

Trouble-Shooting Sequenziererergebnisse

Mixed Base Definitionen

Problem 1: Keine Reaktion, Keine Sequenzdaten

Problem 2: Überlappende Signale

Problem 3: Überlappende Signale beginnen in der Mitte der Sequenz

Problem 4: N-1, N-2, N-3... Primer Signale

Problem 5: Hoher Hintergrund/Verrauschtes Sequenziersignal

Problem 6: Verkürzte Sequenz (Sekundärstruktur)

Problem 7: Schrittweises vorzeitiges Auslaufen des Sequenziersignals: Repetitive Regionen

Problem 8: Dye Blobs

Problem 9: Spikes

Problem 10: Electropherogram zeigt verbreiterte, gestreute Peaks

Problem 11: Homopolymere Regionen

Problem 12: Progressive Abnahme der Signalintensität

Standard Definitionen für Mixed bases (überlagernde Signale):

R: A, oder G

Y: C, oder T

M: A, oder C

K: G, oder T

S: C, oder G

W: A, oder T

H: A, C, oder T

B: C, G, oder T

V: A, C, oder G

D: A, G, oder T

N: A, C, G, oder T

Nachfolgend haben wir die häufigsten Probleme, die beim Sequenzieren von DNA auftreten können, dargestellt.

Die beiden häufigsten Ursachen für schlechte Sequenzierergebnisse sind die Qualität und/oder die Konzentration der template DNA. Wenn diese beiden Gründe ausscheiden und Sie Ihre Proben nach unseren Empfehlungen behandelt haben, finden Sie hier eventuell die Ursachen dafür, warum Ihre Sequenzen nicht die optimale Qualität aufweisen. Für jedes Problem haben wir die Chromatogramme und auch die Rohdaten zur besseren Visualisierung wiedergegeben. Die Rohdaten sind die Daten, die direkt vom Sequencer ermittelt werden und noch nicht durch die Software analysiert wurden.

Beide Dateiformate sind in den .ab1-Dateien enthalten und können mit dem Programm Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) geöffnet und untersucht werden. Die Rohdaten können nur mit diesem Programm geöffnet werden

Die Sequence Scanner Software können Sie sich [hier](#) nach Registrierung kostenfrei herunterladen.

Hochqualitative Sequenzdaten:

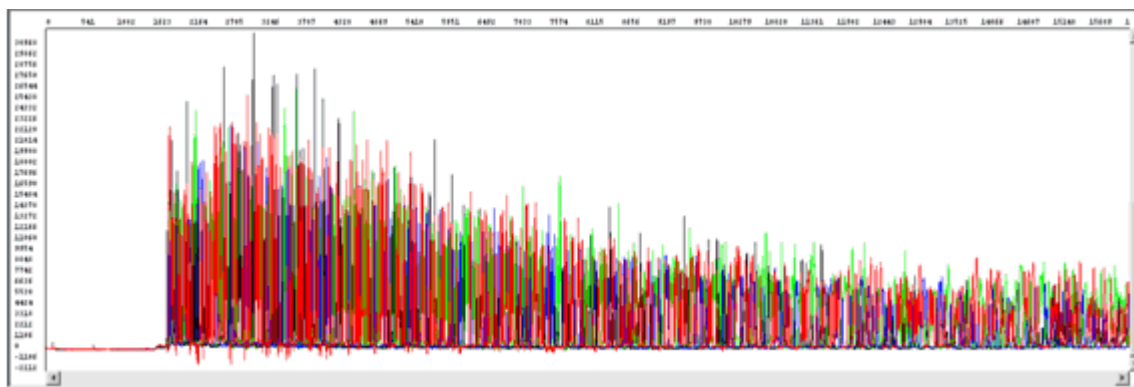


Bild 1: Rohdaten einer hochqualitativen DNA-Sequenzierung.

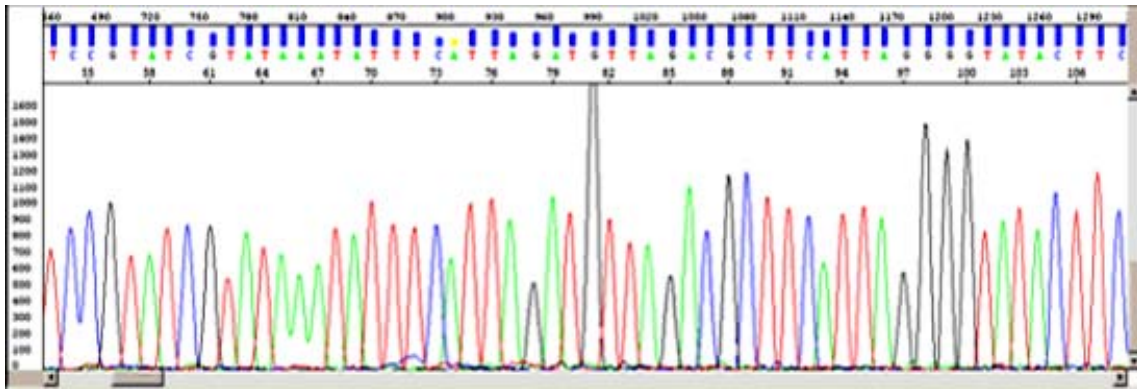


Bild 2: Chromatogramm einer hochqualitativen DNA-Sequenzierung.

Hochqualitative Sequenzierungen zeigen eindeutige, scharfe Peaks und ein sehr geringes Hintergrundrauschen.

Problem 1: Keine Sequenzierreaktion, keine Sequenzdaten:

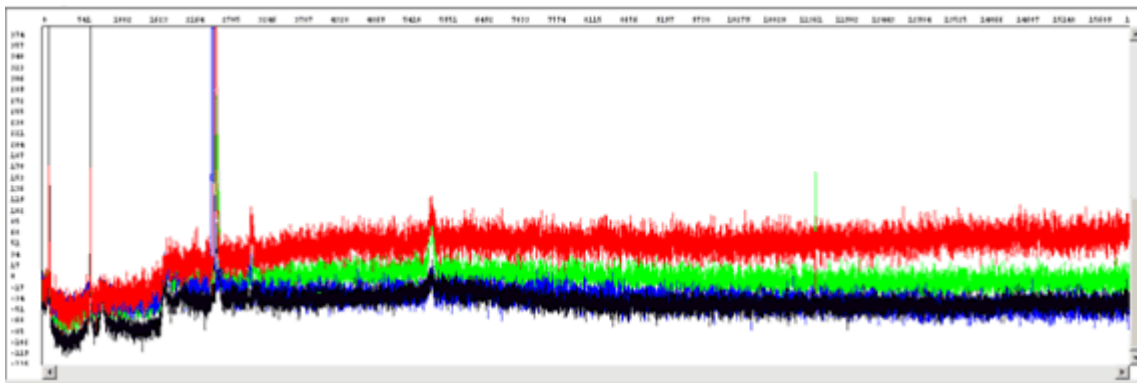


Bild 3: Rohdaten einer misslungenen Sequenzierreaktion. Beachten Sie den hohen Spike der auch in Bild 5 dargestellt ist. Er wird durch nicht eingebauten und nicht abgetrennten Fluoreszenzfarbstoff verursacht.

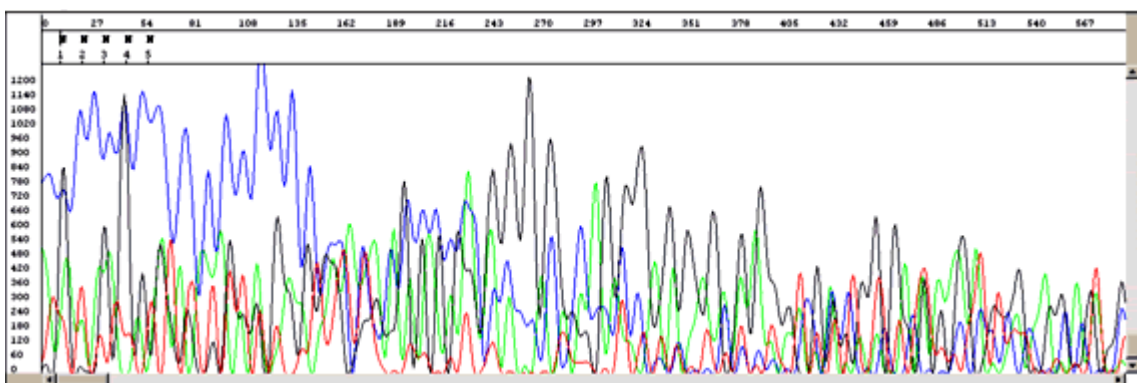


Bild 4: Chromatogramm des Anfangsbereiches der Reaktion aus Bild 3. Beachten Sie, dass keine Sequenzinformation vorhanden ist (kein Basecalling).

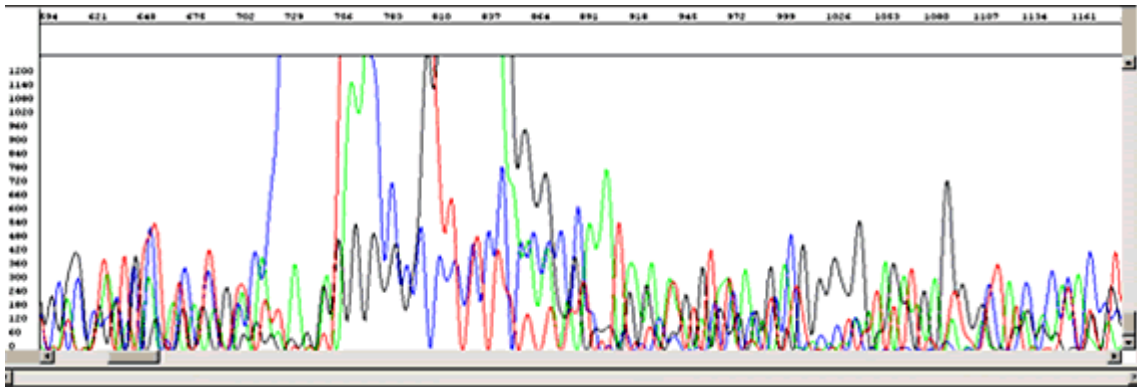


Bild 5: Chromatogramm der mißlungenen Reaktion aus Bild 2. Beachten Sie den großen "Dye blob", der ebenfalls in den Rohdaten in Bild 3 erkennbar ist. Die Peaks die man hier und in Bild 4 erkennen kann, ist Hintergrundrauschen, das von der Analysesoftware artifiziell verstärkt wurde.

Mögliche Ursache 1: Die Primerbindestelle ist nicht vorhanden

Lösung: Häufige Ursache bei Plasmidsequenzierungen. Falls Sie einen unserer Primer gewählt haben, überprüfen Sie bitte, ob dieser zu Ihrem Vektor passt. Überprüfen Sie nochmals Ihre Plasmidkarten und –sequenzen.

Falls Sie einen eigenen, sequenzspezifischen Primer aus vorhandenen Sequenzierdaten konstruiert haben, stellen Sie bitte sicher, dass die Primersequenz aus einer verlässlichen Sequenzierung abgeleitet wurde. Bitte beachten Sie auch unsere Hinweise zum Primerdesign unter Ausgangsmaterialien

Mögliche Ursache 2: Ungenügende Menge an DNA und/oder Primer

Lösung: Überprüfen Sie Ihre Konzentrationsbestimmungen, die Konzentrationen der Stammlösungen und die Verdünnungen. Obwohl ein Sequencer sehr empfindlich ist und einen großen Bereich von DNA-Konzentrationen detektieren kann, gibt es trotzdem immer noch eine "Mindestmenge" von Template und Primer, die in der Reaktion vorhanden sein muss, um eine erfolgreiche Sequenzierung zu gewährleisten.

Mögliche Ursache 3: Inhibitorische, kontaminierende Substanz

Lösung: Die cycle-sequencing Reaktion ist sehr empfindlich bezüglich der Anwesenheit bestimmter Kontaminanten, von denen einige die Polymerase auch komplett inhibieren können. Salze, EDTA, Alkohol, Protein, RNA, Detergentien, Cäsium und Phenol sind einige der am häufigsten beobachteten Kontaminanten, die einen negativen Effekt auf die Sequenzierreaktion, bzw. das verwendete Enzym haben. Unter Umständen muss das Template neu präpariert werden, um eine oder mehrere kontaminierende Substanzen ausreichend zu entfernen, und so eine erfolgreiche Sequenzierreaktion zu ermöglichen.

Problem 2: Mehrere, sich überlagernde Peaks:

Das Auftreten von sich überlagernden Peaks innerhalb einer Sequenz kann verschiedene Gründe haben. Um den genauen Grund bestimmen zu können, achten Sie bitte auf zwei Dinge – von welcher Position an sich die Peaks überlagern und auch auf die mittlere Signalstärke der Probe. Proben mit niedriger Signalstärke können ein künstlich erhöhtes Hintergrundrauschen erzeugen, die wie multiple, sich überlagernde Signale aussehen. Falls die mittlere Signalstärke jedoch hoch ist, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Beobachtung: Multiple, sich überlagernde Peaks vom Anfang der Sequenz an:

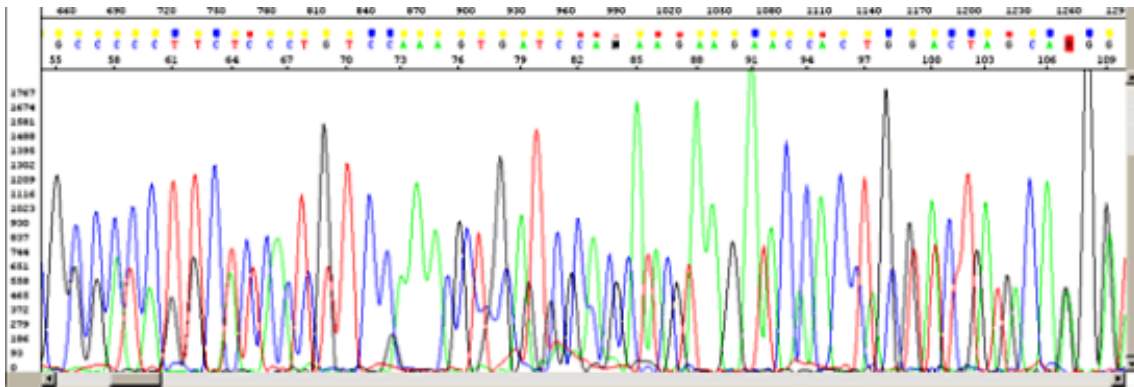


Bild 6: Sich überlagernde Peaks vom Beginn der Sequenz an.

Möglicher Grund 1: Multiple Primerbindestellen im Vektor. Der verwendete Sequenzierprimer könnte eine zweite Bindestelle auf dem Plasmid haben, die entweder identisch oder sehr ähnlich zu der Zielsequenz ist. Die Nukleotidsequenzen, die im Anschluß an die zwei Primerbindestellen folgen, sind unterschiedlich, dies führt zu sich überlagernden Peaks im Chromatogramm. Falls die Primerbindestellen identisch sind, sind die Doppelpeaksignale vom Anfang der Sequenzierung an in etwa gleich intensiv. Die Fragmente können auch ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen, so dass die Doppelpeaks nicht deckungsgleich übereinander liegen, sondern leicht gegeneinander verschoben sind. In anderen Fällen kann die zweite Primerbindestelle von der Zielsequenz in ein paar internen Positionen abweichen. In diesem Fall bindet der Primer nicht mit der gleichen Effektivität wie an die Zielsequenz. Dennoch ist eine Bindung und nachfolgende Extension möglich, die Folge davon ist eine zweite Sequenz geringerer Intensität, die unter der Hauptsequenz mitläuft.

Lösung: In beiden Fällen ist es wichtig, im gesamten Templatekonstrukt nach Sequenzen zu suchen, die zu der Primersequenz identisch oder zumindest sehr ähnlich sind. In diesem Fall sollte ein alternativer Sequenzierprimer gewählt, bzw. konstruiert werden. Wenn die Konstruktion eines alternativen Primers schwierig ist (z.B. beim "primer walking" durch einen repetitiven Sequenzbereich), versuchen Sie einen Primer zu finden, der eine (oder besser mehrere) Basen am 3'-Ende hat, die spezifisch zur Zielsequenz sind und damit als eine Art „Anker“ wirken kann.

Möglicher Grund 2: Multiple Primerbindestellen bei der Generierung von PCR-Produkten.

Lösung: Dies tritt auf, wenn einer oder beide PCR-Primer an mehr als eine Position auf der Template DNA binden und demzufolge multiple PCR-Produkte entstehen. Im allgemeinen können solche unerwünschten Nebenprodukte identifiziert werden, wenn man die PCR-Reaktion auf einem Agarosegel auftrifft. Unterscheiden sich die PCR-Produkte in der Größe, so sollte das Zieltemplate aus dem Agarosegel aufgereinigt werden. Sind die PCR-Produkte in ihrer Größe jedoch sehr ähnlich oder gar gleich, trennen sie sich nicht gut im Gel auf. In diesem Fall sollte die Optimierung der PCR-Bedingungen, ein Redesign der Primer oder eine Klonierung des Produktes in Erwägung gezogen werden.

Möglicher Grund 3: Einer der PCR-primers funktioniert als forward und reverse primer.

Lösung: In diesem Fall wird mit einem Primer eine Doppelsequenz erhalten, während der andere Primer eine negative Sequenzierreaktion ergibt. In diesem Fall müssen die PCR primers neu designed werden.

Möglicher Grund 4: Aus der PCR-Reaktion verbleibende Primer und/oder dNTPs

Lösung: Es ist von entscheidender Wichtigkeit, überschüssige Primer und dNTPs aus der PCR-Reaktion zu entfernen, da verbleibende Primer in der nachfolgenden Sequenzierreaktion zu Signalüberlagerungen führen können. Falls eine direkte Sequenzierung eines PCR-Produkts ohne vorherige Aufreinigung vorgenommen werden soll, indem ein Aliquot der PCR-Reaktion verdünnt für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, um auf diese Weise die Konzentration verbleibender Primer und dNTPs zu verringern (eine Methode, die wir ausdrücklich NICHT empfehlen), ist es unabdingbar, die PCR dahingehend zu optimieren, daß Primer und dNTP nicht im Überschuss zugegeben werden, so dass diese am Ende der PCR-Reaktion zum größten Teil verbraucht sind.

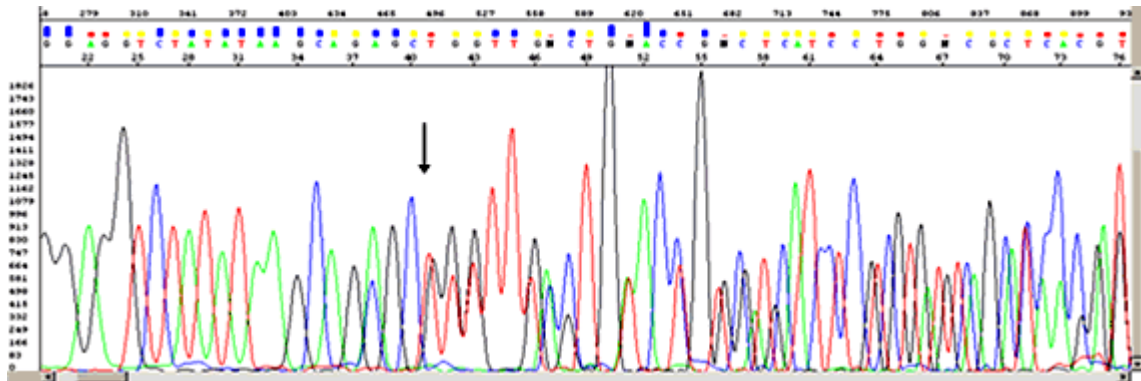
Möglicher Grund 5: Primer mit hohem Schmelzpunkt

Lösung: Primer mit sehr hohem Schmelzpunkt ($T_m > 65^\circ\text{C}$) sind keine empfehlenswerten Sequenzierprimer. Primer mit solch hohem Schmelzpunkt sind oftmals G-C reich oder aber sehr lang. Beides sind Faktoren, die die Möglichkeit des Primers, Sekundärstrukturen auszubilden, erhöhen. In diesem Fall empfehlen wir, Primer mit niedrigerem Schmelzpunkt zu designen. Mit der nachfolgenden

Formel kann man eine gute Näherung des Schmelzpunktes berechnen:

$$T_m = 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C}(\text{G}+\text{C})$$

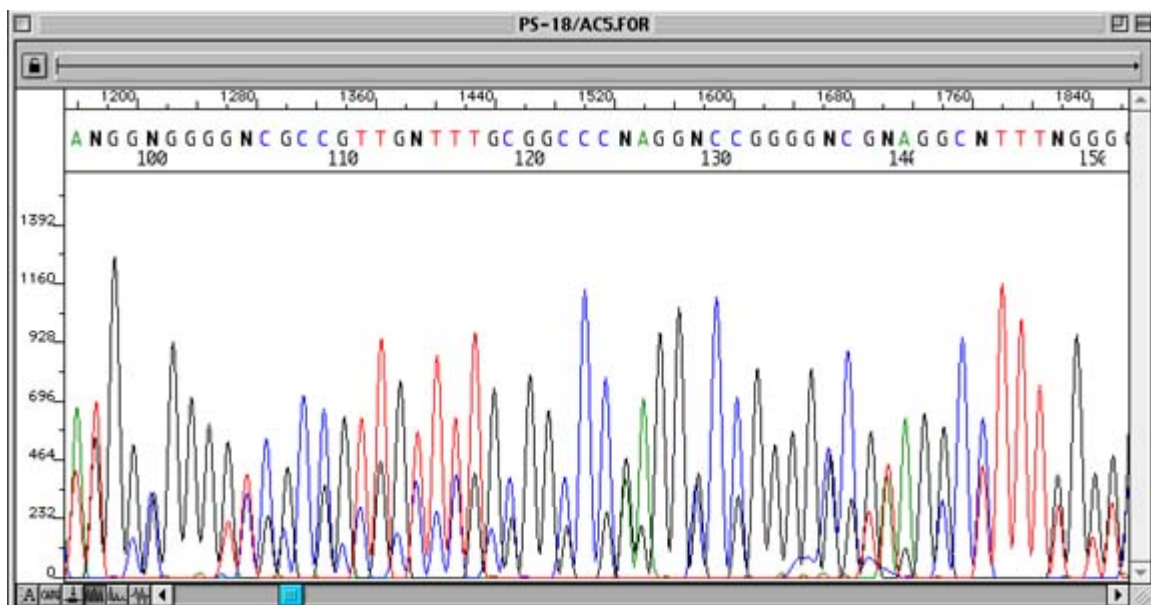
Problem 3: Überlagernde Peaks beginnen innerhalb der Sequenz:



Grund: Mehrere Plasmide in einer Präparation

Lösung: Eine Plasmidpräparation, die mehr als ein Plasmid enthält (so z.B. zwei Vektoren mit unterschiedlichen Inserts, oder ein Vektor mit Insert, ein Vektor ohne) zeigen anfänglich eine klar lesbare Sequenz (Sequenzabschnitt, der bei beiden Vektoren gleich ist), gefolgt von einer Sequenz mit sich überlagernden Signalen. Selten treten spontane Deletionen oder Insertionen in Plasmiden während des Wachstums des Wirtsstammes auf. Es ist sehr wichtig, wirklich eine Einzelkolonie für die Plasmidpräparation zu picken. Im Zweifelsfall bietet sich ein weiterer Vereinzlungsausstrich an, um sicher zu gehen, dass es sich um einen Einzelklon handelt. Nach der Präparation sollte nochmals durch eine Restriktion überprüft werden, ob sich die erwarteten Banden zeigen.

Problem 4: N-1, N-2, N-3... Primer Signale:

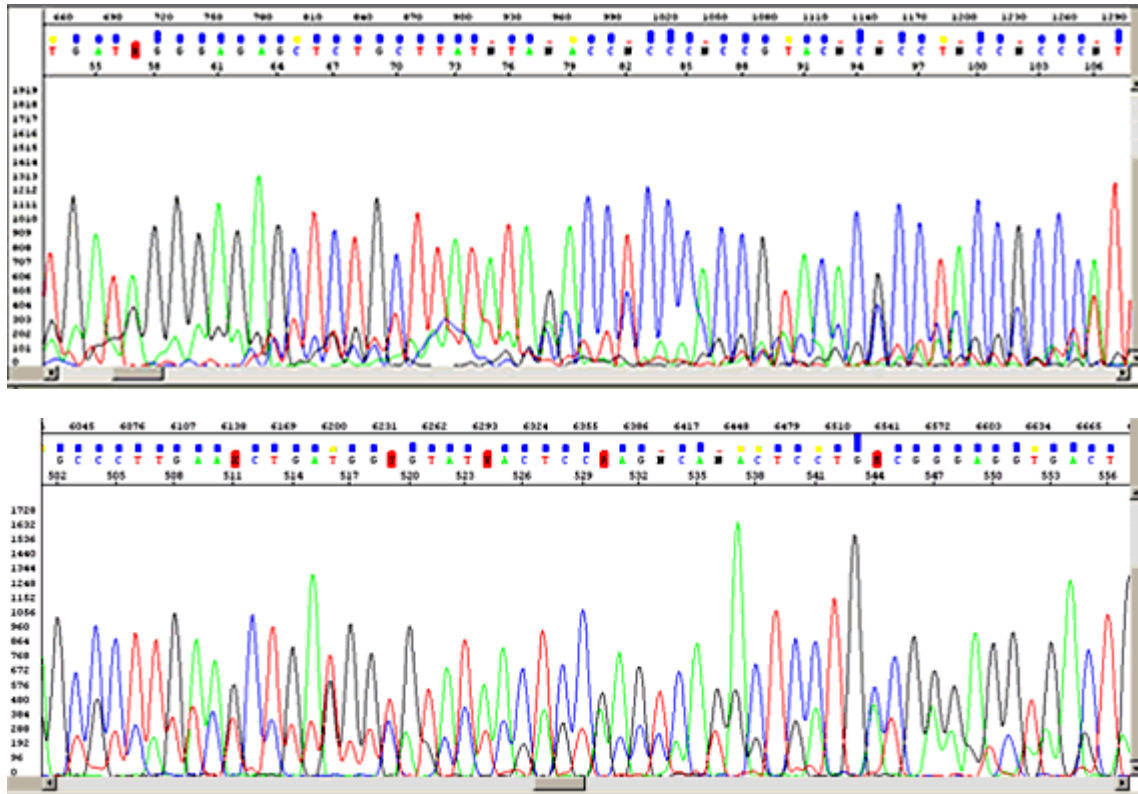


Beobachtung: Die Sequenz zeigt über die gesamte Länge überlagerte Signale. Hierbei ist der zweite (normalerweise kleinere) Peak dieselbe Base, wie die nächste echte Base, die rechts davon positioniert ist.

Grund: Eine ungenügende Aufreinigung von Primern während des Syntheseprozesses, hat einen gewissen Anteil an verbleibenden n-1meren des Primers zur Folge. Wenn dann das Template sequenziert wird, bindet eben auch dieser verbliebene Anteil von n-1meren am Template und ergibt eine Sequenzierreaktion, welche dann 1 Base kürzer ist, als sie sein sollte. Primer, die in Degradation begriffen sind, lösen sich vom 3'-Ende auf und führen dazu, dass ein Teil des originalen Sequenzierprimers n-1 wird.

Lösung: In jedem Fall sollten n-1 Primer nachsynthetisiert werden, um einen Primer zu erhalten, der für die Sequenzierung geeignet ist. Durch korrekte Lagerung kann man die Hydrolyse eines Primers hinauszögern. Wir empfehlen, die Primer als 100 pmol 1xTE-Stocks bei -18°C zu lagern und vor jeder Sequenzierung aus den Stocks frische Verdünnungen anzusetzen. Primer aus Verdünnungen nicht länger als 4 Wochen benutzen. Werden Primer oft benutzt, empfehlen wir, die Stocklösungen zu aliquotieren.

Problem 5: Hoher Hintergrund/Verrauschtes Sequenziersignal:



Beobachtung: "Verrauschte" Sequenzen sind leicht an den multiplen Peaks und einer hohen Anzahl an "N"s innerhalb der Sequenzen zu erkennen. Die Sequenzanalyseprogramme weisen dann ein "N" als Basenidentifikation aus, wenn an einer gegebenen Position zwei oder mehrere Peaks auftreten. Ein "N" kann das tatsächliche Auftreten zweier Nukleotide anzeigen, beispielsweise im Falle einer heterozygoten Probe. Es tritt aber auch auf, wenn multiple Produkte oder ein hoher Hintergrund vorhanden sind. Wenn die Signalstärke einer Probe schwach ist, versucht die Software das zu kompensieren, indem sämtliche Signale auf detektierbare Level angehoben werden. Dadurch werden aber auch die Hintergrundsignale künstlich angehoben, was in einem schlechten Signal/Noise Verhältnis resultiert. Hintergrundrauschen besteht aus vielen kleinen unspezifischen Peaks, die unter den Peaks der Zielsequenz laufen. Dieser Hintergrund ist immer vorhanden, wird aber bei guten Proben mit hoher Signalstärke nicht detektiert.

Möglicher Grund 1: Nicht genügend DNA

Lösungen: Überprüfen Sie Ihre Konzentrationsbestimmungen, die Konzentrationen der Stocklösungen, Ihre Berechnungen und Verdünnungen. Bitte beachten Sie, dass wir in etwa 150-500ng (je nach Größe des Templates) DNA für eine Reaktion benötigen und dass die DNA Konzentration zwischen 50 und 100ng/µl betragen sollte.

Möglicher Grund 2: Inhibitorische Kontaminanten, wie z.B. Salze oder Phenol.

Lösungen: Die Cycle-sequencing Reaktion ist sehr empfindlich hinsichtlich der Anwesenheit bestimmter Kontaminanten, von denen manche die Polymerase teilweise oder gar komplett inhibieren können. Versuchen Sie in diesem Fall, das Template neu zu präparieren, um eine oder mehrere inhibitorische Komponenten zu entfernen und so eine bessere Sequenz zu erhalten.

Möglicher Grund 3: Degradierte DNA infolge der Einwirkungen von Nukleasen, wiederholtem

Einfrieren/Auftauen, exzessiver Exposition gegenüber UV-Licht oder Bisulfit-Behandlung.

Lösungen: Nuklease Kontaminationen in einer Template Präparation oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen kann die DNA mit der Zeit zersetzen. Bereits geringe Mengen an Nukleasen können DNA weitgehend zersetzen, abhängig von den Lagerbedingungen, -temperaturen und -zeit. Im Allgemeinen führt dann eine Re-Isolation und Reinigung der template DNA zu einem besseren Sequenzierergebnis. Wenn PCR Produkte aus einem Agarosegel isoliert werden, führt eine lange Exposition der DNA gegenüber UV-Licht zur Einzelstrangbrüchen oder Zersetzung der DNA. Minimieren Sie die Expositionszeit und die UV-Intensität, um einer Degradation der DNA entgegen zu wirken. Wird die DNA für Methylierungsexperimente mit Bisulfit behandelt, ist ebenfalls darauf zu achten, lange Inkubationszeiten bei hohen Temperaturen zu vermeiden, da sonst substantielle Mengen an DNA in diesem Prozess zerstört werden.

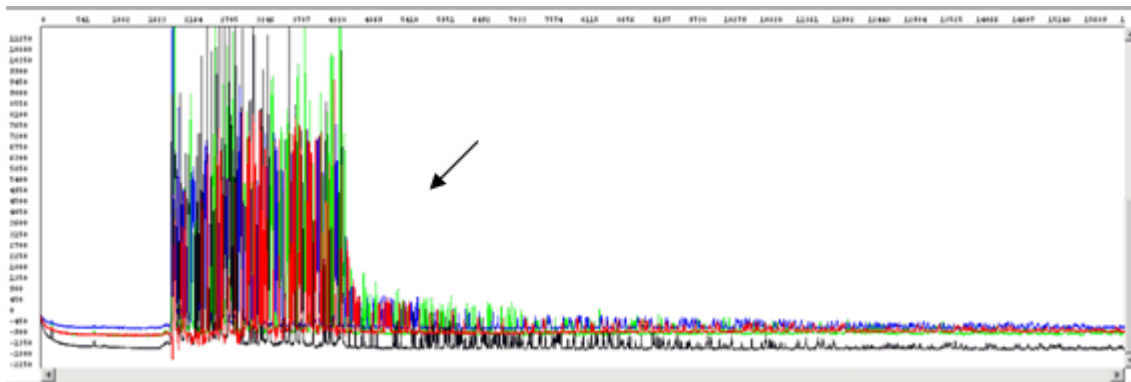
Möglicher Grund 4: Ineffiziente Primerbindung (niedriger Tm, degenerierte Primer, Fehlpaarungen)

Lösungen: Der Tm eines Primers ist definiert als die Temperatur, bei der 50% des Oligonukleotids und seinem komplementären Partner als Duplex vorliegen. Der Tm eines Oligos kann grob über die folgende Formel bestimmt werden:

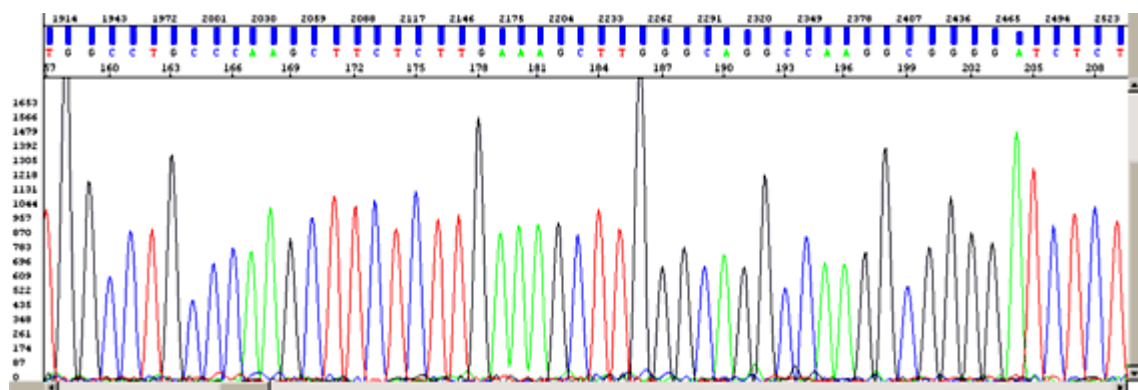
$$Tm = 2^{\circ}C(A+T) + 4^{\circ}C(G+C)$$

In unserem Standard Cycle Sequencing Protokoll findet das Primer/Template annealing bei 50°C statt. Falls der Tm des verwendeten Primers viel niedriger als 50°C ist, ist die Hybridisierung an das zur Primersequenz komplementäre Template sehr viel weniger effizient, demzufolge wird auch eine geringere Anzahl and verlängerten Fragmenten erzeugt. Bitte erhöhen Sie in einem solchen Fall den Tm Ihres Primers auf ca. 52°C-58°C, indem Sie entweder an das 3'- oder das 5'-Ende des Primers noch Basen anfügen. Degenerierte Primer und Primer mit Fehlpaarungen (mismatches) hybridisieren ebenfalls mit geringerer Effizienz aufgrund der reduzierten Stabilität der Primerbindung. Falls die Fehlpaarungen, bzw. die degenerierten Basen am oder nahe des 3'-Terminus Ihres Primers auftreten, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sequenzierung fehlschlägt oder ein schlechtes Ergebnis produziert.

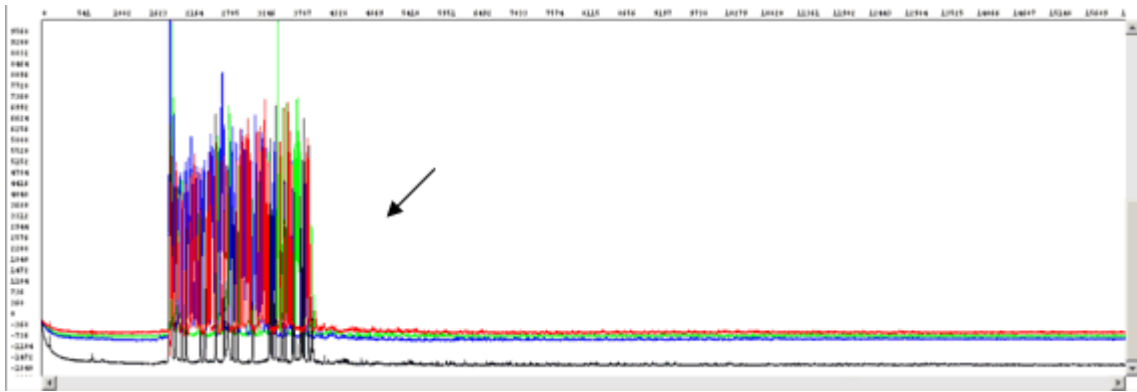
Problem 6: Verkürzte Sequenz (Sekundärstruktur):



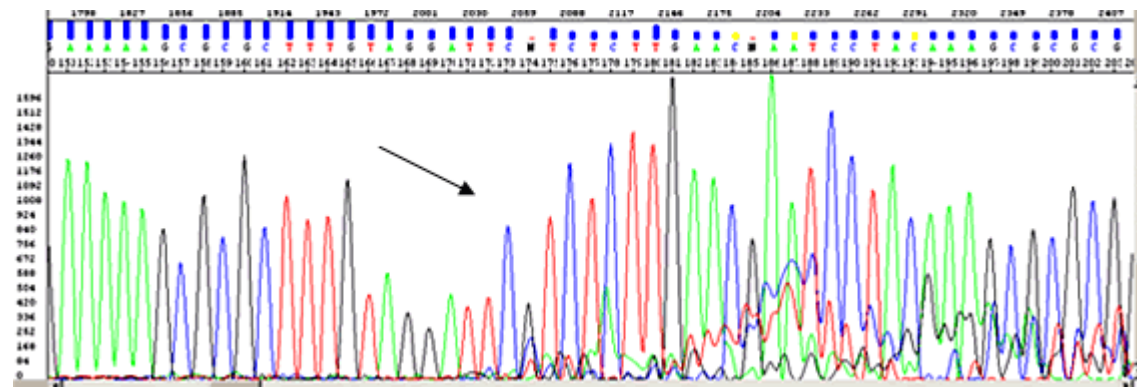
Rohdaten einer Sequenz, die eine Sekundärstruktur enthält. Obwohl die Signalintensität stark abfällt, wird die Sequenz in diesem Fall durchgelesen.



Dies ist das zu den obigen Rohdaten gehörige Chromatogramm. Man sieht den Abfall der Signalintensität hier nicht, da die Analysesoftware optional die Peaks künstlich erhöhen kann, so dass sie gleich hoch erscheinen.



Dies sind die Rohdaten einer Sequenz mit einer starken Sekundärstruktur. Die Sequenz stoppt fast komplett an dem Punkt, an dem die Sekundärstruktur beginnt.



Das Chromatogramm des obigen Bildes. Durch den Pfeil markiert, sieht man, dass die Qualität der Sequenz sofort am Beginn der Sekundärstruktur abfällt. Die zu sehenden Peaks bestehen aus Restsignal, das sich mit dem Hintergrundrauschen mischt. Die Signale sind wieder künstlich durch das Analyseprogramm angehoben.

Beobachtung: Abrupte Abbrüche sind charakterisiert durch starke, klare Signale bis zu einem bestimmten Punkt, ab dem sie stark abfallen und sich binnen weniger nachfolgender Nukleotide bis zu einem nicht mehr detektierbaren Signal abschwächen können.

Möglicher Grund 1: Sekundärstruktur des Templates.

Lösung: G-C reiche, und, in einem geringeren Maß, A-T reiche, DNA ist zur Ausbildung von Sekundärstrukturen prädestiniert, da die starken Wasserstoffbrücken zwischen G und C Nukleotiden die Bildung von Hairpin-Strukturen fördern, indem die DNA sich beispielsweise verbiegt oder ausloopt, so dass komplementäre Bereiche annealen können. Diese Hairpins können die Prozessivität der Polymerase hemmen, bzw. ganz beenden, so dass sich das Enzym vom Template löst und die Sequenzierung terminiert wird. Diese Hairpin-Strukturen schmelzen möglicherweise während unseres Standardsequenzierprotokolls nicht auf, so dass der dahinterliegende Bereich nicht mehr sequenziert wird. Wird die Sekundärstruktur nicht aufgelöst, so sieht man ein scharfes Terminationssignal und nachfolgend keinerlei Sequenzdaten mehr. Falls die Sekundärstruktur zumindest teilweise aufgelöst wird, beobachtet man nach dem starken Anfangssignal einen starken Abfall der Signalintensität, mit nachfolgend schwächeren Peaks, die jedoch noch klar definiert sind. Mit der neuesten BigDye Terminator Sequenzierchemie (v3.1), sind manche G-C assoziierten Probleme stark verbessert worden, allerdings werden nicht alle Probleme damit behoben. Es gibt keine Universallösung für sämtliche Probleme, die von Sekundärstrukturen verursacht werden. Die Zugabe von DNA denaturierenden Agentien zu den Sequenzierreaktionen kann helfen, die Duplexbildung zu schmelzen, so dass die Polymerase ungehindert passieren kann. Eine weitere Möglichkeit ist die Änderung des Cycle Sequencing Protokolls. Details zu diesen Lösungsmöglichkeiten stellen wir unseren Kunden gerne auf Anfrage zur Verfügung. Weitere Lösungsansätze sind: (1) Den Sequenzierprimer so nah wie möglich an den hairpin-Bereich zu positionieren, um dessen Entwindung zu fördern, war in einigen Fällen erfolgreich (2) Die Sequenzierung des Gegenstrangs kann manchmal eine starke Verbesserung bewirken. Falls diese Ansätze nicht erfolgreich sind, würden wir empfehlen, die DNA mit Restriktionsenzymen zu linearisieren, um so den hairpin zu schwächen.

Möglicher Grund 2-Linearisierte DNA

Lösung- Falls die Template DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten wurde, oder

Beobachtung: Im Allgemeinen, erscheinen dye blobs als breite, undefinierte Peaks einer einzelnen Farbe auf, die tatsächlichen Peaks an dieser Stelle sind meist unter den Dye blobs zu erkennen. Dye blobs treten normalerweise recht früh in der Sequenz auf, ca. um Position 70.

Grund: Dye blobs werden von nicht eingebauten Dye-Terminator Molekülen verursacht, die durch den Aufreinigungsprozess nicht abgetrennt worden sind, in Lösung verbleiben mit den aufgereinigten Sequenzierprodukten auf den Sequencer geladen werden.

Lösung: Dye blobs werden meist in Proben mit geringer Signalstärke beobachtet. Proben mit schwachem Signal beinhalten entweder 1) nicht genügend DNA, so dass weniger Ausgangstemplate für die Amplifikations- und Labellingreaktion vorhanden ist, demzufolge bleibt nach Abschluss des Protokolls ein größerer Anteil an nicht eingebauten Farbstoffmolekülen übrig; oder 2) kontaminierende Substanzen, die die Sequenzierreaktion inhibieren. Es wird spekuliert, dass bestimmte Kontaminanten präferentiell an die Farbstoffmoleküle binden. Wir haben allerdings auch beobachtet, dass bestimmte Kundenproben, teilweise abhängig von der Art der Templatreinigung, eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzen, Dye blobs zu produzieren, unabhängig von der Signalstärke. Bei sehr schwachen Proben kann man meist nicht viel unternehmen, um die Sequenzierdaten zu verbessern. Bei Proben mit mittlerer oder hoher Signalintensität führt eine Wiederholung mit weniger Ausgangstemplate oftmals zu einer verringerten Intensität der Dye blobs, somit können dann die korrekten Signale während der Editierung besser zugeordnet und somit die Sequenz korrigiert werden. Gute Erfolge erzielt man auch mit der Verwendung des X-Terminator-Kits (Applied Biosystems).

Problem 9: Spikes:

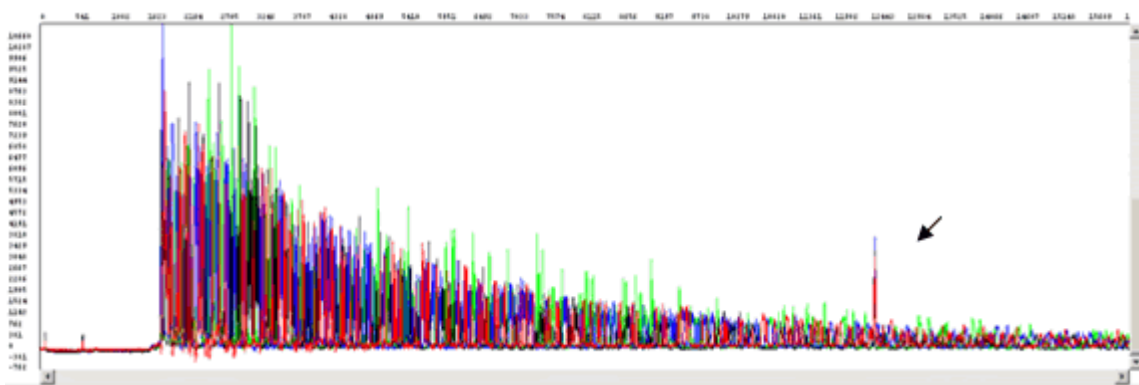


Bild 9-1 Rohdaten einer Sequenz mit einem Spike.

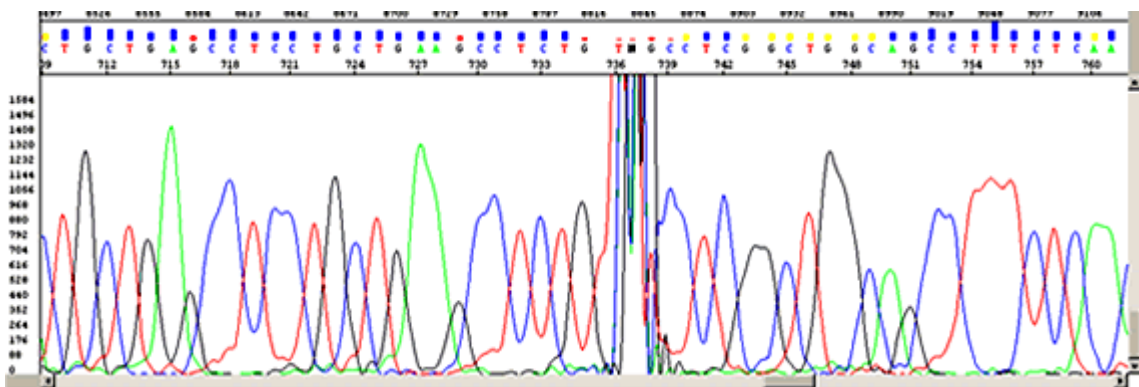


Bild 9-2 Chromatogramm von Bild 9-1.

Beobachtung: Spikes sind vielfarbige, kondensierte Peaks innerhalb der Sequenz, die normalerweise nur eine oder zwei Nukleotide überdecken.

Grund: Spikes werden entweder von kleinen Luftblasen in der Polymerlösung oder von kleinen, auspolymerisierten Polymerpartikeln verursacht, die beim Injizieren in die Kapillaren gelangen. In Proben mit geringer Signalstärke sind sie ausgeprägter als in Proben mit hoher Signalstärke.

Lösung: Spikes tauchen bei Reinjektion derselben Probe im Allgemeinen nicht mehr auf, so dass das Problem mit einer Reinjektion der Probe gelöst wird.

Problem 10: Chromatogramm zeigt verbreiterte, gestreute Peaks:

Bild 11-1: Verschlechterung der Datenqualität nach einer polyT Region.

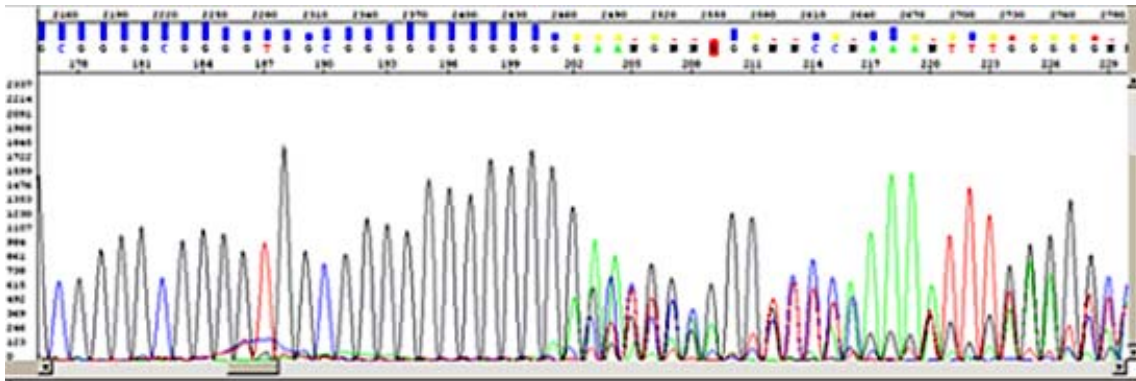


Bild 11-2: Verschlechterung der Datenqualität nach einer polyG Region.

Beobachtung: Die beiden Bilder zeigen die drastische Verschlechterung der Sequenzqualität nach einem polyT Bereich (Bild 11-1) und einem polyG Bereich (Bild 11-2). Die Sequenz bis zur Polynukleotidregion kann sehr gut und klar sein, jedoch die letzte Base des Repeats und alle folgenden Peaks können ein wellenförmiges, "stotterndes" Muster an Doppelsignalen aufweisen, was sich nicht mehr eindeutig interpretieren lässt. In PCR-Produkten oder anderen linearen Templates ist dieser Effekt meist sehr stark, er kann aber auch in Plasmiden auftreten, speziell dann, wenn beispielsweise der polyA Bereich von cDNA sequenziert wird.

Grund: Es wird angenommen, daß diese Schwierigkeiten durch "Rutschen" ("slippage") der Polymerase verursacht wird, wenn der wachsende Strang während der Elongation der Homopolymerregion nicht mehr korrekt mit dem Templatestrang hybridisiert. Hierdurch entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge mit der gleichen Sequenz nach der Homopolymerregion.

Lösung: Für die Sequenzierung klonierter DNA mit einer Homopolymerregion gibt es mehrere Optionen, die zu einem erfolgreichen Ergebnis führen können. Beispielsweise kann die Sequenzierung des Gegenstranges erfolgreicher sein, insbesondere wenn es sich um eine polyG Region handelt. Eine polyC Region läßt sich oftmals besser sequenzieren. Oligo dT(15-20T) oder dA(15-20A) Primer, die entweder eine definierte oder eine Wobble Base (A/T, G oder C) am 3'-Ende besitzt, hybridisieren am Ende der Homopolymerregion und ergeben eine eindeutige Folgesequenz. Wir besitzen jeweils vier polyT (T19A, T19C, T19G, T19V) Primer und vier polyA (A19C, A19G, A19T, A19B) Primer, die wir unseren Kunden kostenlos zur Verfügung stellen. Manchmal kann auch ein Primer, der nahe des Homopolymers bindet, Abhilfe schaffen, da die Nukleotidkonzentration und die Enzymaktivität am Anfang der Reaktion, wenn die kürzeren Fragmente verlängert werden, sich in einem optimaleren Verhältnis befinden. Schließlich kann das Cycle sequencing Protokoll noch etwas modifiziert werden, was ebenfalls manchmal bei homopolymeren Templates erfolgreich ist. Bei PCR-Produkten, die homopolymere Bereiche enthalten, können ähnliche Ansätze versucht werden, aber in einigen Fällen wird es notwendig sein das PCR-Produkt zu klonieren, um über diese Bereiche sequenzieren zu können.

Problem 12: Kurze Leseweite, progressiv abnehmende Signalintensität:

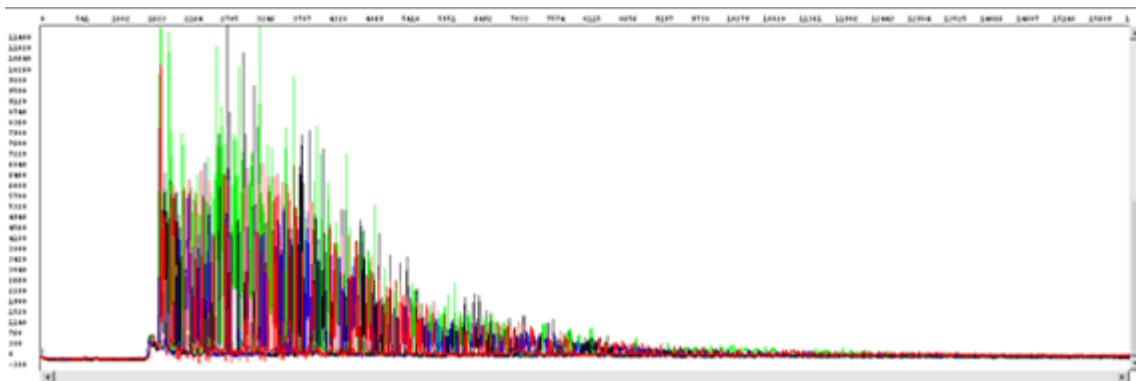


Bild 12-1 Rohdaten einer Sequenzierung mit sich rapide verschlechterndem Signal.

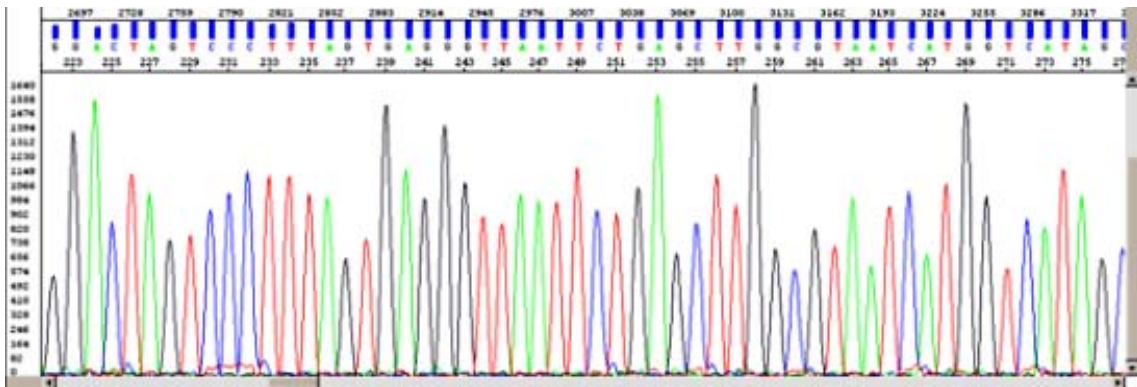


Bild 12-2 Chromatogramm: Der Sequenzanfang von Bild 12-1. Die Peaks sind eindeutig und gut aufgelöst.

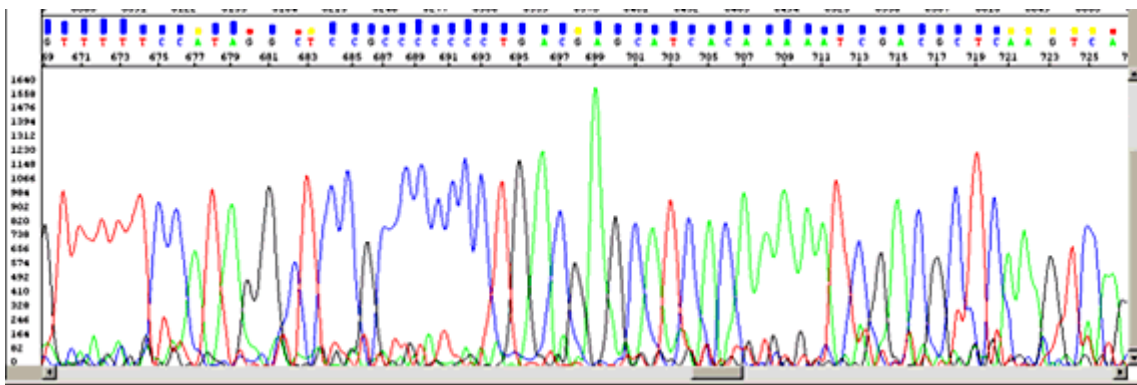


Bild 12-3 Chromatogramm: Der mittlere Teil der Sequenz aus Bild 12-1. Der Hintergrund ist erhöht, die Signalqualität wird niedriger.

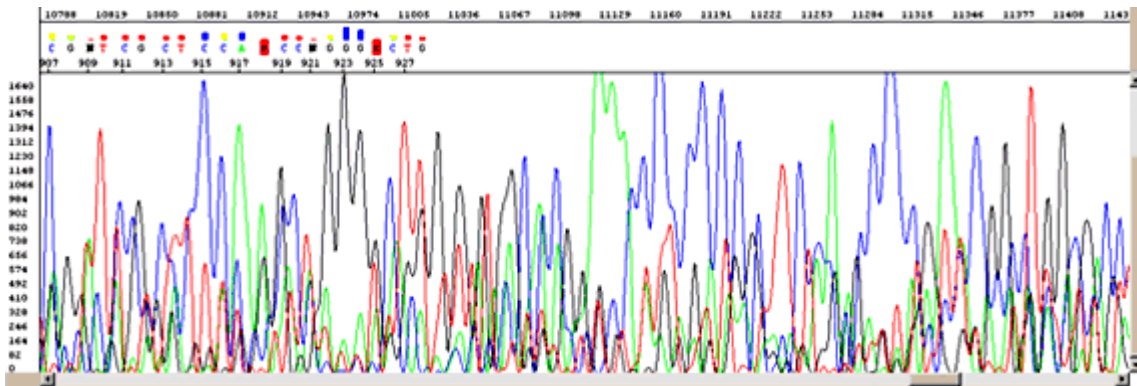


Bild 12-4 Chromatogramm: Der hintere Teil der Sequenz aus Bild 12-1. Die Peaks gehen im Hintergrundrauschen unter, das Basecalling terminiert.

Beobachtung: Die oberen Bilder zeigen eine Sequenz, die mit guten Signalen beginnt, die Signalintensität schwächt sich jedoch zu früh ab und schwindet allmählich bis zum Level des Hintergrundrauschens.

Grund: Es gibt drei mögliche Gründe für das beschriebene Signalmuster: 1) Zuviel Template. Wenn zu viel Template in die Reaktion eingesetzt wird, werden die fluoreszierenden Substrate (BigDye) bereits am Anfang der Cycle-sequencing Reaktion überdurchschnittlich verbraucht, demzufolge ist für längere Extensionen weniger BigDye vorhanden; 2) Es wurde wenig Template eingesetzt, deshalb werden die meisten Templates werden am Anfang der Reaktion verbraucht; 3) Salzkontamination. Salzkontamination alleine ist kein großes Problem, kann aber in Kombination mit Spuren anderer Kontaminanten die Genauigkeit beeinflussen und die Leseweiten verkürzen. Sehr hohe Mengen an Salz führen zu vorzeitiger Termination mit starkem Signal, gefolgt von sich progressiv abschwächendem Signal. Salze haben einen inhibierenden Effekt auf die Prozessivität der verwendeten Polymerase, die zu einer Fülle an kurzen Fragmenten führt. Falls die Salzkonzentration extrem hoch ist, wird das Enzym komplett inhibiert und es werden keine Sequenzdaten erhalten.

Lösung: Es ist schwierig zu bestimmen, welcher der oben beschriebenen Gründe und Faktoren für den progressiven Abfall der Signalintensität verantwortlich ist, ohne einen Test durchzuführen. Wir

wiederholen in einem solchen Fall die Reaktion entweder unter Zugabe von mehr oder weniger DNA Template. Wenn das gleiche Muster wieder auftritt, empfehlen wir unseren Kunden, das Template noch einmal mit 70% Isopropanol zu reinigen und zu trocknen, bevor die DNA in destilliertem Wasser resuspendiert wird.

Nachfolgend ein Beispiel für eine erhöhte Leseweite infolge weniger eingesetztem Template:

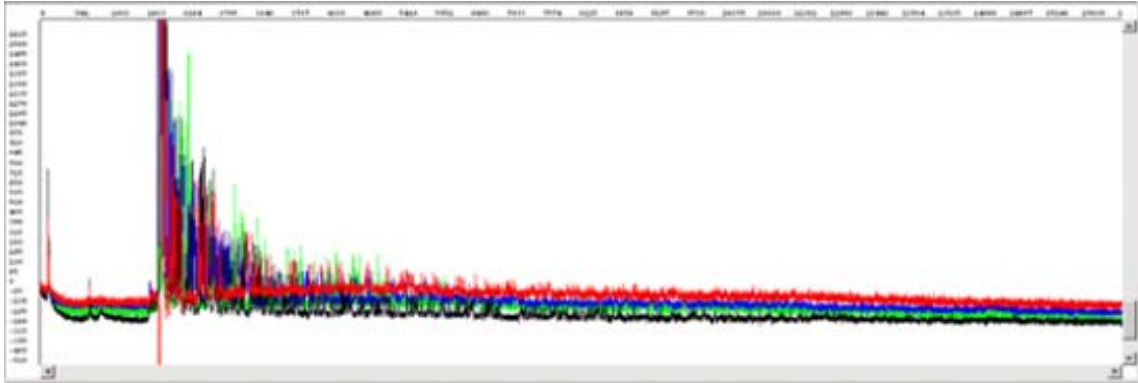


Bild 12-5: Rohdaten einer Reaktion mit 6 μ l eingesetztem Template. Die Template Konzentration ist 100 ng/ μ l, demzufolge wurden 600ng Template in die Reaktion eingesetzt.

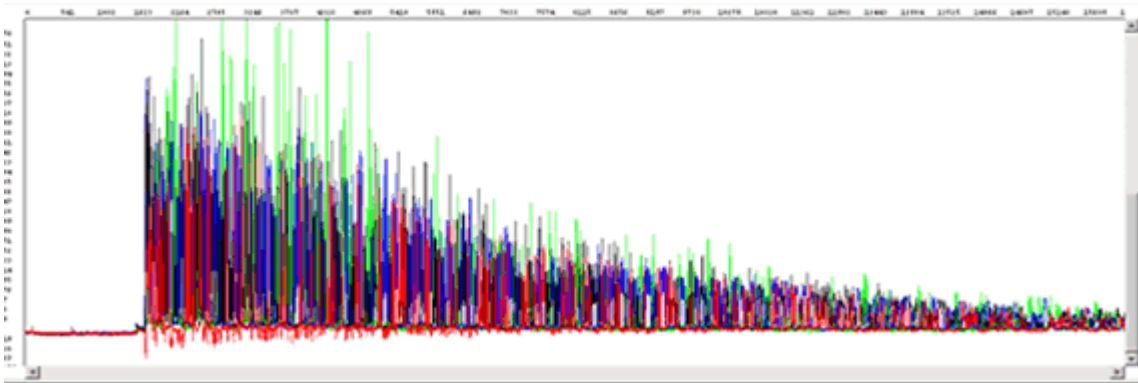


Bild 12-6: Die Reaktion aus Bild 12-5 wurde mit 4 μ l Template (400ng) wiederholt, die Rohdaten sind hier dargestellt. So wird eine wesentlich höhere Leseweite erreicht.