



Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ

Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών & Αυτομάτου Ελέγχου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΣΤΗΜΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

ΣΟΥΡΛΑΝΤΖΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
Λέκτορας κ. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2010

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους, χωρίς την βοήθεια των οποίων το αποτέλεσμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας δεν θα ήταν το αναμενόμενο.

Αρχικά τον καθηγητή κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο, ο οποίος με καθοδήγησε σε έναν τομέα που αποτελούσε άγνωστο πεδίο για εμένα και χάρη σε εκείνον γνώρισα ένα αντικείμενο στο οποίο διενεργείται σοβαρή και πραγματική έρευνα.

Τον κ. Γεώργιο Αθανασίου, τον μόνο άνθρωπο που βρέθηκε και βοήθησε στην κατασκευή του ηλεκτρομαγνήτη, ύστερα από μήνες έρευνας της αγοράς.

Τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο, που βοήθησαν ο καθένας στο επίπεδο που μπορούσε.

Και τέλος τους γονείς μου, που βοήθησαν ηθικά και γνωστικά και στους οποίους αφιερώνεται η εργασία αυτή.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	6
1.1. Το κύτταρο	7
1.2. Σηματοδότηση κυττάρων (cell signaling).....	8
Κεφάλαιο 2: Πειραματική μέθοδος εργαστηρίου - Τεχνικές	11
2.1. ELISA.....	11
2.2. Protein microarray	12
2.3. X map technology	13
2.4. Μαγνητικά σφαιρίδια.....	15
2.4.1. Προδιαγραφές	15
2.4.2. Περιορισμοί	16
2.5. V-bottom plates	17
Κεφάλαιο 3: Ηλεκτρομαγνητισμός	19
3.1. Εισαγωγή.....	19
3.2. Μαγνητικό πεδίο	21
3.3. Γραμμές μαγνητικού πεδίου.....	23
3.4. Δημιουργία μαγνητικού πεδίου	24
3.5. Σιδηρομαγνητικά υλικά για την κατασκευή ηλεκτρομαγνητών.....	26
Κεφάλαιο 4: Προδιαγραφές ηλεκτρομαγνητών και κατασκευή τους.....	30
4.1. Κατάταξη	30
4.2. Ιδιότητες μαγνητικού κυκλώματος.....	31
4.3. Υλικά κατασκευής	33
Κεφάλαιο 5: Μηχανικός εξοπλισμός και αυτοματοποίηση	34
5.1. Ρομποτικός μηχανισμός	34
5.3. Luminex (Luminex 100/200)	35
Κεφάλαιο 6: Εργαστηριακή διαδικασία	37
6.1. Σκοπός.....	37
6.2. Μηχανισμοί ανάκτησης.....	38

6.3. Διαδικασία εργαστηρίου	41
6.4. Σχεδιασμός ηλεκτρομαγνήτη.....	44
6.5. Εγκατάσταση ηλεκτρομαγνήτη.....	47
Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα	50
7.1. Πείραμα 1 (Ηλεκτρομαγνήτης 24 V).....	51
7.2. Πείραμα 2 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V).....	54
7.3. Πείραμα 3 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V με λεπτά ελάσματα)	57
7.4. Πείραμα 4 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V σε αυτοματοποιημένη διαδικασία στο ρομπότ).....	60
7.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα	65
Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα.....	66
Κεφάλαιο 9: Μελλοντική εξέλιξη – Πειράματα.....	70
9.1. Διάταξη μόνιμων μαγνητών	72
9.2. Πείραμα 5 (Χρήση διάταξης με μόνιμους μαγνήτες)	74
Επίλογος.....	78
Παράρτημα εικόνων	79
Βιβλιογραφία	81
Πληροφορίες εξωτερικών συνεργατών.....	83

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με την ανάπτυξη μεθόδου ανάκτησης μαγνητικών μεταλλικών σφαιριδίων (magplex C 38), από πλακίδια 96 wells (πηγαδιών), για την επαναχρησιμοποίηση τους σε βιολογικά πειράματα με τη χρήση ηλεκτρομαγνήτη. Η ηλεκτρομαγνητική συσκευή που κατασκευάστηκε, προσαρτήθηκε σε ρομποτικό μηχανισμό (Tecan Freedom Evo 150). Ο μηχανισμός αυτός, ειδικεύεται στην αυτοματοποίηση βιολογικών διεργασιών με την μικρότερη δυνατή ανθρώπινη παρέμβαση, για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων και την μεγιστοποίηση της ταχύτητας διενέργειάς τους.

Τα πειράματα, που πρέπει να προσομοιαστούν στον ρομποτικό μηχανισμό, γίνονται στο χέρι και έχει αποδειχτεί ότι είναι χρονοβόρα και πολύ κουραστικά για τον άνθρωπο. Έτσι, γίνεται προσπάθεια για την αυτοματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας, ώστε να πάρουμε το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Τα πειράματα αυτά στοχεύουν στην μέτρηση πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες τεχνικές, στις οποίες τα μαγνητικά σφαιρίδια παίζουν σημαντικό ρόλο. Η ανάκτηση και διαχείρισής τους είναι πολύ σημαντική στην εξέλιξη των πειραμάτων και κρίνει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία και αξιοπιστία τους.

Όπως θα διαπιστώσουμε και στη συνέχεια η κατασκευή συσκευής ανάκτησης είναι πολύ δύσκολη και τα αποτελέσματα διακρίνονται από μεγάλη αβεβαιότητα. Γι αυτό το λόγο γίνεται και πειραματική προσέγγιση με μόνιμους μαγνήτες, μέθοδο την οποία χρησιμοποιούν όλοι οι μεγάλοι οργανισμοί στα πειράματά τους. Αργότερα, στα κεφάλαια που ακολουθούν, παρουσιάζεται ο τρόπος λειτουργίας των ηλεκτρομαγνητών και γενικότερα των μαγνητών και γίνονται σαφή τα κριτήρια βάση των οποίων προτείνεται διάταξη με μόνιμους μαγνήτες αντί για ηλεκτρομαγνήτες.

Εδிகότερα, όσο προχωράμε στην εργασία, θα δούμε και θα γνωρίσουμε τις εργαστηριακές τεχνικές που χρησιμοποιούμε και θα δώσουμε βασικές έννοιες του ηλεκτρομαγνητισμού, που είναι απαραίτητες για την κατασκευή του ηλεκτρομαγνήτη. Τέλος, θα παρουσιαστούν τα πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο, στα οποία φαίνεται ο βαθμός επιτυχίας τους και το κατά πόσο κρίνονται ικανοποιητικά ή όχι.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

Με την πάροδο των ετών και την ταυτόχρονη ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας, θα ήταν αδύνατον να μην γίνουν αλματώδη βήματα προόδου στον τομέα της υγείας και γενικότερα της βιολογίας. Η ανάγκη του ανθρώπου για βελτίωση των συνθηκών ζωής, για επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής και της ίασης χρόνιων νόσων, όπως του καρκίνου, είχε ως αποτέλεσμα την άμεση άνθιση ενός τομέα, που αποτελεί παρακλάδι της βιολογίας.. Από την στιγμή που οι προσομοιώσεις βιολογικών διεργασιών χρειάστηκε να αυτοματοποιηθούν σε χώρο εργαστηρίου, ήταν αναπόφευκτη η ενασχόληση των μηχανικών. Οι εξειδικευμένες γνώσεις των ανθρώπων αυτών, επέτρεψαν την συνεργασία διαφόρων επιστημόνων με αποτέλεσμα την επιτάχυνση και βελτιστοποίηση της παραγόμενης γνώσης. Ομάδες σε όλο τον κόσμο, σε διάφορα ερευνητικά κέντρα και πανεπιστήμια συνεργάζονται ή ανταγωνίζονται μεταξύ τους έχοντας δώσει μεγάλη ώθηση στον τομέα.

Κύριο πεδίο ενασχόλησης στον τομέα αυτό αποτελούν οι λειτουργίες του κυττάρου και κυρίως, η μεταξύ τους επικοινωνία και η μεταφορά των πληροφοριών μέσα σε αυτά. Σε αυτές τις διεργασίες βασική συνισταμένη αποτελούν οι πρωτεΐνες οι οποίες είναι το βασικό συστατικό για την κάθε είδους κυτταρική επικοινωνία. Σκοπός είναι η δημιουργία ενός 'χάρτη' στον οποίο θα αποτυπωθεί η επικοινωνία αυτή στα κύτταρα και επομένως θα είναι εφικτή η πρόβλεψη μιας βιολογικής διεργασίας κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Η παραπάνω περιγραφή αποτελεί μέρος ενός γενικότερου τομέα, της συστημικής βιολογίας ή systems biology, που σαν όρος άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως από το 2000. Με τον όρο αυτό εννοούμε τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις σε βιολογικά συστήματα και πώς αυτές οδηγούν σε λειτουργίες και συμπεριφορές των κυττάρων. Γενικότερα, στόχος είναι η αναλυτική ή υπολογιστική μοντελοποίηση ενός βιολογικού συστήματος, το οποίο θα υποβληθεί σε συγκεκριμένες δοκιμές για πειραματική επαλήθευση, το οποίο υπολογιστικό μοντέλο στη συνέχεια, θα μπορεί να βελτιωθεί αφού έχει χρησιμοποιηθεί η ποσοτική περιγραφή των κυττάρων ή των κυτταρικών διεργασιών από τα παραπάνω αποτελέσματα. Από τη στιγμή που σκοπός είναι η δημιουργία μοντέλου των αλληλεπιδράσεων, χρειαζόμαστε ολοκληρωτικά μοντέλα transcriptomics, metabolomics, proteomics, που παρέχουν επαρκή ποσοτικά δεδομένα, όχι μόνο για την κατασκευή των μοντέλων αλλά και για την επαλήθευσή τους.[1,2]

1.1. Το κύτταρο

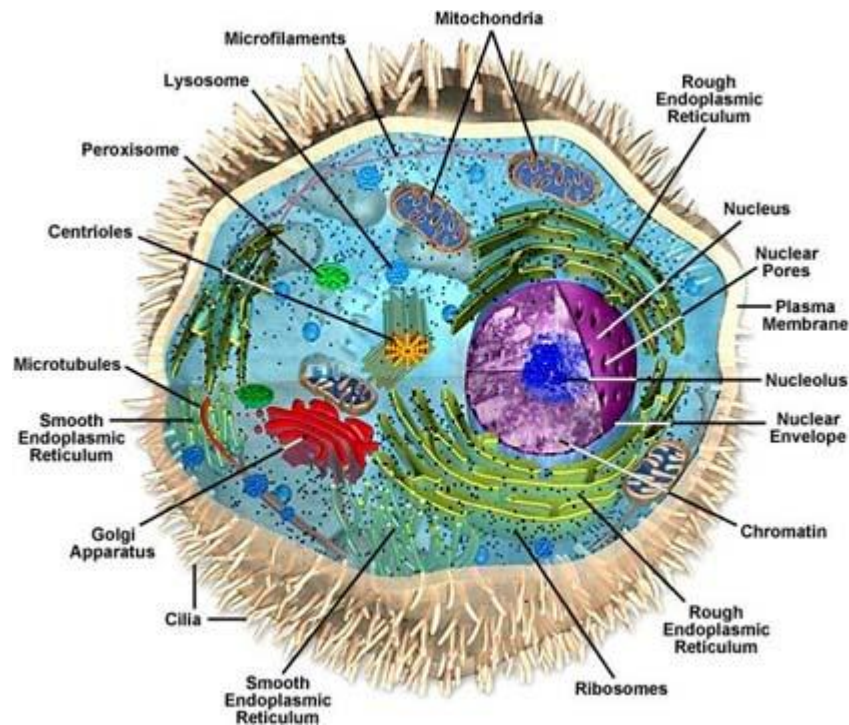
Σε αυτό το στάδιο πρέπει να αναφερθούμε επιγραμματικά στην μορφολογία του κυττάρου, σε τέτοιο επίπεδο για να γίνουν κατανοητοί οι όροι και οι διαδικασίες που ακολουθούν παρακάτω.

Τα κύτταρα αποτελούνται από περιορισμένο αριθμό χημικών στοιχείων. Ιδιαίτερο ρόλο παίζει ο άνθρακας (C), το υδρογόνο (H), το οξυγόνο (O), το άζωτο, ο φωσφόρος (P) και το θείο (S), που αποτελούν και το 99% περίπου του βάρους του[3]. Τα χημικά συστατικά του είναι δυνατόν να ταξινομηθούν:

- α) σε ανόργανα (νερό (H₂O) και μεταλλικά ιόντα) και
- β) οργανικά (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και νουκλεϊκά οξέα).

Από όλα τα όργανα και τις ουσίες που βρίσκονται μέσα σε ένα κύτταρο, αυτά που παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην σηματοδότηση των κυττάρων είναι:

1. Η κυτταρική μεμβράνη
2. Οι πρωτεΐνες που κυκλοφορούν ελεύθερες μέσα στο κύτταρο
3. Ο πυρήνας



*Εικόνα 1.1 [βλέπουμε ανθρώπινο κύτταρο σε τομή με όλα του τα όργανα]

Πιο συγκεκριμένα η **κυτταρική μεμβράνη** είναι η εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κύτταρο και το ξεχωρίζει από το περιβάλλον του. Αποτελείται δε από διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων, ενωμένα εκατέρωθεν σε ενδιάμεσο στρώμα, αποτελούμενο από πρωτεΐνες, και σάκχαρα. Συνεπώς η δομή της χαρακτηρίζεται τρίστιβη.

Η κυτταρική μεμβράνη είναι ημιπερατή, που σημαίνει ότι επιτρέπει σε ορισμένες μόνο ουσίες να εισέρχονται και να εξέρχονται. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ηλεκτροχημικής βαθμίδωσης που δημιουργείται στα εξωτερικά άκρα της μεμβράνης, λόγω του ηλεκτρικού φορτίου που περιέχει αλλά και της διαφοράς της συγκέντρωσης του εξωτερικού από το εσωτερικό υγρό, με συνέπεια να δημιουργείται διαφορά ωσμωτικών πιέσεων, μέσω των οποίων προσδιορίζεται ο συντελεστής διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης.

Ο **πυρήνας** είναι συνήθως το μεγαλύτερο μέρος του κυττάρου. Αποτελείται από το γενετικό υλικό (DNA) και σε αυτό εκφράζονται και δημιουργούνται οι πρωτεΐνες μέσω μιας συγκεκριμένης διαδικασίας που περιγράφεται εν μέρει παρακάτω.

1.2. Σηματοδότηση κυττάρων (cell signaling)

Η σηματοδότηση κυττάρων ή αλλιώς **cell signaling** είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός επικοινωνίας, που καθοδηγεί τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Αλλαγές στη μετάδοση της κυτταρικής πληροφορίας είναι υπεύθυνες για ασθένειες όπως ο καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα και ο διαβήτης.

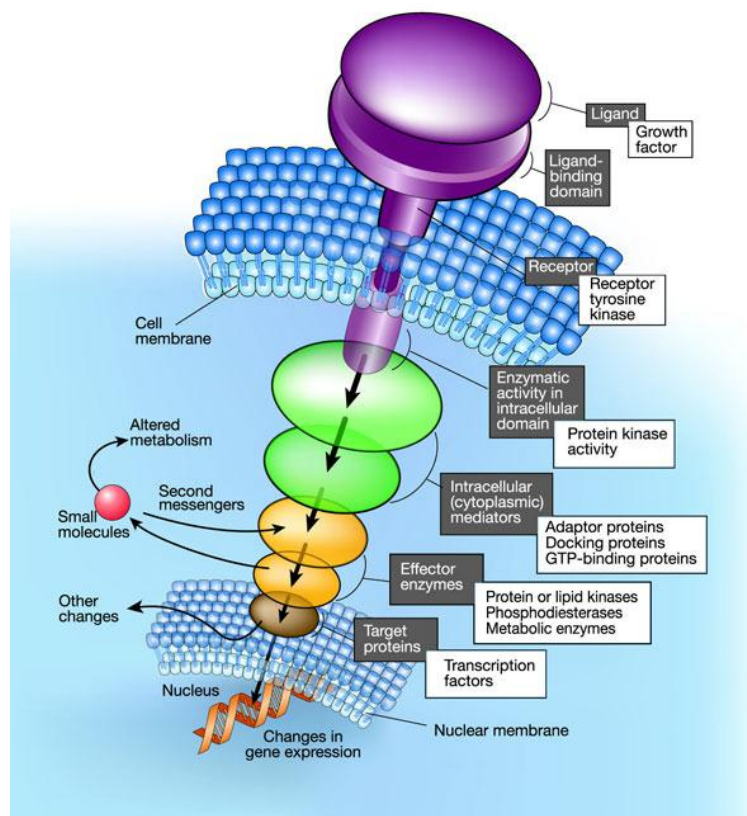
Μέσω της συστημικής βιολογίας μπορούμε να μάθουμε και να καταλάβουμε τη δομή του δικτύου της σηματοδότησης των κυττάρων και πως αλλαγές στο δίκτυο αυτό μπορούν να επηρεάσουν τη μετάδοση και τη ροή της πληροφορίας. Ανάλυση του δικτύου της κυτταρικής σηματοδότησης απαιτεί έναν συνδυασμό πειραματικής και θεωρητικής προσέγγισης, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και της ανάλυσης των προσομοιώσεων και της μοντελοποίησης.

Τα κύτταρα λαμβάνουν πληροφορίες για το περιβάλλον τους μέσω μιας κατηγορίας πρωτεϊνών, που λέγονται υποδοχείς ή **receptors**. Οι υποδοχείς βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και μερικές φορές συναντώνται και στην μεμβράνη του πυρήνα. Τα μόρια που ενεργοποιούν τους υποδοχείς διαφοροποιούνται σε ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (hormones, neurotransmitters, cytokines, growth factors). Όλα αυτά

ονομάζονται υποδοχείς συνδετών (receptor ligands). Οι λεπτομέρειες του συμπλέγματος υποδοχείς-συνδέτες είναι θεμελιώδεις για τη σηματοδότηση των κυττάρων[4].

Οι υποδοχείς βρίσκονται είτε στην επιφάνεια του κυττάρου είτε στο εσωτερικό του. Επιπλέον υπάρχουν πολλοί μεμβρανικοί υποδοχείς για μόρια που περιλαμβάνουν πεπτιδικές ορμόνες και πολλοί ενδοκυτταρικοί υποδοχείς για στεροειδείς ορμόνες. Οι υποδοχείς αυτοί δίνουν στο κύτταρο την ικανότητα, να αντιδρά σε ένα μεγάλο αριθμό από ορμονολογικά και φαρμακολογικά ερεθίσματα. Συχνά σε ασθένειες, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς, είναι ενεργοποιημένες και ως αποτέλεσμα έχουμε ένα συνεχές ενεργοποιημένο σήμα, που μεταδίδεται και προκαλεί παθολογική συμπεριφορά[4].

Για πολλούς τύπους σηματοδοτικών μορίων, που δεν μπορούν να διαπεράσουν την υδρόφοβη κυτταρική μεμβράνη, λόγω της υδρόφιλης φύσης τους, ο υποδοχέας που είναι κατάλληλος για αυτά, βρίσκεται εκφρασμένος στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Όταν τα μόρια ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς, το σήμα μεταφέρεται με τη σειρά του μέσα στο κύτταρο με δευτερεύουσα σηματοδότηση.

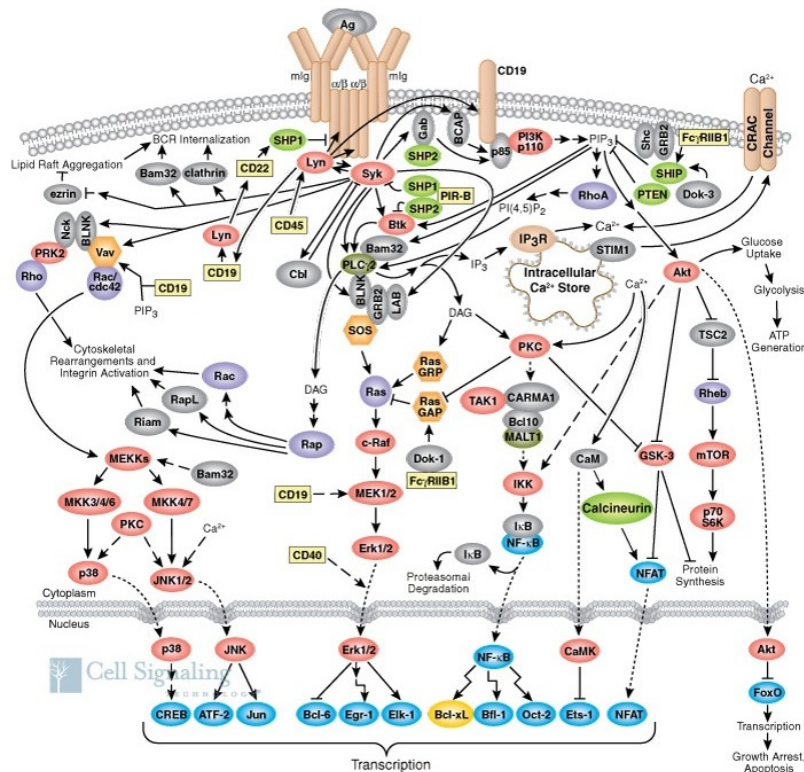


*Εικόνα 1.2 [μονοπάτι σηματοδότησης, λαμβάνεται το σήμα και διαδοχικά φτάνει στον πυρήνα]

Στην παραπάνω περίπτωση, που θεωρείται πολύπλοκη λόγω των πολλών αλληλεπιδράσεων, το μονοπάτι μεταγωγής του σήματος (**signaling transduction pathway**) περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης με πρωτεΐνη μέσα στο κύτταρο, επαγόμενη από ένα εξωτερικό σήμα. Πολλοί αυξητικοί παράγοντες προσδένονται με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων και διεγείρουν τα κύτταρα, ώστε αυτά να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν. Αρκετοί από αυτούς τους υποδοχείς είναι κινάσες, που αρχίζουν να φωσφορυλιώνουν τον εαυτό τους, και άλλες πρωτεΐνες, όταν προσδένονται στους συνδέτες-ligands. Η φωσφορυλίωση μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς για διαφορετικές πρωτεΐνες και έτσι να προκαλέσει αλληλεπίδραση πρωτεΐνης – πρωτεΐνης.

Απλούστερα, αυτό που συμβαίνει είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα και στην συνέχεια η μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου με διαδοχικές φωσφορυλιώσεις αυτό θα φτάσει στον πυρήνα όπου και τελικά θα εκφραστεί. Μερικά μονοπάτια σηματοδότησης αντιδρούν διαφορετικά, ανάλογα με την 'ποσότητα' του σήματος που καταφτάνει στο κύτταρο. Πολύπλοκα μονοπάτια μεταγωγής σήματος προσφέρουν ευκαιρίες για ανατροφοδότηση του σήματος, ενίσχυσή του και αλληλεπιδράσεις μέσα στο κύτταρο μεταξύ πολλών σημάτων και μονοπατιών.

Τα μονοπάτια που παρουσιάζουμε παραπάνω είναι το επίκεντρο, αφού αν καταφέρουμε να μετρήσουμε τις φωσφορυλιώσεις θα δημιουργηθεί μια ακριβής αποτύπωση του κάθε μονοπατιού[5].



*Εικόνα 1.3 [μονοπάτι μεταγωγής σήματος με πολλές αλληλεπιδράσεις]

Κεφάλαιο 2: Πειραματική μέθοδος εργαστηρίου - Τεχνικές

Αρχικά θα εξηγηθούν βασικοί όροι, έννοιες και μέθοδοι που χρειάζεται να γίνουν κατανοητοί, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένες στο χώρο του εργαστηρίου και άρρηκτα συνδεδεμένες με τον σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Όπως έχει περιγραφεί, το **signaling pathway** ή αλλιώς το μονοπάτι σηματοδότησης είναι το επίκεντρο της έρευνας. Για τη μελέτη αυτού χρησιμοποιούμε ορισμένα 'εργαλεία'-μεθόδους που είναι προσαρμοσμένα στις συνθήκες που χρειαζόμαστε κάθε φορά. Το βασικό εργαλείο που χρησιμοποιούμε, είναι η τεχνολογία **xmap**, της οποίας βασικό και κύριο συστατικό είναι τα μαγνητικά σφαιρίδια – magnetic beads.

Για να καταλήξουμε στην τεχνολογία xmap, πρέπει πρώτα να δοθούν ακριβείς ορισμοί των τεχνικών που συνδυάζει, όπως επίσης τα προτερήματά τους και η χρησιμότητά τους.

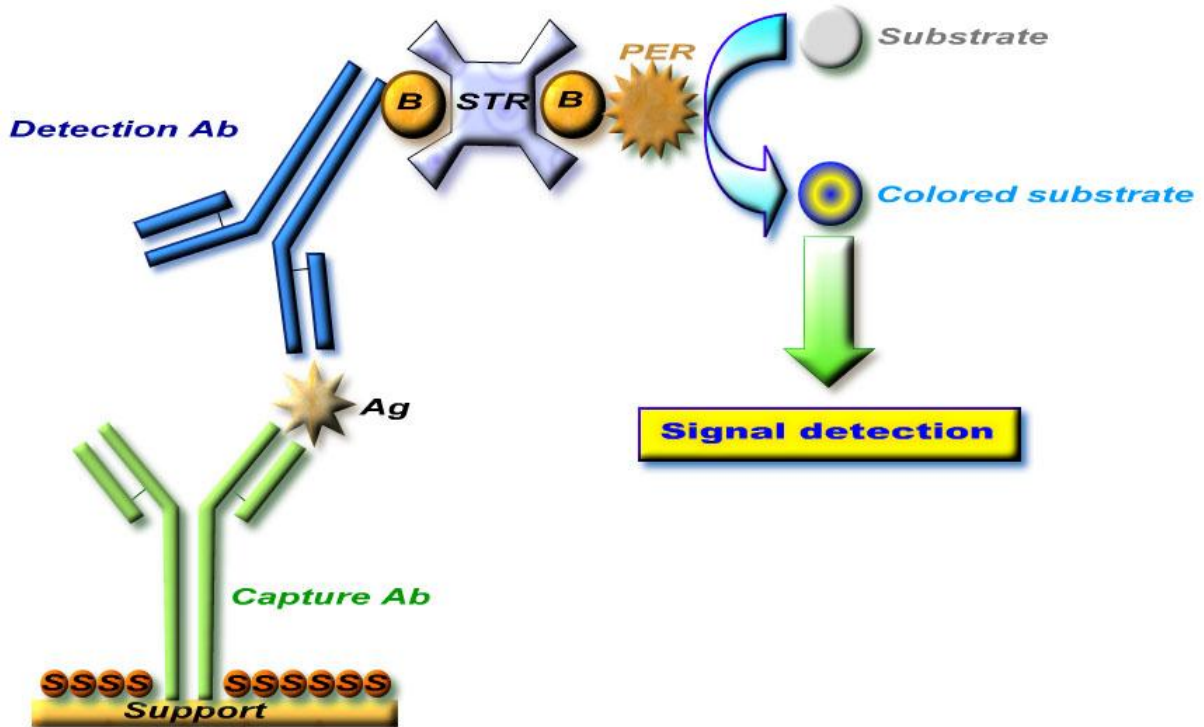
2.1. ELISA

Βασική μέθοδος την οποία συναντούμε είναι η **ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**. Αυτή είναι μια βιοχημική τεχνική για την ανίχνευση αντισωμάτων ή αντιγόνων. Ο εντοπισμός γίνεται με την σύνδεση του αντισώματος με ένα ένζυμο, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε κάποιο αναγνωρίσιμο σήμα όπως χρώμα ή φωσφορίζον δείγμα.

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η **sandwich ELISA**, μέσω της οποίας γίνεται εντοπισμός αντιγόνων. Για να εφαρμοστεί επιτυχώς πρέπει να ακολουθηθούν ορισμένα στάδια-κανόνες:

- I. Προετοιμασία επιφάνειας πλάκας, στην οποία προσδένεται συγκεκριμένος αριθμός αντισωμάτων.
- II. Μπλοκάρισμα περιοχών της επιφάνειας που δεν έχουν αντίσωμα, ώστε να μην προσαρτηθούν ακούσια ανεπιθύμητα σωματίδια.
- III. Επιβολή του δείγματος αντιγόνων στην επιφάνεια της πλάκας.
- IV. Πλύσιμο πλάκας, ώστε τα μη δεσμευμένα αντιγόνα να απομακρυνθούν.
- V. Επιβολή ενζύμου, που διαθέτει αντίσωμα για την πρόσδεσή του στο αντιγόνο. Το ένζυμο αυτό είναι που χρησιμεύει για την σήμανση.
- VI. Πλύσιμο πλάκας, ώστε να απομακρυνθεί το περισσεύον ένζυμο-αντίσωμα.

- VII. Επιβολή χημικού που διεγείρει το ένζυμο για την παραγωγή αναγνωρίσιμου σήματος.
- VIII. Μέτρηση του σήματος για τον προσδιορισμό της ποσότητας των αντιγόνων που εντοπίστηκαν[6].



*Εικόνα 2.1 [μέθοδος ELISA με όλα τα στάδιά της]

2.2. Protein microarray

Με τη μέθοδο **protein microarray**, γίνεται multiplex (μετράει πολλούς χημικούς παράγοντες) αναγνώριση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, για τον προσδιορισμό υποστρώματος με πρωτεϊνικές κινάσες και για τον εντοπισμό μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση πρωτεϊνών. Δηλαδή, μπορούν να μετρηθούν εκατοντάδες πρωτεΐνες σε ένα μόνο δείγμα οι οποίες είναι παγιδευμένες από τα αντισώματα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι προσδεδεμένα σε μια επιφάνεια – μεμβράνη. Η αναγνώριση των αντισωμάτων είναι αυτή που καθορίζει την επιτυχία της μεθόδου. Τα αποτελέσματα που

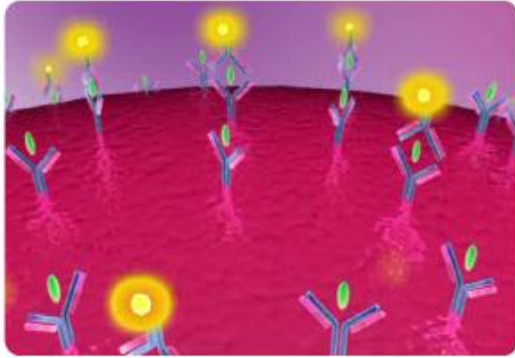
λαμβάνουμε βελτιώνονται περαιτέρω όταν μπλοκάρουμε τα αντισώματα που δεν έχουν παγιδεύσει κάποια πρωτεΐνη, καθώς έχουμε λιγότερα σήματα εκτός του επιθυμητού εύρους. Στη μέθοδο αυτή έχουμε δύο πιθανούς τρόπους σύνδεσης:

1. Άμεση σύνδεση, όπου μπορούμε να πάρουμε ταυτόχρονα τις μετρήσεις αλλά με αυξημένη πιθανότητα σφάλματος.
2. Με sandwich, δηλαδή όπως και στην ELISA χρησιμοποιούμε δύο αντισώματα, ένα για παγίδευση και ένα για σήμανση, όπου έχουμε καλύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα[7,8].

2.3. X map technology

Η μέθοδος xmap έχει αναπτυχθεί ώστε να συνδυάζει τα προτερήματα των δύο παραπάνω διαδικασιών. Τα σφαιρίδια που χρησιμοποιούνται, διαθέτουν στο εσωτερικό τους μίγμα από ερυθρή και υπέρυθη φθορίζουσα βαφή. Εκμεταλλευόμενοι τις διαφορετικές εντάσεις και αποχρώσεις των βαφών, υπάρχει σύνολο 100 δυνατών διαφορετικών σφαιριδίων με μοναδικό φάσμα το κάθε ένα. Έτσι διαφορετικά σφαιρίδια μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα μόνο δείγμα, έχοντας τη δυνατότητα πρακτικά για 100 διαφορετικά τεστ ταυτόχρονα[8].

Η χημική σύσταση της επιφάνειας των σφαιριδίων, επιτρέπει την σύνδεσή τους με υποδοχείς, αντισώματα, πεπτίδια ή ολιγονουκλεοτίδια. Στη συνέχεια το δείγμα αναλύεται σε μηχανισμό με δέσμες laser, που περιγράφει σε μεταγενέστερο κεφάλαιο. Κάθε τεστ πραγματοποιείται σε πλάκες των 96 πηγαδιών, δηλαδή υπάρχει η δυνατότητα να διενεργηθούν 100 τεστ σε κάθε πηγάδι. Το μεγάλο πλεονέκτημα της xmap είναι το γεγονός ότι παρέχει high-throughput και high-content δεδομένα (data). Αυτό σημαίνει ότι από μία μόνο βιοχημική πειραματική διεργασία τα παραγόμενα δεδομένα προέρχονται από μεγάλο αριθμό αναλυτών (analytes). Έτσι, δεν χρειάζονται πολλά δείγματα για την λήψη ίδιου αριθμού αποτελεσμάτων.



*Εικόνα 2.2 [magnetic bead με τα αντισώματα στην επιφάνειά του]

Επιπλέον, το γεγονός ότι τα σφαιρίδια είναι μαγνητικά, καθιστά εφικτή τη διαχείρισή τους με κάποιο κατάλληλο σύστημα ή μηχανισμό, ώστε να μπορέσουμε να τα ανακτήσουμε και να τα επαναχρησιμοποιήσουμε.

2.4. Μαγνητικά σφαιρίδια

Τα μαγνητικά σφαιρίδια MagPlex™ -C Microspheres είναι υπερ-παραμαγνητικά καρβοξυλομένα μικροσφαιρίδια που έχουν εσωτερικά επισημανθεί με φθορίζουσα βαφή. Αυτή εσωκλείεται σε ένα λειτουργικό πολυμερές, που στην επιφάνειά του έχει καρβοξυλομάδες για την σύνδεση με ομοιοπολικούς δεσμούς των συνδετών (**ligants**)[9].

Τα σφαιρίδια αντιδρούν αποτελεσματικά και άμεσα σε ένα εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, αλλά έχουν αμελητέα παραμένουσα μαγνήτιση, κάτι που επιτρέπει γρήγορη αποτελεσματική διαχείρησή τους για περαιτέρω επεξεργασία. Τα σφαιρίδια είναι σχεδιασμένα για να χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιοδιεργασίες που βασίζονται στην τεχνολογία της ανίχνευσης σωματιδίων xMap και χρησιμοποιούν το λογισμικό της Luminex xPONENT.



*Εικόνα 2.3 [φιαλίδια με σφαιρίδια]

2.4.1. Προδιαγραφές

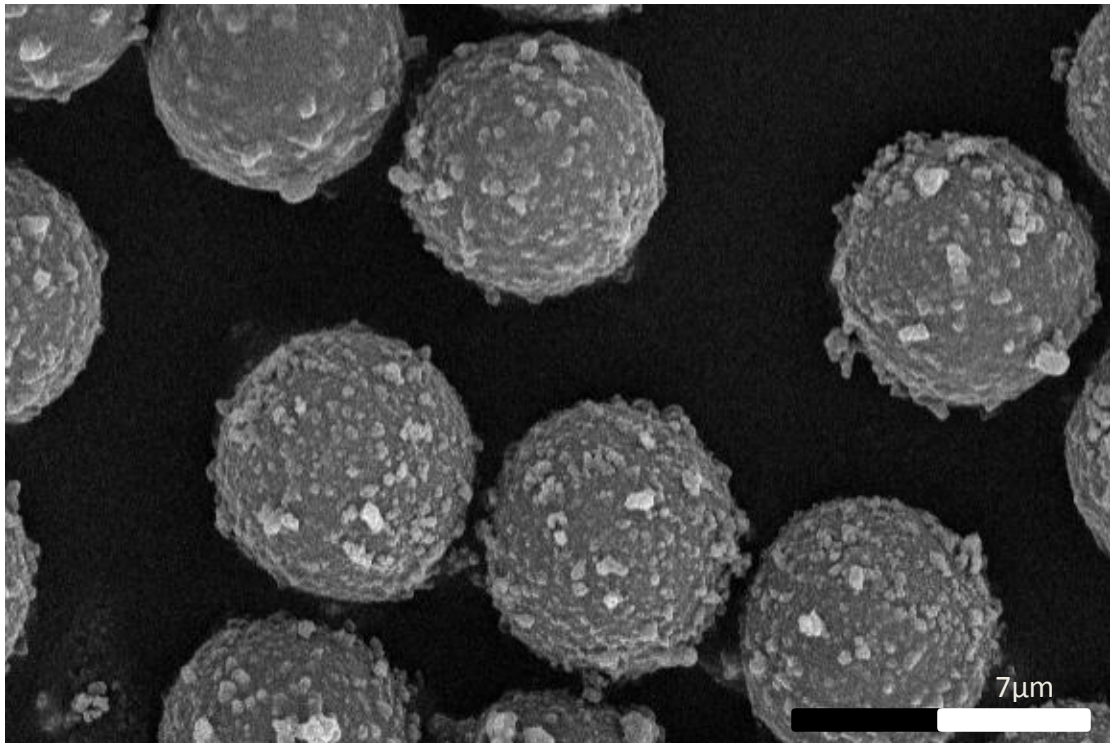
Τα μαγνητικά σφαιρίδια συνοδεύονται σε διάλυμα καθαρού νερού περιέχοντας <0.1% w/v συντηρητικού.

Package Configuration	Specification
Microsphere Concentration (beads/mL)	11.0 x 10 ⁶ - 14.5 x 10 ⁶
Medium	<0.1% ProClin in Water
Microsphere Properties	Specification
Median Microsphere Density (g/mL)	1.10 + 0.06
Mode Microsphere Diameter (μm)	6.5 + 0.2
RP1 background	< 100
Luminex100/200 Classification Efficiency	> 80%
Luminex100/200 Misclassification	< 2.0%
Luminex100/200 Doublet Discrimination Peak	8000 - 15000
Progenitor Microsphere Properties	Specification
Diameter Coefficient of Variation	< 5%
Functional groups	Carboxyl(COOH)
Iron Content	2-4%

2.4.2. Περιορισμοί

Για την βέλτιστη απόδοση των σφαιριδίων, απαιτείται η όσο το δυνατόν ελάχιστη έκθεσή τους στο φως. Τα σφαιρίδια είναι υδρόφοβα στο υδατικό μέσο από το οποίο συνοδεύονται. Επίσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με δυνατούς οργανικούς διαλύτες. Η αποθήκευσή τους πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία 2° – 8°C[9,10].

Η παρακάτω εικόνα δείχνει σε μεγέθυνση τα μαγνητικά σφαιρίδια:



*Εικόνα 2.4 [μαγνητικά σφαιρίδια σε μεγέθυνση]

2.5. V-bottom plates

Για τα πειράματα που θα διενεργηθούν χρησιμοποιείται ένα πλήθος πλακετών, όπου όλες διαθέτουν 96 πηδάδια (wells). Οι πλάκες αυτές είναι λευκές, κατασκευασμένες από πολυστυρένιο και τα πηγάδια είναι διατεταγμένα σε 8 σειρές(A-H) και 12 στήλες(1-12). Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ο πάτος κάθε πηγαδιού, ο οποίος είναι σχήματος V.



*Εικόνα 2.5

Διάφορες πλάκες είναι διαθέσιμες, με επίπεδο είτε ημισφαιρικό πάτο. Ο κύριος λόγος όμως που επιλέχθηκαν αυτού του τύπου(κωνικά), είναι το γεγονός ότι είναι πιο αποτελεσματική η συγκομιδή του μεγαλύτερου μέρους του υγρού από το ρομποτικό μηχανισμό.

Όπως είναι κατανοητό οι πλάκες αυτές συνοδεύονται από συγκεκριμένες προδιαγραφές που δίνονται από τον κατασκευαστή και παρουσιάζονται παρακάτω:

Προδιαγραφές 96 well V-bottom plate

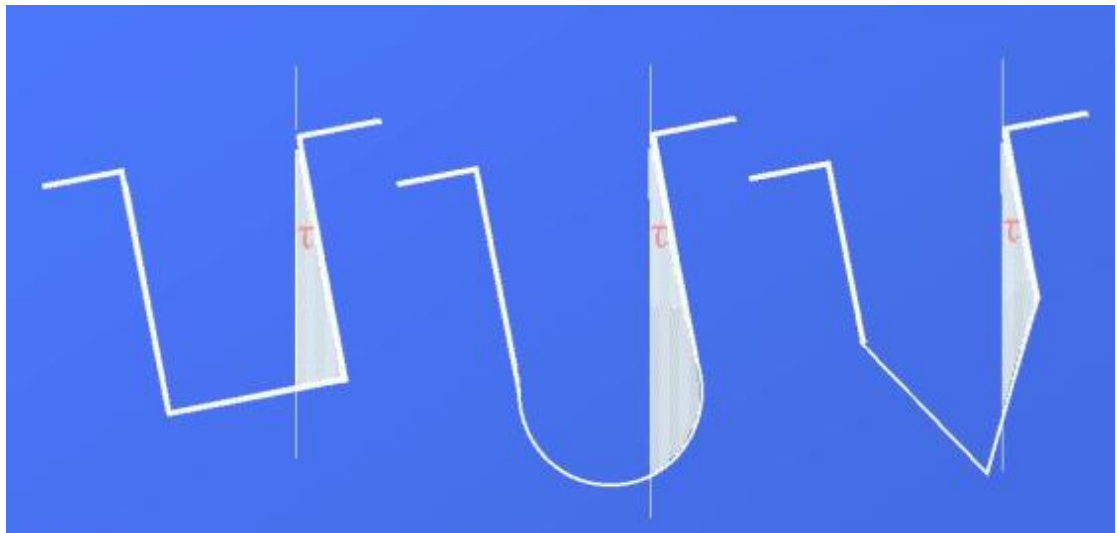
όγκος πηγαδιού	500 μ L
βάθος πηγαδιού	11,12 mm
διάμετρος πηγαδιού άνω/κάτω τμήμα	6,86/6,37 mm
μήκος πλάκας	127,8mm
πλάτος πλάκας	85,5mm
ύψος πλάκας	14,2mm
απόσταση πηγαδιού A1 από πάνω πλευρά	11,2mm
απόσταση πηγαδιού A1 από κάτω πλευρά	14,3mm
απόσταση των κέντρων διαδοχικών πηγαδιών	9mm

Υπάρχουν και άλλου είδους plates που χρησιμοποιούνται στην πειραματική διαδικασία. Η μορφή και οι διαστάσεις της πλάκας είναι ίδιες με την V-bottom και η διαφορά έγκειται στο σχήμα του πάτου. Έτσι έχουμε πλάκες με επίπεδο πάτο (**flat-bottom**) και πλάκες με ημισφαιρικό πάτο (**round-bottom**).



*Εικόνα 2.6 [ημισφαιρικός πάτος]

Η εικόνα που ακολουθεί δείχνει ακριβώς την ουσιαστική διαφορά κάθε πλάκας.



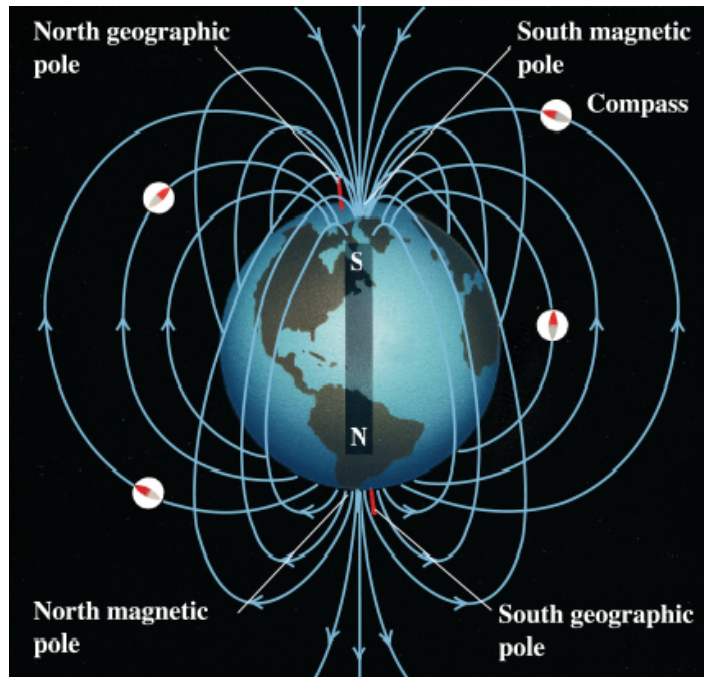
*Εικόνα 2.7 [σύγκριση πάτων πλακών]

Για τα πειράματα που διενεργούμε, βέλτιστο αποτέλεσμα δίνουν τα V-plates, καθώς είναι πιο αποτελεσματική η συλλογή του υγρού με τις πιπέττες του ρομπότ. Στα V-bottom όλο το υγρό συσσωρεύεται στον πάτο, ενώ στις άλλες πλάκες το υγρό δεν μπορεί να συλλεχθεί το ίδιο αποτελεσματικά.

Κεφάλαιο 3: Ηλεκτρομαγνητισμός

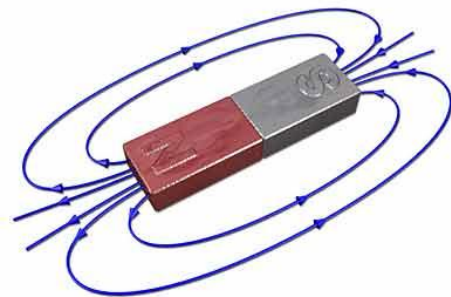
3.1. Εισαγωγή

Όλοι μας, είτε το γνωρίζουμε είτε όχι, χρησιμοποιούμε τις μαγνητικές δυνάμεις. Στην περίπτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, οι δυνάμεις αυτές αποτελούν ίσως το σπουδαιότερο κεφάλαιο για την επίτευξη του στόχου που έχει τεθεί. Οι πιο γνώριμες εκφάνσεις του μαγνητισμού είναι εκείνες που συνδέονται με τους μόνιμους μαγνήτες, όπως η βελόνα της πυξίδας και η Γη, που αποτελεί τον μόνιμο μαγνήτη. Μια από τις θεμελιώδεις αιτίες του μαγνητισμού είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ κινούμενων ηλεκτρικών φορτίων.



*Εικόνα 3.1 [μαγνητικό πεδίο Γης]

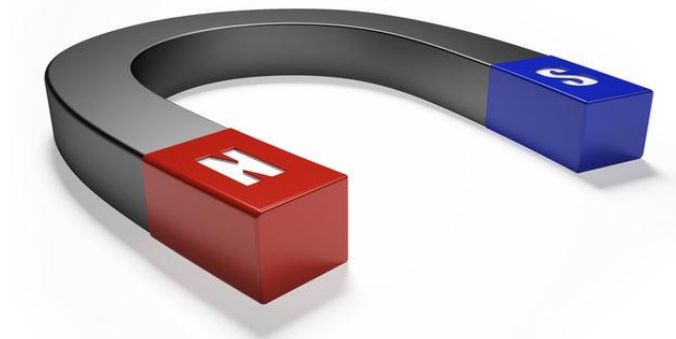
Στη φύση απαντώνται φυσικοί μαγνήτες, δηλαδή αυτοί που έλκουν σιδηρά υλικά από κάποια απόσταση. Έχουν δύο πόλους που ονομάζονται βόρειος και νότιος, σε αντιστοιχία με τη Γη. Όλοι οι μαγνήτες, φυσικοί ή μη(τεχνητοί), έχουν υποχρεωτικά δύο πόλους. Και οι φυσικοί και οι τεχνητοί



ονομάζονται μόνιμοι μαγνήτες (permanent magnets), καθώς το μαγνητικό τους πεδίο παραμένει αμετάβλητο, ανεξάρτητα από τους εξωτερικούς παράγοντες.

Πέραν των ελκτικών δυνάμεων, άλλα χαρακτηριστικά των μόνιμων μαγνητών είναι ο προσανατολισμός των ρινισμάτων σιδήρου κατά τις μαγνητικές γραμμές, δηλαδή γραμμές που εφάπτονται στη δύναμη που προέρχεται από το μαγνητικό πεδίο σε κάποιο σημείο του χώρου. Οι μαγνητικές γραμμές δεν τέμνονται διότι σε κάθε σημείο εφαρμόζεται δύναμη ορισμένης φοράς.

Σε πολλές εφαρμογές συναντάμε συχνά τους ηλεκτρομαγνήτες, δηλαδή τεχνητούς μαγνήτες των οποίων το μαγνητικό πεδίο δημιουργείται από ηλεκτρικό ρεύμα. Τα παραπάνω που ισχύουν για τους μόνιμους μαγνήτες, ισχύουν και στους ηλεκτρομαγνήτες, αλλά με τη διαφορά ότι, όταν σταματήσει η παροχή ρεύματος σε αυτούς, χάνουν σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητές τους.

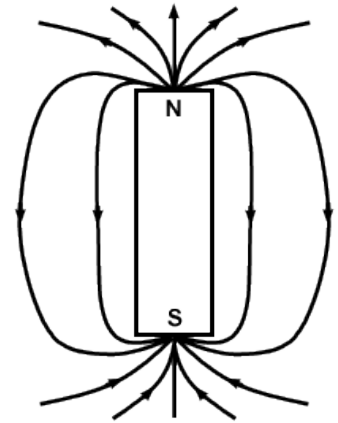


*Εικόνα 3.2 [κλασικός μαγνήτης σε σχήμα πετάλου]

Για εμάς η χρησιμοποίηση ηλεκτρομαγνήτη είναι το βασικότερο συστατικό της εργασίας. Η μεγάλη ποικιλομορφία των ηλεκτρομαγνητών και οι πολλές διαφορετικές παράμετροι που επηρεάζουν την λειτουργία τους, θα είναι ίσως το σημαντικότερο εμπόδιο για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος. Παρακάτω παρουσιάζονται τα βασικά και θεμελιώδη κριτήρια για τον ηλεκτρομαγνητισμό καθώς και οι θεωρίες που τον διέπουν, όπως επίσης και οι αρχές σχεδιασμού των ηλεκτρομαγνητών και οι διάφορες παράμετροι από τις οποίες εξαρτάται η ορθή λειτουργία τους.

3.2. Μαγνητικό πεδίο

Το μαγνητικό πεδίο που σχηματίζεται στο χώρο έχει ορισμένες ιδιότητες και χαρακτηριστικά, ανεξαρτήτως από το αν αυτό προέρχεται από μόνιμο μαγνήτη ή ηλεκτρομαγνήτη. Και στις δύο περιπτώσεις τα γενικά του χαρακτηριστικά είναι παρόμοια. Οι μαγνητικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να περιγραφούν από την κίνηση ηλεκτρικού φορτίου ή από ηλεκτρικό ρεύμα που δημιουργεί μαγνητικό πεδίο στον χώρο. Ομοίως, το μαγνητικό πεδίο ασκεί δύναμη F πάνω σε κάθε κινούμενο φορτίο ή ηλεκτρικό ρεύμα που βρίσκεται μέσα στο πεδίο.



*Εικόνα 3.3

Γενικά το μαγνητικό πεδίο και τα ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα μπορούν να περιγραφούν με τις εξισώσεις του Maxwell και με σχέσεις που περιγράφουν τις ιδιότητες των υλικών που απαρτίζουν μια ηλεκτρομαγνητική διάταξη.

Άρα έχουμε :

1. Νόμος Ampere

$$\oint H \cdot dl = i_{net} + \oint_s \frac{\partial D}{\partial t} \cdot ds \quad (1)$$

2. Νόμος Faraday

$$\oint E \cdot dl = - \oint_s \frac{\partial B}{\partial t} \cdot ds \quad (2)$$

3. Νόμος Gauss ηλεκτρικού πεδίου

$$\oint D \cdot ds = \oint_v p \cdot dV \quad (3)$$

4. Νόμος Gauss μαγνητικού πεδίου

$$\oint_s B \cdot ds = 0 \quad (4)$$

[11]

Όπου:

Μέγεθος	Όνομα	Μονάδα μέτρησης
E	ένταση ηλεκτρικού πεδίου	V/m
H	ένταση μαγνητικού πεδίου	A/m, A-ελίγματα/m
B	μαγνητική επαγωγή	T=Wb/m ²
ρ	πυκνότητα ηλεκτρικού φορτίου	m
D	ρεύμα μετατόπισης	As/m ²
i _{net}	ρεύμα καθαρό	A
dl	στοιχειώδες διαφορικό μήκος	m
ds	στοιχειώδης διαφορική επιφάνεια	m ²
dV	στοιχειώδης διαφορικός όγκος	m ³

Οι εξισώσεις αυτές συμπληρώνονται από μια εξίσωση που συνδέει την ένταση του μαγνητικού πεδίου H, με τη μαγνητική επαγωγή B.

$$B = \mu H \quad (5)$$

Η μαγνητική επαγωγή είναι η ιδιότητα του υλικού που παρουσιάζεται όταν σε αυτό εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο έντασης H. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα, οι μονάδες του εκφράζονται σε T(tesla).

Το μ που βλέπουμε στην παραπάνω εξίσωση ονομάζεται **συντελεστής μαγνητικής διαπερατότητας** ή **permeability**. Το μ είναι ίσο με τη μαγνητική διαπερατότητα του κενού(μ_0) επί την σχετική μαγνητική διαπερατότητα κάθε υλικού(μ_r) που χρησιμοποιούμε. Συνήθως αυτή κυμαίνεται από 1.000-80.000 και του κενού $4\pi \cdot 10^{-7}$ H/m.

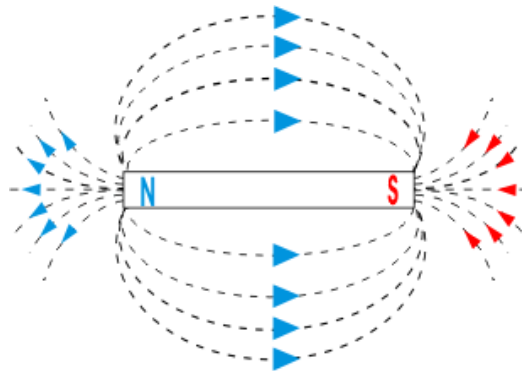
Μέσα στα όρια του μαγνητικού πεδίου αναπτύσσονται δυνάμεις σε φορτία που κινούνται με ταχύτητα v σε αυτό. Η δύναμη αυτή ονομάζεται δύναμη Lorentz και είναι:

$$F = q \cdot v \times B \quad (6)$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτουν και οι μονάδες του B που είναι 1Ns/Cm ή T ή gauss στο σύστημα cgs που χρησιμοποιείται συχνά.

3.3. Γραμμές μαγνητικού πεδίου

Κάθε μαγνητικό πεδίο μπορεί να παρασταθεί με γραμμές. Οι γραμμές αυτές σχεδιάζονται έτσι ώστε, η γραμμή που περνά από οποιοδήποτε σημείο να εφάπτεται στο διάνυσμα του μαγνητικού πεδίου B στο σημείο αυτό. Επίσης, ο αριθμός των γραμμών που σχεδιάζονται ανά μονάδα επιφάνειας κάθετης στις γραμμές σε κάποιο σημείο, είναι ανάλογος προς την ένταση του πεδίου στο σημείο αυτό.



*Εικόνα 3.4 [μαγνητικές γραμμές]

Η παραπάνω περιγραφή αντιστοιχεί σε αυτό που καλούμε γραμμές μαγνητικού πεδίου. Επειδή η κατεύθυνση του B σε κάθε σημείο είναι μονοσήμαντα καθορισμένη, οι γραμμές του μαγνητικού πεδίου ποτέ δεν τέμνονται μεταξύ τους.

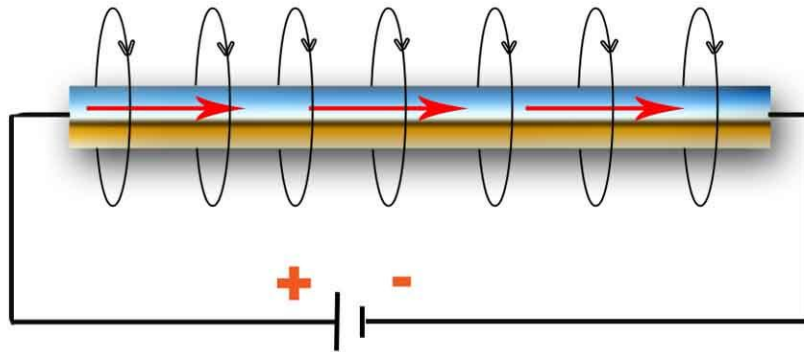
Για να εξηγήσουμε πιο απλά τις μαγνητικές γραμμές, όταν σε ένα μαγνητικό πεδίο ελευθερώσουμε ρινίσματα σιδήρου τότε αυτά θα σχηματίσουν τις μαγνητικές γραμμές. Θα διατεταχθούν δηλαδή με τέτοιο τρόπο ώστε η δύναμη που θα τους ασκείται να είναι πάντα εφαπτόμενη στη μαγνητική γραμμή[12].

3.4. Δημιουργία μαγνητικού πεδίου

Αρχικά θα προσδιορίσουμε το μαγνητικό πεδίο σε απλοποιημένη κλίμακα. Από τον νόμο του Ampere προκύπτει:

$$\oint H \cdot dL = i_{net} \quad (7)$$

Η παραπάνω εξίσωση χρησιμεύει για τον υπολογισμό της έντασης του μαγνητικού πεδίου σε συναρτήσε του ρεύματος i_{net} που διαρρέει την κλειστή επιφάνεια. Άρα το μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται σε ρευματοφόρο αγωγό θα είναι όπως παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα:



*Εικόνα 3.5 [μαγνητικό πεδίο ρευματοφόρου αγωγού]

*Το ρεύμα i_{net} λαμβάνεται αλγεβρικά βάση της σύμβασης του δεξιόστροφου κοχλία.

Η ένταση H είναι εφαπτόμενη στις μαγνητικές γραμμές. Το μέτρο της έντασης υπολογίζεται ως εξής:

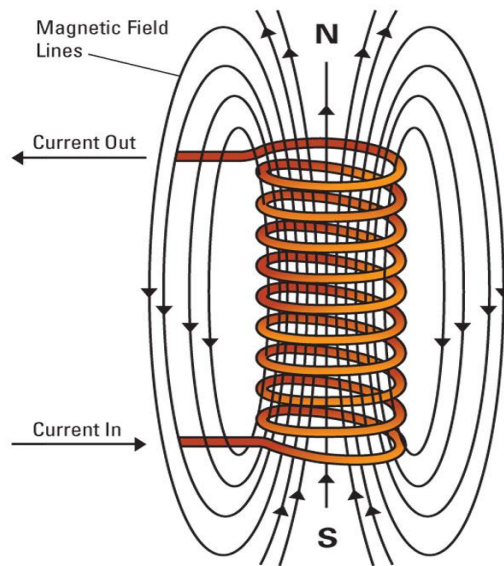
$$H \cdot 2\pi r = i_{net} \quad (8)$$

Άρα, η ένταση του πεδίου είναι ανάλογη του ρεύματος που διέρχεται από το δίσκο ακτίνας r και αντιστρόφως ανάλογη της απόστασης r από αυτόν.

Είναι προφανές πως η ένταση του μαγνητικού πεδίου που μπορούμε να επιτύχουμε με τον παραπάνω τρόπο δεν είναι αρκετή ώστε να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Είναι δυνατό όμως, να αυξήσουμε την ένταση τοποθετώντας πολλούς αγωγούς σε κατάλληλη γεωμετρία.

Παράδειγμα για το πως θα αυξηθεί η ένταση αποτελεί το επόμενο παράδειγμα. Κατασκευάζουμε πηνίο από μονωμένο σύρμα, το οποίο περιελίσσεται περισσότερες της μίας φορές, $N > 1$. Κάθε τύλιγμα συνεισφέρει ισοτρόπως στην αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου, με αποτέλεσμα να ισούται με το γινόμενο της έντασης που οφείλεται σε ένα τύλιγμα, επί τον αριθμό N αυτών.

Η εικόνα που ακολουθεί δείχνει το πλήθος των τυλιγμάτων:



*Εικόνα 3.6

Από τον νόμο του Ampere που παρουσιάστηκε προηγουμένως, προκύπτει για το κύκλωμα με τις N περιελίξεις,

$$H = \frac{i_{net}}{l} = \frac{Ni}{l} \quad (9)$$

Όπου l : το μήκος του πηνίου

Αυτό που μπορούμε να συμπεράνουμε από την παραπάνω εξίσωση είναι ότι με αύξηση των τυλιγμάτων μπορεί να αυξηθεί παράλληλα και η ένταση του πεδίου, χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του ρεύματος που διαρρέει το σύρμα. Αυτό αποτελεί και την βασική κατασκευαστική αρχή για τον σχεδιασμό μιας ηλεκτρομαγνητικής διάταξης. Επομένως, σε έναν ηλεκτρομαγνήτη είναι εφικτός ο έλεγχος και η ρύθμιση της έντασης του πεδίου μέσω της ρύθμισης του ρεύματος i που διαρρέει το σύρμα.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το παραπάνω παράδειγμα είναι για πηνίο χωρίς πυρήνα. Σε περίπτωση που έχουμε κάποιον σιδηρομαγνητικό πυρήνα τότε η μαγνητική επαγωγή B θα

αυξηθεί σημαντικά, λόγω της σχετικής μαγνητικής διαπερατότητας μ , που είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερη αυτής του αέρα[13].

3.5. Σιδηρομαγνητικά υλικά για την κατασκευή ηλεκτρομαγνητών

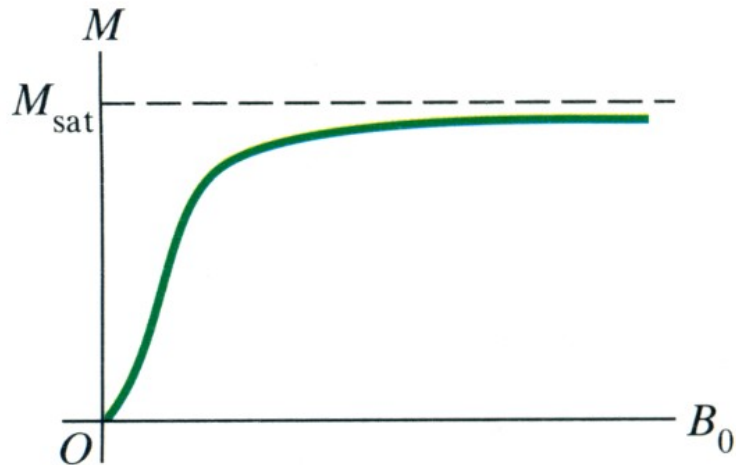
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στις περιπτώσεις που χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρομαγνήτης για μια εφαρμογή, τότε σχεδόν ποτέ δεν θα συναντήσουμε σκέτο πηνίο χωρίς την ύπαρξη κάποιου πυρήνα στο εσωτερικό του. Ανάλογα με την εφαρμογή και τις ιδιότητες του ηλεκτρομαγνήτη που θέλουμε είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν μεταλλικά υλικά όπως ο σίδηρος, το κοβάλτιο, το νικέλιο και κράματα αυτών, τα οποία διαθέτουν μεγάλη μαγνητική διαπερατότητα. Τα παραπάνω υλικά είναι και αυτά που συνηθέστερα χρησιμοποιούνται σε τέτοιες περιπτώσεις και ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των **σιδηρομαγνητικών υλικών (ferromagnetic)**, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η πολύ μεγάλη μαγνητική διαπερατότητα, εκατοντάδες ως και χιλιάδες φορές μεγαλύτερη της μονάδας, δηλαδή του κενού-αέρα[12].

Σε αντίθεση με το μεμονωμένο πηνίο, όταν αυτό διαθέτει πυρήνα, η ένταση του μαγνητικού πεδίου και η μαγνητική ροή στον πυρήνα είναι μ_r φορές μεγαλύτερη. Για τυπικά σιδηρομαγνητικά υλικά η σχετική μαγνητική διαπερατότητα κυμαίνεται από 1.000 μέχρι 80.000 για το εσωτερικό του πυρήνα. Έξω από τον πυρήνα η μαγνητική ροή μειώνεται πολύ μέχρι να μηδενιστεί όσο απομακρυνόμαστε από αυτόν.

Από φυσική σκοπιά, στα υλικά αυτά οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατομικών μαγνητικών ροπών είναι τόσο ισχυρές ώστε να ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους σε τοπικές ενότητες (μαγνητικές περιοχές), ακόμα και χωρίς παρουσία εξωτερικού πεδίου.

Χωρίς κάποιο πεδίο οι μαγνητίσεις των παραπάνω περιοχών έχουν τυχαίο προσανατολισμό. Όταν όμως βρεθούν μέσα σε ένα πεδίο, τότε τείνουν να προσανατολιστούν παράλληλα. Όσο αυξάνεται η ένταση του εξωτερικού πεδίου, τα σιδηρομαγνητικά υλικά φτάνουν σε ένα σημείο στο οποίο όλες οι μαγνητικές ροπές είναι προσανατολισμένες παράλληλα με αυτό. Η φάση αυτή ονομάζεται **μαγνήτιση κόρου ή saturation point**, σημείο στο οποίο έχει επιτευχθεί η μέγιστη μαγνήτιση και ταυτόχρονη παράλληλη ευθυγράμμιση των μαγνητικών περιοχών. Σε αυτή την περίπτωση έχει επιτευχθεί η μέγιστη ένταση και όσο και αν αυξηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα στο πηνίο ενός ηλεκτρομαγνήτη δεν θα έχουμε κανένα επιπλέον αποτέλεσμα[14,15].

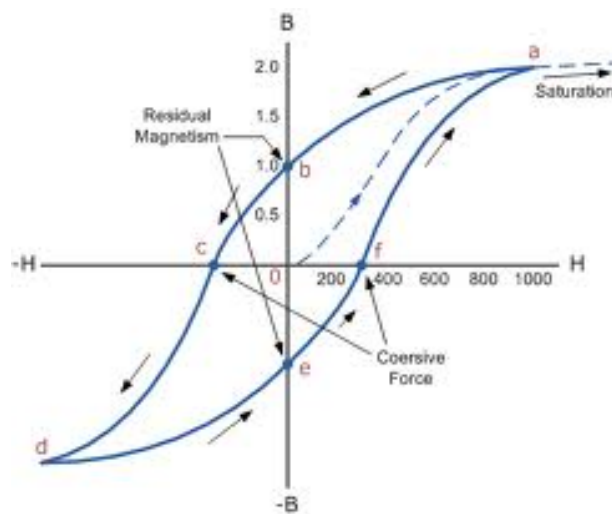
Το διάγραμμα που ακολουθεί δείχνει το σημείο κορεσμού ενός σιδηρομαγνητικού υλικού σε αυξανόμενο μαγνητικό πεδίο:



*Εικόνα 3.7 [διάγραμμα μαγνήτισης ανάλογα με την επαγωγή, στο σημείο κόρου]

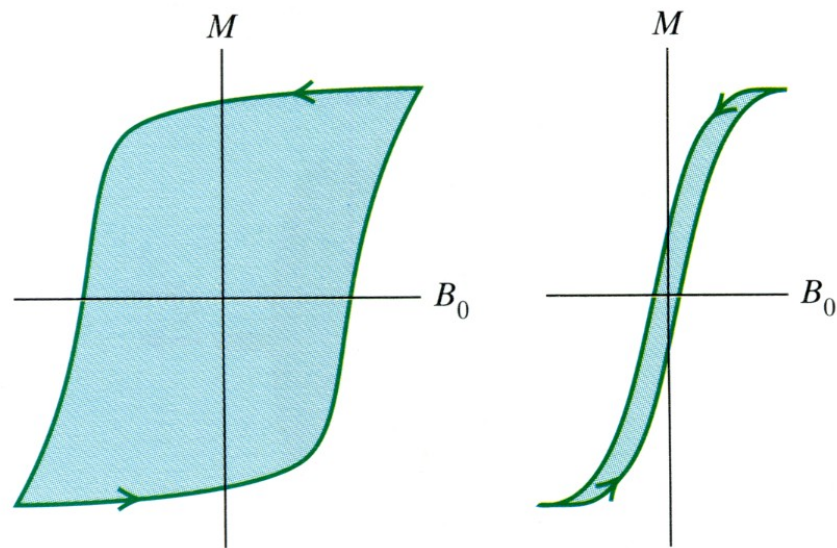
Όσον αφορά τους μόνιμους μαγνήτες και το στάδιο κατασκευής τους, όταν φτάσουμε σε κατάσταση κόρου και εκείνη τη στιγμή μηδενίσουμε το πεδίο τότε η μαγνήτιση δεν μηδενίζεται. Για να απομαγνητιστεί πλέον το υλικό θα πρέπει να του εφαρμοστεί ένα μαγνητικό πεδίο προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Όταν απομακρύνουμε ή παύσουμε το πεδίο από το σιδηρομαγνητικό υλικό παρατηρούμε ότι οι μαγνητικές περιοχές τείνουν να επιστρέψουν στην αρχική τους κατάσταση. Από το παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε πως η συνήθης αντίδραση των υλικών δεν είναι γραμμική και αυτό το φαινόμενο ονομάζεται **μαγνητική υστέρηση (magnetic hysteresis)** και περιγράφεται από την καμπύλη υστέρησης κάθε υλικού.



*Εικόνα 3.8 [Βρόγχος υστέρησης για σιδηρομαγνητικό υλικό]

Η μαγνητική υστέρηση δεν έχει την ίδια ένταση σε όλα τα σιδηρομαγνητικά υλικά. Χαρακτηριστικά, ο σίδηρος απομαγνητίζεται εύκολα, ενώ διάφορα κράματα χρειάζονται μεγάλα αντίθετα πεδία για να χάσουν την μαγνήτισή τους. Για τους ηλεκτρομαγνήτες διαφόρων εφαρμογών, όπου επιδιώκεται το μαγνητικό πεδίο να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερο για συγκεκριμένο ρεύμα, το συχνότερα χρησιμοποιούμενο υλικό είναι ο μαλακός σίδηρος, ο οποίος έχει πολύ στενό βρόγχο υστέρησης και ταυτόχρονα διαθέτει υψηλή διαπερατότητα.



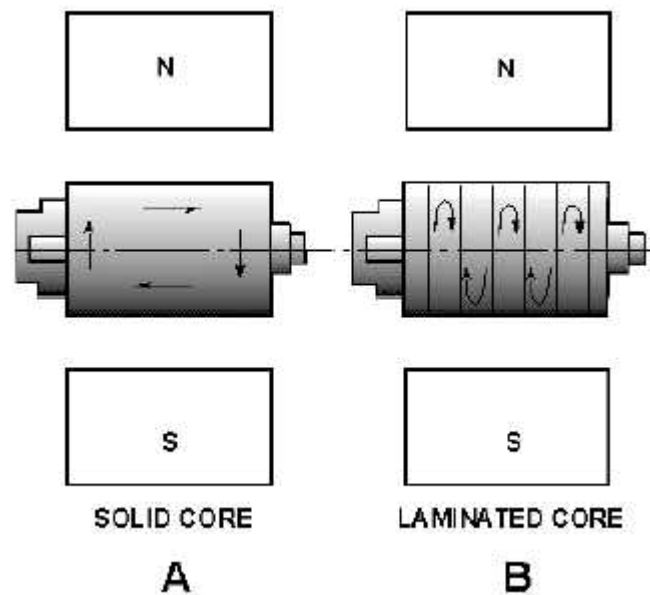
*Εικόνα 3.9 [Στα διαγράμματα βλέπουμε τους βρόγχους υστέρησης: α) υλικού που παραμένει ισχυρά μαγνητισμένο και β) σιδήρου]

Η φυσική ερμηνεία του διαγράμματος υστέρησης είναι ότι, όταν ένα σιδηρομαγνητικό υλικό υπόκειται σε μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο, τότε σε κάθε κύκλο έχουμε απώλειες ισχύος που λέγονται **απώλειες υστέρησης**. Αυτές είναι ανάλογες της συχνότητας του πεδίου, δηλαδή όσο περισσότεροι κύκλοι διαγράφονται ανά μονάδα χρόνου, τόσο μεγαλύτερες είναι οι απώλειες αυτές.

Άλλου είδους απώλειες που συναντώνται συχνά σε μετασχηματιστές και ηλεκτρομαγνήτες είναι οι **απώλειες δινορρευμάτων (eddy current losses)** και οφείλονται στα ρεύματα που δημιουργούνται στον πυρήνα όταν αυτός βρίσκεται εντός μαγνητικού πεδίου. Στον πυρήνα παρουσιάζεται μια διαφορά τάσης που μπορεί να μειωθεί αν μικρύνουμε το μέγεθός του. Αν οι αγωγοί είναι πολλοί σε πλήθος, για να σχηματίσουν τον πυρήνα παρατηρούμε διαρροή ρευμάτων σε όλο το μήκος του αγωγού. Το φαινόμενο αυτό είναι τα δινορρεύματα και μπορούν

να οδηγήσουν σε μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας, ειδικά αν η αντίσταση του υλικού είναι μικρή[11].

Για την εξάλειψη του παραπάνω φαινομένου, η κατασκευή του πυρήνα προτιμάται να γίνει με λεπτά ελάσματα σιδηρομαγνητικού υλικού, τα οποία διαθέτουν και εξωτερική μόνωση. Έτσι η διατιθέμενη για τα δινορρεύματα επιφάνεια είναι πολύ μικρή ώστε να αναπτυχθούν.



*Εικόνα 3.10 [Η παραπάνω εικόνα δείχνει την κυκλοφορία των δινορρευμάτων σε ενιαίο πυρήνα και σε πυρήνα κατασκευασμένο με ελάσματα]

Κεφάλαιο 4: Προδιαγραφές ηλεκτρομαγνητών και κατασκευή τους

4.1. Κατάταξη

Ως τώρα έχουμε αναφερθεί στους ηλεκτρομαγνήτες πολύ γενικά, όμως η βασική ιδέα για το τι ακριβώς χρειάζεται για την κατασκευή ενός, έχει αναφερθεί. Σίγουρα χρειάζεται κάποιος αγωγός-πυρήνας και κάποιο πηνίο γύρω από αυτόν για να δημιουργηθεί μαγνητικό πεδίο. Οι ηλεκτρομαγνήτες χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες.

1. **Ελκύοντες ηλεκτρομαγνήτες**, των οποίων ο σπλισμός έλκεται από απόσταση, όταν ρεύμα διαπεράσει το πηνίο.
2. Ηλεκτρομαγνήτες που χρησιμοποιούνται για **μεταφορά** και έχουν πολύ μεγάλη δύναμη ανύψωσης.
3. **Ηλεκτρομαγνήτες πεδίου**, που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία σταθερού μαγνητικού πεδίου.

Υπάρχει επιμέρους διαχωρισμός των ηλεκτρομαγνητών, αυτή τη φορά σχετικά με το σχέδιό τους και το σχήμα τους. Έτσι μπορούμε να έχουμε τις εξής κατηγορίες:

- i. Ηλεκτρομαγνήτες σχήματος ράβδου
- ii. Ηλεκτρομαγνήτες σχήματος πετάλου
- iii. Ηλεκτρομαγνήτες επενδεδημένου σιδήρου
- iv. Ηλεκτρομαγνήτες πηνίου εμβόλου.

Ότι σχέδιο ηλεκτρομαγνήτη μπορεί να προκύψει, βασίζεται στα παραπάνω είδη με ελάχιστες εξαιρέσεις[16].

4.2. Ιδιότητες μαγνητικού κυκλώματος

Όταν ρεύμα ρέει διαμέσου του τυλίγματος του ηλεκτρομαγνήτη, παράγεται μαγνητική δύναμη που ενεργοποιεί και διατηρεί σε μαγνητική κατάσταση τον πυρήνα. Τότε ο πυρήνας υπόκειται σε πίεση από τη μαγνητική ροή ή τη μαγνητική επαγωγή. Όπως έχει αναφερθεί ήδη στον κεφάλαιο του μαγνητισμού γενικότερα, η ένταση της μαγνητικής επαγωγής ή της ροής μετριέται από την πυκνότητα των γραμμών που διέρχονται από μια επιφάνεια τετραγωνικού εκατοστού cm^2 και συμβολίζεται με B . Η δύναμη που προκαλεί τη μαγνητική επαγωγή λέγεται **μαγνητεγερτική δύναμη M** και η μαγνητεγερτική προς μονάδα μήκους cm **δύναμη μαγνητίσεως H** .

Αν με N συμβολίσουμε τον αριθμό των περιελίξεων του τυλίγματος και I τα ampere που ρέουν, τότε το παράγωγο NI ονομάζεται **αριθμός αμπερελιγμάτων**(ampere-ελίγματα). Για τους ηλεκτρομαγνήτες ισχύει:

$$M = \frac{4\pi}{10} \cdot NI = 1,257NI \quad (10)$$

Αν l είναι το μήκος(μέση περίμετρος) του δακτυλίου σε cm :

$$H = \frac{M}{l} = 1,257 \frac{NI}{l} \quad (11)$$

και αν $n = \frac{N}{l}$, το n είναι ο αριθμός των περιελίξεων ανά cm^2 ,

$$H = 1,257 nI \quad (12)$$

Η πυκνότητα της μαγνητικής ροής εξαρτάται από τις διαστάσεις και το υλικό του πυρήνα. Η ιδιότητα του πυρήνα να περιορίζει την πυκνότητα της ροής ονομάζεται μαγνητική αντίσταση ή **magnetic reluctivity** του υλικού. Ως μονάδα της μαγνητικής αντίστασης θεωρούμε την αντίσταση 1cm^3 αέρα. Η αντίσταση των υλικών που χρησιμοποιούνται στον πυρήνα είναι πολύ πιο μικρή από εκείνη του αέρα.

Παρακάτω παρουσιάζονται σημαντικές σχέσεις σχετικές με τις ποσότητες που έχουν παρουσιαστεί παραπάνω, όπου I είναι η μέση περίμετρος ενός τυλίγματος σε cm και s το εμβαδό της επιφάνειας σε cm^2 .

1. $F=Bs$
2. $M=HI$
3. $B=\mu H$

$$4. S = \frac{1}{\mu} = \frac{H}{B}$$

5. $P = \frac{\mu S}{l}$, όπου P είναι η διαπερατότητα(**permeance**) για τη συγκεκριμένη γεωμετρία.

6. $X = \frac{1}{P} = \frac{l}{\mu S} = \frac{Sl}{S}$, όπου X η μαγνητική αντίσταση(**reluctance**) του υλικού για τη γεωμετρία αυτή.

Από τις παραπάνω σχέσεις προκύπτει ο **νόμος του μαγνητικού κυκλώματος**:

$$F = MP = \frac{M}{X}$$



$$\text{Magnetic flux} = \frac{\text{Magnetomotive force}}{\text{Reluctance}}$$



$$\text{Weber} = \frac{\text{Gilberts}}{\text{Oersteds}}$$

Δηλαδή η μαγνητική ροή F έχει ως μονάδα το Weber, η μαγνητογεργτική δύναμη το Gilbert (1 ampere-turn=1,257 gilberts) και η αντίσταση το Oersted[16].

4.3. Υλικά κατασκευής

Τα διάφορα υλικά που θα χρησιμοποιήσουμε θα είναι για τον πυρήνα, τον αγωγό και την μόνωσή του.

Ο χαλκός είναι το μόνο υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως ως αγωγός. Πρέπει να είναι μαλακός και να έχει αγωγιμότητα τουλάχιστον 98% της αγωγιμότητας του καθαρού χαλκού. Το σύρμα δεν είναι απαραίτητο να είναι κυκλικής διατομής, αλλά είναι δυνατό να έχει διάφορα σχήματα, όμως η κυκλική διατομή είναι η πιο διαδεδομένη.

Το υλικό της μόνωσης πρέπει να αποτρέπει την διαρροή τάσης μεταξύ των περιελίξεων, των στρώσεων και του πυρήνα. Το μονωτικό επιλέγεται με συγκεκριμένα κριτήρια:

- a) Μεγάλη μονωτική αντίσταση
- b) Μηδενική απορροφητικότητα υγρασίας
- c) Αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες
- d) Αντοχή στις υψηλές τάσεις
- e) Χημικά αδρανές

Επειδή πρακτικά είναι πολύ δύσκολο κάποιο υλικό να συνδιάζει όλα τα παραπάνω, η επιλογή του ανά περίπτωση γίνεται ανάλογα με τη χρήση του.

Όπως έχουμε αναφέρει το υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως για την κατασκευή ηλεκτρομαγνητών είναι ο μαλακός σίδηρος. Συνήθως, βάφεται με μονωτική βαφή, ώστε να μην επηρεαστεί από την τάση των τυλιγμάτων, σε περίπτωση που υπάρχει διαρροή τάσης από αυτά[16].

Κεφάλαιο 5: Μηχανικός εξοπλισμός και αυτοματοποίηση

5.1. Ρομποτικός μηχανισμός

Σημαντικό βήμα για την επίτευξη του στόχου μας είναι η καταρχήν ανάκτηση των σωματιδίων. Η ανάκτηση επιχειρείται με χρήση ηλεκτρομαγνήτη, ο οποίος προσαρτήθηκε στον ρομποτικό μηχανισμό **Tecan Freedom Evo 150**. Ο ρομποτικός μηχανισμός είναι εξειδικευμένος για τη διενέργεια βιολογικών πειραμάτων και την αυτοματοποίηση τους για την επίτευξη μεγάλης κλίμακας, ταχύτητας και μικρού σφάλματος.



*Εικόνα 5.1 [ρομπότ Tecan]

Η κύρια λειτουργία του ρομπότ, που θέλουμε να εκμεταλλευτούμε σε αυτή τη φάση, είναι η σταθερότητα και η ακρίβεια στις κινήσεις του καθώς διαθέτει ρομποτικό βραχίονα 4 βαθμών ελευθερίας, που του επιτρέπει να κινείται στον χώρο εργασίας του. Στην άκρη του βραχίονα είναι προσαρμοσμένο σύστημα που δέχεται 8 πιπέτες, και κάθε ένα από τα 8 άκρα του καταλήγει σε μια αντλία αντίστοιχα. Όπως γίνεται αντιληπτό η κύρια δυνατότητά του είναι η αναρρόφηση (aspirate) και διανομή (dispense) του υγρού που διαχειρίζεται. Αυτή του η δυνατότητα το καθιστά

κατάλληλο για την προετοιμασία high- throughput δοκιμών και την ανάλυσή τους με τις απαραίτητες προσθήκες, σε μία αυτόματη προγραμματισμένη διαδικασία.

Η επιφάνεια εργασίας του είναι δυνατό να φιλοξενήσει μέχρι και 21 πλάκες και μπορεί να διαχειριστεί 3-500μLστη Standard επιλογή και 0.5nL-30 μLστην επιλογή nanoripetting.

Μεγάλο πλεονέκτημα αποτελεί το λογισμικό GEMINI που συνοδεύει το ρομπότ, καθώς είναι εύχρηστο και φιλόξενο. Ο προγραμματισμός των κινήσεων, όπως θα παρουσιαστεί και παρακάτω, είναι απλή και στη βιβλιοθήκη του υπάρχουν πολλές κατηγορίες υγρών και πλακών για τα οποία οι ρυθμίσεις είναι προεπιλεγμένες.

5.3. Luminex (Luminex 100/200)

Το μηχάνημα της Luminex διαβάζει τα αποτελέσματα στην πειραματική διαδικασία χκαρ. Εμείς όμως το χρησιμοποιούμε μόνο για την ανίχνευση των σφαιριδίων. Το μηχάνημα αυτό δέχεται μια 96άρα πλάκα και μέσω μιας βελόνας αναρροφά το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού, λαμβάνοντας τόσο υγρό όσο εμείς έχουμε προεπιλέξει.



*Εικόνα 5.2 [Luminex 100/200]

Το υγρό στη συνέχεια οδηγείται σε σωλήνα στον οποίο τα σφαιρίδια ευθυγραμμίζονται και σαρώνονται από δέσμες laser που αναγνωρίζουν και εντοπίζουν τα σφαιρίδια. Υπάρχουν δύο δέσμες, μία πράσινη και μία κόκκινη. Η πράσινη ανιχνεύει τα σφαιρίδια, ενώ η κόκκινη τα αναγνωρίζει καθώς διεγείρει το μίγμα ερυθρής και υπέρυθρης βαφής στο εσωτερικό του. Οι δέσμες εντοπίζονται έπειτα από αισθητήρα που αναλύει τα αποτελέσματα.



*Εικόνα 5.3 [δέσμες laser για ταυτοποίηση των σφαιριδίων]

Τα αποτελέσματα στη συνέχεια παρουσιάζονται στην οθόνη του υπολογιστή και μπορούν να αποθηκευτούν σε φύλλο Excel για μετέπειτα επεξεργασία.

Κεφάλαιο 6: Εργαστηριακή διαδικασία

6.1. Σκοπός

Μέσω της εφαρμογής της τεχνολογίας κπαρ, που έχουμε αναφέρει σε προηγούμενο κεφάλαιο, θέλουμε να μελετήσουμε τα μονοπάτια της σηματοδότησης μέσα στο κύτταρο. Αυτό γίνεται με την μέτρηση των φωσφορυλιώσεων που μετρούνται μέσω των 100 διαφορετικών σημάτων που μπορούν να δώσουν τα μαγνητικά σφαιρίδια.

Σκοπός της εργασίας είναι να επιτευχθεί ανάκτηση και διαχείριση των μαγνητικών σφαιριδίων που έχουν χρησιμοποιούνται σε όλα τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας, ώστε να μην έχουμε απώλειες στους κύκλους του πειράματος. Στα πειράματα αυτά είναι πολύ πιθανό να χρειάζονται κύκλοι πλύσεις όπως στην ELISA. Τότε δηλαδή, θα χρειαστεί από το ίδιο πηγάδι να απομακρύνουμε υγρό μαζί με περιττά μόρια και θέλουμε τα σφαιρίδια να παραμείνουν μέσα στα πηγάδια. Ο στόχος είναι λοιπόν να γίνει κατακράτηση του 98% των σφαιριδίων μέσα σε κάθε πηγάδι. Έτσι θα μπορέσουμε να χρησιμοποιήσουμε το ίδιο σετ σφαιριδίων σε τουλάχιστον 15 κύκλους.

$$100\% \cdot 0,98^{15} = 74\%$$

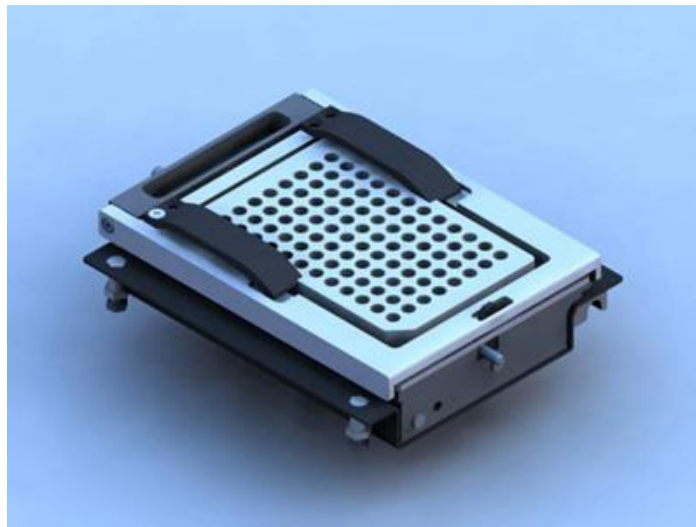
Βλέπουμε από την παραπάνω σχέση πως ακόμα και μετά το πέρας των 15 κύκλων θα έχουμε ακόμα το 73% των σφαιριδίων με τα οποία ξεκινήσαμε, δηλαδή δεν θα έχουμε μεγάλες απώλειες που θα εμπόδιζαν την ομαλή ολοκλήρωση του πειράματος και επομένως τα αποτελέσματά μας θα είναι ικανοποιητικά.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν τα μηχανικά εξαρτήματα τα οποία έχουμε προαναφέρει, θέλουμε να αυτοματοποιήσουμε την διαδικασία ανάκτησης, καθώς η διαδικασία αυτή είναι ως τώρα εφικτή χρησιμοποιώντας διάφορους μηχανισμούς με το χέρι ή ειδικά εξαρτήματα- μηχανισμούς που ειδικεύονται μόνο στην πλύση των σφαιριδίων.

6.2. Μηχανισμοί ανάκτησης

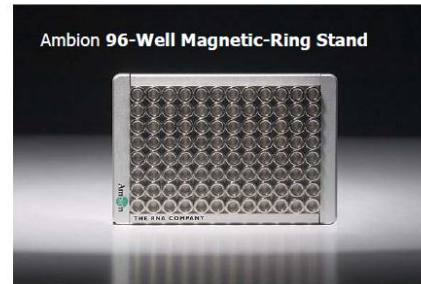
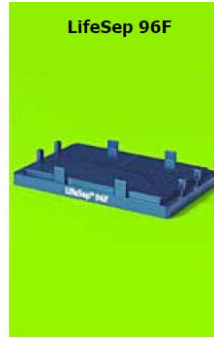
Στην αγορά υπάρχουν διάφορες συσκευές που ειδικεύονται στο να 'πλένουν' τα σφαιρίδια και να τα ανακτούν από ένα δείγμα. Είναι προφανές ότι χρησιμοποιούνται μαγνήτες για αυτό τον σκοπό, καθώς τα σφαιρίδια αλληλεπιδρούν με το μαγνητικό πεδίο.

- Άλλη μέθοδος ανάκτησης των σφαιριδίων, που χρησιμοποιείται και από το εργαστήριο, είναι η χρήση αντλίας, που αναρροφά το υγρό από τις 96άρες πλάκες. Η αναρρόφηση γίνεται από τον διάτρητο πυθμένα, ο οποίος με τα φίλτρα που διαθέτει δεν αφήνει την διέλευση των σφαιριδίων. Η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα και όχι τόσο αποτελεσματική (μικρό ποσοστό ανάκτησης), κάτι που κάνει επιτακτική την ανάκτηση των σφαιριδίων με μαγνητικές εφαρμογές.



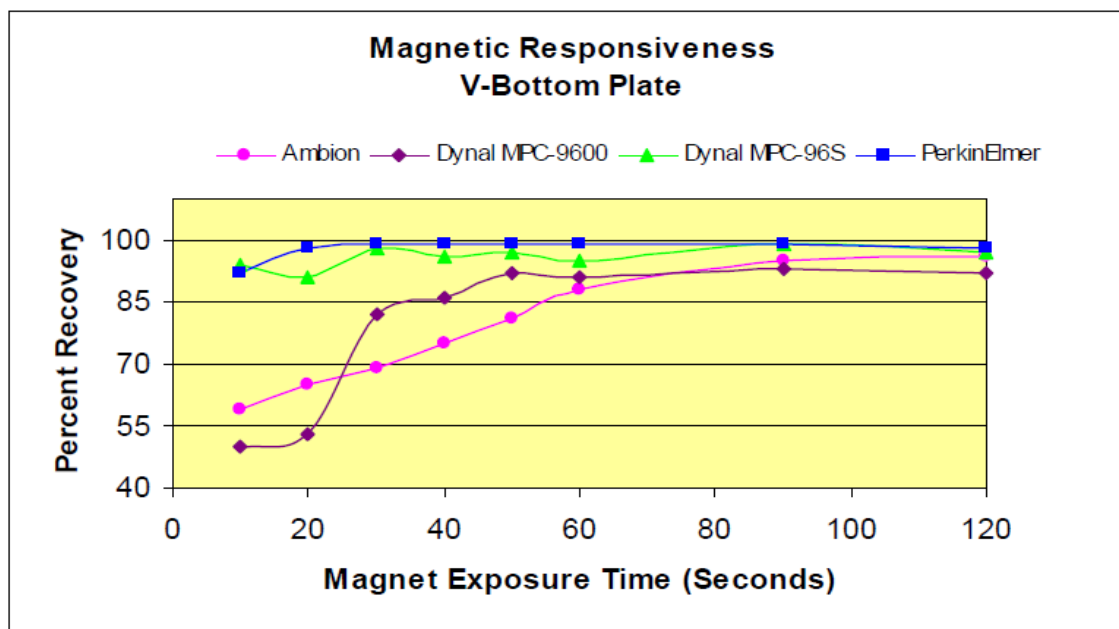
*Εικόνα 6.1 [διάταξη με αντλία που χρησιμοποιεί πλάκες με φίλτρα]

- Άλλοι διαδεδομένοι και ευρέως χρησιμοποιούμενοι μηχανισμοί είναι αυτοί με τη χρήση μόνιμων μαγνητών. Τέτοιοι μηχανισμοί υπάρχουν για διάφορα είδη φυαλιδίων και πλακών. Στην εικόνα που ακολουθεί βλέπουμε μηχανισμούς με μαγνήτες, από τους οποίους όλοι είναι για ανάκτηση χρησιμοποιώντας πιπέτες, δηλαδή με το χέρι.



*Εικόνα 6.2 [μηχανισμοί ανάκτησης με μόνιμους μαγνήτες είτε για 96άρες πλάκες είτε για φυαλίδια]

Ακολουθούν διαγράμματα με τα ποσοστά ανάκτησης σφαιριδίων σε σχέση με το χρόνο των παραπάνω συσκευών. Οι μετρήσεις αυτές διενεργήθηκαν σε κωνικές πλάκες με τα σφαιρίδια Magplex C 38 που χρησιμοποιούμε και εμείς. Αρνητικό αποτελεί το γεγονός πως κανένα δεν εξασφαλίζει ανάκτηση άνω του 80% μετά τον 6^ο κύκλο.



*Εικόνα 6.3

- Άλλο ένα μηχάνημα που χρησιμοποιεί την μέθοδο του φιλτραρίσματος και μαγνήτες είναι το Hydroflex της εταιρίας Tecan. Το συγκεκριμένο μοντέλο ειδικεύεται στην πλύση πλακών και την ανάκτηση σφαιριδίων είτε με φιλτράρισμά τους, είτε με διαχείρισή τους χρησιμοποιώντας μόνιμους μαγνήτες.



*Εικόνα 6.4 [συσκευή πλύσης της Tecan]

6.3. Διαδικασία εργαστηρίου

Στην φάση αυτή, γίνονται δοκιμές με την ηλεκτρομαγνητική διάταξη και είναι προφανές ότι δεν θα ακολουθηθεί η πλήρης διαδικασία χμαρ. Αρχικά η διαδικασία γίνεται με το χέρι ώστε να φανούν ορισμένα ενδεικτικά αποτελέσματα πριν εισάγουμε τη διαδικασία στο ρομπότ. Τα πειράματα που διενεργούνται γίνονται σε υδατικό διάλυμα 100μL/οπή στην 96άρα πλάκα(4.800μL συνολικά) και 2.500 περίπου σφαιρίδια ανά πηγάδι σε σύνολο 48 πηγαδιών. Δεν χρησιμοποιείται ολόκληρη η πλάκα καθώς η συμμετρία της κατασκευής του μαγνήτη μας επιτρέπει να λάβουμε αποτελέσματα ακριβή για την συνολική απόδοσή του.

Κάθε φυαλίδιο με beads έχει $1,27 \cdot 10^7$ σφαιρίδια σε 1mL. Άρα για την ποσότητα των 4.800μL χρειαζόμαστε 0,2μL. Αυτά αναμειγνύονται, ανακινούνται και στη συνέχεια με τη χρήση πιπέτας ισομοιράζονται στα 48 πηγάδια τα οποία και χρησιμοποιούμε για τα πειράματά μας.



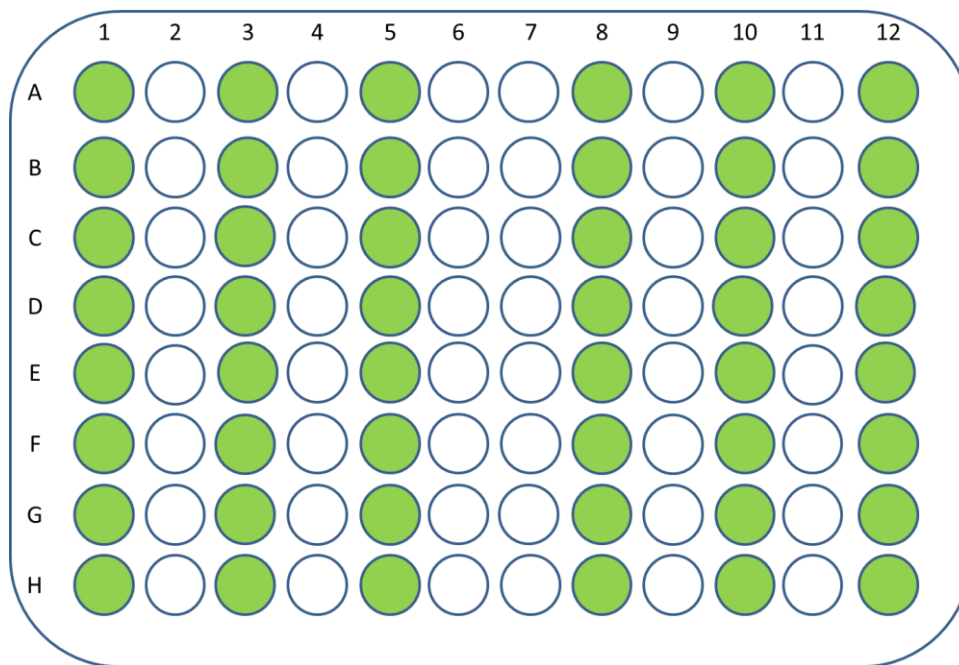
*Εικόνα 6.5 [πιπέτα]



*Εικόνα 6.6 [tip]

Επόμενο βήμα είναι να θέσουμε το μαγνήτη σε λειτουργία και να τοποθετήσουμε την πλάκα στον πάνω μέρος του, ώστε να έλκει τα σφαιρίδια. Ακολουθεί χρόνος αναμονής περίπου 3-5 λεπτά, μέχρι να βεβαιωθούμε ότι τα σφαιρίδια έχουν αλληλεπιδράσει με το μαγνητικό πεδίο. Σε αυτό το στάδιο στόχος είναι τα σφαιρίδια να εκτοπιστούν στα τοιχώματα των πηγαδιών, ώστε όταν κατέβει η πιπέτα και συλλέξει το υγρό αυτά να μείνουν ανέπαφα μέσα σε αυτά.

Μετά τον χρόνο αναμονής και με τον μαγνήτη ακόμα ανοιχτό, αντιγράφουμε την πλάκα σε μια άλλη, δηλαδή μεταφέρουμε με την πιπέτα το υγρό σε μία άλλη διατηρώντας τη θέση των πηγαδιών.



*Η εικόνα αποτελεί μια μικρογραφία της πλάκας που χρησιμοποιούμε. Με πράσινο συμβολίζουμε τα wells στα οποία έχουμε παρουσία σφαιριδίων και υγρού, ενώ τα υπόλοιπα είναι κενά.

Έτσι καταλήγουμε με δύο πλάκες, μία που περιέχει το υγρό και όσο το δυνατό λιγότερα σφαιρίδια, και άλλη μία, την αρχική, που περιλαμβάνει τα σφαιρίδια. Σε αυτή τη δεύτερη πλάκα συμπληρώνουμε πάλι υδατικό διάλυμα, ακριβώς όσο αφαιρέσαμε προηγουμένως. Καταλήγουμε δηλαδή με δύο πλάκες που έχουν ακριβώς τον ίδιο όγκο διαλύματος σε κάθε πηγάδι αντίστοιχα.

Το επόμενο βήμα είναι αυτό που θα κρίνει την επιτυχία των πειραμάτων που διενεργούμε. Εισάγουμε την πλάκα στο Luminec όπου θα 'διαβάσει' πόσα σφαιρίδια υπάρχουν σε κάθε πηγάδι. Ο αριθμός που προκύπτει δεν είναι ακριβής, αλλά το ίδιο το μηχάνημα κάνει μια εκτίμηση και μας δίνει μια ικανοποιητική προσέγγιση που αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα.

Αφού εξάγουμε τα αποτελέσματα, καταλήγουμε με δύο στήλες δεδομένων. Μια είναι αυτή που δείχνει τον αριθμό των σφαιριδίων ανά πηγάδι στην πρώτη πλάκα και η δεύτερη τον αριθμό

των σφαιριδίων στην άλλη. Έχοντας λοιπόν τα παραπάνω, μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό % ανάκτησης των σφαιριδίων και επομένως να κρίνουμε κατά πόσο ήταν επιτυχημένο το πείραμα με τον ηλεκτρομαγνήτη και να προσδιορίσουμε την απόδοσή του.

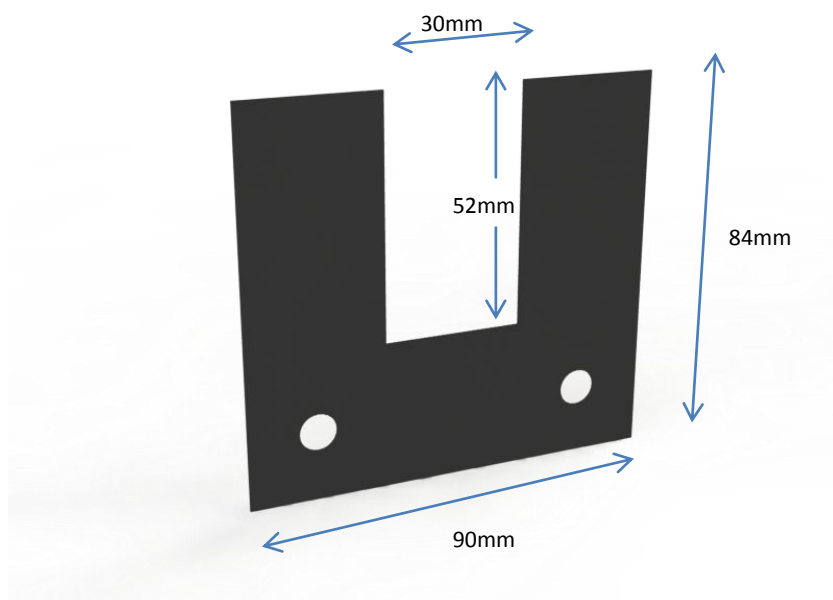
Στόχος όπως έχουμε προαναφέρει είναι το ποσοστό ανάκτησης να ανέλθει στο 98%. Το ποσοστό αυτό είναι το επιδιωκόμενο, καθώς θέλουμε επαναχρησιμοποίηση των σφαιριδίων τουλάχιστον 15 φορές. Έτσι, έπειτα από 15 κύκλους στο πείραμά μας θα έχουμε ακόμα 73% των αρχικών σφαιριδίων.

Τα πειραματικά δεδομένα θα δείξουν αν είναι εφικτή η επίτευξη τέτοιου ποσοστού με χρήση ηλεκτρομαγνήτη, του οποίου η σχεδίαση και οι προδιαγραφές παρουσιάζονται αργότερα.

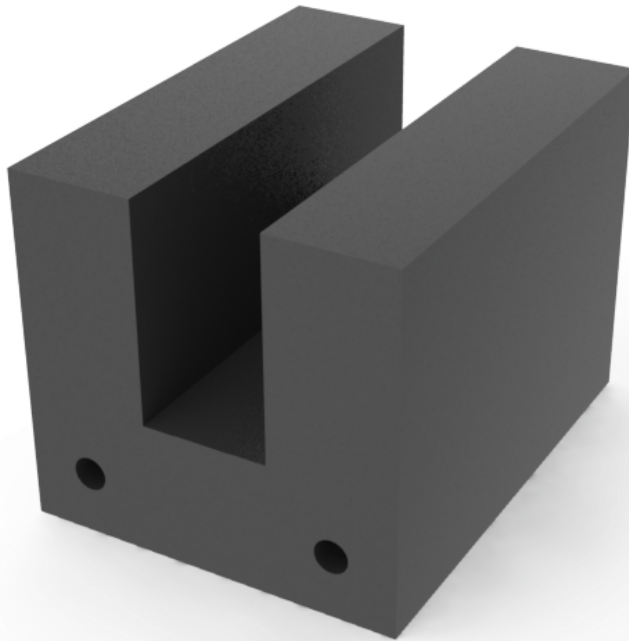
6.4. Σχεδιασμός ηλεκτρομαγνήτη

Ο σχεδιασμός του ηλεκτρομαγνήτη εξαρτάται από την εφαρμογή στην οποία θα χρησιμοποιηθεί. Στην περίπτωση μας το ζητούμενο είναι ο ηλεκτρομαγνήτης να μπορεί να καλύψει όλη την 96άρα πλάκα, ώστε το μαγνητικό πεδίο να περικλείει όλα τα πηγάδια, στα οποία βρίσκονται τα μαγνητικά σφαιρίδια. Κατά προτίμηση, το μαγνητικό πεδίο που θα δημιουργηθεί θέλουμε να είναι πλάγιο και όχι κάθετο ως προς την πλάκα. Αυτό γιατί αν είναι κάθετο, τα σφαιρίδια θα συγκεντρωθούν στον πάτο κάθε πηγαδιού και όταν εισέλθει η πιπέτα, που θα απομακρύνει το υγρό, θα αναρροφήσει και τα σφαιρίδια μαζί. Αν από την άλλη τα σφαιρίδια έχουν συγκεντρωθεί στα πλάγια των πηγαδιών, τότε η πιπέτα θα απομακρύνει το υγρό αφήνοντάς τα ακόμα μέσα σε αυτά.

Με την παραπάνω λογική ο ηλεκτρομαγνήτης μπορεί να είναι μόνο σχήματος πετάλου, ώστε τα δύο πηνία που θα δημιουργηθούν να σχηματίζουν οριζόντια τις μαγνητικές γραμμές τους. Για την κατασκευή του ηλεκτρομαγνήτη χρησιμοποιήθηκαν φύλλα σιδήρου (μαγνητική διαπερατότητα $\mu=3000$) σχήματος **Π** πάχους 0,5 mm, τα οποία ενώθηκαν για να σχηματίσουν έναν πυρήνα. Όπως έχουμε αναφέρεινωρίτερα, τα ελάσματα έχουν το πλεονέκτημα ότι περιορίζουν τα δινορρεύματα. Έτσι δεν θα έχουμε κάποια ανεπιθύμητη αύξηση της θερμοκρασίας του πυρήνα. Στη συνέχεια τα ελάσματα τυλιχθήκαν με σύρμα διατομής $0,35\text{mm}^2$ ώστε να σχηματιστούν 2 πυρήνες. Το σύρμα έχει δυνατότητα να δεχθεί μέχρι 1,5ampere και τάση 24-48V.



*Εικόνα 6.7 [έλασμα]



*Εικόνα 6.8 [Στο σχήμα φαίνονται τοποθετημένα τα 230 ελάσματα που σχηματίζουν τον πυρήνα μήκους 115mm. (solidworks)]

Από τις σχέσεις που έχουν αναφερθεί προηγουμένως, μπορούμε να υπολογίσουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου και τα άλλα αναγκαία στοιχεία που χαρακτηρίζουν τον ηλεκτρομαγνήτη.

Η αρχική τάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 24V και κάθε ένα από τα δύο πηνία ,που έχουν σχηματιστεί, που έχει 1060 περίπου τυλίγματα έκαστο.

Από τα στοιχεία που δόθηκαν από τον κατασκευαστή, το μήκος σύρματος είναι περίπου 700 m.

Για **24V** μετρήθηκε πως έχουμε ρεύμα **$I=0,67$ ampere** και επομένως αντίσταση ίση με **$R=34$ ohm**.

Άρα από τους τύπους 5,10,11 στα προηγούμενα κεφάλαια υπολογίζουμε ότι:

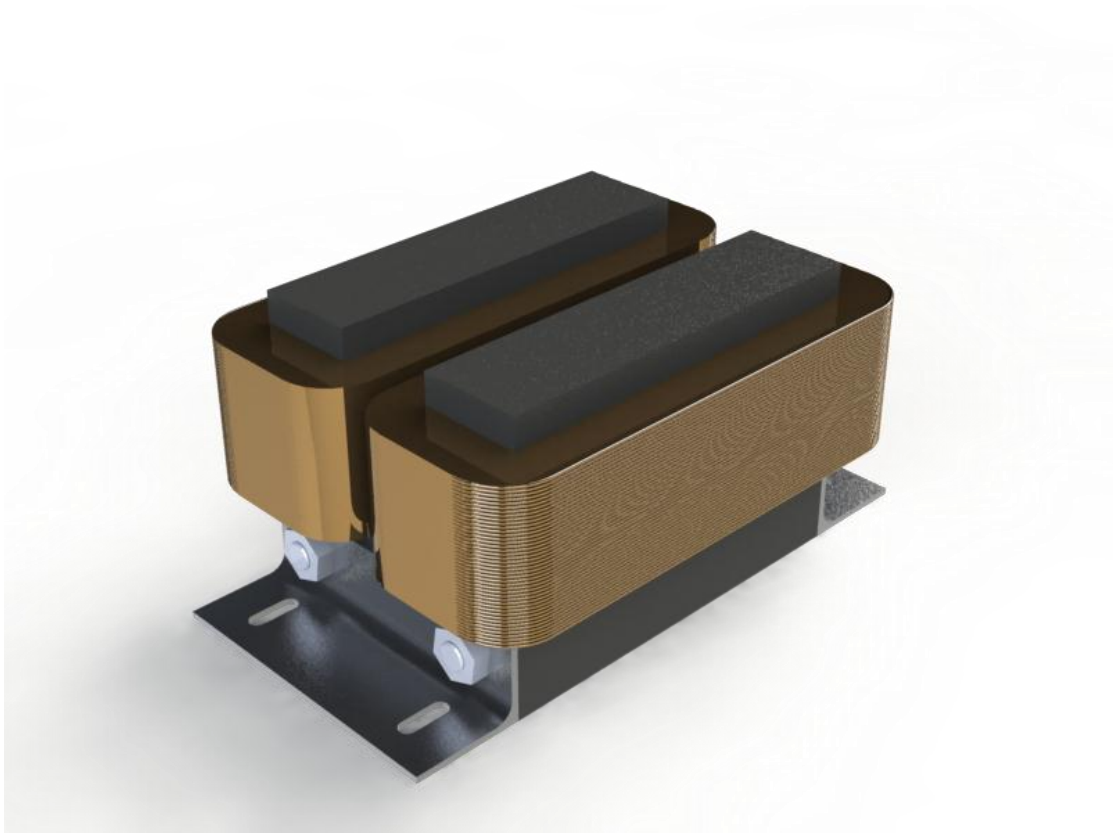
- $M=893$ amp
- $H=27$ amp/cm

- **B=1.017 Gauss**, μαγνητική επαγωγή στο εσωτερικό του πυρήνα.

Για **48V** έχουμε ρεύμα **I=1,45 ampere**.

Άρα υπολογίζουμε με τους ίδιους τύπους:

- **M=1.932 amp**
- **H=58,5 amp/cm**
- **B=2.204 Gauss**, μαγνητική επαγωγή στο εσωτερικό του πυρήνα.



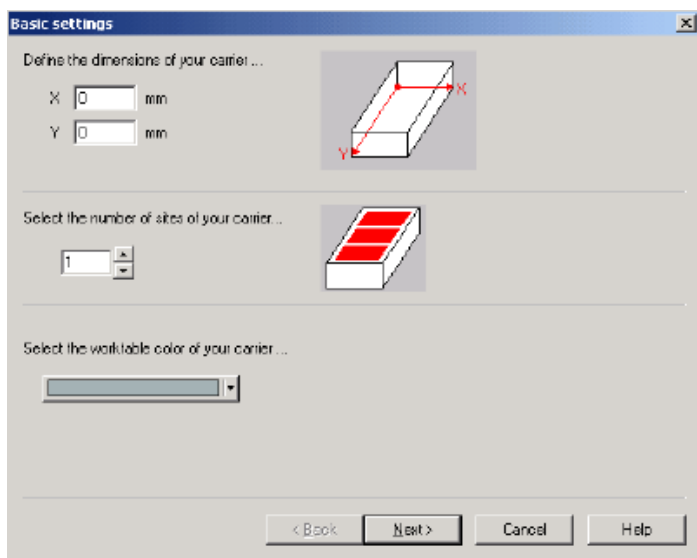
*Εικόνα 6.9 [ηλεκτρομαγνήτης (πυρήνας-πηνίο-βάση στήριξης) σχεδιασμένος στο solidworks]

6.5. Εγκατάσταση ηλεκτρομαγνήτη

Για την εγκατάσταση του ηλεκτρομαγνήτη στο ρομπότ, απαιτείται να ακολουθηθεί συγκεκριμένη διαδικασία. Αυτό γίνεται, ώστε να μπορεί να αναγνωρίσει την ύπαρξη εξωτερικού αντικειμένου στην επιφάνεια εργασίας, καθώς οι διαστάσεις του ηλεκτρομαγνήτη δεν είναι παρασμένες στη μνήμη του. Έτσι θα μπορέσουν να συνεργαστούν ομαλά, χωρίς να έχουμε ανεπιθύμητες συγκρούσεις μεταξύ των εξαρτημάτων.

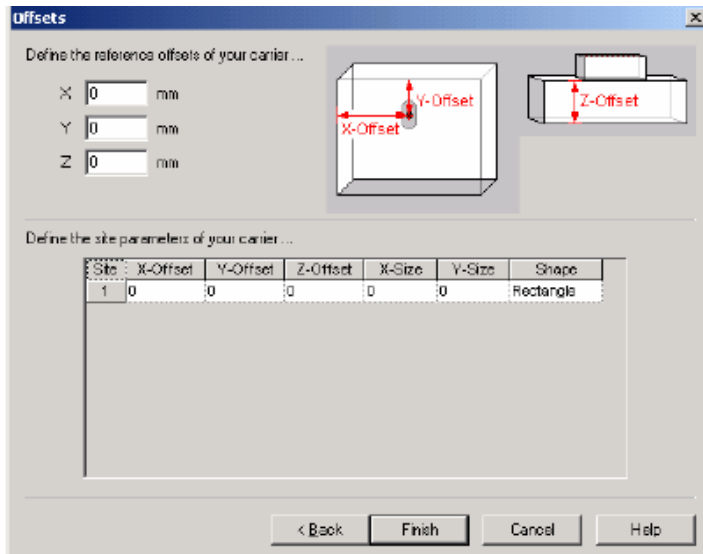
Η διαδικασία ενσωμάτωσης αντικειμένου περιγράφεται λεπτομερώς στο software manual του ρομπότ. Μέσα από κάποιες επιλογές ορίζουμε τις ακριβείς διαστάσεις στη μνήμη του. Έτσι, από τη στιγμή που έχουμε ορίσει και ονομάσει τον ηλεκτρομαγνήτη, μπορούμε να τον χρησιμοποιήσουμε σαν οποιοδήποτε εξάρτημα του ρομπότ.

Μέσα από το software επιλέγουμε **configuring carrier**(ρύθμιση φορέα) για να ορίσουμε το αντικείμενό μας. Πρέπει να καταχωρίσουμε εκτός από τις ακριβείς διαστάσεις του μαγνήτη (x,y,z) και την απόσταση από ένα προεπιλεγμένο σημείο (offset)κατά xyz και τέλος να ορίσουμε τη θέση της πλάκας πάνω στο μαγνήτη.



Διαστάσεις μαγνήτη.

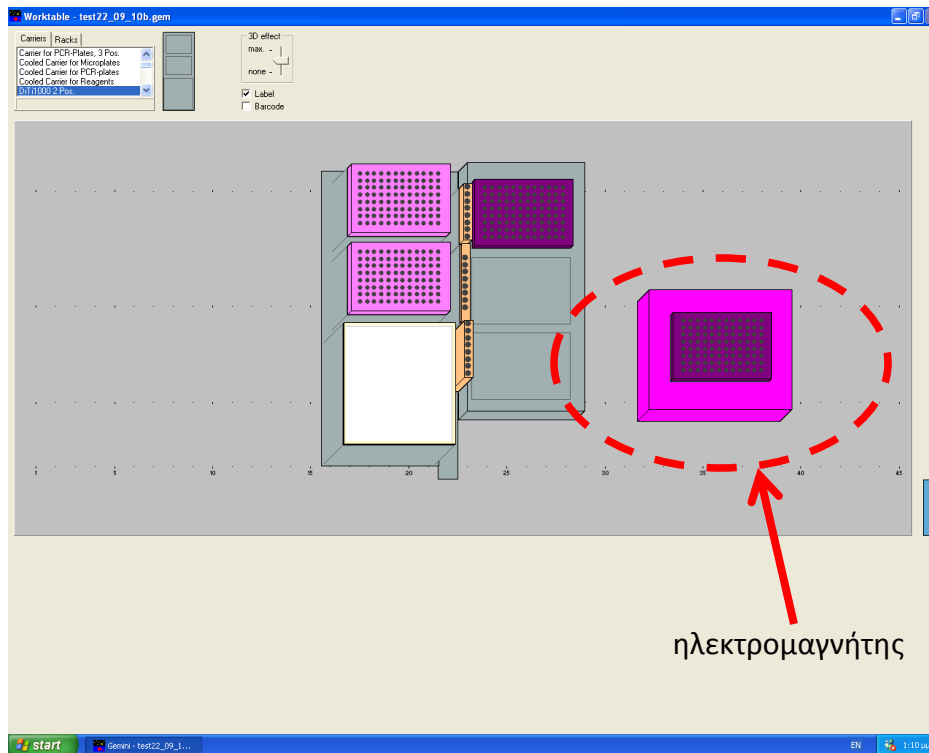
*Εικόνα 6.10 [εγκατάσταση αντικειμένου μέσω του λογισμικού Gemini]



Απόσταση από προεπιλεγμένο σημείο

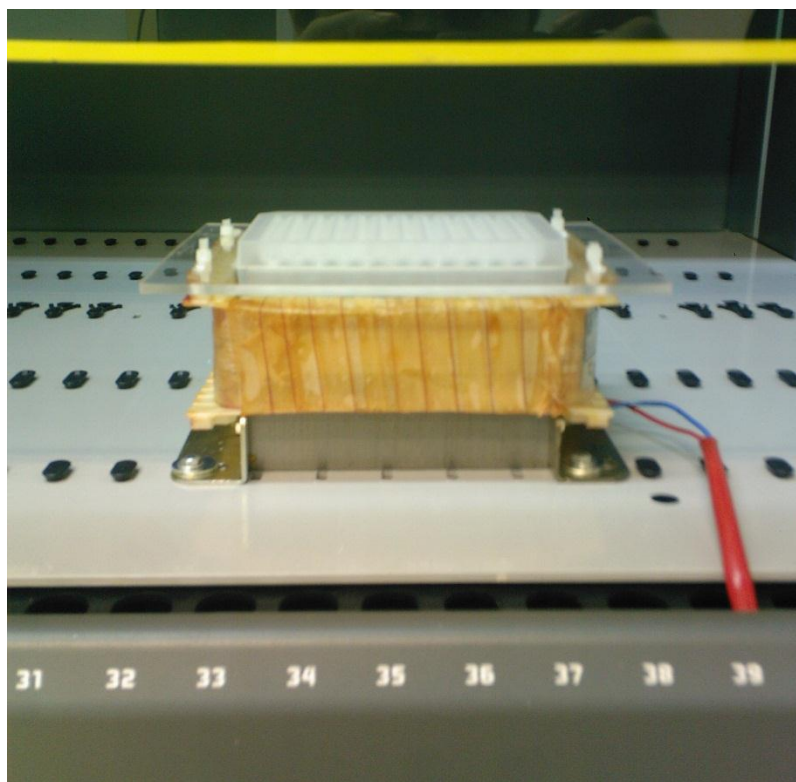
*Εικόνα 6.11

Αφού ολοκληρωθεί η προαναφερθείσα διαδικασία το αντικείμενό μας εμφανίζεται πλέον στη βάση δεδομένων του λογισμικού. Έτσι μπορούμε να επιλέξουμε όλα εκείνα τα αντικείμενα που θέλουμε στην επιφάνεια εργασίας.

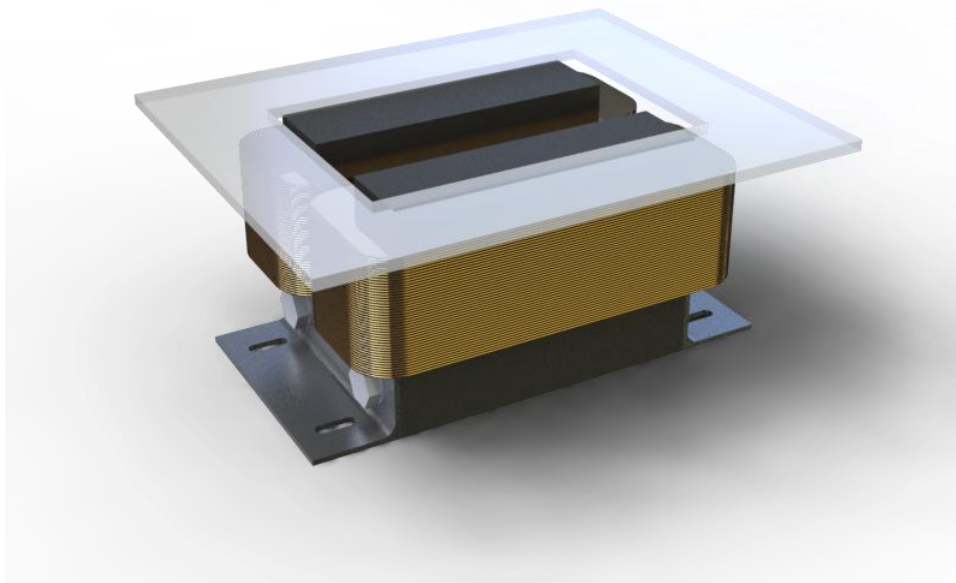


ηλεκτρομαγνήτης

*Εικόνα6.12 [Στιγμιότυπο από την επιφάνεια εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα]



*Εικόνα 6.13 [φωτογραφία ηλεκτρομαγνήτη εγκατεστημένου στην επιφάνεια εργασίας]



*Εικόνα 6.14 [ηλεκτρομαγνήτης και βάση πλακών σχεδιασμένα στο solidworks]

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όπως αυτά έχουν εξέλθει ακριβώς από το Luminox. Φαίνεται σε αυτά ξεκάθαρα το πλήθος των σφαιριδίων που έχει αναγνωριστεί στις δύο πλάκες, ανακτημένα-retrieved και χαμένα-lost σε κάθε πηγάδι ξεχωριστά. Στα τρία πρώτα πειράματα δεν έχει χρησιμοποιηθεί το ρομπότ, καθώς αρχικά έπρεπε να πιστοποιηθεί η απόδοση του μαγνήτη. Χρησιμοποιείται και στις τρεις περιπτώσεις το ίδιο υδατικό διάλυμμα, γι' αυτό το λόγο τα σφαιρίδια μειώνονται σε κάθε μέτρηση, καθώς υπάρχουν πολλά σημεία στην διαδικασία όπου αυτά χάνονται.

Τέτοια σημεία είναι:

- a) κατά την αρχική μεταφορά στα πηγάδια με την πιπέτα, επικάλυψη στα tips τα οποία είναι μιας χρήσης, όπως ακριβώς και η πλάκα
- b) στο Luminox κατά την ανάγνωση
- c) κατά την συλλογή όλου του διαλύματος σε ένα φυαλλίδιο για την αποθήκευσή του και επαναχρησιμοποίησή του.

Επιπλέον κατά τη διάρκεια της ανάγνωσης από το Luminox, τα σφαιρίδια συσσωρεύονται στον πάτο των πηγαδιών, όπου το tip δεν φτάνει, με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να μειώνεται όσο περνάει η ώρα, αφού για την ανάγνωση των 48 πηγαδιών σε μία πλάκα απαιτείται τουλάχιστον μία ώρα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της μάζας των σφαιριδίων. Μπορούμε όμως κατά περίπτωση να αγνοήσουμε το φαινόμενο, καθώς συμβαίνει και στις δύο πλάκες, άρα τα αποτελέσματα που θα λάβουμε, θα είναι σχετικά και ποσοστιαία και θα αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα.

7.1. Πείραμα 1 (Ηλεκτρομαγνήτης 24 V)

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε τον ηλεκτρομαγνήτη με μετασχηματιστή για τάση **24V**. Η πλάκα έμεινε στο μαγνήτη για περίπου 3-5 λεπτά προτού γίνει η μεταφορά του διαλύματος στην άλλη πλάκα. Έπειτα οι δύο πλάκες εισήλθαν στο Luminex και παρήχθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

retrieved beads

lost beads

DataType:,"Result"	DataType:,"Count"
Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"	Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"
1(1,A1)"591"	1(1,A1)"232"
2(1,B1)"596"	2(1,B1)"246"
3(1,C1)"427"	3(1,C1)"260"
4(1,D1)"484"	4(1,D1)"256"
5(1,E1)"486"	5(1,E1)"258"
6(1,F1)"359"	6(1,F1)"350"
7(1,G1)"452"	7(1,G1)"256"
8(1,H1)"505"	8(1,H1)"246"
17(1,A3)"532"	17(1,A3)"192"
18(1,B3)"550"	18(1,B3)"167"
19(1,C3)"510"	19(1,C3)"146"
20(1,D3)"415"	20(1,D3)"234"
21(1,E3)"336"	21(1,E3)"259"
22(1,F3)"433"	22(1,F3)"177"
23(1,G3)"446"	23(1,G3)"191"
24(1,H3)"442"	24(1,H3)"254"
33(1,A5)"484"	33(1,A5)"109"
34(1,B5)"468"	34(1,B5)"94"

35(1,C5)"404"	35(1,C5)"136"
36(1,D5)"303"	36(1,D5)"231"
37(1,E5)"357"	37(1,E5)"271"
38(1,F5)"281"	38(1,F5)"304"
39(1,G5)"302"	39(1,G5)"223"
40(1,H5)"284"	40(1,H5)"318"
57(1,A8)"548"	57(1,A8)"119"
58(1,B8)"364"	58(1,B8)"347"
59(1,C8)"504"	59(1,C8)"118"
60(1,D8)"347"	60(1,D8)"314"
61(1,E8)"399"	61(1,E8)"170"
62(1,F8)"237"	62(1,F8)"411"
63(1,G8)"292"	63(1,G8)"322"
64(1,H8)"258"	64(1,H8)"229"
73(1,A10)"383"	73(1,A10)"187"
74(1,B10)"284"	74(1,B10)"334"
75(1,C10)"276"	75(1,C10)"438"
76(1,D10)"304"	76(1,D10)"409"
77(1,E10)"243"	77(1,E10)"361"
78(1,F10)"214"	78(1,F10)"473"
79(1,G10)"275"	79(1,G10)"394"
80(1,H10)"318"	80(1,H10)"325"
89(1,A12)"263"	89(1,A12)"280"
90(1,B12)"236"	90(1,B12)"255"
91(1,C12)"208"	91(1,C12)"364"
92(1,D12)"201"	92(1,D12)"340"
93(1,E12)"231"	93(1,E12)"448"
94(1,F12)"168"	94(1,F12)"339"
95(1,G12)"217"	95(1,G12)"265"
96(1,H12)"207"	96(1,H12)"299"

Οι στήλες δείχνουν πόσα σφαιρίδια ανακτήθηκαν και πόσα χάθηκαν αντίστοιχα.
 Παρακάτω παρουσιάζεται η μικρογραφία μιας πλάκας, όπου κάθε κελί δείχνει κατ' αντίστοιχία το ποσοστό % ανάκτησης σφαιριδίων ανά πηγάδι, συγκρίνοντας τις δύο στήλες.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	28		27		18			17		33		52
B	29		23		17			49		54		52
C	38		22		25			19		61		64
D	35		36		43			48		57		63
E	35		44		43			30		60		66
F	49		29		52			63		69		67
G	36		30		42			52		59		55
H	33		36		53			47		51		59

Στην περίπτωση αυτή το συνολικό ποσοστό ανάκτησης ανέρχεται στο 43%.

7.2. Πείραμα 2 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V)

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε τον ηλεκτρομαγνήτη με μετασχηματιστή για τάση **48V**. Αυτό αποφασίστηκε καθώς το ποσοστό ανάκτησης ήταν πολύ χαμηλό και όχι αποδεκτό. Άρα αυξάνοντας την τάση αυξάνει και η ένταση του μαγνητικού πεδίου και επομένως αναμένεται να βελτιωθεί το ποσοστό ανάκτησης των σφαιριδίων. Η πλάκα έμεινε στο μαγνήτη για περίπου 3-5 λεπτά προτού γίνει η μεταφορά του διαλύματος στην άλλη πλάκα. Έπειτα οι δύο πλάκες εισήλθαν στο Lumipex και παρήχθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

retrieved beads

lost beads

DataType:,"Result"	DataType:,"Count"
Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"	Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"
1(1,A1)"189"	1(1,A1)"182"
2(1,B1)"229"	2(1,B1)"71"
3(1,C1)"207"	3(1,C1)"32"
4(1,D1)"211"	4(1,D1)"55"
5(1,E1)"206"	5(1,E1)"60"
6(1,F1)"217"	6(1,F1)"28"
7(1,G1)"167"	7(1,G1)"62"
8(1,H1)"165"	8(1,H1)"128"
17(1,A3)"82"	17(1,A3)"112"
18(1,B3)"190"	18(1,B3)"78"
19(1,C3)"218"	19(1,C3)"24"
20(1,D3)"187"	20(1,D3)"39"
21(1,E3)"213"	21(1,E3)"34"
22(1,F3)"194"	22(1,F3)"36"
23(1,G3)"146"	23(1,G3)"78"
24(1,H3)"125"	24(1,H3)"124"

33(1,A5)"62"	33(1,A5)"161"
34(1,B5)"79"	34(1,B5)"121"
35(1,C5)237"	35(1,C5)"36"
36(1,D5)"176"	36(1,D5)"81"
37(1,E5)"151"	37(1,E5)"79"
38(1,F5)"207"	38(1,F5)"33"
39(1,G5)"126"	39(1,G5)"93"
40(1,H5)"131"	40(1,H5)"123"
57(1,A8)"64"	57(1,A8)"161"
58(1,B8)"170"	58(1,B8)"68"
59(1,C8)"189"	59(1,C8)"55"
60(1,D8)"108"	60(1,D8)"99"
61(1,E8)"151"	61(1,E8)"60"
62(1,F8)"126"	62(1,F8)"51"
63(1,G8)"173"	63(1,G8)"35"
64(1,H8)"147"	64(1,H8)"90"
73(1,A10)"121"	73(1,A10)"81"
74(1,B10)"148"	74(1,B10)"47"
75(1,C10)"191"	75(1,C10)"17"
76(1,D10)"129"	76(1,D10)"61"
77(1,E10)"194"	77(1,E10)"14"
78(1,F10)"151"	78(1,F10)"12"
79(1,G10)"168"	79(1,G10)"4"
80(1,H10)"141"	80(1,H10)"35"
89(1,A12)"80"	89(1,A12)"53"
90(1,B12)"123"	90(1,B12)"53"
91(1,C12)"215"	91(1,C12)"13"
92(1,D12)"121"	92(1,D12)"27"
93(1,E12)"120"	93(1,E12)"9"
94(1,F12)"110"	94(1,F12)"11"
95(1,G12)"111"	95(1,G12)"5"
96(1,H12)"151"	96(1,H12)"27"

Αντίστοιχα παρακάτω παρουσιάζεται μικρογραφία της πλάκας με τα ποσοστά ανάκτησης.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51		42		28			28		60		60
B	76		71		40			71		76		70
C	87		90		87			77		92		94
D	79		83		68			52		68		82
E	77		86		66			72		93		93
F	89		84		86			71		93		91
G	73		65		58			83		98		69
H	56		50		52			62		80		85

Στην περίπτωση αυτή το συνολικό ποσοστό ανάκτησης ανέρχεται στο **72%**.

7.3. Πείραμα 3 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V με λεπτά ελάσματα)

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε τον ηλεκτρομαγνήτη με μετασχηματιστή για τάση 48V. Έχοντας λάβει προηγούμενα αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι μονίμως οι σειρές A, B, ΓκαιΗ έχουν αισθητά χαμηλότερα ποσοστά. Αυτό συμβαίνει επειδή τα πηγάδια των τεσσάρων αυτών σειρών βρίσκονται πάνω ακριβώς από τους δύο πυρήνες του ηλεκτρομαγνήτη. Επειδή λοιπόν σε αυτές τις περιοχές οι μαγνητικές γραμμές είναι κάθετες στην επιφάνεια, έτσι τα σφαιρίδια συσσωρεύονται στον κωνικό πάτο, με αποτέλεσμα όταν εισέρχονται τα tips για να αναρροφήσουν το υγρό να συμπαρασύρουν και αυτά μαζί. Για να λυθεί το πρόβλημα που παρουσιάστηκε τοποθετήθηκε στις τέσσερις σειρές λεπτό έλασμα σιδήρου ανάγλυφα του πάτου της πλάκας, ακολουθώντας την κωνικότητα. Τα δύο ελάσματα πάχους 4mm αναδιπλώθηκαν σε στράντζα και τοποθετήθηκαν το ένα στις σειρές A και B και το άλλο στις Γκαι Η. Με αυτόν τον τρόπο επιχειρήθηκε να εκτραπούν οι μαγνητικές γραμμές πλάγιως ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση των σφαιριδίων στον πάτο.

Η πλάκα έπειτα έμεινε στο μαγνήτη για περίπου 3-5 λεπτά προτού γίνει η μεταφορά του διαλύματος στην άλλη πλάκα. Στη συνέχεια οι δύο πλάκες εισήλθαν στο Luminex και παρήχθησαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

retrieved beads

lost beads

DataType:,"Result"	DataType:,"Count"
Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"	Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"
1(1,A1)"62"	1(1,A1)"22"
2(1,B1)"96"	2(1,B1)"2"
3(1,C1)"47"	3(1,C1)"12"
4(1,D1)"60"	4(1,D1)"5"
5(1,E1)"52"	5(1,E1)"24"
6(1,F1)"34"	6(1,F1)"20"
7(1,G1)"58"	7(1,G1)"6"
8(1,H1)"74"	8(1,H1)"7"

17(1,A3)"23"	17(1,A3)"28"
18(1,B3)"32"	18(1,B3)"13"
19(1,C3)"51"	19(1,C3)"32"
20(1,D3)"49"	20(1,D3)"8"
21(1,E3)"44"	21(1,E3)"8"
22(1,F3)"47"	22(1,F3)"20"
23(1,G3)"41"	23(1,G3)"27"
24(1,H3)"44"	24(1,H3)"10"
33(1,A5)"9"	33(1,A5)"56"
34(1,B5)"50"	34(1,B5)"12"
35(1,C5)"67"	35(1,C5)"0"
36(1,D5)"46"	36(1,D5)"0"
37(1,E5)"55"	37(1,E5)"8"
38(1,F5)"55"	38(1,F5)"6"
39(1,G5)"55"	39(1,G5)"0"
40(1,H5)"46"	40(1,H5)"0"
57(1,A8)"4"	57(1,A8)"47"
58(1,B8)"27"	58(1,B8)"7"
59(1,C8)"27"	59(1,C8)"4"
60(1,D8)"27"	60(1,D8)"8"
61(1,E8)"45"	61(1,E8)"4"
62(1,F8)"53"	62(1,F8)"0"
63(1,G8)"25"	63(1,G8)"12"
64(1,H8)"41"	64(1,H8)"8"
73(1,A10)"2"	73(1,A10)"14"
74(1,B10)"25"	74(1,B10)"7"
75(1,C10)"43"	75(1,C10)"10"
76(1,D10)"43"	76(1,D10)"0"
77(1,E10)"29"	77(1,E10)"0"
78(1,F10)"41"	78(1,F10)"0"
79(1,G10)"27"	79(1,G10)"0"
80(1,H10)"26"	80(1,H10)"6"

89(1,A12)"8"

90(1,B12)"26"

91(1,C12)"40"

92(1,D12)"26"

93(1,E12)"33"

94(1,F12)"26"

95(1,G12)"9"

96(1,H12)"31"

89(1,A12)"22"

90(1,B12)"29"

91(1,C12)"12"

92(1,D12)"0"

93(1,E12)"0"

94(1,F12)"0"

95(1,G12)"5"

96(1,H12)"6"

Και αντίστοιχα τα ποσοστά ανάκτησης ανά πηγάδι είναι τα παρακάτω:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	74		45		14			8		13		27
B	98		71		81			79		78		47
C	80		61		100			87		81		87
D	92		86		100			77		100		100
E	68		85		87			92		100		100
F	63		70		90			100		100		100
G	91		60		100			68		100		64
H	91		81		100			84		81		84

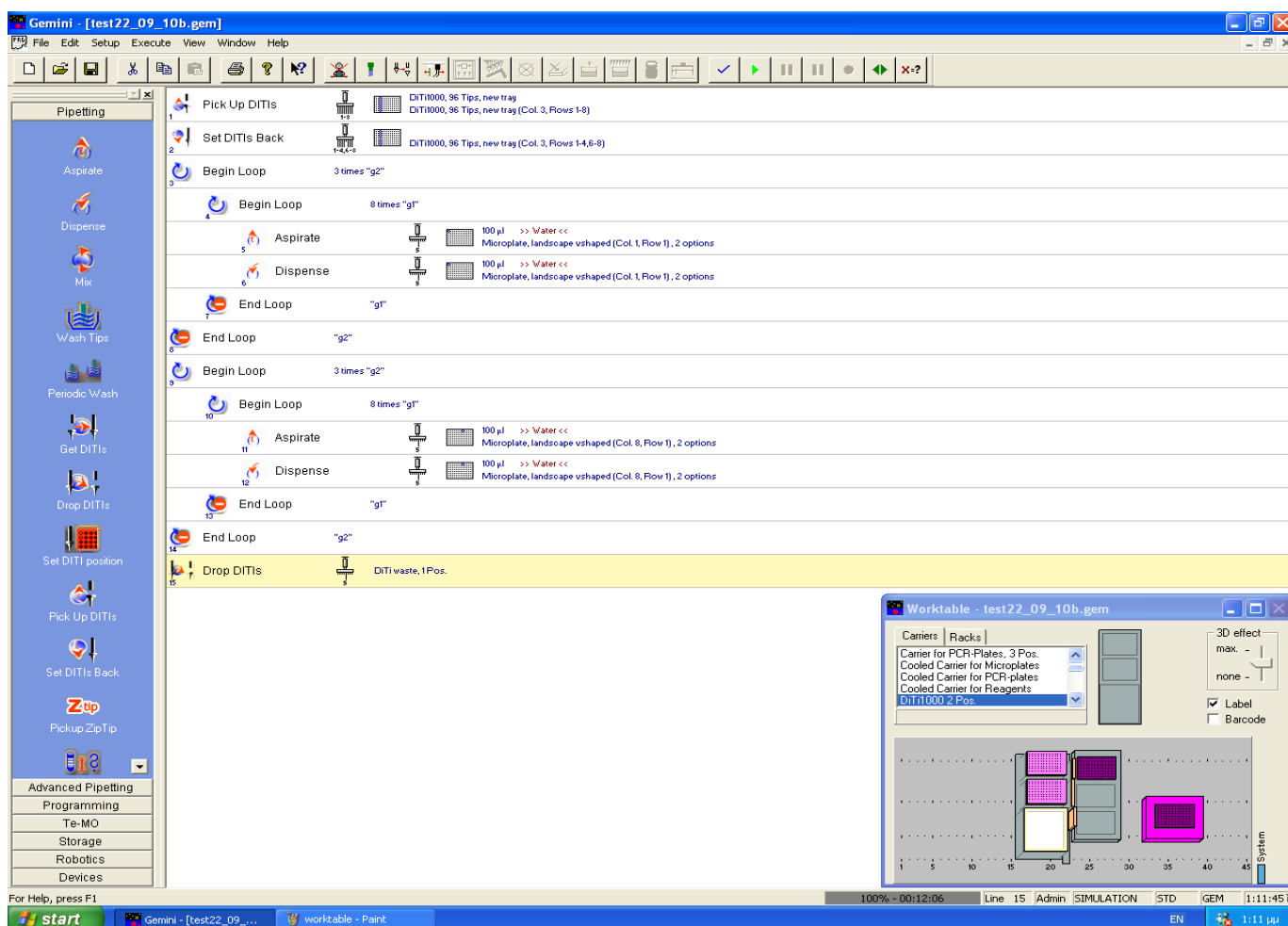
Βλέπουμε από τα αποτελέσματα ότι τα δύο ελάσματα είχαν επίδραση, αλλά όχι σε όλη την πλάκα. Για παράδειγμα η σειρά A δίνει χειρότερα αποτελέσματα, ενώ οι G,H βελτιωμένα.

Στην περίπτωση αυτή το συνολικό ποσοστό ανάκτησης ανέρχεται στο **78%**.

7.4. Πείραμα 4 (Ηλεκτρομαγνήτης 48V σε αυτοματοποιημένη διαδικασία στο ρομπότ)

Το πείραμα αυτό διενεργήθηκε με τον ρομποτικό μηχανισμό Tecan Freedom Evo 150 σε μια προγραμματισμένη αυτόματη διαδικασία. Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως έχει εισαχθεί ο ηλεκτρομαγνήτης στο ρομπότ. Η λογική του πειράματος είναι η ίδια με τα πειράματα που έγιναν με την πιπέτα.

Προγραμματίζουμε το ρομπότ ώστε μετά από κάποιο χρονικό διάστημα που ορίζουμε, στο οποίο ο ηλεκτρομαγνήτης είναι ανοιχτός, να αρχίσει να αντιγράφει την μία πλάκα στην άλλη. Έτσι αφού συμπληρώσουμε και την άδεια πλάκα με υγρό τις τοποθετούμε στο Lumipex για την λήψη των αποτελεσμάτων.



*Εικόνα 7.1 [Στιγμιότυπο από το πρόγραμμα που εκτελεί το ρομπότ.]

Το πρόγραμμα που έχει χρησιμοποιηθεί με τις εντολές και η επεξήγησή του φαίνεται παρακάτω:

Pick Up DITIs (DiTi1000 96 tips, new tray - Col. 3 Row 5), επιλέχθηκε το tip της θέσης 3,5

Begin Loop 3 times g2 , έναρξη loop για τις στήλες 1,3,5

Begin Loop 8 times g1 , έναρξη loop για τις σειρές 1-8

Aspirate (100 μ L, Water - Microplate, landscape v-shaped Col.1,Row1) , εντολή αναρρόφησης από σειρά και στήλη

Dispense (100 μ L, Water - Microplate, landscape v-shaped Col.1,Row1) , εντολή διανομής σε σειρά και στήλη

End Loop g1

End Loop g2

Begin Loop 3 times g2 , έναρξη loop για τις στήλες 8,10,12

Begin Loop 8 times g1 , έναρξη loop για τις σειρές 1-8

Aspirate (100 μ L, Water - Microplate, landscape v-shaped Col.8,Row1) , εντολή αναρρόφησης από σειρά και στήλη

Dispense (100 μ L, Water - Microplate, landscape v-shaped Col.1,Row1) , εντολή διανομής σε σειρά και στήλη

End Loop g1

End Loop g2

Drop DITIs (DiTiWaste, 1Pos.) , πετιέται το tip που είχε επιλεγεί

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία αναμένουμε πιο ορθά αποτελέσματα, καθώς πλέον εξαλείφεται ο παράγοντας του ανθρώπινου σφάλματος κατά την αντιγραφή της πλάκας.

Για να έχουμε όσο το δυνατό πιο ομοιόμορφες συνθήκες επιλέξαμε να κάνουμε την αντιγραφή χρησιμοποιώντας ένα μόνο tip, εξαιτίας μιας μικρής απόκλισης που παρατηρήθηκε στην ευθυγράμμιση των tips. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούσα και τα οκτώ κάθε φορά, υπήρχε περίπτωση ανομοιόμορφης αναρρόφησης και επομένως ανακριβή αποτελέσματα.

Έχοντας εξαλείψει και αυτόν τον παράγοντα το Luminex παρήγαγε τα ακόλουθα αποτελέσματα.

retrieved beads

lost beads

DataType:,"Result"	DataType:,"Count"
Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"	Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"
1(1,A1)"3644"	1(1,A1)"442"
2(1,B1)"3220"	2(1,B1)"229"
3(1,C1)"3790"	3(1,C1)"170"
4(1,D1)"3294"	4(1,D1)"284"
5(1,E1)"3105"	5(1,E1)"434"
6(1,F1)"3142"	6(1,F1)"275"
7(1,G1)"2813"	7(1,G1)"111"
8(1,H1)"2422"	8(1,H1)"365"
17(1,A3)"2026"	17(1,A3)"317"
18(1,B3)"2148"	18(1,B3)"261"
19(1,C3)"2415"	19(1,C3)"92"
20(1,D3)"1952"	20(1,D3)"105"
21(1,E3)"1757"	21(1,E3)"122"
22(1,F3)"2010"	22(1,F3)"108"
23(1,G3)"1554"	23(1,G3)"165"
24(1,H3)"1041"	24(1,H3)"318"
33(1,A5)"1042"	33(1,A5)"620"
34(1,B5)"999"	34(1,B5)"177"
35(1,C5)"1470"	35(1,C5)"61"
36(1,D5)"971"	36(1,D5)"106"
37(1,E5)"772"	37(1,E5)"59"
38(1,F5)"774"	38(1,F5)"77"

39(1,G5)"634"	39(1,G5)"150"
40(1,H5)"559"	40(1,H5)"313"
57(1,A8)"328"	57(1,A8)"424"
58(1,B8)"392"	58(1,B8)"169"
59(1,C8)"497"	59(1,C8)"100"
60(1,D8)"429"	60(1,D8)"104"
61(1,E8)"468"	61(1,E8)"138"
62(1,F8)"681"	62(1,F8)"123"
63(1,G8)"590"	63(1,G8)"210"
64(1,H8)"351"	64(1,H8)"215"
73(1,A10)"413"	73(1,A10)"191"
74(1,B10)"575"	74(1,B10)"47"
75(1,C10)"999"	75(1,C10)"59"
76(1,D10)"815"	76(1,D10)"31"
77(1,E10)"1053"	77(1,E10)"64"
78(1,F10)"984"	78(1,F10)"53"
79(1,G10)"715"	79(1,G10)"269"
80(1,H10)"752"	80(1,H10)"192"
89(1,A12)"716"	89(1,A12)"182"
90(1,B12)"866"	90(1,B12)"23"
91(1,C12)"781"	91(1,C12)"39"
92(1,D12)"671"	92(1,D12)"70"
93(1,E12)"796"	93(1,E12)"40"
94(1,F12)"1154"	94(1,F12)"26"
95(1,G12)"603"	95(1,G12)"76"
96(1,H12)"612"	96(1,H12)"193"

Και αντίστοιχα τα ποσοστά ανάκτησης ανά πηγάδι είναι τα παρακάτω:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	89		86		63			44		68		80
B	93		89		85			70		92		97
C	96		96		96			83		94		95
D	92		95		90			80		96		91
E	88		94		93			77		94		95
F	92		95		91			85		95		98
G	96		90		81			74		73		89
H	87		77		64			62		80		76

Το αντίστοιχο ποσοστό ανάκτησης όλης της πλάκας ανέρχεται στο 86%.

Βλέπουμε δηλαδή πως έχουμε σαφή βελτίωση, που μπορεί να αποδοθεί στην ακρίβεια του ρομποτικού μηχανισμού.

7.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα παραπάνω αποτελέσματα ανάκτησης με χρωματική κλίμακα. Με κόκκινο αποτυπώνεται η κακή απόδοση, ενώ με πράσινο η βέλτιστη. Είναι εμφανής η πρόοδος που επιτυγχάνεται, αλλά το ποσοστό δεν είναι ικανοποιητικό.

πείραμα 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	28		27		18			17		33		52
B	29		23		17			49		54		52
C	38		22		25			19		61		64
D	35		36		43			48		57		63
E	35		44		43			30		60		66
F	49		29		52			63		69		67
G	36		30		42			52		59		55
H	33		36		53			47		51		59

πείραμα 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51		42		28			28		60		60
B	76		71		40			71		76		70
C	87		90		87			77		92		94
D	79		83		68			52		68		82
E	77		86		66			72		93		93
F	89		84		86			71		93		91
G	73		65		58			83		98		69
H	56		50		52			62		80		85

πείραμα 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	74		45		14			8		15		27
B	98		71		81			79		78		47
C	80		61		100			87		81		87
D	92		86		100			77		100		100
E	68		85		87			92		100		100
F	63		70		90			100		100		100
G	91		60		100			68		100		64
H	91		81		100			84		81		84

πείραμα 4

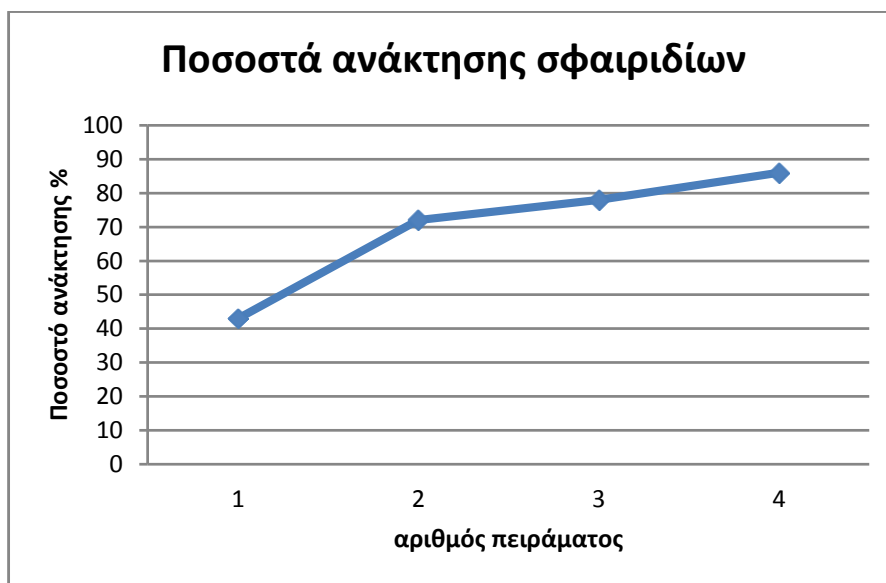
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	89		86		63			44		68		80
B	93		89		85			70		92		97
C	96		96		96			83		94		95
D	92		95		90			80		96		91
E	88		94		93			77		94		95
F	92		95		91			85		95		98
G	96		90		81			74		73		89
H	87		77		64			62		80		76

Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα

Τα πειράματα που διενεργήθηκαν απέδειξαν τη δυσκολία ανάκτησης των σφαιριδίων. Έγιναν τέσσερα πειράματα σε διαφορετικές συνθήκες και με διαφορετικούς παράγοντες.

Συγκεντρωτικά έχουμε:

1. Ηλεκτρομαγνήτης 24V και ποσοστό ανάκτησης **43%**.
2. Ηλεκτρομαγνήτης 48V και ποσοστό ανάκτησης **72%**.
3. Ηλεκτρομαγνήτης 48V με ελάσματα για εκτροπή μαγνητικού πεδίου και ποσοστό ανάκτησης **78%**.
4. Ηλεκτρομαγνήτης 48V ενσωματωμένος στο robot με αυτοματοποίηση της διαδικασίας και ποσοστό ανάκτησης **86%**.



*Εικόνα 8.1

Από τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα για τους λόγους για τους οποίους δεν επιτεύχθηκε το 98%, αν και προχωρήσαμε σε συνεχείς βελτιώσεις. Βλέπουμε ότι η καμπύλη έχει παραβολική αύξηση, δηλαδή τείνει προς το 100. Αυτό και μόνο μας κάνει να αναλογιζόμαστε, ότι οποιαδήποτε περαιτέρω βελτίωση δεν θα φέρει το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα, καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις πρέπει να συμπεριλαμβάνεται το κόστος ως προς την αξία του αποτελέσματος.

Τα αίτια των χαμηλών ποσοστών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν:

- a. Η ένταση του ηλεκτρομαγνήτη δεν είναι τόσο δυνατή, ώστε να εμποδίσει τα σφαιρίδια να αναρροφηθούν με το υπόλοιπο υγρό.
- b. Σε συνδυασμό με το προηγούμενο, τα σφαιρίδια που εναποτίθενται στις κωνικές και κάθετες πλευρές συμπαρασύρονται τη στιγμή της αναρρόφησης.
- c. Ο σχεδιασμός του ηλεκτρομαγνήτη είναι τέτοιος, ώστε τέσσερις τουλάχιστον σειρές να βρίσκονται πάνω από τους πυρήνες, όπου το μαγνητικό πεδίο είναι κάθετο στην επιφάνειά του, με αποτέλεσμα τα σφαιρίδια να συσσωρεύονται στον πάτο και να αναρροφώνται όταν εισέρχεται η πιπέτα.
- d. Όσο απομακρυνόμαστε σε απόσταση από τον ηλεκτρομαγνήτη, τόσο μειώνεται η έντασή του στο σημείο αυτό. Επομένως οι κεντρικές σειρές βρίσκονται σε τέτοια απόσταση, όπου η δύναμη που ασκείται στα σφαιρίδια είναι εξασθενημένη.

Τα παράπανω αίτια είναι αυτά που αποτρέπουν την επίτευξη υψηλών ποσοστών. Για την αντιμετώπισή τους υπάρχουν σχεδιαστικές λύσεις που αφορούν μόνο τον ηλεκτρομαγνήτη και τον τρόπο κατασκευής του. Άρα ως λύση είναι η **αύξηση της έντασης του μαγνητικού πεδίου**.

Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους:

- a. Αύξηση του ρεύματος που διαρρέει το πηνίο. Στην περίπτωση μας αυτό δεν μπορεί να γίνει, καθώς το σύρμα δεν έχει τη δυνατότητα να δεχθεί περισσότερα από 1,5 ampere, γιατί η περισσευούμενη ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα, που μπορεί να βλάψει το πείραμα χωρίς να έχουμε βέβαια αύξηση του πεδίου.
- b. Χρησιμοποίηση σύρματος μεγαλύτερης διατομής, για αύξηση του ρεύματος. Δεν μπορούμε όμως να αντικαταστήσουμε το σύρμα με κάποιο μεγαλύτερης διατομής, καθώς έτσι θα μειωθούν τα τυλίγματα που είναι υπεύθυνα για την ανάλογη αύξηση του πεδίου. Επίσης, η αύξηση της διατομής του σύρματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ampere και άρα είναι πολύ πιθανό να συμβεί βραχυκύκλωμα, εμποδίζοντας τη λειτουργία του μαγνήτη.
- c. Χρησιμοποίηση μεγαλύτερου σε διαστάσεις πυρήνα, ώστε εκτός από αύξηση της έντασης του πεδίου, η πλάκα να τοποθετηθεί ανάμεσα από τους δύο πυρήνες. Όπως οι προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι και αυτή απορρίπτεται καθώς ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους ισούται με πολλαπλασιασμό του βάρους (για νέο ηλεκτρομαγνήτη υπολογίστηκε από τον κατασκευστή σε >20kg), που μπορεί να βλάψει την ομαλή λειτουργία του robot. Επιπλέον, σε αυτήν την περίπτωση τα πηγάδια της πλάκας που βρίσκονται ενδιάμεσα των πυρήνων, υποβάλλονται σε μαγνητικό πεδίο εξασθενημένο λόγω της απόστασης και έτσι τα ποσοστά ανάκτησης στις περιοχές αυτές θα μειωθούν.

- d. Η προσέγγιση του σημείου κορεσμού του σιδήρου θα μπορούσε να επιτευχθεί αν και ο υπάρχων μαγνήτης είναι πολύ κοντά σε αυτό το σημείο, με αποτέλεσμα να μην είχαμε ανάλογη αύξηση των ποσοστών.

Οι τύποι ηλεκτρομαγνητών που είναι δυνατό να κατασκευαστούν, πολύ δύσκολα θα δώσουν αποτελέσματα κοντά στα επιθυμητά.

Ιδανική, θα ήταν η τοποθέτηση δακτυλίων σιδήρου με τυλίγματα γύρω από τον πάτο κάθε πηγαδιού. Όπως όμως και με τις προηγούμενες προτάσεις και αυτή απορρίπτεται, καθώς ο διαθέσιμος χώρος είναι πολύ μικρός ώστε να αναπτυχθεί η απαραίτητη δύναμη.

Άλλωστε ο ίδιος ο κατασκευαστής ηλεκτρομαγνητών πρότεινε λύσεις οι οποίες είναι ογκώδεις και μη λειτουργικές για αυτήν την περίπτωση, και συμφώνησε ότι η υλοποίηση της ανάκτησης του 98% των σφαιριδίων είναι αδύνατη με χρήση ηλεκτρομαγνητών, αφού η πρόδος και ανάπτυξη αυτών τις, τελευταίες δεκαετίες, είναι ασήμαντη έως μηδαμινή.

Επιπλέον, αν λάβουμε ως δεδομένο ότι κάθε τέτοιος ηλεκτρομαγνήτης είναι χειροποίητος το κόστος κατασκευής του ανεβαίνει πολύ. Σε αυτό, αν συμπεριλάβουμε το κόστος του πηνίου, καταλαβαίνουμε ότι δεν είναι η συμφέρουσα λύση.



*Εικόνα 8.2 [Φωτογραφία του ρομπότ κατά τη διεξαγωγή του πειράματος]

Αν και τα ποσοστά δεν είναι τα επιθυμητά, ο ηλεκτρομαγνήτης έχει προσαρτηθεί στο ρομπότ, με το ποσοστό ανάκτησης 86% να είναι δεδομένα εφικτό.

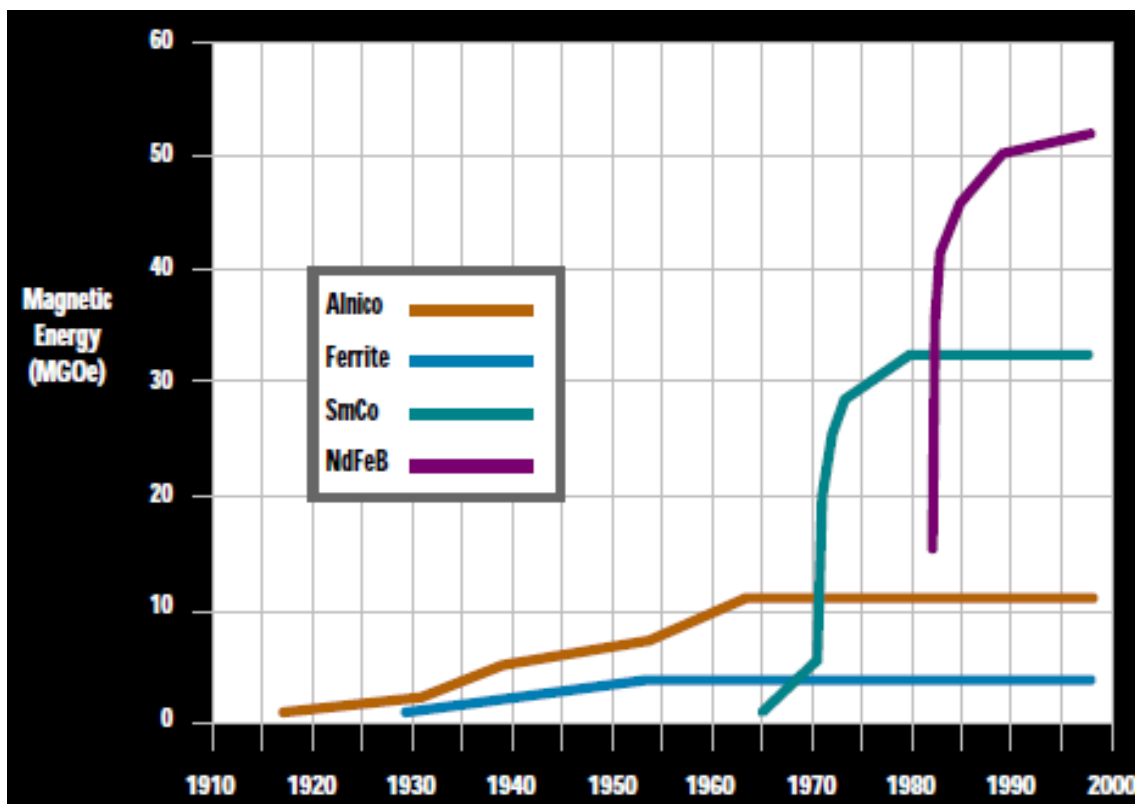
Εξάλλου, όλοι οι κατασκευαστές μαγνητικών διαχωριστών δεν χρησιμοποιούν ηλεκτρομαγνητικές διατάξεις, λόγω των προαναφερθέντων προβλημάτων και χρησιμοποιούν μόνο μόνιμους μαγνήτες. Αντίθετα με τους ηλεκτρομαγνήτες, στους μόνιμους, η τεχνολογία των υλικών έχει δώσει ραγδαία ώθηση, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται όλο ισχυρότεροι μαγνήτες.

Κεφάλαιο 9: Μελλοντική εξέλιξη – Πειράματα

Οι ηλεκτρομαγνήτες δύσκολα θα βοηθήσουν στην επίτευξη ανάκτησης του 98% των σφαιριδίων, καθώς για τις συγκεκριμένες διαστάσεις της πλάκας είναι αδύνατο να προσεγγίσουμε το ποσοστό αυτό. Έτσι προτείνεται πλέον αλλαγή πορείας προς τους μόνιμους μαγνήτες και κατασκευή μηχανικής διάταξης που θα ενσωματωθεί στο ρομπότ και είναι σε θέση να κινείται ως προς την πλάκα ή και αντίστροφα.

Το εύρος των μόνιμων μαγνητών είναι πραγματικά μεγάλο και τα πολλά μεγέθη τους και υλικά καθιστούν εξαιρετικά πιθανή την εύρεση κατάλληλων μαγνητών για κάθε εφαρμογή. Με μια απλή περιήγηση στο internet μπορεί εύκολα να διαπιστώσει κανείς την προσφορά μαγνητών, σε αντίθεση με τους ηλεκτρομαγνήτες, όπου για να βρεθεί ο κατάλληλος για κάποια εφαρμογή θα πρέπει να γίνει ειδική παραγγελία[17].

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται η πρόοδος στην αύξηση της ενέργειας ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα υλικά τα τελευταία χρόνια.



*Εικόνα 9.1

Από το διάγραμμα φαίνεται η χαμηλή ενέργεια του σιδήρου που ανήκει στους φερρίτες, ενώ αντίθετα για τα κράματα NdFeB (νεοδήμιο-σίδηρο-βόριο) η ενέργεια είναι πολλαπλάσια.

Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει διάφορες κατηγορίες του NdFeB και τις ιδιότητές του:

Material	(BH)max (MGOe)	Br (Gauss)	Hc (Oersteds)	Hci (Oersteds)
NdFeB 31/25	31	11200	11000	25000
NdFeB 35/19	35	12300	11900	19000
NdFeB 38/17	38	12500	12100	17000
NdFeB 40/14	40	12600	12300	14000
NdFeB 44/12	44	13500	11000	12000

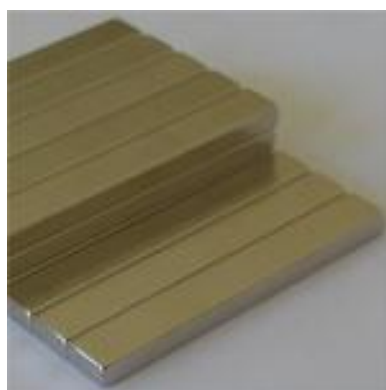
Βλέπουμε πως η δύναμη που μπορεί να παραχθεί από μόνιμους μαγνήτες τέτοιου είδους είναι πολύ μεγάλες. Έτσι αν βρούμε μεγέθη μαγνητών που ταιριάζουν για την εφαρμογή μας, μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

9.1. Διάταξη μόνιμων μαγνητών

Από τον ιστότοπο της εταιρίας HKCM (www.HKCM.de), βρήκαμε μαγνήτες νεοδημίου που εφαρμόζουν στο κωνικό μέρος της πλάκας από την κάτω πλευρά. Συγκεκριμένα είναι ο μαγνήτης **Magnet-Cuboid Q71x05x09.9Ni-28EH**. Οι προδιαγραφές του παρουσιάζονται παρακάτω:

Magnet poles North/South over the height(h)	9.9 mm
Coating	Nickel
Length(a)	71 mm
Width(b)	5 mm
Height(h)	9.9 mm
Material/grade	28EH
max. operation temperature	200 °C
Flux density inside the magnet	1.04 Tesla = 10400 Gauss
Flux density on the surface	3600 Gauss
Dead weight	26.24 g
Holding force on a steel plate	8.23 kg
Weight, which the magnet can lift	80.68 Newton

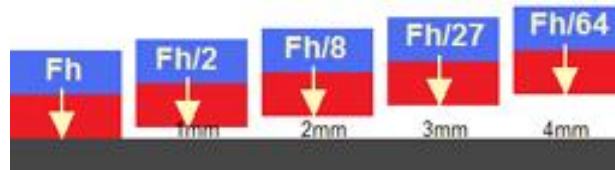
Βλέπουμε από τον πίνακα πως η μαγνητική επαγωγή είναι **10.400 Gauss**, πολλαπλάσια από τα **2200 Gauss** που πετύχαμε με τον ηλεκτρομαγνήτη. Αν αναλογιστούμε το μέγεθος, το βάρος και το κόστος του ηλεκτρομαγνήτη σε σχέση με αυτά του μόνιμου (10€/τεμάχιο), τότε καταλαβαίνουμε ότι οι μόνιμοι μαγνήτες αποτελούν πολύ πιο συμφέρουσα λύση, κάτι που μένει να αποδειχθεί και πειραματικά.



*Εικόνα 9.2 [μόνιμοι μαγνήτες νεοδημίου]

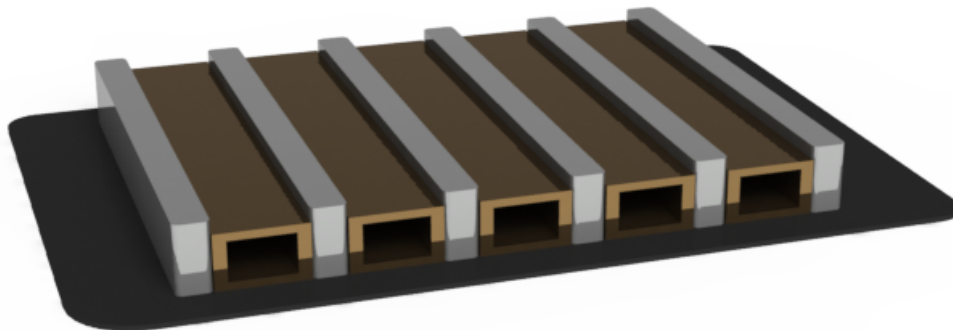
Για την εφαρμογή μας χρησιμοποιήσαμε 6 μαγνήτες, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε φύλλο σιδήρου 0,4mm, τόσο λεπτό ώστε να μην αναγκάζει την πλειοψηφία των μαγνητικών γραμμών να περάσουν μέσα από αυτό.

Επειδή η απόσταση επηρεάζει σημαντικά την απόδοση του μαγνήτη, η πλάκα εφάπτεται με τους μαγνήτες. Στο σχήμα που ακολουθεί βλέπουμε την μεταβολή της δύναμης σε αναλογία με την απόσταση. Καταλαβαίνουμε δηλαδή ότι η μείωση είναι εκθετική.



*Εικόνα 9.3 [μείωση μαγνητικής δύναμης ανάλογα με την απόσταση]

Στο solidworks κατασκευάστηκε μοντέλο της κατασκευής με τους μόνιμους μαγνήτες. Όπως βλέπουμε ανάμεσα από τους μαγνήτες τοποθετήθηκαν ράβδοι χαλκού που δε επηρεάζουν το μαγνητικό πεδίο άρα ούτε έλκονται και ούτε απωθούνται από το μαγνήτη. Βρίσκονται στις θέσεις αυτές ώστε να αποτρέψουν τους μαγνήτες από το να κολλήσουν, κάτω από τις μεγάλες δυνάμεις που ασκούν.



*Εικόνα 9.4 [Διάταξη μόνιμων μαγνητών κατασκευασμένη στο solidworks]

9.2. Πείραμα 5 (Χρήση διάταξης με μόνιμους μαγνήτες)

Έχοντας φτιάξει την κατασκευή αυτή διενεργούμε το ίδιο πείραμα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, χωρίς φυσικά ηλεκτρομαγνήτη αλλά με την κατασκευή των μόνιμων μαγνητών. Τοποθετούμε επομένως την πλάκα με το διάλυμα στην κατασκευή, ώστε κάθε μαγνήτης να βρίσκεται εκατέροθεν από δύο στήλες της πλάκας. Η διαφορά με τα προηγούμενα πειράματα είναι ότι αυτό έχει και την παράμετρο του χρόνου. Δηλαδή η αναρρόφηση και μεταφορά με την πιπέτα έγινε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

- 1) Στήλη 1 σε 10sec.
- 2) Στήλη 3 σε 30sec.
- 3) Στήλη 5 σε 45sec.
- 4) Στήλη 8 σε 60sec.
- 5) Στήλη 10σε 90sec.
- 6) Στήλη 12σε 120sec.

Έπειτα από την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής λάβαμε από το Luminex τα ακόλουθα αποτελέσματα.

retrieved beads

lost beads

DataType:,"Result"	DataType:,"Count"
Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"	Location,"Sample","Analyte 38","Total Events"
1(1,A1)"747"	1(1,A1)"275"
2(1,B1)"932"	2(1,B1)"288"
3(1,C1)"579"	3(1,C1)"918"
4(1,D1)"579"	4(1,D1)"466"
5(1,E1)"770"	5(1,E1)"463"
6(1,F1)"1363"	6(1,F1)"172"
7(1,G1)"1156"	7(1,G1)"60"
8(1,H1)"821"	8(1,H1)"46"
17(1,A3)"1227"	17(1,A3)"167"
18(1,B3)"1080"	18(1,B3)"124"

19(1,C3)"1475"	19(1,C3)"122"
20(1,D3)"1407"	20(1,D3)"104"
21(1,E3)"1626"	21(1,E3)"68"
22(1,F3)"1186"	22(1,F3)"62"
23(1,G3)"1302"	23(1,G3)"89"
24(1,H3)"1261"	24(1,H3)"60"
33(1,A5)"380"	33(1,A5)"124"
34(1,B5)"375"	34(1,B5)"204"
35(1,C5)"304"	35(1,C5)"109"
36(1,D5)"398"	36(1,D5)"111"
37(1,E5)"330"	37(1,E5)"127"
38(1,F5)"468"	38(1,F5)"32"
39(1,G5)"441"	39(1,G5)"38"
40(1,H5)"390"	40(1,H5)"27"
57(1,A8)"479"	57(1,A8)"52"
58(1,B8)"287"	58(1,B8)"28"
59(1,C8)"352"	59(1,C8)"53"
60(1,D8)"455"	60(1,D8)"24"
61(1,E8)"366"	61(1,E8)"44"
62(1,F8)"378"	62(1,F8)"21"
63(1,G8)"311"	63(1,G8)"15"
64(1,H8)"415"	64(1,H8)"10"
73(1,A10)"493"	73(1,A10)"33"
74(1,B10)"367"	74(1,B10)"29"
75(1,C10)"396"	75(1,C10)"73"
76(1,D10)"442"	76(1,D10)"24"
77(1,E10)"491"	77(1,E10)"39"
78(1,F10)"541"	78(1,F10)"26"
79(1,G10)"476"	79(1,G10)"19"
80(1,H10)"461"	80(1,H10)"7"
89(1,A12)"811"	89(1,A12)"10"
90(1,B12)"779"	90(1,B12)"6"

91(1,C12)"750"
92(1,D12)"467"
93(1,E12)"323"
94(1,F12)"478"
95(1,G12)"147"
96(1,H12)"201"

91(1,C12)"36"
92(1,D12)"25"
93(1,E12)"21"
94(1,F12)"8"
95(1,G12)"4"
96(1,H12)"4"

Και αντίστοιχα τα ποσοστά ανάκτησης ανά πηγάδι είναι τα παρακάτω:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	73		88		75			90		94		99
B	76		90		65			91		93		99
C	39		92		74			87		84		95
D	55		93		78			95		95		95
E	62		96		72			89		93		94
F	89		95		94			95		95		98
G	95		94		92			95		96		97
H	95		95		94			98		99		98

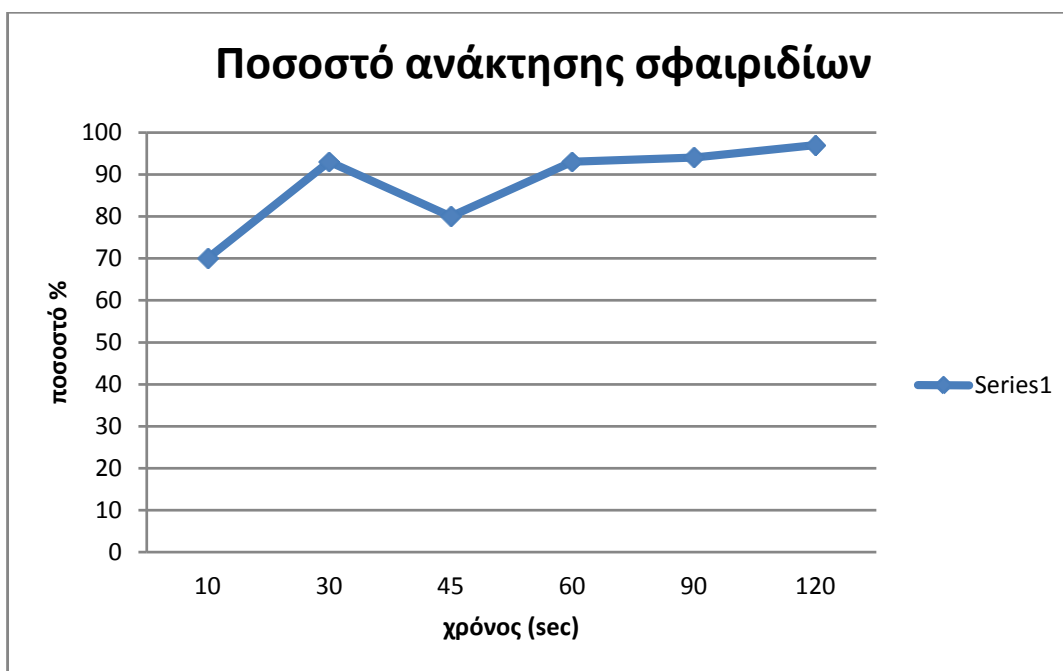
Από τη στιγμή που έχουμε θέσει χρονικό περιορισμό ανά στήλη, δεν θα υπολογίσουμε συνολικό ποσοστό ανάκτησης, αλλά το ποσοστό ανά στήλη.

- 1) Στήλη 1 ποσοστό **73%**.
- 2) Στήλη 3 ποσοστό **93%**.
- 3) Στήλη 5 ποσοστό **80%**.
- 4) Στήλη 8 ποσοστό **93%**.
- 5) Στήλη 10 ποσοστό **94%**.
- 6) Στήλη 12 ποσοστό **97%**.

Εκτός από την στήλη 5 που πιθανότατα έγινε κάποιο σφάλμα, βλέπουμε ότι έχουμε συνεχή αύξηση. Ακολουθεί χρωματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων που μπορεί να συγκριθεί με τα προηγούμενα πειράματα.

πείραμα 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	73		88		75			90		94		99
B	76		90		65			91		93		99
C	39		92		74			87		84		95
D	55		93		78			95		95		95
E	62		96		78			89		93		94
F	89		95		94			95		95		98
G	95		94		92			95		96		97
H	95		95		94			98		99		98



*Εικόνα 9.5

Τα ποσοστά αυτά μας κάνουν αισιόδοξους ότι είναι απόλυτα εφικτό το 98% ανάκτησης σωματιδίων. Αναλογιζόμενοι ότι το πείραμα έγινε με το χέρι, καταλαβαίνουμε ότι η χρήση του ρομπότ θα εξασφαλίσει ακόμα καλύτερα ποσοστά. Αν αντιπαραβάλουμε το παραπάνω διάγραμμα με το διάγραμμα της εικόνας 6.3 των υπάρχουσων κατασκευών με μόνιμους μαγνήτες, βλέπουμε ότι τα ποσοστά είναι παραπλήσια.

Τελικά, η κατασκευή μηχανισμού ανύψωσης, της παραπάνω κατασκευής με τους μαγνήτες ή κάποιας άλλης εφάμιλλης, θα δώσει τη λύση για τον στόχο που θέλουμε να πετύχουμε.

Επίλογος

Έχοντας πλέον ολοκληρώσει όλα τα παραπάνω πειράματα και έχοντας αποκτήσει πολύτιμη γνώση σε θέματα όπως ο ηλεκτρομαγνητισμός και τεχνικές γύρω από cell signaling, καταλαβαίνουμε, πόσο απαιτητική είναι η ανάκτηση των σφαιριδίων, αλλά ταυτόχρονα και πόσο αναγκαία είναι για την αυτοματοποίηση της τεχνολογίας xmap.

Μπορούμε με βεβαιότητα λοιπό να αποκλείσουμε την χρήση ηλεκτρομαγνητών, που αποτελούσαν την πρώτη μας σκέψη, θέλοντας να αυτοματοποιήσουμε την πειραματική διαδικασία. Έτσι, είναι πλέον αναγκαίο να στραφούμε σε άλλες πιο ενδεδειγμένες και πετυχημένες μεθόδους, στην χρήση δηλαδή μόνιμων μαγνητών.

Το τελευταίο πείραμα που διενεργήθηκε απέδειξε την καταλληλότητα των μόνιμων μαγνητών για αυτού του είδους την πειραματική διαδικασία. Ζητούμενο λοιπόν αποτελεί ο σχεδιασμός και η κατασκευή συστήματος, που θα συνεργάζεται με το ρομπότ και θα ελέγχεται από αυτό, με σκοπό όχι μόνο να πετύχει τα επιθυμητά ποσοστά ανάκτησης, αλλά να δοκιμαστεί στην πλήρη, αυτοματοποιημένη πλέον,εργαστηριακή τεχνική xmap.

Εκμεταλλευόμενοι την διάταξη, που φτιάξαμε για το 5^ο πείραμα, μπορούμε να φανταστούμε μια μηχανική συσκευή, η οποία με χρήση μικρού κινητήρα θα ανυψώνει την διάταξη με τους μόνιμους μαγνήτες, ώστε να εφάπτεται με την πλάκα, μέσω εντολής από το ρομπότ, και με αντίστοιχη εντολή θα την απομακρύνει.

Τέλος, μπορούμε να συνειδητοποιήσουμε ότι ο στόχος είναι πολύ κοντά, αν και απαιτείται ακόμα σοβαρή προσπάθεια για να είμαστε βέβαιοι ότι το αποτέλεσμα θα είναι το επιθυμητό.

Παράρτημα εικόνων

- 1.1. Στην εικόνα φαίνεται πλήρως ένα κύτταρο και η δομή του.
- 1.2. Στην εικόνα βλέπουμε ένα κύτταρο με τους υποδοχείς στην κυτταρική του μεμβράνη. (http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6839/fig_tab/411759a0_F1.html)
- 1.3. Στην εικόνα φαίνεται ένα μονοπάτι(pathway) και οι αλληλεπιδράσεις εντός του κυττάρου. (http://www.cellsignal.com/reference/pathway/B_Cell_Antigen.html)
- 2.2. Η εικόνα δείχνει την διαδικασία και το χτίσιμο από κάτω προς τα πάνω (bottom-up). (<http://www.synchronium.net/2009/09/14/drug-testing-all-you-need-to-know/>)
- 2.2. Στην εικόνα βλέπουμε τις δυνατές συνδέσεις στην επιφάνεια των beads. Από lumenix corp.
- 2.3. Φυαλίδια μαγνητικών σφαιριδίων. Από luminex corp.
- 2.4. Μεγέθυνση σφαιριδίου. Από luminex corp.
- 2.5. 96άρα πλάκα με κωνικούς πάτους. (<http://www.usascientific.com/96-well-polypropylene-plate-v-bottom.aspx>)
- 2.6. Ημισφαιρικός πάτος. (http://www.axygen.com/categories/deep-well-plates/core_products/96-well-round-bottom-assay-plate)
- 2.7. Σύγκριση πηγαδιών
- 3.1. Μαγνητικό πεδίο Γης. (http://www.physics.sjsu.edu/becker/physics51/mag_field.htm)
- 3.2. Μαγνήτης (<http://www.beembee.com/2010/10-amazing-facts-about-magnets>)
- 3.3. Μαγνητικές γραμμές (<http://www.tutorvista.com/content/science/science-ii/magnetic-effects-electric-current/mapping-magnetic-lines.php>)
- 3.4. Μαγνητικές γραμμές (<http://www.magnetic-shield.com/fag/interference.html>)
- 3.5. Ρευματοφόρος αγωγός (Hugh D. Young, Πανεπιστημιακή Φυσική, εκδόσεις Παπαζήση)
- 3.6. Τυλίγματα ηλεκτρομαγνήτη (<http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Magnetic+ordering>)
- 3.7. -3.9. Βρόχοι υστέρησης και πεδία κορεσμού (Hugh D. Young, Πανεπιστημιακή Φυσική, εκδόσεις Παπαζήση)
- 3.10. Δινορρεύματα (http://www.tpub.com/content/neets/14177/css/14177_24.htm)
- 5.1. Tecan Freedom Evo 150 (Tecan software manual)

- 5.2. Luminex 100/200 (<http://www.luminexcorp.com>)
- 5.3. Laser scanning (<http://www.luminexcorp.com>)
- 6.1. Διαχωριστής με φίλτρο(<http://www.biotek.com/resources/articles/wash-luminex-xmap-assays.html>)
- 6.2. Μηχανισμοί ανάκτησης με μαγνήτες (Luminex corp.)
- 6.3. Διαγράμματα απόδοσης διαχωριστών (Luminex corp.)
- 6.4. Hydroflex Tecan (Tecan manual)
- 6.5. – 6.6. Πιπέτα και tip (<http://us.mt.com/us/en/home.html>)
- 6.7. Ελάσματα (solidworks)
- 6.8. Πυρήνας (solidworks)
- 6.9. Ηλεκτρομαγνήτης (solidworks)
- 6.10. – 6.11. Εγκατάσταση η/μ (Tecan software manual)
- 6.12. Worktable (pc image capture)
- 6.13. Φωτογραφία του ηλεκτρομαγνήτη ενσωματωμένου στην επιφάνεια εργασίας.
- 6.14. Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτρομαγνήτη ακριβώς όπως έχει ενσωματωθεί στην επιφάνεια εργασίας του ρομπότ. (solidworks)
- 7.1. Στιγμιότυπο από το πρόγραμμα που έχουμε δημιουργήσει για την περίπτωση μας.
- 8.1. Διάγραμμα αποτελεσμάτων για πειράματα 1-4.
- 8.2. Στην φωτογραφία από το εργαστήριο βλέπουμε το ρομπότ σε λειτουργία.
- 9.1. Διάγραμμα προόδου μαγνητικών υλικών.(Dexter Magnetic Technologies, Design manual)
- 9.2. Μόνιμοι μαγνήτες που χρησιμοποιούμε.
([https://www.hkcm.de/advanced_search_result.php?hkcm=engineering&mwst=on&des=off&osCsid=77c531c9ab992b892292b73e6345c4db&dna=3&keywords=Q71x+or+\(Q+and+x71x\)&edi=0&sea=1#OB](https://www.hkcm.de/advanced_search_result.php?hkcm=engineering&mwst=on&des=off&osCsid=77c531c9ab992b892292b73e6345c4db&dna=3&keywords=Q71x+or+(Q+and+x71x)&edi=0&sea=1#OB))
- 9.3. Δύναμη μαγνήτισης ανάλογα με την απόσταση.
(https://www.hkcm.de/product_info.php?hkcm=engineering&products_id=4349&mwst=on&des=off&dna=3&adia0=&idia0=&hig0=&amass=&bmass=&hig1=&arad=&irad=&hig2=&wink=)
- 9.4. Διάταξη μόνιμων μαγνητών. (solidworks)
- 9.5. Ποσοστά ανάκτησης πειράματος 5

Βιβλιογραφία

- [1] http://en.wikipedia.org/wiki/Systems_biology
- [2] Hiroaki Kitano, SYSTEMS BIOLOGY: THE GENOME, LEGOME, AND BEYOND
- [3] [http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_(biology))
- [4] http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_signaling
- [5] http://en.wikipedia.org/wiki/Signal_transduction
- [6] http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA#Sandwich_ELISA
- [7] http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_microarray
- [8] Leonidas G. Alexopoulos, Julio Saez Rodriguez, Christopher W. Espelin, ' High throughput protein-based technologies and computational models for drug development, efficacy and toxicity'
- [9] Luminex Product Information Sheet, MagPlex™ -C Microspheres
- [10] Sherry A. Dunbar, Ph.D., Planet xMAP Europe -2007
- [11] Ε. Παπαδόπουλος. Ηλεκτρομηχανικά Συστήματα Μετατροπής Ενέργειας, Εκδόσεις ΕΜΠ 2001
- [12] Hugh D. Young, Πανεπιστημιακή Φυσική τόμος Β, Εκδόσεις Παπαζήση
- [13] David J. Griffiths, Εισαγωγή στην Ηλεκτροδυναμική, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- [14] Bernard Dennis Cullity, Chad D. Graham, Introduction to magnetic materials, IEEE press
- [15] David Jiles, Introduction to magnetism and magnetic materials, Chapman and Hall 1998
- [16] Arthur N. Mansfield, Electromagnets: Their Design and Construction, D. Van Norstrand 1901
- [17] Reference and Design Manual, Dexter Magnetic Technologies
- [18] www.tecan.com
- [19] www.luminexcorp.com

[20] Wenjing Tao, Doris Yeung, Amrit Dulat, Candice Reyes and Joe Fedynyshyn, Bio-Plex Pro™/Bio-Plex Pro II Wash Stations: Validation for Bead-Based Immunosandwich Suspension Array Assays

[21] Dr. Fang Zhang, Introduction of xMAP technology and BMIA Milliplex, March 2009

[22] Sherry A. Dunbar, Ph.D., MagPlex-C Magnetic Microspheres, Planet xMAP Europe -2007

[23] Tecan Freedom Evo 150 software manual

[24] www.hkcm.de

Πληροφορίες εξωτερικών συνεργατών

Κατασκευαστής ηλεκτρομαγνήτη:

Γεώργιος Αθανασίου, Γ.Ε. Αθανασίου & Υιός Ο.Ε.

Μαραθώνος 13 – 18540

Καμίνια Πειραιάς

Τηλ. 2104122219

Εισαγωγέας Tecan εξαρτημάτων:

Γεώργιος Ι. Χρονόπουλος, Χημικός MSc, INTERLAB, Κωνσταντίνος Οικονόμου

Π. Τσαλδάρη 163-16 Καλλιθέα

Τηλ. 210 9532220

e-mail: gch@interlab.gr