

BİYOLOJİK NUMUNELERDEN NÜKLEİK ASİDİN AYRIŞTIRILMASININ OTOMATİKLEŞTİRİLMESİ

Ömer Burak ÇE, Mehmet İsmet Can DEDE

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi,
Makina Mühendisliği Bölümü 35430, İZMİR
ce-burak@hotmail.com, candede@iyte.edu.tr

ÖZET

Nükleik asitler (DNA veya RNA) hücrenin veya organizmanın genetik yapısını temsil ederler, bu nedenle genetik testler için gerekli bileşenlerdir. Moleküler genetik testler organizmanın anlık, geçici ya da kalıtsal karakteristikleri hakkında bilgi sahibi olunabilmesi için genetik yapısının analiz edilmesini sağlarlar. Genetik yapının analiz edilebilmesi için çoğu zaman hücre içinde bulunan nükleik asitlerin (DNA veya RNA) ayrıştırılması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı düşük çıktılı, otomatikleştirilmiş bir nükleik asit izolasyon cihazının tasarlanması ve prototipinin üretilmesidir. Otomatikleştirilmiş nükleik asit izolasyon cihazlarının yanı sıra manuel nükleik asit izolasyon ekipmanları da araştırılmıştır. Ticari olarak piyasada bulunan, nükleik asit izolasyonunda kullanılan araçlar (pipet uçları, reaktif kartuşlar, tüpler, vb.) gözden geçirilmiştir. Düşük maliyetli, yüksek hassasiyetli ve minimum operatör müdahalesini gerektirecek mekanizma tasarımı ortaya çıkarılmıştır. Kavramsal tasarımlar geliştirilmiş ve seçilmiş olan parçalarla uyumlu olacak şekilde son tasarım elde edilmiştir. Elektronik ekipmanlar gereksinimleri karşılayacak özelliklerde belirlenmiş (motor, sürücü, arayüz kartı, vb.) ve bunlara uyumlu bir kullanıcı arayüzü seçilerek sisteme adapte edilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak, piyasada bulunan ticari cihazlar ile rekabet edebilir bir tasarım ortaya konmuş ve bir prototip üretilerek nükleik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nükleik asit, otomasyon, tıbbi robotik, sıvı işleme, magnetik boncuk

AUTOMATION OF NUCLEIC ACID EXTRACTION FROM BIOLOGICAL SAMPLES

ABSTRACT

Nucleic Acids (DNA or RNA) present the genetic structure of the cell or the organism and so are the essential components to make genetic testing. Molecular genetic testing allows one to analyze the genetic structure of an organism to have an idea about the present temporary or hereditary characteristics of the tissue or the whole organism, or specifically define its species. In order to analyze the genetic structure, one must extract and isolate the nucleic acids (NA), which are most of the time, inside the cell. The aim of this study is to design and manufacture an automated device with low throughput DNA extraction. Currently, the automated devices used for extraction of genetic material are being manufactured only by the foreign companies. Automated commercial devices used for this purpose were investigated in detail as well as the manual NA extraction hand tools for use in NA extraction. Commercially available components (pipette tip, reagent cartridges, tubes, etc.) to isolate NA were reviewed. Mechanism design process for a low cost and high precision system that requires minimal human operator intervention is carried out. The conceptual designs were developed and the final design of the device was made to comply with the selected components. Electronic equipments (motors, drivers, interface card, etc.) and a suitable graphical user interface compatible with the electronic components was selected and adapted to the system. Finally, a device which is competitive with the commercial ones has been designed and its prototype has been manufactured as a result of this study.

Keywords: Nucleic acid, automation, medical robotics, liquid handling, magnetic bead

1. GİRİŞ

Moleküler testlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Her gün daha fazla genetik test rutin kullanıma açılmaktadır. Mikrobiyoloji, biyokimya, patoloji, farmakoloji ve biyolojinin bir çok branşı genetik bazlı testleri hem diagnostik için hem de in vitro araştırmalar için kullanılmaktadır. Moleküler testler sadece tıp alanında değil aynı zamanda veterinerlik, zooloji, ziraat ve organizmalarla ilgilenen tüm alanlarda kullanılmaktadır.

Moleküler genetik testler bir organizmanın anlık yapısının yanı sıra kalıtsal özelliklerinin de tespit edilmesini sağlar. Nükleik asitler (DNA ve RNA) bir hücrenin genetik yapısını gösterirler, bu yüzden genetik testler için temel bileşenlerdir. Laboratuvarlarda biyolojik örneklerden nükleik asit elde edilmesi pahalı yüksek çıktılı robotik sistemler ile yada laboratuvar uzmanı tarafından manüel olarak yapılmaktadır. Laboratuvar uzmanı tarafından gerçekleştirilen bu iş çok zaman almakla beraber güvenilirliği düşüktür. Ayrıca laboratuvar uzmanı çoklu örneklemelerde yinelemeli çalışmayı gerektiren bu iş sonunda sağlık problemleri yaşamaktadır. Bu nedenlerden dolayı düşük çıktılı nükleik asit saflaştırma cihazlarına olan ihtiyaç artmaktadır.

Bu çalışmanın amacı düşük çıktılı otomatikleştirilmiş bir nükleik asit izolasyon robotik platformu üretmektir. Ticari olarak piyasada bulunan nükleik asit izolasyon cihazlarının yanısıra laboratuvar uzmanlarının kullandığı ekipmanlar da incelenmiştir. Nükleik asitler ve nükleik asit izolasyon yöntemleri incelenerek otomasyona en uygun olan yöntem seçilmiştir. Tasarım kriterleri belirlenerek bu kriterlere uygun tasarım gerçekleştirilmiş, gerekli elektronik ekipmanlara ve kullanıcı ara yüzüne karar verilmiş ve nükleik asit elde edebilen bir robotik platformun prototipi bu çalışmanın bir sonucu olarak üretilmiştir.

Bir sonraki bölümde nükleik asitler hakkında okuyucuyu bilgilendirmek için genel bilgiler verilmiştir. Bunu takiben nükleik asit ayrıştırma yöntemleri anlatılmıştır. Nükleik asit ayrıştırması yöntemlerinin irdelenmesi

sonucunda yapılan nükleik asit ayrıştırıcısı robotunun mekanik tasarımı açıklanmıştır. Mekanik tasarımın açıklanmasını takiben sistemin otomasyonu konusundaki bilgiler paylaşılmıştır. Ortaya çıkan prototip üzerindeki ilk testler ve sonuçları özetlenmiş ve tartışılmıştır. Üretilen ilk prototip üzerinde test sonuçları çıktıları kullanılarak gerekli değişikliklere ve düzeltmelere karar verilmiştir. Bu bilgiler bildirinin ilerideki çalışmalar bölümünde özetlenmiştir.

2. NÜKLEİK ASİTLER

Yaşayan tüm organizmalar çok karışık sistemlerdir ve bu sistemlerin doğru olarak yönetilebilmesi için çok fazla bilgi gereklidir [1, 2]. Bu bilgi hücre içinde nükleik asitlerde depolanmıştır ve farklı tiplerde farklı işlevler sahip çeşitli nükleik asitler mevcuttur.

2.1. Nükleik Asit Tipleri

Temel olarak nükleik asitler iki gruba ayrılabilir.

2.2.1. Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)

Virüsler hariç hemen hemen yaşayan tüm organizmalarda birincil ve kalıtsal genetik bilgi DNA'da depolanır. Yaşayan hücrelerin çekirdeklerinde bulunur.

2.2.2. Ribo Nükleik Asit (RNA)

Bir genetik haberci olarak hücre çekirdeği dışında bulunabilir ve DNA'nın bilgilerini gerekli yerlere ulaştırır. Bazı virüsler için temel genetik bileşendir.

2.2. Nükleik Asitlerin Kimyasal Yapıları

Nükleik asitler iki ana bölümden oluşan büyük moleküllerdir. Temelinde şeker ve fosfat moleküllerinin bir zincir oluşturacak şekilde bağlanmasından oluşur. Dört ayrı nükleotid bazının bu zincir üzerine milyonlarca farklı kombinasyonda dizilmesi ile çeşitlilik ortaya çıkar [3].

3. NÜKLEİK ASİT AYRIŞTIRMASI

Genetik yapının analiz edilebilmesi için çoğu zaman hücre içinde bulunan nükleik asitlerin çıkarılarak saflaştırılması gerekmektedir. Nükleik asit elde sebebinden edileceğinden bağımsız olarak elde etme prosedürü birbirlerine benzerdir.

Nükleik asitler yaşayan veya ölü olan tüm organizmalardan elde edilebilir. Hücre içeren vücut sıvıları, kan, idrar, tükürük ve dışkı gibi veya saç gibi tüm doku bileşenlerinden nükleik asit elde edilebilir.

Nükleik asit elde edilmesi hücre çözünmesi, nükleik asidin çözünürlüğünün azaltılması, çözünmüş karışımın spesifik olarak parçalara bölünmesi, yıkama adımlarıyla istenmeyen bölümlerin ayrıştırılması ve son olarak istenen kısmının alınması basamaklarından oluşur. Bu işlemler için farklı hazırlık zamanı ve kimyasallar içeren birçok yöntem olmasıyla beraber, farklı miktarlarda çıktılar ve saflık dereceleri söz konusudur [4]. Söz konusu yöntemlerin bazıları takip eden konu başlıklarında anlatılmıştır.

3.1. Organik Nükleik Asit İzolasyonu

Nükleik asitleri organik çözücüler aracılığı ile çözerek mutlak alkol içinde çökertme prensibine dayanır. İnsan sağlığına zararlı kimyasallar ve santrifüj basamakları içerir [5].

3.2. Chelex Nükleik Asit İzolasyonu

Hızlı ve bağıl olarak düşük maliyetlidir. Fakat nükleik asit izolasyonunu takip eden reaksiyonlar için bozucu artıklar bırakır [5]. Hemen hemen her türlü örneğe uygulanabilir ve santrifüj basamakları içerir

3.3. Silika Matris Nükleik Asit İzolasyonu

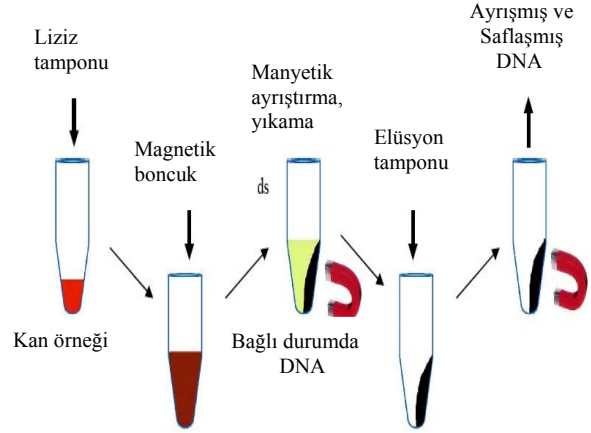
Otomasyona en uygun yöntemlerden biridir. Silika parçacıklarının nükleik asitlerle yaptığı tersinebilir bağ özelliklerine dayanır. Yüksek saflıkta nükleik asit eldesi mümkündür, santrifüj basamakları içermez.

3.4. Paramagnetik Boncuk Yöntemi

Nükleik asit izolasyonunda en son teknolojilerden birisidir. Silika yönteminin geliştirilmiş halidir. Paramagnetik mikro parçacıklarının etrafını silika ile kaplayarak elde edilen boncukların solüsyonun içindeki nükleik asitleri kendine bağlaması ve daha sonra bu boncukların manyetik alana maruz bırakılarak toplanması ilkesine dayanır.

Magnetik boncukların nükleik asitlerle birlikte üzerine topladığı yancılar değişik konsantrasyonlardaki tuz solüsyonları ile uzaklaştırılır. Son olarak tuz konsantrasyonu düşürülerek nükleik asitlerin çözünürlüğü artırılır ve çözelti içinden artık nükleik asit içermeyen boncuklar manyetik alan

uygulanarak alınır. Takipçi reaksiyonlara artık bırakmaz, santrifüj basamaklarına ihtiyaç duymaz. Otomasyona en uygun yöntem olarak kabul edilmiştir [5, 6]. Bu yöntem Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Magnetik boncuk yöntemi ile nükleik asit eldesi şematik gösterimi [7].

4. NÜKLEİK ASİT AYRIŞTIRICI ROBOTİK SİSTEMİN MEKANİK TASARIMI

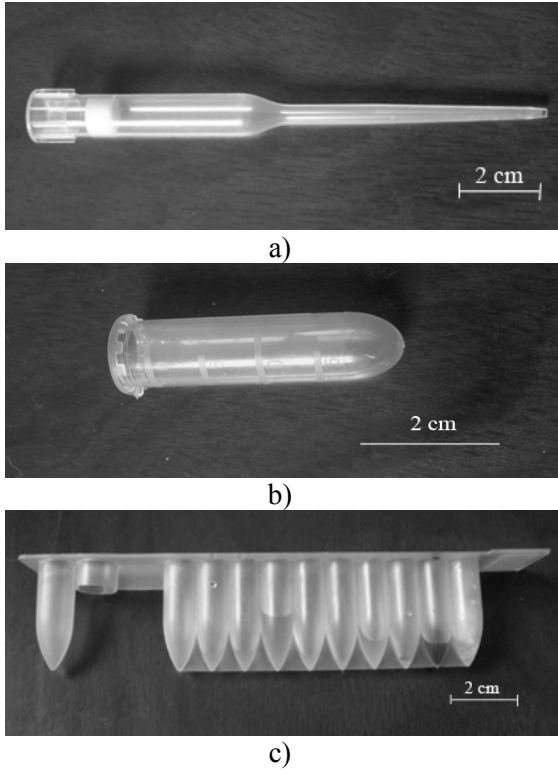
Üretilen robotik platformdan beklenen nükleik asitlerin geniş bir örnek yelpazesinden izole etmesidir. İşlem basamaklarının tümü bir çalışma tablasında gerçekleşir. Sıvı transferi, karıştırma ve manyetik ayırıştırma basamaklarında bu işlemler için üretilmiş pipet uçları reaksiyon çemberi olarak kullanılır.

Nükleik asit izolasyonu yapılan her örnek için dokuz adet önceden gerekli kimyasallar ile doldurulmuş tüp içeren kit, bir adet 1,2 ml sıvı tutabilen pipet ucu, iki adet 2 ml sıvı tutabilen örnek tüpü kullanılır. Robot bu on iki istasyon arasında yüksek hassasiyette sıvı transferini belirlenen sürede gerçekleştirir, pipet uçlarını takip bırakabilir, karışımları homojen olana kadar karıştırabilir ve pipet uçlarını belirlenen süreler boyunca belirlenen büyüklükte manyetik alana maruz bırakabilir şekilde tasarlanmalıdır. Manyetik alanı etkin tutarken istasyonlar arasında dolaşabilmeli ayrıca son aşamada bir tüpü 56°C sıcaklıkta sabit tutabilmelidir.

4.1. Çalışma Alanının Tasarımı

Çalışma alanı QIA-GEN firmasının ürettiği kimyasal kartuş kiti, 2ml standart tüp ve pipet ucu baz alınarak tasarlanmıştır. Çalışma alanı tasarlanırken kolay kullanım hedeflenmiştir.

Bunu sağlamak için çalışma alanı pipet uçlarını ve örnek tüplerini taşıyacak bir bölüm, kimyasal kartuşları taşıyacak bir bölüm olarak iki parça halinde tasarlanmıştır. Ayrıca söz konusu elemanları, cihaz üzerindeki kısıtlı alan nedeniyle, yerlerine yerleştirmenin zor olması ve dökülme, bulaşma riskinin artması nedeniyle, her iki parçanın da cihaz üzerine çıkıp takılabilen şekilde tasarlanmasını gerektirmiştir. Söz konusu pipet ucu, örnek tüpü ve kimyasal kartuş resimleri aşağıda sırasıyla gösterilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2.a) Pipet ucu, b) 2ml tüp, c) kimyasal kartuş

4.2. Hassas Şırınga Tasarımı

Belirli miktarda sıvıyı pipet ucunun içine alması görevini yapacak olan şırıngalar piston-silindir sistemi şeklinde tasarlanmıştır. Piston-silindir sisteminin boyutları belirlenirken bir seferde transfer edilecek olan en fazla sıvı miktarı belirlenip bu değer üzerine %20'lik bir emniyet hacmi öngörülmüştür. Piston silindir arasındaki sızdırmazlığın sağlanması için uzun ömürlü ve sürtünmeye dayanımı yüksek viton o-ring seçilmiş ve sürtünmeyi azaltmak amacıyla silikonlu gres uygulanmıştır. Piston silindirin içinde hareket edince ortaya çıkacak hacim emilecek olan sıvı hacmi olarak kabul

edilmiştir. Sıvı bu şekilde pipet içine emilecektir. Dolayısı ile reaksiyon çemberi olarak pipet hacmi kullanılmıştır. Şekil 3'te piston silindir sistemi tasarımı gösterilmiştir.



Şekil 3. Piston-silindir sistemi

4.3. Pipet Tutucusu Tasarımı

Pipet tutucusunun görevi hassas şırıngalarla pipetler arasında bir boru olmasının yanı sıra pipetin tutunabileceği bir ağızdır. Pipetin sıkı bir şekilde tutucu üzerine oturması ve sızdırmazlık sağlaması gerekmektedir. Tutucu tasarlanırken el pipetleme aletlerindeki tutucu ölçüleri esas alınmıştır ve ucuna, pipet ucu iç çapına uygun boyutta o-ring konulmuştur. Tasarlanan pipet tutucusu Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Pipet tutucusu

4.4. Manyetik Ayırıştırıcı Tasarımı

Manyetik ayırıştırıcıdan pipet uçları etrafında istenildiği zaman manyetik alan oluşturması beklenmektedir. Manyetik alan sabit mıknatıslar kullanarak yada elektromıknatıslar kullanılarak oluşturulabilir. Sabit mıknatıslar kullanıldığı durumda mıknatısları gerekmediği zaman etkisinin az olacağı bir mesafede tutmak gerekmektedir, bununla beraber elektro mıknatıs kullanılması durumunda mıknatıslara uygulanacak akımı kesmek yeterlidir. Elektromıknatısların istenilen boyutlarda üretilmesinin yüksek maliyetli olması nedeniyle sabit mıknatıs kullanılmasına karar verilmiştir. Sabit

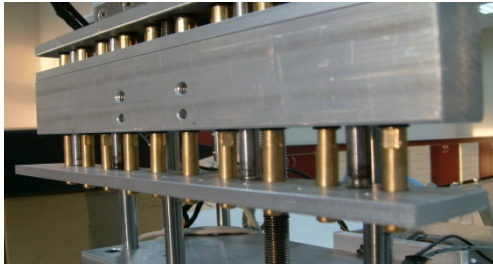
mıknatısları hareket ettiren eyletici olarak elektrik motoru kullanılmasına karar verilmiştir. Tasarlanan manyetik ayırtıcı Şekil 5’te gösterilmiştir.



Şekil 5. Manyetik ayırtıcı

4.5. Pipet Ucu Çıkarma Sistemi Tasarımı

İşlem bitiminde pipet ucunu tutucudan çıkarmak için tasarlanan sistem hareketini piston mekanizmasından alacak şekilde tasarlanarak eyletici sayısı azaltılmıştır. Pipet uçlarını tutucu üzerinden sıyrarak bir plaka olarak tasarlanmıştır. Pistonlarla eş zamanlı olarak tutucu üzerinde hareket eder. Tasarlanan pipet ucu çıkarma sistemi Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6. Pipet ucu çıkarma işlemi

4.6. Eyleticilerin Seçimi

Konumlamada kullanılacak olan eyleticiler için step motor ve servo motor olarak iki seçenek belirlenmiştir.

Step motor;

- Düşük maliyet
- Basit kablolama
- Bakım gerektirmeme

özelliklerine sahiptir. Bunun yanında geri beslemesiz motorlardır, fakat doğru hesaplanmış torklar ve doğru seçilmiş sürücü motor kombinasyonları ile sorunsuz çalışabilmektedirler.

Servo motor;

- Yüksek moment
- Geri besleme

- Çok yüksek hassasiyet özelliklerine sahiptir, ancak step motora göre çok yüksek maliyete sahiptir. Bu nedenle eyletici olarak step motorlar seçilmiştir. Seçilen step motorlar sarım başına en fazla 1,5 A akım çekebilen 550 g.cm torka sahip motorlardır.

4.7. Güç İletimi Mekanizmaları Tasarımı

Vidalı mil ve somun sistemi güç aktarımı için seçilmiştir. Bu sistem yüksek konumlama hassasiyeti sağlar. İhtiyaç duyulan konumlama hassasiyetleri belirlenerek kullanılacak olan vidalı mil çaplarına ve hatvelerine karar verilmiştir. Söz konusu durumlar için en yüksek hız ve en düşük konumlama değerleri hesaplanarak ihtiyaçları karşıladığı Denklem (1) kullanılarak doğrulanmıştır. Hesaplamalar sırasında kullanılan motorların devrinin 600 devir/dakikada sınırlandırıldığı, motorların yarım adım tekniğiyle sürülerek bir turu 400 adımda tamamladığı göz önünde bulundurulmuştur.

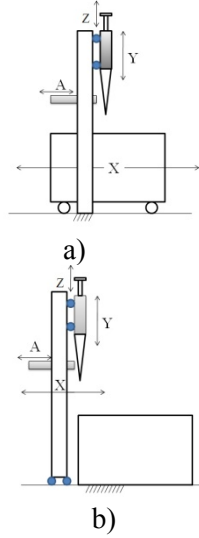
$$AH = MDH \times R \quad (1)$$

Denklem (1)’de vidalı mil somun hızı AH ile, motor dönüş hızı MDH ile ve hatve miktarı h ile belirtilmiştir. Birim miktarda yer değiştirme adım sayısının ($BMAS$) hesaplanabilmesi için Denklem (2) kullanılmıştır. Denklemde devir adım sayısı DAS ve adım bölmesi AB ile belirtilmiştir.

$$BMAS = \frac{(DAS \times AB)}{h} \quad (2)$$

4.8. Eksen Hareketleri Tasarımı

Pipet uçlarının kimyasal kitler boyunca hareketi için X -ekseni, yukarı aşağı hareketi için Y -ekseni, mıknatıs bloğunun pipet uçlarına yaklaşması için A -ekseni, pistonların hareketi için Z -ekseni belirlenmiştir. Söz konusu eksenlerin hareketleri için iki kavramsal tasarım aşağıda sırası ile resimlerde gösterilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Hareket eksenleri yerleşimi kavramsal tasarımları

İlk kavramsal tasarımda (a) X-ekseni olarak çalışma tablası hareket etmektedir, ikinci tasarımda (b) ise X-ekseni Y-, Z- ve A-eksenlerini üzerinde taşımaktadır. İkinci tasarım X-ekseni üzerine ek bir yük getirir daha küçük bir alanda çalışabilmesine rağmen imalatı daha zor ve yüksek maliyetlidir. Bu durum değerlendirildiğinde ilk tasarımın kullanılmasına karar verilmiştir.

4.9. Son Tasarım

Kullanılmasına karar verilen kavramsal tasarımların birleşimi sonucu maliyet, hassasiyet, hız üretim tekniği, güç tüketimi kriterleri göz önünde bulundurularak, son tasarıma karar verilmiştir .

Son tasarım;

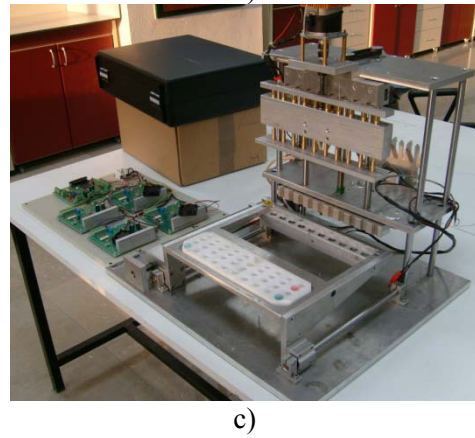
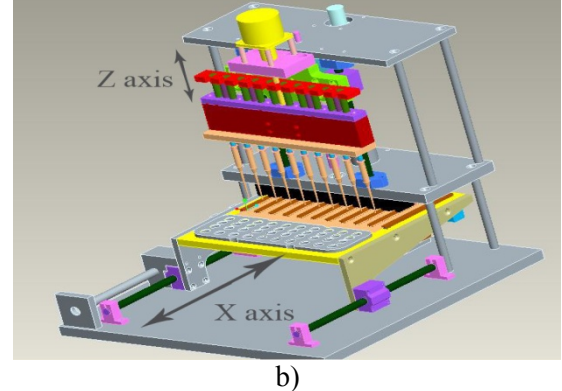
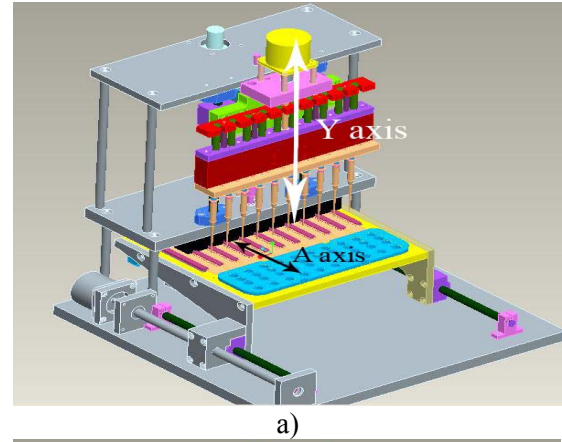
- Çalışma tablası X-ekseni olarak hareketli
- Step motor eyletici
- Sabit mıknatıslı
- Z-ekseninden hareketli pipet ucu düşürücü sistemine sahip

tasarım olarak belirlenmiştir. Ölçülendirmeler ve gerekli hesaplamalar yapılarak imalat resimleri çizilmiştir. Ham maddeler belirlenmiştir, üretim teknikleri belirlenmiştir, kuvvet hesaplamaları Denklem (3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$F = \frac{2\pi \times \tau}{h} \quad (3)$$

Denklem (2)'de, F kuvvet, ve τ dönme momentini belirtmektedir. 2 mm hatveye sahip olan X- ve Y- eksenleri için kuvvet 17,285 kgf, 1,25 hatveye sahip olan Z- ve A- eksenleri için 27,657 kgf olarak hesaplanmıştır.

Kullanılacak olan step motorlar gerekli tork ihtiyacını karşılayacak şekilde seçilmiştir ve cihazın mekanik aksamının üretimi gerçekleştirilmiştir. Eksen konumlamaları ve sistemin bir araya getirilmiş hali Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. a)Y- ve A- eksenleri, b)X- ve Z- eksenleri, c)nükleik asit izolasyon robotik istasyonu

5. NÜKLEİK ASİT AYRIŞTIRICI ROBOTİK SİSTEMİN DONANIMI VE YAZILIMI

5.1. Ara Yüz Kartı

Bilgisayar paralel portu ile step motor sürücülerini, kullanılacak olan ara yüze uyumlu bir şekilde haberleştirecek özelliklere sahip ara yüz kartı belirlenmiştir.

5.2. Step Motor Sürücüleri

Seçilen step motorları sürmeye uygun özellikte sarım başına 4,2 A'ya kadar akım verebilen sürücüler belirlenmiştir. Kullanılan motorlar sarım başına en fazla 1,5 A elektrik akımına ihtiyaç duymaktadırlar, seçilen sürücüler bu değerlerin üzerine çıkabilmektedir.

5.3. Isıtma Ünitesi

İnkübasyon adımının ihtiyaç duyduğu 55°C sıcaklığı sağlayabilecek iki adet 50 W direnç ve sıcaklık kontrolünü sağlayacak olan kontrol devresi ile bu devreye uygun nikel-krom-nikel sıcaklık algılayıcısı belirlenmiştir. Sıcaklık kontrol devresi 0-600°C arası sıcaklıkları algılayabilmektedir.

5.4. Güç kaynakları

Robotik sistemin toplam güç ihtiyacı Denklem (4) ile hesaplanmıştır.

$$P=V \times I \quad (4)$$

Motor sürücü devreleri için 350W, ısıtma ünitesi için 150W'lık 2 adet 24V güç kaynağı kullanılmasına karar verilmiştir. İki ayrı güç kaynağı kullanılarak ısıtıcının devrede olduğu adımlarda oluşabilecek elektriksel tepelerin (peak), motor sürücü devresini etkilememesi hedeflenmiştir.

5.5. Kullanıcı Arayüzü

Kullanıcı arayüzü kriterleri sırasıyla,

- step motor kontrol edebilme,
- anlaşılır ve basit programlanabilir olma,
- yüksek donanımlı bilgisayar gerektirmeme ,
- en az dört eksen aynı anda kontrol edebilme,
- paralel porta çıktı verebilme,

olarak belirlenmiştir. Bu kriterler ışığında step motor kontrolünde kullanılan Mach 3 yazılımı seçilmiştir [8]. Paralel port ayarları ihtiyaçlara uygun olarak yapılmıştır.

Her eksen için hız ve ivme değerleri deneysel olarak elde edilmiştir ve bu değerler paralelinde her eksenin hareket profilleri çıkarılmıştır. Kullanıcı ara yüzü ayarları bu bilgiler dahilinde yapılmıştır [8].

Son tasarım elektronik bileşenlerle bir araya getirilerek başlangıç seviyesi (initial) kodlamaları ile çalıştırılmıştır.

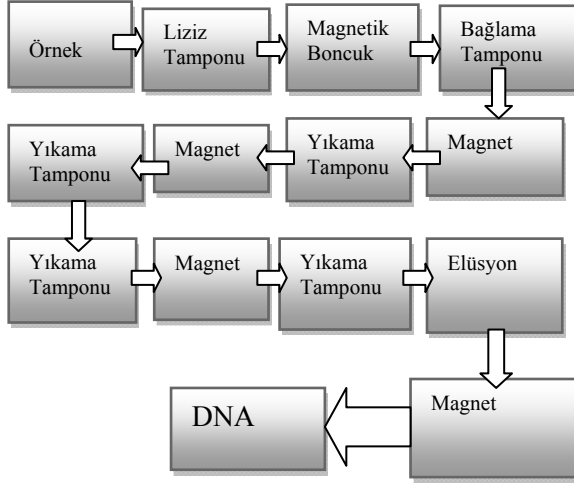
6. ROBOTİK SİSTEM BAŞLANGIÇ SEVİYESİ TESTLERİ

Tasarımın bu aşamasında yapılan testler ve değerlendirmeler bu başlık altında sunulmuştur:

- Sistemin bir araya getirilmesiyle konumlama hassasiyeti kontrol edilmiştir.
- Pipetleme hacim testleri gerçekleştirilmiştir.
- Magnetik boncuklar kullanılarak karıştırma ayırıştırma testleri gerçekleştirilmiştir.
- Solüsyonu homojen hale getirmek için gerekli pompalama adetleri belirlenmiştir.
- Kabarcık oluşumunu engelleyecek piston hızları tespit edilmiştir, pipetler istasyonlar arasında hareket ederken içinde tuttuğu sıvının damlamasına engel olacak kavramsal kodlamalar yapılmıştır.
- Sıcaklık testleri yapılmıştır sıcaklık kontrol devresi testler paralelinde tekrar ayarlanmıştır.
- Her eksen için kritik referans noktaları çıkarılmıştır. Bunlar sırası ile:
 - Y-ekseni için: Pipet takılı durumda tüplerin en alt noktası, pipeti takma yüksekliği, manyetik ayırıştırma yüksekliği.
 - X-ekseni için: Her istasyonun konumu,
 - Z-ekseni için: Pipet ucu sıfır konumu, pipeti çıkarma konumu, hesaplanan emiş hacimlerine dayanarak çıkarılmıştır.
 - A-ekseni için: Magnet pipet üzerinde, magnet sıfır ve magnet ileride konumları

çıkartılıp laboratuvar uzmanları tarafından yapılan nükleik asit izolasyon basamakları

süreleri ve hacimleri esas alınarak akış şeması Şekil 9'da gösterildiği gibi çıkarılmıştır.



Şekil 9. Nükleik asit izolasyon basamakları

Çıkarılan akış şemasına dayanarak ilk kodlama gerçekleştirilmiştir ve DNA ayırıştırma denemeleri başlatılmıştır. İşlem sırasındaki problemler tespit edilerek kodlama basamaklarında düzeltmeler yapılmıştır. Çalışmalar sonunda en az manüel olarak yapılan nükleik eldesi kadar başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. İşlem süresi toplam 30 dakika olarak ölçülmüştür.

7. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu robotik platform kandan DNA elde etmek üzere tasarlanarak üretilmiştir. Otomasyon, operatör kaynaklı hataları engellemiştir. Günde yüz teste kadar ihtiyaç duyan laboratuvarlar için uygun olduğu değerlendirilmiştir. On işlem kapasiteli olarak tasarlanan sistem, laboratuvarlarda çalışanları zaman alan rutin nükleik asit izolasyon prosedüründen kurtarmak üzere üretilmiştir. Mekanik tasarım başarılı olmuştur, elektronik donanım ile uyumlu bir şekilde çalıştırılmıştır. Mach 3 yazılımını kullanım kolaylığı sayesinde testler sırasında programlamak için gereken süreleri kısılmasını sağlamıştır.

Robotik sistem düşük maliyetler hedeflenerek açık bir robotik platform olarak üretilmiştir, ayrıca yazılımın geliştirilmesi ve testlerde kolaylık sağlaması açısından bilgisayara bağlı çalışma öngörülmüştür. Sistem bir prototipten beklenenleri vermekle beraber son kullanıcı için tasarlanmamıştır.

Günlük kullanıma uygun olması için, boyutlandırmalar elden geçirilerek sistemin daha yüksek işlem kapasiteli ve daha kompakt bir yapıya sahip olması gerektiğine karar verilmiştir. İşlem süresinin kısaltılması, bilgisayar yerine dahili bir PLC ünitesi kullanılması ilerisi için planlanmıştır. Ayrıca daha yüksek torklu motorlar ve daha hassas sürücüler, sürtünmesi daha düşük doğrusal kızak sistemleri kullanılmasının gerekliliği anlaşılmıştır. Kullanıcı ara yüzü olarak dokunmatik renkli ekran kullanılmasına ve farklı örnekler için (kan, doku, tükürük,..) kodlamaların çıkarılarak kullanıcının programlamasına gerek kalmayacak şekilde cihaza önceden yüklenmesine ve kolay kullanımlı bir kullanıcı arayüzü ile ekrandan kontrol edilmesine bir sonraki prototip için karar verilmiştir. Sistemin laboratuvar koşullarına uygun olması için görsel tasarımı yapılmış bir dış kabuk eklenmesine ve işlem bitiminde cihazın steril kalması için mor ötesi ışın ile sterilizasyon sistemi eklenmesi kararları alınmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Roberts, K., M.Raff, B. Alberts, P. Walter, J. Lewis, and A.Johnson, "Molecular Biology of the Cell", Routledge, Garland Science, 2002.
- [2] Saenger, W , "Principles of Nucleic Acid Structure", New York, Springer-Verlag Inc. 1984.
- [3] Visionlearning. 2009. http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=63 (Temmuz 25, 2009)
- [4] Cler,L., D.Bu, C. Lewis, and D. Euhus, *A comparison of five methods for extracting DNA from paucicellular clinical samples*, . *Molecular and Cellular Probes* 20; 191–196.
- [5] Valgren,C., S.Wester, O. Hansson, *A comparison of three automated DNA purification methods in Forensic casework*, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1, 76–77, 2008
- [6] Haak, B., A.Porsche, K. Vollack, P. Zimmermann, and W. Pflug, *Evaluation of a semi-automated, magnetic bead-based DNA extraction method for genetic fingerprinting of forensic casework samples*, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*,1,35–36, 2008
- [7] Chemicell. 2009. Magnetic particles. <http://www.chemicell.com/products/magneticparticles/index.html> (Temmuz 13, 2009)
- [8] Mach Support. 2009. http://www.machsupport.com/docs/Mach3Mill_ins_tall_config.pdf (Kasım 18, 2009)