



Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

> Corso di Laurea in Chimica

Utilizzo di nanostrutture d'oro per il miglioramento di prestazioni analitiche di un biosensore di risonanza dei plasmoni di superficie imaging (SPRi)

Gold-based nanostructures for the improvement of analytical performances in surface plasmon resonance imaging (SPRi) biosensing

Relatore

Maria Minunni

Correlatore

Simona Scarano

Candidata

Costanza Bencivenni

Indice

| 1 | Int | troduzione | .3 |
|---|------|---|-----|
| | 1.1. | Biosensori | . 3 |
| | 1.2. | Risonanza di plasmoni di superficie (SPR) | . 5 |
| | 1.2 | 2.1 Format di indagine | . 9 |
| | 1.3. | Risonanza di plasmoni di superficie imaging (SPRi) | 11 |
| | 1.4. | SPRi per indagini su DNA | 11 |
| | 1.5. | Amplificazione del segnale tramite utilizzo nanoparticelle di oro | 12 |
| | 1.5 | 5.1 Nanostrutture in architetture molecolari | 13 |
| | 1.5 | 5.2 Nanostrutturazione della superficie del biochip | 14 |
| | 1.5 | 5.3 Proprietà delle diverse nanostrutture | 15 |
| | 1.6. | Scopo della tesi | 16 |
| 2 | Ma | ateriali e Metodi | 19 |
| | 2.1 | Strumentazione e set-up | 19 |

| | 2.2 Me | etodi | |
|---|---------|--|----|
| | 2.2.1 | Preparazione Chip d'oro | |
| | 2.2.2 | Preparazione Nanostar d'oro | |
| | 2.2.3 | Nanostrutturazione della superficie del chip | |
| | 2.2.4 | Immobilizzazione DNA Probe su Biochip SPRi nanostrutturati | 23 |
| | 2.3 Rea | agenti | 23 |
| | 2.3.1 | Tioli and ditioli | 24 |
| | 2.3.2 | Soluzioni di immobilizzazione, ibridazione e rigenerazione | 25 |
| 3 | Risulta | ti e discussione | |
| | 3.1 Na | nostrutturazione della superficie | |
| | 3.1.1 | Deposizione delle Au Nanostar | 27 |
| | 3.1.2 | Ottimizzazione lavaggio nanoparticelle | 27 |
| | 3.1.3 | Calibrazione di diverse diluizioni di soluzioni nanostar | 35 |
| | 3.1.4 | Saggio sandwich | |
| | 3.2 Uti | lizzo di nanostar all'interno di architetture molecolari | 43 |
| | 3.2.1 | Ottimizzazione delle diluizioni | 44 |
| | 3.2.2 | Metodi di rigenerazione | |
| 4 | Conclu | ısioni | 48 |
| 5 | Bibliog | grafia | 49 |
| 6 | Ringra | ziamenti | |

1 Introduzione

1.1. Biosensori

Si definiscono biosensori quei dispositivi analitici in cui è presente un elemento biologico, detto recettore o probe, immobilizzato sulla superficie del sensore, detto anche trasduttore. Questo elemento interagisce con l'analita presente nel campione e, simultaneamente, converte l'interazione in un segnale analiticamente rilevabile (trasduttore).

L'utilizzo di elementi biologici rende i biosensori strumenti specifici e sensibili rispetto all'analita, dando risposte veloci anche in matrici complesse come il sangue, le urine, il plasma e matrici ambientali.

Un noto esempio di biosensore è il sistema di rilevazione del glucosio nel sangue, in cui l'enzima glucosio ossidasi (GOD) trasforma un semplice elettrodo in un potente strumento analitico per la misura della glicemia nel sangue, che risulta di estrema utilità per i pazienti affetti da diabete.

I biosensori possono essere divisi in due categorie: catalitici e di affinità.

Nei biosensori di affinità, dove il meccanismo di riconoscimento dell'analita è appunto la sua affinità con il recettore, la componente biologica di riconoscimento può essere composta da proteine, anticorpi, recettori sintetici ed acidi nucleici (Griffiths and Hall,1993; Sheller et al, 1989).

I biosensori catalitici, invece, non prevedono la formazione del complesso tra le due componenti, ma una cascata di eventi catalitici in grado di produrre un evento analitico. Per questi dispositivi, il recettore impiegato è un enzima, come nel caso dei biosensori per la misura del glucosio, cui abbiamo fatto riferimento in precedenza.

I biosensori possono essere realizzati sia in strumenti da banco che dispositivi portatili. La prima categoria comprende macchinari dai costi non trascurabili, mentre l'altra include i prodotti di massa.

Entrambi si caratterizzano per la facilità d'uso, ma i primi sono più frequentemente dotati di automazione. I dispositivi portatili, sono strumenti facili da usare, di dimensioni contenute e utilizzabili da persone non specializzate. I costi sono molto variabili, dipendentemente dal principio di trasduzione utilizzato per la rivelazione del segnale.

Dato che il segnale analitico è generato dall'interazione biologica fra analita e recettore biologico, immobilizzato sulla superficie del trasduttore, questo legame è l'evento determinante ai fini della misura (Rogers, 1998).

I biosensori sono spesso utilizzati per saggi immunologici, i cosiddetti immunosensori, strumenti dove l'elemento di riconoscimento biologico è un anticorpo, ed impiegano una marcatura con enzimi in analogia con i saggi ELISA.

Dato che l'utilizzo di agenti marcanti è dispendioso, sia a livello di tempistiche, sia economicamente, si prediligono i metodi detti *"label-free"*, ovvero liberi da marcatura.

Questi metodi, infatti, oltre a fornire semplicità e convenienza, permettono di monitorare direttamente la formazione del legame fra analita e il recettore, senza l'impiego di marcature che potrebbero interferire sull'interazione (Haake et al, 2000).

Nella realizzazione di un biosensore, l'elemento di trasduzione può essere di diversa natura. Si possono avere sensori elettrochimici, gravimetrici o ottici, per citarne alcuni (Tothill e Turner, 2003).

I sistemi gravimetrici come quelli ottici, fra i quali figurano i sistemi basati sulla risonanza plasmonica di superficie (Surface Plasmon Resonance, SPR), sono capaci di monitorare le interazioni durante il loro svolgimento, senza l'impiego di marcatori, in tempo reale.

La risonanza plasmonica di superficie si è rivelata molto interessante per monitorare diverse reazioni di affinità, per esempio: antigene–anticorpo, sonda-target di DNA, aptamero-analita, ecc.

Questo principio, ed in particolare il suo più recente avanzamento, cioè la SPR per immagini (SPR imaging, SPRi), è stato qui utilizzato accoppiato all'applicazione di nanostrutture di oro, al fine di migliorare le prestazioni analitiche del sistema, principalmente in termini del miglioramento del limite di rivelabilità.

1.2. Risonanza di plasmoni di superficie (SPR)

Fra i sistemi ottici per l'individuazione *label-free* di specie chimiche e biologiche, sono presenti gli strumenti i cui sistemi di trasduzione si basano sul fenomeno della risonanza dei plasmoni di superficie (SPR). Contrariamente alla maggior parte dei sistemi di trasduzione, con l'SPR si ottengono misure in tempo reale senza l'utilizzo di marcatori. Questa peculiarità permette lo studio delle cinetiche di interazione, fra queste le velocità

di associazione e di dissociazione dal cui rapporto deriva la costante di affinità del sistema (Schasfoort e Tudos, 2008).

I plasmoni di superficie sono oscillazioni di nuvole elettroniche che si verificano a determinare interfacce fra specifici materiali, per esempio metallo/dielettrico. In SPR vengono utilizzati principalmente oro e argento, anche se, per la realizzazione di biosensori il più utilizzato è l'oro.

Il metallo viene depositato su un prisma di vetro attraverso il quale passa una radiazione luminosa incidente. L'elemento biologico è immobilizzato in prossimità della superficie dello strato metallico dove si formano i plasmoni di superficie.

Se la componente parallela all'interfaccia metallo/dielettrico dell'onda vettore della luce combacia con la costante di propagazione dei plasmoni di superficie, questi, all'interfaccia, si possono accoppiare con l'onda luminosa. L'onda vettore della luce può essere aumentata per combaciare con i plasmoni di superficie attraverso l'attenuazione totale di riflessione (ATR). Questo aumento, e conseguente accordo fra luce e plasmoni di superficie, è realizzato tramite uno strumento di accoppiamento, solitamente un prisma di vetro utilizzato nella configurazione Kretschmann.



Figura 1 Accoppiamento onda luminosa con plasmoni di superficie tramite prisma.

Un'onda di luce passa attraverso il prisma ad alto indice rifrattivo ed è totalmente riflessa alla base di esso, generando un'onda evanescente che penetra nel sottile strato di metallo. L'onda evanescente si propaga lungo l'interfaccia. La sua costante di propagazione può essere modulata per combaciare con quella dei plasmoni di superficie controllando l'angolo d'incidenza. In questo modo le condizioni di accoppiamento possono essere soddisfatte, permettendo all'onda evanescente di associarsi con i plasmoni di superficie. Se la costante di propagazione dei plasmoni di superficie all'interfaccia metallo/dielettrico fosse maggiore rispetto a quella dell'onda evanescente, i plasmoni non potrebbero essere eccitati direttamente dalla luce incidente sulla superficie del metallo.

L'eccitazione avviene solo quando è valida questa relazione:

 $\frac{2\pi}{\lambda}n_{\rm p}\sin\theta = {\rm Re}\{\beta sp\}$

Dove Θ denota l'angolo d'incidenza, n_p è l'indice di rifrattività del prisma e β sp indica la costante di propagazione dei plasmoni di superficie (Homola, 2008).

Durante il processo di eccitazione dei plasmoni di superficie, una parte dell'energia dell'onda luminosa viene trasferita ai plasmoni di superficie e dissipata nello strato di metallo, questo coincide ad un calo dell'intensità ed in un cambiamento di fase nell'onda luminosa.

I plasmoni di superficie eccitati dall'onda luminosa si propagano lungo lo strato di metallo, il suo campo evanescente ricerca l'analita in contatto pellicola con il film metallico. La presenza di specie chimiche o biologiche all'interfaccia metallo/dielettrico, o nelle sue vicinanze, corrisponde ad un cambiamento di permettività, che provoca un'alterazione della costante di propagazione del plasmone. La variazione della costante di propagazione del plasmone, attraverso le condizioni di accoppiamento, causa un'alterazione nelle caratteristiche dell'onda luminosa accoppiata ai plasmoni di superficie (angolo e lunghezza d'onda di accoppiamento, intensità, fase).

I sensori SPR sono classificati sulla base di quale caratteristica dell'onda luminosa regolata dai plasmoni di superficie viene misurata. Esistono sensori a modulazione angolare, a modulazione di lunghezza d'onda, a variazione di intensità e a modulazione di fase.

Sono indicati come sensori a variazione angolare quei sensori dove la forza di accoppiamento fra l'onda incidente (solitamente monocromatica) e i plasmoni di superficie è osservata da diversi angoli di incidenza. L'eccitazione dei plasmoni di superficie è indicata come un abbassamento nello spettro della luce riflessa, l'angolo d'incidenza che permette l'accoppiamento più forte viene misurato ed utilizzato come segnale del sensore (Matsubara et al, 1988). Lo strumento con cui lavoriamo è di questa tipologia.

Nei sensori a modulazione di lunghezza d'onda i plasmoni di superficie sono eccitati dall'onda luminosa collimata contenente più lunghezze d'onda, tipicamente si utilizza un raggio di luce policromatica. L'eccitazione dei plasmoni di superficie è osservata come una variazione della lunghezza d'onda della luce riflessa. La lunghezza d'onda che garantisce l'accoppiamento più forte è usata come segnale del sensore (Zhang e Uttamchandan, 1988).

I sensori SPR a modulazione di intensità sono basati sulla misura della forza dell'accoppiamento fra l'onda luminosa e i plasmoni ad un singolo angolo di incidenza

e lunghezza d'onda, e l'intensità dell'onda luminosa è presa come segnale del sensore (Nylander et al, 1982).

Infine nei sensori SPR a variazione di fase, il cambiamento di fase dell'onda luminosa accoppiato ai plasmoni di superficie è misurato ad una singola lunghezza d'onda e angolo d'incidenza dell'onda luminosa ed è usato come segnale del sensore (Brockman et al, 2000).

Le molecole di analita in un campione liquido entrano in contatto con l'elemento di riconoscimento biologico che è vincolato al sensore SPR (fig. 2 in alto), creando un aumento nell'indice di rifrazione della superficie del sensore che viene misurato otticamente (fig. 2 in basso).





Figura 2 Legame fra analita e ricettore biologico (sopra) variazione dell'indice di rifrattività dovuto al legame (sotto).

Il cambiamento dell'indice di rifrazione prodotto dalla cattura delle molecole biologiche dipende dalla concentrazione e dalle proprietà dell'analita. Il legame dell'analita all'agente immobilizzato sulla superficie del metallo provoca, per esempio, uno spostamento del picco nelle curve plasmoniche registrate dallo strumento, il quale è correlato alla concentrazione dell'analita in soluzione.



Figura 3 Spostamento della curva curve plasmonica

1.2.1 Format di indagine

Il format di indagine è scelto in base alle dimensioni del target analitico, le caratteristiche del legame fra le molecole, l'intervallo di concentrazioni dell'analita che deve essere misurato e la matrice. I format più utilizzati sono: indagine diretta, sandwich, saggio indiretto competitivo con inibizione. Nell'indagine diretta, i recettori sono immobilizzati sulla superficie del sensore e soggetti all'interazione di legame con l'analita di interesse. Il cambiamento dell'angolo di risonanza dovuto all'interazione di legame è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.



Figura 4 Schema saggio diretto

Il saggio sandwich consiste in due passaggi sequenziali di riconoscimento. Nel primo il recettore è immobilizzato sulla superficie del trasduttore lega l'analita di interesse. Nel secondo passaggio, un recettore biologico secondario viene iniettato per legarsi all'analita catturato precedentemente. Questi due riconoscimenti favoriscono un aumento della sensibilità e della specificità del saggio.



Figura 5 Saggio Sandiwich

Il saggio indiretto competitivo è utilizzato per l'analisi di piccole molecole. Si immobilizza l'analita a basso peso molecolare (antigene per esempio) sulla superficie del sensore. Solitamente questo passaggio è svolto usando una proteina coniugata trasportatrice dell'analita (tipo BSA). A parte, viene preparata una soluzione dello stesso analita con il rispettivo recettore (con l'opportuno rapporto antigene/anticorpo), che è fatta fluire sullo stesso analita immobilizzato in superficie. La concentrazione del recettore è mantenuta costante in modo che la variazione della risposta sia proporzionale alla quantità di analita mescolato con esso. Si registra un aumento del segnale di risonanza quando il recettore biologico libero presente nella miscela si lega con il coniugato immobilizzato sulla superficie. La risposta della misura di legame è, quindi, inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione.



Figura 6 Saggio indiretto competitivo

1.3. Risonanza di plasmoni di superficie imaging (SPRi)

La tecnologia SPR per immagini (SPRi), conosciuta anche come microscopia SPR, è stata introdotta da Rothenhäusler e Knoll nel 1988 (Rothenhausler e Knoll, 1988).

SPRi permette di monitorare le interazioni biomolecolari in tempo reale e senza l'uso di nessun supporto, come nelle analisi classiche in SPR. Inoltre, grazie ad una camera CCD per la cattura del segnale, possono essere registrati sia i sensorgrammi (variazione del segnale di risonanza nel tempo), sia le immagini differenziali della superficie, permettendo l'analisi simultanea di molte interazioni (fino a centinaia).

L'approccio alle misure SPRi è diverso da quello SPR perché sono individuate le interazioni parallele in tempo reale grazie alla funzionalizzazione della superficie SPRi (Scarano et al, 2010), il che ha un impatto importante nelle analisi perché permette di effettuare l'analisi simultanea di varie specie garantendo così anche un'alta produttività. Differenti composizioni chimiche o densità dello strato vicino alla superficie metallica provocano cambiamenti nel valore della costante dielettrica locale, che genera l'immagine di contrasto.

L'immagine differenziale, ottenuta tramite sottrazione fra un'immagine di riferimento prima che avvenga il legame e un'immagine dopo che questo è avvenuto, permette di individuare le interazioni fra recettore e analita.

Questa caratteristica permette di analizzare e confrontare diverse modifiche della superficie nello stesso tempo e nelle stesse condizioni sperimentali. In termini applicativi, questo equivale ad analisi sullo stesso recettore, o risposta di differenti recettori allo stesso legante, simultaneamente. Questo permette di confrontare in maniera omogenea i dati e accelerare i processi di analisi.

1.4.SPRi per indagini su DNA

Lo studio di specifiche sequenze genomiche di DNA è fondamentale per le future applicazioni genetiche diagnostiche (per esempio terapia del dolore), di conseguenza, anche lo sviluppo di nuovi strumenti per una indagine rapida, economica e sensibile è importante (Perkel, 2008; Gibson, 2008; Sassolas et al, 2008).

Al momento, la maggior parte dei metodi disponibili per il riconoscimento delle

sequenze di DNA necessitano di una precedente amplificazione, ottenuta tramite reazione a catena di polimerasi (PCR), e di una marcatura, spesso svolta con fluorofori. Questa procedura oltre ad essere costosa può essere affetta da errore, specie durante la reazione a catena (Shi et al, 2008).

L'analisi diretta di sequenze di DNA all'interno di matrici biologiche, senza amplificazione tramite PCR, richiede una sensibilità del sensore intorno all'attomolare o femtomolare. Oltre a questa richiesta, si ricercano anche alta specificità e utilizzo di metodi *label-free*.

L'SPR per immagini è un metodo estremamente versatile per indagini di biomolecole in formato microarray (Scarano et al, 2010), inoltre su apparati SPRi possono essere svolte analisi label-free, in tempo reale, con grandi risultati e basso consumo di reagenti (Grasso et al, 2009).

La sensibilità richiesta per il riconoscimento diretto di sequenze di DNA in un campione non amplificato, cioè non soggetto a reazione polimerasica a catena (PCR) è, però, al di sotto del limite di rilevabilità di un'indagine standard di DNA con SPRi. Per questo motivo sono state studiate diverse procedure per l'amplificazione della risposta SPRi, con particolare attenzione ai metodi basati sull' utilizzo di nanoparticelle.

La tecnologia SPRi per indagine su DNA ha largamente beneficiato dai nuovi design dello strumento e di nuove procedure di funzionalizzazione della superficie chimica.

In particolare, le nanostrutture hanno contribuito maggiormente all'identificazione di procedimenti innovativi per l'indagine di DNA su SPRi, rendendo possibile l'analisi di acidi nucleici in ambienti complessi e a concentrazioni molto basse (Goldrich et al, 2004; Minunni et al, 2007), sfruttando le loro caratteristiche specifiche, come la facilità di modificare la superficie della nanoparticella, la robustezza della loro struttura e la capacità di aumentare l'effetto plasmonico sulla superficie del sensore.

1.5. Amplificazione del segnale tramite utilizzo nanoparticelle di oro

Nonostante le interessanti sensibilità, nell'ordine femtomolare, riscontrate con tecniche SPR ed SPRi nel caso della determinazione di acidi nucleici, si rende necessario abbassare ulteriormente il limite di rilevabilità al fine di ottenere analisi dirette di acidi nucleici in DNA genomico estratto da cellule, eliminando il passaggio di amplificazione dello stesso via PCR (reazione a catena della polimerasi).

Recentemente sono state svolte analisi ultrasensibili di sequenze di DNA umano estratto da linfociti e previamente frammentato con ultrasuoni (Spoto e Minunni, 2012). Per raggiungere tale ultrasensibilità si utilizzano nanostrutture metalliche, di cui sfruttiamo l'accoppiamento plasmonico generato quando si trovano in vicinanza della superficie metallica del sensore.

Differenti metalli, fra cui alluminio, argento e oro, soddisfano le condizioni per l'ottenimento di tale effetto in SPR, la differenza nei parametri rilevanti fra i metalli, come la lunghezza di propagazione dei plasmoni di superficie, sono collegate a valori nella parte immaginaria della costante dielettrica del metallo. L'oro è il metallo d'elezione perché ha una parte immaginaria della costante dielettrica relativamente bassa, inoltre offre ulteriori vantaggi come la purezza chimica della superficie e la sua compatibilità con superfici chimiche affidabili e semplici.

Le nanoparticelle d'oro (AuNPs) sono state indagate come incorporazione nei sistemi SPR per amplificare il segnale ed aumentare la sensibilità (Bedford et al, 2012).

Spesso l'aumento di sensibilità è ricercato per poter svolgere indagini dirette su sequenze di DNA senza dover ricorrere al passaggio aggiuntivo dell'amplificazione del campione tramite reazione a catena di polimerasi (PCR) che può essere affetta da errori ed interferenze.

L'accoppiamento di nanoparticelle metalliche ad analisi SPR è stato riportato in letteratura (Zanoli et al, 2012); inoltre, applicazioni nell'utilizzo di nanostrutture per il miglioramento delle prestazioni analitiche del sistema sono state condotte anche dal nostro gruppo di ricerca (Mariani, Minunni, 2014).

Le nanostrutture possono essere usate come nanostrutturazione della superficie oppure impiegate in architetture molecolari sulla superficie del sensore.

1.5.1 Nanostrutture in architetture molecolari



Figura 7 AuNPs in un'architettura molecolare

Una delle strategie per l'implementazione del segnale prevede l'utilizzo di nanoparticelle d'oro (AuNPs) all'interno di architetture molecolari. Le AuNPs hanno una massa maggiore rispetto alle biomolecole e producono anche un indice di rifrattività più alto rispetto ai materiali dielettrici comunemente utilizzati (per esempio idrogel), inoltre possono essere usate, seguendo opportuni protocolli, per funzionalizzare varie molecole, come gli acidi nucleici, siano essi aptameri o probe lineari di DNA.

In lavori recenti (Homola e Sipova, 2012; Okumura et al, 2005) le nanoparticelle d'oro sono state modificate con probe di DNA tiolati all'estremità 3', in modo da sfruttare l'affinità fra la porzione tiolica e l'oro, complementari ad una parte del target immobilizzato sulla superficie del sensore. La risposta del trasduttore è stata trovata molto più alta in confronto a quella di una amplificazione senza utilizzo di nanoparticelle (circa 1000 volte superiore).

Allo stesso tempo, però, si è verificato un assorbimento aspecifico sia sulla superficie che sugli spot di controllo, sezione di superficie dove avviene la deposizione del probe aspecifico. Questo problema deve essere eliminato. Si sono studiati diversi approcci per mitigarne l'effetto, tipo la funzionalizzazione delle AuNPs tramite SAM (strato funzionale) in modo da prevenire sia l'aggregazione delle nanoparticelle sia l'assorbimento aspecifico alla superficie.

1.5.2 Nanostrutturazione della superficie del biochip



Figura 8 Nanostrutturazione della superficie del biochip con AuNPs

Un aumento del segnale può essere ottenuto anche nanostrutturando la superficie del biochip.

In questo modo si ottiene l'accoppiamento fra i plasmoni di superficie del sensore e i plasmoni di superficie localizzati (Localized Surface Plasmons, LSP), ovvero oscillazioni collettive degli elettroni di conduzione, che si originano nelle nanostrutture metalliche. Questo accoppiamento ottico forte provoca uno spostamento dell'angolo di risonanza che determina un aumento della sensibilità del biosensore SPRi rispetto all'indagine di DNA su superficie priva di nanostrutturazione. Per ottenere l'accoppiamento ottico le caratteristiche della sorgente luminosa e le proprietà della nanostrutture devono essere opportunamente scelte, in particolare si devono scegliere nanostrutture che presentino assorbanza compatibile con l'intervallo di emissione della sorgente luminosa in termini di lunghezza d'onda.

1.5.3 Proprietà delle diverse nanostrutture

Per analisi su DNA a causa della semplicità di sintesi e della possibilità di controllare forma, grandezza (sintesi *shape-controlled*) e, di conseguenza le proprietà ottiche, sono ampiamente utilizzate nanoparticelle di argento e di oro.

Le nanoparticelle d'oro sferiche sono le più utilizzate (Bedford et al, 2012), ma gli Au nanorod, nanoparticelle d'oro a forma di bastoncino, sono stati studiati (Burda et al, 2005) come un'attraente alternativa, in quanto permettono di modulare la lunghezza d'onda dei plasmoni in un intervallo più ampio. Sono stati svolti molti studi sulla sintesi dei nanorods (Jana et al, 2001) mostrando che la loro anisotropia e quindi la loro forma, sono controllate dall'assorbimento selettivo dei leganti nelle facce cristalline. Si è visto quindi che la sintesi *shape-controlled*, che controlla la forma, è di importanza fondamentale per le proprietà strutturali e quindi ottiche, elettriche e magnetiche delle nanoparticelle e le loro possibili applicazioni. Variando le dimensioni delle nanoparticelle, i plasmoni possono essere modulati per combaciare la frequenza dei laser più comuni (per esempio, 633, 785, o 1064 nm), aumentando così la sensibilità ottica con l'inserimento dei laser nel vicino IR.

Inoltre la forma dei Au nanorod e la loro anisotropia implicano una diversa reattività fra la luce incidente ed i plasmoni che si trovano ai vertici rispetto a quelli formati sulle facce dei bastoncini; per questo si possono svolgere due indagini chimiche indipendentemente e contemporaneamente sfruttando un solo insieme di nanoparticelle.

Sono state studiate anche nanoparticelle d'argento (nanoprismi), sia per la nanostrutturazione della superficie del chip, sia all'interno di architetture molecolari per l'indagine su DNA (Mariani et al, 2013).

È risultato che la forma e la densità ridotta di queste nanoparticelle è stata d'aiuto nella formazione di una superficie nanostrutturata omogenea e sottile. I nanoprismi d'argento hanno mostrato un significativo aumento di segnale (circa un 50%) rispetto all'approccio convenzionale con abbassamento del limite di rilevabilità. (Mariani et al, 2013)

1.6.Scopo della tesi

In questa tesi abbiamo utilizzato nanostars d'oro (Au nanostar), gentilmente forniteci dalla Dr.ssa Jolanda Spadavecchia (J. Spadavecchia, Pierre and Marie Curie University – Paris 6, Francia) per saggiare le performance analitiche del sistema accoppiato al loro utilizzo.

La loro forma particolare è stata realizzata sfruttando l'aggiunta di CTAB e Protoporfirina IX durante la sintesi *shape-controlled* (J. Spadavecchia et al, 2013).



Figura 9 Au nanostar

Si è voluto così studiare l'aumento di sensibilità su sistemi a trasduzione SPR per immagini (SPRi), grazie all'impiego di queste nanoparticelle, in indagini analitiche dirette su DNA.

Le nanostar d'oro sono state scelte perché, grazie alla loro anisotropia, permettono di aumentare l'intervallo di lunghezze d'onda su cui lo strumento può lavorare.

L'effetto di miglioramento della sensibilità si basa sull'osservazione che le nanostar hanno un effetto di punta, ovvero presentano un'intensificazione del campo elettromagnetico sulle punte, permettendo quindi l'accoppiamento ottico tra plasmoni superficiali dovuti alla superficie d'oro del chip e campo elettromagnetico dei plasmoni localizzati dovuti alle nanostar. Ci si aspetta quindi, in seguito a questo effetto un aumento delle performance analitiche dello strumento, in termini di limite di rilevabilità nella analisi di sequenze bersaglio di DNA.

Questo effetto lo si vuole studiare utilizzando due approcci. Infatti, le Au nanostar sono state utilizzate sia per nanostrutturare direttamente la superficie d'oro del biochip, sia impiegando la nanoparticella all'interno di architetture molecolari.

Durante la nanostrutturazione del chip sono stati ottimizzati i vari passaggi quali metodi di lavaggio dello stesso, la quantità di nanostar da immobilizzare ed il trattamento per evitare eventuali aggregazioni sulla superficie.

Nell'impiego delle Au nanostar all'interno di architetture molecolari abbiamo ottimizzato la quantità relativa con cui funzionalizzare il probe e le condizioni di rigenerazione del chip.

2 Materiali e Metodi

2.1 Strumentazione e set-up

Lo strumento utilizzato è il SPRi-Lab+, fornito dalla GenOptics-Horiba Scientific (Orsay, Francia). La sorgente luminosa è costituita da un fotodiodo (λ = 635 nm), e la luce riflessa è monitorata in continuo tramite una CCD camera (Pixelfly 230XS), ad un angolo di incidenza fisso. Per l'ottenimento della massima sensibilità l'angolo di incidenza scelto è quello a cui corrisponde la massima variazione di riflettività, di solito corrispondente ad un valore assoluto di riflettività compreso tra il 20 e il 40% (Corne, 2008). Il prisma di vetro su cui è deposto per vaporizzazione uno strato di cromo (5 nm) e uno di oro (50 nm), fornito dalla Genoptics (Orsay, Francia); viene posizionato in una cella integrata con il sistema fluidico.

La cella di flusso, in teflon, ha un volume di 6 μ L, ed e fornita dalla Horiba Scientific (Orsay, Francia). La valvola di iniezione è fornita da Rheodyne 7125 (IDEX Health & Science Group, Wertheim-Mondfeld, Germany).

La pompa utilizzata e di tipo peristaltico a 8 rulli (Gilson, Middleton, USA). Il sistema fluidico e interconnesso utilizzando tubi PEEK (polyetheretherketone). Lo schema fluidico completo e indicato in figura 10.



Figura 20 Schema della fluidica associata allo strumento

Il software Lab View (Horiba Scientific, Orsay, Francia) è stato utilizzato per monitorare in continuo la variazione di riflettività nel tempo, nonché per l'ottenimento delle immagini differenziali nel corso delle analisi.

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione Chip d'oro

Il supporto su cui sono immobilizzate le sonde, SPRi-BiochipsTM, è costituito da un prisma di vetro ad alto indice di rifrattività con un sottile strato d'oro (50 nm) sviluppato appositamente per l'imaging. L'obbiettivo principale nel processo di immobilizzazione è di avere una struttura di supporto per il recettore che assicuri la stabilità nelle condizioni di lavoro e di accesso all'analita, mentre minimizzi la perdita di recettore. Si utilizza un agente bloccante per evitare assorbimento aspecifico sulla superficie. L'oro è un materiale che possiede caratteristiche utili per creare un biosensore. È inerte abbastanza da non essere attaccato dall'umidità o da soluzioni acquose, per questo può

essere esposto alle condizioni di camera umida e sfruttato all'interno di un sistema fluidico. Inoltre, possiede una reattività specifica nel creare legami covalenti con molecole specifiche. Agenti ossidanti non hanno effetti sull'oro, infatti possono essere usati per pulirlo e rimuovere le molecole immobilizzate su di esso. L'oro possiede inoltre, caratteristiche elettroniche che permettono l'eccitazione dei plasmoni e l'utilizzo in SPR. La faccia del prisma su cui è posto lo strato d'oro misura 2,5 cm x 1 cm e solo la parte centrale di essa è utile per l'immobilizzazione perché la cella fluidica copre solo la parte centrale della superficie. Per questo tutti gli spot, sezioni di superficie dove avviene la deposizione, sono creati su un'area ristretta di circa 1 cm x 1 cm. Quando si sviluppa un biochip utilizziamo una maschera PDMS per l'immobilizzazione in modo da ottenere delle microcelle rimuovibili per la deposizione del T-Probe, ovvero del nostro recettore. È possibile immobilizzare fino a 30 diverse sonde, utilizzando anche metodi di immobilizzazione differenti. I fori ottenuti bucando la maschera PDMS, permettono di lavorare singolarmente su ciascun recettore. Una volta che i recettori sono stati immobilizzati, si rimuove la maschera e la superficie viene passivata usando una miscela di tioli per evitare la formazione di legami aspecifici. La maschera è costituita da polidimetilsilano (PDMS), un polimero organico di natura siliconica, inerte, non tossico e non infiammabile, flessibile e idrorepellente. Tutte queste caratteristiche, insieme al fatto che può essere usato in combinazione con acqua e solventi alcolici senza deformazioni, lo rendono un buon materiale per l'utilizzo in SPR. La maschera è ottenuta stendendo il liquido del polimero su una superficie rigida dove è stampata un'immagine di riferimento dello schema di deposizione degli spot. Il polimero è autolivellante, quindi si stende sulla superficie evitando di formare imperfezioni e dopo alcune ore diventa solido a temperatura ambiente. È trasparente e sufficientemente morbido da poter essere tagliato. Con l'aiuto di un ago di una siringa avente diametro di circa 1 mm, sono creati i fori che corrisponderanno agli spot. Una volta tagliata la maschera in modo che abbia le stesse dimensioni dello strato d'oro, essa viene fatta aderire con tale superficie, evitando la formazione di bolle d'aria. Deposta la maschera sulla superficie d'oro, essa copre tutta la superficie eccetto i punti dove verrà effettuata l'immobilizzazione dei recettori. Questa modalità permette di evitare la contaminazione fra spot adiacenti e crea una certa geometria utile poi nella definizione degli spot.

2.2.2 Preparazione Nanostar d'oro

Si riporta la procedura per come adottata dalla dott.ssa Jolanda Spadavecchia (Università Pierre and Marie Curie– Parigi VI, Francia,) che ci ha gentilmente fornito le Au nanostar.

Le nanoparticelle d'oro sono state sintetizzate tramite il metodo *gold seed*: I "semi" d'oro vengono preparati aggiungendo una quantità data di Protoporfirina IX (PP) nella miscela di reazione. 5 ml di CTAB 0.20 M sono aggiunti ai 5mL di Protoporfirina IX (PP) 6.29 x 10^{-4} M in una soluzione EtOH/H₂O (3:2), a 27° sotto agitazione; questa concentrazione di PP è stata scelta perché porta alle migliori risoluzioni di spettro UV-visibile per la soluzione di PP. Sono stati poi aggiunti 5 mL di soluzione acquosa di HAuCl₄ 2.5 x 10^{-4} M e 0.6 mL NaBH₄ 0.01M raffreddato con ghiaccio. La soluzione ottenuta è stata poi centrifugata a 15.000 rpm per 10 min. Il surnatante è stato scartato ed il residuo è stato diluito in una quantità equivalente di acqua MilliQ. La *growth solution* è stata preparata aggiungendo 5mL di CTAB (Bromuro di cetil-trimetilammonio) 0.20 M a 5mL di Protoporfirina (PP) 6.29 x 10^{-4} M e AgNO₃ (0.25 mL; 4 x 10^{-3} M) e centrifugata per 10 minuti. Dopo questo tempo, 5 mL di HAuCl₄ (1 x 10^{-3} M) è trasferita alla miscela, e sono aggiunti 70 µL di acido ascorbico (8 x 10^{-3} M). Infine sono immessi 12μ L di "semi" d'oro alla soluzione di "crescita".

Tutte le soluzioni sono state centrifugate a 8000 rpm per 20 min e analizzate con spettroscopia UV-Visibile e microscopio a trasmissione elettronica (TEM).

Il ruolo dello CTAB è duplice: serve prima nella sintesi altrimenti le nanoparticelle diventerebbero sferiche e poi come copertura superficiale delle nanoparticelle.

Nella sintesi, durante la riduzione da acido tetracloroaurico ad oro metallico lo CTAB favorisce lo sviluppo asimmetrico, lineare e preferenziale di alcune facce.

In presenza della Protoporfirina IX lo sviluppo lineare avviene su più facce ed abbiamo la formazione della stella.

Il secondo ruolo dello CTAB è quello di copertura superficale della nanoparticella, permettendo sospensione ed evitando aggregazione quando si trovano in soluzione (Langmuir, 2008).

2.2.3 Nanostrutturazione della superficie del chip

Le nanoparticelle sono immobilizzate sulla superficie d'oro del biochip per SPRi attraverso linker di ditiolo (BDMT; Benzendimetanetiolo). L'immobilizzazione con il ditiolo è stata portata avanti applicando una maschera PDMS per ottenere delle microcelle (concentrazione 1 mM in acqua MilliQ. 0.8µL/microcella). Dopo la deposizione delle gocce, è stato posto in una camera umida a cui è stato applicato il vuoto per 20 minuti per eliminare le bolle d'aria. Il biochip è lasciato poi in camera umida per 20h, evitando l'evaporazione del solvente. Infine, le gocce nelle microcelle sono aspirate con una micro siringa e lavate con acqua MilliQ. Sono preparati sul biochip anche degli spots di controllo con sequenze aspecifiche ed altri con oro nudo. La sospensione delle nanoparticelle è diluita in acqua MilliQ cercando di assicurare la totale copertura dell'area dello spot (1 mm di diametro ciascuna).

2.2.4 Immobilizzazione DNA Probe su Biochip SPRi nanostrutturati

Il DNA Probe è immobilizzato sulla superficie nanostrutturata sfruttando l'affinità dei solfuri con oro. Una soluzione 10μ M di TProbe è preparata nella soluzione di ibridazione e 0.8 μ M sono stati depositati in ogni micro/cella e lascia reagire in camera umida per 20h. Infine, dopo la rimozione della maschera PDMS, il prisma è immerso in una soluzione di passivazione PS (1 μ M 11-mercapto-1-undecanolo, MU, e 1 μ M 6-mercapto-1-esanolo, MCH, in acqua MilliQ) per 20 h per passivare il resto della superficie d'oro. In ultimo, la superficie dei chip viene sciacquata con acqua MilliQ ed il chip è posto nella cella.

2.3 Reagenti

I reagenti sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (www.sigmaaldrich.com/, Milano, Italia).

Tutti gli oligonucleotidi sintetici sono forniti da Eurofins MWG Operon (www.eurofinsgenomics.eu/, Germania).

| Probes | TProbe (Capturing Probe) | 5' HS-(CH ₂) ₆ - | | | |
|-------------|--------------------------|---|--|--|--|
| (Thiolated) | | GTCACTGCCTAATGTAAGTCTC 3' | | | |
| | NProbe | 5' HS-(CH ₂) ₆ - | | | |
| | (Non-specific Probe) | GAGGGCGATGCCACCTAC 3' | | | |
| Target | TTarget | 5' GAGACTTACATTAGGCAGTGAC | | | |
| | (Complementary Target) | 3' | | | |
| Target | TTarget Long | 5'GAGACTTACATTAGGCAGTGACT | | | |
| | | CGATGAAGGCATGTATGTTGGCCT | | | |
| | | CCTTTGTGCCCTCAC <u>A</u> ATCTCTTCC | | | |
| | | TGTGACACCAC 3' | | | |
| DProbe | DProbe thiolated | 5' HS-(CH ₂) ₆ - | | | |
| | | GTGGTGTCACAGGAAGAGAT <u>T</u> 3' | | | |
| DProbe | DProbe thiolated | 5' HS-(CH ₂) ₆ - | | | |
| | | GTGGTGTCACAGGAAGAGAT <u>T</u> 3' | | | |

2.3.1 Tioli and ditioli

Г

11-mercapto-1-undecanolo (MU),

6-mercapto-1-esanolo (MCH),

1,8 Octanoditiolo (ODT) e 1,4-Benzenedimetanetiolo (BDMT) sono forniti da Sigma (www.sigmaaldrich.com/, Milan, Italy).

2.3.2 Soluzioni di immobilizzazione, ibridazione e rigenerazione

La soluzione di immobilizzazione (IS) è una soluzione acquosa 1M di KH₂PO₄, pH 3.8. La soluzione di Ibridazione è una soluzione acquosa di 300nM NaCl, 20mM Na₂HPO₄, 0.1M EDTA, 0.05% TWEEN®, 20 (polisorbato), pH 7.4. La soluzione di rigenerazione è una soluzione acquosa di HCl 10 mM.

Le soluzioni sono state preparate in acqua MilliQ.

3 Risultati e discussione

In questo lavoro è stato ricercato il miglioramento delle prestazioni analitiche del sistema, un biosensore a DNA basato su SPRi, in termini di aumento del segnale SPR e quindi di abbassamento dei limiti di rilevabilità tramite l'impiego di nanostrutture di oro a forma di stella, qui indicate come Au nanostar.

Le Au nanostar sono stata utilizzate sia per nanostrutturare direttamente la superficie d'oro del biochip, tramite legame covalente con ditioli, sia utilizzando la nanoparticella all'interno di architetture molecolari.

Si vogliono studiare Au nanostar perché, come accennato in materiali e metodi, a causa dell'anisotropia delle particelle si ha un'intensificazione del campo sulle punte rispetto alle facce (Hao et al, 2007).

Durante la nanostrutturazione del chip sono stati ottimizzati vari passaggi quali il metodo di purificazione delle nanoparticelle e la quantità delle nanostar da immobilizzare per evitare eventuali aggregazioni sulla superficie.

Nel caso dell'utilizzo delle nanostrutture in architetture molecolari è stata ottimizzata la quantità di nanoparticelle con cui funzionalizzare il probe, le tecniche di rigenerazione del chip e come minimizzare eventuali risposte aspecifiche della superficie.

3.1 Nanostrutturazione della superficie

Per lo sviluppo di un biochip, si utilizza una maschera PDMS per creare una serie di pozzetti (microcelle) in cui si svolge l'immobilizzazione del biorecettore, nel nostro caso il TProbe.

La maschera è deposta sulla superficie d'oro, creando così delle microcelle, dove viene effettuata l'immobilizzazione dei recettori. Questa modalità permette di evitare la contaminazione fra spot adiacenti e crea una geometria regolare e definita utile poi nella definizione degli spot.

Le nanoparticelle vengono immobilizzate covalentemente sulla superficie d'oro del biochip attraverso linker di ditiolo (BDMT; Benzendimetanetiolo). Il BDMT è stato recentemente dimostrato essere il miglior linker ditiolico tra i diversi testati, tipo ODT (1,8 Ottanditiolo), in quanto nel caso del suo impiego sono stati osservati spostamenti

significativi delle curve di riflettività che fanno pensare ad un avvenuto accoppiamento fra i plasmoni di superficie e quelli localizzati dovuti alle nanoparticelle, che sono rimaste ben adese alla superficie (Mariani et al, 2013).

3.1.1 Deposizione delle Au Nanostar

Dopo la deposizione delle gocce di soluzione di BDMT con Au nanostar (concentrazione 1 mM in acqua MilliQ. 0.8µL/micro-cella), il biochip è stato posto in una camera umida a cui è stato applicato il vuoto per 20 minuti per eliminare eventuali bolle d'aria tra la goccia e la superficie di oro. Le gocce sono state depositate nei pozzetti ditiolati nel loro ambiente di sintesi, descritto nella sezione Materiali e Metodi. Dopo aver lasciato il biochip in camera umida per 20h, le gocce nelle microcelle sono aspirate con una micro-siringa e lavate con acqua MilliQ. Sono preparati sul biochip anche degli spots di controllo con sequenze non complementari alla sequenza target (aspecifiche) di DNA ed altri con oro nudo. La sospensione delle nanoparticelle è lavata con acqua MilliQ cercando di assicurare la totale copertura dell'area dello spot (1 mm di diametro ciascuna).

Successivamente è stato immobilizzato il TProbe, ovvero la sonda campione.



Figura 11 Nanostrutturazione della superficie con Nanostar ed immobilizzazione di TProbe su di essa

3.1.2 Ottimizzazione lavaggio nanoparticelle

Inizialmente le nanoparticelle sono state direttamente immobilizzate nella loro soluzione di sintesi, ovvero CTAB (vedere Materiali e Metodi). Allo scopo di valutare il successo di questa immobilizzazione il sensore funzionalizzato con il Tprobe è stato esposto alla sonda complementare ed il segnale di ibridazione successivamente valutato.



Figura 12 Ibribidazione del target complementare 250 nM alla sonda sulla superficie nanostrutturata con nanostar tal quali in CTAB

| | Probe su | superficie | Probe su superficie priva di |
|-------------------------------|-----------------|------------|------------------------------|
| | nanostrutturata | | nanostrutturazione |
| Variazione di Riflettività | 1,083±0,022 | | 0,753±0,024 |
| Percentuale dopo iniezione di | | | |
| target complementare 250 nM | | | |

Svolgendo tre repliche si dell'iniezione di ottengono questi segnali:

Durante la prova è risultato essere presente un aumento di segnale di ~44%, ma dopo la prima rigenerazione si sono svolte ulteriori iniezioni di target complementare 100 nM ma l'aumento di sensibilità non è stato più riscontrato.

| | Probe su | superficie | Probe su superficie priva di | | |
|-------------------------------|-----------------|------------|------------------------------|--|--|
| | nanostrutturata | | nanostrutturazione | | |
| Variazione di Riflettività | 0,6720±0,028 | | 0,623±0,025 | | |
| Percentuale dopo iniezione di | | | | | |
| target complementare 100 nM | | | | | |

Per capire cosa fosse avvenuto abbiamo studiato il sensorgramma. Si nota che dopo la rigenerazione la linea di base non viene recuperata, come si può osservare dalla figura di seguito riportata.



Figura 13 Sensorgramma da cui possiamo osservare il profilo di rigenerazione.

Quando avviene la rigenerazione ci aspettiamo che la curva del segnale di riflettività torni a zero, in questo caso, invece, la curva non torna sulla linea dello zero ma registra una variazione di riflettività percentuale inferiore di ~ 0.30 RV% rispetto allo zero.

Questo potrebbe essere spiegato dalla perdita della nanostrutturazione, dovuta al mancato legame covalente fra BDMT e nanoparticelle. Il Bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) in largo eccesso nella sintesi, utilizzato come tensioattivo nella soluzione delle nanoparticelle, potrebbe aver impedito la formazione del legame covalente fra linker ditiolico e nanoparticelle. Il CTAB, oltre ad avere un ruolo fondamentale nella sintesi *shape-controlled* delle nanoparticelle, come abbiamo detto in materiali e metodi, è utilizzato in soluzione come copertura superficiale della nanoparticella permettendone la sospensione ed evitandone l'aggregazione (Langmuir, 2008).

Per risolvere questo problema si è deciso di isolare le nanoparticelle in acqua MilliQ attraverso alcuni cicli di centrifugazione.

In particolare la soluzione di nanoparticelle è stata sottoposta a centrifugazione (10000 rpm per 5 min.) ed il CTAB in eccesso rimosso, per semplice allontanamento del

surnatante. Le particelle sono state poi risospese in acqua MilliQ e sottoposte ad ultrasonicazione.

In seguito le nanoparticelle in soluzione acquosa sono state immobilizzate sul biochip tramite il linker ditiolato BDMT. Allo scopo di valutare il successo di questa immobilizzazione il sensore funzionalizzato con il Tprobe è stato esposto alla sonda complementare ed il segnale di ibridazione successivamente valutato.



Figura 14 Ibribidazione del target complementare alla sonda sulla superficie nanostrutturata con nanostar tal quali in soluzione acquosa (MilliQ) che sostituisce la soluzione di CTAB mediante singola centrifugazione (un solo lavaggio).

Avendo osservato un'ibridazione interessante con il target complementare nel caso delle nanoparticelle immobilizzate in soluzione acquosa e poi modificate con Tprobe, si è deciso di insistere ulteriormente sul passaggio di lavaggio delle nanostrutture per allontanare il CTAB, quindi di sottoporle una seconda volta al processo di centrifigazione. Di conseguenza la soluzione di nanoparticelle è stata centrifugata, si è rimosso il CTAB in eccesso e sostituito con acqua MilliQ. In seguito le particelle sono state riportate in sospensione con acqua MilliQ e ultrasonicazione.

Dall'immagine del chip alla CCD si nota fin da subito che le nanoparticelle che avevano subito due lavaggi tendevano a formare aggregati superficiali, forse perché è stato rimosso troppo CTAB che serviva ad impedire l'aggregazione.



Figura 15 Immagine CCD della superficie del biochip. Si possono osservare gli spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito un solo lavaggio (contorno giallo) e quelli nanostrutturati con nanostar che hanno subito due lavaggi e che si sono aggregati (contorno rosso).

L'aggregazione è confermata anche dal grafico della derivata prima delle curve plasmoniche (ovvero la variazione della loro pendenza percentuale rispetto all'angolo), dove si nota un andamento completamente differente nei due casi considerati (lavaggio singolo o doppio in MilliQ), che indica il mancato eccitamento dei plasmoni a causa dell'aggregazione superficiale della nanoparticelle, delle curve corrispondenti agli spot dove sono immobilizzate nanoparticelle che hanno subito due lavaggi (curve blu e arancioni) rispetto alle curve corrispondenti agli spot dove sono state immobilizzate nanostar che hanno subito un solo lavaggio (curve fucsia e gialle).



Figura 16 Curve Plasmoniche corrispondenti al biochip. Si possono osservare le differenze fra le curve corrispondenti agli spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito un solo lavaggio (curve fucsia e gialle) e gli spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito due lavaggi (curve blu e arancioni).



Figura 17 Ibribidazione del target complementare alla sonda sulla superficie nanostrutturata con nanostar tal quali in MilliQ, che sostituisce la soluzione di CTAB mediante doppia centrifugazione (due lavaggi).

Ulteriore conferma dell'avvenuta aggregazione e quindi di una compromissione della superficie del biochip, si ottiene osservando l'immagine differenziale, dopo iniezione di Target specifico e della registrazione dei segnali d'ibridazione relativi. Le superfici che recano nanoparticelle che hanno subito due lavaggi mostrano risposte non correlabili tra loro in seguito ad interazione con il target. Per uno spot sembra esserci una risposta rilevante (spot illuminato in basso a sinistra), per altri, soprattutto dove lo spot non si illumina, il plasmone non si eccita a causa dell'aggregazione superficiale. Il doppio lavaggio risulta essere inadeguato per la realizzazione di una buona nanostrutturazione della superficie con conseguente non soddisfacente segnale SPR.

Alla luce di queste evidenze, è stata scelto per la nanostrutturazione il protocollo che prevede la sostituzione del CTAB con la soluzione di MilliQ utilizzando un solo passaggio di centrifugazione (lavaggio singolo), poiché in questo caso non si è verificata l'aggregazione delle nanostrutture che impediva l'eccitazione dei plasmoni. Inoltre il legame fra BDMT e nanoparticelle risulta stabile anche dopo rigenerazione. In fig. 18 è mostrato il confronto tra la superficie di oro non nano strutturata e quella modificata con le nano strutture sottoposte a singola o doppia centrifugazione (lavaggio singolo e doppio). Confrontando le curve plasmoniche di spot rispettivamente summenzionate situazioni, si può osservare una variazione del segnale fra le varie curve di ibridazione tra Tprobe e target.



Figura 18 Confronto curve plasmoniche di TProbe immobilizzato su superficie non nanostrutturata (curva viola), superficie nanostrutturata con nanostar che hanno subito

un lavaggio (curva rossa) e superficie nanostrutturata con nanostar che hanno subito due lavaggi (curva blu.)

La curva dello spot della superficie nanostrutturata che ha subito due lavaggi presenta una riflettività percentuale maggiore rispetto alle altre due curve. Questo significa che la radiazione incidente non riesce ad eccitare i plasmoni di superficie, a causa dell'aggregazione delle nanoparticelle e quindi viene riflessa maggiormente.

Invece nel caso della superficie nanostruttura con un solo ciclo di lavaggio, la curva di riflettività nell'angolo corrispondente al punto di flesso (punto usato per l'acquisizione del segnale) cresce più rapidamente rispetto a quella della superficie d'oro senza la nanostruttura.

La precedente affermazione è rigorosamente supportata dallo studio della derivata prima nel punto di flesso. In particolare le curve plasmoniche sono state interpolate da curve polinomiali di terzo grado in un intervallo (58°-59°), contenenti i punti di flesso, con un eccellente coefficiente di determinazione (0.999) per entrambe le curve. Ponendo uguale a zero la derivata seconda si trova l'angolo corrispondente al punto di flesso, in seguito si calcola la derivata prima che fornisce la funzione della pendenza delle varie tangenti. Sostituendo l'angolo di flesso nella funzione derivata prima si trova il valore del coefficiente angolare nel flesso. Svolgendo il rapporto fra i valori corrispondenti alle due curve si osserva che la derivata prima nell'angolo di flesso della curva corrispondente allo spot con superficie nanostrutturata, è maggiore di ~3.4% rispetto a quella della superficie d'oro priva di nanostrutturazione.

Come conseguenza, per la stessa variazione dell'angolo nelle vicinanze dell'angolo di flesso, le variazioni dell'intensità della luce riflessa sono maggiori per la superficie nanostrutturata rispetto alla superficie d'oro tal quale, giustificando così, l'aumento di sensibilità per i biosensori con DNA su superficie nanostrutturata.

Di conseguenza sulla superficie nanostrutturata per stesse variazioni dell'angolo di risonanza si hanno variazioni di riflettività maggiori durante l'interazione tra analiti e biorecettori legati.



Figura 19 Interpolazione polinomiale delle le curve di riflettività per sonda su superficie priva di nanostrutturazione (curva in basso) e sonda su superficie nanostrutturata con Au nanostar (curva in alto) a concentrazione tal quale sottoposte ad un ciclo di lavaggio.

3.1.3 Calibrazione di diverse diluizioni di soluzioni nanostar

Una volta ottimizzato il metodo di lavaggio da effettuare sulla soluzione di nanoparticelle, abbiamo immobilizzato differenti diluizioni di tale soluzione: tal quale, 1:5, 1:10 per osservare le differenti risposte alle iniezioni di target complementare.



Figura 20 Curve di Calibrazione per il DNA Target, ottenute sul chip dapprima modificato con le Au nanostar utilizzate tal quali o diluite, e successivamente con il TProbe; E' riportato confronto per lo spot recante il TProbe su spot non nanostrutturato.

Come si può osservare dal grafico si ha un aumento significativo di segnale quando si utilizzano nanostar diluite 1/5 e soprattutto con nanostar tal quali (non diluite), mentre per nanostar diluite 1/10 il segnale, oltre ad essere affetto da deviazioni standard più marcate, risulta coincidente a quello ottenuto dalla sonda depositata sulla superficie del biochip priva di nanostrutturazione.

| Concentrazione | 250 nM | 100 nM | 50 nM | 10 nM | 5 nM |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| target lungo | | | | | |
| complementare | | | | | |
| Nanostar tal quali | 2,631±0,097 | 2,136±0,066 | 1,378±0,024 | 0,301±0,007 | 0,1375±0,013 |
| Nanostar diluite | | | | | |
| 1/5 | 2,325±0,168 | 1,941±0,126 | 1,478±0,082 | 0,217±0,03 | $0,145 \pm 0,015$ |
| Nanostar diluite | | | | | |
| 1/10 | 1,86±0,268 | 1,547±0,252 | 1,032±0,124 | 0,206±0,048 | 0,01±0,011 |
| Sonda su | | | | | |
| superficie priva di | | | | | |
| nanostruttura | 1,674±0,082 | 1,446±0,115 | 1,026±0,073 | 0,192±0,048 | -0,035±0,008 |

A livelli inferiori di 50 nM di concentrazione di target complementare possiamo osservare l'andamento lineare di tali curve:



Figura 21 Andamento lineare dei segnali corrispondenti all'ibridazione di target complementare (50; 5 nM) di sonda immobilizzata su superficie non nanostrutturata e su superficie con nanostrutturazione svolta con Au nanostar a concentrazione tal quale ed a diluizione 1/5 e 1/10.

Si può notare che si ottiene un aumento del segnale del 57% sugli spot nanostrutturati con nanostar tal quali (con un solo lavaggio), rispetto alla sonda su superficie priva di nanostruttura per iniezione di 250 nM di target. Inoltre si ottiene anche un abbassamento del limite di rilevabilità nello spot nanostrutturato da Aunanostar tal quali e diluite 1/5. Per questi spot, infatti, si ottiene un segnale utilizzabile anche a concentrazioni 5 nM, quando per gli altri spot non riusciamo a scendere al di sotto concentrazioni 10 nM.

Successivamente è stato calcolato il limite di rilevabilità strumentale sui i 4 sensori a DNA (nanostrutturati e non) utilizzando la seguente formula:

DL=3,3 $\delta_s \pm \overline{\mu}_b$

Dove δ_s corrisponde al valore medio del rumore di fondo, che per il nostro strumento equivale a 0.005 unità di Variazione di Riflettività Percentuale (RV%) e $\overline{\mu}_b$ equivale al valore medio del bianco (0)

 $(3.3*0.005\text{RV\%}) \rightarrow 0.0165$ è il limite di rilevabilità strumentale, ovvero il segnale più basso che può essere rilevato dallo strumento. Sostituendo tale valore nelle equazioni delle rette si ottengono i detection limit per le concentrazioni di analita rilevabili dallo strumento.

 $0.0165=0.029x \rightarrow x= 0.56 \text{ nM} \rightarrow 0.6 \text{ nM}$ Limite di rilevabilità su superficie nanostrutturazione con nanostar diluite 1/5

 $0.0165=0.0275x \rightarrow x= 0.6$ nM Limite di rilevabilità su superficie con nanostrutturazione svolta con nanostar tal quali

 $0.0165=0.0206x \rightarrow x= 0.80$ nM Limite di rilevabilità su superficie nanostrutturazione con nanostar diluite 1/10

 $0.0165=0.0205x \rightarrow x=0.8$ nM Limite di rilevabilità su superficie priva di nanostruttura

Come si può notare, per spot con Au nanostar tal quali e diluite 1/5 si ha un abbassamento del detection limit di ~43%.

3.1.4 Saggio sandwich

Il saggio sandwich prevede l'utilizzo di un secondo probe (Probe secondario), che ibrida il DNA Target, in una posizione diversa da quella esibita con il TProbe. Per questo motivo si utilizza una seconda sequenza, diversa dal TProbe, che è capace di formare una architettura molecolare con il complesso formato dal Tprobe e dal Target. Come illustrato in figura 22. A questo scopo però è stato utilizzato nella ibridazione con il TProbe un DNA Target più lungo (79 basi), alla cui estremità si ha l'ibridazione con il TProbe ed il Probe secondario.

Diverse concentrazioni di DNA Target lungo (da 5 nM a 250 nM) sono iniettate e successivamente è iniettato concentrazione costante di complementare Probe secondario 250 nM. Si vuole verificare se l'aumento di sensibilità dovuto alla nanostruttura è mantenuto in saggi che prevedono una architettura molecolare.



Figura 22 Schema saggio sandwich. Nel nostro caso L'elemento di riconoscimento 5'-3' = TProbe, 5'-3' = Target Lungo e secondo elemento di riconoscimento 3'-5' = Probe secondario.

Si può notare, già dall'iniezione di Target lungo, un'amplificazione del segnale SPR sugli spot nanostrutturati con nanostar, rispetto agli spot privi di nanostrutturazione, come mostrato in Fig. 22.



Figura 22 Confronto fra le risposte del sensore, dopo aggiunta di Target lungo da parte della sonda immobilizzata sulla superficie nanostrutturata da nanostar tal quali e sottoposte ad un lavaggio (arancione) e sonda immobilizzata su superficie non nanostrutturata (azzurro).

Come si può notare già dal grafico precedente i probe immobilizzati sulla superficie nanostrutturata danno una risposta maggiore rispetto a quelli immobilizzati sulla superficie del biochip tal quale. Questo effetto è ulteriormente ampliato quando si inietta il probe secondario, complementare ad una parte di sequenza del target lungo.



Figura 23 Confronto fra risposte ad iniezione di probe secondario a concentrazione costante (250 nM) complementare al target lungo iniettato a concentrazioni differenti (10; 250 nM) da parte del sensore recante la sonda immobilizzata sulla superficie nanostrutturata con nanostar tal quali (azzurro) e sonda immobilizzata su superficie non nanostrutturata (arancio).

L'amplificazione della risposta ottenuta tramite saggio sandwich può essere osservata anche confrontando le immagini differenziali. L'immagine differenziale mostra, tramite cambiamento di colore (da blu-nessuna interazione a rosso-interazione forte) l'interazione del legame fra recettore e analita in tempo reale (Figura 24 e Figura 25)



Figura 24 Ibribidazione del target lungo complementare alla sonda sui differenti spot. Spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito 1 lavaggio (contorno nero), spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito 2 lavaggi (contorno arancione), spot privi di nanostrutturazione (contorno bianco).

Quando si inietta il target complementare si riscontra un'ulteriore amplificazione su tutti gli spot su cui è depositato il probe. La risposta degli spot nanostrutturati è più alta.



Figura 25 Immagine differenziale dopo iniezione Target Lungo e di Probe secondario complementare. Spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito un lavaggio (contorno nero), spot nanostrutturati con nanostar che hanno subito due lavaggi (contorno arancione), spot privi di nanostrutturazione (contorno bianco).

3.2 Utilizzo di nanostar all'interno di architetture molecolari

Per utilizzare le nanoparticelle all'interno di una architettura molecolare prima di tutto si è ricercata la quantità ottimale di nanoparticelle con cui funzionalizzare il target complementare.



Figura 26 Utilizzo di Au nanostar in architetture molecolari. Elemento di riconoscimento 5'-3' = TProbe, 5'-3' = Target Lungo e secondo elemento di riconoscimento 3'-5' = Target complementare con Au nanostar.

3.2.1 Ottimizzazione delle diluizioni

Le nanostar sono state sottoposte ad un ciclo di centrifugazione e risospese in buffer di ibridazione (PBS), invece della soluzione MilliQ, successivamente è stato aggiunto DNA probe per modificarle. In questo caso la modifica è stata fatta utilizzando il DNA probe che va ad ibridarsi in una regione del target lungo che è stata dapprima catturata dal Tprobe sulla superficie del chip. DNA e le Au nanostar sono stati in incubazione per una notte. Le nanostar così modificate, recanti il probe complementare, sono state iniettate a concentrazione tal quale (250 nM), ma si è verificata una loro aggregazione sulla superficie del chip, rendendo impossibile stabilire un segnale specifico per gli spot in primo luogo e applicare ogni rigenerazione della superficie. Tale inconveniente potrebbe essere dovuto alla concentrazione delle nanoparticelle iniettate, ed allo scopo di verificare questa ipotesi, diversi rapporti fra soluzione nanostar e probe complementare (1:10; 1:100 e 1:1000) sono stati saggiati. Tutte i rapporti considerati hanno fornito una risposta aspecifica e hanno mostrato difficoltà nel passaggio di rigenerazione, svolto con HCl 100 nM e 10% EtOH e HCl 100 nM e 20% EtOH, ad eccezione della soluzione con nanostar (250 nM) e probe complementare in rapporto

1:1000, per la quale si sono ottenuti dei risultati con aspecificità bassa, seppur presente. Abbiamo preparato un biochip su cui abbiamo immobilizzato la sonda di interesse e una sonda aspecifica di controllo. In seguito abbiamo iniettato una soluzione di target lungo complementare alla sonda d'indagine.

Come possiamo notare dal grafico (Fig. 27) e dall'immagine differenziale abbiamo una risposta nel caso degli spot contenenti la sonda d'indagine (abbiamo svolto una media su cinque spot), mentre sulla superficie del biochip e gli spot di controllo (con sonde aspecifiche) non viene registrato alcun segnale.





L'interazione può essere riscontrata anche osservando l'immagine differenziale relativa all'ibridazione ottenuta dopo iniezione del Target lungo.



Figura 28 Ibribidazione del target lungo sui differenti spot con sonda (TProbe), della superficie e degli spot di controllo.

Verificatasi la formazione dell'ibrido TProbe, target lungo, è quindi iniettato la soluzione di probe secondario funzionalizzato con le nanostar. Le risposte del sensore sono riportate in Figura 29.



Figura 29 Confronto dei segnali ottenuti dopo amplificazione con il probe secondario funzionalizzato con le Au nanostar sugli spot recanti il TProbe, (best 5), la superficie di oro tal quale e degli spot di controllo (aspecifico).

Come si può osservare abbiamo un'amplificazione del segnale molto alta di ~874% sugli spot specifici, tuttavia la superficie ed il target aspecifico presentano un contributo aspecifico. Per il segnale sul probe aspecifico si tratta di una risposta corrispondente alla metà del segnale ottenuto per spot specifici.

La risposta aspecifica può essere dovuta ad un effetto di deposito superficiale momentaneo perché il segnale diminuisce gradualmente, facendo fluire sulla superficie un flusso di soluzione tampone, sia sulla superficie di oro (surface) che sugli spot aspecifici.



Figura 30 Immagine differenziale del chip dopo iniezione del target funzionalizzato con nanostar. Si può osservare la diminuzione di affinità sulla superficie dopo un'ora (sinistra) e dopo due ore (destra).

3.2.2 Metodi di rigenerazione

Nel saggio sandwich inoltre è stata riscontrata una diffusa difficoltà a rigenerare il chip. Sono state valutate per la rigenerazione soluzioni di HCl 100 mM, da solo o in presenza di diverse percentuali di Etanolo (HCl 100 nM e 10% EtOH e HCl 100 nM e 20% EtOH) ma non si è ottenuta alcuna rigenerazione della superficie, cioè di dissociazione dell'ibrido di DNA target, Probe secondario con Au nanostar, dal Tprobe. Successivamente è stato saggiata una soluzione 0.05% SDS, ovvero una soluzione di lavaggio, che ha permesso di rigenerare la superficie, facendo registrare un recupero del valore della linea di base (baseline = 0).

4 Conclusioni

In questa tesi è stato sviluppato un sensore a DNA con trasduzione SPR per immagini (SPRi). L'obbiettivo era verificare l'aumento di sensibilità, soprattutto nell'abbassamento di limite di rilevabilità durante il monitoraggio di interazioni di affinità DNA/DNA. tramite utilizzo di nanoparticelle nella (nanostar) nanostrutturazione della superficie del chip e in architetture molecolari.

Per fare ciò si sono sviluppati dei metodi di ottimizzazione per l'immobilizzazione delle nanoparticelle in superficie, partendo da metodi di lavaggio delle nanoparticelle per l'ottenimento di un segnale stabile e permettere la rigenerazione della superficie senza avere perdita di segnale. Si è visto che un ciclo di lavaggio, consistente nella sostituzione della soluzione di sintesi con acqua MilliQ, offre una condizione di lavoro ottimale.

Successivamente si sono confrontate diverse diluizioni della soluzione di nanostar da immobilizzare, riscontrando un aumento di sensibilità per nanostar tal quali e diluite 1/5. Dalla calibrazione del campione si è riscontrato, sulle nanostrutture con nanostar a suddette diluizioni, anche l'abbassamento del limite di rilevabilità da concentrazioni 10 nM a 5 nM di target complementare.

Le nanoparticelle d'oro sono state utilizzate in architetture molecolari, tipo saggio sandwich. È stata ottimizzata la concentrazione di nanoparticelle con cui funzionalizzare il target (250 nM diluite 1/1000 in PBS).

Si riscontra un aumento di segnale elevato, ma si ottiene risposta anche da parte degli spot di controllo. La risposta aspecifica risulta essere equivalente a circa la metà del segnale ottenuto per gli spot dove è immobilizzata la sonda.

Tecniche di rigenerazione del biochip sono state valutate e in particolare tramite iniezione di HCl 100 mM con 20% di EtOH, ma non si è ottenuta completa rigenerazione, soprattutto per gli spot di controllo.

Successivi studi potranno vertere sullo sviluppo di tecniche per evitare la risposta aspecifica degli spot di controllo, tipo ottimizzazione delle velocità del flusso o composizione del tampone, e su tecniche ottimali di rigenerazione, sperimentare altre soluzioni di rigenerazione.

5 Bibliografia

Bedford EE, Spadavecchia J, Pradier C, Gu FX (2012) Surface Plasmon Resonance Biosensors Incorporating Gold Nanoparticles. Macromol Biosci 12:724–739.

Brockman, J. M.; Nelson, B. P.; Corn, R. M. Annu. ReV. Phys. Chem. 2000, 51, 41.

Burda, C.; Chen, X. B.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. Chem. Rev. 2005, 105, 1025.

Corne C, SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase

Feng Hao, Colleen L. Nehl, Jason H. Hafner, and Peter Nordlander Nano Lett., 2007, 7 (3), pp 729–732

Gibson, G., 2008. Nat. Rev. Genet. 9, 575-581

Giuseppe Spoto and Maria Minunni J. Phys. Chem. Lett. 2012, 3, 2682–2691

Goodrich, T.T., Lee, H.J., Corn, R.M., 2004. J. Am. Chem. Soc. 126, 4086–4087.

Grasso, G., Bush, A.I., D'Agata, R., Rizzarelli, E., Spoto, G., 2009a. Eur. Biophys. J., Biophys. Lett. 38, 407–414.

Grasso, G., D'Agata, R., Zanoli, L., Spoto, G., 2009b. Microchem. J. 93, 82-86.

Griffiths D and Hall G, Trends in Biothecnology, (1993), 11(4):122-130.

Haake H. M., Schütz A., Gauglitz G., Fresenius J. Anal. Chem. 2000, 366, 576.

Hana 'Sipova, Ji'ri Homola Analytica Chimica Acta 773 (2013) 9-23

Homola J. Chem. Rev. 2008, 108, 462 493

interactions with damaged DNA duplexes, (2008) www.rsc.org/analyst | The Analyst

Jana, N. R.; Gaearheart, L.; Murohy, C. J. Adv. Mater. 2001, 13, 1389.

Jolanda Spadavecchia, Alexandre Barras, Joel Lyskawa, Patrice Woisel, William Laure, Claire-Marie Pradier, Rabah Boukherroub, and Sabine Szunerits, Anal. Chem. 2013, 85, 3288–3296

Langmuir, 2008, 24 (3), pp 644-649 Acs Publications

Mariani S., Minunni M., Analytical & Bioanalytical Chemistry 2014

Mariani Stefano & Ermini Maria Laura & Scarano Simona & Bellissima Francesca & Bonini Massimo & Berti Debora & Minunni Maria Microchim Acta (2013) 180:1093–1099

Matsubara, K.; Kawata, S.; Minami, S. Appl. Spectrosc. 1988, 42, 1375.

Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M., 2007. Anal. Lett. 40, 1360–1370.

Nylander, C.; Liedberg, B.; Lind, T. Sens. Actuators 1982, 3, 79.

Okumura A., Sato Y., Kyo M., Kawaguchi H., Anal. Biochem. 339 (2005) 328. Perkel, J., 2008. Nat. Methods 5, 447–453.

Rogers K R, 1998, Principles of affinity-based biosensors. In: Methods in Biotechnology, Vol. 7: Affinity biosensors: techniques and protocols. Eds. Rogers K R and Mulchandani A, Totowa, Humana Press Inc.

Rothenhausler, B.; Knoll, W. Surface–Plasmon Microscopy. Nature 1988, 332, 615–617.

Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D., Blum, L.J., 2008. Chem. Rev. 108, 109–139

Scarano Simona, Mascini Marco, Turner Anthony P.F., Minunni Maria, Biosensors and Bioelectronics 25 (2010) 957–966

Schasfoort R B M e Tudos A J, Handobook of Surface Plasmon Resonance, RSC Publishing (2008).

Sheller G et al., Analyst, (1989), 114:653-662

Shi, L., Perkins, R.G., Fang, H., Tong, W., 2008. Curr. Opin. Biotechnol. 19, 10–18.

Tothill L E and Turner A P F, London, Academic Press, (2003), 215:223-230.

Zanoli LM, Agata RD, Spoto G (2012) Functionalized gold nanoparticles for ultrasensitive DNA detection. Anal Bioanal Chem 402:1759–1771 Zhang, L. M.; Uttamchandan, D. Electron. Lett. 1988, 24, 1469.

6 Ringraziamenti

Ringrazio la Prof.ssa Maria Minunni per la bellissima esperienza e per l'opportunità di studiare queste tecniche innovative.

Ringrazio Simona per il suo rigore.

Ringrazio Stefano per essere stato un mentore ed un amico nei pomeriggi passati in laboratorio fra chiacchiere e amplificazioni.

Ringrazio la mia famiglia per il sostegno e per aver sempre creduto in me, anche quando anche ero io la prima a non credere nelle mie capacità.

Ringrazio Andre per tutto, per avermi supportata e sopportata sempre.

Ringrazio Anna per essere stata presente seppur a chilometri di distanza.

Ringrazio gli amici di lavoro che hanno fatto il tifo per me in questa esperienza.

Ringrazio gli amici sia vicini che lontani per i momenti di svago.

Ringrazio Federico e Massimo per essere stati i miei compagni in questo percorso di studi.

Ringrazio tutti, anche quelli che non ho citato qui.