

Relazione scientifica dell'attività svolta dalla Dr Tiziana Conese nell'ambito del programma di ricerca STM svolto presso L'IBBE (Bari) dal 15/11/2014 al 25/11/2014.

Titolo del programma: Sopravvivenza cellulare su substrati plasmonici preparati per SERS (Surface Enhanced Raman Diagnostic)

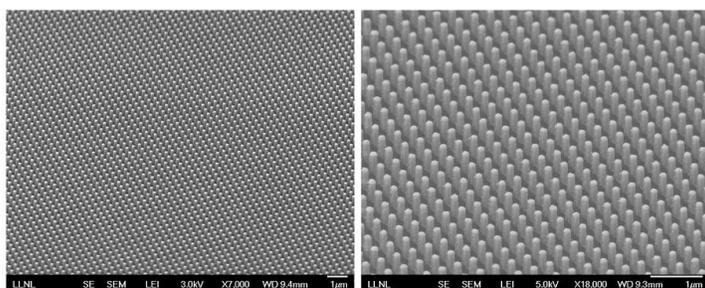
Motivazione della ricerca:

La spettroscopia Raman è una tecnica che consente l'analisi in vivo ed in tempo reale della composizione chimica e strutturale delle molecole. Alcuni studi recenti hanno dimostrato la capacità di questa tecnica di fornire informazioni funzionali sulle cellule in varie condizioni ambientali. La limitazione della tecnica è la scarsa intensità del segnale Raman che è una risposta delle vibrazioni molecolari in seguito ad una sollecitazione laser esterna. Il recente sviluppo nel campo delle nanotecnologie e sul controllo della qualità delle superfici metalliche ha promosso l'avanzamento di una tecnica che accresce di vari ordini di grandezza il segnale Raman, ovvero la Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), e permettere una grossa sensibilità del segnale accompagnata dalla tipica selettività. La crescita di sensibilità è determinata dalla concentrazione del segnale elettrico della sorgente laser sulla superficie nanometallica che conseguentemente amplifica il segnale scattering proveniente dalle molecole poste in prossimità della superficie SERS.

Lo scopo della collaborazione è quello di mettere a punto un modello che consenta lo studio di trasporti intracellulari e meccanismi molecolari delle cellule ed in particolare nei mitocondri, campo nel quale la Dr. Tonazzi è specializzata, in risposta a stimoli esterni utilizzando la tecnica non invasiva SERS.

Obiettivi:

Il nostro studio prevede l'analisi del segnale SERS di cellule cresciute su substrati preparati presso i laboratori di nanotecnologie del Lawrence Livermore National Laboratories (LLNL) dalla Dr. Conese tramite olografia e che consistono in schiere di nano-antenne di silice di circa 150 nm di diametro e separati l'un l'altro da 150 nm e che vengono definite in altezza tramite attacco chimico-fisico e vengono poi ricoperte da un sottile film di oro (o argento o alluminio). Queste strutture operano come antenne che concentrano il segnale in vicinanza delle molecole.



SERS nanopilastrini in metallo su silice fabbricati a LLNL..

Lo scopo principale di questa collaborazione STM è consistito nel verificare la viabilità di vari tipi cellulari cresciuti su vari substrati SERS. In particolare abbiamo verificato ed analizzato la crescita delle linee cellulari: ChoK1, HepG2 ed NG-108.

Risultati

Sono state utilizzate 3 linee cellulari tutte della ditta ATCC (MTA: Dr. Tonazzi) e per ciascuna linea cellulare sono stati utilizzati i terreni di coltura consigliati.

ChoK1: Ham's F12 (GIBCO): catalogo 21765-029,

HepG2: DMEM low glucose (Sigma-Aldrich): catalogo D6046,

NG-108: DMEM senza piruvato (GIBCO) catalogo 11965.

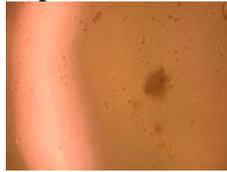
A tutti i terreni sono stati aggiunti Penicillina/Streptomina (100U/l-100 µg/l) ed FBS (Fetal bovine serum - 10%).

Ciascun tipo cellulare è stato cresciuto in flask di 25 cm² in incubatore a 37°C, 5% CO₂. Dopo il raggiungimento della confluenza nel caso delle ChoK1 e quando la densità ha superato il 50% per gli altri tipi cellulari, le cellule sono prelevate, dopo trattamento con tripsina 0.25 % per 5 minuti, e seminate in multiwell da 24 sul cui fondo era stato posizionato il supporto SERS preventivamente trattato (*).

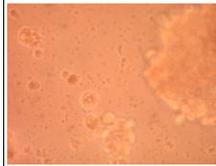
Tutti e tre i tipi cellulari testati si sono dimostrati vitali sui substrati SERS e sono stati fotografati. La densità delle cellule è risultata paragonabile a quanto osservato su normali vetrini.

(*) Supporti SERS immersi separatamente in acetone e sottoposti a sonicazione con potenza 50% , 3 secondi x 10 volte. Successivamente immersi in etanolo assoluto ed infine passati in acqua sterile prima di essere posizionati ciascuno sul fondo di un well con la superficie di nano pilasti in metallo rivolta verso l'alto.

HepG2 > cellule umane di carcinoma epatico

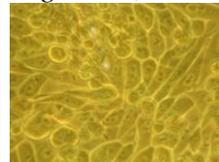
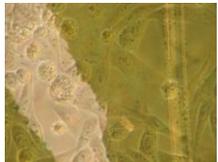


ingrandimento 10 x



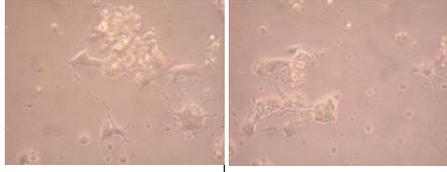
ingrandimento 40 x

Cho K1 > *Cricetulus griseus*, hamster (cellule epiteliali ovariche)



ingrandimento 40 x

NG108 > *Mus musculus* (neuroblastoma); *Rattus norvegicus* (glioma), mouse (neuroblastoma); rat (glioma)



ingrandimento 20 x

Conclusioni:

Lo studio ha dimostrato la capacità delle cellule ad attecchire su tali substrati e crescere con modalità simili a quanto avviene su vetrini da microscopio (crescite avvenute in parallelo). Le cellule sono poi state fissate con paraformaldeide sui supporti SERS che sono stati opportunamente preparati per il trasporto.

Il passo successivo, che è attualmente in fase di elaborazione presso i Lawrence Livermore National Laboratories, è quello di validare l'esistenza il segnale Raman relativo alle cellule, deconvolverlo dal rumore di fondo e da altri segnali interferenti e valutare la sua intensità. Se i segnali Raman lo consentiranno si potrà successivamente prevedere l'applicazione della tecnica su cellule vive per valutare variazioni di segnali Raman in processi metabolici e di trasporto in seguito all'aggiunta ad esempio di composti farmacologici.