

Realizarea de interfete biohibride siliciu-proteine cu aplicatii in bionanodetectie

10.1. IMPORTANTA SI RELEVANTA CONTINUTULUI STIINTIFIC

Importanta problematii abordate si conceptul propus

Proiectul propus are ca scop realizarea si caracterizarea unor interfete biohibride (siliciu-proteina), in vederea realizarii interfetei microdispozitiv-biomolecula. Este cunoscut faptul ca semnalul biomolecula-material inregistrat optic/spectrofotometric are intensitate mica si nu poate fi detectat cu usurinta datorita zgomotului. Pentru cresterea intensitatii semnalului detectat se poate creste suprafata suportului de Si sau Au/Si prin nanostructurare; aceasta contribuie pe de o parte la cresterea densitatii de biomolecula imobilizate, dar si la obtinerea unui efect de amplificarea a semnalului optic IR (SEIR) sau Raman (SERS).

Prin cercetarea propusa se urmareste optimizarea bio(nano)detectiei prin: (i) nanostructurarea suportului pentru amplificarea semnalului detectat; (ii) cresterea numarului de (bio)molecula imobilizate pe suprafata; (iii) formarea unor legaturi stabile biomolecula-suprafata dispozitiv. Informatiile obtinute din acest studiu despre interactia biomoleculilor cu suprafata microdispozitivului (biochip-ului), vor constitui datele de intrare pentru proiectarea unei platforme de testare a interfetelor biohibride pe un chip de Si, cu care sa se poate efectua masuratori electrice si optice in timp real. Subiectul reprezinta o noutate pe plan mondial din punct de vedere stiintific, si isi va gasi aplicabilitate in domeniul biosenzorilor, proteomica, nanomedicina, sisteme de eliberare de medicamente. In tara noastra pana in prezent nu a mai existat un studiu sistematic in domeniul propus prin care sa se realizeze optimizarea biointerfetei in corelatie cu aplicatii specifice.

Colaborari internationale in care suntem implicati si care sustin tema:

Rețele de excelenta FP6: (1) Nanostructured and Functional Polymer-Based Materials and Nanocomposites - *NANOFUN-POLY*, Prioritatea 3 –NMP (2003-2007). Printre domeniile studiate sunt aplicatii medicale- bioactivitate si unul din proiectele noastre referitor la Studiul interfetei Biomolecula-Si a fost selectat si am primit un grant de trei luni la INASMET San Sebastian, Spania.; (2) A network for bringing NANOTEchnologies TO LIFE- *Nano2Life*, (2003-2007) NoE, Prioritatea 3 – NMP, este o retea internationala, in care IMT - Bucuresti este partener asociat si care are ca obiectiv principal imbunatatirea competitivitatii europene in domeniul nanobiotehnologiilor. *Facem parte din grupul de lucru pentru studiul proteinelor din rețeaua N*

Realizarile in domeniu pe plan mondial/national

Modificarea chimica, atat a siliciului cristalin cat si a siliciului poros

In era post genomica, scopul principal al cercetatorilor este sa caracterizeze si sa inteleaga toate proteinele codate de genom. Astfel, a aparut necesitatea dezvoltarii de tehnologii proteomice, capabile sa analizeze, cu o inalta rezolutie, aceste molecule complexe. Imobilizarea proteinelor intr-o conformatie stabila, care sa le conserve proprietatile native biologice pare a fi cheia dezvoltarii cu succes a acestor sisteme multifunctionale. In majoritatea studiilor prezentate in literatura de specialitate, ca substrat solid pentru imobilizarea biomoleculilor, se folosesc lamelele de sticla[1]. Totusi, acest substrat prezinta unele limitari, date de caracterul amorf al oxidului de siliciu SiO_2/Si care face ca acesta sa fie destul de dificil de controlat.

Datorita versatilitatii tehnologiei siliciului (Si), care ofera multe oportunitati de microprelucrare, acest material reprezinta o solutie avantajoasa pentru dezvoltare dispozitivelor miniaturizate. Siliciu poros (PS) este un material anorganic, bine caracterizat in prezent, format prin corodarea chimica sau electrochimica a siliciului in prezenta acidului fluorhidric. Suprafata proaspat preparata va fi formata 99% din legaturi Si-Hx unde $x = 1-3$. Avand o suprafata specifica mare acesta prezinta un real interes si in domeniul biosenzorilor. Totusi, aceasta suprafata este metastabila, lumina camerei initiand rapid oxidarea suprafetelor. Modificare suprafetei PS cu grupari organice stabile face din material o solutie atragatoare pentru aplicatiile biomedicale. In grupul nostru de lucru exista o ampla experienta in ceea ce priveste siliciul poros (PS), astfel: preparare PS (straturi subtiri; membrane; microparticule) cu morfologie controlata in domeniul nanometric; modificarea chimiei suprafetei (hidrofobicitate / hidrofilicitate); grafting de substante organice (saruri de diazoniu) pe suprafata PS; SAM (atasare de primer ADN cu grupari tiol pe suprafata de Au/PS); atasarea de glicoproteine pe suprafata PS (strat S); atasarea de celule vii pe suprafata PS, proprietati de emisie in camp, fotoluminescenta (PL), biocompatibilitate. [2-5].

In prezent, sunt depuse eforturi semnificative spre modificarea chimica, atat a siliciului cristalin cat si a siliciului poros in diferite conditii pentru atasare de biomolecula. Primul raport al lui Chidsey si colab [6] in 1993 despre functionalizarea chimica a Si(111)-H cu alchene in conditii fotochimice si termice a prezentat un interes deosebit. In 1996, Chazalviel [7] a obtinut electrochimic, o legatura stabila Si-C, prin tratarea PS nativ (Si-H) cu reactivi organometalici: reactivi Grignard, metil litiu. Intr-un studiu ulterior, Sailor si Ghadiri [8] au extins acest domeniu prin atasarea de alcoxilani de PS oxidat. M.P.Stewart and J.M. Buriak [9] grefeaza pe PS hidrogenat, alchene si alchine in prezenta de cationi trifenilcarbeniu, in atmosfera inerta. De curand, B.Rabah [10] si colab au aratat ca modificarea suprafetei de (PS)/Si p(100) cu grupari $-COOH$ se poate face fotochimic prin iradierea cu UV (300nm) timp de 3h. In aceste lucrari se evidentiaza dificultatea caracterizarii substratelor functionalizate. Spectroscopia IR, pare a fi

insuficienta, datorita semnalului foarte slab dat de aceste molecule. Astfel, pentru caracterizarea acestora se cere asocierea cu un modul ATR (attenuated total reflexion). Intr-adevar acest modul amplifica semnalul de cateva zeci de ori, dar pregatirea substratului pare a fi un inconvenient important.

In 1980 Harnstein [11] a fost primul care a observat ca semnalul de infrarosu al moleculelor organice grefate direct pe siliciu, poate fi crescut prin evaporarea pe suprafata de metale nobile ca: argint, aur. Amplificarea absorbtiei radiatiei de catre moleculele adsorbite la suprafata sau chiar in proximitatea nanoparticulelor metalice pare atractiva. Mecanismul de amplificare se datoreaza fie efectelor electromagnetice, fie chimiei suprafetei. *In amplificările pe suprafata are loc o excitare rezonanta a plasmonilor de suprafata, care conduce la formarea unor structuri de benzi fotonice si implicit la amplificarea campului electromagnetic local (EM).* Cea mai buna morfologie pentru excitarea plasmonilor aflati la suprafata nanostructurilor este fie o suprafata rugoasa la nivel atomic, fie nano-particule mai mici de 100 nm, frecvent din Au sau Ag. *Cauza amplificarii datorata chimiei suprafetei este formarea unui complex de transfer de sarcina intre suprafata si biomolecula, avand ca rezultat tranzitii electronice de la donor la acceptor, in zona de vizibil a spectrului EM.* Semnal amplificat prezinta si moleculele cu perechi de electroni liberi sau cu nori π [12]. Pana in prezent au fost realizate suprafete active **SERS**-Surface enhanced Raman scattering (este o metoda de amplificare a intensitatii Raman datorita efectelor de suprafata) din materiale poroase, cu nanoparticule de aur, obtinute prin diferite procedee [13]. O trasatura a acestor substraturi este suprafata lor specifica mare, datorata nanoparticulelor de aur, agregate pe suprafata, cat si structurii 3D a porilor ordonati periodic in structura substratului. Cel mai comun procedeu de obtinere a unor astfel de suprafete este introducerea cristalelor coloidale de aur in structuri polimerice de tip *template*. [14]. Suprafete active SERS, au fost obtinute si prin: asamblare pe nanoparticule de Ag pe substrat de Au [15], nanoparticule de Au stabilizate in agaroză [16]; Ag si Au coloidal [17]. In lume exista laboratoare special dotate cu echipamente pentru detectia detectia optica cu sensibilitatea maxima a unei singure molecule cum este Michigans Center of Single Molecule Analysis .De asemenea, se organizeaza conferinte pe acest subiect ca de exemplu: Under the Microscope: Single Molecule Symposium at the University of Michigan, 2006.

Exista firme precum: Platypus, SPI Supplies®Brand, Sigma-Aldrich Co ; InfoSsens care furnizeaza placute de siliciu sau de sticla cu depuneri de Au pentru diferite aplicatii: culturi de celule, microarray-uri, reflectometrie plasmonica de suprafata, microscopie de scanare (SPM). Pretul acestora este foarte mare (1000 Euro 20 buc, (1.7x1) cm²), iar Au depus nu este destul de uniform (am lucrat cu placute de la SSens pentru litografie cu fascicul electronic-EBL).

Grupul nostru are experienta in depuneri PVD de nanoparticule de Au/PS (prin tratament termice se obtin nanoparticule de Au texturat (111) de marime 100 nm); depuneri PVD de straturi subtiri semitransparente de Au/Si sau Au/sticla; recent prin bursa Marie Curie, drd. T. Ignat s-a specializat in prepararea electrochimica de nanodot-uri de Au/Si(111)-H.

Imobilizarea biomoleculor pe suprafata substratului poate fi facuta prin: **(a)** adsorptie- interactii necovalente, de natura electrostatica, Van der Waals; **(b)** covalente, legand gruparile functionale ale biomoleculei de suprafetele functionalizate. *Primul mecanism* este de natura fizica, el fiind in anumite conditii reversibil, pe cand legarea covalenta a biomoleculei de substrat implica formarea unei legaturi chimice ireversibile. Pentru biomolecule, cele mai importante sunt: interactiile de natura electrostatica, fortele van de Waals, deshidratarea suprafetelor hidrofobe, modificarile conformationale precum si interactiile laterale. Quinn, A si colab. [18] au adsorbit pe suprafete hidrofile de oxid de siliciu, precum si pe suprafete hidrofobe (octadeciltriclorosilan) o proteina B18 cu rol in procesul de fertilizare. Legaturi necovalente a realizat si Panagiota S. Petrou [19]. Acesta a folosit filme polimerice subtiri (AZ5214) pentru a obtine microarrayuri de proteine. Toate publicatiile pe acest domeniu releva faptul ca este imposibil de pravazut efectul pe care il va avea interactia biomoleculei adsorbite cu substratul

Pentru *imobilizarea covalenta* a biomoleculor pe support solid (Si, SiO₂, PS) exista metode exclusive chimice (SAM, grafting, aditie de grupari amino) sau se pot utiliza metode combinate fizice si chimice sau fizico-chimice; in cel de-al doilea caz suprafata se preactiveaza pentru formarea de legaturi libere sau radicali in plasma de oxigen, lumina UV, bombardare cu fascicul de electroni. Legarea covalenta a biomoleculei implica formarea unei legaturi puternice intre unul din capetele acesteia si substrat. Gruparile terminale implicate in legaturi covalente sunt in general gruparile: amino, carboxil, hidroxil si tiol. In general, suprafata este functionalizata sau/si proteina este modificata. Cele mai multe tehnici de imobilizare specifica necesita modificarea proteinelor astfel incat acestea sa contina ca grupare terminala: N-din cisteina [20], C-din tioester [21], biotina [22], alchine [23] sau azide [24]. Proteine care contin cisteina libera se pot atasa de suprafete terminate cu grupari tioli sau maleinimide. Fundamentele atasarii proteinelor au fost si sunt inca intens studiate. Problema pare a fi insa dificultatea de a presupune modul in care se va lega proteina de substrat. Spre deosebire de ADN, proteinele sunt instabile, se denatureaza usor (pierzandu-si astfel functiile biochimice), prezinta o structura tridimensionala si nu pot fi amplificate. Din acest motiv se impune dezvoltarea unei suprafete specifice, din punctul de vedere al chimiei suprafetei.

Rabah B. descrie intr-o lucrare recenta [25] imobilizarea proteinelor de suprafete modificate cu semicarbazide. Rezultate deosebite in domeniul functionalizarii suprafetelor in scopul atasarii proteinelor (fibronectinei) obtine si M. Veisheh de la Universitatea din Washington [26]. Acesta dezvolta o metoda relativ simpla de modificare a suprafetei de Au/Si si cu tioli-NHS (tioli modificati cu grupari N-hidroxisuccinimida). Legaturi covalente realizeaza si S. Borini, S. D'Auria [27]. Ei descriu o metoda inovativa de imobilizare a proteinelor care contin grupari glutamina, pe PS proaspat preparat, hidrogenat, iradiat prin bombardare cu fascicul de electroni. Suprafata iradiata va duce la desfacerea

legaturii duble din alchene, permitand astfel reactia proteinelor cu substratul. Toate aceste tehnici, scot in sa in evitenta importanta imobilizarii proteinelor intr-o anumita conformatie, care sa nu le altereze bioactivitatea. Calitatea interfetei biomolecule/chip de Si, respectiv imobilizarea proteinelor pe chip-ul de Si sau pe suport de sticla se determina prin metode de caracterizare fizico-chimice: Microscopie Electronica (SEM), Spectrometrie in Infrarosu cu Transformata Fourier (FTIR), Spectroscopie Raman, Microscopie/spectroscopie de Fluorescenta, Spectroscopie UV-Viz, Microscopie de Forta Atomica (AFM), fotoluminescenta (PL), elipsometrie, voltametrie ciclica.

In concluzie, domeniul de cercetare abordat prin acest proiect, modificarea chimica suprafetelor semiconductorilor, atasarea de proteine si caracterizarea acestora cu o sensibilitate marita este de actualitate, datorita locului pe care il ocupa aceste materiale in tehnologia moderna. De asemenea, trebuie subliniat faptul ca informatiile rezulate in urma acestui proiect vor putea fi valorificate la dezvoltarea de sisteme complexe chimice sau biochimice.

- [1] Lesaicherre, M., Lue R., Chen G. Y., Zhu J. Am. Chem. Soc., 124, 8768-8769, **2002**
- [2] Ignat, T., Kleps, I., Maroun, F., Allongue, P., Bragaru, A., TISSUE ENGINEERING 13 (4): 922- **2007**
- [3] I. Kleps, M. Danila, A. Angelescu, M. Miu, M. Simion, T. Ignat, A. Bragaru, Romanian Journal of Information and Technology, vol.9, vol. 2, 137- 148, **2006**
- [4] M. Simion, I. Kleps, T. Negina, M. Miu, J. Alloys & Comp. (JALCOM), 434-435, 830-832; **2007**
- [5] M. Draghici, M. Miu, V. Iancu, A. Nassiopoulou, I. Kleps, **Physica Status Solidi (a)**, 182, pp. 239-243, **2000**
- [6] M.R. Linford, C.E.D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 12631, **1993**
- [7] C. Viellard, F. Ozanam, J-N Chazalviel, *Proc. Electrochem. Soc.*, 95, 250, **1996**
- [8] V.S.-Y. Lin, M.J. Sailor, M.R. Ghadiri, *Science*, 278, 840, **1997**
- [9] M.P. Stewart and J.M. Buriak, *Langmuir*, 18, 2971, **2002**
- [10] R. Boukherroub, Current Opinion in Solid State and Materials Science, 9, 66-72, **2005**;
- [11] A. Haristein, J. R. Kirtley, and J. C. Tsang, *Phys. Rev. Lett.* **45**, 201-204, **1980**;
- [12] R. Brown, J. Gallop, Review of Tech. for Single Molec. Det. in Biolog. NPL Report COAM 2, **2001**.
- [13] D. M. Kuncicky, S. D. Christesen, *Applied Spectroscopy*, Volume 59, Number 4, 401-409; **2005**
- [14] O. D. Velev and A. M. Lenhoff, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 56, **2000**;
- [15] Chen H; Wang Y; Dong S; Wang E, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* ; 64(2):343-8; **2006**
- [16] V. Kattumuri, M. Chandrasekhar, and S. Guha, *Applied Physics Letters* 88, 153114, **2006**
- [17] Quinn A, Tjipto E, Yu AM, et al., *LANGMUIR* 23 (9): 4944-4949 APR 24 **2007**
- [18] Panagiota S. Petrou, M. Chatzichristidi, *Biosensors and Bioelectronics* 22, 1994-2002, **2007**
- [19] J. Kneipp, H. Kneipp, M. McLaughlin, D. Brown, K. Kneipp *Nano Letters* 6: 2225-2231 **2006**
- [20] A. Ggirish, H. Sun, D.S.yeo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2447-2451, **2005**
- [21] J.A. Camarero, Y. Kwon, M.A. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 14730-14731
- [22] M.L. Lesaichere, R.Y. Rue, G.Y. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 8768- 8769
- [23] P.C. Lin, S.H. Ueng, M.C. Tseng, J.L. Ko, S.C. Tu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 45, 4268-4290, **2006**
- [24] J.M. Gilmore, R.A. Scheck, A.P. Esser-Kahn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 45, 5307-5311, **2006**
- [25] Boukherroub, Rabah Coffinier Y, Szunerits S, Jama C, et al. *LANGMUIR* 23 (8): 4494-4497, **2007**
- [26] M. Veiseh, O. Veiseh, *Langmuir*, 23, 4472-4479, **2007**
- [27] S. Borini, S. D' Auria, *Lab on Chip*, 5, 1048 - 1052, **2005**

10.2. Obiectivele proiectului

Scopul proiectului:

Proiectul propus se refera la o cercetare complexa intr-un domeniu de frontiera: **nanocompozite si modelarea proceselor fizice, chimice, biologice** si anume realizarea si caracterizarea unor interfete biohibride (siliciu-proteina) cu aplicatii in bionanodetectie

Modelul teoretic aplicat : nanostructurile sint amplificatori de semnal in spectroscopia RAMAN pe suprafata sau sint amplificatori de absorbtie IR in spectroscopia IR cu amplificare pe suprafata;

Prin cercetarea propusa se urmareste optimizarea bio(nano)detectiei prin:

- (i) prin nanostructurarea suportului pentru amplificarea semnalului detectat.
- (ii) cresterea numarului de (bio)molecule imobilizate pe suprafata;
- (iii) formarea unor legaturi stabile biomolecula-suprafata dispozitiv.

Informatiile obtinute din acest studiu despre interactia biomoleculilor cu suprafata microdispozitivului (biochip-ului), vor constitui datele de intrare pentru proiectarea unei platforme de testare a interfetelor biohibride pe un chip de Si, cu care sa se poate efectua masuratori electrice si optice in timp real.

Obiectivul 1: Bio-funcionalizarea suportului solid (Si, Si nanocristalin, Au/Si; Au/PS)

- (a) studierea si experimentarea unor metode de obtinerea de materiale nanocompozite multifunctionale cu proprietati controlate (PL) cu potentiale aplicatii in (bio)senzori;
- (b) studierea si experimentarea unor metode de obtinerea a nanoparticulelor de Au, uniforme si reproductibile cu potentiale aplicatii in SERS sau in retele de nanoelectrozi;
- (c) studierea si experimentarea metodei de autoasamblare (SAM) a unor molecule de tioli pe suprafete nanostructurate Au/Si si Au/Si nanocristalin pentru functionalizari specifice, stabilizarea suprafetei, linker chimic intre substrat si biomolecule;
- (d) studierea si experimentarea atasarii covalente a moleculelor de proteine pe suprafata Si prin grupari amino, carboxil, hidroxil si tiol cu aplicatii in bionanodetectie (SEIR, SERS, spectroscopie de fluorescenta in tehnologia microarray-urilor cu proteine);

Obiectivul 2. Biodetectia de proteine

- (a) Caracterizarea suprafetelor de siliciu nanostructurate si functionalizate; Mono- sau multistraturile organice subtiri (50 nm), covalent legate sau depuse pe suportul de siliciu, pe PS sau pe Au anterior mentionate, vor fi caracterizate prin diferite metode: diferite tehnici de microscopie, elipsometrie, difractie de raze X, metode polarografice.
- (b) Biodetectia de proteine atasate de suprafata prin spectroscopie IR (SEIR), Raman (SERS) si Fluorescenta

Obiective secundare

- acumularea de cunostinte pentru dezvoltare de microdispozitive cu arhitecturi supra-moleculare;
- optimizarea biointerfetei Si-biomolecula in corelatie cu aplicatii specifice.
- stabilirea parametrilor de intrare pentru proiectarea unei platforme de testare a interfetelor biohibride pe un chip de Si, cu care sa se poate efectua masuratori electrice si optice in timp real;

Elemente de originalitate vizate in cadrul proiectului

Obiectivele propuse, studiul interfetelor biohibride (Si-proteine) si detectia unui semnal IR si/sau Raman amplificat datorat nanostructurarii suprafetii, precum si formarea unor legaturi stabile biomolecula-suprafata dispozitiv sunt urmarite cu scopul dezvoltarii a doua aplicatii specifice in lucru in laborator si anume biosenzor cu detectie optica si biochip cu proteine pentru diagnosticare medicala. Formarea unor interfete stabile biomolecula - siliciu nanostructurat nu a fost studiata sistematic pana in prezent in lume, Astfel, recent in Reteaua de Excelenta FP6-NoE, NANO2LIFE in care IMT este partener asociat, s-a format un grup de lucru in domeniul imobilizarii proteinelor la care am participat. Concluzia a fost ca problema imobilizarii de proteine pe suport solid este inca nesolutionata in intregime datorita complexitatii/diversitatii structurii proteinelor, adsorptiilor nespecifice si denaturarii materialului biologic. In Romania nu exista pana in prezent cercetari similare. Infrastructura de care dispunem, va permite atat dezvoltarea de noi cunostinte in domeniu (ne propunem depunerea a minimum 1 brevet de inventie), cat si aplicatii in special in proteomica in tehnologia microarray-urilor cu proteine.

Impactul proiectului in conformitatea cu obiectivele programului national / PC7

Proiectul propus este in concordanta cu obiectivele strategice ale sistemului national CDI contribuind la crearea de cunoastere in domenii multidisciplinare (biofizica, stiinta suprafetelor, nanotehnologii, bionanomateriale), cu impact in diferite sectoare: (nano)medicina, mediu (toxicologie), alimentar, in bio(nano)detectie si proteomica. Cunostintele acumulate in proiect vor contribui la crearea de (bio)nanomateriale, dispozitive si tehnologii inovative. De asemenea proiectul se inscrie pe directia prioritara din PC7, a convergentei micro-nano-bio tehnologiilor. Tinerii doctoranzi implicati in proiect vor fi pregatiti sa abordeze un domeniu de varf de mare perspectiva in medicina si farmacologie, tehnologia microarray-urilor cu proteine, pentru studiul reactiilor antigen-anticop, cu aplicatie directa in diagnosticare. Pe termen lung proiectul va contribui la dezvoltarea de dispozitive cu arhitecturi supra-moleculare.

10.3. Metodologia cercetarii

In cadrul Obiectivului 1, generic numit **Bio-functionalizarea suprafetii siliciului**, se vor experimenta si investiga diferite procedee de functionalizare, pe suport de siliciu sau siliciu nanostructurat cu si fara nanoparticule de Au pe suprafata. Etapele de lucru sunt::

1.1. Realizarea suportului

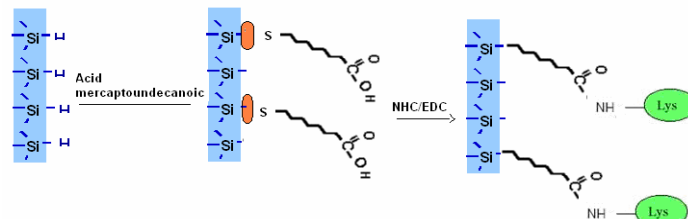
(i)Realizarea suportului de siliciu nanostructurat Se vor proiecta si realiza suprafete support cu structura predeterminata si stabila; (ii) Realizarea nanodot-urilor de aur pe siliciu cristalin; (iii) Realizarea de straturi subtiri discontinue de Au pe substrat de siliciu nanostructurat in etapa (i). Pentru etapa **1.1.** ne bazam pe experienta actuala a grupului de lucru. Se vor rafina metodele existente pentru obtinerea de suprafete stabile si reproductibile.

1.2. Functionalizare prin auto-asamblare moleculara (SAM)

Pe substratul de siliciu sau siliciu poros va fi depus un strat subtire de aur, prin diferite metode: depunere prin pulverizare catodica in vid (PVD) si depunere electrochimica, in scopul compararii rezultatelor; suprafetile de Au/Si nanostructurat vor fi functionalizate prin metoda SAM, cu molecule organice continand grupari tiol (-SH), pentru imobilizarea ulterioara a moleculelor de proteine.

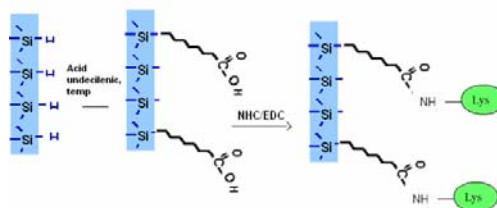
1.3. Metode de imobilizare a proteinei pe suportul de Au/Si

Se va dezvolta o metoda de adsorbție a diferitelor molecule de tiol acizi pe substratele de aur (evaporat in vid si depus electrochimic). Se vor functionaliza suprafetile de aur cu acelasi tiol si se vor compara rezultatele. Pe aceste substraturi de aur modificate cu grupari acide se vor imobiliza proteine. Imobilizarea covalenta, formarea legaturii amidice intre proteina si substrat, se va face utilizand N-hidroxisuccinimida (NHS) si clorura de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida (EDC). Legatura covalenta se va forma prin indepartarea gruparii fugace NHS de pe suprafata de catre reziduurile de lizina din proteina. In aceasta directie de cercetare propusa se va acorda o atentie deosebita caracterizarilor complementare ale structurilor experimentale cat si metodei de imobilizare a proteinelor; se vor analiza din punct de vedere morfologic si structural straturile organice depuse; se vor studia proprietatile optice ale substratului cu ajutorul spectroscopiei IR, si se va verifica structura si organizarea straturilor de tioli acizi, imobilizati pe filme subtiri / nanoinsulele de aur, utilizand spectroscopia de absorbtie IR / RAMAN cu amplificare pe suprafata (SEIAR / SERS).



1.4. Metode de imobilizarea proteinei pe suportul de siliciu nanostructurat/functionalizat

Calitatea sistemelor grefate depinde de natura substratului, calitatea sa (numarul de defecte/ impuritati), precum si a solutiilor de curatare, respectiv pasivare. Spre deosebire de alte suprafete, PS prezinta avantajul ca are o suprafata specifica foarte mare. Insa oxidarea sa rapida apare ca un inconvenient atunci cand se doreste aplicarea sa in domeniul biosenzorilor, microarray-urilor, eliberarii controlate de medicamente. Astfel, noi propunem o metoda simpla de modificare a suprafetei de PS cu grupari acide si succimidil. Reactia dintre suprafata hidrogenata de PS, proaspat preparata si acidul undecilenic ($\text{CH}_2=\text{CH}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$), cu legatura dubla marginala, in conditii termice (prin incalzire la temperatura de 95°C), va duce la obtinerea unui strat organic terminat cu grupari COOH pe suprafata. In scopul imobilizarii proteinei de aceste substraturi se va utiliza metoda descrisa anterior



In cadrul Obiectivului 2, generic numit **Biodetecția de proteine**, Etapele de lucru sunt:

2.1. Caracterizări complementare înainte și după interacțiunea cu mediul biologic.

In vederea optimizării proceselor, in fiecare etapa se vor utiliza tehnici complementare de caracterizare a suprafetelor: (a) microscopie de fluorescanta, de baleiaj (SEM) sau de forta atomica (AFM) pentru verificarea morfologiei suprafetei; (b) spectrofotometrie IR si RAMAN pentru studierea structurii/orientarii straturilor organice pe suprafata.

Tehnici de microscopie. Geometria si morfologia suprafetei sunt caracterizate utilizandu-se tehnicile de microscopie clasice: *microscopia de transmisie electronica (TEM)*, *microscopia de baleiaj electronic (SEM)*, *microscopia de forta atomica (AFM)* si respectiv, *microscopia optica si de fluorescanta*. De asemenea, acestea pot fi utilizate in analiza structurilor dupa atasarea biomoleculor. Analizele SEM si TEM ne vor permite evaluarea gradului de nanostructurare a suprafetei, geometria si morfologia porilor in cazul siliciului poros, ca de altfel si grosimea si calitatea straturilor subtiri de aur. Microscopia de forta atomica va oferi date complete despre substrat si, de asemenea despre stratul nou de biomolecule de pe suprafata. Pe de alta parte, microscopia de fluorescanta este solutia optima pentru localizarea semnalului de la moleculele marcate fluorescent.

Tehnici de spectroscopie. Este importanta cunoasterea atat a structurii cit si a compozitiei chimice a suprafetelor nanostructurilor realizate experimental, si din acest motiv se vor utiliza masuratori de analiza compozitionala. Deoarece marcarea biomoleculor pe nanostructuri are loc prin reactii chimice specifice este important sa cunoastem harta chimica a suprafetei. Vor fi utilizate diferite tehnici de analiza: *difractie de raze X*, *spectroscopie IR*, *spectroscopie de fluorescanta si elipsometrie*.

Tehnici polarografice. O metoda noua, originala de realizarea a functionalizarii suprafetelor si de asemenea, de analiza a interactiilor biomoleculare este *voltametria ciclica sau cu unda patrata*. In timpul proceselor electrochimice, structurile test vor juca rolul de electrod si pe suprafata lor se vor depune moleculele de interes.

2.2. SEIRS - Surface enhanced Infrared spectroscopy si **2.3. SERS**- Surface enhanced Raman scattering sunt metode de amplificare datorita efectelor de suprafata a intensitatii semnalului IR sau Raman.

Pentru stabilirea mecanismului de amplificare in cazul proteinelor atasate stabil pe suprafata investigata se va urmari in ce masura amplificarea se datoreaza excitarii plasmonilor aflati la suprafata nanostructurilor metalice (suprafata rugoasa la nivel atomic, fie particule mai mici de 100 nm din Au), sau chimiei suprafetei (formarii de complexi de transfer al sarcinii intre suprafata si biomoleculele)

2.4. Detectia de fluorescanta, Moleculele de interes se vor marca cu un marker de fluorescanta comercial, si vor fi analizate cu aparatul de scanare pentru detectie de fluorescanta **GeneTAC UC4 Microarray Scanner**. Acesta va permite citirea structurilor realizate prin excitare folosind un laser cu doua lungimi de unda (532nm, 635nm). O analiza statistica calitativa si cantitativa a datelor se va face folosind programul: **GeneTAC Integrator**.

2.5. Chipul de Si cu suprafata biofunctionalizata va fi utilizat pentru aplicatii specifice:

- (i) Se vor stabili parametrii de intrare pentru proiectarea unui biosenzor optic;
- (ii) Se va dezvolta o aplicatie de recunoastere moleculara prin tehnologia micro-array-urilor