

Immobilizzazione di aptameri su nanostrutture plasmoniche per analisi SERS

Original

Immobilizzazione di aptameri su nanostrutture plasmoniche per analisi SERS / Novara, C.; Chiadò, A.; Paccotti, N.; Geobaldo, F.; Rivolo, P.; Giorgis, F.. - ELETTRONICO. - (2018), pp. 185-186. (Intervento presentato al convegno AICIng 2018 - XI Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Chimica per Ingegneria tenutosi a Bologna (IT) nel 9-12 Settembre 2018).

Availability:

This version is available at: 11583/2722308 since: 2019-01-09T11:15:01Z

Publisher:

Associazione Italiana di Chimica per Ingegneria

Published

DOI:

Terms of use:

This article is made available under terms and conditions as specified in the corresponding bibliographic description in the repository

Publisher copyright

(Article begins on next page)

Immobilizzazione di aptameri su nanostrutture plasmoniche per analisi SERS

Chiara Novara, Alessandro Chiadò, Niccolò Paccotti, Francesco Geobaldo, Paola Rivolo, Fabrizio Giorgis

¹Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia, Politecnico di Torino, C.so Duca degli Abruzzi 24, 10129, Torino Italy

chiara.novara@polito.it

Keywords: Surface Enhanced Raman Scattering, aptameri, sensori, aflatossine, nanostrutture plasmoniche

Introduzione

La spettroscopia SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) presenta notevoli potenzialità nello sviluppo di innovative piattaforme sensoristiche portatili.[1] Questa tecnica garantisce elevate sensibilità grazie all'amplificazione del segnale Raman dell'analita a contatto con nanostrutture plasmoniche ed una facile integrazione in dispositivi miniaturizzati. Nell'analisi di matrici complesse, come biofluidi o prodotti alimentari, la specificità intrinseca della spettroscopia SERS, che fornisce un pattern vibrazionale caratteristico della molecola analizzata, può essere ulteriormente migliorata attraverso la funzionalizzazione delle nanostrutture con i più avanzati sistemi di riconoscimento molecolare; tra i più innovativi si distinguono gli aptameri, sequenze di DNA o RNA che possono ripiegarsi in strutture tridimensionali in grado di legare in modo altamente specifico una determinata molecola.

In questo lavoro viene presentato lo studio dell'immobilizzazione di un aptamero specifico per l'Aflatossina B1 su nanostrutture d'argento, cresciute su silicio mesoporoso, e della sua ibridazione a sequenze "switch" complementari al sito di legame, in vista dello sviluppo di un saggio competitivo per la rivelazione SERS di micotossine in matrici alimentari.

Materiali e metodi

Preparazione dei substrati SERS

I substrati SERS, costituiti da membrane di silicio poroso decorate con nanoparticelle (NP) d'argento, sono stati preparati attraverso etching elettrochimico di wafer di silicio drogato p⁺ in soluzioni di HF/H₂O/EtOH.[2] La membrana porosa ottenuta è stata distaccata dal supporto di silicio cristallino attraverso un secondo attacco elettrochimico e trasferita su uno strato di polidimetilsilossano (PDMS) parzialmente reticolato. Dopo una rigenerazione in HF, le NP di Ag sono state sintetizzate per immersione della membrana in una soluzione acquosa di AgNO₃ 10⁻² M a 22 °C per 20 s.

Funzionalizzazione con aptameri

Le nanostrutture metallo-dielettriche ottenute sono state pretrattate in BSA (Bovine Serum Albumin) per 1 h per ridurre l'adsorbimento aspecifico.[1] Due diversi aptameri sono stati ottenuti per modifica di una sequenza, utilizzata in precedenza per la rivelazione di Aflatossina B1 [3], con un gruppo tiolo al terminale 3' (aptamero-3') o 5' (aptamero-5'). Un terzo aptamero è stato ottenuto per eliminazione dei primi otto nucleotidi al terminale 3' (aptamero-3'-Short). Le stesse sequenze sono state acquistate in forma marcata. In quest'ultimo caso, un marcatore Raman (6-carbossifluoresceina - FAM) è stato legato al terminale opposto rispetto al gruppo SH. Tutti gli aptameri sono stati immobilizzati attraverso incubazione overnight in 25 µL di buffer (TE 1 M NaCl) ad una concentrazione di 3 µM.

Per sviluppare un saggio competitivo per la rivelazione di micotossine, cinque sequenze di 9, 10 o 11 nucleotidi, complementari a regioni diverse del sito di legame per l'aflatossina B1, sono state selezionate come "switch" in base ai risultati di modelli in silico. Per aumentare la sensibilità della rivelazione, gli "switch" sono stati marcati con la FAM. L'ibridazione è stata effettuata nelle condizioni precedentemente ottimizzate per sistemi simili [1]. L'aflatossina è stata infine incubata ad una concentrazione 1 µM per 1 h, per consentire lo scambio con lo "switch".

Analisi SERS

I campioni sono stati analizzati ad ogni passaggio del protocollo di funzionalizzazione attraverso l'acquisizione di mappe Raman su un'area di 50 micron x 50 micron, con un passo di 5 micron. Le

misure sono state effettuate con uno spettrometro InVia Reflex della Renishaw eccitando il campione con una linea laser a 514.5 nm con una potenza di 0.05 mW, utilizzando un obiettivo 100x.

Risultati e discussione

Attraverso il confronto del segnale SERS degli aptameri tal quali e marcati con la FAM (Fig. 1 a) è stata investigata l'influenza della posizione del gruppo tiolo sull'orientazione assunta dell'aptamero sulla superficie del substrato. In particolare, è stato possibile osservare come, tra gli aptameri marcati, l'intensità dello spettro SERS, dominato dai modi vibrazionali della FAM, sia nettamente superiore nel caso dell'aptamero-5'. Al contrario, gli spettri degli aptameri non marcati presentano intensità tra loro paragonabili, dimostrando che il ricoprimento superficiale non varia significativamente. Le differenze osservate tra gli aptameri marcati sono quindi dovute alla diversa distanza del fluoroforo dalle NPs di Ag, al diminuire della quale aumenta l'efficienza dell'amplificazione elettromagnetica. Il fatto che la FAM legata all'aptamero-5' si trovi ad una distanza inferiore rispetto a quella riscontrata per l'aptamero-3' suggerisce un'orientazione preferenziale delle sequenze sulla superficie secondo lo schema mostrato in Fig. 1b. L'aptamero-3'-short, fornisce un'intensità intermedia, consistente con quanto ipotizzato. Una fluttuazione del segnale SERS più elevata nel caso delle mappature acquisite sui substrati funzionalizzati con l'aptamero-5' marcato ha inoltre rivelato, una più grande variabilità conformazionale per tale sequenza. Comportamenti simili sono stati osservati dopo l'ibridazione dei tre aptameri con le sequenze "switch" marcate, poiché anche esse risentono della distanza marcatore-superficie.

Sequenze "switch" di differente lunghezza e composizione sono infine state ibridate con gli aptameri immobilizzati per identificare il miglior compromesso tra la stabilità del legame tra aptamero e switch e la capacità dell'aflatossina di sostituirlo. In accordo con la più alta temperatura di melting, le sequenze più lunghe hanno mostrato segnali Raman di intensità confrontabile, mentre modi vibrazionali molto più deboli sono stati osservati per le sequenze da 9 nucleotidi. Tutti i campioni hanno mostrato una diminuzione dell'intensità del segnale SERS dopo l'incubazione con l'aflatossina B1, tuttavia il distacco della sequenza "switch" è risultato specifico solamente per la sequenza da 11 nucleotidi.

Tali risultati sottolineano l'importanza dell'ottimizzazione dell'orientazione dell'aptamero sulla superficie, non solo per la sua influenza sul legame con lo "switch" e l'aflatossina, ma anche per quanto riguarda la sensibilità della rivelazione SERS e indicano l'aptamero 3'-short come miglior compromesso tra intensità e uniformità del segnale SERS.

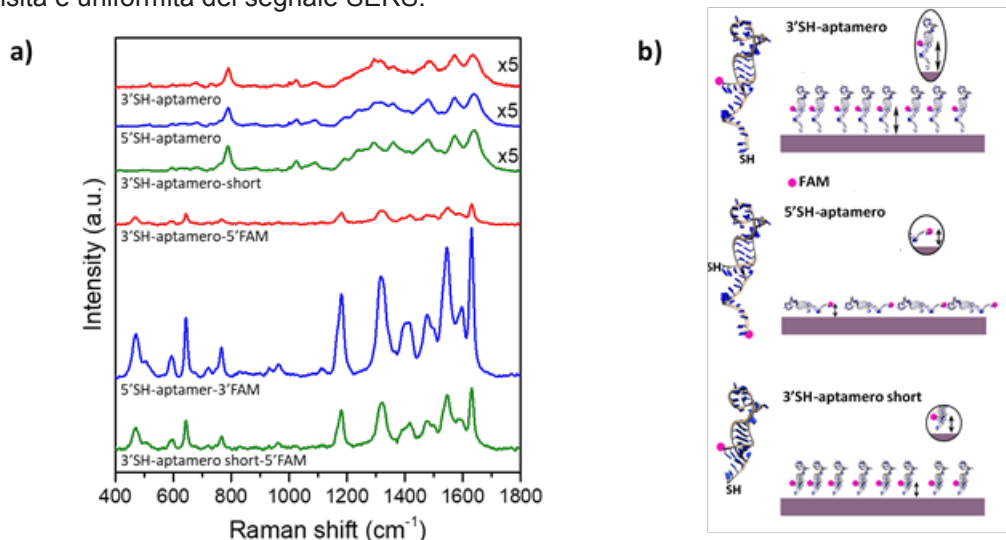


Figura 1. a) Spettri SERS delle nanostrutture di Ag funzionalizzate con i tre aptameri: non marcati (in alto) e marcati con FAM (in basso); b) Schema dell'immobilizzazione delle tre sequenze.

Bibliografia

- [1] C. Novara et al., SERS-active metal-dielectric nanostructures integrated in microfluidic devices for label-free quantitative detection of miRNA, *Faraday Discuss.* **205**, 271–289, (2017)
- [2] A. Chiadò et al., Immobilization of Oligonucleotides on Metal-Dielectric Nanostructures for miRNA Detection, *Anal. Chem.* **88**, 9554–9563, (2016).
- [3] L. Chen et al., *Food Chem.*, A simple aptamer-based fluorescent assay for the detection of Aflatoxin B1 in infant rice cereal, **215**, 377–382, (2017).