

Realizzazione di un biosensore basato sulla Risonanza Plasmonica di Superficie per la diagnostica clinica del tumore al colon-retto

Candidato: Eleonora De Beni (eleonora.debeni@stud.unifi.it)

Relatore: Prof.ssa Maria Minunni (maria.minunni@unifi.it)

Correlatore: Dott.ssa Simona Scarano (simona.scarano@unifi.it)

Questo lavoro di tesi è stato sviluppato sulla base del progetto UltraPlaCad (ULTRAsensitive PLAsmonic devices for early CANcer Diagnosis, finanziato dall'Unione Europea), il cui scopo è quello di mettere a punto un nuovo sistema di analisi, basato su un sensore ottico a risonanza plasmonica di superficie (SPR), in grado di verificare la presenza di alcune molecole associate al tumore, come biomarcatori, del colon-retto direttamente nel sangue dei pazienti, nota come *biopsia liquida*, sfruttando le nuove tecnologie per l'analisi molecolare ultrasensibile, per permettere una diagnosi tempestiva e mirata. Il biosensore utilizza quindi una sonda molecolare a PNA (acido peptido nucleico), opportunamente scelta, capace di discriminare tra il target nativo (*wild type*) e la sequenza mutata (mutazione genetica), nel caso di specie la mutazione G12D del gene K-Ras. L'approccio utilizzato nell'analisi sfrutta un saggio di tipo sandwich, nel quale una sonda di PNA è immobilizzata sulla superficie del sensore, che viene esposta alla soluzione contenente la sequenza del campione con la quale avviene l'ibridazione (i.e. full match o mismatch) ed una successiva iniezione di una sonda secondaria funzionalizzata con nanoparticelle d'oro, la quale ibrida l'analita in una diversa parte della sequenza oligonucleotidica. Il sistema in oggetto sfrutta delle nanoparticelle d'oro, legate direttamente alla sonda secondaria, ai fini di ottenere un'amplificazione del segnale ottico. Le analisi sono state condotte utilizzando diverse chimiche di immobilizzazione (sonde tiolate e sonde recanti un gruppo amminico terminale) sia su un chip passivato che su un chip non passivato, al fine di verificare quanto questa fase di protezione del chip influisse sul risultato di ibridazione tra le sonde in esame. Si è valutata quindi la risposta dei sistemi in seguito all'interazione con sequenze di DNA *wild type* WT o *mutato* MUT. Inoltre, al fine di quantificare la risposta del sensore in un campione reale, le sequenze WT e MUT sono state analizzate diluite in siero umano (1:10).

Si è studiata così la capacità del sistema di distinguere tra sequenze WT e MUT, valutando il potenziale di sonde nel discriminare una mutazione puntiforme da un DNA non mutato, utilizzando un saggio diretto ed uno sandwich. Nel saggio sandwich si sono impiegate sonde secondarie legate a nanoparticelle di oro allo scopo di migliorare il segnale SPR in termini di intensità per ottenere un aumento delle prestazioni analitiche dello strumento, in particolare in termini di sensibilità. Questo approccio ha fornito un aumento di segnale, tuttavia si rileva un importante contributo aspecifico da sottoporre ancora ad ulteriori.