

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
Școala Doctorală de Biologie

Teză de doctorat

Conducător științific

Conf. dr. habil. Ileana C. Fărcășanu

Doctorand

Banu Melania Ana

Îndrumători științifici

Prof. dr. Marieta Costache

CSI dr. Monica Simion

Conf. dr. Șerban Fleschin

București

2018

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

Școala Doctorală de Biologie

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

Conducător științific

Conf. dr. habil. Ileana C. Fărcășanu

Doctorand

Banu Melania Ana

Îndrumători științifici

Prof. dr. Marieta Costache

CSI dr. Monica Simion

Conf. dr. Șerban Fleschin

București

2018

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.

Cercetarea a fost finanțată prin următoarele proiecte:

- “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 București, responsabili IMT Adina Brăgaru și Monica Simion (2012-2016);
- “Multiplexed platform for HPV genotyping – MultiplexGen” – proiect PNII-PCCA coordonator IMT, director Mihaela Kusko (2014-2017);
- “Nanomateriale și nanotehnologii avansate pentru aplicații în biodetecție optoelectronică” – proiect nucleu TEHNologii generice esențiale pentru priorități ale SPECializării inteligente (TEHNOSPEC) – director Monica Simion (2016-2017);
- “Sensor 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).



Per aspera ad astra

Cuprins

<i>Lista Tabelelor</i>	<i>i</i>
<i>Lista Figurilor</i>	<i>i</i>
<i>Lista Abrevierilor</i>	<i>v</i>
PREFAȚĂ.....	1
PARTEA I NOȚIUNI TEORETICE	5
CAP. 1. INTRODUCERE	5
1.1. <i>Prezentarea domeniului tezei de doctorat</i>	8
1.2. <i>Scopul tezei de doctorat</i>	9
CAP. 2. TEHNICI ȘI PLATFORME DE DETECȚIE.....	15
2.1. <i>Suprafețe suport</i>	15
2.1.1. Suporturi comerciale.....	15
2.1.2. Suporturi tridimensionale pe bază de nanofire de siliciu (SiNWs)	16
<i>Am desfășurat totodată experimente de corodare chimică într-un singur pas (1-MACE) și, respectiv în doi pași (2-MACE), prin utilizarea sărurilor de Ag.</i>	19
2.1.3. Substraturi cu filme subțiri de Au	19
2.1.4. Substraturi pe bază de siliciu pe izolator (SOI).....	20
2.2. <i>Chimia suprafețelor</i>	21
2.2.1. Funcționalizarea cu (3-Aminopropil)triethoxisilan (APTES) și glutaraldehidă (GAD).....	23
2.2.2. Funcționalizarea cu glicidil eterul Bisfenolului A (SU-8).....	26
2.2.3. Funcționalizarea cu (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilan (GOPTMS).....	27
2.2.4. Modificarea suporturilor de Au prin formarea monostraturilor autoasamblate.....	28
2.2.5. Mecanisme de imobilizare și hibridizare pe substraturi.....	29
2.3. <i>Tehnici și metode de detecție</i>	30
2.3.1. Tehnica <i>Microarray</i>	30
2.3.2. Tehnica SPR	31
2.3.3. Metoda Ψ -MOSFET	33
CAP. 3. SECVENȚE ADN SPECIFICE ȘI MODALITĂȚI CLINICE DE DETECȚIE	35
3.1. <i>Bazele genetice ale carcinogenezei induse de antioncogenă BRCA1</i>	35
3.2. <i>Bazele genetice ale carcinogenezei induse de HPV</i>	39
PARTEA II REZULTATE ORIGINALE	45
CAP. 4. TEHNOLOGIE DE OBTINERE A SUPRAFEȚELOR-SUPPORT FUNCȚIONALIZATE	45
4.1. <i>Suprafețe suport</i>	46
4.1.1. Tehnici de fabricare a nanofirelor de Si.....	47
4.1.1.1. Tehnologie de fabricare a nanofirelor de Si folosind catalizatori de Au	47
4.1.1.2. Tehnologie de fabricare a nanofirelor de siliciu cu catalizatori de Ag	50
4.2. <i>Modalități de funcționalizare a Si, SiNWs și SOI</i>	58
4.2.1. APTES/GAD	59
4.2.2. SU-8.....	64
4.2.3. GOPTMS	67
CAP. 5. ANALIZA DATELOR MICROARRAY, SPR ȘI ELECTRICE OBTINUTE DIN HIBRIDIZAREA SECVENȚELOR SPECIFICE BRCA 1 ȘI HPV	69
5.1. <i>Teste de imobilizare, hibridizare și stabilitate în timp pe suport comercial</i>	69
5.2. <i>Realizarea structurilor de tip microarray</i>	70
5.2. <i>Analiza morfologiei spot-urilor</i>	72
5.3. <i>Stabilitatea în timp a sondelor imobilizate</i>	75
5.4. <i>Analiza statistică a detecției mismatch-urilor</i>	75
5.5. <i>Detecția specifică a substituțiilor uninucleotidice utilizând platforme de nanofire de siliciu acoperite cu SU-8</i>	78
5.5.1. Flux tehnologic	79
5.5.2. Analiza statistică a datelor experimentale	81
5.5.3. Mecanismul de imobilizare.....	83
5.5.4. Investigarea specificității de detecție în timp.....	84
5.5.5. Analiza statistică a specificității de detecție a polimorfismelor uninucleotidice pe platforme stocate în timp	92
5.6. <i>Experimente microarray și SPR pentru genotiparea secvențelor corespunzătoare tulpinilor HPV imobilizate pe suporturi de Au</i>	98
5.6.1. Procedura experimentală.....	99
5.6.1.1. Amplificarea și clonarea secvențelor ADN corespunzătoare genotipurilor HPV	99

5.6.1.2. Microarray și SPR.....	103
5.6.2. Validarea prin <i>microarray</i> a imobilizării și hibridizării secvențelor HPV pe suport de Au	105
5.6.3. Investigarea eficienței de imobilizare a ADN prin formarea monostraturilor autoasamblate mixte	105
5.6.4. Optimizarea parametrilor de hibridizare	107
5.6.5. Evaluarea prin SPR a imobilizării și hibridizării secvențelor ADN-HPV.....	111
5.7. <i>Caracterizări electrice pentru structuri test realizate pe substrat tip SOI</i>	113
5.7.1. Procedura experimentală și de analiză grafică	114
5.7.2. Caracterizări electrice pe suporturi de tip SOI funcționalizate cu APTES-GAD	115
5.7.3. Caracterizări electrice pe suporturi SOI funcționalizate cu GOPTMS hidrolizat.....	116
5.7.4. Caracterizări electrice pe platforme SOI funcționalizate cu GOPTMS din stare de vapori	118
CAP. 6. CONCLUZII	123
6.1. <i>Contribuții originale</i>	125
6.2. <i>Activitatea de cercetare</i>	126
6.3. <i>Diseminarea rezultatelor</i>	127
6.4. <i>Perspectivă de dezvoltare ulterioară</i>	129
BIBLIOGRAFIE.....	131
ANEXA 1	143
<i>Materiale și metode</i>	143
A1.1. Materiale și reactivi	143
A1.2. Echipamente	144
A1.3. Software.....	147
A1.4. Referințe	148
ANEXA 2.....	149
<i>Metode de sinteză green-chemistry a nanoparticulelor de Ag</i>	149
A2.1. Construcții plasmidiale pentru expresia metalotioneinelor de <i>A. thaliana</i> și <i>N. caerulescens</i> în celulele de <i>S. cerevisiae</i>	149
A2.2. Expresia metalotioneinelor de <i>A. thaliana</i> și <i>N. caerulescens</i> în celulele de <i>S. cerevisiae</i>	150
A2.3. Prepararea liniilor celulare de drojdie pentru caracterizarea TEM.....	155
A2.4. Vizualizarea nano particulelor metalice în <i>Saccharomyces cerevisiae</i> prin caracterizarea TEM.....	156
A2.5. Concluzii.....	159

Lista Tabelelor

Tabel 2.1. Metodele de imobilizare a sondelor pe suprafețele funcționalizate

Tabel 4.1. Pozițiile benzilor de absorbție caracteristice grupărilor chimice specifice funcționalizărilor

Tabelul 5.1. Sonde și secvențe țintă

Tabel 5.2. 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

Tabel 5.3. 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

Tabel 5.5. Secvențe ale primerilor specifici ADN-HPV

Tabel 5.6. Secvențe ADN

Tabel 5.7. Secvențe ADN

Lista Figurilor

Figura 2.1. Metode convenționale de obținere a nanoparticulelor metalice

Figura 2.2. Etapele corodării siliciului cu nanoparticule de Au: (a) imersarea plachetei de Si în soluție Piranha pentru expunerea grupărilor hidroxil pe suprafață; (b) legarea APTES de grupările hidroxil și expunerea la suprafață a grupărilor amino; (c) stabilizarea nanoparticulele de Au în citrat legate prin interacțiune ionică de grupările NH₂; (d) corodarea chimică a substratului de Si cu nanoparticule de Au distribuite uniform

Figura 2.3. Investigarea parametrilor experimentali ai corodării asistate de Ag pentru controlarea morfologiei nanofirelor de Si

Figura 2.4. Procedura Smart-Cut®

Figura 2.5. Hidrofilizarea substraturilor de sticlă sau siliciu

Figura 2.6. Hidroliza APTES

Figura 2.7. Atașarea covalentă a aminosilanului

Figura 2.8. Funcționalizarea APTES cu glutaraldehidă

Figura 2.9. Structura chimică a SU-8

Figura 2.10. Structura GOPTMS

Figura 2.11. Hidroliza GOPTMS

Figura 2.12. Fixarea GOPTMS pe suprafața de SiO₂

Figura 2.13. Principiul de detecție *microarray*

Figura 2.14. Imagini SEM ale vârfulor solide: (a) vârf cu suprafață de contact optimă; (b) vârf cu uzură neuniformă

Figura 2.15. Sensogramă prezentând etapele parcurse în analiza SPR

Figura 2.16. Conducția în Ψ-MOSFET

Figura 3.1. Reprezentare schematică a principalelor proteine care fac parte din complexul BASC

Figura 3.2. Arbore filogenetic al familiei α-HPV prin alinierea secvenței L1

Figura 3.3. Mecanismul de infectare a țesutului cervical cu HPV și evenimente ce duc la declanșarea procesului carcinogenetic

Figura 3.4. Mecanismele genetice care induc transformarea malignă a celulelor

Figura 4.1. (a) Prezentare schematică a realizării biosenzorilor; (b) ariile active obținute în urma configurării suporturilor de tip SOI

Figura 4.2. Prezentare schematică a silanizării din stare de vapori

Figura 4.3. Spectrele ATR-FTIR: comparație între APTES depus din stare de vapori și Si martor

Figura 4.4. Vizualizare în plan a nanoparticulelor de Au depuse pe Si funcționalizat cu APTES

Figura 4.5. Vizualizare a) în plan și b) în secțiune transversală a substratului cu monostrat autoasamblat de Au NPs care a fost corodat prin MACE

Figura 4.6. Etapele de formare a nanofirelor de siliciu și a dendritelor de Ag

Figura 4.7. Dependența de timp a nanofirelor de siliciu

Figura 4.8. Influența rezistivității plachetei de Si asupra morfologiei nanofirelor

Figura 4.9. Nanofirele de Si se dezvoltă pe direcția orientării cristalografice a plachetei

Figura 4.10. Imagini SEM ale S1. (a) în secțiune transversală; (b) în plan

Figura 4.11. Examinarea morfologică a nanofirelor de Si

Figura 4.12. Texturile nanofirelor de Si

Figura 4.13. Măsurarea unghiului de contact pe Si brut și nanoconfigurat

Figura 4.14. Rezultatele ATR-FTIR corespunzătoare probelor cu 2,5% și 5% APTES cu și fără tratament termic

Figura 4.15. Spectru ATR-FTIR al probelor funcționalizate cu APTES hidrolizat și reticulat cu glutaraldehidă

Figura 4.16. Caracterizarea morfologică a SiNWs funcționalizate cu APTES și GAD

Figura 4.17. Spectrul EDX pentru nanofirele de Si funcționalizate cu APTES și GAD

Figura 4.18. Măsurarea unghiului de contact pe nanofire de Si brute sau acoperite cu APTES-GAD

Figura 4.19. Grosimea stratului de SU-8 măsurată pe suport de Si

Figura 4.20. Caracterizarea SEM a SiNWs acoperite cu SU-8

Figura 4.21. Spectrul EDX pentru nanofirele de Si funcționalizate cu SU-8

Figura 4.22. Măsurarea unghiului de contact pe: (a) SiNWs; (b) SiNWs acoperite cu SU-8

Figura 4.23. Variația unghiului de contact în timp pe Si martor și Si cristalin acoperit cu GOPTMS

Figura 5.1. Morfologii ale *spot*-urilor cu diametrul de 250 μm evidențiate fluorescent. (A) *spot*-uri cu hibridizare uniformă; (B) caracteristici „coffee-ring” datorate tiparului de evaporare a sondelor; (C) zgârietură superficială și forme neregulate ale *spot*-urilor; (D) distribuție neuniformă a soluției de hibridizare pe suprafață; (E) hibridizare neregulată cauzată de efectele Marangoni și „coffee-ring”; (F) efect Marangoni evident

Figura 5.2. Semnalul fluorescent de hibridizare

Figura 5.3. Analiza grafică a eficienței de hibridizare cu sondele pregătite în cele două soluții de imobilizare

Figura 5.4. Evaluarea stabilității în timp a sondelor PM atașate pe suport comercial de sticlă

Figura 5.5. Evaluarea comparativă a stabilității morfologice corespunzătoare ADN hibridizat prin scanarea fluorescentă a suporturilor hibridizate după (a) 1 zi și (b) 21 de zile de incubare

Figura 5.6. 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

Figura 5.7. 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

Figura 5.8. Schema de depunere a sondelor PM, C>A și C>T pe suporturile testate și etapele de prelucrare a datelor pentru analiza statistică

Figura 5.9. Reprezentarea schematică a mecanismelor de imobilizare a sondelor modificate cu grupări NH₂ – pe (a) GAD/SiNWs și (b) SU-8/SiNWs

Figura 5.10. Examinarea stabilității morfologice a ADN hibridizat pe suport comercial (REF) după păstrarea biosenzorilor printați pentru (a) 1 zi și (b) 21 zile

Figura 5.11. Unghiurile de contact corespunzătoare picăturilor depuse pe (a) REF, (b) GAD/SiNWs și (c) SU-8/SiNWs, corelate cu unghiurile de contact medii și deviațiile standard calculate din trei măsurări efectuate pe aceeași probă; (d) variația unghiului de contact (UC) în funcție de timp pe REF, GAD/SiNWs și SU-8/SiNWs

Figura 5.12. Semnalul fluorescent de hibridizare pe platforma GAD/SiNWs după stocarea pentru (a) 1 zi și (b) 21 de zile a biosenzorilor având sondele ADN atașate

Figura 5.13. Evaluarea stabilității morfologice a ADN hibridizat pe platforma SU-8/SiNWs scanând fluorescent suporturile hibridizate după (a) 1 zi și (b) 21 de zile de incubare

Figura 5.14. 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

Figura 5.15. 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

Figura 5.16. Evaluarea stabilității după 4 și 8 zile de depozitare a sondelor PM atașate pe SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs), cuplate cu statistici descriptive pentru fiecare tip de substrat

Figura 5.17. Evaluarea diferențelor de intensitate a semnalelor de hibridizare dintre sondele PM și sondele care conțin una (C> A) și două nepotriviri nucleotidice (CG> AA) pe (a) dispozitivul comercial de sticlă - REF; (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă - GAD/SiNWs; (c) SiNW acoperite cu SU-8 - SU-8 / SiNWs, corelate cu analiza statistică

Figura 5.18. Controlul negativ depus pe suprafața constituită din nanofire de siliciu, acoperită cu SU-8. Urma vârfului este prezentă, însă nu există hibridizare nespecifică

Figura 5.19. Analiza statistică a rezultatelor hibridizării pe GAD/Si și SU-8/Si

Figura 5.20. 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

Figura 5.21. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sonda C>A și sonda C>T pe SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs) după 4 și 8 de zile de incubare, corelată cu analiza ANOVA unifactorială

Figura 5.22. Electroforeza ampliconilor HPV după etapa de purificare

Figura 5.23. Electroforeză în gel de agaroză a secvențelor ADN clonate în pCR 2.1 TOPO

Figura 5.24. Depunerea rapoartelor ADN:MCH pe suprafețe de Au

Figura 5.25. Depunerea sondelor ADN pe suprafețe de Au

Figura 5.26. Intensitățile semnalelor de imobilizare după 2 h

Figura 5.27. Intensitățile sondelor imobilizate după incubarea peste noapte

Figura 5.28. Rezultatele imobilizării pe: (a) primul biochip și (b) al doilea biochip

Figura 5.29. Semnalul de imobilizare înaintea procesării biochip-urilor

Figura 5.30. Semnalul de imobilizare după hibridizarea 15 h a chip-ului la 42 °C și etape de spălare

Figura 5.31. Modificarea intensităților semnalelor fluorescente de imobilizare în urma etapelor adiționale de procesare a biochip-urilor

Figura 5.32. Intensitatea semnalului de hibridizare după incubarea suportului 15 h cu ADN țintă

Figura 5.33. Influența lungimii spațiatorului de carbon asupra eficienței reacției de hibridizare

Figura 5.34. Influența MCH asupra eficienței hibridizării

Figura 5.35. Influența amestecării soluției în reacția de imobilizare

Figura 5.36. Monitorizarea în timp real a imobilizării ADN corespunzător HPV 18

Figura 5.37. Curbele de hibridizare pentru concentrații variate de fragmente reale ADN corespunzătoare tulpinii HPV 18

Figura 5.38. Fluorescența secvențelor control atașate de suportul modificat chimic

Figura 5.39. Caracteristici ID-VG 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) (TSi = 70nm, TBOX = 145nm)

Figura 5.40. Imobilizarea secvențelor control de Si cu GOPTMS hidrolizat

Figura 5.41. Caracteristici ID-VG după (a1-a2) etapa de curățare cu soluție Piranha, funcționalizarea cu GOPTMS hidrolizat și (b1-b2) după etapele de funcționalizare, atașare sonde ADN și hibridizare în variație forward și reverse (TSi = 70nm, TBOX = 145nm)

Figura 5.42. Caracteristici VB-VG după fiecare etapă experimentală, în variație forward și reverse

Figura 5.43. Semnalul fluorescent de imobilizare al secvențelor control

Figura 5.44. Semnalul fluorescent de imobilizare al secvențelor control după etape de spălare

Figura 5.45. Semnalul fluorescent de hibridizare cu secvențe de concentrație (a) 10 μM, (b) 1 μM, (c) 0,5 μM și (d) 0,1 μM

Figura 5.46. Analiza grafică a semnalelor fluorescente de hibridizare pentru patru concentrații ADN țintă

Figura 5.47. Caracteristici ID-VG după fiecare etapă experimentală, în variație (a) forward și (b) reverse (TSi = 86nm, TBOX = 145nm)

Figura 5.48. Caracteristici ID-VG după fiecare etapă experimentală, în variație (a) forward și (b) reverse (TSi = 86nm, TBOX = 145nm)

Figura 5.49. Caracteristici ID-VG pentru trei concentrații de ADN țintă, în variație (a) forward și (b) reverse (TSi = 86nm, TBOX = 145nm)

Lista Abrevierilor

- AFM = Atomic Force Microscopy
Microscopie de Forță Atomică
- ADN = Deoxyribonucleic Acid
Acid Deoxiribonucleic
- APTES = (3-Aminopropyl)triethoxysilane
(3-Aminopropil)trietoxisilan
- ASCUS = Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance
Celule Scuamoase Atipice cu Semnificație Nedeterminată
- ATR = Attenuated Total Reflectance
Reflexie Totală Atenuată
- ATR-FTIR = Attenuated Total Reflectance FTIR
Spectroscopie FTIR prin Reflexie Totală Atenuată
- BASC = *BRCA1* Associated Genome Surveillance Complex
Complex de Monitorizare a Genomului Asociat cu *BRCA1*
- BOX = Burried Oxide
Oxid Îngropat
- BRCA1* = Breast Cancer Type 1
Gena implicată în cancerul de sân, tip 1
- BRCA2* = Breast Cancer Type 2
Gena implicată în cancerul de sân, tip 2
- BSA = Bovine Serum Albumin
Albumina Serică Bovină
- CA = Contact Angle Measurement
Măsurarea Unghiului de Contact
- DIW = Deionized Water
Apă Deionizată
- EBPVD = Electron Beam Physical Vapour Deposition
Depunerea Fizică în Stare de Vaporii cu Fascicul Electronic
- EDX = Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
Spectroscopia de Raze X cu Energie Dispersivă
- EIS = Electrochemical Impedance Spectroscopy
Spectroscopie de Impedanță Electrochimică
- FEG-SEM = SEM with Field Emission Gun
Microscop Electronic de Baleiaj cu Emisie în Câmp
- FET = Field Effect Transistor
Tranzistor cu Efect de Câmp
- FTIR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Spectroscopie în Infraroșu cu Transformată Fourier

GAD = Glutaraldehyde
Glutaraldehydă

GOPTMS = (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane
(3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilan

HPV = Human PapillomaVirus
Papilloma Virus Uman

HRM = High Resolution Melting Analysis
Analiza Curbelor de Topire la Rezoluție Înaltă

HR = High Risk
Risk Carcinogenic Ridicat

hTERT = Human Reverse Transcriptase Telomerase
Revers Transcriptaza Telomerazei Umane

IRF3 = Interferon Regulatory Factor 3
Factorul Reglator 3 al Interferonului

IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry
Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată

MACE = Metal Assisted Chemical Etching
Corodarea Chimică Asistată de Săruri Metalice

MEMS = Micro-Electro-Mechanical Systems
Sisteme micro-electro-mecanice

MCH = Mercaptohexanol

MOS = Metal-Oxide-Semiconductor
Metal-Oxid-Semiconductor

MOSFET = Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor
Tranzistor cu Efect de Câmp cu Poartă Izolată

NGS = Next Generation Sequencing
Secvențierea de Nouă Generație

One-way ANOVA = One-way Analysis of Variance
Analiza varianței / Analiza Dispersională Unifactorială

PBS = Phosphate Buffered Saline
Tampon Fosfat Salin

p53 = Phosphoprotein p53
Fosfoproteina p53

PCR = Polymerase Chain Reaction
Reacția de Polimerizare în Lanț

PEPVD = Plasma-Enhanced Physical Vapour Deposition

Depunerea Fizică în Stare de Vaporii cu Descărcare în Plasmă

pRB = Retinoblastoma Protein

Proteina Retinoblastomului

PNA = Peptide Nucleic Acid

Acid Peptido-Nucleic

PMT = Photomultiplier Tube

Tub Fotomultiplicator

PVD = Physical Vapour Deposition

Depunerea Fizică în Stare de Vaporii

PVP = Polyvinylpyrrolidone

Polivinilpirolidonă

RIE = Reactive Ion Etching

Corodarea cu ioni reactivi

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

Polimorfismul Lungimii Fragmentului de Restricție

SAM = Self Assembled Monolayers

Monostraturi autoasamblate

SDS = Sodium Dodecyl Sulfate

Dodecil Sulfat de Sodiu

SEM = Scanning Electron Microscope (or Microscopy)

Microscop(ie) Electronic(ă) de Baleiaj

SiNWs = Silicon Nanowires

Nanofire de siliciu (Si)

SNP = Single Nucleotide Polymorphism

Polimorfism Uninucleotidic

SOI = Silicon on Insulator

Siliciu pe Izolator

SPR = Surface Plasmon Resonance

Rezonanța Plasmonilor de Suprafață

SSC = Sodium Saline Citrate

Citrat Salin de Sodiu

SSCP = Single Stranded Conformation Polymorphism

Polimorfismul Conformațional al Monocatenelor

ssDNA = Single Stranded DNA

ADN monocatenar

SU-8 = Glycidyl ether of bisphenol A

Glicidil eterul Bisfenolului A

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

TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Tris(2-carboxi-etil)fosfină

T_m = Melting Temperature
Temperatura de Topire

VLS = Vapour Liquid Solid Growth
Metoda Vapor-Lichid Solid

XRD = X-Ray Diffractometer
Difractometru de Raze X

PREFAȚĂ

Dezvoltarea sistemelor de detecție ADN (Acid Deoxiribonucleic) este justificată de utilizarea lor în depistarea modificărilor specifice transformărilor maligne și în aplicații de genotipare. Detecția mutațiilor genetice la nivel molecular permite realizarea unui diagnostic fiabil și timpuriu al biomarkerilor specifici, pentru monitorizarea progresiei bolii și a răspunsului la tratament (Sassolas, Leca-Bouvier și Blum, 2008; Mehrotra, 2016).

Potrivit Uniunii Internaționale de Chimie Pură și Aplicată - IUPAC, biosenzorul e definit ca 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). Așadar, enzimele, anticorpii, acizii nucleici, hormonii, structurile celulare sau țesuturile pot fi utilizate pentru a interacționa specific cu analitul (molecula țintă) pentru a rezulta o reacție biochimică convertită în semnal prin intermediul unui traductor electrochimic, electric, optic, piezoelectric sau termometric (Monošík, Stred'anský și Šturdík, 2012).

În mod particular, biosenzorii ADN (numiți și 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 cu scopul de a recunoaște secvența ADN țintă complementară prin hibridizare (Sassolas, Leca-Bouvier și Blum, 2008).

Chiar dacă specificațiile particulare ale senzorilor sunt determinate de aplicația căreia se adresează, caracteristicile comune esențiale rămân specificitatea, limita de detecție, raportul semnal/zgomot și timpul de răspuns. Acestea li se adaugă aspectele de implementare comercială: posibilitatea de integrare electronică pentru prelucrarea semnalului, miniaturizarea dispozitivului și reducerea costurilor de producție.

Scopul acestei teze este de a fabrica noi platforme destinate detecției hibridizării ADN prin fluorescență, rezonanță la suprafață a plasmonilor sau electrică, a căror eficiență să fie demonstrată statistic prin specificitatea ori sensibilitatea de decelare a biomoleculilor.

În prezentul studiu, a fost utilizată tehnica *microarray* pentru detecția prin fluorescență a hibridizării secvențelor ADN specifice *BRCA1* (Breast Cancer, early onset 1 - Genă implicată în cancerul de sân, tip 1) și HPV (Human Papilloma Virus - Virusul

Papilloma Uman), precum și confirmarea datelor prin tehnici complementare: **rezonanța plasmonilor de suprafață** (SPR - Surface Plasmon Resonance) și **detecție electrică**.

În cadrul experimentelor *microarray*, traductorul fluorescent a permis evaluarea specificității de detecție a polimorfismelor uninucleotidice cu efect stabilizator asupra duplexului dintr-o secvență specifică genei *BRCA1*. Suporturi comerciale de sticlă având grupări aldehidice pe suprafață au fost considerate ca referință și comparate cu suporturile de siliciu configurate cu nanofire. Acestea au fost funcționalizate pe de o parte cu grupări aldehidice și pe de altă parte cu grupări epoxi, pentru a evalua specificitatea de detecție. *Față de suportul comercial de sticlă, pe suporturile proprii nanostructurate s-a demonstrat detecția specifică a polimorfismelor uninucleotidice cu o excelentă reproductibilitate.*

Tehnica **SPR** a fost utilizată pentru detecția secvențelor ADN specifice HPV, folosindu-se suporturi comerciale de sticlă acoperite cu un 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 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). Această schemă de detecție a suferit mai multe etape de optimizare, pornind de la alegerea grosimii adecvate de film și oxid îngropat (BOX - Buried Oxide) și evaluând parametrii de funcționalizare. *Au fost abordate cu rezultate promițătoare cercetări de implementare a detecției electrice prin folosirea Ψ -MOSFET ca metodă de caracterizare electrică.*

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. Subiectul ales presupune un proces de documentare laborios adresat tuturor domeniilor științifice enumerate anterior, care a stabilit aspectele teoretice esențiale și au sugerat procedurile experimentale abordate. 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 trei capitole (Capitolele 4 - 6) cuprinde optimizările efectuate pentru realizarea tipurilor de biosenzori propuși și evaluarea statistică a datelor. Capitolul final acumulează rezultatele obținute și trasează direcțiile de cercetare ulterioară.

Capitolul 1 introductiv dezbate incidența cancerului la nivel global și în Europa Centrală și Estică, evidențiind mecanismele specifice modificărilor celulare maligne

produse în cazul cancerului mamar și cervical, anticipând prezentarea metodelor moderne de detecție a polimorfismelor uninucleotidice din cadrul genelor *BRCA* și de genotipare a tulpinilor HPV. 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. Se începe cu descrierea substraturilor comerciale, folosite în detecția *microarray*, evidențiind parametrii ce urmează a fi îmbunătățiți. Sunt identificate beneficiile furnizate de suporturile tridimensionale pentru 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). Introducerea suportului de aur (Au) permite utilizarea tehnicii SPR în studiul procedurii de atașare a oligonucleotidelor și în detecția biomoleculilor pe suprafețe metalice. Utilizarea suporturilor de tip SOI a permis îmbunătățirea detecției electrice ADN față de placheta de Si monocristalin, prin eliminarea efectelor parazite datorită stratului izolator intermediar de SiO₂.

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

Sunt definite noțiunile elementare și termenii specifici metodelor de detecție fluorescentă, plasmonică și electrică, cât și descrierea substraturilor utilizate pentru platformele de detecție. 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 antioncogenul *BRCA1*, 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. Se urmărește prospecția mecanismelor ce induc evoluția multistadială a cancerului cu scopul de a justifica 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 utilizate în practicile clinice pentru detectarea SNPs și pentru aplicații de genotipare, cu menționarea avantajelor și dezavantajelor acestora.

Capitolul 4 conține proceduri de obținere a suporturilor nanoconfigurate, pe bază de nanofire de siliciu realizate prin corodarea chimică asistată de catalizatori de argint (Ag) sau de Au. A fost investigată influența timpului asupra ratei de corodare, precum și influența rezistivității și orientării plachetei asupra eficienței corodării. Au fost optimizate modalitățile de funcționalizare a suporturilor nanoconfigurate, a suporturilor de siliciu monocristalin și de siliciu pe izolator. Tot în acest capitol sunt implementate tehnicile de depunere și imobilizare a ADN pe suporturile funcționalizate și pe suporturile cu film de aur.

Capitolul 5 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. Viabilitatea tehnicilor de detecție a fost demonstrată prin analize statistice.

Capitolul concludiv 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.

Experimentele prezentate în cadrul acestei lucrări multidisciplinare au fost desfășurate 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 cercetării au fost diseminate în publicații cotate sau indexate ISI, precum și în prezentări la conferințe și seminarii.

Partea I NOȚIUNI TEORETICE

Cap. 1. INTRODUCERE

Cancerul reprezintă una din principalele cauze ale mortalității la nivel mondial, numărând în 2012 peste 14,1 milioane de cazuri, conform celor mai recente date statistice (Torre și colab., 2015; Ferlay și colab., 2013). În Europa Centrală și de Est, rata de incidență standardizată la 100 000 de locuitori a fost de 216,1, cu o rată a mortalității de 123,4 (Torre și colab., 2015). Această maladie are o evoluție multistadială, pornind de la acumularea mutațiilor genetice ce induc alterarea funcțiilor produșilor genici și conducând în cele din urmă la degradarea morfologică și fiziologică a celulelor afectate. Modificările genetice care contribuie la apariția cancerului afectează trei categorii de gene: genele tumoral supresoare (antioncogene), protooncogenele și genele care intervin în repararea ADN (Hanahan, Weinberg și Francisco, 2000).

Mutațiile de mică amploare (*small-scale mutations*) sunt cel mai des observate variații din cadrul genomului uman, un exemplu fiind substituțiile uninucleotidice (SNPs) întâlnite cu o frecvență aproximativă de 1 la 1000-2000 perechi baze (Lindroos și colab., 2001; Sachidanandam și colab., 2001). Studiul profilelor SNP în cadrul diverselor populații a permis identificarea factorilor ce influențează riscul dezvoltării cancerului și a condus la descoperirea unor subseturi de polimorfisme uninucleotidice întâlnite numai în cazul pacienților bolnavi de cancer. (Gibbs și colab., 2003; Mahdi, Nassiri și Nasiri, 2013).

Cancerul mamar reprezintă o boală complexă, având în Europa Centrală și de Est o rată standardizată de incidență de 47,7 la 100000 de locuitori și o rată standardizată a mortalității de 0,35 la 100000 de locuitori (DeSantis și colab., 2015; Torre și colab., 2012). Modificarea malignă provocată de diviziunea necontrolată și proliferarea excesivă a celulelor din ductele terminale și lobulare este asociată cu apariția cancerului de sân. Majoritatea neoplaziilor mamare au caracter sporadic (90-95%), în timp ce 5-10% sunt asociate cu predispoziția dobândită (Mahdi, Nassiri și Nasiri, 2013; Karami și Mehdipour, 2013). Gena *BRCA1* (*Breast Cancer 1, Early Onset*) codifică o proteină ce acționează ca supresor al creșterii tumorale. Proteina *BRCA1* interacționează în nucleul celulelor normale cu alte proteine pentru repararea rupturilor catenare din ADN. Pentru declanșarea procesului de tumorigeneză, este suficientă producerea unei mutații deleterioare într-o alelă

Cap. 1. Introducere

BRCA1 dintr-o celulă oarecare (Knudson, 1971), iar dacă procesul se repetă în cadrul aceleiași celule, respectiva devine incapabilă să-și remedieze propriile erori. (Foulkes și Shouen, 2013).

Virusurile au fost asociate cu carcinogeneza în 10-15% din cazuri, acest procent devenind probabil mai mare, odată cu perfecționarea tehnicilor de detecție (Chen și colab., 2014; Hoppe-Seyler și Butz, 1995). Descoperirea tumorilor virale a fost raportată la începutul secolului XX, Peyton Rous, demonstrând în 1910 că un agent viral este responsabil pentru transmiterea leucemiei la păsări (Rous, 1910; Rous, 1911]. La începutul anilor '30, a fost identificat virusul papilloma la câine (DeMonbreun și Goodpasture, 1932) și la iepure (Shope și Hurst, 1933). Cercetările desfășurate în anii '50 pe murine au indicat poliomavirusul ca potențială cauză a declanșării tumorigenezei (Gross, 1951; Gross, 1953a; Gross, 1953b; Stewart și Eddy, 1959; Eddy și Stewart, 1959). În 1983, au fost descoperite în celulele cervicale maligne umane tulpinile HPV 16 și HPV 18, asociate cu un risc oncogen crescut (Durst și colab., 1983; Boshart și colab. 1984).

Întrucât infecția persistentă și integrarea cromozomială a tipurilor HPV cu potențial oncogen ridicat au fost demonstrate ca factori cauzali majori în dezvoltarea cancerului de col uterin, determinarea tipurilor HPV prezente în probe cervico-vaginale este esențială în evaluarea riscului ca o femeie să dezvolte cancer de col uterin. 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 rata mortalității standardizată la 100000 de locuitori a fost de 6,2 (Torre și colab., 2015).

Diagnosticul timpuriu este eficient în prevenția și tratarea afecțiunilor încă din stadii incipiente, astfel că identificarea predispoziției genetice la dezvoltarea anumitor tipuri de cancer este utilă în cazul 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.

În continuare este prezentat un scurt istoric pentru fiecare dintre tehnicile de detecție utilizate în prezentul studiu.

Tehnologia *microarray* a fost introdusă în anii 90' (Lenoir și Giannella, 2006) ca o extensie a tehnicii Southern Blot, dezvoltată în 1975 de Edwin Southern pentru analiza genomului uman (Southern, 1975). Un alt predecesor al *microarray* este tehnica fluorescentă de hibridizare *in situ* (FISH), dezvoltată de Pardue și Gall (Pardue și Gall, 1969), ce constă în vizualizarea nucleului celular și a cromozomilor fixați pe lame de

sticlă. Depunerea controlată a sondelor pe suporturi solide a fost dezvoltată la Universitatea din Stanford (Schena și colab., 1995; Shalon, Smith și Brown, 1996). Automatizarea procedurilor de depunere controlată a ADN a fost implementată comercial în 1994 de către Hans Lehrach și colaboratorii la institutul Max Planck pentru biologie moleculară - Berlin, grupul dezvoltând sisteme robotice de preluare și depunere de clone ADN pe filtre (Hoheisel și colab., 1994). Această direcție de automatizare a procesului de depunere a fost însoțită de înlocuirea materialelor poroase utilizate în dot-blot cu suporturi impermeabile, precum sticla ori siliciul. Folosirea acestor tipuri de suporturi a permis obținerea unui număr mare de *spot*-uri de analizat pe lamă cu un volum considerabil mai mic de probe. Astfel, analiza biologică a fost revoluționată prin trecerea la scală micro a formatului microscopic al aranjamentelor de *spot*-uri pe filtre, rezultând un *biochip* (Lenoir și Giannella, 2006).

Rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR) reprezintă oscilația rezonantă a electronilor din banda de conducție a metalului de interfața cu un dielectric (Sotnikov, Zherdev și Dzantiev, 2016). Principiile teoretice pentru fabricarea acestor tipuri de biosenzori au fost enunțate la începutul secolului XX, când Wood (Wood, 1902) a descris anomalii ale spectrelor de lumină cauzate de undele plasmonilor de suprafață. În 1968, Otto (Otto, 1968), Kretschmann și Raether (Kretschmann și Raether, 1968) au realizat excitarea plasmonilor de suprafață cu ajutorul luminii, folosind o prismă ca instrument de cuplaj între radiația incidentă și plasmonii de suprafață. În 1983, Liedberg și Nylander (Liedberg, Nylander și Lundstrom, 1983) au demonstrat utilitatea tehnicii de detecție optică prin spectroscopia de rezonanță a plasmonilor de suprafață (SPR). Aceasta se bazează pe monitorizarea cineticii și afinității de legare a biomoleculilor în timp real, fără utilizarea *marker*ilor fluorescenți, necesitând o procedura minimală de preparare a probelor (Im și colab., 2009). Condițiile de rezonanță sunt influențate de modificările indicelui de refracție al dielectricului datorate adsorbției moleculelor pe suprafața filmului metalic de pe suport de sticlă (Newman și Turner, 2008). Cu toate că s-a încercat extinderea gamei de metale utilizate, aurul rămâne candidatul predilect pentru acoperirea substratului de sticlă în cazul biosenzorilor SPR (Oliverio și colab., 2017).

Tranzistoarele cu efect de câmp (FET - Field Effect Transistors) permit detecția prezenței moleculelor țintă prin interacțiunea electrostatică a ADN (moleculă cu încărcare globală negativă) cu senzorul, acest fapt fiind demonstrat pentru prima oară de Souteyrand și colab (Souteyrand și colab., 1997). Biosenzorii FET sunt o alternativă viabilă deoarece permit o recunoaștere ce nu necesită marcarea fluorescentă a moleculelor și oferă un timp

de răspuns rapid, având raport semnal/zgomot ridicat, posibilitatea de detecție în paralel a biomoleculilor (Gong, Zhao și Yu, 2015; Duarte-Guevara și colab., 2014; Kaisti, 2017) și limită de detecție îmbunătățită. A fost raportată detecția ADN țintă de concentrații cuprinse între 0,1 și 25 nM (Adam și Hashim, 2015), limita de detecție fiind de 1 fM pentru secvențe de 25 oligonucleotide pe FET cu nanofire de Si (SiNWs - Silicon Nanowires) (Wenga și colab., 2013).

1.1. Prezentarea domeniului tezei de doctorat

Dezvoltarea tehnologiei *microarray* în cadrul biologiei moleculare moderne a influențat 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). Evidențierea spectrului de mutații declanșatoare a cancerelor umane este crucială în dezvoltarea tratamentului personalizat al pacienților, identificarea specifică a biomarkerilor corespunzători facilitând selecția tratamentului adecvat și reducând costul acestuia (Mao, Young, și Lu, 2007). Cu toate acestea, există o serie de limitări ale tehnicii, printre care utilizarea unei suprafețe plane ce scade capacitatea de legare a sondelor de suportul modificat chimic, generând o intensitate slabă a semnalului de hibridizare (Simion și colab., 2010).

Influența tipului de suport și de funcționalizare chimică coroborate cu stabilitatea în timp asupra specificității de detecție nu au fost abordate la modul aprofundat. Cercetările au fost orientate direct pe detecția clinică a SNP-urilor din cadrul genelor *BRCA1* prin depunerea sondelor constituite din acizi peptido-nucleici (PNA) pe un suport comercial de sticlă modificat chimic cu grupări amino (Mun și colab., 2009). Jung și colab. (Jung și colab., 2008) au prezentat o procedură multiplex de detecție a mutațiilor uninucleotidice specifice genei *BRCA1* depunând modificate cu grupări amino pe suporturi comerciale de sticlă modificate cu grupări aldehydice.

Tehnica *microarray* a fost utilizată și pentru genotiparea HPV pe substraturi comerciale de sticlă acoperite cu streptavidină având proprietăți colorimetrice și fluorescente printr-o procedură simplă de colorare imunohistochimică (Klaassen și colab., 2004). Potențialul metodei a fost demonstrat prin detecția a 53 de tipuri HPV din țesut cervical infectat cu una sau mai multe tulpini HPV. Arron și colab. (Arron și colab., 2011) au elaborat pe o platformă comercială Agilent 8x60K SurePrint G3 o strategie *microarray* extinsă pentru detectarea și genotiparea a 102 tipuri HPV, validând eficiența sa practică.

Avantajele diagnosticării prin metoda SPR sunt date de i) posibilitatea reutilizării senzorului, reducându-se astfel costul analizei, ii) obținerea rapidă a rezultatelor și iii) posibilitatea automatizării complete a procedurii. Cu toate acestea, randamentul metodei SPR în aplicațiile clinice de diagnosticare timpurie a bolii ar crește prin îmbunătățirea sensibilității de detecție, astfel încât să se ajungă la o limită de detecție a biomoleculilor < 500 Da, la concentrații < 1 pM. Imobilizarea ADN modificat chimic cu alcantiol și 6-mercaptohexanol a fost propusă de Herne și Tarlov (Herne și Tarlov, 1997) pentru creșterea eficienței de hibridizare, iar studiile ulterioare au urmărit determinarea raportului optim între concentrația de ADN imobilizat și mercaptohexanol, pentru micșorarea limitei de detecție.

Li și colab. (Li și colab., 2014) au realizat detecția polimorfismelor uninucleotidice prin metoda SPR în 15 minute, prin diferențierea specifică a secvențelor ADN mutante având concentrația de 100 pM, de secvențele normale. Wang și colab. (Wang și colab., 2010) au dezvoltat un sistem comercial bazat pe fenomenul SPR pentru detecția a 24 tulpini HPV.

Pe substraturile de tip SOI, au fost configurate nanofire de Si ca tranzistoare cu efect de câmp (FET - Field Effect Transistor), formând SiNW-FETs, în care doi electrozi metalici (pad-uri) contactează capetele unui nanofir fiind desemnați ca sursă și drenă, iar un al treilea electrod (poarta) a fost cuplat capacitiv cu nanofirul prin stratul dielectric de oxid (Gengfeng și Xu, 2014). Datorită suprafeței active generoase pe unitatea de volum a nanofirelor, s-a demonstrat o limită de detecție de ordinul fM pentru ADN, proteine și virusuri (Patolski și Lieber, 2005; Hahm și Lieber, 2004).

1.2. Scopul tezei de doctorat

Scopul tezei constă în identificarea unor soluții tehnice accesibile pentru îmbunătățirea specificității de detecție a *mismatch*-urilor ADN și extinderea metodologiei de testare pentru analiza polimorfismelor uninucleotidice și genotipare. Pe durata cercetării, au fost elaborate trei scheme de detecție a hibridizării ADN prezentate în continuare, fiecare beneficiind de platforme și proceduri de funcționalizare dedicate.

1.2.1. Tehnica *microarray* – detecție optică (fluorescență)

Procesul de fabricare a suporturilor *microarray* pentru analiza ADN constă în curățarea substratului, modificarea chimică, tratamente post-funcționalizare, urmate de imobilizarea și hibridizarea ADN. Fiecare etapă poate influența eficiența globală a detecției

Cap. 1. Introducere

semnalului fluorescent de hibridizare, impunându-se astfel investigarea sistematică a parametrilor de funcționalizare în vederea realizării unui protocol fezabil de modificare chimică și diminuarea variațiilor apărute între platformele *microarray*.

a) Optimizarea imobilizării pe suport comercial pentru eliminarea variației experimentale

Platformele *microarray* comerciale permit detecția specifică și reproductibilă a polimorfismelor uninucleotidice datorită procesului de producție standardizat (Gresham, Dunham și Botstein, 2008), ce presupune costuri ridicate asociate respectării reglementărilor. Suporturile *microarray* configurate în laborator au avantajul costului scăzut, permițând totodată selectarea particulară a genelor de interes, utilizând funcționalizarea specifică a oricărui tip de substrat (Pollack, 2007; Stewart, 2000). Studiile personale anterioare au urmărit eficiența discriminării între secvențe cu complementaritate perfectă (PM - Perfect Match) și necorespunzătoare (MM - Mismatch) prin elaborarea unei platforme *microarray* tridimensionale prin configurarea asistată de săruri metalice a substratului de siliciu (Banu și colab., 2015), rămânând de aprofundat aspectele referitoare la reproductibilitatea scăzută în *microarray* provocată de variația intensității semnalului de hibridizare.

S-a impus efectuarea prealabilă a testelor de imobilizare a ADN pe suport comercial, în vederea evitării eventualelor defecte survenite exclusiv din această cauză, spre aplicarea ulterioară a procedurii optimizate pe suportul nanoconfigurat. Parametrii din timpul imobilizării care necesită a fi controlați sau optimizați sunt pH-ul și tăria ionică a soluției-tampon în care sunt diluate sondele ADN, umiditatea controlată în timpul depunerii oligonucleotidelor și concentrația ADN depus pe suport pentru evitarea impedimentelor sterice care ar duce la o eficiență scăzută de hibridizare. Procedura experimentală este detaliată în **Subcapitolul 5.1. Teste de imobilizare, hibridizare și stabilitate în timp pe suport comercial.**

b) Investigarea stabilității în timp a sondelor ADN imobilizate pe suportul comercial și suportul nanoconfigurat

Atașarea optimă a sondelor și menținerea lor pe parcursul întregului flux de lucru ce implică fazele de depunere/ blocare/ hibridizare/ spălare depinde de afinitatea ADN monocatenar (ssDNA) față de substratul modificat chimic corespunzător și condițiile ambientale (Sobek și colab., 2013), ce trebuie strict controlat în vederea obținerii unui test *microarray* fiabil (Drăghici și colab., 2006; Yauk și Berndt, 2007; van Bakel și Holstege, 2004). Astfel, stabilitatea sondelor

diluate în tamponul de imobilizare ales urmărește evitarea rezultatelor slabe de hibridizare. Stabilitatea chimică a suprafeței funcționalizate și a sondelor ADN imobilizate sunt parametri importanți pentru controlul reproductibilității *microarray*. În plus, stabilitatea platformei pe care sondele ADN sunt depuse este esențială pentru implementarea în regim de testări clinice, unde procedura restrânsă constă în hibridizarea și spălarea lamelor pentru a elimina secvențele ADN țintă nehibridizate. Pornind de la evaluarea stabilității în timp pe suport comercial, studiul a fost extins și pe suporturile nanoconfigurate dezvoltate în cadrul Laboratorului de Nanobiotehnologii (IMT-București). Subiectul va fi aprofundat în **Subcapitolul 5.1. Teste de imobilizare, hibridizare și stabilitate în timp pe suport comercial** și în **Subcapitolul 5.5. Detecția specifică a substituțiilor uniuclotide utilizând platforme de nanofire de siliciu acoperite cu SU-8**.

c) Creșterea specificității de detecție ADN prin configurarea unui substrat tridimensional și alegerea metodei de funcționalizare

Utilizarea unui suport plan limitează cantitatea de probe biologice atașate de o suprafață modificată chimic, reducând sensibilitatea și specificitatea tehnicii (Jayaraman și colab., 2007; Elder și Jayaraman, 2014). Suporturile plane funcționalizate chimic pentru atașarea ADN sunt disponibile comercial, pe când suporturile tridimensionale (3D) există doar pentru *microarray* dedicat analizei proteinelor (<http://www.arrayit.com/index.html>). Substraturile 3D destinate tehnicii *microarray* oferă o capacitate mai mare de legare a sondelor decât substraturile bidimensionale tipice (Bilgic și Klok, 2015; Castagna și colab., 2016; Ressine și colab., 2003; Simion și colab., 2009). Metoda aplicată pentru obținerea configurației tridimensionale utilizată ca substrat *microarray* va fi abordată din punct de vedere teoretic în **Subcapitolul 2.1.2. Suporturi tridimensionale pe bază de nanofire de siliciu (SiNWs)**, iar etapele de fabricație corespunzătoare nanofirelor de siliciu vor fi detaliate în **Subcapitolul 4.1. Tehnici de fabricare a nanofirelor de siliciu**.

Interacțiunile ce pot avea loc între monocatene și suprafață sunt de tip covalent, chemosorbție, sau necovalent (bazat în special pe interacțiunea dintre biotină și streptavidină). Dintre acestea, interacțiunea covalentă asigură legarea puternică de suport, favorizând re folosirea biosenzorilor.

Avantajele utilizării suportului funcționalizat cu grupări aldehidice sunt date de capacitatea mare de legare a sondelor și de stabilitatea asigurată de legătura covalentă, însă semnalul obținut poate avea o intensitate limitată 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). Spre deosebire de modificarea chimică ce conferă grupări aldehydice, aceasta previne crearea impedimentelor sterice printr-o densitate mai scăzută a sondelor atașate. Tipurile de modificare chimică și interacțiuni dintre suport și biomolecule vor fi teoretizate în **Subcapitolul 2.2. Chimia suprafețelor**. Datele experimentale se regăsesc în **Subcapitolul 4.2. Modalități de funcționalizare a Si, SiNWs și SOI**.

1.2.2. Tehnica SPR – detecție optică (rezonanța plasmonilor de suprafață)

Un aspect esențial referitor la tehnica SPR prevede modul în care bioreceptorii (sondele ADN) se leagă de suprafață (Wijaya și colab., 2011). Fiind un metal inert, cu proces tehnologic de prelucrare bine pus la punct, aurul este adesea utilizat ca film subțire în biodetecție, întrucât permite legarea semi-covalentă a biomoleculelor datorită interacțiunilor tiol-metal (Hakkinen, 2012).

Aurul prezintă proprietăți plasmonice bune în spectrul lungimilor de undă aflate deasupra tranziției optice interbandă ($\lambda > 580$ nm), permițând o metodă de biodetecție alternativă numită SPR (Oliverio și colab., 2017), condițiile de rezonanță fiind influențate de indicele de refracție al materialului adsorbit pe un film metalic. (Newman și Turner, 2008). Avantajele conferite de diagnosticarea prin SPR sunt: i) posibilitatea reutilizării senzorului, scăzând astfel costul analizei, ii) obținerea rapidă a rezultatelor și iii) posibilitatea automatizării complete a procedurii. În plus, metoda SPR permite atingerea unor limite joase de detecție (Ex: biomolecule de 500 Da, cu concentrația de 1 pM).

Întrucât nu sunt publicate suficiente date referitoare la raportul optim de concentrații ADN co-immobilizat cu mercaptohexanol (MCH) pentru atingerea unei eficiențe crescute a moleculelor țintă hibridizate, s-a impus investigarea sistematică a acestui parametru în vederea realizării unui protocol viabil de atașare stabilă a ADN pe suport de Au. Un alt parametru investigat a fost limita de detecție a ADN hibridizat.

a) Optimizarea condițiilor de atașare a oligonucleotidelor specifice HPV pe suporturi de Au și evaluarea stabilității acestora după etape de procesare a biochip-ului

Crearea de monostraturi autoasamblate (SAM: Self Assembled Monolayers) pe film de Au reprezintă o metodă simplă și flexibilă prin care sunt modificate proprietățile optice ale structurilor metalice, cum ar fi indicele de refracție local, ori frecvența plasmonilor de suprafață (Love și colab., 2005). O serie de factori experimentali pot afecta

structura monostratului autoasamblat și rata formării acestuia: solventul, temperatura, timpul de imersie, concentrația, puritatea, precum și lungimea lanțului și structura moleculelor adsorbite (Drummond, Hill și Barton, 2003; Ulman, 1996). Reproducibilitatea biosenzorului depinde de suprafața acoperită de ADN monocatenar, parametru ce trebuie atent controlat.

În cadrul acestui studiu, au fost considerate două intervale de timp pentru imobilizarea ADN pe suporturile de Au și numeroase rapoarte de concentrații ADN:MCH pentru atingerea eficienței maxime de hibridizare. Rezultatele SPR au fost verificate și coroborate cu datele *microarray*. Capitolele și subcapitolele dedicate acestor studii sunt **2.1.3. Substraturi cu filme subțiri de Au, 2.2.4. Modificarea suporturilor de Au prin formarea monostraturilor autoasamblate, 5.6. Experimente *microarray* și SPR pentru genotiparea secvențelor corespunzătoare tulpinilor HPV imobilizate pe suporturi de Au.**

b) Evaluarea eficienței de hibridizare și a limitei de detecție pentru secvențe ADN reale

Performanțele optice ale senzorilor SPR sunt evaluate de regulă prin sensibilitatea de detecție (deplasarea unghiului de rezonanță datorată modificării indicelui de refracție al mediului) și rezoluția lor de care depinde limita de detecție (cea mai mică schimbare în indicele de refracție produsă de mediul măsurat ce produce o schimbare detectabilă în unghiul de rezonanță) (Wijaya și colab., 2011).

Eficiența de hibridizare a fost evaluată prin tehnica *microarray*, luând în considerare secvențe oligonucleotidice sintetice marcate fluorescent pentru a stabili raportul optim între concentrațiile de SAM-uri formate din ADN:MCH. Ulterior, a fost stabilită limita de detecție prin SPR pentru diferite concentrații de probă reală ADN.

Capitolele și subcapitolele dedicate acestor studii sunt **2.1.3. Substraturi cu filme subțiri de Au**, ce conține noțiuni teoretice, iar datele experimentale sunt cuprinse în **4.1. Suprafețe suport și 5.6. Experimente *microarray* și SPR pentru genotiparea secvențelor corespunzătoare tulpinilor HPV imobilizate pe suporturi de Au.**

1.2.3. Ψ -MOSFET – detecție electrică

Ψ -MOSFET (pseudo-MOSFET) este o metodă de caracterizare electrică utilizată pentru plachete de siliciu pe izolator (SOI) pentru determinarea mobilității și densității sarcinilor de interfață (Benea și colab., 2017). Ψ -MOSFET folosește structura de tip up-side-down a tranzistorului cu efect de câmp pe un substrat de siliciu pe izolator: substratul

Cap. 1. Introducere

de siliciu servește ca poartă pe spatele plachetei iar oxidul îngropat ca poartă dielectrică (poartă de oxid). O tensiune aplicată pe spate (V_{BG}) induce crearea unui canal la interfața dintre filmul de siliciu de deasupra și oxidul îngropat. Două sonde metalice plasate pe filmul subțire de siliciu joacă rolul de sursă și de drenă și permit măsurarea curentului de drenă (I_D) (Cristoloveanu și Williams, 1992).

Parametrii precum tensiunea de prag, de mobilitate sau de oscilații sub prag depind în cazul filmelor ultra-subțiri ale SOI, de sarcinile electrice de la suprafață (Ghibaudo, 1988). Prezența moleculelor cu încărcare electrică induce modificări ale caracteristicilor electrice ale canalului. În cadrul acestor experimente, am monitorizat evoluția parametrilor electrice după fiecare modificare chimică sau biologică a suprafeței de tip SOI (funcționalizare, atașarea sondelor ADN și hibridizare). Răspunsul electric al straturilor biochimice adăugate a fost înregistrat prin această metodă.

a) Stabilirea protocolului optim de imobilizare

Modificarea chimică a suprafeței este esențială pentru atașarea sondelor ADN, astfel că funcționalizarea substratului a fost realizată luând în considerare grupările funcționale NH_2 introduse la capătul 5' al sondei ADN. Alegerea tipului de funcționalizare a urmărit ușurința de atașare a biomoleculele și diminuarea erorilor în citirea semnalului provenite din procesarea suporturilor.

Tehnica *microarray* a devenit în acest caz metodă de validare a etapelor de lucru. Noțiunile teoretice referitoare la metoda de detecție se vor regăsi în subcapitolele **2.1.4. Substraturi pe bază de siliciu pe izolator (SOI)**, **2.2.1. Funcționalizarea cu (3-Aminopropil)triethoxisilan (APTES) și glutaraldehidă (GAD)**, **2.2.3 Funcționalizarea cu (3-Glicidiloxipropil)trimetoxisilan (GOPTMS)**, iar rezultatele experimentale vor fi discutate în **4.2. Modalități de funcționalizare a Si, SiNWs și SOI** și în **5.7. Caracterizări electrice pentru structuri test realizate pe substrat tip SOI**.

Pentru a demonstra fezabilitatea acestor tehnici de detecție, au fost utilizate numeroase replici ale secvențelor ADN corespunzătoare genei *BRCA1* și tulpinilor HPV. Pentru analiza statistică a datelor, au fost folosite testul ANOVA unifactorial, testul Student's t și elemente de statistică descriptivă.

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 elementelor de recunoaștere (în cazul de față, sondele ADN monocatenar) prin modificarea chimică a suprafeței. Într-un biosenzor, 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. Detecția prin tehnica SPR este posibilă datorită proprietăților plasmonice ale unui suport de sticlă acoperit cu film subțire metalic. Măsurătorile electrice specifice FET-urilor oferă în mod direct semnalul electric necesar, dacă substratul este semiconductor.

2.1. Suprafețe suport

2.1.1. Suporturi comerciale

Suporturile de sticlă sunt cel mai des utilizate ca substraturi pentru fabricarea platformelor *microarray* deoarece sunt inerte din punct de vedere chimic, nu sunt autofluorescente și se funcționalizează cu ușurință, permițând legarea moleculelor organice de suprafață. Depinzând de gruparea funcțională a filmului ce acoperă sticla, suprafața rezultată poate expune grupări aminice, aldehydice, epoxi sau tiol, de care se pot lega secvențe ADN modificate chimic sau nemodificate. Suporturile *microarray* comerciale sunt realizate din borosilicat sau sticlă calcosodică, ambele specificații având un nivel foarte scăzut de fluorescență. Pentru atingerea unui nivel optim al sensibilității de detecție a moleculelor analizate, este esențial ca suporturile *microarray* să prezinte un nivel scăzut de autofluorescență. 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).

În prezentul studiu, s-au utilizat suporturi comerciale de sticlă furnizate de compania ArrayIT, USA având dimensiunile unei lame de microscop. Înainte de funcționalizare, substraturile sunt șlefuite de către producător pentru a obține uniformitate mare a suprafeței ce prezintă grupări SiO₂ distribuite omogen pentru a conferi silanilor

reactivitate mare, necesară procedurilor ulterioare de modificare chimică. În **ANEXA 1 (A1.1.a)** sunt prezentate specificațiile producătorului pentru suporturile utilizate ca referință în activitatea de cercetare.

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

Dezvoltarea biosenzorilor de înaltă precizie configurați la scală nanometrică a cunoscut o evoluție accentuată în ultimii ani prin parteneriatul dintre biologie și nanoștiințe. 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 rapidă și simultană a biomoleculilor (Coffinier și Boukherroub, 2014).

Au fost dezvoltate diverse metode de sinteză a siliciului nanostructurat, împărțite în două mari grupe: *top-down* și *bottom-up* (Hobbs, Petkov și Holmes, 2012). Procedura *bottom-up* de nanofabricare presupune obținerea nanostructurilor pe un substrat fie prin creșterea controlată (epitaxială) pornind de la un germene cu structură cristalină astfel că structura fibrelor va prelua structura cristalină a germeului, fie prin creșterea structurilor unidimensionale pornind de la metoda Vapor-Lichid-Solid (VLS: Vapour Liquid Solid Growth). Prin metoda *top-down*, nanostructurile de interes sunt configurate dintr-un substrat prin corodare uscată (ablație laser sau Corodarea cu Ioni Reactivi - RIE: Reactive Ion Etching), ori prin corodare umedă (corodare electrochimică sau MACE) (Gengfeng și Xu; Mikhael și colab., 2011). Fabricarea Si nanostructurat prin metoda MACE a fost demonstrată pentru prima oară de către Li și Bohn (Li și Bohn, 2000), devenind ulterior foarte apreciată datorită costului scăzut și a ușurinței de obținere a nanostructurilor de Si cu diferite dimensiuni, morfologii și proprietăți (Dawood și colab., 2012; 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 sunt factori care influențează morfologia nanofirelor (Huang și colab., 2008, Mikhael și colab., 2011).

În mod curent, MACE include doi pași succesivi, respectiv 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). 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. Metalele nobile precum Ag,

Au, Pt și Pd sunt cei mai utilizați catalizatori în aceste reacții. Particulele metalice pot fi depuse pe substratul de Si prin evaporare termică, pulverizare catodică (*sputtering*), depunere galvanică sau depunere chimică pornind de la săruri metalice (Zhipeng și colab., 2011). Asoh și colab. (Asof, Arai și Ono, 2007) au investigat influența tipului nanoparticulelor metalice în procesul de corodare, remarcând faptul că viteza de corodare e influențată de metalul nobil utilizat, obținându-se diferite morfologii ale structurilor de Si și ale macroporilor. Observația acestora este susținută de Tsujino și Matsumura (Tsujino și Matsumura, 2007) prin configurarea nanoporilor cu diferite morfologii prin utilizarea nanoparticulelor individuale de Au și Ag, precum și de Dawood și colab. (Dawood și colab., 2012) care au fabricat nanofire cu mezopori obținute în urma corodării cu nanoparticule de Au, pe când cele configurate în prezența nanoparticulelor de Ag prezentau o structură cristalină acoperită de un înveliș poros a cărui densitate creștea spre baza substratului.

Nanoparticulele metalice (NPs) cu rol de catalizatori ai reacției de corodare pot fi obținute prin metode convenționale care folosesc precursori toxici. Ca alternativă, este propusă prepararea nanoparticulelor prin metode “green chemistry” cu randament, solubilitate și stabilitate ridicate (Liu și colab., 2014).

Metodele convenționale prin care pot fi obținute nanoparticulele sunt clasificate ca *top-down* și *bottom-up* (Figura 2.1).

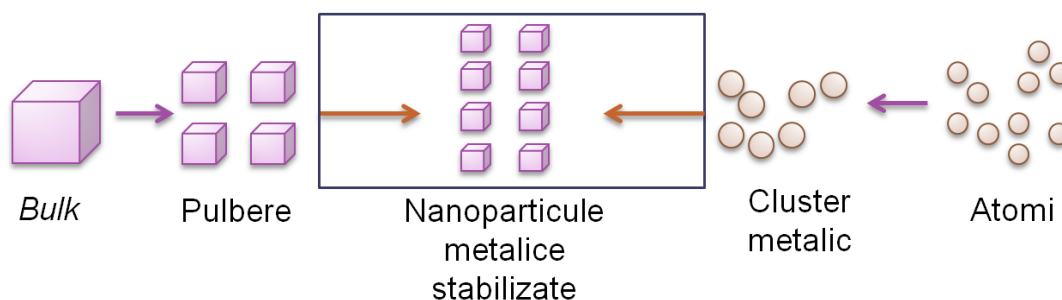


Figura 2.1. Metode convenționale de obținere a nanoparticulelor metalice

Metoda *top-down* este o metodă fizică (mecanică) ce presupune șlefuirea a corpului metalic (*bulk*) de proveniență și stabilizarea ulterioară a pulberii rezultate cu ajutorul agenților stabilizatori. Pentru un randament mai ridicat, există metodele chimice *bottom-up* de sinteză a nanoparticulelor (inclusiv reducerea chimică) și metodele electrochimice. Totuși, acestea presupun utilizarea unor substanțe nocive, precum citratul, borohidrura, tio-glicerolul și 2-mercaptoetanolul, generând în final produse secundare toxice (Zhang și

colab., 2016). Totodată, se impune un tratament suplimentar pentru prevenirea agregării, astfel încât nanoparticulele rezultate să aibă puritatea și dimensiuni controlate.

De exemplu, pentru sinteza nanoparticulelor de Ag (AgNPs) a fost propusă metoda biologică de preparare (ANEXA 2) ca alternativă la sinteza chimică a acestora, dovedindu-se a fi o abordare simplă, necostisitoare și ecologică de preparare cu randament ridicat a AgNPs de dimensiuni bine definite. În acest scop, au fost utilizate bacterii, drojdii, extracte din plante, vitamine și aminoacizi. Sinteza biologică a nanoparticulelor depinde de solventul utilizat, agentul reducător și materialul netoxic (Ni și colab., 2015; Roy, Sarkar și Ghosh, 2015).

Metalotioneinele sunt proteine sau polipeptide celulare de dimensiuni mici capabile să lege cantități mari de metale datorită prezenței cisteinelor (Cys), prin intermediul grupărilor sulfhidril (Simmons și Singleton, 1996; Fărcășanu și Ruță, 2017). Un mecanism propus de obținere a AgNPs este prin reducerea Ag (I) (în formă ionică) efectuată de enzimele prezente în citoplasmă sau în membrana plasmatică. Nanoparticulele se regăsesc în vezicule, izolate de citoplasmă și excretate prin membrana celulară prin exocitoză. În acest studiu, am investigat posibilitatea obținerii AgNPs folosind celule de *Saccharomyces cerevisiae* care exprimă în mod heterolog metalotioneine de plante (MTs) orientate spre fața interioară a membranei plasmatice.

Conform aspectelor expuse anterior, configurarea nanofirelor de siliciu reprezintă o procedură importantă în nanotehnologie. Reproducibilitatea caracteristicilor morfologice (înălțime, grosime, orientare, densitate) reprezintă o provocare suplimentară datorită numeroșilor parametri fizico-chimici ce trebuie controlați interdependent.

A fost investigată corodarea substratului asistată de **nanoparticule de Au (AuNPs)** cu dimensiuni controlate, uniform distribuite pe Si modificat chimic cu (3-aminopropil)trietoxisilan (APTES), fluxul tehnologic fiind schematizat în **Figura 2.2**.

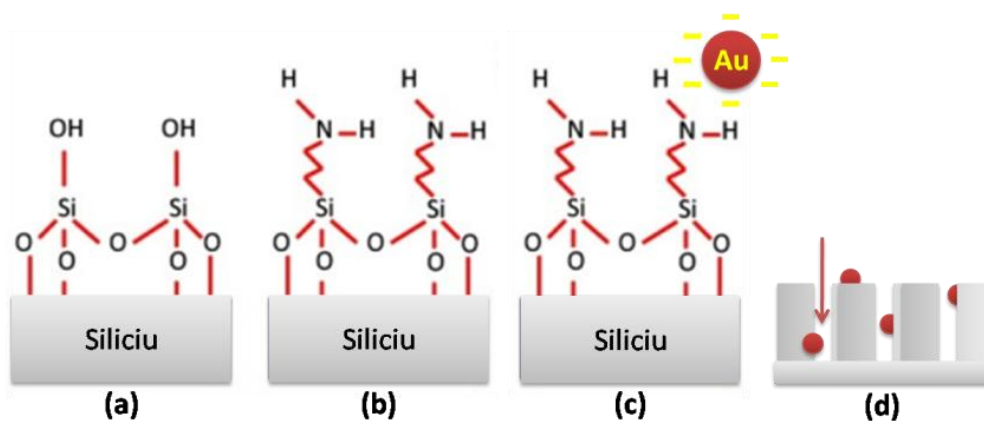


Figura 2.2. Etapele corodării siliciului cu nanoparticule de Au:

(a) imersarea plachetei de Si în soluție Piranha pentru expunerea grupărilor hidroxil pe suprafață; (b) legarea APTES de grupările hidroxil și expunerea la suprafață a grupărilor amino; (c) stabilizarea nanoparticulele de Au în citrat legate prin interacțiune ionică de grupările NH_2 ; (d) corodarea chimică a substratului de Si cu nanoparticule de Au distribuite uniform

De asemenea, am utilizat AgNO_3 pentru a investiga efectele rezistivității și a orientării cristaline a plachetei de Si, precum și a diferitelor intervale de corodare, a concentrației de AgNO_3 și de HF, conform reprezentării grafice din **Figura 2.3**.

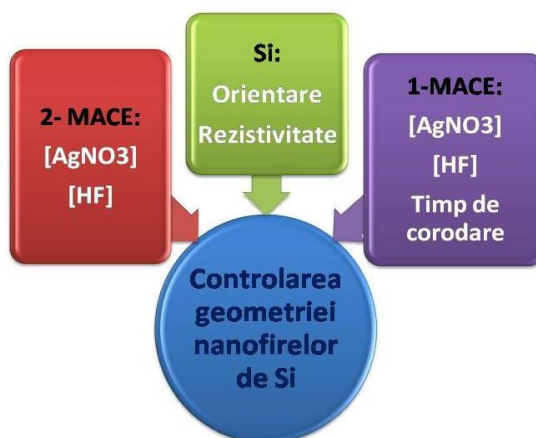


Figura 2.3. Investigarea parametrilor experimentali ai corodării asistate de Ag pentru controlarea morfologiei nanofirelor de Si

Am desfășurat totodată experimente de corodare chimică într-un singur pas (1-MACE) și, respectiv în doi pași (2-MACE), prin utilizarea sărurilor de Ag.

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). Aurul este preferat în detecția SPR datorită proprietăților plasmonice bune pentru lungimi de undă deasupra nivelului de tranziție inter-bandă ($\lambda \geq 580$ nm) (Oliverio și colab., 2017).

Depunerea filmelor subțiri de Au poate fi realizată prin tehnica de Depunere Fizică în Stare de Vaporii (PVD - Physical Vapour Deposition), în care un metal în stare solidă este vaporizat în vid înalt și depus pe un substrat. Tehnica PVD cuprinde mai multe metode, printre care se numără Depunerea Fizică în Stare de Vaporii cu Fascicul Electronic (Electron Beam Physical Vapour Deposition - EBPVD), Depunerea Fizică în Stare de Vaporii cu Descărcare în Plasmă (Plasma-Enhanced Physical Vapor Deposition - PEPVD) sau Depunerea prin Pulverizare Catodică (magnetron sputtering) (Oliveira și colab., 2015). În realizarea biosenzorilor SPR, a fost utilizată depunerea prin pulverizare catodică prin

care au fost obținute filme omogene de Au pe discuri de sticlă BK7 (constituite din borosilicat), având ca promotor de aderență la sticlă un strat subțire de Cr.

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

În caracterizările electrice, utilizarea suporturilor de tip siliciu pe izolator (SOI) 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).

Procesul Smart-Cut[®] pentru obținerea plachetelor de tip SOI constă în 4 etape, schematizate în **Figura 2.4**.

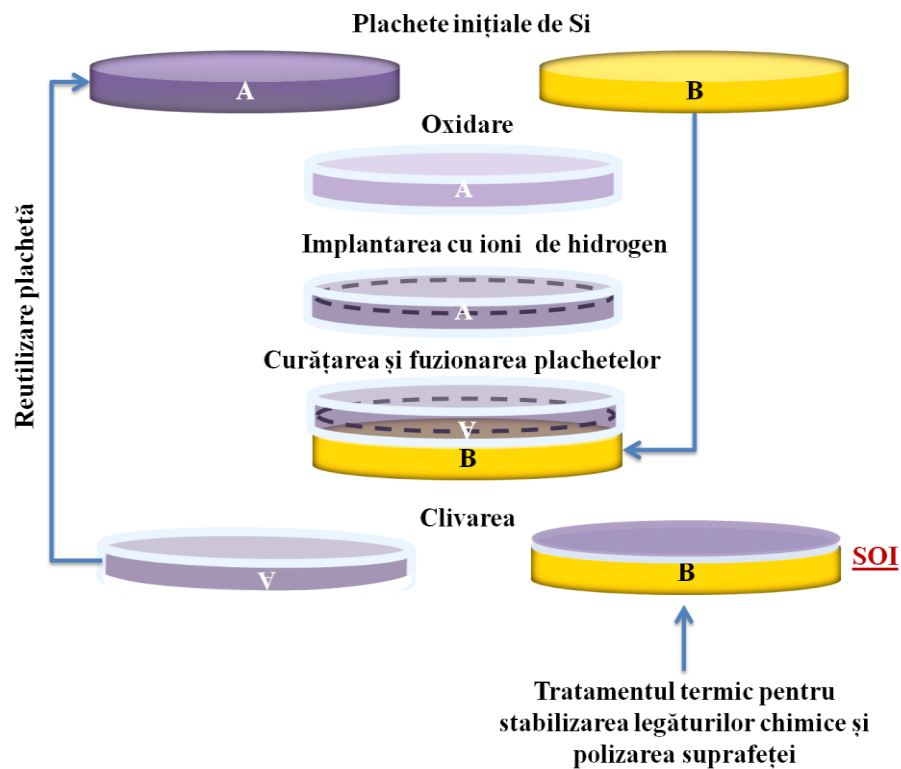


Figura 2.4. Procedura Smart-Cut[®] (adaptare după Nguyen B., Celler G. și Mazuré, 2009 și http://www.soitec.com/pdf/Soitec_SmartCut_FR.pdf)

Etapele schematizate în **Figura 2.4** constau în:

- Implantarea H într-o plachetă A, ce conține un strat dielectric, de regulă SiO₂ crescut termic;

- Îmbinarea hidrofilă a plachetei A cu o plachetă B mai groasă, nemodificată sau conținând un strat dielectric de SiO₂, după etapa de curățare a plachetelor ce are rolul de a înlătura eventualele impurități; placheta B, devine suportul care conferă rigiditate ansamblului, constituind în același timp din punct de vedere electric substratul (bulk) aflat sub stratul de oxid îngropat;
- Un tratament termic în două etape, prima treaptă de temperatură (400-600 °C) având rolul de a activa placheta A de-a lungul regiunii bogate în ioni de hidrogen într-un strat de Si monocristalin atașat de placheta B prin intermediul stratului de SiO₂ îngropat (structura de tip SOI), restul plachetei A fiind reutilizat într-un nou proces de fabricare a structurilor SOI. Al doilea tratament termic (în jur de 1100 °C) întărește legăturile chimice dintre Si și stratul îngropat de SiO₂;
- Polizarea structurii de tip SOI este necesară pentru înlăturarea micro-asperităților rămase în urma separării în două a stratului A de Si (Bruehl, Aspar și Auberton-Herve, 1997).

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).

În **Tabelul 2.1** sunt redată metodele de funcționalizare chimică și de imobilizare a sondelor ADN, fiind evidențiate (cu albastru) mecanismele de atașare selectate.

Tabel 2.1. Metodele de imobilizare a sondelor pe suprafețele funcționalizate. (adaptare după Nimse și colab., 2014)

Metode de imobilizare	Gruparea funcțională a suprafeței	Tip de modificare chimică a monocatenei ADN (ssDNA)
Adsorbție fizică	Aminosilan	Nu este necesară
(Interacțiuni	Nitroceluloză	Nu este necesară

Cap. 2. Tehnici și platforme de detecție

electrostatice)	Poli(L-lizină)	Nu este necesară
	Ion diazoniu	Nu este necesară
Chemisorbție	Aur	Tiol
Covalentă	Carboxil (-COOH)	Amină (NH_2)
	Aldehydă (-CHO)	Amină (NH_2)
	Epoxi (-CHCH₂O)	Amină (NH_2)
	Izotiocianat (-N=C=S)	Amină (NH_2)
	Maleimidă (-HC ₂ (CO) ₂ NH)	Tiol (-SH)
	Mercaptosilan (-Si-R-SH)	Tiol (-SH)
Necovalentă (bioafinitate)	Steptavidină	ADN-Biotină
	Avidină	ADN-Biotină

Pentru imobilizare, deseori este preferată **adsorbția fizică**, întrucât nu necesită modificarea chimică ulterioară a moleculelor de ADN monocatenar. Totuși, nu e recomandată pentru fabricarea unor platforme de detecție cu rezultate reproductibile, din cauza atașării slabe pe suport și eficienței de hibridizare scăzute, datorate multiplelor interacțiuni ale sondelor ADN cu suprafața (Sonawane și Nimse, 2016; Kim și Herr, 2013).

Metoda chemisorbției 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).

Legătura covalentă este cea mai eficientă pentru imobilizarea biomoleculelor, reprezentând un mecanism de atașare stabilă, ireversibilă, ce asigură orientarea perpendiculară a monocatanelor ADN față de suport, crescând eficiența de hibridizare a ADN (Rashid și Yusof, 2017).

Sunt enumerate mai jos procedurile de obținere a grupărilor funcționale necesare atașării covalente a ADN, motivând în final opțiunile aplicate în prezentul studiu.

- Funcționalizarea cu **grupări carboxil** necesită în plus utilizarea unei carbodiimide (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă - EDC) pentru promovarea reacției între grupările carboxil și aminice. În urma reacției dintre EDC și grupările carboxil, rezultă un compus intermediar (o-acrilizouree) ce reacționează foarte lent cu grupările amino formând o legătură ușor de hidrolizat în mediul apos. Așadar, imobilizarea

ADN pe suporturi cu grupări carboxilice prezintă risc crescut de erori experimentale și necesită utilizarea unor compuși adiționali pentru promovarea reacției de atașare, cum ar fi EDC - NHS (N-hidroxisucinimidil ester) (Kim și Herr, 2013).

- 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).

- Protocolul de 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).

- **Funcționalizarea cu izotiocianat** permite legarea de suport a ADN modificat cu grupări aminice. Această chimie a suprafeței implică utilizarea unor protocoale complexe, ce pot duce la multe erori experimentale, un dezavantaj major fiind hibridizarea nespecifică (Nimse și colab., 2014; Kim și Herr, 2013);

- **Maleimida** este utilizată pentru legarea ADN modificat cu grupări sulfhidril. Problema majoră este instabilitatea hidrolitică a acesteia, fiind înlăturată de pe suport în soluții apoase (Nimse și colab., 2014; Kim și Herr, 2013);

- **Funcționalizarea cu mercaptosilan** creează multe interacțiuni nespecifice și necesită temperaturi înalte de hibridizare (Nimse și colab., 2014).

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

Filmele moleculare de aminosilani sunt utilizate în cercetare și aplicații industriale pentru modificarea proprietăților chimice ale suprafețelor de sticlă ori siliciu, necesare pentru atașarea ADN, a enzimelor sau a nanoparticulelor anorganice (Fengxiang și Srinivasan, 2004; Tobias și colab., 2015; Howarter și Youngblood, 2006). Acestea 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 ($-OH$)

Cap. 2. Tehnici și platforme de detecție

generate pe suprafață. Expunerea grupărilor –OH se realizează prin curățarea prealabilă a substratului în soluție Piranha (3:1 H₂SO₄:H₂O₂) (**Figura 2.5**).

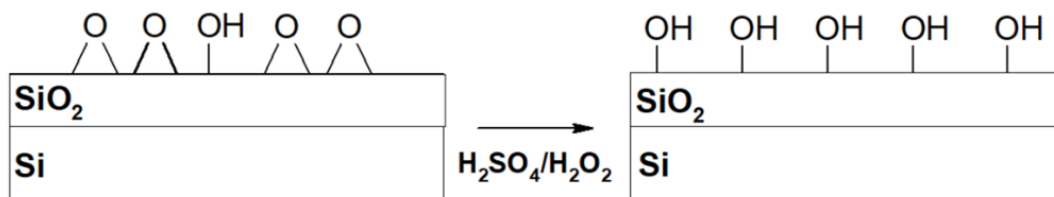


Figura 2.5. Hidrofilizarea substraturilor de sticlă sau siliciu (ACD/ChemSketch (Freeware) version 2016.2.2, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com.)*

* Toate schemele similare au fost realizate cu ACD/ChemSketch (Freeware) version 2016.2.2

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 hidroxilată, 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 hidroxilate este descrisă în **Figura 2.6**.

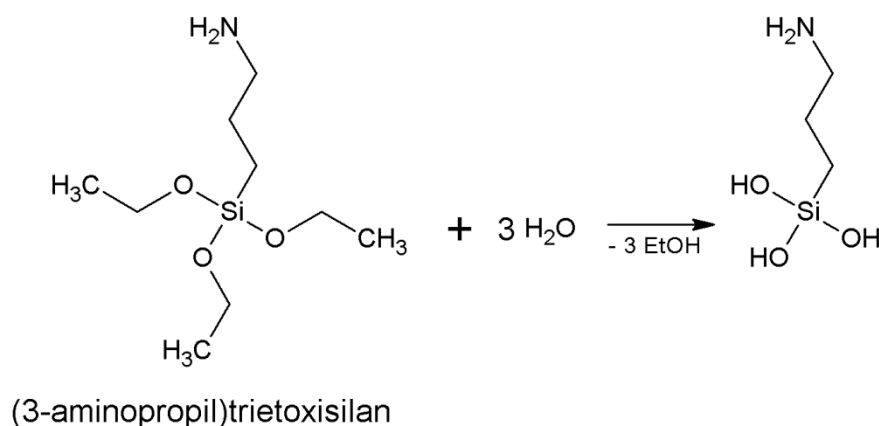


Figura 2.6. Hidroliza APTES

În prezența apei, are loc hidroliza -Si(O-CH₂-CH₃)₃ la trisilanol -Si(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 2.7 ilustrează formarea legăturilor covalente cu substratul modificat chimic, după aplicarea tratamentului termic (Vandenberg și colab., 1991).

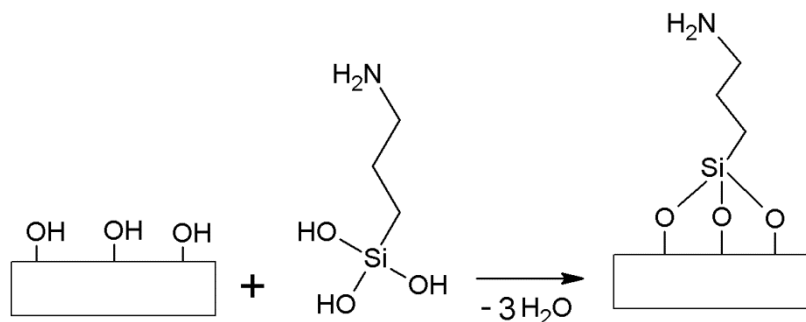


Figura 2.7. Atașarea covalentă a aminosilanului

Se formează astfel grupări Si–O–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 a obține grupări funcționale aldehidice (C=O), se tratează suprafața de interes cu glutaraldehidă, formându-se baze Schiff cu grupările NH₂specifice APTES (**Figura 2.8**).

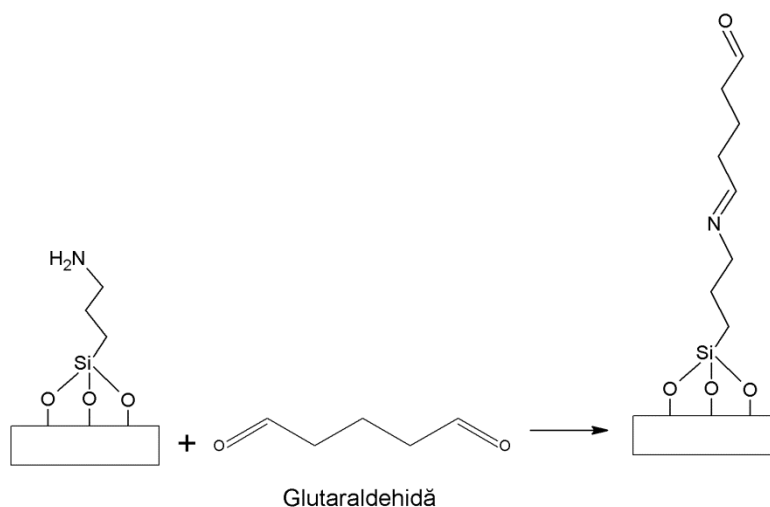


Figura 2.8. Funcționalizarea APTES cu glutaraldehidă

Aceasta este 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).

În **Capitolul 4**, am studiat prin Spectroscopie în Infraroșu cu Transformată Fourier (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) eficiența funcționalizării substraturilor

de Si monocristalin cu APTES hidrolizat la concentrații și timpi diferiți, cât și influența tratamentului termic aplicat la finalul procesului. De asemenea, a fost verificată și funcționalizarea APTES în fază de vapori, spectrul FTIR fiind comparat cu cel obținut pentru silanizarea cu soluție hidrolizată. În final, au fost comparate spectrele FTIR obținute pentru substraturile având APTES hidrolizat sau depus sub formă de vapori și modificate chimic cu glutaraldehidă.

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

SU-8 este un polimer utilizat de regulă pentru definirea unor structuri prin fotolitografie, demonstrându-și utilitatea în fabricarea sistemelor micro-electro-mecanice (MEMS), microfluidice sau a cantileverelor (Deepu, Sai și Mukherji, 2008). Atașarea ADN pe SU-8 a fost demonstrată pentru prima oară de grupul lui Dufva (Marie și colab., 2006), fiind descrisă o procedură de atașare directă a sondelor depuse utilizând tehnica *microarray*. În **Figura 2.9**, este redată structura unei molecule de SU-8. Aceasta conține 8 grupări epoxidice care permit atașarea covalentă a ADN modificat la unul din capete cu grupări NH₂.

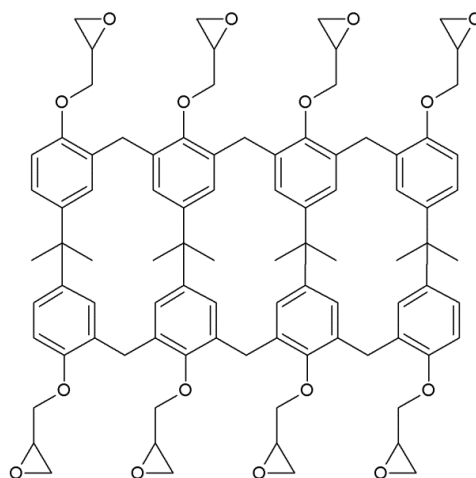


Figura 2.9. Structura chimică a SU-8

Pentru depunerea uniformă a fotorezistului, este necesară curățarea prealabilă a substraturilor în soluție Piranha sau în plasmă de O₂. Principalele componente ale fotorezistului sunt polimerul (rășina de bază) care aderă la substrat, solvenul pentru controlul vâscozității (ciclopentanonă pentru SU-8 2000), ce permite păstrarea polimerului în stare lichidă și agentul fotoactiv, care promovează reacția de polimerizare prin expunerea la radiație UV în spectru apropiat (Martinez-Duarte, Madou, 2011). Depunerea (etalarea) SU-8 pe un substrat se realizează prin centrifugare (*spin-coating*), grosimea

stratului depinzând de vâscozitatea polimerului și viteza de centrifugăicentrifugare. După depunere, surplusul de solvent este evaporat prin tratament termic, utilizând două trepte de temperatură. Polimerizarea este realizată prin expunerea la UV a suportului, urmând 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 biomoleculilor 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 2.10** este reprezentată schematic molecula de GOPTMS.

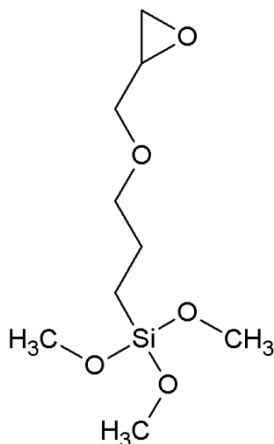


Figura 2.10. Structura GOPTMS

Funcționalizarea cu GOPTMS se poate realiza atât în fază lichidă, cât și prin depunere sub formă de vapori. În **Figura 2.11** este prezentată hidroliza unei molecule de GOPTMS.

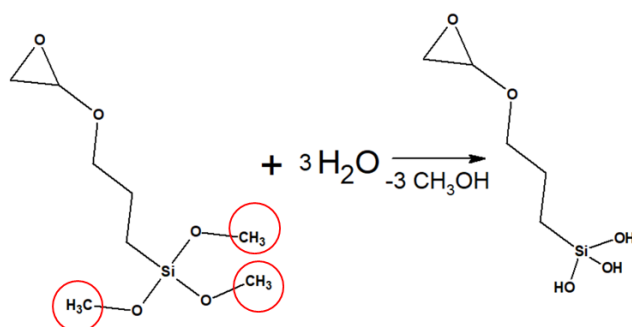


Figura 2.11. Hidroliza GOPTMS

Figura 2.12 prezintă mecanismul de atașare a GOPTMS de substrat.

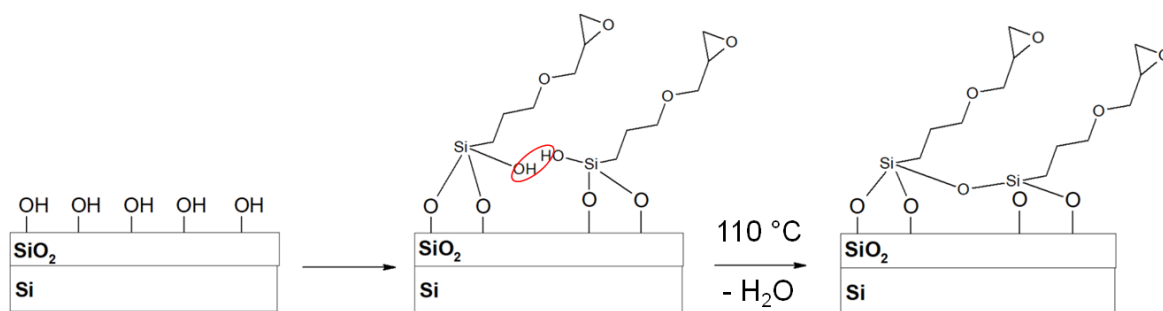


Figura 2.12. Fixarea GOPTMS pe suprafața de SiO₂

Tratamentul termic formează legături Si-O-Si între două molecule GOPTMS cu grupări –OH nereacționate sau între GOPTMS și substrat.

Conform literaturii de specialitate, 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 în **Capitolele 4 și 5** 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) sunt ușor de generat și pot fi modificate cu precizie la nivel molecular. Prin urmare, utilizarea SAM-urilor pentru diverse domenii în cercetare și aplicații comerciale crește rapid. O clasă bine-documentată de SAM-uri este bazată pe adsorbția puternică a tiolilor (R-SH), a disulfidelor (R-S-S-R) și a sulfidelor (R-S-R) de suprafețe metalice. Formarea monostraturilor autoasamblate se desfășoară în două etape. Se inițiază procesul de auto-asamblare al alchil-tiolilor prin atașarea puternică (126 kJ/mol) a atomilor de sulf pe filmul de Au, fiind urmat de 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 monostratului (Luderer și Walschus, 2005).

Suporturile de aur nu necesită funcționalizare, fiind 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.

2.2.5. Mecanisme de imobilizare și hibridizare pe substraturi

Legarea perpendiculară a sondelor ADN de substrat se realizează prin legături covalente sau chemisorbție, în timp ce secvențele ADN complementar se atașează de respectivele sonde prin punți de hidrogen. Pentru eficientizarea procesului de hibridizare, se alege concentrația optimă de sonde ADN pentru prevenirea impedimentelor sterice (Peterson, Wolf, Georgiadis, 2002; Wenmackers și colab., 2009). Cu toate acestea, monocatenele ADN, cât și moleculele ADN dublu catenare se îndoiesc sau răsucesc în soluție, către interfața lichid-aer (Monti, Prampolini și Barone, 2011). Wong și Pettitt (Wong și Pettitt, 2004) au simulat orientarea ADN atașat prin capătul 5'-NH₂-C₆ de un substrat cu grupări epoxidice și au demonstrat că sondele se înclină din poziția verticală până la un unghi maxim de 55 °, în timp ce spațiatorul rămâne perpendicular pe suprafață.

În alte studii, orientarea ADN a fost măsurată prin determinarea grosimii stratului cu ajutorul Microscopiei de Forță Atomică (AFM - Atomic Force Microscopy) (Shin și colab., 2006), elipsometriei (Wenmackers și colab., 2008) sau prin difracția de neutroni (Levicky și colab., 1998). Studiile au implicat suporturi de Au sau diamant funcționalizat. Pe Au, Levicky și colaboratorii (Levicky și colab., 1998) au stabilit prin difracția de neutroni că moleculele ADN se înclină până la un unghi maxim de 30 °, în timp ce Shin și colab (Shin și colab., 2006) au calculat orientarea ADN la un unghi situat între 30-46 ° relativ cu suprafața diamantului. Aceste unghiuri reprezintă orientarea medie a moleculelor ADN față de un suport plan, fiind influențate și de aranjamentul intermolecular care depinde de densitatea oligonucleotidelor (Wenmackers și colab., 2009).

Orientarea perpendiculară în raport cu suprafața promovată de mecanismele de atașare studiate îmbunătățește reacția de hibridizare prin facilitarea accesului moleculelor ADN complementare la sondele corespunzătoare.

2.3. Tehnici și metode de detecție

2.3.1. Tehnica *Microarray*

Platformele *microarray* sunt alcătuite dintr-un aranjament ordonat de *spot*-uri constituite din sonde ADN monocatenar diluate într-o soluție de imobilizare și atașate de un suport solid, modificat chimic. Mecanismul de detecție 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). Principiul de detecție este ilustrat în **Figura 2.13.**

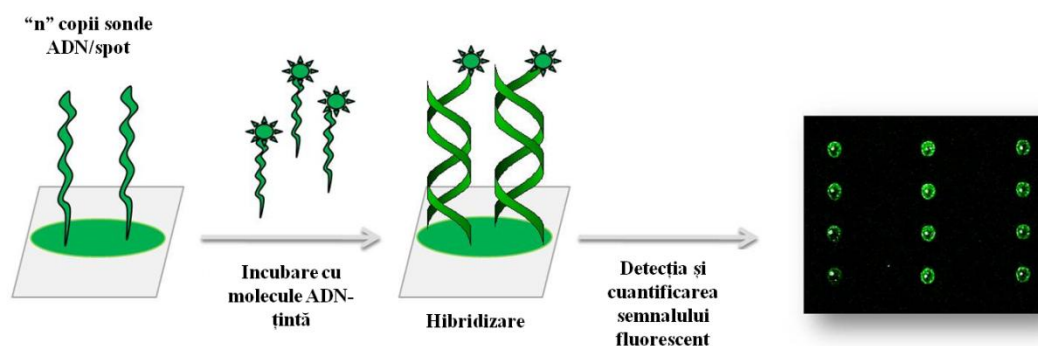


Figura 2.13. Principiul de detecție *microarray*

Randamentul de hibridizare se deduce din nivelul semnalului fluorescent și este determinat de gradul de complementaritate dintre cele două catene. În cazul unei nepotriviri nucleotidice, semnalul fluorescent de hibridizare este scăzut.

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 concentrație controlată de material biologic, prin contact direct cu suprafața sau fără contact. Depunerea prin contact implică utilizarea vârfurilor solide sau a vârfurilor cu rezervor, pe când depunerea fără contact utilizează un sistem piezoelectric pentru eliberarea controlată a materialului. În studiul de față am utilizat vârfuri solide, din titan, cu diametrul de ~200 μm .

În **Figura 2.14** este prezentată o evaluare comparativă efectuată cu ajutorul Microscopiei Electronice de Baleiaj (SEM - Scanning Electron Microscopy) a uniformității vârfulor solide, utilizate la depunerea robotică a materialului biologic.

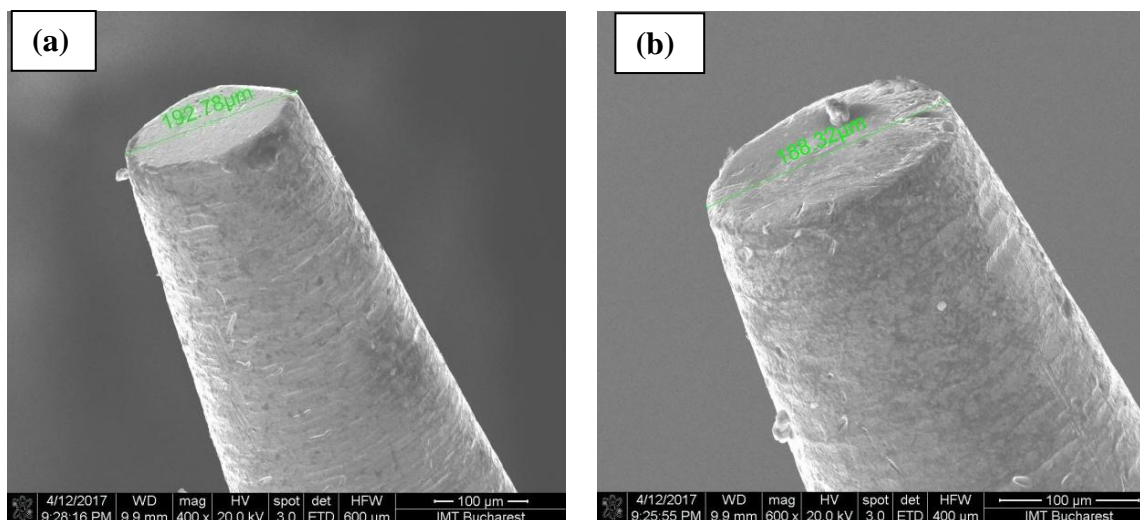


Figura 2.14. Imagini SEM ale vârfulor solide:

(a) vârf cu suprafață de contact optimă; (b) vârf cu uzură neuniformă

În **Figura 2.14(a)** este prezentat ca exemplu un vârf solid având suprafața uniformă iar în **Figura 2.14(b)** este prezentat un vârf uzat, ce prezintă neuniformități ale suprafeței și marginile foarte tocite. Utilizarea unor vârfulor uzate conduce la scăderea reproductibilității *spot*-urilor și de aceea, este necesară verificarea uniformității lor anterior inițierii procesului de depunere.

Depunerea *spot*-urilor utilizează un sistem robotizat (OmniGrid Micro, Genomic Solutions, SUA), prin care sunt controlați parametrii de depunere (viteză, presiune mecanică, numărul de replici) și care prezintă o incintă pentru menținerea umidității.

Reacția de hibridizare este verificată prin detecția semnalului fluorescent cu un echipament cu scanare laser, jucând un rol fundamental în fluxul de lucru. Sursele de eroare ce pot surveni în detecția fluorescenței sunt zgomotul de fond generat de prezența impurităților și neuniformității suporturi și variații ale semnalului fluorescent dat de erori din timpul proceselor de depunere ADN și imobilizare.

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

Cap. 2. Tehnici și platforme de detecție

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). Instrumentele de detecție bazate pe fenomenul SPR reunesc trei elemente esențiale într-un sistem: o unitate optică, o unitate de manevrare a soluției analizate și suprafața senzorului. Acestea utilizează o metodă optică prin care se măsoară modificarea indicelui de refracție în apropierea suprafeței senzorului (până la 200 nm distanță de suprafață). Senzorii SPR nu au selectivitate intrinsecă, toate modificările în indicele unghiului de refracție fiind înregistrate ca modificare a semnalului. Aceste modificări pot fi date fie de indicele de refracție al lichidului în care este analitul, fie de materialul biologic adsorbit pe suprafața senzorului (Tudos și Schasfoort, 2008; 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, rezultatele fiind redată într-o sensogramă.

Figura 2.15 reprezintă o sensogramă tipică, fiind redați pașii generali ai unei măsurători.

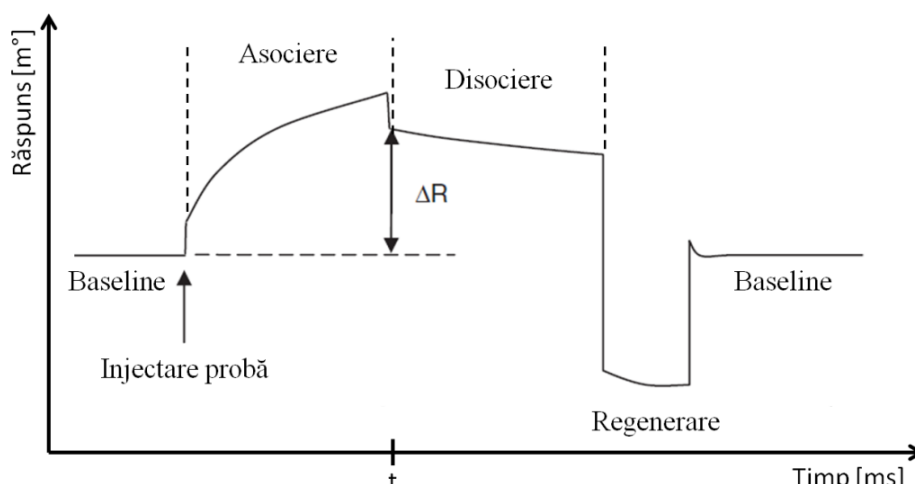


Figura 2.15. Sensogramă prezentând etapele parcurse în analiza SPR (adaptare după Tudos și Schasfoort, 2008)

Fiecare măsurare debutează cu stabilirea unui nivel de referință (*baseline*) ce constă în 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, ΔR indicând răspunsul datorat legării moleculelor țintă la un moment t . Urmează etapa de disociere ce corespunde injectării unei soluții prin care sunt înlăturate

secvențele țintă atașate nespecific. Etapa de regenerare corespunde înlăturării analitului, urmând un nou ciclu de analiză (Tudos și Schasfoort, 2008).

2.3.3. Metoda Ψ -MOSFET

Ψ -MOSFET (pseudo-MOSFET) este o metodă ce 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 siliciu, astfel încât caracteristicile de tip canal n și canal p pot fi obținute pe același dispozitiv (Colinge, 1997). În **Figura 2.16.** este prezentat principiul de caracterizare a substraturilor SOI.

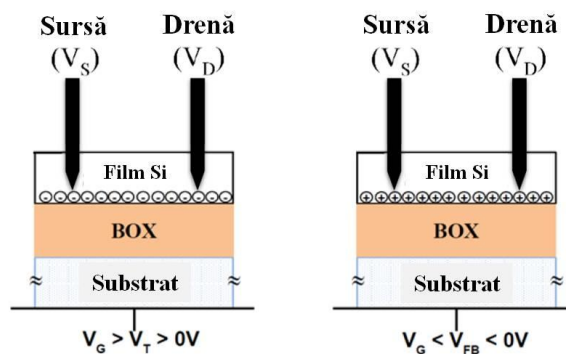


Figura 2.16. Conducția în Ψ -MOSFET

În cazul structurilor de tip Ψ -MOSFET, substratul de siliciu 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 siliciu și oxidul îngropat. Două sonde metalice plasate pe suprafața semiconductoră 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*

O clasă importantă de gene este reprezentată de antioncogene (gene supresoare ale creșterii tumorale) ce 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 (LOH: Loss of Heterozigosity) (Hinds și Weinberg, 1994). Când o persoană moștenește o alelă mutantă pe linie germinală, predispoziția la cancer este crescută deoarece există o probabilitate mai mare de apariție a unei mutații somatice în trans, în cadrul aceleiași celule, care inactivează a doua alelă (Knudson, 1971; Lu și colab., 2015)

Gena *BRCA1* are o dimensiune 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 poliubiquitinilare atașate de Lys. Activitatea acesteia ca ubiquitin-protein ligază E3 este necesară pentru a-și desfășura activitatea de supresor al creșterii tumorale. Proteina conține două domenii conservate pentru interacțiunea proteină-proteină: 1) BRCT la capătul C-terminal, prin care leagă proteine fosforilate și 2) un domeniu *zinc finger* tip RING la capătul N-terminal, prin care leagă proteina BARD1 pentru formarea unui heterodimer ce își exercită rolul în menținerea stabilității genomice, în repararea rupturilor dublu catenare, în recombinare și în transcriere. Fosfoproteina *BRCA1* face parte din Complexul de Monitorizare a Genomului Asociat cu *BRCA1* (BASC - *BRCA1* Associated Genome Surveillance Complex) care include proteine supresoare tumorale, proteine implicate în repararea rupturilor ADN și cu rol în semnalizarea celulară (Miki și colab., 1994; O'Leary și colab., 2016; Wang și colab., 2000; Campbell, Edwards și Glover, 2010; Brzovic și colab., 2001) (**Figura 3.1.**).

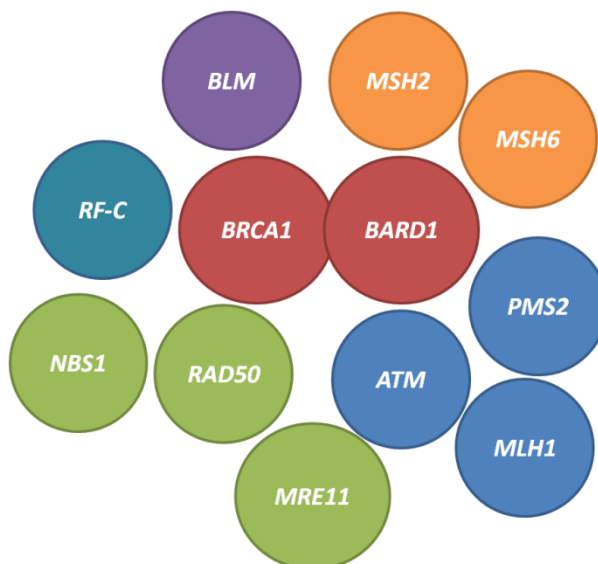


Figura 3.1. Reprezentare schematică a principalelor proteine care fac parte din complexul BASC (adaptare după Wang și colab., 2000; Futaki și Liu, 2000)

Complexul BASC cuprinde proteine implicate în repararea ADN, cum ar fi MSH2, MLH1, MSH6 (repararea *mismatch*-urilor), ATM și BLM. Pe lângă acestea, include și complexul RAD50-MRE11-NBS1 și factorul C de replicare a ADN (RF-C) (Wang și colab., 2000; Futaki și Liu, 2001).

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). Mutațiile din cadrul genei *BRCA1* pot fi mici deleții sau inserții care conduc la translația unei proteine truncate (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). Substituțiile uninucleotidice sunt cel mai comun tip de polimorfism, fiind răspândite în întregul genom (ex: regiuni promotor, regiuni codificatoare sau secvențe intronice) cu o frecvență de aproximativ 1 la 1000 perechi de baze.

SNPs întâlnite în regiunile codificatoare pot produce mutații **cu efect sinonim**, prin codificarea unui aminoacid nemodificat, în timp ce substituțiile uninucleotidice care **nu au efect sinonim** (nsSNPs: nonsynonymous SNPs) modifică secvența de aminoacizi a proteinei codificate, funcția acestora fiind modificată (Shastry, 2002). Mutațiile **nonsens** conduc la formarea prematură a unui codon STOP, rezultând o proteină truncată. Mutațiile de tip **indel** sunt cauzate de inserția sau deleția unei nucleotide, având ca efect schimbarea cadrului de citire (Covic, Ștefănescu și Sandovici, 2011). Variațiile genetice de tipul SNPs din cadrul mai multor populații au fost corelate cu predispoziția la dezvoltarea unor boli asociate cu mai mulți factori cumulativi (genetici, epigenetici) (Gibbs și colab., 2003). SNPs existente în regiunile codificatoare ale genelor care prin efectele non-sinonime modifică structura sau funcția proteinelor codificate sunt analizate cu scopul de diagnostic (Syvänen, 2001).

S-a demonstrat că SNPs prezente în *BRCA1* și *BRCA2* duc la acumularea rapidă a erorilor în cadrul ADN, fiind un factor predispozant în cancerul de sân sporadic și responsabile în proporție de 18% pentru riscul familial (Romanowicz și colab., 2016; Lilyquist și colab., 2018). SNP-ul rs28897696 reprezintă o mutație a genei *BRCA1* în linia germinală, localizată în exonul 18, numărându-se printre primele 10 polimorfisme uninucleotidice responsabile de transformările maligne, care în varianta alelică A (c.5123C>A) codifică (p.Ala1708Glu), iar în varianta alelică T (c.5123C>T) codifică valina (p.Ala1708Val) (Iyer și colab., 2017; Jarhelle și colab., 2017; Lindor și colab., 2012).

c.5123C>A și c.5123C>T corespund nepotrivilor stabile ce formează împerecheri de tipul A/G și T/G și, nefiind recunoscute *in vivo* de enzimele de reparare a ADN, au tendința de a se acumula (Amos, 2010), favorizând transformarea malignă. Prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) s-a arătat că neconcordanțele T/G adoptă împerecheri de tip „wobble” (Piao și colab., 2008; Allawi și SantaLucia, 1998a) ce sunt cu aproximativ 0,4 kcal/mol mai puțin stabile decât nepotrivilor A/G (Allawi și SantaLucia, 1998b); varianta A/G conține două punți de hidrogen între nucleobaze (Piao și colab., 2008; Brown și colab., 1986), adoptând o conformație simetrică, similară cu împerecherile G/C sau A/T canonice, ceea ce o face să fie mutația cea mai grea de recunoscut și reparat *in vivo* (Seela și Budow, 2008).

Variantele uninucleotidice amintite mai sus au fost utilizate în teză, fiind scrise 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)

Testele clinice prin care sunt genotipate genele *BRCA* sunt adresate persoanelor cu istoric familial de cancer mamar sau ovarian, necesitând prelevarea unei probe de sânge din care este extras ADN. Regiunile codante ale *BRCA1* și 2 sunt amplificate prin tehnica Reacția de Polimerizare în Lanț (PCR – Polymerase Chain Reaction) și testate pentru mutații prin tehnici precum polimorfismul conformațional al monocatenelor (SSCP - Single Stranded Conformation Polymorphism), polimorfismul lungimii fragmentului de restricție (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) sau analiza curbelor de topire la rezoluție înaltă (HRM - High Resolution Melting), însă metoda uzitată implică secvențierea ampliconilor prin metode de ultimă generație (NGS - Next Generation Sequencing) (Hernan și colab., 2012; Zhang și colab., 2009; Juwle și Saranath, 2012; Riahi și colab., 2014; Berzina și colab., 2013).

SSCP este o metodă utilizată pentru genotiparea și detecția mutațiilor și se bazează pe faptul că ADN monocatenar are o conformație bine definită, care este modificată de prezența unui polimorfism uninucleotidic, varianta mutantă migrând diferit față de varianta *wild type* în electroforeza în condiții nednaturante. SSCP constă în amplificarea secvenței de interes prin reacția PCR, denaturarea ireversibilă a ampliconilor și detectarea diferențelor de mobilitate electroforetică a ADN monocatenar. Modificările de mobilitate electroforetică sunt vizualizate prin încorporarea radioizotopilor, utilizarea *primer*-ilor marcați fluorescent sau utilizarea metodelor de electroforeză capilară. Diferențele dintre o probă ADN normală și una mutantă sunt totuși greu de decelat, metoda nepermițând analiza *high-throughput* (Dong și Zhu, 2005).

PCR-RFLP utilizează endonucleaze de restricție pentru separarea și identificarea fragmentelor ADN. Prezența sau absența unui situs de recunoaștere pentru enzimele de restricție conduce la formarea fragmentelor de dimensiuni diferite și identificarea alelelor are loc prin migrarea lor în gel de agaroză. Tehnologia PCR-RFLP permite detecția facilă și rapidă a SNPs, însă nu se adresează analizei simultane a unui număr mare de polimorfisme, deoarece implică utilizarea unui număr crescut al perechilor de primeri și de enzime de restricție (Rasmussen, 2012).

Analiza HRM permite detecția mutațiilor germinale și somatice și se bazează pe înregistrarea modificărilor în temperatura de topire (T_m – melting temperature) a duplexului ADN, care este influențată de lungimea secvenței analizate și conținutul de GC. Curba de topire este monitorizată folosind fluorofori care emit în fluorescență când sunt legați la ADN dublu-catenar. Pe măsură ce temperatura este crescută și duplexul ADN atinge T_m , are loc disocierea catenelor ADN și desprinderea fluoroforilor, având ca rezultat scăderea intensității fluorescente. Heteroduplexurile formate din alele mutante sunt separate la T_m mai mici și spre deosebire de variantele *wild type*, generează alte tipare ale curbelor de topire. Calitatea analizei HRM depinde mult de fluoroforii utilizați, concentrația ampliconilor obținuți prin reacția PCR, T_m fiind influențată și de factori extrinseci precum tăria ionică a soluției utilizate și prezența unor substanțe precum DMSO sau betaină. Această tehnică este utilizată pentru genotiparea rapidă și în paralel a exonilor corespunzători *BRCA1* și *BRCA1* (Riahi și colab., 2014; Takano și colab., 2008; Wittwer, 2009).

Tehnicile NGS permit analiza în paralel a mai multor secvențe, detecția bazelor nou incorporate desfășurându-se în timp real, utilizând nucleotide marcate fluorescent, compuși chemiluminiscenți sau variații de pH care apar la încorporarea noilor nucleotide. Tehnicile de secvențiere de nouă generație necesită o etapă de preparare a probelor (presecvențiere) și o etapă de analiză a datelor (postsecvențiere). Etapa dinaintea secvențierii implică amplificarea prin PCR a secvențelor de interes și pregătirea librăriilor de fragmente și ligarea acestora de adaptorii specifici, urmând o nouă etapă de amplificare. Secvențierea de nouă generație necesită algoritmi robusți de aliniere, prin care să fie eliminate erorile de secvențiere (Schendure și Ji, 2008; Wang și colab., 2011).

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. Proteinele timpurii E1, E2 și E4 sunt implicate în controlul transcrierii genelor virale și în replicarea ADN viral. Capsida virală este compusă din două proteine, predominant din L1 și într-o proporție mai mică din L2. Proteinele învelișului viral se asamblează în

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

structuri cunoscute sub denumirea de capsomere, 72 dintre acestea constituind învelișul sferic (Zaravinos și colab., 2009).

Sunt identificate peste 100 de tipuri HPV ce sunt asociate cu diferite afecțiuni ale pielii, membranei mucoaselor, ale tractului digestiv și respirator. În familia papilloma virusurilor există o diversitate considerabilă de secvențe, tipurile HPV fiind încadrate în 5 grupuri: alfa-papillomavirus (α -PV), beta-papillomavirus (β -PV), gamma-papillomavirus (γ -PV), miu-papillomavirus (μ -PV), niu-papillomavirus (ν -PV). Conform reprezentării schematice din **Figura 3.2.**, grupul α -PV este cel mai bine descris, 14 tipuri HPV fiind cel mai frecvent asociate cu riscul ridicat de a dezvolta neoplazie genitală: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 (Burk, Chen și Doorslaer, 2009; Faridi și colab., 2011).

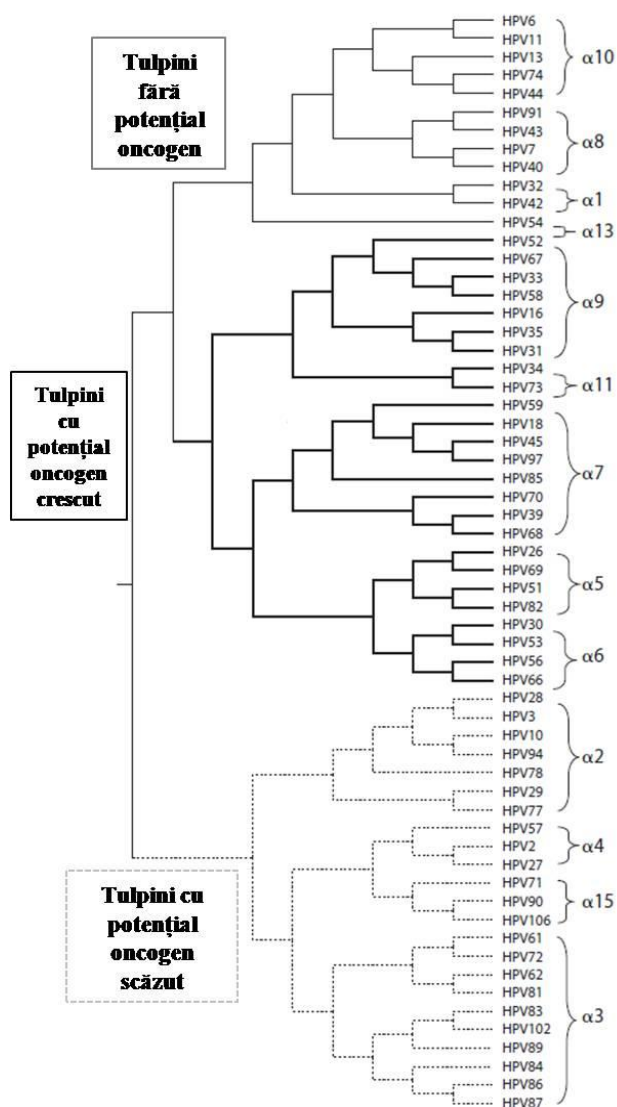


Figura 3.2. Arborele filogenetic al familiei α -HPV prin alinierea secvenței L1 (adaptare după Burk, Chen și Doorslaer, 2009)

În toate cazurile documentate, celulele maligne derivă din diviziuni repetate ale unei celule singulare cu creștere necontrolată, devenind clone ale celulei mamă, majoritatea suferind ulterior mutații cromozomale (Hartl, Freifelder și Snyder, 1987). Concret, transformarea celulară este un proces multistadial, care necesită o serie de modificări la nivel celular, genetic și epigenetic care conduc într-un final la diviziuni celulare necontrolate și la formarea unor mase maligne. Conform lui Hanahan și Weinberg (Hanahan și Weinberg, 2000), transformarea celulelor normale în celule canceroase necesită opt alterări fiziologice. Aceste modificări includ producerea auto-suficientă a semnalelor de creștere celulară, sporirea rezistenței la semnale de inhibiție a creșterii, evitarea mecanismelor apoptotice, potențial replicativ nelimitat, angiogeneza susținută, tulburarea

energeticii celulare, sustragerea de la distrugerea inițiată de sistemul imunitar, invazia țesuturilor și metastaza (Chen și colab. 2014; Hanahan și Weinberg, 2011).

Transformarea celulară indusă de virusuri oncogene respectă atributele lui Weinberg și anume potențialul replicativ nelimitat, sustragerea de la mecanismele apoptotice și instabilitatea genomică (Chen și colab., 2014). Mecanismele de alterare a fiziologiei celulare indusă de virusurile HPV sunt reprezentate în **Figura 3.3**.

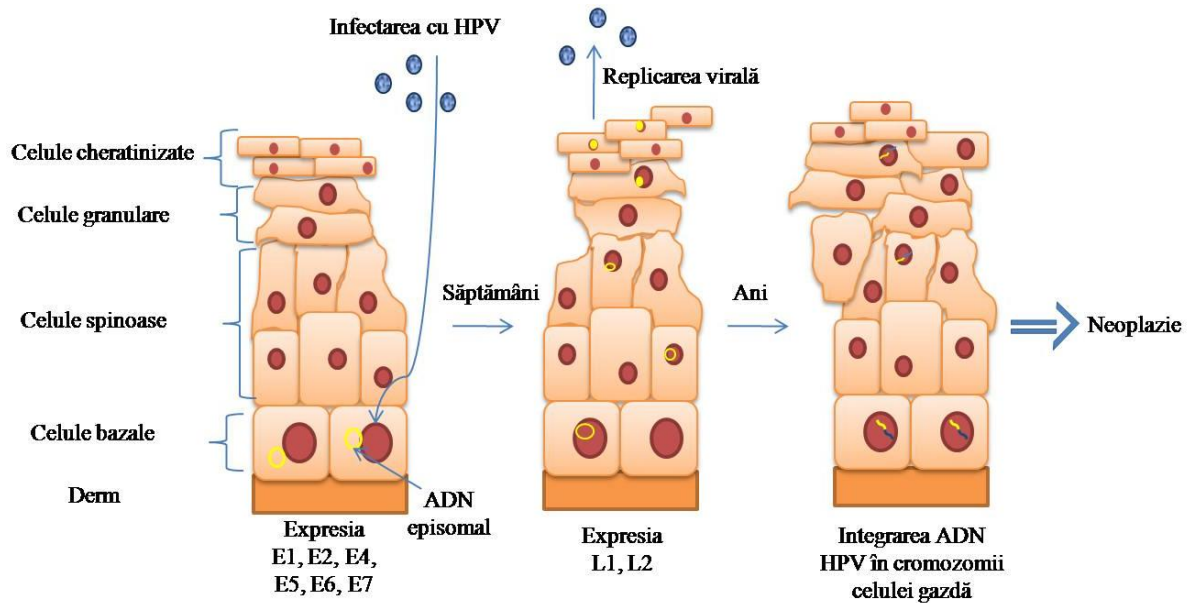


Figura 3.3. Mecanismul de infectare a celulelor cervicale cu HPV și evenimentele ce conduc la declanșarea procesului carcinogenetic (adaptare după zur Hausen și Barre-Sinoussi, 2008; Moody și Laimins, 2010)

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. Genomul viral se replică sincron cu ADN celular, în timpul diviziunii. Ulterior, una din celulele-fiice migrează din stratul bazal, diferențiindu-se. Diferențierea celulelor infectate cu HPV induce o nouă fază în ciclul viral, în care exprimarea genelor E6 și E7 conduce la alterarea ciclului celular. Astfel, celulele care în mod normal ar ieși din ciclul celular suferă tranziția către faza S, permițând amplificarea genomului viral. Proteinele virale L1 și L2 încapsidează genomul viral nou-sintetizat, iar virionii sunt eliberați din primele straturi epiteliale (Moody și Laimins, 2010).

Virusurile carginogene prezintă două mecanisme de transformare a celulelor umane, fiind clasificate ca **agenți direcți** care acționează prin expresia oncogenelor virale ori prin utilizarea mecanismelor de inactivare a fosfoproteinei p53 (p53) și a proteinei retinoblastomului (pRB), sau **carcinogeni indirecti** ce contribuie la dezvoltarea proceselor

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

maligne prin infecție cronică și inflamație (Chen și colab., 2014; Moore și Chang, 2010). Virusurile HPV sunt agenți carcinogenici direcți, în **Figura 3.4.** fiind prezentate modificările genetice induse de virusul HPV cu potențial oncogen ridicat. Inactivarea proteinelor pRB și p53, precum și expresia subunității catalitice hTERT a telomerazei (revers transcriptaza telomerazei umane) constituie evenimentele necesare pentru transformarea malignă a celulelor (Munger și colab., 2004).

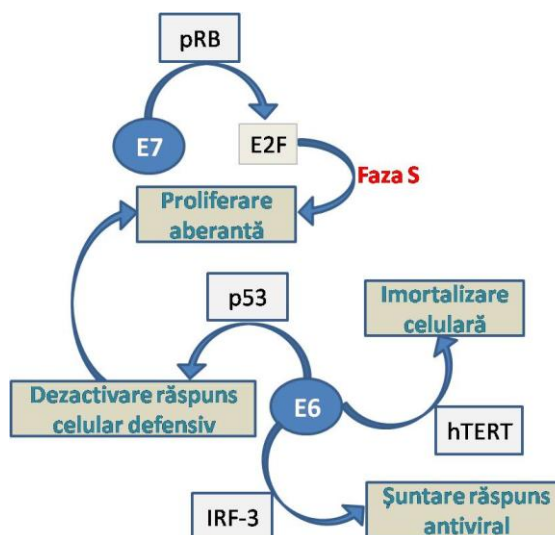


Figura 3.4. Mecanismele genetice care induc transformarea malignă a celulelor (adaptare după Münger și colab., 2004)

Proteina supresoare de creștere tumorală **p53** denumită și “gardianul integrității genomice” este produsul genei TP53; aceasta induce blocarea ciclului celular în G1 sau apoptoza ca răspuns la deteriorarea celulei, protejează împotriva instabilității genomice și joacă un rol esențial în repararea ADN. Prin inactivarea sau alterarea funcției p53 în celulele infectate rezultă acumularea de mutații genomice și a rupturilor ADN, conducând la instabilitate genomică, la pierderea funcției de suprimare a creșterii și a apoptozei, ceea ce duce la promovarea transformării celulare. Cel mai bine studiat exemplu este inactivarea virală a p53 indusă de proteina E6 a HPV cu risc carcinogenic ridicat (High Risk - HR). Proteina HR HPV E6 se asociază cu p53, inducându-i degradarea mediată de ubiquitină dependentă de ATP, având ca rezultat dezactivarea răspunsului celular normal la mutații ADN (Chen și colab., 2014; Tommasino și Crawford, 1995).

Proteina supresoare de creștere tumorală **pRB** este o altă țintă frecventă pentru virusurile oncogene (Butel, 2000). pRB joacă un rol crucial în controlul negativ al ciclului celular, blocând intrarea celulelor în faza S. Pierderea funcției acesteia conduce la dereglarea creșterii și a apoptozei (Giacinti și Giordano, 2006). În celulele normale, pRB

este hipofosforilată în faza G1 timpurie și este fosforilată gradual de ciclina D și complexii CDK4 / 6 pe măsură ce celula înaintează spre faza S ca răspuns la semnalele de diviziune. Hiperfosforilarea are ca rezultat eliberarea proteinei E2F, care apoi activează transcrierea genelor necesare pentru tranziția către faza S. Proteina oncogenă E7 HPV, mimează acest proces legându-se de pRB hipofosforilată. Această interacție conduce la eliberarea proteinei E2F, care activează genele de transcripție necesare pentru tranziția celulelor inactive și infectate din faza G1 în faza S, fiind permisă replicarea genomului viral. (Chen și colab., 2014; Moore și Chang, 2010; Giacinti și Giordano, 2006).

Telomeraza este o enzimă cu mai multe subunități, responsabilă cu sinteza mai multor secvențe repetitive hexamerice care se găsesc la capetele cromozomilor. Proteina este activă de obicei în celulele embrionare și este absentă în celulele somatice. În celulele normale, regiunile telomerice se scurtează cu fiecare rundă de diviziune; expresia inadecvată a telomerazei poate duce la imortalizarea celulară. HR HPV E6 poate activa expresia subunității catalitice a telomerazei hTERT (revers-transcriptaza telomerazei) (Chen și colab., 2014; Oh și Kyo, 2001).

Proteina E6 se leagă la **IRF-3** și îi inhibă activitatea transcripțională, ceea ce îi conferă virusului HPV abilitatea de a ocoli răspunsul antiviral normal.

E6 împreună cu E7 creează instabilitate genomică celulară și defecte mitotice, fiind contributory consacrați în carcinogeneză și ducând la imortalizarea celulară. În concluzie, nivelul crescut de exprimare a E6 și E7 din forma integrată a HPV afectează proliferarea celulară, blochează apoptoza și crește instabilitatea genomică, acestea contribuind la transformarea celulară (Chen și colab., 2014).

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. Motivația studiului a fost de a stabili un proces de atașare a oligonucleotidelor specifice HPV pe suporturi și de a verifica sensibilitatea de detecție electrică, prin microarray și SPR.

În prezent, pentru *screening* se recomandă testul citologic Babeș-Papanicolaou, urmat de diagnosticul molecular efectuat în cazul identificării celulelor scuamoase atipice cu semnificație nedeterminată (ASCUS - Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance). Dacă analizele citologice și virologice ar fi efectuate pe aceeași probă,

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

procedura astfel optimizată ar oferi concomitent informații referitoare la caracterizarea populației în studiile de vaccinare HPV și pentru monitorizarea eficacității vaccinurilor HPV (Albrecht și colab., 2006; Nishiwaki și colab., 2008). În esență, există trei tipuri de detecție a ADN HPV: 1) directă, a acizilor nucleici, 2) indirectă, prin amplificarea semnalului fluorescent de hibridizare și 3) metoda amplificării ADN țintă.

Metoda directă de detecție a acizilor nucleici presupune identificarea nucleotidelor marcate radioactiv sau fluorescent de la nivelul moleculelor de interes. Aceasta cuprinde tehnicile Southern blot și hibridizarea *in situ*; acestea însă sunt laborioase și necesită cantități însemnate de ADN înalt purificat. **Metoda de amplificare a semnalului fluorescent de hibridizare** constă în detecția unui semnal generat de compuși intermediari, cum ar fi enzimele atașate de anticorpi. Amplificarea semnalului de hibridizare se realizează de regulă cu testul *Hybrid capture*® 2 (Digene Corporation, Silver Spring, MD), ce utilizează chemiluminiscenta pentru detecția tipurilor de HPV cu potențial oncogen ridicat sau scăzut. Este aprobat de Administrația Alimentelor și Medicamentelor, SUA (FDA - Food and Drug Administration) și recomandat pentru triajul pacientelor descoperite cu anomalii citologice minore la testul Babeș-Papanicolaou, însă nu permite identificarea genotipurilor HPV specifice (Albrecht și colab., 2006, Nishiwaki și colab., 2008, Abreu și colab., 2012). Analiza prin secvențiere pentru detectarea genotipurilor HPV în probe clinice are dezavantajul de a nu diferenția între multiplele infecții în cadrul aceleiași probe (Rao și colab., 2012).

Amplificare a ADN țintă este cea mai sensibilă și flexibilă metodă de analiză a ADN bazată pe reacția PCR. Amplificarea ADN țintă se realizează fie cu primeri consens (GP5+/6+; MY09/11), specifici mai multor tulpini HPV, cu primeri combinați (PGMY; SPF10; LCR/E7; MY11/GP6+) sau cu primeri specifici fiecărui genotip. PCR utilizează ADN polimerază termostabilă pentru recunoașterea și extinderea unei perechi de primeri oligonucleotidici care flanchează regiunea de interes. ADN viral în cantități foarte mici (10-100 ng) este amplificat *in vitro*, fiind generate suficiente copii vizualizate ulterior prin electroforeză în gel de agaroză (Arron și colab., 2011; Nishiwaki și colab., 2008; Brestovac și colab., 2005; Sotlar și colab., 2004).

Partea II REZULTATE ORIGINALE

Cap. 4. TEHNOLOGIE DE OBTINERE A SUPRAFETELOR-SUPORT FUNCȚIONALIZATE

Pornind de la considerentele teoretice prezentate în capitolele anterioare, programul de formare doctorală a fost axat pe realizarea unor platforme *microarray* noi, utilizabile în detecția polimorfismelor specifice genelor *BRCA* și în genotiparea HPV cu scopul de diagnostic. Având în vedere obiectivele propuse, activitatea de cercetare s-a desfășurat pe două planuri:

- obținerea unor substraturi nanostructurate care să faciliteze 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.

Rezultatul acestor activități a fost corelarea caracteristicilor suporturilor cu performanțele traductorului biosenzorului prin studii legate de influența decisivă a acestora privind specificitatea și sensibilitatea de detecție.

Plecând de la cele trei tehnici de detecție utilizate, am folosit ca substraturi siliciu nanostructurat, film de aur depus pe sticlă și plachete de tip SOI.

Pentru tehnica *microarray*, am urmărit să elaborez o platformă *microarray* tridimensională prin corodarea chimică a substratului de siliciu, asistată de săruri metalice. Se creează astfel mai multe situsuri pentru legarea sondelor ADN, facilitând reacția de hibridizare și calitatea semnalului fluorescent. Pe substraturile conținând nanofire de siliciu, am utilizat două modalități de funcționalizare care să confere grupări aldehidice sau epoxidice. Modificarea chimică a substratului a fost verificată prin FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), EDX (Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) și unghi de contact.

Biosenzorii bazați pe detecția SPR necesită utilizarea unui film metalic pe un suport de sticlă cu indicele de refracție similar cu cel al prisme. Întrucât Au prezintă proprietăți plasmonice bune, am utilizat discuri de sticlă cu film metalic subțire depus prin pulverizare catodică.

Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

În caracterizările electrice, am utilizat substraturi pe bază de siliciu pe izolator (SOI) pentru a contracara efectele parazite induse de substratul de siliciu brut. Ariile active reprezentate de un strat superficial subțire de siliciu au fost definite prin litografie și fotogravură. Funcționalizarile cu soluție epoxidică sau aldehidică au fost repetate și pe aceste substraturi, utilizând procedurile optimizate și validate pentru modificarea nanofirelor de Si.

4.1. Suprafețe suport

Suprafețele suport folosite au fost așa cum am precizat:

-film de Au. 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. Specificațiile tehnice ale echipamentului utilizat se regăsesc în ANEXA 1 - A1.2.d).

-plachete de tip SOI. Pornind de la substratul de tip SOI, au fost definite pe stratul superficial de Si, prin litografie și corodare chimică, arii active de 5 mm² și intercipuri de 2 mm, această dimensiune fiind aleasă pentru a facilita poziționarea sondelor (**Figura 4.1.**).

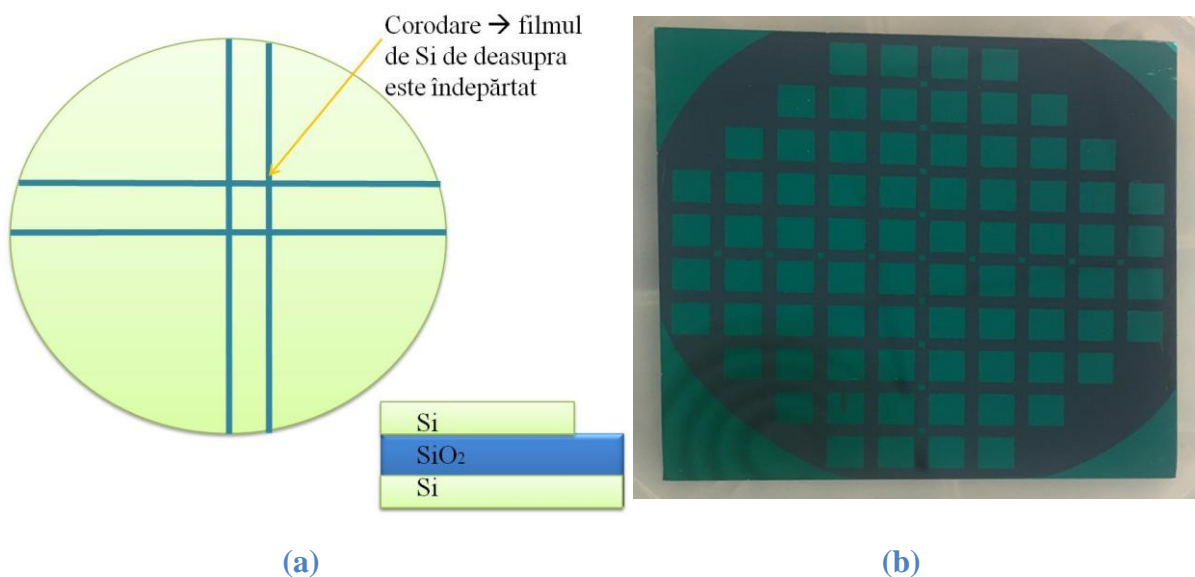


Figura 4.1. (a) Prezentare schematică a realizării biosenzorilor; (b) ariile active obținute în urma configurării suporturilor de tip SOI

Pentru configurarea plăchetei, s-a depus prin centrifugare (spinning) fotorezist negativ expus la radiație ultravioletă printr-o mască de crom, iar materialul nepolimerizat a fost îndepărtat în solvent pentru a delimita intercipul. Insulele de Si protejate de fotorezist

rămân în urma corodării cu ioni reactivi (RIE: Reactive Ion Etching), iar stratul superior de Si neacoperit e corodat până la nivelul SiO₂ de dedesubt pentru a crea intercipul. În final, rezistul de mascare este îndepărtat, rezultând structura cu aspect de grilă din **Figura 4.1(b)**.

- *suprafețe nanostructurate de siliciu*. Obținerea suprafețelor de siliciu nanostructurat este detaliată în **Subcapitolul 4.1.1**, și a fost realizată prin corodare asistată de săruri metalice (MACE) (Materialele și reactivii se regăsesc în **ANEXA 1 – A1.1**). Pentru obținerea acestui tip de suport au fost analizați detaliat toți parametrii implicați în fluxul tehnologic de fabricare: tipul plachetelor, orientarea cristalografică a siliciului, reproductibilitatea proceselor în funcție de tipul de metal folosit, concentrația soluțiilor de corodare și timpul procesului.

4.1.1. Tehnici de fabricare a nanofirelor de Si

4.1.1.1. Tehnologie de fabricare a nanofierelor de Si folosind catalizatori de Au

Nanoparticulele contribuie la dezvoltarea biotehnologiilor prin autoasamblare, ornarea suprafețelor, crearea de noi materiale, nanostructurare etc. S-a demonstrat că 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).

În acest sens, am desfășurat experimente în vederea evaluării uniformității distribuției nanoparticulelor de Au pe substratul funcționalizat cu (3-Aminopropil)triethoxisilan (APTES). În urma corodării prin metoda MACE, a fost investigată morfologia suprafeței și a secțiunii transversale prin tehnici de vizualizare SEM.

(a) Silanizare Si cu APTES din stare de vapori

Silanizarea probelor de Si în stare de vapori a fost efectuată la 85 °C, timp de 3 h, într-un vas petri (**Figura 4.2**).

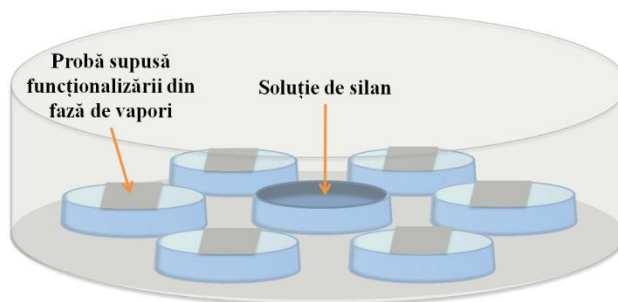


Figura 4.2. Prezentare schematică a silanizării din stare de vapori

Fragmentele de Si au fost plasate la 2 cm distanță de soluție (Mojun, Lerum și Chen, 2012). Acestea au fost curățate de 3 ori în etanol absolut și de alte 3 ori în apă deionizată, pentru ca apoi să fie uscate cu jet de N₂ și supuse tratamentului termic final efectuat la 110 °C, timp de 30 min.

Spectrele ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared spectroscopy) au fost înregistrate cu ajutorul spectrometrului FTIR VERTEX 80/80v (specificații tehnice regăsite în ANEXA1 - A1.2.i). Analiza și măsurătorile spectrometrice au fost realizate cu Software-ul OPUS 7.5. Spectrul FTIR al probei silanizate în vapori este reprezentat în Figura 4.3., în comparație cu Si blank.

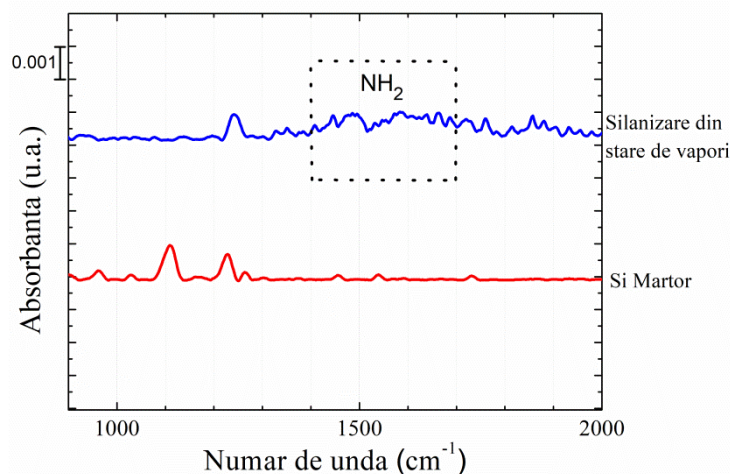


Figura 4.3. Spectrele ATR-FTIR: comparație între APTES deus din stare de vapori și Si martor

Proba silanizată în vapori nu prezintă benzi pronunțate corespunzătoare grupărilor siloxan și propil. Cu toate acestea, peak-urile corespunzătoare grupărilor amino sunt bine evidențiate (1400-1700 cm⁻¹). La 1663 cm⁻¹ apare un nou *peak* asociat unei grupări iminice, formată în urma contactului dintre grupările amino și CO₂ din atmosferă (Vandenberg și colab., 1991).

Analiza FTIR atestă eficiența procesului de silanizare prin identificarea tranzițiilor și benzilor vibraționale corespunzătoare grupărilor specifice APTES.

(b) Depunerea uniformă a NP de Au

Nanoparticulele de Au au fost fixate prin interacțiuni chimice și electrostatice de stratul intermediar de aminosilan, astfel: substraturile funcționalizate de Si au fost imersate pentru o anumită perioadă de timp în soluție de nanoparticule de Au (cu diametrul de aprox. 10 nm) de la Sigma Aldrich la 400 rpm și 25 °C. Acestea au fost ulterior spălate cu etanol și uscate cu N₂. Proba a fost caracterizată în plan utilizând microscopul electronic de baleiaj (FEI Nova NanoSEM 630, detaliile tehnice sunt regăsite în **ANEXA 1 - A1.2.f**), rezultatul fiind prezentat în **Figura 4.4.**, rezultatul fiind prezentat în **Figura 4.4.**

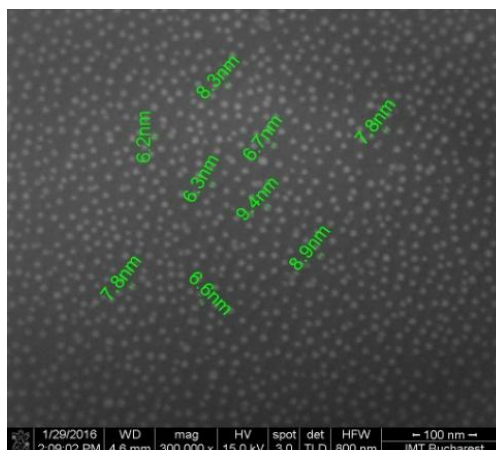


Figura 4.4. Vizualizare în plan a nanoparticulelor de Au depuse pe Si funcționalizat cu APTES

Nanoparticulele de Au au fost uniform distribuite pe suprafața silanizată prin procesul de autoasamblare. Acestea, fiind în prealabil stabilizate în citrat, nu prezintă aglomerări și au diametrul sub 10 nm.

Folosind substraturi silanizate în vapori, s-a obținut un monostrat autoasamblat de nanoparticule de Au.

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 uscare cu jet de N₂, proba a fost vizualizată în plan și în secțiune utilizând microscopul electronic de baleiaj, rezultatul fiind prezentat în **Figura 4.5.**

Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

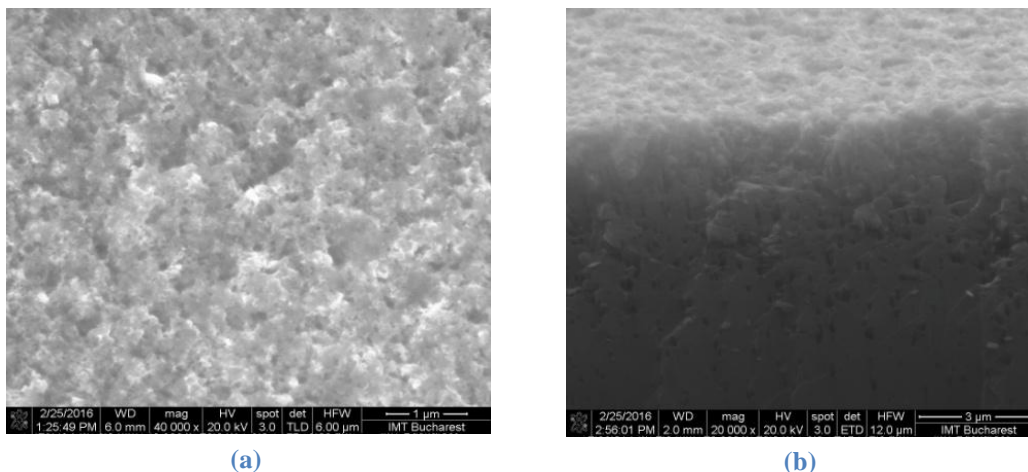


Figura 4.5. Vizualizare a) în plan și b) în secțiune transversală a substratului cu monostrat autoasamblat de Au NPs care a fost corodat prin MACE

Aplicând corodarea MACE pe substraturile silanizate pe care s-au depus în prealabil nanoparticule de Au, s-a obținut o structură poroasă.

Corodarea nanofirelor de Si cu ajutorul nanoparticulelor de Au nu a furnizat structuri uniforme de dimensiuni controlabile, impunându-se optimizarea suplimentară a parametrilor experimentali. Întrucât protocolul cu nanoparticule de Ag a oferit rezultate inițiale promițătoare, această metodă urmează a fi considerată într-un viitor proiect.

4.1.1.2. Tehnologie 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.

De asemenea, a fost abordată o metodă *green chemistry* de sinteză a nanoparticulelor de Ag ce ar putea fi utilizată într-o direcție viitoare de cercetare pentru corodarea siliciului, precum și în alte aplicații de nanobiotehnologie, detaliile acestui studiu regăsindu-se în **ANEXA 2**.

(a) Mecanisme de corodare chimică într-o singură etapă și în două etape

Corodarea chimică asistată de metal poate fi realizată prin două metode: a) Corodarea chimică în doi pași asistată de Ag ce constă în depunerea acestuia pe suprafața siliciului în soluție apoasă, urmată de corodarea chimică în soluție de HF/H₂O₂; b) corodarea chimică într-un singur pas asistată de Ag, în care procesele de nucleație pe suprafață și corodare anizotropă se desfășoară simultan în soluție de corodare formată din HF și săruri de Ag (To și colab., 2011). Principalele reacții care explică disoluția Si în cadrul procesului de corodare chimică într-un singur pas, sunt prezentate în **Figura 4.6**.

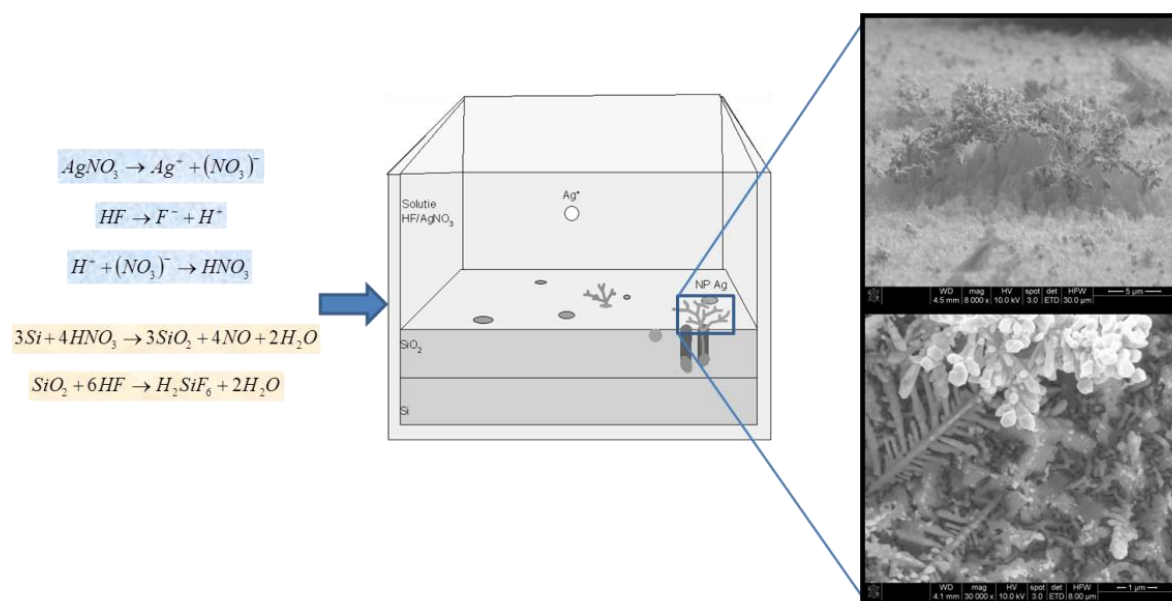


Figura 4.6. Etapele de formare a nanofirelor de siliciu și a dendritelor de Ag

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).

În urma disocierii HF în H⁺ și F⁻, ionii de H⁺ cu NO₃⁻ formează HNO₃ care oxidează suprafața de Si, rezultând SiO₂. SiO₂ este corodat de F⁻, ducând la dislocarea unor atomi din structura cristalină a Si, precum și la formarea H₂SiF₆ (acid hexafluorosilicic). Reducerea ionilor Ag⁺, are loc datorită capturării electronilor din substatul de Si, rezultând creșterea particulelor de Ag (nucleația), care au aspectul unor dendrite (Bachtouli, Aouida și Bessais, 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 derivate din aceste aspecte.

(b) Influența timpului de corodare asupra dimensiunii nanofirelor în cazul metodei 1-MACE

Pentru investigarea ratei de corodare în raport cu timpul, a fost utilizată o plachetă de Si tip p cu orientarea (100) și rezistivitatea de 1-3 Ω cm trasată în fragmente de 4 cm². Fragmentele de siliciu au fost imersate timp de 30 min sau 60 min în amestec conținând 0,007 M $AgNO_3$ /4,5 M HF, w/v, rezultatele fiind verificate prin microscopie electronică de baleiaj și prezentate în **Figura 4.7**.

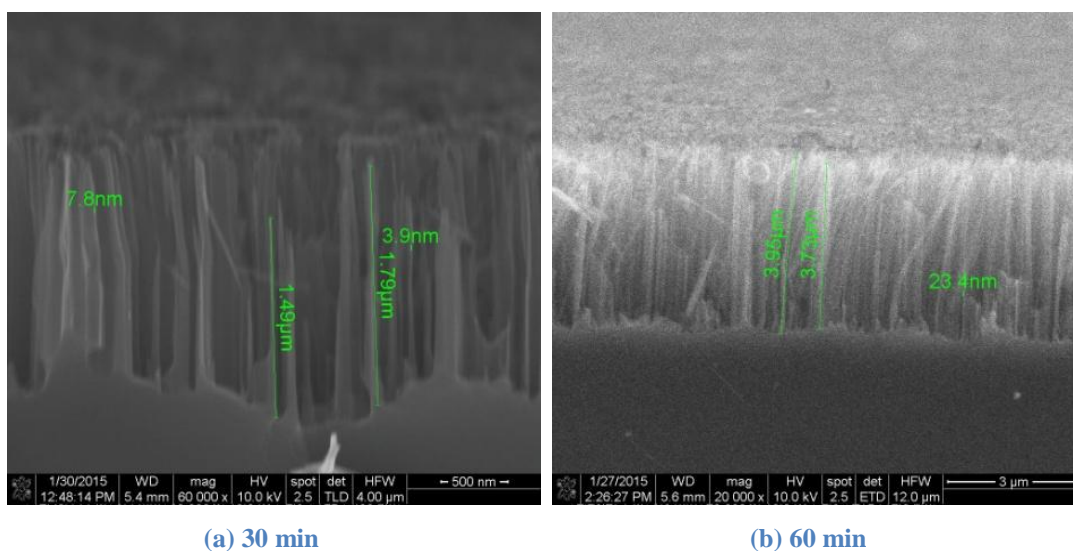


Figura 4.7. Dependența de timp a nanofirelor de siliciu

O tendință liniară a fost observată între timpul de procesare și rata de corodare. După 30 de minute s-au obținut structuri cu lungimea de aproximativ 1,5 - 2 μ m (**Figura 4.7(a)**), iar odată cu dublarea timpului de corodare, dimensiunea nanofirelor crește în consecință, așa cum reiese din **Figura 4.7(b)**. Așadar, pe baza rezultatelor obținute, estimăm că rata de corodare a substratului de siliciu este de aproximativ 60 nm/ min.

(c) Influența rezistivității plachetei asupra eficienței 1-MACE

Dopajul constă în introducerea unor atomi de altă natură într-un cristal de Si pentru modificarea proprietăților semiconductoare, acesta fiind cuantificat prin rezistivitatea plachetei. În acest experiment au fost considerate 3 rezistivități diferite ale plachetelor de start pentru a determina influența acestui parametru asupra eficienței de corodare. Astfel, 3 plachete Si tip p, având orientarea (100) și rezistivități de 0.001 - 0.01 Ω cm, 1 - 3 Ω cm,

10 – 20 Ω cm, au fost trasate în fragmente de 4 cm². Procesul de corodare a avut loc prin imersarea în soluție de 0,007 M AgNO₃ /4,5 M HF, w/v, timp de 60 min. Probele au fost examinate cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj, iar imaginile sunt prezentate în **Figura 4.8**.

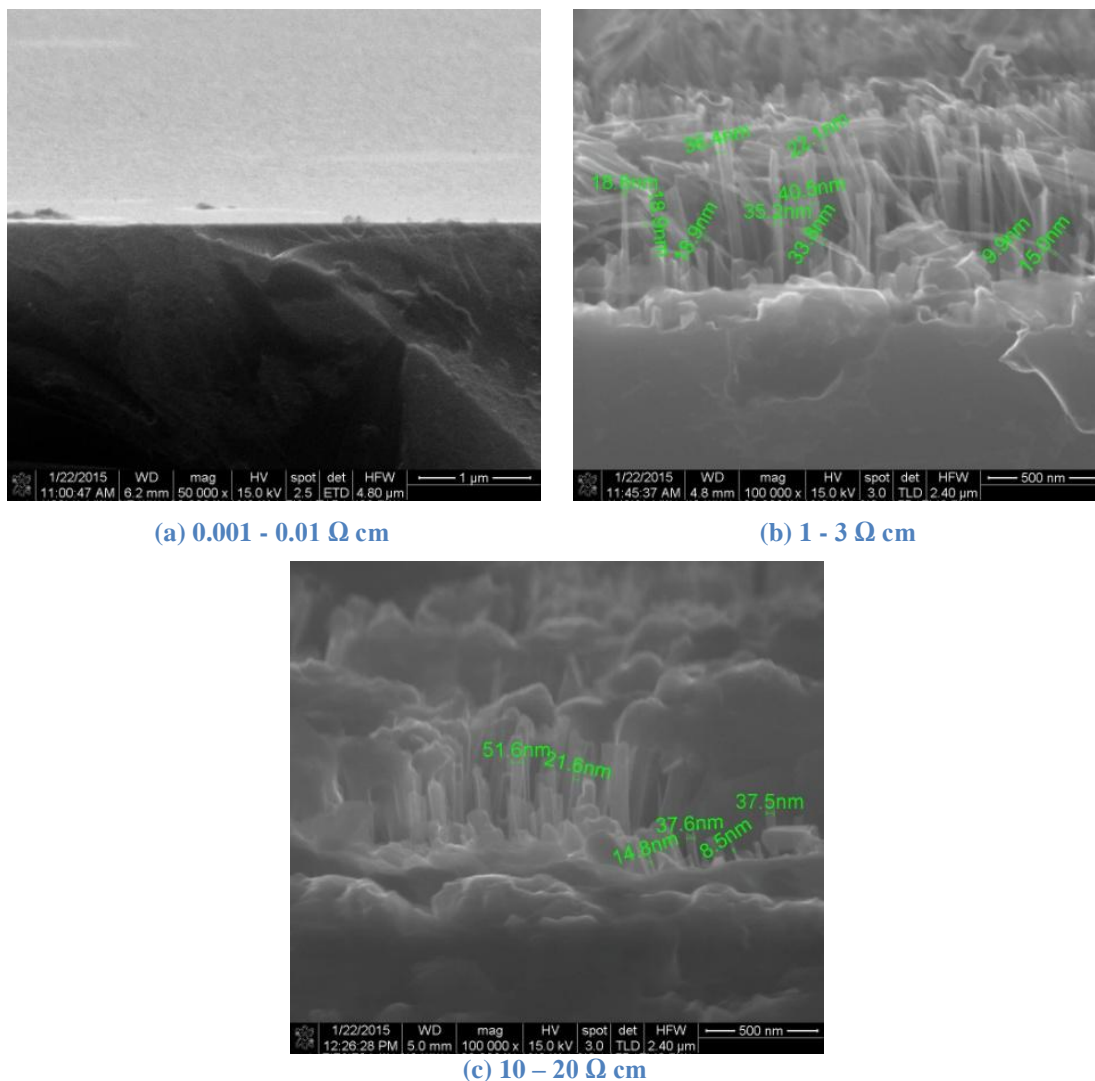


Figura 4.8. Influența rezistivității plachetei de Si asupra morfologiei nanofirelor

Utilizând rezistivitatea de 0.001 - 0.01 Ω cm, substratul de Si nu a putut fi corodat prin metoda 1 MACE (**Figura 4.8 a**). Cele mai bune rezultate au fost obținute pe fragmente de Si cu rezistivitatea de 1 - 3 Ω cm (**Figura 4.8 b**), nanofirele obținute având cea mai bună uniformitate. Firele rupte apar în urma fracturării probei datorita stresului indus de corodare în rețeaua cristalină a siliciului. Pe substraturile de Si cu o rezistivitate de 10 - 20 Ω cm nu a rezultat o nanoarhitectură uniformă (**Figura 4.8 c**).

(d) Influența orientării plachetei asupra ratei de corodare

A fost studiată influența orientării plachetei asupra ratei de corodare. Astfel, au fost utilizate două plachete de Si tip p cu orientarea (100) și respectiv (110), trasate în fragmente de 4 cm² și corodate prin imersarea fragmentelor de siliciu în soluție de 0,007 M AgNO₃/ 4,5 M HF, g/v timp de 60 de minute. Probele au fost caracterizate SEM în secțiune transversală, rezultatele fiind prezentate în **Figura 4.9**.

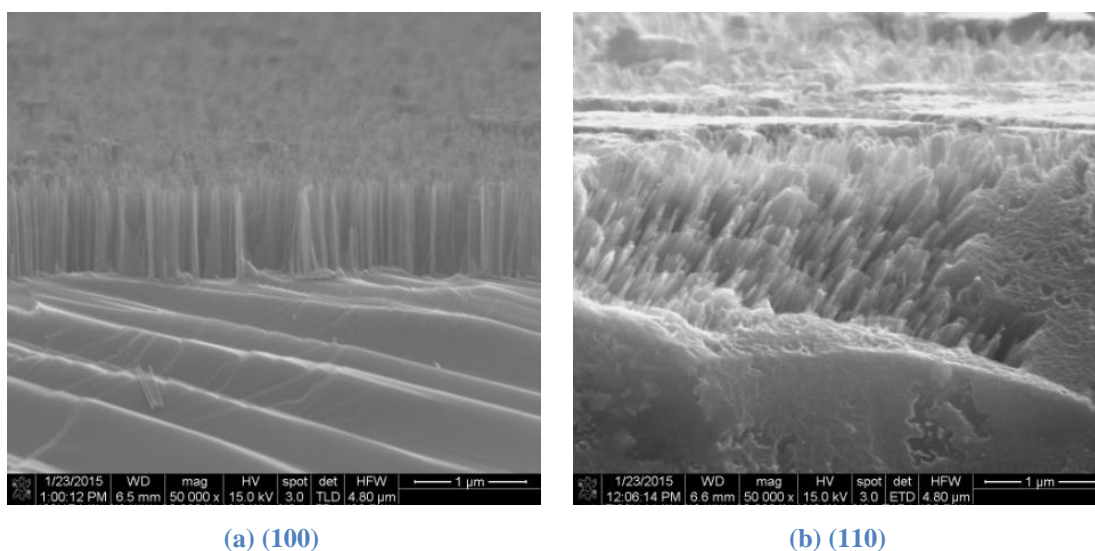


Figura 4.9. Nanofirele de Si se dezvoltă pe direcția orientării cristalografice a plachetei

Imaginile SEM din **Figura 4.9** relevă că direcția de corodare depinde de orientarea cristalografică a plachetei de Si, confirmând observațiile raportate de Peng și colab. (Peng și colab., 2006), Chen și colab. (Chen și colab., 2008) și Lee et al. (Lee și colab., 2008).

(e) Interdependența parametrilor pentru reproductibilitate experimentală

Pentru a cerceta cum influențează varierea parametrilor experimentali reproductibilitatea obținerii firelor, au fost realizate două probe.

Nanofirele de Si prezentate în **Figura 4.10.**, au fost obținute pe plachete de Si de tip p, cu rezistivitatea de 0,001-0,01 Ω cm. Concentrația de AgNO₃ a fost de 0,007 mol/L, iar cea de HF, de 4,5 mol/L, timpul de corodare fiind de 60 min.

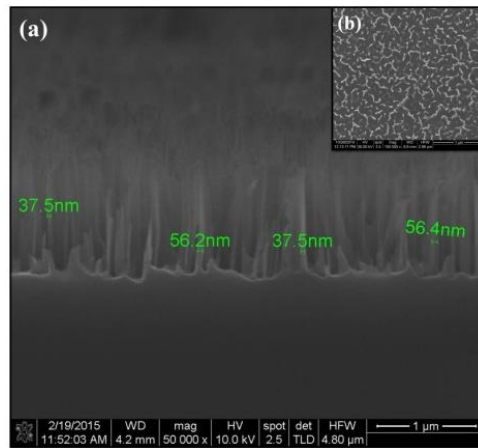
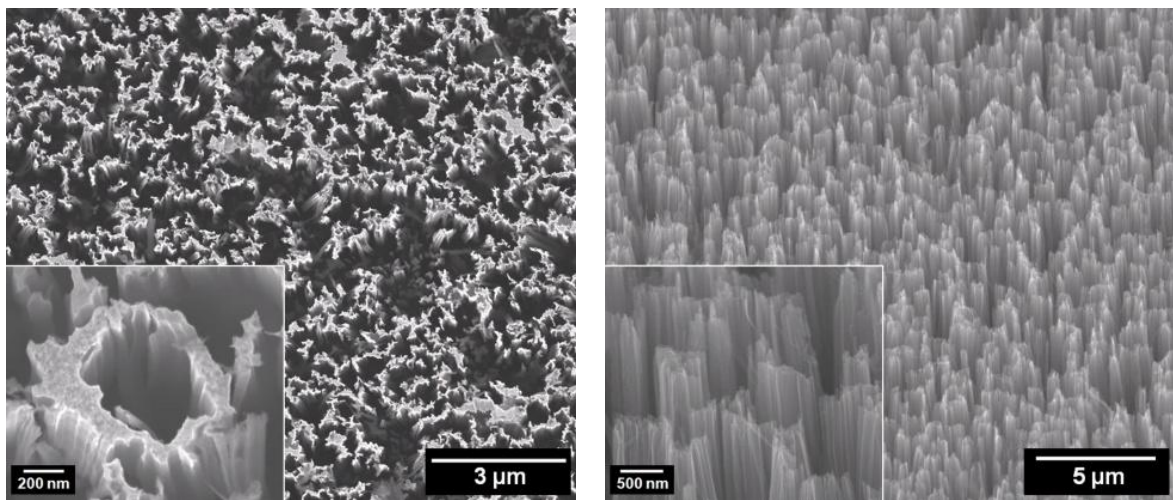


Figura 4.10. Imagini SEM ale S1. (a) în secțiune transversală; (b) în plan

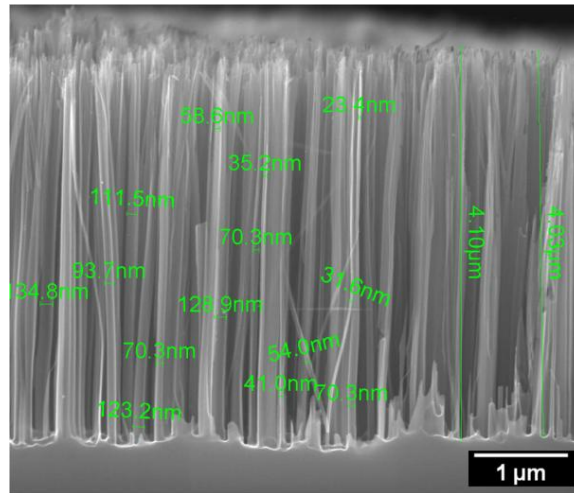
Firele de siliciu produse prin 1-MACE, au fost caracterizate prin metode SEM (FEI-NOVA NanoSEM 630). Acestea au o lungime aproximativă de 1 μm și un diametru cuprins între 30 și 60 nm. La aceste probe, mă voi referi în continuare ca fiind S1.

Nanofirele de Si prezentate în **Figura 4.11.**, au fost obținute folosind plachete de Si de tip p cu orientarea (100) și rezistivitatea de 1-3 $\Omega\text{ cm}$. 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 apoi au fost tratate în soluție HF 5% v / v timp de 1 min.



(a) vedere de suprafață

(b) imagine înclinată la 60°



(c) măsurarea nanofirelor în secțiune transversală

Figura 4.11. Examinarea morfologică a nanofirelor de Si

În **Figura 4.11.**, din vederea în plan se observă 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., 2012b⁷). 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 4.11. (c)**). La aceste probe, mă voi referi în continuare ca fiind S2.

Caracterizarea prin difracție de raze X (GIXRD: Grazing Incidence X-Ray Diffraction, **ANEXA1 – A1.2.h**) a evidențiat caracterul policristalin al nanofirelor de Si. Măsurările XRD în plan pentru cele două tipuri de probe sunt prezentate în **Figura 4.12.**

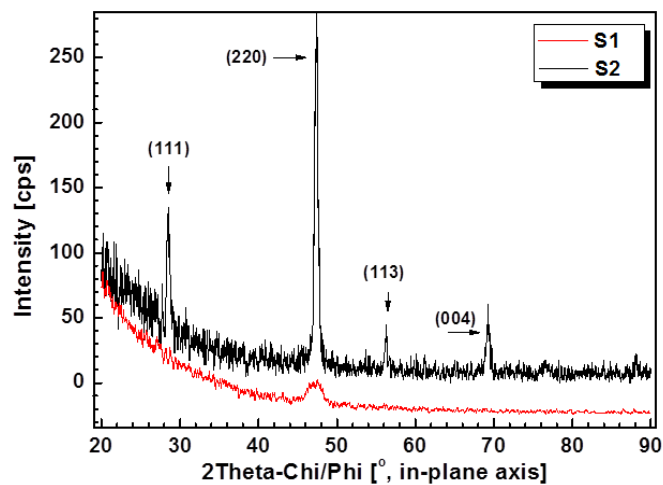


Figura 4.12. Texturile nanofirelor de Si

Spectrul XRD relevă pentru proba S1 o textură de-a lungul planurilor structurii (220), perpendiculară cu suprafața probei. Planul structurii (220) este perpendicular cu (100), care corespunde cu firele de Si crescute vertical (din moment ce substratul Si are orientare {100}).

În cazul probei S2, din spectrul XRD reies următoarele planurile de structură (220), (004), (111) și (113). Textura planului (220) coincide firelor verticale de siliciu. Planurile structurilor (111) și (113) sunt în concordanță cu observațiile SEM, conform cărora SiNWs au tendința să se îndoaie către extremități și să se unească. Prin urmare, rezultatele de difracție cu raze X sunt consistente cu cele obținute în urma caracterizării SEM, indicând o suprafață uniformă cu SiNWs preponderent verticale (Banu și colab., 2015).

Pentru a estima hidrofilicitatea suprafeței nanostructurate, modificarea unghiului de contact corespunzător probelor S2 a fost măsurat pe o durată de 20 de secunde și comparat cu unghiul de contact obținut pe Si cristalin, netratat chimic (**Figura 4.13.**). Specificațiile tehnice ale echipamentului KSV Theta Optical se regăsesc în ANEXA 1 - A1.2.j).

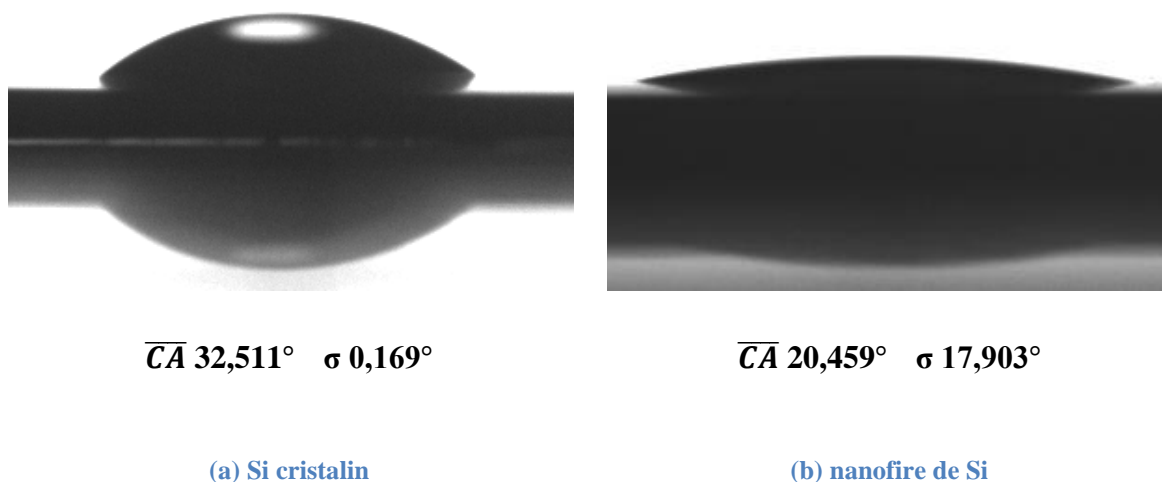


Figura 4.13. Măsurarea unghiului de contact pe Si brut și nanoconfigurat

În cazul suportului nanostructurat de Si, se observă creșterea hidrofilicității suprafeței evidențiată de scăderea unghiului de contact, creșterea deviației standard fiind atribuită distribuției picăturii de apă deionizată printre nanofire.

Dimensiunea firelor de Si poate fi controlată prin modificarea concentrațiilor de $AgNO_3$ și HF utilizate în metoda I-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 dizoluție nu mai au loc și astfel, firele de Si nu se mai formează. Această observație e consistentă cu cea a lui Li și colab., care au raportat fabricarea firelor de Si de tip p prin 1-MACE (Shaoyuan și colab., 2014).

4.2. Modalități de funcționalizare a Si, SiNWs și SOI

A doua etapă a pregătirii platformelor pentru detecția ADN este esențială deoarece de ea depinde întregul proces de atașare a biomoleculelor de suportul anorganic. Modificările chimice realizate la interfața dintre materialul anorganic și materialul organic depind de grupările funcționale ale sondelor ADN, dar 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.

Dacă pentru cazul afinității dintre grupări tiol și aur nu sunt necesare etape speciale de modificare ale suprafețelor suport, pentru obținerea legăturilor covalente între substrat și probele modificate cu grupări NH₂ terminale am efectuat trei tipuri de modificări chimice pe suprafețele de siliciu nanostructurat, în paralel cu folosirea unor probe martor de siliciu cristalin și sticlă ce au avut rolul de referințe pe parcursul experimentelor.

Metoda uzuală pentru imobilizarea sondelor ADN modificate cu grupări 5'-NH₂ include doi pași: silanizarea suprafeței urmată de reticularea cu glutaraldehidă. Acesta este utilizată pentru modificarea siliciului dar și a sticlei pentru suporturile comerciale existente pe piață. În această teză am testat două tipuri noi de modificări chimice mai puțin folosite: depunerea unui film subțire de SU-8, un polimer folosit în general în industria electronică ca material de mascare la definirea dispozitivelor și respectiv GOTPMS ce oferă avantajul unei funcționalizări într-un singur pas similară cu cea pe baza de APTES.

Cele trei tipuri de modificări chimice ale suprafețelor au fost testate și caracterizate din punct de vedere chimic prin metode de analiză spectroscopică ce au evidențiat prezența la suprafață a grupărilor aldehydice și epoxidice. Materialele și reactivii sunt prezentați în **ANEXA 1 – A1.1.**

4.2.1. APTES/GAD

Chimia suprafeței este procesul cheie pentru atașarea secvențelor ADN și din acest motiv funcționalizarea substratului a fost realizată luând în considerare grupările funcționale aminice ($-\text{NH}_2$) introduse la capătul 5' al sondelor ADN. Întrucât tehnica FTIR nu permite analiza modificărilor chimice pe suporturi nanoconfigurate de Si, procedurile de funcționalizare au fost evaluate pe suporturi de Si cristalin. Astfel, substratul de siliciu a fost modificat cu (3-aminopropil)triethoxisilan (APTES), care a asigurat un monostrat funcțional expunând grupări $-\text{NH}_2$. Glutaraldehida (GAD), a conferit grupări active aldehydice, cu care au reacționat grupările $-\text{NH}_2$ 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 la sfârșitul reacției spălării succesive cu etanol absolut de 3 ori și cu apă deionizată de 3 ori, fiind uscate ulterior cu N_2 . 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 4.14**.

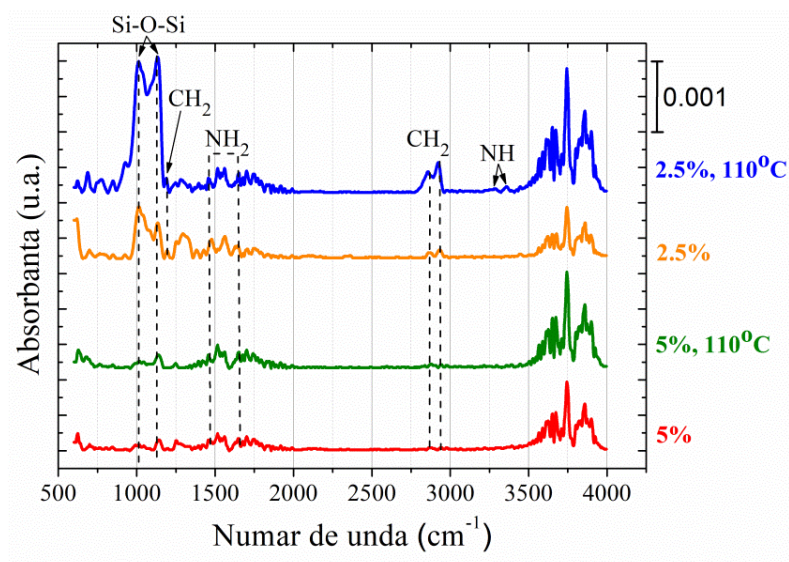


Figura 4.14. Rezultatele ATR-FTIR corespunzătoare probelor cu 2,5 % și 5% APTES cu și fără tratament termic

Eficiența reacției de silanizare a fost analizată înainte și după tratamentul termic

Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

pentru două concentrații de APTES (2,5% și 5%), în **Tabelul 4.1.** fiind atribuite benzile de absorbție datorate vibrațiilor grupărilor chimice. În urma tratamentului termic, se constată pentru concentrația de 2,5 % APTES o creștere evidentă 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, această observație fiind în concordanță cu cea a lui Halliwell și Cass (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.

Tabel 4.1. Pozițiile benzilor de absorbție caracteristice grupărilor chimice specifice funcționalizărilor

Număr de undă	Grupări chimice	Comentarii
2930 cm ⁻¹	CH ₂ - mod asimetric de întindere	Maximul de absorbție este determinat de prezența lanțurilor propil în moleculele de APTES (Aissaoui și colab., 2012; Joonyeong și colab., 2009)
2860 cm ⁻¹	CH ₂ - mod simetric de întindere	
3280 cm ⁻¹	NH ₂ - mod simetric de întindere	Intensități scăzute datorită momentului slab de dipol (Aissaoui și colab., 2012)
3360 cm ⁻¹	NH ₂ - mod asimetric de întindere	
1480 cm ⁻¹ 1645 cm ⁻¹	NH ₃ ⁺ - mod de deformare	Indicator al protonării grupărilor aminice în urma reacției cu aerul (Pasternak, Amy și Chabal, 2008)
1562 cm ⁻¹	NH ₂ - mod de deformare	
1190 cm ⁻¹	CH ₂ - mod de balansare	Bandă mică, specifică grupărilor etoxi nereacționate
1140 cm ⁻¹	Si-O-Si – mod de întindere	LO (longitudinal optic)
1020 cm ⁻¹	Si-O-Si – mod de întindere	TO (transvers optic)

Rezultatele demonstrează că moleculele APTES au fost atașate cu succes de suprafață după două ore de reacție, la o concentrație de 2,5%, în urma tratamentului termic.

Funcționalizarea cu glutaraldehydă a fost realizată pentru 2 h cu o concentrație de 2,5% diluată în apă deionizată. Spectrele FTIR ale probelor funcționalizate cu glutaraldehydă sunt prezentate în **Figura 4.15**.

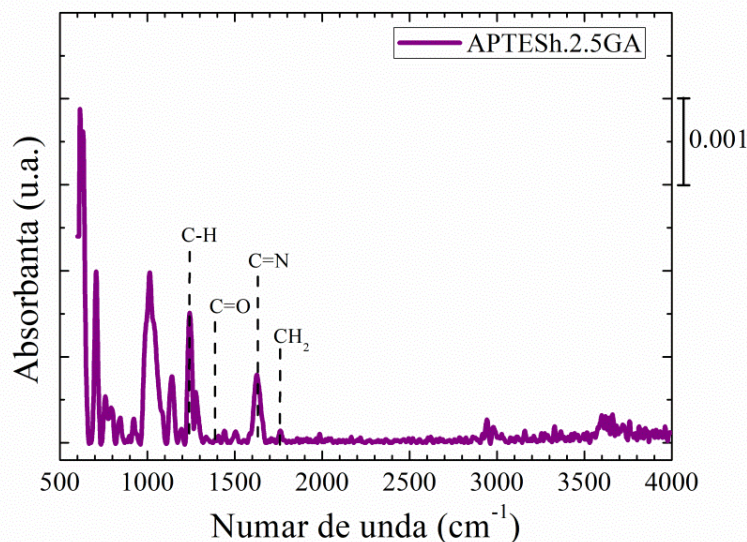


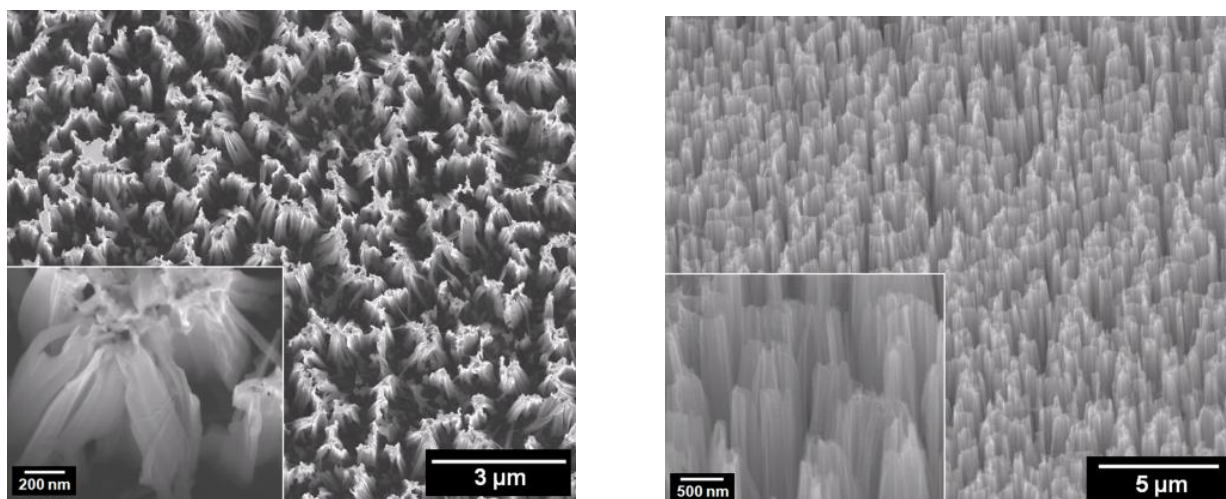
Figura 4.15. Spectru ATR-FTIR al probelor funcționalizate cu APTES hidrolizat și reticulat cu glutaraldehydă

După etapa de reticulare cu glutaraldehydă, maximul benzi de absorbție observat la 1250 cm^{-1} este alocat vibrației C-H de deformare. Două benzi atribuite modului de deformare CH_2 și vibrației de întindere C=O sunt observate la numerele de undă 1407 și 1720 cm^{-1} . Maximul observat la 1637 cm^{-1} este atribuit modului de vibrație C=N apărut în urma formării legăturilor dintre suprafața silanizată și moleculele de glutaraldehydă (Hiraoui și colab., 2011).

Spectrele FTIR confirmă eficiența silanizării și furnizează informații precise asupra diferitelor benzi și stări de vibrație apărute după fiecare etapă de proces. Probele modificate chimic cu glutaraldehydă au prezentat benzi de absorbție atribuite legăturii C=N și $=\text{H}_2\text{C}$, fiind demonstrată astfel eficiența reacției de reticulare pe substraturile silanizate cu APTES în stare de vapori, cât și cu APTES hidrolizat. Aceste investigații amănunțite constituie un punct de plecare în obținerea unor biochip-uri pe substrat de Si și SOI cu rezultate reproductibile. Pentru funcționalizarea substraturilor nanoconfigurate și de tip SOI, am utilizat protocolul de funcționalizare cu 2,5% APTES hidrolizat și am adaptat etapa de funcționalizare cu glutaraldehydă, folosind o concentrație de 5% și 4 h de incubare, pentru a crește numărul de grupări aldehidice expuse pe suprafață.

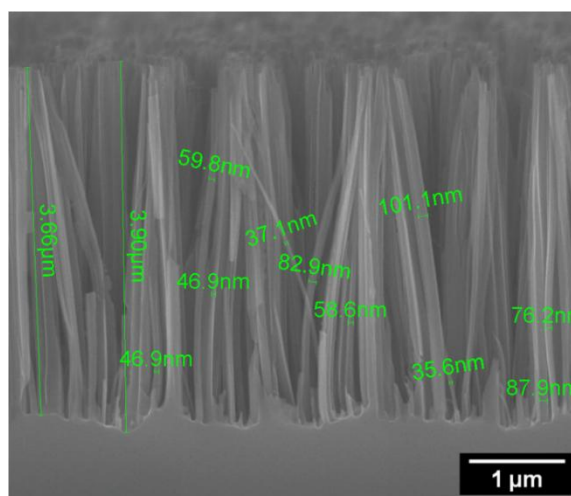
Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

Examinarea detaliată a suprafeței și a profunzimii a fost efectuată cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj pentru a evalua modificările morfologice a substraturilor SiNWs după funcționalizarea cu APTES-GAD. În **Figura 4.16**, sunt ilustrate zone reprezentative împreună cu detalii de înaltă rezoluție a suporturilor 3D pregătite ca suporturi *microarray*.



(a) vizualizare în plan

(b) imaginea înclinată la 60°



(c) măsurarea nanofirelor în secțiune

Figura 4.16. Caracterizarea morfologică a SiNWs funcționalizate cu APTES și GAD

Tendința nanofirelor de a se uni la vârfuri observată anterior în **Figura 4.11**, 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. Se constată scăderea în înălțime cu aproximativ 20 nm a stratului de SiNWs, explicată de gruparea firelor în mănușchiuri.

În sprijinul caracterizării morfologice, a fost efectuată analiza EDX (spectroscopia prin dispersie de raze X) pentru identificarea exactă a compoziției elementale (**Figura 4.17**). Specificațiile tehnice ale detectorului EDX se regăsesc în **ANEXA 1 - A1.2.g**).

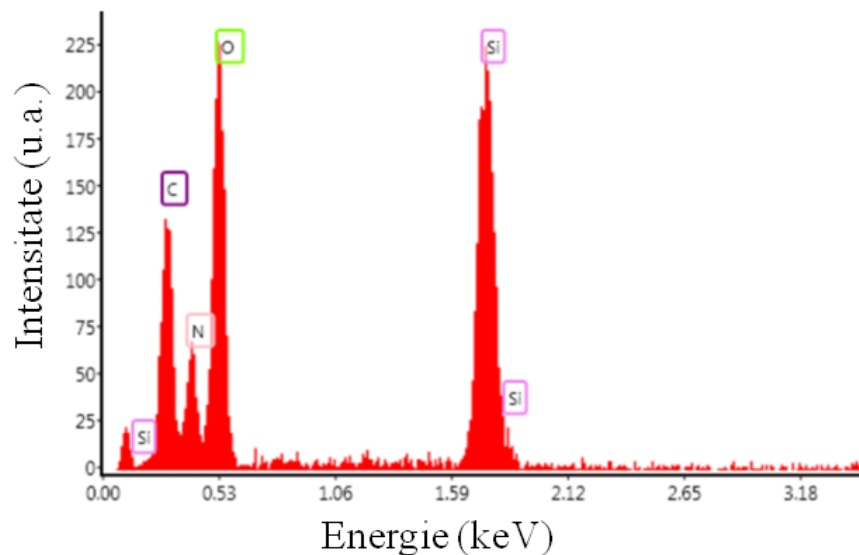


Figura 4.17. Spectrul EDX pentru nanofirele de Si funcționalizate cu APTES și GAD

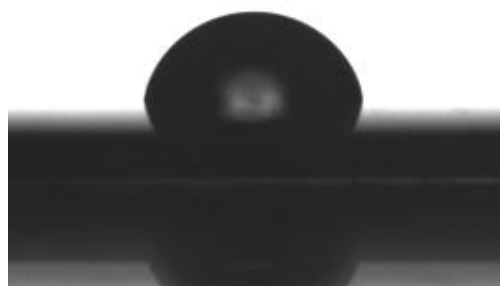
Analiza elementală indică prezența C, N și O, specifice funcționalizării cu APTES-GAD.

Hidrofilicitatea suprafeței funcționalizate cu APTES-GAD a fost studiată prin unghi de contact (**Figura 4.18.**).



\overline{CA} 20,459° σ 17,903°

(a) SiNWs



\overline{CA} 80,646° σ 34,517°

(b) SiNWs funcționalizate cu APTES-GAD

Figura 4.18. Măsurarea unghiului de contact pe nanofire de Si brute sau acoperite cu APTES-GAD

Funcționalizarea SiNWs cu APTES și glutaraldehidă conduce la creșterea unghiului θ până la o valoare medie de $80,6^\circ$ (suport hidrofil), iar deviația standard de $34,5^\circ$ indică difuzia întregii soluții de apă deionizată pe durata măsurării unghiului (15 s).

4.2.2. 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 utilizat în mod obișnuit ca fotorezist negativ în microelectronică, fiind adecvat 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 curățirea în plasmă de O_2 timp de 10 min. Fotorezistul SU-8 2002 a fost etalat prin centrifugare la 4000 rpm. După depunere, 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.

Grosimea stratului de SU-8 obținut la acești parametri a fost măsurată pe un suport de Si cristalin (Figura 4.19.).

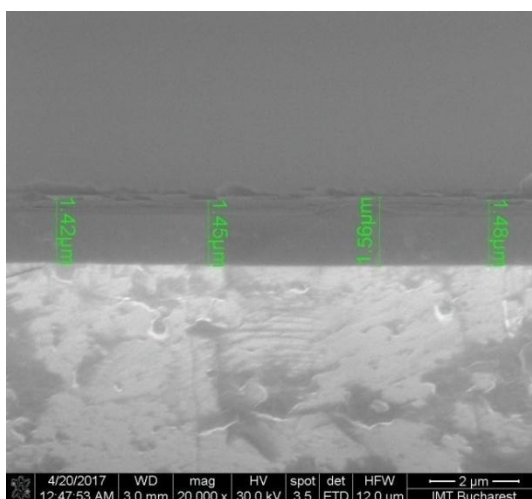
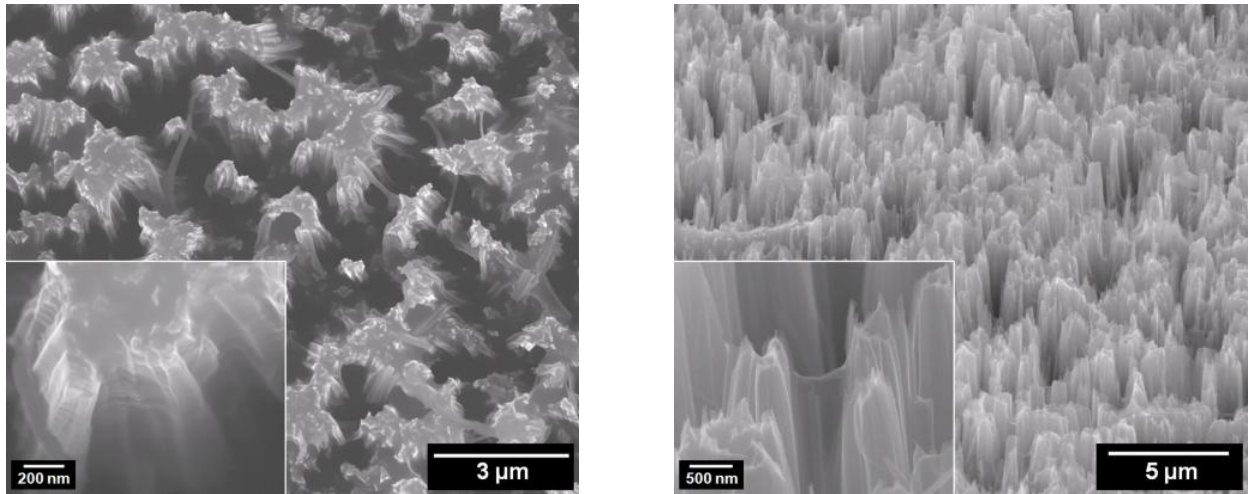


Figura 4.19. Grosimea stratului de SU-8 măsurată pe suport de Si

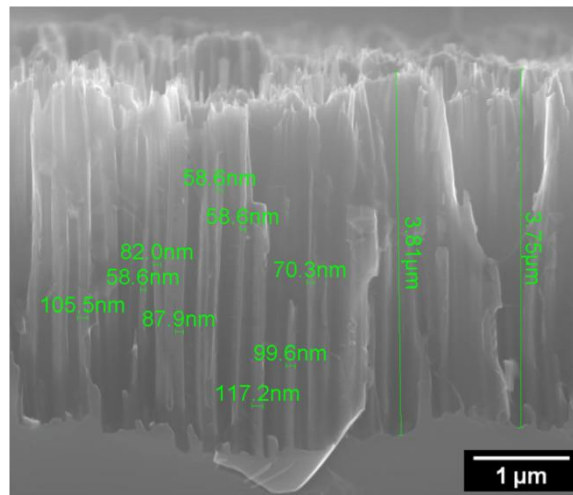
Utilizând parametrii de depunere descriși anterior, se obține un strat uniform de SU-8 cu o grosime medie de $1,5 \mu m$, pe un suport plan. Aceiași parametri de modificare cu

grupări epoxidice au fost utilizați pentru acoperirea suporturilor constituite din nanofire de Si, acestea fiind caracterizate cu ajutorul SEM (**Figura 4.20.**).



(a) vizualizare în plan

(b) imagine înclinată la 60°



(c) măsurarea nanofirelor în secțiune transversală

Figura 4.20. Caracterizarea SEM a SiNWs acoperite cu SU-8

Imaginile SEM relevă că, în plus față de funcționalizarea cu APTES-GAD (**Figura 4.16**), SU-8 înglobează grupuri mari de nanofire într-o masă polimerică și formează punți între blocurile adiacente, crescând suprafața activă, așa cum indică imaginea de înaltă rezoluție achiziționată după înclinarea probei. 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). Comparativ cu proba martor (SiNWs neterminate chimic) (**Figura 4.11**), am observat o mică reducere a

Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

grosimii stratului de SiNW după etapa de funcționalizare, explicată prin procesul de grupare menționat mai sus.

A fost realizată analiza EDX pe probele acoperite cu SU-8 pentru atestarea compoziției elementare corespunzătoare acestui polimer (**Figura 4.21.**).

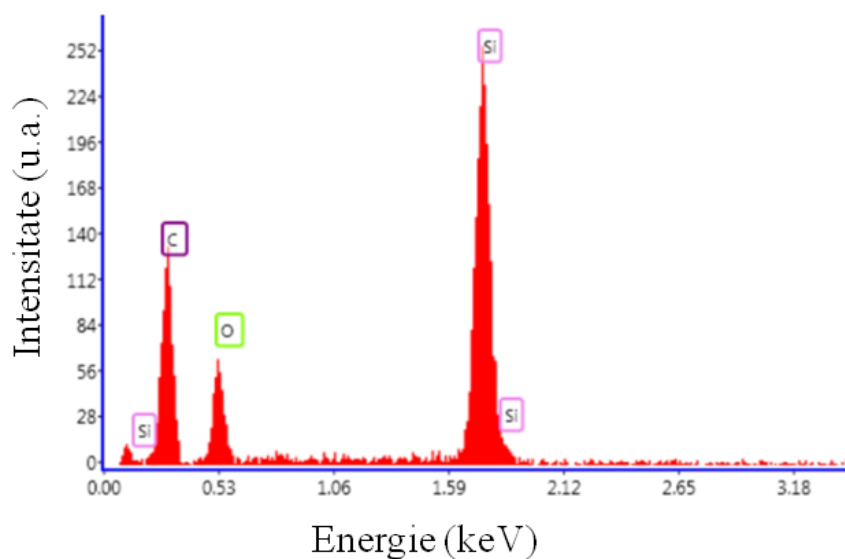
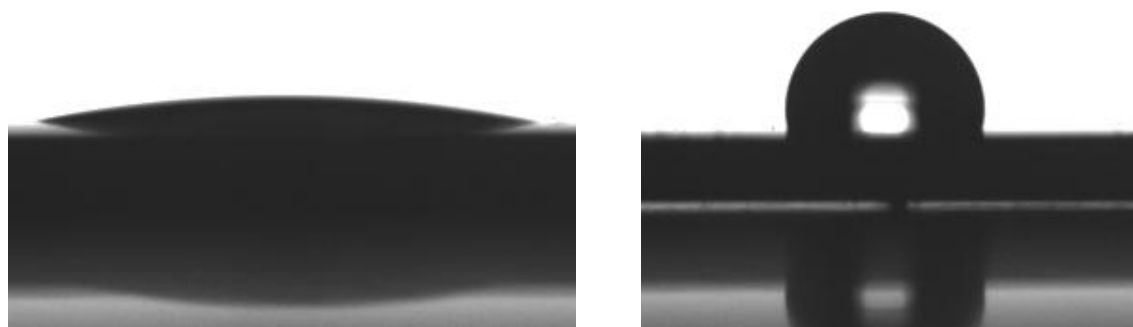


Figura 4.21. Spectrul EDX pentru nanofirele de Si funcționalizate cu SU-8

Compoziția elementală a dezvăluit prezența C și O asociate cu acoperirea SU-8.

Modificările date de acoperirea SiNWs cu SU-8 au fost realizate și prin măsurarea unghiului de contact (**Figura 4.22.**).



$\overline{CA} 20,459^\circ \quad \sigma 17,903^\circ$

$\overline{CA} 102,598 \quad \sigma 4,098$

(a)

(b)

Figura 4.22. Măsurarea unghiului de contact pe: (a) SiNWs; (b) SiNWs acoperite cu SU-8

Acoperirea cu SU-8 a condus la obținerea unui suport nanostructurat hidrofob, având un unghi θ de $102,6^\circ$, cu o deviație standard de 4° pe durata măsurătorii (15 s). Deviația standard scăzută indică faptul că soluția nu difuzează între SiNWs.

4.2.3. GOPTMS

Substraturi de Si și SOI trasate pe dimensiunea $2,5 \times 1,5$ cm au fost funcționalizate cu GOTPMS 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 ($H_2SO_4:H_2O_2$ 3:1 v/v) pentru generarea grupărilor hidroxil. Acest tratament a fost necesar pentru reacția de silanizare și nu afectează oxidul de poartă (Chandradoss și colab., 2014, Han și colab., 2006). După etapa de hidroxilare, substraturile au fost spălate cu apă deionizată și uscate cu N_2 .

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 folosind acest protocol. În cazul funcționalizării GOPTMS în soluție, principala problemă este dată de posibilitatea moleculelor de apă de a reacționa cu inelele epoxidice, ducând la deschiderea și inactivarea lor (Stropoli și Elrod, 2015). Acest aspect va fi evaluat în **Capitolul 5**, unde voi investiga capabilitatea de detecție fluorescentă și electrică pe suporturile modificate chimic prin acest protocol și prin silanizarea în vapori.

Silanizarea în stare de vapori a fost realizată într-un vas petri (Williams, Davies și Bowen, 2013), conform reprezentării schematice din **Figura 4.2.**, pentru 3 h 30 min, la $85^\circ C$, 2 mL de GOPTMS fiind introduși în recipientul din centrul *set-up*-ului.

La sfârșitul funcționalizării, 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 $110^\circ C$, 30 min.

În **Figura 4.23**, este prezentată variația unghiului de contact în timp pe Si modificat cu GOPTMS în stare de vapori, luând Si nemodificat ca martor. Datele din grafic reprezintă o mediere a 3 măsurători efectuate pe suprafețe.

Cap. 4. Tehnologie de obținere a suprafețelor suport funcționalizate

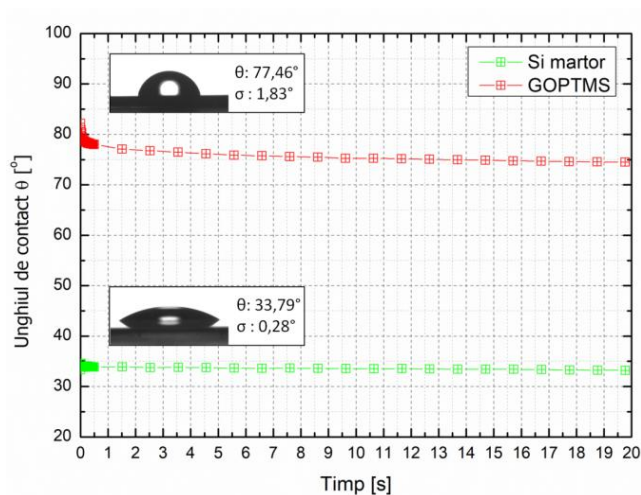


Figura 4.23. Variația unghiului de contact în timp pe Si martor și Si cristalin acoperit cu GOPTMS

Se constată o creștere a unghiului θ de la 33,8 °, corespunzătoare Si martor, la valoarea de 77,4 ° fiind un indicator al silanizării eficiente. Creșterea unghiului de contact se datorează ciclurilor epoxidice intacte și grupărilor metil, rezultatele fiind în concordanță cu cele ale lui Goddard și Erickson (Goddard și Erickson, 2009).

Cap. 5. ANALIZA DATELOR *MICROARRAY*, SPR ȘI ELECTRICE OBȚINUTE DIN HIBRIDIZAREA SECVENȚELOR SPECIFICE *BRCA 1* 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 parametrii 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*.

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

Problema semnificativă pentru orice platformă *microarray* e reprezentată de multitudinea parametrilor ce trebuie controlați (temperatura, umiditatea, salinitatea și tăria ionică a soluțiilor utilizate, timpii de incubare) care au influențează asupra rezultatele (Wrobel, 2003). Depunerea și imobilizarea sondelor, blocarea și hibridizarea sunt etape generatoare de neconcordanțe între analizele efectuate pe platformele dezvoltate în acest studiu. Se impune astfel investigarea cauzelor de

variație și optimizarea fiecărei etape de fabricație a senzorului pentru obținerea de rezultate stabile și reproductibile (Jaksik și colab., 2015; Romanov și colab., 2014).

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, Altman, 2014), am urmărit efectele nepotrivirilor 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). Am folosit secvențe corespunzătoare *BRCA1*, deoarece orice modificare minoră (precum SNPs) crește riscul de a dezvolta în timp cancer mamar și ovarian (Prosperi și colab., 2014; Antoniou și colab., 2010; Fanale și colab., 2012; Milne și Antoniou, 2011), loci noi de susceptibilitate fiind depistați prin studii de asociere genetică (Turnbull și colab., 2010) (detalii asupra carcinogenezei induse de *BRCA1* se regăsesc în **Subcapitolul 3.1. Bazele genetice ale carcinogenezei induse de antioncogenă *BRCA1*.**

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.

5.2. Realizarea structurilor de tip *microarray*

Pentru acest studiu, am întrebuințat sonde oligonucleotidice și secvențe-țintă ce corespund fragmentelor genei *BRCA1*, acestea fiind prezentate în **Tabelul 5.1.**

Tabelul 5.1. 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 azotată	C>A	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG A GGGAGGAAAATGGG-3'
	C>G	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG G GGGAGGAAAATGGG-3'
	C>T	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG T GGGAGGAAAATGGG-3'

(MM)	
Secvență complementară (C)	5'-Cy3-CCCATTTTCCTCCCGCAATTCCTAG-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. Secvențele conținând polimorfisme oligonucleotidice au fost proiectate în conformitate cu SNPs raportate pentru alela patogenă, disponibile în "Baza de date a polimorfismului uninucleotidic (dbSNP) a variantei secvenței de nucleotide" (Kitts, Sherry, 2011; dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?db%BCs>). Dacă se găsește în formă homozigotă (două copii), polimorfismul Rs28897696 crește riscul în timp de dezvoltare a cancerului mamar sau ovarian (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897696).

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 și anume (i) 10 mM tampon fosfat salin (PBS) cu pH 7,4 și (ii) 200 mM Na₂HPO₄, cu pH 8,5. Pe durata depunerii robotizate a sondelor de concentrație 50 μM (specificațiile tehnice ale echipamentului sunt prezentate în ANEXA 1 – A1.2.a)), s-a păstrat umiditatea constantă de 80% pentru a preveni uscarea lor și după încheierea procesului, au fost menținute peste noapte la temperatura camerei, în incintă umedă pentru o imobilizare eficientă. Secvențele neatașate au fost înlăturate prin spălarea succesivă a lamelor, repetată de trei ori în (i) 2x SSC/0.1% g/v, (ii) 1x SSC; (iii) apă deionizată (DIW). Blocarea situsurilor nereacționate a fost realizată prin imersarea platformelor *microarray* 1 h, la 42 °C and 450 rpm într-o soluție preîncălzită la 42 °C, constituită din 1% BSA g/v diluată în 5x SSC și 0,1 % SDS g/v.

Etapa de hibridizare a fost realizată cu 10 μM secvențe complementare marcate fluorescent într-o soluție-tampon constituită din soluție 2x Denhardt, 10x SSC și 200 μg/mL ADN din spermă de hering. Soluția de hibridizare preîncălzită la 60 °C a fost dispersată uniform pe suprafață, prin acoperirea cu o lamelă de sticlă, iar evaporarea ADN țintă a fost prevenită incubând suporturile într-o incintă umedă timp de 4 h, la 42 °C. Înaintea citirii rezultatelor, secvențele ADN-țintă neatașate au fost înlăturate prin spălarea biosenzorilor de trei ori succesiv în 2x SSC/0.1% g / v SDS, 1x SSC și DIW.

5.2. Analiza morfologiei *spot*-urilor

Prima evaluare a rezultatelor a fost cea privind morfologia *spot*-urilor, astfel că **Figura 5.1.** reprezintă un colaj de rezultate obținute în urma scanării fluorescențe a platformelor *microarray* pe care am efectuat etapa de hibridizare, fiind exemplificate *spot*-uri hibridizate corect (**Figura 5.1.A**) și erori variate ce pot surveni în timpul unui experiment (**Figurile 5.1.B-F**). *Spot*-urile prezentate în **Figurile 5.1.A-E** au fost obținute utilizând ca tampon de imobilizare 200 mM Na₂HPO₄, pH 8,5, în timp ce pentru *spot*-urile ilustrate în **Figura 5.1.F** am utilizat 10 mM PBS, pH 7,4 ca tampon de imobilizare. Specificațiile tehnice ale echipamentului utilizat pentru scanarea semnalelor fluorescențe se găsesc în ANEXA 1 – A1.2.b).

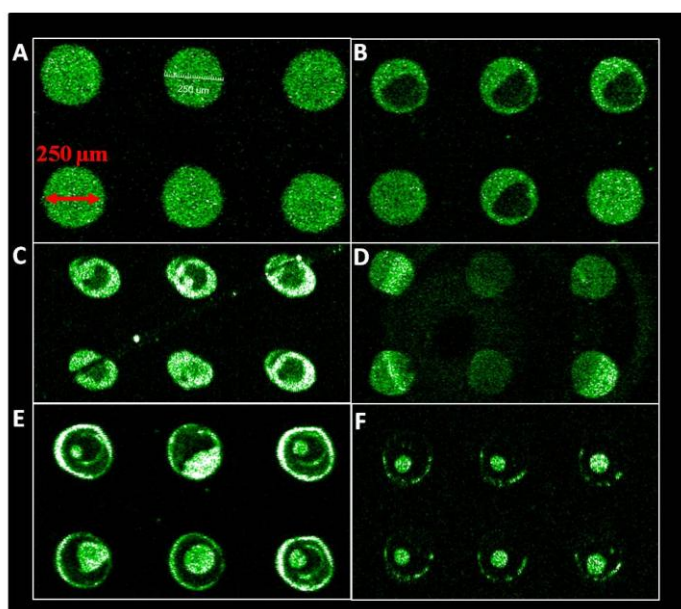
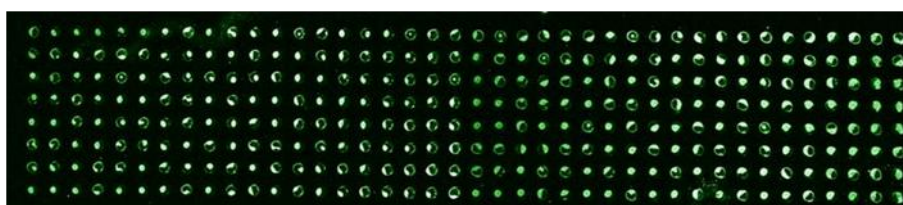


Figura 5.1. Morfologii ale *spot*-urilor cu diametrul de 250 μm evidențiate fluorescent. (A) *spot*-uri cu hibridizare uniformă; (B) caracteristici „coffee-ring” datorate tiparului de evaporare a sondelor; (C) zgârietură superficială și forme neregulate ale *spot*-urilor; (D) distribuție neuniformă a soluției de hibridizare pe suprafață; (E) hibridizare neregulată cauzată de efectele Marangoni și „coffee-ring”; (F) efect Marangoni evident (preluată din Banu și colab., 2018a)

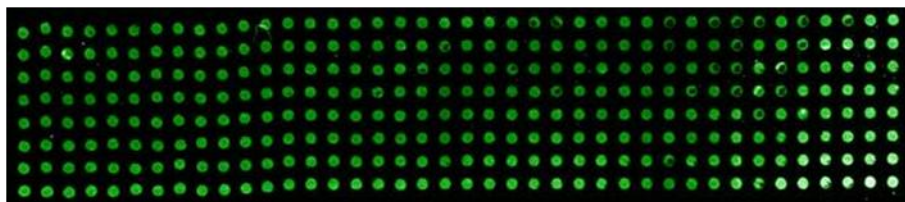
Analiza fluorescentă reprezintă o modalitate simplă de verificare a acurateții experimentale și existența defectelor provenite din imobilizare, spălare sau hibridizare. **Figura 5.1.A** ilustrează *spot*-uri perfect hibridizate de formă circulară și diametru constant, evidențiate de intensitatea scăzută și uniformă a fundalului. O mare parte din variația pe suporturi comerciale provine din depunerea sondelor ADN (Rickman D.S., Herbert C.J., Aggerbeck, 2003; Dawson și colab., 2005). În **Figura 5.1.B**, unele centre au apărut ușor întunecate, indicând o hibridizare defectuoasă, ce poate fi asociată cu distribuția neuniformă a soluției cu sonde ADN. Acest efect este adesea observat în timpul depunerii

cu vârfuri solide, fiind provocat de viteza mare de evaporare și de migrarea soluției către periferia elementului. În **Figura 5.1.C** se observă zgârieturi ale suprafeței și forme neregulate ale *spot*-urilor, produse de vârfurile venite în contact cu suprafața sub formă înclinată. Din **Figura 5.1.D** deducem că soluția de hibridizare nu a fost distribuită uniform, datorită formării unei bule de aer între lamelă și suport, ceea ce a condus la creșterea localizată a semnalului de fundal și la scăderea intensității semnalului fluorescent de hibridizare. În **Figura 5.1.E**, se observă o intensitate mai mare a semnalului fluorescent către periferie datorită migrării sondelor ADN („coffee-ring”). Un rezultat similar a fost prezentat de Pappaert și colab. (Pappaert și colab., 2006), a căror abordare teoretică și simulări au arătat că în cazul cineticii rapide de formare a punților de hidrogen cu sondele atașate, o cantitate mare de molecule hibridizează inițial la periferia *spot*-urilor, urmând ca moleculele-țintă nereacționate să se lege și de situsurile centrale. Rezultatele slabe de hibridizare prezentate în **Figura 5.1.F** sunt date de utilizarea PBS (10 mM, pH 7,4) ca soluție de imobilizare. Motivul unui semnal de hibridizare slab poate fi încărcarea negativă a ADN care provoacă o repulsie electrostatică între suprafață și sondele monocatenare. Încărcarea negativă poate fi ecranată utilizând o soluție-tampon cu o concentrație crescută de sare. Sonda ADN folosită a avut la un capăt o modificare a aminei alifatică liberă, moderat bazică. Deoarece amina alifatică se regăsește în forma neprotonată în cantitate mică la pH sub 8, se utilizează un pH între 8,5-9,5 a soluției pentru conjugarea oligonucleotidelor.

Alegerea soluției de imobilizare reprezintă o etapă-cheie pentru îmbunătățirea rezultatelor *microarray*. Așadar, devine esențială stabilirea concentrației optime de săruri și pH-ul optim al soluțiilor tampon utilizate pentru obținerea unor morfologii reproductibile ale *spot*-urilor hibridizate. A fost investigată eficiența a două soluții, 10 mM PBS, pH 7,4 și 200 mM Na₂HPO₄, pH 8,5. Colecțiile de *spot-uri* utilizate în analiza grafică sunt prezentate în **Figura 5.2**.



(a) sonde pregătite în tampon PBS, pH 7,4



(b) sonde pregătite în tampon Na_2HPO_4 , pH 8,5

Figura 5.2. Semnalul fluorescent de hibridizare

Biochip-ul având pe suprafață depuse oligonucleotide diluate în PBS și hibridizat cu secvențe ADN țintă a fost scanat astfel încât tubul fotomultiplicator (PMT) să genereze un câștig de semnal de 41% și semnalul de fond fiind redus cu 75%. *Biochip*-ul cu sondele diluate în Na_2HPO_4 și hibridizate a fost scanat cu un câștig de semnal de 43%, reducând semnalul de fundal cu 60%.

Variațiile de intensitate a semnalului au fost analizate grafic, unde fiecare punct corespunde unei replici corespunzătoare unui *spot* având sonde PM hibridizate (**Figura 5.3.**).

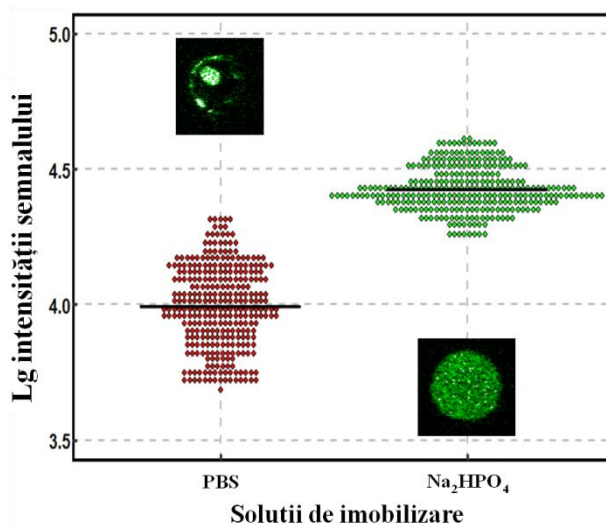


Figura 5.3. Analiza grafică a eficienței de hibridizare cu sondele pregătite în cele două soluții de imobilizare

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 Na_2HPO_4 a evidențiat o dispersie a rezultatelor de două ori mai mică ($\sigma = 0,08$). Este de remarcat faptul că *spot*-urile aferente tamponului Na_2HPO_4 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 Na_2HPO_4 ca soluție de imobilizare.

5.3. 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 5.4**.

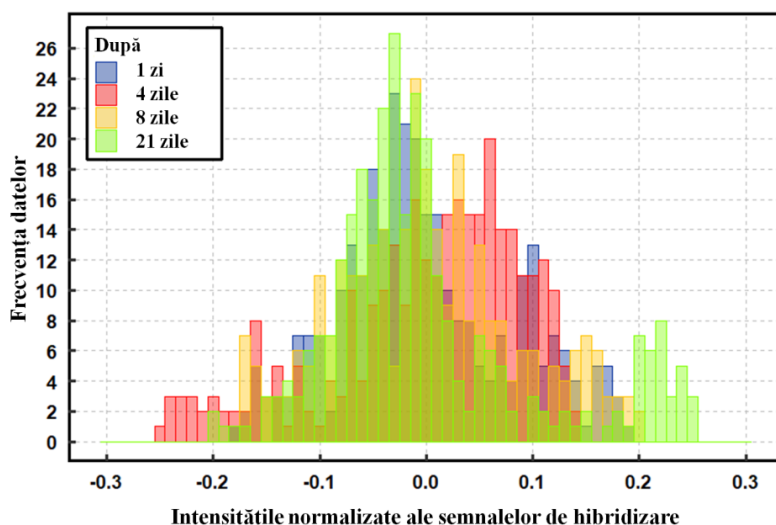


Figura 5.4. Evaluarea stabilității în timp a sondelor PM atașate pe suport comercial de sticlă

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 histograme că nu a fost alterată calitatea *spot*-urilor.

5.4. Analiza statistică a detecției *mismatch*-urilor

În **Figura 5.5.**, este prezentat comparativ rezultatul hibridizării sondelor PM și a celor cu o nepotivire nucleotidică (1MM) după 1 zi și 21 zile de stocare a probelor.

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

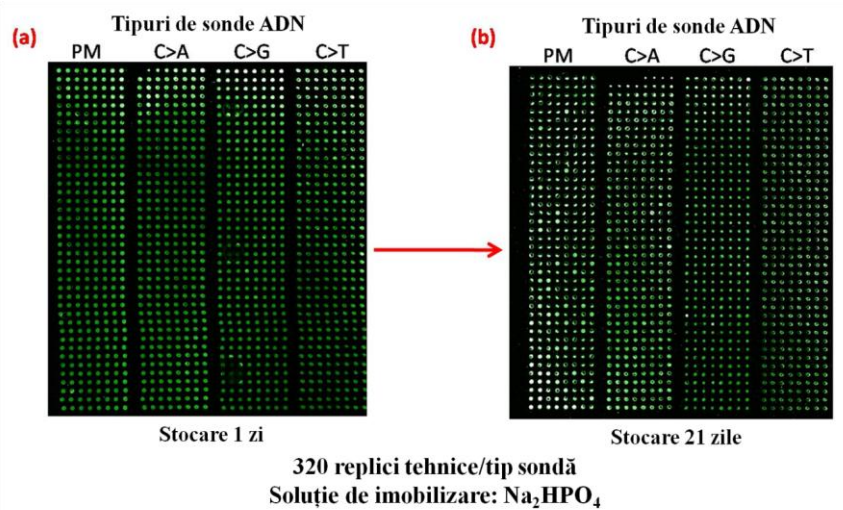


Figura 5.5. Evaluarea comparativă a stabilității morfologice corespunzătoare ADN hibridizat prin scanarea fluorescență a suporturilor hibridizate după (a) 1 zi și (b) 21 de zile de incubare (preluată din Banu și colab., 2018a)

Imaginile *microarray* indică o hibridizare uniformă pentru majoritatea *spot*-urilor, intensitatea semnalului fiind mai mare pentru platforma păstrată timp de 21 zile. Capacitatea de detecție a *mismatch*-urilor a fost investigată după o zi de incubare, rezultatele analizei fiind reprezentate grafic în **Figura 5.6**.

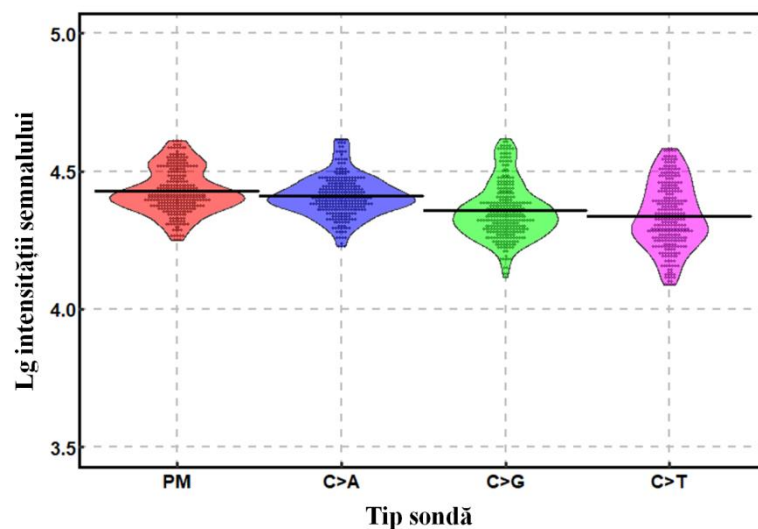


Figura 5.6. Evaluarea comparativă a intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, după 1 zi de incubare a platformei cu sonde ADN depuse

Se constată că diferențele între oligonucleotidele hibridizate PM și C>A nu par semnificative statistic. Pe de altă parte, intensitățile medii de hibridizare cu sondele C>G și C>T apar mai scăzute decât în cazul PM și C>A. Pentru confirmarea acestor observații, am efectuat analiza ANOVA unifactorială împreună cu testul post-hoc Tukey HSD (**Tabelul 5.2.**).

Tabel 5.2. 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 5.7.** este reprezentat grafic rezultatul analizei sondelor cu *mismatch*-uri hibridizate după 21 de zile de incubare.

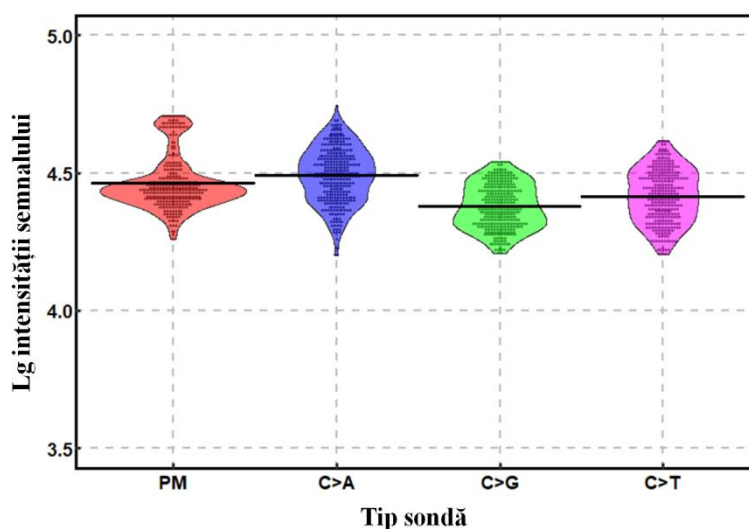


Figura 5.7. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sondele C>A, C>G și C>T, după 21 zile de incubare a platformelor cu sonde ADN depuse

Rezultatele, coroborate cu analiza statistică ANOVA (**Tabelul 5.3**), 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 5.3. 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.

5.5. 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 (Ouilic 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*. Prin urmare, această arhitectură reduce autofluorescența prin reflecțiile multiple din matricea de nanofire, crescând transmitanța datorită modurilor cuplate de ghiduri de lumină care se propagă de-a lungul lungimii SiNWs, rezultând astfel o absorbție îmbunătățită a luminii și intensitatea crescută a semnalului fluorescent.

Mecanismele uzuale de legare a ADN pe o suprafață (sticlă, siliciu, polimer sintetic) implică sonde modificate chimic cu grupări amino sau tiol prin care pot fi atașate covalent de substraturi funcționalizate exprimând grupări epoxi, aldehydice, succinimidil sau izotiocianat (Cretich și colab., 2006; Nimse și colab., 2014). 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 utilizat în mod obișnuit ca fotorezist negativ în microelectronică, fiind adecvat pentru imobilizarea moleculelor în sisteme biologice microelectromecanice (Bio-MEMS) și biosenzori (Joshi și colab., 2007; Deepu, Sai

și Mukherji, 2009). Fezabilitatea lamelor de sticlă acoperite cu SU-8 pentru fabricarea *microarray* a fost deja demonstrată (Sethi și colab., 2010; Marie și colab., 2006), cu toate acestea, nu există studii privind utilizarea SU-8 pe arhitecturi 3D care să susțină atașarea uniformă a sondelor ADN.

Pornind de la aceste observații, am dezvoltat un biosenzor nou, nanoconfigurat (**Subcapitolul 4.1.1.2. Tehnologie de fabricare a nanofirelor de siliciu cu catalizatori de Ag**), stabil din punct de vedere chimic, pe care sunt controlate dimensiunile *spot*-urilor *microarray* prin acoperirea cu SU-8 a SiNWs (procedură descrisă în **Subcapitolul 4.2.2. SU-8**), obținând de asemenea specificitate superioară și reproductibilitate de detecție a SNPs corespunzătoare genei *BRCA1*.

5.5.1. Flux tehnologic

Sondele oligonucleotidice și secvențele țintă utilizate corespund genei *BRCA1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>). Controlul negativ (Nc) (secvență fără complementaritate) și 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 5.4.**).

Tabel 5.4. Sonde și secvențe-țintă

<i>BRCA1</i>		
Sonde cu potrivire perfectă (PM)		5'-C6-NH ₂ -CTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGG-3'
Sonde cu 1 mismatch (MM)	C>A	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG▲GGGAGGAAAATGGG-3'
	C>T	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG■GGGAGGAAAATGGG-3'
Sonde cu 2 mismatch-uri (2MM)	CG>AA	5'- C6-NH ₂ -CTAGGAATTG▲▲GGGAGGAAAATGGG-3'
Sondă fără complementaritate – control negativ (Nc)		5'-C6-NH ₂ -TTGCATCTTCTGGGTCAGGTACGGA-3'
Secvență-țintă cu complementaritate perfectă (C)		5'-Cy3-CCCATTTTCCTCCCGCAATTCCTAG-3'

Secvențele cu *mismatch* au fost proiectate în concordanță cu “SNPs raportate pentru alela patogenă, disponibile în baza de date a polimorfismelor uninucleotidice (dbSNP) a variației secvenței de nucleotide” (Kitts și Sherry, 2011;

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și *HPV*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?db%BCs>). Rs28897696 este un polimorfism care, dacă se găsește sub formă homozigotă (două copii), este foarte probabil să crească predispoziția la cancerul mamar sau ovarian (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897696). O a doua nepotrivire corespunzătoare rs1057520432 (reprezentând o alelă benignă), a fost introdusă într-una din tipurile de sonde pentru a genera un efect mai destabilizator asupra duplexului. Secvența-țintă complementară a avut un fluorofor Cy3 atașat la capătul 5', necesar pentru detectarea fluorescență a hibridizării. 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%). Condițiile de depunere, imobilizare, spălare și blocare au fost aceleași cu cele descrise în **Subcapitolul 5.2**. Configurația structurilor *microarray* este reprezentată în **Figura 5.8**.

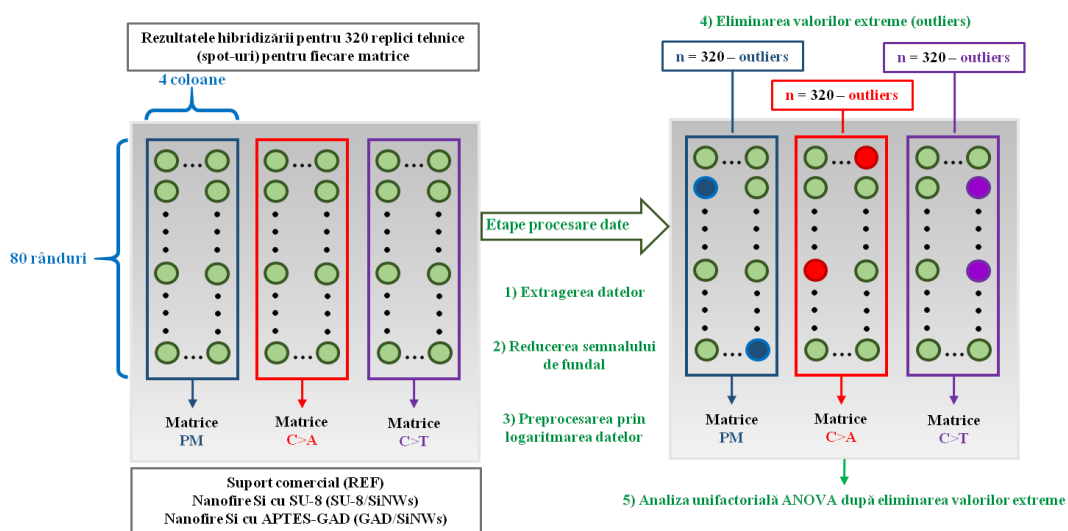


Figura 5.8. Schema de depunere a sondelor PM, C>A și C>T pe suporturile testate și etapele de prelucrare a datelor pentru analiza statistică (preluată din Banu și colab., 2018b)

Mai exact, 3 matrici a 4 x 80 *spot*-uri (320 replici) corespunzătoare sondelor cu complementaritate perfectă (PM), și sondelor cu un mismatch, au fost depuse cu un vârf solid având diametrul de 200 μm atât pe suport comercial de sticlă cu grupări active aldehidice, cât și pe substraturile concepute din SiNWs. Pentru experimentele-control, au fost utilizate 4 matrici corespunzătoare controlului negativ (Nc), sondelor cu complementaritate perfectă (PM), sondelor cu mismatch-ul C>A și sondelor conținând două mismatch-uri (CG>AA); acestea au fost depuse atât pe suportul commercial cu

grupări aldehidice, pe substraturile de SiNWs funcționalizate, cât și pe substraturi de Si cristalin funcționalizate. Incubarea peste noapte a suporturilor s-a realizat la temperatura camerei, pentru a obține atașarea covalentă a sondelor de suprafață. Eliminarea sondelor nelegate a fost ulterior realizată prin spălarea dispozitivelor de trei ori succesiv în fiecare dintre următoarele soluții: (i) 2x SSC/0.1% g / v SDS (citrat de sodiu salin / dodecil sulfat de sodiu); (ii) 1x SSC; (iii) DIW (apă deionizată). Blocarea situsurilor nereacționate a fost realizată prin imersarea platformelor *microarray* timp de 30 de minute la 42 °C și 250 rpm într-o soluție preîncălzită (42 °C) de 1% g / v BSA (albumină serică bovină) în 5x SSC și 0,1% g / v SDS.

Biochip-urile preparate astfel au fost stocate pentru 1 zi și 21 de zile la 4 °C în atmosferă de N₂ înainte de hibridizare, cu scopul de a evalua stabilitatea suporturilor pe termen scurt și îndelungat, alegând adițional două intervale de timp (4 și 8 zile) pentru SiNWs funcționalizate cu SU-8. 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. Înaintea citirii rezultatelor, secvențele ADN-țintă neatașate au fost înlăturate prin spălarea biosenzorilor de trei ori succesiv în 2x SSC/0.1% g / v SDS, 1x SSC și DIW.

5.5.2. 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/>) și structura *microarray* însoțită de etapele de prelucrare a datelor este ilustrată în **Figura 5.8**. Seturile de date corespunzătoare experimentelor control au fost analizate folosind exact aceiași pași aplicați pentru dispozitivele ce au imobilizat sondele PM, C>A și C>T. Graficul a fost generat utilizând valorile 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). Toate graficele au fost generate folosind pachetul ggplot2 din R (Wickham, 2009). Pentru experimentele control care implică sondele Nc,

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și *HPV*

PM, C>A și CG>AA, seturile de date au fost analizate utilizând exact aceiași pași aplicați pentru dispozitivele care conțin PM, C> A și C> T.

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 ($\alpha = 0,05$) 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*).

Calcululele aplicate în studiu sunt prezentate și explicate mai jos:

1. Raportul între semnalul fluorescent și două deviații standard este definit ca:

$$\frac{\bar{S}-\bar{B}}{\sigma_S-\sigma_B}$$

(1)

unde \bar{S} e media intensității semnalului, \bar{B} este media intensității semnalului de fundal, σ_S este deviația standard a intensității semnalului, iar σ_B e deviația standard a intensității semnalului de fundal.

2. Normalizarea intensităților semnalelor de hibridizare (I_N) e calculat conform relației de mai jos:

$$I_N = \sum_{i=1}^n \lg(\bar{X}_i - \bar{B}_i)$$

(2)

unde n este numărul de replici tehnice după excluderea valorilor redundante, \bar{X}_i reprezintă media intensității semnalului spotului, iar \bar{B}_i e media intensității semnalului de fundal. I_N reprezintă intensitățile de hibridizare cu semnal de fundal extras, prelucrate prin logaritmare.

3. Media intensității semnalului fluorescent de hibridizare (\bar{I}) este calculat astfel:

$$\bar{I} = \sum_{i=1}^n \frac{\lg(\bar{X}_i - \bar{B}_i)}{n}$$

(3)

unde n este numărul replici tehnice după eliminarea valorilor redundante, \bar{X}_i reprezintă media intensității semnalului a spotului, iar \bar{B}_i e media intensității semnalului de fundal.

4. Deviația standard (σ) este determinată cu ajutorul următoarei ecuații:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (\lg(\bar{X}_i - \bar{B}_i))^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n \lg(\bar{X}_i - \bar{B}_i) \right)^2}{n} \right)}$$

(4)

ce poate fi scrisă în mod simplificat folosind ecuațiile (1) și (2) astfel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} (I_N - \bar{I})^2}$$

(5)

5. Coeфициentul de variație (*CV*), ca indicator de reproductibilitate al *biochip*-urilor, este evaluat în funcție de intensitatea semnalului de hibridizare (\bar{I}) și de deviația standard (σ), conform formulei următoare:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{I}} \times 100$$

(6)

5.5.3. Mecanismul de imobilizare

Există doi factori care determină recunoașterea eficientă a sondelor atașate cu ADN țintă: concentrația sondei legate trebuie să fie optimă pentru a evita efectul de aglomerare și impedimentele sterice, iar sondele trebuie în mod ideal să fie orientate într-o poziție verticală (Peterson, Wolf și Georgiadis, 2002), aceste aspecte fiind discutate în **Subcapitolul 2.2.5. Mecanisme de imobilizare și hibridizare pe substraturi**. Folosirea unei configurații 3D ar elimina posibilitatea apariției efectului de aglomerare și a impedimentelor sterice și astfel ar crește eficiența hibridizării. Sondele noastre ADN conțin un linker 5'-NH₂-C6 care interacționează cu substraturile modificate cu aldehidă și epoxi, favorizând orientarea verticală în raport cu suprafața. Pe baza analizelor SEM/EDX prezentate în **Subcapitolele 4.2.1. APTES/GAD și 4.2.2. SU-8**, este de așteptat o orientare ușor diferită a sondelor ADN. În cazul funcționalizării cu APTES-GAD, monocatenele 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 5.9.** ilustrează mecanismele de imobilizare pe platformele 3D modificate cu APTES-GAD (GAD / SiNWs) și, respectiv, cu SU-8 (SU-8 / SiNWs).

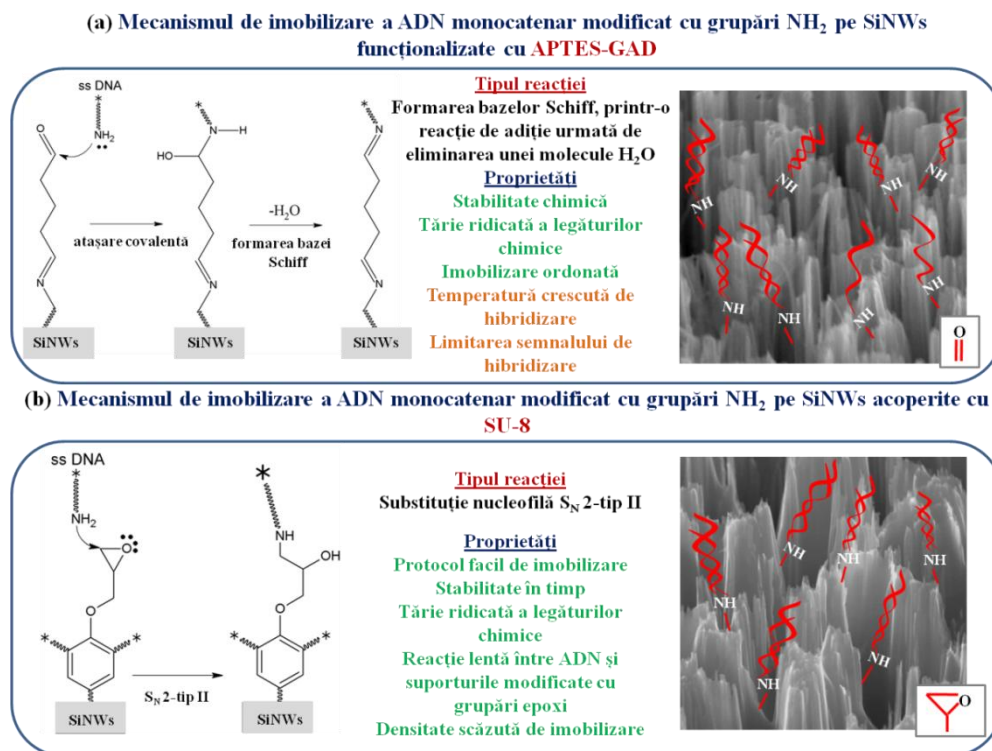


Figura 5.9. Reprezentarea schematică a mecanismelor de imobilizare a sondelor modificate cu grupări NH₂ – pe (a) GAD/SiNWs și (b) SU-8/SiNWs (preluată din Banu și colab., 2018b)

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 5.9. (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 5.9. (b)**.

5.5.4. Investigarea specificității de detecție în timp

Stabilitatea și specificitatea sondelor sunt proprietăți esențiale pentru platformele *microarray* de producție proprie care vizează implementarea comercială. Câteva studii existente au abordat stabilitatea pe termen scurt (până la 16 ore) a sondelor neterminate și modificate cu grupări NH₂ depuse pe suprafețe spălate în prealabil cu acid sau silanizate (Call, Chandler și Brockman, 2010) sau până la 42 zile de evaluare a anticorpilor depuși înainte de prelucrarea datelor

(Gerdtsen și colab., 2016). Am analizat stabilitatea sondelor ADN depuse pe platformele nanostructurate de Si (GAD/SiNWs și SU-8/SiNWs) și eficiența hibridizării până la 21 zile, suportul comercial de sticlă fiind considerat referință (REF). Pe lângă examinarea imaginilor *microarray* fluorescente, histogramele și coeficienții de variație au fost analizați pentru a certifica stabilitatea în timp. Analizele grafice au fost corelate cu statisticile ANOVA pentru a demonstra specificitatea de detecție a oligonucleotidelor conținând mismatch-uri foarte stabile.

Rezultatele imaginilor optice *microarray* arată diferențe semnificative între spot-urile obținute pentru fiecare tip de suport. În **Figura 5.10.** sunt prezentate rezultatele hibridizării pe suport comercial, după 1 zi și 21 de zile de incubare.

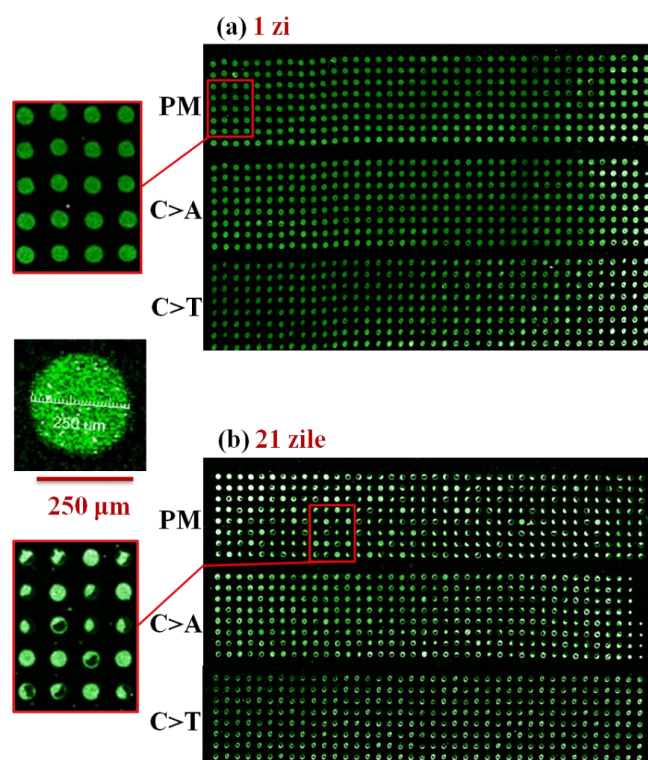


Figura 5.10. Examinarea stabilității morfologice a ADN hibridizat pe suport comercial (REF) după păstrarea biosenzorilor printați pentru (a) 1 zi și (b) 21 zile

Astfel, substratul de sticlă comercială modificat cu aldehydă prezintă după 1 zi de incubare spot-uri de bună calitate, cu forme și intensități conforme, cu diametre de aproximativ 250 μm, mai mari decât diametrul vârfurilor utilizate (**Figura 5.10. (a)**). După 21 de zile de incubare, apare o alterare morfologică în care apare suprasaturație în centrul spot-ului pricinuit de efectul Marangoni și la periferia spot-ului din cauza efectului "coffee-ring" (Rao și Grainger, 2014) (**Figura 5.10. (b)**). Dimensiunea *spot-urilor* este corelată cu umectarea suprafeței, suportul comercial

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

modificat cu grupări aldehidice fiind hidrofil, cu un unghi de contact de 74.3° (Figura 5.11.).

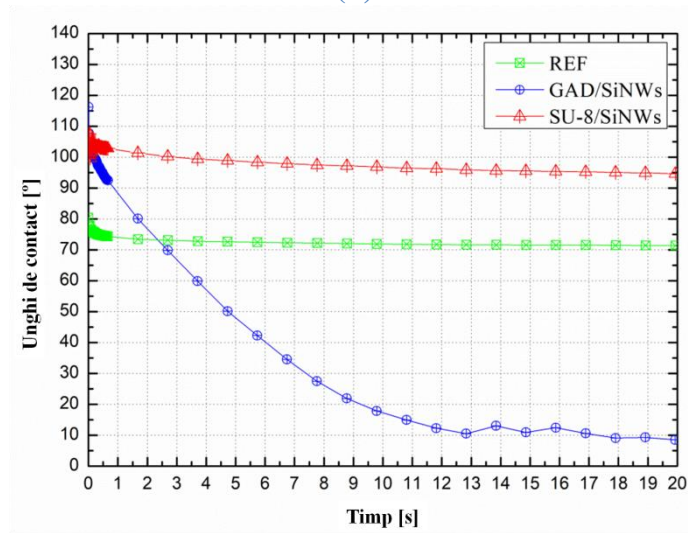
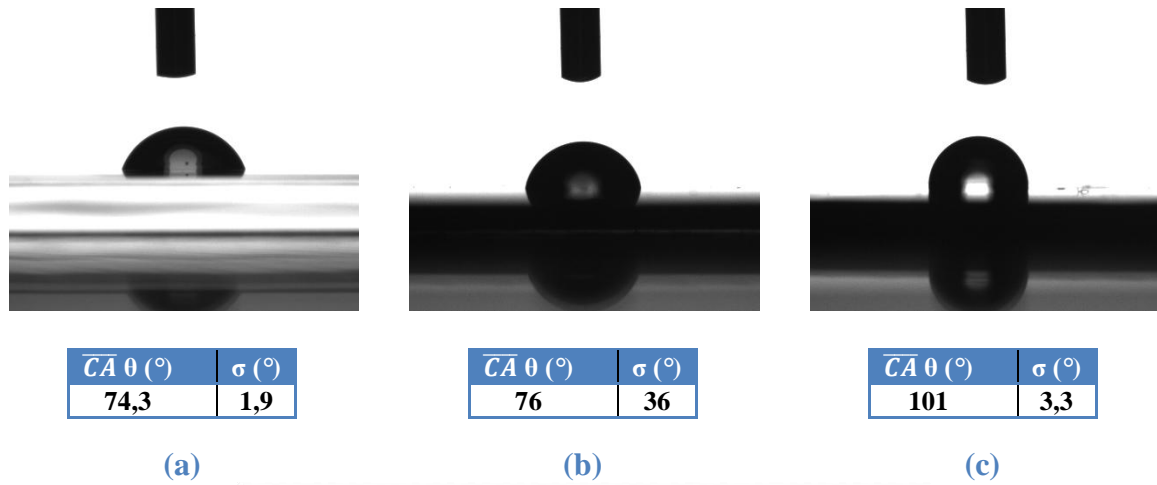


Figura 5.11. Unghiurile de contact corespunzătoare picăturilor depuse pe (a) *REF*, (b) *GAD/SiNWs* și (c) *SU-8/SiNWS*, corelate cu unghiurile de contact medii și deviațiile standard calculate din trei măsurări efectuate pe aceeași probă; (d) variația unghiului de contact (CA) în funcție de timp pe *REF*, *GAD/SiNWs* și *SU-8/SiNWs* (preluată din Banu și colab., 2018b)

Morfologia *spot*-urilor și intensitățile de hibridizare obținute pe platforma *GAD/SiNWs* sunt acceptabile după 1 zi, cu o descreștere evidentă în intensitatea semnalului după 21 de zile de incubare (Figura 5.12.).

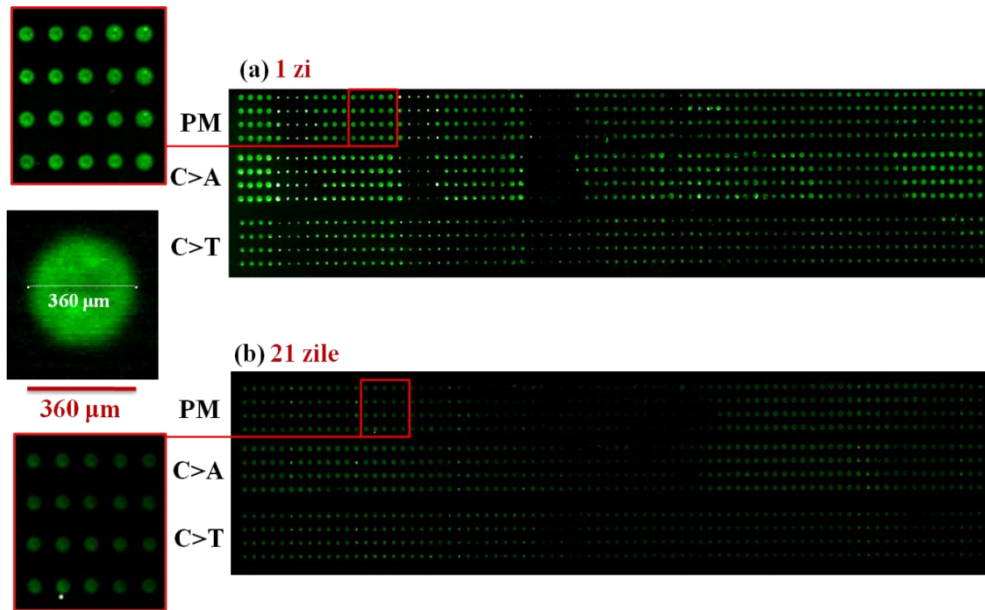


Figura 5.12. Semnalul fluorescent de hibridizare pe platforma GAD/SiNWs după stocarea pentru (a) 1 zi și (b) 21 de zile a biosenzorilor având sondele ADN atașate

S-au obținut diametre mai mari ale *spot*-urilor ($\sim 360 \mu\text{m}$) datorită difuziei capilare printre nanofire atât a soluției de imobilizare conținând sonde ADN monocatenar, cât și a soluției de hibridizare conținând ADN țintă (Banu și colab., 2015). Fenomenul de difuzie capilară este confirmat de media unghiului de contact de 76° , cu o deviație standard de 36° , ceea ce indică reducerea unghiului de contact în timp (Figura 5.11. (b) și (d)).

În schimb, imaginile fluorescente care corespund SU-8/SiNW după 1 și 21 de zile de stocare au dezvăluit, pe lângă diametrele mai mici de spot, intensități uniforme și morfologii bune (Figura 5.13.).

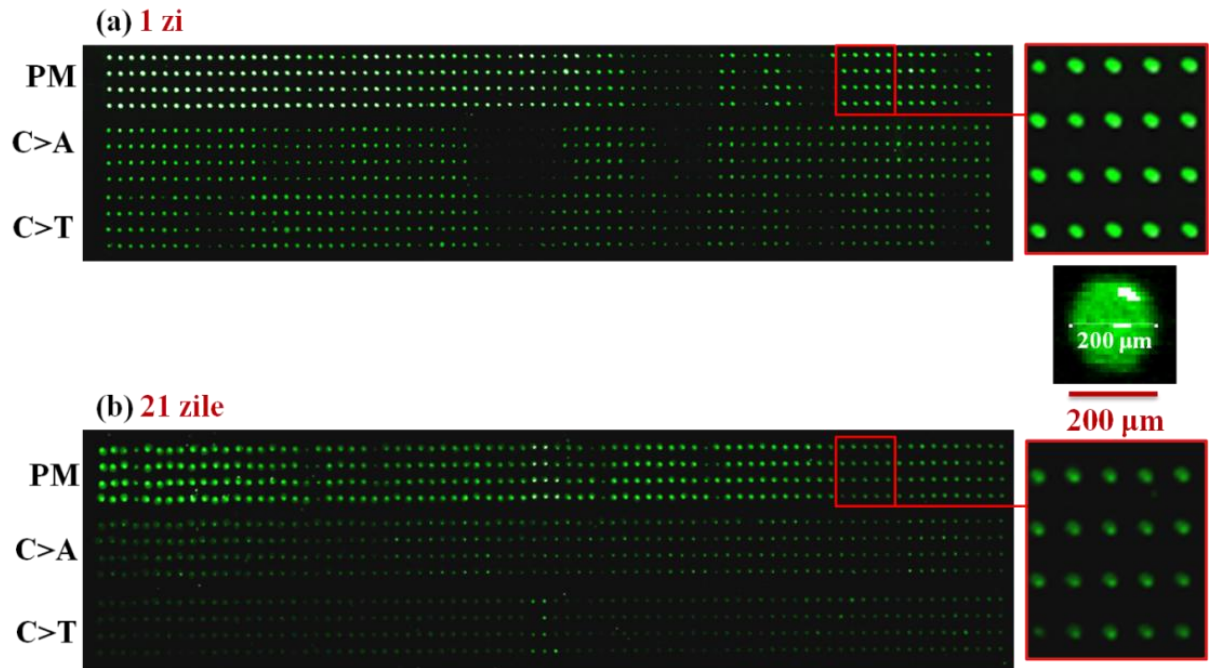


Figura 5.13. Evaluarea stabilității morfologice a ADN hibridizat pe platforma *SU-8/SiNWs* scanând fluorescent suporturile hibridizate după (a) 1 zi și (b) 21 de zile de incubare

Diametrul mai mic al *spot*-urilor se datorează în principal hidrofobicității suprafeței, confirmată de unghiul de contactul mediu θ de 101° (**Figura 5.11. (c)**). Dimensiunea lor este de aproximativ 200 μm , apropiată de dimensiunea vârfului, confirmând că acest tip de funcționalizare este adecvat pentru dezvoltarea suporturilor *microarray*.

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). Valorile semnalului raportat la două deviații standard (SSDR) au fost calculate folosind **Ecuția 1**, iar rezultatele ilustrate în **Figura 5.14.** 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 SSDR scade doar cu 10 %.

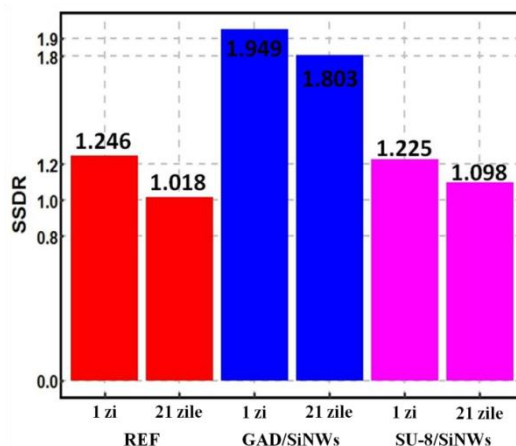


Figura 5.14. Măsurarea semnalului de hibridizare raportat la două deviații standard pentru trei tipuri de biosenzori, după 1 zi și 21 de zile de incubare a suporturilor cu sonde ADN imobilizate (preluată din Banu și colab., 2018b)

Pe de altă parte, nanofirele de siliciu acoperite cu APTES-GAD (GAD/SiNWs) au prezentat cele mai bune valori SSDR, 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 fluorescente medii de hibridizare (\bar{I}), abaterile standard (σ) și coeficienții de variație (CV), așa cum este prezentat în **Figura 5.15**.

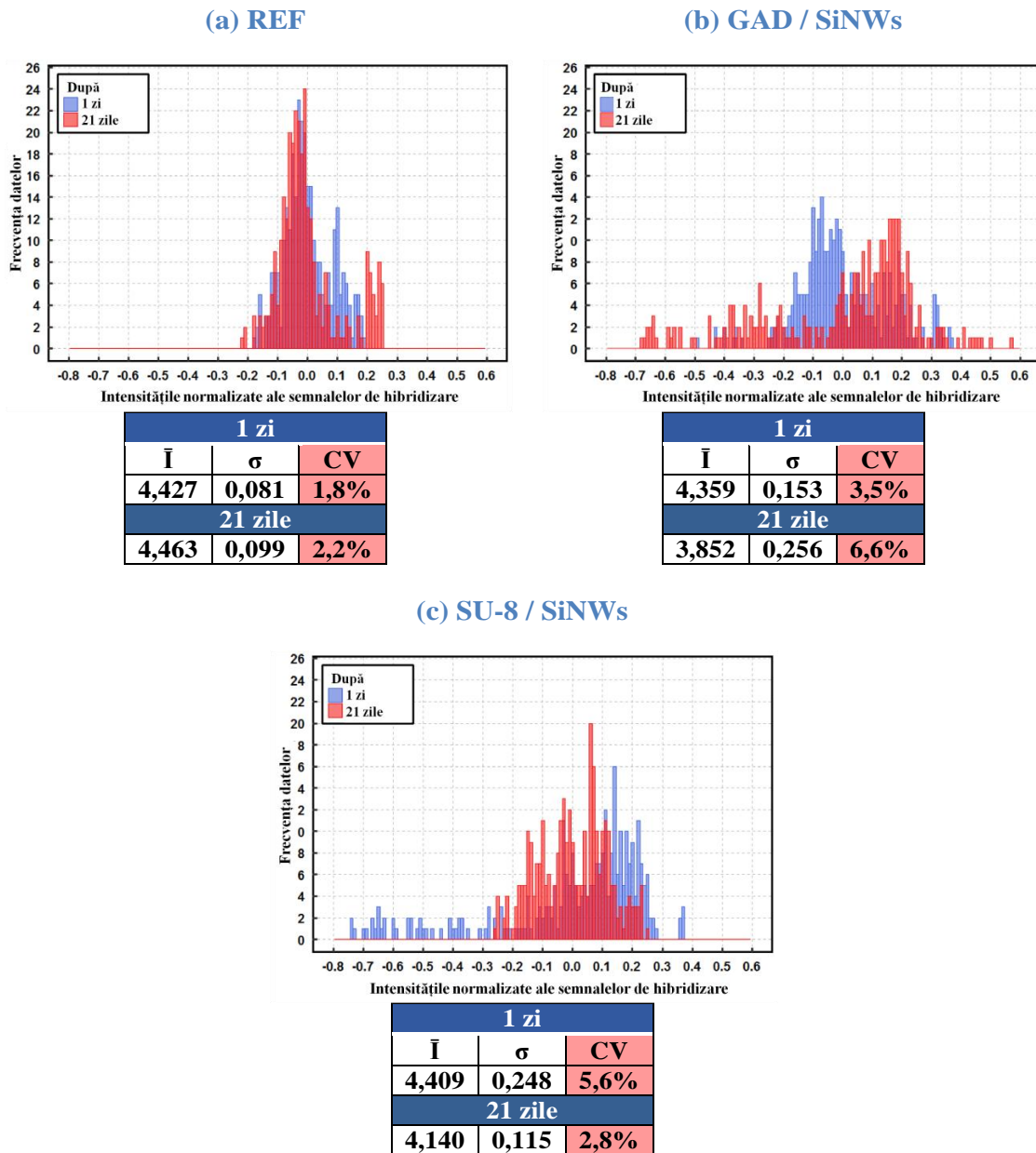
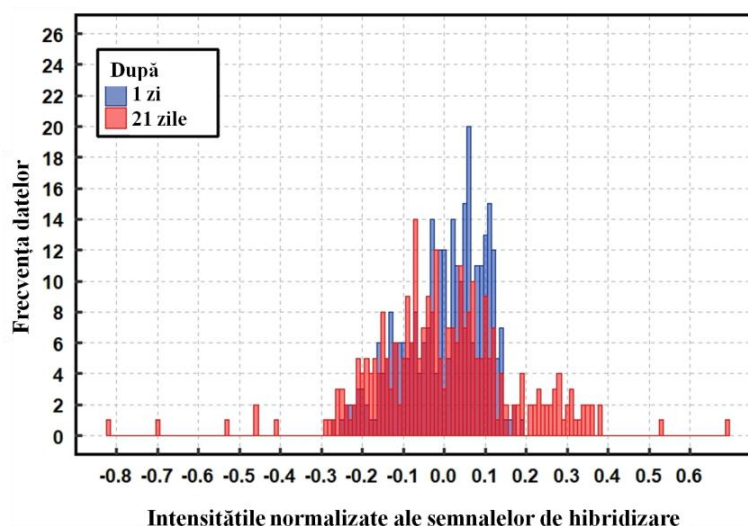


Figura 5.15. Evaluarea stabilității în timp a sondelor PM atașate pe: (a) dispozitiv comercial de sticlă (REF); (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă (GAD/SiNWs); (c) SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs), cuplate cu statistici descriptive pentru fiecare tip de substrat (preluată din Banu și colab., 2018b)

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. Acest fapt a cerut o evaluare suplimentară a intervalelor medii pentru a confirma stabilitatea pe termen lung, prin urmare fiind selectate 4 zile și 8 zile pentru investigații (Figura 5.16.).



4 zile			8 zile		
\bar{I}	σ	CV	\bar{I}	σ	CV
4,041	0,098	2,4%	3,987	0,177	4,4%

Figura 5.16. Evaluarea stabilității după 4 și 8 zile de depozitare a sondelor PM atașate pe SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs), cuplate cu statistici descriptive pentru fiecare tip de substrat (preluată din Banu și colab., 2018b)

Analizele statistice suplimentare confirmă această tendință de îmbunătățire, prezentând două distribuții normale, suprapuse.

Intensitățile medii ale semnalelor fluorescente (\bar{I}) au fost calculate pentru toate substraturile utilizând **Ecuatiile (2) și (3)**. Pentru REF, intensitățile medii ale semnalelor de hibridizare au fost de $\bar{I}_{1zi} = 4.427$ și $\bar{I}_{21zile} = 4.463$, urmate de SU-8/SiNWs cu $\bar{I}_{1zi} = 4.409$ și $\bar{I}_{21zile} = 4.140$ și de GAD/SiNWs cu $\bar{I}_{1zi} = 4.359$ și $\bar{I}_{21zile} = 3.852$. Creșterea intensității medii calculate pentru REF este confirmată și vizual prin compararea imaginilor obținute după scanarea fluorescentă (**Figura 5.10.**), unde saturația indusă de efectele “coffee-ring” și Marangoni a fost evidentă.

Deviațiile standard (σ) pentru 1 zi și 21 de zile de depozitare au fost calculate conform **Ecuatiilor (4) și (5)**. Calitatea medie a *spot*-urilor în cazul substratului comercial (REF) nu a fost afectată în mod substanțial, împrăștierea datelor conducând la valori ale deviației standard $\sigma_{1zi} = 0,081$ și $\sigma_{21zile} = 0,099$ (**Figura 5.15. (a)**). Pentru suporturile fabricate au fost obținute rezultate diferite: în timp ce inițial, deviația standard pentru GAD/SiNWs era $\sigma_{1zi} = 0,153$, aceasta a suferit o scădere până la $\sigma_{21zile} = 0,256$ (**Figura 5.15. (b)**). În cazul SU-8/SiNWs, comportamentul este opus, deviațiile standard îmbunătățindu-se de la $\sigma_{1zi} = 0,248$ până la $\sigma_{21zile} = 0,115$ (**Figura 5.15. (c)**).

Reproductibilitatea *spot*-urilor hibridizate pe platformele create este dată în principal de coeficientul de variație (CV), calculat folosind **Ecuatia 6**. O valoare CV mai

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

mică de 10% este în general acceptabilă, ceea ce denotă o precizie mai bună a calculului atunci când sunt implicate mai multe replici tehnice (Calvi și colab., 2017; Glotov și colab., 2016; Strambini și colab., 2015). Toate dispozitivele analizate au prezentat coeficienți mai mici de 7%, reflectând performanța analizei care garantează fiabilitatea procesului de fabricare. După cum era de așteptat, cea bună stabilitate în timp a fost prezentată de REF, având $CV_{1 zi} = 1,8\%$ și $CV_{21 zile} = 2,2\%$. Pentru GAD/SiNW au fost calculate valori inferioare ale acestui coeficient după 1 zi ($CV_{1 zi} = 3,5\%$), degenerând după 21 de zile la $CV_{21 zile} = 6,6\%$, fiind anticipat de distribuția descentrată a datelor cu vârfuri bimodale disparate. Aceste constatări pot fi asociate cu îndepărtarea straturilor APTES/GAD/ADN datorită instabilității hidrolitice a APTES după păstrarea suporturilor la 4 °C, în atmosferă cu umiditate ridicată (Zhu, Lerum și Chen, 2012; Aissaoui și colab., 2012). Analizând datele obținute pe noua configurație cu SU-8/SiNWs, am obținut un coeficient care, după 21 de zile, a fost comparabil cu cel calculat pentru suporturile comerciale - $CV_{21 zile} = 2,8\%$.

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

Un experiment de probă a fost efectuat având suporturi cu sonde control negativ, sonde PM, sonde care au o nepotrivire nucleotidică (C>A) și sonde care conțin două neconcordanțe (CG> AA). Suportul comercial de sticlă a fost luat drept referință (REF), iar suprafața de siliciu monocristalin modificată cu APTES-GAD și SU-8 (GAD/Si și SU-8/Si) a fost inclusă pentru o vizualizare comparativă cu platformele 3D bazate pe GAD/SiNWs și SU-8/SiNWs). Testul ANOVA unifactorial cu corecția post-hoc Tukey HSD a fost efectuat pentru toate substraturile utilizate în experimentele control pentru a evalua precizia discriminării între sondele hibridizate. Intensitățile semnalelor de hibridizare normalizate conform **Ecuatiei 2** au fost luate în considerare pentru sondele PM în comparație cu sondele MM (**Figura 5.17**).

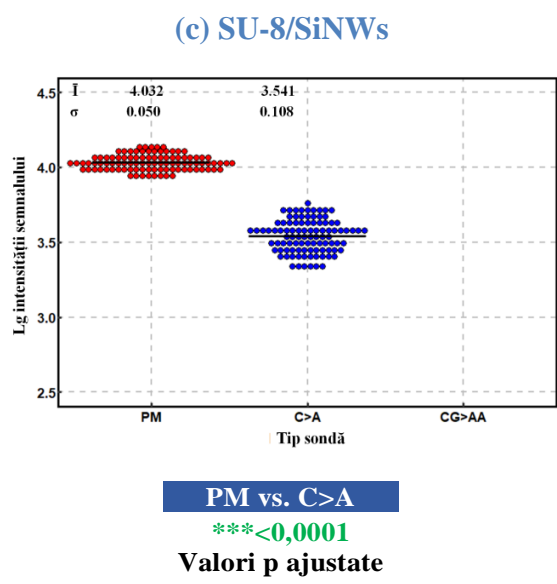
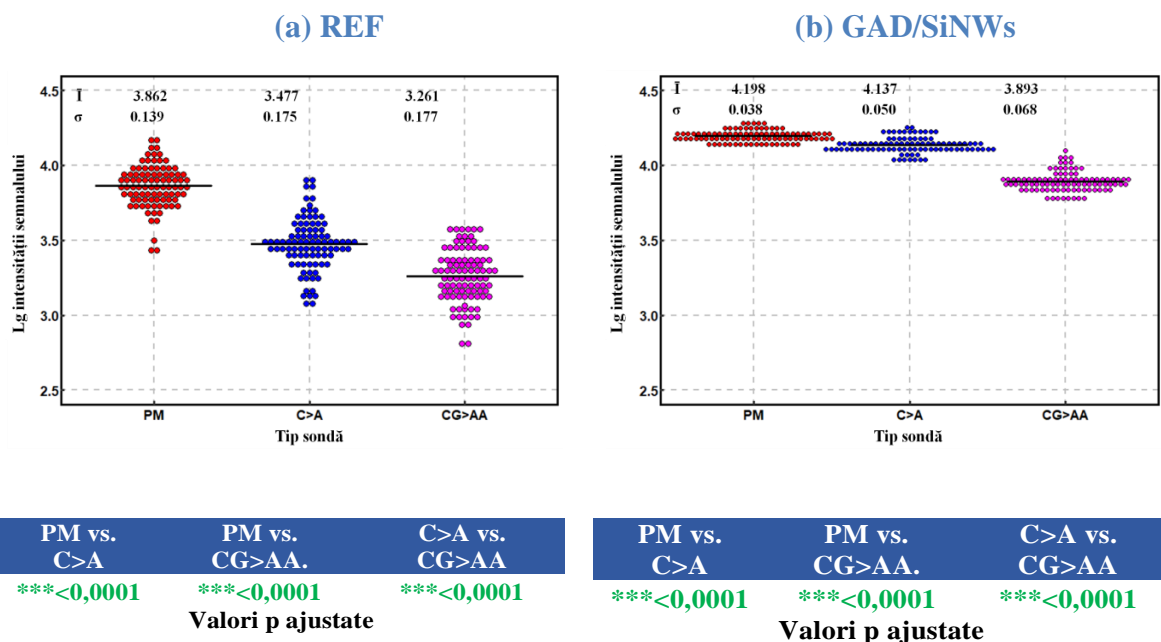


Figura 5.17. Evaluarea diferențelor de intensitate a semnalelor de hibridizare dintre sondele PM și sondele care conțin una (C> A) și două nepotriviri nucleotidice (CG> AA) pe (a) dispozitivul comercial de sticlă - REF; (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă - GAD/SiNWs; (c) SiNW sacoperite cu SU-8 - SU-8 / SiNWs, corelate cu analiza statistică (preluată din Banu și colab., 2018b)

Pentru controalele negative depuse și atașate pe toate tipurile de suport nu s-au observat semnale fluorescente de hibridizare. În **Figura 5.18.**, urmele vârfulor cu care au fost depuse controalele negative sunt clar observate pe SiNWs.

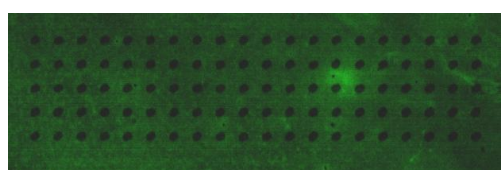


Figura 5.18. Controlul negativ depus pe suprafața constituită din nanofire de siliciu, acoperită cu SU-8. Urma vârfului este prezentă, însă nu există hibridizare nespecifică (preluată din Banu și colab., 2018b)

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și *HPV*

Analiza grafică a REF prezintă o discriminare statistică între sondele PM, C>A și CG>AA neadekvate (** $p < 0,0001$) (**Figura 5.17. (a)**). Analiza statistică a rezultatelor de hibridizare pe GAD/Si prezintă o discriminare semnificativă statistic între sondele PM și CG> AA (** $p < 0,0001$), în timp ce intensitatea semnalului de hibridizare este mai mare pentru C>A (3,631) decât pentru PM (3,521), făcând din GAD/Si o platformă de detecție neadekvată (**Figura 5.19. (a)**).

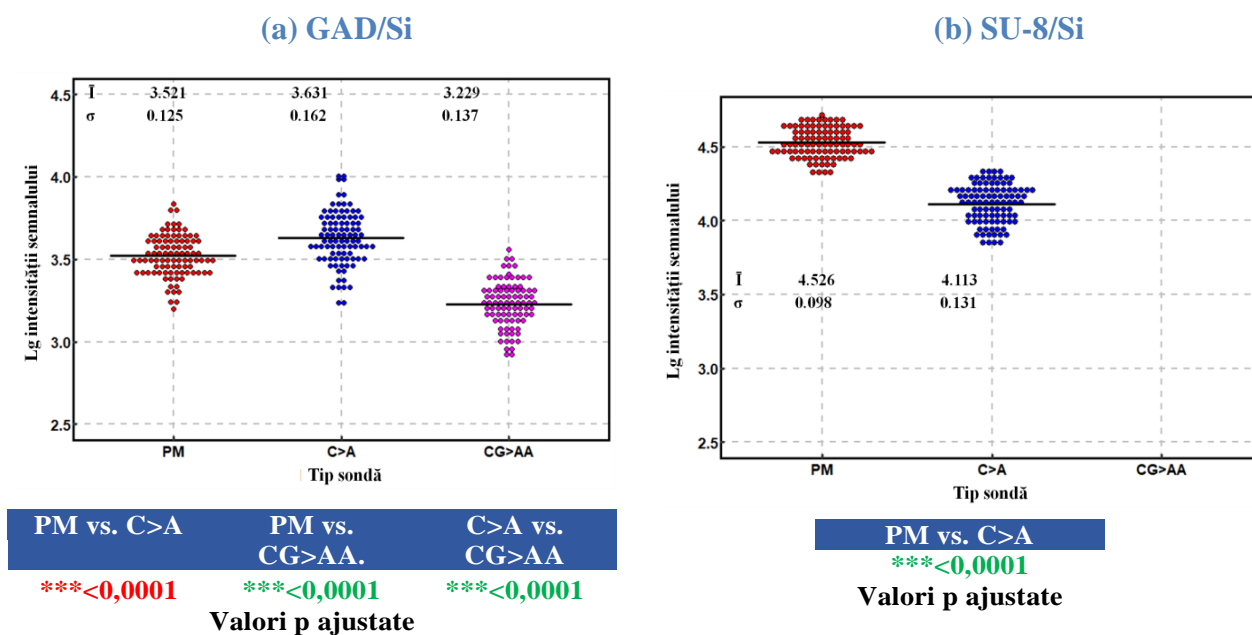


Figura 5.19. Analiza statistică a rezultatelor hibridizării pe GAD/Si și SU-8/Si (preluată din Banu și colab., 2018b)

Prin analogie, rezultatele hibridizării pe suportul GAD/SiNWs au evidențiat intensități mai mari a semnalului (**Figura 5.17. (b)**), 4,198 în loc de $\bar{I} = 3,521$ pe GAD/Si pentru PM și discriminare statistică între toate tipurile de probe (** $p < 0,0001$) deși intensitatea medie a lui C>A (4,137) este puțin mai mică decât în cazul PM hibridizat.

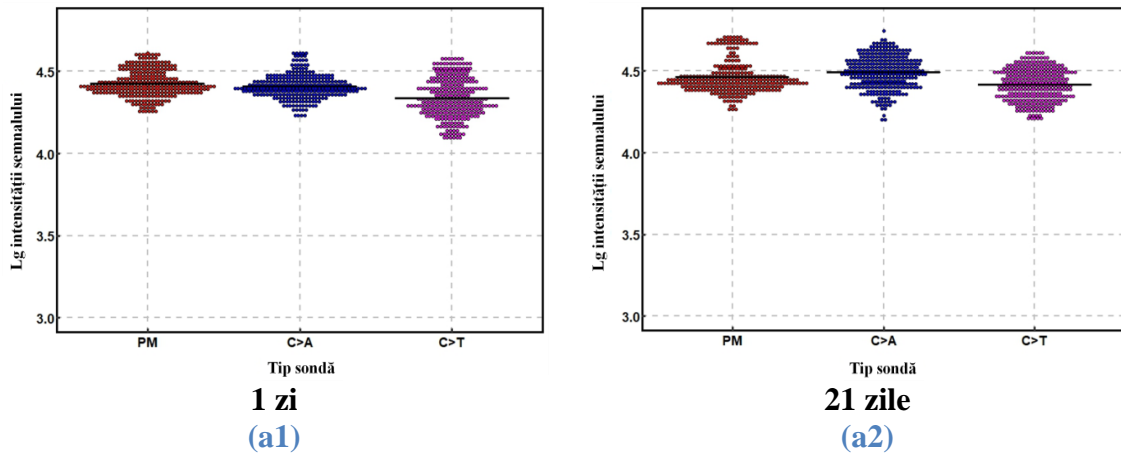
Atât pe SU-8/Si (**Figura 5.19. (b)**) cât și pe SU-8/SiNWs (**Figura 5.17. (c)**), au fost obținute rezultate superioare în termeni de specificitate de detecție (** $p < 0,0001$), cu un coeficient de variație egal cu 2,16% pentru PM hibridizat pe SU-8/Si și 1,24% pe SU-8/SiNWs. Sondele CG> AA au demonstrat o destabilizare puternică a duplexului ADN atunci când sunt atașate pe SU-8, deoarece semnalul fluorescent nu a putut fi decelat de semnalul de fundal și extras pentru analiza datelor, în timp ce pe suprafețele expunând grupări aldehidice, secvența cu două neconcordanțe a fost detectată, având cea mai mică intensitate a semnalului de hibridizare. Pe baza acestor constatări, este evident că nu doar suprafața nanostructurată, ci și grupările funcționale joacă un rol major în acuratețea

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

detecției ADN, cu o mai bună specificitate de hibridizare pe SU-8 datorită reactivității mai mari a grupărilor epoxi (Sonawane și Nimse, 2016).

De asemenea, 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 5.20.).

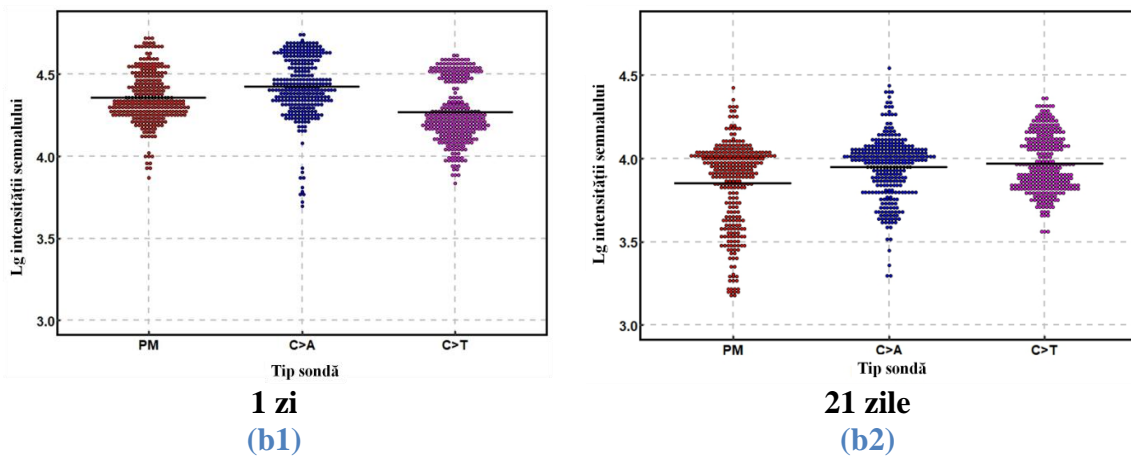
REF



	PM vs. C>A	PM vs. C>T.	C>A vs. C>T
1 zi	ns 0,0675	***<0,0001	***<0,0001
21 zile	**0,001	***<0,0001	***<0,0001

Valori p ajustate

GAD/SiNWs



Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

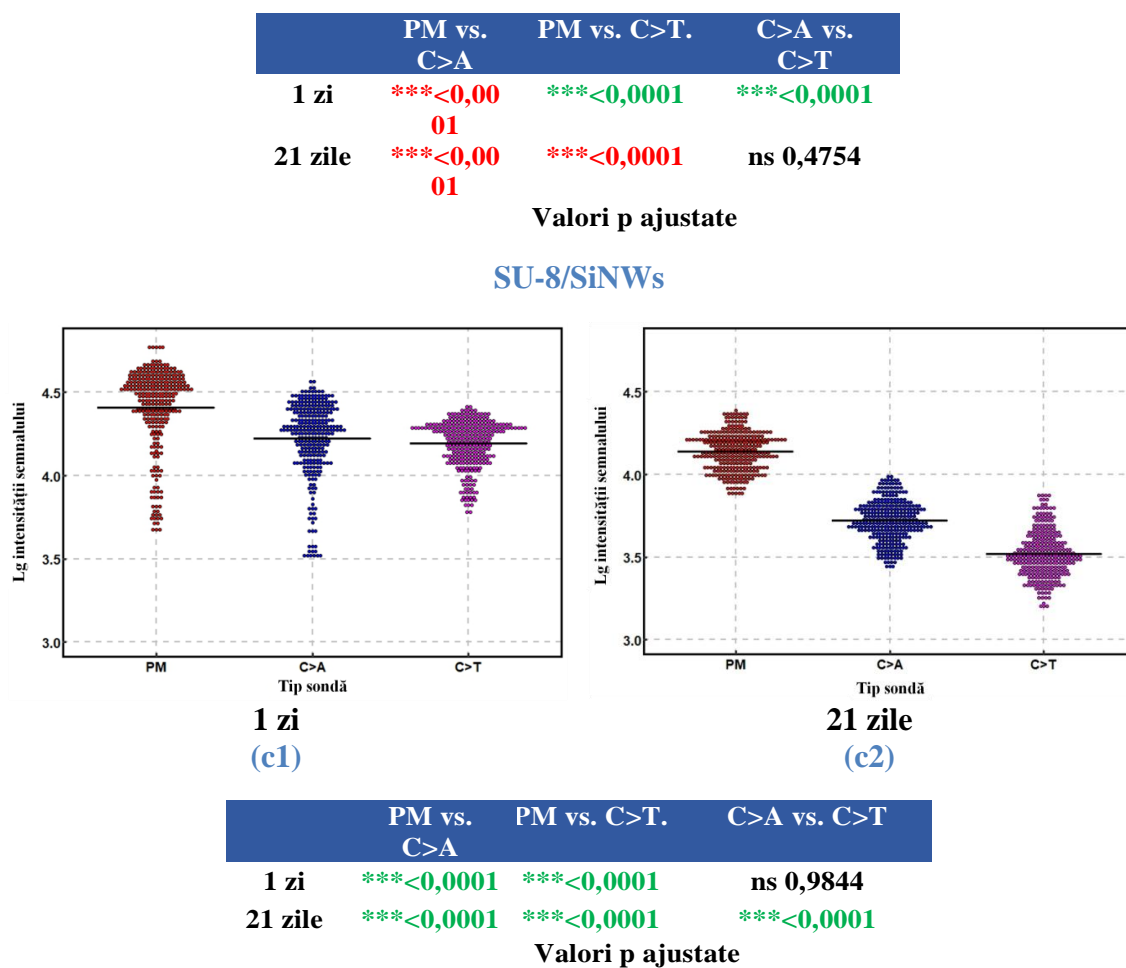


Figura 5.20. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sonda C>A și sonda C>T pe (a) suportul comercial de sticlă - REF; (b) SiNWs funcționalizate cu glutaraldehidă (GAD/SiNWs); (c) SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs) după 1 zi și 21 de zile de incubare au fost corelate cu analiza ANOVA unifactorială (preluată din Banu și colab., 2018b)

Analiza grafică a datelor de hibridizare pe suportul REF după 1 zi de depozitare prezentată în **Figura 5.20. (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 5.20. (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).

Aceeași situație a fost întâlnită pentru platforma GAD/SiNWs în ceea ce privește diferențele dintre sondele hibridizate C>A și PM, atât după 1 zi, cât și după 21 de zile de depozitare (**Figura 5.20. (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 5.20. (c1)**). Un comportament opus în timp a fost observat pentru acest tip de platformă (**Figura 5.20. (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). Rezultatele promițătoare evidențiate pe SU-8/SiNW după 1 zi și 21 de zile au necesitat evaluarea intermediară a stabilității pe termen lung de 4 zile și 8 zile (**Figura 5.21.**).

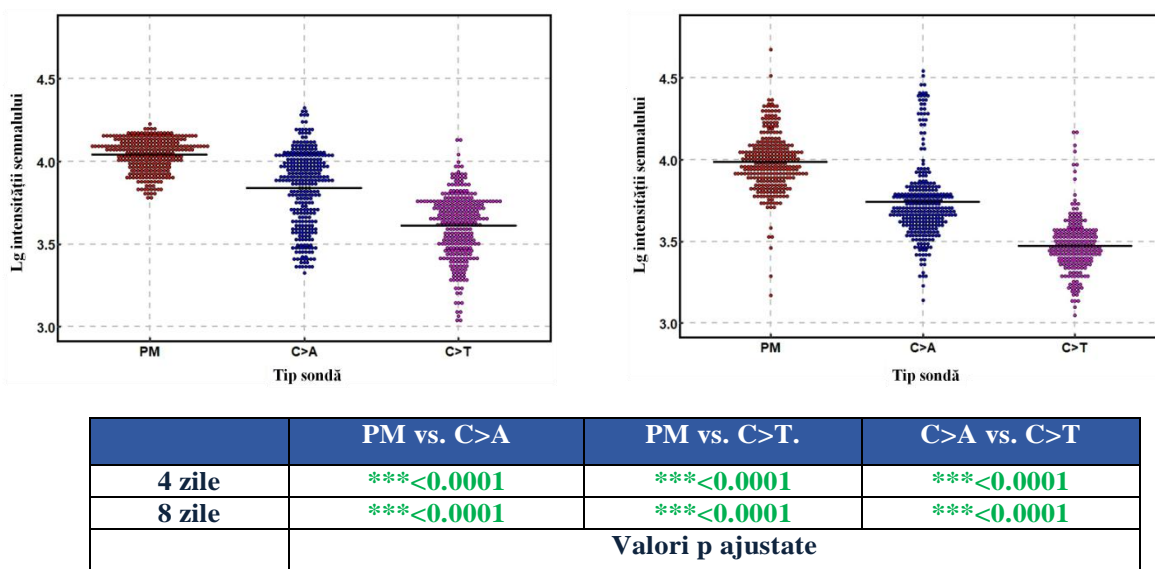


Figura 5.21. Comparația intensităților semnalelor de hibridizare între sonda PM și neconcordanțele reprezentate de sonda C>A și sonda C>T pe SiNWs acoperite cu SU-8 (SU-8/SiNWs) după 4 și 8 de zile de incubare, corelată cu analiza ANOVA unifactorială (preluată din Banu și colab., 2018b)

Pentru intervalele suplimentare investigate se constată aceleași tendințe de detecție, ceea ce confirmă reproductibilitatea înaltă pentru platforma tridimensională acoperită cu SU-8. Astfel, deși densitatea de imobilizare scăzută și reacția lentă între ADN și suporturile epoxidice au fost raportate în literatura de specialitate (Nimse și colab., 2014), studiul nostru evidențiază tendința ca probele fixate să se stabilizeze în timp și să permită discriminarea între cele mai stabile neconcordanțe corespunzătoare *BRCA1*.

*În concluzie, suporturile nanostructurate acoperite uniform cu SU-8 s-au dovedit a îmbunătăți reproductibilitatea procesului de hibridizare. Prin analiza statistică, am demonstrat capacitatea noului suport *microarray* de detecție a nepotrivilor uninucleotidice foarte stabile*

5.6. Experimente *microarray* și SPR pentru genotiparea secvențelor corespunzătoare tulpinilor HPV immobilizate 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). Herne și Tarlov (Herne și Tarlov, 1997) au realizat o analiză cuprinzătoare în care demonstrează utilizarea sondelor ADN modificate cu alcantiol și a 6-mercaptohexanolului pentru obținerea unor suprafețe de aur acoperite uniform cu monocatene pentru obținerea unei activități de hibridizare ridicată. În rest, sunt insuficiente investigații sistematice privind construcția optimă a monostraturilor mixte autoasamblate (Zhang și colab., 2015; Zhang și colab., 2014). Așadar, este esențială evaluarea sistematică a hibridizării ADN de oligonucleotidele atașate de suport și de a optimiza parametrii de lucru, deoarece utilizarea suporturilor din Au permite validarea rezultatelor prin mai multe tehnici, precum electrochimică, rezonanța plasmonilor de suprafață și tehnologia *microarray*. Prin voltametrie ciclică (CV: cyclic voltammetry), Zhang și colab. (Zhang și colab., 2014) au obținut hibridizare optimă prin co-immobilizarea ADN monocatenar (ssDNA) cu mercaptohexanol (MCH) în proporție de 1:1. Pe de altă parte, Keighley și colab. (Keighley și colab., 2008) au stabilit prin spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) un optim al densității sondelor ADN la un raport ssDNA:MCH de 1:4, în timp ce Yang și colab. (Yang și colab., 2016) au optimizat raportul ssDNA:MCH la 1:10.

Am abordat o modalitate proprie de evaluare și validare a eficienței immobilizării și hibridizării ADN pe suport pe Au, utilizând tehnica *microarray* cu analiza statistică dedicată, urmată de analiza în timp real prin SPR a immobilizării 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.

5.6.1. Procedura experimentală

5.6.1.1. 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., îndeplinind următoarele criterii: i) regiunile 3' ale primerilor sunt specifice pentru fiecare genotip HPV în parte; ii) temperatura de topire (T_m) a primerilor este mai mare de 65 °C, crescând astfel specificitatea reacției de amplificare; iii) procentul de GC al primerilor este între 45 - 60%, cu rare excepții; iv) dimensiunea fiecărui amplicon diferă cu peste 20 pb pentru a permite identificarea tulpinilor HPV prin electroforeză; v) primerii au fost construiți astfel încât să nu se atașeze de ADN genomic uman (Nishiwaki și colab., 2008) (**Tabelul 5.5.**).

Tabel 5.5. 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 R: CGTGGTCTACTGTCCACGGCGCAGTCT	27 27	55,6 63	75 75,4	E2, E4	123-128 135
18	F: AACAGTCCATTAGGGGAGCGGCTGGA R: TGCCGCCATGTTGCGCCATTTG	26 21	57,7 57,1	73,7 73,2	E1	187
45	F: TGTTGGACATCACACCTACCGTGGA R: TCCGTACCTGACCCAGAAGATGCAA	25 25	52 52	69,7 69,8	L1, L2	205
39	F: CCGACGGAGTGTCCCTGGACCATCTTA R: CCAGCGTTTTTGTTCCCGTA	27 28	59,3 53,6	74,1 74,1	E2	229
30	F: ACGCAGACGAAAACGGGCTCTGCT R: GGCCTAGCAGGGGATGCGTCCACAA	25 25	60 64	75 76	L2	249
66	F: GCGGGCGGCTCCTACCTCTTCCTCTTC R: CCACCTAACCTGACACACACTGCCCAA GG	27 29	66,7 58,6	75,9 74,9	L1	277
56	F: TGTTGTTTTTCCGCCATTTTGTACATGC AACC	32 32	40,6 43,8	74,8 71,1	-	330

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

	R: TGGCCTACATAGGTGATTCTGCAAGCC AAAAC					
31	F: GCGGTCCAAACGCTCTACAAAACGCAC T R: GCAGGGGCACCAACATCAACAATTCCA	28 27	53,6 51,9	74,3 75,3	L2	360
35	F: CCATAACATCGGTGGACGGTGGACAGG R: CCATTACATCCCGTCCCCTCCCCTTCA	27 27	59,3 59,3	75 75,7	E6, E1	434
52	F: GGTGTGGTGGCTGGTGGCTTTTGCTA R: CAGTTACAGGGGGACGAATGGTGGA	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 matriță 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*. Eficiența amplificării secvențelor HPV a fost verificată prin electroforeză, după etapa de purificare (**Figura 5.22.**).

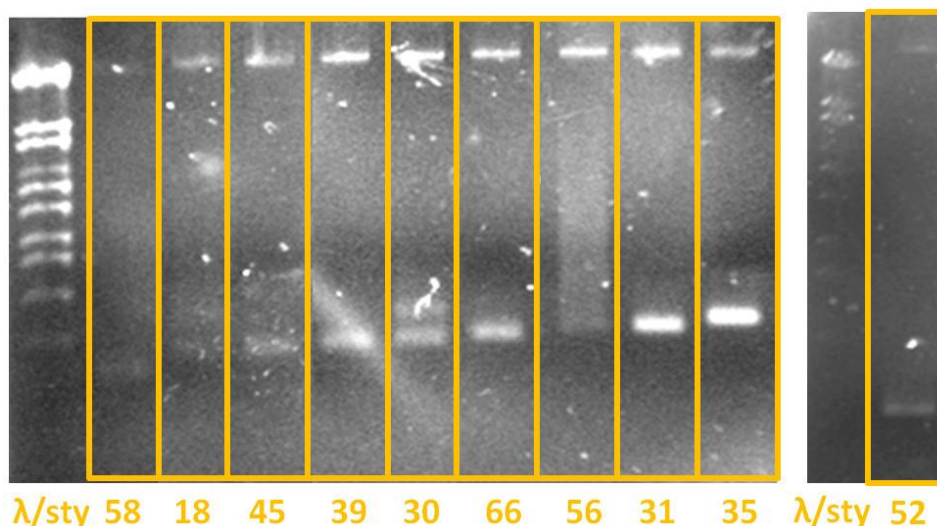


Figura 5.22. Electroforeza ampliconilor HPV după etapa de purificare

(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 μL amplicon, 1 μL soluție salină și 1 μL 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 μL 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 μL 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

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

sterilizarea mediului LB cu agar, 50 μg/mL Amp au fost adăugați, soluția fiind turnată în plăci petri și lăsată să se solidifice.

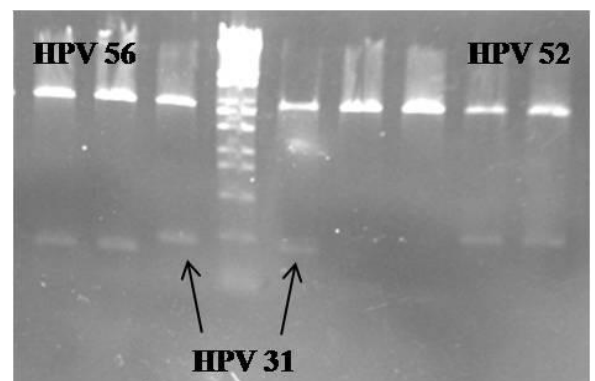
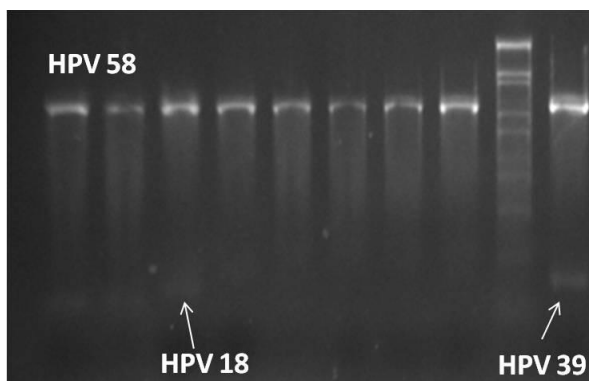
(e) Izolarea ADN plasmidial din coloniile de celule rezistente la ampicilină

Coloniile mai mari au fost selectate și inoculate pe plăci Petri și în 5 mL mediu LB lichid cu Amp (50μg/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 μL, cu 2 μL ADN plasmidial, 2 μL tampon 10x, 0,5 μL enzimă și 15,5 μL 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 5.23.**).



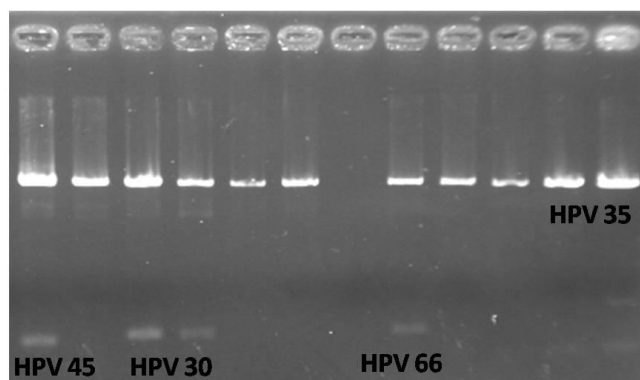


Figura 5.23. Electroforeză în gel de agaroză a secvențelor ADN clonate în pCR 2.1 TOPO

5.6.1.2. Microarray și SPR

Probele utilizate în experimentele *microarray* și SPR sunt prezentate în **Tabelul 5.6.**

Tabel 5.6. Secvențe ADN

HPV 18 – secvențe corespunzătoare fragmentului genei E1	
Sonde ADN	5'- <i>SH-C3</i> -TGCCGCCATGTTCCGCCATTG-3'
	5'- <i>SH-C6</i> -TGCCGCCATGTTCCGCCATTG-3'
Secvențe aleatoare (Sonde control)	5'- <i>SH-C6</i> -AACCAGGATATCCGCTCACAATTCC- <i>Cy3</i> -3'
	5'- <i>SH-C6</i> -AACCAGGATATCCGCTCACAATTCC-3'
Secvențe complementare	5'- <i>Cy5</i> -CAAATGGCGAACATGGCGGCA-3'
	5'- AACAGTCCATTAGGGGAGCGGCTGGAGGTGGATACAGAG TTAAGTCCACGGTTACAAGAAATATCTTTAAATAGTGGGCAG AAAAAGGC AAAAAGGCGGCTGTTTACAATATCAGATAGGGC TATGGCTGTTCTGAAGTGGAAAGCAACACAGATTCAGGTA ACTA <i>CAAATGGCGAACATGGCGGCA</i> -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 a fost pregătită conform descrierii din *Subcapitolul 5.6.1.1. Amplificarea și clonarea secvențelor ADN corespunzătoare genotipurilor HPV.*

Sondele ADN (50 μM) au fost preincubate 30 min în tris(2-carboxi-etil) fosfină (TCEP), pentru reducerea punților disulfurice și sporirea gradului de legare a moleculelor tiolate de Au. O condiție pentru obținerea rezultatelor *microarray* reproductibile pe

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și *HPV*

substratul Au este chimia adecvată de imobilizare. Legătura Au-S este relativ stabilă (30-40 kcal/ mol) (Love și colab., 2005), dar dislocuirea oligonucleotidelor mono-tiolate atașate nespecific constituie un neajuns. Mercaptohexanolul (MCH) are rolul de a dislocui și reorganiza sondele ADN atașate nespecific, rămânând pe suprafață doar sondele atașate prin grupări tiol. În consecință, MCH determină o densitate mai mică a sondelor care crește eficiența hibridizării (Keighley și colab., 2008; Steel și colab., 2000).

Depunerea controlată pe suport de Au a 10 μM sonde ADN diluate în soluție de imobilizare (cu sau fără mercaptohexanol - MCH) a fost realizată conform **Figurii 5.24**. Pentru fiecare tip de ADN atașat au fost depuse 6 rânduri x 6 coloane de *spot*-uri (36 replici tehnice).

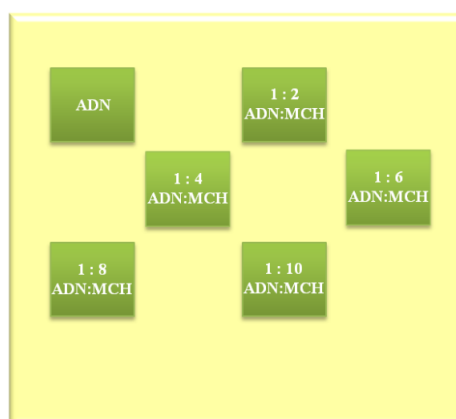


Figura 5.24. Depunerea rapoartelor ADN:MCH pe suprafețe de Au (adaptare după Banu și colab., 2017)

Obținerea unei densități adecvate a suprafeței este necesară în dezvoltarea unei game largi de biosenzori ADN (Keighley și colab., 2008). Acest aspect a fost investigat prin *microarray* după co-imobilizarea ADN cu diferite concentrații de MCH pentru 2 ore și peste noapte. Pentru evaluarea eficacității legării ADN în prezența/ absența MCH, platformele au fost scanate la o lungime de undă de 532 nm (excitarea fluoroforului Cy3).

Teste ulterioare au constatat în analiza eficienței de hibridizare folosind 1 μM ADN specific fragmentului genetic E1 corespunzător tulpinii HPV 18, proiectarea chip-urilor *microarray* fiind prezentată în **Figura 5.25**.

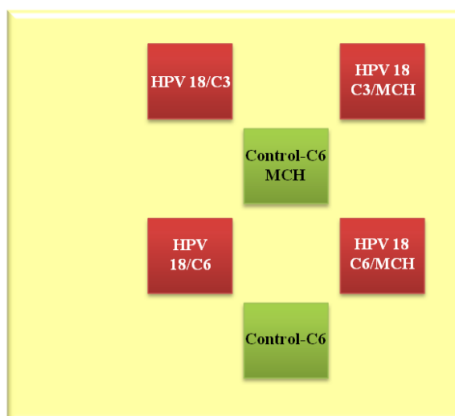


Figura 5.25. Depunerea sondelor ADN pe suprafețe de Au (adaptare după Banu și colab., 2017)

Secvențele control (secvențe aleatoare, fără complementaritate) au fost utilizate pentru a certifica eficiența imobilizării în prezența sau absența MCH. Ulterior, am investigat eficiența reacției de hibridizare la 42 ° C, incubând peste noapte secvențele-țintă cu sondele atașate specifice HPV 18 conținând 3 sau 6 atomi de carbon. Pentru a examina stabilitatea legăturii Au-S-ADN, suporturile au fost spălate după hibridizare la 42 ° C cu 2x SSC + 0.2% SDS, 1x SSC și apă deionizată.

Studiul SPR al imobilizării și hibridizării a fost realizat la temperatura constantă de 22 °C, utilizând 100 μL sonde ADN de concentrația 1 μM pentru cele două cuve ale echipamentului.

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

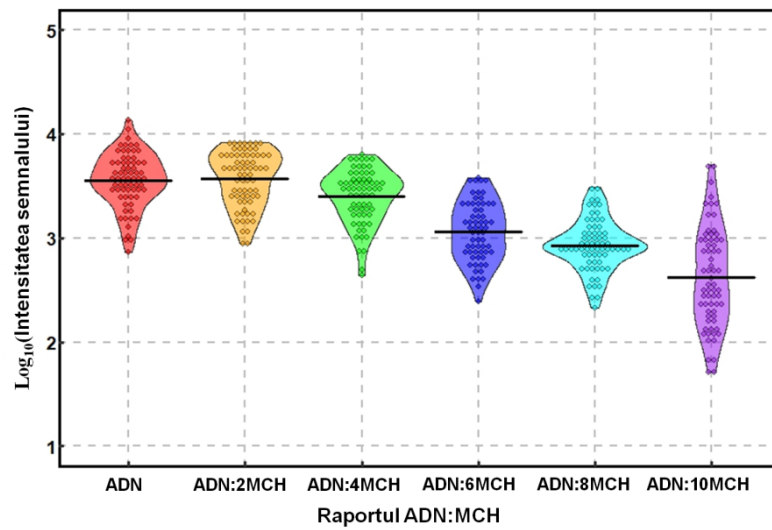
Intensitățile semnalelor de hibridizare au fost extrase cu GenePix® Pro 7 și analizate în RStudio 1.0.136 (RStudio: Integrated development environment for R (Versiunea 1.0.136)) pentru R 3.4.0 (<https://www.R-project.org/>). Valorile afișate în grafice au fost obținute după extracția semnalului de *background* și normalizarea prin \log_{10} (Drăghici, 2003). Valorile situate la 2 σ (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).

5.6.3. 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 5.26.** sunt prezentate

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

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

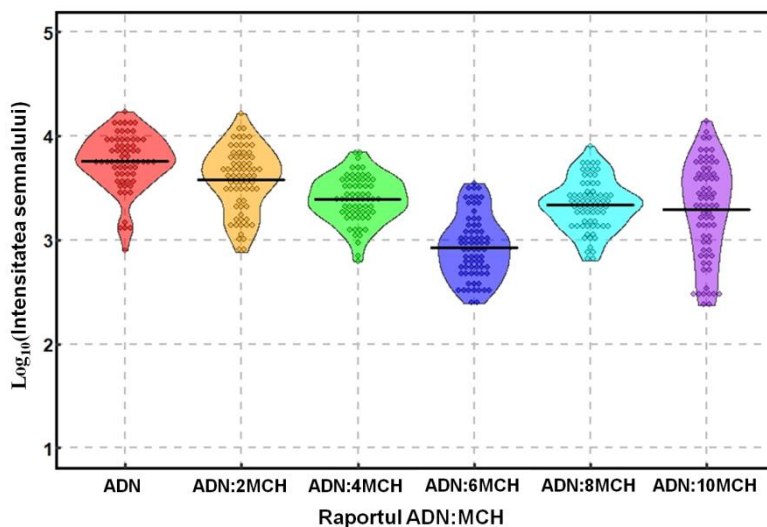


	Rapoarte ADN:MCH					
	ADN	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
\bar{I}	3,552	3,566	3,398	3,063	2,93	2,622
σ	0,263	0,267	0,261	0,29	0,246	0,479
CV	7,4%	7,48%	7,68%	9,46%	8,39%	18,26%

Figura 5.26. 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.

Pornind de la datele colectate după 2h de imobilizare, am investigat influența incubării peste noapte (**Figura 5.27.**).



	Rapoarte ADN:MCH					
	ADN	1:2	1:4	1:6	1:8	1:10
\bar{I}	3,754	3,581	3,391	2,93	3,335	3,29
σ	0,269	0,307	0,223	0,299	0,244	0,465
CV	7,16%	8,57%	6,57%	10,2%	7,31%	14,13%

Figura 5.27. Intensitățile sondelor imobilizate după incubarea peste noapte

Reprezentarea grafică asociată cu statisticile descriptive relevă cele mai mari intensități de imobilizare pentru ADN neasociat cu MCH și pentru amestecul 1: 2 C_{ADN} / C_{MCH} . Incubarea peste noapte nu a îmbunătățit intensitatea semnalului de imobilizare, nici reproductibilitatea acestuia marcată de coeficientul de variație. Aceste constatări susțin măsurările cantitative radioizotopice ale lui Steel și colab. (Steel și colab., 2000), care au constatat că după 2 ore sondele acoperă suprafața în procent de 80%. Intensități inferioare ale semnalului de imobilizare sunt dezvăluite prin co-incubarea ADN cu MCH în proporții ale C_{DNA}/C_{MCH} de 1: 4, 1: 6, 1: 8 și 1:10.

5.6.4. Optimizarea parametrilor de hibridizare

Pe baza studiilor anterioare de imobilizare, 10 μM sonde ADN marcate fluorescent au fost atașate sau co-incubate cu 10 μM MCH, cu rol de control al imobilizării. **Figura 5.28.** prezintă rezultatele fluorescente obținute după imobilizarea timp de 2 h a secvențelor-control.

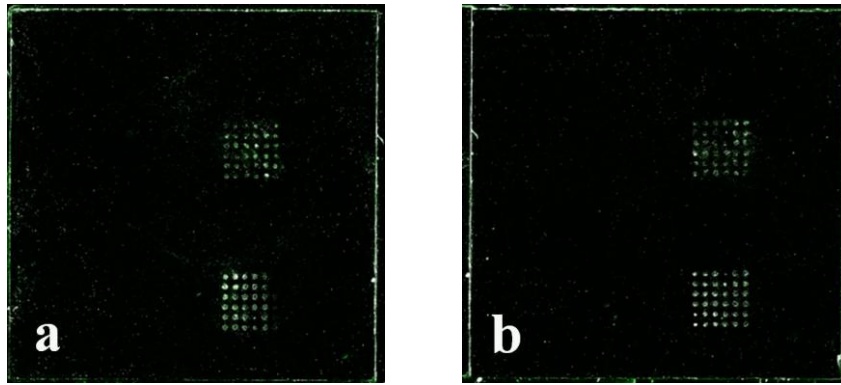


Figura 5.28. Rezultatele imobilizării pe: (a) primul *biochip* și (b) al doilea *biochip*

Din analiza fluorescentă, spot-urile corespunzătoare secvențelor diluate în soluție fără MCH par a fi mai uniforme. Intensitățile semnalelor de imobilizare au fost cuantificate în reprezentarea grafică din **Figura 5.29**. și însoțite de statistici descriptive.

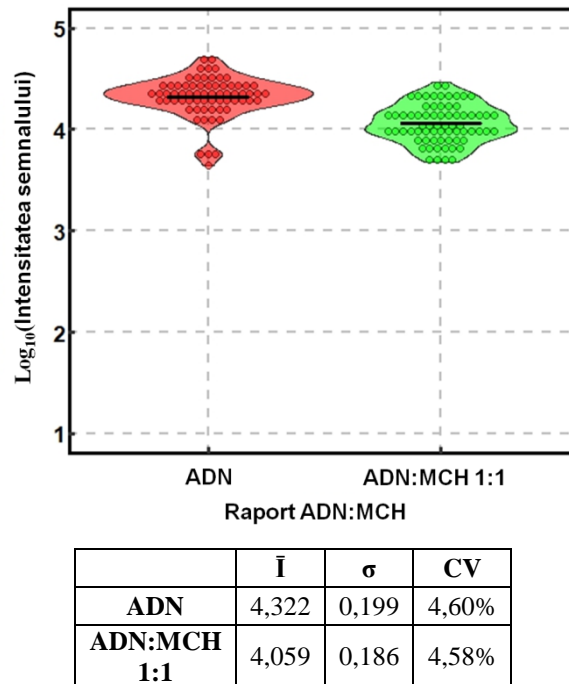


Figura 5.29. Semnalul de imobilizare înainte procesării *biochip*-urilor

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

Tăria legături Au-S-ADN a fost verificată după spălarea *chip*-ului, rezultatele cele mai bune fiind evidențiate într-un cerc verde (**Figura 5.30**).

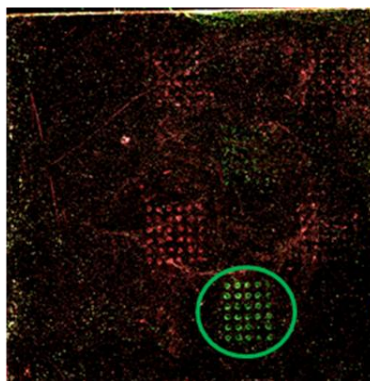


Figura 5.30. Semnalul de imobilizare după hibridizarea 15 h a *chip*-ului la 42 °C și etape de spălare

S-a remarcat o scădere a intensității semnalului datorită înlăturării sondelor ADN neatașate specific rezultatul fiind analizat grafic și statistic în **Figura 5.31**.

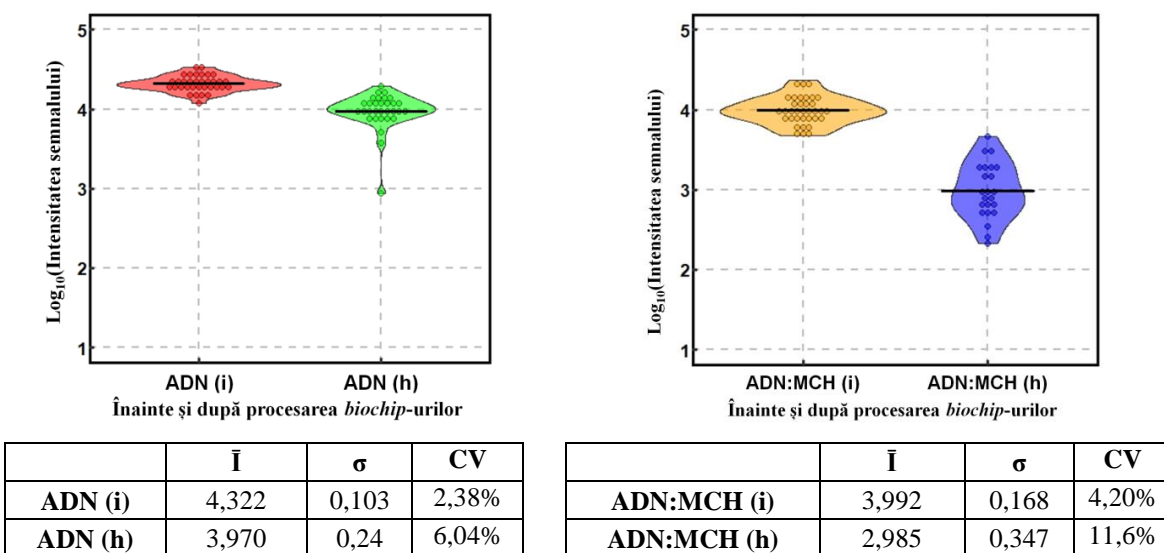


Figura 5.31. Modificarea intensităților semnalelor fluorescente de imobilizare în urma etapelor adiționale de procesare a *biochip*-urilor

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. Folosind

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

oligonucleotide mici (~ 25 baze), este esențial să se optimizeze semnalul de hibridizare prin ajustarea lungimii distanțierului sau a concentrației de sonde (Chou și colab., 2004).

În **Figura 5.32.** sunt evidențiate cu cerc verde cele mai bune rezultate de hibridizare între ADN țintă marcat fluorescent cu Cy5 și oligonucleotidele corespunzătoare fragmentului de genă E1 al tulpinii HPV 18.

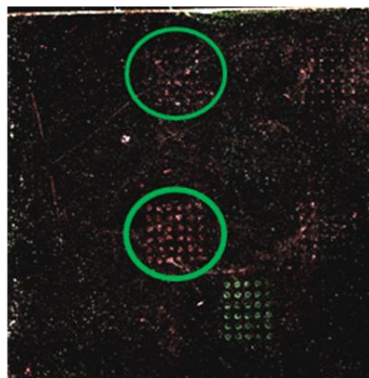
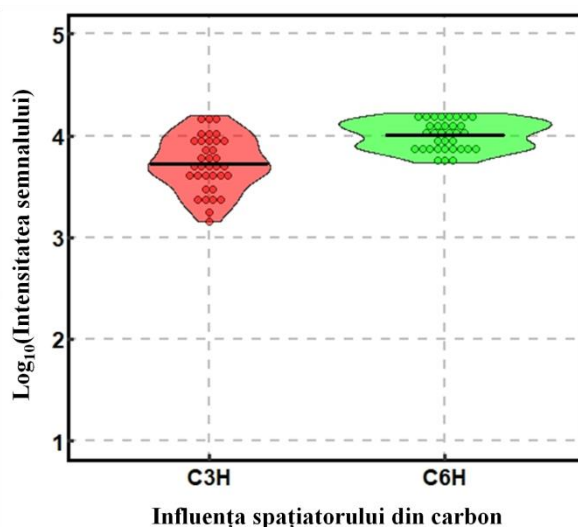


Figura 5.32. Intensitatea semnalului de hibridizare după incubarea suportului 15 h cu ADN țintă

Se observă un semnal crescut de fundal din cauza legării nespecifice a moleculelor țintă marcate cu Cy5. Din analiza imaginii fluorescente, spot-urile hibridizate corespunzătoare sondelor care nu au fost co-immobilizate cu MCH și având distanțier C6 par să fie cel mai bine definite. Această observație este confirmată de analiza grafică și statistică a replicilor tehnice, prezentată în **Figura 5.33.**

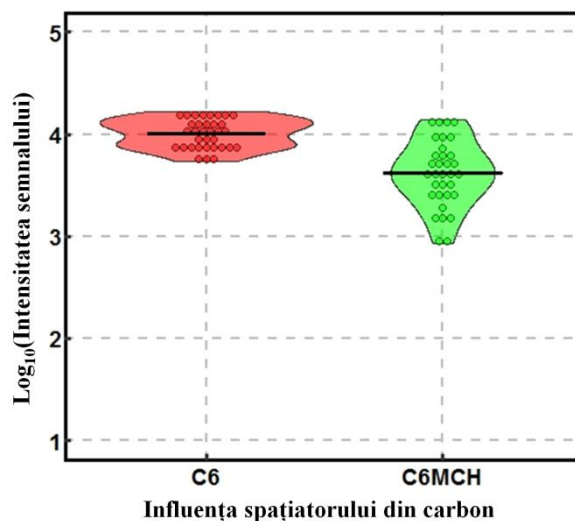


	\bar{I}	σ	CV
C3	3,726	0,266	7,13%
C6	4,005	0,141	3,59%

Figura 5.33. Influența lungimii spațiatorului de carbon asupra eficienței reacției de hibridizare

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 5.34.**).



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

Figura 5.34. 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 intensitate medie a semnalului mai scăzută (3,618 și valori mai dispersate ($CV = 8,98\%$) din cauza dislocuirii sondelor legate nespecific.

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

Pentru a determina cea mai rapidă abordare pentru crearea monostraturilor ADN autoamponente (SAM), am studiat prin SPR influența amestecării soluției (viteza de 33,3 $\mu\text{L/s}$) asupra concentrației de molecule adsorbite (**Figura 5.35.**). Specificațiile tehnice ale SPR se regăsesc în **ANEXA 1 – A1.2.c**).

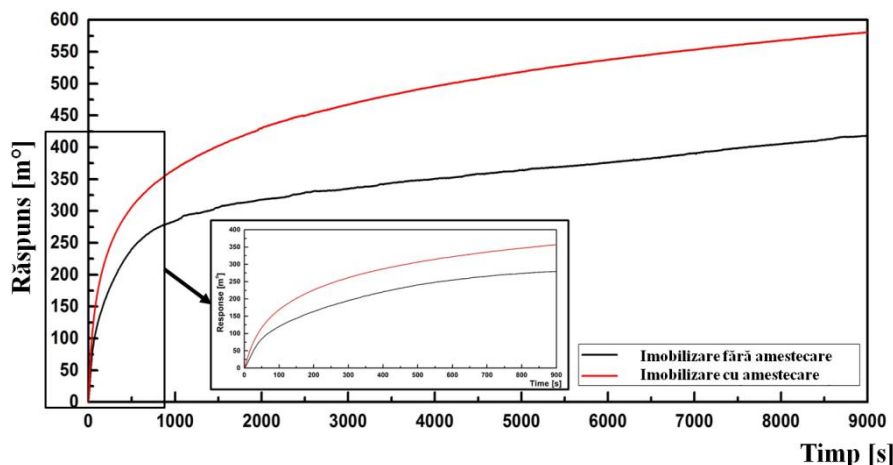


Figura 5.35. Influența amestecării soluției în reacția de imobilizare

Sensograma relevă o deplasare accentuată a unghiului de rezonanță pentru procedura de amestecare, cu $4,71 \text{ ng} / \text{mm}^2$ sonde ADN atașate, experimentul fără amestecare conducând la $3,27 \text{ ng} / \text{mm}^2$ sonde atașate. Legarea nespecifică de suprafață este ușor de îndepărtat prin amestecarea soluției, fiind astfel create mai multe situsuri legarea specifică a ADN. Astfel, amestecarea garantează omogenitatea probelor ADN în canalul cuvei și reduce interacțiunile nespecifice cu suprafața.

Figura 5.36. prezintă analiza SPR a $1 \mu\text{M}$ sonde ADN modificate cu grupări tiol corespunzătoare fragmentului HPV 18, imobilizate de suport de Au.

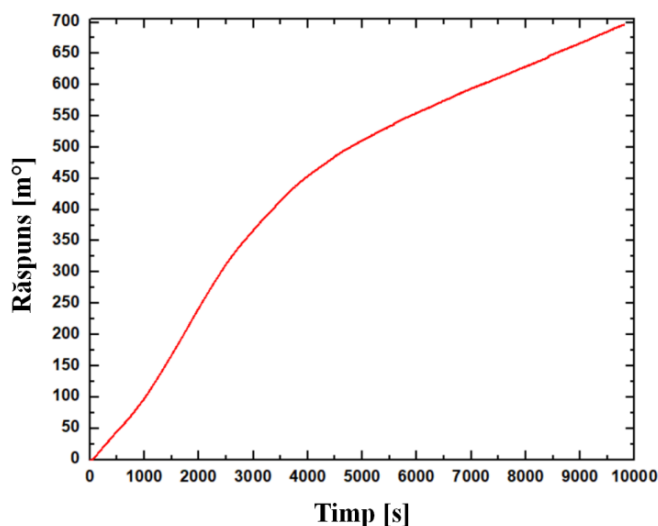


Figura 5.36. Monitorizarea în timp real a imobilizării ADN corespunzător HPV 18

Timpul necesar imobilizării a fost de 170 min, unde am înregistrat o modificare maximă a unghiului de rezonanță de 700 m° ($5,73 \text{ ng}/\text{mm}^2$ 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 5.37**. a implicat utilizarea a 4 concentrații de fragmente reale ADN corespunzătoare fragmentului HPV 18: 1 pM, 10 pM, 0.1 μ M și 10 μ M.

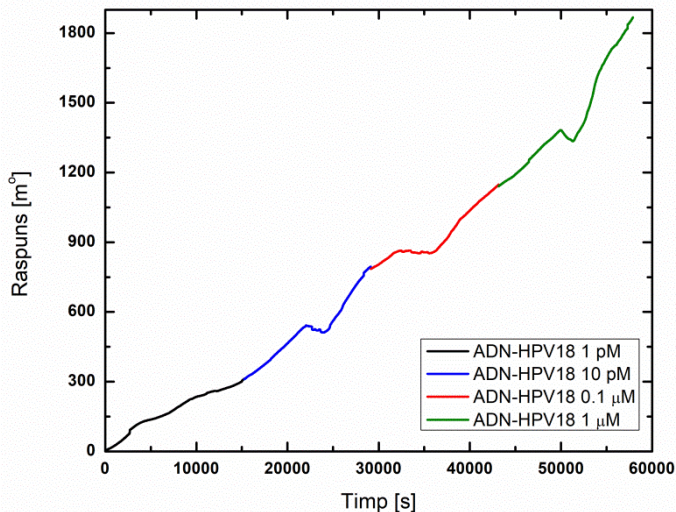


Figura 5.37. Curbele de hibridizare pentru concentrații variate de fragmente reale ADN corespunzătoare tulpinii HPV 18

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 μ M), 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 μ M), 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.

5.7. 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

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

rezultate, s-a ales procedura adecvată măsurărilor electrice I-V și de potențial. Specificațiile tehnice ale sistemului de măsurare electrică se găsesc în **ANEXA1 – A1.2.e**).

5.7.1. Procedura experimentală și de analiză grafică

Probele utilizate în detecția fluorescență și caracterizările electrice sunt prezentate în **Tabelul 5.7**.

Tabel 5.7. Secvențe ADN

Sonde corespunzătoare fragmentului genei L2 a tulpinii HPV 16	5'- NH₂-C6 -TGGGAGGCCTTGTTCCTCAATGGA-3'
Secvențe control (fără complementaritate)	5'- NH₂-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-NH₂ și la capătul 3' un fluorofor Cy3. Secvențele-țintă nemarcate fluorescent au fost utilizate pentru caracterizări electrice.

Imobilizarea și hibridizarea ADN pe suporturi modificate cu APTES-GAD și GOPTMS hidrolizat a avut loc în exact aceleași condiții descrise în **Subcapitolul 5.5.1. Flux tehnologic**. În schimb, pe suporturi funcționalizate cu GOPTMS din stare de vapori am optimizat procedura de imobilizare astfel: după depunerea controlată pe suporturi a sondelor ADN diluate în Na₂HPO₄ la concentrația de 50 μM, incubarea a avut loc peste noapte la temperatura de 60 °C, în incintă umedă. Secvențele ADN depuse au fost uscate la 110 °C, 1 h, suporturile fiind spălate apoi conform descrierii din **Subcapitolul 5.5.1. Flux tehnologic**. Pe substraturile funcționalizate cu GOPTMS din stare de vapori au fost depuse controlat 2 matrici a 8 x 8 spot-uri (64 replici) corespunzătoare fragmentului genei L2-HPV16 și sondelor control. Pentru experimentele *microarray*, etapa de hibridizare a fost realizată cu secvențe țintă diluate la concentrații finale de 10 μM, 1 μM, 0,5 μM și 0,1 μM, iar pentru caracterizările electrice pe suporturi funcționalizate cu GOPTMS din vapori, s-au utilizat 3 concentrații de ADN țintă și anume 1 μM, 0,1 μM și 0,01 μM.

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

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

Substraturile de tip SOI au fost funcționalizate cu APTES-GAD conform protocolului descris în **Subcapitolul 4.2.1. APTES/GAD**, atașarea sondelor ADN fiind confirmată prin semnalul fluorescent dat de secvențele control (**Figura 5.38.**).

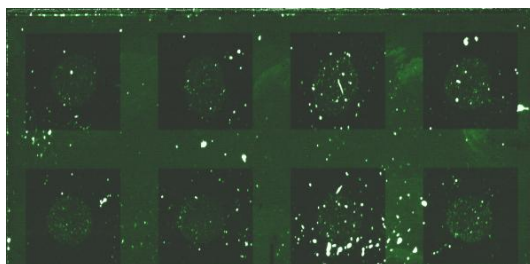


Figura 5.38. Fluorescența secvențelor control atașate de suportul modificat chimic

Imaginea fluorescentă relevă eficiența atașării secvențelor ADN de suportul modificat chimic.

Insulele de Si au fost caracterizate electric prin măsurări I_D-V_G și V_B-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; dacă sunt adăugate grupări pozitive pe suprafață, este de așteptat o deplasare a curbei către tensiunile negative de poartă.

Figura 5.39. prezintă caracteristicile I_D-V_G unde fiecare curbă corespunde unei etape de modificare chimică.

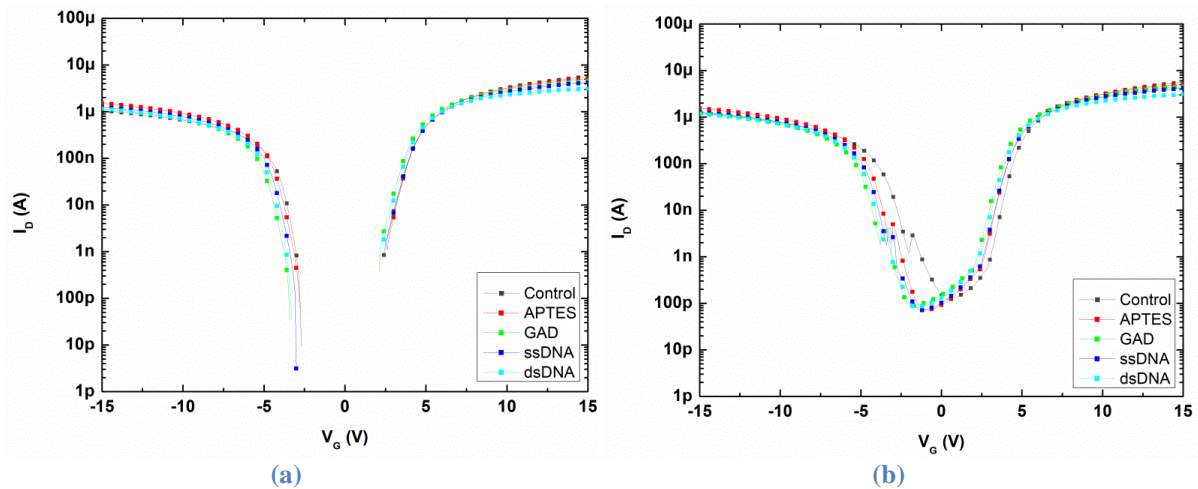


Figura 5.39. Caracteristici I_D - V_G după fiecare etapă de modificare chimică cu (a) variație crescătoare de la -15 la +15 V (*forward*) și (b) variație descrescătoare de la +15 la -15 V (*reverse*) ($T_{Si} = 70\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

Curbele I_D - V_G sunt deplasate spre stânga după etapa de funcționare cu APTES (linia roșie), conform așteptărilor (moleculele de APTES conferă sarcini +). O deplasare mai accentuată spre stânga este observată în urma funcționării cu GAD (linia verde). Grupările aldehidice nu ar fi trebuit să inducă vreo modificare electrică observabilă. Modificarea chimică cu sonde ADN monocatenar (ssDNA) și hibridizarea (dsDNA) induc deplasări ale curbelor care sunt contrare așteptărilor, având în vedere încărcarea globală negativă a oligonucleotidelor.

5.7.3. Caracterizări electrice pe suporturi SOI funcționalizate cu GOPTMS hidrolizat

Substraturile de tip SOI au fost funcționalizate în primele teste cu GOPTMS hidrolizat, conform protocolului descris în **Subcapitolul 4.2.3. GOPTMS**, atașarea ADN fiind verificată prin semnalul fluorescent al secvențelor control (**Figura 5.38**).

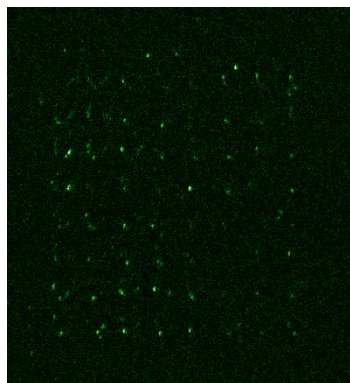


Figura 5.40. Imobilizarea secvențelor control de Si cu GOPTMS hidrolizat

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 GOPTMS hidrolizat sunt promițătoare.

Curbele I_D - V_G corespunzătoare etapei de curățare a *chip-urilor* în soluție Piranha, etapei de funcționalizare cu GOPTMS hidrolizat, imobilizării cu sonde ADN și hibridizării sunt prezentate în **Figura 5.41.**, luând ca referință caracteristicile inițiale ale două *biochip-uri*.

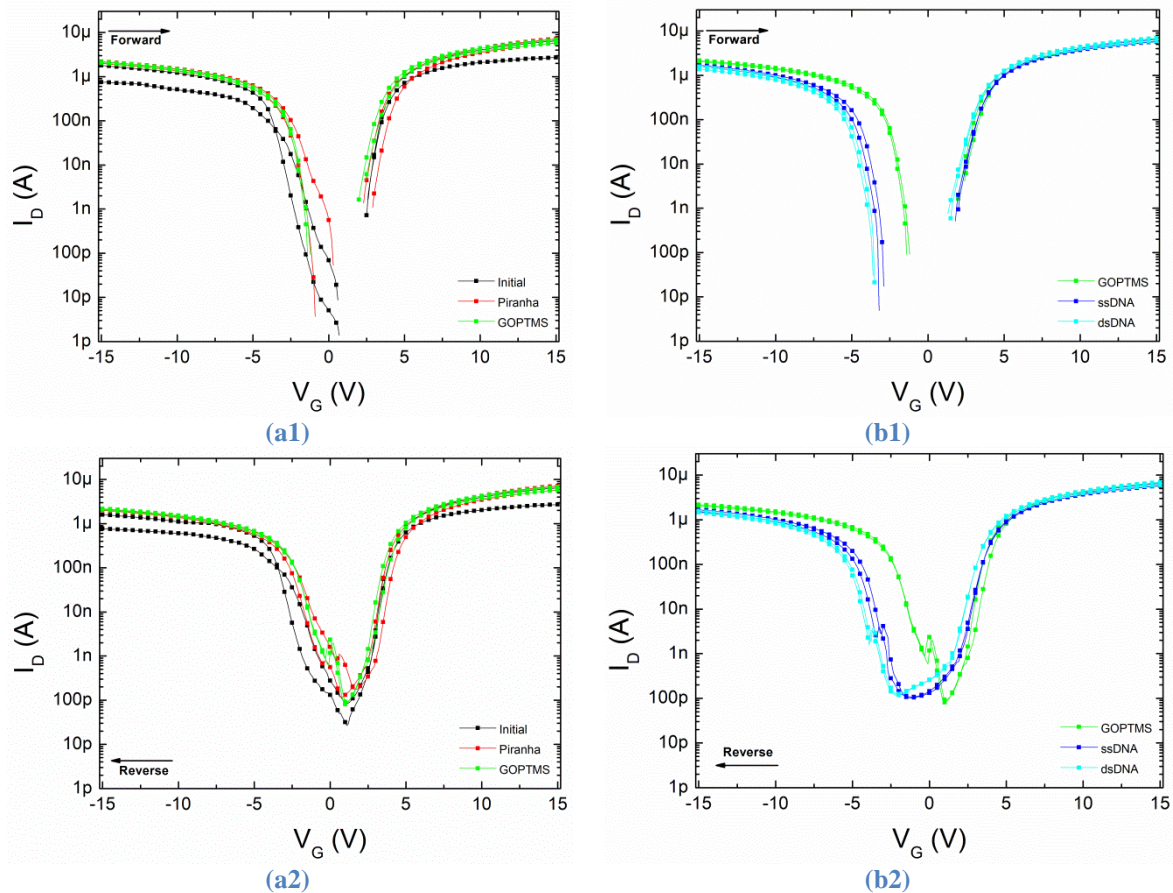


Figura 5.41. Caracteristici I_D - V_G după (a1-a2) etapa de curățare cu soluție Piranha, funcționalizarea cu GOPTMS hidrolizat și (b1-b2) după etapele de funcționalizare, atașare sonde ADN și hibridizare în variație *forward* și *reverse* ($T_{Si} = 70\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

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.

Aceleași deplasări au rezultat și din extragerea caracteristicilor V_B - V_G corespunzătoare fiecărei etape experimentale, acestea fiind reprezentate grafic în **Figura 5.42.**

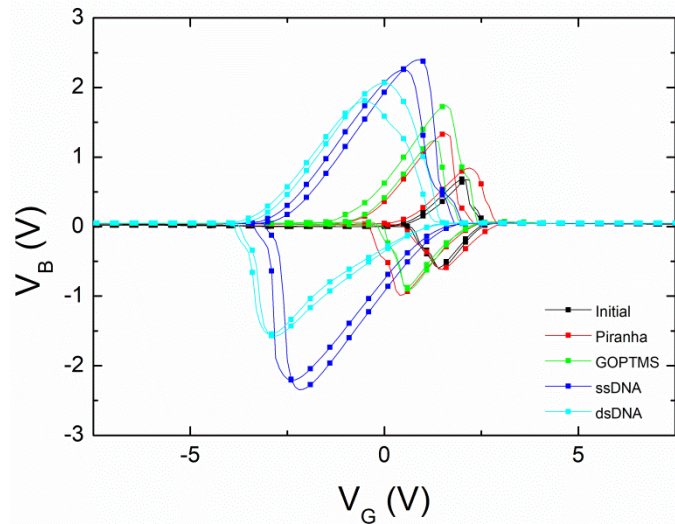


Figura 5.42. Caracteristici V_B - V_G după fiecare etapă experimentală, în variație *forward* și *reverse*

5.7.4. Caracterizări electrice pe platforme SOI funcționalizate cu GOPTMS din stare de vapori

Semnalele fluorescente de imobilizare prezentate în **Figura 5.43.** arată spot-uri cu diametrul măsurat de 250 μm , clar diferențiate față de semnalul de fundal.

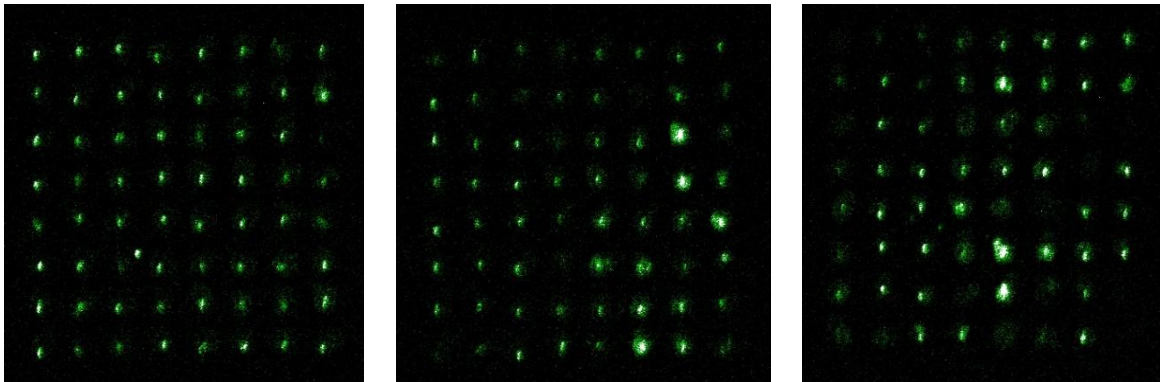


Figura 5.43. Semnalul fluorescent de imobilizare al secvențelor control

Testele de stabilitate a sondelor atașate au fost efectuate pornind de la replicile tehnice prezentate în **Figura 5.43.**, pentru a testa stabilitatea legăturii chimice formate cu suportul și au constat în verificarea semnalului fluorescent prima oară după etapa de imobilizare și spălare a doua oară după hibridizare și spălarea suportului (**Figura 5.44.**).

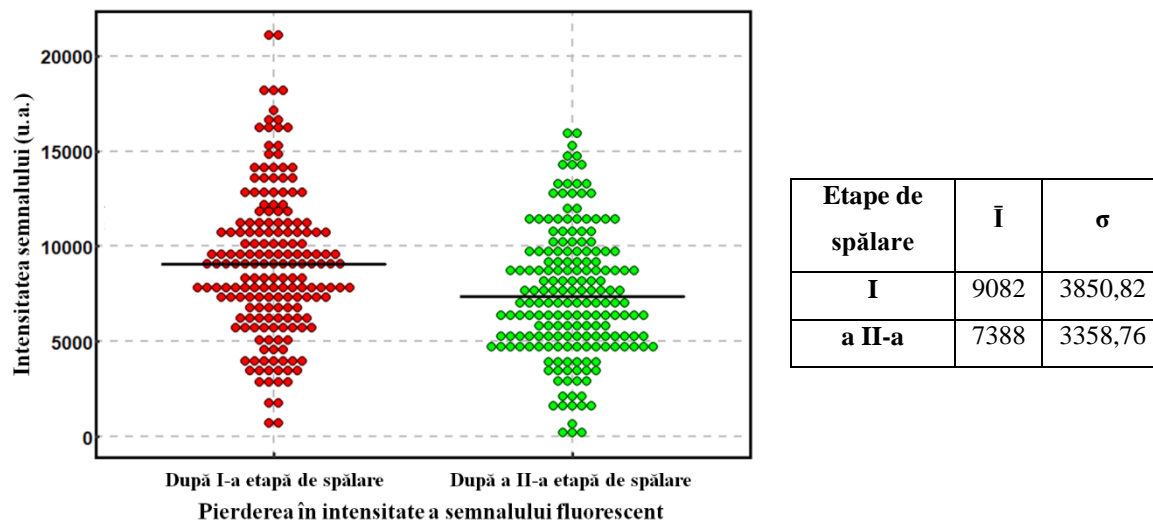


Figura 5.44. Semnalul fluorescent de imobilizare al secvențelor control după etape de spălare

Pierdere 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 GOPTMS.

Rezultatele hibridizării cu concentrații finale de 10 μM , 1 μM , 0,5 μM și 0,1 μM ADN țintă specific HPV 16 sunt prezentate în **Figura 5.45**.

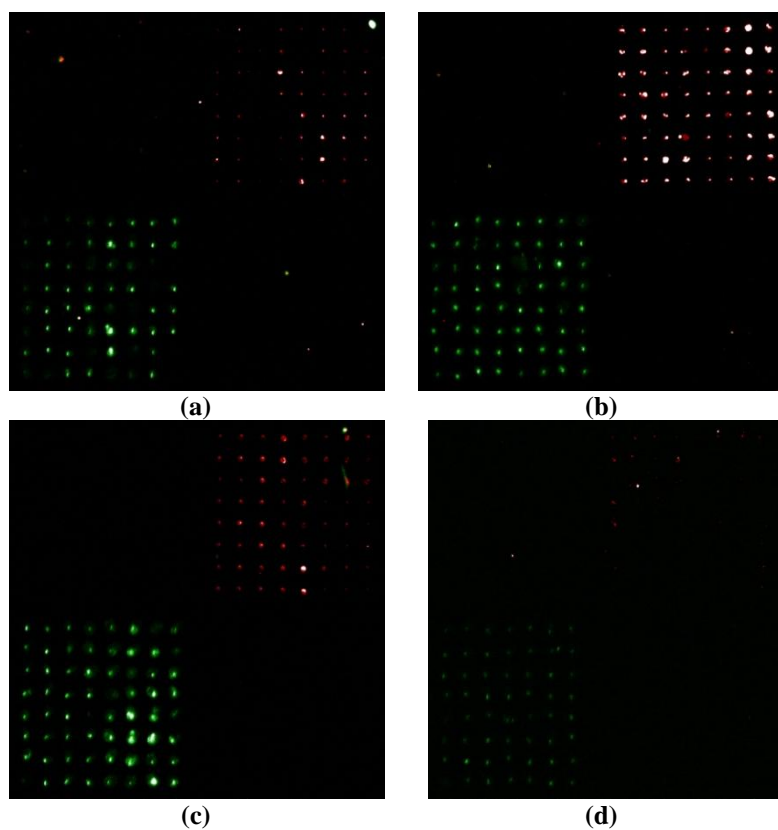
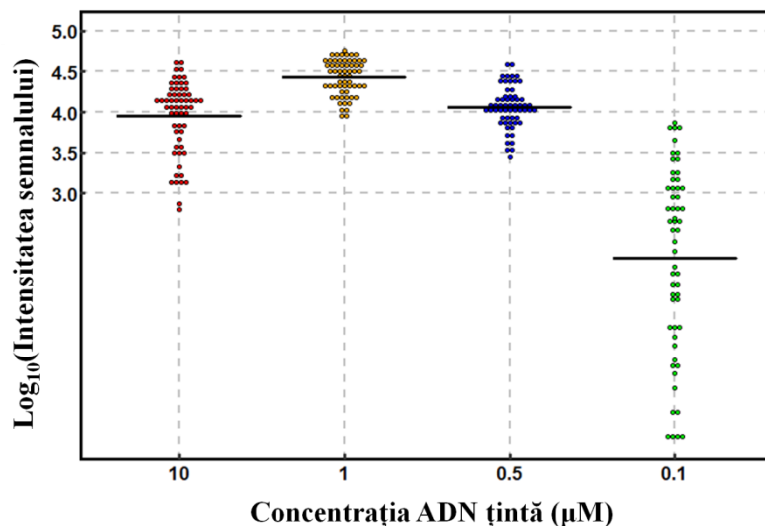


Figura 5.45. Semnalul fluorescent de hibridizare cu secvențe de concentrație (a) 10 μM , (b) 1 μM , (c) 0,5 μM și (d) 0,1 μM

Din analiza imaginilor fluorescente de hibridizare, cel mai bun semnal corespunde 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 fluorescență este completată de graficul prezentat în Figura 5.46, însoțit de elemente de statistică descriptivă.



Concentrația ADN țintă (μM)	10	1	0,5	0,1
\bar{I}	3,958	4,429	4,063	2,202
σ	0,450	0,217	0,257	1,141

Figura 5.46. 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 ($\sigma = 0,217$). Ținând cont de rezultatele slabe de hibridizare cauzate de impedimentele sterice în cazul concentrației de 10 μM , nu am luat-o în considerare în caracterizările electrice ulterioare.

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 5.47.

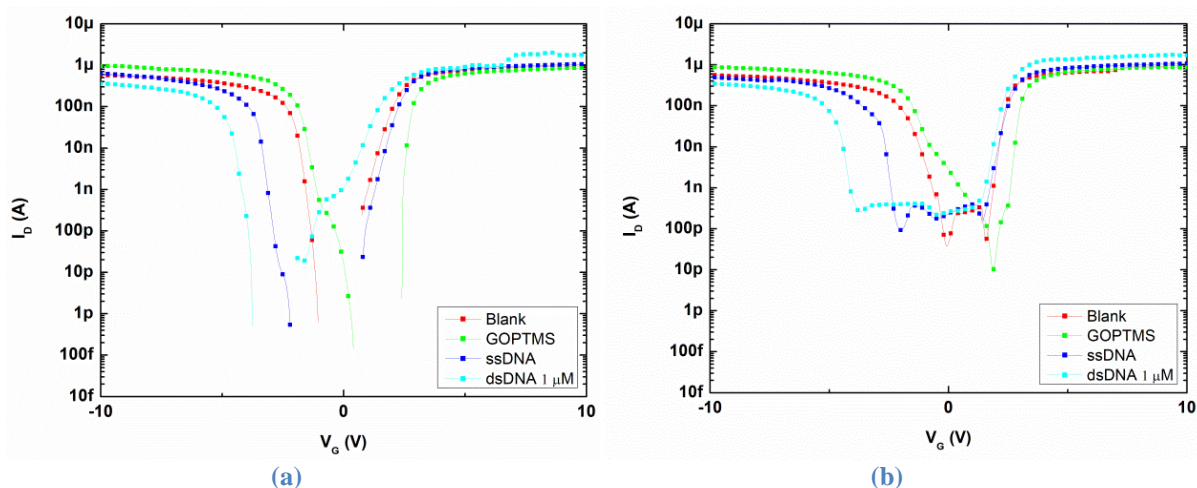


Figura 5.47. Caracteristici I_D - V_G după fiecare etapă experimentală, în variație (a) *forward* și (b) *reverse* ($T_{Si} = 86nm$, $T_{BOX} = 145nm$)

Rezultatele experimentale sunt reproductibile atât pe SOI-urile funcționalizate cu GOPTMS hidrolizat, cât și pe structurile funcționalizate cu GOPTMS din fază de vapori, în sensul că obținem aceleași tendințe de deplasare ale curbelor. Totuși, în cazul de față, decalajele obținute sunt mult mai pronunțate, ceea ce poate fi coroborat cu rezultatele *microarray* unde *spot*-urile se discern clar. **Figura 5.48.** corespunde reprezentării grafice a caracteristicilor V_B - V_G .

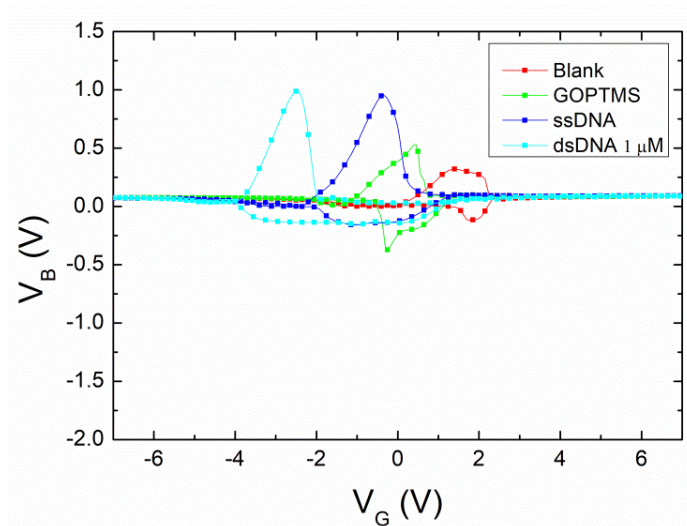


Figura 5.48. Caracteristici I_D - V_G după fiecare etapă experimentală, în variație (a) *forward* și (b) *reverse* ($T_{Si} = 86nm$, $T_{BOX} = 145nm$)

Și în acest caz, observăm aceeași tendință ca cea prezentată în **Figura 5.42.**, cu deplasare mult mai pronunțată a curbelor către potențialul negativ de poartă.

În **Figura 5.49.** am comparat rezultatele I_D - V_G obținute pentru fiecare concentrație ADN țintă utilizată la hibridizare.

Cap. 5. Analiza datelor *microarray*, SPR și electrice obținute din hibridizarea secvențelor specifice *BRCA1* și HPV

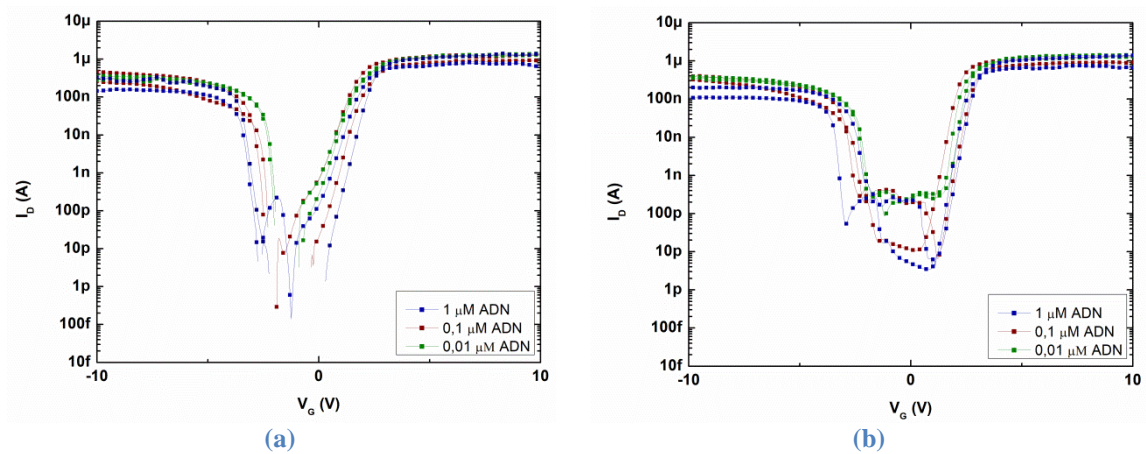


Figura 5.49. Caracteristici I_D - V_G pentru trei concentrații de ADN țintă, în variație (a) *forward* și (b) *reverse* ($T_{Si} = 86\text{nm}$, $T_{BOX} = 145\text{nm}$)

Constatăm în cazul hibridizării că pe măsură ce creștem concentrația de ADN țintă, există aceeași tendință a curbelor de a se deplasa către potențialul negativ 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. Cercetările efectuate împreună cu IMEP-LAHC (Grenoble) au demonstrat că metoda Ψ -MOSFET ar putea fi folosită și ca tehnică de bio-detectie.

Cap. 6. CONCLUZII

Activitatea de cercetare s-a concentrat pe *fabricarea și testarea unor noi suporturi microarray*, cu aplicabilitate în detecția fluorescență 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 intacte și a celor 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. Distribuirea 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.

Ampliconii corespunzători pentru 10 tulpini HPV au fost ligați în vectorul de clonare pCR 2.1 TOPO™, iar plasmidele rezultate au fost transformate în celule competente de *E. coli*. 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. Analiza datelor *microarray* a evidențiat reacția rapidă de imobilizare pe suporturi de Au, *cele mai bune intensități ale semnalului fiind 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 obținut prin utilizarea sondelor 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*. Prin caracterizările electrice am constatat o tendință reproductibilă a curbelor de a se deplasa către potențialul negativ de poartă, probabil datorită sarcinilor pozitive provenite din soluțiile de imobilizare și hibridizare care au conținut Na⁺ ce a rămas atașat de moleculele de oxigen din scheletul pentozo-fosfat.

6.1. Contribuții originale

Am optimizat protocolul de nanostructurare a substratului de siliciu prin metoda 1-MACE.

Toate procedurile de funcționalizare cu APTES/GAD, SU-8 și GOPTMS pe substraturi de Si, SiNWs și SOI au fost realizate și optimizate în cadrul studiului de față.

Am interpretat datele FTIR achiziționate pentru APTES/GAD pe martor de Si.

Am efectuat măsurătorile de unghi de contact și am interpretat rezultatele.

Metodele de imobilizare și hibridizare pe suporturi de sticlă, Si, SiNWs, SOI și pe filme de Au îmi aparțin.

Detecția fluorescentă, extragerea datelor, analiza și interpretarea lor au fost realizate de mine.

Cap. 6. Concluzii

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 și marcate în consecință.

6.2. Activitatea de cercetare

• Participarea la realizarea unor proiecte de cercetare

1. “*Metode noi de monitorizare a sarcinii si diagnostic prenatal*” – CCCDI-UEFISCDI, proiect PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0820, in 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 faze proiect 2014-2017;

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

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

- 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;

6.3. Diseminarea rezultatelor

• **Articole publicate în reviste cotate ISI**

1. **Melania Banu**, Monica Simion, Mihaela Kusko, Ileana 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].

2. Melania Banu, Monica Simion, Marian C. Popescu, Pericle Varasteanu, Mihaela Kusko, Ileana C. Farcasanu, “*Specific detection of stable single nucleobase mismatch using SU-8 coated silicon nanowires platform*”, **Talanta**, 185, 281-290, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.095> [IF: 4.162 / AI: 0.76].

3. Marian C. Popescu, Bogdan I. Bită, Vasilica Tucureanu, Dan Vasilache, **Melania A. Banu**, Andrei M. Avram, Raluca 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. doi: 10.1017/S1431927618000089 [IF: 1.891 / AI: 0.8].

4. Melania Banu, Monica Simion, Pericle Varasteanu, Lorand Savu, Ileana 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].

•Articole publicate în Proceedings sau volume (indexate ISI)

1. Melania Banu, Monica Simion, Pericle Varasteanu, Marian Popescu, Lorand Savu, “*Nanostructured silicon platform for detection of specific gene sequences*”, acceptată spre publicare *in extenso* în **Proceedings of SPIE 2018**.

2. Marian Popescu, Florin Nastase, Iuliana Mihalache, **Melania Banu**, Vasilica Tucureanu, Camelia Ungureanu, Bianca Tincu, Roxana Tomescu, “*UV Protection of Ultra-Thin ZnO Film on Viscose*”, acceptată spre publicare *in extenso* în **Proceedings of SPIE 2018**.

3. Melania Banu, Monica 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, doi: 10.1109/SMICND.2017.8101153.

4. Melania Banu, Antonio Radoi, Monica Simion, Mihaela 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, doi:10.1109/SMICND.2016.7783069.

5. Marian C. Popescu, Bogdan I. Bită, **Melania Banu**, Roxana M. Tomescu, “*Destructive effects induced by the electron beam in Scanning Electron Microscopy*”, ATOM-N 2016 Conference, Constanta, Romania, **Proceedings of the SPIE** [ISSN: 0277-786X], vol. 10010 (100102N-1), 2016, doi: 10.1117/12.2243207.

• **Lucrări prezentate la conferințe și comunicări științifice**

1. Marian C. Popescu, Camelia Ungureanu, Florin Nastase, **Melania A. Banu**, Vasilica Tucureanu, Bianca C. Tincu, “*Antibacterial properties of cotton coated with ZnO by Atomic Layer Deposition*”, BioNanoMed, 25-27 April 2018 – 9th Edition. Graz – Austria – **Poster**.
2. **Melania Banu**, Monica Simion, Marian C. Popescu, Pericle Varasteanu, Mihaela Kusko, Ileana C. Farcasanu, “*SU-8 coated silicon nanowires platform for specific detection of single nucleotide polymorphisms*”, BioNanoMed, 25-27 April 2018 – 9th Edition. Graz – Austria – **Prezentare orală**.
3. **Melania Banu**, Monica Simion, L. Savu, I. Farcasanu, “*Optimization of detection parameters on microarray Au-support for genotyping HPV strains*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS, 11-14 October 2017 – 40th Edition. Sinaia – România – **Prezentare orală**.
4. **Melania Banu**, “*3D Inorganic Nanostructured Substrate for Applications in Genetics*”, European Technology Platform for Nanomedicine – ETPN, 12-14 October 2016 – 11th Annual Event. Heraklion – Greece – **Prezentare orală**.
5. **Melania Banu**, Antonio Radoi, Monica Simion, Mihaela Kusko, “*Reproducible Functionalization of Silicon Substrates Intended for Biomedical Applications*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS, 10-12 October 2016 – 39th Edition. Sinaia – România – **Prezentare orală**.
6. Monica Simion, **Melania Banu**, “*Versatile platform for nanomedicine based on nanostructured silicon*”, Conferința Anuală de Semiconductori, CAS, 10-12 October 2016 – 39th Edition. Sinaia – România – **Lucrare invitată**.
7. Marian C. Popescu, Bogdan I. Bită, **Melania A. Banu**, Roxana M. Tomescu, “*Destructive effects induced by the electron beam in Scanning Electron Microscopy*”, ATOM-N 2016 Conference, 25-28 August 2016 – 9th Edition. Constanța – România – **Prezentare orală**.

6.4. Perspective de dezvoltare ulterioară

Probele ADN reale vor fi utilizate în experimente ulterioare, ca ultim pas în demonstrarea obținerii unui instrument precis de diagnosticare pe supoturi 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

1. Abreu A.L.P., Souza R.P., Gimenes F., Consolaro M.E.L., 2012, A review of methods for detect human papillomavirus infection, *Virology Journal*, vol. 9, p. 1–9.
2. Adam T., Hashim U., 2015, Highly sensitive silicon nanowire biosensor with novel liquid gate control for detection of specific single-stranded DNA molecules, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 67, p. 656–661.
3. Aissaoui N., Bergaoui L., Landoulsi J., Lambert J.F., Boujday S., 2012, Silane layers on silicon surfaces: mechanism of interaction, stability, and influence on protein adsorption, *Langmuir*, vol. 28, p. 656–665.
4. Albrecht V., Chevallier A., Magnone V., Barbry P., Vandenbos F., Lefebvre J.C., 2006, Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA microarrays. *Journal of Virological Methods*, vol. 137, p. 236–244.
5. Allawi H.T., SantaLucia J., 1998, Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G•A mismatches in DNA, *Biochemistry*, vol. 37, p. 2170–2179.
6. Allawi H.T., SantaLucia J., 1998, Thermodynamics of internal C•T mismatches in DNA, *Nucleic Acids Research*, vol. 26, p. 2694–2701.
7. Amos W., 2010, Even small SNP clusters are non-randomly distributed: is this evidence of mutational non-independence?, *Proceedings of Royal Society B*, vol. 277, p. 1443–1449.
8. Antoniou A.C., Beesley J., McGuffog L., Sinilnikova O.M., Healey S., Neuhausen S.L., Ding Y.C., Rebbeck T.R., Weitzel J.N., Lynch H.T., Isaacs C., Ganz P.A., Tomlinson G., Olopade O.I., Couch F.J., Wang X., Lindor N.M., Pankratz V.S., Radice P., Manoukian S., Peissel B., Zaffaroni D., Barile M., Viel A., Allavena A., Dall'Olio V., Peterlongo P., Szabo C.I., Zikan M., Claes K., 2010, Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for *BRCA1* and *BRCA1* mutation carriers: implications for risk prediction, *Cancer Research*, vol. 70, p. 9742–9754.
9. 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.
10. Asoh H., Arai F., Ono S., 2007, Site-selective chemical etching of silicon using patterned silver catalyst, *Electrochemistry Communications*, vol. 9, p. 535–539.
11. 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.
12. Bachtouli N., Aouida S., Bessais B., 2014, Microporous and mesoporous materials formation mechanism of porous silicon nanowires in HF/AgNO₃ solution, *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 187, p. 82–85.
13. Banu M., Simion M., Kusko M., Farcasanu I.C., 2018, Statistical investigations on the effects of immobilisation buffer in SNP microarray, *Revista de Chimie*, acceptată spre publicare în ediția Nov 2018
14. 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.
15. 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.
16. Banu M., Simion M., Varasteanu P., Savu L., Farcasanu I., 2017, Microarray and surface plasmon resonance experiments for HPV genotyping on Au-supports, vol. 20, p. 426–439.
17. Benea L., Bawedin M., Delacour C., Ionica I., 2017, Out-of-equilibrium body potential measurements in pseudo-MOSFET for biosensing, *Ultimate Integration on Silicon (EUROSIOI-ULIS)*, Joint International EUROSIOI Workshop and International Conference, p. 19–22.
18. Berzina D., Nakazawa-Miklasevica M., Zestkova J., Aksenoka K., Irmejs A., Gardovskis A., Kalniete D., Gardovskis J., Miklasevics E., 2013, *BRCA1/2* mutation screening in high-risk breast/ovarian cancer families and sporadic cancer patient surveilling for hidden high-risk families, vol. BMC Medical Genetics, vol. 14, p. 1–5.
19. Bhat R.R., Fischer D.A., Genzer J., 2002, Fabricating planar nanoparticle assemblies with number density gradients, *Langmuir*, vol. 18, p. 5640–5643.
20. Bilgic T., Klok H. A., 2015, Surface-initiated controlled radical polymerization enhanced DNA biosensing, *European Polymer Journal*, vol. 62, p. 281–293.
21. Blainey P., Krzywinski M., Altman N., 2014, Points of significance: replication, *Nature Methods*, vol. 11, p. 879–880.

22. Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurlen W., Hausen, H.Z., 1984, A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *The European Molecular Biology Organization journal*, vol. 3, p.1151-1157.
23. Brestovac B., Harnett G.B., Smith D.W., Frost F., Shellam G.R., 2009, Multiplex nested PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *Journal of Clinical Virology*, vol. 33, p. 116–122.
24. 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.
25. Bruel M., Aspar B., Auberton-Herve A.J., 1997, Smart-Cut: A new Silicon On Insulator material technology based on hydrogen implantation and wafer bonding, *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 36, p.1636-1641.
26. Brzovic P.S., Rajagopal P., Hoyt D.W., King M.C., Klevit R.E., 2001, Structure of a *BRCA1*–*BARD1* heterodimeric RING–RING complex, *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 8, 833-837.
27. Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., 2009, Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity, *Public Health Genomics*, vol. 12, p. 281–290.
28. Call D.R., Chandler D.P., Brockman F., 2001, Fabrication of DNA microarrays using unmodified oligonucleotide probes, *Biotechniques*, vol. 30, p. 368–379.
29. Calvi J.L., Chen F.R., Benson V.B., Brindle E., Bristow M., De A., Entringer S., Findlay H., Heim C., Hodges E.A., Klawitter H., Lupien S., Rus H.M., Tiemensma J., Verlezza S., Walker C.D., Granger D.A., 2107, Measurement of cortisol in saliva: a comparison of measurement error within and between international academic-research laboratories, *BMC Research Notes*, vol. 10, p. 1-6.
30. Campbell S.J.; Edwards R.A.; Glover, J.N.M., 2010, Comparison of the structures and peptide binding specificities of the BRCT domains of *MDC1* and *BRCA1*, *Structure*, vol. 18, p. 167-176.
31. Castagna R., Bertucci A., Prasetyanto E.A., Monticelli M., Conca D.V., Sharma P.P., Damin F., Chiari M., De Cola L., Bertacco R., 2016, Reactive microcontact printing of DNA probes on (DMA-NAS-MAP) co-polymer-coated substrates for efficient hybridization platforms, *Langmuir*, vol. 32, p. 3308–3313.
32. 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.
33. Chen C.Y., Wu C.S., Chou C.J., Yen T.J., 2008, Morphological control of single-crystalline silicon nanowire arrays near room temperature, *Advanced Materials*, vol. 20, p. 3811–3815.
34. Chen Y., Williams V., Filippova M., Filippov V., Duerksen-Hughes P., 2014, Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration, *Cancers*, vol. 6, p. 2155–2186.
35. Chou C.C., Chen C.H., Lee T.T., Peck K., 2004, Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, p. 1–8, 2004.
36. 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.
37. 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.
38. Conzone S.D., Pantano C.G., 2004, Glass slides to DNA microarrays, *Materials Today*, vol. 7, p. 20–26.
39. 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.
40. Covic M., Ștefănescu D., Sandovici I., 2011, *Genetică medicală*, Editura Polirom, ISBN: 978-973-46-1960-3.
41. Cretich M., Damin F., Pirri G., Chiari M., 2006, Protein and peptide arrays: recent trends and new directions, *Biomolecular Engineering*, vol. 23, p. 77–88.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Dawood M.K., Zhou L., Zheng H., Cheng H., Wan G., Rajagopalan R., Too H.P., Choi W.K., 2012b, Nanostructured Si-nanowire microarrays for enhanced-performance bio-analytics., *Lab on a Chip*, vol. 12, p. 5016–5024.

46. Dawson E.D., Reppert A.E., Rowlen K.L., Kuck L.R., 2005, Spotting optimization for oligo microarrays on aldehyde-glass, *Analytical Biochemistry*, vol. 341, p. 352–360.
47. dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?db%BCs>, accessed July 2016
48. 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.
49. DeMonbreun W.A., Goodpasture E.W., 1932, Infectious oral papillomatosis of dogs, *The American Journal of Pathology*, vol. 8, p. 43-56.
50. 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.
51. 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.
52. Dong Y., Zhu H., 2005, Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice., *Methods in Molecular Medicine*, vol. 108, p. 149–157.
53. 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.
54. Draghici S., Khatri P., Eklund A.C., Szallasi Z., 2006, Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements, *Trends in Genetics*, vol. 22, p. 101–109.
55. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., 2003, Electrochemical DNA sensors., *Nature Biotechnology*, vol. 21, p. 1192–1199.
56. Duarte-Guevara C., Lai F.L., Cheng C.W., Reddy B., Salm, E. Swaminathan V., Tsui Y.K., Tuan H.C., Kalnitsky A., Liu Y.S., Bashir R., 2014, Enhanced biosensing resolution with foundry fabricated individually addressable dual-gated ISFETs, *Analytical Chemistry*, vol. 86, p. 8359–8367.
57. 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.
58. Durst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H., 1983, A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, p. 3812–3815.
59. Eddy B.E., Stewart S.E., 1959. Characteristics of the SE polyoma virus, *American Journal of Public Health and the Nations Health*, vol. 49, p.1486-1492.
60. Elder Robert M., Arthi Jayaraman, 2014, Simulation study of the effects of surface chemistry and temperature on the conformations of ssDNA oligomers near hydrophilic and hydrophobic surfaces, *The Journal of Chemical Physics*, vol. 140, p. 155103-1-155103-14.
61. Fanale D., Amodeo V., Corsini L.R., Rizzo S., Bazan V., Russo A., 2012, Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers, *Oncogene*, vol. 31, p. 2121–2128.
62. Farcasanu I.C., Ruta L.L., 2017, Metallothioneins, *Saccharomyces cerevisiae*, and heavy metals: a biotechnology triad? în *Old Yeasts - New Quest*, InTech, doi:10.5772/intechopen.70340.
63. Faridi R., Zahra A., Khan K., Idrees M., 2011, Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer, *Virology Journal*, vol. 8, p. 1-8.
64. Fengxiang Z., Srinivasan M.P., 2004, Self-assembled molecular films of aminosilanes and their immobilization capacities, *Langmuir*, vol. 20, p. 2309–2314.
65. 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>.
66. 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.
67. 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.
68. Foulkes W.D., 2014, *BRCA1* and *BRCA1* - update and implications on the genetics of breast cancer: A clinical perspective, *Clinical Genetics*, vol. 85, p. 1–4.
69. Futaki M., Liu J.M., 2001, Chromosomal breakage syndromes and the *BRCA1* genome surveillance complex, *Trends in Molecular Medicine*, vol. 7, p. 560-565.
70. 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.

71. Gerdtsen A., Dexlin-Mellby L., Delfani P., Berglund E., Borrebaeck C., Wingren C., 2016, Evaluation of solid supports for slide- and well-based recombinant antibody microarrays, *Microarrays*, vol. 5, p. 1-17.
72. Ghibaudo G., 1988, New method for the extraction of MOSFET parameters, *Electronics Letters*, vol. 24, p. 543-545.
73. Giacinti C, Giordano A., 2006, RB and cell cycle progression, *Oncogene*, vol. 25, p. 5220-5227.
74. Gibbs R.A., Belmont J.W., Hardenbol P., Willis T.D., Yu F., Yang H., Ch'ang L.Y., Huang W., Liu B., Shen Y., 2003, The international HapMap project, *Nature*, vol. 426, p. 789-796.
75. Glotov A.S., Sinitsyna E.S., Danilova M.M., Vashukova E.S., Walter J.G., Stahl F., Baranov V.S., Vlach E.G., Tennikova T.B., 2016, Detection of human genome mutations associated with pregnancy complications using 3-D microarray based on macroporous polymer monoliths, *Talanta*, vol. 147, p. 537-546.
76. Goddard J.M., Erickson D., 2009, Bioconjugation techniques for microfluidic biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 394, p. 469-479.
77. Gong X., Zhao R., Yu X., 2015, High sensitive detections of Norovirus DNA and IgG by using multi-SiNW-FET biosensors, *International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, p. 1537-1540.
78. 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.
79. Gresham D., Dunham M.J., Botstein D., 2008, Comparing whole genomes using DNA microarrays, *Nature Reviews Genetics*, vol. 9, p. 291-302.
80. Gross L., 1951, Pathogenic properties, and 'Vertical' transmission of the mouse leukemia agent, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 78, p. 342-348.
81. Gross L., 1953a, A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 83, p. 414-421.
82. Gross L., 1953b, Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 xg), Ak-leukemic extracts, *Cancer*, vol. 6, p. 948-957.
83. 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.
84. Hahn J., Lieber C. M., 2004, Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors, *Nano Letters*, vol. 4, p. 51-54.
85. Hakkinen H., 2012, The gold-sulfur interface at the nanoscale, *Nature Chemistry*, vol. 4, p. 443-455.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Hanahan D., Weinberg R.A., 2011, Review hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, vol. 144, p. 646-674.
90. Hanahan D., Weinberg R.A., Francisco S., 2000, The hallmarks of cancer review, *University of California at San Francisco*, vol. 100, p. 57-70.
91. 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.
92. Hee H., Huang Z., Lee W., 2014, Metal-assisted chemical etching of silicon and nanotechnology applications, *Nano Today*, vol. 9, p. 271-304.
93. Heise C., Bier F.F., 2006, Immobilization of DNA on microarrays, Ed. Wittmann C. in *Immobilisation of DNA on Chips II*, Topics in Current Chemistry, Springer-Verlag, p. 1-25, ISBN-10 3-540-28436-2.
94. Hernan I., Borrs E., De Sousa Dias M., Gamundi M.J., Maé B., Llort G., Agnede J.A.G., Blanca M., Carballo M., 2012, Detection of genomic variations in *BRCA1* and *BRCA2* genes by long-range PCR and next-generation sequencing, *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 14, p. 286-293.
95. Herne T.M., Tarlov M.J., 1997, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 7863, p. 8916-8920.
96. Hinds P.W., Weinberg R.A., 1994, Tumor suppressor genes, *Current Opinion in Genetics and Development*, vol. 4, p. 135-141.

97. Hiraoui M., Guendouz M., Lorrain N., Moadhen A., Haji L., Oueslati M., 2011, Spectroscopy studies of functionalized oxidized porous silicon surface for biosensing applications, *Materials Chemistry and Physics*, vol. 128, p. 151–156.
98. Hobbs R.G., Petkov N., Holmes J. D., 2012, Semiconductor nanowire fabrication by bottom-up and top-down paradigms, *Chemistry of Materials*, vol. 24, p. 1975–1991.
99. Hoheisel J.D., Ross M.T., Zehetner G., Lehrach H., 1994, Relational genome analysis using reference libraries and hybridisation fingerprinting, *Journal of Biotechnology*, vol. 35, p. 121–134.
100. 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*, vol. 9, p. 433–448.
101. Hoppe-Seyster F., Butz K., 1995. Molecular mechanisms of virus-induced carcinogenesis: the interaction of viral factors with cellular tumor suppressor proteins, *Journal of Molecular Medicine*, vol. 73, p. 529–538.
102. Howarter J.A., Youngblood J.P., 2006, Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane, *Langmuir*, vol. 22, p. 11142–11147.
103. <http://www.arrayit.com/index.html>
104. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>
105. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=28897696
106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?db%BCs>, accessed January 2017.
107. http://www.soitec.com/pdf/Soitec_SmartCut_FR.pdf
108. 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.
109. 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.
110. Im H., Lesuffleur A., Lindquist N.C., Oh S.H., 2009, Plasmonic nanoholes in a multichannel microarray format for parallel kinetic assays and differential sensing, *Analytical chemistry*, vol. 81, p. 2854–2859.
111. Iyer P.M., Karthikeyan S., Sanjay Kumar P., Krishnan Namboori P.K., 2017, Comprehensive strategy for the design of precision drugs and identification of genetic signature behind proneness of the disease - a pharmacogenomic approach, *Functional and Integrative Genomics*, vol. 17, p. 375–385.
112. Jaksik R., Iwanaszko M., Rzeszowska-Wolny J., Kimmel M., 2015, Microarray experiments and factors which affect their reliability, *Biology Direct*, vol. 10, p. 1–14.
113. Jarhelle E., Riise Stensland H.M.F., Mæhle L., van Ghelue M., 2017, Characterization of *BRCA1* and *BRCA1* variants found in a Norwegian breast or ovarian cancer cohort, *Familial Cancer*, vol. 16, p. 1–16.
114. Jayaraman A., Hall C.K., Genzer J., 2007, Computer simulation study of probe-target hybridization in model DNA microarrays: effect of probe surface density and target concentration, *Journal of Chemical Physics*, vol. 127, p. 144912-1–144912-14.
115. 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.
116. Jung C., Yim S.C., Cho D.Y., Chang H.N., Park H.G., 2008, Microarray-based detection of Korean-specific *BRCA1* mutations, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, p. 405–413.
117. Juwle A., Saranath D., 2012, *BRCA1/BRCA1* gene mutations/SNPs and *BRCA1* haplotypes in early-onset breast cancer patients of Indian ethnicity, *Medical Oncology*, vol. 29, p. 3272–3281.
118. Kaisti M., 2017, Detection principles of biological and chemical FET sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 98, p. 437–448.
119. Karami F., Mehdipour P., 2013, A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA1* mutations in breast cancer, *Biomed Research International*, vol. 2013, p. 1–21.
120. Keighley S.D., Li P., Estrela P., Migliorato P., 2008, Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, p. 1291–1297.
121. Kim D., Herr A.E., 2013, Protein immobilization techniques for microfluidic assays, *Biomicrofluidics*, vol. 7, p. 1–47.
122. Kim J., Seidler P., Wan L.S., Fill C., 2009, Formation, structure, and reactivity of amino-terminated organic films on silicon substrates, *Journal of Colloid Interface Science*, vol. 329, p. 114–119.
123. Kitts A., Sherry S., 2011, The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>.

124. 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.
125. 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.
126. Kretschmann E., Raether H., 1968, Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Zeitschrift fur Naturforschung*, vol. 23, p. 2135–2136.
127. Lee C.L., Tsujino K., Kanda Y., Ikeda S., Matsumura M., 2008, Pore formation in silicon by wet etching using micrometre-sized metal particles as catalysts, *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18, p. 1015–1020.
128. Lenoir T., Giannella E., 2006, The emergence and diffusion of DNA microarray technology, *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration*, vol. 1, p. 1-39
129. Levicky R., Herne T.M., Tarlov M.J., Satija S.K., 1998, Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study, *Journal of American Chemical Society*, vol. 120, p. 9787–9792.
130. Li X., Bohn P.W., 2000, Metal-assisted chemical etching in HF/H₂O₂ produces porous silicon, *Applied Physics Letters*, vol. 77, p. 2572-2574.
131. Li Y., Yan Y., Lei Y., Zhao D., Yuan T., Zhang D., Cheng W., Ding S., 2014, Surface plasmon resonance biosensor for label-free and highly sensitive detection of point mutation using polymerization extension reaction, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 120, p. 15–20.
132. 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.
133. Li Z., Zhang L., Mo H., Peng Y., Zhang H., Xu Z., Zheng C., Lu Z., 2014, Size-fitting effect for hybridization of DNA/mercaptohexanol mixed monolayers on gold., *Analyst*, vol. 139, p. 3137–3145.
134. Liedberg B., Nylander C., Lunström I., 1983, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, vol. 4, p. 299–304.
135. 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.
136. Lindor N.M., Guidugli L., Wang X., Vallée M.P., Monteiro A.N.A., Tavtigian S., Goldgar D.E., Couch F.J., 2012, A review of a multifactorial probability based model for classification of *BRCA1* and *BRCA1* variants of uncertain significance (VUS), *Human Mutation*, vol. 33, p. 8–21.
137. Lindroos K., Liljedahl U., Raitio M., Syvänen A.C., 2001, Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries., *Nucleic Acids Research*, vol. 29, p. 1-7.
138. Liu L., Liu T., Tade M., Wang S. Li X., Liu S., 2014, Enzyme and microbial technology. Less is more, greener microbial synthesis of silver nanoparticles, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 67, p. 53–58.
139. Love J.C., Estroff L.A., Kriebel J.K., Nuzzo R.G., Whitesides G.M., 2005, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chemical reviews*, vol. 105, p.1103-1170.
140. 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., Dipersio 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.
141. 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.
142. Luzinov I., Julthongpipit 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.
143. 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.
144. Majoul N., Aouida S., Bessaïs B., 2015, Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations, *Applied Surface Science*, vol. 331, p. 388– 391.
145. 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.

146. Mao X., Young B.D., Lu Y.J., 2007, The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research, *Current Genomics*, vol. 8, p. 219–228.
147. Marie R., Schmid S., Johansson A., Ejsing L., Nordstrom M., Hafliker 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.
148. Martinez-Duarte R., Madou M., 2011, Capitolul 8: SU-8 photolithography and its impact on microfluidics, Ed. Mitra S.K. și Chakraborty S. în *Microfluidics and Nanofluidics Handbook*, CRC Press, p. 231–268, ISBN: 978-1-439-81671-4.
149. Mavaddat N., Antoniou A.C., Easton D.F., Garcia-Closas M., 2010, Genetic susceptibility to breast cancer, *Molecular Oncology*, vol. 4, p. 174–191.
150. 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.
151. Mehrotra P., 2016, Biosensors and their applications – A review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, vol. 6, p. 1–7.
152. 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.
153. 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.
154. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P. A., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett L.M., Ding W., Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow P.K., Norris F.H., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett J.C., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., Goldgar D., Wiseman R., Kamb A., Skolnick M.H., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*, vol. 266, p. 66–71.
155. Milne R.L., Antoniou A.C., 2011, Genetic modifiers of cancer risk for *BRCA1* and *BRCA1* mutation carriers, *Annals of Oncology*, vol. 22, p. 11–17.
156. Mojun Z., 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.
157. Monošík R., Stredánský M., Šturdík E., 2012, Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, vol. 5, p. 109–120.
158. Monti S., Prampolini G., Barone V., 2011, Interactions of nucleotide bases with decorated Si surfaces from molecular dynamics simulations, *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, p. 9146–9156.
159. Moody C.A., Laimins L.A., 2010, Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature Reviews in Cancer*, vol. 10, p. 550–560.
160. Moore P.S., Chang Y., 2010, Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews in Cancer*, vol. 10, p. 878–889.
161. Mun H.Y., Girigoswami A., Jung C., Cho D.Y., Park H.G., 2009, SNPs detection by a single-strand specific nuclease on a PNA zip-code microarray, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, p. 1706–1711.
162. Münger K., Baldwin A., Edwards K., Nguyen C., Owens M., Huh K., Mu K., Hayakawa H., Grace M., 2004, Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *Journal of Virology*, vol. 78, p. 11451–11460.
163. Newman J.D., Turner A.P.F., 2008, Historical perspective of biosensor and biochip development, Ed. Marks R., Cullen D., Karube I., Lowe C., Weetall H. în *Handbook of Biosensors and Biochips*, John Wiley & Sons, p. 1–16, ISBN 978–0–470–01905–4
164. Nguyen B., Celler G., Mazuré C., 2009, A review of SOI technology and its applications, *Journal of Integrated Circuits and Systems*, vol. 4, p. 51–54.
165. Ni T.W., Staicu L.C., Nemeth R.S., Schwartz C.L., Crawford D., Seligman J.D., Hunter W.J., Pilon-Smits E.A.H., Ackerson C.J., 2015, Progress toward clonable inorganic nanoparticles, *Nanoscale*, vol. 7, p. 17320–17327.
166. 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.
167. 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.
168. 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.

169. 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.
170. Oh S.T., Kyo S., 2001, Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites, *Journal of Virology*, vol. 75, p. 5559–5566.
171. 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.
172. O'Leary N.A., Wright M.W., Brister J.R., Ciuffo S., Haddad D., McVeigh R., Rajput B., Robertse B., Smith-White B., Ako-Adjei D., Astashyn A., Badretdin A., Bao Y., Blinkova O., Brover V., Chetvernin V., Choi J., Cox E., Ermolaeva O., Farrell C.M., Goldfarb T., Gupta T., Haft D., Hatcher E., Hlavina W., Joardar V.S., Kodali V.K., Li W., Maglott D., Masterson P., McGarvey K.M., Murphy M.R., O'Neill K., Pujar S., Rangwala S.H., Rausch D., Riddick L.D., Schoch C., Shkeda A., Storz S.S., Sun H., Thibaud-Nissen F., Tolstoy I., Tully R.E., Vatsan A.R., Wallin C., Webb D., Wu W., Landrum M.J., Kimchi A., Tatusova T., DiCuccio M., Kitts P., Murphy T.D., Pruitt K.D., 2016, Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation, *Nucleic Acids Research*, vol. 44, p. D733–D745.
173. 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.
174. Otto A., 1968, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift fur Physik*, vol. 216, 398–410.
175. Pappaert K., Ottevaere H., Thienpont H., Van Hummelen P., Desmet G., 2006, Diffusion limitation: A possible source for the occurrence of doughnut patterns on DNA microarrays, *Biotechniques*, vol. 41, p. 609–616.
176. Pardue M.L., Gall J.G., 1969, Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 64, p. 600–604.
177. Pasternack R.M., Amy S.R., Chabal Y.J., 2008, Attachment of 3-(aminopropyl) triethoxysilane on silicon oxide surfaces: dependence on solution temperature, *Langmuir*, vol. 7, p. 12963–12971.
178. Patolsky F., Lieber C. M., 2005, Nanowire nanosensors, *Materials Today*, vol. 8, p. 20–28.
179. 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.
180. Peng K., Fang H., Hu J., Wu Y., Zhu J., Yan Y., Lee S., 2006, Metal-particle-induced, highly localized site-specific etching of Si and formation of single-crystalline Si nanowires in aqueous fluoride solution, *Chemistry: A European Journal*, vol. 12, p. 7942–7947.
181. Peterson A.W., Wolf L.K., Georgiadis R.M., 2002, Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces, *Journal of American Chemical Society*, vol. 124, p. 14601–14607.
182. Piao X., Sun L., Zhang T., Gan Y., Guan Y., 2008, Effects of mismatches and insertions on discrimination accuracy of nucleic acid probes, *Acta Biochimica Polonica*, vol. 55, p. 713–720.
183. 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.
184. Pollack J.R., 2007, A perspective on DNA microarrays in pathology research and practice, *The American Journal of Pathology*, vol. 171, p. 375–385.
185. Pop L.A., Cojocneanu-Petric R.M., Pileczki V., Morar-Bolba G., Irimie A., Lazar V., Lombardo C., Paradiso A., Berindan-Neagoe I., 2018, Genetic alterations in sporadic triple negative breast cancer, *Breast*, vol. 38, p. 30–38.
186. Prospero M.C.F., Ingham S.L., Howell A., Lalloo F., Buchan I.E., Evans D.G., 2014, Can multiple SNP testing in *BRCA1* and *BRCA2* female carriers be used to improve risk prediction models in conjunction with clinical assessment?, *BMC Medical Informatics and Decision Making*, vol. 14, p. 1–11.
187. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
188. 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.
189. Rao A.N., Grainger D., 2014, Biophysical properties of nucleic acids at surfaces relevant to microarray performance, *Biomaterials Science*, vol. 2, p. 436–471.

190. 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.
191. Rasmussen H.B., 2012, Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting, în *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech, p. 315–334.
192. Ressine A., Ekström S., Marko-Varga G., Laurell T., 2003, Macro-/nanoporous silicon as a support for high-performance protein microarrays, *Analytical Chemistry*, vol. 75, p. 6968–6974.
193. Riahi A., Kharrat M., Lariani I., Chaabouni-Bouhamed H., 2014, High-resolution melting (HRM) assay for the detection of recurrent *BRCA1/BRCA1* germline mutations in Tunisian breast/ovarian cancer families, *Familial Cancer*, vol. 13, p. 603–609.
194. Rickman D.S., Herbert C.J., Aggerbeck L.P., 2003, Optimizing spotting solutions for increased reproducibility of cDNA microarrays, *Nucleic Acids Research*, vol. 31, p. 1-8.
195. 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.
196. Romanov V., Davidoff S.N., Miles A.R., Grainger D.W., Gale B.K., Brooks B.D., 2014, A critical comparison of protein microarray fabrication technologies, *Analyst*, vol. 139, p. 1303–1326.
197. 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.
198. Rous P., 1910, A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl). *Journal of Experimental Medicine*, vol. 12, p. 696-705.
199. Rous P., 1911, A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells, *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 142, p. 397-411.
200. Roy K., Sarkar C.K., Ghosh C.K., 2015, Photocatalytic activity of biogenic silver nanoparticles synthesized using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract, *Applied Nanoscience*, vol. 5, p. 953–959.
201. RStudio: Integrated development environment for R (Version 1.0.136) [Computer software]. Boston, MA.
202. 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.
203. Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., Sherry S., Mullikin J.C., Mortimore B.J., Willey D.L., Hunt S.E., Cole C.G., Coggill P.C., Rice C.M., Ning Z., Rogers J., Bentley D.R., Kwok P.Y., Mardis E.R., Yeh R.T., Schultz B., Cook L., Davenport R., Dante M., Fulton L., Hillier L., Waterston R.H., McPherson J.D., Gilman B., Schaffner S., van Etten W.J., Reich D., Higgins J., Daly M.J., Blumenstiel B., Baldwin J., Stange-Thomann N., Zody M.C., Linton L., Lander E.S., Altshuler D., 2001, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature*, vol. 409, p. 928–933.
204. 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.
205. Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J., 2008, DNA biosensors and microarrays, *Chemical Reviews*, vol. 108, p. 109–139.
206. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, vol. 270, p.467–470.
207. 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.
208. Seela F., Budow S., 2008, Mismatch formation in solution and on DNA microarrays: how modified nucleosides can overcome shortcomings of imperfect hybridization caused by oligonucleotide composition and base pairing, *Molecular Biosystems*, vol. 4, p. 232–245.
209. Sethi D., Kumar A., Gandhi R.P., Kumar P., Gupta K.C., 2010, New protocol for oligonucleotide microarray fabrication using SU-8-coated glass microslides, *Bioconjugate chemistry*, vol. 21, p. 1703–1708.
210. Shalon D., Smith S.J., Brown P.O., 1996, A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization, vol. 6, p. 639–645.
211. 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.
212. Shastry B.S., 2002, SNP alleles in human disease and evolution., *Journal of Human Genetics*, vol. 47, p. 561–566.

213. Shendure J., Ji H., 2008, Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, vol. 26, p. 1135–1145.
214. Shin D., Rezek B., Tokuda N., Takeuchi D., Watanabe H., Nakamura T., Yamamoto T., Nebel C.E., 2006, Photo- and electrochemical bonding of DNA to single crystalline CVD diamond, *Physica Status Solidi Applied Materials Science*, vol. 203, p. 3245–3272.
215. Shope R.E., Hurst E.W., 1933, Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology, *Journal of Experimental Medicine*, vol. 58, p.607-624.
216. Simion M., Ruta L., Mihailescu C., Kleps I., Bragaru A., Miu M., Ignat T., Baci I., 2009, Porous silicon used as support for protein microarray, *Superlattices and Microstructures*, vol. 46, p. 69–76.
217. 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.
218. Simmons P., Singleton I., 1996, A method to increase silver biosorption by an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, p. 278–285.
219. Singh P., 2014, *Surface Plasmon Resonance*, Nova Science Publishers, p. 13-16, ISBN: 978-1-63321-866-6
220. Sobek J., Schauer S., Rehrauer H., Fischer D., Patrignani A., Landgraf S., Schlapbach R., 2013, Single molecule interactions studied by using a modified DNA sequencer: a comparison with surface plasmon resonance, *SPIE BiOS*, vol. 8596, p. 1-18.
221. 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.
222. 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.
223. Sotlar K., Diemer D., Dethleffs A., Hack Y., Stubner A., Vollmer N., Menton S., Menton M., Dietz K., Wallwiener D., Kandolf R., Bu B., 2004, Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, p. 3176–3184.
224. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., 2016, Capitolul 24: Surface plasmon resonance based miniaturized biosensors for medical applications, Ed. Chandra P., Segal E. în *Nanobiosensors for personalized and onsite biomedical diagnosis*, The Institution of Engineering and Technology, London, p. 499-520, ISBN: 978-1849199506.
225. Souteyrand E., Cloarec J.P., Martin J.R., Wilson C., Lawrence I., Mikkelsen S., Lawrence M.F., 1997, Direct detection of the hybridization of synthetic homo-oligomer DNA sequences by field effect, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, p. 2980–2985.
226. Southern E.M., 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *Journal of Molecular Biology*, vol. 98, p. 503–517.
227. Steel A.B., Levicky R.L., Herne T.M., Tarlov M.J., 2000, Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly, *Biophysical Journal*, vol. 79, p. 975–981.
228. Stewart D.J., 2000, Making and using DNA microarrays: a short course at Cold Spring Harbor Laboratory., *Genome Research*, vol. 10, p. 1–3.
229. Stewart S.E., Eddy B.E., 1959, Tumor induction by SE polyoma virus and the inhibition of tumors by specific neutralizing antibodies, *American Journal of Public Health and the Nations Health*, vol. 49, p.1493-1496.
230. Strambini L.M., Longo A., Scarano S., Prescimone T., Palchetti I., Minunni M., Giannessi D., Barillaro G., 2015, Self-powered microneedle-based biosensors for pain-free high-accuracy measurement of glycaemia in interstitial fluid, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 66, p. 162-168.
231. 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.
232. Sun W., Yang J., 2010, Functional mechanisms for human tumor suppressors, *Journal of Cancer*, vol. 1, p. 136–140.
233. Syvänen A.C., 2001, Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms, *Nature Reviews. Genetics*, vol. 2, p. 930–942.
234. Takano E.A., Mitchell G., Fox S.B., Dobrovic A., 2008, Rapid detection of carriers with *BRCA1* and *BRCA1* mutations using high resolution melting analysis, *BMC Cancer*, vol. 8, p. 1–7.
235. Tao F., Zhu Y., Bernasek S., 2012, *Functionalization of Semiconductor Surfaces*, John Wiley & Sons, p. 1-10, ISBN 978-0-470-56294-9.
236. To W.K., Tsang C.H., Li H.H., Huang Z., 2011, Fabrication of N-type mesoporous silicon nanowires by one-step etching, *Nano Letters*, vol. 11, p. 5252–5258.

237. Tobias F., Dietrich P.M., Streeck C., Ray S., Nutsch A., Shard A., Beckhoff B., Unger W.E.S., Rurack K., 2015, Quantification of variable functional-group densities of mixed-silane monolayers on surfaces via a dual-mode fluorescence and XPS label, *Analytical Chemistry*, vol. 87, p. 2685–2692.
238. Tommasino M., Crawford L., 1995, Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle, *BioEssays*, vol. 17, p. 509–518.
239. 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.
240. Tsujino K., Matsumura M., 2007, Morphology of nanoholes formed in silicon by wet etching in solutions containing HF and H₂O₂ at different concentrations using silver nanoparticles as catalysts, *Electrochimica Acta*, vol. 53, p. 28–34.
241. 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.
242. Turnbull C., Ahmed S., Morrison J., Pernet D., Renwick A., Maranian M., Seal S., Ghousaini M., Hines S., Healey C.S., Hughes D., Warren-Perry M., Tapper W., Eccles D., Evans D.G., Hoening M., Schutte M., van den Ouweland A., Houlston R., Ross G., Langford C., Pharoah P.D., Stratton M.R., Dunning A.M., Rahman N., Easton D.F., 2010, Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci, *Nature Genetics*, vol. 42, p. 504–507.
243. Ulman A., 1996, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews*, vol. 96, p. 1533–1554.
244. van Bakel H., Holstege F.C.P., 2004, In control: systematic assessment of microarray performance., *EMBO Reports*, vol. 5, p. 964–969.
245. 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.
246. Wang S., Yang H., Zhang H., Yang F., Zhou M., Jia C., Lan Y., Ma Y., Zhou L., Tian S., Wang S., Zhang H., Chen Z., 2010, A surface plasmon resonance-based system to genotype human papillomavirus, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 200, p. 100–105.
247. Wang W., Wei Z., Lam T.W., Wang J., 2011, Next generation sequencing has lower sequence coverage and poorer SNP-detection capability in the regulatory regions, *Scientific Reports*, vol. 1, p. 1–7.
248. Wang Y., Cortez D., Yazdi P., Neff N., Elledge S.J., Qin J., 2000, BASC, a super complex of *BRCA1*-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures, *Genes and Development*, vol. 14, p. 927–939.
249. 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.
250. Wenga G., Jacques E., Salaün A.C., Rogel R., Pichon L., Geneste F., 2013, Step-gate P nanowires Field Effect Transistor compatible with CMOS technology for label-free DNA Biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 40, p. 141–146.
251. Wenmackers S., Pop S.D., Roodenko K., Vermeeren V., Williams O.A., Daenen M., Douhéret O., D’Haen J., Hardy A., Van Bael M.K., Hinrichs K., Cobet C., van de Ven M., Ameloot M., Haenen K., Michiels L., Esser N., Wagner P., 2008, Structural and optical properties of DNA layers covalently attached to diamond surfaces, *Langmuir*, vol. 24, p. 7269–7277.
252. Wenmackers S., Vermeeren V., van de Ven M., Ameloot M., Bijmens N., Haenen K., Michiels L., Wagner P., 2009, Diamond-based DNA sensors: Surface functionalization and read-out strategies, *Physica Status Solidi Applied Materials Science*, vol. 206, p. 391–408.
253. Wickham H., 2009, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
254. Wijaya E., Lenaerts C., Maricot S., Hastanin J., Habraken S., Vilcot J.P., Boukherroub R., Szunerits S., 2011, Surface plasmon resonance-based biosensors: from the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 15, p. 208–224.
255. Williams S., Davies P., Bowen J., Allender C., 2013, Controlling the nanoscale patterning of AuNPs on silicon surfaces, *Nanomaterials*, vol. 3, p. 192–203.
256. Wittwer C.T., 2009, High-resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations, *Human Mutation*, vol. 30, p. 857–859.
257. Wong K.Y., Pettitt B.M., 2004, Orientation of DNA on a surface from simulation, *Biopolymers*, vol. 73, p. 570–578.
258. Wood R.W., 1902, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine Series*, vol. 6, 396–402.
259. Wrobel G., 2003, Optimization of high-density cDNA-microarray protocols by design of experiments, *Nucleic Acids Research*, vol. 31, p. 1–7.

260. 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.
261. Yang Z., Castrignanò E., Estrela P., Frost C.G., Kasprzyk-Hordern B., 2016, Community sewage sensors towards evaluation of drug use trends: detection of cocaine in wastewater with DNA-directed immobilization aptamer sensors, *Scientific Reports*, vol. 6, p. 1-10.
262. 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.
263. Yauk C.L., Berndt M.L., 2007, Review of the literature examining the correlation among DNA microarray technologies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 48, p. 380–394.
264. 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.
265. 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.
266. Zhang F., Srinivasan M.P., 2004, Self-assembled molecular films of aminosilanes and their immobilization capacities, *Langmuir*, vol. 20, p. 2309–2314.
267. Zhang L., Kirchhoff T., Yee C.J., Offit K., 2009, A rapid and reliable test for *BRCA1* and *BRCA1* founder mutation analysis in paraffin tissue using pyrosequencing, *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 11, p. 176–181.
268. Zhang L., Li Z., Zhou X., Yang G., Yang J., Wang H., Wang M., Liang C., Wen Y., Lu Y., 2015, Hybridization performance of DNA/mercaptohexanol mixed monolayers on electrodeposited nanoAu and rough Au surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 757, 203–209.
269. Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S., 2016, Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, p. 1-34.
270. Zhipeng H., Geyer N., Werner P., de Boor J., Gösele U., 2011, Metal-Assisted Chemical Etching of Silicon: A Review, *Advanced Materials*, vol. 23, p. 285–308.
271. 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.
272. zur Hausen H., Barre-Sinoussi F., 2008, The discoveries of human papilloma viruses that cause cervical cancer and of human immunodeficiency virus, *The Nobel Prize*, vol. 8, p. 1–26.

ANEXA 1

Materiale și metode

A1.1. Materiale și reactivi

Suporturi

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

Caracteristici tehnice esențiale:

- Dimensiuni: $25 \pm 0,2$ mm x $76 \pm 0,3$ mm x $0,940$ mm $\pm 0,025$ mm);
- Diferențe topografice la nivel atomic: $< \pm 20$ Å pe $1,0$ μm^2 ;
- Uniformitatea substratului: $< 0,036$ mm pe 25×76 mm;
- Grupările SiO₂ omogen distribuite asigură reactivitatea superioară a silanilor;
- Grupări aldehidice înalt reactive pentru legarea covalentă a aminelor primare;
- Densitatea grupărilor active aldehidice pe suprafață: 1×10^{13} pe mm^2 ;
- Fluorescență intrinsecă foarte scăzută;
- Indice de refracție, transmisie și duritate excelente;
- Rezistență termică excelentă;
- Rezistență la apă, clor, iod, brom, la substanțe organice, la soluții neutre, acide ori salin;
- Nu necesită tratamente suplimentare ale suprafeței înainte de utilizare.

(http://www.arrayit.com/Products/Microarray_Slides/Aldehyde_Slides/aldehyde_slides.html;
<https://m.laboratory-equipment.com/product/3031-83>)

b) Substraturi 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 (H₂SO₄), peroxidul de hidrogen (H₂O₂), 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 (Na₂HPO₄), 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).

A1.2. Echipamente

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

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Plăci de microtitrare compatibile: cu 96, 384 și 1536 de godeuri;
- Numărul maxim de vârfuli: < 16 de vârfuli în configurație de 4x4 cu spațiere de 4,5 mm;
- Precizia de depunere: ± 15 μm;
- Control de mișcare a platformei: mișcare motorizată pe axele X, Y, Z;
- Repetabilitatea de poziționare pe platformă: 0,05 mm pe axele X și Y;
- Viteza de deplasare a platformei: 0 - 330 mm/ s.

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

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Laseri: excitare la două lungimi de undă: 532 și 635 nm;
- Detector: tub fotomultiplicator (PMT) de 16 bit;
- Sistem optic: parțial confocal (cu câmp întunecat);
- Dimensiunea pixelilor: 1 - 100 μm (5 μm pentru scanarea unei lame întregi de microscop);
- Tip de scanare: ~ 5 min/ lamă la 532 sau 635 nm;

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

- Rezoluție: 10 μm per pixel;
- Suport de încărcare: < 4 lame *microarray*;
- Filtre suplimentare: < 3 filtre suplimentare.

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

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Principiu de măsurare: rezonanța plasmonilor de suprafață (SPR);
- Traductor: oglină de baleiaj;
- Lungime de undă a laserului: 670 nm
- Sistem de pompe: două pompe pentru seringi și o pompă peristaltică;
- Debit: 0,8 - 227,3 $\mu\text{L/s}$ (pompele pentru seringi) și 30 - 130 $\mu\text{L/s}$ (pompa peristaltică);
- Decalarea unghiului SPR pe ax: $62^\circ - 78^\circ$;
- Răspuns dinamic: 4000 m° ;
- Rezoluția modificării unghiului: < 0,02 m° ;
- Masa moleculară minimă: 180 Da;
- Registrul de concentrații detectat: $10^{-11} - 10^{-3}$ M;
- Indicele de refracție standard: 1,26 - 1,38;
- Rezoluția indicelui de refracție: < $1,10^{-7}$;
- Senzor: disc de sticlă acoperit cu film de aur;
- Încărcarea și injectarea probei: manuală sau semi-automată;
- Amestecare probă: continuă.

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).

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Depunere de: Au, Pt, Al, Ni, Cr;
- Rezoluție: 1 \AA (0,1 nm);
- Dimensiunea substratului: < \varnothing 260 mm;
- Temperatura substratului: < 250 $^\circ\text{C}$;
- Depunere multistrat: < 6 metale (4 cu fascicul electronic și 2 prin pulverizare catodică).

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).

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Două surse de tensiune;
- Două module de măsurare a tensiunii;
- Patru unități de monitorizare a sursei de putere:
 - Parametri măsurati: $U < \pm 100 \text{ V}$, $I < \pm 100 \text{ mA}$;
 - Rezoluția tensiunii de ieșire: între $100 \mu\text{V}$ la 2V și 5 mV la 100 V ;
 - Rezoluția curentului de ieșire: între 10 fA la 10 pA și $10 \mu\text{A}$ la 100 mA ;
 - Putere maximă la ieșire: 2 W .

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).

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Rezoluție: 1 nm la 15 kV (în vid înalt) sau 1.8 nm la 3 kV (în vid scăzut)
- Tensiunea de accelerare: $0,5 - 30 \text{ kV}$;
- Curentul pe probă: $0,6 \text{ pA} - 100 \text{ nA}$;
- Presiunea de lucru în camera probei: $< 10^{-4} \text{ Pa}$
- Înclinarea maximă a mesei probei: $-10^\circ, +60^\circ$, motorizat;
- Detectori: ETD, TLD-SE și TLD-BSE, EDS.

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

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Detector: de tip SDD (Silicon Drift Detector) fix cu chip de 30 mm^2 și fereastră de Si_3N_4 ;
- Interval de detecție: Be (0.108 pe nivelul K) - Am (105.970 pe nivelul K);
- Rezoluție: 129 eV la Mn pe nivelul K;
- Intensitatea semnalului de intrare (captat): > 1 milion cps (counts per second - unități arbitrare);
- Intensitatea semnalului redat: > 300000 cps;
- Raportul semnal/ zgomot: $> 10000/ 1$;
- Sistem de răcire termoelectrică Peltier.

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

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Sursă de radiație X cu anod rotativ:
 - P: 9 kW ;
 - U: $20 - 40 \text{ kV}$;
 - I: $2 - 44 \text{ mA}$.

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

- Diametrului punctului focal: $0,4 \times 12,0 \text{ mm}^2$;
- Caracteristicile fasciculului paralel: - apertura de incidență variabilă: 0,05 - 7 mm;
 - limita verticală: 2 - 10 mm.
- Sistemul optic Bragg-Brentano: - apertura de incidență variabilă: 0,05 - 7 mm;
 - limita verticală: 2 - 10 mm.
- Caracteristicile fasciculului de difracție: - două aperturi de captare: 0.05 - 20 mm;
 - unghi divergent: 5° .
- Moduri de lucru: HRXRD (difracție cu raze X de înaltă rezoluție), XRR (reflectometrie de raze X), GIXRD (difracție cu raze X sub unghiuri de incidență mici, metoda *grazing*) etc.

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).

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Transmisie: $25000 - 50 \text{ cm}^{-1}$;
- Rezoluție optică: $< 0,06 \text{ cm}^{-1}$;
- Rezoluție spectrală: $< 0,2 \text{ cm}^{-1}$;
- Spectru de analiză: între THz și UV;
- Unghi de incidență variabil: $30^\circ - 80^\circ$;
- Modul de reflexie totală atenuată (ATR).

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.

Caracteristici tehnice reprezentative:

- Caracteristicile camerei video: - Adâncimea de focalizare 55 mm;
 - Viteza de achiziție: 60 sau 100 fps (frames per second - cadre pe secundă);
 - Rezoluția: 512×480 pixeli;
- Masa probei automatizată pe coordonatele X, Y, Z;
- Controlul volumului picăturii.

A1.3. 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 .

A1.4. Referințe

1. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
2. RStudio: Integrated development environment for R (Version 1.0.136) [Computer software]. Boston, MA.
3. Wickham H., 2009, ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

ANEXA 2

Metode de sinteză *green-chemistry* a nanoparticulelor de Ag**A2.1. Construcții plasmidiale pentru expresia metalotioneinilor de *A. thaliana* și *N. caerulea* în celulele de *S. cerevisiae***

Au fost utilizate celule de *S. cerevisiae* transgenice care exprimă metalotioneine corespunzătoare speciilor *Arabidopsis thaliana* (AtMT1a, AtMT1c, AtMT2a, AtMT2b, AtMT3, AtMT4a și AtMT4b) și *Noccaea caerulea* (NcMT1, NcMT2a, NcMT2b și NcMT3). Genele pentru MT transgenice au avut o secvență de miristoilare (myrGFP) fuzionată la capătul N-terminal aflată sub controlul unui promotor inductibil. Celulele de drojdie transgenice au fost crescute pe medii cu deficit de Cu (I) pentru a asigura supraexpresia genei *CTR1* care codifică transportorul cu afinitate pentru Cu (I), considerat a transporta de asemenea Ag (I) în celulele de drojdie. Încărcarea celulară cu Ag (I) a fost asigurată alternativ prin permeabilizarea diferențială a membranei plasmatică cu impulsuri electrice, acetat de litiu sau digitonină. Tulpinile de drojdie au fost lăsate să se recupereze după bioacumularea Ag (I). Formarea AgNPs a fost monitorizată prin spectrometrie de masă (ICP-MS - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), în funcție de tipul de metalotioneină, nivelul de încărcare cu Ag (I), reducerea disponibilității zahărului sau excluderea Ag prin adăugarea Cu (I).

Tabel A2.1. Caracteristicile construcțiilor plasmidiale

<i>Plasmid</i>	<i>Insert</i>	<i>Caracteristici</i>	<i>Proteină recombinantă exprimată în mediu conținând galactoză</i>
pGRD596 (pGREG596-Δ<i>SalI</i>)	-	<i>GAL1::myrGFP, URA3</i>	myrGFP (control)
pGRD596-CUP1	<i>CUP1 (ScMT)</i>	<i>GAL1::myrGFP::CUP1, URA3</i>	myrGFP-Cup1 (Cup1 este MT din <i>S. cerevisiae</i>)
pGRD596- AtMT1a	<i>AtMT1a</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT1a, URA3</i>	myrGFP-AtMT1a
pGRD596- AtMT1c	<i>AtMT1c</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT1c, URA3</i>	myrGFP-AtMT1c
pGRD596- AtMT2a	<i>AtMT2a</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT2a, URA3</i>	myrGFP-AtMT2a
pGRD596- AtMT2b	<i>AtMT2b</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT2b, URA3</i>	myrGFP-AtMT2b
pGRD596- AtMT3	<i>AtMT3</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT2a, URA3</i>	myrGFP-AtMT3
pGRD596- AtMT4a	<i>AtMT4a</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT4a, URA3</i>	myrGFP-AtMT4a
pGRD596- AtMT4b	<i>AtMT4b</i>	<i>GAL1::myrGFP::AtMT4a,</i>	myrGFP-AtMT4b

		<i>URA3</i>	
pGRD596- NcMT1	<i>NcMT1</i>	<i>GAL1::myrGFP::NcMT1, URA3</i>	<i>myrGFP-NcMT1</i>
pGRD596- NcMT2a	<i>NcMT2a</i>	<i>GAL1::myrGFP::NcMT2a, URA3</i>	<i>myrGFP-NcMT2a</i>
pGRD596- NcMT2b	<i>NcMT2b</i>	<i>GAL1::myrGFP::NcMT2b, URA3</i>	<i>myrGFP-NcMT2b</i>
pGRD596- NcMT3	<i>NcMT3</i>	<i>GAL1::myrGFP::</i>	<i>myrGFP-NcMT3</i>

A2.2. Expresia metalotioneinilor de *A. thaliana* și *N. caerulescens* în celulele de *S. cerevisiae*

Tulpinile care exprimă metalotioneine de plante sunt mai tolerante față de Ag în comparație cu tulpinile care exprimă controlul *myrGFP*.

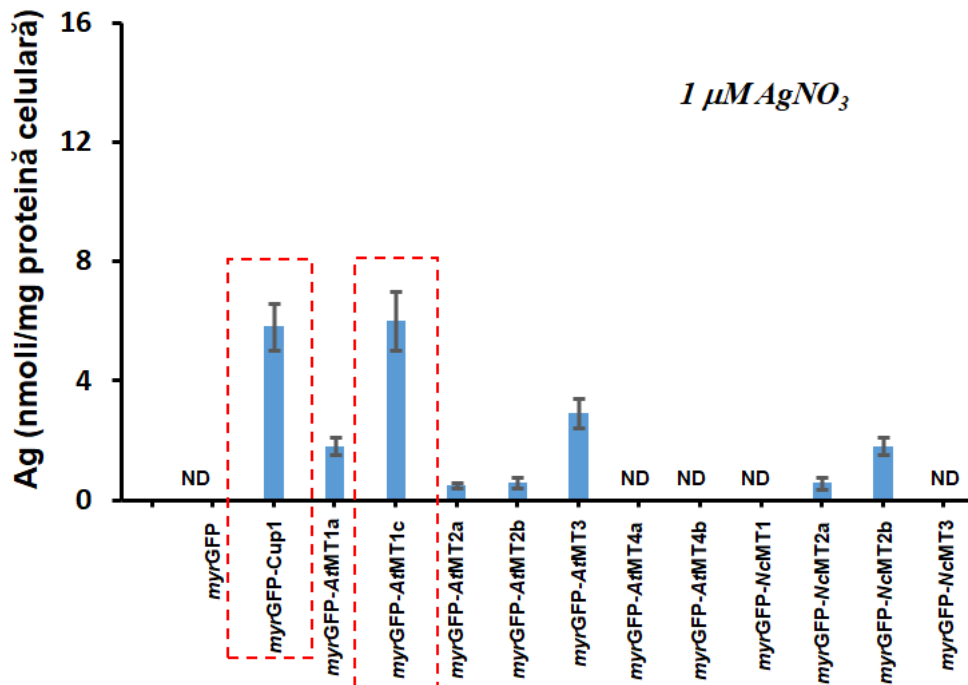


Figura A2.1. Acumularea Ag din medii cu 1 μM AgNO₃

Din **Figura A2.1**, rezultă că tulpinile *myrGFP-Cup1* și *myrGFP-AtMT1C* acumulează Ag din medii cu concentrații scăzute de AgNO₃.

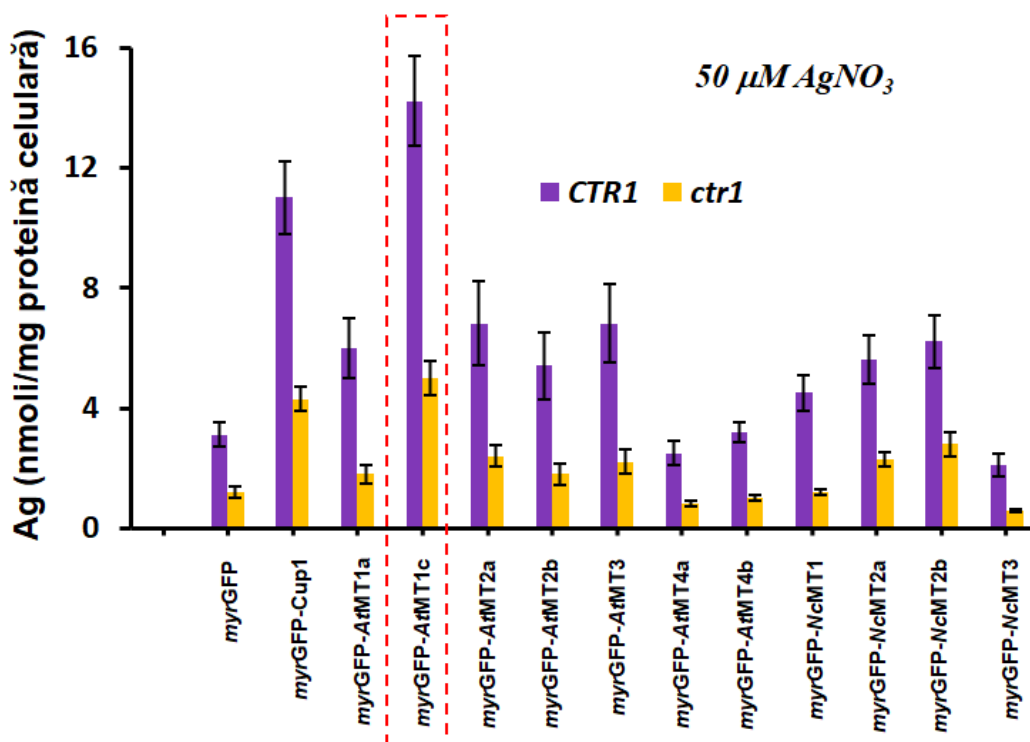


Figura A2.2. Acumularea Ag din medii cu 50 μM AgNO_3

Ctr1, proteina cu afinitate mare pentru Cu(I) este responsabilă în parte pentru transportul Ag prin membrana plasmatică. Tulpina care exprimă myrGFP-AtMT1c acumulează cea mai mare concentrație de Ag, urmată de tulpina ce exprimă myrGFP-Cup1.

Celulele de drojdie transformate cu seria pGRD596 și aflate în faza exponențială de creștere au fost trecute pe mediu selectiv conținând galactoză (SG-Ura) la densitatea 10^6 celule/mL și cultivate pe mediu lichid, la 28 °C sub agitare la 200 rpm, până când densitatea culturii a ajuns la 10^7 celule/mL. S-a adăugat AgNO_3 (concentrație finală 0,05 mM) și s-a incubat timp de încă două ore în prezența / absența de 0,05 mM Cu. Datele reprezintă media determinărilor duplicate pe trei experimente diferite ($n = 6$) (Figura A2.3.).

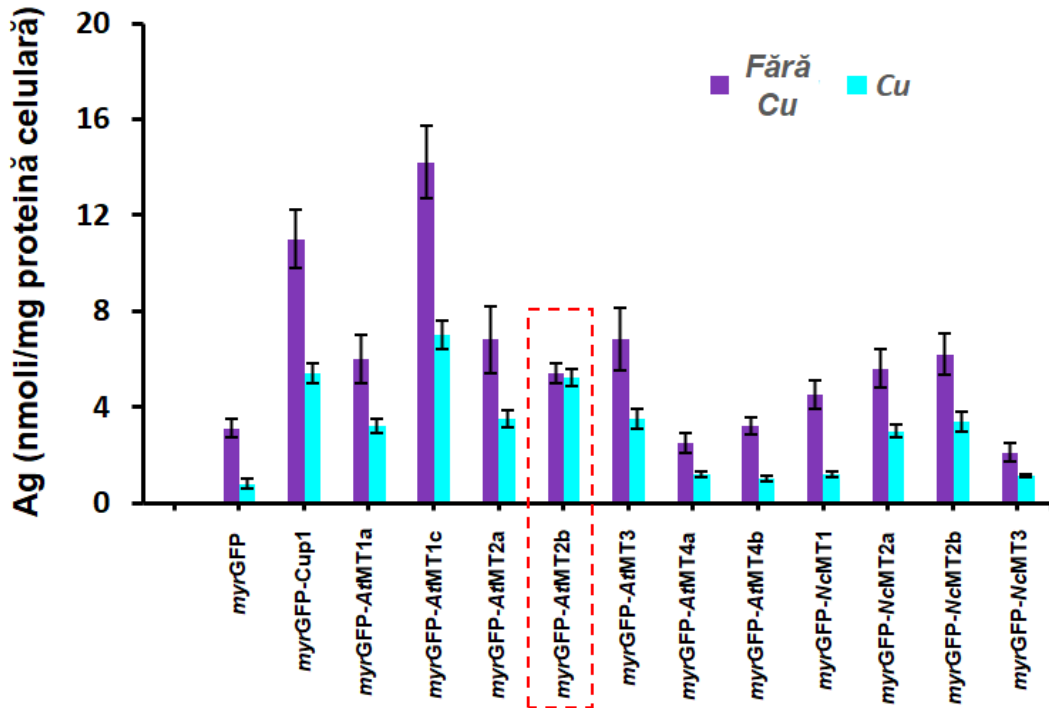
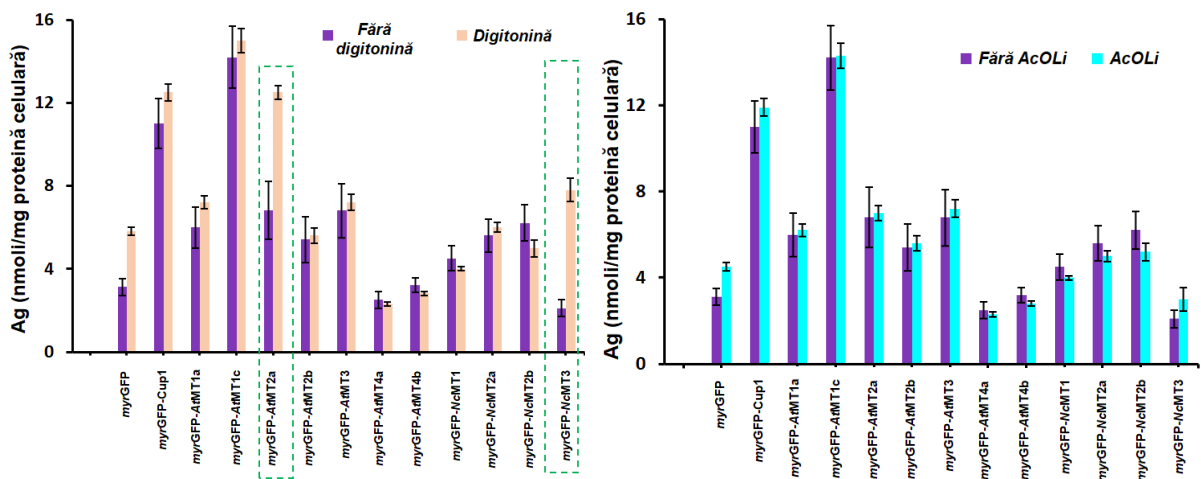


Figura A2.3. Acumularea Ag din medii cu Cu/fără Cu

În Figura A2.3. se observă că adăugarea Cu nu a modificat tulpina care exprimă myrGFP-AtMT2b.

Ag nu este preluat cu ușurință de celulele de drojdie, prin urmare s-a încercat îmbunătățirea absorbției cu ajutorul permeabilizării tranzitorii, rezultatele fiind ilustrate grafic în Figura A2.4.



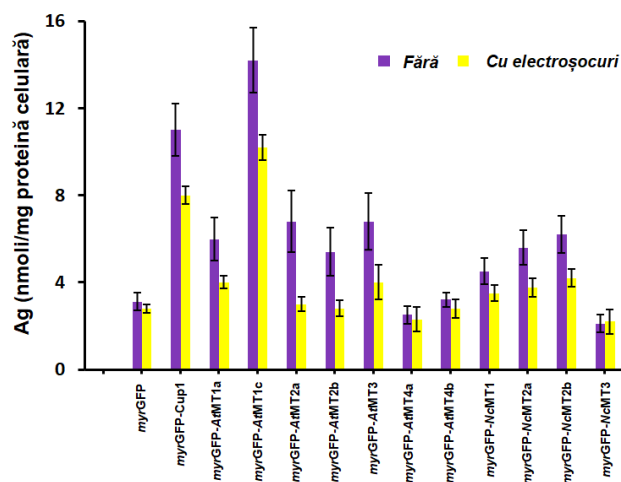


Figura A.2.4. Efectul agenților permeabilizatori asupra acumulării Ag

Tratamentul cu digitonină (0,01 mg/ml, 30 min), a îmbunătățit semnificativ preluarea Ag în cazul celulelor transgenice myrGFP-AtMT2a și myrGFP-NcMT3. În schimb, tratamentele cu acetat de litiu (2 mM, 30 min), sau electroșocuri (10 V, 2 s) nu au îmbunătățit preluarea Ag de către celulele de drojdie.

Celulele de drojdie transformate cu seria pGRD596 situate în faza de creștere exponențială au fost trecute la densitatea 10^6 celule/mL pe mediu selectiv SG-Ura și cultivate la 28 °C, sub agitare la 200 rpm, până când densitatea culturii a ajuns la 10^7 celule/mL. În mediu s-a adăugat AgNO_3 (concentrație finală 0,05 mM) și viabilitatea a fost analizată prin colorarea celulelor cu iodură de propidiu, la 2 ore și 24 ore după expunerea la Ag^+ . Viabilitatea a fost calculată în raport cu viabilitatea celulelor transformate cu vectorul de control pGRD596 cultivat în aceleași condiții, pe mediu conținând glucoză. Datele reprezintă media determinărilor duplicate pe trei experimente diferite ($n = 6$) (Figura A.2.5.).

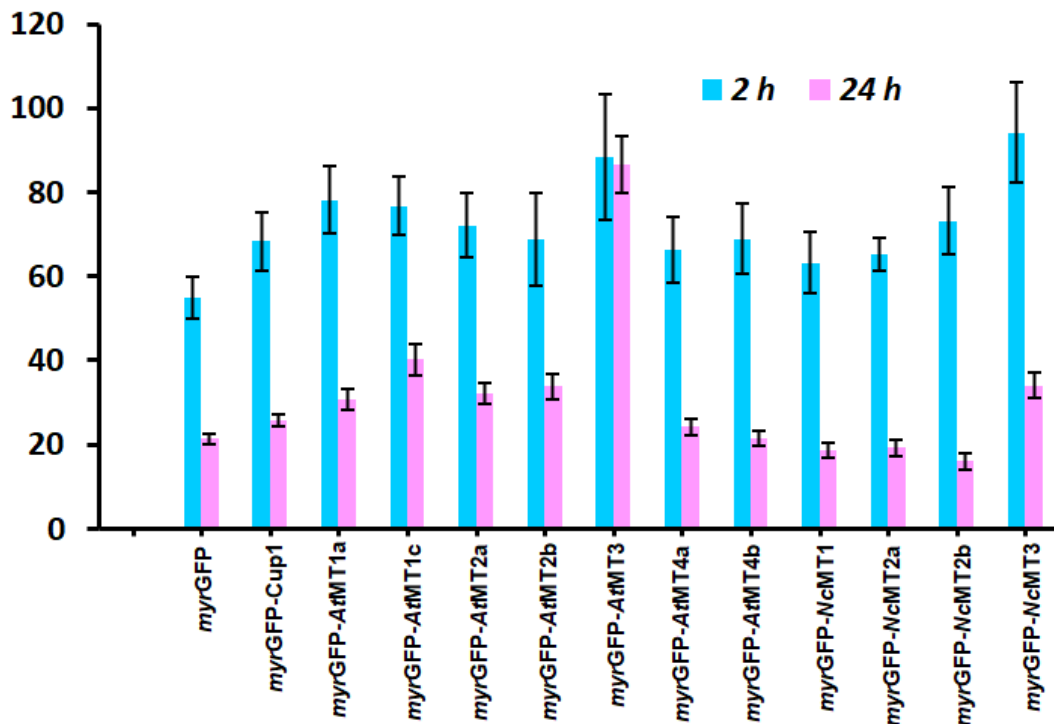
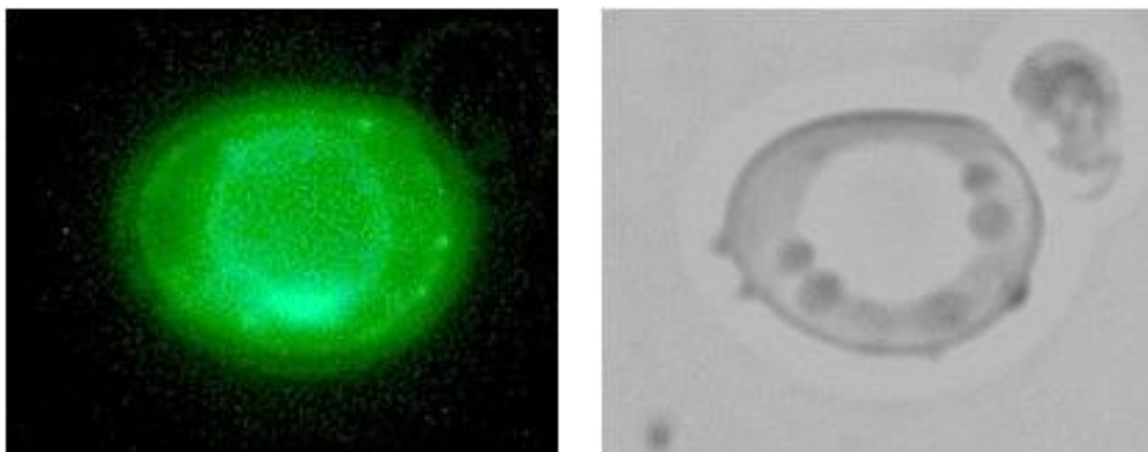


Figura A.2.5. Efectul expunerii Ag asupra viabilității celulelor de drojdie care exprimă metalotioneine

S. cerevisiae ce exprimă myrGFP-AtMT3 prezintă viabilitate celulară mare, chiar și după 24 h de expunere la Ag⁺.

În **Figura A.2.6.** este prezentat un ansamblu de imagini de microscopie optică pentru linia celulară *myrGFP-Cup1*, în care se observă acumularea clusterelor de Ag pe exteriorul peretelui celular și formarea veziculelor citoplasmatică ca răspuns la acumularea metalului.



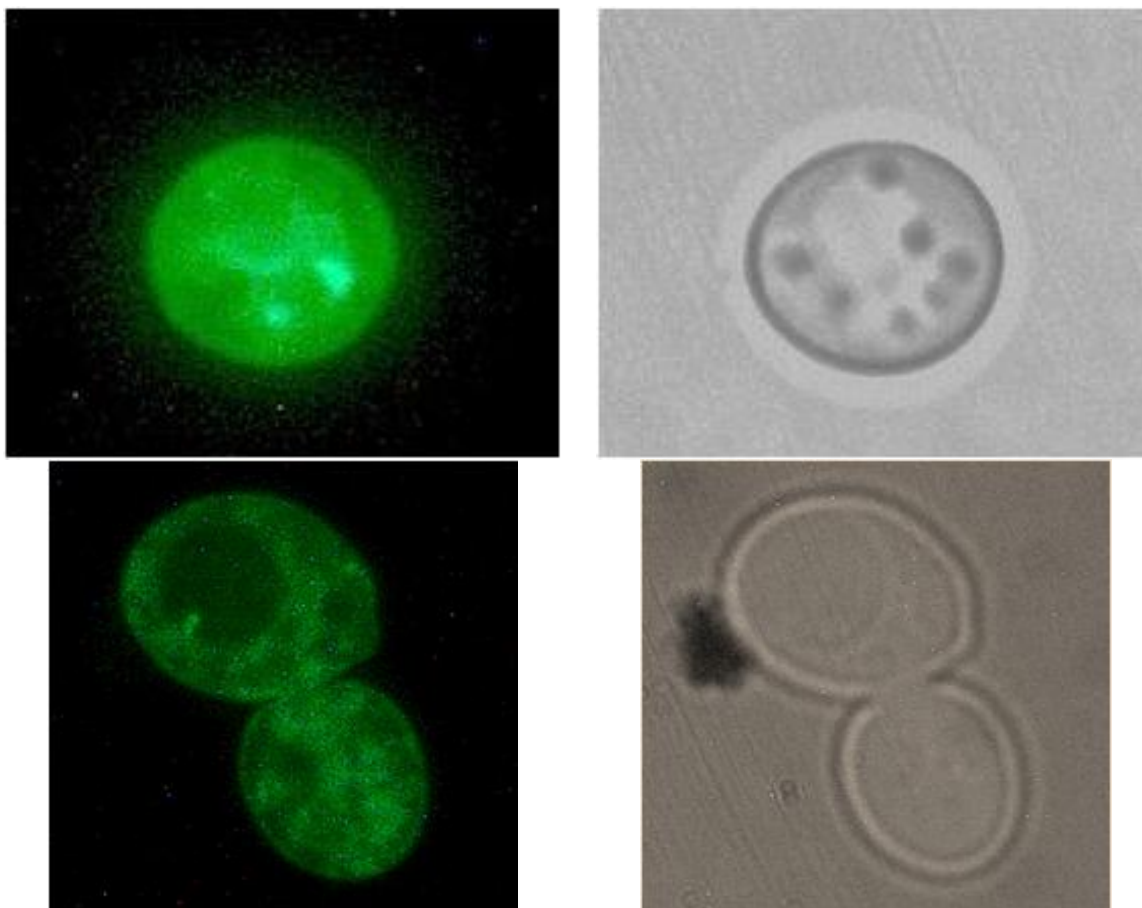


Figura A.2.6. Efectul expunerii Ag asupra liniei celulare *myrGFP-Cup1*

Ca răspuns al expunerii celulelor de *Saccharomyces cerevisiae* la AgNO_3 , numeroasele vezicule evidențiate la nivel intracelular au rol în preluarea metalului, posibil sub formă de nanoparticule (Toxicological Sciences, 150 (2), 473-487. 2016).

A2.3. Prepararea liniilor celulare de drojdie pentru caracterizarea TEM

În etapa experimentală inițială s-au stabilit condițiile pentru evidențierea intracelulară a Ag în linia control de *S. cerevisiae*, experimentul fiind repetat apoi pentru liniile transgenice care au supraexprimat MT.

Mediul de cultură folosit a fost SD-Ura (mediu sintetic), preparat după următoarea rețetă: 0,17 g Yeast Nitrogen Base, 0,5 g sulfat de amoniu, 2 g glucoză, 5 mL amestec aminoacizi și apă deionizată până la 100 mL. Pentru mediu solid, s-a folosit 2% agar. Mediul obținut a fost autoclavat la 121 °C, 21 min, înainte de inoculare sau turnare în plăci. Acest mediu a fost suplimentat cu 40 mg/L leucină pentru îmbunătățirea creșterii și concentrații controlate de AgNO_3 au fost adăugate înainte de utilizare.

În tuburi Falcon de 50 mL s-au introdus 5 mL mediu lichid SD-Ura, preparat conform rețetei anterioare și s-au inoculat celule de *S. cerevisiae* testate. Tuburile au fost

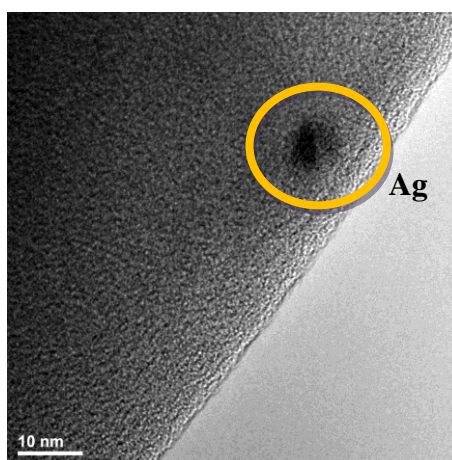
incubate peste noapte (16 ore) într-un agitator orbital la 250 rpm, 28°C. Dimineața s-au realizat diluții 1/10 folosind mediu proaspăt SD și celule din suspensiile de peste noapte, astfel încât suspensiile obținute au avut o densitate de aprox. 10^6 celule/mL. Celulele au fost spălate și apoi transferate pe mediu SGal-Ura pentru inducerea transgenelor. După 2 h de incubare la 250 rpm, 28°C, în culturile celulare s-a adăugat Ag(I) 0,05 mM (concentrație finală), dintr-o soluție stoc de 0,1 M AgNO₃ sterilă. Tuburile s-au incubat încă 60 de minute în aceleași condiții de lucru, după care din fiecare tub s-a prelevat 1 mL suspensie celulară ce a fost centrifugată la 4000 rpm, 3 min, s-a aruncat supernatantul, iar celulele rămase au fost spălate de 2 ori în MES-TRIS pH 6,8. Sedimentul celular a fost preluat în 100 μL MES-TRIS și păstrat la 4 °C, până la analiza TEM.

Caracterizarea de înaltă rezoluție TEM și analiza elementală EDX au fost utilizate pentru verificarea capacității liniilor celulare de a acumula Ag din mediu. În acest sens, celulele de drojdie au fost depuse direct pe o grilă de cupru și uscate.

A2.4. Vizualizarea nano particulelor metalice în *Saccharomyces cerevisiae* prin caracterizarea TEM

Celulele de *S. cerevisiae* au o capacitate mare de legare a ionilor metalici datorită peretelui celular cu încărcare global negativă. În plus, celulele active din punct de vedere metabolic preiau ionii metalici din mediul de cultură prin căi normale de transport membranar. Odată ajunși în celulă, toxicitatea ionilor metalici este scăzută prin sechestrarea acestora mediată de metalotioneine.

În **Figura A.2.7.** este prezentat rezultatul caracterizării TEM cuplat cu EDX pentru linia celulară control (*myrGFP*).



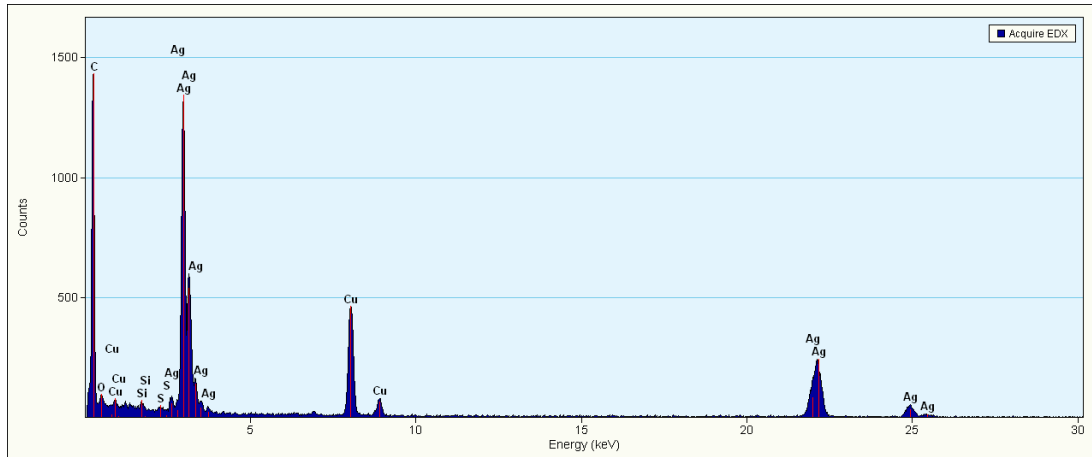
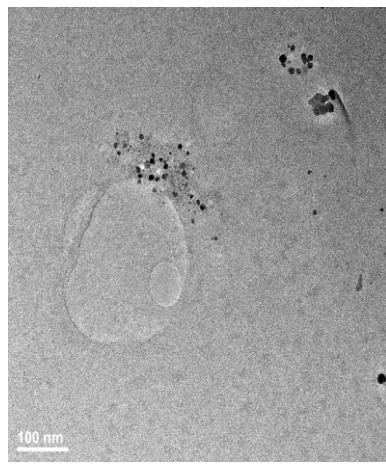


Figura A.2.7. Caracterizare TEM și EDX a liniei celulare *myrGFP*

Se observă că celulele au acumulat Ag pe fața internă a peretelui celular. Analiza elementală EDX confirmă prezența Ag, alături de C, O, S, Si, provenit de la celule. Peak-urile corespunzătoare Cu se datorează utilizării grilei de cupru ca suport pentru imobilizarea celulelor.

În **Figura A.2.8.** este prezentat rezultatul caracterizării TEM cuplat cu EDX pentru linia celulară *myrGFP-Cup1*.



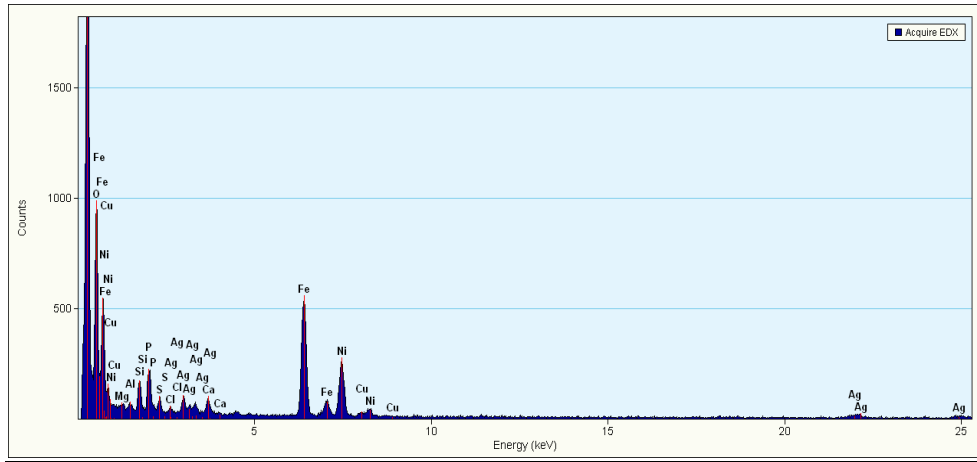


Figura A.2.8. Caracterizare TEM și EDX a liniei celulare myrGFP-Cup1

Liza celulară justifică existența compușilor organici alături de clustere de Ag.

Figura A.2.9. ilustrează rezultatele caracterizării TEM cuplat cu EDX pentru linia celulară myrGFP-AtMT1c.

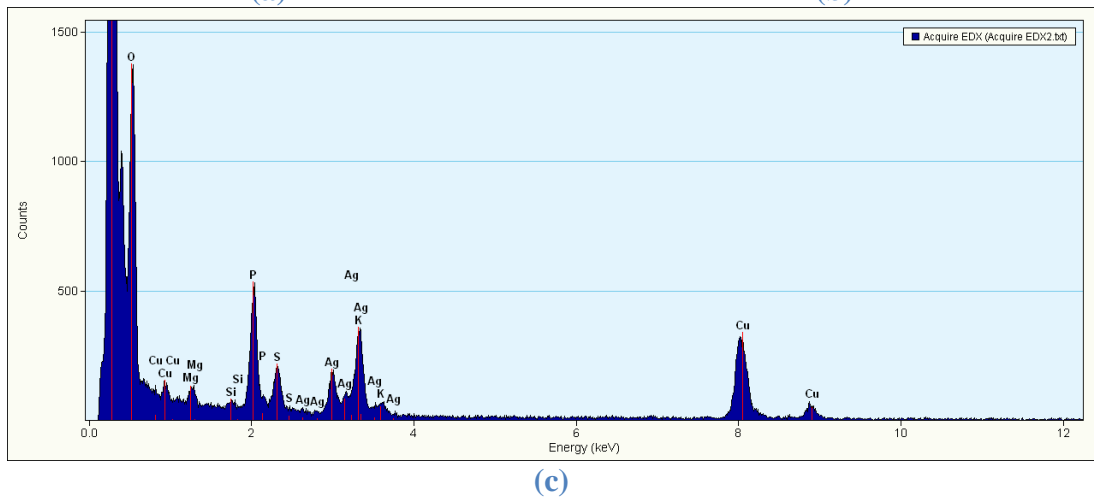
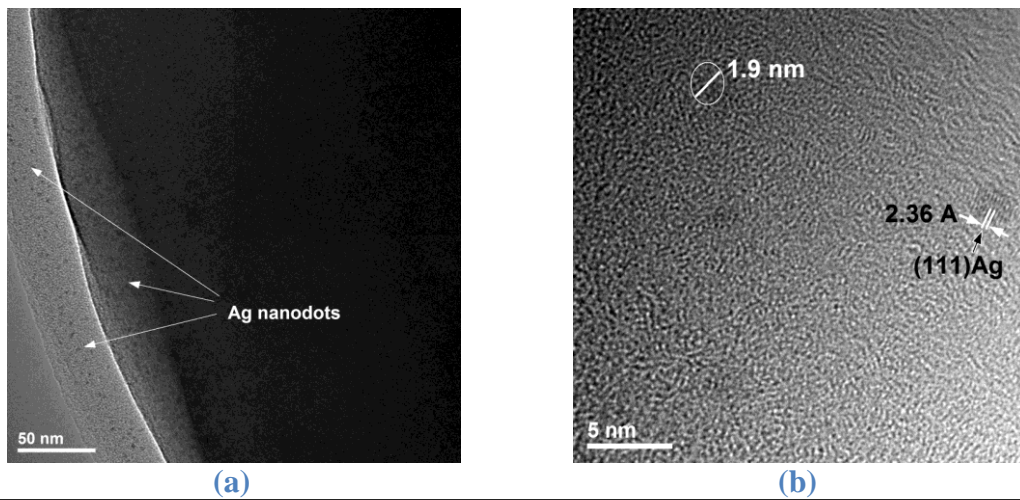


Figura A.2.9. Nanoparticule de Ag, evidențiate la nivelul peretelui celular (TEM)

Caracterizarea TEM (**Figura A.2.9. (a)**) evidențiază prezența Ag, sub formă de nanoparticule uniform dispersate la nivelul peretelui celular și pe fața internă a acestuia, analiza la înaltă rezoluție (HR-TEM) (**Figura A.2.9. (b)**) relevând plane cristalografice specifice Ag $\langle 111 \rangle$, cu distanța interplanară de 2,36 Å, nanoparticulele având dimensiuni cuprinse între 1,8 -2,6 nm. Analiza EDX (**Figura A.2.9. (c)**) atestă prezența Ag la nivel celular, cele mai bune rezultate fiind obținute pe această linie celulară.

A.2.5. Concluzii

Studiile referitoare la metalotioneine relevă capacitatea lor indisputabilă de a lega metale xenobiotice, datorită existenței grupărilor Cys, ce reprezintă peste 20% din conținutul acestora în aminoacizi. Prin obținerea celulelor de drojdie care supraexprimă metalotioneine recombinante este facilitată acumularea unor cantități mari de metale, ceea ce deschide calea către obținerea nanoparticulelor clonabile, cu aplicabilitate în vizualizarea proteinelor de interes prin microscopia electronică și în nanobiotehnologie.