



Preparação da biblioteca de sequenciação com o kit de preparação de DNA da Illumina

Para utilização com o kit de preparação de ADN da Illumina (antigo kit Nextera Flex).

Nota: Centrifugue sempre as placas e os tubos antes de os abrir para minimizar a possibilidade de contaminação.

Nota: Para evitar a contaminação cruzada, mude as pontas entre cada amostra quando adicionar ou transferir amostras ou misturas principais de reagentes.

Nota: Se estiver a utilizar tubos de 8 tiras no termociclador, é importante incluir pelo menos 3 tiras de tubos no total para equilibrar a pressão da tampa (os tubos " EQUILIBRIO" vazios não têm problemas).

Nota: Ao preparar reacções de PCR, é importante trabalhar sempre com gelo (ou blocos frios) para evitar que os componentes reactivos ao calor sejam activados prematuramente. Além disso, tenha em conta o tempo que a tampa do termociclador demora a atingir a temperatura de reacção e aqueça previamente o termociclador em conformidade.

Nota: Deixe sempre que as esferas SPRI atinjam a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de as utilizar.

Materiais

Equipamento:

- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200 (pipeta multicanal opcional)
- Termociclador
- Centrifugadora de tubos
- Centrífuga de placas
- Vortex
- Íman para placas de 96 poços
- Selador de placas
- Temporizador
- Fluorómetro QuBit
- Bioanalisador

Consumíveis:

- Placas de PCR de 96 poços
- Placa de armazenamento profunda de polipropileno de 0,8 ml com 96 cavidades (placa midi) (2)
- Selo adesivo para placas Microseal B (utilizado para cobrir as amostras durante as reacções)
- Selo de folha de alumínio micro-vedante F (utilizado para armazenamento a longo prazo)
- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml
- Tubos de 8 tiras com tampa
- Pontas de pipeta: P20, P200
- Equipamento adequado de EPI e de biossegurança

Reagentes:

- Kit de preparação de DNA Illumina
- Índices IDT da Illumina UD
- Água sem Nuclease
- Etanol



Preparação do Pré-Protocolo

Preparação da placa de índice

1. Determine o conjunto de índices a ser utilizado. Os índices IDT para Illumina UD podem ser utilizados em qualquer plataforma de sequenciação da Illumina, enquanto os índices Illumina Nextera CD só devem ser utilizados nas plataformas MiSeq e NextSeq (para obter mais informações, consulte este link).

Nota: Tenha em atenção que devem ser utilizados diferentes cavidades da mesma placa de índice para amostras num lote de sequenciação (ou seja, as cavidades não podem ser misturadas e combinadas entre placas de índice).

Nota: Cada cavidade de uma placa de índice só pode ser utilizada uma vez (numa única amostra, num único lote). Se não tiver utilizado todas as cavidades de uma placa de índice, pode voltar a congelar a placa e utilizar as cavidades não abertas num lote de sequenciação subsequente.

2. Utilizando a tabela apropriada no Apêndice A, anote o(s) índice(s) utilizado(s) para cada amostra (para índices UD, anote o índice selecionado; para índices CD, anote ambos os valores da célula apropriada). Esta é uma etapa crucial do processo - em caso de esquecimento de anotar os índices utilizados, os dados de sequenciação não podem ser processados no pipeline bioinformático.

Marcação do DNA genómico

Esta etapa utiliza os transposomas ligados a esferas para marcar o DNA, que é um processo que fragmenta e marca o DNA com sequências adaptadoras.

Equipamento:

- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200
- Termociclador
- Centrifugador de tubos
- Vortex

Consumíveis:

- Placas de PCR de 96 cavidades
- Selo adesivo para placas Microvedante B
- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml
- Tira de 8 tubos
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Transposomas ligados a esferas (BLT) - do kit de preparação de DNA da Illumina
- Tampão de marcação 1 (TB1) - do kit de preparação de DNA da Illumina
- Água sem nuclease



Protocolo:

1. Coloque os transposomas ligados a esferas (BLT) à temperatura ambiente. Agitar em vortex para misturar. Não centrifugar antes de pipetar. Não utilizar BLT que tenha sido armazenado a temperaturas inferiores a 2°C.
2. Colocar o Tampão de Marcação (TB1) à temperatura ambiente. Agitar no vortex para misturar.
3. Preparar 20-23* amostras de DNA mais 1 controlo negativo de água sem nuclease por biblioteca. Adicionar 2-30 µL de DNA a cada cavidade de uma placa de PCR de 96 cavidades, de modo a que a quantidade total de entrada para cada amostra seja de 10-24 ng**. Assegurar que é adicionada a mesma quantidade de DNA para cada amostra.

Nota: O número de amostras de DNA a multiplexar depende do comprimento do genoma, da cobertura pretendida e da tecnologia de sequenciação a utilizar. Esta recomendação é para genomas bacterianos de ~4M, cobertura de ~30x e uma execução MiSeq com o kit de reagentes V2.

Nota: O DNA de entrada pode ser tão pequeno como 1 ng e tão grande como 500 ng. A quantidade de entrada deve ser registada para cada amostra e o número de ciclos de PCR em Amplificar DNA marcado deve ser ajustado em conformidade. Consulte o Manual da Illumina DNA Referência da Preparação para efetuar ajustes caso o DNA de entrada for <10 ng ou >24 ng.

4. Se o volume de DNA de qualquer amostra for <30 µL, adicione água sem nuclease à amostra de DNA para aumentar o volume total para 30 µL.
5. Agitar vigorosamente o BLT (tampa amarela) durante 10 segundos para o ressuspender. Repetir se necessário.
6. Preparar a seguinte reação por amostra:

Componente	Volume
BLT	10 µL
TB1	10 µL
DNA	30 µL
Volume Total	50 µL

Note: BLT e TB1 podem ser combinados antecipadamente numa mistura principal. Agitar bem a mistura principal de marcação no vortex para a ressuspender e, utilizando uma nova ponta de pipeta para cada amostra, adicionar 20 µL de mistura principal a cada cavidade da placa que contenha uma amostra.

7. Pipetar cada amostra 10 vezes para a ressuspender. Utilizar pontas novas para cada amostra.
8. Selar a placa com Microvedante B ou outro vedante opticamente transparente.
9. Efetuar os seguintes ensaios num termociclador:

Temperatura	Tempo
55°C	15 min
10°C	∞

Nota: Selecionar a opção de tampa de pré-aquecimento e definir para 100°C. Definir o volume de reação para 50 µL.



Limpeza pós-tagmentação

Este passo lava o DNA marcado com adaptador no BLT antes da amplificação por PCR.

Equipamento:

- Íman para placas de 96 cavidades
- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200 (pipeta multicanal opcional)
- Termociclador
- Centrifugadora de tubos
- Vortex

Consumíveis:

- Selo adesivo de placa Microvedante B
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Tampão de paragem de marcadores (TSB) - do kit de preparação de DNA da Illumina
- Tampão de lavagem do marcador (TWB) - do kit de preparação do DNA Illumina

Protocolo:

1. Se forem observados precipitados no Tampão de Paragem do Marcador (TSB), aquecer a 37°C durante 10 minutos e, em seguida, agitar em vórtice até os precipitados se dissolverem. Utilizar à temperatura ambiente.
2. Adicionar 10 µL de TSB a cada cavidade de amostra da reação de marcação.
3. Pipetar lentamente cada cavidade 10 vezes para ressuspender as esferas.
4. Selar a placa com Microvedante B.
5. Executar o seguinte num termociclador:

Temperatura	Tempo
37°C	15 min
10°C	∞

Nota: Selecionar a opção de tampa de pré-aquecimento e definir para 100°C. Definir o volume de reação para 60 µL.

6. Colocar a placa no suporte magnético e esperar até o líquido ficar transparente (~3 minutos).
7. Retirar e deitar fora o sobrenadante, tendo o cuidado de não romper as esferas.



Protocolo de sequenciação Illumina

8. Retirar a placa de amostras do suporte magnético e utilizar uma técnica de pipetagem deliberadamente lenta para adicionar 100 µl de TWB (à temperatura ambiente) diretamente sobre as esferas. Uma técnica de pipetagem deliberadamente lenta minimiza o potencial de formação de espuma da TWB para evitar uma aspiração incorrecta do volume e uma mistura incompleta.
9. Pipetar lentamente até as esferas estarem completamente ressuspensas.
10. Colocar a placa no suporte magnético e aguardar até que o líquido fique transparente (~3 minutos).
11. Utilizando uma pipeta multicanal, retire e deite fora o sobrenadante.
12. Repetir os passos 8-11 para um total de duas lavagens.
13. Retirar a placa do suporte magnético e utilizar uma técnica de pipetagem deliberadamente lenta para adicionar 100 µl de TWB diretamente sobre as esferas.
14. Pipetar cada cavidade lentamente para ressuspender as esferas.
15. Selar a placa e colocar no suporte magnético até o líquido ficar transparente (~3 minutos). Manter no suporte magnético até ao Passo 4 da secção Amplificar DNA Marcado abaixo. O TWB permanece nas cavidades para evitar a secagem excessiva das esferas.

DNA Amplificar o DNA marcado

Esta etapa amplifica o DNA marcado utilizando um programa de PCR de ciclo limitado. A etapa de PCR adiciona adaptadores e sequências necessárias para a geração de agrupamentos de sequências.

Equipamento:

- Íman para placas de 96 cavidades
- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200 (pipeta multicanal opcional)
- Termociclador
- Centrifugadora de tubos
- Centrifuga de placas
- Vortex

Consumíveis:

- Selo adesivo de placa Microvedante B
- Tubos de microcentrifugação de 1,5mL
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Mistura de PCR melhorada (EPM) - do kit de preparação de DNA da Illumina
- Adaptadores de índice (tubos ou placas)
- Água sem nuclease



Protocolo:

1. Descongelar o EPM em gelo. Inverter para misturar em seguida centrifugar rapidamente.
2. Descongele os Adaptadores de Índice à temperatura ambiente. Centrifugar imediatamente antes de utilizar.
3. Preparar a seguinte mistura principal por amostra:

Componente	Volume
EPM	20 µL
Água sem nuclease	20 µL
Volume Total	40 µL

Note: Agitar rapidamente a mistura principal no vortex e centrifugar a 280 x g durante 10 segundos.

4. Com a placa de DNA marcado no suporte magnético, utilizar uma pipeta de 200 µL para remover e eliminar o sobrenadante J (a espuma que permanece nas paredes das cavidades não afecta negativamente a biblioteca).
5. Retirar a placa do suporte magnético e adicionar imediatamente 40 µl de mistura principal diretamente às esferas. Utilizar uma ponta de pipeta separada para cada cavidade de amostra.
6. Pipetar imediatamente para misturar até as esferas estarem completamente ressuspensas. Selar a placa de amostras e centrifugar a 280 x g durante 3 segundos.
7. Preparar a placa de índice seleccionada centrifugando a placa de índice seleccionada a 1000 x g durante 1 minuto para afastar o líquido do selo.
8. Adicionar 10 µl do adaptador de índice adequado a cada amostra, tendo o máximo cuidado para evitar a contaminação. Mudar as pontas das pipetas entre cada adição e certificar-se de que anotou o(s) índice(s) adicionado(s) a cada amostra.
9. Utilizando uma pipeta regulada para 40 µL, pipetar 10 vezes para misturar. Em alternativa, selar a placa e utilizar um agitador de placas a 1600 rpm durante 1 minuto.
10. Selar a placa com Microvedante B e centrifugar a 280 x g durante 30 segundos.
11. Executar o seguinte num termociclador:

Temperatura	Tempo
68°C	3 min
98°C	3 min
98°C	45 segundos
62°C	30 segundos
68°C	2 min
Repeat steps 3, 4 & 5 for a total of 8 cycles	
68°C	1 min
10°C	∞



Nota: Selecionar a opção de tampa de pré-aquecimento e definir para 100°C. Definir o volume de reação para 50 µL. Aguardar até que a máquina atinja a temperatura antes de adicionar as amostras.

Nota: O número de ciclos pressupõe a entrada de 10-24 ng de DNA. Consultar o Guia de Referência de Preparação de ADN da Illumina para obter recomendações de ciclos para diferentes valores de entrada.

12. Nesta altura, o DNA pode ser armazenado a 2-8°C durante um máximo de 3 dias

Limpeza das bibliotecas

Esta etapa utiliza o procedimento de purificação de esferas de dupla face para purificar as bibliotecas amplificadas

Equipamento:

- Suporte de placas magnéticas
- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200 (pipeta multicanal opcional)
- Termociclador
- Centrifugadora de tubos
- Centrifuga de placas
- Vortex

Consumíveis:

- Placa de armazenamento profunda de 96 cavidades de polipropileno de 0,8 mL (placa midi) (2)
- Placa de PCR de 96 cavidades
- Selo adesivo Microvedante B para placa
- Microvedante F vedante em folha
- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Grânulos de purificação de amostras (SPB) - do kit de preparação de DNA da Illumina
- Tampão de ressuspensão (RSB) - do kit de preparação de DNA Illumina
- Etanol a 80% preparado de fresco
- Água sem nuclease

Protocolo:

1. Permitir que a amostra de esferas de purificação atinja a temperatura ambiente durante 30 minutos antes da utilização. Agitar os grânulos no vortex antes de cada utilização e pipetar lentamente devido à viscosidade da solução.
2. Descongelar o RSB e levar à temperatura ambiente. Agitar no vortex para misturar.
3. Centrifugar a 280 × g durante 1 minuto para recolher o conteúdo no fundo do recipiente.



Protocolo de sequenciação Illumina

4. Colocar a placa no suporte magnético e esperar até o líquido ficar transparente (~5 minutos).
5. Transferir 45 µl de sobrenadante de cada cavidade da placa PCR para a cavidade correspondente de uma nova placa midi.
6. Agitar no vortex e inverter a SPB várias vezes para a ressuspender.
7. Adicionar 40 µl de água sem nuclease a cada cavidade contendo o sobrenadante.
8. Adicionar 45 µl de SPB a cada alvéolo que contenha o sobrenadante.
9. Pipetar cada alvéolo 10 vezes para misturar. Em alternativa, selar a placa e utilizar um agitador de placas a 1600 rpm durante 1 minuto.
10. Selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos.
11. Colocar no suporte magnético e esperar até o líquido ficar transparente (~5 minutos).
12. Durante a incubação, agitar cuidadosamente no vórtex o SPB (tubo de estoque não diluído) e, em seguida, adicionar 15 µl a cada cavidade de uma nova placa midi.
13. Transferir 125 µl de sobrenadante de cada cavidade da primeira placa para a cavidade correspondente da segunda placa (contendo 15 µl de SPB não diluído).
14. Pipetar cada alvéolo da segunda placa 10 vezes para misturar. Em alternativa, selar a placa e utilizar um agitador de placas a 1600 rpm durante 1 minuto.
15. Deitar fora a primeira placa.
16. Incubar a placa midi selada à temperatura ambiente durante 5 minutos.
17. Colocar no suporte magnético e esperar até que o líquido fique transparente (~5 minutos).
18. Sem perturbar as esferas, remover e eliminar o sobrenadante.
19. Com a placa no suporte magnético, adicionar 200 µl de EtOH 80% fresco sem misturar.
20. Incubar durante 30 segundos.
21. Sem perturbar as esferas, remover e descartar o sobrenadante.
22. Repetir os passos 19-21 para um total de duas lavagens.
23. Utilize uma pipeta de 20 µl para remover e eliminar o EtOH residual.
24. Secar ao ar no suporte magnético durante 5 minutos. Evitar a secagem excessiva das esferas.
25. Retire do suporte magnético.
26. Adicionar 32 µl de RSB às esferas.



Protocolo de sequenciação Illumina

27. Pipete para ressuspender.
28. Incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos.
29. Colocar a placa no suporte magnético e esperar até o líquido ficar transparente (~2 minutos).
30. Transferir 30 μ l de sobrenadante para uma nova placa PCR de 96 cavidades.
31. Nesta altura, as bibliotecas podem ser armazenadas congeladas em segurança (-25°C a 15°C) durante um máximo de 30 dias

Bibliotecas de agrupamentos

Equipamento:

- Pipeta P20 (pipeta multicanal opcional)
- Pipeta P200 (pipeta multicanal opcional)
- Centrifugador de tubos
- Vortex

Consumíveis:

- Placa PCR de 96 cavidades
- Tubos de microcentrifugação de 1,5 ml
- Pontas de pipeta: P20, P200

Reagentes:

- Água sem nuclease

Protocolo:

1. Quantificar cada biblioteca individualmente utilizando um Fluorómetro Qubit.
2. Calcule o tamanho médio do fragmento e avalie a qualidade da biblioteca utilizando uma Estação de Fita ou um Analisador Biológico.

Nota: Não agrupe bibliotecas que sejam principalmente dímeros de primers. O tamanho médio do fragmento para este protocolo é de aproximadamente 600 pb. Os dímeros de primers aparecerão num Bioanalisador ou numa Estação de Fita como fragmentos mais curtos, com cerca de 150-200 pb de comprimento.

3. Diluir todas as bibliotecas para 5nM em água sem nuclease.
4. Agrupe bibliotecas individuais em quantidades equimolares, adicionando 5 μ L de cada biblioteca 5nM.

Nota: Agrupar as bibliotecas com concentração <5nM apenas se a biblioteca estiver relativamente isenta de dímeros de iniciadores. Neste caso, adicionar 5 μ L da biblioteca sem diluir.

5. Executar novamente o bioanalisador para obter a concentração final da biblioteca agrupada e o tamanho do fragmento.



Apêndice A

1. **Se utilizar os Índices Illumina UD**, as configurações de placa para as Placas A-D estão disponíveis aqui e nas tabelas abaixo. A sequência específica associada a cada índice (necessária para preparar uma folha de amostras) está disponível aqui. Se estiver a agrupar menos de 8 amostras, leia as "Estratégias de agrupamento de dois a oito plexos" deste site antes de selecionar os índices a utilizar.

IDT para índices Illumina UD Placa A/Conjunto 1

A tabela seguinte mostra a configuração da placa para IDT para Índices UD Illumina Placa A/Conjunto 1. Anote o índice único a ser adicionado a cada amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDP0001	UDP0009	UDP0017	UDP0025	UDP0033	UDP0041	UDP0049	UDP0057	UDP0065	UDP0073	UDP0081	UDP0089
B	UDP0002	UDP0010	UDP0018	UDP0026	UDP0034	UDP0042	UDP0050	UDP0058	UDP0066	UDP0074	UDP0082	UDP0090
C	UDP0003	UDP0011	UDP0019	UDP0027	UDP0035	UDP0043	UDP0051	UDP0059	UDP0067	UDP0075	UDP0083	UDP0091
D	UDP0004	UDP0012	UDP0020	UDP0028	UDP0036	UDP0044	UDP0052	UDP0060	UDP0068	UDP0076	UDP0084	UDP0092
E	UDP0005	UDP0013	UDP0021	UDP0029	UDP0037	UDP0045	UDP0053	UDP0061	UDP0069	UDP0077	UDP0085	UDP0093
F	UDP0006	UDP0014	UDP0022	UDP0030	UDP0038	UDP0046	UDP0054	UDP0062	UDP0070	UDP0078	UDP0086	UDP0094
G	UDP0007	UDP0015	UDP0023	UDP0031	UDP0039	UDP0047	UDP0055	UDP0063	UDP0071	UDP0079	UDP0087	UDP0095
H	UDP0008	UDP0016	UDP0024	UDP0032	UDP0040	UDP0048	UDP0056	UDP0064	UDP0072	UDP0080	UDP0088	UDP0096

IDT para Índices UD Illumina Placa B/Conjunto 2

A tabela seguinte apresenta a configuração da placa para IDT para Illumina UD Indexes Plate B/conjunto 2. Anote o índice único a ser adicionado a cada amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDP0097	UDP0105	UDP0113	UDP0121	UDP0129	UDP0137	UDP0145	UDP0153	UDP0161	UDP0169	UDP0177	UDP0185
B	UDP0098	UDP0106	UDP0114	UDP0122	UDP0130	UDP0138	UDP0146	UDP0154	UDP0162	UDP0170	UDP0178	UDP0186
C	UDP0099	UDP0107	UDP0115	UDP0123	UDP0131	UDP0139	UDP0147	UDP0155	UDP0163	UDP0171	UDP0179	UDP0187
D	UDP0100	UDP0108	UDP0116	UDP0124	UDP0132	UDP0140	UDP0148	UDP0156	UDP0164	UDP0172	UDP0180	UDP0188
E	UDP0101	UDP0109	UDP0117	UDP0125	UDP0133	UDP0141	UDP0149	UDP0157	UDP0165	UDP0173	UDP0181	UDP0189
F	UDP0102	UDP0110	UDP0118	UDP0126	UDP0134	UDP0142	UDP0150	UDP0158	UDP0166	UDP0174	UDP0182	UDP0190
G	UDP0103	UDP0111	UDP0119	UDP0127	UDP0135	UDP0143	UDP0151	UDP0159	UDP0167	UDP0175	UDP0183	UDP0191
H	UDP0104	UDP0112	UDP0120	UDP0128	UDP0136	UDP0144	UDP0152	UDP0160	UDP0168	UDP0176	UDP0184	UDP0192

**IDT para Índices Illumina UD Placa C/Conjunto 3**

A tabela seguinte mostra a configuração da placa para IDT para Illumina UD Indexes Plate B/Set 2. Anote o índice único a ser adicionado a cada amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDP0193	UDP0201	UDP0209	UDP0217	UDP0225	UDP0233	UDP0241	UDP0249	UDP0257	UDP0265	UDP0273	UDP0281
B	UDP0194	UDP0202	UDP0210	UDP0218	UDP0226	UDP0234	UDP0242	UDP0250	UDP0258	UDP0266	UDP0274	UDP0282
									V2			
C	UDP0195	UDP0203	UDP0211	UDP0219	UDP0227	UDP0235	UDP0243	UDP0251	UDP0259	UDP0267	UDP0275	UDP0283
D	UDP0196	UDP0204	UDP0212	UDP0220	UDP0228	UDP0236	UDP0244	UDP0252	UDP0260	UDP0268	UDP0276	UDP02854
									V2			
E	UDP0197	UDP0205	UDP0213	UDP0221	UDP0229	UDP0237	UDP0245	UDP0253	UDP0261	UDP0269	UDP0277	UDP0285
F	UDP0198	UDP0206	UDP0214	UDP0222	UDP0230	UDP0238	UDP0246	UDP0254	UDP0262	UDP0270	UDP0278	UDP0286
G	UDP0199	UDP0207	UDP0215	UDP0223	UDP0231	UDP0239	UDP0247	UDP0255	UDP0263	UDP0271	UDP0279	UDP0287
H	UDP0200	UDP0208	UDP0216	UDP0224	UDP0232	UDP0240	UDP0248	UDP0256	UDP0264	UDP0272	UDP0280	UDP0288

IDT para Índices Illumina UD Placa D/Conjunto 4

A tabela seguinte mostra a configuração da placa para IDT para Illumina UD Indexes Plate B/Conjunto 2. Anote o índice único a ser adicionado a cada amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UDP0289	UDP0297	UDP0305	UDP0313	UDP0321	UDP0329	UDP0337	UDP0345	UDP0353	UDP0361	UDP0369	UDP0377
	V2											
B	UDP0290	UDP0298	UDP0306	UDP0314	UDP0322	UDP0330	UDP0338	UDP0346	UDP0354	UDP0362	UDP0370	UDP0378
	V2											
C	UDP0291	UDP0299	UDP0307	UDP0315	UDP0323	UDP0331	UDP0339	UDP0347	UDP0355	UDP0363	UDP0371	UDP0379
	V2											
D	UDP0292	UDP0300	UDP0308	UDP0316	UDP0324	UDP0332	UDP0340	UDP0348	UDP0356	UDP0364	UDP0372	UDP0380
E	UDP0293	UDP0301	UDP0309	UDP0317	UDP0325	UDP0333	UDP0341	UDP0349	UDP0357	UDP0365	UDP0373	UDP0381
	V2											
F	UDP0294	UDP0302	UDP0310	UDP0318	UDP0326	UDP0334	UDP0342	UDP0350	UDP0358	UDP0366	UDP0374	UDP0382
G	UDP0295	UDP0303	UDP0311	UDP0319	UDP0327	UDP0335	UDP0343	UDP0351	UDP0359	UDP0367	UDP0375	UDP0383
H	UDP0296	UDP0304	UDP0312	UDP0320	UDP0328	UDP0336	UDP0344	UDP0352	UDP0360	UDP0368	UDP0376	UDP0384



2. **Se estiver a utilizar índices de CD Illumina**, a configuração da placa para os índices de CD Nextera DNA está disponível aqui ou na tabela abaixo. A sequência específica associada a cada índice (necessária para preparar a folha de amostras) está disponível aqui. Se o agrupamento for de menos de 8 amostras, leia a secção "Estratégias de agrupamento de dois a oito plexos" deste site antes de seleccionar os índices a utilizar.

Nota: Deve anotar os números H7 e H5 na célula seleccionada para cada amostra.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H701	H702	H703	H705	H707	H723	H706	H712	H720	H710	H711	H714
	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517
B	H702	H703	H701	H707	H723	H705	H712	H720	H706	H711	H714	H710
	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506
C	H703	H701	H702	H723	H705	H707	H720	H706	H712	H714	H710	H711
	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505	H506	H517	H505
D	H705	H707	H723	H706	H712	H720	H710	H711	H714	H701	H702	H703
	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503	H503
E	H706	H712	H720	H710	H711	H714	H701	H702	H703	H705	H707	H723
	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516	H516
F	H710	H711	H714	H701	H702	H703	H705	H707	H723	H706	H712	H720
	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513
G	H711	H714	H710	H702	H703	H701	H707	H723	H705	H712	H720	H706
	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510
H	H714	H710	H711	H703	H701	H702	H723	H705	H707	H720	H706	H712
	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522	H510	H513	H522