

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

Școala Doctorală de Biologie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Dezvoltarea de *biochip*-uri pentru detecția și analiza
high-throughput a biomoleculelor**

Conducător științific

Doctorand

Conf. dr. habil. Ileana C. Fărcășanu

Banu Melania Ana

București

2018

Nr. 696 / 09.07.2018

Către:

Vă aduc la cunoștință că în ziua de _____ ora _____ în _____ din cadrul Facultății de Biologie a Universității din București, Splaiul Independenței, nr. 91-95, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“DEZVOLTAREA DE BIOCHIP-URI PENTRU DETECȚIA ȘI ANALIZA HIGH-THROUGHPUT A BIOMOLECULELOR”

elaborată de: **Melania Ana BANU**

în vederea acordării titlului științific de **DOCTOR**

în domeniul **BIOLOGIE**

cu următoarea comisie:

Președinte	Prof. dr. Otilia ZĂRNESCU
Conducător Științific	Conf. dr. habil. Ileana Cornelia Fărcășanu
Referenți	Prof dr. Marieta COSTACHE <i>Universitatea din București, Facultatea de Biologie</i>
	CS I dr. Norica NICHITA <i>Institutul de Biochimie al Academiei Române</i>
	CS I dr. Monica SIMION <i>Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Microtehnologie</i>

În acest scop, vă trimit rezumatul tezei de doctorat și vă invit să participați la susținerea publică a tezei.

Cu deosebită considerație,

Drd. Melania Ana BANU

Mulțumiri

Mulțumesc conducătorului științific, **Conf. habil. dr. Ileana-Cornelia Fărcășanu** pentru încrederea, îndrumarea și asistența acordate. Mulțumiri comisiei de îndrumare științifică pentru sugestii și recomandări.

Mulțumesc pentru sprijinul acordat în realizarea acestei lucrări colegilor din **INCD IMT București**, a căror contribuție doresc să o amintesc:

Dr. Monica Simion – Fizician – pentru îndrumare și asistență în partea experimentală a cercetării, pentru ajutorul la realizarea lucrărilor publicate și a prezentărilor, și nu în ultimul rând, pentru accesul la echipamentele necesare pentru realizarea experimentelor *microarray*;

Dr. Marian Popescu – Inginer – pentru caracterizările și interpretările SEM, EDX, pentru îndrumarea și sprijinul acordate în revizuirea tezei și a lucrărilor publicate, precum și pentru sugestiile și recomandările primite pe tot parcursul doctoratului;

Drd. Pericle Vărășteanu – Fizician – pentru ajutorul primit în Rstudio, pentru sensogramele SPR și interpretare;

Drd. Cosmin Romanițan – Fizician – pentru caracterizarea XRD și interpretarea spectrelor;

Dr. Antonio Rădoi – Chimist – pentru achiziționarea spectrelor FTIR;

Dr. Mihaela Kusko – Fizician – pentru îndrumarea și ajutorul la realizarea lucrărilor publicate;

Mulțumiri **echipei tehnice** din cadrul IMT București, pentru contribuția importantă la realizarea platformelor *microarray* nanostructurate.

De asemenea, mulțumesc **dr. Lorand Savu** și echipei **GeneticLab** pentru furnizarea secvențelor ADN cu care am lucrat. Kit-urile destinate amplificării și clonării tulpinilor HPV au fost puse la dispoziție de către **Conf. habil. dr. Ileana-Cornelia Fărcășanu**.

Mulțumesc **Prof. dr. Sorin Cristoloveanu, Prof. dr. Irina Ionică** și **drd. Licinius Benea** din cadrul **IMEP-LaHC (Grenoble, Franța)** pentru punerea la dispoziție a suporturilor de tip SOI și colaborarea prin intermediul căreia am demonstrat împreună că procedura de caracterizare electrică pseudo-MOSFET poate fi aplicată în detecția hibridizării ADN.

Mulțumesc familiei și prietenilor apropiați care m-au sprijinit necondiționat și m-au încurajat pe tot parcursul doctoratului.

Cuprins

CUPRINS	5
PREFAȚĂ	1
CAP. 1. INTRODUCERE	3
1.1. PREZENTAREA DOMENIULUI TEZEI DE DOCTORAT.....	3
1.2. SCOPUL TEZEI DE DOCTORAT	4
CAP. 2. TEHNICI ȘI PLATFORME DE DETECȚIE	6
2.1. SUPRAFEȚE SUPORT	6
2.1.1. <i>Suporturi comerciale</i>	6
2.1.2. <i>Suporturi tridimensionale pe bază de nanofire de siliciu (SiNWs)</i>	6
2.1.3. <i>Substraturi cu filme subțiri de Au</i>	7
2.1.4. <i>Substraturi pe bază de siliciu pe izolator (SOI)</i>	7
2.2. CHIMIA SUPRAFEȚELOR.....	7
2.2.1. <i>Funcționalizarea cu (3-Aminopropil)triethoxisilan (APTES) și glutaraldehidă (GAD)</i>	7
2.2.2. <i>Funcționalizarea cu glicidil eterul Bisfenolului A (SU-8)</i>	9
2.2.3. <i>Funcționalizarea cu (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilan (GOPTMS)</i>	10
2.2.4. <i>Modificarea suporturilor de Au prin formarea monostraturilor autoasamblate</i>	11
2.3. TEHNICI ȘI METODE DE DETECȚIE.....	11
2.3.1. <i>Tehnica Microarray</i>	11
2.3.2. <i>Tehnica SPR</i>	11
2.3.3. <i>Metoda Ψ-MOSFET</i>	12
CAP. 3. SECVENȚE ADN SPECIFICE ȘI MODALITĂȚI CLINICE DE DETECȚIE	14
3.1. BAZELE GENETICE ALE CARCINOGENEZEI INDUSE DE ANTIONCOGENA <i>BRCA1</i>	14
3.2. BAZELE GENETICE ALE CARCINOGENEZEI INDUSE DE HPV	14
CAP. 4. MATERIALE ȘI METODE	16
4.1. MATERIALE ȘI REACTIVI.....	16
4.2. ECHIPAMENTE	16
4.3. SOFTWARE.....	17
CAP. 5. TEHNOLOGIA DE OBTINERE A SUPRAFEȚELOR-SUPPORT FUNCȚIONALIZATE	18
5.1. SUPRAFEȚE SUPORT	18
5.1.1. <i>Tehnici de fabricare a nanofirelor de Si</i>	18
5.1.1.1. Tehnologia de fabricare a nanofirelor de Si folosind catalizatori de Au	18
5.1.1.2. Tehnologia de fabricare a nanofirelor de siliciu cu catalizatori de Ag.....	19
CAP. 6. ANALIZA DATELOR MICROARRAY, SPR ȘI ELECTRICE EXTRASE DIN HIBRIDIZAREA SECVENȚELOR SPECIFICE <i>BRCA 1</i> ȘI HPV	25
6.1. TESTE DE IMOBILIZARE, HIBRIDIZARE ȘI STABILITATE ÎN TIMP PE SUPORT COMERCIAL	25
6.5. ANALIZA STATISTICĂ A DETECȚIEI <i>MISMATCH</i> -URILOR	27
6.6. DETECȚIA SPECIFICĂ A SUBSTITUȚIILOR UNINUCLEOTIDICE UTILIZÂND PLATFORME DE NANOFIRE DE SILICIU ACOPERITE CU SU-8	28
6.6.1. <i>Flux tehnologic</i>	29
6.6.2. <i>Analiza statistică a datelor experimentale</i>	29
6.6.3. <i>Mecanismul de imobilizare</i>	30
6.6.4. <i>Investigarea specificității de detecție în timp</i>	30
6.6.5. <i>Analiza statistică a specificității de detecție a polimorfismelor uninucleotidice pe platforme stocate în timp</i>	32

6.7. EXPERIMENTE <i>MICROARRAY</i> ȘI SPR PENTRU GENOTIPAREA SECVENȚELOR CORESPUNZĂTOARE TULPINILOR HPV	
IMOBILIZATE PE SUPORTURI DE AU.....	34
6.7.1. <i>Procedura experimentală</i>	34
6.7.1.1. Amplificarea și clonarea secvențelor ADN corespunzătoare genotipurilor HPV.....	34
6.7.1.2. Microarray și SPR.....	37
6.7.2. <i>Validarea prin microarray a imobilizării și hibridizării secvențelor HPV pe suport de Au.....</i>	37
6.7.3. <i>Investigarea eficienței de imobilizare a ADN prin formarea monostraturilor autoasamblate mixte</i>	37
6.7.4. <i>Optimizarea parametrilor de hibridizare</i>	38
6.7.5. <i>Evaluarea prin SPR a imobilizării și hibridizării secvențelor ADN-HPV</i>	40
6.8. CARACTERIZĂRI ELECTRICE PENTRU STRUCTURI TEST REALIZATE PE SUBSTRAT TIP SOI	41
6.8.1. <i>Procedura experimentală și de analiză grafică</i>	41
CAP. 7. CONCLUZII	46
7.1. CONTRIBUȚII ORIGINALE	47
7.2. ACTIVITATEA DE CERCETARE.....	48
7.3. PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ	49
BIBLIOGRAFIE	50
LUCRĂRI PUBLICATE ÎN TIMPUL PROGRAMULUI DOCTORAL	55
ARTICOLE PUBLICATE ÎN REVISTE COTATE ISI	55
ARTICOLE PUBLICATE ÎN PROCEEDINGS SAU VOLUME (INDEXATE ISI)	55
LUCRĂRI PREZENTATE LA CONFERINȚE ȘI COMUNICĂRI ȘTIINȚIFICE	55

Prefață

Teza este structurată în două părți principale corelate cu etapele de documentare, fabricare, testare și validare a platformelor de detecție ADN. **Partea teoretică** stabilește contextul științific actual și delimitează condițiile tematice aflate la granița dintre biologie, chimie, fizică și nanotehnologie. Platformele de detecție, chimia suprafeței și tehnicile de detecție (Capitolul 2), secvențele ADN specifice și mecanismele carcinogenetice (Capitolul 3) se regăsesc în partea teoretică a tezei. **Procesul experimental** descris în două capitole (Capitolele 4 și 5) cuprinde optimizările efectuate pentru realizarea tipurilor de biosenzori propuși și evaluarea statistică a datelor.

Capitolul 1 introductiv evidențiază mecanismele specifice modificărilor celulare maligne produse în cazul cancerului mamar și cervical, precum și metodele moderne de detecție a polimorfismelor uninucleotidice din cadrul genelor *BRCA* (Breast Cancer, Early Onset - Gene implicate în cancerul de sân) și de genotipare a tulpinilor HPV (Human Papilloma Virus - Virusul Papilloma Uman). Au fost enumerate tipurile de suporturi utilizate în obținerea biosenzorilor, procedurile de modificare chimică a substratului, parametrii de funcționalizare optimizați progresiv și sistemele de detecție.

Capitolul 2 include metodele de modificare a suprafețelor corelate cu schema de detecție selectată. Sunt identificate avantajele suporturilor tridimensionale în detecția fluorescentă a fenomenului de hibridizare în detrimentul celor comerciale, introducând principiul de fabricare a nanofirelor de siliciu prin corodarea chimică asistată de săruri metalice (MACE - Metal Assisted Chemical Etching). Utilizarea suportului de aur (Au) introduce tehnica SPR în studiul atașării oligonucleotidelor și în detecția biomoleculilor pe suprafețe metalice. Suporturile de tip SOI au permis îmbunătățirea detecției electrice ADN față de placheta de Si monocristalin.

Tipurile de funcționalizare și modificările chimice efectuate la nivelul sondelor ADN sunt detaliate aici. Au fost selectate două tipuri de grupări funcționale (aldehidice și epoxidice) ce favorizează atașarea covalentă a biomoleculilor de suport și permit detecția electrică, asigurând în același timp semnal scăzut de fundal în detecția fluorescentă.

Sunt descrise metodele de detecție fluorescentă, plasmonică și electrică, precum și platformele de detecție corespunzătoare. Detecția prin SPR s-a realizat printr-un mecanism suplimentar de atașare bazat pe chemisorbția ADN pe suport de Au. A fost validată metoda pseudo-MOSFET de caracterizare electrică în detecția ADN pe substrat de tip SOI.

Capitolul 3 prezintă bazele genetice ale carcinogenezei induse de antioncogene *BRCA1* (Breast Cancer 1, Early Onset), insistând asupra polimorfismelor uninucleotidice cu efect stabilizator al duplexului. Tot în acest capitol, sunt cuprinse și bazele genetice ale carcinogenezei induse de HPV, fiind schematizată clasificarea tulpinilor HPV și transformarea celulară indusă de exprimarea genelor virale. Este subliniată importanța dezvoltării unor noi platforme de detecție, care să asigure specificitatea și sensibilitatea în discriminarea polimorfismelor uninucleotidice (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms), cât și în genotiparea HPV. În final, sunt prezentate metodele recunoscute în practicile clinice pentru detectarea SNPs și pentru aplicații de genotipare, cu menționarea avantajelor și dezavantajelor acestora.

Capitolul 4 include materialele și reactivii utilizați pentru nanoconfigurarea suporturilor, funcționalizare, imobilizare și hibridizare, precum și aparaturile de detecție, caracterizare și *software*-urile utilizate în extragerea și interpretarea datelor.

Capitolul 5 conține proceduri de obținere a suporturilor nanoconfigurate, pornind de la nanofirele de siliciu realizate prin corodarea chimică asistată de catalizatori de Ag sau de Au. A fost analizată rata de corodare în funcție de timp, precum și influența rezistivității

și orientării plachetei asupra eficienței corodării. S-au optimizat procedurile de funcționalizare a suporturilor nanoconfigurate, a suporturilor de siliciu monocristalin și de siliciu pe izolator. De asemenea, s-au folosit tehnicile de depunere și imobilizare a ADN pe suporturile funcționalizate și pe suporturile cu film de aur.

Capitolul 6 prezintă investigații experimentale referitoare la tăria ionică, pH-ul optim al soluției de imobilizare, precum și condițiile de hibridizare a ADN. În plus, a fost investigată și stabilitatea în timp, stocând suporturile comerciale cu sonde ADN imobilizate covalent pe o perioadă de maxim 21 de zile. Tot aici, sunt reunite rezultatele în materie de specificitate și sensibilitate de detecție obținute pe suport comercial, pe suportul bazat pe nanofire de Si, pe Si monocristalin și pe SOI. Analize statistice complexe au demonstrat viabilitatea tehnicilor de detecție pe platformele dezvoltate.

Capitolul concluziv subliniază contribuțiile personale în optimizarea tehnologiei de fabricație a suporturilor nanoconfigurate, obținerea și prelucrarea datelor *microarray* și validarea statistică a acestora în conformitate cu proiectele științifice în care am fost implicată.

Cap. 1. Introducere

Cancerul reprezintă una din principalele cauze ale mortalității la nivel mondial, numărând în 2012 peste 14,1 milioane de cazuri, conform unor date statistice (Torre și colab., 2015; Ferlay și colab., 2013). Modificările genetice care contribuie la apariția acestei maladii afectează trei categorii de gene: tumoral supresoare (antioncogene), protooncogenele și genele care intervin în repararea ADN (Hanahan, Weinberg și Francisco, 2000).

Cancerul mamar are rata standardizată de incidență de 47,7 la 100000 de locuitori și a mortalității de 0,35 la 100000 de locuitori în Europa Centrală și de Est (DeSantis și colab., 2015; Torre și colab., 2012). Deseori, modificarea malignă responsabilă de apariția cancerului de sân are caracter sporadic (90-95%), iar 5-10% din cazuri sunt asociate cu predispoziția dobândită (Mahdi, Nassiri și Nasiri, 2013; Karami și Mehdipour, 2013). Gena *BRCA1* codifică o proteină ce acționează ca supresor al creșterii tumorale și interacționează în nucleul celulelor sănătoase cu alte proteine pentru repararea rupturilor catenare din ADN. Producerea unei mutații deleterioare într-o alelă *BRCA1* dintr-o celulă oarecare (Knudson, 1971) declanșează procesul de tumorigeneză, iar celula respectivă devine incapabilă să-și remedieze propriile erori dacă fenomenul se repetă. (Foulkes și Shouen, 2013).

Virusurile au fost asociate cu carcinogeneza în 10-15% din cazuri, procentul devenind probabil mai mare odată cu perfecționarea tehnicilor de detecție (Chen și colab., 2014; Hoppe-Seyler și Butz, 1995). Infecția persistentă și integrarea cromozomială a tipurilor HPV cu potențial oncogen ridicat au fost raportate ca factori cauzali majori în dezvoltarea cancerului de col uterin. Astfel, identificarea tipurilor HPV în probe cervico-vaginale este esențială în evaluarea riscului de incidență. În Europa Centrală și de Est, rata de incidență a neoplaziei de col uterin standardizată la 100000 de locuitori a fost de 16,3, iar cea a mortalității, de 6,2 la 100000 de locuitori (Torre și colab., 2015).

Diagnosticul timpuriu crește eficiența în prevenirea și tratarea afecțiunilor, astfel că identificarea predispoziției genetice la dezvoltarea celor două tipuri de cancer amintite este utilă persoanelor cu incidență familială sau pentru genotiparea HPV în cadrul testelor de *screening*. Genosenzorii și *biochip*-urile ADN de tip *microarray* reprezintă soluții accesibile în aplicații de genotipare și în detecția SNP-urilor, în care recunoașterea secvenței specifice se bazează pe fenomenul de hibridizare.

Prin dezvoltarea sistemelor de detecție ADN se urmărește depistarea modificărilor specifice transformărilor maligne și utilizarea în aplicații de genotipare. Detecția mutațiilor genetice la nivel molecular vizează identificarea timpurie a biomarkerilor specifici și furnizarea unui diagnostic fiabil pentru monitorizarea bolii și a răspunsului la tratament (Sassolas, Leca-Bouvier și Blum, 2008; Mehrotra, 2016).

1.1. Prezentarea domeniului tezei de doctorat

Biosenzorul e reprezentă un dispozitiv analitic ce utilizează reacții biochimice specifice mediate de enzime, anticorpi, țesuturi, organite celulare sau celule întregi pentru a detecta compuși chimici printr-un semnal electric, termic sau optic (McNaught și Wilkinson, 1997; Monošík, Stred'anský și Šturdík, 2012).

Biosenzorii ADN (genosenzori), precum și *biochip*-urile ADN de tip *microarray*, exploatează legarea preferențială a secvențelor complementare de ADN monocatenar. Acest sistem se bazează de regulă pe atașarea unei sonde ADN monocatenar (ssADN) pe o suprafață activă în vederea recunoașterii secvenței ADN țintă complementare prin hibridizare (Sassolas, Leca-Bouvier și Blum, 2008).

Dezvoltarea **tehnologiei *microarray*** a îmbunătățit semnificativ metodologia analizei genetice a afecțiunilor umane, fiind ideală pentru analiza rapidă și în paralel a mii de fragmente genice de interes (analiză *high-throughput*). Eficiența în genotiparea HPV pe suporturi comerciale de sticlă a fost demonstrată prin detecția a 53 de tipuri HPV din țesut cervical infectat cu una sau mai multe tulpini (Klaassen și colab., 2004), sau a 102 tipuri de virus HPV (Arron și colab., 2011). Totuși, utilizarea unei suprafețe plane scade capacitatea de legare a sondelor de suportul modificat chimic, generând o intensitate slabă a semnalului de hibridizare (Simion și colab., 2010).

1.2. Scopul tezei de doctorat

Scopul tezei constă în fabricarea de noi platforme de detecție a hibridizării ADN prin fluorescență, rezonanța la suprafață a plasmonilor (Surface Plasmon Resonance - SPR) sau măsurare electrică, a căror specificitate și sensibilitate să fie evaluate statistic.

a) Platforme de detecție

Nanofirele de Si (SiNWs - Silicon Nanowires) au proprietăți semiconductoare, morfologie variată și suprafață activă generoasă pe unitatea de volum, fiind ideale pentru realizarea platformelor miniaturizate de detecție rapidă și simultană a biomoleculilor (Coffinier și Boukherroub, 2014). Fabricarea Si nanostructurat prin metoda MACE a fost propusă de către Li și Bohn (Li și Bohn, 2000), desfășurându-se de regulă în doi pași succesivi (2-MACE): nucleația catalizatorului metalic și corodarea anizotropă. În cazul corodării chimice într-un singur pas (1-MACE), cele două etape uzuale se desfășoară simultan în soluție de corodare conținând săruri metalice și HF, în lipsa H₂O₂ (Manel, Nafie și Bouaicha, 2012). *Pentru realizarea platformelor de detecție tridimensionale cu SiNWs, a fost optimizată metoda 1-MACE cu catalizator de Ag în soluție de HF.*

Aurul este adesea utilizat ca film subțire în biodetecție, deoarece permite legarea semi-covalentă a biomoleculilor datorită interacțiunilor tiol-metal (Hakkinen, 2012) și prezintă proprietăți plasmonice bune în spectrul lungimilor de undă aflate deasupra tranziției optice interbandă ($\lambda > 580$ nm) (Oliverio și colab., 2017).

Substraturile de tip **SOI** (Silicon on Insulator - Siliciu pe Izolator) conferă sensibilitate sporită de detecție a ADN față de o plachetă de Si obișnuită, iar sarcinile electrice de suprafață sunt separate de efectele parazite provenite din substrat prin stratul izolator de SiO₂ intermediar.

Atașarea sondelor ADN necesită modificarea chimică a suprafeței, astfel că funcționalizarea substratului a ținut cont de grupările funcționale NH₂ introduse la capătul 5' al sondei ADN. Alegerea tipului de funcționalizare a vizat facilitarea atașării biomoleculilor și diminuarea erorilor în citirea semnalului provenite din procesarea suporturilor.

Suporturile funcționalizate cu **grupări aldehidice** prezintă capacitate mare de legare a sondelor și stabilitatea asigurată de legătura covalentă, dar semnalul obținut poate avea o intensitate redusă cauzată de impedimentele sterice (Nimse și colab., 2014). Funcționalizarea ce conferă **grupări epoxi** asigură legarea covalentă a sondelor ADN de suport și stabilitatea acestora (Nikolic și colab., 2010), prevenind apariția impedimentelor sterice printr-o densitate mai scăzută a sondelor atașate.

b) Tehnici de detecție

Tehnica *microarray* a fost utilizată pentru detecția prin fluorescență a hibridizării secvențelor ADN specifice *BRCA1* și HPV, precum și confirmarea datelor prin tehnici complementare: **SPR** și **detecție electrică**.

Experimentele *microarray* au utilizat ca referință suporturi comerciale de sticlă funcționalizate cu grupări aldehidice, care au fost comparate cu platforme de siliciu configurate cu nanofire (SiNWs). Substraturile nanostructurate au fost funcționalizate pe de o parte cu grupări aldehidice și pe de altă parte cu grupări epoxi, pentru a evalua specificitatea de detecție. *S-a demonstrat detecția specifică a polimorfismelor uninucleotidice în cazul funcționalizării cu APTES-GAD ((3-Aminopropil)triethoxisilan și glutaraldehidă) și excelența reproductibilitate a genosenzorilor nanostructurați acoperiți cu SU-8 (glicidil eterul Bisfenolului A).*

Tehnica **SPR** a fost utilizată pentru detecția secvențelor ADN specifice HPV, folosindu-se suporturi comerciale de sticlă acoperite cu film subțire de aur pentru determinarea limitei de detecție a sistemului.

Pentru **detecția electrică** a probelor ADN, a fost utilizată o configurație electrică de tip **Ψ -MOSFET** (pseudo-MOSFET - Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor - Tranzistor cu Efect de Câmp cu Poartă Izolată) pe substraturi de Siliciu pe Izolator (SOI - Silicon on Insulator). *S-a realizat detecția electrică a ADN prin folosirea Ψ -MOSFET ca metodă de caracterizare electrică.*

Cercetarea multidisciplinară prezentată în cadrul tezei a fost desfășurată la Institutul Național de Cercetare și Dezvoltare în Microtehnologie - IMT București - Laboratorul de Nanobiotehnologii, în Facultatea de Chimie din cadrul Universității din București - Departamentul de Chimie Organică, Biochimie și Cataliză, precum și la Institutul de Tehnologie din Grenoble - Centrul IMEP-LaHC (L'Institut de Microélectronique Electromagnétisme et Photonique - Laboratoire d'Hyperfréquences et de Caractérisation).

Rezultatele obținute au fost diseminate în publicații cotate sau indexate ISI, precum și în prezentări la conferințe și seminarii.

Cap. 2. Tehnici și platforme de detecție

Suportul și traductorul biosenzorului determină specificitatea și sensibilitatea detecției. În tehnica *microarray*, sunt recomandate suporturile de sticlă sau de siliciu, deoarece nu prezintă autofluorescență și permit atașarea sondelor ADN monocatenar prin modificarea chimică a suprafeței. Traductorul convertește elementul de bio-recunoaștere într-un semnal măsurabil, cum ar fi fluorescența în cazul *microarray*, modificarea unghiului de rezonanță în cazul SPR-ului, ori semnal electric în cazul dispozitivelor electronice de tip tranzistor. Funcționalizarea suportului nanoconfigurat de Si cu APTES-GAD ori SU-8 permite atașarea sondelor oligonucleotidice pentru analiza fluorescență a secvențelor complementare hibridizate. Acoperirea cu film subțire metalic a unui suport de sticlă permite detecția prin tehnica SPR. Substratul semiconductor specific plachetelor SOI asigură în mod firesc semnalul electric necesar măsurătorilor electrice specifice FET-urilor.

2.1. Suprafețe suport

2.1.1. Suporturi comerciale

Cele mai des utilizate substraturi pentru fabricarea platformelor *microarray* sunt suporturile de sticlă, deoarece sunt inerte din punct de vedere chimic, nu sunt autofluorescente și se funcționalizează cu ușurință, permițând legarea moleculelor organice de suprafață. Suprafața rezultată poate expune grupări aminice, aldehydice, epoxi sau tiol, de care se pot lega secvențe ADN modificate chimic sau nemonificate. Suporturile *microarray* comerciale fabricate din borosilicat sau sticlă calcosodică au nivel foarte scăzut de fluorescență pentru creșterea sensibilității de detecție a moleculelor analizate. Suportul de sticlă are însă suprafața plană, ceea ce introduce limitări sterice în timpul reacției de hibridizare (Dufva și colab., 2014; Conzone și Pantano, 2004).

Suporturile comerciale folosite în prezentul studiu au uniformitate bună a suprafeței cu grupări SiO₂ distribuite omogen pentru a conferi silanilor reactivitate mare, necesară procedurilor ulterioare de modificare chimică.

2.1.2. Suporturi tridimensionale pe bază de nanofire de siliciu (SiNWs)

Nanofirele de Si (SiNWs) s-au evidențiat prin proprietățile semiconductoare, morfologia variată și suprafața activă generoasă pe unitatea de volum, fiind ideale pentru realizarea platformelor miniaturizate de detecție simultană rapidă a biomoleculilor (Coffinier și Boukherroub, 2014).

Obținerea Si nanoconfigurat prin metoda MACE a fost demonstrată pentru prima oară de către Li și Bohn (Li și Bohn, 2000), consacându-se prin costul scăzut și ușurința de fabricare a structurilor cu diferite dimensiuni, morfologii și proprietăți (Dawood și colab., 2012a; Shaoyuan și colab., 2014; Yangyang și colab., 2014; Hee, Huang și Lee, 2014). Doparea, orientarea cristalină a plachetei de Si și compoziția soluției de corodare influențează morfologia nanofirelor (Huang și colab., 2008, Mikhael și colab., 2011).

De regulă, MACE utilizează particule de metale nobile (Ag, Au, Pt și Pd) cu rol de catalizatori și se desfășoară în doi pași succesivi: nucleația catalizatorului metalic și corodarea anizotropă. În cadrul procesului de corodare chimică în doi pași (2-MACE), catalizatorii metalici sunt depuși pe suprafața siliciului, iar corodarea ulterioară are loc în soluție HF/H₂O₂. Corodarea chimică într-un singur pas (1-MACE) reunește cele două etape într-o soluție de corodare conținând săruri metalice și HF, în lipsa H₂O₂ (Manel, Nafie și Bouaicha, 2012). *Am aplicat metoda 1-MACE cu AgNO₃ pentru configurarea SiNWs.*

2.1.3. Substraturi cu filme subțiri de Au

Depunerea unui film de Au pe un suport de sticlă permite folosirea acestuia ca substrat pentru *microarray* și utilizarea SPR ca tehnică secundară de detecție, ce nu necesită marcarea fluorescentă a probelor (Dietrich și colab., 2009). În realizarea biosenzorilor SPR, am depus filme omogene de Au pe discuri de sticlă BK7 prin pulverizare catodică, folosind Cr ca strat de aderență la sticlă.

2.1.4. Substraturi pe bază de siliciu pe izolator (SOI)

Utilizarea suporturilor de tip siliciu pe izolator (SOI) pentru caracterizare electrică conferă sensibilitate sporită de detecție a ADN față de o plachetă de Si obișnuită, conducția fiind puternic influențată de sarcinile electrice de suprafață. Într-un tranzistor MOS, numai regiunea superioară a plachetei favorizează transportul electronilor, în timp ce restul de 99,9% din volumul plachetei induce efecte parazite. Structurile de tip siliciu pe izolator au fost realizate pentru a separa filmul superior de Si de influența nefavorabilă a substratului de siliciu (Cristoloveanu și Li, 1995).

Ψ-MOSFET (pseudo-MOSFET) folosește structura de tip up-side-down a tranzistorului cu efect de câmp pe un substrat de siliciu pe izolator: substratul de siliciu servește ca poartă pe spatele plachetei iar oxidul îngropat ca poartă dielectrică (poartă de oxid) (Cristoloveanu și Williams, 1992).

2.2. Chimia suprafețelor

Performanțele de detecție ale unui biosenzor în materie de specificitate și eficiență a hibridizării sunt influențate de orientarea și densitatea sondelor ADN atașate pe suport (Sonawane și Nimse, 2016), depinzând de tipul de substrat utilizat și de chimia suprafeței. Funcționalizarea permite atașarea monocatenelor ADN prin interacțiuni electrostatice, covalente, prin chemisorbție, ori necovalent, pe baza interacțiunii dintre biotină și streptavidină (Tao, Zhu și Bernasek, 2012; Russell, Meadows și Russell, 2008; Nimse și colab, 2014).

Avantajele oferite de funcționalizarea cu **grupări aldehidice** a suportului sunt capacitatea mare de legare a sondelor și stabilitatea asigurată de legătura covalentă, ce permite reutilizarea suportului. Glutaraldehida are eficiență sporită de imobilizare (Ba și colab, 2010), însă e un compus extrem de toxic ce determină timp îndelungat pentru hibridizare, obținându-se totodată un semnal de hibridizare redus prin prezența impedimentelor sterice (Nimse și colab., 2014).

Modificare chimică a suprafețelor cu **grupări epoxidice** protejează integritatea suportului în condiții de umiditate (Kim și Herr, 2013), beneficiind, de asemenea, de stabilitatea legăturii covalente (Nikolic și colab., 2010), însă necesită temperatură înaltă pentru asigurarea procesului de imobilizare (Nimse și colab., 2014).

Chemisorbția este utilizată pentru atașarea ADN modificat cu grupări SH la capătul 5' sau 3' de o suprafață de Au, formând monostraturi autoasamblate (SAM-uri). Legarea ADN prin chemisorbție exploatează mecanismul de formare a unei legături semicovalente între sulf și Au (Rashid și Yusof, 2017).

2.2.1. Funcționalizarea cu (3-Aminopropil)trietoxisilan (APTES) și glutaraldehidă (GAD)

Filmele moleculare de aminosilani sunt obținute prin mecanismul de autoasamblare la interfața lichid-solid, prin intermediul reacției dintre grupările alcoxi ($-O-CH_3$ sau $-O-CH_2-CH_3$) și grupările hidroxil ($-OH$) generate pe suprafață. Expunerea grupărilor $-OH$ se realizează prin curățarea prealabilă a substratului în soluție Piranha (3:1 $H_2SO_4:H_2O_2$) (Figura 2.1).

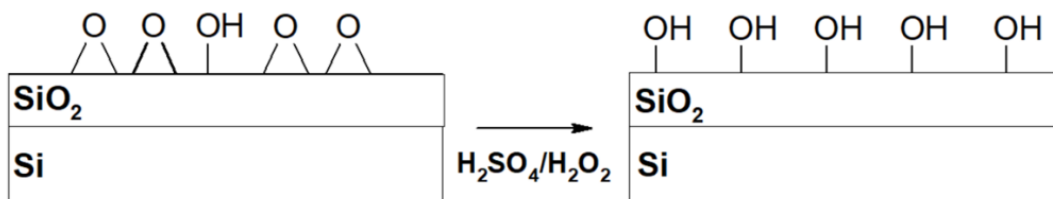


Figura 2.1. Hidrofilizarea substraturilor de sticlă sau siliciu

Procesul de silanizare se desfășoară în două etape: hidroliza grupărilor alcoxi în prezența apei din soluție sau a unei pelicule de apă adăugată pe suprafața hidroxiată, urmată de condensarea APTES (Pavlovic și colab., 2002). Moleculele de APTES pot forma un film funcțional uniform din starea de vapori, fiind împiedicată astfel polimerizarea organosilanului (Song și colab., 2006), fie pot fi depuse din soluție pe substraturi de sticlă sau siliciu activate în prealabil prin tratament în soluție Piranha. Metoda de silanizare a suprafețelor hidroxiolate este descrisă în **Figura 2.2**.

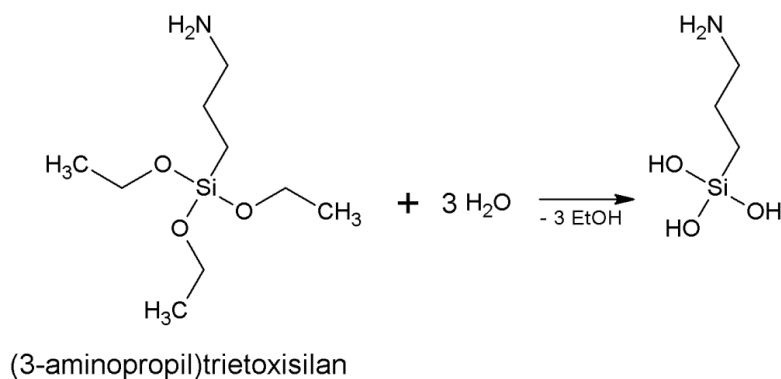


Figura 2.2. Hidroliza APTES

În prezența apei, are loc hidroliza $-\text{Si}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3)_3$ la trisilanol $-\text{Si}(\text{OH})_3$, cu eliminarea a trei molecule de etanol. APTES are capacitatea de a polimeriza în prezența apei formând monostraturi autoasamblate (SAM-uri) sau multistraturi (Zhu, Lerum și Chen, 2012).

Figura 2.3 ilustrează formarea legăturilor covalente cu substratul modificat chimic, după aplicarea tratamentului termic (Vandenberg și colab., 1991).

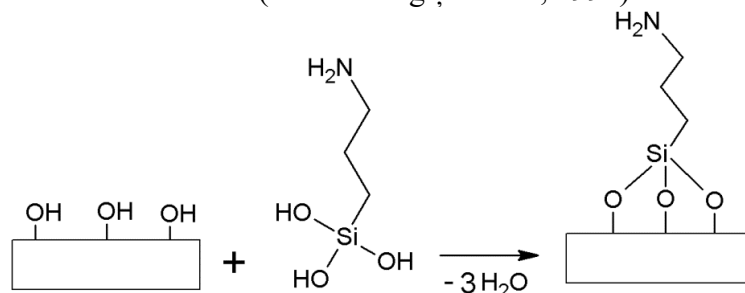


Figura 2.3. Atașarea covalentă a aminosilanului

Se formează astfel grupări $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ stabile între silanol și moleculele de aminosilan în urma reacției de condensare ce conduce la eliminarea a trei molecule de apă (Xiaoyan și colab., 2006; Fiorilli și colab., 2008). Celelalte tipuri de interacțiuni posibile (legături de hidrogen, respectiv interacțiuni electrostatice) au ca rezultat atașarea slabă și densitatea de grefare scăzută a aminosilanilor (Zhu, Lerum și Chen, 2012).

Pentru obținerea grupărilor funcționale aldehidice (C=O), se tratează suprafața de interes cu glutaraldehidă, formându-se baze Schiff cu grupările NH₂specifice APTES (Figura 2.4).



Figura 2.4. Funcționalizarea APTES cu glutaraldehidă

În Figura 2.4. este schematizată o dialdehidă constituită din cinci atomi de carbon, solubilă în apă, alcool și solvenți organici. Reacționează rapid cu grupările amino la pH neutru și este mai eficientă decât alte aldehide în generarea unor reticulări stabile (Migneault și colab., 2004). Glutaraldehida permite reacționarea ulterioară cu sondele ADN modificate la un capăt cu gruparea NH₂ (Sassolas, Leca-Bouvier și Blum, 2008).

A fost studiată eficiența funcționalizării substraturilor de Si monocristalin cu APTES hidrolizat la concentrații și timpi diferiți, inclusiv tratamentul termic finalul.

2.2.2. Funcționalizarea cu glicidil eterul Bisfenolului A (SU-8)

Atașarea ADN pe SU-8 a fost demonstrată pentru prima oară printr-o procedură de atașare directă a sondelor depuse utilizând tehnica *microarray* (Marie și colab., 2006). Structura unei molecule de SU-8 (Figura 2.5) conține 8 grupări epoxidice care permit atașarea covalentă a ADN modificat la unul din capete cu grupări NH₂.

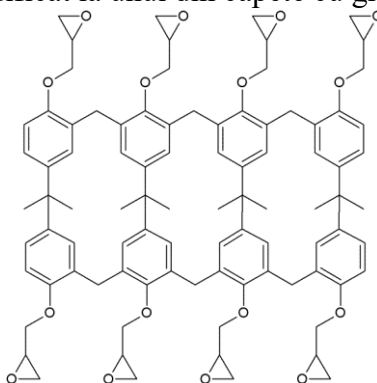


Figura 2.5. Structura chimică a SU-8

Pentru depunerea uniformă a fotorezistului, este necesară curățarea prealabilă a substraturilor în soluție Piranha sau în plasmă de O₂. Depunerea (etalarea) SU-8 pe un substrat se realizează prin centrifugare (*spin-coating*), grosimea stratului depinzând de vâscozitatea polimerului și viteza de rotație. Surplusul de solvent este evaporat prin tratament termic, utilizând două trepte de temperatură. Polimerizarea are loc prin expunerea la UV a suportului, urmată de un nou tratament termic (Marie și colab., 2006).

Am acoperit substraturi de Si monocristalin sau configurate sub formă de nanofire cu o grosime unică a stratului de SU-8, selectată astfel încât să nu prezinte autofluorescență.

2.2.3. Funcționalizarea cu (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilan (GOPTMS)

Epoxisilanii sunt compuși utilizați pentru îmbunătățirea stabilității și integrității polimerilor sau a interfețelor anorganice. În prezent, aceștia se regăsesc și în aplicațiile biomedicale, favorizând atașarea biomoleculor de suprafețe anorganice (Luzinov și colab., 2000).

Principiul de funcționalizare este același ca la APTES, epoxisilanul formând monostraturi autoasblate prin reacția dintre grupările $-O-CH_3$ și $-OH$ exprimate de suportul tratat în prealabil cu soluție Piranha. În **Figura 2.6** este reprezentată schematic molecula de GOPTMS.

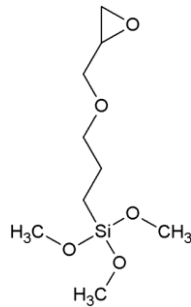


Figura 2.6. Structura GOPTMS

Funcționalizarea cu GOPTMS se poate realiza atât în fază lichidă, cât și prin depunere sub formă de vapori. În **Figura 2.7** este prezentată hidroliza unei molecule de GOPTMS.

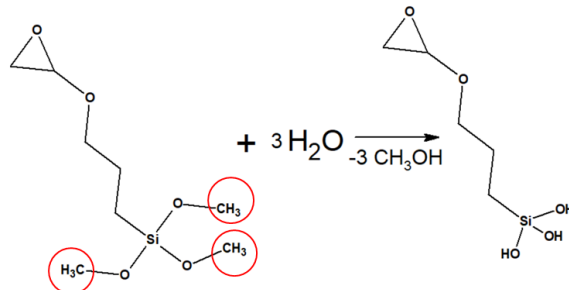


Figura 2.7. Hidroliza GOPTMS

Figura 2.8 prezintă mecanismul de atașare a GOPTMS de substrat.

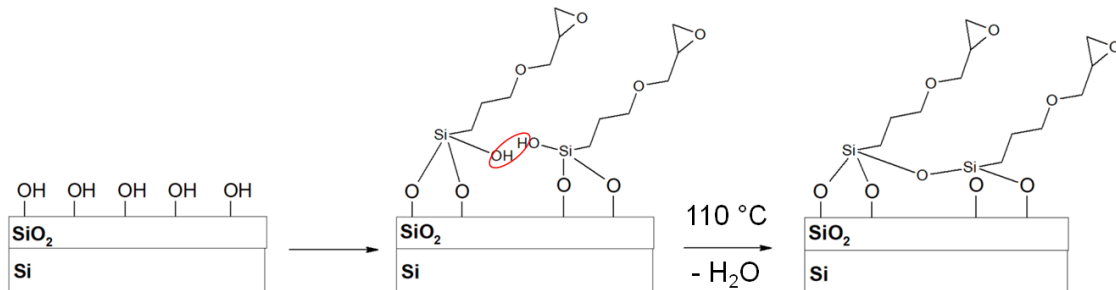


Figura 2.8. Fixarea GOPTMS pe suprafața de SiO₂

Tratamentul termic formează legături Si-O-Si între două molecule GOPTMS cu grupări $-OH$ nereacționate sau între GOPTMS și substrat. Moleculele de apă adăugate în solvent pentru hidroliza GOPTMS au capacitatea de a reacționa cu grupările epoxi prin

adiție nucleofilică, ducând la scăderea numărului de grupări active disponibile pentru atașarea sondelor ADN (Stropoli și Elrod, 2015). *Am investigat funcționalizarea siliciului monocristalin cu GOPTMS hidrolizat și GOPTMS în stare de vapori.*

2.2.4. Modificarea suporturilor de Au prin formarea monostraturilor autoasamblate

Monostraturile autoasamblate (SAM) pot fi modificate cu precizie la nivel molecular. SAM-urile se bazează pe adsorbția puternică a tiolilor (R-SH), a disulfidelor (R-S-S-R) și a sulfidelor (R-S-R) de suprafețe metalice. Pentru formarea monostraturilor autoasamblate, se inițiază procesul de auto-asamblare al alchil-tiolilor prin atașarea puternică (126 kJ/mol) a atomilor de sulf pe filmul de Au, urmând alinierea paralelă a lanțurilor moleculare, datorită forțelor intermoleculare de tip van der Waals, repelente, sterice și electrostatice. Forțele van der Waals existente între grupările metilen ale lanțurilor de hidrocarburi determină orientarea și stabilizarea monostraturii (Luderer și Walschus, 2005).

Suporturile de aur nu necesită funcționalizare, deoarece este suficient tratamentul în soluție Piranha înainte de fixarea sondele ADN modificate chimic astfel încât să conțină o grupare tiol la un capăt. *Pentru obținerea unui monostrat autoasamblat care să faciliteze hibridizarea, am co-atașat sonde ADN cu mercaptohexanol, în proporții variate.*

2.3. Tehnici și metode de detecție

2.3.1. Tehnica *Microarray*

Platformele *microarray* formează un aranjament ordonat de *spot*-uri ale sondelor ADN monocatenar diluate într-o soluție de imobilizare și atașate de un suport solid, modificat chimic. Mecanismul de detecție (**Figura 2.9**) se bazează pe procesul de hibridizare, care reprezintă recunoașterea pe bază de complementaritate dintre ADN-țintă marcat fluorescent și sondele imobilizate, conducând la formarea punților de hidrogen între cele două catene ADN (Schrenzel și colab., 2009).

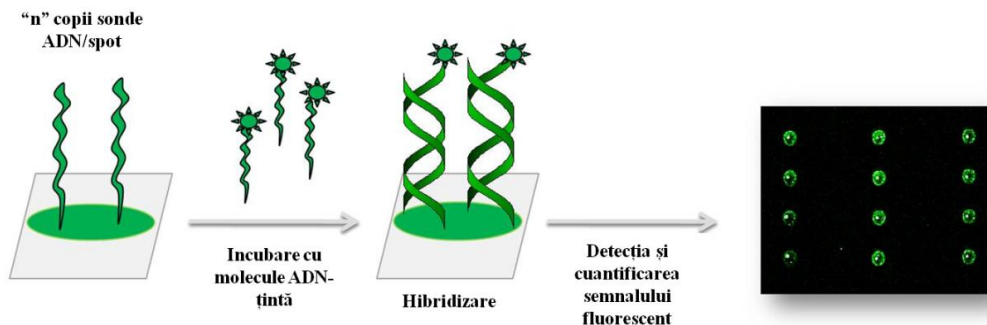


Figura 2.9. Principiul de detecție *microarray*

Sondele ADN monocatenar se fixează pe un suport modificat chimic prin sinteza ADN direct pe *chip* sau prin depunerea oligonucleotidelor presintetizate (Heise, Bier, 2006). *În cadrul experimentelor prezentate în această teză, am utilizat metoda depunerii ADN presintetizat.* Transferul sondelor ADN monocatenar pe un *chip* se realizează prin depunerea unei cantități de ordinul nL cu o concentrație controlată de material biologic, prin contact direct cu suprafața sau fără contact. Reacția de hibridizare este verificată prin detecția semnalului fluorescent cu un echipament cu scanare laser.

2.3.2. Tehnica SPR

Rezonanța plasmonilor de suprafață apare atunci când vectorul de propagare al radiației incidente polarizată transversal magnetic se egalează cu vectorul de propagare al

plasmonilor polaritoni de suprafață de la interfața metal-dielectric. Indicele de refracție al dielectricului determină unghiul la care condiția de rezonanță este îndeplinită, astfel încât orice modificare a indicelui de refracție dată de moleculele ADN adsorbite pe Au este tradusă printr-o schimbare a unghiului de rezonanță. (Singh, 2014). Tehnica SPR permite detecția în timp real a adsorbției sondelor ADN pe suport, cât și procesul de hibridizare dintre monocatenele atașate și cele complementare, prezente în soluție. Pe măsură ce catenele ADN țintă se leagă de sondele ADN, crește indicele de refracție iar rezultatele sunt înregistrate într-o sensogramă.

În **Figura 2.10** sunt enumerați pașii generici ai măsurătorilor SPR.

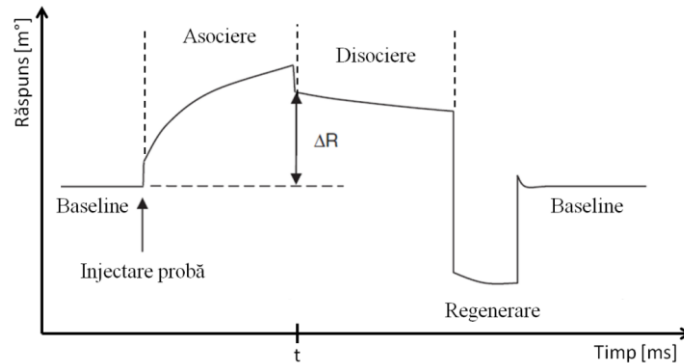


Figura 2.10. Etapele parcurse în analiza SPR (adaptare după Tudos și Schasfoort, 2008)

Fiecare măsurare debutează cu stabilirea unui nivel de referință (*baseline*) prin injectarea unei soluții-blank, aceeași folosită ulterior la diluarea analitului (Ex: molecule ADN țintă pentru detectarea fenomenului de hibridizare). Etapa de asociere corespunde captării analitului, unde ΔR indică răspunsul oferit de legarea moleculelor țintă la un moment t . Urmează etapa de disociere ce corespunde injectării unei soluții prin care sunt înlăturate secvențele țintă atașate nespecific. Regenerarea presupune înlăturarea analitului și este urmată de un nou ciclu de analiză (Tudos și Schasfoort, 2008).

2.3.3. Metoda Ψ -MOSFET

Ψ -MOSFET (pseudo-MOSFET) constă în efectuarea unor măsurări electrice asemănătoare celor pe tranzistoare, fără a fi necesară realizarea efectivă a dispozitivelor. Această metodă a fost inițial utilizată ca instrument rapid de caracterizare a plachetelor de tip SOI, fiind bazată pe utilizarea a două sonde, una jucând rol de sursă, iar cealaltă rol de drenă, substratul fiind poarta. În funcție de polaritatea tensiunii de poartă (V_G), poate fi indusă o acumulare sau o inversie în partea inferioară a filmului de Si, astfel încât caracteristicile de tip canal n și canal p pot fi obținute pe același dispozitiv (Colinge, 1997). Principiul de caracterizare a substraturilor SOI este prezentat în **Figura 2.11**.

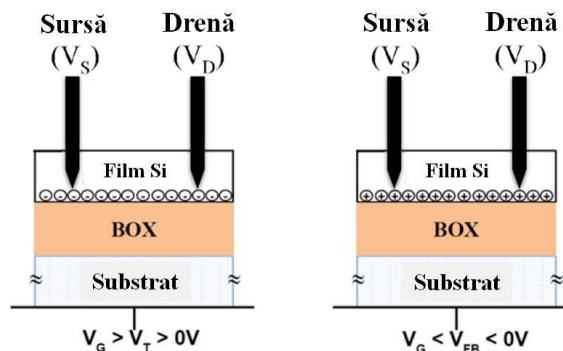


Figura 2.11. Conducția în Ψ -MOSFET

Dezvoltarea de *biochip*-uri pentru detecția și analiza *high-throughput* a biomoleculilor

Substratul de Si are rolul de electrod de poartă, iar oxidul îngropat (BOX) reprezintă oxidul activ (oxid MOS). Aplicând o tensiune pe electrodul de poartă (V_{BG}), se creează un canal de conducție la interfața dintre filmul de Si și oxidul îngropat. Două sonde metalice plasate pe suprafața semiconductoare joacă rolul de sursă și drenă, permițând măsurarea curentului de drenă. În funcție de tensiunea aplicată, conducția între sursă și drenă poate fi efectuată atât prin electroni (e^-), cât și prin goluri (h^+) (Cristoloveanu și Williams, 1992).

Cap. 3. Secvențe ADN specifice și modalități clinice de detecție

3.1. Bazele genetice ale carcinogenezei induse de antioncogenă *BRCA1*

Antioncogenele (gene supresoare ale creșterii tumorale) codifică proteine cu rol de control al diviziunii și creșterii celulare, blocând dezvoltarea neoplaziilor (Sun și Yang, 2010). Genele supresoare tumorale sunt recesive la nivel celular, fiind necesară mutația ambelor alele pentru ca produsul genic să-și piardă funcția (Hinds și Weinberg, 1994). Prin moștenirea unei alele mutante, crește probabilitatea de apariție a unei mutații somatice în trans, în cadrul aceleiași celule, care inactivează a doua alelă și influențează predispoziția la cancer (Knudson, 1971; Lu și colab., 2015).

Gena *BRCA1* are dimensiunea de 110 kb și este compusă din 22 exoni, fiind localizată la nivelul brațului lung al cromozomului 17, în poziția 21.31 (17q21.31). Aceasta codifică o fosfoproteină nucleară compusă din 1863 aminoacizi, care mediază în mod specific formarea lanțurilor de poliubiquitinare atașate de Lys. Activitatea sa ca ubiquitin-protein ligază E3 este necesară pentru a-și desfășura activitatea de supresor al creșterii tumorale.

Majoritatea cazurilor de cancer mamar apar sporadic, însă în unele situații sunt provocate de o predispoziție genetică atribuită mutațiilor patogene în antioncogenele *BRCA1* și *BRCA2* (Breast Cancer, early onset 2 - Genă implicată în cancerul de sân, tip 2). S-a constatat că 72% din femeile cu mutații germinale la nivelul *BRCA1* ar dezvolta cancer de sân (Pop și colab., 2018). S-a demonstrat că SNPs prezente în *BRCA1* și *BRCA2* duc la acumularea rapidă a erorilor în cadrul ADN, contribuind la declanșarea sporadică a cancerului de sân și fiind responsabile de riscul familial în proporție de 18% (Romanowicz și colab., 2016; Lilyquist și colab., 2018).

Mutațiile din cadrul genei *BRCA1* pot fi mici deleții sau inserții ce conduc la troncarea unei proteine (Mavaddat și colab., 2010), fie polimorfisme uninucleotidice (SNPs) aflate în regiuni reglatoare sau codificatoare care alterează funcția și expresia genei (Rajasekaran, 2007). SNPs sunt legate de predispoziția genetică a persoanei de a dezvolta o afecțiune particulară, determinând severitatea sau evoluția bolii. S-a demonstrat că un număr mare de SNPs influențează expresia proteinei sau funcția genetică, fie prin modificarea aminoacizilor și implicit a funcției proteice, fie prin schimbări epigenetice indirecte date de prezența SNPs în regiuni necodificatoare (Pilato și colab., 2011).

Variantele uninucleotidice amintite mai sus se regăsesc în experimente ca C>A și C>T și coincid cu împerecherile A/G și T/G. Studiul de față se adresează tipurilor de nepotriviri nucleotidice ce se pot asocia prin punți de hidrogen formând împerecheri non-canonice și care au efect mai puțin destabilizator asupra ADN (Ikuta și colab., 1987). Motivația a fost de a valida specificitatea de detecție pe platforma dezvoltată pentru perechile nucleotidice ce pot constitui cu ușurință o sursă de intensități de hibridizare fals-pozitive (Seela și Budow, 2008; Piao și colab., 2008)

3.2. Bazele genetice ale carcinogenezei induse de HPV

Virusurile HPV au diametrul de 55 nm și sunt alcătuite din ADN dublu catenar circular închis și capsidă. Genomul viral este constituit din 8 gene (E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 și L2), având aproximativ 8000 pb. Dintre acestea, genele timpurii ce codifică proteinele E5, E6 și E7 sunt implicate în promovarea proliferării celulelor infectate și

imortalizarea acestora, E6 și E7 jucând un rol esențial în carcinogeneza asociată cu infecția HPV (Zaravinos și colab., 2009).

Virusurile HPV infectează inițial celulele bazale ale epitelului care suferă micro-leziuni. Genomul viral se stabilește în nucleul celulelor ca ADN episomal, exprimând genele virale timpurii și se replică sincron cu ADN celular, în timpul diviziunii. Ulterior, una din celulele rezultate migrează din stratul bazal și se diferențiază, alterând ciclul celular prin exprimarea genelor E6 și E7. Astfel, celulele care în mod normal ar ieși din ciclul celular suferă tranziția către faza S, amplificând genomul viral. Proteinele virale L1 și L2 încapsidează genomul viral nou-sintetizat, iar virionii sunt eliberați din primele straturi epiteliale (Moody și Laimins, 2010).

În teză, am utilizat sonde specifice fragmentului genei L2 corespunzătoare tulpinii HPV 16 și fragmentului genei E1 a tulpinii HPV 18. Acestea au prezentat la capătul 5' grupări NH₂ ce permit legarea de suporturi modificate cu grupări aldehydice sau epoxidice sau grupări SH care permit legarea de suporturi de Au. Moleculele ADN țintă au fost reprezentate de oligonucleotide sintetice, marcate fluorescent sau secvențe ADN reale, amplificate prin reacția PCR și clonate în celule competente de E. coli.

Cap. 4. MATERIALE ȘI METODE

4.1. Materiale și reactivi

Suporturi

a) Substraturile Superaldehyde 3 Premium Microarray au fost achiziționate de la ArrayIt Corporation (Sunnyvale, USA).

b) Substraturile de Si de tip p au fost achiziționate de la SIEGERT WAFER (Germania) și Si-Mat (Germania).

c) Substraturile de tip SOI cu ariile active configurate au fost oferite de IMEP-LaHC (Grenoble, Franța).

d) Discurile de sticlă BK7 au fost furnizate de Thorlabs (SUA).

Configurarea nanofirelor de Si

Acidul fluorhidric, acidul azotic, nitratul de argint, (3-aminopropil)-trietoxisilanul (APTES) și soluția coloidală de nanoparticule de aur au fost furnizate de Sigma-Aldrich (Germania).

Funcționalizarea substraturilor

(3-aminopropil)-trietoxisilanul (APTES), glutaraldehida (GAD), (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilanul, acidul sulfuric (H_2SO_4), peroxidul de hidrogen (H_2O_2), etanolul au fost procurate de la Sigma-Aldrich (Germania). Glicidil eterul bisfenolului A (SU-8) a fost furnizat de Microchem (SUA).

Imobilizare și hibridizare

Sondele și secvențele țintă au fost furnizate de Biomers.net (Germania).

Soluțiile tampon fosfat salin (PBS), fosfatul dibazic de sodiu (Na_2HPO_4), dodecil sulfat de sodiu (SDS), albumina serică bovină, fracția V (BSA), citratul de sodiu (SSC), clorura de sodiu (NaCl), Ficoll 400, polivinilpirolidona (PVP) au fost procurate de la Sigma-Aldrich (Germania).

Apa fără nucleaze și lamelele de sticlă au fost achiziționate de la Roth (Germania). Fragmentele ADN extrase din spermă de hering au fost furnizate de Promega (SUA). Filmele adezive pentru plăcile de microtitrare au fost achiziționate de la EXCEL Scientific (SUA). Plăcile microtitrare sterile au fost achiziționate de la BRAND (Germania).

4.2. Echipamente

a) Echipamentul **Omni Grid Micro Plotter** (Genomic Solutions, SUA) a fost utilizat pentru depunerea controlată a sondelor ADN, folosind vârfuri solide cu diametrul de 200 μm .

b) Semnalul fluorescent provenit de la ADN hibridizat a fost detectat printr-un sistem fluorescent de scanare laser **GeneTAC UC4** (Genomic Solutions, SUA).

c) Modificările indicelui de refracție datorate hibridizării au fost înregistrate cu **Autolab TWINGLE** (Metrohm Autolab BV, Olanda).

d) Metalizarea discurilor de sticlă destinate analizei SPR a fost efectuată cu echipamentul de pulverizare catodică prin evaporare cu fascicul de electroni **AUTO 500** (BOC Edwards, Marea Britanie).

e) Sistemul de măsurare electrică este alcătuit dintr-o stație cu 4 sonde situate la 1 mm distanță unele de celelalte, pe care pot fi aplicate presiuni între 0 și 100 g (JANDEL, Marea Britanie) și un analizor al parametrilor semiconductorilor **HP 4155A** (Keysight

Technologies, SUA), cu ajutorul cărora s-au măsurat curentul de drenă (I_D) și potențialul de substrat (*bulk*) (V_B) în funcție de tensiunea de poartă aplicată (V_G).

f) Caracterizarea morfologică a substraturilor nanoconfigurate a fost realizată cu un microscop electronic de baleiaj cu emisie în câmp, **FEI NOVA NanoSEM 630** (FEI Company, în prezent ThermoFischerScientific, SUA).

g) Analiza elementală EDX a fost realizată cu un detector **EDAX Element** (EDAX Ametek Materials Analysis Division, SUA), montat pe FEI Nova NanoSEM 630.

h) Structura cristalină a Si nanostructurat a fost investigată cu ajutorul difractometrului de raze X (XRD) **RigakuSmartLab** (Rigaku Corporation, Japonia).

i) Spectrele în infraroșu au fost înregistrate cu un spectrometru FTIR **VERTEX 80/80v** (Bruker Optics, SUA). Măsurarea și analiza spectrelor a fost realizată cu *software*-ul **OPUS 7.5 Spectroscopy** (Bruker Optics, SUA).

j) Unghiul de contact a fost determinat pe suporturile funcționizate la temperatura camerei, utilizând un tensiometru **KSV Theta Optical**. În experimente a fost utilizată apa deionizată, volumul picăturii fiind controlat printr-un sistem automat de depunere.

4.3. Software

Programe utilizate pentru realizarea grafică a figurilor și schemelor:

- GIMP 2.8.16
- MS Office 2007 - Powerpoint
- ACD/ChemSketch (Freeware) 2016 2.2

Programe de analiză și prelucrare a datelor

Datele corespunzătoare semnalului fluorescent de hibridizare și a intensităților de fundal locale extrase cu GenePix® Pro 7 (Molecular Devices, SUA).

Prelucrarea și analiza datelor *microarray* a fost realizată în mediul RStudio 1.0.136 (RStudio: Integrated development environment for R (Versiunea 1.0.136)) pentru R 3.4.0 (<https://www.R-project.org/>). Graficele au fost generate cu pachetul ggplot2 din R (Wickham, 2009).

OriginPro 8.5 (OriginLab, SUA) a fost utilizat pentru analiza în timp a modificării unghiului de contact și pentru trasarea curbelor electrice I_D - V_G , V_B - V_G .

Cap. 5. Tehnologia de obținere a suprafețelor-suport funcționalizate

Activitatea de cercetare în cadrul studiilor doctorale s-a desfășurat pe două direcții:

- obținerea unor substraturi nanostructurate care să îmbunătățească detecția polimorfismelor uninucleotidice stabile și detecția tulpinilor HPV;
- optimizarea și dezvoltarea protoalelor de lucru specifice tipurilor de suport folosite precum și dezvoltarea unor metode alternative de validare pentru structurile proiectate.

Au fost corelate caracteristicile suporturilor cu performanțele traductorului biosenzorului și a fost evaluată influența acestora asupra specificității și sensibilității de detecție.

Plecând de la cele trei tehnici de detecție utilizate (microarray, SPR și Ψ -MOSFET), am folosit ca substraturi siliciu nanostructurat, film de aur depus pe sticlă și plachete de tip SOI.

5.1. Suprafețe suport

Suprafețele suport folosite în prezentul studiu sunt:

- Fabricarea **suprafetelor nanostructurate de siliciu** este detaliată în **Subcapitolul 5.1.1.** și a fost realizată prin corodare asistată de săruri metalice (MACE). Pentru obținerea acestui tip de suport au fost analizați sistematic parametri implicați în fluxul tehnologic: tipul plachetelor, orientarea cristalografică a siliciului, reproductibilitatea proceselor în funcție de tipul de metal folosit, concentrația soluțiilor de corodare și durata procesului.

- **Filmul de aur** a fost depus prin pulverizare catodică pe discuri de sticlă de tip BK7, cu indice de refracție de 1,515, grosimea filmului fiind de 50 nm, având 3 nm de Cr ca strat de aderență la sticlă.

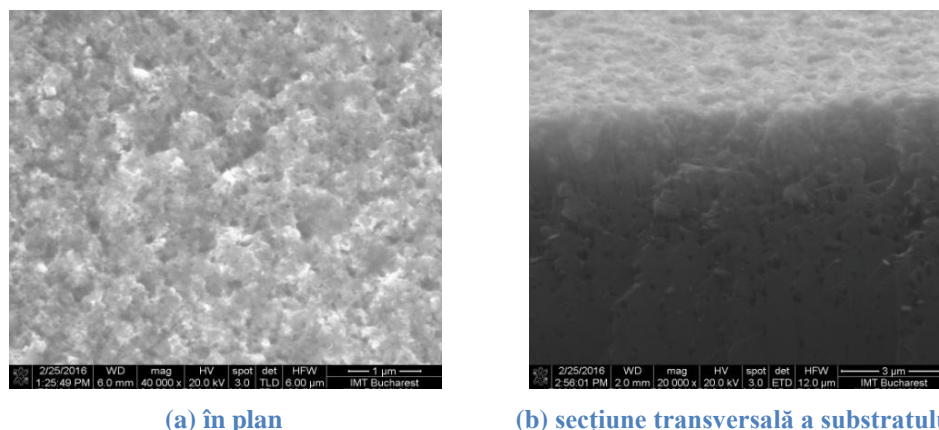
- Pe stratul superficial al **plachetei de tip SOI** au fost definite prin litografie și corodare chimică, arii active de 5 mm² și intercipuri de 2 mm, dimensiuni alese pentru a facilita poziționării sondelor.

5.1.1. Tehnici de fabricare a nanofirelor de Si

5.1.1.1. Tehnologia de fabricare a nanofirelor de Si folosind catalizatori de Au

Nanoparticulele de Au pot fi immobilizate cu succes pe substraturi silanizate care prezintă grupări funcționale cu afinitate pentru Au (Bhat, Fischer și Genzer, 2002; Williams și colab., 2013). Nanoparticulele de Au au fost fixate pe stratul intermediar de aminosilan prin imersarea substraturilor funcționalizate de Si în soluția dedicată și agitarea recipientului la 400 rpm pentru distribuirea uniformă a AuNPs pe suprafață.

Substratul de Si acoperit uniform cu nanoparticule de Au a fost utilizat pentru corodarea prin metoda MACE. Proba a fost imersată în mix 4,8 M HF/ 0,8 M H₂O₂ (v/v) și menținută timp de 1 h la baie de ultrasunete (45 kHz). După spălare cu apă deionizată și uscarea cu jet de N₂, proba a fost vizualizată în plan și în secțiune utilizând microscopul electronic de baleiaj, rezultatul fiind prezentat în **Figura 5.1.**



(a) în plan

(b) secțiune transversală a substratului

Figura 5.1. Examinarea morfologică a monostratului autoasamblat de Au NPs corodat prin MACE

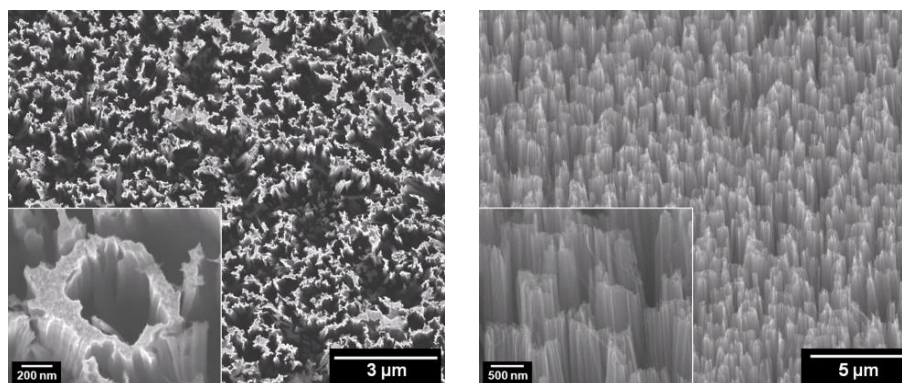
Se observă structura poroasă obținută prin corodarea MACE a substraturilor silanizate ornate cu nanoparticule de Au. *Corodarea nanofirelor de Si cu ajutorul AuNPs nu a furnizat structuri uniforme de dimensiuni controlabile, urmând a fi aprofundată într-un viitor proiect, întrucât protocolul cu AgNPs a oferit rezultate inițiale promițătoare.*

5.1.1.2. Tehnologia de fabricare a nanofirelor de siliciu cu catalizatori de Ag

Această metodă a implicat utilizarea azotatului de argint (AgNO_3) pe post de catalizator al reacției de corodare și am investigat influența rezistivității și a orientării cristaline a plachetei de Si, precum și a diferitelor intervale de proces, a concentrației de AgNO_3 și de HF. De asemenea, am desfășurat experimente de corodare chimică într-un singur pas (1-MACE) și, respectiv în doi pași (2-MACE). Controlarea caracteristicilor morfologice a nanofirelor a reprezentat o provocare datorită numeroșilor parametri fizico-chimici ce au trebuit optimizați interdependent.

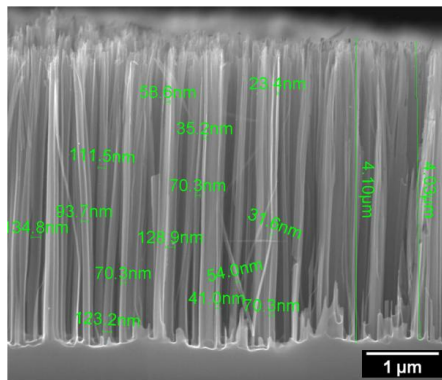
Corodarea chimică într-un singur pas se bazează pe reacția de dislocuire galvanică. Atât reacția la catod (reducerea sărurilor de Ag și depunerea acestuia sub formă de nanoparticule) cât și reacția anodică (oxidarea siliciului și dislocarea acestuia) au loc în paralel (Gengfeng și Xu, 2014). *Metoda 1-MACE a fost aleasă în studiul meu, fiindcă se desfășoară într-o singură etapă simplificată ce nu necesită controlarea concentrației de H_2O_2 în soluție, eliminându-se astfel potențiale erori.*

Nanofirele de siliciu produse prin 1-MACE au fost obținute pe plachete de tip p cu orientarea (100) și rezistivitatea de 1-3 Ω cm. Concentrația de AgNO_3 a fost de 0,06 mol/L, iar cea de HF, de 4,5 mol/L, timpul de corodare fiind de 40 min. La finalul reacției, suporturile au fost imersate în soluție HNO_3 60% v/ v timp de 30 min, pentru a îndepărta catalizatorul rezidual și tratate ulterior în soluție HF 5% v / v timp de 1 min. Morfologia structurilor este ilustrată în **Figura 5.2**.



(a) vedere de suprafață

(b) imagine înclinată la 60°



(c) măsurarea nanofirelor în secțiune transversală

Figura 5.2. Examinarea morfologică a nanofirelor de Si

În **Figura 5.2.**, din vederea în plan rezultă tendința naturală a SiNWs de a se aduna spre vârfuri, datorită raportului ridicat dintre grosimea și înălțimea lor, precum și a tensiunii de suprafață generate de evaporarea mediilor lichide implicate în procedura de fabricare (Han și colab., 2012; Dawood și colab., 2012). Imaginile înclinate la 60° indică o distribuție uniformă a nanofirelor, având o lungime medie de 4 μm și un diametru între 30 și 130 nm (**Figura 5.2. (c)**).

Dimensiunea firelor de Si poate fi controlată prin modificarea concentrațiilor de AgNO₃ și HF utilizate în metoda 1-MACE. Dimensiunea firelor de Si este de asemenea dependentă de concentrația dopajului și de orientarea cristalină a plachetei de lucru. Când concentrația de azotat de argint este prea mică, Ag⁺ se consumă rapid, iar reacțiile de oxidare a Si și de disoluție nu mai au loc și astfel, firele de Si nu se mai formează.

5.2. Modalități de funcționalizare a Si, SiNWs și SOI

A doua etapă a pregătirii platformelor pentru detecția ADN constă în realizarea modificărilor chimice la interfața dintre materialul anorganic și materialul organic, care depind de grupările funcționale ale sondelor ADN și de tipul de detecție a hibridizării. Astfel, pentru detecție fluorescentă se pot utiliza două tipuri de suport modificate pentru a permite fie legarea covalentă cu grupările aminice ale ADN, fie legare de film de Au prin chemisorbția grupărilor tiol ale sondelor ADN modificate.

Pentru obținerea legăturilor covalente între substrat și probele modificate cu grupări NH₂ terminale am efectuat trei tipuri de modificări chimice pe suprafețele de Si nanostructurat, în paralel cu folosirea unor probe martor de Si cristalin și sticlă ce au avut rolul de referințe pe parcursul experimentelor. În această teză am dezvoltat noi metode de modificări chimice pentru atașarea sondelor ADN: acoperirea cu APTES și GAD, ori depunerea unui film subțire de SU-8 sau a unuiia de GOTPMS ce utilizează o singură etapă de funcționalizare.

5.2.1. APTES/GAD

Substratul de siliciu a fost modificat cu (3-aminopropil)trietoxisilan (APTES), care a asigurat un monostrat funcțional expunând grupări –NH₂. Glutaraldehida (GAD), a conferit grupări active aldehydice, cu care au reacționat grupările –NH₂ furnizate de sondele ADN modificate prin formarea de baze Schiff (grupări iminice). Silanizarea în soluție a fost realizată folosind APTES hidrolizat cu concentrație 2,5 și 5% (Majoul, Aouida, Bessaïs, 2015). Soluțiile hidrolizate au fost obținute prin adăugarea APTES în solvent constituit din apă și etanol absolut în proporție de 1:19 v/v și amestecate sub agitare magnetică între 1-3 h. Probele de Si au fost imersate în soluție de APTES timp de 2

h și au fost supuse spălării succesive cu etanol absolut de 3 ori și cu apă deionizată de 3 ori, fiind uscate ulterior cu N₂.

Am investigat impactul pe care îl are concentrația soluției de APTES și tratamentul termic asupra funcționalizării, studiind spectrele FTIR pentru probele tratate la 110 °C și netratate. Spectrele ATR-FTIR ale probelor silanizate în APTES hidrolizat sunt prezentate în **Figura 5.3**.

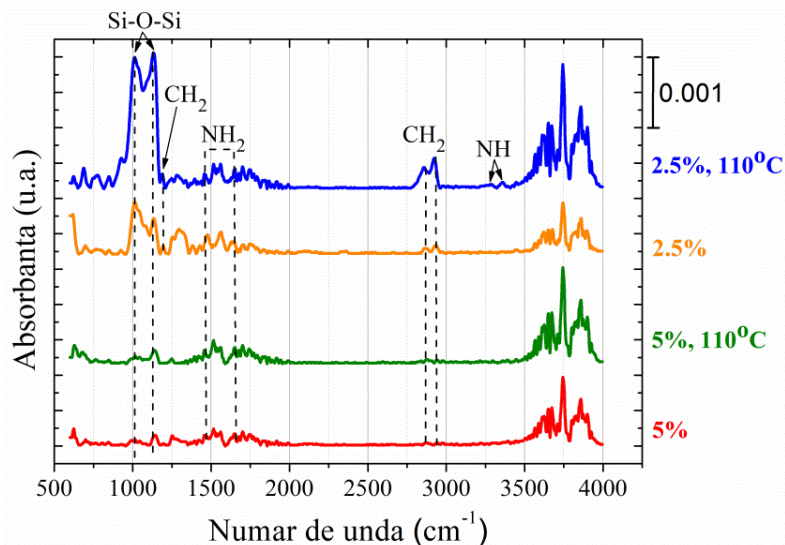


Figura 5.3. Rezultatele ATR-FTIR corespunzătoare probelor cu 2,5 % și 5% APTES cu și fără tratament termic

Eficiența reacției de silanizare a fost analizată înainte și după tratamentul termic pentru două concentrații de APTES (2,5% și 5%). În urma tratamentului termic, se constată pentru concentrația de 2,5 % APTES o creștere a intensității benzilor de absorbție corespunzătoare legăturilor Si-O-Si, ceea ce indică formarea de noi legături siloxanice fie între aminosilani (dimeri de APTES), fie cu suprafața (Halliwell și Cass, 2001). De asemenea, tratamentul termic a crescut considerabil densitatea grupărilor NH₂ expuse la suprafață prin reorientarea moleculelor, fiind rupte punțile de hidrogen dintre grupările aminice și suprafață și favorizând formarea legăturilor covalente (Howarter și Youngblood, 2006). La concentrații mai mari de silan hidrolizat nu se constată creșterea densității NH₂, probabil datorită formării polimerilor și agregatelor de APTES, care interacționează în principal prin punți de hidrogen cu suprafața (Zhang F., Srinivasan, 2004). Aceste legături fiind slabe, înseamnă că sunt ușor de distrus prin etapele succesive de spălare cu apă deionizată și etanol efectuate înaintea tratamentului termic.

Spectrele ATR-FTIR confirmă eficiența modificării chimice cu glutaraldehydă, ce prezintă benzi de absorbție atribuite legăturii C=N și C=O, fiind demonstrată astfel eficiența reacției de reticulare pe substraturile silanizate cu APTES hidrolizat. Pentru funcționalizare, am utilizat protocolul cu 2,5% APTES hidrolizat și 5% glutaraldehydă, cu 4 h de incubare pentru creșterea numărului de grupări aldehidice expuse pe suprafață.

Examinarea de suprafață și în profunzime a fost efectuată cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj pentru observarea modificărilor morfologice ale substraturilor cu SiNWs după funcționalizarea cu APTES-GAD. În **Figura 5.4**, sunt ilustrate zone reprezentative împreună cu detalii de înaltă rezoluție a suporturilor 3D pregătite ca suporturi *microarray*.

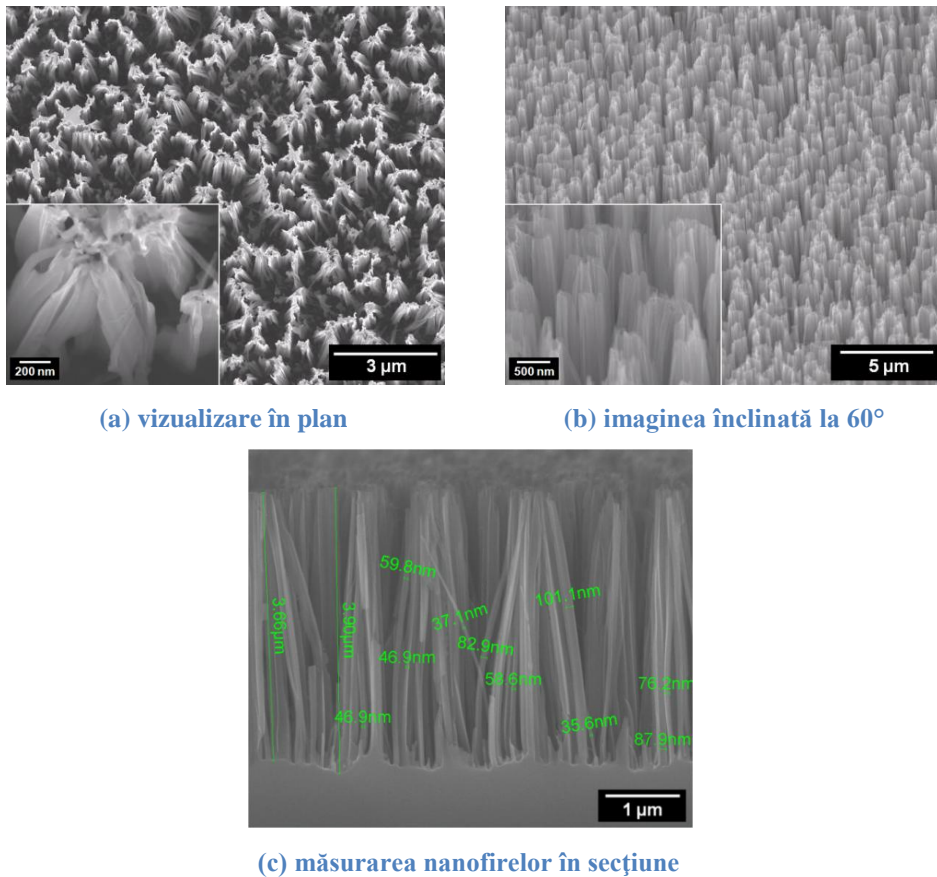


Figura 5.4. Caracterizarea morfologică a SiNWs funcționalizate cu APTES și GAD

Tendința nanofirelor de a se uni la vârfuri observată anterior în **Figura 4.2.** a fost amplificată de acumularea materialului vâscos pe vârfurile nanofirelor (Saddow, 2016; Foglia și colab., 2013; Robin, Vishnoi și Jonnalagadda, 2014) și pe lungimea regiunilor expuse. Funcționalizarea cu APTES-GAD adună vârfurile nanofirelor și acoperă o parte semnificativă din lungimea lor, după cum se observă în imaginile SEM – vizualizarea în plan și înclinată a SiNWs.

5.2.2. SU-8

Glicidil eterul bisfenolului A (SU-8) este un polimer fotosensibil ce exprimă grupări epoxidice și prezintă stabilitate termică, chimică, proprietăți fizice și optice excelente. SU-8 este potrivit pentru imobilizarea moleculelor în sisteme biologice microelectromecanice (Bio-MEMS) și biosenzori (Joshi și colab., 2007; Deepu, Sai și Mukherji, 2009).

Pentru depunerea uniformă a fotorezistului, am efectuat în prealabil curățarea chimică a substraturilor în soluție Piranha ($H_2SO_4:H_2O_2$ 3:1 v/v) timp de 15 min urmată de curățarea în plasmă de O_2 timp de 10 min. Fotorezistul SU-8 2002 a fost etalat prin centrifugare la 4000 rpm. Surplusul de solvent a fost evaporat prin tratament termic în două trepte de temperatură, $65^\circ C - 1$ min și $95^\circ C - 2$ min. Polimerizarea a fost realizată prin expunerea la UV a suportului, urmând un nou tratament termic la $180^\circ C - 30$ min.

Imaginile SEM prezentate în **Figura 5.5.** demonstrează acoperirea uniformă a nanofirelor de Si.

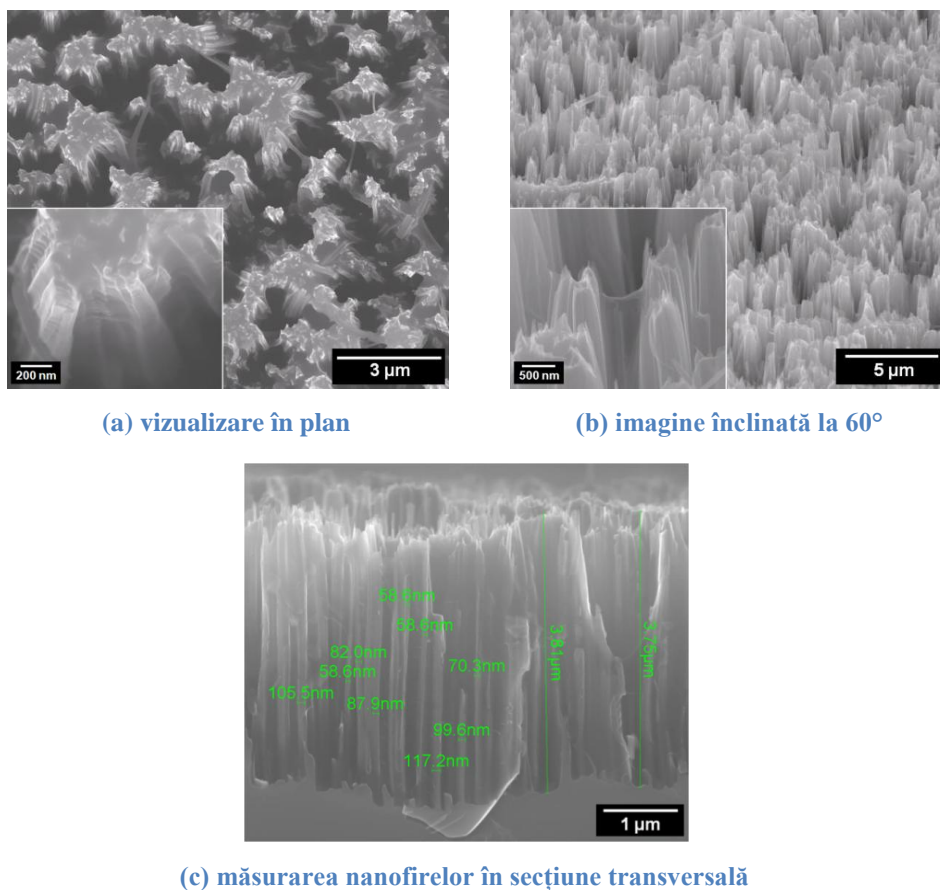


Figura 5.5. Caracterizarea SEM a SiNWs acoperite cu SU-8

Imaginile SEM relevă că, în plus față de funcționalizarea cu APTES-GAD (**Figura 5.4**), SU-8 înglobează grupuri mari de nanofire într-o masă polimerică și formează punți între blocurile adiacente, crescând suprafața activă. Examinarea în secțiune evidențiază modificarea substratului de Si nanostructurat prin funcționalizare și permite măsurarea nanofirelor (între 30 și 70 nm în diametru și ~ 4 μm în lungime).

5.2.3. GOPTMS

Substraturi de Si și SOI trasate pe dimensiunea 2,5 x 1,5 cm au fost funcționalizate cu GOPTMS hidrolizat sau depus din stare de vapori, funcționalitatea suprafețelor fiind validată prin tehnica *microarray* și respectiv, prin caracterizări electrice. Substraturile au fost curățate în soluție Piranha (H₂SO₄:H₂O₂ 3:1 v/v) pentru generarea grupărilor hidroxil. Acest tratament a fost solicitat de reacția de silanizare și nu afectează oxidul de poartă (Chandradoss și colab., 2014; Han și colab., 2006). După hidroxilare, substraturile au fost spălate cu apă deionizată și uscate cu N₂.

Silanizarea cu GOPTMS hidrolizat a fost realizată cu 2,5% epoxisilan adăugat în solvent constituit din apă și etanol absolut în proporție de 1:19 v/v și amestecat 2 h sub agitare magnetică. Probele de Si au fost imersate în soluție hidrolizată timp de 2 h. Principiul silanizării cu GOPTMS este identic cu cel la APTES, unde a fost demonstrată prin FTIR eficiența funcționalizării cu acest protocol. În cazul funcționalizării GOPTMS în soluție, este posibil ca moleculele de apă să reacționeze cu inelele epoxidice, ducând la deschiderea și inactivarea lor (Stropoli și Elrod, 2015).

Silanizarea în stare de vapori a fost realizată într-un vas petri, pentru 3 h 30 min, la 85 °C, 2 mL de GOPTMS fiind introduși în recipientul din centrul *set-up*-ului (Williams, Davies și Bowen, 2013). La final, probele au fost spălate succesiv cu etanol absolut de 3

ori și cu apă deionizată de 3 ori, fiind uscate ulterior cu N_2 și supuse tratamentului termic la $110\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min.

În **Figura 5.6**, este prezentată variația unghiului de contact pe Si modificat cu GOPTMS în stare de vapori, considerând Si nemodificat ca martor. Datele din grafic reprezintă o mediere a 3 măsurători efectuate pe suprafețe.

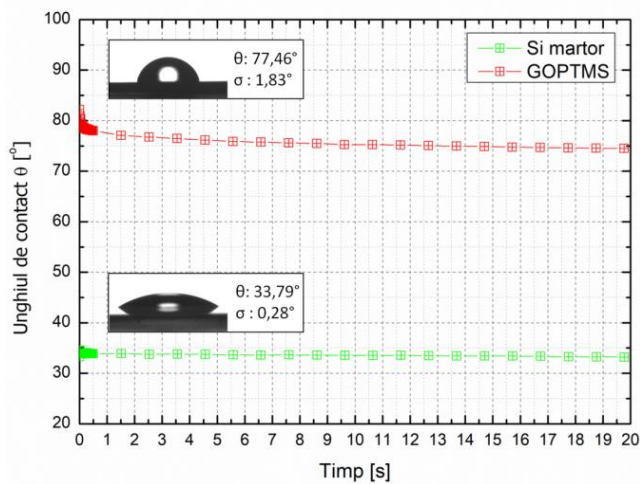


Figura 5.6. Variația unghiului de contact în timp pe Si martor și Si cristalin acoperit cu GOPTMS

Modificarea unghiului θ de la $33,8\text{ }^\circ$ la $77,4\text{ }^\circ$ demonstrează eficiența silanizării. Creșterea unghiului de contact se datorează ciclurilor epoxidice intacte și grupărilor metil (Goddard și Erickson, 2009).

Cap. 6. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice extrase din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

Acest capitol conține date experimentale obținute prin hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV prin detecția fluorescență, SPR și electrică.

Întrucât hibridizarea eficientă a ADN este dependentă de calitatea reacției de atașare a sondelor ADN, am investigat într-o primă instanță utilizarea a două soluții de imobilizare având pH și tărie ionică diferite. În acest scop, am utilizat suporturi comerciale de sticlă funcționalizată pentru a elimina o posibilă sursă de eroare provenită din procesul de fabricare a suporturilor proprii. Odată stabiliți parametri tehnologici optimi, detecția polimorfismelor uninucleotidice specifice *BRCA1* a fost realizată pe platforme *microarray* configurate cu nanofire de siliciu și funcționalizate cu APTES-GAD sau SU-8. Eficiența de discriminare a *mismatch*-urilor pe platformele configurate de mine a fost comparată prin analize statistice cu rezultatele obținute pe suporturi comerciale de sticlă ce prezintă funcționalizare cu grupări aldehidice.

Secvențe specifice ADN-HPV au fost utilizate pe suporturi de Au care permit investigația SPR, metodă prin intermediul căreia am testat eficacitatea de atașare a ADN pe filmul metalic, evaluând totodată limita de detecție a sistemului. Aceste secvențe au fost utilizate și pentru caracterizări electrice pe SOI funcționalizat APTES-GAD sau cu GOPTMS, atașarea și hibridizarea ADN-HPV fiind validată prin tehnica *microarray*.

6.1. Teste de imobilizare, hibridizare și stabilitate în timp pe suport comercial

În acest subcapitol, am investigat soluția de imobilizare ca sursă de variație experimentală, analizând stabilitatea în timp a probelor fixate după etapele de blocare și spălare, un parametru nesistematizat până în prezent. Având în vedere creșterea semnificației statistice prin utilizarea unui număr mare de replici tehnice (Blainey, Krzywinski și Altman, 2014), am urmărit efectele nepotrivilor de o bază azotată în termeni de specificitate prin utilizarea secvenței canonice *BRCA1* (care conține alela C) având complementaritate perfectă cu molecula țintă, în timp ce celelalte trei variante ale sondelor *BRCA1* au fost proiectate pentru a înlocui oligonucleotida C cu o alta (C>A, C>G și C>T).

Testele au fost efectuate pe suporturi comerciale de sticlă modificate chimic cu grupări aldehidice, pentru a eficientiza procedurile de atașare a ADN și de hibridizare, înainte de a fi aplicate pe substraturile nanoconfigurate și pe cele de tip SOI.

6.2. Realizarea structurilor de tip *microarray*

Pentru acest studiu, am utilizat sonde oligonucleotidice și secvențe-țintă ce corespund fragmentelor genei *BRCA1*, acestea fiind prezentate în **Tabelul 6.1**.

Tabelul 6.1. Sonde și secvențe țintă

<i>BRCA1</i>		
Sondă cu complementaritate perfectă (PM)		5'-C6-NH ₂ -CTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGG-3'
Sonde cu o singură nepotrivire de bază	C>A	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG▲GGGAGGAAAATGGG-3'
	C>G	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG▲GGGAGGAAAATGGG-3'

azotată (MM)	C>T	5'-C6-NH ₂ -CTAGGAATTG T GGGAGGAAAATGGG-3'
Secvență complementară (C)		5'-Cy3-CCCATTTTCTCCCGCAATTCCTAG-3'

Proiectarea sondelor și a oligonucleotidelor țintă a fost realizată pornind de la secvența genei *BRCA1* (indexată în NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>), implicând modificarea la capătul 5' cu o grupare amino- și un spațiator constituit din 6 atomi de carbon (C6), cu trei tipuri de nepotrivire uninucleotidică în același locus. Secvența țintă complementară prezintă la capătul 5' atașat fluoroforul Cy3, necesar pentru detecția fluorescentă a fenomenului de hibridizare.

Au fost utilizate două soluții de imobilizare pentru diluarea sondelor la concentrația de 50 μ M: (i) 10 mM tampon fosfat salin (PBS) cu pH 7,4 și (ii) 200 mM Na₂HPO₄, cu pH 8,5. Etapa de hibridizare a fost realizată cu 10 μ M secvențe complementare marcate fluorescent.

6.3. Analiza morfologiei *spot*-urilor

Variațiile de intensitate a semnalului au fost analizate grafic, unde fiecare punct corespunde unei replici corespunzătoare unui spot având sonde PM hibridizate (**Figura 6.1.**).

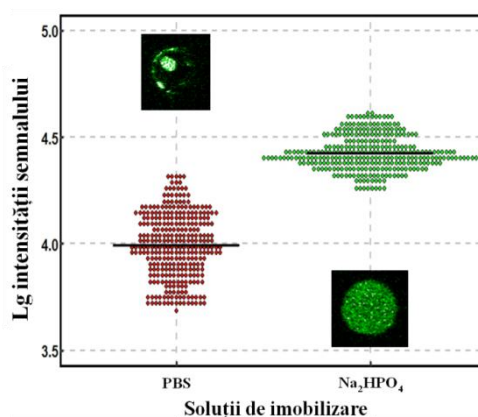


Figura 6.1. Analiza grafică a eficienței de hibridizare cu sondele pregătite în cele două soluții de imobilizare

Analiza grafică demonstrează clar că gradul de variabilitate depinde în mare măsură de natura soluției de imobilizare. S-a observat răspândirea mai pronunțată a rezultatelor pentru hibridizarea platformelor cu sonde ADN diluate în PBS, corespunzând unei deviații standard (σ) de 0,16, în timp ce tamponul Na₂HPO₄ a evidențiat o dispersie a rezultatelor de două ori mai mică ($\sigma = 0,08$). Este de remarcat faptul că spot-urile aferente tamponului Na₂HPO₄ prezintă morfologii excelente și o intensitate mai mare a semnalului de hibridizare. Această îmbunătățire reprezintă un efect al distribuției uniforme a sondelor datorită concentrației mai mari de sare și pH-ului bazic, care a contribuit la un semnal de hibridizare reproductibil.

Având în vedere aceste rezultate preliminare, studiile prezentate în continuare s-au axat exclusiv pe utilizarea Na₂HPO₄ ca soluție de imobilizare.

6.4. Stabilitatea în timp a sondelor imobilizate

Stabilitatea oligonucleotidelor atașate de suport a fost evaluată hibridizând platformele la 1 zi, 4 zile, 8 zile și 21 de zile de depozitare a *chip*-urilor la 4 ° C, după efectuarea etapelor de blocare și spălare. Au fost luate în considerare numai sondele PM, pentru care am generat histogramele din **Figura 6.2.**

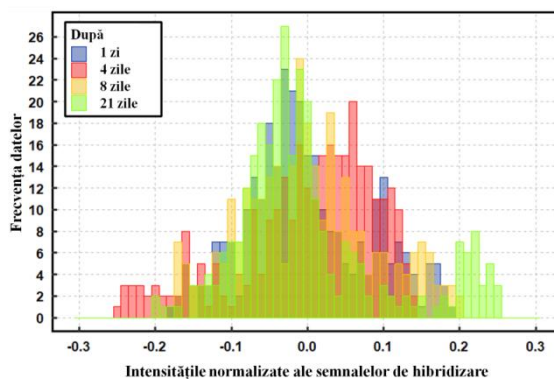


Figura 6.2. Evaluarea stabilității în timp a sondelor PM atașate pe suport comercial de sticlă

Histogramele prezintă distribuții suprapuse, normale ale intensităților semnalelor fluorescente de hibridizare, cu o ușoară deplasare spre stânga a datelor în cazul platformei incubate 4 zile, pentru platforma incubată 21 zile constatându-se în schimb o ușoară dispersie spre dreapta a datelor. Deviațiile standard calculate pentru rezultatele corespunzătoare celor 4 perioade de stocare sunt cuprinse între 0,09 și 0,12, indicând alături de histograma că nu a fost alterată calitatea *spot*-urilor.

6.5. Analiza statistică a detecției *mismatch*-urilor

Capacitatea de detecție a *mismatch*-urilor a fost investigată după o zi de incubare, rezultatele analizei fiind reprezentate grafic în **Figura 6.3**.

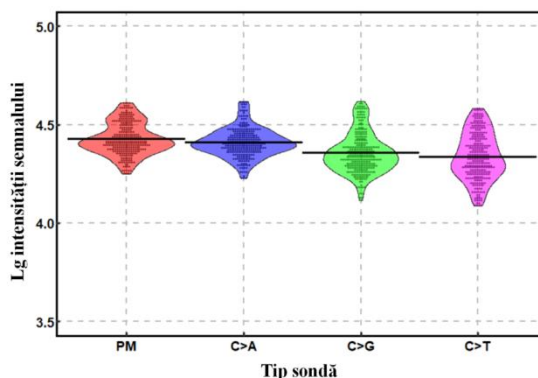


Figura 6.3. Evaluarea comparativă a intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, după 1 zi de incubare a platformei cu sonde ADN depuse

Pentru completarea analizei grafice, am efectuat analiza ANOVA unifactorială împreună cu testul post-hoc Tukey HSD (**Tabelul 6.2**).

Tabel 6.2. Analiza ANOVA unifactorială pentru intensitățile semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, pe platforma incubată 1 zi

PMvs. C>A	PM vs. C>G	PM vs. C>T	C>A vs. C>G	C>A vs. C>T	C>G vs. C>T
Valori p ajustate					
0,1279 ns	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	0,0964 ns

Rezultatele analizei statistice arată o distincție bună între sondele hibridizate PM și C>G, C>T. De asemenea, diferențele între sondele hibridizate C>A vs. C>G și C>A vs. C>T sunt semnificative din punct de vedere statistic. În schimb, între secvențele hibridizate

PM vs. C>A nu apar diferențe statistice, deoarece tipul de mismatch C>A nu afectează formarea și stabilitatea duplexului (Wei și colab., 2012).

În **Figura 6.4.** este reprezentat grafic rezultatul analizei sondelor cu *mismatch*-uri hibridizate după 21 de zile de incubare.

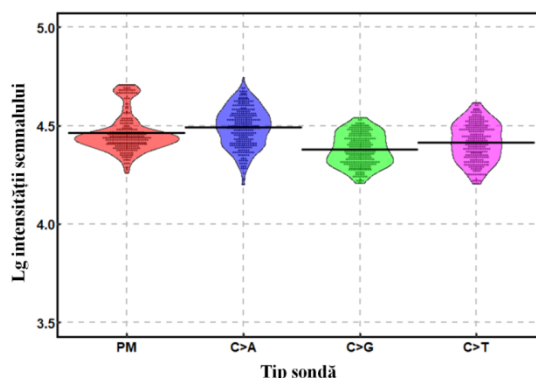


Figura 6.4. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, după 21 zile de incubare a platformelor cu sonde ADN depuse

Rezultatele, coroborate cu analiza statistică ANOVA (**Tabelul 6.3**), indică diferențe semnificative între PM și C>A, în sensul că sondele C>A hibridizate dau semnal eronat mai mare decât PM, în timp ce între toate celelalte tipuri de sonde hibridizate am obținut diferențe statistice conforme.

Tabel 6.3. Statisticile ANOVA pentru intensitățile semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, pe platforma incubată 21 zile

PMvs. C>A	PM vs. C>G	PM vs. C>T	C>A vs. C>G	C>A vs. C>T	C>G vs. C>T
Valori p ajustate					
0,0012 **	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***	<0,0001 ***

Așadar, analizele statistice au confirmat că reproductibilitatea analizei mismatch-urilor nu se modifică după 21 de zile.

În concluzie, am demonstrat îmbunătățirea detecției semnalului de hibridizare între secvențele țintă și sondele BRCA1 diluate în 200 mM Na₂HPO₄, pH 8,5 tampon de imobilizare. În plus, morfologia spot-urilor și specificitatea de detecție nu au fost alterate după 21 de zile de stocare a senzorilor având sonde depuse. Studiul a presupus utilizarea unui număr mare de replici tehnice pentru creșterea discriminării statistice a nucleotidelor în detecția SNPs.

6.6. Detecția specifică a substituțiilor uninucleotidice utilizând platforme de nanofire de siliciu acoperite cu SU-8

Substraturile pe bază de siliciu, adaptate geometriei configurabile prin procesele aplicate în microelectronică, sunt de interes datorită caracteristicilor tehnologice controlabile, reproductibile și stabile (Oilic și colab., 2007; Coombs, Khodjanizyazova și Bright, 2018). Nanofirele de siliciu (SiNWs) au reflectivitate redusă și o bandă largă de absorbție a luminii (Gouda, Allam și Swillam, 2017; Nichkalo și colab., 2017; Zhang și colab., 2017; Guo și colab., 2010), caracteristici esențiale în aplicațiile *microarray*.

În acest capitol am prezentat rezultatele obținute pe un tip nou de biosenzor, având substrat nanoconfigurat, funcționalizat cu APTES-GAD sau SU-8.

6.6.1. Flux tehnologic

Sondele oligonucleotidice și secvențele țintă utilizate corespund genei *BRCA1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>). Sondele specifice *BRCA1* au fost proiectate să conțină o modificare cu 6 atomi de carbon (C6) și o grupare amino (NH₂) la capătul 5' și două tipuri de polimorfisme uninucleotidice situate în același locus (**Tabelul 6.4.**).

Tabel 6.4. Sonde și secvențe-țintă

<i>BRCA1</i>	
Sonde cu potrivire perfectă (PM)	5'-C6-NH ₂ -CTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGG-3'
Sonde cu 1 mismatch (MM)	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG▲GGGAGGAAAATGGG-3'
	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG■GGGAGGAAAATGGG-3'
Secvență-țintă cu complementaritate perfectă (C)	5'-Cy3-CCCATTTTCTCCCGCAATTCCTAG-3'

Soluția de imobilizare constând din 200 mM Na₂HPO₄ (fosfat de sodiu, dibazic), pH 8,5 a fost utilizat pentru diluarea sondelor la concentrația de 50 μM. Depunerea sondelor ADN a fost efectuată la temperatura camerei cu Omni Grid Micro Contact (Genomic Solutions) având incintă cu umiditate controlată (80%). Un protocol optimizat de hibridizare a implicat secvențe complementare Cy3 diluate la 10 μM în soluție preîncălzită la 60 °C, consistând din soluție 2x Denhardt, 10x SSC și 200 μg/mL ADN din spermă de hering. Soluția de hibridizare a fost dispersată uniform pe suprafață, prin acoperirea cu o lamelă de sticlă, iar evaporarea ADN țintă a fost suprimată prin incubarea suporturilor într-o incintă umedă timp de 4 h, la 42 °C.

6.6.2. Analiza statistică a datelor experimentale

Seturile de date bazate pe 320 replici tehnice/tip sondă au fost generate de software-ul GenePix® Pro 6 pentru extragerea intensităților medii ale semnalului fluorescent și a intensităților locale de fundal, prelucrate și analizate ulterior în mediul RStudio 1.0.136 (RStudio: Integrated development environment for R (Versiunea 1.0.136)) pentru R 3.4.0 (<https://www.R-project.org/>). Graficele au fost generate utilizând datele cu valorile de fundal excluse și normalizate prin transformarea log₁₀, pentru a face interpretarea datelor mai facilă și semnificativă (Drăghici, 2003). Valorile situate la 2σ (deviație standard) distanță de medie au fost tratate ca valori redundante (outliers) și eliminate din analiza grafică și statistică a nconcordanțelor (mismatch). Graficele au fost realizate cu pachetul ggplot2 din R (Wickham, 2009).

În analiza comparativă a rezultatelor hibridizărilor cu sondele PM și cu MM, s-a utilizat statistica dispersională unifactorială (one way ANOVA) cuplată cu testul post-hoc Tukey (α = 0,05) disponibilă în RStudio. Valoarea *p < 0,05 a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic pentru aceste teste, unde pragurile de semnificație pentru statisticile F sunt notate ca *p < 0,05, **p < 0,01 și ***p < 0,001.

Pentru a evalua calitatea suporturilor *microarray* fabricate, am comparat raportul între semnalul fluorescent și două deviații standard (SSDR) utilizând metoda de calcul raportată (He și Zhou, 2008). Valorile SSDR pentru *GAD/SiNWs* și *SU-8/SiNWs* au fost comparate cu cele obținute pentru suportul comercial de sticlă (*REF*).

6.6.3. Mecanismul de imobilizare

În cazul funcționalizării cu APTES-GAD, monocatenile ADN pătrund adânc în matricea 3D și sunt imobilizate cvasi-vertical pe pereții SiNWs, în timp ce punțile de SU-8 restricționează pătrunderea ADN în profunzime, păstrând moleculele în apropierea suprafeței, devenind mai accesibile pentru procesul de hibridizare și favorizând o sensibilitate crescută de detecție. **Figura 6.5.** ilustrează mecanismele de imobilizare pe platformele 3D modificate cu APTES-GAD (GAD / SiNWs) și, respectiv, cu SU-8 (SU-8 / SiNWs).

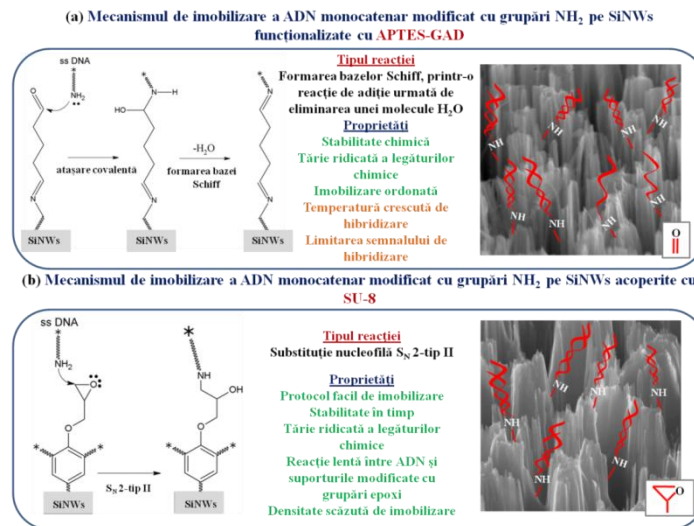


Figura 6.5. Reprezentarea schematică a mecanismelor de imobilizare a sondelor modificate cu grupări NH₂ – pe (a) GAD/SiNWs și (b) SU-8/SiNWs (preluată din Banu și colab., 2018)

În primul caz, reacția de formare a bazelor Schiff între grupările aminice și aldehidice permite legarea sondelor modificate la capătul 5' cu grupări NH₂ de SiNWs funcționalizate, conducând la o tărie ridicată a legăturilor chimice și o imobilizare ordonată – **Figura 6.5. (a)**. În cazul acoperirii SiNWs cu SU-8, este promovată reacția de substituție nucleofilă S_N2 tip II între grupările epoxi și amino (Nikolic și colab., 2010), asigurând stabilitatea și tăria legăturii chimice (Nimse și colab., 2014) – **Figura 6.5. (b)**.

6.6.4. Investigarea specificității de detecție în timp

Stabilitatea și specificitatea sondelor sunt proprietăți esențiale pentru platformele *microarray* de producție proprie care vizează implementarea comercială. Raportul semnal-zgomot (SNR) este utilizat în tehnica *microarray* pentru a măsura nivelul semnalului fluorescent asociat hibridizării, excluzând zgomotul de fundal (Hong și colab., 2013; Venet, Detours și Bersini, 2012). Rezultatele ilustrate în **Figura 6.6.** arată că s-au obținut rezultate similare pe suportul comercial de sticlă (REF) și pe nanofirele acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs), cu o stabilitate îmbunătățită în timp pentru SU-8/SiNWs, unde valoarea SDDR scade doar cu 10 %.

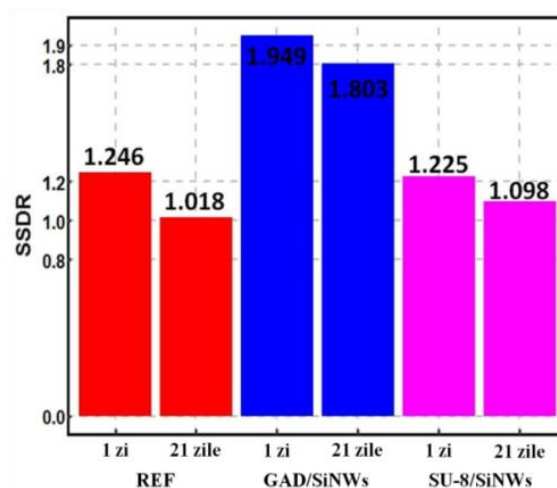
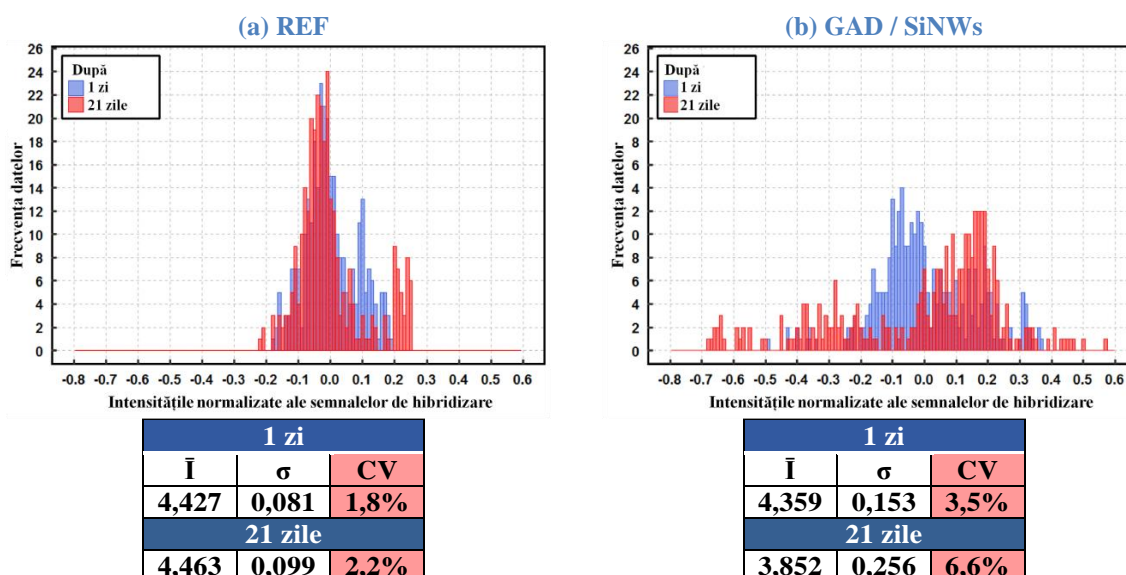


Figura 6.6. Măsurarea semnalului de hibridizare raportat la două deviații standard pentru trei tipuri de biosenzori, după 1 zi și 21 de zile de incubare a suporturilor cu sonde ADN imobilizate (preluată din Banu și colab., 2018)

Pe de altă parte, nanofirele de siliciu acoperite cu APTES-GAD (GAD/SiNWs) au prezentat cele mai bune valori SDR, 1,949 după 1 zi și 1,803 după 21 de zile de depozitare, valorile fiind în concordanță cu rezultatele noastre obținute pentru mai puține replici (Banu și colab., 2015); valorile sunt probabil determinate și de dimaetrul spot-urilor microarray.

Analiza stabilității în timp a rezultatelor hibridizării cu sondele având complementaritate perfectă (PM). După etapele de blocare și spălare a lamelor, stabilitatea probelor PM a fost evaluată prin hibridizarea dispozitivelor după 1 zi și 21 de zile de incubare la 4 °C. Reprezentarea grafică a intensităților semnalului normalizat a fost corelată cu intensitățile fluorescențe medii de hibridizare (\bar{I}), abaterile standard (σ) și coeficienții de variație (CV), așa cum este prezentat în **Figura 6.7**.



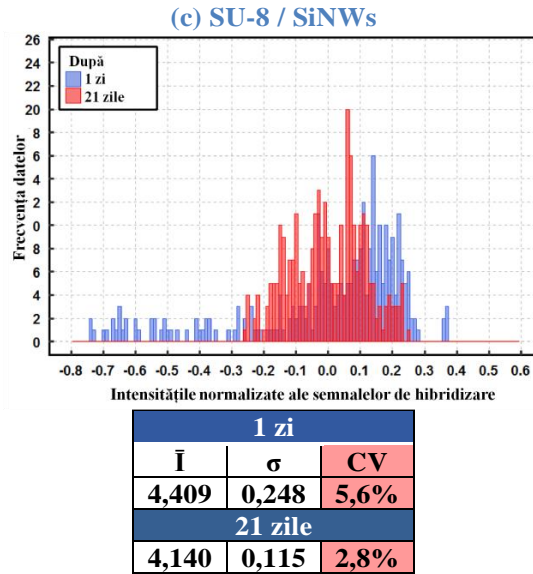
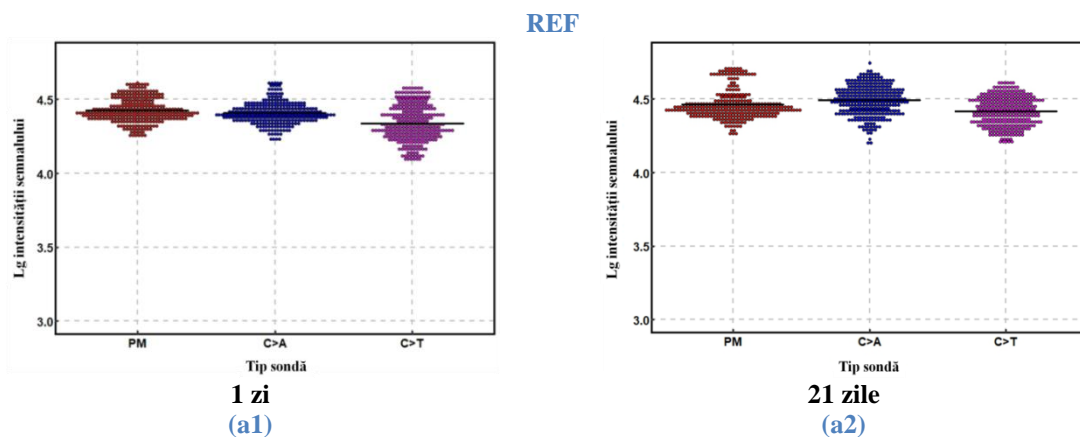


Figura 6.7. Evaluarea stabilității în timp a sondelor PM atașate pe: (a) dispozitiv comercial de sticlă (REF); (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă (GAD/SiNWs); (c) SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs), cuplate cu statistici descriptive pentru fiecare tip de substrat (preluată din Banu și colab., 2018)

Histograma corespunzătoare suportului REF prezintă distribuții suprapuse ale intensităților semnalului după 1 și 21 de zile de depozitare. Pentru GAD/SiNWs, peak-urile distribuțiilor nu sunt situate central, datele fiind semnificativ deplasate spre stânga după 21 de zile. Se observă tendința unei distribuții normale a datelor pentru SU-8/SiNWs, ușor deplasată la stânga după 1 zi de depozitare, dar îmbunătățită substanțial după 21 de zile.

6.6.5. Analiza statistică a specificității de detecție a polimorfismelor uninucleotidice pe platforme stocate în timp

Au fost analizate dispozitivele REF, GAD/SiNWs și SU-8/SiNW având hibridizate sondele PM, C>A și C>T. După extragerea, normalizarea și extragerea datelor, intensitățile normalizate ale semnalelor de hibridizare au fost luate în considerare pentru sondele PM în comparație cu sondele MM (Figura 6.8.).



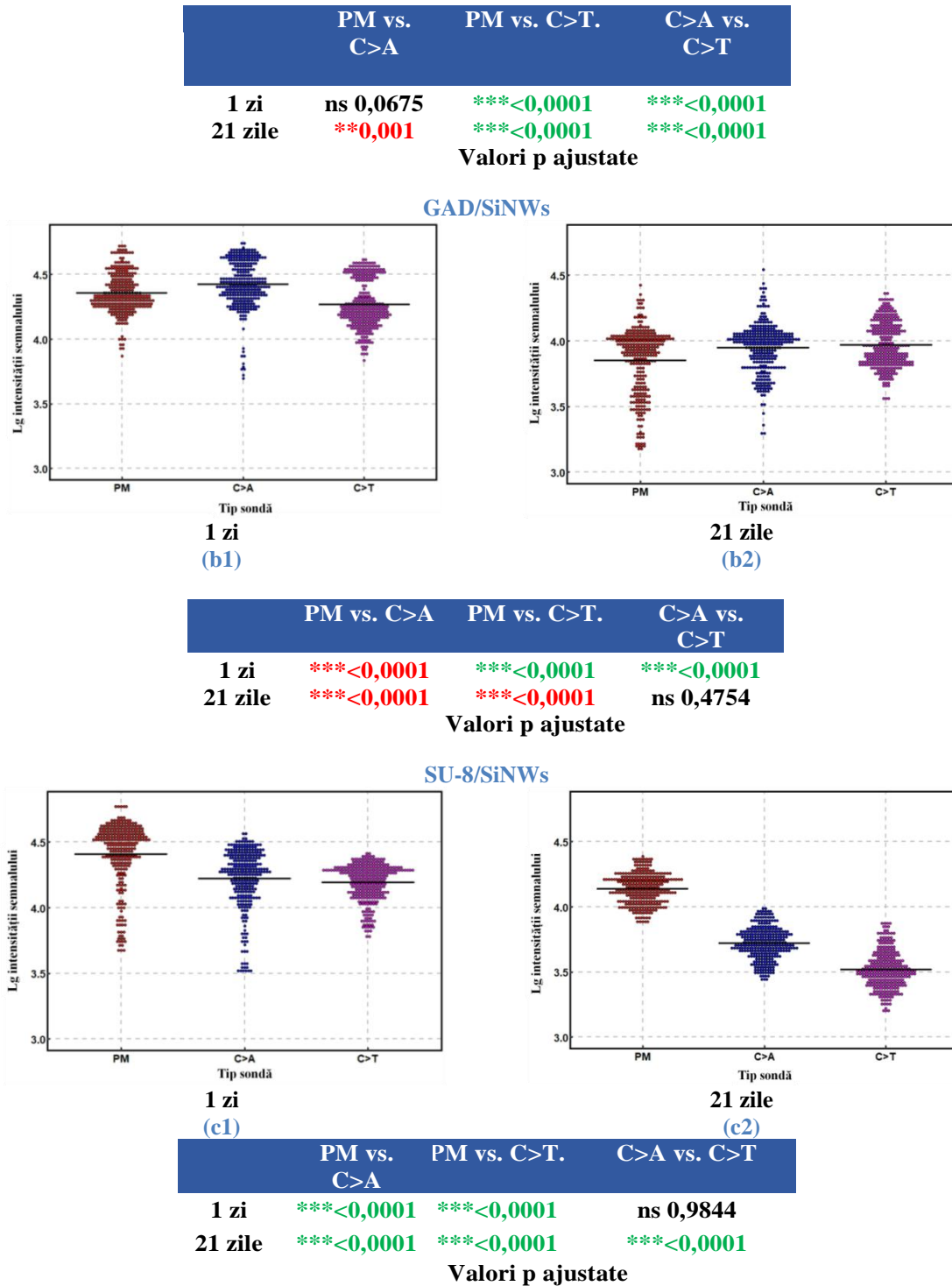


Figura 6.8. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sonda C>A și sonda C>T pe (a) suportul comercial de sticlă - REF; (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă (GAD/SiNWs); (c) SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs) după 1 zi și 21 de zile de incubare au fost corelate cu analiza ANOVA unifactorială (preluată din Banu și colab., 2018)

Analiza grafică a datelor de hibridizare pe suportul REF după 1 zi de depozitare prezentată în Figura 5.9. (a1) a arătat decelare statistică între sondele PM și C>T (** $p < 0,0001$), precum și între sondele C>A și C>T (** $p < 0,0001$). Deși diferențele dintre PM și C>A nu erau semnificative statistic (ns 0.0675), discrepanța a fost accentuată după 21 de zile, când diferența dintre PM și C>A a devenit semnificativă, semnalul de hibridizare mai

ridicat al sondelor C>A făcând analiza incorectă (textul roșu evidențiat în tabelul asociat Figurii 5.9. (a2)). Acest comportament ar putea fi determinat de predilecția C>A de a genera duplexuri ADN stabile A/G după hibridizare, având intensitate a semnalului egală sau mai mare decât duplexul ADN C/G (Li, Zon și Wilson, 1991; Allawi și SantaLucia, 1998).

Aceleași diferențe între sondele hibridizate C>A și PM au fost întâlnite în cazul platformei GAD/SiNWs, atât după 1 zi, cât și după 21 de zile de depozitare (Figura 5.9. (b1) și (b2)). Dacă inițial diferențele dintre celelalte tipuri de sonde erau semnificative statistic, după 21 de zile s-a observat ca intensitatea semnalului pentru C> T este semnificativ mai mare decât pentru PM. De fapt, toate valorile "p" au devenit substandard pe GAD/SiNWs după o perioadă îndelungată de stocare.

O specificitate foarte bună de detecție este obținută pe biochip-ul SU-8/SiNWs, care prezintă o distincție bună între sondele PM hibridizate și oligonucleotidele hibridizate C>A, C>T (***) p <0,0001) după 1 zi de incubare, cu o ușoară diferență (ns 0.9844) între cele două tipuri de nepotriviri (Figura 5.9. (c1)). Un comportament opus în timp a fost observat pentru acest tip de platformă (Figura 5.9. (c2)). Îmbunătățirea calității detecției nepotrivirilor nucleotidice pe substratul acoperit cu SU-8 a demonstrat o distincție bună între sondele PM și MM, precum și diferențe statistice între intensitățile de hibridizare fluorescente C>A și C>T (***) p <0,0001).

Supporturile nanostructurate acoperite uniform cu SU-8 au îmbunătățit reproductibilitatea procesului de hibridizare. Am demonstrat statistic capacitatea noului suport microarray de detecție a nepotrivirilor uninucleotidice foarte stabile.

6.7. Experimente *microarray* și SPR pentru genotiparea secvențelor corespunzătoare tulpinilor HPV imobilizate pe suporturi de Au

Aurul este utilizat ca suport pentru realizarea biosenzorilor deoarece este un material stabil, inert și ușor de configurat, permițând atașarea facilă a ADN modificat cu grupări tiol prin formarea monostraturilor autoasamblate (Häkkinen, 2012).

Am abordat o modalitate proprie de evaluare și validare a eficienței imobilizării și hibridizării ADN pe suport pe Au, utilizând tehnica *microarray* cu analiza statistică dedicată, urmată de analiza în timp real prin SPR a imobilizării și a hibridizării cu concentrații diferite de probă reală, pentru determinarea limitei de detecție și a cantității hibridizate de probă corespunzătoare fragmentelor reale ADN-HPV.

6.7.1. Procedura experimentală

6.7.1.1. Amplificarea și clonarea secvențelor ADN corespunzătoare genotipurilor HPV

(a) Seturi de primeri

ADN viral pentru 10 tipuri HPV a fost extras și furnizat de GeneticLab București, împreună cu primerii HPV (Biomers.net). Au fost construite 10 seturi de primeri specifici genotipurilor HPV pentru amplificarea PCR conform lui Nishiwaki și colab. (Nishiwaki și colab., 2008) (**Tabelul 6.5.**).

Tabel 6.5. Secvențe ale primerilor specifici ADN-HPV (adaptare după Nishiwaki și colab., 2008)

Genotip	Primeri (5' ->3')	Lungime (pb)	GC (%)	T _m (°C)	Fragmente gene amplificate	Dimensiune amplicon
58	F: ACCACCGAGGCCACCAACAACGAAAGT	27	55,6	75	E2, E4	123-128 135
	R: CGTGGTCTACTGTCCACGGCGCAGTCT	27	63	75,4		

Dezvoltarea de *biochip*-uri pentru detecția și analiza *high-throughput* a biomoleculilor

18	<p>F: AACAGTCCATTAGGGGAGCGGCTGGA</p> <p>R: TGCCGCCATGTTGCGCCATTTG</p>	26 21	57,7 57,1	73,7 73,2	E1	187
45	<p>F: TGTTGGACATCACACCTACCGTGGA</p> <p>R: TCCGTACCTGACCCAGAAGATGCAA</p>	25 25	52 52	69,7 69,8	L1, L2	205
39	<p>F: CCGACGGAGTGTCCCTGGACCATCTTA</p> <p>R: CCAGCGTTTTTGGTTCCCCGTA</p>	27 28	59,3 53,6	74,1 74,1	E2	229
30	<p>F: ACGCAGACGAAAACGGGCCTCTGCT</p> <p>R: GGCCTAGCAGGGGATGCGTCCACAA</p>	25 25	60 64	75 76	L2	249
66	<p>F: GCGGGCGGCTCCTACCTCTTCCTCTTC</p> <p>R: CCACCTAACCTGACACACACTGCCCAA GG</p>	27 29	66,7 58,6	75,9 74,9	L1	277
56	<p>F: TGTTGTTTTTCCGCCATTTTGTACATGC AACC</p> <p>R: TGGCCTACATAGGTGATTCTGCAAGCC AAAAC</p>	32 32	40,6 43,8	74,8 71,1	-	330
31	<p>F: GCGGTCCAAACGCTCTACAAAACGCAC T</p> <p>R: GCAGGGGCACCAACATCAACAATTCCA</p>	28 27	53,6 51,9	74,3 75,3	L2	360
35	<p>F: CCATAACATCGGTGGACGGTGGACAGG</p> <p>R: CCATTACATCCCGTCCCCTCCCCTTCA</p>	27 27	59,3 59,3	75 75,7	E6, E1	434
52	<p>F: GGTGTGGTGTGCTGCTTTTGCTA</p> <p>R: CAGTTACAGGGGACGAATGGTGGA</p>	25 25	52 56	70,1 70,8	E5, L2	517

(b) Amplificarea tulpinilor HPV și purificarea produșilor PCR

Pentru fiecare tulpină HPV în parte, au fost amplificate secvențele de interes din ADN izolat din țesut cervico-vaginal infectat. Amestecul PCR a constat din 25 μ L Master Mix (Promega, SUA), câte 2 μ L de *primer forward/ reverse* (concentrația de 10 pM/ μ L pentru fiecare *primer*) și 2 μ L ADN matrită într-un volum final de 50 μ L.

Pentru reacția PCR a fost setat următorul program: denaturarea inițială a ADN la 95 °C, 30 s urmată de 30 cicluri ce constau în denaturarea la 95 °C, 30 s, hibridizarea la 52 °C, 30 s și extensia la 72 °C, 7 min, fiind încheiate cu extensia finală la 72 °C, 7 minute. Produșii PCR au fost analizați calitativ prin electroforeză în 1% gel de agaroză, ampliconii fiind purificați cu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, SUA), în conformitate cu instrucțiunile producătorului și folosiți ulterior pentru clonare în celule competente de *E. coli*.

Secvențele genetice corespunzătoare au fost amplificate, purificate, transformate în vectorul PCR 2.1 TOPO și ulterior clonate în celule competente de *E. coli*.

(c) Ligarea fragmentelor PCR în vectorul de clonare pCR®2.1-TOPO

Prođușii PCR purificați au fost ligați în vectorul de clonare pCR 2.1 TOPO™ (TOPO TA Cloning Kits, Invitrogen, SUA), plasmidele rezultate fiind transformate în celule competente de *E. coli*. Amestecul de ligare a constat din 2,5 μ L amplicon, 1 μ L soluție salină și 1 μ L vector plasmidial. Reacția de ligare a avut loc 15 min la temperatura camerei (25 °C).

Tehnologia ADN recombinant are aplicații în pregătirea unui număr mare de molecule ADN identice. Astfel, fragmentul ADN de interes este atașat prin legături fosfodiesterice de o moleculă ADN vector și replicată în număr mare într-o celulă gazdă (Lodish și colab., 2000).

Produsul PCR și vectorul prezintă capete coezive, iar legarea secvențelor a avut loc în prezența ADN ligazei T4 (Promega, SUA).

(d) Pregătirea celulelor competente de *E. coli* și reacția de transformare

Prođușii de ligare au fost amestecați cu câte 25 μ L de celule competente și incubate 30 min pe gheață, aplicând ulterior șocul termic la 42 °C, 1 minut. În fiecare tub Eppendorf s-au adăugat câte 100 μ L mediu S.O.C. Celulele au fost incubate 1 h la 37 °C, însămânțate pe plăci Petri cu mediu LB solid cu ampicilină (Luria Bertani - Amp) și incubate peste noapte la 37 °C. Mediul LB solid a fost pregătit anterior cu 0,5% extract de drojdie, 0,5% NaCl, 1% peptonă și 2% agar. pH-ul a fost ajustat la 7 - 7,4 cu NaOH 1M. După sterilizarea mediului LB cu agar, 50 μ g/mL Amp au fost adăugați, soluția fiind turnată în plăci petri și lăsată să se solidifice.

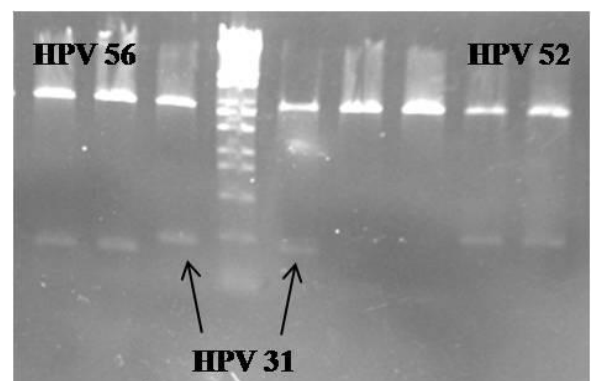
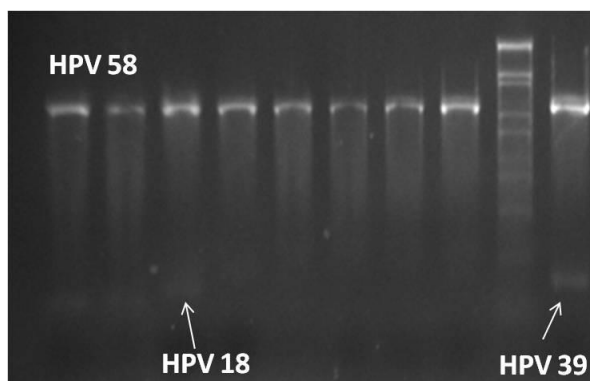
(e) Izolarea ADN plasmidial din coloniile de celule rezistente la ampicilină

Coloniile mai mari au fost selectate și inoculate pe plăci Petri și în 5 mL mediu LB lichid cu Amp (50 μ g/mL) într-un tub Falcon steril de 50 mL. Culturile celulare au fost incubate peste noapte la 37 °C și sub agitare la 100 rpm. A doua zi, au fost centrifugate la 4000 rpm, timp de 2 minute. Supernatantul a fost înlăturat, iar ADN plasmidial a fost izolat conform protocolului PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, SUA). Celulele au fost lizate prin procedura alcalină/ SDS. Lizatul celular a fost transferat apoi pe o membrană de silice care leagă selectiv ADN plasmidial. Contaminanții au fost apoi eliminați cu soluții de spălare. ADN plasmidial a fost eluat în soluție TE.

(f) Confirmarea existenței secvențelor ADN clonate prin restricție enzimatică

Plasmidele purificate au fost supuse restricției enzimaticice cu EcoR I. Reacția de restricție a fost realizată într-un volum final de 20 μ L, cu 2 μ L ADN plasmidial, 2 μ L tampon 10x, 0,5 μ L enzimă și 15,5 μ L apă sterilă. Amestecul a fost incubat timp de 2 h la 37 °C și apoi analizat prin electroforeză cu 1% gel de agaroză.

ADN plasmidial a fost apoi izolat și tăiat cu enzima EcoRI, existența produșilor de interes fiind verificată prin electroforeza în gel de agaroză (**Figura 6.10.**).



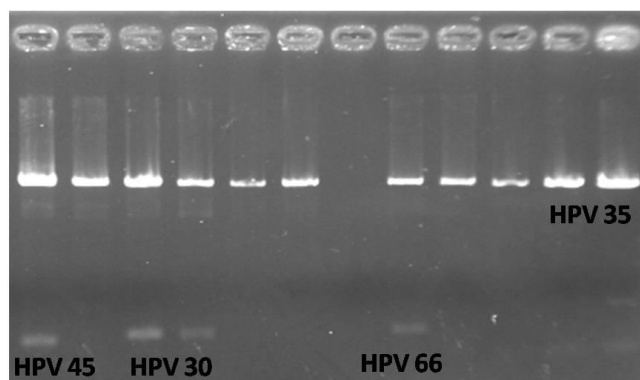


Figura 6.9. Electroforeză în gel de agaroză a secvențelor ADN clonate în pCR 2.1 TOPO

6.7.1.2. Microarray și SPR

Probele utilizate în studiul *microarray* și SPR sunt prezentate în Tabelul 6.6.

Tabel 6.6. Secvențe ADN

HPV 18 – secvențe corespunzătoare fragmentului genei E1	
Sonde ADN	5'- SH-C3 -TGCCGCCATGTTTCGCCATTTG-3'
	5'- SH-C6 -TGCCGCCATGTTTCGCCATTTG-3'
Secvențe aleatoare (Sonde control)	5'- SH-C6 -AACCAGGATATCCGCTCACAATTCC- Cy3 -3'
	5'- SH-C6 -AACCAGGATATCCGCTCACAATTCC-3'
Secvențe complementare	5'- Cy5 -CAAATGGCGAACATGGCGGCA-3'
	5'- AACAGTCCATTAGGGGAGCGGCTGGAGGTGGATACAGAG TTAAGTCCACGGTTACAAGAAATATCTTTAAATAGTGGGCAG AAAAAGGCAAAAAGGCGGCTGTTTACAATATCAGATAGGGC TATGGCTGTTCTGAAGTGAAGCAACACAGATTCAGGTA ACTA CAAATGGCGAACATGGCGGCA-3'

Secvențele oligonucleotidice corespunzătoare fragmentului genei E1 a tulpinii HPV 18 au fost proiectate să conțină la capătul 5' o modificare –SH cu un spațiator din 3 sau 6 atomi de carbon (C3/C6), pentru a evalua relația dintre distanțarea față de suprafață și randamentul reacției de hibridizare. Eficiența reacției de imobilizare a fost verificată prin fluorescență utilizând sonde control (fără complementaritate față de ADN țintă), care conțin la capătul 5' o grupare -SH cu 6 atomi de carbon și la capătul 3' un fluorofor Cy3. Sondele control nemarcate fluorescent au fost utilizate în experimentele SPR. Secvențele complementare sintetice au fost utilizate în experimente *microarray*, în timp ce proba reală ADN utilizată în experimente.

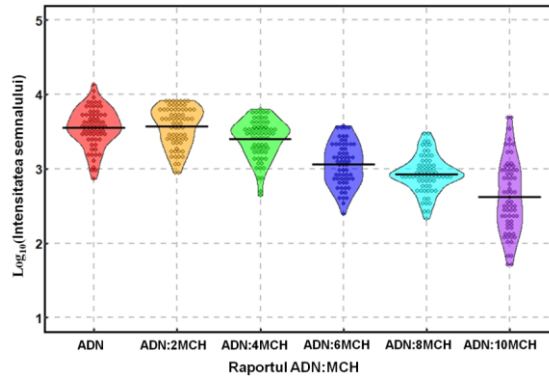
6.7.2. Validarea prin *microarray* a imobilizării și hibridizării secvențelor HPV pe suport de Au

Intensitățile semnalelor de hibridizare au fost extrase cu GenePix[®] Pro 7 și analizate în RStudio 1.0.136 (RStudio: Integrated development environment for R (Versiunea 1.0.136)) pentru R 3.4.0 (<https://www.R-project.org/>). Valorile afișate în grafice au fost obținute după extracția semnalului de *background* și normalizarea prin \log_{10} (Drăghici, 2003). Valorile situate la 2σ (deviație standard) distanță de medie au fost tratate ca valori redundante și înlăturate din analiza grafică și statistică. Graficele au fost generate cu pachetul ggplot2 (Wickham, 2009).

6.7.3. Investigarea eficienței de imobilizare a ADN prin formarea monostraturilor autoasamblate mixte

Pentru a evalua efectul de co-imobilizare a ADN cu MCH, am utilizat 5 rapoarte de concentrație, luând ca referință ADN imobilizat fără MCH. În Figura 6.10. sunt prezentate

grafic rezultatele obținute după 2 h de imobilizare, fiind acompaniate de statistici descriptive.



Rapoarte ADN:MCH						
	ADN	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
\bar{I}	3,552	3,566	3,398	3,063	2,93	2,622
σ	0,263	0,267	0,261	0,29	0,246	0,479
CV	7,4%	7,48%	7,68%	9,46%	8,39%	18,26%

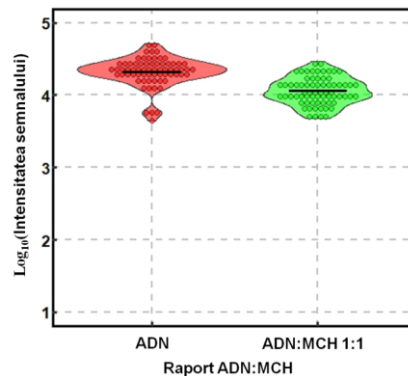
Figura 6.10. Intensitățile semnalelor de imobilizare după 2 h

Reacția de imobilizare pe suprafața aurului este rapidă, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru atașarea ADN și pentru co-imobilizarea secvențelor cu cantitatea de MCH dublată. Se observă o scădere mică a intensității semnalului de imobilizare după co-incubare cu 1:4 C_{ADN}/C_{MCH} . Prin creșterea suplimentară a concentrației MCH, se obține un coeficient de variație mai mare (CV) datorită răspândirii datelor, indicând scăderea reproductibilității deoarece MCH relocalizează ADN legat nespecific în afara zonei definite de vârfulurile solide utilizate la depunere.

6.7.4. Optimizarea parametrilor de hibridizare

Pe baza studiilor anterioare de imobilizare, 10 μ M sonde ADN marcate fluorescent au fost atașate sau co-incubate cu 10 μ M MCH, cu rol de control al imobilizării.

Intensitățile semnalelor de imobilizare au fost cuantificate în reprezentarea grafică din Figura 6.11. și însoțite de statistici descriptive.



	\bar{I}	σ	CV
ADN	4,322	0,199	4,60%
ADN:MCH 1:1	4,059	0,186	4,58%

Figura 6.11. Semnalul de imobilizare înaintea procesării *biochip*-urilor

Incubarea amestecului de ADN cu mecaptohexanol duce la un semnal fluorescent de imobilizare mai scăzut (4,059) datorită dislocării oligonucleotidelor legate nespecific, observând totodată o diferență minoră între deviațiile standard ($\sigma_{ADN} = 0,199$ și $\sigma_{ADN:MCH} = 0,186$). Coeficientul de variație (CV) relevă o reproductibilitate bună pentru ambele situații (4,60% și 4,58%).

Tăria legăturilor Au-S-ADN a fost verificată după spălarea *chip*-ului. S-a remarcat o scădere a intensității semnalului datorită înlăturării sondelor ADN neatașate specific rezultatul fiind analizat grafic și statistic în **Figura 6.12**.

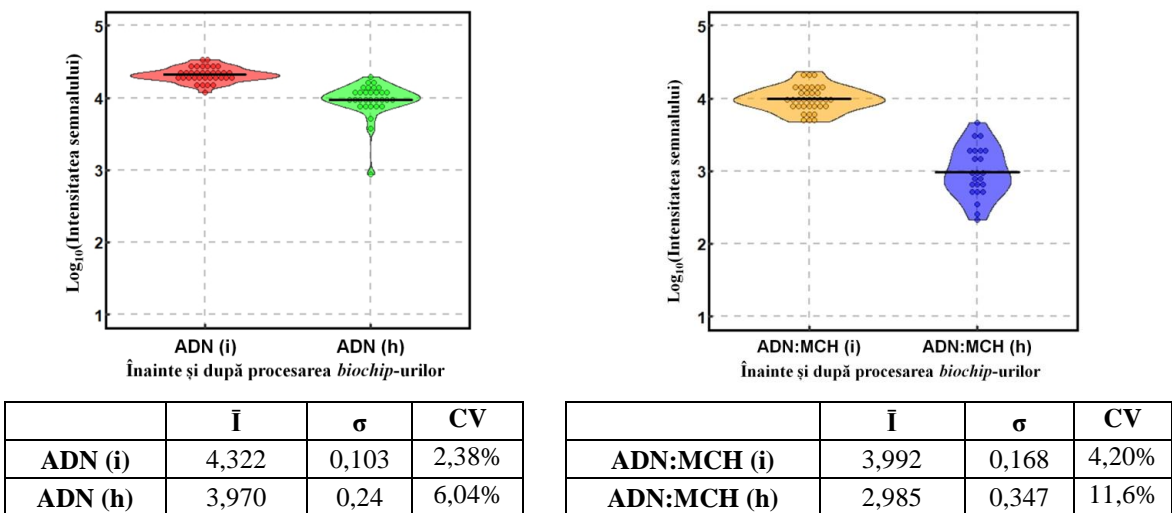


Figura 6.12. Modificarea intensităților semnalelor fluorescente de imobilizare în urma etapelor adiționale de procesare a *biochip*-urilor

Intensitățile semnalelor de imobilizare corespunzătoare sondelor marcate cu fluoroforul Cy3 și incubate cu sau fără MCH scad după prelucrarea suplimentară a *biochip*-ului. CV-ul corelat cu analiza grafică arată răspândirea valorilor și pierderea reproductibilității, așadar condițiile de spălare aplicate nu sunt recomandate pentru platformele de detecție acoperite cu aur.

Coordonarea verticală a atașării sondei pe suportul solid este un parametru cu rol decisiv în facilitarea accesului oligonucleotidelor complementare la sonde în timpul hibridizării. Distanțierul este situat între sonde și suport, rolul său fiind acela de a expune secvențele nucleotidice care vor participa la evenimentul de hibridizare.

Analiza grafică și statistică a replicilor tehnice, prezentată în **Figura 6.13**.

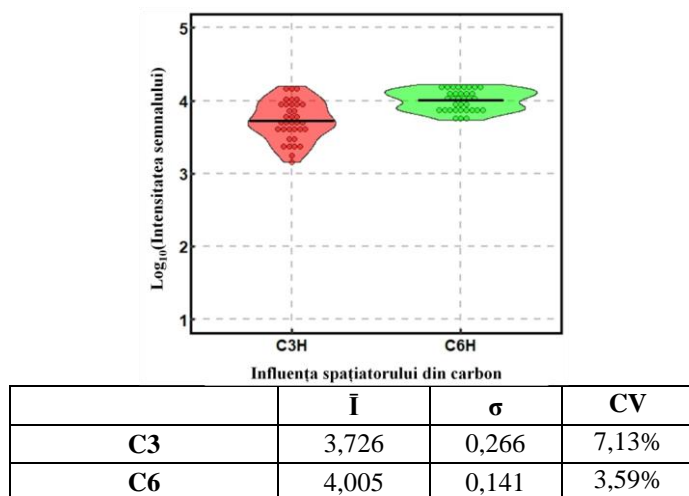
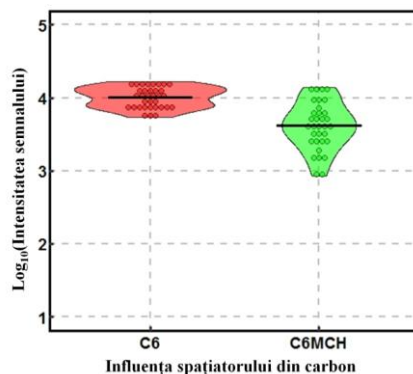


Figura 6.13. Influența MCH asupra eficienței hibridizării

Din analiza grafică se observă că spațiatorul cu 6 atomi de carbon a avut un impact pozitiv asupra hibridizării, intensitatea semnalului fluorescent de hibridizare fiind mai mare (mai multe molecule țintă au fost atașate la sondele ADN) și mai uniformă, relevată de $CV = 3,59\%$.

Sondele specifice HPV 18 cu distanțier C6 legat cu/fără MCH au fost luate în considerare în continuare pentru investigarea comparativă a eficienței hibridizării (**Figura 6.14.**).



	\bar{I}	σ	CV
C6	4,005	0,141	3,59%
C6 MCH	3,618	0,325	8,98%

Figura 6.14. Influența MCH asupra eficienței hibridizării

Cele mai bune rezultate au fost obținute hibridizând sondele legate fără MCH, având cea mai mare medie a intensității semnalului (4,005). Hibridizând secvențele co-immobilizate cu MCH s-a obținut o intensitatea medie a semnalului mai scăzută (3,618 și valori mai dispersate ($CV = 8,98\%$) din cauza dislocuirii sondelor legate nespecific.

5.7.5. Evaluarea prin SPR a imobilizării și hibridizării secvențelor ADN-HPV

Figura 6.15. prezintă analiza SPR a 1 μM sonde ADN modificate cu grupări tiol corespunzătoare fragmentului HPV 18, imobilizate de suport de Au.

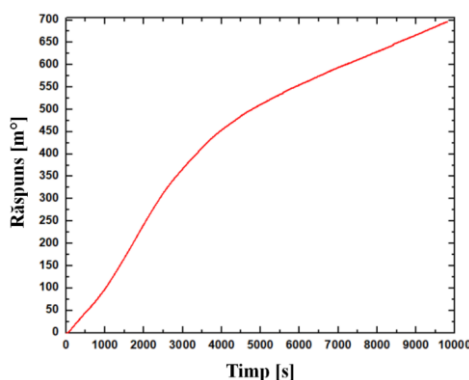


Figura 6.15. Monitorizarea în timp real a imobilizării ADN corespunzător HPV 18

Timpul necesar imobilizării a fost de 170 min, unde am înregistrat o modificare maximă a unghiului de rezonanță de 700 m° (5,73 ng/mm^2 sonde atașate de Au). În prima oră de imobilizare, reacția de atașare are loc foarte rapid, urmată de o creștere mai lentă.

Sensibilitatea de detecție a hibridizării ilustrată în **Figura 6.16.** a implicat utilizarea a 4 concentrații de fragmente reale ADN corespunzătoare fragmentului HPV 18: 1 pM, 10 pM, 0.1 μM și 10 μM .

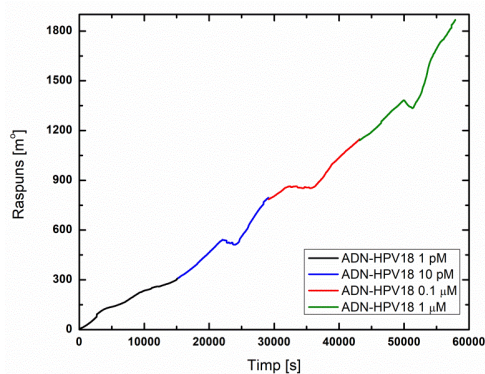


Figura 6.16. Curbele de hibridizare pentru concentrații variate de fragmente reale ADN corespunzătoare tulpinii HPV 18

Pentru cea mai diluată probă ADN (1 pM), s-a obținut pe o perioadă de 15000 s o deplasare maximă a unghiului de rezonanță de 331 m°, corespunzătoare 2,71 ng/ mm². Pentru cea de-a doua concentrație (10 pM), am obținut în 15000 s o deplasare a unghiului de 484 m° echivalentă cu 3,97 ng / mm² ADN țintă. Pentru a treia concentrație de ADN (0,1 μM), maximul a fost atins în 13000 s, cu o deplasare a unghiului de 513 m° corespunzătoare 4,2 ng/ mm² ADN hibridizat, iar pentru ultima probă (1 μM), au fost hibridizate 7 ng/ mm² ADN în 15000 s. Utilizând probe reale de ADN, am obținut rezultate bune de hibridizare, metoda SPR făcând posibilă detecția celor mai scăzute concentrații.

Cercetările viitoare vizează reducerea timpului de incubare a probelor HPV prin aplicarea amestecării continue și determinarea limitei de detecție a ADN hibridizat.

6.8. Caracterizări electrice pentru structuri test realizate pe substrat tip SOI

În acest studiu s-a investigat utilizarea configurației electrice Ψ-MOSFET pe substraturi de tip SOI pentru validarea unui nou concept de genosenzor. În acest context, s-a analizat impactul pe care îl joacă funcționalizarea cu APTES-GAD și cea cu GOPTMS asupra detecției electrice a ADN. Imobilizarea și hibridizarea secvențelor ADN corespunzătoare HPV au fost confirmate prin tehnica *microarray* și ținând cont de aceste rezultate, s-a ales procedura adecvată măsurărilor electrice I-V.

6.8.1. Procedura experimentală și de analiză grafică

Probele utilizate în detecția fluorescență și caracterizările electrice sunt prezentate în **Tabelul 6.7**.

Tabel 6.7. Secvențe ADN

Sonde corespunzătoare fragmentului genei L2 a tulpinii HPV 16	5'-NH ₂ -C6-TGGGAGGCCTTGTTCCCAATGGA-3'
Secvențe control (fără complementaritate)	5'-NH ₂ -C6-CTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGG-Cy3-3'
Secvențe-țintă (cu complementaritate față de secvența specifică genei L2)	5'-Cy5-TCCATTGGGAACAAGGCCTCCCA-3'
	5'-TCCATTGGGAACAAGGCCTCCCA-3'

Secvențele oligonucleotidice corespunzătoare fragmentului genei L2 a tulpinii HPV 16 au fost proiectate să conțină o modificare –NH₂ cu un spațiator din 6 atomi de carbon (C6) la capătul 5'. Eficiența reacției de imobilizare a fost verificată prin fluorescență utilizând sonde control (fără complementaritate față de ADN țintă), care conțin la capătul

5' o grupare $-C6-NH_2$ și la capătul 3' un fluorofor Cy3. Secvențele-țintă nemarcate fluorescent au fost utilizate pentru caracterizări electrice.

Datele *microarray* au fost extrase cu GenePix[®] Pro 7 și analizate în RStudio 1.0.136 (RStudio: Integrated development environment for R (Versiunea 1.0.136)) pentru R 3.4.0 (<https://www.R-project.org/>), graficele fiind generate cu pachetul ggplot2 (Wickham, 2009).

Parametrii electrice extrași au fost trasați folosind software-ul Origin Pro 8.5.

6.8.2. Caracterizări electrice pe suporturi de tip SOI funcționalizate cu APTES-GAD

Atașarea sondelor ADN pe substraturile de SOI cu APTES-GAD a fost confirmată prin spectroscopia de fluorescență a secvențelor control (**Figura 6.17.**).

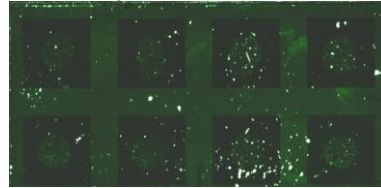


Figura 6.17. Fluorescența secvențelor control atașate de suportul modificat chimic

Insulele de Si au fost caracterizate electric prin măsurări I_D-V_G în configurația Ψ -MOSFET. O deplasare a curbei către tensiunile pozitive de poartă este de așteptat atunci când se adaugă sarcini negative pe suprafața tranzistorului, deoarece pentru a contrabalansa încărcarea negativă este necesar un potențial mai mare al porții. Acest lucru este valabil și invers.

Figura 6.18. prezintă caracteristicile I_D-V_G unde fiecare curbă corespunde unei etape de modificare chimică.

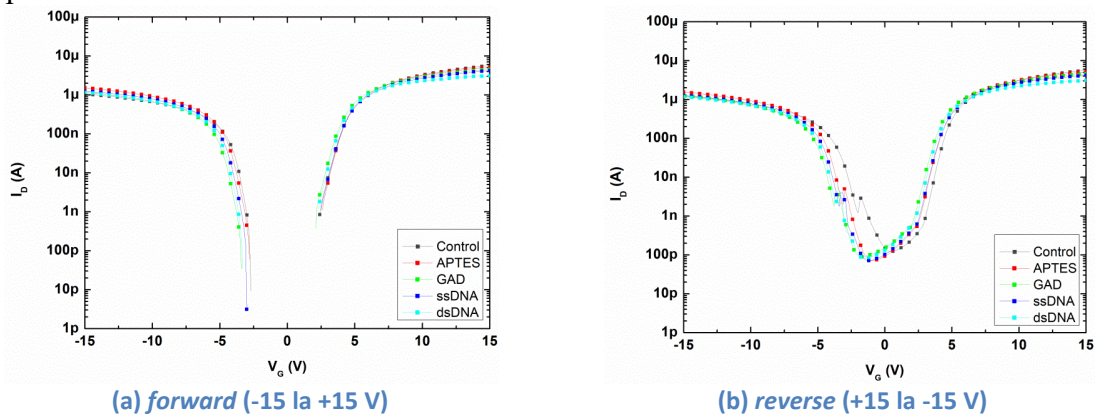


Figura 6.18. Caracteristici I_D-V_G după fiecare etapă de modificare chimică cu (a) variație crescătoare de la -15 la +15 V (*forward*) și (b) variație descrescătoare de la +15 la -15 V (*reverse*) ($T_{Si} = 70nm$, $T_{BOX} = 145nm$)

Curbele I_D-V_G sunt deplasate spre stânga după etapa de funcționalizare cu APTES (linia roșie), deoarece APTES-ul conferă sarcini +. O deplasare mai accentuată spre stânga este observată în urma funcționalizării cu GAD (linia verde). Modificarea chimică cu sonde ADN monocatenar (ssDNA) și hibridizarea (dsDNA) induce deplasări ale curbelor conforme cu încărcarea globală negativă a oligonucleotidelor.

6.8.3. Caracterizări electrice pe suporturi SOI funcționalizate cu GOPTMS hidrolizat

Atașarea ADN a fost verificată prin semnalul fluorescent al secvențelor control (**Figura 6.19.**).

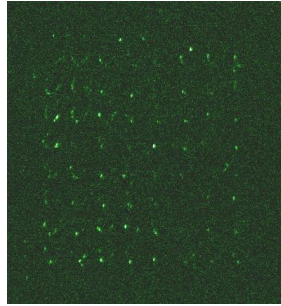


Figura 6.19. Imobilizarea secvențelor control de Si cu GOP-TMS hidrolizat

Primele teste efectuate indică o eficiență mai scăzută a reacției de imobilizare, fiind necesară optimizarea parametrilor de lucru pentru obținerea unor semnale fluorescente clar delimitate de semnalul de fundal. În schimb, rezultatele obținute pe substraturile SOI modificate cu GOP-TMS hidrolizat sunt promițătoare.

Curbele I_D - V_G corespunzătoare etapei de curățare a *chip*-urilor în soluție Piranha, etapei de funcționalizare cu GOP-TMS hidrolizat, imobilizării cu sonde ADN și hibridizării sunt prezentate în **Figura 6.20.**, luând ca referință caracteristicile inițiale ale două *biochip*-uri.

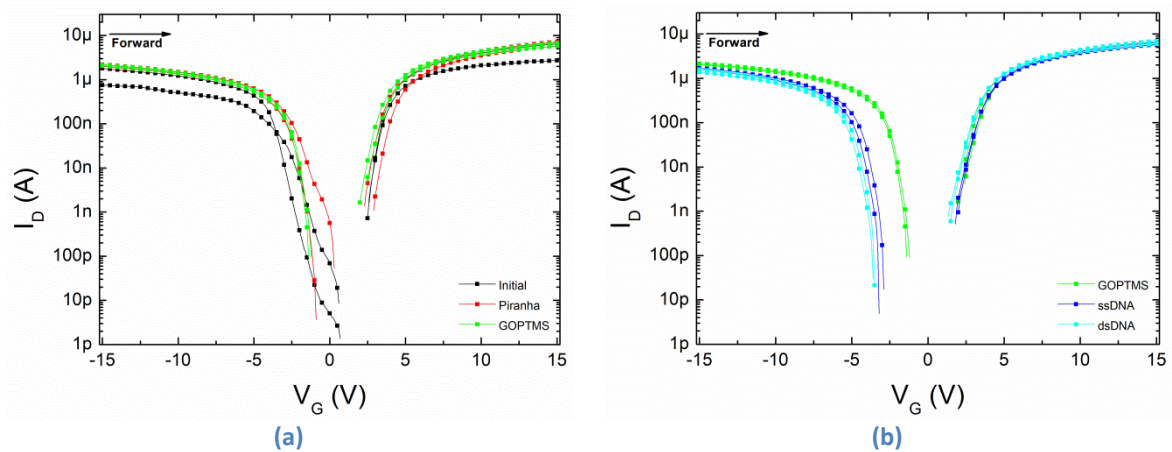


Figura 6.20. Caracteristici I_D - V_G după (a) etapa de curățare cu soluție Piranha, funcționalizarea cu GOP-TMS hidrolizat și (b) după etapele de funcționalizare, atașare sonde ADN și hibridizare în variație *forward* ($T_{Si} = 70\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

Se constată o diferențiere mai bună între caracteristicile I-V după fiecare etapă experimentală, însă, ca și în cazul funcționalizării cu APTES-GAD, se observă o deplasare a curbelor corespunzătoare ssDNA și dsDNA către tensiuni negative ale porții.

6.8.4. Caracterizări electrice pe platforme SOI funcționalizate cu GOP-TMS din stare de vapori

Au fost realizate testele de stabilitate a sondelor atașate prin verificarea semnalului fluorescent astfel că pierderea în intensitate a semnalului calculată a fost de 18,65%, înregistrându-se totodată o scădere a deviației standard după a doua spălare, datorată eliminării sondelor atașate nespecific. Diferența mică între semnalele de imobilizare este un indicator al atașării covalente a ADN de substraturile modificate cu GOP-TMS.

Experimentele de hibridizare cu concentrații finale de 10 μM , 1 μM , 0,5 μM și 0,1 μM ADN țintă specific HPV 16 sunt prezentate în **Figura 6.21.**

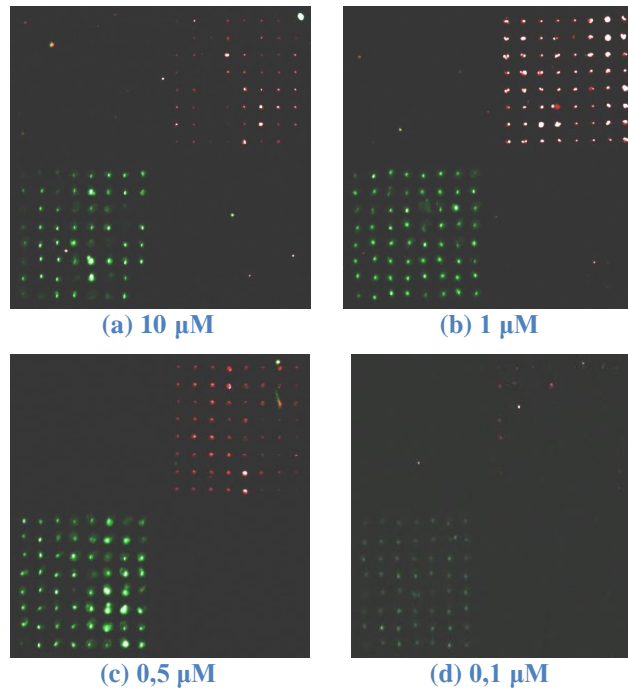


Figura 6.21. Semnalul fluorescent de hibridizare cu secvențe de concentrație

Analiza fluorescentă prezentată în **Figura 6.21** indică cel mai bun semnal corespunzător concentrației de 1 μM , urmată de concentrația de 0,5 μM . În cazul hibridizării cu concentrație de 10 μM , este posibil ca semnalul obținut să fie mai slab din cauza impedimentelor sterice. Analiza fluorescentă este completată de graficul prezentat în **Figura 6.22**, însoțit de elemente de statistică descriptivă.

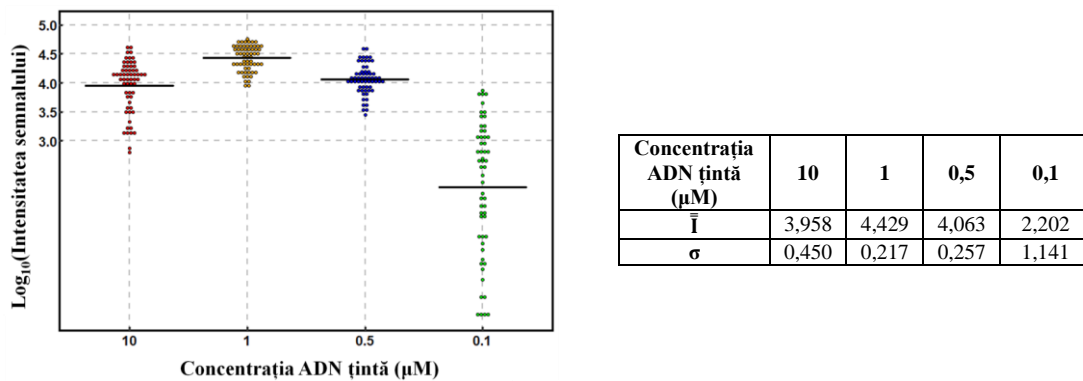


Figura 6.22. Analiza grafică a semnalelor fluorescente de hibridizare pentru patru concentrații ADN țintă

Observațiile din analiza imaginilor fluorescente sunt confirmate de analiza grafică, concentrația de 1 μM prezentând o medie a intensității semnalului de 4,429 și totodată o dispersie scăzută a datelor ($\sigma = 0,217$). Considerând rezultatele slabe de hibridizare cauzate de impedimentele sterice, concentrația de 10 μM am exclus-o din caracterizările electrice.

Prin tehnica microarray, am realizat un protocol îmbunătățit de imobilizare și hibridizare pe suporturi funcționalizate cu GOPTMS în vapori, ce poate fi aplicat și pentru detecția electrică.

Parametrii I_D - V_G extrași după fiecare etapă experimentală sunt prezentați în **Figura 6.23**.

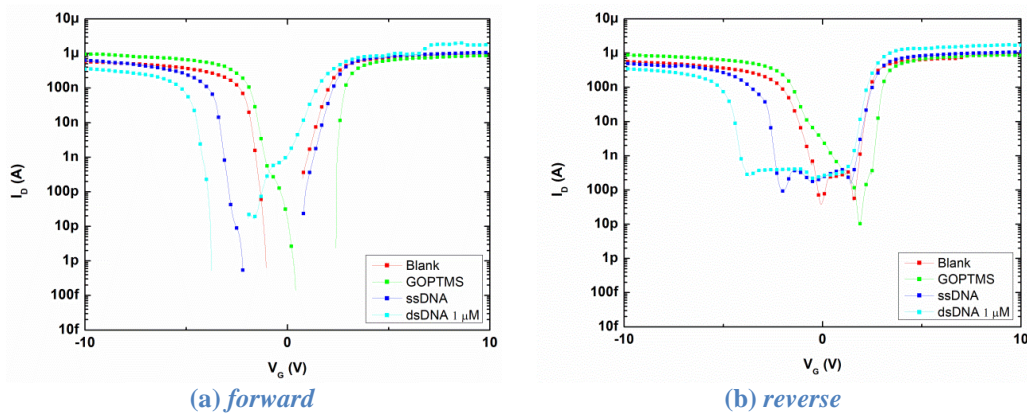


Figura 6.23. Caracteristici I_D - V_G după fiecare etapă experimentală, în variație *forward* și *reverse* ($T_{Si} = 86\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

Rezultatele experimentale sunt reproductibile pentru ambele tipuri de funcționare, în sensul că obținem aceleași tendințe de deplasare ale curbelor. Totuși, în cazul *GOPTMS în vapori*, decalajele obținute sunt mult mai pronunțate, ceea ce poate fi coroborat cu rezultatele *microarray* unde *spot*-urile se discern clar.

În Figura 6.24. sunt prezentate rezultatele I_D - V_G obținute pentru fiecare concentrație ADN țintă utilizată la hibridizare.

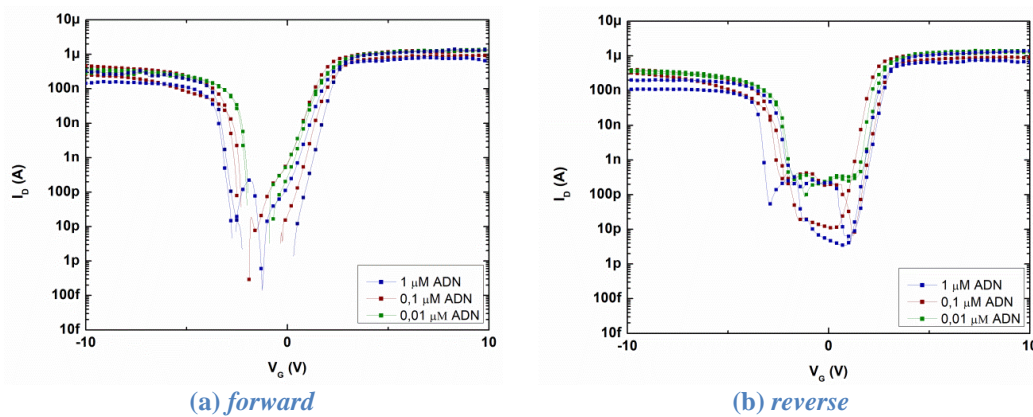


Figura 6.24. Caracteristici I_D - V_G pentru trei concentrații de ADN țintă, în variație (a) *forward* și (b) *reverse* ($T_{Si} = 86\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

În cazul hibridizării, constatăm că pe măsură ce creștem concentrația de ADN țintă, există aceeași tendință a curbelor de a se deplasa către tensiunea negativă de poartă. Presupunem că în cursul etapelor de atașare am indus sarcini pozitive pe suprafață, care au o densitate mai mare decât sarcinile negative. Sarcinile pozitive au provenit din soluțiile de imobilizare și hibridizare folosite, care au fost bogate în Na^+ ce au ecranat încărcarea globală negativă a moleculelor ADN. Este posibil ca după etapele de spălare, parte din ionii de Na^+ să fi rămas în continuare atașați electrostatic la nivelul moleculelor de oxigen din scheletul pentozo-fosfat.

Cap. 7. CONCLUZII

Activitatea de cercetare s-a concentrat pe *fabricarea și testarea unor noi suporturi microarray*, cu aplicabilitate în detecția fluorescentă a polimorfismelor specifice genelor *BRCA* și în genotiparea HPV. Am dezvoltat pe suporturi de siliciu nanostructurat, filme de aur pe sticlă și plachete de tip SOI, protocoale de lucru dedicate și metode alternative de detecție prin *rezonanța plasmonilor de suprafață* (SPR) și *caracterizări electrice* (Ψ -MOSFET) confirmate prin tehnica *microarray*.

Pentru nanostructurarea firelor de siliciu, s-au utilizat protocoale de corodare chimică a plachetelor cu rezistivități și orientări cristaline variate, în unul sau doi pași, cu nanoparticule de aur sau de argint, cu diferite concentrații de AgNO_3 și HF. ***Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru concentrația de 0,06 M AgNO_3 și 4,5 M HF, pe plachete de Si cu rezistivitatea de 1-3 Ω cm și orientarea cristalografică $\langle 100 \rangle$.*** Atașarea covalentă a sondelor ADN modificate chimic cu grupări NH_2 a fost posibilă după optimizarea parametrilor de funcționalizare a suporturilor. Eficiența metodei uzuale de funcționalizare în doi pași (cu APTES și glutaraldehydă) a fost confirmată prin *analiza FTIR a silanizării cu APTES în stare de vapori sau hidrolizat și a modificării chimice cu GAD*.

Filmele de aur cu grosimea de 50 nm *utilizate în experimente microarray și ca arie sensibilă în SPR* au fost depuse pe sticlă BK7 prin pulverizare catodică folosind ca strat de aderență 3 nm Cr. Datorită afinității grupărilor tiol (provenite de la sondele ADN modificate chimic) pentru suprafața de Au, nu a fost necesară funcționalizarea suprafeței, atașarea ADN realizându-se direct prin formarea de monostraturi autoasamblate.

Ariile sensibile de 5 mm² destinate caracterizărilor electrice *au fost definite pe plachetele de tip SOI prin litografie și corodare chimică*. Pentru funcționalizarea substraturilor nanoconfigurate și de tip SOI, am utilizat protocolul de funcționalizare cu 2,5% APTES hidrolizat, 2h, urmat de tratament termic de 30 min la 110 °C și glutaraldehydă cu concentrația de 5% și 4 h de incubare, pentru creșterea numărului de grupări aldehidice expuse pe suprafață. ***Funcționalizarea nanofirelor de siliciu a crescut unghiul de contact de la 20,46° (Si brut) la 80,64°.***

Am implementat noi protocoale de funcționalizare într-un singur pas cu filme subțiri de SU-8 și GOTPMS, similare cu cea pe bază de APTES. Acoperirea uniformă cu SU-8 a fost demonstrată morfologic de caracterizarea SEM, în timp ce analiza EDX a confirmat prezența elementelor specifice acestui polimer. ***Unghiul de contact măsurat pe nanofirele modificate cu SU-8 a indicat hidrofobicitatea suprafeței (102,6°).*** Întrucât principiul de silanizare este același cu cel de la APTES, același protocoale de lucru au fost aplicate și pentru funcționalizarea cu GOPTMS din vapori. ***Unghiul de contact a crescut în acest caz la valoarea de 77,4°*** față de Si martor, datorită grupărilor epoxidice și metil.

Pe lângă eficiența funcționalizării, calitatea reacției de atașare a sondelor depinde și de utilizarea unei soluții de imobilizare cu pH și tărie ionică adecvate. ***Utilizând soluția de Na_2HPO_4 cu concentrație 200 mM și pH 8,5 pe suporturi comerciale de sticlă, am obținut spot-uri uniforme cu intensitate mare a semnalului de hibridizare. Am demonstrat stabilitatea specificității de detecție după 21 de zile de stocare.*** Pe baza acestor rezultate preliminare, am utilizat exclusiv Na_2HPO_4 ca soluție de imobilizare în studiile ce au implicat suporturile nanostructurate și de tip SOI.

Optimizând anterior parametrii de funcționalizare, imobilizare și hibridizare, ***am studiat pe siliciu nanostructurat modificat cu APTES-GAD sau SU-8 capacitatea de detecție a polimorfismelor uninucleotidice stabile, specifice BRCA1.*** Distribuția uniformă a sondelor pe suport a crescut eficiența hibridizării și specificitatea de detectare a

neconcordanțelor uninucleotidice. Analizele statistice efectuate pe 320 replici tehnice/ tip de sondă au indicat că ***acoperirea uniformă cu SU-8 a substratului de SiNWs îmbunătățește semnificativ reproductibilitatea procesului de hibridizare față de suporturile comerciale și nanofirele de Si modificate cu grupări aldehidice.*** În mod unic, abordarea statistică cuprinzătoare a evidențiat că ***sondele legate pe platformele SU-8/SiNW se stabilizează în timp***, prin coeficientul de variație de 2,8% calculat după 21 de zile. Capacitatea noului suport *microarray* de a permite ***detecția nepotrivilor uninucleotidice foarte stabile a fost remarcabilă***, cu niveluri de semnificație între diferitele tipuri de sonde ADN hibridizate de *** $p < 0,0001$, chiar și după o perioadă lungă de depozitare. Astfel, am demonstrat că utilizarea unei arhitecturi 3D pe bază de Si și a unui proces de modificare simplificată a suprafeței cu grupări epoxidice corespund unei soluții fiabile și necostisitoare de discriminare între cele mai stabile SNP-uri corespunzătoare *BRCA1*.

Clonarea secvențelor ADN a fost confirmată prin electroforeză în gel de agaroză. ***Eficiența imobilizării și hibridizării ADN pe suport pe Au a fost validată prin tehnica microarray cu analiza statistică dedicată, urmată de analiza în timp real prin SPR a imobilizării și a hibridizării cu concentrații diferite de probă reală, pentru determinarea limitei de detecție și a cantității hibridizate de probă corespunzătoare fragmentelor reale ADN-HPV. Cele mai bune intensități ale semnalului au fost obținute prin atașarea sau coatașarea cu mercaptohexanol în raport de 1:1 C_{ADN}/C_{MCH} și 1:2 C_{ADN}/C_{MCH} . Cel mai bun semnal mediu de hibridizare (4,005) a fost oferit de sondele cu spațiator de 6 atomi de carbon atașate fără mercaptohexanol. O intensitate mai scăzută a hibridizării – 3,618 – a fost obținută prin coatașarea ADN cu mercaptohexanol, datorită dislocuirii sondelor atașate nespecific. Studiile SPR au demonstrat atașarea rapidă și specifică prin amestecare continuă a soluției, fiind imobilizate 4,71 ng/mm² sonde ADN. Am detectat prin SPR concentrații de 1 pM probă ADN reală, corespunzătoare fragmentului de genă E1 a tulpinii HPV 18.***

Un nou concept de biosenzor a fost validat prin utilizarea configurației electrice Ψ -MOSFET pe substraturi de tip SOI funcționalizate cu APTES-GAD și cu GOPTMS. Imobilizarea și hibridizarea secvențelor ADN corespunzătoare fragmentului genei L2 a tulpinii HPV 16 au fost confirmate prin tehnica *microarray*, ***cele mai bune rezultate fiind obținute pe suporturile funcționalizate cu GOPTMS în vapori.*** Caracterizările electrice au relevat tendința de deplasare a curbilor către potențialul negativ de poartă, probabil datorită sarcinilor pozitive provenite din soluțiile de imobilizare și hibridizare care au conținut Na^+ atașat de moleculele de oxigen din scheletul pentozo-fosfat.

7.1. Contribuții originale

- optimizarea protocolului de nanostructurare a substratului de Si prin metoda 1-MACE;
- funcționalizările cu APTES/GAD, SU-8 și GOPTMS pe substraturi de Si, SiNWs și SOI;
- interpretarea datelor FTIR achiziționate pentru APTES/GAD pe martor de Si;
- efectuarea măsurătorilor de unghi de contact și interpretarea rezultatelor;
- elaborarea metodelor de imobilizare și hibridizare pe suporturi de sticlă, Si, SiNWs, SOI și pe filme de Au;
- detecția fluorescentă, extragerea datelor, analiza și interpretarea lor;
- Software-uri utilizate: Origin Pro, Rstudio, GIMP, OPUS 7.5 Pachet office, ChemSketch.

Toate reprezentările grafice, schemele și imaginile utilizate sunt originale, cu excepția celor prelucrate din literatură sau articolele personale și marcate în consecință.

7.2. Activitatea de cercetare

• Participarea la realizarea unor proiecte de cercetare

1. “*Metode noi de monitorizare a sarcinii și diagnostic prenatal*” – CCCDI-UEFISCDI, proiect PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0820, în cadrul PNCDI III - director Monica Simion (2018-2021).

2. “*Senzor ADN pe substrat tip SOI- BIS-SOI/ DNA Biosensing with Silicon-on-Insulator Substrates-BIS-SOI*” - proiect PN-III P3-3.1-PM-EN-FR-2016 - director Monica Simion (2016-2018).

3. “*Nanomateriale și nanotehnologii avansate pentru aplicații în biodetecție opto-electronică*” – proiect nucleu TEHNologii generice esențiale pentru priorități ale SPECializării inteligente (TEHNOSPEC) – director Monica Simion (2016-2017).

• Proiecte în cadrul cărora am desfășurat activitatea de cercetare

1. “*Senzor ADN pe substrat tip SOI- BIS-SOI/ DNA Biosensing with Silicon-on-Insulator Substrates-BIS-SOI*” - proiect PN-III P3-3.1-PM-EN-FR-2016 - director Monica Simion (2016-2018);

- Autor fază proiect 2017;

- Etape experimentale: funcționalizarea SOI prin metode ce nu inhibă răspunsul electric, imobilizarea și hibridizarea selectivă a ariilor active prin realizarea unei matrici din PDMS.

2. “*Multiplexed platform for HPV genotyping – MultiplexGen*” – proiect PNII-PCCA coordonator IMT, director Mihaela Kusko (2014-2017);

- Coautor fază proiect 2014-2017;

- Etape experimentale: controlarea parametrilor de imobilizare (tip de buffer, timp de incubare, concentrație), hibridizare, analiza statistică a datelor;

- Amplificarea tulpinilor HPV și clonarea acestora în celule competente de *E. coli*; tăierea fragmentelor clonate cu enzime de restricție și evaluarea fragmentelor prin electroforeză în gel de agaroză.

3. “*Nanomateriale și nanotehnologii avansate pentru aplicații în biodetecție opto-electronică*” – proiect nucleu TEHNologii generice esențiale pentru priorități ale SPECializării inteligente (TEHNOSPEC) – director Monica Simion (2016-2017);

- Pregătirea suprafețelor nanostructurate de Si (SiNWs) prin corodare chimică;

- Pregătirea structurilor-test și funcționalizarea selectivă.

4. “*Identification of new modulators of calcium-regulated processes using genomic and chemogenomic screens in yeast – CalChemGen*” – proiect PNII- PCCA – coordonator Univesitatea Bucuresti, resp. IMT Monica Simion (2014-2017);

- Pregătire medii de cultură;

- Creștere culturi *Saccharomyces cerevisiae* pe medii cu Ag, Cu.

5. “*Array structures for prevention, individualized diagnosis and treatment in cancers with high risk of incidence and mortality - HRCArrays*” – proiect PNII- PCCA, coordonator Institutul de Oncologie Bucuresti, resp. IMT Adina Bragaru/Monica Simion (2012-2016).

- Pregătirea substraturilor nanostructurate de Si (SiNWs) prin corodare chimică;

- Analiza performanței de detecție a SNP-urilor în cadrul genei *BRCA1* pe biochip-ul nanostructurat.

•**Activitate didactică**

Curs și laborator dedicat studenților din cadrul Programului de Master de “Electronică și Informatică Medicală” (EIM) al Facultății de Electronică, Telecomunicații și Tehnologia Informației a Universității Politehnica din București.

7.3. Perspective de dezvoltare ulterioară

În experimentele ulterioare, vor fi utilizate probe ADN reale, ca ultim pas în demonstrarea obținerii unui instrument precis de diagnosticare pe suporturi de siliciu nanostructurat acoperite cu SU-8. Pentru detecția SPR, vor fi utilizate pe viitor fragmente ADN aparținând mai multor tulpini HPV și va fi investigată sensibilitatea și specificitatea de detecție. Pe viitor va fi determinată limita de detecție și specificitatea metodei Ψ -MOSFET.

Bibliografie

- Allawi H.T., SantaLucia J., 1998, Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G•A mismatches in DNA, *Biochemistry*, vol. 37, p. 2170–2179.
- Arron S.T., Skewes-Cox P., Do P.H., Dybbro E., Da Costa M., Palefsky J.M., Derisi J.L., Hughes H., Chase C., 2011, Validation of a diagnostic microarray for human papillomavirus: Coverage of 102 genotypes, *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2011, p. 1-6.
- Ba M., González-Pedro V., Barrios C.A., Puchades R., Maquieira Á., 2010, Selective chemical modification of silicon nitride / silicon oxide nanostructures to develop label-free biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 25, p. 1460–1466.
- Banu M., Simion M., Ratiu A.C., Popescu M., Romanitan C., Danila M., Radoi A., Ecovoiu A.A., Kusko M., 2015, Enhanced nucleotide mismatch detection based on a 3D silicon nanowire microarray, *RSC Advances*, vol. 5, p. 74506–74514.
- Banu M., Simion M., Popescu M.C., Varasteanu P., Kusko M., Farcasanu I.C., 2018, Specific detection of stable single nucleobase mismatch using SU-8 coated silicon nanowires platform, *Talanta*, vol. 185, p. 281–290.
- Bhat R.R., Fischer D.A., Genzer J., 2002, Fabricating planar nanoparticle assemblies with number density gradients, *Langmuir*, vol. 18, p. 5640–5643.
- Blainey P., Krzywinski M., Altman N., 2014, Points of significance: replication, *Nature Methods*, vol. 11, p. 879–880.
- Brown T., Hunter W.N., Kneale G., Kennard O., 1986, Molecular structure of the G.A base pair in DNA and its implications for the mechanism of transversion mutations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, p. 2402–2406.
- Chandradoss S.D., Haagsma A.C., Lee Y.K., Hwang J.H., Nam J.M., Joo C., 2014, Surface passivation for single-molecule protein studies, *Journal of Visualised Experiments*, vol. 86, p. 4–11.
- Coffinier Y., Boukherroub R., 2014, Surface modification of semiconducting silicon nanowires for biosensing applications, în *Semiconducting Silicon Nanowires for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing Limited, p. 26-61, ISBN 978-0-85709-771-2.
- Colinge J.P., 1997, Capitolul 3: SOI Materials Characterization, în *Silicon-on-Insulator Technology: Materials to VLSI*, Springer Science and Business Media, p. 66-103, ISBN 978-1-4757-2613-8.
- Conzone S.D., Pantano C.G., 2004, Glass slides to DNA microarrays, *Materials Today*, vol. 7, p. 20–26.
- Coombs S.G., Khodjanizyazova S., Bright F.V., 2018, Exploiting the 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) autocatalytic nature to create bioconjugated microarrays on hydrogen-passivated porous silicon, *Talanta*, vol. 177, p. 26–33.
- Cristoloveanu S., Li S., 1995, Electrical characterization of silicon-on-insulator materials and devices, Ed. Tuller H.L. în *The Springer International Series in Engineering and Computer Science Series*, vol. 305, Springer Science & Business Media, p. 1-5, ISBN 978-1-4613-5945-6.
- Cristoloveanu S., Williams S., 1992, Point-contact pseudo-MOSFET for in-situ characterization of as-grown silicon-on-insulator wafers, *IEEE Electron Device Letters*, vol. 13, p. 102-104.
- Dawood M.K., Tripathy S., Dolmanan S.B., Ng T.H., Tan H., Lam J., 2012a, Influence of catalytic gold and silver metal nanoparticles on structural, optical, and vibrational properties of silicon nanowires synthesized by metal-assisted chemical etching, *Journal of Applied Physics*, vol. 112, p. 1-8.
- Deepu A., Sai V.V.R., Mukherji S., 2009, Simple surface modification techniques for immobilization of biomolecules on SU-8, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 20, p. 25–28.
- DeSantis C.E., Bray F., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Anderson B.O., Jemal A., 2015, International variation in female breast cancer incidence and mortality rates, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 24, p. 1495–1506.
- Dietrich R., Haines D., Redkar R., Rees A., 2009, Capitolul 6: The Role of Substrates in Microarray Experimentation and How to Choose the Correct Coating for Microarraying, Ed. Hardiman G. în *Microarray Innovations: Technology and Experimentation*, CRC Press Taylor & Francis Group, p. 53-69, ISBN: 978-1-4200-9448-0.
- Draghici S., 2003, Multiple comparisons, în *Data analysis tools for DNA microarrays*, Chapman and Hall/CRC Mathematical Biology and Medicine Series, Boca Raton, Florida, ISBN 9781584883159.
- Dufva M., Petronis S., Jensen L.B., Krag C., Christensen C.B.V., 2004, Characterization of an inexpensive, nontoxic, and highly sensitive microarray substrate, *Biotechniques*, vol. 37, p. 286–296.
- Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F., 2013, International Agency for Research on Cancer; Lyon, France: 2013. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

23. Fiorilli S., P. Rivolo, E. Descrovi, C. Ricciardi, L. Pasquardini, L. Lunelli, L. Vanzetti, C. Pederzoli, B. Onida, Garrone E., 2008, Vapor-phase self-assembled monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 321, p. 235–241.
24. Foglia M.L., Camporotondi D.E., Alvarez G.S., Heinemann S., Hanke T., Perez C.J., Diaz L.E., Desimone M.F., 2013, A new method for the preparation of biocompatible silica coated-collagen hydrogels, *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, p. 6283–6290.
25. Foulkes W.D., 2014, BRCA1 and BRCA2 - update and implications on the genetics of breast cancer: A clinical perspective, *Clinical Genetics*, vol. 85, p. 1–4.
26. Gengfeng Z., Xu M., 2014, Growth and characterization of semiconducting silicon nanowires for biomedical applications, în *Semiconducting Silicon Nanowires for Biomedical Applications*, Woodhead Publishing Limited, p. 8-25, ISBN: 9780857097712.
27. Goddard J.M., Erickson D., 2009, Bioconjugation techniques for microfluidic biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, p. 469–479.
28. Gouda A.M., Allam N.K., Swillam M.A., 2017, Efficient fabrication methodology of wide angle black silicon for energy harvesting applications, *RSC Advances*, vol. 7, p. 26974–26982.
29. Guo Z., Jung J.Y., Zhou K., Xiao Y., Jee S., Moiz S.A., Lee J.H., 2010, Optical properties of silicon nanowires array fabricated by metal-assisted electroless etching, *New Journal of Physics*, vol. 7772, p.1 77721C–1–77721C–7.
30. Hakkinen H., 2012, The gold-sulfur interface at the nanoscale, *Nature Chemistry*, vol. 4, p. 443–455.
31. Halliwell C., Cass A., 2001, A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces, *Analytical Chemistry*, vol. 73, p. 2476–2483.
32. Han H., Kim J., Shin H.S., Song J.Y., Lee W., 2012, Air-bridged ohmic contact on vertically aligned Si nanowire arrays: Application to molecule sensors, *Advanced Materials*, vol. 24, p. 2284–2288.
33. Han Y., Mayer D., Offenhäusser A., Ingebrandt S., 2006, Surface activation of thin silicon oxides by wet cleaning and silanization, *Thin Solid Films*, vol. 510, p. 175–180.
34. Hanahan D., Weinberg R.A., Francisco S., 2000, The hallmarks of cancer review, *University of California at San Francisco*, vol. 100, p. 57–70.
35. He Z., Zhou J., 2008, Empirical evaluation of a new method for calculating signal-to-noise ratio for microarray data analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, p. 2957–2966.
36. Hee H., Huang Z., Lee W., 2014, Metal-assisted chemical etching of silicon and nanotechnology applications, *Nano Today*, vol. 9, p. 271–304.
37. Heise C., Bier F.F., 2006, Immobilization of DNA on microarrays, Ed. Wittmann C. în *Immobilisation of DNA on Chips II*, Topics in Current Chemistry, Springer-Verlag, p. 1-25, ISBN-10 3-540-28436-2.
38. Hinds P.W., Weinberg R.A., 1994, Tumor suppressor genes, *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 4, p. 135–141.
39. Hong H., Hong Q., Liu J., Tong W., Shi L., 2013, Estimating relative noise to signal in DNA microarray data, *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*, vo. 9, p. 433-448.
40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>
41. <https://www.R-project.org>
42. Huang Z., Zhang X., Reiche M., Liu L., Lee W., 2008, Extended arrays of vertically aligned sub-10 nm diameter [100] Si nanowires by metal-assisted chemical etching, *Nano Letters*, vol. 8, p. 3046–3051.
43. Ikuta S., Takagi K., Wallace R.B., Itakura K., 1987, Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs, *Nucleic Acids Research*, vol. 15, p. 797–811.
44. Joshi M., Kale N., Lal R., Rao V.R., Mukherji S., 2007, A novel dry method for surface modification of SU-8 for immobilization of biomolecules in Bio-MEMS, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, p. 2429–2435.
45. Karami F., Mehdipour P., 2013, A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer, *Biomed Research International*, vol. 2013, p. 1-21.
46. Kim D., Herr A.E., 2013, Protein immobilization techniques for microfluidic assays, *Biomicrofluidics*, vol. 7, p. 1–47.
47. Klaassen H.W., Prinsen C.F.M., De Valk H.A., Horrevorts A.M., Jeunink M.A.F., Thunnissen F.B.J.M., 2004, DNA microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42 p. 2152–2160.
48. Knudson A.G., 1971, Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 68, p. 820–823.
49. Knudson A.G., 1971, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, vol 68, p. 820-823.
50. Li X., Bohn P.W., 2000, Metal-assisted chemical etching in HF/H₂O₂ produces porous silicon, *Applied Physics Letters*, vol. 77, p. 2572-2574.

51. Li Y., Zon G., Wilson W.D., 1991, NMR and molecular modeling evidence for a G A mismatch base pair in a purine-rich DNA duplex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, p. 26–30.
52. Lilyquist J., Ruddy K.J., Vachon C.M., Couch F.J., 2018, Common genetic variation and breast cancer risk - past, present, and future, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, doi:10.1158/1055-9965.EPI-17-1144.
53. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., 2000. DNA Cloning with Plasmid Vectors. În: *Molecular cell biology*. 4th edition. Ed. Freeman W.H.; Betesda.
54. Lu C., Xie M., Wendl M.C., Wang J., McLellan M.D., Leiserson M.D.M., Huang K.L., Wyczalkowski M.A., Jayasinghe R., Banerjee T., Ning J., Tripathi P., Zhang Q., Niu B., Ye K., Schmidt H.K., Fulton R.S., McMichael J.F., Batra P., Kandoth C., Bharadwaj M., Koboldt D.C., Miller C.A., Kanchi K.L., Eldred J.M., Larson D.E., Welch J.S., You M., Ozenberger B.A., Govindan R., Walter M.J., Ellis M.J., Mardis E.R., Graubert T.A., Dpersio J.F., Ley T.J., Wilson R.K., Goodfellow P.J., Raphael B.J., Chen F., Johnson K.J., Parvin J.D., Ding L., 2015, Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types, *Nature Communications*, vol. 6, p. 1–13.
55. Luderer F., Walschus U., 2005, Immobilization of oligonucleotides for biochemical sensing by self-assembled monolayers: thiol-organic bonding on gold and silanization on silica Surfaces, *Topics in Current Chemistry*, vol. 260, p. 37-56.
56. Luzinov I., Julthongpiput D., Liebmann-Vinson A., Cregger T., Foster M.D., Tsukruk V. V., 2000, Epoxy-terminated self-assembled monolayers : molecular glues for polymer layers, *Langmuir*, vol. 16, p. 504–516.
57. Mahdi K.M., Nassiri M.R., Nasiri K., 2013, Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 14, p. 3403–3409.
58. Majoul N., Aouida S., Bessaïs B., 2015, Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations, *Applied Surface Science*, vol. 331, p. 388– 391.
59. Manel A.L., Nafie N., Bouaicha M., 2012, The Dual Role of Silver during Silicon Etching in HF Solution, *Nanoscale Research Letters*, vol. 7, p. 1-5.
60. Marie R., Schmid S., Johansson A., Ejsing L., Nordstrom M., Hafliger D., Christensen C.B.V., Boisen A., Dufva M., 2006, Immobilisation of DNA to polymerised SU-8 photoresist, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, p. 1327–1332.
61. Mavaddat N., Antoniou A.C., Easton D.F., Garcia-Closas M., 2010, Genetic susceptibility to breast cancer, *Molecular Oncology*, vol. 4, p. 174-191.
62. McNaught A.D., Wilkinson A., 1997, IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford, ISBN 0-9678550-9-8.
63. Mehrotra P., 2016, Biosensors and their applications – A review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, p. 1–7.
64. Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C., 2004, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, vol. 37, p. 790–802.
65. Mikhael B., Elise B., Xavier M., Sebastian S., Johann M., Laetitia P., 2011, New silicon architectures by gold-assisted chemical etching, *Applied Materials and Interfaces*, vol. 3, p. 3866–3873.
66. Monošík R., Stred'anský M., Šturdík E., 2012, Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, p. 109–120.
67. Moody C.A., Laimins L.A., 2010, Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature Reviews in Cancer*, vol. 10, p. 550–560.
68. Nichkalo S., Druzhinin A., Evtukh A., Bratus O., Steblova O., 2017, Silicon nanostructures produced by modified MacEtch method for antireflective Si surface, *Nanoscale Research Letters*, vol. 12, p. 1-6.
69. Nikolic G., Zlatkovic S., Cakic M., Cakic S., Lacnjevac C., Rajic Z., 2010, Fast fourier transform IR characterization of epoxy GY systems crosslinked with aliphatic and cycloaliphatic EH polyamine adducts, *Sensors*, vol. 10, p.684-696.
70. Nimse S.B., Song K., Sonawane M.D., Sayyed D.R., Kim T., 2014, Immobilization techniques for microarray: challenges and applications, *Sensors*, vol. 14, p. 22208-22229.
71. Nishiwaki M., Yamamoto T., Tone S., Murai T., Ohkawara T., Matsunami T., Koizumi M., Takagi Y., Yamaguchi J., Kondo N., Nishihira J., Horikawa T., Yoshiki T., 2008, Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, p. 1161–1168.
72. Oillic C., Mur P., Blanquet E., Delapierre G., Vinet F., Billon T., 2007, DNA microarrays on silicon nanostructures: optimization of the multilayer stack for fluorescence detection, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, p. 2086–2092.

73. Oliverio M., Perotto S., Messina G.C., Lovato L., De Angelis F., 2017, Chemical functionalization of plasmonic surface biosensors: a tutorial review on issues, strategies and costs, *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 9, p. 29394–29411.
74. Pavlovic E., Quist A.P., Gelius U., Oscarsson S., 2002, Surface functionalization of silicon oxide at room temperature and atmospheric pressure, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 1, p. 200–203.
75. Pilato B., Martinucci M., Danza K., Pinto R., Petriella D., Lacalamita R., Bruno M., Lambo R., D'Amico C., Paradiso A., Tommasi S., 2011, Mutations and polymorphic BRCA variants transmission in breast cancer familial members, *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 125, p. 651–657.
76. Rajasekaran R., Sudandiradoss C., Doss C.G.P., Sethumadhavan R., 2007, Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene, *Genomics*, vol. 90, p. 447–452.
77. Rashid J.I.A., Yusof N.A., 2017, The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review, *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 16, p. 19–31.
78. Robin C.J., Vishnoi A., Jonnalagadda K.N., 2014, Mechanical behavior and anisotropy of spin-coated SU-8 thin films for MEMS, *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 23, p. 168–180.
79. Romanowicz H., Strapagiel D., Słomka M., 2016, New single nucleotide polymorphisms (SNPs) in homologous recombination repair genes detected by microarray analysis in Polish breast cancer patients, *Clinical and Experimental Medicine*, vol. 17, p. 541–546.
80. RStudio: Integrated development environment for R (Version 1.0.136) [Computer software]. Boston, MA.
81. Russell S., Meadows L., Russell R., 2008, Capitolul 3: Designing and producing microarray, în *Microarray technology in practice*, Elsevier, p. 36–70, ISBN: 978-0-12-372516-5.
82. Sadow S.E., 2016, Capitolul 9: SiC nanowire-based transistors for electrical DNA detection, în *Silicon carbide biotechnology: A biocompatible semiconductor for advanced biomedical devices and applications*, Elsevier, USA, p. 261–306, ISBN: 978-0-12-802993-0.
83. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J., 2008, DNA biosensors and microarrays, *Chemical Reviews*, vol. 108, p. 109–139.
84. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J., 2008, DNA biosensors and microarrays, *Chemical Reviews*, vol. 108, p. 109–139.
85. Schrenzel J., Kostic T., Bodrossy L., Francois P., 2009, Introduction to microarray-based detection methods. Ed. Kostic T., Butaye P., Schrenzel J. în *Detection of highly dangerous pathogens: microarray methods for BSL 3 and BSL 4 agents*, John Wiley & Sons, p. 1–34, ISBN: 978-3-527-32275-6.
86. Shaoyuan L., Ma W., Zhou Y., Chen X., Xiao Y., Ma M., Wei F., Yang X., 2014, Fabrication of p-type porous silicon nanowire with oxidized silicon substrate through one-step MACE, *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 213, p. 242–249.
87. Simion M., Ruta L.L., Matache M., Kleps I., Miu M., Paraschivescu C.C., Bragaru A., Ignat T., 2010, Study of CRP immobilization on nanostructured silicon, *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, vol. 169, p. 67–72.
88. Singh P., 2014, *Surface Plasmon Resonance*, Nova Science Publishers, p. 13–16, ISBN: 978-1-63321-866-6.
89. Sonawane M.D., Nimse S.B., 2016, Surface modification chemistries of materials used in diagnostic platforms with biomolecules, *Journal of Chemistry*, vol. 2016, p. 1–19.
90. Song X., Zhai J., Wang Y., Jiang L., 2006, Self-assembly of amino-functionalized monolayers on silicon surfaces and preparation of superhydrophobic surfaces based on alkanolic acid dual layers and surface roughening, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 298, p. 267–273.
91. Stropoli S.J., Elrod M.J., 2015, Assessing the potential for the reactions of epoxides with amines on secondary organic aerosol particles, *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 119, p. 10181–10189.
92. Sun W., Yang J., 2010, Functional mechanisms for human tumor suppressors, *Journal of Cancer*, vol. 1, p. 136–140.
93. Tao F., Zhu Y., Bernasek S., 2012, *Functionalization of Semiconductor Surfaces*, John Wiley & Sons, p. 1–10, ISBN 978-0-470-56294-9.
94. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A., 2015, Global cancer statistics, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 65, p. 87–108.
95. Tudos A.J., Schasfoort R.B.M., 2008 Introduction to surface plasmon resonance, Ed. Schasfoort R.B.M. și Tudos A.J. în *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Publishing, p. 1–14, ISBN: 978-0-85404-267-8 A.
96. Vandenberg E.T., Bertilsson L., Liedberg B., Uvdal K., Erlandsson R., Elwing H., Lundström I., 1991, Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 147, p. 103–118.

97. Venet D., Detours V., Bersini H., 2012, A measure of the signal-to-noise ratio of microarray samples and studies using gene correlations, *PLoS One*, vol. 7, p. 1–9.
98. Wei T., Pearson M.N., Armstrong K., Blohm D., Liu J., 2012, Analysis of crucial factors resulting in microarray hybridization failure, *Molecular Biosystems*, vol. 8, p. 1325–1338.
99. Williams S., Davies P., Bowen J., Allender C., 2013, Controlling the nanoscale patterning of AuNPs on silicon surfaces, *Nanomaterials*, vol. 3, p. 192–203.
100. Wickham H., 2009, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
101. Xiaoyan S., Zhai J., Wang Y., Jiang L., 2006, Self-assembly of amino-functionalized monolayers on silicon surfaces and preparation of superhydrophobic surfaces based on alkanolic acid dual layers and surface roughening, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 298, p. 267–273.
102. Yangyang Q., Wang Z., Zhang M., Wang X., Ji A., Yang F., 2014, Electron transport characteristics of silicon nanowires by metal-assisted chemical etching, *AIP Advances*, vol. 4, p. 1-6.
103. Zaravinos A., Mammias N.I., Sourvinos G., Spandidos A.D., 2009, Molecular detection methods of human papillomavirus. *The International Journal of Biological Markers*, vol. 24, p. 215-222.
104. Zhang F., Srinivasan M.P., 2004, Self-assembled molecular films of aminosilanes and their immobilization capacities, *Langmuir*, vol. 20, p. 2309–2314.
105. Zhang C., Li S., Ma W., Ding Z., Wan X., Yang J., Chen Z., Zou Y., Qiu J., 2017, Fabrication of ultra-low antireflection SiNWs arrays from mc-Si using one step MACE, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, vol. 28, p. 1–9.
106. Zhu M., Lerum M.Z., Chen W., 2012, How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica, *Langmuir*, vol. 28, p. 416–423.

Lucrări publicate în timpul programului doctoral

Articole publicate în reviste cotate ISI

1. **M. Banu**, M. Simion, M.C. Popescu, P. Varasteanu, M. Kusko, I.C. Farcasanu, “*Specific detection of stable single nucleobase mismatch using SU-8 coated silicon nanowires platform*”, **Talanta**, 185, 281-290, 2018, [IF: 4.162 / AI: 0.76].
2. M.C. Popescu, B.I. Bită, V. Tucureanu, D. Vasilache, **M.A. Banu**, A.M. Avram, R.A. Giurescu Dumitrescu, „*Superficial and inner examination of a microwave-irradiated dental acrylic resin and its metal-polymer interface*”, **Microscopy and Microanalysis**, 24(1), 49-59, 2018. [IF: 1.891 / AI: 0.8].
3. **M. Banu**, M. Simion, P. Varasteanu, L. Savu, I. Farcasanu, “*Microarray and Surface Plasmon Resonance experiments for HPV genotyping on Au-supports*”, **Romanian Journal of Information Science and Technology**, 20, 426–439, 2017 [IF: 0.422 / AI: 0.1].
4. **M. Banu**, M. Simion, M. Kusko, I.C. Farcasanu, “*Statistical investigations on the effects of immobilisation buffer in SNP microarray*”, **Revista de Chimie**, acceptată spre publicare în ediția Nov 2018 [IF: 1.23 / AI: 0.06].
5. L.L. Ruta, **M. Banu**, A.D. Neagoe, R. Kissen, A.M. Bones, I.C. Farcasanu, “*Accumulation of Ag(I) by Saccharomyces cerevisiae Cells Expressing Plant Metallothioneins*”, **New Biotechnology**, trimisă spre evaluare [IF: 3.81 / AI: 0.7].

Articole publicate în Proceedings sau volume (indexate ISI)

1. **M. Banu**, M. Simion, L. Savu, I. Farcasanu, “*Optimization of detection parameters on microarray Au-support for genotyping HPV strains*”, CAS 2017 Conference, Sinaia, Romania, **Proceedings of the International Semiconductor Conference CAS**, 59-62, 2017.
2. **M. Banu**, A. Radoi, M. Simion, M. Kusko, “*Reproducible Functionalization of Silicon Substrates Intended for Biomedical Applications*”, CAS 2016 Conference, Sinaia, Romania, **Proceedings of the International Semiconductor Conference CAS**, 151-154, 2016.
3. M.C. Popescu, B.I. Bită, **M. Banu**, R.M. Tomescu, “*Destructive effects induced by the electron beam in Scanning Electron Microscopy*”, ATOM-N 2016 Conference, Constanta, Romania, **Proceedings of the SPIE**, vol. 10010 (100102N-1), 2016.
4. M. Popescu, F. Nastase, I. Mihalache, **M. Banu**, V. Tucureanu, C. Ungureanu, B. Tincu, R. Tomescu, “*UV Protection of Ultra-Thin ZnO Film on Viscose*”, lucrare in extenso acceptată spre publicare în **Proceedings of SPIE 2018**.
5. **M. Banu**, M. Simion, P. Varasteanu, M. Popescu, L. Savu, “*Nanostructured silicon platform for detection of specific gene sequences*”, acceptată spre publicare in extenso în **Proceedings of SPIE 2018**.

Lucrări prezentate la conferințe și comunicări științifice

1. **M. Banu**, M. Simion, M.C. Popescu, P. Varasteanu, M. Kusko, I.C. Farcasanu, “*SU-8 coated silicon nanowires platform for specific detection of single nucleotide*

- polymorphisms*”, BioNanoMed 9th Ed., Graz, Austria, 25-27 April 2018. – **Prezentare orală.**
2. M.C. Popescu, C. Ungureanu, F. Nastase, **M.A. Banu**, V. Tucureanu, B.C. Tincu, “*Antibacterial properties of cotton coated with ZnO by Atomic Layer Deposition*”, BioNanoMed 9th Ed., Graz, Austria, 25-27 April 2018. – **Poster.**
3. **M. Banu**, M. Simion, L. Savu, I. Farcasanu, “*Optimization of detection parameters on microarray Au-support for genotyping HPV strains*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS 40th Ed., Sinaia, România, 11-14 October 2017. – **Prezentare orală.**
4. **M. Banu**, “*3D Inorganic Nanostructured Substrate for Applications in Genetics*”, European Technology Platform for Nanomedicine – ETPN 11th Annual Event, Heraklion, Greece, 12-14 October 2016. – **Prezentare orală.**
5. **M. Banu**, A. Radoi, M. Simion, M. Kusko, “*Reproducible Functionalization of Silicon Substrates Intended for Biomedical Applications*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS 39th Ed., Sinaia, România, 10-12 October 2016.– **Prezentare orală.**
6. M. Simion, **M. Banu**, “*Versatile platform for nanomedicine based on nanostructured silicon*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS 39th Ed., Sinaia, România, 10-12 October 2016. – **Lucrare invitată.**
7. M.C. Popescu, B.I. Bită, **M.A. Banu**, R.M. Tomescu, “*Destructive effects induced by the electron beam in Scanning Electron Microscopy*”, ATOM-N 9th Ed., Constanța, România, 25-28 August 2016. – **Prezentare orală.**
8. L.L. Ruta, **M. Banu**, Y.F. Lin, R. Kissen, A.M. Bones, I.C. Farcasanu, “*Biological synthesis of silver nanoparticles using Saccharomyces cerevisiae cells expressing plant metallothioneins*”, Norwegian Plant Biology, Trondheim, Norway, 15-17 June, 2016 – **Poster.**