

POLITECNICO DI MILANO  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica  
Dipartimento di Elettronica e Informazione



Sviluppo e ottimizzazione di componenti  
microfluidiche per un sistema integrato di  
estrazione ed analisi di DNA su  
Lab-on-a-Chip

Relatore: Prof. Marco Carminati  
Correlatore: Ing. Lillo Raia

Tesi di Laurea di:  
Luca Saccheri  
Matr. n. 787024

Anno Accademico 2017/2018

**Dedico questo lavoro  
alla mia famiglia,  
se posso fare qualcosa  
di buono nella vita,  
lo devo a loro.**

# Indice

Elenco delle figure . . . . .	IV
Elenco delle tabelle . . . . .	IX
Sommario	X
Abstract	XII
<b>1</b> Introduzione	<b>1</b>
<b>1.1</b> Chimica analitica . . . . .	1
1.1.1 Raccolta del campione . . . . .	2
1.1.2 Preparazione del campione . . . . .	2
1.1.3 Analisi del campione . . . . .	4
<b>1.2</b> Lab-on-a-chip . . . . .	5
1.2.1 Q3 . . . . .	7
<b>2</b> Cenni teorici	<b>9</b>
<b>2.1</b> Acido desossiribonucleico . . . . .	9
<b>2.2</b> Metodi di separazione del DNA . . . . .	13
2.2.1 Lisi . . . . .	14
2.2.2 Purificazione . . . . .	15
2.2.3 Eluizione . . . . .	18
<b>2.3</b> Analisi del DNA: real-time PCR . . . . .	19

2.4	Sistemi commerciali per l'estrazione automatica di DNA e analisi PCR . . . . .	23
2.4.1	QIAcube QIAGEN . . . . .	23
2.4.2	Maxwell System 16, Promega . . . . .	24
2.4.3	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio Rad . . . . .	26
2.4.4	Rotor-Gene Q QIAGEN . . . . .	27
2.5	Progetto EASY . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Stato dell'arte</b>	<b>29</b>
3.1	Sistemi automatici di estrazione di acidi nucleici . . . . .	29
3.2	Sistema di purificazione di acidi nucleici EASY . . . . .	30
3.3	Funzionamento . . . . .	36
3.4	Protocollo di estrazione . . . . .	40
3.5	Scopo della tesi . . . . .	41
<b>4</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>43</b>
4.1	Valvole magnetiche . . . . .	43
4.1.1	Stampino . . . . .	44
4.1.2	Minitex CNC Mini-Mill GX™ . . . . .	45
4.1.3	Gomma siliconica . . . . .	46
4.2	Cartuccia di prova . . . . .	47
4.2.1	Processo di <i>bonding</i> termico . . . . .	49
4.2.2	Spin coater ws 650sz 6npp Lite . . . . .	50
4.3	Banco di prova . . . . .	51
4.3.1	Stratasys Fortus FDM 360mc . . . . .	56
4.4	Software . . . . .	57
4.4.1	Controllo Proporzionale-Integrale-Derivativo . . . . .	61



<b>5</b>	<b>Risultati</b>	<b>64</b>
5.1	Affidabilità del sistema . . . . .	64
5.2	Valutazione dei prototipi delle valvole magnetiche . . . .	67
5.2.1	Primo prototipo . . . . .	69
5.2.2	Secondo prototipo . . . . .	70
5.2.3	Terzo prototipo . . . . .	71
<b>6</b>	<b>Conclusioni e sviluppi futuri</b>	<b>74</b>
6.1	Conclusioni . . . . .	74
6.2	Sviluppi futuri . . . . .	76
	<b>Bibliografia</b>	<b>79</b>

# Elenco delle figure

1.1	Tempo utilizzato nelle differenti fasi dell'analisi del campione secondo il sondaggio di R.E. Majors. . . . .	3
1.2	Principali cause di errori nella fase di analisi secondo il sondaggio condotto da R.E. Majors. . . . .	4
1.3	Rappresentazione concettuale del LOC: ogni parte del <i>chip</i> esegue una procedura classica di laboratorio. . . . .	7
1.4	Q3. . . . .	8
2.1	Struttura di un nucleotide costituito da un gruppo fosfato, uno zucchero e una base azotata . . . . .	12
2.2	legame fosfodiesterico tra due nucleotidi adiacenti . . . . .	12
2.3	Sinistra: struttura del DNA. Destra: struttura chimica . . . . .	13
2.4	Fasi dell'estrazione tramite fenolo-cloroformio. . . . .	16
2.5	Rappresentazione del legame chimico tra DNA e matrice di silice tramite l'azione del sale caotropico. . . . .	17
2.6	Fasi della separazione del DNA tramite microbiglie magnetiche. . . . .	18
2.7	Fasi della PCR: 1) denaturazione, 2) annealing, 3) estensione. . . . .	21
2.8	Spettri di assorbimento e di emissione del SYBR Green. . . . .	22
2.9	Tipico risultato di una real-time PCR. . . . .	22

2.10	Esempio di due curve di amplificazione ottenute con Real-time PCR utilizzando due campioni con concentrazioni iniziali di DNA differenti. Una concentrazione iniziale di DNA maggiore avrà bisogno di un numero di cicli inferiore per raggiungere la fase esponenziale rispetto a un campione con una minore concentrazione iniziale di DNA	23
2.11	QIAcube QIAGEN . . . . .	24
2.12	Maxwell system 16, Promega . . . . .	25
2.13	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio Rad	26
2.14	Rotor-Gene Q QIAGEN . . . . .	27
3.1	Estrattore automatico VolTRAX. . . . .	30
3.2	GeneXpert nelle sue differenti versioni. . . . .	30
3.3	Schema a blocchi del prototipo di estrattore EASY. . . .	35
3.4	Cartuccia del prototipo di estrattore EASY: 1) Input (A) output (B), 2) Valvola di cera, 3) Camera di estrazione, 4) Camera di scarto, 5) Foro di uscita per eluato, 6) Foro di inserimento del materiale biologico, 7) <i>Stirrer</i> , 8) Valvole a vite. . . . .	35
3.5	Vista laterale del magnete permanente che si muove verticalmente all'esterno della camera (sinistra) e vista frontale dell'ancoretta che sale e scende lungo la camera roteando su se stessa (destra). . . . .	36
3.6	Sezione della valvola a vite. A) Valvola aperta, B) Valvola chiusa. . . . .	36

3.7	1) Inserimento del campione attraverso il foro d'ingresso superiore. 2) La freccia blu indica il percorso del reagente verso l'intero della camera di estrazione. Ciò è reso possibile grazie all'apertura della valvola A, che connette la camera di estrazione con quella di scarto, permettendo l'estrazione dell'aria (freccia verde) dalla cartuccia. 3) La freccia verde indica il percorso dell'aria. Aprendo anche la valvola B è possibile far fluire i reagenti esausti (freccia rossa) nella camera di scarto 4) La freccia nera indica il percorso intrapreso dall'eluato nella fase di prelievo con la micro pipetta. . . . .	39
4.1	Vista superiore dello stampino. In blu sono evidenziati i rialzi per ogni negativo. . . . .	45
4.2	Minitech CNC Mini-Mill GX™. . . . .	45
4.3	Vista frontale della cartuccia di prova. In blu è evidenziato il percorso del fluido che inizia dall'input fino alla sede della valvola (A) per poi continuare sul retro della cartuccia e concludersi nella parte frontale. . . . .	48
4.4	Vista posteriore della cartuccia di prova. In blu è evidenziato il percorso del fluido dal retro della sede della valvola fino al punto in cui esso ritorna nella parte frontale della cartuccia. Nei punti A e B sono visibili le sedi dei gommini di input e output. . . . .	49
4.5	Spin coater ws 650sz 6npp Lite. . . . .	51
4.6	Banco di prova. . . . .	53
4.7	Diagramma a blocchi del banco di prova. . . . .	54
4.8	Vista superiore della base in policarbonato. In giallo è evidenziato la direzione dei fluidi. . . . .	54

4.9	Vista inferiore della base in policarbonato. . . . .	55
4.10	Scheda elettronica con i suoi componenti: 1) Alimentazione, 2) Microusb, 3) Connessioni per il motore stepper, 4) Connessioni per l'attuatore magnetico, 5) Microcontrollore, 6) Connessioni per il sensore di pressione. . . . .	55
4.11	Stratasys Fortus FDM 360mc. . . . .	56
4.12	Scelta dei parametri prima di eseguire un'esperimento. . . . .	59
4.13	Software durante l'esecuzione di un esperimento. . . . .	60
4.14	Esempio di output grafico visualizzato dal software. . . . .	60
4.15	Opzioni fornite dal software per il controllo dei singoli elementi dello strumento. . . . .	61
4.16	Schema del controllo Proporzionale-Integrale-Derivativo. . . . .	63
5.1	Cartuccia di prova caratterizzata dalla sola presenza di un canale che collega l'input con l'output. . . . .	66
5.2	Il grafico mostra i dati relativi all'esperimento in cui, per la cartuccia, è stato utilizzato il processo di <i>bonding</i> termico ottimizzato. . . . .	67
5.3	Sezione della sede della valvola caratterizzata da una superficie piatta . . . . .	68
5.4	Sezione della sede della valvola caratterizzata dalla presenza di uno scalino. . . . .	68
5.5	Vista laterale della valvola cilindrica. . . . .	68
5.6	vista laterale della valvola tronco-conica. . . . .	69
5.7	Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede piatta e inserto cilindrico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output. . . . .	70

5.8	Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede rialzata e inserto cilindrico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output. . . . .	71
5.9	Esempio di cartuccia di prova per testare il terzo prototipo.	72
5.10	Movimento dell'inserto quando è sottoposto a una forza magnetica. . . . .	72
5.11	Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede rialzata e inserto tronco-conico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output. . . . .	73
6.1	Nuova cartuccia monouso utilizzata nel sistema di estrazione e analisi. . . . .	76
6.2	Versione aggiornata dell'estrattore di acidi nucleici. . . .	77
6.3	Prototipo concettuale dei serbatoi integrati sulla cartuccia monouso. . . . .	78

# Elenco delle tabelle

5.1	Risultati relativi alla Figura 5.2 . . . . .	67
5.2	Risultati relativi agli esperimenti condotti sul primo prototipo . . . . .	69
5.3	Risultati relativi agli esperimenti condotti sul secondo prototipo . . . . .	71
5.4	Risultati relativi agli esperimenti condotti sul terzo prototipo . . . . .	73

## Sommario

La real-time PCR è una tecnica utilizzata nei laboratori di biologia molecolare che permette l'identificazione di sequenze di DNA target e la loro quantificazione. Questo tipo di analisi trova applicazioni in vari ambiti come ad esempio il sequenziamento del DNA, la diagnosi di malattie infettive, la genetica forense e l'ispezione dei prodotti alimentari. Il Q3 è uno strumento sviluppato da STMicroelectronics, in grado di eseguire un'analisi real-time PCR partendo dal DNA estratto da un qualsiasi campione biologico. In seguito è stato avviato un progetto che vuole aggiungere l'estrazione di acidi nucleici all'analisi di real-time PCR. Questo progetto, che prende il nome di EASY (Extraction and Analysis System) è l'ambito nel quale si inserisce il mio lavoro di tesi. La peculiarità di tale sistema vuole essere una completa automazione del protocollo di estrazione e analisi. Lo strumento, ancora in fase prototipale, ha lo svantaggio di aver bisogno dell'intervento dell'operatore per eseguire la procedura.

Il prototipo è composto da due elementi, il primo è lo strumento vero e proprio, mentre il secondo è una cartuccia monouso che include le componenti necessarie alla realizzazione della sola procedura di purificazione. L'attività di tesi è stata focalizzata sulla cartuccia. In particolar modo mi sono occupato del processo di realizzazione della stessa e delle valvole che essa contiene, che erano uno dei componenti che necessitavano dell'intervento umano durante l'estrazione.

Per quanto riguarda la realizzazione della cartuccia, ho ottimizzato il protocollo di bonding termico degli strati che la compongono. In particolare ho aggiunto una nuova fase nel processo che garantisce un'adeguata tenuta e che impedisce la fuoriuscita di reagenti nel mondo esterno.



Le valvole invece presentavano lo svantaggio di richiedere un intervento umano per essere aperte o chiuse. Durante il mio lavoro, dopo una serie di esperimenti atti a valutare le possibili alternative, ho individuato tra i prototipi che ho realizzato il design che garantiva l'automazione del processo di estrazione.

Con i risultati ottenuti nel mio lavoro è stato possibile realizzare un test con un prototipo di cartuccia che integra l'estrazione di acidi nucleici con l'analisi PCR.

## Abstract

The Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) is a technique used in molecular biology laboratories that allows the identification of target DNA sequences and their quantification.

This type of analysis finds applications in various fields such as DNA sequencing, the diagnosis of infectious diseases, forensic science and the inspection of food products.

The Q3 is a device developed by STMicroelectronics, able to perform a real-time PCR analysis starting from the DNA extracted from any biological sample. Later a project was started to add nucleic acid extraction to the real-time PCR analysis. This project, which takes the name of EASY, is the area in which my thesis is focused.

The peculiarity of this system is to perform the extraction protocol in a complete automated way. The device, still in the prototyping phase, has the disadvantage of needing an operator to perform the procedure. The prototype is composed of two elements, the first is the actual device, while the second is a single-use cartridge that includes the components necessary for carrying out the purification procedure. This thesis activity was focused on the cartridge. In particular, I was involved in the process of its fabrication and the valves it contains, which were one of the components that needed human intervention during the extraction.

Regarding the construction of the cartridge, I have optimized the thermal bonding protocol of the layers that compose it. In particular, I have added a new phase in the process that guarantees an adequate seal and prevents reagents from leaking into the environment.

The valves instead presented the disadvantage of requiring human intervention to be opened or closed. During my work, after a series

of experiments aimed at evaluating possible alternatives, I identified among the prototypes that I realized the design that guaranteed the automation of the extraction process.

With the results obtained in my work it was possible to carry out a test with a prototype cartridge that integrates the extraction of nucleic acids with PCR analysis.

# 1 | Introduzione

STMicroelettronics sta sviluppando uno strumento in grado di estrarre, da campioni biologici, gli acidi nucleici e di analizzarli tramite real-time PCR. Essendo ancora in fase prototipale lo strumento presenta ancora diversi elementi da migliorare. Questo lavoro di tesi ha l'obiettivo di migliorare uno di questi aspetti avvicinando così il prototipo all'obiettivo per cui è stato pensato. In questo capitolo introduttivo verranno affrontati i principi teorici alla base di questo strumento.

## 1.1 Chimica analitica

La chimica analitica ha assunto, negli ultimi 50 anni, un ruolo importante nel mondo scientifico. Il *target* di questa attività è quello di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico i componenti di un dato materiale. Queste caratterizzazioni possono essere sia di tipo quantitativo che di tipo qualitativo. I risultati ottenuti variano in base al tipo di analisi a cui il campione è sottoposto. Per esempio si possono ottenere valutazioni di natura chimica, come la verifica della presenza di uno o più componenti, oppure di natura dimensionale, stimando le diverse concentrazioni dei componenti nel campione studiato [6]. Nella chimica analitica l'analisi del campione è l'ultima parte di un processo più complesso ed è composto da tre passaggi:

- 1) raccolta del campione;
- 2) preparazione del campione;
- 3) analisi del campione.

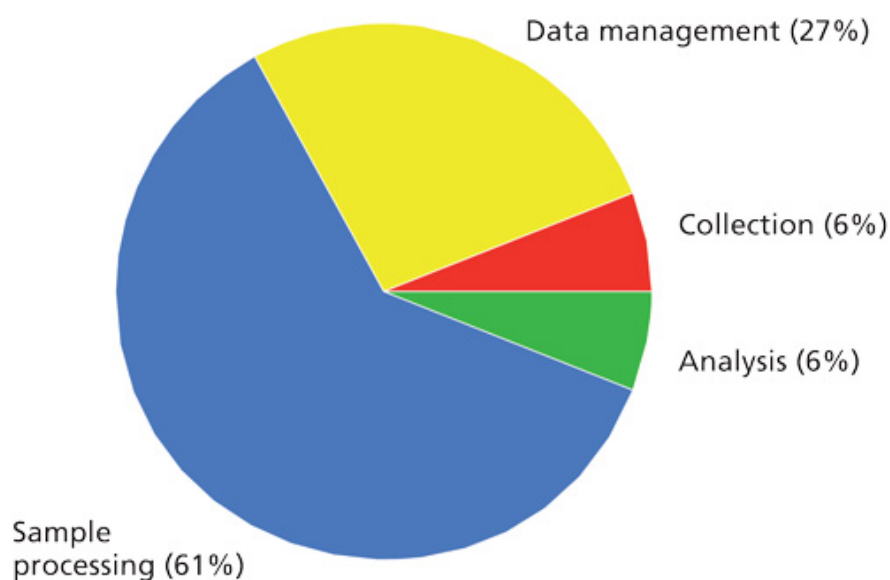
### 1.1.1 Raccolta del campione

Il primo passo consiste nella raccolta del materiale che contiene l'obiettivo dell'analisi. Questa azione di raccolta prende il nome di campionamento ed è l'unico modo utilizzato per ottenere l'analita, ovvero la specie chimica che deve essere sottoposta ad analisi. Pierre Gy, chimico francese, spiegò nel suo "Sample preparation, analytical chemistry" questo passaggio di raccolta come un aspetto veramente importante e sviluppò una teoria campionaria utile per non ottenere errori nella successiva fase di analisi. Nella sua teoria definisce due tipi di eterogeneità. La prima è rappresentata dall'eterogeneità intrinseca, il campione deve essere composto da tutte le componenti che caratterizzano il materiale da cui è stato prelevato, mentre la seconda è l'eterogeneità della distribuzione che afferma come la distribuzione spaziale degli elementi presenti nel campione deve essere uguale a quella del materiale di partenza [15]. In alcuni casi, i campioni grezzi possono essere lavorati e solo una parte di esso viene successivamente utilizzata per l'analisi. Questa operazione può anche essere ripetuta più volte. Il peso del campione deve essere molte volte maggiore del peso delle più grandi particelle contenute in esso. La tecnica utilizzata per ottenere i campioni cambia in base al tipo di materiali che devono essere raccolti.

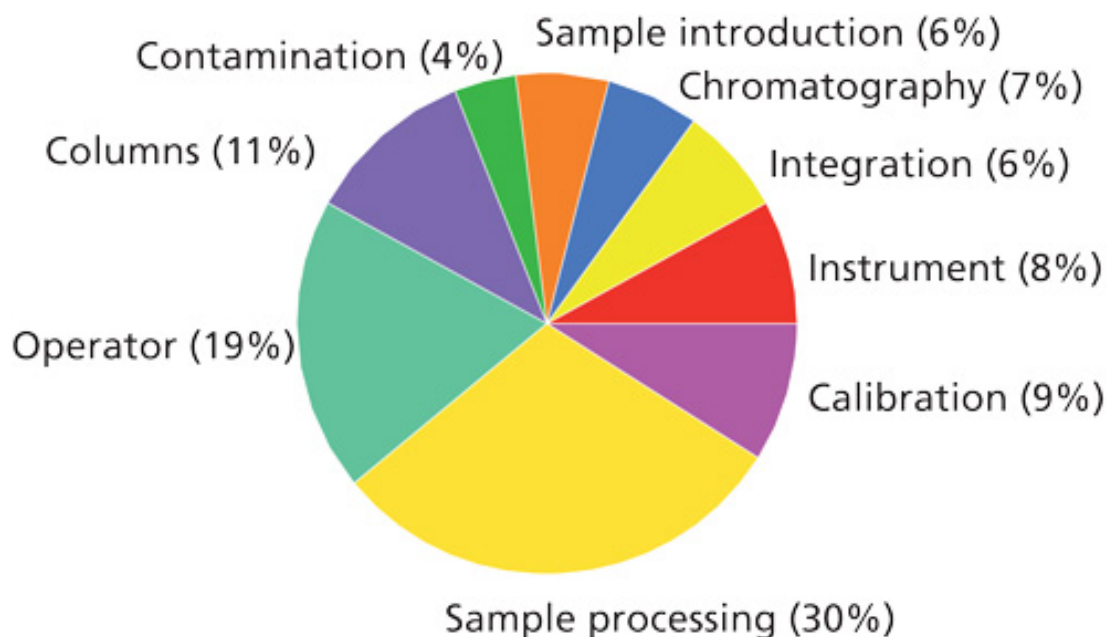
### 1.1.2 Preparazione del campione

La preparazione del campione, invece, mostra come viene trattato l'oggetto di studio prima della fase di analisi. Questo processo è considerato uno dei passaggi più critici. Nella chimica analitica, tipicamente, due

terzi del tempo sono utilizzati nella preparazione del campione (Figura 1.1). Un sondaggio realizzato da R.E. Majors [8] mostra la distribuzione degli errori generati durante l'intero processo di analisi del campione. Il 30% degli operatori intervistati considera la preparazione del campione la prima causa degli errori ottenuti durante le fasi successive (Figure 1.2). La maggior parte del lavoro indirizzato a migliorare questa fase è diretto a ridurre il tempo necessario alla preparazione del campione. Questa fase può includere azioni come la dissoluzione, l'estrazione o reazioni con altre sostanze chimiche. Risulta quindi molto importante per evitare errori nella fase di misura.



**Figura 1.1:** Tempo utilizzato nelle differenti fasi dell'analisi del campione secondo il sondaggio di R.E. Majors.



**Figura 1.2:** Principali cause di errori nella fase di analisi secondo il sondaggio condotto da R.E. Majors.

### 1.1.3 Analisi del campione

Esistono numerose tecniche utilizzate per analizzare i campioni. Come affermato in precedenza l'analisi può portare a valutazioni qualitative o quantitative del campione. L'analisi qualitativa è utilizzata per identificare le sostanze presenti in un campione. L'analisi quantitativa, di solito, è il passo successivo all'analisi qualitativa ed è usata, invece, per verificare le concentrazioni presenti nel campione di partenza. L'analisi quantitativa, quindi, stabilisce una relazione matematica tra la quantità di sostanza presente e la caratteristica utilizzata per misurare sperimentalmente questa quantità.

Tra i principali metodi di analisi troviamo quelli che sfruttano le caratteristiche fisiche della sostanza analizzata come ad esempio le tecniche di spettroscopia che si basano sulla misurazione dell'assorbimento di una determinata lunghezza d'onda da parte del campione. Altri metodi, invece, come ad esempio la titolazione o la precipitazione valutano

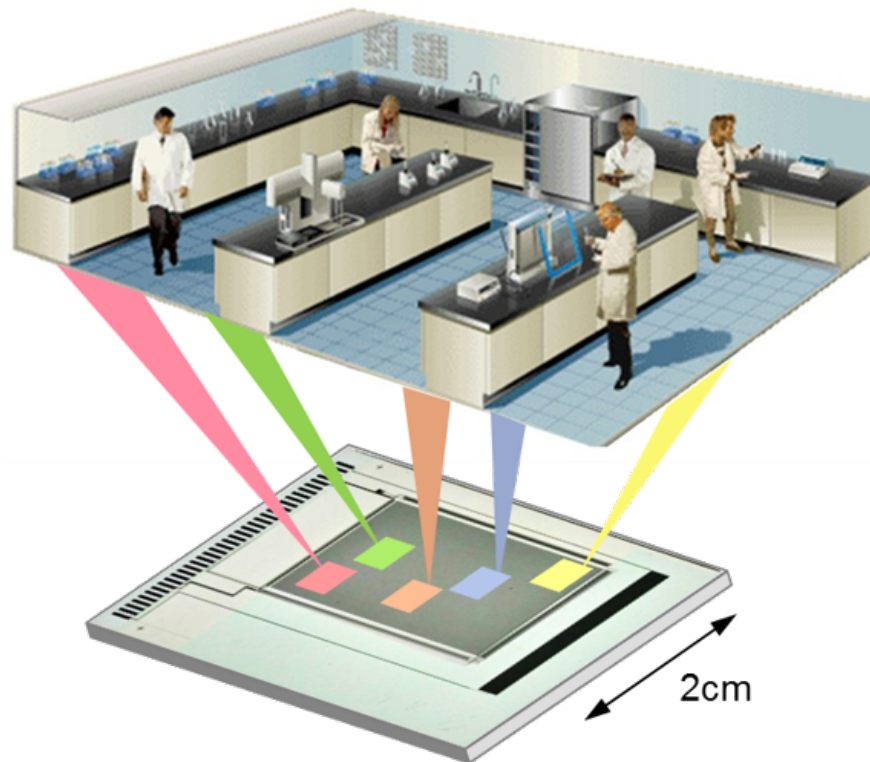
il comportamento sfruttando le caratteristiche chimiche del campione tramite reazioni ottenute miscelando quest'ultimo con opportuni composti.

## 1.2 Lab-on-a-chip

I *Lab-on-a-chip* (LOC) sono strumenti che utilizzano sistemi microelettromecchanici (MEMS - *Micro Electro Mechanical System*) applicati alla microfluidica. Generalmente hanno una grandezza che va dai pochi millimetri a qualche centimetro quadrato e trattano volumi di fluidi inferiori ai picolitri. Il processo base su cui si fonda la maggior parte dei LOC è la fotolitografia. I primi dispositivi sfruttavano processi tecnologici tipici della microelettronica, partendo dal substrato più usato in questo campo, che è il silicio, ma con la crescita d'interesse per questa nuova tecnologia e la necessità di soddisfare specifiche caratteristiche ottiche, di biocompatibilità e anche di abbattimento dei costi, sono stati introdotti materiali ceramici, vetro, metalli e polimeri quali il polidimetilsilossano (PDMS), il policarbonato (PC) e il polimetilmetacrilato (PMMA). I LOC sono in grado di svolgere una o più funzioni che normalmente si svolgono in laboratorio. Lo scopo ultimo di queste tecnologie è quello di ottenere un processo di analisi automatizzato, in modo da ridurre al minimo l'interazione dell'operatore con il campione: con il semplice inserimento del campione biologico all'interno del dispositivo, si ottiene il risultato dell'analisi desiderata (quella per il quale il *chip* è predisposto) senza dover conoscere le reazioni chimico-biologiche che avvengono al suo interno. Quindi per utilizzare il LOC non è necessario avere delle conoscenze specifiche e non c'è bisogno di intervenire se non per la lettura del risultato. Questa caratteristica rende i LOC una tecnologia in grado di portare analisi da



laboratorio molto costose e complesse alla portata di qualsiasi utente. Oltre la non necessità di personale specializzato e all'utilizzo di volumi ridotti sia per i campioni da analizzare che per i reagenti, i principali vantaggi riguardano la miniaturizzazione dei dispositivi, la qualità del risultato e la riduzione dei tempi di reazione [4]. Utilizzando volumi ridotti di campioni e reagenti, infatti, diminuiscono sia le probabilità di reazioni collaterali, migliorando così il rapporto segnale-rumore, sia il numero di esperimenti necessari ad avere dati di buona qualità. I tempi di reazione, invece, sono ridotti in quanto le piccole dimensioni dei LOC abbattano le distanze di diffusione. Le principali problematiche risiedono nella difficoltà di perfezionamento dei diversi componenti e integrazione delle funzionalità in sistemi completi ed efficienti che possano essere utilizzati anche da operatori non esperti. Sono molteplici i requisiti che dovrà soddisfare per imporsi come tecnologia di ampio utilizzo: dovrà riscuotere un elevato successo commerciale piuttosto che rimanere confinata nei laboratori e allo stesso tempo essere disponibile a prezzi contenuti [5]. Attualmente i LOC vengono utilizzati soprattutto nei laboratori di ricerca e rimane molto limitato il loro utilizzo in campo medico, fatta eccezione per strumenti come il glucosimetro o i più comuni test di gravidanza.



**Figura 1.3:** Rappresentazione concettuale del LOC: ogni parte del chip esegue una procedura classica di laboratorio.

### 1.2.1 Q3

Il Q3 [2] è uno strumento sviluppato da STMicroelectronics. Questo dispositivo è in grado di eseguire un'analisi real-time PCR partendo dal DNA estratto da un qualsiasi campione biologico. Come mostrato nella Figura 1.4 oltre allo strumento, che contiene tutti gli elementi per realizzare una real-time PCR, è presente una parte non riutilizzabile, il *chip*. Questo *chip* è un particolare tipo di LOC e viene precaricato con i reagenti necessari per la reazione. I reagenti inseriti quindi variano in base alla tipologia di gene ricercato. Alcune applicazioni riguardanti questo strumento sono riconducibili alla verifica della presenza del virus Ebola [1] o alla valutazione riguardante il metabolismo del Clopidogrel [9].



*Figura 1.4: Q3.*

## 2 | Cenni teorici

In questa tesi saranno descritti strumenti che, partendo da campioni biologici, sono in grado di estrarre acidi nucleici che saranno poi analizzati. In questo capitolo vengono, quindi, introdotti e spiegati i principali termini utili alla comprensione dei processi svolti da questi strumenti che sono al centro del mio lavoro di tesi.

### 2.1 Acido desossiribonucleico

L'acido desossiribonucleico (DNA) è un acido nucleico, contenuto nel nucleo della cellula, indispensabile per il funzionamento e lo sviluppo degli organismi viventi in quanto permette la biosintesi delle proteine e dell'acido ribonucleico (RNA). I primi studi sul DNA risalgono al 1953 quando James Watson e Francis Crick pubblicarono il loro lavoro sulla struttura del DNA [18].

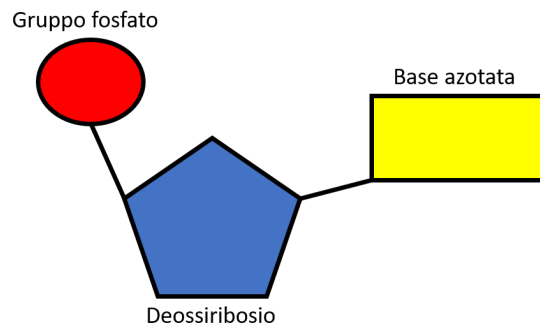
Gli acidi nucleici sono polimeri i cui monomeri (nucleotidi) sono composti da tre parti chimicamente distinte. Il primo è il desossiribosio, monosaccaride a 5 atomi di carbonio avente due gruppi ossidrilici (-OH). Un gruppo ossidrilico è coinvolto nel legame con il gruppo fosfato mentre l'altro è coinvolto nel legame con la base azotata. Il secondo è il gruppo fosfato che riveste la funzione di ponte tra due unità successive di desossiribosio. Possiede due gruppi ossidrilici che sono coinvolti nel legame

fosfodiesterico con altrettanti ossidrili di altri monosaccaridi. L'ultimo è la base azotata: si intende una delle quattro basi che compongono i nucleotidi del DNA. Le basi azotate implicate nella formazione dei nucleotidi sono l'adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) e la timina (T). I tre componenti di ogni nucleotide vengono uniti assieme attraverso dei legami chimici covalenti. Come si può vedere dalla Figura 2.1, il desossiribosio fa da ponte tra il gruppo fosfato e la base azotata. Il gruppo fosfato si posiziona sul lato esterno della doppia elica di DNA, mentre la base azotata si dispone nella zona interna dell'elica, dove si lega alla base complementare presente sul filamento opposto.

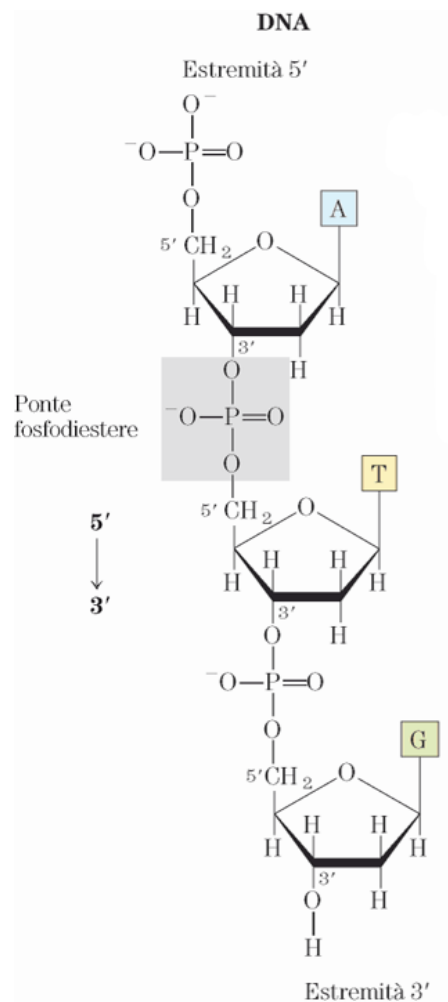
La catena polinucleotidica è formata da singoli nucleotidi uniti tra loro attraverso il legame fosfodiesterico (Figura 2.2). Questo legame si forma tra il fosfato associato al carbonio in posizione 5' dello zucchero di un nucleotide e il carbonio in posizione 3' dello zucchero presente sul nucleotide successivo. Il polinucleotide che si viene a formare grazie a questi legami ha una direzionalità intrinseca: ad una estremità della catena il primo nucleotide presenta un ossidrile libero (-OH) legato al carbonio in quella che viene chiamata posizione 3' dello zucchero, mentre all'altra estremità, l'ultimo nucleotide presenta un gruppo fosforico (-PO<sub>4</sub>) legato al carbonio che prende il nome di posizione 5' dello zucchero (Figura 2.2).

Negli acidi nucleici è possibile distinguere una catena nucleotidica (struttura primaria) ed una forma a doppia elica (struttura secondaria). La struttura primaria assolve la funzione codificatrice: ogni insieme di tre nucleotidi consecutivi (tripletta) codifica un singolo aminoacido, oppure le istruzioni di avvio e fine della sintesi proteica. La struttura secondaria del DNA (Figura 2.3) consiste in due catene di nucleotidi avvolte intorno allo stesso asse e tenute insieme, in una doppia elica de-

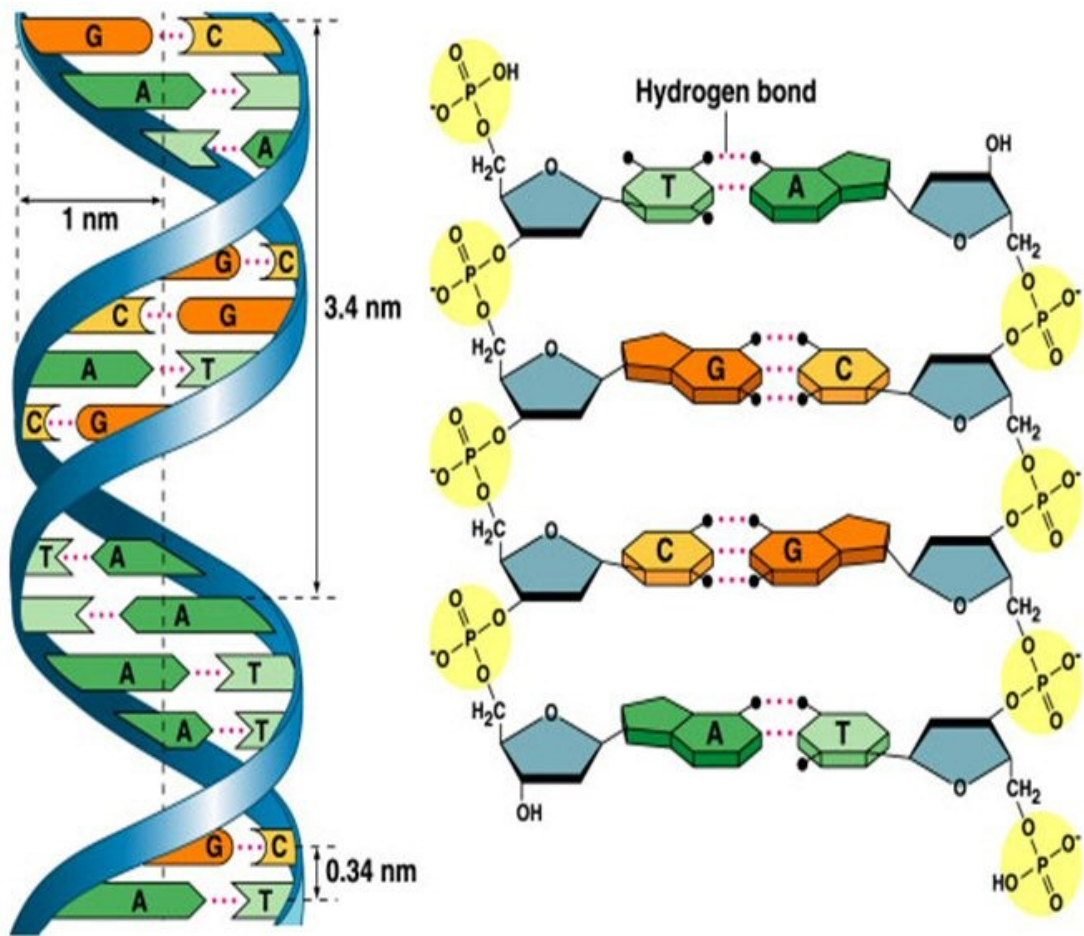
storsora, da legami idrogeno fra le basi azotate diametralmente opposte. Le basi sono rivolte verso il centro dell'elica mentre zuccheri e gruppi fosfato sono rivolti verso l'esterno e formano la struttura verticale della molecola. La molecola risultante ha un diametro di 20 Angstrom e se distesa, può raggiungere, nel caso del DNA umano, la lunghezza di 1,7 metri. A causa dell'elevato valore del rapporto lunghezza/diametro del filamento di DNA, durante il processo di purificazione potrebbero verificarsi delle rotture del filamento. Per motivi stereochimici, al centro della doppia elica l'adenina può legarsi solo con la timina e la citosina solo con la guanina; questi accoppiamenti obbligatori rendono i due filamenti complementari. Nonostante la relativa fragilità dei ponti idrogeno che legano ciascuna coppia di basi azotate, ogni molecola di DNA contiene un numero di coppie basi tale da impedire la separazione spontanea delle catene in condizioni fisiologiche. Tuttavia, se la doppia elica viene sottoposta ad una temperatura maggiore di  $70^{\circ} C$  o in condizioni di pH estremo ( $pH < 3$  o  $pH > 10$ ), i legami idrogeno tra le basi accoppiate si rompono ed essa si scinde nelle due catene complementari. Questo processo di scissione delle due catene è chiamato denaturazione. Il processo opposto alla denaturazione è detto ibridazione e si manifesta quando la temperatura diminuisce; catene complementari si riconoscono e si ricombinano, riformando la doppia elica.



**Figura 2.1:** Struttura di un nucleotide costituito da un gruppo fosfato, uno zucchero e una base azotata



**Figura 2.2:** legame fosfodiesterico tra due nucleotidi adiacenti



*Figura 2.3: Sinistra: struttura del DNA. Destra: struttura chimica*

## 2.2 Metodi di separazione del DNA

Durante il mio tirocinio ho analizzato diversi metodi per la separazione del DNA; ognuno dei quali presenta caratteristiche diverse sia per efficienza che per durata di esecuzione. Il protocollo di preparazione del campione deve essere scelto tenendo a mente il tipo di campione biologico utilizzato (cellule della pelle, sangue), il tipo di acido nucleico che si vuole estrarre (DNA o RNA) e il tipo di analisi usata. Indipendentemente dal protocollo scelto, i metodi di separazione hanno tre punti in comune:



- 1) Lisi
- 2) Purificazione
- 3) Eluizione

### 2.2.1 Lisi

La lisi è il processo utilizzato per distruggere la membrana cellulare. Questa fase deve essere abbastanza aggressiva da frammentare il materiale di partenza, ma allo stesso tempo deve essere sufficientemente delicata da mantenere l'integrità dell'acido nucleico. La lisi cellulare può essere ottenuta sfruttando metodi chimici, meccanici o termici [7]. La lisi chimica è ottenuta tramite l'utilizzo di buffer, in quanto garantiscono un buon grado di stabilità nell'isolamento di specifiche biomolecole. I principali componenti dei buffer di lisi sono gli enzimi litici, che liberano i contenuti cellulari dall'involucro cellulare, gli agenti caotropici, che distruggono le strutture ordinate dei sistemi biologici, e i detergenti. I detergenti (o surfattanti) hanno la funzione di disgregare l'interfaccia tra i sistemi idrofilici e idrofobici. Un esempio di interfaccia tra sistemi idrofilici e idrofobici è rappresentata dalla membrana cellulare. I detergenti sono molecole organiche caratterizzate da una testa idrofilica e una coda idrofobica. Non tutti i detergenti sono chimicamente uguali: alcuni sono in grado di solubilizzare completamente le membrane e denaturare le proteine, altri separano solo debolmente le proteine di membrana. La testa idrofilica dei detergenti può essere ionica o non ionica. I detergenti ionici tendono a solubilizzare meglio le membrane e a denaturare efficacemente le proteine.

La lisi meccanica avviene quando una forza fisica o meccanica rompe le membrane cellulari. Viene utilizzata quando la lisi chimica ha poco effetto come ad esempio su alcuni tessuti animali o vegetali. I lisati che si formano a seguito di trattamenti meccanici risultano differenti

rispetto ai lisati che si originano dai trattamenti chimici; infatti molte proteine citosoliche hanno maggior probabilità di rimanere intatte dopo la rottura della cellula. Questa tecnica risulta quindi efficace se utilizzata in combinazione con agenti denaturanti.

La lisi termica è un metodo di disaggregazione della cellula molto utilizzato in laboratorio. Il metodo più comune per indurre la lisi termica è l'immersione delle provette contenenti i campioni in acqua bollente per circa 40 secondi; questo breve tempo d'esposizione è sufficiente per provocare la rottura delle membrane, senza danneggiare gli acidi nucleici. In questo modo si ottiene la denaturazione della membrana e delle proteine causando, di conseguenza, la fuoriuscita del contenuto citoplasmatico.

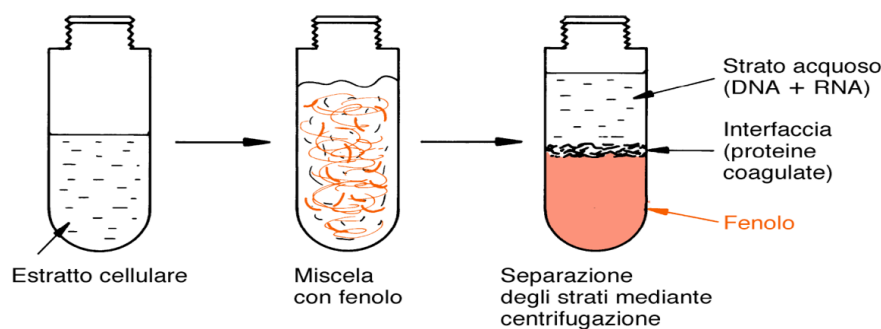
### 2.2.2 Purificazione

Il risultato ottenuto, dopo la fase di lisi, è quello di una soluzione eterogenea composta da diversi componenti cellulari. Materiali come proteine e reagenti utilizzati per la lisi devono essere rimossi dal lisato. Questa procedura è molto importante in quanto la presenza di certe proteine o di alcuni enzimi può interferire con la successiva fase di analisi. Ad esempio alcuni enzimi possono rompere le catene di DNA inibendo successivi trattamenti. Le più comuni procedure sono spiegate qui di seguito.

#### Estrazione fenolo-cloroformio

Al campione lisato è aggiunta una soluzione composta da fenolo, cloroformio e alcol isoamilico in proporzione 25:24:1. In seguito la soluzione è mescolata per 20 secondi e centrifugata per 5 minuti. Due fasi differenti vengono formate. La prima (quella più bassa) è composta da una fase organica densa caratterizzata dalla presenza di elementi come ad

esempio le proteine e i lipidi. La seconda (quella più in alto), invece, è quella che contiene il DNA. Una volta rimossa la parte della soluzione oggetto di studio (quella contenente il DNA), questa procedura è seguita da una precipitazione in etanolo. L'etanolo viene quindi aggiunto alla soluzione che viene poi centrifugata. L'operatore rimuove il surnatante con la pipetta, il DNA viene asciugato e poi risospeso in un buffer. Questa descritta è una procedura standard e permette di ottenere una buona resa di DNA. L'estrazione fenolo-cloroformio rappresenta un modo economico per ottenere del DNA. I maggiori svantaggi riguardanti questa tecnica sono la lentezza di esecuzione e la possibilità di avere tracce di fenolo e cloroformio nel campione finale.

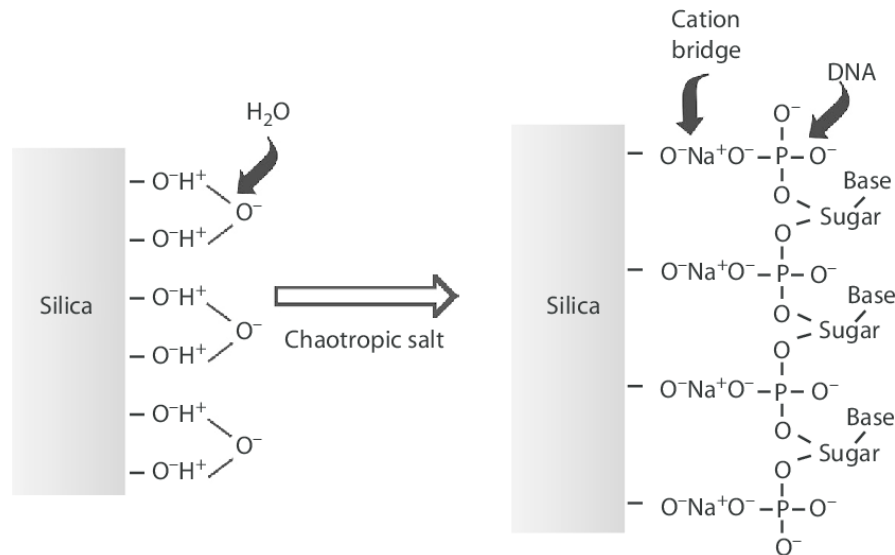


*Figura 2.4: Fasi dell'estrazione tramite fenolo-cloroformio.*

### Matrice di silice

In questo metodo il lisato è ottenuto utilizzando sali caotropici come ad esempio il cloruro di guanidinio, tiocianato di guanidinio o perclorato di litio. In aggiunta a queste sostanze viene utilizzato un buffer di lisi come detergente e la proteinasi K per degradare le proteine presenti nel lisato. In seguito viene aggiunto un buffer che promuove l'adesione tra matrice di silice e gli acidi nucleici. Questa procedura si basa sull'affinità ionica tra DNA (carico negativamente) e matrice di silice (carica positivamente). I passaggi successivi consistono in una serie di

lavaggi, in presenza di elevate concentrazioni di sali e alcol; infine, l'ultimo passaggio è l'eluizione dell'acido nucleico grazie ad una soluzione iposmotica.

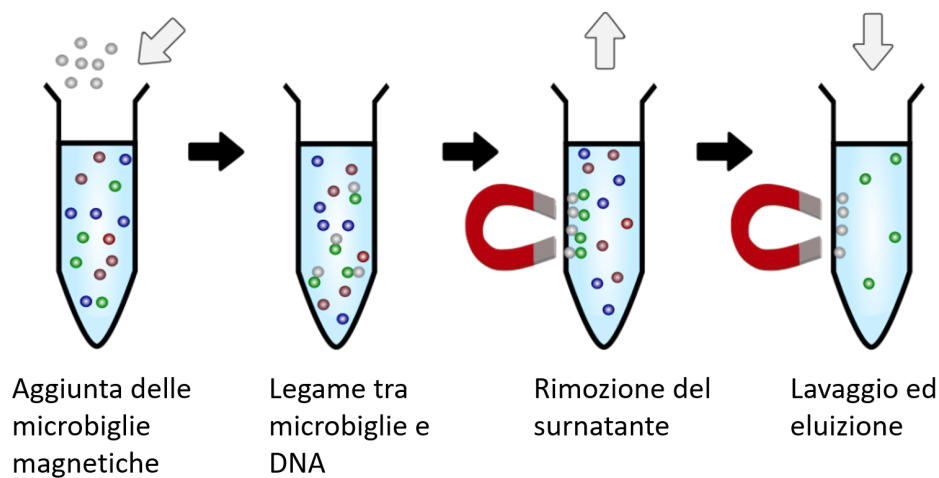


**Figura 2.5:** Rappresentazione del legame chimico tra DNA e matrice di silice tramite l'azione del sale caotropico.

### Microbiglie magnetiche

Le microbiglie magnetiche sono microsferiche capaci di legare il DNA o l'RNA grazie a un particolare coating in superficie. Le microbiglie presentano un diametro medio compreso tra 4 e 8  $\mu\text{m}$ . L'intera superficie di queste sfere è ricoperta di pori, le cui dimensioni non superano i 500 Å. Un elevato grado di porosità consente di aumentare il rapporto superficie/volume, favorendo così la capacità di legame delle microbiglie. Una volta ottenuto il lisato vengono aggiunti le microbiglie magnetiche e un buffer di legame. Questo buffer di legame, chiamato *binding buffer*, favorisce l'adesione degli acidi nucleici alla superficie delle microbiglie. Successivamente queste microbiglie vengono attratte da un magnete esterno e si procede al prelievo del surnatante; il magnete viene rimosso e le microbiglie ancora legate agli acidi nucleici vengono

risospese per effettuare una serie di lavaggi utili a rimuovere i prodotti contaminanti residui. La fase finale di questa procedura consiste nell'aggiunta di un buffer per separare le microbiglie dagli acidi nucleici a cui erano legati. Viene nuovamente utilizzato un magnete esterno per raggruppare le microbiglie e si procede al recupero del surnatante contenente l'acido nucleico purificato.



*Figura 2.6: Fasi della separazione del DNA tramite microbiglie magnetiche.*

### 2.2.3 Eluizione

Il DNA, dopo essere stato separato dalle sostanze usate per la purificazione, è eluito con soluzioni leggermente alcaline, come ad esempio il Tris-EDTA *buffer*. Il prodotto finale è conservato a una temperatura di  $4^{\circ}\text{C}$ , per un breve periodo, o a  $-20^{\circ}\text{C}$  per un periodo maggiore. Tutti i metodi per l'estrazione del DNA sono valutati utilizzando due parametri: la resa e la purezza. La resa indica la quantità di DNA ottenuta, mentre la purezza misura la presenza di materiali di scarto nell'eluato finale. I prodotti di scarto, infatti, sono causa di errore nella fase successiva di analisi (ad esempio l'emoglobina può inibire la PCR).

## 2.3 Analisi del DNA: real-time PCR

La real-time PCR è una tecnica utilizzata nei laboratori di biologia molecolare ed è un'evoluzione della reazione a catena della polimerasi (PCR), aggiungendo a quest'ultima la quantificazione della concentrazione iniziale di DNA target. La polimerasi è un enzima il cui ruolo è associato alla polimerizzazione degli acidi nucleici e la cui funzione più importante è la produzione di nuove molecole di DNA. Questo enzima è ricavato da batteri resistenti al calore. Questa caratteristica di resistenza al calore è di fondamentale importanza in quanto la real-time PCR il raggiungimento di temperature elevate durante la reazione. In precedenza l'enzima era ricavato dall'organismo umano, ma smetteva di funzionare dopo il primo ciclo. La polimerasi dei batteri termofili, invece, può essere utilizzata per molti cicli, data la naturale caratteristica dell'enzima di lavorare ad alte temperature. Oltre alla DNA polimerasi per far funzionare la reazione sono necessarie delle sequenze di basi azotate (dette *primer*) complementari alla porzione di gene che si vuole amplificare. La soluzione di partenza è composta, quindi, dal campione biologico che si vuole studiare, dai primer e dalla DNA polimerasi. La classica PCR (Figura 2.7) è strutturata in tre fasi diverse:

- 1) la soluzione è scaldata tra i  $94^{\circ}\text{C}$  e i  $99^{\circ}\text{C}$ . In questo modo le due eliche che compongono il DNA si separano (fase di denaturazione).

- 2) La temperatura si abbassa in un range che va dai  $40^{\circ}\text{C}$  ai  $55^{\circ}\text{C}$ . In questa fase i primer si legano alle singole catene di DNA (fase di *annealing*).

- 3) La temperatura viene alzata ( $65^{\circ}\text{C}$  -  $72^{\circ}\text{C}$ ) per fare in modo che la DNA polimerasi si attivi, creando in questo modo nuove catene di DNA (fase di estensione).

Queste tre fasi compongono un ciclo di PCR. Ad ogni ciclo la quan-

tità della sequenza oggetto di studio raddoppia. In aggiunta agli elementi della soluzione di partenza (campione, *primer*, DNA polimerasi) la real-time PCR prevede l'aggiunta di un fluoroforo (tipicamente il SYBR Green). Questa molecola è capace di legarsi ai filamenti a doppia elica di DNA. Durante la fase di denaturazione si separa dal DNA evitando, in questo modo, di compromettere la fase di *annealing* e di estensione. Il SYBR Green è utilizzato in quanto emette luce con una lunghezza d'onda nel verde quando viene colpito da una lunghezza d'onda nel *range* del blu. Nella Figura 2.8 è mostrato il picco di assorbimento a 488 *nm* e quello di emissione a 522 *nm*. Nella real-time PCR, come nella PCR classica, ad ogni ciclo la quantità di DNA raddoppia, e quindi con la stessa legge cresce la quantità di fluoroforo legato alle eliche. Tramite un rilevatore ottico è possibile misurare l'intensità di luce emessa dai fluorofori legati alle catene di DNA. Risulta quindi che l'intensità di luce emessa è correlata alla quantità di DNA presente nel campione. Osservando la curva relativa alla quantità di DNA (Figura 2.9) replicato durante un esperimento di PCR in funzione dei cicli, possiamo notare tre differenti zone:

1) plateau inferiore. I primi cicli non producono un numero di sequenze apprezzabile, per cui abbiamo una curva piatta.

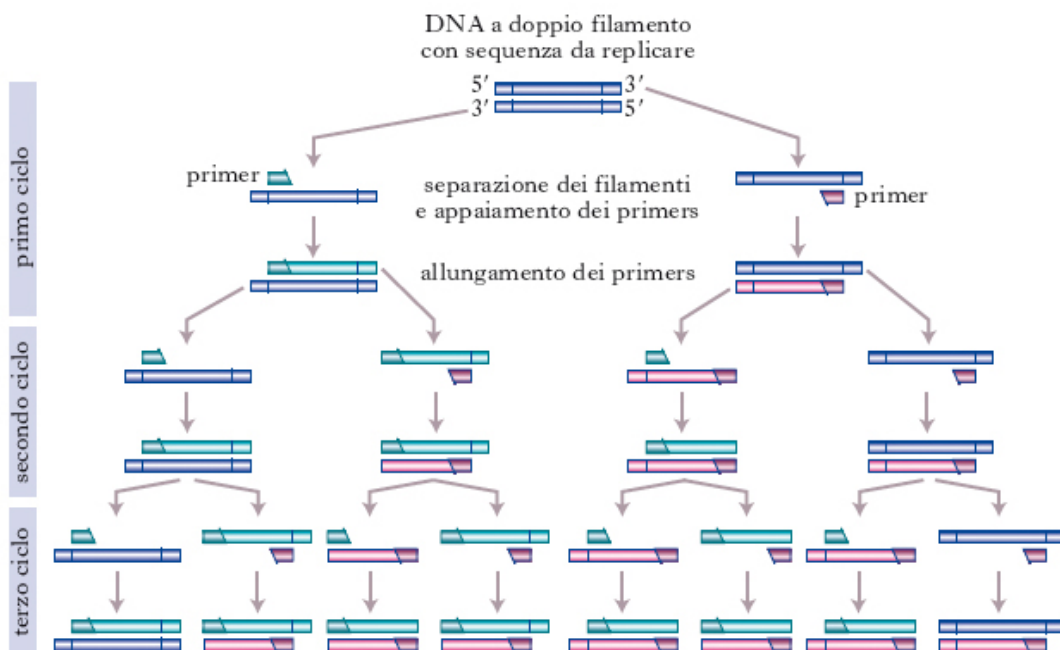
2) Fase esponenziale. Il numero di catene di DNA cresce con andamento esponenziale. Il logaritmo del numero di copie prodotte è direttamente proporzionale al numero di copie di partenza.

3) Fase lineare. In questa fase il logaritmo della quantità di copie prodotte è lineare rispetto al numero di cicli.

4) Plateau superiore. Le basi azotate e i primer vengono completamente consumati e la reazione si arresta.

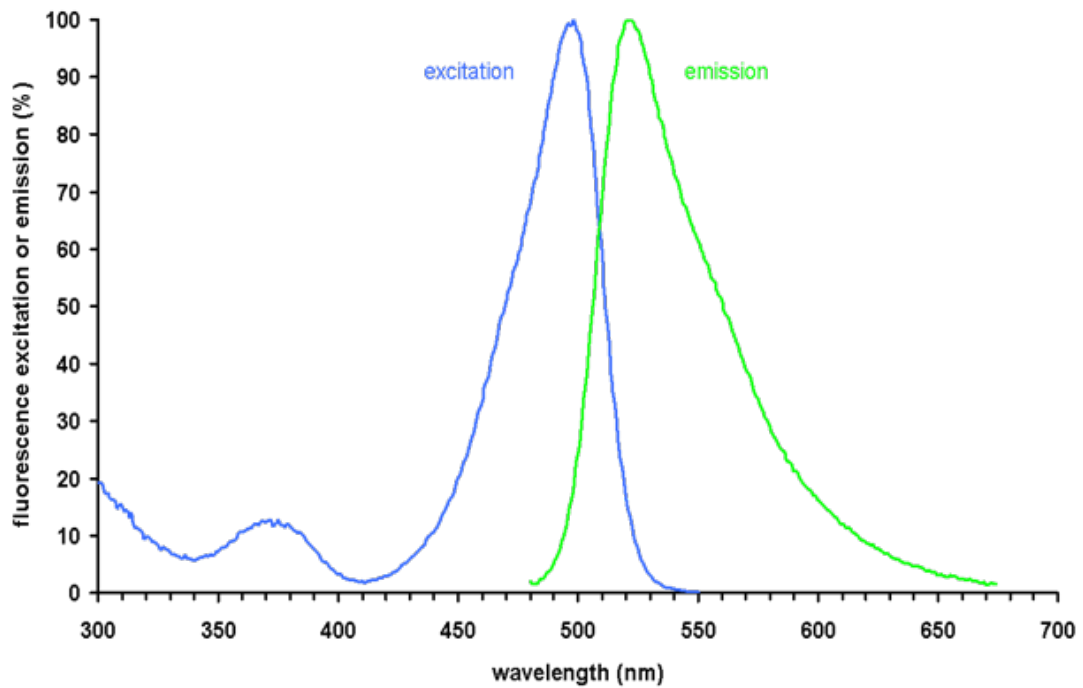
Una caratteristica importante è che se aumenta il numero delle co-

pie iniziali la fase esponenziale inizierà prima (Figura 2.10). Utilizzando i dati estrapolati dalla misurazione della fluorescenza e confrontandoli con opportune curve standard di calibrazione, possiamo risalire alla concentrazione iniziale di DNA. Grazie a questa sua caratteristica di poter quantificare il DNA presente nel campione di partenza, la real-time PCR è stata utilizzata per valutare l'efficacia dei metodi di estrazione di DNA.

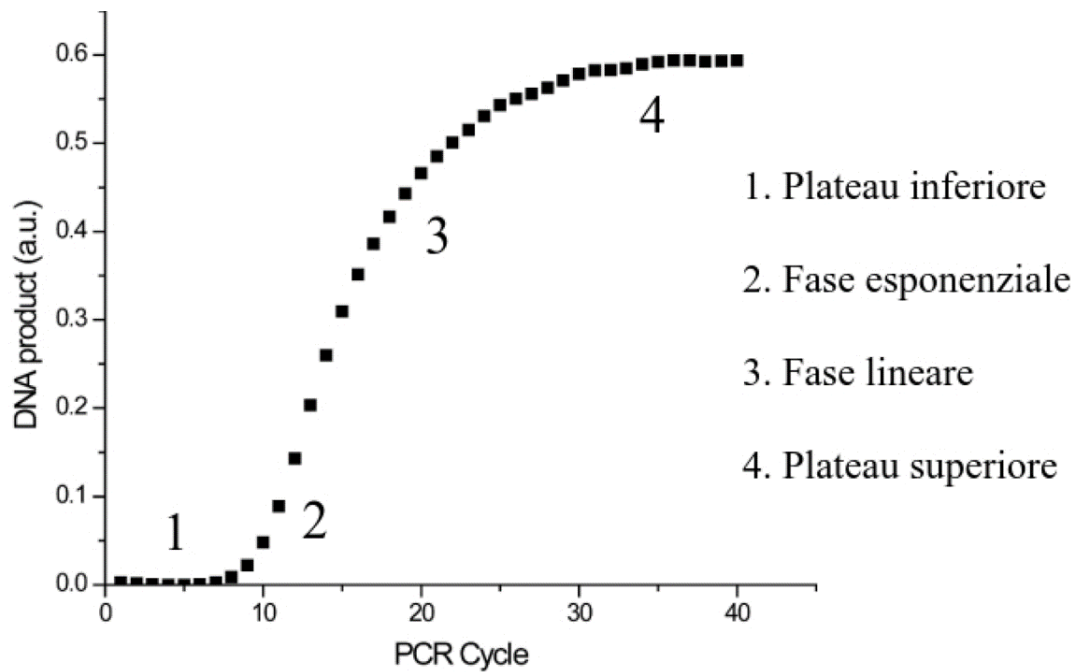


**Figura 2.7:** Fasi della PCR: 1) denaturazione, 2) annealing, 3) estensione.

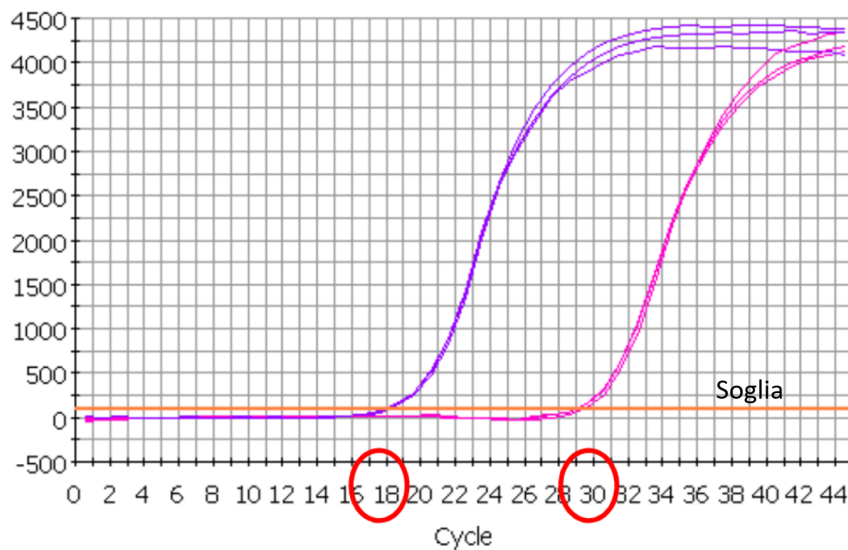




*Figura 2.8: Spettri di assorbimento e di emissione del SYBR Green.*



*Figura 2.9: Tipico risultato di una real-time PCR.*



**Figura 2.10:** Esempio di due curve di amplificazione ottenute con Real-time PCR utilizzando due campioni con concentrazioni iniziali di DNA differenti. Una concentrazione iniziale di DNA maggiore avrà bisogno di un numero di cicli inferiore per raggiungere la fase esponenziale rispetto a un campione con una minore concentrazione iniziale di DNA

## 2.4 Sistemi commerciali per l'estrazione automatica di DNA e analisi PCR

Sul mercato non esistono molti sistemi integrati che eseguono estrazione e PCR. Di seguito descrivo il QIAcube QIAGEN e il Maxwell System 16 come strumenti per eseguire l'estrazione mentre il CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System e il Rotor-Gene Q QIAGEN come strumenti per eseguire la PCR.

### 2.4.1 QIAcube QIAGEN

Un esempio di strumento per estrazioni automatiche è il sistema QIAcube della QIAGEN [12] (Figure 2.11). 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 incorporati una centrifuga e un riscaldatore, oltre a sistemi di pipettaggio e di shakeraggio. Un braccio robotico dotato di pinze permette la movimentazione delle provette. Si tratta di un macchinario molto ingombrante: 650 mm x 620 mm x 570 mm per oltre 70 kg di peso.



*Figura 2.11: QIAcube QiAGEN*

#### 2.4.2 Maxwell System 16, Promega

Il Maxwell System 16 [10] (Figura 2.12) è un macchinario realizzato da Promega, che fornisce anche cartucce monouso dedicate all'estrazione. Possono essere elaborati in parallelo fino a 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. 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:  $330\text{ mm} \times 330\text{ mm} \times 440\text{ mm}$  e circa  $18\text{ kg}$  di peso. Naturalmente però non può essere considerato un sistema compatto.



**Figura 2.12:** Maxwell system 16, Promega

### 2.4.3 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio Rad

Al giorno d'oggi possiamo trovare un numero elevato di strumenti che eseguono la PCR. Ogni strumento viene scelto in base ai parametri richiesti dagli operatori. Il sistema Real-Time PCR CFX96 Touch [3] (Figura 2.13) è composto da un termociclatore per controllare la temperatura dei campioni, 96 pozzetti nei quali inserire i campioni, 6 LED di eccitazione e 6 fotodiodi per la *detection*. Per ciascun pozzetto è possibile impostare la temperatura, fino a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e il tempo di riscaldamento. La dimensione del campione da utilizzare è dell'ordine dei microlitri ( $1\text{-}50\ \mu\text{l}$ ), ma la quantità da utilizzare, consigliata dal produttore, è tra  $10\ \mu\text{l}$  e  $25\ \mu\text{l}$ . Il caricamento dei campioni deve essere compiuto manualmente per ogni singolo pozzetto. Si possono impostare fino a cinque target genetici per ogni esperimento. Il CFX96 ha una sensibilità elevata: può rilevare una singola copia della sequenza *target*. Le dimensioni sono  $33\times 46\times 36\text{ cm}$  per  $21\text{ kg}$  e questo rende il dispositivo non portatile. Un altro vantaggio del CFX96 è il costo, infatti, oltre al costo del macchinario (circa  $30000\text{ €}$ ) bisogna aggiungere quello dei reagenti che sono necessari per far avvenire le reazioni.



**Figura 2.13:** CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio Rad

#### 2.4.4 Rotor-Gene Q QIAGEN

Il Rotor-Gene Q Qiagen [13] (Figura 2.14) è un dispositivo per la real-time PCR. Attualmente è l'unico dispositivo in grado di decifrare il polimorfismo a singolo nucleotide di IV classe tramite *melting* ad alta risoluzione. Utilizzando la *melting* ad alta risoluzione è inoltre possibile, sfruttando i kit QUIAGEN dedicati, realizzare la genotipizzazione, analisi quantitativa della metilazione, scansione genica e corrispondenza sequenziale. Le provette contenenti il campione biologico da studiare e tutti gli elementi utili a realizzare una real-time PCR vengono inseriti nel dispositivo e successivamente centrifugate utilizzando aria calda. In questo modo i campioni inseriti sono riscaldati in maniera uniforme. Quando la provetta, contenente il campione da analizzare, si allinea con il rilevatore ottico il campione viene illuminato e il segnale fluorescente viene misurato da un rilevatore ottico. Il Rotor-Gene Q è in grado di realizzare 40 cicli in 45 minuti. Il desing rotante del dispositivo permette di avere una variazione di temperatura da provetta a provetta di  $\pm 0.2^{\circ}C$ . Le dimensioni del dispositivo sono 370 mm x 286 mm x 420 mm per 12.5 kg



**Figura 2.14:** Rotor-Gene Q QIAGEN

## 2.5 Progetto EASY

Il Q3, descritto nel capitolo precedente, è quasi pronto per essere messo in commercio. In parallelo è stato avviato un progetto che vuole aggiungere l'estrazione di acidi nucleici all'analisi di real-time PCR. Questo progetto, che prende il nome di EASY, è lo strumento al quale ho lavorato e verrà descritto nel prossimo capitolo.

## 3 | Stato dell'arte

### 3.1 Sistemi automatici di estrazione di acidi nucleici

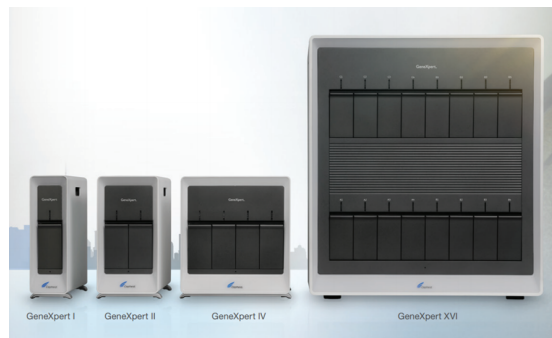
Come affermato in precedenza, in commercio non esistono molti strumenti in grado di eseguire procedure di estrazione di acidi nucleici e di analisi PCR. Recentemente è stato messo sul mercato un dispositivo portatile che esegue una procedura di purificazione del DNA, il VolTRAX (Figura 3.1), prodotto da Nanopore Technologies. Questo dispositivo, dal costo di 8000 \$, purifica il DNA in modo automatico, tramite l'utilizzo di microbiglie magnetiche, senza l'intervento umano. Il VolTRAX sfrutta un array di pixel, che vengono caricati in sequenza dal software dedicato, per muovere all'interno dello strumento reagenti e campioni biologici.

Un altro strumento in commercio è il GeneXpert (Figura 3.2) prodotto da Cepheid. Questo strumento è in grado di realizzare un'estrazione di acidi nucleici e di eseguire analisi di PCR sul medesimo campione. Esistono diverse versioni di questo strumento. La versione dalle dimensioni più contenute è in grado di eseguire una sola analisi alla volta. Se si vuole aumentare il numero di analisi da realizzare in contemporanea è necessario utilizzare una versione che però risulta essere ingombrante.





*Figura 3.1: Estrattore automatico VolTRAX.*



*Figura 3.2: GeneXpert nelle sue differenti versioni.*

## 3.2 Sistema di purificazione di acidi nucleici EASY

STMicroelectronics ha sviluppato un dispositivo chiamato EASY (Extraction and Analysis System) che ha lo scopo di pretrattare i campioni biologici in modo da renderli adatti ad una successiva analisi. La peculiarità di tale sistema vuole essere la trasportabilità e l'integrazione del processo di purificazione con l'analisi PCR. Questo sistema di preparazione deve consentire la lisi cellulare del campione biologico di partenza e la purificazione dell'acido nucleico, il quale deve essere estratto per poi essere analizzato. La fase di analisi ha l'obiettivo di creare 6 camere dove realizzare altrettante analisi contemporaneamente. Lo strumento invece, ancora in fase prototipale, è lontano dal poter eseguire in modo

autonomo una purificazione dei campioni biologici e, al momento, non integra il protocollo di analisi PCR. Durante l'estrazione infatti, sono diversi gli interventi che gli operatori devono eseguire per portare a termine l'operazione.

Il prototipo (Figura 3.3) è composto da due elementi, il primo è lo strumento che contiene tutti gli elementi di comando e gestione dei fluidi, mentre il secondo è la cartuccia monouso.

Lo strumento per il controllo della cartuccia monouso include le componenti necessarie alla realizzazione della procedura di purificazione. Questi elementi sono la pompa peristaltica, necessaria per generare una pressione negativa, e un attuatore magnetico.

La pompa, lavorando a pressione negativa (a un valore inferiore rispetto a quella atmosferica) e muovendo unicamente l'aria, permette il movimento fluidico dei reagenti all'interno del sistema, senza che questi entrino in contatto con essa. Il circuito microfluidico è caratterizzato da due connessioni fluidiche tra il dispositivo e la cartuccia, in questo modo la pompa può richiamare i liquidi e l'aria dallo strumento verso la cartuccia. Queste due connessioni sono realizzate tramite due aghi installati in posizione verticale sullo strumento e due guarnizioni di gomma (Figura 3.4-1) presenti nella cartuccia. La caratteristica fondamentale di questi gommini, oltre a quella di essere perforabili dagli aghi, è che una volta estratta la cartuccia dallo strumento, si chiudono automaticamente, evitando così che la cartuccia possa perdere materiale, contaminando l'ambiente esterno. Gli aghi utilizzati hanno un diametro che gli permette di non rompersi durante la fase di inserimento della cartuccia. Gli aghi, inoltre, hanno il foro sul lato, questo fa sì che durante l'inserimento della cartuccia, non recidano la gomma ostruendosi. I fluidi che arrivano all'interno della cartuccia possono es-

sere aria o reagenti. La scelta di far entrare uno piuttosto che un altro varia in base alla fase del protocollo ed è realizzata tramite l'utilizzo di elettrovalvole.

Il movimento dei liquidi all'interno della cartuccia avviene nel modo seguente: viene aperta l'elettrovalvola corrispondente al reagente desiderato, sulla cartuccia viene aperta una delle due valvole presenti e, infine, viene azionata la pompa peristaltica. La pompa aspira aria dalla connessione di output causando un abbassamento di pressione all'interno della cartuccia. Questa variazione di pressione ottenuta causa il movimento dei fluidi dai rispettivi serbatoi verso l'interno della cartuccia.

L'attuatore magnetico presente sullo strumento è posto in prossimità della cartuccia e viene utilizzato per due scopi. Il primo è quello di raggruppare le microbiglie magnetiche, in questo modo è possibile spostare i liquidi dalla camera di estrazione a quella di scarto, se ci si trova nella fase in cui il materiale genomico è legato alle microbiglie, o di raccogliere il prodotto finale, se ci si trova nella fase di eluizione. Il secondo scopo è quello di mescolare la soluzione presente nella camera di estrazione della cartuccia. All'interno di quest'ultima viene inserita un'ancoretta (*stirrer*) in materiale ferromagnetico (Figura 3.4-7). Le dimensioni dell'ancoretta devono consentire il movimento e la rotazione della stessa all'interno della camera, e sono perciò estremamente ridotte, con una lunghezza di 7 *mm*, un diametro pari a 1.5 *mm* ed un peso inferiore a 0.1 *g*. Il movimento dell'ancoretta viene controllato dall'attuatore posto sullo strumento che viene mosso tramite due motorini elettrici. Questi motori permettono al *stirrer* di muoversi sia in verticale che di ruotare su se stesso modificandone oltre che la direzione anche la velocità.

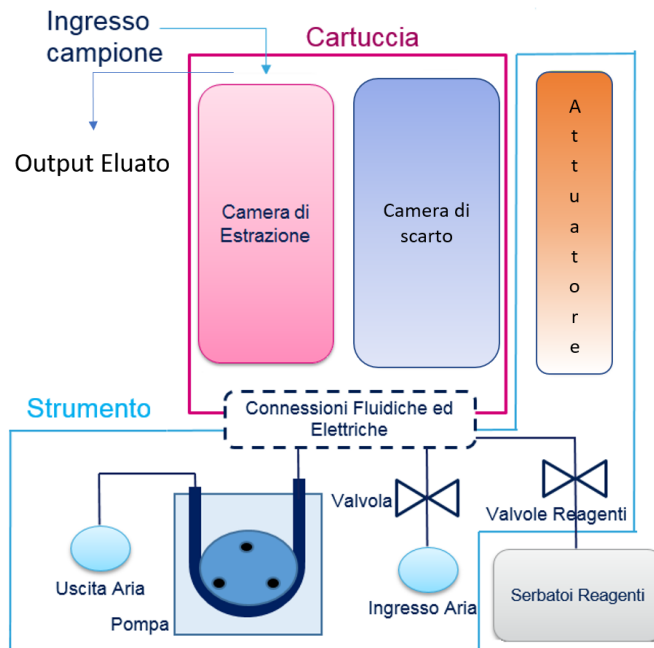
In questa versione prototipale i reagenti per la purificazione si trovano all'esterno della cartuccia. Questa scelta rappresenta un sistema molto compatto e sicuro, poiché tutti i reagenti sono confinati in una zona ben precisa dello strumento e ad oggi vengono sostituiti al termine di ogni test di purificazione, evitando così il rischio di contaminazione. Per ogni passaggio del processo è presente un serbatoio, contenente il reagente necessario a quella fase; l'ingresso del reagente nella camera di estrazione avviene attraverso l'apertura controllata di una elettrovalvola che si trova sul fondo di ogni contenitore. Una di queste valvole è invece a contatto con l'esterno e consente il passaggio dell'aria all'interno dello strumento, quando richiesto.

La cartuccia rappresenta la parte monouso dello strumento è formata da due strati di policarbonato dello spessore di 4 *mm* tenuti insieme da quattro viti ed è caratterizzata dalla presenza di diversi elementi oltre a quelli citati precedentemente. Il *design* scelto rispecchia la volontà di creare un elemento il più compatto possibile e che possa essere utilizzato su uno strumento portatile come il sistema di estrazione EASY. Le parti che occupano più spazio all'interno della cartuccia sono la camera di estrazione (Figura 3.4-3), dove avvengono le reazioni di purificazione, e la camera di scarto (Figura 3.4-4), dove vengono convogliati tutti i reagenti esausti. Inoltre, nella cartuccia è presente un foro d'ingresso (Figura 3.4-6), attraverso il quale viene inserito il campione dall'alto all'interno della camera di estrazione, ed un foro di uscita (Figura 3.4-5), per consentire il recupero mediante aspirazione con pipetta dell'acido nucleico che è stato purificato nella camera d'estrazione. Per evitare che la soluzione, durante la procedura d'estrazione, vada nel canale di recupero è stata installata una valvola in cera che viene sciolta una volta completato il protocollo.

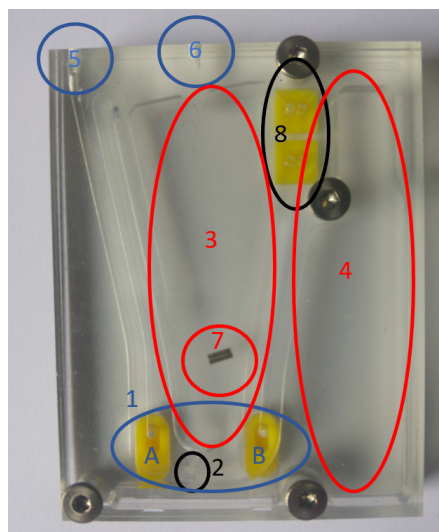
Nella cartuccia sono presenti due valvole a vite (Figura 3.4-8) che permettono di cambiare il percorso intrapreso dai fluidi inseriti nella cartuccia. Ruotando la vite è quindi possibile chiudere la valvola deformando la gomma presente alla sua estremità o aprirla facendola ritornare alla sua forma originaria (Figura 3.6) . Questo tipo di valvole rappresentano una grande limitazione per il dispositivo. L'operatore è costretto ad aprire e chiudere le valvole rallentando l'esecuzione della procedura di purificazione e ciò impedisce, di fatto, l'automazione.

Il principale vantaggio di questo prototipo è rappresentato dalle ridotte dimensioni (cartuccia: 5 x 7.5 x 0.9 *cm*, strumento: 9 x 8 x 12 *cm*) e dal peso (cartuccia: 29 *g*, strumento: 300 *g*). Il protocollo ottimizzato che verrà descritto nel paragrafo successivi garantisce un'elevata efficienza del processo di estrazione, minimizzando i tempi richiesti per ogni passaggio e fornendo materiale purificato in tempi brevi, senza sacrificare i requisiti di resa e purezza del prodotto ottenuto.

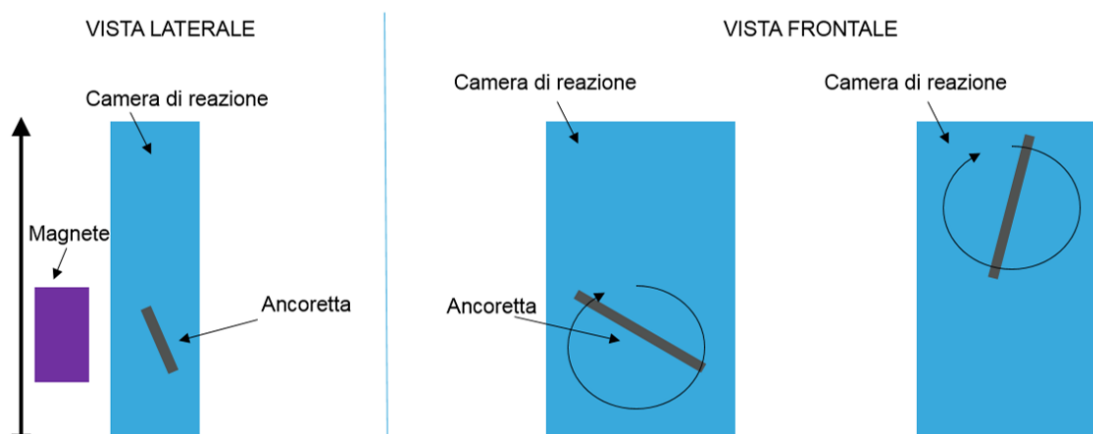
I principali svantaggi riguardano, invece, l'assenza di automazione del processo di purificazione. Le valvole a vite presenti sulla cartuccia richiedono l'ausilio di un operatore per essere aperte o chiuse. L'attuatore e le elettrovalvole vengono attivate anche loro a discrezione dell'operatore tramite un software dedicato.



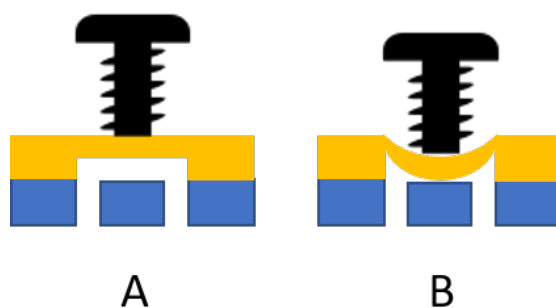
**Figura 3.3:** Schema a blocchi del prototipo di estrattore EASY.



**Figura 3.4:** Cartuccia del prototipo di estrattore EASY: 1) Input (A) output (B), 2) Valvola di cera, 3) Camera di estrazione, 4) Camera di scarto, 5) Foro di uscita per eluato, 6) Foro di inserimento del materiale biologico, 7) Stirrer, 8) Valvole a vite.



**Figura 3.5:** Vista laterale del magnete permanente che si muove verticalmente all'esterno della camera (sinistra) e vista frontale dell'ancoretta che sale e scende lungo la camera roteando su se stessa (destra).



**Figura 3.6:** Sezione della valvola a vite. A) Valvola aperta, B) Valvola chiusa.

### 3.3 Funzionamento

Dal punto di vista fluidico si possono individuare alcuni passaggi chiave nella procedura implementata con il prototipo di estrattore.

Prima di tutto, il campione viene inserito all'interno della camera di estrazione attraverso il foro d'ingresso presente sulla superficie apicale della cartuccia (Figura 3.7.1), il quale deve essere successivamente sigillato con un nastro di plastica per consentire la formazione del vuoto quando richiesto.

Durante l'ingresso del campione, permesso grazie all'uso di una micro-

pipetta, tutte le valvole sono chiuse e la pompa è ferma.

Per inserire il primo reagente all'interno della camera di estrazione, generalmente il buffer di lisi, bisogna aprire la valvola a vite, indicata nella Figura 3.7.2 con la lettera A, che connette la parte superiore della camera di estrazione con la camera di scarto; attivando la pompa in aspirazione, si abbassa la pressione all'interno delle camere di scarto e di estrazione, e successivamente, sullo strumento, si apre la valvola relativa al reagente che si vuole usare. Il gradiente pressorio generato muove il reagente all'interno della camera di estrazione (Figura 3.7.2). Dopo ogni step i reagenti esausti vengono trasferiti nella camera di scarto (Figura 3.7.3). Per compiere quest'azione viene aperta sullo strumento la valvola dell'aria, in questo modo attraverso il connettore fluidico d'ingresso, la pressione all'interno della cartuccia è riportata allo stesso valore di quella atmosferica. Si apre inoltre la valvola a vite B che connette la parte inferiore della camera di estrazione alla camera di scarto e si riduce nuovamente la pressione all'interno di quest'ultima, aspirando con la pompa tramite il connettore fluidico d'uscita. L'aria introdotta rimane in alto all'interno della camera di estrazione ed il liquido esausto si sposta verso la camera di scarto grazie alla forza di gravità e al gradiente pressorio generato dalla pompa.

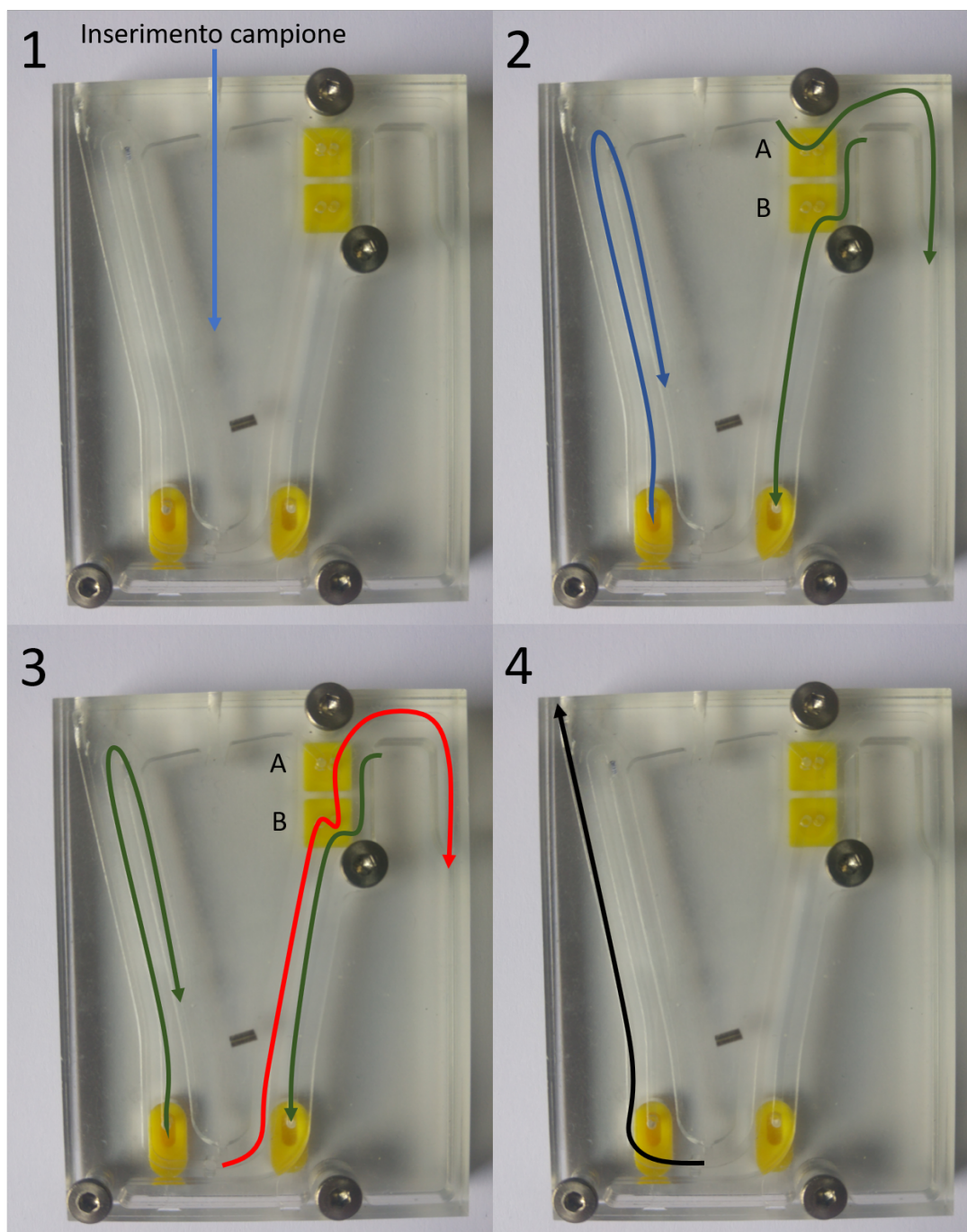
Nell'ultimo passaggio l'eluato viene prelevato dal foro presente nella parte superiore della cannucchia utilizzando una micro pipetta. Il canale attraverso il quale l'eluato fluisce collega la parte inferiore della camera di estrazione con l'esterno. Una valvola in cera impedisce alla soluzione di invadere il canale di uscita durante le fasi di purificazione. Una volta concluse questa valvola viene sciolta e l'eluato prelevato (Figura 3.7.4).

In generale, i passaggi tipici del processo di estrazione basato su micro-



biglie magnetiche adattato a questo sistema sono i seguenti:

- 1) inserimento del campione biologico all'interno della camera di estrazione;
- 2) entrata del buffer di lisi, che consente il rilascio degli acidi nucleici;
- 3) legame degli acidi nucleici alle microbiglie magnetiche, preventivamente caricate all'interno della camera di estrazione o dispensate successivamente;
- 4) mixing della soluzione per il tempo opportuno stabilito;
- 4) avvicinamento del magnete per la raccolta selettiva delle microbiglie magnetiche;
- 5) svuotamento della soluzione esausta dalla camera di estrazione verso la camera di scarto;
- 6) lavaggi con diversi reagenti e cicli di essiccazione delle microbiglie magnetiche;
- 7) eluizione del DNA/RNA dalle microbiglie magnetiche;
- 8) raccolta degli acidi nucleici eluiti all'interno del collettore;
- 9) recupero degli acidi nucleici eluiti tramite pipetta, per eseguire le analisi all'esterno del sistema;



**Figura 3.7:** 1) Inserimento del campione attraverso il foro d'ingresso superiore. 2) La freccia blu indica il percorso del reagente verso l'interno della camera di estrazione. Ciò è reso possibile grazie all'apertura della valvola A, che connette la camera di estrazione con quella di scarto, permettendo l'estrazione dell'aria (freccia verde) dalla cartuccia. 3) La freccia verde indica il percorso dell'aria. Aprendo anche la valvola B è possibile far fluire i reagenti esausti (freccia rossa) nella camera di scarto 4) La freccia nera indica il percorso intrapreso dall'eluato nella fase di prelievo con la micro pipetta.

### 3.4 Protocollo di estrazione

Per testare la validità dello strumento nell'eseguire il protocollo di estrazione è stato utilizzato, come campione biologico, del sangue intero. Questa scelta dipende dal fatto che il sangue intero non necessita di nessun pretrattamento e può essere direttamente purificato.

In commercio esistono numerosi kit per l'estrazione di acidi nucleici. Essi contengono tutto il necessario per eseguire interamente la procedura di estrazione. Il kit scelto è il "NucleoMag® VET" (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) ed è basato sull'utilizzo di microbiglie magnetiche come fase solida mobile. Questo kit è stato utilizzato per le estrazioni di acidi nucleici effettuate in manuale (considerate il gold standard). Il protocollo utilizzato dal kit è stato inoltre fedelmente adattato alle caratteristiche del prototipo di estrattore automatico, in modo da poter confrontare procedure analoghe tra loro, seppur con strumentazione differente.

Il protocollo suggerito dalla casa madre per le estrazioni in manuale è il seguente. Si caricano 200  $\mu\text{l}$  di sangue intero umano contenente acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, per la sua funzione di anticoagulante) insieme con 20  $\mu\text{l}$  di Proteinasi K, ai quali si aggiungono 180  $\mu\text{l}$  di buffer di lisi; la soluzione viene tenuta in agitazione per 15 minuti a temperatura ambiente. Vengono aggiunti 20  $\mu\text{l}$  di microbiglie magnetiche risospese e 600  $\mu\text{l}$  di buffer di legame e si procede con il mixing a temperatura ambiente per 5 minuti. A questo punto si avvicina un magnete esterno, che attira a sé le microbiglie con adesi gli acidi nucleici; si attendono almeno 2 minuti prima di rimuovere il surnatante. Una volta rimosso il magnete, si procede con i lavaggi: si aggiungono 600  $\mu\text{l}$  di buffer di lavaggio 1 e si risospendono le microbiglie agitando bene la soluzione, dopodiché si aggiunge nuovamente il magnete ester-

no al quale si legano le microbiglie con adesi gli acidi nucleici. Dopo 2 minuti si rimuove prima il surnatante e poi si allontana il magnete esterno. Si procede dunque con il secondo lavaggio aggiungendo 600  $\mu\text{l}$  di buffer di lavaggio 2, mescolando bene la soluzione in modo da risospendere completamente le microbiglie magnetiche. Ancora una volta, si avvicina il magnete in modo che avvenga il legame con le microbiglie; dopo 2 minuti si procede con la rimozione del surnatante e poi l'allontanamento del magnete. Si effettua un ultimo lavaggio con 600  $\mu\text{l}$  di etanolo 80% e si agita la soluzione fino a quando le microbiglie sono risospese completamente. Si separano le microbiglie dal resto della soluzione avvicinando il magnete esterno; dopo 2 minuti di raccolta delle microbiglie, si elimina il surnatante e poi si allontana il magnete. Prima di procedere con l'eluizione, la soluzione contenente il *pellet* di microbiglie magnetiche con legati gli acidi nucleici ormai purificati viene lasciata ad essiccare a temperatura ambiente per 10 minuti, in modo da rimuovere ogni traccia di buffer residua. Infine si eluisce aggiungendo un volume di 100  $\mu\text{l}$  di buffer di eluizione e si mantiene la soluzione in agitazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Viene avvicinato il magnete esterno, al quale si legano le microbiglie; dopo almeno 2 minuti si preleva il surnatante, contenente gli acidi nucleici purificati.

### 3.5 Scopo della tesi

In questo capitolo è stato descritto lo strumento sviluppato da STMicroelectronics ed ha l'obiettivo di estrarre, tramite una procedura automatizzata, acidi nucleici e di sottoporli ad analisi PCR. Lo strumento, ancora in fase prototipale, ha lo svantaggio di aver bisogno dell'intervento dell'operatore per eseguire una procedura di estrazione.

Il lavoro presentato in questa tesi ha lo scopo di rendere automatico il dispositivo di purificazione precedentemente progettato. L'attenzione è stata focalizzata in particolar modo sulle valvole presenti sulla cartuccia. L'obiettivo è quello di rendere le valvole completamente autonome e quindi di essere in grado di aprirsi e chiudersi senza l'intervento umano. Tali attività pongono le basi per l'integrazione nello stesso dispositivo dell'analisi del DNA tramite un secondo dispositivo che effettua una real-time PCR.

## 4 | Materiali e metodi

Nel capitolo precedente ho descritto lo strumento di estrazione di acidi nucleici sviluppato da STMicroelectronics. Nel farlo mi sono soffermato su uno dei suoi principali svantaggi: l'impossibilità di avere una procedura di estrazione completamente automatizzata. In questo capitolo andrò a descrivere come è stato creato un nuovo prototipo di valvole autonome da utilizzare nella cartuccia dello strumento di estrazione. Descriverò come sono state realizzate, i materiali utilizzati e di come si è resa necessaria la costruzione di un banco di prova per valutarne la funzionalità.

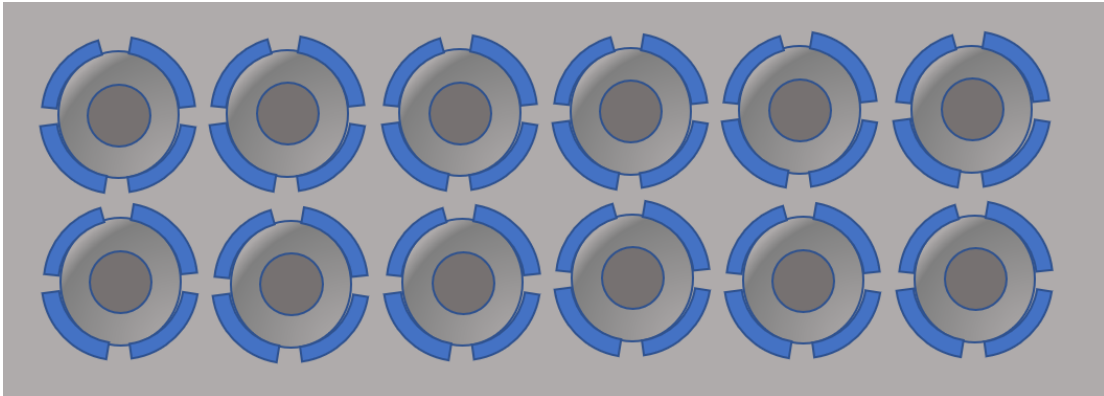
### 4.1 Valvole magnetiche

Per la realizzazione delle nuove valvole da utilizzare nella cartuccia monouso si è reso necessario mettere a punto un processo di fabbricazione. Il materiale scelto per le nuove valvole è la gomma siliconica mescolata con la ferrite. E' stato quindi realizzato uno stampino grazie al quale la gomma siliconica magnetica potesse polimerizzare secondo la forma da noi scelta per la valvola.

### 4.1.1 Stampino

Lo stampino è stato realizzato utilizzando una lastra di polycarbonato dello spessore di 2 *mm* in cui sono stati ricavati per micro fresatura i negativi della valvola da realizzare. Grazie a questo stampino è possibile creare fino a 12 valvole contemporaneamente. La miscela, la cui composizione verrà descritta in seguito, introdotta nello stampino per colata, dove successivamente verrà degasata. Prima di iniziare la fase di polimerizzazione della gomma, allo stampino viene applicato una copertura di vetro borosilicato. Questa copertura ha lo scopo di definire la superficie inferiore dell'inserto gommoso, faccia che in questo caso si trova nella parte superiore dello stampino.

Per ogni negativo sullo stampino è presente un rialzo la cui altezza e spessore sono di 1 *mm* e il cui diametro interno è uguale a quello della valvola. Come mostrato in Figura 4.1 questo rialzo non è continuo lungo tutta la circonferenza, ma è assente nei punti in prossimità dei negativi adiacenti. Il compito di questo rialzo è quello di dare forma e di ridurre al minimo il materiale di scarto attaccato alla valvola al termine del processo di polimerizzazione, mentre nei punti dove è assente le valvole rimangono collegate tra loro rendendo in questo modo semplice l'estrazione di quest'ultime dallo stampino. Come tutti gli elementi in polycarbonato anche lo stampino per le valvole è stato lavorato utilizzando la fresatrice Minitex CNC Mini-Mill GX™.



*Figura 4.1: Vista superiore dello stampino. In blu sono evidenziati i rialzi per ogni negativo.*

#### 4.1.2 Minitech CNC Mini-Mill GX™

La Minitech CNC Mini-Mill GX™ [11] (Figura 4.2) è una fresatrice a tre assi. Il piano di lavorazione è grande 508x152 mm ed è in grado di spostarsi di 300 mm lungo l'asse X e di 200 mm lungo l'asse Y. Il motore che esegue le lavorazioni è montato sull'asse Z e la sua escursione è pari a 200 mm. Il motore utilizzato per la lavorazione è un motore stepper che impiega 400 step per compiere una rivoluzione. La risoluzione lungo i 3 assi è di 0.0001 mm.



*Figura 4.2: Minitech CNC Mini-Mill GX™.*



### 4.1.3 Gomma siliconica

Il materiale utilizzato per realizzare le nuove valvole è la gomma siliconica. La scelta è ricaduta su tale materiale per l'ampia gamma di durezza disponibili (da *Shore A 4* a *Shore A 50*).

La durezza indica la capacità di un materiale a resistere alle deformazioni. Per valutare la durezza degli elastomeri viene utilizzata la scala *Shore*. La misurazione della deformazione avviene valutando il movimento di una punta tronco conica che inizialmente fuoriesce di 2,5 mm dal foro di un piattello ed è soggetta a una forza costante prodotta da una molla. Il piattello viene quindi posizionato sul materiale da valutare, la punta tronco conica si muoverà verso l'interno dello strumento in modo proporzionale alla forza esercitata dalla superficie studiata. La norma ASTM D2240-00 contempla dodici diverse scale di misura *Shore*: tipo A, B, C, D, DO, E, M, O, OO, OOO, OOO-S, e R. Le differenze tra queste scale sono nella forma della punta che penetra nel materiale e nella forza che viene applicata a quest'ultima. Le scale che tipicamente vengono più utilizzate sono la *Shore A* e la *Shore D*. La scala di durezza utilizzata per valutare la durezza della gomma siliconica da me utilizzata è la *Shore A*.

Come descritto in precedenza, il materiale base verrà miscelato con la ferrite. La gomma siliconica, oltre che per la sua facilità di lavorazione e all'ampio range di durezza, è stata scelta per la sua capacità di deformarsi e di ritornare alla forma originale quando cessa l'applicazione di una forza esterna. La ferrite è stata aggiunta per rendere la valvola suscettibile alla forza magnetica generata da una calamita.

Sono stati testati diversi tipi di gomma dalla durezza diversa: *Shore A 4*, *Shore A 22*, *Shore A 50*. La scelta è ricaduta su quella avente lo *Shore* più basso, in quanto un indice di durezza maggiore corrisponde a una

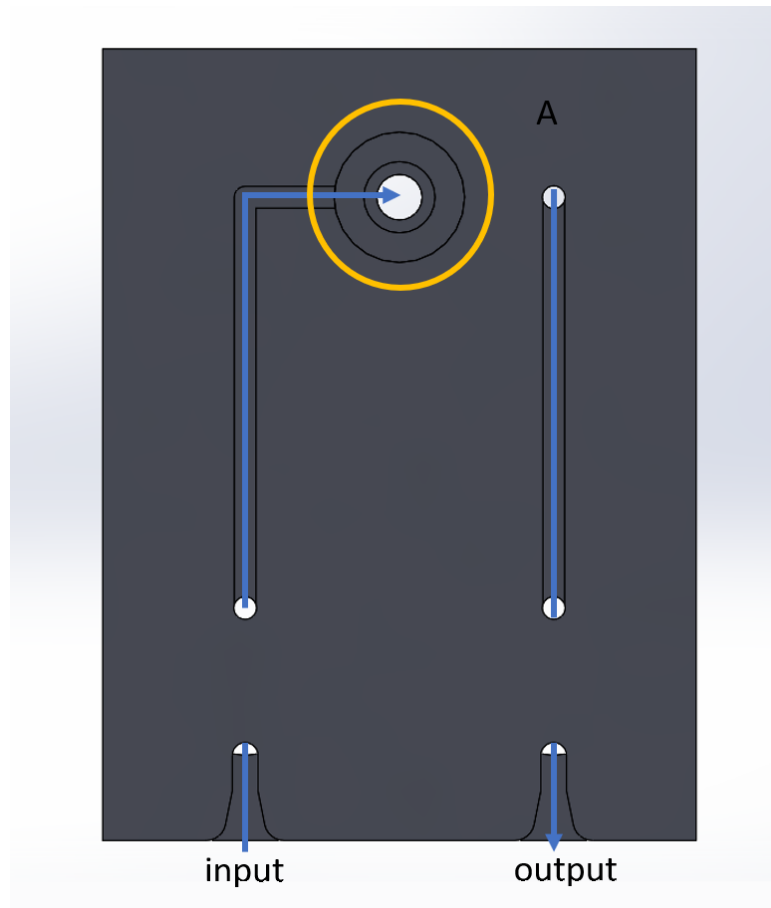
minor deformazione della valvola che porta a un non corretto funzionamento di quest'ultima. Aumentando la durezza, infatti, diminuisce l'adesione della valvola, durante la fase di chiusura, sulla superficie della sede e questo comporta perdite fluidiche indesiderate. Il rapporto della miscela gomma-ferrite è di 1:2. Una ulteriore valutazione è stata fatta variando il rapporto tra la gomma e la ferrite: se una minore quantità di ferrite corrispondeva a una minore spostamento della valvola causato dall'azione di un magnete, con una quantità maggiore non si è notato un miglioramento apprezzabile nella funzionalità di quest'ultima.

## 4.2 Cartuccia di prova

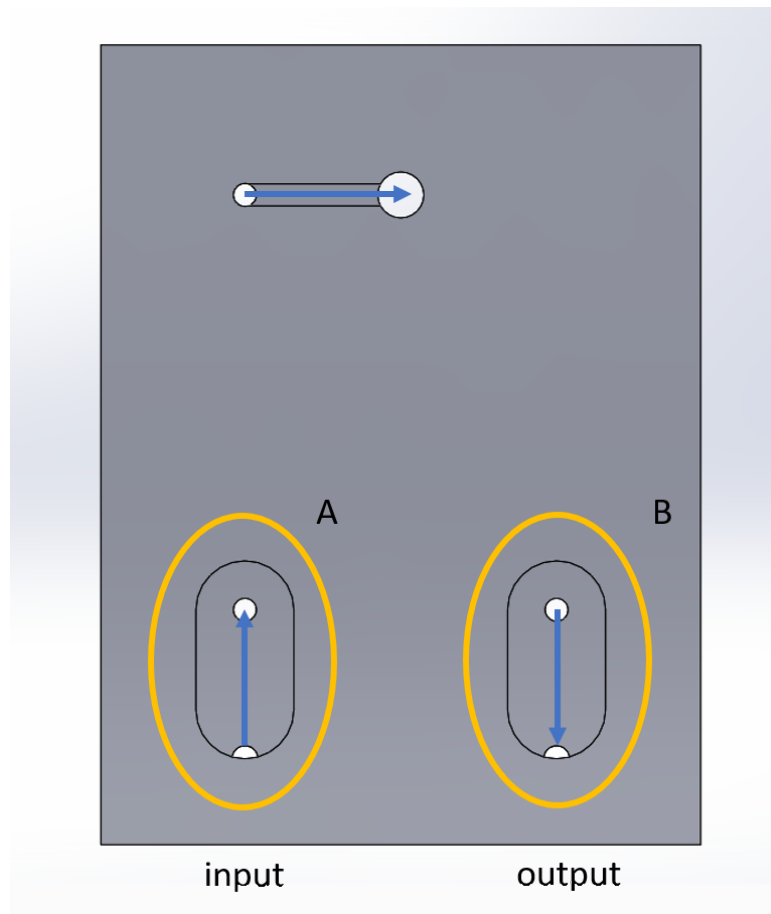
La cartuccia di prova (Figura 4.3 e Figura 4.4) creata per testare i nuovi prototipi di valvole è una versione semplificata della cartuccia monouso utilizzata per lo strumento di purificazione degli acidi nucleici. Principalmente ne condivide la forma, anche se con dimensioni ridotte (30x40 *mm*), le connessioni di input e output e il materiale con cui è realizzata. I gommini utilizzati hanno le medesime forme e dimensioni di quelli presenti nella cartuccia originale. Il materiale usato per la realizzazione della cartuccia di prova è il policarbonato ed è stato lavorato utilizzando la fresatrice Minitex CNC Mini-Mill GX™.

La cartuccia di prova è composta da 3 strati differenti. Il primo, quello principale, è spesso 4 *mm* e presenta, oltre alle sedi dei gommini di input (Figura 4.4) e output (Figura 4.4), anche la sede della valvola (Figura 4.3) da testare e i canali microfluidici che collegano questi 3 elementi, le cui dimensioni sono 1 *mm* (larghezza) per 0.5 *mm* (profondità). Gli altri due strati hanno le stesse dimensioni di quello principale (30x40 *mm*), ma lo spessore di 1 *mm*. La funzione di questi due strati è quella di sigillare la cartuccia di prova. La cartuccia viene chiusa dopo che al

suo interno vengono posizionati i gommini di input e output e la valvola da testare. Questi 3 strati vengono tenuti insieme grazie al processo di *bonding*.



**Figura 4.3:** Vista frontale della cartuccia di prova. In blu è evidenziato il percorso del fluido che inizia dall'input fino alla sede della valvola (A) per poi continuare sul retro della cartuccia e concludersi nella parte frontale.



**Figura 4.4:** Vista posteriore della cartuccia di prova. In blu è evidenziato il percorso del fluido dal retro della sede della valvola fino al punto in cui esso ritorna nella parte frontale della cartuccia. Nei punti A e B sono visibili le sedi dei gommini di input e output.

### 4.2.1 Processo di *bonding* termico

Il processo di *bonding* usato è stato da me ottimizzato per unire diverse parti in policarbonato; questo si compone di 3 frasi:

- 1) attivazione della superficie;
- 2) assemblaggio e allineamento;
- 3) somministrazione di calore e pressione.

La fase di attivazione con l'acetone è realizzata utilizzando uno *spin coater*. L'elemento in policarbonato è posizionato su una base all'interno dello strumento. Su questa base viene generata una pressione

negativa che ha il compito di immobilizzare la parte da lavorare. Successivamente l'elemento legato alla base dello strumento viene fatto girare a 2000 *rpm* e durante questa fase si inserisce l'acetone nello *spin coater* per effettuare questa fase di attivazione. Nella seconda fase del processo di *bonding* prima vengono inseriti gli elementi in gomma siliconata (gommini di input e output e valvola da testare) e successivamente vengono allineate le superfici degli elementi in policarbonato poco prima che questi vengano effettivamente uniti tra di loro. L'ultima fase prevede la somministrazione di calore e pressione. Il pezzo in policarbonato viene posizionato in una morsa d'acciaio che applica pressione su entrambe le superfici da unire e viene inserito in un forno a una temperatura di 130° C per 40 minuti.

Inizialmente il protocollo di *bonding* prevedeva soltanto l'ultima fase sopra descritta, ma il risultato finale non era duraturo. Aggiungendo prima la fase di attivazione, si è notato un miglioramento, dal punto di vista della durata dell'unione delle due superfici.

#### 4.2.2 Spin coater ws 650sz 6npp Lite

Lo spin coater ws 650sz 6npp Lite (Figura 4.5) realizzato da Laurell viene utilizzato per wafer con un diametro massimo di 150 *mm* o per elementi che hanno dimensioni massime di 127x127 *mm*. L'oggetto della lavorazione viene posizionato all'interno dello strumento. Sulla base su cui poggia viene generata una pressione negativa che ancora l'oggetto alla base dello spin coater. Una volta chiuso lo strumento, utilizzando l'apposito coperchio, è possibile far partire la lavorazione. La rotazione, che arriva fino a 12000 *rpm*, e la relativa durata vengono impostate dall'utente. I prodotti chimici inseriti durante la lavorazione vengono raccolti in un serbatoio per reagenti esausti.



*Figura 4.5: Spin coater ws 650sz 6npp Lite.*

### 4.3 Banco di prova

Una volta determinato il materiale e i metodi di fabbricazione con cui realizzare la valvola magnetica, si è scelto di creare un banco di prova (Figura 4.6) che valutasse la bontà di questo nuovo prototipo. Precedentemente per testare nuovi prototipi era necessario creare una cartuccia completa e avviare un protocollo usando il sistema di estrazione. Con il banco di prova si vuole avere la possibilità di creare una cartuccia contenente gli elementi essenziali per far funzionare il prototipo e di poterne valutare l'affidabilità. Questo strumento e l'estrattore descritto nel capitolo precedente funzionano in modo simile.

In Figura 4.7 è rappresentato lo schema a blocchi del banco di prova. La peristaltica, connessa al motore stepper RS Pro Hybrid Stepper Motor [14], genera una pressione negativa che permette ai fluidi di muoversi all'interno della cartuccia di prova. Prodotta da Williamson è realizzata con un tubo in norprene con calibro di 0.8 *mm* e muove

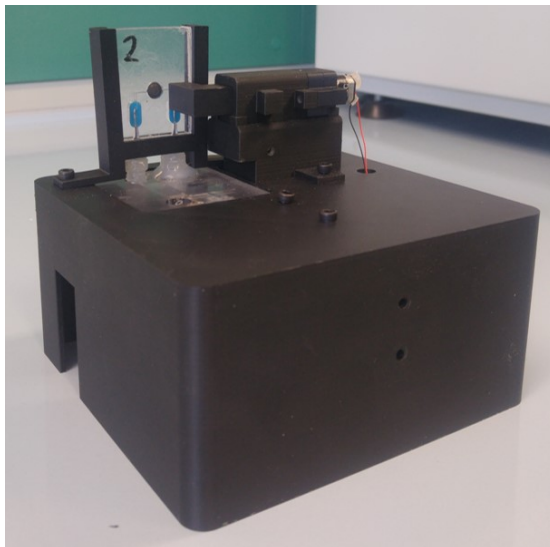
0.02 *ml/rivoluzione*. Esattamente come nell'estrattore di acidi nucleici EASY, due aghi, in posizione verticale, vengono utilizzati per connettere la cartuccia, descritta nel paragrafo 4.2, allo strumento. L'attuatore magnetico, la cui struttura è realizzata in Nylon 12, è utilizzato per testare il movimento della valvola nella propria sede. Alla fine di ogni esperimento questo attuatore si muove in direzione della valvola fino a che, la forza generata dal magnete, non la apre. Tutti gli elementi realizzati in Nylon 12 sono stati creati utilizzando la stampante 3D Stratasys Fortus FDM 360mc.

La base di questo strumento è stata realizzata in policarbonato e lavorata utilizzando la fresatrice Minitex CNC Mini-Mill GX™. Questo elemento che ha dimensioni 50x50 *mm* è composto da due lastre dello spessore di 4 *mm* unite tra loro utilizzando il *bonding* termico descritto nel paragrafo precedente. Inizialmente i due strati che componevano questo elemento erano tenuti insieme tramite l'utilizzo di 7 viti, come accadeva per le cartucce usate nel sistema di estrazione descritto nel capitolo 3. Una volta ottimizzato il processo di *bonding* termico si è scelto di utilizzare questo metodo anche sulla base in policarbonato del banco di prova. Su questa base (Figura 4.8), oltre ai canali necessari a permettere il passaggio di fluidi, è presente anche un canale che collega l'output della base con due elementi diversi: un sensore di pressione (TruStability® Board Mount Pressure Sensors [17]), utilizzato nelle prove sperimentali per valutare la tenuta della valvola, e con una elettrovalvola prodotta da dolomite che è utilizzata per riportare il sistema a pressione atmosferica nel caso in cui l'attuatore non riesca ad aprire la valvola magnetica a termine della prova. Come riportato in Figura 4.9 entrambi questi elementi sono posizionati sulla parte inferiore della base. Lungo questo canale che collega l'output con il sensore di pressio-

ne e la valvola dolomite è stato scavato un serbatoio che ha lo scopo di proteggere il sensore di pressione dall'entrare in contatto con eventuali liquidi che ne comprometterebbero il funzionamento.

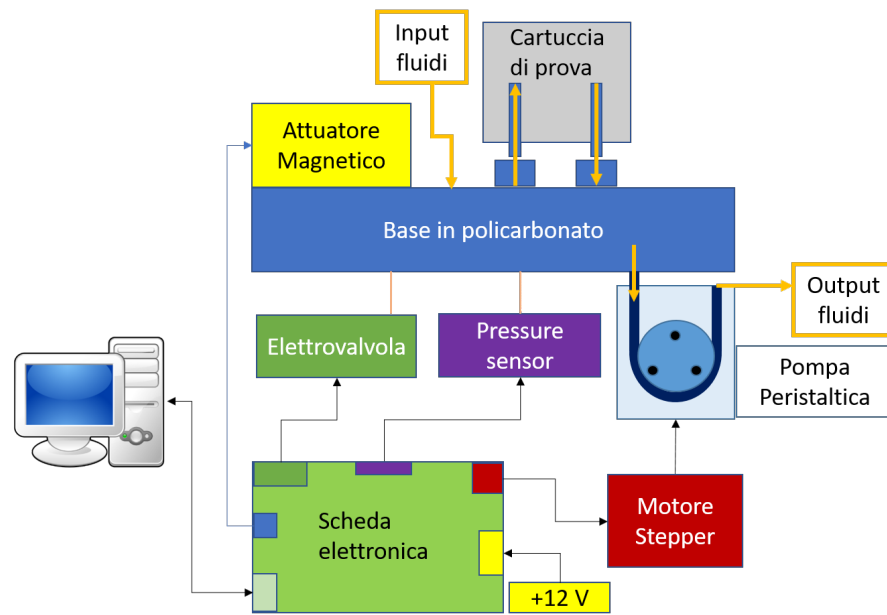
La base in policarbonato è inserita a sua volta in un guscio. Questo guscio, realizzato sempre in Nylon 12, contiene tutti gli elementi dello strumento (base in policarbonato, motore stepper connesso alla peristaltica, e la scheda elettronica).

La scheda elettronica (Figura 4.10) è caratterizzata dalla presenza di un microcontrollore (STM32F103RBT6), utilizzato per muovere gli attuatori dello strumento e per leggere i dati provenienti dal sensore di pressione. Oltre a questo elemento sono presenti le connessioni per collegare la board elettronica con il motore stepper, con il sensore di pressione e con l'attuatore magnetico. La scheda, inoltre, presenta anche una microusb, che permette di interfacciare lo strumento con il computer tramite l'utilizzo di un apposito software, e il circuito di alimentazione che fornisce +12 V all'intero strumento.

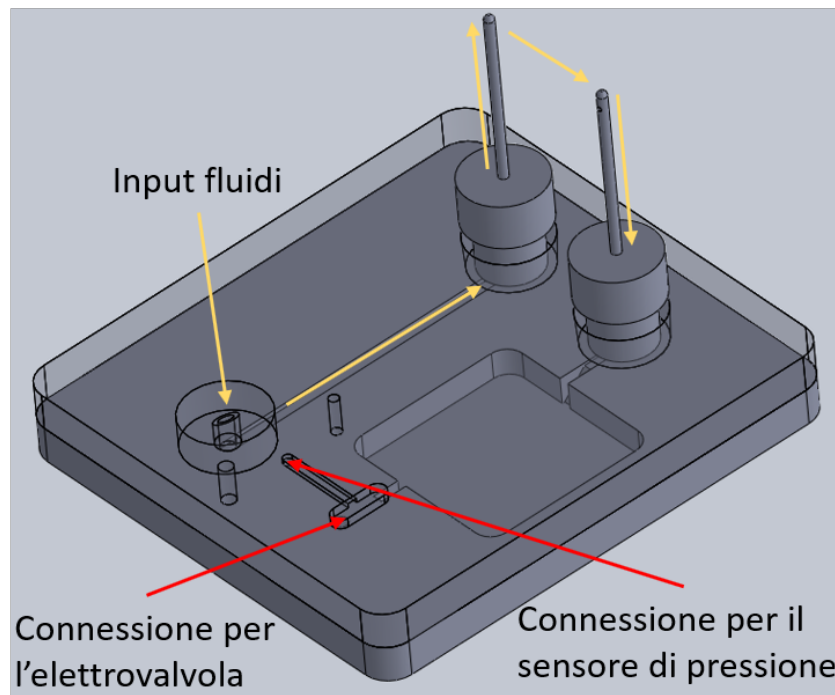


**Figura 4.6:** Banco di prova.

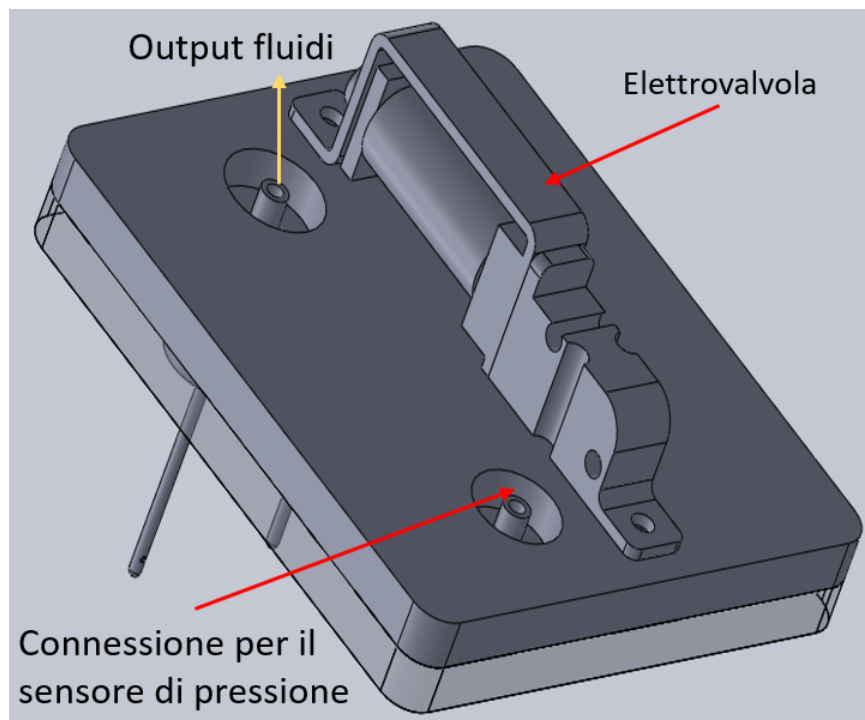




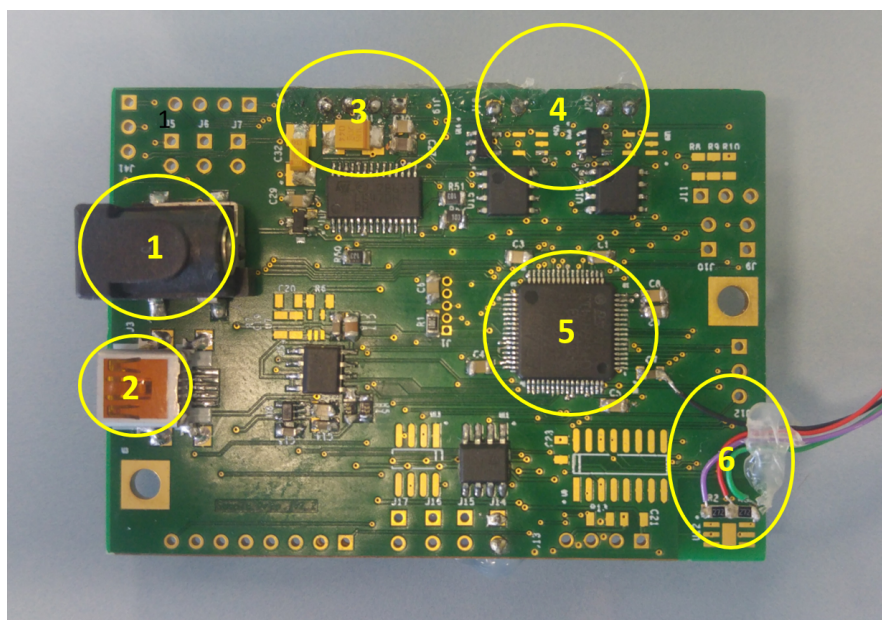
**Figura 4.7:** Diagramma a blocchi del banco di prova.



**Figura 4.8:** Vista superiore della base in polycarbonato. In giallo è evidenziato la direzione dei fluidi.



**Figura 4.9:** Vista inferiore della base in policarbonato.



**Figura 4.10:** Scheda elettronica con i suoi componenti: 1) Alimentazione, 2) Microusb, 3) Connessioni per il motore stepper, 4) Connessioni per l'attuatore magnetico, 5) Mirocontrollore, 6) Connessioni per il sensore di pressione.

### 4.3.1 Stratasys Fortus FDM 360mc

La Stratasys Fortus FDM 360mc [16] (Figura 4.11) è una stampante 3D che sfrutta la modellazione a deposizione fusa (FDM dall'inglese *fused deposition modelling*). Il materiale utilizzato da questo strumento è il Nylon 12 e lo spessore di ogni singolo strato depositato è di 0.178 mm. Il materiale di supporto utilizzato è l'SR-110 ed è solubile in acqua. La stampante 3D scalda l'ugello dove fuoriesce il Nylon 12 e procede con il deposito del polimero. Nei punti in cui la struttura che viene costruita necessita di sostegno, viene depositato l'SR-110 dopo essere stato riscaldato.



**Figura 4.11:** Stratasys Fortus FDM 360mc.

## 4.4 Software

Il software è stato realizzato per poter interagire in maniera efficace con il banco di prova. Il suo compito principale è quello di leggere, visualizzare e salvare i dati provenienti dal sensore di pressione. Una volta eseguito, il software richiede di essere connesso allo strumento inserendo il numero di porta COM alla quale è connesso. Compiuta questa operazione è possibile scegliere se eseguire un esperimento completo oppure singole azioni. Se si sceglie di compiere un esperimento (Figura 4.12) comparirà un menu in cui è possibile decidere i parametri del protocollo. Oltre al nome dell'esperimento è possibile impostare il valore più alto e più basso di pressione (espresso in atmosfere) che si dovrà raggiungere durante l'esperimento e il passo (numero di acquisizioni) con cui il nostro sistema, partendo dal valore più alto di pressione impostato, raggiungerà il valore quello più basso. Se, invece, si sceglie di eseguire una sola acquisizione, la pressione target usata sarà quella inserita nella casella "P max". Una volta valutata l'idoneità dei parametri inseriti cliccando sul tasto "Controllo Parametri" sarà possibile eseguire l'esperimento premendo il tasto "Start". Verrà aperta quindi una nuova finestra (Figura 4.13) che mostrerà i parametri scelti e visualizzerà i dati in tempo reale forniti dal sensore di pressione e la velocità di rotazione della pompa peristaltica. I dati visualizzati, mostrati in Figura 4.14, sono *step/s*, pressione target e il valore di pressione letto dal sensore. Per ogni acquisizione effettuata durante l'esperimento la pressione target cambierà secondo la seguente legge:

$$P_{Target} = P_{Max} - \frac{(P_{Max} - P_{Min})}{n_{acq} - 1}(i - 1)$$

Dove

- 1)  $P_{Target}$  è la pressione che il sistema deve raggiungere alla  $i$ -esima iterazione;
- 2)  $P_{Max}$  è la pressione che il sistema deve raggiungere alla prima iterazione;
- 3)  $P_{Min}$  è la pressione che il sistema deve raggiungere all'ultima iterazione;
- 4)  $n_{acq}$  è il numero di acquisizioni con cui il sistema passa da  $P_{Max}$  a  $P_{Min}$ .
- 5)  $i$  è il numero di acquisizione effettuate durante un singolo esperimento.

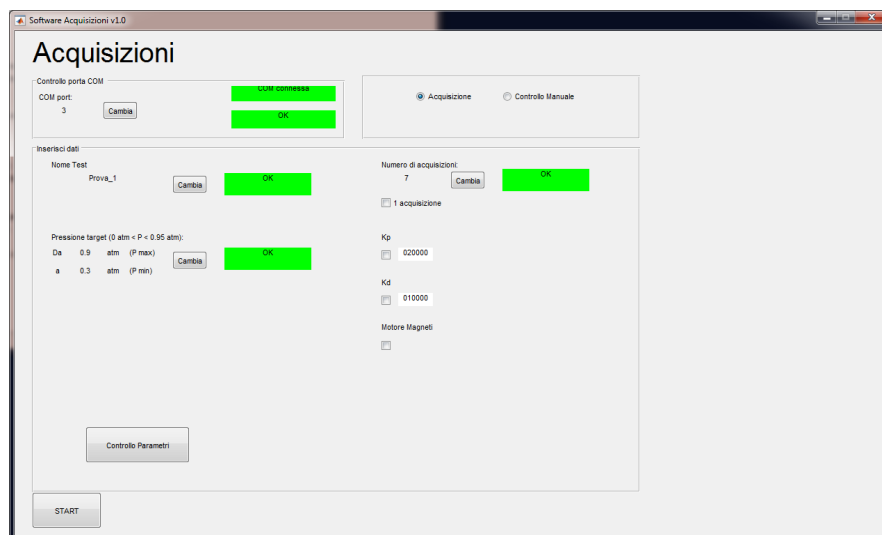
Ogni acquisizione dura il tempo necessario al sistema di raggiungere la pressione desiderata e una volta raggiunta si protrae per altri 100 secondi in modo da ottenere un numero sufficiente di campioni da poter analizzare. La frequenza di campionamento è di 10 Hz. Per raggiungere la pressione target la velocità della peristaltica viene modulata utilizzando l'algoritmo PID, che verrà spiegato nel dettaglio nel prossimo paragrafo. La massima velocità raggiunta dalla pompa peristaltica è 1500 *step/s*, una velocità maggiore provoca il blocco della pompa. Se si sceglie invece l'opzione "Controllo Manuale" (Figura 4.15) sarà possibile scegliere tra le seguenti azioni:

- 1) Scegliere la velocità di rotazione della peristaltica da 0 a 10 (dove ogni valore aumenta la velocità di rotazione di 150 *step/s*), il senso della rotazione e se fermare il motore.
- 2) Scegliere se aprire o chiudere l'elettrovalvola presente sulla base in policarbonato dello strumento.
- 3) Modificare il valore della costante proporzionale e derivativa dell'algoritmo PID.
- 4) Scegliere la pressione target e farla raggiungere al sistema trami-

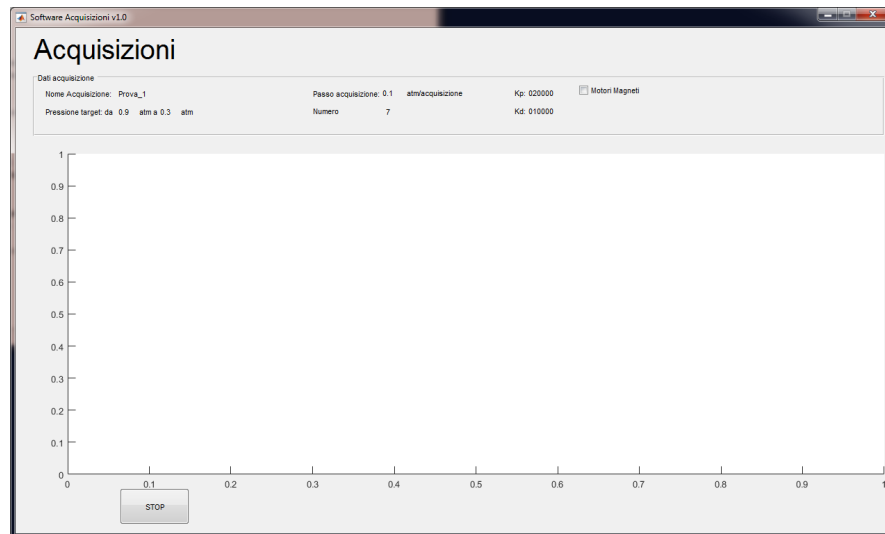
te la pressione del tasto "Start" (è possibile fermare questa'azione in qualsiasi momento tramite l'apposito pulsante di stop)

5) Leggere i dati provenienti dal sensore di pressione (premendo il tasto start). I dati saranno visualizzati nel riquadro a fianco di queste opzioni.

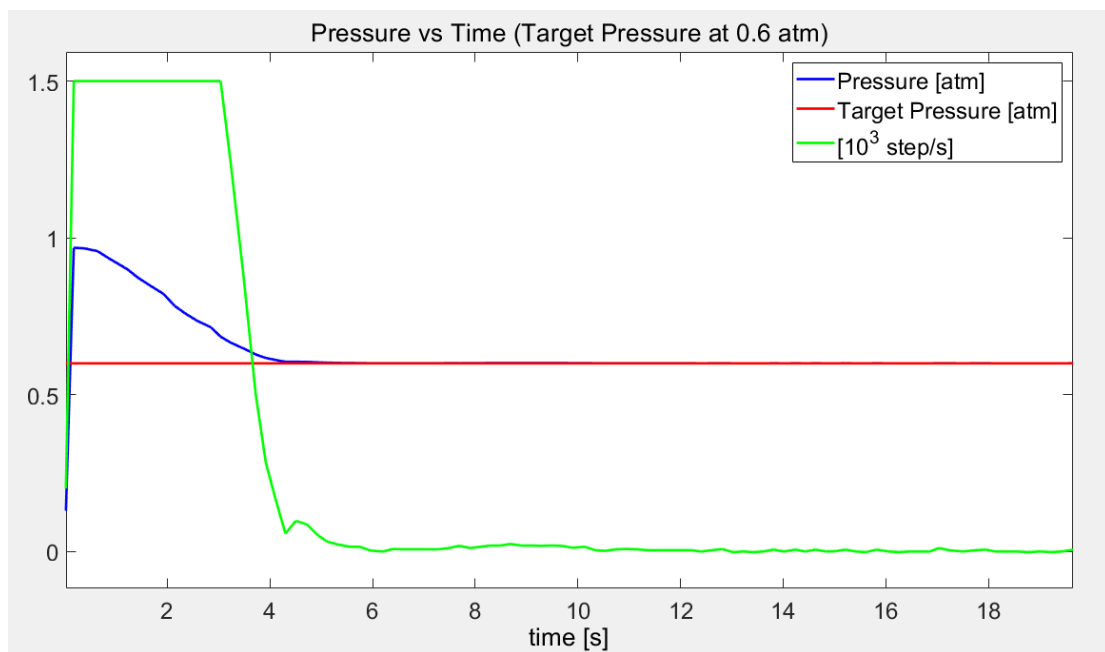
6) Controllare l'attuatore magnetico. E' possibile scegliere tra il "controllo in tensione" (una volta attivato, utilizzando il tasto "forward" o "backward", l'attuatore si muoverà fino a che l'utente non preme il tasto "Stop") o il "Controllo durata" (l'attuatore, premendo il tasto "forward" o "backward", si muoverà per il valore, espresso in secondi, scelto dall'utente)



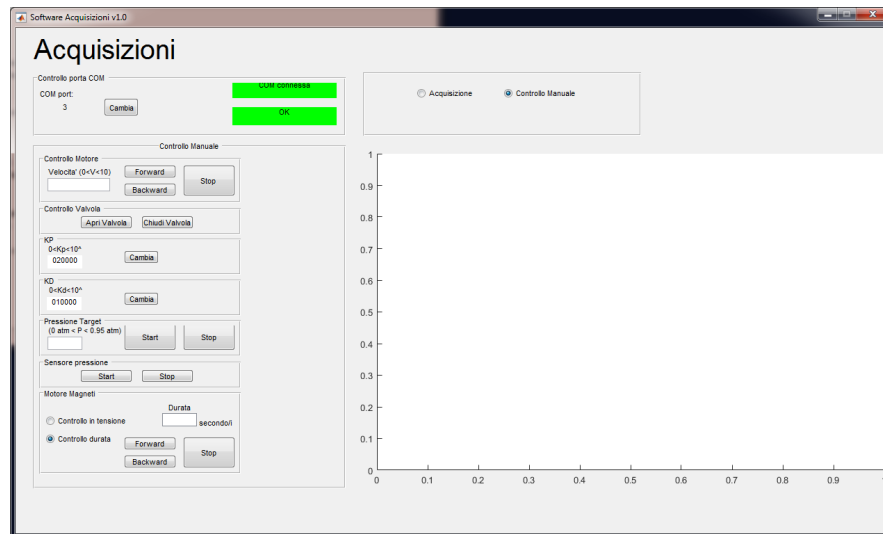
**Figura 4.12:** Scelta dei parametri prima di eseguire un'esperimento.



**Figura 4.13:** Software durante l'esecuzione di un esperimento.



**Figura 4.14:** Esempio di output grafico visualizzato dal software.



**Figura 4.15:** Opzioni fornite dal software per il controllo dei singoli elementi dello strumento.

#### 4.4.1 Controllo Proporzionale-Integrale-Derivativo

Il controllo Proporzionale-Integrale-Derivativo (PID), mostrato in Figura 4.16, è un sistema a retroazione negativa che ha un largo utilizzo nei sistemi di controllo. L'algoritmo prende in ingresso il valore di un processo e lo confronta con uno di riferimento. La differenza che si ottiene costituisce, quindi, un errore che viene utilizzato per ottenere la variabile di output del processo. L'errore viene processato in tre modi diversi che vengono sommati algebricamente tra loro per ottenere l'output del sistema. La formula dell'algoritmo PID è la seguente:

$$U = u_P + u_I + u_D$$

Dove

1)  $U$  è l'output del sistema

2)

$$u_P = K_P e$$



Rappresenta l'azione proporzionale e si ottiene moltiplicando l'errore ( $e$ ) con una opportuna costante ( $K_P$ ).

3)

$$u_I = K_I \int e(t) dt$$

Rappresenta l'azione integrale e si ottiene moltiplicando l'integrale dell'errore per una costante ( $K_I$ ). Questo termine tiene memoria dei valori passati dell'errore ed è utilizzato per portare il sistema al valore di riferimento quando l'azione proporzionale risulta nulla.

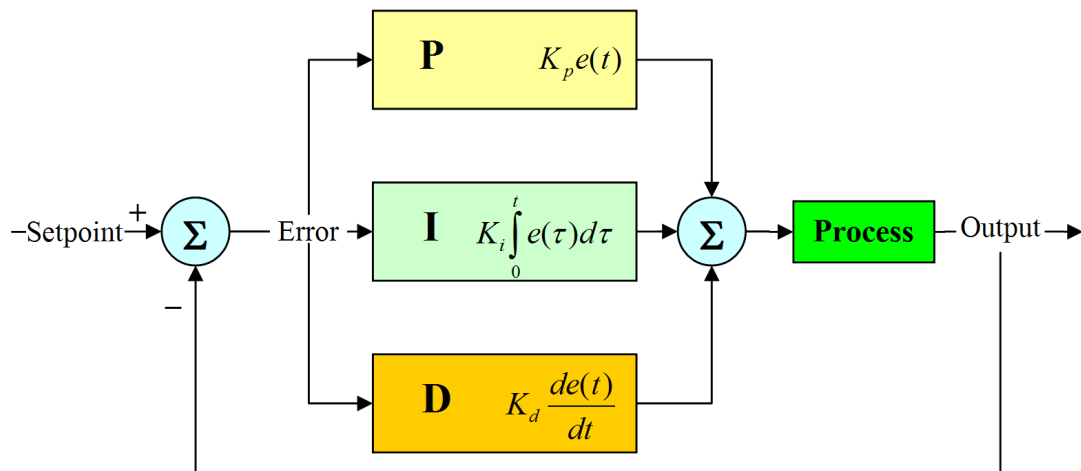
4)

$$u_D = K_D \frac{de}{dt}$$

Rappresenta l'azione derivativa e si ottiene moltiplicando la derivata dell'errore per una costante ( $K_D$ ). Questo termine viene utilizzato per compensare l'errore quando questi cambia troppo velocemente. In questo modo si evita che l'errore diventi significativamente elevato, ciò comporterebbe un'alterazione dell'azione proporzionale e, nel caso in cui persista nel tempo, anche dell'azione integrale.

Nel banco di prova creato per testare i nuovi prototipi di valvole l'errore viene calcolato come differenza tra la pressione target decisa dall'utente e il valore di pressione letto dal sensore (entrambi i valori sono espressi in atmosfere). I coefficienti dell'algoritmo hanno i seguenti valori:  $K_P = 20000$ ,  $K_D = 10000$ ,  $K_I = 0$ . I valori delle costanti sono stati determinati tramite un *tuning* manuale. Tramite software è possibile cambiare il valore di questi due coefficienti. Questa scelta è stata presa per garantire la stabilità al sistema nel caso in cui venga cambiato qualche elemento al banco di prova. L'output del controllo PID applicato al banco di prova restituisce il valore di velocità che il motore stepper deve mantenere per ridurre l'errore tra valore di pressione target e quello letto dal sensore.

Una volta terminata la realizzazione del banco di prova e del software è stato possibile definire una procedura che ha permesso di valutare l'affidabilità dei prototipi creati.



**Figura 4.16:** Schema del controllo Proporzionale-Integrale-Derivativo.

## 5 | Risultati

Utilizzando il banco di prova e il software descritto nel capitolo precedente è stato possibile valutare l'affidabilità delle valvole magnetiche. Affinchè una valvola funzioni, quando chiusa, le perdite fluidiche devono essere il più limitate possibili. Se così non fosse la pompa peristaltica non potrebbe generare una pressione negativa sufficiente da muovere i fluidi all'interno della cartuccia.

Il parametro utilizzato per valutare l'efficacia delle valvole è quindi il flusso ( $\frac{ml}{s}$ ) medio di aria movimentata dalla pompa ad una pressione data; esso si ottiene utilizzando la seguente formula:

$$Flusso[\frac{ml}{min}] = 0.02[\frac{ml}{rev}] \cdot VelocitMedia[\frac{step}{s}] \cdot 60[\frac{s}{min}] \cdot 0.9[\frac{\circ}{step}] \cdot \frac{1}{360[\frac{\circ}{giro}]}$$

dove  $0.02[\frac{ml}{rev}]$  e  $0.9[\frac{\circ}{step}]$  sono parametri estrapolati dal *datasheet* della pompa peristaltica. Il parametro "Velocità Media", invece, è la velocità di rotazione media tenuta dalla pompa peristaltica durante l'acquisizione.

### 5.1 Affidabilità del sistema

La prima valutazione è stata effettuata cortocircuitando gli aghi di input e di output del banco di prova. Per fare questo è stata creata una

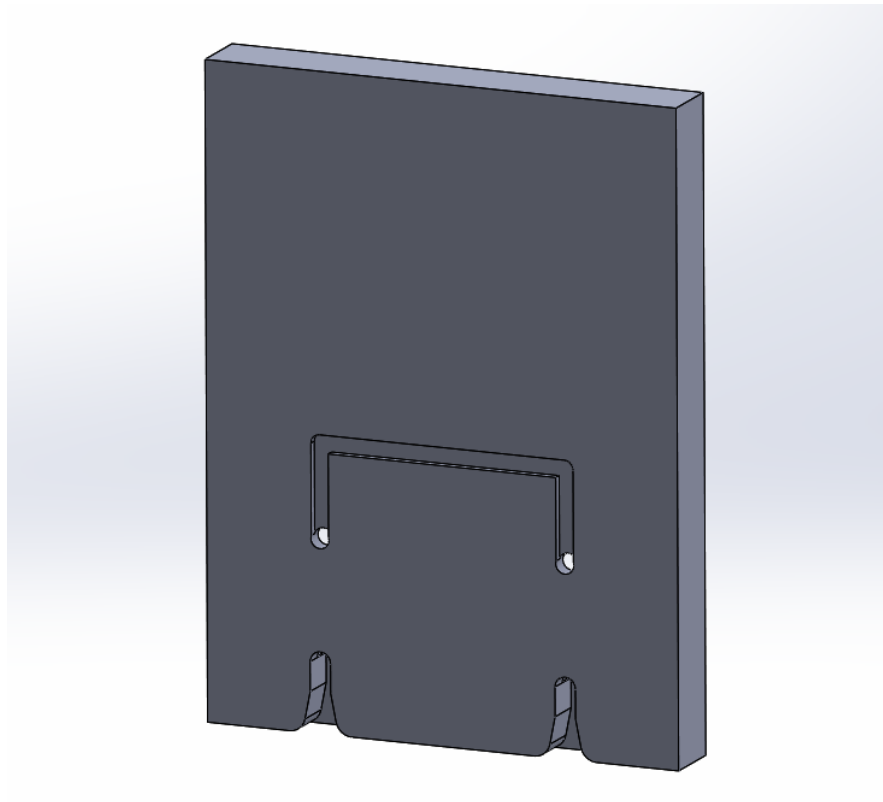
cartuccia in cui è presente solamente un canale che collega i gommini di input e output (Figura 5.1).

I risultati mostrano quindi il massimo flusso generato dalla pompa peristaltica che, collegata al motore stepper, ruota alla velocità di 1500 *step/s*. Il sistema, essendo aperto, è incapace di raggiungere i valori di pressione target designati dall'utente, rimanendo a quello di 1 *atm*. La rotazione della peristaltica a velocità massima porta quindi ad avere un flusso di 4,5 *ml/min*.

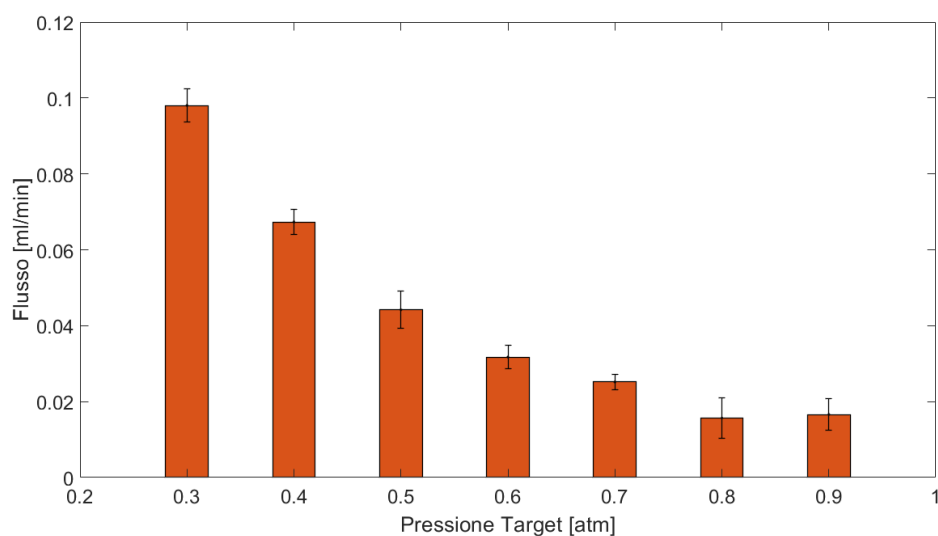
Il prossimo passo è stato quello di valutare le perdite della cartuccia di prova. Utilizzando una cartuccia con gli stessi elementi di quella precedente è stato chiuso l'input del banco di prova per simulare il flusso che si otterrebbe avendo una valvola chiusa. I risultati sono uguali a quelli dell'esperimento precedente nel quale si è valutato il flusso massimo a sistema aperto. Questi valori sono dovuti al processo di *bonding* che non sigilla il sistema nel modo corretto. L'ottimizzazione di questo processo ha portato all'aggiunta di una fase, quella di attivazione della superficie (descritta nel paragrafo 4.2.1). Dopo questa modifica è stato eseguito un nuovo esperimento con lo stesso *setup* sperimentale usato in precedenza, ma con una cartuccia che è stata trattata con il nuovo processo di *bonding* termico. I risultati sono stati ottenuti conducendo 10 esperimenti sulla cartuccia, per ogni esperimento sono state eseguite 7 acquisizioni nel range di pressioni che va da 0.9 *atm* a 0.3 *atm*. Questo range è stato deciso in quanto 0.3 *atm* è il valore di pressione minimo raggiunto dal sistema di estrazione EASY. Nel grafico in Figura 5.2 sono mostrati i risultati. Questi valori differiscono rispetto a quelli ottenuti con il processo di *bonding* non ottimizzato. Questo mostra come l'aggiunta della fase di attivazione nel processo di *bonding* termico abbia portato un miglioramento nel sigillare la cartuccia dall'ambiente

esterno.

Grazie a questi due esperimenti effettuati con il canale di input del banco di prova, prima aperto e poi chiuso, si sono ottenuti i valori limite del nostro sistema.



**Figura 5.1:** Cartuccia di prova caratterizzata dalla sola presenza di un canale che collega l'input con l'output.



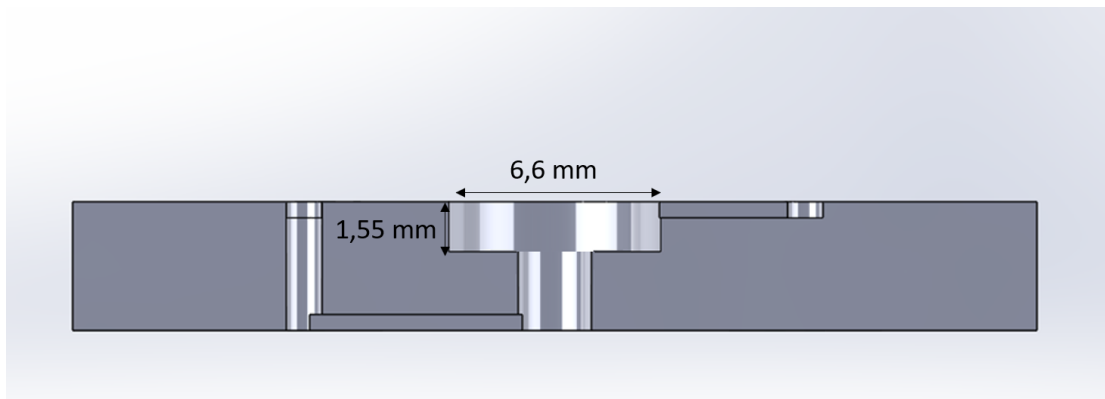
**Figura 5.2:** Il grafico mostra i dati relativi all'esperimento in cui, per la cartuccia, è stato utilizzato il processo di bonding termico ottimizzato.

**Tabella 5.1:** Risultati relativi alla Figura 5.2

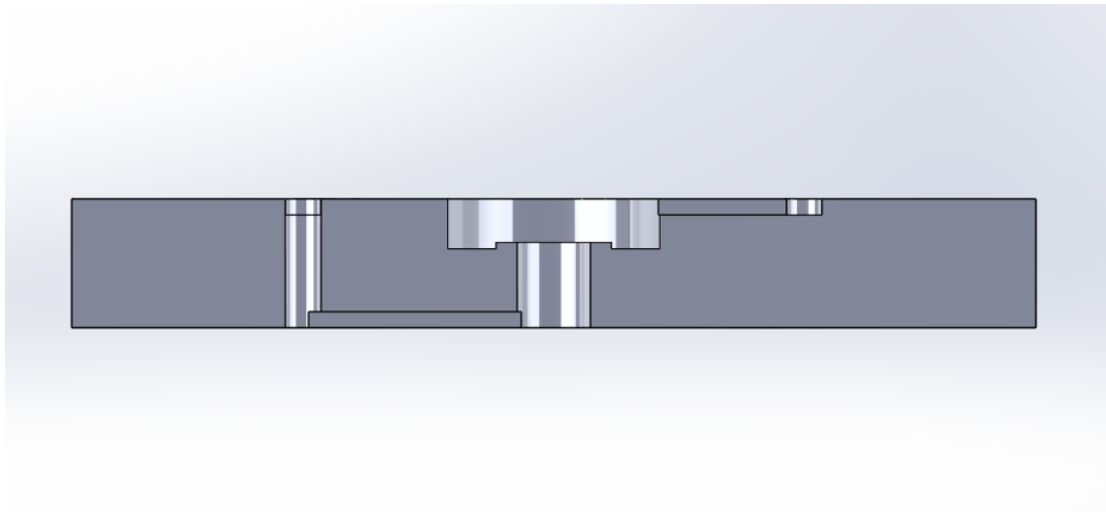
Pressione Target [atm]	Flusso Medio [ml/min]	Std. Dev.
0.9	0.0166	0.0041
0.8	0.0157	0.0052
0.7	0.0252	0.0019
0.6	0.0317	0.0030
0.5	0.0442	0.0049
0.4	0.0673	0.0033
0.3	0.0980	0.0043

## 5.2 Valutazione dei prototipi delle valvole magnetiche

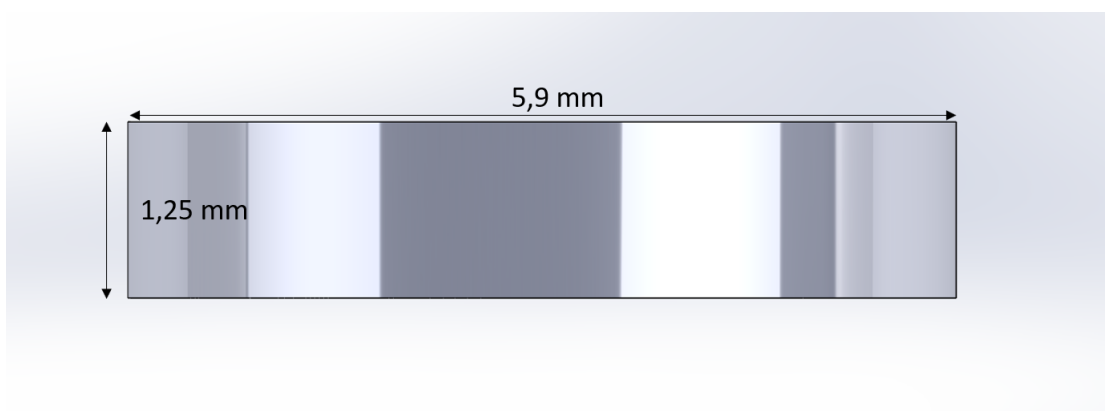
Per valutare l'affidabilità delle valvole magnetiche è stata usata la cartuccia di prova, descritta nel capitolo precedente. I prototipi così creati presentano due diverse sedi (mostrate in Figura 5.3 e in Figura 5.4) e due diverse forme dell'inserito magnetico: una cilindrica (Figura 5.5) e una a tronco-conica (Figura 5.6).



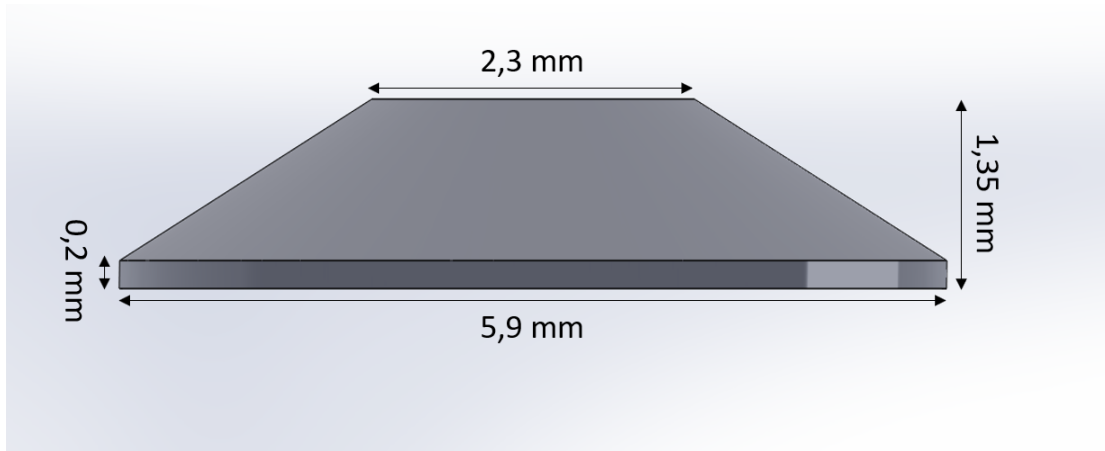
**Figura 5.3:** Sezione della sede della valvola caratterizzata da una superficie piatta



**Figura 5.4:** Sezione della sede della valvola caratterizzata dalla presenza di uno scalino.



**Figura 5.5:** Vista laterale della valvola cilindrica.



**Figura 5.6:** vista laterale della valvola tronco-conica.

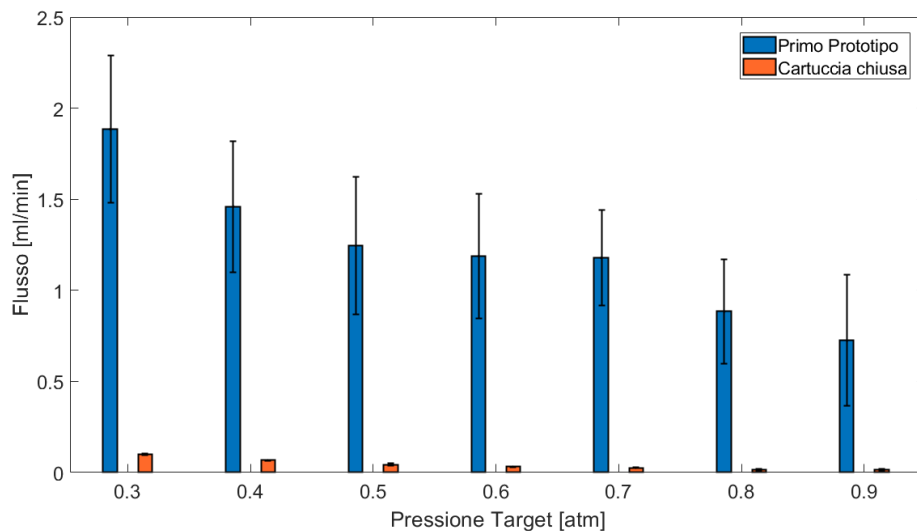
### 5.2.1 Primo prototipo

Il primo prototipo di valvola magnetica presenta la sede piatta (Figura 5.3) e l'inserto cilindrico (Figura 5.5). Su questo prototipo sono stati condotti 10 esperimenti comprendenti ognuno 7 acquisizioni lungo il *range* di pressioni che va da 0.9 atm a 0.3 atm. I risultati sono mostrati in Figura 5.7. Questi valori sono lontani da quelli ottenuti nel valutare il sistema chiuso, questo implica che la valvola presenta delle perdite.

**Tabella 5.2:** Risultati relativi agli esperimenti condotti sul primo prototipo

Pressione Target [atm]	Flusso Medio [ml/min]	Std. Dev.
0.9	0.7252	0.3584
0.8	0.8844	0.2857
0.7	1.1776	0.2615
0.6	1.1870	0.3421
0.5	1.2450	0.3762
0.4	1.4587	0.3612
0.3	1.8840	0.4035





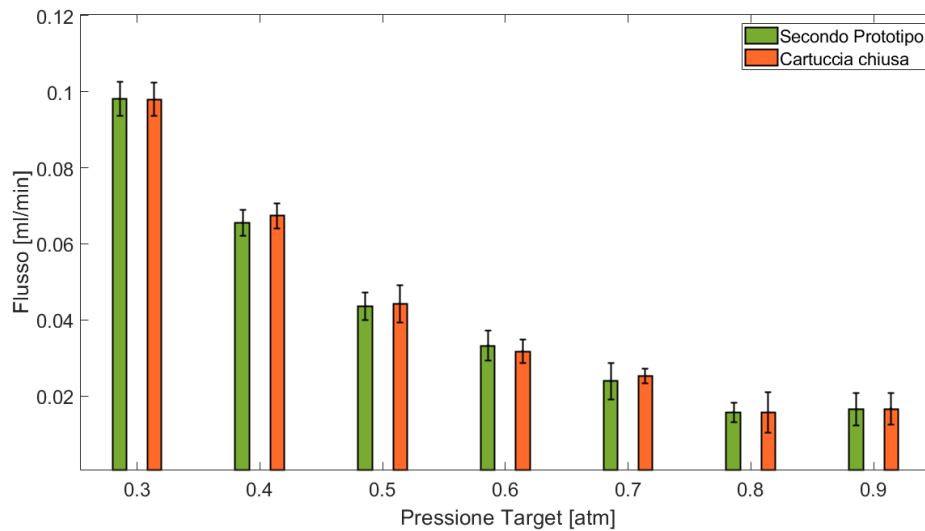
**Figura 5.7:** Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede piatta e inserto cilindrico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output.

### 5.2.2 Secondo prototipo

Nel tentativo di migliorare il sistema valvole-sede si è deciso di portare una modifica nella sede delle valvole. Come mostrato in Figura 5.4 è stato aggiunto uno scalino alto  $0.2\text{ mm}$ . Con questa modifica, all'inserto cilindrico è sempre permesso muoversi lungo l'asse verticale, ma la forza di chiusura è esercitata unicamente sulla superficie dello scalino; avendo quindi una superficie di chiusura limitata, a parità di forza, la pressione di chiusura esercitata dal campo magnetico è maggiore.

Anche per questo prototipo è stata utilizzata la seguente procedura di analisi: 10 esperimenti da 7 acquisizioni ciascuno lungo il *range* di pressioni che va da  $0.9\text{ atm}$  a  $0.3\text{ atm}$ . I risultati mostrati in Figura 5.8 indicano come tale modifica abbia risolto il problema della perdita di pressione riscontrato nel primo prototipo con una ripetibilità del 30%. Questo significa che nel 70% dei casi la valvola non chiude correttamente il circuito e tale problema è dovuto al difficile accoppiamento delle

superfici sede-inserto, in quanto il campo magnetico di chiusura, non sempre perfettamente perpendicolare all'inserto, non ne permette un perfetto allineamento.



**Figura 5.8:** Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede rialzata e inserto cilindrico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output.

**Tabella 5.3:** Risultati relativi agli esperimenti condotti sul secondo prototipo

Pressione Target [atm]	Flusso Medio [ml/min]	Std. Dev.
0.9	0.0164	0.0042
0.8	0.0156	0.0025
0.7	0.0238	0.0048
0.6	0.0332	0.0039
0.5	0.0435	0.0035
0.4	0.0655	0.0033
0.3	0.0980	0.0044

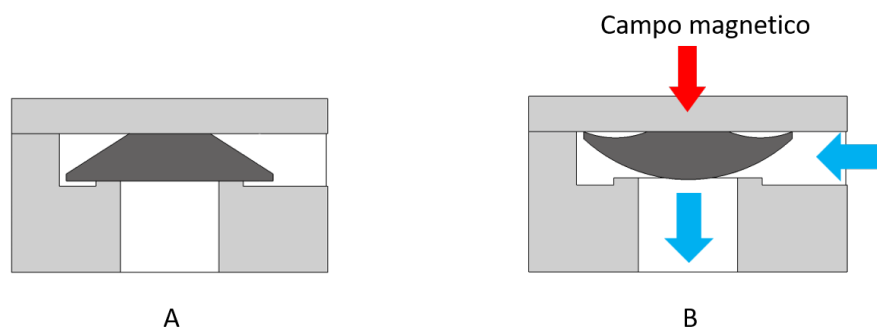
### 5.2.3 Terzo prototipo

Un'ulteriore modifica per migliorare la ripetibilità del sistema è stata apportata cambiando la forma dell'inserto della valvola. E' stato realizzato un inserto tronco-conico (Figura 5.6) posizionato nella sede descritta nel secondo prototipo (Figura 5.9).

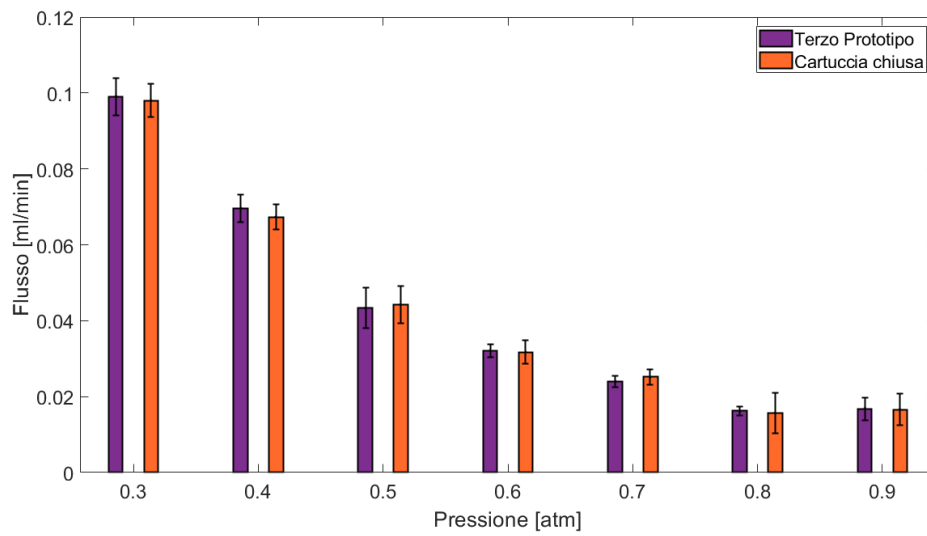
Questa versione presenta una funzionalità diversa, in quanto l'inserto non ha la possibilità di muoversi lungo l'asse  $y$  e in assenza di forze magnetiche la valvola risulta chiusa. L'apertura della valvola è ottenuta applicando una forza magnetica che modifica la forma dell'inserto permettendo il passaggio di fluidi (Figura 5.10). Applicando la precedente procedura di *test* mostrano come nel caso precedente bassi valori di perdite (Figura 5.11), ma, al contrario del secondo prototipo, la ripetibilità è del 100%.



**Figura 5.9:** Esempio di cartuccia di prova per testare il terzo prototipo.



**Figura 5.10:** Movimento dell'inserto quando è sottoposto a una forza magnetica.



**Figura 5.11:** Risultati degli esperimenti condotti sulla valvola con sede rialzata e inserto tronco-conico messi a confronto con quelli ottenuti nell'esperimento svolto sulla cartuccia che isola l'input dall'output.

**Tabella 5.4:** Risultati relativi agli esperimenti condotti sul terzo prototipo

Pressione Target [atm]	Flusso Medio [ml/min]	Std. Dev.
0.9	0.0168	0.0029
0.8	0.0162	0.0011
0.7	0.0240	0.0014
0.6	0.0320	0.0017
0.5	0.0433	0.0054
0.4	0.0696	0.0035
0.3	0.0990	0.0048

# 6 | Conclusioni e sviluppi futuri

## 6.1 Conclusioni

In questo lavoro di tesi ho descritto un sistema, sviluppato da STMicroelectronics, che ha l'obiettivo di integrare all'analisi di real-time PCR, l'estrazione di acidi nucleici. Uno degli obiettivi di questo strumento è quello di eseguire una procedura di estrazione in modo completamente autonomo, ma trovandosi ancora allo stadio prototipale non è in grado di effettuarla. L'estrattore è composto da due parti: una è lo strumento vero e proprio, che contiene tutti i componenti per eseguire il protocollo, mentre l'altra è la cartuccia monouso, che è l'oggetto nel quale avvengono le reazioni. Questo elemento è composto da due strati in policarbonato e vengono tenuti insieme tra loro tramite l'utilizzo di viti. Oltre ai serbatoi in cui avvengono le reazioni, e le connessioni di input e output sono presenti 3 valvole: una di cera, che si scioglie al termine della procedura per raccogliere l'eluato, e due valvole a vite, azionate manualmente, che vengono utilizzate per spostare i reagenti all'interno della cartuccia. Il mio lavoro è stato focalizzato sulla cartuccia monouso.

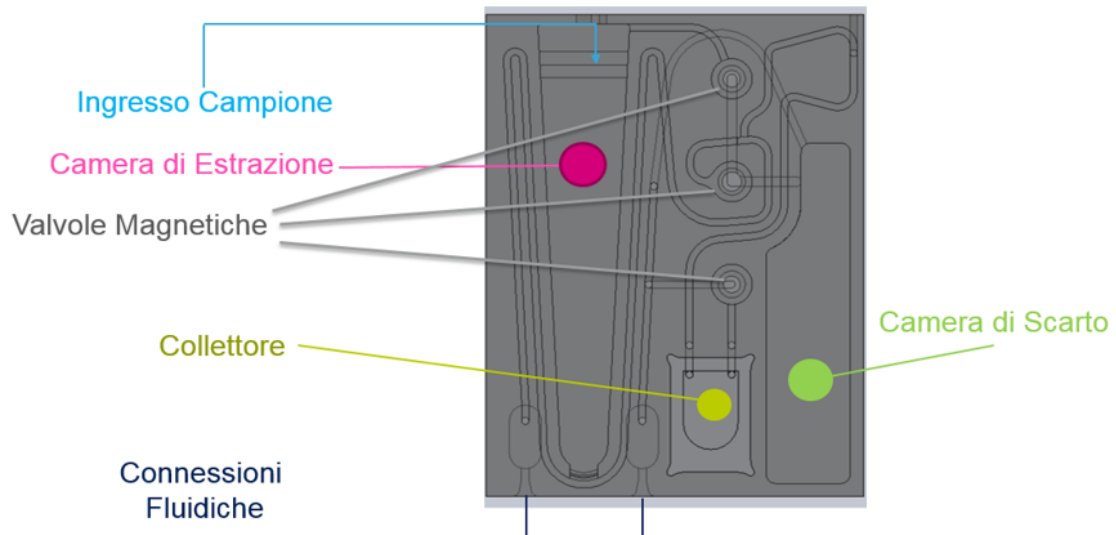
Mi sono occupato, in particolar modo, dell'ottimizzazione di un processo di *bonding* termico, usato per unire due strati in policarbonato. Questa procedura inizialmente prevedeva l'allineamento delle superfici

da unire e la successiva somministrazione di calore e pressione. Dopo numerosi tentativi, ho identificato un nuovo passaggio che è stato inserito in questo processo: l'"attivazione della superficie". Questo passaggio, da effettuare prima degli altri sopra descritti, consiste nel distribuire, in modo uniforme, uno strato di acetone sulle superfici da unire. Questo ha permesso di ottenere un'unione più duratura e performante rispetto a prima, evitando di incorrere in perdite di reagenti o elementi biologici nel mondo esterno.

Un'altro elemento della cartuccia, a cui mi ho dedicato tempo per cercare di migliorarlo, è la valvola a vite. Ho sviluppato e testato diversi prototipi per ottenere un'apertura automatizzata della valvola. La scelta è ricaduta su una valvola suscettibile alla forza magnetica. La sede della presenta uno scalino, mentre l'inserito, realizzato con una miscela di gomma siliconica e ferrite, ha una forma tronco-conica. L'inserito, inoltre, non può muoversi lungo l'asse  $y$ . In assenza di forze esterne la valvola risulta, quindi, chiusa. Applicando una forza magnetica l'inserito si deforma, permettendo il passaggio di fluidi. Questo prototipo ha permesso di eliminare l'azione umana ogni volta che si voleva aprire o chiudere la valvola

E' stata realizzata una cartuccia (Figura 6.1) sulla quale è stata utilizzata la procedura ottimizzata di *bonding* termico e che integra il nuovo prototipo di valvole magnetiche. Oltre alle due valvole magnetiche, utilizzate per muovere i fluidi all'interno di cartuccia, ne è stata aggiunta una terza. Questa valvola, che sostituisce la precedente in cera, ha lo scopo di aprire il canale che collega la camera di reazione con il collettore. Il collettore è un piccolo serbatoio nel quale è presente un chip in silicio, per il controllo dei cicli termici, e sei camere che precedentemente sono state precaricate con i reagenti necessari per rea-

lizzare un'analisi PCR. Nel collettore viene quindi convogliato l'eluato che verrà analizzato tramite PCR.



**Figura 6.1:** Nuova cartuccia monouso utilizzata nel sistema di estrazione e analisi.

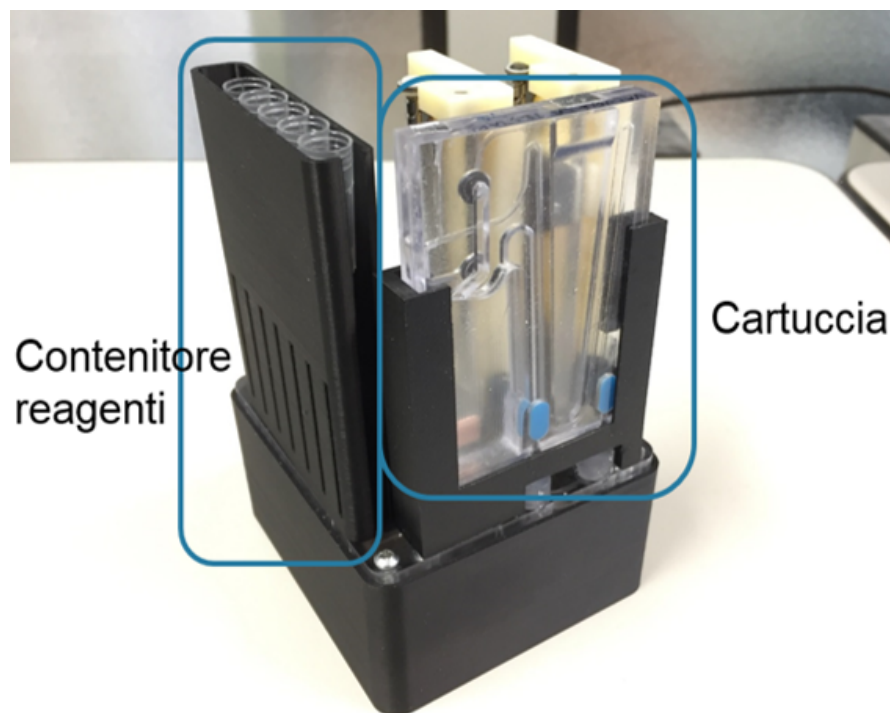
## 6.2 Sviluppi futuri

Lo strumento di estrazione (Figura 6.2) presenta ancora alcuni punti da migliorare. Uno di questi, riguarda le elettrovalvole utilizzate sullo strumento. Si sta studiando un modo in cui possano essere sostituite con le valvole magnetiche create e testate durante in questo lavoro di tesi. Questa sostituzione porterebbe alcuni vantaggi. Le dimensioni delle valvole magnetiche sono inferiori rispetto alle elettrovalvole utilizzate. Questa sostituzione potrebbe portare a ripensare il *design* dello strumento e a renderlo ancora più compatto. Un altro aspetto riguarda il costo delle elettrovalvole. Questi elementi hanno un prezzo elevato, sostituendoli con le valvole magnetiche si abbasserebbero i costi di produzione dello strumento. Gli svantaggi riguardanti questa sostituzione sono da ricercare nella tenuta delle valvole magnetiche che risulta inferiore rispetto quella delle elettrovalvole, pur non impedendo il corretto

svolgimento del protocollo di estrazione.

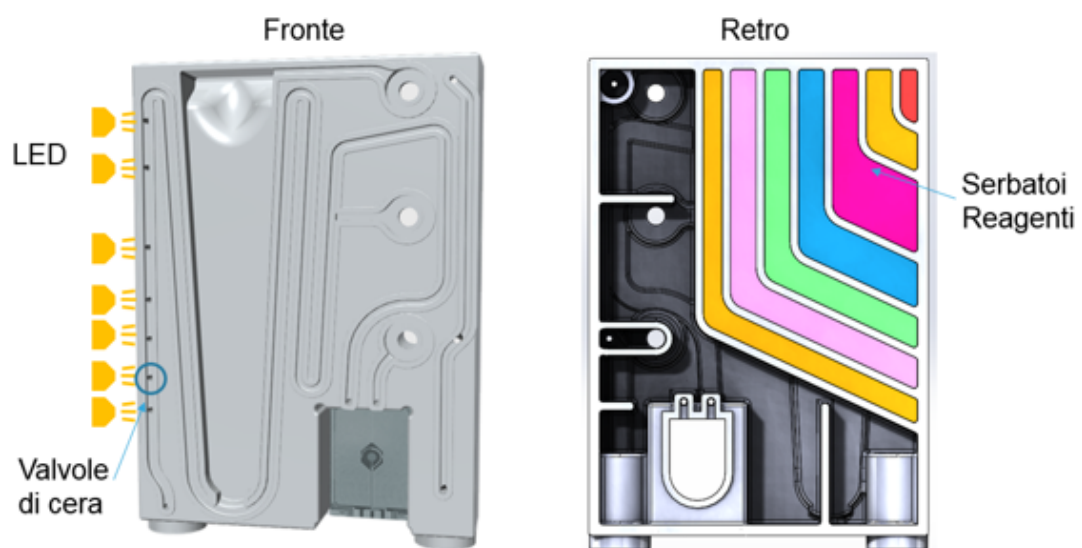
Un altro modo per eliminare le elettrovalvole sullo strumento sarebbe quello di integrare i serbatoi con i reagenti sulla cartuccia monouso. In Figura 6.3 è mostrato un'idea di questo prototipo. I serbatoi sono posizionati sul retro della cartuccia e sono sigillati tramite l'utilizzo di valvole di cera. Queste valvole verranno poi sciolte utilizzando dei LED posizionati a lato della cartuccia. Anche in questo caso, l'introduzione di questa modifica porterebbe a ripensare all'intero *design* dello strumento.

Il passo successivo per questo strumento sarà l'industrializzazione. Per cui si dovrà modificare lo strumento per renderlo realizzabile tramite i processi di produzione in serie.



**Figura 6.2:** Versione aggiornata dell'estrattore di acidi nucleici.





**Figura 6.3:** Prototipo concettuale dei serbatoi integrati sulla cartuccia monouso.

# Bibliografia

- [1] M. Biava et al. «Evaluation of a rapid and sensitive RT-qPCR assay for the detection of Ebola Virus». In: *Journal of Virological Methods* 252 (2018), pp. 70–74. ISSN: 0166-0934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.009>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093417305001>.
- [2] Marco Cereda et al. «Q3: A Compact Device for Quick, High Precision qPCR». In: *Sensors* 18.8 (2018). ISSN: 1424-8220. DOI: 10.3390/s18082583. URL: <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/8/2583>.
- [3] *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio Rad datasheet*. URL: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10021337.pdf> (visitato il 11/06/2018).
- [4] Rosamund Daw e Joshua Finkelstein. «Lab on a chip». In: *Nature* 442.7101 (2006), p. 367.
- [5] Y. Ghallab e W. Badawy. «Sensing methods for dielectrophoresis phenomenon: from bulky instruments to lab-on-a-chip». In: *IEEE Circuits and Systems Magazine* 4.3 (2004), pp. 5–15. ISSN: 1531-636X. DOI: 10.1109/MCAS.2004.1337805.
- [6] P. Gy. *Sampling of Particulate Materials Theory and Practice*. Developments in Geomathematics. Elsevier Science, 2012. ISBN: 9780444601353. URL: <https://books.google.it/books?id=qMONTTfx7hsC>.
- [7] J Kim et al. «Microfluidic sample preparation: Cell lysis and nucleic acid purification». In: 1 (ott. 2009), pp. 574–86.
- [8] R.E. Majors. «Overview of Sample Preparation». In: *LCGC* 33.11 (2015), pp. 46–51.
- [9] Nicola Marziliano et al. «Rapid and portable, lab-on-a-chip, point-of-care genotyping for evaluating clopidogrel metabolism». In: *Clinica Chimica Acta* 451 (2015), pp. 240–246. ISSN: 0009-8981. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.003>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898115300061>.

- 
- [10] *Maxwell system 16 datasheet*. URL: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/maxwell-16-blood-dna-purification-system-protocol.pdf> (visitato il 11/06/2018).
- [11] *Minitex CNC Mini-Mill GX™ datasheet*. URL: <https://www.minitehcnc.com/184-2/> (visitato il 11/06/2018).
- [12] *QIAcube QIAGEN datasheet*. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f7d77c6e-0479-4b2b-a2e0-5ca747114e34&lang=en> (visitato il 11/06/2018).
- [13] *Rotor-Gene Q QIAGEN datasheet*. URL: <https://www.qiagen.com/us/search/rotor-gene-q/#technicalspecification> (visitato il 11/06/2018).
- [14] *RS Pro Hybrid Stepper Motor datasheet*. URL: <https://docs-emea.rs-online.com/webdocs/162b/0900766b8162b797.pdf> (visitato il 11/06/2018).
- [15] *Sample preparation, Analytical chemistry*. Date Published: Nov. 21, 2016. URL: <https://www.britannica.com/science/sample-preparation#ref992142> (visitato il 11/06/2018).
- [16] *Stratasys FDM 360mc datasheet*. URL: <https://manualzz.com/doc/10073444/datasheet-for-fortus-360mc-by-stratasys> (visitato il 11/06/2018).
- [17] *TruStability® Board Mount Pressure Sensors datasheet*. URL: <https://sensing.honeywell.com/honeywell-sensing-trustability-rsc-series-data-sheet-32321348-c-en.pdf> (visitato il 11/06/2018).
- [18] James D Watson, Francis HC Crick et al. «Molecular structure of nucleic acids». In: *Nature* 171.4356 (1953), pp. 737–738.