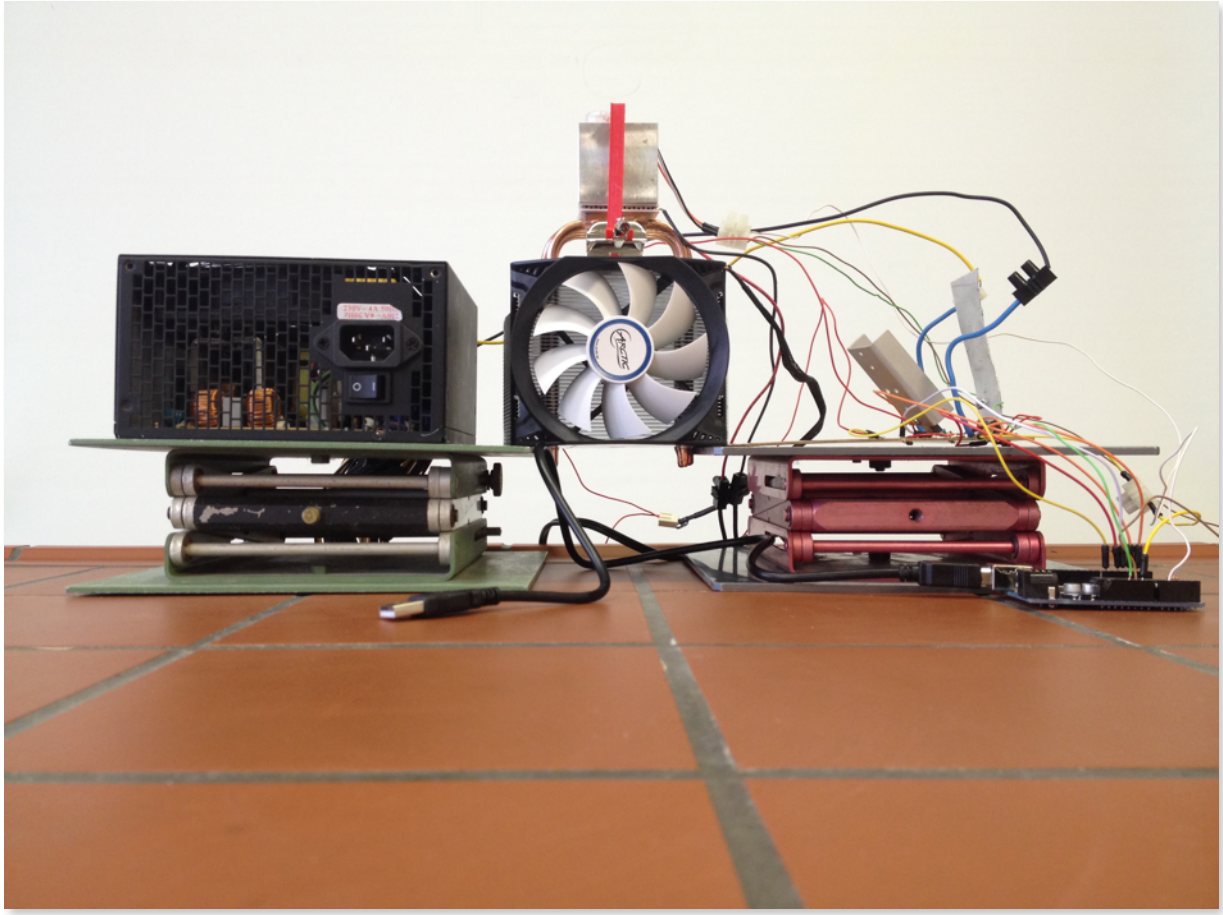
Die Do-it-yourself-PCR

—

Konstruktion einer microcontrollergesteuerten

Polymerase**C**hain**R**eaction-Maschine für den Biologieunterricht



Dominik Neu

David Pitsch

Johanna Schlatter

-

Jugend forscht 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung 3
2. Einleitung 3
3. Motivation und Zielsetzung 4
4. Theoretische Vorbetrachtung 4
4.1 Was ist eine PCR? 5
4.2 Das Peltier-Element 6
4.3 Der Arduino 8
4.4 Die H-Brücke 8
5. Umsetzung und Bau 9
5.1 Leistungstest 10
5.2 Programmierung des Arduinos 10
5.3 Bau der H-Brücke 12
5.4 Troubleshooting 12
5.5 Bau des Gehäuses 13
6. Finaler Testlauf 13
7. Kostenübersicht 14
8. Ausblick 15
9. Zusammenfassung 16
10. Danksagung 16
11. Literaturverzeichnis 17
12. Abbildungsverzeichnis 17
13. Bildverzeichnis 18
14. Tabellenverzeichnis 18

1. Kurzfassung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) ist eine molekularbiologische Arbeitsmethode, mit deren Hilfe die DNA in vitro vervielfältigt werden kann. Die PCR wird in biologischen und medizinischen Laboratorien für eine Vielzahl verschiedener Aufgaben verwendet, zum Beispiel für die Erkennung von Erbkrankheiten und Virusinfektionen, für das Erstellen genetischer Fingerabdrücke oder für das Klonieren von Genen. Ohne die PCR, die zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie zählt, wären viele wissenschaftliche Fortschritte auf diesem Gebiet (z.B. im Rahmen des Humangenomprojekts) nicht möglich gewesen.

Für uns ist es wichtig den Biologieunterricht so anschaulich wie möglich zu gestalten. Experimente helfen beim Verständnis eines abstrakten Themas wie der Molekularbiologie enorm und die Schüler kommen der komplizierten Welt der DNA viel schneller näher. Die Nähe zur praktischen Anwendung weckt das Interesse an der Wissenschaft.

Die Kosten für eine PCR Maschine betragen für gewöhnlich 5.000 Euro aufwärts, was sie für den Einsatz im schulischen Rahmen praktisch unerschwinglich macht. Das Ziel unseres Projektes ist es daher, eine PCR-Maschine für einen Bruchteil dieses Betrages zu konstruieren.

Ferner werden wir die Konstruktionspläne und -dateien veröffentlichen, so dass jede interessierte Schule diese PCR-Maschine für den Einsatz im Unterricht selbständig nachbauen kann.

2. Einleitung

PCR ist die wichtigste Grundlage für Arbeiten auf molekularer Ebene. Ohne eine PCR-Maschine ist die Arbeit mit DNA praktisch unmöglich. Da Genetik im Schulunterricht ohnehin schon ein sehr abstraktes Thema ist, wollten wir mit unserem Projekt erreichen, dass es auch Schülern möglich wird, Versuche mit ihrer eigenen DNA durchzuführen.

Retrospektive Interviews mit Leipziger Gymnasialschülern (KÖGEL u.a. 2000) ergaben, dass Schüler nach der Grundschulzeit dem biologischen Fachunterricht mit hohen Erwartungen und großer Neugier entgegensehen und darin zunächst auch befriedigt werden. Als Gründe für ihr Interesse gaben 69% der Schüler an, dass in Biologie interessante Themen behandelt werden, insbesondere in der Humanbiologie und 63% gaben an, dass im Unterricht praktisch gearbeitet würde, vor allem beim Experimentieren. Auch die Einbeziehung von lebenden Tieren, Exkursionen und die praktische Anwendung der biologischen Kenntnisse im täglichen Leben spielen eine große Rolle.

Den Interessenabfall im Verlauf der Sekundarstufe I begründeten die meisten Schüler vor allem damit, dass ab Klasse 7 die behandelten Unterrichtsinhalte immer theoretischer und komplexer wurden und deshalb immer weniger ihren Erwartungen entsprachen.[1]

Diesem Interessenabfall durch zu viel Theorie möchten wir mit einer praktischen Anwendung entgegenwirken.

[1] Ulrike Spörhase-Eichmann und Wolfgang Ruppert: Biologie Didaktik, Praxishandbuch für die Sekundarstufe I und II. Cornelsen, 2004, S.115

3. Motivation und Zielsetzung

Die Motivation für unser Projekt stammt direkt aus dem Biologieunterricht und von einem parallelen Forschungsprojekt, dessen Ziel es ist, körpereigene DNA zu isolieren und anhand dieser nachzuweisen, ob eine bekannte Mutation, die einen Geschmacksrezeptor funktionslos macht mit welchen man den Bitterstoff Phenylthiocabamid (PTC) schmecken kann, vorhanden ist oder nicht. Dieses Experiment war jedoch nur möglich mit vervielfältigter DNA, um diese mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese sichtbar zu machen. Um die DNA jedoch zu vervielfältigen, war eine PCR-Maschine nötig. Unser Ziel war es also, diese zur Verfügung zu stellen. Aber nicht nur für spezifische Untersuchungen wie diese ist eine PCR-Maschine notwendig; sie ist für sämtliche Arbeiten und Experimente auf molekularer Ebene essenziell. Im Biologieunterricht wird der zu behandelnde Bereich der Genetik mithilfe von Bildern und Videos verdeutlicht. Dennoch bleibt die DNA immer etwas sehr Abstraktes. Experimente helfen, abstrakte Themenbereiche den Schülern weitaus deutlicher näher zu bringen (Spörhase-Eichmann & Ruppert, 2004).
Auch aufgrund dessen wollten wir es möglich machen, für Schulen eine Bauanleitung zur Konstruktion einer PCR-Maschine Verfügung zu stellen, damit sie eine PCR-Maschine einfach und kostengünstig selber bauen können.

4. Theoretische Vorbetrachtung

Um unsere eigene PCR-Maschine zu bauen, mussten wir natürlich erstmal die genaue Funktionsweise einer solchen untersuchen. Am wichtigsten ist das Element zum Kühlen und Heizen. Das Ergebnis von Nachforschungen war, dass diese Aufgabe am besten von einem Peltier Element erfüllt wird, denn durch Umkehren der Stromrichtung wird auch die Kalt- und Warmseite umgekehrt. Da unsere PCR-Maschine zudem nicht manuell gesteuert werden sollte, sondern mit Hilfe eines Microcontrollers, mussten wir zusätzlich einen Arduino programmieren, welcher das Peltier-Element mit Hilfe der Information eines Temperatursensors steuert.

4.1 Was ist eine PCR?

PCR (Polymerasekettenreaktion) ist ein Vorgang, in welchem DNA durch Heizen und Kühlen mit Zugabe von Nukleotiden und Primern exponentiell vervielfältigt wird.
Die Vervielfältigung von DNA wird wichtig, wenn man sie zum Beispiel mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese sichtbar machen möchte. DNA-Moleküle, wie man sie aus dem Körper isolieren kann, oder an Tatorten findet, reichen oftmals quantitativ nicht aus, um Banden sichtbar zu machen und z.B. einen genetischen Fingerabdruck zu erstellen, um damit arbeiten zu können.
Mit dem Verfahren der Polymerasekettenreation reichen bereits Spuren von DNA-haltigem Material wie Blut, Haare oder Speichel für eine Typisierung aus.

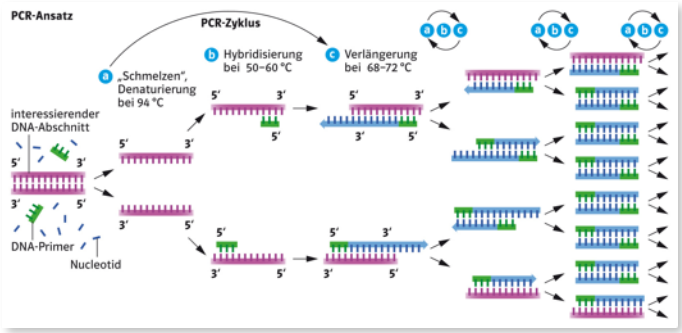


Abb.:1 Ablauf einer PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein zyklischer Prozess, bei dem drei Schritte immer wieder ablaufen[2]:

Denaturierung: Die DNA wird auf circa 94°C erhitzt. Die Temperatur wird 15 Sekunden gehalten, sodass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen komplett auflösen. Damit wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt.
Hybridisierung: Bei 50°- 60°C wird die Temperatur wieder 15 Sekunden gehalten. In diesem Zeitraum lagern sich die spezifischen Primer an die 3´ Enden der DNA-Einzelstränge an. Dabei gilt das Prinzip der Komplementarität: Die Primer können sich gemäß ihrer Basen nur an ein komplementäres Gegenstück (Adenin mit Thymian und Cytosin mit Guanin) anlagern.
Polymerisation: Die Temperatur wird wieder auf circa 72° C erhöht und 15 Sekunden gehalten. Die hitzebeständigen DNA-Poymerasen beginnen an den Primären von 3´nach 5´mit der Anlagerung von komplementären Basen (Elongation). Am Ende sind aus den zwei DNA-Einzelsträngen wieder zwei DNA-Doppelstränge entstanden. Die angegebenen Temperaturen entsprechen dem Datasheet unseres PCR-Mastermixes [3]
Dieser Prozess wird 30-35 mal wiederholt. Dann hat man genügend DNA-Kopien des gewünschten Abschnitts. Diesen Vorgang des Erhitzen und Abkühlen wollten wir für den Schulrahmen mit einer microcontroller gesteuerten PCR-Maschine ermöglichen.
Notwendig für PCR sind DNA, zwei Primer (forward und backward Primer), hitzeresistente DNA-Polymerase, Desoxyribonucleotidtriphoshate, als Bausteine für die DNA, Mg^{2+}-Ionen, welche für die Funktion der Polymerase essentiell sind und Pufferlösung, die für ein geeignetes chemisches Umfeld sorgt.

[2] Markl Biologie Oberstufe, Ernst Klett Verlag GmbH, Stuttgart 2011

[3] http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/07-KK5101-03_an.pdf, 25.12.2014

Die Methode der PCR ist aus der Medizin, Genetik und Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken. Sie wird verwendet zur Erstellung von genetischen Fingerabdrücken, für Vaterschaftstests, zur Detektion von Mutationen, zur Analyse alter (fossiler) DNA und zur Geschlechtsbestimmung.[4]

4.2 Das Peltier-Element

Das Peltier Element bildet als Wärme- und Kühlelement das Herzstück der PCR-Maschine.
Doch was ist eigentlich ein Peltier-Element? Ein Peltier-Element ist ein elektrisches Bauelement, welches bei Stromfluss eine Temperaturdifferenz erzeugt. (Deltron,2014)[5]
1834 entdeckte Jean Charles Athanase Peltier, dass, wenn man die Enden von zwei verschiedenen Metallen in Kontakt bringt und einen Gleichstrom durchleitet, das eine Ende kalt und die andere Kontaktstelle warm wird. Bei umgekehrten Strom vertauschen sich die Warm- und Kaltstelle. (Stefan Ambühl, Arthur van Dorp und Christoph Rüegg, 1998)[6]

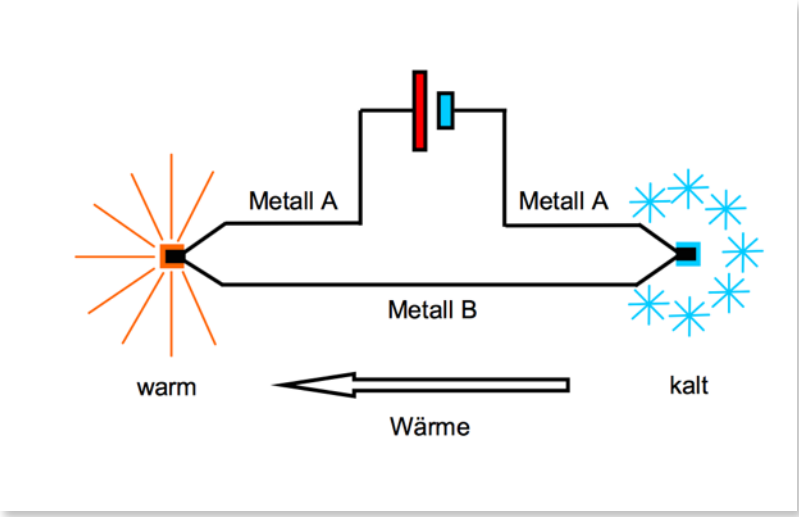


Abb: 2 Funktionsweise eines Peltier-Element Deltron, 2014, S. 3 von 8

Diese Eigenschaft macht man sich beim Peltier-Element zu Nutze.
Die Beobachtung beruht auf dem Kontakt von zwei Halbleitern mit unterschiedlichen Energieniveaus (Peltier-Element Wikipedia, 2014)[7]. Mit Halbleitern erzielt man den besten Wirkungsgrad.(Deltron, 2014) Die verschiedenen Energieniveaus sind wichtig, da nur der Sprung der Elektronen von einem Energieniveau in das andere, Wärme entweder abgibt oder entzieht. Wenn die Elektronen des höheren Energieniveaus in das tiefere fallen, geben diese Energie in Form von Wärme ab vice versa (Peltier-Element Wikipedia, 2014).

[4] http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion, 25.12.2014

[5] http://www.deltron.ch/pdf/produkte/peltier/peltier-element_kurz_erklaert_d.pdf, 13.11.2014

[6] http://www.siteware.ch/peltier/theorie.html, 13.11.2014

[7] http://de.wikipedia.org/wiki/Peltier-Element, 13.11.2014

Da die Kühl- und Wärmeleistung weniger auf der Menge des Stroms, als auf der Temperaturdifferenz zwischen der Warm- und Kaltseite beruht, ist es wichtig, die Differenz DeltaT möglichst gering zu halten (Deltron, 2014). Ab DeltaT > 70° C wird von einstufigen Peltier (wie wir es verwenden) gar keine Wärme mehr transportiert. Im Umkehrschluss wird bei DeltaT= 0°C die maximale Wärmemenge transportiert (Quick-ohm,2014, Regel 8)[8].

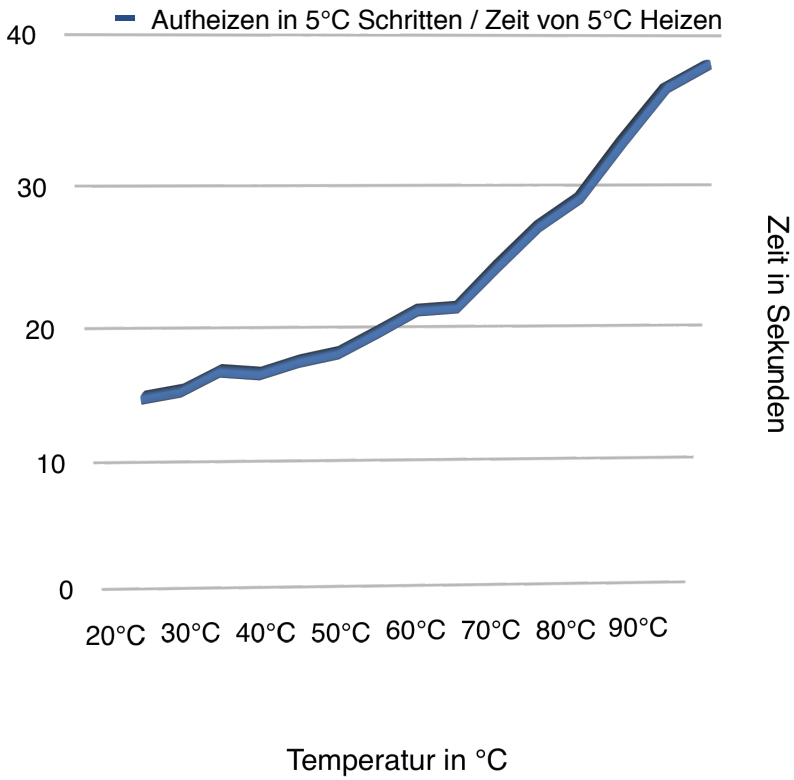


Abb. 3: Heizleistung in Abhängigkeit von der Temperatur (eigene Messungen/Grafik)

In der Abbildung 3 sind unsere eigenen Messwerte dargestellt. Je höher die Temperatur ist, desto länger braucht das Peltier-Element, um einen Temperaturanstieg von 5°C zu generieren. DeltaT wird größer, da der Lüfter die Hitze bzw. Kälte nicht vollständig abführen kann und die Leistungsfähigkeit des Peltier-Elements nimmt ab.

Da Qh = Pel + Qc ist, ist es für uns also wichtig, beim Kühlen, die Wärme auf der Warmseite so gut wie möglich abzuleiten, denn je kälter die Warmseite ist desto besser arbeitet das Peltier. Beim Aufheizen unserer DNA auf 94°C lässt man auch da den Lüfter laufen, denn der Lüfter bringt das Peltier-Element immer auf Raumtemperatur. Die Warmseite wird somit durch abführen der Kälte auf der Kaltseite schneller aufgewärmt.

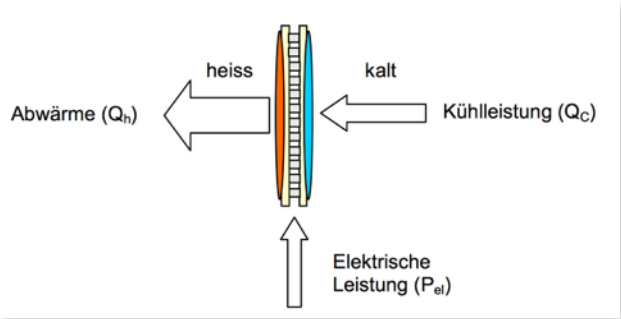


Abb. 4: Funktionsweise eines Peltier-Elements, Deltron, 2014 S.4

[8]http://www.quick-ohm.com/peltier_elements/download/10-Regeln.pdf, 13.11.2014

4.3 Der Arduino

Der Arduino kann eine maximale Stromstärke von 40mA pro Pin zur Verfügung stellen. Das Peltier-Element benötigt jedoch den 200-fachen Strom. Dieses Problem lösen wir, indem wir den Arduino einen externen Strom über eine H-Brücke zuschalten lassen.
Der Arduino besteht aus einer Software- und einer Hardwarekomponente. Die Hardwarekomponente ist ein Mikrocontroller, der 14 digitale I/O-Pins sowie sechs analoge Eingänge besitzt. Er dient dazu, eigenständige interaktive Objekte über einen USB-Port mit dem Computer zu steuern. Der Arduino kann entweder über den USB-Port oder über eine externe Spannungsquelle mit 7V – 12V betrieben werden. Programmiert wird über C bzw. C++, wobei noch weitere Libraries implementiert wurden, die das Programmieren erleichtern. Arduino wurde im Jahr 2005 von Massimo Banzi und David Cuartielles entwickelt und der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt.

4.4 Die H-Brücke

Die H-Brücke übernimmt in der PCR-Maschine die Umkehrung der Stromrichtung. Das Peltier-Element muss sowohl kühlen als auch heizen. Wenn man eine Spannung an das Peltierelement anlegt, beginnt es zu heizen. Polt man die Spannungsquelle nun um, vertauscht also den Minus- und Pluspol, beginnt das Peltier-Element zu kühlen. Über die Öffnungen der Schalter S2 und S3 fließt der Strom von „links-nach-rechts“ durch das Peltier-Element und das beginnt zu heizen. Bei Öffnung der Schalter S1 und S4 fließt der Strom in die umgekehrte Richtung und das Peltier kühlt.

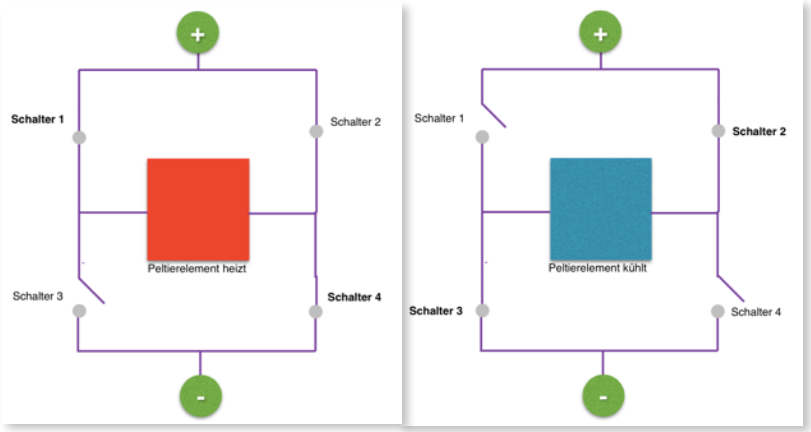


Abb. 5: Die H-Brücke: links sind Schalter 1 & 4 geschlossen, das Peltier-Element heizt. Rechts sind Schalter 2 & 3 geschlossen, die Stromrichtung so umgekehrt und das Peltier-Element kühlt.

In unserem Fall, soll die Umkehrung nicht über Schalter bedient werden, sonder je nach Temperatur elektronisch geregelt werden. Dies wird über eine Transistorschaltung realisiert. Transistoren können jedoch keinen großen Strom leiten. Aufgrund dessen verwenden wir für die H-Brücke der PCR-Maschine MOSFETs (Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekt-Transistoren).

MOSFETs sind Transistoren, also Schalter, die der Arduino schalten kann und die zudem hohe Ströme leiten können. Wichtig ist, dass S1 und S2 bzw. S3 und S4 niemals gleichzeitig offen sind, da es dann zu einem Kurzschluss kommen würde, was die MOSFETs zerstören würde.

Der Schaltplan unserer H-Brücke sieht man in Abb. 6. Q1 bis Q4 sind die Schalter, die die Stromrichtung einstellen. Die beiden oberen MOSFETs Q1 und Q2 sind P-Kanal MOSFETs. Die beiden unteren MOSFETs Q3 und Q4 sind N-Kanal MOSFETs.
Um diese MOSFETs richtig anzusteuern, benutzen wir die Transistoren Q5 und Q6.

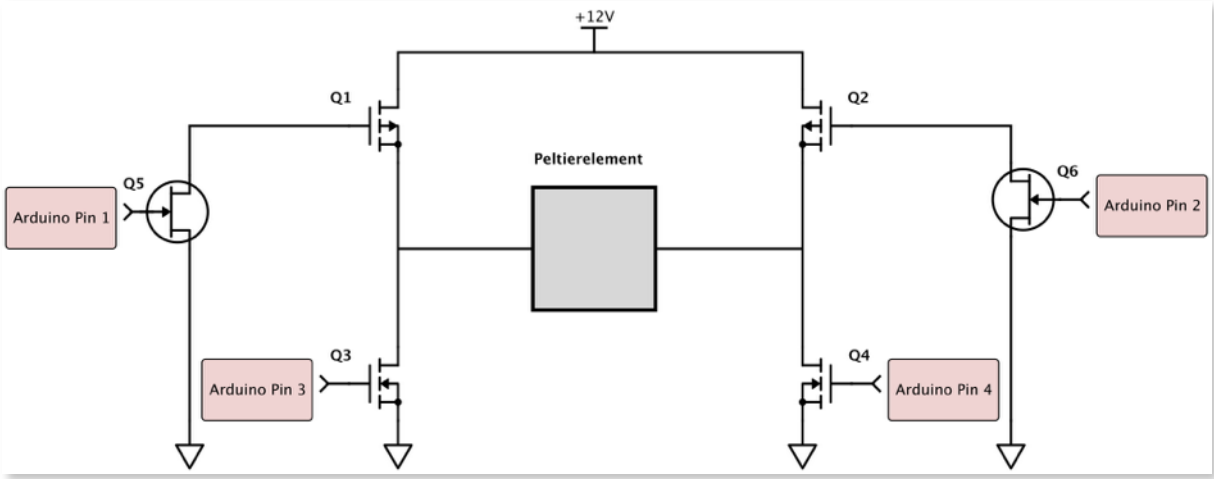


Abb.6: Der Schaltplan der H-Brücke (eigene Darstellung)

5. Umsetzung und Bau

Nachdem wir uns mit den einzelnen Elementen der PCR-Maschine auseinandergesetzt hatten und uns die nötigen Bauteile bestellt hatten, haben wir begonnen, uns mit dem praktischen Teil der PCR-Maschine auseinander zu setzten. Vorerst brauchten wir ein Material, in welchem die DNA in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit maximaler Energieübertragung aufgeheizt und heruntergekühlt werden konnte. Aluminium hat eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit (236 W/m*K). Aufgrund dessen haben wir in einen Aluminumblock in Größe des Peltier Elements Löcher gebohrt in welchen die Eppendorf-Gefäße mit der DNA reinpassen, sowie einen Slot für den Temperatursensor. Zudem haben wir einen Lüfter bestellt, der beim Kühlen die Wärme, welche auf der anderen Seite des Peltiers entsteht, abführt und beim Heizen, die Kälte durch Luft auf Raumtemperatur minimiert um somit eine geringere Temperaturdifferenz und eine bessere Leistung des Peltiers zu erzielen.

5.1 Leistungstest

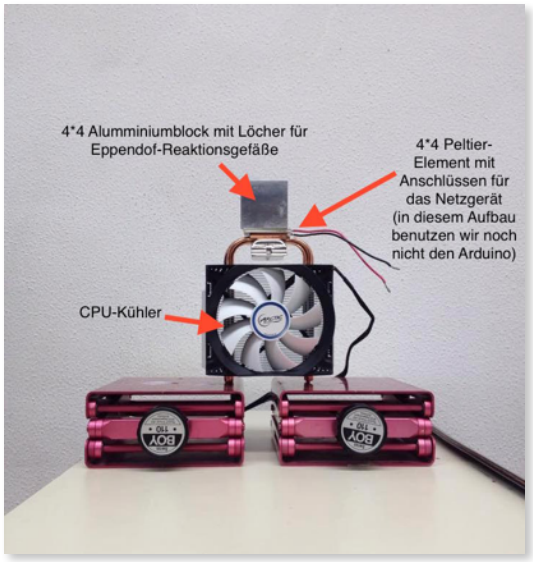


Bild 1: Minimalaufbau unserer PCR-Maschine (eigenes Foto)

In einer Reihe von Experimenten haben wir mit diesem Minimalaufbau (siehe Foto) Wasser auf die erwünschten 94°C zum Trennen, 54°C, zum Kopieren der DNA und 72° C zum Binden des Primers geheizt bzw gekühlt, um den Zeitrahmen einschätzen zu können, wie lange ein Vorgang der Vervielfältigung laufen würde. (ZEITEN) Das Peltier unserer ersten Versuche, war jedoch ein sehr günstiges Peltier aus unserer Physiksammlung und konnte den hohen Temperaturen nicht standhalten. Nach etwas Internetrecherche (Fußnote 3,4,5,6) haben wir uns für folgendes Peltier entschieden: (Typenbezeichnung Conrad: „HighTech Peltier-Element 15.5 V 8.5 A 72 W (A x B x C x H) 40 x 40 x - x 3,4 mm“)[9]. Die 71° C maximal mögliche Temperaturdifferenz reichen für die Erzeugung der gewünschte Zieltemperatur von 94°C aus und mit einer Toleranz von maximal 270° C konnten wir einen weiteren Verlust eines Peltier aufgrund zu großer Hitze garantieren, was für eine praktische Nutzung der Maschine wichtig ist. Mit dem neuen Peltier Element haben wir die Zeiten erneut manuell gemessen und sind auf folgende Daten gekommen. (Siehe Grafik bzw. Tabelle, in welcher Zeiten mit neuem und alten Peltier verdeutlicht werden.) Parallel dazu lief die Programmierung des Arduino.

5.2 Programmierung des Arduinos

Im Rahmen unseres Projektes gab es zwei große Hauptaufgaben. Der Bau der PCR-Machine und die Programmierung des Arduinos. Da unsere Vorkenntnisse sich nur auf den rudimentären Informatikunterricht in der Klasse 7 beschränkte, erwies sich die Programmierung als schwieriger als im Vorhinein gedacht. Einige der Befehle in TurboPascal sind anders definiert als in Arduino, sodass der Umstieg auf die neue Programmiersprache etwas verwirrend war.

Für den Einstieg in die Programmierung haben wir uns mit der Sprache des Arduinos auseinandergesetzt. Dies taten wir mit Hilfe der Onlinebibliothek auf Arduino.cc[10] und verschiedenen Arduino-Tutorials. Nachdem wir uns hineingearbeitet hatten, haben wir uns damit beschäftigt, was das Programm ausführen sollte und wie wir dies erreichen.

---

[9] http://www.conrad.de/ce/de/product/189183/HighTech-Peltier-Element-155-V-85-A-72-W-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm-Qu?ref=list

[10] http://arduino.cc/en/Reference/HomePage, entnommen 8.9.2014

Grundlegend sollte es in einem Durchlauf die Temperatur des PCR-Mastermix auf 94°C, 72°C und 53°C erhitzen und kühlen und anschließend für jeweils 15 Sekunden halten. An dieser Stelle war es für uns wichtig, dass das Programm auch während des Durchlaufes übersichtlich für den Benutzer ist, sodass auch unerfahrene Schüler die PCR benutzen können. Hierzu ließen wir den Arduino die Nummer des Durchlaufes, die derzeitige Temperatur und den derzeitigen Vorgang, dh. kühlen oder heizen, ausgeben.

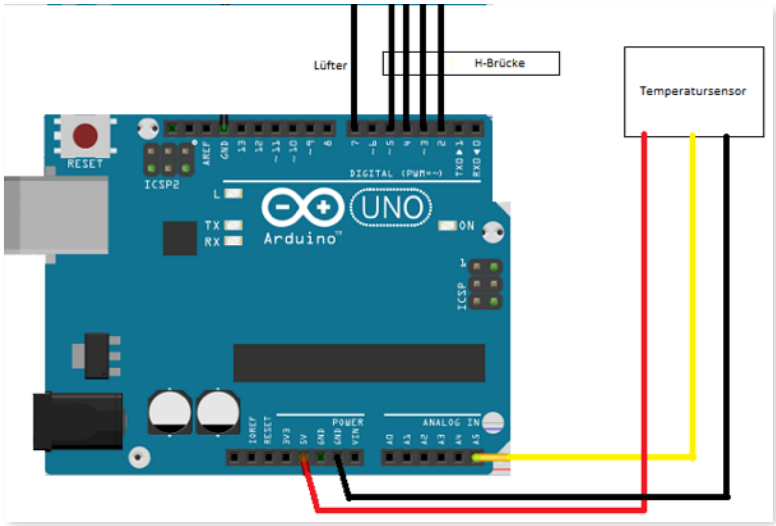


Abb. 7: Arduino

Der Ausgang 7 steuert den Lüfter, welcher einmal vor Beginn des Hauptprogramms eingeschaltet und zum Ende wieder ausgeschaltet wird. In der H-Brücke sind die Ausgänge 2,3,4 und 5 die, welche über die MOSFETs das Peltier steuern. Der Ausgang 2 steuert dabei vom Schaltplan unserer H-Brücke ausgehend den Schalter Q4 an. Weiter geht es gegen den Uhrzeigersinn, also steuert Ausgang 3 Schalter Q3, Ausgang 4 Schalter Q1 und Ausgang 5 Schalter Q2. Dementsprechend steuern Ausgang 2 und 4 die N-MOSFETs, welches für das Heizen zuständig ist und Ausgang 3 und 5 die P-MOSFETs, für das Kühlen. (siehe Abbild)[11]

Über den Temperatursensor in den Ausgängen 5V, GND und A5 entscheidet das Programm anhand des Wertes, den der Sensor über den analogen Eingang A5 angibt, ob Q1 und Q4 offen sein sollen oder Q2 und Q3.

Da es sich um einen analogen Sensor handelt gibt er dem Programm nicht direkt die Temperatur, sondern einen Wiederstandswert aus, welcher entsprechend umgerechnet wird. Die beiden anderen Eingänge 5V und GND geben jeweils eine Spannung von 5 Volt an den Arduino und da diese wieder abgeleitet werden muss, wird an GND, also an die Masse, angeschlossen.

Die verbleibenden Fehler im Programm versuchten wir durch Trial und Error zu beheben und das Programm weiter zu optimieren. Beispiele hierfür sind das Ersetzen von Befehlen zur Gunsten anderer, um die Prozessstruktur zu vereinfachen oder auch das Erweitern der Daten, die im Seriellen Monitor ausgegeben werden.

[11] http://i.stack.imgur.com/L7FRY.png, entnommen 11.12.2014

5.3 Bau der H-Brücke

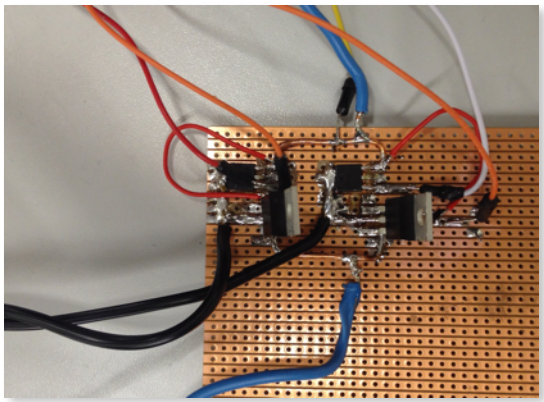


Bild 2: Unsere erste Platine (eigenes Foto)

Für das Austesten des Programmes haben wir zunächst eine fertig gebaute H-Brücke aus unserer Physiksammlung verwendet, doch da unsere Maschine eine self-made PCR-Maschine sein sollte, haben wir uns entschieden, unsere eigene H-Brücke zu bauen. Mit unserer H-Brückenschlaltung haben wir zunächst eine Schaltung auf einem Steckbrett vorgebaut, um die Funktion unserer H-Brücke zu testen. Daraufhin haben wir diese dann auf eine Platine gelötet. Was allerdings bei der Benutzung der H-Brücke auffiel, war die hohe Temperatur der MOSFETs, weshalb wir an diesen noch Kühlelemente anfügt haben. Nach einigen Anbauten wurde diese Platine jedoch sehr unübersichtlich und vor allem empfindlich, da durch die großen Kühlelemente leicht etwas abbrechen konnte. Aufgrund dessen haben wir uns entschlossen die H-Brücke noch einmal, ordentlicher, auf eine Platine zu setzen.

5.4 Troubleshooting

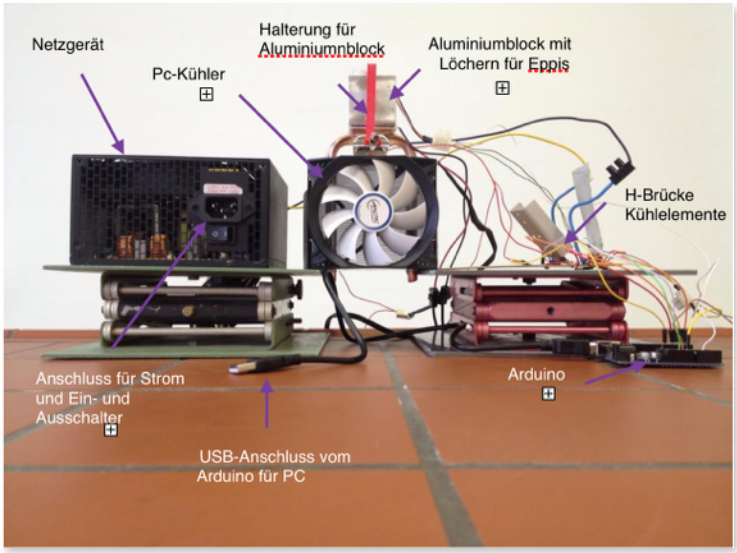


Bild 3: Versuchsaufbau der PCR (eigenes Foto)

Was wir nun hatten, waren Einzelteile, welche wir noch zusammenbauen mussten. (FOTO) Um den Halt des Aluminiumblockes zu garantieren, haben wir mithilfe eines 3D-Druckers eine Halterung ausgedruckt. Wenn andere Schulen die PCR nachbauen, brauchen sie keinen 3D-Drucker., denn jedes biegbare, hitzeresistente Material, das diese Funktion übernehmen kann, würde funktionieren. Statt mit Klemmen kann man dieses Material auch am Kühler festschrauben.

Was blieb, war der spannende Moment des Zusammenspiels.
Nach der Behebung einiger Programmierfehler waren wir bereit die finalen Tests durchzuführen und zur Vervollständigung einen Kasten um unsere Maschine zu bauen, um diese alltagsfähig zu machen.

5.5 Bau des Gehäuses

Mit dem Bau des Gehäuses werden uns nun als letztes befassen, da wir sicher sein mussten, dass keine großen Veränderungen mehr vollzogen werden müssen. Zudem gilt zu beachten, dass die Wärme gut abgeführt werden kann, damit wir weiterhin eine möglichst gute Leistung des Peltier-Elements haben. Dafür werden wir den PC-Kühler in die Mitte des Kastens bauen und ein Bassreflexrohr, welches den Durchmesser des Kühlers[12] hat, auf die passende Länge schneiden. Dieses hat die Funktion eines Ansaugrohres. Auch die Wärme des Netzgerätes muss abgeführt werden, weshalb wir den Kasten auf Füße stellen haben, um ein Loch für den Kühler des Netzgerätes machen zu können. Platine mit H-Brücke und Arduino bringen wir an der Rückseite des Gehäuses an. Eine genauere Anleitung wird es im Bauplan für die PCR.

6. Finaler Testlauf

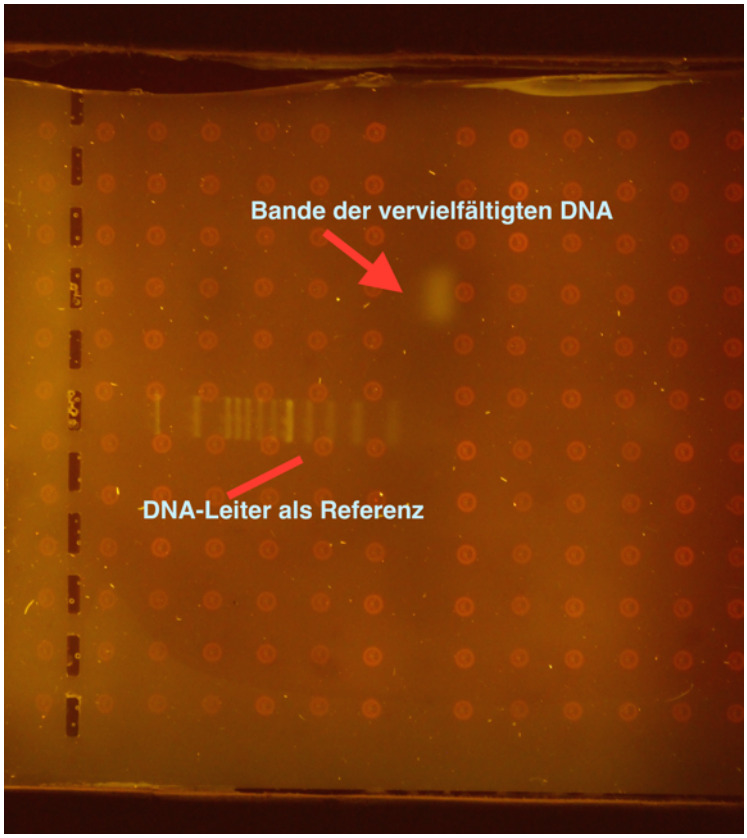


Bild 4: Gel mit vervielfältigter DNA/sichtbare DNA (eigenes Foto)

Mit unserer funktionsfähigen PCR-Maschine haben wir zudem mit DNA einen Testlauf durchgeführt. Dafür hat ein paralleles Jugend forscht Team, welches sich mit der Isolierung von DNA beschäftigt, uns körpereigene DNA isoliert und vorbereitet. Am Morgen vor der Schule haben wir dann unsere Maschine, entsprechend der Primer, auf die richtigen Temperaturen eingestellt und daraufhin 35 Zyklen der PCR laufen lassen. Zum Ende des Schultages haben wir diese DNA der PCR-Maschine entnommen und durch eine Gel-Elektrophorese laufen lassen. Parallel dazu haben wir eine DNA-Leiter als Referenz mitlaufen lassen. Mithilfe einer selbstgebauten Blaulichtkammer haben wir die Bande dann sichtbar gemacht. Die vervielfältigte DNA wurde nicht von Restriktionsenzymen geschnitten, weshalb wir nur eine einzige Bande sehen. Die Breite der Bande zeigt jedoch, dass ausreichend DNA vorhanden ist, also unsere Maschine ihre Arbeit getan hat.

[12] http://www.amazon.de/RCS-Bassreflex-Rohr-dm-100mm-L-197mm-schwarz/dp/B00I8H1C0Y/ref=sr_1_11?ie=UTF8&qid=1420814114&sr=8-11&keywords=bassreflexrohr, entnommen 22.12.2014

7. Kostenübersicht

Bei der Erstellung der Kostenübersicht sind wir davon ausgegangen, dass die zur Konstruktion der PCR-Machine erforderlichen Materialien allesamt nicht vorhanden sind.

Bauteil	n	Kosten	Summe	Quelle
Arduino UNO Microcontroller	1	24,50	24,50	www.reichelt.de
Arduino LCD-Display	1	11,99	11,99	www.amazon.de
65Stk wiederverwendbare Jumper-Kabel male/male	65	2,30	2,30	www.amazon.de
P-MOSFETS	2	2,09	4,18	farnell.de
N-MOSFETS	2	1,71	3,42	farnell.de
HighTech-Peltier-Element-155-V-85-A-72-W-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm	1	38,93	38,93	www.conrad.de
CPU-Kühler Arctic Freezer 13	1	24,45	24,45	www.amazon.de
Temperatursensor analog LM 35 CZ	1	3,35	3,35	www.reichelt.de
Aluminiumblock 4*4*	1	2,38	2,38	www.alu.verkauf.de
Gesamtkosten:			115,5 €	

Tabelle 1: Kostenübersicht

*Da wir teilweise Materialen aus der Physiksammlung unserer Schule verwendet haben, haben wir für die Kostenübersicht die Preise recherchiert und diesen Preis angegeben. Die angegebenen Preise können sich natürlich ändern oder die Seiten diese Produkte nicht mehr verkaufen. Um sicher zu stellen, dass die Bauanleitung jedoch auch dann noch vollständig ist, haben wir im Bauplan für die einzelnen Materialen jeweils angegeben, was diese leisten müssen bzw. was für Merkmale sie aufweisen müssen.

Für den Bau des Kastens haben wir eine Pauschale von etwa 20€ einberechnet.
Damit wären wir bei einer voll funktionsfähigen PCR-Maschine für unter 140€.

8. Ausblick

Mit unserer Do-it-youself PCR haben wir eine voll funktionsfähige PCR-Maschine für den Einsatz im schulischen Rahmen konstruiert. Der Aluminiumblock hat jedoch, insbesondere bei den 72°C und 54°C eine gewisse (geringe) Temperaturabweichung im Vergleich zur DNA-Probe, aufgrund der thermischen Trägheit. Während der Haltezeit wird die Temperatur nicht ideal konstant gehalten.

	Vorgang startet bei:	**hält 15 Sekunden**	**beginnt kühlen/heizen bei:**
Trennen bei 94°C	93°C	hält 15 Sekunden	94,6°C
Primer ansetzen bei 72°C	72,2°C	hält 15 Sekunden	68,8°C
Verlängerung bei 53°C	53,1°C	hält 15 Sekunden	50,0°C

Tabelle 2: Temperaturabweichungen/Verzögerung
Temperatur und Haltezeit kann je nach verwendetem Primer variieren. Die jeweiligen Temperaturen können im Programm verändert werden. (eigene Tabelle)

Somit bekommt der Arduino das Signal zur Kühlung zu spät. Dieses Problem der Trägheit möchten wir noch mithilfe eines zweiten Temperatursensor beheben. Auch das LCD-Display für die PCR-Maschine möchten wir noch an den Arduino anschließen, damit man auch ohne PC sehen kann, wie weit der Vorgang der PCR ist und wie hoch die Temperatur ist.
Hinzu kommen außerdem die Erstellung eines Konstruktionsplanes und einer Bedienungsanleitung für Schulen mit Details über Materialen und Aufbau.

9. Zusammenfassung

Mit der Konstruktion einer microcontroller-gesteuerten PCR-Maschine für den Biologieunterricht und der Erstellung eines Bauplanes für eine low-cost PCR ist es uns gelungen, eine voll funktionsfähige PCR-Maschine für weniger als 140€ zur Verfügung zu stellen. Die Dauer eines kompletten PCR-Durchlaufes beträgt durchschnittlich 5 Stunden und 40 Minuten. Die Zeiten können je nach eingestellter Temperatur variieren. In der nachfolgenden Tabelle sind exemplarisch die gemessenen Zeiten zum Erreichen der jeweiligen Zieltemperaturen für drei verschiedene Durchläufe dargestellt. Wie man sehen kann sind die Zeiten unserer PCR sehr konstant und es gibt nur geringe Abweichungen.

Temperatur	1. Durchlauf	2. Durchlauf	3. Durchlauf
von 20°C* auf 94°C	6:50 Minuten**	/	/
von 94°C auf 72°C	1:50 Minuten	1:45 Minuten	1:45 Minuten
von 72°C auf 53°C	1:30 Minuten	1:32 Minuten	1:29 Minuten
von 53°C auf 94°C	5:30 Minuten	5:07 Minuten	5:28 Minuten
Gesamtlaufzeit für 3 Durchgänge			30:46 Minuten mit aufheizen von RT* 29:26 Minuten 3 Durchgänge

Tab. 3: Heiz- und Kühlzeiten der PCR (eigene Tabelle)
*Raumtemperatur
** In den Zeiten sind jeweils 15 Sekunden Haltezeit mit einberechnet

Wir hoffen damit weitere Experimente im Rahmen des Biologieunterrichts zu ermöglichen, die den Bereich der Genetik anschaulicher gestalten und weitere Schüler von der Genetik begeistern können.

10. Danksagung

Wir möchten uns bei unserem Betreuer und Biologielehrer Herrn Nebe bedanken, der uns bei Fragen immer zur Seite stand und uns in erster Linie durch seinem Unterricht motiviert hat, ein solches Projekt zu starten. Im Rahmen unseres Projektes standen wir außerdem technischen Problemen gegenüber, welchen keiner von uns gewachsen war. Für die Erklärung solcher und für die tatkräftige Unterstützung bei unserem Projekt möchten wir uns zusätzlich bei Stefan Hück bedanken.

11. Literaturverzeichnis

(1) Ulrike Spörhase-Eichmann und Wolfgang Ruppert: Biologie Didaktik, Praxishandbuch für die Sekundarstufe I und II. Cornelsen, 2004, S.115

(2) Markl Biologie Pberstufe, Ernst Klett Verlag GmbH, Stuttgart 2011

(3) http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/07-KK5101-03_an.pdf, entnommen 25.12.2014

(4) http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion, entnommen 25.12.2014

(5) http://www.deltron.ch/pdf/produkte/peltier/peltier-element_kurz_erklaert_d.pdf, entnommen 13.11.2014

(6) http://www.siteware.ch/peltier/theorie.html, entnommen 13.11.2014

(7) http://de.wikipedia.org/wiki/Peltier-Element, entnommen 13.11.2014

(8) http://www.quick-ohm.com/peltier_elements/download/10-Regeln.pdf, entnommen 13.11.2014

(9) http://www.conrad.de/ce/de/product/189183/HighTech-Peltier-Element-155-V-85-A-72-W-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm-A-x-B-x-C-x-H-40-x-40-x-x-34-mm-Qu?ref=list, entnommen 13.12.2014

(10) http://arduino.cc/en/Reference/HomePage, entnommen 13.10.2014

(11) http://i.stack.imgur.com/L7FRY.png, entnommen 11.12.2014

(12) http://www.amazon.de/RCS-Bassreflex-Rohr-dm-100mm-L-197mm-schwarz/dp/B00I8H1C0Y/ref=sr_1_11?ie=UTF8&qid=1420814114&sr=8-11&keywords=bassreflexrohr, entnommen 22.12.2014

12. Abbildungsverzeichnis

(1) Abb. 1: Ablauf von einer PCR, Kapitel 4.1 Was ist eine PCR, Quelle: Mark Biologie Oberstufe, Ernst Klett Verlag GmbH, Stuttgart 2011

(2) Abb. 2: Funktionsweise eines Peltier-Element, Quelle: Deltron, 2014, S. 3 von 8, Kapitel 4.2 Das Peltier-Element, entnommen am 13.10.2014

(3) Abb. 3: Heizleistung in Abhängigkeit von der Temperatur, (eigene Messungen/Grafik), Kapitel 4.2 Das Peltier-Element, entnommen am 13.10.2014

(4) Abb. 4: Funktionsweise eines Peltier-Elements, Quelle: Deltron, 2014 S.4, Kapitel 4.2 Das Peltier-Element, entnommen am 13.10.2014

(5) Abb. 5: Die H-Brücke: links sind Schalter 1 & 4 geschlossen, das Peltier-Element heizt. Rechts sind Schalter 2 & 3, Kapitel 4.5 Die H-Brücke (eigene Zeichnung)

(6) Abb.6: Der Schaltplan der H-Brücke, Kapitel 4.5 Die H-Brücke (eigene Zeichnung)

(7) Abb. 7: Arduino, Kapitel 5.2 Programmierung des Arduinos, Quelle: http://i.stack.imgur.com/L7FRY.png, entnommen 11.12.2014

13. Bildverzeichnis

(1) Bild 1: Minimalaufbau unserer PCR-Maschine, Kapitel 5.1 Leistungstest, (eigenes Foto)
(2) Bild 2: Unsere erste Platine, Kapitel 5.3 Der Bau der H-Brücke , (eigenes Foto)
(3) Bild 3: Versuchsaufbau der PCR, Kapitel 5.4 Troubleshooting, (eigenes Foto)
(4) Bild 4: Gel mit vervielfältigter DNA/sichtbare DNA, Kapitel 6 Testlauf (eigenes Foto)

14. Tabellenverzeichnis

(1) Tabelle 1: Kostenübersicht (eigene Tabelle)
(2) Tabelle 2: Temperaturabweichungen/Verzögerung (eigene Tabelle)
(3) Tabelle 3: Heiz- und Kühlzeiten der PCR (eigene Tabelle)