



Целью проекта является разработка общедоступной технологии секвенирования ДНК.

На сегодняшний день самой простой и пригодной для широкого применения является технология полупроводникового секвенирования. Пока она реализована только в секвенаторе PGM (Personal Genomic Machine) – приборе компании Ion Torrent, принадлежащей корпорации Life Technologies. Во второй половине 2012 года должна появиться более производительная (и более дорогая) модель этой же компании – Ion Proton.

Цены на подобные секвенаторы и необходимые для их работы расходные материалы и реагенты явно завышены. Особенно это относится к pH-сенсорным чипам, себестоимость производства которых не превышает 1...2\$. Об этом свидетельствует и то, что после появления в продаже чипов Ion 318 (500\$) цена Ion 314 уменьшилась с 250 до 99\$, а Ion 316 – с 500 до 299\$.

Значительно понизится стоимость pH-сенсорных чипов только после появления на рынке конкурентов. Первым конкурентом, по-видимому, станет корпорация Roche, которая ещё в 2010 году подписала соглашение с обладателями патента на pH-сенсорное секвенирование. Возможно, в следующем году подобные чипы удастся разработать компаниям Silixa и InVisage. Но кардинально уменьшить расходы на чипы способно только их многократное использование. Этим определяется актуальность разработки устройства для регенерации и проверки качества использованных чипов – “Chip Washing Station”.

Chip Washing Station

Удалить использованные микросферы из сенсорных лунок можно, например, при помощи центрифугирования перевёрнутых чипов ([Hiro.Protagonist, Cambridge, USA](#)), но использовать их после этого «вслепую», без проверки качества, слишком рискованно. Поэтому желательно оснастить сервер секвенатора PGM программой “Chip Viewer”, позволяющей анализировать качество, количество и расположение работоспособных микросенсоров. Такой контроль качества чипов позволит использовать их повторно даже без регенерации, поскольку очень редко микросферы с ДНК заполняют более 50% лунок. Но после вторичного использования новых чипов обойтись без их регенерации уже не удастся.

В процессе регенерации желательно наблюдать за удалением микросфер из лунок в режиме on line. Для этого чип необходимо перевернуть основанием вверх. Переворачивать вместе с ним и секвенатор весьма затруднительно, поэтому желательно иметь небольшую печатную плату (коннектор) с гибким шлейфом, один конец которой прижимается к контактной площадке PGM, а второй контактирует с перевёрнутым чипом. Подключенный к такой плате чип можно будет трясти микровибратором и промывать его проточную ячейку пульсирующим потоком промывочного раствора, создаваемым пьезоэлектрическим микронасосом. Для программного обеспечения работы подобной приставки к PGM (“Chip Washer”),

включающей коннекторную плату, микровибратор и микронасос, также потребуется вышеупомянутая программа “Chip Viewer”.

Секвенатор PGM – это довольно дорогой прибор (49,5 тыс.\$) с предустановленным на далеко не дешёвом сервере (16,5 тыс.\$) программным обеспечением. Его использование не по прямому назначению может вызвать нарекания со стороны сервисных инженеров, обеспечивающих гарантийное обслуживание. Поэтому желательно разработать “Chip Washing Station” – автономное устройство для просмотра и регенерации чипов. Для этого потребуется “Chip Reader” – электронная плата с контактной площадкой для чипа (упрощённый аналог электронной платы PGM). Требования к компонентам такой платы невысоки, поэтому “Chip Washing Station” (“Chip Viewer” + “Chip Washer” + “Chip Reader”) может стоить меньше 500\$.

Таким образом, возможны три основных варианта регенерации pH-сенсорных чипов для их повторного использования. Самый простой – с помощью программы “Chip Viewer”, установленной на сервере секвенатора PGM. Более эффективный – со специальной коннекторной платой, позволяющей наблюдать за регенерацией чипа *on line* (“Chip Washer”). Наиболее удобный – при помощи подключаемого к любому компьютеру автономного устройства – “Chip Washing Station”. Разработка подобной станции сможет ежегодно экономить тысячи долларов каждой лаборатории, занимающейся полупроводниковым секвенированием ДНК, общее количество которых уже сейчас перевалило за тысячу.

Сложнее всего будет разработать “Chip Reader”, поскольку для этого необходимо знать структуру и архитектуру pH-сенсорных чипов, особенности их работы, функциональное назначение всех контактов и характеристики подаваемых на них электрических импульсов и потенциалов. Но, разобравшись во всех этих тонкостях, можно будет разработать не только “Chip Reader”, но и “Ion Reader” – более совершенный электронный блок, способный не только просматривать и анализировать чипы, но и использовать их для секвенирования ДНК. В итоге разработка “Chip Washing Station” может стать основой для создания дешёвого полупроводникового секвенатора – упрощённого аналога PGM (“Junior Torrent”), способного многократно использовать «одноразовые» pH-сенсорные чипы компании Ion Torrent.

Junior Torrent

Секвенатор PGM состоит из трёх подсистем – детектирующей, жидкостной и вычислительной

В электронной детектирующей подсистеме, считывающей информацию с pH-сенсорных чипов, центральным элементом у PGM является FPGA Lattice 2M компании Lattice Semiconductor. Этот микрочип был разработан более 6 лет назад и на сегодняшний день вряд ли может считаться наиболее совершенным. Смена поколений FPGA происходит очень быстро. Их производительность удваивается каждые 14 месяцев и сейчас в продаже имеются намного более мощные микрочипы подобного рода, а также оснащённые ими специализированные и универсальные отладочные платы. Стоимость таких плат колеблется от нескольких сотен до нескольких тысяч долларов.

Отладочные платы отличаются избыточными функциональными возможностями и обычно применяются разработчиками электроники только как

вспомогательные средства для выбора оптимальных компонентов и параметров работы электронных устройств. В самих разрабатываемых устройствах чаще всего используются не дорогие FPGA (программируемые пользователем вентильные матрицы), а DSP (специализированные процессоры цифровой обработки сигналов) и другие более дешёвые компоненты. Благодаря этому общедоступными стали, например, цифровые фотоаппараты и смартфоны.

Специализированная плата секвенатора с быстродействующим FPGA (“Ion Reader”) может стоить 1000...2000\$. Если удастся использовать производимые в массовых масштабах платы цифровых фотокамер, то цена детектирующей системы может понизиться до 100...200\$.

Система подачи растворов у PGM пневматическая, работающая на сжатом аргоне. У неё есть свои достоинства, но тяжёлый (~ 70 кг) баллон с аргонem не украшает секвенатор. Поэтому на фотографиях прибора он обычно остаётся за кадром. Заменить эту громоздкую систему можно двумя общедоступными компактными устройствами – перистальтическим микронасосом и селекторным клапаном, приводами у которых служат шаговые моторы. Последние необходимы для того, чтобы подключать эти устройства к компьютеру.

В продаже имеется несколько моделей перистальтических микронасосов с шаговыми приводами. Стоят они от 60\$ (Kamoer, China) до 100...200\$ (Williamson Manufacturing Company Ltd, UK) и выше. Выбор используемых в хроматографии селекторных клапанов (многоходовых кранов) менее обширен. Возможно, подходящим вариантом окажется восьмиканальный селекторный клапан низкого давления компании VICI (Valco Instruments Company Inc., USA). Смущает только его цена (кат. №C25Z-3188EMH, ~1500\$). Без шагового мотора такой клапан (Replacement valve, кат. №C25Z-3188D) стоит намного дешевле (~ 500\$).

Перистальтические микронасосы с шаговым приводом	Селекторный клапан с шаговым приводом
 	

Маломощные шаговые моторы стоят чуть больше 100 рублей, но с вращением ротора селекторного клапана они могут не справиться. Более мощные компактные моторы отечественного производства стоят от одной до двух тысяч рублей. Состыковать их с готовым американским клапаном стоимостью более 15 тысяч рублей не слишком сложно, но дешевле такой клапан сделать в России. Освоение производства головок перистальтических микронасосов не столь актуально, поскольку их стоимость невысока. Но конструкция таких головок настолько проста, что особых затруднений при их производстве возникнуть не должно.

Таким образом, при использовании в жидкостной подсистеме секвенатора имеющихся в продаже готовых зарубежных компонентов их общая стоимость может приближаться к 2000\$. В случае освоения производства перистальтических насосов и селекторных клапанов собственной конструкции эта цифра может уменьшиться в 4...5 раз.

Третьей подсистемой – вычислительной – у секвенатора PGM служит “Torrent Server EL”. Судя по техническим характеристикам и описанию, это далеко не самая совершенная графическая станция компании Dell (Precision T3500) с максимальным для неё объёмом оперативной памяти (24 Gb), четырьмя жёсткими дисками по 2 Tb и шестиядерным процессором Intel Xeon W3670. В России этот же сервер можно купить за 3...4 тыс.\$, но в составе секвенатора, приобретаемого через европейское представительство корпорации Life Technologies (+30%), пересекающего границу РФ (+30%) и продаваемого местными дилерами, его цена возрастает с 16,5 тыс.\$ (в США) до 46 тыс.\$.

За такие деньги можно приобрести дюжину не менее производительных современных серверов с двумя-тремя накопителями информации. Последние быстро дешевеют, и стоимость подключаемых через порт USB 3.0 внешних RAID на 6 Tb сейчас не превышает 600\$. Подключить к серверу до четырёх таких накопителей можно через активный USB-хаб (50...60\$).

			
Buffalo Technology DriveStation Duo 6 TB USB 3.0 External RAID Hard Drive Array HD-WL6TU3R1	Avolusion 6TB SuperSpeed USB 3.0 RAID 0/1/10/JBOD External Hard Drive	Vantec 4 UGT-MH430U3 USB 3.0 Active Hub	D-Link 4-Port SuperSpeed USB 3.0 Hub (DUB-1340)

Судя по тому, что специалисты компании Ion Torrent предлагали подключать к каждому своему серверу по 4 секвенатора PGM, навязываемая ими графическая станция обладает избыточной мощностью. Отсюда следует, что с обработкой информационных потоков полупроводникового секвенатора может справиться практически любой не слишком дешёвый (1,5...2 тыс.\$) современный игровой компьютер с жёстким диском на 2...4 Tb. Достаточно высокой производительностью уже обладают и некоторые современные модели ноутбуков.

Если не учитывать вес вычислительной подсистемы разрабатываемого секвенатора (компьютера, RAID и хаба), то самыми тяжёлыми его компонентами окажутся два шаговых мотора весом 200...300 грамм. Общий вес такого прибора со всеми принадлежностями может не превышать 1,5...2 кг, что в 15...20 раз меньше, чем у PGM (30 кг). Примерно во столько же раз может уменьшиться и цена полупроводникового секвенатора. В США PGM сейчас стоит 49,5 тыс.\$ (в России ~140 тыс.\$). “Junior Torrent” может продаваться за 2...3 тыс.\$, причём не только в США, но и в России.

DIY Torrent

Ещё дешевле могут стоять комплекты деталей для сборки самодельных секвенаторов типа DIY (Do It Yourself).

Девизом «сделай сам» руководствуются обычно садоводы-любители и радиолюбители, но в последние годы набирает силу это движение и в биологии. Появились, например, [биохакеры](#) – любители проведения молекулярно-генетических экспериментов на собственной кухне или в гараже. Непомерная стоимость необходимого для таких экспериментов оборудования и реактивов вынуждает их делать всё своими руками и объединяться в группы по интересам.

Некоторые разработанные биохакерами приборы и оборудование можно приобрести за умеренную плату, которая обычно на порядок меньше, чем у практически аналогичных по качеству фирменных поделок.

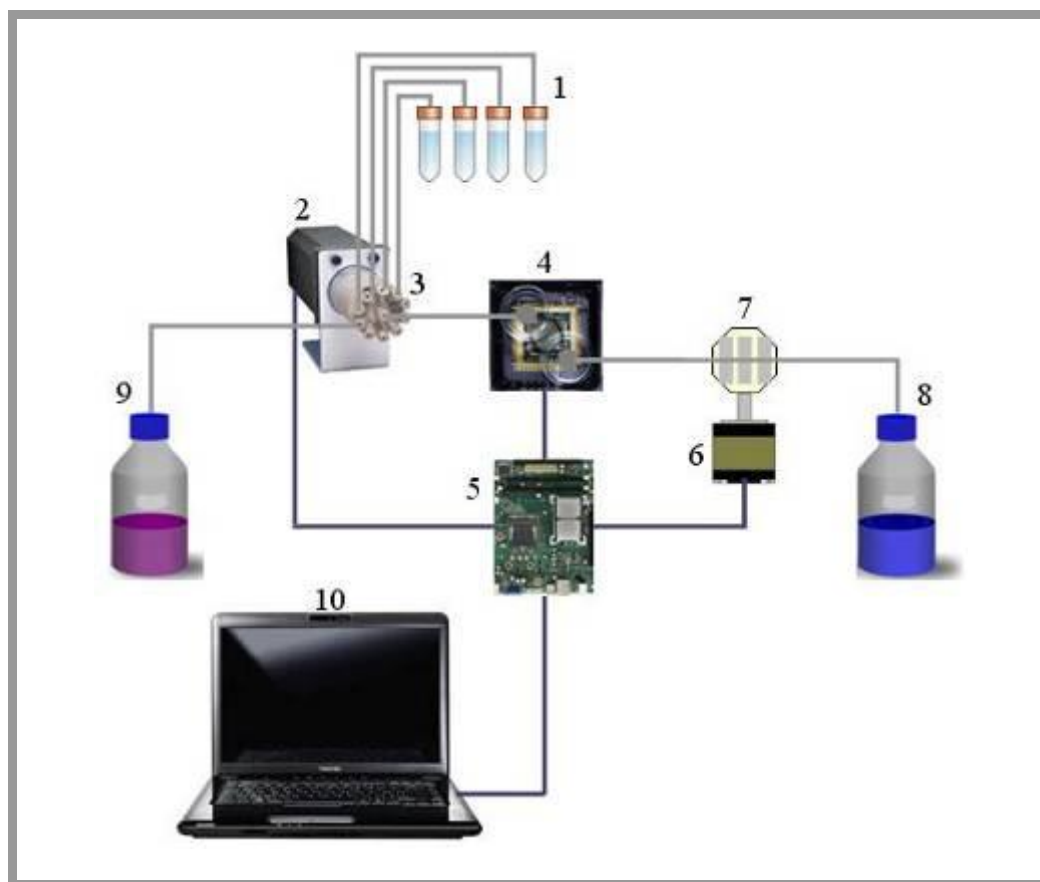
Термоциклер OpenPCR \$599 \$3,000 	Микроцентрифуга The Dremelfuge \$55 \$500 
Сканирующий туннельный электронный микроскоп Open-source STM - scanning tunneling electron microscope \$100 \$9,500 	Цифровой микроскоп Webcam Microscope \$10 \$200 

Простейший [комплект самодельного оборудования](#), состоящий из термоциклера, электрофоретической камеры, источника питания и осветителя, позволяет определять генетически модифицированные организмы, идентифицировать вирусы и бактерии, обнаруживать некоторые мутации в геноме человека и т.п.. Стоимость такого комплекта измеряется сотнями долларов. Его можно использовать и для подготовки ДНК к секвенированию, но само секвенирование для биохакеров пока относится к невыполнимым «фигурам высшего пилотажа». Не хватает самой малости – самого секвенатора.

Многие детали DIY-секвенатора можно приобрести самостоятельно, но лучше использовать готовые наборы, включающие все необходимые для сборки элементы. Аналогичные комплекты деталей в восьмидесятые годы успешно использовались отечественными радиолюбителями для сборки первых персональных компьютеров, которые или отсутствовали в продаже, или были непомерно дороги.

Выбор комплектующих для DIY-секвенатора определяется его устройством, которое должно быть предельно простым и эффективным. Самой рациональной на сегодняшний день является схема Ларина, в которой используется минимальное количество элементов. От обычных проточных систем её отличает возможность многократного использования реагентов, подаваемых в проточную ячейку рН-сенсорного чипа.

Устройство DIY-секвенатора
(схема Ларина)



- | | |
|---|--|
| 1. Ёмкости с реагентами (растворами дНТФ) | 6. Шаговый мотор перистальтического насоса |
| 2. Шаговый мотор селекторного клапана | 7. Головка перистальтического насоса |
| 3. Селекторный клапан | 8. Флакон с промывочным раствором |
| 4. рН-сенсорный чип | 9. Флакон для сбора промывочного раствора |
| 5. Ion Reader с контроллерами шаговых моторов | 10. Компьютер |

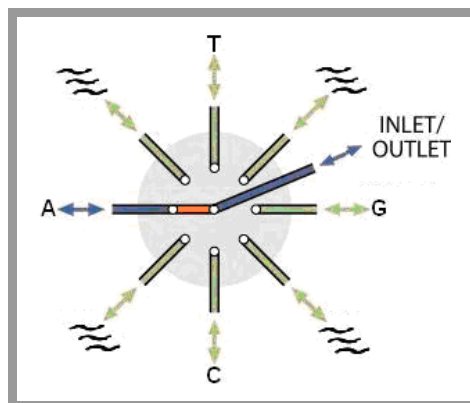
Используемая в этой схеме жидкостная подсистема секвенатора работает в возвратном режиме:

1. Насос подаёт в проточную ячейку один из реагентов.
2. После заполнения ячейки насос выключается (4...5 сек.), и детекторная система считывает информацию с чипа.
3. Насос прокачивает промывочный раствор в обратном направлении.

4. После возврата основной части реагента (90...95%) в предназначенную для него ёмкость клапан переключается на слив, и насос продолжает работать, промывая ячейку чипа.
5. После окончания промывки (15...20 сек.) насос выключается, клапан переключается в следующую позицию, насос включается в прямом направлении и подаёт в ячейку следующий реагент. Затем цикл повторяется.

Работающий в таком режиме селекторный клапан должен обладать роторной головкой, переключающей 8 потоков (4 порта для дНТФ и 4 - для промывочного раствора).

Схема селекторного клапана



Используемые в хроматографических системах селекторные клапаны обладают избыточными габаритами и стоят сотни долларов. Последнее делает их непригодными для DIY-секвенатора. Отсюда следует необходимость разработки миниатюрного и сравнительно дешёвого (40...100\$) аналога. Головка перистальтического насоса, если освоить производство её простейшей модели, может стоить ещё меньше (15...30\$).

Для вращения клапанного ротора и головки перистальтического насоса потребуются 2 шаговых мотора с контроллерами (15...20\$) и управляющая ими электронная плата, подключаемая к компьютеру через USB-порт (30...50\$). Суммарная стоимость вышеперечисленных компонентов жидкостной подсистемы секвенатора составит ~100...200\$. Примерно столько же стоят 2 чипа Ion 314 (198\$), которые желательно включить в сборочный комплект. Ещё 100...200\$ придётся потратить на корпус, флаконы, соединительные кабели, трубки и стартовый набор реагентов. В сумме набирается 400...600\$, что сопоставимо с ценой комплекта деталей, предлагаемых для сборки самодельного термоциклера [OpenPCR](#) (599\$).

Для американцев - основных потенциальных покупателей наборов деталей для сборки DIY-секвенаторов - психологическим барьером является сумма в 1000\$. Часть этой суммы потребуется на комплектацию наборов, налоги (18% НДС, 6% при UCN) и прочие накладные расходы, поэтому стоимость детектирующей подсистемы не должна превышать 200\$. Замена новых чипов в комплекте на регенерированные (бесплатные) позволит удвоить эту статью расходов. Если же и этого окажется недостаточно, то придётся переориентироваться на европейских любителей секвенирования, у которых психологическим барьером служат не 1000\$, а 1000€.

Dream Machine

Dream Machine (DM) – это секвенатор будущего, характеристики которого обсуждались на форуме сайта seqanswers.com (Biotech Rockstar, UK). Описанные там параметры (размеры смартфона, 100\$ за геном, рециркуляция реагентов и т.д.) вполне достижимы, хотя и не в самом ближайшем будущем. Например, разместить секвенатор в корпусе смартфона - это не первоочередная задача. Важнее увеличить его производительность и уменьшить стоимость, причём последнее относится не только к прибору и расходным материалам, но и к пробоподготовке.

Производительность PGM всего за год увеличилась почти в 100 раз и в рекордных рабочих циклах достигла 1 Gb (млрд.п.о.). При этом количество микросенсоров на чипах серии Ion 31x увеличилось почти на порядок, в несколько раз возросла эффективность их использования (загрузка лунок) и примерно в 2 раза (до 200 п.о.) увеличилась средняя длина ридов. По-видимому, миллиардные запуски для PGM скоро станут обычным делом, но значительного прироста производительности от этой модели ожидать не приходится.

Более совершенная модель (Ion Proton), продажи которой начнутся в сентябре, будет работать с чипами Proton I (165 Mp), а в следующем году ещё и с Proton II (0,66 Gp). Её начальная производительность приблизится к 10 Gb, а в перспективе может возрасти до 100 Gb – показателя, необходимого для секвенирования генома одного человека. При этом стоимость генома должна понизиться до 1000\$.

По-видимому, следующее поколение полупроводниковых секвенаторов (“Dream Machine”) получит многоразовые гигапиксельные чипы, что позволит с высокой точностью секвенировать геномы за 100\$, или даже за 1000 руб.. От предшественников новое поколение полупроводниковых секвенаторов, по-видимому, будут отличаться ещё и «многоядерностью» - способностью одновременно работать с несколькими сенсорными чипами. Но будет всё это ещё очень не скоро. Года через два. Или даже через три.

В ближайшем будущем более востребованным может оказаться аналог “Junior Torrent”, позволяющий одновременно работать с четырьмя чипами Ion 314 (“DM-1”). Переход на четырёхчиповую схему не потребует кардинальной переработки конструкции. Правда, увеличение количество модулей жидкостной подсистемы повысит её стоимость до 1...2 тыс.\$, но стоимость детекторной подсистемы увеличится не столь значительно.

У PGM с максимальной нагрузкой электронная плата работает около 5 секунд - при поступлении в проточную ячейку реагентов. При промывке чипа (20 секунд) она может отключаться. У DM-1 она может переключаться на обработку сигналов со следующего чипа. Следовательно, при несинхронной подаче реагентов одна детекторная подсистема способна справиться с обработкой сигналов от четырёх чипов Ion 314. Для этого придётся модифицировать программное обеспечение платы с FPGA, изменить её конструкцию и увеличить количество контактных площадок, но подобные переделки не способны сильно повлиять на стоимость детекторной подсистемы.

Таким образом, переход на многочиповые модели секвенаторов не должен сопровождаться заметным удорожанием приборов, но приведёт к значительному увеличению расхода реагентов. В результате первоочередной задачей станет экономия основных расходных реагентов - особо чистых дНТФ.

DIY-dNTP

При средней длине чтения ДНК, составляющей ~100 п.о. (65 циклов подачи дНТФ), стоимость набора расходуемых дезоксинуклеозидтрифосфатов составляет 75\$ (в США). Увеличение длины чтения до 200 п.о. и доставка в Россию увеличивают эту цифру до 256\$. В ближайшем будущем компания Ion Torrent должна разработать технологию получения ещё более чистых препаратов дНТФ, что позволит увеличить длину чтения ДНК до 400 п.о.. Естественно, увеличится и стоимость наборов таких препаратов, расходуемых за один цикл работы прибора (>300\$ в США и >600\$ в РФ). Для дешёвой технологии полупроводникового секвенирования подобные цены явно неприемлемы.

Можно предложить несколько вариантов экономии дНТФ. Так, в системе Ларина основные потери связаны с разбавлением рабочих растворов дНТФ на границе с промывочным раствором. Существенный вклад в такое разбавление вносит далеко не оптимальная конфигурация проточной ячейки чипа. Тем не менее, объём реагентных растворов, используемых повторно, может достигать 90...95%. Соответственно, их расход может уменьшиться в 10...20 раз.

Разбавленные дНТФ удаляются через порты промывочного раствора, на выходе которых могут стоять колонки с сорбентами. Тогда при работе секвенатора вся расходуемая часть дНТФ постепенно перейдёт из рабочих ёмкостей на сорбенты, с которых дНТФ можно смыть, очистить от примесей, довести до рабочих концентраций и использовать повторно. Для некоторых высококвалифицированных пользователей PGM такой способ экономии реагентов вполне приемлем, но для обладателей дешёвых DIY-моделей необходим более простой вариант.

Проще всего ограничить длину чтения ДНК и использовать менее чистые и не столь дорогие препараты дНТФ. Для сборки генома бактериофага лямбда (~48,5 т.п.о.) и близких по размеру вирусов длина читаемых нуклеотидных последовательностей должна быть не меньше 14 п.о.. Собрать бактериальный геном можно из фрагментов длиной 20...22 п.о.. Такой же длины, как правило, достаточно для идентификации любых возбудителей инфекционных заболеваний. Следовательно, для решения большинства прикладных задач длина чтения может быть уменьшена до 25 п.о.. Данное ограничение позволит использовать менее очищенные и более дешёвые препараты дНТФ, причём в меньших количествах.

Примеси посторонних дНТФ в их индивидуальных препаратах приводят к быстрому накоплению сдвигов рамки чтения, поэтому длина чтения очень сильно зависит от чистоты этих реагентов. Обычно их чистоту повышают многократной хроматографией исходных нуклеотидов (дезоксинуклеозидмонофосфатов) с последующим химическим или ферментативным синтезом из них трифосфатов. Освоить все этапы подобной технологии сложно даже специалистам.

Намного проще удалять нежелательные примеси ферментативным истощением – добавлением к недостаточно чистому реагенту компонентов ДНК-полимеразной реакции (ДНК-полимеразы и матричной ДНК с сайтами инициации полимеразной реакции). Образующиеся ими ДНК-полимеразные комплексы будут служить ловушками для посторонних примесей в растворах индивидуальных дНТФ. Такой способ получения особо чистых DIY-dNTP может использоваться повсеместно, что позволит не слишком сильно ограничивать (или даже увеличивать) длину читаемых нуклеотидных последовательностей.

О тщите сущего

Препарат подготовленной к полупроводниковому секвенированию ДНК – это десятки миллионов микросфер (Ion Sphere™) с клонами фрагментов ДНК, которые получают при помощи эмульсионной ПЦР. Для подготовки и контроля качества таких клонов используют несколько приборов и наборов реагентов, стоимость каждого из которых обычно исчисляется тысячами долларов.

Для фрагментации исходной ДНК рекомендуется ультразвуковая обработка (Bioruptor® UCD-200, 13310\$). Затем фракцию фрагментов заданной длины выделяют, как правило, при помощи электрофоретической системы Pippin Prep™ (15000\$). Концы полученных фрагментов «полируют», пришивают к ним адапторы и проводят эмульсионную ПЦР на Ion OneTouch™ System (14490\$). В смеси полученных микросфер содержится много «пустышек», от которых избавляются при помощи входящей в эту систему Ion OneTouch™ ES (enrichment system).

Очищенные микросферы, содержащие клоны фрагментов ДНК, загоняют в лунки чипа центрифугированием. Для этого необходимо иметь настольную скоростную микроцентрифугу (2,5...4 тыс.\$). В комплект PGM входит только Ion Chip Rotor. Ещё для работы может понадобиться вортекс Ultra Turrax Drive компании IKA (1000\$).

Bioruptor® UCD-200



Pippin Prep™ System



Ion OneTouch™ System



Ultra Turrax Drive from IKA®



К стоимости вышеперечисленного оборудования нужно приплюсовать стоимость приборов, используемых для качественной и количественной оценки получаемых препаратов ДНК – Qubit® 2.0 Fluorometer (1845,18 \$), Agilent 2100

Bioanalyzer™ (~18 тыс.\$) и термоциклер для Real-Time PCR (15...30 тыс.\$). Если ещё учесть стоимость пипеток и прочей мелочёвки, то одного только вспомогательного оборудования наберётся почти на 100 тыс.\$.

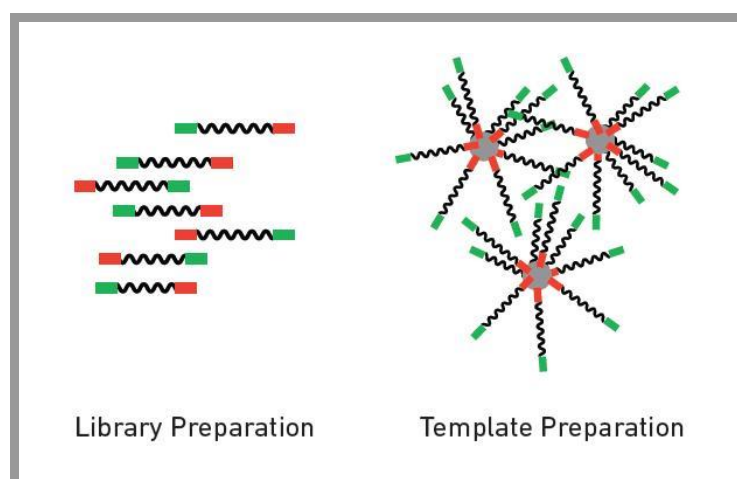
Некоторые наборы реагентов позволяют проводить фрагментацию и очистку фрагментов ДНК с адапторами (библиотек) без применения дополнительного оборудования, но стоят они не так уж и дёшево. Например:

NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep (на 50 проб)	-	1000\$;
Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (на 10 проб)	-	750\$.

Цена наборов для получения библиотек из фрагментов ДНК, получаемых ультразвуковой обработкой, тоже довольно солидна:

Ion Plus Fragment Library Kit (на 10 реакций)	-	500\$;
NuGEN® Encore™ NGS Library System (на 8 проб)	-	428\$.

Для проведения эмульсионной ПЦР и получения микросфер с иммобилизованными клономатричной (секвенируемой) ДНК потребуется ещё Ion OneTouch™ 200 Template Kit или Ion PGM™ 200 Xpress™ Template Kit (1250\$ на 10 образцов).



Значительно удорожает пробоподготовку необходимость применения различных контрольных материалов, комплектов праймеров для баркодирования, специальных наборов и т.п.. Например:

Ion Sphere™ Quality Control Kit (20 измерений)	-	350\$;
Ion Control Materials 200 Kit (3 реакции)	-	500\$;
Ion Library Quantitation Kit (250 реакций)	-	1034\$;
Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit (16 адапторов/10 реакций)	-	1600\$;
Ion AmpliSeq™ Cancer Panel	-	2000\$;
Ion Total RNA-Seq Kit (48 реакций)	-	4000\$.

В результате стоимость подготовки препарата ДНК к полупроводниковому (и не только) секвенированию исчисляется сотнями, а в некоторых случаях и тысячами долларов. На этом фоне попытки удешевления секвенатора и расходующихся им реагентов выглядят совершенно бессмысленно. Придать им осмысленность способно только кардинальное удешевление пробоподготовки.

Library/Template preparation

Основной вклад в заоблачную стоимость комплектов для подготовки ДНК к секвенированию вносит их фирменная упаковка. Сейчас ценовой сговор фирм, поделивших рынок секвенирования, оправдывается их многомиллионными расходами на разработку, приобретение и рекламу разнообразных технологий пробоподготовки. От конкурентов эти фирмы защищаются многочисленными патентами, но сроки действия большинства таких патентов истекли, а описанные в них методы и приёмы уже давно опубликованы и хорошо изучены.

Реальная стоимость необходимых для пробоподготовки реагентов исчисляется не сотнями долларов, а сотнями рублей. Иногда даже не рублей, а копеек. Типичным примером может служить Ion Shear™ Plus Reagent – ДНКаза, используемая в некоторых наборах (Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit и др.) для фрагментации ДНК. Примерно такую же ДНКазу синтезирует широко распространенная в природе бактерия *Serratia marcescens* (чудесная палочка), которая хорошо растёт на многих средах при комнатной температуре. Данный фермент отличается низкой субстратной специфичностью и разрезает двунитевую ДНК на фрагменты с «тупыми» концами, пригодными для пришивки адапторов.

В большинстве фирменных комплектов излюбленным средством очистки ДНК после её амплификации, фрагментации, «полировки» концов, пришивки адапторов и т.п. служит набор реагентов AMPure® XP Kit, разработанный компанией Agencourt (Beckman Coulter Genomics). Используемый в нём метод очистки основан на осаждении ДНК полиэтиленгликолем (10%) при высокой ионной силе раствора (1,25 М NaCl). Со стоимостью поваренной соли многие знакомы. Менее известно то, что пригодный для осаждения ДНК полиэтиленгликоль стоит копейки. Он производится тоннами и используется в качестве загустителя красок, флокулянта при обогащении руд, для повышения эффективности нефтедобычи и т.п.. Правда, в набор входит ещё соосадитель ДНК – суспензия карбоксилированных магнитных микросфер. Подобрать им дешёвую замену не слишком сложно. Кроме того, вместо магнитов или центрифугирования для осаждения ДНК можно использовать микрофильтрацию. Тогда и соосадитель не потребуется.

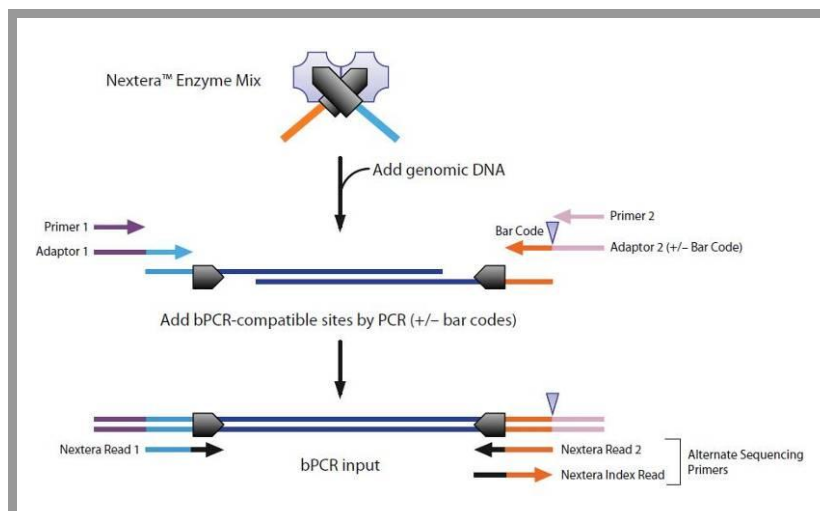
Не менее чем на порядок завышены цены и на адапторы – синтетические олигонуклеотиды, необходимые для приготовления библиотек ДНК. Например, в наборе Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit содержится 1 общий адаптор (320 мкл, на 160 проб) и 16 адапторов с баркодами (по 20 мкл, на 10 реакций каждый).

Ion P1 Adapter		
5'	–CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT–	3' 41N
3'	–T*T*GGTGATGCGGAGGCCAAAGGAGAGATACCCGTCAGCCACTA–	5' 42N
Ion Xpress™ Barcode 1		
5'	–CCATCTCATCCCT*G*CGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGAT–	3' 45N
3'	–C–GCACAGAGGCTGAGTCGATTCCATTGCTA–	5' 30N

Даже с учётом тиофосфатных модификаций (*) стоимость заказного синтеза пары таких адапторов в России не превышает 10 рублей на одну реакцию. Соответственно, «нефирменный» Barcode Adapters Kit на 160 (10x16) проб должен стоить примерно 1600 рублей, тогда как фирменный продаётся за 1600\$.

Приготовление аликвот, этикетирование, упаковка, налоги и т.п. могут увеличить эту сумму в 2...3 раза, но никак не в 30 раз.

Гордостью конкурентов – компании Illumina – являются наборы реагентов, позволяющие получать предназначенные для секвенирования библиотеки ДНК всего за полтора часа, причём без применения какого-либо специального оборудования (Nextera™ DNA Sample Preparation Kit). И фрагментацию ДНК, и «пришивку» адапторов в этих наборах осуществляет один фермент – транспозаза.



В прошлом веке в Ленинградском институте ядерной физики транспозонными технологиями занимался И.Ю.Горышин. Впоследствии он продолжил свои изыскания в Висконсинском университете, а затем перешёл в компанию Epicentre, приобретённую в прошлом году компанией Illumina. Себестоимость транспозазного получения библиотек ДНК вряд ли превышает несколько десятков рублей, но если учитывать годы труда И.Ю.Горышина и миллионы долларов, потраченных компанией Illumina на приобретение этой технологии, то подешевеют наборы Nextera™ ещё не скоро.

Самая простая технология приготовления библиотек ДНК – «ПЦР-фрагментация» - была разработана всё в том же прошлом веке Н.И.Матвиенко (Институт белка РАН) и Л.А.Железной (ИТЭБ РАН). В данной технологии используются два праймера и Клёновский фрагмент ДНК-полимеразы *E.coli*. Стоимость этих реагентов в пересчёте на одну реакцию не превышает 10 рублей.

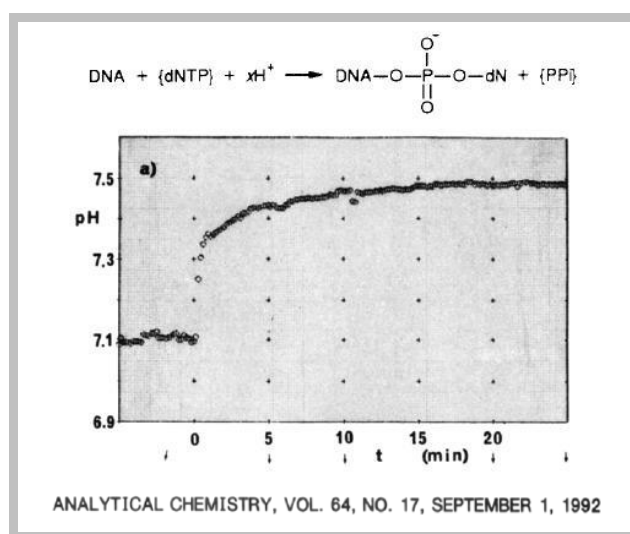
Многие специалисты могли бы предложить и другие варианты замены дорогих фирменных наборов реагентов простейшими приёмами и методиками, основанными на использовании самых дешёвых и широко распространенных реактивов. И не только для *library preparation*, но и для *template preparation* – получения микросфер с иммобилизованными клонами матричной ДНК. Но все такие предложения требуют экспериментальной проверки.

Проблема в том, что стоимость каждого запуска PGM исчисляется сотнями долларов, и экспериментировать с нововведениями слишком накладно. Пользователям полупроводниковых (и не только) секвенаторов приходится неукоснительно исполнять все предписания и инструкции разработчиков. Появление дешёвых и экономичных секвенаторов способно изменить эту ситуацию и сделать разработку методов пробоподготовки доступной для широких слоёв малоимущих учёных, остро нуждающихся в подобных технологиях.

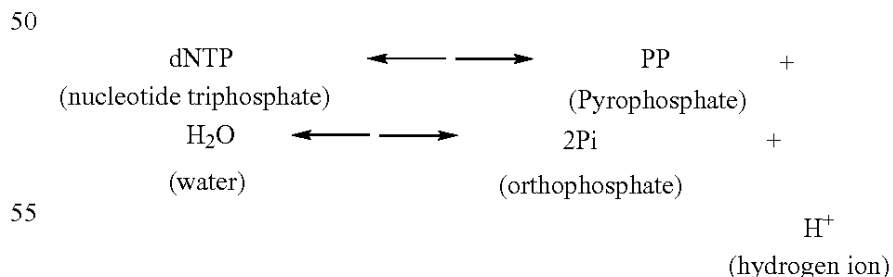
Intellectual Property

Патенты на полупроводниковое секвенирование, основанное на регистрации изменения рН при включении нуклеотидов в ДНК, были получены компанией DNA Electronics (UK) в Великобритании, в США и в Китае. Аналогичный подход был описан и запатентован специалистами Стэнфордского университета (US Pat.7223540), но их претензии к компании Ion Torrent были слишком вялыми и остались без последствий.

Задолго до англичан и американцев (в том числе индийского и иранского происхождения) изменение рН при включении нуклеотидов в ДНК регистрировали и японские учёные. По их расчетам при включении нуклеотидов в ДНК рН должна была не уменьшаться, а увеличиваться. Самое смешное то, что благодаря некоторым ошибкам в планировании опытов и в трактовке получаемых результатов им удалось получить экспериментальные доказательства правильности своих ошибочных расчётов.

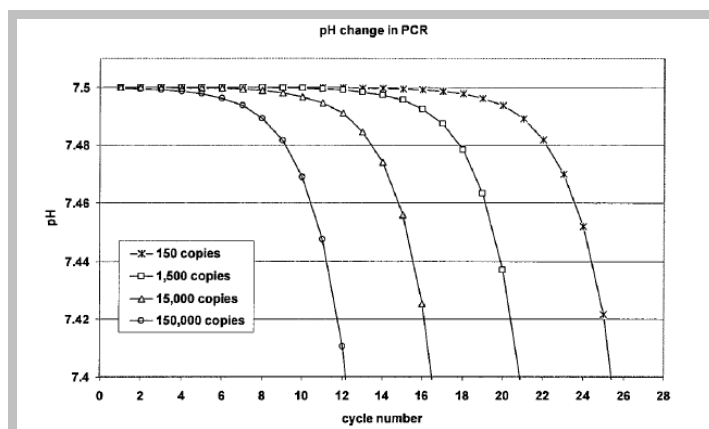


Авторами ключевого патента с неприятзательным названием “Sensing apparatus and method” (GB Appl.0105831.2 - 09.02.2001; US Pat.7686929 B2 - 30.03.2010) являются английские учёные С.Томазу и S.Пурешотаман. Изюминкой предлагаемого ими способа секвенирования является динамическое снижение рН при включении нуклеотидов в ДНК. Правда, по их мнению, это снижение должно происходить в результате ферментативного гидролиза выделяющегося пирофосфата (строки 50...55 описания патента и п.15 формулы):



15. The sensing apparatus according to claim 1 which is configured to generate the electrical output signal in response to a pyrophosphate hydrolysis reaction.

В действительности рН изменяется и без гидролиза пирофосфата, что отражено в следующем патенте этих же авторов “qPCR using solid-state sensing” (US Pat.7888015 B2 – 15.02.2011), в котором они предложили использовать регистрацию рН для проведения количественной ПЦР.



Впоследствии они убрали из первичного патента пирофосфатный гидролиз и увеличили количество пунктов в формуле с 15 до 31, сохранив исходное название (“Sensing apparatus and method”, US Pat.8114591 B2 - 14.02.2012) и дату приоритета (09.02.2001), что позволило окончательно запутать и патентоведов, и юристов.

Компания Ion Torrent заключила с DNA Electronics, которой принадлежат несколько подобных патентов, неэксклюзивное лицензионное соглашение (03.09.2010). Через пару месяцев после этого (01.11.2010) DNA Electronics и 454 Life Sciences (Roche) подписали партнёрское соглашение, целью которого является разработка дешёвой и высокопроизводительной системы секвенирования ДНК. В обоих случаях речь идёт не о каком-то конкретном патенте, а о предоставлении “relevant IP from its semiconductor technology portfolio”.

Данное патентное «портфолио», срок действия которого истекает через 9 лет, распространяется на США, Великобританию и Китай. Но оно не мешает заниматься полупроводниковым секвенированием в России и во многих других странах Евразии, а также Америки, Австралии и Африки. Впрочем, для исключения всех возможных коммерческих рисков было бы неплохо подписать лицензионное соглашение с С.Томмазоу – исполнительным директором (CEO) компании DNA Electronics и соавтором всех основных патентов на полупроводниковое секвенирование, основное на динамической регистрации изменения рН.

Проблема в том, что для подписания такого соглашения нужен не только лицензиар, но и лицензиат - организация, кровно заинтересованная в развитии дешёвого полупроводникового секвенирования ДНК, причём не только в России, но и в мировом масштабе. В России найти такую организацию очень сложно, поэтому проще никого не искать, а зарегистрировать новое юридическое лицо (ООО «Клон Торрент», ЗАО «Полупроводниковое секвенирование», НП «День ДНК» или что-нибудь в этом роде). Тогда можно будет попытаться уговорить С.Томмазоу стать президентом этой организации, а заодно поручить ему решение всех проблем, связанных с IP. Боюсь только, что российским разработчикам не удастся столкнуться с такими проблемами.

Послесловие

...Он устало прикрыл воспаленные веки и задернул тяжелую портьеру. За ней было не окно, а огромный экран, освещающий бетонную коробку призрачным мерцанием бесконечного белого шума. В полной темноте мысли не казались столь беспросветными, а стены не так давили. И как всякий лишенный общения, чтобы не окончательно тронуться умом, он говорил сам с собой. Отрывистые, хриплые фразы повисали в сухом воздухе Убежища.

— Когда это случилось? Дай-ка вспомню... 2020-й или 2025... "Познай самого себя"... Генный анализатор в мобильном телефоне... "Старости и смерти — конец", писали тогда в Нью-Йорк Блог... Благие, благие намерения.

Он замолчал и задумался.

— Никто и не вспомнит, кто был первым. А дальше всё по этой же дороге. Гены геены огненной. Мода на цвет глаз и кожи. Новые оттенки. "Эволюционируй за ночь!" Что они выращивали из головы вместо волос? Перья? Чешую? А после четвертого взрыва на Фукусиме и теракта в Бушере...

Он снова надолго ушел в себя.

— Кто первый начал войну? Пуристы или мутанты? Неважно. Победителей нет. Есть проигравший. Род человеческий. Мне 126 или 127 лет. Я последний.

И набрав полную грудь затхлого воздуха, он страшно, протяжно закричал. —

Будь! Прокляты! Секвенаторы!!

Александр Нечаев

<http://dirty.ru/comments/321360>