

Cell3™ Nexome

(Illumina Sequencers)

Verze 1.4

Přehled workflow

a) BEZ ENZYMATICKÉ FRAGMENTACE
pro vzorky cfDNA

b) S ENZYMATICKOU FRAGMENTACÍ
pro vzorky genomické (g) DNA



Vstupní vzorky DNA

1 – 1000 ng DNA ve vodě/0,1mM EDTA TE pufru/10mM TrisHCl pH 8,0. DNA vzorky v 1xTE převedte do vody. Koncentraci měřte pouze fluorometricky na Qubit.

1.Verze (b): S enzymatickou fragmentací

Fragmentace a end-repair / A-tailing pro rozstříhání DNA vzorku na velikost 180-200 bp.

Pracujte na ledu/chladícím stojánku.

1. Nastavte cycler dle následující tabulky:

Krok	Teplota	Čas
1	4°C	Hold
2	37°C	20 min
3	65°C	30 min
4	4°C	Hold

Pozn: Nastavte vyhřívání víka cycleru na 105°C (nebo na max), objem vzorku je 50 µl

2. Napipetujte fragmentační reakce dle tabulky níže. Jednotlivé mixy nevortexujte, pouze promíchejte otočením dnem vzhurů a stočte.

	Objem na 1 reakci
Fragmentation Buffer	4 µl
Fragmentation Enzyme	6 µl
DNA vzorek	X µl
Nuclease-free voda	(40 – X) µl
Celkem	50 µl

3. Fragmentační reakce silně zvortexujte, stočte a vložte do cycleru,. První krok přeskočte a pokračujte 37°C 20 minut a dál.
4. Ihned pokračujte dalším krokem – ligací.

2. Ligace Illumina UMI adapterů

Vyndejte z lednice magnetické kuličky.

Pracujte na ledu/chladícím stojánku.

1. Nastavte cycler dle následující tabulky:

Krok	Teplota	Čas
1	4°C	Hold
2	20°C	15 min

Pozn: Nastavte vyhřívání víka cycleru vypnuto, objem vzorku je 75 µl

2. Přidejte 20 µl **Ligation Mix** do každého vzorku do finálního objemu 75 µl. Propíetejte, nevortexujte a krátce stočte.
3. Vložte do cycleru a přeskočte na další krok 20°C 15 min.
4. Ihned pokračujte přečištěním na kuličkách.

3. Přečištění na kuličkách

1. Přidejte ke vzorkům 67,5 µl dobře rozmíchaných magnetických kuliček, propipetujte a inkubujte při RT 5 min.
2. Připravte čerstvý 80% Ethanol.
3. Vložte reakce na magnetický stojánek na 5 min a poté odsajte a vyhoďte supernatant.
4. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
5. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhoďte supernatant.
6. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
7. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhoďte supernatant. Pomocí 10 µl pipety odsajte zbytek Ethanolu.
8. Vysušte peletu.

9. Rozpusťte peletu ve 22 µl vody nebo EB pufru (10mM Tris-HCl, pH 8,0) inkubujte 2 min při RT.
10. Vložte reakce na magnetický stojánek na 2 min a poté přeneste 20 µl supernatantu do čisté PCR zkumavky.
STOPPING POINT: v tomto kroku lze reakce skladovat při -20°C.

4. Amplifikace knihovny

Pracujte na ledu/chladícím stojánku.

1. Nastavte cycler dle následující tabulky:

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	98°C	Hold	1
2	98°C	45 sec	1
3	98°C	15 sec	4
4	60°C	30 sec	
5	72°C	30 sec	
6	72°C	1 min	1
7	4°C	Hold	1

Pozn: Nastavte vyhřívání víka cycleru na 105°C nebo na max, objem vzorku je 75 µl

2. Připravte master mix dle následující tabulky. Krátce vortexujte a stočte.

	Objem na 1 reakci
PreCap Amplification Mix	25 µl
PreCap Primer Mix	5 µl
Celkem	30 µl

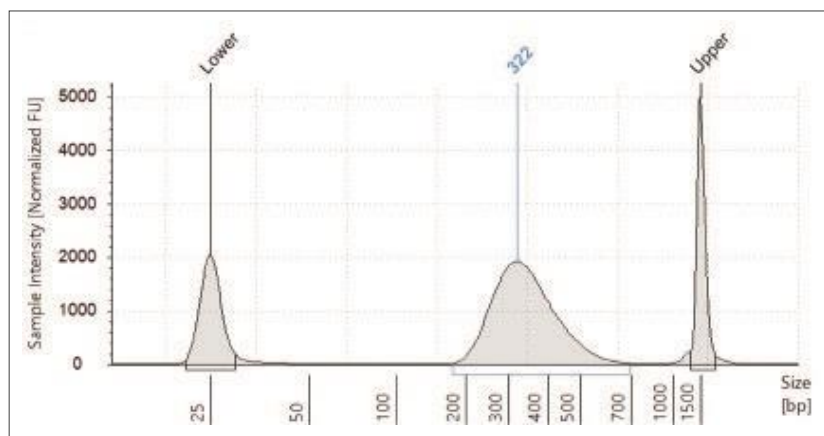
3. K 20 µl vzorku přidejte 30 µl master mixu, propipetujte, krátce vortexujte a stočte.
4. Vložte do cycleru a přeskočte na další krok 98°C 45 sek.
5. Ihned pokračujte přečištěním na kuličkách.

5. Přečištění na kuličkách

1. Přidejte ke vzorkům 50 µl dobře rozmíchaných magnetických kuliček, propipetujte a inkubujte při RT 5 min.
2. Připravte čerstvý 80% Ethanol.
3. Vložte reakce na magnetický stojánek na 5 min a poté odsajte a vyhoďte supernatant.
4. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
5. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhoďte supernatant.
6. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
7. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhoďte supernatant. Pomocí 10 µl pipety odsajte zbytek Ethanolu.
8. Vysušte peletu.
9. Rozpusťte peletu ve 32 µl vody nebo EB pufru (10mM Tris-HCl, pH 8,0) inkubujte 2 min při RT.
10. Vložte reakce na magnetický stojánek na 2 min a poté přeneste 30 µl supernatant do čisté PCR zkumavky.
STOPPING POINT: v tomto kroku lze reakce skladovat při 4°C přes noc, nebo při -20°C déle.

6. Kontrola kvality knihoven

Změřte koncentraci knihoven pomocí Qubit Broad range kitu. Očekávaná koncentrace se obvykle pohybuje od 16 ng/μl. Na Agilent 4200 TapeStation s D1000 reagents změřte knihovny a získaný peak by měl mít velikost cca 329 bp.



STOPPING POINT: v tomto kroku lze reakce skladovat při 4°C přes noc, nebo při -20°C déle.

7.A Poolování a hybridizace s vakuovým koncentrátorem

Doporučujeme poolovat 8 vzorků najednou.

Zapněte vakuový koncentrátor, nastavte teplotu na 70°C nebo nižší.

Pokud nemáte koncentrátor, tak lze použít purifikaci magnetickými kuličkami, viz níže.

1. Zpoolujte jednotlivé vzorky/knihovny ekvimolárně tak, aby výsledný pool měl 1000ng.
2. K poolu přidejte 5 μl **COT-1 Human DNA** a 2 μl **Universal Blockers**, zortexujte a stočte.
3. Vložte do vakuového koncentrátoru a vysušte do sucha.

STOPPING POINT: v tomto kroku lze reakce skladovat při 4°C přes noc.

4. Nastavte cyklus dle následující tabulky:

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	95°C	Hold	1
2	95°C	30 sec	1
3	65°C	4 hours	1
4	65°C	Hold	1

Pozn: Nastavte vyhřívání víka cycleru na 105°C nebo na max, objem vzorku je 17 μl

5. Připravte master mix dle následující tabulky. Krátce vortexujte a stočte.

	Objem na jeden pool
Hybridization Buffer (2x)	8.5 μl
Hybridization Enhancer	2.7 μl
Cell3™ Target Nexome Panel	4 μl
Nuclease-free voda	1.8 μl
Celkem	17 μl

6. Přidejte master mix přímo k vysušenému poolu, promýchejte pipetou a inkubujte 10 min při RT.
7. Vložte do cycleru a přeskočte na další krok 98°C 30 sek.
8. Hybridizaci lze nechat v cycleru přes noc, maximálně však 18h.

NEBO

7.B Poolování a hybridizace bez vakuového koncentrátoru

Doporučujeme poolovat 8 vzorků najednou.

1. Připravte master mix dle následující tabulky. Krátce vortexujte a stočte.

	Objem na 1 reakci
Hybridization Buffer (2x)	9.5 µl
Hybridization Enhancer	3 µl
Universal Blockers	2 µl
Cell3™ Target Nexome Panel	4.5 µl
Celkem	19 µl

2. Zpoolujte jednotlivé vzorky/knihovny ekvimolárně tak, aby výsledný pool měl 1000ng.
3. K poolu přidejte 7,5 µl **COT-1 Human DNA**, zvortexujte a stočte.
4. Přidejte 1,8x objemu magnetických kuliček, propipetujte a inkubujte při RT 10 minut.
5. Připravte čerstvý 80% Ethanol.
6. Vložte reakce na magnetický stojánek na 5 min a poté odsajte a vyhodte supernatant.
7. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
8. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhodte supernatant.
9. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
10. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhodte supernatant. Pomocí 10 µl pipety odsajte zbytek Ethanolu.
11. Vysušte peletu.
12. Rozpusťte peletu v 19 µl hybridizačního master mixu z bodu 1., inkubujte 5 min při RT.
13. Vložte reakce na magnetický stojánek na 5 min a poté přeneste 17 µl supernatant do čisté PCR zkumavky.
14. Vložte do cycleru a přeskočte na další krok 98°C 30 sek.
15. Hybridizaci lze nechat v cycleru přes noc, maximálně však 18h.

8. Přechištění na streptavidinových kuličkách

Nechte Dynabeads® M-270 Streptavidin při RT alespoň 30 min před použitím.

Nechte rozmraznout Stringent Wash Buffer (10x) bílé (bílý víčko, S), Wash Buffer 1 (10x) (bílý víčko, 1), Wash Buffer 2 (10x) (bílý víčko, 2), Wash Buffer 3 (10x) (bílý víčko, 3) a Bead Wash Buffer (2x) (bílý víčko, B), zvortexujte a krátce stočte.

Nastavte PCR cycler na 65°C forever s víkem vyhřátým na 70°C, případně s vypnutým víkem.

1. Příprava pufrů

	Stock solution	Nuclease-free voda
Stringent Wash Buffer (10x)	42 µl	378 µl
Wash Buffer 1 (10x)	31,5 µl	283,5 µl
Wash Buffer 2 (10x)	21 µl	189 µl
Wash Buffer 3 (10x)	21 µl	189 µl
Bead Wash Buffer (2x)	262,5 µl	262,5 µl

2. připravené roztoky zvortexujte a stočte.
3. Napipetujte 105 µl 1x Wash Buffer 1 do 0.2 ml zkumavky a předehejte ji v cycleru na 65°C minimálně 15 minut před použitím.
4. Rozdělte 1x Stringent Wash Buffer do dvou 0.2 ml zkumavek po 210 µl a vložte je také do PCR cycleru na 65°C.
5. Zvortexujte Dynabeads® M-270 Streptavidin a napipetujte 100 µl kuliček do 1.5 ml zkumavky.
6. Vložte kuličky do magnetického stojánu na 20-30 sekund, odsajte a vyhodte supernatant.
7. Přidejte 200 µl 1x Bead Wash Buffer, zvortexujte, vraťte na magnetický stojánek a odsajte a vyhodte supernatant.
8. Přidejte 200 µl 1x Bead Wash Buffer, zvortexujte, vraťte na magnetický stojánek a odsajte a vyhodte supernatant.
9. Přidejte 100 µl 1x Bead Wash Buffer zvortexujte a přeneste rozpuštěné kuličky do čisté 0.2 ml zkumavky.
10. Vložte kuličky do magnetického stojánu na 20-30 sekund, odsajte a vyhodte supernatant. **Okamžitě pokračujte dalším krokem.**
11. Peletu kuliček vložte do cycleru (65°C víko 70°C) a okamžitě přidejte celý objem hybridizační reakce (poolu), propipetujte.
12. Inkubujte při 65°C 45 minut a každých 12 minut propipetujte.
13. Přidejte 100 µl předehřátého 1x Wash Buffer 1, propipetujte a vložte zkumavku do magnetického stojánu. Co nejrychleji odsajte a vyhodte supernatant, vraťte do cycleru

14. Okamžitě přidejte 200 µl předehřátého 1x Stringent Wash Buffer, propipetujte a inkubujte v cycleru 5 minut při 65°C.
15. Vložte zkumavku do magnetického stojánu. Co nejrychleji odsajte a vyhodte supernatant, vraťte do cycleru
16. Okamžitě přidejte 200 µl předehřátého 1x Stringent Wash Buffer, propipetujte a inkubujte v cycleru 5 minut při 65°C.
17. Vložte zkumavku do magnetického stojánu. Co nejrychleji odsajte a vyhodte supernatant a ponechte při RT.
18. Přidejte 200 µl 1x Wash Buffer 1 (nepředehřátý), vortexujte 2 min a stočte.
19. Vložte zkumavku do magnetického stojánu, odsajte a vyhodte supernatant.
20. Přidejte 200 µl 1x Wash Buffer 2 vortexujte 1 min a stočte.
21. Vložte zkumavku do magnetického stojánu, odsajte a vyhodte supernatant.
22. Přidejte 200 µl 1x Wash Buffer 3 vortexujte 30 sekund a stočte.
23. Vložte zkumavku do magnetického stojánu, odsajte a vyhodte supernatant. Nesušte.
24. Rozpusťte peletu ve 48 µl vody a propipetujte.

9. Amplifikace

Vyndejte z lednice magnetické kuličky.

Pracujte na ledu/chladícím stojánu.

1. Nastavte cycler dle následující tabulky:

Krok	Teplota	Čas	Cykly
1	98°C	Hold	1
2	98°C	45 sec	1
3	98°C	15 sec	7
4	60°C	30 sec	
5	72°C	30 sec	
6	72°C	1 min	1
7	4°C	Hold	1

Pozn: Nastavte vyhřívání víka cycleru na 105°C nebo na max, objem vzorku je 50 µl

2. Připravte master mix dle následující tabulky. Krátce vortexujte a stočte.

	Objem na 1 reakci
PostCap Amplification Mix	50 µl
PostCap Primer Mix	5 µl
Celkem	55 µl

3. Rozdělte master mix po 27.5 µl do dvou 0,2 ml zkumavek.
4. Do každé zkumavky s master mixem přidejte 22.5 µl rozpuštěných Dynabeads® M-270 Streptavidin kuliček s poolem. Propipetujte.
5. Vložte do cycleru a přeskočte na další krok 98°C 45 sek.
6. Ihned po skončení programu pokračujte an přečištění na kuličkách. Clean-up of amplified captured library

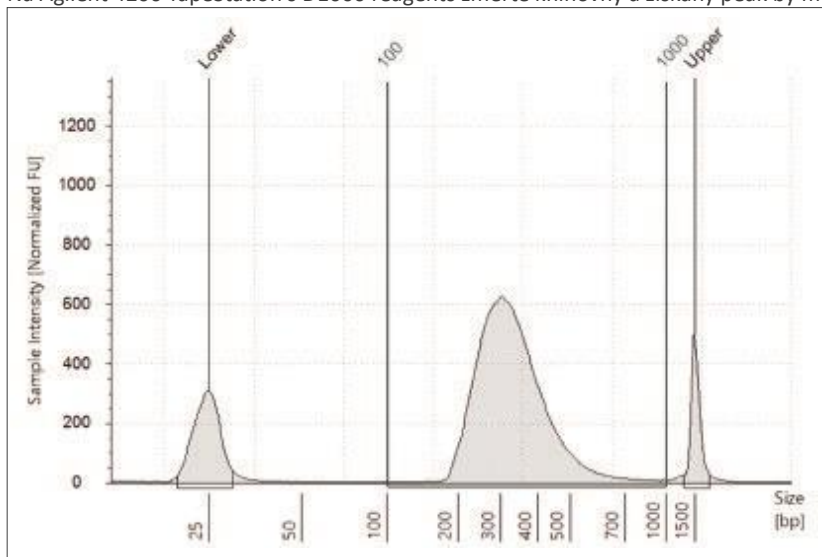
10. Přečištění na kuličkách

1. Spojte amplifikované pooly do jedné 1,5 ml zkumavky.
2. Přidejte k poolu 150 µl dobře rozmíchaných magnetických kuliček, propipetujte a inkubujte při RT 5 min.
3. Připravte čerstvý 80% Ethanol.
4. Vložte reakci na magnetický stojánek na 5 min a poté odsajte a vyhodte supernatant.
5. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
6. Vložte reakci na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhodte supernatant.
7. K peletě přidejte 200 µl 80% ethanol inkubujte při RT 30 sekund.
8. Vložte reakce na magnetický stojánek, počkejte na usazení pelety, odsajte a vyhodte supernatant. Pomocí 10 µl pipety odsajte zbytek Ethanolu.
9. Vysušte peletu.
10. Rozpusťte peletu ve 32,5 µl vody nebo EB pufru (10mM Tris-HCl, pH 8,0) inkubujte 2 min při RT.
11. Vložte reakce na magnetický stojánek na 2 min a poté přeneste 30 µl supernatant do čisté PCR zkumavky.

STOPPING POINT: v tomto kroku lze reakce skladovat při -20°C déle.

11. Kontrola kvality poolu

Změřte koncentraci knihoven pomocí Qubit High sensitivity range kitu. Očekávaná koncentrace se obvykle pohybuje v rozmezí 2-10 ng/μl. Na Agilent 4200 TapeStation s D1000 reagents změřte knihovny a získaný peak by měl mít velikost cca 325-338 bp.



12. Indexy

Well position	Adapter ID	17 index	15 index forward HiSeq 2000/2500 MiSeq (all systems) NovaSeq 6000 (v1 reagent kit) MiniSeq (Rapid reagent kits)	15 index reverse HiSeq 3000/4000 HiSeq X NextSeq (all systems) MiniSeq (Standard reagent kits) NovaSeq 6000 (v1.5 reagent kits) iSeq 100
A1	UMIRC_AN01	CTGATCGTNNNNNNNNN	ATATGCGC	GCGCATAT
B1	UMIRC_AN02	ACTCTCGANNNNNNNNN	TGGTACAG	CTGTACCA
C1	UMIRC_AN03	TGAGCTAGNNNNNNNNN	AACCGTTC	GAACGGTT
D1	UMIRC_AN04	GAGACGATNNNNNNNNN	TAACCGGT	ACCGGTTA
E1	UMIRC_AN05	CTTGTCGANNNNNNNNN	GAACATCG	CGATGTTC
F1	UMIRC_AN06	TTCCAAGGNNNNNNNNN	CCTTGTAG	CTACAAGG
G1	UMIRC_AN07	CGCATGATNNNNNNNNN	TCAGGCTT	AAGCCTGA
H1	UMIRC_AN08	ACGGAACANNNNNNNNN	GTTCTCGT	ACGAGAAC
A2	UMIRC_AN09	CGGCTAATNNNNNNNNN	AGAACGAG	CTCGTTCT
B2	UMIRC_AN10	ATCGATCGNNNNNNNNN	TGCTTCCA	TGGAAGCA
C2	UMIRC_AN11	GCAAGATCNNNNNNNNN	CTTCGACT	AGTCGAAG
D2	UMIRC_AN12	GCTATCCTNNNNNNNNN	CACCTGTT	AACAGGTG
E2	UMIRC_AN13	TACGCTACNNNNNNNNN	ATCACACG	CGTGTGAT
F2	UMIRC_AN14	TGGACTCTNNNNNNNNN	CCGTAAGA	TCTTACGG
G2	UMIRC_AN15	AGAGTAGCNNNNNNNNN	TACGCCTT	AAGGCGTA
H2	UMIRC_AN16	ATCCAGAGNNNNNNNNN	CGACGTTA	TAACGTCG
A3	UMIRC_AN17	GACGATCTNNNNNNNNN	ATGCACGA	TCGTGCAT
B3	UMIRC_AN18	AACTGAGCNNNNNNNNN	CCTGATTG	CAATCAGG

C3	UMIRC_AN19	CTTAGGACNNNNNNNNNN	GTAGGAGT	ACTCCTAC
D3	UMIRC_AN20	GTGCCATANNNNNNNNNN	ACTAGGAG	CTCCTAGT
E3	UMIRC_AN21	GAATCCGANNNNNNNNNN	CACTAGCT	AGCTAGTG
F3	UMIRC_AN22	TCGCTGTTNNNNNNNNNN	ACGACTTG	CAAGTCGT
G3	UMIRC_AN23	TTCGTTGNNNNNNNNNN	CGTGTGTA	TACACACG
H3	UMIRC_AN24	AAGCACTGNNNNNNNNNN	GTTGACCT	AGGTCAAC
A4	UMIRC_AN25	CCTTGATCNNNNNNNNNN	ACTCCATC	GATGGAGT

Well position	Adapter ID	17 index	15 index forward HiSeq 2000/2500 MiSeq (all systems) NovaSeq 6000 (v1 reagent kit) MiniSeq (Rapid reagent kits)	15 index reverse HiSeq 3000/4000 HiSeq X NextSeq (all systems) MiniSeq (Standard reagent kits) NovaSeq 6000 (v1.5 reagent kits) iSeq 100
B4	UMIRC_AN26	GTCGAAGANNNNNNNNNN	CAATGTGG	CCACATTG
C4	UMIRC_AN27	ACCACGATNNNNNNNNNN	TTGCAGAC	GTCTGCAA
D4	UMIRC_AN28	GATTACCGNNNNNNNNNN	CAGTCCAA	TTGGACTG
E4	UMIRC_AN29	GCACAACNNNNNNNNNN	ACGTTCAG	CTGAACGT
F4	UMIRC_AN30	GCGTCATTNNNNNNNNNN	AACGTCTG	CAGACGTT
G4	UMIRC_AN31	ATCCGGTANNNNNNNNNN	TATCGGTC	GACCGATA
H4	UMIRC_AN32	CGTTGCAANNNNNNNNNN	CGCTCTAT	ATAGAGCG
A5	UMIRC_AN33	GTGAAGTGNNNNNNNNNN	GATTGCTC	GAGCAATC
B5	UMIRC_AN34	CATGGCTANNNNNNNNNN	GATGTGTG	CACACATC
C5	UMIRC_AN35	ATGCCTGTNNNNNNNNNN	CGCAATCT	AGATTGCG
D5	UMIRC_AN36	CAACACCTNNNNNNNNNN	TGGTAGCT	AGTACCA
E5	UMIRC_AN37	TGTGACTGNNNNNNNNNN	GATAGGCT	AGCCTATC
F5	UMIRC_AN38	GTCATCGANNNNNNNNNN	AGTGGATC	GATCCACT
G5	UMIRC_AN39	AGCACTTCNNNNNNNNNN	TTGGACGT	ACGTCCAA
H5	UMIRC_AN40	GAAGGAAGNNNNNNNNNN	ATGACGTC	GACGTCAT
A6	UMIRC_AN41	GTTGTTGNNNNNNNNNN	GAAGTTGG	CCAACCTC
B6	UMIRC_AN42	CGGTTGTTNNNNNNNNNN	CATACCAC	GTGGTATG
C6	UMIRC_AN43	ACTGAGGTNNNNNNNNNN	CTGTTGAC	GTCAACAG
D6	UMIRC_AN44	TGAAGACGNNNNNNNNNN	TGGCATGT	ACATGCCA
E6	UMIRC_AN45	GTTACGCANNNNNNNNNN	ATGCCCAT	ATGGCGAT
F6	UMIRC_AN46	AGCGTGTTNNNNNNNNNN	TTGCGAAG	CTTCGCAA
G6	UMIRC_AN47	GATCGAGTNNNNNNNNNN	AGTTCGTC	GACGAACT
H6	UMIRC_AN48	ACAGCTCANNNNNNNNNN	GAGCAGTA	TACTGCTC
A7	UMIRC_AN49	GAGCAGTANNNNNNNNNN	ACAGCTCA	TGAGCTGT
B7	UMIRC_AN50	AGTTCGTCNNNNNNNNNN	GATCGAGT	ACTCGATC
C7	UMIRC_AN51	TTGCGAAGNNNNNNNNNN	AGCGTGTT	AACACGCT

D7	UMIRC_AN52	ATGCCCATNNNNNNNNNN	GTTACGCA	TGCCTAAC
E7	UMIRC_AN53	TGGCATGTNNNNNNNNNN	TGAAGACG	CGTCTTCA
F7	UMIRC_AN54	CTGTTGACNNNNNNNNNN	ACTGAGGT	ACCTCAGT
G7	UMIRC_AN55	CATACCACNNNNNNNNNN	CGGTTGTT	AACAACCG
H7	UMIRC_AN56	GAAGTTGGNNNNNNNNNN	GTTGTTCC	CGAACAAAC
A8	UMIRC_AN57	ATGACGTCNNNNNNNNNN	GAAGGAAG	CTTCCTTC
B8	UMIRC_AN58	TTGGACGTNNNNNNNNNN	AGCACTTC	GAAGTGCT
C8	UMIRC_AN59	AGTGGATCNNNNNNNNNN	GTCATCGA	TCGATGAC
D8	UMIRC_AN60	GATAGGCTNNNNNNNNNN	TGTGACTG	CAGTCACA
E8	UMIRC_AN61	TGTTAGCTNNNNNNNNNN	CAACACCT	AGGTGTTG
F8	UMIRC_AN62	CGCAATCTNNNNNNNNNN	ATGCCTGT	ACAGGCAT
G8	UMIRC_AN63	GATGTGTGNNNNNNNNNN	CATGGCTA	TAGCCATG
H8	UMIRC_AN64	GATTGCTCNNNNNNNNNN	GTGAAGTG	CACTTCAC
A9	UMIRC_AN65	CGTCTATNNNNNNNNNN	CGTTGCAA	TTGCAACG
Well position	Adapter ID	I7 index	I5 index forward HiSeq 2000/2500 MiSeq (all systems) NovaSeq 6000 (v1 reagent kit) MiniSeq (Rapid reagent kits)	I5 index reverse HiSeq 3000/4000 HiSeq X NextSeq (all systems) MiniSeq (Standard reagent kits) NovaSeq 6000 (v1.5 reagent kits) iSeq 100
B9	UMIRC_AN66	TATCGGTCNNNNNNNNNN	ATCCGGTA	TACCGGAT
C9	UMIRC_AN67	AACGTCTGNNNNNNNNNN	GCGTCATT	AATGACGC
D9	UMIRC_AN68	ACGTTTCAGNNNNNNNNNN	GCACAACCT	AGTTGTGC
E9	UMIRC_AN69	CAGTCCAANNNNNNNNNN	GATTACCG	CGGTAATC
F9	UMIRC_AN70	TTGCAGACNNNNNNNNNN	ACCACGAT	ATCGTGGT
G9	UMIRC_AN71	CAATGTGGNNNNNNNNNN	GTCGAAGA	TCTTCGAC
H9	UMIRC_AN72	ACTCCATCNNNNNNNNNN	CCTTGATC	GATCAAGG
A10	UMIRC_AN73	GTTGACCTNNNNNNNNNN	AAGCACTG	CAGTGCTT
B10	UMIRC_AN74	CGTGTGTANNNNNNNNNN	TTCGTTGG	CCAACGAA
C10	UMIRC_AN75	ACGACTTGNNNNNNNNNN	TCGCTGTT	AACAGCGA
D10	UMIRC_AN76	CACTAGCTNNNNNNNNNN	GAATCCGA	TCGGATTC
E10	UMIRC_AN77	ACTAGGAGNNNNNNNNNN	GTGCCATA	TATGGCAC
F10	UMIRC_AN78	GTAGGAGTNNNNNNNNNN	CTTAGGAC	GTCCTAAG
G10	UMIRC_AN79	CCTGATTGNNNNNNNNNN	AACTGAGC	GCTCAGTT
H10	UMIRC_AN80	ATGCACGANNNNNNNNNN	GACGATCT	AGATCGTC
A11	UMIRC_AN81	CGACGTTANNNNNNNNNN	ATCCAGAG	CTCTGGAT
B11	UMIRC_AN82	TACGCCTTNNNNNNNNNN	AGAGTAGC	GCTACTCT
C11	UMIRC_AN83	CCGTAAGANNNNNNNNNN	TGGACTCT	AGAGTCCA
D11	UMIRC_AN84	ATCACACGNNNNNNNNNN	TACGCTAC	GTAGCGTA

E11	UMIRC_AN85	CACCTGTTNNNNNNNNN	GCTATCCT	AGGATAGC
F11	UMIRC_AN86	CTTCGACTNNNNNNNNN	GCAAGATC	GATCTTGC
G11	UMIRC_AN87	TGCTTCANNNNNNNNN	ATCGATCG	CGATCGAT
H11	UMIRC_AN88	AGAACGAGNNNNNNNNN	CGGCTAAT	ATTAGCCG
A12	UMIRC_AN89	GTTCTCGTNNNNNNNNN	ACGGAACA	TGTTCCGT
B12	UMIRC_AN90	TCAGGCTTNNNNNNNNN	CGCATGAT	ATCATGCG
C12	UMIRC_AN91	CCTGTAGNNNNNNNNN	TTCCAAGG	CCTTGAA
D12	UMIRC_AN92	GAACATCGNNNNNNNNN	CTTGTCGA	TCGACAAG
E12	UMIRC_AN93	TAACCGGTNNNNNNNNN	GAGACGAT	ATCGTCTC
F12	UMIRC_AN94	AACCGTTCNNNNNNNNN	TGAGCTAG	CTAGCTCA
G12	UMIRC_AN95	TGGTACAGNNNNNNNNN	ACTCTCGA	TCGAGAGT
H12	UMIRC_AN96	ATATGCGCNNNNNNNNN	CTGATCGT	ACGATCAG

Nonacus Limited
Quinton Business Park
11 Ridgeway
Birmingham
B32 1AF

info@nonacus.com

nonacus.com