



# GenNext<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit

(Code No. LPK-101, LPK-101T, LPK-101L)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.  
Bioproducts Sales and Marketing Department  
OSAKA JAPAN

**TOYOBO**

## —目次—

[1]	はじめに	2
[2]	製品内容	3
[3]	製品のほかに用意するもの	5
[4]	使用方法	6
	1. 末端修復および3'末端のアデニル化	6
	2. アダプターのライゲーション	6
	3. ライゲーション後の精製	7
	4. ライブラリーの増幅	8
	5. ライブラリー増幅後の精製	9
	6. サイズセレクション(オプション)	10
[5]	ライブラリーの検証	12
[6]	実施例	12
[7]	トラブルシューティング	15
[8]	関連製品	16

## —ご注意—

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

※illumina<sup>®</sup>、TruSeq<sup>™</sup>は illumina Inc.の登録商標または商標です。

※MultiNA<sup>®</sup> は、島津製作所の登録商標です。

# [1] はじめに

GenNext® NGS Library Prep Kit は、断片化された 2 本鎖 DNA や PCR 産物から illumina®次世代シーケンサー用ライブラリーを調製するためのキットです。本製品をご使用いただくことで簡便かつ迅速にライブラリーを調製いただけます。

本製品では、1 ng - 1µg の 2 本鎖 DNA 断片の末端修復および 3' 末端のアデニル化を行った後、T オーバーハングのアダプターをライゲーションします。

インプットする DNA 量が少なく、ライブラリーの増幅が必要な場合は、遺伝子改変型 KOD DNA polymerase を用いて開発された高正確性 PCR 用酵素を用いて、末端にアダプター配列をもつライブラリーを低バイアスで増幅します。

本製品には、アダプターと磁性ビーズ(アダプターのライゲーションおよびライブラリー増幅後の精製用)は含まれておりません。

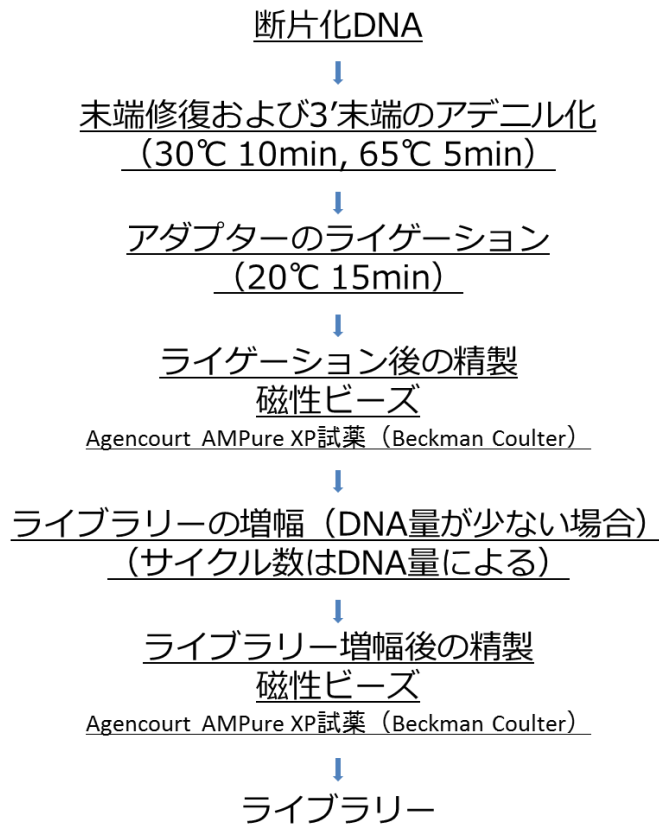


図. 本製品によるライブラリー調製フロー

## ◆本製品の特長◆

### 1. 簡便かつ迅速な操作フロー

末端修復および 3' 末端のアデニル化からアダプターライゲーションまでの工程を同一容器内で実施できます。末端修復および 3' 末端のアデニル化は 15 分、アダプターのライゲーションは 15 分で実施可能です。ライブラリー増幅はアニーリング 10 秒、伸長 15 秒のサイクルで実施できます。

### 2. 広範囲のインプット量

広範囲のインプット量 (1 ng - 1µg) に対応するように設計されています。

### 3. 低バイアスのライブラリー増幅

ライブラリーの増幅に使用する Library Amplification Master Mix には遺伝子改変型 KOD DNA polymerase を用いて開発された高正確性 PCR 用酵素が使用されています。GC の偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、さまざまな領域を均一に増幅することが可能です。

## [2] 製品内容

本製品には、以下の試薬が含まれており、50µL の断片化 DNA 使用時に、LPK-101 が 24 回用、LPK-101T が 8 回用、LPK-101L が 96 回用としてご使用になれます。試薬は-20°Cで保存してください。

### GenNext® NGS Library Prep Kit (Code: LPK-101)

試薬名	保存	容量
End Repair and A-tailing Buffer	-20°C(注 1)	240µL
End Repair and A-tailing Enzyme	-20°C(注 1)	60µL
Ligation Solution	-20°C	1,200µL
Library Amplification Master Mix	-20°C	690µL
Library Amplification Primer Mix	-20°C	138µL

### GenNext® NGS Library Prep Kit (Code: LPK-101T)

試薬名	保存	容量
End Repair and A-tailing Buffer	-20°C(注 1)	80µL
End Repair and A-tailing Enzyme	-20°C(注 1)	20µL
Ligation Solution	-20°C	400µL
Library Amplification Master Mix	-20°C	230µL
Library Amplification Primer Mix	-20°C	46µL

## GenNext® NGS Library Prep Kit (Code: LPK-101L)

試薬名	保存	容量
End Repair and A-tailing Buffer	-20°C(注 1)	960μL
End Repair and A-tailing Enzyme	-20°C(注 1)	240μL
Ligation Solution	-20°C	4,800μL (1,600μL×3)
Library Amplification Master Mix	-20°C	2,760μL (1,380μL×2)
Library Amplification Primer Mix	-20°C	552μL

注1) End Repair and A-tailing Buffer と End Repair and A-tailing Enzyme を混合して保存しないでください。必ずご使用前に必要な量の End Repair and A-tailing Buffer を分取して End Repair and A-tailing Enzyme を添加してください。

### **End Repair and A-tailing Buffer**

末端修復および 3' 末端のアデニル化用に最適化されたバッファーです。付属の End Repair and A-tailing Enzyme を加えて使用します。

### **End Repair and A-tailing Enzyme**

末端修復および 3' 末端のアデニル化用に最適化された酵素です。End Repair and A-tailing Buffer 8μL に 2μL の割合で添加して使用します。粘性がありますので、ゆっくりとピペティングを行ってください。

### **Ligation Solution**

本キットに最適化した 1 液タイプのライゲーション試薬です。粘性がありますので、ゆっくりとピペティングを行ってください。

### **Library Amplification Master Mix**

遺伝子改変型 KOD DNA polymerase、dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)および Mg<sup>2+</sup>などを含んだ 2×濃度のマスターミックスです。GC の偏りによる増幅への影響を最小限に抑えており、さまざまな領域を均一に増幅することが可能です。この特性を活かし、次世代シーケンサー解析に使用する増幅産物の調製に使用することができます。

### **Library Amplification Primer Mix**

10×濃度のプライマーミックスです。P5、P7 フローセル配列をもつ illumina®用のライブラリーを高効率に増幅できるように設計されています。

### [3] 製品のほかに用意するもの

本製品のほかに、以下の機器・試薬類をご用意ください。

- ・ サーマルサイクラーまたはインキュベーター  
本製品の反応で使用する温度(4°C、20°C、30°C、60°C、65°C、68°C、94°C及び98°C)を保つことができる機器をご用意ください。ご使用にあたっては各装置の取扱説明書に従ってください。
- ・ 断片化装置または試薬  
GenNext® NGS Library Prep Kit は、NGS ライブラリー調製用に一般的に使用される物理的断片化および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断片化試薬の製造元の試薬の取扱説明書に従ってください。
- ・ アダプター  
インデックスを有する Illumina® TruSeq™ などのライブラリー作製で一般的に使用されるアダプターが使用できます。  
  
例: IDT for Illumina – TruSeq DNA UD Indexes v2 (96 Indexes, 96 Samples)  
カタログ番号:20040870  
  
(上記以外も、同様の設計を有するアダプターであれば本キットで使用できます。)
- ・ SPRI (solid phase paramagnetic bead) 磁性ビーズ  
Agencourt AMPure XP 試薬 (Beckman Coulter、カタログ番号: A63880、A63881 等)、Sera-Mag Select (GE Healthcare、カタログ番号: 29343045、29343052 等) を推奨いたします。ご使用にあたっては試薬の取扱説明書に従ってください。
- ・ 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)  
アダプターストックの希釈および DNA の溶出に使用します。水での代用はできません。
- ・ 磁気スタンド  
磁性ビーズを用いた精製時に使用します。
- ・ 80%エタノール  
磁性ビーズを用いた精製時の洗い液として使用します。

## [4] 使用方法

ライブラリー調製の工程(末端修復および 3' 末端のアデニル化～ライブラリー増幅)は、サンプル数で前後しますが 3 時間以内に終了します。途中で作業を止める場合は、ライゲーション後の精製後や、ライブラリー増幅後であれば問題ありません。

### 1. 末端修復および 3' 末端のアデニル化 (End Repair and A-tailing)

(1) **End Repair and A-tailing** に必要な試薬を調製します。チューブまたはプレートのウェルに、以下を参考に調製してください。

	1 反応 (60 $\mu$ L)
断片化された DNA	50 $\mu$ L
End Repair and A-Tailing Buffer*	8 $\mu$ L
End Repair and A-Tailing Enzyme*	2 $\mu$ L

\* 混合後は 24 時間以内にご使用ください。

(2) 軽くボルテックスし、スピンドウンした後、氷上に戻します。

(3) 以下に示した温度でインキュベートします。

30°C、10 分\*

65°C、5 分

4°C、保温

\*物理的断片化など、末端形状が複雑な場合、30 分に延長してください。

(4) 速やかに次工程(アダプターのライゲーション)に進みます。

### 2. アダプターのライゲーション(Adapter Ligation)

(1) アダプター(本製品には含まれません)を以下に示す推奨アダプター濃度を参考に、10mM Tris-HCl(pH8.0-8.5)を用いて希釈し、アダプターストックを調製してください。

インプット量	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 $\mu$ g	15 $\mu$ M	10:1
500ng	15 $\mu$ M	20:1
250ng	15 $\mu$ M	40:1
100ng	15 $\mu$ M	100:1
50ng	15 $\mu$ M	200:1
25ng	7.5 $\mu$ M	200:1
10ng	3 $\mu$ M	200:1
5ng	1.5 $\mu$ M	200:1
2.5ng	750nM	200:1
1ng	300nM	200:1

- (2) End Repair and A-tailing の反応を行ったチューブあるいはプレートに、以下を参考にアダプターおよび Ligation Solution を加えます。

	1 反応 (110 $\mu$ L)
End Repair and A-Tailing 反応液	60 $\mu$ L
アダプターストック	5 $\mu$ L
Ligation Solution	45 $\mu$ L

- (3) 軽くボルテックスし、スピンドウンします。
- (4) 以下に示した温度でインキュベートします。  
20°C、15 分  
4°C、保温
- (5) 速やかに次工程(ライゲーション後の精製)へ進みます。

### 3. ライゲーション後の精製

- (1) Adapter Ligation の反応を行ったチューブあるいはプレートに、以下を参考に 0.8  $\times$  SPRI 磁性ビーズ (Agencourt AMPure XP 試薬) を加えます。

	1 反応 (198 $\mu$ L)
Adapter Ligation 反応液	110 $\mu$ L
Agencourt AMPure XP 試薬*	88 $\mu$ L

\* 磁性ビーズが完全に懸濁されているか確認してください。

- (2) ボルテックスあるいはピペッティングで十分混合します。
- (3) 室温で 5–15 分インキュベートします。
- (4) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (5) 上清を除去します。
- (6) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 200 $\mu$ L 加えます。
- (7) 室温で 30 秒間インキュベートします。
- (8) エタノールを除去します。
- (9) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを



200 $\mu$ L 加えます。

- (10) 室温で 30 秒間インキュベートします。
- (11) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。
- (12) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、室温で 3–5 分間、風乾します。
- (13) 磁気スタンドからチューブあるいはプレートを取り外します。
- (14) ライブラリーを増幅する場合は 25 $\mu$ L の 10mM Tris-HCl(pH8.0-8.5)を加えて、室温で 2 分間インキュベートして DNA を溶出します。  
なお、ライブラリーのサイズセレクションを行う場合は 55 $\mu$ L の 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)を加えてインキュベートします。サイズセレクションについては p.10 [4] 6. サイズセレクション(オプション)を参照ください。
- (15) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (16) 透明な上清を新しいチューブあるいはプレートに移します。  
作業を停止する場合、精製後のライブラリーは-20 $^{\circ}$ Cで保存できます。

#### 4. ライブラリーの増幅

- (1) 以下を参考に反応液を調製します。

	1 反応(50 $\mu$ L)
Library Amplification Master Mix (2 $\times$ )	25 $\mu$ L
Library Amplification Primer Mix (10 $\times$ )	5 $\mu$ L
アダプター付加後のライブラリー	20 $\mu$ L

- (2) 軽くボルテックスし、スピンドウンします。
- (3) 以下に示すサイクル条件を参考にライブラリーを増幅します。  
増幅後、作業を停止する場合は-20 $^{\circ}$ Cで保存できます。

ステップ	温度	時間	サイクル数
初期変性	94 $^{\circ}$ C	2 min	1
変性	98 $^{\circ}$ C	10 sec	必要最小数 (以下の推奨サイクル数を 参照ください)
アニーリング	60 $^{\circ}$ C	10 sec	
伸長	68 $^{\circ}$ C	15 sec	
保温	4 $^{\circ}$ C	$\infty$	1

## 推奨サイクル数

インプット量	サイクル数*
1 $\mu$ g	0
500ng	0
250ng	0
100ng	0-2
50ng	3-5
25ng	5-6
10ng	7-9
5ng	9-11
2.5ng	11-13
1ng	13-15

\* サンプル種、鋳型のサイズ分布によって、最適なサイクル数は 1~3 サイクル前後する場合があります。

## 5. ライブラリー増幅後の精製

(1) Adapter Ligation の反応を行ったチューブあるいはプレートに、以下を参考に 1 $\times$  SPRI 磁性ビーズ (Agencourt AMPure XP 試薬) を加えます。

	1 反応 (100 $\mu$ L)
増幅後のライブラリー	50 $\mu$ L
Agencourt AMPure XP 試薬*	50 $\mu$ L

\* 磁性ビーズが完全に懸濁されているか確認してください。

- (2) ボルテックスあるいはピペティングで十分混合します。
- (3) 室温で 5–15 分インキュベートします。
- (4) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (5) 上清を除去します。
- (6) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 200 $\mu$ L 加えます。
- (7) 室温で 30 秒間インキュベートします。
- (8) エタノールを除去します。
- (9) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 200 $\mu$ L 加えます。

- (10) 室温で 30 秒間インキュベートします。
- (11) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。
- (12) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、室温で 3–5 分間、風乾します。
- (13) 磁気スタンドからチューブあるいはプレートを取り外します。
- (14) 必要量(例:20 $\mu$ L)の 10mM Tris-HCl(pH8.0-8.5)を加えて、室温で 2 分間インキュベートして DNA を溶出します。  
 なお、ライブラリーのサイズセレクションを行う場合は 55 $\mu$ L の 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)を加えてインキュベートします。サイズセレクションについては p.10 [4] 6. サイズセレクション(オプション)を参照ください。
- (15) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (16) 透明な上清を新しいチューブあるいはプレートに移します。  
 精製後のライブラリーは-20 $^{\circ}$ Cで保存できます。

## 6. サイズセレクション (オプション)

サイズセレクションを行うことで、目的とするサイズのライブラリー分布を得ることができます。一方、収量やライブラリーの多様性は少なくなりますので、必要な場合にのみ実施してください。以下に 250~450bp のライブラリーをセレクションする例を示します。

- (1) 以下を参考に 0.6 $\times$  SPRI 磁性ビーズ(Agencourt AMPure XP 試薬)を加えます。

	1 反応(80 $\mu$ L)
サイズセレクションするライブラリー	50 $\mu$ L
Agencourt AMPure XP 試薬*	30 $\mu$ L

\* 磁性ビーズが完全に懸濁されているか確認してください。

- (2) ボルテックスあるいはピペッティングで十分混合します。
- (3) 室温で 5–15 分インキュベートします。
- (4) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (5) 上清 75 $\mu$ L を新しいチューブあるいはプレートに移し、磁性ビーズを含むチューブあるいはプレートは廃棄します。

- (6) 分取した上清に、以下を参考に 0.13 × SPRI 磁性ビーズ (Agencourt AMPure XP 試薬) を加えます。

	1 反応 (85 $\mu$ L)
サイズセレクションするライブラリー	75 $\mu$ L
Agencourt AMPure XP 試薬	10 $\mu$ L

- (7) ボルテックスあるいはピペッティングで十分混合します。
- (8) 室温で 5–15 分インキュベートします。
- (9) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (10) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 200 $\mu$ L 加えます。
- (11) 室温で 30 秒間インキュベートします。
- (12) エタノールを除去します。
- (13) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、80%エタノールを 200 $\mu$ L 加えます。
- (14) ピペットを用いて、エタノールを完全に除去します。
- (15) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置いたまま、室温で 3–5 分間、風乾します。
- (16) 磁気スタンドからチューブあるいはプレートを取り外します。
- (17) 必要量 (例: 20 $\mu$ L) の 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5) を加えて、室温で 2 分間インキュベートして DNA を溶出します。
- (18) チューブあるいはプレートを磁気スタンドの上に置き、溶液が透明になるまで静置します。
- (19) 透明な上清を新しいチューブあるいはプレートに移します。  
精製後のライブラリーは -20 $^{\circ}$ C で保存できます。

## [5] ライブラリーの検証

### 1. ライブラリーの定量

GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) あるいは同等の市販品を用いて qPCR で定量することを推奨いたします。GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit(Code: NLQ-101) は illumina<sup>®</sup>次世代シーケンサー用のライブラリー定量キットで、illumina<sup>®</sup>が採用している P5、P7 アダプター配列に対応しており、フローセル上に結合できるライブラリーのみを特異的、かつ正確に定量します。

### 2. ライブラリーサイズ分布の確認

ライブラリーの分布を確認する場合は、Bioanalyzer(アジレント・テクノロジー株式会社)、MultiNA<sup>®</sup>(島津製作所)等の電気泳動で確認することをお勧め致します。

## [6] 実施例

### 1. ライブラリー収量および分布の比較

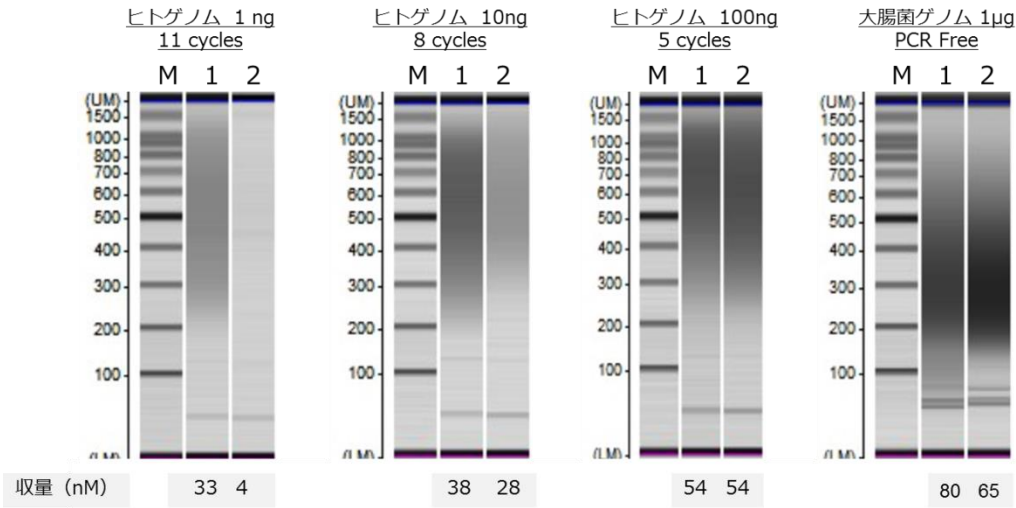
#### <方法>

断片化処理済みのヒトゲノム DNA 1、10、100ng、大腸菌ゲノム DNA 1μg、あるいは 100bp DNA ラダー 1、10ng から、GenNext<sup>®</sup> NGS Library Prep Kit あるいは A 社ライブラリー調製キットでライブラリーを調製しました。

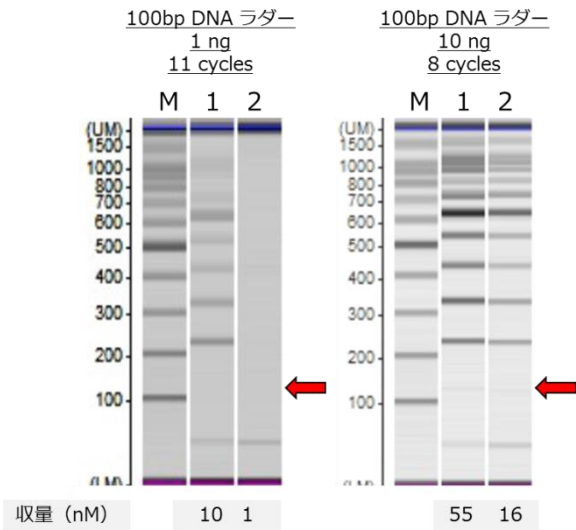
アダプターは illumina 社のインデックスアダプター、ライブラリーのクリーンアップは Agencourt AMPure XP 試薬(Beckman Coulter)を用いました。

1μg は増幅なし、1ng は 11 サイクル、10ng は 8 サイクル、100ng は 5 サイクルで増幅し、ライブラリーサイズの分布を MultiNA<sup>®</sup> (島津製作所)で確認しました。ライブラリー収量は GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit (Code: NLQ-101)で確認しました。

## <結果>



M: 100bp DNA ラダー  
 1: GenNext® NGS Library Prep Kit使用  
 2: A社ライブラリー調製キット 使用



M: 100bp DNA ラダー  
 1: GenNext® NGS Library Prep Kit使用  
 2: A社ライブラリー調製キット 使用

← 120bp アダプターダイマー

100bp DNA ラダーをインプットした場合、アダプターが両端に付加されるため、約 120bp 加算されたバンド(100bp のバンドならば約 220bp)が確認されます。

その結果、ライブラリーサイズの分布は GenNext® NGS Library Prep Kit と A 社の試薬で同等であり、低インプット量において、GenNext® NGS Library Prep Kit では、A 社の試薬と比較して高い収量を示しました。いずれも MiSeq に供するために必要な 4nM 以上の収量が得られました。

## 2. NGS 解析結果の評価

### <方法>

MiSeq (illumina 社) および MiSeq Reagent Kit v2 (300 Cycles) (illumina 社) を用いて大腸菌ゲノム (1µg PCR Free あるいは 1ng 12 サイクル増幅) の次世代シーケンサー解析を実施しました。

ライブラリーの調製は、GenNext® NGS Library Prep Kit あるいは A 社ライブラリー調製キットを用いて実施しました。

ライブラリーデータはリード数を等しくするためダウンサンプリングを行い、各サンプル 100 万リードに揃えて解析しました。解析は CLC Genomics Workbench (QIAGEN 社/CLC bio) を用いました。

### <結果>

#### 1µg PCR Free の場合

	マッピングされたリード(%)	リファレンスと異なった塩基(%)
GenNext® NGS Library Prep Kit 使用	93.14	5.65
A社ライブラリー調製キット 使用	93.01	5.89

#### 1ng 12 サイクル増幅した場合

	マッピングされたリード(%)	リファレンスと異なった塩基(%)
GenNext® NGS Library Prep Kit 使用	92.31	5.77
A社ライブラリー調製キット 使用	89.64	5.99

その結果、GenNext® NGS Library Prep Kit では、A 社の試薬と比較して良好なマッピング率、エラー率を示しました。

## [7] トラブルシューティング

現象	原因	対策
アダプターダイマーが多い	アダプターの劣化	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アダプターは部分的な 2 本鎖 DNA であるため、2 本鎖部分が乖離しないように、アダプターストックの凍結融解はできる限り少なくしてください。また、アダプターはできる限り室温以下の温度で取り扱ってください。</li> <li>・アダプターストックの希釈は 10mM Tris-HCl (pH8.0-8.5)で行ってください。</li> </ul>
	アダプター濃度が最適でない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・p.6 [4] 2.(1)に記載された推奨アダプターストック濃度の前後で濃度を振って予備検討してください。</li> <li>・ライブラリーの収量が十分である場合は、再度精製工程を行うか、p.10 [4] 6. サイズセレクション(オプション)を行ってください。</li> </ul>
ライブラリー収量が少ない	添加する磁性ビーズ試薬とライブラリー溶液の割合が不正確	<ul style="list-style-type: none"> <li>・精製に用いる SPRI 磁性ビーズ試薬とライブラリー溶液の量比はサイズ分布、収量に大きく影響します。液量の割合が正確か確認してください。</li> </ul>
	DNA を吸着した磁性ビーズを乾燥させすぎている	<ul style="list-style-type: none"> <li>・磁性ビーズにDNAを吸着、エタノールで洗浄した後の磁性ビーズを乾燥させすぎること、DNA が溶出していない可能性があります。室温での乾燥時間を 5 分以内で行ってください。</li> </ul>



## [8] 関連製品

品名	内容	Code No.
イルミナ社次世代シーケンサー用ライブラリー定量キット <b>GenNext<sup>®</sup> NGS Library Quantification Kit</b>	500 回用 /20 $\mu$ L 反応	NLQ-101

より詳細な情報は、弊社ウェブサイトをご覧ください

<https://lifescience.toyobo.co.jp/>

# TOYOBO

## 【製造・販売元】

— 価格・在庫に関するお問い合わせ —

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)  
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号  
大阪梅田ツインタワーズ・サウス  
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (東京)  
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル  
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951  
E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

— 製品の内容・技術に関するお問い合わせ —

テクニカルライン  
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土日祝日、休日を除く)  
E-mail : tech\_osaka@toyobo.jp  
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>