

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2018

Simona Hidegová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

PCR THERMOCYCLER

PCR THERMAL CYCLER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Simona Hidegová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Sekora

BRNO 2018

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Simona Hidegová

ID: 186658

Ročník: 3

Akademický rok: 2017/18

NÁZEV TÉMATU:

PCR thermocycler

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a hardwarem pro podporu této metody. 2) Prostudujte možnosti a parametry podpůrného hardwaru metody (thermocycleru) a parametry procesu. 3) Navrhněte autonomní mikroprocesorem řízený thermocycler pro měření metodou PCR ve dvou mikrokyvetách. Thermocycler musí umožňovat ohřev a ochlazování vzorku v teplotním rozsahu 30°C až 90°C s gradientem 4°C/s. Thermocycler musí umožňovat externí řízení pracovního cyklu. 4) Sestavte navržený thermocycler včetně souvisejícího řídicího softwaru pro mikroprocesor. Konstruktivně uvažujte rozšíření o optická měření. 5) Ověřte funkci thermocycleru.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] ATWOOD, John G. et al. Thermal cycler for automatic performance of the polymerase chain reaction with close temperature control. 1995. USA. US 5602756 A. Uděleno 29. 11. 1990. Zapsáno 8. 12. 1995.

[2] Thermo Fisher Scientific. VeriFlex temperature control technology for thermal cycling: application note [online]. Thermo Fisher Scientific, 2015. Dostupné z: <<http://lifeltechnologies.com/thermalcyclers>>.

Termín zadání: 5.2.2018

Termín odevzdání: 25.5.2018

Vedoucí práce: Ing. Jiří Sekora

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Metóda PCR umožňujúca množenie úseku molekuly DNA závisí na teplotnom cykle ohrevu a ochladzovania zaobstaraného pomocou termocykléru. Možnosti a parametre komerčne dostupných termocyklérov sú rôzne, daná práca predstavuje konkrétny návrh a zostrojenie podporného hardwaru pre tri mikrokyvety s možnosťou ohrevu a ochladzovania vzoriek v rozsahu 5 °C až 100 °C s riadiacim firmwarom umožňujúcim externé riadenie pracovného cyklu. Následne posudzuje dosiahnuté parametre jeho pracovného cyklu, uvažuje o ďalších možnostiach a vývoji firmwaru a rozšírení prístroju o optické meranie.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

PCR, DNA, termocyklér, konštrukcia pre mikrokyvety, riadenie teploty, užívateľské riadenie, optické meranie

ABSTRACT

PCR enables to amplify copies of a segment of DNA and is dependent on thermal cycle, heating and cooling, provided by thermocycler. Options and parameters of commercially available thermocyclers are various. This thesis brings in design of hardware for three PCR tubes with ability to heat or cool down the samples in the range from 5°C to 100°C and firmware which allows external device control. It assesses acquired parameters of thermal cycle and discusses possible further development of firmware and extension for optical measurement.

KEYWORDS

PCR, DNA, thermocycler, construction for PCR tubes, temperature control, external device control, optical measurement

HIDEGOVÁ, Simona. *PCR thermocycler*. Brno, 2018, 36 s. Bakalárska práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav bio-medicínského inženýrství. Vedúci práce: Ing. Jiří Sekora

VYHLÁSENIE

Vyhlasujem, že som svoju bakalársku prácu na tému „PCR thermocycler“ vypracovala samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce, využitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autorka uvedenej bakalárskej práce ďalej vyhlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto bakalárskej práce som neporušila autorské práva tretích osôb, najmä som nezasiahla nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a/alebo majetkových a som si plne vedomá následkov porušenia ustanovenia § 11 a nasledujúcich autorského zákona Českej republiky č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia časti druhej, hlavy VI. diel 4 Trestného zákoníka Českej republiky č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala vedúcemu práce Ing. Jiřímu Sekorovi za cenné rady, informácie a konzultácie v priebehu vedenia práce. Taktiež konzultantovi MUDr. Michalovi Jurajdovi, PhD. za podnetné návrhy a pripomienky ohľadom biologickej stránky návrhu a Ing. Vratislavovi Harabšovi, PhD. za výrobu konštrukcie využitej v hardware.

Brno

.....

podpis autorky

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Úvod | 9 |
| 1 Polymerázová reťazová reakcia | 10 |
| 1.1 Princíp metódy | 10 |
| 1.2 Optimalizácia priebehu PCR | 11 |
| 1.2.1 Výber teplôt pre priebeh reakcie | 11 |
| 1.2.2 Počet amplifikačných cyklov a účinnosť PCR | 11 |
| 2 PCR termocyklér a jeho pracovný cyklus | 12 |
| 2.1 Teplotná krivka pracovného cyklu | 12 |
| 2.2 Parametry komerčných PCR termocyklérov | 13 |
| 3 Návrh a realizácia hardwaru termocykléra | 15 |
| 3.1 Konštrukcia prostredia pre pracovný cyklus PCR | 15 |
| 3.2 Meranie teploty systému a prebiehajúcej PCR | 18 |
| 3.3 Systém ohrievania vzoriek | 19 |
| 3.4 Systém ochladzovania vzoriek | 20 |
| 3.5 Uživatelské rozhranie pre ovládanie pracovného cyklu | 21 |
| 3.6 Elektrické zapojenie častí hardwaru | 22 |
| 4 Riadiaci firmware termocykléra | 25 |
| 4.1 Nastavenie pracovného cyklu užívateľom | 26 |
| 4.2 Rozdelenie riadiaceho systému na funkčné podjednotky | 26 |
| 4.2.1 Maximálne ohrievanie do definovanej teploty | 27 |
| 4.2.2 Maximálne ochladzovanie do definovanej teploty | 27 |
| 4.2.3 Regulácia udržania stabilnej teploty | 28 |
| 4.3 Prechody medzi funkčnými podjednotkami | 28 |
| 5 Zhodnotenie dosiahnutých parametrov a predpoklady ďalšieho vývoja termocykléra | 30 |
| Záver | 32 |
| Literatúra | 33 |
| Zoznam symbolov, veličín a skratiek | 36 |

ZOZNAM OBRÁZKOV

| | | |
|-----|--|----|
| 1.1 | Tri cyklické kroky PCR [16]. | 10 |
| 2.1 | Krivka pôsobenia teploty na vzorky. | 12 |
| 3.1 | Konštrukcia prostredia pre pracovný cyklus PCR. | 16 |
| 3.2 | Rozmery používaných mikrokyviet. | 16 |
| 3.3 | Pohľad na mriežku tunelov a zasunuté topné patrony. | 17 |
| 3.4 | Umiestnenie teplotného senzora v konštrukcii. | 18 |
| 3.5 | Zabudovanie topných patron v konštrukcii. | 19 |
| 3.6 | Schéma systému ochladzovania vzoriek. | 21 |
| 3.7 | Spínacie jednotky riadiaceho systému. | 23 |
| 3.8 | Pripojenie I2C zbernice k LCD. | 23 |
| 4.1 | Zobrazenie série pokynov v rámci užívateľského prostredia. | 25 |
| 4.2 | Zmena teplotnej krivky vplyvom tepelnej kapacity. | 29 |

ZOZNAM TABULIEK

| | | |
|-----|---|----|
| 2.1 | Základné parametre komerčných termocyklérov [7][8][15][25]. | 13 |
| 2.2 | Porovnanie konkrétneho parametru rôznych výrobcov [26]. | 14 |
| 3.1 | Zoznam častí PCR termocykléra. | 22 |
| 3.2 | Zoznam použitých rezistorov a kondenzátorov. | 24 |
| 5.1 | Porovnanie vytvoreného PCR termocykléru s komerčnými. | 30 |

ÚVOD

Pokrok vedy a výskumu v oblasti biológie, chémie a medicíny je neoddeliteľný od pokroku techniky a metód, ktoré využíva k skúmaniu. Jednou z prelomových metód skúmania je metóda PCR, ktorá je možná pomocou PCR termocykléra.

PCR termocyklér, tak ako každý prístroj, priťahuje pozornosť v oblasti jeho rozvoja, ktorý si pokladá za úlohu docieľiť najlepšie možné požadované parametry s ich najefektívnejšou kombináciou v záujme dosiahnuť čo najlepšiu funkčnosť pracujúceho systému. Pre dosiahnutie tohto záujmu je základom prvotný rozbor informácií, ohľadom vlastností a funkčnosti, ktoré už boli získané doposiaľ a možnosťí, ktoré už boli dosiahnuté.

Preštudovanie samotnej polymerázovej reťazovej reakcie, optimalizácie jej priebehu, jej pracovného cyklu, ktorý sa vyžaduje od prístroja a porovnanie s inými komerčnými prístrojmi je kľúčové pre reálny základ, na ktorom sa má nový návrh postaviť. Poznatky z preštudovania týchto informácií sú uvedené v nasledujúcich kapitolách, na ktoré naväzuje samotný návrh a realizácia nového prístroja.

Návrh a realizácia čiastočných systémov, ktoré spolu spolupracujú v rámci celku, sú rozobraté z pohľadu použitých elektronických súčiastok, modulov a výberu použitých materiálov v kapitole o hardware termocykléra s vysvetleniami konkrétnych výberov.

Na daný rozbor následne naväzuje rozbor fungovania riadenia firmwaru termocykléru. Rozbor sa zaoberá použitými funkciami a premennými, ktoré si predávajú informácie pre chod prístroja, a ich umiestnením vo fázach pracovného cyklu definovaných voči teplotnej krivke.

Po popísaní vlastností vytvoreného PCR termocykléra dochádza k zhodnoteniu jeho dosiahnutých parametrov v spätnom porovnaní s komerčnými termocyklérmi, od ktorých sa odvíjal návrh a rozobratiu dôvodov spôsobujúcich tieto získané výsledky. V rámci uzavretia témy sú uvedené predpoklady ďalšieho vývoja prístroja v budúcnosti so zhrnutím dosiahnutých informácií.

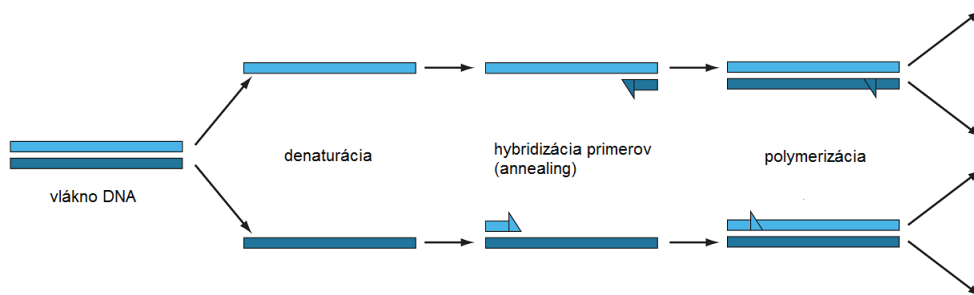
1 POLYMERÁZOVÁ REŤAZOVÁ REAKCIA

Metóda PCR je základnou technikou využívanou v medicíne, molekulárnej biológii a genetike. Umožňuje namnoženie definovaného úseku molekuly DNA z minimálneho množstva vzorku. Jej objav od roku 1983 prispel k významnému rozvoju vedy a priniesol objaviteľovi biochemikovi Dr. Kary Banks Mullisovi v roku 1993 Nobelovu cenu za chémiu.

Svoje využitie metóda našla pri detekcii ochorení (geneticky podmienené ochorenia a znaky, nádorové a infekčné ochorenia) včetně prenatálnej diagnostiky, vo forenznej genetike (identifikácia osôb), živočíšnej a rastlinnej výrobe (detekcia kmeňových a druhových odlišností, paternita, populačná analýza), potravinárstve (identifikácia surovín, prítomností patogénov) a v mnohých ďalších odvetviach [16].

1.1 Princíp metódy

Princíp je založený na činnosti DNA polymerázy amplifikujúcej vlákno DNA. Nakoľko DNA polymeráza nedokáže syntetizovať nové vlákno DNA od začiatku, potrebuje tzv. primer. Primer je krátky úsek DNA presne komplementárny k 3'-koncom DNA vlákien. Na dané vlákna sa ďalej špecificky viažu deoxynukleotidtrifosfáty, DNA polymeráza a templátová DNA.



Obr. 1.1: Tri cyklické kroky PCR: denaturácia, hybridizácia primerov (annealing) a polymerizácia. Dané cykly sa opakujú n-krát [19].

Na začiatku metódy dôjde k zahriatiu templátovej DNA na 95 °C, ktoré spôsobí jej denaturáciu, rozpletie sa na dve jednotlivé vlákna. Rozpletenie umožní primerom naviazať sa (hybridizovať) na komplementárne vlákna DNA. Tento krok prebieha v závislosti od viacerých faktorov pri teplote v rozsahu od 45 °C do 70 °C. DNA polymeráza následne dosyntetizuje komplementárne DNA vlákna, pričom syntéza začína od 3'-koncev naviazaných primerov. Optimálna teplota pre DNA polymerázu je 37 °C, momentálne sa však bežne využíva široká paleta DNA polymeráz

z termofilných mikroorganizmov, ktorých teplotné optimum je 72 °C. Ich výhoda spočíva v odolnosti voči teplotám denaturácie a preto ich nie je potrebné počas reakcie znova pridávať. V ďalšom kroku slúži novosyntetizovaný produkt ako templát pre ďalšiu reakciu, pričom množstvo DNA kópií sa v každom cykle zdvojnásobuje (Obr. 1.1) [16].

1.2 Optimalizácia priebehu PCR

Každá PCR reakcia sa dá modifikovať pre produkciu čo najväčšieho výťažku pri vysokej špecificite a citlivosti. Na priebeh reakcie pôsobia faktory, ktoré treba zohľadniť, medzi ktoré patria: výber a koncentrácia primerov, stanovenie teplôt, koncentrácia a typ DNA polymerázy, koncentrácia horečnatých iontov a iontová sila reakčného roztoku, počet amplifikačných cyklov a prídavok aditív [16].

1.2.1 Výber teplôt pre priebeh reakcie

V priebehu PCR reakcie sú potrebné tri teploty, ktoré zabezpečujú denaturáciu DNA, špecifické naviazanie primerov na templát a polymerizáciu vlákna.

V typickej PCR reakcii sa dvojjávitnicová DNA denaturuje pri teplote medzi 90 °C až 95 °C. Naviazanie primerov prebieha pri teplote v rozmedzí 40 °C až 60 °C, pričom teplota hybridizácie primerov závisí od počtu GC párov, dĺžky samotných primerov a koncentrácie solí v reakcii. Výpočet danej teploty vychádza z empirického vzorca:

$$T = 4 \cdot (G + C) + 2 \cdot (A + T) - 4 \cdot C \quad (1.1)$$

Premenné G,C,A a T značia počet daných jednotlivých dusíkatých báz. Polymerizácia vyžaduje teplotu medzi 70 °C a 75 °C [16].

1.2.2 Počet amplifikačných cyklov a účinnosť PCR

Amplifikácia je exponenciálny proces, pri ktorom malé odchýlky v reakcii môžu výrazne zmeniť výťažok produktov. Z dôvodu, že účinnosť PCR sa znižuje vo vyšších fázach amplifikácie, hlavne v dôsledku vyčerpania jednotlivých reakčných komponentov, zníženiu enzymatickej aktivity a akumulácii produktov, sa produkty analyzujú iba počas exponenciálnej fázy amplifikácie. Množstvo PCR produktov narastá exponenciálne do koncentrácie zhruba 10^{-8} mol/l, lineárne do 10^{-7} mol/l [16].

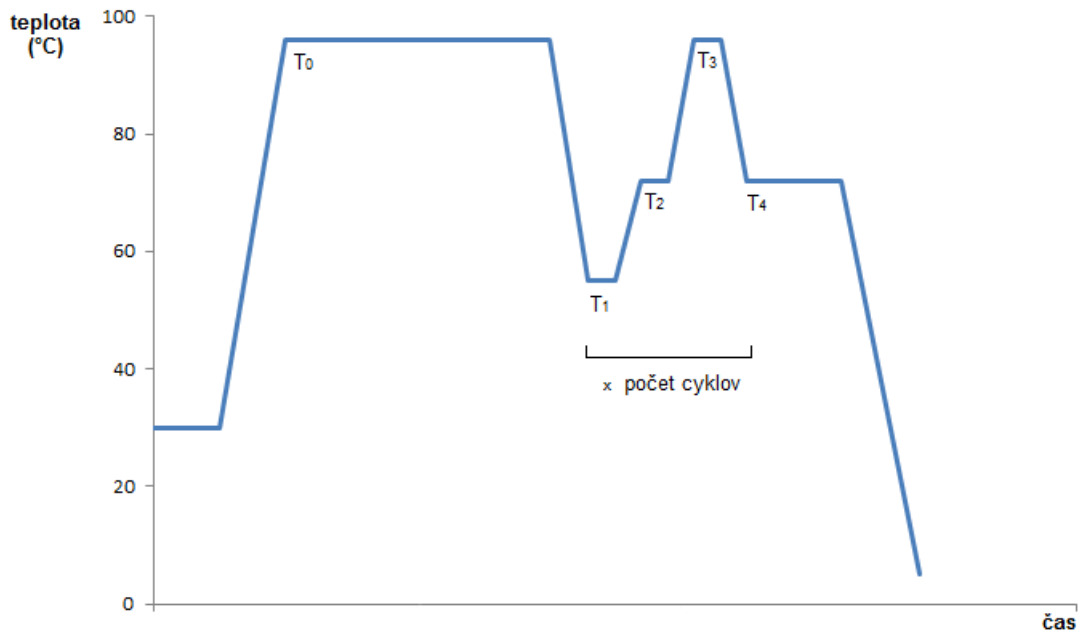
Optimálny počet cyklov je 25 až 35. Zvýšenie počtu cyklov indukuje akumuláciu nešpecifických produktov PCR. V prípade potreby amplifikácie daného úseku na viac cyklov sa odoberá časť produktu po prvej amplifikácii, ktorá slúži ako templát pre druhú amplifikáciu [16].

2 PCR TERMOCYKLÉR A JEHO PRACOVNÝ CYKLUS

Priebeh PCR je možný pomocou PCR termocykléru. Ide o laboratórny prístroj, ktorý zabezpečuje niektoré faktory pôsobiace na reakciu ako sú udržanie a zmena teplôt v priebehu reakcie v čase a zároveň je schopný cyklovať dané zmeny spôsobujúce početné amplifikácie, od čoho sa odvíjajú hlavné parametre a kladené požiadavky na jeho funkčnosť.

V rámci jeho pracovného cyklu je sledovaná rýchlosť dosiahnutia stanovenej maximálnej teploty, gradient príbytku teploty za jednotku času ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$), schopnosť udržania stability teploty pri prechode z ohrievania na ochladzovanie a naopak, ale i počas fázy bez požadovanej zmeny.

2.1 Teplotná krivka pracovného cyklu



Obr. 2.1: Krivka pôsobenia teploty na vzorky.

T_0, T_3 - teplota denaturácie, T_1 - teplota annealingu, T_2, T_4 - teplota polymerizácie. Os času nie je popisateľná vzhľadom k veľkej variabilite hodnôt počas pracovného cyklu (ide o približnú schému). Pre predstavu sú hodnoty časov pôsobenia teplôt pre T_0 približne 15 min, v cykle pre teploty T_1, T_2, T_3 približne 20 s pre každú a pre T_4 približne 5 min.

Počas pracovného cyklu sa prístroj snaží splniť a zachovať teplotnú krivku pôsobenia teploty na vzorky v čase (Obr. 2.1). Vzorky z teploty prostredia najskôr zahreje a zahrieva na teplote denaturácie DNA, následne vykoná niekoľko opakujúcich sa cyklov s teplotami annealingu, polymerizácie a denaturácie, nakoniec podrží teplotu pre polymerizáciu a podchladí vzorky na maximálnu možnú teplotu efektívne vztiahnutú k času. Podchladenie sa vykonáva vzhľadom k ich následnému uchovávaní v chladiacich zariadeniach.

Užívateľ pred samotným pracovným cyklom musí definovať parametre reakcie, konkrétne hodnoty pre teplotnú krivku: teplotu denaturácie DNA, teplotu annealingu, teplotu polymerizácie, čas trvania prvého ohrevu spôsobujúceho denaturáciu, dĺžku trvania pôsobenia teploty annealingu, polymerizácie a denaturácie v amplifikačnom cykle, počet amplifikačných cyklov a čas trvania poslednej polymerizácie.

2.2 Parametry komerčných PCR termocyklérov

Výrobcovia prístrojov sa vo vývoji stretávajú s výzvou docieľiť najlepšie možné požadované parametre s ich najefektívnejšou kombináciou v záujme dosiahnuť čo najlepšiu funkčnosť pracujúceho systému a tak zabezpečiť čo najideálnejšie zachovanie požadovanej teplotnej krivky a priebehu cyklu. Táto skutočnosť je príčinou veľkého rozmedzia ponúkaných komerčných prístrojov, ktoré umožňuje optimálny výber požadovaného prístroja a tak aj prevedenie samotnej reakcie PCR. Špecifikácie a parametre jednotlivých prístrojov sú voľne dostupné v brožúrach predajcov spolu s dosiahnutými výsledkami. Zároveň sú dostupné mnohé porovnania výrobcami uvádzaných a reálne dosiahnutých hodnôt.

Medzi komerčne ponúkanými prístrojmi boli vybrané prístroje rôznych výrobcov pre predstavu konkrétnych dosiahnuteľných základných parametrov pre návrh nového PCR termocykléru, ktoré sú požadované v rámci bežnej praxe (Tab. 2.1).

| | Rozmedzie teplôt | Presnosť teploty | Teplotná uniformita | Napájacie parametry |
|--------------------------------|------------------|---|--|--|
| ProFlex 96-well Thermal Cycler | 0 - 100 °C | ± 0,25 °C | < 0,5 °C | 100 - 240 V 50 - 60 Hz max. 950 W |
| Bio-Rad T100TM Thermal Cycler | 4 - 100 °C | ± 0,50 °C | ± 0,5 °C | 100 - 150 V / 220 - 240 V 50 - 60 Hz; max. 700 W |
| SensoQuest Labcycler | 5 - 99,9 °C | - | ± 0,25 °C pre 55 °C ± 0,40 °C pre 95 °C | 85 - 265 V 50 - 60 Hz max. 350 W |
| Bioer GeneMax | 4 - 105 °C | 0,1 °C pre 55 °C 0,15 °C pre 72 °C a 95 °C | 0,2 °C | 100 - 240 V 50 - 60 Hz max. 600 W |

Tab. 2.1: Základné uvádzané parametre komerčných termocyklérov [7][15][8][25].

– uvedená informácia nie je dostupná

Týmito parametrami sú *Rozmedzie teplôt*, *Presnosť teploty*, *Teplotná uniformita*, *Maximálny výkon* a napájacie parametre. *Rozmedzie teplôt* udáva možný rozsah pracovnej teploty, teploty voliteľnej pre pracovnú krivku. *Presnosť teploty* definuje odchylku reálnej teploty od meranej a zobrazovanej teploty. *Teplotná uniformita* reprezentuje rozdielnosť jednotnosti hodnôt teploty vo vzorkách [18].

Zároveň boli preskúvané odlišnosti v oficiálne uvedených a reálne získavaných/nameraných charakteristikách a parametroch na príklade *priemerného maximálneho gradientu prírbytku teploty* za jednotku času ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$) rôznych výrobcov pre posúdenie dôveryhodnosti uvádzaných hodnôt (Tab. 2.2) [26]. Tieto zistenia viedli k posúdeniu reálne dosiahnuteľných možností a zisteniu nakoľko striktne treba cieľiť kritéria návrhu voči uvádzaným komerčným termocyklérom.

| ProFlex 96-well Thermal Cycler | | | | Bio-Rad T100™ Thermal Cycler | | | |
|--------------------------------|------------|--------|------------|------------------------------|------------|--------|------------|
| Publikované | | Merané | | Publikované | | Merané | |
| Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie |
| 6,0 | 6,0 | 6,4 | 5,9 | 4,0 | 4,0 | 2,6 | 1,6 |

| SensoQuest Labcycler | | | | Bioer GeneMax | | | |
|----------------------|------------|--------|------------|---------------|------------|--------|------------|
| Publikované | | Merané | | Publikované | | Merané | |
| Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie | Ohrev | Chladienie |
| 4,2 | 3,6 | 3,7 | 3,2 | 5,0 | 4,0 | 4,6 | 3,5 |

Tab. 2.2: Porovnanie *Priemerného maximálneho gradientu prírbytku teploty* ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$) [26]. Vybrané termocykléry pochádzajú od rôznych výrobcov. Medzi publikovanými hodnotami a meranými hodnotami sú odchýlky značiace horšie vlastnosti parametru ako je výrobcami prezentované.

3 NÁVRH A REALIZÁCIA HARDWARU TERMOCYKLÉRA

Pre uskutočnenie metódy PCR je základom ohrievanie a ochladzovanie vzoriek, ktoré sa vkladajú do termocykléru v mikrokyvetách. Štandardné konštrukcie komerčných PCR termocyklérov pozostávajú z priameho ohrievania a ochladzovania kovového bloku Peltierovými článkami s požiadavkou na vysoké výkony, na ktorom sú umiestnené veľké množstvá mikrokyviet v radoch [5].

Vytvorený návrh je jedinečný a snaží sa odstraňovať limity daných riešení. Oddeluje ohrievanie a ochladzovanie na dva samostatné a nekonvenčne realizované systémy. Oddelenie ohrievania a ochladzovania bolo zvolené z dôvodu pomerne vysokej zotrvačnosti Peltierových článkov, ktoré spôsobujú prírastok teploty v momentoch po vypnutí, keď už je jej rast nežiadany a zároveň vyžaduje vysoké výkony článkov.

Namiesto Peltierovho článku boli pre ohrievanie zvolené topné patrony (cartridge heaters), ktoré sú schopné zastavenia ohrevu takmer okamžite. Zároveň sú schopné rovnomerného ohrevu mikrokyviet pri vhodnom umiestnení spôsobom, že ich symetricky obklopujú narozdiel od komerčných PCR termocyklérov, v ktorých ohrievanie pôsobí plošne a tak dochádza k značnej zmene *Teplotnej uniformity* rôznych vzoriek v rámci vložených radov v konštrukcii (Podkapitola 2.2) [27].

Ochladzovanie síce funguje pomocou tradične využívaného Peltierovho článku, v tomto prípade je však vložený do systému rozdielne a tak posúva využitie jeho vlastností pomocou podchladzovania vzduchu a jeho následnej distribúcie v momente požadovaného chladenia.

Dané dva systémy sú spoločne regulované a spúšťané v priebehu pracovného cyklu pomocou mikrokontroléru na základe aktuálnej meranej teploty snímanej zabudovaným teplotným senzorom tak, aby zachovávali konkrétnu teplotnú krivku pracovného cyklu, ktorej parametre sú nastavené užívateľom prostredníctvom užívateľského rozhrania (Podkapitola 2.1).

3.1 Konštrukcia prostredia pre pracovný cyklus PCR

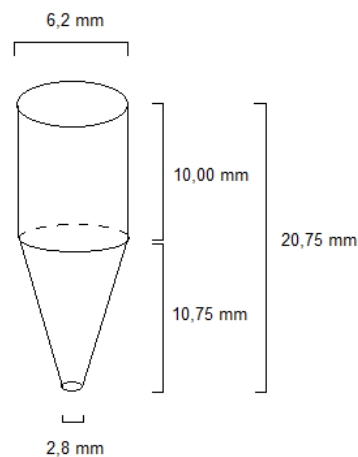
Základnou časťou celého termocykléru je konštrukcia, ktorá slúži na umiestnenie mikrokyviet. Nielenže tvorí podporu pre mikrokyvety obsahujúce vzorky pre reakciu, jej hlavnou úlohou je vytvoriť prostredie, ktoré spája systémy zabezpečujúce teplotné zmeny a ich riadenie. Konštrukcia je kovový blok, ktorý obsahuje 3 vstupy pre uloženie mikrokyvet, vstup pre umiestnenie teplotného senzoru, 3 vstupy pre

aktívny systém ohrievania pomocou topných patron a mriežku tunelov, ktorá vytvára prieduchy pre distribuovaný vzduch pomocou systému ochladzovania (Obr. 3.1). Celkové rozmery konštrukcie ako kovového bloku sú 40 mm x 50 mm x 25 mm.



Obr. 3.1: Konštrukcia prostredia pre pracovný cyklus PCR.
Fotografia verzie konštrukcie v testovacom materiále - hliníkové prevedenie.

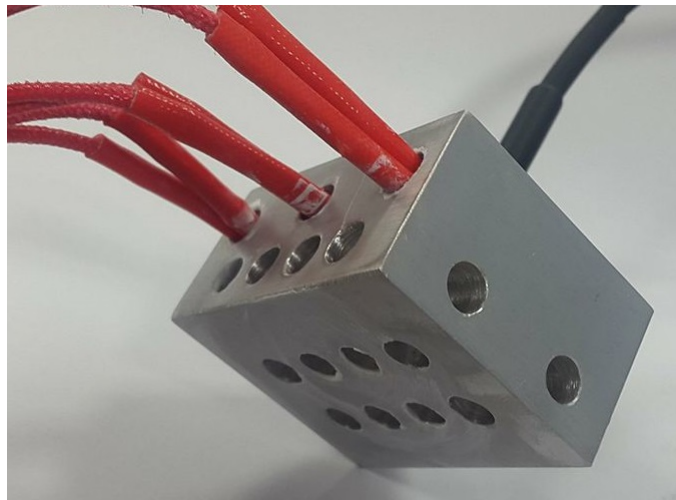
Vstupy pre uloženie mikrokyviet zachovávajú rozmery časti používaných mikrokyviet, časti v tvare zrezaného kužela, s úmyslom zabezpečiť úplné dolahnutie mikrokyvety v otvore pre ideálny prenos teploty na vzorky (Obr. 3.2). Hĺbka vstupného otvoru pre jednu mikrokyvetu je 10,75 mm, pričom priemer otvoru na povrchu je 6,2 mm a priemer na dne je 2,8 mm. Vstup pre umiestnenie teplotného senzoru je umiestnený v bode, ktorý je symetrický v rámci kovového bloku k pozíciám obsahujúcim vzorky.



Obr. 3.2: Rozmery používaných mikrokyviet.
Rozmery boli namerané opakovaným meraním pomocou posuvného meradla.

System aktívneho ohrievania využívajúci 3 vstupy je umiestnený obklopujúc mikrokyvety symetricky. Výhrevné časti topných patron sú umiestnené osovo súmerne voči mikrokyvetám, takže jednotlivé topné patrony sú zasunuté v konštrukcii do hĺbky 30 mm so vstupom totožným s ich priemerom (Obr. 3.3).

Mriežka tunelov pre systém ochladzovania je tvorená tunelmi prechádzajúcimi naskrz celým kovovým blokom z jeho oboch strán, v centrách ich stretov sa ne napájajú tunely vedúce zo spodnej časti kovového bloku (Obr. 3.3). Priemer týchto tunelov je 60 mm.

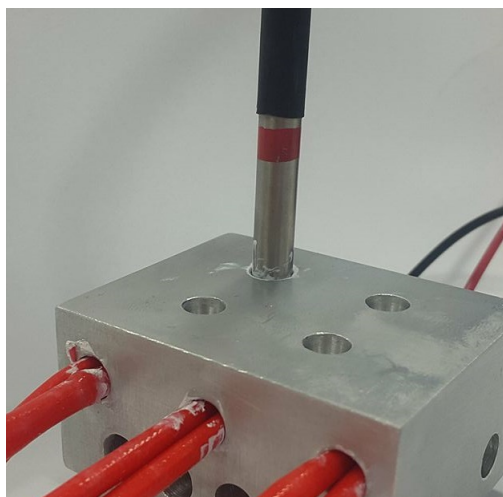


Obr. 3.3: Pohľad na mriežku tunelov a zasunuté topné patrony v konštrukcii. Fotografia verzie konštrukcie v testovacom materiále - hliníkové prevedenie.

Nakoľko celý priebeh termocykléru sa odohráva pomocou kovovej konštrukcie na princípe vodivosti tepla a zároveň hlavným dôvodom oddelenia systému ohrievania a ochladzovania bola vysoká teplotná zotrvačnosť, výber použitého kovového materiálu konštrukcie na základe jeho fyzikálnych vlastností bol kľúčový. Materiál potrebuje zabezpečiť čo najlepšie vedenie tepla a zároveň umožniť jeho rýchlu zmenu, nesmie teplo dlhodobo zadržiavať. Medzi ako vybraný materiál týmito vlastnosťami disponuje s vysokou tepelnou vodivosťou 335 až $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ a pomerne nízkou mernou tepelnou kapacitou rovnou okolo 383 až $393 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. O niečo horšie vlastnosti má hliník, ktorý pri vývoji možností konštrukcie slúžil ako testovací materiál a bol zvolený pre jeho nižšiu nákladovosť a jednoduchšiu obrábateľnosť vzhľadom k opakovanému zhotovovaniu konštrukcie. Jeho tepelná vodivosť je rovná okolo 180 až $240 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ a merná tepelná kapacita 879 až $896 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ [29].

3.2 Meranie teploty systému a prebiehajúcej PCR

Priebeh pracovného cyklu je závislý na neustálom meraní aktuálnej teploty, ktorá tvorí smerodajnú zložku pre rozhodovanie firmwaru pri riadení termocykléru. Zároveň je informatívne zobrazovaná užívateľovi pre orientáciu v zadanom pracovnom cykle a vizuálnu kontrolu jeho stavu. Je monitorovaná pomocou teplotného senzoru, ktorý je zabudovaný v konštrukcii s mikrokyvetami so snímacou časťou v bode symetrickom k pozíciám obsahujúcim vzorky (Obr. 3.4).



Obr. 3.4: Umiestnenie teplotného senzora v konštrukcii.

Teplotný senzor je umiestnený v pozícii symetrickej k pozíciám všetkých mikrokyviet so vzorkami.

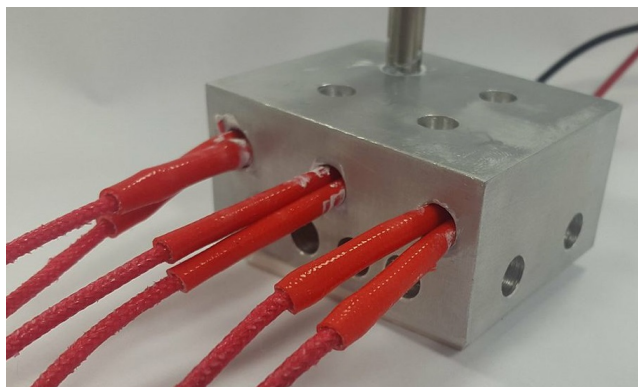
Určená pozícia zabezpečuje meranie rovnakej hodnoty teploty aká pôsobí na vzorky v mikrokyvetách a odstraňuje nepresnosť využitia kalibračnej krivky, ktorou by mohli byť hodnoty prepočítavané pri prípadnom umiestnení senzoru v okrajovom bode konštrukcie. Daná nepresnosť by mohla značne ovplyvniť a zvýšiť chybu, ktorá by v rozhodovaní firmwaru značne ovplyvnila celú činnosť pracovného cyklu a tak spôsobila nepresné pôsobenie teploty na vložené vzorky.

Popri vhodnom umiestnení snímacieho senzoru je hlavným parametrom, ktorý významne ovplyvňuje chybu systému a merania *Presnosť teploty* (Podkapitola 2.2). Na základe daného parametru je zásadná vhodná voľba použitého teplotného senzoru v záujme minimalizovania rozdielu medzi reálnou a meranou teplotou. Pre tento systém bolo konkrétne zvolené digitálne teplotné čidlo DS18B20, ktorého výrobca udáva kalibrovanú presnosť 0,5 °C, uvádzaná je ale aj presnosť 0,05 °C v praxi, schopné merať teplotu v rozsahu -55 až 125 °C, čo pre konkrétnu aplikáciu daného

senzoru ideálne vyhovuje a korešponduje s hodnotami dosiahnutými výrobcami komerčných termocyklérov (Tab. 5.1) [20]. Rozmery použitého teplotného čidla sú definované dĺžkou 30 mm a priemerom 5 mm, je napájané 5 V.

3.3 Systém ohrievania vzoriek

Navrhnutý systém ohrievania vzoriek je tvorený aktívnou a pasívnou časťou pre umožnenie priebehu PCR. Aktívna časť slúži k vyhrievaniu vzoriek umiestnených v mikrokyvetách a tak k dosiahnutiu teplôt pre priebeh pracovného cyklu podľa teplotnej krivky PCR. Pasívna časť sa nezúčastňuje na priebehu pracovného cyklu, zahrieva viečka mikrokyviet.



Obr. 3.5: Zabudovanie topných patron v konštrukcii v 3 vstupoch do hĺbky 30 mm.

V aktívnej časti boli k vyhrievaniu vzoriek zvolené 3 topné patrony (cartridge heaters) umiestnené vo vstupoch konštrukcie s mikrokyvetami. Rozmiestnené boli v rovnakej úrovni symetricky okolo umiestnených mikrokyviet z dôvodu rovnomerného šírenia tepla materiálom ku mikrokyvetám a tak rovnomerného zahrievania vzoriek (Obr. 3.5). Týmto riešením by mala byť maximalizovaná šanca dosiahnutia najlepšej hodnoty základného parameteru *Teplotná uniformita* (Podkapitola 2.2).

Konkrétne topné patrony boli vyberané podľa informácií uvedených výrobcom na základe požiadavok na dostatočný výkon a celkové rozmery. Špecifikácie každej zvolenej patrony sú rovnaké. Rozmery sú definované dĺžkou 20 mm a priemerom 6 mm, výkon je 40 W (teda celkovo 3 x 40 W) a napájacie napätie 12 V. Dĺžka prívodných káblov je 100 cm. Topné patrony sú zhotovené z nerezovej oceli s vodičmi chránenými teplotne odolnou silikónovou izoláciou. [4].

Pasívna časť systému zahrievajúca viečka mikrokyviet zahrňuje riešenie problému práce s biologickým materiálom, ktorým dané vzorky sú. Vplyvom ohrievania

vzorku môže v mikrokyvetách fyzikálne dochádzať k odparovaniu jeho kvapalných častí a tak následne vzniká nežiaduce zhustovanie roztoku. Odstránenie nežiadúceho efektu ukladania zhustených častí na spodku mikrokyvety a koncentrovania vyparenej kvapalnej časti na povrchu vedúceho k nežiadaným a neefektívnym chemickým reakciám počas pracovného cyklu má vďaka svojim vlastnostiam zabezpečovať polyimidová odporová fólia [9]. Svojou schopnosťou plošne ohrievať odstraňuje problém delenia zložiek roztoku spätným skvapalňovaním vyparovaných častí roztoku.

Ohrievanie zabezpečuje pomocou elektricky vodivého povrchu, ktorý zaistuje odporová vrstva uhlíku s definovanou povrchovou rezistivitou nanosená na polyimidovej fólii. Okrem vlastnosti výborne viesť teplo je odporová vrstva nestierateľná, odolná voči praskaniu, starnutiu a chemicky stabilná. V danej aplikácii je vrstva nanosená jednostranne s hrúbkou 50 μm s povrchovou rezistivitou 120 Ω/cm^2 a rozsahom pracovných teplôt -60 až 200 $^{\circ}\text{C}$ [12].

3.4 Systém ochladzovania vzoriek

Ochladzovanie vzoriek je výsledkom spolupráce súčastí elektro-mechanického systému zloženého z Peltierovho článku, chladiča, 2 ventilátorov, kovovej mriežky a mriežky tunelov v konštrukcii s mikrokyvetami (Obr. 3.6). Je dosiahnutý procesom, ktorý pozostáva z podchladenia vzduchu v objeme kovovej mriežky a jeho distribúcie do konštrukcie s mikrokyvetami.

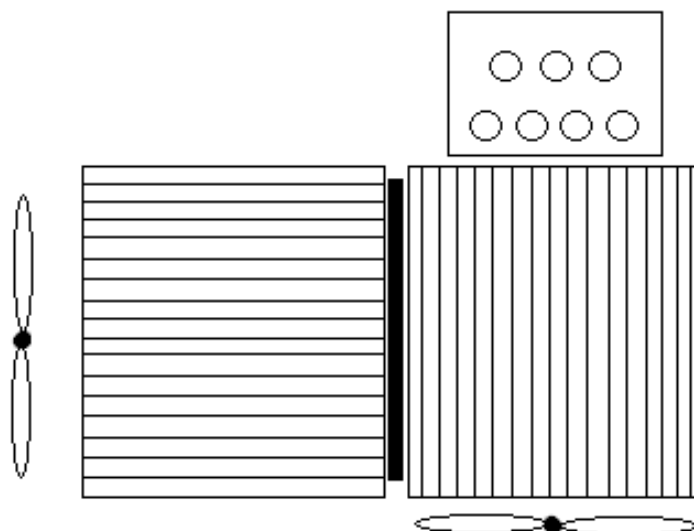
Zdrojom chladu systému je Peltierov článok, ktorý sa fyzikálne prejavuje ako tvorca dvoch rozdielnych teplôt na stykoch jeho vodičov. Vybraný Peltierov článok v rozmere 40,0 mm x 40,0 mm s výškou 3,3 mm obsahuje 127 párov PN prechodov. Napájaný je 12 V pri výkone 89 W. Okolo obvodu článku je nanosený silikón, ktorý zaistuje vodeodolnosť [11]. Pre lepší kontakt s okolitými telesami je natrený teplotne vodivou pastou.

Zabezpečenie čo najväčšieho chladenia je závislé na odvode tepla z tepelne sálajúcej strany Peltierovho článku. Odvod je zabezpečený pripevneným chladičom (kovový rebrovaný blok) na sálajúcu stranu a ventilátorom odvodzajúcim jeho teplo.

Z druhej strany Peltierovho článku, na jeho chladiacej strane, je pripevnená kovová mriežka, ktorej podstatou je vytvoriť prostredie s podchladeným vzduchom. Miera schopnosti podchladzovania vzduchu je určená vlastnosťami použitého materiálu pre danú mriežku. Vyžaduje sa schopnosť čo najväčšieho ukladania pôsobiacej teploty, takže vhodným aplikovateľným materiálom je hliník vďaka svojej vysokej mernej tepelnej kapacite rovnej okolo 879 až 896 $\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ [18].

K podchladzovanej mriežke je zároveň pripojený ventilátor, ktorý smeruje prúd podchladeného vzduchu a privádza ho ku kovovej konštrukcii, ktorá obsahuje mriežku tunelov.

Mriežka tunelov tvorí posledný článok systému. Vytvára priechody pre prúdy podchladeného vzduchu prechádzajúceho danou konštrukciou, ktoré podchladzujú materiál, v dôsledku čoho sú ochladzované vzorky. Mriežka zároveň znižuje množstvo hmoty, v ktorej dochádza k teplotnej výmene a odvádza teplo z konštrukcie.



Obr. 3.6: Schéma systému ochladzovania vzoriek.

Na okrajoch obrázku sú zobrazené dve vrtulky symbolizujúce 2 ventilátory. Štvorec s vodorovnými pruhmi symbolizuje chladič, čierny obdĺžnik Peltierov článok. Štvorec so zvislými čiarami symbolizuje kovovú mriežku, na ktorej je zobrazená konštrukcia s mikrokyvetami.

3.5 Uživatelské rozhranie pre ovládanie pracovného cyklu

Nakoľko každá PCR vyžaduje definovanie vlastných hodnôt pre teplotnú krivku priebehu (Podkapitola 2.2), okrem spustenia a vypnutia pracovného cyklu by užívateľovi malo byť umožnené externé riadenie pracovného cyklu s užívateľským prostredím, ktoré umožňuje voľbu daných hodnôt. V rámci užívateľského prostredia musia byť zaradené aktívne prvky a pasívne prvky, ktoré umožňujú zadávanie a vizuálnu kontrolu zadaných parametrov. Podľa zásad tvorenia užívateľského prostredia by užívateľské prostredie malo byť čo najviac jednoduché a intuitívne. S ohľadom na náročnosť ovládania prístroja je užívateľsky najvhodnejšou voľbou využitie LCD displaya spolu s tlačítkom vo forme rotačného enkodéra.

Display ako pasívny prvok slúži na zobrazovanie krátkych pokynov pri nastavovaní, zobrazovanie nastavovaných hodnôt a orientáciu v pracovnom cykle s popisom pozície na teplotnej krivke a aktuálnej teploty. Tieto informácie sú pri interakcii s užívateľom pomerne krátke a tak nie je potreba veľkej informačnej plochy. Pre použitie bol vybraný display s dostatočnými rozmermi samotnej informačnej plochy, ktorý umožňuje zobrazovanie 20 znakov v rozmere 4 riadkov s celkovými rozmermi modulu 98 mm x 60 mm x 12 mm. Modul má modré podsvietenie a je napájaný 5 V DC [1].

Aktívny prvok, ktorým je tlačítko, bol zvolený vo forme rotačného enkodéru. Rotačný enkodér je efektívne spojenie schopností pre rýchle interakcie. Spája schopnosť rýchleho presunu po veľkom rozsahu ponúkaných hodnôt teploty, ktorú si užívateľ volí otáčaním tlačítka a zároveň jeho stlačením v tomto bode umožňuje potvrdiť užívateľovi svoj výber [28]. Konkrétny typ použitého rotačného enkodéru je KY-040, ktorý pripisuje 20 pulzov na jedno otočenie. Napájaný je 5 V a jeho rozmery ako tlačítka sú 31 mm x 19 mm x 29 mm [23].

3.6 Elektrické zapojenie častí hardwaru

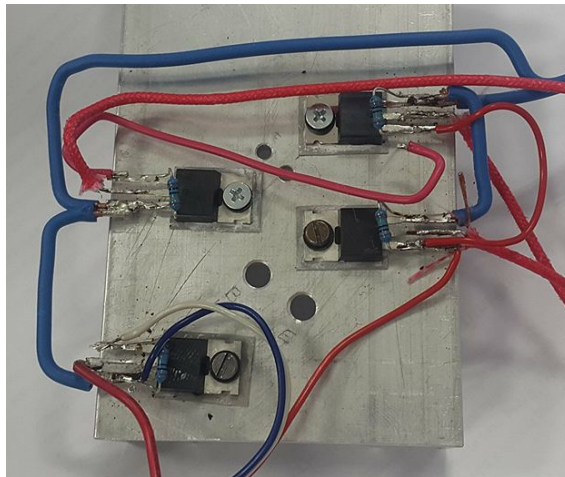
Medzi jednotlivými časťami podieľajúcimi sa na funkcii PCR termocykléru je vytvorený elektrický obvod riadený mikrokontrolérom Arduino Uno s pracovným napätím 5 V [3], ktorý obstaráva funkčnosť celého prístroja pomocou riadenia jeho podjednotiek (Tab. 3.1).

| | |
|----------------------------|--------|
| mikrokontrolér | 1 kus |
| spínaný zdroj | 1 kus |
| tranzistor typu MOSFET | 4 kusy |
| teplotné čidlo | 1 kus |
| topná patrona | 3 kusy |
| polyimidova odporová fólia | 1 kus |
| Peltierov článok | 1 kus |
| ventilátor | 2 kusy |
| LCD | 1 kus |
| I2C zbernica | 1 kus |
| rotačný enkodér | 1 kus |

Tab. 3.1: Zoznam častí PCR termocykléru.

Vymenované časti sú uvedené so svojím použitým množstvom v elektrickom obvode.

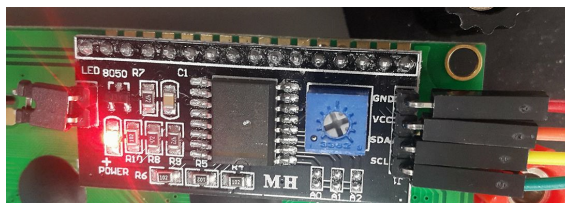
Tieto podjednotky tvorí teplotný senzor, 3 topné patроны s polyimidovou odporovou fóliou, Peltierov článok s ventilátormi a LCD s rotačným enkodérom, ktoré sú napájané na spínaný zdroj značky MEAN WELL s výstupným napätím 12 V, výstupným prúdom 20 A a výkonom 240 W [14]. Časti podjednotiek, ktoré sú využívané iba dočasne počas pracovného cyklu sú spínané riadiacou jednotkou prostredníctvom tranzistorov IRF740 druhu MOSFET (Obr. 3.7).



Obr. 3.7: Spínacie jednotky riadiaceho systému.

Elektrický obvod pomocou tranzistorov typu MOSFET samostatne spína Peltierov článok (tranzistor na spodku obrázka) alebo 3 topné patроны (3 tranzistory od vrchu obrázka), ktoré spína súčasne.

Špeciálne pripojenie na komunikáciu s mikrokontrolérom využíva LCD prostredníctvom I2C zbernice s napájacím napätím 5V. Umožňuje prevod 16 pinov LCD na 4 piny, ktoré sú napájané na mikrokontrolér (Obr. 3.8) [2].



Obr. 3.8: Pripojenie I2C zbernice k LCD.

Prepojením I2C zbernice k LCD na plošnej doske sa piny zredukovali na pin GND (uzemnenie), pin VCC (zdroj napätia), pin SDA (RX data) a pin SCL (TX data).

Do elektrického obvodu sú zároveň zaradené kombinácie kondenzátorov a rezistorov s charakteristickými hodnotami pre dané použitie, ktoré sa pripájajú ku vstupom do mikrokontroléra. Zabraňujú výskytom falošných signálov, ktoré môžu vzniknúť pri prechodových javoch (použitie pri zapojení rotačného enkodéra), v prípade ich umiestnenia pri napájaní sú blokujúce (Tab. 3.2).

| | |
|----------------|-------|
| Rezistor R1 | 10k |
| Rezistor R2 | 4k7 |
| Rezistor R3 | 1M |
| Rezistor R4 | 1M |
| Rezistor R5 | 1M |
| Rezistor R6 | 1M |
| Kondenzátor C1 | 22 nF |
| Kondenzátor C2 | 22 nF |
| Kondenzátor C3 | 22 nF |

Tab. 3.2: Zoznam použitých rezistorov a kondenzátorov.

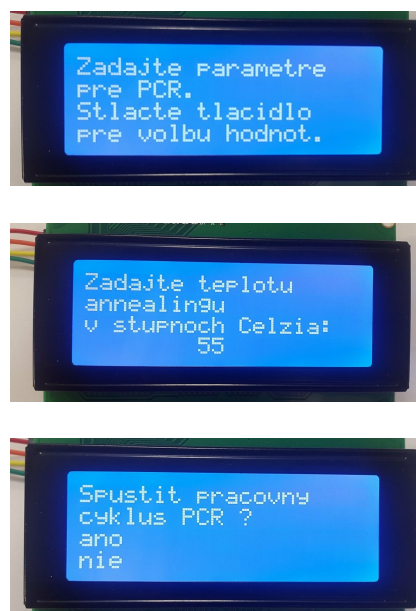
Rezistory a kondenzátory sú uvedené s číselnými značeniami vyjadrujúcimi ich hodnotu elektrického odporu alebo elektrickej kapacity.

Zapojenie funkčného elektrického obvodu neobsahuje zapojenie polyimidovej odporovej fólie, ktorá bude posledným prvkom vo vývoji celého termocykléru. Jej zapojenie totiž súvisí s umiestnením do vonkajšieho obalu priliehajúceho na mikrokryvety.

4 RIADIACI FIRMWARE TERMOCYKLÉRA

Celá činnosť PCR termocykléru je uložená v mikrokontroléri Arduino Uno, ktorý pracuje pomocou štruktúr jazyka Wiring. Funkčnosť prístroja požaduje vstupovanie do pracovného kódu užívateľom, ktorý volí činnosť termocykléru a nastavuje konkrétne hodnoty. Nastavenie sa vykonáva prostredníctvom užívateľského rozhrania, ktoré umožňuje interakciu užívateľa s PCR termocyklérom po spustení prístroja alebo po ukončení pracovného cyklu PCR. Počas priebehu samotnej PCR nie je možné prenasťavovať zvolené hodnoty.

Pri zapojení prístroja do zásuvky sa prístroj automaticky zapne a ponúkne možnosť zadania parametrov pracovného cyklu užívateľovi. Po potvrdzujúcom stlačení tlačítka sa zobrazí séria po sebe nasledujúcich pokynov na zadanie konkrétneho parametru teplotnej krivky pracovného cyklu (Podkapitola 2.1) s požiadavkou na výber hodnoty, ktorá sa mení rotáciou tlačítka a potvrdzuje jeho stlačením. Užívateľské prostredie v každom pokyne ponúkna začiatočnú hodnotu, ktorá je zvolená na základe pravdepodobnosti vzhľadom k voleným hodnotám v rozsahu hodnôt používaných pre parameter (Podkapitola 1.1). Po zadaní parametrov žiada potvrdzujúci pokyn pre súhlas so spustením pracovného cyklu (Obr. 4.1).



Obr. 4.1: Zobrazenie výberu zo série pokynov v rámci užívateľského prostredia. Zobrazený je uvítací pokyn po zapnutí prístroja, pokyn pre zadanie konkrétneho parametru s možnosťou voľby hodnoty (dynamicky sa mení pri rotácii tlačidla) v spodnom riadku a pokyn pre zahájenie pracovného cyklu.

Vo fáze priebehu pracovného cyklu nie je možné do prístroja zasahovať. Prístroj na LCD zobrazuje užívateľovi aktuálny stav, v ktorom sa pracovný cyklus nachádza. Na pozadí prebiehajú rozhodovacie cykly pre spínanie systému ohrievania alebo systému ochladzovania vzorkov vďaka činnosti teplotného senzoru podľa nastavených parametrov.

Po skončení PCR sa automaticky prenasťavujú parametre teplotnej krivky na defaultne zvolené, ktoré budú znova ponúknuté v nasledujúcej kaskáde pokynov voľby parametrov teplotnej krivky pre ďalšiu PCR. Užívateľské prostredie automaticky znovu umožňuje voľbu nového pracovného cyklu a jeho parametrov užívateľovi. Užívateľ sa dostáva do rovnakého bodu v programe PCR termocykléru ako bolo vyššie uvedené .

4.1 Nastavenie pracovného cyklu užívateľom

Užívateľské prostredie funguje na základe spolupráce LCD, I2C zbernice a rotačného enkodéru riadených mikroprocesorom. Tieto komponenty spoločne zobrazujú pokyny pre užívateľa a reakciu na jeho otáčanie a stláčanie tlačítka.

Pre zobrazovanie na LCD využíva mikroprocesor spolu s I2C zbernicou stiahnutú open-source knižnicu `<LiquidCrystal_I2C.h>`, v rámci ktorej sú využité základné funkcie `lcd.begin()`, `lcd.setCursor()` a `lcd.print()`, ktorými sú vypisované pokyny pre užívateľa [21].

Rotačný enkodér sprostredkúva informáciu o svojom mechanickom stave prostredníctvom pinov. Rotácia je zaznamenaná pomocou pinov `pinCLK` a `pinDT`. V prípade zmeny stavu na týchto pinoch dochádza k prepisu premenných definujúcich parametre teplotnej krivky. Stlačenie pomocou pinu `pinSW` vyberá ponúkanú možnosť, posúva užívateľa ďalej prostredím alebo ukladá premennú navolenú pomocou pinov `pinCLK` a `pinDT` v závislosti na aktuálnom pokyne, ktorý je zobrazený na LCD [21].

4.2 Rozdelenie riadiaceho systému na funkčné podjednotky

S prístupom k navoleným parametrom teplotnej krivky sú definované 3 teploty a 4 časové úseky, ktoré vytvárajú oblasti pre orientáciu rozhodovacieho systému. Parametre charakterizujú body prepnutia medzi jednotlivými riadiacimi funkciami, body spínania systému ohrievania a systému ochladzovania.

Okrem priebehu maximálneho zachladenia sú pre celkový priebeh činnosti charakteristické 3 opakované požiadavky: maximálne ohrievanie do určitej teploty, maximálne ochladzovanie do určitej teploty a udržanie rovnakej teploty po definovanú dobu. Tento fakt vedie k rozdeleniu rozhodovacieho systému využívajúceho 3 opakujúce sa funkcie vyvolávané inými postupujúcimi funkciami v kóde.

Po celú dobu je riadenie systému korigované pomocou porovnávania aktuálnej meranej teploty s definovanými teplotami. Aktuálna meraná teplota je meraná teplotným čidlom pomocou knižníc `<OneWire.h>` a `<DallasTemperature.h>` a ukladaná v premennej *teplota*.

4.2.1 Maximálne ohrievanie do definovanej teploty

Vo fáze pracovného cyklu s podmienkou dosiahnutia definovanej teploty, ktorá je vyššia ako je aktuálna teplota je logické využiť maximálne schopnosti systému ohrievania vzoriek a nepoužívať systém ochladzovania vzoriek.

Spôsobom dosiahnutia týchto cieľov je zopnutie pinu pre ohrievanie, pinu *pinCar* na maximum a vypnutie pinu pre ochladzovanie, pinu *pinChlad*. Spínanie je riešené na analógových hladinách v rozsahu 0 až 255, ktoré dodávajú veľkosť výkonu do spínaných jednotiek úmerne s hodnotou nastavenej hladiny. K tomuto sa využíva príkaz *analogWrite()*, konkrétne pre požiadavku maximálneho ohrievania vzniká kombinácia príkazov *analogWrite(pinCar,255)* a *analogWrite(pinChlad,0)*. Pôsobenie príkazov s týmito hodnotami trvá po dosiahnutie aktuálnej teploty rovnkej definovanej teplote mínus konštanta *konst_kmit* (Podkapitola 4.2.4).

4.2.2 Maximálne ochladzovanie do definovanej teploty

Vo fáze pracovného cyklu s podmienkou dosiahnutia definovanej teploty, ktorá je nižšia ako je aktuálna teplota je snaha využiť maximálne schopnosti systému ochladzovania vzoriek a nepoužívať systém ohrievania vzoriek.

Spôsobom dosiahnutia týchto cieľov je zopnutie pinu pre ochladzovanie, pinu *pinChlad* na maximum a vypnutie pinu pre ohrievanie, pinu *pinCar*. Analógové hladiny spínania dodávajú veľkosť výkonu do spínaných jednotiek úmerne s hodnotou nastavenej hladiny v rozsahu 0 až 255. Využíva sa príkaz *analogWrite()*, pre daný prípad maximálneho ochladzovania sa volí kombinácia príkazov *analogWrite(pinChlad,255)* a *analogWrite(pinChar,0)*. Pôsobenie príkazov s týmito hodnotami trvá po dosiahnutie aktuálnej teploty rovnkej definovanej teplote mínus konštanta *konst_kmit* (Podkapitola 4.2.4).

4.2.3 Regulácia udržania stabilnej teploty

Komplikovaným miestom, ktoré vytvorilo problémy pre realizáciu kompletného PCR termocykléru je situácia, kedy má systém riadenia udržať požadovanú teplotu po definovanú dobu. Pre udržanie teploty je potrebné vytvorenie kombinácie pôsobenia systému ohrievania a systému ochladzovania vzoriek s optimálnymi hodnotami výkonov aplikovanými súčasne, ktoré udržujú daný stav. Spínanie týchto dvoch systémov má rozdielne fyzikálne prejavy a nie je možné jednoducho dopočítať ich charakteristiku, podľa ktorej by sa dali nastaviť hodnoty pôsobenia.

Pre dosiahnutie požadovaného udržania stability je nutné navrhnutie inteligentného regulátora. Komplikovanosť návrhu sa neblíži žiadnemu štandardnému riešeniu a vymyká sa z možností dokončenia v rámci danej bakalárskej práce. Návrh regulátora sa vykresľuje ako predmet ďalšieho vývoja so základom v dlhodobejšom skúmaní chovania sa systému, meraní, výpočtov a programovania regulátora.

Pre potreby konkrétnej práce však bola snaha priniesť aspoň približné výsledky, ktoré by mohol PCR termocyklér v tejto oblasti dosahovať navrhnutím jednoduchšieho regulátora. Skúsila sa možnosť stabilného pôsobenia výkonu systému ochladzovania s výkonom nastaveným pomocou príkazu *analogWrite(pinChlad,100)* a dopočítavania diferencií pre systém ohrievania. Kód pre reguláciu systému ohrievania, ktorý bol naprogramovaný, tvoril štandardný PID regulátor využívajúci rozdiel požadovanej hodnoty teploty na výstupe od aktuálnej teploty. Konštanty proporčialnej, integračnej a derivačnej zložky dosadené do kódu pre PID regulátor boli ladené pomocou aplikácie *PID Tuner* v prostredí *MATLAB R2017a* na základe meraných dát vložených vo forme skokovej funkcie [24].

Napriek snahe dosiahnuť aspoň nedostatočné výsledky sa nepodarilo ani len získať odpoveď termocykléru vo forme približne udržiavanej hladiny. Termocyklér na riadiaci systém vôbec nereagoval a vykazoval nedefinovateľné výsledky. Tento pokus len dokazuje komplikovanosť budúceho návrhu regulátora.

V budúcnosti v prípade úspešného navrhnutia regulátora stability bude kód pre tento regulátor dosadený do vytvoreného kódu, ktorý riadi celý termocyklér práve s výnimkou tejto oblasti. Časti vyžadujúce doplnenie kódu regulátora sú predpripravené a označené pre vloženie, kde sa pomocou funkcie *millis()* odpočítava doba trvania vplyvu tohto regulátora a tak doba trvania pôsobenia stabilnej teploty podľa definovaného parametra užívateľom v časovej premennej (Podkapitola 4.1).

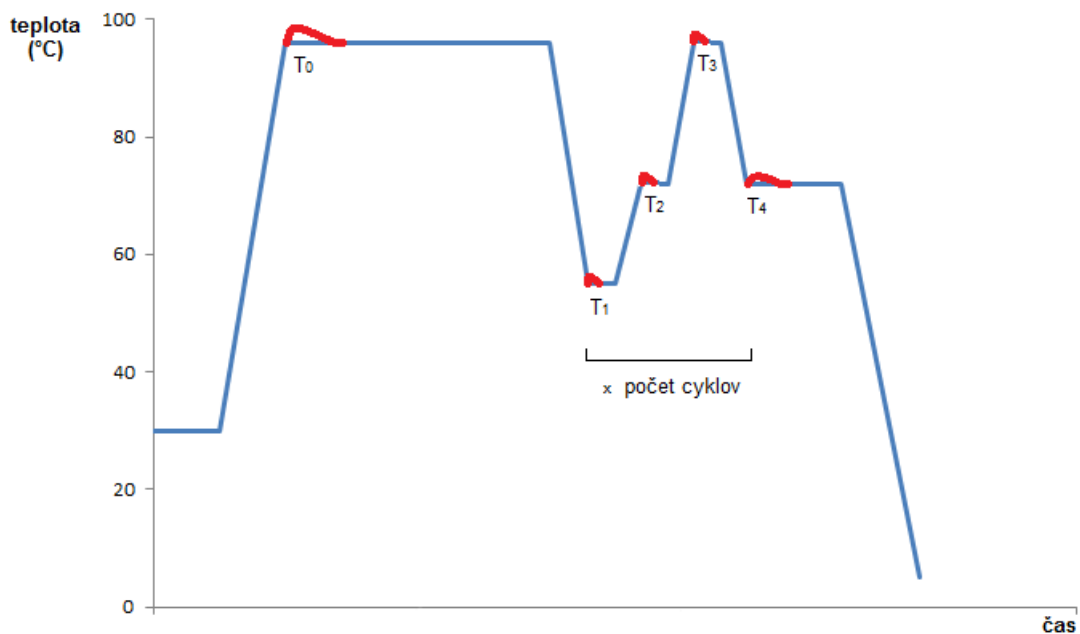
4.3 Prechody medzi funkčnými podjednotkami

V bodoch, ktoré vyžadujú zmenu riadiacej funkcie pre konkrétnu podjednotku vznikajú prekmity (Obr. 4.1). Prekmity sú dôsledkom teplenej kapacity použitého ma-

teriálu, ktorá spôsobuje miernu tepelnú zotrvačnosť v konštrukcii, ktorá bola minimalizovaná, ale aj tak sa prejavuje (Podkapitola 3.1).

Pre minimalizovanie prekmitov bola zvolená možnosť využitia inteligentného regulátora (Podkapitola 4.2.3) navrhnutého aj pre udržiavanie stability teploty pri tesnom priblížení sa k požadovanej teplote bodu pomocou úpravy premennej o rozdiel s konštantnou premennou *konst_kmit*, pri ktorej vzniká prepnutie na regulátor.

Efektom využitia činnosti tohto regulátora je ukončenie maximálneho ohrievania alebo ochladzovania s maximálnymi výkonmi topných patron a Peltierovho článku nastavených príkazmi *analogWrite(pinCar,255)* a *analogWrite(pinChlad,0)* (Podkapitola 4.2.1) alebo *analogWrite(pinCar,0)* a *analogWrite(pinChlad,255)* (Podkapitola 4.2.2) a nahradenie daných výkonov za regulátorom vypočítané výkony.



Obr. 4.2: Zmena teplotnej krivky vplyvom tepelnej kapacity.

Os času nie je popisateľná vzhľadom k veľkej variabilite hodnôt počas pracovného cyklu (ide o približnú schému).

Teplotná krivka sa v bodoch zmeny riadenia prirodzene prejavuje prekmitmi nahradzujúcimi časti pôvodnej krivky. Zmeny sú vyznačené červenou farbou pri pôvodnej požadovanej krivke.

5 ZHODNOTENIE DOSIAHNUTÝCH PARAMETROV A PREDPOKLADY ĎALŠIEHO VÝVOJA TERMOCYKLÉRA

Napriek nezrealizovanému finálnemu výsledku vo forme prístroja s plnou funkčnosťou sa dá na základe popisu návrhu a jednotlivých zhotovených častí vytvoriť približný odhad a porovnanie s parametrami komerčných PCR termocyklérov. Podľa informácií obhajujúcich výber konkrétnych prvkov v systémoch ohrievania vzoriek, ochladzovania vzoriek a výber teplotného senzoru sa dá potvrdiť efektívnosť riešenia, ktorou návrh disponuje.

Kombináciou, ktorú výbery použitých prvkov v návrhu termocykléru tvoria, je možné dosiahnutie požadovaných hodnôt medzi posudzovanými parametrami, ktorými sú *Rozmedzie teplôt*, *Presnosť teploty*, *Teplotná uniformita* a napájacie parametre (Tab. 5.1) (Podkapitola 2.2).

| | Rozmedzie teplôt | Presnosť teploty | Teplotná uniformita | Napájacie parametre |
|--------------------------------|-------------------|--|--|---|
| ProFlex 96-well Thermal Cycler | 0 - 100 °C | ± 0,25 °C | < 0,50 °C | 100 - 240 V 50 - 60 Hz max. 950 W |
| Bio-Rad T100TM Thermal Cycler | 4 - 100 °C | ± 0,50 °C | ± 0,50 °C | 100 - 150 V / 220 - 240 V 50 - 60 Hz; max. 700 W |
| SensoQuest Labcycler | 5 - 100 °C | - | ± 0,25 °C pre 55 °C ± 0,40 °C pre 95 °C | 85 - 265 V 50 - 60 Hz max. 350 W |
| Bioer GeneMax | 4 - 105 °C | 0,10 °C pre 55 °C 0,15 °C pre 72 °C a 95 °C | 0,20 °C | 100 - 240 V 50 - 60 Hz max. 600 W |
| Vytvorený termocyklér | 4 - 102 °C | ± 0,50 °C | * | 88 - 264 V 50 - 60 Hz max. 240 W |

Tab. 5.1: Porovnanie parametrov vytvoreného PCR termocykléru [7][15][8][25].

Informácie sú uvedené na základe prezentovaných hodnôt komerčnými prístrojmi.

- uvedená informácia nie je dostupná

* uvedenú hodnotu nie je možné získať

Vytvorený PCR termocyklér je vo svojej rozpracovanej fáze schopný dosiahnuť opakovane namerané *Rozmedzie teplôt* 4 až 102 °C. *Presnosť teploty*, ktorou disponuje sa podľa informácií od výrobcu objavuje v rozmedzí do 0,5 °C (s uvádzanou presnosťou 0,05 °C v bežnej praxi) [20]. *Teplotná uniformita* sa ako mnohé ďalšie parametre z dôvodu nezrealizovania nedá zatiaľ preukázať, jej hodnota má však dobrý predpoklad na základe ideálneho rozmiesnenia mikrokyviet so vzorkami voči zdrojom tepla a voľby materiálu pre jeho prenos. Vybraným materiálom je meď s vysokou tepelnou vodivosťou 335 až 400 W.m⁻¹.K⁻¹ a pomerne nízkou mernou

tepelnou kapacitou rovnou okolo 383 až 393 J.kg⁻¹.K⁻¹ (Podkapitola 3.1). Pozoruhodným je významný rozdiel v oblasti napájacích parametrov, kde sa objavuje výrazne nižší výkon narozdiel od komerčných PCR termocyklérov. Ďalšie charakteristiky a hlavné parametry dodržania teplotnej krivky, ktoré vyvolávajú najväčší záujem, nie je možné pozorovať a vyhodnocovať.

Dôvod znemožnenia vyhodnocovania je zároveň výzvou k ďalšiemu vývoju prístroja. Komplikovaná realizácia regulácie udržania stability spôsobujúca potrebu dlhodobejšieho skúmania chovania sa systému predstavuje požiadavku po ďalšej práci, ktorá sa už netýka návrhu riadiacich jednotiek, elektrického obvodu a riešení, ktoré boli spomínané a rozobrané. Vyžaduje pohľad a prístup z oblasti automatizačných systémov, aby viedla k vytvoreniu vhodného návrhu regulátora a jeho spracovaniu.

K dokončeniu celkového prístroja ešte pripadá návrh obalu pre celý systém (kryt PCR termocykléra), ktorý má obsahovať priestor s riešením pre polyimidovú odporovú fóliu (práca zahŕňa jej dodatočné zapojenie do elektrického obvodu) a priestor pre rozšírenie o optické meranie, ktoré momentálne vôbec nebolo riešené vzhľadom k stále otvorenému problému veľkého rozmeru s regulátorom, ktorý môže všetky návrhy dodatočne zásadne zmeniť.

ZÁVER

Vďaka preštudovaniu odbornej literatúry, možností a parametrov bol v práci uvedený princíp fungovania metódy PCR a podstatné faktory vplývajúce na jej priebeh. Dané poznatky o priebehu metódy, ale hlavne poznatky o parametroch a princípoch fungovania iných, komerčných termocyklérov boli zohľadnené pri návrhu vytvoreného PCR termocykléru v oblasti podporného hardwaru a vytvorenia firmwaru.

Samotná realizácia prístroja bola problematická a pribrzdila jeho vývoj v oblasti regulácie udržiavania stabilnej teploty, bez ktorej ďalej nemohla pokračovať. Týmto nie sú doriešené všetky komponenty, ktoré by mal termocyklér obsahovať. Dočasne je vytvorený experimentálny model čakajúci na nahratie kódu regulátora a následné rozobratie ohľadom rozšírenia o optické meranie s umiestnením v obale termocykléru spolu s polyimidovou odporovou fóliou. Dané súčasti po dohode s vedúcim práce neboli rozobrané, pretože by bolo zbytočné plánovať zložky v meniacom sa systéme.

Napriek nezrealizovaniu finálneho výsledku sa ale na základe popisu návrhu a jednotlivých zhotovených častí vytvoril približný odhad a porovnanie s parametrami komerčných PCR termocyklérov. Vytvorený experimentálny model doteraz merateľné parametre už v rámci jeho rozpracovanej fázy spĺňa. Otázkou ostávajú ostatné charakteristiky, ktoré momentálne nie sú merateľné a dostupné k vyhodnoteniu.

Na základe týchto výsledkov je vhodné dlhodobejšie skúmanie chovania systému, ktoré si vyžaduje pohľad a prístup z oblasti automatizačných systémov. Po vytvorení vhodného regulátora a jeho dosadení do kódu vytvoreného PCR termocykléru môžu dokončenia pokračovať a môže dôjsť k zaujímavému zhodnoteniu potenciálne dobrých výsledkov celkovej funkčnosti.

LITERATÚRA

- [1] Arduino. Arduino display modrý 20x4 znaků [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z : <https://arduino-shop.cz>
- [2] Arduino. LCD Sériové rozhraní IIC/I2C/TWI/SP [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z: <https://arduino-shop.cz/arduino/1071-lcd-seriove-rozhrani-iic-i2c-twi-sp-1602-1438010911.html>
- [3] Arduino. Originál Arduino Uno Rev3 [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z: <https://arduino-shop.cz/arduino/1511-original-arduino-uno-rev3-1485165418.html>
- [4] Arduino. Reprap 12V 40W Keramické topné těleso pro hotend 3D tiskárny.
Dostupné z: <https://arduino-shop.cz/arduino/1024-reprap-12v-40w-keramicke-topne-teleso-pro-hotend-3d-tiskarny-1434305661.html>
- [5] ATWOOD, John G. et al. Thermal cycler for automatic performance of the polymerase chain reaction with close temperature control. 1995 [cit. 2017-09-24]. USA. US 5602756 A. Uděleno 29. 11. 1990. Zapsáno 8. 12. 1995.
- [6] BELL, John. The polymerase chain reaction. Immunology Today [online]. 1989 [cit. 2017-12-27]. DOI: 10.1016/0167-5699(89)90193-X.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2679632>
- [7] Bio-Rad. T100TM Thermal Cycler [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-cz/product/t100-thermal-cycler?ID=LGTWGIE8Z>
- [8] D'AQUILA, R.T et al. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating [online]. 1991 [cit. 2017-12-27].
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328414/?page=1>
- [9] DuPont. DUPONT KAPTON Summary of properties [online]. [cit. 2018-01-02].
Dostupné z: <http://www.dupont.com/content/dam/dupont/products-and-services/membranes-and-films/polyimide-films/documents/DEC-Kapton-summary-of-properties.pdf>
- [10] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) [online]. 2013 [cit. 2017-12-27]. DOI: 10.1038/jid.
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>

- [11] GM electronic, spol. s.r.o. Peltierův článek 89W 40x40mm TEC1-12710 [online]. [cit. 2018-05-23].
Dostupné z: <https://www.gme.cz/peltieruv-clanek-tec1-12710-vigan>
- [12] GM electronic, spol. s.r.o. Polyimidová odporová fólie [online]. [cit. 2017-10-23].
Dostupné z: <https://www.gme.cz/>
- [13] GM electronic, spol. s.r.o. Unipolární tranzistor IRF520 TO220 [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z: <https://www.gme.cz/unipolarni-tranzistor-irf740-to220>
- [14] GM electronic, spol. s.r.o. Spínaný síťový zdroj MEANWELL MSP-300-12 [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z: <https://www.gme.cz/spinany-zdroj-mean-well-sp-240-12>
- [15] Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd. (BIOER). Bioer GeneMax [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <https://www.alphalabs.co.uk/laboratory-products/laboratory-equipment/pcr-equipment/thermal-cyclers/bioer-genemax8482-thermal-cycler/tc1400>
- [16] KRIŽANOVÁ, O. Vybrané biochemické a molekulárne-biologické metódy v lekárskom výskume a medicínskej diagnostike [online]. Martin: Jesseniova lekárska fakulta UK, 2012 [cit. 2017-12-27].
Dostupné z: <https://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=188>.
- [17] LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. Journal of Visualized Experiments [online]. 2012 [cit. 2017-12-27]. DOI: 10.3791/3998
Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3998/>
- [18] PolyScience Temperature Control Solutions. Temperature Terminology: Accuracy, Stability, and Uniformity [online]. 2012 [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <https://polyscience.wordpress.com/2012/09/28/temperature-terminology-accuracy-stability-and-uniformity/>
- [19] SANTIAGO, J.G., PERSAT, A. On-chip Device for Isothermal, Chemical Cycling Polymerase Chain Reaction (ccPCR) [online]. [cit. 2017-12-27].
Dostupné z: <http://microfluidics.stanford.edu/Projects/Archive/OnChipPCR.html>
- [20] Santy.cz. Digitální čidlo teploty DS18B20 [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <http://www.santy.cz>

- [21] SELECKÝ, Matúš. Arduino: uživatelská příručka. Přeložil Martin HERODEK. Brno: Computer Press, 2016. ISBN 9788025148402.
- [22] SensoQuest GmbH. SensoQuest Labcycler [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <http://www.sensoquest.de/labcycler.php?nav=3seite=seite100langs=en>
- [23] Techfun.sk. Rotačný Enkóder [online]. [cit. 2017-05-23].
Dostupné z: <https://techfun.sk/produkt/rotacny-enkoder/>
- [24] The MathWorks, Inc. Interactively Estimate Plant Parameters from Response Data [online]. [cit. 2017-05-05].
Dostupné z: <https://nl.mathworks.com/help/control/getstart/interactively-estimate-plant-parameters-from-response-data.html>
- [25] Thermo Fisher Scientific. ProFlexTM 96-well PCR System [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4484075>
- [26] Thermo Fisher Scientific. Thermal cyclers: key thermal cycling concepts and ramp rates [online]. [cit. 2018-05-17].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/PCR/pdfs/Thermal-Cycler-Ramp-Rates-AppNote.pdf>
- [27] Thermo Fisher Scientific. VeriFlex temperature control technology for thermal cycling: application note [online]. [cit. 2017-09-24].
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/PCR/pdfs/App-note-Temperature-control-VeriFlex-vs-Gradient-Global-FHR.pdf>
- [28] ULBRICHT, R. Rotačný enkodér [online]. [cit. 2017-10-23].
Dostupné z: <https://www.arduinosllovakia.eu/page/rotacny-enkoder>
- [29] Západočeská univerzita v Plzni. Fyzikální tabulky [online]. [cit. 2017-10-15].
Dostupné z: <https://kfy.zcu.cz/export/sites/kfy/dokumenty/FP1/tabulky.pdf>

ZOZNAM SYMBOLOV, VELIČÍN A SKRATIEK

| | |
|--------------------------------|---|
| PCR | polymerázová reťazová reakcia |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| °C | stupeň Celzia; jednotka teploty |
| G | guanín; purínová dusíkatá báza |
| C | cytozín; pyrimidínová dusíkatá báza |
| A | adenín; purínová dusíkatá báza |
| T | tymín; pyrimidínová dusíkatá báza |
| mol/l | mol na liter; jednotka molárnej koncentrácie |
| min | minúta; jednotka času |
| mm | milimeter; jednotka dĺžky |
| $W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$ | watt na meter a Kelvin; jednotka tepelnej vodivosti |
| $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$ | Joule na kilogram a Kelvin; jednotka mernej tepelnej kapacity |
| s | sekunda; jednotka času |
| W | watt; jednotka výkonu |
| V | volt; jednotka elektrického napätia |
| cm | centimeter; jednotka dĺžky |
| LCD | displej z tekutých kryštálov |
| RX data | transmitované dáta |
| TX data | prijímané dáta |
| μm | mikrometer; jednotka dĺžky |
| Ω/cm^2 | ohm na meter kubický; jednotka rezistivity |
| DC | jednosmerný prúd |
| A | ampér; jednotka elektrického prúdu |