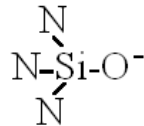




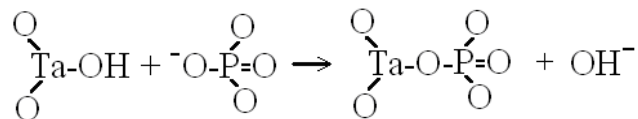
## 1. Reusable pH-sensor chips

First Ion 31x chips were released with silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) on the surface layer. This surface with water forms negatively charged silanol groups:



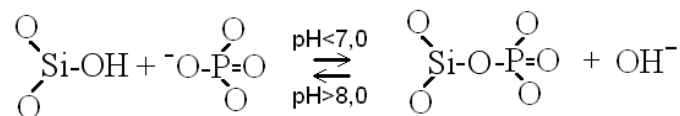
Negatively charged surface at low ionic strength and  $\text{pH} > 7$  repel negatively charged DNA and interfere with filling chip wells by ionospheres. The lack of attachment leads to leaching of ionosphere from wells located near the inlet of the flow cell.

The problem was solved by substitution of silicon nitride by tantalum pentoxide ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ), which forms strong chemical bonds with phosphate groups:

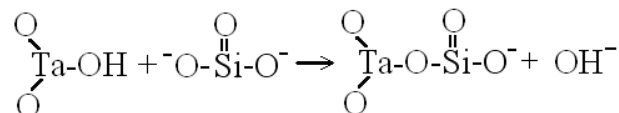


Tantalum surface can “to glue” DNA by chemisorption and provides immobilization of ionospheres at the bottom of the wells. Their “peeling” is possible in alkaline conditions (hydrolysis bonds Ta-O-P), but the conditions of this reaction has not yet been studied. Alkaline hydrolysis can damage thin  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  protective film.

Reversible chemisorption of DNA in mild conditions (for regeneration of used chips) may be carried out on chips coated with silica. Si-O-P bonds formed in the slightly acidic conditions and hydrolyzed in slightly alkaline conditions:



A silanol coating may be formed on tantalum pentoxide - by hydrolysis of tetraethoxysilane (or thereof derivatives) or by alkaline solution of  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ :



An alternative approach – chips with silicon nitride on the surface layer (with the same silanol groups). More straightforward approach – coating chips by silica ( $\text{SiO}_2$ ), but such surface is short-lived in water and must be applied on top of a strong and chemically resistant film of silicon nitride or tantalum pentoxide.

## 2. Chip Washing Station

Удалить использованные микросферы из сенсорных лунок можно, например, при помощи центрифугирования перевернутых чипов, 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 микросферы с ДНК обычно заполняют менее 80% 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 перевернутым 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 измеряется тысячами.

### 3. Purification of dNTP by enzymatic mop-up

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9821582>

#### Способ ферментативной очистки дезоксинуклеозидтрифосфатов, применяемых для секвенирования ДНК

##### Описание сути изобретения

Основными расходными реагентами для секвенаторов нового поколения, разработанных компаниями "454 Life Sciences" и "Ion Torrent", являются растворы, содержащие особо чистые дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дТТФ, дСТФ и дГТФ). Основное требование этим субстратам ДНК-полимеразы – отсутствие даже незначительных примесей прочих дНТФ в любом из четырёх индивидуальных реагентов. Многократное фракционирование, применяемое для их очистки, значительно увеличивает стоимость данных реагентов.

Простым и эффективным способом очистки индивидуальных дНТФ от нежелательных примесей может служить их ферментативное истощение. Для проведения такой очистки к инкубационному раствору одного из дНТФ нужно добавить ДНК-полимеразу и субстратную ДНК, содержащую сайты инициации полимеразной реакции. Образующие ими комплексы могут наращивать цепь ДНК только при наличии на матричной нити комплементарного нуклеотида. При отсутствии такой комплементарности реакция или не начнётся, или быстро остановится, поскольку в растворе присутствует только один из дНТФ, а для продолжения синтеза нужен их полный набор. Продолжение синтеза ДНК в такой системе лимитируется примесями остальных дНТФ, которые будут постепенно удаляться из раствора и встраиваться ДНК-полимеразой в растущую нить ДНК.

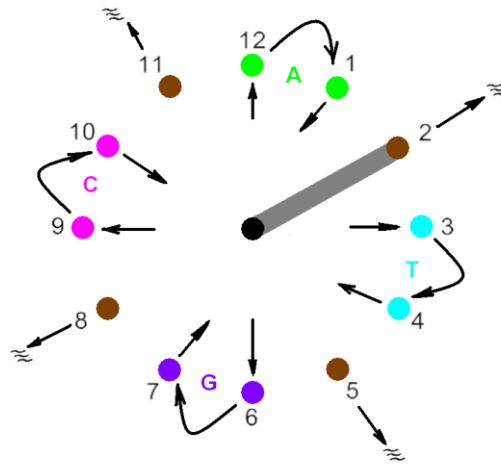
Ферментативная реакция истощения примесей будет идти до их полного удаления из растворов индивидуальных дезоксинуклеозидтрифосфатов или снижения концентраций до уровня, не мешающего проведению секвенирования ДНК.

 В.В. Зубов *Зубов Владимир Витальевич*

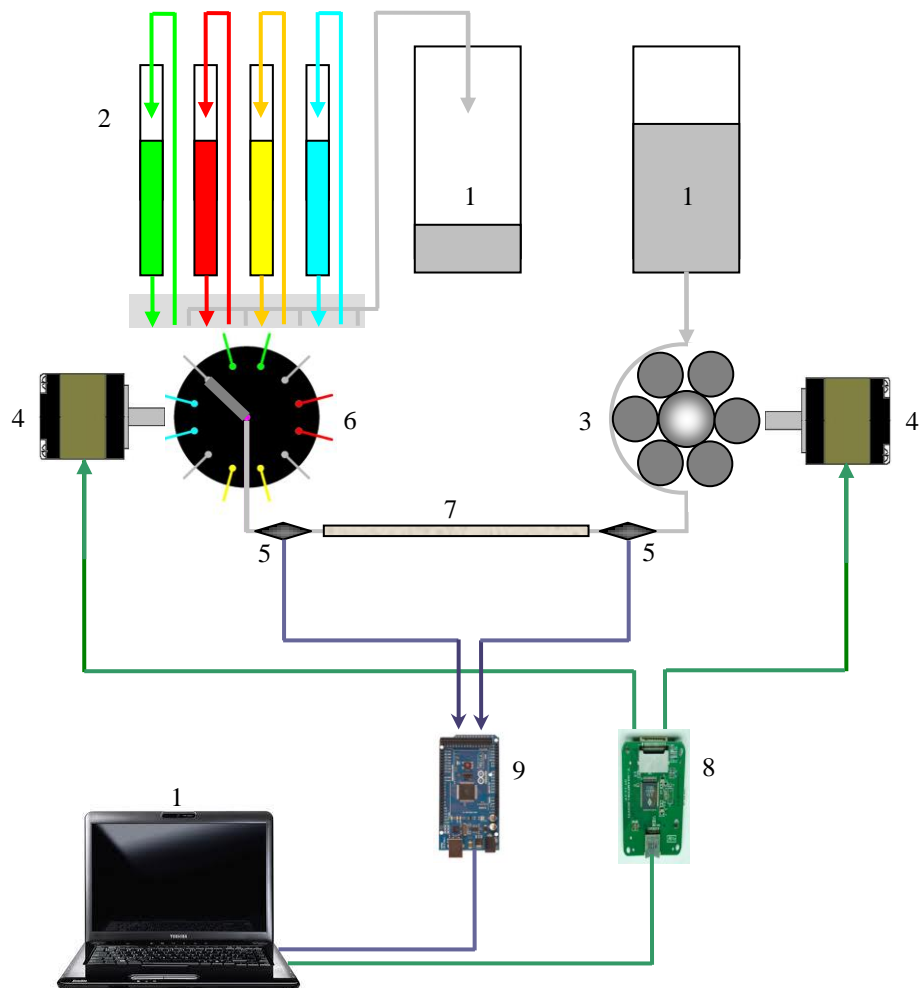


## 4. Reusage of dNTP

*Rotary selector microvalve (12-channel)*



**Схема Ларина**



## 5. Magnetic ionospheres

## 6. Convection em-PCR

<http://www.findpatent.ru/patent/241/2413770.html>

<http://www.google.com/patents/US20110033899?hl=ru&cl=ru>

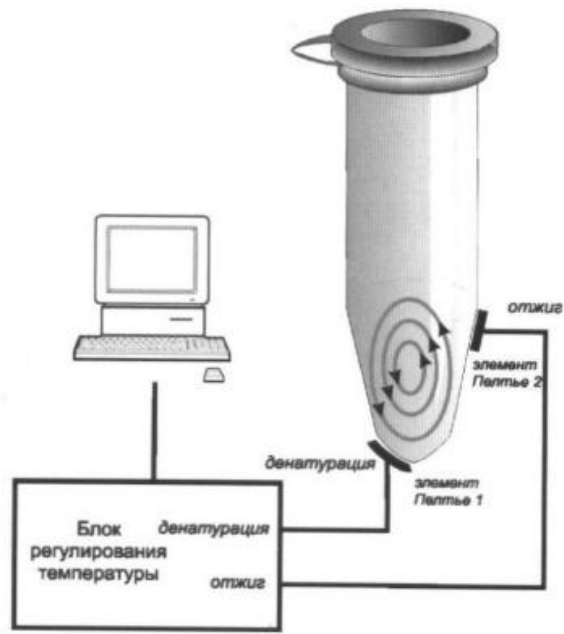


Схема приложения точек нагрева (охлаждения), обеспечивающих возникновение внутри реакционной пробирки наклонного градиента температуры, ориентированного под углом к направлению действия силы тяжести

Фиг. 1