Набор реагентов для подготовки ампликоновых библиотек для массового параллельного секвенирования «MetaGen-16sRNA»

Версия 1.2

СИНТОЛ

Используемые пиктограммы

Знак	Описание
	Производитель
	Каталожный номер
	Срок годности
	Номер лота
	Температурный режим хранения
	Минимальное количество реакций
	Ссылка на информацию, размещённую на сайте производителя

Информация о продукте

MetaGen-16sRNA

Кат №	Количество реакций
NGS-MG-32	32
NGS-MG-96	96

Информация о производителе

ООО «НПФ Синтол», 125499, Москва,
Кронштадский б-р, д. 39, корп. 1, пом. 43/РМ 12-3
syntol@syntol.ru, www.syntol.ru

Описание и состав набора

Набор **«MetaGen-16sRNA»** предназначен для быстрого и точного анализа микробных сообществ, применяется в исследовании сложных микробных сообществ, позволяющий с высокой точностью и эффективностью подготовить ДНК для секвенирования нового поколения (NGS).

Преимуществом набора является широкая совместимость – работает с образцами из любых сред: почва, вода, кишечник, биопленки и др.

Компонент набора	**Кат. № «NGS-MG-32»**	**Кат. № «NGS-MG-96»**
MetaGen 2.5x PCR - буфер	1 мл	1 мл x 3
MetaGen-pol, 2U	32 реакции	96 реакций
dNTP 2,5 mM	500 мкл	500 мкл x 2
BSA, 40 mg	100 мкл	100 мкл
F_16S (5 mkM)	32 реакции	96 реакций
R_16S (5 mkM)	32 реакции	96 реакций
Dual Index	32 реакции	96 реакций
Деионизованная вода, ddH_2O	1,7 мл	1,7 мл x 3

Необходимые компоненты и материалы, не входящие в набор:

1. 80% EtOH (свежеприготовленный)
2. 0.1X TE (1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)
3. Магнитные частицы для разделения ДНК по размерам «SynMag Beads», кат. № «SynMag Beads-10» *(с протеиназой)
4. Набор реагентов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК «СинКвант *HS* ДНК», кат. № «E-023-250»
5. Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SybrGreen I, кат. № «M-439»
6. Набор для выделения из растительной и пищевой продукции «Сорб-ГМО-Б», кат. № GM-503-50
7. Набор для выделения из почв «Почва Экспресс», кат. № PH-525
8. Набор для выделения из тканей животных и человека «ДНК Экстран 2», кат. № EX-511

Необходимое оборудование:

1. Магнитный штатив
2. Амплификатор «ДТклассик»
3. Флуориметр для измерения концентрации ДНК, РНК и белков «Qubix», кат. № Qubix

Рекомендации к использованию набора

1. Рекомендуемый температурный режим хранения **-20 °C**.
2. После размораживания тщательно перемешивайте каждый компонент на вортексе в течение нескольких секунд, кроме компонента MetaGen-pol.
3. Перед началом операций на Qubix, необходимо прогреть все реактивы до комнатной температуры.
4. Рекомендуется оценить качество исходного материала ДНК перед приготовлением библиотек с помощью проведения Real-Time PCR.

Пороговый цикл (Ct) в RT PCR – ключевой параметр, используемый для количественной оценки целевой ДНК или РНК в образце. Чем ниже значение Ct, тем больше исходное количество целевой нуклеиновой кислоты в образце. Рекомендуется использовать образцы с Ct не более 25 цикла (синие кривые на рисунке 1).
При значениях Ct более 25 циклов, см рекомендации по программе амплификации в разделе **Этап 1**.

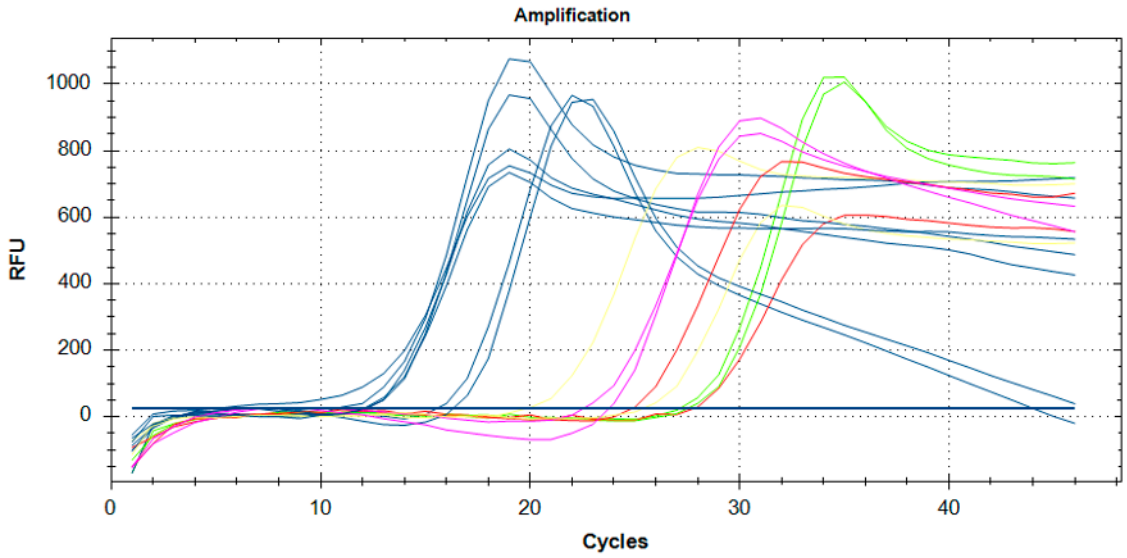
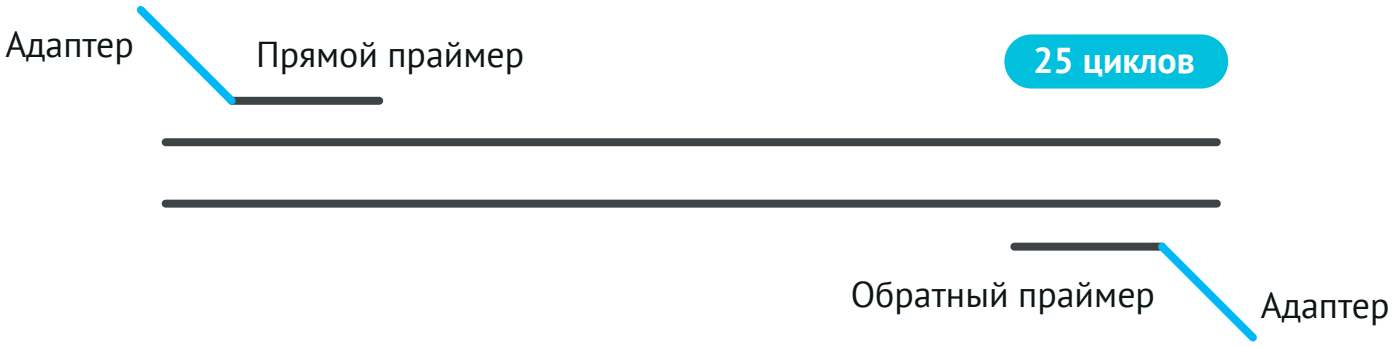


Рисунок 1. Пример результатов RT PCR для количественной оценки исходного материала ДНК перед приготовлением метагеномных библиотек.

Синие кривые – имеют Ct до 25 цикла и подходят для пробоподготовки.
Розовые и желтые кривые находятся на пределе рекомендуемого диапазона Ct.
Красные и зеленые кривые находятся за пределами рекомендуемого диапазона Ct.

Алгоритм подготовки библиотек фрагментов V3 и V4 гена 16S РНК

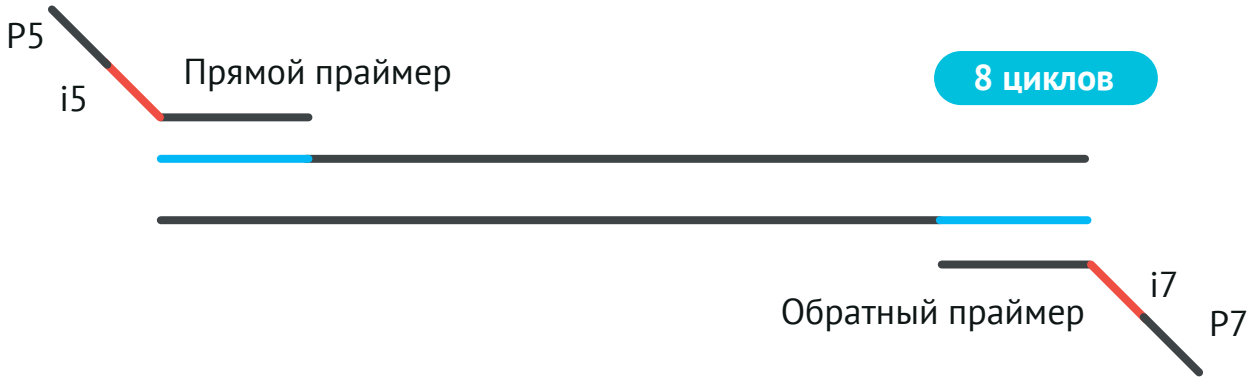
1. **Первая ПЦР** — Амплификация целевого участка мишени образцов геномной ДНК праймерами с адаптерами



2. Оценка продуктов ПЦР размером **~ 550 п.н.** на агарозном геле или приборе Нанофор 05. **Опционально!**

3. Очистка продуктов ПЦР с помощью магнитных частиц «SynMag beads»

4. **Вторая ПЦР** — Введение служебных индексов и адаптеров для секвенирования



5. Очистка продуктов ПЦР с помощью магнитных частиц «SynMag beads»

6. Оценка продуктов ПЦР размером **~ 630 п.н.** на агарозном геле или приборе Нанофор 05. **Опционально!**

7. Оценка концентраций продуктов второй ПЦР, их нормализация и пулирование

8. Массовое параллельное секвенирование

Инструкция

Этап 1. Первая ПЦР

На этом этапе ПЦР используется для амплификации фрагмента V3-V4 гена 16S рибосомальной РНК из образца выделенной ДНК.

1. Приготовить реакционную смесь по прописи:

Компонент	мкл/р-ю
Метаген 2.5x PCR - буфер	10
Метаген-pol, 2U	0,5
dNTPs (2,5 mM)	2
BSA* (40 mg)	0,22
F_16S (5 mkM)	1
R_16S (5 mkM)	1
ddH_2O	до 25
DNA (5 ng/ul)	2,5

*** Используется для приготовления библиотек из почв**

Отдельно!!!

2. Аккуратно пипетировать вверх и вниз 10 раз смеси в каждой лунке, используя наконечники с аэрозольным барьером.

3. Закрыть крышки планшета.

4. Центрифугировать планшет при 1000 g при комн. температуре в течение 1 минуты.

5. Провести ПЦР, используя следующую программу:

Температурный режим	Время	Количество циклов
98 °C	1 минута	
98 °C	7 секунд	25*
55 °C	30 секунд	
72 °C	30 секунд	
72 °C	5 минут	
4 °C	Хранение	

* Рекомендуется увеличить циклы ПЦР до 30 при Ct более 25 циклов в RT PCR.

Этап 2. Очистка ПЦР-продуктов

На этом этапе используются магнитные частицы **«SynMag Beads»** для очистки ампликонов от свободных праймеров и димеров праймеров.

1. Довести раствор с магнитными частицами до комнатной температуры (30 минут).

2. Интенсивно перемешать частицы на вортексе в течение 30 секунд, чтобы убедиться, что частицы распределены равномерно.

3. С помощью пипетки добавить по **20 мкл** частиц в каждую лунку ПЦР-планшета с ампликонами.

4. Аккуратно пипетировать весь объем в лунках ПЦР-планшета вверх и вниз 10 раз, закрыть крышки ПЦР-планшета.

5. Инкубировать при комнатной температуре без встряхивания в течение 5 минут.

6. Поместить ПЦР-планшет на магнитный штатив на 2 минуты или до тех пор, пока визуально не очистится надосадочная жидкость.

7. Используя многоканальную пипетку, удалить весь супернатант. Менять наконечники с аэрозольным барьером между образцами.

8. Промыть частицы свежеприготовленным 80% водным раствором этанола на магнитном штативе следующим образом:
— С помощью многоканальной пипетки добавить в каждую лунку по **200 мкл** свежеприготовленного 80% водного раствора этанола.
— Инкубировать планшет на магнитном штативе в течение 30 секунд.
— Осторожно удалить супернатант.

9. Повторить дважды процедуру промывки частиц этанолом (пункт 8).

10. Используя многоканальную пипетку с тонкими наконечниками (на **10 мкл**), удалить избыток этанола со дна лунок.

11. Оставить ПЦР-планшет на магнитном штативе с открытыми крышками, дать частицам высохнуть на воздухе 10 минут.

12.Снять ПЦР-планшет с магнитного штатива. Используя многоканальную пипетку, добавить **52,5 мкл** буферного раствора 10 мМ Tris, pH 8,5, в каждую лунку ПЦР-планшета.

13. Аккуратно перемешать пипеткой вверх и вниз 10 раз, меняя наконечники после каждой серии 8 лунок. Убедиться, что частицы полностью ресуспендированы.

14. Инкубировать при комнатной температуре в течение 2 минут.

15. Поместить ПЦР-планшет на магнитный штатив на 2 минуты или до тех пор, пока визуально не очистится надосадочная жидкость.

16. С помощью многоканальной пипетки осторожно перенести **50 мкл** супернатанта из ПЦР-планшета в новый планшет. Менять наконечники с аэрозольным барьером между образцами, чтобы избежать перекрестного загрязнения.

Для проверки размера наработанного продукта рекомендуется разогнать **5-10 мкл** ПЦР-продукта в агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса **«M-100»**.

При использовании пары праймеров V3 и V4 регионов «16S» в протоколе, ожидаемый размер ампликона после этапа ПЦР составляет ~ 550 п.н. Пример представлен на рисунке 2 (страница 10).

Этап 3. Индексная амплификация

На этом этапе используются двойные индексы и адаптеры для дальнейшего секвенирования.

1. С помощью многоканальной пипетки перенести по **2,5 мкл** очищенных ПЦР-продуктов (из этапа №2) в новый планшет.

Оставшиеся **45 мкл** ПЦР-продуктов не используются в протоколе и могут быть сохранены для других целей.

2. Подготовить необходимую смесь индексных праймеров Dual Index - вортексировать и центрифугировать перед внесением в реакционную смесь.

3. Последовательно смешать компоненты по прописи ниже:

Компонент	мкл/р-ю
MetaGen 2.5x PCR - буфер	10
MetaGen-pol, 2U	0,5
dNTPs (2,5 mM)	2
Dual index	5
ddH_2O	5
PCR_1	2,5

Отдельно!!!

На каждый образец использовать индивидуальный Dual Index

4. Аккуратно пипетировать вверх и вниз 10 раз миксы в каждой лунке, используя наконечники с аэрозольным барьером.

5. Закрыть крышки планшета.

6. Центрифугировать планшет при 1000 g при комн. температуре в течение 1 минуты.

7. Провести ПЦР, используя следующую программу:

Температурный режим	Время	Количество циклов
98 °C	1 минута	
98 °C	7 секунд	8
55 °C	30 секунд	
72 °C	30 секунд	
72 °C	5 минут	
4 °C	Хранение	

Этап 4. Очистка ПЦР-продуктов

На этом этапе используются магнитные частицы **«SynMag Beads»** для финальной очистки библиотек перед количественным анализом.

1. Довести раствор с магнитными частицами до комнатной температуры (30 минут).

2. Интенсивно перемешать частицы на вортексе в течение 30 секунд, чтобы убедиться, что частицы распределены равномерно.

3. С помощью пипетки добавить по **30 мкл** частиц в каждую лунку ПЦР-планшета с библиотеками.

4. Аккуратно пипетировать весь объем в лунках ПЦР-планшета вверх и вниз 10 раз, закрыть крышки ПЦР-планшета.

5. Инкубировать при комнатной температуре без встряхивания в течение 5 минут.

6. Поместить ПЦР-планшет на магнитный штатив на 2 минуты или до тех пор, пока визуально не очистится надосадочная жидкость.

7. Используя многоканальную пипетку, удалить весь супернатант. Менять наконечники с аэрозольным барьером между образцами.

8. Промыть частицы свежеприготовленным 80% водным раствором этанола на магнитном штативе следующим образом:
— С помощью многоканальной пипетки добавить в каждую лунку по **200 мкл** свежеприготовленного 80% водного раствора этанола.
— Инкубировать планшет на магнитном штативе в течение 30 секунд.
— Осторожно удалить супернатант.

9. Повторить дважды процедуру промывки частиц этанолом (пункт 8).

10. Используя многоканальную пипетку с тонкими наконечниками (на **10 мкл**), удалить избыток этанола со дна лунок.

11. Оставить ПЦР-планшет на магнитном штативе с открытыми крышками, дать частицам высохнуть на воздухе 10 минут.

12.Снять ПЦР-планшет с магнитного штатива. Используя многоканальную пипетку, добавить **30 мкл** буферного раствора 10 мМ Tris, pH 8,5, в каждую лунку ПЦР-планшета.

13. Аккуратно перемешать пипеткой вверх и вниз 10 раз, меняя наконечники после каждой серии 8 лунок. Убедиться, что частицы полностью ресуспендированы.

14. Инкубировать при комнатной температуре в течение 2 минут.

15. Поместить планшет с библиотеками на магнитный штатив на 2 минуты или до тех пор, пока визуально не очистится надосадочная жидкость.

16. С помощью многоканальной пипетки осторожно перенести **25 мкл** супернатанта из ПЦР-планшета в новый планшет. Менять наконечники с аэрозольным барьером между образцами, чтобы избежать перекрестного загрязнения.

Важно!!! Хранить планшет с библиотеками при температуре от -15° до -25°С в течение 1 недели.

Для проверки размера наработаной индексированной библиотеки рекомендуется разогнать **1 мкл** продукта в агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса **«М-100»**.

Ожидаемый размер конечной библиотеки после этапа индексной ПЦР составляет **~ 630 п.н.**

Пример представлен на рисунке 2:

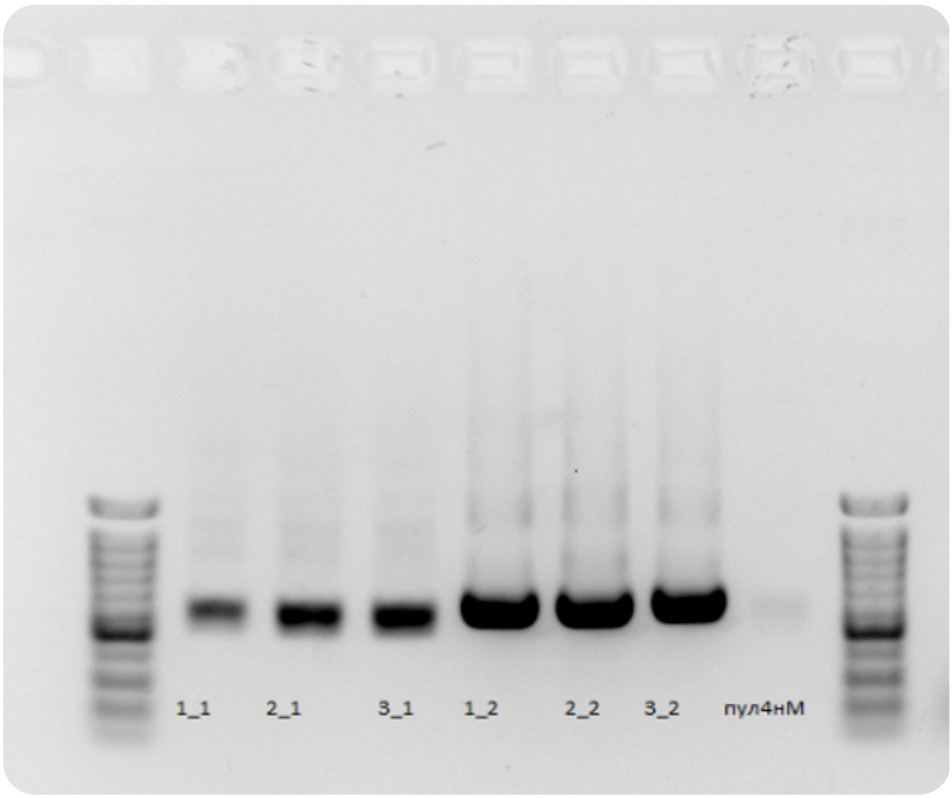


Рисунок 2. Пример анализа в агарозном геле очищенных продуктов первой ПЦР (лунки № 1_1, 2_1, 3_1) и второй ПЦР (лунки № 1_2, 2_2, 3_2) по **10 мкл** образца.

Исходное количество геномной ДНК на реакцию — 5 нг.

В лунке «пул4нМ» нанесен **1 мкл** готовой к секвенированию библиотека с концентрацией 4 нМ.

Маркера молекулярного веса «М-100» (Синтол) нанесено **2,5 мкл**.

Этап 5. Количественное определение библиотеки, нормализация и объединение в пул.

Рекомендуется проводить количественную оценку библиотек с помощью флуорометрического метода количественной оценки, в котором используются красители, связывающие дцДНК набором «СинКвант» на приборе Qubix. Для измерений используются специальные пробирки **0,2 мл** тонкостенные с плоской крышкой.

1. Рассчитайте концентрацию ДНК в **нМ**, исходя из размера ампликонов ДНК, определенного методом неденатурирующего фореза на генетическом анализаторе Нанофор 05.

$$\frac{(\text{концентрация, нг/мкл})}{(660\ \text{г/моль} \times \text{средний размер библиотеки})} \times 10^6 = \text{концентрация, нМоль}$$

2. Разбавьте концентрированную конечную библиотеку, используя ресуспендирующий буфер или 10 мМ Tris, pH от 8,5 до 4 нМ.

3. Спулируйте по 5 мкл разведенной ДНК из каждой библиотеки.

Пример итоговой смеси 4 нМ библиотек представлен на **Рисунке 2** в лунке «пул4нМ».
Нанесение пробы - 10 мкл и 2,5 мкл маркера «М-100».

В зависимости от потребностей покрытия в одну группу можно объединить до 192 библиотек.

Для метагеномных образцов >100 000 чтений на образец достаточно для полного изучения бактериального состава.

Для образцов с низким разнообразием рекомендуется вносить в запуск сбалансированную библиотеку PhiX control 10-20% для улучшения качества секвенирования.

№ п/п	i7 Index №	Bases in Adapter	i7 Bases for Sample Sheet	i5 Index №	Bases in Adapter	i5 Bases for Sample Sheet NovaSeq MiSeq
A1	701	TCGCCTTA	TAAGGCGA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
B1	702	CTAGTACG	CGTACTAG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
C1	703	TTCTGCCT	AGGCAGAA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
D1	704	GCTCAGGA	TCCTGAGC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
E1	705	AGGAGTCC	GGACTCCT	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
F1	706	CATGCCTA	TAGGCATG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
G1	707	GTAGAGAG	CTCTCTAC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
H1	710	CAGCCTCG	CGAGGCTG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
A2	711	TGCCTCTT	AAGAGGCA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
B2	712	TCCTCTAC	GTAGAGGA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
C2	714	TCATGAGC	GCTCATGA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
D2	715	CCTGAGAT	ATCTCAGG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
E2	716	TAGCGAGT	ACTCGCTA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
F2	718	GTAGCTCC	GGAGCTAC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
G2	719	TACTACGC	GCGTAGTA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
H2	720	AGGCTCCG	CGGAGCCT	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
A3	721	GCAGCGTA	TACGCTGC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
B3	722	CTGCGCAT	ATGCGCAG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
C3	723	GAGCGCTA	TAGCGCTC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
D3	724	CGCTCAGT	ACTGAGCG	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
E3	726	GTCTTAGG	CCTAAGAC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
F3	727	ACTGATCG	CGATCAGT	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
G3	728	TAGCTGCA	TGCAGCTA	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
H3	729	GACGTCGA	TCGACGTC	502	CTCTCTAT	CTCTCTAT
A4	701	TCGCCTTA	TAAGGCGA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
B4	702	CTAGTACG	CGTACTAG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
C4	703	TTCTGCCT	AGGCAGAA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
D4	704	GCTCAGGA	TCCTGAGC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
E4	705	AGGAGTCC	GGACTCCT	503	TATCCTCT	TATCCTCT
F4	706	CATGCCTA	TAGGCATG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
G4	707	GTAGAGAG	CTCTCTAC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
H4	710	CAGCCTCG	CGAGGCTG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
A5	711	TGCCTCTT	AAGAGGCA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
B5	712	TCCTCTAC	GTAGAGGA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
C5	714	TCATGAGC	GCTCATGA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
D5	715	CCTGAGAT	ATCTCAGG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
E5	716	TAGCGAGT	ACTCGCTA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
F5	718	GTAGCTCC	GGAGCTAC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
G5	719	TACTACGC	GCGTAGTA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
H5	720	AGGCTCCG	CGGAGCCT	503	TATCCTCT	TATCCTCT
A6	721	GCAGCGTA	TACGCTGC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
B6	722	CTGCGCAT	ATGCGCAG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
C6	723	GAGCGCTA	TAGCGCTC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
D6	724	CGCTCAGT	ACTGAGCG	503	TATCCTCT	TATCCTCT
E6	726	GTCTTAGG	CCTAAGAC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
F6	727	ACTGATCG	CGATCAGT	503	TATCCTCT	TATCCTCT
G6	728	TAGCTGCA	TGCAGCTA	503	TATCCTCT	TATCCTCT
H6	729	GACGTCGA	TCGACGTC	503	TATCCTCT	TATCCTCT
A7	701	TCGCCTTA	TAAGGCGA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
B7	702	CTAGTACG	CGTACTAG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
C7	703	TTCTGCCT	AGGCAGAA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG

№ п/п	i7 Index №	Bases in Adapter	i7 Bases for Sample Sheet	i5 Index №	Bases in Adapter	i5 Bases for Sample Sheet NovaSeq MiSeq
D7	704	GCTCAGGA	TCCTGAGC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
E7	705	AGGAGTCC	GGACTCCT	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
F7	706	CATGCCTA	TAGGCATG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
G7	707	GTAGAGAG	CTCTCTAC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
H7	710	CAGCCTCG	CGAGGCTG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
A8	711	TGCCTCTT	AAGAGGCA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
B8	712	TCCTCTAC	GTAGAGGA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
C8	714	TCATGAGC	GCTCATGA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
D8	715	CCTGAGAT	ATCTCAGG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
E8	716	TAGCGAGT	ACTCGCTA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
F8	718	GTAGCTCC	GGAGCTAC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
G8	719	TACTACGC	GCGTAGTA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
H8	720	AGGCTCCG	CGGAGCCT	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
A9	721	GCAGCGTA	TACGCTGC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
B9	722	CTGCGCAT	ATGCGCAG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
C9	723	GAGCGCTA	TAGCGCTC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
D9	724	CGCTCAGT	ACTGAGCG	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
E9	726	GTCTTAGG	CCTAAGAC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
F9	727	ACTGATCG	CGATCAGT	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
G9	728	TAGCTGCA	TGCAGCTA	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
H9	729	GACGTCGA	TCGACGTC	505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
A10	701	TCGCCTTA	TAAGGCGA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
B10	702	CTAGTACG	CGTACTAG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
C10	703	TTCTGCCT	AGGCAGAA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
D10	704	GCTCAGGA	TCCTGAGC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
E10	705	AGGAGTCC	GGACTCCT	506	ACTGCATA	ACTGCATA
F10	706	CATGCCTA	TAGGCATG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
G10	707	GTAGAGAG	CTCTCTAC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
H10	710	CAGCCTCG	CGAGGCTG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
A11	711	TGCCTCTT	AAGAGGCA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
B11	712	TCCTCTAC	GTAGAGGA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
C11	714	TCATGAGC	GCTCATGA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
D11	715	CCTGAGAT	ATCTCAGG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
E11	716	TAGCGAGT	ACTCGCTA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
F11	718	GTAGCTCC	GGAGCTAC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
G11	719	TACTACGC	GCGTAGTA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
H11	720	AGGCTCCG	CGGAGCCT	506	ACTGCATA	ACTGCATA
A12	721	GCAGCGTA	TACGCTGC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
B12	722	CTGCGCAT	ATGCGCAG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
C12	723	GAGCGCTA	TAGCGCTC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
D12	724	CGCTCAGT	ACTGAGCG	506	ACTGCATA	ACTGCATA
E12	726	GTCTTAGG	CCTAAGAC	506	ACTGCATA	ACTGCATA
F12	727	ACTGATCG	CGATCAGT	506	ACTGCATA	ACTGCATA
G12	728	TAGCTGCA	TGCAGCTA	506	ACTGCATA	ACTGCATA
H12	729	GACGTCGA	TCGACGTC	506	ACTGCATA	ACTGCATA

Для заметок: