



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών και Αυτομάτου Ελέγχου

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

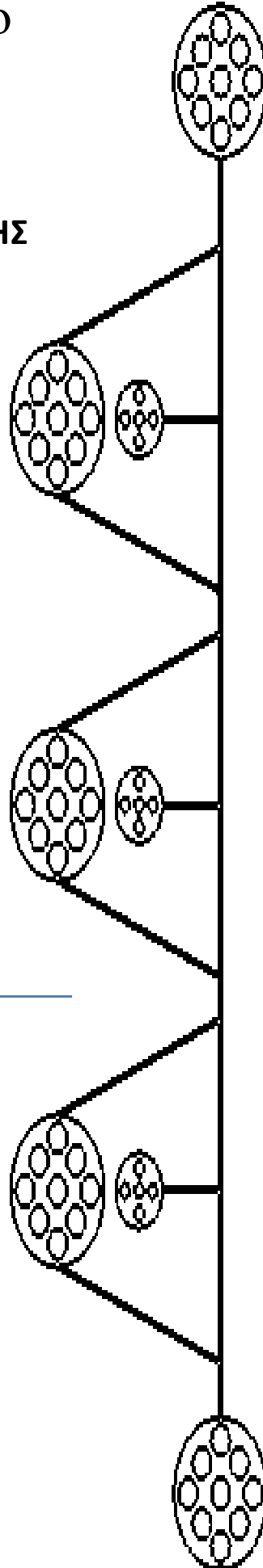
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ
ΜΙΚΡΟΡΟΪΚΗΣ ΠΛΑΚΕΤΑΣ
ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ**

Καβαλόπουλος Νικόλαος

**Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής
Λεωνίδας Αλεξόπουλος**

Αθήνα, Νοέμβριος 2013





Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	6
1. Το πρωτόκολλο ELISA.....	8
a. Η Μέθοδος ELISA.....	8
b. solid phase ELISA.....	12
c. Suspension ELISA.....	13
d. Μέθοδοι suspension ELISA.....	16
e. Μαγνητικά μικροσφαιρίδια και σωματίδια.....	18
2. Bio-MEMS: Βιολογικές μικροηλεκτρομηχανολογικές διατάξεις.....	22
a. Γενική αρχή.....	22
b. η τεχνολογία του LAB-ON-A-CHIP.....	23
3. Διαχείριση ρευστών σε μικροροϊκό περιβάλλον microfluidics.....	26
a. Γενικά.....	26
b. Υδραυλική αντίσταση.....	28
c. Η τεχνολογία υπερυδρόφοβων βαλβίδων.....	29
4. Σχεδιασμός μικροροϊκής πλακέτας εκτέλεσης βιολογικού πρωτοκόλλου ELISA.....	32
a. Υπάρχουσες βιολογικές και βιοχημικές εφαρμογές.....	32
b. προδιαγραφές.....	39
c. Σχεδίαση κύριων στοιχείων μικροροϊκού κυκλώματος.....	40
d. Σχεδίαση στοιχείων ελέγχου μικροροϊκού κυκλώματος.....	48
5. Μέθοδος Κατασκευής.....	60
b. Σφράγιση μικροροϊκού κυκλώματος.....	70
c. δημιουργία υπερυδρόφοβων επιφανειών.....	74
d. Δημιουργία βαλβίδων απομόνωσης.....	76
6. Λειτουργία και αποτελέσματα.....	80
7. Συμπεράσματα.....	86
8. Δυνατότητες περαιτέρω διερεύνησης.....	88
9. Βιβλιογραφία.....	90
Ευχαριστίες.....	92



Περίληψη

Η αυξανόμενη ανάγκη εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων για την ανίχνευση πρωτεϊνών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτοματοποιημένων διατάξεων για την εκτέλεσή τους. Η χρήση μικροδιατάξεων ενδείκνυται για αυτές τις εφαρμογές, γιατί παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και καλύτερα αποτελέσματα. Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκαν τα επικρατέστερα και πιο διαδεδομένα συστήματα εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων όπως και τα υπάρχοντα βιολογικά πρωτόκολλα, για τον προσδιορισμό των καλύτερων χαρακτηριστικών ενός μικροσυστήματος εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων όπως επίσης και το καταλληλότερο πρωτόκολλο εκτέλεσης με στόχο τη βέλτιστη λειτουργία και τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Μελετήθηκε και δημιουργήθηκε μία πλακέτα μικροροϊκής διαχείρισης αντιδρώντων (lab-on-a-chip) για την εκτέλεση βιολογικού πρωτοκόλλου ανίχνευσης πρωτεϊνών. Σχεδιάστηκαν μελετήθηκαν και αναπτύχθηκαν μέθοδοι αποκοπής και κατεύθυνσης της ροής αντιδρώντων στο ροϊκό κύκλωμα χωρίς την χρήση μηχανικών μερών (παθητικά στοιχεία κυκλώματος) ώστε το παρόν microfluidic chip να είναι ικανό να λειτουργήσει σε εφαρμογές εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος (point of care systems). Μελετήθηκαν και εφαρμόστηκαν διάφοροι μέθοδοι αποτύπωσης και σφράγισης του κυκλώματος με στόχο να παραχθεί μια αξιόπιστη και οικονομική λύση που θα μπορεί να αποτελέσει τον πυρήνα ενός micro-total-analysis-system.



1. Το πρωτόκολλο ELISA

a. Η Μέθοδος ELISA

Είναι γνωστό ότι όλη η πληροφορία που χρειάζεται για να λειτουργήσει ένα κύτταρο και ακόμα και ένας ολόκληρος οργανισμός βρίσκεται στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η έκφραση και η πραγματοποίηση όμως όλων αυτών των λειτουργιών υπόκεινται στις πρωτεΐνες. Δηλαδή υπεύθυνες για όλες τις λειτουργίες και τα χαρακτηριστικά οποιουδήποτε ζωντανού οργανισμού είναι οι πρωτεΐνες του. Χαρακτηριστικό που καθιστά την μελέτη των μηχανισμών διακίνησης και παραγωγής πρωτεϊνών, όπως επίσης και τον προσδιορισμό του ποια πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για ποιο χαρακτηριστικό, μεγάλης σημασίας για την κατανόηση της λειτουργίας ενός οργανισμού. Η αναλυτική μελέτη όλων των λειτουργιών της κάθε πρωτεΐνης οδηγεί δυνητικά στην χαρτογράφηση των μεθόδων επικοινωνίας των κυττάρων. Επομένως μπορεί να μελετηθεί η συμπεριφορά των κυττάρων υπό την παρουσία φαρμάκων ή άλλων ενεργών ουσιών και να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα .

Η μέτρηση όλων των πρωτεϊνών σε όλες τις δυνατές μορφές και συνδυασμούς τους δεν έχει τον ντετερμινιστικό χαρακτήρα που έχει η μέτρηση του γονιδιώματος. Καθώς κάθε χρονική στιγμή υπάρχει διαφορετική σύσταση πρωτεϊνών σε έναν οργανισμό. Επιπλέον η απλή αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης είναι μόνο ένα κομμάτι της ταυτότητάς της καθώς η λειτουργία που επιτελεί εξαρτάται πολλές φορές και από το σχήμα της, το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται. Τέλος ο συνδυασμός πρωτεϊνών μεταξύ τους παράγει νέες λειτουργίες οι οποίες δεν μπορούν να προβλεφτούν απλά από την χημική σύσταση των επιμέρους πρωτεϊνών .

Όλα αυτά καθιστούν την μελέτη των λειτουργιών των πρωτεϊνών υψίστης σημασίας για τον προσδιορισμό του τρόπου επικοινωνίας των κυττάρων . Με την γνώση του οποίου μπορεί να προβλεφτεί η



συμπεριφορά ενός κυττάρου σε κάποια ξένη προς αυτό ουσία (π.χ. φάρμακα) ή ακόμα και η ανταπόκριση ενός ασθενούς σε κάποια συγκεκριμένη θεραπεία

Προκειμένου να εξαχθούν λοιπόν χρήσιμα συμπεράσματα για την λειτουργία των κυττάρων είναι αναγκαία η ταυτοποίηση και μέτρηση των πρωτεϊνών σε μια πληθώρα βιολογικών δειγμάτων. Τα κατεξοχήν βιοχημικά πρωτόκολλα που επιτελούν αυτή τη λειτουργία είναι τα πρωτόκολλα χημικής συγγένειας (affinity based assays)

Τα affinity based assays χρησιμοποιούν μόρια τα οποία έχουν μεγάλη χημική συγγένεια και εκλεκτικότητα με τις πρωτεΐνες προς ανίχνευση. Δηλαδή συνδέονται πολύ εύκολα με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη και πολύ δύσκολα έως και καθόλου με οποιαδήποτε άλλη.

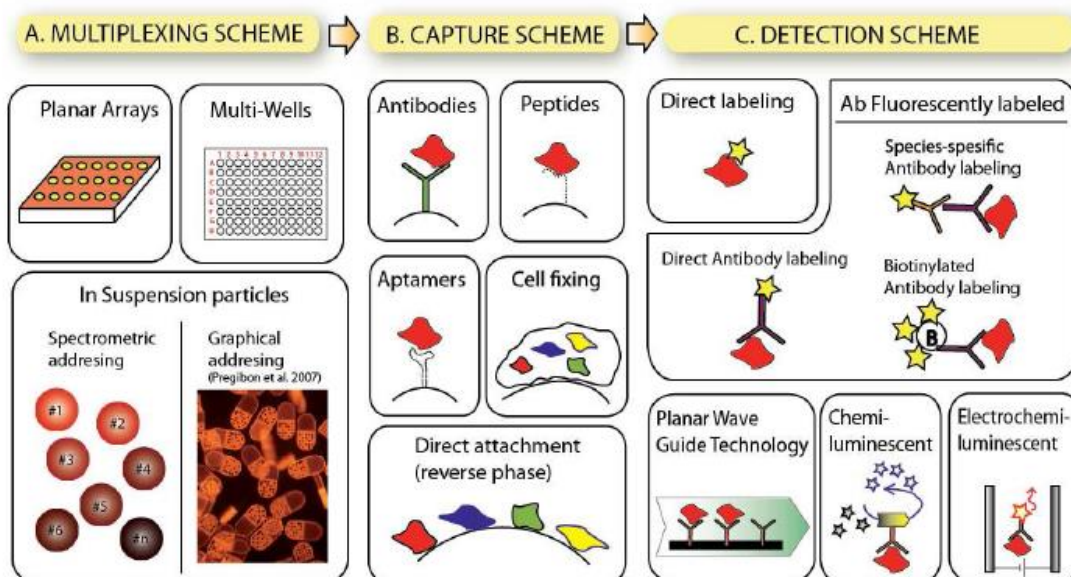
Τυπικά τέτοια μόρια είναι τα αντισώματα, τα οποία είναι βιοχημικές ενώσεις που παράγονται από τους ζωντανούς οργανισμούς με σκοπό την καταπολέμηση ξένων ουσιών. Για αυτό παρουσιάζουν την ιδιότητα να «ενώνονται» με συγκεκριμένες χημικές ουσίες που θεωρούνται βλαπτικές από τον οργανισμό και έτσι να τις εξουδετερώνουν. Κάθε αντίσωμα ενώνεται μόνο με μία συγκεκριμένη χημική ουσία (πρωτεΐνη), αυτή την ιδιότητα εκμεταλλεύεται το βιολογικό πρωτόκολλο για να ανιχνεύσει την ύπαρξη των πρωτεϊνών

Κάθε πρωτόκολλο χημικής συγγένειας αποτελείται από τρία βασικά στοιχεία

1. Μια μέθοδο ταυτοποίησης με την χρήση της οποίας ένα στερεό στήριγμα (όπως μικροσφαιρίδια, γυάλινες επιφάνειες ή τα τοιχώματα ενός δοχείου) αποκτά μια συγκεκριμένη ταυτότητα που προσδίδει στο σύνολο του πρωτοκόλλου πολυπλεκτικότητα την δυνατότητα δηλαδή να διεξαχθούν πολλές μετρήσεις παράλληλα με την χρήση του ίδιου δείγματος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής 2 τρόπους.
 - a. Κατανομή σε ένα επίπεδο. Όπου κάθε περιοχή στον δισδιάστατο χώρο αποτελεί διαφορετικές συνθήκες ανίχνευσης (όπως οι πλάκες 96 δοχείων ή πολλαπλά σημεία μέτρησης-spots σε μία γυάλινη πλάκα)



- b. Μικροσωματίδια σε αιώρηση μέσα στο δείγμα. Κάθε μικροσωματίδιο έχει ξεχωριστά φυσικά χαρακτηριστικά (πχ ακτινοβολία) και αυτά καθιστούν το κάθε σωματίδιο αναγνωρίσιμο και ξεχωριστό από τα άλλα
 2. Μία μέθοδο δέσμησης. Η οποία στοχεύει στο να ακινητοποιήσει την πρωτεΐνη στόχο στο κατάλληλο στερεό στήριγμα . προς αυτό υπάρχουν οι εξής λύσεις
 - a. Ένα αντίσωμα, πεπτιδίο ή άλλο βιολογικό μόριο το οποίο συνδέεται σε ένα στερεό υπόστρωμα και πάνω σε αυτό δεσμεύεται η πρωτεΐνη στόχος
 - b. Κύτταρα τα οποία βρίσκονται στερεά δεμένα με το υπόστρωμα
 3. Μία μέθοδο ανίχνευσης, η οποία έχει στόχο την παραγωγή ενός σήματος το οποίο υποδηλώνει ότι ανιχνεύτηκε πρωτεΐνη. Τυπικό παράδειγμα τέτοιων σημάτων αποτελούν φωσφορίζουσες ουσίες, οι οποίες παράγουν συγκεκριμένου μήκους κύματος ακτινοβολία όταν διεγερθούν



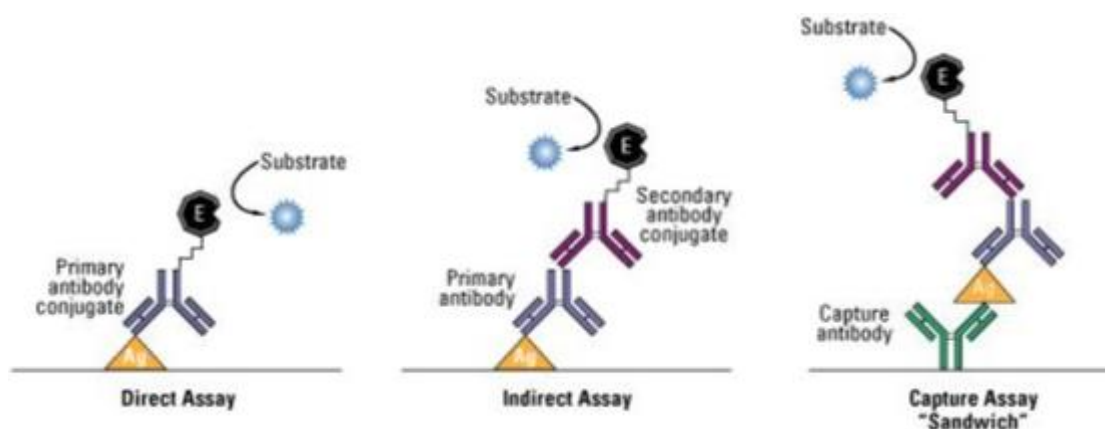
Αν και όπως δείχνει ο παρακάτω συγκριτικός πίνακας υπάρχει πληθώρα affinity based assays



ASSAY	MULTIPLEXING SCHEME	CAPTURE SCHEME	DETECTION SCHEME	Size of SAMPLES (per run)	Size of SIGNALS (per run)
ELISA (several brands)	Multi-wells (96 or 384)	Sandwich antibodies	Fluorescent or Enzymatic	100 / plate	1 per well
In-Cell Western LICOR	Multi-wells (usually 96)	Fixed Cell and single antibody	Fluorescently labeled Antibody	100 / plate	1-2 per well
Protein Arrays (several brands)	Planar Array slides/membranes	Sandwich antibodies	Fluorescently labeled Antibody	1 / slide	~100 per slide (Ab pair limited)
Protein Arrays on multi-wells (several brands)	Planar Array slides/membranes on multi-wells (usually 96)	Sandwich antibodies and different sample per well	Fluorescently labeled Antibody	100 / plate	~10 spots/well (spot size limited)
Protein Arrays Reverse Phase (several brands)	Planar Array slides/membranes	Spotting and single antibodies	Fluorescently labeled Antibody	1000s / slide	Usually 1 per slide
Protein Arrays Reverse Phase on multi-wells (several brands)	Planar Array slides/membranes on multi-wells (usually 96)	Spotting and single antibodies per well	Fluorescently labeled Antibody	~10 spots/well	~100 per plate

Η μέθοδος που υιοθετήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών, καθώς παρουσιάζει τόσο τα ποιο αξιόπιστα αποτελέσματα, όσο και της μεγαλύτερες δυνατότητες για πολυπλεκτική λειτουργία ονομάζεται ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) και είναι μια βιοχημική διαδικασία ταυτοποίησης πρωτεϊνών σε ένα δείγμα η οποία στηρίζεται στην αντίδραση μεταξύ αντισώματος-πρωτεΐνης και μπορεί να εκτελεστεί με τις εξής βασικές μεθοδολογίες

1. Direct ELISA στην οποία το πρωτεΐν αντίσωμα έχει ενωθεί με την φωσφορίζουσα ουσία και οδηγεί σε άμεση ανίχνευση
2. Indirect ELISA στην οποία χρησιμοποιείται και δευτερεύον αντίσωμα
3. Sandwich ELISA κατά την οποία η πρωτεΐνη προς ανίχνευση παγιδεύεται έμμεσα και χρησιμοποιείται και δευτερεύον αντίσωμα

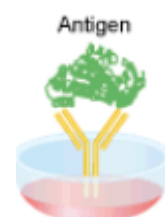


Από τις 3 διαφορετικές μεθόδους αυτή που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος και έτσι την ευκολότερη και πιο αξιόπιστη ανάγνωση των αποτελεσμάτων είναι η sandwich ELISA η οποία μπορεί να εκτελεστεί με 2 διαφορετικά υποστρώματα. Είτε με πλάκας εργαστηρίου-τριβλίο (solid phase ELISA), είτε με μικροσωματίδια (suspension ELISA) οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω.

b. solid phase ELISA

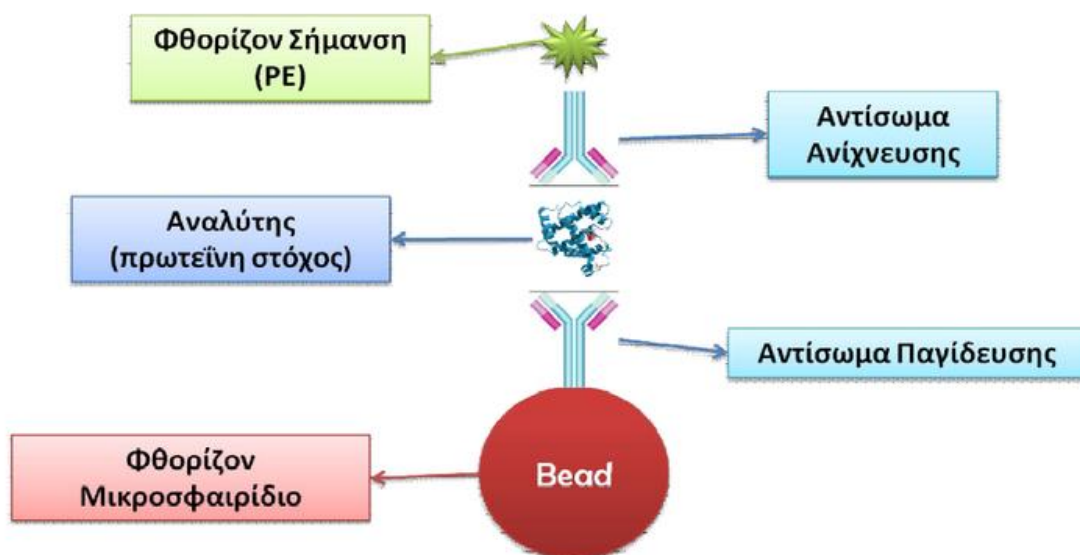
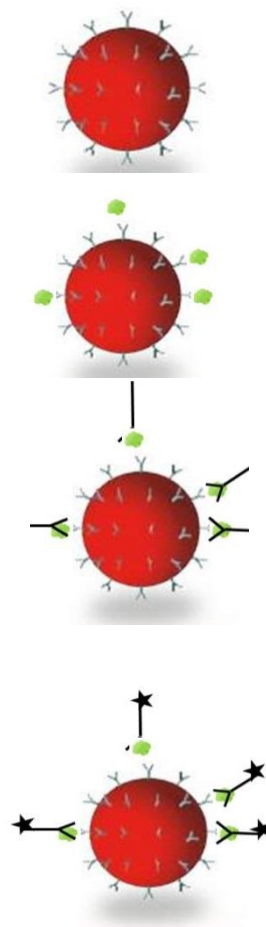
Το πρωτόκολλο ELISA το οποίο εκτελείτε στην επιφάνεια ενός τριβλίου, ειδικά επεξεργασμένη ώστε σε αυτήν να μπορούν να προσκολλούνται βιομόρια, ονομάζεται solid phase ELISA και αποτελείται από τα εξής στάδια.

1. Με την επιφάνεια του τριβλίου ενώνονται χημικά, αντισώματα τα οποία δεσμεύουν την προς ανίχνευση πρωτεΐνη.
2. Εισάγεται το δείγμα στο τριβλίο και αν υπάρχουν οι ζητούμενες πρωτεΐνες δεσμεύονται από τα πρωτεύοντα αντισώματα.
3. Εισάγεται διάλυμα με δευτερεύοντα αντισώματα τα





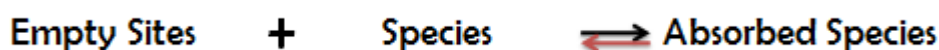
1. Εισαγωγή στο βιολογικό δείγμα προς μέτρηση, υπερπαραμαγνητικών μικροσφαιριδίων (microbeads) στην επιφάνεια των οποίων βρίσκονται αντισώματα που δεσμεύουν την πρωτεΐνη προς ανίχνευση.
2. Αν υπάρχει στο δείγμα η πρωτεΐνη προς ανίχνευση μόρια αυτής δεσμεύονται από τα αντισώματα στην επιφάνεια των Microbeads.
3. Εισαγωγή στο δείγμα δευτερευόντων αντισωμάτων που δεσμεύονται από την πρωτεΐνη
4. εισαγωγή Φυκοερυθρίνης (PE) , μιας φωσφορίζουσας ουσίας που ενώνεται με τα δευτερεύοντα αντισώματα
5. Εξαγωγή των Microbeads και τοποθέτησή τους υπό ακτινοβολία Laser που προκαλεί την έκκλιση φωτός από την Φυκοερυθρίνη και έτσι την ανίχνευση της πρωτεΐνης στο δείγμα



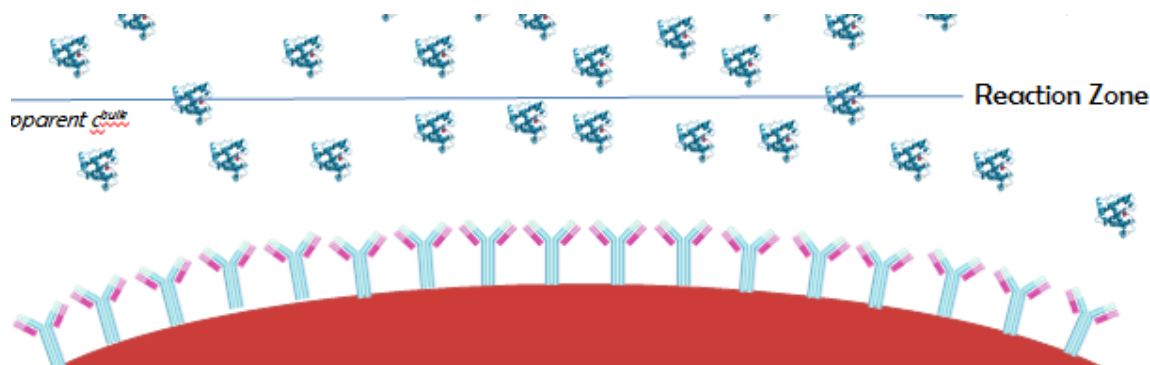


Η χρήση πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων προσδίδει μεγάλη ευελιξία και δυνατότητα για προσαρμογή σε εξειδικευμένες εφαρμογές. Παρουσιάζεται επίσης και βελτιωμένη πρόσδεση του δείγματος στο αντίσωμα παγίδευσης εξ αιτίας των binding kinetics.

Η Αντίδραση με βάση την οποία δεσμεύετε η πρωτεΐνη πάνω στο αντίσωμα



Ως χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μια στενή περιοχή γύρω από την επιφάνεια πάνω στην οποία βρίσκονται τα αντισώματα



Και διέπτετε από τα εξής φαινόμενα. Την μεταφορά μάζας (convection) στην ζώνη της αντίδρασης (reaction zone) η οποία γίνεται είτε με διάχυση είτε με απλή οριζόντια μεταφορά μορίων. Και την απορρόφηση των μορίων από τα αντισώματα

Συνήθως τα πρωτόκολλα ELISA διαθέτουν αντισώματα που ενώνονται με τις πρωτεΐνες με ικανοποιητικό ρυθμό και υπάρχει πληθώρα «κενών θέσεων» πάνω στις οποίες δεσμεύονται πρωτεΐνες, έτσι το φαινόμενο που

παίζει καθοριστικό ρόλο στον χρόνο και στον βαθμό απόδοσης της αντίδρασης ένωσης αντισώματος και πρωτεΐνης, είναι τα φαινόμενα μεταφορά μάζας (convection)

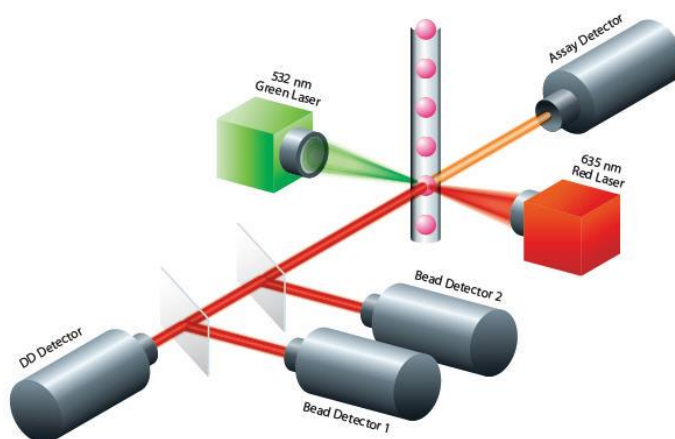
Έτσι τα suspension πρωτόκολλα τα οποία αν και δεν παρουσιάζουν ενισχυμένη συνολική επιφάνεια σε σχέση με τα solid phase, παρουσιάζουν αντίθετα μεγαλύτερο convection και έτσι συνολικά θεωρούνται βέλτιστα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

d. Μέθοδοι suspension ELISA

Η φύση των συγκεκριμένων μεθόδων υπαγορεύει την χρήση μικροσφαιριδίων τα οποία αιωρούνται μέσα σε διάλυμα και λειτουργούν σαν το υπόστρωμα πάνω στο οποίο δένονται τα πρωτεύοντα αντισώματα.

Υπάρχουν πολλές τεχνολογίες μικροσωματιδίων, οι οποίες κυρίως διαφοροποιούνται στον τρόπο με τον οποίο γίνεται η κωδικοποίηση των σωματιδίων .

Η πιο διαδεδομένη κωδικοποίηση είναι μέσω ακτινοβολίας. Τα μικροσωματίδια που χρησιμοποιούνται (κυρίως μικροσφαιρίδια)

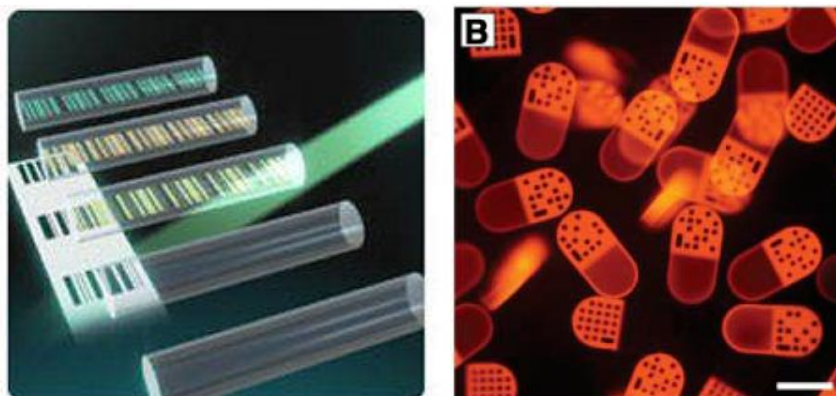


περιέχουν σε συγκεκριμένες αναλογίες διαφορετικές βαφές οι οποίες



όταν διεγερθούν εκπέμπουν φώς συγκεκριμένου μήκους κύματος, συνήθως χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός ερυθρής και υπέρυθρης βαφής. Έτσι κάθε αναλύτης κωδικοποιείται με την χρήση μιας οικογένειας μικροσωματιδίων με συγκεκριμένη αναλογία βαφών. Ως μέθοδος κωδικοποίησης, η χρήση των διαφορετικών αναλογιών στις βαφές μπορεί να παράξει έως και 500 διαφορετικές οικογένειες μικροσφαιριδίων παρέχοντας μεγάλη πολυπλεκτικότητα στις μετρήσεις. Βέβαια όσο περισσότερες οικογένειες χρησιμοποιούνται τόσο μεγαλύτερη πρέπει να είναι η διακριτική ικανότητα ανίχνευσης του φάσματος από όλες τις ακτινοβολίες καθώς οι διαφορές στο φάσμα γίνονται πολύ μικρές.

Εξίσου διαδεδομένη είναι και η κωδικοποίηση μέσω γραφικών απεικονίσεων. Η ταυτότητα του κάθε σωματιδίου καθορίζεται με γραφικά, συνήθως κάποιας μορφής barcode χαραγμένου πάνω στα μικροσωματίδια. Η αναγνώριση της ταυτότητας του κάθε μικροσωματιδίου (συνήθως κύλινδροι ή πλακίδια) αναγνωρίζεται μέσω οπτικής καταγραφής τους και μετά με την εφαρμογή ενός pattern recognition αλγόριθμου. Αν και δυνητικά με την χρήση μεγαλύτερων σωματιδίων μπορεί να επιτευχθεί μεγάλη πολυπλεκτικότητα ως τώρα έχουν αναπτυχθεί εφαρμογές που χρησιμοποιούν έως και 128 διαφορετικά σωματίδια (2^7)



Τέλος έχουν δημιουργηθεί και μέθοδοι ηλεκτρονικής κωδικοποίησης ή κωδικοποίησης μέσω των φυσικών ιδιοτήτων των μικροσωματιδίων, αλλά

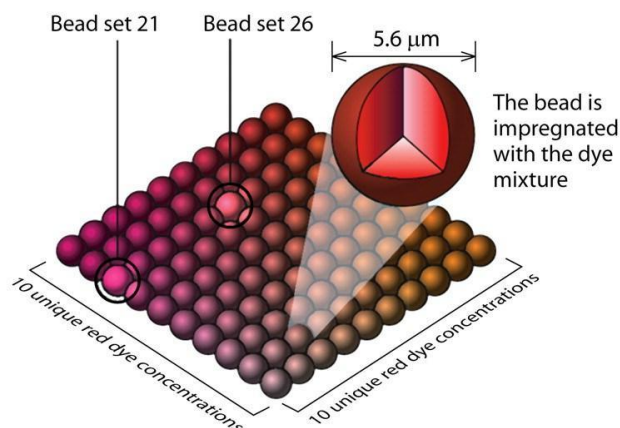


η μικρή πολυπλεκτικότητα που προσέφεραν και η δυσκολία στην κατασκευή δρουν σαν αποτρεπτική παράγοντες περαιτέρω ανάπτυξης.

e. Μαγνητικά μικροσφαιρίδια και σωματίδια

Η διεξαγωγή του πρωτοκόλλου bead-based-sandwich ELISA, πραγματοποιείται με την χρήση υπερπαραμαγνητικών μικροσφαιριδίων.

Συγκεκριμένα τα σφαιρίδια είναι διαμέτρου μερικών μικρομέτρων και στο εσωτερικό τους διαθέτουν ένα μείγμα από ερυθρή και υπέρυθη φωσφορίζουσα βαφή. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές εντάσεις και

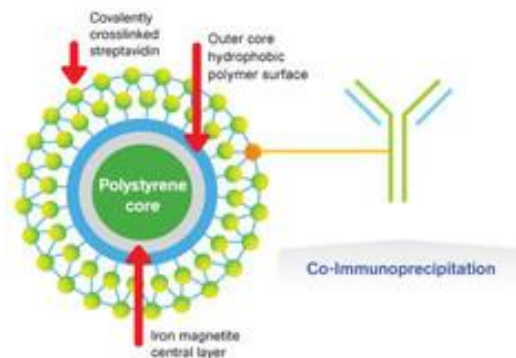


αναλογίας των 2 βαφών όταν τα μικροσφαιρίδια προσβάλλονται από την κατάλληλη ακτινοβολία αντανακλούν ακτινοβολία μοναδικού φάσματος το κάθε ένα, έτσι έχουν δημιουργηθεί 100 διαφορετικά είδη μικροσφαιριδίων με διαφορετικό φάσμα. Έτσι ο πειραματιστής έχει την δυνατότητα να εκτελέσει ταυτόχρονα έως 100 διαφορετικές μετρήσεις στο ίδιο δείγμα χρησιμοποιώντας διαφορετικά μικροσφαιρίδια για κάθε πρωτεΐνη που θέλει να ταυτοποιήσει.

Η Επιφάνεια των μικροσφαιριδίων είναι τέτοια που επιτρέπει την σύνδεσή τους με αντισώματα δίνοντας την δυνατότητα στον ερευνητή να εκτέλεση την ανίχνευση μιας πληθώρας πρωτεϊνών.



Το υλικό από τα οποίο αποτελούνται είναι πλαστικό με μία μικρή περιεκτικότητα σε σίδηρο ώστε αυτά να παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά. Δηλαδή μόνο όταν βρίσκονται σε μαγνητικό πεδίο να συμπεριφέρονται ως μαγνητικά σωματίδια και να μπορούν με την χρήση κατάλληλων μαγνητικών δυνάμεων να μεταφερθούν ή να κρατηθούν ακίνητα, ενώ εκτός μαγνητικού πεδίου να συμπεριφέρονται ως μη μαγνητικά. Χαρακτηριστικό που διευκολύνει την συγκράτηση των μικροσφαιριδίων κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου και την εύκολη απελευθέρωσή τους στο τέλος του



Συγκεκριμένα για μαγνητικό σφαιρίδιο μέσα σε μαγνητικό πεδίο ισχύει για την δύναμη που δέχεται από το πεδίο ότι

$$\vec{F}_m = -\vec{\nabla}U = -V\chi\vec{\nabla}u = \frac{V\chi}{2\mu_0}\nabla B^2$$

Όπου V: Ο Όγκος, B: πυκνότητα πεδίου, μ_0 : μαγνητική διαπερατότητα και χ : magnetic sensibility

Επιπλέον στο σωματίδιο ασκείται δύναμη βαρύτητας και δύναμη οπισθέλκουσας

$$\vec{F}_{drag} = 6\pi\eta R(u_{particle} - u_{medium})$$

$$\vec{F}_{grav} = V_p(\rho_p - \rho_{medium})g$$

Όπου R: ακτίνα, u: ταχύτητα, ρ : πυκνότητα και η : ιξώδες



Θεωρώντας ότι το σωματίδιο έχει μικρή μάζα και βρίσκεται σε περιβάλλον χαμηλών ταχυτήτων μπορούμε να αμελήσουμε όλες της δυνάμεις εκτός από την μαγνητική η οποία είναι ανάλογη με το ρυθμό μεταβολής του μαγνητικού πεδίου

Εκμεταλλευόμενοι λοιπόν τα παραπάνω χαρακτηριστικά μπορεί με τη βοήθεια της χρήσης της τεχνολογίας FlexMap να γίνει τόσο η ταυτοποίηση του είδους του μικροσφαιριδίου (μέσω του φάσματος που εκπέμπει) όσο και η ποσότητα της φυκοερρυθρίνης (PE) που υπάρχει προσκολλημένη σε κάθε μικροσφαιρίδιο. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η ανίχνευση της ποσότητας των προς ανίχνευση πρωτεϊνών στο δείγμα. Χάρη στον μεγάλο αριθμό διαφορετικών μικροσφαιριδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν δίνεται η δυνατότητα με μόνο μία βιοχημική διαδικασία να διεξαχθούν ταυτόχρονα πολλά πειράματα και να παραχθούν δεδομένα από μεγάλο αριθμό αναλυτών. Μειώνοντας δραστικά τον αριθμό των βιολογικών δειγμάτων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν



2. Bio-MEMS: Βιολογικές μικροηλεκτρομηχανολογικές διατάξεις

α. Γενική αρχή

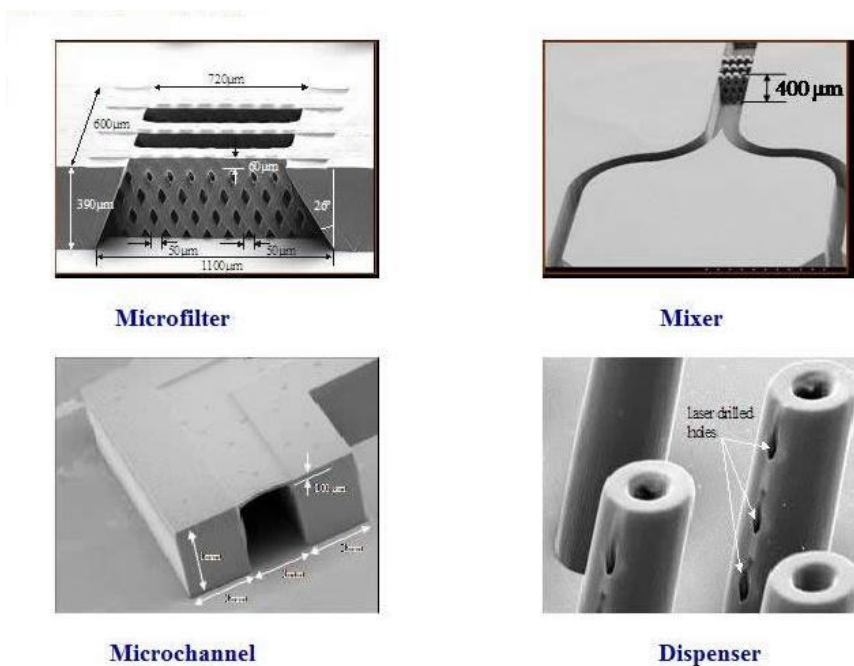
Ο όρος bioMEMS προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων biological Micro-Electro-Mechanical systems και αναφέρεται σε μικροσκοπικές διατάξεις και συσκευές με εφαρμογές στην βιολογία και την ιατρική

Γενικά τα MEMS αποτελούνται από διάφορα δομικά μέρη με διαστάσεις ορισμένων μικρών (1-100μm). Ο τυπικός σχεδιασμός τους περιλαμβάνει μια βασική μονάδα επεξεργασίας και διάφορους επενεργητές και αισθητήρες ειδικά σχεδιασμένους για την εκάστοτε εφαρμογή. Ήδη ολοκληρωμένα συστήματα MEMS βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς της σύγχρονης τεχνολογίας, από Microrobotics και Microactuators μέχρι microimplants

Δεδομένης της κλίμακας μεγέθους αυτών των συσκευών, οι θεμελιώδεις νόμοι της φυσικής που τις διέπουν παρουσιάζονται διαφορετικοί από ότι στην κλίμακα που τυπικά εμφανίζονται οι τεχνολογικές εφαρμογές. Αυτό το χαρακτηριστικό υποδηλώνει και την ανάγκη διαφορετικής αντιμετώπισής τους.

Πολύ συχνά σε MEMS συσκευές ο λόγος της επιφάνειας προς την μάζα είναι πολύ μεγαλύτερος από το συνηθισμένο με αποτέλεσμα φαινόμενα επιφάνειας να έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση από φαινόμενα μάζας (π.χ. οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις έχουν πολύ μεγαλύτερη επίδραση από ότι οι δυνάμεις αδράνειας)

Αυτό το χαρακτηριστικό τους οδήγησε στην ανάπτυξη ενός ευρύ φάσματος από μικροσυσκευές ικανές να επιτελέσουν εργασίες που τυπικά γίνονται σε ένα βιολογικό εργαστήριο. Τις αποκαλούμενες lab-on-a-chip και micro-total-analysis-system



Microfilter

Mixer

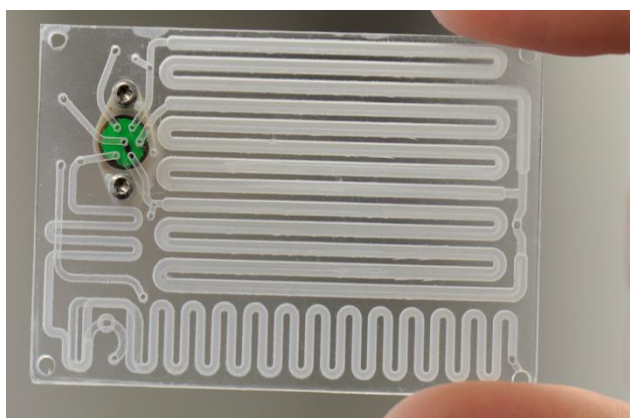
Microchannel

Dispenser

b. η τεχνολογία του LAB-ON-A-CHIP

Με τον όρο LAB-ON-A-CHIP (LOC) εννοούμε συσκευές και διατάξεις οι οποίες ενσωματώνουν πολλαπλές λειτουργίες ενός εργαστηρίου, από απλές χημικές αντιδράσεις μέχρι σύνθετα βιολογικά και βιοχημικά πρωτόκολλα σε μια πλακέτα μικρού μεγέθους (λίγων τετραγωνικών εκατοστών)

Τυπικά τα LOC υπάγονται στα συστήματα μικροολοκληρωμένης ανάλυσης (micro-total-analysis systems ή μ TAS) αν και εστιάζονται κυρίως στην αυτοματοποίηση εργαστηριακών λειτουργιών και λιγότερο σε



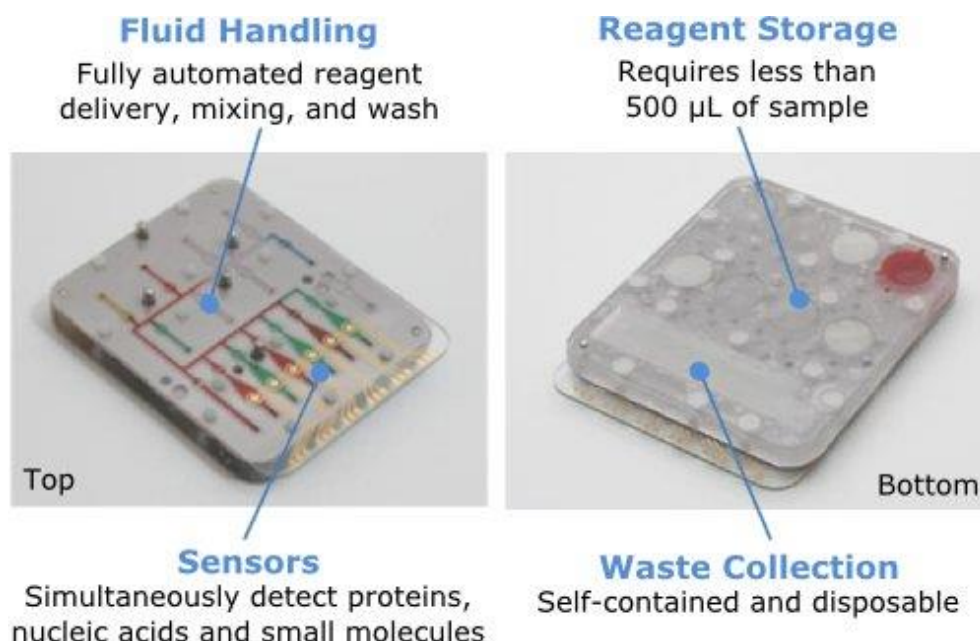
χημικές αναλύσεις.



Η λειτουργία των LOC εστιάζεται κυρίως σε μεθόδους και τεχνολογίες διαχείρισης πολύ μικρών όγκων ρευστών, ως εκ τούτου η λειτουργία τους είναι στενά συνδεδεμένη με την φυσική της μικρορευστομηχανικής η οποία περιγράφει την συμπεριφορά των ρευστών σε διαστάσεις και περιβάλλον μικρομέτρων όπως αυτό που παρουσιάζεται στα LAB-ON-A-CHIP.

Συνήθως κατασκευάζονται με τις μεθόδους φωτολιθογραφίας που αναπτύχθηκαν για την κατασκευή Microchip υπολογιστών σε μία πληθώρα υλικών, όπως πυρίτιο, γυαλί, PMMA (plexiglass), PDMS (polydimethylsiloxane) κεραμικά και ακόμα και μέταλλα. Προκειμένου να ικανοποιηθεί η ανάγκη των συστημάτων για βιοσυμβατότητα, καλή θερμική αγωγιμότητα ή συγκεκριμένες

Υπακούοντας στους χημικούς και φυσικούς νόμους που διέπουν τον μικρόκοσμο τα LOC εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα απέναντι σε ολοκληρωμένα συστήματα αντιδράσεων κανονικών διαστάσεων. Η κατανάλωση των αντιδρώντων για της χημικές αντιδράσεις είναι πολύ μικρότερη γιατί διαχειρίζονται πολύ μικρότεροι όγκοι, ενώ ταυτόχρονα οι χρόνοι αντιδράσεων είναι μικρότεροι εξαιτίας των μικρών χρόνων διάχυσης και την μεγάλο λόγο επιφάνειας προς όγκου που διέπει τα μικροροϊκά κυκλώματα. Επιπλέον το μικρό τους μέγεθος δίνει την δυνατότητα σε καλύτερο έλεγχο και αυτοματοποίηση των διαδικασιών καθώς οι ενέργειες που απαιτούνται για τον έλεγχο του συστήματος είναι πολύ μικρές. Τέλος εμφανίζουν μικρότερο κόστος κατασκευής και αποτελούν ασφαλέστερο μέσο διαχείρισης επιβλαβών ουσιών (π.χ.





ραδιενεργές και τοξικές ουσίες)

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό τους, είναι η δυνατότητα τους να αποτελέσουν φθηνά ολοκληρωμένα συστήματα διάγνωσης. Με αποτέλεσμα να αποτελούν point-of-care testing systems δηλαδή συστήματα ικανά να αποτελέσουν διαγνωστικά εργαλεία στον χώρο περίθαλψης των ασθενών. Σε αντίθεση με τα βιολογικά εργαστήρια που είναι από τη φύση τους περιορισμένα σε ειδικούς χώρους. Επομένως δίνονται οι δυνατότητες σε κλινικές και χώρες με περιορισμένη οικονομική δυνατότητα να εκτελούν διαγνωστικά πρωτόκολλα τα οποία με την παρούσα τεχνολογία θα ήταν αδύνατο ή ασύμφορο να εκτελούν



3. Διαχείριση ρευστών σε μικροροϊκό περιβάλλον microfluidics

a. Γενικά

Μικροροϊκά συστήματα ή Microfluidic systems ονομάζουμε όλα τα συστήματα που διαχειρίζονται πολύ μικρούς όγκους ρευστών (της τάξης των μικρόλυτρων) υπό ροών πολύ μικρών ταχυτήτων ($Re < 0.50$).

Δεδομένου ότι οι επιφανειακές δυνάμεις είναι ανάλογες του τετραγώνου της διάστασης ενώ οι ογκικές δυνάμεις είναι ανάλογες του κύβου της διάστασης. Καταλαβαίνουμε ότι οι επιφανειακές δυνάμεις έχουν πολύ μεγαλύτερη ισχύ σε μικροροϊκά συστήματα από ότι στα τυπικά συστήματα ρευστών που κύριο ρόλο έχουν οι αδρανειακές δυνάμεις.

$$\frac{\text{surface forces}}{\text{volume forces}} \propto \frac{\ell^2}{\ell^3} = \ell^{-1} \xrightarrow{\ell \rightarrow 0} \infty.$$

Εξαιτίας των πολύ μικρών ταχυτήτων που υπάρχουν στα μικροροϊκά συστήματα όλα τα ρευστά μπορούν με ικανοποιητική ακρίβεια να θεωρηθούν ασυμπίεστα και έτσι η εξίσωση Navier-Stokes που διέπει την κίνηση των ρευστών

$$\rho[\partial_t \mathbf{v} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}] = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \beta \eta \nabla (\nabla \cdot \mathbf{v}) + \rho \mathbf{g} + \rho_{el} \mathbf{E}.$$

Γίνεται $\rho[\partial_t \mathbf{v} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}] = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \rho \mathbf{g} + \rho_{el} \mathbf{E},$

Προχωρώντας σε αδιαστατοποίηση των όρων ταχύτητας, μήκους, χρόνου και πίεσης ως εξής

$$\begin{aligned} \mathbf{r} &= L_0 \tilde{\mathbf{r}}, & t &= \frac{L_0}{V_0} \tilde{t} = T_0 \tilde{t}, & p &= \frac{\eta V_0}{L_0} \tilde{p} = P_0 \tilde{p}. \\ \mathbf{v} &= V_0 \tilde{\mathbf{v}}, \end{aligned}$$



Και αντικαθιστώντας στην εξίσωση Navier-Stokes έχουμε

$$\rho \left[\frac{V_0}{T_0} \tilde{\partial}_t \tilde{\mathbf{v}} + \frac{V_0^2}{L_0} (\tilde{\mathbf{v}} \cdot \tilde{\nabla}) \tilde{\mathbf{v}} \right] = -\frac{P_0}{L_0} \tilde{\nabla} \tilde{p} + \frac{\eta V_0}{L_0^2} \tilde{\nabla}^2 \tilde{\mathbf{v}}$$

Οπότε ορίζοντας αριθμό Reynolds $Re \equiv \frac{\rho V_0 L_0}{\eta}$

Εχούμε την ακόλουθη μορφή της εξίσωσης N-S

$$Re \left[\tilde{\partial}_t \tilde{\mathbf{v}} + (\tilde{\mathbf{v}} \cdot \tilde{\nabla}) \tilde{\mathbf{v}} \right] = -\tilde{\nabla} \tilde{p} + \tilde{\nabla}^2 \tilde{\mathbf{v}}$$

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εξίσωση για αριθμούς Reynolds

αρκετά μικρότερους του 1 ($Re \ll 1$). Όρος ιξώδους $\tilde{\nabla}^2 \tilde{\mathbf{v}}$, κυριαρχεί έναντι στον αδρανειακό όρο $(\tilde{\mathbf{v}} \cdot \tilde{\nabla}) \tilde{\mathbf{v}}$

Τελικά για πολύ χαμηλές ταχύτητες και με βάση την υπόθεση της μη συμπιεστότητας η N-S εξίσωσης μετασχηματίζονται στην

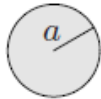
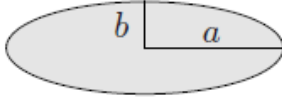
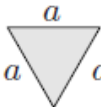
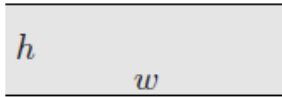
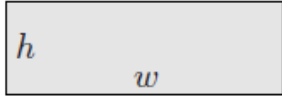
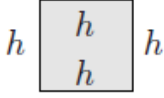
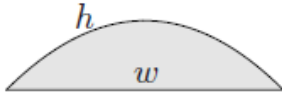
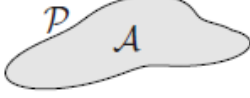
$$\mathbf{0} = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v}$$

Η οποία αποτελεί την εξίσωση Stokes που περιγράφει την κίνηση των νευτώνειων ρευστών σε μικροροϊκά κυκλώματα (stokes flow).



β.Υδραυλική αντίσταση

για τον υπολογισμό της αντίστασης των καναλιών στην ροή υιοθετήθηκαν οι παρακάτω τύποι που χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιβλιογραφία

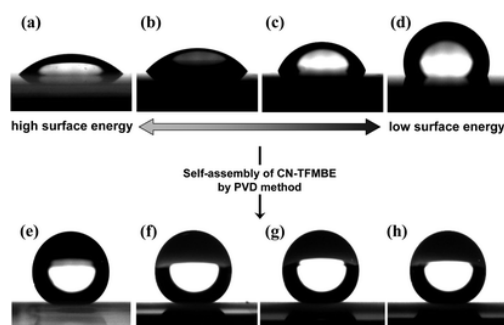
shape		R_{hyd} expression	R_{hyd} [$10^{11} \frac{\text{Pa}\cdot\text{s}}{\text{m}^3}$]
circle		$\frac{8}{\pi} \eta L \frac{1}{a^4}$	0.25
ellipse		$\frac{4}{\pi} \eta L \frac{1 + (b/a)^2}{(b/a)^3} \frac{1}{a^4}$	3.93
triangle		$\frac{320}{\sqrt{3}} \eta L \frac{1}{a^4}$	18.5
two plates		$12 \eta L \frac{1}{h^3 w}$	0.40
rectangle		$\frac{12 \eta L}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3 w}$	0.51
square		$28.4 \eta L \frac{1}{h^4}$	2.84
parabola		$\frac{105}{4} \eta L \frac{1}{h^3 w}$	0.88
arbitrary		$\approx 2 \eta L \frac{P^2}{A^3}$	-

γ. Η τεχνολογία υπερυδρόφοβων βαλβίδων

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ υγρού και επιφανειών είναι ένας σημαντικός παράγοντας καθορισμού της συμπεριφοράς των ρευστών σε μικροροϊκό περιβάλλον. Με την εκμετάλλευση λοιπόν του φαινομένου της επιφανειακής τάσης που έχει μεγάλη ισχύ στο μικρό-επίπεδο μπορούν να δημιουργηθούν παθητικά στοιχεία ελέγχου ενός μικροροϊκού κυκλώματος τα οποία παρουσιάζουν μηδενική ενεργειακή κατανάλωση και απλή κατασκευή.

Τέτοια στοιχεία είναι και οι υπερυδρόφοβες βαλβίδες. Δηλαδή η κατεργασία της επιφάνειας και της γεωμετρίας ενός τμήματος ενός καναλιού ώστε να παρουσιάζει υδρόφοβη συμπεριφορά

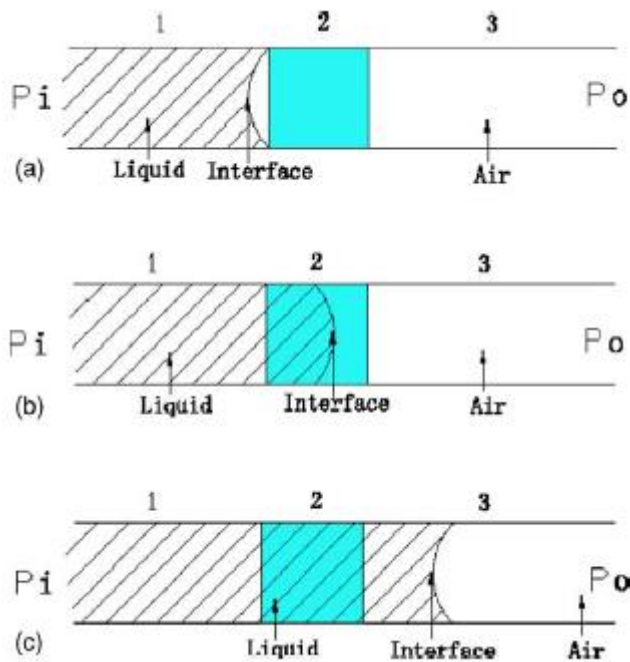
Αυτή η κατεργασία έχει παρουσιαστεί στην βιβλιογραφία να γίνεται κυρίως με 2 τρόπους. Ο πρώτος είναι η δημιουργία ενός μοτίβου στην



επιφάνεια του καναλιού που την καθιστά εξαιρετικά υδρόφοβη (γωνίες επαφής μεγαλύτερες των 90 μοιρών), μια διαδικασία που επιτελείται συνήθως από κατεργασία με πλάσμα της επιφάνειας ώστε μέσα σε μικροθύλακες σε αυτήν να παγιδεύεται αέρας και να καθιστά την επιφάνεια υπερυδρόφοβη. Ο δεύτερος είναι η δημιουργία διαδοχικών μικροστενώσεων στο κανάλι ώστε η αλλαγή στην διατομή να λειτουργεί

σαν βαλβίδα πίεσης. Συγκεκριμένα εκφράζοντας την διαφορά πίεσης σε ένα παραλληλεπίπεδο κανάλι ($w \times h$) στο οποίο υπάρχει μια στένωση

έχουμε
$$\Delta p = 2\gamma_{gl} \cos \theta_c \left[\left(\frac{1}{w_1} + \frac{1}{h_1} \right) - \left(\frac{1}{w_2} + \frac{1}{h_2} \right) \right]$$
 όπου γ_{gl} η ειδική ενέργεια επιφάνειας και θ_c η γωνία επαφής. Θεωρώντας ίδιες ιδιότητες του υλικού σε όλο το μήκος του καναλιού (ίδια ενέργεια επιφάνειας και γωνία επαφής >90) η Δp παρουσιάζεται θετική. Άρα η στένωση του καναλιού, που προκαλεί αύξηση του θ_c πάνω από 90 μοίρες μπορεί να λειτουργήσει σαν βαλβίδα πίεσης



Αν και το μήκος της βαλβίδας δεν επηρεάζει την πίεση στην οποία ανοίγει μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές βαλβίδες στην σειρά για αθροιστικά αποτελέσματα

4. Σχεδιασμός μικροροϊκής πλακέτας εκτέλεσης βιολογικού πρωτοκόλλου ELISA

α. Υπάρχουσες βιολογικές και βιοχημικές εφαρμογές

Philips microarray	
<p>Μια συσκευή η οποία εκμεταλλεύεται τις μαγνητικές ιδιότητες των μικροσφαιριδίων, προκαλώντας την απομάκρυνση τους από το δείγμα όχι μέσω της διακίνησης ρευστών αλλά μέσω ηλεκτρομαγνητισμού. Το δευτερεύων αντίσωμα βρίσκεται πάνω σε επιφάνεια και δεν προστίθεται σαν αντιδρών στο δείγμα. Η ανίχνευση γίνεται έπειτα με οπτική επισκόπηση της επιφάνειας στην οποία είναι κολλημένο το αντίσωμα</p>	
<p>The diagram shows three stages of the Philips microarray process. Stage (1) 'Target capture' shows red spherical particles with blue spikes (antibodies) binding to a surface. Stage (2) 'Surface binding' shows green arrows pointing upwards from the surface, indicating the application of a magnetic field to pull the particles towards the surface. Stage (3) 'Magnetic washing' shows the particles bound to the surface, with some particles being washed away, indicated by green arrows pointing upwards.</p>	
<p><u>Πλεονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Μικρός χρόνος μέτρησης• Αναλώσιμη συσκευή• Καθόλου διακίνηση ρευστών	<p><u>Μειονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Δύσκολος προσδιορισμός κατάλληλου actuation pattern• Δεν υπάρχει δυνατότητα πολυπλεκτικών μετρήσεων



Biocode

Μια συσκευή η οποία χρησιμοποιεί απλά σφαιρίδια όχι υπερπαραμαγνητικά τα οποία αντί για τις 2 φθορίζουσες βαφές έχουν σε μέθοδο κωδικοποίησης ένα barcode μικροεκτυπωμένο σε κάθε σφαιρίδιο. Η ανίχνευση γίνεται με την χρήση CCD κάμερας στο δείγμα αφού κατακαθίσουν τα σφαιρίδια και συνδυάζοντας το barcode με την φωτεινότητα εξάγονται αποτελέσματα για την ανίχνευση των πρωτεϊνών .



Πλεονεκτήματα

- Μεγάλη πολυπλεκτικότητα
- Δυνατότητα εκτέλεσης πολλών πειραμάτων ταυτόχρονα

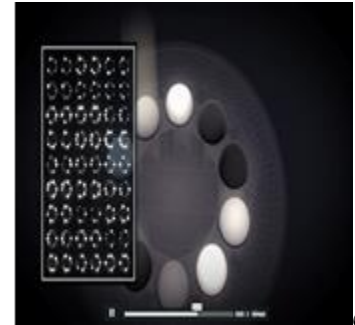
Μειονεκτήματα

- Ακριβά αναλώσιμα
- Αποτελέσματα μικρής αξιοπιστίας
- Δεν υπάρχει δυνατότητα πολυπλεκτικών μετρήσεων
- Δυσκολία εκτέλεσης βιολογικού πρωτοκόλλου



Dynex

Μια συσκευή η οποία χρησιμοποιεί απλά σφαιρίδια όχι υπερπαραμαγνητικά τα οποία αποτίθενται σε συγκεκριμένες θέσεις μέσω ρομποτικού μηχανισμού και έπειτα εκτελείται το πείραμα πάνω από εκεί. Έπειτα γνωρίζοντα



ποιο σφαιρίδιο είναι σε ποια θέση με μια απλή μέτρηση της φωτεινότητας προσδιορίζεται η ανίχνευση της πρωτεΐνης

Πλεονεκτήματα

- Μεγάλη πολυπλεκτικότητα
- Δυνατότητα εκτέλεσης πολλών πειραμάτων ταυτόχρονα
- Μεγάλη αξιοπιστία αποτελεσμάτων

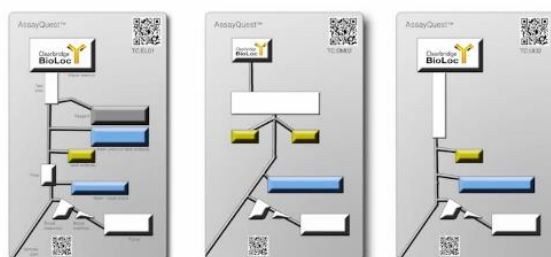
Μειονεκτήματα

- Ακριβά αναλώσιμα
- Σύνθετος μηχανισμός
- Υποστήριξη ενός μόνο είδους σφαιριδίων
- Μικρή επαναληψιμότητα των μετρήσεων



Clearbridge Bioloc

Μια συσκευή η οποία χρησιμοποιεί τεχνολογία εξειδικευμένων πλακετών για κάθε πρωτόκολλο. Τα αντιδρώντα αποθηκεύονται πάνω στο τσιπ σε εύκαμπτους θαλάμους και μετά με πίεση πάνω σε κάθε θάλαμο διακινούνται στο σύστημα. Η συσκευή αποτελεί μόνο την μηχανική υποβοήθηση της πλακέτας. Αν και είναι ικανή να υποστηρίξει μια πληθώρα βιολογικών πρωτοκόλλων ακόμα δεν έχει αναπτυχθεί εφαρμογή ELISA ούτε τεχνολογία ανίχνευσης μικροσφαιριδίων



Πλεονεκτήματα

- Ικανότητα εκτέλεσης πολλών διαφορετικών βιολογικών πρωτοκόλλων
- Εύκολη και αξιόπιστη εκτέλεση μέσω των roller pump
- Μεγάλος βαθμός αυτοματοποίησης

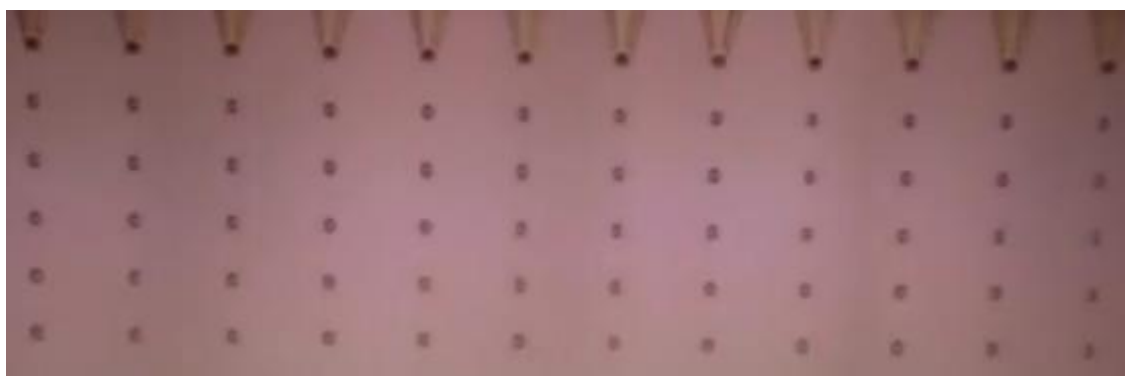
Μειονεκτήματα

- Ακριβά αναλώσιμα
- Σύνθετος μηχανισμός
- Μικρή πολυπλεκτικότητα
- Μικρή επαναληψιμότητα των μετρήσεων



Nanoink's nanoarray

Είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε η οποία λειτουργεί ως εξής. Μέσω μιας σειράς από microneedles τοποθετούνται spots (κηλίδες) πάνω σε ενεργοποιημένη επιφάνεια (επιφάνεια στην οποία ήδη έχουν κολλήσει τα πρωτεύοντα αντισώματα) από το δείγμα και μετά από πάνω από αυτές με σειρά οι ποσότητες των κατάλληλων αντιδρώντων.



Πλεονεκτήματα

- Ικανότητα εκτέλεσης πολλών διαφορετικών βιολογικών πρωτοκόλλων
- Εκτέλεση πολλών πειραμάτων ταυτόχρονα
- Μεγάλος βαθμός αυτοματοποίησης

Μειονεκτήματα

- Καθόλου πολυπλεκτικό
- Σύνθετος μηχανισμός
- Μικρή ακρίβεια στην ποσότητα αντιδρώντων
- Μικρή επαναληψιμότητα στην εκτέλεση



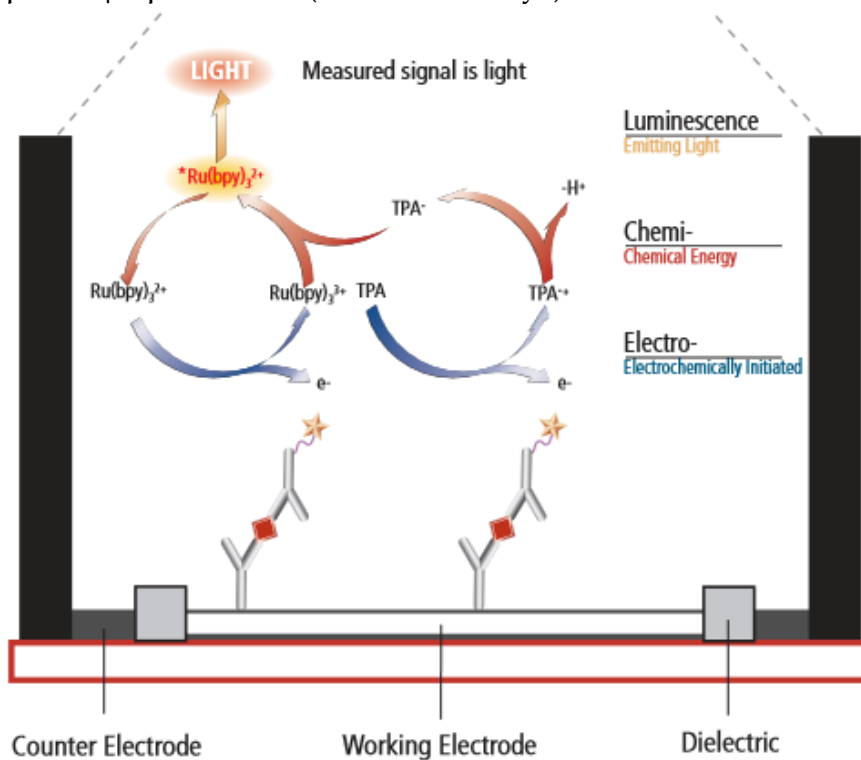
Biocartis molecular diagnostics platform	
<p>Ως συσκευή προσανατολίζεται σε χρήση solid phase πρωτοκόλλων. Είναι μία διάταξη η οποία χρησιμοποιεί έτοιμες μικροροϊκές πλακέτες σαν αναλώσιμα και μπορεί με ακρίβεια να μετρήσει έως και 30 διαφορετικά βιομόρια (με χρήση της κατάλληλης πλακέτας. Επιπλέον η εισαγωγή του δείγματος γίνεται απευθείας πάνω στο μηχάνημα και έτσι δίνεται η δυνατότητα διαχείρισης τόσο στερεών όσο και υγρών δειγμάτων.</p>	
<p><u>Πλεονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ικανότητα ανάλυσης και στερεών και υγρών δειγμάτων • Μεγάλη αξιοπιστία μετρήσεων 	<p><u>Μειονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Περιορισμένη ευελιξία • Μικρή αυτοματοποίηση • Ανάγκη για μεγάλη ποσότητα δείγματος • Καθόλου πολεπλεκτικό

Zeus scientific AIMS	
<p>Πρόκειται για μια συσκευή αυτοματοποίησης βιολογικών πρωτοκόλλων. Μέσα από μία πλατφόρμα ελέγχου ρευστών και ρομποτικών βραχιόνων μπορεί να προγραμματιστεί να εκτελεί οποιοδήποτε βιολογικό πρωτόκολλο. Δέχεται τα διάφορα αντιδραστήρια σε ειδικά κωδικοποιημένα φιαλίδια και πέραν από τον αρχικό προγραμματισμό του πρωτοκόλλου είναι τελείως αυτοματοποιημένη</p>	
<p><u>Πλεονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ικανότητα εκτέλεσης όλων των βιολογικών πρωτοκόλλων • Κατεξοχήν αυτοματοποιημένη λειτουργία 	<p><u>Μειονεκτήματα</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Δεν περιλαμβάνει detection • Χρησιμοποιεί τα τυπικά πρωτόκολλα εργαστηρίου • Δεν υπάρχει δυνατότητα προγραμματισμού επιπλέον πρωτοκόλλων



Mesoscale

Η συγκεκριμένη συσκευή στηρίζεται σε φωτοχημική ανίχνευση του σήματος. Συγκεκριμένα μόνο όταν βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο διεγείρεται και ακτινοβολεί έτσι επιτυγχάνεται η ανίχνευση μόνο εκείνων των μορίων δείγματος που έχουν δεσμευτεί από τα αντισώματα που βρίσκονται πάν σε ηλεκτρόδιο. Με αποτέλεσμα να μπορούν να εκτελούνται πρωτόκολλα χωρίς την ανάγκη πλύσεων (non wash assays)



Πλεονεκτήματα

- Εκτέλεση πρωτοκόλλων χωρίς πλύσεις
- Δεν περιλαμβάνει σύνθετη διαχείριση ρευστών

Μειονεκτήματα

- Περιορισμένο εύρος υποστηριζόμενων πρωτοκόλλων
- Υποχρεωτική χρήση συγκεκριμένων αντιδρώντων
- Δύσχροστη επιλογή για πολυπλεκτικές μετρήσεις



b. προδιαγραφές

Με βάση τις παραπάνω υπάρχουσες εφαρμογές παρατηρούνται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά

1. Η διαχείριση των διαφόρων αντιδραστηρίων γίνεται ως επί το πλείστον με την χρήση διαφόρων διατάξεων ελέγχου ρευστών (βαλβίδες, αντλίες) ειδικών για διαχείριση μικροροών
2. Οι διατάξεις που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση των διαφόρων πειραμάτων είναι συνήθως ογκώδεις και αποτελούνται από πληθώρα υποσυστημάτων προκειμένου να εκτελέσουν όλες τις απαιτούμενες λειτουργίες.
3. Κάθε εφαρμογή παρουσιάζει κάποιον βαθμό πολυπλεκτικότητας στις μετρήσεις της
4. Το μέγεθος των συσκευών αποτελεί απαγορευτικό παράγοντα για την μετακίνησή τους εκτός του εργαστηριακού περιβάλλοντος
5. Τα αναλώσιμα, όπου αυτά χρησιμοποιούνται, είναι συνήθως εξειδικευμένα και ως εκ τούτου, αρκετά ακριβά καθιστώντας την εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων απαγορευτική

Εξ αιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης υιοθετήθηκαν οι ακόλουθες προδιαγραφές για την δημιουργία της μικροροϊκής πλακέτας εκτέλεσης ELISA

1. Χρήση όσον το δυνατόν λιγότερων ενεργητικών στοιχείων ελέγχου (βαλβίδες, αντλίες) για την εκτέλεση των πρωτοκόλλων
2. Περιορισμένο μέγεθος της συσκευής ελέγχου της πλακέτας, ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί φορητή και point of care σύστημα
3. Χρήση όσον το δυνατόν λιγότερων υποσυστημάτων-τεχνολογιών για την διακίνηση των ρευστών
4. Τα αναλώσιμα στοιχεία της διάταξης να είναι γενικά, όχι εξειδικευμένα για να είναι οικονομικά συμφέρουσα η εκτέλεση πολλών πρωτοκόλλων



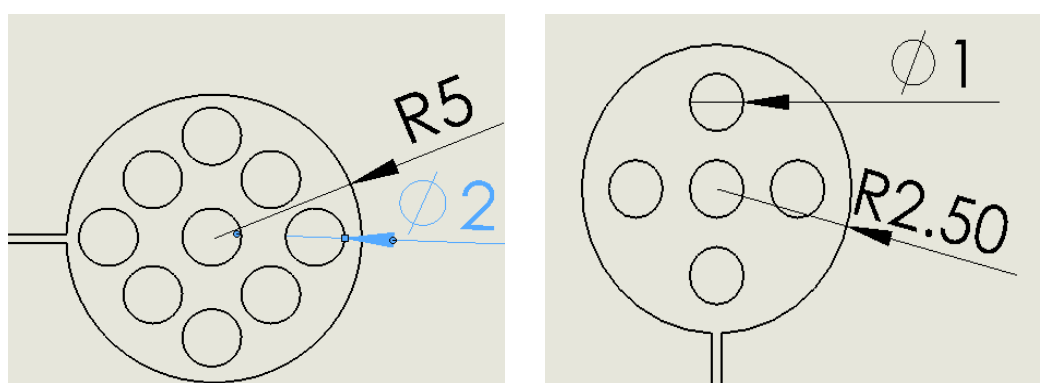
5. Να υποστηρίζεται πολυπλεκτικότητα στις μετρήσεις που μπορούν να εκτελεστούν με βάση το ίδιο σχέδιο πλακέτας

ε. Σχεδίαση κύριων στοιχείων μικροροϊκού κυκλώματος

Ως κύρια στοιχεία του μικροροϊκού κυκλώματος, ορίζονται όλα τα στοιχεία της πλακέτας που δεν επιτελούν κάποιον έλεγχο.

Δεδομένης της φύσης του βιολογικού πρωτοκόλλου, πρέπει στο κύκλωμα της πλακέτας να υπάρχουν θάλαμοι στους οποίους θα αποθηκεύονται σε στερεά ή υγρή μορφή τα αντιδρώντα, και θάλαμος στον οποίο θα εκτελούνται οι αντιδράσεις.

Αρχικά γνωρίζοντας τους όγκους των χημικών που χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση του πρωτοκόλλου ELISA σχεδιάστηκαν οι θάλαμοι πάνω στην πλακέτα στην οποία θα φυλάσσονται τα διάφορα χημικά. Δεδομένου του τυπικού βάθους αποτύπωσης των μικροροϊκών κυκλωμάτων, το οποίο είναι 20μm, σχεδιάστηκαν οι ακόλουθοι 2 θαλαμίσκοι (chambers), για τις αντίστοιχες ποσότητες αντιδρώντων

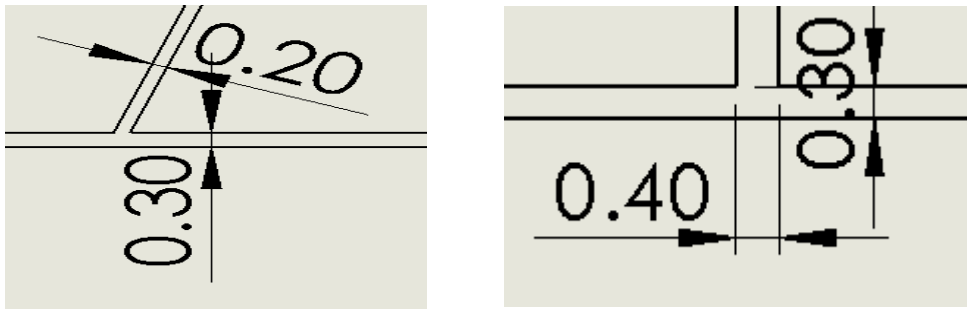


Εξ αιτίας της διαδικασίας σφράγισης των κυκλωμάτων, η οποία θα εξηγηθεί εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο, είναι απαραίτητο προκειμένου να αποφευχθεί πιθανή κατάρρευση των chamber να τοποθετηθούν στο εσωτερικό τους πυλώνες που θα υποστηρίζουν την επιφάνεια σφράγισης.



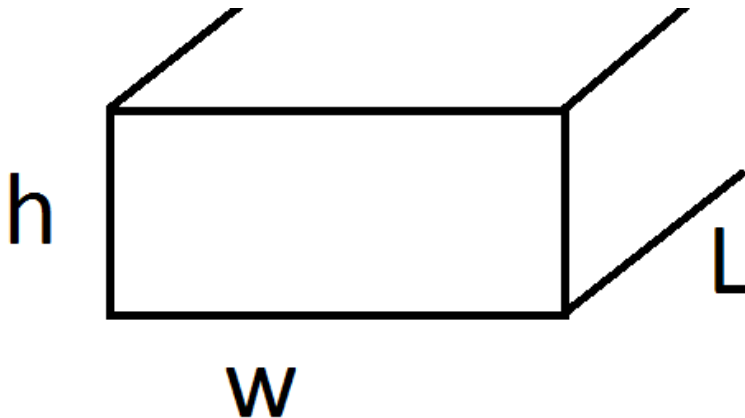
Δεδομένου του τυπικού βάθους των μικροροϊκών κυκλωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ευρεία γκάμα καναλιών, με πλάτος από 15-60 μm .

Ανάλογα με τις διαφορές πίεσης και παροχής που έπρεπε να επιτευχθούν στην παρούσα εφαρμογή χρησιμοποιήθηκαν κανάλια βάθους 20 μm και πλάτους 20 μm , 30 και 40 για την δημιουργία βαλβίδων, του κύριου



καναλιού και των βαλβίδων αποκοπής αντίστοιχα.

Δεδομένης της φύσης του κυκλώματος, έπρεπε αρχικά να διαπιστωθεί η πίεση που χρειάζεται να ασκηθεί προκειμένου να υπάρξει κατάλληλη ροή σε κανάλια της συγκεκριμένης γεωμετρίας. Έχουμε



Ορίζοντας λοιπόν 20 μm ύψος (h) και 40 μm πλάτος (w) και για υδατικά διαλύματα χρησιμοποιούμε τον τύπο υπολογισμού υδραυλικής αντίστασης



$$R_{hyd} = \frac{12nL}{1 - 0.63(h/w)} \frac{1}{h^3w}$$

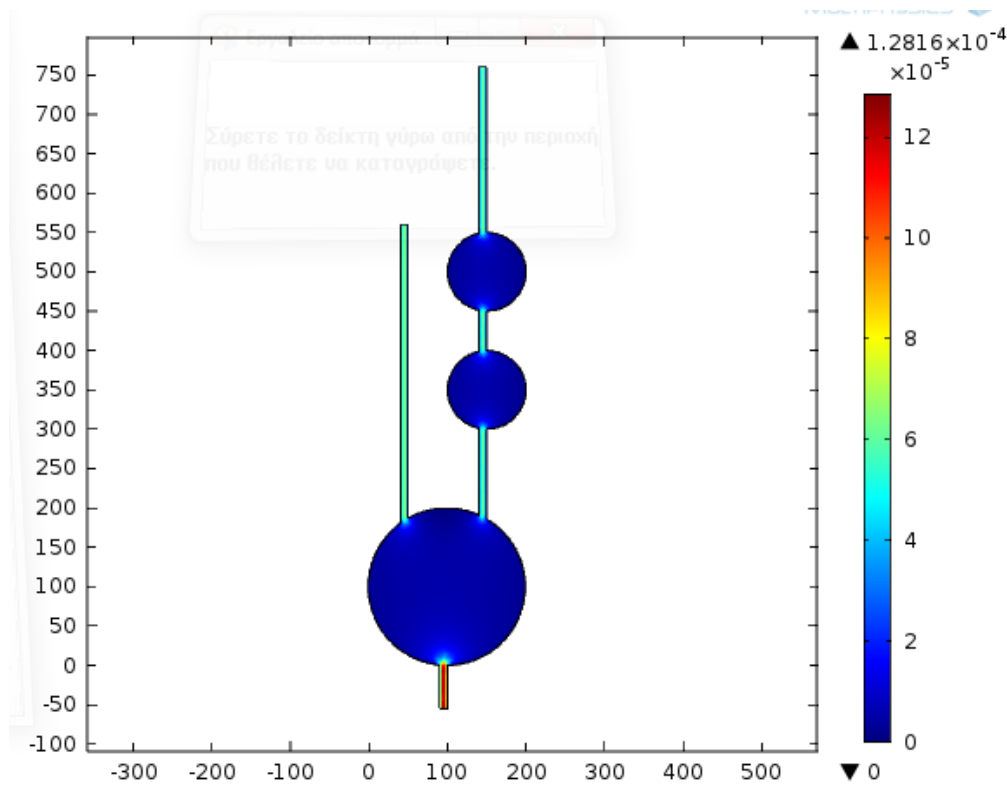
Και υπολογίζουμε $R_{hyd} = 0.704 \cdot 10^{11} \text{ Pas} / \text{m}^3$

Γνωρίζοντας ότι $\Delta P = R_{hyd} \cdot Q$ και ότι το πρωτόκολλο απαιτεί ροές της τάξης των 10-150 $\mu\text{l/s}$ υπολογίζονται ότι οι απαραίτητες πιέσεις για τις συγκεκριμένες παροχές είναι 1-10 μbar .

Βέβαια το κύκλωμα δεν αποτελείται αποκλειστικά από κανάλια συγκεκριμένης γεωμετρίας, αλλά περιλαμβάνει και στοιχεία (όπως υπερυδροφόβες βαλβίδες) που παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη υδραυλική αντίσταση. Επιπλέον οι διαδοχικές αλλαγές γεωμετρίας παρουσιάζουν αύξηση στην υδραυλική αντίσταση. Ως εκ τούτου το εύρος τιμών για τις πιέσεις που πρέπει να ασκηθούν είναι αντιπροσωπευτικό μεν, αλλά για εξακρίβωση των συγκεκριμένων τιμών απαιτούνται πειράματα.

Δεδομένης της φύσης των αντιδρώντων στα chamber, τα οποία θα τοποθετούνται σε στερεή μορφή, για καλύτερη αποθήκευση, και έπειτα θα διαλύονται, είναι σημαντικό τα chamber να αποτελούν χώρους μικρής ταχύτητας (ηρεμίας) προκειμένου να διευκολύνεται η διάλυση χωρίς να υπάρχει μεγάλη απώλεια αντιδρώντων.

Η παρακάτω προσομοίωση αποτελείται από τα 2 ήδη chamber και πίεση 100 μbar , όλες οι γεωμετρίες είναι 20 μm βάθος. Η ροή θεωρήθηκε επιφανειακή (laminar flow) και χρησιμοποιηθεί προσέγγιση ρηχού καναλιού (shallow channel approximation).



Όπως φαίνεται στο εσωτερικό των θαλάμων υπάρχει σχεδόν μηδενική ταχύτητα ροής, πράγμα αναμενόμενο δεδομένου ότι για την γεωμετρία των καναλιών το μέγεθος των θαλάμων είναι αρκετά μεγαλύτερο ώστε να μπορούν να θεωρηθούν περιοχές ηρεμίας. Άρα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι θα υπάρξει κατάλληλη διάλυση των αντιδρώντων.

Όσον αφορά την διάχυση που συμβαίνει γνωρίζουμε ότι

εξίσωση διάχυσης διαλυτής ουσίας σε διαλύτη είναι

$$\partial_t c_\alpha + \mathbf{v} \cdot \nabla c_\alpha = D_\alpha \nabla^2 c_\alpha.$$

Όπου \mathbf{v} : η ταχύτητα του υγρού, c : η συγκέντρωση (αριθμός mole/όγκο), και D ο συντελεστής διάχυσης της διαλυτής ουσίας στον διαλύτη ο οποίος εξαρτάται από την επιφάνεια επαφής των 2.

Χρησιμοποιώντας τυπικές τιμές του συντελεστή διάχυσης από την βιβλιογραφία για βιολογικές ουσίες και διατομή καναλιού 20μm



$D \approx 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, small ions in water,

$D \approx 5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, sugar molecules in water,

$D \approx 4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, 30-base-pair DNA molecules in water,

$D \approx 1 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, 5000-base-pair DNA molecules in water

Και με αρχική συνθήκη μηδενική ταχύτητα ροής η εξίσωση εκφυλίζεται στην

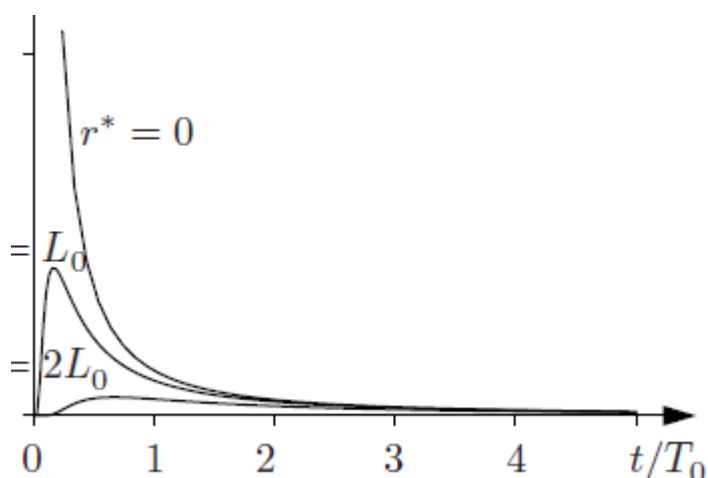
$$\partial_t c = D \nabla^2 c$$

Ορίζουμε 2 σταθερές διάχυσης T , ως το χαρακτηριστικό χρόνο στον οποίο υπάρχει αλλαγή στην συγκέντρωση σε στατικό πρόβλημα, και L μήκος καναλιού στο οποίο υπάρχει αλλαγή στην συγκέντρωση

Εκτελώντας διαστατική ανάλυση στην παραπάνω εξίσωση θεωρώντας σταθερή ταχύτητα μερικών μικρόλυτρων έχουμε

$$L_0 = \sqrt{DT_0}, \quad T_0 = \frac{L_0^2}{D}$$

Οπότε για χρόνους επαφής διαλύτη και διαλυτής ουσίας της τάξης των μερικών δευτερολέπτων και ταχύτητες της τάξης 1-100μl/s εξαιτίας της μικρής επιφάνειας επαφής των 2, η αρχική μονάδα μήκους αλλαγής της συγκέντρωσης ακολουθεί την παρακάτω κατανομή στον χρόνο σε σχέση με το αρχικό μήκος αλλαγής



Ακολουθώντας τις παρακάτω τυπικές τιμές του T_0 από την πειραματική βιβλιογραφία

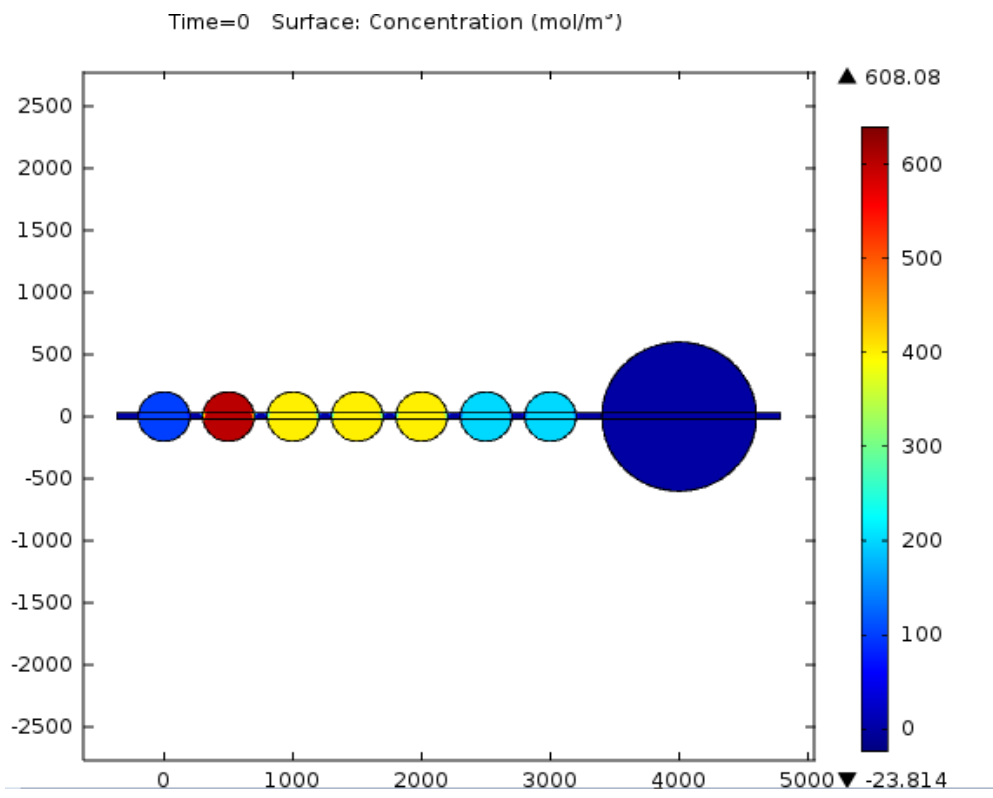
$T_0(100 \mu\text{m}) \approx 5 \text{ s},$	small ions in water,
$T_0(100 \mu\text{m}) \approx 20 \text{ s},$	sugar molecules in water,
$T_0(100 \mu\text{m}) \approx 250 \text{ s} \approx 4 \text{ min},$	30-base-pair DNA molecules in water,
$T_0(100 \mu\text{m}) \approx 10^4 \text{ s} \approx 3 \text{ h},$	5000-base-pair DNA molecules in water.

Για περιορισμένο χρόνο εκτέλεσης του πειράματος το μήκος αλλαγής της συγκέντρωσης είναι υπερπολλαπλάσιο του μήκους ενός καναλιού, άρα είναι ασφαλές να υποθέσουμε λοιπόν ότι στο μήκος ενός καναλιού και για περιορισμένο χρόνο εκτέλεσης του πειράματος, στη συγκεκριμένη εφαρμογή είναι πρακτικά μηδενική η διάχυση που συμβαίνει.

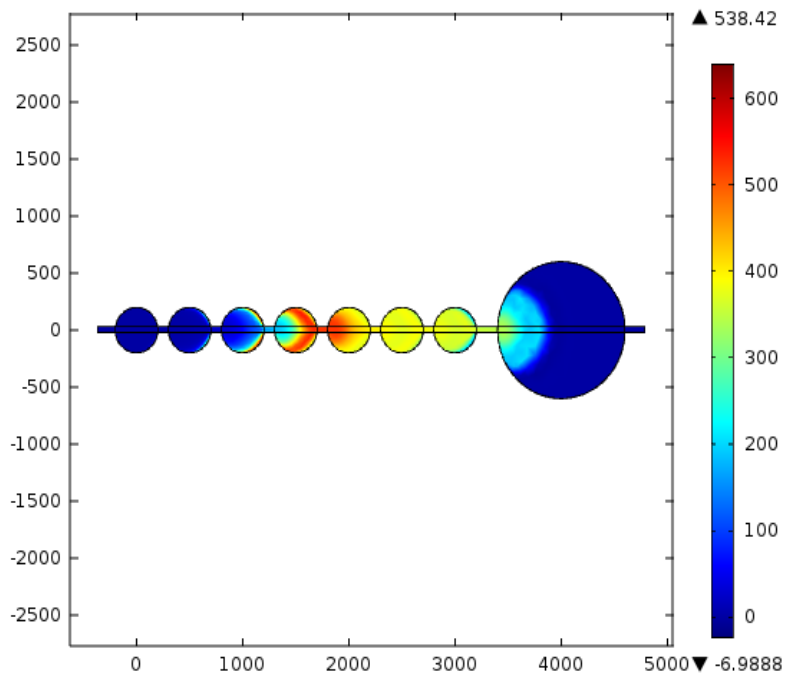
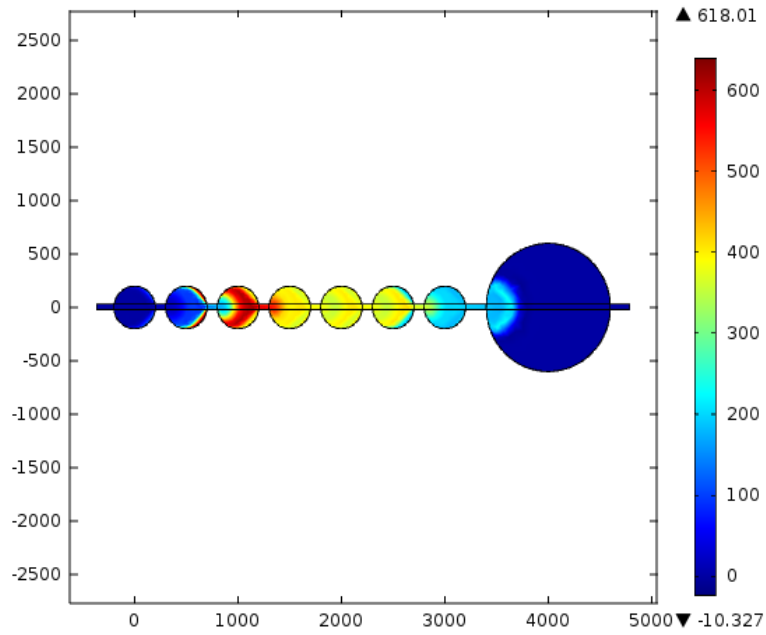
Δεδομένου ότι αν και τα φαινόμενα διάχυσης είναι περιορισμένα στο εσωτερικό των καναλιών που επικρατεί μικροροϊκό περιβάλλον (σύμφωνα με την παραπάνω ανάλυση), στο εσωτερικό των chamber πρέπει να ελεγχθεί αν διαχέεται το υγρό, δηλαδή αν η δραστική ουσία διαλύεται κατά τη διάρκεια της μετακίνησής της μέσα στο κύκλωμα



Στην παρακάτω προσομοίωση εμφανίζονται 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδρώντος, διαλυτού στο υγρό που ρέει στο κύκλωμα, τοποθετημένες σε διαφορετικές αποστάσεις από το chamber στο οποίο καταλήγουν. Η ώθηση των υγρών μέσα στο κύκλωμα γίνεται με διαφορά πίεσης 2mbar εισόδου και εξόδου και το φαινόμενο εξελίσσεται με τον

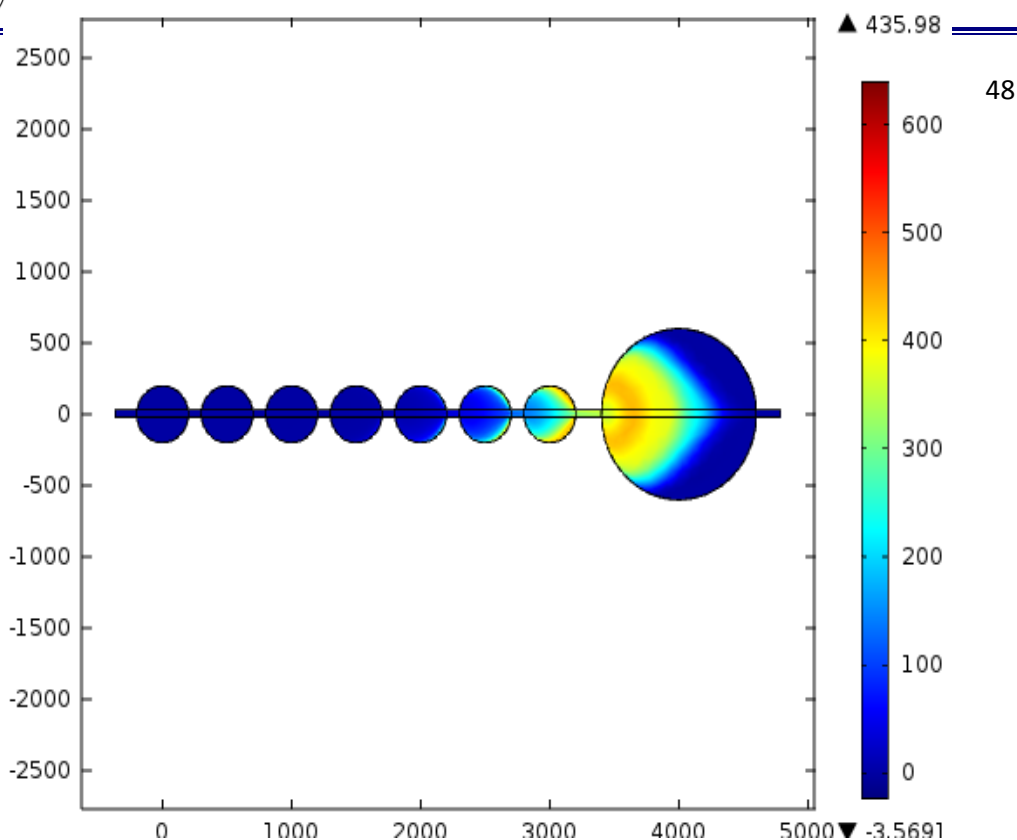


χρόνο





Σχεδιασμός μικροροϊκής πλακέτας εκτέλεσης βιολογικού πρωτοκόλλου ELISA



Όπως φαίνεται από την πρόοδο του φαινομένου υπάρχει έντονη διάχυση στο εσωτερικό των chamber με αποτέλεσμα η ποσότητα του αντιδρώντος που καλείται να περάσει από πάνω από 3 chamber πριν φτάσει στον θάλαμο αντιδράσεων να διαλύεται σχεδόν εξολοκλήρου. Οπότε πρέπει να ενσωματωθεί στον σχεδιασμό της πλακέτας, το γεγονός ότι ένα αντιδρόν δεν πρέπει να περνάει από chamber στην μετακίνησή του από το θάλαμο αποθήκευσής του στο θάλαμο αντιδράσεων.

d. Σχεδίαση στοιχείων ελέγχου μικροροϊκού κυκλώματος

Ως στοιχεία ελέγχου του κυκλώματος ορίζουμε εκείνα τα στοιχεία τα οποία διαχειρίζονται την κατεύθυνση την οποία θα πάρει η ροή στο κύκλωμα.

Όπως αναφέρθηκε και στις προδιαγραφές, σκοπός είναι να χρησιμοποιηθούν όσο το δυνατόν λιγότερα ενεργητικά στοιχεία ελέγχου (δηλαδή που να απαιτούν κάποια μηχανική κίνηση). Έτσι η χρήση μηχανικών μικροβαλβίδων είναι απαγορευτική. Ως εκ τούτου



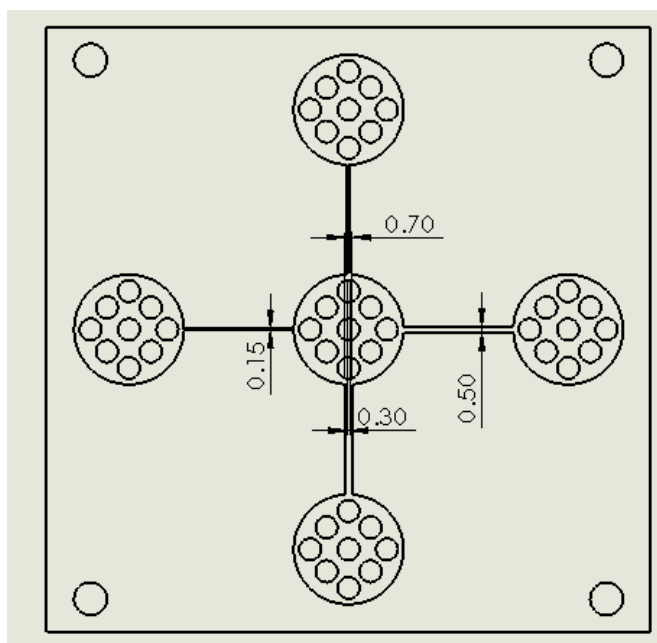
χρησιμοποιήθηκαν παθητικά στοιχεία. Συγκεκριμένα παθητικές βαλβίδες αποκοπής και παρεμπόδισης της ροής, οι οποίες ενεργοποιούνται με όσο το δυνατόν λιγότερη εξωτερική παρέμβαση.

Συγκεκριμένα στις βαλβίδες παρεμπόδισης της ροής χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία των υπερυδροφобων βαλβίδων, η οποία έχει προηγουμένως περιγραφεί. Προκειμένου να εξακριβωθεί η ακριβής λειτουργία των βαλβίδων σχεδιάστηκαν τα παρακάτω πειράματα.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1.

Στόχος αυτού του πειράματος είναι να ελέγξει κατά πόσο επηρεάζει η διατομή του καναλιού την λειτουργία της βαλβίδας. Σύμφωνα με την προαναφερθείσα θεωρία, η μείωση της διατομής πρέπει να οδηγεί και σε αύξηση της απαιτούμενης πίεσης που χρειάζεται για να ανοίξει η βαλβίδα και να επιτρέψει τη διέλευση της ροής.

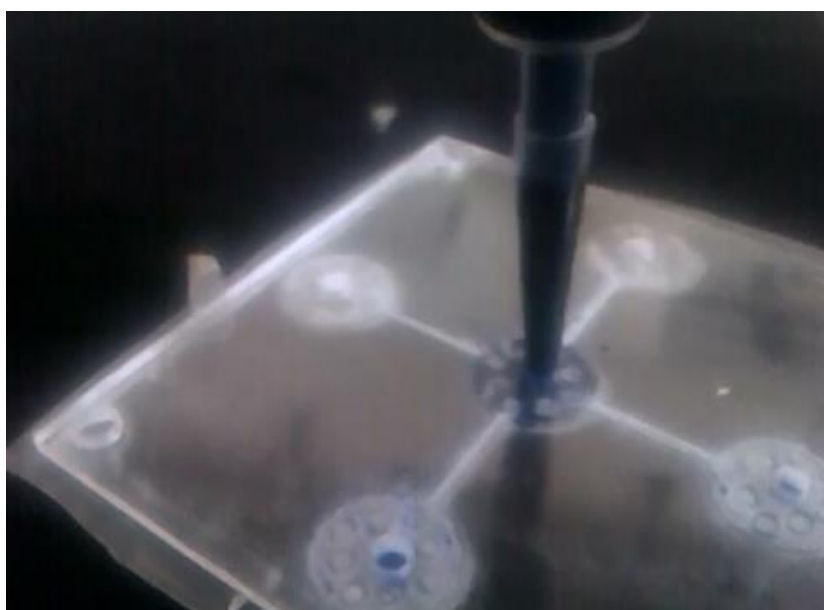
Το παρακάτω κύκλωμα χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραμάτων





Διαδοχικά αυξανόμενη πίεση ασκείται στο κεντρικό chamber και οπές διαφυγής τοποθετούνται στα τέσσερα περιμετρικά chamber. Τα κανάλια αποτελούν υπερυδροφικές βαλβίδες διαφορετικού πλάτους.

Παρακάτω παρουσιάζονται διαδοχικά στιγμιότυπα από τη μαγνητοσκόπηση του πειράματος.



Εικόνα 1 υγρό δεν διαρρέει καμία βαλβίδα (2mbar)



Εικόνα 2 υγρό διαρρέει την βαλβίδα διατομής 50μm (13mbar)



Εικόνα 3 υγρό διαρρέει και τη βαλβίδα διατομής 50 μ m (15mbar)



Εικόνα 4 υγρό διαρρέει όλες της βαλβίδες (20mbar)

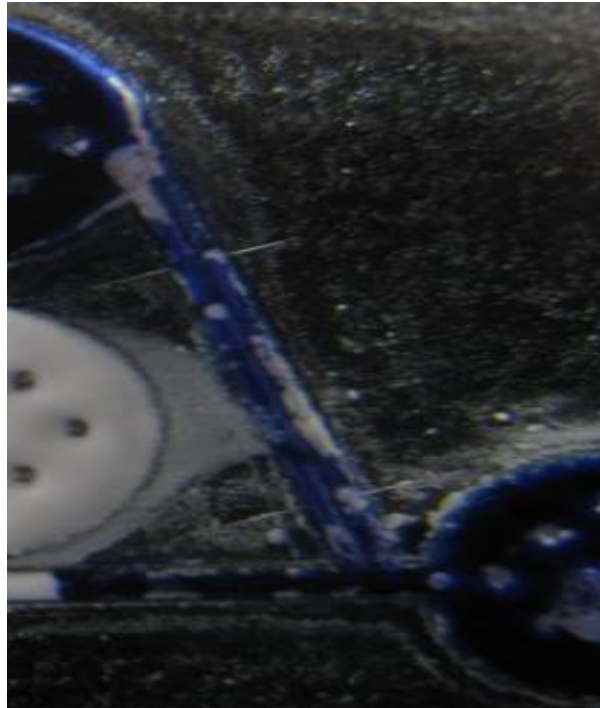
Αν και παρουσιάστηκε διαφοροποίηση στην πίεση στην οποία ανοίγουν οι βαλβίδες παρεμπόδισης της ροής, η μέθοδος δημιουργίας των βαλβίδων δεν δίνει συνεπή αποτελέσματα κάθε φορά, όπως και στο συγκεκριμένο



πείραμα πολλές φορές βαλβίδες να ανοίγουν σε μικρότερη πίεση από ότι θα έπρεπε. Άρα με το συγκεκριμένο τρόπο δημιουργίας υπερυδροφόβων βαλβίδων δεν μπορεί να υπάρξει αξιόπιστη διαχείριση των ρευστών στο κύκλωμα

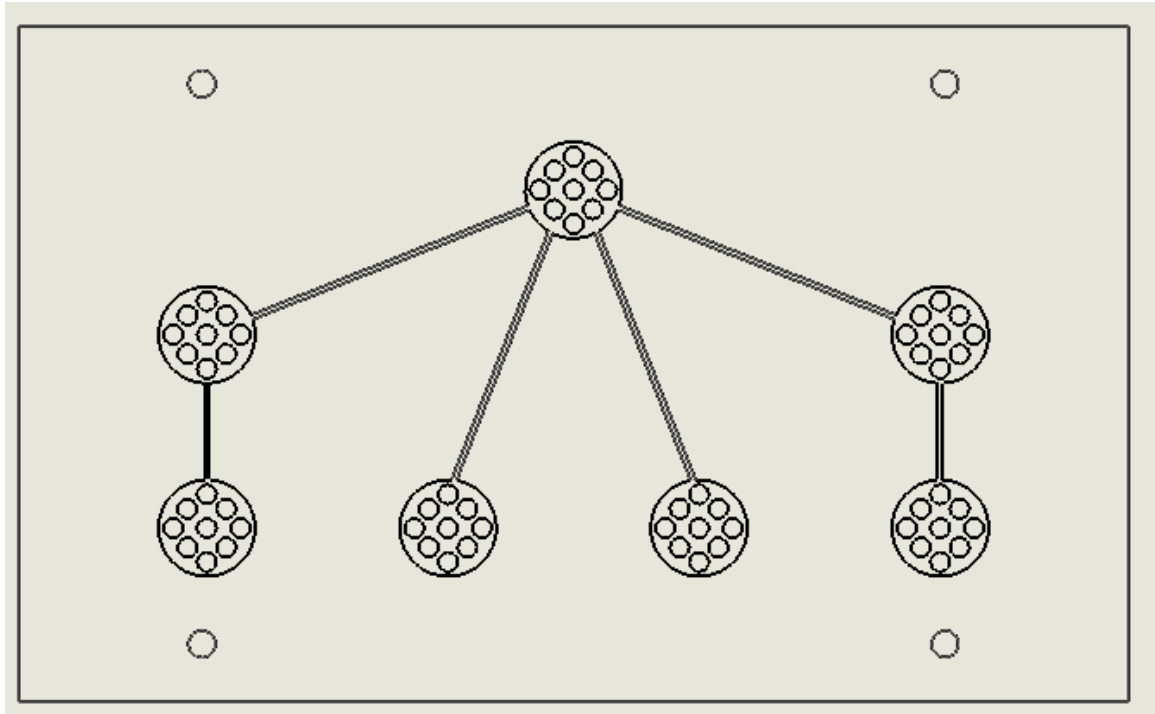
ΠΕΙΡΑΜΑ 2

Σκοπός του παρακάτω πειράματος είναι να μελετηθεί, το κατά πόσο το μήκος της υδροφόβης επιφάνειας επηρεάζει την πίεση στην οποία ανοίγει. Αν και σύμφωνα με την θεωρία των υδροφόβων βαλβίδων, η πίεση κατάρρευση δεν επηρεάζεται από το μήκος της βαλβίδας, εξαιτίας της μεθόδου δημιουργίας τους πολλές φορές δεν γίνεται όλη η επιφάνεια του καναλιού υδροφόβη αλλά δημιουργούνται υδροφόβα τμήματα. Γεγονός που καθιστά το μήκος εφαρμογής πιθανό παράγοντα στην πίεση κατάρρευσης της βαλβίδας

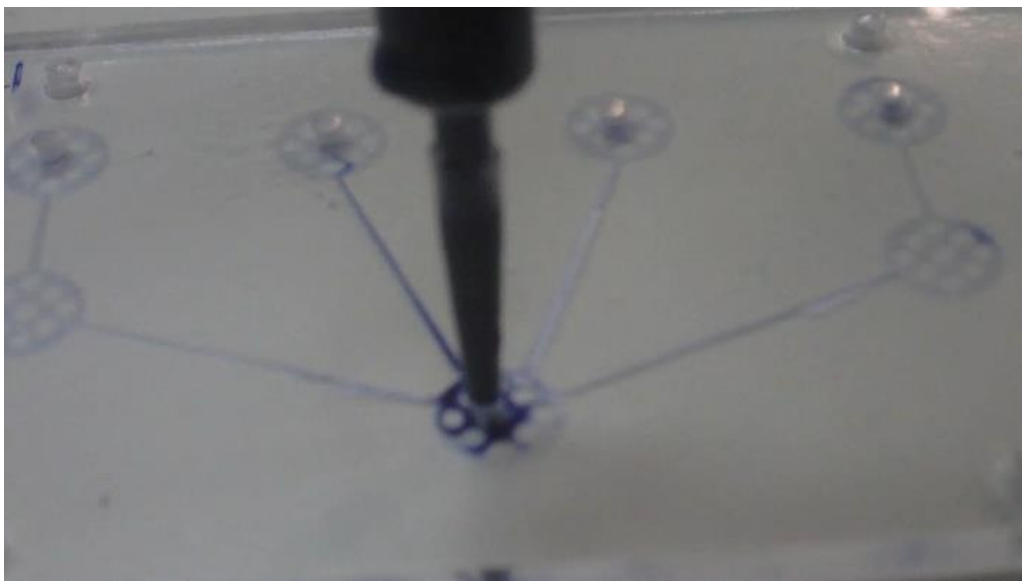


Εικόνα 5 βαλβίδα με υδρόφοβες περιοχές

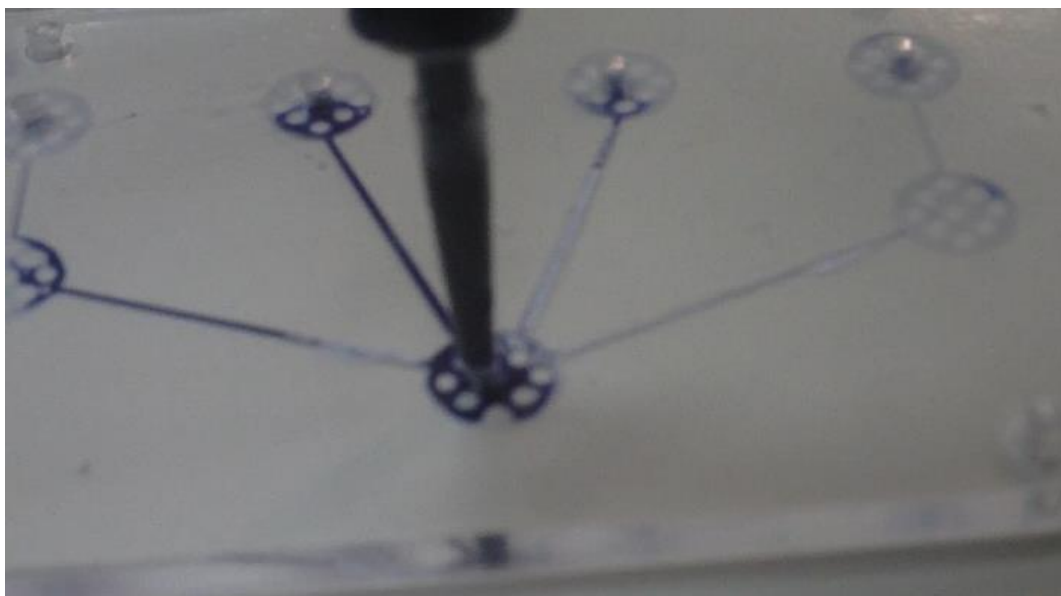
Χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διάταξη για την διεξαγωγή των πειραμάτων, σε κάθε κανάλι ίσης διατομής, γινόταν η δημιουργία υπερυδρόφοβης βαλβίδας διαφορετικού μήκους. Διαδοχικά αυξανόμενη πίεση ασκείται στο κεντρικό chamber και οπές διαφυγής τοποθετούνται στα τέσσερα περιμετρικά chamber.



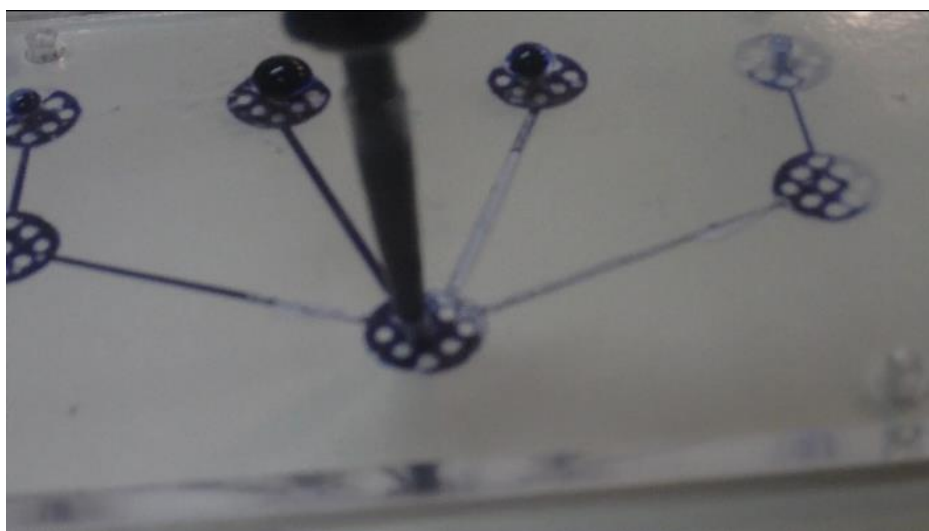
Παρακάτω ακολουθούν στιγμιότυπα από την βιντεοσκόπηση του πειράματος.



Εικόνα 6 υγρό διαρρέει μόνο το κανάλι χωρίς βαλβίδα (2mbar)



Εικόνα 7 υγρό διαρρέει και τα κανάλια με βαλβίδες στο 1/4 και 1/2 του μήκους (25mbar)



Εικόνα 8 υγρό διαρρέει και το κανάλι με βαλβίδα σε όλο το μήκος του (30mbar)

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, εμφανίζεται διαφοροποίηση ανάλογα με το μήκος της υπερυδροφоба βαλβίδας, η οποία οφείλεται στον τρόπο δημιουργίας τους όπως προαναφέρθηκε. Όπως και πριν τα



αποτελέσματα δεν επιδεικνυαν συνέπεια στις πιέσεις στις οποίες ανοίγουν οι βαλβίδες με πολλές φορές να ανοίγουν βαλβίδες διαφορετικού μήκους στην ίδια πίεση.

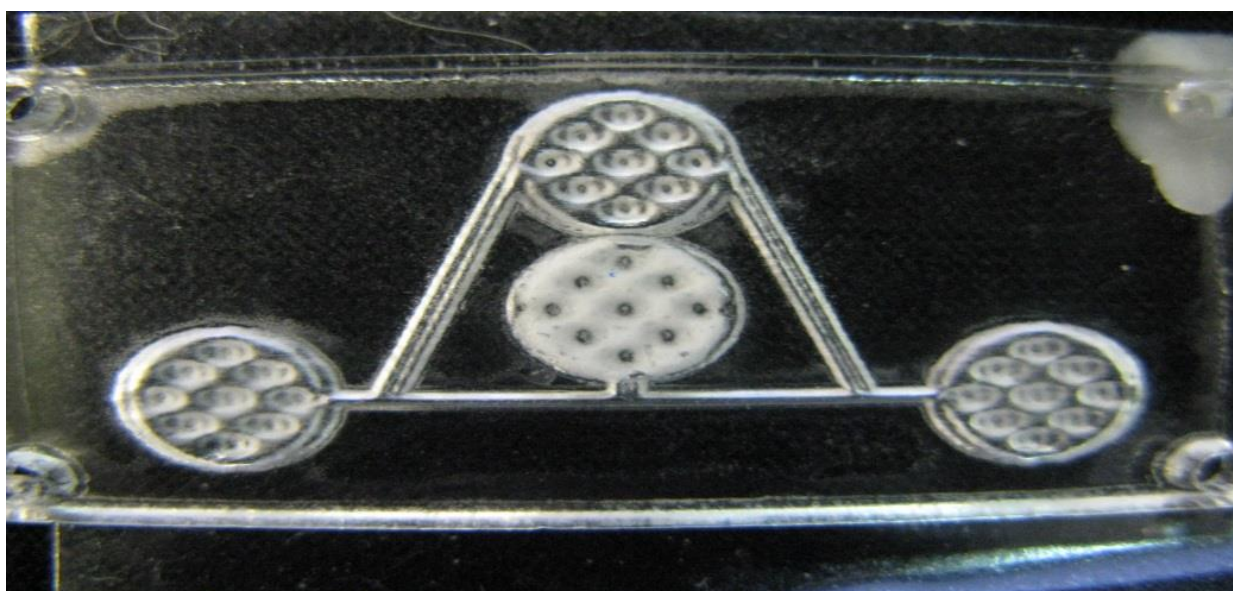
Τα 2 παραπάνω πειράματα έδειξαν ότι αν και δεν γίνεται με αξιόπιστο τρόπο να υπάρξει πλήρης έλεγχος μόνο με βαλβίδες παρεμπόδισης της ροής, εξ αιτίας ασυνέπειας στον τρόπο δημιουργίας τους. Φάνηκε ότι υπάρχει εμφανής διαφορά στην πίεση που χρειάζεται για να διατρέξει υγρό ένα κανάλι με υδρόφοβη επιφάνεια από ότι ένα χωρίς καθόλου υπερυδρόφοβη επεξεργασία. Έτσι γίνεται φανερή η ανάγκη δημιουργία παθητικών βαλβίδων αποκοπής της ροής σαν συμπληρωματικό στοιχείο ελέγχου στις υδρόφοβες βαλβίδες.

Οι παθητικές βαλβίδες αποκοπής είναι βαλβίδες οι οποίες όταν ενεργοποιηθούν ανακόπτουν την ροή σε ένα συγκεκριμένο κομμάτι του κυκλώματος με μη αναστρέψιμο τρόπο.

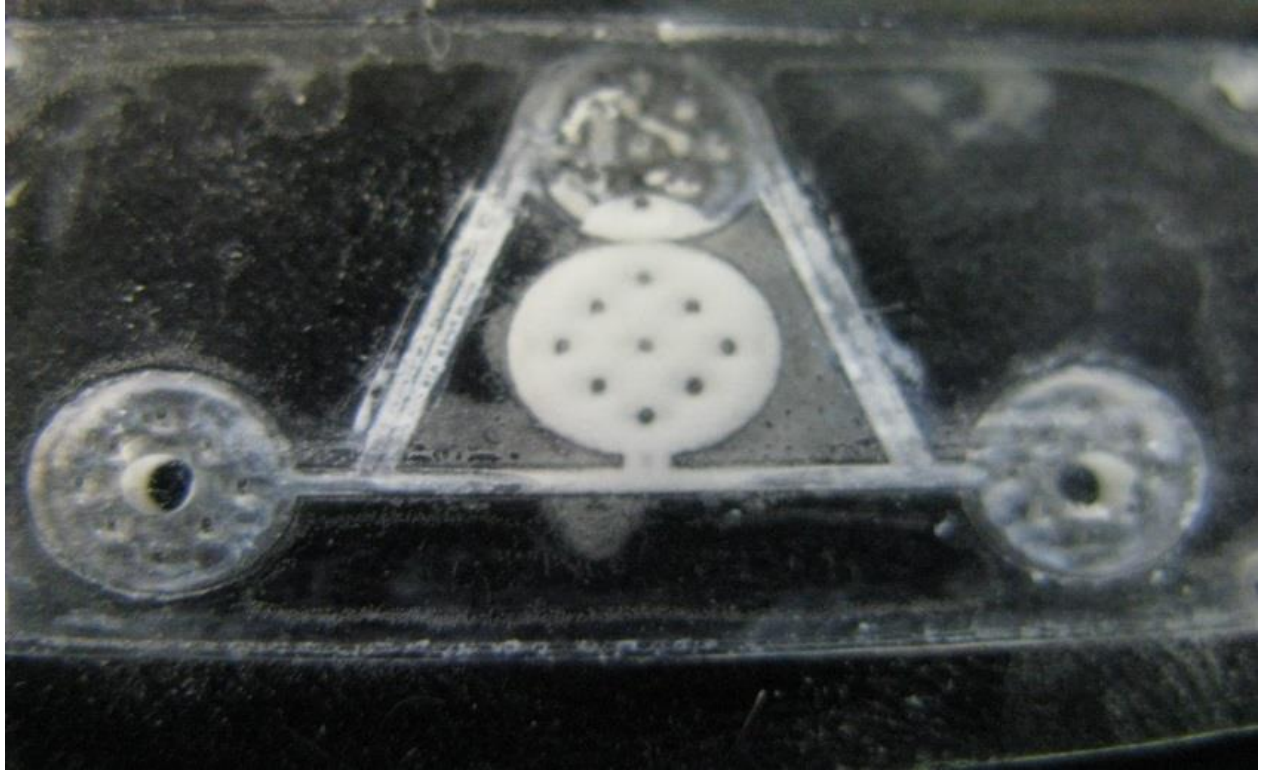
Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, υιοθετήθηκε το παρακάτω σχέδιο, στο οποίο ισχύουν τα εξής: Στο κεντρικό θάλαμο υπάρχει μια ουσία η οποία βρίσκεται σε υγρή μορφή και έχει την ιδιότητα να στερεοποιείται όταν εκτεθεί σε υπεριώδες φως. Η δευτερεύουσα ιδιότητά της είναι ότι με μικρή άνοδο της θερμοκρασίας της μεγαλώνει πολύ ο όγκος της έτσι μπορεί να λειτουργήσει σαν βαλβίδα αποκοπής της ροής. Παρακάτω φαίνονται τα διαφορετικά στάδια λειτουργία της βαλβίδας.



Εικόνα 9 η βαλβίδα αποκοπής σε θερμοκρασία δωματίου



Εικόνα 10 η βαλβίδα αποκοπής σε θερμοκρασία 60C



Εικόνα 11 η βαλβίδα αποκοπής μετά απο έκθεση σε UV

Όπως φαίνεται στη παρακάτω εικόνα, το υλικό από το κεντρικό θάλαμο έχει διασταλεί μετά την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία και καταλαμβάνει πλέον χώρο και στο κεντρικό κανάλι, αποτελώντας στερεό φράγμα στην ροή του ρευστού από το αριστερό chamber στο δεξί,

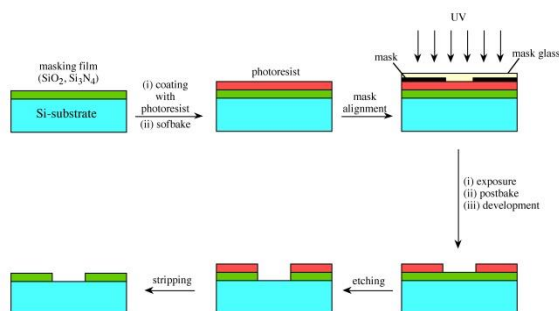


5. Μέθοδος Κατασκευής

α. Αποτύπωση του μικροροϊκού κυκλώματος

Για την ακριβή αποτύπωση όλων των δομών του μικροροϊκού κυκλώματος υπάρχει μια πληθώρα μεθόδων.

Η συνηθέστερη είναι η λιθογραφία. Με την χρήση κατάλληλου μήκους κύματος ορισμένες ουσίες έχουν την δυνατότητα να πολυμερίζονται και



έτσι να είναι δυνατόν να απεικονίσουν δομές μέσα από διάφορα στάδια έκθεσης και χημικής προσβολής. Αν και αποτελεί την πιο διαδομένη μέθοδο δημιουργίας μικροδομών απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και αναλώσιμα. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής χρησιμοποιήθηκε περιορισμένα εξαιτίας αυτών των δυσκολιών.

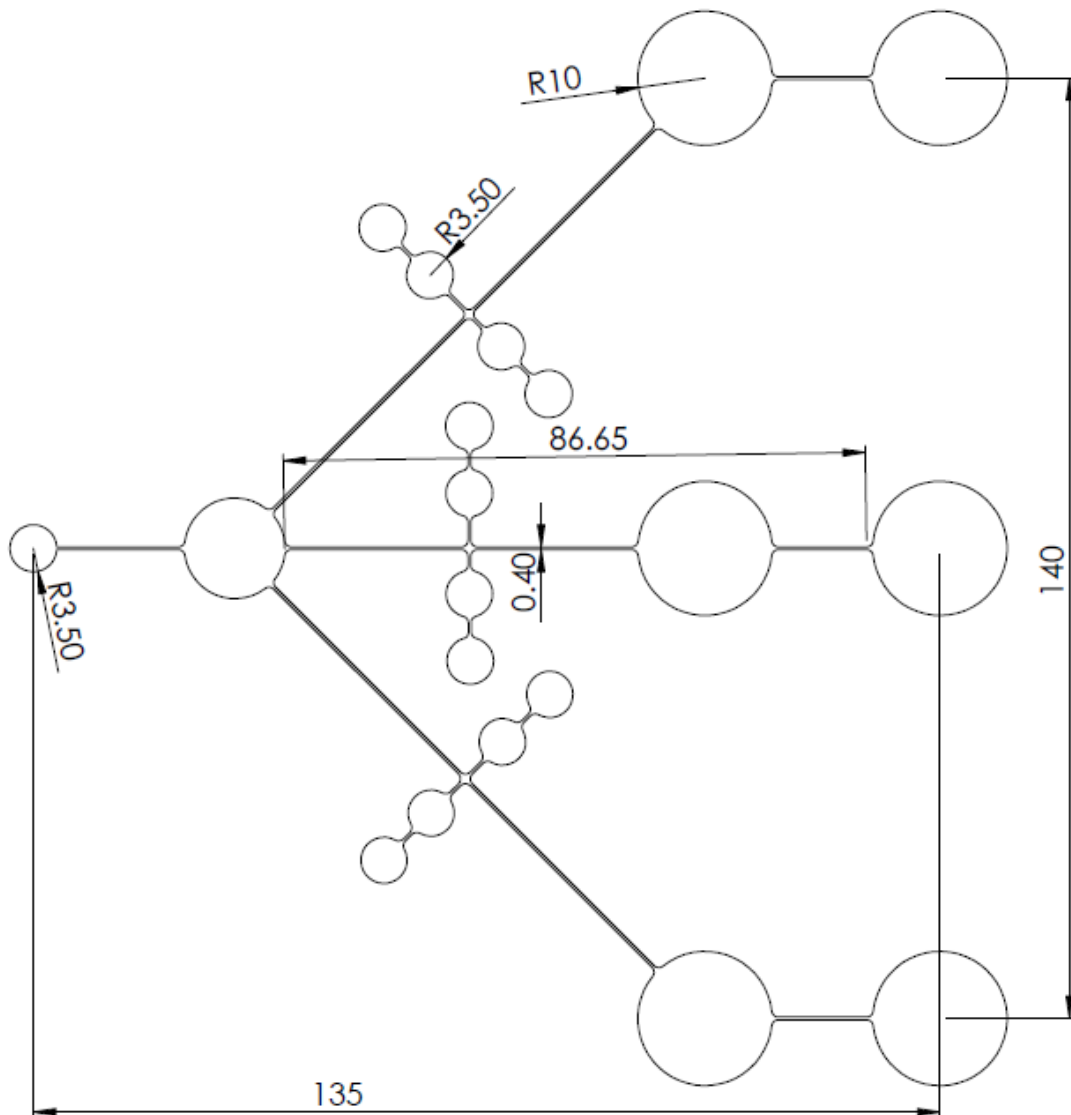
Οι πιο προσιτές και διαθέσιμες μέθοδοι αποτύπωσης που ήταν διαθέσιμες ήταν η αποτύπωση μέσω εγχάραξης με Laser και η αποτύπωση με την χρήση αρνητικού καλουπιού. Μέσω πειραμάτων διαπιστώθηκε ποια από τις 2 παρήγαγε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η αποτύπωση με την χρήση αρνητικής γεωμετρίας γίνεται με την εξής διαδικασία. Αρχικά τοποθετείται το πλακίδιο πλεξιγκλάς πάνω σε μία μήτρα με την αρνητική γεωμετρία. Έπειτα αυτό θερμαίνεται έως ότου φτάσει την θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του υλικού, στην οποία αυτό παρουσιάζει έντονη ευκολία για πλαστική παραμόρφωση. Τέλος με την άσκηση πίεσης στην πλάκα του πλεξιγκλάς γίνεται η αποτύπωση των δομών. Είναι προφανές ότι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχημένη



εξαγωγή της διαδικασίας είναι η θερμοκρασία και η πίεση κάτω από την οποία θα εκτελεστεί η διαδικασία καθώς και ο χρόνος παραμονής της πλάκας υπό πίεσης και ο χρόνος απόψυξης . Προς εύρεση αυτών εκτελέστηκε το παρακάτω πείραμα

Το συγκεκριμένο σχέδιο κυκλώματος περιλαμβάνει τις συνήθεις δομές που χρειάζονται. Δηλαδή κανάλια και θαλάμους αντιδράσεων (chambers) διαφόρων μεγεθών και σε διάφορες αποστάσεις μεταξύ τους προκειμένου να μελετηθεί το πώς μπορούν να αποτυπωθούν με επιτυχία





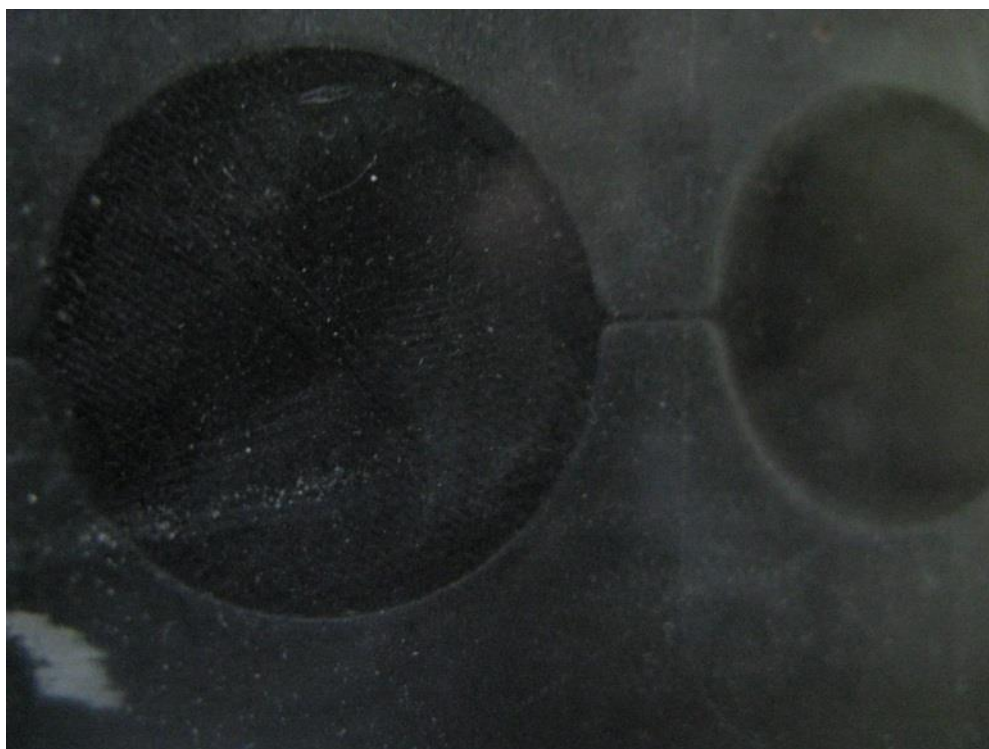
Με την δημιουργία της αντίστοιχης μήτρας εκτελέστηκε το παρακάτω πείραμα για τον προσδιορισμό των κατάλληλων παραμέτρων (θερμοκρασία πίεση και χρόνου)

Πείραμα 1. Επίδραση της θερμοκρασίας παραμονής υπό πίεση στην αποτύπωση

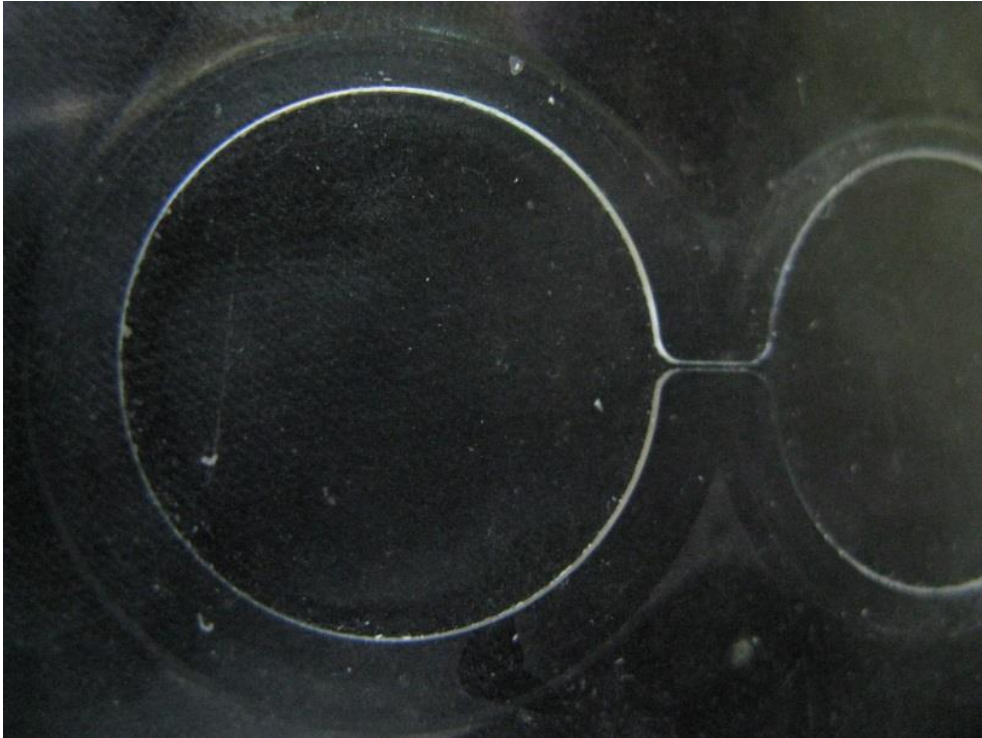
Θερμοκρασία παραμονής (β.С)	Θερμοκρασία εξαγωγής (β.С)	χρόνος παραμονής (min)	ρύθμιση πίεσης
100	80	60	low
140	80	60	low
170	80	60	low
180	80	60	low



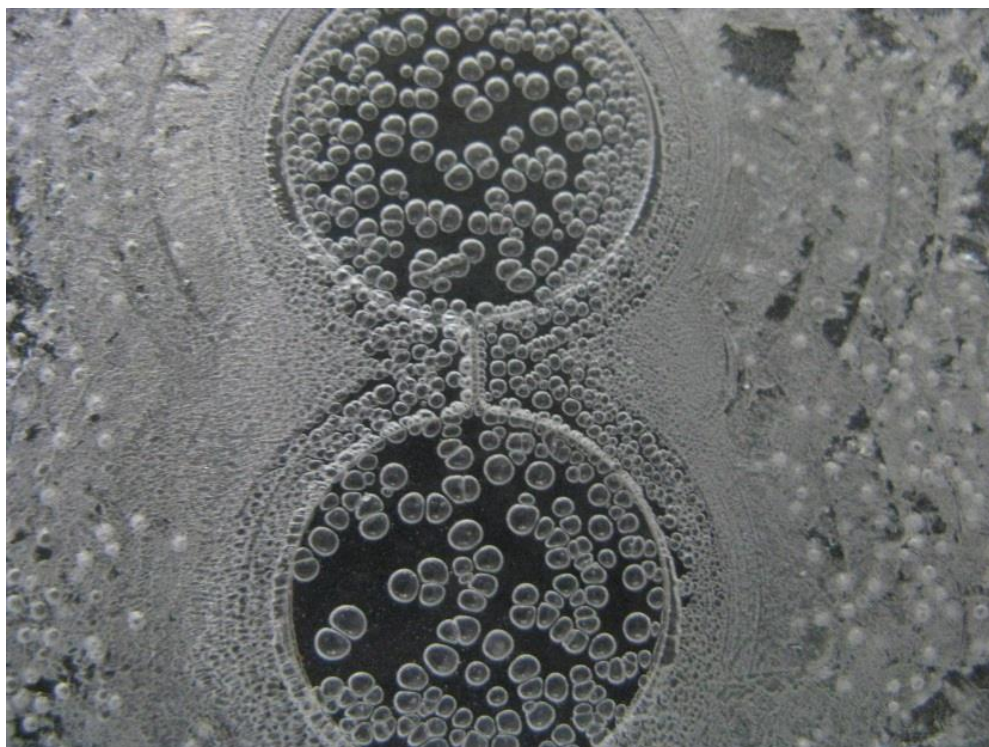
Εικόνα 12 αποτύπωση δομών σε 100C



Εικόνα 13 Αποτύπωση δομών σε 170C



Εικόνα 14 αποτύπωση δομών σε 140C



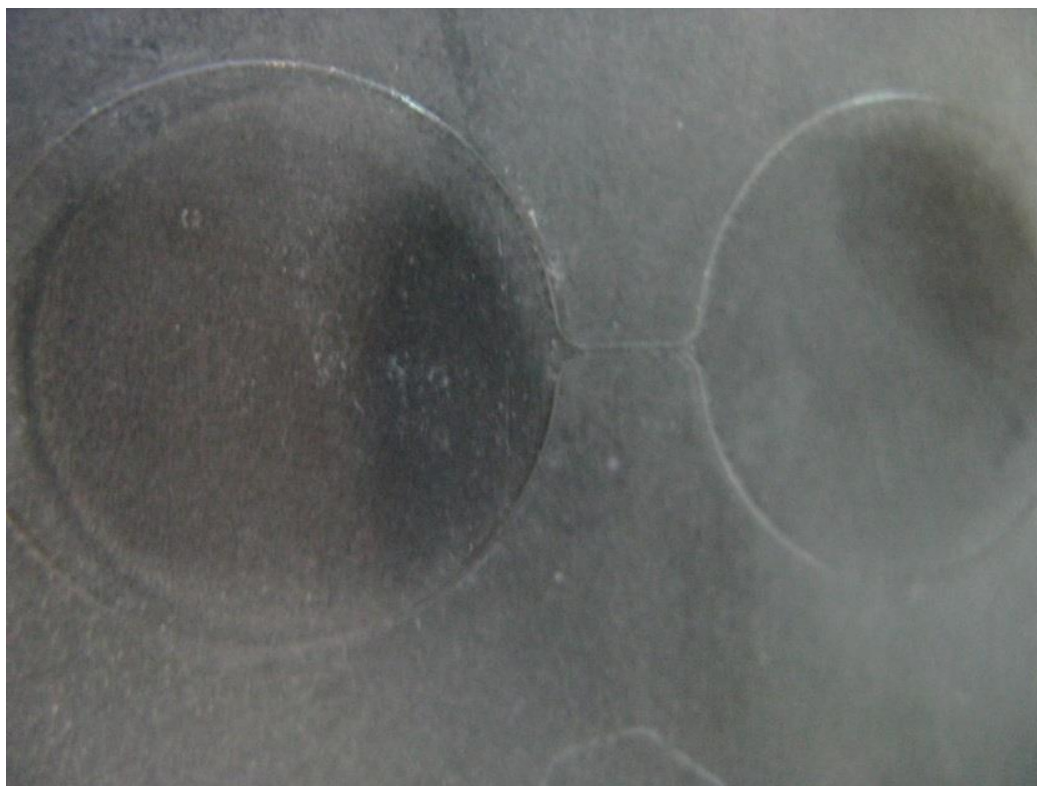
Εικόνα 15 Αποτύπωση δομών σε 180C

Αποτέλεσμα: Όλες οι πλακέτες παρουσίαζαν μεγάλη καμπυλότητα και περιορισμένη αποτύπωση δομών. Η πλακέτα της θερμοκρασίας 140 παρουσίαζε την καλύτερη αποτύπωση, με αυτές που βρίσκονταν σε μικρότερη θερμοκρασία να μην παρουσιάζουν αποτύπωση και αυτές με μεγαλύτερη να παρουσιάζουν διαρροή των δομών λόγω λιωσίματος

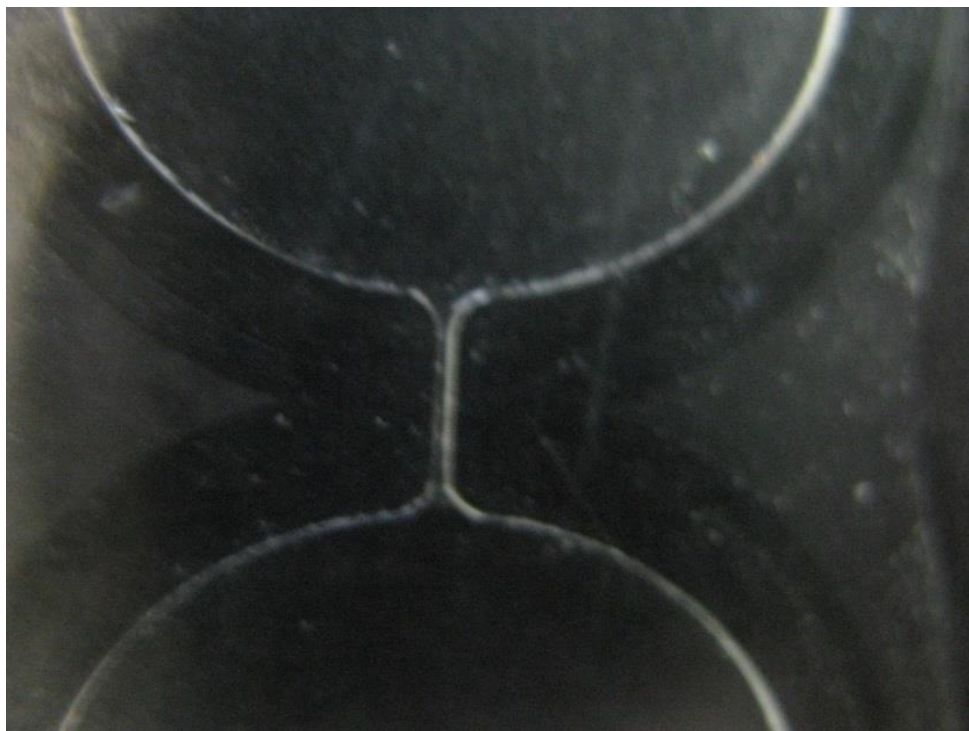
Ερμηνεία: η κατάλληλη θερμοκρασία αποτύπωσης είναι 140 βαθμοί C και απαιτείται αλλαγή στις υπόλοιπες παραμέτρους

Πείραμα 2. Επίδραση του επιπέδου πίεσης στην αποτύπωση

Θερμοκρασια παραμονής (β. C)	Θερμοκρασια εξαγωγής (β. C)	χρόνος παραμονής (min)	ρύθμιση πίεσης
138	80	60	low
138	80	60	Medium
138	80	60	high



Εικόνα 16 αποτύπωση δομών σε λειτουργία χαμηλής πίεσης



Εικόνα 17 αποτύπωση δομών σε λειτουργία μέτριας πίεσης



Εικόνα 18 αποτύπωση δομών σε λειτουργία υψηλής πίεσης

Αποτέλεσμα : Η πλακέτα που παρουσίαζε πλήρη αποτύπωση δομών ήταν εκείνη που βρισκόταν σε υψηλή πίεση, αλλά όλες παρουσίαζανε μεγάλη καμπυλότητα.

Ερμηνεία : Απαιτείται λειτουργία υψηλής πίεσης για την ορθή αποτύπωση δομών αλλά πρέπει να ρυθμιστεί η θερμοκρασία εξαγωγής και ο χρόνος παραμονής ώστε να αποφεύγεται η καμπύλωση της πλακέτας κατά την απόψυξη



Πείραμα 3 . Επίδραση του χρόνου παραμονής στην αποτύπωση

Θερμοκρασία παραμονής (β.ο)	Θερμοκρασία εξαγωγής (β.ο)	χρόνος παραμονής (min)	ρύθμιση πίεσης
140	80	60	high
140	80	70	high
140	80	80	high
140	80	90	high
140	80	120	high

Αποτέλεσμα : Η ακρίβεια στις αποτυπωμένες δομές επιτυγχάνεται στα 70 λεπτά παραμονής υπό πίεση, τα υπόλοιπα με περισσότερο χρόνο παραμονής δεν παρουσιάζουν βελτίωση στην αποτύπωση των δομών. Όλα βέβαια παρουσιάζουν μεγάλη καμπυλότητα

Ερμηνεία: μετά από τα 70 λεπτά παραμονής υπό πίεση δεν φαίνεται ο επιπλέον χρόνος να επηρεάζει το αποτέλεσμα.

Πείραμα 4. Επίδραση της θερμοκρασίας εξαγωγής στην αποτύπωση

Θερμοκρασία παραμονής (β.ο)	Θερμοκρασία εξαγωγής (β.ο)	χρόνος παραμονής (min)	ρύθμιση πίεσης
138	80	70	high
138	70	70	high
138	60	70	high
138	50	70	high
138	Περιβάλλοντος	70	high

Αποτέλεσμα. Όλες οι πλακέτες έχουν μεγάλη καμπυλότητα. Εκτός από εκείνη η οποία ψύχθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ερμηνεία: Η απόψυξη υπό πίεση φαίνεται να εμποδίζει το σχηματισμό καμπύλωσης.



Από τα προηγούμενα πειράματα διαπιστώθηκε ότι οι καταλληλότερες συνθήκες για την αποτύπωση όλων των δομών πάνω στο πλακίδιο πλεξιγκλάς είναι: 138 °C θερμοκρασία παραμονής, 25 °C θερμοκρασία εξαγωγής, 70 min χρόνος παραμονής και υπό υψηλή πίεση.

Παρότι παρουσιάζεται αρκετά καλή αποτύπωση των δομών η μέθοδος



του imprinting είναι αρκετά χρονοβόρα και δεν ενδείκνυται για την κατασκευή πολλών πλακιδίων χειροκίνητα. Ως εκ τούτου μελετήθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως συμπληρωματική μέθοδος η εγχάραξη με laser (laser engraving). Η οποία ενδείκνυται, λόγω του μικρού χρόνου ολοκλήρωσης της διαδικασίας, της δυνατότητας παραγωγής πολλαπλών πλακιδίων ταυτόχρονα και την δυνατότητα δοκιμής πολλών σχεδίων χωρίς την παραγωγή ξεχωριστής μήτρας για το καθένα.

Ως laser engraver χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο VLS3.50 της εταιρείας Universal Laser Systems το οποίο επιτρέπει επιλογή του βάθους κοπής από 20 έως 40μm και παρουσιάζει διαστασιακή ακρίβεια 15μm. Παρακάτω παρουσιάζεται μια αποτύπωση με χρήση της μεθόδου laser engraving



Εικόνα 19 δομή από εγχάραξη με laser

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, αν και υπάρχει ακρίβεια 15 μm στην δημιουργία των δομών, εξ αιτίας του μηχανισμού κοπής υπάρχει απώλεια στην ακρίβεια στον οριζόντιο άξονα, για την παρούσα εφαρμογή βέβαια η μειωμένη ακρίβεια δεν επηρέασε την επιτυχή εκτέλεση του πρωτοκόλλου.

β. Σφράγιση μικροροϊκού κυκλώματος

Η αποτύπωση των δομών γίνεται σε ένα πλακίδιο πλεξιγκλάς προκειμένου οι αποτυπωμένες δομές να αποτελέσουν κλειστό κύκλωμα



πλακέτα χωρίς
επιφάνεια σφράγισης



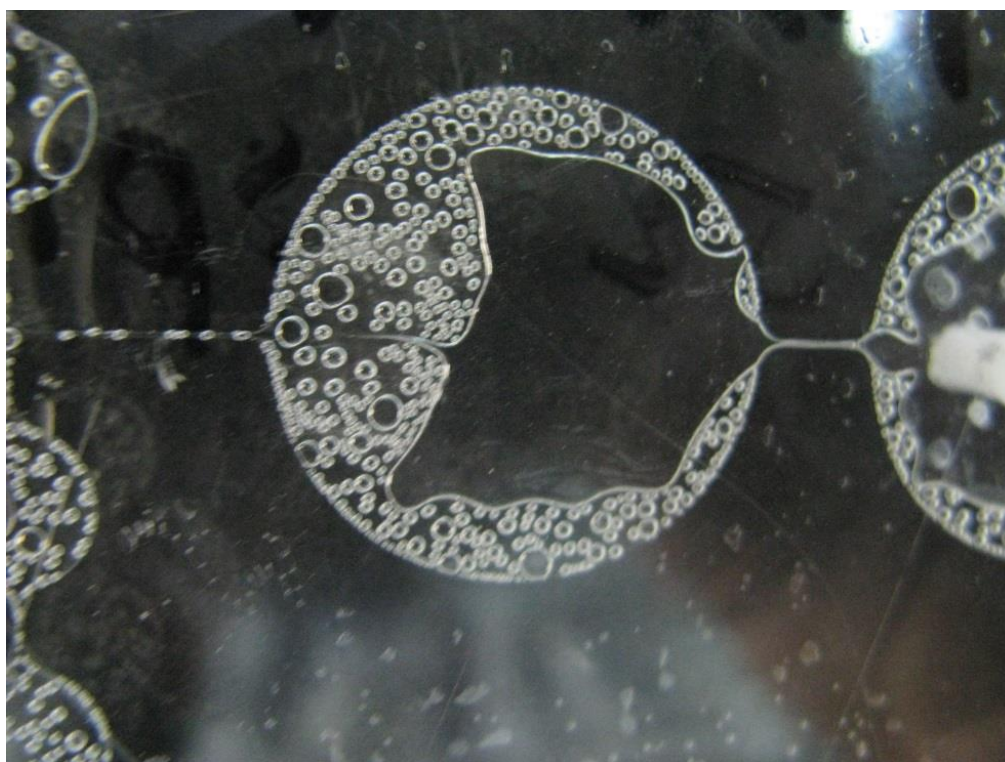
πλακέρα με επιφάνεια
σφράγισης



πρέπει να σφραγιστεί η επιφάνεια του κυκλώματος

Δεδομένου ότι τα πλακίδια αποτελούνται από πλεξιγκλάς. Αρχικά μελετήθηκε η δυνατότητα σφράγισης μέσω υαλώδους μετάπτωσης της επιφάνειας σφράγισης (glass transition). Σε θερμοκρασία περίπου 170C το πλεξιγκλάς χωρίς να λιώνει γίνεται εύπλαστο και αποκτά ελαστική επιφάνεια. Εξ αιτίας αυτής της επιφανειακής ιδιότητας εμφανίζει την δυνατότητα μερικής ελαστικής παραμόρφωσης όταν πιεστεί πάνω σε μία επιφάνεια. Όταν η θερμοκρασία επανέλθει οι 2 επιφάνειες μένουν κολλημένες. Ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία για σφράγιση μικροροϊκών κυκλωμάτων που έχουν αποτυπωθεί σε πλεξιγκλάς.

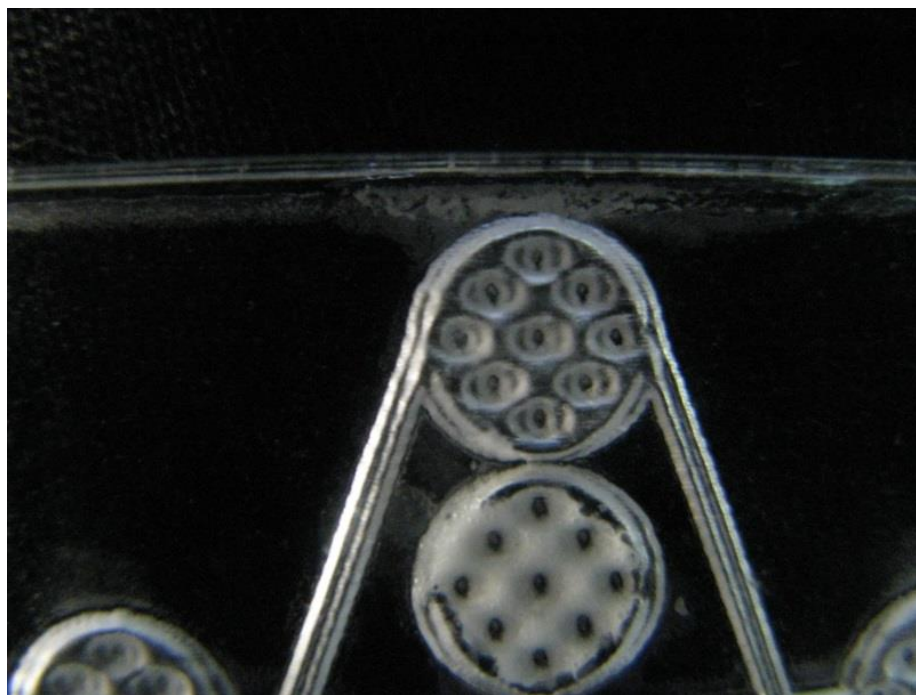
Αρχικά εξαιτίας της ελαστικής παραμόρφωσης της πλάκας που χρησιμοποιείται για σφράγιση, τα chamber του κυκλώματος παρουσιάζουν κατάρρευση, καθώς υλικό από την πλάκα σφράγισης εισχωρεί στο εσωτερικό των μεγάλων δομών.



Εικόνα 20 chamber που έχει υποστεί μερική κατάρρευση



Εξ αιτίας αυτού, προσαρμόστηκε ο σχεδιασμός των θαλαμίσκων του κυκλώματος στο να περιλαμβάνει και υποστηρίγματα (pillars) προκειμένου να εμποδίζεται η κατάρρευση του chamber.



Εικόνα 21 chamber με υποστηρίγματα

Το παρακάτω πείραμα εκτελέστηκε για τον προσδιορισμό της κατάλληλης πίεσης, και της ώρας που πρέπει να ασκείται αυτή προκειμένου να επιτευχθεί σφράγιση. Η θερμοκρασία είναι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του πλεξιγκλάς 170C.

#chip	Χρόνος	Πίεση
10.1	15	High
10.2	30	High
10.3	45	High
10.4	60	High
10.5	15	Low
10.6	30	Low
10.7	45	Low
10.8	60	Low



Όλες η παραπάνω δοκιμές οδήγησαν σε μερικώς επιτυχημένη σφράγιση με τμήματα του κυκλώματος να είναι επιτυχώς σφραγισμένα και άλλα πολύ ασθενώς. Η καμπυλότητα που παρουσιάζει η πλακέτα του πλεξιγκλάς απαγορεύει την επιτυχή σφράγιση εκτεταμένων μικροροϊκών κυκλωμάτων.



Εικόνα 22 επιτυχής σφράγιση αριστερά, ασθενής δεξιά , στο ίδιο κύκλωμα

Ως εκ τούτου μελετήθηκε και η ψυχρή σφράγιση του κυκλώματος με χρήση μεμβράνης. Χρησιμοποιήθηκε βιοσυμβατή υδρόφοβη μεμβράνη, με κολλητική ουσία η οποία εφαρμόζει στην επιφάνεια του κυκλώματος και στεγανώνει σφραγίζοντας τις μικροροϊκές διατάξεις. Ως επιπλέον στεγάνωση και αντοχή σε πίεση, πάνω σε αυτή τη μεμβράνη με την προηγούμενη μέθοδο εφαρμόζεται πλεξιγκλάς και έτσι επιτυγχάνεται πλήρης στεγάνωση και αντοχή σε θερμικά φαινόμενα.



c. δημιουργία υπερυδρόφοβων επιφανειών

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, για την δημιουργία των υπερυδρόφοβων βαλβίδων ρύθμισης της ροής. Απαιτείται η δημιουργία υπερυδρόφοβων επιφανειών, οι οποίες θα λειτουργούν ως βαλβίδες

Ο τρόπος που επιλέχτηκε για να επιτευχθεί η δημιουργία βαλβίδας είναι η εναπόθεση στην επιφάνεια του καναλιού που θα δημιουργηθεί η υπερυδρόφοβη επιφάνεια μιας ουσίας με εξαιρετικά υδρόφοβο χαρακτήρα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε PTFE (tefflon) του οποίου η εναπόθεση έγινε με τα παρακάτω βήματα.

1. Καθαρισμός της επιφάνειας με χρήση ultra sound cleaner (λουτρού σε υγρό το οποίο διέρχεται από υπέρηχους) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων από την διαδικασία αποτύπωσης και σκόνης
2. Τοποθέτηση μάσκας, η οποία επιτρέπει την εναπόθεση υλικού μόνο στα σημεία που έχουν επιλεγεί και όχι στο σύνολο του κυκλώματος
3. Εναπόθεση του PTFE με χρήση ψεκασμού πτητικού διαλύματος υψηλής περιεκτικότητας.
4. Εξάτμιση υγρού και στερεοποίηση του PTFE
5. Αφαίρεση της μάσκας από την επιφάνεια της πλακέτας
6. Επιφανειακός καθαρισμός των υπολειμμάτων PTFE



αρχική πλακέτα



πλακέτα μετά τον καθαρισμό



πλακέτα με εφαρμογή της
μάσκας



ψεκασμός του PTFE



στερεοποίηση του PTFE



αφαίρεσης μάσκας και καθαρισμός



Εξ αιτίας του ψεκασμού και της διαδικασίας της εξάτμισης του υδατικού διαλύματος. Η επικάλυψη του PTFE δεν γίνεται ομογενώς και ισότροπα καθόλο το μήκος και το πλάτος της ζητούμενης επιφάνειας με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται κενά στην υπερυδροφόβη βαλβίδα, με μη προβλέψιμο τρόπο. Έτσι το μήκος της βαλβίδας καταλήγει να επηρεάζει την πίεση στην οποία ανοίγει η βαλβίδα και ακόμα δεν καθίσταται δυνατόν να κατασκευαστούν βαλβίδες που να ενεργοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος πιέσεων με αξιόπιστο τρόπο.

d. Δημιουργία βαλβίδων απομόνωσης.

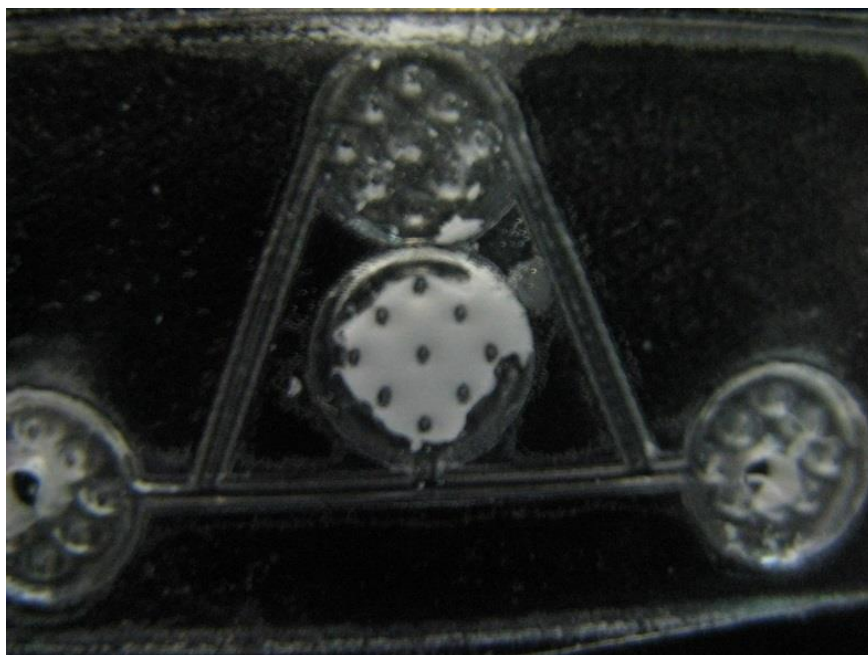
Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο του σχεδιασμού, ήταν απαραίτητη η δημιουργία βαλβίδων αποκοπής της ροής η οποίες θα ενεργοποιούνται χωρίς μηχανική παρέμβαση. Προς αυτό υιοθετήθηκε η χρήση της UV (υπεριώδους) ακτινοβολίας, ως μηχανισμός ενεργοποίησης.

Το υλικό που υπάρχει στις βαλβίδες απομόνωσης είναι διμερές. Αποτελείται από :

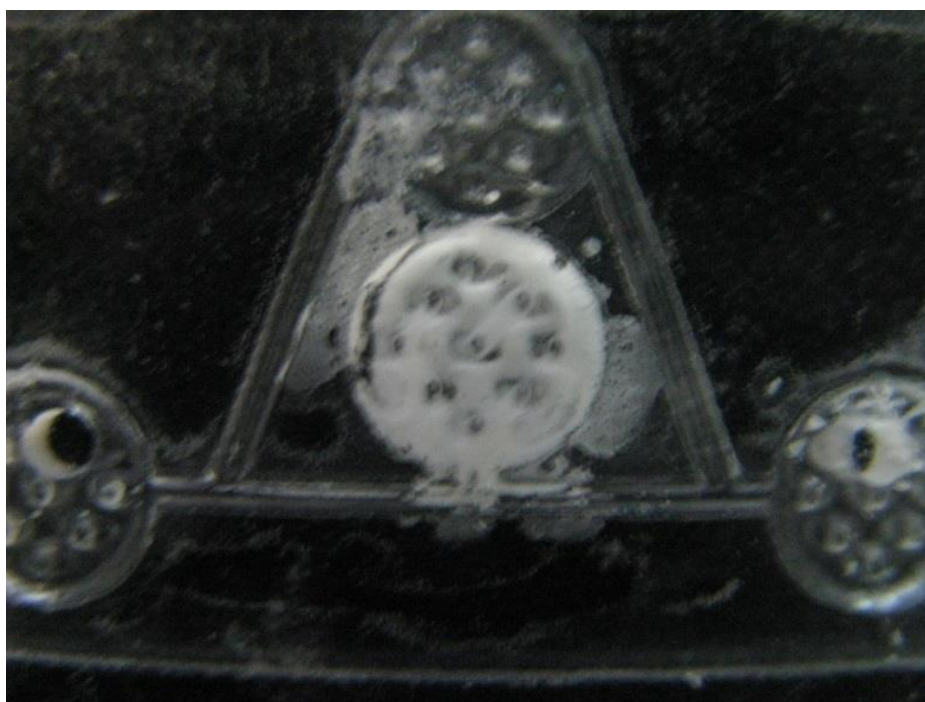
- ρητίνη (Solarez Fiberfill UV cure Epoxy Resin) η οποία στερεοποιείται όταν εκτεθεί σε ικανή ποσότητα υπεριώδους ακτινοβολίας
- σκόνη μικροσωματιδίων (Exprancel waterproof) κρυσταλλικού πλέγματος, με την ιδιότητα να διαστέλλονται έντονα όταν εκτεθούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60C

Η αντίδραση πολυμερισμού αυτής της ρητίνης, παράγει θερμότητα. Το ποσό της θερμότητας που παράγεται είναι ανάλογο της ισχύος της υπεριώδους ακτινοβολίας.

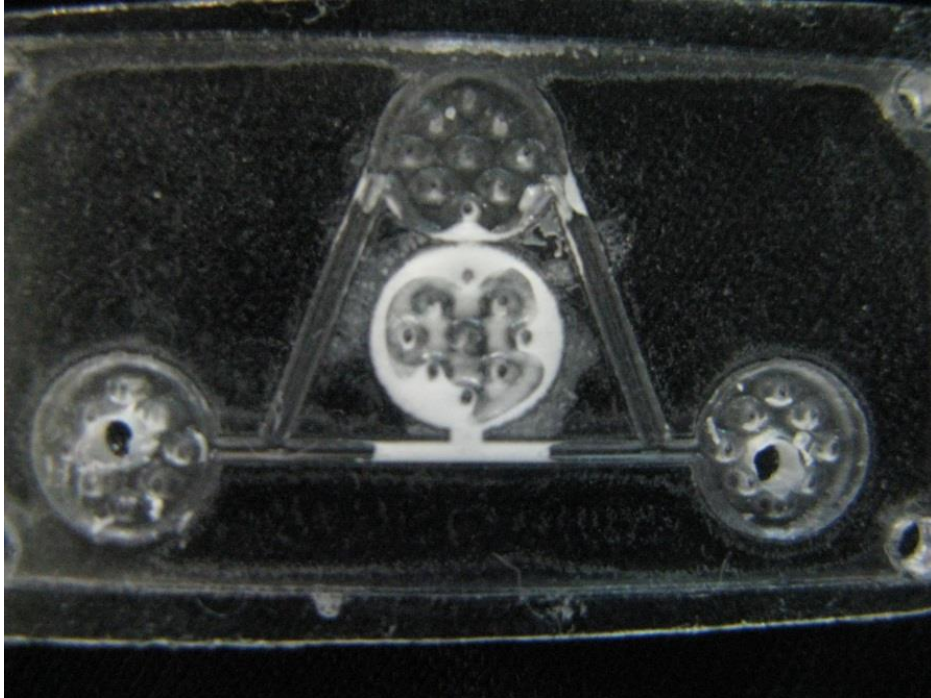
Από την παραγόμενη θερμότητα της αντίδρασης στερεοποίησης, το δεύτερο συστατικό του υλικού των βαλβίδων, προκαλεί την διαστολή και την διαφυγή του υλικού από το θάλαμο φύλαξης του, στο κανάλι που φράσσεται. Προκαλώντας ένα στερεό και ακίνητο φράγμα, οι παρακάτω φωτογραφίες περιγράφουν τα στάδια της διαδικασίας.



Εικόνα 23 αρχική θέση της ρητίνης σε εσωτερικού θαλάμου



Εικόνα 24 αρχή της διαστολής με την αύξηση της θερμοκρασίας

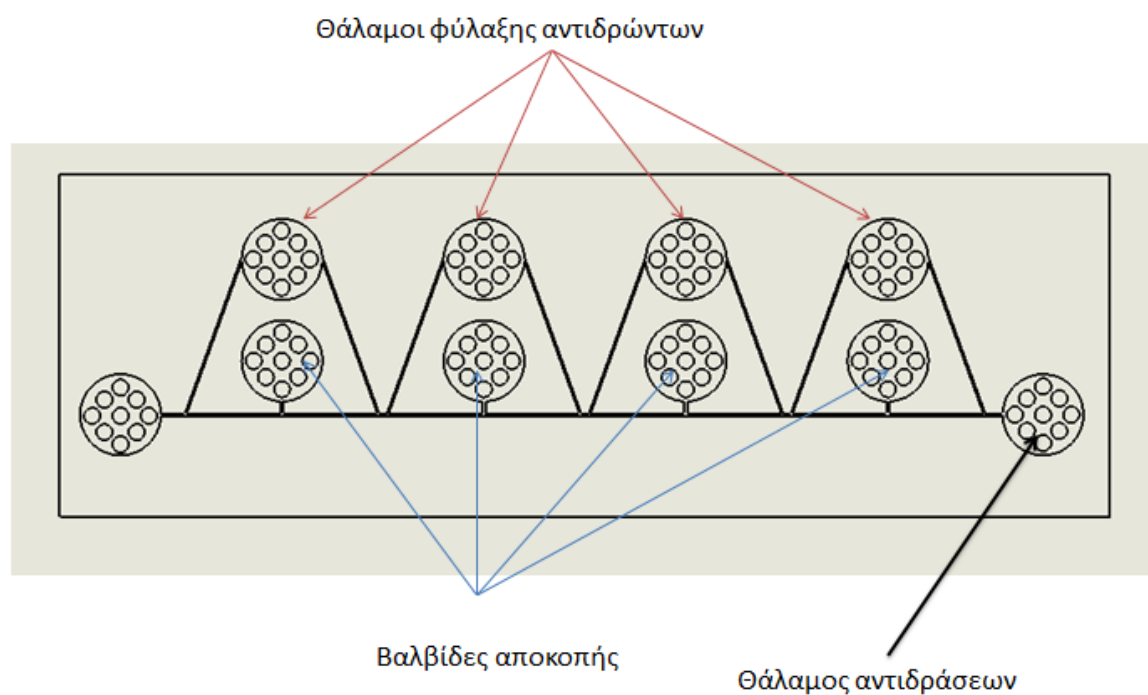


Εικόνα 25 ολοκλήρωση της διαστολής και στερεοποίησης υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας

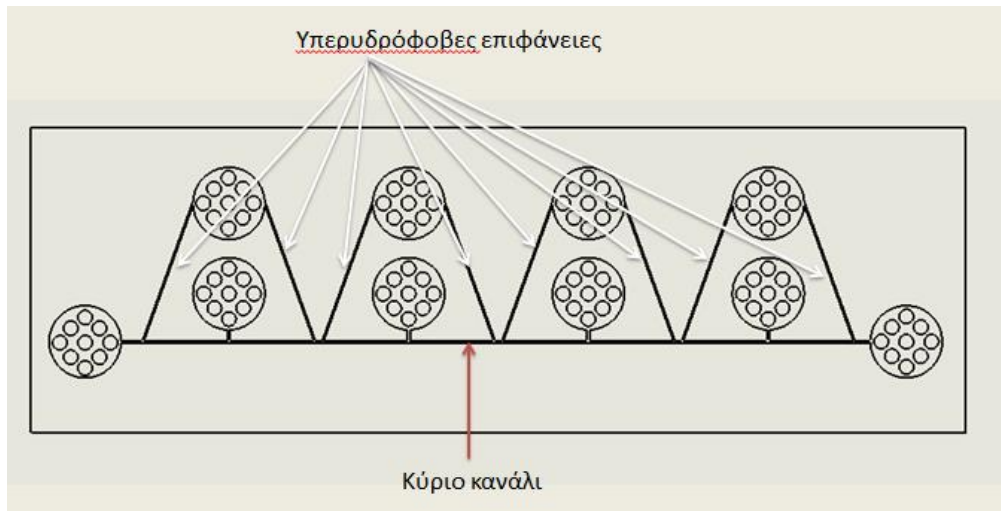
Η αντίδραση πολυμερισμού υπό την επίδραση της πηγής UV που υπήρχε διαθέσιμη για την παρούσα εργασία δεν παρήγαγε αρκετή θερμότητα για να προκαλέσει ολική διαστολή και κλείσιμο της βαλβίδας, για αυτό χρησιμοποιήθηκε αρχική θέρμανση σε θερμοκρασία 50C

6.Λειτουργία και αποτελέσματα

Σύμφωνα με τις παραπάνω τεχνολογίες, χρησιμοποιώντας τα παθητικά συστήματα ελέγχου που δημιουργήθηκαν σχεδιάστηκε η παρακάτω πλακέτα, ικανή να επιτελέσει το πλήρες βιολογικό πρωτόκολλο



Εικόνα 26 σχέδιο πλακέτας εκτέλεσης του πρωτοκόλλου

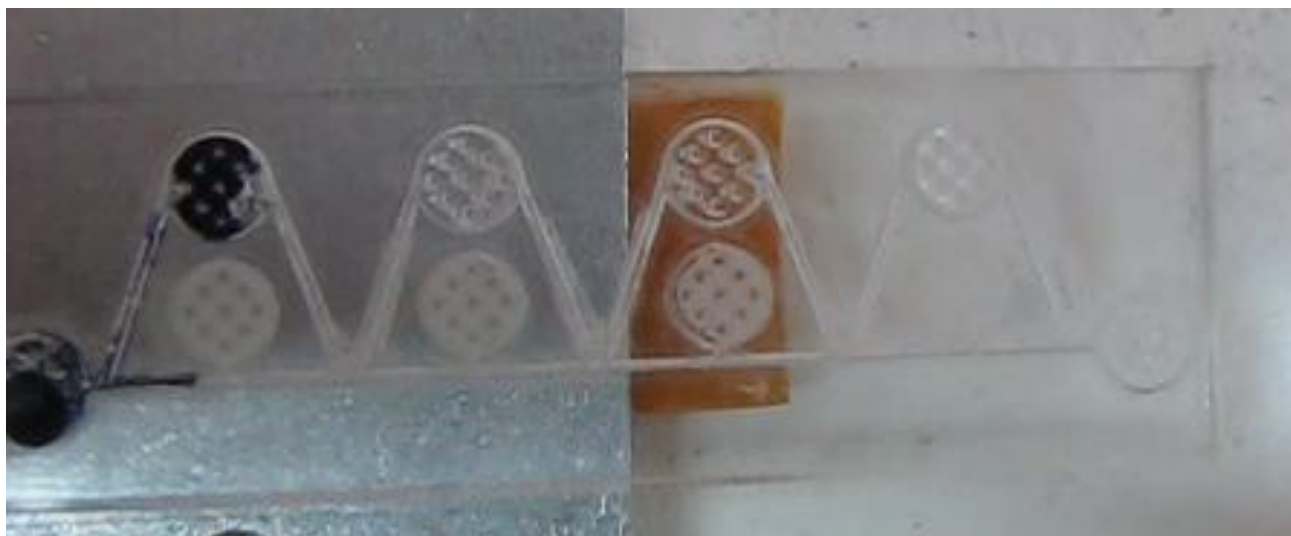


Εικόνα 27 υπερυδρόφοβες επιφάνειες

Η αρχή λειτουργίας είναι ότι με την χρήση υπερυδρόφοβων βαλβίδων, το υγρό δεν εισέρχεται στους θαλάμους φύλαξης των αντιδρώντων παρά μόνο όταν εξ αιτίας της φραγής της εναλλακτικής διαδρομής από της βαλβίδες αποκοπής. Τα στάδια λειτουργίας απεικονίζονται παρακάτω.



Εικόνα 28 αρχικά υγρό δεν διέρχεται από κανένα θάλαμο



Εικόνα 29 με την ενεργοποίηση της πρώτης βαλβίδας αποκοπής υγρό γεμίζει το πρώτο θάλαμο



Εικόνα 31 από τον θάλαμο φύλαξης οδηγείτε στο θάλαμο αντιδράσεων χωρίς να διαταράσσονται οι υπόλοιποι θάλαμοι



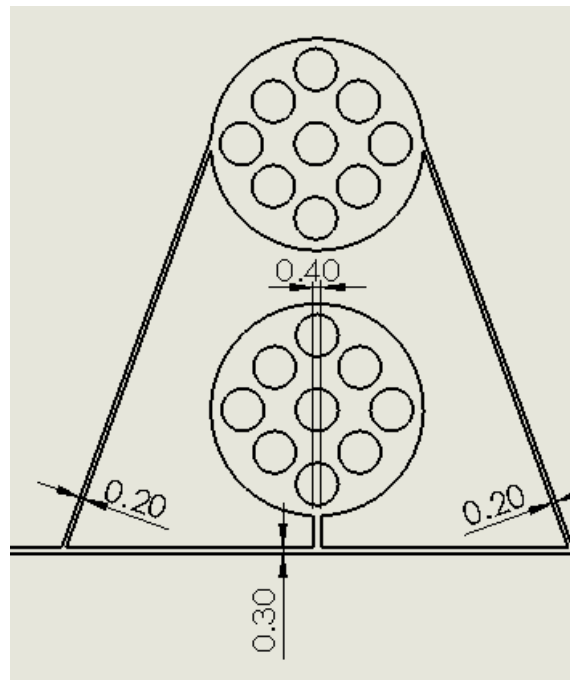
Εικόνα 30 ενεργοποίηση και της δεύτερης βαλβίδας εκτρέπει την ροή στον δεύτερο θάλαμο φύλαξης



Εικόνα 31 μετά την ενεργοποίηση και της τρίτης βαλβίδας αποκοπής η ροή εκτρέπεται προς τον τρίτο θάλαμο φύλαξης



Προκειμένου να διευκολυνθεί η λειτουργία των υπερυδροφωβων βαλβίδων επιλέχτηκε μικρότερης διατομής κανάλι για της υδροφωβες επιφάνειες από το κύριο κανάλι. Αντίστοιχα προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα διαρροής υλικού από τις βαλβίδες αποκοπής επιλέχτηκε μεγαλύτερης διαμέτρου κανάλι.



Εικόνα 32 διαστασιολόγηση κυκλώματος



7. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία δημιουργήθηκε μια πλακέτα εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων. Μέσω της εκμετάλλευσης της ιδιαίτερης φύσης που παρουσιάζουν τα μικροροϊκά κυκλώματα, έγινε δυνατή η δημιουργία ενός γενικού κυκλώματος ικανού να εκτελέσει βιολογικά πρωτόκολλα σε πολύ μικρό κόστος. Με χρήση μόνο παθητικών στοιχείων ελέγχου σε μια πλακέτα απολύτως αναλώσιμη, η εκτέλεση οποιουδήποτε πρωτοκόλλου αποδεικνύεται ότι είναι εφικτή και συμφέρουσα οικονομικά σε εφαρμογές micro-total-analysis-systems. Η επιλογή της χρήσης ελέγχου που απαιτεί μικρή κατανάλωση ενέργειας καθιστά την συγκεκριμένη πλακέτα κατάλληλη για εφαρμογές point-of-care λόγω του μικρού μεγέθους της και καθίσταται δυνατόν να εκτελούνται πειράματα εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος



8. Δυνατότητες περαιτέρω διερεύνησης

Η δημιουργία της παρούσας μικροροϊκής πλακέτας εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων παρουσιάζει και τις παρακάτω δυνατότητες περαιτέρω διερεύνησης.

- Η δημιουργία συσκευής η οποία θα υποδέχεται σαν αναλώσιμο στοιχείο τη συγκεκριμένη πλακέτα και θα περιλαμβάνει τα απαραίτητα στοιχεία ενέργειας για να τροφοδοτεί την υπεριώδη ακτινοβολία, που είναι απαραίτητη για την λειτουργία της πλακέτας
- Εφαρμογή πηγής παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας κατάλληλα ισχυρής ώστε να προκαλείται ταχύς πολυμερισμός και ικανή διαστολή των βαλβίδων αποκοπής, ώστε να αποφευχθεί η χρήση επιπλέον μέσου θέρμανσης
- Πειραματικός προσδιορισμός σαφούς αναλογίας υλικών στην δημιουργία των βαλβίδων αποκοπής για καλύτερη και πιο συνεπή συμπεριφορά στον μηχανισμό ενεργοποίησης
- Σχεδιασμός μιας μεθόδου εισαγωγής δείγματος, η οποία να καθιστά την χρήση της πλακέτας δυνατή εκτός εργαστηριακού περιβάλλοντος
- Εκτέλεση πλήρων βιολογικών πρωτοκόλλων και προσαρμογή του συστήματος αποθήκευσης και διανομής των αντιδρώντων ανάλογα με τα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου.
- Μελέτη και εφαρμογή της διαδικασίας αποκρυστάλλωσης των αντιδρώντων για καλύτερη φύλαξή τους στο εσωτερικό της πλακέτας και μεγαλύτερο χρόνο ζωής της, σε περιβάλλον εκτός εργαστηρίου
- Αυτοματοποίηση της εκτέλεσης βιολογικών πρωτοκόλλων με χρήση της συγκεκριμένης εφαρμογής
- Επέκταση της αρχής λειτουργίας σε πλακέτες για την εκτέλεση πρωτοκόλλων που χρειάζονται και επιπλέον στοιχεία (όπως θέρμανση ή ψύξη) για να πραγματοποιηθούν



9.Βιβλιογραφία

- [1]
B. Lincoln, J. G. Cordero, C. R. Poulsen, and L. P. Lee, “A MICROFLUIDIC PLATFORM OPTIMIZING BEAD-BASED ELISA FOR THE DETECTION OF CELL SECRETION.”
- [2]
C. H. Ahn, J. Kai, S. H. Lee, N. Santiago, D. W. Sehy, R. Schultheis, J. Han, and A. Puntambekar, “A New Game Changer for Immunoassays and IVD: Microfluidics and Polymer Lab-on-a-Chips,” *Procedia Engineering*, vol. 25, pp. 651–656, Jan. 2011.
- [3]
V. Miralles, A. Huerre, F. Malloggi, and M.-C. Jullien, “A Review of Heating and Temperature Control in Microfluidic Systems: Techniques and Applications,” *Diagnostics*, vol. 3, no. 1, pp. 33–67, Jan. 2013.
- [4]
J.-W. Choi, T. M. Liakopoulos, and C. H. Ahn, “An on-chip magnetic bead separator using spiral electromagnets with semi-encapsulated permalloy,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, no. 6, pp. 409–416, 2001.
- [5]
C.-H. Wang and G.-B. Lee, “Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 3, pp. 419–425, Sep. 2005.
- [6]
E. F. Hasselbrink, T. J. Shepodd, and J. E. Rehm, “High-Pressure Microfluidic Control in Lab-on-a-Chip Devices Using Mobile Polymer Monoliths,” *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 19, pp. 4913–4918, Oct. 2002.
- [7]
E. Menegatti, D. Berardi, M. Messina, I. Ferrante, O. Giachino, B. Spagnolo, G. Restagno, L. Cognolato, and D. Roccatello, “Lab-on-a-chip: Emerging analytical platforms for immune-mediated diseases,” *Autoimmunity Reviews*, vol. 12, no. 8, pp. 814–820, Jun. 2013.
- [8]
P. Novo, G. Moulas, V. Chu, and J. P. Conde, “Lab-on-Chip Prototype Platform for Ochratoxin A Detection in Wine and Beer,” *Procedia Engineering*, vol. 47, pp. 550–553, Jan. 2012.
- [9]
L. Gervais, N. de Rooij, and E. Delamarche, “Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics,” *Advanced Materials*, vol. 23, no. 24, pp. H151–H176, Jun. 2011.
- [10]



- H. Andersson, W. van der Wijngaart, P. Enoksson, and G. Stemme, “Micromachined flow-through filter-chamber for chemical reactions on beads,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 67, no. 1, pp. 203–208, 2000. [11]
- C. Zhang, D. Xing, and Y. Li, “Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends,” *Biotechnology Advances*, vol. 25, no. 5, pp. 483–514, Sep. 2007. [12]
- B. J. Kirby and T. J. Shepodd, “Microvalve Architectures for High-Pressure Hydraulic and Electrokinetic Fluid Control in Microchips,” in *Micro Total Analysis Systems 2001: Proceedings of the [Mu] TAS 2001 Symposium, Held in Monterey, CA, USA, 21-25 October, 2001*, 2002, vol. 1, p. 338. [13]
- J. E. Rehm, T. J. Shepodd, and E. F. Hasselbrink, “Mobile Flow Control Elements For High-Pressure Micro-Analytical Systems Fabricated Using In-Situ Polymerization,” in *Micro Total Analysis Systems 2001*, 2001, pp. 227–229. [14]
- J. K. Luo, Y. Q. Fu, Y. Li, X. Y. Du, A. J. Flewitt, A. J. Walton, and W. I. Milne, “Moving-part-free microfluidic systems for lab-on-a-chip,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 19, no. 5, p. 054001, May 2009. [15]
- J. K. Luo, Y. Q. Fu, Y. Li, X. Y. Du, A. J. Flewitt, A. J. Walton, and W. I. Milne, “Moving-part-free microfluidic systems for lab-on-a-chip,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 19, no. 5, p. 054001, May 2009. [16]
- Y. Feng, Z. Zhou, X. Ye, and J. Xiong, “Passive valves based on hydrophobic microfluidics,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 108, no. 1–3, pp. 138–143, Nov. 2003. [17]
- J. W. Zubrick, *The organic chem lab survival manual*. Wiley, 2007. [18]
- H. Bruus, *Theoretical microfluidics*. Oxford: Oxford University Press, 2008. [19]
- U. Lehmann, S. Hadjidj, V. K. Parashar, C. Vandevyver, A. Rida, and M. A. M. Gijs, “Two-dimensional magnetic manipulation of microdroplets on a chip as a platform for bioanalytical applications,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 117, no. 2, pp. 457–463, Oct. 2006. [20]

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες στους: Θοδωρή Σακελλαρόπουλου, Νίκο Γεωργίου, Δημήτρη Μεσσίνη για την άμεση και απλόχερη βοήθειά τους, στον Γιώργο Κανακάρη για την συνεργασία και τον χρόνο του, όπως επίσης και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Βιοτεχνολογίας της σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών. Ειδικά στον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Λεωνίδα Αλεξόπουλο για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή που μου έδειξε.