



Oggi ci occuperemo di due lavori riguardanti la messa a punto di nuovi saggi biologici. Entrambi i lavori sono apparsi su riviste chimiche leader nel settore, poiché la componente chimica di queste ricerche è importante per la loro applicazione industriale.

Gli autori del primo lavoro (S.K. Sia *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 498) rivendicano scopi farmaceutici, biotecnologici, diagnostici, e perfino militari, o meglio di sicurezza nazionale. Senza fare dell'allarmismo fantascientifico, immaginiamo operatori scientifici al lavoro in un'area colpita da un agente biologico tossico, con un bisogno estremo di evidenziare al più presto la natura di questo agente tossico e la sua presenza in campioni biologici originanti da potenziali vittime dell'agente stesso.

Questi operatori hanno bisogno di un saggio robusto e semplice, eseguibile con attrezzatura non sofisticata e portatile, non troppo costoso così da "ridurre" ad operazioni di routine le analisi in questione. Le stesse esigenze sono importanti per scienziati e gruppi di ricerca operanti in molti paesi del Terzo Mondo, dove i fondi scarseggiano e per contro malattie richiedenti saggi diagnostici robusti, efficienti e poco costosi abbondano; per chi considerasse certi budgets universitari in Italia equiparabili a situazioni terzomondiste, l'Italia può diventare un altro cliente interessato...

Gli autori hanno messo a punto un sistema multifunzionale di saggio immunologico che ha i vantaggi dei saggi ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) e dei saggi immunocromatografici. I primi sono estremamente sensibili ed affidabili, ma richiedono ore di incubazione e strumentazione costosa ed ingombrante; i secondi sono semplici, rapidi e commercialmente disponibili come kits portatili, ma danno solo risultati qualitativi (sì/no) e in generale meno affidabili. Si è qui scelto un sistema miniaturizzato, basato su micropiastre trasparenti preparate con tecniche litografiche (vedi D.C. Duffy *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4974), capace di analizzare molti campioni in parallelo. L'identificazione e la quantificazione dell'analita biologico desiderato avviene attraverso l'uso di un anticorpo specifico coniugato con oro colloidale (particelle di alcuni nm di diametro), seguito da nitrato d'argento e idrochinone come agente riducente: quando l'anticorpo riconosce nel campione l'analita biotossico desiderato il costruito anticorpo-colloide si lega al campione, e quindi alla sua posizione nella micropiastre.

L'oro colloidale catalizza poi la riduzione degli ioni Ag⁺ in soluzione, e l'argento metallico che ne risulta si deposita sulla stessa posizione della micropiastre. L'argento opaco inibirà più o meno (a seconda della concentrazione dell'analita biotossico nel campione da analizzare) il passaggio della luce attraverso la posizione della micropiastre in cui il campione è contenuto. Un diodo laser semiconduttore, generante luce rossa (654 nm), e un circuito ottico integrato contenente un amplificatore di segnale, da parti opposte della micropiastre completano il sistema bioanalitico desiderato: questo sistema, riutilizzabile e portatile, ha un costo stimato di 45 \$ ed è ali-

mentato da una semplice batteria a 9 V per alcune ore operando in continuo! In alcuni esempi (determinazione dei livelli di anticorpo IgG di coniglio, identificazione di pazienti affetti da HIV), livelli di 80-90 pM (picomoli!!!) di analita sono stati misurati riproducibilmente dal sistema, e (ancor più importante), differenze fino a 5 ordini di grandezza (da 100 pM fino a 10 mM) sono state quantificate in maniera corretta.

Il secondo lavoro (P.M. Kasili *et al.*, *JACS*, 2004, **126**, 2799) tratta della messa a punto di un saggio biologico per determinare l'attività della caspasi-9, un enzima importante nei processi apoptotici, a livello di una singola cellula attraverso l'uso dei cosiddetti "nano-tools". Il mio convincimento è che questo tipo di lavoro di ricerca di base getterà le fondamenta per l'utilizzo di tecniche simili in maniera routinaria fra una decina d'anni o poco più; ciò succederà anche grazie all'attenzione che una comunità scientifica vasta dedicherà sin da ora a lavori e progetti "visionari".

Gli autori hanno messo a punto un sistema miniaturizzato, basato su un microsensore, o tip, del diametro di 150 nm che può inserirsi a diversi livelli di profondità all'interno di una sola cellula. Questo tip, costituito da una fibra ottica, è funzionalizzato sulla sua superficie così da poter supportare molecole ad attività biologica sul suo esterno, ed è anche collegato ad un laser miniaturizzato per eccitare sia le molecole supportate che il micro-intorno cellulare nel quale viene inserito. Restando il tip di poco all'interno del citoplasma senza alterare la natura del nucleo, la cellula rimane fisiologicamente attiva; ciò permette di studiare in tempo reale un singolo processo enzimatico, verificandone la rilevanza all'interno di uno o più pathways cellulari, attraverso l'impiego di un substrato covalentemente legato al tip introdotto.

Utilizzando questa sofisticata tecnologia gli autori hanno misurato in una singola cellula l'aumento esponenziale (fino a 10 volte rispetto al livello di base) dell'attività 9-caspasica immediatamente dopo aver indotto processi apoptotici, o di "morte cellulare"; un substrato peptidico fluorescente, specifico per la 9-caspasi, ha permesso di misurare l'attività caspasica in maniera accurata. La sensibilità del metodo in generale è elevata, così come la sua risoluzione temporale (processi che si svolgono in pochi secondi possono essere ben registrati e quantificati). Qualsiasi singola proteina per cui sia noto un marker selettivo e un metodo di rilevazione ottico della sua attività potrebbe essere studiata a questo livello di dettaglio; ne consegue che progressi importanti nei cosiddetti "cell-signaling pathways", e più precisamente nella loro organizzazione, sono da attendersi nel futuro non troppo lontano.