

测序样品分析与问题解决

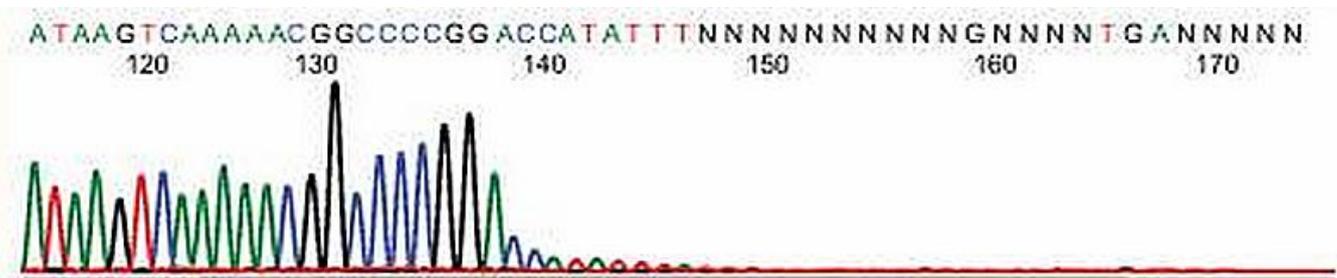
摘要：本文主要对测序中经常遇到的问题进行总结并提出解决方法，同时对测序样品的要求作出分析，帮助我们在测序前对样品做好准备，并在失败的结果中找到解决方法。

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

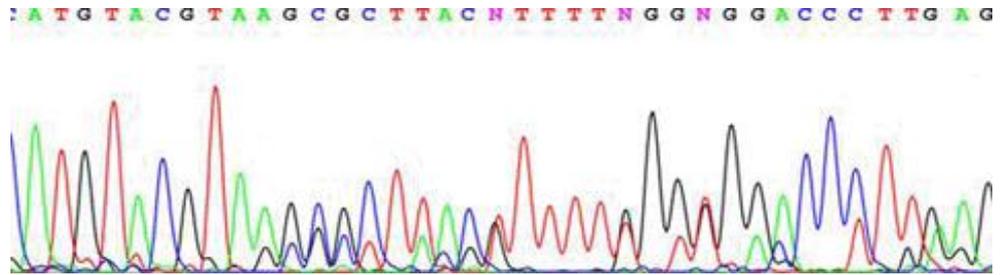


测序信号衰减或中断是测序过程中的常见问题，原因多种多样：模板中含有重复序列，或是模板含有高级结构所致，模板中 GC 含量过高等都有可能使测序信号衰减，此外，引物的质量，试剂失活也有可能造成此现象。解决方法：采用反向引物测序，通过序列拼接获得全长，过程中可适当的加入 DMSO，并使用高级试剂盒扩增。

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%。

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

SingleB® 单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

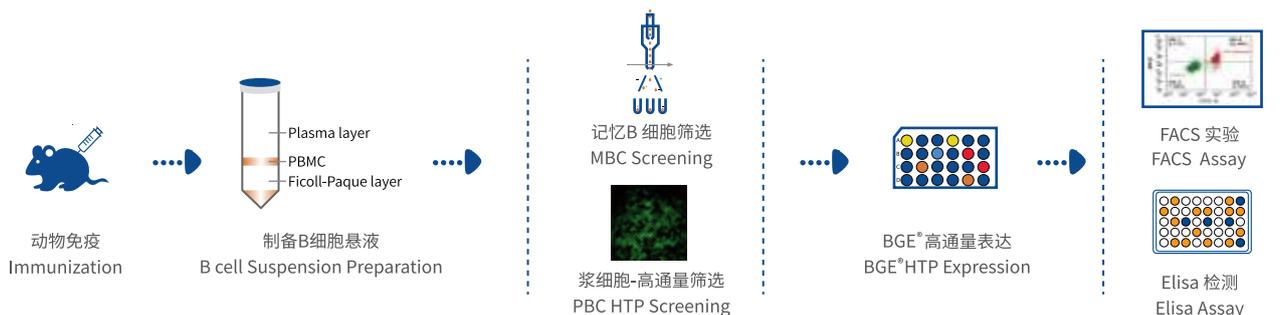
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

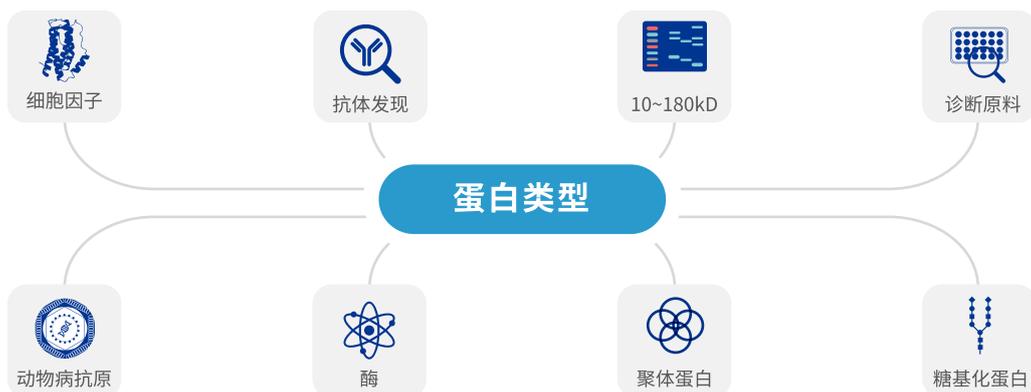


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

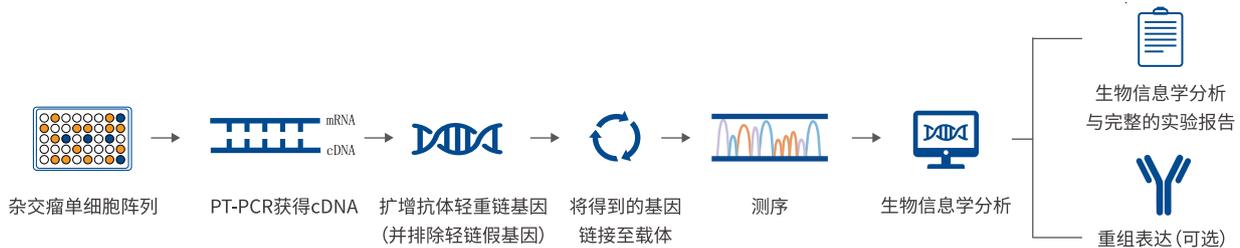
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除k轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



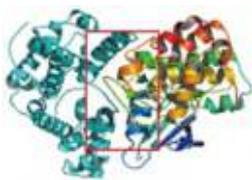
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



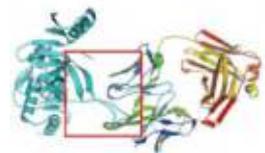
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



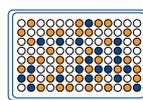
基因合成&质粒抽提



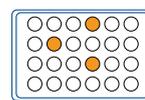
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L