

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901762618A1

Publication Date

20110304

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Title

CHIP NANOFORATO DI NITRURO DI SILICIO PER L'ANALISI DI PROFILI DI
ESPRESSIONE GENICA E RELATIVI BIOSENSORI.

secondo l'invenzione permette di analizzare, in diverse patologie (tumoriali e non), i profili di espressione genica a partire da campioni biologici di varia natura (materiale bioptico, sangue periferico o midollare ecc.). Tale applicazione consente di valutare marcatori molecolari con significato prognostico e/o consentire un migliore inquadramento del paziente nelle categorie di rischio e la conseguente personalizzazione della terapia. In particolare, il dispositivo permette di identificare SNP in campioni biologici di diverse patologie (tumoriali e non). Essendo noto che gli SNP sono associati alla suscettibilità di alcune malattie e alla diversa risposta alla terapia farmacologica, tale analisi consentirà di effettuare un fingerprinting dei pazienti al fine di valutare la predisposizione a patologie e la risposta ai farmaci. Inoltre, il dispositivo secondo l'invenzione può essere utilizzato per applicazioni in campo botanico, zootecnico e zooprofilattico, ad esempio per l'identificazione di OGM in alimenti o in coltivazione o per la caratterizzazione di virus.

~~Ferma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un chip~~ comprendente o consistente in una membrana di nitruro di silicio nanoforata, ^{ovvero} in cui i nanofori ^{di} hanno diametro efficace ~~compreso da 20 a 100 nm, preferibilmente da 20 a 50 nm e lo spessore della membrana varia da 10 nm a 100 nm, preferibilmente da 10 nm a 50 nm, e ancora più preferibilmente da 10 a 20 nm.~~

I nanofori possono essere formati mediante fascio di ioni focalizzati, ad esempio mediante l'impiego di un

microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo a risoluzione ultra alta con fascio di ioni focalizzati.

forma presente oggetto specifico della presente invenzione
 La presente invenzione concerne inoltre un biosensore *il biosensore di tipo di risposta rapida* comprendente il o consistente nel chip *il chip* come definito sopra, in cui almeno un nanoforo *complementare ad una molecola target, detta oligonucleotide* è funzionalizzato con un oligonucleotide di lunghezza da 13,6 nm a 18,7 nm, preferibilmente 15,3 nm, i nanofori possono essere funzionalizzati con oligonucleotidi uguali o diversi tra loro. Il diametro efficace *per i nanofori funzionalizzati con* del biosensore *note* può variare da 3 a 20 nm, preferibilmente da 4 a 10 nm, ancora più preferibilmente da 4 a 6 nm.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un procedimento di preparazione del biosensore descritto sopra comprendente o consistente nelle seguenti fasi: a) deposizione di una soluzione di oligonucleotide di lunghezza da 40 a 55 basi, preferibilmente 45 basi, detta soluzione avendo una concentrazione che varia da 10 a 200 nM, preferibilmente 100 nM in acqua bidistillata oppure in SSC 2X ossia una soluzione di 0,3 M cloruro di sodio, 0,03 M citrato di sodio e pH 7,1; b) disattivazione della superficie del biosensore. La disattivazione della superficie del biosensore può avvenire mediante lavaggi con una soluzione di ammoniaca 28% e successivi lavaggi con acqua bi-distillata.

La presente invenzione concerne inoltre un dispositivo per la rilevazione di ~~sequenze~~ *molecole di DNA* oligonucleotidiche comprendente ~~il chip o il biosensore~~ come definito sopra. Il dispositivo può comprendere

[X] *del diametro efficace essendo definito come* $d_{eff} = 2 \sqrt{\frac{l}{\pi R}}$ *in cui R è la resistenza elettrica del nanoforo, l è la lunghezza delle molecole e S è la conducibilità di una soluzione porosa in cui il nanoforo è immerso.*

[O] *a) trattamento del substrato con una soluzione 10% in etilene di ossido in acqua per 1 ora, a temperatura ambiente e per un'ora in soluzione 5% di 1,6-pentano-diolo in acqua a temperatura ambiente;*

ulteriormente due serbatoi contenenti una soluzione ionica comunicanti attraverso i nanofori e due elettrodi per l'applicazione di una tensione e rilevazione di corrente.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso ^{della} ~~del chip o del~~ biosensore o del dispositivo come definiti sopra per rilevazioni di molecole ^{di DNA} ~~oligonucleotidiche~~ in campo medico, botanico, zootecnico o zooprofilattico.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati in cui:

Figura 1 mostra uno schema di cella tratto da A J Storm, J H Chen, H W Zandbergen, and C Dekker, Translocation of double-strand dna through a silicon oxide nanopore. Physical Review, 71:051903, 2005 [8].

Figura 2 mostra la cella della figura 1 posizionata su un tavolo antivibrante all'interno di una doppia gabbia di Faraday.

Figura 3 mostra una rampa di corrente rilevata applicando diverse tensioni alla cella di misura contenente il chip nanoforato (figura 3A) e la curva tensione-corrente ricostruita a partire dalla rampa di corrente con evidenziato in linea tratteggiata il fit lineare realizzato per ricavare una stima della resistenza R del nanoporo (figura 3B).

Figura 4 mostra uno schema di nanoporo in cui r è il raggio e l la lunghezza.

RIVENDICAZIONI

[0]

1) Chip comprendente o consistente in una membrana di nitruro di silicio nanoforata ^{ovvero} in cui i nanofori ^e hanno diametro efficace ~~comprende~~ da 20 a 100 nm, preferibilmente da 20 a 50 nm ~~La~~ spessore della membrana varia da 10 nm a 100 nm, preferibilmente da 10 nm a 50 nm, e ancora più preferibilmente da 10 a 20 nm.

2) Chip secondo la rivendicazione 1, in cui i nanofori sono formati mediante fascio di ioni focalizzati.

3) Biosensore ^{per l'analisi di profili di espressione genica} comprendente o consistente ^{in un} chip ^{detto chip} [0] come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-2, in cui almeno un nanoforo è funzionalizzato con un oligo nucleotide ^{complementare ad una molecola target} di lunghezza da 13,6 nm a 18,7 nm, preferibilmente 15,3 nm, [X]

4) Biosensore secondo la rivendicazione 3, in cui i nanofori sono funzionalizzati con oligonucleotidi uguali o diversi tra loro.

5) Biosensore secondo ognuna delle rivendicazioni 3-4, in cui ^{derivanti dai funzionalizzati} il diametro efficace ^{da 3 a 20 nm} varia da 3 a 20 nm, preferibilmente da 4 a 10 nm, ancora più preferibilmente da 4 a 6 nm.

3) Procedimento di preparazione del biosensore secondo ognuna delle rivendicazioni ¹⁻² 3-5, comprendente o consistente nelle seguenti fasi: ^[0] A) deposizione di una soluzione di oligonucleotide di lunghezza da 40 a 55 basi, preferibilmente 45 basi, detta soluzione avendo una concentrazione che varia da 10 a 200 nM, preferibilmente 100 nM in acqua bidistillata oppure in una soluzione di 0,3 M cloruro di sodio, 0,03 M citrato

[X] detto diametro efficace essendo definito come $d_{eff} = 2 \sqrt{\frac{l}{5\pi R}}$ in cui R è la resistenza elettrica del nanoforo, l è lo spessore della membrana e σ è la conduttività di una soluzione data in cui il nanoforo è immerso.

[0] e) Trattamento del substrato con una soluzione 10% in etanolo di un reagente propiltrimossil silico a 1 ora a temperatura ambiente e poi con una soluzione 3% di 1,4-fenilene-diol trimossilato in dimetilsolfossidolo per 5 ore a temperatura ambiente.

di sodio, pH 7,1; b) disattivazione della superficie del biosensore.

4 ~~7~~ ³ Procedimento secondo la rivendicazione ~~6~~, in cui la disattivazione della superficie del biosensore avviene mediante lavaggi con una soluzione di ammoniaca 28% e successivi lavaggi con acqua bi-distillata.

5 ~~8~~ ⁴ Dispositivo per la rilevazione di ^{molecole} ~~sequenze~~ ^{di DNA} oligonucleotidiche comprendente il ^{biosensore} ~~chip~~ come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-2 e ~~il biosensore come definito in ognuna delle rivendicazioni 3-6~~.

6 ~~9~~ ⁵ Dispositivo secondo la rivendicazione ~~6~~, comprendente ulteriormente due serbatoi contenenti una soluzione ionica comunicanti attraverso i nanofori e due elettrodi per l'applicazione di una tensione e rilevazione di corrente.

7 ~~10~~ ⁶ ~~Uso del chip come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-2 o del biosensore come definito in ognuna delle rivendicazioni 3-6~~ ⁴⁻² o del dispositivo come definito in ognuna delle rivendicazioni ~~5-6~~ ⁵⁻⁶ per rilevazioni di ^{di DNA} ~~oligonucleotidiche~~ molecole in campo medico, botanico, zootecnico o zooprofilattico.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1) Chip comprising or consisting in a silicon nitride nanopore membrane, wherein the effective diameter is comprised from 20 to 100 nm, preferably from 20 to 50 nm and the membrane thickness ranges from 10 nm to 100 nm, preferably from 10 nm to 50 nm and more preferably from 10 to 20 nm.

2) Chip according to claim 1, wherein nanopores are made by means of a focused ion beam.

3) Biosensor comprising or consisting of the chip as defined in anyone of the claims 1-2, wherein at least one nanopore is functionalized with a oligonucleotide having length from 13,6 nm to 18,7 nm, preferably 15,3 nm.

4) Biosensor according to claim 3, wherein the nanopores are functionalized with oligonucleotides each other equal or different.

5) Biosensor according to anyone of the claims 3-4, wherein the effective diameter ranges from 3 to 20 nm, preferably from 4 to 10 nm, more preferably from 4 to 6 nm.

6) Process for the preparation of the biosensor as defined in anyone of the claims 3-5, comprising or consisting of the following steps: a) depositing a solution of a oligonucleotide having length from 40 to 55 basis, preferably 45 basis, said solution having a concentration ranging from 10 to 200 nM, preferably 100 nM in bidistilled water or in a solution of sodium chloride 0,3 M, sodium citrate 0,03 M, pH 7,1; b) deactivation of the biosensor surface.

7) Process according to claim 6, wherein the deactivation of the biosensor surface is made by means of rinsing with an ammonia solution 28% and subsequent rinsing with bidistilled water.

8) Device for the detection of oligonucleotides sequences comprising the chip as defined in anyone of the claims 1-2 or the biosensor as defined in anyone of the claims 3-6.

9) Device according to claim 8, further comprising two tanks containing a ionic solution, said tanks communicating through the nanopores, and two electrodes for the application of voltage and voltage dection.

10) Use of the chip as defined in anyone of the claims 1-2 or the biosensor as defined in anyone of the claims 3-6 or the device as defined in anyone of the claims 8-9 for the detection of oligonucleotide molecules in medical, botanic, zootechnic, or zooprophylactic fields.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Life

12/12

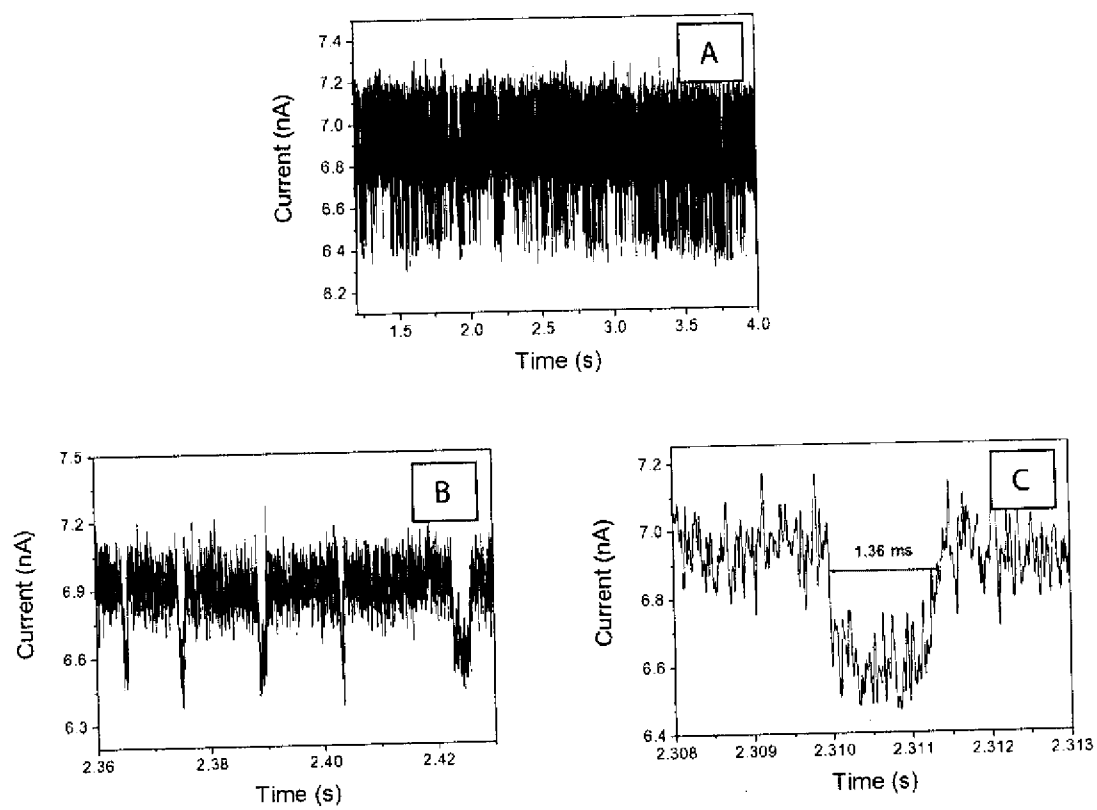


Fig. 18