

# Literaturopdracht kostenberekening en kostenvergelijking synthetisch DNA versus PCR producten

Mark van der Lee, Stanley van Herk en Otto Bachaus.

Met een naschrift van Eric Kamst (begeleidend docent).

Opleiding Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek, Hogeschool Rotterdam.

Mei 2016.

## Inleiding

Sinds kort is er synthetisch DNA op de markt. Tot nu toe is het een relatief dure manier van het verkrijgen van DNA, maar omdat er innovatie is op dit gebied is de prijs aan het zakken. Op dit moment wordt er echter nog vaak gebruik gemaakt van de PCR-techniek om dsDNA te krijgen. Het probleem van de PCR-methode is dat de DNA-sequentie die je wilt krijgen alleen geamplificeerd kan worden, dus je moet het van tevoren al hebben. Als je deze sequentie echter al hebt of goedkoop kan krijgen, dan is de PCR manier een snelle en goedkope manier om dsDNA te amplificeren. In deze kostenberekening worden de kosten van het maken van dsDNA via de PCR-methode berekend en gerelateerd aan de kosten van het kopen van synthetisch dsDNA bij de momenteel meest gebruikte aanbieder in Nederland, genaamd IDT. Op deze manier wordt er gekeken of het kopen van synthetisch dsDNA qua prijs al in de buurt komt van de PCR-methode en of het het al waard is om synthetisch dsDNA te kopen i.p.v. te maken.

## Kostenberekening voor het maken/kopen van (synthetisch) dsDNA

Voor de kostenberekening is er begonnen met een koersenlijst van munteenheden te maken, omdat veel bedrijven prijzen in dollars en of Pond weergeven. De gebruikte koers in dit onderzoek is de koers van 19-05-2016. De koersen op het uur van raadplegen op die dag waren; 1 euro = 0,7662 pond = 1,1205 dollar(1).

Vervolgens werd er gekeken naar waar school zijn spullen koopt/besteld. Niet alle bedrijven gaven op de sites weer wat de prijzen waren, dus soms hebben we de leverancier gebeld of gekeken naar een soortgelijke leverancier. De gebruikte artikelen met hun fabrikant, leverancier en prijs zijn weergegeven in tabel I. Alle (berekende) prijzen zijn exclusief btw.

Tabel I: Kosten per materiaal

Artikel	Fabrikant / leverancier	Aantal	Prijs in euro	prijs per eenheid of werkoplossing	opmerking
Flex Tubes (epjes)	eppendorf	500 stuks	€ 30,97	€ 0,062 /stuk	34,70 dollar
PCR tube	sigma-ALDRICH	960 stuks	€ 145,30	€ 0,151 /stuk	
Blauwe puntjes	gilson	960 stuks	€ 41,60	€ 0,043 /stuk	1ml pipet
Gele puntjes	gilson	960 stuks	€ 39,10	€ 0,041 /stuk	200ul pipet
witte puntjes	gilson	960 stuks	€ 46,60	€ 0,049 /stuk	10ul pipet
PCR clean-up kit	BioK	10 stuks	€ 28,00	€ 2,800 /stuk	Niet op de site te vinden, dus gebeld met BioK.
Loading Dye	NEB	4,00ml	€ 41,05	€ 0,010 /ul	46 dollar, berekend voor 6x concentratie
log ladder	NEB	0,50ml	€ 196,34	€ 0,039 /ul	220 dollar, berekend voor 0,1ug/ul concentratie (1000ug/ml geleverd)
GelRed	NEB	500ul	€ 93,71	€ 0,019 /ul	105 dollar, berekend voor 1000x concentratie (10.000x concentratie geleverd)
DNTP's	NEB	0,80ml	€ 51,76	€ 0,065 /ul	58 dollar, berekend voor 10mM per DNTP
Taq polymerase	NEB	0,08ml	€ 54,44	€ 0,476 /ul	61 dollar, berekend voor 3,5U/ul ( geleverde concentratie = 5000U/ml)
Azijnzuur	ROTH	2500ml	€ 41,41	€ 0,017 /ml	> 99%
Agarose	ROTH	500g	€ 177,50	€ 0,355 /g	136,00 pond
TRIS	ROTH	1000g	€ 77,90	€ 0,078 /g	
EDTA	MERCK	500g	€ 69,00	€ 0,138 /g	gebruikt in TAE
Primers		bp		€ 0,300/nucleotide	Vaak +/- 500ul 100pm/ul per primer geleverd

Na het bekijken van de prijs van de artikelen is er gekeken naar hoeveel van deze artikelen zijn gebruikt. Dit is bekeken per onderdeel van de PCR-methode om fragmenten te verkrijgen. Eerst is berekend hoeveel het kost om 1 liter 50x TAE stock te maken. Daarnaast is berekend wat een liter TAE gebruikoplossing kost. Dit is te zien in tabel II.

Tabel II: Kosten 1L 50x TAE stock:

Artikel	nodig per liter	prijs
EDTA	18,61g	€ 2,57
TRIS	242g	€ 18,85
azijnzuur	57,1ml	€ 0,95
<b>Totaal/L 50x</b>		<b>€ 22,37</b>
<b>Totaal/L 1x</b>		<b>€ 0,45</b>

Vervolgens is er gekeken naar wat de prijs is van primers en hoeveel het kost om ze te verdunnen. De gemiddelde grootte van de in dit onderzoek gebruikte primers was 33bp, dus hier is dan ook van uitgegaan in de berekening. De door school bestelde primers zijn €0,30/nucleotide, dus de primers komen uit op €9,90 per primer. Omdat er een forward en reverse primer nodig is komt de prijs uiteindelijk uit op €19,80 voor de primers. De prijsberekening aan de verdunning van de primers is te zien in tabel III en komt neer op €0,189 per primer.

Tabel III: Kosten Primers verdunnen

Artikel	nodig	prijs
Blauwe puntjes	2	€ 0,087
Gele puntjes	1	€ 0,041
Flex Tubes (epjes)	1	€ 0,062
<b>Totaal per primer</b>		<b>€ 0,189</b>

Na de berekening aan de kosten van de primers is er gekeken naar de kosten per PCR reactie (per epje). Het DNA is niet meegerekend in de kostenberekening, omdat de PCR methode om dsDNA te krijgen alleen mogelijk is als je de sequentie al ergens in hebt zitten. De kosten om het DNA eventueel te verkrijgen voor de PCR zijn hierdoor niet meegerekend. De prijs per epje, te zien in tabel IV, is hierdoor bij zowel de epjes mét als zonder DNA hetzelfde. Voor de negatieve controle en de epjes met DNA werd 1 gezamenlijke mastermix gemaakt. De kosten van het gebruikte epje voor de mastermix is €0,062.

Tabel IV: Kosten per PCR reactie (per epje)

Artikel	ul/aantal	[conc]	prijs (euro)
PCR epje	1,0		€ 0,151
Witte puntjes	10,0		€ 0,485
Gele puntjes	10,0		€ 0,407
Blauwe puntjes	1,0		€ 0,043
dNTP	0,5	10mM	€ 0,032
Taq polymerase	0,2	3,5U	€ 0,095
Rev primer	1ul	10uM	Al meegenomen
Fw primer	1ul	10uM	Al meegenomen
<b>Totaal</b>			<b>€ 1,215</b>

Als de PCR-reactie klaar is moet het PCR-product getest worden met behulp van Gelelektroforese. Soms zal hiervoor een kleine agarose-gel worden gebruikt, maar soms ook een grote (respectievelijk 8 en 20 slotjes). Voor de zekerheid is er in dit onderzoek uitgegaan van een grote agarose-gel. De kostenberekening van een grote agarose-gel is weergegeven in tabel V.

Tabel V: Kostenberekening grote agarose-gel

Artikel	aantal	prijs	bestemming
Agarose	0,8g	€ 0,284	Gel
Gele puntjes	1	€ 0,041	voor gelred
Gelred	100ul	€ 1,874	Gel
TAE buffer	100ml	€ 0,045	Gel
TAE buffer	800ml	€ 0,358	elektroforesebak
<b>Totaal</b>		<b>€ 2,601</b>	

Wanneer het PCR product is gecontroleerd op de gel dan moet het product worden gezuiverd met behulp van een PCR clean-up kit. De kostenberekening hiervan is te zien in tabel VI. Alle gebruikte epjes en dergelijke zitten al in de clean-up kit zelf, op de pipetpunten en het eind-epje na.

Tabel VI: kosten per PCR clean-up

Artikel	aantal	prijs
PCR cleanup Kit	1	€ 2,800
Blauwe puntjes	5	€ 0,217
Gele puntjes	5	€ 0,204
Flex Tubes (epjes)	1	€ 0,062
<b>Totaal</b>		<b>€ 3,282</b>

Al deze bedragen zijn bij elkaar op geteld en samen met de geschatte benodigde tijd weergegeven in tabel VII. Er is hier ook het prijsverschil weergegeven tussen PCR'en met 1 en 3 epjes/reacties tegelijk en het verschil tussen de eerste keer PCR'en en de tweede keer PCR'en. Het verschil tussen de eerste en tweede keer PCR'en is dat als de primers al zijn gekocht, er vaak nog ruim voldoende primers over zijn en deze dus niet opnieuw gekocht hoeven worden. Daarnaast hoeft je primers normaliter dus ook niet te verdunnen bij een tweede PCR-reactie.

Tabel VII: Prijstabel van PCR-epjes per onderdeel

Takenlijst:	per 3 epjes/reacties		per epje/reactie		tijd
	eerste keer	tweede keer	eerste keer	tweede keer	
Primers kopen	€ 19,800	-	€ 19,800	-	-
Primers verdunnen	€ 0,379	-	€ 0,379	-	0,25 uur
PCR epjes vullen	€ 3,707	€ 3,707	€ 1,277	€ 1,277	0,5 uur
PCR controle vullen (2x Neg.)	€ 2,430	€ 2,430	€ 2,430	€ 2,430	
PCR runnen	-	-	-	-	0,25 uur
PCR epjes electroforeren	€ 2,601	€ 2,601	€ 2,601	€ 2,601	1 uur
PCR epjes zuiveren	€ 3,282	€ 3,282	€ 3,282	€ 3,282	1 uur
<b>Totaalbedragen</b>	<b>€ 32,20</b>	<b>€ 12,02</b>	<b>€ 29,77</b>	<b>€ 9,59</b>	
<b>Geschatte benodigde tijd</b>	<b>3 uur</b>	<b>2,75 uur</b>	<b>3,0 uur</b>	<b>2,75 uur</b>	

Nu bekend is wat de prijs is van het maken van dsDNA met behulp van de PCR, kan het vergeleken worden met de prijzen van synthetisch dsDNA. De momenteel meest gebruikte aanbieder in Nederland is het bedrijf IDT. Het mooie van dit bedrijf is dat ze pallets synthetische DNA fragmenten verkopen, waar veel bedrijven alleen synthetisch dsDNA sequenties in constructen verkopen. De kosten van synthetisch DNA bij IDT zijn opgezocht op hun site en zijn weergegeven in Tabel VIII (2).

Tabel VIII: Prijsvergelijking (2)

Artikel	Hoeveelheid (ng)	Lengte (bp)	Prijs	prijs/ng	Prijs/bp	% van prijs eerste PCR (3 epjes)	prijs/bp bij 1ug dsDNA
Eerste PCR (3 epjes)	5000	1000-2000	€ 32,20	€ 0,006	€ 0,018	100%	€ 0,0036
latere PCR (3 epjes)	5000	1000-2000	€ 12,02	€ 0,002	€ 0,007	37%	€ 0,0013
Eerste PCR (1 epje)	1667	1000-2000	€ 29,77	€ 0,018	€ 0,017	92%	€ 0,0099
latere PCR (1 epje)	1667	1000-2000	€ 9,59	€ 0,006	€ 0,005	30%	€ 0,0032
IDT	1000	1000	€ 150,00	€ 0,150	€ 0,150	839%	€ 0,1500
IDT	1000	1250	€ 190,00	€ 0,190	€ 0,152	850%	€ 0,1520
IDT	1000	1500	€ 230,00	€ 0,230	€ 0,153	857%	€ 0,1533
IDT	1000	1750	€ 260,00	€ 0,260	€ 0,149	831%	€ 0,1486
IDT	1000	2000	€ 290,00	€ 0,290	€ 0,145	811%	€ 0,1450

Als er wordt gekeken naar de prijs van IDT en de prijs en benodigde tijd van de PCR voor +/- 1000 ng 1500bp dsDNA, kan er gesteld worden dat het verschil in prijs en tijd rond de €212,- en 3 uur is. In het optimale geval, wanneer de PCR-methode 3 uur zou duren, zou het uurloon +/- €71 per uur moeten zijn om de PCR-methode evenveel te laten kosten als het kopen van synthetisch dsDNA bij IDT

## Discussie

Dit onderzoek is betrouwbaar uitgevoerd, maar bevat wel een aantal beperkingen. Zo is in tabel VIII te zien dat de PCR-methode goedkoper is dan het kopen van dsDNA van IDT. Voor de PCR-methode is er echter van uitgegaan dat alle stappen in 1 keer goed gingen, terwijl je bij een PCR-reactie vaak nog even bezig bent met het zoeken van de juiste PCR-condities. De kosten én tijd zullen in de meeste gevallen dus hoger uitkomen dan de berekende kosten en tijd. Als de PCR een paar keer mis gaat, is het mogelijk dat het kopen van DNA met het oog op het uurloon van de onderzoeker duurder is dan het kopen van synthetisch dsDNA bij IDT. Wanneer de optimale PCR-condities zijn gevonden kan men hiermee echter goedkoop veel dsDNA verkrijgen, omdat de basis-kosten na aankoop van de primers laag zijn. Zelfs als de PCR-methode opstartprocedure meer geld kost dan het kopen van het synthetische dsDNA, dan nog zal deze techniek dus geld besparend zijn als je veel dsDNA nodig hebt. Ook is er van uitgegaan dat alle artikelen die nodig waren (op de primers na) al aanwezig waren op het lab. De kosten van het gebruikte materiaal zijn dus weergegeven (excl. Btw), maar niet de kosten van het kopen van een stock van materiaal. De meeste laboratoria zullen echter vrijwel alle gebruikte materialen al op lab hebben staan, omdat het veel gebruikte materialen zijn.

Daarnaast is er in dit onderzoek alleen gekeken naar de materiaal kosten, terwijl je in de praktijk vaak ziet dat mensen ook geld over hebben voor bijvoorbeeld kwaliteit en gemak. Synthetisch dsDNA is over het algemeen van zeer hoge kwaliteit en heeft een garantie op foutloosheid. In de PCR-methode is deze garantie er echter niet en worden er relatief vaak foutjes gemaakt<sup>(3)</sup>. Daarnaast geeft de PCR-methode bijproducten zoals primers, die in het synthetische dsDNA niet aanwezig zijn. Deze voordelen van synthetisch DNA zijn in sommige projecten erg groot, maar dus niet in dit onderzoek meegenomen. Een nadeel van het bestellen is echter wel dat het tijd kost voordat je het synthetisch dsDNA binnen krijgt, wat geld kan kosten als je project er stil door komt te liggen.

## Conclusie

De prijzen van 1000ug dsDNA bij de PCR-methode en bij het kopen van synthetisch dsDNA zijn respectievelijk tussen de €0,0013/bp en €0,0099/bp voor de PCR-methode en tussen de €0,1486/bp en €0,1533bp bij het kopen van dsDNA. Op dit moment is de PCR-methode voor het verkrijgen van dsDNA dus nog goedkoper dan het kopen van synthetisch dsDNA bij IDT. Op het moment dat je veel dsDNA nodig hebt wordt het verschil in prijs nog extremer, want je hebt maar één keer de kosten van primers kopen en verdunnen. Er moet momenteel dus nog wel wat veranderen op het gebied van het maken van synthetisch dsDNA wil het kopen van synthetisch dsDNA voor onderzoekers goedkoper worden dan de PCR-methode.

## Literatuurlijst

1. <http://www.wisselkoersen.nl/> (laatst geraadpleegd 19-05-2016)
2. <http://eu.idtdna.com/pages/products/genes/gblocks-gene-fragments> (laatst geraadpleegd 09-06-2016)
3. McInemey P., Adams P., Hadi M.Z. (2014) Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. Mo. Biol. Int. 2014:287430. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4150459/>

## Naschrift

Op basis van bovenstaande is geprobeerd of we een soort standaard konden berekenen.

Met als aannames:

1. Dat het totale proces van primers ontwerpen, PCR uitvoeren, analyseren en product zuiveren netto 3 uur werk is,
2. Dat de DNA opbrengst van een 50 µl PCR ongeveer 1,5 µg DNA is,
3. Dat een nieuw ontworpen PCR de eerste keer al voldoende en specifiek product geeft.
4. Gerekend met €30 reagentia voor 3 PCR reacties van een nieuw ontworpen PCR,
5. En dat een analist ca €30 per uur kost (inclusief werkgeverslasten),

zou je kunnen stellen:

De synthese van 1 µg dsDNA van 1 Kb kost:

- met PCR  $3 \times 30 + 30 =$  € 120
- synthetisch € 150

De synthese van 1 µg dsDNA van 2 Kb kost:

- met PCR  $3 \times 30 + 30 =$  € 120
- synthetisch € 290

In nagesprekken tot nu toe met analisten en onderzoekers komen de fragmentlengte, de doorlooptijd van zelf-maken versus synthetisch kopen, en de kans op puntmutaties naar voren als kritieke factoren in de keuze tussen de twee opties.

De invloed van fragmentlengte is te verwerken in een prijsvergelijking. De andere twee niet.