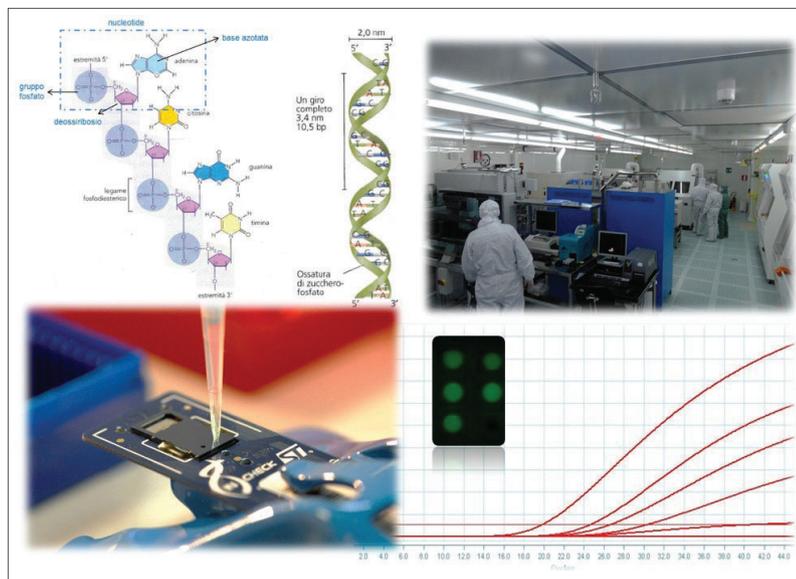


IL RUOLO DELLA CHIMICA NELLO SVILUPPO DEI LAB-ON-CHIP

La chimica gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella produzione di dispositivi miniaturizzati per l'analisi degli acidi nucleici. Ogni singolo modulo tecnologico dei Lab-on-chip necessita di processi di funzionalizzazione chimica che abilita il modulo stesso alla sua particolare funzione, come quella di microreattore per reazioni biochimiche, canale fluidico per movimentazione liquidi, substrato solido per lettura ottica o elettrica.



La completa decodifica del genoma umano (Progetto Genoma Umano) seguita da quella di molti microrganismi come virus e batteri e i progressi tecnologici ottenuti in questi ultimi decenni nel settore della biologia molecolare nei metodi di rilevazione del DNA (DNA microarray, real time PCR, LAMP etc.) e nell'ingegnerizzazione di nuovi materiali, hanno permesso lo sviluppo di dispositivi miniaturizzati detti Lab-on-chip (LoC), in grado di integrare in un unico chip i vari step per l'esecuzione dell'analisi di acidi nucleici. Tali dispositivi trovano attualmente larga applicazione sia nel settore della diagnostica molecolare genetica [1] che nella diagnosi di patologie infettive batteriche e virali [2, 3]. I LoC sono stati sviluppati e commercializzati all'interno di piattaforme diagnostiche più o meno complesse. Esempi di piattaforme che integrano moduli miniaturizzati per la detezione degli acidi nucleici me-

diante la reazione di amplificazione della PCR e successiva rilevazione del target amplificato mediante la tecnologia del microarray sono: Verigene System, INFINITY System, Rheonix CARD ed In-Check system (Fig. 1) [4, 5]. L'utilizzo di tali piattaforme diagnostiche necessita però la presenza di personale specializzato e di un laboratorio centralizzato equipaggiato con attrezzature in grado di gestire tutti gli step accessori, quali l'estrazione del materiale genetico (sample preparation) e la preparazione di reagenti. Negli ultimi anni gli avanzamenti tecnologici nella progettazione e sviluppo dei Lab-on-Chip, uniti all'innovazione della biologia molecolare, hanno indirizzato la ricerca in questo settore verso i cosiddetti Point-of-Care (POC) genetici, capaci di integrare in un unico dispositivo tutti i singoli moduli tecnologici necessari per gestire l'intero processo diagnostico, che va dalla fase di estrazione del materiale genetico al risultato diagnostico (*sample-in-answer-out*). Tali sistemi integrano anche i reagenti *on-board* e possono quindi essere utilizzati da personale tecnico non specializzato ovvero presso studi medici, aeroporti, dogane o direttamente dal paziente stesso.

In questo ampio e multidisciplinare settore scientifico e tecnologico la chimica ricopre un ruolo fondamentale sia nella fase di ricerca e sviluppo di nuovi materiali che nella produzione industriale. Le problematiche che il chimico si trova ad affrontare sono molteplici e coinvolgono rilevanti aspetti:

- 1) integrazione tecnologica di vari moduli analitici di varia complessità come micropompe, microreattori, sensori e canali microfluidici per la movimentazione di soluzioni liquide. In questo caso la possibilità di modulare e controllare opportunamente le proprietà chimico-fisiche superficiali, quali idrofilicità ed idrofobicità dei singoli moduli, è fondamentale per il corretto funzionamento del dispositivo e per la sua integrazione nel sistema [5, 6];

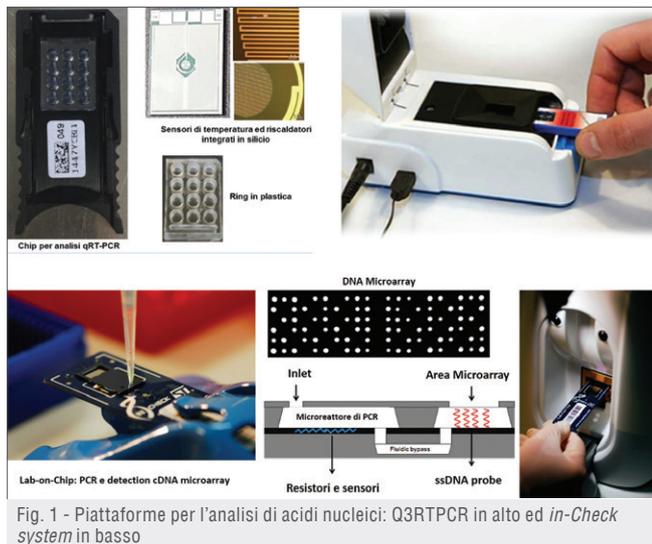


Fig. 1 - Piattaforme per l'analisi di acidi nucleici: Q3RTPCR in alto ed *in-Check* system in basso

- 2) compatibilità biochimica delle superfici con reazioni quali PCR, estrazione del materiale genetico, ibridazione; oppure l'utilizzo di appropriati additivi/reagenti per incrementare le performance funzionali del sistema [7];
- 3) compatibilità ottica od elettrica delle superfici per la trasduzione del segnale.

La Fig. 1 riporta due esempi di piattaforme diagnostiche basati su LoC in cui la chimica ha avuto un ruolo da protagonista nello sviluppo e nella produzione massiva dei dispositivi. Il primo (Q3RTPCR) è un sistema basato su amplificazione e rilevazione degli acidi nucleici tramite real time PCR, il cui *core* è un LoC ibrido costituito da silicio e policarbonato, contenente 6 microreattori ciascuno con un volume da 20 μ l, o contenente 12 microreattori ciascuno con un volume da 12 μ l. In tale dispositivo sono stati integrati dei riscaldatori e dei sensori di temperatura per l'esecuzione dei cicli termici di PCR. La seconda piattaforma diagnostica (*In-Check* System) è basata su un dispositivo interamente costruito in silicio, composto da due microreattori per PCR (volume 11,5 μ l ciascuno) ed una camera di ibridazione per la detection del target tramite tecnologia cDNA-microarray, in cui i due moduli sono interconnessi da un *by-pass* in silicio. Entrambi i sistemi sviluppati da STMicroelectronics trovano larga applicazione nell'analisi genetica e nella rilevazione di materiale genetico virale o batterico.

Il ruolo della chimica nei DNA-microarray

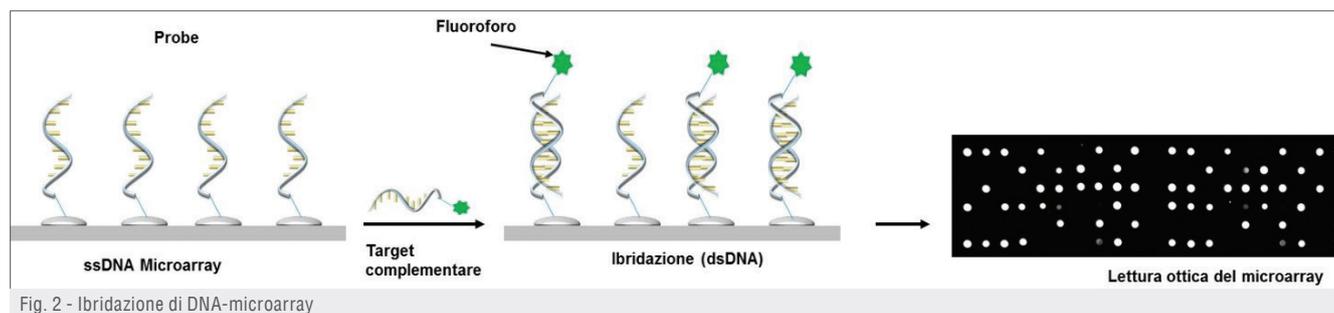


Fig. 2 - Ibridazione di DNA-microarray

Uno dei primi moduli diagnostici utilizzati nell'analisi degli acidi nucleici con il quale il chimico si è dovuto confrontare è il DNA-microarray [8]. Esso è costituito da un supporto solido, generalmente silicio, plastica, vetro, quarzo, ITO, metallo, sul quale, dopo un opportuno trattamento chimico, viene depositata (o cresciuta) una serie ordinata di *spot*, ciascuno dei quali costituito da un oligonucleotide a singola elica (ss-DNA) detto *probe*, contenente l'informazione genetica necessaria per il riconoscimento della sequenza complementare del target. Tale riconoscimento viene eseguito tramite la reazione di ibridazione, che consiste nell'incubare, in certe condizioni di temperatura/umidità/tempo, il DNA-microarray direttamente con il DNA target (prodotto di amplificazione del campione biologico). In tali condizioni, solo il target contenente l'esatta sequenza genetica, interagirà con il probe complementare formando sullo specifico spot una doppia elica (ds-DNA). La formazione della ds-DNA, basata sulla complementarità delle basi azotate del DNA, è alla base dell'esperimento di ibridazione. La rilevazione dello spot ibridato può avvenire in diversi metodi: per via ottica utilizzando opportuni marcatori fluorescenti, come ad esempio Fluoroscaina, Cy5 o Cy3, per via elettrochimica utilizzando intercalanti redox come i complessi di rutenio od osmio, o per via elettrica, misurando ad esempio le variazioni di carica elettrica della superficie del substrato in seguito all'avvenuta ibridazione. In Fig. 2 si riporta un esempio di test di ibridazione con lettura ottica del microarray, in questo caso il target biologico complementare è stato opportunamente marcato con un fluoroforo.

La chimica, in tutte le sue discipline, organica, inorganica, analitica, chimica delle superfici ecc. gioca un ruolo da protagonista in tutte le singole fasi del processo di produzione (processo tecnologico di produzione di microarray, funzionalizzazione del substrato solido ed immobilizzazione dei probe e passivazione finale del substrato) e testing del modulo microarray.

In particolare, il processo di immobilizzazione dei probe sulla superficie del dispositivo, prevede diversi processi chimici, quali:

- a) pulizia della superficie eseguita allo scopo di rimuovere residui organici ed inorganici;
- b) attivazione della superficie, il cui scopo è quello di aumentare la densità superficiale di gruppi reattivi;
- c) funzionalizzazione della superficie, attraverso la formazione di coating molecolari contenenti gruppi reattivi in grado di immobilizzare con alta specificità il probe attraverso la formazione di legami di natura elettrostatica o covalente;
- d) passivazione finale del substrato, il cui scopo è quello di disattivare i gruppi reattivi residui che causerebbero legami aspecifici della superficie con il campione biologico in esame.

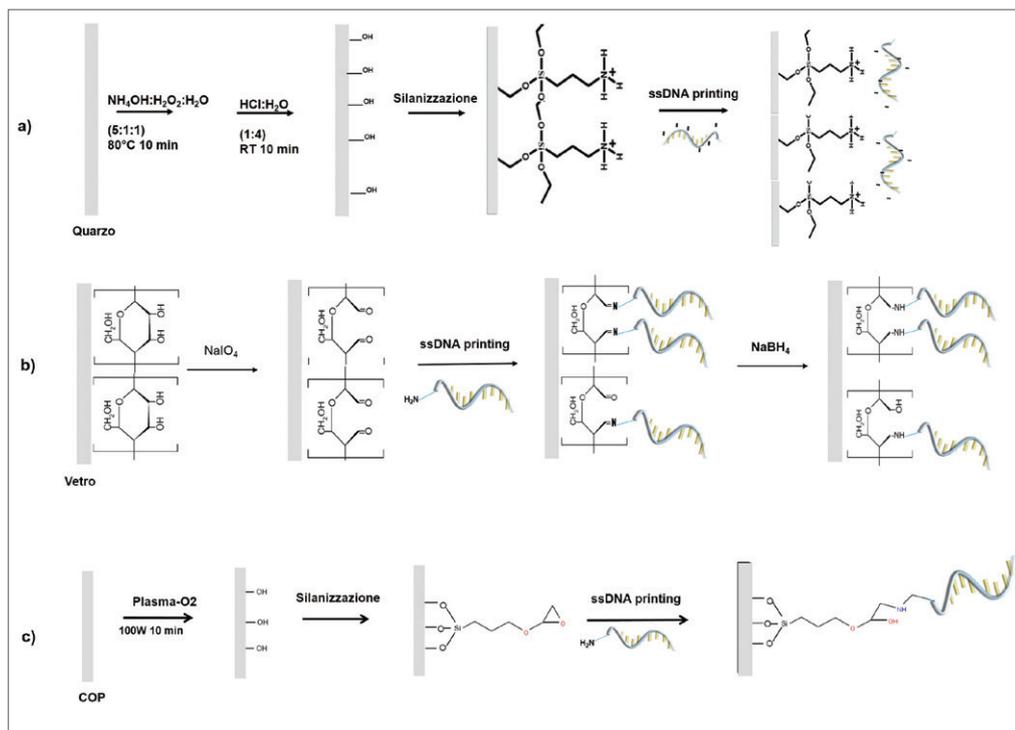


Fig. 3 - Strategie di immobilizzazione dei probe: elettrostatica a) e covalente b, c)

Un tipico esempio di processo chimico di pulizia di superfici metalliche (Au, Pt ecc.) prevede un attacco con soluzione Piranha (H₂SO₄:H₂O₂ 3:1) a 90-120 °C per 5-10 minuti. Mentre superfici costituite da SiO₂, vetro, ITO, quarzo, vengono generalmente trattate con un processo per circa 10 min. a 80 °C con una soluzione H₂O:H₂O₂:NH₄OH (5:1:1 v:v:v). Questi ultimi substrati vengono inoltre sottoposti ad un processo chimico di attivazione che prevede l'utilizzo di una soluzione idroalcolica di HCl a temperatura ambiente per 10 minuti. Un nuovo processo fisico alternativo e veloce per ottenere in un singolo step sia pulizia sia attivazione del substrato è il trattamento in plasma-O₂ a 100 W per circa 10 min.

Il processo chimico di funzionalizzazione del substrato ed immobilizzazione dei probe sulla superficie dipende dalla natura del legame probe-superficie. Tale legame può essere un'interazione debole, come legami ad idrogeno, interazioni elettrostatiche, interazioni di Van der Waals, o un forte legame covalente.

In Fig. 3 sono riportati alcuni esempi di processi chimici di funzionalizzazione ed immobilizzazione di oligonucleotidi su substrati per la preparazione di DNA-microarray.

In Fig. 3a è riportato un processo chimico per la preparazione di DNA microarray con interazioni probe-superficie di natura elettrostatica. In particolare una superficie di quarzo dopo il processo di lavaggio ed attivazione è trattata con un processo di silanizzazione con una soluzione all'1% di 3-amminopropil-trietossi-silano in toluene. Dopo una reazione di 4 ore a temperatura ambiente si ottiene una superficie avente un coating che a pH leggermente acido assume una carica positiva in grado di legare elettrostaticamente le cariche negative del probe ssDNA (in questo caso il probe non necessita alcuna derivatizzazione chimica). L'interazione elettrostatica probe-superficie produce un microarray caratterizzato da un orientamento casuale della singola elica dei probe ed un legame

probe-superficie debole, questo produrrà, di conseguenza, un DNA-microarray caratterizzato da bassa efficienza di ibridazione, scarsa stabilità e riproducibilità, in compenso tale processo ha un basso costo ed una facile preparazione.

Le Fig. 3b e 3c riportano due esempi di immobilizzazione covalente dei probe. In questo approccio è necessario che il probe venga opportunamente funzionalizzato con gruppi reattivi quali gruppi amminici, tiolici, pirrolici ecc. in grado di creare legami covalenti specifici con il coating del substrato. Al fine di aumentare l'efficienza di ibridazione, tra il gruppo reattivo ed il probe stesso vengono inseriti degli spaziatori quali catene di gruppi (-CH₂)_n od una catena di poli-adenina, in grado di allontanare la singola elica dalla superficie.

In Fig. 3b si riporta un esempio

di immobilizzazione covalente di ss-DNA su una superficie di agarosio. In questo caso il film di agarosio è stato depositato per spin coating (4.000 rpm, 50 °C per 40 secondi) su un substrato di quarzo precedentemente lavato. Il coating di agarosio viene quindi attivato da una soluzione NaIO₄ con formazione di gruppi aldeidici reattivi, sul substrato così attivato viene depositato il probe ammino terminato. Un processo di anchoring eseguito in cella climatica ad umidità e temperatura controllata garantisce la formazione del legame aldeide-ammina primaria con formazione della base di Schiff. La successiva riduzione in soluzione di NaBH₄ stabilizza il legame tra probe e coating del substrato.

In Fig. 3c è riportato un processo di immobilizzazione chimica di probe su una superficie di COP (Cyclic Olefin Polymers), in particolare la superficie viene pulita ed attivata con un processo fisico in plasma di ossigeno per 10 min. a 100 W; la variazione di angolo di contatto da 82° a 21° indica l'avvenuta attivazione del substrato. La successiva silanizzazione chimica eseguita in presenza di vapori di 3-glicidossi-propil-trimetossi-silano (a 120 °C per 2 ore, sotto vuoto), permette la formazione di un coating con terminazioni epossidiche (angolo di contatto 60°+/-1,5°). Il successivo processo di printing di probe ammino modificati ed anchoring permette l'immobilizzazione covalente degli oligonucleotidi con formazione di un legame amminico [9].

L'approccio di immobilizzazione covalente, garantisce un'elevata stabilità del microarray, un ben determinato orientamento delle singole eliche sulla superficie e di conseguenza un'alta e riproducibile efficienza di ibridazione.

Il processo chimico finale prevede inoltre uno step di passivazione della superficie (*blocking process*) il cui scopo è quello di rimuovere i probe non ancorati alla superficie e di disattivare i gruppi reattivi residui che causerebbero legami aspecifici della superficie con il campione biologico



in esame. Le strategie di passivazione chimica sono diverse a seconda della natura della superficie. In generale si può seguire un approccio elettrostatico o covalente. Nell'approccio elettrostatico la superficie del substrato viene passivata da un layer di materiale organico ottenuto dall'interazione tra la superficie e le molecole passivanti quali: tensioattivi (Triton, Tween 20), proteine (BSA Albumina Bovina Sierica), polimeri (polivinilpirrolidone, parilene, glicolepolietilenico) o miscele, come la soluzione di Denhart. Un approccio covalente può essere eseguito utilizzando dei reagenti

specifici, ad esempio una superficie terminata con gruppi epossidici può essere passivata covalentemente con etanolamina producendo una superficie polare ed inerte caratterizzata da gruppi ossidrilici superficiali.

Ruolo della chimica nel modulo tecnologico per PCR

Il processo di miniaturizzazione che guida l'innovazione tecnologica dei LoC che sfruttano la reazione di amplificazione del DNA è accompagnato da alcuni svantaggi, quali ad esempio la diminuzione di efficienza di amplificazione della PCR dovuta all'interazione dei reagenti (Taq polimerasi, primers, nucleotidi (dNTP)) con le pareti del dispositivo stesso, con il risultato finale di una diminuzione di efficienza di amplificazione. In questo scenario la chimica è intervenuta attivamente con diverse soluzioni, proponendo, ad esempio, un processo chimico *low-cost* e quindi utilizzato a livello industriale che consiste nel passivare le pareti del LoC con un coating proteico PCR-*friendly*, ovvero compatibile con la reazione di PCR. Tale processo consiste semplicemente nell'immergere il dispositivo in una soluzione acquosa a pH neutro in citrato, contenente BSA a concentrazione pari all'1% P/V in presenza di agenti denaturanti, come SDS. Dopo un'incubazione di circa 4-8 ore ad una temperatura di 55 °C la superficie viene ricoperta da un coating proteico [10]. In Fig. 4a sono riportati i risultati delle analisi TEM che mettono in evidenza la formazione del coating di BSA.

Un metodo alternativo per incrementare le performance della PCR nei LoC è l'utilizzo di additivi a base di nanomateriali e solubili in mezzo acquoso [7-11], quali ad esempio complessi *host-guest* di nanoparticelle di Pt (diametro 2-3 nm) con β -ciclodestrine. (Fig. 4b). In tali complessi le strutture ciclodestriniche, garantiscono un'elevata solubilità del complesso nel mezzo di reazione biologico e il core metallico di nanoparticelle contribuisce con diversi meccanismi ad aumentare l'efficienza della PCR; in questo caso si è riscontrato un incremento delle performance di circa il 50% grazie all'eccellente efficienza termica delle nanoparticelle metalliche.

Conclusioni

Dallo sviluppo dei materiali innovativi alla messa a punto di nuovi processi specializzati, la chimica in tutte le sue discipline, chimica organica,

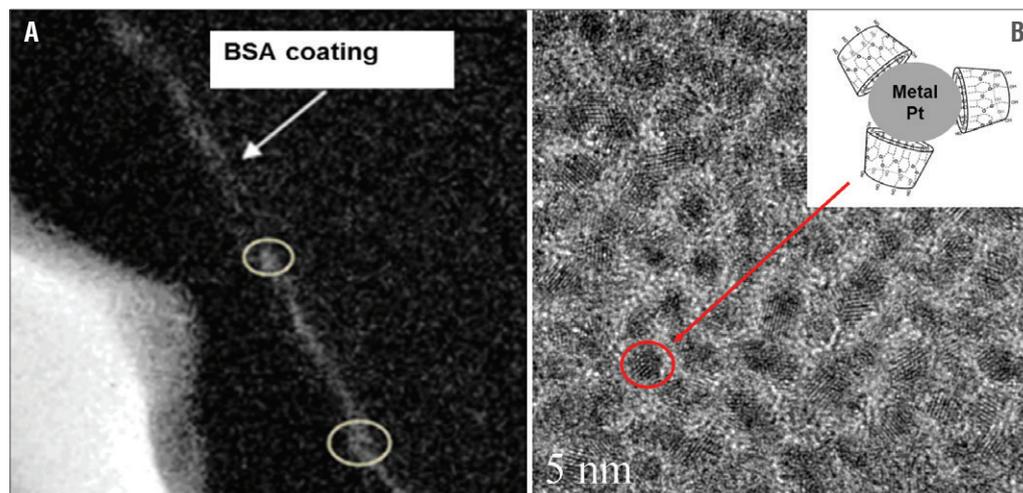


Fig. 4 - Immagini TEM del coating di BSA su superficie di SiO_2 (sinistra), in complessi *host-guest* di nanoparticelle di platino con β -ciclodestrine

inorganica, analitica, chimico-fisica e biochimica gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella produzione dei dispositivi miniaturizzati (Lab-on-Chip) progettati per l'analisi degli acidi nucleici. Ogni modulo tecnologico di tali dispositivi necessita dei processi di funzionalizzazione chimica che abilitano le funzionalità specifiche del modulo stesso, quali microreatore per reazioni biochimiche, movimentazione liquidi, substrati solidi per lettura ottica o elettrica ecc. Tutto ciò fa sì che la figura del chimico sia diventata ormai essenziale nell'industria della diagnostica molecolare e dei dispositivi medici, per la messa a punto, lo sviluppo e la produzione di tali dispositivi innovativi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B. Foglieni *et al.*, *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 2010, **48**, 329.
- [2] A. Kaushik *et al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **75**, 254.
- [3] S. Petralia *et al.*, *Biosensors Journal*, 2016, **5**, 136.
- [4] M. Guarnaccia *et al.*, *Genomics*, 2014, **103**, 177.
- [5] S. Petralia *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, **187**, 99.
- [6] S. Petralia *et al.*, *Bionanoscience*, 2015, **5**, 150.
- [7] S. Petralia *et al.*, *Bionanoscience*, 2016, **6**, 139.
- [8] S. Petralia *et al.*, *Materials Science and Engineering C*, 2012, **32**, 848.
- [9] G. Ventimiglia S. Petralia, *Bionanoscience*, 2013, **3**, 428.
- [10] S. Petralia, G. Ventimiglia, *Bionanoscience*, 2014, **4**, 226.
- [11] S. Petralia, G. Ventimiglia, *Sensors & Transducers Journal*, 2012, **137**, 215.

[11] S. Giuffrida *et al.*, *Inorganic Chemistry*, 2006, **45**, 508.

The Role of Chemistry on Lab-on-Chip Development

Chemistry plays a fundamental role on the development and production of miniaturized device designed for the nucleic acids detection. Each technological Lab-on-Chip module need derivatization chemical processes to enable the module its specific function such as microreactor for biochemical reactions, liquid handler or solid support for optical or electrical reading.