



Creating cDNA Libraries using Twist Library Preparation Kit for ssRNA Virus Detection

For use with the Twist Target Enrichment Workflow

2019年～2020年コロナウイルスパンデミックの原因ウイルスSARS-CoV-2を含め、ほとんどのウイルス病原体は一本鎖RNAです。このプロトコルは、NGSターゲットエンリッチメントの下流で使用するために、RNAをcDNAライブラリに変換する方法を説明します。このプロトコルは、市販の試薬を使用して、RNAを抽出/精製後にcDNAを合成することから始まります。次に、cDNAサンプルは、酵素による断片化とユニークなデュアルインデックス(UDI)を使用するTwist Library Preparation Kitを用いて、Illumina TruSeq互換ライブラリに変換します。得られるcDNAライブラリは、Twistターゲットエンリッチメントプロトコルと互換性があります。Twist synthetic SARS-CoV-2 RNA controlsなど、合成ウイルスRNAコントロールをリファレンスRNAサンプルにスパイクイン（添加）することで、ポジティブコントロールとして機能します。

ワークフローの構成

各キットの製品パッケージと保管の推奨事項を注意して読み、受領後は直ちに推奨事項に従って構成部品を保管してください。

製品番号	名称	説明	保管
付録Cを参照	Twist synthetic SARS-CoV-2 RNA Controls	合成SARS-CoV-2 RNAコントロール	-90～-70°C
101059：16反応 101058：96反応	Twist Library Preparation EF Kit	ライブラリ構築用の試薬	-25～-15°C
	Twist Library Preparation EF Kit 1	5x Fragmentation Enzyme 10x Fragmentation Buffer DNA Ligation Mix DNA Ligation Buffer Amplification Primers、ILMN（Universal Adaptersを使用する場合には、チューブ100220、100583は不要）	
	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads	
100401：16反応 100573：96反応	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads (cDNA合成時にはスタンドアロン製品として、ビーズ精製も必要になります)	2～8°C
101307：16反応 101308、101309、 101310、101311： 96反応	Twist Universal Adapter System - TruSeq Compatible	Twist Universal AdaptersとTwist UDI Primersを用いて、インデックスペアごとに1反応のユニーク・デュアルインデックス付きの組み合わせを提供	-25～-15°C

*実験のコントロールとしてのオプション。

この製品は研究専用です。

Last revised: 9月 2020

プロトコルの概要

このプロトコルは一本鎖RNAから始まり、cDNAを合成します。次に後のターゲットエンリッチメントのために、cDNAから増幅されたインデックス付きDNAライブラリを作成します。酵素による断片化と、UDIプライマーを使用したTwist Universal Adaptersが特徴です。このプロトコルを使用すると、cDNA合成とライブラリの調製（ステップ1～5）が5時間で可能です。

	ヒトゲノムRNAサンプル、ヒトゲノムリファレンスRNA、TWIST合成コントロール	時間
ステップ 1	実験RNAサンプルとオプションの合成コントロールの希釈 希釈された実験RNAサンプルと合成コントロール	10分間
ステップ 2	cDNA合成 ライブラリ調製用のcDNA材料	2.75時間
cDNA、≥25 NGの開始DNA材料		
ステップ 3	DNA断片化、末端修復、dA付加 dA付加したDNA断片	1時間
ステップ 4	Twist Universal Adaptersのライゲーションと精製 cDNAライブラリとユニバーサルアダプター	1時間
ステップ 5	Twist UDI Primersを用いたPCR増幅、精製、品質管理(QC)の実施 増幅されたインデックス付きライブラリ	1時間
停止ポイント		

付録A：アダプター配列とプーリングガイドライン

Twist Universal Adapter System：TruSeq Compatible、96サンプル、プレートA～D（101308、101309、101310、101311）

プレートA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

プレートB

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	185
B	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	186
C	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179	187
D	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180	188
E	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	181	189
F	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	182	190
G	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	183	191
H	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	184	192

プレートC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	193	201	209	217	225	233	241	249	257	265	273	281
B	194	202	210	218	226	234	242	250	258	266	274	282
C	195	203	211	219	227	235	243	251	259	267	275	283
D	196	204	212	220	228	236	244	252	260	268	276	284
E	197	205	213	221	229	237	245	253	261	269	277	285
F	198	206	214	222	230	238	246	254	262	270	278	286
G	199	207	215	223	231	239	247	255	263	271	279	287
H	200	208	216	224	232	240	248	256	264	272	280	288

プレートD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	289	297	305	313	321	329	337	345	353	361	369	377
B	290	298	306	314	322	330	338	346	354	362	370	378
C	291	299	307	315	323	331	339	347	355	363	371	379
D	292	300	308	316	324	332	340	348	356	364	372	380
E	293	301	309	317	325	333	341	349	357	365	373	381
F	294	302	310	318	326	334	342	350	358	366	374	382
G	295	303	311	319	327	335	343	351	359	367	375	383
H	296	304	312	320	328	336	344	352	360	368	376	384

付録Aの終わり