

ターゲットサイトに絞った カスタムライブラリーのシーケンス

November 20, 2015



崎川 真里
 イルミナ株式会社
 テクニカルアプリケーションサイエンティスト

© 2015 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, ForenSeq, Genetic Energy, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, MiSeq, MiSeqDx, MiSeq FGx, NeoPrep, NextBio, Nextera, NextSeq, Powered by Illumina, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the US and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.



ターゲットサイトに絞ったシーケンスとは？

▶ 全ゲノムシーケンス

特徴

- ・ 全ゲノムを包括的に解析可能
- ・ 構造変異を含む様々なタイプの変異を検出できる

考慮すべき点

- ・ コストが割高
- ・ カバレッジは通常x30程度
- ・ データ量が多く解析が煩雑

例

- ・ ヒト全ゲノムシーケンス
- ・ 微生物de novoシーケンス など

▶ ターゲットシーケンス

特徴

- ・ 興味のある領域のみを高いカバレッジで解析可能
- ・ 多サンプルを一度に解析できる

考慮すべき点

- ・ ターゲット領域外の変異情報は検出できない
- ・ ターゲットとする遺伝子について既知の情報が必要

例

- ・ エクソームシーケンス
- ・ 疾患別パネル
- ・ 16S 菌叢解析 など

こんなことでお困りではないでしょうか

- ▶ カスタムライブラリーを作製したいが、どのようにデザインすればよいのかわからない
- ▶ カスタムプライマーを作製したものの、シーケンスでのデータが得られない
- ▶ カスタムライブラリーをシーケンスする際のランの設定がわからない
- ▶ ランは完了したがDemultiplexingがうまくいかない

本セッションのご注意事項

- ▶ 本セッションはカスタムライブラリーのラン成功を保証するものではありません
 - ご留意いただく点をお伝えするセッションになります。
 - カスタムライブラリー（弊社ライブラリー調製キットを使用されないライブラリー）の作製については、サポート外とさせていただきます。
 - 考慮すべき点が多く、各ライブラリーについて弊社で検証を行っていないためです。
 - カスタムライブラリーを使用したランの装置のトラブルシュートはお手伝い致します。
- ▶ 本セッションの内容は、以下の資料をもとに作成しています
 - David R. Bentley et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 456
 - Supplementary informationを中心にご参照ください。
 - Illumina Adapter Sequences Document
 - 弊社HPよりダウンロードできます。

<https://support.illumina.com/downloads/illumina-customer-sequence-letter.html>

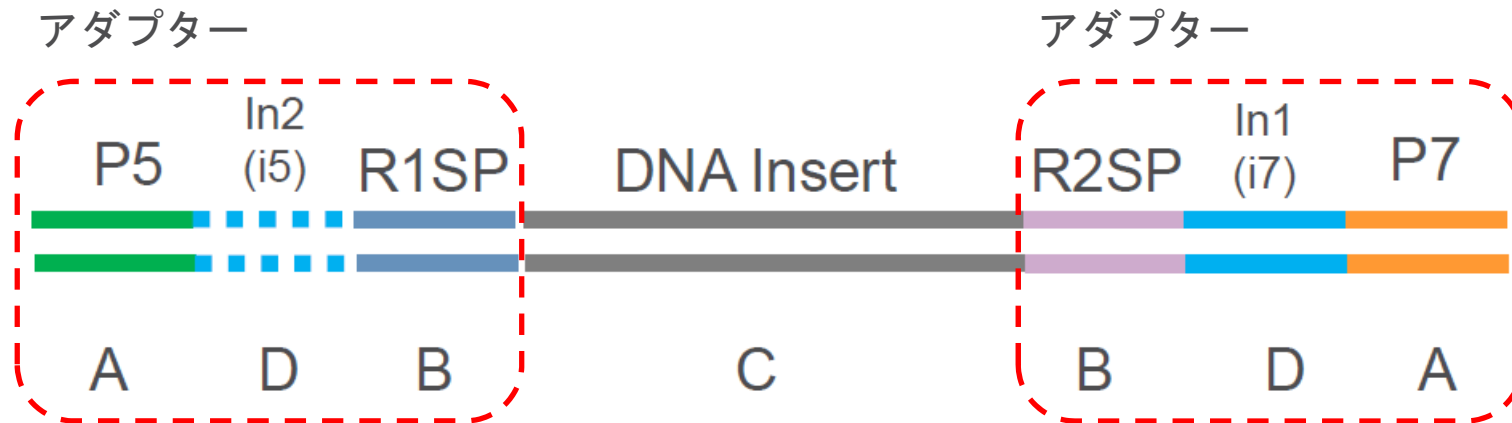
本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
- ▶ カスタムライブラリーを使用したMiSeqランのセットアップ

本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
- ▶ カスタムライブラリーを使用したMiSeqランのセットアップ

ライブラリーのデザインにあたり、必要な配列

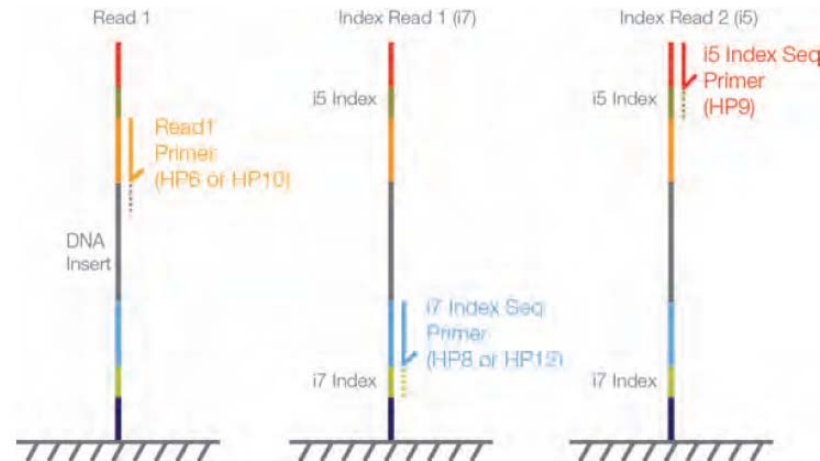


- A : フローセル（FC）に結合するために必要な配列
 - B : シーケンスプライマー（Seq Primer）が結合する配列
 - C : シーケンスされるDNA（インサート）
 - D : Index（サンプルを区別するためのバーコード配列）
- どれも必要な配列です。

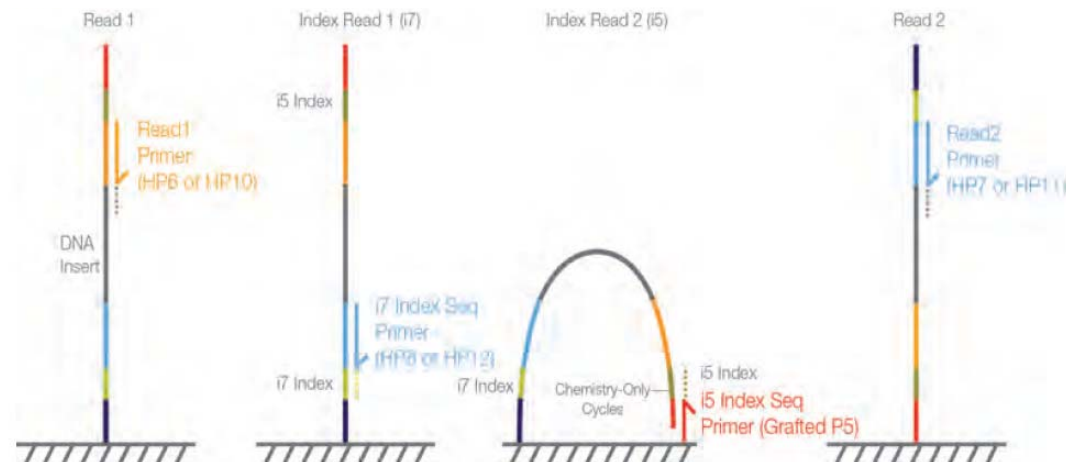
シーケンスの流れ

- Single Read(SR)とPaired End(PE)の違い

SR



PE

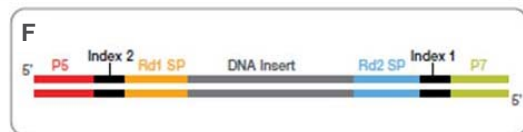
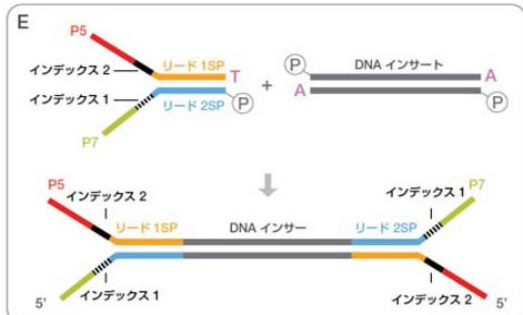
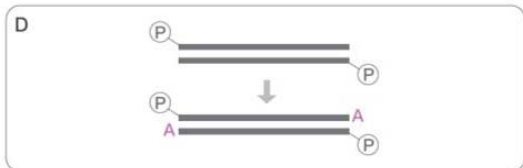
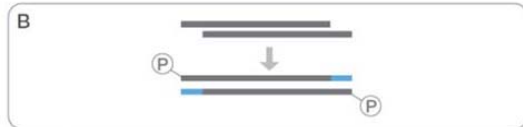
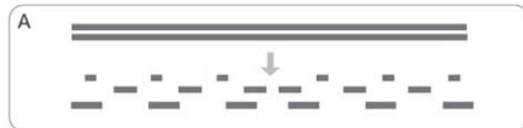


SBS (Sequencing By Synthesis) ケミストリーとは何か？

http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2015_techsupport_session9.pdf

ライブラリーの調製

- TruSeqライブラリーの場合（例 TruSeq Nano DNA kit）



A) DNAの断片化

B) 末端の平滑化、5'末端リン酸化

C) サイズ選択

D) A付加

E) インデックス付アダプターのライゲーション

F) PCR

TruSeqライブラリーの配列とは

▶ アダプター配列

Index2(i5) Adapters - D501-508

5' **AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC** [**TATAGCCT**] **ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC** T
P5配列 i5

Index1(i7) Adapters - D701-712

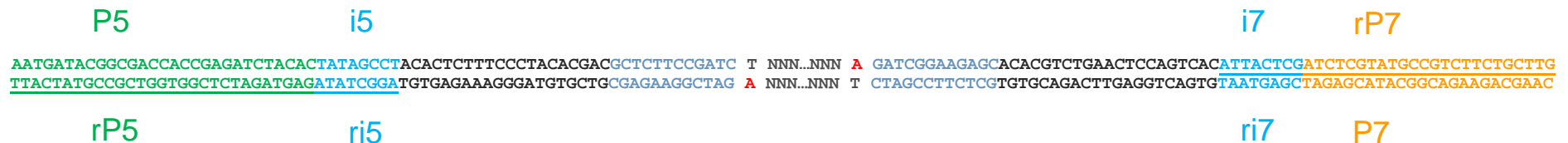
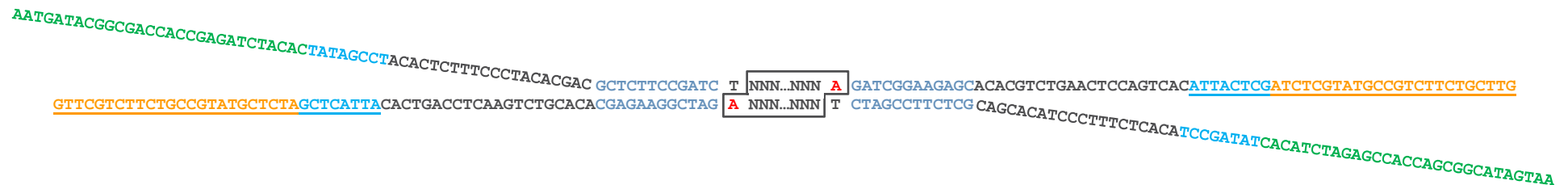
5' **GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC** [**ATTACTCG**] **ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG**
Y字形成用配列 i7 rP7配列

Y字を形成している

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC**TATAGCCT**ACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCT
i5
GTTCTGTCTTCTGCCGTATGCTCTA**GCTCATT**ACACTGACCTCAAGTCTGCACA CGAGAAGGCTAG
i7

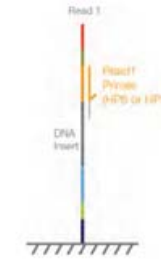
TruSeqライブラリー調製キットで作製されるライブラリー

▶ Y字アダプターライゲーション後の二本鎖DNAの構造



※TruSeq DNA PCR-Freeライブラリー調製キットでは、アダプターライゲーション後にPCRを行わない。

Read1 配列を読むときのライブラリー構造



▶ Read1

- FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

P7配列 ri7 ri5 rP5
 FC | 5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CGAGTAAT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC - T [NN] A - GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT - AGGCTATA - GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTACATT
<=T-CTAGCCTTCTCGCAGCACATCCCTTTCTCACA [possible R1 Sequence Primer]

<=TCTAGCCTTCTCGCAGCACATCCCTTTCTCACA [possible Read1 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

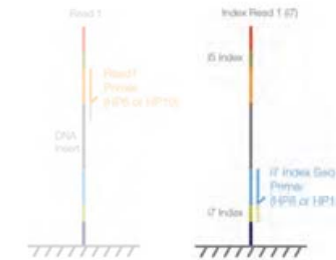
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] [possible Read1 Sequence Primer]
ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

D701–D712 Adapters

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

※Illumina Adapter Sequences Document 15ページ

Index1 配列を読むときのライブラリー構造



- ▶ Index1 Read (i7)
 - FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

P7配列 ri7 ri5 rP5
 FC | 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAAT-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-T[NN]A-GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT-AGGCTATA-GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTACATT
 <=CACTGACCTCAAGTCTGCACACGAGAAGGCTAG [possible Index1 Sequence Primer]
 GCTCATTAC<=CACTGACCTCAAGTCTGCACACGAGAAGGCTAG [possible Index1 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

D701–D712 Adapters

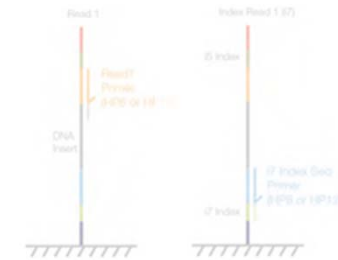
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCGGTCTTCTGCTTG
 [possible Index1 Sequence Primer]

i7 Index Name i7 Bases for Sample Sheet

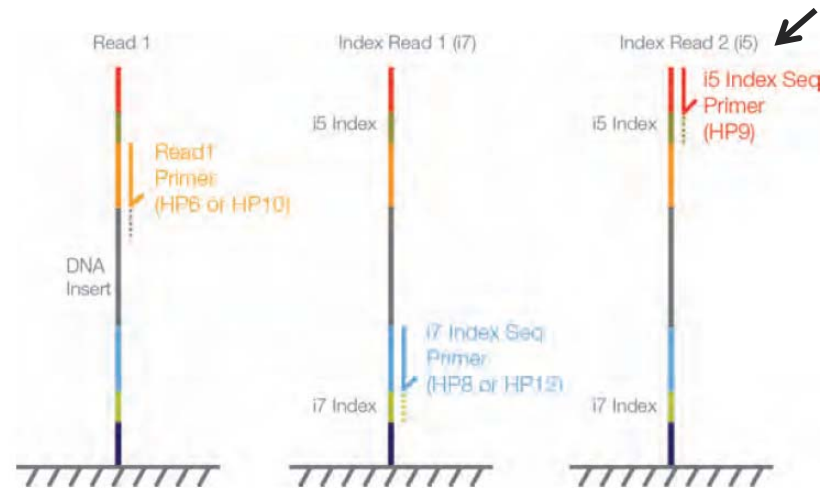
i7 Index Name	i7 Bases for Sample Sheet
D701	ATTACTCG

※サンプルシートにはこのまま入力する

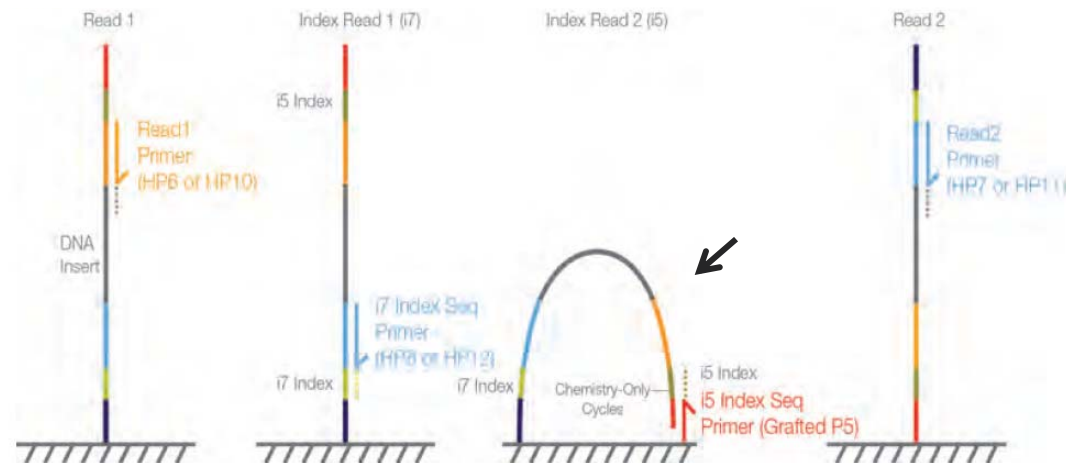
Dual Index, Index2の読み方 SRとPEで異なる



SR

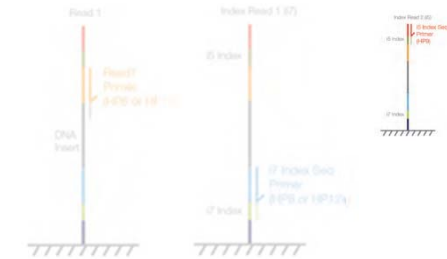


PE



GTATCATTAAGTACTTTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
ACTGACACACTTCTGTTAAGCTTAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
CCTGGAACAGTAAAGGATCTGTTAAGCTTAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
CTTTAAGGCTTAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
CAAAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
CTTAAGGCTTAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT
GTATCATTAAGGATACCTGATCCACTGATTCACGCTACGCTACGGAAGGATATCAATTGAGATTAAGGATACCATTAAGGCTGCTGAGGCTGCGAAGGATGATAACAGTAAGGCTCTGTTAGGCTTAAGGGAAGGATATCATTAAGGATACCT

Index2 配列を読むときのライブラリー構造



▶ Index2 Read (i5)

– SRの場合: FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

P7配列

ri7

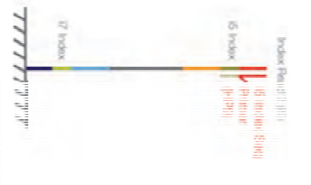
ri5

rP5

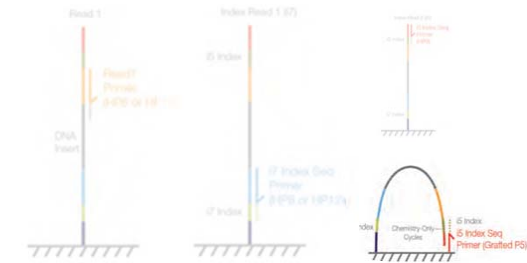
FC | 5' - CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGAGTAAT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC - T[NN]A - GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT - AGGCTATA - GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTACATT

i5 <= CACATCTAGACCACCAGCGGCATAGTAA
[possible Index2 Sequence Primer]

TCCGATAT <= CACATCTAGACCACCAGCGGCATAGTAA
[possible Index2 Sequence Primer]



Index2 配列を読むときのライブラリー構造



▶ Index2 Read (i5)

– SRの場合: FC上にP7配列を下にしてクラスターが立っている状態

P7配列

ri7

ri5

rP5

FC | 5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CGAGTAAT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC - T [NN] A - GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAGTGT - AGGCTATA - GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTACATT

i5 <= CACATCTAGACCACCAGCGGCATAGTAA
[possible Index2 Sequence Primer]

TCCGATAT <= CACATCTAGACCACCAGCGGCATAGTAA
[possible Index2 Sequence Primer]

– PEの場合: FC上のP5配列にクラスターがハイブリ、ブリッジを形成している状態

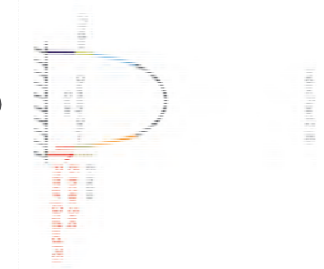
P7配列

FC | 5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT CGAGTAAT - GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC - T [NN]

TTACATAGCCGCTGGTGGCTCTAGATGTG - ATATCGGA - TGTGAGAAAGGGATGTGCTGCGAGAAGGCTAG - A [NN]

FC | 5' - AATGATACGGCGACCACCGAGA => i5

AATGATACGGCGACCACCGAGA => (7cycle) - TATAGCCT
Chemistry Only



D501–D508 Adapters

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] ACACCTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

[possible Index2 Sequence Primer]

D701–D712 Adapters

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCCGCTCTTCTGCTTG

i5 Index Name

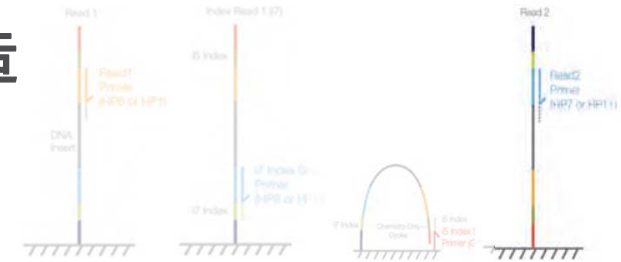
D501

i5 Bases for Sample Sheet
HiSeq 2000/2500 and MiSeq

TATAGCCT

※サンプルシートにはこのまま入力する

Read2 配列を読むときのライブラリー構造



▶ Read2

- FC上にP5配列を下にしてクラスターが立っている状態

P5配列
i5
i7
rP7配列

FC | 5' - AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC - TATAGCCT - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT - [NN]A - GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC ATTACTCGA ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

<=T-CTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTG
[possible Read2 Sequence Primer]

<=TCTAGCCTTCTCGTGTGCAGACTTGAGGTCAGTG
[possible Read2 Sequence Primer]

TruSeq HT Kits

Includes TruSeq DNA PCR-Free HT, TruSeq Nano HT, TruSeq Stranded mRNA HT, and TruSeq Total RNA HT

D501–D508 Adapters

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

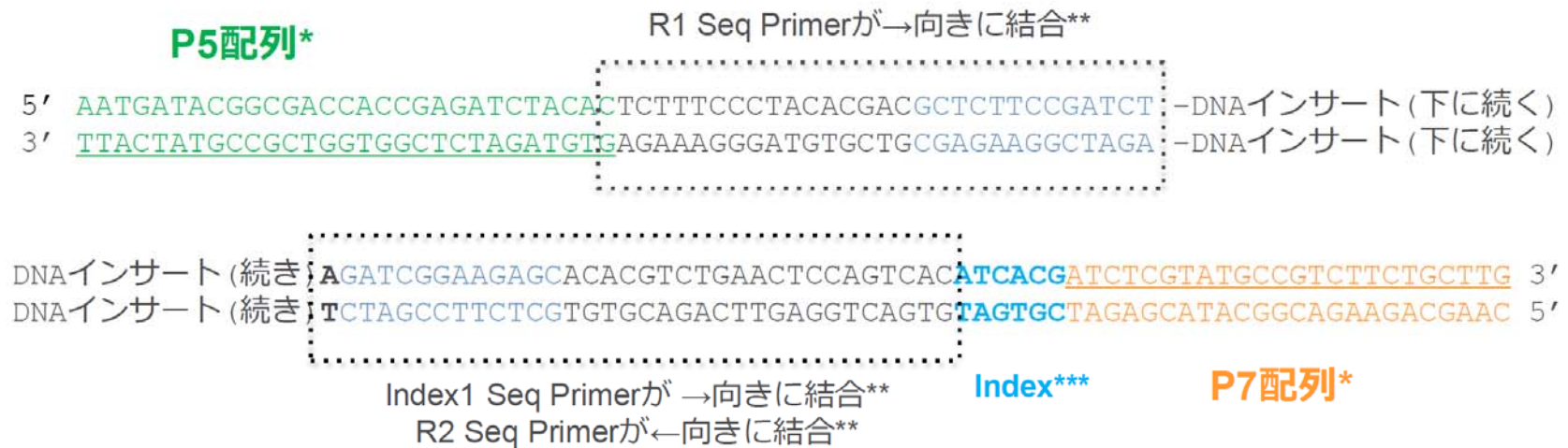
D701–D712 Adapters

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC [i7] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

[possible Read2 Sequence Primer]

カスタムライブラリーに必要な配列のまとめ

- ▶ MiSeqで使用するアダプター&プライマー配列
 - DNAインサートの両端に下記塩基配列がついたDNAを調製すれば解析可能



*P5, P7配列はフローセル上への結合とフローセル上でのDNA鋳型増幅（ブリッジPCR）に必要

** 実際のプライマー結合部位は多少前後する可能性がある。

***このインデックス配列をサンプルごとに変えることで、
MiSeqシーケンス後にサンプルごとにデータを分離できる

本日の内容

- ▶ カスタムライブラリーのデザイン
- ▶ カスタムライブラリー使用したMiSeqランのセットアップ
 - Seq Primer
 - サンプルシートの作成

MiSeqのランで使用するSeq Primerは？

- ▶ イルミナのSeq Primerを使用
 - イルミナのアダプター配列と同じ配列をもつライブラリー（TruSeq、Nextera）
 - 試薬カートリッジにセットされた通常のプライマー

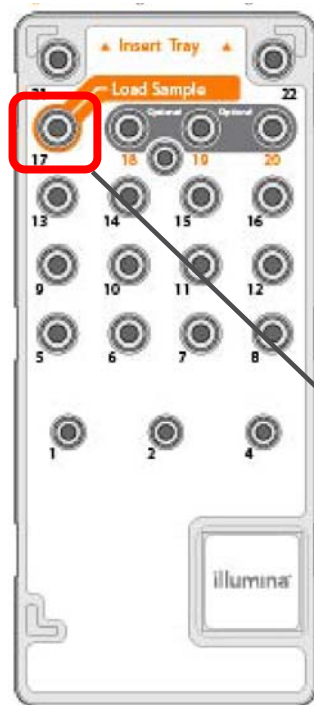
- ▶ カスタムのSeq Primerを使用
 - カスタムのアダプター配列をもつライブラリー
 - MiSeqのSeq Primerアニーリング温度を考慮したプライマーの設計が必要
 - MiSeqの場合は65°C

<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/q15y583ofUi3U5DU3e45cw/sequencing-primer-annealing-temperatures-on-illumi>

- カスタムライブラリーのみを流すのか？
 - カスタムSeq Primerのみを使用
- PhiXをスパイクインするのか？
 - カスタムSeq Primer＋イルミナのSeq Primer（通常のプライマー）を使用

1) イルミナのSeq Primerを使用する

- ▶ 試薬カートリッジ内の通常のプライマーでシーケンス可能
 - Read1 Primer Mix(12番)、Index Primer Mix (13番)、Read2 Primer Mix (14番)
 - 17番ポートに変性・希釈済みのサンプルを入れるだけ

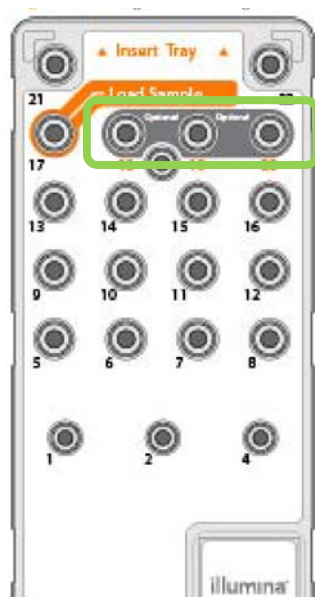


Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers
19	Optional	Optional use for custom sequencing primers
20	Optional	Optional use for custom sequencing primers
21	PW1	Water
22	Empty	Empty

2) カスタムのSeq Primerを使用する カスタムライブラリーのみを流す場合

- ▶ 試薬カートリッジの専用ポートにカスタムプライマーを投入
 - Read1 (18番)、Index (19番)、Read2 (20番)

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq_using_custom_primers_15041638_b.pdf



Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers
19	Optional	Optional use for custom sequencing primers
20	Optional	Optional use for custom sequencing primers
21	PW1	Water

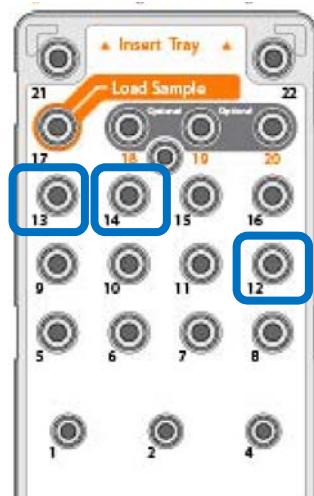
各ポートには0.5 uMに希釈したカスタムプライマーを600 uL加える

- 必ずサンプルシートで使用するポートを指定すること

3) カスタムのSeq Primerを使用する カスタムライブラリーにPhiXをスパイクインする場合

- ▶ 通常のプライマー（12番、13番、14番）にカスタムプライマーを混合

<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/8EkhELfE-EqVqVOg9bKqMg/using-custom-primers-on-illumina-sequencing-platfo>



Position	Reagent Name	Description
1	IMF	Incorporation Mix
2	SRE	Scan Mix
4	CMF	Cleavage Mix
5	AMX1	Amplification Mix
6	AMX2	Read 2 Amplification Mix
7	LPM	Linearization Premix
8	LDR	Formamide
9	LMX1	Linearization Mix
10	LMX2	Read 2 Linearization Mix
11	RMF	Resynthesis Mix
12	HP10	Read 1 Primer Mix
13	HP12	Index Primer Mix
14	HP11	Read 2 Primer Mix
15	PW1	Water
16	PW1	Water
17	Sample	Your sample libraries
18	Optional	Optional use for custom sequencing primers

12: Read1 – 680uL入りのため100 uMのRead1カスタムプライマーを3.4 uL添加
 13: Index – 680uL入りのため100 uMの Index カスタムプライマーを3.4 uL添加
 14: Read2 – 680uL入りのため100 uMのRead2カスタムプライマーを3.4 uL添加

Caporaso JG, et al., Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 2012 Mar 8.

– プライマー溶液までチップをつけるために、パスツールピペットの使用をお勧めします

MiSeqランのためのサンプルシート

- ▶ Illumina Experiment Manager(IEM)を使用してサンプルシートを作成

NGSをはじめよう！

サンプルシート作成ソフト Illumina Experiment
Manager (IEM) の使い方

February 20, 2015

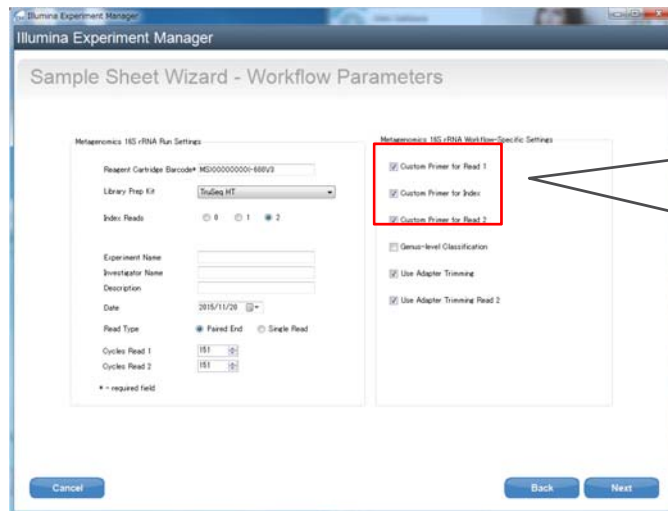


http://www.illumina.co.jp/documents/pdf/2015_techsupport_session1.pdf

- ▶ カスタムSeq Primerを使用した場合
 - 試薬カートリッジの該当するポートを指定
- ▶ カスタムライブラリーでイルミナのキットにないindexを使用した場合
 - 作成したサンプルシートのindex配列をNotePad等のテキストエディタで編集

カスタムSeq Primerを使用するランの設定

- ▶ IEMにてInstrument Selection>MiSeq Application Selection>Workflow Parameters



Metagenomics 16S rRNA Workflow-Specific Settings

- ☒ Custom Primer for Read 1
- ☒ Custom Primer for Index
- ☒ Custom Primer for Read 2

- ▶ カスタムSeq Primerの専用ポートの選択
 - 試薬カートリッジの18、19、20番を使用する場合は、各項目にチェックを入れる。
 - PhiXをスパイクインする場合は、カスタムSeqPrimerは通常のプライマーのポートに混合するので、チェックは入れないこと。

カスタムで作製したindex配列を設定したい

- ▶ サンプルシートをNotePad（メモ帳）で開くと、以下のような内容が表示される。
 - 表示項目のうち、各サンプルのindex名とindex配列を、カスタムライブラリーの作製に使用したReverseプライマー情報等を参照しながら書き換える。
 - 書き換え部分周辺のカンマ(,)は消さないこと。構成が崩れると、サンプルシートが正しく機能しなくなる。

```
MSXXXXXX-600V3.csv - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)

[Header]
IEMFileVersion,4
Date,2015/11/20
Workflow,Metagenomics
Application,Metagenomics 16S rRNA
Assay,TruSeq HT
Description,
Chemistry,Amplicon

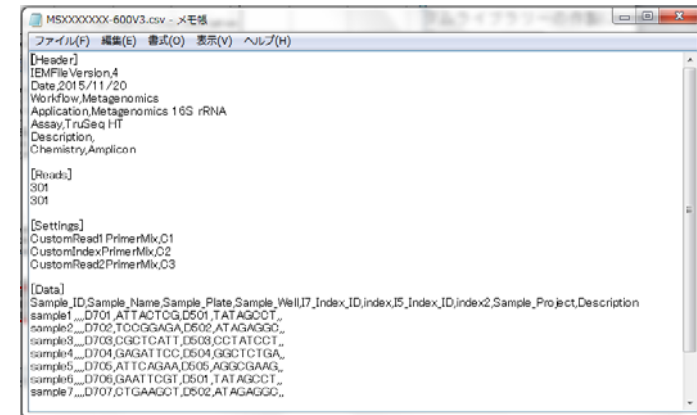
[Reads]
301
301

[Settings]
CustomRead1 PrimerMix,C1
CustomIndexPrimerMix,C2
CustomRead2 PrimerMix,C3

[Data]
Sample_ID,Sample_Name,Sample_Plate,Sample_Well,I7_Index_ID,index,I5_Index_ID,index2,Sample_Project,Description
sample1,,D701,ATTACTCG,,D501,TATAGCCT,,
sample2,,D702,TCCGGAGA,,D502,ATAGAGGC,,
sample3,,D703,CGCTCATT,,D503,CCTATCCT,,
sample4,,D704,GAGATTCC,,D504,GGCTCTGA,,
sample5,,D705,ATTCAGAA,,D505,AGGCGAAG,,
sample6,,D706,GAATTCGT,,D501,TATAGCCT,,
sample7,,D707,CTGAAGCT,,D502,ATAGAGGC,,
```

カスタムで作製したindex配列を設定したい

- ▶ カスタムライブラリー作製時に使用したプライマーの情報をもとに、全てのサンプルに対して情報の書き換えを実施する
 - 書き換えが終わったら上書き保存して編集を終了する。



- ▶ 出来上がったサンプルシートは、MCSが参照する所定のフォルダに配置する
 - サンプルシートの参照先を変更していなければ、以下の場所に保管すれば良い
D:\¥Illumina¥MiSeq Control Software¥SampleSheets



本日のまとめ

- ▶ カスタムライブラリーデザインの際には以下の点に注意する
 - P5/P7配列の並び
 - Seq Primerがハイブリするサイト
- ▶ 一度でうまくいくとは限らない
 - うまくいかない場合はCorresponding Authorにお問い合わせ
- ▶ ラン条件の設定に注意する
 - 試薬カートリッジへのカスタムプライマーの投入
 - サンプルシート作成

サポート資料

- ▶ David R. Bentley et al. (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 456
- ▶ Illumina Adapter Sequences Document
 - <https://support.illumina.com/downloads/illumina-customer-sequence-letter.html>
- ▶ Using Custom Primers on the MiSeq (15041638B)
 - https://support.illumina.com/downloads/using_customprimers_miseq_15041638.html
- ▶ Support Bulletins
 - Sequencing Primer Annealing Temperatures on Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/q15y583ofUi3U5DU3e45cw/sequencing-primer-annealing-temperatures-on-illumina>
 - Using Custom Primers on Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/8EkhELfE-EqVqVOg9bKqMg/using-custom-primers-on-illumina-sequencing-platfo>
 - Considerations for Library when Switching Between Illumina Sequencing Platforms
<https://my.illumina.com/MyIllumina/Bulletin/W1xgT4kJbKWgW30jATEy4g/considerations-for-library-when-switching-between>

