

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2005020415

Coordinatore Scientifico	Giorgio SBERVEGLIERI
Ateneo	Università degli Studi di BRESCIA
Titolo della Ricerca	Nanosensori quasi mono-dimensionali per la biorilevazione ultra sensibile priva di marcatori
Finanziamento assegnato	Euro 198.000
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca

Lo sviluppo di dispositivi elettricamente indirizzabili per la rilevazione senza marcatori di DNA e di altre macromolecole biologiche ha la potenzialità di rivoluzionare sia la ricerca di base in campo biologico che i controlli di qualità degli alimenti e i sistemi di protezione da bioterrorismo e in campo medico.

Lo scopo principale del progetto consiste nel dimostrare la potenzialità di tecnologia nuova e innovativa e di materiali nanostrutturati materiali per la rilevazione di DNA senza l'ausilio di marcatori, con elevata sensibilità, e con buona selettività, per fornire le basi di una rivelazione di DNA molteplice, integrata, e ad elevata capacità di trattamento per controlli genetici estesi, rilevazione di pericoli biologici e per sicurezza alimentare.

Nell'ambito della ricerca, verrà progettato, realizzato e sperimentato un nuovo biosensore di DNA basato sulle proprietà sensibili di nanostrutture quasi-unidimensionali opportunamente funzionalizzate. Una piattaforma tecnologica di elettronica dedicata e di nanomanipolazione verrà sviluppata per costruire un dispositivo basato su un singolo nanofilo sensibile. Per verificare il funzionamento del dispositivo, verrà identificata una applicazione di prova per la rilevazione di organismi geneticamente modificati (OGM) per controlli estesi a basso costo nel campo della sicurezza alimentare.

Il dispositivo funziona essenzialmente come un transistor che commuta tra le condizioni di trasporto di corrente elevato o ridotto, corrispondenti ai due stati logici on e off, in conseguenza del legame selettivo tra una molecola e la superficie dell'elemento sensibile. Un transistor commuta modificando la densità di portatori di carica nel canale conduttivo tra i terminali di ingresso e di uscita. In un transistor con nanowire, il canale conduttivo è costituito dal nanofilo, che è connesso elettricamente da contatti metallici alle estremità.

Tale configurazione elettrica prospetta una trasduzione altamente sensibile perché la quantità minima di molecole adsorbita necessaria a modificare la proprietà conduttive del canale del transistor produce una commutazione di stato del transistor. La riduzione di questo soglia di rilevazione significa un abbassamento del limite inferiore di rilevazione.

Il meccanismo di rilevazione viene attualmente descritto in termini di modulazione della regione di carica spaziale alla superficie del nanofilo. Quando una molecola elettricamente attiva aderisce alla superficie del nanofilo, provoca l'accumulazione o lo svuotamento di portatori di carica all'interno del filo a seconda che la carica accumulata nella molecola ed i portatori maggioritari di carica siano di segno opposto o contrario. Questo porta ad un cambio di conduttanza per il filo, in modo che l'evento di adsorbimento sia registrato come una variazione della corrente che attraversa il filo. Il contatto di gate al di sotto del substrato fornisce un ulteriore mezzo per migliorare la sensibilità attraverso l'effetto elettroassorbitivo.

Per sviluppare l'elemento sensibile nanostrutturato, verranno considerati gli approcci top-down e bottom-up auto-assemblante:

1. Nanofili di silicio (Sinw) di dimensioni laterali inferiori a 20 nm, preparati tramite tecnologia top-down tramite litografia ottica o con fascio elettronico, e rimozione chimica in soluzione.

2. Ossidi metallici tramite Bottom-up (In₂O₃, ZnO, SnO₂): nanonastri ultra lunghi (MOXnb) ottenuti per evaoprazione di polveri di ossidi metallici ad elevata temperatura. La morfologia nastriforme si presenta come caratteristica tipica e distintiva degli ossidi semiconduttori.

3. Nanotubi di carbonio tramite Bottom-up (CNT): CNT a parete multipla preparati tramite deposizione chimica da fase vapore standard con filamento caldo.

Top-down Sinw sono molto promettenti come materiale sensibile e sono già stati proposti per la rilevazione elettrica di DNA, ma la rilevazione di OGM non è stata ancora esplorata. Sinw verranno considerato come materiale di riferimento per validare la tecnologia. Come sviluppo delle tecniche più recenti, verrà effettuata la immobilizzazione di probes su nanofili di silicio anche rivestiti di SiO₂; inoltre verrà sperimentata l'efficacia dell'effetto elettroassorbitivo realizzando il contatto posteriore di gate. L'esperienza acquisita verrà estesa a materiali innovative quali MOXnb e CNT. La loro notevole reattività di superficie e il loro basso costo di produzione li rende candidati ideali per la rilevazione altamente sensibile di DNA

La nanomanipolazione, surface clamping e la nanolitografia Dip-pen (DPN) sono attualmente le tecniche più promettenti per posizionare i MOXnb e i CNT sopra i substrati. Infatti, i naomanipolatori e DPN possono essere implementati in microscopi SEM e AFM per consentire la visualizzazione, la mascheratura di nanostrutture, la deposizione localizzata di probe chimici, e l'incapsulamento della nanostruttura. In aggiunta, la deposizione tramite Focused Ion Beam (FIB) verrà impiegata nel caso si rendano necessarie tecniche non a contatto per la metallizzazione e l'incapsulamento. Al giorno d'oggi queste tecniche non possono essere impiegate per la produzione su larga scala e a basso costo, ma lo sforzo enorme compito nel mondo in questi campi fa sperare in novità imminenti in questo settore tecnologico.

Come piano di lavoro scientifico e tecnico, il progetto si articola in sette Workpackages (WPs) dei quali WP1 "Definizione delle specifiche e delle applicazioni" riguarda la definizione di una applicazione guida per la rilevazione di OGM e l'individuazione dei requisiti; WP2 "Preparazione dei materiali e dispositivi" riguarda la preparazione dei nanofili di MOX e di silicio e dei CNT in stretta sinergia con WP3 "Preparazione dei substrati" che affronterà le tematiche relative a interconnessione, nanomanipolazione e incapsulamento per supportare i nanofili.

Lo sviluppo efficace di una nuova generazione di sensori richiede di essere supportato da una gamma estesa di caratterizzazioni

morfologiche e chimico fisiche a livello atomico: nel WP4 "Caratterizzazione Fisica e Chimica", i processi di preparazione saranno studiati tramite microscopia elettronica in scansione e trasmissione (SEM/TEM) e microscopia a forza atomica e scanning-tunnelling (AFM/STM). Misure di fluorescenza su aree estese e microscopia elettrochimica a scansione (SECM) saranno impiegate per visualizzare la reattività chimica di nanostrutture funzionalizzate.

In "WP6 Disseminazione e sfruttamento dei risultati" verranno effettuate le seguenti attività di divulgazione: pubblicazioni in riviste internazionali, e diffusione dei risultati tramite sito internet, presentazioni a congressi scientifici e workshops. Questa attività di coordinamento assicurerà all'interno della collaborazione una diffusione tempestiva dei risultati e dei componenti, garantendo il flusso di informazioni all'interno e tra i WP. L'attività di ricerca sarà inoltre caratterizzata da un notevole collaborazione tra i partecipanti: si prevede di tenere degli incontri tecnici a scadenza semestrale per verificare lo sviluppo del progetto e per pianificare le attività.

Inoltre, gli sviluppi recenti nel campo delle nanobiotecnologie saranno costantemente considerati e aggiornati durante tutta la durata del progetto.

A fronte di una riduzione del 25% del finanziamento ottenuto rispetto alla richiesta iniziale, l'impegno in mesi uomo di ciascuna unità è ridotto di una quota corrispondente

Activity Title UNIBS UNIAQ UNIFI UNIPI

WP1 Identification of technical specifications and applications 0 0 5 0

WP2 Preparation of materials and devices 15 20 4 20

WP3 Preparation of the substrates 9 15 0 16

WP4 Physical and chemical characterization 11 15 4 0

WP5 Production and characterisation of the biosensor 9 0 12 0

WP6 Dissemination and exploitation 2 1 1 1

WP7 Consortium Management 2 0 0 0

Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

Lo sviluppo di dispositivi elettricamente indirizzabili per la rilevazione senza marcatori di DNA e di altre macromolecole biologiche ha la potenzialità di rivoluzionare sia la ricerca di base in campo biologico che i controlli di qualità degli alimenti e i sistemi di protezione da bioterrorismo e in campo medico.

Lo scopo principale del progetto consiste nel dimostrare la potenzialità di tecnologia nuova e innovativa e di materiali nanostrutturati materiali per la rilevazione di DNA senza l'ausilio di marcatori, con elevata sensibilità, e con buona selettività, per fornire le basi di una rivelazione di DNA molteplice, integrata, e ad elevata capacità di trattamento per controlli genetici estesi, rilevazione di pericoli biologici e per sicurezza alimentare.

Nell'ambito della ricerca, verrà progettato, realizzato e sperimentato un nuovo biosensore di DNA basato sulle proprietà sensibili di nanostrutture quasi-unidimensionali opportunamente funzionalizzate. Una piattaforma tecnologica di elettronica dedicata e di nanomanipolazione verrà sviluppata per costruire un dispositivo basato su un singolo nanofilo sensibile. Per verificare il funzionamento del dispositivo, verrà identificata una applicazione di prova per la rilevazione di organismi geneticamente modificati (OGM) per controlli estesi a basso costo nel campo della sicurezza alimentare.

Per sviluppare l'elemento sensibile nanostrutturato, verranno considerati gli approcci top-down e bottom-up auto-assemblante:

4. Nanofili di silicio (Sinw) di dimensioni laterali inferiori a 20 nm, preparati tramite tecnologia top-down tramite litografia ottica o con fascio elettronico, e rimozione chimica in soluzione.

5. Ossidi metallici tramite Bottom-up (In₂O₃, ZnO, SnO₂): nanonastri ultra lunghi (MOXnb) ottenuti per evaporazione di polveri di ossidi metallici ad elevata temperatura. La morfologia nastriforme si presenta come caratteristica tipica e distintiva degli ossidi semiconduttori.

6. Nanotubi di carbonio tramite Bottom-up (CNT): CNT a parete multipla preparati tramite deposizione chimica da fase vapore standard con filamento caldo.

Top-down Sinw sono molto promettenti come materiale sensibile e sono già stati proposti per la rilevazione elettrica di DNA. Sinw verranno considerato come materiale di riferimento per validare la tecnologia. L'esperienza acquisita verrà estesa a materiali innovative quali MOXnb e CNT. La loro notevole reattività di superficie e il loro basso costo di produzione le rende candidati ideali per la rilevazione altamente sensibile di DNA

La ben nota elevata reattività delle superfici degli ossidi metallici e la specifica reattività dei CNT verso le specie ossidanti li rende candidati ideali per sviluppare sensori di DNA e di proteine molto più sensibili che i nanowire di Si sotto forma di dispositivi ad "effetto di campo". Questo effetto già usato nel campo dei sensori chimici, in questo progetto di ricerca, verrà portato sulla scala dei conduttori nanometrici. In fatti i sensori che intendiamo studiare sono costituiti da transistor il cui canale è costituito dal "filo" (MOX, Si o CNT) connesso a due contatti metallici. Quando una molecola dotata del suo precipuo sistema elettronico interagisce con la superficie del nanofilo, questo induce per "effetto di campo" modificazioni del numero di portatori di carica nel filo stesso e quindi una modifica della conduttanza del dispositivo, così che l'evento di legame viene registrato come una modifica della corrente che fluisce attraverso il dispositivo. Le dimensioni nanometriche della parte attiva del dispositivo sono cruciali al fine della sensibilità poichè la superficie, dove avvengono le interazioni con l'esterno, risulta essere predominante rispetto al "bulk" e quindi le variazioni relative della conducibilità del sistema possono risultare assolutamente rilevanti anche in caso di eventi di interazione con la specie da rilevare deboli e/o sporadici.

Criteri di verificabilità

Il rischio tecnico principale è associato alla sfida ambiziosa di riunire nanotecnologia di materiali inorganici e biologia su scala nanostrutturata. Infatti, la riuscita positiva del progetto si basa sia sulla esperienza e sulla qualifica dei partecipanti, che offrono competenze interdisciplinari in Fisica, Bio-chimica e Ingegneria, sia sulla disponibilità di strumentazione di alta prestazione per visualizzazione, nanomanipolazione, funzionalizzazione e immobilizzazione di probes, e di nano dispensazione.

Un ulteriore punto critico dal punto di vista tecnico e scientifico è associato all'ambiente liquido nel quale il dispositivo si troverebbe immerso durante il funzionamento. Per quanto la dispersione di corrente elettrica da parte del nanofilo non dovrebbe essere un problema in quanto si dovrebbe produrre una regione di carica spaziale quasi isolante, l'adsorbimento di acqua dalla soluzione acquosa o dall'atmosfera circostante e la conseguente idratazione non potrà essere evitata. Quest'ultima rappresenta una delle cause principali di invecchiamento e isteresi per il sensore. Ci si attende comunque che questo effetto sia meno efficace per un sensore basato su una nanostruttura a singola cristallinità e priva di difetti estesi. In merito alla strategia possibile per limitare la idratazione verranno considerati sia l'introduzione di un rivestimento protettivo (quale SiO₂ per i Sinw) sia la modulazione della regione di carica spaziale tramite il controllo del potenziale di gate del dispositivo. Come ulteriore soluzione, verrà considerata la possibilità di asciugare il dispositivo successivamente alla esposizione alla soluzione contenente il DNA da rilevare.

Criterio di verificabilità è il raggiungimento dei milestones con la tempistica indicata

WP1 Definizione delle specifiche e delle applicazioni

Milestones e tempistica

M1. (Mese 4) definizione della applicazione e del protocollo di misura.

WP2 Preparazione dei materiali e dispositivi

Milestones e tempistica

M2. (mese 6) Preparazione di nanobelts a base di In₂O₃

M3. (mese 6) Deposizione e clusterizzazione del film catalitico per i CNTs

M4. (mese 8) Fabbricazione della 1a generazione di Sinws

M5. (mese 12) Preparazione di nanobelts a base di ZnO

M6. (mese 12) Crescita di CNTs e valutazione delle procedure di purificazione

M7. (mese 12) Efficace funzionalizzazione cross-linker dei dispositivi ad elevate area

M8. (mese 12) Crescita di CNTs su substrate pretrattati

M9. (mese 18) Deposizione di Au su CNTs

M10. (mese 18) Tiolizzazione a secco dei CNTs

M11. (mese 18) Efficace funzionalizzazione cross-linker delle nanostrutture

M12. (mese 18) Preparazione di nanobelts a base di In₂O₃ e ZnO

M13. (mese 20) Fabbricazione della 2a generazione di Sinws (diametro meno di 20nm)

WP3 Preparazione dei substrati

Milestones e tempistica

M14. (Mese 4) Fabbricazione delle interconnessioni per i sensori di tipo top-down

M15. (Mese 12) Messa in funzione dei nanomanipolatori per SEM e AFM

M16. (Mese 16) Accertamento della DPN per la deposizione dei contatti e del materiale biologico

M17. (Mese 18) Realizzazione delle strutture a FET basate su CNT e MOX

M18. (Mese 20) Realizzazione del packaging

M19. (Mese 24) Studio e progettazione del apparato microfluidico

WP4 Caratterizzazione chimica e fisica

Milestones e tempistica

M20. (Mese 4) Efficacia della strumentazione per la caratterizzazione strutturale e morfologica delle nanostrutture

WP5 Realizzazione e caratterizzazione del biosensore

Milestones e tempistica

M21. (mese 12) Efficace immobilizzazione del biosensore su dispositivi ad area elevata

M22. (mese 18) Efficace immobilizzazione del biosensore sulle nanostrutture

M23. (mese 24) Valutazione delle prestazioni del biosensore

WP6 Disseminazione e sfruttamento dei risultati

Milestones e tempistica

M24. (mese 1) Preparazione della pagina web del progetto

M25. (mese 24) Organizzazione del workshop conclusivo

WP7 Gestione del Consorzio

Milestones e tempistica

M26. (mese 1) Kick-off meeting

M27. (mese 6, 12, 18) Meeting successivi per la valutazione dello sviluppo del progetto

M28. (mese 12) Preparazione del report del primo anno

M29. (mese 24) Termine del progetto senza maggiori azioni ancora da intraprendere

M30. (mese 24) Preparazione del report finale

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità Università degli Studi di BRESCIA
Responsabile Scientifico Giorgio SBERVEGLIERI
Finanziamento assegnato Euro 80.000

Compito dell'Unità

- ° *Task 2.1 Preparazione bottom-up di nanonastri di ossidi metallici: Preparazione di ossidi metallici tramite Bottom-up (In₂O₃, ZnO, SnO₂): nanonastri ultra lunghi (MOXnb) ottenuti per evaoprazione di polveri di ossidi metallici ad elevata temperatura.*
 - ° *Task 2.4 Funzionalizzazione chimica: Funzionalizzazione dei nanonastri di ossidi metallici e dei nanowires di Si per dipping e DPN*
 - ° *Task 3.2 Nanomanipolazione e contatti: Nanomanipolazione di MOXnb e di CNTs tramite AFM e deposizione dei contatti metallici tramite AFM e FIB*
 - ° *Task 4.1 Caratterizzazione morfologica e strutturale: Caratterizzazione strutturale, morfologica e di composizione chimica dei MOXnbs (SEM, TEM, AFM, STM)*
 - ° *Task 4.2 Caratterizzazione elettrica: Caratterizzazione elettrica di MOXnb*
 - ° *Task 4.3 Caratterizzazione elettrochimica e di fluorescenza della reazione di ibridazione: caratterizzazione di fluorescenza della reazione di ibridazione*
 - ° *Task 5.1 Immobilizzazione degli oligonucleotidi: Immobilizzazione degli ODN sui trasduttori Si, SiO₂, MOX nb*
 - ° *WP6 Disseminazione e sfruttamento dei risultati: disseminazione scientifica. Organizzazione del workshop conclusivo*
 - ° *WP7 Gestione del Consorzio: monitoraggio dell'attività, organizzazione degli incontri, preparazione dei report*
- UNIBS è leader del progetto e dei workpackage WP2 Preparazione dei materiali e dispositivi, WP6 Disseminazione

Sede dell'Unità Università degli Studi di PISA
Responsabile Scientifico Andrea NANNINI
Finanziamento assegnato Euro 48.500

Compito dell'Unità

- ° *Task 2.3 Processo top down di nanowires di Si: Nanofili di silicio (Sinw) di dimensioni laterali inferiori a 20nm, preparati tramite tecnologia top-down tramite litografia ottica o con fascio elettronico, e rimozione chimica in soluzione.*
- ° *Task 3.1 Interconnessioni: definizione dei substrati per la deposizione delle strutture nanomanipolate, definizione di substrati prepatternati per la crescita bottom up selettiva*
- ° *Task 3.3 Packaging: Realizzazione del packaging e studio e progettazione dell'apparato microfluidico*
- ° *Task 4.2 Caratterizzazione elettrica: caratterizzazione elettrica dei Sinws*
- ° *WP6 Disseminazione e sfruttamento dei risultati: disseminazione scientifica. Organizzazione del workshop conclusivo*
- ° *WP7 Gestione del Consorzio: monitoraggio tecnico e scientifico*

UNIFI è leader del workpackage WP3 Preparazione dei substrati

Sede dell'Unità Università degli Studi de L'AQUILA
Responsabile Scientifico Sandro SANTUCCI
Finanziamento assegnato Euro 35.500

Compito dell'Unità

- ° *Task 2.2 Preparazione bottom up di Nanotubi di Carbonio: Nanotubi di carbonio tramite Bottom-up (CNT): CNT a parete multipla preparati tramite deposizione chimica da fase vapore standard con filamento caldo*
- ° *Task 2.4 Funzionalizzazione chimica: Tiolizzazione a secco dei CNTs*
- ° *Task 3.2 Nanomanipolazione e contatti: manipolazione nanorobotica all'interno di un SEM di CNTs e MOXnbs*
- ° *Task 4.1 Caratterizzazione morfologica e strutturale: Caratterizzazione strutturale, morfologica e di composizione chimica dei CNTs (SEM, TEM, AFM, STM, AES, XPS)*
- ° *Task 4.2 Caratterizzazione elettrica: caratterizzazione elettrica dei CNTs*
- ° *WP6 Disseminazione e sfruttamento dei risultati: disseminazione scientifica. Organizzazione del workshop conclusivo*
- ° *WP7 Gestione del Consorzio: monitoraggio tecnico e scientifico*

UNIAQ è leader del workpackage WP4 Caratterizzazione chimica e fisica

Sede dell'Unità	Università degli Studi di FIRENZE
Responsabile Scientifico	Giovanna MARRAZZA
Finanziamento assegnato	Euro 34.000

Compito dell'Unità

- ° WP1 *Definizione delle specifiche e delle applicazioni: definizione della applicazione e del protocollo di misura nel campo della rivelazione degli OGM*
 - ° Task 2.4 *Funzionalizzazione chimica: Funzionalizzazione dei CNTs*
 - ° Task 4.3 *Caratterizzazione elettrochimica della reazione di ibridazione. Caratterizzazione elettrochimica (voltammetrica e SECM) di tutte le nanostrutture e della reazione di ibridazione.*
 - ° Task 5.1 *Immobilizzazione degli oligonucleotidi: Immobilizzazione degli ODN sui trasduttori CNTs*
 - ° Task 5.2 *Caratterizzazione funzionale: valutazione delle prestazioni di tutti i genosensori*
 - ° WP6 *Disseminazione e sfruttamento dei risultati: disseminazione scientifica. Organizzazione del workshop conclusivo*
 - ° WP7 *Gestione del Consorzio: monitoraggio tecnico e scientifico*
- UNIFI è leader del workpackage WP1 *Definizione delle specifiche e delle applicazioni* e del WP5 *Realizzazione e caratterizzazione del biosensore*
-