



# Creating cDNA Libraries using Twist Library Preparation EF Kit 2.0 for ssRNA Virus Detection

For use with the Twist NGS Workflow

COVID-19 パンデミックの原因ウイルスである SARS-CoV-2 を含めて、ほとんどのウイルス病原体は、一本鎖 RNA です。このプロトコルでは、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ています。このプロトコルは、市販の試薬を用いて抽出／精製した RNA から cDNA を作製するところから始まります。次に、Twist Library Preparation EF Kit 2.0 を使用した酵素による断片化と Unique Dual Indices (UDI) を用いて、cDNA を Illumina TruSeq 対応の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を有しています。Twist synthetic SARS-CoV-2 RNA control などのウイルス合成 RNA コントロールをリファレンス RNA に添加することで、ポジティブコントロールとして機能します。



## プロトコルの構成

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品を保管してください。

カタログ番号	名称	説明	保管
付録 C 参照	Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Controls*	SARS-CoV-2 合成 RNA コントロール	-90 ~ -70°C
104206 : 16 反応 104207 : 96 反応	Twist Library Preparation EF Kit 2.0	ライブラリ構築用の試薬	—
	Twist Library Preparation EF Kit 1, 2.0	Frag/AT Enzymes Frag/AT Buffer Ligation Master Mix Equinox Library Amp Mix (2x) P5/P7 Primers (10x)	-25 ~ -15°C
	Twist Library Preparation Kit 2	DNA Purification Beads	2 ~ 8°C
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、ビーズの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	-25 ~ -15°C

\* オプションの実験用コントロール

本製品は**研究専用**です。





## ユーザーが準備するもの

ssRNA キット用の Twist Library Preparation EF Kit 2.0 を使用してライブラリを作製するためには、以下のものまたは同等品が必要です。

製品	推奨サプライヤー
ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (E6560L)
NEBNext Ultra II Non-Directional RNA Second Strand Synthesis Module	New England Biolabs (E6111)
Random Primer 6	New England Biolabs (S1230S)
Gene Expression Universal Reference RNA (ヒト)	Agilent Technologies (740000-41)
エタノール (200 プルーフ)	—
ヌクレアーゼフリー水	—
10 mM Tris-HCl pH 8 (任意)	—
Buffer EB (任意)	Qiagen
1.5 mL マイクロ遠心チューブ	VWR
Thin-walled PCR 0.2 mL ストリップチューブ	Eppendorf
96 ウェルサーマルサイクラー対応プレート	VWR
96 ウェル対応の磁気プレート	Alpaqua、Permagen Labware
Qubit RNA 広範囲定量アッセイ	Thermo Fisher Scientific
Qubit dsDNA 広範囲定量アッセイ	Thermo Fisher Scientific
Qubit dsDNA 高感度定量アッセイ	Thermo Fisher Scientific
Agilent DNA 7500 キット	Agilent Technologies



## ユーザーが準備する機器

---

ssRNA キット用の Twist Library Preparation EF Kit 2.0 を使用してライブラリを作製するためには、以下の機器または同等品が必要です。

製品	推奨サプライヤー
ピペットとチップ	—
ホルテックス	—
0.2 mL チューブ用の卓上ミニ遠心機	—
ヒートリッド付きのサーマルサイクラー (96 ウェル)	—
蛍光光度計 (Qubit 3.0)	Thermo Fisher Scientific
Agilent 2100 バイオアナライザ	Agilent Technologies

## プロトコルの概要

このプロトコルは ssRNA で始まり、cDNA を合成します。次に、この cDNA を増幅し、インデックス付けして、その後のターゲットエンリッチメントのための DNA ライブラリを作製します。このプロトコルは、酵素による断片化と UDI プライマーを使用した Twist Universal Adapters を特徴とします。このプロトコルを使用すると、cDNA 合成およびライブラリの調製（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 および TWIST 合成コントロール		時間
ステップ 1	<b>実験用 RNA サンプルおよびオプションの合成コントロールの希釈</b> 希釈した実験用 RNA サンプルおよび合成コントロール	10 分
ステップ 2	<b>cDNA 合成と精製の実行</b> ライブラリ調製用 cDNA マテリアル	2.75 時間
cDNA、開始材料 DNA 50 NG		
ステップ 3	<b>DNA 断片化、末端修復、dA- 付加の実施</b> dA- 付加した DNA 断片	1 時間
ステップ 4	<b>Twist Universal Adapters のライゲーションと精製</b> Universal Adapters を付加した cDNA ライブラリ	1 時間
ステップ 5	<b>Twist UDI Primers を用いた PCR 増幅、精製、QC の実施</b> 増幅されたインデックス付きライブラリ	1 時間
<div style="border: 1px solid black; border-radius: 15px; padding: 5px; display: inline-block;">停止ポイント</div>		

## 付録 A：アダプター配列およびプーリングに関するガイドライン

### UDI 配列

Twist UDI 配列の完全なガイドについては、PDF 文書 DOC-001129 または Excel ファイル DOC-001130 を参照してください。どちらのファイルも、[twistbioscience.com/resources](https://twistbioscience.com/resources) からダウンロードできます。

### プーリングガイドライン

Twist UDI primers は次世代シーケンシング用にカラムベースで塩基のバランスが保たれています。8 ブレックスハイブリダイゼーション用にユニークなデュアルインデックスライブラリをプーリングする場合には、ライブラリを単一カラムから選択することを推奨します。シーケンシング用に、単一シングルプレートまたは複数のプレートからのカラムを任意の組み合わせで選択できます。

**表 1 Twist UDI primer プレートのレイアウトとプーリングガイドライン**

Twist Universal Adapter System：TruSeq Compatible、16 Samples (101307)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9										
B	2	10										
C	3	11										
D	4	12										
E	5	13										
F	6	14										
G	7	15										
H	8	16										

\* 注意：16 サンプルのプレートのインデックスは、96 サンプル（プレート A）と同じではありません。

## 付録 A：アダプターのシーケンスおよびプーリングに関するガイドライン

Twist Universal Adapter System：TruSeq Compatible、96 Samples、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

## 付録 B : TWIST ターゲットエンリッチメントプロトコル

Twist Standard ターゲットエンリッチメントプロトコルは、このワークフローに対応しています。2 日間のターゲットエンリッチメントワークフローで 16 時間のハイブリダイゼーション時間をかけて、Illumina 次世代シーケンシング (NGS) システムでのシーケンシング用に、濃縮された TruSeq DNA ライブラリを作製します。本プロトコルは、[twistbioscience.com/resources](https://twistbioscience.com/resources) で閲覧できます。このターゲットエンリッチメントワークフローと併せて Twist SARS-CoV-2 Research Panel を使用する場合も、変更はありません。

カタログ番号	名称	説明	保管
102016 : 2 反応 102017 : 12 反応 102018 : 96 反応	Twist SARS-CoV-2 Research Panel	SARS-CoV-2 ウイルス検出用のカスタム DNA パネル	-25 ~ -15°C
100856 : 2 反応 100578 : 12 反応 100767 : 96 反応	Twist Universal Blockers	非特異キャプチャの抑止用： Universal Blockers Blocker Solution	-25 ~ -15°C
101262 : 2 反応 100983 : 12 反応 100984 : 96 反応	Twist Binding and Purification Beads	ターゲットエンリッチメントと精製用： Streptavidin Binding Beads DNA Purification Beads	2 ~ 8°C
101279 : 2 反応 101025 : 12 反応 101026 : 96 反応	Twist Hybridization and Wash Kit (2 Boxes)	標準的なハイブリダイゼーションを用いたターゲットエンリッチメント用：	
	Twist Hybridization Reagents (Box 1 of 2)	Hybridization Mix Hybridization Enhancer Amplification Primers	-25 ~ -15°C
	Twist Wash Buffers (Box 2 of 2)	Binding Buffer Wash Buffer 1 Wash Buffer 2	2 ~ 8°C

## 付録 B : TWIST ターゲットエンリッチメントプロトコル

Twist Fast Hybridization ターゲットエンリッチメントシステムはウイルス検出用にも対応しています。このワークフローはハイブリダイゼーション時間が 30 分から 2 時間で、1 日間のターゲットエンリッチメントワークフローです。本プロトコルは、[twistbioscience.com/resources](https://twistbioscience.com/resources) で閲覧できます。このターゲットエンリッチメントワークフローと併せて Twist SARS-CoV-2 Research Panel を使用する場合、Fast Wash Buffer 1 の温度は 68°C に設定してください。

カタログ番号	名称	説明	保管
102016 : 2 反応 102017 : 12 反応 102018 : 96 反応	Twist SARS-CoV-2 Research Panel	SARS-CoV-2 ウイルス検出用のカスタム DNA パネル	-25 ~ -15°C
100856 : 2 反応 100578 : 12 反応 100767 : 96 反応	Twist Universal Blockers	非特異キャプチャの抑止用： Universal Blockers Blocker Solution	-25 ~ -15°C
101262 : 2 反応 100983 : 12 反応 100984 : 96 反応	Twist Binding and Purification Beads	ターゲットエンリッチメントと精製用： Streptavidin Binding Beads DNA Purification Beads	2 ~ 8°C
101278 : 2 反応 101174 : 12 反応 101175 : 96 反応	Twist Fast Hybridization and Wash Kit (2 Boxes)  Twist Fast Hybridization Reagents (Box 1 of 2)  Twist Fast Wash Buffers (Box 2 of 2)	Fast hybridization を用いたターゲットエンリッチメント用：  Fast Hybridization Mix Hybridization Enhancer Amplification Primers  Fast Binding Buffer Fast Wash Buffer 1 Wash Buffer 2	-25 ~ -15°C  2 ~ 8°C

### 付録 B の終わり

## 付録 C : TWIST SARS-COV-2 合成コントロール

各ウイルスのコントロールは、Twist のシリコンプラットフォームおよび *in vitro* 転写で合成されています。各コントロールは、ウイルスゲノム全体を、6 つのユニークな 5 kb 断片で分割しています。

カタログ番号	TWIST 新型コロナウイルス (SARS-COV-2) 合成 RNA コントロールの名称	GENBANK / GISAID ID	GISAID 名称	PANGO 系統	WHO ラベル	核酸の種類	保管
102019	コントロール 1	MT007544.1/EPI_ISL_406844	Australia/VIC01/2020	B	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
102024	コントロール 2	MN908947.3/EPI_ISL_402119	Wuhan-Hu-1	B	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
102860	コントロール 3	LC528232.1/EPI_ISL_412968	Japan/Hu_DP_Kng_19-020/2020	B	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
102862	コントロール 4	MT106054.1/EPI_ISL_411956	USA/TX1/2020	A	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
102917	コントロール 5	MT188340/EPI_ISL_414589	USA/MN2-MDH2/2020	B.11	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
102918	コントロール 6	MT118835/EPI_ISL_412862	USA/CA9/2020	B	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103087	コントロール 7	EPI_ISL_418227	France/HF2393/2020	B.1	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103511	コントロール 8	MT066176/EPI_ISL_410218	Taiwan/NTU02/2020	B	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103512	コントロール 9	MT152824/EPI_ISL_412970	USA/WA2/2020	A.1	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103513	コントロール 10	EPI_ISL_414648	USA/CA-PC101P/2020	B.1	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103514	コントロール 11	EPI_ISL_417739	Iceland/5/2020	B.1.5	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103515	コントロール 12	EPI_ISL_420244	England/SHEF-C05B2/2020	B.1.1.1	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103533	コントロール 13	EPI_ISL_421184	Belgium/ULG-10004/2020	B.1.12	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
103907	コントロール 14	EPI_ISL_710528	England/205041766/2020	B.1.1.7	Alpha	ssRNA	-90 ~ -70°C
103909	コントロール 15	EPI_ISL_601443	England/MILK-9E05B3/2020	B.1.1.7	Alpha	ssRNA	-90 ~ -70°C
104043	コントロール 16	EPI_ISL_678597	South Africa/KRISP-EC-K005299/2020	B.1.351	Beta	ssRNA	-90 ~ -70°C
104044	コントロール 17	EPI_ISL_792683	Japan/IC-0564/2021	P.1	Gamma	ssRNA	-90 ~ -70°C
104338	コントロール 18	EPI_ISL_1662307	India/CT-ILSGS00361/2021	B.1.617.1	Kappa	ssRNA	-90 ~ -70°C
104533	コントロール 23	EPI_ISL_1544014	India/MH-NCCS-P1162000182735/2021	B.1.617.2	Delta	ssRNA	-90 ~ -70°C
104534	コントロール 24	EPI_ISL_1939891	India/MH-SEQ-221_S66_R1_001/2021	B.1.617.3	該当せず	ssRNA	-90 ~ -70°C
104538	コントロール 28	EPI_ISL_2695467	Portugal/PT9543/2021	AY.1	Delta	ssRNA	-90 ~ -70°C
104539	コントロール 29	EPI_ISL_2693246	USA/WA-CDC-UW21061750277/2021	AY.2	Delta	ssRNA	-90 ~ -70°C

### 付録 C の終了

DOC-001155 REV 4.0 | 最終改訂 : 2021年10月28日

改訂	日付	詳細
4.0	2021年10月28日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プロトコルをSARS-CoV-2のワークフローからより一般的な全核酸プロトコルに更新</li> <li>・サンプルの種類、用途、濃度に応じて断片化条件を最適化することを推奨するための軽微な文言の変更</li> </ul>
3.0	2021年9月24日	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プロトコルをTwist Library Preparation EF Kit 2.0のワークフローとともに更新</li> <li>・ワークフローステップを明確にするための軽微な更新</li> </ul>