

## DNA シーケンス トラブルシューティングガイド

### はじめに

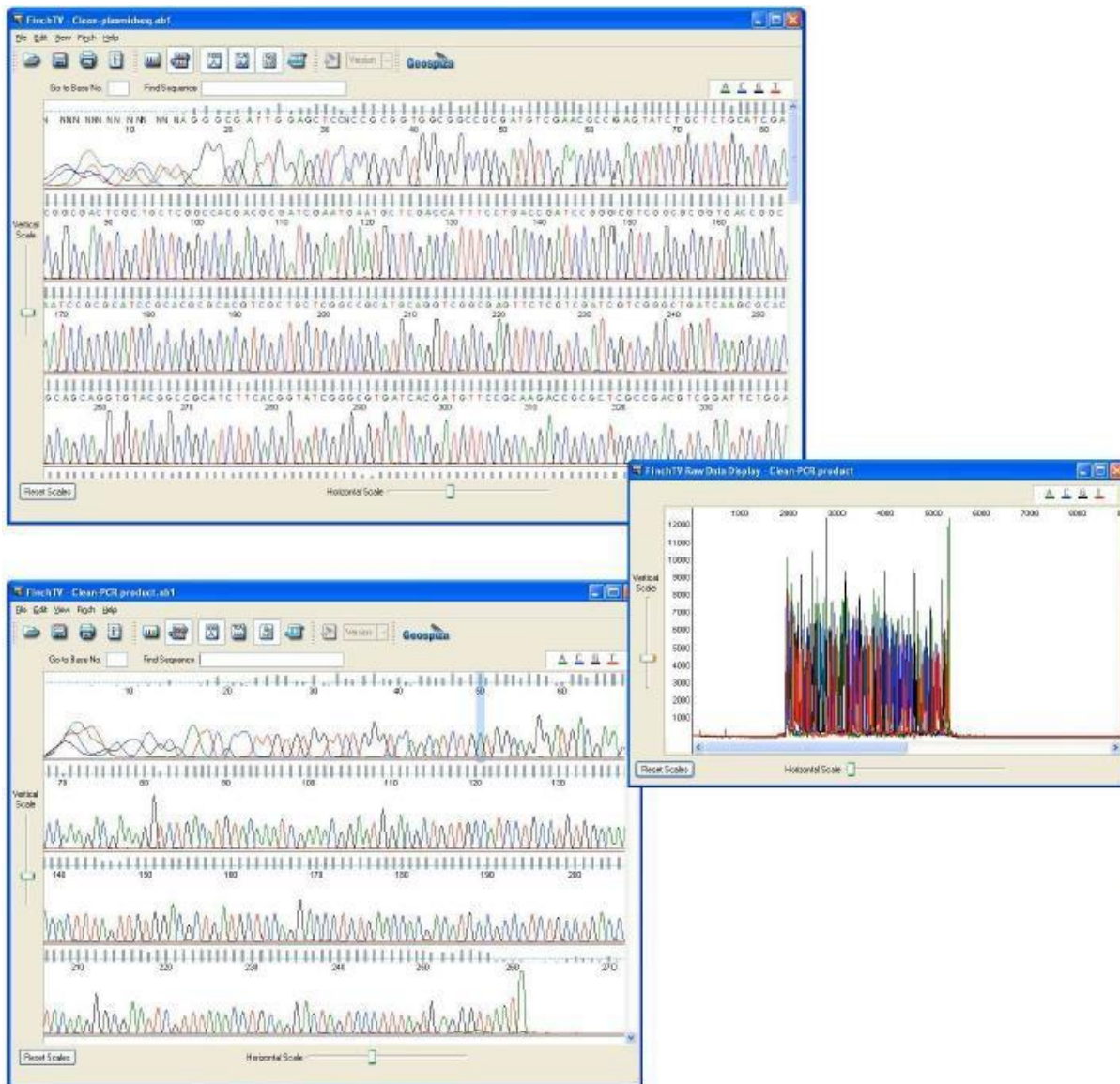
シーケンス解析の成否を評価するために、弊社から納品する解析データ（ABI ファイル）を Sequence Scanner 等の Data Viewer ソフトウェアで開き、波形データをご確認ください。フリーのソフトウェアについては、結果報告メール内でご紹介しています。

このトラブルシューティングガイドでは、よく見られる結果不良例の特徴および対処法についてご説明いたします。

## Successful DNA Sequencing Read

### 特徴

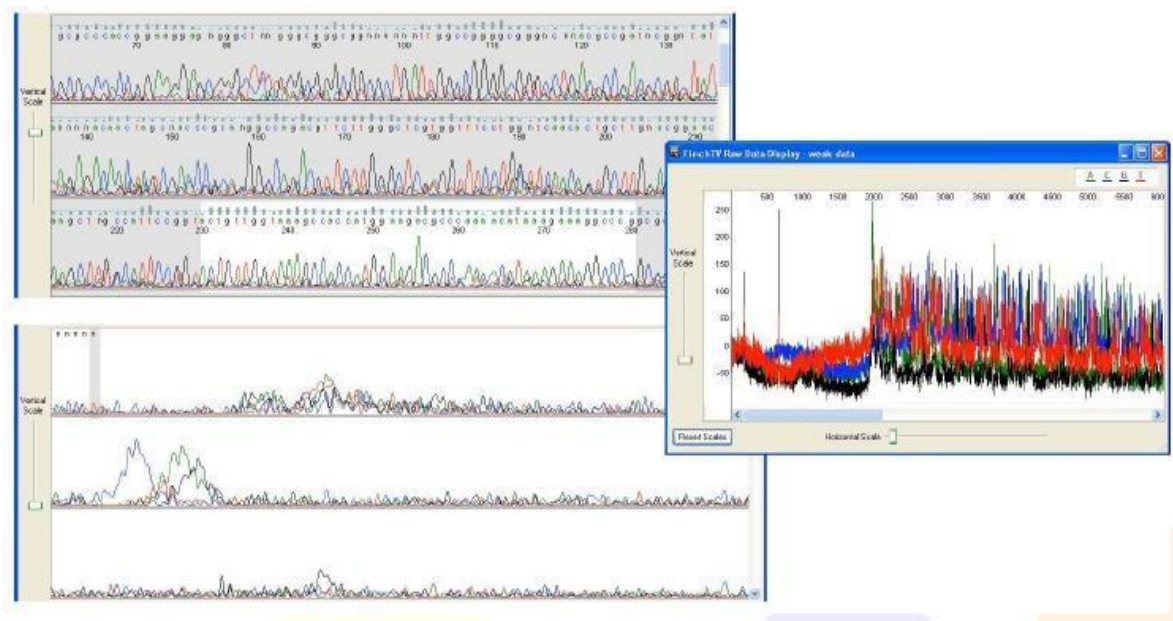
- 一定間隔で分離した、単一色のシングルピークが形成されている。
- ベースコールされた塩基の信頼度 (Quality Value) が高い。
- バックグラウンドが低い。
- 読み始め (プライマー3' 末端から数十ベース) は分離が悪く、解読できない領域がある。



## Failed DNA Sequencing Reaction or “Dirty” Sequence

### 特徴

- きれいに分離したピークが見られない。
- Raw data のシグナル強度が 300 より低い。
- S/N 比が 15 以下。
- 配列中に N (未決定塩基) が多くみられる、または、ベースコールされていない。



### 予想される原因

データが得られていないため、原因の特定は難しいが、一般的な原因として以下のようなものがある。

- DNA テンプレートの濃度不足 - **ご注意**：吸光度による濃度測定では夾雑物も測ってしまい、濃度が高めにでる傾向がある。アガロースゲル電気泳動にて DNA テンプレートの濃度および質を確認いただくことを推奨。
- 間違ったプライマーの使用、もしくはプライマーの入れ忘れ - DNA テンプレートとプライマーが結合できないため、シグナルが得られない。
- DNA テンプレートの精製度が低い - タンパク質や RNA、塩、その他の化学物質の除去が不十分なため、シーケンス反応酵素が阻害されている。

### 対処方法

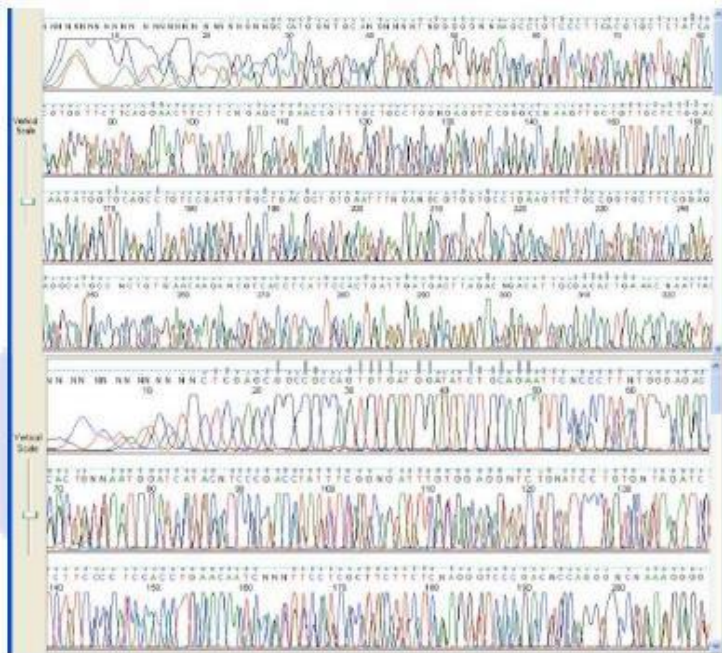
- DNA テンプレート濃度をアガロースゲル電気泳動で確認し、「サンプル調整方法」に記載されたテンプレート量を満たしているか確認する。

- プライマー配列をチェックし、テンプレート配列に対して適切な結合部位が存在するか確認する。
- DNA テンプレートの純度を上げる。
  - 新しい試薬を準備して、サンプル提出の直前にテンプレート調整および希釈を行う。
  - 市販の mini-prep キットを使用して、プラスミド調整を行う。
  - テンプレート調整後にエタノール沈殿を行うことで結果が改善する場合がある。

## Double Sequence Data

### 特徴

- 複数のピークが同じ高さ、もしくは異なる高さで、お互いに重なり合っている。
- Raw data の示すシグナル強度は十分であり、弱いシグナルやバックグラウンドノイズと重なっているわけではない。



### 予想される原因

- クローンコンタミネーション - この場合、シーケンス読み始め部分はきれいな波形を示すが、インサートの挿入部位を過ぎたあたりからピークの重なりが見られる。
- 2 倍体もしくは倍数体生物において、挿入または欠損による遺伝的変異のために PCR テンプレートがヘテロ接合になっている可能性。
- 誤って 2 種類のプライマーが添加された可能性。
- PCR 産物が精製されていない（または精製が不十分）。この場合、除ききれなかった PCR プライマーによるシ

一ケンス反応が起こる可能性がある。

- 目的の領域以外にもプライマーの結合サイトがあり、その領域でもシーケンス反応が起こっている可能性。

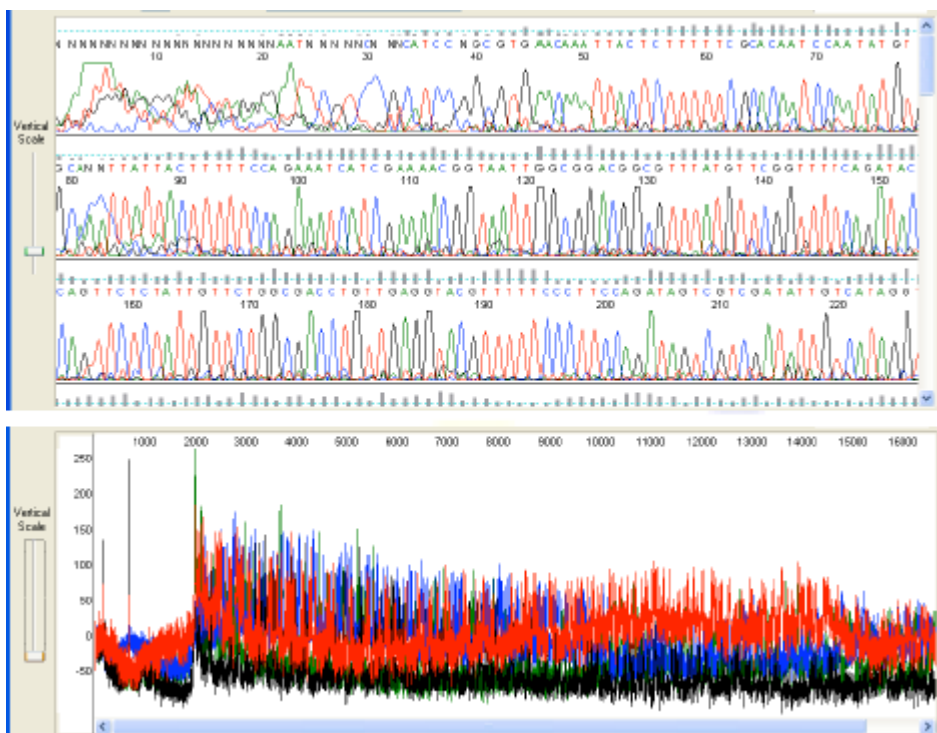
### 対処方法

- クローンコンタミネーションが疑われる場合は、クローン供給源に戻り、バクテリアを選択培地プレートに塗布し培養を行う。目的のクローンを見つけるために、最大 12 個の良く分離したクローンを選択しシーケンス決定を行う。
- 2 種類の異なるプライマーの添加が疑われる場合、サンプルを再調整する。使用中のシーケンスプライマーがコンタミしている場合には、コンタミしていないプライマーのストック溶液から新たに調整しなおすか、新しくプライマーを再合成する。
- PCR 産物精製のプロトコルと精製に使用したキットや試薬に問題がないか確認する。
- プライマー配列をチェックし、テンプレート配列に対して一か所のみで結合するか確認する。配列がわからない場合は、問題解決のために、異なるシーケンスプライマーに変える必要がある。

## Noisy Background

### 特徴

- メインのシーケンスピークの下に、バックグラウンドのノイズや別の小さなピークが見られる。



### 予想される原因

- クローンコンタミネーション - この場合、シーケンス読み始め部分はきれいな波形を示すが、インサートの挿入部位を過ぎたあたりからピークの重なりが見られる。
- 2 倍体もしくは倍数体生物において、挿入または欠損による遺伝的変異のために PCR テンプレートがヘテロ接合体になっている可能性。
- 誤って 2 種類のプライマーが添加された可能性。
- PCR 産物が精製されていない（または精製が不十分）。この場合、除ききれなかった PCR プライマーによるシーケンス反応が起こる可能性がある。
- 目的の領域以外にもプライマーの結合サイトがあり、その領域でもシーケンス反応が起こっている可能性。

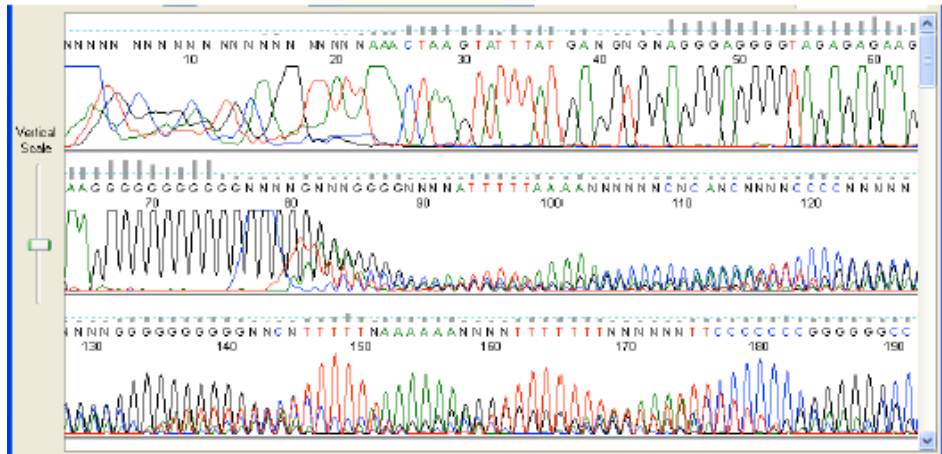
### 対処方法

- クローンコンタミネーションが疑われる場合は、クローン供給源に戻り、バクテリアを選択培地プレートに塗布し培養を行う。目的のクローンを見つけるために、最大 12 個の良く分離したクローンを選択しシーケンス決定を行う。
- 2 種類の異なるプライマーの添加が疑われる場合、サンプルを再調整する。使用中のシーケンスプライマーがコンタミしている場合には、コンタミしていないプライマーのストック溶液から新たに調整しなおすか、新しくプライマーを再合成する。
- PCR 産物精製のプロトコルと精製に使用したキットや試薬に問題がないか確認する。
- プライマー配列をチェックし、テンプレート配列に対して一か所のみで結合するか確認する。配列がわからない場合は、問題解決のために、異なるシーケンスプライマーに変える必要がある。

## Stuttering after Mononucleotide Stretches

### 特徴

7 塩基以上同じ塩基が連続したあとに、それ以降の塩基の信頼性が低くなる。



### 予想される原因

- DNA を伸長する際に、ポリメラーゼがスリップしている。サンガー法シーケンシングでは改善が非常に難しい。

### 対処方法

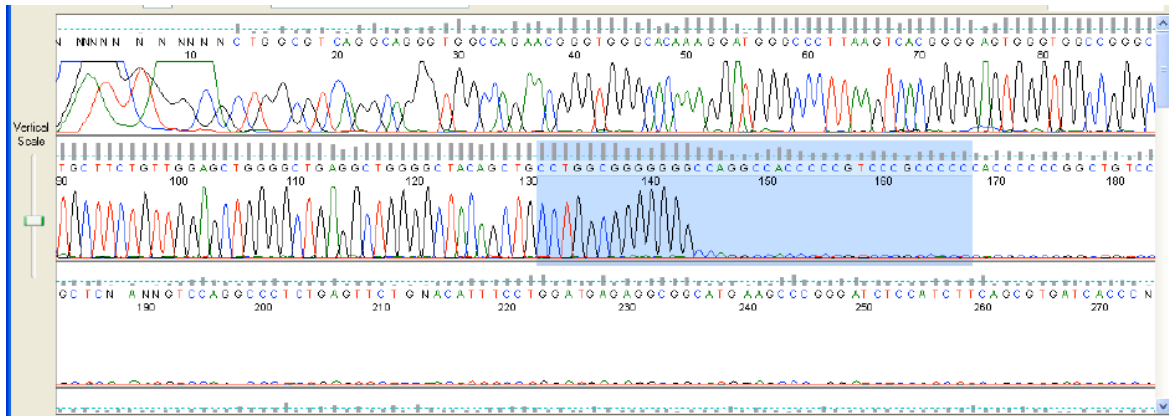
- 逆方向から解析する。
- 3' 末端に縮重塩基を持つ poly-mononucleotide プライマー（アンカープライマー）を使用する

## Mid Sequence Stop or Drop-Off

### 特徴

- シーケンスが途中で止まってしまう、または、シグナル強度が急激に低下する。

※多くの汎用ベクターにはリンカーに隣接するパルindrome配列があり、シーケンスすると急激なシグナルの低下が見られることがある。これはサンガー法の欠点ですが、弊社のフルサポートサービスでは、特別な試薬を使用することで改善が見られる場合があります。



### 予想される原因

- DNA テンプレート中の二次構造 (ex. hairpin loops, palindromes)
- GC または GT リッチな領域
- サンプルが siRNA コンストラクトの場合

### 対処方法

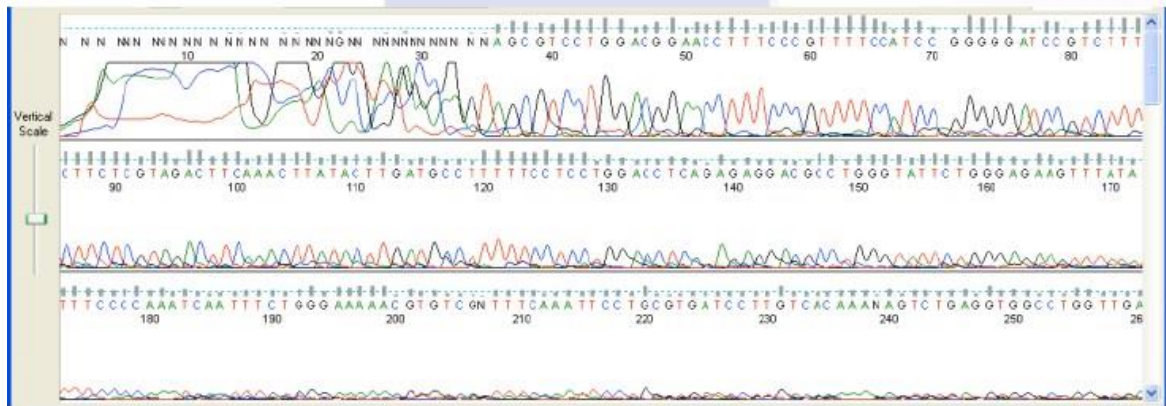
- 逆方向から解析する。
- サンプルに DMSO を加える。
- 弊社の「フルサポートシーケンス」で【PowerRead】をご指定ください。特に、二次構造を持つテンプレートや siRNA コンストラクトで改善が見られる場合がございます。  
(必ずしも改善するわけではございませんので、予めご了承の上、ご依頼ください。)



## Top-Heavy Sequences

### 特徴

シグナルが徐々に減衰し、途中でなくなる。



### 予想される原因

- DNA テンプレートまたはプライマーを過剰に添加している。
- GC または GT リッチテンプレート(ex.バイサルファイド処理した DNA)。

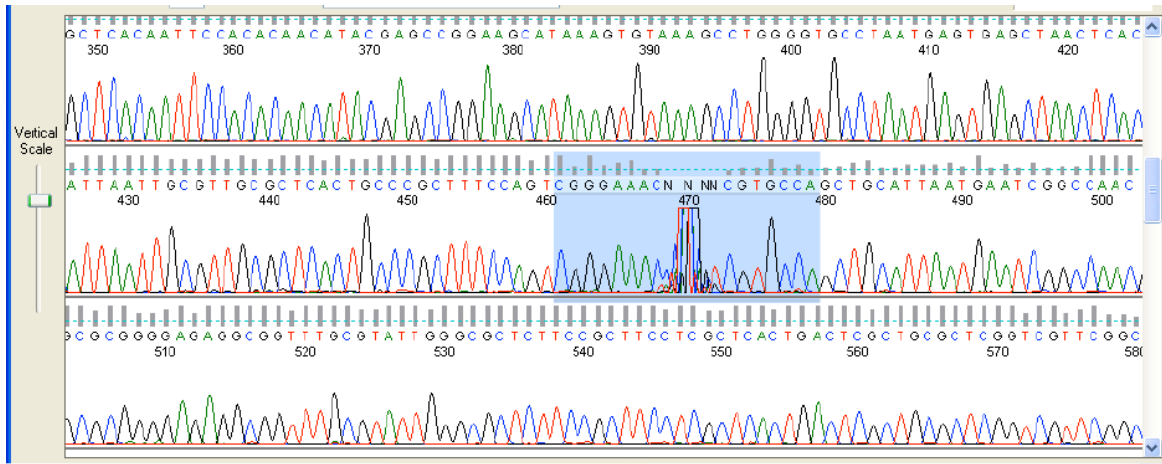
### 対処方法

- サンプル調整前に、DNA テンプレートとプライマーの濃度を正確に定量する。
- 逆方向からシーケンスする。
- 3' 末端に縮重塩基を持つ poly-mononucleotide プライマー (アンカープライマー) を使用する。

## Spikes

### 特徴

複数の色が重なったシャープでシグナル値の高いピーク(スパイク)が波形データ中に現れる。



### 予想される原因

- スパイクの原因は完全には明らかになっていない。原因の一つとして、不純物やマイクロバブルがカメラ視野を通過するとき光を散乱させる可能性がある。

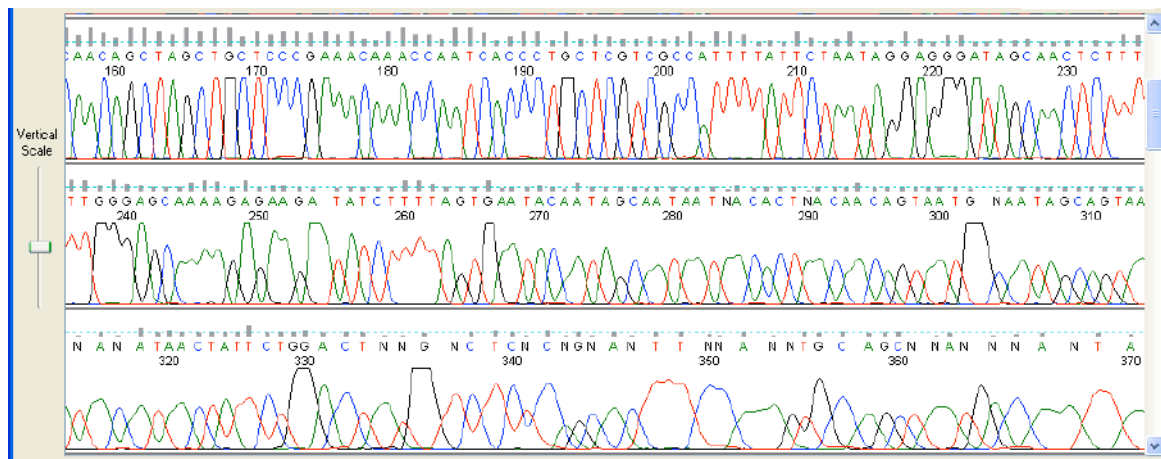
### 対処方法

- スパイクの前後のピークがきれいに出ている領域の配列には影響はない。  
※ご希望があれば再解析を実施いたしますので<ユーロフィン カスタマーサポート>までご連絡ください。

## Early Peak Deterioration

### 特徴

早い段階で、ピークが幅広になる、もしくは、形が崩れる。



### 予想される原因

- DNA 抽出の際に塩や不純物が混入している(特に市販キットを使用しない場合に多い)。

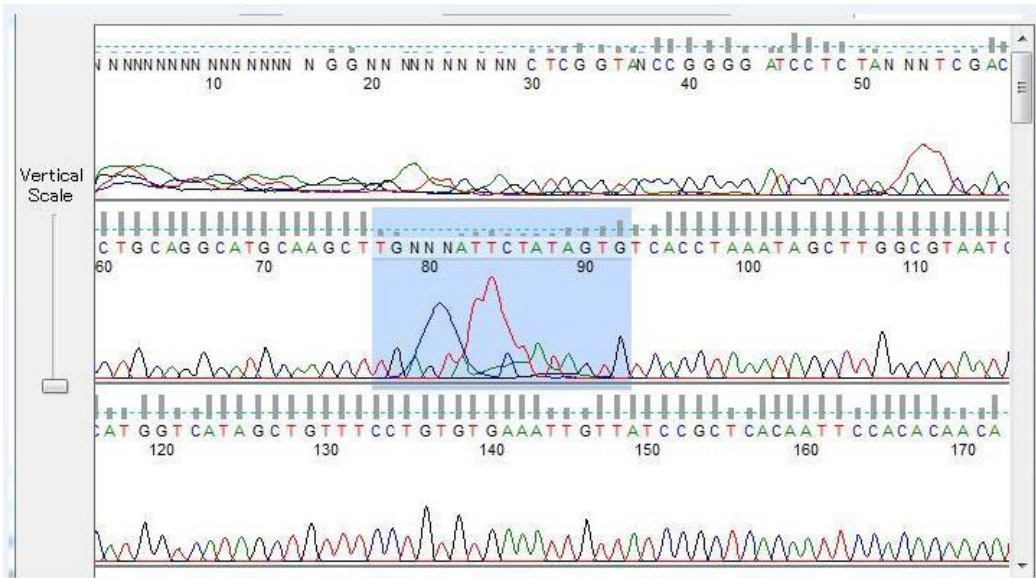
### 対処方法

- 市販の脱塩キットを用いて、DNA テンプレートを精製する。

## Dye Blobs

### 特徴

40~150 ベースの間で、1つまたは複数の大きな幅の広いピークが現れる。



### 予想される原因

- 反応が不十分なために、未反応の蛍光標識ヌクレオチドが過剰に残り、精製で完全に除去されなかった。

### 対処方法

- DNA テンプレートの量を増やす。
- DNA テンプレートの純度を上げる。