



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA
ELETTRICA ED ELETTRONICA
Piazza d'Armi - 09123 CAGLIARI (I)
Tel. +39 070 675 5889 - Fax +39 070 675 5900
<http://www.diee.unica.it>



**SARDIGNA CHIRCAS
SARDEGNA RICERCHE**

PROGETTO DI RICERCA COLLABORATIVA

RNA4CoV: MESSA A PUNTO DI UN SENSORE PORTATILE PER UNO SCREENING PRELIMINARE DEL SARS-CoV-2 (DET. DG 543 PST DEL 28/04/2020)

Relazione Conclusiva sull'attività di ricerca

05/05/2020-05/11/2020

L'obiettivo del progetto è sviluppare un sistema portatile di analisi dell'RNA virale che possa essere utilizzato per la rilevazione del SARS-CoV-2 in matrici biologiche facili da ottenere (saliva), e in grado di fornire un risultato di screening sufficientemente preciso, da confermare successivamente con l'analisi del tampone orofaringeo.

La prima fase del progetto, iniziato il 05/05/2020 e in conclusione il 05/11/2020 (in seguito a proroga dei termini, come da DET DG 849 PST del 29/07/2020) mira alla validazione del funzionamento del sensore elettronico, ovvero alla sua capacità di rilevare in acqua sequenze di RNA identificate come proprie del SARS-CoV-2.

La prima attività svolta è consistita nella selezione di una sequenza di basi nell'RNA virale che fosse caratteristica del SARS-CoV2 rispetto ad altri coronavirus, e nella progettazione di sonde adatte alla rilevazione di tale sequenza. L'attività di selezione della sequenza caratteristica dell'RNA target si è concentrata sulla regione Orf3a del genoma virale (Reference Sequence NC_045512.2). In questa sezione, è stato selezionato un sotto-insieme di 150 nucleotidi sulla base della minore omologia con le sequenze di altri virus mediante algoritmi di allineamento (BLAST) verso database pubblici. Sulla base della sequenza target così identificata, sono state disegnate tre sonde complementari a un RNA sintetico target rappresentante una porzione del genoma di SARS-CoV-2. Le sonde, indicate come P1, P2 e P3, hanno lunghezza variabile tra 29 e 33nt, e sono progettate per rilevare tre diverse regioni dell'RNA target. I criteri di selezione adottati consistono nella ricerca dell'unicità di sequenza mediante BLAST e una composizione in basi che favorisca l'ibridazione specifica delle sonde all'RNA target alle diverse condizioni termodinamiche (temperatura e concentrazioni saline) dettate dal campione (saliva o tampone rinofaringeo) e dal sistema di rilevazione (sensore).

Il sensore investigato sfrutta come trasduttore un transistor organico a modulazione di carica (Organic Charge-Modulated Field-Effect Transistor, OCMFET), già brevettato dal Dipartimento di Ingegneria Elettrica ed Elettronica dell'Università di Cagliari. La struttura di principio del dispositivo è mostrata in Figura 1.

Si tratta di un dispositivo ottenuto dalla modifica di un normale transistor organico ad effetto di campo (Organic Field-Effect Transistor, OFET), in modo da incorporare un gate flottante (ovvero non connesso elettricamente). Parte del gate flottante, esposta all'ambiente di misura, funge da area sensibile, sulla quale avviene la rilevazione della reazione biochimica di interesse.

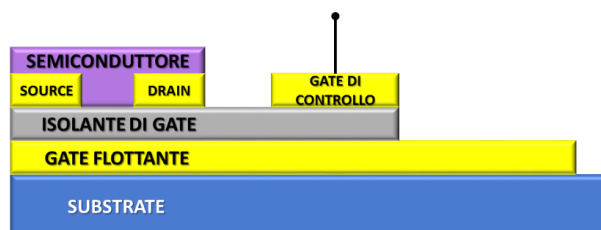


Figura 1: Schema di principio dell'OCMFET

Nel corso del progetto, sono stati realizzati 15 dispositivi, per un totale di 45 sensori OCMFET che saranno coinvolti nelle misure di test. In Figura 2, sono mostrate delle misure esemplificative di un sensore OCMFET caratterizzato come semplice transistor. In particolare, sono riportate una caratteristica ingresso-uscita (a) e la corrispondente caratteristica di trasferimento (b). È possibile notare che i dispositivi sono in grado di operare a bassa tensione. Questa caratteristica è fondamentale per il corretto funzionamento del sensore, in quanto elevate tensioni operative potrebbero essere deleterie per la stabilità delle molecole, e fondamentale per garantire la portabilità del kit che si dovrà sviluppare. Le caratteristiche testimoniano

inoltre il corretto funzionamento del transistor, che mostra un buon effetto di campo con separazione quadratica delle curve, una buona saturazione della corrente e, dalla caratteristica di trasferimento, un'isteresi trascurabile a dimostrazione di un'interfaccia ideale tra isolante e semiconduttore. Inoltre, la corrente I_{GS} , che scorre tra gate di controllo e source, è molto bassa.

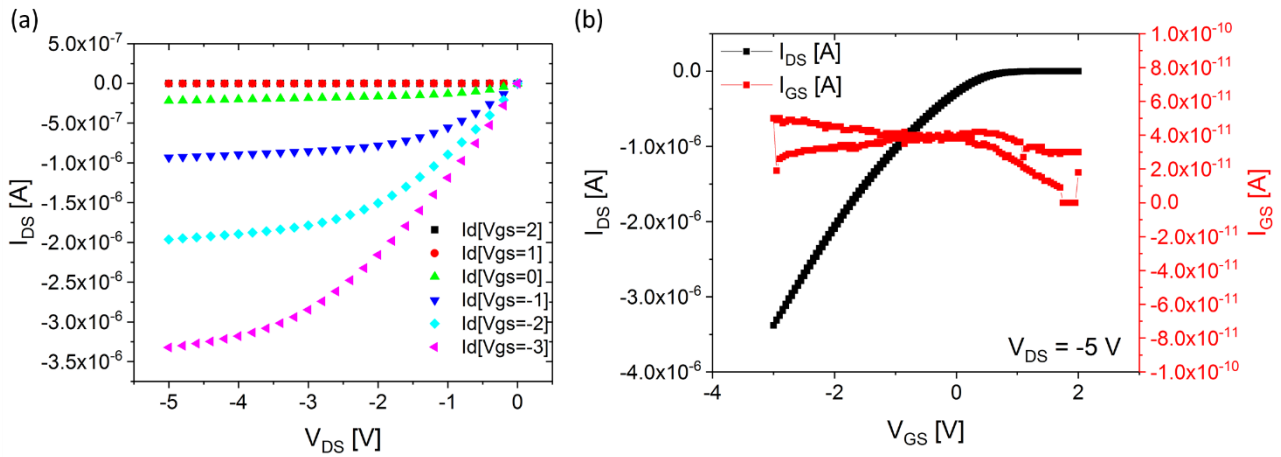


Figura 2: caratteristica ingresso-uscita (a) e di trasferimento (b) di un tipico sensore OCMFET realizzato.

Una volta progettati i sensori e le sonde, si è quindi provveduto a identificare una procedura di immobilizzazione di queste ultime sull'area sensibile. Questa deve garantire da un lato che le molecole siano in grado di ancorarsi efficacemente alla superficie sensibile del sensore, ma deve essere contemporaneamente tale da garantire una buona efficienza di ibridazione tra le sonde immobilizzate e le molecole target da rilevare. Infatti, una concentrazione troppo bassa di sonde immobilizzate ridurrebbe la quantità di carica a disposizione per la trasduzione, impattando sull'efficacia del sensore, ma similmente una concentrazione troppo elevata renderebbe inefficiente l'ibridazione per via dell'eccessivo ingombro sterico, con simili conseguenze sulla funzionalità del dispositivo.

La verifica delle più corrette condizioni di immobilizzazione è avvenuta utilizzando una delle sequenze sonde progettate, P1, e utilizzando come riferimento una sequenza nota di DNA, denominata T0, per le quali erano state precedentemente approntati specifici protocolli di funzionalizzazione¹.

Si è proceduto in prima istanza a verificare in modo semi-quantitativo le caratteristiche del film di sonde tramite misure di microscopia a fluorescenza, utilizzando molecole modificate con un marcatore fluorescente. La funzionalizzazione è avvenuta su superfici d'oro realizzate secondo le medesime procedure utilizzate per la fabbricazione dei sensori.

La Figura 3(a) riporta i risultati della luminanza (brightness), un parametro estratto sulla base dei livelli di radiazione CYM (ciano, giallo e magenta) ricavate dalle immagini a fluorescenza. Questi colori sono quelli più rappresentativi della banda di emissione del marcatore fluorescente utilizzato, la Cianina 3. La luminanza è stata calcolata secondo la procedura riportata in Lai et al.². Nel grafico è riportato con funzione di riferimento (REF) il livello di auto-fluorescenza riscontrato su un'area d'oro non funzionalizzata. La misura sulla sonda T0, eseguita a varie concentrazioni, ha consentito di valutare la corretta dipendenza del livello di segnale dalla concentrazione iniziale di sonde presente nella soluzione. È interessante notare come la luminanza ricavata

¹ Per ulteriori informazioni, si faccia riferimento, ad esempio, a Lai et al., *Advanced Materials* 25 (2013), 103-105, o a Lai et al., *Sensors and Actuators B: Chemical* 233 (2016), 314-319.

² Lai et al., *Applied Physics Letters* 107 (2015), 103301.

per P1 e per T0, a parità di concentrazione iniziale, sia confrontabile, a dimostrazione del fatto che la procedura di funzionalizzazione individuata sia valida. Le immagini in Figura 3(b) e Figura 3(c) mostrano i risultati della fluorescenza, dai quali è possibile notare come le due diverse sonde, pur presentando un livello di fluorescenza simile, mostrino caratteristiche morfologiche differenti, con una maggior tendenza alla formazione di cluster da parte della sonda P1 (Figura 3(b)) rispetto alla sonda di DNA T0, la quale pare più uniformemente distribuita sulla superficie.

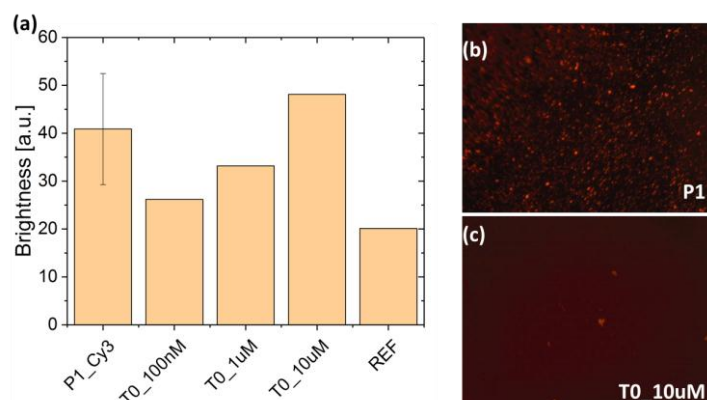


Figura 2: (a) livelli di luminanza ricavati per le sonde P1 e T0 (a diverse concentrazioni) con indicazione del rumore di fondo (REF); (b) e (c): emissione fluorescente delle aree sensibili funzionalizzate con P1 e T0 rispettivamente, alla concentrazione di 10 μ M.

Si è quindi proceduto a verificare che le condizioni di funzionalizzazione individuate risultassero efficienti per la corretta funzionalità del sensore elettronico. Si sono quindi ripetuti i test descritti in Figura 3, verificando la risposta all'ibridazione della sonda P1 in presenza di molecole target perfettamente complementari (T1_FC) e non complementari (T1_FNC). Tale misura, inoltre, consente di valutare preliminarmente l'ordine di grandezza del tempo di risposta del sensore, informazione utile per l'esecuzione dei test successivi.

Sfruttando il numero di sensori presenti su ciascun substrato, si è approntato il seguente protocollo di test:

1. Un dispositivo, non funzionalizzato con le sonde, viene utilizzato come riferimento (REF);
2. Un dispositivo viene funzionalizzato con le sonde, ed esposto alle molecole target non complementari;
3. Un dispositivo viene funzionalizzato con le sonde, ed esposto alle molecole target complementari.

Il dispositivo di riferimento REF mostra una lieve variazione aspecifica di corrente in seguito al solo inserimento di PBS e quando è esposto alle catene target, al pari del sensore funzionalizzato ed esposto alle molecole non complementari (curva blu). Questo dimostra che, in assenza di ibridazione, il sensore funzionalizzato non è in grado di mostrare risposte aspecifiche alla carica presente in soluzione. Quando invece si considera il sensore funzionalizzato esposto alle molecole target complementari la variazione di corrente più rapida e più che doppia (oltre il 4% di variazione percentuale). Se si aumenta il tempo di misura per consentire la completa saturazione della risposta del sensore l'ampiezza della variazione di corrente raggiunge circa il 10%.

Una volta verificata la funzionalità del sensore, si è infine proceduto alla valutazione delle sue prestazioni nella rilevazione di sequenze di RNA caratteristiche del SARS-CoV-2 in condizioni rappresentative dell'applicazione finale. A tale scopo, sono state acquistate delle sequenze di RNA sintetico di 120 basi, contenenti le porzioni complementari alle sonde P1 e P2 progettate.

Anche in questo caso, si sono utilizzati dei dispositivi di riferimento per la verifica di variazioni aspecifiche della corrente. I dispositivi di riferimento, sia nel caso di esposizione al PBS sia nel caso di esposizione alla sequenza target, mostrano una lenta deriva della corrente, che nel tempo dell'esperimento (3800 secondi) non supera il 4% del valore della corrente di base. Sia nel caso di P1 che nel caso di P2, invece, la variazione di corrente è decisamente più ampia, arrivando a un valore prossimo all'8%. Queste misure consentono di dimostrare che entrambe le sonde sono adeguate al riconoscimento della sequenza di RNA individuata.

Riducendo la concentrazione della molecola target, il segnale si riduce notevolmente. Il decadimento del segnale nel passaggio dalla concentrazione 1 μ M a quella 10 nM suggerisce che il limite di quantificazione di tale sensore è verosimilmente compreso tra queste due concentrazioni.

Riassumendo, la prima fase del progetto ha raggiunto i seguenti obiettivi:

1. è stata identificata una sequenza nell'RNA virale che distingue SARS-CoV2 da altri virus e coronavirus;
2. sono state progettate delle sonde in grado di rilevare tale sequenza;
3. sono stati progettati e realizzati sensori per la rilevazione dell'RNA virale ed è stato approntato un protocollo per la loro funzionalizzazione con le sonde progettate;
4. è stata dimostrata la capacità di rilevazione delle sequenze di RNA virale (utilizzando sequenze sintetiche) in diverse modalità di funzionamento.

Il raggiungimento di questi ultimi due obiettivi realizza inoltre la milestone del progetto.