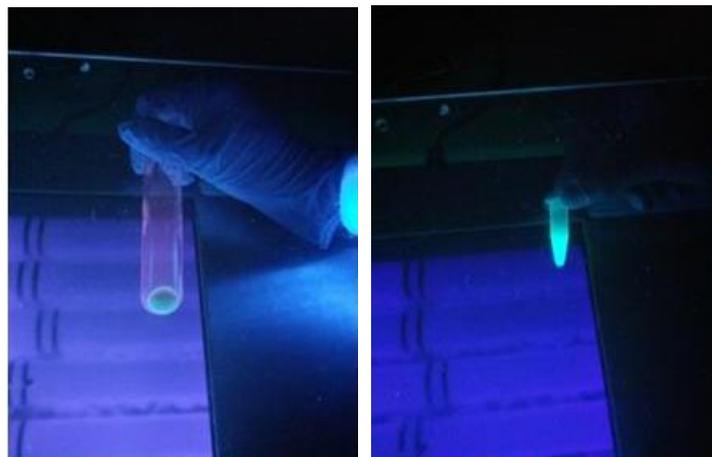




Attività scientifiche del Progetto Bio.Me.P

“Progetto e Sviluppo di un Biosensore per le rilevazione in real-time di Metalli Pesanti”

PO/FESR Sicilia 2007/2013, Linea di intervento 4.1.1.2



Marilena Di Natale

Istituto di Studi sul Mediterraneo, S.S. di Palermo, Via F. Parlatore, 65 90145 Palermo
marilena.dinatale@ismed.cnr.it

PREMESSA	3
FASI E OBIETTIVI	3
FASE 1	4
1.1 ISOLAMENTO MRNA PROTEINA FLUORESCENTE	4
1.2 CLONAZIONE DELLA PROTEINA FLUORESCENTE IN VETTORI DI ESPRESSIONE	5
1.3 PURIFICAZIONE E STANDARDIZZAZIONE DI PROTOCOLLI DI ESPRESSIONE	6
FASE 2	6
2.1 CREAZIONE DI UN SISTEMA IDEALE DI RIFERIMENTO	6
2.2 CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA E MOLECOLARE DELLA GFP RICOMBINANTE CLONATA DA ANEMONIA SULCATA	8
2.3 SAGGI IN VIVO SU ANEMONIA SULCATA E STUDIO DEL COMPORTAMENTO DELLA GFP	9
FASE 3	10
3.1 PROGETTO SISTEMA OPTOELETTRONICO	10
3.2 PROGETTO SUBSTRATO CHIMICO/BIOLOGICO	11
3.3 PROGETTO SISTEMA ELETTRONICO DI TRASDUZIONE E AMPLIFICAZIONE	11
3.4 SPERIMENTAZIONE SU BANCO OTTICO	11
FASE 4	12
4.1 PROGETTO SISTEMA ELETTRONICO DI ACQUISIZIONE E CONVERSIONE	12
4.2 PROGETTO INTERFACCIA UTENTE LOCALE E REMOTA	12
4.3 REALIZZAZIONE PROTOTIPO DIMOSTRATORE	13
FASE 5	13
5.1 SVILUPPO DELLA COLTIVAZIONE IDROPONICA E FUORISUOLO	13
5.2 VALUTAZIONE DEL DANNO BIOLOGICO DA METALLI PESANTI SULLE PIANTE	13
5.3 MISURAZIONE DEI METALLI PESANTI NELLE PIANTE	14
CONCLUSIONI	15
RINGRAZIAMENTI	15

Premessa

Il progetto intitolato ”**Progetto e Sviluppo di un Biosensore per le rilevazione in "real-time" di Metalli Pesanti**”- Bio.Me.P - ha come obiettivo quello di sperimentare una tecnologia che possa consentire di realizzare uno strumento analitico di facile utilizzo, commercialmente sostenibile ed in grado di fornire dei risultati qualitativi in tempo reale, utile pertanto ad effettuare una sorta di “screening ambientale”. Tale strumento potrà essere utilizzato sia all’interno di strumenti analitici sia in sistemi di monitoraggio continuo.

Il progetto della durata di 18 mesi e concluso nel 2014, ha visto come soggetto proponente BioDiagene Srl e come partner di progetto l’Istituto di Biorisorse e Bioscienze del Consiglio Nazionale delle Ricerche (già Istituto di Genetica Vegetale) UOS di Palermo, l’Istituto per l’ambiente Marino e Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche UOS Torretta Granitola (TP), l’Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche UOS di Palermo.

Fasi e Obiettivi

Il progetto ha previsto la realizzazione di cinque fasi operative ciascuna mirata al raggiungimento dei corrispondenti obiettivi specifici:

Fase 1: Clonazione e sintesi della proteina fluorescente

- Obiettivo 1.1: libreria di cDNA retrotrascritti da *Anemonia sulcata*;
- Obiettivo 1.2: clone di cDNA in grado di esprimere la versione completa del messaggero per la GFP;
- Obiettivo 1.3: protocollo standardizzato di induzione e purificazione della GFP.

Fase 2: Sperimentazione sulla proteina fluorescente ed analisi della risposta del sistema di emissione in presenza di metalli pesanti.

Obiettivo 2.1: Creazione di un sistema ideale di riferimento: caratterizzazione spettroscopica e molecolare della Green Fluorescent Protein di *Aequorea coerulea* (Clontech)

Obiettivo 2.2: Caratterizzazione spettroscopica e molecolare della GFP ricombinante clonata da *Anemonia sulcata*

Obiettivo 2.3: Saggi in vivo su *Anemonia sulcata* e studio del comportamento della GFP in presenza di metalli pesanti

Fase 3: Sviluppo del sistema elettronica di trasduzione

- Obiettivo 3.1: progetto completo degli elaborati tecnici relativi al sistema optoelettronico;
- Obiettivo 3.2: protocolli sperimentali messi a punto durante le attività ed un confronto tra i risultati ottenibili con le diverse metodologie messe a punto;

- Obiettivo 3.3: progetto del circuito elettronico di amplificazione e trasduzione, completo degli schemi elettrici, del layout di montaggio e dell'elenco dei componenti necessari;
- Obiettivo 3.4: prototipo del sistema optoelettronico ed i report sperimentali

Fase 4: Integrazione del trasduttore in un dispositivo automatico

- Obiettivo 4.1: progetto del circuito elettronico (completo di schemi elettrici e layout di montaggio) ed il diagramma di flusso (o analogo diagramma funzionale) del firmware di gestione;
- Obiettivo 4.2: diagramma funzionale dell'interfaccia utente;
- Obiettivo 4.3: prototipo dimostrativo dello strumento analitico progettato.

Fase 5: Sperimentazione del biosensore e validazione del dispositivo

- Obiettivo 5.1: protocollo utile alla realizzazione di un sistema di coltivazione fuori suolo efficiente per studiare l'effetto dei metalli pesanti;
- Obiettivo 5.2: report su danni biologici derivanti dall'allevamento in sistemi arricchiti di metalli pesanti e protocolli validati e ripetibili utili alla valutazione del danno biologico su piante e prodotti alimentari destinati al mercato;
- Obiettivo 5.3: report di validazione del prototipo messo a punto per la misurazione dei metalli pesanti presenti nelle piante coltivate.

Fase 1

1.1 Isolamento mRNA proteina fluorescente

È stato estratto l'RNA totale da *Anemonia sulcata*, campionata lungo la costa siciliana, utilizzando differenti protocolli di purificazione e diversi tessuti dell'animale, prediligendo la porzione tentacolare; tale porzione è stata separata, selezionata e dismembrata. Gli RNA messaggeri sono stati poi successivamente purificati e retro-trascritti al fine di identificare i cDNA specifici per la Green Fluorescent Protein (GFP). L'isolamento della sequenza completa codificante per la GFP è stato effettuato mediante l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare ed in particolare della polimerizzazione a catena del DNA (PCR). Alla fine è stato possibile creare una libreria di cDNA retrotrascritti dalla specie in questione, su cui è stato fatto uno screening per la regione codificante la proteina di interesse e che è stata utilizzata per l'isolamento del messaggero specifico per la GFP (Fig. 1).

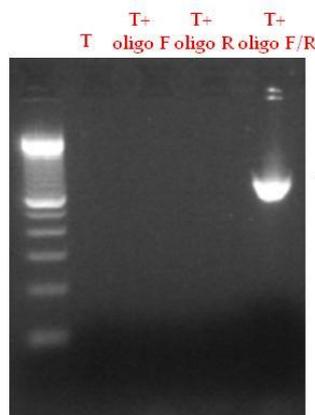


Fig. 1 – Banda di DNA di 687 bp ottenuta attraverso PCR con oligo F/R specifici. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder, line 2: templat; line 3: templat con oligo F; line 4: templat con oligo R; line 5: templat con oligo F/R.

1.2 Clonazione della proteina fluorescente in vettori di espressione

La sequenza di cDNA contenente la sequenza codificante per la GFP è stata espressa in vettori di espressione procariotici al fine di produrre grandi quantità di proteina con elevato grado di purezza. Sono stati testati diversi vettori e ceppi batterici con lo scopo di definire il sistema biologico in grado di garantire il più elevato grado di espressione e purezza. Per verificare che il clonaggio sia andato a buon fine sono state eseguite prove di amplificazione con primer specifici e prove di digestione enzimatica, mentre per valutare l'omologia con la sequenza ottenuta rispetto a quella di riferimento presente nella banca dati "GeneBank" si è proceduto al sequenziamento dei cloni ottenuti.

Inizialmente sono state ottenute un basso numero di colonie con un errato orientamento della sequenza inserita, probabilmente a causa della tossicità della proteina nei riguardi del ceppo batterico utilizzato, e si è allora deciso di modificare il protocollo di trasformazione usando cellule differenti.

È stato ottenuto quindi un clone in grado di esprimere la versione completa del messaggero per la GFP che è stato utilizzato per la produzione e purificazione della GFP in forma ricombinante (Fig. 2).

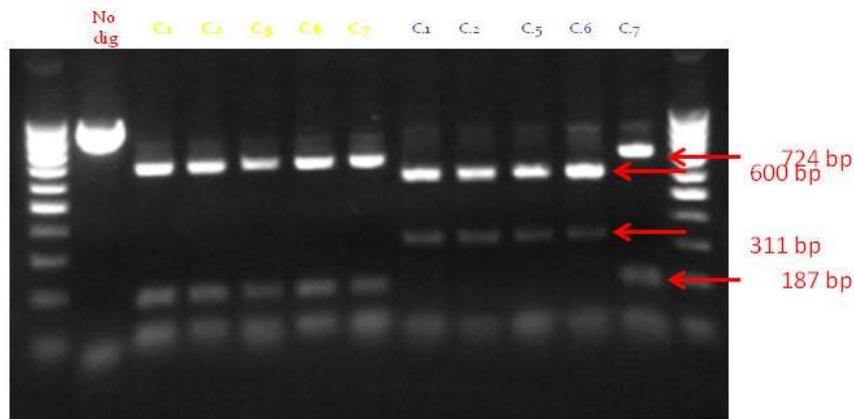


Fig. 2 – Prova di digestione con BamH 1 (in giallo) e Hind III (in blue) dei ricombinanti ottenuti dopo trasformazione con XL 1 Blue. Line 1: GeneRuler 100 bp DNA Ladder; line 2: DNA clone non digerito; line 3: DNA clone 1 digerito Bam H1; line 4: DNA clone 2 digerito Bam H1; line 5: DNA clone 5 digerito Bam H1; line 6: DNA clone 6 digerito Bam H1; line 7: DNA clone 7 digerito Bam H1; line 8: DNA clone 1 digerito Hind III; line 9: DNA clone 2 digerito Hind III; line 10: DNA clone 5 digerito Hind III; line 11: DNA clone 6 digerito Hind III; line 12: DNA clone 7 digerito Hind III; line 13: GeneRuler 100 bp DNA Ladder. Le frecce marcate in rosso identificano la dimensione dei

frammenti ottenuti in seguito a digestione con Hind III, nello specifico 600 bp e 311 bp per i ricombinanti con errato orientamento e 724 bp e 187 bp per l'unico con corretto orientamento.

1.3 Purificazione e standardizzazione di protocolli di espressione della proteina fluorescente

Il clone selezionato nella precedente attività è stato usato per la trasformazione in cellule competenti. Sono stati quindi standardizzati i protocolli di espressione della proteina GFP e definiti di protocolli di produzione da utilizzare su scala industriale. La proteina ricombinante è stata purificata mediante cromatografia per affinità, sfruttando l'affinità del nichel legato alla resina utilizzata per i residui di istidina della proteina prodotta. La purezza della proteina è stata poi valutata tramite gel di poliacrilammide e colorazione con Coomassie brilliant blue (Fig. 3). La proteina GFP ricombinante è stata successivamente analizzata per le sue capacità bioluminescenti per essere saggiata nelle fasi successive.

Questo protocollo standardizzato ha consentito di preparare grandi quantità di proteina ricombinante in forma pura (> 90%) da utilizzare per tutti i saggi funzionali previsti nel progetto.

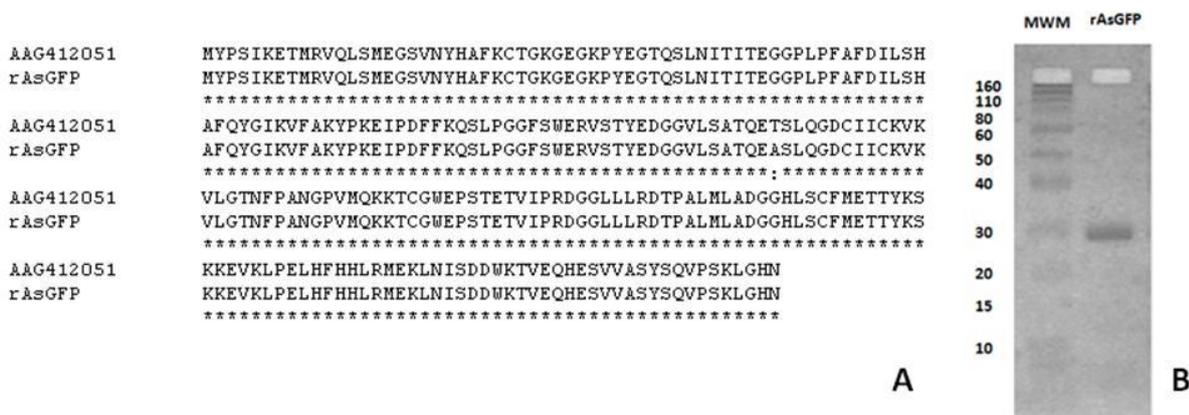


Fig. 3 - Caratterizzazione della proteina ricombinante: A) allineamento di sequenza (ClustalW) tra la asFP499 (GenBank: AAG412051) e la proteina ricombinante prodotta; B) SDS-PAGE in condizioni riducenti: *Line 1*: Molecular Weight Marker (3.5 – 260 KDa); *Line 2*: proteina ricombinante prodotta (rAsGFP).

Fase 2

2.1 Creazione di un sistema ideale di riferimento caratterizzazione spettroscopica e molecolare della Green Fluorescent Protein di *Aequorea coerulea* (Clontech)

È stato realizzato un sistema ideale di riferimento a cui poter paragonare i risultati spettroscopici ottenuti dallo studio della proteina fluorescente purificata da *Anemonia sulcata*.

Per fare ciò è stata utilizzata una GFP estratta da *Aequorea coerulea* (rAcGFP1), purificata e commercializzata dalla Clontech, studiandola da un punto di vista spettroscopico.

In particolare sono stati analizzati (Fig. 4):

- ✓ lo spettro di assorbimento, emissione ed eccitazione, valutando le migliori condizioni in termini di rapporto segnale – rumore, analizzando la forma, posizione ed intensità della banda di emissione e verificando la stabilità della proteina al variare della temperatura;
- ✓ l'effetto sull'intensità di emissione della GFP, dei metalli scelti come traccianti di contaminazione ambientale;
- ✓ la cinetica di reazione e la stabilità del complesso in termini di temperatura e di pH;
- ✓ Dot Blott assay su membrana di nitrocellulosa.

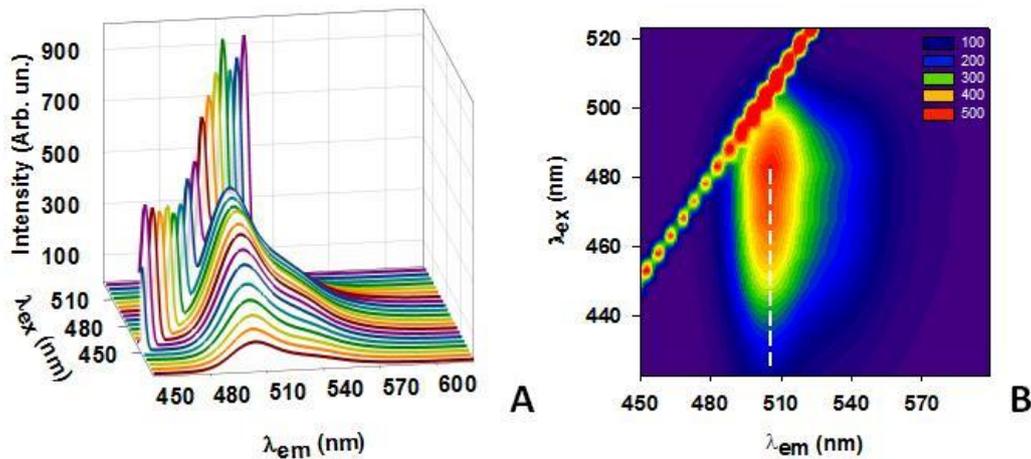


Fig. 4 – A) Spettro di emissione 3D della proteina rAcGFP1 (Clontech). Range di eccitazione da 423 nm a 523 nm; range di emissione da 450 nm a 620 nm. B) Contour plot di rAcGFP1. Range di eccitazione da 423 nm a 523 nm; range di emissione da 450 nm a 620 nm. I differenti colori indicano l'intensità di emissione e la linea tratteggiata la posizione del picco massimo.

In particolare nei saggi GFP-metallo si è riscontrato che tutti i metalli determinassero esclusivamente una diminuzione dell'intensità di emissione e nessuna modificazione a carico della forma della banda e della posizione del picco massimo. I dati ottenuti relativi all'interazione tra i due sistemi "Proteina/metallo" hanno mostrato un debole quenching sulla fluorescenza emessa dalla proteina e un trend uguale per tutti i metalli usati.

Per confermare che l'effetto di quenching registrato non potesse essere dovuto al contro ione legato al metallo sono stati condotti ulteriori esperimenti di controllo.

Per quanto riguarda invece la valutazione della stabilità del complesso GFP-metallo al variare della temperatura si è visto che aumentando la temperatura, l'emissione della fluorescenza diminuisce in intensità.

E' stato inoltre valutata la possibilità di utilizzare un test di Dot Blott per la determinazione degli inquinanti nell'ambiente, ma i risultati ottenuti hanno evidenziato la mancata riproducibilità delle

misure e la scarsa sensibilità in termini di quantizzazione della intensità di emissione al variare della concentrazione del metallo.

2.2 Caratterizzazione spettroscopica e molecolare della GFP ricombinante clonata da *Anemonia sulcata*

Prendendo come riferimento il protocollo messo a punto sulla rAcGFP1, si è proceduto alla caratterizzazione spettroscopica mediante spettroscopia UV-Vis, della GFP isolata, clonata e purificata da *Anemonia sulcata* (rAsGFP).

In particolare è stato studiato (Fig. 5):

- ✓ lo spettro di assorbimento, emissione ed eccitazione, valutando le migliori condizioni in termini di rapporto segnale – rumore, analizzando la forma, posizione ed intensità della banda di emissione e verificando la stabilità della proteina al variare della temperatura;
- ✓ l'effetto sull'intensità di emissione della GFP, dei metalli scelti come traccianti di contaminazione ambientale;
- ✓ la cinetica di reazione e la stabilità del complesso in termini di temperatura e di pH;
- ✓ del sito di legame, la tipologia ed il meccanismo di interazione.

In particolare si è visto che i dati relativi all'interazione tra i due sistemi “Proteina/metallo” hanno mostrato risultati decisamente differenti rispetto a quanto ottenuto dal sistema di riferimento, poiché la proteina rAsGFP ha evidenziato una buona sensibilità in termini di quenching della fluorescenza ed un'ottima selettività al rame rispetto che agli altri metalli testati.

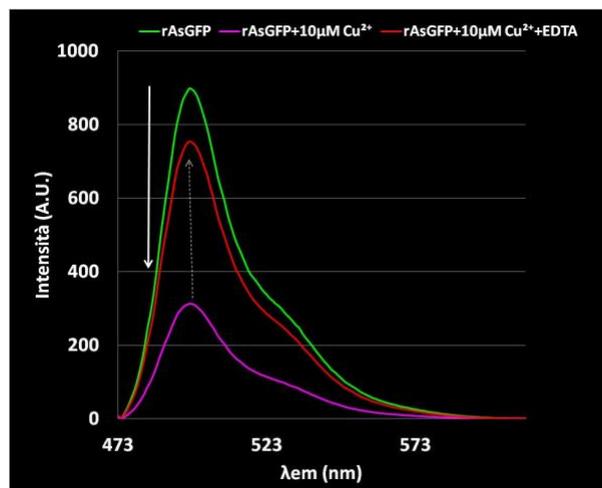


Fig. 5 – Spettro di emissione della proteina rAsGFP in presenza di rame alla concentrazione di 10 μM . La freccia continua indica la diminuzione della intensità della fluorescenza mentre la freccia tratteggiata il recupero dell'intensità in seguito all'aggiunta di EDTA.

2.3 Saggi in vivo su *Anemonia sulcata* e studio del comportamento della GFP in presenza di metalli pesanti

Sono state ottenute informazioni sul comportamento del sistema fluorescente in vivo, ovvero è stato valutato l'effetto che i metalli presenti nel mezzo acquoso, hanno sulla GFP nativa della specie target mediante l'utilizzo della tecnica di microscopia confocale.

Inizialmente è stato osservato al VersaDoc Imaging Systems che la fluorescenza è esclusivamente evidenziata a livello dei tentacoli della *Anemonia sulcata*, mentre a carico del corpo e del disco basale non si osserva alcuna luminescenza (Fig. 6).

In seconda analisi si è proceduto ad effettuare una sezione ottica della porzione tentacolare mediante microscopio confocale per visualizzare la presenza di pigmenti colorati e la compartimentalizzazione dei suddetti, confermando la localizzazione della GFP nella porzione ectodermica del tentacolo (Fig. 7).

Si è successivamente proceduto ad effettuare degli esperimenti in vivo di contaminazione da metalli su un selezionato numero di individui di *Anemonia sulcata*, al fine di misurare il quenching della fluorescenza della GFP tramite sezione ottica del tentacolo.

Sono stati studiati 9 organismi controllo e 9 organismi sottoposti a contaminazione da metalli a vari intervalli di tempo e, dopo processamento degli stessi, è stata effettuata un'analisi della fluorescenza della GFP dal tentacolo dell'animale tramite microscopia confocale, da cui non è stata riscontrato alcun segnale apprezzabile in termini di estinzione della fluorescenza misurata dopo esposizione al rame.

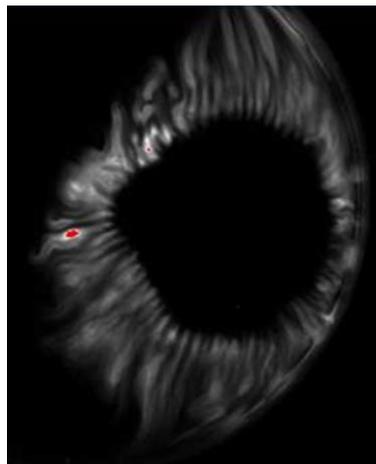


Fig. 6 – *Anemonia sulcata* osservata al VersaDoc Imaging Systems.

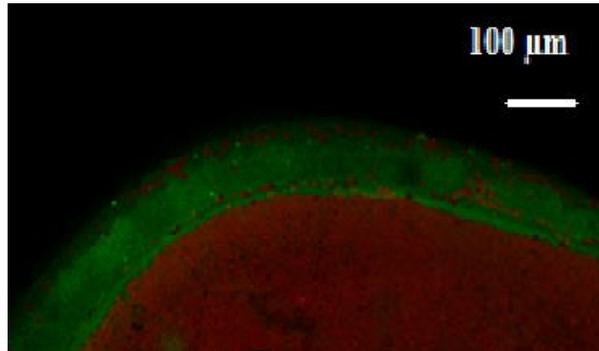


Fig. 7 – Sezione ottica del tentacolo di *Anemonia sulcata* acquisita mediante microscopia confocale.

Fase 3

3.1 Progetto sistema optoelettronico

È stato progettato un sistema optoelettronico miniaturizzato, da integrare nello strumento analitico, adibito alla lettura della fluorescenza che stimola e misura la capacità di emettere luce dei campioni sotto esame a differenti lunghezze d'onda.

È stato eseguito un disegno:

- ✓ del supporto meccanico;
- ✓ della geometria dei componenti ottici;
- ✓ del circuito elettronico per la gestione dei led e dei fotodiodi.

Sono state progettate due schede elettroniche: la scheda "Opto", che ha come funzione principale quella di fornire un segnale di tensione proporzionale alla luce incidente sull'area sensibile di un fotodiode saldato sulla scheda stessa, e la scheda "Led", per il pilotaggio dei led di eccitazione.

Tale modulo è stato inizialmente progettato su un banco ottico e poi, per la realizzazione dell'effettivo prototipo, è stato creato un progetto CAD utilizzando un software specifico.

L'ottica del sistema è stata divisa in due blocchi:

- ✓ blocco di eccitazione, formato da tre assi ottici paralleli, ciascuno contenente un led (scelto in base alle bande di eccitazione del campione), un filtro (anch'esso scelto in base alle bande di eccitazione del campione) e due lenti piano convesse, racchiusi in un supporto di alluminio.

- ✓ blocco di rivelazione, formato da tre assi ottici, ciascuno contenente un fotodiode, un filtro (scelto in base alle bande di emissione del campione) e due lenti piano convesse, racchiusi in un supporto di alluminio.

Sono stati progettati inoltre dei supporti di alluminio in modo da posizionare i due blocchi ottici ad un'opportuna distanza dal portacampioni, in modo che il campione si trovi sull'intersezione tra il fuoco del led e quello del fotodiode.

3.2 Progetto substrato chimico/biologico

È stata effettuata una ricerca bibliografica per individuare il miglior protocollo da utilizzare per far aderire la GFP ricombinante su un vetrino con sopra uno strato di argento nanostrutturato e sono state testati diversi tempi e temperature di incubazione tra il vetrino e la GFP.

Vista la scarsa stabilità della GFP adsorbita sul vetrino, si è deciso di far avvenire prima in soluzione la reazione tra la GFP e il metallo e di depositare poi direttamente sul vetrino il campione da analizzare.

Nella realizzazione di questo substrato ci si è resi conto che l'utilizzo del supporto analitico costituito dal vetrino su cui è stato depositato lo strato di argento nanostrutturato non ha mostrato l'aumento atteso della sensibilità del sistema di rilevazione. Dopo prove di confronto, si è deciso quindi di optare per l'utilizzo di un supporto di reazione senza lo strato di argento in cui depositare il prodotto della reazione tra la GFP e il campione che viene inserito direttamente nello strumento di lettura.

Questa soluzione ha permesso di ottenere una sensibilità maggiore oltre ad un risparmio di tempo e denaro nella preparazione dei vari reagenti.

Inizialmente sono state effettuate dei test di quenching della fluorescenza emessa dalla GFP dopo reazione con delle soluzioni a concentrazione nota di rame e poi sono state condotte prove su campioni reali.

Ciò ha permesso di mettere a punto i protocolli sperimentali per la preparazione substrato chimico/biologico.

3.3 Progetto sistema elettronico di trasduzione e amplificazione

Poiché i segnali elettrici generati dal sistema optoelettronico necessitano di essere amplificati al fine di migliorare il rapporto segnale rumore e di essere convertiti in valori digitali per le successive elaborazioni, è stato progettato un circuito elettronico di trasduzione e amplificazione che converte il segnale in corrente in uscita dai fotodiodi in un segnale in tensione da inviare alla scheda elettronica digitale.

A tal fine, sulla scheda sono stati progettati tre fotodiodi e tre output di tensione, in modo tale che il segnale di corrente proveniente dal fotodiode, quando della luce incide sulla sua superficie sensibile, viene convertito in un segnale di tensione da una transimpedenza e amplificato da un amplificatore operazionale.

È stato quindi redatto il progetto definitivo del circuito elettronico di amplificazione e trasduzione, completo degli schemi elettrici, del layout di montaggio e dell'elenco dei componenti necessari.

3.4 Sperimentazione su banco ottico

È stato realizzato il prototipo del sistema optoelettronico ed in particolar modo:

- ✓ il supporto meccanico;
- ✓ i circuiti elettronici ed optoelettronici;
- ✓ l'assemblaggio dei componenti ottici.

Sono state effettuate verifiche di funzionamento, in termini di ripetibilità e sensibilità, su banco ottico, in modo tale da apportare, se necessario, modifiche e ottimizzazioni al progetto.

Ciò ha consentito anche di valutare la precisione e la sensibilità del setup dello strumento.

Il sistema realizzato è costituito da un led pilotato dalla relativa scheda, la cui luce veniva collimata da una lente piano convessa, filtrata da un filtro passa banda e focalizzata sul campione da una seconda lente piano convessa. La fluorescenza del campione è stata collimata da una lente piano convessa, filtrata da un filtro passa banda e focalizzata sul fotodiodo presente nella scheda "Opto". L'output di tensione della scheda "Opto" è stata misurata con un multimetro.

Fase 4

4.1 Progetto sistema elettronico di acquisizione e conversione

È stato progettato il circuito elettronico digitale che, acquisendo i valori elettrici in uscita dal circuito elettronico di trasduzione e amplificazione, permette di elaborare le informazioni affinché possano essere rese disponibili all'operatore.

In particolare, per la gestione dei movimenti del carrello, dell'accensione dei led e per la misurazione e l'interpretazione dei segnali forniti dal fotodiodo è stata progettata una scheda elettronica con microcontrollore.

La scheda presenta un microcontrollore che svolge le seguenti funzioni:

- ✓ controllo dei led tramite tre opportuni output di tensione;
- ✓ controllo del movimento del carrello, tramite degli opportuni output di tensione e l'ausilio di una scheda esterna per il controllo dei motori passo-passo;
- ✓ misurazione degli output provenienti dalla scheda fotodiodo tramite il convertitore A/D del PIC e interpretazione dei risultati;
- ✓ gestione del display touchscreen e della relativa interfaccia.

4.2 Progetto interfaccia utente locale e remota

È stata implementata l'interfaccia utente locale attraverso la creazione di menù grafici di facile utilizzo su un display touch-screen. Questa interfaccia consente di far visualizzare all'operatore i risultati delle analisi, derivanti dall'elaborazione dei dati digitali acquisiti, in maniera tale da non richiedere ulteriori operazioni di interpretazione del risultato finale.

Per svolgere tutte queste funzioni è stato sviluppato un apposito firmware, che permette l'interazione dello strumento con il display touch-screen.

Per l'acquisizione dei dati sono state previste due modalità:

- ✓ Dev mode, che permette di ottenere il valore di fluorescenza misurato dal convertitore A/D del PIC in tempo reale, senza alcun tipo di manipolazione dei dati;

- ✓ Analysis, che permette di effettuare l'analisi desiderata sul campione dispensato sul vetrino.

Selezionata la modalità Analysis viene effettuato un movimento del carrello meccanico che sposta il portacampioni nella posizione di caricamento vetrino.

Successivamente, dopo conferma tramite il touch-screen da parte dell'utente, la slide viene posizionata nelle varie posizioni di lettura, che permettono di misurare l'intensità di fluorescenza del campione. I valori misurati vengono quindi scritti nella memoria interna del PIC e sottoposti ad una opportuna analisi dati, che consiste nel confronto di tali valori con dei valori soglia stabiliti precedentemente.

4.3 Realizzazione prototipo dimostratore

Il sistema optoelettronico ed i circuiti elettronici realizzati nelle attività precedenti sono stati assemblati in un prototipo dimostrativo in modo tale da consentire le analisi sui campioni reali. È stato realizzato anche un case esterno che consente di proteggere le parti meccaniche ed elettroniche dello strumento e di riparare dalla luce il campione.

Ciò ha permesso di diminuire notevolmente il rumore di fondo ed aumentare la sensibilità delle analisi. Questo prototipo è stato consegnato all'IGV (partner del progetto) per essere validato e per effettuare le analisi sui campioni di fragola e pomodoro cresciuti in condizioni di coltura idroponica in presenza di diversi livelli di metalli pesanti.

Fase 5

5.1 Sviluppo della coltivazione idroponica e fuori suolo con livelli crescenti di metalli pesanti

È stato messo a punto un sistema di coltivazione fuori suolo grazie al quale è stato possibile controllare e regolare le quantità di metalli pesanti somministrate alla coltura e valutarne l'effetto su colture scelte quali il pomodoro e la fragole.

In particolare, è stata costruita una curva dose/effetto in modo da calcolare la giusta concentrazione di metalli pesanti in grado di non produrre effetti letali sulla coltura. Sono state coltivate piantine di pomodoro e di fragola in condizioni di fuori suolo in presenza di concentrazioni crescenti di un mix di metalli pesanti in modo da valutare gli effetti sia sulla pianta che sul prodotto finale destinato all'alimentazione umana.

5.2 Valutazione del danno biologico da metalli pesanti sulle piante coltivate in idroponica e fuori suolo

È stata effettuata una ricerca bibliografica su assay descritti in letteratura utilizzati per stimare il danno biologico derivante dalla presenza dei metalli pesanti sulle piante coltivate.

- ✓ In particolare i parametri analizzati sono stati:
 - ✓ la valutazione della morte cellulare programmata e la necrosi;
 - ✓ l'ingiallimento fogliare;

- ✓ lo stress ossidativo;
- ✓ la capacità fotosintetica e la concentrazione dei pigmenti fotosintetici.

Al termine di questa attività sono stati redatti protocolli validati da utilizzare per la valutazione del danno biologico su piante e prodotti alimentari destinati al mercato.

5.3 Misurazione dei metalli pesanti nelle piante coltivate in idroponica e fuorisuolo con il prototipo

Utilizzando il prototipo realizzato nelle attività precedenti sono state calcolate le quantità di metalli pesanti presenti nelle piante cresciute nelle condizioni sopra descritte.

In particolare sono state create tre fasce di identificazione del campione in base alla quantità di metalli pesanti presenti:

- ✓ campione sano
- ✓ campione leggermente contaminato
- ✓ campione contaminato

Per fare ciò è stato necessario realizzare delle soluzioni di preparazione del campione che consentano di tamponare il pH del campione e quindi di favorire il legame tra la GFP e l'eventuale metallo presente.

Sono state testate varie soluzioni con capacità tamponante differente, valutando la capacità di funzionamento della GFP a contatto con le varie soluzioni e l'effettivo quenching della fluorescenza emessa in presenza di rame.

Conclusioni

Il progetto ha permesso la realizzazione in fase prototipale di un dispositivo che dopo un'ulteriore miniaturizzazione consentirà la definizione di nuovi standard qualitativi per gli alimenti, a garanzia dei consumatori e, di riflesso, a tutela del valore aggiunto dei prodotti agroalimentari italiani e siciliani.

Esso infatti presenta una serie di vantaggi tra cui:

- Selettività e sensibilità agli ioni rame (dipendenza dalla dose e alto limite di rivelazione)
- Basso rumore del segnale
- Nessun pretrattamento del campione
- Tecnologia a basso costo
- Biocompatibilità
- Rapidità di analisi

Ringraziamenti

PO/FESR Sicilia 2007/2013, Linea di intervento 4.1.1.2