



Nanofire de siliciu utilizate ca substrat pentru amplificarea semnalului de hibridizare in tehnologia microarray

Autori: Melania Ana Banu, Monica Simion, Mihaela Kusko, Marian Catalin Popescu, Bogdan Bita

Afilieri: Institutul National de Cercetare Dezvoltare pentru Microtehnologii - IMT Bucuresti, Str. Erou Iancu Nicolae, nr. 126A, 077190, Bucuresti, Romania;

Cuprins

Scop

- **Obtinerea unui suport nanostructurat pe siliciu care poate amplifica semnalul de hibridizare in tehnologia microarray.**

Nanofire de siliciu

- Determinarea conditiilor optime pentru obtinerea nanofirelor de siliciu, prin corodarea chimica intr-un singur pas, asistata de saruri metalice.
↳ **Caracterizarea SEM a substratului obtinut.**

Modificarea suportului

- Functionalizarea cu APTES.
- Functionalizarea cu glutaraldehida. ↳ **Determinarea gradului de hidrofobicitate prin masurarea unghiului de contact.**

Imobilizarea sondelor

- Determinarea concentratiei optime de sonde depuse pentru obtinerea unor spot-uri uniforme, pe suport de siliciu nanostructurat si pe suport de sticla. ↳ **Realizarea design-ului experimental si a programului de depunere.**

Hibridizarea

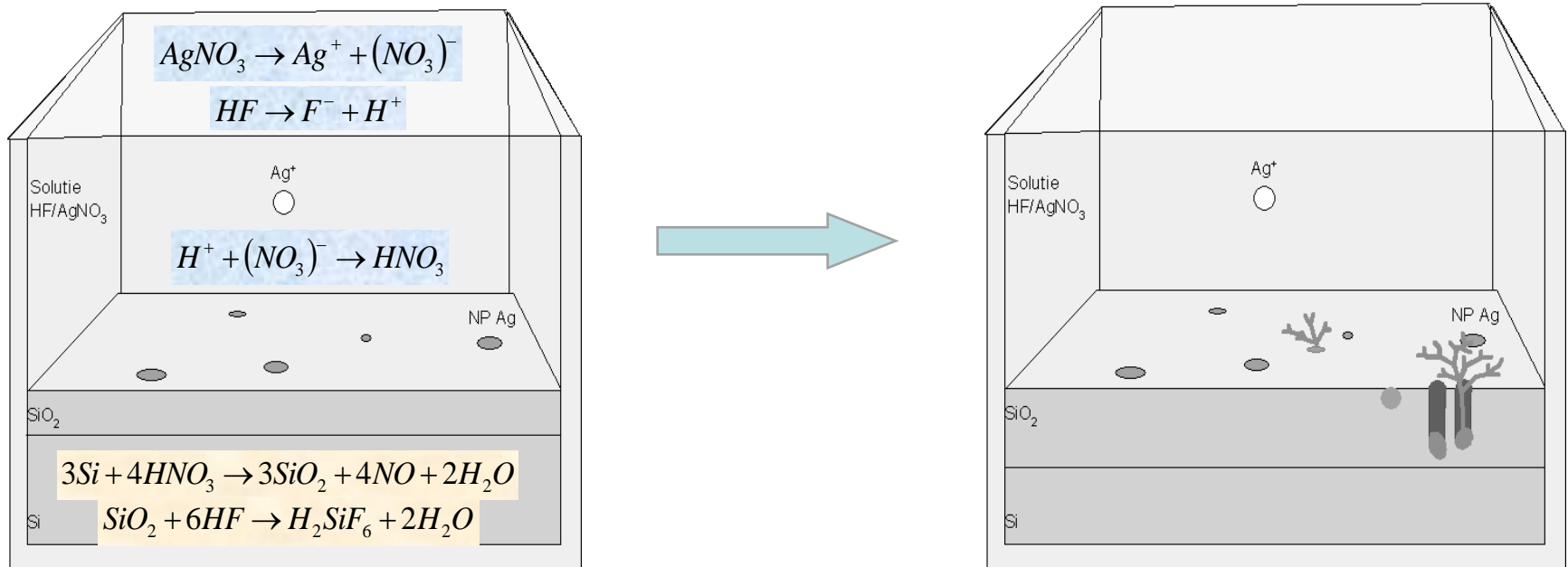
- Stabilirea parametrilor optimi pentru hibridizarea eficienta a moleculelor tinta cu sondele. ↳ **Detectia si cuantificarea semnalului fluorescent.**

Analiza rezultatelor

- Determinarea tipului de eroare, care poate fi data de tipul de mismatch, de pozitia mismatch-ului in sonda, de marcatorul fluorescent, precum si de hibridizarile nespecifice ↳ **Interpretarea datelor obtinute in urma hibridizarii.**

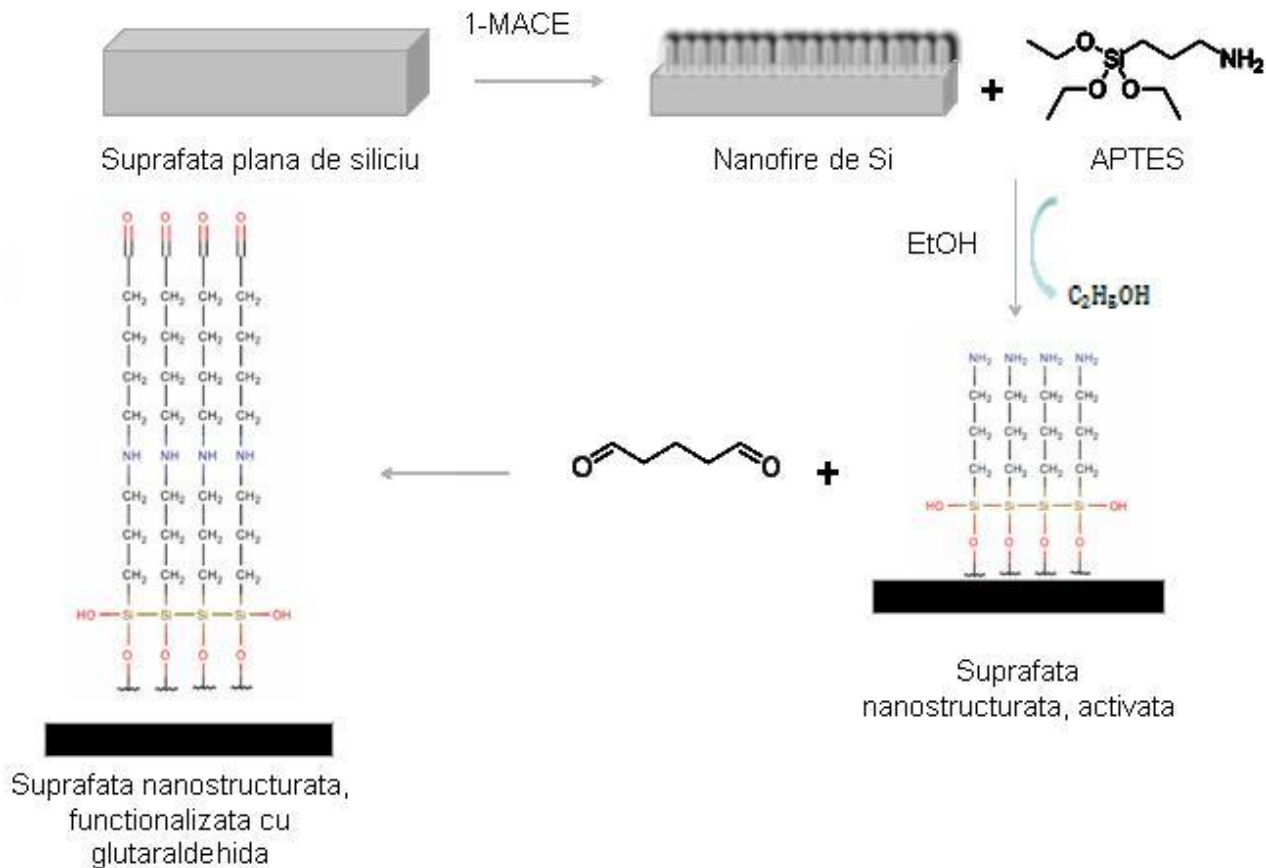
Corodarea chimica asistata de saruri metalice

- Corodarea chimica asistata de AgNO_3 , este o modalitate rapida de obtinere a siliciului nanostructurat.
- Procesul are la baza reactia de oxido-reducere, care are loc la interfata lichid-semiconductor.
- Diametrul, lungimea, orientarea firelor, pot fi usor controlate.
- Include doi pasi succesivi: **nucleatia catalizatorului metalic** si **corodarea anizotropa**.



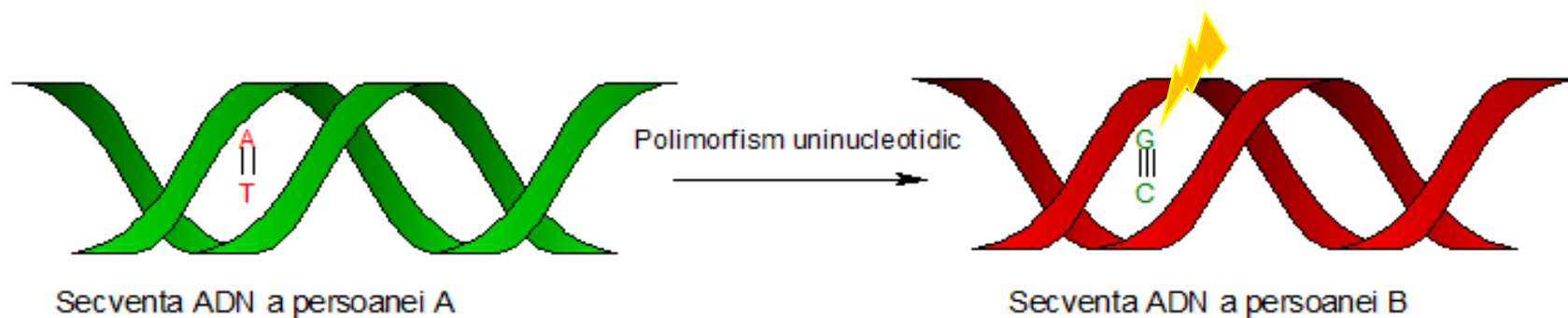
Functionalizarea cu APTES si glutaraldehida

- Activarea suprafetei:
- ✓ Silanizarea cu (3-aminopropil)trietoxisilan (APTES);
- ✓ Functionalizarea cu glutaraldehida - cu rol de a furniza gruparea functionala -CHO;



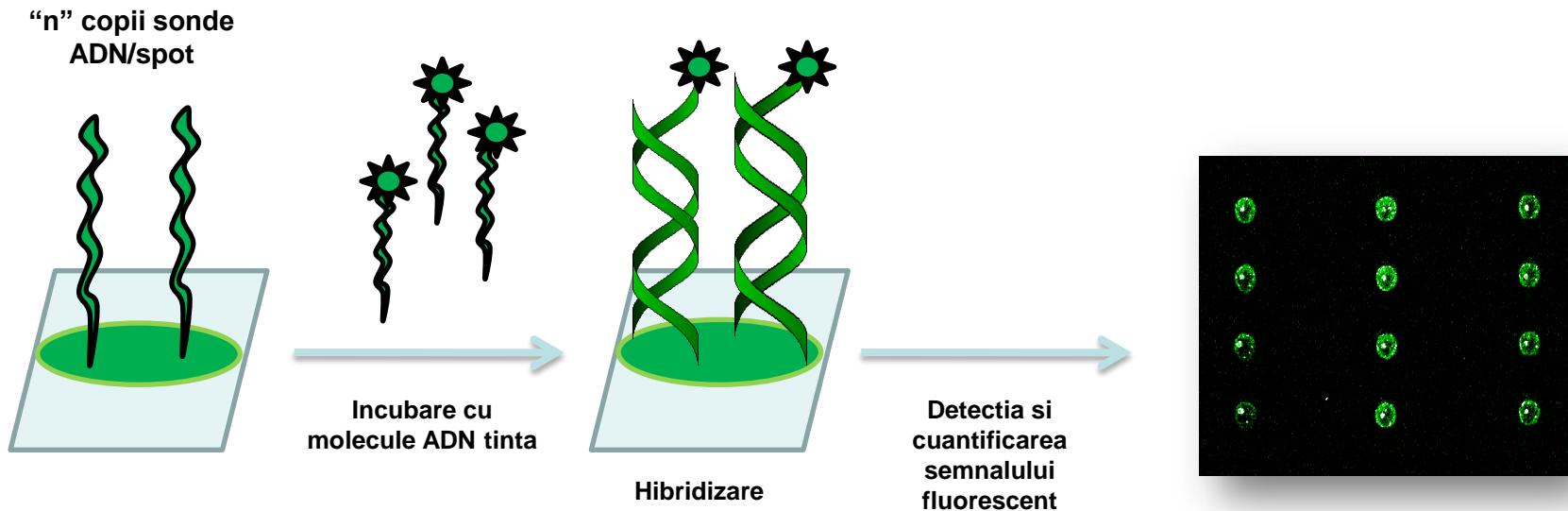
Genotiparea variatiilor uninucleotidice

- Studiul markerilor SNP permite **identificarea variatiei in cadrul genelor care stau la baza maladiilor de natura complexa.**
- Polimorfismele uninucleotidice/SNP-uri (Single Nucleotide Polymorphism) = **variatii la nivelul unei perechi de nucleotide, dispersate aleator in cadrul intregului genom;**
- Multe SNP-uri n-au impact asupra functiei normale a celulei, **insa altele dau o predispozitie mai mare la dezvoltarea unor afectiuni sau influenteaza raspunsul organismului la un medicament sau la alti factori.**



Tehnologia microarray

- **Principiu:** sondele (ADN monocatenar) sunt immobilizate pe un substrat solid (sticla, siliciu), multiple copii ale fiecărei secvențe de ADN fiind atasate într-un spot. Moleculele ADN tinta (marcate fluorescent) sunt incubate cu sondele, având loc hibridizarea pe baza complementarității secvenței.



Concluzii

✓ Prin utilizarea substratului de siliciu, **dimensiunea spot-urilor** obtinute este mai mare decat in cazul celor immobilizate pe substraturi comerciale. Nanofirele de siliciu **au optimizat suprafata de contact**, contribuind totodata la diminuarea impedimentelor sterice intre moleculele ADN immobilizate. ➔ *cele mai bune rezultate au fost obtinute pe suport de siliciu nanostructurat, cu lungimea medie a nanofirelor de 3,85 μm.*

✓ Pentru detectia corecta a diferitelor tipuri de mismatch-uri, un pas important il constituie **ajustarea raportului intre concentratia sondelor depuse si concentratia moleculelor marcate fluorescent.**

✓ Avantajul tehnicii microarray este dat de posibilitatea de a adauga **controale pozitive si negative**, pentru a cerceta corectitudinea datelor obtinute.

✓ **Directii de continuare a cercetarii:**

!!! Dupa elucidarea efectelor mismatch-urilor, va fi determinata limita de detectie a diferitelor concentratii de molecule ADN tinta.

!!! Rezultatele obtinute vor contribui la eliminarea detectiei fals-pozitive a unor mutatii cu sens gresit din probe ADN ale pacientilor.

Acknowledgements: *Rezultatele sunt nepublicate, obtinute in cadrul urmatoarelor proiecte de cercetare:*

• *Contract nr. 4 / 2012 / PN-II-PT-PCCA-2011-3.1-0803: Structuri de tip array pentru preventia, diagnosticul si tratamentul individualizat al unor forme de cancer cu incidenta si mortalitate majore (HRCarrays);*

• *Contract nr. 36/2014 / PN-II-PT-PCCA-2013-4-1434: Platforma integrata pentru genotiparea multiplexata a HPV – ului (MultiplexGen).*