

**QKGEN[®] 细菌 16S rDNA V3-V4
文库构建试剂盒 (for Illumina)**

使用说明书 (V2.0)

本产品仅供科研用途

目 录

产品简介:	1
产品信息:	1
保存方法:	1
注意事项:	1
操作流程图:	2
一、 16S rDNA V3-V4 区域扩增	3
二、 区域扩增产物纯化或片段筛选	3
三、 区域扩增纯化产物浓度检测	4
四、 末端修复 / 加 A 尾	4
五、 接头连接	5
六、 接头连接产物纯化	5
七、 文库扩增	6
八、 文库扩增产物纯化/片段分选	6
九、 文库质控	7
附录 1 16S rDNA V3-V4 区域扩增引物信息	8
附录 2 片段分选操作步骤	9
附录 3 可能出现的问题及其解决方法	10
附录 4 Adapter 与 index 序列信息及选择方案	11

QKGEN® 细菌 16S rDNA V3-V4 区域文库构建试剂盒 (for Illumina)

产品简介:

本试剂盒是专门为细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区域设计的二代测序文库制备试剂盒，适用于 illumina 平台。本试剂首先将 16S rDNA 的 V3-V4 区域进行特异性扩增，然后进行末端修复及“A”尾添加、接头连接等步骤，构建出完整的 illumina 文库。本试剂盒目标区域约 450bp，推荐使用 illumina Miseq 平台 PE300 或 Novaseq PE250 策略进行测序。

产品信息:

产品组分	用量	规格 96T (Q160096)
Phusion Master Mix (2×)	15μL	1440μL
V3_V4 Panel mix	2.4μL	230.4μL
末修与加 A 缓冲液	10μL	960μL
末修与加 A 酶	5μL	480μL
T4 链接缓冲液	34μL	3264μL
T4 DNA 链接酶	6μL	576μL
通用 adapter (15μM)	5μL	480μL
HiFi 文库扩增试剂 (2×)	15μL	1440μL
Index Primer (CDI 001~CDI 096)	5μL	5μL/孔

保存方法:

-20°C

注意事项:

1. 本试剂盒适用以下各种类型样本进行细菌 16S rDNA 扩增测序，如：粪便、唾液、痰液、尿液、阴道分泌物等其他体液，以及土壤、海水、河水等环境样本。
2. 本试剂盒推荐投入量为 1-10ng 纯细菌 DNA，如无法确定细菌 DNA 量请参考附录 3。
3. 本试剂盒适用双端测序 PE250 或 PE300，建议使用 illumina Miseq 平台。
4. 本试剂盒所得文库为纯细菌 16S rDNA 片段文库，文库类型单一，在上机时建议加入占总数据量 5%~20%的 phi X 文库，确保碱基平衡。
5. 本试剂盒推荐使用 Beckman 磁珠分选试剂 (Agencourt AMPure XP reagent)、或齐凯基因磁珠分选试剂进行产物纯化和片段分选。
6. 本试剂盒仅包含扩增及文库制备所需试剂，其他耗材和试剂需自备。如：1.5mL 离心管、0.2 mL PCR 管、磁力架、各规格移液器、各规格枪头、无水乙醇、无核酸酶水 (Nuclease-free Water)、low TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0)、纯化磁珠。
7. 使用本试剂盒前，请将各组分管置于冰上解冻，解冻后颠倒混匀，短暂离心后置于冰上

待用。

操作流程图：

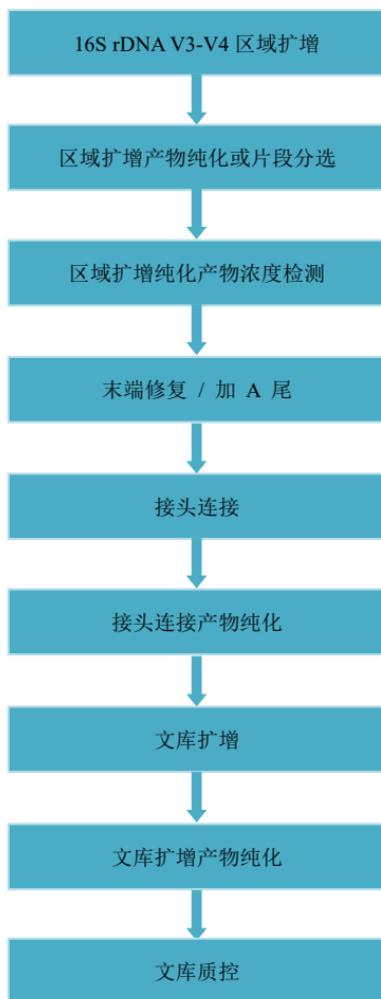


图 1. 16S rDNA V3-V4 区域文库构建操作流程图

一、16S rDNA V3-V4 区域扩增

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管或八联 PCR 管或 96 孔 PCR 板，根据表一内容，在冰上配制 16S rDNA V3-V4 扩增反应液：

表一 16S rDNA V3-V4 扩增反应液

试剂名称	体积
Phusion Master Mix (2×)	15μL
V3_V4 Panel mix	2.4μL
细菌 DNA (2ng/μL) *	5 μL
无核酸酶水	7.6μL
总体积	30 μL

- *注：a. 纯细菌DNA推荐投入量为1-10ng，投入体积≥1μL。
b. 若样本包含大量非细菌DNA，无法正确确定细菌DNA量时，投入体积为2μL。
c. 若样本质量非常低时，甚至无法检测到时，建议投入体积为12.6μL。

2. 轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表二设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表二 16S rDNA V3-V4 扩增反应程序

循环数	温度 (热盖 105°C)	时间
1	98°C	1 min
25-30 *	98°C	10s
	50°C	30s
	72°C	30s
1	72°C	5min
1	4°C	Hold

- *注：a. 当样本为1-10ng 纯细菌DNA时，使用25个循环进行扩增。
b. 当样本包含大量非细菌DNA，无法正确确定细菌DNA量时，使用25个循环扩增。
c. 若样本质量非常低时，甚至无法检测到时，使用30个循环扩增。

3. 取 2μL 扩增产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带在 400-500 之间，如无扩增产物，解决方法参考附录 3；如出现非特异条带，建议进行片段筛选（片段筛选步骤参考附录 2）。

二、区域扩增产物纯化或片段筛选

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。

2. 将 28 μ L 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 1 倍体积（28 μ L）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
3. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2 min，直至溶液完全变澄清。
4. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
5. 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
8. 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μ L 至新的 1.5mL 离心管中。

备注：如产物需进行片段筛选，操作流程则参考附录 2 的片段筛选操作步骤进行。

三、区域扩增纯化产物浓度检测

1. 使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测。
2. 根据浓度，取 50ng 产物进行文库构建，剩余产物-20 $^{\circ}$ C低温保存备用。

四、末端修复 / 加 A 尾

1. 取出洁净的 0.2mL PCR 管或八联 PCR 管或 96 孔 PCR 板，根据表三内容，在冰上配制末端修复及加 A 反应液：

表三 末端修复及加 A 反应液

试剂名称	体积
PCR 纯化产物（50ng）	35 μ L
未修与加 A 缓冲液	10 μ L
未修与加 A 酶	5 μ L
总体积	50 μ L

2. 轻柔震荡混合均匀，瞬时离心，立即将 PCR 管置于提前按照表四设置好程序的 PCR 仪上进行反应。

表四 末端修复及加 A 反应程序

温度（热盖 105 $^{\circ}$ C）	时间
20 $^{\circ}$ C	30 min

65°C	30 min
4°C	Hold

五、接头连接

1. 向末端修复/加 A 的产物中，加入以下表格配制的接头连接反应体系：

表五 接头连接反应体系

试剂名称	体积
末端修复及加 A 纯化产物	50 μ L
T4 链接缓冲液	34 μ L
T4 DNA 链接酶	6 μ L
通用 adapter*	5 μ L
无核酸酶水	5 μ L
总体积	100 μ L

注：*a. 通用adapter应与T4 DNA链接酶分开添加，避免产生接头二聚体。建议先往末端修复/加A产物中加入通用adapter，再加入其他成分或其他成分配好的mix。

2. 使用移液器轻轻吹打或轻柔振荡混匀，并短暂离心将反应液离心至管底。
3. 将上述 PCR 管置于提前按照表六设置好程序的 PCR 仪中反应。

表六 接头连接反应程序

温度（无热盖）	时间
20°C	15min
4°C	Hold

六、接头连接产物纯化

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 将 100 μ L 连接产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 0.8 倍体积（80 μ L）的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
3. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2min，直至溶液完全变澄清。
4. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
5. 加入 200 μ L 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
6. 重复步骤 5 一次。
7. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）

8. 将离心管从磁力架上取下，加入 21 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 20 μ L 至新的 PCR 管中。

七、文库扩增

1. 根据下表七所示配制文库扩增反应体系：

表七 文库扩增反应体系

试剂名称	体积
接头连接纯化产物	20 μ L
Index Primer CDI XXX	5 μ L
HiFi 文库扩增试剂 (2 \times)	25 μ L
总体积	50 μ L

注：*每个样本加入不同的 Index 引物 i5XX 和 Index 引物 i7XX，具体引物及 index 序列及组合方案详见附录 4。

2. 使用移液器轻轻吹打或轻柔振荡混匀，并短暂离心。
3. 按下表八设置反应程序，将上述 PCR 管置于 PCR 仪中反应。

表八 文库扩增反应程序

循环数	温度 (热盖 105 $^{\circ}$ C)	时间
1	98 $^{\circ}$ C	45s
7	98 $^{\circ}$ C	15s
	65 $^{\circ}$ C	30s
	72 $^{\circ}$ C	30s
1	72 $^{\circ}$ C	1min
1	4 $^{\circ}$ C	Hold

八、文库扩增产物纯化/片段分选

1. 提前取出纯化磁珠室温平衡 30 min。
2. 将 50 μ L 扩增产物转移到新的 1.5mL 离心管中，加入 0.6 倍体积 (30 μ L) 的纯化磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温静置孵育 5 min。
3. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 2 min，直至溶液完全变澄清。
4. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
5. 加入 200 μ L 80%乙醇溶液 (现配现用)，室温静置 30s，小心吸弃上清液。
6. 重复步骤 5 一次。

-
7. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
 8. 将离心管从磁力架上取下，加入 31 μ L 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 3-5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 30 μ L 至新的 1.5mL 离心管中。

九、文库质控

1. 浓度检测：推荐使用 Qubit dsDNA HS 分析试剂盒或齐凯基因提供的文库定量试剂盒进行文库浓度检测，出库浓度应 \geq 5 ng/ μ L。
2. 片段分布检测：推荐使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行片段长度分布检测，片段长度应在 580-620bp 处有明显主峰，且无杂峰。
符合以上要求的文库可上机测序。

附录 1 16S rDNA V3-V4 区域扩增引物信息

引物名称	序列 (5'-3')
上游引物	CCTAYGGGRBGCASCAG
下游引物	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
扩增长度	465bp

附录 2 片段分选操作步骤

1. 提前 30min 将纯化磁珠置于室温平衡，配制 80% 乙醇。
2. 先确保样品体积 $\geq 100 \mu\text{L}$ ，不足 $100 \mu\text{L}$ ，应加无核酸酶水补足。
3. 根据 DNA 片段长度要求，参考以下表格向样品中加入第一轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。

表 1 DNA 文库不同片段大小的推荐磁珠用量

DNA 片段大小	250-350bp	350-450bp	400-500bp
第一轮加入磁珠体积倍数	0.8×	0.7×	0.65×
第二轮加入磁珠体积倍数	0.2×	0.2×	0.15×

注意：分选磁珠体积均为 DNA 样品体积的倍数，如样品体积为 $100 \mu\text{L}$ ，第一轮分选磁珠为 0.8X，即 $80 \mu\text{L}$ 。

4. 孵育完成后，将离心管置于磁力架上，室温静置 5min，直至溶液完全变澄清。
5. 小心将上清液转移到新的 1.5mL 离心管中（注意不要吸取到磁珠），丢弃磁珠。
6. 向上清液中加入第二轮分选磁珠，用移液器轻柔吹打混匀，室温孵育 5min。
7. 小心吸弃上清液，保留磁珠。
8. 加入 $200 \mu\text{L}$ 80%乙醇溶液（现配现用），室温静置 30s，小心吸弃上清液。
9. 重复步骤 8 一次。
10. 尽可能将残留的乙醇吸弃，注意不要吸到磁珠。保持离心管在磁力架上，打开离心管管盖，室温晾干至磁珠看不到反光（约 1-3 min）。（注意磁珠不能太干，不能出现干裂，否则影响得率）
11. 加入 $21 \mu\text{L}$ 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 5 min，将离心管置于磁力架上，待溶液完全变澄清，小心移取 $20 \mu\text{L}$ 至新的 PCR 管或 1.5mL 离心管中。

附录 3 可能出现的问题及其解决方法

出现问题	可能原因	解决方法
待测样本及阳性对照均无产物	<ol style="list-style-type: none"> 1、区域扩增体系配制错误，漏加某个试剂。 2、PCR 仪损坏，无法正确制热。 	严格按照说明书操作，重新配制反应液，并使用新的 PCR 仪进行反应。
待测样本无 PCR 产物，而阳性对照有产物	<ol style="list-style-type: none"> 1、样本中细菌 DNA 总量非常低。 2、样本 DNA 中存在大量 PCR 抑制物。 	<ol style="list-style-type: none"> 1、增大样本投入量至 12.6μL，或/并增大扩增循环数至 30cycles。 2、将样本 DNA 稀释 10 倍，使用原来的循环数或增大循环数进行扩增。 3、重新提取细菌 DNA，建议使用 QIAGEN 品牌的试剂盒进行提取。
阴性对照有 PCR 产物	<ol style="list-style-type: none"> 1、阴性对照被之前的 PCR 产物污染。 2、扩增试剂盒的组分受到之前的 PCR 产物污染。 	<ol style="list-style-type: none"> 1、更换新的无菌的阴性对照进行扩增。 2、更换新的未拆封过的试剂盒进行扩增。 3、以上操作均要在新的实验室环境或生物安全柜中进行，确保当前实验环境无气溶胶污染。
区域扩增纯化产物总量不足 50ng	样本中细菌 DNA 量非常少	若根据第二个问题中的解决方法仍无法达到 50ng，可在文库扩增步骤增加循环数至 9 个 cycles。
文库产量偏低，不足 100ng	<ol style="list-style-type: none"> 1、没有正确定量区域扩增产物，实际投入末端修复及加“A”反应的总量偏小。 2、建库时通用 adapter 与 T4 链接酶先混合后再加入样品中，导致接头连接的效率低下。 	严格按照说明书进行区域扩增产物的定量，重新构建文库。

附录 4 Adapter 与 index 序列信息及选择方案

一、通用 Adapter 序列信息：

通用 Adapter 名称	序列 (5'-3')
PE1.0	5'-p-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-3'
PE2.0	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC-s-T-3'

注：p 代表磷酸化修饰，s 代表硫代修饰

二、Index 序列及选择方案

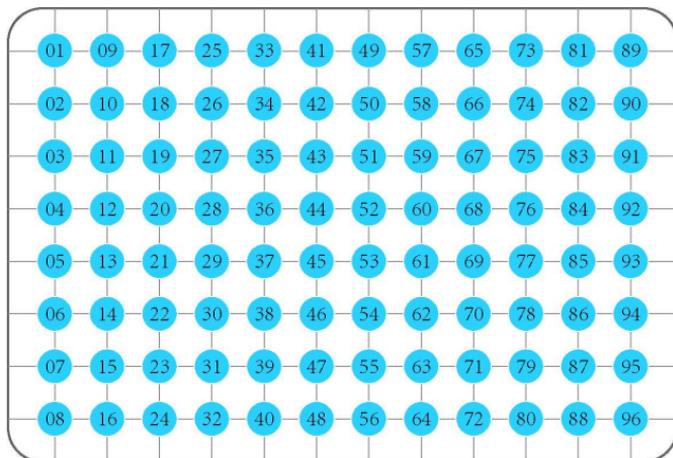


图 2：96 种 CDI-index 引物对应的孔位关系

Index 序列：

接头编号	i7_index 名称	i7 index (all Illumina® systems)	i5_index 名称	i5 index (HiSeq® 2000/2500, MiSeq®, NovaSeq® v1.0 systems)	i5 index (HiSeq® 3000, 4000, HiSeq® X, N extSeq®, MiniSeq®, NovaSeq® v1.5 systems)
CDI-001	Index i701	ATTACTCG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-002	Index i701	ATTACTCG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-003	Index i701	ATTACTCG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-004	Index i701	ATTACTCG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-005	Index i701	ATTACTCG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-006	Index i701	ATTACTCG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-007	Index i701	ATTACTCG	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-008	Index i701	ATTACTCG	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-009	Index i702	TCCGGAGA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-010	Index i702	TCCGGAGA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-011	Index i702	TCCGGAGA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-012	Index i702	TCCGGAGA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-013	Index i702	TCCGGAGA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-014	Index i702	TCCGGAGA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-015	Index i702	TCCGGAGA	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-016	Index i702	TCCGGAGA	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-017	Index i703	CGCTCATT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-018	Index i703	CGCTCATT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-019	Index i703	CGCTCATT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-020	Index i703	CGCTCATT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA

CDI-021	Index i703	CGCTCATT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-022	Index i703	CGCTCATT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-023	Index i703	CGCTCATT	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-024	Index i703	CGCTCATT	Index i508	GTCAGTAC	GTACTIONG
CDI-025	Index i704	GAGATTCC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-026	Index i704	GAGATTCC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-027	Index i704	GAGATTCC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-028	Index i704	GAGATTCC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-029	Index i704	GAGATTCC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-030	Index i704	GAGATTCC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-031	Index i704	GAGATTCC	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-032	Index i704	GAGATTCC	Index i508	GTCAGTAC	GTACTIONG
CDI-033	Index i705	ATTCAGAA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-034	Index i705	ATTCAGAA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-035	Index i705	ATTCAGAA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-036	Index i705	ATTCAGAA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-037	Index i705	ATTCAGAA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-038	Index i705	ATTCAGAA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-039	Index i705	ATTCAGAA	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT
CDI-040	Index i705	ATTCAGAA	Index i508	GTCAGTAC	GTACTIONG
CDI-041	Index i706	GAATTCGT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-042	Index i706	GAATTCGT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-043	Index i706	GAATTCGT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-044	Index i706	GAATTCGT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-045	Index i706	GAATTCGT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-046	Index i706	GAATTCGT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-047	Index i706	GAATTCGT	Index i507	ACGTCTCG	CAGGACGT

CDI-048	Index i706	GAATTCGT	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-049	Index i707	CTGAAGCT	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-050	Index i707	CTGAAGCT	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-051	Index i707	CTGAAGCT	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-052	Index i707	CTGAAGCT	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-053	Index i707	CTGAAGCT	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-054	Index i707	CTGAAGCT	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-055	Index i707	CTGAAGCT	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-056	Index i707	CTGAAGCT	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-057	Index i708	TAATGCGC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-058	Index i708	TAATGCGC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-059	Index i708	TAATGCGC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-060	Index i708	TAATGCGC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-061	Index i708	TAATGCGC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-062	Index i708	TAATGCGC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-063	Index i708	TAATGCGC	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-064	Index i708	TAATGCGC	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-065	Index i709	CGGCTATG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-066	Index i709	CGGCTATG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-067	Index i709	CGGCTATG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-068	Index i709	CGGCTATG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-069	Index i709	CGGCTATG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-070	Index i709	CGGCTATG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-071	Index i709	CGGCTATG	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-072	Index i709	CGGCTATG	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-073	Index i710	TCCGCGAA	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-074	Index i710	TCCGCGAA	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC

CDI-075	Index i710	TCCGCGAA	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-076	Index i710	TCCGCGAA	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-077	Index i710	TCCGCGAA	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-078	Index i710	TCCGCGAA	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-079	Index i710	TCCGCGAA	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-080	Index i710	TCCGCGAA	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-081	Index i711	TCTCGCGC	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-082	Index i711	TCTCGCGC	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-083	Index i711	TCTCGCGC	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-084	Index i711	TCTCGCGC	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-085	Index i711	TCTCGCGC	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-086	Index i711	TCTCGCGC	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-087	Index i711	TCTCGCGC	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-088	Index i711	TCTCGCGC	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC
CDI-089	Index i712	AGCGATAG	Index i501	AGGCTATA	TATAGCCT
CDI-090	Index i712	AGCGATAG	Index i502	GCCTCTAT	ATAGAGGC
CDI-091	Index i712	AGCGATAG	Index i503	AGGATAGG	CCTATCCT
CDI-092	Index i712	AGCGATAG	Index i504	TCAGAGCC	GGCTCTGA
CDI-093	Index i712	AGCGATAG	Index i505	CTTCGCCT	AGGCGAAG
CDI-094	Index i712	AGCGATAG	Index i506	TAAGATTA	TAATCTTA
CDI-095	Index i712	AGCGATAG	Index i507	ACGTCCTG	CAGGACGT
CDI-096	Index i712	AGCGATAG	Index i508	GTCAGTAC	GTA CTGAC