

POLITECNICO DI MILANO

SCUOLA DI INGEGNERIA INDUSTRIALE E DELL'INFORMAZIONE

Corso di Laurea in Ingegneria Elettronica



Sviluppo di un sistema compatto e portatile per estrazioni di materiale genomico su Lab-on-Chip

Relatore: Prof. Marco Angelo BIANCHESSI

Correlatore: Ing. Alessandro COCCI

Tesi di Laurea di:
Maria Chiara SCHGOR
Matr. 782331

Anno Accademico 2012 – 2013

Sommario

Indice delle Figure	7
Indice delle Tabelle	13
Abstract	15
Introduzione	17
Capitolo 1	19
IL DNA E I METODI DI ESTRAZIONE GENOMICA.....	19
1.1. Il DNA.....	22
1.2. Metodi di Estrazione del DNA	23
1.2.1. Solventi Organici	25
1.2.2. Assorbimento alla silice.....	26
1.2.3. Kit di estrazione rapida.....	28
1.3. Valutazione della qualità e della quantità del DNA estratto.....	29
1.3.1. Real Time PCR.....	29
1.3.2. Spettrofotometria	34
1.4. Lab-on-Chip	36
1.5. Estrattori automatici per acidi nucleici: stato dell'arte.....	40
1.5.1. QIAcube QIAGEN	42
1.5.2. Maxwell System 16, Promega	43
1.5.3. Macchinari a <i>throughput</i> elevato.....	44
1.5.4. Macchinari polifunzionali	45
1.6. Scelta metodo di estrazione per il sistema automatico.....	46
Capitolo 2	49
SISTEMA PER ESTRAZIONI AUTOMATICHE.....	49
2.1. Panoramica dello strumento per estrazione automatizzata di DNA	51
2.2. Dispositivo microfluidico e riscaldatore	55
2.2.1. La fluidica del dispositivo	55
2.2.2. Chip termico	56
2.2.3. Elettronica del chip termico	58
2.2.3.1. Calibrazione del chip e controllo della temperatura.....	58
2.2.4. Realizzazione della cartuccia per estrazione.....	62
2.3. Fluidica	63
2.3.1. Pompa piezoelettrica	64
2.3.1.1. Controllo della Pompa.....	67

2.3.1.2. Caratterizzazione della Pompa	70
2.3.2. Valvole a solenoide.....	73
2.3.3. Tubi e connettori	76
2.4. Il motore	77
2.4.1. I motori passo-passo.....	79
2.4.2. Sistema di pilotaggio del motore.....	82
2.5. Fotosensori	83
2.5.1. Fotosensori per il controllo del motore.....	85
2.5.2. Fotosensori per il monitoraggio del riempimento della cartuccia	87
2.6. Microcontrollore.....	91
2.6.1. Il microcontrollore STM32F103	94
Capitolo 3.....	97
PROTOCOLLO PER ESTRAZIONI AUTOMATICHE CON MICROBIGLIE MAGNETICHE	97
3.1. MagneSil ONE, Fixed Yeld Blood Genomic System.....	99
3.2. Studio del protocollo di reazione per il sistema di estrazione automatica	101
3.3. Software per lo strumento di estrazione automatica	105
3.3.1. Software per la gestione semi-automatica sistema di estrazione.....	108
3.3.2. Software per la gestione autonoma dello sistema di estrazione	114
Capitolo 4.....	125
RISULTATI E ANALISI DEI DATI	125
4.1. Studio preliminare del kit di estrazione Promega e analisi di fattibilità	126
4.2. Analisi di fattibilità: estrazioni con il sistema automatico.....	128
4.3. Analisi con alcol	131
4.4. Estrazioni con microbiglie idratate o disidratate.....	133
4.5. Protocollo ottimizzato per estrazioni automatiche.....	134
4.6. Quantificazione del DNA estratto con il sistema automatico	137
4.7. Prove di RT-PCR nel Q3.....	140
Capitolo 5.....	143
CONCLUSIONI E FUTURI SVILUPPI	143
5.1. Futuri sviluppi	147
Appendice 1.....	151
SCHEMI CIRCUITALI PER LA SCHEDA ELETTRONICA	151
Appendice 2.....	157
SOFTWARE PER ESTRAZIONI GENOMICHE AUTOMATIZZATE	157
Bibliografia.....	161

Indice delle Figure

Figura 1 Struttura elicoidale della molecola DNA e basi azotate (A, T, G, C).....	22
Figura 2 Metodo di estrazione di acidi nucleici con miscela di fenolo: cloroformio: alcol isoamilico (25: 24: 1)x.....	26
Figura 3 Andamento dell'amplificazione del DNA: ad ogni ciclo della reazione si raddoppia il numero di copie di DNA disponibili:	30
Figura 4: Curva caratteristica della <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> , con il numero dei cicli sulle ascisse e la fluorescenza sulle ordinate; controllo positivo e controllo negativo	31
Figura 5 Soglia e ciclo soglia sul grafico della RT- PCR. Più il ciclo soglia è altro, minore è la concentrazione di DNA nel campione di partenza: il campione 1 (BLU) è più concentrato del campione 2 (VIOLA)	32
Figura 6 Esempio di RT – PCR con un campione privo di inibitori (VERDE) e un campione che contiene degli inibitori (ROSSO)	33
Figura 7 Schema di funzionamento dello spettrofotometro	34
Figura 8 Sistema Quiacube per l'estrazione automatica di acidi nucleici e proteine da materiale organico	42
Figura 9 Sistema Quiacube, particolare. Si vedono le provette all'interno della centrifuga, con il meccanismo di pipettaggio automatico	43
Figura 10 (sinistra) Sistema Maxwell 16 realizzato da Promega	44
Figura 11 (destra) Sistema Maxwell 16, particolare. Le 16 cartucce sono posizionate sul supporto. Un puntale metallico	44
Figura 12 schema di funzionamento del robot Genesis Tecan	45
Figura 13 Scheda elettronico per il controllo e la gestione dello strumento di estrazione automatica	51

Figura 14 Schema del percorso dei fluidi all'interno dello strumento di estrazione. I campi evidenziati in verde sono quelli che richiedono un controllo elettronico	53
Figura 15 Cad dello strumento per estrazione automatica di DNA	54
Figura 16 Maxwell 16 e prototipo dello strumento per estrazioni realizzato nell'ambito del progetto di tesi	54
Figura 17 Chip termico	57
Figura 18 Chip termico alloggiato all'interno della cartuccia di estrazione	58
Figura 19 Schema illustrativo del sistema di calibrazione del chip e di acquisizione della temperatura	60
Figura 20 La corrente erogata dal generatore viene ricavata come retta passante per i due punti individuati sul grafico tensione vs resistenza	60
Figura 21 Cartucce per estrazione di materiale genomico con il sistema automatico in via di sviluppo; sono state realizzate con la fresa (sinistra) e con la stampante 3D (destra)	63
Figura 22 Strumetno di estrazione automatica	64
Figura 23 Pompa piezoelettrica mp6 (Bartels Mikrotechnik)	64
Figura 24 Proiezioni e misure della pompa mp6	65
Figura 25 Spaccato della pompa mp6. Si possono vedere le membrane attive (piezo) e passive (PPSU) all'interno del package, con anche le connessioni per pilotare la pompa	66
Figura 26 Schema di funzionamento del circuito di step up. Durante la ON phase il l'interruttore attivo S è chiuso, mentre in OFF è aperto. La tensione di uscita rimane costante, a meno di un'oscillazione attorno al valor medio	67
Figura 27 Funzionamento del transistore S nel tempo. T è il periodo dell'interruttore, mentre il duty cycle D corrisponde al tempo in cui il MOSFET è conduttivo	68
Figura 28 Schema di funzionamento con controllo in anello chiuso della pompa	68
Figura 29 L'oscilloscopio misura l'onda quadra forzata sull'ingresso della pompa	69
Figura 30 Sistema di caratterizzazione della pompa mp6	71

Figura 31 Caratteristica del flusso della pompa al variare di tensione e frequenza	72
Figura 32 Schema di funzionamento delle valvole della Dolomite.....	75
Figura 33 Valvole a solenoide (Dolomite)	75
Figura 34 Elettrovalvole montate sul supporto plastico, viste rispettivamente da sotto e da sopra	76
Figura 35 Motore passo-passo e ingranaggi per la movimentazione delle microbiglie all'interno della cartuccia di estrazione	78
Figura 36 proiezioni del carrello in grado di muoversi lungo la vite senza fine montata sull'albero del motore	78
Figura 37 particolare dell'ingranaggio del motore, carrello montato sulla vite senza fine	78
Figura 38 Schema di uno stepper motor bioplare. All'esterno è situato lo statore, con due coppie di poli e due fasi; all'interno c'è il rotore, che segue il campo magnetico che si genera quando le fasi vengono alimentate	79
Figura 39 1.8' High Torque Stepper Motor, motore passo-passo con funzionamento a riluttanza variabile	81
Figura 40 Grafico della caratteristica coppia (N*cm) vs velocità (pps, <i>pulse per second</i>) dello motore passo-passo.....	81
Figura 41 Schema logico di un fotosensore	83
Figura 42 Fotosensore Kingbright KRB011 per il controllo della posizione del motore.....	85
Figura 43 Schema circuitale del fotosensore	86
Figura 44 Carrello del motore	86
Figura 45 Fotosensore TCRT1000, per rilevare il riempimento	88
Figura 46 Schema di funzionamento del fotosensore	88
Figura 47 Tensioni misurate all'uscita del fotosensore in corrispondenza dei diversi riempimenti del tubo a valle della cartuccia di estrazione	90
Figura 48 Microcontrollore STM32F103 RET6	94

Figura 49 Schema dei pin del microcontrollore STM32F103 RET6. Il μ C consta di tre gruppi di GPIO. In rosso sono evidenziati i 16 piedini del banco A, in verde quelli del banco B e in blu quelli del banco C.....	95
Figura 50: Kit Promega <i>MagneSil ONE, Fixed Yeld Blood Genomic System</i> per estrazione di DNA da sangue. Da sinistra ci sono il flacone di Alcol, quello di Magnesis PMPs, il buffer di lisi e il buffer di eluizione. In basso, la provetta di anticoagulante.....	100
Figura 51 Interfaccia grafica del software per la estrazioni in modalità semi-automatica. In alto a sinistra c'è la sezione riservata alle valvole, di fianco si trovano in ordine quella del timer e quella della pompa. Nella parte inferiore della schermata ci sono i controlli per lo stepper motor e per il riscaldatore	110
Figura 52 Diagramma di flusso con il controllo della fase di calibrazione del chip termico integrato nella cartuccia di estrazione. Il processo si realizza in tre passaggi. Il primo è la calibrazione per determinare la corrente erogata del generatore sulla scheda elettronica; seguono la verifica del valore della resistenza del riscaldatore e la calibrazione del chip	114
Figura 53 Traccia del protocollo (*.txt) con i parametri e le istruzioni che definiscono il processo di estrazione automatica	116
Figura 54 Pagina iniziale del software per estrazioni totalmente automatiche; in basso, la finestra che permette di selezionare un protocollo di estrazione tra quelli già esistenti.....	118
Figura 55 Software per estrazioni totalmente automatizzate; finestra per la creazione di un nuovo protocollo di estrazione del DNA.....	119
Figura 56: Diagramma di flusso esemplificativo del funzionamento del processo di lavaggio con il buffer di lisi.	120
Figura 57 Diagramma di flusso della funzione Main del software	121
Figura 58 Esempio dell'andamento del protocollo di estrazione completo, nel quale si susseguono tutte le fasi necessarie per ottenere il DNA purificato al termine del processo.....	123

Figura 59 confronto tra curve di PCR relative a due campioni di DNA, estratti manualmente con due diversi protocolli (diluizioni 1:1)	128
Figura 60 Curve di RT-PCR, con DNA estratto manualmente su due diversi supporti: in verde le estrazioni eseguite in provetta e in rosso quelle nella cartuccia	129
Figura 61 Curve di RT-PCR, con diluizioni di DNA isolato nella cartuccia mediante lo strumento di estrazione automatica.....	130
Figura 62 Curve di RT-PCR, zoom	130
Figura 63 Curve di RT-PCR, DNA sintetico diluito con alcol di lavaggio	132
Figura 64 Curve di RT-PCR di DNA con alcol, zoom	132
Figura 65 Cicli soglia di PCR relativi agli esperimenti per individuare la risorsa scarsa nel mix di estrazione. Protocollo Promega (45 µl sangue + 10 µl MagneSil) vs protocollo modificato	135
Figura 66 Rappresentazione grafica dei CT	137
Figura 67 Curve di PCR con l'eluato di P2	139
Figura 68 Grafico semi-logaritmico dei cicli soglia di P2 in funzione del logaritmo della concentrazione; è possibile apprezzare l'andamento lineare dei CT	139
Figura 69 Curve di PCR relative alle analisi con il Q3	141

Indice delle Tabelle

Tabella 1 Risultati sintetici delle prove di caratterizzazione della pompa.....	73
Tabella 2 La tabella riporta i dati con l'andamento del flusso al variare dei vari parametri e con i coefficienti di linearità.....	73
Tabella 3 Tensioni rilevate dal sensore ottico al variare dei fluidi presenti all'interno del tubo a valle della cartuccia	90
Tabella 4 Differenza tra le tensioni alle diverse condizioni di riempimento	90
Tabella 5 Parametri per definire il funzionamento dei dispositivi. Sono anche indicati i limiti superiori e inferiori che non devono essere oltrepassati per il corretto funzionamento di ciascuno dei dispositivi.....	109
Tabella 6 Operazioni attuabili dallo strumento, con il relativo codice identificativo e i dispositivi coinvolti per portare a termine ciascuna operazione.....	117
Tabella 7 Dati relativi alle prove di PCR di diverse diluizioni dei DNA isolati manualmente con due diversi protocolli di estrazione	127
Tabella 8 Cicli soglia delle dei campioni estratti in provetta e nella cartuccia ...	129
Tabella 9 Cicli soglia di PCR relative a 4 diluizioni dello stesso eluato, ottenuto da estrazione da sangue nel lo strumento automatico	131
Tabella 10 Cicli soglia di PCR relative a prove di diluizioni del DNA col alcol di lavaggio del kit Promega	133
Tabella 11 Cicli soglia di PCR relative a prove di estrazione con microsfere alla silice disidratate o in soluzione	133
Tabella 12 Cicli soglia di PCR relativi agli esperimenti per individuare la risorsa scarsa nel mix di estrazione. Protocollo Promega (45 µl sangue + 10 µl MagneSil) vs protocollo modificato	135
Tabella 13 Cicli soglia di PCR condotte su campioni di DNA estratti con due diversi protocolli: uno richiede 45 µl di sangue e 10 µl di Magnesil, mentre per il secondo ne occorrono rispettivamente 60 e 20 µl.....	136

Tabella 14 Risultati delle analisi di PCR per la quantificazione del DNA estratto; i dati riportati in azzurro sono stati esclusi dalle analisi	138
Tabella 15 Misure spettrofotometriche del DNA ricavato con il protocollo standard consigliato dal kit Promega e con il protocollo ottimizzato per estrazioni col sistema automatico.....	140
Tabella 16 Confronto tra protocollo di estrazione Promega e protocollo per la procedura ottimizzata per il nostro strumento.....	146

Abstract

Obiettivo del presente lavoro di tesi è stato la realizzazione e lo sviluppo di un sistema per l'estrazione automatica di DNA a partire da campione di sangue umano.

La preparazione di materiale genomico è di particolare attualità nel panorama scientifico-tecnologico: qualunque indagine genetica richiede DNA purificato. Per soddisfare la crescente capacità di svolgere analisi biologiche in tempi brevi, sono nati diversi strumenti per estrazioni automatiche, che riducono tempi e costi. Il sistema sviluppato nasce per rispondere alle esigenze delle strutture che non necessitano di purificare quotidianamente enormi quantitativi di DNA.

Il funzionamento dello strumento si basa sull'impiego di un kit per estrazione con microbiglie di silice (*Promega MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System*), tecnologia che meglio si presta alla miniaturizzazione e automazione.

La reazione di estrazione avviene su *Lab-on-Chip* monouso [1], dotato di un chip termico e di canali microfluidici. Lo strumento è compatto e comprende tutti i componenti elettronici, fluidici e meccanici necessari per portare a termine l'estrazione di DNA.

I componenti hardware sono gestiti tramite un'apposita scheda elettronica. Il software consente di controllare lo strumento da PC e impostare il protocollo di reazione: quando l'utente ha posizionato la cartuccia nello strumento, la reazione di estrazione procede in totale autonomia.

La valutazione delle prestazioni del sistema è stata fatta analizzando la qualità e la quantità del DNA estratto. È stato sviluppato ed ottimizzato un protocollo specifico per estrarre DNA con il sistema automatico, che ha consentito di

purificare efficacemente materiale genomico da sangue, con resa e purezza sufficienti per sottoporre il campione a *Real Time* PCR.

Al fine di ottenere risultati paragonabili ai sistemi di estrazione attualmente in commercio, saranno necessari ulteriori sviluppi ed ottimizzazioni dello strumento realizzato.

Introduzione

Con l'avvento delle nuove tecnologie e di tecniche di fabbricazione sempre più precise, negli ultimi dieci anni la ricerca in ambito biomedico ha intrapreso la strada dei *Lab-on-Chip*: dispositivi miniaturizzati in grado di trattare e analizzare campioni biologici, che rendono svariate funzioni di laboratorio disponibili su di un chip [1].

Grazie alla miniaturizzazione dei dispositivi elettronici e alla possibilità di integrare su di un unico chip tecnologie MEMS e microfluidiche [2], le dimensioni di attuatori e dispositivi diventano compatibili con quelle dell'apparato di controllo, permettendo la realizzazione di sistemi compatti per l'analisi e chimica e biologica.

Si apre così l'affascinante prospettiva di replicare avanzate analisi da laboratorio su strumenti pratici e monouso, con funzionamento interamente automatizzato. Il vantaggio è quello di creare dispositivi più economici e compatti, quindi facilmente presenti in strutture mediche, chimiche o aziendali di piccole dimensioni. Le analisi potranno essere eseguite *in loco*, con conseguenti riduzioni delle spese in termini di denaro, tempi d'attesa e impiego di personale specializzato tipico dei centri di analisi specializzati.

Il presente lavoro di tesi si colloca all'interno di questo panorama scientifico, nell'ambito della preparazione dei campioni biologici: in particolare il progetto riguarda l'estrazione automatica di DNA da sangue umano. L'isolamento degli acidi nucleici dai tessuti organici è un passaggio obbligato per condurre qualsiasi analisi genomica [3]: è dunque essenziale che tale operazione venga svolta con accuratezza, per non interdire le successive indagini a cui dovrà essere sottoposto il DNA.

La tecnica scelta per l'isolamento degli acidi nucleici si basa sull'assorbimento alla silice del materiale genomico [4], [5]. Il sistema sfrutta l'idea di Lab-on-Chip: la vera e propria reazione di estrazione deve avvenire all'interno di un supporto monouso.

Nella fase iniziale del progetto, è stata necessaria un'analisi a livello biologico per verificare la fattibilità della preparazione dei campioni all'interno di una cartuccia appositamente realizzata. La cartuccia è profondamente diversa dai tradizionali supporti per estrazione, dunque è essenziale controllare che l'estrazione venga portata a termine in modo corretto ed efficace.

Dopo lo studio del processo di estrazione manuale, la preparazione dei campioni organici è stata eseguita mediante il sistema automatico in via di realizzazione. Lo strumento è in grado di portare a termine le estrazioni di DNA in modo totalmente autonomo. La combinazione di elementi elettronici, fluidici e meccanici consente di svolgere tutti i passaggi per l'isolamento e la purificazione del DNA a partire da un campione di sangue. Una scheda elettronica appositamente realizzata controlla tutti i dispositivi integrati nel sistema e un software di semplice utilizzo ne consente la gestione da PC.

Di pari passo allo sviluppo del sistema, è stata condotta una prima indagine per la validazione di un nuovo protocollo di reazione, ottimizzato in base al funzionamento del nostro sistema di estrazione automatica.

Capitolo 1

IL DNA E I METODI DI ESTRAZIONE GENOMICA

La vita dipende dalla capacità delle cellule di immagazzinare, recuperare e tradurre istruzioni necessarie per generare e mantenere un organismo vivente. Le cellule non sono strutture immortali, alcune popolazioni cellulari vivono solo per qualche settimana. Tuttavia le informazioni contenute al loro interno permangono grazie al processo di riproduzione cellulare, che avviene miliardi di volte nel corso dell'esistenza di un individuo. Le informazioni sono immagazzinate all'interno dei geni, elementi capaci di contenere i dati che determinano le caratteristiche di una specie nel suo complesso e dell'individuo nella sua singolarità [6].

Le prime scoperte di una certa rilevanza per la comunità scientifica in ambito genetico si riconducono a Mendel, che nella prima metà dell'Ottocento ipotizzò per primo la teoria dell'ereditarietà dei caratteri, e in seguito a numerose prove sperimentali giunte all'elaborazione delle 3 leggi fondamentali della genetica [7]; sulla base di queste prime ipotesi, in seguito verificate per mezzo di studi più approfonditi e mezzi più sofisticati, le indagini in ambito genetico hanno portato ad una conoscenza sempre più approfondita del DNA. A James Watson e Francis Crick si deve la scoperta della struttura del DNA nel 1953 [8]. Al loro lavoro sono seguiti 50 anni di ricerche e scoperte sia per quanto riguarda le caratteristiche che le funzionalità dei geni, fino ad arrivare nel 2000 al Progetto Genoma Umano [9], [10], che per primo ha sequenziato il DNA dell'uomo nella sua interezza. L'esplosione di informazioni in possesso della scienza dal 2000 in poi è indiscussa: da quel momento gran parte del lavoro è stato – ed è ancora oggi- finalizzato alla comprensione del DNA come “libretto delle istruzioni” della biologia umana. Le

conoscenze sul genoma dell'uomo hanno permesso di comprendere alcuni dei complessi processi biochimici che controllano il normale sviluppo dell'organismo e l'omeostasi biologica.

Gli studi genetici hanno un forte impatto applicativo in ambito clinico [11]: consentono di studiare la progressione delle malattie all'interno del corpo umano, la predisposizione ereditaria ad alcune patologie e la risposta dei singoli individui ai principi attivi farmacologici. L'identificazione di alcuni geni all'interno della catena di DNA e la rilevazione della presenza di mutazioni del patrimonio genetico permettono di conoscere importanti informazioni sulla risposta metabolica all'assunzione di cibi e bevande; o ancora, l'interazione dell'organismo con fattori allergenici può essere indagata con maggior precisione. Inoltre, dal momento che i virus, batteri e funghi hanno un genoma proprio, grazie alle metodiche sviluppate è possibile non solo individuare gli agenti patogeni virali che contaminano un campione biologico, ma anche studiare e sintetizzare soluzioni genetiche per contrastare la loro azione. L'abilità di conoscere e comprendere i segreti della genetica aumenta nel tempo man mano che cresce il numero di informazioni in nostro possesso. Il sapere acquisito non solo permette applicazioni d'avanguardia, ma spesso pone ulteriori interrogativi, che indirizzano il mondo scientifico a formulare nuove indagini ed ipotesi [12].

Le potenzialità derivanti dalle approfondite conoscenze genomiche sono infinite, e trovano un'applicazione pratica non solo nell'ambito strettamente medico e farmaceutico, ma anche in campo agricolo [13] e forense [14], [15], [3].

L'enorme quantità di informazioni e istruzioni per il funzionamento di un organismo è contenuta nel DNA. Insieme all'RNA, il DNA è un acido nucleico presente in ogni singola cellula degli esseri viventi, all'interno del quale sono codificate le caratteristiche fisiologiche e strutturali dell'individuo.

L'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici sono alla base di qualsiasi indagine genomica [16]: avendo a disposizione un qualsiasi campione biologico

(sangue, tessuto, etc.) bisogna in qualche modo “scomporlo” per estrarre il DNA racchiuso all’interno del nucleo cellulare. Per ottenere risultati ottimali in un’indagine genetica, occorre una buona purificazione del DNA estratto. Bisogna conoscere la quantità e la qualità del DNA ottenuto: un campione non abbastanza puro potrebbe pregiudicare le analisi seguenti [3].

In questa fase di estrazione del DNA, devono essere rimossi dal materiale biologico quegli agenti chimici e organici in grado di inibire o alterare le reazioni seguenti a cui si vuole sottoporre il DNA. Tra i possibili contaminanti del prodotto di estrazione ci sono i residui organici: ad esempio, proteine che impaccano e proteggono gli acidi nucleici, o enzimi come le DNasi che causano un’eccessiva frammentazione del DNA e lo rendono inutilizzabile; anche i sali e i detergenti sono considerati degli inibitori [3], [17].

Ad oggi esistono diverse metodiche di estrazione del DNA da materiale biologico. Alle tecniche tradizionali -molto efficienti, che però richiedono una serie di complesse elaborazioni successive- si affiancano numerosi preparati in grado di isolare il DNA in un singolo passaggio, a discapito naturalmente del grado di purificazione dell’acido nucleico. Sarà necessario scegliere di volta in volta il miglior compromesso tra praticità e qualità dell’estrazione, valutando sia il campione di partenza che le analisi a cui si vuole sottoporre il DNA. Ad esempio, il grado di purezza richiesto da un’analisi come la rilevazione virale -che implica un’elevata sensibilità per individuare agenti patogeni di cui non è nota a priori la presenza né la concentrazione- sarà maggiore di quello necessario per semplici discriminazioni alleliche.

Questa tesi ha come obiettivo lo studio e la realizzazione di uno strumento per l’estrazione automatica del DNA da sangue umano. Per realizzarlo è stata messa a punto una tecnica basata sull’utilizzo di microbiglie magnetiche rivestite di silice. La valutazione delle prestazioni dello strumento sarà effettuata tramite la misura della quantità e della purezza del DNA isolato. I metodi scelti per stimare le qualità dell’eluato sono la misura di assorbimento mediante spettrofotometro

[18], [19], [20] e la *Real Time – Polymerase Chain Reaction* [21]. Il loro funzionamento sarà brevemente illustrato nel corso di questo capitolo .

1.1. Il DNA

Il DNA –o Acido Desossiribonucleico- contiene l'informazione sul patrimonio genetico di ogni essere vivente; nelle cellule eucariote, la maggior parte del DNA è situata all'interno del nucleo.

Una molecola di DNA consta di due lunghe catene polinucleotidiche che si dispongono a doppia elica: ogni filamento è costituito da una serie di subunità, le basi azotate (Figura 1). Il DNA contiene la codifica, scritta secondo il codice genetico, di tutte le informazioni e le istruzioni per la sintesi degli amminoacidi, e quindi delle proteine. La specificità, lo sviluppo e il funzionamento dell'organismo in ogni sua parte dipendono unicamente dalla sequenza delle basi azotate del DNA e dalla regolazione della sintesi proteica.

Il codice genetico si basa sulla combinazione delle quattro basi azotate (A-adenina, G-guanina, C-citosina e T-timina), organizzate in triplette. Ciascuna tripletta codifica uno dei 20 amminoacidi esistenti in natura –che servono a formare le proteine. Ogni base è legata ad una molecola di zucchero pentoso (il desossiribosio) e a un gruppo fosfato; l'insieme di questi tre elementi costituisce un nucleotide.

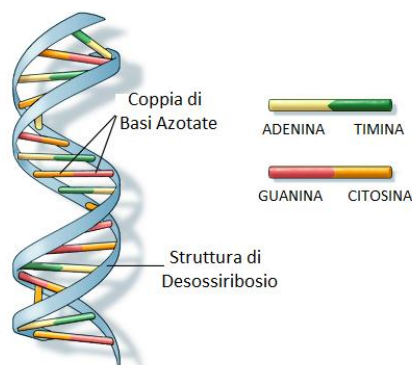


Figura 1 Struttura elicoidale della molecola DNA e basi azotate (A, T, G, C)

I nucleotidi sono le unità fondamentali del DNA; sono connessi tra di loro mediante legami covalenti in modo da formare una lunga catena. I due filamenti

di DNA si trovano per la maggior parte del tempo appaiati; le combinazioni tra le basi delle due catene sono fisse (A e T, C e G), possono saldarsi fra loro solo catene complementari. Il vincolo che si stabilisce tra i nucleotidi dei filamenti che si specchiano è un legame idrogeno.

La struttura del DNA venne identificata nel 1953, quando Watson e Crick presentarono al mondo scientifico il modello a doppia elica [8]. L'osservazione che il DNA era formato da due filamenti appaiati e complementari fu fondamentale: apparvero da subito chiare grandi potenzialità di questa struttura dal punto di vista della codifica e della replica dell'informazione. La conformazione genomica è predisposta a trasmettere con precisione l'informazione biologica che è codificata nell'ordine delle basi azotate. Quando un'informazione deve essere copiata, la catena di DNA si apre e i nucleotidi liberi nel nucleo si legano al DNA dove trovano la base azotata complementare, in modo da creare un nuovo filamento. Per garantire l'integrità del patrimonio genetico non è sufficiente il fine sistema di replicazione e copiatura del DNA: nella cellula esistono dei veri e propri meccanismi per la correzione e la riparazione dei filamenti, in modo che la probabilità di errore sia circa 10^{-9} [8].

1.2. Metodi di Estrazione del DNA

Esistono vari metodi per l'estrazione degli acidi nucleici dalle cellule, che differiscono tra loro per complessità, tempo necessario e resa finale. Ogni volta si dovrà scegliere una tra le tecniche, in base al campione biologico di partenza (sangue, tessuto, saliva, etc.) e dal tipo di acido nucleico d'interesse (DNA o RNA). Sarà inoltre necessario tener conto della qualità del DNA richiesta dalle analisi a valle dell'estrazione, sia in termini di purezza che di volume ottenuto.

Il DNA assume una forma allungata e sottile: la lunghezza dei cromosomi varia tra le 50 e le 70 Megabasi [6]. Data la fragilità e l'elevata sensibilità agli stress meccanici della molecola, allo stato attuale dell'arte non è possibile recuperarla senza romperla o danneggiarla. Normalmente però è sufficiente che durante il

processo di isolamento del DNA i frammenti rimangano nell'ordine di grandezza di 50-100 Kilobasi per essere in grado di effettuare le successive analisi.

Tutte le tecniche di estrazione si articolano in tre fasi:

Lisi cellulare

Consiste nella rottura delle membrane della cellula e del nucleo. Quest'operazione –che può essere di natura chimica o meccanica- è di solito combinata con un'azione enzimatica, che rende più efficace la lisi. Enzimi come la Proteinasi K sono infatti in grado di degradare le proteine di membrana e le nucleasi. Questa fase deve essere abbastanza aggressiva da distruggere le membrane e allo stesso tempo delicata, così da non danneggiare eccessivamente gli acidi nucleici stessi.

Deproteinizzazione del campione lisato

Dopo la rottura delle membrane cellulari, si ottiene una miscela costituita da varie componenti cellulari -DNA, RNA, lipidi, carboidrati, proteine. La rimozione delle proteine dal lisato è un passaggio particolarmente importante: la cellula contiene diversi elementi che se non vengono eliminati sono in grado di degradare gli acidi nucleici e di interferire con le reazioni successive. Alcuni enzimi tendono infatti a frammentare e disgregare il DNA, mentre altre proteine, legandosi alle catene di nucleotidi, possono inibire i trattamenti a valle.

Isolamento e risospensione dell'acido nucleico

Una volta eliminati tutti gli elementi dannosi per gli acidi nucleici e per le analisi successive, al DNA estratto viene addizionato un buffer di eluizione e il processo è terminato. La soluzione finale può essere conservata a +4 °C per tempi brevi o a -20 °C per periodi più prolungati.

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, il DNA isolato viene valutato in base a due fattori: la resa e la purezza. Con resa si intende semplicemente la quantità di DNA ricavata dal campione organico di partenza. Il

requisito della purezza implica l'assenza di sostanze contaminanti, che potrebbero modificare i risultati del sequenziamento, della PCR e di qualsiasi altra indagine a cui si voglia sottoporre il DNA ricavato.

Andiamo ora a illustrare brevemente le modalità di estrazione, ponendo fin da ora una particolare attenzione agli aspetti utili al fine dell'automatizzazione del processo e dunque della realizzazione del sistema robotizzato per la preparazione dei campioni. Le grandi famiglie in cui si possono suddividere le tecniche di estrazione sono tre: si basano rispettivamente sull'impiego di solventi organici, membrane alla silice o kit per l'estrazione rapida.

1.2.1. Solventi Organici

L'estrazione mediante solventi organici è un metodo di estrazione tradizionale: prevede l'impiego di fenolo (C_6H_5OH) e cloroformio ($CHCl_3$) e permette di ottenere un DNA altamente purificato [22]. Si procede innanzitutto con la lisi di globuli rossi e leucociti tramite citrato di sodio; segue la digestione del materiale proteico e lipidico (proteinasasi K, SDS). Il DNA in soluzione viene isolato tramite una miscela di fenolo, cloroformio e alcol isoamilico. Dopo qualche minuto di centrifugazione, la miscela all'interno della provetta si separa in tre fasi: nello strato inferiore rimangono gli elementi più pesanti, come lipidi ed estratti cellulari. Le proteine si dispongono a metà altezza, mentre gli acidi nucleici - immersi in soluzione acquosa - possono essere prelevati dalla zona superficiale ed essere depositati in una provetta sterile. Aggiungendo alcol etilico o isopropanolo alla soluzione contenente DNA, gli acidi nucleici precipitano e possono essere recuperati in forma solida. L'ultimo passaggio del protocollo di estrazione consiste in un lavaggio dell'estratto con etanolo per eliminare i sali in eccesso; l'etanolo deve poi essere rimosso completamente, di solito tramite evaporazione. Il DNA purificato può essere poi risospeso in H_2O [4] (Figura 2).



Figura 2 Metodo di estrazione di acidi nucleici con miscela di fenolo: cloroformio: alcol isoamilico (25: 24: 1)x

Questa tecnica di estrazione risulta molto efficiente e ha bisogno di quantità minime di campione: sono sufficienti tracce di materiale biologico per essere in grado di isolare il DNA. I solventi organici però presentano lo svantaggio di essere tossici ed irritanti. Ciò che più ostacola l'automatizzazione di un processo basato sul fenolo-cloroformio è che si tratta di un procedimento lungo, che richiede di sottoporre il campione organico a trattamenti numerosi e talmente accurati da richiedere un intervento umano.

1.2.2. Assorbimento alla silice

La silice è un composto del silicio (SiO_2 , diossido di silicio). Si tratta di una resina molto affine agli acidi nucleici, che ha il vantaggio di non legare molte sostanze contaminanti presenti nei campioni biologici o nei buffer per la lisi cellulare. Proteine, enzimi, fenolo e cloroformio vengono respinti dalla silice e rimangono liberi in soluzione, mentre il DNA resta intrappolato nelle porosità del materiale.

La prerogativa delle tecniche basate sull'assorbimento alla silice è quella di ridurre il numero di passaggi della reazione: la procedura di estrazione è intrinsecamente già associata ad una purificazione degli acidi nucleici stessi.

La prima fase delle estrazioni mediante silice consiste necessariamente in una lisi cellulare, eseguita mediante soluzione; dal momento che non avviene alcun processo meccanico è possibile ricavare un'elevata quantità di acidi nucleici ad alto peso molecolare. Solitamente viene effettuato più di un lavaggio con il

buffer di lisi, in modo da disgregare al meglio le strutture cellulari e legare tutto il DNA alla matrice di SiO₂.

Una volta che il DNA è vincolato alla silice, si eseguono ripetuti lavaggi con alcol per eliminare completamente i componenti organici indesiderati e gli scarti dell'estrazione. Il numero di risciacqui deve essere ottimizzato in modo da garantire un trade off soddisfacente tra la purezza e la quantità di DNA estratto. L'alcol di lavaggio –a base di etanolo- deve poi essere rimosso completamente. Al termine del processo, gli acidi nucleici vengono separati dalla matrice di silice immergendo la matrice stessa in un buffer di eluizione ad alta affinità per gli acidi nucleici. Eventuali tracce di SiO₂ presenti nell'estratto finale non inibiscono le reazioni enzimatiche a valle.

Esistono diverse modalità di impiego della silice per estrazione. I kit in commercio sono fondamentalmente di due tipi, riportati di seguito; sono indicate anche alcune case produttrici di ciascun formato di silice a titolo di esempio:

Membrane (Qiagen) o colonnine (Eppendorf) di silice

Il campione lisato viene spinto su una matrice di silice e gli acidi nucleici rimangono legati ad essa. I reagenti vengono fatti passare attraverso il materiale grazie all'impiego di una centrifuga o di una pompa a vuoto, in modo da lavare via tutti gli scarti organici e i fattori inibitori.

Microbiglie magnetiche rivestite di silice (Promega)

La silice riveste la superficie di microscopiche particelle sferiche, caratterizzate da nucleo ferroso al loro interno. Esse vengono agitate all'interno del lisato cellulare, in modo che catturino il DNA presente in soluzione. La silice viene sottoposta a lavaggi ripetuti, come avviene nel caso delle membrane o delle colonnine. Un magnete permette di trattenere le biglie durante i lavaggi, in modo che esse non vengano eliminate insieme agli scarti di reazione– e il DNA con loro.

1.2.3. Kit di estrazione rapida

Già a partire dagli anni Novanta, sono state sviluppate soluzioni volte all'estrazione di DNA in un solo passaggio. Questi preparati, semplicemente addizionati al campione biologico di partenza, sono in grado di realizzare un'estrazione completa, rendendo il DNA pronto per le analisi successive.

Uno tra i primi metodi impiegati si basa sull'utilizzo di un reagente contenente guanidina tiocianato e fenolo [23]. Il campione biologico doveva essere addizionato al reagente e l'isolamento di DNA avveniva in un unico passaggio; il tempo necessario per l'estrazione era di circa tre ore.

Ad oggi esistono preparati molto più efficienti, sia in termini di efficienza che di tempo richiesto. Un esempio è il kit TaqMan *Sample-to-SNP* della Life Technologies [24]. Questo prodotto assicura estrazioni genomiche di ottima qualità: come dichiara il nome del prodotto, permette di passare dal campione grezzo (*Sample*) a un eluato pronto per essere sottoposto a una reazione per identificare mutazioni a livello di singolo nucleotide (*SNP, Single Nucleotide Polymorphism*). Il kit è in grado di ricavare DNA da una vasta gamma di elementi organici, che vanno da sangue a campioni buccali a tessuti vegetali. Il tempo necessario per l'estrazione è di soli cinque minuti. Le impurità non vengono rimosse dalla soluzione, ma semplicemente neutralizzate in modo da impedire che alterino il DNA e le sue proprietà durante le analisi successive.

La criticità maggiore degli estratti ottenuti col kit TaqMan *Sample-to-SNP* e preparati affini consiste nell'opacità dell'eluato finale. Gli scarti cellulari non vengono separati dal DNA, la soluzione rimane scura: questo può rendere difficoltosa la lettura ottica del segnale di fluorescenza durante la *Real-Time* PCR e rende impossibile qualunque valutazione spettrofotometrica. I kit per l'estrazione rapida degli acidi nucleici, sempre più diffusi sul mercato, vanno via via migliorando grazie alle numerose ricerche in questa direzione.

1.3. Valutazione della qualità e della quantità del DNA estratto

Una volta estratto il DNA da un campione biologico qualsiasi, è interessante valutare le caratteristiche del prodotto che si è ottenuto. La stima della bontà dell'estratto si esprime attraverso due parametri [25]:

- Resa del processo di estrazione, ovvero quantità di acidi nucleici isolata
- Purezza del DNA, cioè assenza di contaminanti organici e di altri fattori di inibizione [17]

La qualità e la quantità dell'estratto sono fattori che incidono in maniera essenziale sull'esito delle analisi a cui si vuole sottoporre il DNA stesso [3]. Esistono tre tecniche diverse per eseguire questa valutazione: la misura spettrofotometrica dell'assorbanza, l'elettroforesi in agarosio e la Real Time-PCR.

Nell'ambito di questo progetto, per valutare il DNA estratto -e quindi le prestazioni dello strumento realizzato- è stata utilizzata principalmente la RT-PCR; nella fase conclusiva del progetto è stato possibile anche effettuare delle misure di assorbanza. I due metodi vengono di seguito brevemente illustrati.

1.3.1. Real Time PCR

La *Polymerase Chain Reaction* non nasce innanzitutto come metodo di valutazione del DNA. La *Polymerase Chain Reaction* è una reazione che permette l'amplificazione esponenziale di sequenze di DNA attraverso una reazione enzimatica ciclica in vitro [26], [27], [28].

Di per sé è un metodo che non fornisce alcuna informazione quantitativa riguardo al DNA contenuto nel campione biologico. Esiste però una variante del processo di PCR, detta Real Time – PCR, che permette di misurare in tempo reale la quantità di DNA ricavata ad ogni ciclo di reazione. La sensibilità che si raggiunge con la RT- PCR è estremamente elevata: è possibile rilevare una quantità di DNA pari a quella contenuta in una singola cellula [29]. La RT- PCR

consente non solo di quantificare con buona precisione il DNA, ma anche di ricavare informazioni relative alla presenza dei contaminanti nell'eluato [21], [30].

Andiamo a esporre brevemente il funzionamento della Polymerase Chain Reaction.

Il campione di DNA viene miscelato con un apposita mix di nucleotidi, enzimi e sequenze target, dette *primers*, che identificano la regione genomica da sottoporre ad amplificazione. Ad ogni ciclo termico della reazione, le due catene che costituiscono il DNA vengono separate e duplicate. In condizioni di processo ottimali, la quantità di DNA prodotto al ciclo n -esimo è 2^n volte la quantità iniziale (Figura 3). Dopo 30 cicli di PCR, le copie di DNA circa 1 miliardo più numerose -nei limiti di efficienza della reazione, che si aggira intorno al 90-100%. Per risalire alla concentrazione di DNA nella soluzione iniziale basta usare la formula (1.1), dove η è l'efficienza di reazione e n è il numero di cicli:

$$[DNA]_n = [DNA]_0 \cdot (1 + \eta)^n \quad (1.1)$$

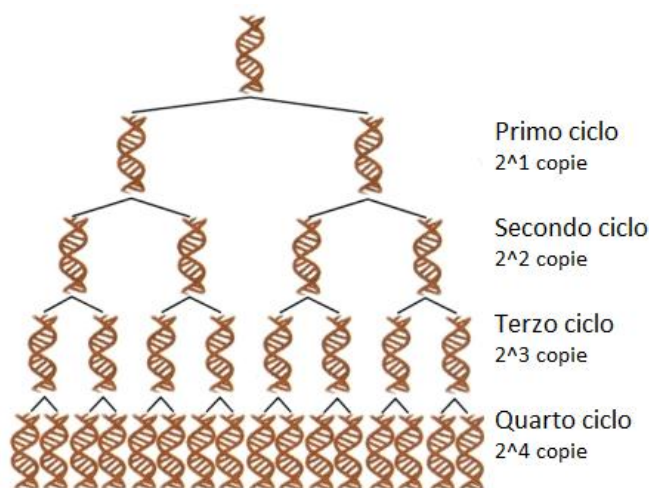


Figura 3 Andamento dell'amplificazione del DNA: ad ogni ciclo della reazione si raddoppia il numero di copie di DNA disponibili:

La valutazione quantitativa del DNA è possibile grazie agli intercalanti (eg. SYBER Green) o ai marcatori fluorescenti (eg. FAM, VIC, NED) presenti in soluzione: misurando il livello di fluorescenza al termine di ogni ciclo termico, si riescono a quantificare molto precisamente gli acidi nucleici.

L'andamento della reazione può essere tracciato su un grafico con il numero di cicli in ascissa e le RFU (*Relative Fluorescence Unit*) in ordinata (Figura 4). Il primo tratto corrisponde alla fase esponenziale, la curva cresce con le potenze di 2 e dipende soltanto dalla quantità di DNA presente in soluzione: minore è la concentrazione iniziale, più ritardato sarà il punto in cui la fluorescenza comincia ad aumentare in modo evidente. Il tratto seguente ha un andamento lineare e da ultimo c'è una fase di plateau, dovuto all'esaurimento progressivo dei reagenti: sia i nucleotidi che gli enzimi DNA Polimerasi possono costituire il fattore limitante.

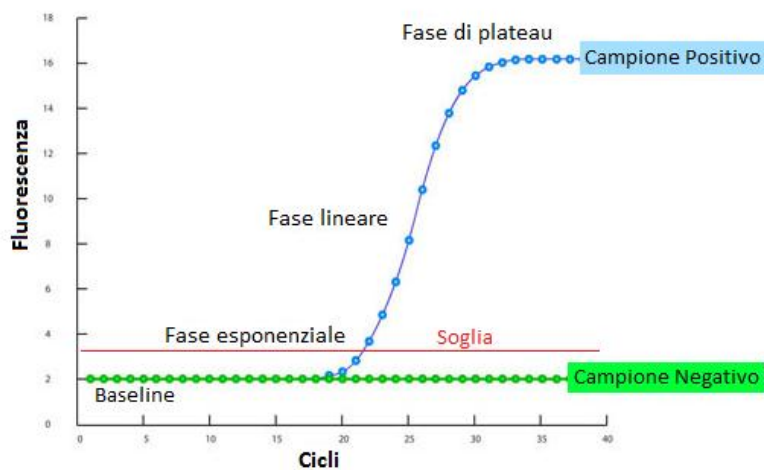


Figura 4: Curva caratteristica della *Real Time Polymerase Chain Reaction*, con il numero dei cicli sulle ascisse e la fluorescenza sulle ordinate; controllo positivo e controllo negativo

In Figura 4 e Figura 5 è evidenziata in rosso la soglia di fluorescenza: fissato un certo valore sull'asse delle RFU, si dice ciclo soglia (CT, *Cycle Threshold*) il ciclo in cui la curva di PCR supera il limite di fluorescenza prestabilito. Il confronto tra il valore di CT di un DNA a concentrazione nota con il CT di un campione a concentrazione ignota, permette di quantificare il DNA incognito [21], [30], [31]. Tipicamente il CT viene posto vicino all'asse delle ascisse, in modo da sfruttare il tratto che segue la caratteristica esponenziale. Nelle nostre analisi è stata scelta una soglia pari al 4% dell'RFU massima.

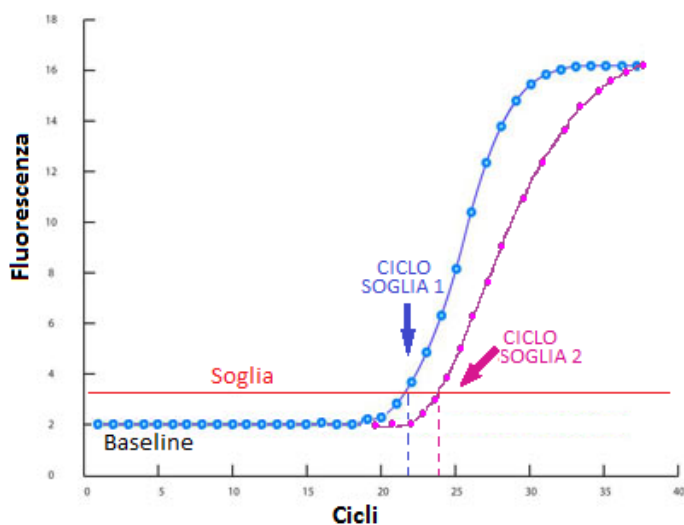


Figura 5 Soglia e ciclo soglia sul grafico della RT-PCR. Più il ciclo soglia è alto, minore è la concentrazione di DNA nel campione di partenza: il campione 1 (BLU) è più concentrato del campione 2 (VIOLA)

L'efficienza della reazione η può essere ricavata studiando l'andamento dei cicli soglia di diluizioni ottenute da uno stesso campione di partenza. L'espressione è riportata nell'equazione (1.2), dove m è la pendenza della retta dei CT espressi in funzione del logaritmo della concentrazione del DNA in soluzione:

$$\eta = 10^{-1/m} - 1 \quad (1.2)$$

Osservando i CT è l'efficienza della reazione di PCR è possibile ricavare alcune informazioni interessanti riguardo alla purezza dell'estratto [17].

Prendiamo ad esempio in considerazione due diversi eluati di DNA, supponendo che la loro concentrazione iniziale sia identica (Figura 6). Il primo campione (evidenziato in verde in figura) non presenta nessun tipo di inibitore; l'altro invece (rosso), contiene una certa percentuale di fattori contaminanti, quali residui proteici o tracce di alcol isopropilico. Quando i due esemplari vengono sottoposti ad una RT-PCR, la curva relativa al campione 2 salirà meno rapidamente e il suo ciclo soglia risulterà essere ritardato rispetto a quello della soluzione con uguale quantità di DNA ma nessun inibitore. Se a questo punto si provvede a diluire i due estratti di DNA, e ad effettuare nuovamente la RT-PCR, vedremo che il contributo dei fattori di inibizione nel campione contaminato sarà meno marcato. Il ciclo soglia del campione 1 dovrà essere più alto del precedente –proprio a causa della diluizione– ma risulterà questa volta confrontabile con il CT del campione 2.

In altre parole, se l'efficienza della reazione valutata su diverse diluizioni, è maggiore del 110%, il campione contiene una certa percentuale di elementi inibitori. Più è alto il valore di efficienza, meno è puro l'eluato di DNA.

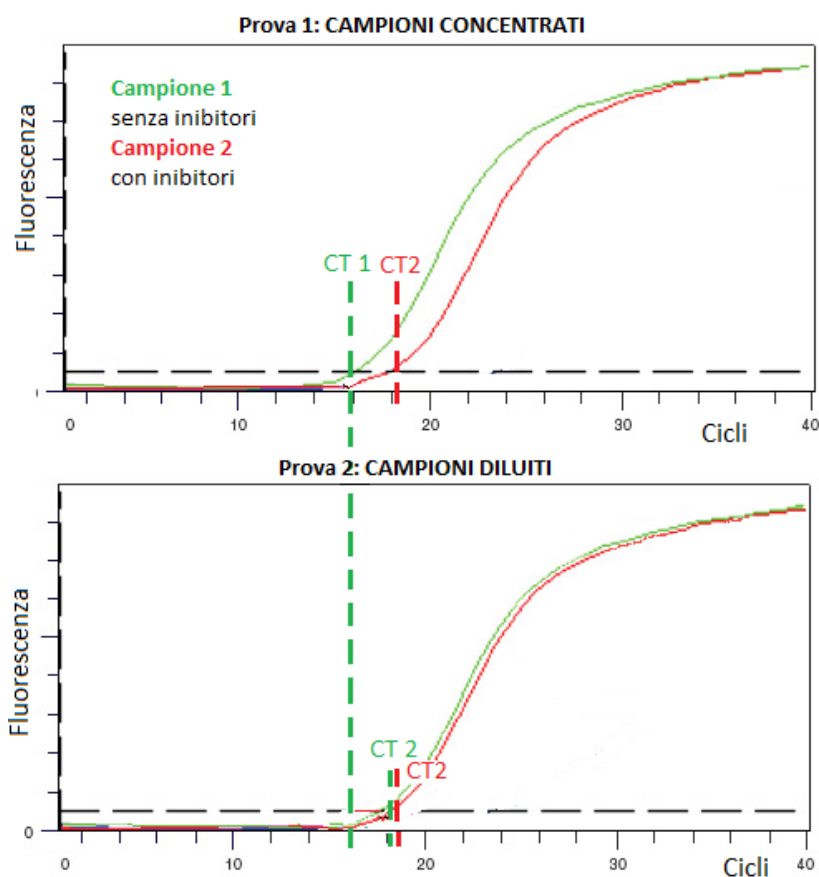


Figura 6 Esempio di RT – PCR con un campione privo di inibitori (VERDE) e un campione che contiene degli inibitori (ROSSO)

Nell'ambito del presente progetto di tesi, il DNA estratto grazie al sistema automatico è stato principalmente valutato tramite la *Real Time*–PCR. Le reazioni di PCR sono state svolte utilizzando il termociclatore *BioRad CFX384 Real-Time PCR*, strumento disponibile all'interno del BioLab di ST.

È importante fare una notazione. Per eseguire la RT-PCR si possono usare miscele di reagenti con target diversi. I risultati delle reazioni possono essere confrontati solo se i campioni sono stati sottoposti a PCR nelle medesime condizioni, quindi usando la stessa mix.

1.3.2. Spettrofotometria

L'analisi spettrofotometrica è il metodo di valutazione più semplice e più utilizzato nei laboratori di biologia molecolare per determinare la resa e la purezza di un procedimento di estrazione di DNA da materiale organico [19].

La spettrofotometria è una tecnica analitica che fornisce informazioni sia qualitative che quantitative. La misura dell'assorbanza permette di individuare e di quantificare una sostanza presente in soluzione mediante. La luce emessa da una sorgente UV attraversa la provetta contenente il campione: un sensore posto a valle permette di risalire allo spettro di assorbimento.

L'assorbimento dell'energia luminosa dipende dall'assorbanza a del materiale in analisi, dalla sua concentrazione in soluzione c e dalla profondità della provetta l (Figura 7). L'entità dell'assorbimento è espressa dalla densità ottica.



Figura 7 Schema di funzionamento dello spettrofotometro

L'assorbanza del DNA viene valutata ad una lunghezza d'onda di 260 nm, dove l'assorbimento luminoso è più elevato. È possibile quantificare il DNA presente in soluzione sapendo che una densità ottica pari a 1 corrisponde approssimativamente ad una concentrazione di 50 $\mu\text{g/ml}$ -tenendo conto del fattore di diluizione d [20]:

$$[DNA]_{\mu\text{g}/\text{ml}} = A_{260} \cdot d \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml} \quad (1.3)$$

$$DNA_{\mu\text{g}} = [DNA]_{\mu\text{g}/\text{ml}} \cdot V_{\text{ml}} \quad (1.4)$$

Per determinare la purezza dell'estratto, bisogna valutare il rapporto tra l'assorbimento degli acidi nucleici e l'assorbimento delle sostanze contaminanti (principalmente proteine). Abbiamo detto che picco di assorbimento del DNA è a 260 nm, mentre quello delle proteine è spostato sui 280 nm. Il rapporto tra le assorbanze alle due lunghezze d'onda è un indice della qualità dell'estratto: più questo parametro è basso, maggiore sarà la presenza di contaminanti in soluzione [18], [19]. Si considera soddisfacente il grado di purezza del prodotto di estrazione se il rapporto A_{260}/A_{280} è maggiore di 1,5.

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1,5 \quad (1.5)$$

La misura di assorbanza a 260 nm non è esente da errore: DNA a singolo filamento, RNA, *primer* di PCR, nucleotidi, o composti organici aromatici interferiscono assorbendo la luce a questa lunghezza d'onda. Campioni di tessuto con proteine molto reticolate e preparazioni di DNA contenenti enzimi o stabilizzatori per le proteine stesse sono difficili da valutare con la tecnica spettrofotometrica [29].

Il parametro A_{260}/A_{280} è il più utilizzato per valutare la qualità del DNA, ma anche i rapporti A_{260}/A_{320} e A_{260}/A_{230} possono fornire informazioni utili, rispettivamente riguardo al grado di torbidità e alla presenza di sali caotropici.

Il limite inferiore per il rilevamento degli acidi nucleici si aggira attorno ai 50 ng di DNA in 500-100 μ l di soluzione acquosa [29].

1.4. Lab-on-Chip

Negli ultimi decenni le analisi genomiche si sono affermate con prepotenza grazie alle loro enormi possibilità conoscitive ed applicative. L'estrazione di informazioni correlate agli acidi nucleici diventata ogni giorno più accessibile anche ai laboratori con risorse limitate.

A partire dagli anni Novanta, diversi studi si sono occupati del sequenziamento del genoma nella sua interezza, come ad esempio il Progetto Genoma Umano [9], [11], mettendo a disposizione del mondo scientifico un sapere importantissimo. Oggi in campo medico la conoscenza di variazioni del patrimonio genetico del singolo individuo diventa sempre più interessante, sia per formulare una diagnosi accurata che per valutare preventivamente la risposta del paziente ai principi attivi dei farmaci. Gli sviluppi tecnologici futuri inerenti a questo ambito dovranno bilanciare costi e accuratezza delle analisi con la crescente richiesta di informazioni genetiche su larga scala.

In questo panorama scientifico si colloca la nascita dei Lab-on-Chip: sistemi miniaturizzati che incorporano funzioni meccaniche, elettriche e fluidiche. Come indica il nome stesso, questi dispositivi integrano al loro interno molteplici funzioni di un laboratorio biochimico, inclusi il trasferimento dei campioni, il mescolamento dei reagenti, il riscaldamento e così via, tutte le funzioni necessarie per svolgere un'analisi completa. Si tratta di un'idea semplice, destinata però a cambiare il volto della diagnostica medica [1]. I Lab-on-Chip vengono studiati per essere sistemi dedicati: tutte le strutture vengono ottimizzate per svolgere al meglio il processo chimico e le funzioni a cui sono preposte.

Occorre fare anche alcune considerazioni di tipo economico. I costi legati ai laboratori chimici e biochimici sono estremamente elevati: al valore effettivo dei reagenti, sul costo delle analisi vanno a pesare il lavoro degli operatori e le strumentazioni. Avere a disposizione sistemi compatti e pronti all'uso ridurrebbe

le spese in maniera significativa. Un altro vantaggio della fabbricazione di Lab-on-Chip su scala industriale è la semplificazione della gestione delle analisi, nonché la miglior riproducibilità degli esperimenti. Gran parte dell'allestimento del processo biochimico può essere svolto in maniera automatizzata, quindi preciso e veloce; oltretutto in questo modo la preparazione delle reazioni è più controllata e diventa perciò meno soggetta all'errore umano e alla contaminazione dovuta all'ambiente [1].

Un elemento essenziale per la costruzione dei Lab-on-Chip è lo sviluppo della microfluidica: condotti e serbatoi dell'ordine di grandezza di qualche decina di micrometri consentono di ridurre i volumi dei reagenti e del materiale biologico impiegato nelle analisi. Anche questo è un fattore economicamente piuttosto rilevante, dato che le mix di reazione hanno costi elevati [2]. Le strutture microfluidiche si prestano bene per il processing di reazioni in parallelo: è infatti possibile confinare ciascuna molte analisi in poco spazio, all'interno di sistemi dedicati e monouso.

La realizzazione di elementi microfluidici richiede l'utilizzo di tecniche derivate da quelle impiegate per lo stampaggio dei circuiti elettronici integrati, la fotolitografia e l'*etching* su silicio o su vetro. La fotolitografia è quel processo che vede il trasferimento di un pattern da una maschera ad un materiale sensibile alle radiazioni luminose incidenti. Dopo essere stata esposta ad una luce con lunghezza d'onda controllata, la superficie da trattare è sottoposta ad un attacco chimico (appunto l'*etching*) che colpisce selettivamente le aree impressionate, andando a creare delle vere e proprie strutture all'interno del materiale. La spesa maggiore per l'impiego di questa tecnica è la realizzazione della maschera litografica; il costo può essere ammortizzata producendo componenti su larga scala, come avviene in ambito microelettronico. Per la fabbricazione delle strutture microfluidiche, i metodi litografici e di attacco chimico sono stati adattati all'uso del PDMS (Polidimetilsilossano), un silicone che viene preferito a vetro e silicio per la realizzazione dei Lab-on-Chip. Dato che si tratta di una

plastica, le proprietà elettroniche di questo materiale non sono eccellenti, il PDMS è molto più economico del vetro e, a differenza del SiO₂ è trasparente, e permette indagini e misure con metodi ottici [32]; inoltre il processo di lavorazione dei siliciumi è meno impegnativo di quello richiesto dai materiali organici [1].

Oltre alle strutture microfluidiche, i Lab-on-Chip necessitano di microattuatori: pompe, valvole e altri elementi attivi che permettano la movimentazione dei fluidi possono essere integrati grazie all'impiego di sistemi micro-elettromeccanici (MEMS, *Micro Electro-Mechanical Systems*).

L'integrazione di elementi elettronici, elettromeccanici e microfluidici dà luogo a sistemi pratici ed intelligenti, che possono essere facilmente portati al di fuori dei grandi laboratori: sistemi del genere possono essere usati non solo nei reparti ospedalieri, ma possono arrivare anche ad ambiti di analisi più vicine all'uso dei consumatori. Per applicazioni di questo genere sono richiesti strumenti di piccole dimensioni, che operino in tempi rapidi e che siano il più possibile prefunzionalizzati, cioè sollevino l'utente da tutte quelle operazioni che richiederebbero conoscenze specialistiche.

Alcuni Lab-on-Chip sono in grado di funzionare stand alone; altri necessitano invece della presenza di una piattaforma stabile, con a bordo una parte della strumentazione e uno stadio di alimentazione per l'elettronica, o anche le funzioni per la lettura dei dati. In ogni caso lo strumento non entra a contatto con il materiale biologico in analisi e rimane incontaminato, dato che le reazioni avvengono all'interno del dispositivo usa e getta.

Un esempio di Lab-on-Chip ormai affermati come strumento di diagnostica sono i test di gravidanza. I più conosciuti sono i prodotti Clearblue e Analysis, che si basano sul rilevamento della presenza dell'ormone HCG nell'urina. Il loro costo è molto contenuto, si aggira intorno ai 20 euro, possono essere fatti a casa e non necessitano di prescrizione medica. Si tratta di sistemi stand-alone e monouso,

vengono eliminati dopo che il test è stato effettuato; non necessitano di nessun supporto o alimentazione esterna per funzionare.

Anche glucometri per misurare il livello di glicemia sono largamente diffusi: misurano gli zuccheri presenti nel sangue con una sola goccia. È uno strumento portatile al quale si accompagnano stick o cartucce monouso. Il materiale organico viene assorbito capillarmente dall'elemento usa e getta. Per quanto riguarda invece il funzionamento dell'analisi, la misura viene effettuata dallo strumento vero e proprio, che non è monouso. La lettura della glicemia nel sangue può essere fatta con meccanismi riflettometrici o elettrochimici. Le case produttrici più famose sono Roche e Lifescan, che realizzano rispettivamente le linee di glucometri Accu-Chek e OneTouch.

Un altro esempio di strumento basato sull'impiego dei Lab-on-Chip è il Q3, realizzato all'interno del BioLab di ST. Si tratta di un apparecchio dedicato al processo di Real Time - Polimerase Chain Reaction su chip. La reazione di amplificazione del DNA avviene interamente su un chip termico usa e getta: la lettura di fluorescenza viene invece eseguita dalla testa ottica compresa nella parte stabile dello strumento.

I Lab-on-Chip presentano alcune criticità che devono ancora essere risolte. Innanzitutto è ancora necessario studiare a fondo la biocompatibilità di molti materiali, e testarne la resistenza agli attacchi dei reagenti chimici impiegati nelle reazioni. Inoltre deve essere aumentata la robustezza di questi dispositivi, dal momento che risultano piuttosto fragili, soprattutto quando si tratta di architetture realizzate su scala sub-millimetrica. Un punto molto importante per lo sviluppo dei Lab-on-Chip riguarda poi la sensibilità degli strumenti che devono andare ad interagire con le strutture a grandezza microscopica. Ad esempio, per leggere la fluorescenza di una sonda all'interno di un pozzetto o di un canale, bisogna disporre di un'ottica estremamente accurata. In generale, i processi e le analisi diventano più complessi da controllare quando si opera su scale molto

ridotte. Gestire la stessa precisione e affidabilità di un laboratorio di analisi non è semplice, ma è un obiettivo che i Lab-on-Chip devono raggiungere per affermarsi come strumento di diagnostica [1]

1.5. Estrattori automatici per acidi nucleici: stato dell'arte

Ad oggi esistono sul mercato molteplici strumenti robotizzati che permettono di condurre analisi sul DNA in modo rapido: queste apparecchiature garantiscono un elevato throughput di informazioni, requisito fondamentale per i laboratori che si occupano su larga scala di studi e indagini inerenti al DNA. Data la possibilità di condurre studi genomici su una così alta quantità di campioni, non stupisce che i progetti basati sull'analisi e l'elaborazione degli acidi nucleici stiano diventando comuni nei più svariati ambiti -medicina, farmacologia ed ecologia ne sono degli esempi [11], [13].

Il primo passaggio inevitabile per condurre qualsiasi analisi sul patrimonio genetico, è l'estrazione del DNA dal campione biologico. Procurare un'elevata quantità di DNA isolato e purificato richiede un'ottimizzazione dei protocolli di estrazione.

Il miglioramento delle tecniche di estrazione genomica è uno step critico ma necessario, dal momento che l'impiego acidi nucleici purificati è alla base a tutti gli ambiti di analisi ed elaborazione genomica. Non è più pensabile di ricavare acidi nucleici di alta qualità con metodi obsoleti e processi lunghi e costosi, quindi la ricerca per nuove tecniche e tecnologie di estrazione diventa oggi un passaggio chiave per il mondo delle scienze biologiche [33]. A partire da questa esigenza, comincia la realizzazione di molteplici macchinari in grado di svolgere il lavoro di estrazione al posto dell'uomo. Il dispendio richiesto in termini di

energie e tempo di allestimento della reazione è minimo, e anche la spesa legata ad ogni singolo processo di purificazione si abbatte [5].

Uno dei vantaggi maggiori legati al vero e proprio processo di estrazione, deriva proprio dall'automatizzazione della procedura: il robot esegue rigidamente il protocollo di reazione implementato, a cui consegue una standardizzazione del materiale organico isolato. L'uniformità dei prodotti finali è notevole sia in termini di concentrazione, che di resa effettiva a partire dalla quantità iniziale di campione biologico. Questo comporta un significativo aumento della ripetibilità delle analisi e degli esperimenti effettuati a valle dell'estrazione.

Per automatizzare il processo di estrazione è importante adottare tecniche e protocolli semplici, che non prevedano passaggi talmente accurati da richiedere l'intervento di un operatore. Oggigiorno i metodi basati sull'impiego di silice (SiO₂) hanno largamente rimpiazzato il tradizionale Fenolo-Cloroformio, che risulta essere efficiente ma impiega reagenti tossici. Quest'altro approccio, che si fonda sul legame tra silice e DNA, permette di isolare una DNA molto stabile, in modo agevole e veloce [34].

Il fattore che più impedisce la larga diffusione di macchinari per la purificazione automatica di acidi nucleici e di sistemi per analisi biologiche integrati rimane il costo estremamente elevato. Si parla infatti di investimenti che si aggirano intorno ai 20-30 mila euro –senza contare naturalmente le spese aggiuntive per i reagenti e per i supporti monouso. I laboratori medio-piccoli fanno fatica ad affrontare il peso di acquisti che verranno ammortati solo in molti anni; così queste apparecchiature si trovano principalmente in grossi centri di ricerca o in strutture specializzate per le analisi cliniche.

Le performance degli strumenti per la purificazione automatica di acidi nucleici sono andati via via migliorando negli anni. Life Technology, QIAGEN, Promega e tutte le grandi case di produzione di materiale per laboratori biochimici hanno realizzato apparecchiature dedicate, che sono ormai presenti in tutti i laboratori

di medio-grandi dimensioni. Andiamo ora a dare una rapida panoramica dei sistemi per estrazione automatizzata che esistono.

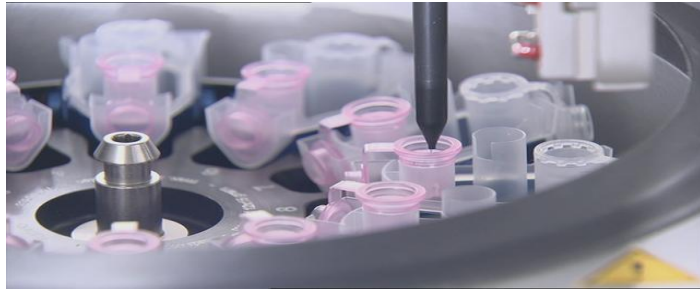
1.5.1. QIAcube QIAGEN

Un esempio di strumento per estrazioni automatiche è il sistema QIAcube della QIAGEN (Fig.) [35]. Questo macchinario permette di processare fino a 12 campioni contemporaneamente, impiegando dai 20 ai 40 minuti per estrazione. I passaggi manuali della reazione sono ridotti al minimo: una volta inseriti i campioni biologici nelle apposite provette, il sistema è in grado di processarli autonomamente. Il QIAcube dispone di protocolli differenziati per la purificazione di DNA, RNA e proteine. Per effettuare l'estrazione sono impiegate delle colonnine di silice, in particolare viene usato il kit "spin-column" prodotto sempre presso QiAGEN. All'interno del QIAcube sono incorporate una centrifuga e un riscaldatore, oltre a sistemi di pipettaggio e di shakeraggio (Figura 8 e Figura 9). Un braccio robotico dotato di pinze permette la movimentazione delle provette. Si tratta di un macchinario molto ingombrante: 650 x 620 x 570 mm³ per oltre 70 Kg di peso.



Figura 8 Sistema Quiacube per l'estrazione automatica di acidi nucleici e proteine da materiale organico

Figura 9 Sistema Qiacube, particolare. Si vedono le provette all'interno della centrifuga, con il meccanismo di pipettaggio automatico



1.5.2. Maxwell System 16, Promega

Un dispositivo analogo al QIacube appena illustrato è il Maxwell System 16 (Figura 10) [36]. Si tratta di un macchinario realizzato da Promega, che fornisce anche cartucce monouso dedicate all'esarazione. Possono essere elaborati in parallelo un massimo di 16 campioni e i tempi di processing sono analoghi allo strumento della QIAGEN. La differenza principale rispetto al QIacube consiste nell'impiego di microbiglie magnetiche ricoperte di silice al posto delle colonnine fatte con lo stesso materiale. Proprio grazie all'utilizzo delle biglie, il Maxwell non necessita di centrifughe né di elementi in grado di spostare le provette di campioni. Il funzionamento è molto semplice: la cartuccia destinata ad ogni estrazione è composta da diversi pozzetti, già preparati con la corretta quantità di reagenti necessari per l'attuazione di ciascuna fase del protocollo di reazione (Figura 11). L'estrazione si articola in sette passaggi: dopo l'introduzione del campione, vengono effettuati un lavaggio di lisi e cinque lavaggi con alcol. Il sistema è realizzato in modo che la cartuccia rimanga ferma, l'unico elemento mobile all'interno del Maxwell è un'asticella metallica che può essere magnetizzata; essa permette il trasposto delle biglie magnetiche da un serbatoio all'altro della cartuccia. Al termine di ogni passaggio del protocollo, il campo magnetico della barra viene attivato, e le biglie vengono raccolte e prelevate dal pozzetto in cui si trovano. Quando poi l'asta arriva in corrispondenza del serbatoio successivo le microbiglie vengono rilasciate e si procede con un nuovo lavaggio degli acidi nucleici. Il volume del Maxwell 16 è un po' più contenuto rispetto al QIacube: 33 x 33 x 44 cm³ e circa 18 kg di peso. Naturalmente però non può essere considerato un sistema compatto.



Figura 10 (sinistra) Sistema Maxwell 16 realizzato da Promega

Figura 11 (destra) Sistema Maxwell 16, particolare. Le 16 cartucce sono posizionate sul supporto. Un puntale metallico

1.5.3. Macchinari a *throughput* elevato

Oltre a macchinari tipo QIAcube e Maxwell 16, esistono anche sistemi automatizzati per l'estrazione di acidi nucleici con *throughput* ancora più elevato [5]. Sono apparecchiature pensate appositamente per quei laboratori che necessitano di ottenere in poco tempo un altissimo numero di campioni di DNA analizzare.

Il BioRobot M48 della QIAGEN processa da 6 a 48 campioni, sfruttando la silice in formato di microbiglie magnetiche; il suo meccanismo di funzionamento è molto simile a quello realizzato per il QIAcube [37].

Il Tecan Genesis [38] è un altro strumento per la preparazione di un elevato numero di campioni: questo macchinario estrae DNA plasmidico da un massimo di 96 pozzetti. Per purificare gli acidi nucleici vengono impiegate delle membrane di silice. Il lisato grezzo viene innanzitutto filtrato, in modo da trattenere le impurità solide e ingombranti. Dopodiché il campione "ripulito" arriva al vero e proprio piano di estrazione: si crea il vuoto al di sotto della membrana di SiO₂, così che il lisato cellulare viene aspirato e fluisce attraverso le cavità porose della

silice. In questo modo la fase liquida precipita, mentre gli acidi nucleici sono trattieneuti dalla silice (Figura 12).

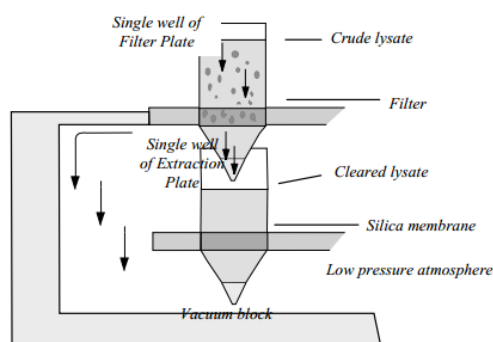


Figura 12 schema di finzionamento del robot Genesis Tecan

1.5.4. Macchinari polifunzionali

I prodotti citati finora sono esempi di strumenti che svolgono solo il processo di estrazione di acidi nucleici e/o proteine. Il materiale organico isolato e purificato dovrà poi essere elaborato manualmente o da altri sistemi per indagini biologiche. Il prodotto ricavato potrà poi essere utilizzato per qualunque tipo di analisi genomica, come PCR, sequenziamento e molte altre ancora.

Accanto a sistemi di questo tipo, si sviluppano anche strumenti che incorporano non solo il necessario per estrarre DNA dai campioni biologici, ma anche i reagenti e i supporti per analisi specifiche successive. I sistemi dedicati al momento sono più che altro oggetto di ricerca, ma sul mercato esistono già sistemi integrati che consentono la purificazione e l'amplificazione del DNA tramite PCR in un unico macchinario [39], [40]. Il vantaggio di questi oggetti è che si passa dal campione grezzo ai risultati delle indagini genomiche senza sforzo e con impegno di personale ridotto al minimo. Anche la possibilità di errore nell'analisi diminuisce, proprio perché l'intervento umano è limitato all'avviamento del processo di reazione.

1.6. Scelta metodo di estrazione per il sistema automatico

In questo lavoro di tesi si vuole sviluppare un macchinario volto all'estrazione automatica di DNA da sangue umano.

L'obiettivo è quello di realizzare uno strumento compatto, di facile utilizzo ed economico. Vuole essere un sistema alla portata di tutti i laboratori non altamente specializzati. In futuro, potrebbe essere abbinato allo strumento sviluppato da ST per la Real Time - PCR su chip (il Q3).

Per rientrare nei parametri di dimensioni e basso costo, il nostro strumento deve sfruttare le potenzialità dei Lab-on-Chip. Ciò significa che la vera e propria estrazione del DNA avverrà all'interno di una cartuccia monouso, mentre parte dell'apparecchiatura sarà stabile.

Questo strumento unisce tutti i vantaggi dell'isolamento automatico del DNA con la praticità dell'usa e getta. L'automatizzazione del processo richiede il minimo impiego di risorse umane e ottimizza le quantità di reagenti chimici utilizzati, oltre a garantire una resa di estrazione piuttosto costante. La cartuccia può poi essere buttata, una volta prelevato l'eluato con il DNA.

Per la procedura di estrazione, è stato scelto di implementare una tecnica basata sull'assorbimento di acidi nucleici mediante la silice. In particolare è stato impiegato il kit Promega *MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System*.

Il tempo necessario per portare a termine un'estrazione con il kit MagneSil richiede all'incirca 40 minuti. I liquidi necessari per il risciacquo dei campioni biologici sono solo due –un buffer per la lisi delle cellule e uno per eliminarne i residui [41]; insieme viene fornita una soluzione per l'eluazione del DNA estratto.

I procedimenti con impiego di silice presentano molteplici vantaggi rispetto ai metodi tradizionali e ai preparati per estrazione rapida. Innanzitutto si tratta di tecniche più semplici e veloci di quelle tradizionali, dato che si compongono di step molto ripetitivi. Per estrarre il DNA dal campione biologico d'interesse è necessario solamente eseguire alcuni lavaggi del materiale di partenza con diverse soluzioni. Dato che il protocollo non prevede passaggi talmente complessi e di precisione da richiedere l'intervento umano, l'utilizzo del diossido di silicio si presta particolarmente per un'automatizzazione del processo [34].

La silice permette inoltre di ottenere un DNA più purificato, se paragonato all'estratto che si ottiene con i reagenti che effettuano l'isolamento degli acidi nucleici in un solo passaggio. Le tecniche di estrazione rapida prevedono che gli scarti della reazione vengano resi inoffensivi per il DNA e per le elaborazioni chimiche effettuate a valle dell'estrazione, ma essi rimangono presenti in soluzione. L'eluato che si ricava con questi prodotti risulta quindi molto torbido: ciò può talvolta risultare problematico, soprattutto se le analisi genomiche a cui dovrà essere sottoposto il campione estratto prevedono l'impiego di fluorofori.

Le biglie magnetiche sono state preferite alle membrane per molteplici ragioni. Le microsfere rivestite di silice sono una "fase solida mobile" - a differenza delle lamine realizzate con lo stesso materiale, che rimangono un elemento statico all'interno della camera di reazione. Ciò significa che la matrice di silice può essere facilmente risospesa in soluzione e garantire quindi una migliorata efficienza per quanto riguarda la cattura del DNA da parte delle microbiglie. La presenza di elementi piccoli e con un'ampia superficie bagnabile permette inoltre di incrementare l'esposizione ai reagenti durante le fasi di lavaggio, facilitando l'eliminazione degli scarti dell'estrazione (proteine, resti cellulari, etc.). L'impiego delle biglie risulta particolarmente vantaggioso anche da un punto di vista volumetrico, perché elimina la necessità di una centrifuga, permettendo di realizzare uno strumento compatto.

Capitolo 2

SISTEMA PER ESTRAZIONI AUTOMATICHE

L'obiettivo di questa tesi è la realizzazione di uno strumento in grado di portare a termine il processo di estrazione del DNA in modo totalmente automatico.

Il sistema di estrazione genomica in via di sviluppo vuole collocarsi in un mercato a metà strada tra le apparecchiature dei laboratori di biologia molecolare e le tecnologie più facilmente accessibili ai consumatori. In un futuro non molto lontano, è possibile che una parte delle analisi genomiche venga condotta non più solo a livello di grandi strutture specializzate: ad esempio, gli ambulatori e gli studi medici potranno svolgere internamente delle analisi per individuare in modo rapido e molto preciso le patologie, e scegliere quindi le terapie più adeguate. O ancora, le farmacie stesse potranno avere l'incarico di svolgere delle indagini genomiche semplici o preliminari, magari non solo strettamente legate all'ambito medico, ma anche alla cosmesi e alla dietologia. Naturalmente, per svolgere una qualunque di queste indagini, è necessario estrarre e purificare il DNA del paziente in oggetto.

Un sistema per l'estrazione genomica finalizzato ad applicazioni di questo genere deve essere efficiente, pratico e totalmente automatizzato. Non deve richiedere un grosso impegno da parte dell'utilizzatore, né in termini di tempo né in termini di conoscenze. Una volta caricata la cartuccia con il materiale biologico, lo strumento deve processare il campione in maniera autonoma, e fornire il prodotto finale (il DNA) in uscita.

Lo strumento di estrazione in via di sviluppo non è pensato per processare molti campioni in parallelo: se non è necessario isolare una quantità di DNA molto

elevata, macchinari come il Maxwell 16 (Promega) [42] e Genesis (Tecan) [43] sono superflui. Al di fuori dei grandi laboratori si richiede inoltre che le spese siano contenute: gli strumenti per estrazione automatica di DNA sono generalmente molto costosi, richiedono investimenti che non rendono queste tecnologie facilmente accessibili. Lo strumento che si va a realizzare dovrà anche avere un ingombro limitato: tutti i dispositivi integrati al suo interno per isolare il DNA sono stati scelti in modo da rispondere alla specifica di compattezza.

Il sistema per la purificazione degli acidi nucleici sfrutta l'idea dei Lab-on-Chip, ovvero quei dispositivi che integrano al loro interno molteplici funzioni tipiche di un laboratorio biochimico. La particolarità dei Lab-on-Chip è quella di essere dispositivi altamente specifici: pur essendo molto piccoli, essi incorporano tutte e sole le funzioni necessarie per svolgere un ben preciso processo chimico. Le strutture vengono studiate nel dettaglio e ottimizzate per compiere le funzioni a cui sono preposte [44]. I Lab-on-Chip sono pensati come dispositivi monouso: ogni dispositivo può essere utilizzato per portare a termine una sola analisi genomica, dopodiché viene smaltito. Un sistema del genere garantisce che gran parte della preparazione delle reazioni biochimiche sia fatta a livello di produzione industriale: oltre a consentire un minor impiego di tempo ed energie da parte dell'utente ultimo, l'allestimento robotizzato dei processi comporta anche una maggior affidabilità del dispositivo e un costo razionalizzato. Inoltre, dato che si tratta di un dispositivo usa e getta, è più facile assicurare la non contaminazione tra elaborazioni di campioni biologici diversi. I vantaggi dei Lab-on-Chip sono molteplici: hanno dimensioni e costi ridotti, e allo stesso tempo garantiscono accuratezza nelle analisi e non inquinamento al livello biologico. Tutte queste peculiarità ne fanno un elemento che ben si sposa con le necessità del nostro strumento per la preparazione dei campioni.

Il sistema per l'estrazione automatica del DNA che si va a realizzare fa parte di un progetto sviluppato all'interno del BioLab ST, condotto da un'equipe di ingegneri e biologi. Il presente lavoro di tesi ha avuto uno scopo di sintesi rispetto a tutte

le conoscenze acquisite fino a questo momento, da diversi punti di vista. Per quanto riguarda l'elettronica del sistema, a partire da schematici già esistenti, è stata creata una scheda in PCB dedicata. La scheda è stata ottimizzata per l'impiego di tutti i componenti pilotati elettricamente: un motore, delle valvole, una pompa piezoelettrica, dei fotosensori e un chip riscaldatore. Le parti fluidiche e meccaniche sono state integrate in un sistema compatto e funzionante: la struttura è ancora un prototipo, ma è in grado di portare a termine dei processi di estrazione in modo efficace e totalmente autonomo.

2.1. Panoramica dello strumento per estrazione automatizzata di DNA

Lo strumento realizzato per la preparazione dei campioni automatizzata necessita di una serie di elementi elettronici, meccanici e fluidici, che permettano la corretta esecuzione della reazione di estrazione del DNA in tutte le sue fasi. Lo strumento comprende dispositivi atti al controllo e alla regolazione dell'intero sistema.

Possiamo pensare alla scheda elettronica (Figura 13) come un vero e proprio "cervello", che pilota tutti gli attuatori e i sensori ad essa connessi.

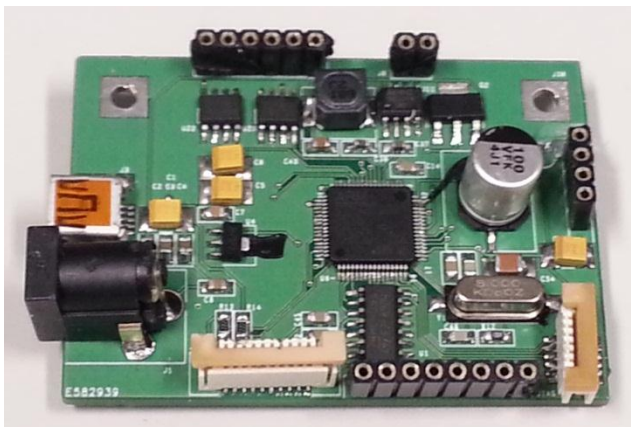


Figura 13 Scheda elettronica per il controllo e la gestione dello strumento di estrazione automatica

Gli attuatori sono quegli elementi che attivamente svolgono operazioni, dunque sono le “braccia” e i “muscoli” dello strumento: si tratta della pompa, delle valvole a solenoide e del motore passo - passo. La pompa e le valvole consentono il passaggio dei reagenti fluidici dai serbatoi alla cartuccia, dove si svolgono le reazioni biochimiche. Il motore è necessario per agitare le biglie magnetiche e risospenderle nel reagente presente di volta in volta nella cameretta di reazione: esso muove una calamita sopra la cartuccia di estrazione e muove così anche le microbiglie.

All'interno dello strumento ci sono poi i sensori, che permettono di acquisire informazioni dall'ambiente e costituiscono i “sensi” dello strumento. In particolare sono stati usati due tipi di dispositivi per la rilevazione: uno è un sensore di temperatura, accoppiato al riscaldatore del chip termico; gli altri rilevatori sono ottici, si tratta in particolare di fotosensori che agevolano il controllo del movimento del motore e monitorano lo stato di riempimento dei tubi.

Il funzionamento della parte fluidica dello strumento è piuttosto semplice (Figura 14). Le cinque valvole, comandabili in maniera indipendente, abilitano il passaggio del fluido da uno dei serbatoi ad un canale comune. Qui un primo connettore mette in comunicazione il canale dei reagenti con la camera di reazione della cartuccia. All'interno della cameretta centrale del Lab-on-Chip avviene il vero e proprio processo di estrazione. La pompa che muove i liquidi si trova a valle della camera di reazione, dal momento che lavora in aspirazione. Tra l'outlet del dispositivo di reazione e la pompa si trova il fotosensore che consente di controllare l'effettivo riempimento del dispositivo stesso. I reagenti, una volta usciti dal vano centrale scorrono attraverso la pompa e raggiungono finalmente l'area dedicato agli scarti di reazione.

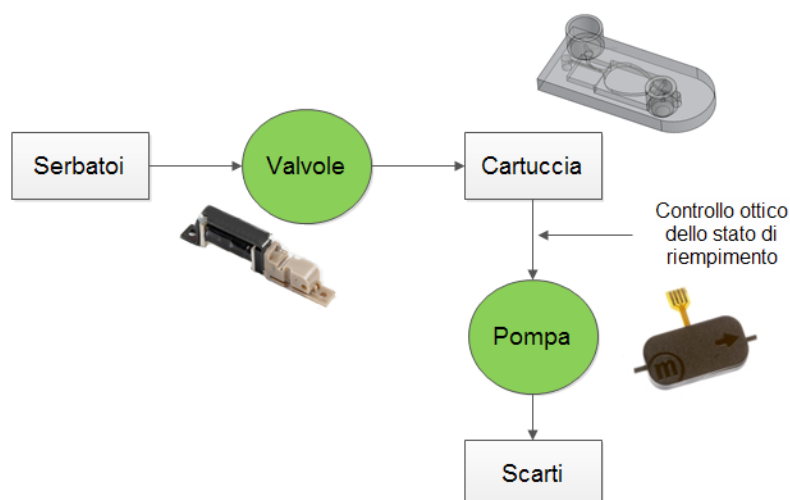


Figura 14 Schema del percorso dei fluidi all'interno dello strumento di estrazione. I campi evidenziati in verde sono quelli che richiedono un controllo elettronico

Durante il processo di estrazione, il motore fa muovere un magnete permanente sopra alla cameretta di reazione con una duplice funzione. In una fase esso permette di risospingere le biglie di silice, miscelandole all'interno dei reagenti. In un secondo momento, quando cioè viene azionata la pompa per far fluire i liquidi, la calamita rimane ferma in corrispondenza del vano centrale della cartuccia e trattiene le microsferine magnetiche.

La struttura dello strumento di estrazione è illustrato in Figura 15. Aprendo il coperchio dell'apparecchio, sulla destra (in rosso) si trova il supporto della cartuccia, con le connessioni per la fluidica. A sinistra in alto c'è lo spazio riservato ai serbatoi (verde), al di sotto del quale sono montate le valvole che controllano l'ingresso dei reagenti. In blu è evidenziato il modulo del motore, composto dal motore passo-passo e dagli ingranaggi necessari alla corretta movimentazione della calamita.

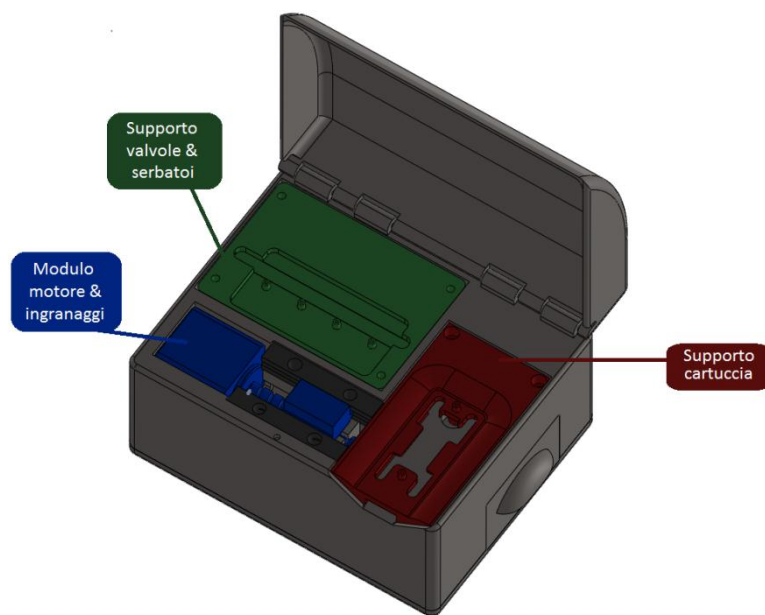


Figura 15 Cad dello strumento per estrazione automatica di DNA

Le dimensioni del nostro strumento per estrazione automatica sono molto contenute: il suo volume di $36 \times 31,5 \times 33 \text{ cm}^3$ ne fa un sistema portatile ed estremamente pratico rispetto agli estrattori automatici da laboratorio attualmente in commercio (Figura 16).



Figura 16 Maxwell 16 e prototipo dello strumento per estrazioni realizzato nell'ambito del progetto di tesi

In questo capitolo verranno presentati i vari strumenti e dispositivi impiegati nel macchinario; di pari passo alle specifiche e al funzionamento delle singole parti, verrà esposto il controllo realizzato tramite il microcontrollore.

2.2. Dispositivo microfluidico e riscaldatore

Il dispositivo microfluidico è il centro operativo del sistema di estrazione: al suo interno avviene la vera e propria estrazione del DNA partendo dal sangue. Una volta caricata con il campione biologico, la cartuccia viene alloggiata all'interno dello strumento. Dei connettori Luer permettono l'ancoraggio allo supporto e la comunicazione fluidica con i serbatoi dei reagenti e con la pompa. La cartuccia è anche dotata di un chip termico per il riscaldamento della camera di reazione.

Il dispositivo microfluidico è un elemento usa e getta, destinato a essere cambiato ad ogni nuova reazione biochimica, per garantire la sterilità e la non contaminazione tra i prodotti finali dei diversi processi di estrazione.

2.2.1. La fluidica del dispositivo

Il cuore del dispositivo è la camera di reazione. All'interno di questo spazio, le biglie rivestite di silice entrano in contatto con il campione di sangue e poi con i reagenti necessari per isolare gli acidi nucleici; sempre nella camera di reazione le biglie vengono agitate nei diversi buffer per estrazione, tramite il movimento di un magnete permanente esterno.

I reagenti arrivano alla camera di reazione tramite un canale di ingresso e sono espulsi attraverso un secondo condotto situato in posizione diametralmente opposta rispetto al primo. I due fori della cartuccia non solo costituiscono l'inlet e l'outlet per i liquidi, ma permettono anche di ancorare il dispositivo al supporto dello strumento, tramite il meccanismo ad incastro tipo Luer.

La forma del vano è stata studiata in modo che il suo riempimento sia continuo e non dia luogo alla formazione di bolle. La presenza di aria all'interno del vano avrebbe due conseguenze indesiderate. Innanzitutto, i lavaggi con la soluzione di lisi e con l'alcol sarebbero meno efficienti: il volume dei reagenti con cui le microbiglie entrano in contatto sarebbe minore di quello prestabilito e le sfere

verrebbero in parte agitate in aria –in modo inutile ai fini della reazione. La seconda controindicazione riguarda la concentrazione di DNA nell'eluato finale: se il volume di buffer di eluizione non è sempre il medesimo, diventa impossibile stabilire il rendimento delle estrazioni effettuate con il nostro estrattore automatico.

Per evitare la formazione di bolle dunque, la microcamera deve avere un'angolatura d'ingresso maggiore di quella d'uscita e il materiale con cui è realizzata la cartuccia deve avere il minor numero possibile di imperfezioni a livello superficiale [45].

2.2.2. Chip termico

La cartuccia di estrazione non svolge solo una funzione di contenimento dei fluidi. Il fondo della camera di estrazione è costituito da un chip in silicio che incorpora un riscaldatore e un sensore: questo fa sì che la zona di reazione possa essere scaldata e controllata in temperatura in modo molto accurato.

La temperatura è un fattore importante in molte reazioni chimiche e biologiche. Fornire calore significa fornire energia al processo, quindi velocizzarne l'andamento [46]. Nelle reazioni che coinvolgono strutture organiche, la temperatura agisce sui legami tra le molecole.

Il chip termico è stato realizzato e ottimizzato già da alcuni anni all'interno del BioLab di ST. Fa parte di un Lab-on-Chip dedicato alla Real Time- PCR, una reazione chimica che per funzionare necessita di un controllo molto preciso della temperatura [15], [28]. Il chip si adatta perfettamente alla cartuccia di estrazione, dove il calore viene usato con una duplice funzione. Innanzitutto, favorisce l'eliminazione –tramite evaporazione- dell'alcol rimasto nella camera di reazione. Un residuo troppo elevato di alcol all'interno dell'eluato potrebbe infatti inibire le reazioni a cui il DNA viene successivamente sottoposto. In secondo luogo, la temperatura serve a staccare in maniera più veloce ed efficace il DNA dalla matrice di silice nella fase finale dell'estrazione.



Figura 17 Chip termico

Il chip (Figura 17) occupa un'area di $17,5 \times 12 \text{ mm}^2$ e ha uno spessore di soli 720 nm. E' fatto interamente in silicio, materiale che garantisce una buona conduzione del calore (conducibilità termica pari a 148 W/mK). Al suo interno sono integrati i riscaldatori, quattro elementi resistivi di alluminio collegati in parallelo e posti ad uguale distanza tra il centro e il bordo esterno della superficie del chip, per una resistenza complessiva di 21Ω : per effetto Joule, la corrente genera potenza termica. Al centro del chip è posizionato un sensore RTD (*Resistance Temperature Detector*), che sfrutta la variazione di conducibilità di un resistore per risalire al valore della temperatura. Il valore della resistenza a temperatura ambiente è di circa 950Ω e la variazione causata dall'innalzamento della temperatura si aggira intorno ai $4 \text{ m}\Omega / ^\circ\text{C}$. La sensibilità della misura che si raggiunge è di un decimo di grado centigrado. Su uno dei due lati corti del chip si trovano i contatti elettrici che servono per fornire corrente al riscaldatore e per monitorare le variazioni di resistività del sensore.

Grazie al sistema riscaldatori-sensore, la temperatura può essere regolata in anello chiuso, controllando con un PWM l'afflusso di corrente alla resistenza da 21Ω . I riscaldatori possono essere attivati e disattivati semplicemente controllando un interruttore che abiliti o meno il passaggio della corrente attraverso le resistenze preposte.

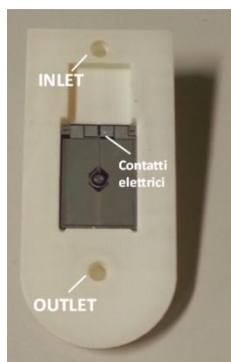


Figura 18 Chip termico alloggiato all'interno della cartuccia di estrazione

Il chip termico viene fisicamente attaccato alla cartuccia (Figura 18), in modo da costituire il fondo della camera di reazione; può essere incollato indifferentemente con silicone o collante a raggi UV, dato che entrambi i materiali non vanno ad interferire il processo di estrazione. In particolare si è adoperata come colla la Delo-Photobond AD494, che risulta essere molto vantaggiosa se si ha a disposizione una lampada a raggi ultravioletti con lunghezza d'onda di 400 nm: infatti il tempo necessario per l'incollaggio è notevolmente ridotto, solo 14 secondi a dispetto delle 24 ore che assicurano la tenuta ottimale del silicone.

2.2.3. Elettronica del chip termico

Il controllo della temperatura sul chip avviene tramite un sistema retroazionato che consta di un riscaldatore –l'elemento attivo- e di un sensore. Questi elementi sono in realtà due semplici resistenze: quella del riscaldatore è molto piccola (appena 21 Ω) e si scalda per effetto Joule quando viene percorsa da corrente. Per ricavare le variazioni di temperatura si usa un secondo resistore, che ha un valore nominale di 950 Ω : la resistività cresce circa linearmente quando il chip si scalda ed è quindi possibile risalire alla temperatura monitorando il valore di resistenza del sensore.

2.2.3.1. Calibrazione del chip e controllo della temperatura

Per un corretto funzionamento del sensore di temperatura, prima del suo utilizzo è necessario effettuare una calibrazione del chip. In pratica, ogni volta che si

monta una nuova cartuccia sullo strumento per fare un'estrazione di DNA, bisognerà ripetere questa procedura.

Innanzitutto è necessario conoscere il valore effettivo della resistenza del sensore: si hanno a disposizione un generatore di corrente e un ADC (incorporato nel μC), che legge il valore di tensione sulla resistenza stessa e lo trasforma in formato numerico. C'è poi un sensore di temperatura digitale [47], che legge la temperatura con una sensibilità al centesimo di grado Celsius. Possiamo sinteticamente affermare che questa parte di circuito implementa un Ohmetro.

In linea teorica, è possibile ricavare R_{sens} semplicemente applicando la legge di Ohm. La corrente erogata dal generatore I_{Gen} è imposta dai dispositivi sulla scheda elettronica, e il valore della tensione sul sensore V_{ADC} viene letto tramite il microcontrollore:

$$R_{sens} = \frac{V_{ADC}}{I_{Gen}} \quad (2.1)$$

Tuttavia il caso reale è più complesso di questo modello. Si incappa infatti in due difficoltà:

- La corrente I_{Gen} proveniente dal generatore non è costante, ma è soggetta a deriva e variazioni (anche dovuti alla variazione di temperatura).
- A priori non è nota la caratteristica di R_{sens} vs T . Se vogliamo disegnare su un grafico l'andamento della resistenza al variare della temperatura, al momento è noto solamente il coefficiente angolare della retta: la resistenza aumenta circa $4 \text{ m}\Omega$ al $^{\circ}\text{C}$. Per definire in maniera univoca su quale delle infinite traiettorie parallele si trovi effettivamente la R_{sens} , dobbiamo conoscere le coordinate di almeno un punto appartenente alla retta stessa.

Per ovviare al primo problema, il sistema dispone di due resistenze di calibrazione montate sulla scheda elettronica. Valgono rispettivamente $1 \text{ K}\Omega$ e

1,3 KΩ e la tolleranza sul valore nominale è appena dello 0,1%. Tramite un multiplexer, il microcontrollore può abilitare il passaggio della corrente attraverso uno di questi due resistori o attraverso il sensore termico (Figura 19). L'ADC all'interno del microcontrollore converte in formato numerico la tensione analogica misurata sul resistore selezionato. Il valore della corrente è ricavato come:

$$I_{gen} = \frac{V_{adc,R1}}{R_{1K}} = \frac{V_{adc,R1.3}}{R_{1.3K}} \quad (2.2)$$

L'acquisizione con l'ADC viene effettuata più volte, così che la corrente viene calcolata usando i valori medi delle tensioni misurate (Figura 20).

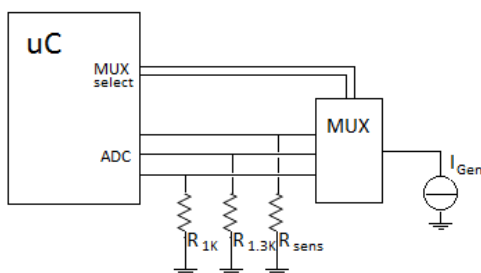
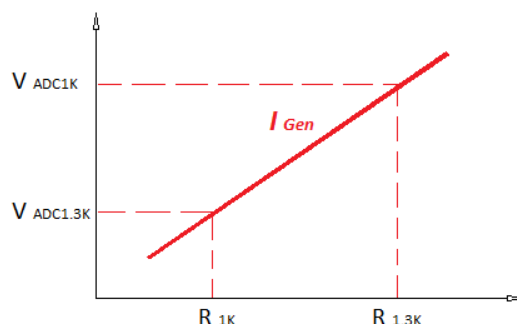


Figura 19 Schema illustrativo del sistema di calibrazione del chip e di acquisizione della temperatura

Figura 20 La corrente erogata dal generatore viene ricavata come retta passante per i due punti individuati sul grafico tensione vs resistenza



A questo punto, per concludere la fase di calibrazione, dobbiamo trovare la retta caratteristica R_{sens} vs T specifica del chip. Per definire l'andamento della resistenza del sensore in funzione della temperatura, è necessario calcolare il valore di R_0 , ovvero la resistenza del sensore a 0°C. Questo parametro è necessario per andare poi a misurare la temperatura del chip in fase di riscaldamento tramite la R_{sens} . La temperatura rilevata e la resistenza del sensore sono legati da una relazione lineare, secondo la seguente espressione:

$$R_{sens}(T) = R_0 (1 + a \cdot T) \quad (2.3)$$

All'interno dell'equazione, α è un parametro noto, ricavato sperimentalmente, pari a $4,23344 \cdot 10^{-3}$ [48]. Per trovare il valore di R_0 , basta invertire la formula (2.3) -l'entità della resistenza e della temperatura possono essere ricavate. R_{Sens} viene ricavata tramite la legge di Ohm, noti la tensione sull'ADC e il valore della corrente I_{Gen} -ricavata nel passaggio precedente della calibrazione. Per quanto riguarda la temperatura, durante la fase di taratura essa è rilevata mediante il sensore termico digitale.

La procedura per il calcolo di R_0 è piuttosto semplice. Il chip viene riscaldato con un impulso di corrente di durata 200 ms: la temperatura sale bruscamente e poi comincia a decrescere con andamento esponenziale. Il sistema in qualche istante torna a temperatura ambiente e la sua condizione termica viene monitorata grazie al sensore digitale. L'ADC del microcontrollore registra delle coppie di valori $T_{SensoreDigitale} - R_{Sens}$, che vengono mediati a gruppi di 10. I valori medi calcolati sui set di acquisizioni vengono confrontati: il software controlla che la differenza tra le temperature medie sia inferiore a 2°C e che la variazione della resistenza tra i due set di misure sia minore di 10 Ω . Se questo vincolo è effettivamente rispettato, R_0 si calcola a partire dalla equazione (2.4):

$$R_0 = \frac{R_{Sens}(T)}{1 + \alpha \cdot 10^{-3} T} \quad (2.4)$$

La relazione $R_{Sens}(T)$ è ora univocamente definita e la fase di calibrazione è terminata.

È importante aggiungere una notazione. Anche durante il riscaldamento del chip sarà necessario monitorare le variazioni di corrente, e applicare un fattore correttivo al valore di I_{Gen} per garantire una misura sempre accurata della resistenza del sensore. Ogni volta che si vuole leggere la tensione ai capi di R_{Sens} bisognerà leggere anche la tensione su una delle due resistenze di calibrazione (nella fattispecie l'acquisizione viene fatta su quella da 1K Ω).

Il sistema termico del chip è composto da un attuatore (riscaldatore) e da un dispositivo di controllo (sensore di temperatura): la presenza di questi elementi permette di realizzare un anello di retroazione: in particolare è stato implementato un controllo PID (*Proporzionale-Integrativo-Derivativo*) [49]. La retroazione consente di gestire la quantità di corrente fornita alla resistenza di riscaldamento per portare e mantenere il chip ad una certa temperatura prefissata.

2.2.4. Realizzazione della cartuccia per estrazione

Il dispositivo microfluidico occupa un volume complessivo pari a $52 \times 20 \times 5 \text{ mm}^3$; il vano centrale arriva a contenere $150 \mu\text{l}$ a cui si sommano i $20 \mu\text{l}$ dei canali. Per la sua realizzazione sono stati testati due diversi materiali (Figura 21).

In un primo momento si è usato il policarbonato in lastre di 4 m , lavorato con un una fresa a controllo numerico (CNC, *Cutter Numeric Control*) in grado di garantire una precisione di qualche decina di micron. La lavorazione risulta essere piuttosto complessa e lunga, dal momento per la sua conformazione il chip richiede che il pezzo sia lavorato in due fasi: una per modellare la superficie superiore del pezzo, con i canali e il profilo della camera di reazione, e l'altra per quella inferiore, dove si trovano l'alloggiamento del chip termico e lo spazio per i contatti elettrici dello stesso. Con questa tecnica non è possibile creare dei canali sepolti. La cartuccia microfluidica deve quindi essere composto di due pezzi: una è appunto quella ottenuta dalla lavorazione con la fresa, che poi deve essere chiusa con un foglio di polietilene spesso circa 1 mm , che va a sigillare la camera e i condotti. Per unire i due pezzi si possono usare colla a raggi UV o silicone, con le stesse considerazioni fatte per l'incollaggio del chip termico.

In un secondo momento, per realizzare la cartuccia si è utilizzata una stampante 3D. Questo macchinario funziona per deposizione di sottili strati successivi ($32 \mu\text{m}$) di una resina impermeabile e permette di realizzare una cartuccia con dei canali sepolti al suo interno. Sperimentalmente si è andati a verificare che il

materiale impiegato dalla stampante fosse compatibile con le reazioni biochimiche di estrazione. Il secondo prototipo della cartuccia è stato realizzato con l'aggiunta di due aperture sul lato superiore, che facilitano l'immissione del campione di sangue e l'estrazione dell'eluato finale contenente il DNA. Le aperture per la gestione dei fluidi biologici sono munite di un tappo, con un O-ring che garantisce la tenuta stagna per non avere perdite di carico quando la pompa è attiva.



Figura 21 Cartucce per estrazione di materiale genomico con il sistema automatico in via di sviluppo; sono state realizzate con la fresa (sinistra) e con la stampante 3D (destra)

2.3. Fluidica

Questa sezione è dedicata agli elementi fluidici attivi e passivi incorporati dallo strumento per eseguire l'estrazione del DNA.

I dispositivi di fluidica costituiscono una parte fondamentale dello strumento, che possiamo paragonare al suo "apparato circolatorio". Le cinque valvole e la pompa costituiscono la parte attuativa di questo sistema, mentre i tubi e le connessioni sono elementi inerti. Rientra nei dispositivi fluidici anche la cartuccia dentro alla quale fisicamente avviene il processo di estrazione.

Quando una delle valvole viene aperta, aria, buffer di lisi, alcol o buffer di eluizione possono essere aspirati e fluire nella cartuccia, per poi passare attraverso la pompa e arrivare alla vasca adibita ad accogliere gli scarti della reazione. La quinta valvola è riservata all'acqua deionizzata, che non è

strettamente necessaria ai fini dell'estrazione, ma viene usata per il risciacquo della pompa al termine del processo.



Figura 22 Strumento di estrazione automatica

2.3.1. Pompa piezoelettrica

Lo strumento fa uso di una micropompa, in particolare la mp6 prodotta da Bartels Mikrotechnik (Figura 23) [50]. La pompa costituisce uno dei pilastri della microfluidica all'interno del sistema di estrazione automatica: è necessaria per muovere i reagenti dalla loro sede fino alla cartuccia dove avviene la reazione. La pompa funziona in modalità di aspirazione: solo dopo essere passati nella camera di reazione, i liquidi, divenuti scarti, passano all'interno della pompa stessa e vengono convogliati in un serbatoio finale. Questo attuttore piezoelettrico va a sostituire sistemi di pompaggio ingombranti e costosi, come può essere una pompa a siringa, permettendo di contenere in maniera significativa le dimensioni del macchinario. Il flusso prodotto dalla mp6 non è perfettamente lineare come quello di una pompa a pistone, ma è sufficientemente continuo. Per aumentare la costanza dell'erogazione del liquido, è anche possibile usare dei tubi abbastanza lunghi (≥ 10 cm), che smorzano l'andamento pulsatile prodotto dalla pompa.



Figura 23 Pompa piezoelettrica mp6 (Bartels Mikrotechnik)

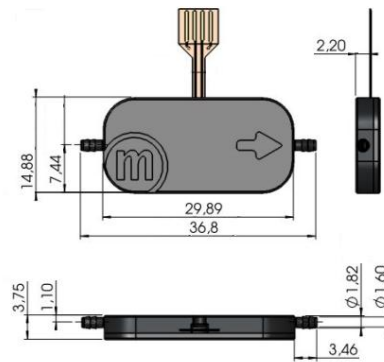


Figura 24 Proiezioni e misure della pompa mp6

La micropompa mp6 combina due attuatori all'interno di un unico involucro. E' estremamente piccola, con dimensioni e peso ridotti (Figura 24): il volume è pari a $30 \times 15 \times 3.8 \text{ mm}^3$ e peso è di 2 g. Ciascuna delle due camere interne è dotata di una membrana piezoelettrica: il suo principio di funzionamento è basato su questo diaframma controllabile elettricamente, combinato con delle valvole passive. Il sistema a due camere garantisce alla pompa un'elevata capacità di adescamento con buona tolleranza a particelle e bolle, in modo che gas, liquidi e anche miscele possano essere pompate in modo efficiente. Nell'intero dispositivo, l'unico materiale che entra in contatto con il fluido è il PPSU (Polifenilensulfone), una plastica di cui sono fatte tutte le sue componenti principali che si presenta inerte alle sostanze chimiche e resistente ad urti e alte temperature. Le connessioni fluidiche della pompa in ingresso e in uscita hanno un diametro pari a 1.6 mm, cui possono essere collegati dei tubi flessibili con diametro interno di 1.3 mm.

Come appena accennato, la mp6 sfrutta il fenomeno della piezoelettricità, ovvero la proprietà di alcuni cristalli di deformarsi se soggetti all'applicazione di una differenza di potenziale e viceversa, di generare una tensione ai propri capi una volta compressi. Questa caratteristica permette di costruire attuatori e sensori molto piccoli, che trovano applicazioni nei più svariati ambiti. Naturalmente nel nostro caso il materiale piezoelettrico altera la sua forma seguendo il profilo della tensione imposta dal microcontrollore. La potenza richiesta da questi dispositivi non è elevata: nel nostro caso il consumo è addirittura inferiore a 200mW. Tuttavia, dal momento che il voltaggio richiesto

dall'mp6 per una deformazione percettibile e funzionale ai fini del pompaggio è estremamente alto (parliamo di 250V, a dispetto dei 12V forniti per l'alimentazione della scheda), è necessario dotare il sistema elettronico di una soluzione circuitale in grado di trasformare una tensione continua in ingresso in una più elevata all'uscita, sempre in DC.

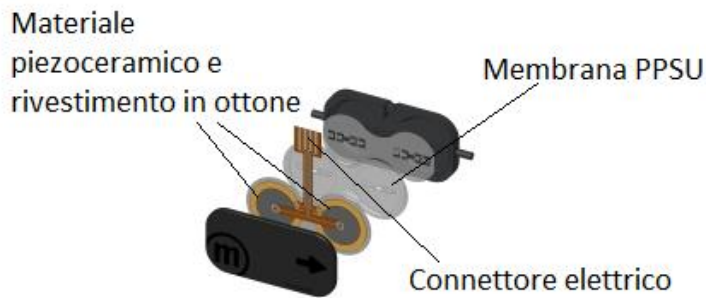


Figura 25 Spaccato della pompa mp6. Si possono vedere le membrane attive (piezo) e passive (PPSU) all'interno del package, con anche le connessioni per pilotare la pompa

Nelle due camere che costituiscono la pompa, il materiale piezoceramico (Figura 25) è montato su una membrana con diametro di 8 mm rivestita di ottone che si deforma quando viene applicata la tensione. A causa del voltaggio, il piezo si schiaccia verso il basso e questo colpo provoca lo spostamento del fluido fuori dalla camera di pompaggio. Le valvole passive poste su entrambi i lati di ogni vano della pompa definiscono la direzione del flusso. Quando la tensione diminuisce, la deformazione del piezoelettrico provoca una risalita della membrana, il liquido viene aspirato e la camera si riempie di nuovo.

Per quanto riguarda le valvole passive presenti all'interno dell'mp6, il loro funzionamento si basa su un rapporto tra pressioni. Quando la pressione all'interno della camera della pompa è minore di quella esterna la valvola d'ingresso si apre permettendo il passaggio del liquido; se al contrario la pressione interna supera quella esterna, essa rimarrà chiusa. Lo stesso discorso può essere fatto sulla valvola d'uscita. Tipicamente le valvole hanno una struttura a mensola: la loro conformazione permette di regolare la direzione del flusso, requisito fondamentale per il buon funzionamento di una pompa [51].

Ogni secondo la pompa può fare diverse centinaia di cicli di pompaggi. Le prestazioni di pompaggio possono essere controllate mediante la regolazione di due parametri: la tensione e la frequenza dell'onda quadra con cui si pilota lo strumento.

2.3.1.1. Controllo della Pompa

L'imp6 necessita di un voltaggio elevato per funzionare. È stato necessario inserire sulla scheda elettronica un circuito per portare la tensione ai valori richiesti (*boost converter*). Il *boost* è un convertitore DC-DC; gli elementi che compongono il circuito sono solamente un induttore, interruttore passivo (diodo) e un transistor usato come interruttore attivo (Figura 26). La capacità C stabilizza la tensione sul carico. Il funzionamento del convertitore di tensione si basa sul fatto che L e C sono componenti che tengono "memoria" del loro stato precedente: la corrente dell'induttore non può variare istantaneamente, così anche la capacità non può subire variazioni di tensione repentine.

Il circuito ha due stati di funzionamento: nel primo, il MOSFET S è chiuso e la corrente I scorre attraverso di esso senza arrivare al carico. Nella fase successiva, l'interruttore attivo viene aperto e la tensione all'anodo del diodo aumenta: D si polarizza e la corrente può fluire verso l'uscita e caricare la capacità C.

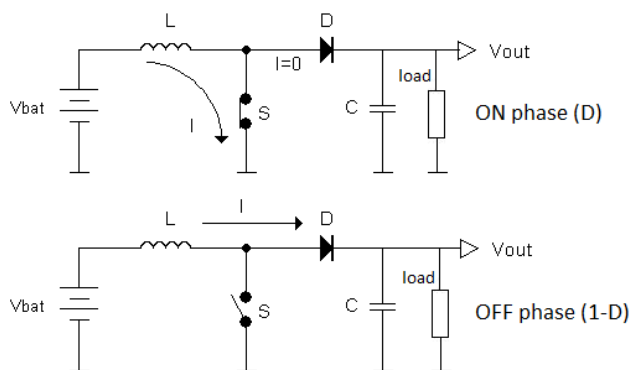


Figura 26 Schema di funzionamento del circuito di step up. Durante la ON phase il l'interruttore attivo S è chiuso, mentre in OFF è aperto. La tensione di uscita rimane costante, a meno di un'oscillazione attorno al valor medio

A seconda del *duty cycle* -ovvero del tempo in cui S conduce rispetto all'intero periodo di funzionamento T (Figura 27)- cambia la tensione in uscita.

L'equazione che regola il convertitore boost è:

$$V_{out} = \frac{1}{1-D} V_{bat} \quad (2.5)$$

dove D è il duty cycle; più il tempo di accensione dell'interruttore è breve, più aumenta la tensione sul carico [52].

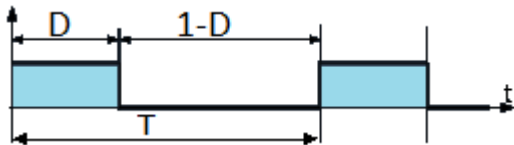


Figura 27 Funzionamento del transistor S nel tempo. T è il periodo dell'interruttore, mentre il duty cycle D corrisponde al tempo in cui il MOSFET è conduttivo

Nel circuito realizzato, V_{bat} è la tensione di alimentazione dell'intero circuito e vale 12 V. Il controllo dell'interruttore NMOS è attuato mediante il microcontrollore della scheda e un MIC5020 [53], un driver per interruttori *low-side*. Il carico, rappresentato dalla pompa, è di tipo puramente capacitivo.

La tensione di lavoro della pompa è impostata tramite il comando che viene inviato alla scheda elettronica attraverso l'USB. Per regolare la tensione sul carico è utile creare un controllo in anello chiuso. Il *duty cycle* può essere di volta in volta ritoccato, in modo da garantire una V_{out} molto precisa e stabile. Il segnale di retroazione è rilevato tramite un partitore di tensione posto in parallelo al carico: questa tensione –scalata di circa un fattore 100 rispetto a quella erogata alla pompa- viene passata ad un ADC del microcontrollore, che agisce su D (Figura 28).

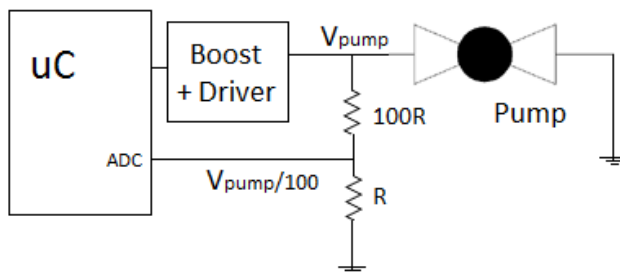


Figura 28 Schema di funzionamento con controllo in anello chiuso della pompa

La regolazione del *duty cycle* per controllare la tensione sulla pompa è attuata tramite un controllo PD (proporzionale-derivativo):

$$D(i) = D(i - 1) - k_p \cdot \varepsilon(i) - k_d \cdot (\varepsilon(i) - \varepsilon(i - 1)) \quad (2.6)$$

All' interno della formula, $D(i)$ e $\varepsilon(i)$ sono rispettivamente il duty cycle e l'errore all'istante attuale, mentre $D(i - 1)$ e $\varepsilon(i - 1)$ si riferiscono alla fase precedente. L'errore ε viene calcolato come differenza tra tensione attesa e tensione misurata:

$$\varepsilon(i) = V_{pump} - V_{pump\ ADC}(i) \quad (2.7)$$

I parametri con cui vengono pesati gli errori per attuare la correzione *sul duty cycle* sono k_p e k_d . Sia il coefficiente proporzionale che quello derivativo sono stati impostati a 0,5.

Per azionare la pompa non è sufficiente fornirle un voltaggio elevato: la tensione deve essere pulsatile, in modo da permettere il movimento sincopato delle membrane piezoelettriche –che attuano l'azione di pompaggio. Per ottenere una tensione intermittente, è stato introdotto un secondo interruttore all'interno del circuito, e un altro MIC5020 per pilotarlo. La frequenza di commutazione del transistore determina la velocità con cui si caricano e scaricano i piatti capacitivi della pompa. Dal momento che la pulsazione di questo interruttore ha a che fare con un azionamento meccanico, le frequenze utili sono molto basse, l'intervallo di funzionamento è compreso tra i 30 e i 70 Hz.

Il risultato del controllo implementato è un'onda quadra molto stabile in ampiezza (Figura 29).

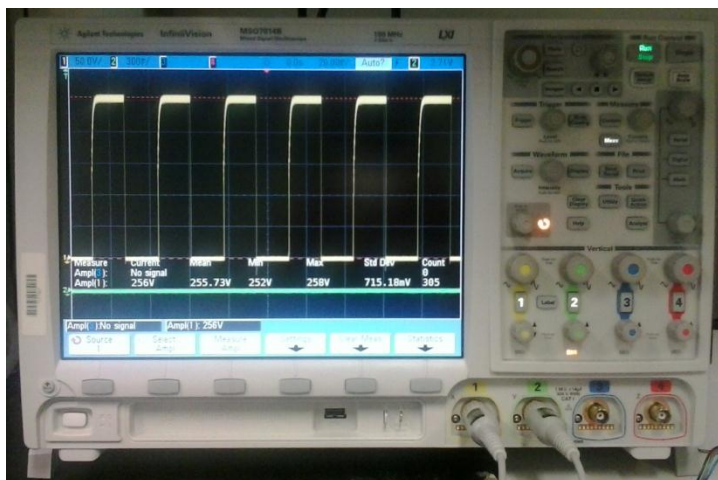


Figura 29 L'oscilloscopio misura l'onda quadra forzata sull'ingresso della pompa

2.3.1.2. Caratterizzazione della Pompa

Il controllo della pompa piezoelettrica è attuato tramite due parametri:

- tensione di alimentazione
- frequenza di commutazione dell'interruttore, che pilota la tensione sui due attuatori piezoelettrici e provoca il movimento sincopato delle membrane, necessario per avere l'azione di spinta (o aspirazione) della pompa

Bisogna risalire al flusso prodotto dalla combinazione di queste due grandezze. Il datasheet della mp6 fornisce una caratterizzazione relativa alla modalità di spinta, mentre per lo strumento di estrazione automatica si è preferito utilizzare la pompa in aspirazione.

Per caratterizzare il dispositivo è stato allestito un set up sperimentale molto semplice: le performance della pompa vengono valutate misurando una variazione di massa. La pompa preleva acqua deionizzata da un becker e la fa fluire in un altro recipiente, identico al primo, poggiato sul piatto di una bilancia. Dato che il volume del liquido nel secondo becker aumenta nel tempo, la bilancia rileva un aumento di peso. Sapendo che la densità d dell'acqua deionizzata è pari a 1 Kg/dm^3 , siamo in grado di ricavare le variazioni del volume di liquido istante per istante:

$$V(t) = \frac{m(t)}{d} \quad (2.8)$$

Possiamo quindi calcolare la derivata del volume nel tempo, e ricavare il flusso generato dalla pompa:

$$F = \frac{\partial V(t)}{\partial t} \quad (2.9)$$

Il sistema per la caratterizzazione della mp6 in aspirazione si compone dei seguenti elementi (Figura 30):

- bilancia Kern ABS 120-4: è una bilancia analitica con sensibilità pari a 10^{-4} g, e carico massimo sopportabile di 120 g. Dispone di una porta seriale per la comunicazione con dispositivi esterni; la frequenza di campionamento dei dati inviati al pc è di circa 4 Hz (un dato ogni 0,23 s).
- due becker, posizionati alla stessa altezza. Sono appositamente stati scelti dei contenitori con identico diametro e volume, rispettivamente 5 cm e 200 cm³.
- tubi in silicone, con diametro esterno pari a 2,5 mm e diametro interno di 1,5 mm, connessi all'ingresso e all'uscita della pompa piezoelettrica. Sono stati usati due tubi molto lunghi, per rendere più uniforme il flusso: le discontinuità di flusso dovute al movimento sincopato delle membrane piezo si smorzano lungo il tragitto.
- Acqua deionizzata

La pompa è stata posizionata all'interno di un contenitore isolante per ridurre il rumore

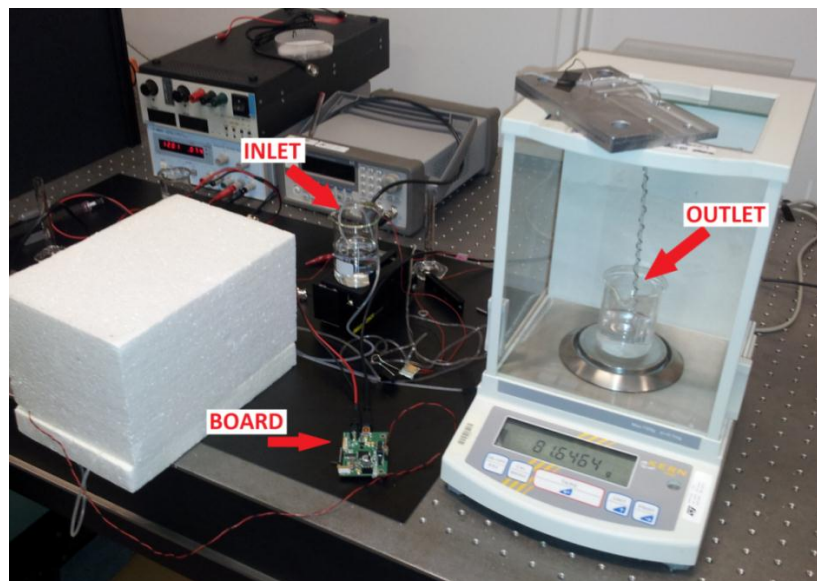


Figura 30 Sistema di caratterizzazione della pompa mp6

Data l'elevata sensibilità della bilancia, è necessario che il tubo che arriva al becker di scarico rimanga fermo, senza subire oscillazioni. Il contenitore di scarico poggiato sul piatto della bilancia deve già essere parzialmente pieno d'acqua, in modo che il tubo sia immerso fin dall'inizio delle acquisizioni di peso; non è importante il volume iniziale di acqua, è sufficiente accertarsi che il peso totale alla fine della misurazione non superi il limite di carico della bilancia (120 g). L'acqua nei becker è soggetta ad evaporazione: in condizioni statiche -quando cioè la pompa non è attiva- la bilancia rileva una lieve diminuzione di peso (circa $1,6 \mu\text{l/s}$). Per caratterizzare la pompa in modo accurato, è sufficiente applicare un fattore di correzione al flusso misurato.

Per quanto riguarda l'alimentazione della pompa, è stato mantenuto lo stesso assetto impiegato all'interno dello strumento di estrazione: la pompa è pilotata tramite il microcontrollore e il *boost* della scheda elettronica dedicata.

Una volta realizzato il sistema di caratterizzazione, si è monitorato l'andamento del flusso al variare della frequenza, campionando ogni 10 Hz l'intervallo utile di misura (30-70 Hz); per ogni frequenza sono stati registrati i flussi corrispondenti a tre diverse condizioni di alimentazione (150, 200 e 250V). In Tabella 1 è riportato solo il flusso medio relativo ad ogni condizione di funzionamento testata

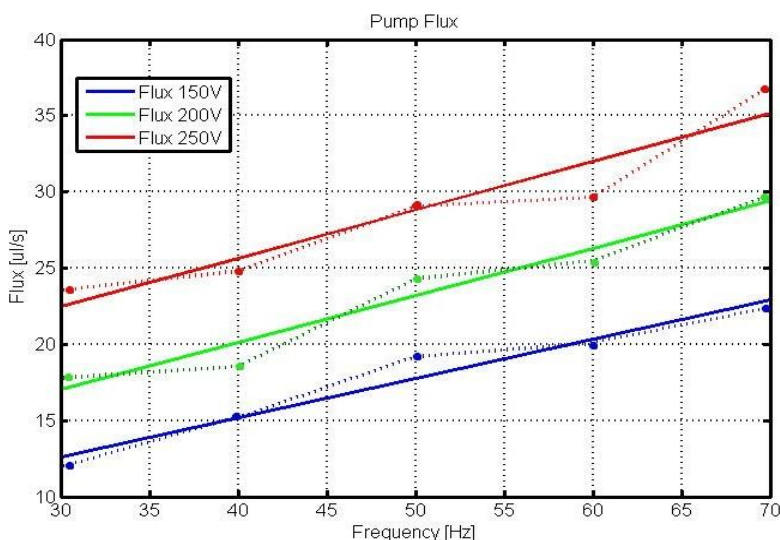


Figura 31
Caratteristica
del flusso della
pompa al
variare di
tensione e
frequenza

Frequenza [Hz]	Flusso a 150V [μl/s]	Flusso a 200V [μl/s]	Flusso a 250V [μl/s]
70	22,4	29,83	37
60	20,1	25,53	29,67
50	19,21	24,33	29,08
40	15,23	18,58	24,83
30	11,97	17,83	23,58

Tabella 1 Risultati sintetici delle prove di caratterizzazione della pompa

	Pendenza	Coeff. di regressione lineare
Flusso 150V	0,257 [μl/s·Hz]	95,9%
Flusso 200V	0,309 [μl/s·Hz]	95%
Flusso 250V	0,317 [μl/s·Hz]	90,3%

Tabella 2 La tabella riporta i dati con l'andamento del flusso al variare dei vari parametri e con i coefficienti di linearità

Le prove effettuate mostrano un andamento molto lineare del flusso sia in funzione della frequenza che della tensione (Figura 31 e Tabella 2); i coefficienti di regressione lineare confermano il dato visivo. Mediamente la caratteristica del flusso al variare della frequenza ha una pendenza pari a 0,29 μl/s·Hz; la variazione dovuta alla tensione è di circa 1,2 μl/s·V.

2.3.2. Valvole a solenoide

Lo strumento di estrazione è dotato di quattro serbatoi, più una presa d'aria. I serbatoi contengono i reagenti che devono fluire all'interno della cartuccia. Il buffer di lisi, l'alcol e il buffer di eluizione vengono aspirati in successione dalla pompa per isolare il DNA a partire dal campione biologico grezzo. L'ultimo serbatoio contiene acqua deionizzata e sterilizzata, che non è necessaria per il processo di estrazione del DNA, ma permette di pulire i componenti fluidici una volta portato a termine il processo biologico.

Per la buona riuscita dell'estrazione è necessario poter controllare con precisione l'ingresso dei vari fluidi nella camera di reazione. Al tempo stesso è fondamentale la non contaminazione tra i reagenti dei diversi serbatoi.

Nello strumento per estrazione automatica di DNA non è stato possibile usare valvole passive, che funzionano semplicemente per differenza di pressione tra la camera a monte e la camera a valle [51]. Sono valvole economiche, ma non adatte ai nostri scopi: il loro funzionamento è prettamente meccanico, dunque incompatibile con la presenza della pompa. Una volta attivata la pompa infatti, tutte le valvole si aprirebbero riversando contemporaneamente i reagenti nella camera di reazione della cartuccia. Sono state quindi usate delle valvole attive; in particolare si tratta di valvole a solenoide, ovvero a comando elettromagnetico. Il movimento dell'otturatore in questi dispositivi è causato dal campo prodotto da un solenoide incorporato nella valvola stessa: la posizione della membrana otturatrice abilita o interdice la fuoriuscita dei reagenti dai serbatoi.

Nelle elettrovalvole la membrana otturatrice è l'elemento meccanico che decide la condizione di apertura o chiusura del canale di passaggio, esattamente come avviene nelle valvole passive. Lo stato della valvola però è regolabile in maniera indipendente dalle pressioni in gioco nelle camere a monte e a valle della membrana stessa. Usando delle valvole attive, come le elettrovalvole, la gestione dei serbatoi può essere implementata in maniera molto accurata.

Quando il "tappo" della valvola situato sul canale viene alzato o abbassato, varia la pressione all'interno delle camere del dispositivo. Questo permette la fuoriuscita o la ritenzione del fluido immesso. Il movimento della membrana è attuato dalla bobina incorporata nella valvola. Quando viene percorso da corrente, il solenoide attira a sé un nucleo ferroso presente all'interno della membrana stessa, causando lo spostamento meccanico dell'elemento occludente del sistema. L'elettrovalvola ha solo due stati possibili, aperto o chiuso, quindi il flusso è del tipo "tutto / niente". La posizione di equilibrio del sistema corrisponde allo stato di riposo, quando il dispositivo non è alimentato. Solo se viene fornita una tensione la valvola si attiva e si apre. Da un punto di vista energetico, questo significa che la valvola consuma potenza solo quando è aperta.

Lo schema di funzionamento delle valvole è riportato in figura (Figura 32). Le valvole sono sempre collegate a massa; un interruttore MOSFET abilita il collegamento con l'alimentazione (12 V) e quindi il passaggio della corrente all'interno del solenoide. Quando il gate del transistor è tenuto alto dal microcontrollore, la corrente può scorrere nella valvola e l'otturatore si apre e il fluido può uscire dal serbatoio.

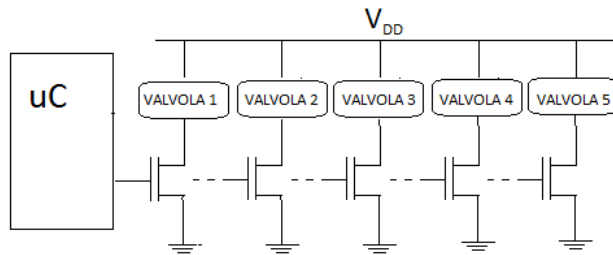


Figura 32 Schema di funzionamento delle valvole della Dolomite

Una volta che la membrana occludente libera il canale, solitamente il flusso del liquido dipende unicamente dalla pressione che il liquido stesso esercita: nel nostro sistema di estrazione invece, il movimento dei fluidi è soprattutto causato dall'attivazione della pompa, che aspira il reagente dal serbatoio verso la cartuccia.

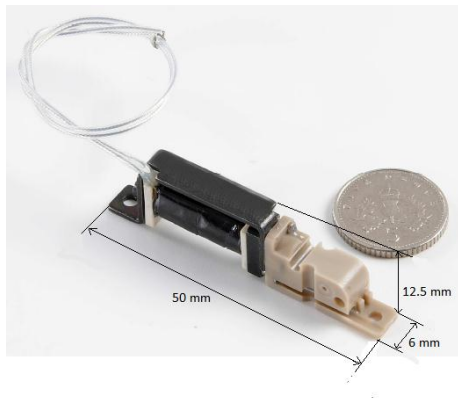


Figura 33 Valvole a solenoide (Dolomite)

Nello strumento sono state introdotte cinque Dolomite Miniature Isolation Solenoid Valve (Figura 33) [54]. È stato scelto il loro formato pilotabile con una tensione pari a 12V compatibile con la scheda progettata. Sono dispositivi di piccolo taglio, quindi si prestano bene per l'integrazione in sistemi microfluidici; il volume complessivamente occupato è di $6 \times 12.5 \times 50 \text{ mm}^3$. Le elettrovalvole

scelte hanno un'eccellente resistenza chimica: sono completamente composte da PEEK e perfluoroelastomero, tra i polimeri con le migliori performance dal punto di vista della robustezza ad agenti chimici aggressivi.

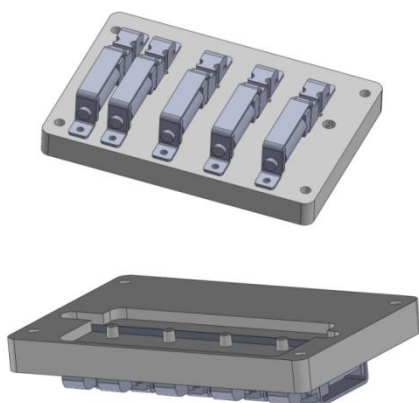


Figura 34 Elettrovalvole montate sul supporto plastico, viste rispettivamente da sotto e da sopra

Le valvole sono state montate su un supporto in polietilene, realizzato tramite lavorazione a fresa (Figura 34). La buona tenuta tra le elettrovalvole e l'elemento plastico è assicurata dalla presenza di un O-ring. Per creare questo il supporto si è utilizzata una CNC (Cutter Numeric Control): è stato fatto in modo che da una parte ci siano i cinque dispositivi della Dolomite, mentre sul lato superiore poggiano i serbatoi. Sotto i serbatoi c'è un canale coperto, comune a tutti i reagenti: quando una valvola si apre, il liquido viene risucchiato in questo dotto per poi dirigersi verso la camera di reazione.

2.3.3. Tubi e connettori

La fluidica è una delle colonne portanti del sistema per la preparazione automatica dei campioni biologici. Lo strumento dispone di elementi che svolgono un ruolo attivo nel processo di estrazione, che sono necessari per la movimentazione dei liquidi (pompa, valvole). Tuttavia, lo strumento non potrebbe funzionare senza la presenza di adeguate connessioni fluidiche, che hanno una funzione parimenti essenziale al fine del conseguimento dell'estrazione del DNA. Stiamo parlando di elementi passivi come tubi e connettori.

È importante che non esistano perdite all'interno del sistema fluidico: una qualsiasi fessura si tradurrebbe a livello pratico in un'inefficienza dell'azione di aspirazione della pompa. Le interfacce fluidiche sono numerose e sono un aspetto critico della gestione dei reagenti.

L'interfaccia fluidica tra le varie parti è sempre realizzata tramite connettori Luer. Il Luer è un tipo di connessione standardizzata, specifica per l'ambito fluidico: è composto da un elemento maschio e da un elemento femmina, che si incastrano perfettamente in modo da garantire l'assenza di perdite. Le pareti del Luer hanno un'inclinazione pari al 6%, che rende molto agevole l'incastro e salda la tenuta.

Sono stati usati tubi in silicone, con diametro interno di 1,2 mm, esterno di 3 mm. La lunghezza delle tre tratte necessarie si aggira intorno agli 8-10 cm ciascuna. La flessibilità del materiale permette di adattare il tubo ai connettori.

2.4. Il motore

Nello strumento per estrazioni automatiche, la presenza di un motore è necessaria per agitare le microsferi di silice all'interno della camera di reazione. Esso muove un magnete permanente montato su un braccio, facendolo scorrere avanti e indietro al di sopra della cartuccia (Figura 35). È stato scelto di utilizzare un motore passo-passo.

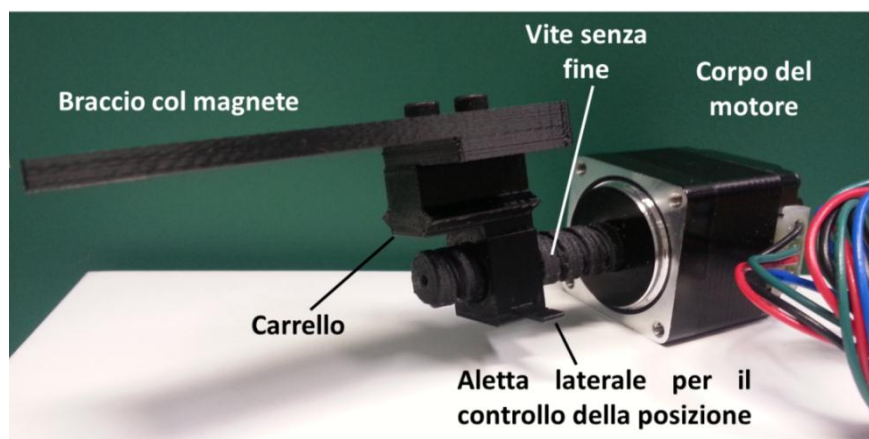


Figura 35 Motore passo-passo e ingranaggi per la movimentazione delle microbiglie all'interno della cartuccia di estrazione

Il motore passo-passo produce un movimento circolare. Per passare dal moto rotatorio allo spostamento traslatorio desiderato, si è montata sull'albero motore una "vite senza fine", o "vite evolvente", con passo di 5 mm. Su questo ingranaggio viene avvitato un carrello (Figura 36 e Figura 37): esso è costretto tra due guide metalliche parallele alla direzione di moto che fanno da binari. Il carrello è un elemento meccanico dotato di una madre vite: quando la vite senza fine gira in maniera concorde al rotore, il filetto interno al carrello segue le scanalature della vite stessa e procede con un movimento rettilineo.

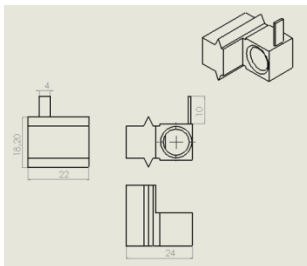
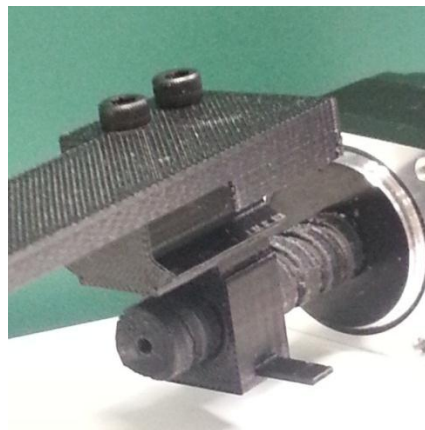


Figura 36 proiezioni del carrello in grado di muoversi lungo la vite senza fine montata sull'albero del motore

Figura 37 particolare dell'ingranaggio del motore, carrello montato sulla vite senza fine



Per invertire la direzione di marcia del braccio meccanico con ancorato il magnete, è sufficiente cambiare il verso di rotazione del motore. Se la vite evolvente gira in senso orario, il carrello va avanti, altrimenti procede all'indietro.

2.4.1. I motori passo-passo

I motori passo-passo, detti anche *step* o *stepper motor*, sono dispositivi elettromeccanici in grado di convertire impulsi elettrici in movimenti meccanici discreti.

Questi motori si compongono di uno statore esterno che è fisso, e di un rotore, l'elemento libero di muoversi e capace di generare una coppia col suo movimento. Sullo statore sono situati i poli, cioè delle protuberanze con attorno degli avvolgimenti metallici. Quando queste bobine vengono percorse da corrente, si genera un campo magnetico tra i poli stessi (Figura 38).

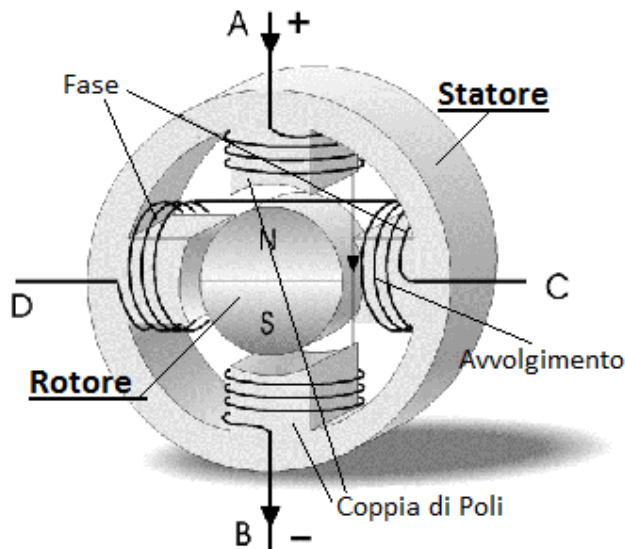


Figura 38 Schema di uno stepper motor biplare. All'esterno è situato lo statore, con due coppie di poli e due fasi; all'interno c'è il rotore, che segue il campo magnetico che si genera quando le fasi vengono alimentate

Il principio di funzionamento dei motori passo-passo è molto semplice: quando una barra di ferro (il rotore) è in grado di ruotare all'interno di un campo magnetico (generato dallo statore), essa si allinea al campo. Se cambia la polarità del campo, il rotore tenderà a ruotare in modo tornare parallelo ad esso. Il movimento del rotore genera una coppia di forze meccaniche [52]. Gli stepper sono caratterizzati da una serie di elementi che ne fanno la scelta privilegiata per tutte quelle applicazioni che richiedono alta precisione nello sposamento e nel controllo della velocità angolare ma che non necessitano di una coppia particolarmente elevata. Dal momento che la rotazione può essere suddivisa in

un largo numero di passi, non è necessario pilotarlo in anello chiuso: dunque non bisogna aggiungere dei sensori per il monitoraggio di velocità e posizione.

La velocità di rotazione che può essere raggiunta dai motori passo-passo è piuttosto limitata. Accelerazioni troppo improvvise comportano non solo la diminuzione della coppia prodotta dal motore ma può portare anche a una “perdita di passi”: in altre parole, il rotore non riesce a seguire la rapidità degli impulsi generati dai poli dello statore e quindi rimane indietro. Per ovviare la problematica del surriscaldamento dei motori passo-passo, è sufficiente metterlo in alta impedenza nel momento in cui non deve muoversi; in questo modo si impedisce che la corrente scorra attraverso gli avvolgimenti dello statore se non è necessario, e che dunque venga inutilmente dissipata potenza.

I motori passo-passo si suddividono in tre categorie:

- **Motori passo-passo a magnete permanente**

Il rotore è un magnete permanente; sono i motori più economici tra gli stepper, ma hanno anche la minor risoluzione angolare (la precisione si aggira tra i 30° e i 3° per passo, mentre l’accuratezza delle altre due tipologie può arrivare ad angoli minori di 1.8°)

- **Motori passo-passo a riluttanza variabile**

Il rotore è di materiale ferromagnetico. Quando si genera un campo elettromagnetico alimentando le fasi dello statore, il rotore si muove verso la posizione di riluttanza minima. La costruzione di questo motore è molto semplice, e il rotore in ferro dolce permette rapide accelerazioni e il mantenimento di elevate velocità di rotazione. Il maggior difetto di questo sistema è la mancanza di una coppia di stallo.

- **Motori passo-passo ibridi**

Questi macchinari sono realizzati usando un rotore formato da due ruote dentate montate su un magnete permanente; il campo generato da quest'ultimo è orientato in direzione perpendicolare al piano del campo magnetico variabile dello statore. Sono i motori più performanti tra gli i passo-passo, ma hanno un costo più elevato.

Figura 39 1.8' High Torque Stepper Motor, motore passo-passo con funzionamento a riluttanza variabile

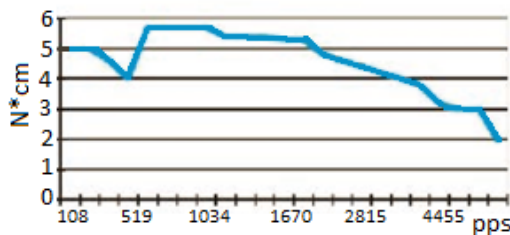
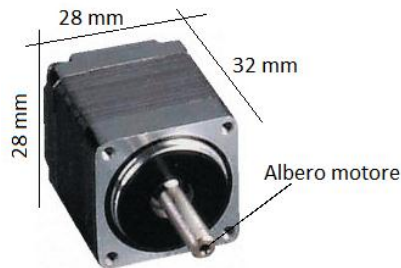


Figura 40 Grafico della caratteristica coppia (N*cm) vs velocità (pps, *pulse per second*) dello motore passo-passo

Nel nostro sistema per estrazioni automatiche è stato inserito un 1.8' High Torque Stepper Motor, modello 535 0344 (Figura 39). Si tratta di un motore passo-passo a riluttanza variabile, che garantisce una coppia massima di 6 N·cm (Figura 40). La risoluzione degli spostamenti angolari è alta, la circonferenza può essere suddivisa in 200 passi [55]. È un motore a due fasi, alimentate a 3,8 V; in ognuna delle fasi possono scorrere al massimo 670 mA di corrente. È caratterizzato da un volume abbastanza compatto ($28 \times 28 \times 32 \text{ mm}^3$), a cui si aggiungono i 2 centimetri dell'albero motore che fuoriesce dal corpo centrale.

Per la realizzazione dell'estrattore robotizzato è sufficiente che il motore si muova piuttosto lentamente: le microbiglie di silice sono immerse in un liquido semiviscoso come il sangue o le miscele derivanti dai lavaggi con i reagenti, e devono vincere una certa inerzia per seguire gli spostamenti del magnete.

2.4.2. Sistema di pilotaggio del motore

I motori passo-passo funzionano grazie all'accoppiamento tra il campo magnetico variabile generato tra i poli dello statore e il rotore, che si muove in modo da allinearsi sempre con il campo stesso. La temporizzazione e la successione dell'alimentazione delle fasi decide della velocità e del verso di rotazione del motore.

I motori passo-passo vengono controllati gestendo dei ponti formate da quattro interruttori che, a seconda del loro stato, abilitano o meno il passaggio della corrente negli avvolgimenti: questi elementi circuitali si chiamano ponti ad H. La polarità del campo magnetico tra i poli dello statore dipende dal percorso chiuso che la corrente trova tra l'alimentazione e la massa. A seconda della sequenza degli impulsi con cui vengono alimentate le fasi cambiano il verso e la velocità con cui gira il rotore. Generalmente ad ogni istante c'è un avvolgimento sullo statore polarizzato –cioè alimentato e percorso da corrente, a meno che il motore venga messo in uno stato di alta impedenza.

Per gestire il motore è impiegato un apposito driver montato sulla scheda elettronica di controllo. Si tratta dell'L6470 [56], un sistema integrato prodotto da ST Microelectronics specifico per pilotare i motori passo-passo a due fasi con controllo a microstep. Questo dispositivo integra due architetture full-bridge, costituiti da quattro interruttori di potenza DMOS. Gli interruttori presentano una bassa resistenza in fase di ON (minore di $0,5 \Omega$), che limita la dissipazione di potenza. Ogni ponte ad H ha anche un sistema di *current sensing* che permette di controllare la corrente che alimenta le fasi del motore e di implementare una protezione per l'*overcurrent*. Il dispositivo contiene anche un set di registri facilmente programmabili: queste zone di memoria servono ad impostare i parametri di spostamento angolare e i profili di velocità, accelerazione e decelerazione.

2.5. Fotosensori

I fotosensori appartengono alla famiglia dei dispositivi optoelettronici. Questi sensori sono stati inseriti nel sistema di estrazione automatica per avere un controllo più preciso di quanto avviene durante all'interno dello strumento. In particolare è utile monitorare due aspetti durante il processo di estrazione:

- il movimento del motore nella fase di shaker delle microbiglie, per evitare che il carrello montato sulla vite senza fine vada a urtare contro i limiti del percorso
- lo stato di riempimento della cartuccia, in modo da verificare l'effettivo riempimento e svuotamento della cella di reazione

I fotosensori derivano dall'accoppiamento di due elementi:

- una sorgente luminosa o un fotoemettitore, che converte un segnale elettrico modulato in impulsi di energia luminosa.
- un elemento in grado di reagire alla presenza della luce, detto fotoricevitore: esso trasforma l'energia dei fotoni incidenti in grandezza elettrica

I fotosensori sono dispositivi largamente impiegati, dato il loro basso costo e la loro versatilità; permettono di rilevare la presenza di oggetti di qualunque materiale, purché interrompano o modifichino il flusso luminoso tra sorgente e fotoricevitore [57] (Figura 41).

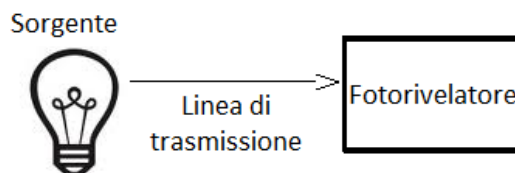


Figura 41 Schema logico di un fotosensore

Solitamente il fotoemettitore è un LED (*Light Emitting Diode*): quando questo componente è polarizzato in senso diretto, viene percorso da corrente ed emette

radiazioni luminose ad una certa lunghezza d'onda; il fenomeno è detto elettroluminescenza.

I LED hanno un duplice vantaggio: generano luce con uno spettro praticamente deltiforme e hanno delle dimensioni molto ridotte. Talvolta al LED viene affiancato un sistema ottico per direzionare il fascio di luce emessa. Per quanto riguarda il fotoricevitore, può trattarsi di un fotodiodo o di un fototransistore: in entrambi i casi, quando i fotoni incidono sull'elemento sensibile, si genera una fotocorrente proporzionale alla luce incidente sul sensore.

Esistono poi diversi tipi di fotoricevitori, suddivisi in due categorie: sensori termici (fotopila, fotoresistenza) o a semiconduttore (fotodiodi, fototransistori). I sensori utilizzati nello strumento per la preparazione aromatica dei campioni sono fototransistori. Nei fototransistori, l'intensità della corrente generata per effetto fotoelettrico dipende dall'intensità della radiazione luminosa e dalla tensione presente ai capi del sensore.

Il principio di funzionamento è molto semplice: quando la luce generata dalla sorgente raggiunge la zona sensibile del dispositivo, l'energia incidente genera delle cariche all'interno della zona svuotata. Queste cariche libere si muovono seguendo il campo elettrico della regione di svuotamento: il loro moto a livello macroscopico si traduce in un flusso di corrente. Quando al contrario il percorso tra sorgente e fotorivelatore è interdetto, il sensore si comporta come un interruttore aperto. I fototransistori hanno una sensibilità alla luce molto maggiore rispetto agli altri dispositivi citati. Infatti, dal momento che il fototransistore è fondamentalmente un transistor bipolare, la fotocorrente generata risulta naturalmente amplificata proprio a causa del funzionamento del bipolare stesso.

I fotosensori in commercio possono essere classificati in due categorie principali:

- sensori a sbarramento
- sensori a riflessione diretta.

I sensori a sbarramento sono i più semplici, funzionano sul principio dell'interruzione del fascio di luce diretto verso il rivelatore. L'emettitore e il ricevitore sono posizionati in due contenitori diversi, e devono essere perfettamente allineati. Qualunque oggetto non trasparente che attraversi la linea di trasmissione provoca un'interruzione del flusso di corrente del fototransistore.

Nei dispositivi a riflessione diretta invece, la sorgente e l'elemento sensibile non sono posti uno di fronte all'altro, ma si trovano in due celle affiancate e otticamente non comunicanti. Il sensore risponde a qualunque oggetto che rifletta la luce proveniente dal LED verso il fotorecettore.

2.5.1. Fotosensori per il controllo del motore

L'agitazione delle microsferi di silice nella camera di reazione avviene tramite il movimento di un carrello al quale è ancorato un magnete permanente. La traslazione orizzontale del carrello è legata alla vite senza fine montata sull'albero rotore del motore ed è limitata proprio dalla lunghezza di questo ingranaggio. Un controllo impreciso del motore può portare il carrello ad urtare contro i limiti che delimitano lo spazio entro cui può muoversi il carrello; se il rotore del motore continua a girare anche dopo l'impatto, il filetto ricavato nel carrello si rompe, rendendo dunque impossibile la trasformazione del moto da circolare a rettilineo. È quindi necessario assicurarsi che il carrello non si sposti al di là di soglie prestabilite.

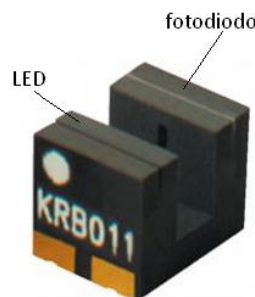


Figura 42 Fotosensore Kingbright KRB011 per il controllo della posizione del motore

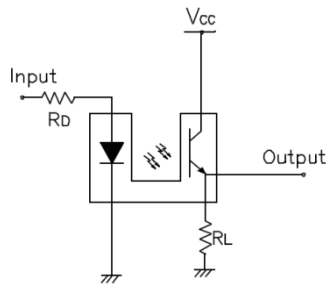


Figura 43 Schema circuitale del fotosensore

Per monitorare lo spostamento orizzontale del carrello sono stati impiegati tre fotosensori Kingbright KRB011 (Figura 42 e Figura 43) [58]. Questi sensori appartengono alla categoria dei rivelatori ottici a sbarramento. Al carrello è stata aggiunta un'aletta laterale sufficientemente sottile da passare tra il fotodiode e il LED (Figura 44) che permette di identificare la posizione del carrello stesso.

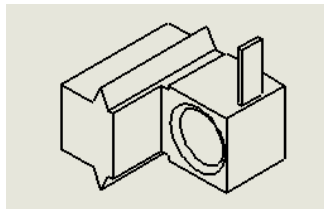


Figura 44 Carrello del motore

Quando l'asticella va ad interrompere il flusso luminoso che arriva all'elemento sensibile, la tensione che si legge al piedino d'uscita del sensore è nulla, perché il foto interruttore non si accende. Il microcontrollore legge il segnale in uscita dal sensore come una grandezza digitale ed è in grado di agire di conseguenza, invertendo il senso di marcia del motore o fermandolo, se necessario. Due di questi sensori svolgono la funzione di fine corsa alle estremità dello spazio entro cui può muoversi il carrello del motore, mentre il terzo identifica la posizione di perfetto allineamento tra il magnete e la camera reazione della cartuccia.

I Kingbright KRB011 sono componenti di dimensioni molto contenute, pari a $5 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$. Vengono alimentati con una tensione di 3,3 V e hanno un basso consumo energetico, che si aggira intorno a 100 mW ciascuno (70 mW nello stadio del fotorivelatore e 30 mW per l'emettitore). La lunghezza d'onda utilizzata da questo sensore è compresa tra i 920 e i 940 nm.

2.5.2. Fotosensori per il monitoraggio del riempimento della cartuccia

Il riempimento del dispositivo usa e getta è effettuato tramite la pompa piezoelettrica. Una volta noto il flusso a cui opera questo dispositivo, è possibile impostare il tempo di aspirazione in modo da estrarre dai serbatoi il volume di reagente desiderato. Talvolta però accade che la pompa non funzioni a dovere, e che ad esempio richieda un azionamento più prolungato per colmare la camera di reazione: questa criticità può essere risolta tramite l'ausilio di un dispositivo fotoelettronico.

Per accettare lo stato di riempimento della cartuccia non è stato impiegato lo stesso componente utilizzato per il controllo della posizione motore: si è scelto il TCRT1000 Vishay Semiconductor [59]. È un dispositivo a riflessione diretta, con geometria planare: la superficie misura $7 \times 4 \text{ mm}^2$ e lo spessore è di 2.5 mm; le finestre per l'emissione luminosa e per la ricezione da parte dell'elemento sensibile hanno un diametro pari a 1 mm (Figura 45 e Figura 46). La lunghezza d'onda emessa è pari a 950 nm e il consumo di potenza è un po' più elevato rispetto al sensore KRB011 utilizzato per il motore (circa 200 mW). Il LED e il fototransistore (che costituisce lo stadio d'uscita) sono posizionati in due camere separate: la luce proveniente dal LED deve essere specchiata da un mezzo riflettente perché il fotogate possa riceverla.

Il sensore non è stato posizionato direttamente sulla camera di reazione della cartuccia: da un lato infatti, esso avrebbe impedito il movimento del magnete; dall'altro il materiale della stampante 3D è piuttosto opaco, e avrebbe impedito una buona lettura del segnale. Il sensore è stato posto a contatto con il tubo subito a valle del dispositivo microfluidico, sul tratto che collega quest'ultimo alla pompa. Il sensore viene usato per leggere le variazioni di riflessione causate dal fluido di volta in volta presente nel condotto: la frazione di luce riflessa è maggiore se il tubo è pieno di acqua o alcol piuttosto che d'aria, e sarà invece

minore in presenza del buffer di lisi misto agli scarti derivanti dal campione di sangue.

La tensione che si genera sulla resistenza a valle dell'emettitore del transistor è proporzionale alla luce incidente sul fotorivelatore. A differenza di quanto fatto con il sensore usato per controllare gli spostamenti del motore, la tensione all'uscita del TCRT1000 viene letta grandezza come analogica. Andremo infatti a monitorare la riflettività del fluido presente nel condotto a valle della cartuccia. Dunque è necessario collegare l'emettitore del fototransistore ad un ADC in grado di ricevere e convertire il dato di tensione. La funzione di convertitore da analogico a digitale è svolta dal microcontrollore.

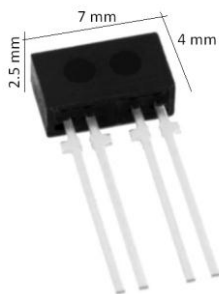
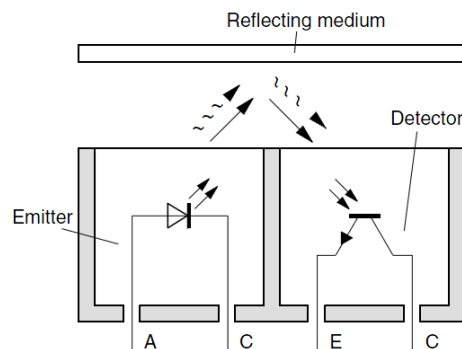


Figura 45 Fotosensore TCRT1000, per rilevare il riempimento

Figura 46 Schema di funzionamento del fotosensore



Per determinare lo stato di riempimento del tubo si può procedere in due diversi modi:

- Monitorando il valore assoluto dell'indice di riflessione: quando esso supera una soglia prestabilita viene definito lo stato del tubo. Al di sotto di un certo limite il tubo verrà identificato come pieno di buffer di lisi e materiale organico, al di sopra di un altro sarà invece colmo dei fluidi più riflettenti, come acqua e alcol. Nell'intervallo centrale di tensioni, il dotto

è classificato come vuoto. Questa tecnica prevede la necessità di calibrare il sensore, acquisendo le tensioni conseguenti a tutti gli stati di riempimento del tubo prima di eseguire l'estrazione di DNA.

- E' possibile identificare lo stato di riempimento valutando la variazione repentina di tensione tra lo stato attuale e lo stato precedente del sistema, senza bisogno di fissare un valore di soglia. Diventa rilevante l'entità della differenza tra gli indici di riflessione misurati, non il loro valore assoluto: evitiamo così di definire un limite a priori, che sarebbe problematico in presenza di offset

Per stabilire se la cartuccia è piena o vuota è stata adottata la seconda tecnica: si considera avvenuto lo svuotamento o il riempimento della camera di reazione quando la differenza tra l'ultima tensione misurata e quella relativo allo stato di riempimento precedente supera una certa soglia. Il valore della tensione presa come riferimento dovrà essere di volta in volta riaggiornato, dopo aver accertato l'effettivo riempimento o svuotamento del dispositivo fluidico.

La soglia che definisce la variazione dello stato di riempimento della cartuccia è stata scelta analizzando il funzionamento del TCRT1000 in relazione alla sua applicazione nel sistema. Il sensore è stato incapsulato in un supporto a valle della cartuccia, in modo da trovarsi a contatto con un tubo in silicone. Sono state acquisite varie tensioni corrispondenti al riempimento del condotto con diverse sostanze: aria, acqua deionizzata, alcol del kit Promega , sangue lisato con buffer del kit Ptomega

Dobbiamo monitorare la differenza tra la tensione rilevata con il tubo vuoto e con il tubo pieno di uno degli altri fluidi: è il parametro utile ai fini della procedura di estrazione automatica. Tutte le misure sono state ripetute 15 volte. È stato effettuato uno Shapiro-test per verificare la gaussianità delle popolazioni: il p-value è buono per sangue lisato e alcol -vale rispettivamente 0.47 e 0.6- mentre l'ipotesi di normalità è più debole per aria e acqua. Nelle tabelle sottostanti sono riportati i dati che sintetizzano i risultati ottenuti: la Tabella 3

contiene le tensioni mediate relative al passaggio dei diversi fluidi nel tubo; la Tabella 4 riporta i valori assoluti delle differenze tra le tensioni medie.

	Tensione Media [V]	Min [V]	Max [V]	Dev st	ε%
Aria	2,15	1,92	2,25	0,08	3,65
Acqua	2,47	2,46	2,49	0,01	0,23
Sangue lisato	1,93	1,84	2,05	0,06	2,80
Alcol	2,41	2,38	2,43	0,02	0,71

Tabella 3 Tensioni rilevate dal sensore ottico al variare dei fluidi presenti all'interno del tubo a valle della cartuccia

	Media [mV]
Δ(Aria-Acqua)	318,5
Δ(Aria-Sangue)	216,5
Δ(Aria-Alcol)	257,6

Tabella 4 Differenza tra le tensioni alle diverse condzioni di riempimento

Il delta tra le tensioni della seconda Tabella 4 ha un valor medio pari a 260 mV e una deviazione standard di 50 mV. Come si vede bena dalla rappresentazione grafica (Figura 47), le popolazioni sono separate, fatta eccezione per l'aria e il sangue lisato che hanno qualche valore. Per essere conservativi, si è scelto di impostare 175 mV come soglia per stabilire l'effettivo riempimento della cartuccia.

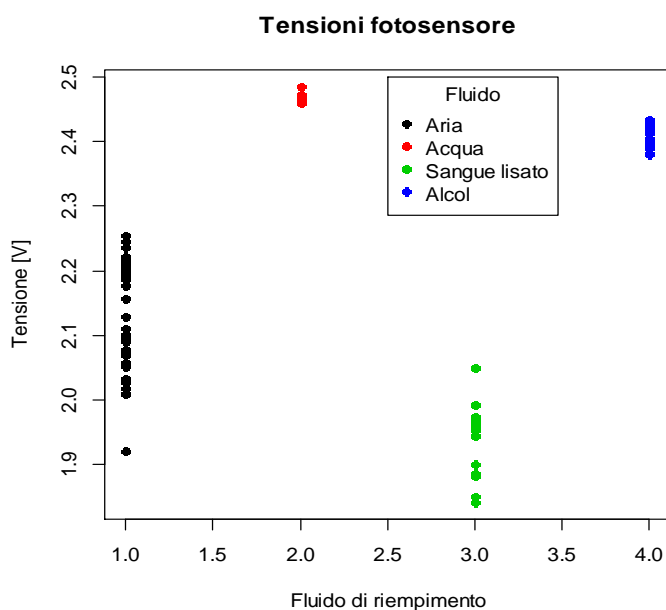


Figura 47 Tensioni misurate all'uscita del fotosensore in corrispondenza dei diversi riempimenti del tubo a valle della cartuccia di estrazione

2.6. Microcontrollore

Lo strumento realizzato per l'estrazione automatica di acidi nucleici da sangue umano è composto da un insieme di dispositivi che devono cooperare affinché il sistema funzioni correttamente.

Per portare a termine la purificazione del DNA devono essere eseguite numerose operazioni: è richiesta quindi una gestione accurata di attuatori e sensori. Ad esempio, è necessario che le valvole dei serbatoi contenenti i reagenti si aprano al momento opportuno e che la pompa venga attivata per aspirare la corretta quantità di liquido. Il motore poi deve essere azionato per effettuare il rimescolamento delle microbiglie all'interno della camera dove avviene l'isolamento del DNA e il sistema di riscaldamento deve mantenere la camera di reazione della cartuccia alla temperatura desiderata. Nello strumento di estrazione sono presenti anche dei sensori, sia termici che ottici. Il dispositivo di controllo quindi non deve solo essere capace di inviare i comandi per pilotare le periferiche, ma anche di acquisire dati dall'esterno e di dialogare con gli apparecchi che compongono lo strumento. Quando interpellati, i sensori devono fornire informazioni relative allo stato del sistema ad un oggetto in grado di ricevere ed elaborare i dati che gli vengono forniti in ingresso, in modo da poter poi agire di conseguenza.

C'è bisogno di un "cervello elettronico" capace di coordinare e regolare tutte le periferiche e le parti attive da cui è formato lo strumento. Queste funzioni di regolazione e comunicazione con i dispositivi sono svolte dal microcontrollore, un STM32F103 [60].

Il microcontrollore (spesso indicato anche come μC , uC o MCU) è un sistema a microprocessore completo, integrato in un solo chip [61]. È progettato in modo da garantire la massima autosufficienza funzionale: in altri termini, una volta alimentato esso è in grado di svolgere in maniera autonoma le funzioni per cui è stato predisposto; un sistema dotato di MCU (*Micro Controller Unit*) è in grado di

lavorare *stand alone*, senza bisogno di essere collegato ad altri processori o elementi di controllo. Il microcontrollore è realizzato in modo da ottimizzare il rapporto tra il costo di fabbricazione e le prestazioni necessarie per una specifica applicazione. Diversamente dai microprocessori impiegati nei personal computer, i μC non sono adatti per un utilizzo *general purpose*: generalmente sono programmati una sola volta e nascono già con l'intento dispositivi dedicati.

I microcontrollori sono la forma più diffusa e più invisibile di computer: sono contenuti nella quasi totalità di apparecchi ed elettrodomestici. Le periferiche integrate sono la vera forza dei microcontrollori: si possono avere convertitori ADC e convertitori DAC multicanale, timer e contatori, USART, numerose porte esterne bidirezionali bufferizzate, comparatori, PWM. La loro capacità di calcolo è molto limitata e di solito eseguono lo stesso programma (ovvero il firmware) per tutta la durata del loro funzionamento.

All'interno del μC gli elementi fondamentali sono:

- **CPU**

La CPU (*Central Processing Unit*) è l'unità centrale di elaborazione o processore. Il suo ruolo si suddivide in due mansioni: un'unità è predisposta al controllo mentre l'altra svolge le funzioni di calcolo. La CU (*Control Unit*) è la mente della CPU, alla quale sono assegnati i compiti di prelevare e decodificare le istruzioni presenti nella memoria del microcontrollore stesso. L'unità di controllo inoltre ha il compito di sincronizzare le attività e gestire la parte di calcolo, la memoria e le unità di input/ output. La ALU (*Aritmetic Logic Unit*) è l'unità di calcolo, ovvero il componente che esegue le operazioni aritmetiche prelevando i valori dai registri del μC . La ALU può essere considerata come il braccio della CPU. L'unità centrale del microcontrollore dispone anche di canali per l'interconnessione dei componenti della CPU, detti Bus.

- **Porte logiche**

Le porte costituiscono le periferiche di base per le comunicazioni del microcontrollore da e verso l'esterno. Si dispone di una serie di interfacce standard di tipo GPIO (*General Purpose Input/ Output*), che possono essere configurate dal programmatore come ingressi o uscite digitali. Alcune delle porte possono essere configurate tramite il firmware per svolgere le diverse funzioni all'interno del sistema elettronico: ad esempio, possono portare il segnale del clock ai timer di altri driver presenti sulla scheda oppure possono fare da ingresso degli ADC del micro.

- **Memoria**

All'interno del microcontrollore è presente un certo quantitativo di memoria RAM e memoria ROM, che permette di conservare dati anche in assenza di alimentazione. La memoria deve contenere il codice del programma eseguito dalla MCU (firmware), oltre ai parametri immagazzinati nei registri. Solitamente questi dispositivi incorporano delle Flash, una tipologia di memorie non volatili con tecnologia a stato solido.

La funzionalizzazione del microcontrollore è attuata tramite il firmware. Il firmware fa parte del software dello strumento, ovvero del programma che permette di gestire il microcontrollore e le sue periferiche per il corretto funzionamento del sistema. In particolare il firmware è la parte di codice di più di basso livello all'interno del software.

Il firmware è un codice eseguibile salvato all'interno di una piccola memoria programmabile del μC , chiamata EEPROM (o anche $E^2\text{PROM}$, *Electrically Erasable Programmable Read-Only Memory*). Le operazioni di scrittura, reset e riscrittura del firmware vengono fatte elettricamente da computer. L'interfaccia tra il PC e la scheda elettronica è realizzata tramite una connessione JTAG (*Joint Test Action Group*), che consente tutte le azioni di programmazione della logica della scheda elettronica, compreso il debug.

All'interno del firmware vengono definite tutte le istruzioni basilari per impostare il funzionamento della parte elettronica di un qualsiasi strumento. Il suo compito è fondamentalmente quello di far avviare il dispositivo e farlo interagire con il resto del sistema, tramite l'implementazione di protocolli di comunicazione o interfacce di programmazione: il firmware funge da ponte di collegamento tra i componenti hardware di un sistema e la parte software (il sistema operativo) con cui il dispositivo verrà utilizzato.

Le funzionalità dei pin del microcontrollore, l'assegnazione dei timer, le comunicazioni con i dispositivi presenti sulla scheda elettronica sono tutte azioni definite tramite il firmware.

Esistono diversi ambienti di programmazione dedicati allo sviluppo del firmware; nell'ambito di questa tesi è stato usato Keil μ Vision4, che prevede che il codice venga scritto in linguaggio C++.

2.6.1. Il microcontrollore STM32F103

Per pilotare i dispositivi integrati nel sistema per estrazioni automatiche si è impiegato un microcontrollore STM32F103 RET6 [60], prodotto ST Microelectronics (Figura 48).

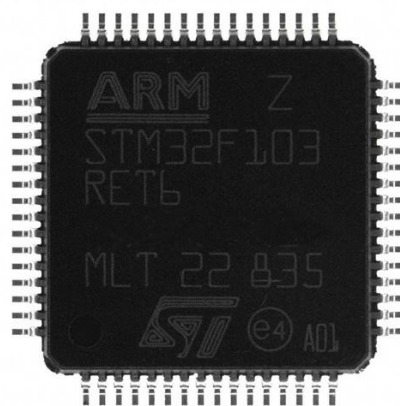


Figura 48 Microcontrollore STM32F103 RET6

L'STM32F103 è un microcontrollore della famiglia degli STM32, a cui appartengono tutti i dispositivi di ST Microelectronics con microprocessori ARM a 32-bit. L'architettura ARM (*Advanced RISC Machine*) viene utilizzata in una

grande quantità di sistemi embedded grazie alle sue caratteristiche di basso consumo in rapportato alle prestazioni erogate.

All'interno della linea di prodotti STM32 si è scelto l'RET6: si tratta della versione del microcontrollore a 64 pin, con package di tipo LQFP (*Low-Profile Quad Flat Package*). La geometria di questo componente è molto compatta, l'area occupata è di appena 1 mm x 1 mm.

Questo modello dell'STM32F103 a disposizione 512 Kilobyte di memoria Flash, 48 dei quali sono riservati alla RAM. Come periferiche sono fruibili un ADC e 5 timer con quattro canali ciascuno.

I 64 piedini del microcontrollore sono posizionati 16 per ogni lato. Oltre ai pin dedicati all'alimentazione, il dispositivo ha tre banchi di GPIO (Figura 49), ognuno dei quali gestisce 16 pin. Queste interfacce possono essere utilizzate come semplici porte di input e output oppure possono essere programmate come via di comunicazione con i timer e con l'ADC del micro.

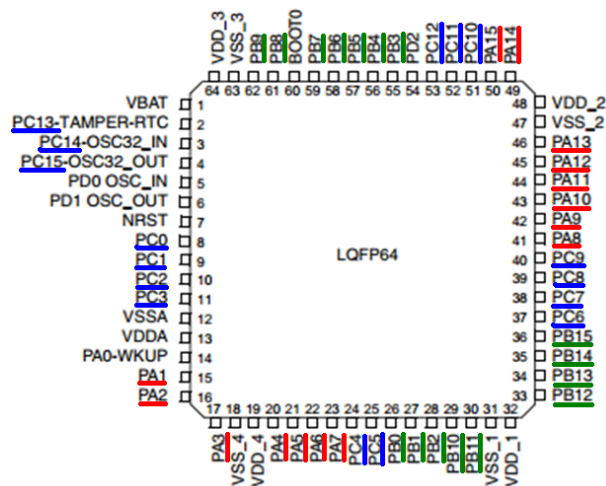


Figura 49 Schema dei pin del microcontrollore STM32F103 RET6. Il μ C consta di tre gruppi di GPIO. In rosso sono evidenziati i 16 piedini del banco A, in verde quelli del banco B e in blu quelli del banco C

Capitolo 3

PROTOCOLLO PER ESTRAZIONI AUTOMATICHE CON MICROBIGLIE MAGNETICHE

Il campo delle indagini analitiche sul DNA acquista sempre maggiore interesse nel panorama scientifico: lo screening delle patologie, l'analisi forense e molti altri settori si aprono a nuovi orizzonti alla luce di queste tecniche [1]. Per il buon esito di qualunque analisi di biologia molecolare, occorre disporre di DNA genomico altamente purificato. Dunque è necessario che l'estrazione degli acidi nucleici dal materiale biologico venga fatta in modo accurato, dato che questo processo andrà ad influire su qualunque indagine successiva. L'estrazione di DNA dal campione organico è un passaggio obbligato ed è una delle fasi più critiche e delicate [3].

Proprio a causa dell'interesse sempre più elevato nell'ambito della chimica del DNA, cresce lo sviluppo tecnologico volto ad una completa automatizzazione del processo di preparazione del campione. Tra i molteplici vantaggi che presentano i sistemi robotizzati, vanno innanzitutto citate la buona qualità e la resa standardizzata dell'estratto: il processo di isolamento e purificazione è meno soggetto a variabilità ed errori umani. Dato che la preparazione delle reazioni avviene in maniera industrializzata, anche il tempo e costo necessari per ogni singola estrazione diminuiscono.

Gli strumenti per l'estrazione di DNA sono pensati per richiedere il minimo impiego di lavoro umano, permettendo tra l'altro l'utilizzo di questi apparati anche da parte di personale non altamente specializzato.

La tecnica di estrazione privilegiata per ottenere il DNA tramite un processo totalmente automatizzato è basata sull'utilizzo della silice. Ciò è dovuto principalmente al fatto che le operazioni richieste dai protocolli dei kit alla silice sono semplici e ripetitive, facilmente standardizzabili ed eseguibili da sistemi robotici.

Grazie alla sua spiccata affinità per gli acidi nucleici, la silice lega a sé il DNA. I resti cellulari e le impurità organiche che potrebbero inibire le analisi genomiche successive all'estrazione vengono eliminate con lavaggi specifici. Un vantaggio importante della silice è quello di permettere allo stesso tempo l'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici presenti all'interno del campione organico. La possibilità di svolgere due azioni simultaneamente è una caratteristica che rende la categoria dei kit basati sull'impiego della SiO₂ spesso convenienti rispetto alle tecniche tradizionali e ai preparati per estrazioni in un singolo passaggio. Inoltre la buona qualità dell'estratto e la semplicità delle operazioni richieste dal protocollo ne fanno la tecnica di estrazione preferita per la realizzazione dei sistemi automatici.

La silice per l'estrazione di acidi nucleici è disponibile in due versioni:

- membrane attraverso cui vengono fatti fluire il materiale biologico e i reagenti
- sotto forma di microbiglie con un'anima ferromagnetica.

Il metodo messo a punto per l'estrazione automatica nell'ambito di questo lavoro di tesi prevede l'impiego di un kit Promega con microbiglie magnetiche, specifico per ottenere DNA da sangue umano: il *MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System* [41].

Nella fase iniziale del progetto, per estrarre il DNA dal sangue si è fatto riferimento al protocollo di reazione fornito dal kit MagneSil. La casa di produzione del kit certamente ha studiato un'ottimizzazione del processo per garantire un buon risultato dell'estrazione, sia per quanto riguarda i volumi di

reagenti da usare che per le fasi della reazione. In un secondo momento si è deciso di semplificare il procedimento di reazione per renderlo più idoneo al nostro sistema -verificando di non peggiorare la qualità dell'estratto ottenuto. Da ultimo, dopo aver appurato la fattibilità dell'estrazione con il sistema per estrazioni automatiche, si è cercato di ottimizzare tutto il protocollo rispetto al funzionamento dello strumento stesso.

L'implementazione del protocollo di estrazione ha richiesto lo sviluppo di un software che consenta il controllo dello strumento da PC e la gestione automatica delle fasi di isolamento e purificazione del DNA. Il primo programma è stato realizzato in modo da lasciare all'utente piena libertà nella scelta dei parametri e delle operazioni eseguite dall'apparecchiatura per portate a termine il processo di estrazione. La seconda versione prevede che il protocollo venga svolto in maniera totalmente automatica.

3.1. MagneSil ONE, Fixed Yeld Blood Genomic System

Il *MagneSil ONE, Fixed Yeld Blood Genomic System* è un prodotto per estrazione di DNA realizzato da Promega, illustrato in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** Il kit è stato studiato per purificare il DNA con rendimento fisso: partendo da 60 µl di sangue intero non coagulato si ottengono mediamente 1000 ng di DNA. Il range della resa di estrazione è compreso tra 500 e 1500 ng.

Il kit deve essere mantenuto a temperatura ambiente (20 - 25°C); i reagenti forniti per l'estrazione di DNA sono:

- Buffer di lisi (160 ml)
- Reagente di anticoagulazione (300 µl)
- Magnesis PMPs (microbiglie in sospensione liquida, 25 ml)
- Alcol per il lavaggio (120 ml)
- Buffer di eluizione (45 ml)



Figura 50: Kit Promega *MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System* per estrazione di DNA da sangue. Da sinistra ci sono il flacone di Alcol, quello di Magnesis PMPs, il buffer di lisi e il buffer di eluizione. In basso, la provetta di anticoagulante

Prima di procedere all'estrazione di DNA da occorre preparare i reagenti: questa operazione deve essere eseguita una volta sola, precedentemente al primo utilizzo del kit. È richiesto innanzitutto di aggiungere 200 μ l di anticoagulante al flacone del buffer di lisi; dopodiché si devono aggiungere all'alcol 60 ml di EtOH (etanolo) e 60 ml di IPA (alcol isopropilico). È necessario procurarsi i supporti e gli strumenti con cui eseguire le reazioni (provette, pipette, puntali, etc.) e un magnete per trattenere le microbiglie tra un lavaggio e l'altro.

Per garantire una buona estrazione si richiede che il sangue impiegato si fresco o mantenuto a 4°C per non più di 2 settimane. Nel caso il campione di DNA prelevato non venga elaborato al momento, sarà necessario aggiungervi un anticoagulante - prestando attenzione a che esso non contenga fattori inibitori per la PCR: per questo motivo si usa l'EDTA e non ad esempio l'eparina o il citrato .

Il protocollo del *MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System* è validato da Promega per essere eseguito in provetta da un operatore, oppure mediante macchinari automatici per l'estrazione da più campioni in parallelo, come ad esempio la piattaforma di lavoro robotizzata Biomek della Beckman Coulter o il sistema dedicato alle estrazioni Maxwell 16 di Promega. Viene di seguito riportata la sequenza di passaggi da effettuare per portare a termine manualmente l'estrazione di DNA da sangue umano .

Fase 1, preparazione

Agitare il flacone di MagneSil per qualche minuto, poi prelevare con la pipetta 15 μ l e metterli in una provetta sterile. Aggiungere 110 μ l di Buffer di Lisi e il campione di sangue (60 μ l). Agitare bene la provetta, aggiungere altri

430 µl di Buffer di Lisi e miscelare nuovamente. Posizionare il magnete in modo da raccogliere tutte le biglie (mantenerlo accanto alla provetta per almeno 30 secondi), poi estrarre tutta la fase liquida.

Fase 2, lavaggi con Buffer di Lisi

Unire 360 µl di Buffer di Lisi alle biglie rimaste nella provetta, mescolare bene, recuperare le biglie tramite il magnete ed eliminare la fase liquida. Ripetere due volte il passaggio.

Fase 3, lavaggi con Alcol

Aggiungere 680 µl di alcol alle microbiglie, mescolare bene, recuperare le biglie tramite il magnete ed eliminare la fase liquida. Eseguire tre volte questa fase.

Fase 4, essiccamento

Riscaldare la provetta col tappo aperto a 80°C per 5 minuti in modo da far evaporare i residui di alcol -potrebbero inibire reazioni sul DNA eseguite a valle dell'estrazione.

Fase 5, eluizione

Risospendere le biglie in 210 µl di Buffer di Eluizione, agitare bene e scaldare la provetta tappata a 80°C per 8-10 minuti. Da ultimo, raccogliere le biglie con la calamita e prelevare il buffer di eluizione. L'eluato, contenente ora DNA, può essere trasferito in una nuova provetta sterile.

Il DNA estratto può essere conservato ad una temperatura di +4°C per qualche mese, altrimenti in un freezer a -20°C per tempi più prolungati.

3.2. Studio del protocollo di reazione per il sistema di estrazione automatica

Lo strumento realizzato nell'ambito di questo progetto ha delle caratteristiche e delle peculiarità che lo rendono differente da tutti i metodi di utilizzo per cui è stato validato e ottimizzato il protocollo del *MagneSil ONE*. Ad esempio, la

cartuccia in cui avviene la purificazione è diversa da qualsiasi tipo di provetta per estrazioni manuali o con il Maxwell 16. Anche la gestione della fluidica è atipica, dal momento che quando la pompa è attiva, le microbiglie si trovano in mezzo a un flusso continuo. Per queste particolarità, alcune specifiche del processo di estrazione dettate da Promega presentano delle criticità rispetto all'impiego del kit nel nostro macchinario.

L'obiettivo di questa fase di ottimizzazione del lavoro è modificare il protocollo di estrazione, al fine di renderlo più adatto alle esigenze dello strumento in via di realizzazione. Per fare questo lavoro ci si è mossi per passaggi successivi, verificando di volta in volta che i cambiamenti attuati non andassero a diminuire in maniera sensibile le prestazioni del kit Promega. Alcuni ritocchi sono stati effettuati guardando semplicemente alla struttura dello strumento e in particolare a quella della cartuccia, dove avviene la vera e propria reazione. Altre accortezze invece sono state adottate a partire da osservazioni sperimentali del funzionamento del sistema nel suo insieme. Di seguito vengono illustrate le principali variazioni adottate per realizzare un protocollo di estrazione dedicato allo strumento.

Cartucce precaricate con MagneSil

Un primo aspetto problematico riguarda l'immissione delle microbiglie all'interno della camera di reazione della cartuccia. Secondo il protocollo, è necessario agitare a lungo il flacone di MagneSil per assicurare una buona sospensione delle microbiglie in soluzione e una concentrazione abbastanza uniforme. Nell'ipotesi di voler realizzare una riserva multiuso di reagenti per lo strumento di estrazione, il trasferimento del MagneSil dal serbatoio alla cartuccia renderebbe necessario includere un sistema tipo il vortex utilizzato nei laboratori biologici come agitatore meccanico di provette, in modo da mescolare bene i composti contenuti al loro interno. Oltre ad essere un oggetto di dimensioni considerevoli, esso andrebbe ad aggravare il problema delle connessioni fluidiche tra serbatoi, valvole e cartuccia, a causa del moto di roto-vibrotorio che lo caratterizza. Tale complicazione può essere aggirata, prevedendo che ogni

singolo chip venga precaricato con la corretta quantità di *MagneSil* per un processo di purificazione. L'espedito è funzionale, anche se comporta che al momento dell'utilizzo della cartuccia, le microsfere siano disidratate: la soluzione acquosa in cui sono contenute infatti tende facilmente ad evaporare. In fase di validazione del procedimento biologico sarà necessario verificare che l'impiego di microbiglie essiccate non vada a inficiare l'estrazione di DNA.

Volumi di reagenti

Altra questione importante riguarda i volumi dei reagenti consigliati da Promega per effettuare l'estrazione. La cameretta di reazione all'interno della cartuccia ha una capacità di contenimento fissata, pari all'incirca a 140 μ l. Per portare a termine al meglio il processo biologico, è conveniente riempire completamente il vano ogni volta che si immette un reagente. Non lasciare bolle d'aria è particolare importante: infatti, caricare del tutto la camera di reazione, garantisce che le microbiglie siano sempre immerse e movimentate all'interno del buffer presente di volta in volta -e non inutilmente in aria.

Si è dunque proceduto con una semplificazione del protocollo, scalando e uniformando tutti i volumi dei reagenti. Le estrazioni con le prove di variazione dei volumi dei reagenti sono state condotte inizialmente in provetta. La modalità di estrazione manuale è infatti la più appropriata per avere dei risultati facilmente confrontabili tra di loro: le complicazioni derivanti dall'uso dello strumento automatico sono state introdotte e analizzate in seguito, in un secondo momento dell'analisi di fattibilità.

Il volume del dispositivo monouso si aggira intorno ai 170 μ l, contando i canali di riempimento e svuotamento, 150 μ l solo la camera di estrazione. I volumi dei reagenti sono stati uniformati in modo da mantenere invariato il rapporto tra sangue, *MagneSil* e buffer di eluizione, andando dunque a modificare le quantità di lisi e alcol.

Dal momento poi che il condotto di immissione del campione di sangue è stretto, non partecipa in modo soddisfacente al processo di estrazione: il canale rimane

un po' sporco di sangue e non viene mai raggiunto dalle biglie. Per questo si è scelto di aumentare leggermente la quantità di sangue da introdurre nella cartuccia. Di seguito sono riportati i volumi del primo protocollo di riferimento stabilito per lo strumento di estrazione automatica:

- 150 µl (effettivi) buffer di lisi, alcol, buffer di eluizione
- 45 µl di sangue
- 10 µl MagneSil

Fase di essiccamento con ventilazione

La modifica della fase di essiccamento (fase 4 del protocollo Promega) è un esempio emblematico dei ritocchi apportati in seguito a osservazioni sperimentali della procedura di estrazione automatica. Monitorando l'andamento dell'estrazione di DNA all'interno della cartuccia, ci si è resi conto dell'impossibilità di eliminare completamente le tracce di alcol dalla camera di reazione. La rimozione dell'alcol al termine delle fasi di lavaggio delle biglie è importante: esso infatti contiene etanolo e isopropanolo, che possono inibire le analisi sul DNA condotte a valle dell'estrazione, in particolare la PCR [17]. Dunque è necessario che questo passaggio di essiccamento venga effettuato in modo accurato.

Il protocollo del kit prevede di eliminare l'alcol mediante evaporazione, scaldando la provetta a tappo aperto a 80 °C per un tempo pari a 5 minuti. La cameretta di estrazione può essere riscaldata grazie al chip termico, però rimane chiusa e i vapori di alcol tendono a condensare sulle pareti interne del dispositivo. Per questo motivo, dopo aver svuotato la gran parte del vano tramite l'aspirazione della pompa, si è scelto di combinare il riscaldamento del chip termico con un'azione di ventilazione. L'areazione dei condotti fluidici è attuata sempre tramite la pompa, che risucchia aria da una delle valvole appositamente aperta.

Nonostante queste accortezze, la rimozione dell'alcol non risulta completa. Si è scelto quindi di affrontare il problema, andando ad osservare sperimentalmente l'influenza dei residui di etanolo sulla reazione di *Real Time*-PCR.

Temperatura di eluizione

Un'altra modifica del protocollo riguarda la fase di eluizione. Dopo l'ingresso del buffer di eluizione nella cartuccia, la camera di estrazione deve essere portata ad una temperatura di 80°C per 10 minuti, al fine di favorire il distacco dei filamenti di DNA dalla matrice di silice. Il problema insorge nel momento in cui il riempimento della cameretta non è perfetto, ma rimangono delle bolle d'aria al suo interno. Il calore fa aumentare il volume dei gas e l'aria nella cartuccia riesce facilmente a far uscire tutto l'eluato dalla camera di reazione, rendendo quindi vano il processo di estrazione. La chiusura di tutte le valvole non è sufficiente ad evitare lo scivolamento del buffer di eluizione al di fuori della camera, perché l'aria all'interno dei tubi –che non sono riscaldati– si comprime con molta facilità sotto la pressione esercitata dal liquido. Per questo motivo si è deciso di non scaldare il chip a 80°C, ma di mantenerlo a una temperatura più bassa, per un tempo più lungo. In questa fase il calore serve solamente ad aumentare l'entropia del sistema, quindi non è necessario raggiungere una ben definita condizione termica per attivare enzimi o processi chimici specifici. I 60 gradi si sono sperimentalmente rivelati essere il miglior *trade-off* tra la durata del riscaldamento e la dilatazione delle bolle d'aria all'interno del liquido. Il chip mantiene questa temperatura per un tempo che può variare tra i 12 e i 15 minuti.

3.3. Software per lo strumento di estrazione automatica

Lo sviluppo del software per la preparazione automatica dei campioni biologici ha costituito una parte importante di questo lavoro di tesi. Il sistema operativo è una parte essenziale all'interno dello strumento, in quanto rappresenta la logica di funzionamento dell'apparato. Naturalmente, la programmazione del software

si è potuta avviare una volta pronta la prima versione dell'apparecchiatura hardware per l'estrazione automatica del DNA.

Tipicamente il software si sviluppa a diversi livelli della logica. Al più basso troviamo il firmware, ovvero la parte di codice che risiede nella memoria all'interno del microcontrollore. L'utente non ha accesso a questa zona di memoria: una volta che è stato caricato, tendenzialmente il firmware non viene più modificato per tutta la vita dello strumento. Il suo scopo è fare da tramite tra l'hardware dello strumento e il sistema operativo. Il firmware gestisce l'avvio del microcontrollore stesso e ne configura le funzioni dei pin. Anche la struttura dei comandi che vengono inviati alle periferiche definita all'interno di questo codice.

La parte logica di più di alto livello è gestita dal software applicativo –o semplicemente software. Si tratta dell'insieme di comandi e istruzioni che, a differenza del codice firmware, non vengono registrati all'interno del microcontrollore. Il software può essere creato in un ambiente di sviluppo dedicato ed essere memorizzato su un dispositivo separato dal μC dello strumento. Solitamente gli applicativi vengono installati sui PC e consentono il controllo di tutte le parti del sistema. Il software è rivolto all'utilizzo dei consumatori ed è dotato di un'interfaccia grafica che permette all'utente di dialogare facilmente con la periferica tramite PC.

La comunicazione tra il PC e il nostro sistema elettronico avviene mediante un collegamento USB-USB mini. Quando si apre il programma per la gestione dello strumento di estrazione, il codice effettua una scansione delle porte USB: automaticamente viene riconosciuto l'ingresso a cui è collegata la scheda elettronica dello strumento, alla quale verranno inviate tutte le istruzioni relative alla procedura di estrazione.

Sono stati realizzati due software specifici per il controllo del sistema di estrazione. Il primo permette di portare a termine la purificazione del campione in modo semi-automatico: pur utilizzando tutti i supporti e le apparecchiature che costituiscono lo strumento, questa versione del software necessita della

presenza di un operatore che invii in sequenza i comandi dal computer alla scheda elettronica. Sarà dunque compito dell'utente decidere quando aprire le valvole, quando azionare il motore e così via. Questa semplice interfaccia ha consentito uno studio preliminare dell'automazione delle fasi di estrazione, permettendo di identificare le principali criticità del protocollo e di fare un primo settaggio dei parametri di reazione.

Il secondo software è stato sviluppato a partire dalla stesura del codice semi-automatico. Una volta nota la risposta dello strumento ai comandi e nota l'impostazione ottimale dei parametri, si è implementato un applicativo volto alla completa automazione del processo. All'apertura del programma di gestione del sistema, è possibile selezionare o generare un protocollo di estrazione; dopodiché l'esecuzione delle istruzioni procede in maniera indipendente.

Prima di addentrarsi nello specifico dei software applicativi, per capire come funziona il sistema è doveroso fare una piccola parentesi sulla struttura dei comandi. Le istruzioni sono composte da un certo numero di byte e vengono inviate da computer tramite collegamento USB -quindi con un protocollo di comunicazione seriale. Oltre ai byte di comando predefiniti, alcune istruzioni sono predisposte per contenere dei parametri per impostare il funzionamento dei dispositivi. I parametri contenuti nelle istruzioni vengono definiti all'interno del firmware: se la sequenza non contiene il numero giusto di termini, il microcontrollore non è in grado di riceverla e di attuarla correttamente.

Per la stesura del software si è lavorato con Visual Studio 2010, un prodotto Microsoft con una piattaforma di lavoro che fornisce servizi e strumenti dedicati alla realizzazione di applicazioni e siti web. Supporta diversi tipi di linguaggi di programmazione, C, C#, C++ e Visual Basic: in questo lavoro si è utilizzata la versione C++ di Visual Studio.

3.3.1. Software per la gestione semi-automatica sistema di estrazione

Il software per eseguire le estrazioni di DNA in modo semi-automatico è il primo codice che è stato implementato per il controllo dello strumento di estrazione. Per isolare il DNA da sangue si sfrutta l'insieme dei componenti attivi, microfluidici e strutturali del macchinario, che possono essere gestiti tramite interfaccia grafica (Figura 51).

Il processo di estrazione non avviene autonomamente: è necessaria la presenza di un utente che gestisca la reazione dal terminale. All'interno di questo software non esiste un vero e proprio protocollo di reazione prestabilito. L'utente ha a disposizione dei pulsanti a video per l'attivazione dei dispositivi: sta a lui decidere quando aprire le valvole, azionare la pompa, muovere il motore e così via.

Anche se con questo software il sistema non è in grado di lavorare autonomamente, un funzionamento del genere risulta essenziale per una fase sperimentale di valutazione generale dello strumento. Una gestione così "manuale" permette di conoscere il funzionamento di ogni dispositivo presente al suo interno in modo molto accurato. L'utente ha modo di verificare ad ogni passaggio come le varie parti dello strumento rispondono ai comandi e quali sono le criticità delle diverse fasi: in questo modo è possibile affrontare un problema alla volta e migliorare quindi il procedimento di estrazione nel suo insieme.

Un'altra caratteristica rende interessante il software semi-automatico. Proprio per la sua non completa autonomia, questo programma permette di effettuare un monitoraggio continuo dell'andamento dell'estrazione e una correzione in tempo reale dei parametri di comando del motore, della pompa e del chip termico. Ciò consente un primo settaggio dei parametri da inserire all'interno delle istruzioni, che risulta molto utile nella fase iniziale di sviluppo del sistema. In Tabella 5 sono inseriti tutti i termini che possono essere impostati

dall'operatore, con anche l'intervallo di valori massimi e minimi utili per il corretto funzionamento dello strumento.

	Parametro	Standard	Max	Min	Unità
Pompa					
Modalità di aspirazione					
	Volume	200	1	10 ⁶	ul
	Flusso	30	10	40	μl/min
Calibrazione					
	Tensione max	300	250	320	V
	Tensione min	200	150	250	V
	Passo	10	5	20	V
Motore					
Movimento unidirezionale					
	Direzione	1	indietro	avanti	/
	Spazio	20	1	25	mm
	Velocità	5	1	12	/
Shakeraggio					
	Durata	40	1	300	sec
	Spazio	20	1	25	mm
	Velocità	5	1	12	/
	Pausa	1	0.5	5	Sec
Riscaldamento					
	Durata	5	1	60	min
	Temperatura	80	30	90	°C

Tabella 5 Parametri per definire il funzionamento dei dispositivi. Sono anche indicati i limiti superiori e inferiori che non devono essere oltrepassati per il corretto funzionamento di ciascuno dei dispositivi

Grazie questa prima versione del software, è stato inoltre possibile apprendere ed attuare una serie di accortezze necessarie a migliorare l'andamento dell'estrazione. Le modifiche al protocollo del kit *MagneSiONE* relative alla fase di essiccamento e alla temperatura di eluizione descritte al paragrafo precedente sono state implementate a partire dalle osservazioni fatte durante le reazioni semi- automatiche.

Il programma si suddivide in quattro macroaree di interesse (Figura 51): una è destinata al controllo delle valvole, una a pilotare la pompa, una a muovere il motore e una alla regolazione termica. Anche l'interfaccia grafica è stata di conseguenza realizzata in modo da raggruppare i comandi inerenti a ciascun ambito. La schermata a video incorpora anche una sezione aggiuntiva, dedicata alla visualizzazione e alla gestione di un timer sincronizzato con il sistema operativo del computer.

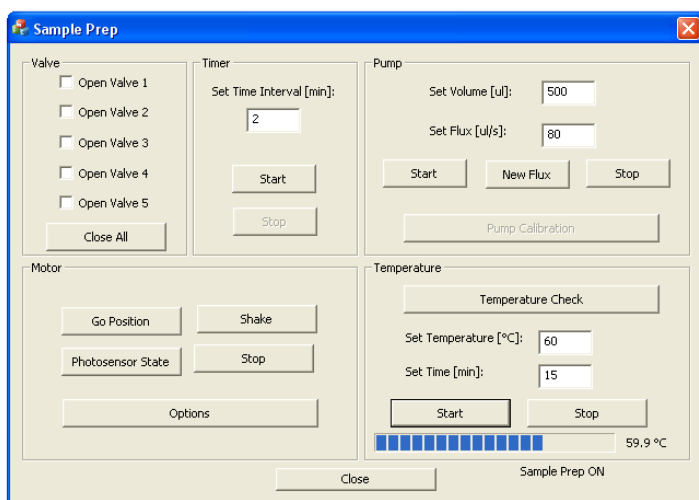


Figura 51 Interfaccia grafica del software per la estrazioni in modalità semi-automatica. In alto a sinistra c'è la sezione riservata alle valvole, di fianco si trovano in ordine quella del timer e quella della pompa. Nella parte inferiore della schermata ci sono i controlli per lo stepper motor e per il riscaldatore

Le valvole

La sezione riservata alle elettrovalvole consta di cinque *Check Box* (uno per ogni valvola), che possono essere gestiti in maniera indipendente. Il tick nella casella controlla l'interruttore MOS adibito a driver della valvola: se il gate del transistore è settato alto, l'otturatore si apre; in caso contrario la valvola rimane chiusa. L'utente può scegliere qualunque combinazione di valvole aperte e chiuse. Il pulsante posto al di sotto delle caselle permette di chiudere tutti gli otturatori contemporaneamente.

La pompa

La gestione della pompa è un po' più complessa di quella delle valvole. I parametri che l'utente può impostare a suo piacimento sono il volume del liquido e il flusso con cui il reagente viene aspirato all'interno della camera di razione.

Per funzionare correttamente, la pompa necessita di una calibrazione. La calibrazione serve per aggiustare il *duty cycle* (D) del PWM al variare della tensione e della frequenza di lavoro. A parità di tensione sulla pompa, D varia a seconda della frequenza di pulsazione che si imposta, cioè a seconda della frequenza con cui vengono mosse le membrane piezoelettriche. Durante la calibrazione, la frequenza rimane fissata; intanto il microcontrollore memorizza i valori di *duty cycle* che corrispondono ad alcune tensioni utili. Così, se la tensione della pompa rimane nell'intervallo definito dai valori di calibrazione e se la frequenza di lavoro non subisce modifiche, all'accensione la pompa si trova già a lavorare con il *duty cycle* corretto, senza bisogno di grossi assestamenti. È necessario effettuare una nuova taratura del dispositivo tutte le volte che si vuole cambiare la frequenza degli impulsi con cui si muove la membrana piezoelettrica.

All'avvio, il software controlla innanzitutto che la pompa sia già calibrata: in caso affermativo la pompa può essere attivata, altrimenti non viene abilitato il pulsante di *Start*. Se si preme il pulsante *Pump Calibration*, appare in sovrapposizione una nuova finestra che permette di settare i parametri relativi alla calibrazione e fa partire la procedura di taratura.

Il motore

Per quanto riguarda la gestione del motore, il programma prevede due modalità di azionamento. Il primo pulsante (*Go Position*) fa semplicemente muovere il carrello in avanti o all'indietro, facendogli percorrere uno spostamento predefinito. L'altro (*Shake*) realizza un moto alternato: il motore ruoterà per un certo tempo in senso orario e poi in senso opposto. Lo spazio percorso dal carrello, la velocità e tutti i parametri relativi ai due comandi possono essere impostati dall'utente premendo il pulsante *Motor Options*, che fa comparire in sovrapposizione una finestra dedicata. Il comando *Go Position* permette di allineare il magnete montato sul carrello con la camera di reazione, l'istruzione *Shake* permette alla stessa calamita di strisciare avanti e indietro sopra la camera di reazione in modo continuo e shakerare le microbiglie. Lo *stepper motor* si

ferma quando raggiunge la posizione prefissata, quando termina il tempo di moto impostato o semplicemente quando viene premuto il pulsante *Stop* presente all'interno del riquadro del motore.

Il pulsante *Photosensor State*, presente nel riquadro dedicato al motore, effettua un controllo sui sensori ottici per il rilevamento della posizione. I fotosensori danno all'utente un'informazione relativa al punto dove si trova il carrello lungo il suo percorso rettilineo.

Il chip termico

A differenza di tutte le altre apparecchiature dell'estrattore in via di sviluppo, il riscaldatore fa parte del dispositivo monouso, non dello strumento vero e proprio. Per questo è necessario effettuare dei controlli sull'impianto termico ogni volta che si effettua una reazione di estrazione del DNA. L'utente può da subito impostare la temperatura e la durata della fase di riscaldamento, ma il pulsante *Start* viene abilitato solo dopo che è stata completata la procedura di calibrazione del chip. La calibrazione è composta da tre fasi, come si vede bene nel diagramma di flusso (Figura 52).

Board Calibration

Innanzitutto, nella fase di *Board Check*, si va a quantificare con precisione l'entità della corrente erogata dal generatore. Per far questo, tramite un multiplexer si sceglie di indirizzare la corrente prima su uno e poi sull'altro dei due resistori di calibrazione. Intanto un ADC legge la tensione che si genera ai capi di ciascuna delle resistenze. Acquisiti due valori di V e note le $R_{\text{Calibrazione}}$, la corrente può essere ricavata come retta interpolante dei due punti ricavati. Al termine di questa prima fase, se la scheda elettronica risponde correttamente all'interrogazione del software, si può passare al *check* successivo.

Chip Detection

Il programma va a leggere la resistenza del sensore, per controllare che la cartuccia sia stata correttamente posizionata sull'apposito supporto. La

R_{Sens} viene riconosciuta se è compresa entro un intervallo di $\pm 50 \Omega$ rispetto al valore nominale di 940Ω . Se questa condizione è soddisfatta, comincia la vera e propria calibrazione del chip termico.

Chip Calibration

L'obiettivo di quest'ultima fase di calibrazione del chip è calcolare il valore di R_0 , la resistenza del sensore a 0°C . Questo parametro è necessario per poi misurare la temperatura del chip in fase di riscaldamento tramite la R_{Sens} . La temperatura rilevata e la resistenza del sensore sono legati da una relazione lineare, secondo la seguente espressione:

$$R_{Sens}(T) = R_0 (1 + a \cdot T) \quad (3.1)$$

dove a è un parametro noto, ricavato sperimentalmente, pari a $4,23344 \cdot 10^{-3}$ [48]. Per trovare il valore della R_0 sarà necessario solamente misurare l'entità della resistenza del sensore e della temperatura.

A questo punto il sistema di riscaldamento è pronto per funzionare correttamente e il pulsante di *Start* viene abilitato. Una volta impostati i parametri di temperatura e durata di riscaldamento, quando l'operatore preme lo *Start*, appaiono nella finestra una barra per la visualizzazione del tempo di riscaldamento rimanente e una casella con il monitoraggio della temperatura effettiva del chip. La fase di riscaldamento si interrompe automaticamente al termine del tempo prestabilito, ma può essere troncata in qualsiasi momento, premendo il tasto *Stop*.

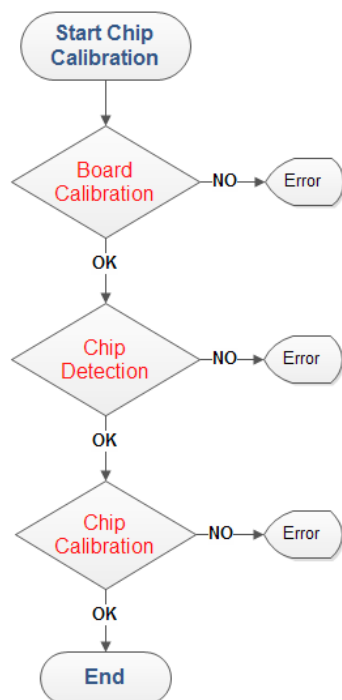


Figura 52 Diagramma di flusso con il controllo della fase di calibrazione del chip termico integrato nella cartuccia di estrazione. Il processo si realizza in tre passaggi. Il primo è la calibrazione per determinare la corrente erogata del generatore sulla scheda elettronica; seguono la verifica del valore della resistenza del riscaldatore e la calibrazione del chip

3.3.2. Software per la gestione autonoma dello sistema di estrazione

Lo strumento per estrazioni di materiale genomico che si va a realizzare nasce con l'idea di un sistema che lavori in modo totalmente autonomo. Per conseguire questo obiettivo non è sufficiente l'esistenza di un macchinario robotizzato: se si utilizza il software descritto al paragrafo precedente infatti, lo strumento è in grado di svolgere tutti i passaggi della reazione in modo meccanico, ma è ancora necessaria la presenza di un operatore che da PC invii i comandi ai dispositivi e gestisca in sequenza le fasi del protocollo.

La realizzazione di questo software punta alla completa indipendenza e autonomia dello strumento nell'esecuzione della procedura di estrazione. L'utente avrà solo il compito di caricare la cartuccia, posizionarla sul supporto e avviare il protocollo della reazione; al termine del processo, egli potrà prelevare l'eluato contenente il DNA purificato. Non è necessario che chi adopera lo strumento abbia delle conoscenze approfondite di biologia molecolare né della procedura di estrazione specifica.

Il software semi - automatico descritto nelle pagine precedenti ha permesso due passaggi fondamentali per lo sviluppo del software automatico:

- Lo studio approfondito delle parti dello strumento, in termini di funzionamento e di risposte che la scheda elettronica restituisce ai comandi inviati da computer. Queste conoscenze hanno permesso di acquisire di un certo numero di accortezze da avere nello svolgimento della reazione, che permettono di implementare al meglio le fasi di estrazione
- La definizione dei valori massimi e minimi dei parametri con cui impostare le istruzioni dello strumento, oltre alla creazione di un “protocollo standard” con valori preimpostati

L’obiettivo ultimo del progetto è definire un protocollo di estrazione ottimizzato per le estrazioni di DNA con lo strumento in via di sviluppo. Per poter facilmente studiare e modificare il processo, è conveniente che il suo andamento non sia rigidamente fissato. Ad esempio, è interessante la possibilità di analizzare singolarmente le fasi di estrazione, e non per forza in sequenza; anche la modifica dei parametri che definiscono la procedura deve poter avvenire in modo semplice, senza bisogno di modificare al codice. Proprio per questo, il software per la gestione autonoma delle estrazioni ha una struttura molto agile, che ben si presta alla necessità della fase di ottimizzazione della reazione biochimica.

I parametri che regolano il processo di estrazione non sono vincolati al software, ma dipendono da un protocollo a parte. Le informazioni relative al flusso di aspirazione della pompa, o alla velocità di rotazione del motore, sono memorizzate in un file di testo separato dal programma. Il software recupera i dati contenuti nel documento e l’estrazione avviene secondo quanto specificato all’interno di questo protocollo. Per avviare l’estrazione, all’utente è richiesto di creare o selezionare un protocollo di reazione già esistente.

Il documento di testo che contiene i dati per lo svolgimento della reazione può essere suddiviso in due parti (Figura 53):

- I parametri che regolano il processo di estrazione
- le istruzioni che vengono eseguite per portare a termine la reazione

Pump_Voltage] Parametri protocollo
Pump_Flux		
Pump_LysisVolume		
Pump_AlcoholVolume		
Pump_ElutionVolume		
Chip_DryTemp		
Chip_DryTime		
Chip_ElutionTemp		
Chip_ElutionTime		
Motor_TotalShakeTime		
Motor_Space		
Motor_Speed		
Motor_Pause		
PumpCal_Vmax		
PumpCal_Vmin		
PumpCal_Step		
wash_Lysis		
wash_Alcohol		
TEMPERATURE_CHECK	1] Istruzioni protocollo
PUMP_CHECK	2	
LYSIS_WASH	3	
ALCHOL_WASH	4	
DRY	5	
ELUTION	6	
CLEAN	7	

Figura 53 Traccia del protocollo (*.txt) con i parametri e le istruzioni che definiscono il processo di estrazione automatica

La prima parte del protocollo è costituita da 18 campi riservati ai parametri, che definiscono il funzionamento dello strumento in ogni sua parte. Ad esempio, le prime righe del protocollo sono dedicate alla pompa, per stabilire la tensione di lavoro, il flusso di e i volumi dei reagenti che verranno immessi nella cartuccia. Ci sono poi le informazioni riguardanti il motore -e quindi il movimento del magnete e subito dopo le righe dedicate alle temperature e al tempo di riscaldamento del chip nelle varie fasi di reazione. In ultimo troviamo i campi dove inserire il numero di lavaggi che devono essere effettuati con il buffer di lisi e con l'alcol. Il software memorizza tutte le informazioni ricavate dal protocollo all'interno del codice e dei comandi relativi ai vari dispositivi

La seconda parte del protocollo contiene le istruzioni e serve a definire l'andamento del processo di estrazione: la sequenza delle fasi di reazione non è fissata, il compito di specificare i le operazioni che lo strumento deve svolgere è delegato al protocollo. Ad esempio, è possibile eseguire solo le operazioni di

essiccamento ed eluizione, saltando tutti i passaggi di reazione precedenti: effettuare solo alcune operazioni naturalmente non permette di avere un processo di estrazione efficace, ma è versatile e consente di analizzare lo svolgimento delle singole fasi. Le operazioni che il sistema può eseguire è attuata mediante la cooperazione di più parti dello strumento; ognuna è identificata da un codice numerico (Tabella 6)

Codice operazione	Operazione	Dispositivi coinvolti
1	Temperature Check	Chip termico
2	Pump Calibration Check	Pompa
3	Lysis Wash	Valvole, Pompa, Motore, Fotosensori
4	Alcol Wash	Valvole, Pompa, Motore, Fotosensori
5	Dry	Pompa, Chip termico
6	DNA Elution	Valvole, Pompa, Motore, Chip termico, Fotosensori
7	Cleaning	Valvole, Pompa

Tabella 6 Operazioni attuabili dallo strumento, con il relativo codice identificativo e i dispositivi coinvolti per portare a termine ciascuna operazione

Le fasi di *Temperature Check* e di *Pump Calibration Check* servono per il settaggio iniziale dello strumento: controllano rispettivamente la calibrazione del chip termico e della pompa. Le operazioni di *Lysis Wash*, *Alcol Wash*, *Dry* e *DNA Elution* entrano nel vivo della reazione biologica: esse corrispondono esattamente alle procedure indicate all'interno del Protocollo del kit Promega. Una volta conclusa la fase di eluizione (codice operazione 6), l'operatore può prelevare il DNA purificato dal cartuccia monouso, e il processo di estrazione è terminato. L'ultima fase riportata in tabella (codice operazione 7, *Cleaning*) serve a pulire le tubature e la pompa dello strumento: viene fatta scorrere acqua deionizzata all'interno dei condotti, che vengono poi nuovamente svuotati.

La scelta del protocollo è un passaggio obbligato per avviare la procedura di estrazione. Quando si apre il programma per la gestione dello strumento, all'utente è richiesto di selezionare un protocollo: premendo il pulsante *Load*

Protocol, appare a video una finestra dedicata che permette la scelta di un documento tra quelli già esistenti, come si vede in figura (Figura 54).

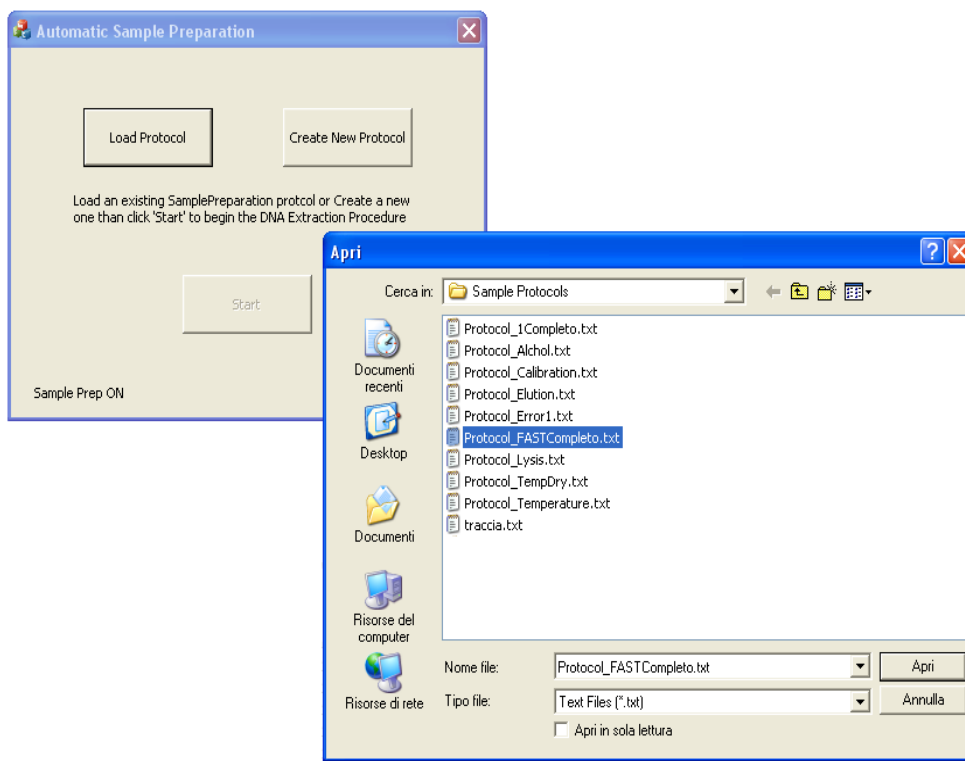


Figura 54 Pagina iniziale del software per estrazioni totalmente automatiche; in basso, la finestra che permette di selezionare un protocollo di estrazione tra quelli già esistenti

Naturalmente, l'operatore non è obbligato a scegliere uno dei protocolli già impostati: tramite il pulsante *Create New Protocol*, è sempre possibile definire un processo di estrazione specifico. Se si decide di creare un nuovo protocollo, si apre una finestra di dialogo (Figura 55) predisposta per settare tutte le voci del protocollo di reazione. Se i parametri rispettano i limiti fissati (Tabella 5), il nuovo protocollo viene salvato in formato di file di testo.

Figura 55 Software per estrazioni totalmente automatizzate; finestra per la creazione di un nuovo protocollo di estrazione del DNA

Prendiamo un caso esplicativo per chiarire il ruolo delle parametri e delle istruzioni presenti all'interno del protocollo. Se ad esempio la variabile che si riferisce all'operazione da svolgere contiene il valore 3, il codice attua la fase di lisi del sangue (Figura 56). Per portare a termine questo passaggio, è necessario aprire la valvola corrispondente al serbatoio del buffer di lisi, e che la pompa ne aspiri il volume corretto. Dopodiché bisogna agitare le microbiglie nella camera di reazione e attendere che esse vengano ricatturate dal magnete prima di passare alla fase successiva. Le informazioni relative al funzionamento della pompa e del motore sono impostate nella prima parte del protocollo; anche il numero di lavaggi a cui deve essere sottoposto il materiale biologico è un dato contenuto nelle righe riservate ai parametri.

In Figura 56 i parametri sono evidenziati in rosso. Il numero della valvola che permette l'accesso al reagente desiderato –il buffer di lisi nel nostro esempio- è già specificato nelle righe di codice relative alla fase 3, ed è indicato in verde.

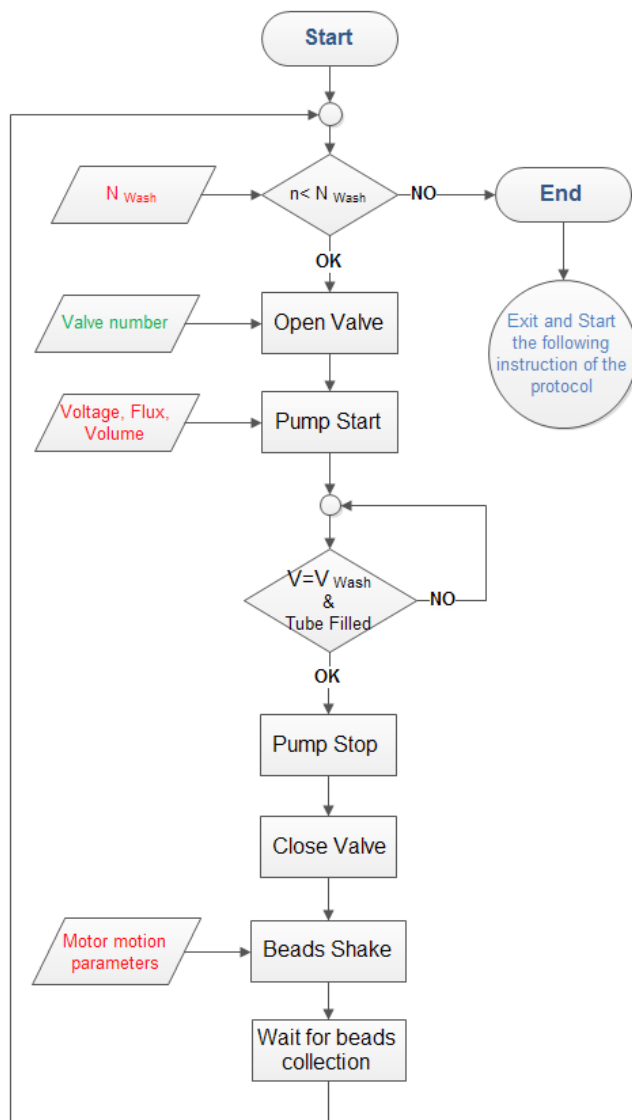


Figura 56: Diagramma di flusso esemplificativo del funzionamento del processo di lavaggio con il buffer di lisi.

Lo svolgimento dell'estrazione automatica dipende dalla combinazione di tutte le informazioni contenute nel protocollo. Quando l'utente seleziona un protocollo, il software controlla che tutti i parametri siano corretti e che i loro valori non eccedano i limiti prestabiliti (Tabella 5); se questa condizione è soddisfatta, i parametri e le istruzioni del protocollo vengono memorizzati negli spazi di memoria preposti.

Una volta caricato il protocollo, il processore rimane in attesa finché non riceve il comando per iniziare. Solo quando l'operatore preme il pulsante *Start* comincia la vera e propria procedura di estrazione: il programma va a prendere il numero contenuto nella prima posizione del vettore delle istruzioni, ed svolge le

operazioni ad esso associate. Una volta eseguite le righe di codice associate ad un'istruzione, il software torna a leggere il vettore per eseguire l'istruzione successiva. Il diagramma di flusso (Figura 57) mostra graficamente come si articola il codice principale del software.

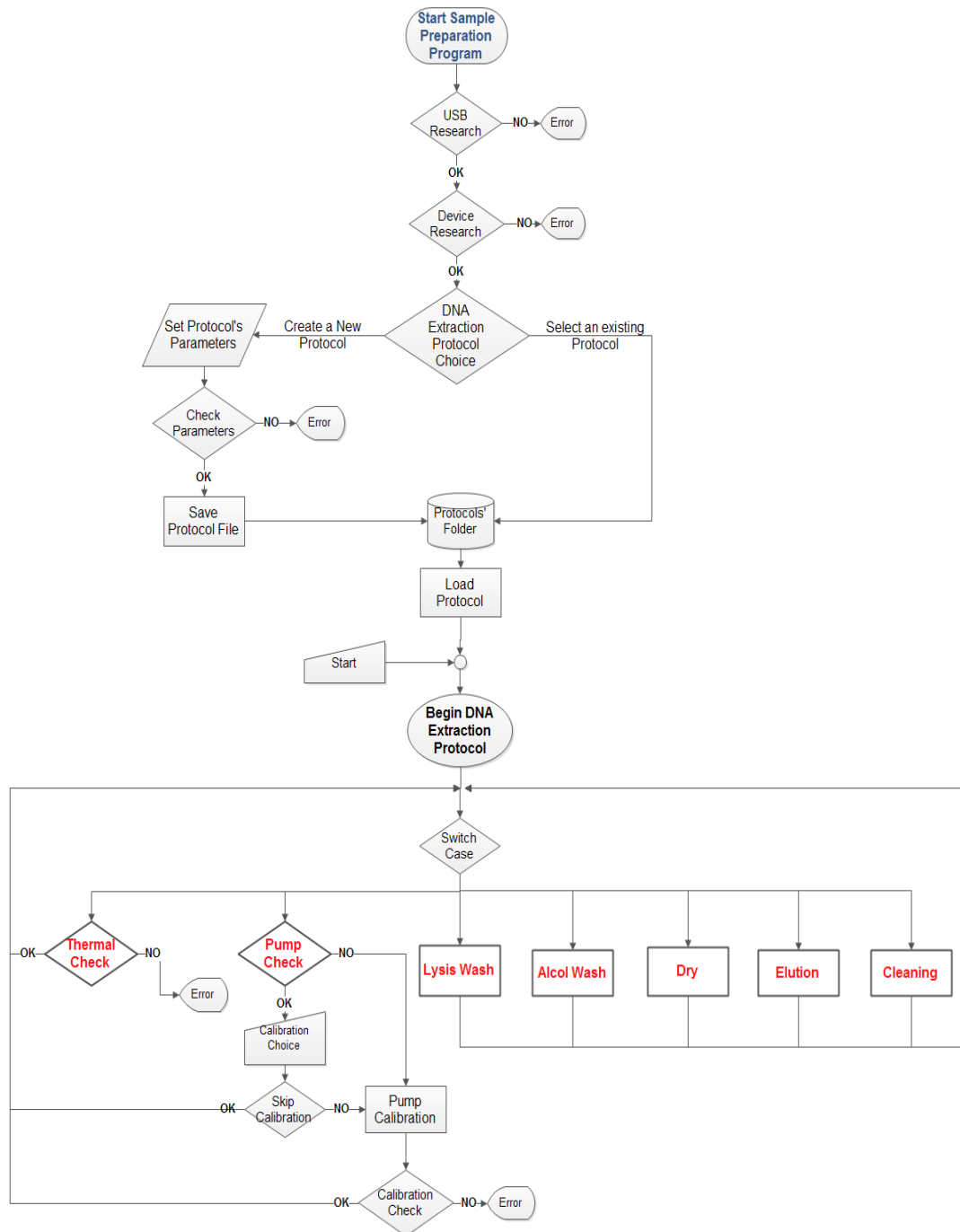


Figura 57 Diagramma di flusso della funzione Main del software

Perché il processo di estrazione sia efficace e dia come prodotto finale un eluato contenente DNA purificato, l'ordine delle operazioni da effettuare è quello indicato dal protocollo di riferimento fornito da Promega (Figura 58):

- lavaggi con buffer di lisi, per distruggere le membrane cellulari e inibire i fattori capaci di danneggiare il DNA
- lavaggi con alcol, per rimuovere le impurità e i resti cellulari dannosi per il DNA e per l'andamento delle reazioni a valle dell'estrazione
- essiccamento, per rimuovere le tracce di alcol che potrebbero inibire le analisi a cui verrà sottoposto il DNA una volta estratto
- eluizione

I passaggi che richiedono l'intervento di un operatore sono molto limitati. Le microbiglie magnetiche sono già presenti all'interno della cartuccia: la prima operazione di cui l'utente si deve preoccupare è quella di immettere il campione di sangue nella cameretta di reazione. Se il processo di calibrazione del chip termico va a buon fine, e se la pompa risulta anch'essa già correttamente calibrata, all'utente è chiesto di decidere se ricalibrare la pompa: questo passaggio è utile nel caso sia stata montata una nuova pompa nello strumento; altrimenti la calibrazione può essere saltata, e si passa alla fase successiva del protocollo.

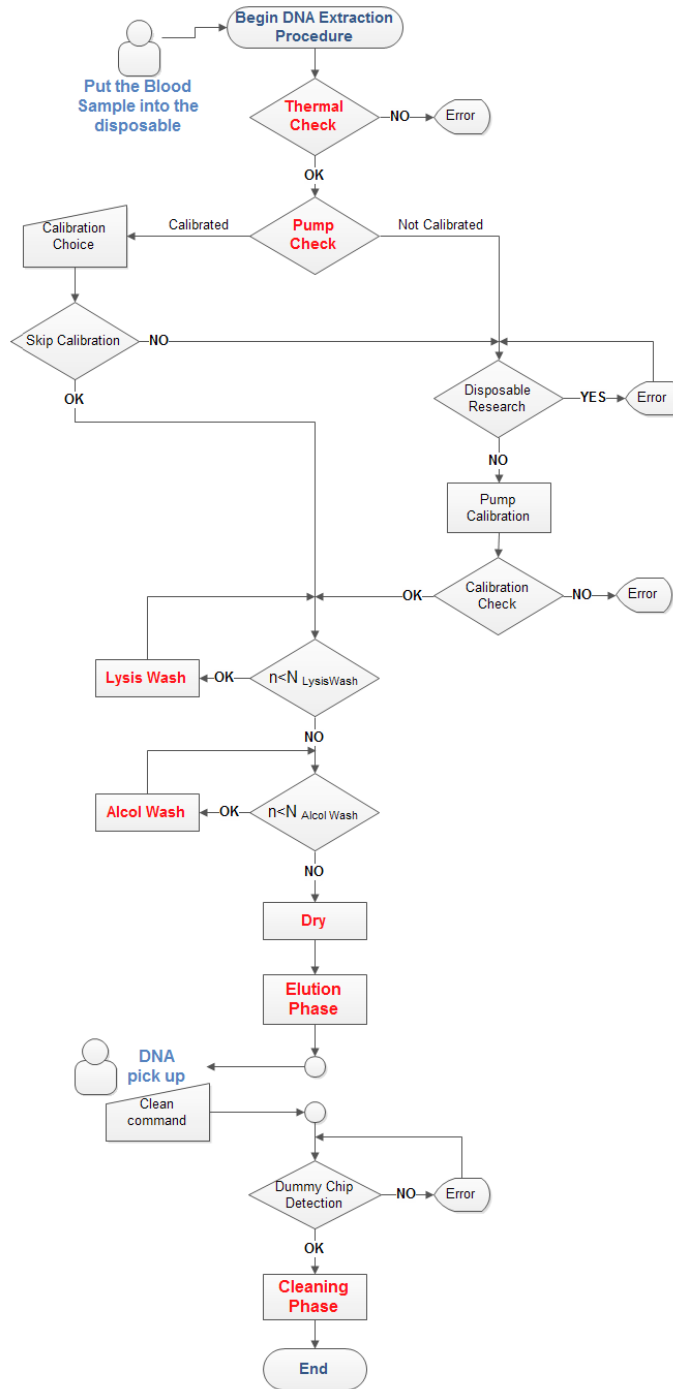


Figura 58 Esempio dell'andamento del protocollo di estrazione completo, nel quale si susseguono tutte le fasi necessarie per ottenere il DNA purificato al termine del processo

Capitolo 4

RISULTATI E ANALISI DEI DATI

Contemporaneamente allo sviluppo e alla realizzazione dello strumento, è stata svolta un'importante attività di sperimentazione e validazione del prototipo a livello biologico.

In un primo momento, gli esperimenti biologici sono stati eseguiti come test di fattibilità: il kit *MagneSil ONE di Promega* [41] è validato per eseguire estrazioni in provetta o con il Maxwell 16 [42], entrambi profondamente diversi dallo strumento realizzato nel corso del nostro progetto. È stato dunque necessario verificare la possibilità di estrarre DNA da sangue all'interno di un sistema nuovo, in un supporto con caratteristiche geometriche e funzionali molto diverse da qualsiasi provetta.

In seguito alla realizzazione del primo prototipo è cominciata una vera e propria valutazione delle performances dello strumento, stimate attraverso le caratteristiche del DNA estratto [21]. I parametri per la valutazione dell'eluato sono la qualità e la quantità [3].

Nel corso di questo capitolo verranno illustrati i risultati relativi alle analisi del DNA ottenuto con il nostro estrattore automatico. La stima della resa del processo di estrazione è stata effettuata attraverso due metodi di analisi:

- Real Time – PCR [21]
- Spettrofotometria [18], [19], [20]

Le osservazioni e le analisi biologiche esposte all'interno di questo capitolo non hanno la pretesa di essere conclusive: si tratta di indicazioni preliminari, che dovranno poi essere approfondite e validate in sede di laboratorio biologico.

4.1. Studio preliminare del kit di estrazione Promega e analisi di fattibilità

Prima di procedere con qualunque altra analisi sperimentale, si è andati a testare le prestazioni del kit Promega *MagneSil ONE*, in modo da avere un target di riferimento con cui confrontare il DNA isolato nelle prove sperimentali successive. Innanzitutto sono state svolte alcune estrazioni manuali di DNA seguendo con precisione il protocollo indicato dal kit. Dopodiché è stata effettuata una variazione dei volumi di reazione, come prima verifica di fattibilità: è necessario accertare che le quantità di reagenti impiegati all'interno del sistema automatico non impediscano il buon esito dell'estrazione. I volumi dei reagenti sono stati scalati in base alla capacità della camera di reazione della cartuccia, facendo però attenzione a mantenere invariato il rapporto tra buffer di eluizione, sangue e microbiglie: sono stati diminuiti i volumi del buffer di lisi e dell'alcol.

Gli eluati di DNA sono stati ottenuti con estrazioni manuali. I campioni sono stati diluiti, in modo da avere diverse concentrazioni di ciascuno poter valutare la loro purezza; ognuno di essi è stato sottoposto a *Polymerase Chain Reaction* con una mix per rivelare mutazioni del CYP2C9*18¹.

Osservando la Figura 59 notiamo innanzitutto che la fluorescenza dei campioni di DNA aumenta, mentre quella del controllo negativo rimane costante: possiamo asserire che effettivamente il DNA è stato estratto e l'andamento della curva non è dovuto ad una contaminazione dei reagenti e che la purezza degli estratti è sufficiente per sottoporre il DNA a PCR. Dai cicli soglia relativi alle diverse concentrazioni dei due eluati (Tabella 7) si ricava un'efficienza che si aggira

¹ Il CYP2C9*18 è uno dei citocromi presenti nel fegato, insieme ad altri enzimi del metabolismo. In particolare è un enzima coinvolto nell'assimilazione dei principi attivi di circa 100 farmaci. La mix di PCR in questione serve a rilevare la variazione di un singolo nucleotide del gene che contiene la codifica questo enzima, in particolare la modifica numero 18.

attorno al 100%: deduciamo un buon grado di purezza del DNA ricavato. Il modello lineare interpola bene i dati. Non ci sono differenze rilevanti tra i due protocolli di estrazione, quindi possiamo affermare che la variazione dei volumi attuata non influisce sull'esito del processo biologico.

I dati non sono conformi con le prestazioni di estrazione attese: la scheda tecnica del *MagneSil ONE* attesta una resa di 500-1500 ng di materiale genomico a partire da 60 μ l di sangue [41]. I campioni ricavati in provetta contengono una quantità di DNA inferiore, circa 200ng. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto a un deterioramento dei reagenti del kit di estrazione. In ogni caso, possiamo prendere come riferimento per le indagini future i risultati ottenuti in questo studio preliminare.

	ciclo soglia				Efficienza	
	1 : 1	1 : 4	1 : 16	1 : 64	η %	r^2 %
Protocollo modificato	26,09	28,38	30,06	32,1	100,5% ²	99,1%
	25,96	28,15	29,5	32,23		
Protocollo standard	25,94	27,55	29,99	32,65	96,7%	98,6%
	25,91	28,44	30,16	32,50		

Tabella 7 Dati relativi alle prove di PCR di diverse diluizioni dei DNA isolati manualmente con due diversi protocolli di estrazione

² L'efficienza di PCR può arrivare ad avere valori di efficienza maggiori del 100%: quando il DNA più che raddoppia ad ogni ciclo di PCR, η aumenta. Ciò è dovuto alla presenza di inibitori all'interno dell'eluato, la cui azione diventa sempre meno efficace man mano che la loro concentrazione in soluzione diminuisce.

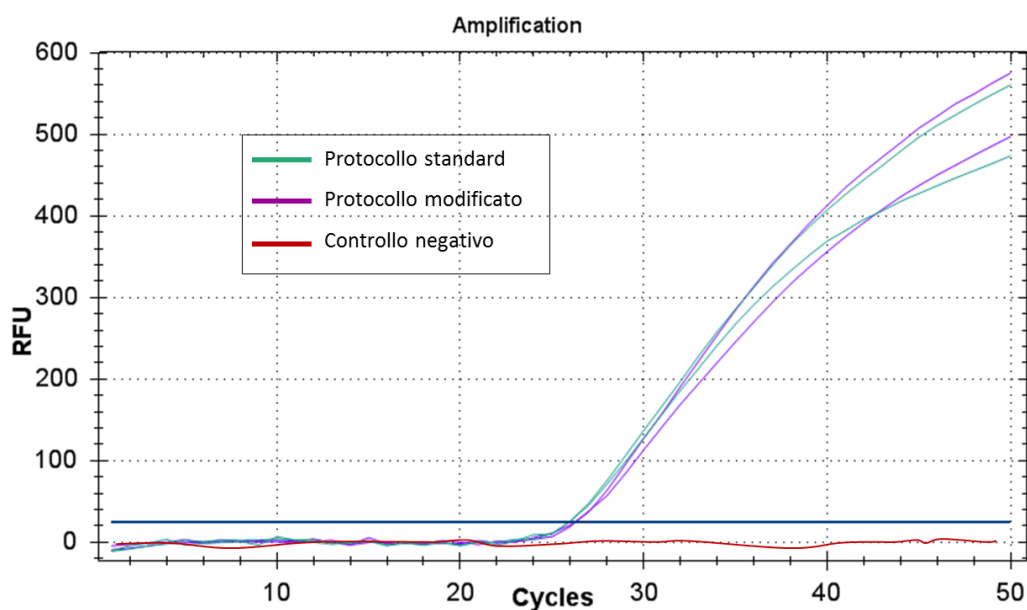


Figura 59 confronto tra curve di PCR relative a due campioni di DNA, estratti manualmente con due diversi protocolli (diluizioni 1:1)

4.2. Analisi di fattibilità: estrazioni con il sistema automatico

Le analisi esposte al paragrafo precedente hanno permesso di ottenere un obiettivo di riferimento al quale tendere per le estrazioni portate a termine con lo strumento in via di sviluppo. A questo punto è stato interessante eseguire prove di estrazioni in modalità manuale all'interno di un supporto simile alla cartuccia monouso

Questo passaggio, è stato necessario per verificare che l'estrazione di DNA possa avvenire correttamente anche su un supporto diverso dalla provetta, più simile alla cartuccia di estrazione. La gestione dei reagenti nei due contenitori è molto differente: la cartuccia è larga e piatta, quindi la rimozione dei buffer al termine dei lavaggi è più difficoltosa. Inoltre non sappiamo se i materiali e le colle impiegati per la realizzazione della cartuccia possano in qualche modo compromettere il processo biologico.

Si sono sottoposti a PCR sia un DNA estratto in provetta che uno estratto nel contenitore simile alla cartuccia. La miscela di reagenti per il processo di

amplificazione discrimina il cromosoma 23, individuando se è di tipo XX (femmina) o XY (maschio).

I CT ottenuti con i due diversi estratti coincidono (Figura 60 ,Tabella 7Tabella 8) , quindi il materiale della cartuccia non inficia la PCR.

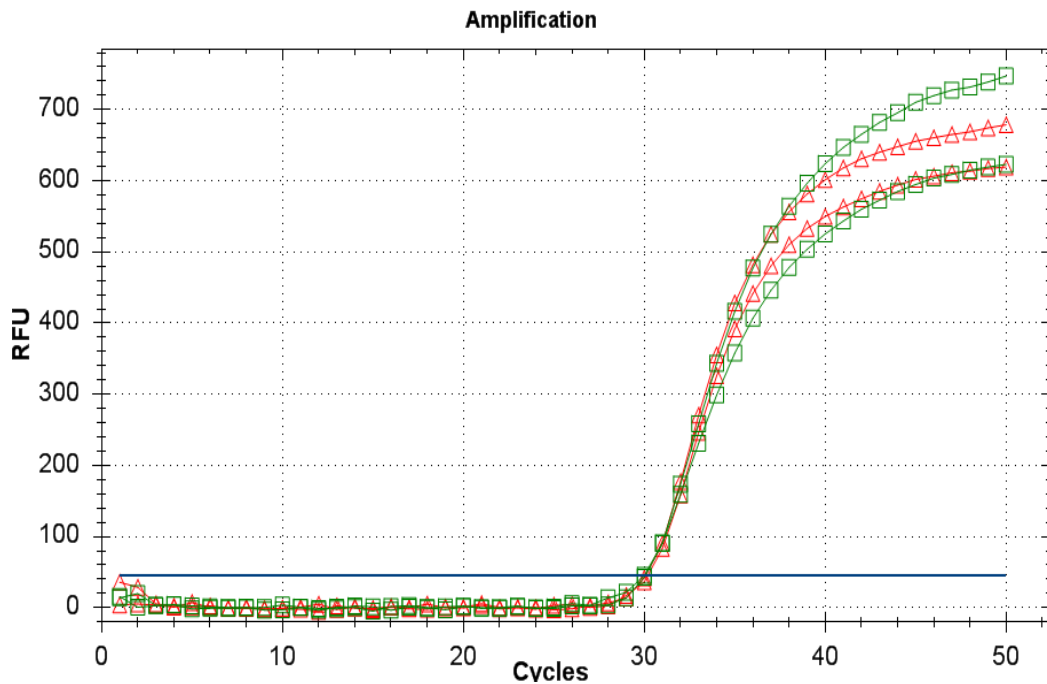


Figura 60 Curve di RT-PCR, con DNA estratto manualmente su due diversi supporti: in verde le estrazioni eseguite in provetta e in rosso quelle nella cartuccia

	CT 1	CT 2	Mean	Dev st
Estrazione in provetta	30,04	29,96	30,00	0,57
Estrazione nella cartuccia	30,17	30,06	30,12	0.78

Tabella 8 Cicli soglia delle dei campioni estratti in provetta e nella cartuccia

Il secondo passaggio dell'analisi di fattibilità prevede l'impiego dello strumento in via di sviluppo e l'esecuzione di estrazioni in modo automatico.

I risultati di queste prove sono stati soddisfacenti (Tabella 9 e Figura 61). La verifica del buon esito della purificazione del DNA è stata condotta tramite PCR, usando una mix il cui target è il Fattore V³; la quantità di DNA immessa nella

³Il fattore V è una proteina umana, fa parte dei fattori di coagulazione del sangue. nella mix di PCR sono presenti sia il target del gene che codifica la proteina *wild-type* che il target che

miscela per la PCR è pari a 1/5 del volume totale, il che corrisponde a diluire l'eluato di un fattore 2,2.

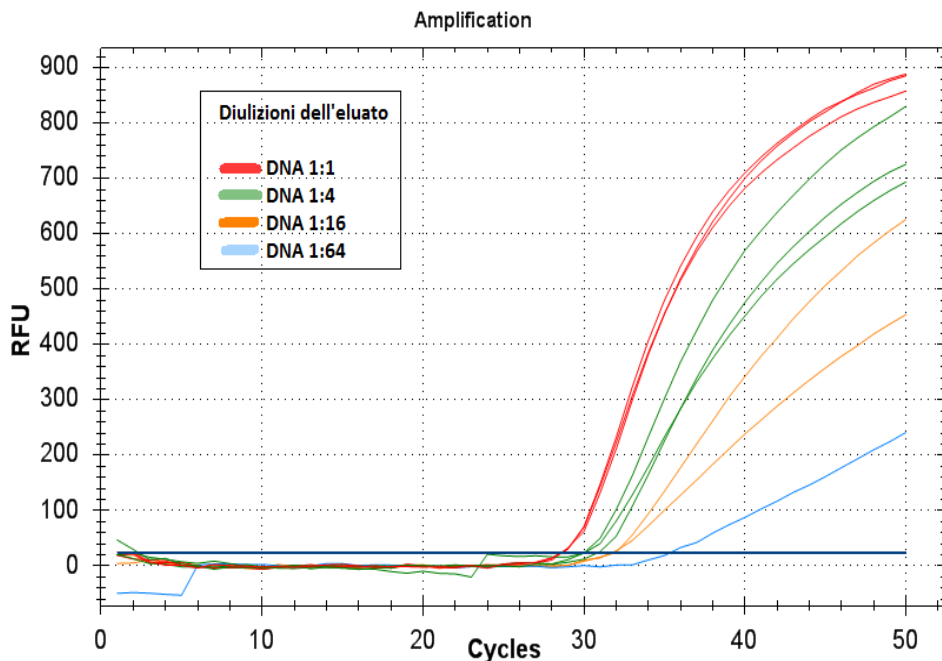


Figura 61 Curve di RT-PCR, con diluizioni di DNA isolato nella cartuccia mediante lo strumento di estrazione automatica

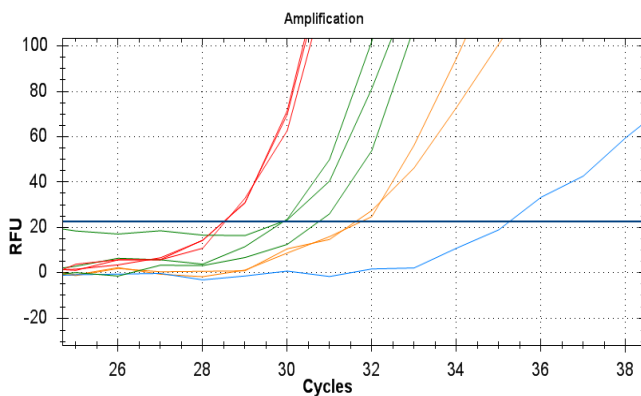


Figura 62 Curve di RT-PCR, zoom

I risultati ottenuti sono piuttosto buoni. Innanzitutto confermano la fattibilità delle estrazioni con il nostro sistema di estrazione; una prima analisi dei cicli

identifica la mutazione di Leiden, indice di un aumentato rischio di trombofilia. i due target sono identificati da diversi fluorofori, rispettivamente FAM e VIC.

soglia relativi alle diverse diluizioni mette in luce la presenza di qualche impurità all'interno dell'eluato -l'efficienza è pari al 109%.

Diluizioni	CT 1	CT2	CT3	Mean	DevSt	ε%
1 : 1 (rosso)	28,49	28,53	28,49	28,50	0,023	0,081
1 : 4 (verde)	30,74	29,90	29,88	30,17	0,491	1,627
1 : 16 (giallo)	31,61	31,74		31,68	0,092	0,290
1 : 64 (blu)	35,25	34,90		35,08	0,247	0,706

Tabella 9 Cicli soglia di PCR relative a 4 diluizioni dello stesso eluato, ottenuto da estrazione da sangue nel lo strumento automatico

4.3. Analisi con alcol

Per rimuovere gli inquinanti dal DNA, dopo aver lisato il campione, il protocollo di estrazione prevede di sottoporre le microbiglie a ripetuti lavaggi con alcol. Al termine di questa fase é importante che tutto l'alcol venga rimosso: esso infatti contiene etanolo, un noto inibitore della PCR [17]. Osservando l'andamento dell'estrazione all'interno del chip, si è notato che l'eliminazione e dell'alcol al termine della fase di essiccazione non è completa. La camera di reazione viene riscaldata e ventilata per espellere l'alcol e i suoi vapori, ma alcune gocce rimangono condensate sulle pareti del vano.

- Per verificare che percentuali anche minimealcol non rendano il processo di amplificazione meno efficiente, si è scelto di sottoporre a PCR un DNA sintetico, diluito con alcol a diverse concentrazioni (taget di PCR: Fattore V di coagulazione):DNA 100%: DNA puro⁴
- DNA 80%: diluizione DNA 4:5
- DNA 50%: diluizione DNA 1:2

⁴ Si tratta di DNA sintetico, quindi privo di qualsiasi tipo di inibitore. è stato usato un DNA maschile di Applied Biosystems

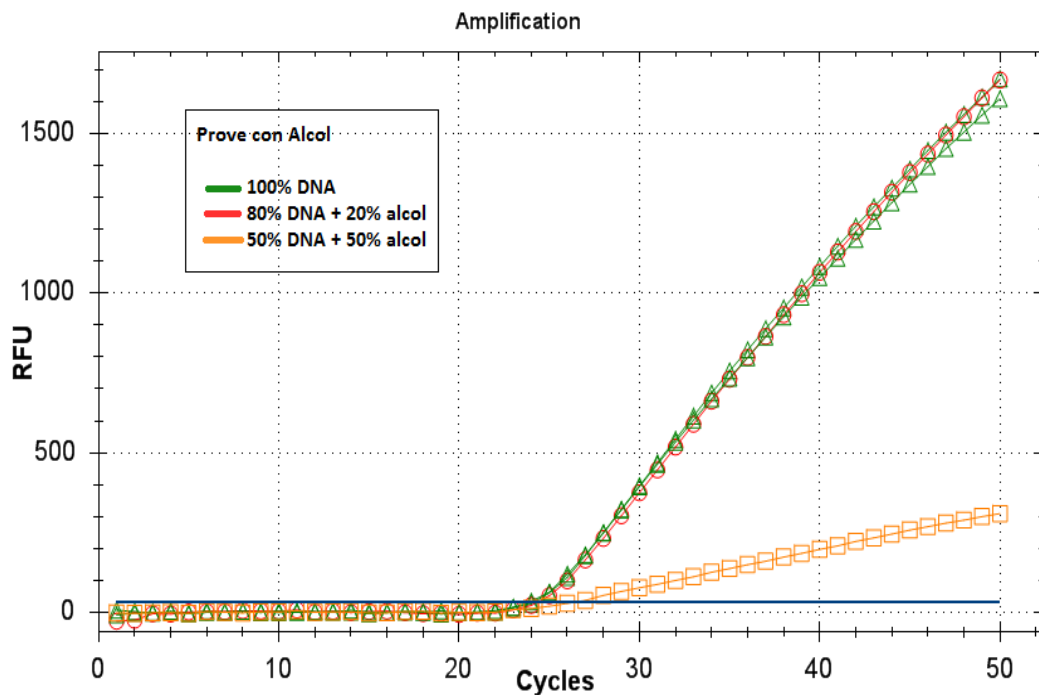


Figura 63 Curve di RT-PCR, DNA sintetico diluito con alcol di lavaggio

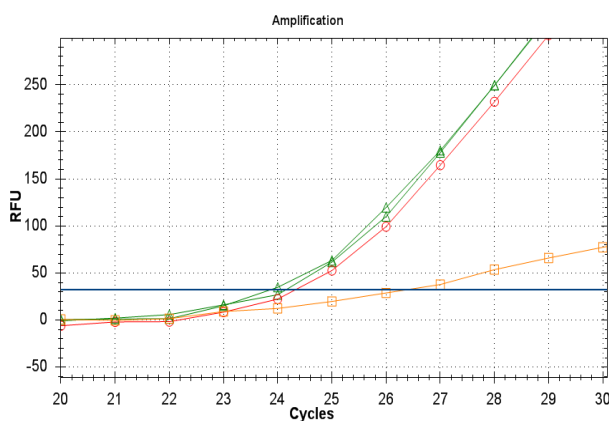


Figura 64 Curve di RT-PCR di DNA con alcol, zoom

La Figura 63 mostra chiaramente che percentuali troppo elevate di alcol in soluzione inibiscono la PCR. Osservando i cicli soglia in Figura 64 vediamo che le curve dei campioni 1 e 2 (rispettivamente evidenziati in rosso e in verde) salgono sostanzialmente insieme, mentre quella del campione 3 (giallo) è ritardata di più di due cicli rispetto alla media delle prime tre curve (Tabella 10). L'alcol di lavaggio presente all'interno dell'eluato che si recupera dalla cartuccia ha una concentrazione minore di 1:5, si tratta solo di residui:ossiamo quindi concludere

che le tracce di l'etanolo non costituiscono un reale problema nel nostro sistema di estrazione.

	CT
100% DNA	24.34
80% DNA +20% alcol (1)	23.89
80% DNA +20% alcol (2)	24.16
50% DNA +50% alcol	26.42

Tabella 10 Cicli soglia di PCR relative a prove di diluizioni del DNA col alcol di lavaggio del kit Promega

4.4. Estrazioni con microbiglie idratate o disidratate

Per semplificare l'allestimento dell'estrazione con lo strumento di automatico, si è deciso di precaricare ciascuna cartuccia la corretta quantità di Magnesil. Si è osservato che, lasciando le microbiglie all'interno della cameretta, in meno di 24 ore evapora tutta la soluzione acquosa in cui esse sono immerse. È stato deciso di controllare se questo fenomeno influisce sull'efficienza del processo di estrazione.

I dati in esame (Tabella 11) sono relativi ad estrazioni condotte in modo automatico sistema per la purificazione di acidi nucleici; la mix di PCR usata per analizzare questi campioni ha come target il Fattore V.

	CT 1	CT 2	CT 3	Mean	Dev St	ε%
Microbiglie disidratate	30,19	30,8	30,6	30,53	0,31	1,02
Microbiglie in soluzione	29,84	28,54		29,19	0,92	3,15

Tabella 11 Cicli soglia di PCR relative a prove di estrazione con microsfere alla silice disidratate o in soluzione

I dati acquisiti non sono molto numerosi, ma guardando i cicli soglia della RT-PCR sembra che le estrazioni peggiorino un po' quando le biglie sono essiccate. Trarre delle conclusioni con un set di misure così ridotto sarebbe sbagliato: tuttavia questi risultati non escludono una correlazione tra l'idratazione delle microsfere e l'esito dell'estrazione. E' necessario che questo fenomeno venga studiato più approfonditamente e che la valutazione venga effettuata su un set di dati più ampio.

4.5. Protocollo ottimizzato per estrazioni automatiche

Dopo le verifiche di fattibilità descritte nei paragrafi precedenti, è cominciata una fase di ottimizzazione del protocollo di reazione per estrarre DNA all'interno della cartuccia. Promega indica 45 µl di sangue e 10 µl di MagneSil come volumi ottimi per l'estrazione manuale. Si è deciso di analizzare altri possibili protocolli di estrazione che potrebbero essere più adatti per la procedura automatizzata nel nostro macchinario. Alcune analisi preliminari sono state condotte su un campione ridotto di dati, rimandando eventuali conferme a lavori futuri.

Data la scarsa numerosità di misure, si è ricorsi a test basati su statistiche differenti al fine di controllare in modi alternativi la validità dei risultati. Innanzitutto si è eseguita una valutazione non parametrica, cioè che non necessita di alcuna assunzione sulla distribuzione di provenienza dei dati. L'analisi è stata effettuata attraverso il test di Kolmogorov–Smirnov⁵ [62] poiché garantisce una buona potenza al test anche in presenza di campioni poco numerosi. In un secondo momento sono state fatte assunzioni gaussiane sui dataset, confermate con gli Shapiro-test. Non essendo note le varianze dei campioni, si sono utilizzati dei t-test per stimare la differenza tra le popolazioni [62]. La differenza tra le medie delle popolazioni è un parametro utile per le nostre valutazioni; gli intervalli di confidenza sono stati calcolati al 95%.

	Protocollo di estrazione	CT 1	CT 2	CT 3	CT 4	Media	Dev St	ε%
DNA 1	45 - 20	28,87	29,1			28,99	0,16	0,56
DNA 2	45 - 20	29	29,15			29,08	0,11	0,36
DNA 3	45 - 10	30	30,2			30,10	0,14	0,47
DNA 4	45 - 10	30,4	30,9	30,1	31	30,60	0,42	1,39
DNA 5	45 - 10	29,84	30,2	29,62	29,68	29,84	0,26	0,87
DNA 6	45 - 10	30,4	30,89			30,65	0,35	1,13

⁵ Il Kolmogorov–Smirnov è un test non parametrico che mira a verificare l'ipotesi che due popolazioni di dati provengano dalla stessa distribuzione o piuttosto da distribuzioni differenti. In questo lavoro si è utilizzato il test unilatero, che verifica se una delle due popolazioni assume valori mediamente maggiori dell'altra

Tabella 12 Cicli soglia di PCR relativi agli esperimenti per individuare la risorsa scarsa nel mix di estrazione. Protocollo Promega (45 μ l sangue + 10 μ l MagneSil) vs protocollo modificato

La prima modifica rispetto al protocollo Promega [41] è stata volta ad individuare la “risorsa scarsa” nel mix di estrazione. Sono state eseguite alcune estrazioni mantenendo invariato il volume di sangue e raddoppiando le microbiglie all’interno della cartuccia, così da avere 45 μ l e 20 μ l di MagneSil; gli eluati sono stati sottoposti a RT-PCR con il Fattore V come target. I risultati ottenuti (Tabella 12) mostrano che effettivamente i cicli soglia dei due dataset sono diversi. Il plot esplorativo (Figura 65) mostra graficamente che i CT ottenuti dal protocollo 45–20 sono inferiori. Dato che le misure delle due popolazioni sono abbastanza ben amalgamate tra di loro, possiamo svincolarci dalla variabile “DNA” relativa al campione estratto, e trattare i dati solo in base al protocollo a cui si riferiscono. Il test di Kolmogorov-Smirnov conferma l’osservazione grafica (p -value = $2.5 \cdot 10^{-3}$) e Shapiro-test stabilisce una differenza di 0.97 cicli tra le due popolazioni (p -value = $4,6 \cdot 10^{-7}$).

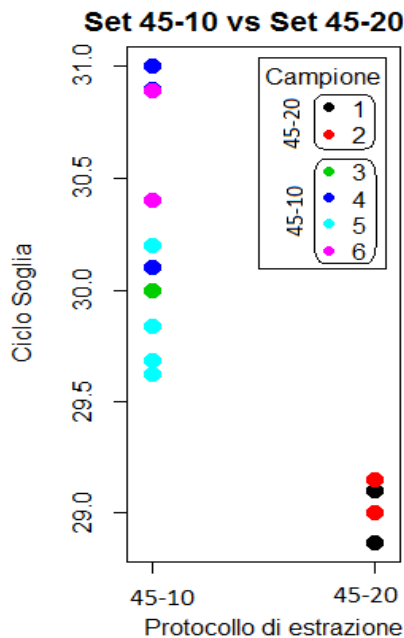


Figura 65 Cicli soglia di PCR relativi agli esperimenti per individuare la risorsa scarsa nel mix di estrazione. Protocollo Promega (45 μ l sangue + 10 μ l MagneSil) vs protocollo modificato

Effettivamente le microbiglie si sono rivelate essere la risorsa scarsa. Negli esperimenti appena esposto, il volume di MagneSil è stato addirittura raddoppiato, quindi possiamo ipotizzare che la silice sia in grado di legare a se più DNA di quello estratto a partire da 45 µl di sangue: ci aspettiamo che aumentando leggermente il volume di sangue la curva di PCR salga anticipata. Per verificare questa ipotesi, sono state fatte alcune estrazioni con 20 µl di MagneSil 60 µl di sangue.

Confrontiamo i protocolli 60-20 e 45-10, che sono i dataset più numerosi a nostra disposizione. Gli eluati estratti sono stati sottoposti a RT-PCR con mix per il Fattore V; i CT sono riportati di seguito (Tabella 13, Figura 66).

	Protocollo di estrazione	CT 1	CT 2	CT 3	CT 4	CT 5	CT 6	Media	DevSt	ε%
DNA 1	45 - 10	30	30.2					30.10	0.14	0.47
DNA 2	45 - 10	30.4	30.9	30.1	31.0			30.60	0.42	1.39
DNA 3	45 - 10	29.8	30.2	29.6	29.7			29.84	0.26	0.87
DNA 4	45 - 10	30.4	30.9					30.65	0.35	1.13
DNA 5	60 -20	27.6	27.7	27.5	27.6	26.9	27.1	27.41	0.30	1.08
DNA 6	60 -20	28.2	28.3	27.6	28.1			28.03	0.29	1.05
DNA 7	60 -20	27.4	28.2					27.80	0.59	2.11

Tabella 13 Cicli soglia di PCR condotte su campioni di DNA estratti con due diversi protocolli: uno richiede 45 µl di sangue e 10 µl di MagneSil, mentre per il secondo ne occorrono rispettivamente 60 e 20 µl

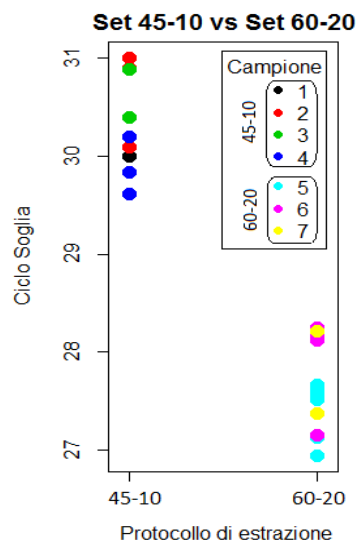


Figura 66 Rappresentazione grafica dei CT

Anche in questo caso possiamo trascurare la variabile "DNA". Le popolazioni di dati sono differenti (Kolmogorov Smirnov test, $p\text{-value} = 6,1 \cdot 10^{-3}$), e il T-test indica che la differenza tra le due è maggiore di 2 cicli (la differenza è di 2,29 cicli, $p\text{-value} = 1,3 \cdot 10^{-12}$).

Le analisi statistiche condotte sui cicli soglia di PCR confermano che il nuovo protocollo è migliore per le estrazioni all'interno della cartuccia. Un aumento dei volumi di estrazione del 100% per le microbiglie e del 30% per il sangue sembra comportare un incremento di DNA pari a 5 volte ($2^{2.29} = 4.89$) la quantità ottenuta con protocollo Promega.

4.6. Quantificazione del DNA estratto con il sistema automatico

Il protocollo di estrazione che impiega 60 μl di sangue e 20 μl di microbiglie alla silice sembra essere più efficiente rispetto al protocollo proposto da Promega. Sono state condotte delle analisi più approfondite per confermare questa osservazione sperimentale e per ricavare informazioni sulla quantità e sulla qualità del DNA estratto mediante le diverse procedure. A questo scopo sono state eseguite delle prove di PCR e qualche analisi spettroscopica.

Si è deciso di valutare in parallelo eluati di DNA ottenuti con il protocollo di estrazione standard e con i volumi ottimizzati per lo strumento automatico.

Ognuno dei campioni è stato sottoposto a RT-PCR con quattro concentrazioni (1:1, 1:4, 1:16 e 1:64):

- P1: Estrazioni col sistema automatico, 10 µl MagneSil – 45 µl sangue
- P2: Estrazioni col sistema automatico, 20 µl MagneSil – 60 µl sangue

Avendo fatto delle diluizioni successive con rapporto 1:4, ci aspettiamo che il ritardo tra le curve di PCR delle repliche di uno stesso campione sia di circa 2 cicli. I cicli soglia degli estratti sono stati confrontati con i CT relativi a diluizioni di un DNA puro, con concentrazione nota [10 ng/µ]. Se le efficienze dei processi di amplificazione sono tra loro confrontabili, possiamo risalire alla quantità di DNA inizialmente presente nei campioni in analisi.

Sono state fatte tre prove di estrazione con ciascuno dei due protocolli; ogni diluizione è stata sottoposta a diverse prove di PCR, usando sempre il CYP2C9*18 come target di amplificazione. I dati riportati in Tabella 14 sono il risultato di un'operazione di media applicata sul dataset disponibile.

Protocollo Estrazione		ciclo soglia				parametri efficienza		quantificazione DNA	
		1 : 1	1 : 4	1 : 16	1 : 64	η %	r ² %	Copie/ul	ng/ul
P1	media	34,20	31,15	33,98	36,25	81	98.9	43	0,22
	dev st		0,72	0,61	1,10				
P2	media	33,78	29,73	31,80	33,83	103	99.6	290	1,02
	dev st		0,51	0,52	0,96				
DNA puro		23,14	25,15	27,04	29,26	98	99.5	7045	24,66

Tabella 14 Risultati delle analisi di PCR per la quantificazione del DNA estratto; i dati riportati in azzurro sono stati esclusi dalle analisi

Dalle analisi delle curve di PCR, possiamo dedurre che la purezza dei campioni estratti con il sistema automatico non è particolarmente elevata. La fluorescenza dei campioni a concentrazione maggiore sale molto ritardata: i dati relativi ai DNA concentrati 1:1 sono del tutto fuori scala, tanto da rendere insensato qualunque indicatore di efficienza -e quindi di purezza. Il fenomeno è chiaramente evidente in nel grafico sottostante, relativo ad una PCR di un eluato estratto con il protocollo P2 (Figura 67). Per nostre valutazioni, possiamo non

considerare questi risultati come particolarmente significativi: le schede tecniche per la PCR consigliano di usare un volume di eluato pari a 1/5 del volume totale di reazione, mentre usando il campione non diluito il DNA corrisponde a circa 1/2 della miscela. Se prendiamo in analisi solo i dati delle tre diluizioni degli eluati ottenuti con diversi protocolli, i cicli soglia hanno andamento lineare con il logaritmo della concentrazione, e l'efficienza della reazione si aggira intorno al 100% (Figura 68).

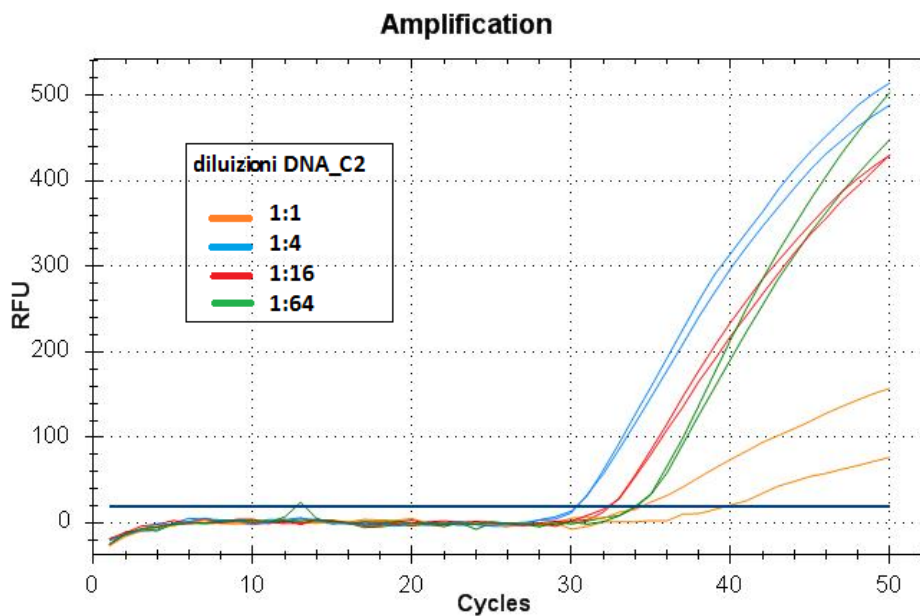


Figura 67 Curve di PCR con l'eluato di P2

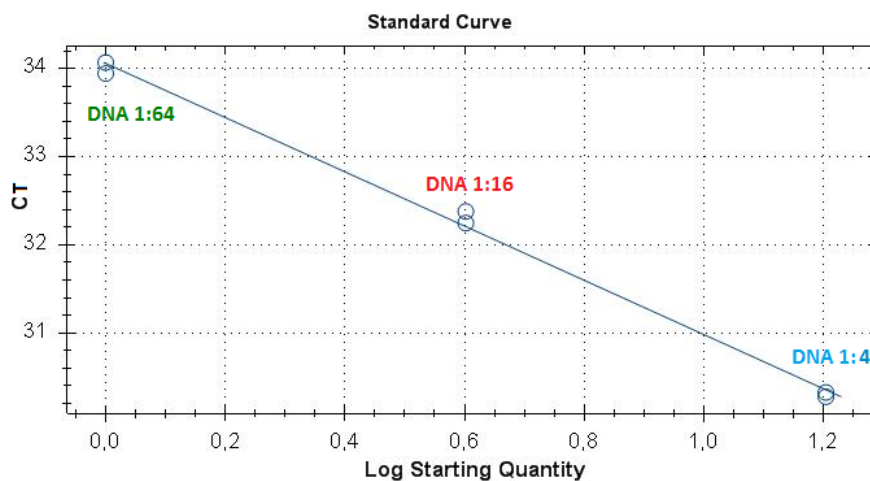


Figura 68 Grafico semi-logaritmico dei cicli soglia di P2 in funzione del logaritmo della concentrazione; è possibile apprezzare l'andamento lineare dei CT

In Tabella 14 è riportata anche una stima della concentrazione iniziale di DNA nei diversi eluati. La quantità di DNA che si ottiene è piuttosto inferiore a quella ricavata manualmente (Tabella 7): il ritardo è di circa 1,5 cicli -confrontando i dati relativi ai campioni diluiti 1:4. In ogni caso, i risultati confermano che le prestazioni del protocollo di estrazione modificato sono migliori rispetto al protocollo standard.

I due campioni di DNA estratti sono stati sottoposti ad un'indagine spettrofotometrica. I risultati però non sono ben interpretabili: l'incertezza potrebbe essere dovuta a due fattori. Innanzitutto, le valutazioni quantitative tramite PCR ci dicono che siamo vicini al limite di sensibilità minima della spettrofotometria. Inoltre, la presenza di inibitori organici già riscontrata può alterare le misure ottiche di assorbanza. L'unico dato interessante (Tabella 15) riguarda il rapporto tra le quantità di DNA isolato con i diversi protocolli: abbiamo un'ulteriore conferma che usando 60 µl di sangue e 20 µl di biglie alla silice si ricava una dose maggiore di DNA.

	OD Medio	Dev st	ε%
P1	0.340	0.053	15.59
P2	0.673	0.047	6.98

Tabella 15 Misure spettrofotometriche del DNA ricavato con il protocollo standard consigliato dal kit Promega e con il protocollo ottimizzato per estrazioni col sistema automatico

4.7. Prove di RT-PCR nel Q3

Il sistema di estrazione automatica nasce con l'intento di essere abbinato o integrato all'interno del Q₃, uno strumento per Real Time-PCR in via di sviluppo presso il BioLab ST.

L'ultima prova effettuata con il DNA estratto è stata un'amplificazione di PCR con il Q₃. Anche in questo caso è stata usata la miscela per rivelare il CYP2C9*18. I campioni in analisi sono gli stessi riportati al paragrafo precedente: in particolare si tratta del DNA di P2 e di P1 estratto in prove diluito 1:4. Sono stati aggiunti due pozzetti per il controllo positivo con il DNA Applied Biosystems.

Il grafico della reazione (Figura 69) mostra dei risultati soddisfacenti: la RT-PCR avviene in maniera corretta.

Non è sensato confrontare i valori assoluti dei cicli soglia ottenuti con i due diversi strumenti; possiamo però notare che la differenza tra i cicli soglia dei vari campioni elaborati termociclature e con il Q₃ sono paragonabili.

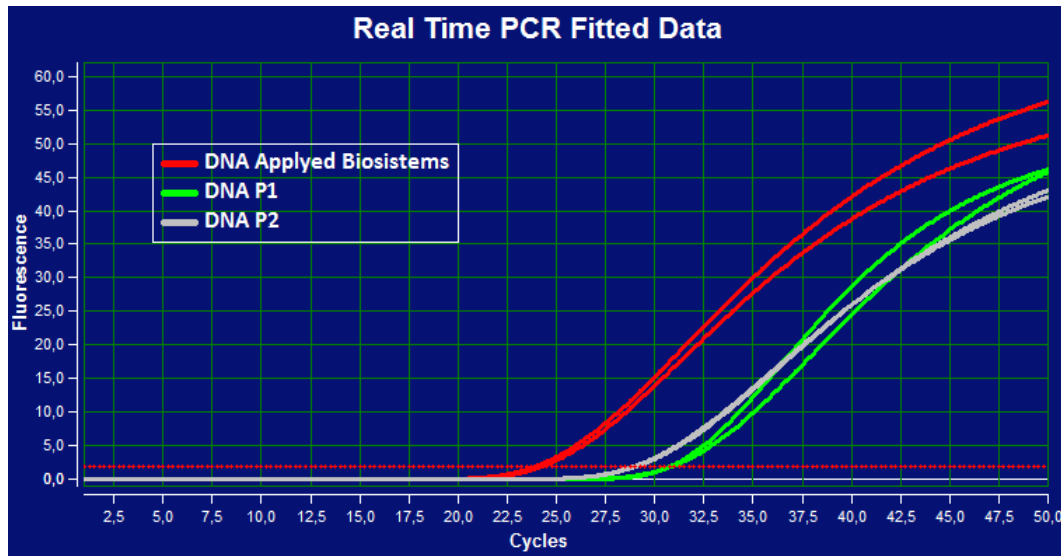


Figura 69 Curve di PCR relative alle analisi con il Q3

Capitolo 5

CONCLUSIONI E FUTURI SVILUPPI

Il presente lavoro di tesi si colloca nell'ambito della realizzazione e dello sviluppo di un sistema per l'estrazione automatica di materiale genomico da sangue umano.

La preparazione del materiale genomico è di particolare attualità nel panorama scientifico-tecnologico, dato che il mondo delle scienze biologiche ha subito rapidi e radicali cambiamenti nel corso degli ultimi decenni. In particolare, l'ambito della genetica è stato oggetto di notevoli scoperte e sviluppi: l'identificazione della struttura degli acidi nucleici risale solamente a 60 anni fa [8], e oggi sequenziamento, indagini e manipolazioni sul DNA sono operazioni che si svolgono quotidianamente all'interno dei laboratori di biologia molecolare [12].

Le applicazioni derivanti da una conoscenza approfondita del DNA sono potenzialmente illimitate. Le informazioni derivanti dagli studi sul genoma sono innanzitutto fruibili in ambito medico [11]. L'identificazione di mutazioni genetiche e tare ereditarie, o l'osservazione delle loro conseguenze sull'organismo sono solo alcuni esempi di applicazioni dirette; indagini preliminari sul DNA dei pazienti inoltre, consentono di valutare gli effetti dei medicinali prima che essi vengano assunti, garantendo la somministrazione del farmaco più adatto a ciascun soggetto in cura. Le industrie farmaceutiche si collocando in prima linea accanto alla medicina nel campo della ricerca genetica, per sviluppare medicinali sempre più specifici ed efficaci. Anche in campo agricolo e forense le analisi genetiche diventano sempre più importanti [3], [13], [14], [15].

Dato che qualunque indagine genomica richiede innanzitutto di isolare e purificare il DNA dai campioni grezzi [16], l'ambito della preparazione del materiale organico è particolarmente interessante. Per soddisfare la crescente capacità di svolgere analisi biologiche in tempi brevi, sono nati diversi strumenti per l'estrazione automatica DNA. Questi sistemi permettono di ridurre costi e tempi legati alla singola estrazione, oltre a garantire un rendimento piuttosto costante -e quindi del materiale genomico con caratteristiche standardizzate. Gli strumenti impiegati nei grandi laboratori sono ingombranti e costosi, e permettono di isolare DNA in parallelo da molti campioni biologici [42], [35], [38].

Il sistema sviluppato, oggetto di questo lavoro di tesi, nasce per rispondere alle esigenze di quelle strutture che non necessitano di ricavare giornalmente enormi quantitativi di materiale genomico. Se il *throughput* di materiale richiesto non è eccessivo, si possono realizzare strumenti compatti ed economici, più facilmente accessibili utenti poco specializzati e con limitate capacità finanziarie. Questo permetterebbe di ottenere ed analizzare il DNA d'interesse *in loco*, evitando di ricorrere a strutture esterne qualificate.

Il funzionamento dello strumento realizzato si basa sull'impiego di un kit per estrazione prodotto da Promega, il *MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System* [41]. Dopo un passaggio di lisi cellulare, il DNA si lega a microsferi magnetiche ricoperte di silice, che vengono sottoposte a lavaggi ripetuti per eliminare gli scarti organici della reazione. La tecnica basata sulla silice realizza in un solo passaggio l'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici [34]; inoltre l'impiego di microbiglie elimina la necessità utilizzare una centrifuga per portare a termine la reazione.

La reazione di estrazione avviene all'interno di un Lab-on-Chip [1]. Si tratta di una cartuccia monouso, dotata di un chip in silicio per la regolazione termica del processo e di canali microfluidici che permettono ai reagenti di entrare in contatto con la silice e il sangue nella camera di reazione. La cartuccia è realizzata tramite una

stampante 3D, con una resina impermeabile che si è rivelata idonea ai nostri scopi: le prove di estrazione effettuate usando provette tradizionali e cartucce non hanno rivelato differenze notevoli. È quindi possibile concludere che la resina impiegata non inibisce il processo di estrazione del DNA. Il sistema di aperture – dotate di tappo a tenuta stagna- per l’inserimento del sangue nella cartuccia e per il recupero del DNA purificato al termine dell’ estrazione, si è rivelato efficiente, oltre che funzionale.

Lo strumento realizzato risponde al requisito di compattezza richiesto dal nostro mercato d’interesse: il suo volume di $36 \times 31,5 \times 33 \text{ cm}^3$ ne fa un sistema portatile ed estremamente pratico. Lo strumento comprende tutti i dispositivi necessari per portare a termine la preparazione del campione genomico. La movimentazione dei reagenti avviene grazie alle valvole a solenoide Dolomite [54] e ad una piccola pompa piezoelettrica Bartles [50]. Il controllore PID implementato per gestire la tensione degli elementi piezoelettrici e la caratterizzazione della pompa hanno permesso di regolare con precisione flussi e volumi dei reagenti che entrano nella camera di estrazione. I dati provenienti dal fotosensore a valle della cartuccia [59] costituiscono un controllo aggiuntivo utile per monitorare la fluidica del sistema. Il motore passo-passo [55] muove un magnete permanente sulla cartuccia, in modo da agitare o trattenere le biglie, a seconda del passaggio dell’ estrazione; anche in questo caso, per gestire più accuratamente la traslazione della calamita, sono stati utilizzati dei sensori ottici [58].

Tutti i componenti hardware del sistema sono gestiti da una scheda elettronica appositamente realizzata. Un software dedicato consente di gestire lo strumento da PC e di impostare facilmente i parametri del protocollo di reazione: dopo che l’utente ha correttamente posizionato la cartuccia col sangue all’interno dello strumento, la reazione di estrazione procede in totale autonomia. Al termine della reazione, il DNA purificato può essere prelevato e conservato in provetta a -4°C o a -

20°C. Grazie ad un sistema così fatto non è richiesto che l'utente abbia delle conoscenze approfondite di biologia molecolare né della procedura di estrazione specifica.

Il sistema realizzato si è rivelato in grado di estrarre efficacemente materiale genomico dal campione di sangue. Il DNA ricavato ha una purezza sufficientemente elevata per sottoporre il campione *Real Time*-PCR. Le reazioni di amplificazione sono avvenute correttamente sia usando un termociclatore da laboratorio (Biorad CFX96) che un strumento prototipale sviluppato all'interno di ST (Q₃).

È stato testato un protocollo di estrazione specifico per effettuare estrazioni con il sistema automatico sviluppato; la valutazione dei diversi processi di reazione è stata fatta confrontando l'esito delle PCR dei diversi eluati. Abbiamo evidenze sperimentali per affermare che, all'interno della cartuccia, il nuovo protocollo di estrazione garantisce prestazioni migliori rispetto al protocollo consigliato da Promega, dato che si ricava una quantità di DNA maggiore. Tuttavia al momento l'isolamento di materiale organico con il sistema automatico ha un rendimento minore di quelle manuali. La procedura di estrazione specifica per lo strumento realizzato ha le seguenti caratteristiche (Tabella 16):

	Protocollo Promega	Protocollo ottimizzato per estrazioni su Lab-on-Chip
Volumi di reazione	60 µl sangue 15 µl microbiglie 160 µl buffer di lisi 680 µl alcol 210 µl buffer di eluizione	60 µl sangue 20 µl microbiglie 160 µl buffer di lisi, 160 µl alcol 160 µl buffer di eluizione
Numero di lavaggi	3 lisi 3 alcol	3 lisi 4 alcol
fase di eluizione	80°C 10min	60° C 15 min

Tabella 16 Confronto tra protocollo di estrazione Promega e protocollo per la procedura ottimizzata per il nostro strumento

Le indagini biologiche lasciano ancora aperti degli interrogativi. Sarà necessario svolgere delle indagini accurate riguardo alla presenza di inibitori nel DNA estratto all'interno della cartuccia. Se si sottopone l'eluato a PCR senza averlo diluito, la reazione non avviene correttamente: questo fenomeno è indice della presenza di inibitori, che se hanno una concentrazione troppo elevata vanno ad inficiare il processo di amplificazione. In ogni caso, in condizioni di normale utilizzo (quando cioè la quantità di eluato è pari a 1/5 del volume totale di reazione), il livello di purezza è tale da permettere il funzionamento della RT-PCR.

I dati di assorbanza acquisiti non sono facilmente interpretabili e non ci aiutano della valutazione delle proprietà dell'eluato. Probabilmente questo è dovuto sia alla scarsa sensibilità della spettrofotometria per basse concentrazioni di DNA che alla presenza di inibitori, che alterano le misure spettrofotometriche.

Per quanto riguarda la quantificazione precisa del DNA estratto, ci sono delle discrepanze: la resa dichiarata dal kit per estrazione Promega *MagneSil ONE* è nettamente più elevata di quella stimata con la RT-PCR, sia relativamente ai campioni estratti in provetta che a quelli ottenuti con il sistema automatico. La causa più verosimile è un'inefficienza dei reagenti in uso.

Le osservazioni e le analisi biologiche effettuate sul DNA estratto con il nostro sistema automatico non hanno la pretesa di essere conclusive. Si tratta di indagini preliminari, che dovranno essere approfondite e validate accuratamente in sede di laboratorio biologico.

5.1. Futuri sviluppi

Il sistema per la preparazione di materiale genomico realizzato ha ormai raggiunto un buon livello di maturità. Lo strumento incorpora infatti tutti i componenti necessari per condurre in modo efficace il processo di estrazione, ed è effettivamente in grado di isolare DNA da un campione di sangue fresco.

Il sistema necessita' di ulteriori miglioramenti ed ottimizzazioni prima di poter giungere alla conclusione del progetto: sono necessari perfezionamenti inerenti sia ai dispositivi, sia ai materiali impiegati. Le modifiche strutturali dello strumento dovranno procedere di pari passo con lo studio e la validazione di un protocollo di estrazione ottimo.

Un primo lavoro di ottimizzazione del sistema riguarderà la cartuccia dedicata ai reagenti di estrazione. Attualmente infatti, i serbatoi devono essere riempiti dall'utente con una pipetta, prima dell'avvio della reazione. Bisogna pensare a un tipo di cartucce monouso, contenenti una quantità prestabilita di buffer di lisi, alcol e buffer di eluzione, che richiedano solo di essere aperte e posizionate in corrispondenza delle apposite connessioni fluidiche.

Sarebbe anche interessante che le valvole che regolano l'afflusso dei reagenti fossero incorporate all'interno dei serbatoi monouso: naturalmente non valvole a solenoide come quelle attualmente impiegate, ma dispositivi più economici e che non richiedano di essere alimentati. Una soluzione potrebbero essere le membrane in PDMS arricchite con limatura di ferro, prototipi realizzati presso un laboratorio di Lecce che collabora con ST. L'apertura di una valvola avviene semplicemente posizionando un magnete sotto la membrana.

Anche per quanto riguarda la cartuccia dedicata al vero e proprio processo di estrazione, si possono attuare delle migliorie: studi approfonditi dei materiali e trattamenti specifici delle superfici andrebbero a ottimizzare la fluidica del Lab-on-Chip. Un lavoro di questo tipo è già in atto all'interno del BioLab ST.

Obiettivo finale sarà quello di integrare il sistema descritto con uno strumento altrettanto compatto e portatile realizzato da ST per analisi in Real Time PCR: in questo modo si otterrebbe un sistema per analisi genomiche completo, in grado di acquisire il campione organico grezzo e di restituire i risultati delle indagini sul DNA.

Appendice 1

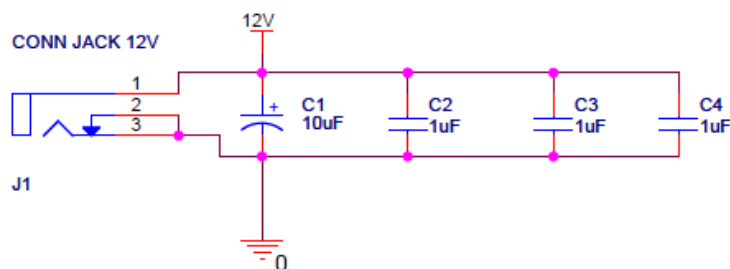
SCHEMI CIRCUITALI PER LA SCHEDA ELETTRONICA

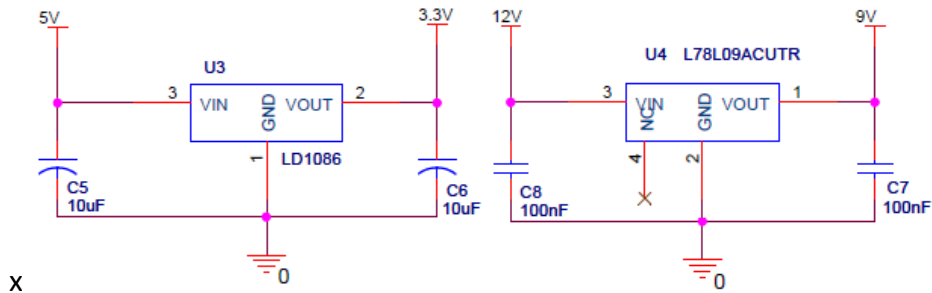
Nell'ambito del progetto di sviluppo del sistema per estrazioni genomiche, è stata creata una scheda elettronica PCB (*Printed Circuit Boards*) per il controllo e l'azionamento di tutti i componenti dello strumento. Il disegno della scheda è stato fatto a partire da schematici già esistenti. È stato usato Cadence OrCAD PCB Designer [63]. La piattaforma di lavoro permette di creare gli schemi circuitali e il layout della scheda.

Di seguito sono riportati gli schematici relativi alla scheda dell'estrattore automatico.

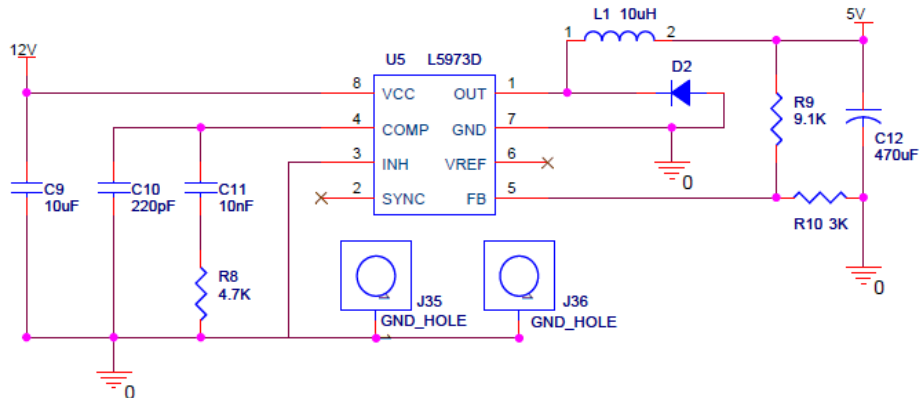
Alimentazione

- Per il corretto funzionamento dei componenti pilotati attraverso la scheda elettronica sono necessarie diverse tensioni di alimentazione.
- 12 V: Pompa, valvole, motore,
- 9 V: Chip termico
- 5 V: Chip termico
- 3,3 V: Motore, fotosensori, microcontrollore
- La tensione che la scheda acquisisce dall'esterno è pari a 12 V; dei convertitori permettono di ricavare le altre alimentazioni.



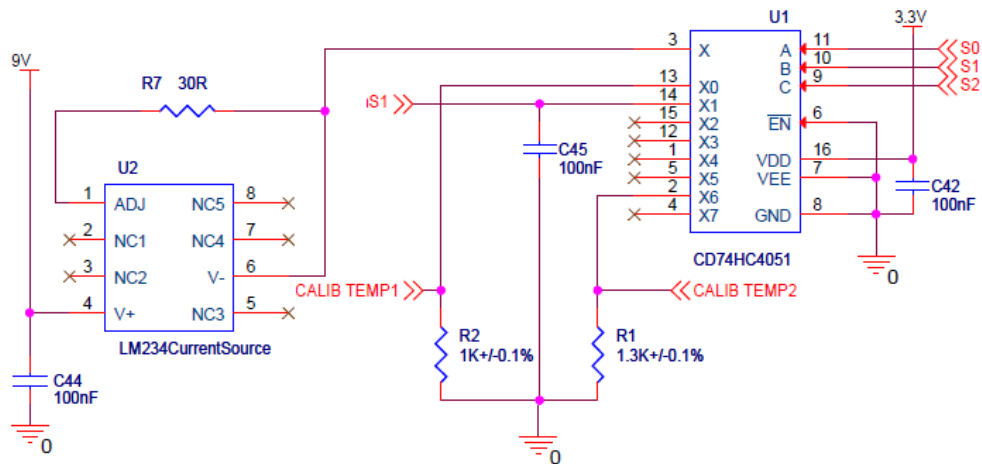
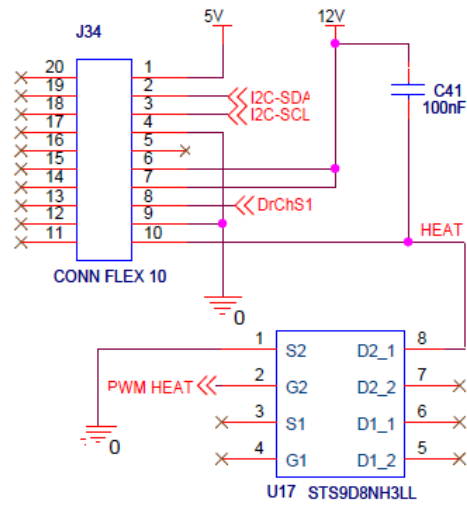


X



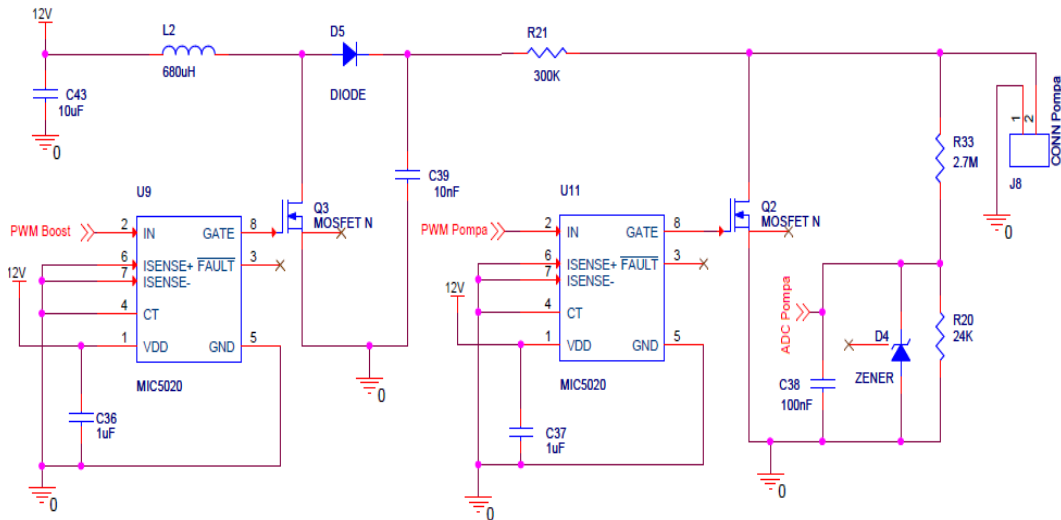
Controllo termico

Il controllo della temperatura avviene mediante disposti di controllo posizionata sulla scheda principale, a cui si aggiunge una seconda scheda elettronica, necessaria per contattare il chip termico e per rilevare la temperatura con il sensore digitale.



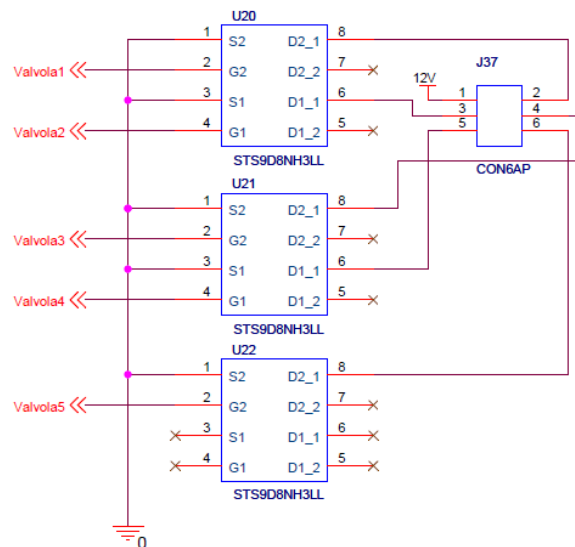
Controllo pompa

Convertitore di tensione (circuito di *step up*). U_9 e l'interruttore Q_3 regolano l'innalzamento del voltaggio; U_{11} e Q_2 fanno in modo che la tensione sul morsetto della pompa sia intermittente. Il partitore resistivo fornisce al microcontrollore una tensione proporzionale a quella della pompa, parametro necessario per il controllo ad anello chiuso.



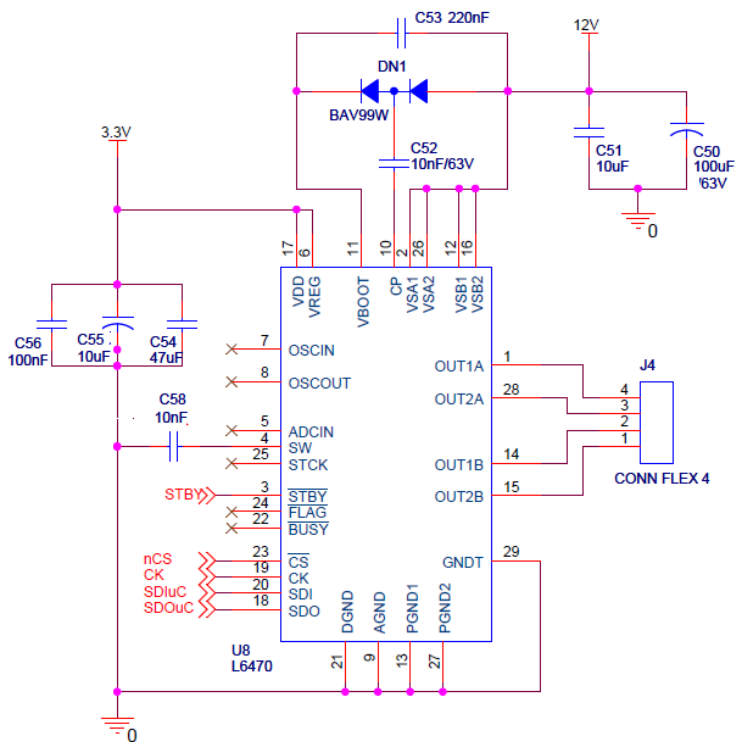
Controllo valvole

I tre integrati (U_{20} , U_{21} , U_{22}) contengono due interruttori NMOS. La tensione al *gate* decide l'apertura e la chiusura delle valvole.



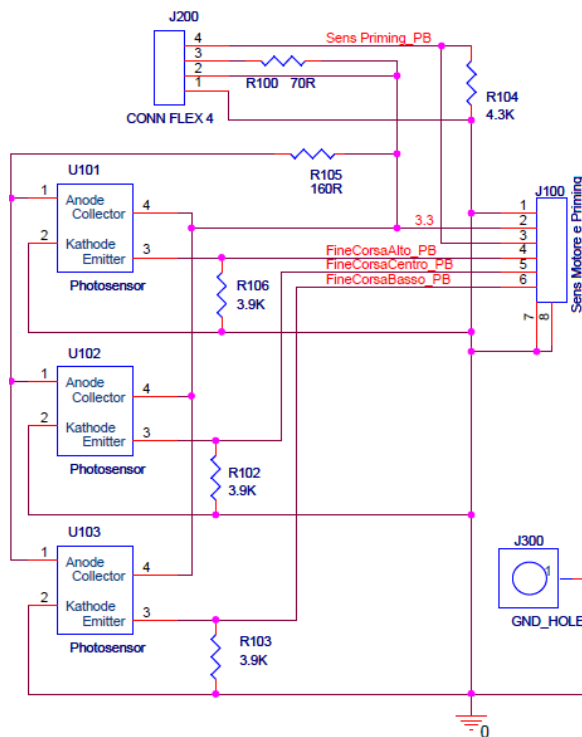
Controllo motore

La gestione del motore è interamente attuata tramite l'integrato L6740.



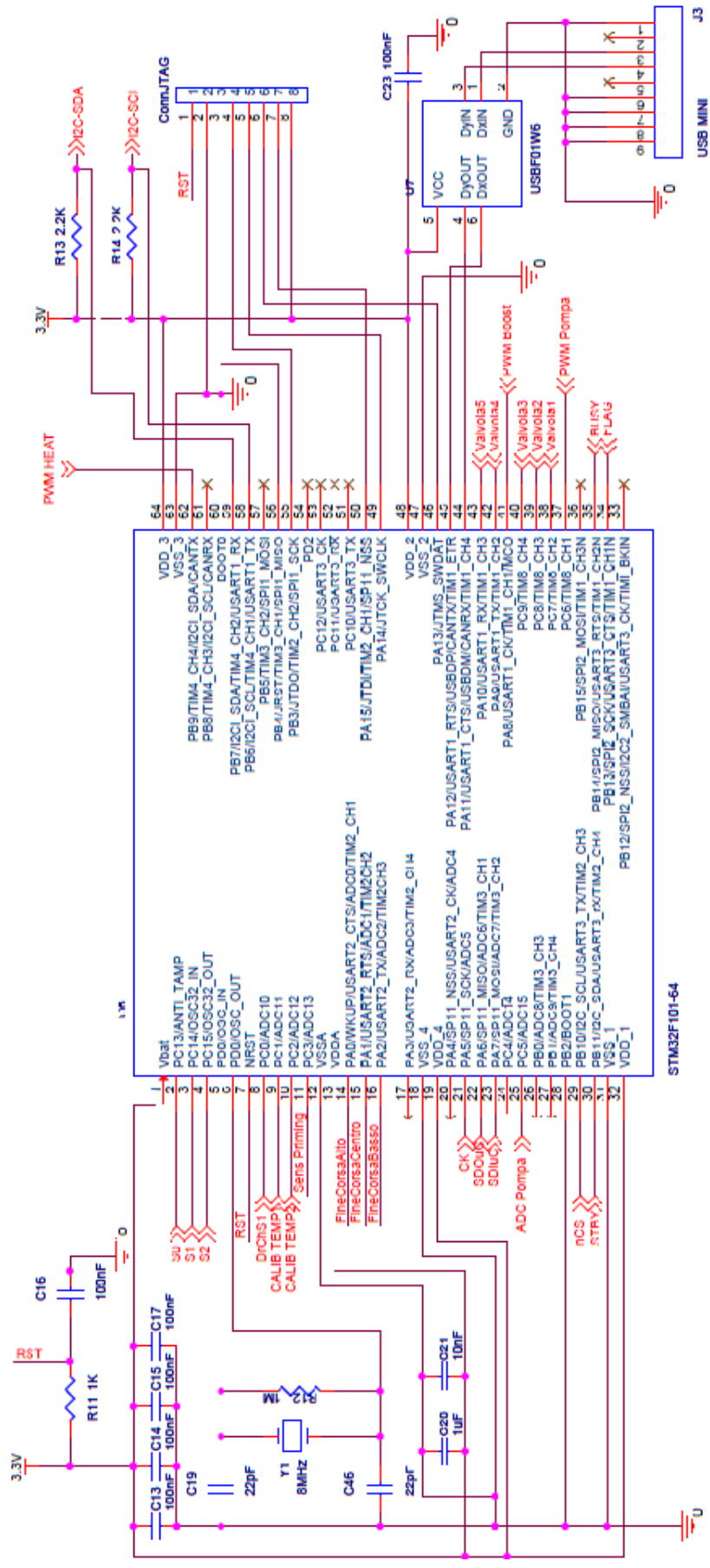
Controllo fotosensori

I fotosensori sono posizionati su una scheda separata da quella principale; la connessione con la scheda madre e con il microcontrollore permette la gestione e la comunicazione con i sensori -sia i tre fototransistori a sbarramento del motore quello a riflessione diretta per la verifica del riempimento della cartuccia di estrazione.



Microcontrollore

Assegnazione dei pin del microcontrollore STM32 per la gestione elettronica dello strumento.



Appendice 2

SOFTWARE PER ESTRAZIONI GENOMICHE AUTOMATIZZATE

Di seguito sono riportati alcuni passaggi chiave del software implementato gestire il sistema di estrazione automatizzata. Il codice è scritto in linguaggio C++ (Microsoft Visual Studio).

Comunicazione PC-microcontrollore

```
m_serialPort.Write ((void*)PUMP_START, 12);  
Sleep (*LocalTSleep);  
m_serialPort.Read(DeviceResponse, 9);  
m_serialPort.Write ((void*)PUMP_STOP, 10);  
Sleep (100);  
m_serialPort.Read(DeviceResponse, 9);
```

Identificazione della porta USB

```
for (char i=0; i<60; i++)  
{  
    if (m_serialPort.Open(i,500) == 4)  
    {  
        nCOM = i;  
        m_serialPort.Write ((void*)BOARD_QUERY, 9);  
        m_serialPort.Read(BoardResponse, 7);  
        if((BoardResponse[0]=='I') && (BoardResponse[6]=='e'))  
        {  
            GetDlgItem(IDC_STATIC_SAMPLEPREPON)->ShowWindow(TRUE);  
            i=100;  
        }  
    }  
}  
m_serialPort.Close();  
m_serialPort.Open(nCOM,4000);
```

caricamento protocollo di reazione

```
CFileDialog FileOpen(TRUE, NULL, NULL, OFN_FILEMUSTEXIST, "Text Files..  
(* .txt)|*.txt|", this);  
if (FileOpen.DoModal() == IDOK)  
    ProtocolName = FileOpen.GetFileName();  
  
FileName.Format("C:\\Documents and Settings\\stage\\Desktop\\Sample..  
Protocols\\%s", ProtocolName);  
  
fopen_s(&pFile, FileName, "r");
```

```

while(!feof(pFile))          //Conta le righe del file
{
    fscanf_s(pFile, "%c", &c);
    if (c == '\n')
        nProtocolRow++;
}
nProtocolRow = nProtocolRow-1;
nOperation = nProtocolRow - 18;
fclose(pFile);
fopen_s(&pFile,FileName, "r");
    //Carica le i parametri e le operazioni
while(!feof(pFile)) //del protocollo su un vettore
{
    for (int i=0; i<nProtocolRow; i++)
        fscanf(pFile, "%d", &Buffer_Load[i]);
}
fclose(pFile);

```

main del programma

```

//INIZIALIZZAZIONE DEL PROGRAMMA
//creazione del thead principale e del semaforo per attivarlo
g_threadMain = CreateThread(NULL, 100000, (LPTHREAD_START_ROUTINE)taskMain,
this, 0, NULL); g_semaphoreMain = CreateSemaphore(NULL, 0, 1, "SemMain");

//MAIN
void CAutomaticSampleDlg::taskMain(CAutomaticSampleDlg* LocalDialog)
{
    while(1)
    {
        WaitForSingleObject (g_semaphoreMain, INFINITE);

        for(int iOperation=0; iOperation<nOperation; iOperation++)
        {
            switch (SP_Operation[iOperation])
            {
                case LYSIS_WASH:
                {
                    tSleep=SP_Par.Pump_LysisVolume/SP_Par.Pump_Flux);

                    for (int i=0; i<SP_Par.Wash_Lysis; i++)
                    {
                        OPEN_VALVE[6] = 1;

                        if (LocalDialog -> Wash(ptSleep) == TRUE)
                            Sleep(50);
                    }
                    LocalDialog -> AirWash();
                }
                break;

                case ALCHOL_WASH:
                {
                    . . .
                }
                break;

                . . .
            }
        }
    }
}

```


Bibliografia

- 1 Margottini, L. Laboratori in miniatura. *Le scienze*, 527 (2012).
- 2 P. Abgrall, A.M. Guè. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17 (2007), 15 - 49.
- 3 N.Onori. Introduzione alla genetica forense. 2010.
- 4 Girlando, S. *Estrazione acidi nucleici*. Laboratorio Patologia Molecolare, Trento.
- 5 Z. Xin, J.P. Velten et.al. Extraction Method Suitable for PCR. *BioTechniques*, 4, 34 (2003), 820 - 826.
- 6 B. Alberts, D. Bray et.al. Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell. 2003.
- 7 Wood, T. Genetic prehistory in selective breeding: a prelude to Mendel. 2001.
- 8 J.D. Watson, F.H.C. Crick. The Structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 18 (1953), 123-131.
- 9 Olson, M.V. *The human genome project*. Proc. Natl. Academy, 1993.
- 10 K.S. Burley, S.C. Almo. Structural genomics: beyond the Human Genome Project. *Nature Genetics*, 151 - 157, 23 (1999).
- 11 F.S. Collins, V.A. McKusick. Implications of the Human Genome Project for Medical Science. *Opportunities for Medical Research*, 5, 285 (2001), 540 - 544.

- 12 D. J. Lockhart, E.A. Winzeler. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405 (2000).
- 13 P. Robe, R. Nalin et.al. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39 (2003), 183 - 190.
- 14 M.D. Coble, R.S. Just et.al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Legal Medicine*, 118 (2004), 137 - 146.
- 15 E. Giardina, I. Pietrangeli et.al. Whole genome amplification and real-time PCR in forensic casework. *BMC Genomics*, 10 (2009), 159.
- 16 M.G. LaMontagne, F.C. Michel Jr. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *The journal of Microbiological Methods*, 49 (2001), 255 – 264.
- 17 Bessetti, J. *An Introduction to PCR Inhibitors*. Promega Corporation, 2007.
- 18 Glasel, J.A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* , 3, 18 (1997), 62.
- 19 Manchester, K.L. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* , 10, 19 (1995), 208.
- 20 www.promega.com. *Protocols & Applications Guide*. 2010.
- 21 R.A. Haugland, N. Brinkman, S.J. Vesper. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Microbiological Methods*, 37 (1999), 165-176.
- 22 Caramelli, D. *Antropologia molecolare -Manuale di base*. Firenze University Press, 2009.

- 23 Chomczynski, P. Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 3, 15 (1993), 532 - 536.
- 24 www.lifetechnologies.com. *TaqMan Sample-to-SNP*.
- 25 Crasta, L. *Valutazione della possibilità di utilizzo del DNA estratto dai campioni di latte*. Università di Sassari, 2009.
- 26 K.B. Mullis, F.A. Faloon et.al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1986).
- 27 K.B. Mullis, F.A. Faloon. Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol*, 155 (1987), 335 -350.
- 28 Mullis, K.B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American Magazine*, 262 (1990), 56-64.
- 29 C. A. Heid, J. Stevens et.al. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 6 (1996), 986-994.
- 30 J. Roe, R.A. Haugland, S.J. Vesper. Quantification of *Stachybotrys chartarum* conidia in indoor dust using real time, fluorescent probe-based detection of PCR products. *Exposure Anal. Environ. Epidemiol*, 11 (2011), 12-20.
- 31 S. J. Ahn, J. Costa. PicoGreen Quantitation of DNA: Effective Evaluation of Samples Pre-or Post-PCR. *Oxford Journals, Life Sciences*, 24, 13 (1996), 2623 - 2625.
- 32 J.C. McDonald, D.C. Duffy et.al. Fabrication of microfluidic systems in polydimethylsiloxane. *Electrophoresis 2000*, 21 (2000), 27 - 40.
- 33 N.V. Ivanova, J.R. Dewaard, P.D.N. Herbert. An inexpensive, automation-

- friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* (2006).
- 34 R. Boom, C.J. Sol et.al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (1990), 495 – 503.
- 35 www.qiagen.com. QIAcube datasheet.
- 36 www.promega.com. Maxwell System 16 datasheet.
- 37 www.qiagen.com. BioRobot M48 datasheet.
- 38 www.tecan.com. Automated Plasmid DNA Preparation.
- 39 C. Costa, J.M. Costa et.al. Real-Time PCR Coupled with Automated DNA Extraction and Detection of Galactomannan Antigen in Serum by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 6, 40 (2002), 2224-2227.
- 40 S. Fafi-Kermer, G. Bargues. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *Journal of Clinical Virology*, 2, 30 (2004), 157 - 154.
- 41 www.promega.com. Promega MagneSil ONE, Fixed Yield Blood Genomic System datasheet.
- 42 www.promega.com. *Maxwell 16 datasheet*.
- 43 Tecan. *Automated Plasmid DNA Preparation*.
- 44 Margottini, L. Laboratori in miniatura. *Le scienze*, 527 (2012).
- 45 F.Xibilia. *Progetto e sviluppo di un sistema per l'estrazione e purificazione di*

- acini nucleici su chip microfluidico*. Politecnico di Milano, 2012.
- 46 Fersht, A.R. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman Puplicher (1999).
- 47 www.rs-online.com. *TMP275AIDGKTG4 datasheet*.
- 48 Sanna, A. *Studio e modellizzazione di un sistema di controllo della temperatura per Real Time - PCR su Lab-on-Chip*. Politecnico di Milano, 2010.
- 49 *Appunti per l'insegnamento di "Laboratorio di Elettronica"*. Università di Trento. 2003.
- 50 www.bartels-mikrotechnik.de. *mp6 datasheet*.
- 51 G. Gafforelli, A. Corigliano. *Piezolettrici per la realizzazione di micropompe*. Politecnico di Milano, 2011.
- 52 Ghoini, M. *Power Electronics*. Politecnico di Milano, 2010.
- 53 www.micrel.com. *MIC5020 datasheet*.
- 54 www.dolomite-microfluidics.com. *Miniature Isolation Solenoid Valves datasheet*.
- 55 www.rs.com. *28mm 1.8' HIGH TORQUE STEPPER datasheet*.
- 56 www.st.com. *L6470 datasheet*.
- 57 *Sensori optoelettronici*. Università di Messina, 2009.
- 58 www.rs.com. *Kingbright KRB011 datasheet*.
- 59 www.vishay.com. *TCRT1000- TCRT1010 datasheet*.
- 60 www.st.com. *STM32F103 datasheet*.

61 D. Beninatom, N. Trivelli. *Introduzione ai microcontrollori PIC*. Università di Padova, 2007.

62 Brazzale, A.R. *Raccolta statistiche in R: Verifca d'ipotesi e stima intervallare*. IsIB CNR. 2003.

63 www.cadence.com. *Cadence OrCAD PCB Designer*.

64 www.beckmancoulter.com. Biomeck FX.