

# Sequences troubleshooting



T T G G C G T A A T C A T G G T C A T A G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T G T T A T C C  
90 100 110 120 130

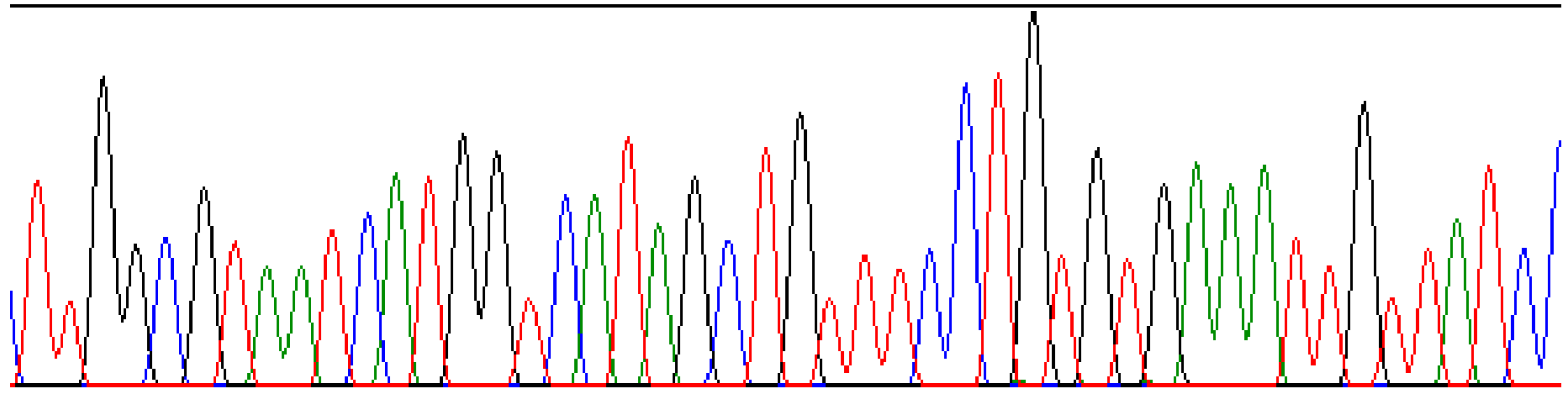
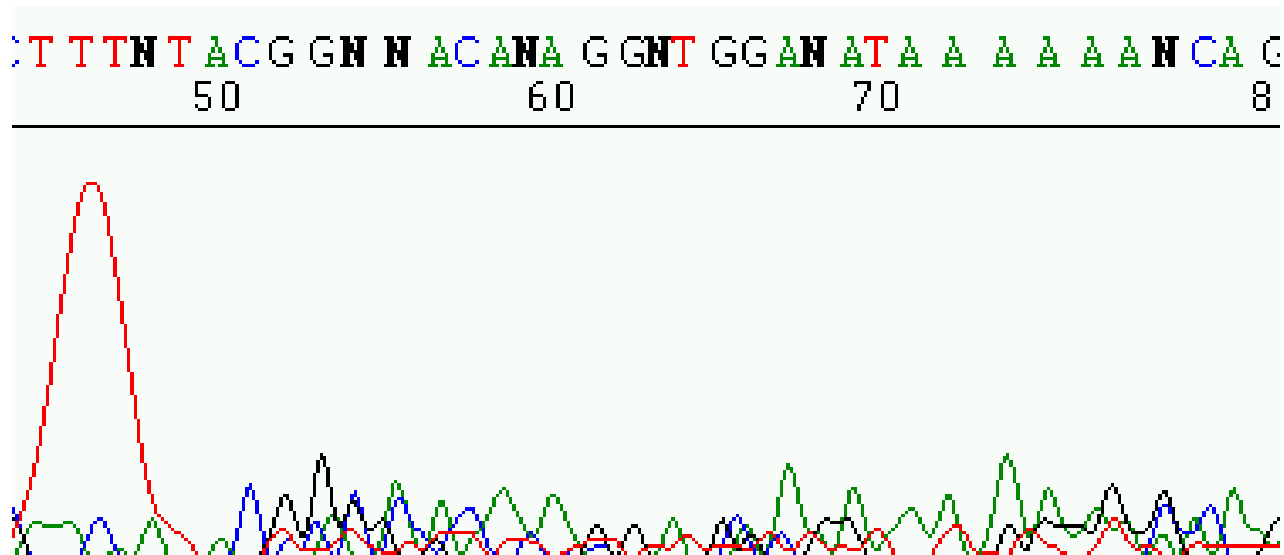


Immagine di una sequenza ben riuscita.

# Sequenza fallita



Reazione fallita: non presenta picchi definiti e ha un alto rumore di fondo.

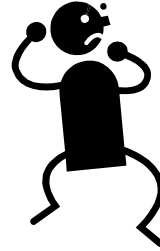
## Possibili cause

- il primer non trova sito di annealing
- il DNA presenta contaminazioni di vario tipo
- la quantità di DNA e' insufficiente
- la quantità di primer è insufficiente
- il primer è stato disegnato male, es. temperatura di melting troppo bassa
- altri problemi riconducibili al Sequenziamento

## Possibili soluzioni

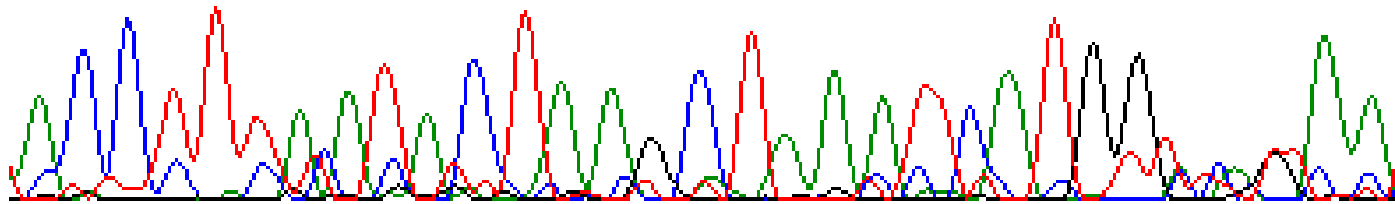
- cambiare primer
- ripreparare il DNA
- aumentare la quantità di DNA
- aumentare la quantità di primer
- ridisegnare il primer
- verificare il pGem di controllo.

# Sequenza con ? alto background



A C C T T T A A T A C T A A G C T A A A T C A T G G N C N A A

140 150 160



Campione che presenta rumore di fondo sufficientemente alto da causare ambiguità (N) nel riconoscimento dei picchi da parte del software.

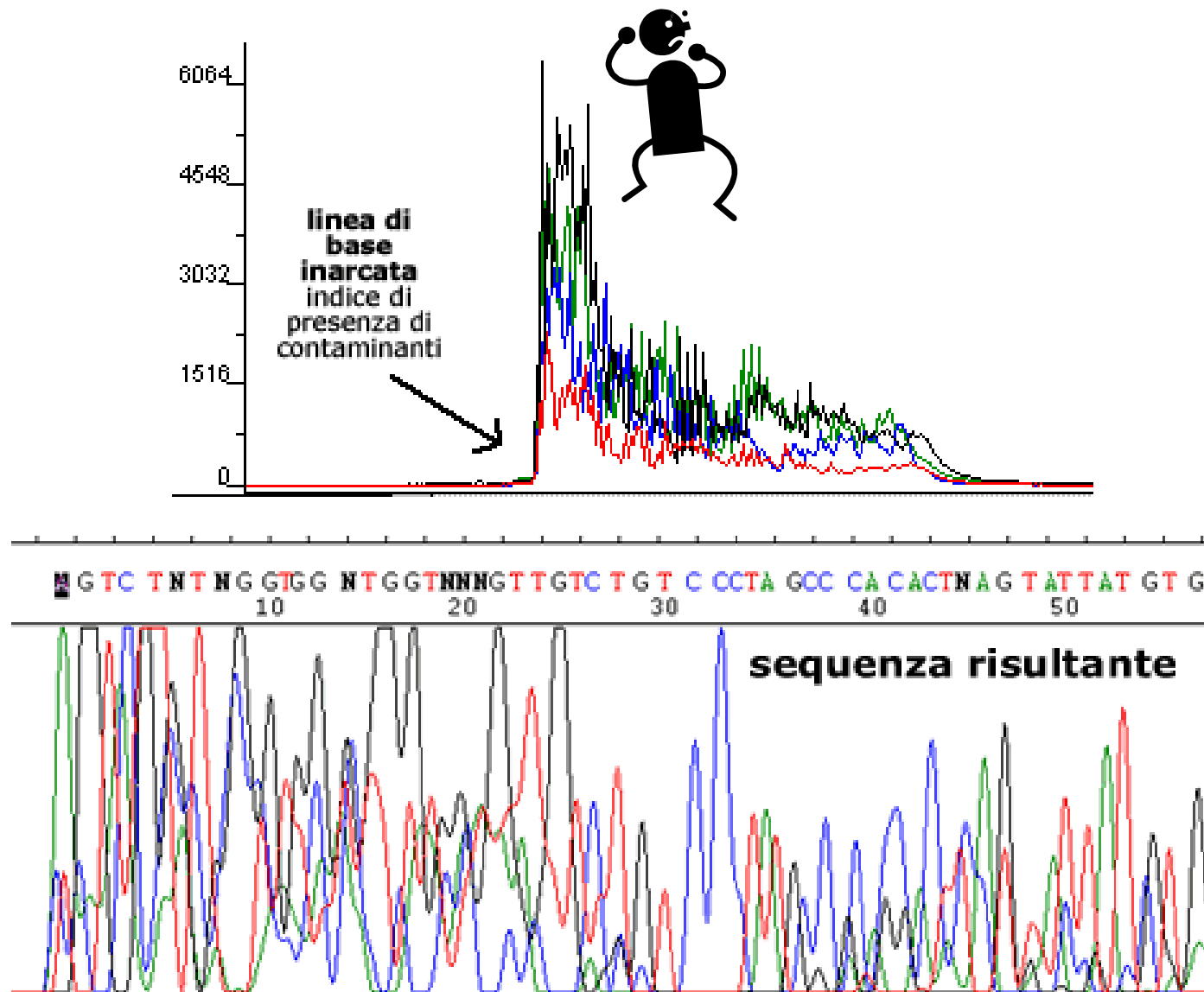
## Possibili cause

la quantità di DNA e' insufficiente e il segnale troppo debole  
il DNA presenta contaminazioni che inibiscono la reazione  
ci sono altri templati contaminanti

## Possibili soluzioni

aumentare la quantità di DNA  
purificare meglio il DNA  
ripreparare il DNA

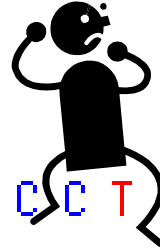
# Sequenza risultante da template non ben purificato I



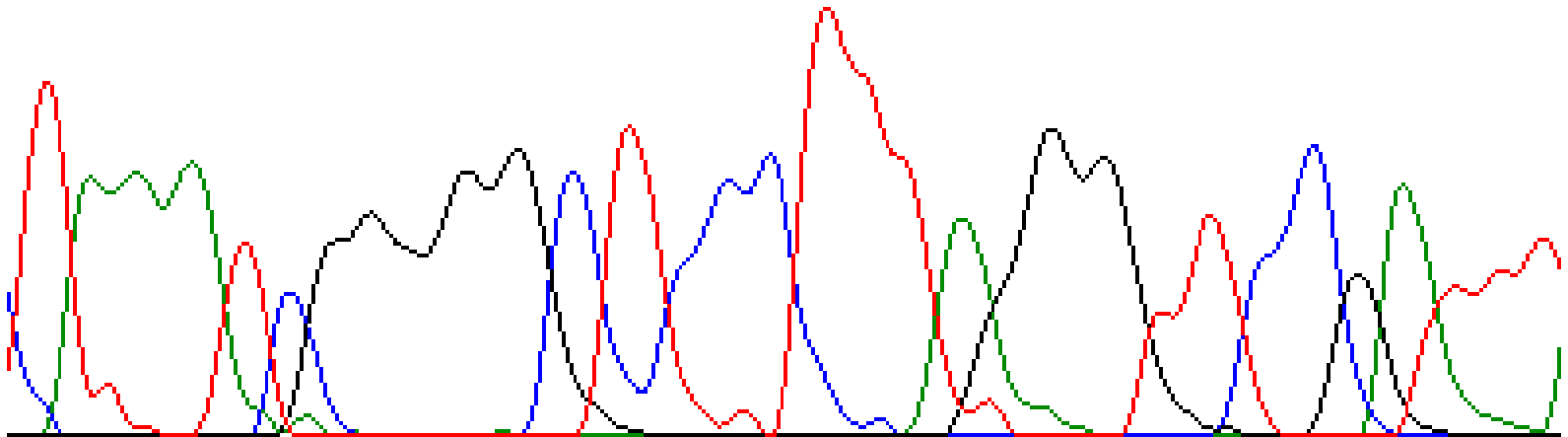
Template non ben purificato

ATTENZIONE: il sequenziatore capillare è estremamente sensibile ai sali ed altri contaminanti

# Sequenza risultante da template non ben purificato II



T A A A T C G G G G G C T C C C T T T A G G G T T C C G A T T T  
430 440 450 4



Perdita di risoluzione precoce per cui i picchi sono sempre meno definiti

Possibili cause

Problemi di elettroforesi capillare

Presenza di contaminanti nel campione

Possibili soluzioni

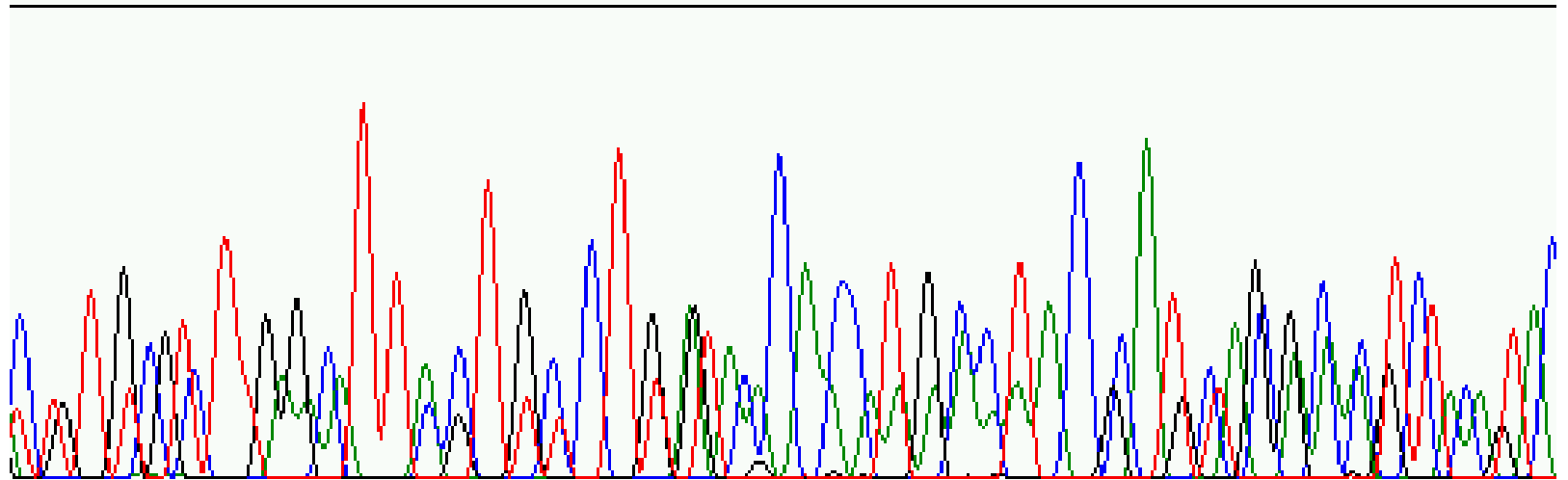
ricaricare il campione

purificare meglio il DNA

# Sequenza doppia



C N T G G T T G G C T T A C T G C C T G N A A C A C A T G C C T A C N A T N A G G C N T C A A T A C  
30 40 50 60 70



## Sequenza doppia

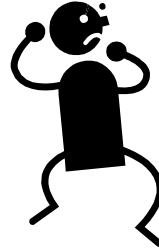
### Possibili cause

- nel caso di plasmidi, clone multipli
- bande multiple nel prodotto di PCR
- siti multipli di attacco del primer sul DNA
- primer di pcr non eliminati
- primer degenerato
- presenza di più primer

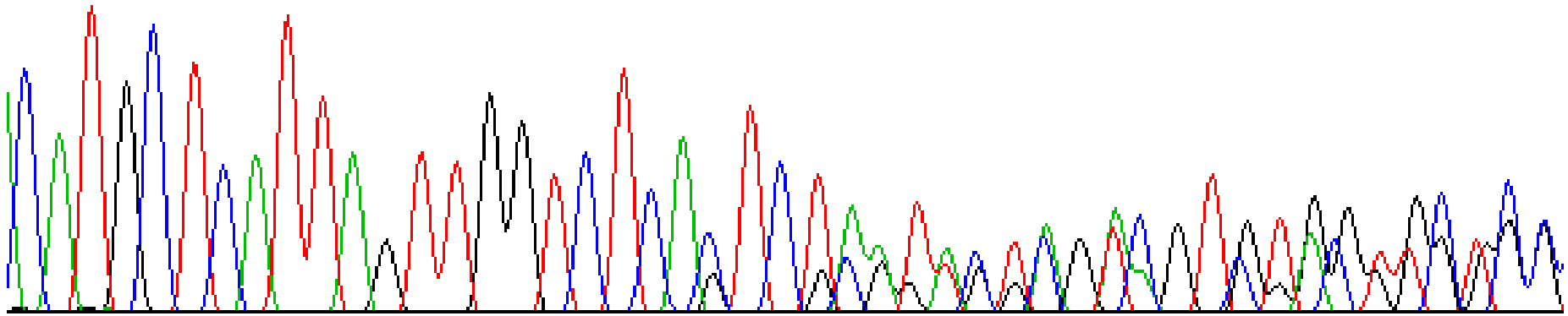
### Possibili soluzioni

- ripreparare DNA
- tagliare ed estrarre la singola banda da gel di agarosio
- cambiare primer
- purificare meglio il DNA
- cambiare primer
- usare un solo primer

# Sequenza inizialmente buona? ma successivamente doppia



C A T G C T C A T T A G T T G G T C T C A C T C T A N T N C T N G N C G T G T N G T G C N N N



Sequenza diventa doppia dopo un tratto buono

## Possibili cause

colonia doppia (verificare se il tratto doppio inizia in corrispondenza del sito di taglio del vettore)

PCR multiple o repeat con stesso tratto iniziale

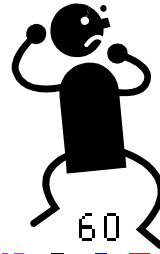
mutazione frame shift

## Possibili soluzioni

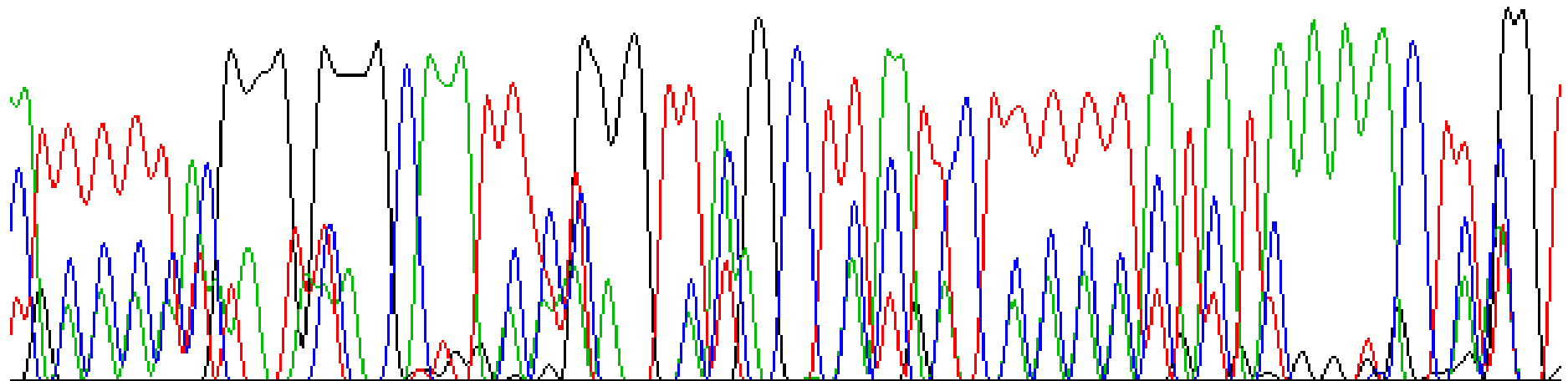
ripreparare DNA in modo da avere un tipo di template unico

provare a cambiare primer

# Sequenza fuori scala



40 50 60 70 80  
NTN NNT CGGG GGGCAATN CGAGTTN GCTNN TNCTN NNNN TN TN AA AC TN GG T



Sequenza fuori scala

Possibili cause

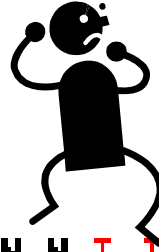
troppo DNA

Possibili soluzioni

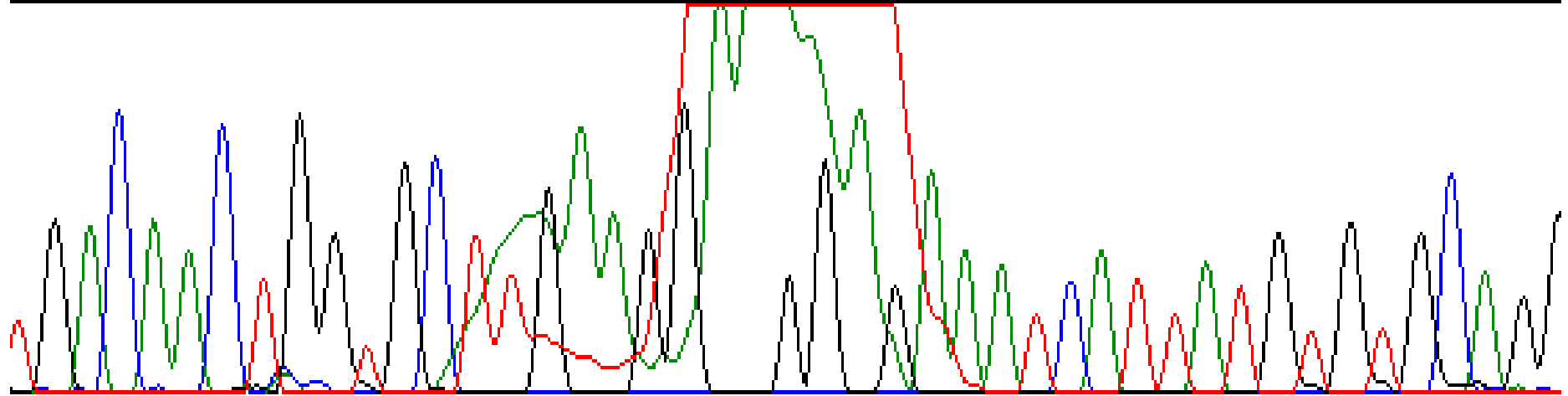
riquantizzare e ridurre la quantità di DNA



# Unincorporated dyes blob



T G A C A A C T G G T G C T T N A A G G N N T T T T A A A T C A T T A T G T G T G C A G C  
40 150 160 170 180



Blob di terminatori non incorporati

Possibili cause

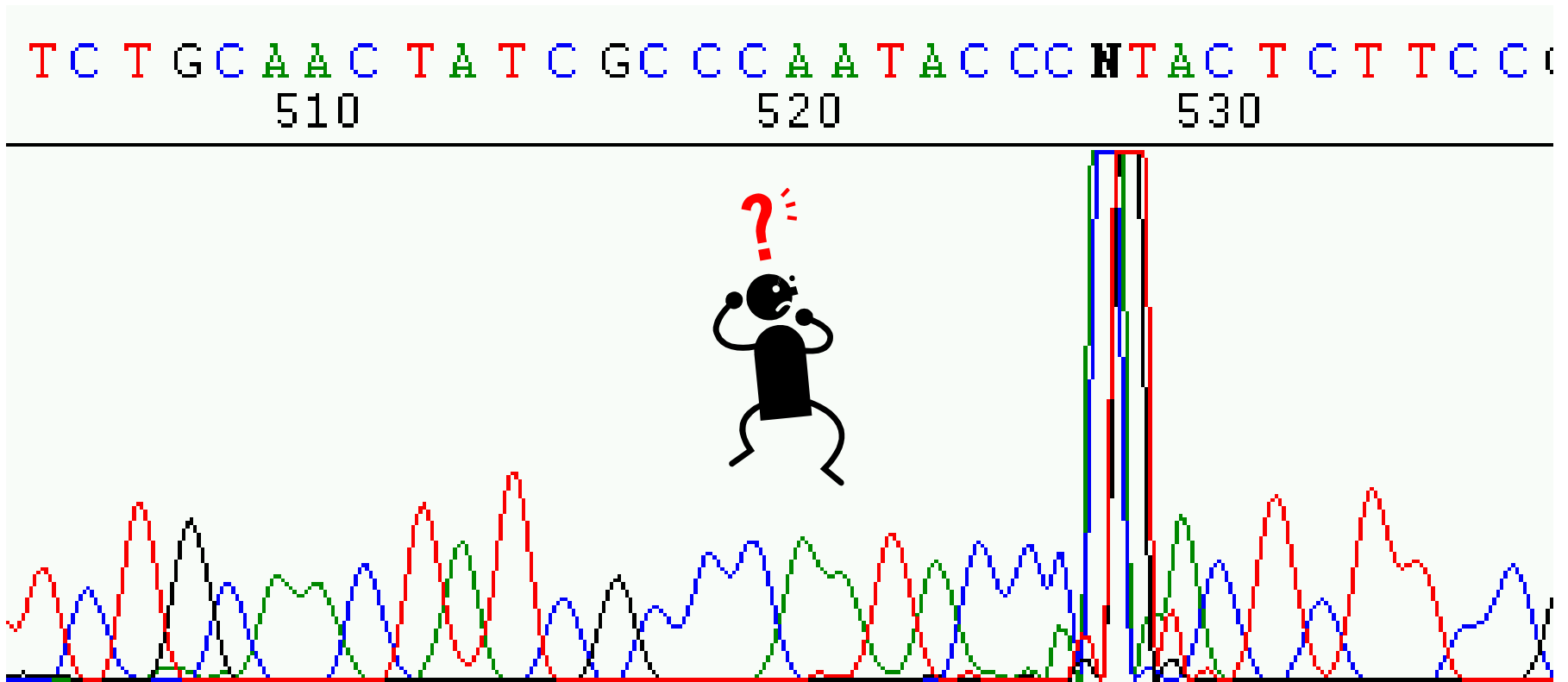
terminatori non incorporati

Possibili soluzioni

ripetere la reazione

Commento: la sequenza è generalmente leggibile sotto il blob

# Picco anomalo



Picco anomalo con tutti e quattro i colori

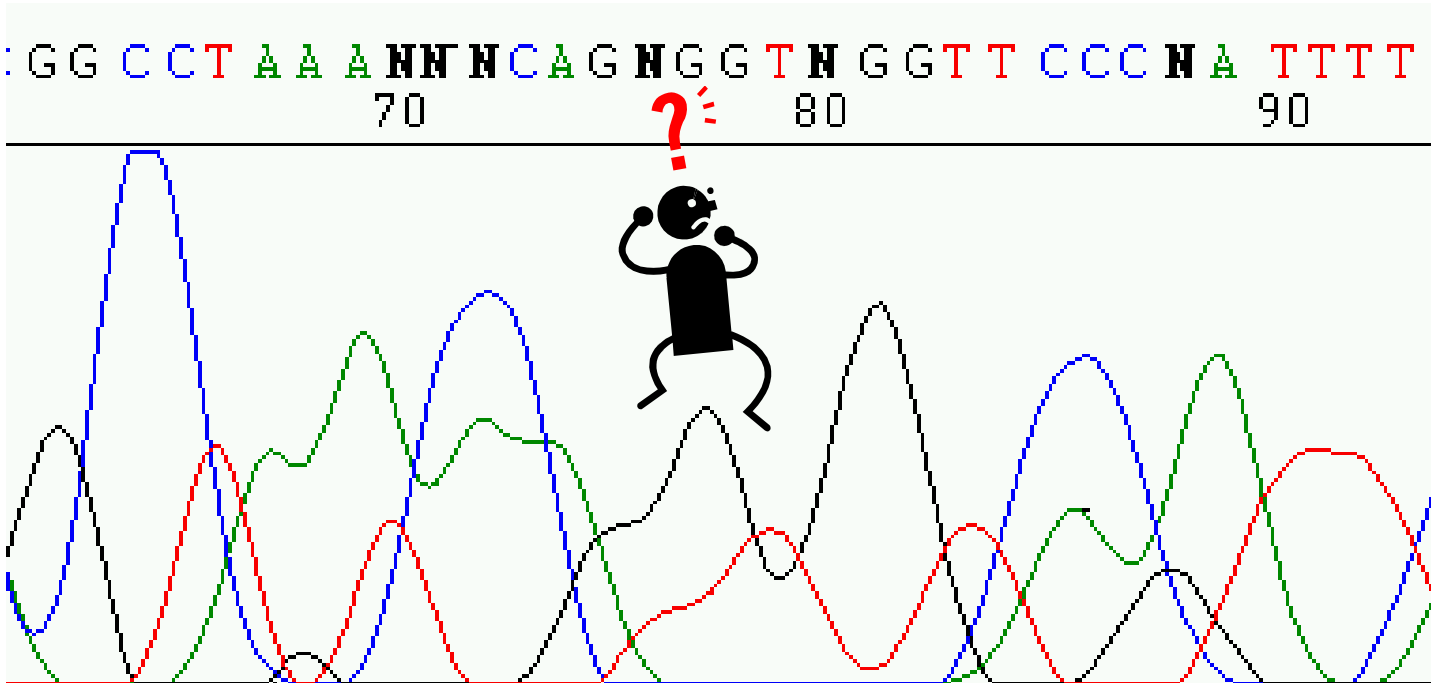
Possibili cause

-bolla nel capillare

Possibili soluzioni

ripetere la corsa se la bolla è oltre le 30 basi e prima di 600 basi.  
Dal dato grezzo è spesso possibile assegnare il picco corretto

# Sequenza con bassa risoluzione (picchi slargati)



Picchi larghi

Possibili cause

contaminanti nel campione o eccesso di DNA

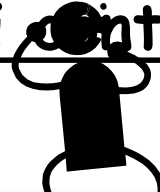
Problema del capillare

Possibili soluzioni

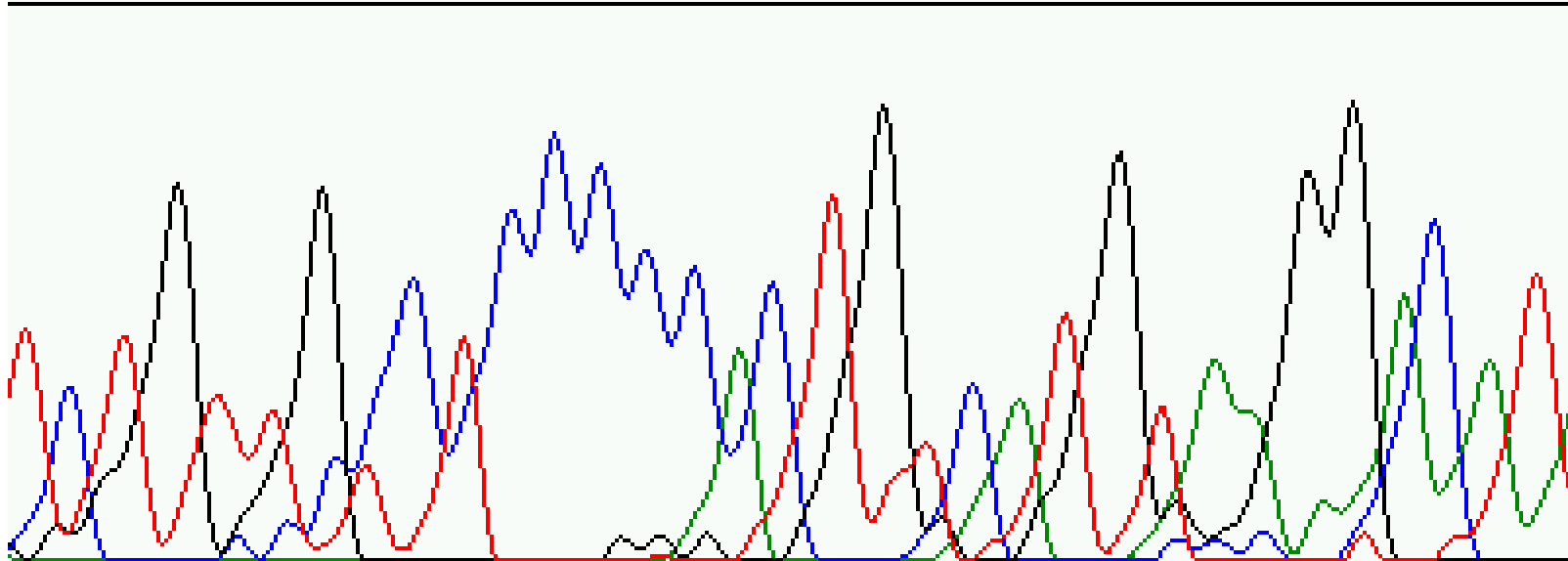
ripetere la corsa del campione.  
La causa è certa solo quando ci sono due o più sequenze con picchi larghi di uno stesso utente nella stessa corsa;

ripetere la corsa del campione.

# Sequenza con ? picchi inclinati probabile presenza di contaminanti nel campione



T C T G T T G **N** C T C C C C C C A C T G T C A T G T A A G G A C A T  
250 260 270 280



Picchi inclinati

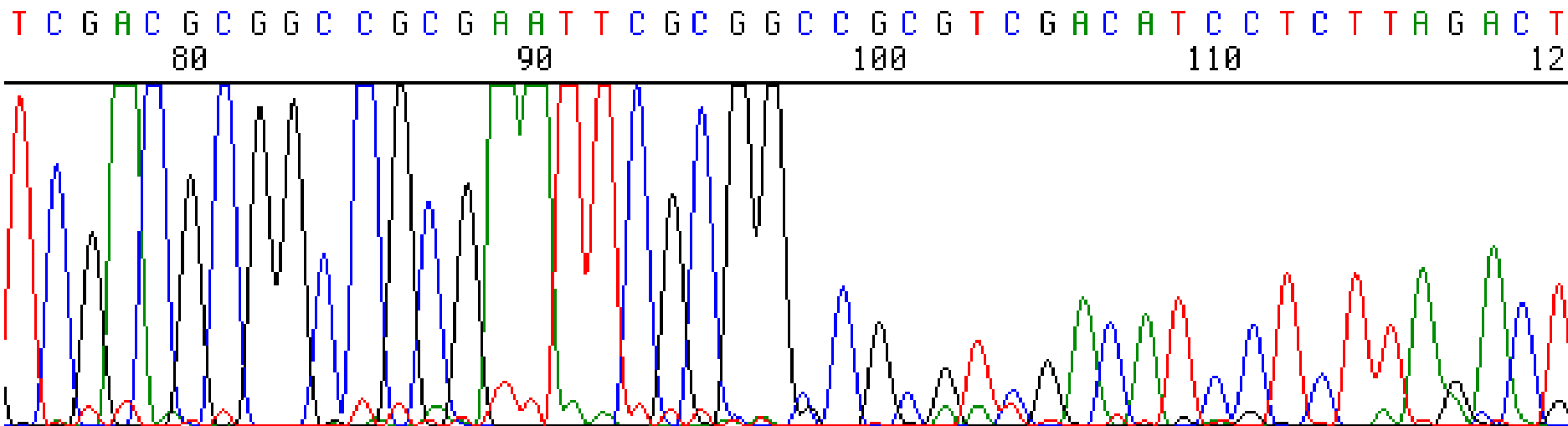
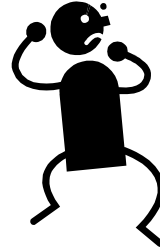
Possibili cause

- cattivo funzionamento del capillare
- contaminanti nel campione

Possibili soluzioni

- ripetere la corsa del campione
- ripreparare DNA

# Sequenza difficile? regione ricca in GC



Regione ricca in GC

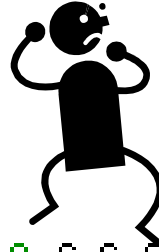
Possibili cause

struttura secondaria che impedisce l'avanzamento della polimerasi perchè, per effetto dell'alta  $T_m$  del tratto di DNA, i due filamenti non si separano bene.

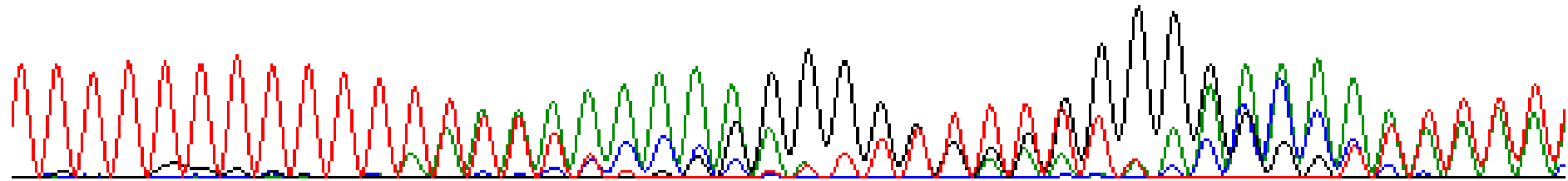
Possibili soluzioni

richiedere aggiunta di DMSO

# Sequenza difficile: ? stretch omopolimerico I



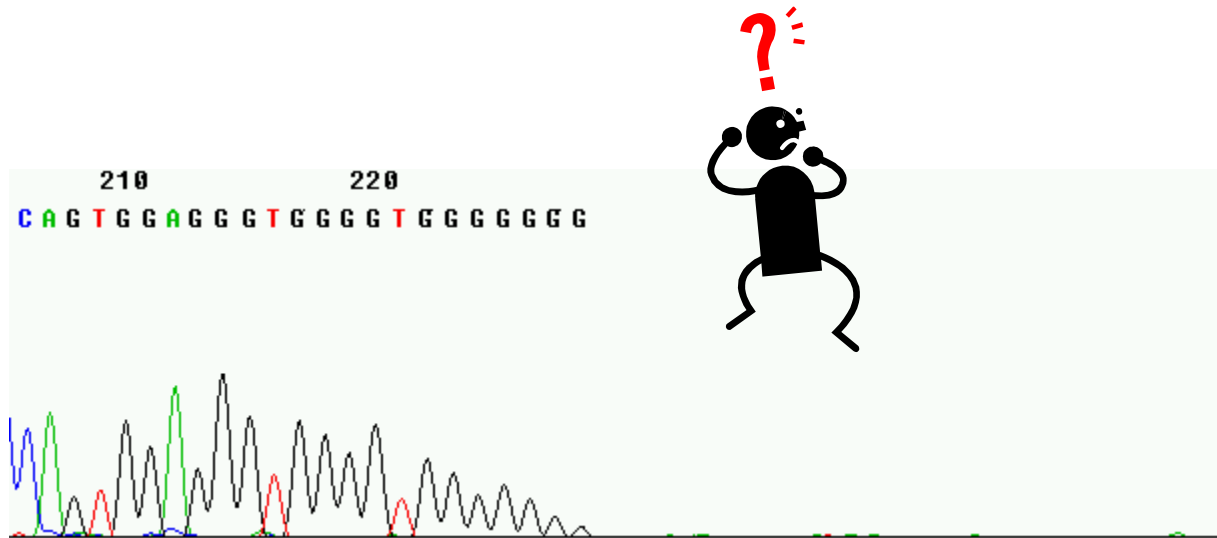
T T T T T T T T T T T T N N N A A A A A A G G G G N T T T N G G G N A N A N N N N N I  
20 130 140 150 160



Stretch omopolimerico

Possibili cause	Possibili soluzioni
Stretch omopolimerico in materiale clonato, che causa uno slittamento della polimerasi; la sequenza dopo il tratto di poli N diventa illeggibile	sequenziare a partire dalla parte opposta rispetto allo stretch usare un primer più interno
Nei prodotti di PCR lo slittamento può riguardare anche tratti che non avrebbero problemi in materiale clonato	sequenziare materiale clonato (anche dall'amplificato); è meglio verificare l'esattezza della sequenza su più cloni diversi

# Sequenza difficile: stretch omopolimerico II



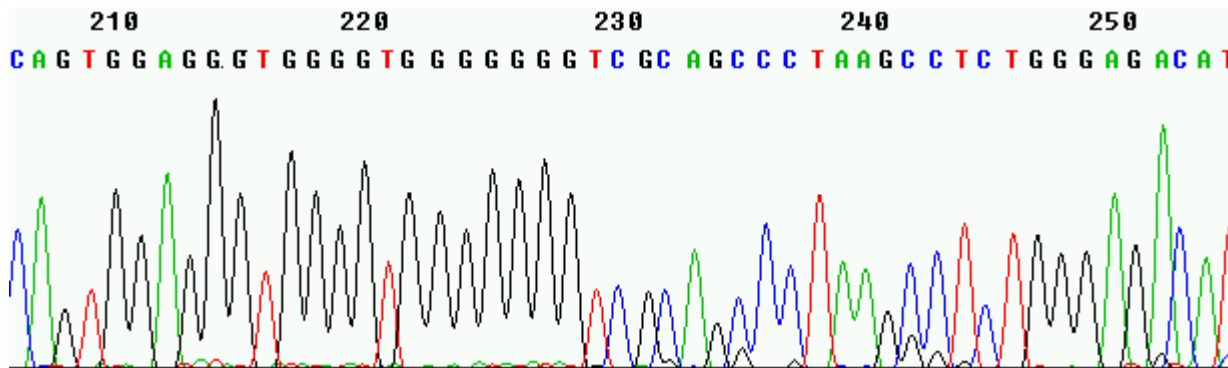
Perdita di segnale dopo una regione ricca in G (struttura secondaria).

Possibili cause

struttura secondaria che blocca la reazione

Possibili soluzioni

richiedere aggiunta di DMSO

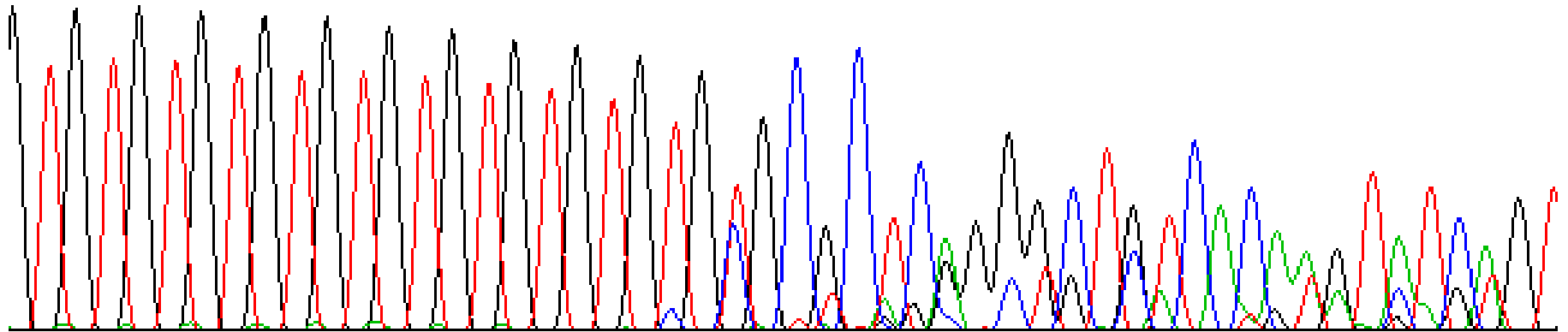


Sequenza corrispondente a quella della figura precedente, in questo caso si e' adottata una procedura dedicata per superare lo stretch di G.

# Sequenza difficile: repeat GT



250 260 270 280 290  
3 TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG TG NG CGC TCN GGG CTN TCACAAGTATCAGT



Regione ricca in GT

Possibili cause

regione ricca in GT in cui il duplex formato dal primer in via di allungamento e dallo stampo non sono stabili alle temperature del ciclo standar di sequenziamento

Possibili soluzioni

modificare il ciclo standard di sequenziamento con temperature più basse (da richiedere al Servizio)



# Sequenza difficile: effetto della presenza di un microsatellite



30

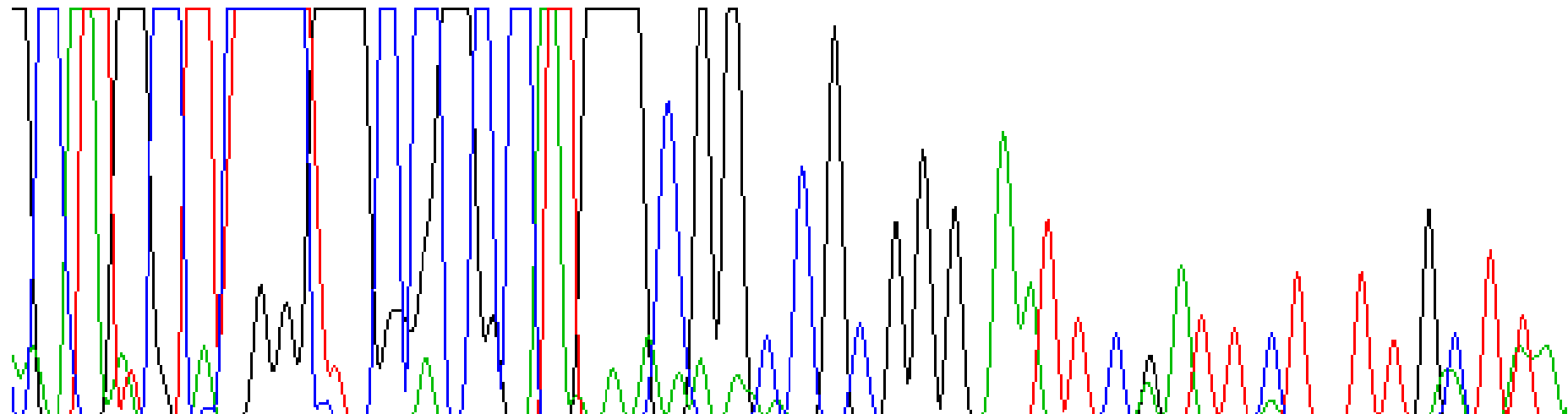
40

50

60

70

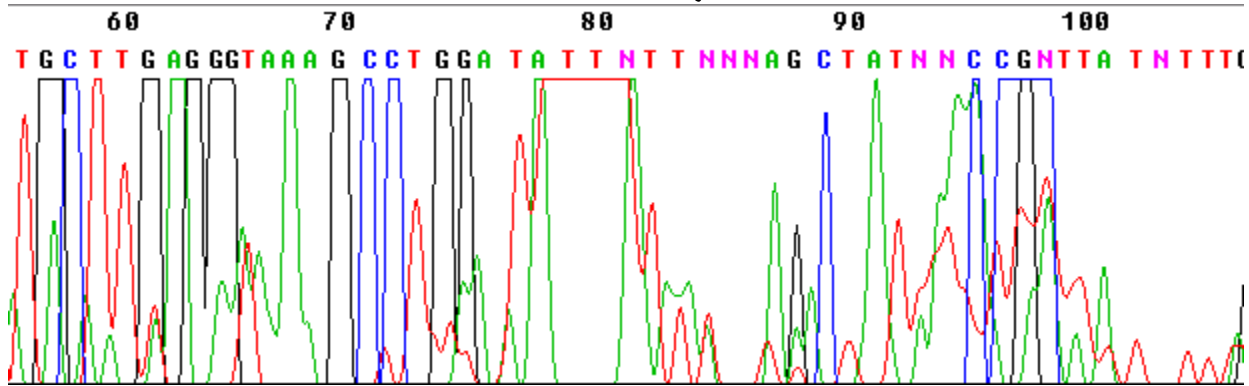
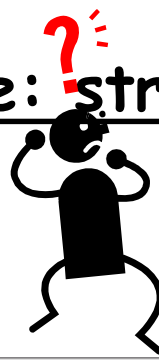
G C A T G G C T C C C G G G C G C G G C A T G G G C G G C C G G C G G G N A A T T C G A T T C T N T T G C T T A



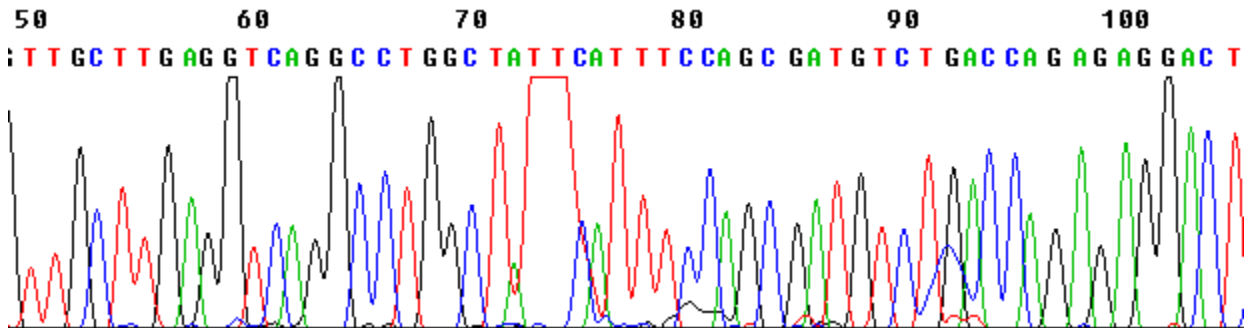
## Effetto della presenza di microsatelliti

Possibili cause	Possibili soluzioni
Perdita di segnale dovuto alla presenza di microsatelliti che formano strutture secondarie	Sequenziare da plasmide non da PCR Aggiungere DMSO

# Sequenza difficile: struttura secondaria



Effetto della presenza di una struttura secondaria: la sequenza perde bruscamente segnale e muore. Qui sotto, la stessa regione sequenziata con DMSO



Effetto del DMSO sull'esito della sequenza del campione nella figura precedente; la sequenza poi prosegue oltre 500 basi