

Středoškolská technika 2025

Obor: Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na
ČVUT

Vývoj DIY PCR Thermocykleru

Ota Železný, Jakub Mráček

Gymnázium Teplice Čs. dobrovolců 530/11, Teplice

Seminární práce

VÝVOJ DIY PCR THERMOCYKLERU

DEVELOPMENT AND TESTING OF OPEN-SOURCE THERMOCYCLER

AUTOR	Ota Železný, Jakub Mráček
ŠKOLA	Gymnázium Teplice, Čs. dobrovolců 11
KRAJ	Ústecký
ŠKOLITEL	Ing. Jakub Mráček
OBOR	Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Gymnázium Teplice Čs. dobrovolců 530/11, Teplice

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma *Vývoj DIY PCR Thermocyklieru* jsem vypracoval/a samostatně pod vedením Ing. Jakub Mráček a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Teplicích dne: _____

Ota Železný, Jakub Mráček

Anotace

Tato práce se zaměřuje na vývoj jednoduchého PCR termocycleru, který by mohl sloužit jako dostupná alternativa drahého laboratorního vybavení. Projekt je veden pod licencí open-source s cílem usnadnit jeho další vývoj a zpřístupnit technologii širší vědecké komunitě.

Klíčová slova

Termocycler; PCR; PID; open-source hardware; elektrotechnika; biochemie

Annotation

This work focuses on the development of a simple PCR thermocycler, which could be used as a cheaper alternative to expensive lab equipment. The project is under an open-source license with the aim of facilitating further development and enabling its use for a wide range of scientists.

Keywords

Thermocycler; PCR; PID; open-source hardware; electronics; biochemistry

Obsah

1	Úvod	7
1.1	Cíl práce	8
2	Teoretické pozadí	9
2.1	Co je to PCR?	9
2.2	Stávající řešení a jejich nedostatky	10
2.3	Cykly Termocycleru	10
3	Pouzdro	12
3.1	Puzdro	12
3.1.1	Použité materiály	12
3.1.2	Aktivní chlazení	12
3.1.3	Místo pro elektrické komponenty	13
4	Tepelná tělíska	15
4.1	Koncept	15
4.2	Tepelná výměna	15
4.3	Použité tepelné tělísko	15
5	Tištěný spoj	17
5.1	Design vlastního PCB	17
6	Kód	19
6.1	Program	19
6.1.1	Konfigurace hardwaru (Piny)	19

6.1.2	Logování dat	20
6.1.3	PID regulátor	20
6.1.4	PWM algoritmus	20
6.1.5	Fáze termocyklu	21
6.1.6	Hlavní program	21
7	Kalibrace PID a její výsledky	22
7.1	Cíl	22
7.2	Postup	22
7.3	Závěr a provedené úpravy algoritmu	23
	Závěr	25
	Literatura	26
	Seznam obrázků	27
	Seznam rovnic	28

Kapitola 1

Úvod

V posledních letech se experimentování s genetikou stalo dostupnější než kdy dřív. DNA testy, které dříve prováděli pouze profesionálové, si dnes může udělat téměř kdokoli. Problém ale zůstává – potřebné vybavení je stále velmi drahé a pro běžného člověka nedostupné. A právě to se snažím svým projektem změnit – umožnit téměř každému přístup k těmto technologiím.

K tomuto projektu jsem se dostal na doporučení Ing. Jakuba Mráčka, který mi navrhl, že thermocykler se velmi podobá jednoduché 3D tiskárně, což je oblast, které se věnuji ve svém volném čase a velmi mě zajímá. Projekt mě zaujal a viděl jsem v něm příležitost dále jej rozvinout a využít jeho potenciál. Zařízení by mohlo být dostupné nejen pro širokou veřejnost, ale také pro školní laboratoře, kde by si žáci mohli jednotlivě proces vyzkoušet.

1.1 Cíl práce

Cílem této práce je vytvořit cenově dostupný a uživatelsky přívětivý PCR přístroj, který zpřístupní technologii široké veřejnosti. Práce se zaměřuje na řešení problému vysokých nákladů a složitosti stávajících zařízení, přičemž klade důraz na jednoduchost používání a dostupnost. K dosažení tohoto cíle je navržen postup zahrnující návrh a výrobu přístroje, implementaci softwarového řešení a vytvoření příslušné dokumentace. Výsledkem práce bude funkční prototyp PCR přístroje s otevřenou dokumentací, který umožní snadné sestavení a použití. [1]

Kapitola 2

Teoretické pozadí

2.1 Co je to PCR?

Polymerázová řetězová reakce, známá pod zkratkou PCR, umožňuje syntetizovat specifickou část DNA a vytvořit více než 10^9 kopií.

Tato metoda výrazně urychluje celý diagnostický proces, od odběru vzorku až po interpretaci výsledků, což usnadňuje stanovení diagnózy. Uplatnění nachází v různých medicínských oborech, například v lékařské genetice při diagnostice genetických onemocnění nebo v onkologii, kde pomáhá analyzovat patologické změny v genomu. Neustálý vývoj laboratorních přístrojů využívaných pro PCR analýzy umožňuje technikům neustále zdokonalovat metody a zavádět nové inovace do praxe. [2]

Metodu PCR vyvinul v roce 1983 Kary Mullis. PCR metoda se prováděla zahříváním vzorku nad kahanem a následným rychlým ochlazením ve studené vodě. Dnes je celý proces plně automatizovaný a probíhá ve specializovaných přístrojích, které jej provádějí s vysokou přesností a mnohem rychleji, než by dokázal člověk. [3]

2.2 Stávající řešení a jejich nedostatky

PCR technologie je celosvětově využívána v laboratořích jako zásadní nástroj pro diagnostiku a výzkum. Přestože jsou dnešní PCR stroje vysoce vyspělé, jejich praktické nasazení stále naráží na několik zásadních problémů.

Současné PCR přístroje jsou primárně navrhovány pro velké laboratoře, které disponují dostatečným prostorem, vhodnou infrastrukturou a kontrolovaným prostředím, zahrnujícím stabilní vlhkost a čistotu vzduchu. To výrazně omezuje jejich využití v menších laboratořích nebo mobilních diagnostických jednotkách.

Pořízení PCR přístroje představuje značnou investici, a kromě samotné technologie je nutné počítat i s dodatečnými náklady na školení zaměstnanců, kteří musí být schopni přístroj správně obsluhovat.

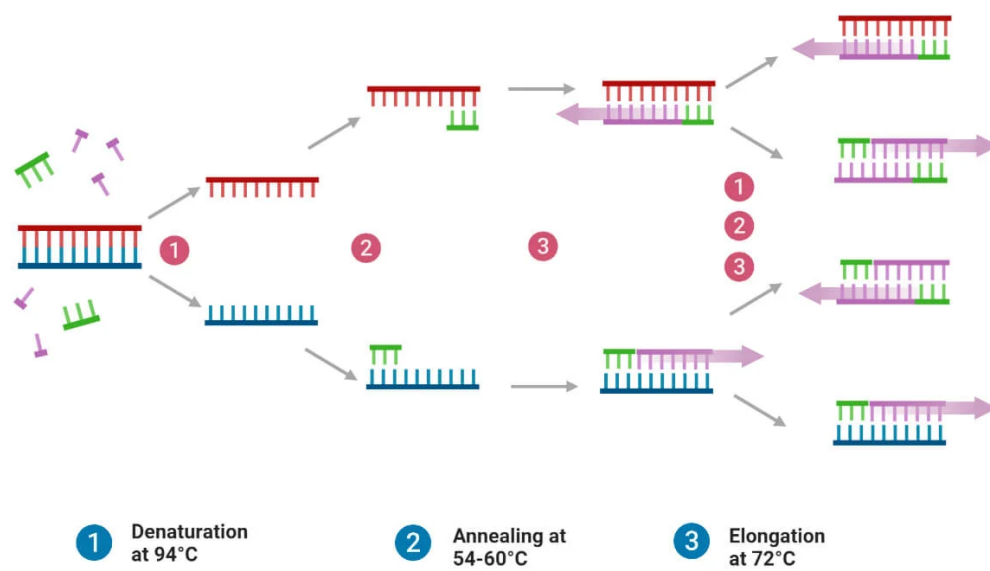
2.3 Cykly Termocycleru

Denaturace je první fáze PCR cyklu, během níž je vzorek spolu s primerem ohřátý na teplotu 95 °C. Při této teplotě dochází k narušení vodíkových vazeb mezi dvěma částmi DNA, což způsobí rozdělení dvoušroubovice na jednotlivá vlákna. (viz. obrázek 2.1)

Annealing (žíhání) je fáze kdy se vzorek rychle zchladí na teplotu zhruba 50°-60°C a poloviční šroubovice DNA se spojí s primerem a z původní jedné se vytvoří dvě částečné šroubovice. (viz. obrázek 2.1)

Extenze je poslední krok, který zajišťuje konečnou syntézu celé šroubovice, probíhá zhruba o teplotě 65°-75°C (viz. obrázek 2.1) [4]

PCR Steps



Obrázek 2.1: Popis PCR cyklu. [5]

Kapitola 3

Pouzdro

3.1 Pouzdro

Pouzdro celého přístroje bylo vytvořeno s ohledem na jeho malou velikost a také efektivitu zahřívání a chlazení vzorků.

3.1.1 Použité materiály

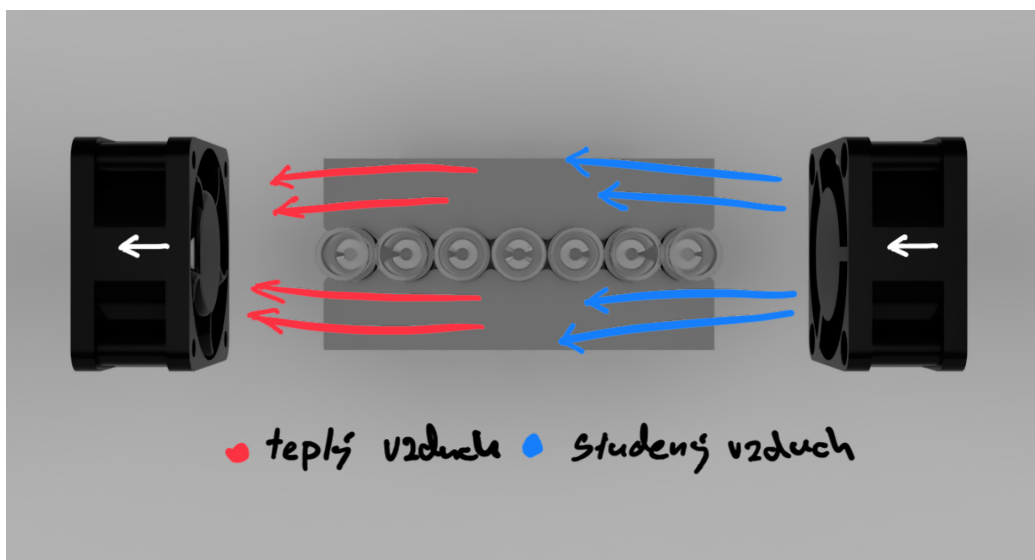
ASA - Filament ideální k použití v běžně a dlouhodobě používaných zařízeních, odolný vůči UV světlu a teplotám pohybujícím se kolem 80°C.

PA-GF - Filament plněný skelnými vlákny má velmi vysokou tepelnou odolnost a je ideální pro kontakt s topným tělískem, které může dosáhnout teplot až 160°C.

3.1.2 Aktivní chlazení

Chlazení tohoto zařízení je založeno na dvou větrácích, které jsou běžně používány v serverových systémech. Tyto větráky jsou zapojeny v sériovém uspořádání, přičemž jeden z nich tlačí vzduch dovnitř přístroje, zatímco druhý ho vyfukuje ven. Tato kombinace zajišťuje optimální chlazení komponentů, jako jsou topné tělíska a samotné vzorky, které jsou umístěny přímo

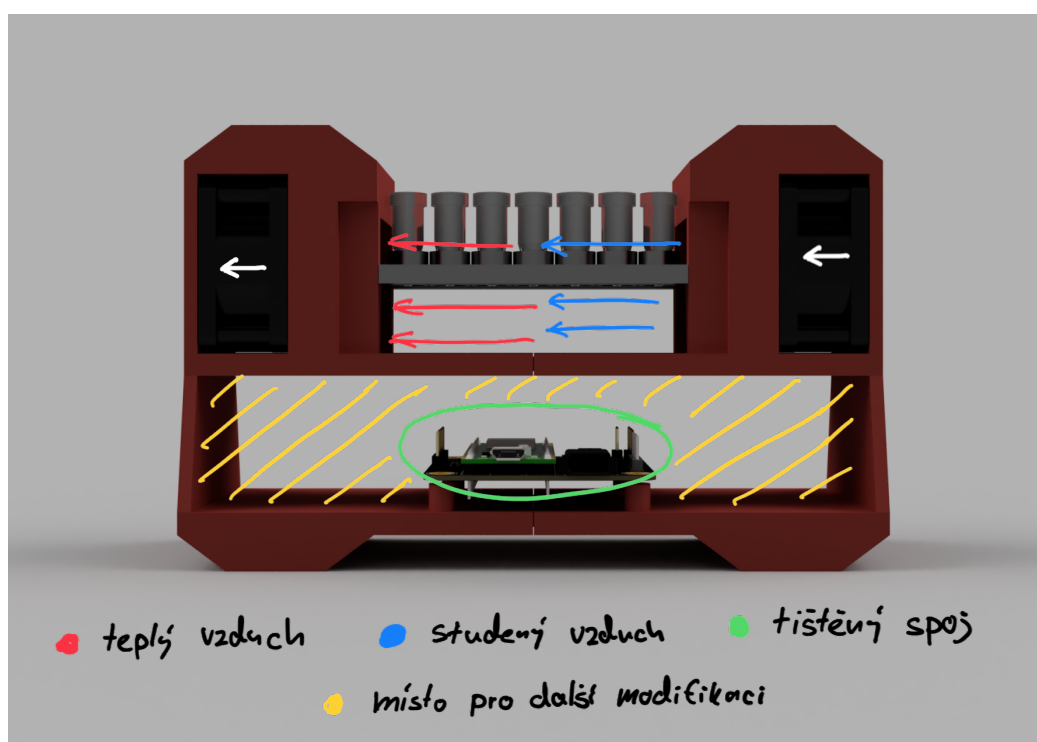
uprostřed zařízení pro co největší průtok vzduchu. Větráky jsou řízeny algoritmem PID. (viz. obrázek 3.1; obrázek 3.2)



Obrázek 3.1: Proudění vzduchu přístrojem

3.1.3 Místo pro elektrické komponenty

Tištěný spoj (PCB) je navržen tak, aby přesně zapadl do pouzdra a zároveň zabíral co nejméně místa. Konstrukce zároveň počítá s volným prostorem uvnitř pouzdra, který umožňuje případné modifikace zařízení. (viz. obrázek 3.2)



Obrázek 3.2: Prostor pro elektroniku.

Kapitola 4

Tepelná tělíska

4.1 Koncept

Na začátku stavby jsme se rozhodli použít tepelný výměňkový blok, který zajišťoval přenos tepla mezi tepelnými tělíska a samotnými vzorky. Postupem času jsme se ale blok rozhodli odstranit. Měl totiž vysokou tepelnou kapacitu. To znamenalo, že jsme museli do systému vložit hodně energie na zahřátí i ochlazení, to snižovalo rychlost a efektivitu přístroje.

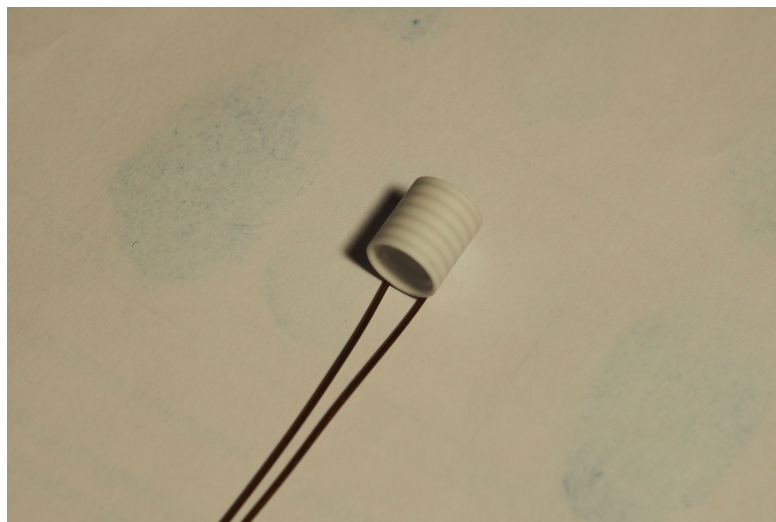
4.2 Tepelná výměna

Výměna tepla mezi tepelnými tělíska a samotným vzorkem je velmi neefektivní, protože probíhá skrze vrstvu vzduchu, která je tepelně nevodivá. Tento problém jsme následně řešili PID kalibrací, která tento problém téměř eliminovala.

4.3 Použité tepelné tělísko

Do přístroje jsme se rozhodli usadit válcové topné tělísko (viz. obrázek 4.1), které poskytuje rovnoměrný ohřev z každé strany vzorku. Tento typ topných tělísek se používá v běžných 3d tiskárnách. Funkci thermocycleru s tímto

topným tělískem stále testujeme.



Obrázek 4.1: Tepelné tělísko

Kapitola 5

Tištěný spoj

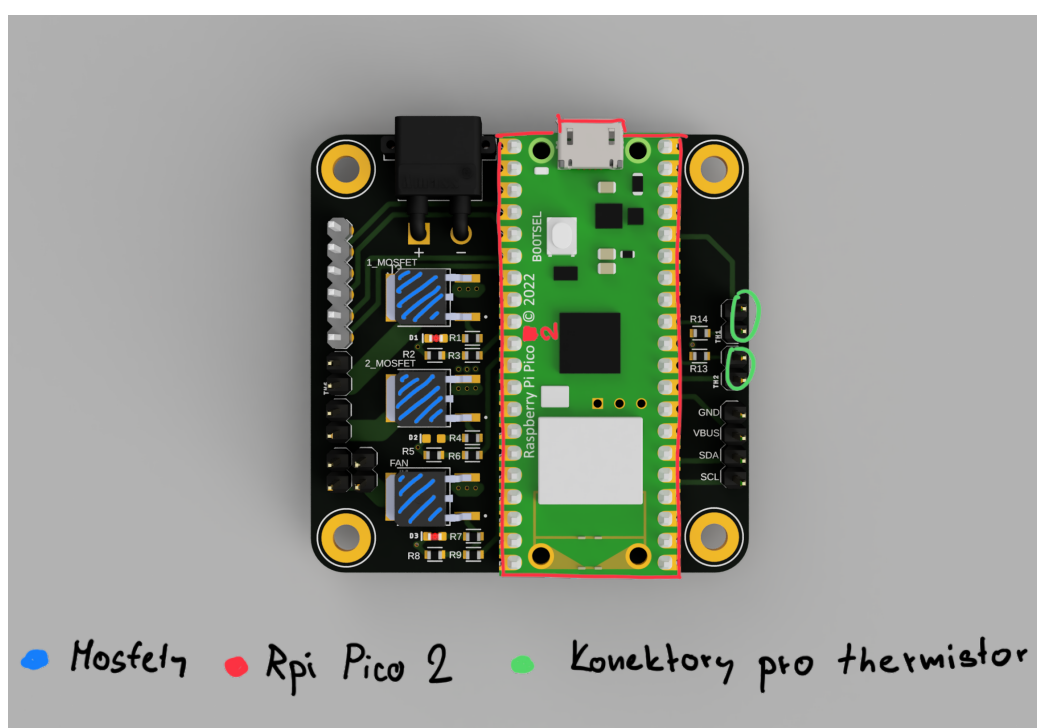
5.1 Design vlastního PCB

K termocykleru jsem si vytvořil vlastní PCB (tištěný spoj), protože volně dostupné desky s podobnými funkcemi neodpovídaly mým požadavkům. Na tištěném spoji jsem se rozhodl použít jako hlavní řídicí jednotku Raspberry Pi Pico 2. K řízení topného tělíska a větráku jsem použil 3 mosfety typu-N. Přes tištěný spoj jsou také k desce připojené dva thermistory, které slouží k monitorování teplot v termocykleru a jeho řízení. (viz. obrázek 5.1)

Raspberry Pi Pico 2 jsem se rozhodl použít pro jeho jednoduchost programování, skvělou dokumentaci, a také pro velké množství pinů, které jsou vhodné pro prototypování a vývoj.

Mosfety A4184 umožňují spínání velkých napětí a proudů ve srovnání se samotnou řídicí jednotkou. Jsou zde využívány pro spínání tepelných tělísek a větráků pomocí algoritmu PWM. [6]

V zařízení jsou použity 100k Ω thermistory, které jsou jednoduché na čtení hodnoty a také relativně přesné a dostupné. Na tištěném spoji dochází k zvýšení napětí pomocí děliče napětí. Ten zvyšuje měřitelné napětí, aby bylo čitelné celé spektrum, ve kterém thermistor dokáže měřit.



Obrázek 5.1: Popis tištěného spoje

Kapitola 6

Kód

6.1 Program

Tento kód aktivně řídí teplotu vzorků v termocycleru. Je napsán pro platformu Raspberry Pi Pico 2, která ovládá topná tělíska a větráky tak, aby udržovaly požadovanou teplotu během jednotlivých fází PCR cyklu.

Nastavení a konfigurace

Cycle_count – určuje počet cyklů, které přístroj provede.

Freq – nastavuje frekvenci, na které zařízení pracuje.

temp – teplota, které by mělo zařízení dosáhnout v daném cyklu.

time – doba, po kterou se zařízení snaží udržet vzorek na definované teplotě.

6.1.1 Konfigurace hardwaru (Piny)

Nastavení pinů pro ovládání jednotlivých komponent. K ovládání se využívají GPIO piny, které podporují generování PWM signálu.

Dále jsou přiřazeny piny s ADC (Analog-to-Digital Converter) pro měření hodnot termistorů.

6.1.2 Logování dat

Class Logger zapisuje do CSV souboru aktuální čas, hodnoty teplot, senzorů a PID výstupů pro ohřev a chlazení.

6.1.3 PID regulátor

Class PID (Proportional-Integral-Derivative) implementuje regulátor pro řízení ohřevu a chlazení. Výstupy PID regulátoru slouží k udržení teploty na požadované hodnotě.

Ke správné funkci je nutné správně nastavit hodnoty složek P, I a D, které se musí před prvním použitím přístroje zkalibrovat.

PID algoritmus je regulační smyčka používaná k udržení stabilní hodnoty určité veličiny, například teploty, rychlosti nebo polohy. Funguje na principu zpětné vazby – porovnává skutečnou hodnotu s požadovanou a na základě rozdílu (chyby) upravuje výstupní signál.

Regulace se skládá ze tří složek: Proporcionální složka (P) reaguje přímo na aktuální chybu – čím větší chyba, tím větší korekční zásah. Integrální složka (I) sleduje součet minulých chyb a eliminuje dlouhodobé odchylky, čímž zajišťuje dosažení cílové hodnoty bez trvalé chyby. Derivační složka (D) předpovídá budoucí trend chyby na základě její rychlosti změny a pomáhá stabilizovat regulaci tím, že snižuje překmity [7].

6.1.4 PWM algoritmus

PWM (Pulse Width Modulation) je technika, která umožňuje řízení výkonu elektronických zařízení změnou šířky pulzů v signálu s pevnou frekvencí. Princip spočívá v opakovaném zapínání a vypínání výstupu v rychlých intervalech, přičemž délka zapnutého stavu v každém cyklu určuje výsledný průměrný výkon. Tento poměr mezi dobou zapnutí a celkovou periodou se nazývá “duty cycle” a udává se v procentech. Například při 50% duty cycle je signál zapnutý a vypnutý po stejnou dobu, zatímco při 75% duty cycle je zapnutý tři čtvrtiny doby a pouze čtvrtinu vypnutý. [8]

6.1.5 Fáze termocykleru

Kód implementuje řízení jednotlivých fází PCR procesu: počáteční denaturace, denaturace, annealing, extenze a konečná extenze.

V každé fázi probíhají tzv. subfáze. Každá subfáze zkontroluje cílovou teplotu pro aktuální cyklus, porovná ji s aktuální teplotou a dosadí hodnoty do PID algoritmu, který vypočítá potřebný výkon ohřevu či chlazení. Výstupní hodnota je následně převedena na PWM signál pro regulaci výkonu.

Subfáze také obsahuje if podmínku, která kontroluje, aby tepelné tělísko nepřekročilo teplotu 160 °C, což by mohlo vést k poškození kontejneru na vzorek.

6.1.6 Hlavní program

Funkce main zajišťuje spuštění všech cyklů ve správném pořadí a také bezpečné vypnutí přístroje při náhlém zastavení programu.

Kapitola 7

Kalibrace PID a její výsledky

7.1 Cíl

Cílem kalibrace je přiblížit se s teplotou vzorku co nejblíže cílové teplotě. (viz. obrázek 7.1; obrázek 7.2)

7.2 Postup

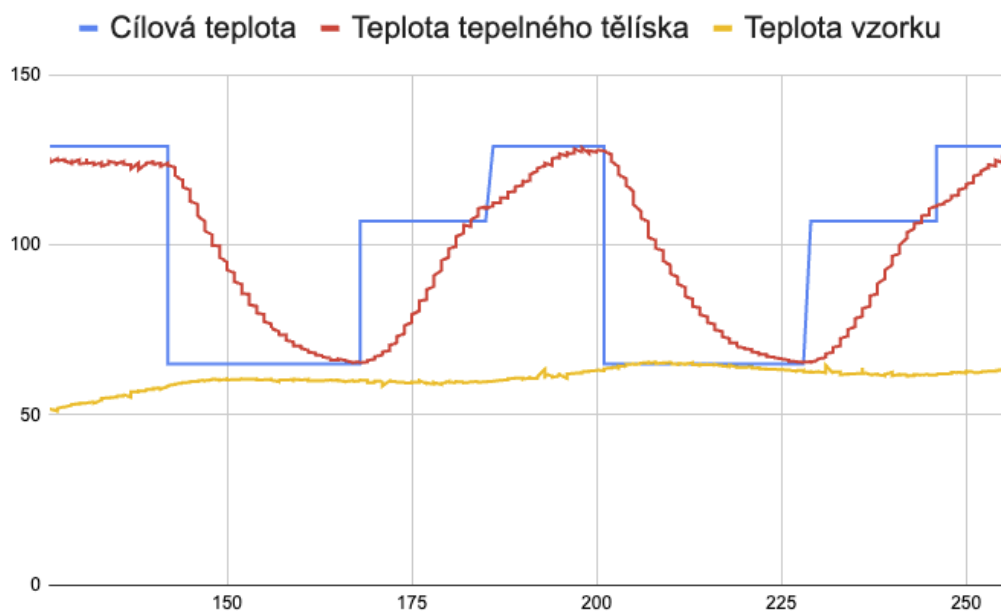
Po sestavení přístroje bylo nutné provést kalibraci PID algoritmu. Proces kalibrace jsme zahájili postupným zvyšováním hodnoty K_p (P) až do bodu, kdy teplota teplotního článku začala oscilovat kolem cílové hodnoty. Následně jsme tuto hodnotu vydělili dvěma, čímž jsme získali počáteční nastavení. K_i (I) jsme určovali postupným zvyšováním v malých intervalech (0.05), dokud se teplota nezačala přesně zastavovat na požadované hodnotě. K_d (D) jsme použili pro jemné doladění přesnosti. Nastavil jsem jej na hodnotu 0.2, což umožnilo teplotě dosáhnout přibližně požadovaných hodnot s minimální odchylkou.

7.3 Závěr a provedené úpravy algoritmu

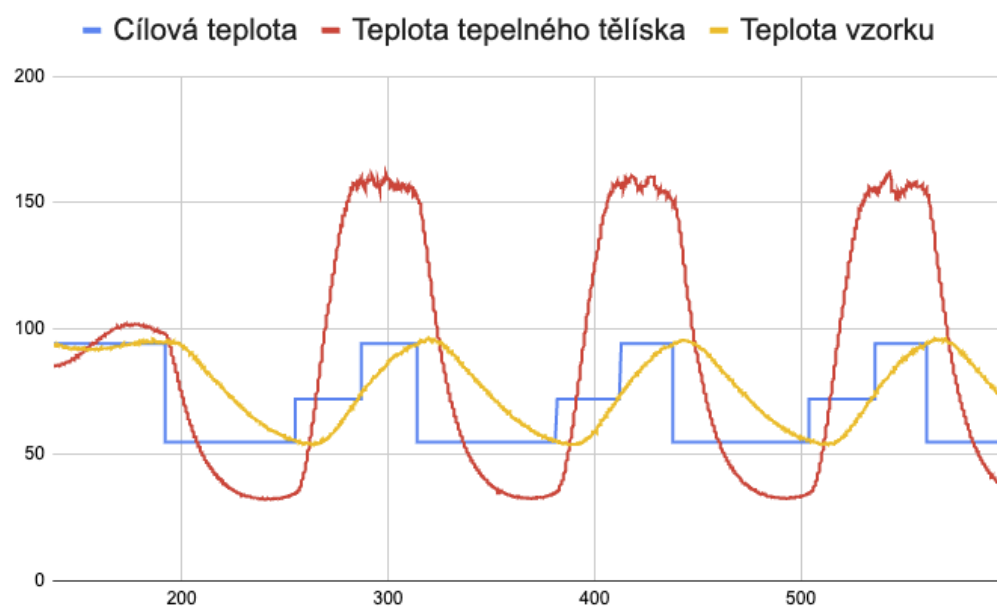
Kalibrace pid se povedla, ale teploty které měl dosahovat vzorek, prakticky nedosahoval, proto jsem se rozhodl v kodu udělat jednu změnu které nás k tomuto cíli dovedla. Zavedl jsem takzvanou hodnotu efektivní_cíl, kterou se vždy topné tělísko pokoušelo dozáhnout. Tato proměná se spočítala pomocí této rovnice.

$$T_{\text{efektivní}} = T_{\text{cílová}} + (T_{\text{tělíska}} - T_{\text{vzorku}})$$

Rovnice 7.1: Rovnice pro výpočet efektivního cíle



Obrázek 7.1: Graf s zkalibrovaným PID



Obrázek 7.2: Graf s funkcí efektivní teplota

Závěr

Přístroj jsme úspěšně sestavili a zkalibrovali, avšak zatím se nám nepodařilo úspěšně provést PCR reakci, protože testy vždy vykazovaly určitou chybu. Do budoucna chceme zařízení dále vylepšit a dosáhnout úspěšného znásobení DNA vzorku.

Vývoj tohoto projektu pro mě byl velmi přínosný, zejména v oblasti 3D modelování. Měl jsem možnost pracovat s komplexními modely přístrojů a reálnými součástkami, které jsem musel zohlednit v designu. Kromě technických dovedností mi tento projekt přinesl i důležitou zkušenost. Naučil jsem se dokončit projekt, i když jsem věděl, že nebude dokonalý. To pro mě byl jeden z nejzásadnějších momentů v celém procesu.

Literatura

1. OPENAI. *GPT-4* [online]. 2025. [cit. 2025-02-04]. Dostupné z: <https://chatgpt.com/share/6794e069-bb58-8011-a5dd-6c1e4d5121b1>.
2. BROŽÍKOVÁ, Anna. *Amplifikace v biochemii a její další mezioborové souvislosti: PCR*. Čs. dobrovolců 11, Teplice, 2023.
3. WIKIPEDIE: OTEVŘENÁ ENCYKLOPEDIE. *Polymerázová řetězová reakce*. 2024. Dostupné také z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce&oldid=24437522.
4. WIKISKRIPTA. *Polymerázová řetězová reakce*. 2023. Dostupné také z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce&oldid=471220.
5. MICROBE NOTES. *PCR Steps*. 2022. Dostupné také z: <https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2022/09/Steps-of-PCR.jpg>.
6. ALFA & OMEGA SEMICONDUCTORS. *D4184 Datasheet: 40V N-Channel MOSFET*. 2009. Rev. 0.
7. CHATGPT. *Popis PID algoritmu* [online]. 2025. [cit. 2025-02-19]. Dostupné z: <https://chatgpt.com/share/67b5ff0c-0444-8011-87f0-8475a76a8a89>.
8. CHATGPT. *Popis PWM algoritmu* [online]. 2025. [cit. 2025-02-04]. Dostupné z: <https://chatgpt.com/share/67b61aca-a6bc-8011-b622-11416ace8734>.

Seznam obrázků

2.1	Popis PCR cyklu. [5]	11
3.1	Proudění vzduchu přístrojem	13
3.2	Prostor pro elektroniku.	14
4.1	Tepelné tělísko	16
5.1	Popis tištěného spoje	18
7.1	Graf s zkalibrovaným PID	23
7.2	Graf s funkcí efektivní teplota	24

Seznam rovnic

7.1	Rovnice pro výpočet efektivního cíle	23
-----	--	----