



NEXT-GENERATION SEQUENCING

Sekwencjonowanie nowej generacji z ProNex®

Liczy się każdy krok!



Sekwencjonowanie nowej generacji z ProNex® Liczy się każdy krok!

Sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) to wysokowydajny, lecz niezwykle złożony proces. Decydujące dla powodzenia analizy jest optymalne przygotowanie próbek do sekwencjonowania oraz łączenie ich we właściwych proporcjach. Dzięki nowej serii produktów ProNex®, firma Promega oferuje idealne narzędzia do przygotowania próbek i ich obróbki w procesie NGS, bez względu na to, czy chodzi o izolację kwasów nukleinowych z trudnego materiału wyjściowego, wysokoczuły pomiar ilościowy DNA i całych bibliotek, czy też o oddzielenie fragmentów danej długości. Z produktami firmy Promega Twoje analizy NGS sprostają wszystkim wymogom jakości, takim jak pokrycie (coverage), jednoznaczność (uniformity) i wiarygodność uzyskanych wyników.

Procedura przygotowania próbek do NGS

Ekstrakcja



Oczyszczanie kwasów nukleinowych do NGS

Jakość oczyszczenia kwasów nukleinowych jest kluczowa dla kolejnych kroków. Otrzymany wynik końcowy może być jedynie tak dobry, jak materiał wyjściowy. Firma Promega oferuje wiele manualnych i automatycznych rozwiązań do izolacji wysokiej jakości DNA i RNA. Tak wyizolowane kwasy nukleinowe idealnie nadają się do sekwencjonowania nowej generacji – również w przypadku tzw. trudnych próbek, jak tkanki roślinne, tkanki FFPE, czy izolacji ccfDNA.



Jakościowa i ilościowa analiza kwasów nukleinowych do NGS

Oznaczenie ilości i jakości wyizolowanego materiału są decydujące dla następnych kroków w procesie NGS. W razie wykrycia zanieczyszczeń, użytkownik może przed sekwencjonowaniem podjąć dodatkowe kroki w celu ich usunięcia.



Selekcja fragmentów względem wielkości

Selekcja względem wielkości gwarantuje fragmenty o optymalnej długości dla danego typu sekwencjonowania. Precyzyjnie zdefiniowane wielkości bibliotek zapewniają równomierne pokrycie sekwencji, szczególnie w przypadku krótkich odczytów.



Ligacja adapterów, selekcja względem wielkości i oczyszczanie

Przyłączone do fragmentów DNA adaptery o określonej sekwencji służą wiązaniu do wewnętrznej powierzchni komory przepływowej (Illumina) lub do mikro-kulek (Ion Torrent) oraz zawierają sekwencje, z którymi hybridyzują startery podczas sekwencjonowania. Selekcja fragmentów względem wielkości zapewnia, że cała biblioteka DNA posiada adaptery i równocześnie służy usunięciu niezwiązanych adapterów.



Oznaczenie ilościowe i normalizacja sekwencjonowanych bibliotek

Precyzyjny pomiar stężenia zapewnia zastosowanie do sekwencjonowania prawidłowej ilości biblioteki, a dzięki temu polepsza jakość i wydajność klastrowania w komorze przepływowej.

Ponadto umożliwia tworzenie równomolowych mieszanin bibliotek w przypadku multipleksowania próbek, aby zapewnić najkorzystniejsze pokrycie docelowych sekwencji.

Automatyczna izolacja:

- ▶ Maxwell® RSC i RSC 48
- ▶ Maxwell® HT

Manualna:

- ▶ ReliaPrep™
- ▶ Wizard®

Pomiar stężenia oparty na fluorescencji:

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

Oznaczenie ilościowe oparte na qPCR:

- ▶ ProNex® DNA QC Assay

Selekcja na bazie kulek magnetycznych:

- ▶ ProNex® Size-Selective Purification System

Selekcja na bazie kulek magnetycznych:

- ▶ ProNex® Size-Selective Purification System

Pomiar stężenia oparty na fluorescencji:

- ▶ Quantifluor®
- ▶ Quantus™ / GloMax®

qPCR sekwencji ze specyficznymi adapterami:

- ▶ ProNex® NGS Library Quant Kit

Oznaczanie ilościowe bibliotek NGS

Prosty pomiar stężenia

Quantus™ NGS Starter Package

- Wysokoczuła i prosta metoda oznaczania ilościowego DNA na bazie fluorescencji
- Do zastosowania w NGS w wyjątkowo atrakcyjnej cenie za pakiet
- System obejmujący fluorometr Quantus™, barwnik QuantiFluor® ONE dsDNA System, 500 reakcji oraz 500 probówek do PCR (0,5 ml)
- Na życzenie dostępny również z innymi barwnikami

Więcej informacji na temat fluorometru Quantus™ i systemu QuantiFluor™ Dye znajdziesz na stronie www.pronex.com/quantus.

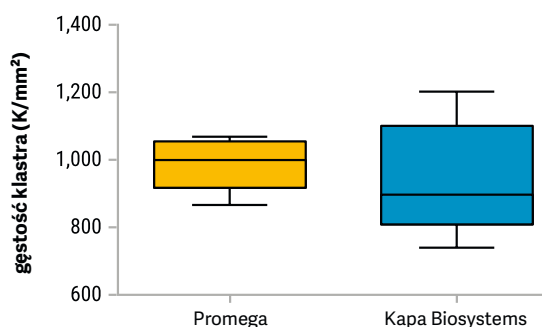
NR KAT.	ILOŚĆ
E5150	1 szt.

Oznaczanie ilościowe bibliotek dla systemu Illumina

ProNex® NGS Library Quant Kit

- Zestaw do reakcji qPCR umożliwiający niezwykle precyzyjne i powtarzalne oznaczanie stężenia molowego bibliotek do sekwencjonowania w technologii Illumina
- Dla wydajniejszego klastrowania w komorach reakcyjnych wszystkich urządzeń Illumina
- System qPCR oparty na barwniku BRYT Green®
- Dane mogą służyć do tworzenia równomolowych mieszanin bibliotek do multipleksowego NGS

NR KAT.	ILOŚĆ
NG1201	500 reakcji



Pomiar stężenia bibliotek NGS Illumina przeprowadzono za pomocą ProNex® NGS Library Quant Kit (Promega) lub KAPA Library Quantification Kit for Illumina (Kapa BioSystems). Przed sekwencjonowaniem w urządzeniu MiSeq/Illumina, mieszaninę bibliotek (n=10) znormalizowano na podstawie zmierzonych stężeń. Docelowa gęstość klastrowania wynosiła 1000 K/mm². Gęstość klastrowania była oznaczana po każdym sekwencjonowaniu i wykazywała znacznie wyższą powtarzalność po sekwencjonowaniu próbek normalizowanych z systemem ProNex®.

Ilościowe i jakościowe oznaczanie potencjalnie zdegradowanych próbek DNA

Próbki tkanek nowotworowych utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE) to istotny w patologii molekularnej materiał wyjściowy do badań mutacji.

Utrwalanie ma jednak niekorzystny wpływ na jakość i ilość DNA z próbek FFPE. Stosowanie formaldehydu prowadzi do degradacji i chemicznych modyfikacji kwasów nukleinowych, które negatywnie wpływają na wydajność amplifikacji i końcowe wyniki analizy NGS.

Alternatywą dla materiału FFPE jest wolnokrążące pozakomórkowe DNA (ccfDNA) z osocza lub innych płynów fizjo-

logicznych. Analiza ccfDNA z osocza, tzw. płynna biopsja, jest badaniem nieinwazyjnym, które można przeprowadzić nawet w przypadku utrudnionej dostępności do nowotworu lub jego nieznanej lokalizacji. Ograniczeniem metody jest niska zawartość ccfDNA we krwi pacjenta.

ProNex® DNA QC Assay, oparty na metodzie PCR, służy do określania ilości, jakości i zdadności do amplifikacji genomowego DNA wyizolowanego z próbek FFPE lub innych potencjalnie zdegradowanych próbek DNA. Zestaw może również służyć do oznaczenia proporcji ccfDNA w stosunku do genomowego DNA w osoczu.

ProNex® DNA QC Assay

- ▶ Zestaw do qPCR typu multipleks z użyciem sond specyficznych dla materiału ludzkiego
- ▶ Zawiera wewnętrzną kontrolę pozytywną w celu wykrycia fałszywie negatywnych wyników spowodowanych np. obecnością inhibitorów PCR
- ▶ Amplifikacja ludzkiego genomowego DNA o długości 75 bp, 150 bp i 300 bp

ProNex® DNA QC Assay BioRad CFX96™

NR KAT.		IŁOŚĆ
NG1004	<i>Helix</i>	200 reakcji
NG1005	<i>Helix</i>	800 reakcji

ProNex® DNA QC Assay ABI 7500 / 7500FAST

NR KAT.		IŁOŚĆ
NG1002	<i>Helix</i>	200 reakcji
NG1003	<i>Helix</i>	800 reakcji

ProNex® DNA QC Assay Calibration Kit

NR KAT.		IŁOŚĆ
NG1001	<i>Helix</i>	1 szt.

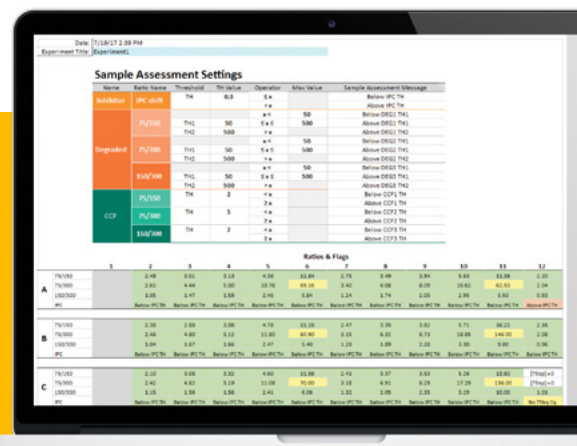
ASSAY ANALYSIS SOFTWARE

Analiza danych przy pomocy bezpłatnego oprogramowania ProNex® DNA QC Assay Analysis Software

Łatwy import danych i szybka analiza:

- ▶ analiza krzywych wzorcowych (nachylenie, współczynnik determinacji R²)
- ▶ kalkulacja stężenia próbki (oparta na krzywych)
- ▶ oznaczenie jakości próbki (inhibicja reakcji PCR, wskaźniki kontaminacji lub degradacji)
- ▶ automatyczne obliczanie stopnia degradacji na podstawie stosunku długości fragmentów

Oprogramowanie umożliwia import danych z następujących systemów: Applied Biosystems R 7500, 7500FAST, QuantStudio™ 6 System i BioRad CFX96 Touch™ System.



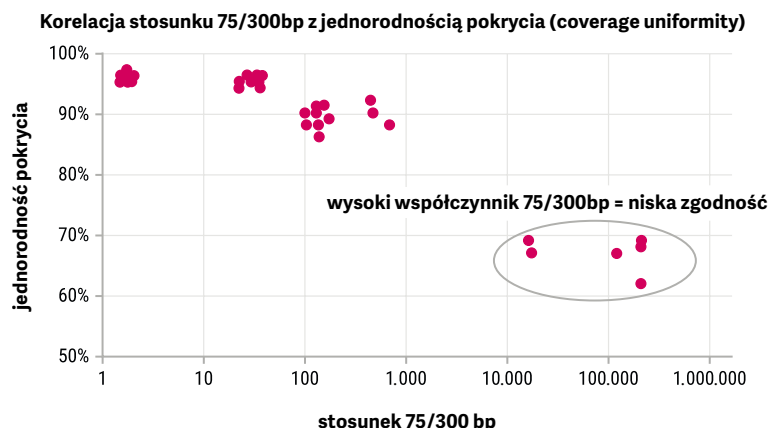
[www.pronex.com/
pronexqcssoftware](http://www.pronex.com/pronexqcssoftware)

**ProNex® DNA QC Assay
Analysis Software**

Do pobrania tutaj

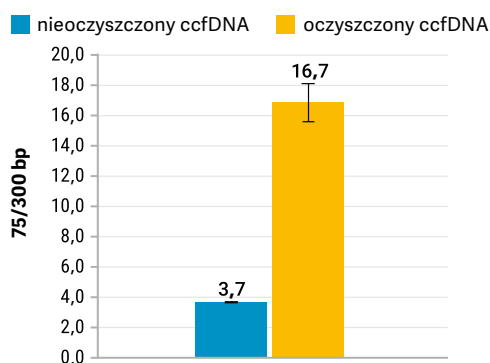
ProNex® DNA QC Assay – oznaczanie ilościowe DNA zdolnego do amplifikacji

Tkanki nowotworowe FFPE (z piersi, płuca, okrężnicy lub odbytnicy), różniące się wiekiem i czasem utrwalania, poddano różnym metodom izolacji DNA. Łącznie uzyskano 31 próbek, których stężenie określono za pomocą qPCR. 10 ng każdego DNA sekwencjonowano przy użyciu zestawu Swift Biosciences Accel-Amplicon 56G Oncology NGS-Panel. Za pomocą ProNex® DNA QC Assay w każdej próbce oznaczony został stosunek ilości fragmentów 75 / 300 bp, który określa stopień degradacji. Wysoki stopień degradacji wyraźnie korelował z niską jednorodnością pokrycia sekwencji referencyjnych (coverage uniformity). Zastosowanie ProNex® DNA QC Assay przed sekwencjonowaniem pozwala użytkownikowi przewidzieć jakość uzyskanych wyników NGS.



ProNex® DNA QC Assay – oznaczanie stosunku wolnokrążącego pozakomórkowego DNA (ccfDNA) do genomowego DNA

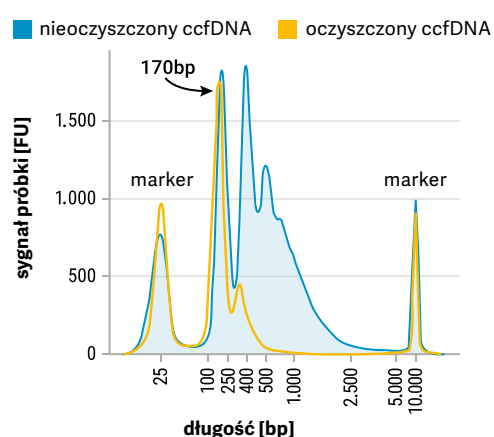
Parametr jakości próbki ccfDNA przed i po selekcji fragmentów względem długości



ccfDNA wyizolowano z próbki surowicy i oczyszczono w systemie ProNex® Size-Selective Purification, usuwając fragmenty dłuższe niż 400 bp.

Próbka przed i po oczyszczeniu została oznaczona ilościowo (qPCR) za pomocą ProNex® DNA QC Assay i określono stosunek fragmentów 75 / 300 bp jako parametr jakości. Niskie wartości tego współczynnika (bliskie 1) wskazują na zanieczyszczenie próbki przez gDNA, a wartości >10 na wyjątkowo czysty ccfDNA.

Zakres długości fragmentów przed i po oczyszczeniu próbki ccfDNA



Opisane wcześniej próbki ccfDNA (przed i po selekcji fragmentów z ProNex® Size Selective System) analizowano w systemie Agilent 2200 TapeStation. Wykres oczyszczonej próbki ccfDNA (żółty) koreluje z wysokim współczynnikiem 75 / 300 bp (rysunek po lewej) podczas gdy kontaminacja próbki dłuższym DNA (niebieski) idzie w parze z niskim współczynnikiem. Współczynnik 75 / 300 bp uzyskany za pomocą ProNex® DNA QC Assay jest więc przydatnym parametrem jakości próbek DNA.

Przygotowywanie bibliotek NGS

Selekcja względem wielkości fragmentów DNA

Przygotowywanie biblioteki do sekwencjonowania nowej generacji wymaga próbek kwasów nukleinowych wysokiej jakości. W zależności od metody tworzenia biblioteki i metody sekwencjonowania ważne jest zastosowanie w bibliotekach fragmentów o ściśle określonej ilości, stężeniu i długości.

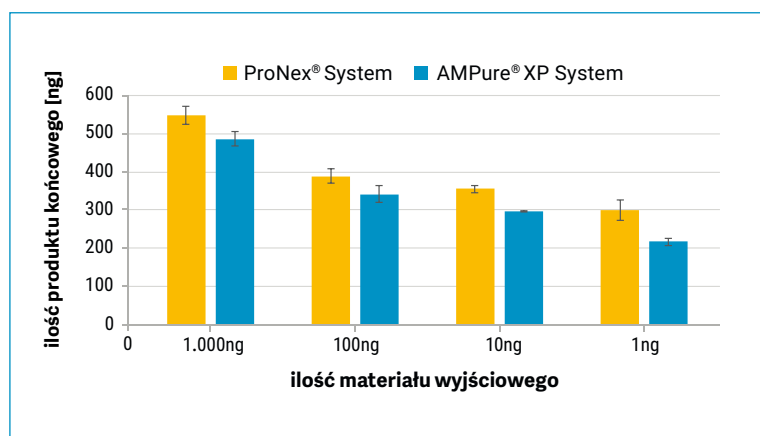
Technologia zestawu ProNex® Size-Selective Purification System opiera się na złożu magnetycznym, które umożliwia szybką i niezawodną selekcję pod względem wielkości dwuniciowego DNA (dsDNA) dla NGS, reakcji PCR i innych badań biologii molekularnej.

ProNex® Size-Selective Purification System umożliwia precyzyjną selekcję fragmentów o określonych rozmiarach od 100 do 1000 bp. Nowa formuła odczynnika zapewnia wyższą selektywność, powtarzalność i wydajność selekcji w porównaniu do tradycyjnych metod oczyszczania. ProNex® Size-Selective Purification System można stosować w trybie manualnym lub (w przypadku wysokiej przepustowości) w pełni zautomatyzowanym.

ProNex® Size-Selective Purification System

- ▶ Wysoko specyficzna selekcja względem wielkości
- ▶ Niezwykle wysoka wydajność selekcji w wymaganym zakresie
- ▶ Krótki czas wiązania do złoża magnetycznego i niska lepkość odczynników umożliwiające precyzyjne pipetowanie

NR KAT.		ILOŚĆ
NG2001	<i>Helix</i>	10 ml
NG2002	<i>Helix</i>	125 ml
NG2003	<i>Helix</i>	500 ml

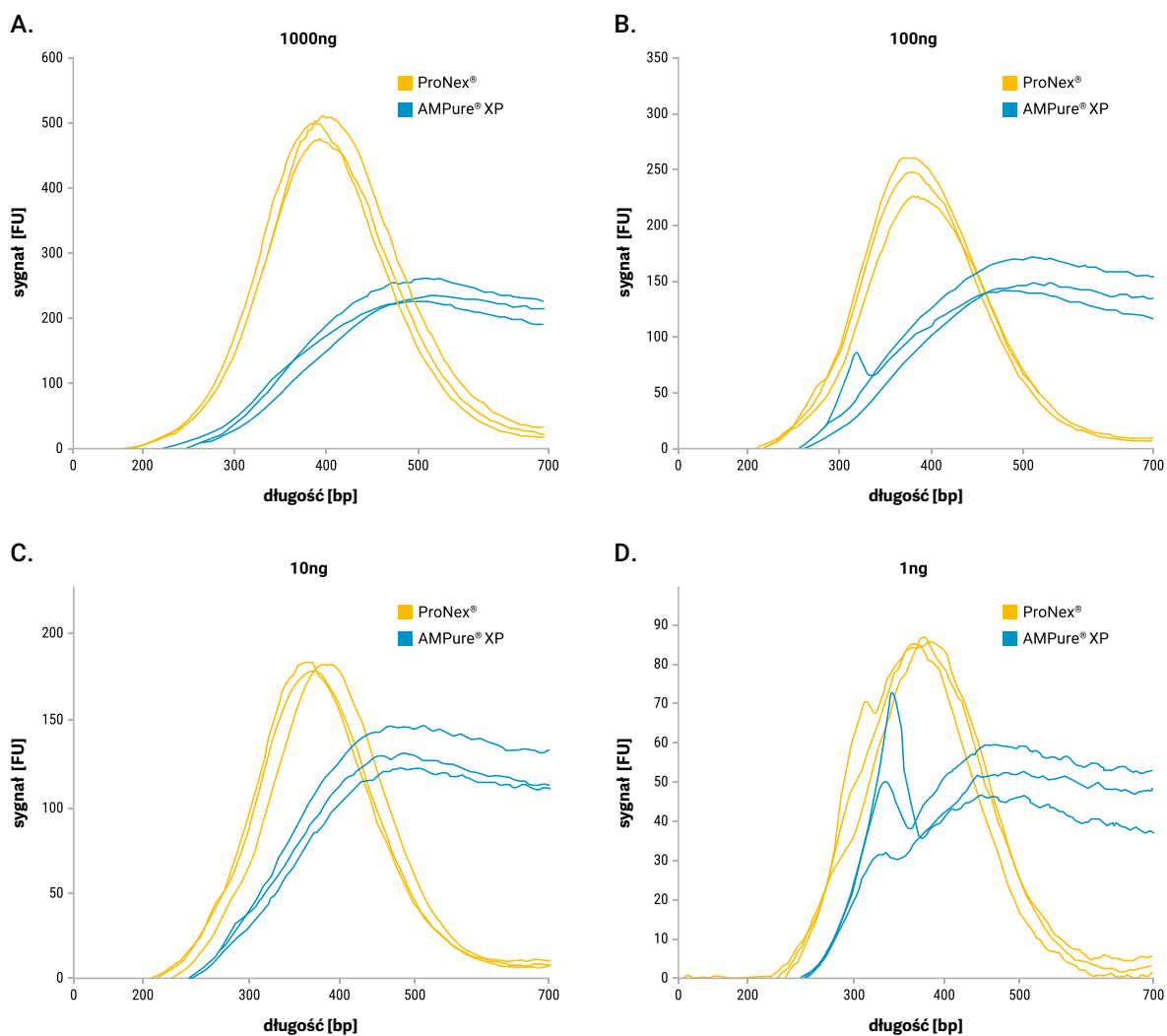


Porównanie wydajności selekcji bibliotek względem wielkości przy użyciu ProNex® Size-Selective Purification System z zestawem AMPure® XP Beads

Biblioteki *E.coli* zostały przygotowane przy użyciu NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®. Selekcję pod względem wielkości fragmentów bibliotek przeprowadzono przy użyciu zestawów AMPure® XP Beads lub ProNex® Size-Selective Purification System. Frakcja o średniej długości 300 bp została wyselekcjonowana zgodnie z zaleceniami danego producenta.

Końcowy zakres wielkości bibliotek po selekcji z pomocą ProNex® Size-Selective Purification lub AMPure® XP Beads

Zestaw ProNex® Size-Selective Purification umożliwia nie tylko efektywniejsze usunięcie fragmentów o za niskiej i za wysokiej masie cząsteczkowej, ale również większy uzysk wybranej frakcji.



Spectrum
COMPACT
CE SYSTEM

Sekwencjonowanie Sangera i analiza fragmentów/STR

Spectrum Compact CE System

www.promega.com/SpectrumCompact





Promega GmbH

Gutenbergring 10
69190 Walldorf, Niemcy
www.promega.com

Zamówienia

☎ +48 22 531 06 67
☎ +48 22 531 06 69
pl_custserv@promega.com

Wsparcie techniczne

☎ +48 22 531 06 68
☎ +48 22 531 06 69
pl_techserv@promega.com

Dołącz do nas

📷 @promegagmbh
🌐 Promega Corporation
📺 Promega Corporation