

# Σύγκριση μικρορευστονικών διατάξεων για την ενίσχυση DNA μέσω υπολογιστικής μελέτης

**Βασίλειος Ε. Παπαδόπουλος, Ιωάννα Ν. Κεφαλά, Γεώργιος Κόκκορης  
και Αγγελική Τσερέπη**

Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction - PCR) μπορεί να δημιουργήσει αντίγραφα τμημάτων του δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) υποβάλλοντας το σε μια διαδικασία θερμικών κύκλων. Μία τυπική PCR περιλαμβάνει την αποδιάταξη (denaturation) του δίκλωνου DNA στους 95°C, την ανόπτηση (annealing) των εκκινητών (primers) στους 55°C, και την επέκταση (extension) των αλληλουχιών συνδεδεμένων εκκινητών (primer-bound) στους 72°C. Κάθε θερμικός κύκλος μπορεί να διπλασιάσει την ποσότητα του DNA, και εντός 20-35 κύκλων μπορεί να παραχθούν εκατομμύρια αντίγραφα του DNA.

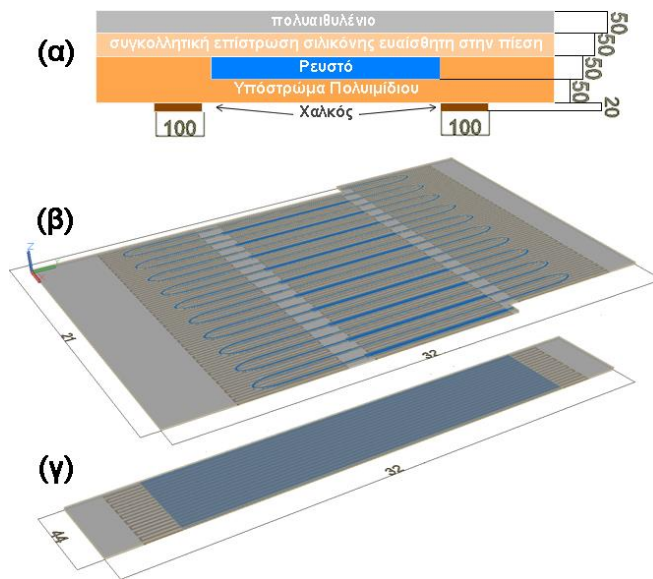
Οι βασικές κατηγορίες μικρορευστονικών διατάξεων που υλοποιούν το πρωτόκολλο της PCR είναι δύο: Οι διατάξεις συνεχούς ροής (continuous flow) και οι διατάξεις στατικού θαλάμου (static chamber). Η λειτουργία των διατάξεων στατικού θαλάμου (ΣΘ) ομοιάζει με αυτή των συμβατικών μεγάλης κλίμακας εργαστηριακών διατάξεων (thermocyclers) όπου το δείγμα DNA είναι στατικό σε ένα θάλαμο και υποβάλλεται στο θερμικό κύκλο του πρωτοκόλλου της PCR. Ο πρώτος τύπος των διατάξεων συνεχούς ροής (ΣΡ) είναι αυτός του σταθερού βρόγχου (fixed loop) [1] όπου το δείγμα ρέει μεταξύ των σταθερών θερμοκρασιακών ζωνών για την επίτευξη των απαραίτητων θερμικών κύκλων. Ο αριθμός των θερμικών κύκλων καθορίζεται κατά την κατασκευή της διάταξης. Ο δεύτερος τύπος των διατάξεων ΣΡ είναι αυτός του κλειστού βρόγχου [2] όπου το δείγμα επανακυκλοφορεί με τη βοήθεια κατάλληλης μικροαντλίας στις τρεις θερμοκρασιακές ζώνες. Το πλήθος των θερμικών κύκλων δεν περιορίζεται από την κατασκευή, καθορίζεται από τον χρήστη της συσκευής.

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η λεπτομερής σύγκριση μέσω υπολογιστικής μελέτης διατάξεων ΣΡ (Σχήμα 1β) και ΣΘ (Σχήμα 1γ) με προδιαγραφές κατασκευής από την τεχνολογία εύκαμπτων τυπωμένων κυκλωμάτων (flexible printed circuit, FPC) και από τις λιθογραφικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται [3]. Η στοιβία των στρωμάτων των υλικών φαίνεται στο Σχήμα 1α. Συγκρίνονται η ενεργειακή κατανάλωση, η ταχύτητα και η ενίσχυση του DNA. Η σύγκριση γίνεται υπό τις ίδιες συνθήκες: Ίδια υλικά, ίδιος όγκος δείγματος DNA και ίδιο πρωτόκολλο για την PCR.

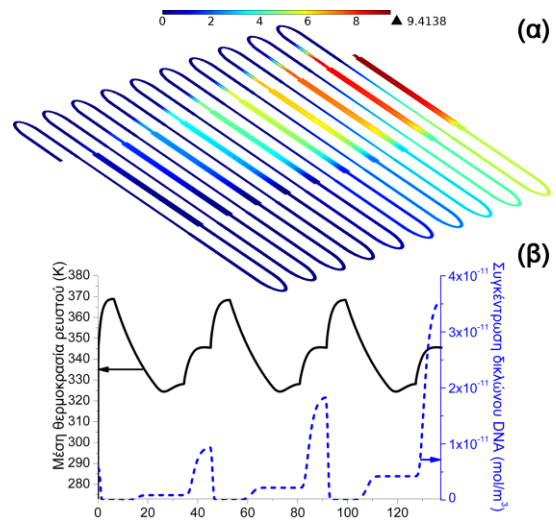
Η υπολογιστική μελέτη πραγματοποιείται με λεπτομερές μοντέλο 3 διαστάσεων, το οποίο περιλαμβάνει εξισώσεις α) διατήρησης ορμής και συνέχειας, β) διατήρησης μάζας των συστατικών και γ) μεταφοράς θερμότητας. Η θερμότητα παράγεται στα θερμαντικά στοιχεία μέσω φαινομένου Joule. Για την πραγματοποίηση του θερμοκρασιακού πρωτοκόλλου που απαιτείται για την λειτουργία της διάταξης ΣΘ, το μοντέλο της διεργασίας οδηγείται από μοντέλο αυτόματου ρυθμιστή (controller) της θερμοκρασίας του δείγματος DNA. Ο αυτόματος ρυθμιστής μεταβάλλει κατάλληλα το ρεύμα που ρέει στα θερμαντικά στοιχεία που λειτουργούν ως αντιστάσεις. Η κινητική των αντιδράσεων αποδιάταξης, ανόπτησης και επέκτασης προέρχεται από την εργασία του Hunicke-Smith [4]. Οι εξισώσεις λύνονται με τον εμπορικό κώδικα Comsol.

Οι υπολογισμοί έδειξαν ότι η απόδοση της ενίσχυσης του DNA (Σχήμα 2) είναι σχεδόν η ίδια και στις δύο συσκευές. Όμως, η διάταξη ΣΘ απαιτεί (2-4 φορές) μικρότερη κατανάλωση ενέργειας (Σχήμα 3α), που αποδίδεται στην μικρότερη θερμική μάζα και μικρότερη επιφάνεια απωλειών (μέσω συναγωγής και ακτινοβολίας) προς το περιβάλλον σε σύγκριση με εκείνη της διάταξης ΣΡ. Όσον αφορά την ταχύτητα, ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για τη διάταξη ΣΘ είναι ελάχιστα μεγαλύτερος (Σχήμα 3β) λόγω των χρονικών καθυστερήσεων για τη μετάβαση μεταξύ των τριών θερμοκρασιών (95, 55 και 72 °C). Τόσο η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, όσο και η εγγενής ευελιξία

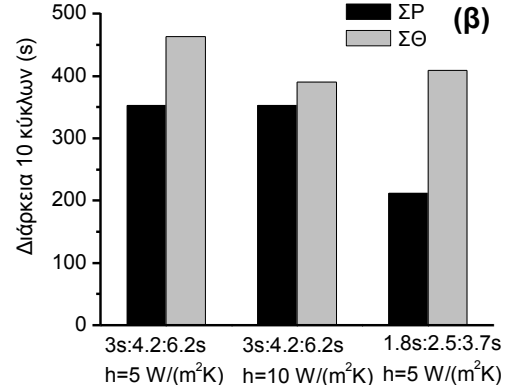
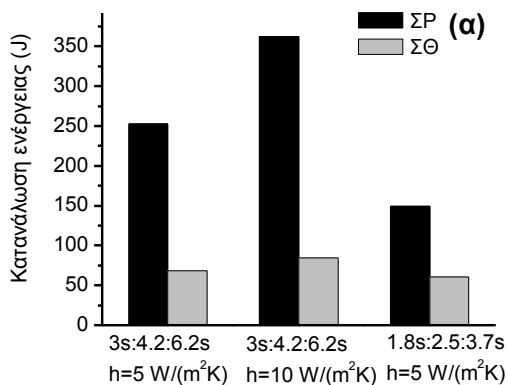
του πρωτοκόλλου υποδεικνύουν ως πλεονεκτικότερες τις συσκευές στατικού θαλάμου κατασκευασμένες σε εύκαμπτα υποστρώματα με ολοκληρωμένες μικρο-αντιστάσεις.



**Σχήμα 1.** (α) Κάθετη τομή των διατάξεων όπου φαίνονται τα υλικά (διαστάσεις σε μm). Γεωμετρία διάταξης β) ΣΡ και γ) ΣΘ (διαστάσεις σε mm).



**Σχήμα 2.** α) Λογάριθμος της ενίσχυσης του DNA,  $\log_2([dsDNA]/[dsDNA]_0)$  για 10 κύκλους της διάταξης ΣΡ. β) Θερμοκρασία ρευστού και συγκέντρωση DNA για 3 κύκλους της διάταξης ΣΘ.



**Σχήμα 3.** α) Κατανάλωση ενέργειας και β) διάρκεια 10 κύκλων συναρτήσκει πρωτόκολλου της PCR (3s:4.2s:6.2s ή 1.8s:2.5s:3.7s), συντελεστή μεταφοράς θερμότητας [ $h=5$  ή  $10$  W/(m²K)] και τύπου διάταξης (ΣΡ ή ΣΘ).

- [1] D. Moschou, N. Vourdas, G. Kokkoris, G. Papadakis, J. Parthenios, S. Chatzandroulis, *et al.*, "All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 199, pp. 470-478, 2014.
- [2] Z. Chen, S. Qian, W. R. Abrams, D. Malamud, and H. H. Bau, "Thermosiphon-based PCR reactor: experiment and modeling," *Anal Chem*, vol. 76, pp. 3707-15, 2004.
- [3] V. E. Papadopoulos, I. N. Kefala, G. Kaprou, G. Kokkoris, D. Moschou, G. Papadakis, *et al.*, "A passive micromixer for enzymatic digestion of DNA," *Microelectronic Engineering*, vol. 124, pp. 42-46, 2014.
- [4] S. P. Hunnicke-Smith, *PCR and cycle sequencing reactions: a new device and engineering model*, 1997.