

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

## Sviluppo di un genosensore impedimetrico per la determinazione di microRNA

**Candidato:** Veronica Fiorini

**Relatore:** Ilaria Palchetti (email: [ilaria.palchetti@unifi.it](mailto:ilaria.palchetti@unifi.it))

**Correlatore:** Giovanna Marrazza (email: [giovanna.marrazza@unifi.it](mailto:giovanna.marrazza@unifi.it))

Le patologie neoplastiche sono la seconda causa di morte (30% di tutti i decessi), dopo le malattie cardio-circolatorie (38%) e si configurano, quindi, come uno dei problemi sociosanitari più rilevanti. L'analisi qualitativa e quantitativa di biomarcatori, ossia di molecole associate alla malattia tumorale nei suoi vari stadi, risulta essenziale per la diagnosi precoce della malattia e, in definitiva, per aumentare il tasso di sopravvivenza del paziente.

Lo scopo di questo lavoro di tesi ha riguardato lo sviluppo di un genosensore impedimetrico per la determinazione di biomarcatori tumorali. In particolare è stato studiato un genosensore per la determinazione qualitativa e quantitativa di microRNA. I microRNA, scoperti per la prima volta nel 1993, sono filamenti di RNA costituiti approssimativamente da 22 basi. Recenti studi hanno dimostrato che i microRNA giocano un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica. Essi sono coinvolti in diversi processi biologici e stati patologici, tra cui le malattie tumorali, cardiache e neurologiche: in questi casi i livelli cellulari di alcune sequenze di microRNA risultano alterati. Per questo negli anni si è cercato di investigare queste molecole a fini diagnostici, per sviluppare cure mirate e seguire il decorso della malattia.

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 faradica, impiegando come marcatore della reazione di ibridazione il coniugato enzimatico streptavidina fosfatasi alcalina e come substrato enzimatico la miscela 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/blu nitrotetrazolo. L'azione catalitica della fosfatasi genera un prodotto insolubile e isolante che precipita sulla superficie elettrodica, aumentando la resistenza al trasferimento elettronico di un'opportuna coppia redox come  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ . Tale resistenza è stata impiegata come segnale analitico per il riconoscimento dell'evento di ibridazione. Sono state studiate due diverse sonde di cattura: una sonda di tipo lineare e una sonda *hairpin*. La sonda di tipo *hairpin* permette di evitare la marcatura della sequenza bersaglio di microRNA con biotina e rende più semplice e veloce l'analisi. Le due sonde sono state caratterizzate per via elettrochimica e spettrofotometrica. L'analisi spettrofotometrica ha permesso di valutare l'efficacia dell'ibridazione tra la sonda di cattura e il target attraverso la misura della temperatura di melting dell'ibrido. I saggi sviluppati raggiungono limiti di rilevabilità per il microRNA-221 di 0.82 nM (RSD 13%) con la sonda di cattura lineare e 1.3 nM (RSD 20%) con la sonda di cattura *hairpin*.