

# KAPA Hyper Prep Kit 取扱説明書

## 日本語版補足資料

※ 本資料は、KAPA Hyper Prep 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 Hyper Prep Kit

KR0961 – v5.16

This Technical Data Sheet provides product information and a detailed protocol for the KAPA Hyper Prep Kit.

### Contents

Product Description	2
Product Applications	2
Product Specifications	2
Shipping and Storage	2
Handling	2
Quality Control	2
<b>Important Parameters</b>	<b>3</b>
Automated Library Construction	3
Safe Stopping Points	3
Input DNA and Fragmentation	3
Adapter Design and Concentration	4
Post-ligation Processing	5
Reaction Cleanups	5
Size Selection	6
Library Amplification	6
Evaluating the Success of Library Construction	8
<b>Process Workflow</b>	<b>10</b>
<b>Library Construction Protocol</b>	<b>11</b>
Appendix 1: Size Selection	13
Appendix 2: Library Construction Guidelines for the Roche® NimbleGen™ SeqCap™ EZ Target Capture System	15
Restrictions and Liabilities	16
Note to Purchaser: Limited Product Warranty	16
Note to Purchaser: Limited License	16

Kapa/Roche Kit Codes and Components		
<b>KK8500</b> 07962312001	End Repair & A-Tailing Buffer	60 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	25 µL
<b>KK8501*</b> 07962339001	Ligation Buffer	245 µL
	DNA Ligase	80 µL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)*	250 µL
8 libraries	Library Amplification Primer Mix (10X)*	50 µL
<b>KK8502</b> 07962347001	End Repair & A-Tailing Buffer	210 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	90 µL
<b>KK8503*</b> 07962355001	Ligation Buffer	900 µL
	DNA Ligase	300 µL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)*	690 µL
24 libraries	Library Amplification Primer Mix (10X)*	138 µL
<b>KK8504</b> 07962363001	End Repair & A-Tailing Buffer	930 µL
	End Repair & A-Tailing Enzyme	400 µL
<b>KK8505*</b> 07962371001	Ligation Buffer	3.8 mL
	DNA Ligase	1.26 mL
	KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)*	3.0 mL
96 libraries	Library Amplification Primer Mix (10X)*	600 µL

\*KK8501, KK8503, and KK8505 are available for PCR-free workflows, and do not contain library amplification reagents.

### Quick Notes

- This kit provides a versatile, streamlined DNA library construction protocol. Libraries for Illumina® sequencing may be prepared from a wide range of DNA samples and inputs (1 ng – 1 µg) in 2 – 3 hrs, with minimal hands-on time. DNA input is appropriately fragmented double-stranded DNA.
- The novel one-tube chemistry improves library yield and quality, particularly for FFPE and low-input samples.
- The protocol is easy to automate. Generous reagent excesses are supplied in 96-reaction kits to accommodate the dead volumes required for automated liquid handling.
- Kits contain all the reagents for library construction and high-efficiency, low-bias library amplification, except for adapters and beads. KAPA Pure Beads (KK8000, KK8001, KK8002) and KAPA Adapters are sold separately. Kits without an amplification module are available for PCR-free workflows.
- The **Process Workflow** provides an overview of the library construction process. **Appendix 1** provides protocols for bead-based, double-sided size selection. **Appendix 2** provides details for integration with the SeqCap EZ workflow.

## Product Description

The KAPA Hyper Prep Kit provides a versatile, streamlined protocol for the rapid construction of libraries for Illumina® sequencing from fragmented, double-stranded DNA (dsDNA). The novel chemistry and streamlined, one-tube protocol improves the efficiency and consistency of library construction across a wide range of sample types and inputs.

The workflow combines enzymatic steps and employs minimal bead-based cleanups, thereby reducing sample handling and overall library preparation time to 2 – 3 hrs. The kit contains all of the enzymes and reaction buffers required for:

1. end repair and A-tailing, which produces end-repaired, 5'-phosphorylated, 3'-dA-tailed dsDNA fragments;
2. adapter ligation, during which dsDNA adapters with 3'-dTTP overhangs are ligated to 3'-dA-tailed molecules;
3. 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 each of the two library construction steps. This offers the best combination of product stability, convenience and efficiency. Adapters and beads required for cleanups after adapter ligation and library amplification are not included. KAPA Pure Beads (KK8000, KK8001, KK8002) and KAPA Adapters are sold separately.

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 Hyper Prep 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 Library Amplification Primer Mix (10X), designed for the high-efficiency amplification of Illumina libraries flanked by adapters containing the P5 and P7 flow cell sequences. Kits without the amplification module (KK8501, KK8503, and KK8505) 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 (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 (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 Hyper Prep Kits are ideally suited for low- and high-throughput NGS library construction workflows that require 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, cell-free/circulating tumor DNA and low-quality DNA such as FFPE samples. For small genomes, cell-free/circulating tumor DNA and lower complexity samples such as ChIP DNA, amplicons or cDNA (for RNA-seq), library construction from lower inputs (~100 pg or more) may be attempted.

The protocol 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
- ChIP-seq
- RNA-seq (starting with cDNA)
- 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 Hyper Prep 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 Hyper Prep Kit components have been fully thawed and thoroughly mixed before use. The KAPA Hyper Prep End Repair & A-tailing Buffer and Ligation Buffer may contain precipitates when thawed at 4°C. These buffers must be thawed at room temperature and vortexed thoroughly 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 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 Technical Support at [kapabiosystems.com/support](http://kapabiosystems.com/support) 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 Library Preparation Technical Guideを参照および/または [kapabiosystems.com/support](http://kapabiosystems.com/support) のテクニカルサポートにご相談ください。

## ライブラリー作製の自動化

本文書に記載したKAPA Hyper Prep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取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 Hyper Prep Kitを用いることにご関心のある場合は、自動化装置の販売会社または[kapabiosystems.com/support](http://kapabiosystems.com/support) のテクニカルサポートにご相談ください。

KAPA Hyper Prep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、個々の試薬ごと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。マスターミックス液は、室温で24時間安定であり、自動ライブラリー作製中に冷却する必要はありません。
- エンドリペアおよびA-テ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を慎重に最適化する必要があります。
- 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、ビーズ、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。
- 50℃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200µL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。
- ス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前プレートグリッパーなどのコンポーネント
  - ビーズ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

エンドリペアおよびA-テリングからライブラリー増幅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異なりますが、経験上2~3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 (step 3.17) または増幅後のクリーンアップ (step 5) の前で、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℃で1~2週間、-20℃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量と断片化

- 本プロトコルは、1ng~1µgの適切に断片化された二本鎖DNAからのライブラリー作製に適しています。一方で、最終的なライブラリー中のサンプルコピー数がカバレッジや多様性の必要条件を満たすのであれば、1ng未満の低インプット量からでもライブラリー調製ができます。異なるシーケンシングアプリケーションにおける推奨インプットDNA量については次のページの表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、ターゲットキャプチャ	Cell-free/ circulating tumor DNA	≥100pg
WGS	微生物DNA	1 ng~1 µg
WGS (PCRフリー)	高品質DNA	≥50 ng (SSなし) * ≥200 ng (SSあり) *
ChIP-seq	ChIP DNA	≥100pg
ターゲットシーク エンシング	アンプリコン	≥100pg
RNA-seq	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の収量を損失する可能性があります。

・「インプット」は、一般的にエンドリペアおよびA-ターミング反応へのインプットを指します。DNA定量を断片化前に行った場合、エンドリペア及びA-ターミング前に断片化DNAのクリーンアップまたはサイズ選択の実施による収量の減少により、ライブラリー作製への実際のインプットは、少なくなる可能性があります。このことは、このプロセスの効率を評価する際や、ライブラリーの増幅サイクル数を最適化する際に考慮する必要があります。

・インプット量が減少すると、断片化DNAがアダプターをライゲーションされた分子に変換される割合は減少します。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、通常インプットDNA量の25~50%が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、100pg~100ngのDNAから作製されたライブラリーでは変換率は1~25%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にビーズによる追加のクリーンアップまたは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は上記の値よりも低下する可能性があります。

・高濃度のEDTA、他のキレート剤または塩を含有するDNAサンプルは、エンドリペアおよびA-ターミング反応を阻害する可能性があります。DNA断片化後、ビーズ精製 (あるいはサイズ選択) を実施せずにそのままライブラリー作製を用いる場合は、DNAを断片化する際に水中で断片化せずに、10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5) +0.1mM EDTA溶液中で断片化することを推奨しています。DNAクリーンアッププロトコールについてはKAPA Pure Bead のテクニカルデータシートをご参照ください。

・KAPA Hyper Prepキットは、NGSライブラリー作製ワークフローに一般的に用いられる全ての機械的およびタグメンテーションを除いた酵素的断片化方法と互換性があります。お使いの断片化装置や選択した試薬の製造元により提供された断片化のガイドラインを参照してください。

・KAPA Fragキットの酵素による断片化は、機械的せん断を用いたくない場合、または特別な装置が利用できない環境にある場合に特に強く推奨されます。KAPA FragとKAPA Hyper Prepの各要素を兼ね備えたKAPA HyperPlusライブラリー調製キットは、1つのチューブでの効率的な断片化/ライブラリー作製プロトコルであり、利用可能なインプットサンプルから、最も高いライブラリー収率を提供します。さらなる情報については、kapabiosystems.comにアクセスしてください。

## アダプターのデザインおよび濃度

・KAPA Hyper Prep KitではKAPA Adaptersを使用する事が推奨されますが、Illumina® TruSeq™、Roche NimbleGen™ SeqCap EZ、Agilent SureSelectやその他の類似した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、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もできます。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。アダプターの互換性や注文についてサポートが必要な場合は、kapabiosystems.com/supportをご参照ください。

・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の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、上記の要因と費用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の範囲でロバストであり、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、アダプターストック溶液の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2をご参照ください。

・低インプット量のアプリケーションには、アダプターとインサートのモル比を高く (>200 : 1) することが効果的です。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、表2の推奨アダプター濃度と同時に、推奨濃度より2~10倍高い1~2点の濃度を試すなど、いくつかのアダプター濃度を検討してください (表2)。

・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。

・同一バッチで処理するサンプルに異なるアダプター濃度を適用する必要がある場合には、アダプターのストック溶液濃度を変え、固定液量 (5µL) の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2 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\*

エンドリペア/A-テーリング 反応 50 µl中の断片化DNA	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	エンドリペア/A-テーリング 反応 50 µl中の断片化DNA	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 µM	200:1
50 ng	15 µM	200:1	1 ng	300 µM	200:1

\*アダプター：インサートのモル比は、最頻サイズが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、200 bp未満に断片化されるDNAの場合はやや低くなります。高濃度のアダプターを用いるとより多くの収量でライブラリー得られますが、インプット量が100 ngより多い場合の推奨アダプター：インサート比はライブラリー作製効率と費用の適正な兼ね合いにより決められています。

## 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 Hyper Prep 試薬はアダプターのダイマー形成を抑制し、未使用のアダプターおよびアダプターダイマーは、ライゲーション後の1回のクリーンアップで効率的に除去することが可能です。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なDNA容量に対するビーズ容量比は、0.8 Xです。長いDNA断片から調製したライブラリーに対応する場合や、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変更したい場合には、この比を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の最終ステップで、洗浄したビーズから溶出させる際の液量は、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。
  - 一次にライブラリー増幅を行う場合、保管および/またはQCのためにライブラリー溶液の一部を転用および/または確保するかもしれないことに留意して、ライブラリーDNAを溶出する適切な最終液量を決定してください。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、選択したサイズセレクション法に適した液量でライブラリーDNAを溶出してください。Appendix 1に記載した長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションプロトコルの場合、ビーズは55 µLの溶出液にリサスペンドする必要があります。
- 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ていたことがライゲーション後または増幅後の分析により判明した場合は、ライゲーション後に2回目のクリーンアップ(1 xまたはそれ以外のビーズ対DNA比で)を行えます。パターン化されたフローセルを採用したIllumina社のシークエンサー機種用にPCRフリーのワークフローでライブラリーを調製している場合には、この2回目のクリーンアップは特に有益であるかもしれませんが、この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るかもしれませんが、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。

## 反応液のクリーンアップ

- 本プロトコルは、KAPA Pure Beads (KK8000、KK8001、KK8002) またはAgencourt® AMPure® XP試薬 (Beckman Coulter) を用いてパリア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。
- KAPA Pure BeadsあるいはAMPure® XPのための全ての保管及び取扱いに関する推奨条件を順守してください。室温への平衡化は、指定されたサイズ分布とライブラリーの収率を達成するために不可欠です。
- 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。
- DNAを最適に回収するには、DNA結合のためのインキュベーションの前に(ボルテックスまたは十分なピペティングにより) DNAとKAPA Pure Beadsが完全に混合されることが必須です。
- 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に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、小さな反応容器および/または限られたピペティング容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。エタノール溶液を適切に吸引除去することにより、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を乾燥させることから、PCR grade waterにより溶出し、保存する必要があります。

## 反応液のクリーンアップ (続き)

- 溶出バッファー中の精製DNAは、4℃で1~2週間または-20℃での長期の保存期間安定です。-20℃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。長期保存用には必ず低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。必要な場合には、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 Hyper Prep ワークフローに統合します。

サイズセレクションは

- 断片化DNAのエンドリペアおよびA-テリング前
- ライゲーション後のクリーンアップの完了後
- 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 Hyper Prepプロトコル (p11~12)には、サイズセレクションは含まれていません。長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションの詳細なプロトコルに関してはAppendix 1をご参照ください。
- 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ケンシング)のための十分な試料を作成するために、増幅サイクル数を大幅に増やす必要性が生じるかもしれません。特にインプットDNA量が限定される場合には、ライブラリー作成ワークフローにおける1回以上のサイズセレクションによるメリットと、その操作によるライブラリーの多様性の損失というデメリットとを比較した上で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。
- ライゲーションバッファーには高濃度のPEG6000が含まれており、長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションに影響を及ぼします。また、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ビーズまたは電気泳動によるサイズセレクションを実施する場合、少なくとも1回のビーズによるクリーンアップをサイズセレクションの前に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、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分析上の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が含まれます。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(サイクル数とプライマー濃度)の最適化を推奨します。詳細については次のサブセクションをご参照ください。

## 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ー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において、プライマーの枯渇が起こらないまたは遅延されるように調整されています。Primer Mixは、P5およびP7フローセルシーケンス用のすべてのIllumina®ライブラリーの増幅に適しています。プライマーは10倍濃度である20 μM溶液で提供されており、step 4.1で記述するように反応溶液を調整します。独自のカスタムアダプターと組み合わせ、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場合があります。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kapabiosystems.com/supportのテクニカルサポートにご連絡ください。
- 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ことが必要となります。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ています。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℃で保存するか、一定量を分注して-20℃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した場合)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、二次的な高分子量ピークとして検出されます。しかし、それらの分子は通常、適切な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本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れます。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を定量するため、ライブラリーが過剰増幅された場合でも、ライブラリー中のアダプターがライゲーションされた分子のDNA量を正確に測定できます。

## ライブラリー増幅 (続き)

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 Library Preparation Technical Guide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、キメラ状のライブラリー挿入および塩基置換などの望まないアーティファクトをもたらします。したがって、ライブラリー増幅の程度は可能な限り限定し、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に留めるべきです。

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step 4に記載したとおりに実施した50  $\mu$ Lの1回のライブラリー増幅PCRにより、最大で8~10  $\mu$ g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に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する必要があります。最適量は通常250 ng~1.5  $\mu$ gです。約100 ngまたは1  $\mu$ g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から調製するライブラリーの推奨サイクル数を表3に示します。

表3 1 ng~1  $\mu$ gのDNAインプット量から100 ng または1  $\mu$ gの増幅DNAを産生する推奨サイクル数

エンドリペアとA-ターミングへのインプットDNA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 $\mu$ g
1 $\mu$ g	0*	1-2*
500 ng	0*	2-4
250 ng	0-2*	4-6
100 ng	2-3*	6-7
50 ng	3-5	7-8
25 ng	5-7	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クエンシング）のための完全なアダプターシークエンスには、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テンプレートDNA（アダプターライゲーションした分子）量を正確に測定できます。それにより、指定された増幅ライブラリー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のアダプターライゲーションDNAから約1  $\mu$ gのDNAを入手するために推奨されるサイクル数は表4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ツールに関してはkapabiosystems.com/supportのテクニカルサポートにご連絡ください。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サイクル多くなったり少なくなったりする可能性があることに留意してください。

表4 0.5~500 ngのアダプターライゲーションDNAから約1  $\mu$ gのライブラリーDNAを入手するために必要な理論サイクル数\*

増幅反応に用いるアダプターライゲーションDNA量	1 $\mu$ g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による増幅を行い、KAPA Library Quantification Kitによるライブラリー定量を行った場合を想定して作成されています。

- 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クエ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2時間未満に短縮します。KAPA Hyper Prep 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 Hyper Prep Kit (KK8501, KK8503およびKK8505)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クエンシング）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が十分量得られるように、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。
- 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る必要があります。従来のゲルによる方法よりも、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 Hyper Prep 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）。泳動結果の全体的な見た目とサイズ分布の増幅ライブラリーと未増幅ライブラリーでの相違は、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）。
- qPCRに基づくライブラリーの定量にはIllumina®社用のKAPA Library Quantification Kitが推奨されます。こうしたキットは、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。
  - フローセル増幅に進めることができる状態のライブラリー
  - 例えば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、あるいは、ライゲーション後または増幅後のサイズセレクションの前後のように、ライゲーションが完了して完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適切に配置された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が安定した収量で得られるようになれば、工程管理は通常必要ありません。しかし、アダプターライゲーション後のクリーンアップ後（ライブラリー増幅前）に、qPCRに基づくライブラリーの定量を行うことにより、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。

– インプットDNAがアダプターライゲーション分子に転換された割合を測定することで、中核となるライブラリー作製プロセス（エンドリペア、A-テリングおよびライゲーション）の効率を評価

– PCRに実際に使用したテンプレートDNA量に基づく、選択したサイクル数でのライブラリー増幅効率を評価

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、すでに概説し、図1に示したとおり、見かけの最頻断片長およびサイズ分布は、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にご留意ください。



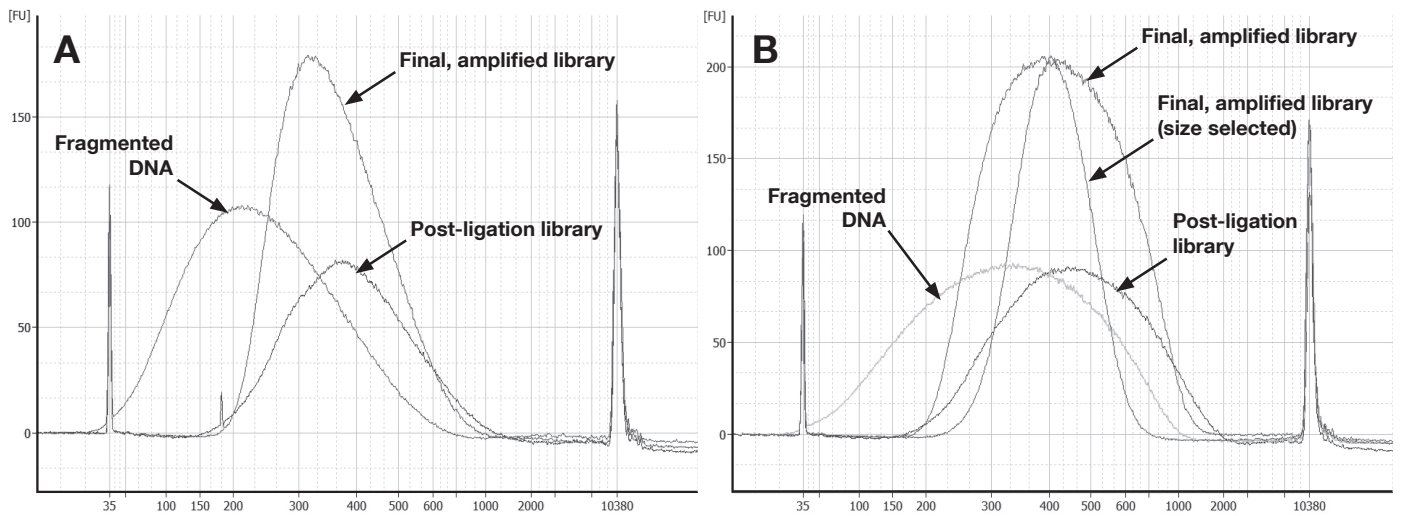


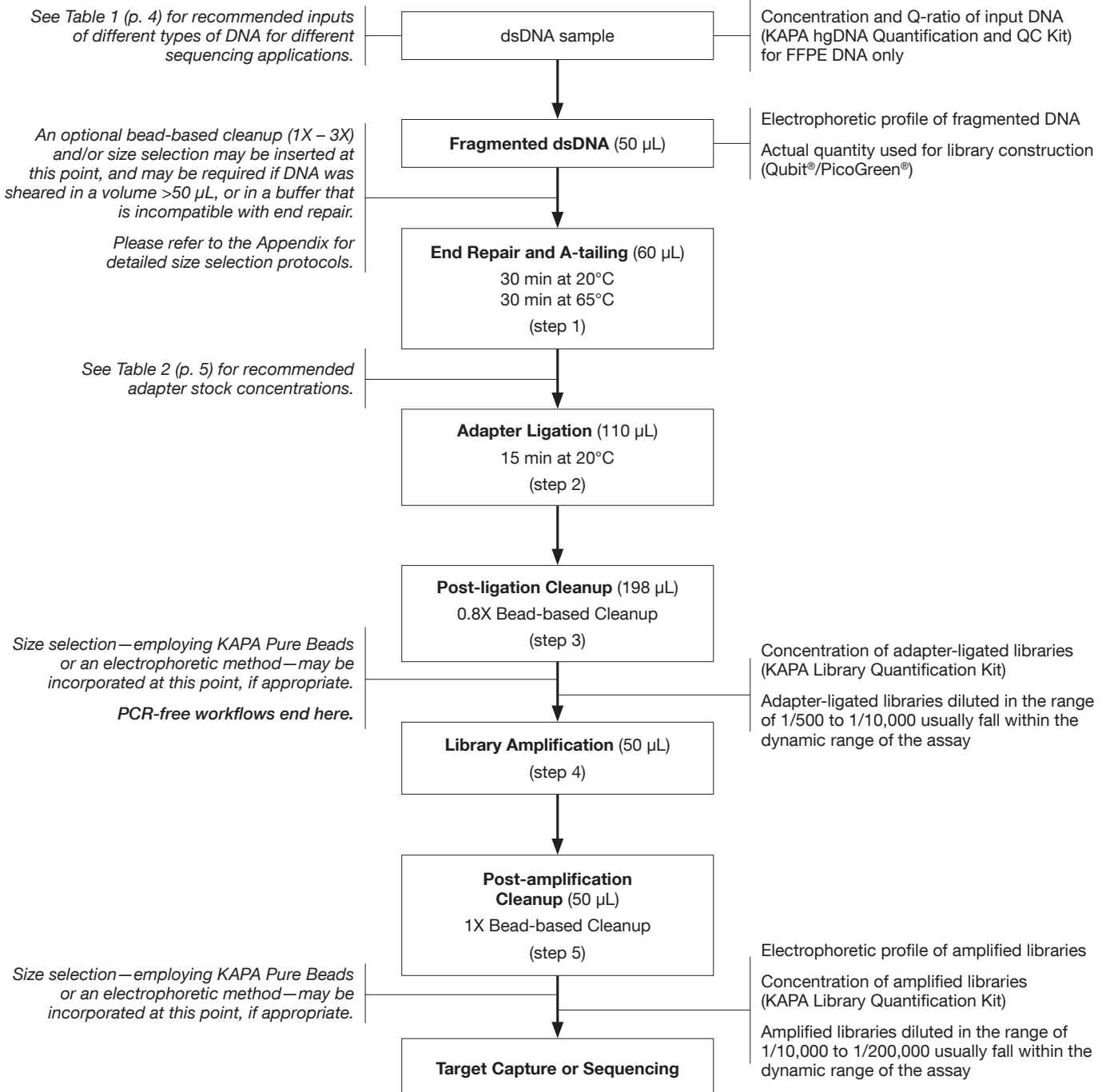
図1 KAPA Hyper Prep Kitで調製したライブラリーの実例

インプットDNA量 (高品質のヒトゲノムDNA 100ng) をコバリスで断片化し、それぞれ約200bp (A) または約300bp (B) の最頻断片サイズが得られました。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 (p.11~12) の記載どおりにライブラリーを調製しました。大きい方のインサートライブラリー (B) は2本調製し、1本はライゲーション後のクリーンアップ終了後、「Appendix 1」に記載されたとおりに、長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションを行いました。もう1本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濃度を分析前にノーマライゼーションしているため、処理工程の異なる段階での実際のDNA濃度は反映されていません。

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、ライゲーション後のライブラリーのピークは予測したサイズ分布より大きく見えています。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するため、この図で示したよりもかなり顕著な差として検出される場合があります。サイズセレクションにより、極めて狭いサイズ分布の最終ライブラリーが得られますが、ライブラリーの収量は減少します。

## Process Workflow

## Recommended QC Metrics



## Library Construction Protocol

**Note:** This protocol does not include size selection. Please refer to **Appendix 1** for detailed double-sided size selection protocols.

### 1. End Repair and A-tailing

- 1.1 Assemble each end repair and A-tailing reaction in a tube or well of a PCR plate 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 hrs at room temperature, for ≤3 days at 4°C, and for ≤4 weeks at -20°C.

- 1.2 Vortex gently and spin down briefly. Return the plate/tube(s) to ice. Proceed immediately to the next step.
- 1.3 Incubate in a thermocycler programmed as outlined below:

Step	Temp	Time
End repair and A-tailing	20°C	30 min
	65°C*	30 min
HOLD	4°C**	∞

\*A heated lid is required for this incubation. If possible, set the temperature of the lid at 85°C, instead of the usual ~105°C.

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

- 1.4 Proceed immediately to **Adapter Ligation** (step 2).

### 2. Adapter Ligation

- 2.1 Dilute adapter stocks to the appropriate concentration, as outlined in Table 2 (p. 5).
- 2.2 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 hrs at room temperature, for ≤3 days at 4°C, and for ≤4 weeks at -20°C.

- 2.3 Mix thoroughly and centrifuge briefly.

- 2.4 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 hrs 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.

- 2.5 Proceed immediately to the next step.

### 3. Post-ligation Cleanup

- 3.1 In the same plate/tube(s), perform a 0.8X bead-based cleanup by combining the following:

Component	Volume
Adapter ligation reaction product	110 µL
KAPA Pure Beads	88 µL
<b>Total volume:</b>	<b>198 µL</b>

- 3.2 Mix thoroughly by vortexing and/or pipetting up and down multiple times.
- 3.3 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 5 – 15 min to bind DNA to the beads.
- 3.4 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 3.5 Carefully remove and discard the supernatant.
- 3.6 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.
- 3.7 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.
- 3.8 Carefully remove and discard the ethanol.
- 3.9 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200 µL of 80% ethanol.
- 3.10 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for ≥30 sec.
- 3.11 Carefully remove and discard the ethanol. Try to remove all residual ethanol without disturbing the beads.
- 3.12 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 reduced yield.**
- 3.13 Remove the plate/tube(s) from the magnet.
- 3.14 Thoroughly resuspend the beads:
- in 25 µL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) to proceed with **Library Amplification** (step 4), or
  - in 55 µL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 8.5) to proceed with double-sided size selection (**Appendix 1**).

- 3.15 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 2 min to elute DNA off the beads.
- 3.16 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 3.17 Transfer the clear supernatant to a new plate/tube(s):
  - to proceed with **Library Amplification** (step 4), transfer 20  $\mu\text{L}$  of supernatant, or
  - to proceed with double-sided size selection (**Appendix 1**), transfer 50  $\mu\text{L}$  of supernatant.

## 4. Library Amplification

Note: Please refer to **Important Parameters: Library Amplification** (pp. 6 – 7) and the **KAPA NGS Library Preparation Technical Guide** for more information on optimizing library amplification.

- 4.1 Assemble each library amplification reaction as follows:

Component	Volume
KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)	25 $\mu\text{L}$
KAPA Library Amplification Primer Mix (10X)*	5 $\mu\text{L}$
Adapter-ligated library	20 $\mu\text{L}$
<b>Total volume:</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>

\*Or another, suitable 10X library amplification primer mix. The recommended final concentration of each primer in the library amplification reaction is 0.5 – 4  $\mu\text{M}$ . Also refer to **Important Parameters: Library Amplification** (p. 6).

- 4.2 Mix thoroughly and centrifuge briefly.
- 4.3 Amplify using the following cycling protocol:

Step	Temp	Duration	Cycles
Initial denaturation	98°C	45 sec	1
Denaturation	98°C	15 sec	Minimum number required for optimal amplification (Table 3 or 4)
Annealing*	60°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	1 min	1
HOLD	4°C	$\infty$	1

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

- 4.4 Proceed directly to **Post-amplification Cleanup** (step 5).

## 5. Post-amplification Cleanup

- 5.1 In the library amplification plate/tube(s) perform a 1X bead-based cleanup by combining the following:

Component	Volume
Library amplification reaction product	50 $\mu\text{L}$
KAPA Pure Beads	50 $\mu\text{L}$
<b>Total volume:</b>	<b>100 <math>\mu\text{L}</math></b>

- 5.2 Mix thoroughly by vortexing and/or pipetting up and down multiple times.
- 5.3 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 5 – 15 min to bind DNA to the beads.
- 5.4 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 5.5 Carefully remove and discard the supernatant.
- 5.6 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200  $\mu\text{L}$  of 80% ethanol.
- 5.7 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for  $\geq 30$  sec.
- 5.8 Carefully remove and discard the ethanol.
- 5.9 Keeping the plate/tube(s) on the magnet, add 200  $\mu\text{L}$  of 80% ethanol.
- 5.10 Incubate the plate/tube(s) on the magnet at room temperature for  $\geq 30$  sec.
- 5.11 Carefully remove and discard the ethanol. Try to remove all residual ethanol without disturbing the beads.
- 5.12 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 reduced yield.**
- 5.13 Remove the plate/tube(s) from the magnet.
- 5.14 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-amplification cleanup, or double-sided size selection (**Appendix 1**), resuspend the beads in 55  $\mu\text{L}$  of elution buffer.
- 5.15 Incubate the plate/tube(s) at room temperature for 2 min to elute DNA off the beads.
- 5.16 Place the plate/tube(s) on a magnet to capture the beads. Incubate until the liquid is clear.
- 5.17 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.

## Appendix1 : 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、ここに記載した長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションまたは電気泳動法) をKAPA Hyper Prepのライブラリー作製ワークフローの下記にあげるいくつかのポイントのサンプルに対して組み込むことができます。

- エンドリペアおよびA-テリング操作前の断片化dsDNA (50 $\mu$ Lまたは130 $\mu$ L)
- ライゲーション後のクリーンアップ完了後 (50 $\mu$ L)
- ライブラリー増幅後 (50 $\mu$ L)

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、ライブラリー作製へのインプット量およびシークエ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長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションプロトコルは、150~350 bpの最頻断片長のDNA断片 (アダプターを除く) 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、KAPA Pure Beadsの少なくとも0.2 x液量で実施してください。二回目のカットに必要なKAPA Pure Beads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二回目のサイズカットに0.2 x 以上のKAPA Pure Beadsを使用した場合、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がることにご注意ください。

アダプターライゲーションしたライブラリーをサイズセレクションすると、DNA断片に結合された「Y字」アダプターの長い非相補的アームは、電気泳動法で断片サイズが見かけ上のサイズとして検出されるのと同様、サイズに依存したKAPAピュアビーズへの結合にも影響することに留意してください。このため、アダプターをライゲーションしたライブラリーに関する長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションパラメータは、適切な範囲のサイズを選択するよう最適化しなくてはならない場合があります。長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションに関するさらなる情報については、KAPA NGS Library Preparation Technical Guideを参照するか、またはkapabiosystems.com/supportのテクニカルサポートにご連絡ください。

### A1. 長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションプロトコル

A1.1 下記の通り、サイズセレクションを行うサンプルの種類と容量に応じて適当な容量のKAPA Pure BeadsをDNAに添加することにより、不要な大きいDNA断片またはライブラリーの分子を除外するため一回目のサイズカットを実施します：

コンポーネント	50 $\mu$ L中の断片化dsDNA (1.0X - 1.2X)	130 $\mu$ L中の断片化dsDNA (1.0X - 1.2X)	アダプターライゲーションDNA、または増幅DNA (0.7X - 0.9X)*
サイズセレクションを行うDNA	50 $\mu$ L	130 $\mu$ L	50 $\mu$ L
KAPA Pure Beads	50 $\mu$ L	130 $\mu$ L	35 $\mu$ L
ウェル/チューブ当たりの総液量	100 $\mu$ L	260 $\mu$ L	85 $\mu$ L

\* アダプターライゲーションDNAと増幅DNAの両方においては、インサートDNAに結合されたアダプターにより、最大120bpまでライブラリーサイズが増加されていることに留意することは重要です。このため、この一回目のカットでは断片化dsDNAを用いる場合と比較してより低い比率で行う必要があります。

- 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、不要な大きいDNA断片/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。液体が澄明になるまで、インキュベートします。
- A1.5 必要用量の上清 (排除するよう意図したサイズよりも小さいサイズのDNA断片/ライブラリー分子を含有) を、新たなプレート/チューブに注意深く移します (ステップ A1.6 の表を参照)。上清とともにビーズを移さないことが重要です。不要かつ大きなサイズのDNA断片/ライブラリー分子が結合したビーズが残ったプレート/チューブは廃棄します。

## 長鎖及び短鎖の両方を除去するサイズセレクションプロトコル (続き)

A1.6 初回のサイズカットから得た上清に以下のように0.2X容量のKAPA Pure Beadsを加えて二回目のサイズカットを実施します。

コンポーネント	50 $\mu$ L中の断片化dsDNA (1.0X - 1.2X)	130 $\mu$ L中の断片化dsDNA (1.0X - 1.2X)	アダプターライゲーションDNA、 または増幅DNA (0.7X - 0.9X)*
初回のサイズカット上清	95 $\mu$ L	255 $\mu$ L	80 $\mu$ L
KAPA Pure Beads	10 $\mu$ L	26 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>ウェル/チューブ当たりの総液量</b>	<b>105<math>\mu</math>L</b>	<b>281<math>\mu</math>L</b>	<b>90<math>\mu</math>L</b>

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、最終的に回収するDNA断片/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 不必要な、小さなサイズのDNA断片/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 $\mu$ L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 $\mu$ L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。ビーズをかき乱さ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。

A1.17 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低下する可能性があります。

A1.18 プレート/チューブを磁石から取り外します。

A1.19 ライブラリーを回収するための必要量の溶出バッファー (10 mM TrisHCl, pH 8.0~8.5) またはPCRグレードウォーターにビーズを完全に再懸濁します。

- 断片化dsDNAのサイズセレクションを実施している場合、最大55 $\mu$ L中で溶出し、エンドリペアおよびA-テリング反応に50 $\mu$ Lを用います。
- アダプターライゲーションしたライブラリーDNAのサイズセレクションを実施している場合、最大25 $\mu$ L中で溶出し、ライブラリーの増幅反応に20 $\mu$ Lを用いるか、ワークフローにおける次のステップ (例えば、ターゲットキャプチャまたはシーケンシング等) に必要な容量で溶出します。
- 増幅されたライブラリーDNAのサイズセレクションを実施している場合、ワークフローにおける次のステップ (例えば、ターゲットキャプチャまたはシーケンシング等) に必要な容量で溶出します。

A1.20 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。

A1.21 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。

A1.22 サイズセレクションされたDNAを含む透明な上清を新しいプレート/チューブに移し、ワークフローの次のステップに進みます。また4 $^{\circ}$ Cで1~2週間もしくは-20 $^{\circ}$ CでDNAを保存することもできます。

## Appendix 2: Library Construction Guidelines for the Roche® NimbleGen™ SeqCap™ EZ Target Capture System

The KAPA Hyper Prep Kit may be used (instead of a KAPA HTP/LTP Library Preparation Kit) for the construction of pre-capture libraries in the SeqCap EZ workflow—to ensure a more streamlined protocol, shorter turnaround times and improved performance with low-input and challenging samples, such as FFPE and cell-free/free circulating tumor DNA.

### Library Construction

Detailed instructions for specific steps or processes are included below.

#### DNA Input and Fragmentation

- The standard SeqCap EZ Library SR workflow specifies 100 ng of Covaris-sheared DNA as the input into library construction (the End Repair and A-tailing reaction).

**Note:** libraries may be constructed from lower inputs, but sequencing metrics are not guaranteed. To use the KAPA Hyper Prep Kit in a SeqCap EZ workflow with lower DNA inputs, please consult **Important Parameters** (pp. 3 – 9) or contact Technical Support at [kapabiosystems.com/support](http://kapabiosystems.com/support) for more information.

- Shear the input DNA to an average size of 180 – 220 bp using a Covaris instrument. If an optimized protocol is not available then start with the guidelines provided by the supplier of the Covaris instrument and fine-tune the parameters to yield the appropriate DNA fragmentation size distribution.

#### End Repair and A-tailing

- Follow instructions outlined in the **Library Construction Protocol: End Repair and A-tailing** (step 1).

#### Adapter Ligation

- Follow instructions outlined in the **Library Construction Protocol: Adapter Ligation** (step 2).
- Use 5 µL of undiluted SeqCap Indexed Adapter per reaction.

#### Post-ligation Processing

- Perform the 0.8X post-ligation cleanup as outlined in the **Library Construction Protocol: Post-ligation Cleanup** (step 3). Resuspend the beads with adapter-ligated DNA in 55 µL elution buffer, and recover 50 µL of supernatant.
- Perform a 0.7X – 0.9X double-sided size selection, with KAPA Pure Beads as outlined in **Appendix 1** (p. 13).
- Resuspend beads with size-selected, adapter-ligated DNA in 22 – 25 µL elution buffer, and recover 20 µL of supernatant.

#### Pre-capture Library Amplification (LM-PCR)

- Amplify 20 µL of each pre-capture library, using the reaction setup and cycling parameters outlined in **Library Construction Protocol: Library Amplification** (step 4).
- Use 5 µL of the KAPA Library Amplification Primer Mix (10X) supplied in the KAPA Hyper Prep Kit for each amplification reaction.
- Perform 9 cycles of pre-capture amplification.

**Note:** 9 cycles of pre-capture amplification should yield  $\geq 1$  µg of pre-capture library (i.e., a sufficient amount to perform individual captures). If you are pooling libraries before capture, the amount of DNA needed per capture is  $\geq 1$  µg/n, where n = the number of libraries per capture. The number of pre-capture amplification cycles may therefore be reduced to achieve the lowest possible duplication rates and highest library complexity prior to capture.

#### Cleanup after Pre-capture Library Amplification (LM-PCR)

- Perform a 1X bead-based cleanup of the pre-capture LM-PCR products, as outlined in **Library Construction Protocol: Post-amplification Cleanup** (step 5).

#### Quality Control of Pre-capture Libraries

- Please refer to the SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1 (Chapter 4, Step 5) (Roche document number 06588786001, 09/15).

#### Target Enrichment

- Please refer to Chapters 5 – 8 of the SeqCap EZ Library SR User's Guide v5.1 to complete the workflow and generate sequencing-ready, enriched libraries.

## 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.

