

## 测序样品分析与问题解决

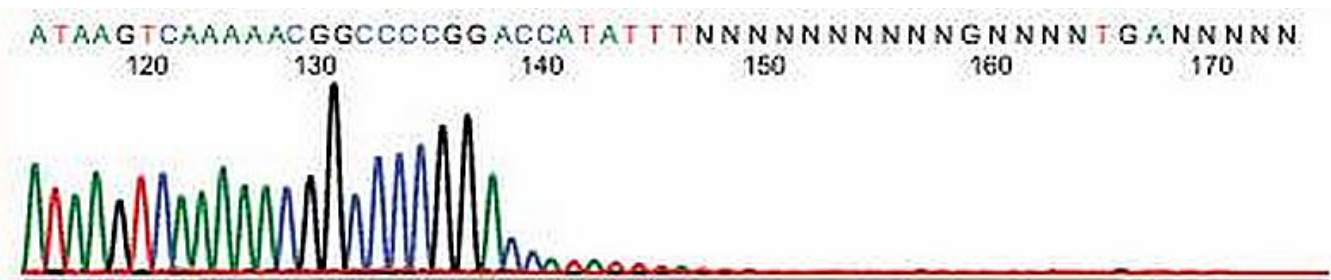
摘要：本文主要对测序中经常遇到的问题进行总结并提出解决方法，同时对测序样品的要求作出分析，帮助我们在测序前对样品做好准备，并在失败的结果中找到解决方法。

### 测序样品分析

1. 测序的样品可以有 PCR 产物，菌（新鲜菌液、穿刺菌、平板菌、甘油菌），质粒。测序提供的样品最基本的原则就是要保证样品的量和纯度。
2. PCR 产物测序，PCR 产物测序的第一要素是 PCR 产物的纯度，如果是 PCR 产物原液，则需要经过琼脂糖凝胶电泳纯化后再进行测序，如果不经过电泳产物回收纯化这一步，测序容易出现乱峰或叠峰，如果是已经纯化好的 PCR 产物，可直接测序。第二要素是引物，引物必须经过纯化，纯度至少大于 90%。
3. 菌液测序，需提供足量的新鲜的菌液，新鲜菌液成功率较高，测序公司可以直接提取质粒测序。
4. 菌体可以是多种形式平板菌、穿刺菌。两者都是在含有抗生素的固体培养基中，可用肉眼观察到菌落并保证无杂菌污染。
5. 质粒测序要提供一定浓度和量，注明名称，酶切位点及片段大小。此外，小于 100bp 片段一般是先克隆再测序，直接测序较难得到结果。

### 测序问题与解决

#### 1. 测序信号衰减/中断

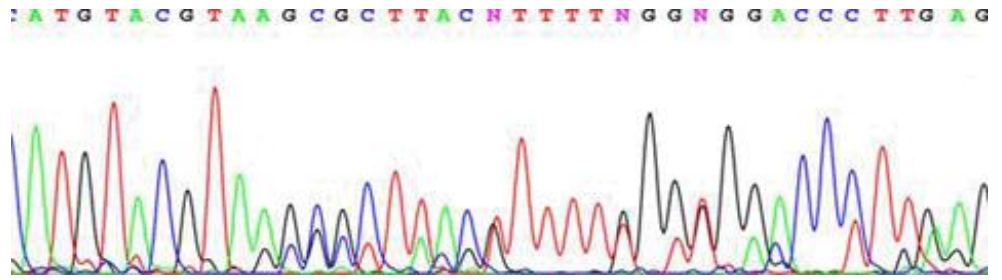


测序信号衰减或中断是测序过程中的常见问题，原因多种多样：模板中含有重复序列，或是模板含有高级结构所致，模板中 GC 含量过高等都有可能使测序信号衰减，此外，引物的质量，试剂失活也有可能造成此现象。解决方法：采用反向引物测序，通过序列拼接获得全长，过程中可适当的加入 DMSO，并使用高级试剂盒扩增。

#### 2. 测序出现重叠峰/乱峰

测序中间出现重叠峰（双峰），是因为序列前面有连续的碱基出现，或是测序引物碱基缺失。如果一直出现重叠峰，就是序列本身有非特异性条

带，非特异性条带的话就要从 PCR 扩增开始分析，注意提高 PCR 扩增的特异性，扩增可以选择高特异性的 Taq 酶（如热



启动酶），能够大大的降低错配，提高扩增序列的特异性。也可以做 TA 克隆，采用单克隆测序。测序的引物，最好自己提供，保证引物的特异性并防止降解（不要选择通用引物），同时表明测序结果提供序列全长。

### 3.poly 结构测序结果乱峰/衰减/中断

Poly ( A/T/C/G ) 结构的测序易出现移码现象并导致测序信号衰减中断，这是因为序列中有连续的碱基出现所致，建议采用反向引物测序获得全长。

### 4.测序结果为空载体

目的片段插入失败（提供的克隆为阳性克隆）或培养过程中目的片段丢失，只要重新挑取单克隆，进行 PCR 后送去测序即可。

### 5.测序引物

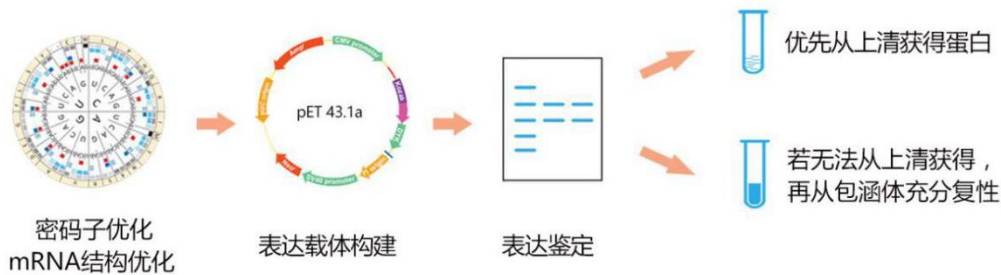
测序引物要求较高，理论上可以用 PCR 扩增时的引物测序，但不能测得全长，当测序完成时，可以从中间设计引物反向测一个，这样便能得到序列全长。测序的引物 3' 端要和模板完全配对，长度 16-22bp 左右，GC 含量 50% 左右，测序引物纯度有很高要求，必须经过纯化且纯度至少大于 90%。

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

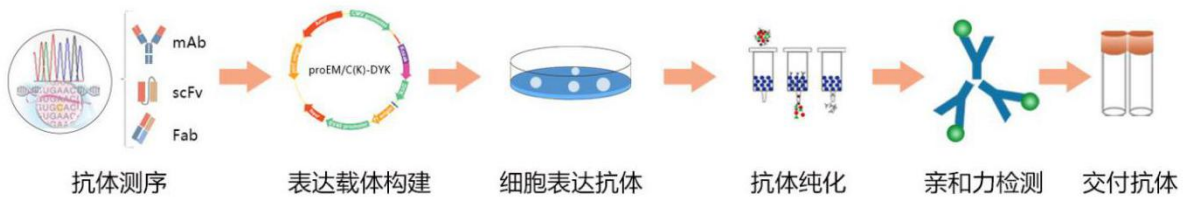
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

