



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ DNA ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

ΚΟΚΚΟΡΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΤΣΕΡΕΠΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

[ΑΘΗΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ/2020]





ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ DNA ΚΛΕΙΣΤΟΥ ΒΡΟΧΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ:

ΚΟΚΚΟΡΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΤΣΕΡΕΠΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

[ΑΘΗΝΑ, ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ/2020]



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΚΚΟΡΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΤΣΕΡΕΠΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α΄, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΤΣΟΥΚΑΛΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ

---

Σκαλτσούνης Παναγιώτης

© (2020) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.



## *Ευχαριστίες*

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Αγγελική Τσερέπη και τον κ. Γεώργιο Κόκκορη, επιβλέποντες της παρούσας εργασίας, για την πολύτιμη βοήθεια, την ουσιαστική καθοδήγηση και την ηθική στήριξη που μου παρείχαν. Η αδιάκοπη παρακολούθηση της εργασίας, το θερμό ενδιαφέρον τους, η ενέργεια και ο χρόνος που αφιέρωσαν, καθώς και οι πολύωρες συζητήσεις μας για την επίλυση των ποικίλων προβλημάτων που προέκυπταν, αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Την κα. Αγγελική Τσερέπη, θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για τη συμβολή της στο συντονισμό των επί μέρους δραστηριοτήτων που πραγματοποιήθηκαν για την εκπόνηση της εργασίας σε διάφορα τμήματα του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς και σε συνεργαζόμενο εργαστήριο στο Πολυτεχνείο της Σεβίλλης.

Τον κ. Γεώργιο Κόκκορη, ευχαριστώ επίσης για την ουσιαστική συμμετοχή του στην ολοκλήρωση των προσομοιώσεων, στην οποία συνέβαλε καθοριστικά με τις γνώσεις του και την εμπειρία του στην εκπόνηση υπολογιστικών μελετών.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τη Γεωργία Κάπρου για την εκπαίδευση στη μικρορευστονική τεχνολογία που μου παρείχε, στη χρήση των πολλών και διαφορετικών διατάξεων στο χώρο του INN του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ελευθέριο Αδειλίνη για τη βοήθειά του στην κατασκευή της PMMA ψηφίδας, τη Μαρία Γεωργούτσου για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή πειραμάτων με τη μέθοδο της παραδοσιακής PCR, τους Άγγελο Ζένιου και Δημοσθένη Ιωάννου για την βοήθειά τους στη χρήση των αντιδραστήρων RIE και ICP, το Δημήτρη Νιώρα για τη βοήθειά του στην κατασκευή του ηλεκτρικού κυκλώματος του κινητήρα και τη χρήση της θερμικής κάμερας, τον Παναγιώτη Σαρκίρη για τη βοήθειά του στην μέτρηση των γωνιών επαφής των σιδηρομαγνητικών ρευστών, καθώς και τη Μυρτώ Φιλιππίδου για τη βοήθειά της στην ολοκλήρωση των σχεδίων για την προμήθεια των PCB ψηφίδων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τα μέλη του «Dpto. de Ingeniería Electrónica, Escuela Técnica Superior De Ingeniería – Universidad de Sevilla», για την



πρακτική εκπαίδευση που μου προσέφεραν και για τη δυνατότητα που μου παρείχαν να εργαστώ στο εργαστήριό τους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 1  |
| ABSTRACT .....  | 3  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 5  |
| 1.1 ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ (LOC) .....           | 5  |
| 1.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....                          | 9  |
| 1.2.1 Τα συστατικά της PCR.....   | 9  |
| 1.2.2 Τα στάδια της PCR .....   | 16 |
| 1.2.3 Παραδοσιακή PCR .....   | 19 |
| 1.2.4 PCR Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR).....                       | 21 |
| 1.2.5 Ψηφιακή PCR (Digital PCR) .....                                   | 24 |
| 1.2.6 Ισοθερμοκρασιακός (Isothermal) πολλαπλασιασμός DNA .....          | 25 |
| 1.3 ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ PCR.....   | 26 |
| 1.3.1 Χρονικά μεταβαλλόμενη μPCR (Time domain μPCR) .....               | 26 |
| 1.3.2 Χωρικά μεταβαλλόμενη μPCR (Space Domain μPCR) .....               | 30 |
| 1.3.3 Μικροδιατάξεις ισοθερμοκρασιακού (Isothermal) πολλαπλασιασμού DNA | 35 |
| 1.3.4 Ψηφιακή μPCR (Digital μPCR) .....                                 | 36 |
| 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....   | 38 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΕΡΓΑΛΕΙΑ.....                                   | 43 |
| 2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ 3D ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ΨΗΦΙΔΩΝ .....                          | 43 |
| 2.2 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ .....   | 43 |
| 2.2.1 Μεταφορά θερμότητας σε στερεά σώματα.....                         | 44 |
| 2.2.2 Μεταφορά θερμότητας σε ρευστά.....                                | 45 |
| 2.2.3 Μαγνητικά πεδία.....  | 46 |

|  |  |    |
|--|--|----|
| 2.2.4                                    | Υπολογιστικά Πλέγματα.....                           | 47 |
| 2.2.5                                    | Κριτήρια σύγκλισης.....                              | 49 |
| 2.2.6                                    | Συντελεστές εκπομπής επιφανειών των υλικών .....     | 49 |
| 2.2.7                                    | Παραδοχές.....                                       | 50 |
| 2.3                                      | ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΡΑ .....                               | 51 |
| 2.4                                      | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ .....                           | 51 |
| 2.4.1                                    | Ψηφίδες .....  | 52 |
| 2.4.2                                    | Μαγνήτες και εξαρτήματα .....                        | 52 |
| 2.4.3                                    | Σιδηρομαγνητικά ρευστά και επιφάνειες .....          | 53 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... |  | 55 |
| 3.1                                      | ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ .....                                     | 55 |
| 3.2                                      | ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ .....                                  | 61 |
| 3.2.1                                    | Μελέτη του προβλήματος μεταφοράς θερμότητας.....     | 61 |
| 3.2.2                                    | Μελέτη του προβλήματος μαγνητικού πεδίου .....       | 72 |
| 3.3                                      | ΡΟΗ ΤΟΥ ΡΕΥΣΤΟΥ .....                                | 80 |
| 3.3.1                                    | Επιλογή μαγνήτη .....                                | 80 |
| 3.3.2                                    | Επιλογή σιδηρομαγνητικού ρευστού και επιφάνειας..... | 83 |
| 3.3.3                                    | Μετακίνηση του σιδηρομαγνητικού ρευστού.....         | 89 |
| 3.4                                      | ΚΥΚΛΩΜΑ ΚΙΝΗΤΗΡΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ.....    | 91 |
| 3.5                                      | ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΗ.....                                    | 93 |
| 3.5.1                                    | Δοκιμαστική ψηφίδα από PMMA .....                    | 93 |
| 3.5.2                                    | Ψηφίδα σε PCB .....                                  | 94 |
| 3.5.3                                    | Κινητήρας και κύκλωμα .....                          | 95 |
| 3.5.4                                    | Εξαρτήματα στήριξης μαγνήτη και ψηφίδας.....         | 96 |
| 3.5.5                                    | Ολοκληρωμένη διάταξη .....                           | 98 |

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
| 3.6            | ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΜΕΡΑ.....                              | 99  |
| 3.6.1          | Θερμοκρασιακές ζώνες.....                        | 99  |
| 3.6.2          | Περιοχές ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες ..... | 102 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.    | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....                               | 104 |
| ΠΗΓΕΣ .....    |  | 106 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... |  | 119 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction – PCR), είναι η πιο συχνά χρησιμοποιημένη μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA), και αποτελεί απαραίτητη διαδικασία για την ανάλυση του DNA. Οι μικρορευστονικές ψηφίδες είναι καθιερωμένα εργαλεία που σκοπεύουν στην απλοποίηση και στη διευκόλυνση της ανάλυσης του DNA, με πολλές κλινικές και επιστημονικές εφαρμογές. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η δημιουργία μίας απλής, γρήγορης, ευέλικτης και αποτελεσματικής μικροδιάταξης PCR. Έως τώρα, έχει αναφερθεί μία μεγάλη ποικιλία τέτοιων μικροδιατάξεων, διαφορετικών υλικών και σχεδίων. Δύο βασικές κατηγορίες των μικροδιατάξεων PCR περιλαμβάνουν τις μικροδιατάξεις στατικού δείγματος (χρονικά μεταβαλλόμενες PCR) και τις μικροδιατάξεις κινούμενου δείγματος (χωρικά μεταβαλλόμενες PCR). Οι πρώτες, τείνουν σε γενικές γραμμές, να είναι πιο χρονοβόρες και να καταναλώνουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας. Από την άλλη πλευρά, οι μικροδιατάξεις PCR κινούμενου δείγματος, προκειμένου να επιτύχουν την επιθυμητή ροή του δείγματος, βασίζονται συνήθως στη χρήση αντλιών, οι οποίες τείνουν να είναι ογκώδεις, στερούν την αυτονομία του συστήματος, ενώ παράλληλα αυξάνουν το κόστος και την πολυπλοκότητά του. Ταυτόχρονα, λόγω του μεγάλου μήκους καναλιού, αναπτύσσουν μεγάλη διαφορά πίεσης που απαιτεί ισχυρή σφράγιση του μικροκαναλιού. Περαιτέρω περιορισμοί μίας τυπικής χωρικά μεταβαλλόμενης PCR μικροδιάταξης, περιλαμβάνουν τον σταθερό αριθμό κύκλων, οι οποίοι συνήθως καθορίζονται από το σχεδιασμό του μικροκαναλιού, όπως και το σχετικά μεγάλο αποτύπωμα της ψηφίδας.

Η παρούσα εργασία περιγράφει μία καινοτόμα μικροδιάταξη PCR, κινούμενου δείγματος, συνεχούς ροής και κλειστού βρόχου. Η μικροδιάταξη χρησιμοποιεί κυκλικό μικροκάνάλι μικρού αποτυπώματος, κατασκευασμένο σε υπόστρωμα πλακέτας τυπωμένων κυκλωμάτων [printed circuit board (PCB)]. Στη μικροδιάταξη αυτή, το διάλυμα της PCR ρέει στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού, χωρητικότητας 9,42  $\mu\text{l}$ , με τη ροή να δημιουργείται από ένα σιδηρομαγνητικό ρευστό-έμβολο. Το σιδηρομαγνητικό ρευστό έμβολο ακολουθεί την κίνηση ενός εξωτερικού μαγνήτη, ο οποίος κινείται με τη βοήθεια ενός κινητήρα, περνώντας διαδοχικά (όσες φορές χρειαστεί) από τις τρεις

θερμοκρασιακές ζώνες. Το σχέδιο της ψηφίδας περιλαμβάνει δύο ενσωματωμένα μαιανδρικά θερμικά μικροστοιχεία χαλκού στο εσωτερικό του PCB υποστρώματος, ένα πολύ λεπτό στρώμα χαλκού πάνω από τα θερμικά στοιχεία που προσφέρει θερμική ομοιομορφία και ένα κυκλικό μικροκανάλι σχεδιασμένο για κατασκευή με χρήση φωτοευαίσθητου πολυϊμιδίου σε πολύ κοντινή απόσταση από τα θερμικά στοιχεία, εξασφαλίζοντας έτσι καλή μεταφορά θερμότητας. Η όλη διαδικασία κατασκευής της ψηφίδας, είναι συμβατή με την καθιερωμένη βιομηχανία PCB, επιτρέποντας έτσι τη χαμηλού κόστους, αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη κατασκευή της και ενισχύοντας τις προοπτικές εμπορευματοποίησης μιας τέτοιας μικροδιάταξης. Ο σχεδιασμός της μικροδιάταξης βασίστηκε σε υπολογιστική μελέτη, στην οποία αναλύθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν παράμετροι όπως το σχέδιο της ψηφίδας, η ταχύτητα ροής του ρευστού, η κατανομή της θερμότητας κατά τη διάρκεια των κύκλων της PCR και το σχήμα του μαγνήτη.

Η μικροδιάταξη αυτή παρέχει γρήγορες θερμοκρασιακές μεταβολές (το βασικό πλεονέκτημα των μικροδιατάξεων συνεχούς ροής), οδηγώντας σε γρήγορους κύκλους PCR, της τάξης των μερικών δευτερολέπτων. Η υπολογιστική μελέτη προτείνει πως το επιθυμητό θερμοκρασιακό πρωτόκολλο της PCR μπορεί να επιτευχθεί σε 6 s ανά κύκλο. Η ταχύτητα αυτή του κύκλου της PCR είναι υπερπενταπλάσια σε σύγκριση με παρόμοια διάταξη, κατασκευασμένη σε ψηφίδα από πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (PMMA), σε θερμική επαφή με ογκώδη θερμαινόμενη πλάκα. Επιπλέον, το κυκλικό μικροκανάλι εξασφαλίζει μικρότερο αποτύπωμα σε σύγκριση με τις περισσότερες μικροδιατάξεις συνεχούς ροής, με τη συνολική διάμετρο της ψηφίδας να είναι 40 mm, καθώς και ευελιξία στο συνολικό αριθμό των κύκλων της PCR. Επιπρόσθετα, η επίτευξη της ροής του ρευστού με τη βοήθεια του μαγνήτη, καθιστά αχρείαστες τις εξωτερικές αντλίες.

Η μικροδιάταξη που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία, είναι η πρώτη, από όσο γνωρίζουμε, που χρησιμοποιεί συνεχή κυκλική ροή σε PCB ψηφίδα με ενσωματωμένα θερμικά μικροστοιχεία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις της θερμοκρασίας στην PCB ψηφίδα που κατασκευάστηκε, σε συνδυασμό με τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το μαγνητικό πεδίο και τη ροή του ρευστού, φαίνεται

ότι μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία μιας απλής, χαμηλού κόστους, ευέλικτης και γρήγορης μικροδιάταξης για ανάλυση DNA, βασισμένη στη μέθοδο PCR.

## **ABSTRACT**

Polymerase chain reaction (PCR) is the most common method used for nucleic acid (DNA) amplification and an indispensable process in DNA analysis. Microfluidic chips are well established tools aiming to simplify and facilitate PCR-based DNA analysis in various important clinical and basic science applications such as medical diagnostics. The purpose of this work is to create a simple, fast and efficient PCR microdevice. A wide variety of such chips with different materials and designs have been reported. Two basic types of PCR microdevices include stationary sample PCR microdevices (time domain PCR) and moving sample PCR microdevices (space domain PCR). Time domain PCR microdevices overall tend to be more time and energy consuming. On the other hand, space domain PCR microdevices, in order to achieve the desired flow of the DNA sample, are generally based on the use of pumps, which tend to be bulky, deprive the system of its autonomy and may also raise the system's cost and complexity. At the same time, due to the long channel length, they develop a large pressure difference that requires strong sealing of the microchannel. Further limitations of typical space domain microdevices include the fixed number of cycles, often dictated by the channel layout, as well as the relatively large chip footprint.

The present work describes a novel space domain PCR microdevice, of a continuous flow (CF) in a closed loop. The microdevice uses a circular channel, with small footprint, fabricated on printed circuit board (PCB). In this microdevice, the PCR solution flows within a circular channel of  $9,42 \mu\text{l}$  capacity, the flow being created by a ferrofluid plug. The plug is driven by an external magnet which is moving with the aid of a micromotor, passing consecutively (as many times as necessary) through three temperature zones. The design of the chip comprises two integrated meandering copper microheaters within the PCB substrate, a very thin copper layer above the heaters that

improves thermal uniformity, and a circular microchannel designed for fabrication using photosensitive polyimide at a very close distance to the microheater, thus ensuring good heat transfer. The whole fabrication process of the chip is compatible with the established PCB industry, thus allowing for low-cost, reliable and reproducible fabrication, enhancing the commercialization prospects of such a device. The design of the microdevice is based on a computational study, analyzing and optimizing various parameters, such as the design of the chip, the flow velocity, the thermal distribution during the PCR cycles and the magnet's shape.

This microdevice provides quick temperature transitions (the main advantage of CF microdevices), leading to fast PCR cycles, on the order of a few seconds. The computational study suggests that the desired PCR temperature protocol can be obtained at 6 s per cycle, which is more than five times faster than in a similar device fabricated on a polymethyl methacrylate (PMMA) chip, in contact with bulky Peltier elements. Moreover, the circular channel ensures a smaller footprint compared with most CF microdevices, the total diameter of the chip being 40 mm, as well as flexibility for the total number of PCR cycles. Furthermore, the magnet driven flow spares the device from the use of pumps.

The herewith presented microdevice is the first, to our knowledge, to use circular continuous flow on a PCB chip with embedded microheaters. The results that emerged from the temperature measurements on the PCB chip, in combination with the analysis made on the magnetic field and fluid flow, appears to result in a simple, cost saving, flexible and fast method for PCR-based DNA amplification.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

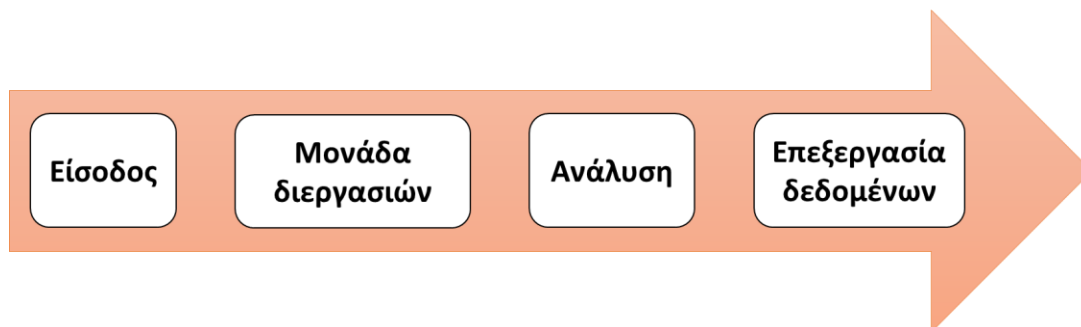
### 1.1 ΜΙΚΡΟΡΕΥΣΤΟΝΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΣΕ ΨΗΦΙΔΑ (LOC)

Ο όρος μικρορευστονική (microfluidics) χρησιμοποιείται για να περιγράψει, τόσο την επιστήμη που μελετά τη συμπεριφορά των ρευστών, όταν αυτά περιορίζονται σε μικρές γεωμετρίες (με διαστάσεις της τάξης των μικρόμετρων ή και μικρότερες), όσο και την τεχνολογία κατασκευής μικροδιατάξεων, οι οποίες επιτρέπουν το χειρισμό και τον ακριβή έλεγχο μικρών όγκων ρευστών (από μικρόλιτρα έως πικόλιτρα) [1–4]. Πρόκειται για έναν τομέα που συγκεντρώνει τεχνογνωσία από πολλούς διαφορετικούς κλάδους, όπως η φυσική, η μηχανική, η χημεία, η βιολογία, η μικροηλεκτρονική κ.α. Η πρώτη πρακτική εφαρμογή της μικρορευστονικής σε συσκευή, μπορεί να θεωρηθεί ο εκτυπωτής ψεκασμού μελάνης (inkjet printer), που κατασκεύασε ο Richard Sweet το 1965 [5]. Ωστόσο, η συστηματική έρευνα στον τομέα της μικρορευστονικής ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, με την ανάπτυξη τεχνολογιών όπως οι μικροβαλβίδες και οι μικροαντλίες [6]. Μέσα στις επόμενες δεκαετίες, η ποιότητα, η ακρίβεια στην κατασκευή και η πολυπλοκότητα των μικρορευστονικών διατάξεων αυξήθηκε σημαντικά, χάρη στην ανάπτυξη τεχνολογιών όπως: replica moulding, hot embossing, SU-8 photoresist, plasma processing, micro injection moulding, 3D printing κ.α [6]. Την ανάπτυξη αυτών των τεχνολογιών, ακολούθησε μία κατακόρυφη αύξηση στο πλήθος, αλλά και στο είδος των εφαρμογών που χρησιμοποιούσαν μικρορευστονικές διατάξεις, οι οποίες πλέον συναντώνται σε τομείς όπως η χημεία, η βιολογία, η φυσική, η φαρμακευτική, η μελέτη του περιβάλλοντος, η ανάλυση τροφίμων, η κλινική διάγνωση κ.α [7].

Μία από τις βασικές ιδέες πίσω από τη μικρορευστονική, είναι η μεταφορά όλων των αντιδράσεων, αναλύσεων και πειραμάτων σε μία μικροδιάταξη, για την εφαρμογή

των οποίων απαιτείται κανονικά ένα εργαστήριο. Η ιδέα αυτή εκφράζεται ξεκάθαρα με τη χρήση του όρου «Μικροεργαστήριο σε Ψηφίδα» [«Lab on Chip» (LOC)], που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τις ψηφίδες (chips) οι οποίες, συνήθως σε μερικά τετραγωνικά εκατοστά, ενσωματώνουν πολλές εργαστηριακές λειτουργίες, αποτελώντας έτσι το ισοδύναμο σύστημα ενός ολόκληρου εργαστηρίου.<sup>1</sup> Ένα LOC μπορεί να αποτελείται από πολλές διαφορετικές μονάδες, ανάλογα με την τη συγκεκριμένη εφαρμογή στην οποία χρησιμοποιείται και τις ανάγκες της. Παρόλα αυτά, όλα τα LOC περιέχουν τις ακόλουθες βασικές μονάδες [7].

- Μονάδα εισαγωγής, όπου τα δείγματα εισέρχονται στο σύστημα.
- Μονάδα διεργασιών, όπου εκτελούνται οι απαραίτητες φυσικές, χημικές ή/και βιολογικές διεργασίες. Σε ένα LOC μπορεί να υπάρχουν περισσότερες από μία μονάδες διεργασιών.
- Μονάδα ανάλυσης, όπου τα αποτελέσματα συλλέγονται από αισθητήρες.
- Μονάδα επεξεργασίας δεδομένων, όπου τα αποτελέσματα μετατρέπονται σε σήμα εξόδου.



Σχήμα 1-1. Οι κύριες μονάδες ενός LOC.

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την προσπάθεια κατασκευής μικροδιατάξεων, είναι το γεγονός πως οι φυσικές ιδιότητες των ρευστών αλλάζουν στο εσωτερικό των μικροκαναλιών. Δεν αρκεί επομένως, η μεταφορά των εργαστηριακών

<sup>1</sup> Εκτός από τον όρο «Lab on Chip», συχνά συναντάται και ο όρος «**μικροσυστήματα ολοκληρωμένης ανάλυσης**» [**micro total analysis systems (μTAS)**]. Ένα μTAS μπορεί να περιγραφεί ως μικρογραφία χημικού εργαστηρίου, το οποίο λειτουργεί εκτελώντας συγκεκριμένες αντιδράσεις στο εσωτερικό μίας ψηφίδας και συνδυάζει διάφορα αναλυτικά βήματα όπως η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η διήθηση, η αντίδραση, η απομόνωση, η ανάλυση και η επεξεργασία των δεδομένων [7].

μακροσυστημάτων στη μικροκλίμακα, απλώς μειώνοντας τις διαστάσεις τους, αλλά χρειάζεται και η κατάλληλη μετατροπή τους, ώστε αυτά να αποδίδουν τα ίδια αποτελέσματα στις νέες συνθήκες. Παράλληλα, για την επιτυχή κατασκευή των μικρορευστονικών διατάξεων, είναι απαραίτητη η τεχνογνωσία πάνω στην κατασκευή ψηφίδων με πολύ μικρό αποτύπωμα (small footprint). Από τότε που εμφανίσθηκαν οι μικρορευστονικές διατάξεις, έχουν δοκιμαστεί αρκετές διαφορετικές τεχνολογίες και υλικά κατασκευής, όπως πυρίτιο, γυαλί, διάφορα πολυμερή, χαρτί κ.α. Κάθε ένα από τα υλικά αυτά έχει ορισμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται για μικρορευστονικές διατάξεις. Τελικά, το καταλληλότερο υλικό προκύπτει από την εκάστοτε εφαρμογή και τις ανάγκες της.

Σήμερα, η μικρορευστονική και τα LOC αποτελούν πολύ δημοφιλείς τεχνολογίες, τόσο για τους ακαδημαϊκούς ερευνητές όσο και για τη βιομηχανία, καθώς λόγω των μικρών τους διαστάσεων, παρέχουν κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα. Τα βασικότερα από αυτά είναι τα εξής.

- Χαμηλό κόστος κατασκευής. Λόγω των πολύ μικρών διαστάσεων των μικροδιατάξεων, περιορίζεται σημαντικά το κόστος των υλικών κατασκευής, επιτρέποντας τελικά τη μαζική παραγωγή των LOC.
- Μικρότεροι χρόνοι. Στη μικροκλίμακα, φαινόμενα όπως η διάχυση των χημικών και η μετάδοση της θερμότητας πραγματοποιούνται σε πολύ μικρότερους χρόνους, με αποτέλεσμα οι αντιδράσεις και οι αναλύσεις να ολοκληρώνονται σε χρόνους έως και της τάξης των μερικών δευτερολέπτων.
- Συγκέντρωση πολλών αναλύσεων σε ένα LOC. Χάρη στη δυνατότητα ενσωμάτωσης πολλών μικροκαναλιών σε μία ψηφίδα, είναι δυνατή η διεξαγωγή πολλών αναλύσεων ταυτόχρονα.
- Φορητότητα και αυτονομία. Τα LOC μεταφέρονται εύκολα, λόγω των μικρών διαστάσεών τους και τη μικρής ενεργειακής τους κατανάλωσης, γεγονός που επιτρέπει τη διεξαγωγή αναλύσεων και πειραμάτων εκτός του εργαστηρίου.
- Ευκολία στη χρήση και μείωση πιθανότητας του ανθρώπινου λάθους. Λόγω της υψηλής αυτοματοποίησης των διαδικασιών που πραγματοποιούνται σε ένα LOC, η ανθρώπινη ανάμιξη ελαχιστοποιείται. Κατ' αυτόν τον τρόπο μειώνεται η

πιθανότητα λάθους που οφείλεται στον ανθρώπινο παράγοντα. Επίσης, απλοποιείται ιδιαίτερα το έργο του χρήστη της συσκευής, και επομένως δεν είναι απαραίτητη η παρουσία εξειδικευμένου προσωπικού για τη διεξαγωγή των αναλύσεων.

- Μικρές ποσότητες δειγμάτων και χημικών αντιδραστηρίων. Οι μικρές ποσότητες χημικών που χρησιμοποιούνται στα LOC, μειώνουν ακόμη περισσότερο το συνολικό κόστος, ενώ έτσι περιορίζεται και η ποσότητα των αποβλήτων. Παράλληλα, στα LOC χρειάζονται μόνο μικρές ποσότητες δειγμάτων, γεγονός που επιτρέπει την πραγματοποίηση διαγνωστικών εξετάσεων χωρίς τη συλλογή μεγάλης ποσότητας αίματος από τους ασθενείς.
- Έλεγχος και απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο. Χάρη στην άμεση απόκριση των μικροδιατάξεων, είναι δυνατός ο έλεγχος των αντιδράσεων και των αναλύσεων τη στιγμή που συμβαίνουν.
- Ασφαλέστερο περιβάλλον για τη διεξαγωγή πειραμάτων. Λόγω των μικρών διαστάσεων, η ενέργεια και η ποσότητα των ρευστών και των χημικών, που συσσωρεύονται εντός του LOC είναι πολύ μικρές, με αποτέλεσμα να περιορίζεται ο κίνδυνος σε περίπτωση ατυχήματος.
- Προσιότητα. Λόγω του χαμηλού κόστους και της φορητότητάς τους, τα LOC αποτελούν ιδανικά εργαλεία στην προσπάθεια να φτάσουν ιατρικές εξετάσεις σε όλα τα μέρη του πλανήτη, και ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Ιδιαίτερα τον τελευταίο καιρό, τα LOC έχουν γίνει εξαιρετικά δημοφιλή στον τομέα της κλινικής διάγνωσης, κυρίως λόγω της αυξημένης ανάγκης που έχει προκύψει για άμεση ανάπτυξη εξατομικευμένων μικροδιατάξεων, με τη δυνατότητα να προσφέρουν γρήγορο και αξιόπιστο διαγνωστικό έλεγχο στο σημείο όπου παρέχεται ιατρική φροντίδα στον ασθενή [point of care testing (**POC**)] [7]. Σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις (αλλά και σε άλλες εφαρμογές, όπως στην ανίχνευση παθογόνων οργανισμών σε τρόφιμα), απαραίτητο στάδιο για τη λειτουργία της μικροδιάταξης αποτελεί ο πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί αρκετή έμφαση στην κατασκευή μικροδιατάξεων με τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού γενετικού υλικού.

## 1.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [polymerase chain reaction (**PCR**)] είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (**DNA**). Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis το 1983 [8] και για το έργο του αυτό βραβεύθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1993 (μοιράστηκε το βραβείο με τον Michael Smith) [9]. Με τη μέθοδο αυτή, είναι δυνατό να παραχθεί πολύ μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, ξεκινώντας από μικρή ποσότητα γενετικού υλικού.

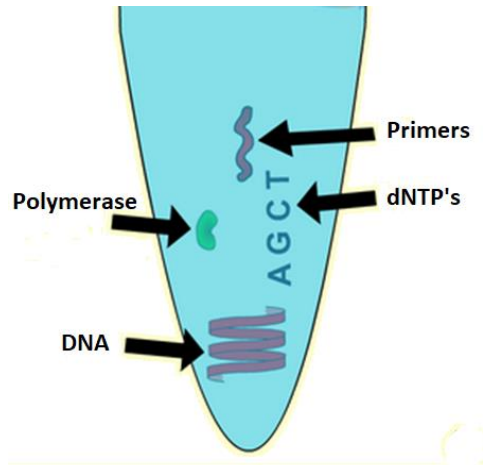
Ο πολλαπλασιασμός του DNA με τη μέθοδο της PCR είναι υψηλής σημασίας, καθώς βρίσκει ποικίλες εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς τομείς. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για ανάλυση του DNA, χρειάζονται μεγαλύτερη ποσότητα από όση μπορεί να βρίσκεται συνήθως σε ένα τυπικό δείγμα, επομένως είναι απαραίτητο να προηγηθεί πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού του δείγματος. Μερικές από τις διαδικασίες στις οποίες εφαρμόζεται η PCR είναι η ταυτοποίηση και ανάλυση μεταλλάξεων σε DNA ευκαρυωτικών οργανισμών, η ανίχνευση ογκογονιδίων, η ταυτοποίηση προσώπων, μέσω «δακτυλικού αποτυπώματος» του DNA (DNA fingerprint)<sup>2</sup>, η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων, καθώς και η ανίχνευση παθογόνων οργανισμών [10].

### 1.2.1 Τα συστατικά της PCR

Στην κλασσική PCR το υπό πολλαπλασιασμό δείγμα του DNA τοποθετείται σε ένα υδατικό διάλυμα, μαζί με το ένζυμο DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (**dNTPs**) και τους εκκινητές (primers).

---

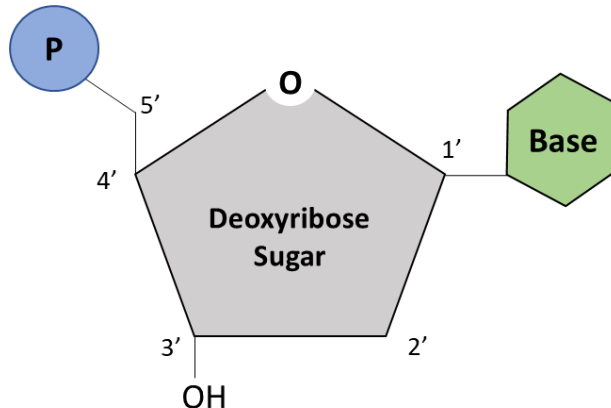
<sup>2</sup> «Δακτυλικό αποτύπωμα» του DNA (DNA fingerprinting ή DNA typing ή genetic fingerprinting) ονομάζεται η τεχνική κατά την οποία εξάγονται, απομονώνονται και ταυτοποιούνται στοιχεία της αλληλουχίας του DNA.



Σχήμα 1-2. Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την PCR τοποθετούνται μέσα σε υδατικό διάλυμα.

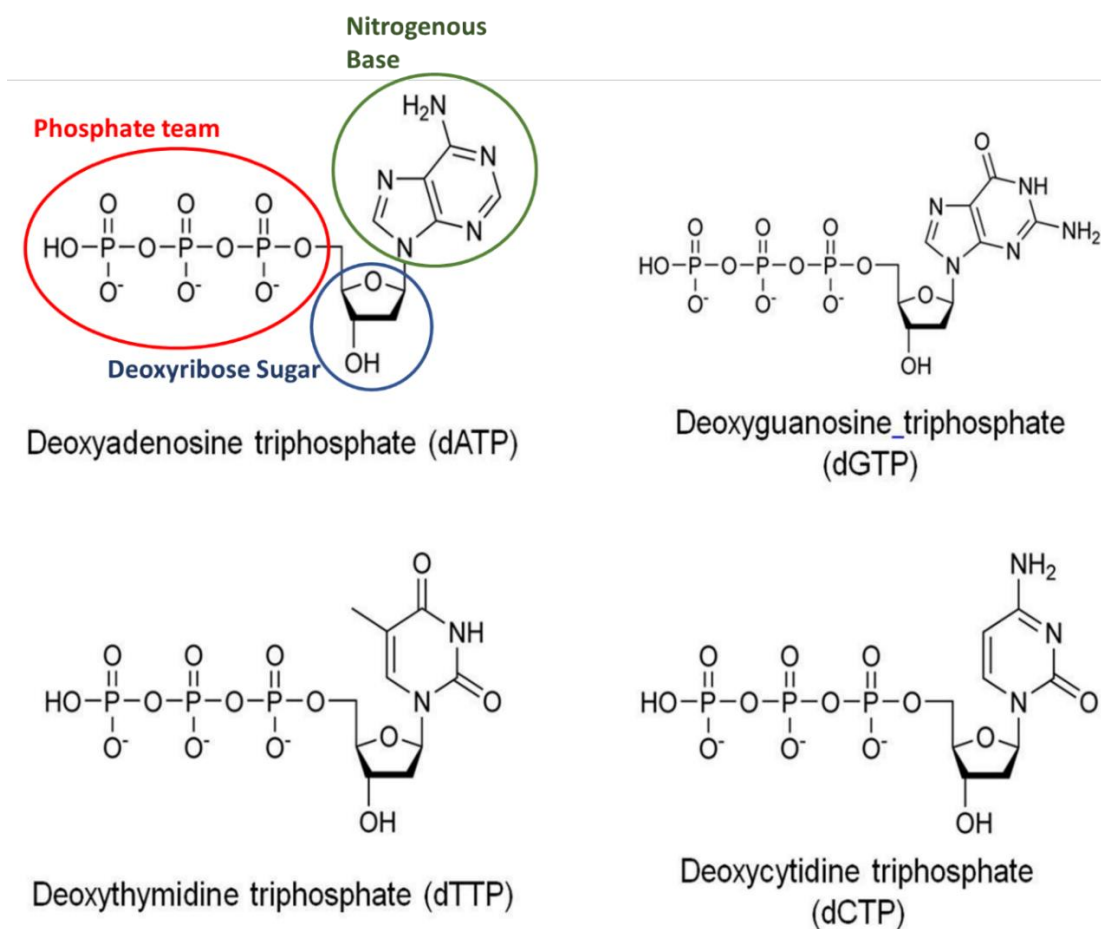
### Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleoside triphosphates ή dNTPs) είναι σύνθετα οργανικά μόρια τα οποία αποτελούν τις βασικές δομικές μονάδες από τις οποίες συντίθεται το DNA. Κάθε dNTP αποτελείται από μία φωσφορική ομάδα (triphosphate group), ένα δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο (deoxyribose sugar) και μια αζωτούχα βάση (nitrogenous base), που συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς, όπως φαίνεται στο σχήμα 1-3.



Σχήμα 1-3. Κάθε dNTP αποτελείται από μία φωσφορική ομάδα (P), ένα δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο και μία αζωτούχα βάση. Οι πέντε άνθρακες στο δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο αριθμούνται ωρολογιακά, ξεκινώντας από το Οξυγόνο (O). Έτσι, ο άνθρακας 1' συνδέεται με την αζωτούχα βάση, ο άνθρακας 3' συνδέεται με το υδροξύλιο (-OH), ενώ άνθρακας 5' συνδέεται με τη φωσφορική ομάδα.

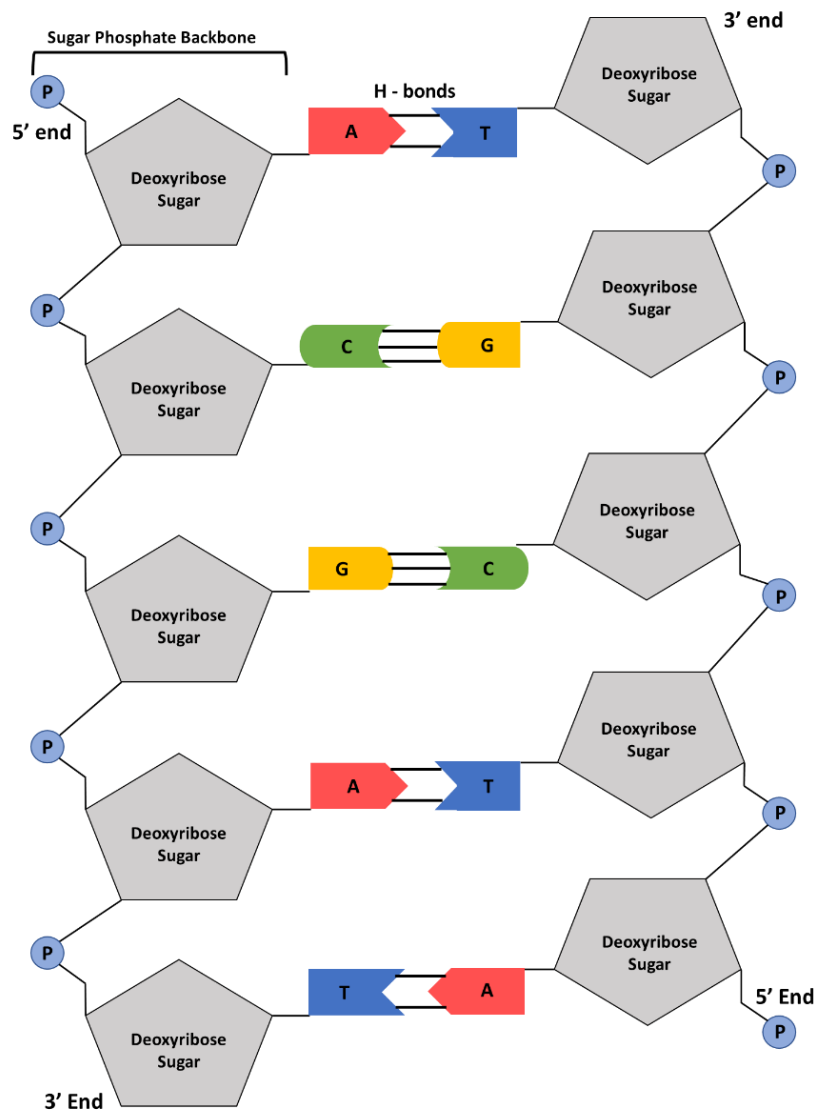
Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά είδη αζωτούχων βάσεων, ένα εκ των οποίων μπορεί να περιέχεται σε ένα dNTP. Οι διαφορετικές αυτές βάσεις είναι οι: Αδενίνη (Adenine - A), Θυμίνη (Thimine - T), Κυτοσίνη (Cytosine - C) και Γουανίνη (Guanine - G). Ανάλογα με το ποια από τις παραπάνω βάσεις περιέχει το κάθε μόριο, προκύπτει και το αντίστοιχο dNTP (dATP, dTTP, dCTP και dGTP).



Σχήμα 1-4. Η μοριακή δομή των dNTPs. Το σταθερό μέρος είναι ίδιο σε όλα τα dNTPs και αποτελείται από τη φωσφορική ομάδα και το δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο. Ανάλογα με το ποια αζωτούχα βάση συνδέεται με το δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο, προκύπτουν τα τέσσερα διαφορετικά είδη dNTPs που παρατηρούνται στο DNA.

Η φωσφορική ομάδα εναλλάσσεται με το δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο στην εξωτερική πλευρά της διπλής έλικας του DNA, συνθέτοντας έτσι το σταθερό τμήμα της. Για το λόγο αυτό, αποκαλούνται και «σκελετός» του DNA (sugar - phosphate backbone of DNA). Στο εσωτερικό της διπλής έλικας βρίσκονται οι αζωτούχες βάσεις, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους. Οι δεσμοί αυτοί

μπορούν να δημιουργηθούν μόνο μεταξύ ζευγών Αδενίνης (A) – Θυμίνης (T) (διπλοί δεσμοί υδρογόνου) και Κυτοσίνης (C) – Γουανίνης (G) (τριπλοί δεσμοί υδρογόνου), κρατώντας έτσι τις δύο έλικες του DNA ενωμένες μεταξύ τους.

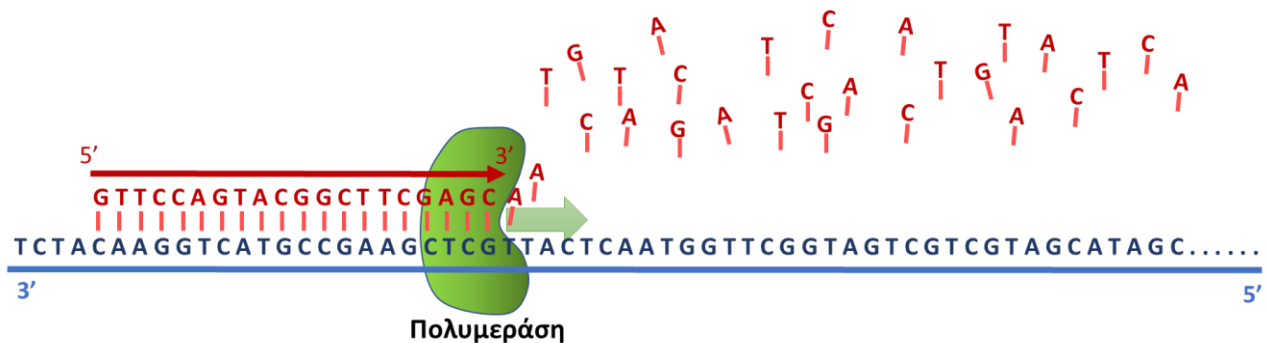


Σχήμα 1-5. Η δομή του DNA. Στην εξωτερική πλευρά εναλλάσσονται η φωσφορική ομάδα με το δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο, συνθέτοντας έτσι το σταθερό τμήμα της διπλής έλικας του DNA (sugar - phosphate backbone of DNA). Στο εσωτερικό της διπλής έλικας βρίσκονται οι αζωτούχες βάσεις, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους. Οι δεσμοί αυτοί, κρατούν τις δύο έλικες του DNA ενωμένες μεταξύ τους.



## Πολυμεράση (Polymerase)

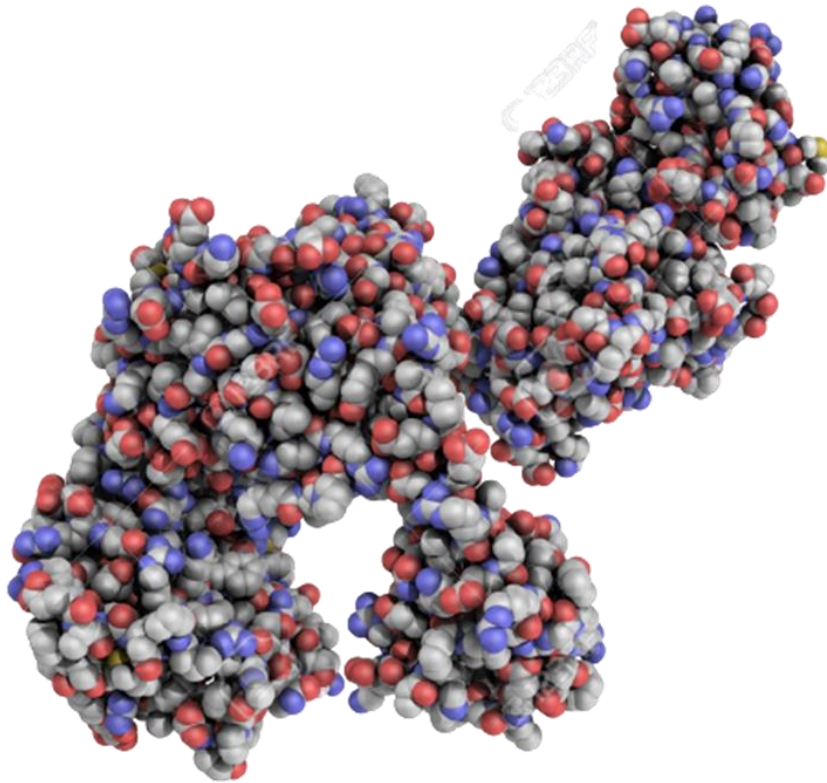
Όπως προκύπτει και από την ονομασία της, η μέθοδος της PCR βασίζεται στο ένζυμο DNA πολυμεράση. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται από τους ζωντανούς οργανισμούς για τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA και έχει την ικανότητα να δημιουργεί νέες αλυσίδες DNA, χρησιμοποιώντας ως οδηγό τις μονές συμπληρωματικές τους. Κατά τη διαδικασία αυτή, η πολυμεράση προσδένεται στη μονή αλυσίδα του DNA και μετακινείται κατά μήκος της, προς την κατεύθυνση 3'→5',<sup>3</sup> τοποθετώντας διαδοχικά dNTPs με συμπληρωματικές βάσεις σε σχέση με αυτά της αλυσίδας. Έτσι, επεκτείνεται η νέα αλυσίδα του DNA (στην κατεύθυνση 5'→3'), η οποία είναι συμπληρωματική ως προς την αρχική αλυσίδα.



Σχήμα 1-6. Η πολυμεράση προσδένεται στη μονή αλυσίδα του DNA και μετακινείται κατά μήκος της, προς την κατεύθυνση 3'→5', τοποθετώντας διαδοχικά dNTPs με συμπληρωματικές βάσεις σε σχέση με αυτά της αλυσίδας. Δημιουργείται έτσι, μία νέα αλυσίδα με κατεύθυνση 5'→3' συμπληρωματική ως προς την αρχική.

<sup>3</sup> Οι ονομασίες 5' και 3' αναφέρονται στην αρίθμηση των ατόμων του άνθρακα στο δεοξυριβονουκλεϊκό σάκχαρο (βλ. σχήμα 1-3). Με την ένωση πολλών dNTPs, η μονή αλυσίδα DNA που προκύπτει θα έχει διαφορετικό άνθρακα σε κάθε άκρο της. Στο αρχικό άκρο θα βρίσκεται ο 5' άνθρακας του πρώτου dNTP, ενώ στο τελικό άκρο θα υπάρχει ο 3' άνθρακας του τελικού dNTP (βλ. σχήμα 1-5). Η ασυμμετρία αυτή, μας επιτρέπει να ορίσουμε κατευθύνσεις στο σκελετό του DNA. Επειδή τα dNTPs έχουν την ιδιότητα να προστίθενται στο 3' άκρο μίας αλυσίδας DNA, οι αλυσίδες επεκτείνονται προς την κατεύθυνση 5'→3'.

Στην πράξη, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις που εφαρμόζεται PCR, χρησιμοποιείται κάποια πολυμεράση με την ικανότητα να παραμένει σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως η Taq πολυμεράση.<sup>4</sup>



Σχήμα 1-7. Μοριακή δομή του ενζύμου της Taq πολυμεράσης [11].

### Εκκινητές (Primers)

Οι εκκινητές είναι μονές αλυσίδες γενετικού υλικού περιορισμένου μήκους και χρησιμοποιούνται στην PCR, καθώς επιτρέπουν στο ένζυμο της πολυμεράσης να ξεκινήσει τη σύνθεση του DNA. Κατασκευάζονται έτσι ώστε να έχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων, με σκοπό να μπορούν να προσδεθούν σε μία περιοχή «στόχο» της

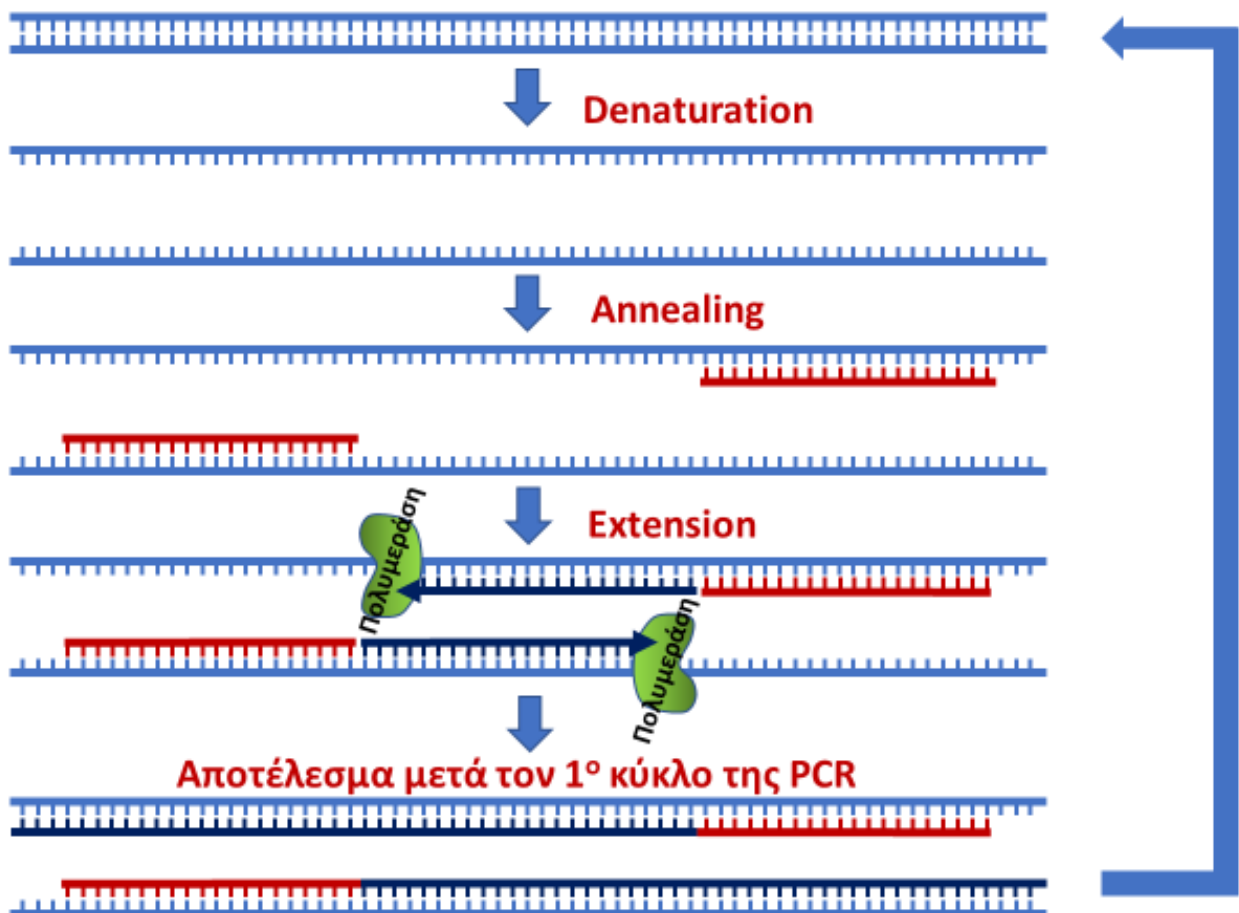
---

<sup>4</sup> Η ονομασία της Taq πολυμεράσης προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, από το οποίο και απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Chien et al, το 1976 [103].



## 1.2.2 Τα στάδια της PCR

Κατά τη διαδικασία της PCR, το δείγμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί περνάει από τα ακόλουθα στάδια: αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA (denaturation), υβριδισμός των εκκινητών (primer annealing) και επιμήκυνση (extension ή elongation).



Σχήμα 1-9. Ένας κύκλος της PCR. Κατά το στάδιο της αποδιάταξης (95 °C) αποκολλώνται οι δύο αλυσίδες του DNA. Στο στάδιο του υβριδισμού (50-65 °C), προσκολλώνται οι εκκινητές στις μονές αλυσίδες. Στο στάδιο της επιμήκυνσης (72 °C), η πολυμεράση ξεκινώντας από τους εκκινητές, συνθέτει νέες αλυσίδες DNA συμπληρωματικές ως προς τις υπάρχουσες.

## Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA (Denaturation)

Το πρώτο στάδιο ενός κύκλου της PCR, είναι αυτό της αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA. Κατά το στάδιο αυτό, το δείγμα θερμαίνεται στη θερμοκρασία **αποδιάταξης [denaturation temperature ( $T_{den}$ )]**, στους 95 °C.<sup>5</sup> Στη θερμοκρασία αυτή, διαρρηγνύονται οι δεσμοί που συγκρατούν τη διπλή έλικα του DNA ενωμένη, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δύο μονές αλυσίδες DNA. Το δείγμα δεν πρέπει να θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 98 °C, καθώς έτσι εκτίθεται σε κίνδυνο βρασμού του υγρού διαλύτη και καταστροφής του βιολογικού υλικού.

## Υβριδισμός των εκκινητών (Primer Annealing)

Μετά το στάδιο της αποδιάταξης, ακολουθεί αυτό του υβριδισμού των εκκινητών. Κατά το στάδιο αυτό, το δείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία μεταξύ 50 και 65 °C. Η ακριβής θερμοκρασία υβριδισμού [annealing temperature ( $T_{an}$ )], στην οποία μεγιστοποιείται ο βαθμός απόδοσης του υβριδισμού των εκκινητών, εξαρτάται από τους εκάστοτε εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην PCR και πιο συγκεκριμένα, από τη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών [melting temperature ( $T_m$ )].<sup>6,7</sup> Στη νέα αυτή θερμοκρασία, οι εκκινητές προσκολλώνται στις μονές αλυσίδες του DNA που προέκυψαν από το προηγούμενο στάδιο.

---

<sup>5</sup> Η θερμοκρασία αυτή, όπως και οι υπόλοιπες που ακολουθούν στα επόμενα στάδια, μπορεί να κυμαίνεται μερικούς βαθμούς κελσίου. Η διακύμανση αυτή οφείλεται στην επιλογή διαφορετικών πρωτοκόλλων, ανάλογα με την διάταξη της PCR αλλά και την επιλογή της πολυμεράσης και των εκκινητών.

<sup>6</sup> Συχνά στην PCR, χρησιμοποιείται θερμοκρασία υβριδισμού  $T_{an}$  περίπου 5 °C χαμηλότερη της θερμοκρασίας αποδιάταξης του κάθε εκκινητή [primer melting temperature ( $T_m$ )]. Υπάρχουν ωστόσο, ακριβέστεροι τρόποι για τον υπολογισμό της  $T_{an}$ , όπως η παρακάτω σχέση [104]:

$$T_a Opt = 0.3 \times (T_m \text{ of primer}) + 0.7 \times (T_m \text{ of product}) - 14,9$$

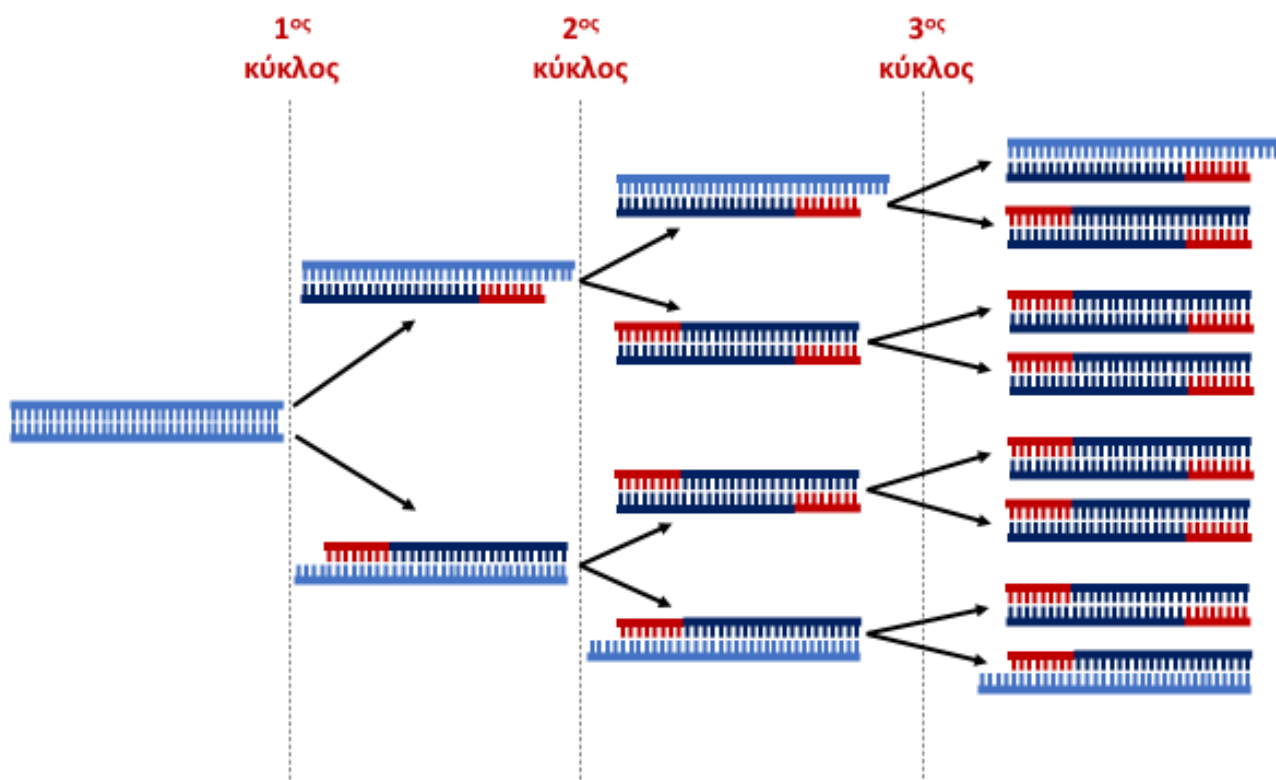
<sup>7</sup> Η θερμοκρασία αποδιάταξης του κάθε εκκινητή [primer melting temperature ( $T_m$ )], η οποία δεν πρέπει να συγχέεται με τη θερμοκρασία αποδιάταξης της διπλής έλικας του DNA [denaturation temperature ( $T_{den}$ )], είναι η θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές αποκολλώνται από τις συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA και εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων G-C (οι οποίες δημιουργούν τριπλούς δεσμούς υδρογόνου), που βρίσκονται στον εκκινητή.

## *Επιμήκυνση (Extension)*

Στο τρίτο στάδιο, αυτό της επιμήκυνσης, το δείγμα θερμαίνεται στη θερμοκρασία επιμήκυνσης [extension temperature ( $T_{ext}$ )], η οποία είναι συνήθως στους 72 °C. Στη θερμοκρασία αυτή βελτιστοποιείται η δράση του ενζύμου της πολυμεράσης, το οποίο ξεκινώντας από τους ήδη προσκολλημένους εκκινητές, προσθέτει dNTPs και συνθέτει νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές ως προς τις ήδη υπάρχουσες. Η θερμοκρασία επιμήκυνσης εξαρτάται, όπως είναι φυσικό, από το είδος της πολυμεράσης που χρησιμοποιείται στην PCR.

## *Κύκλοι της PCR*

Τα τρία αυτά διαδοχικά στάδια (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμήκυνση) αποτελούν ένα κύκλο της PCR. Κάθε κύκλος της PCR οδηγεί στο διπλασιασμό του τμήματος του DNA του οποίου επιθυμούμε τον πολλαπλασιασμό (σχήμα 1-9). Επομένως, η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά με το πέρασμα των κύκλων της PCR, γεγονός που μας επιτρέπει να καταλήξουμε σε έναν πολύ ποσότητα του επιθυμητού τμήματος του DNA, ξεκινώντας από μικρό αρχικό αριθμό μορίων. Θεωρητικά, κάθε κύκλος θα έπρεπε να οδηγεί στο διπλασιασμό του αρχικού DNA (σχήμα 1-10). Στην πράξη ωστόσο, σε κάθε κύκλο της PCR επιτυγχάνεται ο διπλασιασμός μόνο σε ένα ποσοστό των μορίων του DNA, με αποτέλεσμα η πρόοδος με την οποία αυξάνεται το DNA να μην είναι γεωμετρική, αλλά μικρότερη. Η συνολική διαδικασία χρειάζεται συνήθως από 20 έως 40 κύκλους, ανάλογα με την εφαρμογή στην οποία χρησιμοποιείται η PCR.



Σχήμα 1-10. Σε κάθε κύκλο της PCR διπλασιάζεται το τμήμα του DNA, του οποίου επιθυμούμε τον πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα η συνολική ποσότητα του DNA να αυξάνεται εκθετικά.

### 1.2.3 Παραδοσιακή PCR

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τη διεξαγωγή της PCR είναι η «παραδοσιακή μέθοδος». Κατά την παραδοσιακή PCR, το υδατικό διάλυμα που περιέχει το υπό πολλαπλασιασμό δείγμα και τα υπόλοιπα συστατικά, τοποθετείται σε μία διάταξη που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής (thermal cycler ή thermocycler). Συνήθως, για λόγους εξοικονόμησης χρόνου και ενέργειας, τοποθετούνται πολλά δείγματα συγχρόνως μέσα στον ίδιο θερμοκυκλοποιητή. Στη συνέχεια, ο θερμοκυκλοποιητής μεταβάλλει τη θερμοκρασία στο εσωτερικό του, διατηρώντας τη σταθερή για τα κατάλληλα χρονικά διαστήματα, έτσι ώστε να επιτευχθούν τα αντίστοιχα στάδια της PCR. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθούν οι απαραίτητοι κύκλοι.



*Σχήμα 1-11. Θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της παραδοσιακής PCR.*

Η παραδοσιακή PCR, αν και έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη και λειτουργική μέθοδος για τον πολλαπλασιασμό του DNA, παρουσιάζει και κάποιους περιορισμούς. Λόγω του μεγάλου μεγέθους των μηχανημάτων που απαιτούνται για να γίνουν οι θερμοκοί κύκλοι της PCR, προκύπτουν χρονικοί περιορισμοί στη διαδικασία. Οι μεγάλες μάζες του θερμοκυκλοποιητή και των δειγμάτων, αποτελούν εμπόδιο στη γρήγορη αλλαγή των θερμοκρασιών, μεταξύ των σταδίων του κάθε κύκλου της PCR. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό κύκλων της PCR, καθυστερεί σημαντικά τη συνολική διαδικασία. Ο χρόνος διεξαγωγής της παραδοσιακής PCR είναι συνήθως της τάξης μεγέθους των δύο ωρών ή και περισσότερο. Ένα άλλο πρακτικό πρόβλημα που σχετίζεται με τον εξοπλισμό της παραδοσιακής PCR, είναι η δυσκολία της να πραγματοποιηθεί εκτός εργαστηρίου. Το μέγεθος του θερμοκυκλοποιητή και η σχετικά υψηλή κατανάλωση του σε ηλεκτρική ενέργεια, αποτελούν σημαντικά εμπόδια στην προσπάθεια να γίνει η παραδοσιακή PCR, μία φορητή μέθοδος. Αν συνυπολογισθεί το γεγονός, ότι για τη διεξαγωγή της απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, προκύπτει τελικά πως η εφαρμογή της παραδοσιακής PCR εκτός εργαστηρίου είναι πρακτικά αδύνατη.



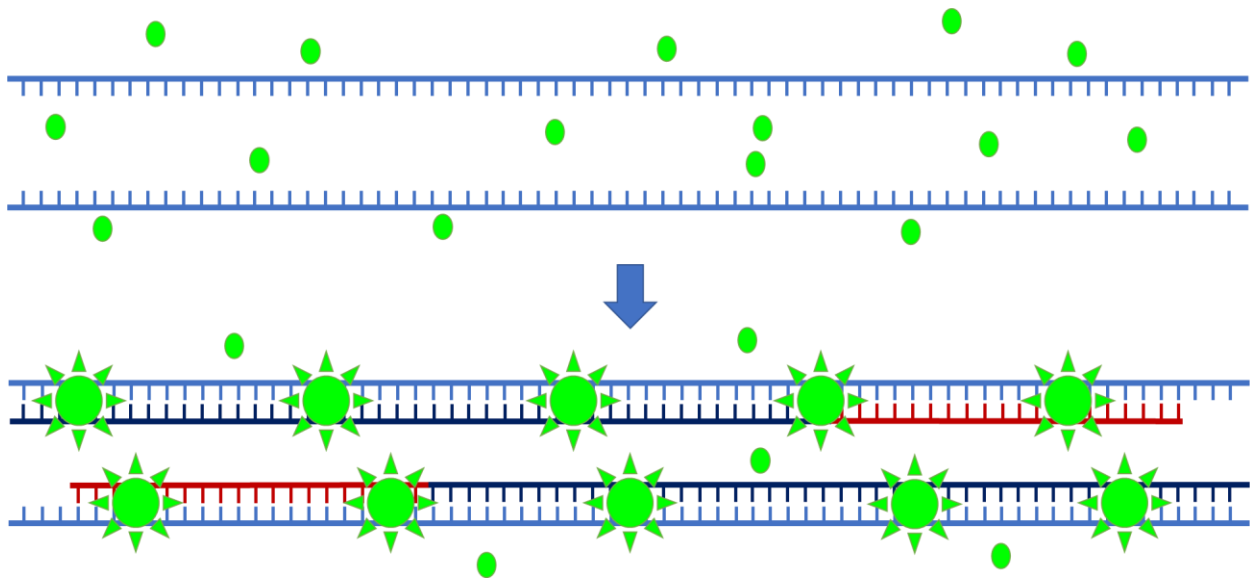
## 1.2.4 PCR Πραγματικού Χρόνου (Real-Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) ή ποσοτική [quantitative PCR (qPCR<sup>8</sup>)], είναι μία μέθοδος, η οποία επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας του γενετικού υλικού στο δείγμα, σε πραγματικό χρόνο. Στην qPCR, η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με τη χρήση φθορίζοντων δεικτών ανίχνευσης. Οι δείκτες αυτοί, μπορεί να είναι είτε κάποια φθορίζουσα βαφή (fluorescent dye), είτε εξειδικευμένα μόρια ανιχνευτές (target-specific probes).

Στην πρώτη περίπτωση, προστίθενται στο αρχικό διάλυμα ειδικά μόρια βαφές (dyes), με την ιδιότητα να προσκολλώνται στο DNA, όταν αυτό βρίσκεται σε μορφή διπλής έλικας. Η πιο συχνή περίπτωση τέτοιου μορίου, είναι το SYBR Green I (SG), το οποίο στην κανονική του κατάσταση εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία χαμηλής έντασης. Ωστόσο, μετά την προσκόλλησή του σε μία διπλή έλικα DNA, το σύμπλεγμα DNA-SG αποκτά την ιδιότητα να απορροφά γαλάζιο φως ( $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$ ), εκπέμποντας πράσινο ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ ). Φωτίζοντας με γαλάζιο φως το δείγμα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός της ποσότητας των μορίων DNA διπλής έλικας στο δείγμα, καθώς όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός τους, τόσο περισσότεροι δείκτες προσκολλώνται σε αυτά, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το συνολικό σήμα του φθορισμού (σχήμα 1-12). Η μέθοδος αυτή είναι σχετικά απλή, αποτελεσματική και με χαμηλό κόστος. Ένα μειονέκτημα ωστόσο που παρουσιάζει είναι πως το SG δεν είναι εξειδικευμένο, δηλαδή προσκολλάται σε όλα τα μόρια DNA με διπλή έλικα.

---

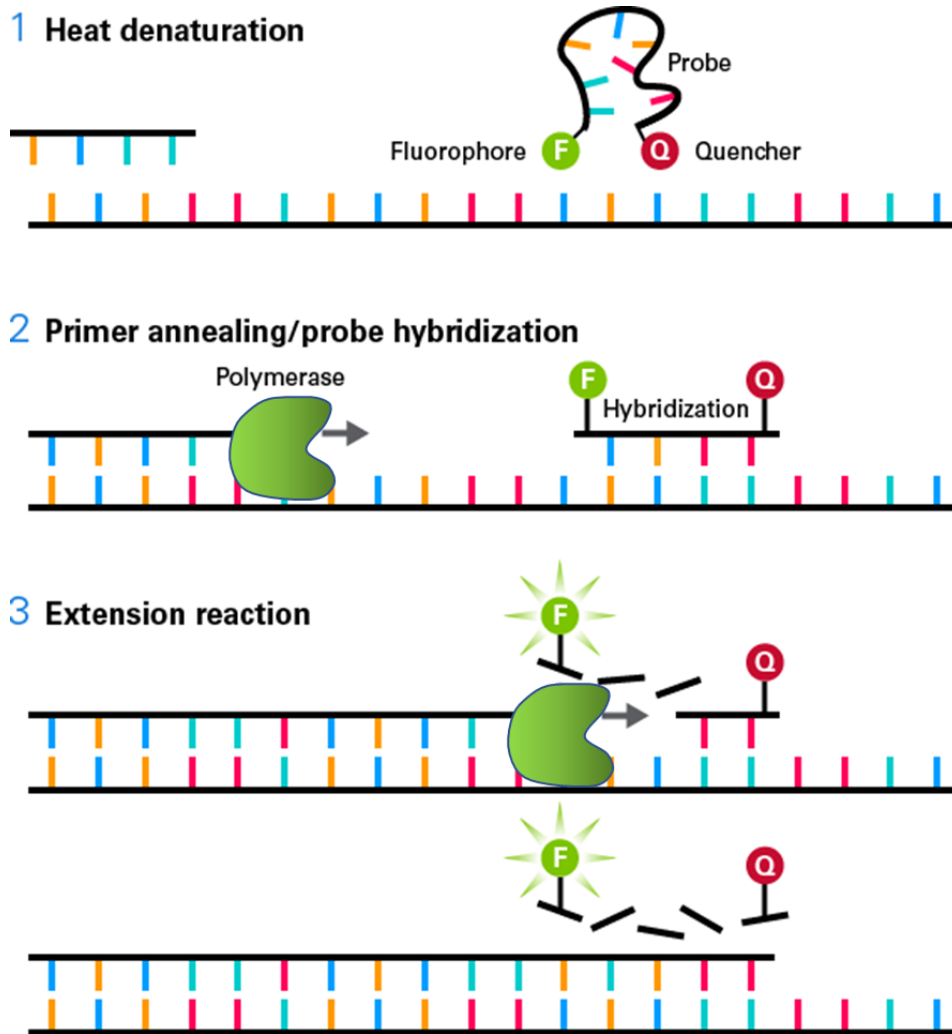
<sup>8</sup> Σε ορισμένες περιπτώσεις στη βιβλιογραφία, χρησιμοποιείται ο όρος RT-PCR ως συντομογραφία για την Real-Time PCR. Ωστόσο, η χρήση αυτής της συντομογραφίας μπορεί να δημιουργήσει κάποια σύγχυση μεταξύ της Real-Time PCR και της Reverse Transcription PCR, η οποία επίσης συντομεύεται ως RT-PCR. Στην παρούσα εργασία, η Real-Time PCR θα αναφέρεται ως qPCR, από το quantitative PCR.



Σχήμα 1-12. Real-Time PCR (qPCR) με χρήση SYBR Green I (SG). Για κάθε νέα διπλή αλυσίδα DNA που παράγεται, προσδένονται σε αυτήν μόρια SG, εκπέμποντας πράσινη φθορίζουσα ακτινοβολία.

Η δεύτερη μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του γενετικού υλικού, γίνεται με χρήση εξειδικευμένων δεικτών (specific probes). Η πιο συνηθισμένη περίπτωση probe είναι ο δείκτης TaqMan. Πρόκειται για μία μονή αλυσίδα DNA, με συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική ως προς το υπό πολλαπλασιασμό DNA. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει στους δείκτες TaqMan να προσδένονται κατά το στάδιο του υβριδισμού, στις ελεύθερες μονές αλυσίδες του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, όπως συμβαίνει και με τους εκκινητές. Στα άκρα της μονής αλυσίδας του TaqMan, είναι προσδεμένα, με ομοιοπολικούς δεσμούς, δύο μόρια. Το πρώτο μόριο ονομάζεται fluorophore, βρίσκεται στο 5' άκρο και εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία, ενώ το δεύτερο ονομάζεται quencher, βρίσκεται στο 3' άκρο και απορροφά την ακτινοβολία του πρώτου. Όταν αυτά τα δύο μόρια βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους, ο quencher απορροφά όλη την ακτινοβολία του fluorophore. Κατά τη διαδικασία της PCR, στο στάδιο υβριδισμού, οι δείκτες TaqMan προσδένονται στις μονές αλυσίδες του DNA (probe hybridization), όπως ακριβώς και οι εκκινητές. Στη συνέχεια, κατά το στάδιο της επιμήκυνσης, η πολυμεράση συνθέτει νέες συμπληρωματικές αλυσίδες DNA, αποσυνθέτοντας τους προσδεμένους TaqMan. Έτσι, ο fluorophore ελευθερώνεται από τον quencher, και η ακτινοβολία του ανιχνεύεται από το εξωτερικό όργανο. Όσο

περισσότερα διπλά μόρια DNA συνθέτει η πολυμεράση τόσο περισσότεροι δείκτες TaqMan αποσυντίθενται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το σήμα φθορισμού.



Σχήμα 1-13. qPCR με χρήση specific probes.

Η χρήση των εξειδικευμένων δεικτών καθιστά την όλη διαδικασία πολυπλοκότερη, ενώ αυξάνει και το κόστος της qPCR. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή παρέχει εξειδίκευση στην επιλογή του DNA από τους δείκτες, γεγονός που επιτρέπει την παράλληλη διεξαγωγή qPCR σε πολλά διαφορετικά τμήματα DNA στον ίδιο αντιδραστήρα (multiplex qPCR).

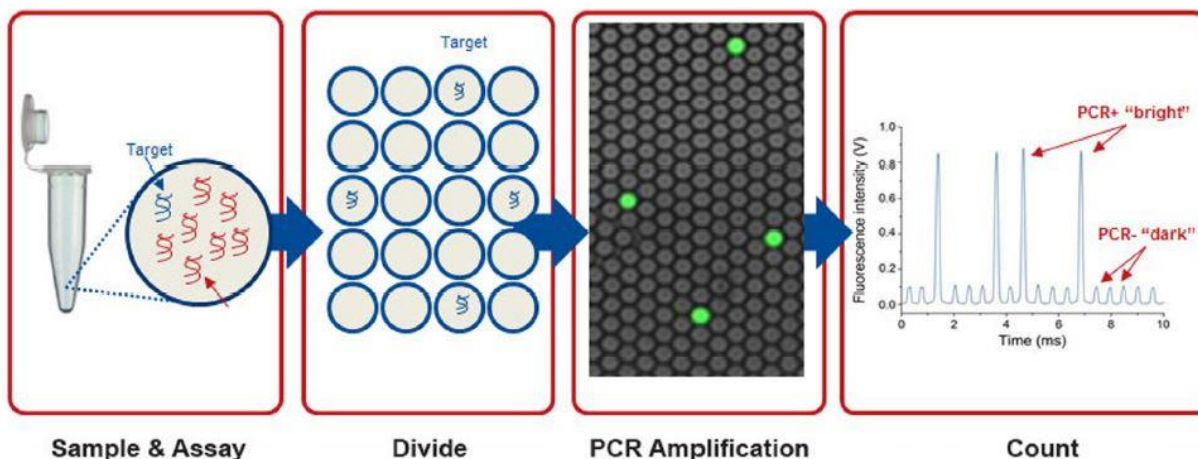
Τελικά, τα δεδομένα από την φθορίζουσα ακτινοβολία συλλέγονται κατά τη διάρκεια της qPCR και αναλύονται. Με την κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων αυτών και με τη χρήση καμπυλών αναφοράς (standard curves) είναι δυνατή η εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος στο DNA.

### 1.2.5 Ψηφιακή PCR (Digital PCR)

Η qPCR αποτελεί το βασικότερο εργαλείο, την παρούσα χρονική στιγμή, για τον ποσοτικό πολλαπλασιασμό γενετικού υλικού. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις, στις οποίες τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την qPCR δεν έχουν ικανοποιητικό βαθμό ακρίβειας. Οι πιο χαρακτηριστικές περιπτώσεις είναι αυτές, στις οποίες η αρχική ποσότητα του DNA στόχου είναι πολύ μικρή, και υπάρχει ο κίνδυνος να χαθεί το σήμα που εκπέμπεται από το DNA στόχο, ανάμεσα στο υπόλοιπο σήμα. Απευθυνόμενοι στο πρόβλημα αυτό, οι Vogelstein et al παρουσίασαν το 1999 την πρώτη ψηφιακή PCR (Digital PCR – **dPCR**) [12]. Η Ψηφιακή PCR είναι μια προχωρημένη μέθοδος PCR, η οποία δίνει τη δυνατότητα υπολογισμού της συγκέντρωσης του αρχικού DNA στόχου, παρακάμπτοντας ορισμένους περιορισμούς που παρουσιάζονται στην qPCR [12,13]. Κατά τη μέθοδο αυτή, το δείγμα διαχωρίζεται σε χιλιάδες επιμέρους τμήματα<sup>9</sup>, έτσι ώστε το κάθε ένα από αυτά να περιέχει είτε λίγα μόρια του αρχικού DNA στόχου, είτε κανένα [13,14]. Στη συνέχεια εφαρμόζεται PCR σε όλα τα επιμέρους τμήματα, και καταμετράται ο αριθμός αυτών που περιέχουν το ζητούμενο DNA. Γνωρίζοντας τον αριθμό των τμημάτων που βρέθηκαν θετικά στο ζητούμενο DNA, και ότι ο αρχικός αριθμός των μορίων του DNA που βρισκόταν σε κάθε τμήμα, ακολουθεί την κατανομή Poisson [15,16], καθίσταται δυνατός ο υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης του DNA. Η dPCR μπορεί να δώσει αποτελέσματα υψηλής ακρίβειας και είναι ιδανική για τις περιπτώσεις στις οποίες η αρχική ποσότητα του DNA είναι πολύ μικρή [17], όπου η qPCR δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα [12,13].

---

<sup>9</sup> Ο διαχωρισμός (partitioning), μπορεί να φτάσει τα δεκάδες χιλιάδες ή ακόμα και εκατοντάδες χιλιάδες τμήματα του αρχικού δείγματος.



Σχήμα 1-14. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της dPCR.

### 1.2.6 Ισοθερμοκρασιακός (Isothermal) πολλαπλασιασμός DNA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την εφαρμογή της PCR απαιτείται ένας αριθμός επαναλαμβανόμενων κύκλων, κατά τους οποίους μεταβάλλεται η θερμοκρασία του δείγματος. Τα τελευταία χρόνια, έχουν δοκιμαστεί αρκετές μέθοδοι πολλαπλασιασμού DNA, στις οποίες δεν απαιτείται η μεταβολή της θερμοκρασίας του δείγματος. Αυτές οι μέθοδοι ονομάζονται ισοθερμοκρασιακές (Isothermal Amplification – **IsoAamp**).

Από αυτές τις μεθόδους, μακράν η πιο διαδεδομένη, είναι η Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), η οποία αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 2000 από τους Notomi et al [18]. Άλλες τεχνικές ισοθερμοκρασιακού πολλαπλασιασμού είναι οι recombinase polymerase amplification (RPA) [19], helicase-dependent amplification (HDA) [20], strand displacement amplification (SDA) [21], rolling circle amplification (RCA) [22], signal-mediated amplification of RNA technology (SMART) [23], nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [24], single primer-triggered isothermal amplification [25] και cross priming amplification (CPA) [26].

## 1.3 ΜΙΚΡΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ PCR

Η PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό τμημάτων DNA, βρίσκοντας πλήθος εφαρμογών σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς (ιατρικές διαγνώσεις, βιολογία, γεωργία, βιομηχανία τροφίμων, ιατροδικαστική κ.α [14,27]). Ιδιαίτερα στον τομέα της μικροβιολογίας και των ιατρικών διαγνώσεων, ο πολλαπλασιασμός του DNA έχει συχνά καθοριστικό ρόλο για την ανίχνευση παθογόνων οργανισμών [28–30]. Παράλληλα, η ανάπτυξη στην τεχνολογία της μικρορευστονικής, έχει οδηγήσει στην κατασκευή πλήθους μικροδιατάξεων LOC, οι οποίες εφαρμόζουν εργαστηριακές αναλύσεις και πειράματα, προσφέροντας πολλά πλεονεκτήματα. Επομένως, δεν υπήρχε καμία αμφιβολία πως η PCR θα απασχολούσε τους ερευνητές της μικρορευστονικής, καθώς η μεταφορά της τεχνικής αυτής στη μικροκλίμακα προσφέρει πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα και νέες δυνατότητες. Πράγματι, τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί πολλές και διαφορετικές μικροδιατάξεις PCR (**μPCR**), χρησιμοποιώντας μία πολύ μεγάλη ποικιλία σε υλικά και μεθόδους κατασκευής, γεωμετρίες μικροκαναλιών, θερμοκρασιακά πρωτόκολλα, μηχανισμούς θέρμανσης, μηχανισμούς κίνησης των ρευστών, τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του γενετικού υλικού κ.α. Όλα αυτά, καθιστούν την ταξινόμηση και ομαδοποίησή των μικροδιατάξεων PCR, μία αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. Στην παρούσα εργασία, θα γίνει μία προσπάθεια κατηγοριοποίησής τους, με βάση τη γεωμετρία των μικροκαναλιών που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λαμβάνουν χώρα οι θερμοκρασιακοί κύκλοι.

### 1.3.1 Χρονικά μεταβαλλόμενη μPCR (Time domain μPCR)

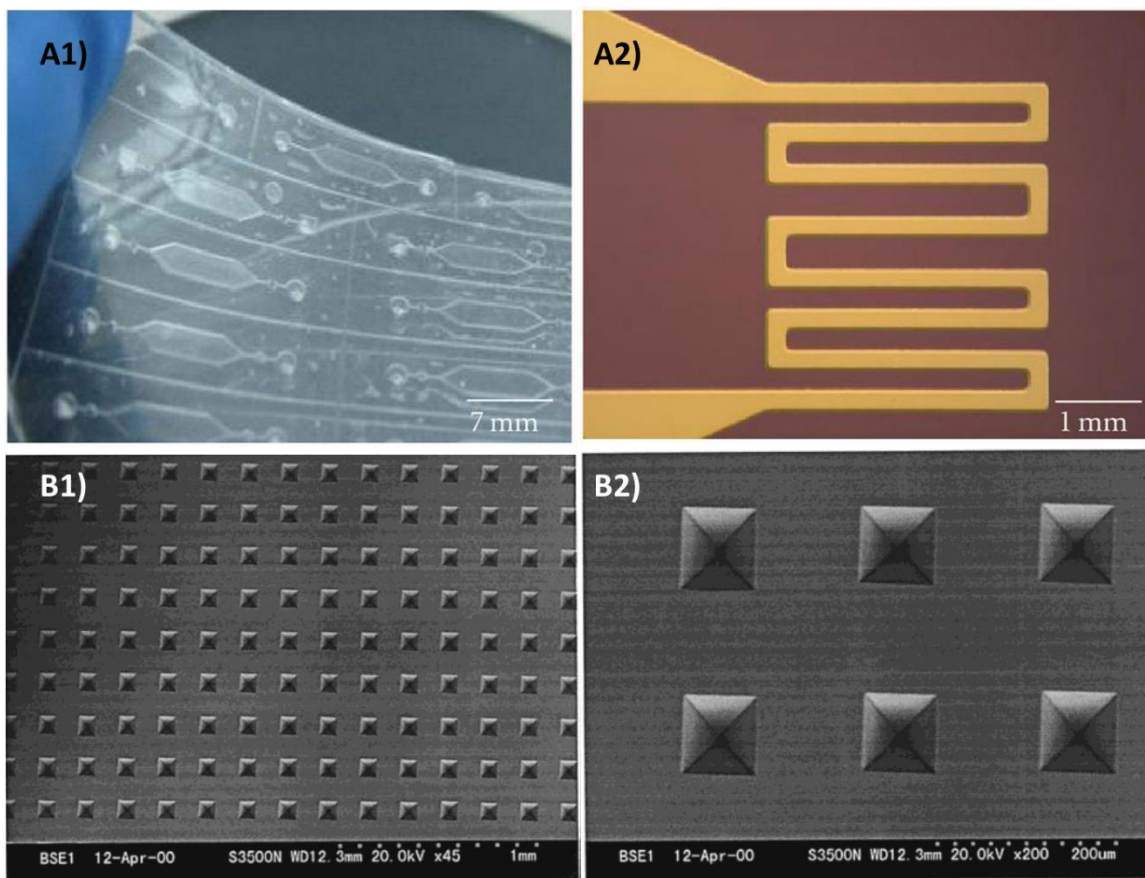
Στην πρώτη κατηγορία μικροδιατάξεων PCR το δείγμα παραμένει στατικό, ενώ η θερμοκρασία του μεταβάλλεται με συστήματα ενεργητικής θέρμανσης και ψύξης. Επειδή η θερμοκρασία του δείγματος εξαρτάται μόνο από το χρόνο και όχι από τη θέση στην

οποία βρίσκεται, η κατηγορία αυτή ονομάζεται PCR στατικού ρευστού (static PCR) ή χρονικά μεταβαλλόμενη PCR (Time domain PCR).

### *μPCR στατικού ρευστού (Micro-chamber PCR)*

Η πιο κλασική περίπτωση χρονικά μεταβαλλόμενης μPCR, είναι οι μικροδιατάξεις οι οποίες χρησιμοποιούν μικροθαλάμους (micro-chamber PCR). Κατά την προσέγγιση αυτή, το δείγμα τοποθετείται στο εσωτερικό ενός ή περισσότερων μικροθαλάμων, συνήθως πολύ μικρών διαστάσεων. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία των μικροθαλάμων μεταβάλλεται σύμφωνα με το επιλεγμένο πρωτόκολλο, ώστε να πραγματοποιηθεί ένας θερμοκρασιακός κύκλος της PCR. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τους απαραίτητους κύκλους, μέχρι να ολοκληρωθεί ο πολλαπλασιασμός του DNA. Πρόκειται δηλαδή, για μία μεταφορά της παραδοσιακής PCR στη μικροκλίμακα. Αυτή η προσέγγιση, ακολουθήθηκε και στην πρώτη προσπάθεια που έγινε για κατασκευή μίας μικροδιατάξης PCR από τους Northrup et al το 1993 [31]. Από τότε, τέτοιου είδους προσπάθειες έχουν επαναληφθεί αρκετές φορές, ενώ η αρχική ιδέα έχει βελτιωθεί σημαντικά. Οι μικροδιατάξεις αυτού του είδους μπορούν με τη σειρά τους να χωριστούν σε μικροδιατάξεις ενός μικροθαλάμου [32–36] και σε μικροδιατάξεις πολλών μικροθαλάμων [37–39].

Αν και έχει υπάρξει σημαντική πρόοδος στις μικροδιατάξεις PCR που χρησιμοποιούν μικροθαλάμους, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί, οι οποίοι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με την προσέγγιση αυτή. Ένα βασικό πρόβλημα που προκύπτει στις διατάξεις αυτές, είναι πως όταν θερμαίνονται και ψύχονται με συμβατικές μεθόδους, μεταβάλλεται η θερμοκρασία ολόκληρου του μικροθαλάμου (ή των μικροθαλάμων), σε κάθε θερμικό κύκλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζεται μεγάλη θερμική αδράνεια, γεγονός που οδηγεί αναπόφευκτα σε σχετικά μεγάλους χρόνους, αλλά και σε αυξημένο ενεργειακό κόστος. Για το λόγο αυτό, μεγάλη έμφαση έχει δοθεί σε εναλλακτικές και πιο περίπλοκες μεθόδους μεταβολής και ελέγχου της θερμοκρασίας.



Σχήμα 1-15. Α) Μικροδιάταξη PCR στατικού ρευστού, κατασκευασμένη σε PDMS το 2011 από τους Morganti et al [36]. Α1) Ο μικροθάλαμος στον οποίο λαμβάνει χώρα η PCR. Α2) Θερμικό στοιχείο. Β) Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) από τη μικροδιάταξη των Nagai et al του 2001 [39], όπου φαίνεται σειρά μικροθαλάμων πάνω σε πυρίτιο (Si), στους οποίους πραγματοποιείται PCR με όγκους της τάξης των μερικών πικόλιτρων. Β1) Μεγέθυνση x45. Β2) Μεγέθυνση x200.

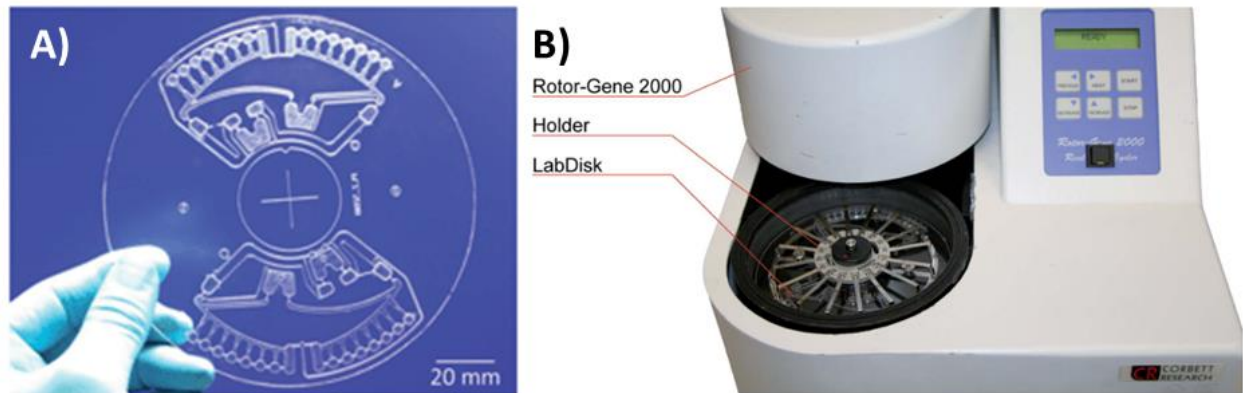
Μία δημοφιλής επιλογή είναι η χρήση υπέρυθρης ακτινοβολίας, η οποία μπορεί να παράγεται μέσω ειδικών λαμπτήρων [40,41] ή μέσω laser [42]. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να θερμανθεί κατευθείαν το δείγμα, χωρίς τη μεταφορά θερμότητας μέσω αγωγής ή συναγωγής. Οι Son et al κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη στην οποία το δείγμα θερμαίνεται με τη χρήση ενός φωτονικού μετατροπέα θερμότητας (photonic thermal converter), διεγείροντας ένα πολύ λεπτό επίπεδο στρώμα χρυσού στο εσωτερικό της μικροδιάταξης με χρήση Light Emitting Diodes (LEDs) [43]. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την ταχύτερη ψύξη των μικροθαλάμων, με συνηθέστερη τη χρήση κάποιου ψυκτικού μέσου (συνά το νερό) [44],[45]. Οι μέθοδοι αυτές, παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Άλλες παρέχουν ταχεία θέρμανση και ψύξη,



ενώ άλλες προσφέρουν μεγαλύτερη ακρίβεια και καλύτερο έλεγχο της θερμοκρασίας, ενώ σημαντικοί παράγοντες παραμένουν το μέγεθος της εκάστοτε μικροδιάταξης, η πολυπλοκότητα, η φορητότητα και η αυτονομία της.

### *Φυγοκεντρικές μικροδιατάξεις PCR (Centrifugal PCR microdevices)*

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί ορισμένες περιπτώσεις, όπου χρησιμοποιούνται ψηφίδες σε σχήμα δίσκου. Στις περιπτώσεις αυτές, ο δίσκος περιστρέφεται προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι φυγοκεντρικές δυνάμεις που αναπτύσσονται, και για τον λόγο αυτόν οι μικροδιατάξεις αυτές ονομάζονται φυγοκεντρικές (centrifugal microdevices). Με τον τρόπο αυτόν, επιτυγχάνεται η μετακίνηση του δείγματος και των αντιδρώντων έως τους μικροθαλάμους, στις εξωτερικές στιβάδες του δίσκου χωρίς τη χρήση εξωτερικών αντλιών, όπου στη συνέχεια εφαρμόζεται η PCR, κατά τρόπο αντίστοιχο με τη μPCR στατικού ρευστού [46–48]. Μία ειδική κατηγορία των φυγοκεντρικών μικροδιατάξεων PCR, είναι τα «Μικροεργαστήρια σε Δίσκο» (Lab Disks). Οι μικροδιατάξεις αυτές ενσωματώνουν πολλαπλές λειτουργίες, όπως η προετοιμασία του δείγματος και η ανάλυσή του μετά τον πολλαπλασιασμό με PCR. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στα μικροεργαστήρια σε δίσκο, καθώς έχουν κατασκευαστεί και δοκιμαστεί αρκετές μικροδιατάξεις με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [49–53]. Παρόλα αυτά, ο συνολικός χρόνος που απαιτείται σε αρκετά από αυτά, προκειμένου να ολοκληρωθεί η ανάλυση, μπορεί να είναι της τάξης των μερικών ωρών [50,54], και σίγουρα υπάρχει ακόμα σημαντικό περιθώριο βελτίωσης αυτών των μικροδιατάξεων.



Σχήμα 1-16. Α) Μικροεργαστήριο σε δίσκο (Lab Disk) που εφαρμόζει qPCR για ανίχνευση παθογόνων οργανισμών στην τροφή, κατασκευασμένο από τους Strohmeier et al [49]. Β) Συσσκευή περιστροφής του δίσκου.

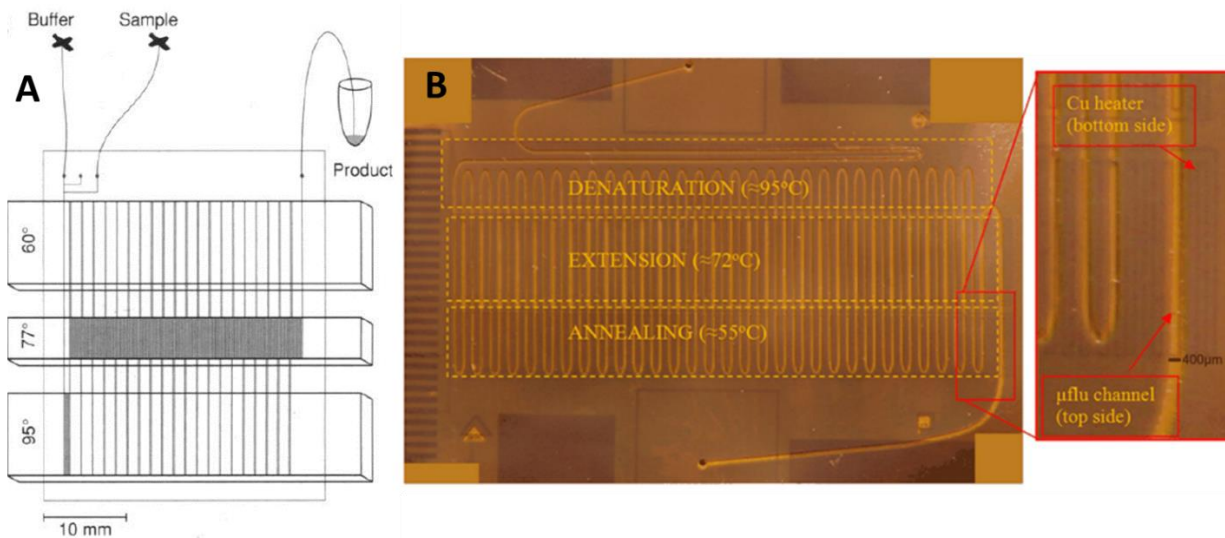
### 1.3.2 Χωρικά μεταβαλλόμενη μPCR (Space Domain μPCR)

Μία άλλη κατηγορία PCR μικροδιατάξεων είναι η χωρικά μεταβαλλόμενη (Space Domain) PCR ή PCR κινούμενου ρευστού. Στην περίπτωση αυτή, το δείγμα ρέει εντός μικροκαναλιών, περνώντας από περιοχές σταθερών θερμοκρασιών. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η εναλλαγή των θερμοκρασιών συμβαίνει καθώς μετακινείται το ρευστό στο χώρο. Το βασικό πλεονέκτημα των μικροδιατάξεων αυτών, είναι πως μόνο το δείγμα υπόκειται σε μεταβολή της θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τη χρονικά μεταβαλλόμενη PCR, στην οποία θερμαίνεται και ψύχεται όλος ο θάλαμος<sup>10</sup>. Το γεγονός αυτό, μειώνει σημαντικά τη θερμική αδράνεια του συστήματος, επιτρέποντας άμεσες θερμοκρασιακές μεταβολές, μειωμένους χρόνους αντίδρασης και χαμηλότερο ενεργειακό κόστος. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί αρκετές μικροδιατάξεις χωρικής PCR. Οι κυριότερες μορφές αυτών των μικροδιατάξεων, είναι οι μικροδιατάξεις συνεχούς ροής [continuous flow (CF) PCR] και οι εναλλασσόμενης ροής [oscillatory flow (OF) PCR].

<sup>10</sup> Αναφερόμαστε στις περιπτώσεις χρονικά μεταβαλλόμενης PCR, στις οποίες η θέρμανση γίνεται με συμβατικό τρόπο.

## Συνεχούς ροής - Continuous-Flow

Το 1998, οι Kopp et al ανέφεραν την πρώτη προσπάθεια πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA του βακτηρίου της Γονόρροιας (*Neisseria gonorrhoeae*) με PCR, χρησιμοποιώντας μία μικροδιάταξη συνεχούς ροής [Continuous flow PCR microdevice (CF μPCR)] με μαιανδρικό μικροκανάλι [55]. Στη μικροδιάταξη αυτή, υπάρχουν τρία θερμαινόμενα σώματα χαλκού, τα οποία καθορίζουν τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες της PCR. Το δείγμα ωθείται μέσα στο μαιανδρικό μικροκανάλι, το οποίο είναι εγχαραγμένο σε γυάλινη ψηφίδα, με τους κύκλους της PCR να πραγματοποιούνται, καθώς το δείγμα θερμαίνεται και ψύχεται, περνώντας πάνω από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες. Το μαιανδρικό μικροκανάλι έχει μία είσοδο και μία έξοδο, ενώ αποτελείται από πολλά επαναλαμβανόμενα πανομοιότυπα τμήματα, που κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα κύκλο της PCR. Επομένως, στην περίπτωση αυτή οι κύκλοι της PCR είναι καθορισμένοι από τη γεωμετρία της ψηφίδας.



Σχήμα 1-17. Α) Η πρώτη διάταξη CF PCR που κατασκευάστηκε από τους Kopp et al το 1998 [55]. Το μαιανδρικό μικροκανάλι επιτρέπει στο ρευστό να περνά από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες. Β) Φωτογραφία μικροδιάταξη PCR, κατασκευασμένη το 2014, στο INN του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», από τους Moschou et.al [56]. Οι τρεις θερμοκρασιακές ζώνες καθορίζονται από τα τρία θερμικά στοιχεία. Το μαιανδρικό μικροκανάλι βρίσκεται στην επιφάνεια της ψηφίδας, επιτρέποντας τη ροή του δείγματος διαδοχικά πάνω από την κάθε ζώνη. Το μικροκανάλι αποτελείται από 30 μαιανδρούς, επιτρέποντας έτσι τη διεξαγωγή 30 κύκλων της PCR. Στο πλαίσιο (δεξιά της φωτογραφίας) φαίνεται ένα τμήμα της μικροδιάταξης σε μεγέθυνση, όπου λεπτομέρειες του μικροκαναλιού και των θερμικών στοιχείων είναι ορατές.

Από τότε, έχουν κατασκευασθεί πολλές CF μPCR, με τις περισσότερες από αυτές να χρησιμοποιούν την ίδια βασική ιδέα του μαιανδρικού μικροκαναλιού, προχωρώντας παράλληλα σε πολλές τροποποιήσεις και βελτιώσεις, σε σχέση με την αρχική διάταξη των Kopp et al [56–59]. Ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την αποδοτικότητα αυτού του είδους των μικροδιατάξεων, είναι η γεωμετρία του μικροκαναλιού, καθώς από αυτήν εξαρτάται το χρονικό διάστημα που θα βρίσκεται το ρευστό σε κάθε θερμοκρασιακή ζώνη. Μία άλλη πρόκληση που αντιμετωπίζουν οι CF μPCR, είναι η διαχείριση των τριών θερμοκρασιακών ζωνών εντός της ψηφίδας. Όταν τα θερμικά στοιχεία που θερμαίνουν την κάθε ζώνη, βρίσκονται αρκετά κοντά μεταξύ τους, παρουσιάζονται φαινόμενα θερμικής συνομιλίας (thermal cross-talk<sup>11</sup>) και θερμοκρασιακής ανομοιομορφίας. Στην αντίθετη περίπτωση που υπάρχει αρκετός χώρος ανάμεσα στα θερμικά στοιχεία, επιτυγχάνεται θερμική απομόνωση των ζωνών, με κόστος όμως στο αποτύπωμα της μικροδιάταξης.

Μία πιθανή λύση για τα παραπάνω προβλήματα είναι η μείωση των θερμοκρασιακών ζωνών, και για το λόγο αυτό έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις CF μPCR δύο θερμοκρασιών [60–62]. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το κάθε στάδιο της PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Έτσι, αν και στα περισσότερα πρωτόκολλα της PCR, οι βέλτιστες θερμοκρασίες για τα στάδια του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης είναι περίπου 58 °C και 72 °C αντιστοίχως, μπορούν να πραγματοποιηθούν και σε μία ενδιάμεση κοινή θερμοκρασία, με την κατάλληλη επιλογή εκκινητών και πολυμεράσης. Οι Fernández-Carballo et al αναφέρουν μία CF μPCR, μαιανδρικού μικροκαναλιού, δύο θερμοκρασιών, όπου τα στάδια του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης συμβαίνουν ταυτόχρονα στους 62 °C [63]. Οι μελέτες πάνω σε μικροδιατάξεις με διαφορετικές γεωμετρίες και αριθμό θερμοκρασιακών ζωνών συνεχίζονται. Το 2015 οι Chen et al κατασκεύασαν μία μικροδιάταξη, η οποία χρησιμοποιώντας ένα θερμικό στοιχείο, δημιουργεί πέντε θερμοκρασιακές ζώνες [64].

---

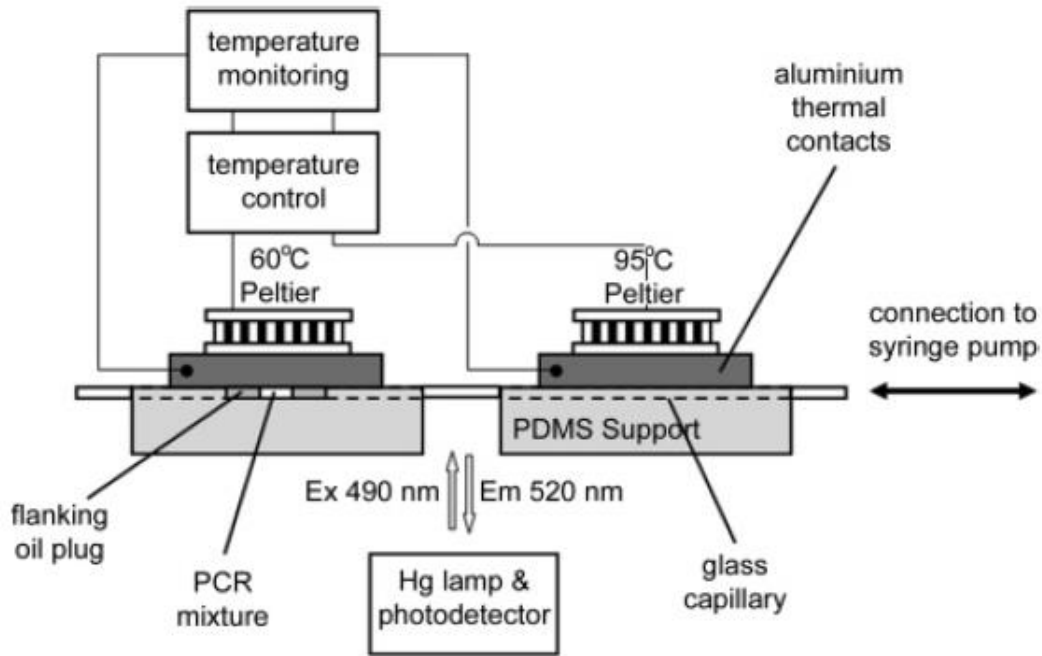
<sup>11</sup> Ο όρος θερμική συνομιλία (thermal cross-talk) αναφέρεται στο φαινόμενο κατά το οποίο, η θερμότητα που παράγεται σε μία θερμοκρασιακή ζώνη, επηρεάζει τη θερμοκρασία των γειτονικών ζωνών. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο στις περιοχές κοντά στα σύνορα των ζωνών.

Ίσως το βασικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι μικροδιατάξεις CF μPCR είναι η δυσκολία προώθησης του ρευστού μέσα από το μαιανδρικό μικροκανάλι χωρίς τη χρήση εξωτερικών αντλιών. Η μικρή διατομή σε συνδυασμό με το μεγάλο μήκος του μικροκαναλιού οδηγούν σε σχετικά υψηλές υδροδυναμικές αντιστάσεις. Ταυτόχρονα, είναι απαραίτητη η ελεγχόμενη και σταθερή ροή του δείγματος, ώστε να διασφαλιστεί πως αυτό θα βρίσκεται για το κατάλληλο χρονικό διάστημα σε κάθε θερμοκρασιακή ζώνη. Για τους λόγους αυτούς, στις περισσότερες περιπτώσεις CF μPCR χρησιμοποιούνται εξωτερικές αντλίες, οι οποίες ωστόσο, είναι συνήθως ογκώδεις σε σχέση με το μέγεθος των μικροδιατάξεων, ενώ αυξάνουν επίσης τη συνολική ενεργειακή κατανάλωση. Επομένως, η χρήση εξωτερικών αντλιών περιορίζει σημαντικά τη φορητότητα και την αυτονομία των μικροδιατάξεων, ενώ παράλληλα αυξάνει το κόστος και καθιστά τις διατάξεις πολυπλοκότερες. Αν και έχουν δοκιμαστεί ορισμένες τεχνικές προώθησης του ρευστού σε ψηφίδες χωρίς τη χρήση εξωτερικών αντλιών [65–71], υπάρχουν ακόμα εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν προκειμένου να έχουμε μικρές, αυτόνομες και αποτελεσματικές CF μPCR.

### *Εναλλασσόμενης (ταλαντωτικής) ροής – Oscillatory-Flow*

Στις μικροδιατάξεις PCR εναλλασσόμενης ροής [Oscillatory flow PCR microdevices (**OF μPCR**)], το δείγμα ταλαντεύεται μεταξύ των διαφορετικών θέσεων, μέσω ενός μικροκαναλιού. Με την τεχνική αυτή, το ρευστό, αφού περάσει από όλες τις θερμοκρασιακές ζώνες και ολοκληρώσει έναν κύκλο της PCR, επιστρέφει στην αρχική του θέση. Επομένως, στην OF μPCR το μικροκανάλι μπορεί να είναι αρκετά μικρό και απλό στη γεωμετρία του (συνήθως μία ευθεία), σε αντίθεση με τα μαιανδρικά μικροκανάλια που συναντώνται στις CF μPCR. Οι OF μPCR συνδυάζουν την ευελιξία των κύκλων που συναντάται στη χρονικά μεταβαλλόμενη μPCR με τη γρήγορη δυναμική της CF μPCR, ενώ άλλα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι η απλότητά τους και η δυνατότητα εξαγωγής αποτελεσμάτων σε πραγματικό χρόνο [72]. Η πρώτη μικροδιάταξη OF μPCR κατασκευάστηκε το 2007 από τους Chen et al [73] και πρόκειται για ένα ευθύ

μικροκανάλι που συνδέει δύο θερμοκρασιακές ζώνες, μεταξύ των οποίων ταλαντεύεται το ρευστό δείγμα.



Σχήμα 1-18 Σχηματική αναπαράσταση της μικροδιάταξης που χρησιμοποίησαν οι Chen et al [73]. Πρόκειται για μία μικροδιάταξη PCR Εναλλασσόμενης Ροής (OF μPCR) δύο θερμοκρασιών.

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί πολλές OF μPCR, χρησιμοποιώντας διαφορετικά υλικά υποστρώματος (πυρίτιο, γυαλί, πολυμερή), αλλά και διαφορετικά είδη θερμικών στοιχείων (μεταλλικά ή κεραμικά θερμικά μπλοκ, θερμικά στοιχεία τύπου Peltier, θερμενόμενα φιλμ) [72,74,75].

Ωστόσο, οι OF μPCR παρουσιάζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, όπως συμβαίνει με όλες τις περιπτώσεις της χωρικά μεταβαλλόμενης μPCR, έτσι και εδώ απαιτείται η μετακίνηση του ρευστού δείγματος μέσα στο μικροκανάλι. Για τη μετακίνηση αυτή του ρευστού, κάποιες μικροδιάταξεις χρησιμοποιούν εξωτερικές αντλίες με τα μειονεκτήματα που αναφέρονται παραπάνω. Όπως και στην περίπτωση της CF μPCR, έχουν δοκιμαστεί κάποιες τεχνικές μετακίνησης του ρευστού, χωρίς εξωτερικές αντλίες (όπως μικροαντλίες ενσωματωμένες στην ψηφίδα) [72,76]. Η διαφορά με τους

μηχανισμούς προώθησης που χρησιμοποιούνται στην CF PCR, είναι πως αντί για συνεχή ροή μεγάλης διάρκειας, εδώ απαιτείται γρήγορη, εναλλασσόμενη και επαναλαμβανόμενη κίνηση του ρευστού. Η ιδιαιτερότητα αυτή στην κίνηση του ρευστού στις OF μPCR, καθιστά σχετικά δύσκολη την εφαρμογή πρωτόκολλων PCR που περιλαμβάνουν τρεις θερμοκρασιακές ζώνες, καθώς σε αυτή την περίπτωση απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στην κίνηση του δείγματος. Ένας άλλος περιορισμός για τη χρήση της OF PCR, παρουσιάζεται στις εφαρμογές όπου απαιτείται πολλαπλασιασμός και ανίχνευση περισσότερων τμημάτων DNA ταυτόχρονα, όπως στις περισσότερες αναλύσεις για τη διάγνωση παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε τρόφιμα [59]. Παρόλα αυτά, οι διατάξεις OF μPCR αναπτύσσονται συνεχώς, προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα που παρουσιάζονται [72,75].

### **1.3.3 Μικροδιατάξεις ισοθερμοκρασιακού (Isothermal) πολλαπλασιασμού DNA**

Η σημαντική πρόοδος της τεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της μικρορευστονικής, έχει επιτρέψει την ανάπτυξη πολλών νέων και καινοτόμων μικροδιατάξεων, οι οποίες χρησιμοποιούν ισοθερμοκρασιακό πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται από τις μικροδιατάξεις αυτές, ποικίλλουν σημαντικά και για το λόγο αυτό δεν είναι δυνατή η αναλυτική παρουσίασή τους στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Οι πιο σημαντικές είναι οι loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [77], recombinase polymerase amplification (RPA) [19], helicase-dependent amplification (HDA) [20], strand displacement amplification (SDA) [21], rolling circle amplification (RCA) [22], signal-mediated amplification of RNA technology (SMART) [23], nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [24], single primer-triggered isothermal amplification [25] και cross priming amplification (CPA) [26]. Η δυνατότητα των τεχνικών αυτών να πολλαπλασιάζουν DNA αποφεύγοντας τους θερμοκρασιακούς κύκλους της PCR, μπορεί να οδηγήσει σε αποτελέσματα αρκετά μεγάλης ακρίβειας και χαμηλού κόστους [78]. Ωστόσο, στις ισοθερμοκρασιακές μεθόδους υπάρχουν ακόμα αρκετά σοβαρά εμπόδια να αντιμετωπισθούν, όπως η εξάρτηση της

ευαισθησίας από τη θερμοκρασία του υβριδισμού, ο μη εξειδικευμένος πολλαπλασιασμός, η μόλυνση Ριβονουκλεάσης (RNase contamination), τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, η χρονική διάρκεια της αντίδρασης κ.α [79]. Για τους παραπάνω λόγους, η πλειοψηφία των μικρορευστονικών διατάξεων που αποσκοπούν στον πολλαπλασιασμό DNA, εφαρμόζουν την PCR [59,80].

### **1.3.4 Ψηφιακή μPCR (Digital μPCR)**

Η ψηφιακή PCR (dPCR) είναι μία προχωρημένη μέθοδος PCR, η οποία απαιτεί το διαχωρισμό του αρχικού δείγματος σε χιλιάδες ή και δεκάδες χιλιάδες τμήματα και την πραγματοποίηση της PCR σε κάθε ένα από αυτά. Λόγω των πολύ μικρών όγκων και της μεγάλης λεπτότητας που απαιτείται στο χειρισμό τους, η μεταφορά της dPCR σε μικροδιατάξεις αποτελεί μία από τις σημαντικότερες προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές στον τομέα των μικροδιατάξεων PCR.

Η βασικότερη δυσκολία που πρέπει να αντιμετωπίσει η dPCR, είναι ο διαχωρισμός του αρχικού δείγματος στα επιμέρους τμήματα. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την παγίδευση των τμημάτων του δείγματος σε μικροπηγάδια (microwells) ή με τη δημιουργία σταγονιδίων (droplet dPCR). Οι τεχνικές που εφαρμόζονται από τις μικροδιατάξεις dPCR, προκειμένου να διαχωριστεί το δείγμα στα επιμέρους τμήματα είναι πολλές και ποικίλες. Μία από τις πρώτες μικροδιατάξεις dPCR βασιζόταν στο διαχωρισμό του δείγματος με τη βοήθεια μικροβαλβίδων [81]. Το ρευστό δείγμα εισερχόταν αρχικά, σε ένα δίκτυο μικροκαναλιών και μικροθαλάμων εγχαραγμένο σε ελαστομερές υλικό PDMS. Στη συνέχεια, οι βαλβίδες ενεργοποιούνταν υπό πίεση, φράσσοντας την επικοινωνία μεταξύ των μικροθαλάμων και απομονώνοντας το ρευστό σε διαφορετικά τμήματα. Ένας άλλος τρόπος παραγωγής μεγάλου αριθμού σταγονιδίων, είναι με τη βοήθεια ειδικά κατεργασμένων επιφανειών [82,83]. Εκτός από το διαχωρισμό του δείγματος σε επιμέρους τμήματα, ένας επίσης σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία των μικροδιατάξεων dPCR, είναι η διαχείριση των πολύ μικρών όγκων που προκύπτουν (συνήθως της τάξης των νανολίτρων ή και πικολίτρων). Ένα πρόβλημα που μπορεί να



προκύψει όταν εφαρμόζεται η PCR σε τόσο μικρούς όγκους ρευστών, είναι η πιθανή εξάτμιση του δείγματος λόγω των μεγάλων θερμοκρασιών που αναπτύσσονται, ειδικά στο στάδιο της αποδιάταξης. Σε αρκετές μελέτες, έχει δοκιμαστεί η χρήση λαδιού ως μονωτικού υλικού για την προστασία των σταγονιδίων ή των μικροπηγαδιών από το φαινόμενο αυτό [84–87]. Στις περιπτώσεις αυτές, το λάδι επικαλύπτει το δείγμα, εμποδίζοντας έτσι την εξάτμισή του. Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η dPCR μπορεί να συνδυαστεί με τις γεωμετρίες και τα σχέδια μικροδιατάξεων που αναλύθηκαν παραπάνω, όπως το μαιανδρικό μικροκανάλι [86] ή οι μικροδιατάξεις σε σχήμα δίσκων [88–90].

Τα σημαντικά πλεονεκτήματα που παρέχει η dPCR, την καθιστούν πολύ προσφιλή μέθοδο, γεγονός που έχει οδηγήσει σε μία μεγάλη ανάπτυξη στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της, με πλήθος μικροδιατάξεων να αναφέρονται τα τελευταία χρόνια [88,91]. Σύμφωνα δε, με ορισμένους ερευνητές, έχει τη δυναμική να αντικαταστήσει στο μέλλον την qPCR. Υπάρχουν ωστόσο, ορισμένα στοιχεία που περιορίζουν τις χρήσεις της dPCR. Ίσως το κυριότερο ζήτημα που προκύπτει με την dPCR, είναι πως όντας μία σχετικά πολύπλοκη μέθοδος, για την εφαρμογή της απαιτείται ειδικά εξειδικευμένο προσωπικό και σύνθετες και ακριβές διατάξεις. Για το λόγο αυτό, στις περισσότερες περιπτώσεις η dPCR περιορίζεται σε εργαστήρια [59], γεγονός που στερεί στις μικροδιατάξεις τη φορητότητα και μειώνει τη δυναμική τους. Παρόλα αυτά, προσπάθειες γίνονται προκειμένου να αντιμετωπισθούν τα διάφορα πρακτικά προβλήματα που προκύπτουν [92], ενώ υπάρχουν και κάποιες διατάξεις dPCR, οι οποίες έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά [93–95].

## 1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία περιγράφει μία καινοτόμα μικροδιάταξη PCR, συνεχούς ροής με μικρό αποτύπωμα, κατασκευασμένη σε υπόστρωμα πλακέτας τυπωμένων κυκλωμάτων [printed circuit board (**PCB**)]. Πρόκειται για μία μικροδιάταξη κινούμενου δείγματος, συνεχούς ροής (CF) και κλειστού βρόχου PCR, στην οποία το ρευστό περνά από τρεις ζώνες σταθερής θερμοκρασίας, προκειμένου να ολοκληρωθεί κάθε κύκλος της PCR. Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των περιπτώσεων CF PCR, όπου το ρευστό ρέει συνήθως εντός ενός μαιανδρικού μικροκαναλιού, στη συγκεκριμένη μικροδιάταξη η ροή του ρευστού εξελίσσεται σε ένα κλειστό κυκλικό μικροκανάλι (κλειστός βρόχος) χωρητικότητας 9,42  $\mu\text{L}$ . Κατ' αυτόν τον τρόπο, το προς ανάλυση δείγμα ακολουθεί μία κλειστή διαδρομή, την οποία και επαναλαμβάνει για τον απαραίτητο αριθμό κύκλων. Η κίνηση του ρευστού πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός εμβόλου από σιδηρομαγνητικό έλαιο (ferrofluid plug), το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού. Το έμβολο αυτό με τη σειρά του, κινείται χάρη στη βοήθεια εξωτερικού μαγνήτη, ο οποίος είναι προσαρμοσμένος στον άξονα ενός βηματικού κινητήρα.

Η μικροδιάταξη αυτή, παρέχει τα βασικά πλεονεκτήματα των CF  $\mu\text{PCR}$ , δηλαδή ταχείες θερμοκρασιακές μεταβολές, μικρούς χρόνους αντίδρασης και μειωμένο ενεργειακό κόστος. Ωστόσο, λόγω της κυκλικής γεωμετρίας του μικροκαναλιού, προσφέρει μερικά επιπλέον πλεονεκτήματα σε σχέση με τις CF  $\mu\text{PCR}$  μαιανδρικών μικροκαναλιών. Τα βασικότερα αναφέρονται παρακάτω.

- **Μικρότερο αποτύπωμα.** Λόγω του κυκλικού μικροκαναλιού, το ρευστό ακολουθεί κλειστή διαδρομή και επομένως δε χρειάζεται η ύπαρξη των επαναλαμβανόμενων μαιανδρικών μικροκαναλιών προκειμένου να πραγματοποιηθούν όλοι οι κύκλοι της PCR, γεγονός που μειώνει σημαντικά το τελικό αποτύπωμα της μικροδιάταξης.
- **Ευελιξία στον αριθμό των κύκλων της PCR.** Στις διατάξεις με μαιανδρικά μικροκανάλια, ο αριθμός των κύκλων είναι προκαθορισμένος από τη γεωμετρία του μικροκαναλιού και τον αριθμό των μαιανδρικών επαναλήψεων που περνάνε από την κάθε θερμοκρασιακή ζώνη. Αντιθέτως, το κυκλικό μικροκανάλι επιτρέπει

την επανάληψη της ίδιας διαδρομής του ρευστού, όσες φορές χρειαστεί, διατηρώντας έτσι την ευελιξία στο συνολικό αριθμό των κύκλων της PCR.

- **Μεγαλύτερη θερμοκρασιακή ομοιομορφία στο εσωτερικό της κάθε ζώνης.** Ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζουν συχνά οι μικροδιατάξεις με μαιανδρικά μικροκανάλια, είναι η δυσκολία που συναντάται στο να διατηρηθεί ομοιόμορφη η θερμοκρασία σε όλη την επιφάνεια της θερμοκρασιακής ζώνης. Λόγω των απωλειών θερμότητας, συχνά η θερμοκρασία στο μέσο της ψηφίδας είναι μεγαλύτερη από αυτή στις άκρες. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα, την πραγματοποίηση των κύκλων της PCR σε διαφορετικές θερμοκρασίες μεταξύ τους, ανάλογα με το αν ο μαιάνδρος που αντιστοιχεί στον κύκλο βρίσκεται στην αρχή, στη μέση ή στο τέλος της ψηφίδας. Το φαινόμενο αυτό γίνεται εντονότερο, για διατάξεις με μεγαλύτερο αποτύπωμα. Η μικροδιάταξη της παρούσας εργασίας δεν αντιμετωπίζει τέτοιου είδους πρόβλημα, καθώς το ρευστό περνά για κάθε κύκλο από το ίδιο κυκλικό μικροκανάλι και επομένως δεν τίθεται θέμα διαφορετικών θερμοκρασιών.
- **Δεν απαιτείται η χρήση εξωτερικών αντλιών για τη μετακίνηση του ρευστού.** Όπως αναφέρεται παραπάνω, στις CF μPCR που χρησιμοποιούν μαιανδρικά μικροκανάλια, χρησιμοποιούνται συχνά εξωτερικές αντλίες για τη μετακίνηση του ρευστού. Οι αντλίες αυτές είναι συνήθως ογκώδεις και καταναλώνουν μεγάλη ποσότητα ηλεκτρικού ρεύματος, αυξάνοντας έτσι το ενεργειακό κόστος και περιορίζοντας την αυτονομία και τη φορητότητα των μικροδιατάξεων. Στην περίπτωση της μικροδιάταξης της παρούσας εργασίας, το ρευστό μετακινείται με τη βοήθεια ενός σιδηρομαγνητικού ελαίου. Επομένως η διάταξη δεν χρειάζεται εξωτερική αντλία για την προώθηση του ρευστού. Είναι αλήθεια βέβαια, πως για την κίνηση του ελαίου απαιτείται ένας μαγνήτης και ένας βηματικός κινητήρας, οι οποίοι όμως είναι σαφώς λιγότερο ογκώδεις από τις αντλίες που απαιτούνται σε διαφορετική περίπτωση.

Η ιδέα του κυκλικού μικροκαναλιού έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν με επιτυχία από τους Chen et al [96]. Στη μικροδιάταξη αυτή, το μικροκανάλι ήταν κατασκευασμένο σε

υπόστρωμα από πολυμεθακρυλικό μεθύλιο (**PMMA**), η κίνηση του ρευστού επιτυγχανόταν με τη βοήθεια σιδηρομαγνητικού ρευστού εμβόλου, ενώ η θέρμανση γινόταν με θερμικά στοιχεία τύπου Peltier τα οποία δεν ήταν ενσωματωμένα στην PMMA ψηφίδα.

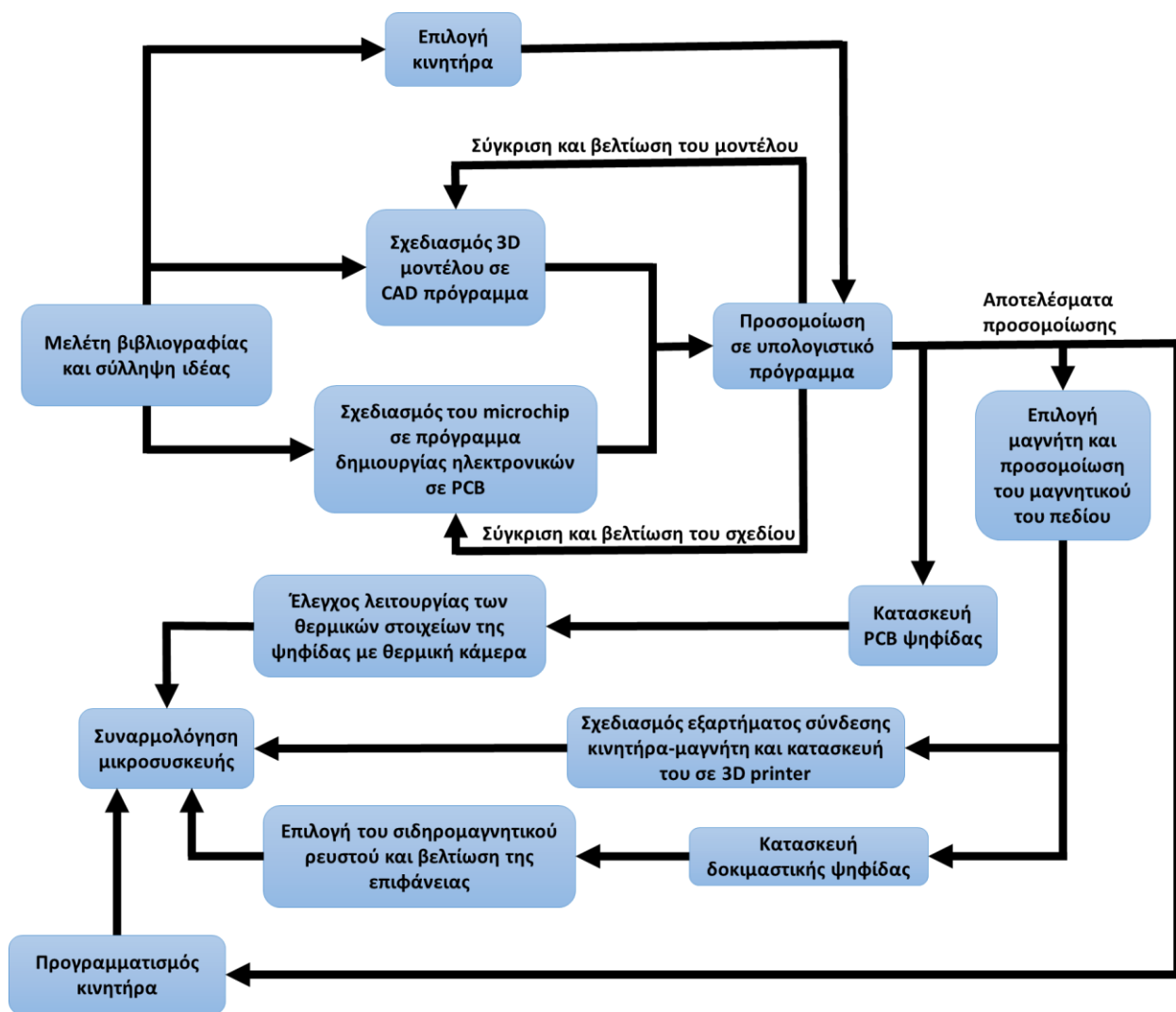
Η μικροδιάταξη που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία ακολουθεί τη βασική ιδέα του κυκλικού μικροκαναλιού που εφαρμόστηκε από τους Chen et al, με κύρια διαφορά πως η κατασκευή της ψηφίδας γίνεται σε υπόστρωμα πλακέτας τυπωμένων κυκλωμάτων [Printed Circuit Board (**PCB**)]. Η επιλογή του PCB προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως τη δυνατότητα ενσωμάτωσης των θερμικών στοιχείων στο εσωτερικό του ψηφίδας και το μικρότερο συνολικό όγκο της διάταξης, γεγονός που με τη σειρά του επιτρέπει την πραγματοποίηση της PCR σε μικρότερους χρόνους, σε σχέση με την περίπτωση των Chen et al. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι η διαδικασία κατασκευής της ψηφίδας είναι συμβατή με την καθιερωμένη βιομηχανία PCB, επιτρέπει τη χαμηλού κόστους, αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη κατασκευή της, ενισχύοντας έτσι τις προοπτικές εμπορευματοποίησης μιας τέτοιας μικροδιάταξης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η κατασκευή μίας ψηφίδας σε υπόστρωμα PCB, η οποία θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες της μικροδιάταξης που περιγράφεται. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν υπολογιστικές και πειραματικές μελέτες, με σκοπό την κατάλληλη επιλογή και βελτίωση του μαγνήτη, του σιδηρομαγνητικού ρευστού και της επιφάνειας του μικροκαναλιού. Τέλος, για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, επιλέχθηκε και προγραμματίστηκε ο κατάλληλος κινητήρας, ενώ επίσης σχεδιάστηκαν πρωτότυπα εξαρτήματα τα οποία και κατασκευάστηκαν με τριδιάστατη εκτύπωση. Ο απώτερος στόχος αυτής της εργασίας, είναι η δημιουργία μίας φορητής και αυτόνομης μικροσυσκευής, η οποία θα χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό γενετικού υλικού βακτηρίων και ιών, παρέχοντας ακριβή διαγνωστικά αποτελέσματα σε σύντομα χρονικά διαστήματα.

Για την ανάπτυξη της μικροδιάταξης, ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια, μετά τη μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με τις PCR μικροδιατάξεις και τη σύλληψη της ιδέας.

- Σχεδιασμός τριδιάστατης γεωμετρίας της μικροδιάταξης σε ειδικό πρόγραμμα computer aided design (CAD).
- Σχεδιασμός της ψηφίδας σε λογισμικό CAD, ειδικό για τη δημιουργία ψηφίδας σε υπόστρωμα PCB.
- Υπολογισμοί μεταφοράς θερμότητας σε ειδικό πρόγραμμα προσομοίωσης. Έλεγχος και βελτίωση των αρχικών σχεδίων, με βάση τα αποτελέσματα της προσομοίωσης.
- Επιλογή μαγνητών και προσομοίωση των μαγνητικών τους πεδίων.
- Επιλογή κινητήρα. Σύνδεση των κυκλωμάτων και προγραμματισμός λογισμικού για τον έλεγχο της κίνησης του κινητήρα.
- Σχεδιασμός και κατασκευή εξαρτημάτων για τη σύνδεση του μαγνήτη με τον κινητήρα και για τη στήριξη της ψηφίδας, σε εκτυπωτή τριδιάστατων γεωμετριών (3D printer).
- Παραγγελία των ψηφίδων σε εταιρεία κατασκευής, με βάση το τελικό σχέδιο της ψηφίδας σε PCB.
- Κατασκευή δοκιμαστικής ψηφίδας σε υπόστρωμα PMMA, για τον έλεγχο της ροής του ρευστού στο εσωτερικό του μικροκαναλιού.
- Επιλογή, κατόπιν δοκιμών, του κατάλληλου σιδηρομαγνητικού υλικού, όπως και βελτίωση της επιφάνειας του μικροκαναλιού, έτσι ώστε να είναι δυνατή η απρόσκοπτη ροή του ρευστού μέσα σε αυτό.
- Ρύθμιση και έλεγχος με θερμική κάμερα, της λειτουργίας της PCB ψηφίδας και των ενσωματωμένων θερμικών στοιχείων.
- Συναρμολόγηση όλων των επιμέρους τμημάτων της μικροδιάταξης.

Τα στάδια ανάπτυξης της διάταξης φαίνονται σχηματικά στο σχήμα 1-19.



Σχήμα 1-19. Διάγραμμα ροής των σταδίων που ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

# ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΕΡΓΑΛΕΙΑ

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι μέθοδοι και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία.

### 2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ 3D ΓΕΩΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ΨΗΦΙΔΩΝ

Ο σχεδιασμός της τριδιάστατης γεωμετρίας της PCB ψηφίδας με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, καθώς επίσης και του μαγνήτη και των λοιπών εξαρτημάτων της μικροδιάταξης, πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα *Autodesk Inventor Professional 2019*. Τα διαφορετικά επίπεδα της ψηφίδας και εξαρτήματα, σχεδιάστηκαν σε ξεχωριστά αρχεία «parts» (της μορφής .ipt). Στη συνέχεια, τα επιμέρους τμήματα τοποθετήθηκαν μαζί σε ένα αρχείο Assembly (.iam), όπου και συγκροτήθηκε η τελική γεωμετρία της μικροδιάταξης. Για το σχεδιασμό των κυκλωμάτων του PCB χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *KiCad (5.1.0)*. Για το σχεδιασμό της δοκιμαστικής PMMA ψηφίδας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *LPKF CircuitPro PM 2.3*.

### 2.2 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ

Πριν προχωρήσουμε στην κατασκευή της ψηφίδας, έπρεπε να ελεγχθούν τα σχέδια σε υπολογιστικό πρόγραμμα προσομοίωσης, ώστε να εξετασθεί αν είναι κατάλληλα για την πραγματοποίηση της PCR. Το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Comsol Multiphysics 5.3*, στο οποίο και εισήχθησαν οι

γεωμετρίες που σχεδιάσθηκαν στο προηγούμενο στάδιο. Το πρόγραμμα αυτό, επιλύει τις μερικές διαφορικές εξισώσεις χρησιμοποιώντας την υπολογιστική μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων [Finite Element Method (FEM)]. Το πρόβλημα εξετάστηκε ως προς τη μεταφορά θερμότητας σε στερεά και ρευστά, ενώ σε ξεχωριστή προσομοίωση εξετάσθηκαν και τα μαγνητικά πεδία των μαγνητών. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μαθηματικές εξισώσεις που επιλύονται από το πρόγραμμα.

### 2.2.1 Μεταφορά θερμότητας σε στερεά σώματα

Για το πρόβλημα της μεταφοράς θερμότητας σε στερεά σώματα, επιλύεται η παρακάτω εξίσωση. [97]

$$\rho C_p \left( \frac{\partial T}{\partial t} + \mathbf{u}_{trans} \cdot \nabla T \right) + \nabla \cdot (\mathbf{q} + \mathbf{q}_r) = -\alpha T : \frac{dS}{dt} + Q \quad (1)$$

Όπου:

- $\rho$  η πυκνότητα
- $C_p$  η ειδική θερμοχωρητικότητα σε σταθερή πίεση
- $T$  η απόλυτη θερμοκρασία
- $\mathbf{u}_{trans}$  το διάνυσμα της ταχύτητας μεταφερόμενης κίνησης
- $q$  η ροή της θερμότητας μέσω αγωγής
- $q_r$  η ροή της θερμότητας μέσω ακτινοβολίας
- $\alpha$  ο συντελεστής θερμικής διαστολής
- $S$  ο δεύτερος τανυστής τάσης Piola-Kirchhoff
- $Q$  οι επιπρόσθετες πηγές θερμότητας

Για τις περιπτώσεις μόνιμης κατάστασης (steady-state) η θερμοκρασία δεν μεταβάλλεται με το χρόνο, και επομένως οι όροι με τη χρονική παράγωγο μηδενίζονται.



## 2.2.2 Μεταφορά θερμότητας σε ρευστά

Για το πρόβλημα της μεταφοράς θερμότητας σε ρευστά, επιλύεται η παρακάτω εξίσωση. [97]

$$\rho C_p \left( \frac{\partial T}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla T \right) + \nabla \cdot (\mathbf{q} + \mathbf{q}_r) = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla p \right) + \tau : \nabla \mathbf{u} + \mathbf{Q} \quad (2)$$

Όπου:

- $\rho$  η πυκνότητα
- $C_p$  η ειδική θερμοχωρητικότητα σε σταθερή πίεση
- $T$  η απόλυτη θερμοκρασία
- $\mathbf{u}$  είναι το διάνυσμα της ταχύτητας
- $\mathbf{q}$  η ροή της θερμότητας μέσω αγωγής
- $\mathbf{q}_r$  η ροή της θερμότητας μέσω ακτινοβολίας
- $\alpha_p$  ο συντελεστής θερμικής διαστολής

με 
$$\alpha_p = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial \rho}{\partial T} \quad (3)$$

για ιδανικά αέρια, ο συντελεστής θερμικής διαστολής παίρνει τη μορφή  $\alpha_p = \frac{1}{T}$

- $p$  η πίεση
- $\tau$  ο τανυστής ιξώδους τάσης
- $\mathbf{Q}$  οι πρόσθετες πηγές θερμότητας

$$Q_p = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla p \right) \quad (4)$$

με 
$$Q_{vd} = \tau : \nabla \mathbf{u} \quad (5)$$

Για τις περιπτώσεις μόνιμης κατάστασης (steady-state) η θερμοκρασία δεν μεταβάλλεται με το χρόνο, και επομένως οι όροι με τη χρονική παράγωγο μηδενίζονται. Άρα, η σχέση (6) παίρνει τη μορφή:

$$\rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T + \nabla \cdot \mathbf{q} = Q + Q_p + Q_{vd} \quad (7)$$

με 
$$\mathbf{q} = -k \nabla T \quad (8)$$

### 2.2.3 Μαγνητικά πεδία

Οι παρακάτω εξισώσεις επιλύονται για την περίπτωση του προβλήματος των μαγνητικών πεδίων, τα οποία δημιουργούνται χωρίς την παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος (Magnetic Fields, No Currents interface). [98]

$$\nabla \times \mathbf{H} = 0 \quad (9)$$

$$\mathbf{H} = -\nabla V_m \quad (10)$$

$$\mathbf{B} = \mu_0 (\mathbf{H} + \mathbf{M}) \quad (11)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (12)$$

$$-\nabla \cdot (\mu_0 \nabla V_m - \mu_0 \mathbf{M}_0) = 0 \quad (13)$$

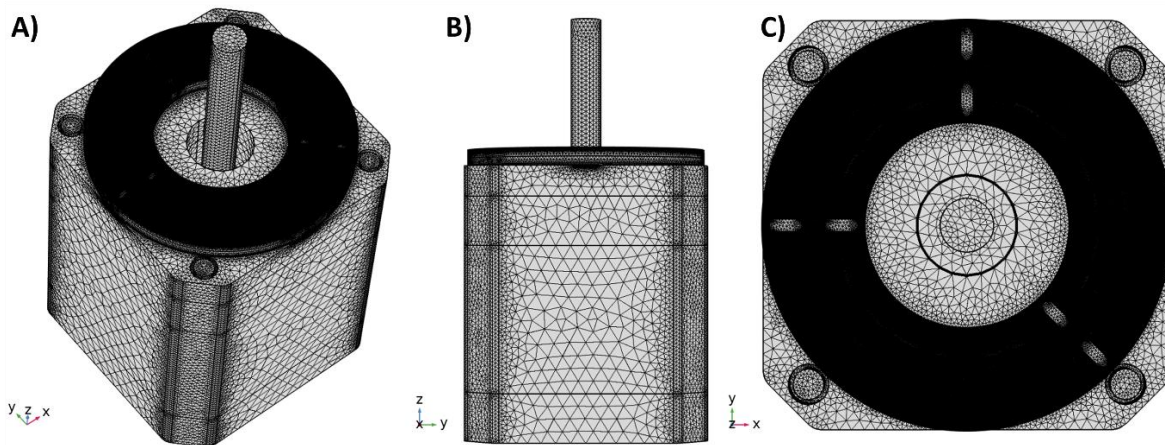
Όπου:

- $\mathbf{H}$  η ένταση του μαγνητικού πεδίου
- $\mathbf{B}$  η πυκνότητα της μαγνητικής ροής
- $V_m$  το βαθμωτό μαγνητικό δυναμικό
- $\mu_0$  η μαγνητική διαπερατότητα του κενού
- $\mathbf{M}$  η μαγνήτιση

## 2.2.4 Υπολογιστικά Πλέγματα

### Πλέγματα για την προσομοίωση της μεταφοράς θερμότητας

Τα πλέγματα των τριδιάστατων μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις προσομοιώσεις, για την επίλυση του προβλήματος της μεταφοράς θερμότητας στη διάταξη, δημιουργήθηκαν από συνδυασμό τετραέδρων και εξαεδρικών πρισμάτων. Στην περίπτωση του προβλήματος της μεταφοράς θερμότητας, τα τετράεδρα αποτέλεσαν τον κύριο όγκο των στοιχείων των πλεγμάτων, ενώ τα εξαεδρικά πρίσματα χρησιμοποιήθηκαν στα τοιχώματα της ψηφίδας, αλλά και σε επιφάνειες όπου έπρεπε να δοθεί περισσότερη έμφαση στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Για την οικονομία υπολογιστικών πόρων το πλέγμα κατασκευάστηκε αραιότερο στα σημεία μικρότερου ενδιαφέροντος και πυκνότερο στα σημεία έντονου ενδιαφέροντος.<sup>12</sup> Το τελικό πλέγμα, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς μεταφοράς θερμότητας, αποτελείται συνολικά από 5092421 στοιχεία.

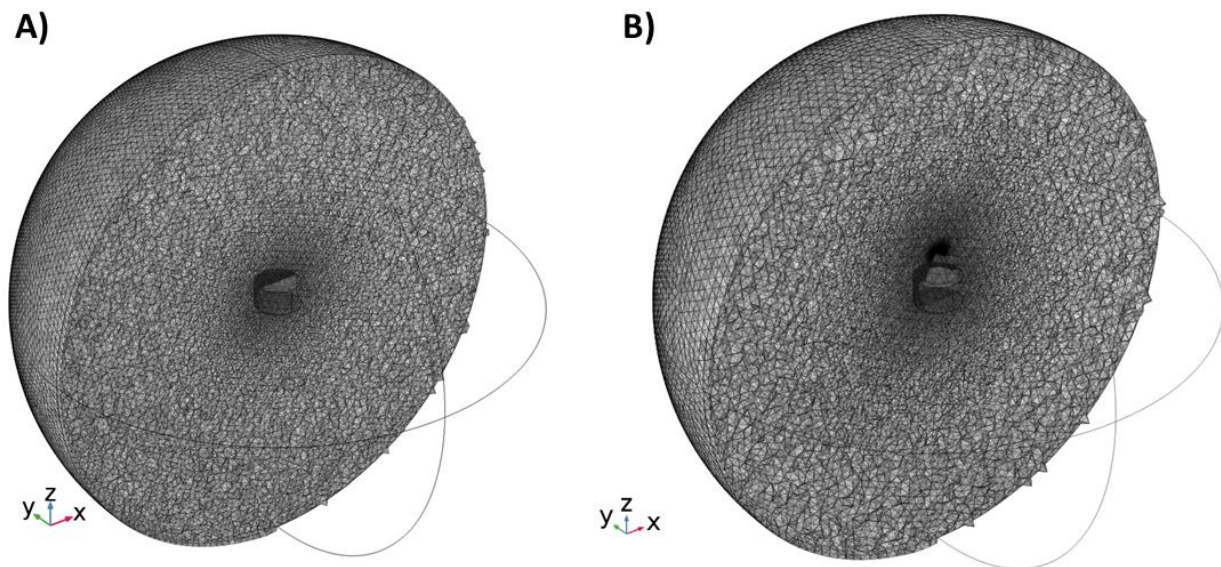


Σχήμα 2-1. Το υπολογιστικό πλέγμα 5092421 στοιχείων, που χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις του προβλήματος της μεταφοράς θερμότητας. Α) Αξονομετρική όψη. Β) Πλάγια όψη. Γ) Κάτωψη

<sup>12</sup> Παραδείγματος χάριν, η θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού, όπου πρόκειται να λάβουν χώρα οι βιολογικές διαδικασίες, είναι σαφώς σημαντικότερη και ο υπολογισμός της χρειάζεται πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια, σε σχέση με τη θερμοκρασία που αναπτύσσεται στη βάση του κινητήρα. Επομένως, και η πυκνότητα του πλέγματος θα είναι μεγαλύτερη στην πρώτη περίπτωση σε σχέση με τη δεύτερη.

## Πλέγματα για την προσομοίωση των μαγνητικών πεδίων

Για τις προσομοιώσεις των μαγνητικών πεδίων των δύο μαγνητών, χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά πλέγματα αποτελούμενα από τετράεδρα, σε μία σφαιρική περιοχή, η οποία περικλείει τον μαγνήτη και έχει διάμετρο  $D_{sph} = 40 \text{ cm}$ . Τα υπολογιστικά αυτά πλέγματα είναι σαφώς πυκνότερα κοντά στους μαγνήτες στο κέντρο των σφαιρών, όπου και μας ενδιαφέρει η μελέτη του μαγνητικού πεδίου, ενώ όσο μετακινούμαστε προς τις εξωτερικές περιοχές των σφαιρών, επέρχεται σταδιακή αραίωση των πλεγμάτων. Τα πλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες των μαγνητικών πεδίων κυλινδρικού και συνδυασμένου μαγνήτη, αποτελούνται από 4866464 και 8639059 στοιχεία αντίστοιχα.



Σχήμα 2-2. Τα πλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις υπολογιστικές προσομοιώσεις των μαγνητικών πεδίων. A) Υπολογιστικό πλέγμα 4866464 στοιχείων, που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του μαγνητικού πεδίου κυλινδρικού μαγνήτη. B) Υπολογιστικό πλέγμα 8639059 στοιχείων, που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του μαγνητικού πεδίου μαγνήτη που αποτελείται από συνδυασμό κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών.

## 2.2.5 Κριτήρια σύγκλισης

Για τη σύγκλιση των προσομοιώσεων χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο η σχετική ανοχή (relative tolerance) μεταξύ των λύσεων δύο διαδοχικών επαναλήψεων (iterations), η οποία και ρυθμίστηκε στην τιμή  $relative\ tolerance = 0,00001$ .

## 2.2.6 Συντελεστές εκπομπής επιφανειών των υλικών

Για τη διεξαγωγή της υπολογιστικής προσομοίωσης και τη μελέτη του προβλήματος της μετάδοσης θερμότητας, απαραίτητη ήταν η επιλογή συντελεστή εκπομπής της επιφάνειας για κάθε υλικό (surface emissivity). Οι τιμές των συντελεστών αυτών ελήφθησαν από τη βιβλιογραφία. Ακολουθεί πίνακας με όλες τους συντελεστές εκπομπής επιφάνειας για κάθε υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην υπολογιστική μελέτη της μεταφοράς θερμότητας.

Πίνακας 2-1. Οι συντελεστές εκπομπής των επιφανειών, για κάθε υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις της μεταφοράς θερμότητας.

| Υλικό         | Surface Emissivity |
|---------------|--------------------|
| Αέρας         | 0,9                |
| FR4           | 0,9                |
| PDMS          | 0,86               |
| Πολυαιθυλένιο | 0,1                |
| Χάλυβας       | 0,79               |
| PVC           | 0,94               |
| Πολυϊμίδιο    | 0,74               |

## 2.2.7 Παραδοχές

Η θερμοκρασία (T), υπολογίσθηκε από το πρόγραμμα προσομοίωσης σε μόνιμη κατάσταση (steady state). Για την επίλυση του προβλήματος της μεταφοράς θερμότητας στη διάταξη, έγιναν οι παρακάτω παραδοχές.

- Τα θερμικά στοιχεία θεωρήθηκαν σταθερές πηγές θερμότητας (δεν έγινε προσομοίωση ως προς το φαινόμενο Joule heating).
- Επειδή η διατομή του κάθε θερμικού στοιχείου παραμένει σταθερή σε όλο το μήκος του, θεωρήθηκε πως η θερμότητα παράγεται ομοιόμορφα κατά μήκος των θερμικών στοιχείων.
- Το ρευστό κινείται εντός του κυκλικού μικροκαναλιού, πραγματοποιώντας εμβολική ροή με σταθερό μέτρο ταχύτητας (δεν πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί της ροής του ρευστού).
- Δεν ελήφθη υπόψιν το έμβολο σιδηρομαγνητικού υλικού και ο εξωτερικός μαγνήτης.
- Το όλο σύστημα θεωρήθηκε ότι περιβάλλεται από αέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C).
- Δεν ελήφθησαν υπόψιν παραμορφώσεις των στερεών σωμάτων.
- Δεν ελήφθησαν υπόψιν βαρυτικές δυνάμεις και ηλεκτρομαγνητικά φαινόμενα.

Οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων, χρησιμοποιήθηκαν ώστε να βελτιωθούν τα αρχικά σχέδια. Τα νέα βελτιωμένα σχέδια ελέγχθηκαν επίσης με προσομοίωση, με τη διαδικασία αυτή να επαναλαμβάνεται μέχρι να προκύψουν τα κατάλληλα σχέδια, ώστε αυτά να αποδίδουν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

## 2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΙΝΗΤΗΡΑ

Η ροή του ρευστού στη διάταξη της παρούσας εργασίας, επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση του σιδηρομαγνητικού ρευστού εμβόλου, το οποίο ακολουθεί τον εξωτερικό μαγνήτη. Η μετακίνηση του μαγνήτη, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια του κινητήρα, πρέπει να γίνεται με μεγάλη ακρίβεια, δεδομένου των μικρών αποστάσεων μεταξύ των στοιχείων της μικροδιάταξης.

Το χρονικό διάστημα που επιλέχθηκε από τις προσομοιώσεις<sup>13</sup> για την πραγματοποίηση του ενός κύκλου της PCR είναι τα 6 s, τα οποία αντιστοιχούν σε περιστροφική ταχύτητα ίση με 10 rpm. Η περιστροφική ταχύτητα αυτής της τάξης μεγέθους, είναι αρκετά μικρή για να επιτευχθεί με συμβατικούς κινητήρες συνεχούς ρεύματος. Για το λόγο αυτό, έπρεπε να γίνει η κατάλληλη επιλογή του κινητήρα, ώστε αυτός να μπορεί να ικανοποιήσει τις ανάγκες της συγκεκριμένης διάταξης.

Το μοντέλο του κινητήρα που επιλέχθηκε, ονομάζεται «*Wantai NEMA23 57BYGH627P1 stepper motor*» και ανήκει στην οικογένεια των βηματικών κινητήρων. Οι βηματικοί κινητήρες είναι ιδανικοί για περιπτώσεις στις οποίες χρειάζεται μεγάλη ακρίβεια στην κίνηση σε χαμηλές ταχύτητες, χωρίς να μειώνεται η ροπή που παρέχουν, [99] και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές που απαιτούνται τα παραπάνω στοιχεία, όπως στην περίπτωση των 3D printers.

## 2.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Στην ενότητα αυτή, παρουσιάζονται τα υλικά και οι διεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τμήμα της παρούσας εργασίας.

---

<sup>13</sup> Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης, από τα οποία προέκυψε η ταχύτητα περιστροφής του κινητήρα, παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

## 2.4.1 Ψηφίδες

Για τον έλεγχο της ροής του σιδηρομαγνητικού ρευστού, κατασκευάστηκε σε πρώτο στάδιο μία δοκιμαστική ψηφίδα. Η ψηφίδα αυτή, κατασκευάστηκε σε υπόστρωμα από πολυμεθακρυλικό μεθύλιο [Polymethyl methacrylate (PMMA)], με τη μέθοδο CNC milling. Το σχέδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της δοκιμαστικής ψηφίδας παρουσιάζεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων (σχήμα 3-7). Η εξωτερική σφράγιση έγινε με την κάλυψη της ψηφίδας από ένα λεπτό φύλλο πολυολεφίνης.

Η τελική ψηφίδα με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία κατασκευάστηκε σε PCB υπόστρωμα, το οποίο αποτελείται κυρίως από FR4 με εσωτερικά επίπεδα χαλκού. Η κατασκευή έγινε από την εταιρεία *Eurocircuits*, με βάση το σχέδιο που σχεδιάστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα *KiCad (5.1.0)*, το οποίο και παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων (σχήμα 3-1). Ο έλεγχος της θερμοκρασίας στην επιφάνεια της PCB ψηφίδας, πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις που έγιναν με χρήση θερμικής κάμερας. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *FLIR A300*, με την προσθήκη πρόσθετου μεγεθυντικού φακού. Οι εικόνες που προέκυψαν από την κάμερα, παρουσιάζονται και αυτές στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

## 2.4.2 Μαγνήτες και εξαρτήματα

Για την κίνηση του σιδηρομαγνητικού ρευστού, χρησιμοποιήθηκαν επινικελωμένοι (NiCuNi plated) μαγνήτες νεοδυμίου, κυλινδρικού και κωνικού σχήματος. Ο κυλινδρικός μαγνήτης που χρησιμοποιήθηκε είναι διαμέτρου  $D = 35 \text{ mm}$  και ύψους  $H = 20 \text{ mm}$ . Οι τρεις κωνικοί μαγνήτες που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν έτσι ώστε, τοποθετούμενοι ο ένας επάνω στον άλλο με φθίνουσα σειρά μεγέθους, να δημιουργούν έναν κώνο με τις ακόλουθες συνολικές διαστάσεις: Διάμετρος βάσης  $D = 25 \text{ mm}$ , διάμετρος κεφαλής  $d = 5 \text{ mm}$ , ύψος  $H = 20 \text{ mm}$ . Η μονάδα μαγνήτισης των μαγνητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι N 45. Τα εξαρτήματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνδεση του μαγνήτη με τον άξονα του κινητήρα και για τη στήριξη της ψηφίδας πάνω στον κινητήρα, κατασκευάστηκαν σε



τριδιάστατο εκτυπωτή (3D printer) μοντέλου *STRATASYS Eden260V OBJET*, τεχνολογίας *POLYJET*, από την εταιρεία *SOLID3D*. Η ανάλυση που χρησιμοποιήθηκε για την τριδιάστατη εκτύπωση είναι  $30\ \mu\text{m}$  για τους άξονες  $x$ ,  $y$  και  $16\ \mu\text{m}$  για τον άξονα  $z$ . Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την τριδιάστατη εκτύπωση των εξαρτημάτων ήταν το φωτοπολυμερές Vero Dent.

### 2.4.3 Σιδηρομαγνητικά ρευστά και επιφάνειες

Για την επιλογή των κατάλληλων υλικών, ώστε να επιτευχθεί η ροή του ρευστού στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού, δοκιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά είδη σιδηρομαγνητικών ρευστών, σε διαφορετικές επιφάνειες. Τα σιδηρομαγνητικά ρευστά που δοκιμάστηκαν είναι τα ακόλουθα.

1. APG CDF 1120 Ferrofluid
2. APG CDF 1165 Ferrofluid
3. APG CDF 2250 Ferrofluid
4. Magnitech Ferrofluid

Τα τρία πρώτα σιδηρομαγνητικά ρευστά είναι κατασκευασμένα από την ίδια εταιρία (Ferrotec), χρησιμοποιούν ως διαλύτη συνθετικό έλαιο (synthetic ester oil) και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ποσότητα των σωματιδίων σιδήρου που είναι διαλυμένα στο διαλύτη, με το ρευστό «APG CDF 2250 Ferrofluid» να είναι το πυκνότερο από τα τρία. Η προμήθεια του Magnitech ferrofluid έγινε από την εταιρεία Magnitech.gr. Αυτό το σιδηρομαγνητικό ρευστό, χρησιμοποιεί ως διαλύτη διαφορετικό έλαιο από τα τρία πρώτα ρευστά, ενώ περιέχει και μεγαλύτερη ποσότητα σωματιδίων σιδήρου διαλυμένα στο διαλύτη.<sup>14</sup>

---

<sup>14</sup> Περισσότερα στοιχεία για τη σύνθεση των σιδηρομαγνητικών ρευστών βρίσκονται στο παράρτημα.

Οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν, για τη μελέτη της ροής των σιδηρομαγνητικών ρευστών είναι οι εξής.

1. Επιφάνεια από PMMA.
2. Υδρόφοβη επιφάνεια κατασκευασμένη σε μεταλλικό υπόστρωμα (σιδήρου). Για την δημιουργία της επιφάνειας, έγινε απόθεση υμενίου πάχους 60nm με πλάσμα αερίου  $\text{CHF}_3$ , σε αντιδραστήρα *Reactive Ion Etching (RIE)*. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στον αντιδραστήρα RIE είναι οι εξής: Ισχύς: 50 w, Πίεση: 100 mTorr, Ροή αερίου: 50 sccm.
3. Υπερυδρόφοβη επιφάνεια κατασκευασμένη σε υπόστρωμα PMMA, με εγχάραξη πλάσματος οξυγόνου και απόθεση  $\text{C}_4\text{F}_8$ . Για τη δημιουργία της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη κατεργασία. Αρχικά, έγινε εγχάραξη της επιφάνειας με πλάσμα οξυγόνου σε αντιδραστήρα *Inductively Coupled Plasma (ICP)* για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε απόθεση υμενίου πάχους 40 nm με πλάσμα  $\text{C}_4\text{F}_8$  στον ίδιο αντιδραστήρα πλάσματος.
4. Ελαιόφοβη επιφάνεια με την εμπορική ονομασία «*Mocolo Nano Optics UV Liquid Tempered Glass*», η οποία χρησιμοποιείται για την επικάλυψη οθονών κινητών τηλεφώνων.

Τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για την επιλογή των υλικών αυτών, παρουσιάζονται στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε στάδιο της εργασίας.

### 3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Η PCB ψηφίδα με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, σχεδιάστηκε σε σχήμα κυκλικού δακτυλίου, εξωτερικής διαμέτρου 40 mm, εσωτερικής διαμέτρου 20 mm και πάχους 1,546 mm. Το σχήμα αυτό είναι κατάλληλο για την κατασκευή του κυκλικού μικροκαναλιού στην επιφάνεια της ψηφίδας, ενώ παράλληλα επιτρέπει στην ψηφίδα να τοποθετείται εύκολα πάνω στον κινητήρα, γύρω από τον άξονά του.

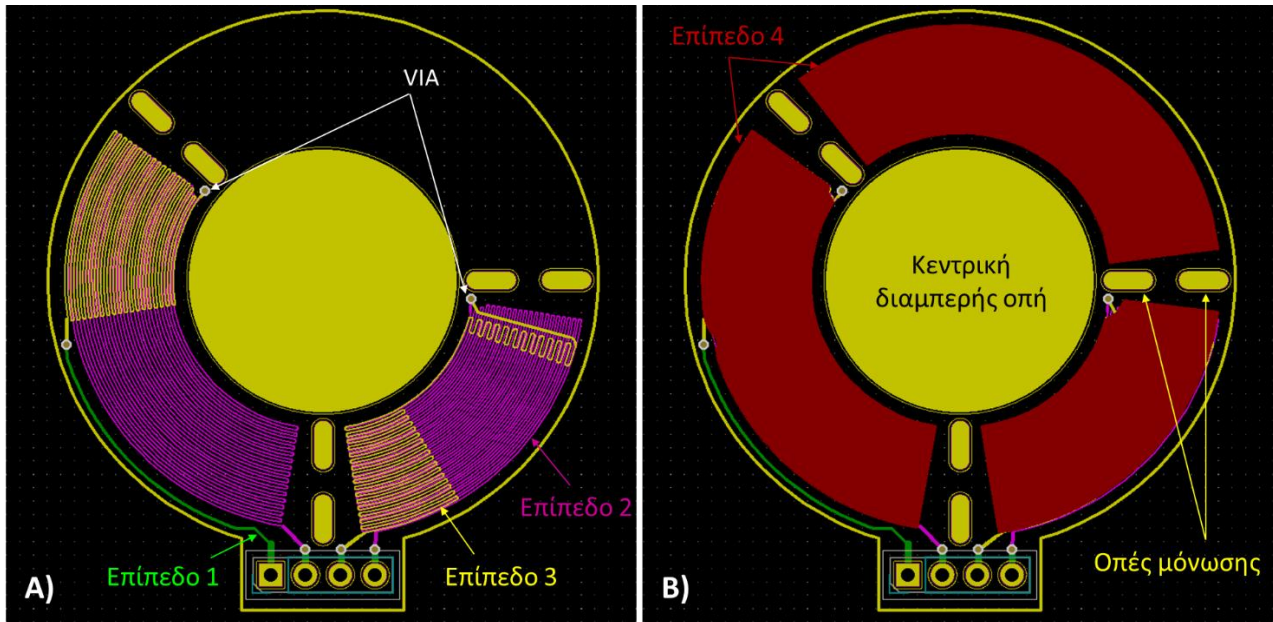
Η ψηφίδα είναι χωρισμένη σε τρεις ζώνες, μία για κάθε στάδιο της PCR. Στη ζώνη της αποδιάταξης αντιστοιχεί μόνο το ένα τέταρτο της συνολικής επιφάνειας, σε αντίθεση με τις άλλες δύο ζώνες (υβριδισμός και επιμήκυνση), στην κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί περιοχή ίση με τα τρία όγδοα της ψηφίδας (σχήμα 3-1). Αυτό συμβαίνει διότι στο στάδιο της αποδιάταξης, η αποκόλληση των διπλών αλυσίδων του DNA συμβαίνει σχεδόν ακαριαία μόλις το δείγμα αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Επομένως, το ρευστό δεν χρειάζεται να παραμείνει για το ίδιο χρονικό διάστημα στη ζώνη της αποδιάταξης, όσο στις άλλες δύο ζώνες όπου πρέπει να λάβουν χώρα οι βιολογικές αντιδράσεις. Ένας επιπλέον λόγος για να δοθεί λιγότερος χώρος στη ζώνη της αποδιάταξης, είναι πως στη συγκεκριμένη ψηφίδα, η μεταβολή της θερμοκρασίας ρυθμίζεται με θερμικά, αλλά όχι ψυκτικά στοιχεία. Το δείγμα δηλαδή, θερμαίνεται ενεργά περνώντας πάνω από τις θερμαινόμενες περιοχές, αλλά κατά την ψύξη του απλώς αποδίδει τη θερμότητά του στο περιβάλλον. Το γεγονός αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να

αυξήσουμε τη θερμότητα που προσλαμβάνει το ρευστό ανά μονάδα μήκους στις δύο πρώτες θερμοκρασιακές ζώνες, εξοικονομώντας χώρο για το στάδιο του υβριδισμού και την ψύξη του δείγματος.

Στο σχήμα 3-1 παρουσιάζεται η ψηφίδα, όπως αυτή σχεδιάστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα *KiCad* (5.1.0). Αρχικά, διακρίνονται οι τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες, που αντιστοιχούν στα τρία στάδια του κύκλου της PCR. Στο κέντρο της ψηφίδας, έχει σχεδιαστεί μία κυκλική οπή διαμέτρου 20 mm (κίτρινο χρώμα), η οποία επιτρέπει την τοποθέτηση της ψηφίδας γύρω από τον άξονά του κινητήρα.

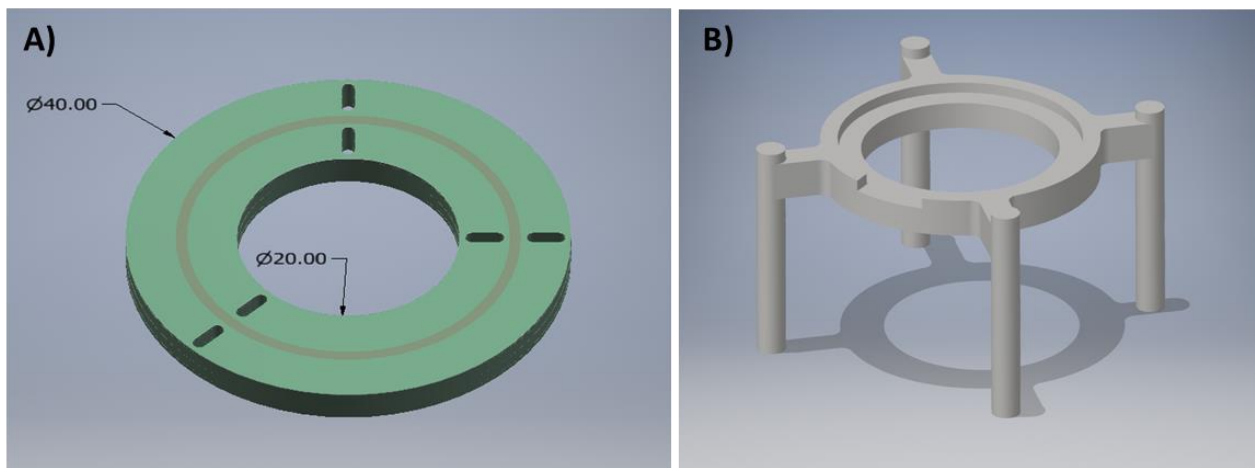
Στο εσωτερικό της ψηφίδας είναι ενσωματωμένα τέσσερα επίπεδα χαλκού. Τα θερμικά στοιχεία έχουν σχεδιαστεί με μαιανδρική μορφή και βρίσκονται στα δύο ενδιάμεσα επίπεδα χαλκού της ψηφίδας [σχήμα 3-1.A, επίπεδα 2 (ιώδες) και 3 (κίτρινο)]. Η επιλογή του σχεδίου των θερμικών στοιχείων έγινε κατόπιν προσομοιώσεων, ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο θερμοκρασιακό προφίλ για τους κύκλους της PCR. Πιο συγκεκριμένα, τα θερμικά στοιχεία βρίσκονται μόνο στις ζώνες στις οποίες λαμβάνουν χώρα τα στάδια της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης, όπου και απαιτείται η θέρμανση του ρευστού δείγματος. Στην αρχή της κάθε θερμοκρασιακής ζώνης, τα θερμικά στοιχεία αποτελούνται από δύο επίπεδα χαλκού, έτσι ώστε να προσδίδουν περισσότερη θερμότητα στις συγκεκριμένες περιοχές, προκειμένου να επιτυγχάνεται ταχύτερα η επιθυμητή θερμοκρασία στο ρευστό. Αντιθέτως, στο μέσο της κάθε θερμοκρασιακής ζώνης, τα θερμικά στοιχεία αποτελούνται από μόνο ένα επίπεδο, αποδίδοντας έτσι λιγότερη θερμότητα, ώστε τελικά η θερμοκρασία στο εσωτερικό της κάθε ζώνης να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερή και κοντά στην επιθυμητή τιμή.

Στο ανώτερο από τα τέσσερα επίπεδα χαλκού της PCB ψηφίδας, ανάμεσα στα θερμικά στοιχεία και στην περιοχή όπου πρόκειται να κατασκευαστεί το κυκλικό μικροκανάλι, βρίσκονται τρία λεπτά στρώματα χαλκού, ένα για κάθε θερμοκρασιακή ζώνη [σχήμα 3-1.B, επίπεδο 4 (κόκκινο)]. Τα τρία αυτά στρώματα τοποθετήθηκαν προκειμένου να διατηρούν τη θερμοκρασία ομοιόμορφη σε κάθε ζώνη. Ανάμεσά τους, έχουν σχεδιαστεί διαμπερείς οπές ελλειπτικού σχήματος (σχήμα 3-1, κίτρινο χρώμα), για την καλύτερη μόνωση των θερμοκρασιακών ζωνών και τον περιορισμό του φαινομένου της θερμικής συνομιλίας.



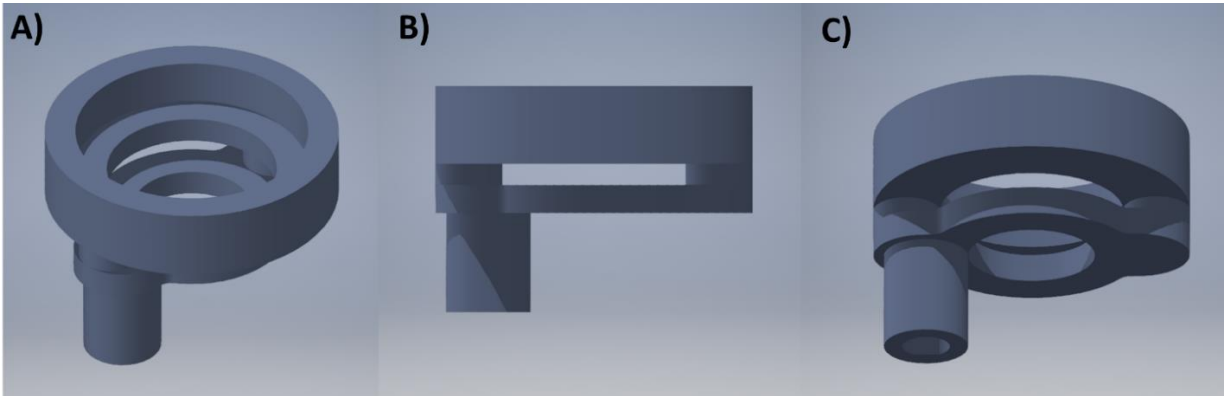
Σχήμα 3-1. Σχέδιο της PCB ψηφίδας με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, όπως σχεδιάστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα KiCad (5.1.0). Αριστερά (A), διακρίνονται τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία στα επίπεδα 2 (ιώδες) και 3 (κίτρινο) της ψηφίδας. Στο πρώτο και χαμηλότερο επίπεδο χαλκού (πράσινο), γίνεται η σύνδεση των θερμικών στοιχείων με την τροφοδοσία. Τα επίπεδα συνδέονται μεταξύ τους σε συγκεκριμένα σημεία με στοιχεία κάθετης διασύνδεσης [vertical interconnect access (VIA)]. Δεξιά (B), φαίνονται με κόκκινο χρώμα τα τρία λεπτά στρώματα χαλκού, που βρίσκονται στο ανώτερο επίπεδο της ψηφίδας (επίπεδο 4) πάνω από κάθε θερμοκρασική ζώνη και παρέχουν θερμοκρασιακή ομοιομορφία.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα τελικά σχέδια της μικροδιάταξης όπως αυτά σχεδιάστηκαν στο *Autodesk Inventor Professional 2019*.

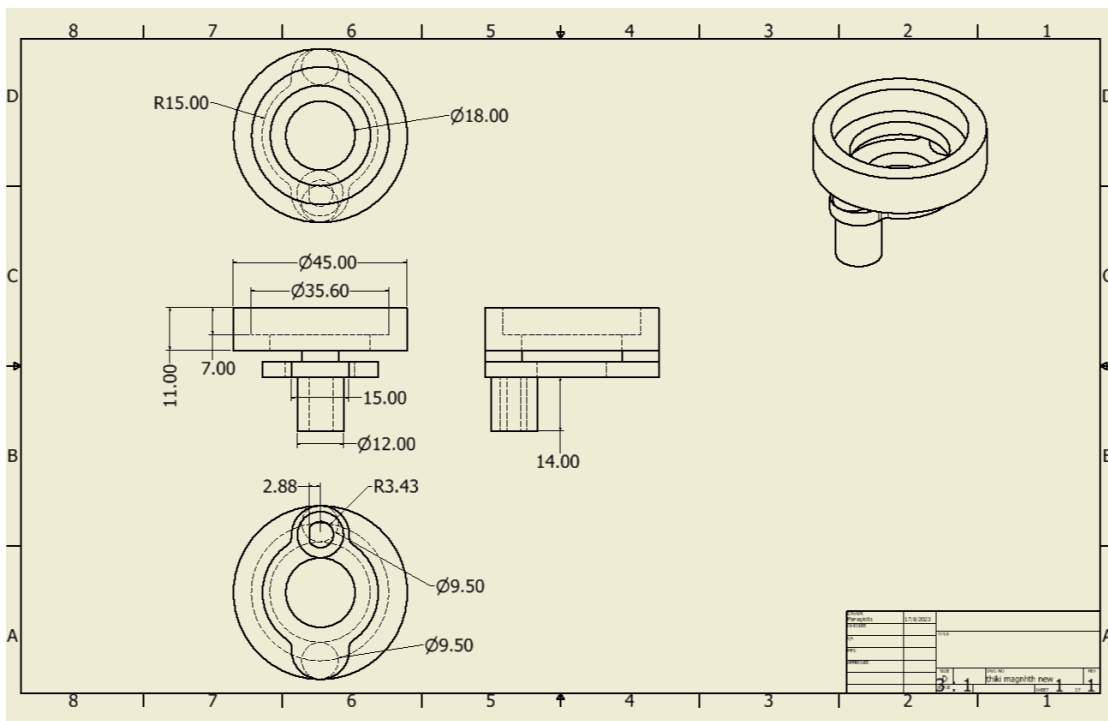


Σχήμα 3-2. A) Τριδιάστατη γεωμετρία της ψηφίδας, όπως αυτή κατασκευάστηκε στο *Autodesk Inventor Professional 2019*, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στις υπολογιστικές προσομοιώσεις (οι διαστάσεις σε mm). B) Τριδιάστατο σχέδιο της βάσης στήριξης της ψηφίδας.

Στο σχήμα 3-2 φαίνονται τα τριδιάστατα σχέδια της ψηφίδας (σχήμα 3-2. A) και της βάσης στήριξής της (σχήμα 3-2. B), όπως σχεδιάστηκαν στο λογισμικό τριδιάστατης σχεδίασης *Autodesk Inventor Professional 2019*. Το πρώτο σχέδιο χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του προβλήματος μεταφοράς θερμότητας, ενώ το δεύτερο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της βάσης στήριξης σε τριδιάστατο εκτυπωτή.

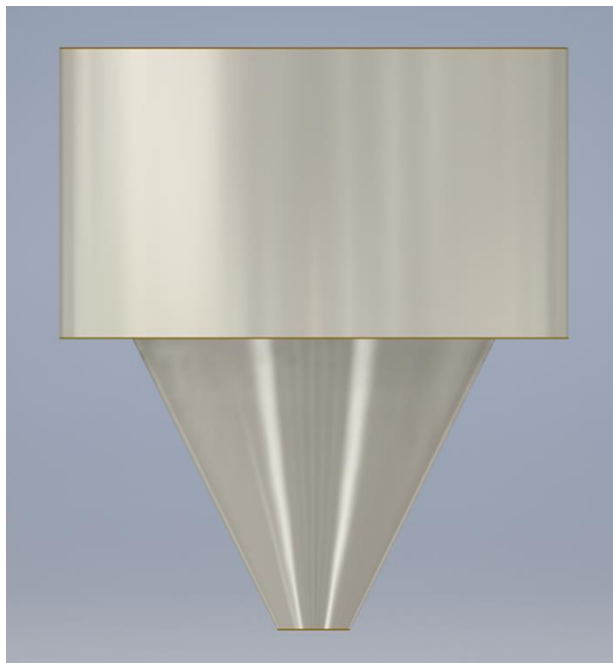


Σχήμα 3-3. Τριδιάστατο σχέδιο του εξαρτήματος σύνδεσης του μαγνήτη με τον άξονα του κινητήρα, από τρεις διαφορετικές όψεις.



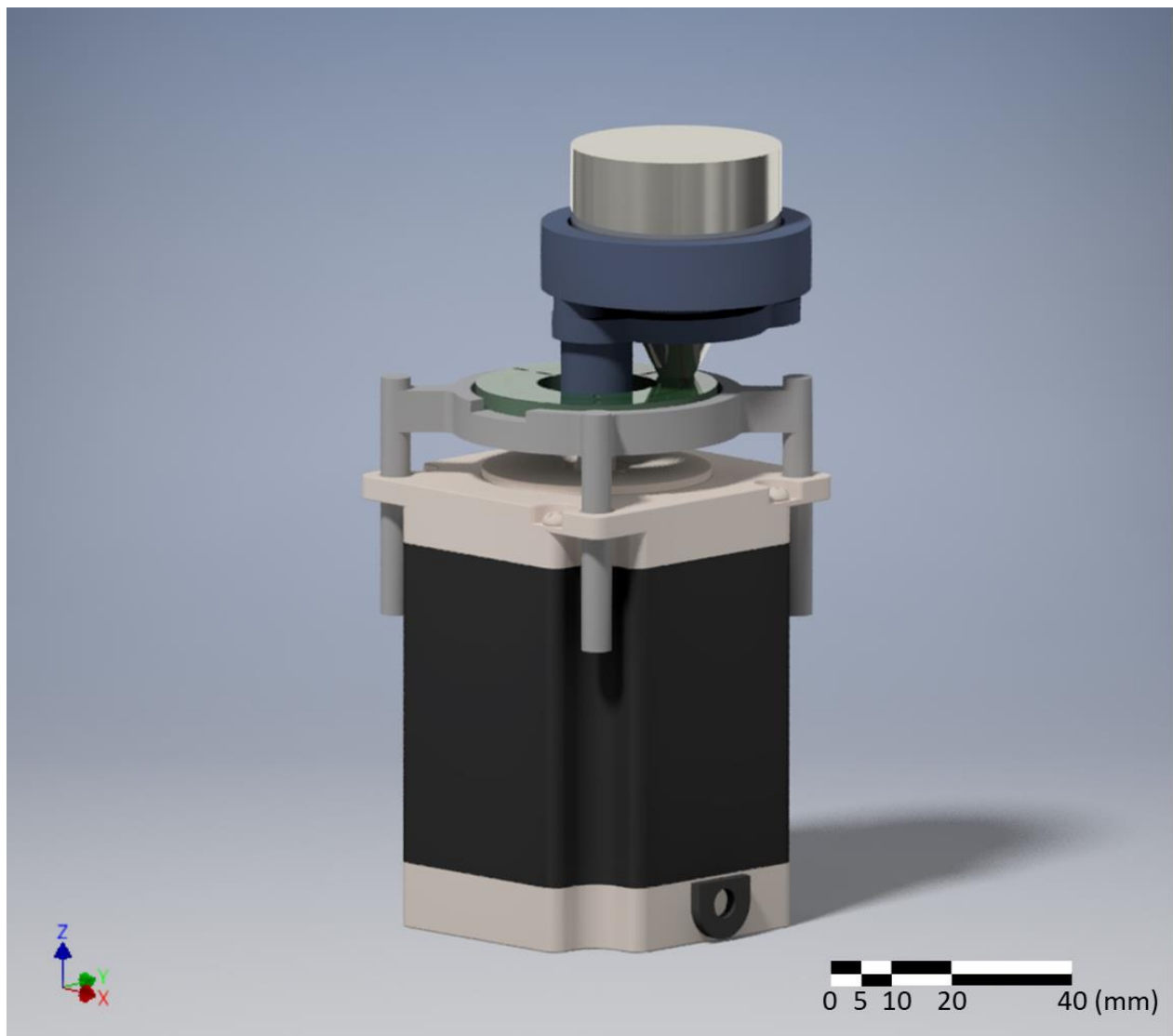
Σχήμα 3-4. Μηχανολογικό σχέδιο του εξαρτήματος σύνδεσης του μαγνήτη με τον άξονα του κινητήρα.

Στο σχήμα 3-3 παρουσιάζεται το τριδιάστατο σχέδιο του εξαρτήματος σύνδεσης του μαγνήτη με τον άξονα του κινητήρα, από τρεις διαφορετικές όψεις, ενώ στο σχήμα 3-4 παρουσιάζεται το μηχανολογικό σχέδιο του ίδιου εξαρτήματος. Οι διαστάσεις του εξαρτήματος επιλέχθηκαν με βάση το μαγνήτη αλλά και τον κινητήρα, επομένως, το εξάρτημα αυτό λειτουργεί μόνο για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μικροδιάταξης. Το σχέδιο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή πρωτότυπου εξαρτήματος, σε τριδιάστατο εκτυπωτή.



*Σχήμα 3-5. Τριδιάστατο σχέδιο του μαγνήτη που χρησιμοποιήθηκε.*

Στο σχήμα 3-5 παρουσιάζεται το τριδιάστατο σχέδιο του μαγνήτη που επιλέχθηκε. Η επιλογή του μαγνήτη έγινε κατόπιν προσομοιώσεων και πειραμάτων, τα οποία παρουσιάζονται στις ενότητες που ακολουθούν.



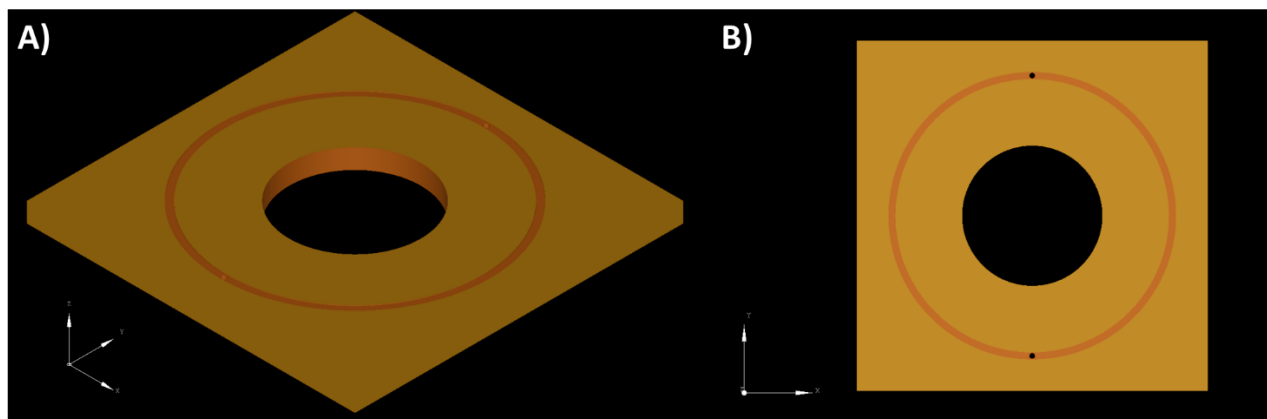
Σχήμα 3-6. Σχηματική αναπαράσταση της συναρμολογημένης διάταξης με όλα τα προηγούμενα εξαρτήματα τοποθετημένα στα κατάλληλα σημεία.

Τέλος, στο σχήμα 3-6 παρουσιάζεται η τριδιάστατη σχηματική αναπαράσταση της συναρμολογημένης διάταξης, με όλα τα προηγούμενα εξαρτήματα τοποθετημένα στα κατάλληλα σημεία.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για τη δοκιμή της ροής του σιδηρομαγνητικού ρευστού κατασκευάστηκε δοκιμαστική ψηφίδα σε υπόστρωμα PMMA. Στο σχήμα 3-7, παρουσιάζεται το σχέδιο της δοκιμαστικής ψηφίδας, όπως σχεδιάστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα *LPKF CircuitPro PM 2.3*, για την κατασκευή σε υπόστρωμα



PMMA, με τη μέθοδο CNC milling. Η δοκιμαστική ψηφίδα είναι τετραγωνικού παραλληλεπιπέδου σχήματος, πλευράς 5 cm και πάχους 3 mm. Στο κέντρο της βρίσκεται μία διαμπερής οπή διαμέτρου 20 mm, ενώ το κυκλικό μικροκανάλι έχει μέση διάμετρο 40 mm, πλάτος 1 mm και βάθος 100  $\mu$ m. Σε δύο αντιδιαμετρικά σημεία στο εσωτερικό του μικροκαναλιού βρίσκονται διαμπερείς οπές, διαμέτρου 800  $\mu$ m η κάθε μία, οι οποίες χρησιμεύουν στην αρχική πλήρωση του χώρου του μικροκαναλιού με το ρευστό.



Σχήμα 3-7. Σχέδιο της δοκιμαστικής ψηφίδας όπως σχεδιάστηκε στο λογισμικό πρόγραμμα LPKF CircuitPro PM 2.3. A) Αξονομετρική προβολή B) Κάτοψη.

## 3.2 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ

### 3.2.1 Μελέτη του προβλήματος μεταφοράς θερμότητας

Ο βασικός στόχος των προσομοιώσεων ήταν ο έλεγχος της απόδοσης της λειτουργίας των στοιχείων της διάταξης, όπως αυτά είχαν σχεδιαστεί, με σκοπό τη βελτιστοποίησή τους. Πιο συγκεκριμένα, για να είναι λειτουργική η διάταξη και να μπορούν να επιτευχθούν οι απαραίτητες θερμοκρασίες που απαιτούνται για τη διεξαγωγή της PCR, έπρεπε να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα παρακάτω στοιχεία.

- Το σχέδιο της ψηφίδας και των θερμικών στοιχείων που είναι ενσωματωμένα σε αυτή.
- Η θερμική ισχύς που παράγεται από κάθε θερμικό στοιχείο.
- Η ταχύτητα με την οποία κινείται το ρευστό δείγμα στο εσωτερικό του μικροκαναλιού.

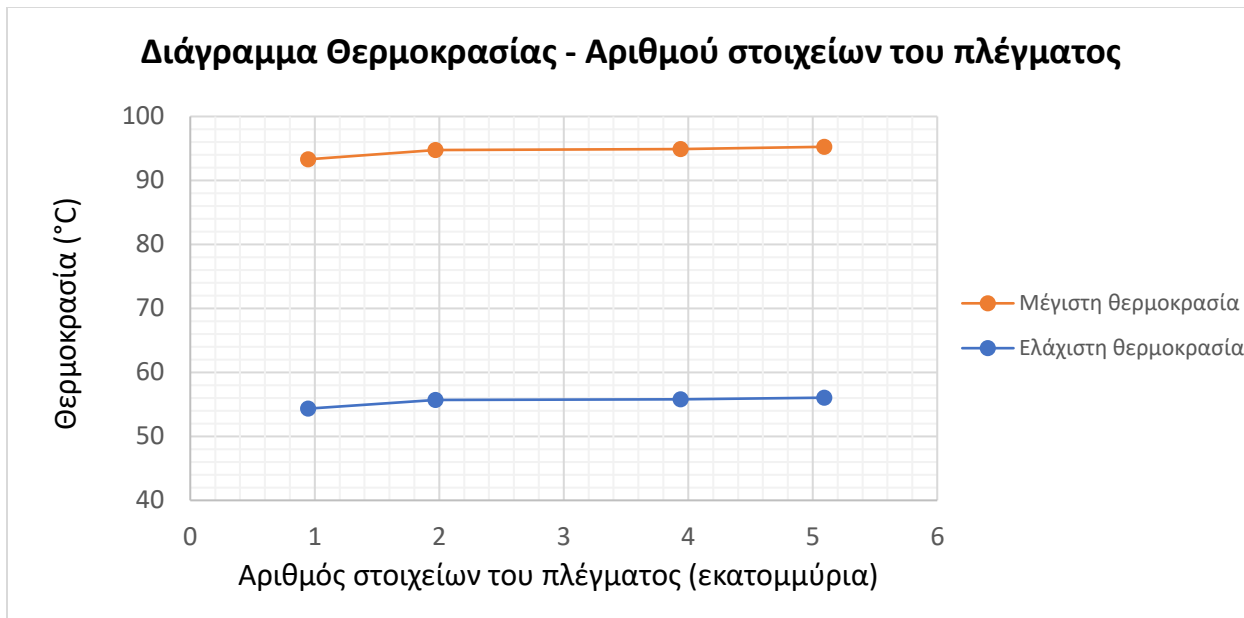
Οι παραπάνω παράμετροι μελετήθηκαν με προσομοιώσεις, με σκοπό να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός τους, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό θερμοκρασιακό προφίλ στο ρευστό εντός του μικροκαναλιού, για τη διεξαγωγή της PCR.

### *Ανεξαρτησία λύσης από το υπολογιστικό πλέγμα για το πρόβλημα της μεταφοράς θερμότητας.*

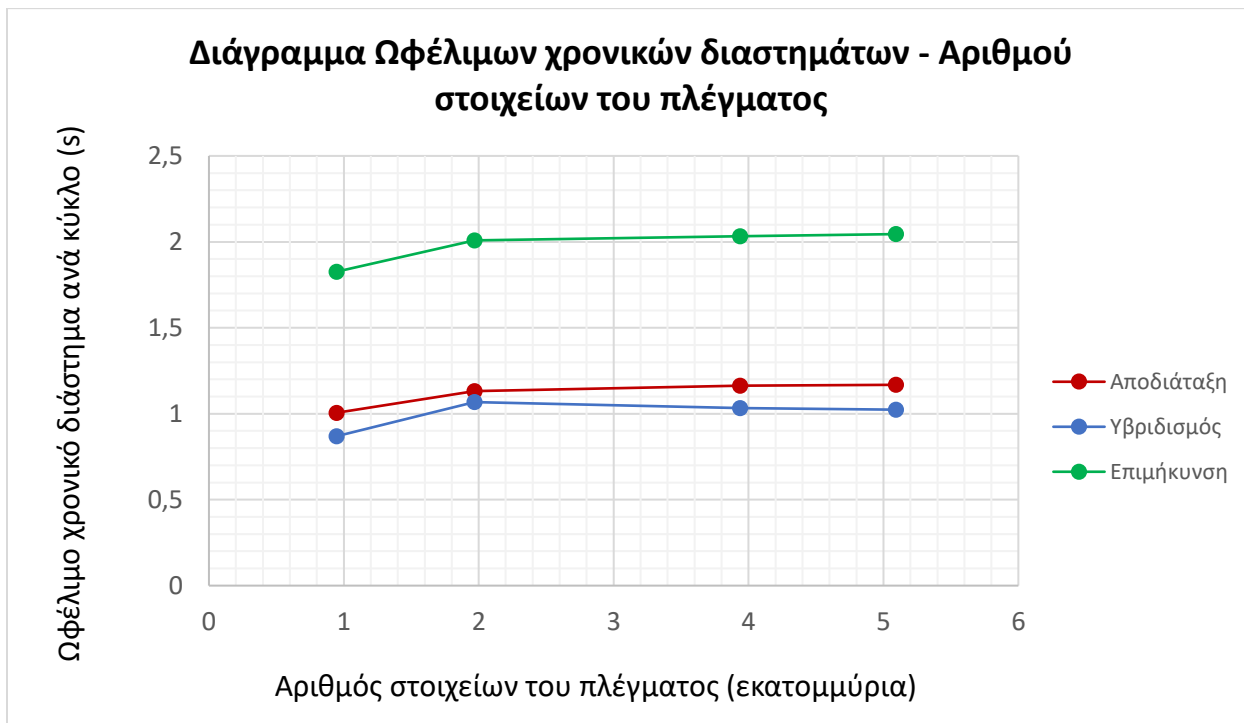
Για την προσομοίωση που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν πλέγματα υψηλής πυκνότητας, ώστε να επιτευχθεί ανεξαρτησία των τελικών αποτελεσμάτων από αυτά. Για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας της λύσης από το υπολογιστικό πλέγμα, εξετάστηκαν, η μέγιστη και ελάχιστη θερμοκρασία που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού, καθώς και τα ωφέλιμα χρονικά διαστήματα<sup>15</sup> κάθε σταδίου της PCR, για έναν κύκλο της. Οι τιμές των παραπάνω μεγεθών συγκρίθηκαν μεταξύ τους, για λύσεις που προέκυψαν από τέσσερα υπολογιστικά πλέγματα διαφορετικών πυκνοτήτων, ξεκινώντας από πλέγμα 945623 στοιχείων και καταλήγοντας σε πλέγμα 5092421 στοιχείων. Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

---

<sup>15</sup> Με τον όρο «ωφέλιμο χρονικό διάστημα» αναφερόμαστε στο χρονικό διάστημα, για το οποίο η θερμοκρασία του ρευστού βρίσκεται εντός των επιθυμητών ορίων, ώστε να πραγματοποιείται ένα από τα τρία στάδια της PCR με ικανοποιητική απόδοση. Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν ως όρια για τις ωφέλιμες περιοχές, παρουσιάζονται αναλυτικότερα στην επόμενη ενότητα («Προσομοιώσεις για κινούμενο και στατικό ρευστό»). Προς το παρόν εξετάζεται μόνο η ανεξαρτησία της λύσης της προσομοίωσης από την πυκνότητα του πλέγματος.



Σχήμα 3-8. Διάγραμμα **Θερμοκρασίας – Αριθμού στοιχείων του πλέγματος**, για τη μέγιστη και την ελάχιστη θερμοκρασία που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού, κατά τη διάρκεια ενός κύκλου της PCR.



Σχήμα 3-9. Διάγραμμα **Ωφέλιμων χρονικών διαστημάτων – Αριθμού στοιχείων του πλέγματος**, για τα τρία διαφορετικά στάδια ενός κύκλου της PCR.

Παρατηρούμε πως, ήδη από το δεύτερο πλέγμα (1968546 στοιχεία), οι τιμές των αποτελεσμάτων βρίσκονται πολύ κοντά σε αυτές των επόμενων πλεγμάτων. Συγκρίνοντας το δεύτερο με το τρίτο πλέγμα (με αριθμούς στοιχείων 1968546 και 3938235 αντίστοιχα), παρατηρούμε πως οι αποκλίσεις που εμφανίζονται στα αποτελέσματα είναι αρκετά μικρές. Πιο συγκεκριμένα, οι αποκλίσεις μεταξύ των δύο πλεγμάτων, για τις τιμές της μέγιστης και της ελάχιστης θερμοκρασίας στο εσωτερικό του μικροκαναλιού (σχήμα 3-8), μετρήθηκαν σε  $\Delta T_{max} = 0,181 \text{ }^\circ\text{C}$  και  $\Delta T_{min} = 0,122 \text{ }^\circ\text{C}$ . Οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δύο πλεγμάτων στα ωφέλιμα χρονικά διαστήματα (σχήμα 3-9) για τα στάδια της αποδιάταξης, του υβριδισμού και της επιμήκυνσης είναι  $\Delta t_{Den} = 0,018 \text{ s}$ ,  $\Delta t_{An} = 0,021 \text{ s}$  και  $\Delta t_{Ext} = 0,018 \text{ s}$ . Οι μεταβολές αυτές είναι αποδεκτές για την ακρίβεια που απαιτείται από την προσομοίωση στη συγκεκριμένη εφαρμογή και μπορούμε να θεωρήσουμε πως η λύση της προσομοίωσης έχει αποκτήσει ικανοποιητικό επίπεδο ανεξαρτησίας από την πυκνότητα του πλέγματος, ήδη από το δεύτερο πλέγμα (1968546 στοιχεία). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην ενότητα που ακολουθεί, προέκυψαν από προσομοιώσεις για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε το πυκνότερο πλέγμα από αυτά που παρουσιάζονται στα σχήματα 3-8 και 3-9, με αριθμό στοιχείων  $n = 5092421$ .

### *Προσομοιώσεις για κινούμενο και στατικό ρευστό*

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι βασικές παράμετροι της προσομοίωσης ήταν το σχέδιο της ψηφίδας με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, η θερμική ισχύς που εκπέμπει το κάθε θερμικό στοιχείο, καθώς και η ταχύτητα του ρευστού. Αυτές οι τρεις παράμετροι μεταβλήθηκαν και δοκιμάστηκαν επανειλημμένα με προσομοιώσεις, μέχρις ότου να βρεθεί ο καταλληλότερος συνδυασμός τους, με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί το επιθυμητό θερμοκρασιακό προφίλ της PCR.

Τα σχέδια της ψηφίδας και των θερμικών στοιχείων, έχουν ήδη παρουσιαστεί στην ενότητα του σχεδιασμού. Η ταχύτητα που επιλέχθηκε για την κίνηση του ρευστού είναι αυτή των 10 rpm, η οποία αντιστοιχεί χρονική περίοδο 6 s για κάθε κύκλο της PCR. Η

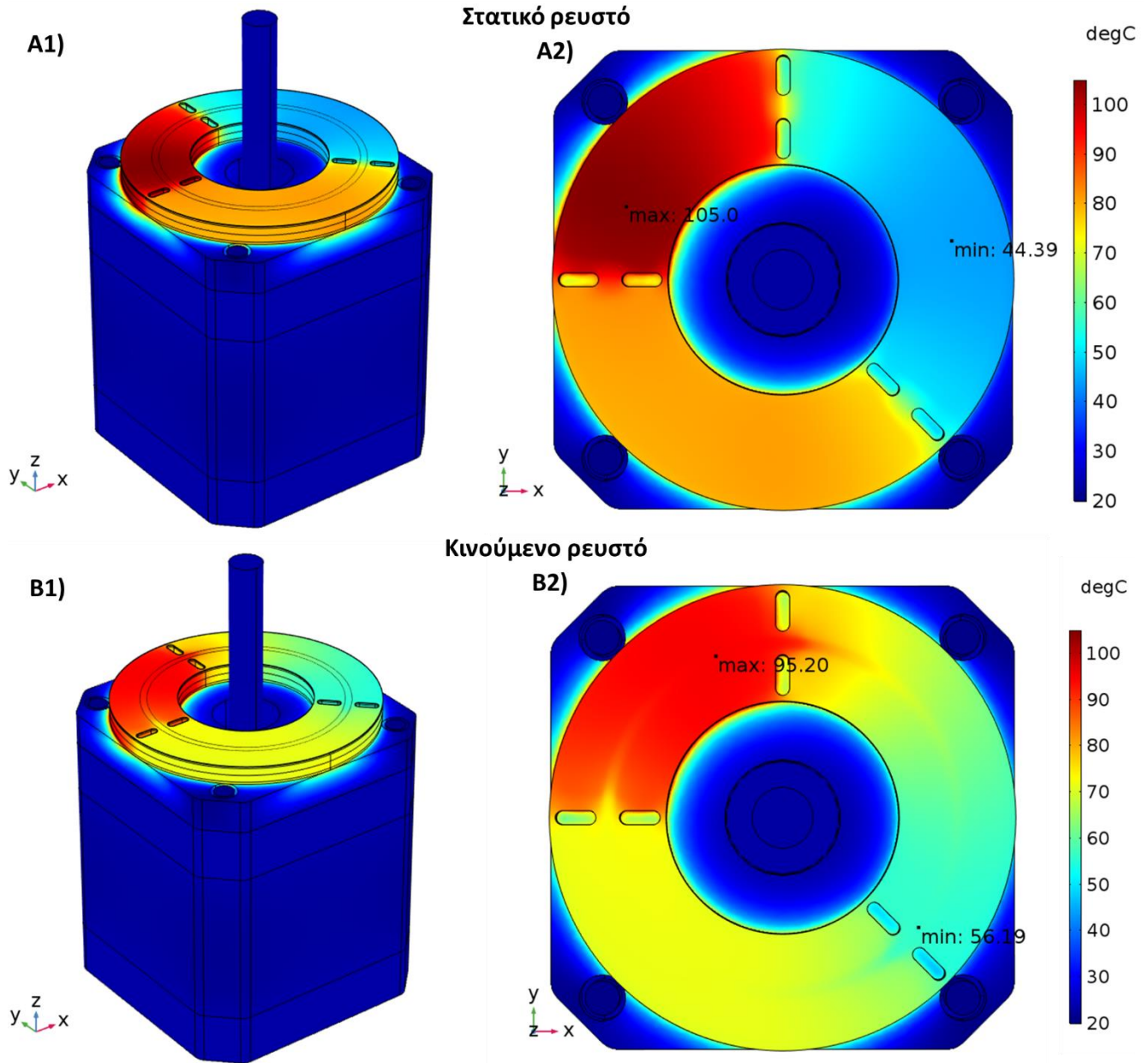
επιλογή αυτή έγινε κατόπιν αρκετών προσομοιώσεων, στις οποίες παρατηρήθηκε πως για κύκλο 6 s, είναι εφικτό να επιτευχθούν θερμοκρασίες κοντά στις επιθυμητές τιμές του πρωτοκόλλου της παραδοσιακής PCR. Τα 6 s επιλέχθηκαν ως ελάχιστη τιμή για τη χρονική διάρκεια ενός κύκλου της PCR, καθώς για μικρότερους χρόνους παρουσιάζονται πρακτικά προβλήματα που σχετίζονται με τη μετακίνηση του ρευστού στο εσωτερικό του μικροκαναλιού.<sup>16</sup> Η θερμική ισχύς που εκπέμπει το κάθε θερμικό στοιχείο, επιλέχθηκε επίσης κατόπιν πολλών δοκιμών, με κριτήριο και πάλι την επίτευξη θερμοκρασιών κοντά στις επιθυμητές τιμές του πρωτοκόλλου της παραδοσιακής PCR. Οι θερμικές ισχύες που επιλέχθηκαν είναι οι εξής.

- Θερμικό στοιχείο στη ζώνη αποδιάταξης:  $P_{Den} = 0,638 W$
- Θερμικό στοιχείο στη ζώνη επιμήκυνσης:  $P_{Ext} = 0,510 W$

Για να ορισθούν οι τιμές της έντασης του ηλεκτρικού ρεύματος οι οποίες θα πρέπει να παρέχονται στα θερμικά στοιχεία της ψηφίδας, ώστε να επιτευχθούν οι παραπάνω θερμικές ισχύες, απαραίτητη είναι η αρχική δοκιμή της ψηφίδας χωρίς την κίνηση του ρευστού και η σύγκρισή της με αντίστοιχη προσομοίωση. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή προσομοίωση για την περίπτωση στατικού ρευστού. Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η ρύθμιση της έντασης του ηλεκτρικού ρεύματος στα θερμικά στοιχεία της ψηφίδας, προτού τεθεί σε λειτουργία ο κινητήρας. Για την προσομοίωση αυτή, οι ισχύες των θερμικών στοιχείων της ψηφίδας, διατηρήθηκαν σταθερές σε σχέση με την περίπτωση του κινούμενου ρευστού. Στο σχήμα 3-10 παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή απεικόνιση τμήματος της μικροδιάταξης (ψηφίδα και κινητήρας), όπως προέκυψε από τις προσομοιώσεις για στατικό και κινούμενο ρευστό. Και στις δύο περιπτώσεις, διακρίνονται ξεκάθαρα οι τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες.

---

<sup>16</sup> Παρόλα αυτά, αν ξεπεραστούν οι περιορισμοί που προκύπτουν από τη δυσκολία στην κίνηση του ρευστού, η προσομοίωση έδειξε πως με ορισμένες τροποποιήσεις στη μικροδιάταξη, είναι δυνατή η πραγματοποίηση της PCR σε χρόνους μικρότερους των 6 s ανά κύκλο.

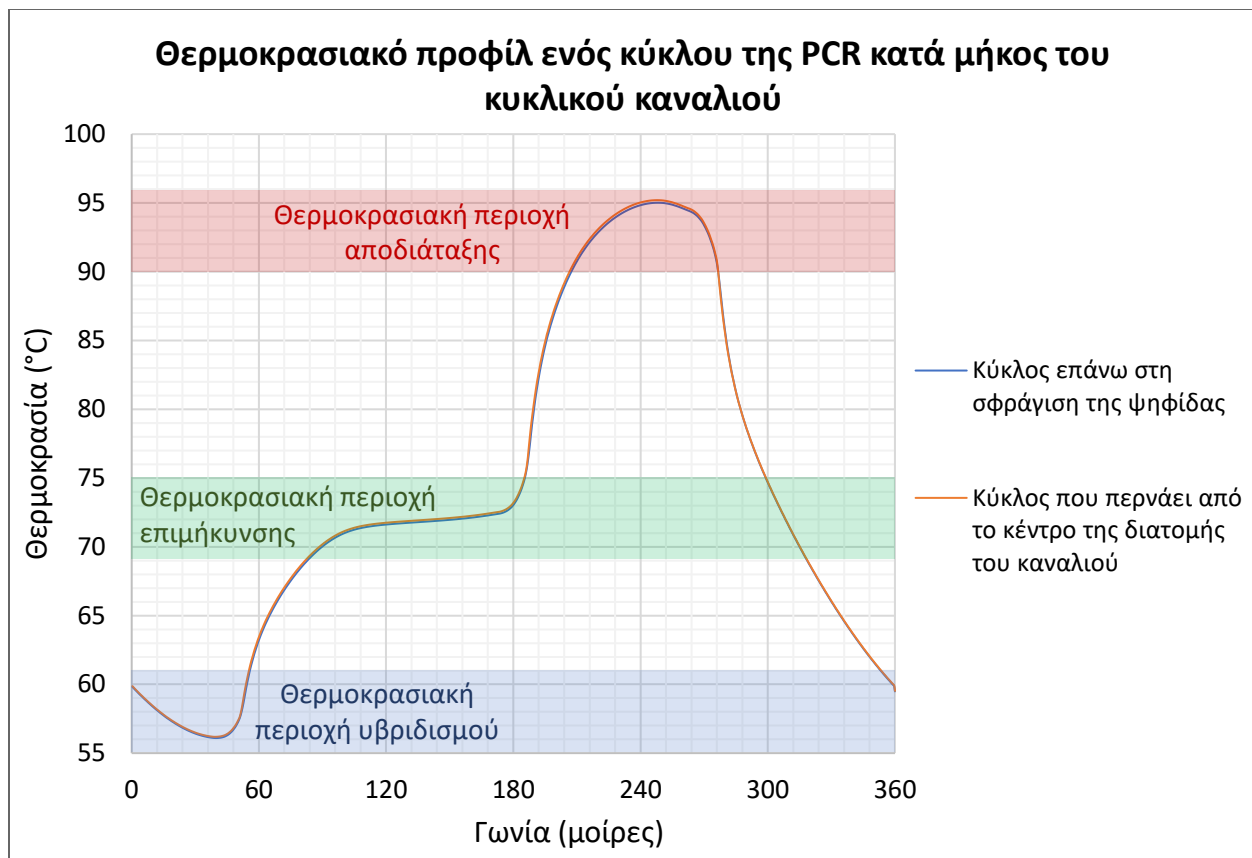


Σχήμα 3-10. Θερμοκρασιακή απεικόνιση της διάταξης (ψηφίδα και κινητήρας), όπως προέκυψε από τις προσομοιώσεις. Α) Προσομοίωση για στατικό ρευστό. Α1) Αξονομετρική προβολή Α2) Κάτοψη Β) Προσομοίωση για κινούμενο ρευστό με ταχύτητα περιστροφής 10 rpm. Β1) Αξονομετρική προβολή Β2) Κάτοψη.

Για την περίπτωση του κινούμενου ρευστού (σχήμα 3-10 Β), η μέγιστη θερμοκρασία που αναπτύσσεται στη διάταξη ξεπερνά τους 105 °C στο εσωτερικό του PCB, ωστόσο επειδή το ρευστό κινείται συνεχώς στην επιφάνεια της ψηφίδα, αλλάζοντας θερμοκρασιακές ζώνες, η θερμοκρασία του διατηρείται σε χαμηλότερο

επίπεδο, με μέγιστο τους 95,2 °C, και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος καταστροφής του βιολογικού δείγματος ή βρασμού του υδατικού διαλύματος. Στην κάτοψη της διάταξης (σχήμα 3-10.B2), διακρίνεται το φαινόμενο της θερμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των τριών θερμοκρασιακών ζωνών. Παρά το γεγονός ότι έχουν σχεδιαστεί διαμπερείς οπές μεταξύ των τριών ζωνών, προκειμένου να περιοριστεί η μεταφορά θερμότητας, το φαινόμενο αυτό εξακολουθεί να εμφανίζεται, εξαιτίας της μετακίνησης του ρευστού δείγματος μεταξύ των θερμοκρασιακών ζωνών, γεγονός που οδηγεί σε μεταφορά θερμότητας λόγω συναγωγής. Επιπλέον, εξαιτίας της κίνησης του ρευστού, η κάθε θερμοκρασιακή ζώνη μετατοπίζεται κατά μία γωνία μερικών μοιρών προς την αρχή της επόμενης ζώνης. Το ρευστό δηλαδή, λόγω της κίνησής του, θερμαίνεται και ψύχεται με μία διαφορά φάσης, σε σχέση με τα όρια των τριών θερμοκρασιακών ζωνών στην ψηφίδα, χωρίς ωστόσο αυτό να επηρεάζει τη συνολική απόδοση του κύκλου της PCR.

Για την περίπτωση του στατικού ρευστού (σχήμα 3-10 A), παρατηρούμε πως οι θερμοκρασίες στο μέσο του μικροκαναλιού είναι αυξημένες στις δύο θερμές ζώνες, σε σχέση με την προσομοίωση για κινούμενο ρευστό, και ιδιαίτερα στη ζώνη της αποδιάταξης, όπου η μέγιστη θερμοκρασία αγγίζει τους 105 °C. Αντιθέτως, στη ζώνη υβριδισμού το ρευστό είναι ψυχρότερο από ότι στην περίπτωση του κινούμενου ρευστού, με τη θερμοκρασία να μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από τους 45 °C. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, καθώς η κίνηση του ρευστού μέσω του μικροκαναλιού, μεταφέρει θερμότητα από τις περιοχές υψηλής θερμοκρασίας, στις περιοχές χαμηλής θερμοκρασίας. Επομένως, τώρα που απουσιάζει η κίνηση του ρευστού, οι τρεις περιοχές τείνουν να είναι θερμικά απομονωμένες μεταξύ τους. Παρατηρούμε επίσης, πως στην περίπτωση αυτή έχει εξαφανιστεί εντελώς το φαινόμενο της θερμικής συνομιλίας, όπως είναι λογικό αφού δεν μεταφέρεται θερμότητα μέσω της ροής του ρευστού. Τέλος, όπως αναμενόταν, στην περίπτωση του στατικού ρευστού δεν υπάρχει καμία διαφορά φάσης ανάμεσα στη θερμοκρασία του ρευστού και στα όρια των ζωνών.



Σχήμα 3-11. Θερμοκρασιακό προφίλ ενός κύκλου της PCR κατά μήκος του κυκλικού μικροκαναλιού (από την προσομοίωση του κινούμενου ρευστού). Με κόκκινο χρώμα φαίνεται η θερμοκρασιακή περιοχή της αποδιάταξης του DNA, με γαλάζιο η περιοχή του υβριδισμού των εκκινήτων και με πράσινο η περιοχή της επιμήκυνσης. Τα χρονικά διαστήματα στα οποία η καμπύλη του διαγράμματος βρίσκεται μέσα σε κάποια από αυτές τις τρεις θερμοκρασιακές περιοχές, θεωρούνται ωφέλιμα χρονικά διαστήματα για την PCR, καθώς αυτό σημαίνει πως ένα από τα τρία στάδια της PCR εξελίσσεται με πολύ υψηλό βαθμό απόδοσης.

Στο σχήμα 3-11 παρουσιάζεται το προφίλ των θερμοκρασιών του ρευστού δείγματος, κατά μήκος του κυκλικού μικροκαναλιού (από την προσομοίωση του κινούμενου ρευστού). Η γαλάζια καμπύλη αναφέρεται στις θερμοκρασίες των σημείων ενός κύκλου, ο οποίος περνάει από το κέντρο της διατομής του κυκλικού μικροκαναλιού. Η πορτοκαλί καμπύλη αναφέρεται στις θερμοκρασίες των σημείων ενός κύκλου, ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια της σφράγισης της ψηφίδας, όπου και είναι δυνατή η μέτρηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια του πειράματος. Παρατηρούμε πως οι δύο καμπύλες σχεδόν ταυτίζονται. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς το ύψος τους μικροκαναλιού είναι μόλις 100 μm συνολικά και οι δύο κύκλοι βρίσκονται σε πολύ κοντινές αποστάσεις μεταξύ τους. Επομένως, μπορούμε να θεωρήσουμε με ασφάλεια, πως όσες πειραματικές



μετρήσεις πραγματοποιηθούν στην επιφάνεια της ψηφίδας κατά τη διάρκεια της PCR, θα είναι αντιπροσωπευτικές της θερμοκρασίας του ρευστού στο εσωτερικό του μικροκαναλιού.

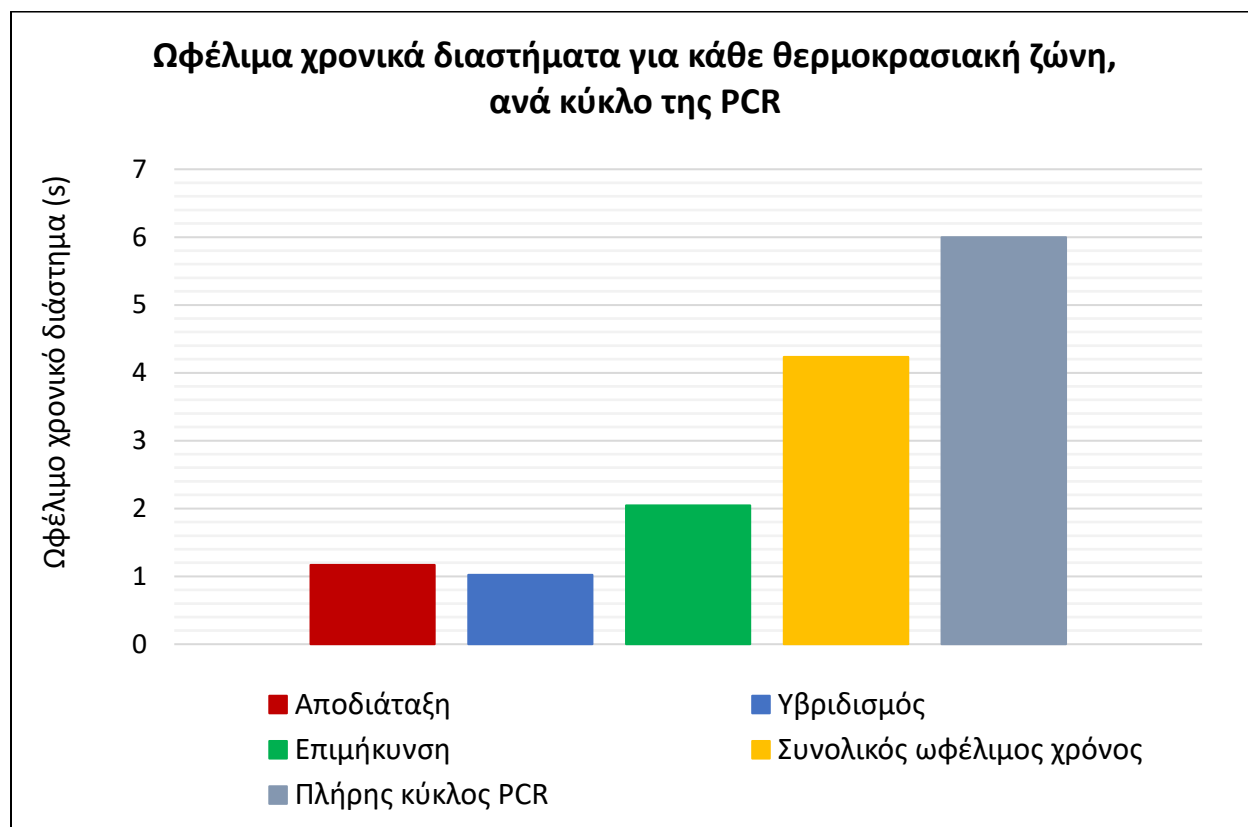
Στο σχήμα 3-11 είναι επίσης διακριτές οι τρεις θερμοκρασιακές ζώνες. Οι ωφέλιμες περιοχές στο διάγραμμα, είναι εκείνες όπου η θερμοκρασία του ρευστού βρίσκεται εντός των θερμοκρασιακών ορίων της κάθε ζώνης. Για το λόγο αυτό, κατά το σχεδιασμό των θερμικών στοιχείων δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση έτσι ώστε οι μεταβολές των θερμοκρασιών να είναι όσο το δυνατόν πιο απότομες τη στιγμή που το ρευστό αλλάζει θερμοκρασιακή ζώνη<sup>17</sup>. Αντιθέτως, οι θερμοκρασίες πρέπει να διατηρούνται κατά το δυνατόν σταθερές και κοντά στις επιθυμητές τιμές στο εσωτερικό των ζωνών. Παρατηρούμε πως η θερμοκρασία αυξάνεται με ταχύτερο ρυθμό στα σημεία όπου το ρευστό εισέρχεται στις ζώνες της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης, από όσο ψύχεται κατά την είσοδο του ρευστού στη ζώνη του υβριδισμού. Αυτό συμβαίνει επειδή η ψύξη του ρευστού γίνεται με απόδοση της θερμότητας του στο περιβάλλον, διαδικασία που δεν μπορεί να επιταχυνθεί παρά μόνο με ενεργητικό τρόπο (π.χ. με ανεμιστήρα), σε αντίθεση με τη θέρμανση του ρευστού από τα θερμικά στοιχεία.

Για τον έλεγχο της απόδοσης των κάθε θερμοκρασιακών ζωνών, υπολογίσθηκαν τα ωφέλιμα χρονικά διαστήματα της κάθε ζώνης, ανά κύκλο της PCR. Με τον όρο «ωφέλιμο χρονικό διάστημα» αναφερόμαστε στο χρονικό διάστημα, για το οποίο η θερμοκρασία του ρευστού βρίσκεται εντός των επιθυμητών ορίων, ώστε να πραγματοποιείται ένα από τα τρία στάδια της PCR με ικανοποιητική απόδοση. Για το στάδιο της αποδιάταξης θεωρήθηκαν ωφέλιμες θερμοκρασίες, αυτές που βρίσκονται στο διάστημα μεταξύ των 90 °C και 96 °C, όπου έχει βρεθεί πως η αποδιάταξη των διπλών αλυσίδων του DNA επιτυγχάνεται με βαθμό απόδοσης μεγαλύτερο του 80% [100]. Για το στάδιο του υβριδισμού, θεωρήθηκαν ωφέλιμες οι θερμοκρασίες μεταξύ 55 °C και 61 °C, καθώς στις θερμοκρασίες αυτές επιτυγχάνεται η εξειδικευμένη προσκόλληση των εκκινητών στις μονές αλυσίδες του DNA. Για το στάδιο της επιμήκυνσης θεωρήθηκαν ωφέλιμες οι θερμοκρασίες μεταξύ 69 °C και 75 °C, θερμοκρασιακή περιοχή στην οποία

---

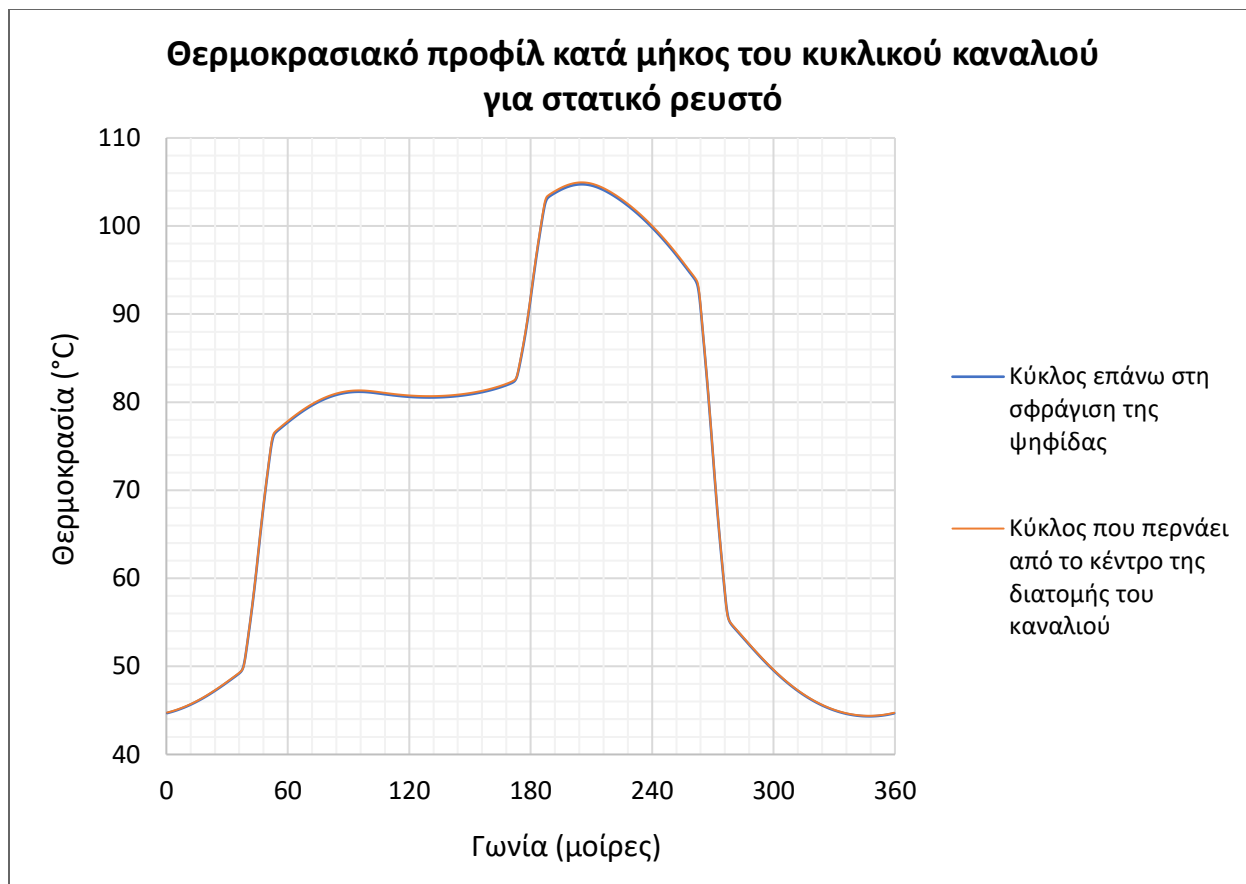
<sup>17</sup> Τα θερμικά στοιχεία έχουν ένα δεύτερο επίπεδο, το οποίο αποδίδει μεγαλύτερη θερμική ισχύ στην αρχή της κάθε θερμοκρασιακής ζώνης. Αναλυτικότερα για το σχεδιασμό και τη μορφή των θερμικών στοιχείων στην ενότητα «3.1 Σχεδιασμός».

μεγιστοποιείται η δράση της Taq πολυμεράσης. Τα ωφέλιμα χρονικά διαστήματα, που προέκυψαν από την προσομοίωση είναι  $t_{Den} = 1,168 s$ ,  $t_{An} = 1,023 s$  και  $t_{Ext} = 2,045 s$ , για τα στάδια της αποδιάταξης, του υβριδισμού και της επιμήκυνσης αντίστοιχα.



Σχήμα 3-12. Ωφέλιμα χρονικά διαστήματα για κάθε θερμοκρασιακή ζώνη, ανά κύκλο της PCR.

Στο σχήμα 3-12, παρουσιάζονται τα ωφέλιμα χρονικά διαστήματα για κάθε στάδιο ενός κύκλου της PCR, όπως προέκυψαν από την προσομοίωση. Παρατηρούμε, πως ο λόγος των ωφέλιμων χρονικών διαστημάτων των σταδίων της PCR (αποδιάταξη: υβριδισμός: επιμήκυνση), είναι περίπου 1:1:2. Ο λόγος αυτός των χρονικών διαστημάτων, προσεγγίζει το πρωτόκολλο της παραδοσιακής PCR [101].



Σχήμα 3-13. Θερμοκρασιακό προφίλ κατά μήκος του κυκλικού μικροκαναλιού για στατικό ρευστό.

Στο σχήμα 3-13 παρουσιάζεται το θερμοκρασιακό προφίλ κατά μήκος του κυκλικού μικροκαναλιού για την περίπτωση του στατικού ρευστού. Όπως και στην προσομοίωση για το κινούμενο ρευστό, δίνονται δύο καμπύλες, η γαλάζια αναφέρεται στις θερμοκρασίες που βρίσκονται σε κύκλο, ο οποίος περνά από το κέντρο της διατομής του μικροκαναλιού, ενώ η πορτοκαλί αναφέρεται στις θερμοκρασίες που βρίσκονται σε νοητό κύκλο ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια της σφράγισης της ψηφίδας, όπου και θα είναι δυνατή η πραγματική μέτρηση των θερμοκρασιών στην πειραματική διάταξη. Παρατηρούμε πως οι μεταβολές της θερμοκρασίας μεταξύ των διαφορετικών ζωνών, είναι μεγαλύτερες και πιο απότομες σε σχέση με την περίπτωση του κινούμενου ρευστού. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην απουσία της κίνησης του ρευστού εντός του κυκλικού μικροκαναλιού. Σε αντίθεση με την περίπτωση του κινούμενου ρευστού, απουσιάζουν τα φαινόμενα της μεταφοράς θερμότητας μέσω συναγωγής και της θερμικής συνομιλίας μεταξύ των ζωνών,

με αποτέλεσμα η θερμότητα που παράγεται σε κάθε θερμικό στοιχείο να παραμένει στην αντίστοιχη θερμοκρασιακή ζώνη, αντί να διασπείρεται κατά μήκος του μικροκαναλιού. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση του στατικού ρευστού, χρησιμεύουν ως μέτρο σύγκρισης για την πειραματική διάταξη, ώστε να ρυθμιστεί η παροχή ηλεκτρικού ρεύματος που θα δοθεί στα θερμικά στοιχεία.

### 3.2.2 Μελέτη του προβλήματος μαγνητικού πεδίου

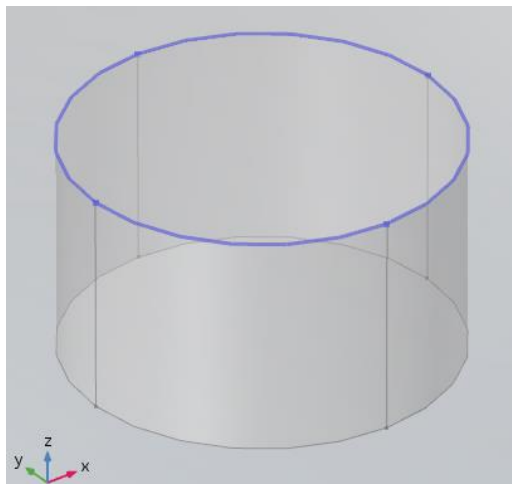
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη των μαγνητικών πεδίων, με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου μαγνήτη για τη διάταξη. Για τις ανάγκες της διάταξης δοκιμάστηκαν ένας κυλινδρικός μαγνήτης νεοδυμίου και ένας συνδυασμός μαγνητών, αποτελούμενος από τον ίδιο κυλινδρικό μαγνήτη και τρεις κωνικούς μαγνήτες.

#### *Προσομοίωση για κυλινδρικό μαγνήτη*

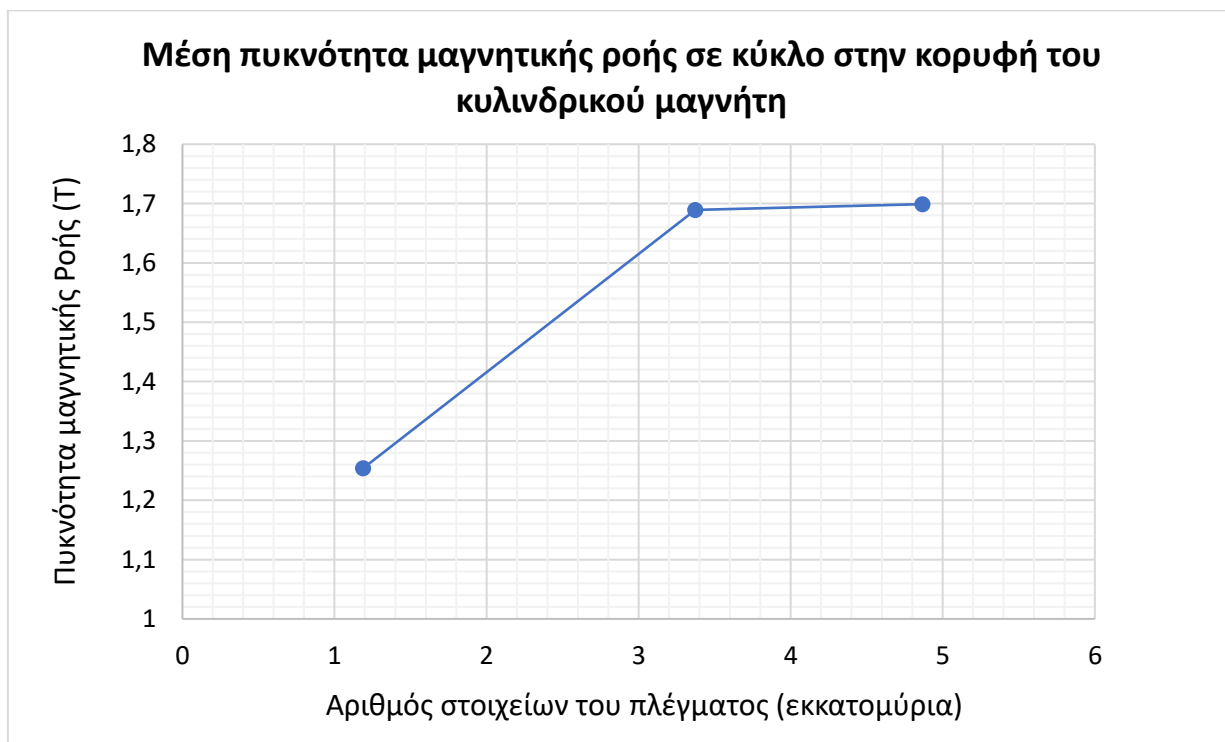
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση του μαγνητικού πεδίου κυλινδρικού μαγνήτη νεοδυμίου (N:45), διαμέτρου  $D = 35 \text{ mm}$  και ύψους  $H = 20 \text{ mm}$ . Οι δύο πόλοι του μαγνήτη βρίσκονται στους κυκλικούς δίσκους στην κορυφή και στη βάση του κυλίνδρου. Για την προσομοίωση αυτή, χρησιμοποιήθηκε ως αρχική συνθήκη, η τιμή του μαγνητικού πεδίου στο κέντρο του μαγνήτη  $B_z = 5154,8 \text{ gauss} = 0,51548 \text{ Tesla}$ , με την κατεύθυνση του άξονα  $z$ , κάθετη στις επιφάνειες των πόλων του μαγνήτη. Η τιμή αυτή προέκυψε από ειδικό πρόγραμμα του υπολογισμού του μαγνητικού πεδίου [102].

Αρχικά, παρουσιάζεται η μελέτη της ανεξαρτησίας της λύσης της προσομοίωσης από το υπολογιστικό πλέγμα. Για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο, η μέση τιμή της πυκνότητας της μαγνητικής ροής [average magnetic flux density

( $B_{av}$ )] σε κύκλο στην κορυφή του κυλινδρικού μαγνήτη (σχήμα 3-14), όπου και μεγιστοποιείται η πυκνότητα της μαγνητικής ροής.

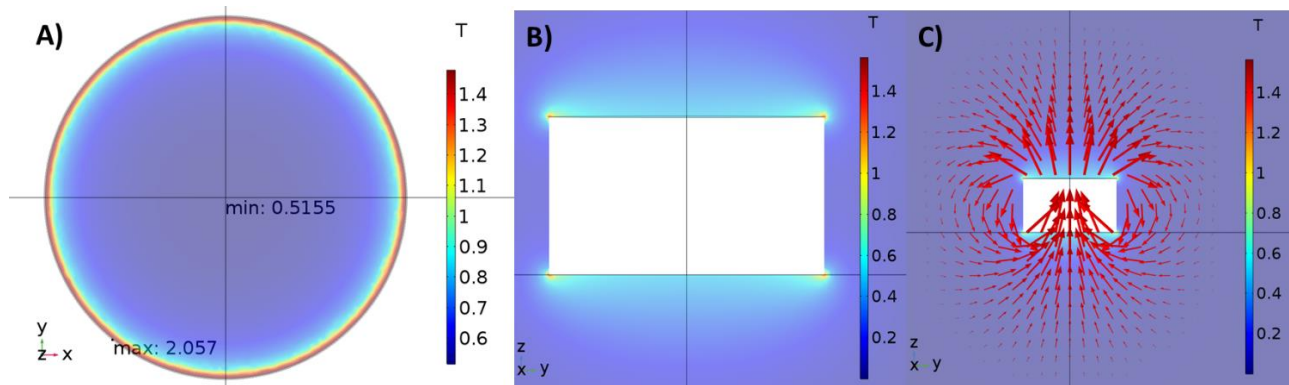


Σχήμα 3-14. Με μπλε χρώμα φαίνεται ο κύκλος στην κορυφή του κυλινδρικού μαγνήτη, όπου μετρήθηκε η μέση τιμή της πυκνότητας της μαγνητικής ροής, για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας της λύσης από το υπολογιστικό πλέγμα.



Σχήμα 3-15. Διάγραμμα Μέσης πυκνότητας μαγνητικής ροής σε κύκλο στην κορυφή του κυλινδρικού μαγνήτη – Αριθμού στοιχείων του πλέγματος.

Στο σχήμα 3-15 φαίνονται οι τιμές της μέσης πυκνότητας της μαγνητικής ροής στα σημεία του κύκλου του σχήματος 3-14, σε σχέση με τον αριθμό των στοιχείων του κάθε υπολογιστικού πλέγματος. Παρατηρούμε πως μεταξύ των δύο πυκνότερων πλεγμάτων, με συνολικούς αριθμούς στοιχείων 3373061 και 4866464, η τιμή της μέσης πυκνότητας της μαγνητικής ροής μεταβάλλεται κατά  $\Delta B_{av} = 0,009 T$ . Επομένως, μπορούμε να θεωρήσουμε πως η λύση της προσομοίωσης, έχει αποκτήσει ικανοποιητικό βαθμό ανεξαρτησίας από το υπολογιστικό πλέγμα. Τα αποτελέσματα που ακολουθούν, προέκυψαν από προσομοίωση, στην οποία χρησιμοποιήθηκε το πυκνότερο πλέγμα από αυτά που παρουσιάζονται στο σχήμα 3-15, με αριθμό στοιχείων  $n = 4866464$ .

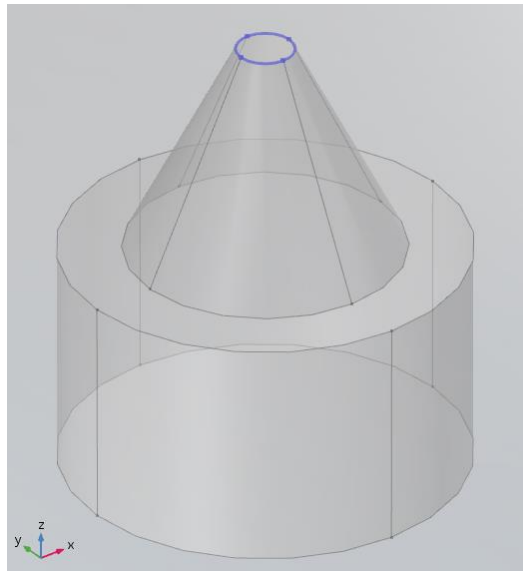


Σχήμα 3-16. Η πυκνότητα της μαγνητικής ροής όπως προέκυψε από την προσομοίωση για κυλινδρικό μαγνήτη. Α) Κάτοψη του μαγνήτη. Β) Κάθετη τομή στο μέσο του κυλίνδρου. Γ) Διανυσματική απεικόνιση του μαγνητικού πεδίου (τα μήκη των διανυσμάτων είναι σε λογαριθμική κλίμακα).

Στο σχήμα 3-16 διακρίνονται οι περιοχές, όπου η πυκνότητα της μαγνητικής ροής του κυλινδρικού μαγνήτη είναι εντονότερη. Παρατηρούμε πως η πυκνότητα της μαγνητικής ροής αυξάνεται στους πόλους του μαγνήτη, με το μαγνητικό πεδίο να είναι εντονότερο κοντά στις άκρες των κυκλικών δίσκων, αποκτώντας έτσι το σχήμα ενός δακτυλίου ή μίας στεφάνης (σχήμα 3-16.A). Η προσομοίωση έδειξε πως στο δακτύλιο αυτό, η πυκνότητα της μαγνητικής ροής αποκτά μέγιστο μέτρο  $B_{max} = 2,057 T$ , ενώ η ελάχιστη τιμή βρίσκεται στο κέντρο του κυκλικού δίσκου με  $B_{min} = 0,5155 T$ .

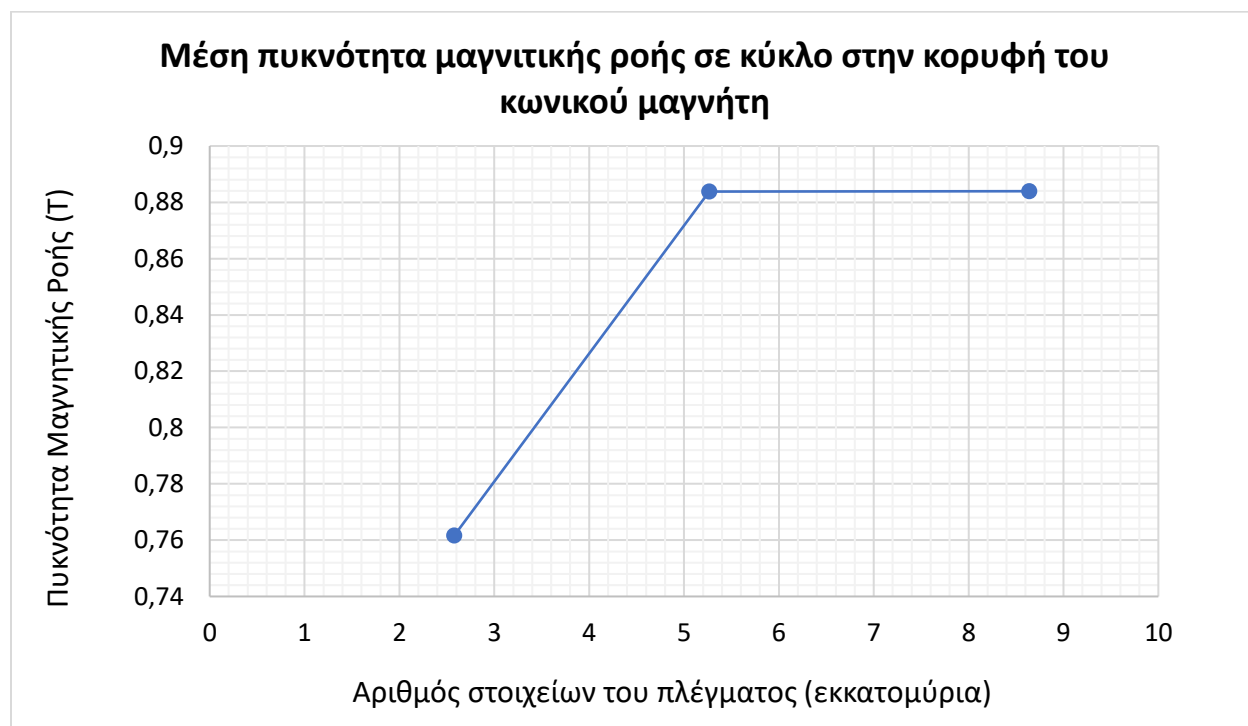
## Προσομοίωση για συνδυασμό κυλινδρικού και κωνικού μαγνήτη

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση συνδυασμού κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών. Ο συνδυασμός αυτός αποτελείται από τον κυλινδρικό μαγνήτη της προηγούμενης προσομοίωσης, με την προσθήκη τριών κωνικών μαγνητών διαδοχικών μεγεθών, οι οποίοι τοποθετούμενοι ο ένας επάνω στον άλλο με φθίνουσα σειρά μεγέθους, δημιουργούν έναν κώνο με τις ακόλουθες συνολικές διαστάσεις: Διάμετρος βάσης  $D = 25 \text{ mm}$ , διάμετρος κεφαλής  $d = 5 \text{ mm}$ , ύψος  $H = 20 \text{ mm}$ . Οι αρχικές συνθήκες της προσομοίωσης του συνδυασμένου μαγνήτη, παρέμειναν ίδιες με αυτές της προηγούμενης προσομοίωσης. **Η προσθήκη των κωνικών μαγνητών έγινε με σκοπό την απόκτηση ενός πιο συγκεντρωμένου μαγνητικού πεδίου, καθώς για τις ανάγκες της διάταξης απαιτείται η συγκέντρωση του σιδηρομαγνητικού ρευστού σε ένα σημείο, ώστε να μπορέσει να λειτουργήσει ως έμβολο για το υπόλοιπο ρευστό.** Ο νέος συνδυασμένος μαγνήτης έχει τους δύο πόλους του, στην κάτω βάση του κυλίνδρου και στην κορυφή του κώνου.



Σχήμα 3-17. Με μπλε χρώμα φαίνεται ο κύκλος στην κορυφή του κώνου του συνδυασμένου μαγνήτη, όπου μετρήθηκε η μέση τιμή της πυκνότητας της μαγνητικής ροής, για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας της λύσης από το υπολογιστικό πλέγμα.

Όπως και στην περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη, παρουσιάζεται πρώτα η μελέτη της ανεξαρτησίας της λύσης της προσομοίωσης από το υπολογιστικό πλέγμα. Για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας, ελέγχθηκε η μέση τιμή της πυκνότητας της μαγνητικής ροής, αυτή τη φορά σε κύκλο στην κορυφή του κωνικού μαγνήτη (σχήμα 3-17).



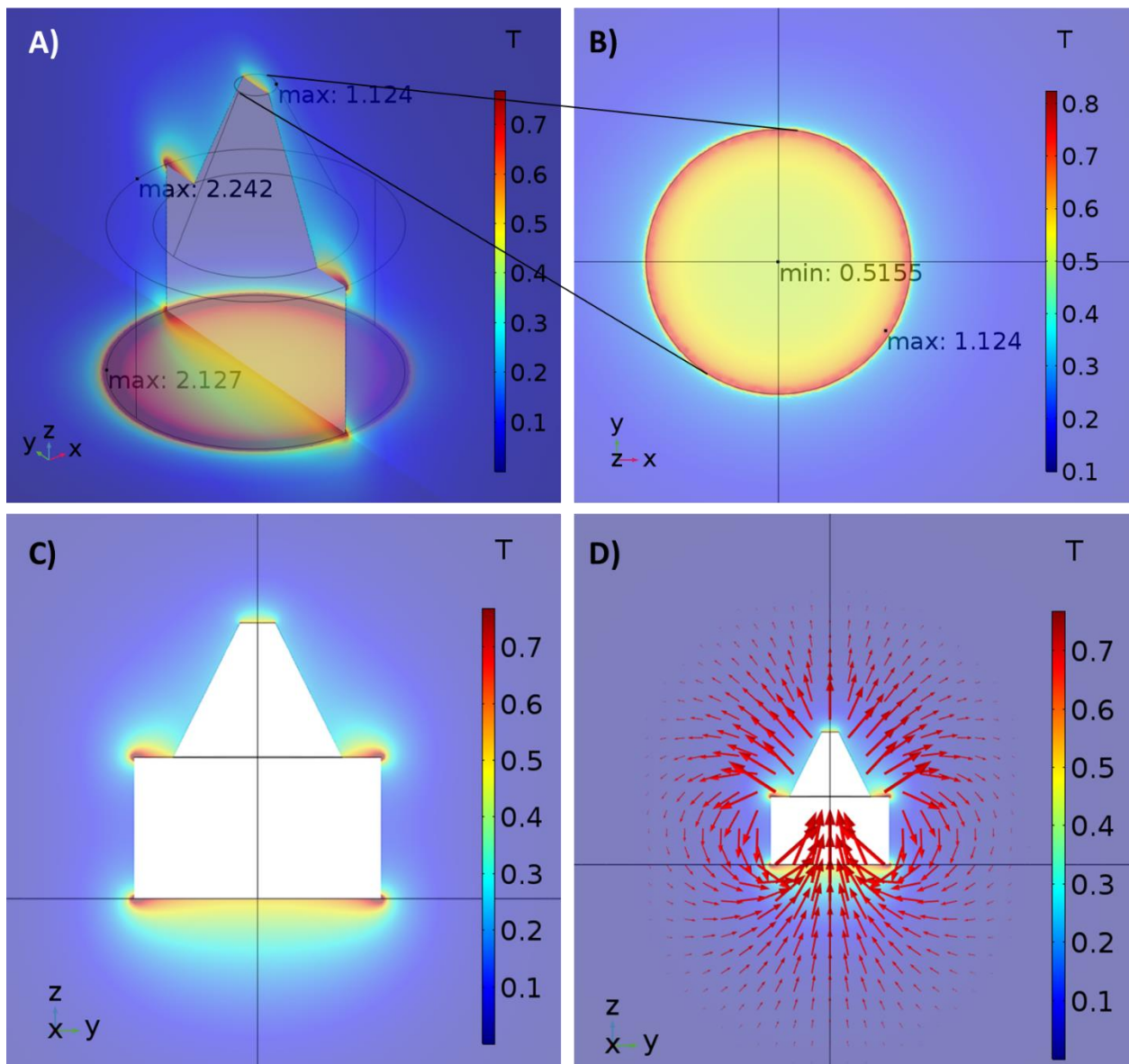
Σχήμα 3-18. Διάγραμμα μέσης πυκνότητας μαγνητικής ροής σε κύκλο στην κορυφή του κωνικού μαγνήτη – αριθμού στοιχείων του πλέγματος.

Στο σχήμα 3-18 φαίνονται οι τιμές της μέσης πυκνότητας της μαγνητικής ροής στα σημεία του κύκλου του σχήματος στην κορυφή του κώνου του συνδυασμένου μαγνήτη (σχήμα 3-17), σε σχέση με τον αριθμό των στοιχείων του υπολογιστικού πλέγματος. Λόγω της πιο σύνθετης γεωμετρίας του μαγνήτη, χρειάστηκαν πυκνότερα πλέγματα για να επιτευχθεί ικανοποιητική ανεξαρτησία της λύσης, σε σχέση με την περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη. Παρατηρούμε πως μεταξύ των δύο πυκνότερων πλεγμάτων, με συνολικούς αριθμούς στοιχείων 5265981 και 8639059, η τιμή της μέσης πυκνότητας της μαγνητικής ροής μεταβάλλεται μόλις κατά  $\Delta B_{av} = 0,00008 T$ . Επομένως, συμπεραίνουμε πως η λύση της προσομοίωσης έχει αποκτήσει ικανοποιητικό βαθμό ανεξαρτησίας από



το υπολογιστικό πλέγμα. Το υπολογιστικό πλέγμα που χρησιμοποιήθηκε, είναι το πυκνότερο από αυτά που παρουσιάζονται στο σχήμα 3-18, με τον αριθμό των στοιχείων του να ανέρχεται στα  $n = 8639059$ .

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση του μαγνητικού πεδίου για το συνδυασμό των μαγνητών.

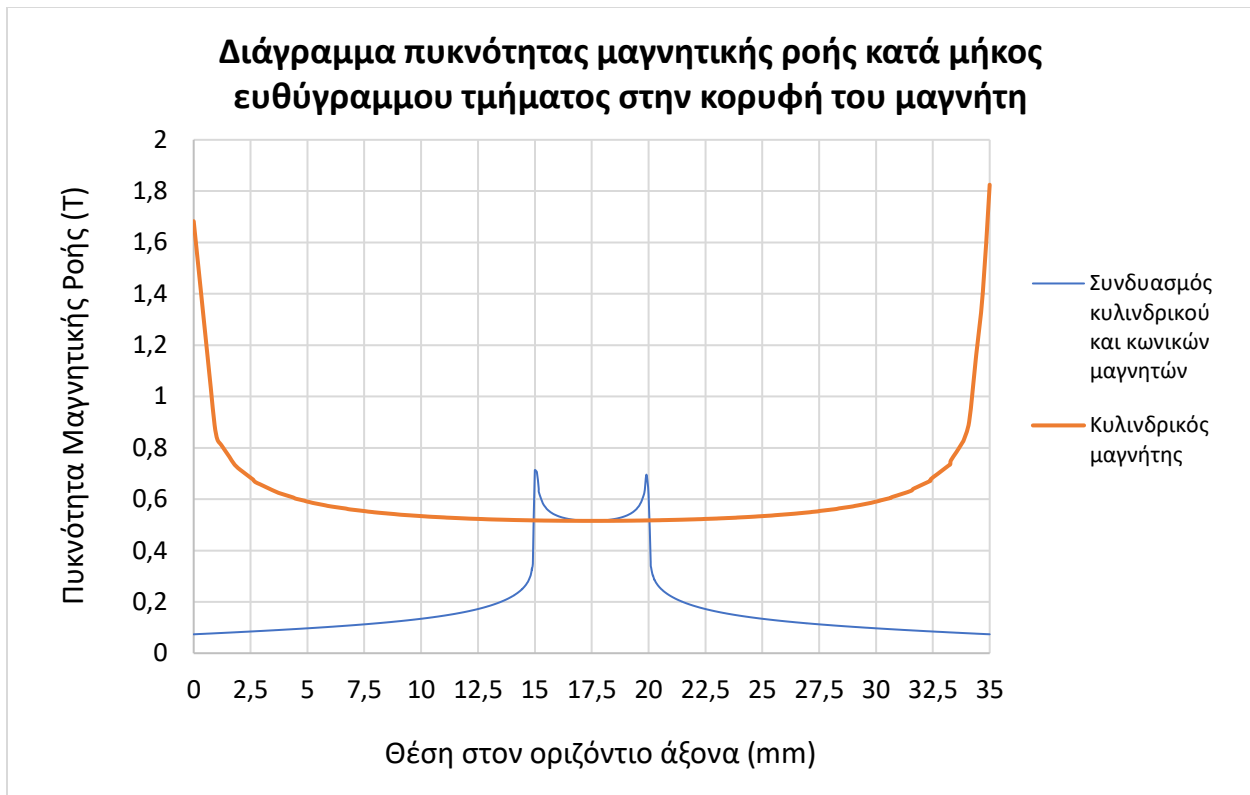


Σχήμα 3-19. Η πυκνότητα της μαγνητικής ροής όπως προέκυψε από την προσομοίωση για συνδυασμό κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών. A) Αξονομετρική όψη του συνδυασμένου μαγνήτη, με μέγιστες τιμές της πυκνότητας της μαγνητικής ροής σε τρία επίπεδα. B) Κάτοψη του μαγνήτη, στην οποία φαίνεται η κορυφή του κώνου. C) Κάθετη τομή στο μέσο του μαγνήτη D) Διανυσματική απεικόνιση του μαγνητικού πεδίου (τα μήκη των διανυσμάτων είναι σε λογαριθμική κλίμακα).

Παρατηρούμε πως στην κάτω βάση του κυλίνδρου, το πεδίο διατηρεί τη μορφή που είχε και στη περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη (σχήμα 3-19.A), με τη μέγιστη πυκνότητα μαγνητικής ροής ωστόσο να είναι  $B_{bottom\_max} = 2,127$  T. Στο ενδιάμεσο επίπεδο, όπου ενώνονται ο κύλινδρος με τους κώνους, συνεχίζει να είναι πυκνότερο το πεδίο στο δακτύλιο στην άκρη του κυκλικού δίσκου, με το μέγιστο μέτρο της πυκνότητας της μαγνητικής ροής είναι  $B_{mid\_max} = 2,242$  T. Στην κορυφή του κώνου διακρίνεται ένας μικρότερος κυκλικός δίσκος (σχήμα 3-19.B). Η πυκνότητα της μαγνητικής ροής είναι μικρότερη σε σχέση με του κυλίνδρου, με το μέγιστό της να φτάνει  $B_{top\_max} = 1,124$  T. Το μαγνητικό πεδίο στην κορυφή του κώνου, μπορεί να είναι ασθενέστερο σε σχέση με αυτό που βρίσκεται στο δακτύλιο του κυλίνδρου, είναι ωστόσο συγκεντρωμένο σε μικρή επιφάνεια, ενώ παράλληλα η πυκνότητα της μαγνητικής ροής είναι σαφώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που υπολογίσθηκε στην προηγούμενη προσομοίωση στο κέντρο του κυλινδρικού μαγνήτη.

Η μορφή αυτή του μαγνητικού πεδίου φαίνεται ικανοποιητική, καθώς δείχνει πως ο συνδυασμός αυτός των μαγνητών, θα μπορούσε να συγκεντρώσει το σιδηρομαγνητικό ρευστό σε ένα σημείο, ασκώντας του ταυτόχρονα δύναμη αρκετά ισχυρή, έτσι ώστε αυτό να μετακινείται με ευκολία και ταχύτητα, στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού.

Για την καλύτερη σύγκριση των δύο μαγνητικών πεδίων που δημιουργούν ο κυλινδρικός και ο συνδυασμένος μαγνήτης, παρατίθεται το παρακάτω διάγραμμα (σχήμα 3-20). Στο διάγραμμα αυτό, παρουσιάζονται οι τιμές της πυκνότητας της μαγνητικής ροής για τους δύο μαγνήτες κατά μήκος διαστήματος 35 mm στο επίπεδο στο οποίο βρίσκεται η κορυφή του κάθε μαγνήτη, δηλαδή στο σημείο στο οποίο ελαχιστοποιείται η απόσταση μεταξύ του μαγνήτη και της ψηφίδας.



Σχήμα 3-20. Διάγραμμα πυκνότητας μαγνητικής ροής κατά μήκος ευθύγραμμου τμήματος στην κορυφή του μαγνήτη.

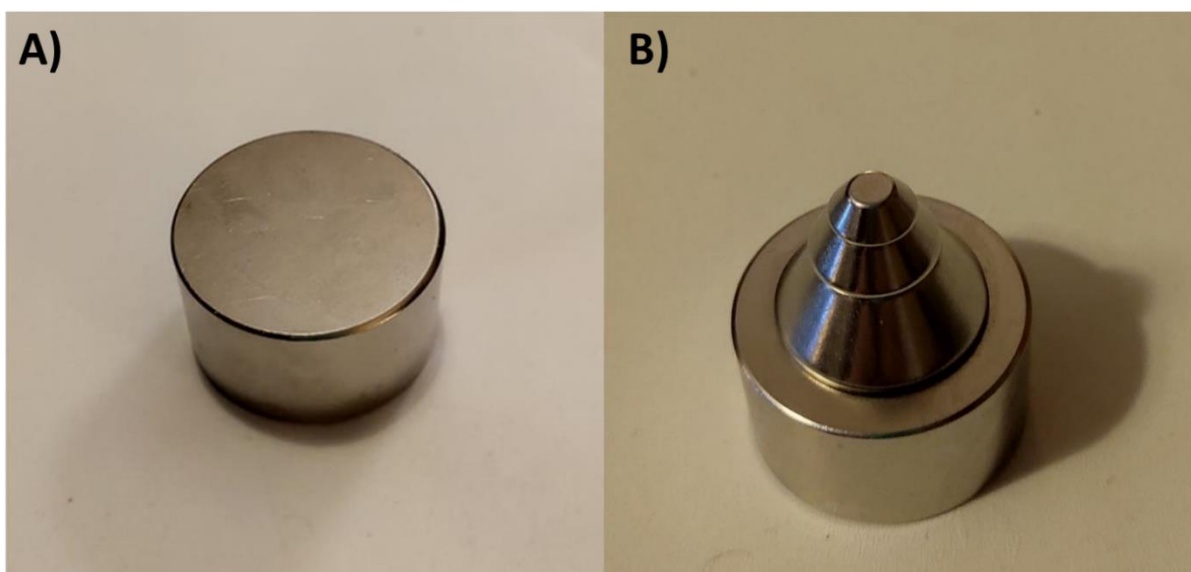
Παρατηρούμε, πως οι μέγιστες τιμές της πυκνότητας της μαγνητικής ροής, που υπολογίσθηκαν από την προσομοίωση για τον κυλινδρικό μαγνήτη, υπερβαίνουν κατά πολύ αυτές του συνδυασμένου μαγνήτη. Παρόλα αυτά, η απόσταση μεταξύ αυτών των μεγίστων στην περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη είναι 35 mm, (όσο και η διάμετρος του κυλίνδρου). Αντιθέτως, στην περίπτωση του συνδυασμένου μαγνήτη, παρατηρούμε πως οι περιοχές στις οποίες μεγιστοποιείται η πυκνότητα της μαγνητικής ροής, βρίσκονται όλες στο κέντρο του διαγράμματος, με τα μέγιστα σημεία να απέχουν 5 mm μεταξύ τους (όσο και η μικρή διάμετρος του κώνου). Επομένως, μπορούμε να προβλέψουμε από την προσομοίωση, πως η συγκέντρωση του μαγνητικού ρευστού σε ένα μοναδικό σημείο του κυκλικού μικροκαναλιού, θα είναι εφικτή μόνο με τη χρήση του συνδυασμένου μαγνήτη.

### 3.3 ΡΟΗ ΤΟΥ ΡΕΥΣΤΟΥ

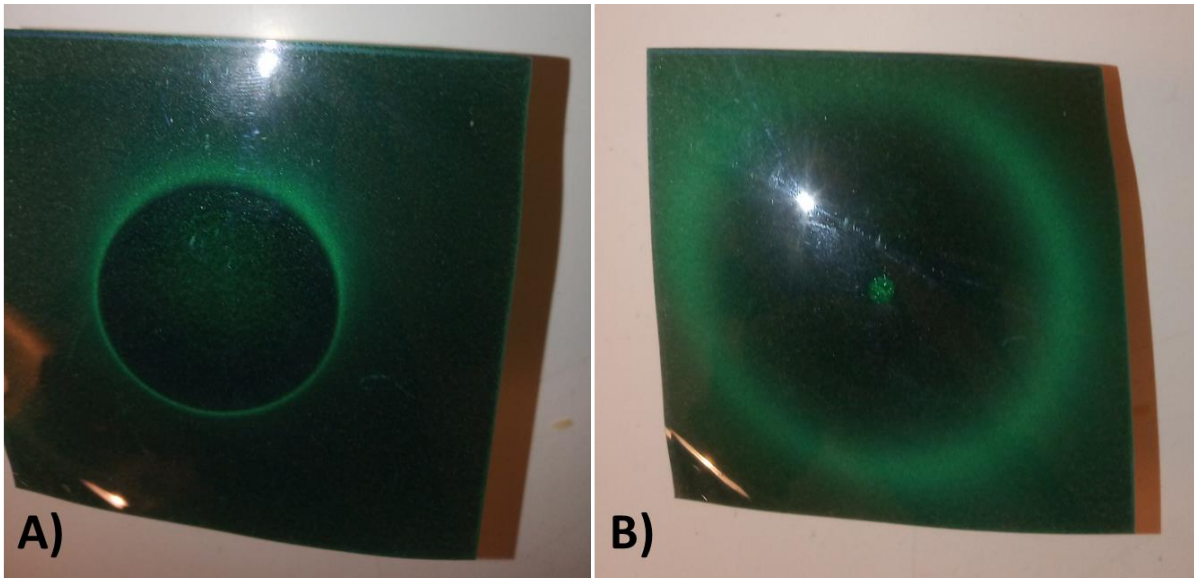
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειραματικές δοκιμές, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την επιλογή μαγνήτη, σιδηρομαγνητικού υλικού και επιφάνειας.

#### 3.3.1 Επιλογή μαγνήτη

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες, για τις ανάγκες της διάταξη της παρούσας εργασίας, εκτελέσθηκαν πειράματα με δύο διαφορετικούς επινικελωμένους μαγνήτες νεοδυμίου. Ο πρώτος μαγνήτης είναι κυλινδρικός, διαμέτρου  $D_{cyl} = 35 \text{ mm}$  και ύψους  $H_{cyl} = 20 \text{ mm}$ , ενώ ο δεύτερος αποτελείται από ένα συνδυασμό του πρώτου κυλινδρικού μαγνήτη, μαζί με τρεις κωνικούς μαγνήτες, τοποθετημένους στην πάνω βάση του, με συνολικό ύψος  $H_{comb} = 40 \text{ mm}$  και τελική διάμετρο (στην κορυφή του μικρού κώνου)  $D_{comb} = 5 \text{ mm}$  (σχήμα 3-21).

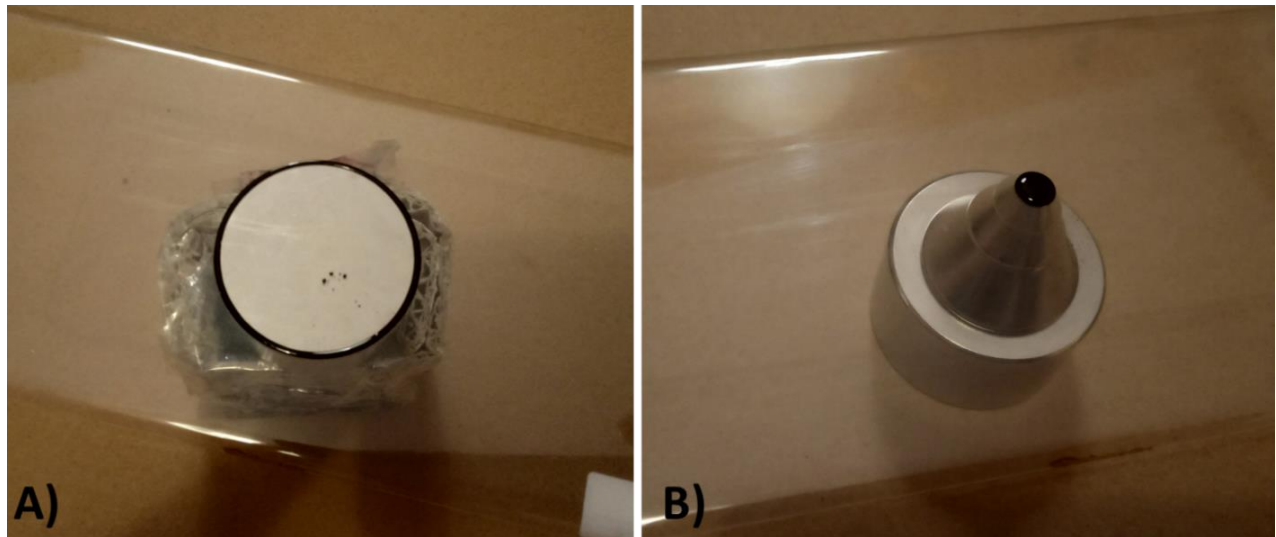


Σχήμα 3-21. Οι δύο μαγνήτες που δοκιμάστηκαν για την κίνηση του σιδηρομαγνητικού εμβόλου στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού. Α) Κυλινδρικός μαγνήτης Β) Συνδυασμός κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών.



Σχήμα 3-22. Τα μαγνητικά πεδία των δύο υποψήφιων μαγνητών, όπως φαίνονται στο φύλλο ανίχνευσης μαγνητικής ροής. Το φύλλο γίνεται φωτεινότερο στα σημεία όπου η πυκνότητα της μαγνητικής ροής είναι μεγαλύτερη. Αριστερά (A) φαίνεται το μαγνητικό πεδίο του κυλινδρικού μαγνήτη. Το φύλλο βρίσκεται σε επαφή με την επάνω επιφάνεια του κυλίνδρου. Δεξιά (B) φαίνεται το μαγνητικό πεδίο που προκύπτει από το συνδυασμό κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών. Το φύλλο βρίσκεται σε επαφή με τη μικρή επιφάνεια στην κορυφή του κώνου.

Στο σχήμα 3-22 βλέπουμε τα μαγνητικά πεδία των δύο μαγνητών, όπως αυτά σχηματίζονται στο φύλλο ανίχνευσης μαγνητικής ροής (flux detector). Παρατηρούμε πως τα μαγνητικά πεδία έχουν λάβει τη μορφή που είχε προβλεφθεί από τις προσομοιώσεις. Στην περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη, διακρίνουμε τον έντονο δακτύλιο που σχηματίζεται στις άκρες της επιφάνειας του ενός πόλου. Στην περίπτωση του συνδυασμού των μαγνητών, διακρίνεται και πάλι το έντονο μαγνητικό πεδίο που σχηματίζεται σε σχήμα δακτυλίου. Διακρίνεται ωστόσο και μία αύξηση της πυκνότητας της μαγνητικής ροής, στο κέντρο του φύλλου ανίχνευσης, στην κορυφή του συνδυασμένου κώνου.



Σχήμα 3-23. Διατάξεις με μαγνήτη (κάτω), φύλλο πλαστικού (στη μέση) και σιδηρομαγνητικό ρευστό (πάνω από την πλαστική επιφάνεια). Α) Διάταξη με κυλινδρικό μαγνήτη. Β) Διάταξη με συνδυασμό κυλινδρικού και κωνικών μαγνητών.

Στο σχήμα 3-23 φαίνονται οι μορφές που παίρνει το σιδηρομαγνητικό ρευστό για τα δύο διαφορετικά μαγνητικά πεδία. Παρατηρούμε πως επαληθεύονται οι προβλέψεις των προσομοιώσεων, όπως και του φύλλου ανίχνευσης μαγνητικής ροής. Όπως ήταν αναμενόμενο για την περίπτωση του κυλινδρικού μαγνήτη, το σιδηρομαγνητικό ρευστό σχηματίζει έναν δακτύλιο ακριβώς πάνω στην άκρη της βάσης του κυλίνδρου, όπου και το μαγνητικό πεδίο είναι εντονότερο. Για την περίπτωση του συνδυασμού των μαγνητών, παρατηρούμε πως το σιδηρομαγνητικό ρευστό συγκεντρώνεται σε μία μικρή περιοχή στην μικρή επιφάνεια του κώνου.

Η μορφή που λαμβάνει το μαγνητικό πεδίο του κυλινδρικού μαγνήτη δεν είναι ικανοποιητική για την εφαρμογή που τον χρειαζόμαστε. Ο λόγος είναι πως, παρότι η πυκνότητα της μαγνητικής ροής που αναπτύσσεται είναι αρκετά υψηλή, το σχήμα του δακτυλίου δεν επιτρέπει τη συγκέντρωση του σιδηρομαγνητικού ρευστού σε μικρή περιοχή. Για τη λειτουργία της μικροδιάταξης, το σιδηρομαγνητικό ρευστό θα πρέπει να λειτουργεί ως υγρό έμβολο, το οποίο θα ακολουθεί την κίνηση του μαγνήτη και με τη σειρά του θα προωθεί το υπόλοιπο ρευστό δείγμα στο κυκλικό μικροκανάλι. Για να λειτουργήσει αυτός ο μηχανισμός, θα πρέπει το σιδηρομαγνητικό ρευστό να συγκεντρώνεται σε μία

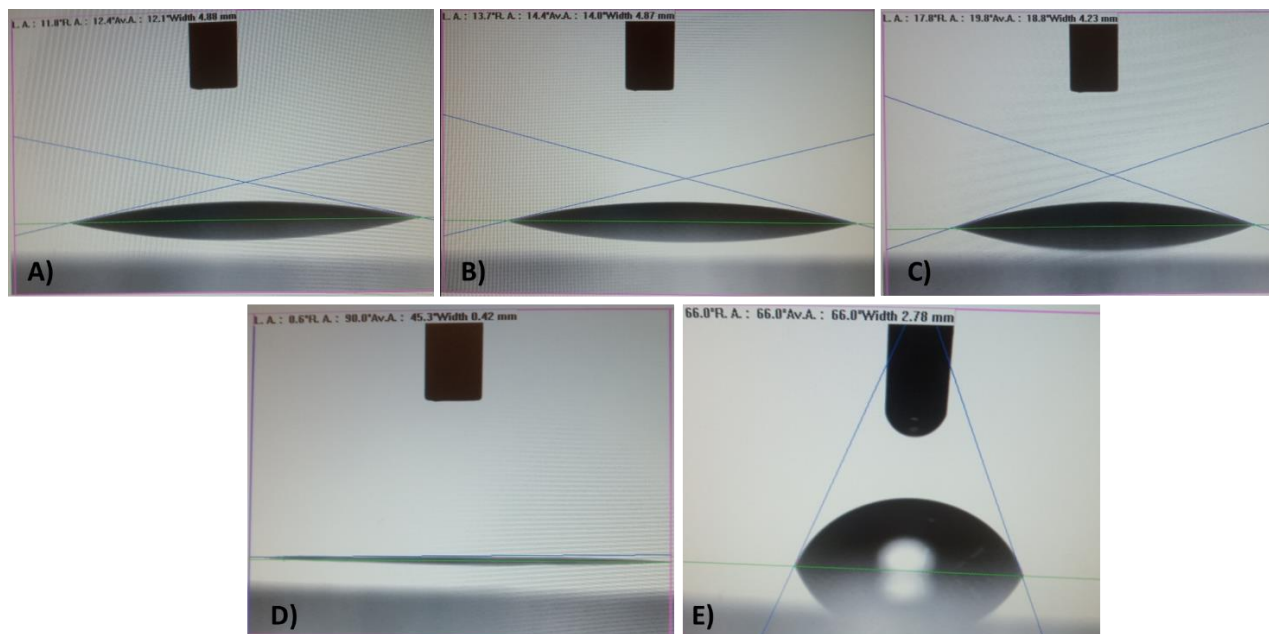
μικρή περιοχή του κυκλικού μικροκαναλιού. Για τους παραπάνω λόγους, επιλέχθηκε ο συνδυασμός του κυλινδρικού και των κωνικών μαγνητών, ως καταλληλότερος για τη λειτουργία της μικροδιάταξης.

### 3.3.2 Επιλογή σιδηρομαγνητικού ρευστού και επιφάνειας

Για τη μελέτη των υλικών μετρήθηκαν οι γωνίες επαφής που σχηματίζονται από σταγόνες υγρού των 5 μl σε κάθε μία από τις διαφορετικές επιφάνειες. Ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πειραματικές δοκιμές. **Το ζητούμενο των μετρήσεων και των δοκιμών, ήταν να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός σιδηρομαγνητικού ρευστού και επιφάνειας, έτσι ώστε να κινείται το ρευστό με σχετική ευκολία και μικρή προσρόφηση, χωρίς να αφήνει κατάλοιπα πίσω του που θα οδηγούσαν σε εξάλειψη του «εμβόλου» μετά από μερική περιστροφή του υγρού.**

#### *Υπόστρωμα PMMA*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τοποθέτηση των τεσσάρων διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε επιφάνεια κατασκευασμένη σε υπόστρωμα PMMA. Οι γωνίες επαφής που σχηματίζονται ανάμεσα στις σταγόνες των υγρών και της επιφάνειας, μετρήθηκαν με βάση τις εικόνες του σχήματος 3-24.



Σχήμα 3-24. Σταγόνες διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε υπόστρωμα PMMA. A) APG CDF 1120 Ferrofluid. B) APG CDF 1635 Ferrofluid. C) APG CDF 2250 Ferrofluid. D) Ferrofluid Magnitech. E) Απιονισμένο νερό.

Πίνακας 3-1. Γωνίες επαφής που σχηματίζονται ανάμεσα στις σταγόνες και την επιφάνεια υποστρώματος PMMA.

| Υλικό                   | Μέση γωνία επαφής<br>(μοίρες) |
|-------------------------|-------------------------------|
| APG CDF 1120 Ferrofluid | 12,1                          |
| APG CDF 1635 Ferrofluid | 14,0                          |
| APG CDF 2250 Ferrofluid | 18,8                          |
| Ferrofluid Magnitech    | 0,6                           |
| Απιονισμένο νερό        | 66,0                          |

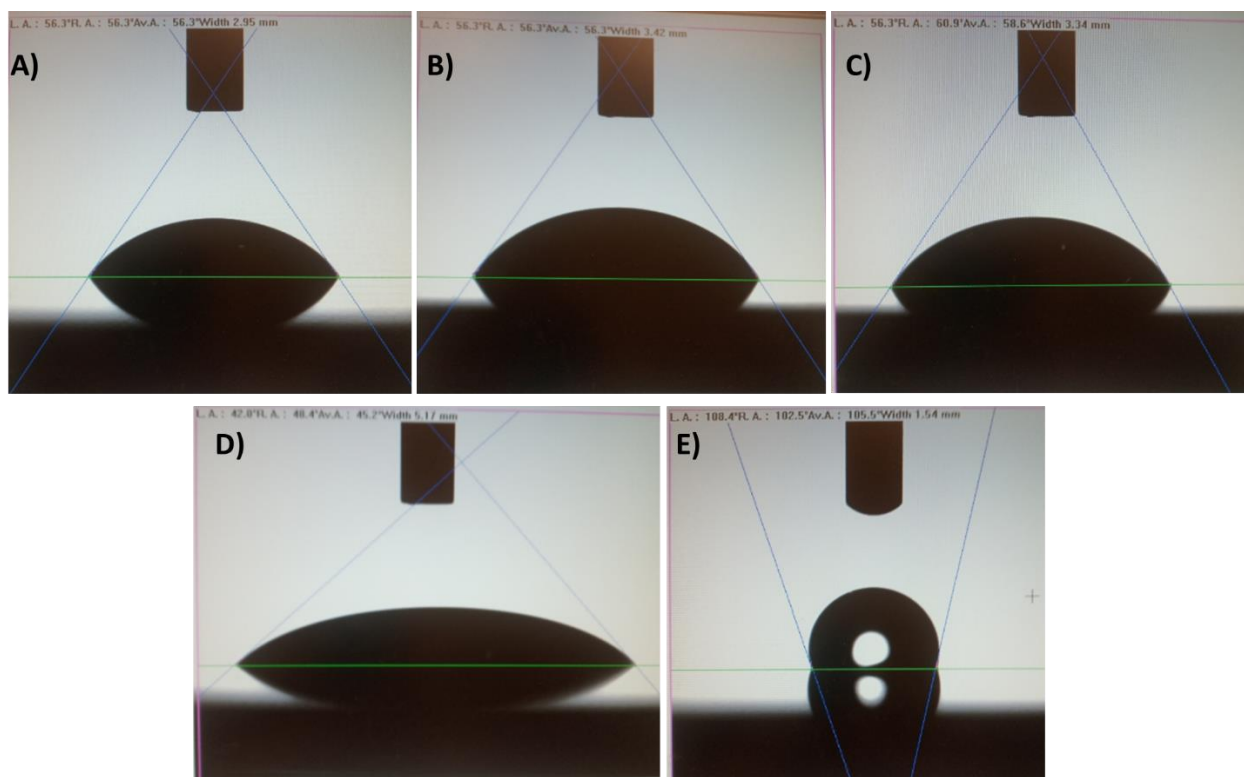
Παρατηρούμε πως οι γωνίες επαφής που σχηματίζουν τα σιδηρομαγνητικά ρευστά με την επιφάνεια από PMMA είναι πολύ μικρές, με αποκορύφωμα τη γωνία επαφής του Ferrofluid Magnitech, το οποίο σχηματίζει γωνία επαφής με την επιφάνεια, μικρότερη από μία μοίρα. Το απιονισμένο νερό έχει σχετικά μεγαλύτερη γωνία επαφής (66°), γεγονός που οφείλεται στη μεγαλύτερη επιφανειακή του τάση (72,8 mN/m), σε σχέση με τα σιδηρομαγνητικά ρευστά, τα οποία είναι διαλυμένα σε έλαια και έχουν μικρότερες



επιφανειακές τάσεις (FerroTec: 32 mN/m και Magnitech 29 mN/m). Οι πολύ μικρές γωνίες επαφής δεν είναι επιθυμητές για το σκοπό της εργασίας, καθώς αυτό σημαίνει πως το υγρό απλώνεται στην επιφάνεια και η μετακίνησή του γίνεται δυσκολότερη.

### Υδρόφοβη επιφάνεια με πλάσμα $CHF_3$

Ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τοποθέτηση των τεσσάρων διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε υδρόφοβη επιφάνεια που σχηματίστηκε από απόθεση φθορανθρακικού υμενίου σε μεταλλικό υπόστρωμα σιδήρου.



Σχήμα 3-25. Σταγόνες διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε υδρόφοβη επιφάνεια που προέκυψε με απόθεση  $CHF_3$  σε υπόστρωμα σιδήρου, σε αντιδραστήρα RIE. A) APG CDF 1120 Ferrofluid. B) APG CDF 1635 Ferrofluid. C) APG CDF 2250 Ferrofluid. D) Ferrofluid Magnitech. E) Απιονισμένο νερό.

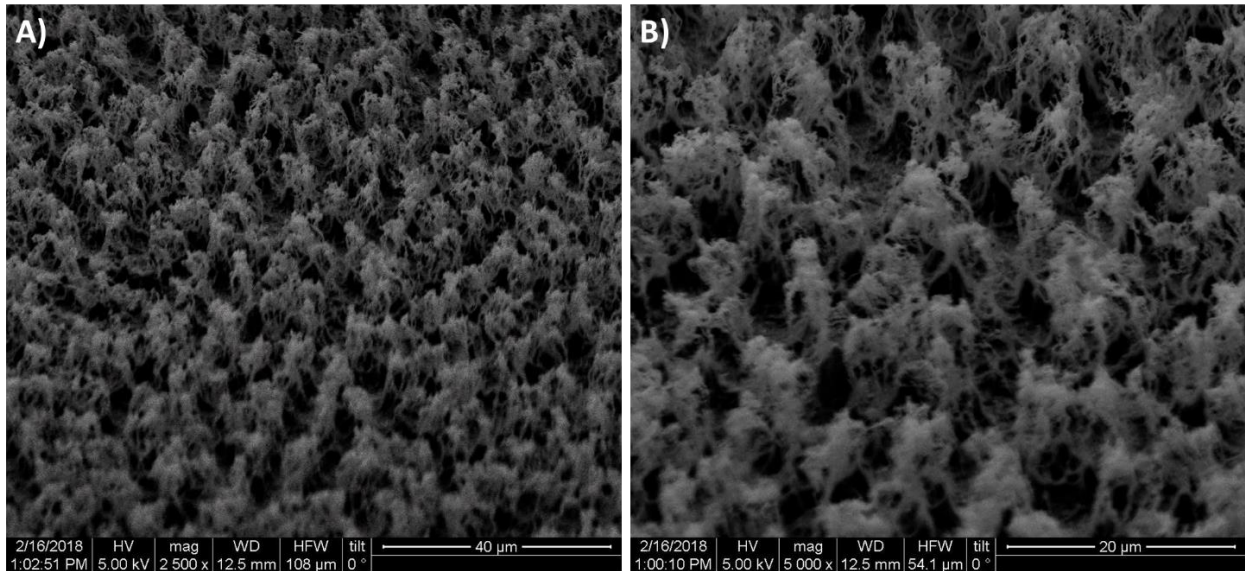
Πίνακας 3-2. Γωνίες επαφής που σχηματίζονται ανάμεσα στις σταγόνες και την υδρόφοβη επιφάνεια που προέκυψε με απόθεση  $CHF_3$  σε αντιδραστήρα RIE.

| Υλικό                   | Μέση γωνία επαφής<br>(μοίρες) |
|-------------------------|-------------------------------|
| APG CDF1120 Ferrofluid  | 56,3                          |
| APG CDF 1635 Ferrofluid | 56,3                          |
| APG CDF 2250 Ferrofluid | 58,6                          |
| Ferrofluid Magnitech    | 45,2                          |
| Απιονισμένο νερό        | 105,5                         |

Οι γωνίες επαφής είναι σαφώς μεγαλύτερες από αυτές της προηγούμενης επιφάνειας. Επομένως, η επίστρωση που χρησιμοποιήθηκε καθιστά την επιφάνεια καλύτερη για τη ροή του ρευστού.

### Υπερυδρόφοβη επιφάνεια με πλάσμα οξυγόνου και $C_4F_8$

Εξετάσθηκε επίσης, υπερυδρόφοβη επιφάνεια κατασκευασμένη σε υπόστρωμα PMMA, με εγχάραξη πλάσματος οξυγόνου και απόθεση  $C_4F_8$ . Η επιφάνεια αυτή απορρίφθηκε χωρίς να χρειαστούν μετρήσεις γωνιών, καθώς κρίθηκε ακατάλληλη για τη ροή του ρευστού, αφού αυτό εμποτίζεται στην επιφάνεια, αντί να ρέει. Ο λόγος είναι πως, η υπερυδρόφοβη επιφάνεια που δημιουργήθηκε, έχει μικροδομές με μεγάλη τραχύτητα, ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται αέρας (σχήμα 3-26). Υπό κανονικές συνθήκες, τα υγρά που έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια δεν μπορούν να εισχωρήσουν ανάμεσα στις δομές, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολύ μεγάλες γωνίες επαφής, οι οποίες ευνοούν τη ροή. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη διάταξη, η ισχυρή μαγνητική δύναμη που ασκείται από το μαγνήτη, ωθεί το σιδηρομαγνητικό ρευστό ανάμεσα στις δομές της επιφάνειας, εκτοπίζοντας τον αέρα και παίρνοντας τη θέση του. Έτσι, όταν ο μαγνήτης μετακινείται σε επόμενη θέση, το ρευστό παραμένει εγκλωβισμένο ανάμεσα στις δομές της υπερυδρόφοβης επιφάνειας (σχήμα 3-27) και η ροή του καθίσταται αδύνατη.



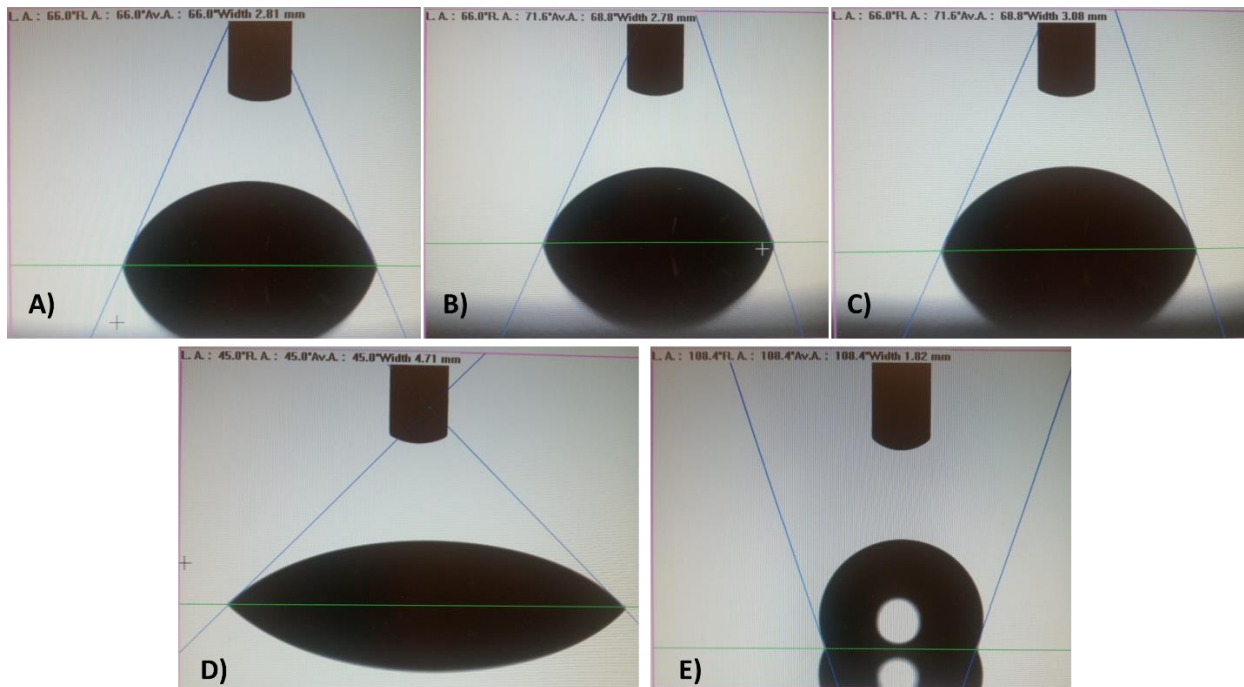
Σχήμα 3-26. Η επιφάνεια που προέκυψε μετά την εγχάραξη με πλάσμα οξυγόνου, όπως φαίνεται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Α) Μεγέθυνση  $\times 2,500$  Β) Μεγέθυνση  $\times 5000$



Σχήμα 3-27. Υπερυδρόφοβη επιφάνεια σε υλικό PMMA, με κατεργασία πλάσματος οξυγόνου και  $C_4F_8$ . Πάνω στην επιφάνεια έχει τοποθετηθεί σιδηρομαγνητικό ρευστό, ενώ από την άλλη πλευρά της βρίσκεται ο μαγνήτης.

## Ελαιόφοβη επιφάνεια

Ακολουθούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις των τεσσάρων διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε ελαιόφοβη επιφάνεια με την εμπορική ονομασία «Mocolo Nano Optics UV Liquid Tempered Glass», η οποία χρησιμοποιείται για την επικάλυψη οθονών κινητών τηλεφώνων. Οι γωνίες επαφής που σχηματίζονται ανάμεσα στις σταγόνες των υγρών και της επιφάνειας, μετρήθηκαν με βάση τις εικόνες του σχήματος 3-28.



Σχήμα 3-28. Σταγόνες διαφορετικών σιδηρομαγνητικών ρευστών σε ελαιόφοβη επιφάνεια του εμπορίου. A) APG CDF 1120 Ferrofluid. B) APG CDF 1635 Ferrofluid. C) APG CDF 2250 Ferrofluid. D) Ferrofluid Magnittech. E) Απιονισμένο νερό.

Πίνακας 3-3. Γωνίες επαφής που σχηματίζονται ανάμεσα στις σταγόνες και την ελαιόφοβη επιφάνεια.

| Υλικό                   | Μέση γωνία επαφής<br>(μοίρες) |
|-------------------------|-------------------------------|
| APG CDF 1120 Ferrofluid | 66,0                          |
| APG CDF 1635 Ferrofluid | 68,8                          |
| APG CDF 2250 Ferrofluid | 68,8                          |
| Ferrofluid Magnitech    | 45,0                          |
| Απιονισμένο νερό        | 108,4                         |

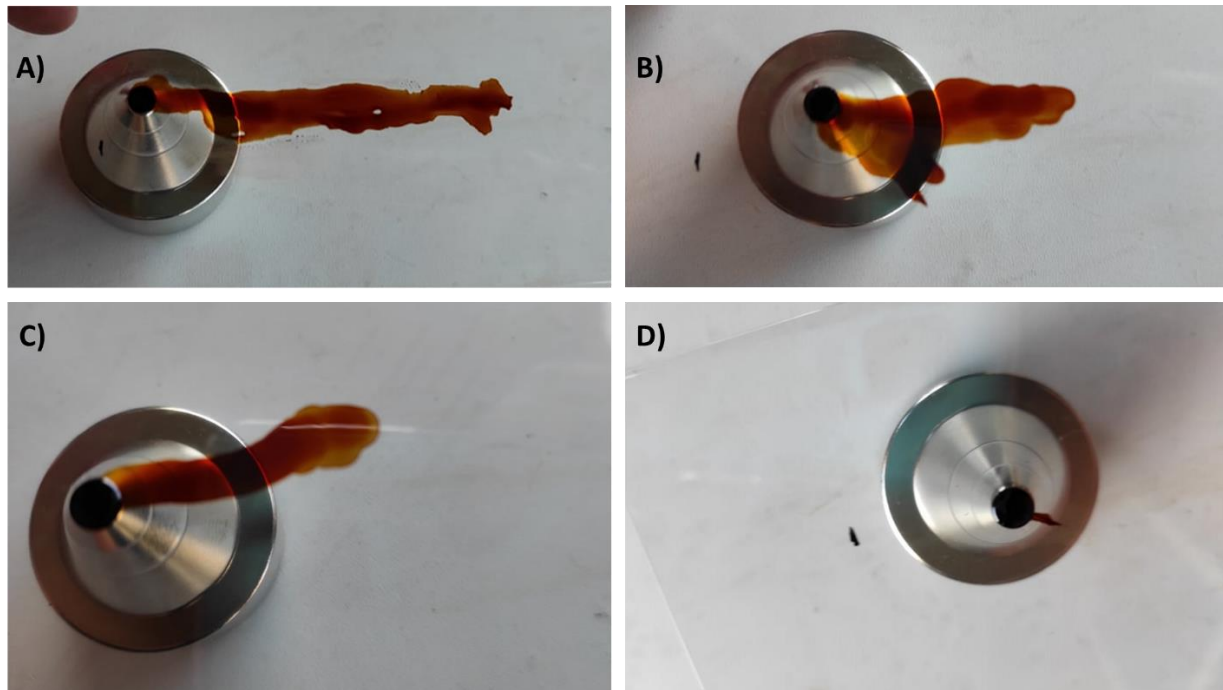
Οι γωνίες επαφής είναι σε γενικές γραμμές μεγαλύτερες από αυτές των προηγούμενων επιφανειών, ενώ και το απιονισμένο νερό σχηματίζει σχετικά μεγάλη γωνία επαφής, γεγονός που σημαίνει πως η επιφάνεια εκτός από ελαιόφοβη είναι και υδρόφοβη.

Από τις μετρήσεις της γωνίας επαφής προκύπτει πως η επιφάνεια που παρουσιάζει τις μεγαλύτερες γωνίες επαφής με τα σιδηρομαγνητικά υγρά είναι η ελαιόφοβη επιφάνεια. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, καθώς τα σιδηρομαγνητικά υγρά χρησιμοποιούν έλαια ως διαλύτες, τα οποία λόγω της χαμηλής τους επιφανειακής τάσης προσροφώνται σε μη ειδικά κατεργασμένες επιφάνειες.

### 3.3.3 Μετακίνηση του σιδηρομαγνητικού ρευστού

Για να εξετασθεί ποιο είναι το καταλληλότερο από τα τέσσερα σιδηρομαγνητικά ρευστά για τη χρήση του ως έμβολο στη μικροδιάταξη PCR, δοκιμάστηκε η κίνηση τους πάνω στην ελαιόφοβη επιφάνεια, με σκοπό να βρεθεί αν κάποιο από τα ρευστά αυτά μπορεί να καλύψει την απαιτούμενη απόσταση των 94,25 mm (η περίμετρος του κυκλικού μικροκαναλιού) μέσα στο χρονικό διάστημα των 6 s που προβλέπεται από την προσομοίωση.

Όπως φαίνεται από και στο σχήμα 3-29, μόνο το Ferrofluid Magnitech είναι σε θέση να μετακινηθεί κατά  $94,25\text{ mm}$  εντός των  $6\text{ s}$ , χωρίς σημαντική προσρόφησή του από την επιφάνεια. Παρά το γεγονός πως το σιδηρομαγνητικό ρευστό εμφανίζει τις μικρότερες γωνίες επαφής σε σχέση με τα άλλα ρευστά, χάρη στη μεγαλύτερη ποσότητα σιδηρομαγνητικού υλικού που περιέχει, παρουσιάζει καλύτερη απόκριση στο μαγνητικό πεδίο. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα σιδηρομαγνητικά υλικά χάνουν πολύ μεγάλο ποσό του όγκου τους κατά τη μετακίνησή τους, γεγονός που τα καθιστά ακατάλληλα για τη λειτουργία του σιδηρομαγνητικού εμβόλου στη διάταξη μPCR.



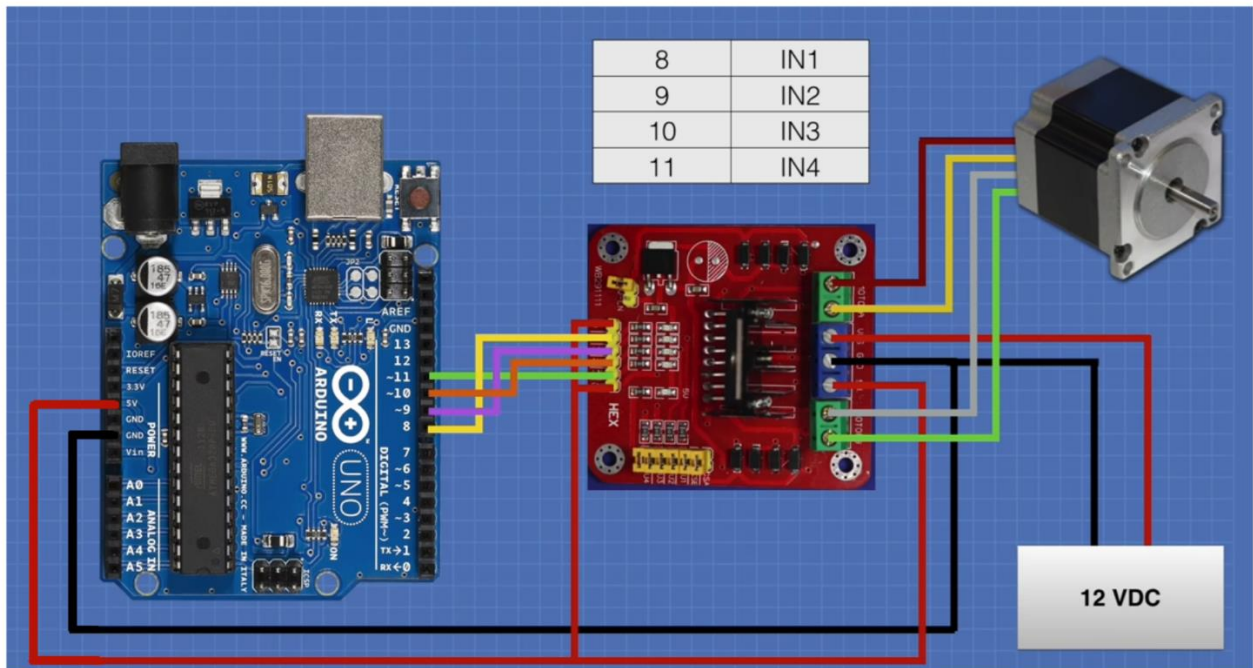
Σχήμα 3-29. Οι κινήσεις των τεσσάρων σιδηρομαγνητικών ρευστών πάνω στην ελαιόφοβη επιφάνεια. A) APG CDF 1120 Ferrofluid. B) APG CDF 1635 Ferrofluid. C) APG CDF 2250 Ferrofluid. D) Ferrofluid Magnitech.

### 3.4 ΚΥΚΛΩΜΑ ΚΙΝΗΤΗΡΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΤΟΥ

Για τη λειτουργία του κινητήρα, δημιουργήθηκε κύκλωμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στοιχεία.

- Arduino UNO microcontroller board
- L298N H-Bridge Motor Driver
- Κινητήρας
- Πηγή ηλεκτρικής τάσης

Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση του κυκλώματος.



Σχήμα 3-30. Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτρικού κυκλώματος που χρησιμοποιήθηκε για τη λειτουργία του βηματικού κινητήρα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η γωνιακή ταχύτητα που επιλέχθηκε για την περιστροφή του άξονα του βηματικού κινητήρα είναι αυτή των 10 rpm, ώστε να

πραγματοποιείται μία πλήρης περιστροφή κάθε έξι δευτερόλεπτα. Για τον έλεγχο της, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω κώδικας στο λογισμικό πρόγραμμα Arduino.

```
#include <Stepper.h>

const int stepsPerRevolution = 200; // change this to fit the number of steps per revolution

// for your motor

int i=0;

// initialize the stepper library on pins 8 through 11:

Stepper myStepper(stepsPerRevolution, 8, 9, 10, 11);

void setup() {

  // set the speed at 10 rpm:

  myStepper.setSpeed(10);

  // initialize the serial port:

  Serial.begin(9600);

}

void loop() {

  i = i+1;

  // step one revolution in one direction:

  Serial.println(i);

  myStepper.step(stepsPerRevolution);

}
```

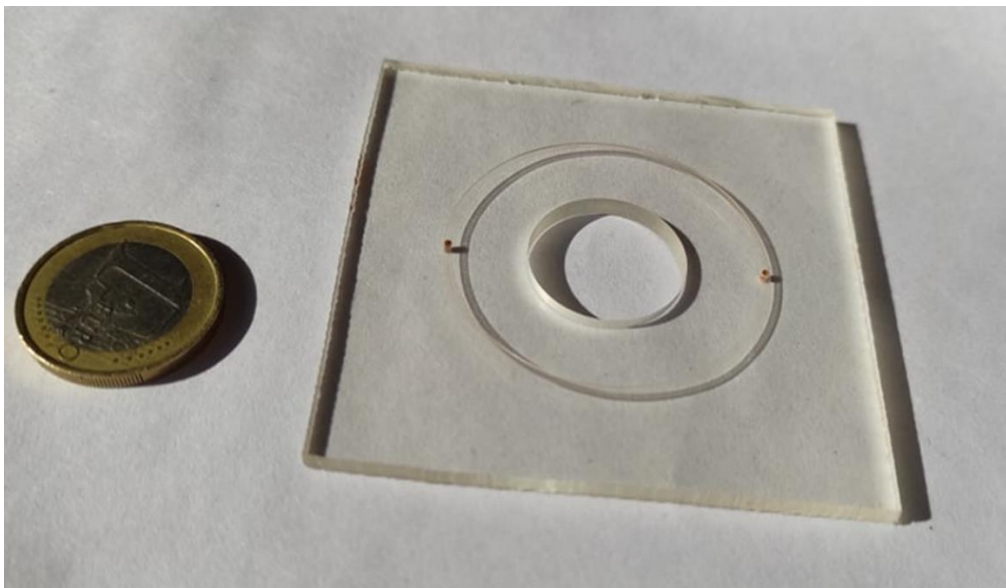


## 3.5 ΜΙΚΡΟΣΥΣΚΕΥΗ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα εξαρτήματα της διάταξης όπως αυτά κατασκευάστηκαν και συναρμολογήθηκαν.

### 3.5.1 Δοκιμαστική ψηφίδα από PMMA

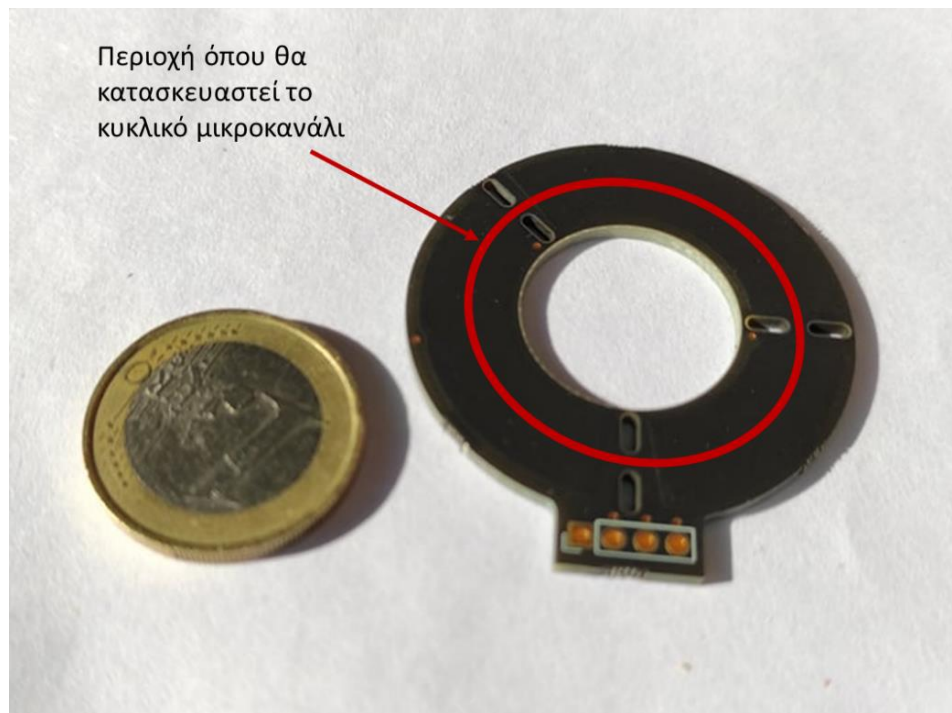
Στο σχήμα 3-31 παρουσιάζεται η δοκιμαστική ψηφίδα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ροής του σιδηρομαγνητικού ρευστού. Η δοκιμαστική αυτή ψηφίδα έχει ενσωματωμένο το κυκλικό μικροκανάλι, και κατασκευάστηκε με τη μέθοδο CNC milling σε υπόστρωμα PMMA, με βάση το σχέδιο του σχήματος 3-7. Στο κέντρο της ψηφίδας υπάρχει μία διαμπερής οπή, προκειμένου να περνά από εκεί ο άξονας του κινητήρα. Σε δύο αντιδιαμετρικά σημεία του κυκλικού μικροκαναλιού, βρίσκονται δύο μικρές οπές, οι οποίες επιτρέπουν την είσοδο και την έξοδο των ρευστών στο κυκλικό μικροκανάλι.



Σχήμα 3-31. Δοκιμαστική ψηφίδα, που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ροής του σιδηρομαγνητικού εμβόλου. Κατασκευάστηκε σε υπόστρωμα PMMA, με τη μέθοδο CNC milling με βάση το σχέδιο του σχήματος 3-7.

### 3.5.2 Ψηφίδα σε PCB

Στο σχήμα 3-32, παρουσιάζεται η PCB ψηφίδα με τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, πάνω στην οποία πρόκειται να κατασκευασθεί το κυκλικό μικροκανάλι με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας.



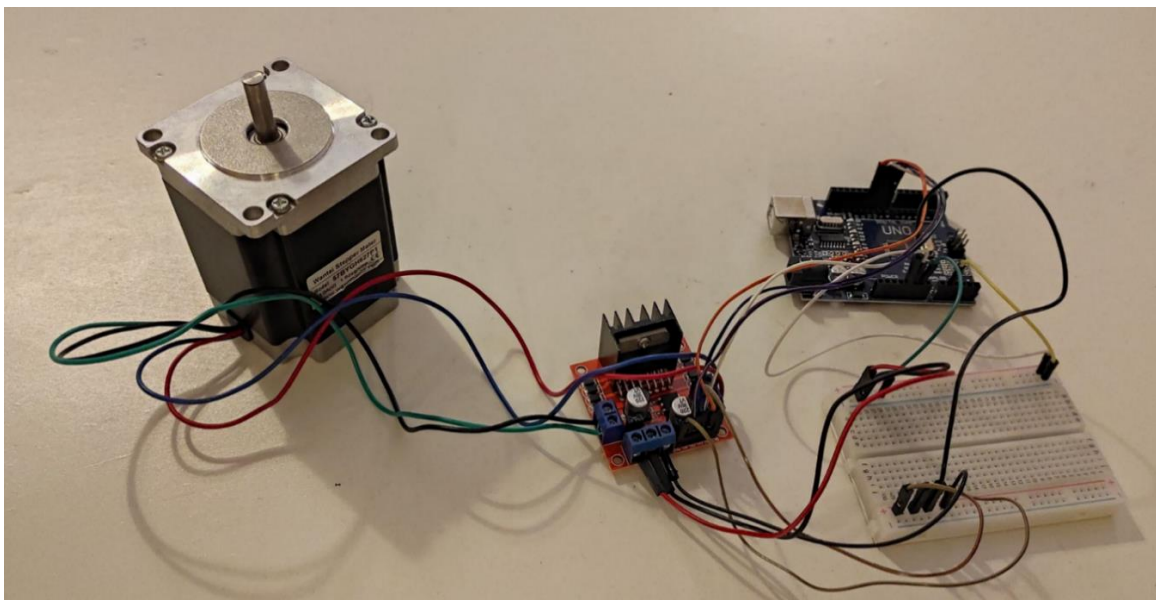
Σχήμα 3-32. Ψηφίδα με ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία. Κατασκευάστηκε σε υπόστρωμα PCB με βάση το σχέδιο 3-1.

Η ψηφίδα του σχήματος 3-32 κατασκευάστηκε σε υπόστρωμα PCB, από την εταιρεία *Eurocircuits*, με βάση το σχέδιο του σχήματος 3-1. Τα ενσωματωμένα θερμικά στοιχεία, καθώς και τα λεπτά φύλλα χαλκού, βρίσκονται στο εσωτερικό της ψηφίδας (σκεπασμένα από τη μαύρη μάσκα προστασίας της πλακέτας) και για το λόγο αυτό δεν είναι ορατά. Στη φωτογραφία διακρίνονται οι τρεις ξεχωριστές θερμοκρασιακές ζώνες, καθώς και οι διαμπερείς οπές που χωρίζουν τις ζώνες μεταξύ τους, προσφέροντάς τους θερμική απομόνωση. Διακρίνονται επίσης τα σημεία τροφοδοσίας της ψηφίδας, καθώς και τα σημεία κάθετης διασύνδεσης VIA, όπου και συνδέονται τα διαφορετικά επίπεδα των ενσωματωμένων θερμικών στοιχείων μεταξύ τους, ώστε να ολοκληρώνεται το

ηλεκτρικό κύκλωμα. Οι τελικές αντιστάσεις των κυκλωμάτων μετρήθηκαν για τις ζώνες της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης  $R_{Den} = 21,7 \Omega$  και  $R_{Ext} = 28,2 \Omega$  αντίστοιχα. Οι αντιστάσεις που μετρήθηκαν, είναι μεγαλύτερες από τις θεωρητικές τιμές των αντιστάσεων που υπολογίζονται με βάση τα σχέδια των θερμικών στοιχείων του σχήματος 3-1 ( $R_{Den_{th}} = 10,9 \Omega$  και  $R_{Ext_{th}} = 17,2 \Omega$  αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή είναι αναμενόμενη και οφείλεται στο γεγονός πως κατά τη διαδικασία εγχάραξης των επιπέδων του χαλκού για το σχηματισμό των θερμικών στοιχείων, το πάνω μέρος του χαλκού εγχαράσσεται περισσότερο από το κάτω. Έτσι, μειώνεται η διατομή του κάθε μαιανδρικού θερμικού στοιχείου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αντίστασή του.

### 3.5.3 Κινητήρας και κύκλωμα

Στη φωτογραφία του σχήματος 3-33, φαίνεται ο κινητήρας, συνδεδεμένος στο ηλεκτρικό κύκλωμα που παρουσιάστηκε στο σχήμα 3-30. Ο κινητήρας είναι βηματικός (stepper motor), τύπου Nema 23, μοντέλο «Wantai NEMA23 57BYGH627P1 stepper motor». Στη φωτογραφία διακρίνονται επίσης τα στοιχεία Arduino UNO microcontroller board και L298N H-Bridge Motor Driver.

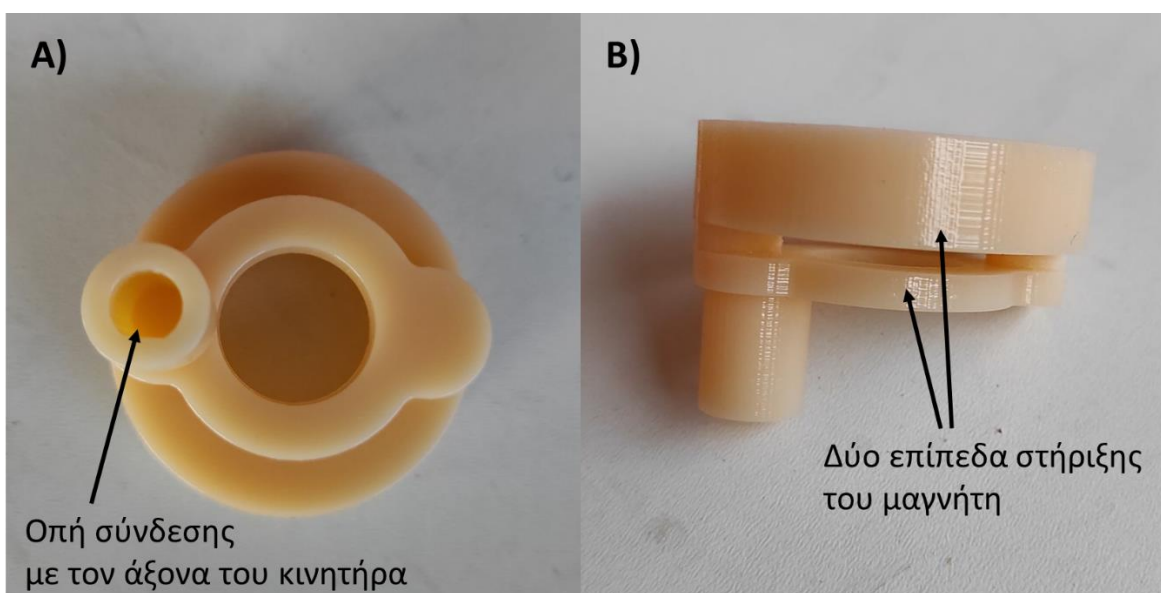


Σχήμα 3-33. Φωτογραφία του κινητήρα και του ηλεκτρικού κυκλώματος της μικροσυσκευής.

### 3.5.4 Εξαρτήματα στήριξης μαγνήτη και ψηφίδας

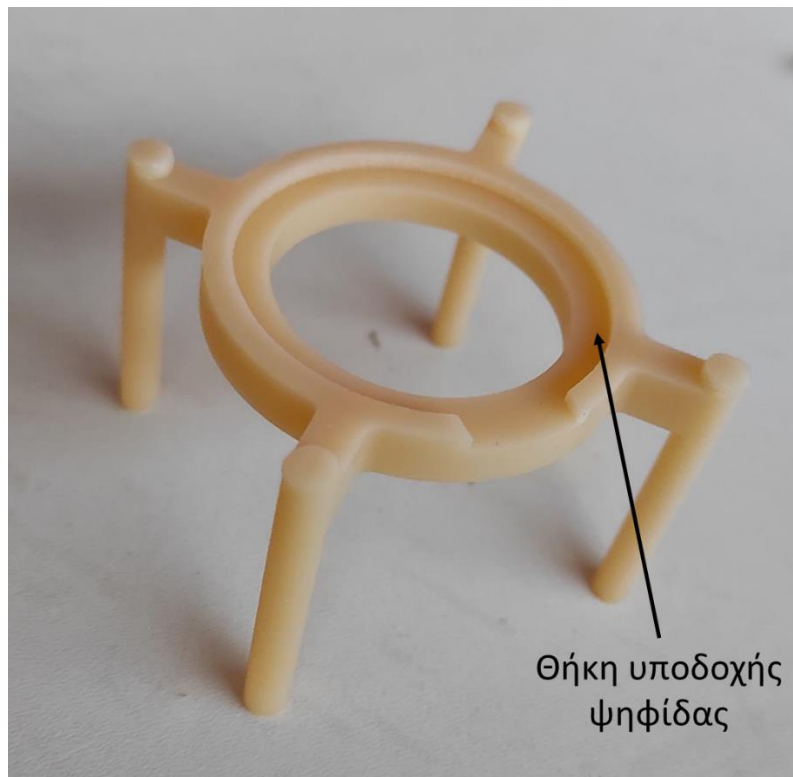
Στις φωτογραφίες των σχημάτων 3-34 και 3-35, παρουσιάζονται τα εξαρτήματα που κατασκευάστηκαν με τριδιάστατη εκτύπωση. Και τα δύο εξαρτήματα αποτελούν πρωτότυπα και κατασκευάστηκαν με βάση τα σχέδια που παρουσιάστηκαν στην ενότητα του σχεδιασμού (σχήματα 3-2.B, 3-3 και 3-4) ειδικά για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μικροσυσκευής.

Στο σχήμα 3-34, φαίνεται το εξάρτημα το οποίο συνδέει τον άξονα του κινητήρα με το μαγνήτη, επιτρέποντας έτσι την περιστροφική κίνηση του δευτέρου, πάνω από την ψηφίδα και το μικροκανάλι. Το εξάρτημα είναι ένα ενιαίο στερεό σώμα, το οποίο αποτελείται από έναν κύλινδρο με εσωτερική οπή και από δύο ομόκεντρες κυκλικές βάσεις. Η οπή στο εσωτερικό του κυλίνδρου έχει τέτοιες διαστάσεις, ώστε να εφαρμόζει ακριβώς στον άξονα του κινητήρα. Οι δύο κυκλικές βάσεις βρίσκονται σε διαφορετικά επίπεδα και έχουν διαφορετικές διαμέτρους, επιτρέποντας έτσι στο εξάρτημα να εφαρμόζει ακριβώς στις διαστάσεις του συνδυασμένου μαγνήτη, αφήνοντας την κορυφή του κώνου να εξέχει προς τα κάτω.



Σχήμα 3-34. Φωτογραφίες του εξαρτήματος σύνδεσης του άξονα του κινητήρα με τον μαγνήτη. Αριστερά, φαίνεται το κάτω μέρος του εξαρτήματος, το οποίο συδέεται με τον άξονα του κινητήρα. Α) Κάτω όψη. Β) Πλάγια όψη.

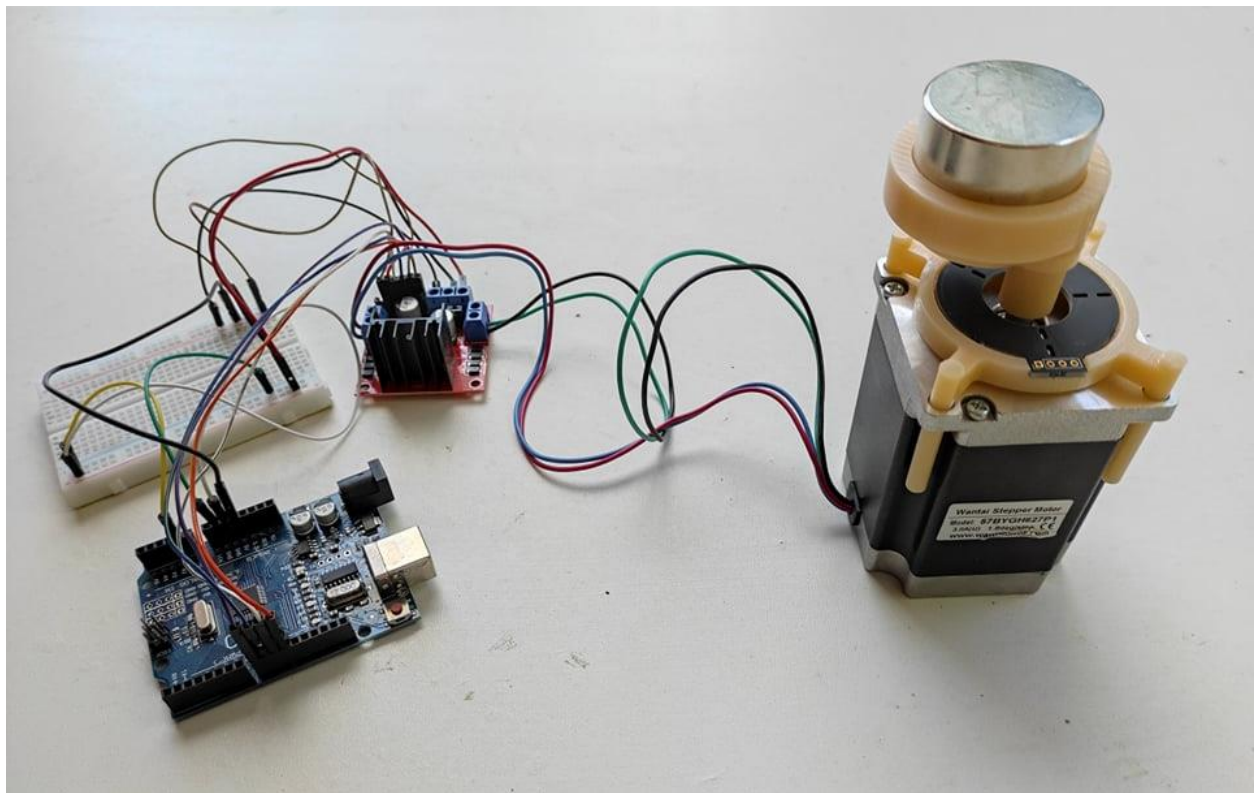
Στο σχήμα 3-35, παρουσιάζεται το εξάρτημα που χρησιμοποιείται για την στήριξη της ψηφίδας πάνω στον κινητήρα. Το εξάρτημα έχει τέσσερα «πόδια», τα οποία είναι τοποθετημένα ώστε να εφαρμόζουν πάνω στον κινητήρα τύπου *Nema 23*, καθώς και μία θήκη υποδοχής της ψηφίδας, κατασκευασμένη στις κατάλληλες διαστάσεις ώστε να στηρίζει την ψηφίδα της μικροσυσκευής. Στο εσωτερικό υπάρχει κενό, ώστε να μπορεί να περνά από το κέντρο ο άξονας του κινητήρα.



Σχήμα 3-35. Φωτογραφία του εξαρτήματος στήριξης της ψηφίδας.

### 3.5.5 Ολοκληρωμένη διάταξη

Στη φωτογραφία του σχήματος 3-36, παρουσιάζεται η ολοκληρωμένη διάταξη (χωρίς τη σύνδεση του κυκλώματος και της ψηφίδας με τις ηλεκτρικές πηγές). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνεται ο βηματικός κινητήρας τύπου *Nema 23* με το ηλεκτρικό κύκλωμά του, η ψηφίδα τοποθετημένη πάνω στο εξάρτημα στήριξής της, ο μαγνήτης και το εξάρτημα σύνδεσής του με τον κινητήρα.



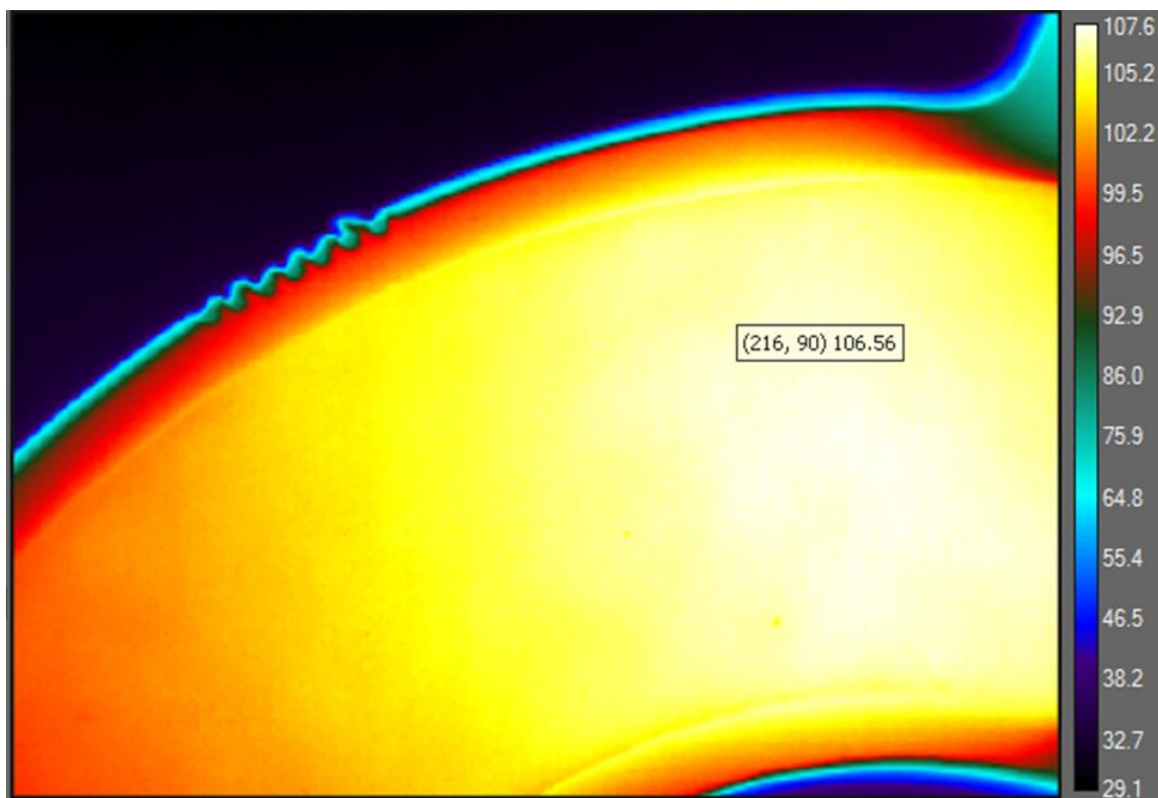
Σχήμα 3-36. Ολοκληρωμένη διάταξη.

## 3.6 ΘΕΡΜΙΚΗ ΚΑΜΕΡΑ

Για τον έλεγχο της λειτουργίας της PCB ψηφίδας, έγινε σύνδεσή της με ειδική διάταξη ελέγχου της θερμοκρασίας (thermal controller). Οι μετρήσεις της θερμοκρασίας στην επιφάνεια της PCB ψηφίδας έγιναν με τη χρήση θερμικής κάμερας. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίνονται με αυτά της προσομοίωσης στατικού ρευστού.

### 3.6.1 Θερμοκρασιακές ζώνες

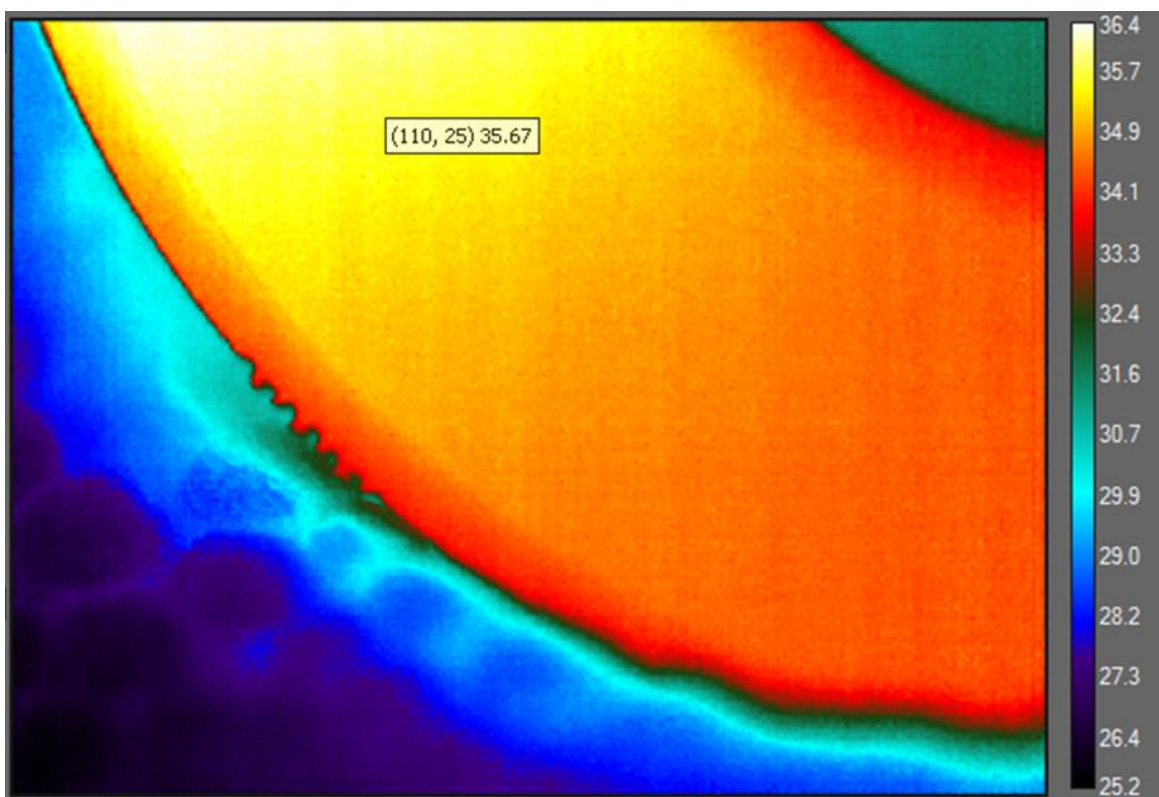
Στο σχήμα 3-37 παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή ζώνη της αποδιάταξης, όπως αποτυπώνεται στην θερμική κάμερα.



Σχήμα 3-37. Η θερμοκρασιακή ζώνη της αποδιάταξης, όπως φαίνεται στην θερμική κάμερα.

Παρατηρούμε πως η θερμοκρασία είναι αρκετά ομοιόμορφη, με τη μέγιστη θερμοκρασία να φτάνει τους 107,6 °C, θερμοκρασία που δεν απέχει πολύ από το μέγιστο των 105,0 °C που προέβλεψε η προσομοίωση για στατικό ρευστό.

Στο σχήμα 3-38 παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή ζώνη του υβριδισμού των εκκινητών, όπως αποτυπώνεται στην θερμική κάμερα.



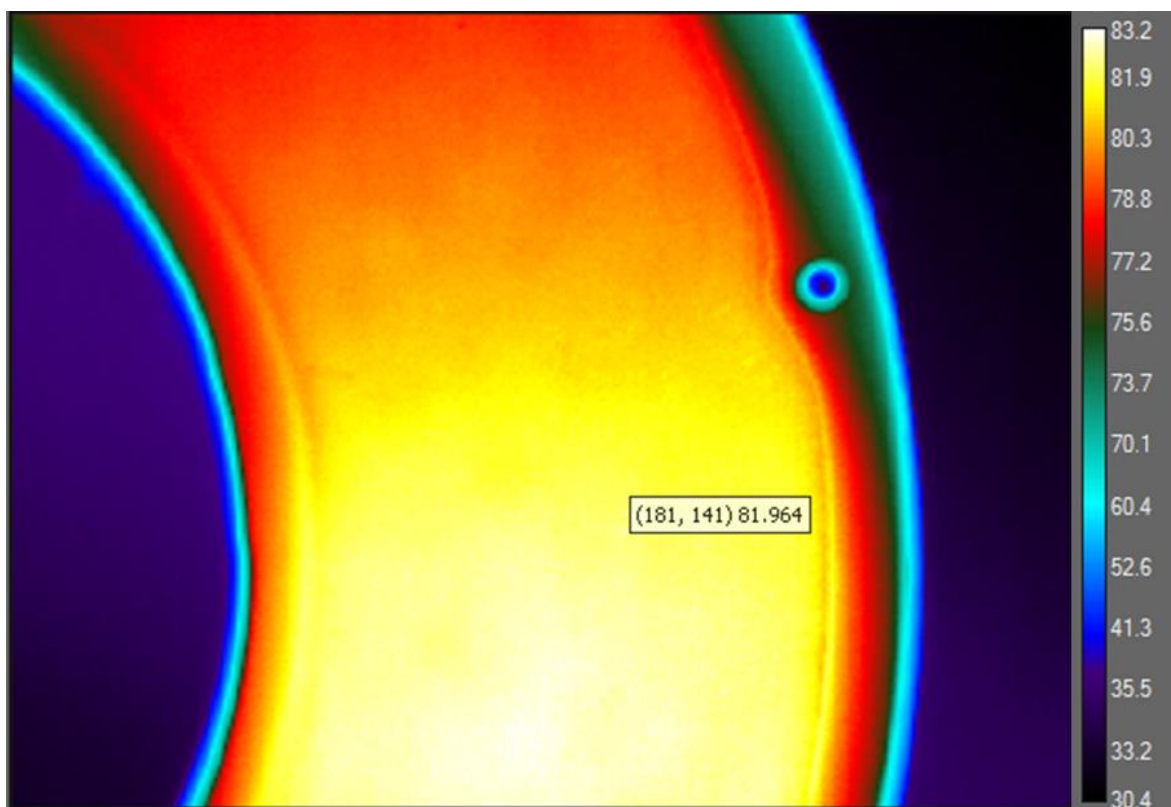
Σχήμα 3-38. Η θερμοκρασιακή ζώνη του υβριδισμού των εκκινητών, όπως φαίνεται στην θερμική κάμερα.

Παρατηρούμε πως υπάρχει θερμοκρασιακή ομοιομορφία στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της ζώνης του υβριδισμού. Η θερμοκρασία βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτά που προβλέπει η προσομοίωση (περίπου 36 °C αντί για 45 °C). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται, στο ότι ο συνολικός ρυθμός μεταφοράς θερμότητας από την ψηφίδα προς το περιβάλλον, ενδέχεται να είναι μεγαλύτερος από αυτόν που είχε προβλεφθεί αρχικά στην προσομοίωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αβεβαιότητα στις τιμές του συντελεστή εκπομπής ή/και του συντελεστή μεταφοράς θερμότητας μέσω



συναγωγής και στη διαφορά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταξύ του πειράματος και της προσομοίωσης.

Στο σχήμα 3-39 παρουσιάζεται η θερμοκρασιακή ζώνη της επιμήκυνσης, όπως αποτυπώνεται στη θερμική κάμερα. Παρατηρούμε πως η θερμοκρασία βρίσκεται σε επίπεδα πολύ κοντινά με αυτά που προβλέπονται από την προσομοίωση.

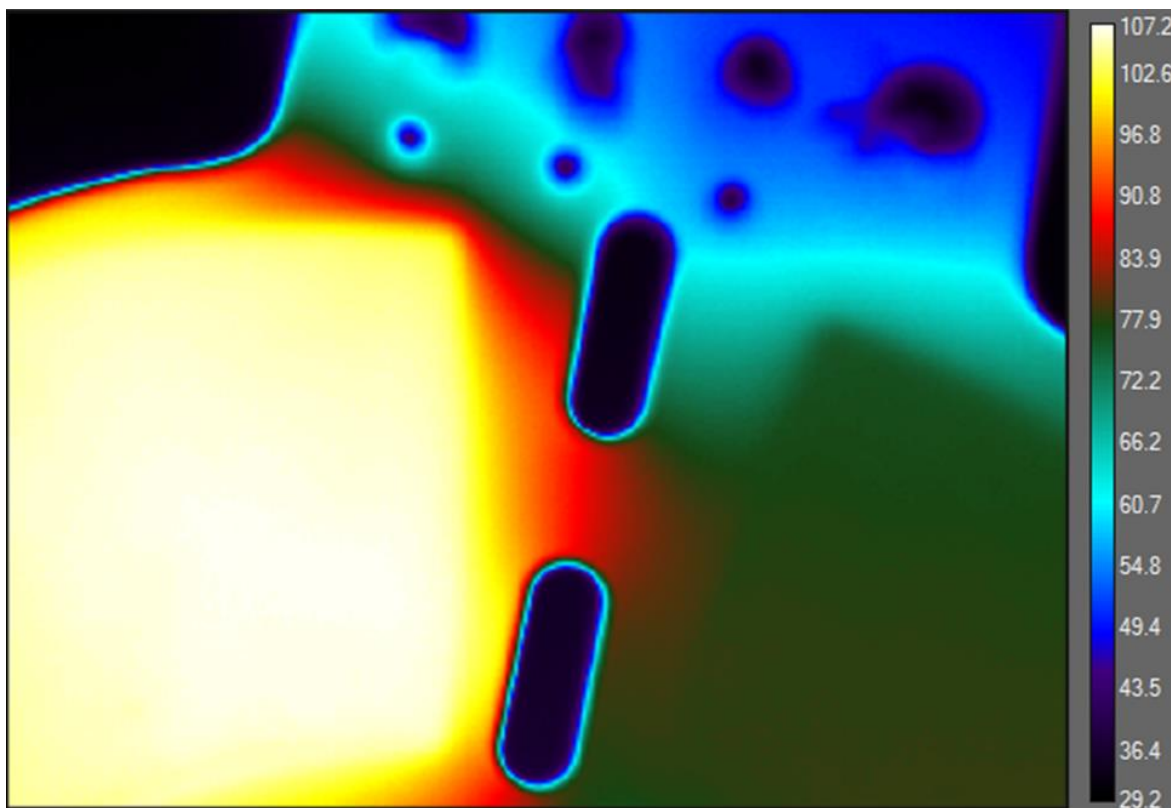


Σχήμα 3-39. Η θερμοκρασιακή ζώνη της επιμήκυνσης, όπως φαίνεται στην θερμική κάμερα.

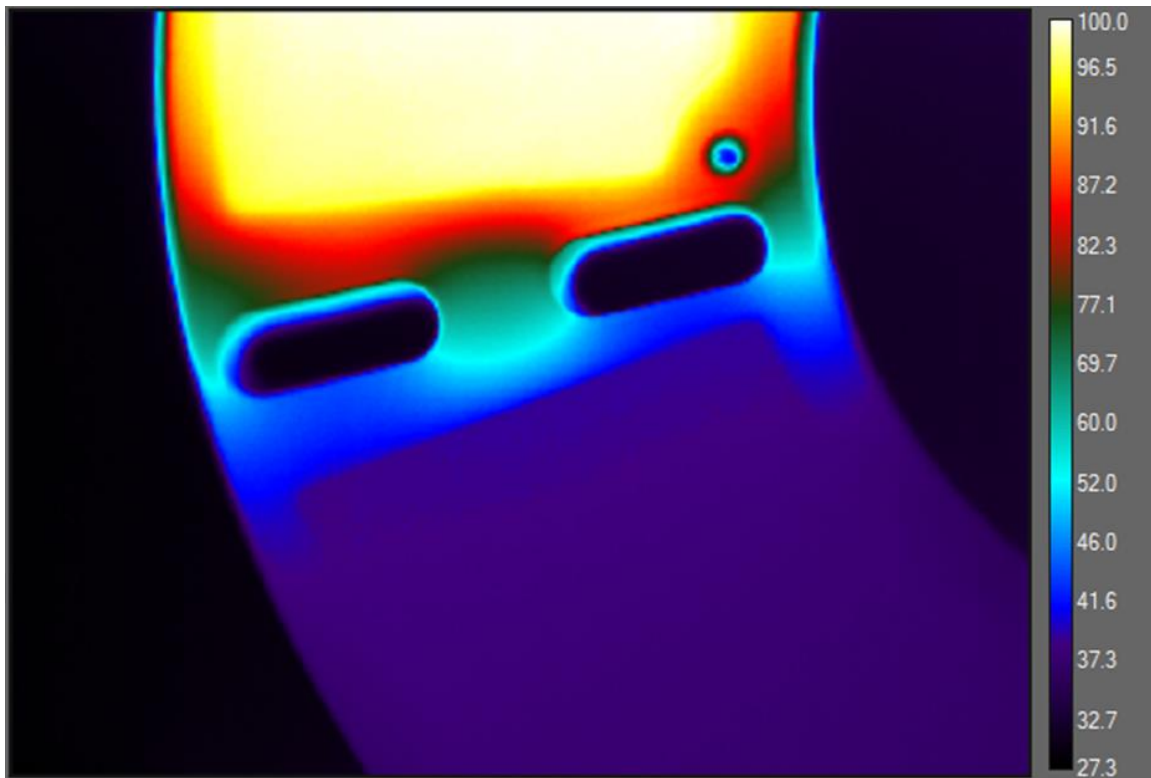
Παρατηρούμε πως σε γενικές γραμμές, οι τρεις θερμοκρασιακές ζώνες έχουν αρκετά καλή θερμοκρασιακή ομοιομορφία στο εσωτερικό τους. Παράλληλα, οι τιμές των θερμοκρασιών που αναπτύσσονται στην επιφάνεια της ψηφίδας, δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτές που έχουν προβλεφθεί από την προσομοίωση στατικού ρευστού.

### 3.6.2 Περιοχές ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες

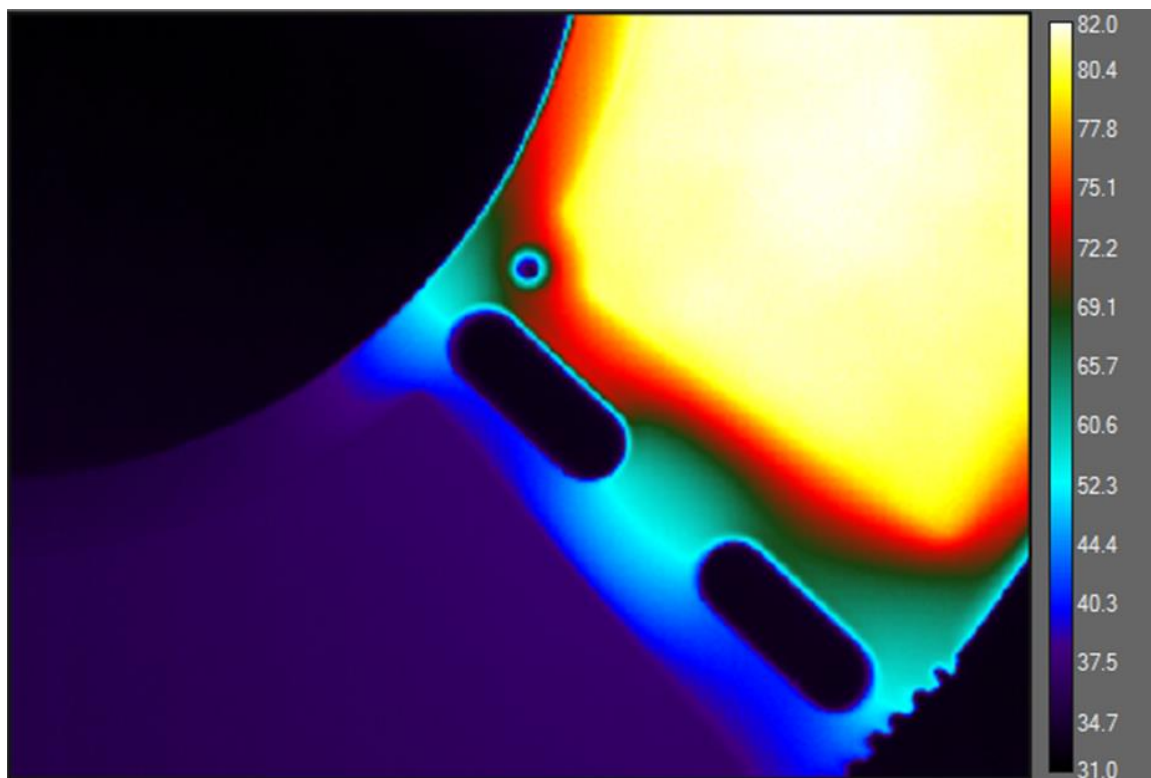
Στα σχήματα 3-40, 3-41 και 3-42 παρουσιάζονται οι τρεις συνοριακές περιοχές που βρίσκονται ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες της PCB ψηφίδας, όπως αποτυπώνονται στη θερμική κάμερα. Παρατηρούμε πως η μεταβολές της θερμοκρασίας ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες είναι αρκετά απότομες και δεν παρατηρούνται έντονα φαινόμενα θερμικής συνομιλίας μεταξύ των ζωνών. Στο γεγονός αυτό, συνεισφέρουν σημαντικά οι διαμπερείς οπές που βρίσκονται ανάμεσα στις ζώνες, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη θερμική μόνωση της κάθε θερμοκρασιακής ζώνης.



Σχήμα 3-40. Περιοχή ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες της επιμήκυνσης και της αποδιάταξης.



Σχήμα 3-41. Περιοχή ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες της αποδιάταξης και του υβριδισμού των εκκινήτων.



Σχήμα 3-42. Περιοχή ανάμεσα στις θερμοκρασιακές ζώνες του υβριδισμού των εκκινήτων και της επιμήκυνσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ενότητα των αποτελεσμάτων, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα. Αρχικά παρατηρούμε, πως ο σχεδιασμός και η κατασκευή της PCB ψηφίδας πραγματοποιήθηκαν επιτυχώς. Το κύκλωμα των ενσωματωμένων θερμικών στοιχείων λειτουργεί κανονικά. Επιπλέον, οι θερμοκρασιακές ζώνες παρουσιάζουν καλή θερμοκρασιακή μόνωση, με τις θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια της ψηφίδας να είναι κοντινές σε αυτές που προβλέπονται από την αντίστοιχη προσομοίωση για στατικό ρευστό.

Επιπρόσθετα, οι προσομοιώσεις αλλά και τα πειραματικά αποτελέσματα, δείχνουν πως, το μαγνητικό πεδίο που προκύπτει από τον μαγνήτη που επιλέχθηκε, είναι το καταλληλότερο για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μικροδιάταξης.

Παράλληλα, με την επιλογή του κατάλληλου σιδηρομαγνητικού ρευστού, αλλά και με την κατάλληλη διεργασία στην επιφάνεια της ψηφίδας, φαίνεται πως είναι δυνατή η ροή του σιδηρομαγνητικού ρευστού με την επιθυμητή γωνιακή ταχύτητα των  $10 \text{ rpm}$ , η οποία ισοδυναμεί με κύκλο της PCR στο χρονικό διάστημα των  $6 \text{ s}$ .

Τη στιγμή της έκδοσης της παρούσας εργασίας, η μικροδιάταξη είναι ολοκληρωμένη ως προς το κομμάτι της κατασκευής και του ελέγχου της λειτουργίας της PCB ψηφίδας, καθώς και των υπόλοιπων απαραίτητων τμημάτων και εξαρτημάτων (κινητήρας, ηλεκτρικό κύκλωμα, μαγνήτες, λοιπά εξαρτήματα). Για την ολοκλήρωση της μικροδιάταξης, απομένει η δημιουργία του κυκλικού μικροκαναλιού με τη μέθοδο της φωτολιθογραφίας, η επίτευξη της ροής του δείγματος στο εσωτερικό του κυκλικού μικροκαναλιού με τη βοήθεια του σιδηρομαγνητικού ρευστού, καθώς και η πραγματοποίησή του πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού με τη μέθοδο της PCR.

Για την περαιτέρω ανάπτυξη της μικροδιάταξης, στόχος είναι η προσθήκη επιπλέον μονάδων, στο πνεύμα της τεχνολογίας των LOC, με σκοπό να επιτευχθεί τελικά η δημιουργία μίας φορητής και αυτόνομης μικροσυσκευής, η οποία θα χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό γενετικού υλικού βακτηρίων και ιών με τη μέθοδο της PCR.

Η μικροδιάταξη που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία, είναι η πρώτη, από όσο γνωρίζουμε, που χρησιμοποιεί συνεχή κυκλική ροή σε PCB ψηφίδα με ενσωματωμένα θερμικά μικροστοιχεία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις της θερμοκρασίας στην PCB ψηφίδα, σε συνδυασμό με τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το μαγνητικό πεδίο και τη ροή του ρευστού, φαίνεται ότι μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία μιας απλής, χαμηλού κόστους, ευέλικτης και γρήγορης μικροδιάταξης για ανάλυση DNA, βασισμένη σε PCR.

## ΠΗΓΕΣ

- [1] Microfluidics - Wikipedia n.d. <https://en.wikipedia.org/wiki/Microfluidics> (accessed October 22, 2020).
- [2] Farré M, Kantiani L, Barceló D. Microfluidic Devices: Biosensors. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00007-8>.
- [3] what are microfluidic definitions and advantages?| Fluigent n.d. <https://www.fluigent.com/resources/microfluidic-expertise/what-is-microfluidic/microfluidic-definitions-and-advantages/> (accessed October 22, 2020).
- [4] Microfluidics: A general overview of microfluidics - Elveflow n.d. <https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/a-general-overview-of-microfluidics/> (accessed October 22, 2020).
- [5] Sweet RG. High frequency recording with electrostatically deflected ink jets. *Rev Sci Instrum* 1965;36:131–6. <https://doi.org/10.1063/1.1719502>.
- [6] Convery N, Gadegaard N. 30 Years of Microfluidics. *Micro Nano Eng* 2019;2:76–91. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.01.003>.
- [7] Keçili R, Büyüktiryaki S, Hussain CM. Micro total analysis systems with nanomaterials. *Handb Nanomater Anal Chem Mod Trends Anal* 2020:185–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00008-6>.
- [8] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:263–73.
- [9] Kary B. Mullis – Nobel Lecture: The Polymerase Chain Reaction. n.d.
- [10] N. Bermingham and K. Luettich. Polymerase chain reaction and its applications. *Diagn Pathol* 2003;6053:322–7. <https://doi.org/10.1016/S0968>.
- [11] Taq Polymerase PCR Enzyme: A Heat-stable DNA Polymerase Protein.. Stock

- Photo, Picture And Royalty Free Image. Image 22949270. n.d. [https://www.123rf.com/photo\\_22949270\\_taq-polymerase-pcr-enzyme-a-heat-stable-dna-polymerase-protein-that-is-the-key-component-that-makes-.html](https://www.123rf.com/photo_22949270_taq-polymerase-pcr-enzyme-a-heat-stable-dna-polymerase-protein-that-is-the-key-component-that-makes-.html) (accessed October 15, 2020).
- [12] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9236–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>.
- [13] Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. DPCR: A technology review. *Sensors* 2018;18:1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>.
- [14] Ahrberg CD, Manz A, Chung BG. Lab on a Chip. *Lab Chip* 2016:1995–2000. <https://doi.org/10.1039/C6LC00984K>.
- [15] Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One* 2008;3:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002876>.
- [16] Whale AS, Cowen S, Foy CA, Huggett JF. Methods for Applying Accurate Digital PCR Analysis on Low Copy DNA Samples. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058177>.
- [17] Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep* 2017;7:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.
- [18] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Notomi et al LAMP.pdf. *Nucleic Acids Res* 2000;28:e63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
- [19] Shen F, Davydova EK, Du W, Kreutz JE, Piepenburg O, Ismagilov RF. Digital isothermal quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on SlipChip. *Anal Chem* 2011;83:3533–40. <https://doi.org/10.1021/ac200247e>.
- [20] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification.

- EMBO Rep 2004;5:795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>.
- [21] Shi C, Liu Q, Ma C, Zhong W. Exponential strand-displacement amplification for detection of micrnas. *Anal Chem* 2014;86:336–9. <https://doi.org/10.1021/ac4038043>.
- [22] Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang DK, Ankrum JA, et al. Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev* 2014;43:3324–41. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>.
- [23] Hall MJ, Wharam SD, Weston A, Cardy DLN, Wilson WH. Use of signal-mediated amplification of RNA technology (SMART) to detect marine cyanophage DNA. *Biotechniques* 2002;32:604–11. <https://doi.org/10.2144/02323rr02>.
- [24] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991;350:91–2.
- [25] Ma C, Han D, Deng M, Wang J, Shi C. Single primer-triggered isothermal amplification for double-stranded DNA detection. *Chem Commun* 2015;51:553–6. <https://doi.org/10.1039/c4cc07845d>.
- [26] Xu G, Hu L, Zhong H, Wang H, Yusa SI, Weiss TC, et al. Cross priming amplification: Mechanism and optimization for isothermal DNA amplification. *Sci Rep* 2012;2:1–7. <https://doi.org/10.1038/srep00246>.
- [27] Safdar M, Abasıyanık MF. Simultaneous identification of pork and poultry origins in pet foods by a quick multiplex real-time PCR assay using evagreen florescence dye. *Appl Biochem Biotechnol* 2013;171:1855–64. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0485-7>.
- [28] Osman F, Hodzic E, Omanska-Klusek A, Olineka T, Rowhani A. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. *J Virol Methods* 2013;194:138–45. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.046>.
- [29] Kim Y, Choi Y, Jeon BY, Jin H, Cho SN, Lee H. A simple and efficient multiplex PCR assay for the identification of Mycobacterium genus and Mycobacterium tuberculosis complex to the species level. *Yonsei Med J* 2013;54:1220–6.



<https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.5.1220>.

- [30] Mehrabadi JF, Morsali P, Nejad HR, Imani Fooladi AA. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *J Infect Public Health* 2012;5:263–7. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.02.004>.
- [31] Northrup MA, Ching MT, White RM, Watson RT. DNA amplification in a microfabricated reaction chamber. *Proc. 7th Int. Conf. Solid-State Sensors Actuators (Transducers '93)*, Yokohama, Japan: 1993, p. 924–6.
- [32] Cady NC, Stelick S, Kunnavakkam M V, Batt CA. Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform. *Sensors Actuators B* 2005;107:332–41. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.10.022>.
- [33] Cho Y, Kim J, Lee Y, Kim Y, Namkoong K, Lim H, et al. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens Bioelectrons* 2006;21:2161–9. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.005>.
- [34] Easley CJ, Karlinsey M, Landers JP. On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. *Lab Chip* 2006;6:601–10. <https://doi.org/10.1039/b600039h>.
- [35] Ke C, Kelleher A, Berney H, Sheehan M, Mathewson A. Single step cell lysis / PCR detection of *Escherichia coli* in an independently controllable silicon microreactor. *Sensors Actuators B* 2007;120:538–44. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.03.019>.
- [36] Morganti E, Collini C, Potrich C, Ress C, Adami A, Lorenzelli L, et al. A micro polymerase chain reaction module for integrated and portable DNA analysis systems. *J Sensors* 2011;2011. <https://doi.org/10.1155/2011/983430>.
- [37] Morrison T, Hurley J, Garcia J, Yoder K, Katz A, Roberts D, et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl639>.
- [38] Marcus JS, Anderson WF, Quake SR. Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics. *Anal Chem* 2006;78:956–8. <https://doi.org/10.1021/ac0513865>.

- [39] Nagai H, Murakami Y, Morita Y, Yokoyama K, Tamiya E. Development of a microchamber array for picoliter PCR. *Anal Chem* 2001;73:1043–7. <https://doi.org/10.1021/ac000648u>.
- [40] Ouyang Y, Duarte GRM, Poe BL, Riehl PS, dos Santos FM, Martin-Didonet CCG, et al. A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control. *Anal Chim Acta* 2015;901:59–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.042>.
- [41] Schrell AM, Roper MG. Frequency-encoded laser-induced fluorescence for multiplexed detection in infrared-mediated quantitative PCR. *Analyst* 2014;139:2695–701. <https://doi.org/10.1039/c3an02334f>.
- [42] Pak N, Saunders DC, Phaneuf CR, Forest CR. Plug-and-play, infrared, laser-mediated PCR in a microfluidic chip. *Biomed Microdevices* 2012;14:427–33. <https://doi.org/10.1007/s10544-011-9619-2>.
- [43] Son JH, Cho B, Hong S, Lee SH, Hoxha O, Haack AJ, et al. Ultrafast photonic PCR. *Light Sci Appl* 2015;4. <https://doi.org/10.1038/lsa.2015.53>.
- [44] Wheeler EK, Hara CA, Frank J, Deotte J, Hall SB, Bennett W, et al. Under-three minute PCR: Probing the limits of fast amplification. *Analyst* 2011;136:3707–12. <https://doi.org/10.1039/c1an15365j>.
- [45] Houssin T, Cramer J, Grojsman R, Bellahsene L, Colas G, Moulet H, et al. Ultrafast, sensitive and large-volume on-chip real-time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections. *Lab Chip* 2016;16:1401–11. <https://doi.org/10.1039/c5lc01459j>.
- [46] Furutani S, Nagai H, Takamura Y, Kubo I. Compact disk (CD)-shaped device for single cell isolation and PCR of a specific gene in the isolated cell. *Anal Bioanal Chem* 2010;398:2997–3004. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4205-7>.
- [47] Amasia M, Cozzens M, Madou MJ. Centrifugal microfluidic platform for rapid PCR amplification using integrated thermoelectric heating and ice-valving. *Sensors Actuators, B Chem* 2012;161:1191–7. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.11.080>.

- [48] Law ILG, Loo JFC, Kwok HC, Yeung HY, Leung CCH, Hui M, et al. Automated real-time detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on a lab-on-a-disc by Recombinase Polymerase Amplification. *Anal Biochem* 2018;544:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.031>.
- [49] Strohmeier O, Marquart N, Mark D, Roth G, Zengerle R, Von Stetten F. Real-time PCR based detection of a panel of food-borne pathogens on a centrifugal microfluidic “labDisk” with on-disk quality controls and standards for quantification. *Anal Methods* 2014;6:2038–46. <https://doi.org/10.1039/c3ay41822g>.
- [50] Czilwik G, Messinger T, Strohmeier O, Wadle S, Von Stetten F, Paust N, et al. Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation. *Lab Chip* 2015;15:3749–59. <https://doi.org/10.1039/c5lc00591d>.
- [51] Keller M, Wadle S, Paust N, Dreesen L, Nuese C, Strohmeier O, et al. Centrifugo-thermopneumatic fluid control for valving and aliquoting applied to multiplex real-time PCR on off-the-shelf centrifugal thermocycler. *RSC Adv* 2015;5:89603–11. <https://doi.org/10.1039/c5ra16095b>.
- [52] Yan H, Zhu Y, Zhang Y, Wang L, Chen J, Lu Y, et al. Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification. *Sci Rep* 2017;7:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01415-x>.
- [53] Zhang L, Tian F, Liu C, Feng Q, Ma T, Zhao Z, et al. Hand-powered centrifugal microfluidic platform inspired by the spinning top for sample-to-answer diagnostics of nucleic acids. *Lab Chip* 2018;18:610–9. <https://doi.org/10.1039/c7lc01234a>.
- [54] Roy E, Stewart G, Mounier M, Malic L, Peytavi R, Clime L, et al. From cellular lysis to microarray detection, an integrated thermoplastic elastomer (TPE) point of care Lab on a Disc. *Lab Chip* 2015;15:406–16. <https://doi.org/10.1039/c4lc00947a>.
- [55] Kopp MU, Mello AJ De, Manz A. Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip. *Science (80- )* 1998;280:1046–8. <https://doi.org/10.1351/goldbook.ct07134>.
- [56] Moschou D, Vourdas N, Kokkoris G, Papadakis G, Parthenios J, Chatzandroulis S,

- et al. All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification. *Sensors Actuators, B Chem* 2014;199:470–8. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.007>.
- [57] Kaprou GD, Papadakis G, Papageorgiou DP, Kokkoris G, Papadopoulos V, Kefala I, et al. Miniaturized devices for isothermal DNA amplification addressing DNA diagnostics. *Microsyst Technol* 2016;22:1529–34. <https://doi.org/10.1007/s00542-015-2750-x>.
- [58] Li S, Fozdar DY, Ali MF, Li H, Shao D, Vykoukal DM, et al. A continuous-flow polymerase chain reaction microchip with regional velocity control. *J Microelectromechanical Syst* 2006;15:223–36. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2005.859083>.
- [59] Gorgannezhad L, Stratton H, Nguyen N. Microfluidic-Based Nucleic Acid Amplification Systems in Microbiology. *Micromachines* 2019:1–34.
- [60] Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KSJ. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001;25:430–42. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1265>.
- [61] Hashimoto M, Chen PC, Mitchell MW, Nikitopoulos DE, Soper SA, Murphy MC. Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip* 2004;4:638–45. <https://doi.org/10.1039/b406860b>.
- [62] Sun K, Yamaguchi A, Ishida Y, Matsuo S, Misawa H. Highly integrated transparent microchannel chips for continuous-flow PCR. *Sensors Actuators, B Chem* 2002;84:283–9.
- [63] Fernández-Carballo BL, McGuinness I, McBeth C, Kalashnikov M, Borrós S, Sharon A, et al. Low-cost, real-time, continuous flow PCR system for pathogen detection. *Biomed Microdevices* 2016;18:1–10. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0060-4>.
- [64] Chen JJ, Liao MH, Li KT, Shen CM. One-heater flow-through polymerase chain reaction device by heat pipes cooling. *Biomicrofluidics* 2015;9:1–22. <https://doi.org/10.1063/1.4906505>.

- [65] Andersson H, Van Der Wijngaart W, Nilsson P, Enoksson P, Stemme G. Valve-less diffuser micropump for microfluidic analytical systems. *Sensors Actuators, B Chem* 2001;72:259–65. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00644-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00644-4).
- [66] Xie J, Shih J, Lin Q, Yang B, Tai YC. Surface micromachined electrostatically actuated micro peristaltic pump. *Lab Chip* 2004;4:495–501. <https://doi.org/10.1039/b403906h>.
- [67] Gervais L, Hitzbleck M, Delamarche E. Capillary-driven multiparametric microfluidic chips for one-step immunoassays. *Biosens Bioelectron* 2011;27:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.06.016>.
- [68] Delamarche E, Juncker D, Schmid H. Microfluidics for processing surfaces and miniaturizing biological assays. *Adv Mater* 2005;17:2911–33. <https://doi.org/10.1002/adma.200501129>.
- [69] Tachibana H, Saito M, Tsuji K, Yamanaka K, Hoa LQ, Tamiya E. Self-propelled continuous-flow PCR in capillary-driven microfluidic device: Microfluidic behavior and DNA amplification. *Sensors Actuators, B Chem* 2015;206:303–10. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.004>.
- [70] Tachibana H, Saito M, Shibuya S, Tsuji K, Miyagawa N, Yamanaka K, et al. On-chip quantitative detection of pathogen genes by autonomous microfluidic PCR platform. *Biosens Bioelectron* 2015;74:725–30. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.009>.
- [71] Perdignes F, Franco E, Salvador B, Flores G, Quero JM. Highly Integrable Microfluidic Impulsion System for Precise Displacement of Liquids on Lab on PCBs. *J Microelectromechanical Syst* 2018;27:479–86. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2018.2821187>.
- [72] Zhang C, Wang H, Xing D. Multichannel oscillatory-flow multiplex PCR microfluidics for high-throughput and fast detection of foodborne bacterial pathogens. *Biomed Microdevices* 2011;13:885–97. <https://doi.org/10.1007/s10544-011-9558-y>.
- [73] Chen L, West J, Auroux PA, Manz A, Day PJR. Ultrasensitive PCR and real-time

- detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor. *Anal Chem* 2007;79:9185–90. <https://doi.org/10.1021/ac701668k>.
- [74] Liu D, Liang G, Lei X, Chen B, Wang W, Zhou X. Highly efficient capillary polymerase chain reaction using an oscillation droplet microreactor. *Anal Chim Acta* 2012;718:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.066>.
- [75] Koppaarthi VL, Crews ND. Oscillating-flow Thermal Gradient PCR 2019:1–9. <https://doi.org/10.1101/544908>.
- [76] Bu M, Melvin T, Ensell G, Wilkinson JS, Evans AGR. Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR. *J Micromechanics Microengineering* 2003;13. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/13/4/321>.
- [77] Wang H, Ma Z, Qin J, Shen Z, Liu Q, Chen X, et al. A versatile loop-mediated isothermal amplification microchip platform for *Streptococcus pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* testing at the point of care. *Biosens Bioelectron* 2018;126:373–80. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.011>.
- [78] Asiello PJ, Baeumner AJ. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip* 2011;11:1420–30. <https://doi.org/10.1039/c0lc00666a>.
- [79] Lefever S, Pattyn F, De Wilde B, Coppieters F, De Keulenaer S, Hellemans J, et al. High-throughput PCR assay design for targeted resequencing using primerXL. *BMC Bioinformatics* 2017;18:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1809-3>.
- [80] Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: Latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res* 2007;35:4223–37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm389>.
- [81] Unger MA, Chou H-P, Thorsen T, Scherer A, Quake SR. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography 2000;288:113–6.
- [82] Hatch AC, Fisher JS, Tovar AR, Hsieh AT, Lin R, Pentoney SL, et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab Chip* 2011;11:3838–45. <https://doi.org/10.1039/c1lc20561g>.

- [83] Kinz E, Leiherer A, Lang AH, Drexel H, Muendlein A. Accurate quantitation of JAK2 V617F allele burden by array-based digital PCR. *Int J Lab Hematol* 2015;37:217–24. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12269>.
- [84] Wang P, Jing F, Li G, Wu Z, Cheng Z, Zhang J, et al. Absolute quantification of lung cancer related microRNA by droplet digital PCR. *Biosens Bioelectron* 2015;74:836–42. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.048>.
- [85] Tanaka H, Yamamoto S, Nakamura A, Nakashoji Y, Okura N, Nakamoto N, et al. Hands-off preparation of monodisperse emulsion droplets using a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip for droplet digital PCR. *Anal Chem* 2015;87:4134–43. <https://doi.org/10.1021/ac503169h>.
- [86] Thompson AM, Gansen A, Paguirigan AL, Kreutz JE, Radich JP, Chiu DT. Self-digitization microfluidic chip for absolute quantification of mRNA in single cells. *Anal Chem* 2014;86:12308–14. <https://doi.org/10.1021/ac5035924>.
- [87] Song Q, Gao Y, Zhu Q, Tian Q, Yu B, Song B, et al. A nanoliter self-priming compartmentalization chip for point-of-care digital PCR analysis. *Biomed Microdevices* 2015;17:1–8. <https://doi.org/10.1007/s10544-015-9970-9>.
- [88] Sundberg SO, Wittwer CT, Zhou L, Palais R, Dwight Z, Gale BK. Quasi-digital PCR: Enrichment and quantification of rare DNA variants. *Biomed Microdevices* 2014;16:639–44. <https://doi.org/10.1007/s10544-014-9866-0>.
- [89] Schuler F, Schwemmer F, Trotter M, Wadle S, Zengerle R, Von Stetten F, et al. Centrifugal step emulsification applied for absolute quantification of nucleic acids by digital droplet RPA. *Lab Chip* 2015;15:2759–66. <https://doi.org/10.1039/c5lc00291e>.
- [90] Schuler F, Siber C, Hin S, Wadle S, Paust N, Zengerle R, et al. Digital droplet LAMP as a microfluidic app on standard laboratory devices. *Anal Methods* 2016;8:2750–5. <https://doi.org/10.1039/c6ay00600k>.
- [91] Tian Q, Yu B, Mu Y, Xu Y, Ma C, Zhang T, et al. An integrated temporary negative pressure assisted microfluidic chip for DNA isolation and digital PCR detection.

- RSC Adv 2015;5:81889–96. <https://doi.org/10.1039/c5ra18166f>.
- [92] Byrnes SA, Chang TC, Huynh T, Astashkina A, Weigl BH, Nichols KP. Simple Polydisperse Droplet Emulsion Polymerase Chain Reaction with Statistical Volumetric Correction Compared with Microfluidic Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. *Anal Chem* 2018;90:9374–80. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01988>.
- [93] QX200™ Droplet Digital™ PCR System | Life Science Research | Bio-Rad. BioRad n.d. <https://www.bio-rad.com/en-uk/sku/1864001-qx200-droplet-digital-pcr-system?ID=1864001> (accessed April 16, 2020).
- [94] RainDrop Plus Digital PCR System | RainDance Technologies n.d. <http://raindancetech.com/digital-pcr-tech/raindrop-digital-pcr-system/> (accessed April 16, 2020).
- [95] Fluidigm | Consumables | Digital PCR n.d. <https://www.fluidigm.com/reagents/digital-pcr#products> (accessed April 16, 2020).
- [96] Sun Y, Kwok YC, Foo-Peng Lee P, Nguyen NT. Rapid amplification of genetically modified organisms using a circular ferrofluid-driven PCR microchip. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:1505–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2808-7>.
- [97] COMSOL Multiphysics. Heat Transfer Module. Manual, 2015, p. 161–3.
- [98] Pawl P, W JJ. Permanent Magnet - COMSOL Multiphysics 5.3 2001:2–3.
- [99] Stepper Motors Advantages and Disadvantages | RealPars n.d. <https://realpars.com/stepper-motors-advantages/> (accessed August 18, 2020).
- [100] Kaprou GD, Papadopoulos V, Loukas CM, Kokkoris G, Tserepi A. Towards PCB-based miniaturized thermocyclers for DNA amplification. *Micromachines* 2020;11. <https://doi.org/10.3390/mi11030258>.
- [101] PCR Protocol for Taq DNA Polymerase | NEB n.d. <https://www.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273> (accessed October 2, 2020).



- [102] K&J Magnetics - Magnetic Field Calculator n.d.  
<https://www.kjmagnetics.com/fieldcalculator.asp> (accessed October 11, 2020).
- [103] ALICE CHIEN, DAVID B. EDGAR AJMT. Deoxyribonucleic Acid. J Bacteriol  
1976;127:1550–7. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_4305](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_4305).
- [104] How do you calculate the annealing temperature for PCR? n.d.  
<https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-you-calculate-the-annealing-temperature-for-pcr-> (accessed October 5, 2020).



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## APG CDF Series Ferrofluid

### Type: APG CDF 1120

Ferrotec's APG CDF 1120 Ferrofluid is a member of Ferrotec's family of APG CDF Series ferrofluids for speaker applications. The APG CDF Series is black-brown or red-brown viscous fluid and uses a synthetic ester oil carrier liquid.

### APG CDF 1120 Specifications and Physical Properties

**Appearance** black-brown or red-brown viscous fluid

**Carrier Liquid** synthetic ester oil

|   | <b>CGS Units</b>               | <b>SI Units</b>                        |
|---|--------------------------------|--|
| <b>Saturation Magnetization (Ms)</b>    | 110 Gauss                      | 11 mT                                  |
| <b>Viscosity @27°C</b>                  | 200 cP                         | 200 mPa·s                              |
| <b>Density @25°C</b>                    | 1.07 g/cc                      | 1.07 10 <sup>3</sup> kg/m <sup>3</sup> |
| <b>Pour Point</b>                       | -43 °C                         | -43 °C                                 |
| <b>Flash Point</b>                      | >270 °C                        | >270 °C                                |
| <b>Thermal Conductivity @38°C</b>       | 200 mW/(m·K)                   | 200 mW/(m·K)                           |
| <b>Surface Tension @25°C</b>            | 32 dynes/cm                    | 32 mN/m                                |
| <b>Coefficient of Thermal Expansion</b> | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> ml/ml°C | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> /K              |

## APG CDF Series Ferrofluid

### Type: APG CDF 1635

Ferrotec's APG CDF 1635 Ferrofluid is a member of Ferrotec's family of APG CDF Series ferrofluids for speaker applications. The APG CDF Series is black-brown or red-brown viscous fluid and uses a synthetic ester oil carrier liquid.

### APG CDF 1635 Specifications and Physical Properties

**Appearance** black-brown or red-brown viscous fluid

**Carrier Liquid** synthetic ester oil

|   | <b>CGS Units</b>               | <b>SI Units</b>                        |
|---|--------------------------------|--|
| <b>Saturation Magnetization (Ms)</b>    | 165 Gauss                      | 16.5 mT                                |
| <b>Viscosity @27°C</b>                  | 350 cP                         | 350 mPa·s                              |
| <b>Density @25°C</b>                    | 1.13 g/cc                      | 1.13 10 <sup>3</sup> kg/m <sup>3</sup> |
| <b>Pour Point</b>                       | -41 °C                         | -41 °C                                 |
| <b>Flash Point</b>                      | >270 °C                        | >270 °C                                |
| <b>Thermal Conductivity @38°C</b>       | 200 mW/(m·K)                   | 200 mW/(m·K)                           |
| <b>Surface Tension @25°C</b>            | 32 dynes/cm                    | 32 mN/m                                |
| <b>Coefficient of Thermal Expansion</b> | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> ml/ml°C | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> /K              |

## APG CDF Series Ferrofluid

### Type: APG CDF 2250

Ferrotec's APG CDF 2250 Ferrofluid is a member of Ferrotec's family of APG CDF Series ferrofluids for speaker applications. The APG CDF Series is black-brown or red-brown viscous fluid and uses a synthetic ester oil carrier liquid.

### APG CDF 2250 Specifications and Physical Properties

**Appearance** black-brown or red-brown viscous fluid

**Carrier Liquid** synthetic ester oil

|   | <b>CGS Units</b>               | <b>SI Units</b>                        |
|---|--------------------------------|--|
| <b>Saturation Magnetization (Ms)</b>    | 220 Gauss                      | 22 mT                                  |
| <b>Viscosity @27°C</b>                  | 500 cP                         | 500 mPa·s                              |
| <b>Density @25°C</b>                    | 1.18 g/cc                      | 1.18 10 <sup>3</sup> kg/m <sup>3</sup> |
| <b>Pour Point</b>                       | -39 °C                         | -39 °C                                 |
| <b>Flash Point</b>                      | >270 °C                        | >270 °C                                |
| <b>Thermal Conductivity @38°C</b>       | 200 mW/(m·K)                   | 200 mW/(m·K)                           |
| <b>Surface Tension @25°C</b>            | 32 dynes/cm                    | 32 mN/m                                |
| <b>Coefficient of Thermal Expansion</b> | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> ml/ml°C | 7.5 x 10 <sup>-4</sup> /K              |

# EFH1 Magnitech Ferrofluid

Type: EFH1

## EFH1 Specifications and Physical Properties

**Appearance** black-brown or red-brown viscous fluid

**Carrier Liquid** Light mineral oil

|                                      | <b>CGS Units</b> | <b>SI Units</b>                        |
|--------------------------------------|------------------|--|
| <b>Saturation Magnetization (Ms)</b> | 400 Gauss        | 40 mT                                  |
| <b>Viscosity @27°C</b>               | 6 cP             | 6 mPa·s                                |
| <b>Density @25°C</b>                 | 1.21 g/cc        | 1.18 10 <sup>3</sup> kg/m <sup>3</sup> |
| <b>Pour Point</b>                    | -94 °C           | -94 °C                                 |
| <b>Flash Point</b>                   | 92 °C            | 92 °C                                  |
| <b>Initial Susceptibility</b>        | 1.70             | 1.70                                   |
| <b>Surface Tension @25°C</b>         | 29 dynes/cm      | 29 mN/m                                |
| <b>Volatility (1 hr. @50°C)</b>      | 9%               | 9%                                     |