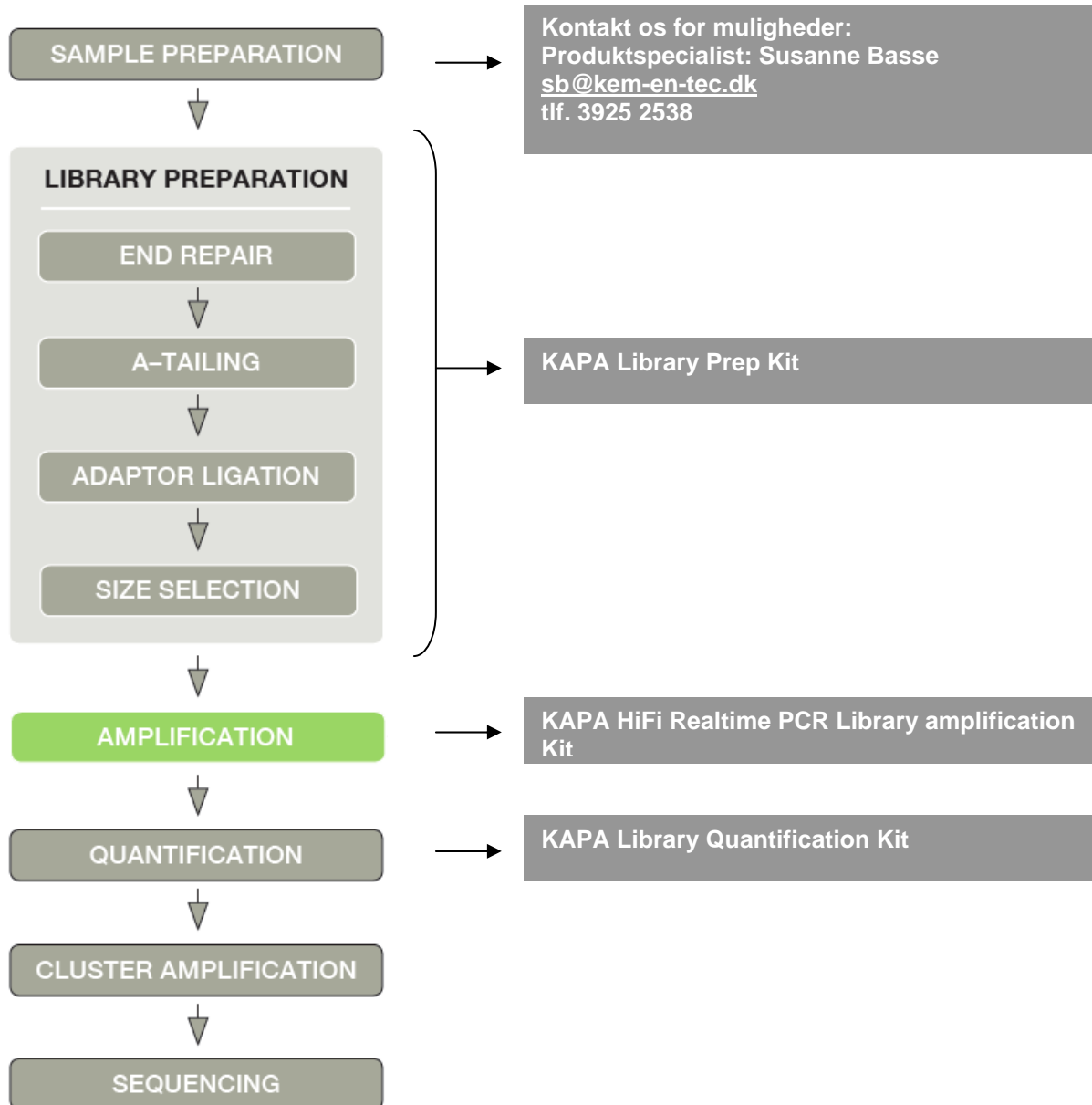


Next generation sequencing

Workflow v. Next Generation Sequencing	1
Minimer bias ved amplificeringen – brug HiFi og realtime PCR	2
Hvorfor qPCR til kvantificering?	5
Kem-En-Tec tilbyder til NGS	6
Real time PCR	7
Library Preparation Kit	8
Library Amplification Kit	8
Library Quantification Kit	9
PCR/qPCR mastermix	10
DNA til qPCR?	10
DNA til kloning?	10
Elektroforese – specielt til sekventering	11
Visualisering af bånd uden UV-lys	11
Støbekar til Next generation Sequencing	12
Færdigstøbte geler til Next Generation Sequencing	13
Origins by Elchrom™ Scientific	13

Workflow v. Next Generation Sequencing

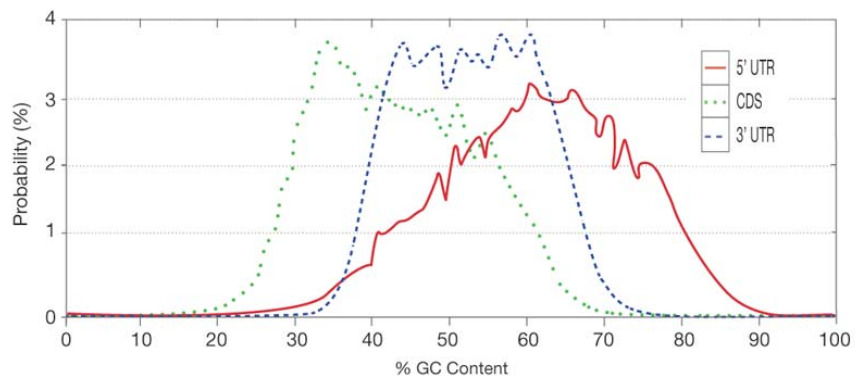




Minimer bias ved amplificeringen – brug HiFi og realtime PCR



High fidelity PCR anvendes til amplificering af biblioteksfragmenter med de rette adaptersekvenser forud for sekventering. Ved PCR syntetiserer polymerasen ikke DNA med samme effektivitet, dette giver amplificerings bias, der forværrer uens sekventering.



Derudover er GC-indholdet også kendt som en vigtig faktor i NGS amplificerings bias (Aird *et al.* Genome Biology 2011, 12:R18). DNA polymeraser normalt anvendt til amplificering af biblioteker har signifikante bias i forhold til GC- og AT-rige regioner. Både genomer med ekstreme, gennemsnitlige GC-indhold og elementer med højt GC-indhold (5' UTRs, CpG islands og first exons) er udsatte i forhold til amplificerings bias (Zhang L *et al.* PNAS 2004; 101:16855-16860).

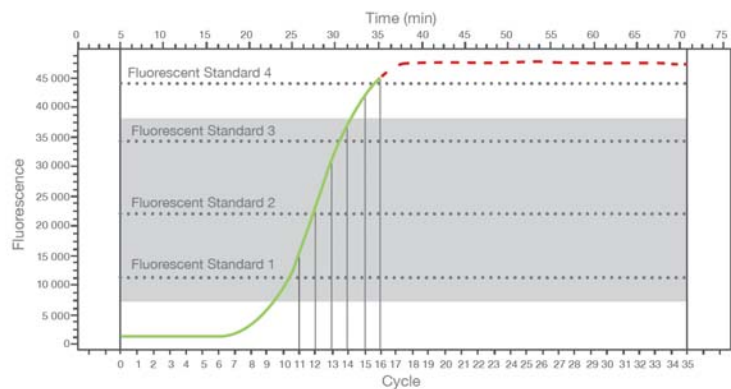
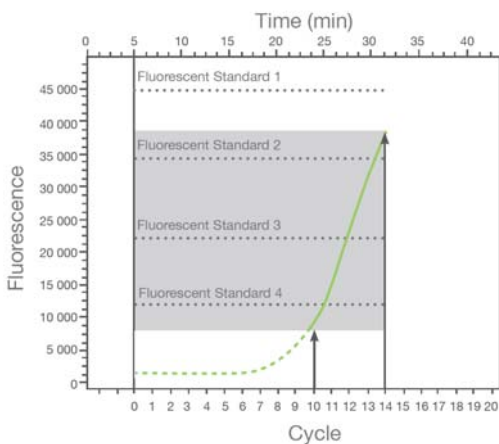
KAPA HiFi Real-Time PCR Library Amplification Kits er udviklet til at minimere begge typer PCR-inducerede bias. Kitten indeholder KapaBiosystems designede KAPA HiFi DNA Polymerase, designet til high fidelity og vægtet amplificering af komplekst biblioteks DNA. Real-time monitorering af amplificeringen af biblioteket giver yderligere information, som gør det muligt at minimere overamplificering.

Next generation sequencing

Fordelene ved at anvende high fidelity, real-time PCR til next-generation sequencing biblioteks amplificering er:

- Real-time monitorering giver præcis kontrol af det optimale antal PCR cykler
- Real-time plots giver mulighed for kvalitetsmåling af individuelt, amplificerede biblioteker – og udelukker dermed dyr og tidskrævende post-PCR gelelektroforese og identificering af uoverensstemmelser i bibliotekspræparationen (library preparation).
- Perfekt integration til KAPA Library Quantification Kits (beskrevet nedenfor).

KAPA HiFi Real-Time PCR Library Amplification Kittet indeholder KAPA HiFi HotStart Real-Time PCR mastermix (2X), et klart-til-brug mastermix med alle komponenterne til PCR undtagen primere og template. Mastermixet indeholder KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase i en reaktionsbuffer, dNTPs, MgCl₂ (2.5 mM at 1X), SYBR® Green I dye og stabilisatorer. Fire fluorescerende standarder er også inkluderet og anvendes til at definere vinduet for optimal amplificering (se figurer nedenfor).



Libraries are amplified using a SYBR® Green-based real-time, high fidelity PCR master mix (left panel). Four triplicate wells of the PCR plate contain fluorescent reference standards representing a range of distinct DNA concentrations. Reactions terminated between standards 1 and 3 represent the optimal library amplification range (grey box), depicted here from cycle 10- 14. Gel image of a typical library stopped at different amplification cycles (right panel). Low and high molecular weight artefacts increase progressively with additional cycles.

Next generation sequencing

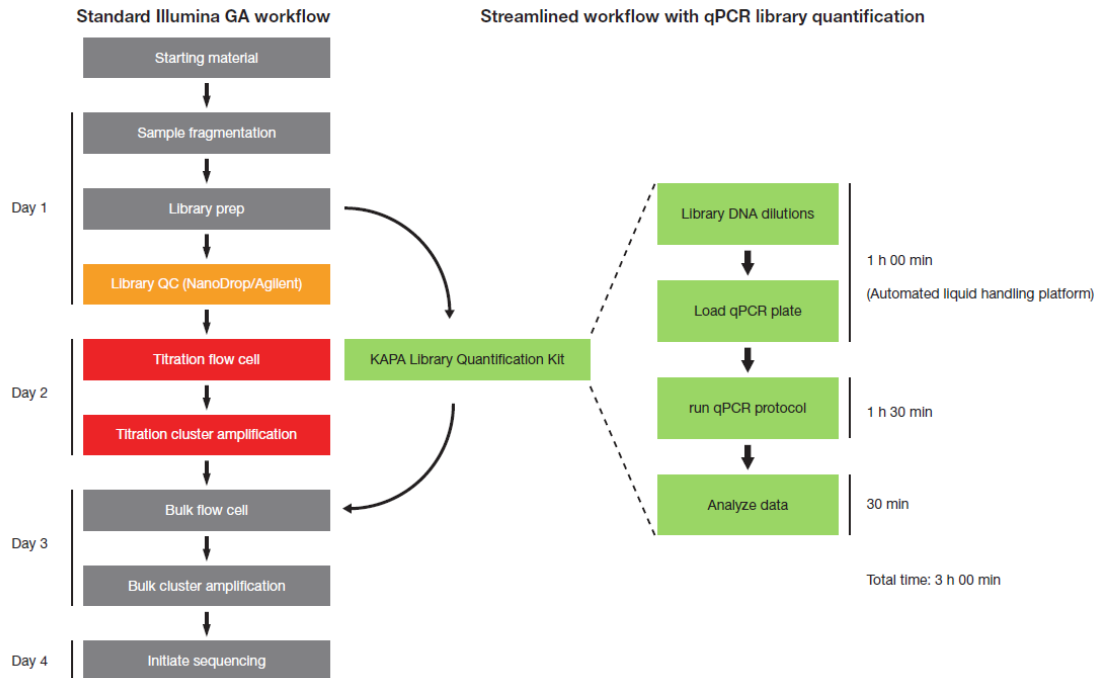
Læs mere > [KAPA HiFi Real-Time PCR Library Amplification](#)

KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase er en antistof-baseret hotstart formel af KAPA HiFi DNA Polymerase, en designet, B-family DNA polymerase med en fidelitet på linje med markedets bedste (B-family) DNA polymeraser og polymerase-blends. KAPA HiFi DNA Polymerase er udviklet til at have en øget affinitet for DNA uden brug af ekstra proteindomæner. Den indbyggede høje processivitet hos enzymet resulterer i en signifikant forbedring af udbyttet, sensitiviteten, hastigheden, target længden og muligheden for at amplificere vanskelige amplicons. Disse forbedringer minimerer amplificerings bias og giver en mere ens sekventering.

KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase har 5'-3' polymerase og 3'-5' exonuclease (proofreading) aktivitet, men ingen 5'-3' exonuclease aktivitet. Den stærke 3'-5' exonuclease aktivitet giver en helt unik nøjagtighed ved DNA amplificering – den laveste fejlrate af alle B-family DNA polymeraser (1 fejl pr. 2.8×10^7 nucleotider indbygget). Denne fidelitet er ca. 100X højere end wild-type Taq og op til 10X højere end andre B-family DNA polymeraser og polymerase-blends. PCR produkter lavet med KAPA HiFi HotStart ReadyMix er blunt-ended, men kan være 3'-dA-tailed for kloning ind i TA kloning vektorer.

Læs mere > [KAPA HiFi PCR Kits](#)

Hvorfor qPCR til kvantificering?



Kvantificering af mængden af DNA i biblioteket er nødvendig for at kunne lade det optimale volumen til efterfølgende sekventering. Der kan bruges forskellige metoder til kvantificeringen, men realtime PCR har den fordel, at den kun medregner den amplificerbare mængde DNA, dvs. DNA med påsatte adaptore. Ved sekventering er det kun DNA med påsatte adaptore påsat, der vil blive sekventeret. En nøjagtig kvantificering er derfor vigtig for at kunne lade mest muligt DNA til sekventering, uden dog at lade for meget, så data ikke kan bruges.

Derfor er det også vigtigt at have både instrumenter og reagenser med den nødvendige nøjagtighed for at kvantificeringen kan blive så nøjagtig som muligt.

Kem-En-Tec tilbyder til NGS

- **Realtime instrumentet ECO™** produceret af den største udbyder af sekventeringssystemer: illumina.
- **Kvantificeringskit** med primer premix, standarder og mastermix med en helt unik sensitivitet.
- Realtime **amplificeringskit** til biblioteker med KAPA HiFi hotstart realtime PCR mastermix og fluorescerende standarder.
- **Præparationskit** til fremstilling af bibliotekerne forud for NGS. Indeholder End repair enzymmix, A-taling enzym, DNA Ligase, Kapa HiFi hotstart readymix og tilhørende buffere.

Vi har også et bredt sortiment af produkter og reagenser til PCR, molekylærbiologi og elektroforese, brug nedenstående links for at se mere:

[Kem-En-Tec - PCR](#)

[Kem-En-Tec - Molekylærbiologi](#)

[Kem-En-Tec - Elektroforese](#)



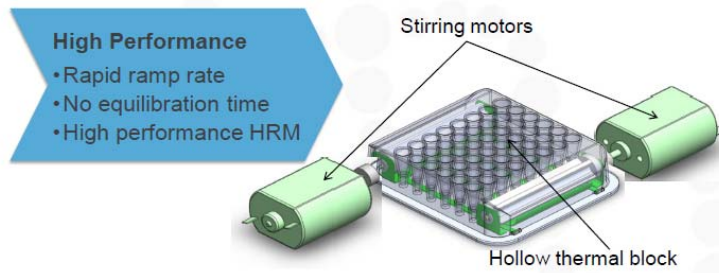
Real time PCR

Illumina ECO™

Med Illuminas ECO™ har I mulighed for at opleve en PCR verden i realtime



- 4 detektionsfiltre = 4 farvet multiplexing
- Fabrikskalibreret til Sybr®Green I, FAM, HEX, ROX, CY5
- Kan anvendes til alle farver mellem 500-700 nm
- 48 brøndsplader i 384-blokformat
- 40 min/ 40 cykler
- Høj reproducerbarhed og temperaturuniformitet takket være en helt ny teknologi med en varmeledende væske der vha. omrøring flyttes rundt indeni blokken.



- Kan også anvendes til HRM



Eco Real-Time PCR System

For flere informationer kontakt Susanne Basse,
sb@kem-en-tec.dk eller tlf. 3925 2538



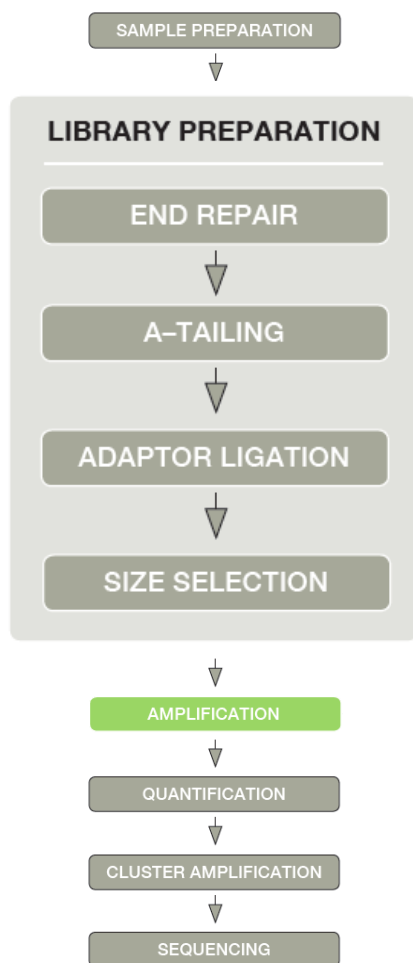
Library Preparation Kit

Kapa Library Preparation kit indeholder alle nødvendige enzymer og reaktionsbufre til at fremstille biblioteker fra dsDNA:

- End repair:
Laver blunt-ended, 5' phosphoryerede fragmenter
- A-tailing:
Tilføjer dAMP til 3'-enderne af dsDNA biblioteks fragmenterne
- Adaptor ligation:
Ligation af dsDNA adapterer med 3'-dTTP overhangs til biblioteks fragmenterne
- Amplificering:
PCR amplificering af biblioteks fragmenter med adaptere

Applikationer

- Genomiske DNA biblioteker
- Paired-end DNA biblioteker
- Paired-end multiplexed (indexed/barcoded) DNA biblioteker



Library Amplification Kit

Minimer risikoen for bias pga. GC-indhold og/eller uens amplificering af komplekst DNA.

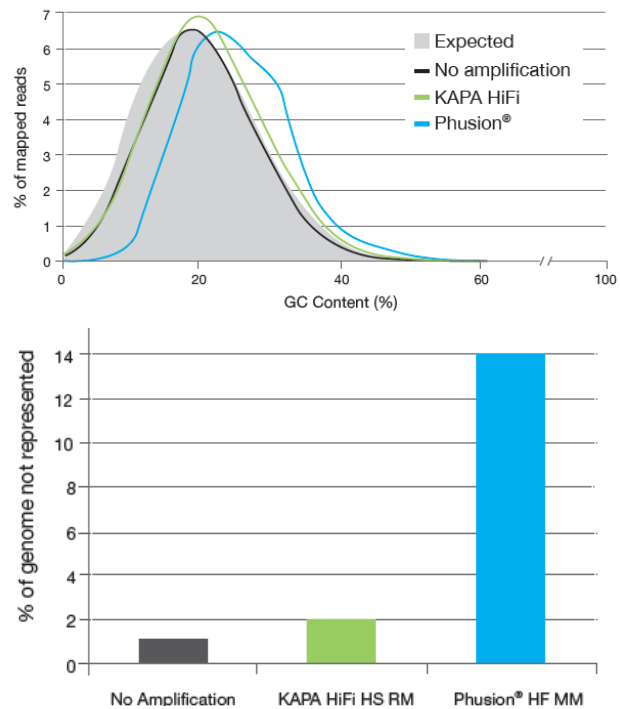
KAPA har udviklet et realtime PCR mastermix baseret på deres high fidelity KAPA HiFi polymerase. KAPA HiFi amplificerer GC-holdigt og komplekst DNA vægtet, så der ikke sker en uens sekventering efterfølgende. Realtime PCR gør det muligt at optimere antallet af PCR cykler for amplificeringen – se beskrivelsen på side 2 i dette dokument.

Kittet indeholder:

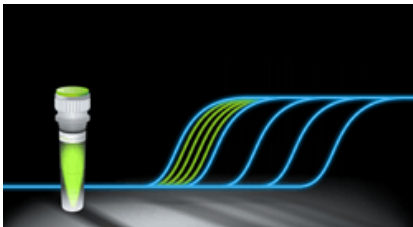
- KAPA HiFi hotstart realtime PCR mastermix
- Fluorescerende standarder



Next generation sequencing



Læs mere > [KAPA HiFi Real-Time PCR Library Amplification](#)



Library Quantification Kit

Kapa går skridtet videre og har udviklet et kit til kvantificering af bibliotekets størrelse forud for NGS. På den måde kan mængden af amplificerbart dna optimeres til sekventeringen.

Fordele:

- Bedre kvantificering af bibliotek pga. høj sensitivitet hos polymerasen
- Optimal DNA konc. til sekventering
- Undgå at lave standarder
- Opnå mindre lot-lot variation i standarder

Anvendes bl.a. af The Broad Institute, Trust Sanger Institute og Doe Joint Genome Institute

Kittet indeholder:

- KAPA SYBR Fast qPCR mastermix
- Primer premix
- DNA standarder

Læs mere >

[KapaBiosystems >> KAPA Library Quant Kits](#)



PCR/qPCR mastermix

Polymeraserne fra **KapaBiosystem** er de absolut optimale enzymer til dit PCR arbejde - nu og i fremtiden. Polymeraserne er udviklede gennem molekylærevolution.

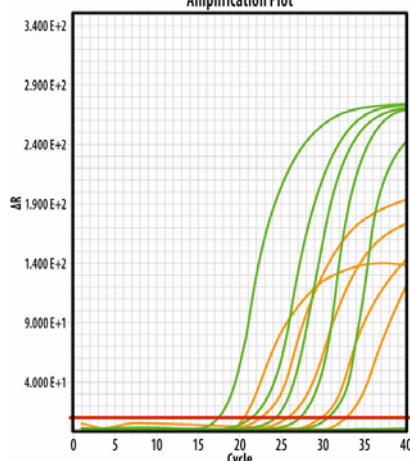
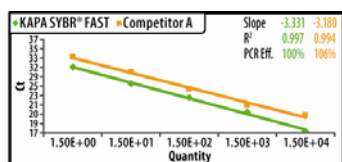
[KapaBiosystems](#)

Anbefales
af illumina

DNA til qPCR?

Prøv **KAPA SYBR FAST**

- Den højeste reaktionseffektivitet, der giver tidlige Ct værdier
- Det højeste fluorescenssignal, hvilket forbedrer signal-støjforholdet
- Høj hastighed formindsker behovet for antal cykler



Applikationer

- Genekspression
- Microarray
- Gendetektion (low copy)
- Gen knockdown validering

Vælg universalkit eller kit optimeret til ABI Prism, Bio Rad eller Light cycler 480.

Læs mere >

[KapaBiosystems >> KAPA SYBR FAST qPCR Kits](#)

DNA til kloning?

Prøv **KAPAHIFI** – long range, high speed

- 100x mere præcis end Taq
- long range og høj specificitet – amplificering af gDNA < 15kb
- Velegnet til vanskelige applikationer

Applikationer

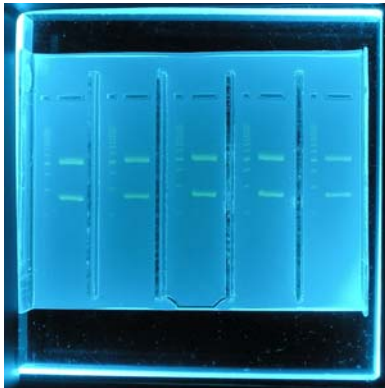
- Site-directed mutagenese
- Sekventering
- Protein ekspression

Læs mere > [KapaBiosystems >> KAPAHiFi HotStart](#)



Elektroforese – specielt til sekventering

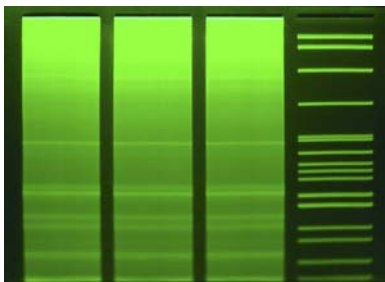
Du kan sikre dig større succes med Next generation sequencing ved at støbe de rigtige geler. Det kan ikke anbefales at køre forskellige prøver på samtidigt på almindelige gel pga. risikoen for kryds-kontaminering – men det findes der nu løsninger på:



- Støb jeres egne geler i NexGen casting stands med ekstra brede brønde og fysisk separerede brønde og baner (lanes).

Hver bane har sin egen markør-bane

Læs mere > [NexGen støbekar](#)



- Anvend færdigstøbte geler med en speciel polymer-gel-matrix (ikke-giftig) med helt unik separationsevne – ned til 4bp

Læs mere > [Færdigstøbte NextGen geler](#)

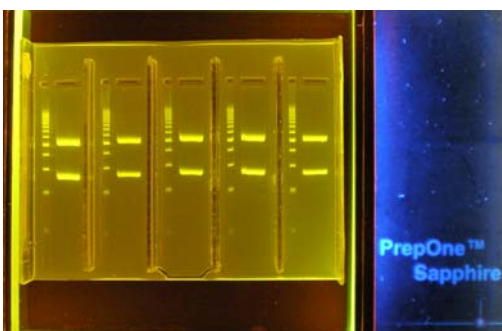
Visualisering af bånd uden UV-lys

Belys gelen med Blåt LED lys og sikrer dig DNA af høj kvalitet til videre sekventering.

UV-lys nedbryder DNA og visualisering af bånd vha. UV-lys skal derfor gøres med største forsigtighed. Vi kan tilbyde

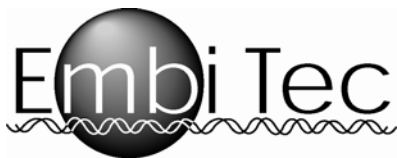
'UV-bordet uden UV'

- Gelen belyses fra siden af blåt LED lys
- Udtag båndene direkte på bordet med lys på
- Excitation: 475 +/- 30nm (Sybr Green, GelGreen, Gelstar, MidoriGreen m.fl.)

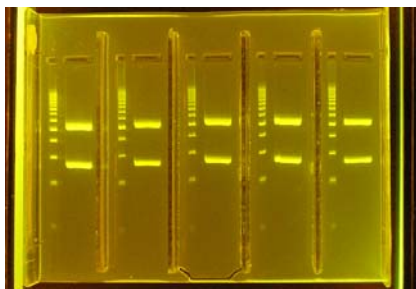


Læs mere > [PrepOne™ Sapphire](#)

Støbekar til Next generation Sequencing



Vi kan tilbyde det kompakte elektroforesesystem RunOne fra Embitec med integreret strømforsyning. Embitec har udviklet et støbesystem, som gør støbning af geler meget lettere. Deres nyeste støbekar er beregnet til next generation sequencing.



Fordele ved NexGen støbekarret

- Let at anvende
- Består af kar, støbebakke og specialkam
- Specialkam m. plastik 'finner' mellem bannerne og markørbrønd til hver bane

Læs mere > [NexGen Long Gel Casting System](#) og [NexGen Medium Gel Casting System](#)



RunOne - Ganske enkelt

- Lille personligt elektroforese apparat
- Inklusiv støbestand
- Integreret strømforsyning.

Kompakt gel elektroforese apparat, fylder ikke mere end en pakke engangshandsker!!!

Læs mere > [RunOne](#)



Multicaster

Kør mange prøver med de store støbekar
Kompatibel med multikanals pipetter
4 forskellige multicaster:

- Blue (6 8+1/16+2 kamme)
- Aqua (4 12+1/24+1 kamme)
- Orange (2 PREP kamme)
- Gul (8 12+1/24+1 kamme)

[Multicaster](#)

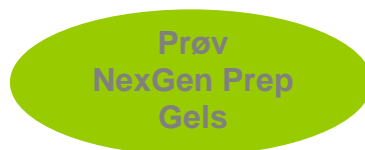
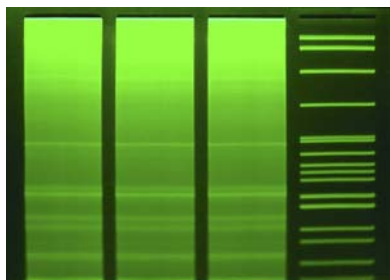


Færdigstøbte geler til Next Generation Sequencing



Fra Elchrom Scientific kan vi tilbyde færdigstøbte geler med en meget høj opløsning (4bp) og reproducerbare resultater.

På den måde kan størrelsen bestemmes mere nøjagtigt og forskellen mellem prøverne bliver minimal.



Gelerne er udarbejdet i samarbejde med Universitetet i Zürich og kan anvendes til sekventerings platformene Roche-454 GS FLX, illumina GA og ABI SOLiD.

Læs mere > [NexGen Prep Gels](#)

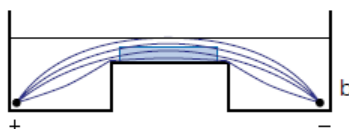
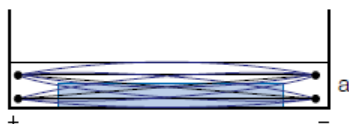
Elchrom tilbyder også et helt unik elektroforesesystem: Origins med indbygget temperaturkontrol og buffercirkulation. På den måde



Origins by Elchrom™ Scientific

Helt unikt elektroforeseapparat pga. 3 helt specifikke egenskaber:

- Konstant temperatur (4-55°C) pga. temp.kontrol
- Homogen buffer cirkulation pga. integreret pumpe
- Lige bånd på gel pga. uniformt, lineært spændingsfelt



Sammen med Elchroms geler giver det en opløsning på helt ned til **1bp**.

Læs mere > [Origins by Elchrom™](#)