



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMAZIONE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**SVILUPPO DI UN GENOSENSORE IMPEDIMETRICO PER  
RILEVAZIONE DI CAMPYLOBACTER IN AMBITO  
AGROALIMENTARE**

Relatore: Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella

Correlatore: Dott. Stefano Bonaldo

Laureanda: Lara Franchin

Matricola: 1223991

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

21 febbraio 2022



*A mia sorella*  
*A mio zio*



# SOMMARIO

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>11</b>
<b>IL CAMPYLOBACTER.....</b>	<b>13</b>
1.1    IL BATTERIO .....	13
1.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i> .....	14
1.2    ASPETTI CLINICI .....	16
1.3    TRASMISSIONE E INCIDENZA .....	17
1.4    RILEVAMENTO DEL PATOGENO .....	18
1.4.1 <i>Coltura batterica</i> .....	18
1.4.2 <i>Saggi immunologici</i> .....	19
1.4.3 <i>Sequenziamento e PCR</i> .....	21
<b>I BIOSENSORI.....</b>	<b>26</b>
2.1    DEFINIZIONE DEI BIOSENSORI .....	26
2.1.1 <i>Trasduttori elettrochimici</i> .....	26
2.1.2 <i>Trasduttori ottici</i> .....	27
2.1.3 <i>Altri trasduttori</i> .....	28
2.2    INTERFACCIA DEI TRASDUTTORI ELETTROCHIMICI .....	28
2.2.1 <i>Modello di Helmholtz</i> .....	29
2.2.2 <i>Modello di Gouy-Chapman</i> .....	29
2.2.3 <i>Modello di Stern</i> .....	30
2.2.4 <i>Modello di Grahame</i> .....	30
2.2.5 <i>Modello BDM</i> .....	30
2.3    METODI DI MISURA PER BIOSENSORI ELETTROCHIMICI.....	31
2.3.1 <i>Voltrammetria Ciclica</i> .....	31
2.3.2 <i>Differential Pulse Voltammetry</i> .....	33
2.3.3 <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> .....	34
2.4    AGENTI DI RICONOSCIMENTO BIOLOGICI .....	36
2.4.1 <i>Enzimi</i> .....	36
2.4.2 <i>Anticorpi</i> .....	38
2.4.3 <i>Aptameri</i> .....	39
2.4.4 <i>Acidi Nucleici</i> .....	40
2.5    IMMOBILIZZAZIONE DEI COMPONENTI BIOLOGICI .....	41
2.5.1 <i>SAM</i> .....	42

2.6	GENOSENSORI.....	43
<b>MATERIALI, METODI E STRUMENTAZIONE.....</b>		<b>46</b>
3.1	MATERIALI.....	46
3.1.1	<i>Prodotti chimici usati</i> .....	46
3.1.2	<i>DPRC223BT</i> .....	50
3.1.3	<i>Strumenti ausiliari</i> .....	51
3.2	STRUMENTAZIONE.....	52
3.2.1	<i>Hardware: PalmSens EmStat PICO</i> .....	52
3.2.2	<i>Software</i> .....	52
3.2.3	<i>Strumentazione ausiliaria: SensoSpot Fluorescence Microarray Analyzer</i> .....	54
3.3	PROTOCOLLI.....	55
3.3.1	<i>Protocollo di misura</i> .....	55
3.3.2	<i>Protocollo di funzionalizzazione overnight</i> .....	55
3.3.3	<i>Protocollo di analisi in fluorescenza</i> .....	56
3.3.4	<i>Protocollo di preparazione buffer</i> .....	56
3.3.5	<i>Protocollo di passivazione con MUA/MCH</i> .....	57
3.3.6	<i>Protocollo di ibridazione</i> .....	57
<b>RISULTATI.....</b>		<b>58</b>
4.1	STABILITÀ DEL SENSORE SCELTO.....	58
4.2	FUNZIONALIZZAZIONE CON SONDE DI DNA.....	59
4.2.1	<i>Riproducibilità dei risultati di funzionalizzazione</i> .....	62
4.2.2	<i>Stabilità ai protocolli</i> .....	64
4.3	BUFFER DI IBRIDAZIONE.....	65
4.3.1	<i>Prima prova di ibridazione: Problemi di rilevazione</i> .....	65
4.3.2	<i>Passivazione con MUA</i> .....	70
4.3.3	<i>Passivazione con MCH</i> .....	72
4.3.4	<i>Analisi dei componenti del Buffer</i> .....	73
4.3.5	<i>Frammentazione della BSA</i> .....	75
4.4	IBRIDAZIONE CON DNA COMPLEMENTARE.....	76
4.4.1	<i>Seconda prova di ibridazione con buffer trattato</i> .....	76
4.4.2	<i>Terza prova di ibridazione con buffer trattato</i> .....	81
4.4.3	<i>Passivazione con MCH post funzionalizzazione</i> .....	83
4.4.4	<i>Passivazione con MUA post funzionalizzazione</i> .....	87
4.4.5	<i>Passivazione con Buffer post funzionalizzazione</i> .....	91
4.5	INTERCALANTI.....	94
4.5.1	<i>Intercalanti elettroattivi</i> .....	95

4.5.2 Prove con Blu di Metilene.....	97
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>106</b>



## ABSTRACT

Il seguente lavoro di tesi fa parte della fase intermedia di un progetto svolto presso i laboratori di ARC - Centro Ricerche Applicate s.r.l. e il laboratorio di BioDevices del dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università degli Studi di Padova, inserendosi nel contesto di un progetto nazionale in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). L'obiettivo di tale progetto è quello di realizzare un genosensore impedimetrico per la rilevazione della presenza di *Campylobacter* da applicare nel settore agroalimentare, in particolare negli allevamenti avicoli e nelle relative linee di produzione industriale.

Il *Campylobacter* è uno tra i principali patogeni che si trasmettono all'uomo attraverso l'alimentazione ed è causa di un'infezione intestinale chiamata campylobatteriosi.

Essendo particolarmente diffuso negli allevamenti di pollame, una tempestiva identificazione degli esemplari infetti e il conseguente trattamento di essi comporta una riduzione dell'invalidazione di interi stock, una diminuzione nella somministrazione di antibiotici ad ampio spettro e un'inferiore trasmissione all'uomo, che si traduce in una minor spesa sanitaria legata all'infezione.

Il progetto prevede lo sviluppo di un genosensore impedimetrico, ossia un sensore in grado di identificare la presenza di specifico materiale genetico in un dato campione, utilizzando un elettrodo funzionalizzato con catene singole di DNA alle quali si ibridano per complementarità catene dell'analita cercato. Tale evento viene rilevato con l'impiego di misure elettrochimiche. Le tecniche elettrochimiche utilizzate sono spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) e voltammetria ad impulso differenziale (DPV).

La prima parte delle misure effettuate si riferisce alla verifica della corretta funzionalizzazione dell'elettrodo con catene singole di DNA, mentre la seconda parte riguarda la rilevazione dell'evento di ibridazione con DNA complementare e gli approcci applicati per aumentarne la sensibilità.



## INTRODUZIONE

Il *Campylobacter* è un batterio molto comune e largamente diffuso in tutto il mondo, particolarmente presente negli allevamenti di pollame. Nella sola Unione Europea ogni anno circa 9 milioni di persone vengono infettate da *Campylobacter*, comportando un aumento di circa 2.4 miliardi di euro sulla spesa di salute pubblica.

Il batterio si trasmette facilmente all'uomo attraverso il consumo di carne di pollo non adeguatamente trattata e comporta l'insorgenza di campylobatteriosi: un'infezione intestinale con sintomatologia simile ad altre infezioni batteriche, come salmonellosi o shigellosi. A seguito dell'infezione, inoltre, possono svilupparsi altre patologie ad essa legate, tra cui la sindrome di Guillain-Barré. Infine, sebbene la campylobatteriosi non sia classificata come malattia fatale, annualmente è causa della morte di numerosi soggetti fragili come infanti, anziani e pazienti immunodepressi.

Vengono spesso somministrati antibiotici sia nel trattamento della patologia che negli allevamenti per limitare il contagio. Tuttavia, ciò non fa altro che incrementare lo sviluppo di ceppi batterici resistenti, rendendo così complicata la gestione dell'infezione. Il *Campylobacter*, dunque, non è solo un problema dal punto di vista sanitario, ma la sua diffusione grava anche sulla società, per via degli elevati costi di cura, e sull'ambiente.

Adottare un efficace metodo di rilevazione del *Campylobacter* appare, quindi, fondamentale per limitarne la trasmissione all'uomo e ridurre le conseguenze socioeconomiche e ambientali. Il mio lavoro di tesi si focalizza sullo sviluppo di un genosensore impedimetrico per la rilevazione di *Campylobacter*, in modo economico e facilmente implementabile a livello dell'industria agroalimentare. L'obiettivo è di distinguere gli animali sani da quelli infetti affinché questi ultimi possano subire un adeguato e differente processo di macellazione.

I biosensori sono degli strumenti di rilevazione che forniscono informazioni circa la presenza di analiti in un campione, attraverso l'accoppiamento tra un elemento di riconoscimento biologico e un trasduttore. L'uso di questi dispositivi sta diventando sempre più diffuso in ambito agroalimentare per la rilevazione di patogeni e microorganismi. Uno degli ambiti maggiormente coinvolti è il controllo della salute del bestiame, necessario in particolare per evitare la trasmissione di patologie all'uomo. I biosensori applicati in questo contesto sono spesso di natura elettrochimica, poiché permettono di ottenere buoni risultati ad un costo ridotto e sono applicabili nell'identificazione di numerosi batteri e virus, tra cui figura anche il *Campylobacter*.

I genosensori elettrochimici sono una sottoclasse di biosensori. Essi utilizzano delle catene singole di DNA come agente di riconoscimento biologico, accoppiato con un trasduttore elettrochimico. L'analita di interesse è la catena di DNA complementare a quella presente sul genosensore e l'evento di riconoscimento è l'ibridazione delle due, che viene rilevato tramite tecniche elettrochimiche.

Nel primo capitolo di questa tesi ho esplorato le motivazioni per le quali è necessario sviluppare un genosensore per rilevare il *Campylobacter*, ponendo l'accento sulle problematiche legate alle metodologie finora applicate. Nel secondo capitolo, invece, ho approfondito le tecniche elettrochimiche utilizzate per la rilevazione, sottolineando i motivi per i quali si predilige quest'approccio rispetto ad altri disponibili. Il terzo capitolo tratta di metodi e protocolli che ho sviluppato per effettuare analisi e misure ed espone gli strumenti e i prodotti chimici di cui ho fatto uso durante la sperimentazione. Infine, il quarto capitolo riporta tutti i risultati sperimentali che ho raccolto nel corso del mio lavoro. Nella prima parte si evidenzia la stabilità del dispositivo scelto e si studia la funzionalizzazione della superficie con catene singole di DNA. La seconda parte mette in luce una problematica che ho riscontrato circa la rilevazione dell'evento di ibridazione e tratta delle prove che ho effettuato per risolverla. Nella terza parte si riportano i risultati a seguito dell'ibridazione con DNA complementare, mentre l'ultima sezione è dedicata ad un'approfondita ricerca in letteratura che ho svolto circa i metodi per ottenere un aumento di intensità dei segnali elettrochimici, evidenziando, infine, i vantaggi dell'approccio che ho suggerito. Da ultimo, concludo questo lavoro con delle riflessioni conclusive e degli spunti per le fasi successive del progetto.

Tutta la fase sperimentale di misura e preparazione dei composti chimici è stata condotta presso i laboratori di ARC - Centro Ricerche Applicate s.r.l. e il laboratorio di BioDevices del dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università degli Studi di Padova.

# IL CAMPYLOBACTER

## 1.1 IL BATTERIO

Il Campylobacter è tra le cause più importanti e diffuse di problematiche intestinali e risulta essere circa da 2 a 7 volte più frequente di Salmonella, Shigella o Escherichia coli [1].

Genere batterico identificato come patogeno nell'uomo già nel 1973 [2], il Campylobacter è, tutt'ora, tra le principali cause di gastroenterite nel mondo. In particolare, è responsabile di coliti e infiammazioni intestinali che prendono il nome di campylobatteriosi e che, talvolta, possono comportare conseguenze più gravi e durature, rendendo così il Campylobacter un significativo problema di salute pubblica [3]. In Europa<sup>1</sup>, la campylobatteriosi si classifica come la più comune delle infezioni del tratto gastrointestinale dal 2005: nel 2019 il numero di infezioni dovute a Campylobacter confermate è stato di 220'682, corrispondente ad un tasso di occorrenza di 59.7 casi ogni 100'000 abitanti, con una tendenza di insorgenza che si è mantenuta stabile negli ultimi anni. Pur evidenziando che nelle aree più sviluppate del mondo il numero di campylobatteriosi registrate recentemente sia leggermente declinato, le conseguenze dell'infezione continuano a non essere trascurabili soprattutto a livello di costi sanitari: in tutta l'Unione Europea, infatti, nel solo 2019 si sono rese necessarie più di 20'000 ospedalizzazioni dovute all'infezione comportando un'ingente spesa per le cure mediche [4].

Nazione	2019			2018		2017	
	Casi totali	Casi confermati e rapporti		Casi confermati e rapporti		Casi confermati e rapporti	
		Casi	Rapporti	Casi	Rapporti	Casi	Rapporti
<b>Austria</b>	6.573	6.573	74,2	7.999	90,7	7.204	82,1
<b>Belgio</b>	7.337	7.337	64,0	8.086	70,9	8.649	76,2
<b>Bulgaria</b>	231	229	3,3	191	2,7	195	2,7
<b>Croazia</b>	1.732	1.722	42,2	1.965	47,9	1.686	40,6
<b>Cipro</b>	21	21	2,4	26	3,0	20	2,3
<b>Rep. Ceca</b>	23.169	22.894	215,0	22.895	215,8	24.326	230,0
<b>Danimarca</b>	5.402	5.402	93,0	4.559	78,9	4.255	74,0
<b>Estonia</b>	348	347	26,2	411	31,2	285	21,7
<b>Finlandia</b>	4.382	4.382	79,4	5.099	92,5	4.289	77,9
<b>Francia</b>	7.712	7.712	57,5	7.491	56,0	6.579	49,2
<b>Germania</b>	61.526	61.254	73,8	67.585	81,6	69.251	83,9
<b>Grecia</b>	366	366	3,4	357	3,3	.	.
<b>Ungheria</b>	6.441	6.400	65,5	7.117	72,8	7.807	79,7
<b>Irlanda</b>	2.776	2.776	56,6	3.044	63,0	2.779	58,1
<b>Italia</b>	1.633	1.633	-	1.356	-	1.060	-

---

<sup>1</sup> Dati aggiornati al 2019

<b>Lettonia</b>	133	133	6,9	87	4,5	59	3,0
<b>Lituania</b>	1.225	1.221	43,7	919	32,7	990	34,8
<b>Lussemburgo</b>	271	271	44,1	625	103,8	613	103,8
<b>Malta</b>	298	278	56,3	333	70,0	231	50,2
<b>Paesi Bassi</b>	3.415	3.415	34,1	3.091	34,6	2.890	32,5
<b>Polonia</b>	715	715	1,9	719	1,9	874	2,3
<b>Portogallo</b>	942	887	8,6	610	5,9	596	5,8
<b>Romania</b>	805	805	4,1	573	2,9	467	2,4
<b>Slovacchia</b>	7.829	7.690	141,1	8.339	153,2	6.946	127,8
<b>Slovenia</b>	1.085	1.085	52,1	1.305	63,1	1.408	68,2
<b>Spagna</b>	9.723	9.723	-	18.411	-	18.860	-
<b>Svezia</b>	6.693	6.693	65,4	8.132	80,4	10.608	106,1
<b>Regno Unito</b>	58.718	58.718	88,1	65.246	98,4	63.267	96,1
<b>Totale UE</b>	<b>221.501</b>	<b>220.682</b>	<b>59,7</b>	<b>246.571</b>	<b>64,1</b>	<b>246.194</b>	<b>64,9</b>
<b>Islanda</b>	136	136	38,1	145	41,6	119	35,2
<b>Norvegia</b>	4.154	4.154	78,0	3.668	69,3	3.883	73,8
<b>Svizzera</b>	7.223	7.223	84,0	7.675	90,1	7.219	85,4

Tabella 1. Casi di infezione da *Campylobacter* in Europa relativi aggiornati al 2019

Sono state identificate numerose specie di *Campylobacter* diffuse nelle diverse aree del mondo con una differente patogenicità. La specie più comune e maggiormente responsabile delle acute infezioni enteriche tipiche della campylobatteriosi è il *Campylobacter jejuni*, causa di circa 80-85% dei casi, seguita da *C. coli*, che invece è responsabile di un ulteriore 10-15%. Altre specie di *Campylobacter* (tra le quali vi sono *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. fetus*) risultano essere più rare e solitamente isolate in specifiche aree del mondo [3] [1].

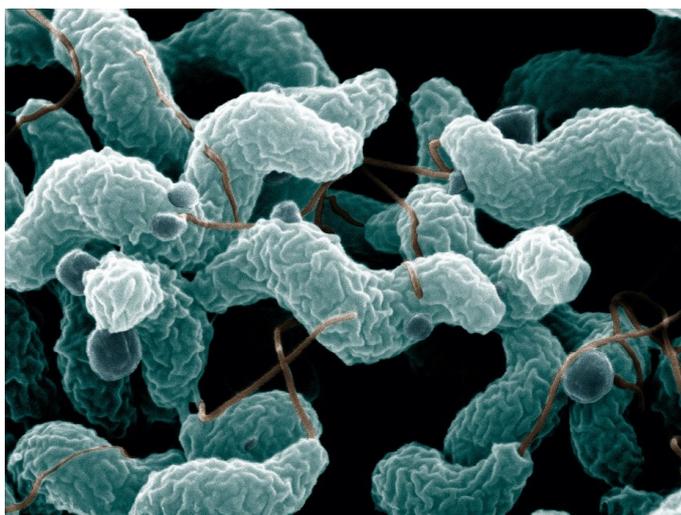
### 1.1.1 *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

Il *Campylobacter jejuni* (fig. 1) è la specie più diffusa e associata con lo sviluppo della successiva campylobatteriosi, patologia caratterizzata da disturbi al tratto gastroenterico che si manifestano con dissenteria, febbre e dolori addominali. In alcuni casi può comportare l'insorgenza di una malattia autoimmune: la sindrome di Guillain-Barré [5]. Il batterio è stato rilevato principalmente negli uccelli selvatici o domestici. In particolare, trova un ambiente molto favorevole al suo sviluppo negli allevamenti di pollame, spesso legato alle condizioni in cui gli esemplari vivono, e nelle risorse di acqua naturali [6].

Il *C. jejuni* è un batterio gram-negativo, con un genoma di circa  $1.68 \times 10^6$  bp totali, microaerofilo, termofilo, a forma spiraleica con dimensioni che variano da qualche decimo di  $\mu\text{m}$  a qualche  $\mu\text{m}$  e presenta un flagello che ha ruolo sia nel movimento che nell'infezione. Quest'ultima, nello specifico, avviene a livello della parete intestinale [7]. La sopravvivenza del batterio al di fuori dell'ambiente intestinale è molto bassa e

la sua replicazione non prosegue in modo intenso. La temperatura più adatta per il suo sviluppo è compresa, infatti, tra i 37 e i 42°C. Di conseguenza, dal momento che la temperatura corporea dei polli è approssimativamente di 42°C, il loro tratto intestinale risulta essere un ottimo territorio per la proliferazione. Temperature inferiori ai 30°C, al contrario, limitano alquanto la sua capacità replicativa [8] [6]. Il *C. jejuni*, inoltre, prolifera al meglio in ambienti poveri di ossigeno con atmosfera composta da 5% di O<sub>2</sub>, 10% di CO<sub>2</sub> e 85% di N<sub>2</sub> ed appare piuttosto sensibile a congelamento, essiccazione e acidità e salinità [6].

Essendo la sua dose infettiva è compresa tra i 500 e i 10'000 organismi [8] e l'ambiente di sviluppo nell'intestino di esemplari di pollame particolarmente favorevole, la maggior parte della carne di pollo destinata alla produzione industriale risulta contaminata, con una conta batterica che può arrivare fino a 10<sup>3</sup> organismi per 100g di prodotto, soprattutto per pelle e frattaglie che sono le parti delle carcasse con la maggior carica batterica [6]. È, dunque, dalla contaminazione delle carni durante il macello che il *Campylobacter jejuni* giunge fino all'uomo, dove, una volta insediato nell'intestino, resta in incubazione per un periodo variabile fino a sfociare in campylobatteriosi [8].



*Figura 1. Campylobacter jejuni*

## 1.2 ASPETTI CLINICI

La conseguenza più comune e frequente dell'infezione da *Campylobacter* è una patologia intestinale acuta i cui sintomi principali sono dissenteria e dolore addominale, accompagnati da febbre, mal di testa e astenia. Solitamente, la malattia si sviluppa nei due o tre giorni successivi alla contaminazione, che avviene attraverso l'ingestione di alimenti derivati da organismi infetti non accuratamente trattati, e perdura all'incirca una settimana dopodiché appare risolversi da sola nella maggior parte dei casi. In comparazione con altre infezioni batteriche alimentari come salmonellosi o shigellosi, gli effetti della campylobatteriosi tendono ad essere meno prominenti, con minor eventi febbrili e sintomi generali, ma con una tendenza superiore alla ricorrenza nel caso in cui non si sia prevista un'adeguata terapia [3]. Il trattamento principale della patologia, dunque, richiede semplice supporto per il mantenimento dell'idratazione e il bilanciamento degli elettroliti durante la fase acuta dell'infezione. Tuttavia, soprattutto in caso di preesistenti condizioni cliniche più complesse come pazienti immunodepressi o gravidanze, l'infezione può rivelarsi più persistente e duratura. In tali casi il trattamento viene coadiuvato da una terapia antibiotica. Nell'ultimo periodo, però, l'uso incontrollato di antibiotici sugli animali ha reso possibile lo sviluppo di *Campylobacter* resistenti rendendo così necessaria l'adozione di farmaci alternativi [1] [8].

Analizzando più approfonditamente le manifestazioni cliniche di una campylobatteriosi emerge che esse sono piuttosto varie e dipendenti dal soggetto in cui essa si sviluppa. Mentre i sintomi più comuni appaiono essere analoghi a quelli di un'inflammatione intestinale acuta uniti a febbre anche alta nel 90% dei pazienti, un buon 50% dei soggetti infetti risulta essere asintomatico [1]. Tuttavia, si sono anche registrati casi nei quali la campylobatteriosi è stata causa di successive setticemie e morti [3] [8]. È d'obbligo evidenziare che, sebbene di rado, la presenza di *Campylobacter jejuni* nell'uomo può produrre delle conseguenze post-infezione innescando alcune patologie come artrite, la sindrome di Reiter e soprattutto la sindrome di Guillain-Barré [3] [1] [8] (malattia acuta demielinizzante del sistema nervoso periferico). In particolare, queste complicanze insorgono in pazienti con un quadro clinico già compromesso, in infanti o anziani, arrivando a portare il tasso di mortalità per *Campylobacter* a 0.05 eventi su 100 infezioni [1].

Differente è invece la risposta dell'organismo animale: nei polli, infatti, l'infezione procede in maniera molto diversa rispetto all'uomo. Tipicamente, la presenza di *Campylobacter* negli esemplari non comporta sintomi e un'analogia risposta infiammatoria, nonostante l'intestino infetto possa arrivare a contare colonie batteriche estremamente popolate con  $10^{10}$  unità per grammo [7].

Una tale disparità di comportamento e le conseguenze dell'infezione nell'uomo fanno sì che sia necessario rilevare la presenza di *Campylobacter* negli allevamenti e nelle carni destinate al consumo per poter prendere adeguate precauzioni ed evitarne la trasmissione all'uomo stesso.

### 1.3 TRASMISSIONE E INCIDENZA

Il *Campylobacter jejuni* è una delle principali cause di malattie batteriche dovute al consumo di carne animale, in particolare di pollame. Le maggiori fonti della diffusione di questo patogeno sono gli allevamenti, dove il batterio risulta presente e prolifera sia nelle fasi antecedenti alla macellazione che successivamente ad essa. Il *Campylobacter* risulta perciò in grado di entrare nella catena alimentare umana attraverso il consumo di carne di pollo, soprattutto se l'ingestione avviene senza un'adeguata cottura o a seguito di un contatto con carne cruda contaminata [3].

Nel pollame, il batterio colonizza l'intestino, ma raramente ciò comporta una sintomatologia evidente nell'esemplare che resta altresì asintomatico fino all'età del macello [3] [7]. Il *Campylobacter*, tuttavia, risulta essere piuttosto infettivo e prolifico ed è in grado di diffondersi rapidamente negli allevamenti fino ad arrivare a contaminarne l'intera popolazione. Tale propagazione viene esacerbata dalle condizioni di vita degli animali, dalla cross-contaminazione tra esemplari vivi e carcasse che avviene durante il macello e dalla non rimozione della pelle durante la lavorazione della carne [3].

Risulta, quindi, necessario rilevare prontamente la presenza del patogeno negli allevamenti e nelle partite di pollame destinate al macello e durante la loro elaborazione per poter contenere la diffusione del *Campylobacter* e ridurre l'incidenza nell'uomo.

Si stima che una sola goccia di secreto da un pollo infetto possa contenere fino a 500 organismi batterici. Di conseguenza, se non adeguatamente trattate le sue carni diventano il veicolo principale di trasmissione del batterio all'uomo. Altri alimenti che possono fungere da tramite tra *Campylobacter* e uomo risultano essere latte non pastorizzato, salsicce o carne rossa e acque contaminate. La dose necessaria per indurre l'infezione nell'uomo è abbastanza bassa. Bastano infatti solo 500-800 organismi per dare inizio alla colonizzazione batterica [7].

Prema specificare, inoltre, un diverso comportamento del batterio tra paesi sviluppati e in via di sviluppo. Nei paesi in via di sviluppo l'infezione avviene principalmente in infanti in assenza di sintomi o con semplice dissenteria, mentre nei paesi sviluppati l'asintomaticità è più rara [1] [7]. Nei paesi sviluppati il *campylobacter* appare avere una stagionalità, essendo più prolifero

durante l'estate rispetto che all'inverno, caratteristica che invece non si rileva nei paesi in via di sviluppo [1].

Il controllo della contaminazione da *Campylobacter* in fase di produzione degli alimenti, dunque, costituisce un mezzo efficace per ridurre l'ingresso del batterio nell'uomo. Corrette misure igieniche durante l'allevamento e la produzione di carni sono fondamentali per abbassare il tasso di infezione nel pollame, nonostante risulti praticamente impossibile eliminare totalmente la colonizzazione intestinale anche adottando con misure molto severe. Si rivela quindi estremamente necessario un metodo efficace per rilevarne la presenza per poter intervenire di conseguenza.

#### 1.4 RILEVAMENTO DEL PATOGENO

Il riconoscimento della presenza di *Campylobacter* in allevamenti di pollame destinati al macello e durante le varie fasi di produzione ed elaborazione delle carni è fondamentale per poterne isolare gli esemplari contagiosi, o trattarli adeguatamente in modo da ridurre il più possibile la presenza del batterio in essi, evitandone, così, la trasmissione all'uomo.

Esistono numerosi metodi applicabili per il rilevamento di un patogeno. In genere gli approcci utilizzati per il *Campylobacter* sono basati su coltura batterica o su metodi biochimici e molecolari come PCR e saggi immunologici. In aggiunta, durante l'elaborazione del campione in laboratorio per confermare la presenza del batterio e identificarne la specie, spesso si fa uso di ulteriori tecniche di analisi [4].

Di seguito vengono brevemente elencati i principali metodi di analisi dei campioni.

##### 1.4.1 COLTURA BATTERICA

I metodi basati sulle colture batteriche costituiscono la maggior parte degli approcci convenzionali per il rilevamento di patogeni e sono lo standard applicativo in tutto il mondo, nonostante vi siano nuove e sempre più emergenti tecnologie.

L'uso della coltura batterica trova la sua origine con Robert Koch e la sua serie di regole che prende il nome di postulati di Koch. Essi sono un elenco di regole atte a determinare se un dato microorganismo è causa di malattia o meno; in particolare, uno di questi postulati afferma che l'organismo deve essere in grado di sopravvivere e accrescersi al di fuori dell'ospite umano affinché possa essere considerato come patogeno. È da qui che i saggi sui patogeni basati sulla conta delle colonie batteriche coltivate hanno inizio. Il metodo è piuttosto semplice nell'esecuzione e prevede di predisporre una serie di diluizioni della coltura del batterio target disponendole su piastre di coltura preparate

con agar come mezzo di coltura (fig. 2). Le piastre sono poi incubate a 37°C per far accrescere i batteri. Dopo circa 24-48 ore è già possibile vedere le colonie batteriche formarsi sul mezzo di agar. Il numero di queste colonie viene contato entro 5-7 giorni dalla loro formazione valutando la popolazione tramite il numero di unità formanti le colonie (CFU), calcolato come prodotto tra il numero di colonie rilevate e il fattore di diluizione diviso il volume di coltura [9].

Nonostante la sua efficacia e sensibilità e i differenti approcci implementati, la tradizionale coltura batterica presenta delle limitazioni. È poco capace nell'identificare tutti i batteri presenti in un dato campione e, se comparata con più nuove tecnologie come la PCR e i biosensori, le sue prestazioni risultano alquanto insoddisfacenti. In aggiunta, richiede un dispendio di tempo che si scontra decisamente con la necessità di una risposta immediata delle applicazioni industriali, e risulta scarsamente utilizzabile al di fuori di laboratori specializzati in assenza di personale qualificato.



Figura 2. Coltura di *Campylobacter jejuni*

#### 1.4.2 SAGGI IMMUNOLOGICI

I saggi immunologici sono strumenti diagnostici largamente usati sia in medicina che nei processi industriali di controllo qualità, essendo in grado di rilevare e quantificare determinati antigeni presenti in un dato campione tramite la presenza di anticorpi monoclonali o policlonali specifici per il target.

Tali test si basano sull'abilità di un anticorpo di legarsi specificamente a un solo antigene e sfruttano questo concetto per rilevare anche piccole quantità di antigene target nel campione. In particolare, i test *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) usano antigeni e anticorpi marcati con enzimi per rilevare specifiche biomolecole

tramite lettura colorimetrica. Nella procedura standard, denominata ELISA diretto (fig. 3a), l'antigene in soluzione viene immobilizzato sulla superficie della piastra per adsorbimento e viene messo in contatto con il suo specifico anticorpo marcato da un enzima. Successivamente, in soluzione viene introdotto un substrato con il quale l'enzima andrà a reagire, inducendo, così, una variazione di colore dal cui livello di intensità si dedurrà la quantità di antigene inizialmente presente sulla piastra.

Sebbene il passaggio di immobilizzazione dell'antigene o dell'anticorpo direttamente sulla superficie resti come principio della procedura, in base alle applicazioni esistono numerose versioni del test ELISA, come il test indiretto e il test sandwich (fig. 3b). In particolare, quest'ultimo prevede l'immobilizzazione diretta sulla superficie dell'anticorpo primario per l'antigene target; dopo di che in soluzione viene aggiunto il campione in modo che l'antigene presente si leghi specificamente al suo anticorpo. A seguito delle procedure di lavaggio, un secondo anticorpo marcato con un enzima viene inserito andando a legarsi all'antigene. In tale modo, si formano due strati di anticorpi: uno primario, sotto l'antigene, e uno secondario, marcato con label enzimatica al di sopra di esso. Infine, in soluzione viene aggiunto il substrato per la reazione con l'enzima, dal cui cambiamento di colore si misurerà la concentrazione di antigene nel campione.

Nonostante quest'approccio sia particolarmente efficiente nell'identificare anche di basse quantità di target e non risulti particolarmente costoso da effettuare, vi sono alcune limitazioni che ne rendono l'uso poco pratico. È necessario, infatti, conoscere l'anticorpo o l'antigene reciproco del target che si vuole andare a rilevare; occorre, inoltre, considerare la presenza di legami non specifici che si possono formare sulla superficie e che possono indurre risultati falsati. Infine, la lettura colorimetrica basata sulla reazione enzimatica può non essere accurata dal momento che il colore ottenuto persiste e con lo scorrere del tempo non riflette più il quantitativo di anticorpi presenti, portando conclusioni erranee [10].

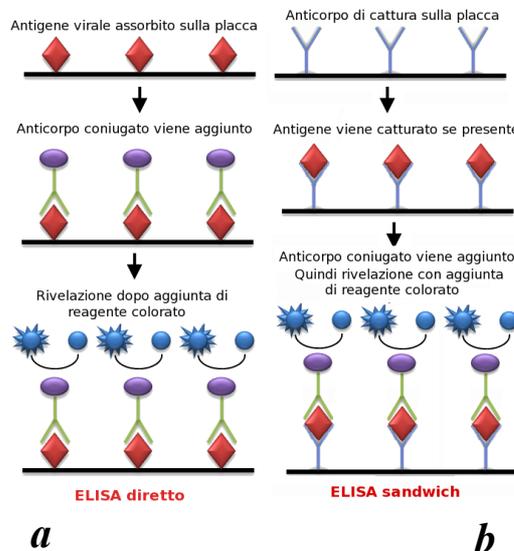


Figura 3. Procedure test ELISA diretto e sandwich a confronto

### 1.4.3 SEQUENZIAMENTO E PCR

L'applicazione di metodi derivati dalle biotecnologie per il riconoscimento della presenza di DNA patogeno in un campione è, fino ad oggi, l'approccio più utilizzato, anche se comporta costi rilevanti ed elaborazioni che lo rendono difficilmente realizzabile al di fuori dei laboratori [3].

Il sequenziamento si basa sulla determinazione della precisa sequenza di nucleotidi in un campione di DNA tramite l'uso di elettroforesi su gel per la lettura. Uno dei primi metodi implementati per questo approccio nonché uno dei più efficaci è il metodo di Sanger (fig. 4) che si basa sull'iniziale sintesi di copie del frammento di DNA di interesse tramite l'uso di un vettore batterico e di un primer in modo da indurre la DNA polimerasi a replicare il template. Durante questa fase, oltre che a normali nucleotidi, vengono inseriti in soluzione anche dei particolari nucleotidi di-deossidati legati a una label fluorescente. Essendo di-deossidati essi non presentano il gruppo OH sul deossiribosio; a tale modo nella fase di elongazione della catena da parte della DNA polimerasi talvolta vengono incorporati questi ultimi al posto di quelli normali. L'assenza del gruppo OH impedisce l'attaccamento di un nuovo nucleotide alla catena in allungamento facendone terminare la sintesi; al completamento di questa procedura si saranno ottenuti quindi numerosi frammenti di diversa lunghezza sintetizzati a partire dal template iniziale. Il sequenziamento vero e proprio avviene, infine, tramite la separazione dei frammenti per dimensione decrescente grazie all'elettroforesi su gel e

la successiva lettura della sequenza di basi dallo spettro di emissione dei nucleotidi terminali per mezzo di un software.

Da questa iniziale soluzione, con il tempo, sono stati individuati nuovi metodi più innovativi con l'obiettivo di automatizzare sempre di più il sequenziamento, passando a una clonazione del frammento senza l'utilizzo di vettori batterici e a una maggior rapidità seppur perdendone in accuratezza e lunghezza di lettura. Tali tecnologie, quali ad esempio *Ion Torrent*, *Illumina* e *Roche/454*, si basano inizialmente sullo stesso principio di Sanger, utilizzando una prima fase di amplificazione e frammentazione, ma vi differiscono per la tecnica di amplificazione e per l'analisi dei dati, dal momento che implementano l'uso della PCR e utilizzano diverse procedure di ricostruzione della sequenza [11]. Nonostante con questi metodi sia possibile effettuare un completo sequenziamento dell'intero genoma presente in un campione reale, dunque di rilevare sia il genoma del paziente che quello di tutti i patogeni presenti nel microbiota, il loro uso e la strumentazione necessaria risultano piuttosto dispendiosi soprattutto per i piccoli laboratori rendendoli quindi difficilmente implementabili.

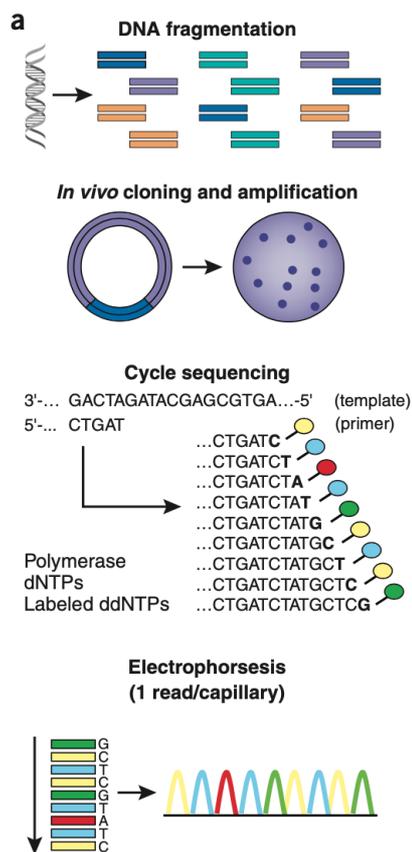


Figura 4. Sequenziamento con metodo di Sanger

La tecnologia alla base dei più recenti approcci di sequenziamento è la PCR (fig. 5), una tecnica di amplificazione del DNA piuttosto semplice sviluppata a partire dagli anni '80 da parte del biochimico Kary Mullis. I fondamenti di tale processo sono l'isolamento, l'amplificazione e la quantificazione di corte catene di DNA. Si rivela per tanto molto adatta all'identificazione di materiale genetico di batteri specifici all'interno di campioni biologici.

La PCR non utilizza cellule batteriche come vettori ai fini dell'amplificazione del frammento di DNA target, bensì viene effettuata direttamente in vitro ed è basata sul principio di replicazione del DNA utilizzando un enzima polimerasi termostabile (*Taq polymerase*) e dei primer selezionati appositamente per lo specifico template di DNA dal quale si desidera partire. Il processo ciclico prevede la ricorrenza di tre passaggi:

1. Denaturazione: la soluzione contenente DNA target, primer, i quattro nucleotidi e la polimerasi viene portata a 94-98°C per un minuto circa, in modo da far separare le catene doppie di DNA.
2. Annealing: la temperatura della soluzione viene riportata a 50-60°C per aiutare il primer a legarsi al DNA target.
3. Sintesi: ad una temperatura di circa 70-75°C ora, la polimerasi lega con il target tramite il primer e procede nell'estenderne la sequenza aggiungendo le basi corrispondenti elongando la stringa fino a riottenere catene doppie di DNA.

Quando la fase di sintesi è completata, il ciclo di PCR risulta completo e si riprende il processo dal primo passo. Ripetendo più volte questa sequenza di operazioni si ottiene l'amplificazione dello specifico frammento di DNA per il quale si è inserito il primer in soluzione. Al termine della PCR i risultati possono essere verificati tramite elettroforesi su gel, con il sequenziamento o con metodi di ibridazione.

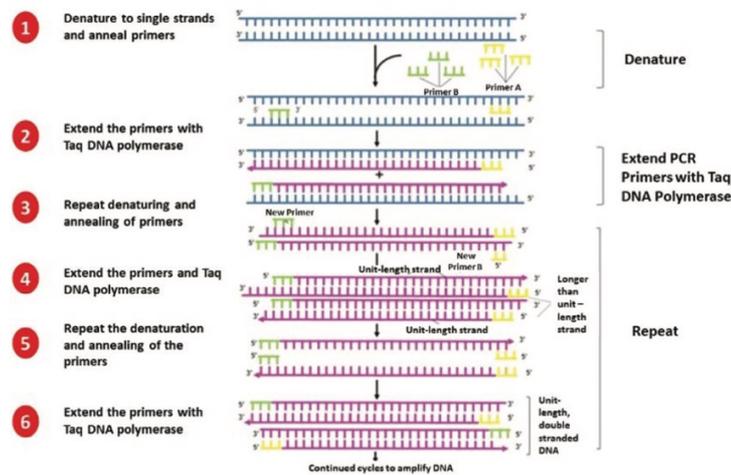


Figura 5. Fasi della PRC

Esistono numerose varianti della PCR, ciascuna adattata per specifiche applicazioni come ad esempio *multiplex PCR*, che viene usata per il rilevamento simultaneo di diversi organismi nello stesso campione tramite l'inserimento in soluzione di primer differenti, o *RT-PCR*, che prevede di partire da sequenze di RNA e di utilizzare una trascrittasi inversa per ottenere il DNA da amplificare.

*Real-time PCR* o *quantitative PCR* (qPCR) è una variante della tradizionale PCR con la quale si è in grado di ottenere la quantificazione dell'amplificazione del DNA in tempo reale grazie al rilevamento del segnale in fluorescenza emesso da coloranti o sonde (*probe*) marcate con label fluorescenti legate ai frammenti. La fluorescenza misurata risulta essere direttamente proporzionale al quantitativo di DNA amplificato presente fornendo così l'informazione in tempo reale e permettendo di eliminare i passi successivi di verifica del risultato.

La PCR è una tecnica molto utilizzata per rilevare patogeni in campioni biologici grazie alla sua precisione, sensibilità e rapidità; occorrono infatti appena dalle 5 alle 24 ore per ottenere un risultato completo e, per tanto, risulta più efficace rispetto a metodi di rilevamento tradizionali come la coltura. Tuttavia, vi sono delle limitazioni che rendono problematico l'uso della PCR. Innanzitutto, la PCR non riesce a distinguere tra DNA proveniente da cellule vive e quello proveniente da cellule morte, motivo per il quale, nel caso sia necessario, si preferisce usare la RT-PCR. In aggiunta, la polimerasi è piuttosto prona ad incorporare nucleotidi errati nella sequenza replicata e per struttura stessa del processo questi verranno inclusi nelle copie successive amplificando l'entità

dell'errore. Infine, la PCR risulta alquanto sensibile alle contaminazioni del campione che potrebbero quindi indurre un risultato errato e richiede la conoscenza preliminare dei primer specifici adatti per la sequenza target che dunque deve essere nota almeno in parte [9].

Nonostante, quindi, la sensibilità di questo metodo e la sua popolarità, il suo utilizzo comporta delle problematiche nonché una serie di costi ingenti che ne rendono la sua applicazione al di fuori dei laboratori di microbiologia poco pratica.

# I BIOSENSORI

## 2.1 DEFINIZIONE DEI BIOSENSORI

Un biosensore è un dispositivo in grado di fornire un segnale in output correlato alla concentrazione di una determinata sostanza target [12]. Il composto ricercato prende il nome di analita, mentre il dispositivo che lo rileva è costituito da due elementi distinti: un elemento di rilevamento e un trasduttore. L'elemento di rilevamento, che spesso è di origine biologica, è utile per il riconoscimento dell'analita e viene incorporato nel biosensore in modo che in presenza della sostanza target avvenga un determinato evento; quest'ultimo è poi convertito dal trasduttore in un segnale misurabile, proporzionale all'entità dell'evento di riconoscimento stesso.

Gli studi sui biosensori sono in rapida espansione e il loro mercato è in costante ascesa, soprattutto nelle aree più sviluppate del mondo per via dei numerosi vantaggi di utilizzo. Infatti, permettono un rapido e affidabile riconoscimento dell'analita di interesse con costi relativamente contenuti e con strumentazioni di dimensioni ridotte adatte all'applicazione sul campo [13].

Esistono diverse tipologie di biosensori che differiscono tra loro sia per l'elemento di rilevamento che per il metodo di trasduzione utilizzato. Un'ulteriore suddivisione viene definita dal metodo di rilevamento dell'analita: diretto o indiretto [14].

### 2.1.1 TRASDUTTORI ELETTROCHIMICI

I biosensori basati su trasduttori elettrochimici sono comunemente utilizzati per il rilevamento di eventi di ibridazione di DNA, farmaci e composti che legano con il DNA, nonché per il monitoraggio della concentrazione di glucosio.

Essi usano come parametro di misura per la rilevazione la variazione delle proprietà elettriche di una soluzione a seguito di una reazione chimica che produce o consuma ioni o elettroni inducendo, così, uno scambio di carica all'interfaccia tra l'elettrodo e la soluzione.

I biosensori elettrochimici possono essere classificati in base ai parametri elettrici misurati come impedimetrici, amperometrici e potenziometrici.

- **Impedimetrici.** Sono basati sulla variazione di impedenza, conduttanza o resistenza elettrica a seguito durante reazione elettrochimica che produce ioni o elettroni. Misurano il valore di impedenza elettrica in risposta ai piccoli segnali come rapporto della corrente sul potenziale all'applicazione di un voltaggio sinusoidale a diverse

frequenze tramite tecniche EIS (electrochemical impedance spectroscopy). Si osserva una forte crescita nell'uso di biosensori impedimetrici usati per esaminare numerosi analiti con l'utilizzo di un ampio range di biomolecole come elementi di riconoscimento. Tra queste si annoverano enzimi, anticorpi e DNA [15].

- **Amperometrici.** Il parametro su cui operano è quantità di corrente prodotta da una reazione di ossidoriduzione all'applicazione di una differenza di potenziale tra gli elettrodi del sensore. Se la differenza di potenziale applicata è fissa la tecnica di misura usata è l'amperometria, mentre se è variabile si utilizza la voltammetria [16].
- **Potenzimetrici.** Misurano la variazione di potenziale dovuta alla variazione di concentrazione di specie ioniche. Sono in grado di rilevare la variazione di protoni o di altri ioni nella soluzione e di correlarla in modo logaritmico alla concentrazione di analita generando la risposta. Una particolare applicazione di questa trasduzione ione-selettiva è implementata nei più recenti sensori con transistor ad effetto di campo (ISFET) [17].

### 2.1.2 TRASDUTTORI OTTICI

I biosensori basati su trasduttori ottici sono tra stati i primi disponibili sul mercato già all'inizio degli anni '80 del secolo scorso e permettono lo studio di campioni biologici tramite le loro proprietà fotometriche. Il risultato dell'analisi con trasduttori ottici può venire misurato per mezzo della variazione di luce assorbita, come nella spettrofotometria UV-Vis, o con la variazione di luce emessa, come nelle tecniche a emissione di fluorescenza e chemiluminescenza. Un'altra tecnica utilizzata per questi dispositivi consiste nella diffrazione ottica. Vengono preparati dei wafer di substrato solido nei quali si realizzano degli intagli paralleli ripetuti con un determinato passo ricoprendoli, successivamente, con un sottile film riflettente di alluminio o oro. La superficie così trattata viene fatta incidere da un fascio di luce misurando la differenza di percorso tra i raggi riflessi prodotti dalla diffrazione.

Altra tecnologia ottica molto diffusa [18] è la risonanza plasmonica di superficie (SPR) che si basa sull'interazione tra la luce e gli elettroni di conduzione superficiali di un metallo. Un fascio di luce incide sulla superficie andando ad eccitarne gli elettroni di conduzione e trasferendo loro parte della sua energia. Si generano, di conseguenza, delle onde legate alla superficie che prendono il nome di onde plasmoniche di risonanza, che si propagano su di essa fino alla dissipazione. Dal momento che la distanza di decadimento dell'onda plasmonica è strettamente legata alla costante dielettrica della

superficie, si possono realizzare biosensori in grado di rilevare la presenza di un analita misurando la variazione dell'angolo di risonanza.

### 2.1.3 ALTRI TRASDUTTORI

Altre tipologie di trasduttori utilizzate sono i trasduttori termici e piezoelettrici [19].

L'uso di materiali piezoelettrici permette di implementare dei sensori che, se sottoposti a pressione, generano sulla superficie del cristallo piezoelettrico usato una carica netta proporzionale allo stimolo meccanico ricevuto. La carica prodotta viene poi misurata garantendo così la trasduzione del segnale.

I trasduttori termici sfruttano l'assorbimento o la produzione di calore durante una reazione chimica in presenza dell'analita di interesse, misurando i cambiamenti di temperatura indotti. I sensori sono realizzati in modo che la variazione di temperatura rilevata, proporzionale alla concentrazione dell'analita, origini una differenza di potenziale che può quindi essere facilmente misurata.

## 2.2 INTERFACCIA DEI TRASDUTTORI ELETTROCHIMICI

L'interfaccia è definita come la regione di separazione tra due fasi fisiche diverse e costituisce una discontinuità nelle proprietà chimico-fisiche del sistema.

In un trasduttore elettrochimico, le due fasi a contatto sono, di solito: un metallo, dove le cariche mobili sono elettroni liberi, e una soluzione, nella quale le cariche mobili sono ioni disciolti in una soluzione elettrolitica.

Nella fase liquida, le molecole più vicine alla discontinuità prendono il nome di interfase. In questa porzione della soluzione si verificano condizioni anisotrope ed eterogenee che danno luogo ad elettrificazione con conseguente generazione di un campo elettrico. Nel metallo, invece, la parte interessata da tali cambiamenti è molto più piccola. Entrambe le regioni dei componenti più distanti, dunque non interessate dalle variazioni di proprietà, prendono il nome di bulk.

La presenza di cariche mobili vicino all'interfaccia determina un trasferimento di carica attraverso di essa. In questo modo si innesca un processo di ossidoriduzione sulla superficie dell'elettrodo. In particolare, solo gli elettroni hanno la capacità di attraversare la discontinuità rendendo quindi il passaggio uno scambio di carica elettronico.

Durante il processo redox, gli elettroni liberi che si trovano nella regione superficiale del metallo passano in soluzione venendo acquisiti agli orbitali degli ioni, causandone la riduzione. Viceversa, l'ossidazione avviene nel momento in cui gli elettroni lasciano gli orbitali ionici per

tornare al metallo. Le correnti scambiate nelle due direzioni diventano uguali quando la reazione raggiunge l'equilibrio al potenziale standard di ossidoriduzione  $E_0$ , specifico per ogni elettrolita in soluzione e definito rispetto al potenziale dell'elettrodo usato come riferimento. Comprendere il comportamento delle specie presenti all'interfaccia elettrodo/soluzione è, dunque, molto importante per caratterizzare i sensori. È proprio per questo motivo che, da quando sono iniziati gli studi in tale ambito, sono stati elaborati modelli di differente complessità e completezza con lo scopo di definirne il layout e spiegarne i fenomeni.

### 2.2.1 MODELLO DI HELMHOLTZ

Dal momento che all'interfaccia è presente un campo elettrico, tra le due fasi appare anche una differenza intrinseca di potenziale elettrico. Il primo modello sviluppato per descrivere tale comportamento è il modello di Helmholtz che consiste nel rappresentare l'interfaccia come un condensatore piano. Le due facce del condensatore sono realizzate una sulla superficie del metallo, l'altra nel luogo dei centri degli ioni in soluzione che sono a diretto contatto con la superficie stessa, mentre la regione di interfase tra esse viene definita double layer.

La densità di carica sulle sue facce è, dunque, uguale ed opposta  $\sigma_{metallo} = -\sigma_{soluzione}$  e la sua capacità viene definita analogamente alla capacità di un condensatore.

$$C_{dl} = \frac{\partial \sigma}{\partial V} = \frac{\epsilon \epsilon_0}{d}$$

*Equazione 1. Capacità di double layer*

### 2.2.2 MODELLO DI GOUY-CHAPMAN

Il modello di Helmholtz, però, presenta delle limitazioni poiché considera la capacità dipendente solo dalla costante dielettrica della soluzione e dallo spessore del layer, senza considerare i fenomeni diffusivi di adsorbimento e di interazione dei momenti di dipolo ionici. Per ovviare a questi vincoli, Gouy e Chapman hanno realizzato un modello che introduce un double layer diffusivo la cui struttura può essere quantitativamente descritta tramite l'equazione di Poisson-Boltzmann. La variazione di potenziale all'interfaccia diventa, perciò, esponenziale e in funzione della distanza dall'elettrodo.

$$\nabla^2 \Psi_i(r) = -\frac{1}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \sum_i \left\{ n_i(z_i e) e^{\left( -\frac{z_i e \Psi_i(r)}{K_B T} \right)} \right\}$$

*Equazione 2. Equazione di Poisson-Boltzmann*

### 2.2.3 MODELLO DI STERN

Un'ulteriore modifica al modello di interfaccia è stata introdotta da Stern, che tiene conto anche della presenza di ioni adsorbiti sulla superficie. Il nuovo modello, quindi, prevede la presenza di due strati: uno diffuso, analogo al precedente, e uno interno, dove vi sono gli ioni a diretto contatto con il metallo.

Il modello di Stern, tuttavia, considera le interazioni che avvengono come coulombiane, la viscosità e la costante dielettrica dell'interfase come costanti, e da ultimo assume le cariche ioniche come puntuali. Per via di queste limitazioni, è stato sviluppato un modello successivo.

### 2.2.4 MODELLO DI GRAHAME

Il modello di Grahame prende in considerazione anche gli ioni solvatati vicino all'elettrodo. Di conseguenza, all'interfaccia si hanno tre regioni: lo strato interno di Helmholtz, che modella gli ioni specificamente adsorbiti dalla superficie, lo strato esterno di Helmholtz, dove sono gli ioni solvatati vicino alla superficie e, infine, lo strato diffuso che occupa tutto il resto dell'interfase. Le regioni interna ed esterna, inoltre, sono ciascuna delimitata dal luogo dei centri degli ioni che le compongono.

### 2.2.5 MODELLO BDM

L'ultimo modello (proposto da Bockris, Devanathan e Müller da cui BDM) mantiene la precedente struttura del double layer, ma include anche l'azione del solvente, considerando le sue molecole allineate in modo fisso sulla superficie a seconda del campo elettrico applicato. Vicino alla superficie vi è dunque un primo strato di solvente fortemente orientato per via del campo elettrico che causa una variazione della costante dielettrica.

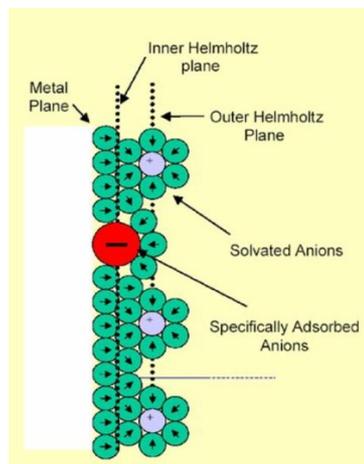


Figura 6. Schema modello BDM. Viene rappresentata l'interfaccia secondo il modello mettendone in evidenza i diversi piani che la costituiscono.

## 2.3 METODI DI MISURA PER BIOSENSORI ELETTROCHIMICI

Una cella elettrochimica può essere configurata in due modi principali a seconda dei valori di corrente misurati e della velocità di variazione della tensione imposta dall'esterno (*ramp rate*). Il primo set-up prevede una semplice struttura a due elettrodi, il Working (W) e il Reference (R), tra i quali viene imposta una tensione. La corrente che fluisce nel circuito viene quindi misurata attraverso gli elettrodi stessi.

La seconda tipologia di cella, invece, utilizza tre elettrodi: il Working, il Reference e il Counter (C). La tensione viene imposta tra il Working e il Reference da un potenziostato che, per mantenerne il valore costante, assorbe la corrente che fluisce nel circuito attraverso il Counter. Di conseguenza, il valore di corrente viene letto tra il Working e il Counter.

La scelta della configurazione dipende dal tipo di misura elettrochimica da effettuare. Il set-up a due elettrodi, infatti, non è adatto nel caso in cui si debbano applicare ampie variazioni di tensione, poiché questo indurrebbe alte correnti nella cella, che comporterebbero la polarizzazione degli elettrodi e uno scambio di carica non faradico. È opportuno, per tanto, scegliere configurazioni a tre elettrodi se si desidera svolgere misure perturbative del sistema, come ciclo voltammetria o voltammetria a impulsi differenziali, mentre si può utilizzare la cella con soli due elettrodi nel caso di spettroscopia di impedenza elettrochimica (tecnica non perturbativa applicata nell'ambito dei piccoli segnali).

### 2.3.1 VOLTRAMMETRIA CICLICA

La voltammetria ciclica o ciclo voltammetria (CV) fa parte delle tecniche di misura voltammetriche ed è basata sull'applicazione consecutiva di due rampe lineari di potenziale (sweep): una crescente e una decrescente. Il potenziale viene applicato tra

Working e Reference di una cella elettrochimica a tre elettrodi in presenza di un elettrolita di supporto e di una specie elettroattiva. La risposta misurata assume una particolare forma che prende il nome di ciclovoltammogramma che mette in relazione la corrente rilevata con il potenziale imposto (fig. 7).

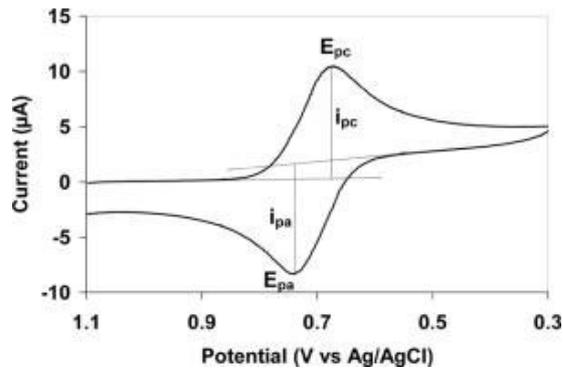


Figura 7. Esempio di ciclovoltammogramma

Nel momento in cui la prima sweep viene applicata, la tensione diventa sempre più negativa del potenziale standard di ossidoriduzione  $E_0$  e al Working, che agisce da catodo, avviene la reazione di riduzione della specie elettroattiva. Tale reazione prosegue fino al raggiungimento del potenziale di picco catodico  $E_{p,c}$ , in corrispondenza del quale si registra il picco di corrente di riduzione  $i_{p,c}$ . Successivamente, nonostante il potenziale continui ad allontanarsi da  $E_0$ , il valore di corrente inizia a decrescere dal momento che tutta la specie ossidata disponibile è stata ridotta, e si devono attendere le tempistiche dei processi diffusivi dal bulk affinché giunga nuova specie da ridurre sulla superficie dell'elettrodo.

Quando la prima sweep è completata e si è raggiunta la massima tensione, si inverte la direzione della rampa e, di conseguenza, anche la direzione della reazione al Working, che ora funge da anodo. Su quest'ultimo avviene il processo di ossidazione in modo analogo a precedente. La reazione prosegue con una tensione che diventa sempre più positiva di  $E_0$ , fino al raggiungimento del potenziale  $E_{p,a}$  in corrispondenza del quale si ha il picco di corrente di ossidazione  $i_{p,a}$ , dopo il quale tutta la specie ridotta disponibile è stata ossidata e si deve attendere un ricambio dal bulk.

I valori dei picchi di corrente anodica e catodica sono proporzionali alla concentrazione di specie ossidata o ridotta e seguono l'equazione di Randles-Sevcik:

$$i_p = 2.686 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

Equazione 3. Equazione di Randles-Sevcik, con  $C$ =concentrazione specie ossidata o ridotta,  $A$ =area dell'elettrodo,  $D$ =coefficiente diffusivo,  $n$ =numero di elettroni scambiati e  $v$ =sweep rate

Tramite voltammetria ciclica è possibile, inoltre, determinare la reversibilità di un processo redox valutando la forma del rispettivo grafico e verificando le seguenti condizioni:

- 1)  $|i_{p,a}|/i_{p,c} = 1$ , che implica che le specie devono essere tutte completamente ossidate o ridotte
- 2)  $\Delta E = E_{p,a} - E_{p,c} = 0.056V/n$
- 3)  $i_p \propto v^{1/2}$

### 2.3.2 DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY

La voltammetria a impulsi differenziali (*Differential Pulse Voltammetry*, DPV) è una tecnica derivante dalla voltammetria a scansione lineare.

La DPV si ottiene applicando ad una singola rampa lineare di tensione una serie periodica di impulsi di potenziale di ampiezza limitata tra 1 e 100 mV, e durata costante compresa tra 10 e 100 ms.

La rampa lineare comporta la presenza di una corrente DC alla quale si impone, tramite l'impulso, una corrente ulteriore, generando così un'intensità di segnale maggiore. Al fine di dissipare i contributi non faradici, la misura di esso viene poi ricavata tramite la differenza del valore di corrente immediatamente prima dell'impulso applicato e al termine di esso, definendo, quindi, un voltammogramma a forma di picco (fig. 8).

Le misure DPV sono piuttosto sensibili ai cambiamenti di corrente e permettono una precisa analisi delle reazioni ossidoriduttive all'elettrodo dal momento che estraggono solo le correnti faradiche.

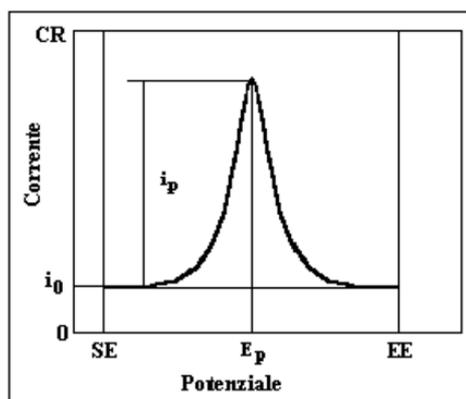


Figura 8. Esempio di voltammogramma per una DPV

### 2.3.3 ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY

La spettroscopia di impedenza elettrochimica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS) viene utilizzata per studiare la regione di interfaccia tra elettrodo e soluzione tramite misure di impedenza del sistema nel dominio delle frequenze.

Il concetto di impedenza è analogo a quello della resistenza elettrica, che viene definita tramite la legge di Ohm  $R = \frac{V(t)}{i(t)}$ . Tale legge, tuttavia, ha valenza solo per i resistori ideali. Per i casi reali il circuito risulta molto più complesso e non mantiene più un comportamento esclusivamente ohmico. Si sostituisce, perciò, la misura di resistenza del circuito con quella dell'impedenza, definita sempre come la misura dell'abilità del circuito di resistere al flusso di corrente elettrica dovuta ad un potenziale esterno applicato.

L'impedenza viene misurata tramite l'applicazione di una tensione esterna  $V_0$ , che determina la presenza di una corrente  $I_0$  nel circuito. A questa tensione DC viene imposta una piccola tensione  $\delta V$  sinusoidale (picco < 10 mV), che, a sua volta, impone sulla  $I_0$  una perturbazione  $\delta I$ . L'impedenza del circuito alla tensione  $V_0$  viene quindi calcolata in prima approssimazione come  $Z(\omega) = \frac{\delta V(\omega)}{\delta I(\omega)}$ .

Questa tecnica non risulta perturbativa del sistema poiché applica correnti abbastanza basse da non indurre polarizzazione negli elettrodi, di conseguenza è possibile utilizzare una cella con configurazione a due soli elettrodi.

La misura di impedenza viene ripetuta a differenti frequenze partendo dalle più alte, che possono raggiungere l'ordine del MHz, fino ad arrivare ai più bassi valori, compresi negli ordini di mHz e Hz. L'intervallo di frequenze utilizzato è dipendente dalla

specifica applicazione, ma occorre tenere in considerazione che più si abbassa la frequenza maggiore è il tempo necessario per eseguire la misura completa.

L'impedenza considera sia le proprietà resistive che quelle capacitive, dunque  $Z(\omega)$  ha due componenti: una reale resistiva, data dal contributo  $R$  con fase nulla, e una puramente immaginaria, data dal contributo  $\frac{1}{j\omega C}$  con fase pari a  $-\frac{\pi}{2}$ .

Il comportamento di una cella elettrochimica caratterizzata tramite EIS in presenza di mediatore redox ed elettrolita di supporto può essere modellato tramite un circuito equivalente, che prende il nome di cella di Randles (fig. 9). A tale modo, la curva sperimentale può essere fittata con lo spettro teorico ottenuto con il modello al fine di ricavarne i parametri elettrici. L'impedenza totale sarà quindi determinata dai contributi reali e puramente immaginari dei differenti componenti.

La cella di Randles modella con  $R_s$  e  $R_{el}$  rispettivamente il contributo della resistenza della superficie e della resistenza dell'elettrolita.  $C_{dl}$  definisce, invece, la capacità del double layer all'interfaccia, mentre  $R_{ct}$  è la resistenza faradica dovuta al trasferimento di carica per la reazione redox.

$W$  rappresenta l'elemento di Warburg, un contributo con componenti sia reali che immaginarie, che entra in gioco solo a basse frequenze nel momento in cui il passaggio di corrente è limitato dalla lentezza del processo diffusivo.

$$W = \sigma(\omega)^{-1/2}(1 - j)$$

*Equazione 4. Contributo di Warburg, dove  $\sigma$  è il coefficiente di Warburg*

Ulteriore parametro che può essere inserito nel circuito in sostituzione della  $C_{dl}$  è l'Elemento a fase costante (*Constant Phase Element CPE*), che modella il comportamento non ideale dei condensatori nel sistema elettrochimico.

$$CPE = (j\omega)^{-\alpha}/C$$

*Equazione 5. Contributo Elemento a fase costante, dove  $C$  è la capacità e  $\alpha$  è un coefficiente empirico  $<1$ . Per  $\alpha=1$  si ottiene il contributo di un condensatore ideale.*

Tramite i diagrammi di Bode e Nyquist (fig. 10) si possono rappresentare i dati mettendo in evidenza i contributi dei diversi parametri. Si deduce, dunque, che per alte frequenze domina il contributo resistivo, per frequenze intermedie si ha prettamente il contributo

capacitivo, mentre a basse frequenze sono i processi diffusivi a definirne l'andamento e si nota la caratteristica deriva a 45° del ramo nel diagramma di Nyquist dovuto al contributo di Warburg.

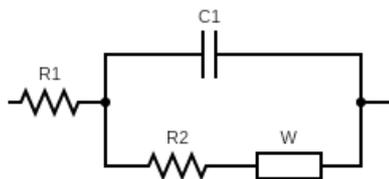


Figura 9. Cella di Randles

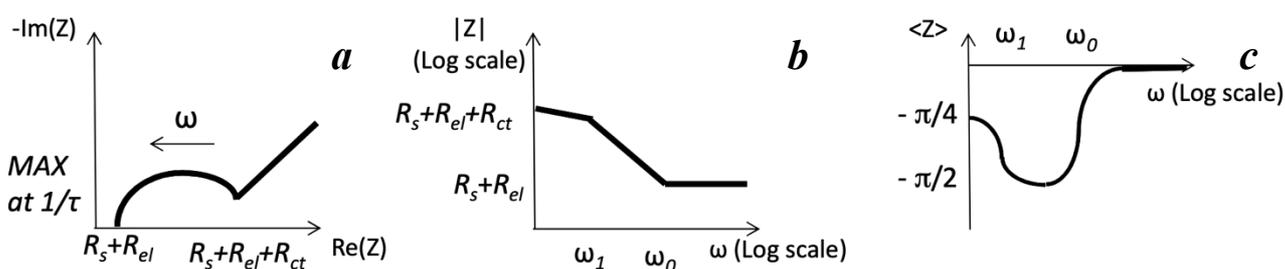


Figura 10. Diagramma di Nyquist (a), Diagramma di Bode di modulo (b) e fase (c) per cella di Randles

## 2.4 AGENTI DI RICONOSCIMENTO BIOLOGICI

A prescindere dall'applicazione per cui verranno utilizzati, o dalla loro tipologia, i biosensori devono essere in grado di effettuare in modo efficace il riconoscimento dell'analita di interesse. Spesso è necessario che il riconoscimento sia specifico, ossia che il sensore individui uno e un solo analita, altre volte occorre sia selettivo per una famiglia di analiti. In ogni caso, devono essere presenti degli elementi capaci di svolgere tale compito e di limitare le interferenze che possono provenire da altre specie in soluzione. Gli agenti di riconoscimento devono quindi essere sostanze in grado di legarsi selettivamente ad un particolare substrato, ma non facilmente ad altri.

Molto spesso, nelle applicazioni dei biosensori gli elementi di riconoscimento hanno origine biologica. Se ne individuano quattro categorie principali: enzimi, anticorpi, aptameri e acidi nucleici.

### 2.4.1 ENZIMI

Un enzima è una complessa macromolecola di composizione prevalentemente proteica che ha il ruolo di catalizzatore nelle reazioni biochimiche [20]. Agisce su una o più

sostanze, che prendono il nome di substrati, andando a ridurre l'energia di attivazione della reazione e favorendo, di conseguenza, la formazione dei prodotti in quantità maggiore, in più breve tempo e a una temperatura minore rispetto a quanto avverrebbe senza l'uso del catalizzatore (fig. 11a).

Gli enzimi hanno una forma tridimensionale che risulta molto più grande dei substrati (fig. 11b) con i quali vanno ad interagire. Posseggono un sito attivo con particolari legami e struttura in modo da renderlo utilizzabile alle sole sostanze per la reazione catalizzata, con un meccanismo che è molto simile al concetto di chiave e serratura. Nei complessi enzimatici, inoltre, talvolta sono presenti degli atomi metallici, che formano un gruppo chiamato prostetico, o altri complessi biologici più piccoli che prendono il nome di cofattori e che aiutano la catalisi andando a formare un ponte tra il substrato e l'enzima.

Esistono moltissimi tipi di enzimi in natura, ciascuno dei quali permette il legame solo con determinati reagenti. Di conseguenza, mentre le sostanze coinvolte possono fungere da substrati per diversi enzimi, un enzima catalizza un solo tipo di reazione essendo specifico solo per particolari sostanze.

Il rilevamento nei biosensori che utilizzano questo tipo di agente di riconoscimento avviene, perciò, basandosi sul prodotto della reazione catalizzata, quantificando poi la concentrazione di substrato con metodi differenti.

Nonostante i molti vantaggi nell'uso degli enzimi come agenti di riconoscimento, vi sono alcune problematiche circa la loro scarsa stabilità, specie se immobilizzati su una superficie, e la loro suscettibilità a variazioni di temperatura e pH. Inoltre, esistono numerose sostanze in grado di inibirne l'azione e queste possono essere presenti nel campione di analisi andando a bloccare l'azione enzimatica ed impedendo il riconoscimento.

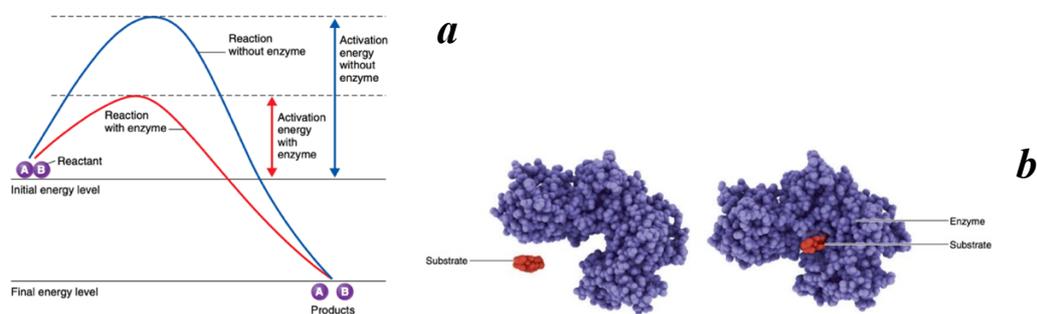


Figura 11. Schema dell'azione catalitica di un enzima (a) e complesso Enzima-Substrato (b)

#### 2.4.2 ANTICORPI

Gli anticorpi o immunoglobuline sono delle grosse proteine strettamente legate alla risposta immunitaria che hanno come funzione principale quella di riconoscere e legare sostanze sconosciute all'organismo, dette antigeni [21]. Esistono cinque classi di immunoglobuline nei mammiferi, ciascuna delle quali ha un ruolo ben definito all'interno della risposta immunitaria e una differente conformazione, con una struttura di base è caratterizzata da una particolare forma a Y (fig. 12). Essa è composta da quattro catene polipeptidiche, due identiche più lunghe, dette pesanti, e due identiche più corte, dette leggere. Tutte le catene sono divise in due regioni: una costante, simile per tutti i tipi di anticorpi, e una variabile, dove avviene il legame con l'antigene e che si localizza all'apice di entrambi i rami della Y. È l'alta variabilità delle sequenze amminoacidiche che compongono questi siti di legame che determina la capacità degli anticorpi di essere altamente selettivi e specifici. Ciascun antigene, infatti, può essere riconosciuto da più tipi di anticorpi; tuttavia, un anticorpo può legare uno e un solo tipo di antigene, rendendo così il riconoscimento estremamente specifico. La natura del legame antigene-anticorpo è di tipo reversibile e non covalente, e la sua forza deriva dalla grande affinità dell'anticorpo alla sostanza riconosciuta.

Grazie alla loro grande specificità e variabilità, gli anticorpi sono tra i più versatili agenti di riconoscimento e hanno diverse applicazioni sia per rilevamento di analiti tramite etichette fluorescenti, come per i saggi immunologici<sup>2</sup>, sia per rilevamento label-free, con tecniche EIS, FET od ottiche [22].

I vantaggi dell'utilizzo delle immunoglobuline per realizzare biosensori, quindi, sono la grande selettività e affinità con l'analita di interesse e la possibilità di riutilizzare l'anticorpo andando a tagliare i legami con l'antigene tramite metodo chimico. Vi sono, a contraltare, alcuni svantaggi legati al loro uso. Non è possibile, infatti, avere un effetto catalitico, dovendo ricorrere spesso all'integrazione di enzimi per amplificare il segnale, e la selettività può essere anche troppo elevata, non permettendo il riconoscimento di isoforme dell'antigene e portando conseguenti falsi negativi. In aggiunta, il costo di produzione risulta alquanto elevato soprattutto se si fa uso di immunoglobuline monoclonali, ossia provenienti da una singola specie anticorpale al posto che da una mistura di esse.

---

<sup>2</sup> Si veda paragrafo 1.4.2

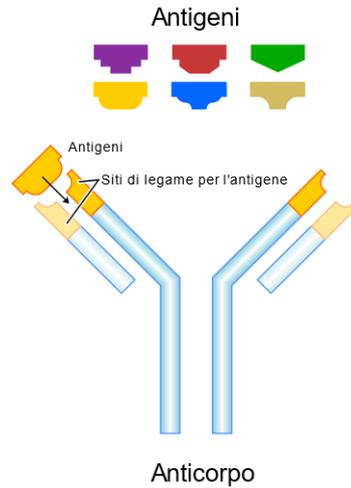


Figura 12. Struttura di un anticorpo

### 2.4.3 APTAMERI

Gli aptameri sono sequenze di acidi nucleici (DNA o RNA), tipicamente lunghe dai 15 ai 40 nucleotidi, che sono in grado di legarsi strettamente con proteine, amminoacidi, farmaci o altri composti. Posseggono delle strutture secondarie e terziarie piuttosto organizzate e riescono a legarsi con alta affinità alla molecola target grazie alla loro particolare conformazione spaziale [23].

Gli aptameri per uno specifico analita di interesse vengono selezionati tramite una procedura chiamata SELEX (fig. 13) nella quale le sequenze di DNA o RNA che si legano al target vengono selezionate con una procedura ciclica fino ad ottenere gli aptameri aventi la più alta affinità alla molecola.

Questi agenti vengono usati, per esempio, nel rilevamento impedimetrico di antibiotici facendo uso di misure differenziali per confrontare la risposta in presenza o assenza della sostanza.

Essendo selezionati appositamente per avere la più alta affinità con l'analita, ed essendo acidi nucleici, gli aptameri godono di alta selettività, sensibilità e stabilità. Risultano inoltre sufficientemente economici, anche se non posseggono effetto catalitico, per il quale è necessario aggiungere una label enzimatica.

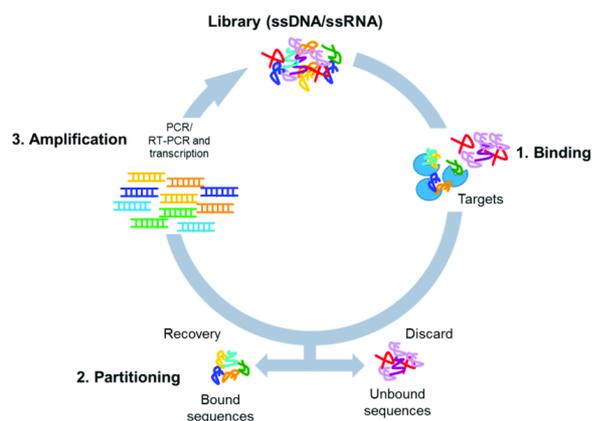


Figura 13. Procedura SELEX

#### 2.4.4 ACIDI NUCLEICI

Gli acidi nucleici DNA e RNA sono macromolecole con delle particolari strutture che sono in grado di codificare informazioni per l'attività cellulare. La struttura principale del DNA è la ben nota doppia elica formata dall'accoppiamento di basi azotate (fig. 14), rispettivamente Adenina-Timina e Citosina-Guanina, mentre per l'RNA la struttura è caratterizzata da una catena singola e la Timina viene sostituita con l'Uracile [24].

È in particolare la complementarità che sussiste tra le sequenze di nucleotidi ad essere sfruttata per effettuare il riconoscimento dell'analita di interesse. I biosensori basati su questo elemento, infatti, normalmente rilevano l'ibridazione di una catena singola di DNA (ssDNA), posizionata sulla superficie del sensore, con una catena singola di DNA target complementare (cDNA). Le proprietà intrinseche del DNA e dell'appaiamento delle basi azotate fanno sì che vi siano buona specificità e sensibilità del riconoscimento, soprattutto utilizzando sequenze di nucleotidi abbastanza corte per mettere in evidenza i possibili eventi di mismatch. Inoltre, l'uso del DNA garantisce un'elevata stabilità nel tempo, una buona resistenza all'aumento di temperatura e un forte legame con il target. Alcune caratteristiche che, all'apparenza, potrebbero attenuarne l'impiego sono i costi di preparazione della specifica sequenza di DNA e le condizioni di ibridazione, che comportano l'uso di temperature attorno ai 40-60°C e tempi che possono arrivare fino a qualche ora. Tuttavia, i benefici in termini di affidabilità e versatilità fanno sì che il DNA come agente di riconoscimento venga molto utilizzato nei biosensori. È infatti possibile rilevare l'evento di ibridazione sfruttando molteplici tecniche, come la variazione delle proprietà ottiche o elettrochimiche, usando label di vario tipo e

modificando in parte la struttura della molecola per renderlo più adatto alla rilevazione non solo di altri acidi nucleici ma anche di complessi proteici e altri ligandi [25].

I biosensori prodotti per questo genere di applicazioni con acidi nucleici, basati su legami DNA-DNA, vengono denominati genosensori.

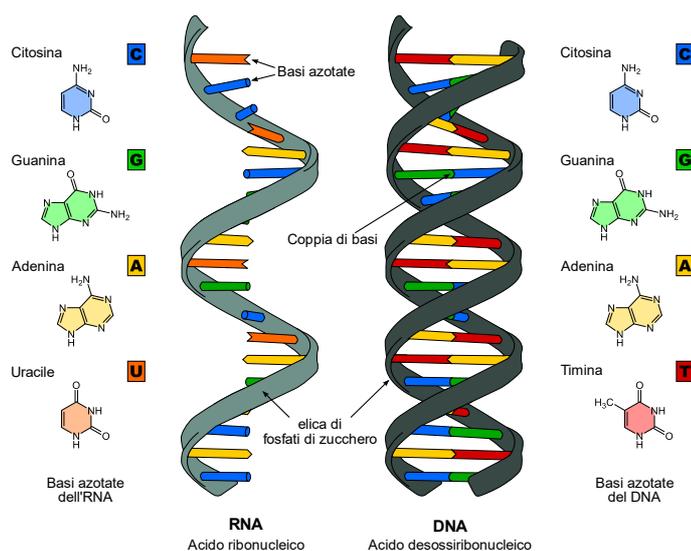


Figura 14. Struttura DNA e RNA e relative basi azotate

## 2.5 IMMOBILIZZAZIONE DEI COMPONENTI BIOLOGICI

Affinché il biosensore sia utilizzabile è necessario che l'elemento di riconoscimento sia strettamente legato al trasduttore in modo che il rilevamento possa avere luogo. Il processo con il quale la superficie di un sensore viene modificata per introdurre la presenza dell'agente prende il nome di immobilizzazione o funzionalizzazione ed esistono svariati metodi di diversa complessità e robustezza per realizzarlo [26].

Quello più semplice, seppur il meno resistente, è l'adsorbimento che consiste nell'accumulo sulla superficie dell'agente di riconoscimento, tramite deboli interazioni come forze di van der Waals, legami idrogeno o forze legate a trasferimento di carica.

Altri due approcci, simili tra loro, sono la microincapsulazione e il cross-linking che prevedono di immobilizzare l'elemento sensibile rispettivamente tramite la deposizione di una membrana inerte, che funge da filtro, o attraverso la formazione di una rete tridimensionale di molecole trattate chimicamente oppure con luce UV. Tecnica differente è, invece, l'intrappolamento, che utilizza un processo di gelificazione per inserire l'agente di riconoscimento in una matrice di gel polimerico.

Da ultimo, il metodo di immobilizzazione più duraturo utilizza la formazione di legami covalenti tra un gruppo funzionale della molecola, non essenziale al rilevamento, e il substrato. Poiché il legame covalente è molto forte, l'agente resterà fissato al trasduttore per lungo tempo, garantendo così la stabilità dell'immobilizzazione.

### 2.5.1 SAM

Un *self-assembled monolayer* (SAM) è un arrangiamento di molecole fortemente orientate che si forma spontaneamente sulla superficie di differenti substrati. Quasi tutte le biomolecole presenti in natura sono in grado di organizzarsi a questo modo e di orientarsi ordinatamente a seconda della loro funzionalità. La struttura tipica di un SAM è composta da tre parti principali (fig. 15): un gruppo di testa, che si lega alla superficie del substrato, una catena mediana, responsabile dell'organizzazione delle molecole spesso composte da catene alifatiche, e un gruppo di coda, che si interfaccia con l'ambiente e definisce l'energia superficiale, la topografia e le proprietà dello strato depositato. Tramite il gruppo terminale, inoltre, è possibile far avvenire ulteriori legami con altre biomolecole per immobilizzarle e funzionalizzare ulteriormente la superficie. Dal momento che l'uso dei SAM sul substrato implica l'attacco del gruppo di testa attraverso un legame covalente, la modificazione della superficie risulta particolarmente stabile, soprattutto in relazione alle altre tecniche di immobilizzazione viste in precedenza. È possibile ottenere con diversi approcci queste modifiche superficiali, applicando differenti molecole a più tipi di sensore [27]. Per le applicazioni biologiche su elettrodi d'oro, molto spesso vengono utilizzate molecole che presentano un tiolo a una delle estremità, sfruttando l'alta affinità tra tale gruppo e l'oro stesso per far avvenire la passivazione della superficie. Molecole molto comuni in questo genere di metodi sono MUA e MCH.

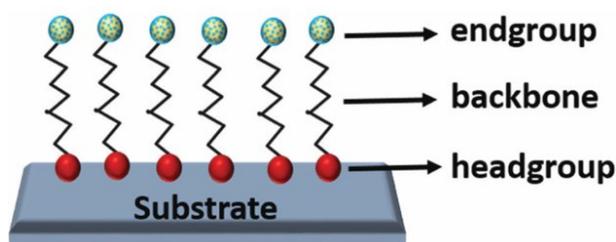


Figura 15. Struttura tipica di disposizione di un SAM

## 2.6 GENOSENSORI

Con il termine *genosensori* (fig. 16) si identifica la categoria di biosensori che utilizza il DNA come agente di riconoscimento, unito a trasduttori che possono essere di vario genere, in particolare ottici ed elettrochimici.

Alcuni dei vantaggi principali dell'uso dei genosensori sono la loro rapidità di risposta e l'alta sensibilità che garantiscono per la rilevazione di acidi nucleici presenti nei campioni. In generale, la loro implementazione è basata su una prima fase di immobilizzazione della sonda di DNA sul substrato dell'elettrodo di Working, alla quale segue una seconda fase in cui avviene l'ibridazione tra la sonda e la catena target e terminando con la lettura del segnale prodotto [28]. I genosensori possono essere distinti in due gruppi sulla base dei protocolli utilizzati per rilevare se l'evento di ibridazione è avvenuto o meno. Si parla di approccio *label-based* nel caso in cui l'ibridazione venga osservata tramite un segnale causato dalla presenza di etichette fluorescenti, enzimi redox attivi e altri tipi di nanoparticelle che vengono messi a contatto con la catena di DNA e vi interagiscono. L'approccio *label-free*, invece, prevede che non vi sia l'uso di etichette sull'acido nucleico. Il segnale misurato è, dunque, dovuto direttamente all'ossidazione delle basi di DNA e viene rilevato tramite tecniche basate sulle variazioni di proprietà elettriche della superficie modificata degli elettrodi.

Focalizzandosi in particolare sul rilevamento elettrochimico dell'ibridazione del DNA, è il caso di approfondire i due differenti approcci basati su specie redox elettroattive e tecniche amperometriche e impedimetriche [29].

- **Label-based**

Molto comune nei genosensori basati su trasduttori elettrochimici è l'uso di etichette che hanno attività ossidoriduttiva. Per questo genere di approccio solitamente l'elettrodo modificato viene immerso in una soluzione contenente una molecola elettroattiva in grado di legarsi in cima alla struttura del DNA stesso, avendo più affinità con la sonda o con l'ibrido. All'applicazione di una tecnica di misura come ciclovoltammetria o DPV, tale differenza nel comportamento dell'etichetta viene rilevata attraverso una variazione di segnale redox prodotto dalla molecola stessa che si traduce in un aumento o diminuzione del picco di corrente a seconda dell'affinità. Per questo genere di approccio la rilevazione può inoltre essere basata sull'attività ossidoriduttiva di label enzimatiche [30] [31] o svolta tramite l'uso di nanoparticelle metalliche [32].

- **Label-free**

I genosensori elettrochimici label-free sono basati sulla misura diretta del segnale dovuto all'intrinseca elettroattività dell'acido nucleico o sul rilevamento dei cambiamenti di segnale elettrochimico legati alla reazione di ibridazione, senza che vi sia l'uso di etichette elettroattive.

Per realizzare tale processo, si sono implementate differenti strategie che si basano sull'ossidazione delle basi del DNA, sulla conduzione elettrica della catena ibridata, oppure sulle variazioni delle proprietà elettriche superficiali causate dall'ibridazione utilizzando tecniche di misura come EIS o SPR [33].

Per quanto riguarda il primo approccio, è stato dimostrato che basi azotate come Adenina e Guanina sono particolarmente elettroattive e subiscono ossidazione a potenziali più bassi rispetto a Citosina e Timina [34]. Tale comportamento è stato sfruttato soprattutto nei primi genosensori label-free incentrando la rilevazione sulla variazione di segnale elettrochimico dovuta alla differente elettroattività di basi libere e basi ibridate alle complementari.

Il secondo metodo, invece, è basato sulla conduttività della doppia catena di DNA, misurando la corrente che fluisce attraverso di essa all'applicazione di un potenziale. Tale corrente aumenta in presenza della catena correttamente ibridata e diminuisce in caso ci siano mismatch.

L'ultimo approccio, infine, si basa sulle modifiche che subisce la superficie dell'elettrodo al momento di funzionalizzazione ed ibridazione. A seguito di questi eventi, infatti, la presenza delle catene di DNA comporta dei cambiamenti nelle proprietà elettriche della superficie che si traducono in variazioni del segnale misurato. Per questo tipo di genosensori è consuetudine che vengano usate tecniche EIS con ferri-ferrocianuro ( $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ) come mediatore redox caricato negativamente. Si sfrutta, in definitiva, l'interazione elettrostatica tra quest'ultimo e il DNA presente che impedisce al mediatore di raggiungere la superficie, modificando così la misura di impedenza rilevata.

Talvolta diviene necessario amplificare il segnale ottenuto per avere una maggiore sensibilità. A tale scopo si utilizzano delle molecole che si legano in modo non covalente al DNA che fungono da indicatori, sia elettroattivi che non. Il Blu di Metilene, ad esempio, oltre che essere una molecola elettroattiva usata per il rilevamento label-based, ha anche applicazione come indicatore di segnale per l'approccio label-free [35].

Per la loro affidabilità e praticità, che permettono di evitare le elaborate procedure legate al rilevamento label-based, i genosensori label-free stanno riscontrando un crescente impiego

anche in ambito di sicurezza alimentare, in particolare per il rilevamento di patogeni come l'Epatite A [36], la Salmonella [37] o l'Escherichia Coli [38].



Figura 16. Schema generale del funzionamento di un genosensore. Si introduce come passaggio intermedio la passivazione della superficie con SAM per regolarizzare la disposizione delle catene singole di DNA e facilitare l'ibridazione.

# MATERIALI, METODI E STRUMENTAZIONE

## 3.1 MATERIALI

Di seguito vengono elencati e descritti i materiali che ho utilizzato in laboratorio per lo svolgimento di questo lavoro di tesi.

### 3.1.1 PRODOTTI CHIMICI USATI

#### 1. MilliQ

Si tratta di acqua purificata deionizzata ad alto livello tramite sistema di purificazione brevettato da *Millipore Corporation*. Tale sistema usa filtri a resine e metodi di deionizzazione monitorando la concentrazione di ioni presenti nell'acqua attraverso la misura di resistenza elettrica.

#### 2. PBS

Il tampone fosfato salino (*phosphate buffered saline* PBS) è una soluzione tampone molto comune nella ricerca biologica venendo spesso usata per diluizioni e colture biologiche. La soluzione salina acquosa è a pH 7.4 e contiene: cloruro di sodio (NaCl), cloruro di potassio (KCl), idrogenofosfato di disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e diidrogenofosfato di potassio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) le cui concentrazioni sono elencate in tabella 2. Lo scopo di una soluzione tampone è quello di mantenere il pH costante usando le concentrazioni dei sali in modo da rendere la soluzione isotonica. Il metodo più semplice di preparazione prevede di utilizzare delle pastiglie preformulate da disciogliere in un volume standard di acqua distillata.

<b>NaCl</b>	137 mM
<b>KCl</b>	2.7 mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	10 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.8 mM

Tabella 2. Composizione PBS

#### 3. Etanolo

L'etanolo è un alcol lineare con formula di struttura condensata CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH. Si presenta come un liquido incolore con un caratteristico odore, è estremamente infiammabile e tende ad essere piuttosto volatile.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato prevalentemente per la preparazione delle soluzioni di passivazione della superficie con SAM e per i relativi lavaggi.

#### 4. $Fe(CN)_6^{3-/4-}$

Il ferrocianuro triidrato di potassio ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) è un sale complesso di ferro(II)-cianuro e potassio e in soluzione acquosa si dissocia formando lo ione ferrocianuro  $Fe(CN)_6^{4-}$ . Si presenta a temperatura ambiente come un sale inodore di colore giallo chiaro e risulta essere un composto pericoloso per l'ambiente.

Il ferricianuro di potassio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) è invece un sale complesso di ferro(III)-cianuro e potassio e in soluzione acquosa libera lo ione ferricianuro  $Fe(CN)_6^{3-}$ . È un sale rosso scuro inodore e, una volta disciolto, fa assumere alla soluzione un caratteristico colore giallo. Essendo piuttosto suscettibile alla luce ultravioletta, è bene schermarlo dalla luce solare.

Nei processi chimici, ferrocianuro e ferricianuro formano una coppia di ossidoriduzione  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ .

Per effettuare le misure elettrochimiche ho preparato la soluzione di ferri/ferrocianuro disciogliendo i sali in PBS per ottenere una concentrazione pari a 10 mM (fig. 17).

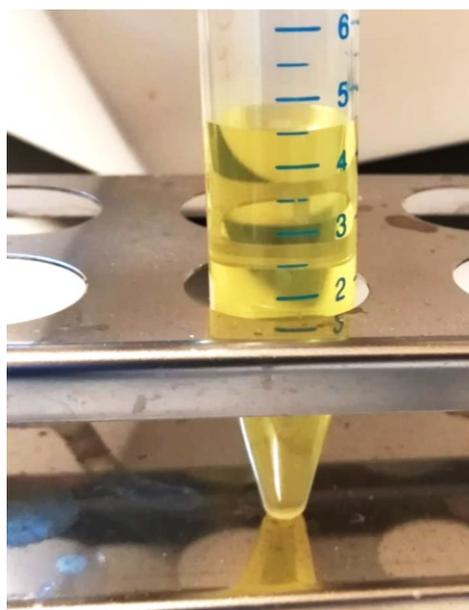


Figura 17. Soluzione a concentrazione 10 mM di  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  in PBS

## 5. MCH e MUA

Il 6-Mercapto-1-esanolo (*6-Mercapto-1-hexanol* MCH, formula bruta  $C_6H_{14}OS$ ) e l'acido 11-mercaptoundecanoico (*11-Mercaptoundecanoic acid* MUA, formula bruta  $C_{11}H_{22}O_2S$ ) sono due composti chimici utilizzati molto di frequente per la costituzione di Self-Assembled Monolayer grazie alla presenza di un gruppo tiolico ad una delle estremità (fig. 18).



Figura 18. Struttura molecolare MCH e MUA. Si evidenziano in entrambe i terminali tiolici

## 6. BSA

L'albumina sierica bovina (*bovine serum albumin* BSA) è una proteina sierica dell'albumina bovina (fig. 19). È una proteina composta da ben 583 amminoacidi nella sua forma matura e ha numerose applicazioni biochimiche soprattutto legate l'uso degli anticorpi. La funzionalità principale di questa proteina è quella di legarsi ai siti di legame non specifico fungendo, quindi, da agente di bloccaggio per aumentare la possibilità che il target si legni solo in modo specifico. L'uso della BSA come blocker aumenta la sensibilità e diminuisce il rumore di background nella risposta.

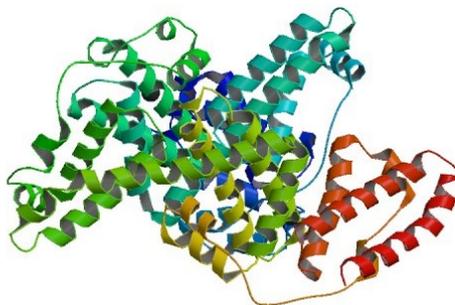


Figura 19. Struttura proteica della BSA

## 7. Proteinasi K

La proteinasi K (fig. 20) è un enzima proteasi della famiglia delle subtilisine in grado di idrolizzare la cheratina e di scindere il legame peptidico adiacente al gruppo carbossilico di amminoacidi alifatici e di amminoacidi aromatici con i gruppi alfa-amminici bloccati. La proteinasi K agisce in un intervallo di temperatura tra 25°C e 65°C e, nonostante sfrutti ioni calcio per attivarsi e stabilizzarsi, riesce a essere funzionante anche in assenza di  $Ca^{2+}$ . Per questo viene utilizzata molto spesso per purificare gli acidi nucleici in presenza di EDTA, composto che lega il calcio per inibire l'azione delle nucleasi.

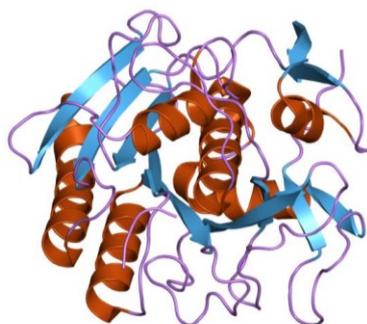


Figura 20. Struttura dell'enzima proteinasi K

## 8. Blu di Metilene

Il Blu di Metilene (fig. 21) è un sale organico eterociclico aromatico comunemente usato come colorante e come indicatore di reazioni di ossidoriduzione essendo un composto elettroattivo. Viene inoltre utilizzato in medicina per le sue proprietà antiossidanti, antimalariche, antidepressive e cardioprotettive.

Si presenta come solido cristallino di colore verde scuro a temperatura ambiente, mentre in soluzione acquosa o alcolica assume una colorazione blu intenso che in ambiente riducente tende a perdersi, rendendo la soluzione incolore.

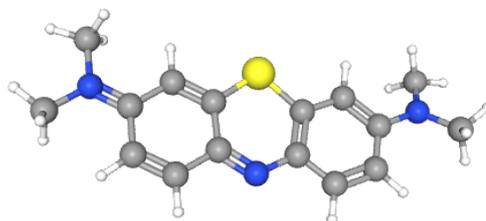


Figura 21. Struttura del Blu di Metilene

Per ricavare il Blu di Metilene che ho utilizzato nella fase sperimentale (fig. 22) ho disciolto il sale in PBS ottenendo una soluzione ad alta concentrazione e successivamente ho effettuato delle diluizioni in PBS o ferri/ferrocianuro a diverse concentrazioni.

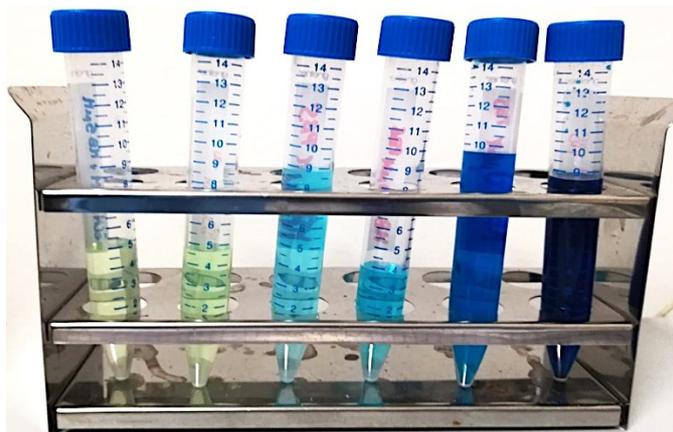


Figura 22. Soluzioni di Blu di Metilene a diverse concentrazioni diluite in PBS o in ferri/ferrocianuro

### 3.1.2 DPRC223BT

Ho utilizzato dei sensori screen-printed DPC223BT<sup>3</sup> prodotti dall'azienda *Metrohm DropSens*. Tali sensori sono a basso costo e monouso, pensati specificamente per essere usati con microvolumi.

Il sensore [39] ha dimensione di 3.4 x 1.0 x 0.05 cm e il diametro dell'elettrodo di Working è pari a 1.6 mm.

Gli elettrodi screen-printed (SPE) sono realizzati tramite tecnica serigrafica su un substrato ceramico con inchiostri polimerizzanti a bassa temperatura. L'elettrodo di Working (W) e il Counter (C) sono in oro, mentre l'elettrodo di Reference (R) e tutti i contatti elettrici sono in argento (fig. 23a).

Ho fatto uso, inoltre, di un connettore dello stesso produttore (fig. 23b) per poter interfacciare gli elettrodi al potenziostato.

---

<sup>3</sup> Questo tipo di sensore è stato selezionato a seguito di valutazioni di caratterizzazione e stabilità svolte in lavori di tesi precedenti al corrente.



Figura 23. Sensore DRPC223BT (a) e relativo connettore (b)

### 3.1.3 STRUMENTI AUSILIARI

#### 1. Parafilm

Il parafilm è un materiale composto principalmente da poliolefine e cere paraffiniche, utilizzato nei laboratori al fine di sigillare contenitori. Ha la capacità di aderire saldamente anche a forme irregolari ed è in grado di resistere fino a 48 ore anche in presenza di sostanze polari come soluzioni saline e alcaline.

#### 2. Cella

La cella (fig. 24) è un supporto stampato in 3D che ho utilizzato per proteggere il sensore e la goccia di soluzione depositata su di esso, in modo da poter effettuare le misure senza danneggiare la configurazione.

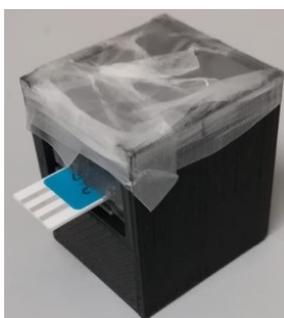


Figura 24. Sensore montato su una cella coperta da parafilm

## 3.2 STRUMENTAZIONE

Nei paragrafi a seguire vengono esposte brevemente le strumentazioni che ho utilizzato ai fini della rilevazione e dell'analisi dei dati.

### 3.2.1 *HARDWARE: PALMSENS EMSTAT PICO*

Il PalmSens EmStat PICO (fig. 25) è un potenziostato di dimensioni piuttosto ridotte prodotto dall'azienda *PalmSens*. Permette di effettuare un'ampia gamma di misure elettrochimiche, tra cui EIS e DPV, grazie all'utilizzo di un kit di sviluppo che consente di collegare gli elettrodi di qualsiasi tipo di sensore elettrochimico e di interfacciarsi direttamente con un software sul computer per la gestione delle misure.

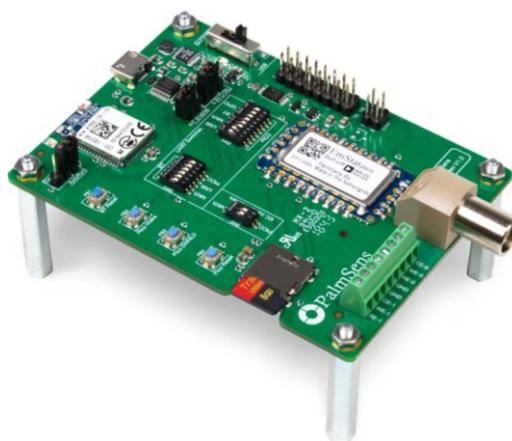


Figura 25. PalmSens EmStat PICO

### 3.2.2 *SOFTWARE*

#### 1. **Matlab**

Matlab è una piattaforma per programmazione e computazione numerica usata per analizzare dati, sviluppare algoritmi e creare modelli. Prevede un'interfaccia grafica (fig. 26) attraverso la quale si possono creare script, visualizzare gli output, definire variabili e importare dati utilizzando funzioni built-in o sviluppandone di personalizzate. Per questo lavoro di tesi ho utilizzato tale programma allo scopo di analizzare ed elaborare i dati raccolti, svolgere l'estrazione dei parametri dalle misure elettrochimiche tramite procedure di fitting, e visualizzare i risultati graficamente.

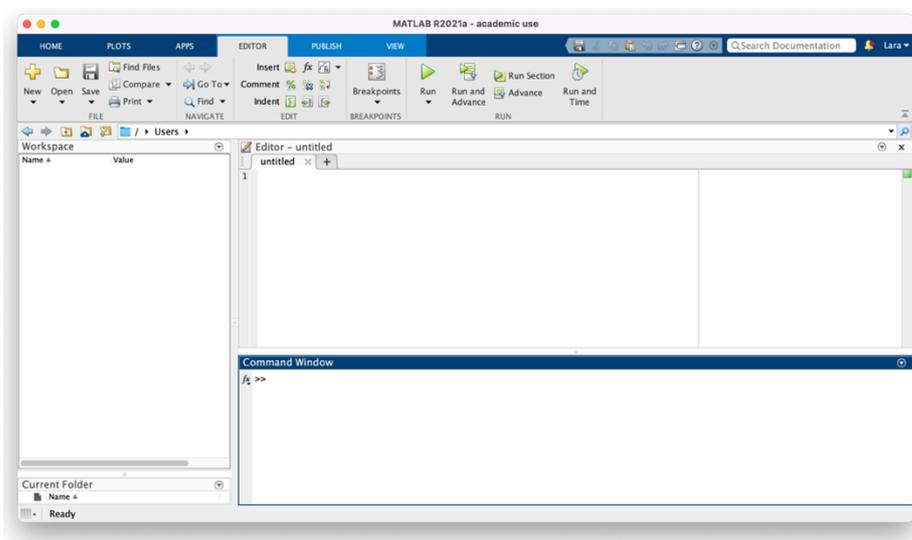


Figura 26. Schermata iniziale di MATLAB

## 2. PStTrace

PStTrace è il software dedicato alla gestione delle misure per la strumentazione PICO. Permette di effettuare sia la raccolta di dati che l'analisi e l'elaborazione di essi tramite comandi da terminale (fig. 27), dando la possibilità di selezionare il tipo di tecnica da applicare e di impostarne i relativi parametri. Consente, da ultimo, di esportare i dati sia in formato Excel che in formati adatti l'elaborazione in Matlab.

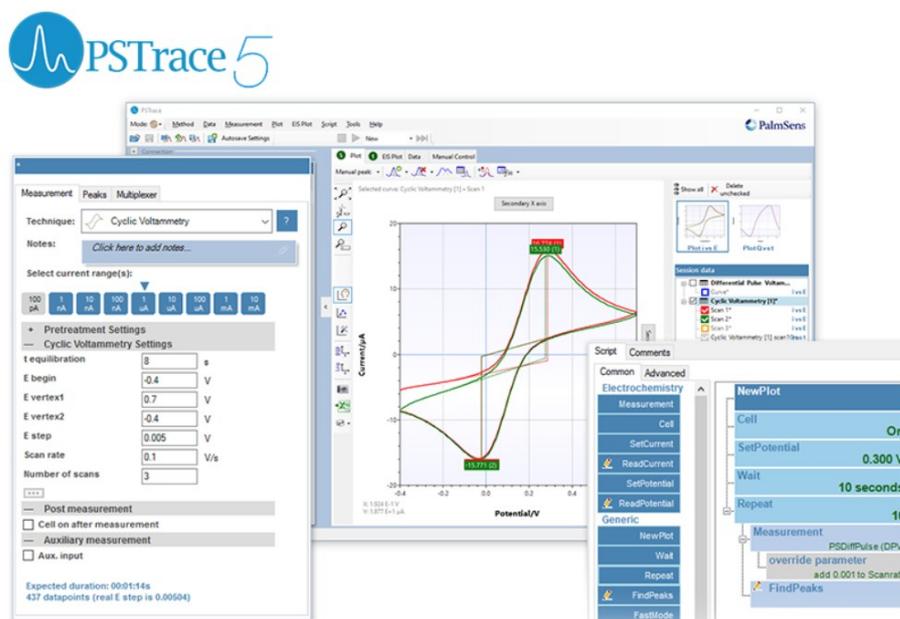


Figura 27. Schermata di lavoro del software PStTrace

### 3.2.3 STRUMENTAZIONE AUSILIARIA: *SENSOSPOT FLUORESCENCE MICROARRAY ANALYZER*

Il SensoSpot Fluorescence Microarray Analyzer (fig. 28) è un analizzatore di microarray a fluorescenza prodotto dall'azienda *Sensovation*. Si tratta di un lettore a piattaforma aperta di microarray e campioni di vario formato molto utilizzato nei laboratori di ricerca per la diagnostica di routine. Include un sistema ottico per ottenere immagini in fluorescenza a 2 o 3 colori che indicano le lunghezze d'onda di eccitazione. Il sistema utilizza dei LED ad alta potenza per eccitare i coloranti fluorescenti presenti nei campioni analizzati e dei sensori CCD altamente sensibili per effettuare la rilevazione. Inoltre, permette un rapido set-up e una veloce visualizzazione dei risultati tramite terminale dedicato.



*Figura 28. SensoSpot Fluorescence Microarray Analyzer*

### 3.3 PROTOCOLLI

Si presentano i protocolli e le procedure che ho elaborato per la preparazione dei sensori e la raccolta dei relativi dati.

#### 3.3.1 PROTOCOLLO DI MISURA

Per le misure EIS e DPV, ho sciacquato i sensori con milliQ, asciugati con aria e montati nelle celle. Ho messo poi una goccia di 100 $\mu$ L di una soluzione 10mM di FeCN in PBS sull'area degli elettrodi tramite micropipettata e l'ho lasciata depositare per 10 minuti prima di svolgere le misure, ricoprendo la cella con parafilm al fine di evitare l'evaporazione durante il periodo di attesa. Per ogni gruppo di sensori utilizzato ho prima effettuato tutte le misure EIS e in seguito le DPV.

##### 1. EIS

Le misure EIS vengono effettuate a due elettrodi. Ho quindi preparato il connettore considerando i soli elettrodi di Working e Reference, cortocircuitando il Counter con quest'ultimo. Ho poi impostato lo strumento di misura PICO con i seguenti parametri.

<b>V<sub>DC</sub></b>	133 mV
<b>V<sub>AC</sub></b>	10 mV
<b>Range frequenze</b>	[1-100k] Hz
<b>Punti per decade</b>	10
<b>Numero cicli</b>	35

Tabella 3. Set-up dei parametri per le misure EIS

##### 2. DPV

Le misure DPV prevedono l'uso di tutti e tre gli elettrodi e ho effettuato le misure applicando un intervallo di tensione tra -0.4 V e 0.6 V. Per le misure in Blu di Metilene, invece, ho utilizzato un range da -0.7 a 0.6 poiché ho notato uno spostamento del potenziale di picco verso il negativo.

#### 3.3.2 PROTOCOLLO DI FUNZIONALIZZAZIONE OVERNIGHT

A seguito delle misure preliminari di caratterizzazione, ho depositato sul solo elettrodo di Working una goccia di 5 $\mu$ L di soluzione contenente DNA sonda (ssDNA, SH-Cy3 per C. jejuni in PBS, lunghezza pari a 55 basi azotate) con colorante Cy3, fluorescente a 532 nm (verde), e ho incubato i sensori in camera umida (fig. 29) per una notte (circa

14 ore) affinché la funzionalizzazione avvenisse. Al termine di questo periodo, ho dapprima eseguito delle scansioni in fluorescenza prima e dopo il lavaggio. Per la procedura di risciacquo ho usato una micropipetta da 5 $\mu$ L per mettere e togliere consecutivamente due gocce di PBS e due gocce di milliQ autoclavata. L'asciugatura avviene poi ad aria.



Figura 29. Camera umida per incubazione overnight

### 3.3.3 *PROTOCOLLO DI ANALISI IN FLUORESCENZA*

Utilizzando il SensoSpot Fluorescence sopracitato, ho realizzato un'analisi in fluorescenza per valutare qualitativamente l'avvenuta funzionalizzazione o ibridazione. Il set-up dello strumento prevede di selezionare il tipo di array usato e il metodo di analisi desiderato, oltre che di variare alcuni parametri per la miglior messa a fuoco e centratura dell'immagini.

La configurazione usata per l'array è la DropSens, che prevede l'uso di una struttura ad array di quattro sensori DropSens, mentre come il metodo di analisi ho utilizzato il Red10. Per visualizzare i risultati della funzionalizzazione la fluorescenza è nella banda del verde (532 nm), invece per l'ibridazione il colorante è fluorescente nel rosso (635 nm).

### 3.3.4 *PROTOCOLLO DI PREPARAZIONE BUFFER*

Il buffer di ibridazione contiene SSC, SDS, BSA e Formammide, 2 $\mu$ L ciascuno, al quale vengono aggiunti in fase di preparazione 2 $\mu$ L di DNA complementare (SH-Cy5 per *C. jejuni*), non complementare o milliQ a seconda del tipo di soluzione di incubazione.

Per completare il buffer ho aggiunto in seguito la proteinasi K, portando il tutto a 37°C per un'ora, riscaldando poi fino a 95°C per 2 minuti al fine di eliminare la presenza dell'enzima.

### 3.3.5 *PROTOCOLLO DI PASSIVAZIONE CON MUA/MCH*

Per effettuare la passivazione della superficie con MUA o con MCH ho usato soluzioni 1mM delle due sostanze in etanolo immergendovi i sensori per un'ora in agitazione tramite pillola magnetica, avendo cura di non fare entrare in contatto i composti con i terminali elettrici. Durante questo periodo, ho ricoperto il becher utilizzato con parafilm per evitare l'evaporazione dell'etanolo. Infine, per il lavaggio ho inizialmente risciacquato gli elettrodi con etanolo e poi con milliQ.

### 3.3.6 *PROTOCOLLO DI IBRIDAZIONE*

Ho realizzato l'ibridazione depositando una goccia da 5µL di soluzione di ibridazione sul solo elettrodo di Working di ciascun sensore funzionalizzato e li ho poi incubati in agitazione alla temperatura di 60°C per un'ora. Da ultimo, ho lavato i sensori tramite una procedura quattro passaggi, depositando 10µL di ciascuna delle sostanze sul Working e lasciando passare 5 minuti di attesa in agitazione tra un passo e il suo successivo:

- 1) SSC 0.5x + SDS 0.1x
- 2) SSC 0.2x
- 3) SSC 0.1x
- 4) milliQ autoclavata

# RISULTATI

## 4.1 STABILITÀ DEL SENSORE SCELTO

Il sensore selezionato per condurre i successivi esperimenti di funzionalizzazione e ibridazione è il DRPC223BT, la cui stabilità a misurazioni successive è studiata attraverso la tecnica di voltammetria ciclica (-0.1/0.4 V) tramite quattro set di misure consecutive.

Protocollo utilizzato:

1. Deposizione goccia di 100  $\mu\text{L}$  di  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ;
2. Attesa di 10 minuti per deposizione;
3. Set di tre misure consecutive;
4. Attesa di 2 minuti prima del set successivo.

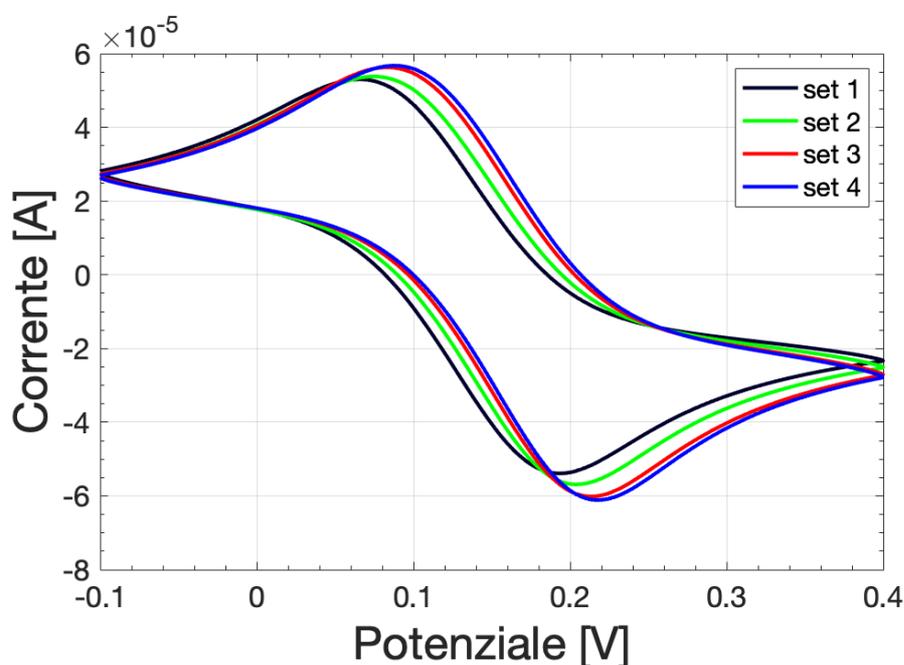


Figura 30. Set di quattro misure CV consecutive su sensore DRPC223BT con  $\text{FeCN}$  10 mM in PBS

In figura 30 ho riportato la prima misura di ogni set effettuato. Si nota immediatamente la riproducibilità delle misure rispetto al cambio goccia nonché la stabilità della risposta, sebbene vi sia un leggero spostamento positivo delle tensioni di picco e un lieve aumento di intensità di correnti per i picchi anodici e catodici, che si suppone causato dal deterioramento dell'elettrodo di riferimento interno utilizzato per le misure.

Il comportamento del sensore DRPC223BT risulta, quindi, pressoché stabile per misurazioni successive in seguito alla deposizione di nuova soluzione sulla superficie.

Inoltre, analizzando le posizioni dei picchi di corrente nel ciclovoltammogramma ottenuto, si deduce il potenziale  $E_0$  caratteristico del sensore pari a 133 mV, il quale viene utilizzato come potenziale  $V_{DC}$  per le successive EIS.

## 4.2 FUNZIONALIZZAZIONE CON SONDE DI DNA

Ho ottenuto la funzionalizzazione della superficie dei sensori con le sonde di DNA (ssDNA) tramite il protocollo di funzionalizzazione overnight precedentemente descritto<sup>4</sup> effettuando misure sia tramite tecnica EIS che tramite DPV. In parallelo, inoltre, ho applicato il medesimo protocollo di misure ed incubazione anche a un gruppo di sensori in assenza di ssDNA, in modo da poter avere un controllo negativo (CN) delle risposte ottenute.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo;
3. Nuove misure EIS e DPV per verificare l'effettiva presenza di ssDNA sulla superficie.

I risultati dei sensori funzionalizzati sono presentati nelle figure seguenti.

---

<sup>4</sup> Paragrafo 3.3.2

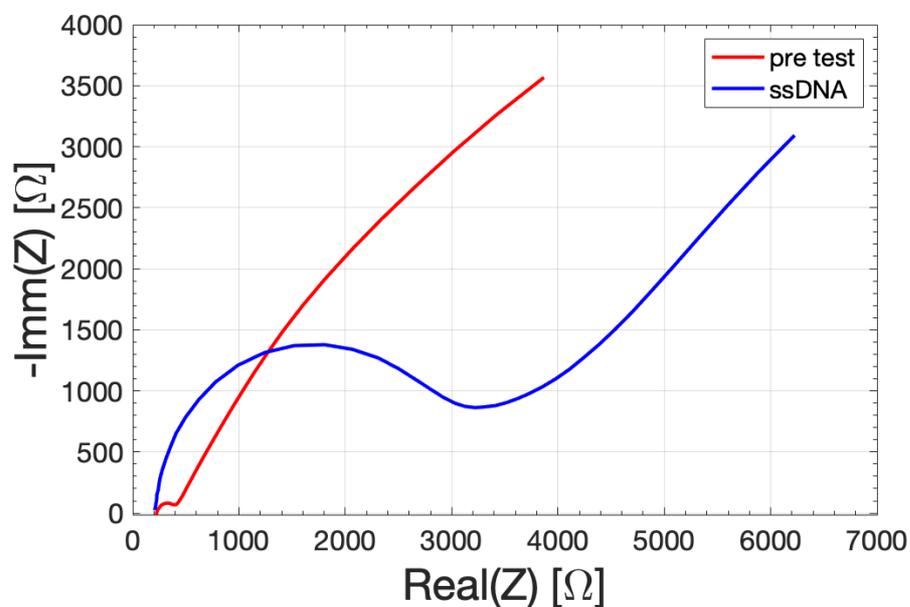


Figura 31. Confronto dei risultati EIS prima e dopo la funzionalizzazione.

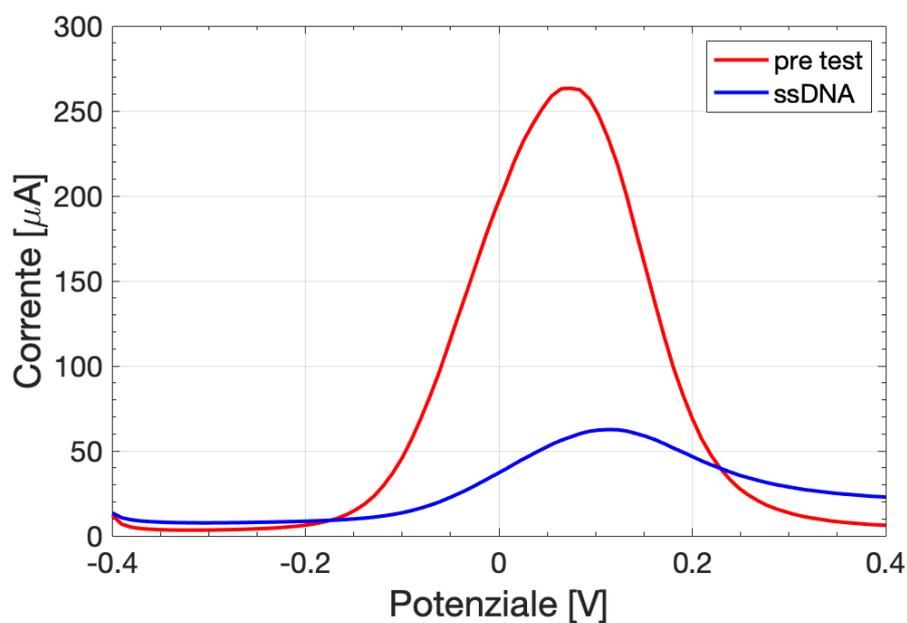


Figura 32. Confronto dei risultati DPV prima e dopo la funzionalizzazione.

Osservando le misurazioni EIS (fig. 31) si nota un'evidente crescita della curva a seguito della funzionalizzazione del sensore che determina, di conseguenza, un distinto aumento del parametro  $R_{ct}$ . Viceversa, le misure DPV (fig. 32) mostrano un netto calo del picco di corrente  $I_p$ , comportamento che risulta in accordo con la nota reciprocità dei parametri  $R_{ct}$  e  $I_p$ . A seguito della funzionalizzazione è possibile notare, inoltre, un leggero spostamento positivo del

potenziale di picco. Questo può essere spiegato sia dalla presenza delle sonde di DNA sulla superficie, che vanno a influenzare il potenziale caratteristico del sensore, sia tramite i risultati della precedente analisi di stabilità alle misure successive, per i quali era visibile uno shift analogo.

Dalla comparazione delle figure 31 e 32 con le figure 33 e 34, relative ai controlli negativi, la differenza di comportamento risulta evidente. La variazione a seguito dell'incubazione overnight per i sensori di controllo è nettamente più contenuta rispetto ai sensori funzionalizzati.

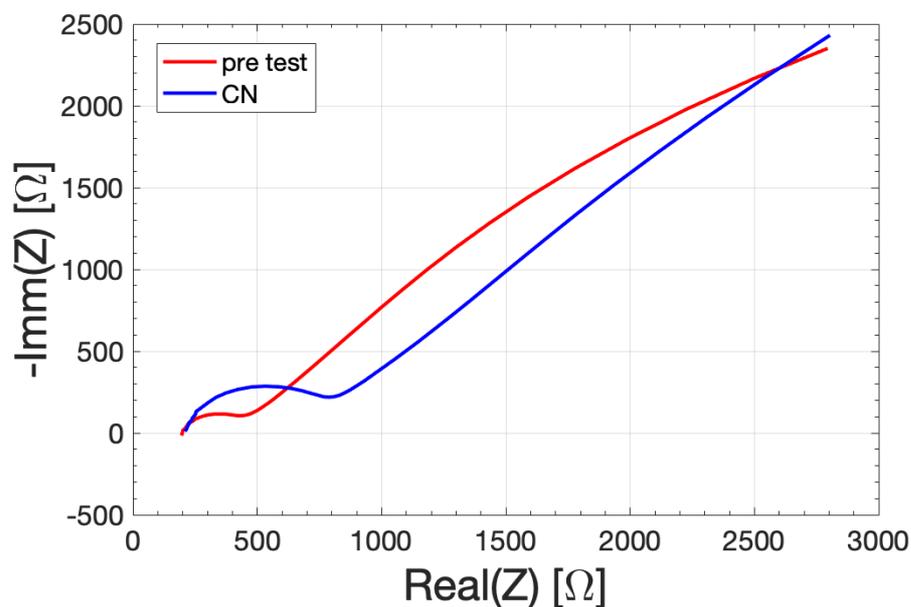


Figura 33. Confronto dei risultati EIS prima e dopo il protocollo overnight in assenza di sonda di DNA.

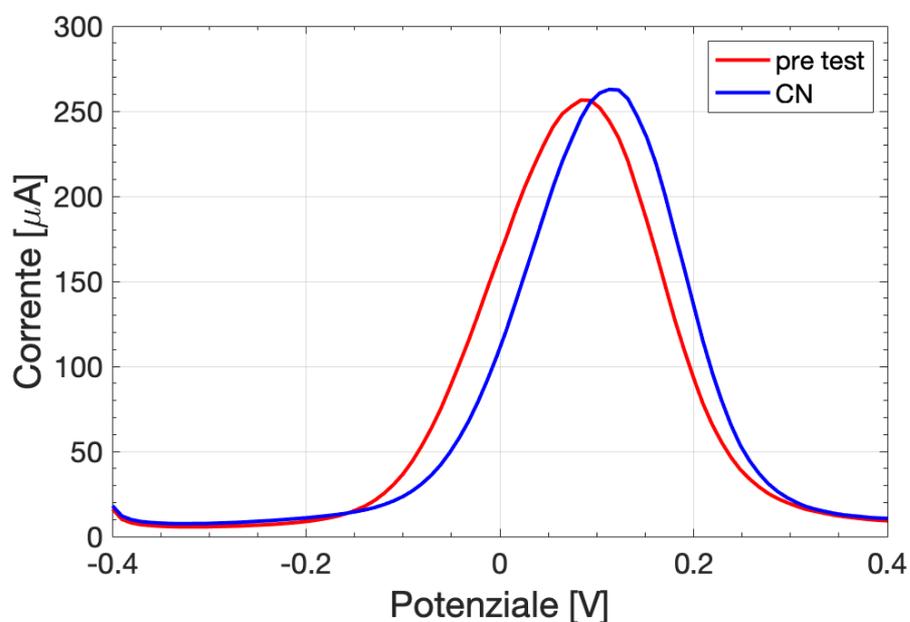


Figura 34. Confronto dei risultati DPV prima e dopo il protocollo overnight in assenza di sonda di DNA.

#### 4.2.1 RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DI FUNZIONALIZZAZIONE

Dalla valutazione della differenza delle medie dei valori di  $I_p$  tra sensori funzionalizzati e controlli negativi (fig. 35) è evidente come la presenza di ssDNA comporti una netta decrescita del parametro, con una variabilità delle misure, data dalla deviazione standard, che risulta essere relativamente contenuta e analoga a quella ritrovata sia per i controlli negativi che per i sensori fresh.

Differente è, invece, la valutazione per le medie delle misure EIS post overnight (fig. 36), dove dalla deviazione standard dei sensori funzionalizzati si nota un ampio intervallo entro il quale spaziano i valori di  $R_{ct}$ . Ciò può essere spiegato dalla variabilità del numero di sonde rimanenti sulla superficie a seguito del lavaggio. Infatti, la natura biologica del DNA e la diversa disponibilità di legami sull'elettrodo possono comportare una differente presenza di ssDNA. Dunque, i sensori risultano funzionalizzati, ma il numero di sonde presenti non è identico. Tale differenza viene messa particolarmente in evidenza da  $R_{ct}$  poiché la tecnica EIS risulta molto sensibile ai cambiamenti superficiali.

La variazione delle misure EIS e DPV tra pre test e post overnight per i controlli negativi, com'è noto, può trovare spiegazione nell'utilizzo della camera umida. L'incubazione, infatti, comporta la creazione di un ambiente umido nel quale le sonde di DNA possono essere preservate durante tutto il periodo. L'umidità presente, dunque,

può aver indotto delle piccole modifiche superficiali sui sensori di controllo causando la variazione di  $R_{ct}$  e di  $I_p$ .

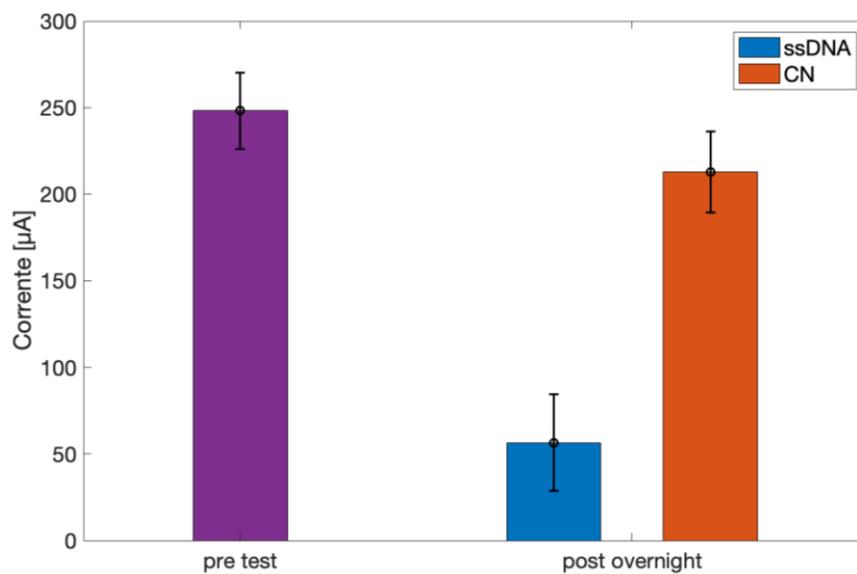


Figura 35. Media e deviazione standard di  $I_p$  ricavata da DPV: confronto sensori funzionalizzati vs controlli negativi post overnight.

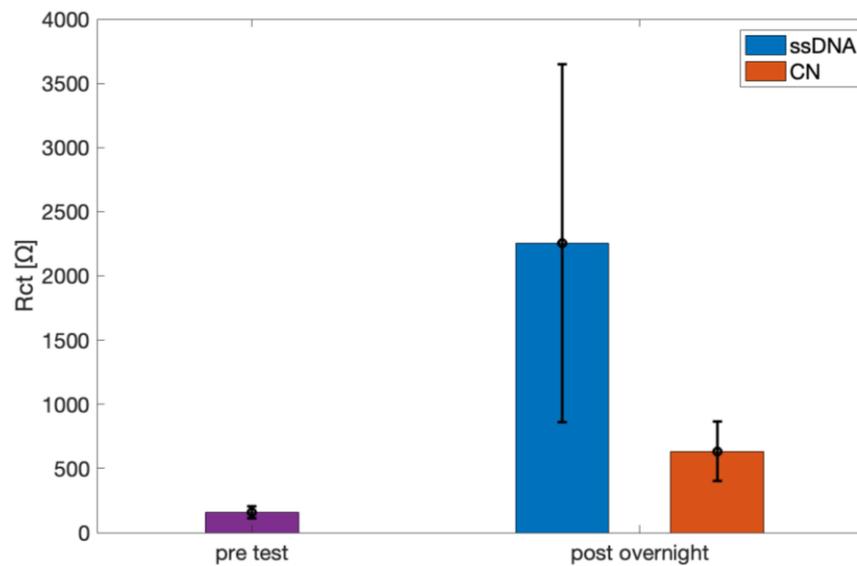


Figura 36. Media e deviazione standard di  $R_{ct}$  ricavata da EIS: confronto sensori funzionalizzati vs controlli negativi post overnight

#### 4.2.2 STABILITÀ AI PROTOCOLLI

Affinché l'ibridazione con il DNA complementare possa avvenire è di fondamentale importanza che la sonda di DNA resti sulla superficie e sia disponibile anche a seguito delle successive procedure applicate sull'elettrodo.

Ho effettuato, dunque, delle scansioni in fluorescenza per ogni sensore utilizzato prima e dopo l'applicazione del protocollo di lavaggio post overnight al fine di valutarne la permanenza sulla superficie.

Come è possibile notare dalla figura 37, la prima scansione sul sensore funzionalizzato presenta una forte fluorescenza dovuta sia alla soluzione in cui le sonde sono immerse per far avvenire il legame, sia all'elevata presenza di ssDNA non legato specificamente alla superficie.

Successivamente alle procedure di lavaggio con PBS e milliQ, la fluorescenza dovuta alla presenza di ssDNA risulta ancora evidente seppur leggermente attenuata dall'assenza di soluzione e legami aspecifici.

Tramite le scansioni si può, inoltre, vedere come la goccia di soluzione debba essere ben centrata sul Working al fine di favorire la presenza del maggior numero di sonde possibile sulla superficie e quindi una più efficace funzionalizzazione.

I risultati ottenuti per i controlli negativi, invece, confermano l'assenza di qualsiasi deposito di soluzione o DNA sulla superficie dal momento che non danno fluorescenza.

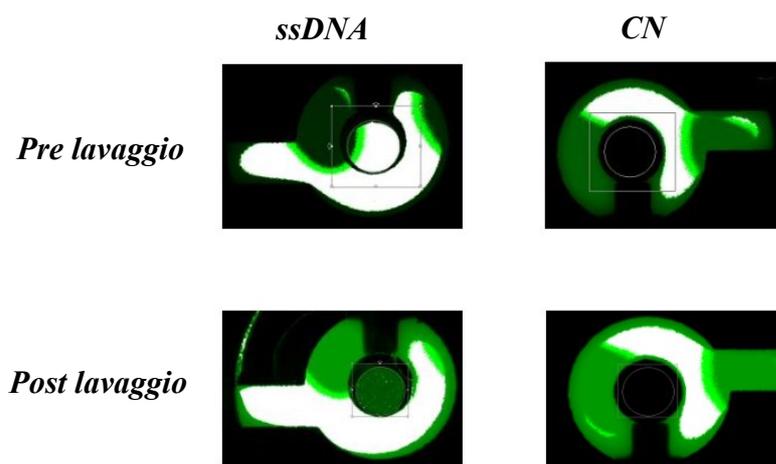


Figura 37. Scansioni in fluorescenza pre e post lavaggio di sensori funzionalizzati (ssDNA) e sensori di controllo (CN).

Ulteriore dato ricavato è la permanenza delle sonde di DNA anche a seguito del protocollo di ibridazione (fig. 38). Ho effettuato, infatti, scansioni in fluorescenza a 532 nm dopo la deposizione di DNA complementare sulla superficie, che invece dà fluorescenza a 635 nm. I risultati mostrano chiaramente come ssDNA resti adeso alla superficie, sebbene vi sia una diminuzione di intensità del segnale luminoso dovuto ad un parziale distacco della sonda e al quenching del fluoroforo Cy3 da parte del fluoroforo Cy5 del DNA complementare.

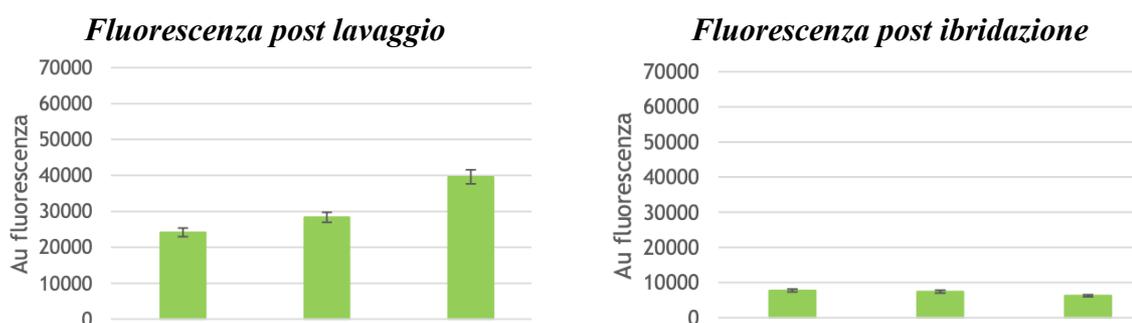


Figura 38. Confronto della fluorescenza post lavaggio di tre sensori funzionalizzati con la fluorescenza degli stessi a seguito dell'ibridazione.

### 4.3 BUFFER DI IBRIDAZIONE

La prima prova di ibridazione eseguita ha posto in evidenza una problematica circa il buffer di ibridazione. Per questo esperimento, infatti, il buffer che ho utilizzato prevedeva, inizialmente, una composizione di SSC, SDS, BSA e Formammide, senza il trattamento con proteinasi K, che si è rivelato, invece, necessario in seguito.

Nei successivi paragrafi sono descritti i risultati dei differenti approcci che ho applicato per identificare il problema e giungere alla soluzione.

#### 4.3.1 PRIMA PROVA DI IBRIDAZIONE: PROBLEMI DI RILEVAZIONE

L'esperimento è stato svolto confrontando le risposte EIS e DPV di un gruppo di otto sensori: quattro funzionalizzati e quattro di controllo.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo sia per il gruppo con ssDNA, sia per i controlli negativi;
3. Nuove misure EIS e DPV per valutare le risposte a seguito dell'overnight;

4. Applicazione tramite protocollo di ibridazione del DNA complementare (cDNA) su due sensori funzionalizzati e su due sensori di controllo, i restanti sensori sono incubati con il solo buffer (bianco);
5. Nuove misure EIS e DPV per verificare l'avvenuta ibridazione.

Ho riportato i risultati ottenuti nelle figure 39 e 40.

Considerando le curve EIS ottenute per sensori funzionalizzati (fig. 39a) si nota immediatamente una problematica nelle risposte a seguito di ibridazione. La curva post ibridazione ottenuta in presenza di cDNA (linea blu) e la curva ottenuta con il solo buffer (linea rossa) risultano molto simili, dando valori di  $R_{ct}$  analoghi (fig. 41). Non è quindi rilevabile una variazione del parametro abbastanza evidente da permettere di distinguere i due casi.

Inoltre, esaminando anche le risposte EIS per controlli negativi (fig. 39b) insorge una seconda problematica dovuta all'aumento piuttosto elevato di  $R_{ct}$  su entrambe le curve post ibridazione. Dalla curva ottenuta in presenza di cDNA (linea blu) si ha, infatti, una crescita anomala del parametro, soprattutto considerando che i soli legami sulla superficie sono aspecifici dal momento che non vi è ssDNA. Valutando il risultato in presenza di solo bianco (linea rossa) è possibile vedere anche qui un aumento di  $R_{ct}$ , seppur più contenuto, che appare dunque dovuto all'azione del buffer di ibridazione sul sensore.

Analoghi risultati sono visibili dalle risposte DPV (fig. 40) dove la corrente di picco decresce in modo evidente soprattutto in presenza di funzionalizzazione, ma, anche in questo caso, non è visibile una variazione di  $I_p$  per permettere di rilevare l'avvenuta ibridazione con cDNA. Si nota, inoltre, un leggero shift positivo del potenziale di picco che si suppone determinato dalla risposta del sensore a misure consecutive e alla presenza di DNA.

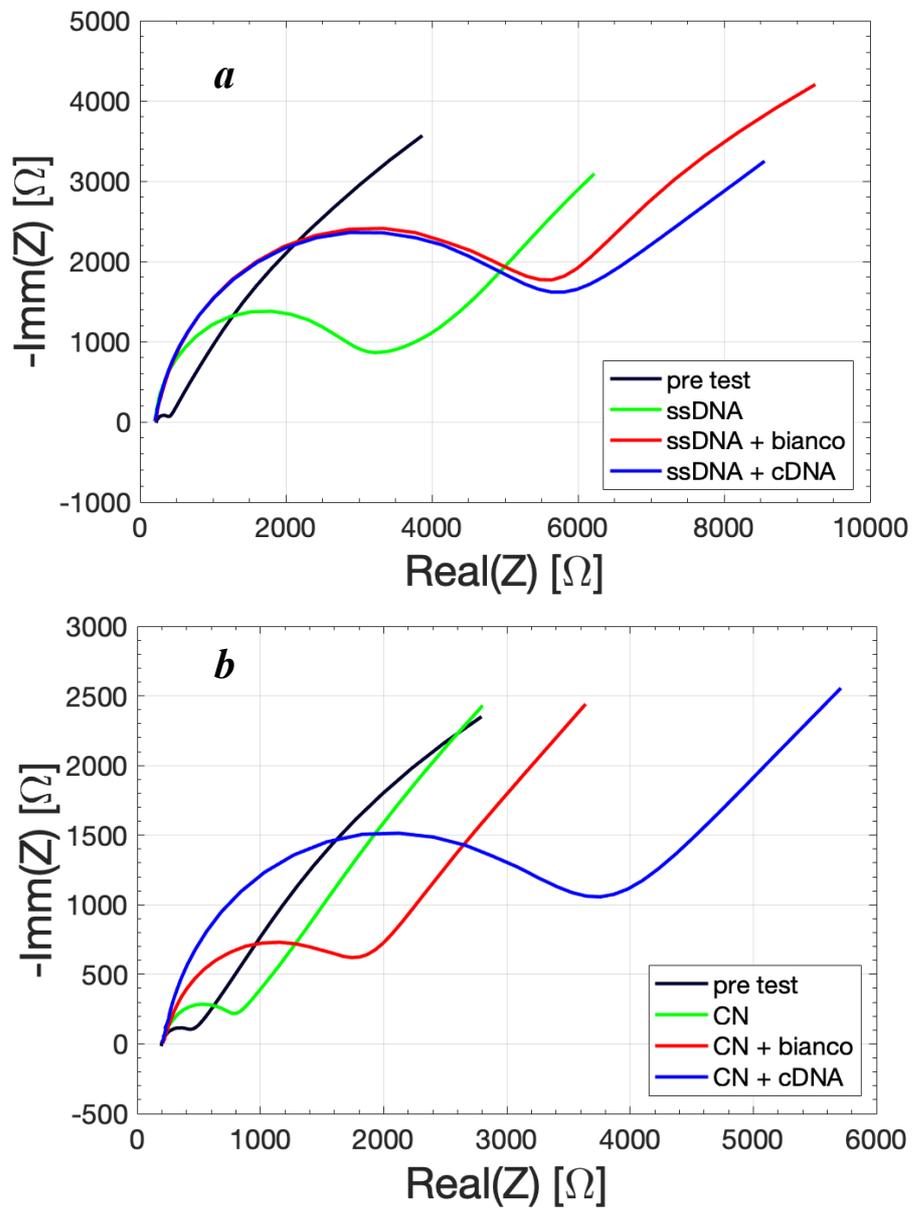


Figura 39. Curve EIS prima e dopo l'ibridazione per sensori funzionalizzati (a) e controlli negativi (b). Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati.

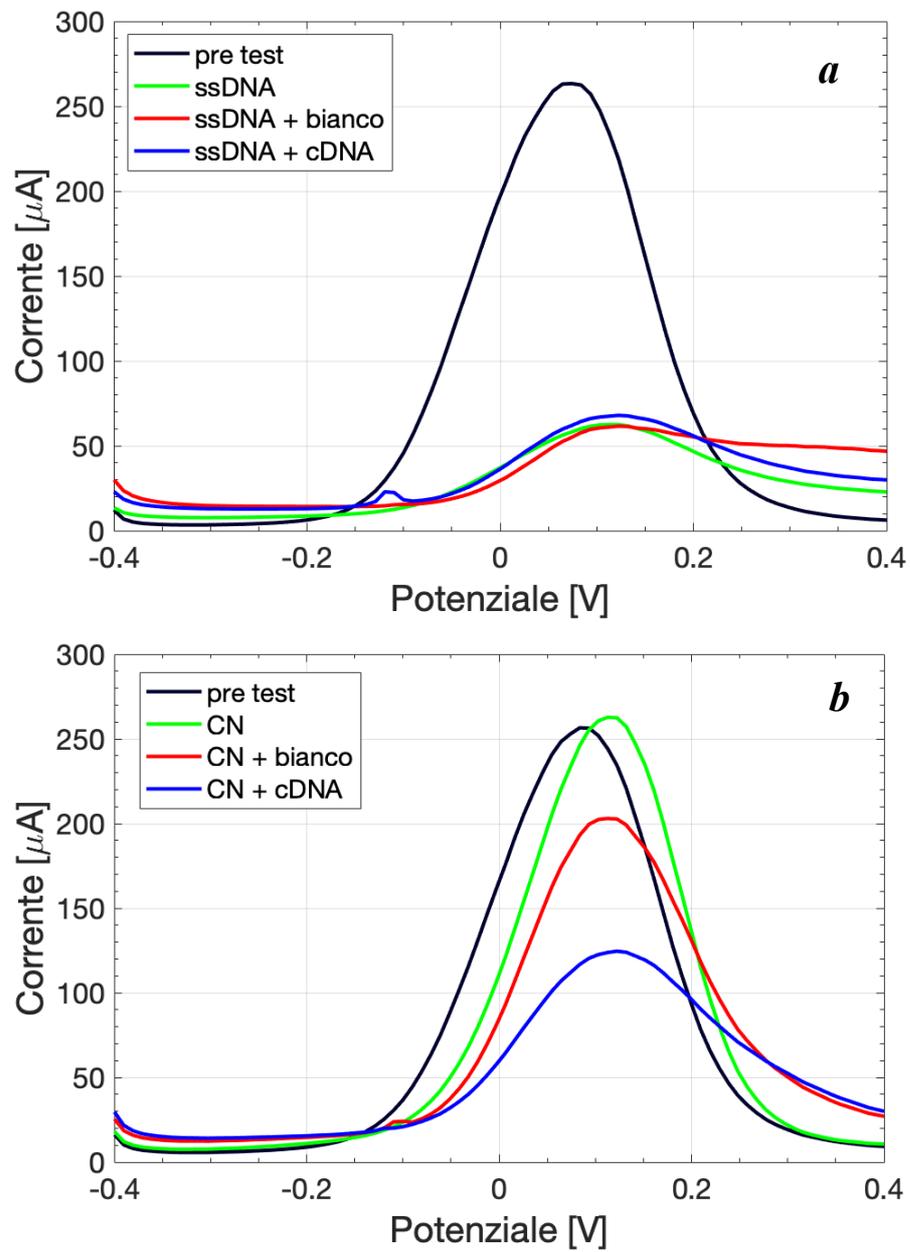


Figura 40. Curve DPV prima e dopo l'ibridazione per sensori funzionalizzati (a) e controlli negativi (b). Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati.

Queste considerazioni appaiono particolarmente evidenti dal confronto dei risultati in figura 41. Si nota in particolare come i valori ottenuti per l'ibridazione con il DNA complementare (♦) non siano nettamente distinguibili dai valori presenza di solo bianco (◆). Inoltre, è evidente l'elevata variazione sia di  $R_{ct}$  che di  $I_p$  a seguito del protocollo di ibridazione nei controlli negativi.

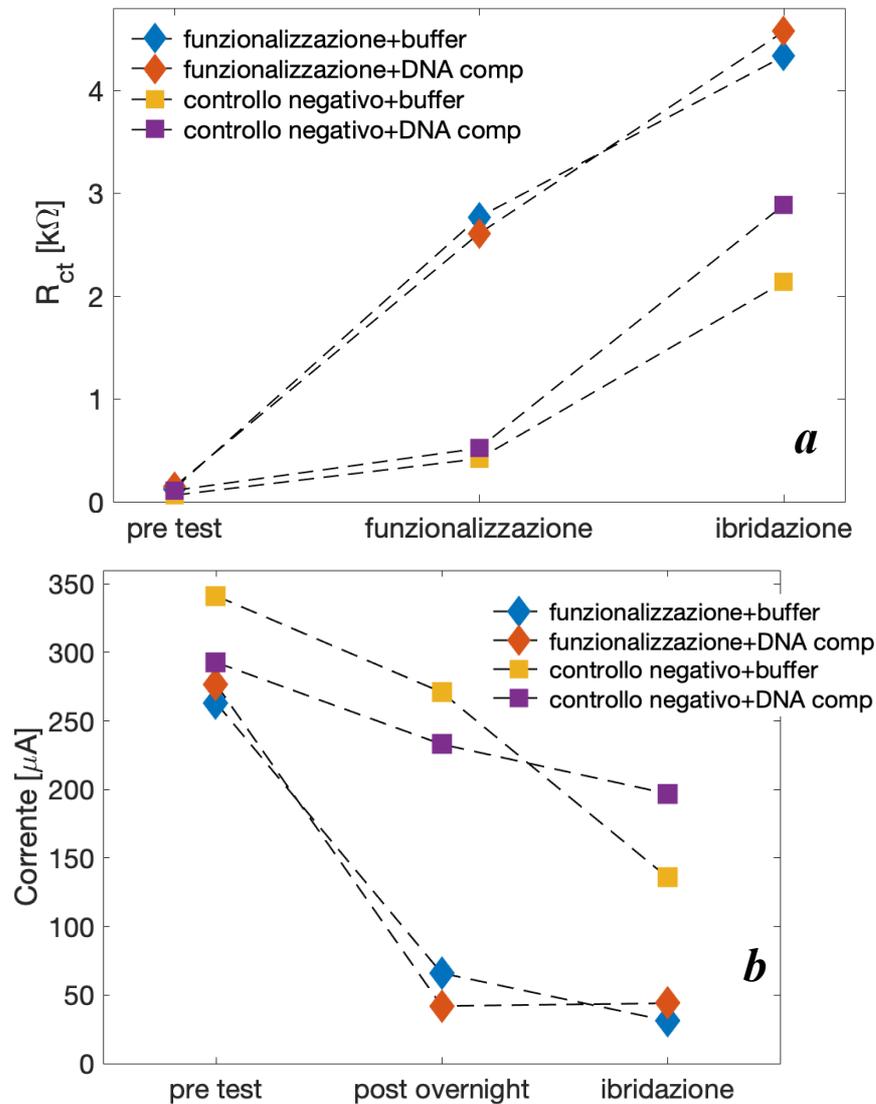


Figura 41.  $R_{ct}$  (a) e  $I_p$  (b) in funzione delle misure effettuate. Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati

Per confermare queste osservazioni ho svolto delle scansioni in fluorescenza a 635 nm su tutti i sensori a seguito del protocollo di ibridazione. I risultati (fig. 42) hanno evidenziato la presenza del DNA complementare sui sensori funzionalizzati, mentre quelli incubati con il solo buffer non indicano fluorescenza. Di conseguenza, si può

dedurre che l'evento di ibridazione avvenga effettivamente, ma che le misure elettrochimiche non siano in grado di rilevarlo, dal momento che non si nota la differenza di segnale prodotto sia per DPV che EIS.

Dai controlli negativi (fig. 43), invece, non appare esserci un segnale luminoso, come appunto atteso.



Figura 42. Scansioni in fluorescenza di sensori funzionalizzati a seguito dell'incubazione. I numeri 1 e 2 presentano ibridazione con cDNA, i numeri 3 e 4 sono stati incubati con il solo buffer.



Figura 43. Scansioni in fluorescenza di sensori di controllo. I numeri 1 e 2 sono incubati con cDNA, i numeri 3 e 4 con il solo buffer.

Le problematiche insorte durante questa prima prova di ibridazione rendono necessaria una ridefinizione dei protocolli utilizzati. Valutando la variazione dei parametri per il controllo negativo in presenza di solo buffer sembra che sia appunto quest'ultimo ad interagire sull'elettrodo in modo tale da non essere trascurabile, a prescindere dalla presenza di DNA. Ho, quindi, svolto delle prove di passivazione della superficie e di modifica del buffer per limitare la sua influenza sulle misure elettrochimiche.

#### 4.3.2 PASSIVAZIONE CON MUA

La passivazione della superficie ha lo scopo formare un sottile strato di molecole in modo da ridurre i siti liberi per legami aspecifici sull'elettrodo.

Con l'obiettivo di studiare l'effetto del solo buffer di ibridazione sulla superficie, per questa prova non ho utilizzato sensori funzionalizzati, ma ho verificato i risultati a seguito della sola passivazione con MUA tramite tecnica EIS poiché più sensibile alle modifiche superficiali.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS su quattro sensori fresh;
2. Due sensori subiscono passivazione in MUA 1 mM per un'ora secondo il protocollo di passivazione, i restanti vengono usati come controlli negativi;
3. Nuove misure EIS per valutare l'avvenuta passivazione;
4. Incubazione con buffer su tutti i sensori secondo il precedente protocollo di ibridazione;
5. Nuove misure EIS per studiare il comportamento in presenza di buffer.

Dai risultati presentati in fig. 44, si nota come la passivazione con MUA sulla superficie vada ad innalzare in modo evidente la  $R_{ct}$  (linea nera). A seguito dell'incubazione con il buffer, tale parametro aumenta ancora di più mandando il segnale a saturazione (linea rossa) dal momento che è difficilmente visibile il tratto corrispondente all'elemento di Warburg. L'ulteriore crescita di  $R_{ct}$  nella misura post incubazione porta a pensare, dunque, che la passivazione con MUA non sia particolarmente efficace nel limitare l'effetto del buffer.

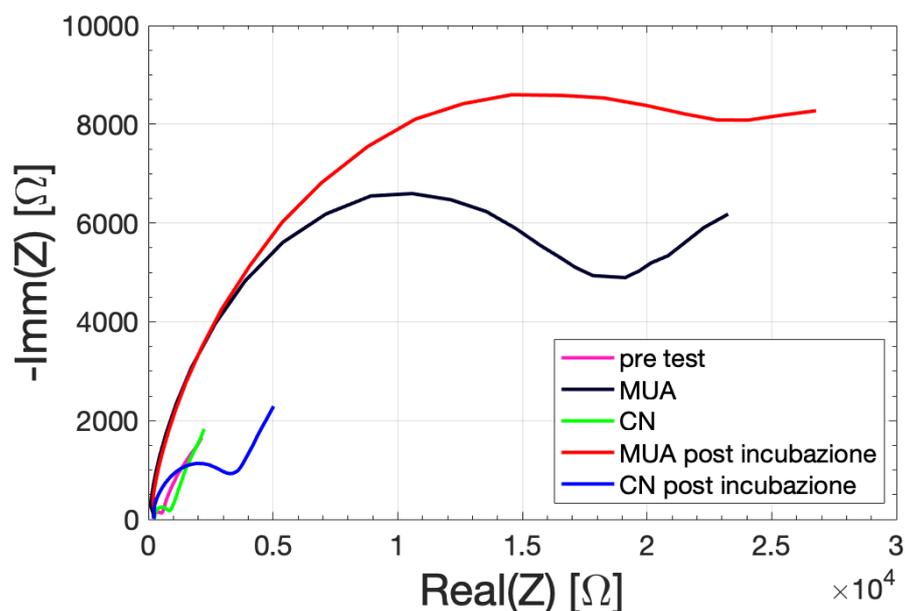


Figura 44. Curve EIS post passivazione con MUA e post incubazione con relativi controlli negativi. Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati.

### 4.3.3 PASSIVAZIONE CON MCH

Ho svolto la seconda prova di passivazione della superficie utilizzando MCH per valutare se la sua presenza insieme al buffer comportasse un risultato differente dal precedente e fosse in grado di limitare l'aumento di  $R_{ct}$ .

L'esperimento è definito con la medesima struttura, usando quattro sensori non funzionalizzati.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS su quattro sensori fresh;
2. Due sensori subiscono passivazione in MCH 1 mM per un'ora secondo il protocollo di passivazione, i restanti vengono usati come controlli negativi;
3. Nuove misure EIS per valutare l'avvenuta passivazione;
4. Incubazione con buffer su tutti i sensori secondo il precedente protocollo di ibridazione;
5. Nuove misure EIS per studiare il comportamento in presenza di buffer.

I risultati in figura 45 mostrano chiaramente come la passivazione con MCH (linea nera) mantenga il valore di  $R_{ct}$  simile a quello ottenuto per la seconda misura sul controllo negativo (linea verde). Tuttavia, a seguito dell'incubazione è evidente come l'MCH (linea rossa) non sia in grado di limitare l'effetto del buffer dal momento che la sua curva cresce in maniera analoga al controllo negativo (linea blu). Ne consegue che anche la passivazione con MCH sia inefficace allo scopo.

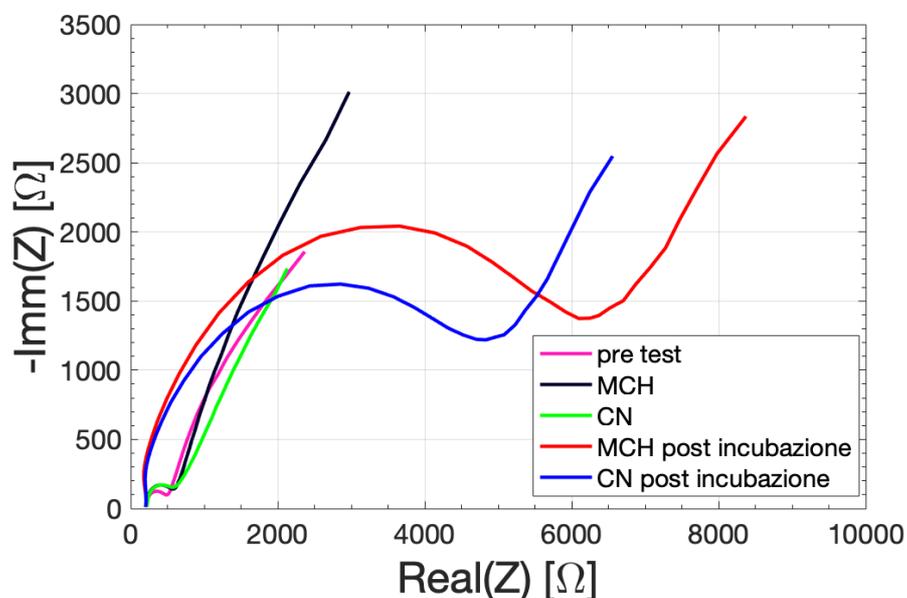


Figura 45 Curve EIS post passivazione con MCH e post incubazione con relativi controlli negativi. Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati.

#### 4.3.4 ANALISI DEI COMPONENTI DEL BUFFER

Dal momento che le prove di passivazione della superficie eseguite non hanno portato i risultati sperati, ho spostato l'attenzione sulla composizione del buffer per comprendere se l'aumento di  $R_{ct}$  fosse dovuto a uno o più dei suoi fattori.

Il buffer di ibridazione è composto da:

- SSC: stabilizzatore dell'ibridazione degli acidi nucleici;
- SDS: tensioattivo che migliora la qualità dell'ibridazione;
- BSA: proteina che occorre bloccare eventuali siti di legame aspecifico presenti;
- Formammide: agente denaturante che permette di abbassare la temperatura di ibridazione e favorisce la formazione di legami specifici.

Ho preso, quindi, in considerazione ciascuno di tali composti separatamente, applicando il protocollo di ibridazione precedentemente descritto e adattando le procedure di lavaggio per ogni componente in modo da non depositare sulla superficie ulteriori molecole.

Ho applicato, perciò, la procedura di risciacquo in quattro passaggi precedentemente descritta solo ai sensori di controllo, sui quali è stato depositato il buffer completo, mentre ho sciacquato i sensori trattati con SSC utilizzando solo gli ultimi tre passi della

procedura. Per i sensori trattati con formammide e SDS ho, invece, utilizzato tre gocce in agitazione di sola milliQ.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS su dodici sensori fresh;
2. Incubazione a coppie con i componenti del buffer, i restanti vengono usati come controlli;
3. Nuove misure EIS per valutare la variazione di  $R_{ct}$ .

Le misure EIS dopo l'incubazione (fig. 46) mostrano come, tra tutti i componenti, l'unico a comportare un aumento ingente di  $R_{ct}$  sia la BSA (linea rossa), mentre per gli altri i valori del parametro restano molto più contenuti e simili tra loro. La curva ottenuta per il controllo con il buffer completo (linea blu) risulta, invece, intermedia, e ciò si suppone sia dovuto all'interazione tra la BSA e i restanti componenti.

Il marcato effetto del buffer sul sensore sembra causato, quindi, dalla presenza di BSA che, essendo una proteina molto voluminosa usata per bloccare i siti liberi, modifica le proprietà superficiali dell'elettrodo in modo preponderante, tanto da indurre una forte risposta nella misura elettrochimica.

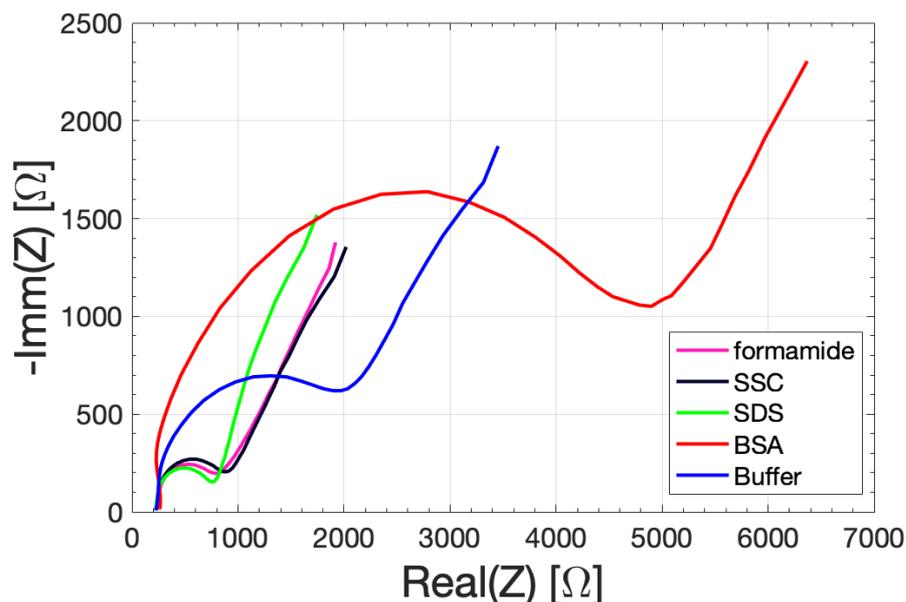


Figura 46. Misure EIS per l'incubazione con componenti del buffer.

#### 4.3.5 FRAMMENTAZIONE DELLA BSA

Il precedente esperimento ha portato in luce la necessità di un cambiamento nel buffer utilizzato senza però perdere le sue proprietà per favorire la corretta ibridazione. Perciò, ho eseguito una prova per aggirare il problema andando ad usare l'enzima proteinasi K con il fine di frammentare la BSA per potere rendere la proteina meno ingombrante, e limitare l'occupazione della superficie, senza tuttavia rinunciare alla sua funzione di bloccaggio dei siti di legame aspecifico.

Il trattamento del buffer con proteinasi K avviene secondo il protocollo di preparazione descritto in precedenza, lasciando l'enzima agire per un'ora al fine di ottenere la frammentazione e rimuovendolo al termine della sua azione tramite aumento di temperatura del composto. Per rendere omogeneo il protocollo sperimentale, anche il buffer in assenza di proteinasi K è stato sottoposto al medesimo periodo di attesa e variazione di temperatura.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS su tre sensori fresh;
2. Due sensori vengono incubati con buffer trattato, il rimanente con buffer senza trattamento come controllo;
3. Nuove misure EIS.

Dai risultati (fig. 47) appare evidente come il trattamento (linea blu) comporti una  $R_{ct}$  nettamente inferiore a quanto si ottiene per il buffer senza proteinasi K (linea rossa). L'uso di tale enzima per la frammentazione della BSA sembra garantire, dunque, una riduzione dell'influenza del buffer sulle misure.

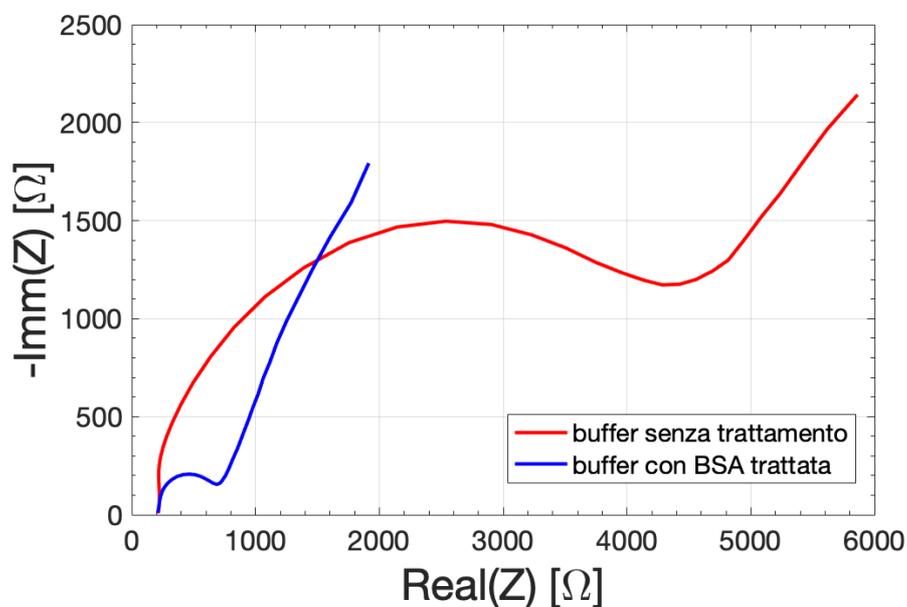


Figura 47. Curve EIS post incubazione con buffer trattato tramite proteinasi K e buffer senza trattamento. Risultati riferiti ad uno solo dei sensori trattati.

#### 4.4 IBRIDAZIONE CON DNA COMPLEMENTARE

Le successive prove di ibridazione, effettuate tramite l'uso del buffer precedentemente definito, si sono rivelate soddisfacenti per quanto riguarda la distinzione tra controlli negativi e sensori funzionalizzati e hanno messo in luce l'abilità del sistema di rilevare la presenza di DNA complementare ibridato.

Tuttavia, permane una certa difficoltà nel produrre una variazione di segnale abbastanza elevata per poter distinguere con maggior sensibilità l'evento di ibridazione.

Ho realizzato, quindi, degli ulteriori esperimenti di modifica della superficie tramite passivazione e studiato soluzioni di rilevazione alternative per poter aumentare l'intensità del segnale e permettere così di aumentare la sensibilità del sistema.

##### 4.4.1 SECONDA PROVA DI IBRIDAZIONE CON BUFFER TRATTATO

Per convalidare l'efficacia del buffer trattato con proteinasi K, ho effettuato una nuova prova di ibridazione con il DNA complementare utilizzando un gruppo di sensori funzionalizzati e un gruppo di sensori di controllo.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;

2. Incubazione overnight secondo il protocollo sia per il gruppo con ssDNA sia per i controlli negativi;
3. Nuove misure EIS e DPV per valutare le risposte a seguito dell'overnight;
4. Applicazione tramite protocollo di ibridazione di DNA complementare o bianco sia sui sensori funzionalizzati che sui sensori di controllo;
5. Nuove misure EIS e DPV per verificare l'avvenuta ibridazione.

Ho riportato i risultati ottenuti nelle figure 48 e 49.

Dalle curve EIS si nota immediatamente che la risposta per il controllo negativo (fig. 48b) a seguito dell'incubazione, sia con bianco (linea rossa) che con cDNA (linea blu), è molto più contenuta rispetto alla prima prova di ibridazione effettuata. Tale risultato appare ancora più evidente dalle misure DPV (fig. 49b) per le quali i picchi di corrente risultano molto simili tra loro e di poco differenti dal valore ottenuto per il sensore fresh. Inoltre, sia per EIS che per DPV nei controlli negativi, la variazione dei parametri in presenza di cDNA differisce di poco da quella causata dal bianco, sebbene comunque qualche catena riesca a permanere sulla superficie in modo aspecifico nonostante le procedure di lavaggio dei sensori.

Differente è, invece, il caso delle risposte EIS rilevate per i sensori funzionalizzati (fig. 48a). Dopo il periodo di incubazione, verifica un abbassamento di  $R_{ct}$  che appare più evidente per la curva ottenuta con il bianco (linea rossa) rispetto al cDNA (linea blu). Il risultato è confermato dalle curve DPV (fig. 49a) dove si vede un innalzamento dei valori di  $I_p$  rispetto alla misura post funzionalizzazione.

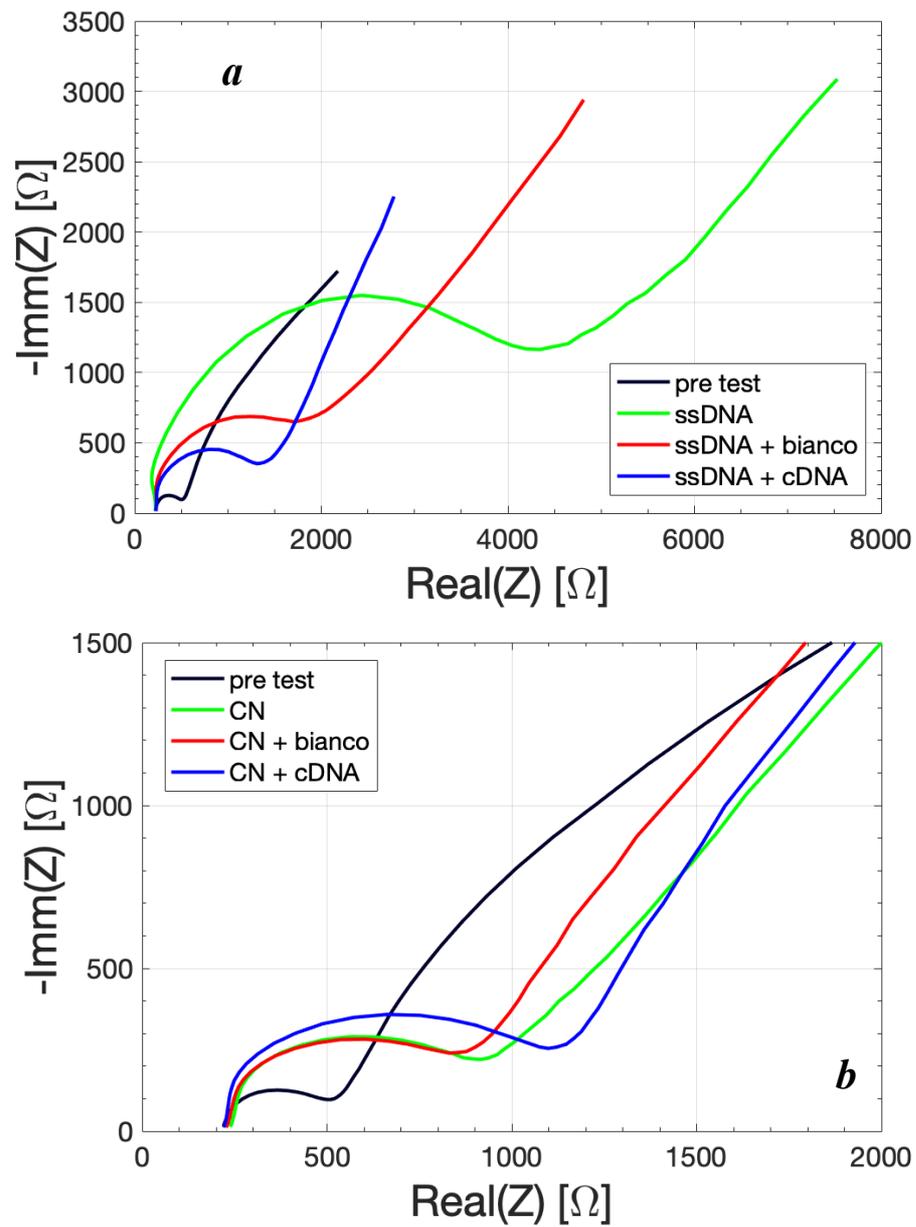


Figura 48. Curve EIS prima e dopo l'ibridazione per sensori funzionalizzati (a) e controlli negativi (b). Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati. Si nota ora la differenza più marcata tra cDNA e bianco per i sensori funzionalizzati.

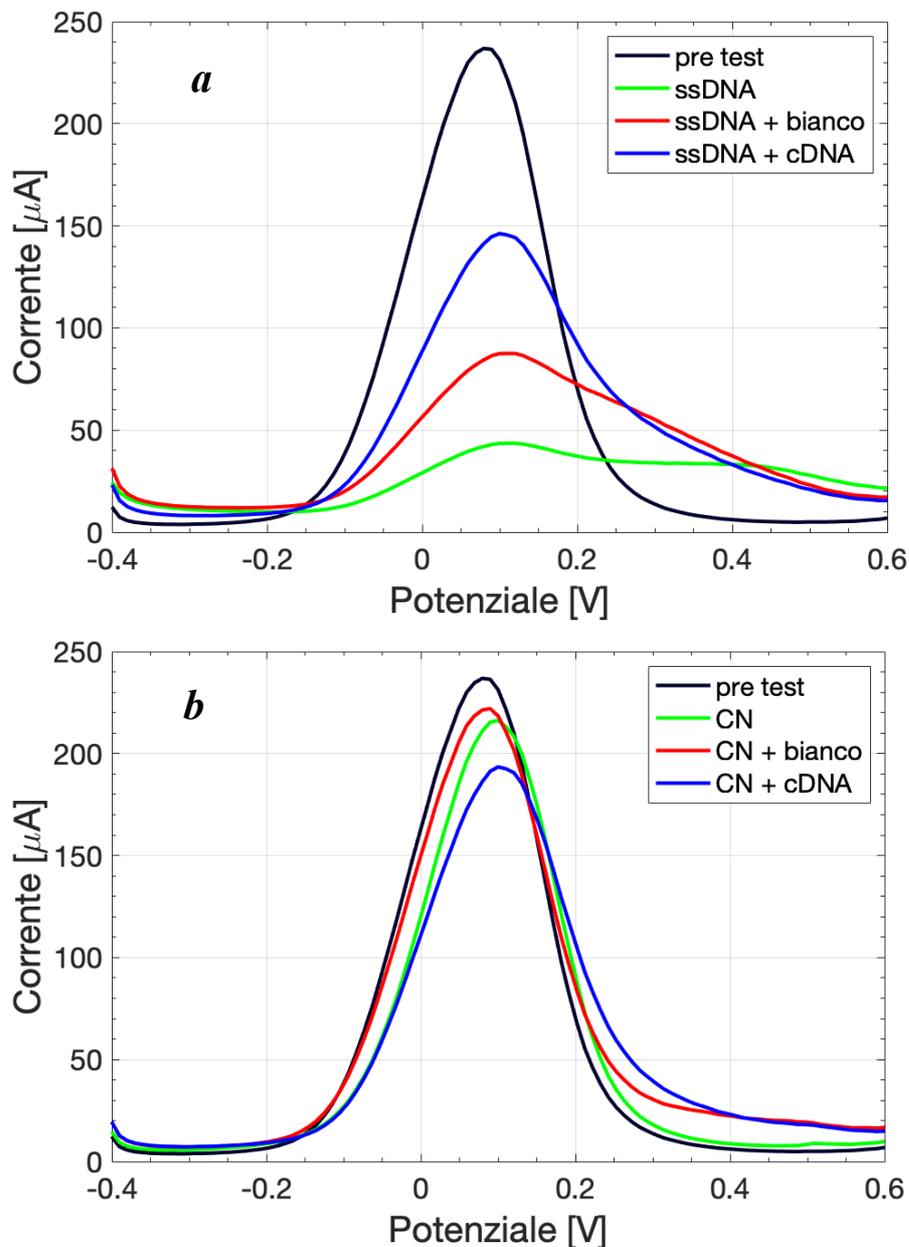


Figura 49. Curve DPV prima e dopo l'ibridazione per sensori funzionalizzati (a) e controlli negativi (b). Risultati riferiti a due sensori tra quelli utilizzati.

La differenza di comportamento tra sensori di controllo e funzionalizzati appare adesso molto più evidente, dal momento che non si verificano significative variazioni di segnale in assenza di ssDNA.

La presenza di DNA complementare sui sensori funzionalizzati viene ora rilevata grazie ad una variazione dei parametri, a seguito dell'incubazione con bianco o cDNA, che permette di distinguere l'evento di ibridazione. La differenza di comportamento, seppur non così netta, risulta evidente in entrambe le tecniche di misura (fig. 50). Si evidenzia,

inoltre, un'ampia variabilità delle misurazioni post ibridazione che potrebbe in questo caso essere dovuta ad un lavaggio poco efficace.

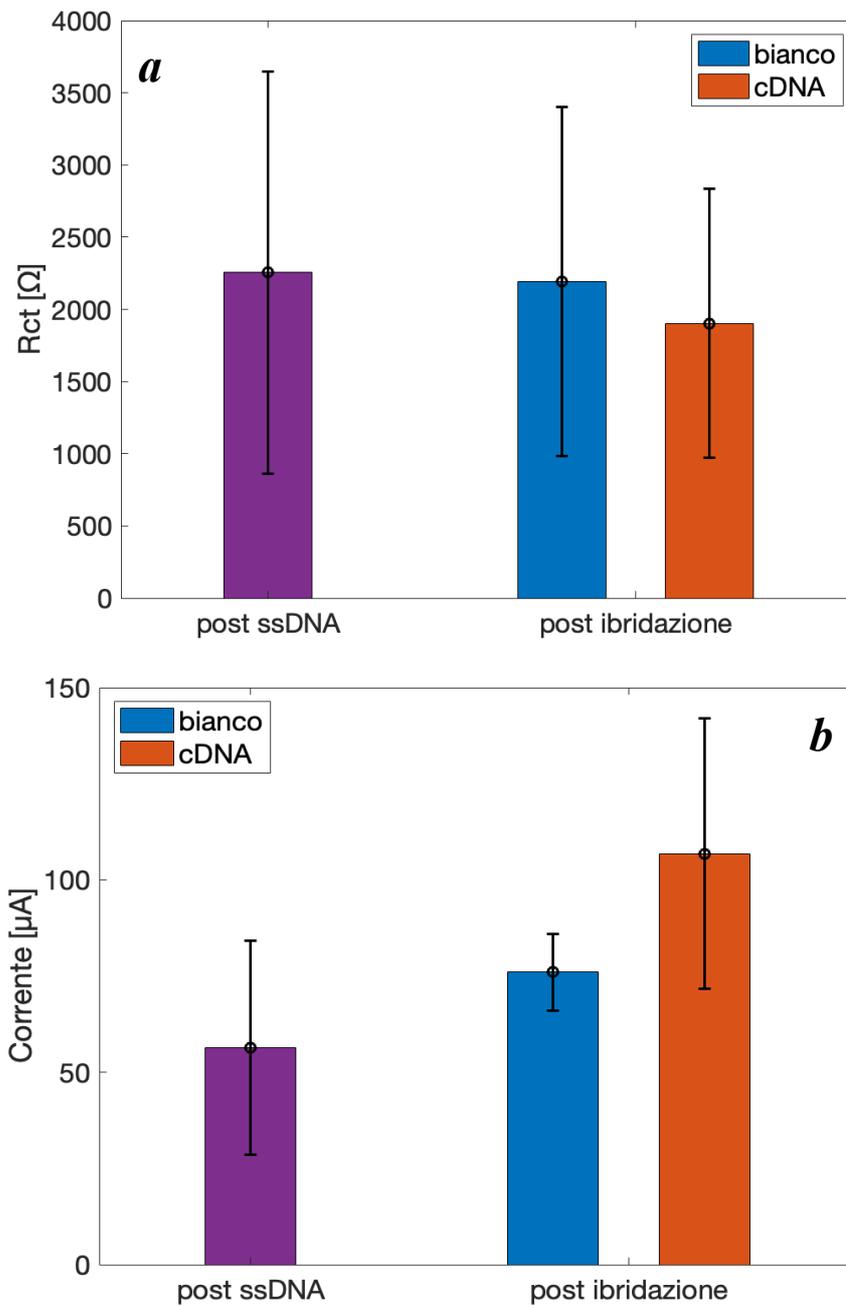


Figura 50. Media e deviazione standard  $R_{ct}$  (a) e  $I_p$  (b) in funzione delle misure effettuate.

Oltre alle misure EIS e DPV, sui medesimi sensori ho effettuato, da ultimo, delle scansioni in fluorescenza post ibridazione a seguito del protocollo di lavaggio per verificare la permanenza del DNA complementare sulla superficie.

I risultati sui sensori funzionalizzati (fig. 51) confermano quanto visto con le misure elettrochimiche. Nei fatti, si evidenzia una fluorescenza molto marcata per i sensori incubati con DNA complementare, mentre non si osserva segnale per i sensori con il solo buffer.

Si nota, inoltre, una differenza di intensità nella fluorescenza per i sensori con DNA target, il che appare correlato alla variabilità di misure EIS e DPV post ibridazione che si vede in elettrochimica.

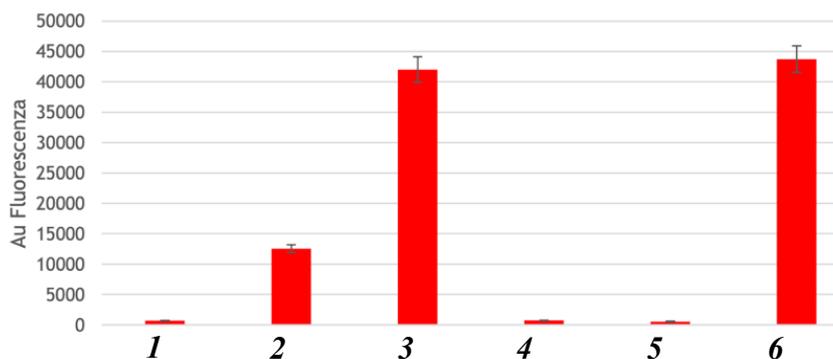


Figura 51. Intensità del segnale in fluorescenza post ibridazione su sensori funzionalizzati. I sensori numero 1-4-5 sono stati incubati con il solo buffer, mentre i sensori 2-3-6 presentano cDNA.

#### 4.4.2 TERZA PROVA DI IBRIDAZIONE CON BUFFER TRATTATO

Nell'ottica delle precedenti considerazioni, ho realizzato un'ulteriore prova su un nuovo gruppo di sensori per verificare il loro comportamento a seguito dell'ibridazione.

L'obiettivo è, dunque, quello di confrontare le risposte EIS e DPV ottenute successivamente all'incubazione con DNA target (cDNA), bianco e DNA non complementare (NcDNA), il quale per questo esperimento è ricavato dall'*Escherichia coli*, per poter valutare la capacità di rilevazione del sistema e definire se vi sia presenza di un'eventuale aspecificità di legame.

Protocollo utilizzato:

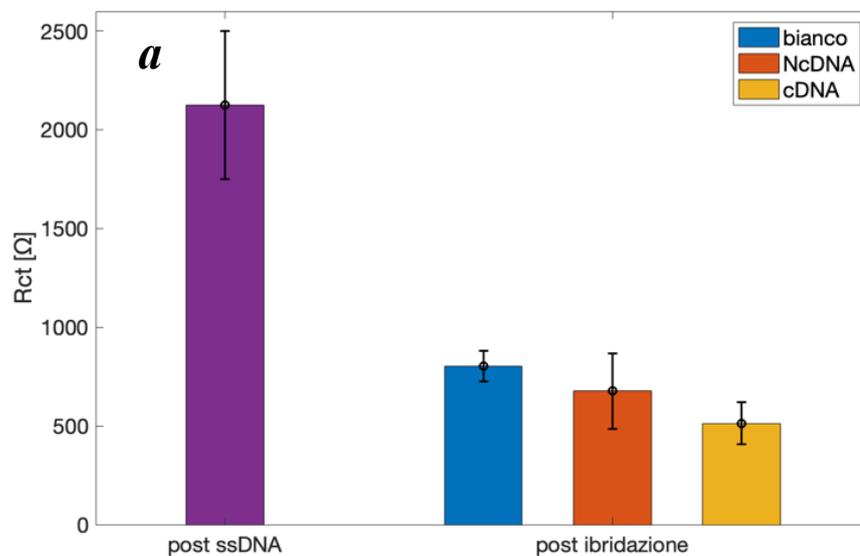
1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo su tutti i sensori;
3. Nuove misure EIS e DPV;
4. Applicazione tramite protocollo di ibridazione di cDNA, bianco o DNA non complementare (*E. coli*);
5. Nuove misure EIS e DPV per valutarne le differenze.

Dai risultati in figura 52, presentati tramite la media e la deviazione standard dei valori dei parametri ricavati, si conferma la conclusione precedente: entrambe le tecniche di misura mettono in luce l'evento di ibridazione attraverso una diversa variazione dei segnali. Sarebbe auspicabile, tuttavia, che tale differenza fosse più ampia.

Per le misure EIS (fig. 52a) si nota che il valore di  $R_{ct}$  ottenuto per cDNA è evidentemente più basso rispetto a quelli ricavati per bianco e NcDNA. In particolare, è visibile una variazione tra i risultati di bianco e DNA complementare, con delle deviazioni standard relativamente contenute. Analogamente, questo risultato si riflette sulle misure DPV (fig. 52b) per le quali si nota una discreta differenza tra le medie di  $I_p$ , correlate anch'esse a piccole deviazioni standard.

Diverso è, invece, il risultato per il DNA non complementare, che presenta deviazioni standard più elevate rispetto alle precedenti. La variabilità della misura è particolarmente evidente per  $I_p$ , dove è possibile vedere un'ampia deviazione standard riferita alla media per NcDNA.

Il comportamento intermedio dei sensori incubati con DNA non complementare lascia, dunque, intendere la presenza di una forte aspecificità dei legami sulla superficie.



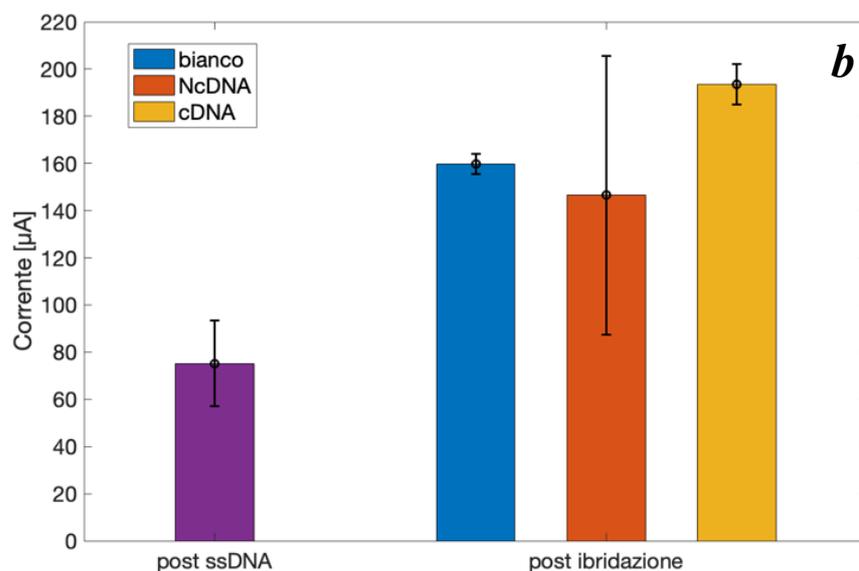


Figura 52. Media e deviazione standard di  $R_{ct}$  (a) e  $I_p$  (b) in funzione delle misure effettuate. La variabilità delle misure è ora più contenuta, eccetto per NcDNA.

In questo caso, mio malgrado, non ho potuto effettuare delle scansioni in fluorescenza poiché il DNA di E. coli utilizzato non è stato marcato con una label fluorescente; pertanto, nelle prove successive l'ho sostituito con un frammento di un diverso genoma batterico con etichetta fluorescente.

Nonostante la mancanza di analisi in fluorescenza, questa nuova prova di ibridazione ha confermato i risultati di quella precedente e ha evidenziato maggiormente il riconoscimento dell'evento di ibridazione. L'intensità del segnale prodotto da tale evento, tuttavia, rimane comunque ridotta e rende difficile garantire la distinzione dell'ibridazione nell'ottica di una futura applicazione sul campo. In aggiunta, le misure con il DNA non complementare hanno messo in luce un'ulteriore problematica di aspecificità dei legami.

#### 4.4.3 PASSIVAZIONE CON MCH POST FUNZIONALIZZAZIONE

Allo scopo di aggirare il problema dell'aspecificità e di aumentare la sensibilità della rilevazione, ho eseguito una prova di passivazione della superficie con MCH a seguito della funzionalizzazione. Tutti i sensori utilizzati, perciò, sono stati prima funzionalizzati con il DNA sonda in overnight e, successivamente, hanno subito il processo di passivazione. L'obiettivo di tale esperimento era, infatti, quello di andare a ridurre i siti rimasti vacanti dopo la funzionalizzazione, per evitare successivi legami

aspecifici durante la fase di ibridazione, e valutare se l'uso di uno strato passivante potesse aumentare le differenze tra i valori ricavati dalle misure elettrochimiche.

Dal momento che si intende valutare anche la permanenza di DNA non complementare, l'*Escherichia coli* usato in precedenza è stato sostituito da DNA di una specie del genere *Campylobacter* diversa da *C. jejuni* che presenta anch'esso un'etichetta fluorescente per permettere la successiva scansione.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo su tutti i sensori;
3. Nuove misure EIS e DPV;
4. Passivazione con MCH 1 mM su tutti i sensori per un'ora secondo il protocollo;
5. Nuove misure EIS e DPV;
6. Applicazione tramite protocollo di ibridazione di cDNA, bianco o DNA non complementare;
7. Nuove misure EIS e DPV per valutarne le differenze.

I risultati riassunti in figura 53 confermano il comportamento atteso per la passivazione con MCH (linea rosa) per la quale si ha una curva simile a quella ottenuta con funzionalizzazione (linea nera). Si nota, inoltre, una buona distinzione tra la curva relativa a cDNA (linea blu) e quella relativa al bianco (linea verde) che appare molto simile a quella della passivazione. Tuttavia, sembra che la problematica dell'aspecificità non sia risolta tramite l'uso di MCH dal momento che la curva ottenuta con NcDNA (linea rossa) tende a diminuire troppo rispetto al bianco.

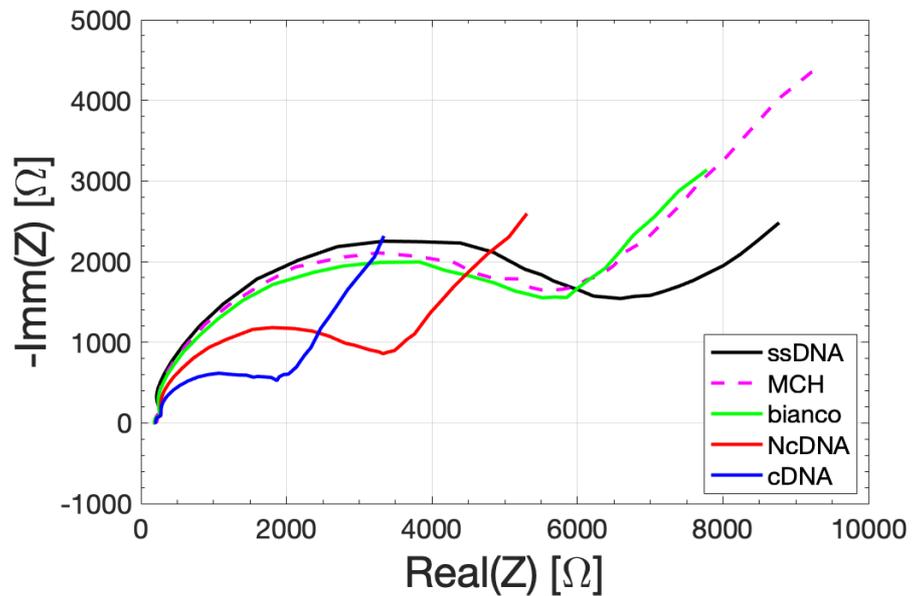


Figura 53. Curve EIS in presenza di passivazione con MCH post funzionalizzazione. Risultati relativi ad un solo sensore tra quelli usati.

Tali considerazioni sono ancora più evidenti dal confronto di media e deviazione standard di  $R_{ct}$  e  $I_p$  dei sensori usati (fig. 54).

Considerando i valori di  $R_{ct}$  (fig. 54a) si nota immediatamente come la variabilità del parametro sia molto elevata a seguito della passivazione, ma ciò può essere spiegato dalla presenza di DNA sonda e dal differente numero di siti liberi disponibili per l'MCH sulla superficie. Le risposte post ibridazione sia per misure DPV che per EIS invece mostrano particolarmente bene la variazione tra bianco e DNA complementare, già evidenziata in precedenza, così come la tendenza del DNA non complementare ad avere lo stesso comportamento del target.

Si può concludere, dunque, che la passivazione con l'MCH sia in grado di aumentare la sensibilità della rilevazione, andando ad incrementare la differenza di comportamento tra bianco e DNA complementare. Inoltre, essa limita la variazione della risposta dovuta al solo buffer post funzionalizzazione e quella post ibridazione. Non sembra, tuttavia, capace di evitare la forte aspecificità dovuta a NcDNA.

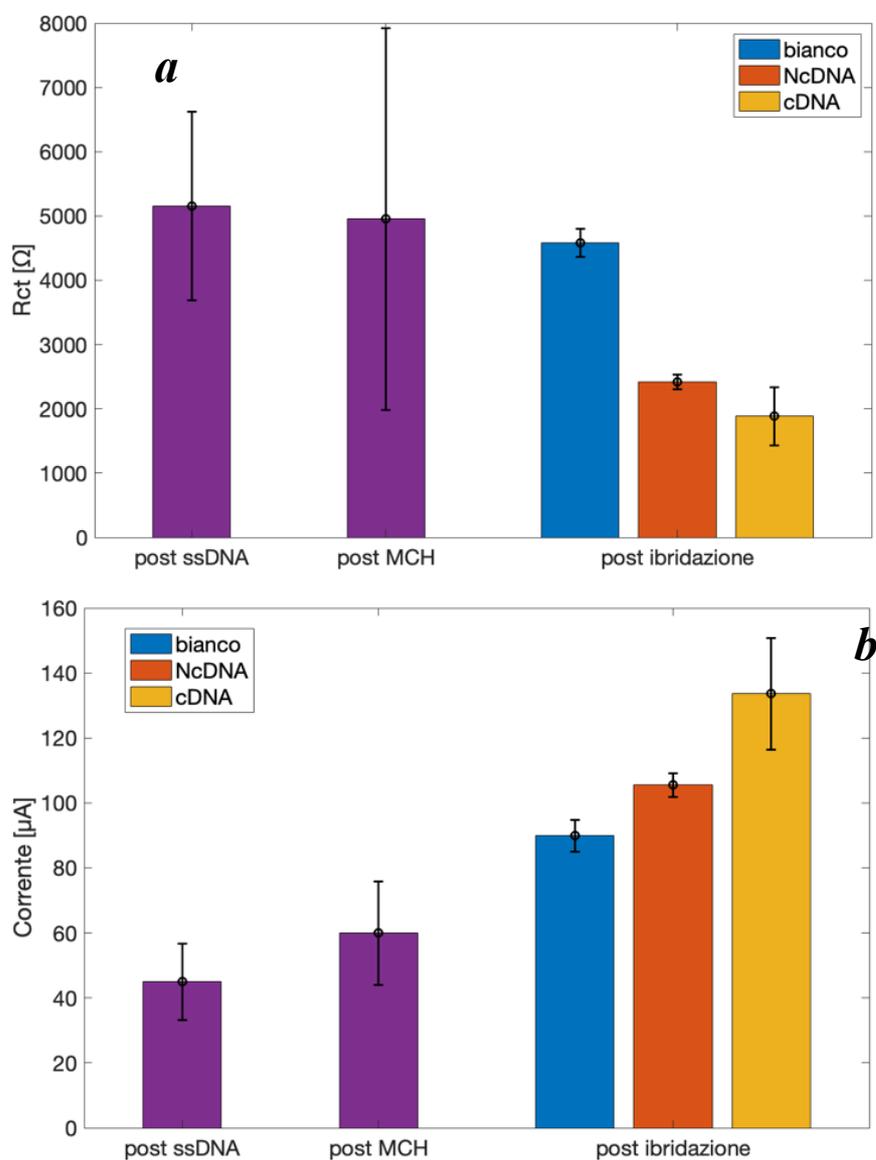


Figura 54. Media e deviazione standard di  $R_{ct}$  (a) e  $I_p$  (b) in funzione delle misure effettuate. È particolarmente evidente la differenza di comportamento post ibridazione tra bianco e cDNA.

Ho realizzato un'analisi in fluorescenza a 532 nm sui sensori a seguito della funzionalizzazione e, successivamente, alla passivazione con MCH per valutare come quest'ultima vada ad interagire con le sonde di DNA presenta.

Dal confronto delle scansioni (fig. 55) si evidenzia che la passivazione comporta una leggera diminuzione di intensità del segnale, ma la fluorescenza è ancora molto elevata, segno che la sonda permane sulla superficie.

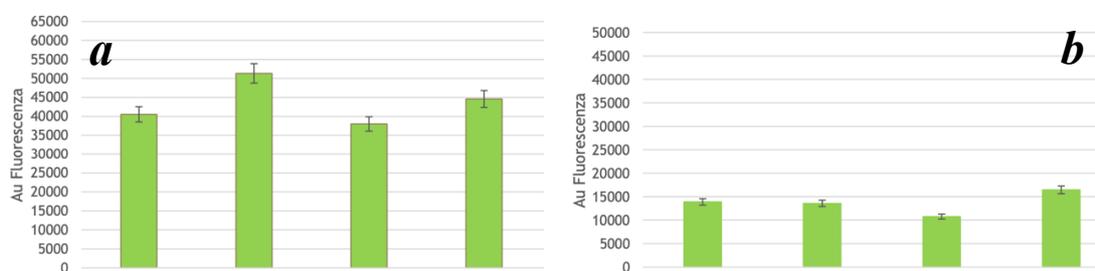


Figura 55. Confronto delle intensità del segnale in fluorescenza post funzionalizzazione (a) e post passivazione (b) con MCH su sensori funzionalizzati.

Infine, si confermano i risultati (fig. 56) delle misure elettrochimiche con le scansioni acquisite che mostrano un segnale luminoso sia in presenza sia di cDNA che di NcDNA sui diversi sensori, a conferma che la passivazione con MCH non è in grado di limitare il problema dell'aspecificità insorto.

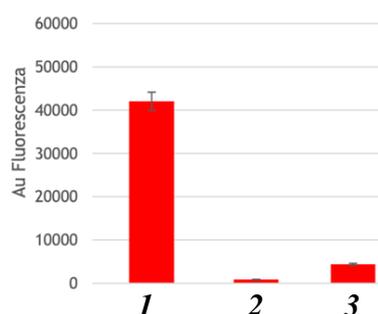


Figura 56. Intensità del segnale in fluorescenza post ibridazione su sensori funzionalizzati e passivati con MCH. Il sensore numero 1 presenta cDNA, il numero 2 è incubato con solo bianco e il numero 3 presenta NcDNA.

#### 4.4.4 PASSIVAZIONE CON MUA POST FUNZIONALIZZAZIONE

Visti i risultati della prova di passivazione con MCH, ho eseguito un secondo tentativo di passivazione tramite MUA per valutare se vi fossero differenze di comportamento.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo su tutti i sensori;
3. Nuove misure EIS e DPV;
4. Passivazione con MUA 1 mM su tutti i sensori per un'ora secondo il protocollo;
5. Nuove misure EIS e DPV;

6. Applicazione tramite protocollo di ibridazione di cDNA, bianco o DNA non complementare;
7. Nuove misure EIS e DPV per valutarne le differenze.

I risultati sono presentati in figura 57.

Anche in questo caso la risposta ottenuta a seguito della passivazione con il MUA (linea rosa) è analoga al comportamento atteso poiché, come già studiato, tale modifica superficiale comporta un ingente aumento di  $R_{ct}$ .

Al contrario, nonostante l'evidente abbassamento tra la curva relativa al MUA e le curve post ibridazione, le risposte ottenute per bianco (linea verde) e NcDNA (linea rossa) sono molto più simili tra loro rispetto a quanto ottenuto con la passivazione MCH. Tuttavia, appare essere diminuita la differenza con la curva relativa al DNA complementare (linea blu).

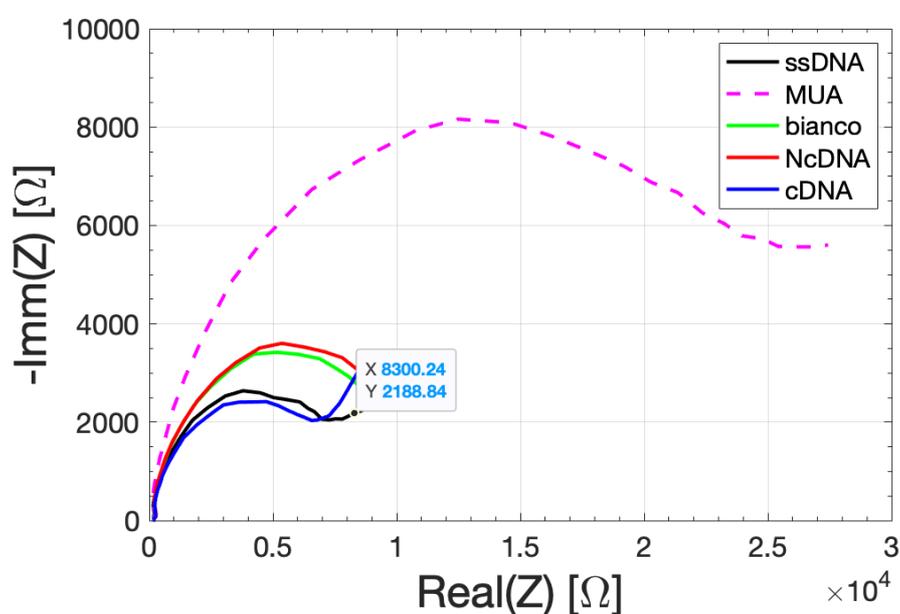


Figura 57. Curve EIS in presenza di passivazione con MUA post funzionalizzazione. Risultati relativi ad un solo sensore tra quelli usati.

Considerando tutti i sensori utilizzati, i valori di  $R_{ct}$  (fig. 58a) dopo la passivazione mostrano un ampio intervallo di variabilità, spiegabile sempre dalla presenza di ssDNA e dal differente numero di siti disponibili. Dai valori post ibridazione, invece, si nota che la  $R_{ct}$  media per il DNA non complementare risulta essere di poco maggiore rispetto a quanto ottenuto con il bianco, suggerendo che il MUA sia abbastanza efficace

nell'evitare legami aspecifici. Tale risultato è più evidente dalle misure di corrente di picco (fig. 58b) per le quali la media di  $I_p$  in presenza di NcDNA risulta più bassa rispetto a quella di DNA target.

Tuttavia, insorge il problema della scarsa variazione di risposta tra bianco e DNA complementare che, invece, era ben visibile con MCH.

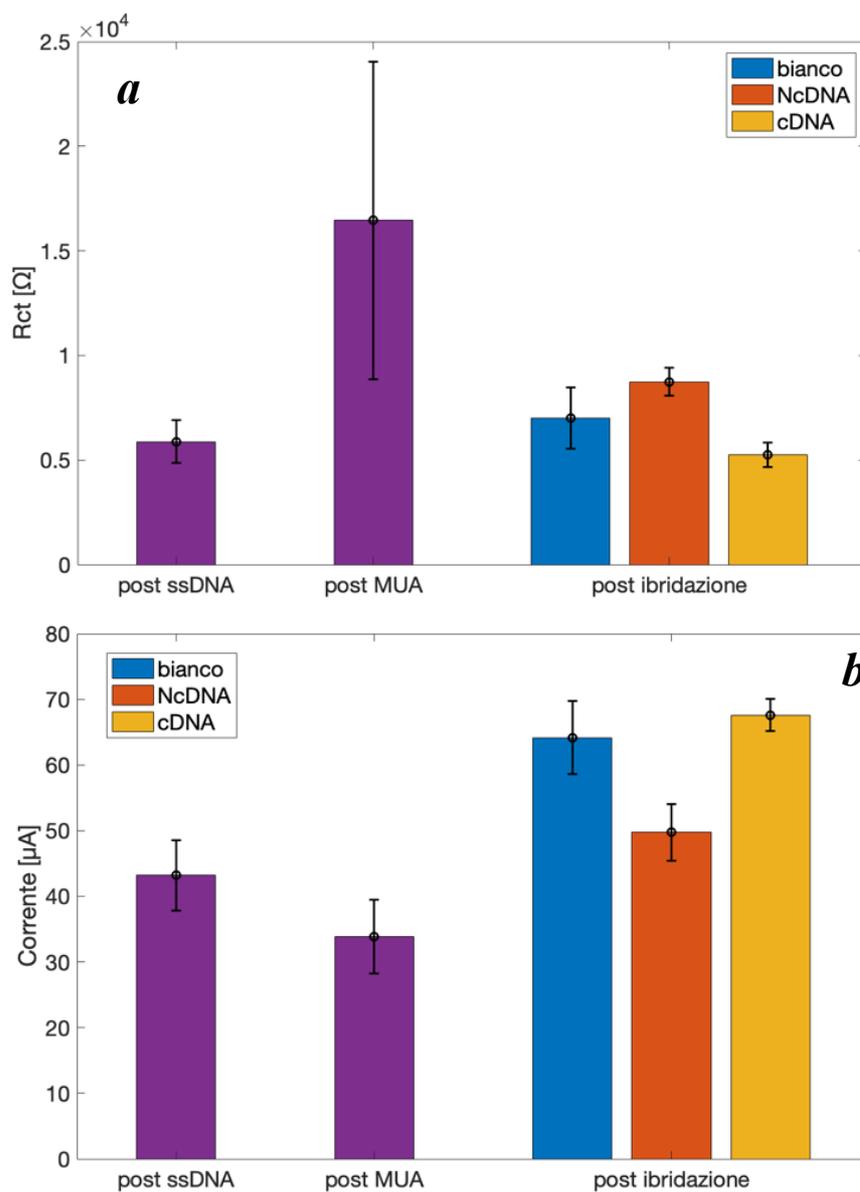


Figura 58. Media e deviazione standard di  $R_{ct}$  e  $I_p$  in funzione delle misure effettuate. È particolarmente evidente nel grafico di destra per i picchi di corrente la differenza di comportamento post ibridazione tra NcDNA e cDNA.

Ho svolto inizialmente delle scansioni in fluorescenza a 532 nm (fig. 59) confrontando la risposta di sensori funzionalizzati prima e dopo la passivazione con MUA e, come nel caso precedente con MCH, si nota un abbassamento di intensità nel segnale che però rimane comunque piuttosto alto, indicando la presenza di ssDNA ancora adeso sulla superficie.

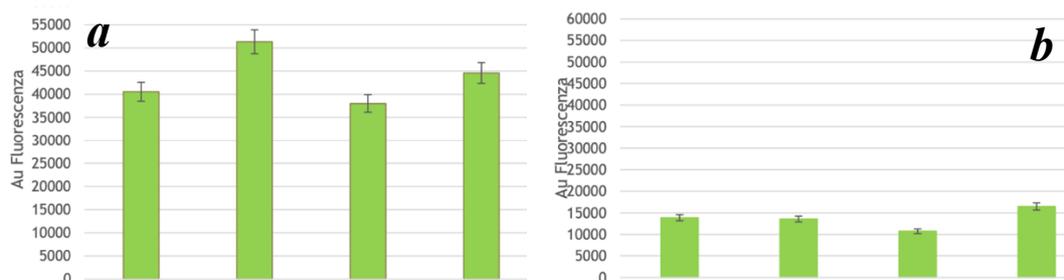


Figura 59. Confronto delle intensità del segnale in fluorescenza post funzionalizzazione (a) e post passivazione (b) con MUA su sensori funzionalizzati.

Di contro, dalle scansioni in fluorescenza a 635 nm post ibridazione (fig. 60) si conferma l'azione del MUA nel limitare i legami aspecifici poiché la fluorescenza residua per NcDNA è molto bassa e analoga a quella ottenuta con il bianco.

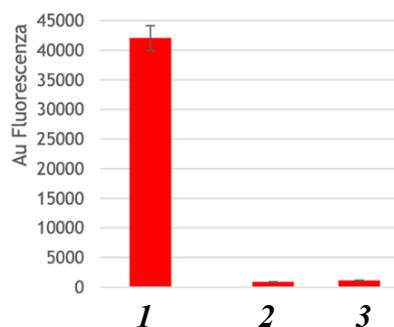


Figura 60. Intensità del segnale in fluorescenza post ibridazione su sensori funzionalizzati e passivati con MUA. Il sensore numero 1 presenta cDNA, il numero 2 è incubato con solo bianco e il numero 3 presenta NcDNA.

Dalle misure elettrochimiche e dalle scansioni in fluorescenza si deduce, dunque, che il MUA sia in grado di limitare il numero di legami aspecifici sulla superficie. Tuttavia, è evidente come non favorisca la distinzione tra le risposte dovute ai differenti composti presenti sui sensori.

#### 4.4.5 PASSIVAZIONE CON BUFFER POST FUNZIONALIZZAZIONE

Tutti gli esperimenti di ibridazione visti finora e le successive prove di passivazione mostrano delle variazioni di  $R_{ct}$  e  $I_p$  anche per sensori incubati con il solo buffer trattato tramite proteinasi K, in assenza di qualsiasi tipo di DNA. Si può, quindi, presupporre una certa influenza del buffer stesso nelle misure. Tale contributo si presume realisticamente dovuto alla presenza di BSA che, seppur frammentata, rimane sull'elettrodo per bloccare siti di legame aspecifico. Pertanto, come ulteriore prova, ho eseguito una passivazione della superficie utilizzando il buffer di ibridazione con l'obiettivo di sfruttare le proprietà di bloccaggio della BSA per limitare l'aspecificità e migliorare la sensibilità.

Protocollo utilizzato:

1. Caratterizzazione EIS e DPV su sensori fresh;
2. Incubazione overnight secondo il protocollo su tutti i sensori;
3. Nuove misure EIS e DPV;
4. Passivazione con buffer trattato con proteinasi K su tutti i sensori tramite incubazione di un'ora con il bianco secondo il protocollo di ibridazione;
5. Nuove misure EIS e DPV;
6. Applicazione tramite protocollo di ibridazione di cDNA, bianco o DNA non complementare;
7. Nuove misure EIS e DPV per valutarne le differenze.

Le risposte EIS (fig. 61) di questa nuova prova di passivazione mettono immediatamente in evidenza la decrescita di  $R_{ct}$  successiva alla passivazione (linea rosa) e si nota come le curve ottenute per le successive misure post ibridazione aumentino rispetto ad essa (linee verde, rossa e blu). Tuttavia, nessuna di queste sembra essere avere un comportamento nettamente distinguibile dalle altre e le differenze appaiono simili a quelle ottenute senza alcuna passivazione della superficie.

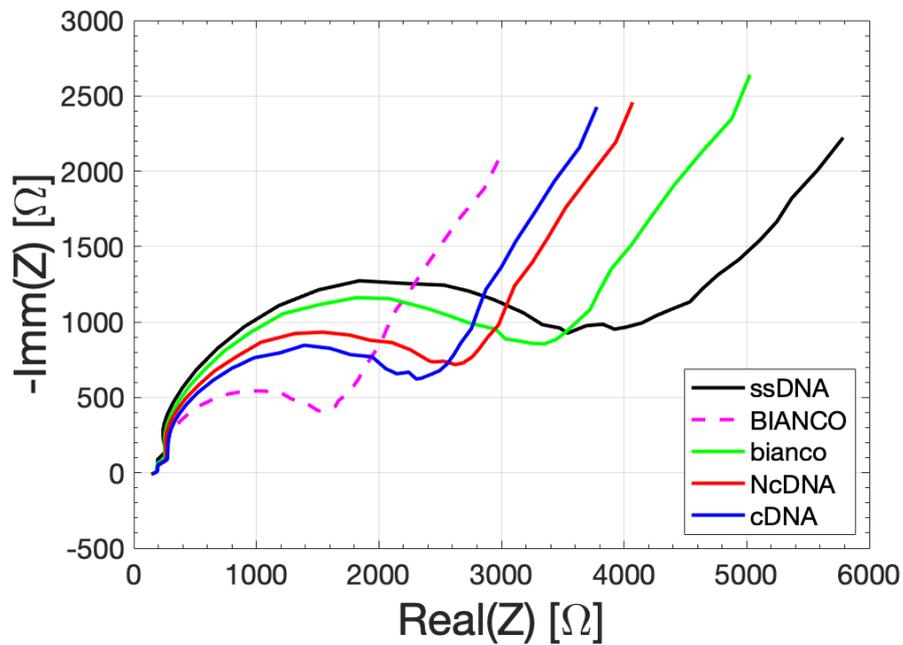


Figura 61. Curve EIS in presenza di passivazione con BIANCO post funzionalizzazione. Risultati relativi ad un solo sensore tra quelli usati.

I risultati sono particolarmente evidenti dalle medie post ibridazione dei parametri  $R_{ct}$  (fig. 62a) e  $I_p$  (fig. 62b), che differiscono poco tra di loro con deviazioni standard, per quanto contenute, che spaziano all'interno di intervalli di valori analoghi. Inoltre, la vicinanza dei risultati per NcDNA e DNA target mostra la scarsa efficacia di questa soluzione nel limitare i legami aspecifici sulla superficie.

L'aumento di  $R_{ct}$  e il correlato abbassamento di  $I_p$  ottenuti in post ibridazione sono comportamenti opposti rispetto a quanto notato fino ad ora. La passivazione con il bianco agisce, quindi, in modo analogo a un'incubazione con il solo buffer, portando  $R_{ct}$  verso il basso e accrescendo  $I_p$  come visto nelle prove precedenti, mentre la risposta a seguito delle ulteriori procedure di ibridazione risulta semplicemente come una seconda misura, senza che sia rilevata l'aggiuntiva modifica superficiale.

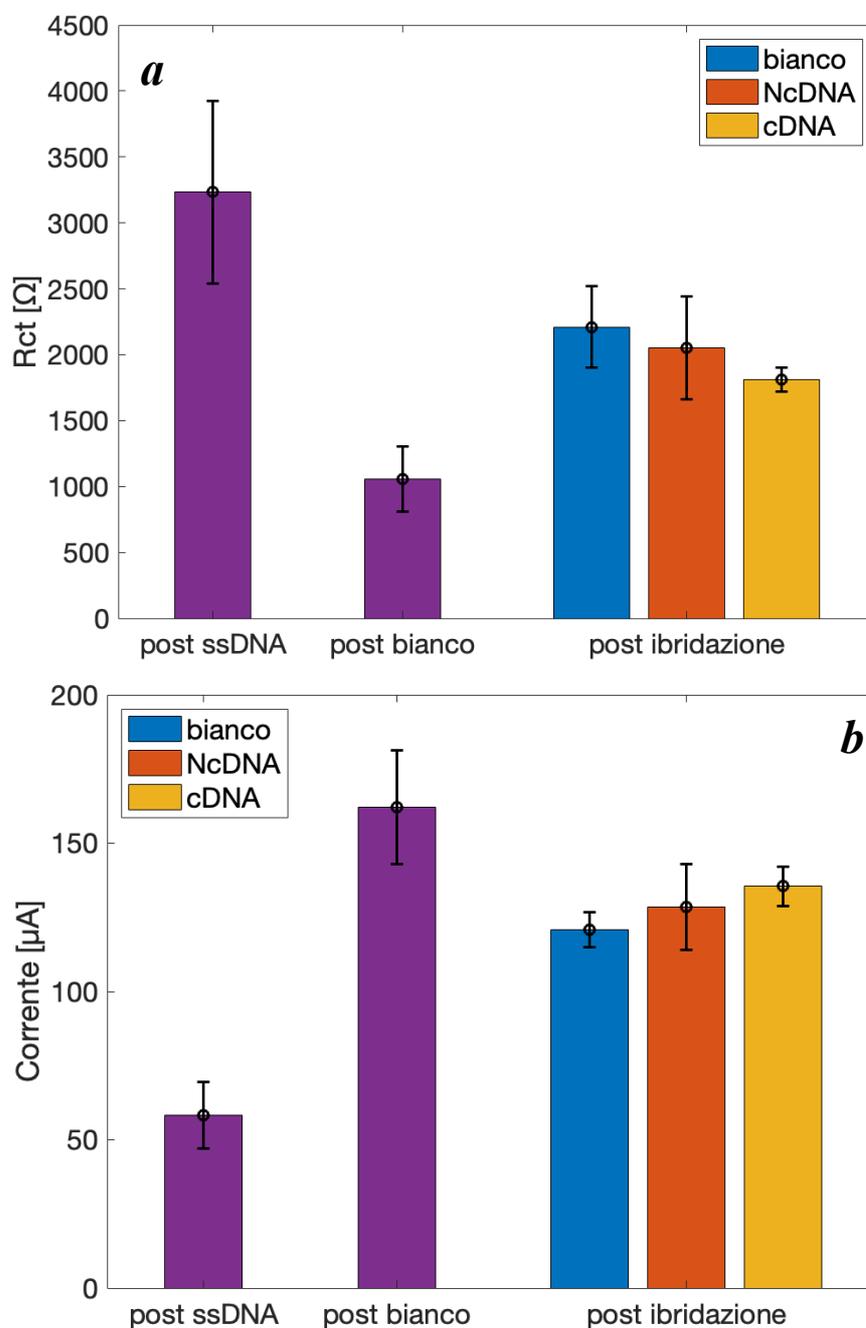


Figura 62. Media e deviazione standard di  $R_{ct}$  (a) e  $I_p$  (b) in funzione delle misure effettuate. Dalle medie post ibridazione si nota come le loro differenze non siano particolarmente evidenti.

Questi ultimi risultati mettono in luce le medesime problematiche già evidenziate dalla seconda prova di ibridazione con buffer trattato tramite proteinasi K. Di conseguenza, il buffer di ibridazione non può essere usato per effettuare la passivazione.

È interessante notare, tuttavia, come la variabilità delle misure EIS e DPV post ibridazione sia abbastanza ridotta, e che tra un esperimento e l'altro la differenza di comportamento sia leggera. Ciò fa dedurre, innanzitutto, una buona riproducibilità dei

risultati e suggerisce che il problema della sensibilità della rilevazione non sia da ricercare nelle proprietà superficiali dell'elettrodo modificato, ma nella debole intensità delle risposte. A seguito di queste considerazioni ho spostato il focus sui possibili metodi usati in elettrochimica per ottenere un aumento dei segnali rilevati.

#### 4.5 INTERCALANTI

Gli eventi di ibridazione che avvengono sulla superficie dell'elettrodo fino ad ora sono stati rilevati tramite metodo diretto sfruttando un mediatore redox per la lettura del segnale. Tuttavia, dai risultati si nota che la sensibilità di rilevazione ottenuta debba essere migliorata, dal momento che le differenze di risposta evidenziate renderebbero difficile la quantificazione dell'ibridazione in un'applicazione sul campo.

Per cercare di ridurre tale criticità, ho eseguito un'approfondita ricerca in letteratura con lo scopo di valutare diversi approcci per la rilevazione pur sempre mantenendo la struttura del sensore label-free.

Un metodo che ho trovato essere applicato in numerosi studi è l'uso di un indicatore elettroattivo come molecola segnale.

Il design di questi biosensori è basato sull'interazione non covalente tra le catene di DNA immobilizzate sulla superficie dell'elettrodo e tale indicatore elettroattivo. L'identificazione dell'evento, infatti, avviene analizzando la variazione di segnale elettrochimico dovuta all'indicatore stesso prima e dopo la reazione di ibridazione attraverso l'uso di comuni tecniche di misura elettrochimica come ciclovoltammetria, voltammetria ad impulso differenziale e spettroscopia elettrochimica di impedenza [33].

Un meccanismo di interazione tra indicatore e DNA particolarmente interessante è l'intercalazione. In tale approccio, l'indicatore elettroattivo è una molecola in grado di intercalarsi tra le basi di DNA tramite legami ad idrogeno, forze di van der Waals o altre deboli interazioni. Alcuni tra i più comuni intercalanti che fungono anche da indicatori sono piccole molecole organiche con struttura aromatica come, ad esempio, il Blu di Metilene, un composto molto spesso usato per tali studi.

In generale, un intercalante del DNA è una molecola in grado di associarsi alla catena in modo non covalente [40]. La sua caratteristica principale, che permette il suo utilizzo nei biosensori elettrochimici, è la differente affinità della molecola tra catena singola e catena doppia di DNA. Alcuni intercalanti, infatti, vanno a legarsi maggiormente alla doppia elica (dsDNA), mentre

hanno una ridotta affinità con ssDNA. Viceversa, esistono delle molecole in grado di intercalarsi facilmente alla catena singola, ma interagiscono scarsamente con dsDNA.

Questa differenza di comportamento è alla base della rilevazione dell'ibridazione poiché la presenza o meno dell'intercalante determina una variazione del segnale acquisito permettendo la distinzione dell'evento.

Gli intercalanti possono essere sia elettroattivi che elettroinattivi ed entrambi trovano applicazione nelle misure elettrochimiche in modo da aumentare l'intensità delle risposte.

Per quanto riguarda gli intercalanti elettroinattivi, dal momento che non sono in grado di partecipare alla reazione di ossidoriduzione, la rilevazione è basata ancora una volta sul mediatore redox, il cui segnale però viene influenzato dalla presenza questi composti sul DNA.

Le molecole più spesso utilizzate sono proflavina [41] e actinomicina D [42], tuttavia queste risultano essere di dimensioni troppo elevate per intercalarsi con le corte catene di DNA di *Campylobacter* utilizzate in questo caso. Gli intercalanti elettroattivi, invece, hanno solitamente dimensioni più ridotte, quindi, appaiono essere più adatti all'applicazione.

#### *4.5.1 INTERCALANTI ELETTROATTIVI*

Gli intercalanti elettroattivi vengono molto spesso usati negli studi come indicatori per rilevare il segnale. Le risposte, dunque, non sono più derivate dalla sola interazione con il mediatore redox presente nella soluzione, ma sono ottenute dall'attività di tali molecole legate alle catene di DNA.

Un intercalante elettroattivo in passato usato di frequente è il Bromuro di Etidio (EB). Tale composto ha un'alta affinità con la doppia elica di DNA, ma fatica a legarsi alla catena singola. Sfruttando questa proprietà, dunque, si può identificare l'ibridazione del DNA target grazie una risposta in corrente maggiore rispetto a quella prodotta dal solo ssDNA, rilevabile, ad esempio, tramite DPV [43]. Tuttavia, nonostante l'affidabilità dei risultati, il bromuro di etidio non viene più utilizzato nei laboratori per via dei suoi effetti mutageni.

Anche delle molecole più complesse possono essere in grado di avere il medesimo effetto sulle misure elettrochimiche. Alcuni studi di ibridazione del DNA sono realizzati, infatti, tramite l'uso di più composti intercalati sulla stessa catena [44], mentre altri applicano indicatori studiati appositamente per ottenere una maggiore accuratezza, come nell'identificazione di SNP (Single Nucleotide Polymorphism) [45]. Questo genere di indicatori, tuttavia, sembra essere fin troppo specifico e difficilmente trasferibile in un'ottica di commercializzazione del sensore.

Invece, un composto che ho trovato particolarmente usato per questi scopi in letteratura è il Blu di Metilene, un colorante organico che funge anche da indicatore redox e che può, quindi, essere sfruttato anche in qualità di mediatore.

Il Blu di Metilene ha la capacità di legarsi alle guanine libere sulla catena di DNA (fig. 63). Di conseguenza, presenta una maggiore affinità con ssDNA, mentre fatica ad intercalarsi nella doppia elica legandosi solo all'estremità libera. Tale differenza di comportamento genera un segnale in corrente più elevato per il sensore privo di ibridazione, mentre la risposta decresce parecchio in presenza di DNA target [35] [46]. Ulteriore vantaggio dell'uso del Blu di Metilene è la possibilità di creare un ciclo di elettrocatalisi con  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  (fig. 64). Per ottenere il segnale, in questo caso, si sfrutta la riduzione del Blu di Metilene (MB) in Blu di Leucometilene (LB) per trasferimento elettronico da parte del DNA. Il ferricianuro poi viene ossidato da LB per rigenerare nuovamente MB [47].

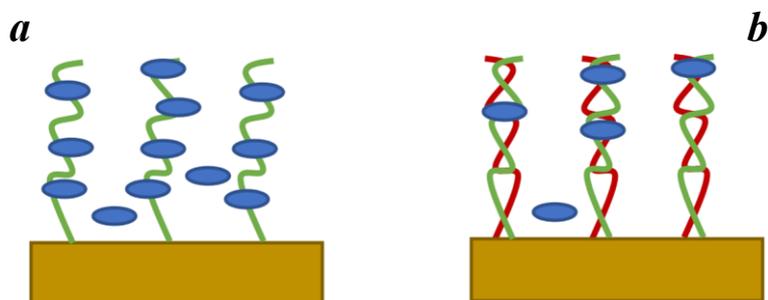


Figura 63. Schema di rilevamento con Blu di Metilene. In assenza di ibridazione (a) la molecola si lega molto di più al DNA, restando molto più presente, mentre se l'evento di ibridazione è avvenuto (b) il Blu di Metilene fatica a legarsi.

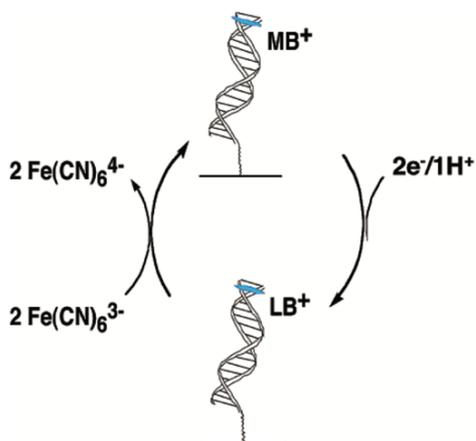


Figura 64. Schema del ciclo di elettrocatalisi del Blu di Metilene

#### 4.5.2 *PROVE CON BLU DI METILENE*

Ho effettuato delle misure DPV preliminari con il Blu di Metilene per caratterizzare in sua presenza il sensore usato per questo lavoro.

Dalla ricerca in letteratura citata in precedenza, è emerso che esistono due approcci per utilizzare il Blu di Metilene come indicatore: il primo sfrutta la differente affinità alle catene di DNA della molecola, mentre il secondo prevede di compiere le misurazioni usando una soluzione di Blu di Metilene e ferri/ferrocianuro. Perciò, ho verificato l'applicabilità di entrambi i metodi al sensore, valutando il comportamento degli elettrodi con le due soluzioni a diverse concentrazioni.

Utilizzando dei sensori fresh privi di funzionalizzazione, per prima cosa, ho esaminato la stabilità della risposta al cambio goccia, usando una soluzione concentrata di Blu di Metilene in PBS a 100  $\mu\text{M}$  su un sensore e una soluzione a concentrazione 2  $\mu\text{M}$  di Blu di Metilene e 2 mM di ferri/ferrocianuro diluita in PBS per l'altro.

Protocollo utilizzato:

1. Deposizione goccia di Blu di Metilene o Blu di Metilene e ferri/ferrocianuro;
2. Attesa di 10 minuti;
3. Set di tre misure DPV consecutive;
4. Lavaggio del sensore e sostituzione della goccia.

Ho ripetuto la procedura per tre volte, e in figura 65 ho riportato la prima misura di ogni set effettuato.

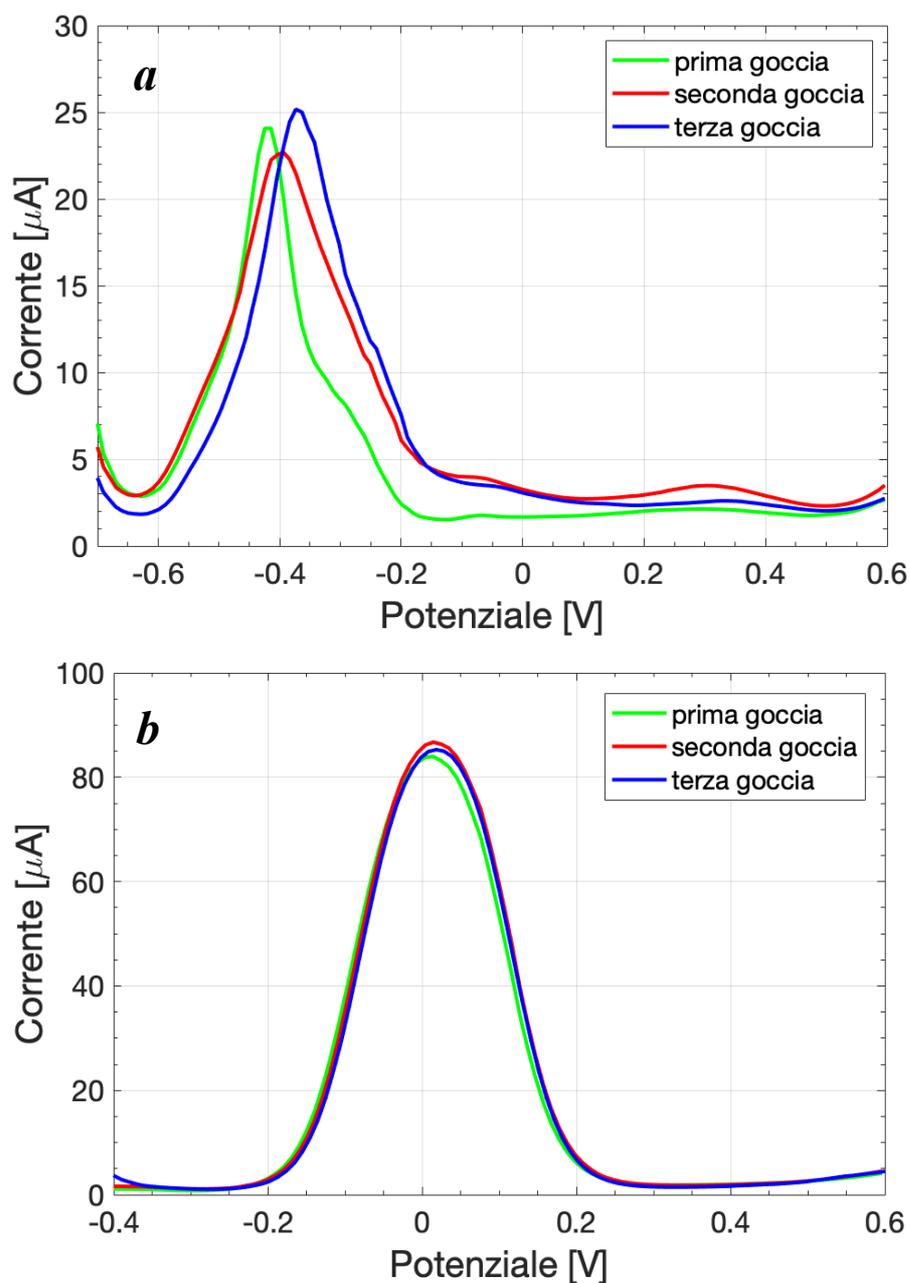


Figura 65. Stabilità al cambio goccia del sensore con Blu di Metilene 100  $\mu\text{M}$  (a) e Blu di Metilene 2  $\mu\text{M}$  e ferri/ferrocianuro 2 mM (b).

Si nota subito che l'intervallo di potenziale applicato per le misure DPV in solo Blu di Metilene è più ampio di quello utilizzato precedentemente (da -0.7 V a 0.6 V al posto che da -0.4 V a 0.6 V). Durante le prove ho, infatti, rilevato che il picco di corrente si verifica ad un potenziale più negativo (circa -0.4 V) dunque ho ampliato il range per poterlo visualizzare correttamente.

Con entrambi gli approcci appare esserci una certa stabilità delle misure.

Il solo Blu di Metilene (MB) fornisce valori di corrente alquanto bassi per i quali si spiega la maggior variabilità evidente in figura 65a, mentre il Blu di Metilene con il ferri/ferrocianuro (MB - FeCN) genera risposte DPV molto stabili con picchi più alti a potenziale pari a 0.01 V.

Infine, per confermare la stabilità, ho ripetuto il medesimo protocollo su altri sensori ottenendo risultati analoghi.

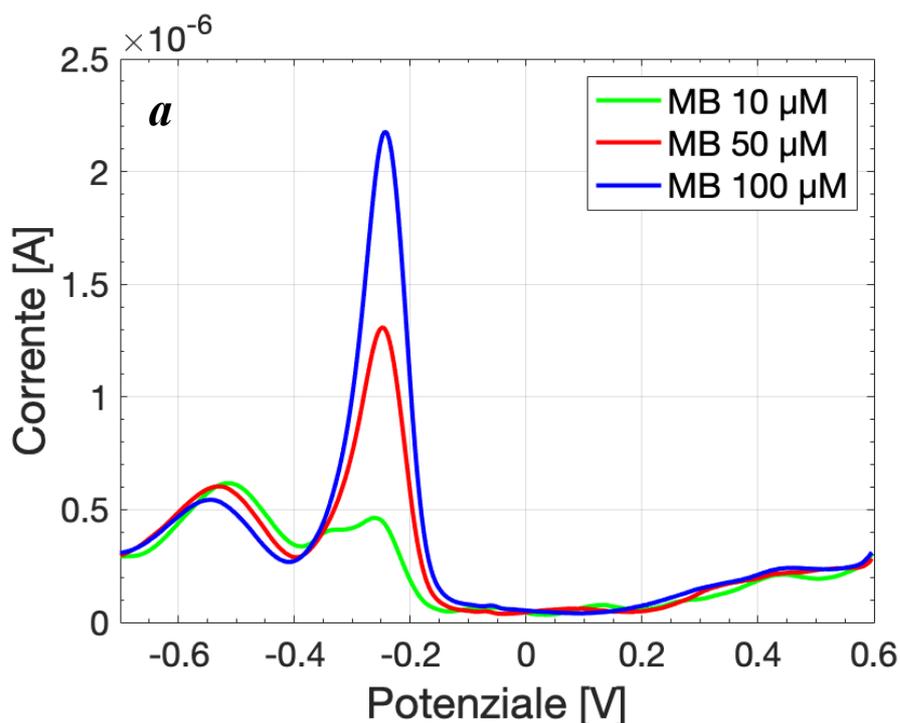
Dopo aver verificato il comportamento del sensore al cambio goccia, ho valutato le variazioni di correnti di picco per concentrazioni crescenti di entrambe le soluzioni.

Le concentrazioni di Blu di Metilene che ho usato sono 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , mentre le concentrazioni di  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  e Blu di Metilene sono 5 mM – 5  $\mu\text{M}$ , 2 mM – 10  $\mu\text{M}$ , 2 mM – 20 mM.

Protocollo utilizzato:

1. Deposizione goccia di Blu di Metilene o Blu di Metilene e ferri/ferrocianuro;
2. Attesa di 10 minuti;
3. Misura DPV;
4. Lavaggio del sensore e sostituzione della goccia con una a concentrazione più alta.

Di seguito ho riportato i risultati ottenuti (fig. 66).



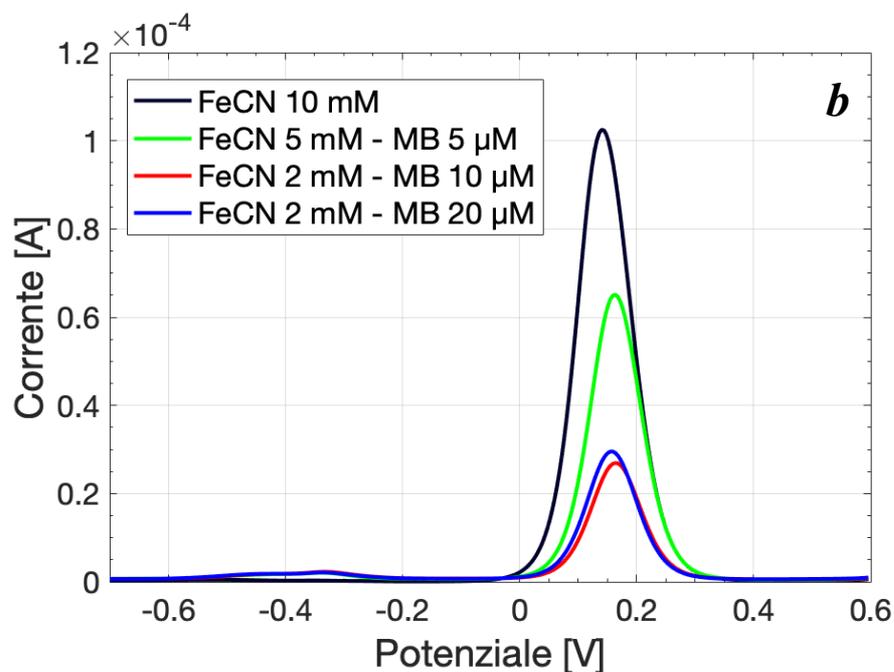


Figura 66. Misure DPV a concentrazioni crescenti per il solo Blu di Metilene (a) e per Blu di Metilene e ferri/ferrocianuro (b).

Da entrambi i grafici è evidente come una minor disponibilità di Blu di Metilene implichi una minor risposta in corrente. In particolare, prendendo in esame i risultati per il solo Blu di Metilene (fig. 66a) si nota come le intensità dei picchi di corrente restino particolarmente basse e siano dunque piuttosto rumorose. Inoltre, si osserva una diversa risposta ottenuta in base alla concentrazione del composto: se è poco presente (10  $\mu\text{M}$ ) il picco di corrente a -0.25 V non è praticamente visibile, mentre per concentrazioni superiori ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) il picco è ben evidente. Questo dato è molto importante ai fini della futura applicazione del Blu di Metilene per la rilevazione dell'evento di ibridazione, dal momento che il suo utilizzo si fonda sulla differente affinità tra DNA a catena singola e doppia. In base alle risposte ottenute in figura 66a, una minor presenza di Blu di Metilene, dovuta alla scarsa affinità con la catena doppia di DNA, comporterebbe una risposta in corrente molto minore rispetto a quanto si otterrebbe con la catena singola, per la quale, invece, resterebbe molto più composto legato ad essa.

Per quanto riguarda invece la figura 66b, si notano due picchi di corrente: uno a 0.15 V, in corrispondenza del potenziale di picco per  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , l'altro in corrispondenza del potenziale di picco per il Blu di Metilene, a -0.25 V. Le misure mettono, quindi, in evidenza la presenza di entrambi i composti in soluzione. In particolare, si nota la

dependenza del principale picco di corrente dal solo mediatore redox ferri/ferrocianuro, con l'intensità che decresce in base alla diminuzione di concentrazione. Si osserva, inoltre, che il picco secondario (fig. 67) è presente solo nelle misure per le quali è disponibile il Blu di Metilene (linea verde, rossa e blu), mentre è assente per il solo ferri/ferrocianuro 10 mM. Ciò porta a concludere che tale picco sia relativo alla sola elettroattività del Blu di Metilene.

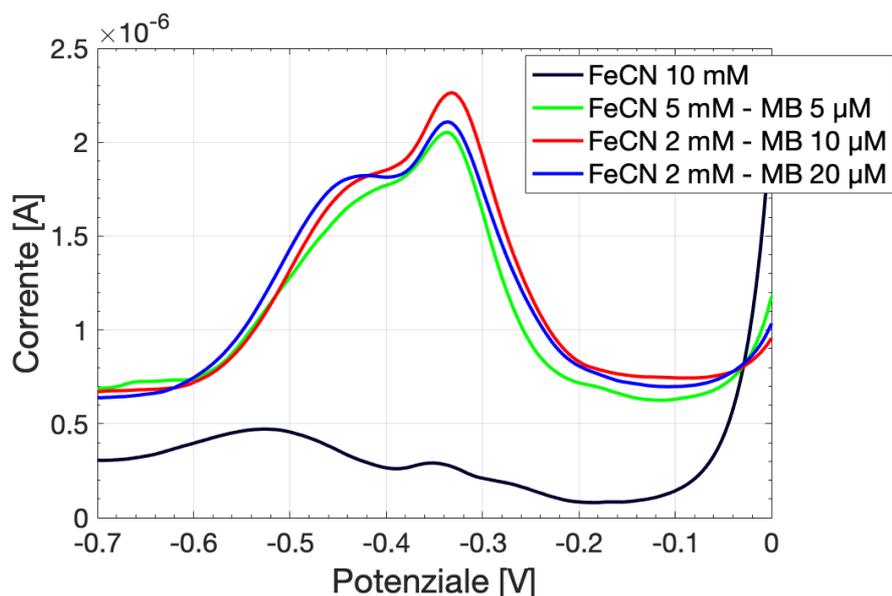
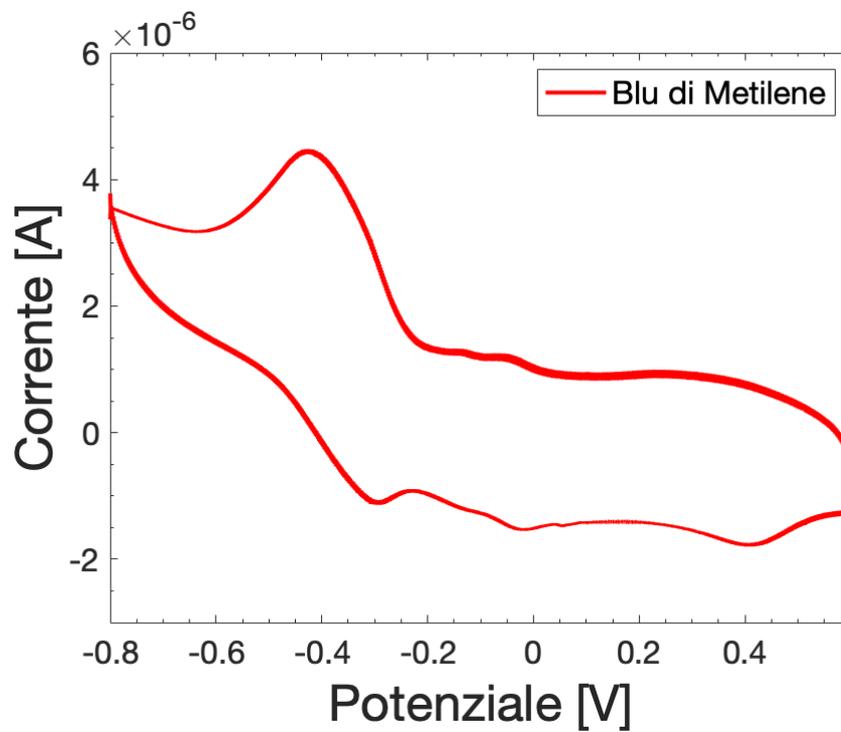


Figura 67. Ingrandimento sul picco secondario della figura 66b.

Dalla figura 67 si evidenzia, infine, una scarsa influenza della concentrazione di Blu di Metilene sull'intensità del picco secondario. La causa può essere dovuta sia alle basse concentrazioni disponibili, sia all'ossidazione di  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , che risulta essere primaria e appare guidare le reazioni all'interfaccia.

La poca intensità di corrente prodotta dal solo Blu di Metilene può trovare spiegazione nel fatto che la sua reazione abbia una sola direzione privilegiata: la riduzione.

Tale deduzione è supportata dalla ciclovoltammetria che mostra un comportamento prettamente riduttivo, dal momento che si vede un picco catodico ma non quello anodico (fig. 68).



*Figura 68. CV in Blu di Metilene 50 μM*

Da queste misure, entrambi gli approcci appaiono implementabili sul sensore usato per questo lavoro. Occorre, dunque, effettuare delle nuove prove di funzionalizzazione e ibridazione per valutarne l'azione anche in presenza di DNA.

## CONCLUSIONI

Il mio obiettivo in questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo un genosensore impedimetrico per rilevare la presenza di *Campylobacter*, prestando particolare attenzione alle sue caratteristiche nell'ottica di un'applicazione a livello industriale.

La rilevazione del *Campylobacter* è molto importante soprattutto negli allevamenti di pollame, poiché il batterio è molto comune in essi e si diffonde rapidamente permanendo nelle carni lavorate durante la macellazione. Attraverso il consumo di carne di pollo non adeguatamente trattata, il batterio si trasferisce all'uomo infettandone l'intestino e portando all'insorgenza di campylobatteriosi. Per limitare l'infezione da *Campylobacter*, è dunque necessario identificare in modo precoce gli esemplari o le carcasse contaminate per poterle trattare in maniera differente ed evitare il contagio dell'intero stock durante la produzione industriale.

I genosensori elettrochimici sono dei dispositivi di rilevazione pratici e affidabili che stanno divenendo sempre più diffusi in questo genere di applicazioni poiché la loro realizzazione è piuttosto economica e si prestano facilmente a impieghi diretti sul campo. Il sensore sviluppato consiste in un elettrodo d'oro che viene funzionalizzato tramite catene singole di DNA in grado di ibridarsi con catene di DNA batterico ad esse complementari. L'ibridazione viene rilevata sfruttando tecniche di misura elettrochimiche.

Nel corso del mio lavoro sperimentale, mi sono occupata delle fasi di funzionalizzazione della superficie del sensore e della conseguente rilevazione dell'ibridazione con il DNA complementare. Dalle analisi dei risultati dei diversi esperimenti che ho eseguito sono emerse delle interessanti considerazioni circa la capacità del sensore di identificare l'effettiva presenza di *Campylobacter*.

Ho funzionalizzato con successo la superficie dell'elettrodo di Working con sonde di DNA per *Campylobacter jejuni*, confermando la loro presenza anche attraverso delle scansioni in fluorescenza.

La prima prova di ibridazione che ho svolto ha messo in luce una problematica circa l'efficacia della rilevazione del DNA complementare, poiché l'evento non è stato rilevato nelle misure elettrochimiche, nonostante l'analisi in fluorescenza abbia evidenziato la presenza sull'elettrodo. Dunque, ho analizzato i componenti della soluzione di ibridazione utilizzata identificando la proteina BSA come il componente di disturbo. Al fine di mantenere la funzionalità di tale proteina, ma di ridurre il suo ingombro sulla superficie e, conseguentemente, la sua influenza sulle misure, ho frammentato la BSA tramite l'enzima proteinasi K. Tale trattamento sulla proteina ha avuto successo nell'eliminare il disturbo precedentemente notato.

La successiva prova di ibridazione, svolta utilizzando la soluzione con BSA trattata, ha portato a risultati soddisfacenti circa la rilevazione dell'evento, che è stato identificato sia nell'analisi in fluorescenza che nelle misure elettrochimiche. Tuttavia, si è notato anche un problema riguardo l'aspecificità di legami sulla superficie.

Ho effettuato, dunque, delle prove di passivazione dell'elettrodo con tre diverse molecole: due Self-Assembled Monolayer e la proteina BSA, per valutare la loro capacità di limitare i legami aspecifici e di migliorare la sensibilità della rilevazione. Da queste misure ho concluso che la passivazione tramite BSA non comporta alcuna variazione nelle prestazioni del sensore. L'uso di MCH 1 mM, invece, risulta adatto per il miglioramento della sensibilità, mentre MUA 1mM ha migliori prestazioni nel ridurre i legami aspecifici.

Infine, ho cercato di trovare una soluzione valutando i metodi usati in elettrochimica per aumentare l'intensità dei segnali rilevati. Ho identificato il Blu di Metilene come un possibile indicatore dell'evento di ibridazione e ho verificato preliminarmente che il suo uso fosse adatto al sensore scelto per questa applicazione.

Il mio lavoro ha fornito degli importanti risultati e considerazioni che indicano la necessità dell'utilizzo di un metodo che aumenti l'intensità del segnale prodotto dalle misure. Le fasi future del progetto prevedono, innanzitutto, di condurre nuovi test di ibridazione applicando il Blu di Metilene come indicatore per verificare la sua efficacia. A seconda di questi risultati, poi, si valuterà quale molecola utilizzare per la passivazione della superficie del sensore. Infine, occorrerà effettuare dei test di verifica delle prestazioni per valutare la specificità e la sensibilità della rilevazione in campioni artificiali e reali.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] B. M. Allos, «Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, n. 8, pp. 1201-1206, 2001.
- [2] M. Véron e R. Chatelain, «Taxonomic Study of the Genus Campylobacter Sebald and Vcron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Vkon,» *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 23, n. 2, pp. 122-134, 1973.
- [3] J. E. Moore, D. Corcoran e al., «Campylobacter,» *Veterinary research*, vol. 36, n. 3, pp. 351-382, 2005.
- [4] European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control, «The European Union One Health 2019 Zoonoses Report,» *EFSA Journal*, vol. 19, n. 2, 2021.
- [5] O. Gundogdu e B. W. Wren, «Microbe Profile: Campylobacter jejuni – survival instincts,» *Microbiology*, vol. 166, n. 3, pp. 230-232, 2020.
- [6] S. F. Altekruze, N. J. Stern, P. I. Fields e D. L. Swerdlow, «Campylobacter jejuni—An Emerging Foodborne Pathogen,» *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, n. 1, pp. 28-35, 1999.
- [7] K. T. Young, L. M. Davis e V. J. DiRita, «Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, pp. 665-679, 2007.
- [8] W. Snelling, M. Matsuda, J. Moore e J. Dooley, «Campylobacter jejuni,» *Letters in applied microbiology*, vol. 41, n. 4, pp. 297-302, 2005.
- [9] P. Rajapaksha, A. Elbourne, S. Gangadoo, R. Brown, D. Cozzolino e J. Chapman, «A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms,» *Analyst*, vol. 144, n. 2, pp. 396-411, 2019.
- [10] S. D. Gan e K. R. Patel, «Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,» *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, n. 9, p. e12, 2013.
- [11] J. Shendure e H. Ji, «Next-generation DNA sequencing,» *Nature biotechnology*, vol. 26, n. 10, pp. 1135-1145, 2008.

- [12] D. R. Theâvenot, K. Toth, R. A. Durst e G. S. Wilson, «Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification,» *Pure and Applied Chemistry*, vol. 71, n. 12, pp. 2333-2348, 1999.
- [13] V. S. & G. Pezzotti, I. Pezzotti, J. Cano, K. Buonasera, D. Giannini e M. T. Giardi, «Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market,» *Microchimica Acta*, vol. 170, pp. 215-225, 2010.
- [14] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov e E. Wilkins, «Biosensors for detection of pathogenic bacteria,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, n. 7, pp. 599-624, 1999.
- [15] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao e Q.-J. Zhang, «Impedimetric biosensors,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 97, n. 4, pp. 219-226, 2004.
- [16] E. Lojou e P. Bianco, «Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices,» *Journal of Electroceramics*, vol. 16, n. 1, pp. 79-91, 2006.
- [17] J. Ding e W. Qin, «Recent advances in potentiometric biosensors,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 124, 2020.
- [18] C. Chen e J. Wang, «Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review,» *Analyst*, vol. 145, pp. 1605-1628, 2020.
- [19] P. Mehrotra, «Biosensors and their applications – A review,» *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.
- [20] G. J. Tortora, B. R. Funke e C. L. Case, «Microbial Metabolism,» in *Microbiology - An introduction*, Boston, Pearson, 2019, pp. 111-115.
- [21] L. Hawley, R. J. Ziegler e B. L. Clarke, «Immunology,» in *Microbiology and Immunology*, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2014, pp. 252-258.
- [22] S. A. Lim e M. U. Ahmed, «Introduction to Immunosensors,» in *Immunosensors*, Minhaz Uddin Ahmed, Mohammed Zourob, Eiichi Tamiya, 2019, pp. 1-20.
- [23] B. R. Glick, J. J. Pasternak e C. L. Patten, «Nucleic Acids as Therapeutic Agents,» in *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, Washington DC, ASM Press, 2010, pp. 437-439.
- [24] B. R. Glick, J. J. Pasternak e C. L. Patten, «DNA, RNA, and Protein Synthesis,» in *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, Washington DC, ASM Press, 2010, pp. 14-25.

- [25] M. Yang, M. E. McGovern e M. Thompson, «Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 346, n. 3, pp. 259-275, 1997.
- [26] S. P. Mohanty e E. Kougianos, «Biosensors: A tutorial review,» *IEEE Potentials*, vol. 25, n. 2, pp. 35-40, 2006.
- [27] M. Singh, N. Kaur e E. Comini, «The role of self-assembled monolayers in electronic devices,» *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 8, n. 12, pp. 3938-3955, 2020.
- [28] S. Cosnier e P. Mailley, «Recent advances in DNA sensors,» *Analyst*, vol. 133, n. 8, pp. 984-991, 2008.
- [29] K. Kerman, M. Kobayashi e E. Tamiya, «Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology,» *Measurement Science and Technology*, vol. 15, n. 2, pp. R1-R11, 2003.
- [30] N. Paniel e J. Baudart, «Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of Escherichia coli DNA without amplification in seawater,» *Talanta*, vol. 115, pp. 133-142, 2013.
- [31] C. N. Campbell, D. Gal, N. Cristler, C. Banditrat e A. Heller, «Enzyme-Amplified Amperometric Sandwich Test for RNA and DNA,» *Analytical chemistry*, vol. 74, n. 1, pp. 158-162, 2002.
- [32] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul e al., «Electrochemical Genosensor Based on Colloidal Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes,» *Analytical chemistry*, vol. 75, n. 9, pp. 2181-2187, 2003.
- [33] X. Hai, Y. Li, C. Zhu, W. Song, J. Cao e S. Bi, «DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications,» *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 133, p. 116098, 2020.
- [34] A. Oliveira-Brett, J. Piedade, L. Silva e V. Diculescu, «Voltammetric determination of all DNA nucleotides,» *Analytical biochemistry*, vol. 332, n. 2, pp. 321-329, 2004.
- [35] G. A. Nascimento, E. V. Souza, D. S. Campos-Ferreira e al., «Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 38, n. 1, pp. 61-66, 2012.

- [36] M. Manzano, S. Viezzi, S. Mazerat, R. S. Marks e J. Vidic, «Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus,» *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 100, 2018, Pages 89-95, vol. 100, pp. 89-95, 2018.
- [37] M. A. Tabrizi e M. Shamsipur, «A label-free electrochemical DNA biosensor based on covalent immobilization of salmonella DNA sequences on the nanoporous glassy carbon electrode,» *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 69, pp. 100-105, 2015.
- [38] H. Yang, H. Zhou, H. Hao, Q. Gong e K. Nie, «Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer,» *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 297-304, 2016.
- [39] DropSens, «Metrohm DropSens,» 2021. [Online]. Available: [https://www.dropsens.com/en/pdfs\\_productos/new\\_brochures/gold\\_electrodes.pdf](https://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/gold_electrodes.pdf). [Consultato il giorno 7 Gennaio 2022].
- [40] A. D. Richards e A. Rodger, «Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure,» *Chemical Society Reviews*, vol. 36, n. 3, pp. 471-483, 2007.
- [41] S. Grützke, S. Abdali, W. Schuhmann e M. Gebala, «Detection of DNA hybridization using electrochemical impedance spectroscopy and surface enhanced Raman scattering,» *Electrochemistry Communications*, vol. 19, pp. 59-62, 2012.
- [42] M. Gebala, L. Stoica, S. Neugebauer e W. Schuhmann, «Label-Free Detection of DNA Hybridization in Presence of Intercalators Using Electrochemical Impedance Spectroscopy,» *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, vol. 21, n. 3-5, pp. 325-331, 2009.
- [43] H. Qi, X. Li, P. Chen e C. Zhang, «Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode,» *Talanta*, vol. 72, n. 3, pp. 1030-1035, 2007.
- [44] E. G. Hvastkovs e D. A. Buttry, «Electrochemical Detection of DNA Hybridization via Bis-Intercalation of a Naphthylimide-Functionalized Viologen Dimer,» *Analytical chemistry*, vol. 79, n. 18, pp. 6922-6926, 2007.
- [45] S. Sato, Y. Maeda, T. Nojima, H. Kondo e S. Takenaka, «SNP analysis by using ferrocenyl naphthalene diimide (FND)-based electrochemical hybridization assay (EHA),» *Nucleic acids symposium series*, vol. 3, n. 1, pp. 169-170, 2003.

- [46] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca e M. Ozsoz, «Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 422, n. 2, pp. 139-149, 2000.
- [47] E. M. Boon, J. K. Barton e al., «Reduction of Ferricyanide by Methylene Blue at a DNA-Modified Rotating-Disk Electrode,» *Langmuir*, vol. 19, n. 22, pp. 9255-9259, 2003.
- [48] A. Gattani, S. V. Singh, A. Agrawal, M. H. Khan e P. Singh, «Recent progress in electrochemical biosensors as point of care diagnostics in T livestock health,» *Analytical biochemistry*, vol. 579, pp. 25-34, 2019.

