



# NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

Ihr NGS-Workflow mit ProNex® –  
Weil jeder Schritt zählt!



GENOMIC  
ESSENTIALS

# Ihr NGS-Workflow mit ProNex® – Weil jeder Schritt zählt!

Next-Generation Sequencing ist extrem leistungsstark, aber auch hochkomplex. Die Proben für die Sequenzierung optimal aufzuarbeiten und ggf. im korrekten Verhältnis zu poolen, ist entscheidend für aussagekräftige Ergebnisse. Mit der neuen ProNex® Produktserie bietet Promega perfekte Werkzeuge für die Schritte der Probenvorbereitung. Sei es für die Isolation von Nukleinsäuren – selbst aus schwierigen Materialien, die hochsensitive Quantifizierung von DNA, ganzen Bibliotheken oder die definierte Abtrennung spezifischer Fragmentbereiche. Damit bei Ihren NGS-Läufen Coverage, Uniformity und Ergebnis stimmen.

## Next-Generation Sequencing-Workflow

### Extraktion



#### Nukleinsäure-aufreinigung fürs NGS

Qualitativ hochwertige Nukleinsäure (Inhibitorfrei, nicht degradiert) ist essentiell für die nachfolgenden Schritte.

Promega bietet eine Vielzahl manueller und automatisierter Aufreinigungssysteme, um hochqualitative, NGS-gerechte DNA und RNA zu erhalten – auch für anspruchsvolle Proben wie FFPE-Gewebe, Pflanzengewebe oder ccfDNA.

#### Automatisiert:

- ▶ Maxwell® RSC 16 und 48
- ▶ Maxwell® HT Reagenzien

#### Manuell:

- ▶ ReliaPrep™
- ▶ Wizard®



#### Quantifizierung fürs NGS

Die präzise Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren ist entscheidend für die folgenden Schritte im NGS-Prozess. Die Identifizierung von Beeinträchtigungen wie Kontaminationen, erlaubt dem Anwender die notwendigen Schritte vorzunehmen um diese noch vor der Sequenzierung zu entfernen.

#### Fluoreszenzbasiert:

- ▶ Quantifluor® Dyes
- ▶ Quantus™ / GloMax®

#### qPCR:

- ▶ ProNex® DNA QC Assay

### Herstellung der Bibliothek



#### Größenselektion der Fragmente

Durch die Größenselektion erhält man Fragmente optimaler Länge für die entsprechende Art der Sequenzierung. Genau definierte Fragmentlängen sorgen für gleichmäßige Sequenzabdeckung, besonders im Fall kurzer Leselängen.

#### Größenselektion mit magnetischen Beads:

- ▶ ProNex® Size-Selective Purification System



#### Ligation der Adapter, Größenselektion und Aufreinigung

Die an die DNA-Fragmente angefügten definierten Sequenzen dienen zur Bindung an die Oberfläche der Flusszelle oder der Partikel (Ion Torrent) und enthalten die Bindestelle für die Sequenzierprimer.

Die Aufreinigung mit Größenselektion stellt sicher, dass die DNA der Bibliothek Adapter besitzt und ungebundene Adapter entfernt werden.

#### Größenselektion mit magnetischen Beads:

- ▶ ProNex® Size-Selective Purification System



#### Quantifizierung und Normalisierung der sequenzierfertigen Bibliothek

Genaue Quantifizierung der Bibliotheken stellt sicher, dass die korrekte Menge für optimales Clustering und Fragmentverteilung in der Sequenzierung eingesetzt wird.

Außerdem ermöglicht sie eine bzgl. Molarität genau definierte Mischung von Bibliotheken für optimale Sequenzabdeckung beim Multiplexen.

#### Fluoreszenzbasiert:

- ▶ Quantifluor®
- ▶ Quantus™ / GloMax®

#### Adapter-spezifische qPCR:

- ▶ ProNex® NGS Library Quant Kit

# Quantifizierung der NGS-Bibliotheken

## Einfache Quantifizierung

### Quantus™ NGS Starter Package

- ▶ Hochsensitive und einfach durchzuführende fluoreszenzbasierte Methode zur DNA-Quantifizierung
- ▶ Insbesondere für Next-Generation Sequencing-Anwendungen zu einem vergünstigten Paketpreis
- ▶ System beinhaltet Quantus™ Fluorometer, QuantiFluor® ONE dsDNA System, 500 Reaktionen und 500 × 0,5 ml PCR Tubes
- ▶ Auf Anfrage auch mit anderen Farbstoff-Systemen erhältlich

Mehr Informationen zum Quantus™ Fluorometer und den QuantiFluor™ Dye Systemen finden Sie hier:  
[www.promega.com/NGS-Quantus](http://www.promega.com/NGS-Quantus)

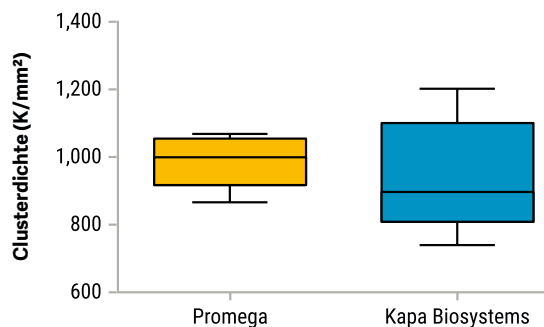
BEST-NR.	MENGE
<b>E5150</b>	1 Stück

## Quantifizierung von Illumina-Bibliotheken

### ProNex® NGS Library Quant Kit

- ▶ qPCR-Kit für äußerst präzise und reproduzierbare Molaritätsbestimmung von Sequenzierungsbibliotheken, die mit Illumina-Plattformen kompatibel sind.
- ▶ Für eine effiziente Clusterbildung in den Durchflusszellen aller Illumina-Geräte.
- ▶ BRYT Green® farbstoffbasiertes qPCR-System
- ▶ Daten können verwendet werden, um beim Poolen von NGS-Bibliotheken die DNA-Mengen auf die gewünschten molaren Verhältnisse zu bringen

BEST-NR.	MENGE
<b>NG1201</b>	<i>Helix</i> 500 Reaktionen



Illumina NGS-Bibliotheken wurden entweder mit dem ProNex® NGS Library Quant Kit oder dem KAPA Library Quantification Kit for Illumina (Kapa BioSystems) quantifiziert. Die ermittelten Konzentrationen wurden verwendet, um Bibliotheken (n=10 Pools) vor der Sequenzierung auf einem Illumina MiSeq Instrument zu normalisieren und zu vereinen. Die angestrebte Clusterdichte betrug 1000 K / mm². Die Clusterdichte wurde für alle Sequenzierläufe gemessen und zeigte eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit bei der Quantifizierung von Proben mit dem ProNex®-System.

## Quantifizierung und Qualifizierung potentiell degradierteter DNA-Proben

Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Tumor-Gewebe ist eine wichtige molekularepathologische Probenquelle für die Mutationsanalyse.

Die Qualität und Quantität von DNA aus FFPE-Proben ist jedoch durch das Fixierungsverfahren stark beeinträchtigt. Die Verwendung von Formaldehyd führt zu einer Quervernetzung der DNA, die bei diesem Probentyp oft fragmentiert vorliegt. Dies beeinträchtigt die Amplifizierbarkeit und die Ergebnisse der NGS-Analyse.

Eine Alternative zu FFPE-Material ist die Gewinnung von zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) aus Plasma oder anderen biologischen Flüssigkeiten. Die Gewinnung von

ccfDNA-Proben aus Plasma ist nicht-invasiv und kann auch im Fall eines schwer zugänglichen bzw. unauffindbaren Tumors erfolgen.

Eine Herausforderung hierbei ist der geringe Anteil an ccfDNA im Blut.

Der qPCR-basierte ProNex® DNA QC Assay ermittelt die Quantität, Qualität und Amplifizierbarkeit genomischer DNA, extrahiert aus FFPE-Proben oder anderen Quellen potentiell degradierteter DNA. Er kann auch zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen ccfDNA und höhermolekularer genomischer DNA in Proben aus Plasma verwendet werden.

### ProNex® DNA QC Assay

- ▶ Human-spezifischer sondenbasierter Multiplex-qPCR-Assay
- ▶ Beinhaltet interne Positiv-Kontrolle (IPC), um falsch-negative Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren zu detektieren
- ▶ Amplifiziert 75 bp, 150 bp und 300 bp große humane genomische DNA-Sequenzen

#### ProNex® DNA QC Assay BioRad CFX96™

BEST-NR.		MENGE
NG1004	<i>Helix</i>	200 Reaktionen
NG1005	<i>Helix</i>	800 Reaktionen

#### ProNex® DNA QC Assay ABI 7500 / 7500FAST

BEST-NR.		MENGE
NG1002	<i>Helix</i>	200 Reaktionen
NG1003	<i>Helix</i>	800 Reaktionen

#### ProNex® DNA QC Assay Calibration Kit

BEST-NR.		MENGE
NG1001	<i>Helix</i>	1 Stück

#### ASSAY ANALYSIS SOFTWARE

### Analyse der Daten mit der kostenlosen ProNex® DNA QC Assay Analysis Software

Einfacher Datenimport mit schneller Analyse:

- ▶ Prüfung der Standardkurven (Steigung und R<sup>2</sup>-Werte im definierten Bereich)
- ▶ Probenquantifizierung (basierend auf den Standardkurven)
- ▶ Probenqualität (mögliche PCR-Inhibierung, Kontamination oder Degradation)
- ▶ Automatische Berechnung der Degradationsrate

Die Software ist kompatibel mit Daten folgender Cycler: Applied Biosystems® 7500, 7500 Fast, QuantStudio™ 6 System, und BioRad CFX96 Touch™ System.



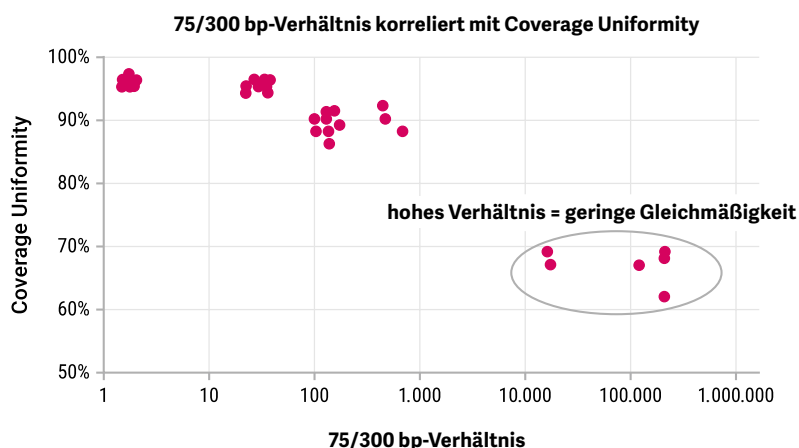
[www.promega.com/pronexqcsoftware](http://www.promega.com/pronexqcsoftware)

**ProNex® DNA QC Assay Analysis Software**

Hier downloaden

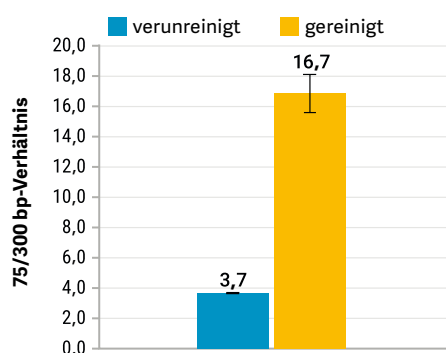
## Der ProNex® DNA QC Assay bestimmt die Menge an amplifizierbarer DNA in einer Probe

Vier verschiedene FFPE-Tumorgewebeproben mit unterschiedlichen Alterungs- und Fixierungszeiten wurden aus Brust, Lunge, Dickdarm und Mastdarm mit drei verschiedenen Methoden in insgesamt 31 Extraktionen eingesetzt. Jede DNA-Probe wurde unter Verwendung eines Monoplex-qPCR-Assays quantifiziert und 10 ng im Swift Biosciences Accel-Amplicon 56G Oncology NGS-Panel normalisiert. Nach der Sequenzierung wurden die Proben mit dem ProNex® DNA-QC-Assay analysiert und eine Degradationsrate berechnet (Quantifizierungsverhältnis der 75 bp und 300 bp großen Amplikons). Proben mit hohen Degradationsraten korrelierten eindeutig mit einer niedrigen Coverage Uniformity, also einer ungleichmäßigen Abdeckung der sequenzierten Bereiche. Der ProNex® DNA QC Assay erlaubt somit vorab, eine mögliche Aussage über den Erfolg der Sequenzierung zu treffen.



## Der ProNex® DNA QC Assay bewertet das Verhältnis von zirkulierender zellfreier DNA (ccfDNA) zu höhermolekularer genomischer DNA in Serumproben

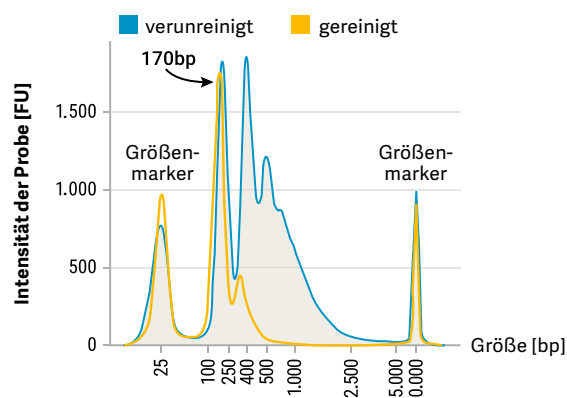
Qualitätsmaß für ccfDNA vor und nach Größenselektion



ccfDNA wurde aus einer Serumprobe isoliert. Die DNA wurde mit dem ProNex® Size-Selective Purification System aufgereinigt, um Fragmente oberhalb von 400 bp zu entfernen.

Die Probe wurde vor und nach der Aufreinigung mit dem ProNex® DNA QC Assay mittels qPCR quantifiziert und das Verhältnis der 75/300 bp-Konzentrationen bestimmt. Niedrige Verhältnisse deuten auf eine gDNA-Kontamination hin, während Verhältnisse >10 eine sehr reine ccfDNA charakterisieren.

Größenverteilung in ccfDNA- Proben vor und nach der Größenselektion



Zur Entfernung hochmolekularer DNA >400 bp wurde aus Serumproben extrahierte ccfDNA mit dem ProNex® Size Selective System gereinigt. Um die Größenverteilung der Fragmente insgesamt zu analysieren, wurde die Probe vor und nach der Aufreinigung auf ein Agilent 2200 TapeStation System geladen. Die Ergebnisse des ProNex® DNA QC Assays (vgl. Abb. links) spiegeln die Qualität der Proben wider.

# Herstellung einer NGS-Bibliothek

## Größenselektion der DNA-Fragmente

Next-Generation Sequencing-Bibliotheken erfordern den Einsatz qualitativ hochwertiger Nukleinsäuren. Je nach Methode der Bibliothekserstellung und Sequenzierplattform variieren diese in Menge, Konzentration und Größe.

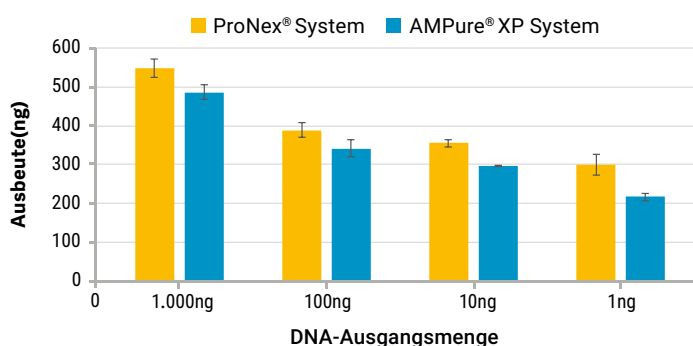
Das ProNex® Size-Selective Purification System basiert auf magnetischen Beads und erlaubt die schnelle und verlässliche Größenselektion doppelsträngiger DNA (dsDNA) für nachfolgendes NGS, PCR und weitere molekularbiologische Anwendungen.

Das ProNex® Size-Selective Purification System ermöglicht die Selektion scharf abgegrenzter und frei wählbarer Fragmentbereiche mit einem möglichen Größenausschluss zwischen 100 und 1000 bp. Die neuartige Reagenzformulierung bietet eine deutlich verbesserte Selektivität, Reproduzierbarkeit und Ausbeute im Vergleich zu herkömmlichen Aufreinigungsmethoden. Das ProNex® Size-Selective Purification System kann sowohl manuell als auch automatisiert im Hochdurchsatz verwendet werden.

### ProNex® Size-Selective Purification System

- ▶ Hohe Spezifität der Größenselektion bei geringem Übertrag unerwünschter DNA
- ▶ Außergewöhnlich hohe DNA-Ausbeute im gewünschten Fragmentbereich
- ▶ Schnelle magnetische Reaktionszeit und geringe Viskosität für präzises Pipettieren

BEST-NR.		MENGE
NG2001	<i>Helix</i>	10 ml
NG2002	<i>Helix</i>	125 ml
NG2003	<i>Helix</i>	500 ml

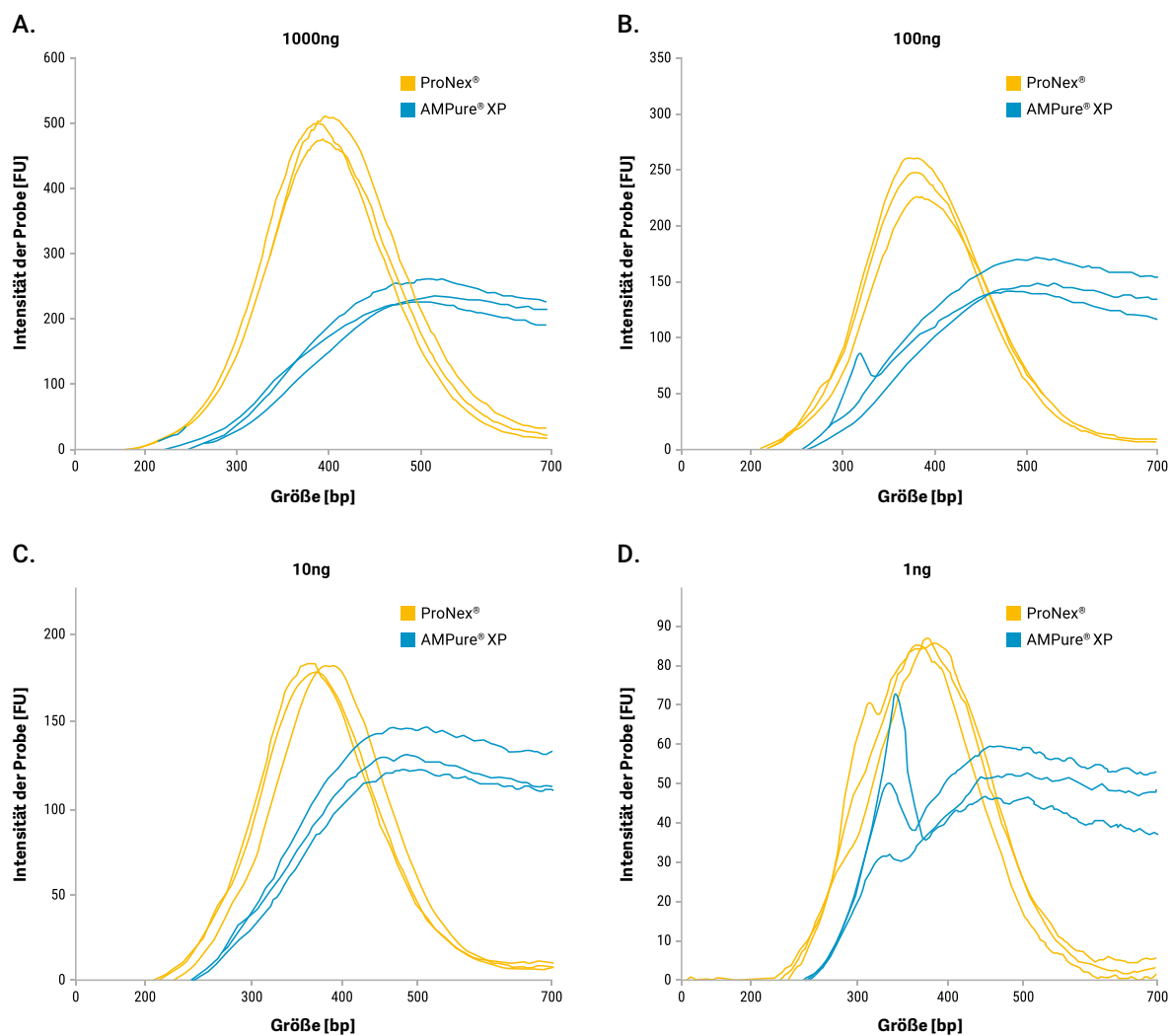


### Vergleich der Gesamtausbeuten von Bibliotheken zwischen ProNex® Size-Selective Purification System und AMPure® XP Beads.

*E. coli*-Bibliotheken wurden mit dem NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® erstellt. Die Größenselektion der Bibliotheken erfolgte entweder mit AMPure® XP Beads oder mit dem ProNex® Size-Selective Purification System. Die Bibliotheken wurden auf 300 bp zentriert, entsprechend den jeweiligen Empfehlungen für die Größenselektion mit AMPure® XP-Beads bzw. dem ProNex® Size-Selective Purification System.

## Endgültige Größenverteilung der Bibliotheken nach der Größenselektion

Das ProNex® Size-Selective Purification System entfernt mehr nieder- und hochmolekulare DNA als AMPure® XP Beads bei höherer Ausbeute der gewünschten Fraktion.



**Spectrum**  
COMPACT  
CE SYSTEM

Sanger Sequenzierung und Fragment-/STR-Analyse  
**Spectrum Compact CE System**

[www.promege.com/SpectrumCompact](http://www.promege.com/SpectrumCompact)





**Promega GmbH**

Gutenbergring 10  
69190 Walldorf  
[www.promega.com](http://www.promega.com)

**Bestellungen, Preis- und Lieferanfragen**

Telefon +49 6227 6906-291  
Fax +49 6227 6906-222  
[de\\_custserv@promega.com](mailto:de_custserv@promega.com)

**Fragen zu Produktanwendungen**

Telefon +49 6227 6906-290  
[de\\_techserv@promega.com](mailto:de_techserv@promega.com)

**Folgen Sie uns online**

 @promegagmbh  
 Promega Corporation  
 Promega Corporation