

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

Genosensore elettrochimico nanostrutturato per la determinazione dei microRNA

Candidato: Daniele Calzolari

Relatore: Ilaria Palchetti (email: ilaria.palchetti@unifi.it)

Correlatore: Giovanna Marrazza (email: giovanna.marrazza@unifi.it)

Le patologie neoplastiche si configurano come uno dei problemi socio-sanitari più rilevanti degli ultimi decenni. L'analisi quali- e quantitativa di biomarcatori, ossia di molecole associate alla malattia tumorale nei suoi vari stadi, risulta essenziale per la diagnosi precoce della malattia ed, in definitiva, per aumentare il tasso di sopravvivenza del paziente. Si calcola, infatti, che il cancro sia il responsabile di circa 4 milioni di morti all'anno e sia la seconda causa di decesso, in tutto il mondo, preceduto solo dalle malattie cardiovascolari.

In questo lavoro di tesi, è stato sviluppato un genosensore elettrochimico per l'analisi di biomarcatori tumorali. Nello specifico, è stato sviluppato un genosensore elettrochimico nanostrutturato per la determinazione di microRNA.

I microRNA, sono dei piccoli filamenti di RNA, composti da 20-22 nucleotidi, che risultano essere determinanti nella regolazione dell'espressione genica. Recenti studi hanno dimostrato che i microRNA sono associati allo sviluppo della patologia tumorale, alla sua progressione, e alla risposta alla terapia, suggerendoli come biomarcatori diagnostici, prognostici e predittivi.

Un genosensore è un biosensore a base di DNA, ovvero un biosensore che utilizza una sequenza oligonucleotidica di DNA come elemento di riconoscimento per una sequenza complementare bersaglio. In particolare, in questo lavoro di tesi per lo sviluppo del genosensore, sono stati utilizzati dei sensori serigrafici a base di carbonio sui quali sono state elettrodepositate nanoparticelle di oro. Su queste nanoparticelle è stata poi immobilizzata la sonda di DNA tiolata, sfruttando l'affinità Au-S. La reazione di ibridazione tra la sonda ed il filamento di microRNA target biotinilato, viene monitorata in spettroscopia di impedenza elettrochimica, impiegando come marcatore della reazione di ibridazione il coniugato enzimatico streptavidin-alcin fosfatasi. Come substrato enzimatico è stata utilizzata la miscela 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/blu nitrotetrazolo (BCIP/NBT). L'azione catalitica della fosfatasi genera, infatti, un prodotto insolubile isolante che precipita sulla superficie elettrodica. Sono state eseguite delle caratterizzazioni della superficie elettrodica modificata con nanoparticelle di oro, ottimizzata la quantità di sonda ed in seguito realizzata la curva di calibrazione. Il limite di rilevabilità risulta essere 5 pM, con una deviazione standard relativa percentuale del 8%.

È stata poi investigata la possibilità di impiego di liposomi biotinilati per amplificare il segnale analitico. Queste nanostrutture lipidiche sferiche permettono, infatti, di legare molteplici molecole di streptavidin-alcin fosfatasi per molecola di ibrido formatasi sulla superficie elettrodica.