

# KAPA HyperPlus Library Preparation Kit 取扱説明書

## 日本語版補足資料

※ 本資料は、KAPA HyperPlus Library Preparation Kit の取扱説明書を一部翻訳した資料です。  
事前にオリジナルの英文マニュアルを必ずご確認ください。

## KAPA HyperPlus Library Preparation Kit

KR1145 – v1.15

This Technical Data Sheet provides product information and a detailed protocol for the KAPA HyperPlus Library Preparation Kit.

### Contents

Product Description	2
Product Applications	2
Product Specifications	2
Shipping and Storage	2
Handling	2
Quality Control	2
Important Parameters	3
Automated Library Construction	3
Safe Stopping Points	3
Input DNA	4
Fragmentation Parameters	5
Adapter Design and Concentration	5
Post-ligation Cleanup	6
Paramagnetic SPRI® Beads and Reaction Cleanups	6
Size Selection	6
Library Amplification	7
Evaluating the Success of Library Construction	8
Process Workflow	11
Library Construction Protocol	12
Appendix 1: Size Selection	15
Appendix 2: Optimization of Fragmentation Parameters	16
Restrictions and Liabilities	18
Note to Purchaser: Limited Product Warranty	18
Note to Purchaser: Limited License	18

Kit Codes and Components		
<b>KK8510</b> <b>KK8511*</b> 8 libraries	KAPA Frag Enzyme	100 µL
	KAPA Frag Buffer (10X)	50 µL
	KAPA Frag Conditioning Solution	580 µL
	End Repair & A-Tailing Buffer	70 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	30 µL
	Ligation Buffer	300 µL
	DNA Ligase	100 µL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)* Library Amplification Primer Mix (10X)*	250 µL 50 µL
<b>KK8512</b> <b>KK8513*</b> 24 libraries	KAPA Frag Enzyme	270 µL
	KAPA Frag Buffer (10X)	140 µL
	KAPA Frag Conditioning Solution	580 µL
	End Repair & A-Tailing Buffer	210 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	90 µL
	Ligation Buffer	900 µL
	DNA Ligase	300 µL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)* Library Amplification Primer Mix (10X)*	690 µL 138 µL
<b>KK8514</b> <b>KK8515*</b> 96 libraries	KAPA Frag Enzyme	1.27 mL
	KAPA Frag Buffer (10X)	640 µL
	KAPA Frag Conditioning Solution	580 µL
	End Repair & A-Tailing Buffer	930 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	400 µL
	Ligation Buffer	3.8 mL
	DNA Ligase	1.26 mL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)* Library Amplification Primer Mix (10X)*	3.0 mL 600 µL

\*KK8511, KK8513 and KK8515 are available for PCR-free workflows, and do not contain library amplification reagents.

### Quick Notes

- This kit provides a versatile, streamlined DNA fragmentation and library construction protocol. Libraries for Illumina® sequencing may be prepared from a wide range of DNA samples and inputs (1 ng – 1 µg) in 1.5 – 3 hours.
- The novel one-tube chemistry improves library yield and quality, particularly for FFPE and low-input libraries.
- The protocol is easy to automate. Generous reagent excesses are supplied in 96-reaction kits to accommodate automated liquid handling.
- Kits contain all the reagents for DNA fragmentation, library construction and high-efficiency, low-bias library amplification, except for adapters and SPRI beads. Kits without an amplification module are available for PCR-free workflows.
- The **Process Workflow** (p. 11) provides an overview of the DNA fragmentation and library construction process. **Appendix 1** provides a protocol for dual-SPRI size selection. **Appendix 2** contains guidelines for the optimization of fragmentation parameters.

## Product Description

The KAPA HyperPlus Library Preparation Kit provides a versatile, streamlined DNA fragmentation and library construction protocol for the rapid preparation of libraries for Illumina® sequencing. The novel one-tube protocol improves the efficiency and consistency of library construction, and yields libraries of similar or better quality than those produced with the KAPA Hyper Prep Kit from Covaris-sheared DNA. It outperforms tagmentation-based workflows in terms of robustness, flexibility and sequence coverage and uniformity.

The workflow combines enzymatic steps and employs minimal SPRI® bead cleanups, thereby reducing sample handling and overall library preparation time to 1.5 – 3 hours. The kit contains all of the enzymes and reaction buffers required for:

1. **enzymatic fragmentation**, which produces dsDNA fragments;
2. **end repair and A-tailing**, which produces end-repaired, 5'-phosphorylated, 3'-dA-tailed dsDNA fragments;
3. **adapter ligation**, during which dsDNA adapters with 3'-dTTP overhangs are ligated to 3'-dA-tailed molecules;
4. **library amplification (optional)**, which employs high-fidelity, low-bias PCR to amplify library fragments carrying appropriate adapter sequences on both ends.

The kit provides a single concentrated buffer and a single enzyme mixture for enzymatic fragmentation, as well as for each of the two library construction steps—but does not include adapters or SPRI beads required for cleanups after adapter ligation and library amplification.

In order to maximize sequence coverage uniformity, it is critical to minimize library amplification bias. KAPA HiFi DNA Polymerase is designed for low-bias, high-fidelity PCR, and is the reagent of choice for NGS library amplification.<sup>1,2,3,4</sup> KAPA HyperPlus Kits include KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X), a ready-to-use PCR mix comprising all the components for library amplification—except primers and template. Kits also include KAPA Library Amplification Primer Mix (10X), designed for the high-efficiency amplification of Illumina libraries flanked by the P5 and P7 flow cell sequences. Kits without the amplification module (KK8511, KK8513 and KK8515) are available for PCR-free workflows. They may also be combined with KAPA HiFi Real-Time Library Amplification Kits (KK2701 and KK2702), or with KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix Kits (KK2801 and KK2802) for the amplification of bisulfite-converted libraries.

1. Oyola, S.O. et al. *BMC Genomics* 13, 1 (2012).
2. Quail, M.A. et al. *Nature Methods* 9, 10 – 11 (2012).
3. Quail, M.A. et al. *BMC Genomics* 13, 341 (2012).
4. Ross, M.G. et al. *Genome Biology* 14, R51 (2013).

## Product Applications

KAPA HyperPlus Library Preparation Kits are ideally suited for low- and high-throughput NGS library construction

workflows that require DNA fragmentation, end repair, A-tailing, adapter ligation and library amplification (optional). Kits are designed for library construction from a wide range of sample types and inputs (1 ng – 1 µg), and are compatible with complex, genomic DNA; low-complexity samples such as small viral genomes, plasmids, cDNA and long amplicons; and low-quality DNA such as FFPE samples.

The entire workflow is automation-friendly and may be incorporated into workflows for a wide range of NGS applications, including:

- Whole-genome shotgun sequencing
- Whole exome or targeted sequencing, using Roche Nimblegen™ SeqCap EZ, Agilent SureSelect, Illumina TruSeq™, or IDT xGen™ Lockdown™ Probes, or other hybridization capture systems
- RNA-seq (selected applications)
- Methyl-seq (in combination with KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix for library amplification)

## Product Specifications

### Shipping and Storage

The enzymes provided in this kit are temperature sensitive, and appropriate care should be taken during shipping and storage. KAPA HyperPlus Library Preparation Kits are shipped on dry ice or ice packs, depending on the destination country. Upon receipt, immediately store enzymes and reaction buffers at -15°C to -25°C in a constant-temperature freezer. When stored under these conditions and handled correctly, the kit components will retain full activity until the expiry date indicated on the kit label.

### Handling

Always ensure that KAPA HyperPlus Library Preparation Kit components have been fully thawed and thoroughly mixed before use. The KAPA Hyper Prep End Repair & A-Tailing Buffer may contain a precipitate when thawed. Vortex this buffer thoroughly to ensure that it is fully homogenized before use. KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X) contains isostabilizers and may not freeze completely, even when stored at -15°C to -25°C. Nevertheless, always ensure that the ReadyMix is fully thawed and thoroughly mixed before use. Reaction master mixes prepared from the enzymes and buffers for fragmentation, end repair and A-tailing, as well as for ligation, are very viscous and require special attention during pipetting. Keep all enzyme components and master mixes on ice as long as possible during handling and preparation.

### Quality Control

All kit components are subjected to stringent functional quality control, are free of detectable contaminating exo- and endonuclease activities, and meet strict requirements with respect to DNA contamination. Please contact [support@kapabiosystems.com](mailto:support@kapabiosystems.com) for more information.

## 重要なパラメータ

ライブラリー作製ワークフローは、特定の実験計画、サンプル特性、シーケンシングアプリケーションおよび装置に応じて調整し、最適化してください。本文書に示したプロトコルは一般的なものであり、必要に応じて、反応パラメータを調整することでパフォーマンス、効率および費用対効果を最適化できます。

本セクションの情報に加えて、ライブラリー作製ワークフローの設計または最適化に関する詳細なガイドラインは、KAPA NGS ライブラリー調製法技術ガイドを参照および/またはsupport@kapabiosystems.comにご相談ください。

## ライブラリー作製の自動化

本文書に記載したKAPA HyperPlusワークフローは、「自動化しやすく」設計されており、手動、適切な自動分注器を用いた半自動または全自動で行うことができます。サンプル処理量の増加に加えて、自動化により、再現性および処理工程管理の改善などの利点が追加されることが期待できます。それでも、熟練した豊富な経験がある注意深い技術者が行う手動ライブラリー作製と比較すると、自動ライブラリー作製ではやや低収量な場合や異なるサイズ分布となることがあります。大半の場合、これらの問題は、ハードウェアとプラスチック製品を慎重に選択すること、ならびに分注器のパラメータを最適化することにより最小限にすることができます。

KAPA Biosystemsは、自動分注システムを提供しませんが、NGS ライブラリー作製で日常的に使用する自動分注プラットフォームに関しては、自動化装置会社およびお客様と協力して、当社のキットに最適な自動化法の開発・認定をサポートいたします。自動分注システムを用いてKAPA HyperPlus Library Preparation Kitを用いることにご関心のある場合は、support@kapabiosystems.comにご相談ください。

KAPA HyperPlusの自動化法の開発を試みる場合、以下の事項を念頭に置いてください。

- 酵素反応のコンポーネントは、反応ごとに個別に分注する代わりに、マスターミックス液として準備します。断片化マスターミックス液は、使用時に調製し、4°Cに冷却します。反対に、エンドリベア、A-テーリングおよびアダプターライゲーション用のマスターミックス液は、室温で24時間まで安定であり、自動ライブラリー作製中に冷却する必要はありません。
- 断片化、エンドリベアおよびA-テーリング反応ならびにアダプターライゲーションのマスターミックス液は、粘性が高く、ピペッティングパラメータの慎重な最適化が必要です。
- KAPA HiFi HotStart DNA Polymeraseは強力な3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性のため、プライマーを含むPCRのマスターミックス液は、特に冷却しない場合、なるべくデッキ内に長時間放置しないでください。使用直前にライブラリー増幅マスターミックス液を調製するか、KAPA HiFi HotStart ReadyMixとは別にプライマーミックス液を分注してください。
- 各試薬のマスターミックス液は余剰分（5～20%）が必要となります。96回用キットには試薬量が多く含まれています。他の試薬（アダプター、AMPure® XP、80%エタノールおよび溶出バッファー）の適切な量は、分注システムごとに異なります。
- 酵素による断片化反応は、4°Cに冷却したプレート中でセットアップし、断片化インキュベーションを行うためには（通常37°Cで実施）、予め平衡化した別のペルチェ装置またはデッキ内のサーマ

ルサイクラーに移す必要があります。断片化後、プレートを直ちに4°Cに冷却し、エンドリベアおよびA-テーリング試薬を4°Cで添加し、プレートを65°Cでインキュベーションするためにすぐにデッキ内またはデッキ外のサイクラーに移します。

- 50°Cより高い温度でインキュベーションする場合は、ヒートリッド型のサーマルサイクラーで実施してください。
- 本プロトコルでは、最大反応液量が約200 μLの96ウェルPCRプレートを使用します。これより多い反応液量のプレートまたはウェルの深いプレートは、より多くの反応液量の場合に使用します。
- ヌクレアーゼフリーであることが証明されたプラスチック製品を必ず使用してください。低DNA結合性プラスチックを推奨します。ワークフローに最も適切なプラスチック製品を選択する際は、以下の器具、機材との適合性を考慮してください。
  - 自動分注システムのプレートグリッパーなどのコンポーネント
  - AMPure XP の操作中に使用するマグネットスタンド
  - インキュベーションおよび/またはライブラリー増幅中に用いるペルチェ装置またはサーマルサイクラー
- 96ウェルプレートの全ウェルに最大の均一性が保証され、サンプル間および環境による汚染のあらゆる原因が除去される自動化法を設計してください。可能な場合は、PCR前後のステップを別々の装置にすることを検討ください。

## 安全な停止ポイント

断片化から最終的なライブラリーまでのライブラリー作製プロセスは、処理サンプル数およびライブラリーの増幅の有無により、経験上1.5～3時間で実施することができます。必要な場合、ライゲーション後のクリーンアップ終了後（ステップ4.17: PCRフリーワークフローに関するプロトコルの最後）または増幅後のクリーンアップ前（セクション6）のステップで、プロトコルを安全に停止することができます。

アダプターライゲーション後に精製したライブラリーDNAは、PCR増幅、ターゲットキャプチャおよび/またはシーケンシング前に、4°Cで1～2週間、-20°Cで1ヵ月以上保存することができます。

ライブラリー増幅産物も同様な方法で保存できますが、増幅後のクリーンアップは、可能な限り早急に行ってください。分解を防ぐため、可能な場合はDNAを緩衝液（10 mM Tris-HCl, pH 8.0～8.5）中に常時保存してください。

## インプットDNA量

- 本プロトコルは、1 ng~1 µgの二本鎖DNAからの断片化とライブラリー作製に適しています。異なるシークエンシングアプリケーションにおける推奨インプットDNA量については表1をご参照ください。

表1 ライブラリー作製に対する推奨インプット量

アプリケーション	サンプルの種類	推奨インプット量
WGS	複雑なgDNA (高品質)	50 ng~1 µg
ターゲットキャプチャ (WES、カスタムパネル)	複雑なgDNA (高品質)	10 ng~1 µg
WGS、ターゲットキャプチャ	FFPE DNA	≥50 ng (品質に依存)
WGS	微生物DNA	1 ng~1 µg
WGS (PCRフリー)	高品質DNA	≥50 ng (SSなし) * ≥500 ng (SSあり) *
ターゲットシークエンシング	長いアンプリコン	≥1 ng
RNA-seq	全長/ 未断片化cDNA	≥1 ng

\*SS=サイズセレクション; 磁気ビーズ法またはゲル抽出法ともに、60~95%のDNAの収量損失する可能性があります。

- インプット量が減少すると、アダプターをライゲーションした分子に変換される断片化DNAの割合は減少します。100 ng以上の断片化DNAからライブラリー作製を開始する場合、インプットDNA量の50~100%が通常、アダプターをライゲーションした分子に変換される一方、変換率は、10 ng~100 ngのDNAから作製されたライブラリーでは10~50%、1 ng~10 ngのインプット量では5~20%です。これらの数値は、高品質DNAの場合で、低品質DNA (例、FFPEサンプル) では低下します。アダプターライゲーション前のSPRI<sup>®</sup>による追加のクリーンアップまたはゲルによるサイズセレクションを行うワークフローでは、アダプターをライゲーションした分子の収量が低下する可能性があります。
- 酵素断片化反応は、サンプルDNA溶液のEDTAの存在に大きく影響を受けるため、断片化前にEDTAを除去するか中和する必要があります。
- DNAサンプル中に存在するEDTA (DNA抽出または精製プロセスの最終段階で使用される溶出バッファーにEDTAが含まれている場合) は、酵素的な断片化反応前にカラムまたはビーズを用いるクリーンアップ法あるいはバッファー交換を行うことにより除去することができます。これは、断片化反応のセットアップを大幅に単純化するため、特にハイスループットワークフローでは推奨される手順です。断片化の結果を最適化するために、断片化前に10 mM Tris-HCl、pH 8.0~8.5でDNAを調整してください。
- あるいは、断片化反応で適切な終濃度のKAPA Frag Conditioning Solutionを使用することによりEDTAの阻害作用を緩和することもできます。
- 反応のセットアップを促進するために、表2に概説したとおり、KAPA Frag Conditioning Solutionを適切な濃度に予め希釈して、断片化反応に固定液量 (5 µL) を添加します。KAPA Frag Conditioning Solutionの希釈率は、断片化反応液中のEDTA終濃度 (インプットDNA量を50 µL反応液に調製する場合のEDTA

終濃度) に合わせて調製します。DNAサンプル中のEDTA濃度ではないのでご注意ください。

表2 EDTAを含有するDNAサンプルに対するKAPA Frag Conditioning Solutionの希釈率

50 µL反応液中のEDTA終濃度	希釈率	Conditioning Solutionの液量 (100 µLあたり)	PCR grade waterの液量 (100 µLあたり)
0.02-0.05mM	32.0	3.1µL	96.9µL
0.1mM	15.4	6.5µL	93.5µL
0.2mM	7.4	13.5µL	86.5µL
0.3mM	4.8	21.0µL	79.0µL
0.4mM	3.3	30.0µL	70.0µL
0.5mM	2.6	38.8µL	61.2µL
0.6mM	2.2	46.5µL	53.5µL
0.7mM	1.8	56.0µL	44.0µL
0.8mM	1.6	64.0µL	36.0µL
0.9mM	1.4	72.0µL	28.0µL
1.0mM	1.3	80.0µL	20.0µL

- 希釈済みKAPA Frag Conditioning Solutionの最少100 µLを調製するか (表2のとおり)、以下の公式で必要液量を算出します。  
(反応サンプル数×5 µL) + 10%の余剰量
- DNAサンプルにEDTAが含まれない場合や、または反応液中のEDTA終濃度が間違っている場合、KAPA Frag Conditioning Solutionを断片化反応液に添加すると、期待したサイズが得られない結果になります。
- EDTAを含有するDNAサンプルの処理に関する詳細なガイドラインに関しては、「付録2: 断片化パラメータの最適化」をご参照ください。

## 断片化パラメータ

- ライブラリー作製プロトコルのセクション1に示した断片化パラメータは、高品質のゲノムDNAの断片化に当てはまります。
- 断片化の程度（DNA断片の最頻サイズおよびサイズ分布）は、断片化時間と温度によりコントロールされ、望ましい結果を得るためには両方の条件を調節する必要があります。
- FFPE DNAのDNAの品質は、断片化に影響を及ぼします。ライブラリー作製プロトコルのセクション1のガイドラインは、(KAPA hgDNA Quantification and QC Kitにより決定される) Q129/Q41比が約0.4以上のFFPEサンプルにおいて適切な出発点となります。一方、長い断片化時間で、低品質のFFPEサンプルの結果が改善することがあります。長い断片化時間は、通常インプットDNAが150~250 bpの断片に変換される割合を増加させ、残りの高分子量DNAを減少させ、ライブラリー作製における高収量と相関します。
- 標準的な断片化パラメータは、小さなウイルスゲノム、プラスミド、長いアンプリコンおよびcDNAなどの複雑性の低いサンプルを過剰に断片化する可能性があります。これらの種類のサンプルの場合、望ましい最頻断片長を得るために断片化時間を5分以内に短縮する必要があります。このことにより、特に大量サンプルを手動で処理する場合、反応の制御が困難になります。より安定した再現性のある結果を得るために、酵素活性を抑制する目的で断片化温度を下げ（30℃または25℃まで）、時間を延長します。
- 貴施設固有のサンプルに関して断片化パラメータを体系的に最適化する方法のガイドラインに関しては、「付録2：断片化パラメータの最適化」をご参照ください。
- 装置が異なると（例、サーマルサイクラー対ヒートブロックまたは自動分注システムに統合されたペルチェ装置）、同じサンプルおよびインプット量で同一の断片化プロファイルが得られないことがあります。装置を変更する場合は、断片化時間を幾分修正する必要があります。断片化時間を延長すると、断片化インキュベーションに用いる装置の相対的な影響は重大ではなくなる可能性があります。

## アダプターのデザインおよび濃度

- KAPA HyperPlus Library Preparation Kitでは、Illumina® TruSeq™、Roche Nimblegen™ SeqCap EZ、Agilent SureSelectなどの類似のライブラリー作製およびターゲットキャプチャワークフローで一般的に使用されるアダプターが使用できます。それらはインデックスのないアダプター、シングルインデックスアダプターおよびデュアルインデックスアダプターを使用することができます。同様なデザインで、dsDNAの「TA-ライゲーション」と互換性のある特注アダプターも使用できます。
- アダプターは、定評のあるオリゴヌクレオチドの供給業者から入手してください。アダプターの注文についてサポートが必要な場合は、support@kapabiosystems.comにご連絡ください。
- アダプター濃度はライゲーション効率に影響を及ぼします。同様にライゲーション後のクリーンアップでアダプターおよびアダプターダイマーのキャリアオーバーにも影響します。貴施設のワークフローにとり最適なアダプター濃度は、費用と上記の要因との兼ね合いで決まります。
- ライゲーション効率は、アダプターとインサートのモル比が10:1~>200:1の範囲が最適であり、インプットDNA量または断片長のわずかなばらつきに合わせるために、アダプターのストック濃度を調整する必要はありません。異なるインプットDNA量に対する推奨アダプター濃度に関しては表3をご参照ください。
- アダプターとインサートの高いモル比 (>200:1) は、低インプット量のアプリケーションに効率的です。25 ng以下のインプットDNA量でワークフローを最適化する場合、いくつかのアダプター濃度を検討してください。推奨アダプター濃度および推奨濃度より2~10倍高い濃度も1~2点お試しください（表3）。
- アダプター品質は、ライゲーションに利用可能なアダプターの有効濃度に影響を及ぼします。必ず、信頼できる供給業者から最高品質のアダプターを購入し、適切なイオン強度のバッファーでアダプターを溶解して保存し、アダプターストック溶液の過度な凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 同時に処理するサンプルのバッチ中の異なるアダプター濃度に対応するために、アダプターのストック溶液濃度を変え、固定液量（5 µL）の各アダプターを分注することが最良です。別の方法（単一のストック溶液を用い、ライゲーション反応に様々な液量のアダプターを分注する）は推奨しません。

表3 1 ng~1 µgのインプットDNAから作製するライブラリーの推奨アダプター濃度\*

インプットDNA量	アダプターストック濃度	アダプター： インサートのモル比	インプットDNA量	アダプターストック濃度	アダプター： インサートのモル比
1 µg	15 µM	10:1	25 ng	7.5 µM	200:1
500 ng	15 µM	20:1	10 ng	3 µM	200:1
250 ng	15 µM	40:1	5 ng	1.5 µM	200:1
100 ng	15 µM	100:1	2.5 ng	750 nM	200:1
50 ng	15 µM	200:1	1 ng	300 nM	200:1

\*アダプター：インサートのモル比は、200 bpのDNA断片長に基づいており、DNA断片が長い場合は高く、最頻サイズが200 bp未満に断片化されるDNAの場合はやや低くなります。100 ngより多いインプット量に推奨されるアダプター：インサートの低いモル比は、ライブラリー作製効率と費用の適正な兼ね合いを示しており、高いアダプター濃度を用いるとより多くのライブラリー収量が得られます。

## ライゲーション後のクリーンアップ

- ライブラリー増幅またはクラスター形成の前に、ライゲーションしなかった過剰のアダプターおよび/またはアダプターダイマーをライブラリーから取り除くことが重要です。
- KAPA HyperPlus試薬は、アダプターのダイマー形成を抑制し、ライゲーション後の1回のクリーンアップで未使用のアダプターおよびアダプターダイマーの効率的な処理を可能にします。断片化dsDNA長が150~350 bpとなるライブラリーを精製する際の最適SPRI<sup>®</sup>比は、0.8 Xです。この比は、長いDNA断片から調製したライブラリーに対応するために、またはアダプターをライゲーションしたライブラリーのサイズをシフトさせるためにカスタマイズすることができます。
- ライゲーション後のクリーンアップを行った後に、洗浄したビーズから溶出させる液量は、貴施設で選択したワークフローに適するように調整を行う必要があります。
  - 直接ライブラリー増幅に進む場合、ライブラリーDNAを溶出する適切な最終液量を決定します。保管および/またはQCのためにこのライブラリーのうち若干量を転用および/または確保することに留意してください。50 μLのライブラリー増幅反応液は、20~24 μLのテンプレートDNAに対応することができるため、約25 μLの溶出量を推奨します。
  - サイズセレクションに進む場合は（以下参照）、選択したサイズセレクション法に従って、適切な液量でライブラリーDNAを溶出してください。付録1に記載したdual-SPRI<sup>®</sup>によるサイズセレクションプロトコルの場合は、ビーズを55 μLの溶出液にリサスペンドする必要があります。
- ライゲーション後または増幅後の分析により、初回のクリーンアップ後に許容できない程度のアダプターおよび/またはアダプターダイマーのキャリアオーバーが生じる場合は、ライゲーション後の2回目のクリーンアップ（1 Xまたは異なるSPRI比）が行えます。ライゲーション後の2回目のクリーンアップでは、サンプル液量を（溶出バッファーを用いて）少なくとも50 μLに調整します。アダプターおよび/またはアダプターダイマーのキャリアオーバーを防ぐため（およびライゲーション後の2回目のクリーンアップの必要を除くため）に、ライゲーション時のアダプター濃度を最適化する必要があります。ただし、ライブラリー作製の収量は、高いアダプター：インサートのモル比を用いた場合に最も効率的であることを念頭に置いてください。

## Paramagnetic SPRI<sup>®</sup> Beadsおよび反応液のクリーンアップ

- 本プロトコルは、Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP試薬（Beckman Coulter、パート番号A63880、A63881またはA63882）を用いてバリデーションされました。他のビーズを用いた場合は、DNAの結合およびサイズセレクションに用いる溶液類および条件が変わることがあります。
- AMPure<sup>®</sup> XP試薬に関する製造業者の保存および取り扱いに関する推奨条件をご覧ください。
- ビーズは、徐々に沈殿します。使用時には必ずビーズが完全に懸濁していることを確認してください。
- ビーズインキュベーション時間は、ガイドラインに過ぎません。ライブラリー作製の効率および処理量を最大にするために、現行のプロトコル、以前の経験ならびに特定の装置およびサンプルに応じてインキュベーション時間の修正および/または最適化を行います。

- 磁性ビーズの完全なキャプチャーに必要な時間は、使用した反応容器および磁石に応じて変わります。上清の除去または移し替えよりビーズが廃棄されないこと、またはビーズが移し替えられないことが重要です。したがって、キャプチャー時間は最適化する必要があります。
- ビーズの洗浄に用いる80%エタノールの液量は、より小さな反応容器および/または限られたピペティング量に適合するように調整しますが、洗浄ステップ中は、ビーズが完全に溶液に浸されていることが重要です。**必ず、用時調製した80%エタノールをご使用ください。**
- 以降の反応を行う前にエタノールを完全に取り除くことが重要です。但し、ビーズを過度に乾燥させると、再懸濁が困難になり、DNAが著しく失われます。エタノール溶液の除去を最適な分注条件にすることにより、室温で3~5分間のビーズの乾燥で十分となります。**37°Cでビーズを乾燥させることは推奨しません。**
- 必要に応じて、溶出バッファー（10 mM Tris-HCl, pH8.0）を用いてDNAをビーズから溶出します。DNAは緩衝作用のない溶液中では不安定であることから、PCR grade waterによるDNAの溶出は推奨いたしません。但し、ターゲットキャプチャーのために作製したライブラリーはPCR grade waterにより溶出し、プローブとのハイブリダイゼーションの前にDNAを乾燥させて、保存する必要があります。溶出バッファー中の精製DNAは、4°Cで1~2週間または-20°Cで少なくとも1ヵ月安定です。-20°CでのライブラリーDNAの長期安定性は、ライブラリー濃度を含む多数の因子に依存します。必ず、長期保存用に低DNA結合性チューブを使用し、過度の凍結融解の繰り返しは避けてください。

## サイズセレクション

- サイズセレクションの必要性は、シーケンシングアプリケーションに応じて異なります。必要な場合、一般的に使用されるビーズまたはゲルを用いるサイズセレクション法をKAPA HyperPlusワークフローに統合します。
- サイズセレクションは、ライゲーション後のクリーンアップの完了後またはライブラリー増幅後などの全ワークフロー中のいくつかの段階で行うことができます。
- 標準的なKAPA HyperPlusプロトコル（p12~14）には、サイズセレクションは含まれていません。dual-SPRIによるサイズセレクションの詳細なプロトコルに関しては「付録1：サイズセレクション」をご参照ください。

## サイズセレクション (続き)

- サイズセレクションは、必ずサンプルの損失を招きます。この損失は劇的な場合があります (60~95%)、本プロセスの次のステップ (キャプチャまたはシークエンシング) のために十分な試料を産生する上で必要な増幅サイクル数を大幅に増加させる可能性があります。ライブラリー作製ワークフローにおける1回以上のサイズ特にインプットDNA量が限定される場合は、セレクションステップの利点と、ライブラリーの多様性の損失を比較して実施する必要があります。断片化プロトコルを最適化することで、サイズセレクションの必要性が除かれ、それにより、ライブラリー作製プロセスが単純化され、サンプルの損失量が限定されます。特にインサートライブラリー長および/またはリード長が短い場合に有効です。
- KAPA HyperPlusライゲーションバッファーは、高濃度のPEG6000を含み、dual-SPRIによるサイズセレクションに影響します。PEG6000を除去しない場合は、その他のサイズセレクション法の効率にも影響を及ぼす可能性があります。ライゲーション後にサイズセレクションを実施する場合、ビーズまたは電気泳動によるサイズセレクションの実施の前に、少なくとも1回のSPRI<sup>®</sup>ビーズによるクリーンアップを実施することが重要です。
- 過剰増幅したライブラリーを電気泳動で分析すると、ライブラリー二次的な高分子量のピークが認められます。これらの高分子量ピークはアーティファクトであり、通常は適切な長さの本物のライブラリー分子を含みます。このアーティファクトを取り除くためには、増幅後のサイズセレクションではなく、ライブラリー増幅反応のパラメータの最適化を推奨します。詳細な情報に関しては「重要なパラメータ: ライブラリー増幅」をご参照ください。

## ライブラリー増幅

- KAPA HiFi HotStart ReadyMixで提供される酵素KAPA HiFi HotStartは、KAPA HiFi DNAポリメラーゼの抗体型ホットスタート仕様で、高い処理能力とハイフィデリティが得られるようにエンジニア加工された新規のBファミリーDNAポリメラーゼです。KAPA HiFi HotStartには、5'→3'ポリメラーゼ活性および3'→5'エキソヌクレアーゼ (ブルーフリーディング) 活性がありますが、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性はありません。この強力な3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、DNA増幅に優れた正確性をもたらします。KAPA HiFi HotStart DNAポリメラーゼのエラー率は、 $2.8 \times 10^{-7}$  errors/base未満であり、伸長されたヌクレオチド  $3.5 \times 10^6$  塩基でエラー1つに相当します。
- KAPA Library Amplification Primer Mix (10X)は、KAPA HiFi HotStart ReadyMixを用いて実施するライブラリー増幅反応中のプライマーの枯渇を排除または遅延させます。Primer Mixは、P5およびP7フローセルシーケンスに隣接したすべてのIllumina<sup>®</sup>ライブラリーの増幅に適しています。プライマーは、それぞれ20 μMの10倍濃度で提供され、下記のように調製されています。独自のカスタムアダプターを使用する場合は、それに対応したプライマーをお客様ご自身でご用意いただくこともできます。ユーザー作製のカスタムライブラリー増幅プライマーの調製に関するガイドラインについてはsupport@kapabiosystems.comにご連絡ください。
- 最適な増幅効率を達成し、プライマーの枯渇を回避するためには、高品質なプライマーを至適濃度で使用する必要があるとなります。プライマーは、それぞれ0.5~4 μMの終濃度で使用します。100 ng以上のインプットDNA量で作製するライブラリーの場

合、各プライマーの終濃度は少なくとも2 μM以上を推奨します。

- ライブラリー増幅用のプライマーは、HPLCで精製され、(KAPA HiFi HotStartの強力なブルーフリーディング活性による分解を防ぐため) 各プライマーの3' 端にホスホロチオエート結合を有するように修飾されます。必ず、緩衝液 (例、10 mM Tris-HCl, pH 8.0~8.5) でプライマーを希釈、保存し、頻回な凍結融解の繰り返しは避けてください。そのために、短期間に使用する場合はプライマーを4°Cで保存するか、一定液量を分注して-20°Cで保存してください。
- ライブラリー増幅反応 (推奨プロトコルに従ってセットアップ) で、プライマーは通常dNTPよりも早く枯渇します。基質が枯渇するためDNA合成は起こらず、DNAの変性およびアニーリングの繰り返しにより相補的DNA鎖の分離が生じ、次いで非相補的なパートナーに対する不完全なアニーリングが生じます。これにより、不正確にアニーリングし、部分的に二重鎖になったヘテロ二本鎖DNAを含む、いわゆる「daisy-chains」または「tangled knot」が形成されます。これらの分子種は、増幅ライブラリーの電気泳動分析では遅れて移動し、二次的な高分子ピークとして検出されます。しかし、それらの分子は通常、好ましい長さのライブラリー分子から構成され、クラスター増幅またはプローブハイブリダイゼーションの前の変性中に一本鎖化されます。過剰増幅によるこれらのヘテロ二重鎖は大部分が一本鎖DNAの状態のため、dsDNA結合色素を用いたアッセイではライブラリー分子が少なく測定させます。KAPA Library Quantification assayなどのqPCRベースのライブラリー定量法は、変性と増幅によりDNAを定量し、それによりライブラリーが過剰増幅された場合でも、アダプターをライゲーションした分子のライブラリー中のDNA量を正確に測定できます。

ライブラリー増幅の効率に影響を及ぼす因子およびライブラリーの定量に関する過剰増幅の影響に関する詳細な考察についてはKAPA NGSライブラリー調製法技術ガイドを参照してください。

- ライブラリーの過剰増幅は、増幅バイアス、PCR duplicates、chimeric library insertsおよび塩基置換などの望まないヒューマンアーティファクトをもたらします。したがって、QCおよびダウンストリームの処理工程 (例、ターゲットエンリッチメントまたはシークエンシング) に十分なサンプル量を得るだけで留めて、ライブラリー増幅の程度は可能な限り限定するべきです。

## ライブラリーの増幅 (続き)

• サイクルをエンドポイントの最後まで実施した場合 (推奨しません)、ライブラリー作製プロトコルのセクション5に記載したとおりを実施した、50 µlの1回のライブラリー増幅PCRにより最大で8~10 µgまでライブラリーが増幅できます。過剰増幅およびそれに伴う望ましくないアーティファクトを最小限にするために、ダウンストリーム処理工程で必要な最適量のライブラリーが得られるように増幅サイクル数を調整させる必要があります。最適量は通常250 ng~1.5 µgです。約100 ngまたは1 µgの増幅ライブラリーを得るために、高品質のインプットDNAから調整するライブラリーの推奨サイクル数を表4に示します。

表4 1 ng~1 µgのDNAインプット量から100 ng または1 µgの増幅DNAを産生する推奨サイクル数

ライブラリー作製へのインプット量	産生に必要なサイクル数	
	ライブラリー100 ng	ライブラリー1 µg
1 µg	0*	0-1*
500 ng	0*	2-3
250 ng	0-1*	3-5
100 ng	0-2*	5-6
50 ng	3-5	7-8
25 ng	5-6	8-10
10 ng	7-9	11-13
5 ng	9-11	13-14
2.5 ng	11-13	14-16
1 ng	13-15	17-19

\*PCRで配列が完成するアダプターを用いる場合、処理工程の次段階 (ターゲットキャプチャまたはシーケンシング) のための完全なアダプターシーケンスには、ライゲーション後に十分量のライブラリーが入手可能かどうかにかかわらず、最少の増幅サイクル数 (1~3) が必要になります。必要なサイクル数は、特異的なアダプターと増幅用プライマーのデザインに依存します。

- ライブラリー増幅の前にアダプターライゲーションライブラリーの定量を行うことでは、ライブラリー増幅の最適化に有効です。特に、ライブラリー作製ワークフローを初めて確立する場合に効果的です。KAPA Library Quantification Kitを用いることで、ライブラリー増幅に使用できるプレートDNA (アダプターをライゲーションした分子) 量は、正確に測定できます。それにより、増幅ライブラリーの特定量を達成するために必要なPCRサイクル数を理論的に予測することができます。0.5~500 ngのアダプターをライゲーションしたDNAから約1 µgのDNAを入手するために推奨されるサイクル数は表5を参照するか、これらの算出を支援するように設計された計算機に関してはsupport@kapabiosystems.comにご連絡ください。増幅サイクルの実際の最適回数は、インプットDNAのサンプルの種類およびサイズ分布に応じて、1~3サイクル多くなる可能性があることに留意してください。
- 貴施設のアプリケーションに必要なライブラリー量に応じて、ライブラリー増幅を省略することが可能です。こうした場合、貴施設のアダプターが、サンプルのインデックス付与 (必要な場合)、クラスター増幅およびシーケンシングを支援するようにデザインされていることを確認することが重要です。ライブラリー増幅の省略は、ワークフローを更に効率化し、ライブラリー調製時間全体を1.5時間以下に短縮します。KAPA HyperPlus Library

表5 0.5~500 ngのアダプターをライゲーションしたDNAから約1 µgのDNAを入手するために必要な理論サイクル数\*

増幅反応中のアダプターをライゲーションしたDNA量	1 µgのライブラリーDNAを産生するために必要なサイクル数
500 ng	1-2
100 ng	3-4
50 ng	5-6
10 ng	7-8
5 ng	8-9
1 ng	11-12
500 pg	12-13

\*ガイドラインは、KAPA HiFi HotStart ReadyMixおよびKAPA Library Amplification Primer Mixによる増幅、ならびにqPCR-based KAPA Library Quantification Kitによるライブラリー定量に基づきます。

Preparation Kitにより達成された高い変換効率は、50 ng程度のインプットDNA量からPCRフリーのワークフローを可能にします。増幅試薬を含まないKAPA HyperPlus Library Preparation Kit (KK8511, KK8513および KK8515) は、PCRフリーのワークフローに使用することができます。

## ライブラリー作製成功の評価

- 本プロセスの次のステップ (例、ターゲットキャプチャまたはシーケンシング) ならびにライブラリーのQCおよび所定期間保存用に、好ましいサイズ分布を持ったアダプターライゲーション分子の十分量が得られるように、貴施設に固有のライブラリー作製ワークフローを設計し、最適化する必要があります。
- 統合した断片化/ライブラリー作製ワークフローで、分析のために断片化反応産物の一定量を取り除くことが可能な場合、以下の理由で全KAPA HyperPlusワークフローが完了次第、断片化の成績を評価することが最も生産的です。
  - わずかな一定量を取るために操作を中断するのが困難な場合、最終的なライブラリーで評価することができます。
  - Lowインプット量のサンプル (断片化に1~10 ng) の断片化プロファイルは、高感度のアッセイ法を用いた場合でも価値のある情報ではない可能性があります。
  - FFPE使用から調製したライブラリーの最終サイズ分布は、断片化後のサイズ分布およびアダプター長に基づいて予測された結果より一般的に小さくなります。ライブラリー増幅に用いる高フィデリティのDNAポリメラーゼがダメージを受けたDNA、特に塩基が脱アミノ化または酸化されたテンプレートを増幅することができないに起因する一般的な現象です。

貴施設の固有のサンプルに関して断片化パラメータを体系的に最適化する方法のガイドラインに関しては、「付録2: 断片化パラメータの最適化」をご参照ください。



## ライブラリー作製成功の評価 (続き)

- キャプチャ前または最終的なライブラリーのサイズ分布は電気泳動法で確認すべきです。従来のゲルに関しては、LabChip® GX、GXIIもしくはGX Touch (PerkinElmer)またはBioanalyzerもしくは Tapestation(Agilent Technologies)、Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical) などの装置を推奨します。KAPA HyperPlus Library Preparation Kitで調製した典型的な電気泳動プロファイルを次ページの図1に示します。
- PCR-Freeワークフローにより「Y字」アダプター状態で調製されたライブラリーを電気泳動的電気泳動で分析した場合、予測した最頻断片長より長くなることもあり、さらに広いもしくは二峰性のサイズ分布を示すことがあることに留意してください(図1参照)。増幅ライブラリーと未増幅ライブラリーで実際のサイズを検出されるサイズ分布の相違は、使用するアダプターの設計および電気泳動法に応じて変動します。未増幅ライブラリーのサイズ分布を正確に測定するためには、電気泳動分析の前に、アダプターをライゲートした分子を完全な二本鎖にするためにライブラリーの一部を数サイクルPCR増幅を行います。または、KAPA Library Quantification Kitで産生されたライブラリー定量産物を電気泳動法により分析することにより二本鎖状態のライブラリーサイズ情報が得られます(以下参照)。
- Illumina®社用のKAPA Library Quantification Kitは、KAPA HyperPlus ワークフローを用いて産生したライブラリーのqPCRに基づく定量に推奨されます。これらのキットは、Illumina® flow cell oligosに基づくプライマーを用いており、以下のライブラリーを定量するために使用できます。

—フローセル増幅のため用意するライブラリー

—ライゲーションが完了次第、すなわちライゲーション後のクリーンアップ終了後、(pre-capture後の) 増幅のクリーンアップ終了後またはPOST-Ligation後もしくはPOST-Amplification後のサイズセレクションの前後に、全長アダプターで作製されたライブラリー

KAPA Library Quantification Kitは、ワークフローの異なる段階におけるライブラリーおよびPCRフリーワークフローで生産されたライブラリーを定量する唯一の信頼できる手段を提供します。その理由は下記です。

—クラスター増幅およびシークエンシングのために正確に配置した2つのアダプターを持つ分子のみを定量します。

—測定は、ライブラリーの過剰増幅の影響を受けません(「重要なパラメータ:ライブラリー増幅」参照)

- ライブラリー作製ワークフローが最適化され、必要なサイズ分布の増幅ライブラリーの収量が安定して得られると、工程管理は通常必要ありません。しかし、アダプターのライゲーション後(ライブラリー増幅前)に、ライブラリーのqPCRに基づく定量により、最適化またはトラブルシューティングに有用なデータが得られます。この段階での定量により、以下のプロセスの効率を評価することができます。

—アダプターをライゲーションした分子に転換されたインプットDNAの割合を測定することによる、中核的なライブラリー作製プロセス(断片化からライゲーション)

—PCRに使用したテンプレートDNAの実際量に基づいた、選択したサイクル数によるライブラリー増幅

ライブラリー増幅前後の定量データが入手できると、ライブラリー

作製プロセスの2つの主要なフェーズの評価と最適化を独立して実施することが可能になり、望ましい収量の増幅ライブラリーが得られます。

- 本プロセスのいずれかの段階でサイズセレクションを実施する場合、サイズセレクション前後のqPCRによる定量も、サイズセレクションの相対的な有益性を明らかにし、プロセスに関連したサンプルの損失を測定する上で有益です。
- ライゲーション後のクリーンアップ終了後/ライブラリー増幅前のライブラリーの電気泳動法による評価は有益ですが、見かけの最頻断片長およびサイズ分布は、すでに概説し、図1に示すとおり、アダプターの非相補的領域の妨害により不正確になることをご銘記ください。

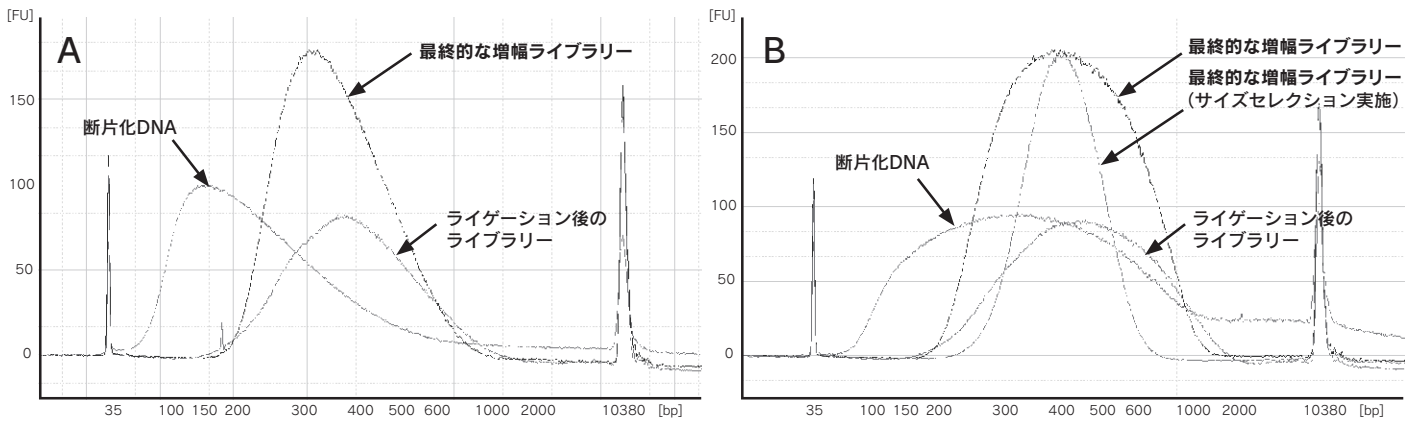


図1 KAPA HyperPlus Library Preparation Kitで調製したライブラリーの実例

インプットDNA量 (高品質のヒトゲノムDNA 100ng) を37℃で30分 (A) または10分間 (B) 断片化し、それぞれ約150bpまたは約350bpの最頻断片長が得られました。ライブラリーは、推奨されたアダプター：インサートのモル比を用い、ライブラリー作製プロトコル (p12~14) の記載どおりに調製しました。大きい方のインサートライブラリー (B) は2通り調製しました。一つのライブラリーは、「付録1：サイズセレクション」に記載されたとおりにライゲーション後のクリーンアップ終了後、dual-SPRI<sup>®</sup>によるサイズセレクションを行いました。別のライブラリーはサイズセレクションを行いませんでした。電気泳動図は、Bioanalyzer 2100 High Sensitivity DNA Kitにより得られました。DNA濃度は分析前にノーマライゼーションしており、処理工程の異なる段階での実際のDNA濃度を反映しません。断片化DNAの電気泳動プロファイルは、「独立」のワークフローで入手しており、それによってプロトコルは断片化後に終了し、反応産物は2 X SPRIによるクリーンアップを用いて精製しました。

ライゲーション後、全長の「Y字」アダプターの非相補末端が、ゲルマトリクス中でライブラリー断片の泳動を妨害したため、予測したサイズ分布より大きくなりました。アダプターをライゲートした未増幅のライブラリーにおける実際と見かけの最頻断片長の相違は、使用したアダプターのデザインと電気泳動システムに依存し、ここで認められたよりかなり顕著になります。サイズセレクションにより、最終ライブラリーの極めて狭いサイズ分布が得られますが、ライブラリーの収量が犠牲になります。

## Process Workflow

See **Table 1** on p. 4 for recommended inputs of different types of DNA for different sequencing applications.

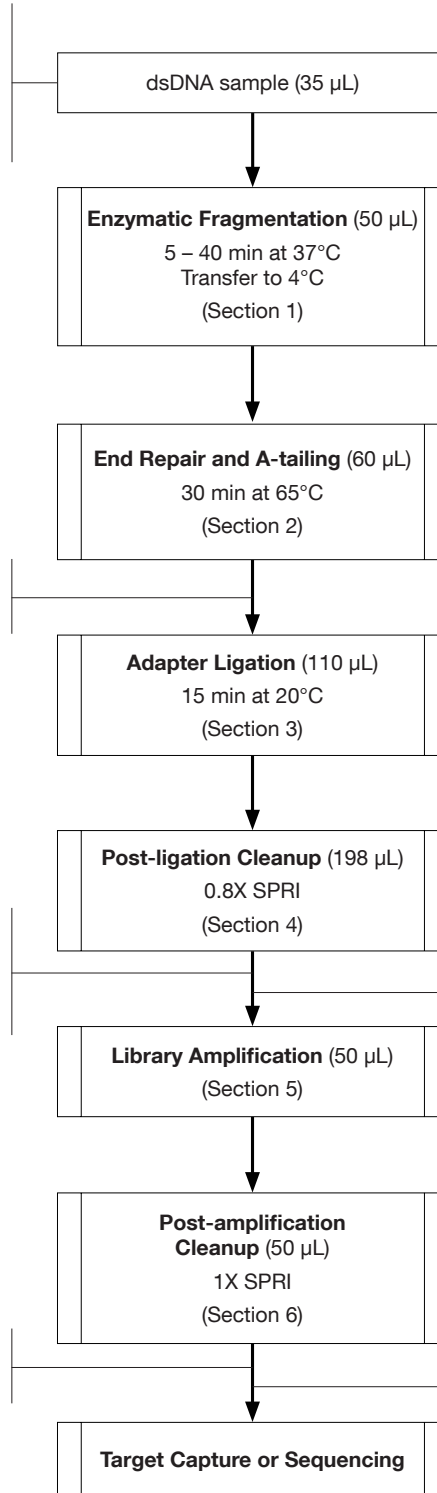
For samples containing EDTA: include the appropriate concentration of KAPA Frag Conditioning Solution (see **Table 2** on p. 4)

See **Table 3** on p. 5 for recommended adapter stock concentrations.

Size selection, employing SPRI® beads or an electrophoretic method, may be incorporated at this point, if appropriate.

**PCR-free workflows end here.**

Size selection, employing SPRI beads or an electrophoretic method, may be incorporated at this point, if appropriate.



## Recommended QC Metrics

- **Concentration and Q-ratio of input DNA** (*KAPA hgDNA Quantification and QC Kit*)  
for FFPE DNA only

- **Concentration of adapter-ligated libraries** (*KAPA Library Quantification Kit*)  
Adapter-ligated libraries diluted in the range of 1/500 to 1/10,000 usually fall within the dynamic range of the assay

- **Electrophoretic profile of amplified libraries**
- **Concentration of amplified libraries** (*KAPA Library Quantification Kit*)  
Amplified libraries diluted in the range of 1/10,000 to 1/200,000 usually fall within the dynamic range of the assay

## Library Construction Protocol

### Notes:

- Standard fragmentation parameters may not result in the optimal size distribution for libraries prepared from your specific DNA samples. For this reason, precious samples should not be used when evaluating this kit for the first time. Instead, parameters should be optimized with a non-precious, bulk DNA sample that is representative of the actual samples to be processed. Please refer to **Appendix 2: Optimization of Fragmentation Parameters** for guidelines.
- This protocol does not include size selection. Please refer to **Appendix 1: Size Selection** for a detailed dual-SPRI® size selection protocol that may be included after ligation or after amplification.

### 1. Enzymatic Fragmentation

1.1 Dilute the amount of dsDNA to be used for library construction as follows:

- In 10 mM Tris-HCl (pH 8.0 – 8.5), in a total of 35 µL if the DNA preparation does not contain EDTA.
- In the EDTA-containing buffer in which samples are currently suspended, in a total of 30 µL if the DNA preparation does contain EDTA.

1.2 If the DNA samples contain EDTA: prepare a sufficient volume of appropriately diluted KAPA Frag Conditioning Solution (5 µL per DNA sample plus excess). Refer to **Table 2** (p. 4) for guidelines on the dilution of the KAPA Frag Conditioning Solution.

To each reaction tube/well of a PCR plate with 30 µL of EDTA-containing DNA, add 5 µL of diluted KAPA Frag Conditioning Solution Mix by gentle vortexing or pipetting up and down.

1.3 Assemble each fragmentation reaction on ice by adding the rest of the components in the order shown below:

Component	Volume
Double-stranded DNA (with KAPA Frag Conditioning Solution, if needed)	35 µL
KAPA Frag Buffer (10X)*	5 µL
KAPA Frag Enzyme*	10 µL
<b>Total volume</b>	<b>50 µL</b>

\*The KAPA Frag Buffer and Enzyme may be pre-mixed and kept on ice prior to reaction setup, and dispensed as a single solution.

1.4 Vortex gently and spin down briefly. Return the plate/tube(s) to ice. Proceed immediately to the next step.

1.5 Incubate in a thermocycler, pre-cooled to 4°C and programmed as outlined below. A heated lid is not required for this step. If used, set the temperature of the heated lid to ≤50°C.

Step	Temp	Time
Pre-cool block	4°C	N/A
Fragmentation	37°C	See table below
HOLD	4°C	∞

Mode fragment length	Incubation time at 37°C*	Optimization range
600 bp	5 min	3 – 10 min
350 bp	10 min	5 – 20 min
200 bp	20 min	10 – 25 min
150 bp	30 min	20 – 40 min

\*These parameters are a good starting point for high-quality genomic DNA. Please refer to **Appendix 2: Optimization of Fragmentation Parameters** for guidelines on how to optimize fragmentation time and temperature, if needed.

1.6 Transfer reactions to ice, and proceed immediately to **Section 2**.

### 2. End Repair and A-tailing

2.1 In the same tube(s)/plate in which enzymatic fragmentation was performed, assemble each end repair and A-tailing reaction as follows:

Component	Volume
Fragmented, double-stranded DNA	50 µL
End Repair & A-Tailing Buffer*	7 µL
End Repair & A-Tailing Enzyme Mix*	3 µL
<b>Total volume</b>	<b>60 µL</b>

\*The buffer and enzyme mix should preferably be pre-mixed and added in a single pipetting step. Premixes are stable for ≤24 hours at room temperature, for ≤1 week at 4°C, and for ≤3 months at -20°C.

2.2 Vortex gently and spin down briefly. Return the reaction tube(s)/plate to ice. Proceed immediately to the next step.

2.3 Incubate in a thermocycler programmed as outlined below. A heated lid is required for this step. If possible, set the temperature of the heated lid to ~85°C (instead of the usual 105°C).

Step	Temp	Time
End repair and A-tailing	65°C*	30 min
HOLD	4°C**	∞

\*Both the fragmentation and end repair enzymes are inactivated at 65°C. When reactions are set up according to recommendations, additional fragmentation should be negligible. The brief period of end repair is sufficient for enzymatically fragmented DNA.

\*\*If proceeding to the adapter ligation reaction setup without any delay, the reaction may be cooled to 20°C instead of 4°C.

2.4 Proceed immediately to the next step.

### 3. Adapter Ligation

- 3.1 Dilute adapter stocks to the appropriate concentration, as outlined in **Table 3** on p. 5.
- 3.2 In the same plate/tube(s) in which end repair and A-tailing was performed, assemble each adapter ligation reaction as follows:

Component	Volume
End repair and A-tailing reaction product	60 µL
Adapter stock (concentration as required)	5 µL
PCR-grade water*	5 µL
Ligation Buffer*	30 µL
DNA Ligase*	10 µL
<b>Total volume</b>	<b>110 µL</b>

\*The water, buffer and ligase enzyme should preferably be premixed and added in a single pipetting step. Premixes are stable for ≤24 hours at room temperature, for ≤1 week at 4°C, and for ≤3 months at -20°C.

- 3.3 Mix thoroughly and centrifuge briefly.
- 3.4 Incubate at 20°C for 15 min.

**Note:** to achieve higher conversion rates and library yields, particularly for low-input samples, consider increasing the ligation time, to a maximum of 4 h at 20°C, or overnight at 4°C. Please note that longer ligation times may lead to increased levels of adapter-dimer. Adapter concentrations may have to be optimized if ligation times are extended significantly.

- 3.5 Proceed immediately to the next step.

### 4. Post-ligation Cleanup

- 4.1 In the same plate/tube(s), perform a 0.8X SPRI® cleanup by combining the following:

Component	Volume
Adapter ligation reaction product	110 µL
Agencourt® AMPure® XP reagent	88 µL
<b>Total volume</b>	<b>198 µL</b>

- 4.2 Mix thoroughly by vortexing and/or pipetting up and down multiple times.
- 4.3 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 5 – 15 min to bind DNA to the beads.
- 4.4 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 4.5 Carefully remove and discard the supernatant.
- 4.6 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.
- 4.7 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.

- 4.8 Carefully remove and discard the ethanol.
- 4.9 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.
- 4.10 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.
- 4.11 Carefully remove and discard the ethanol. Try to remove all residual ethanol without disturbing the beads.
- 4.12 Dry the beads at room temperature for 3 – 5 min, or until all of the ethanol has evaporated. **Caution: over-drying the beads may result in dramatic yield loss.**
- 4.13 Remove the plate/tube(s) from the magnet.
- 4.14 Resuspend the beads:
  - in 25 µL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) to proceed with library amplification (Section 5), or
  - in 55 µL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) to proceed with dual-SPRI size selection (**Appendix 1**).
- 4.15 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 2 min to elute DNA off the beads.
- 4.16 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 4.17 Transfer the clear supernatant to a new plate/tube(s) and proceed with library amplification or size selection, as appropriate. Store purified, adapter-ligated libraries at 4°C for 1 – 2 weeks, or at -20°C.

### 5. Library Amplification

**Note:** Please refer to **Important Parameters: Library Amplification** and Section 7 of the **KAPA NGS Library Preparation Technical Guide** for more information on optimizing library amplification.

- 5.1 Assemble each library amplification reaction as follows:

Component	Volume
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix	25 µL
10X KAPA Library Amplification Primer Mix*	5 µL
Adapter-ligated library	20 µL
<b>Total volume</b>	<b>50 µL</b>

\*Or other, suitable 10X library amplification primer mix. The recommended final concentration of each primer in the library amplification reaction is 0.5 – 4 µM. Also refer to **Important Parameters: Library Amplification**.

- 5.2 Mix thoroughly and centrifuge briefly.
- 5.3 Amplify using the cycling protocol outlined on the next page:

## 5. Library Amplification (continued)

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98°C	45 sec	1
Denaturation	98°C	15 sec	Minimum number required for optimal amplification (Table 4 or 5)
Annealing*	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	1 min	1
HOLD	4°C	∞	1

\*Optimization of the annealing temperature may be required for non-standard (i.e., other than Illumina® TruSeq™) adapter/primer combinations.

5.4 Store the plate/tube(s) at 4°C or -20°C for up to 72 hours, or proceed directly to **Step 6: Post-amplification Cleanup**.

## 6. Post-amplification Cleanup

6.1 In the library amplification plate/tube(s), perform a 1X SPRI® cleanup by combining the following:

Component	Volume
Library amplification reaction product	50 µL
Agencourt® AMPure® XP reagent	50 µL
<b>Total volume</b>	<b>100 µL</b>

6.2 Mix thoroughly by vortexing and/or pipetting up and down multiple times.

6.3 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 5 – 15 min to bind DNA to the beads.

6.4 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.

6.5 Carefully remove and discard the supernatant.

6.6 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.

6.7 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.

6.8 Carefully remove and discard the ethanol.

6.9 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.

6.10 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.

6.11 Carefully remove and discard the ethanol. Try to remove all residual ethanol without disturbing the beads.

6.12 Dry the beads at room temperature for 3 – 5 min, or until all of the ethanol has evaporated. **Caution: over-drying the beads may result in dramatic yield loss.**

6.13 Remove the plate/tube(s) from the magnet.

6.14 Thoroughly resuspend the beads in an appropriate volume of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) or PCR-grade water. **Always use PCR-grade water if proceeding to target capture.**

**Note:** If proceeding with a second post-ligation cleanup, or dual-SPRI size selection (**Appendix 1**), resuspend the beads in 55 µL of elution buffer.

6.15 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 2 min to elute DNA off the beads.

6.16 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.

6.17 Transfer the clear supernatant to a new plate/tube(s) and proceed with size selection (refer to **Appendix 1**), library QC, target capture or sequencing, as appropriate. Store purified, amplified libraries at 4°C for 1 – 2 weeks, or at -20°C.

## 付録1

### サイズセレクション

一般的に使用されるサイズセレクション法 (例、ここに記載した「double-sided SPRI<sup>®</sup>」または電気泳動法) を、KAPA HyperPlusのライブラリー作製ワークフローに統合します。ライゲーション後のクリーンアップ終了後またはライブラリー増幅後は、なるべくサイズセレクションを実施してください。サイズセレクションを実施するか否か、どの方法を使用するか、ライブラリー作製プロセスのどの段階で行うかは、サンプルの性質、ライブラリー作製のインプット量およびシーケンシングのアプリケーションとリード長に依存します。サイズセレクションに関する詳細の情報は、「重要なパラメータ: サイズセレクション」をご参照ください。

この付録で概説したdual-SPRIのサイズセレクションプロトコルは、250~450 bpのライブラリー分子 (アダプターを含む) を選択するためにデザインされています。これより短いまたは長い分子集団を入手するためには、プロトコルを以下のように修正します。

サイズ上限値	修正内容	サイズ下限値	修正内容
増加	初回カットの比を下げる	増加	二回目カットの比を下げる*
減少	初回カットの比を上げる	減少	二回目カットの比を上げる*

\*二回目のカットは、Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP試薬の少なくとも0.2 x液量で実施します。二回目のカットに必要なAMPure<sup>®</sup> XP試薬の液量は、初回のカット後に移すDNA含有上清の液量ではなく、サイズセレクション手順開始時のDNA液量と比較して算出することにご注意ください。DNA回収量は、初回のサイズカットと二回目のサイズカットの試薬液量の差が約0.2 x 液量より少ない場合に劇的に減少します。DNAの回収量を増加させるために、AMPure<sup>®</sup> XP試薬の0.2 x 液量超を二回目のサイズカットに使用しますが、これにより、回収されるライブラリーの断片が小さくなることおよび/またはサイズ分布が広くなることにご注意ください。dual-SPRIによるサイズセレクションに関する詳細な情報については、KAPA NGSライブラリー調製技術ガイドを参照するか、support@kapabiosystems.comにご連絡ください。

A1.1 以下の成分を混合して (約450bpより長いライブラリー分子を除外するため) 初回 (0.6 x) のサイズカットを実施します。

コンポーネント	液量
サイズセレクションを行うDNA	50 µL
Agencourt AMPure XP試薬	30µL
ウエル/チューブあたりの総液量	80µL

A1.2 ボルテックスミキサーの使用および/またはピペッティングによる吸排出を数回繰り返して完全に混和します。

A1.3 プレート/チューブを室温で5~15分間インキュベートし、約450 bpより大きいライブラリー分子をビーズに結合させます。

A1.4 ビーズを収集するために磁石の上にプレート/チューブを設置します。溶液が透明になるまでインキュベートします。

A1.5 約450 bpより小さいライブラリー分子を含む上清約75 µLを新しいプレート/チューブに慎重に移します。ビーズが上清に移行しないようにすることが重要です。約450 bpより大きなライブラリー分子が結合したビーズを含むプレート/チューブは廃棄します。

A1.6 以下の成分を混合して二回目 (0.8 x、250 bp超のライブラリー分子を回収するため) のサイズカットを実施します。

コンポーネント	液量
初回のサイズカット上清	75 µL
Agencourt AMPure XP試薬	10 µL
ウエル/チューブあたりの総液量	85 µL

A1.7 ボルテックスミキサーの使用および/またはピペッティングによる吸排出を数回繰り返して完全に混和します。

A1.8 プレート/チューブを室温で5~15分間インキュベートし、約250 bpより大きなライブラリー分子をビーズに結合させます。

A1.9 ビーズを収集するために磁石の上にプレート/チューブを設置します。溶液が透明になるまでインキュベートします。

A1.10 約250 bpより小さいライブラリー分子を含む上清を慎重に取り除き、廃棄します。

A1.11 プレート/チューブを磁石の上に設置したまま、200 µLの80%エタノールを添加します。

A1.12 磁石上でプレート/チューブを30秒以上室温でインキュベートします。

A1.13 エタノールを慎重に取り除き、廃棄します。

A1.14 プレート/チューブを磁石上に設置したまま、200 µLの80%エタノールを添加します。

A1.15 磁石上でプレート/チューブを30秒以上室温でインキュベートします。

A1.16 エタノールを慎重に取り除き、廃棄します。ビーズが拡散しないようにしながら残存するエタノールをすべて除去します。ビーズを室温で3~5分乾燥させるか、エタノールがすべて蒸散するまで乾燥させます。注: ビーズを乾燥させ過ぎると収量が劇的に低下する可能性があります。

A1.17 プレート/チューブを磁石から取り外します。

A1.18 溶出バッファー (10 mM TrisHCl, pH 8.0~8.5) の必要量にビーズを完全に再懸濁します。

A1.19 ビーズからDNAを溶出するために、プレート/チューブを室温で2分間インキュベートします。

A1.20 ビーズを捕捉するために磁石の上にプレート/チューブを設置します。溶液が透明になるまでインキュベートします。

A1.21 サイズを選択したDNAを含む透明な上清を新しいプレート/チューブに移し、4℃で1~2週間または-20℃でDNAを保存します。

## 付録2

### 断片化パラメータの最適化

ライブラリー作製プロトコルのセクション1に示した断片化のガイドラインでは、貴施設に固有のDNAサンプルについてライブラリーのサイズ分布を最適化しない可能性があります。このため、KAPA HyperPlus Library Preparation Kitを初めて評価する場合は、貴重なサンプルを使用しないでください。その代わりに、処理する実際のサンプルの代用となる貴重ではないバルクのDNAサンプルを用いて、KAPA HyperPlusワークフローの上で断片化パラメータを最適化してください。

KAPA HyperPlus Library Preparation Kitを貴施設で評価する実験計画においては、この付録の情報を考慮してください。

### インプットDNAの定量

KAPA Fragの酵素的断片化システムは、タグメンテーションに基づくライブラリー作製法よりインプットDNAの量の違いによる影響は低いが、インプットDNAは定量にすることを推奨しています。PicoGreen®/Qubit®は、高品質DNAの定量に推奨されています。一方FFPE DNAの場合はKAPA Human gDNA Quantification and QC Kitを用いることでDNAの濃度および品質情報を得ることができます。

### EDTAを含むDNAサンプルの取り扱い

DNAサンプル中のEDTAは、DNA抽出またはクリーンアッププロセスの初段階で使用される溶出バッファーを介して通常導入されます。EDTA濃度は通常は既知です（例、標準TEバッファーでは1 mM、「低濃度EDTA」のTEバッファーでは0.1 mM）。この場合および貴施設のサンプルが同様な濃度（すなわち、DNAの一定液量がライブラリー作製に用いられる）の場合、KAPA Frag Conditioning Solutionを用いてください。KAPA Frag Conditioning Solutionの適切な希釈に関しては、p4の表2を参照し、ステップ1.1からはライブラリー作製プロトコルに従います。

DNA精製に使用したEDTA含有バッファーの組成は既知であるが、サンプルの濃度が広範囲に及ぶ場合（すなわち、ライブラリー作製に望ましいインプット量を達成するために、種々の液量が使用される場合）、サンプルのバッファーは、DNA精製に使用する同じEDTA含有バッファーに統一する必要があります。

例えば、

- 貴施設のDNAサンプルではTEバッファーを用いており、ライブラリー作製のインプット量が100 ngの場合、100 ngの各サンプルをTEバッファーにより希釈し、最終液量を30 $\mu$ L (3.33 ng/ $\mu$ L) にします。
- 断片化のために50  $\mu$ Lに希釈すると、全サンプルは同じ終濃度のEDTAを含みます。

この濃度は次のとおりになります。

$$\text{TEバッファー中のEDTA濃度} \times (30 \mu\text{L}/50 \mu\text{L}) = 1 \text{ mM} \times (30 \mu\text{L}/50 \mu\text{L}) = 0.6 \text{ mM}$$

- KAPA Frag Conditioning Solution (p4 表2に従う) を2.2倍に希釈し、ライブラリー作製プロトコルのステップ1.2の後半に従います。

貴施設のDNAサンプル中のEDTAの有無または濃度が不確かな場合カラムまたは、ビーズ精製によりEDTAを除去し、酵素による断片化の前にバッファーを交換するか、以下の手順に従って最適化してください。

- 適切なインプットDNA量およびいくつかの異なる濃度のKAPA Frag Conditioning Solutionにより試験反応をセットアップし、その中で適切な反応が得られるようにします。
- EDTAフリーであることが既知のコントロールDNAを同じインプット量で少なくとも反応分を試験に含めます。コントロールDNAは、試験サンプルと同じ種類および品質であることが望まれます。
- ライブラリー作製プロトコルのセクション1に概説したとおり、適切なパラメータを用いてDNAを断片化します。ライブラリー作製プロセスを完了し、電気泳動システムを用いて試験サンプルと対照サンプルのライブラリーのサイズ分布を比較します（「重要なパラメータ: ライブラリー作製成功の評価」参照）。
- 試験サンプルでEDTAフリーの対照サンプルと同様な断片化プロファイルが得られるまで、または望ましいライブラリーのサイズ分布が得られるまで、反応液中のKAPA Frag Conditioning Solutionの終濃度を最適化します。
- 2段階の戦略が最善な場合があります。KAPA Frag Conditioning Solutionの広範な終濃度をカバーする3~4件の試験サンプルから開始し、次いでより狭い濃度範囲で精密な滴定を行います。

### 断片化時間の最適化

ライブラリー作製プロトコルのセクション1の断片化ガイドラインは、高品質のゲノムDNAの良好な出発点になります。KAPA HyperPlus Kitを初めて評価する場合は、以下のとおりに進めることを推奨します。

- 処理する実際のサンプルの代用となる貴重ではないバルクサンプルの望ましいインプット量で少なくとも3回の反復反応をセットアップします。
- ライブラリー作製プロトコルのセクション1 (p12) の3番目の表から最も適切な（望ましい最頻断片長が得られる）断片化時間を選択します。その時間で1回の反応を行い、至適範囲でわずかにより短いまたは長い断片化時間のいずれかで1回の反応を行います。3~5分の変更を推奨します。
- ライブラリー作製プロセスを完了し、最終的なライブラリーのサイズ分布を電気泳動で評価します。
  - 最頻断片長が長すぎる場合、最適な最終ライブラリー分布が得られるまで、断片化時間を2~5分増加させます。
  - 最頻断片長が短すぎる場合、最適な最終ライブラリー分布が得られるまで、断片化時間を2~5分減少させます。



## 断片化時間の最適化 (続き)

- 断片化時間が比較的短い場合 (10分以下)、微調整 (±1~2分) が必要な場合があります。この場合は、断片化温度の最適化を検討します (下記参照)。

低品質サンプルでは、やや長い断片化時間で成果が得られることがあります。FFPEサンプルの断片化時間を最適化するために同様な戦略を用いることがあります。

FFPEサンプルの場合:

- 処理する実際のサンプルの代用となる貴重ではないバルクサンプルの望ましいインプット量で4~5回の反復反応をセットアップします。このサンプルは、少数の個別サンプルをプールして作成しなければならぬ場合があります。
- ライブラリー作製プロトコルのセクション1 (p12) の3番目の表から、望ましい最頻断片長に対応する断片化時間を選択します。これを最小断片化時間として用い、追加の各反復反応で5分毎に37℃でのインキュベーション時間を増加させます。
- ライブラリー作製プロセスを完了し、最終ライブラリーのサイズ分布を評価し、必要な場合、上記のとおり断片化時間の微調整を行います。

FFPEサンプルに関しては以下のことにご注意ください。

- 断片化前のFFPEサンプルのQCにおいて得られた電気泳動プロファイルは、必ずしもライブラリーおよびシーケンスの品質の良好な判断材料ではありません。高分子DNAと考えられるサンプルでは、分解されていると考えられるサンプルより有意に良好な品質のライブラリーが得られない可能性があります。KAPA hgDNA Quantification and QC Kitは、FFPE DNAの品質評価用にqPCRに基づくアッセイ法を提供します。このアッセイ法により測定された品質スコア (Q-レシオ) は、ライブラリー作製成功と相関することが示されています。
- 増幅したFFPEライブラリーの最頻断片長は、断片化したDNAのサイズ分布から予測されたサイズより通常短くなります。このため、KAPA HyperPlusのワークフローを用いる場合、断片化以外のライブラリー作製プロセスを断片化パラメータと独立して試し、最適化することは生産的ではありません。

## 断片化温度の最適化

標準断片化温度は37℃です。高品質のゲノムDNA、その他の高度に複雑なDNAサンプルまたはFFPE DNAを500 bp未満の最頻断片長まで断片化を行っているのであれば、断片化温度を変更または最適化しなければならない必要はありません。

しかし、複雑性の低いサンプル (例、小型のウイルスゲノム、プラスミド、長いアンプリコンおよびcDNA) は、短いインキュベーション時間でも37℃で過剰に断片化される場合があります。過剰な断片化の可能性は、インプットDNAの性質、分子量/長さ、断片化後の望ましいサイズ分布に依存します。また、程度はより少ないですが、断片化のインプット量の影響を受けることもあります。例えば、1.8 kbのPCR産物100 ngは、37℃で10分間断片化すると100 ngの大腸菌ゲノムまたはヒトゲノムDNAと同程度の最頻断片長 (約300 bp) が生じる一方、1 kbのPCR産物1 ngは、同一のパラメータを用いると250 bp未満の最頻長に断片化されます。

望ましい最頻断片長が500 bp超の場合、複雑性の低いサンプルまたは複雑性の高いサンプルの最適断片化パラメータを決定するためには、

- 処理する実際のサンプルの代用となる貴重ではないバルクサンプルで4回の反復反応をセットアップします。
- 37℃で2件のサンプルをそれぞれ5分間および10分間断片化します。他の2件のサンプルを用いてこれらの断片化を30℃で反復します。
- ライブラリー作製プロセスを完了し、最終的なライブラリーのサイズ分布を電気泳動法により評価します。
  - 37℃で10分間のインキュベーションで得られた最頻断片長が長すぎる場合、37℃での断片化時間の最適化 (延長) を継続します。
  - 30℃で10分間のインキュベーションで得られた最頻断片長は長すぎるが、37℃で5分間では過剰な断片化が生じる場合、30℃で断片化時間の最適化 (延長) を継続します。
  - 30℃で5分間のインキュベーションにより過剰な断片化が生じる場合、25℃で別の反応条件 (例、5分、10分、15分および20分) によりインキュベーションを行い、必要な場合は断片化時間を微調整します。

## Restrictions and Liabilities

This technical data sheet is provided “as is” and Kapa Biosystems assumes no responsibility for any typographical, technical, or other inaccuracies. The document is subject to change, without notice, in future editions.

To the maximum extent permitted by applicable law, Kapa Biosystems disclaims all warranties, either express or implied, with regard to this technical data sheet and any information contained herein, including but not limited to the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Kapa Biosystems shall not be liable for errors or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, use, or performance of this document or of any information contained herein.

This document might contain references to third party sources of information, hardware or software, products, or services and/or third party web sites (collectively the “Third-Party Information”). Kapa Biosystems does not control, and is not responsible for, any Third-Party Information. The inclusion of Third-Party Information in this document does not imply endorsement by Kapa Biosystems of the Third-Party Information or the third party in any way.

Kapa Biosystems is not responsible nor will be liable in any way for your use of any software or equipment that is not supplied by Kapa Biosystems in connection with your use of Kapa Biosystems products.

Kapa Biosystems does not in any way guarantee or represent that you will obtain satisfactory results from using Kapa Biosystems products as described herein. The only warranties provided to you are included in the Limited Warranty enclosed with this document. You assume all risk in connection with your use of Kapa Biosystems products.

## Note to Purchaser: Limited Product Warranty

Any product that does not meet the performance standards stated in the product specification sheet will be replaced at no charge. This warranty limits our liability to the replacement of the product. No other warranties of any kind, express or implied, including without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided by Kapa Biosystems. Kapa Biosystems shall have no liability for any direct, indirect, consequential or incidental damages arising out of the use, the results of use or the inability to use any product.

## Note to Purchaser: Limited License

KAPA Hyper Prep Kits are developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use. Neither the product, nor any individual component, has been tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to the MSDS, which is available on request.

Certain applications of this product are covered by patents issued to parties other than Kapa Biosystems and applicable in certain countries. Purchase of this product does not include a license to perform any such applications. Users of this product may therefore be required to obtain a patent license depending upon the particular application and country in which the product is used.

Licensed under U.S. Patent nos. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

Agencourt, AMPure and SPRI are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. Illumina and TruSeq are trademarks or registered trademarks of Illumina, Inc. xGen and Lockdown are trademarks of Integrated DNA Technologies. Qubit and PicoGreen are registered trademarks of Life Technologies. LabChip is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. Nimblegen is a trademark of Roche.



