

# Genauer und zuverlässiger Proteinnachweis mit der Illumina Protein Prep-Lösung



Leitfaden zu den Qualitätssicherungs- und Datennormalisierungsschritten  
mit der DRAGEN™ Protein Quantification-Sekundäranalyse-Pipeline

## Reproduzierbare Ergebnisse

Konsistenter  
Proteinnachweises  
über mehrere Proben  
und Platten hinweg

## Analyse mit Autostart

Hochwertige Ergebnisse  
mit der DRAGEN-  
Sekundäranalyse

## Direkte Erkenntnisse

Normalisierte  
Proteinzählungsdateien  
einfach mit Illumina  
Connected Multiomics  
analysieren

## Einleitung

Proteine spielen in der Humanbiologie eine wichtige funktionale Rolle, da sie einen Echtzeiteinblick in Gesundheit und Erkrankungen ermöglichen. Die genaue und reproduzierbare Proteinquantifizierung ist eine wichtige Voraussetzung für die Gewinnung aussagekräftiger biologischer Erkenntnisse. Illumina Protein Prep ist ein innovativer Proteomik-Assay, der SOMAmer®-Reagenzien (Slow Off-Rate Modified Aptamer) für die Proteinerfassung verwendet, was einen hochgradig sensitiven Proteinnachweis ermöglicht. Die Kombination dieses Assays mit der NGS-Ausgabe (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) und der Bioinformatikleistung der DRAGEN-Sekundäranalyse bietet eine optimierte Hochdurchsatz-Proteomiklösung von der Probe bis zum Ergebnis.

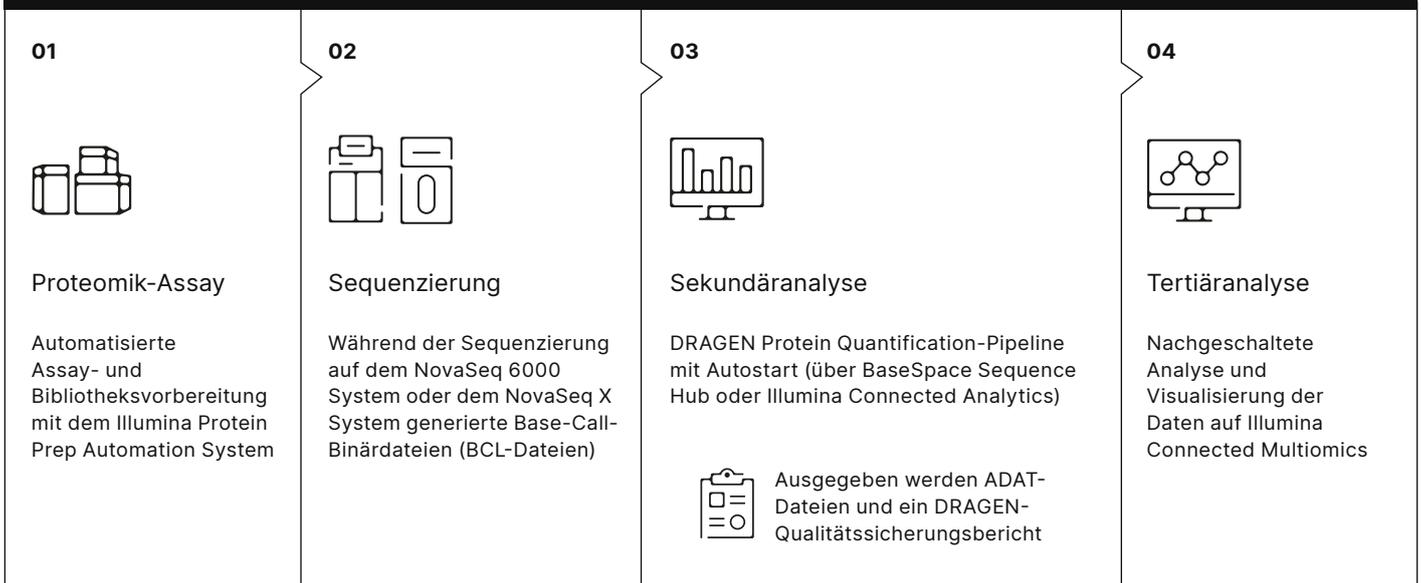
Illumina Protein Prep weist als leistungsstarke Plattform für die Biomarker-Erkennung Tausende Proteine gleichzeitig in einer einzigen Probe nach. Verzerrungseffekte zwischen Platten und die technisch bedingte Varianz von Hochdurchsatz-Proteomikplattformen können jedoch die Differentialexpression überlagern, insbesondere

bei Biomarkern mit geringen Effektgrößen.

Die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline begegnet dieser Herausforderung während der Sekundäranalyse mit robusten Normalisierungsverfahren, die versuchsübergreifend qualitativ hochwertige, vergleichbare Daten liefern. Die Pipeline wird im Anschluss an die Sequenzierung auf einem NovaSeq™ 6000 System oder einem NovaSeq X System automatisch in der Cloud gestartet und generiert einen DRAGEN-Qualitätssicherungsbericht sowie ADAT-Dateien mit normalisierter Proteinzählung, die für die nachfolgende Tertiäranalyse mit Illumina Connected Multiomics ([Abbildung 1](#)) verwendet werden können, um weiterreichende biologische Erkenntnisse über das Proteom zu gewinnen. Anwender, die Analysen vor Ort durchführen möchten, können die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline auf einem lokalen DRAGEN-Server installieren.

Dieser technische Hinweis erläutert die Qualitätssicherungs- und Normalisierungsschritte, mit der die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline die Effekte von Proben- und technisch bedingter Varianz eliminiert und somit hochwertige Proteomikdaten liefert.

Abbildung 1: Überblick über den Workflow von Illumina Protein Prep.



Die Hochdurchsatzlösung für die Proteomik verwendet einen Proteomik-Assay auf Basis von SOMAmer-Reagenzien für den sensitiven Proteinnachweis bei Serum- oder Plasmaproben, gefolgt von der Bibliotheksvorbereitung und -sequenzierung von Illumina auf dem NovaSeq 6000 System oder dem NovaSeq X System. Der Workflow für Proteomik-Assay und Bibliotheksvorbereitung läuft auf dem Illumina Protein Prep Automation System, einem speziell angepassten Tecan Fluent 780, automatisiert ab, wodurch sich konsistente und reproduzierbare Ergebnisse gewinnen lassen. Die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline wird im Anschluss an die Sequenzierung automatisch in BaseSpace Sequence Hub oder Illumina Connected Analytics gestartet und wandelt die in von Illumina-Sequenziersystemen generierten BCL-Dateien enthaltenen Proteomikdaten in normalisierte Proteomikzählungen in einer ADAT-Datei um, der ein DRAGEN-Qualitätssicherungsbericht beigelegt ist. Die ADAT-Datei kann zur weiteren Dateninterpretation direkt in Programme für die Tertiäranalyse wie Illumina Connected Multiomics integriert werden.

## Warum müssen Daten normalisiert werden?

Bei allen Hochdurchsatz-Proteomikassays besteht eine technisch bedingte Varianz, die mehrere Ursachen haben kann, darunter Probenvorbereitung, intrinsische Heterogenität der Proben, Hybridisierungseffizienz, PCR-Effizienz (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) und Sequenzierung. Zusätzlich zur technisch bedingten Varianz innerhalb einer Probe können aufgrund von unterschiedlichen Bedienern, Geräten oder Umwelteinflüssen Batch-Effekte auftreten, die alle Proben auf derselben Platte betreffen. Ohne wirksame Normalisierung oder Batch-Korrektur besteht die Möglichkeit, dass diese systembedingte Varianz echte biologische Unterschiede überlagert, woraus sich fehlerhafte Schlussfolgerungen ergeben können.

Die Datennormalisierung ist zur Korrektur dieser Varianz, zur Standardisierung von Daten sowie für aussagekräftige Vergleiche zwischen Proben, Platten und auch unterschiedlichen Assayläufen unerlässlich. Die Implementierung umfassender Normalisierungsstrategien mit der DRAGEN Protein Quantification-Pipeline sorgt für zuverlässige und reproduzierbare Proteinquantifizierungsdaten.

## Illumina Protein Prep-Kontrollproben

Der Illumina Protein Prep-Assay verringert die Assayvarianz, indem bei jeder Probe zusätzlich Platten- und SOMAmer-Reagenzienkontrollproben analysiert werden. Beide Arten von Kontrollproben dienen der Generierung von normalisierten Proteinexpressionszählungen mit der DRAGEN Protein Quantification-Pipeline.

### Plattenkontrollproben

Jede 96-Well-Platte kann 85 Proben und 11 Plattenkontrollproben aufnehmen ([Abbildung 2](#)), einschließlich Leerproben, Kalibratorkontrollproben und Qualitätssicherungsproben. Diese Kontrollproben sind im Illumina Protein Prep-Assay enthalten und werden zur Normalisierung und Qualitätssicherung bei jeder Platte gemeinsam mit den Plasma- oder Serumproben analysiert. Sie liefern Vergleichswerte zur Bestimmung sowie zur Korrektur technisch bedingter Abweichungen und liefern die Basis für das Alignment auf unterschiedlichen Platten analysierter Proben.

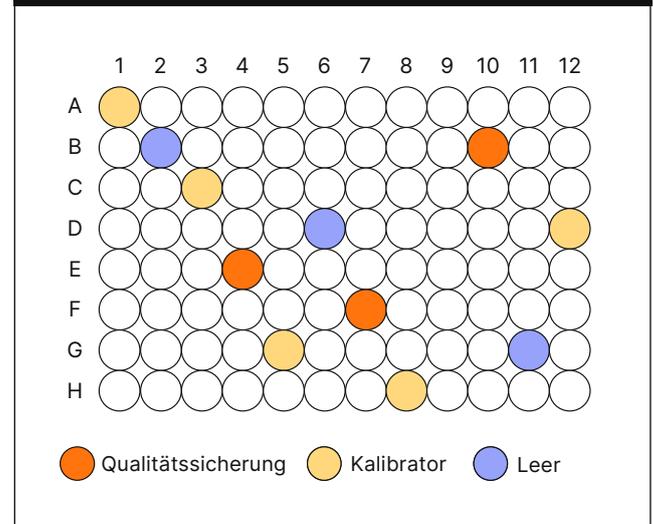
### Leerproben

Leerproben enthalten ausschließlich Puffer und ermöglichen die Bestimmung des unspezifischen Hintergrunds im Illumina Protein Prep-Assay. Diese Kontrollproben sollten signifikant geringere Zählungen aufweisen als Plasma- oder Serumproben. Erhöhte Zählungen in Wells mit Leerproben deuten auf einen Lauf mit erhöhtem Hintergrund oder eine Probenkontamination hin.

### Kalibratorkontrollproben

Kalibratorkontrollproben ermöglichen die Korrektur der Varianz zwischen Platten. Diese Kontrollproben bestehen je nach Probentyp entweder aus gepooltem Humanplasma oder -serum. Die Normalisierung der Plattenkalibrierung erfolgt durch Vergleich des Medians der Kalibratorkontrollproben für die einzelnen SOMAmer-Reagenzien mit der entsprechenden Kalibrierungsreferenz.

Abbildung 2: Beispiel für ein Plattenlayout mit Kontrollproben.



### Qualitätssicherungsproben

Qualitätssicherungsproben ermöglichen die Prüfung der Platte auf deren korrekte Funktion. Diese Kontrollproben bestehen je nach Probentyp entweder aus gepooltem Humanplasma oder -serum. Die Bewertung der Plattenqualität erfolgt durch Vergleich des Medians dieser Proben für die einzelnen SOMAmer-Reagenzien mit der entsprechenden Qualitätssicherungsreferenz.

### SOMAmer-Reagenzienkontrollproben

SOMAmer-Reagenzienkontrollproben werden jeder einzelnen Probe vor der Hybridisierung in bekannten Konzentrationen zugegeben. Damit lassen sich probenspezifische Skalierungsfaktoren für die Normalisierung von Proben und die Bewertung von deren Qualität berechnen.

## Datennormalisierungsschritte

Die Normalisierung der Proteomik-Rohzählung umfasst mehrere Schritte zur Beseitigung von systembedingten Verzerrungen zwischen Proben und Platten, die sich im Verlauf des Workflows von Illumina Protein Prep ergeben können. Diese Anpassungen erfolgen in vier nicht aufeinanderfolgenden Schritten: Hybridisierungsnormalisierung, Mediannormalisierung anhand einer externen Referenz, Kalibrierung und Plattenskalierung ([Abbildung 3](#)).

### Hybridisierungsnormalisierung

Dieser Schritt korrigiert die Varianz zwischen Proben, die während der Assay-Phasen Hybridisierung und Bibliotheksvorbereitung auftreten kann. Probenspezifische Skalierungsfaktoren werden anhand des Vergleichs der Zählungen für die in den einzelnen Proben enthaltenen Hybridisierungsnormalisierungskontrollproben mit den entsprechenden Medianwerten für alle Proben auf der Platte berechnet.

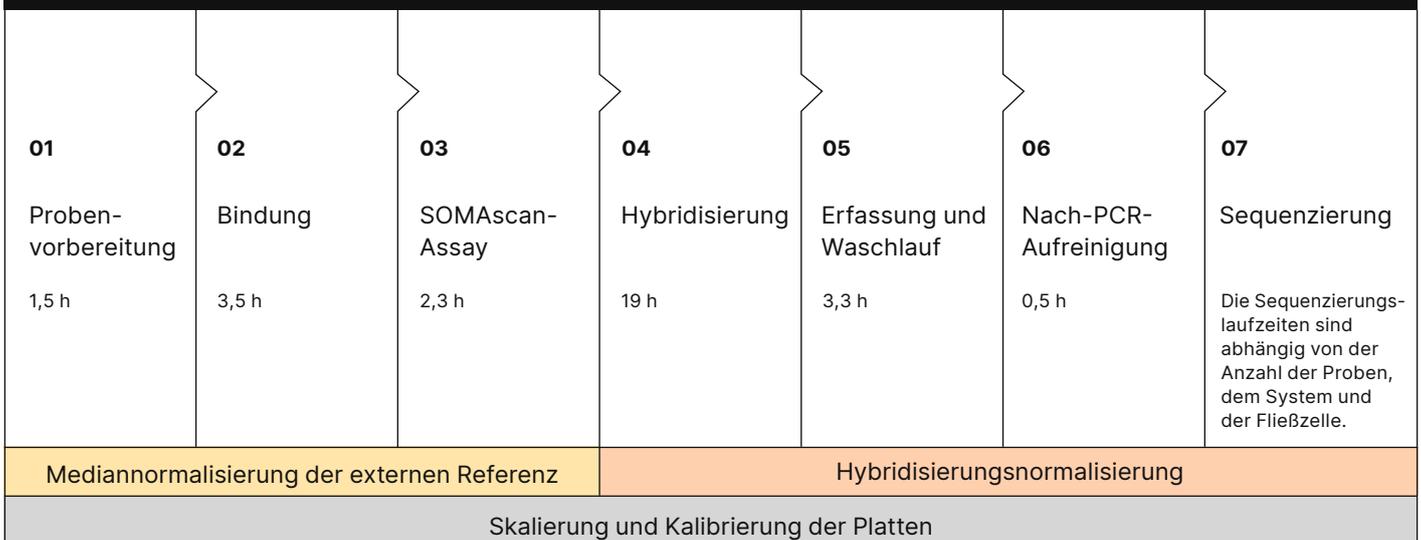
### Mediannormalisierung anhand einer externen Referenz

Dieser Schritt korrigiert Unterschiede bei der Messung der Gesamtproteinabundanz der Nichtkontrollproben. Ein Skalierungsfaktor wird durch Vergleich der gewonnenen Proteinnmessungen mit einer Referenz berechnet, die die erwarteten Werte für die einzelnen Proteine enthält.

### Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgt anhand der fünf im Abschnitt zu den Plattenkontrollproben erläuterten Kalibratorproben und korrigiert Batch-Effekte, die sich auf einzelne SOMAmer-Reagenzien auswirken. Dieser Schritt ermöglicht den genauen Vergleich von Daten, die mit unterschiedlichen Platten und Läufen generiert wurden. Für jedes SOMAmer-Reagenz korrigiert die Kalibrierung die Varianz zwischen den Kalibratoren und den erwarteten Referenzwerten für die Kalibratorkontrollprobe.

Abbildung 3: Überblick über die von der DRAGEN Protein Quantification-Pipeline durchgeführten Normalisierungsschritte.



Die Kalibrierung erfolgt in zwei Schritten:

- Schritt 1: Vergleicht die Kalibratormedianwerte mit einer vom Sequenziersystem erhaltenen Referenz und passt die einzelnen SOMAmer-Reagenzien entsprechend an.
- Schritt 2: Vergleicht die aktualisierten Kalibratormedianwerte mit einer von den Sequenziersystemen erhaltenen Referenz und ermöglicht damit den Vergleich von Daten, die auf verschiedenen Geräten generiert wurden. Der Skalierungsfaktor zur Anpassung des Medians der Kalibratoren an den Referenzwert wird auf alle Proben auf der Platte angewendet.

### Plattenskalierung

Die Plattenskalierung berücksichtigt die Varianz der Gesamtproteinmessungen zwischen einzelnen Platten, indem der Median aller SOMAmer-Reagenzmessungen für die einzelnen Kalibratoren verwendet und auf eine externe Kalibrierungsreferenz abgestimmt wird.

Die Skalierung erfolgt in zwei Schritten:

- Schritt 1: Passt die Messwerte basierend auf einer vom Sequenziersystem (NovaSeq 6000 System oder NovaSeq X System) erhaltenen Referenz an.
- Schritt 2: Verfeinert die Anpassung mithilfe einer für alle Sequenziersysteme übereinstimmenden Referenz und ermöglicht so den Vergleich auf verschiedenen Geräten generierter Daten. Der DRAGEN Protein Quantification-Bericht enthält ausschließlich Qualitätssicherungsmetriken aus dem ersten Skalierungsschritt.

### Prozentsatz der Qualitätssicherungswerte in Randbereichen

Am Ende der Normalisierung erfolgt ein Qualitätssicherungsschritt anhand der entsprechenden Kontrollproben auf den einzelnen Platten. Bei diesem Schritt wird der aus den drei Qualitätssicherungsprobenreplikaten gebildete Median jeder SOMAmer-Reagenzmessung mit einer externen Qualitätssicherungsreferenz verglichen, damit ein SOMAmer-reagenzspezifischer Skalierungsfaktor sowie eine Qualitätssicherungsmetrik (QCCheckTailPercent) zugewiesen werden können.

Die verschiedenen Normalisierungsverfahren, die in der DRAGEN Protein Quantification-Pipeline zum Einsatz kommen, minimieren die irrelevante Varianz, die in den unterschiedlichen Phasen des Illumina Protein Prep-Workflows entsteht ([Abbildung 4](#)).

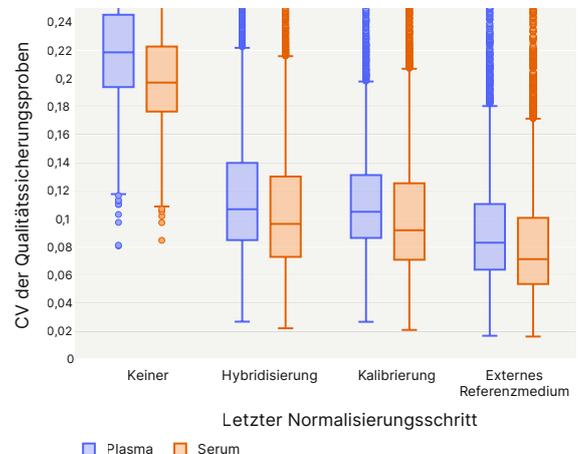
## Ausgabe von DRAGEN Protein Quantification

Die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline gibt zwei Arten von Dateien aus, die für die Analyse von Illumina Protein Prep-Daten unverzichtbar sind. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Reihe von ADAT-Dateien aus den einzelnen Normalisierungsschritten und zum anderen um einen DRAGEN-Qualitätssicherungsbericht mit einer Zusammenfassung zur Laufqualitätssicherung.

### ADAT-Dateien

Die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline verarbeitet Rohzählungen und gibt für jeden durchgeführten Normalisierungsschritt eine tabulatorgetrennte ASCII-Textdatei mit der Erweiterung ADAT aus. Die ADAT-Datei enthält Messungen für eine Reihe von Analyten (Spalten) in einer Reihe von Proben (Zeilen), einschließlich einer Beschreibung der Analyte und Proben.

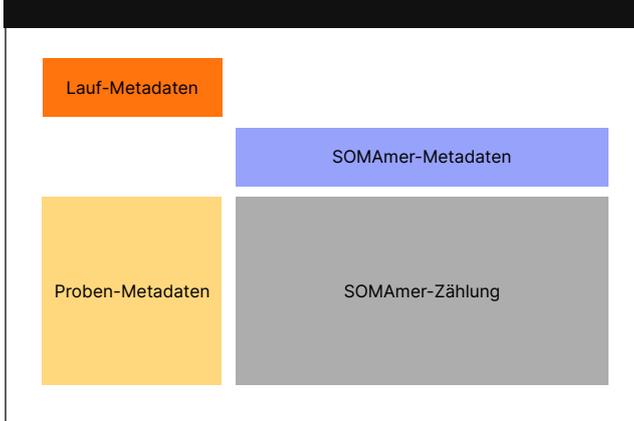
Abbildung 4: Auswirkungen der Normalisierung auf die Datenvarianz.



Die Normalisierung der Assay-Rohdaten hat eine Verringerung des Variationskoeffizienten (CV, Coefficient of Variation) zwischen Platten zur Folge. Die Daten wurden mit dem Illumina Protein Prep 6K-Assay mit Plasma- und Serum-Qualitätssicherungsproben generiert. Der Illumina Protein Prep 9.5K-Assay mit einem medianen CV von ca. 5,5 %<sup>a</sup> ist ab sofort verfügbar.

a. Anhand von Proben gesunder Spender berechneter erwarteter medianer CV.

Abbildung 5: ADAT-Dateistruktur.



## Verwenden von ADAT-Dateien für die Tertiäranalyse

Die normalisierte ADAT-Datei lässt sich unmittelbar für die weitere Datenanalyse mit Illumina Connected Multiomics über Illumina Connected Analytics verwenden. Illumina Connected Multiomics bietet eine grafische Benutzeroberfläche für das Management und die Auswahl von Daten und kann für die erweiterte Dateninterpretation verwendet werden, darunter differenzielle Proteinexpression, Signalweganalyse und Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Der Inhalt der ADAT-Datei lässt sich zudem mit Open-Source-Paketen analysieren, die in R (SomadataIO) und Python (Canopy) bereitgestellt werden.

## Zusammenfassung

Durch den Assay und die Proben verursachte Verzerrungseffekte, die im Rahmen des Illumina Protein Prep-Workflows auftreten können, lassen sich nur durch die Normalisierung der Proteomik-Rohdaten minimieren. Die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline sorgt für genaue Ergebnisse, indem mithilfe mehrerer Normalisierungs- und Kalibrierungsschritte die systembedingte Varianz reduziert und zugleich verhindert wird, dass echte biologische Varianz verloren geht. Diese Pipeline ist in der Cloud und auf lokalen Servern verfügbar. In der Cloud wird die DRAGEN Protein Quantification-Pipeline im Anschluss an die Sequenzierung auf dem NovaSeq 6000 System oder dem NovaSeq X System automatisch gestartet und generiert einen DRAGEN-Qualitätssicherungsbericht sowie ADAT-Dateien mit normalisierter Proteinzählung. Die ausgegebenen ADAT-Dateien lassen sich unmittelbar für die nachgeschaltete Tertiäranalyse mit Illumina Connected Multiomics verwenden, was weitreichendere biologische Erkenntnisse über das Proteom ermöglicht.

### Weitere Informationen →

[Illumina Protein Prep](#)

[DRAGEN-Sekundäranalyse](#)

[Illumina Connected Analytics](#)

Bei den ADAT-Dateien handelt es sich um tabulatorgetrennte Dateien mit der folgenden Struktur ([Abbildung 5](#)):

- **Laufmetadaten** – enthalten Metriken, die für den gesamten Lauf bzw. einzelne Platten relevant sind (z. B. RunID und Metriken im Zusammenhang mit dem Prozentsatz der Qualitätssicherungswerte in Randbereichen)
- **SOMAmer-Metadaten** – enthalten Metriken, die für die einzelnen SOMAmer-Reagenzien oder Proteintargets relevant sind (z. B. die SOMAmer-ID und die spezifischen Gen- und Ziel-IDs)
- **Probenmetadaten** – enthalten Metriken, die für die einzelnen Proben relevant sind (z. B. die Proben-ID, die Platten-ID und Qualitätssicherungsmetriken)
- **SOMAmer-Zählungen** – eine Matrix aus NGS-Zählungen, die die relative Häufigkeit des jeweiligen SOMAmer in der einzelnen Probe angeben

Das Format ist flexibel und eignet sich so für eine unterschiedliche Anzahl von Proben sowie von Analyt- und Probendescriptorarten. Es lässt sich für die nachgelagerte Tertiäranalyse zur Gewinnung biologischer Erkenntnisse verwenden.

### DRAGEN-Qualitätssicherungsbericht

Der ADAT-Datei ist ein DRAGEN Protein Quantification-Qualitätssicherungsbericht beigefügt, in dem die Ergebnisse der Qualitätssicherung für die einzelnen Proben und die gesamte Platte zusammengefasst werden. Die Ergebnisse der Qualitätssicherung zu einzelnen Proben werden aus den Schritten Hybridisierungsnormalisierung und Mediannormalisierung anhand einer externen Referenz abgeleitet. Die Ergebnisse der Qualitätssicherung zur gesamten Platte werden aus den Schritten Kalibrierungsnormalisierung und Qualitätssicherung abgeleitet.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-03205 DEU v1.0