

SISTEME NANOSTRUCTURATE PENTRU IDENTIFICAREA DE ANTIGENE VIRALE CU UTILIZARI IN DIAGNOSTICUL MEDICAL

Acronim: VIRNANO, Nr. Contract: D11034 /2007

ETAPA II: Dezvoltarea de modele experimentale bazate pe cristale lichide si ciclodextrine pentru stabilirea posibilitatilor de decelare a interactiunilor specifice ligand-receptor

REZUMAT

A fost descrisa o tehnica de depunere in vid pentru un strat subtire de aur, la unghi de incidenta mic) pentru obtinerea de placute de sticla utilizate la formarea celulelor de masurare optica.

S-a optimizat tehnica de depunere in vid, prin stabilirea conditiilor de depunere in functie de dimensiunile placutelor de sticla si a unghiului de evaporare.

Cu ajutorul nomogramelor, a fost descrisa o metoda de analiza pentru alegerea conditiilor de depunere in vid.

A fost elaborata o reteta de laborator pentru curatarea suportului de sticla pe care se depune stratul de aur. Pe sticla de tip ROTH, s-au depus straturi de Cr/Au folosind tehnica de depunere in vid, utilizand instalatia de depunere Edwards AUTO500, cu sistem de pompe turbomoleculare, la vid de 10^{-6} torr. Straturi de Cr/Au au fost caracterizate cu AFM si SEM, realizandu-se si masuratori interferometrice.

Pentru cresterea aderenței stratului de aur la suprafata suportului din sticla, s-a utilizat un strat intermediar de polistiren, depus prin spin-coating.

S-au realizat celule cu cristal lichid (celule de masurare) de diferite tipuri, luand in considerare continutul stratului depus pe suportul de sticla, unghiul de depunere al stratului de Au si grosimea stratului depus.

S-a adaptat metoda conoscopica pentru determinarea gradului de aliniere a cristalului lichid in celulele experimentale.

S-a evidentiat ca metoda SERS de studiu constituie o procedura de identificare a legarii alcantiolului de aurul depus pe suprafata suportului din celula de analiza.

Au fost folosite mai multe metode de punere in evidenta a orientarii cristalelor lichide si de studiu a structurii straturilor depuse: vizualizare directa, conoscopie, difractie de raze X, reflectometrie de raze X, microscopie de forta atomica, spectroscopie de fotoelectroni, spectroelipsometrie.

S-au stabilit doua metode si procedee de obtinere a straturilor de tip SAM, elaborand strategia de abordare a cercetarilor pentru identificarea si selectionarea componentelor constitutive, precum si stabilirea conditiilor de operare privind realizarea si aplicarea acestora pe suporturi din sticla pe care sunt depuse filme din aur.

Au fost obtinute un numar de noua straturi autoasamblate (SAM), din care trei pe baza de alcantioli, doua pe baza de compusi de incluziune ai ciclodextrinei si derivatilor reactivi ai acesteia, doua SAM-uri mixte si cate un SAM pe baza de poli-L-lizina si respectiv acid sialic. Structurile obtinute experimental au fost caracterizate fizico-chimic.

S-a elaborat un studiu de modelare (model matematic) si simulare a procesului de grefare a monoclorotriazinil- β -ciclodextrinei pe suporturi celulozice (celofan si bumbac), prin aplicarea metodelor de programare factoriala si centrala rotabila compusa, in scopul obtinerii unei relatii cantitative si calitative referitoare la parametri semnificativi care influenteaza procesul.

Au fost obtinuti si purificati compusi de incluziune ai β -ciclodextrinei (β -CD) si monoclorotriazinil- β -ciclodextrinei (MCT- β -CD) cu substante bioactive (biotina), structurile proiectate fiind confirmate prin analiza spectrala FT-IR in transmisie.

Pentru obtinerea suprafetelor fotosensibile cu grupe fotoorientabile (in lumina UV-liniar polarizata LUVLP) sunt necesari copolimeri speciali avand grupe reactive -OH si grupe fotoreactive cinamat. In acest scop s-a simulat reactia grupei monoclorotriazinil din MCT- β -CD cu grupele -OH din pelicule celulozice, respectiv celofan.

Pentru evidentierea interactiunilor de tip biotina-avidina, folosind streptavidina, pe diverse suporturi (membrane celulozice, lame sticla, polistiren) au fost adaptate tehnicile standard Dot Blot, imunofluorescenta si determinari spectrofotometrice in microplaci cu godeuri.

Prezenta compusilor biotinizati de ciclodextrina in sisteme cu streptavidina conduce la un efect de competitie a produsilor biotinizati prezenti, enzima peroxidaza biotinizata (HRP-B) si derivati biotinizati ai ciclodextrinei (β -CD-B si MCT-B), pentru locurile de legare ale streptavidinei fixate pe suprafata microplacii. Aceste rezultate arata ca produsii de ciclodextrina sintetizati au fost biotinizati.

Tehnica de spectroscopie IR folosita si protocolul experimental de masuratori in microplaci, puse la punct in aceasta etapa, sunt metode valide de identificare a produsilor biotinizati si de evidentiere a interactiunii de tip biotina-avidina in probele analizate.