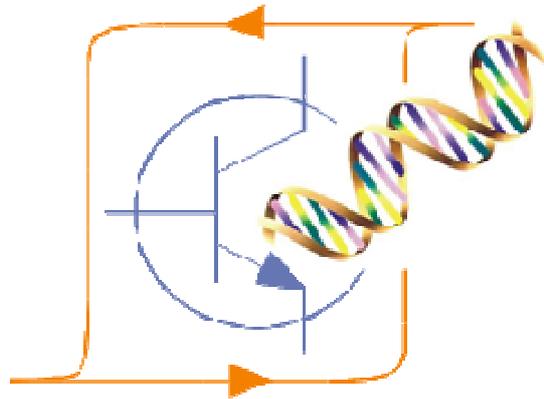


# Spintronic Biosensors for Medicine

SpinBioMed

N. Pratica: 2008-2330



## Relazione sui risultati

*I anno di attività*

*01/04/2009 -31/03/2010*

## **Introduzione**

Lo stato di avanzamento del progetto può essere valutato sulla base dei report scientifici riportati nel seguito per le tre diverse Unità coinvolte nel progetto SpinBioMed:

**Unità I:** Politecnico di Milano –LNESS (POLIMI)

*WP1: Sviluppo dei trasduttori spintronici*

**Unità II:** Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM)

*WP2: Funzionalizzazione della superficie dei biosensori*

**Unità III:** IFOM Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM)

*WP3: Validazione dei biosensori in oncologia*

Inoltre è possibile consultare il sito web del progetto, disponibile all'indirizzo:

<http://lness.como.polimi.it/SpinBioMed/index.html>

In linea generale il lavoro procede con lieve anticipo rispetto alle previsioni iniziali e non si evidenziano particolari criticità per il raggiungimento di tutti gli obiettivi previsti entro la fine del progetto.

Como, 06/04/2010

# Spintronic Biosensors for Medicine

## Report sull'attività svolta dall'Unità I

Gruppo Spintronica - Centro LNESS (POLIMI)

1 aprile 2009 - 31 marzo 2010

Responsabile Scientifico: Prof. R. Bertacco

### RELAZIONE SCIENTIFICA

L'attività svolta dal gruppo Spintronica del Centro LNESS (Politecnico di Milano) nell'ambito del progetto SpinBioMed ha riguardato lo sviluppo di biosensori impieganti dispositivi spintronici secondo quanto previsto dal piano di lavoro nel Work Package 1, la cui descrizione viene sommariamente riportata nel seguito.

#### **WP1: Sviluppo di trasduttori spintronici (POLIMI-Unit I)**

*Lo scopo del WP1 è lo sviluppo di trasduttori spintronici che rilevino la presenza di marcatori magnetici di biomolecole target. In base all'esperienza acquisita dall'Unità I, due tecnologie, che presentano interessanti complementarietà, sono sviluppabili a questo scopo, una basata su giunzioni magnetiche ad effetto tunnel (MTJ) e l'altra su dispositivi che presentano magnetoresistenza anisotropa (AMR). Lo scopo finale è lo sviluppo di una matrice di dispositivi sullo stesso chip, compatibile con i protocolli di immobilizzazione di molecole sonde e per la realizzazione di esperimenti biologici.*

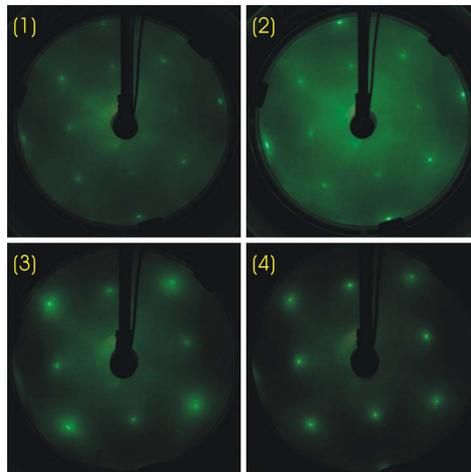
Lo stato di avanzamento del progetto è descritto nel seguito con specifico riferimento ai tasks previsti nella stesura originaria del progetto stesso.

#### **Task 1.1 Sviluppo di trasduttori basati su giunzioni magnetiche ad effetto tunnel (Mese 1-24)**

Durante i primi 12 mesi sono state studiate e caratterizzate diverse interfacce ferromagnete/MgO per migliorare le prestazioni dei dispositivi. Due promettenti sistemi, Fe/MgO e Fe(001)-p(1x1)O/MgO, sono stati caratterizzati con studi di fisica delle superfici focalizzandosi in particolar modo sulle caratteristiche strutturali, le proprietà elettroniche e magnetiche. Ciò ha portato alla

pubblicazione di un lavoro scientifico su rivista internazionale [Ref 1]. Entrambi i sistemi sono ottenuti mediante crescita con epitassia da fasci molecolari (MBE) su substrati di MgO monocristallino; il primo è costituito da un film di Fe che viene pulito tramite trattamenti in ultra alto vuoto e su cui poi viene depositato un film di MgO. Nel secondo caso il film di Fe, dopo la medesima procedura di pulizia viene passivato con uno strato di ossigeno.

In figura 1 sono presentate le immagini LEED (diffrazione di elettroni a bassa energia) acquisite su diverse superfici: (1) 2 ML di MgO depositato a temperatura ambiente su Fe(001), (2) 2 ML di MgO depositato a temperatura ambiente su Fe(001)-p(1x1)O, (3) 4 ML di MgO cresciuto a temperatura ambiente su Fe(001)-p(1x1)O e (4) 4 ML di MgO su Fe(001)-p(1x1)O dopo un trattamento termico a 540K. Si può notare come tutte le immagini presentino punti netti e alto contrasto, rivelando quindi un buon ordine della struttura superficiale. Le strutture presentano equivalente ordine cristallografico e in particolare si può vedere che anche a spessori più alti di MgO (ad esempio si veda l'immagine 3 di figura 1) l'ordine superficiale sia preservato e addirittura migliorato con un trattamento un termico (pannello 4).



**Figura 1:** immagini LEED di : 2 ML di MgO depositato a temperatura ambiente su Fe(001) (1) e Fe(001)-p(1x1)O (2), 4 ML di MgO depositato a temperatura ambiente su Fe(001)-p(1x1)O (3) e successivamente scaldato a 570 K (4).

L'analisi dell'interfaccia ferromagnete/MgO effettuata con spettroscopia di fotoelettroni eccitati da Raggi X (XPS) rivela che la deposizione dell'ossido non altera la chimica della superficie del Fe sottostante, che non cambia il suo stato di ossidazione (nel caso del Fe(001) pulito) o non si ossida ulteriormente (nel caso di Fe(001)-p(1x1)O). Questo risultato è un primo indicatore del fatto che le proprietà del ferromagnete e dell'ossido non sono alterate dalla formazione dell'interfaccia, prerequisiti fondamentali per avere efficiente tunnelling.

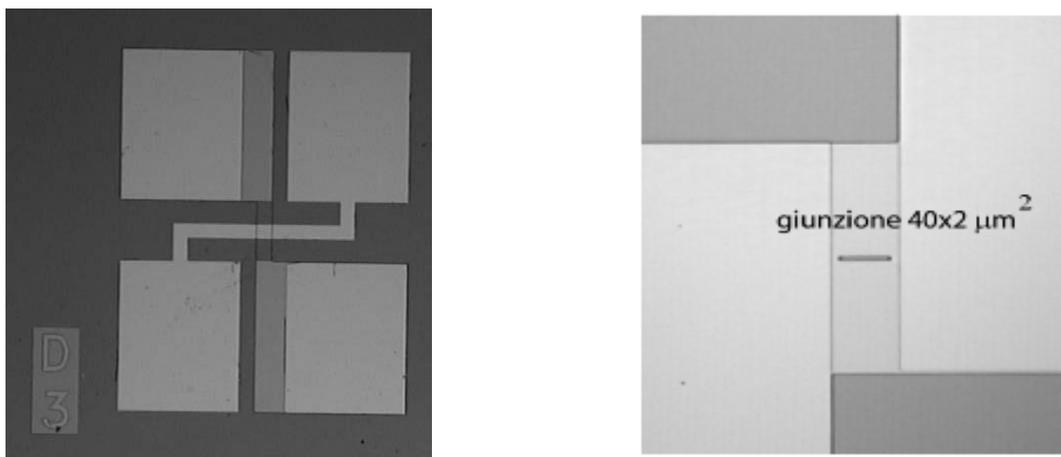
Per quanto riguarda infine la caratterizzazione magnetica delle due interfacce, uno studio con fotoemissione inversa risolta in spin (SPIPE) rivela che le proprietà magnetiche superficiali del ferromagnete (in particolare la polarizzazione in spin degli elettroni coinvolti nel tunnelling) vengono preservate dopo la deposizione dell'MgO in entrambi i casi. In conclusione quindi entrambi i due sistemi rappresentano un buon candidato per giunzioni ad effetto tunnel.

Con l'upgrade del sistema di deposizione tramite magnetron sputtering previsto nel progetto e descritto più sotto, è stato possibile iniziare a utilizzare anche altri tipi di ferromagneti, ad esempio FeCo e FeCoB. In particolare quest'ultimo, secondo dati riportati in letteratura, assicura valori di TMR (magnetoresistenza di tunnelling) molto elevati, dell'ordine del 600% a temperatura ambiente.

In parallelo allo studio dei materiali per le eterostrutture, è stato ottimizzato il processo di litografia ottica per la fabbricazione di dispositivi. Nell'attesa che venisse ultimato l'upgrade del sistema da sputtering del laboratorio LNESS si è sfruttata una collaborazione internazionale con il gruppo di P. Freitas (INESC-MN Lisbona) presso il quale un ricercatore di LNESS (M. Cantoni) ha trascorso qualche mese crescendo eterostrutture e acquisendo maggiore dimestichezza con il processo di sputtering. Giunzioni con aree diverse (da  $30 \mu\text{m}^2$  a  $900 \mu\text{m}^2$ ) e forme differenti sono utilizzate per lo studio delle figure di merito delle giunzioni, che sono il prodotto resistenza per area (RA) e la linearità delle stesse. In seguito all'ottimizzazione, il processo risulta altamente riproducibile, dato che i valori di RA ottenuti su diversi dispositivi risultano costanti all'interno dello stesso chip. Il processo di fabbricazione viene effettuato in tre passi:

1. Definizione della mesa, ovvero separazione fisica dei diversi dispositivi all'interno del singolo campione  $10 \times 10 \text{ mm}^2$ . Questo avviene tramite litografia e un processo di etching fisico (ion beam etching).
2. Definizione dell'area di giunzione e isolamento delle giunzioni con  $\text{SiO}_2$ . Anche in questo caso oltre alla litografia si utilizzano ion beam etching e deposizione per sputtering dell'ossido.
3. Deposizione dei contatti inferiore e superiori. La deposizione avviene in questo caso tramite evaporazione elettronica.

In figura 2 sono riportate le immagini acquisite al microscopio ottico della giunzione completa (a sinistra), in cui sono chiaramente visibili i contatti superiori e inferiori, e del particolare (a destra) di una giunzione con area attiva di  $80 \mu\text{m}^2$  dopo il secondo step litografico.



**Figura 2: giunzione completa dopo il terzo passo di litografia (a sinistra); particolare di una giunzione dopo il secondo step (a destra).**

### *Upgrade le sistema di crescita mediante magnetron sputtering*

L'upgrade del sistema per magnetron sputtering esistente presso il laboratorio LNESS è stato condotto, coerentemente con il progetto iniziale, allo scopo di dotare il laboratorio di un apparato versatile per la crescita di eterostrutture complesse su substrati di dimensioni compatibili con lo sviluppo di un processo di micro fabbricazione affidabile. Il sistema per magnetron sputtering presenta ora sette sorgenti confocali differenti per la deposizione su un substrato di FeCo, FeCoB, MgO, Ta, Ru, IrMn, SiO<sub>2</sub>, ovvero degli strati necessari per la realizzazione di giunzioni magnetiche ad effetto tunnel.

La possibilità di ruotare il campione durante la deposizione ha permesso di ottenere uniformità dei film depositi dell'ordine del 2% su un'area di 3 pollici. Inoltre, poiché la temperatura di deposizione è un fattore critico per la qualità dei film, è presente un sistema di riscaldamento fino a 850°C. Un'altra funzionalità implementata, importante durante il processo di sputtering, è la possibilità di applicare al substrato un potenziale a radiofrequenza: questo fornisce l'energia necessaria per un riarrangiamento degli atomi depositati e quindi influisce sulla qualità dei film in termini di rugosità. Ad esempio, durante l'ottimizzazione della crescita dell'ossido di silicio, l'applicazione di un potenziale al substrato ha permesso di ridurre il grado di rugosità da 1 nm RMS a meno di 0.1 nm RMS.

Infine tramite un portacampioni magnetico è possibile crescere campioni in campo magnetico applicato, altro fattore cruciale per ottenere sensori con risposta lineare.

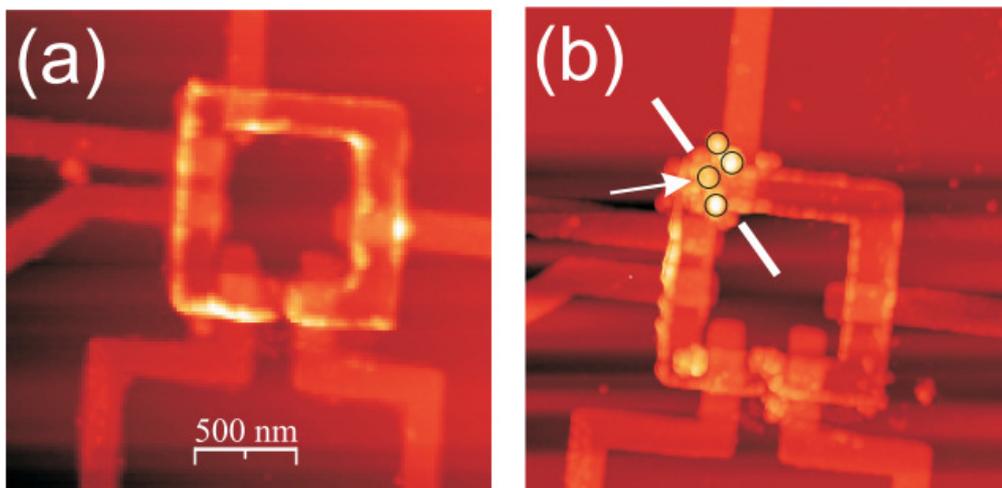
I film ottenuti con il sistema modificato sono tutti di ottima qualità per quel che riguarda la rugosità: essi presentano tutti valori RMS minori di 0.1 nm, ovvero rugosità comparabile con il substrato sottostante di silicio. Anche strutture multistrato del tipo 5nm Ru/30nm FeCoB/3nm MgO/3nm

FeCoB, che costituiranno la parte principale del sensore, presentano rugosità RMS minore di 0.2 nm, comparabile o addirittura inferiore con i dati riportati in letteratura.

Sia il SiO<sub>2</sub> sia l'MgO presentano inoltre buone proprietà dielettriche, che riflettono la qualità strutturale del film.

### **Task 1.2 sviluppo di trasduttori basati su dispositivi AMR (Mese 1-24)**

Durante la fase di valutazione del progetto SpinBioMed, ovvero nell'estate 2008, abbiamo dimostrato la possibilità di rilevare un singolo marcatore magnetico del diametro di 80 nm, attraverso la misura del segnale di magnetoresistenza anisotropa legato allo spostamento di un barriera di dominio magnetico tra due angoli di permalloy in un dispositivo quadrato della dimensione del micron. Tale lavoro è descritto in una pubblicazione su rivista internazionale, [Vavassori, P., Metlushko, V., Ilic, B., Gobbi, M., Donolato, M., Cantoni, M. & Bertacco, R. Domain wall displacement in Py square ring for single nanometric magnetic bead detection. *Appl. Phys. Lett.* **93**, 203502 (2008)] e consiste in una dimostrazione di fattibilità di un'idea iniziale oggetto di brevetto [R. Bertacco, P. Vavassori, domanda di brevetto italiano TO2008A000314].



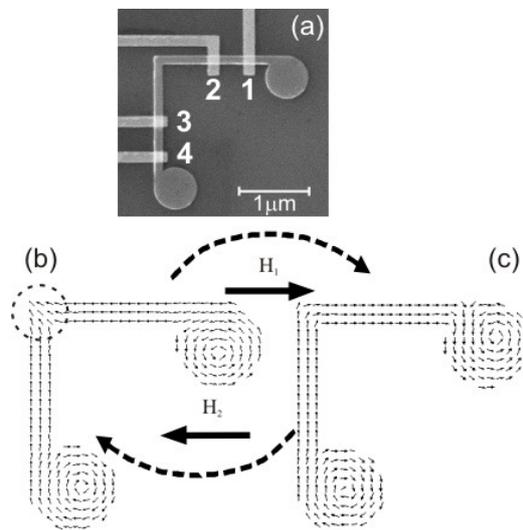
**Figura 3: Immagine AFM di un dispositivo AMR prima (a) e dopo (b) la cattura di quattro marcatori magnetici. La variazione del segnale elettrico ai capi delle piste concorrenti sull'angolo in alto a sinistra permette di rilevare la presenza di un singolo marcatore. [P. Vavassori et al. APL 2008]**

Nel corso del progetto si è passati ad uno studio maggiormente approfondito dell'idea allo scopo di comprendere fino in fondo le potenzialità applicative dello stesso in vista dello scopo specifico di SpinBioMed, ovvero la misura di concentrazioni di molecole in un campione biologico.

Durante i primi 12 mesi di attività è stato realizzato un sensore di dimensioni nanometriche basato sullo stesso principio descritto precedentemente, ma disegnato specificatamente per ottenere un

singolo polo magnetico che si può creare o rilasciare in maniera controllata per intrappolare e rilevare nanoparticelle magnetiche nell'area sensibile. Tale attività scientifica è stata oggetto di due pubblicazioni su rivista internazionale [Ref. 2], [M Donolato, M Gobbi, P Vavassori, M Cantoni, V Metlushko, B Ilic, M Zhang, S X Wang, M F Hansen and R Bertacco "Detection of a single synthetic antiferromagnetic nanoparticle with an AMR nanostructure: comparison between simulations and experiments", 2010 J. Phys.: Conf. Ser. 200 122001] fra cui la prima, su Nanotechnology, è stata segnalata fra gli highlights del sito dell' Institute of Physics "Nanocorner detects single magnetic nanoparticles", <http://nanotechweb.org/cws/article/lab/40664>.

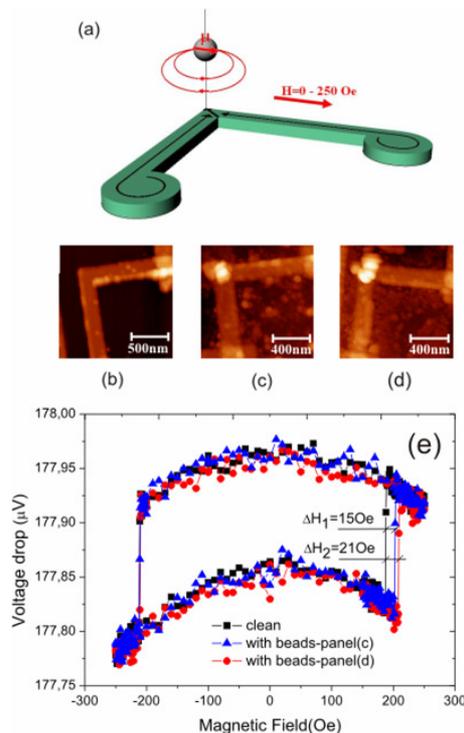
In figura 4 è presentata un'immagine acquisita al microscopio elettronico a scansione del dispositivo (pannello a); lo schema sottostante (pannelli b e c) sono le configurazioni micromagnetiche simulate attraverso software (OOMMF).



**Figura 4: (a) immagine SEM della struttura del dispositivo; i quattro contatti servono per le misure di magnetoresistenza. Configurazione micromagnetica del dispositivo (simulata con il software OOMMF) con (b) e senza (c) barriera di dominio magnetico.  $H_1$  e  $H_2$  sono i campi magnetici necessari per passare da una microconfigurazione all'altra (per creare e annichilare la barriera).**

Il dispositivo è costituito da una struttura a forma di L costituita da permalloy; la cattura e il rilevamento delle nanoparticelle avviene nell'angolo dello stesso. Le dimensioni sono 25 nm di spessore, 180 nm di larghezza e 2  $\mu\text{m}$  di lunghezza; il dispositivo viene poi ricoperto da uno strato isolante di 150 nm di  $\text{SiO}_2$ . In figura 5 è presentato un esperimento di rilevamento di nanoparticelle magnetiche. I pannelli (b), (c) e (d) sono immagini prese col microscopio a forza atomica (AFM) della struttura con e senza particelle; si può notare come dopo aver dispensato un goccia di sospensione di nanoparticelle sul dispositivo, le nanoparticelle si focalizzano nell'area sensibile, attratte dalla parete di dominio.

Una misura del campo magnetico (depinning field) necessario a creare e rilasciare la parete di dominio (pannello e) eseguita senza (nero) e con (blu, rosso) nanoparticelle permette di rilevare quest'ultime; infatti la presenza di una goccia di sospensione di nanoparticelle implica un aumento del "depinning field" di 20 Oe su un campo di circa 200 Oe con un'incertezza di  $\pm 1$  Oe.



**Figura 5: (a) schema del dispositivo interagente con la particella magnetica; (b) immagine AFM del dispositivo pulito. (c) e (d) immagine AFM dopo aver dispensato una prima e una seconda volta sul sensore  $2\mu$ l di sospensione con una concentrazione di  $5 \cdot 10^{10}$  particelle  $ml^{-1}$ . (e) misura del campo magnetico per passare da una microconfigurazione magnetica all'altra senza (nero) e con (rosso, blu) nanoparticelle.**

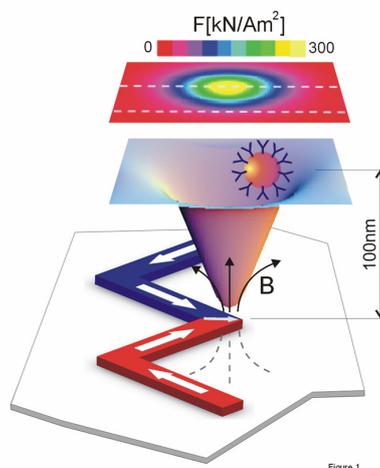
L'esperimento viene effettuato misurando la variazione di resistenza del dispositivo dato dalla presenza o assenza della parete di dominio magnetico (magnetoresistenza). Considerando il limite di sensitività di 1 Oe e ottimizzando lo spessore dello strato protettivo di  $SiO_2$ , abbiamo dimostrato che questo sensore permette di rilevare una singola nanoparticella.

Utilizzando ad esempio nanoparticelle antiferromagnetiche sintetiche (SAF) di 70 nm di diametro e 20 nm di spessore è possibile rilevare una variazione del campo magnetico sopra il limite di sensitività per strati protettivi fino a 25 nm. Invece, con particelle Nanomag®-D di 300 nm e 500 nm di diametro e uno spessore di  $SiO_2$ , la variazione di depinning field risulta di 8 e 12 Oe rispettivamente, ben oltre il limite di detezione.

Il lavoro condotto sulle nanostrutture magnetiche alla base dei sensori AMR ha però permesso di fare una scoperta che è poi diventata il fondamento di una tecnologia assolutamente innovativa per la manipolazione di entità biologiche on-chip (acidi nucleici, proteine, cellule, ...), sviluppata e brevettata a LNESS nel corso del primo anno del progetto. Anche se inizialmente non previsto, lo

sviluppo di questa tecnologia è stato un reale breakthrough nel panorama internazionale della manipolazione molecolare e cellulare on-chip, che è valso al nostro gruppo significativi riconoscimenti scientifici, fra i quali inviti a tenere relazioni a conferenze (R. Bertacco, ICSM 2010) premi a giovani ricercatori coinvolti nel progetto (Premio Rotary alla Ricerca e Targa della conferenza Lab Automation 2010 a M. Donolato). Il principio generale è stato brevettato nel febbraio 2009 congiuntamente ad un ente di ricerca spagnolo (nanGune), prima dell'inizio del progetto, (R. Bertacco, M. Donolato, M. Gobbi, M. Cantoni, S. Brivio, D. Petti, P. Vavassori; *“Manipolazione di particelle magnetiche in circuiti per la propagazione di pareti di dominio magnetiche”*. Italian Patent Application VI2009A000026 (2009), Politecnico di Milano - nanoGune Consolider). Durante il progetto l'idea iniziale è stata sviluppata e anche oggetto di alcune rilevanti pubblicazioni [Ref. 4] e presentazioni a conferenze [Ref. 5,6,7]. Vale la pena sottolineare l'inerenza di tale attività di ricerca al progetto SpinBioMed, dato che la manipolazione molecolare risulta essenziale allo scopo di concentrare le molecole da rilevare sull'area attiva del sensore.

L'idea di base si basa sul fatto che una parete di dominio è un polo attrattore per una particella magnetica, cosicchè la manipolazione di particelle magnetiche con precisione nanometrica è ottenibile sfruttando lo spostamento controllato di una parete di dominio in una struttura come quella schematizzata in figura 6. Utilizzando le nanoparticelle non solo come marcatori di un'entità biologica (ad esempio una cellula) ma anche come “vettori”, è possibile quindi ottenere un equivalente magnetico delle pinzette ottiche (optical tweezers) per spostare in maniera controllata tali biomolecole. Differentemente però dalla tecnologia già esistente, questo metodo non danneggia le entità biologiche e permette con facilità l'ottenimento di precisione nanometriche, che sono essenzialmente dettate dalla geometria delle strutture magnetiche su cui si muovono le pareti di dominio.



**Figura 6: schema di dispositivi per la movimentazione di nanoparticelle; in figura è illustrato come in corrispondenza ad una parete di dominio si crei un intenso gradiente del campo magnetico che genera la forza che attrae la particella. Lo spostamento della parete di dominio genera quindi uno spostamento della particella.**

### Task 1.3 fabbricazione di chip con matrici di trasduttori (Mese 18-36)

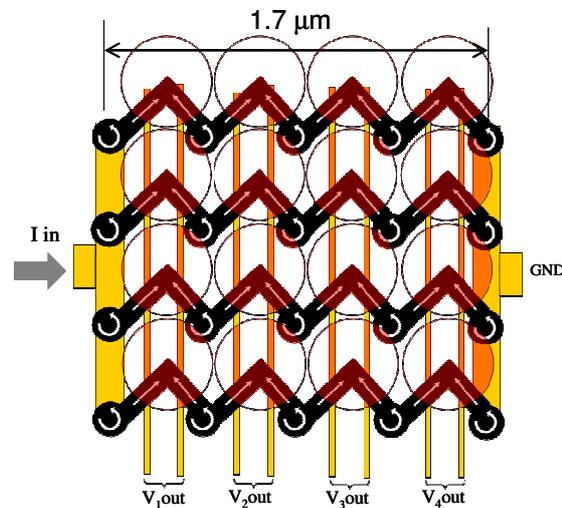


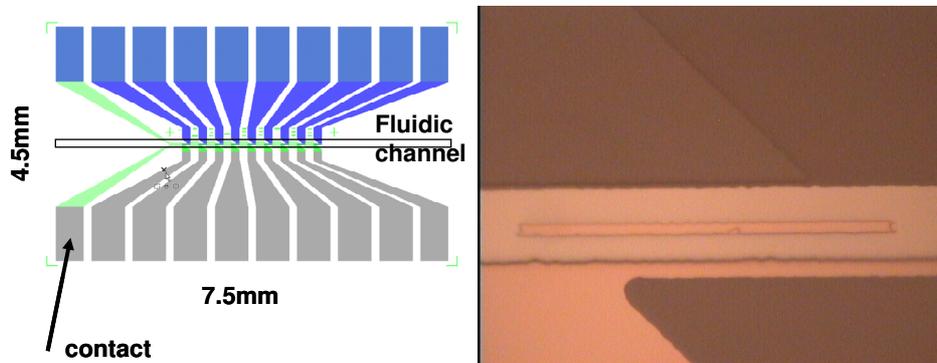
Figura 7: schema di una matrice di sensori sviluppati nel task 1.2 con area di cattura di 200 nm.

In anticipo rispetto al programma iniziale che prevedeva di considerare solo al 18° mese la realizzazione di matrici di trasduttori, ma sulla base di una sufficiente maturità del lavoro svolto sui sensori AMR, è stata effettuata una valutazione dell'opportunità di impiegare detti sensori in esperimenti di misura di concentrazioni di molecole. Sfruttando i sensori AMR sviluppati nel task 1.2 sono state quindi progettate matrici di sensori (70 unità in un'area di  $200 \mu\text{m}^2$ ) che consentono di ottenere valori teorici del limite di detezione (LOD) di  $5 \cdot 10^5$  particelle/ $\text{cm}^2$  e un range dinamico di  $5 \cdot 10^8$  particelle/ $\text{cm}^2$  per punto sensibile.

Questa configurazione tuttavia necessita di un numero elevato di contatti per le misure di magnetoresistenza, rendendo complessa la realizzazione della matrice. Si richiede infatti una complessità tipica di un microprocessore e, in definitiva, la realizzazione dei sensori su un ASIC nel quale è già stata integrata l'elettronica CMOS con multiplexer, piste ed elettronica per l'indirizzamento dei vari sensori. Sulla base di tale considerazione si è quindi scelto di non sviluppare matrici di sensori AMR per riconoscimento molecolare e concentrare invece il lavoro del progetto nella realizzazione di biosensori che sfruttano giunzioni magnetiche ad effetto tunnel (vedi Task 1.1).

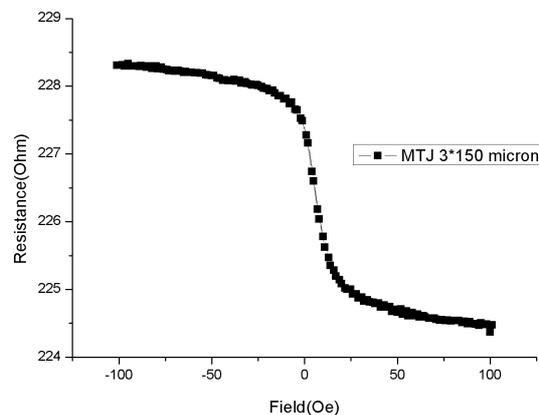
In parallelo allo studio di fattibilità per lo sviluppo di matrici di dispositivi basati sulla AMR, nel primo anno di attività sono state sviluppate anche matrici di dispositivi basati sulla TMR. Differentemente dalla geometria utilizzata nel task 1.1 che serviva a testare ed ottimizzare i dispositivi, questa prevede già l'integrazione dei dispositivi con un sistema microfluidico che

consenta la realizzazione di un esperimento biologico. In figura 8 (sinistra) è rappresentato lo schema del chip con il canale microfluidico e le sottostanti giunzioni ad effetto tunnel; il particolare di una giunzione  $2 \times 100 \mu\text{m}^2$  è invece visibile nell'immagine a destra presa con un microscopio ottico dopo il secondo step di litografia.



**Figura 8:** sinistra: schema finale del chip con un sistema micorfluidico integrato; destra: immagine al microscopio ottica di una particolare di una giunzione litografata.

Anche in questo caso il processo litografico è stato ottimizzato utilizzando giunzioni prodotte presso il gruppo di P. Freitas (INESC, Lisbona). Questo lavoro ha consentito di ottenere nel mese di marzo 2010 i primi sensori con una risposta lineare, come si può vedere in figura 8. Infatti, una variazione del campo magnetico applicato alla giunzione fornisce una variazione della resistenza del dispositivo che è lineare intorno al punto di lavoro (intorno a 0 Oe).



**Figura 9:** risposta del sensore fabbricato secondo la geometria di figura 7; al variare del campo magnetico applicato la resistenza del dispositivo cambia in modo lineare.

#### **Task 1.4 ottimizzazione della compatibilità tra trasduttori e materiali biologici (Mese 1-36)**

L'attività dei primi 12 mesi legata a questo task è stata duplice: da un lato è stata verificata la compatibilità dei dispositivi spintronici con i protocolli biologici necessari per portare a termine un

esperimento biologico, in secondo luogo sono state studiati diversi tipi rivestimenti dell'area attiva del sensore su cui immobilizzare il DNA.

In collaborazione con l'Unità II, alcuni dispositivi litografati sono stati sottoposti ai processi necessari in un esperimento biologico (a partire dall'immobilizzazione del DNA fino al processo di riconoscimento biologico); questo ha permesso di accertare l'assenza di danneggiamento, soprattutto per quanto riguarda i contatti elettrici e le prestazioni del dispositivo stesso, che si basano sulla qualità degli strati di materiali che lo compongono.

Per quel che riguarda invece il secondo aspetto di questo obiettivo, due substrati in particolare sono stati testati per l'immobilizzazione del DNA: oro e ossido di silicio. Per i risultati raggiunti si può far riferimento ai task del WP2.

Substrati parzialmente protetti tramite photoresist sono stati inoltre utilizzati per ottenere funzionalizzazioni solo in aree specifiche: in questo caso l'ossido di silicio presenta una migliore compatibilità con i processi di immobilizzazione e rimozione del resist.

Infine, come già illustrato nel task 1.3, è stata sviluppata una geometria per integrare una matrice di sensori con un canale microfluidico pensato per portare a termine un esperimento biologico.

### Piano temporale del WP1

L'andamento del WP1 in relazione al piano temporale previsto si può desumere dalla tabella seguente:

	Attività svolte nel primo anno	Piano previsionale	
		2° anno	3° anno
<b>Task 1.1</b> (mese 1-24)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caratterizzazione sistema Fe(001)/MgO e Fe(001)-p(1x1)O/MgO</li> <li>• Sviluppo processo litografico per caratterizzazione giunzioni ad effetto tunnel</li> <li>• Upgrade del sistema di deposizione per sputtering</li> </ul>	Ottimizzazione crescita per sputtering e fabbricazione per ottenere basso LOD e un range dinamico soddisfacente	-
<b>Task 1.2</b> (mese 1-24)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sviluppo di sensori basati su AMR</li> <li>• Sviluppo di un sistema magnetico di movimentazione molecolare e cellulare</li> </ul>	Sviluppo di nanostrutture per la concentrazione su area sensibile delle biomolecole	-

<b>Task 1.3</b> (mese 18-36)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studio di fattibilità di una matrice di sensori AMR</li> <li>• Sviluppo di una geometria per l'integrazione dei sensori TMR con canale microfluidico</li> </ul>	Fabbricazione di chips comprendenti una matrice con 9 punti sensibili e un canale microfluidico	Fabbricazione dispositivo completo per esperimenti di riconoscimento molecolare su campioni da tessuto tumorale.
<b>Task 1.4</b> (mese 1-36)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test preliminari di compatibilità sensori con protocolli biologici</li> <li>• Studio di diverse superfici per l'immobilizzazione del DNA</li> </ul>	Test di compatibilità dei dispositivi con il processo di funzionalizzazione	Test di compatibilità dei dispositivi con l'esperimento finale di riconoscimento molecolare
<b>Task 1.5</b> (mese 24-36)	-	-	Esperimento biologico finale

## Conclusioni

In definitiva si può affermare che tutti i tasks previsti sono stati svolti secondo il piano temporale previsto. In linea generale il lavoro procede con un leggero anticipo rispetto alle previsioni iniziali e non si evidenziano particolari criticità per il raggiungimento di tutti gli obiettivi previsti per il WP1 entro la fine del progetto. Vale la pena sottolineare inoltre come dall'attività inizialmente prevista sia gemmata una nuova linea di ricerca, ovvero quella della manipolazione molecolare e cellulare on chip mediante movimentazione controllata di pareti di dominio magnetiche, comunque inerente il progetto SpinBioMed in quanto funzionale alla concentrazione degli acidi nucleici sull'area attiva dei sensori.

Sono stati inoltre stabiliti contatti con aziende locali operanti in regione Lombardia nel settore della diagnostica biomedica per la fase di disseminazione dei risultati conseguiti. Si segnalano in particolare:

- STMicroelectronics (Agrate; Maria Teresa Gatti, Marco Bianchessi)
- Genomnia srl (Linate, A. Guffanti, A. Moles)
- Roche Diagnostics S.p.A.

## **Lista delle Pubblicazioni inerenti il progetto SpinBioMed e riportanti la menzione del finanziamento ricevuto da Fondazione Cariplo nei ringraziamenti**

- [1] A. Cattoni, D. Petti, S. Brivio, M. Cantoni, R. Bertacco, F. Ciccacci; “*MgO/Fe(001) and MgO/Fe(001)-p(1×1)O interfaces for magnetic tunnelling junctions: a comparative study*”, Phys. Rev. B 80, 104437 (2009).
- [2] M. Donolato, M. Gobbi, P. Vavassori, M. Cantoni, V. Metlushko, B. Ilic, M.Zhang, S. X. Wang and R Bertacco “*Nanosized corners for trapping and detecting magnetic nanoparticles*” Nanotechnology 20 (2009) 385501.
- [4] M. Donolato, P. Vavassori, M.Gobbi, M. Deryabina, M.F.Hansen, V. Metlushko, B. Ilic, M. Cantoni, D. Petti, S. Brivio and, R. Bertacco; “*On-chip manipulation of protein coated magnetic beads via domain walls conduits*”, Advanced Materials 2010, in press.
- [5] R. Bertacco, M. Donolato, M. Gobbi, M. Cantoni, D. Petti, S. Brivio, V. Metlushko, B. Ilic, P. Vavassori, “*On-chip manipulation of single magnetic nano-particles via domain walls conduits*”, Proceedings of the conference IEEE NANO 2009 Genoa July 26-30 2009.
- [6] P. Vavassori, M. Gobbi, M. Donolato, V. Metlushko, B. Ilic, M. Cantoni, D. Petti, S. Brivio, R. Bertacco; “*Manipulation at the nano-scale of single magnetic particles via domain walls conduits*”, Proceeding of ICEAA '09, Torino, September 14-18, 2009.
- [7] M. Donolato, M. Gobbi, P. Vavassori, V. Metlushko, B. Ilic and R Bertacco; “*On chip nanomanipulation of magnetic particles for cells and molecules handling*”, Proceedings of the 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2009), Jeju, Korea, November 1-5, 2009.

## **Lista dei contributi a conferenze inerenti il progetto SpinBioMed**

- [1] R. Bertacco, M. Donolato, M. Gobbi, M. Cantoni, D. Petti, S. Brivio, V. Metlushko, B. Ilic, P. Vavassori, “*On-chip manipulation of single magnetic nano-particles via domain walls conduits*”, IEEE NANO 2009 Genoa, July 26-30 2009.
- [2] M. Donolato, M. Gobbi, P. Vavassori, V. Metlushko, B. Ilic and R Bertacco; “*On chip nanomanipulation of magnetic particles for cells and molecules handling*”, 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2009), Jeju, Korea, November 1-5, 2009.
- [3] M. Donolato, “*On chip nanomanipulation of functionalized magnetic beads via domain walls conduits*” Lab Automation 2010, Palm Springs, USA January, 25-29 2010.

[4] “On chip nano-manipulation of single magnetic particles via domain wall conduits”, R. Bertacco, M. Donolato, M. Gobbi, M. Cantoni, A. Torti, V. Metlushko, P. Vavassori, Magnet09, Ottobre 2009 Roma.

### **Lista dei seminari tenuti presso Centri di Ricerca su attività inerenti il progetto SpinBioMed**

[1] “On-chip nano-manipulation of single magnetic particles via domain wall conduits for cell or molecule handling”, R. Bertacco, M. Donolato, M. Gobbi, M. Cantoni, D. Petti, S. Brivio, V. Metlushko, B. Ilic, P. Vavassori; Politecnico di Torino, 08/05/2009

[2] “On chip detection and manipulation of biological entities carried by magnetic beads via domain wall conduits”, M. Donolato, Chungun National University of Technology, Daejon (Korea) 10/11/2010

[3] “On chip detection and manipulation of biological entities carried by magnetic beads via domain wall conduits”, R. Bertacco, NNL Lecce 04/02/2010

# **Spintronic Biosensors for Medicine**

## **Report sull' attività svolta dall'Unità II**

**ICRM- CNR dall' aprile 2009 al marzo 2010**

**Responsabile Dr. Marcella Chiari**

L'attività del CNR all'interno del progetto ha riguardato la funzionalizzazione della superficie del sensore secondo quanto previsto dal piano di lavoro nel Work Package 2

### **WP2: funzionalizzazioni della superficie dei biosensori (ICRM-Unit II)**

Lo scopo del WP2 è lo sviluppo di rivestimenti polimerici per la superficie di biosensori al fine di promuovere il legame tra acidi nucleici e il biosensore stesso. Il controllo dell'identità, della densità e dell'architettura delle catene polimeriche che costituiscono il rivestimento sono necessarie per garantire proprietà ottimali al substrato.

### **Task 2.1 Sintesi di polimeri funzionali con proprietà adsorbitive su substrati per l'immobilizzazione di DNA sull'area attiva del sensore (mese 1-18)**

Durante i primi 12 mesi sono state sviluppate due metodiche per la derivatizzazione di sensori rivestiti di ossido di silicio al fine di mediare l'immobilizzazione di sonde a DNA:

1. sintesi di copolimeri in grado di formare un rivestimento per dip coating sulla superficie attiva del sensore.
2. sintesi di copolimeri a blocchi con architettura "brush" costruiti direttamente sulla superficie del sensore previa funzionalizzazione con agenti mediatori della polimerizzazione.

Il primo copolimero è stato sintetizzato mediante polimerizzazione radicalica di tre monomeri: *N,N*-dimetilacrilammide (DMA), *N*-acriloillossisuccinimide (NAS) e 3-metacriloil-ossipropil-trimetossisilano (MAPS) (copoli-DMA-MAPS\_NAS) al 20% w/v di monomeri in solvente organico secondo la procedura descritta di seguito.

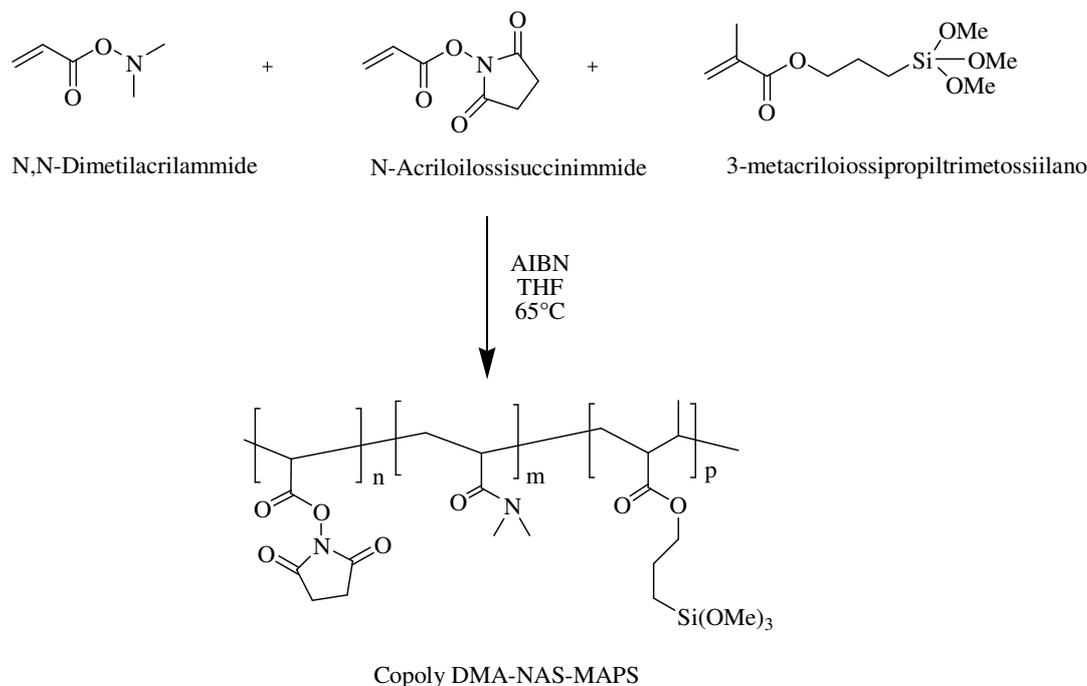


Figura 1: composizione chimica del rivestimento polimerico

In un pallone a due colli da 100ml, equipaggiato di ricadere, si degasano per 20 min sotto vuoto 20 mL di tetraidrofurano (THF) anidro. Al solvente vengono poi aggiunti, sotto flusso di azoto, *N,N*-dimetilacrilammide (DMA 97%, 4.00g, 40.35mmol, filtrata su allumina) e *N*-acriloillossisuccinimide (NAS 2%, 0.140g, 0.832mmol). Alla soluzione, limpida e incolore, viene aggiunto  $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutirronitrile (AIBN 0.013g, 0.079mmol) e viene ulteriormente degasata alternando il vuoto all'azoto per 10 minuti. Viene poi aggiunto il 3-metacriloil-ossipropil-trimetossisilano (MAPS 1%, 0.1033g, 0.413mmol) sotto azoto. La soluzione viene scaldata a 65°C è poi lasciata reagire sotto agitazione magnetica e atmosfera di azoto per 16 ore. A reazione terminata la soluzioni viene diluita con THF fino ad un volume finale pari a 40ml. Il polimero viene poi recuperato come solido bianco con una resa del 96% per precipitazione in etere di petrolio (400ml), filtrazione e successiva asciugatura sottovuoto a temperatura ambiente.

Ciascuno dei monomeri che costituiscono il ter-polimero ha una specifica funzione: la DMA permette l'adsorbimento del polimero ai silanoli di superficie per mezzo di legami ad idrogeno e forze di Van der Waals; il MAPS contribuisce, per mezzo del suo gruppo silanizzante, ad aumentare

la forza dell'interazione verso la superficie con legami covalenti; infine il NAS fornisce i gruppi funzionali (esteri della succinimide) che promuovono il legame covalente di oligonucleotidi ammino-modificati (sonde).

Il polimero è stato caratterizzato mediante  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO),  $\delta$  (ppm): 174.6 (Carbonile del backbone polimerico), 166 (carbonile della succinimide) 40-30 (carboni metilenici). Dal rapporto dei segnali del backbone polimerico con i segnali tipici della succinimide si determina la frazione molare del NAS: essa corrisponde a 0.015.

Il co-polimero forma un rivestimento per dip coating ovvero immergendo la superficie da ricoprire, precedentemente attivata per mezzo di un trattamento al plasma di ossigeno per 15 minuti, in una soluzione acquosa del polimero all'1% w/v e al 20% di saturazione di  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  per 30 minuti a temperatura ambiente. I substrati così rivestiti vengono successivamente lavati in acqua milliQ e asciugati a  $80^\circ\text{C}$  sottovuoto per 10 minuti. Il procedimento risulta, quindi, particolarmente adatto per la formazione di un film idrofilico tridimensionali sulla superficie dei sensori.

Il rivestimento polimerico di copoli(DMA-MAPS-NAS) è in fase di caratterizzazione mediante AFM, XRR e XPS. Questa attività è prevista dal 12 al 36 mese, nell'ambito del Task 2.3 .

Il secondo tipo di rivestimento polimerico è stato sviluppato accoppiando la “surface initiated polymerization” (SIP) con la “reversible addition-fragmentation transfer polymerization” (RAFT). Allo scopo è stato sintetizzato un agente RAFT avente un gruppo silanizzante che, ancorato ai silanoli del sensore, possa promuovere la crescita delle catene polimeriche direttamente dalla superficie. I film polimerici che si ottengono con la SIP possiedono un'architettura chiamata comunemente “brush”. Inoltre il processo RAFT permette un controllo cinetico della polimerizzazione che consente di creare catene polimeriche di peso molecolare omogeneo e viventi, in grado, cioè, di promuovere la formazione di un secondo blocco polimerico in un ulteriore processo di polimerizzazione. Rivestimenti polimerici biofunzionali ad architettura “brush” sono stati sintetizzati su superfici di ossido di silicio secondo la procedura descritta di seguito:

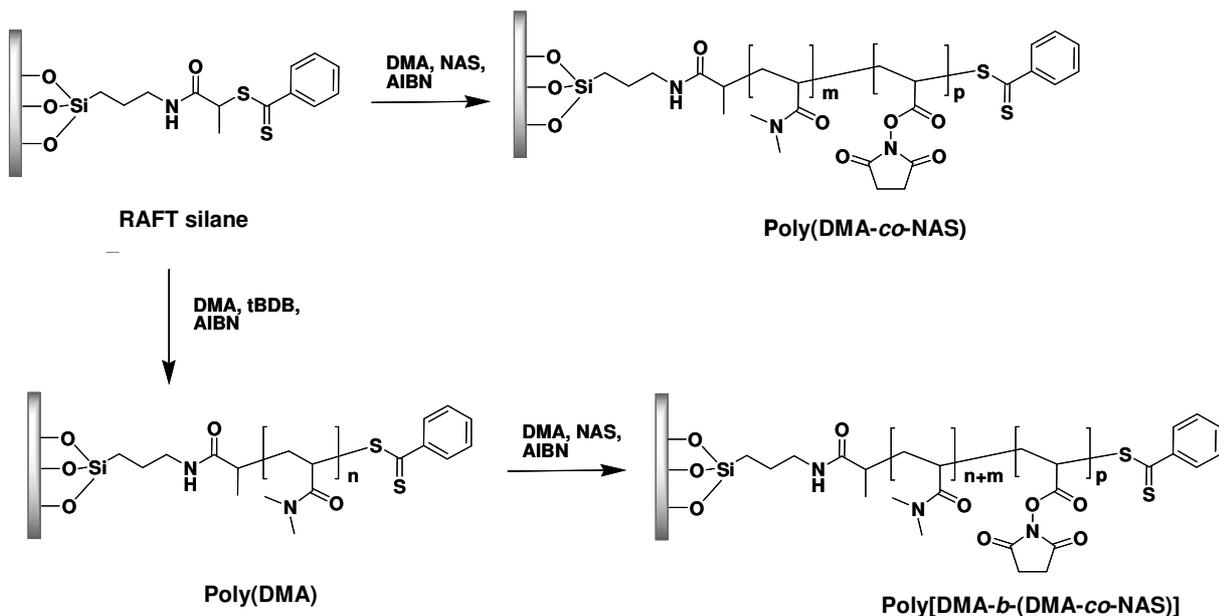


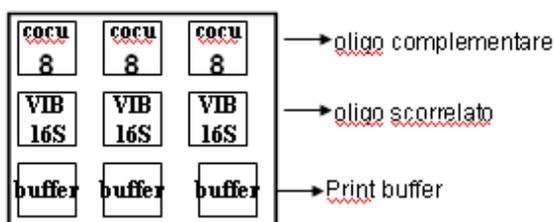
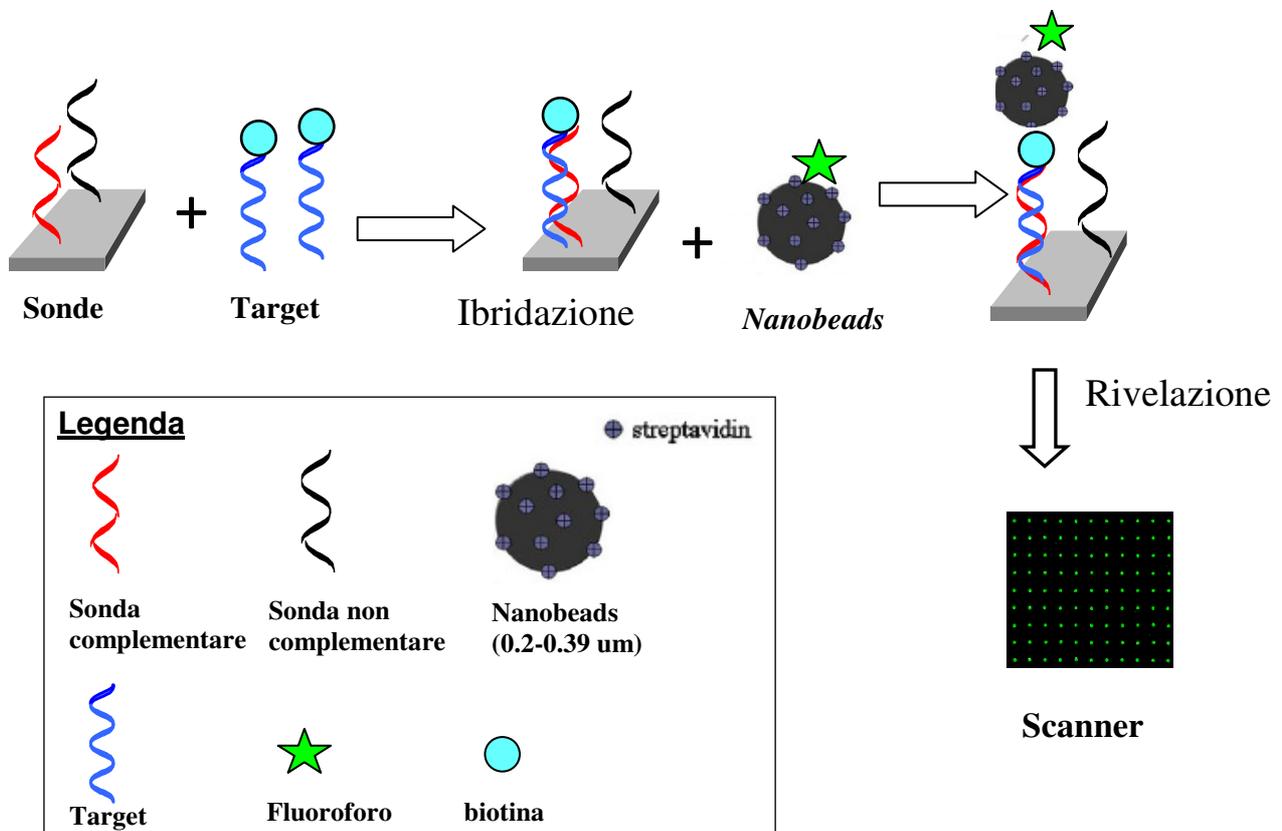
Figura 2: rappresentazione schematica della procedura di formazione del rivestimento polimerico ottenuto accoppiando la “surface initiated polymerization” (SIP) con la “reversible addition-fragmentation transfer polymerization” (RAFT).

Le superfici di ossido di silicio, attivate mediante trattamento con plasma di ossigeno per 15 minuti, vengono derivatizzate con una soluzione dell’agente RAFT silanizzante (1% w/v in toluene, 5 h a temperatura ambiente). Successivamente le stesse superfici sono state utilizzate come substrati nel processo di polimerizzazione di DMA (0.9 M) e NAS (0.1 M) in presenza di un iniziatore radicalico (AIBN; 5.6 mM) in DMF a 80°C per 16 h al fine di ottenere un rivestimento di catene “brush” di poly(DMA-co-NAS). Rivestimenti polimerici biofunzionali con architettura a due blocchi, poly[DMA-b-(DMA-co-NAS)], sono stati, invece, preparati previa sintesi di un primo blocco spaziatore di poly(DMA) per polimerizzazione di monomeri di DMA (4.46 M) in presenza di un agente RAFT in soluzione (tBDB; 12.5 mM) e AIBN (2.5 mM) in toluene a 80°C per 16 h .

### Task 2.2 sviluppo di test di ibridazione con DNA marcato da sfere magnetiche (Mese 9-24)

Per una veloce determinazione delle caratteristiche funzionali del rivestimento è stato messo a punto un test di ibridazione su fase solida tra un oligonucleotide ammino modificato ed il suo complementare, marcato con sfere magnetiche e fluorescenti. Nella figura 3 sono riportate le fasi essenziali del test funzionale. Due diversi oligonucleotidi, entrambe ammino modificati, sono stati spottati su una superficie (possono essere utilizzate sia superfici di vetro che di ossido di silicio) utilizzando uno spotter piezoelettrico (SciFlexarrayer S5, Scienion Germany). Le sonde si legano

alla superficie, rivestita dal polimero, in quanto le ammine dell'oligonucleotide reagiscono covalentemente con i gruppi succinimidile del polimero. Il processo di legame avviene over night, in una camera umida. Dopo un lavaggio per rimuovere l'eccesso di oligonucleotide non immobilizzato e un *blocking* dei gruppi non reagiti, si incuba la superficie con un oligonucleotide complementare ad uno dei frammenti immobilizzati e marcato con biotina. L'incubazione dura 2 ore e avviene a 50°C. Terminata questa fase e i successivi lavaggi si incuba la superficie con sole sferette (Sherotech FSVM-02556-2, 4ul in acqua) per 1 ora al buio a temperatura ambiente. Si procede con la lettura della fluorescenza eseguita mediante uno scanner (ProScanArray, Perkin Elmer). Nella figura 3 sono riportati lo schema di *spotting* e i tamponi utilizzati nelle varie fasi dell'esperimento.



Schema di spotting:

### **1. Fase di BLOCKING**

1. blocking con etanolamina preriscaldata a 50°C per 20 min
2. lavaggio in soluzione SSC 4x+ SDS 10% preriscaldata a 50°C per 20 min
3. lavaggio in acqua e asciugare con argon

### **2. FASE DI IBRIDAZIONE: 2h A 50 °C**

Buffer di ibridazione:	SSC 2X
	SDS 1%
Uso del coprioggetto	BSA 0,2mg/ml
	<b>Biococu 10 (1uM)</b>
	H <sub>2</sub> O a volume

Volume finale 25 ul

### **3. Lavaggi**

Soluzione SSC4 X ;

SSC 2X –SDS 0.1%;

SSC 0,2%;

SSC 0,1%

Asciugare con Argon

### **4. INCUBAZIONE DELLE SFERE SU CIASCUNA SLIDE**

Si utilizzano 3 ul di sfere per ciascun vetrino, si copre con copri-oggetto per favorire la diffusione.

L'incubazione dura 1h a temperatura ambiente

### **5. LAVAGGIO DEI VETRINI**

Lavaggio con una soluzione di SSC 4X; asciugare con argon.

### **6. SCANSIONE DEI SEGNALI DI FLUORESCENZA MEDIANTE SCANNER CON LASER AT 70% DELLA POTENZA E PMT AL 70% DI GAIN**

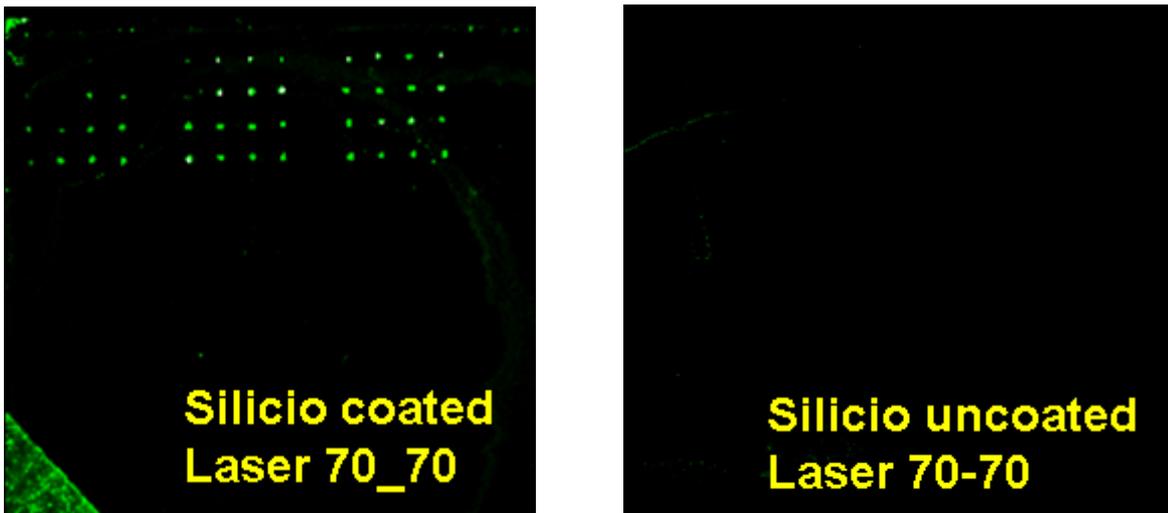


Figura 3: rappresentazione schematica e risultati dell'esperimento di ibridazione modello

Dalla scansione della fluorescenza sulla superficie di un substrato di ossido di silicio rivestito e non, si può notare come il rivestimento polimerico conferisca al substrato la capacità di legare oligonucleotidi ammino modificati alla superficie. Si nota inoltre che, solo l'oligonucleotide correlato viene riconosciuto, dimostrando l'assenza di fenomeni di adsorbimento aspecifico.

Un esperimento del tutto analogo al precedente ha dimostrato la capacità del copoli(DMA-MAPS-NAS) di rivestire superfici d'oro nelle stesse condizioni utilizzate per l'ossido di silicio. Pertanto il primo tipo di sensore utilizzato ha previsto l'utilizzazione di una regione attiva rivestita di tale metallo.

Un primo esperimento di valutazione della procedura di rivestimento direttamente sulla superficie del sensore ha evidenziato un primo problema. Due biosensori contrassegnati dai numeri **5 e 6** sono stati spottati con l'oligonucleotide complementare all'oligonucleotide marcato con sferette **mentre il Biosensore 19 e Ref 3** sono stati spottati con un oligo scorrelato. Eseguendo un esperimento di ibridazione in condizioni simili a quelle utilizzate nel test modello sopra descritto ci si attendeva presenza di sferette solo in corrispondenza del Gold Pad dei biosensori 5 e 6. Invece anche al di fuori di quest'area la superficie di silicio ed i biosensori 19 e Ref3 sono ricoperti di sferette. Il problema deriva dal fatto che essendo praticamente impossibile spottare sul biosensore e non coinvolgere la superficie di ossido di silicio esterna alla gold pad è praticamente impossibile evitare l'adesione delle sferette alle regioni esterne alla parte attiva del sensore che sono state contaminate da gocce di oligonucleotide che si sono legate alla superficie.

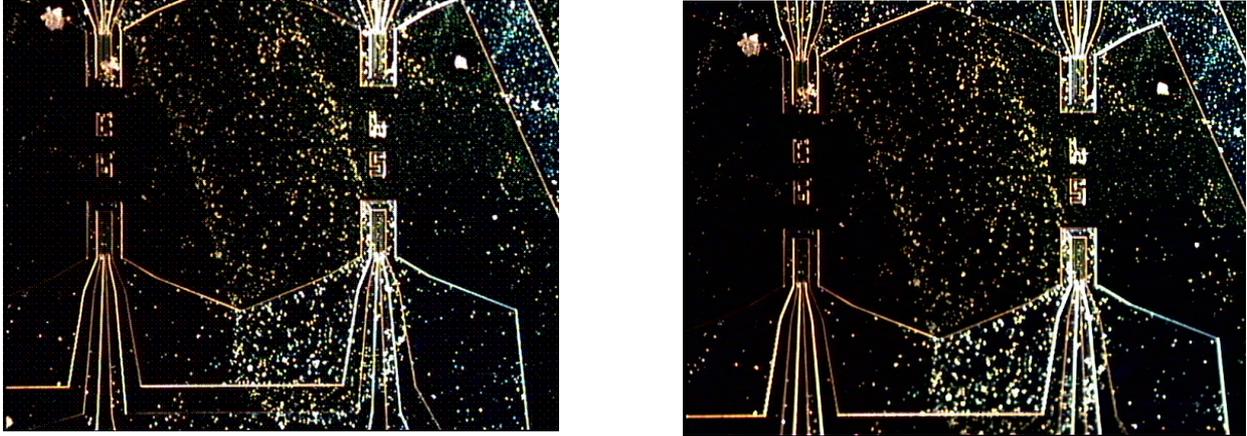


Figura 4 : immagine AFM dei sensori 5 e 6 dopo ibridazione dell'oligonucleotide immobilizzato con oligonucleotide marcato con fluorescenza.

Una prima soluzione di tale problema è stata proposta: realizzando intorno all'area attiva del sensore una protezione mediante un photoresist che viene rimosso dopo aver realizzato il rivestimento del sensore con il polimero e possibile ottenere una funzionalizzazione specifica solo nell'area attiva del sensore. Un esperimento preliminare, ha dimostrato che è possibile rimuovere il photoresist per trattamento in acetone e sonicazione senza danneggiare il rivestimento polimerico di copoli(DMA-MAPS-NAS). Nella figura si osserva che gli spot sono rimasti legati solo alle regioni del chip che non erano inizialmente protette dal photoresist.

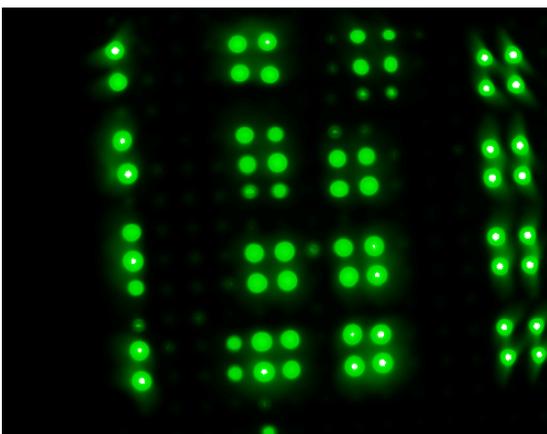


Figura 5: su una superficie di ossido di silicio ricoperta da photoresist, secondo un pattern preciso, rivestita dal copoli(DMA-MAPS-NAS), si rimuove il photoresist e si spotta un array di spot di un oligonucleotide. Dopo lavaggio ed ibridazione con oligonucleotide complementare marcato con fluorescenza, solo in corrispondenza degli spot depositati nelle aree funzionali, ovvero rivestite dal copolimero, si osserva fluorescenza.

## Piano temporale del WP2

L'andamento del WP2 in relazione al piano temporale previsto si può desumere dalla tabella seguente:

	Attività svolte nel primo anno	Piano previsionale	
		2° anno	3° anno
<b>Task 2.1</b> (mese 1-18)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sintesi di copolimeri in grado di formare un rivestimento per dip coating sulla superficie attiva del sensore.</li> <li>Sintesi di copolimeri a blocchi con architettura "brush" costruiti direttamente sulla superficie del sensore previa funzionalizzazione con agenti mediatori della polimerizzazione.</li> </ul>	Sviluppo di procedure di rivestimento della superficie del sensore	-
<b>Task 2.2</b> (mese 9-24)	<ul style="list-style-type: none"> <li>messo a punto un test di ibridazione su fase solida tra un oligonucleotide ammino modificato ed il suo complementare, marcato con sferette magnetiche e fluorescenti.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilizzo di sferette magnetiche nella marcatura di frammenti di DNA</li> <li>Utilizzo di metodi di marcatura in esperimenti di espressione genica utilizzando sensori sviluppati nel WP 1</li> </ul>	-
<b>Task 2.3</b> (mese 12-36)		Caratterizzazione chimico fisica e funzionale del rivestimento polimerico	Ottimizzazione della composizione del rivestimento funzionale utilizzando dati provenienti dalla caratterizzazione

### Conclusioni:

Nella primo anno del progetto è stato dimostrato che è possibile funzionalizzare diversi materiali quali l'ossido di silicio e l'oro che sono potenzialmente utilizzabili per ricoprire l'area attiva del sensore. E' stato sviluppato anche un test di ibridazione su fase solida nel quale uno degli oligonucleotidi è marcato con sferette magnetiche. E' stata evidenziato e risolto il problema della funzionalizzazione selettiva dell'area attiva del sensore mediante una procedura di protezione dell'area esterna al sensore attraverso l'uso di un photoresist.

Non si evidenziano scostamenti rispetto all'attività proposta e non sono stati incontrati problemi che potrebbero pregiudicare l'esito del progetto.

### **Report Unità III**

## **FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation (IFOM)**

Responsabile: Prof. Francesco Blasi

Sommario. Allo scopo di testare in via preliminare i sensori con il materiale con cui saranno successivamente utilizzati, abbiamo preparato dell'RNA totale a partire da due campioni di RNA umano, un aspirato midollare umano da paziente linfomatoso, ed uno non linfomatoso da usare come standard e come controllo. Inoltre, sono state sintetizzate le apposite sonde e l'RNA è stato retrotrascritto ed inviato al gruppo 2 (Dott.ssa Marcella Chiari) per i test preliminary.

### **Task 3.1: Synthesis of specific and control probes for Prep1 mRNA**

Sonde specifiche. Sono stati sintetizzate n° 4 sonde da 50 bp modificate con l'aminolinker C6 in posizione 5' dei seguenti geni (umani):

- **PREP-1** AAACGTAGCCATGGCGACGGTGGCAGGTGGCACAGTGTATCAGCCTGTCA

- **ACTINA** AGGACCTGTATGCCAACAACGTCATGTCGGGGGGCACCACGATGTACCCT

#### **- GAPDH**

GCTCATTTCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGC

#### **- PREP-1 mutato**

TAGCATCGACGTAGAGGCAGGGCCGGCTCGGAGAATCTGTGACCGTCTGA

Tutte le sonde hanno un quantitativo di G - C compreso tra il 50-70%

Queste sonde sono state consegnate nel Lab della Dott.ssa M. Chiari.

### **Task 3.2: RNA preparation from tumors and normal tissues.**

Retrotrascrizione dell'RNA. Sono state effettuate delle retro trascrizioni (RT-PCR) di un campione (RNA estratto da aspirato midollare umano) di un paziente con un linfoma evidenziato anche nel midollo ed un campione da un paziente con un linfoma non presente nel midollo utilizzando

primers universali (oligo-dT), marcati con cianina-5 (oligo dT-Cy5) e con biotina (oligo dT-Biotina).

Il protocollo seguito per la reazione di RT è stato il seguente:

- RNA utilizzato: 100ng/reazione
- Oligo dT (marcati e non): 100pMoli/reazione

E' stato utilizzato il kit della Promega ImProm II Reverse Transcription System (cat. n° A3800) seguendo le istruzioni riportate nel manuale allegato.

I cDNA ottenuti (40µl per ogni campione) sono stati controllati per PCR utilizzando dei primers contro l'actina umana e la GAPDH umana per verificare la bontà dei prodotti derivanti dalla retro trascrizione. Sono stati confrontati su gel di agarosio i prodotti di PCR ottenuti utilizzando il cDNA derivante da oligo dT non marcati (controllo) ed i due cDNA derivanti da oligo dT-Cy5 ed oligo dT-biotina. I saggi hanno dato un risultato positivo evidenziando una banda dal peso previsto per tutti i campioni analizzati.

Tutti i cDNA ottenuti sono stati inviati nel Lab della Dott.ssa M. Chiari.

	Attività svolte nel primo anno	Piano previsionale	
		2° anno	3° anno
<b>Task 3.1</b> (mese 1-12)	Sintesi oligonucleotidi biotiniliati specifici per Prep1 e per mRNA di base e loro uso nel sensore	Ottimizzazione delle sonde in relazione alla specificità dimostrata	Esperimento biologico finale
<b>Task 3.2</b> (mese 13-24)	Retrotrascrizione RNA paziente con linfoma	Retrotrascrizione RNA da adenocarcinomi e carcinomi	-
<b>Task 3.3</b> (mese 25-36)	-	-	Test di quantitatizzazione su mRNA di controllo murini e umani
<b>Task 3.4</b> (mese 25-36)	-	-	Profile di espressione genica di tumori Prep1 positivi e negativi