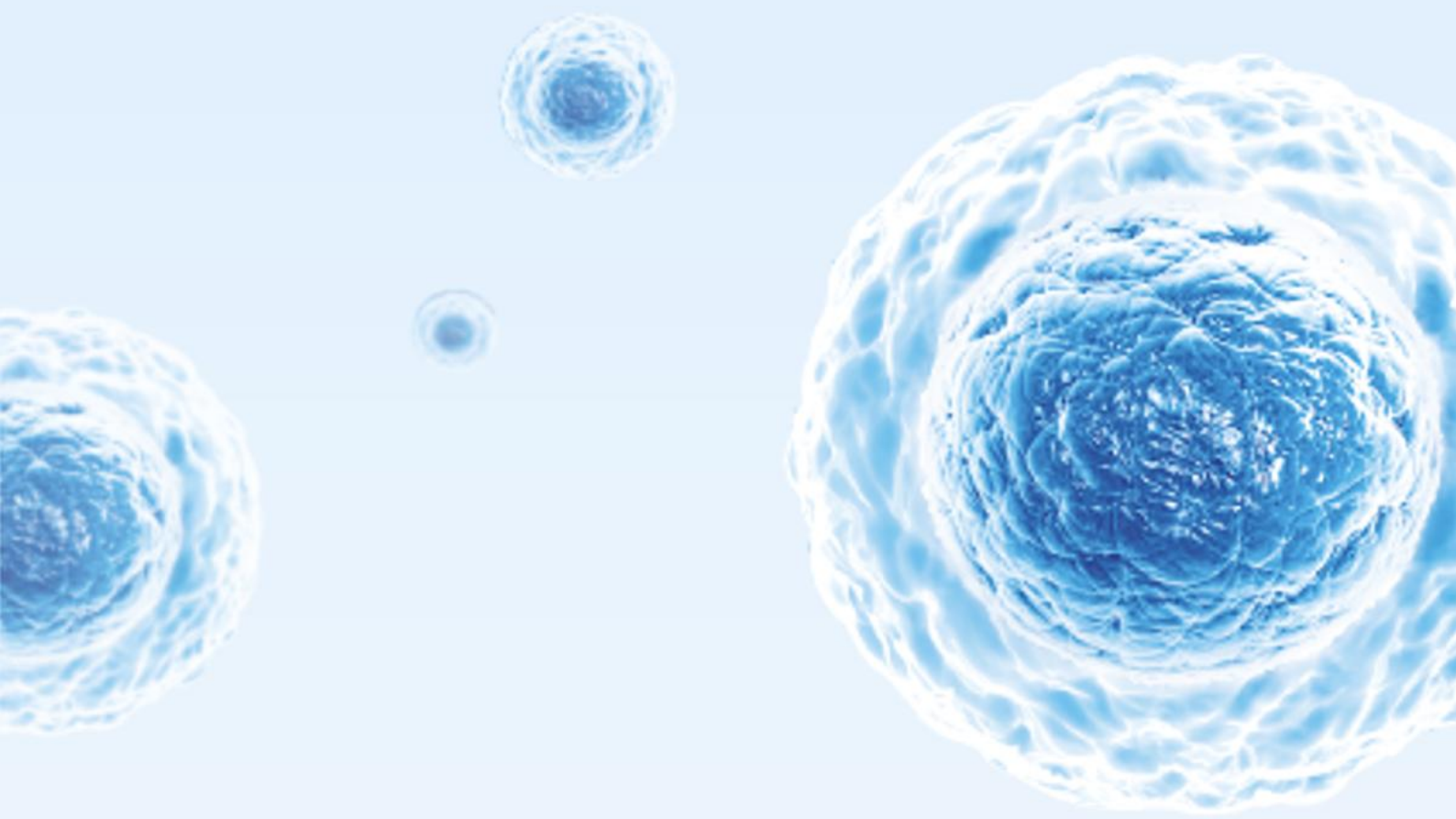




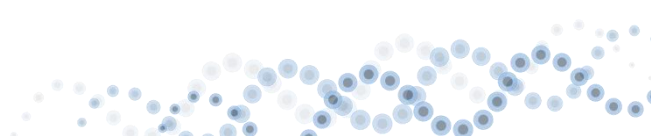
GEXSCOPE® Single Cell Human Immuno-TCR&BCR Kit for NEO
单细胞免疫受体(人源 VDJ)建库试剂盒用户手册·NEO 版

本手册适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
41831251	GEXSCOPE® Single Cell Human Immuno-TCR&BCR Kit for NEO	4 RXNs
41831221	GEXSCOPE® Single Cell Human Immuno-TCR&BCR Kit for NEO	16 RXNs

版权说明

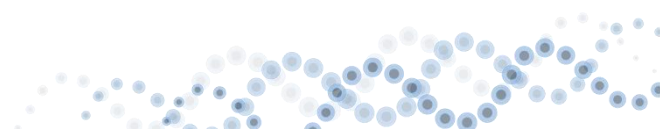
新格元生物科技有限公司保留所有解释权利。本手册所描述的所有产品和服务仅供科学研究使用，不可用于临床诊断。



目 录

1. 基本信息	5
1.1 产品概述	5
1.2 产品组成	6
2. 自备仪器耗材试剂	10
2.1 自备仪器耗材试剂	10
3. 工作流程和操作时间	12
4. 实验准备	13
5. 单细胞分离和 mRNA 捕获	14
5.1 准备 Lysis Buffer 和 VDJ Barcode Beads SD	14
5.2 细胞悬液和微流控芯片准备	15
5.3 仪器操作	16
6. 反转录 cDNA 扩增	21
6.1 反转录	21
6.2 cDNA 扩增	22
6.3 产物纯化	23
6.4 扩增纯化产物质检	25
7. 转录组文库构建	27
7.1 片段化	27
7.2 接头连接	28
7.3 接头连接后产物纯化	29
7.4 PCR 富集	30

7.5 扩增产物片段分选	31
7.6 文库质检	32
8. 免疫受体 (TCR&BCR) 富集	34
8.1 免疫受体 (TCR) 第一轮富集	34
8.2 免疫受体 (BCR) 第一轮富集	36
8.3 免疫受体 (TCR) 第二轮富集	37
8.4 免疫受体 (BCR) 第二轮富集	40
8.5 免疫受体 (TCR 或 BCR) 富集文库构建	42
附录 A 技术原理	46
A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录	46
A2 cDNA 富集	47
A3 转录组文库构建	47
A4 TCR&BCR 富集及文库构建	48



1. 基本信息

1.1 产品概述

GEXSCOPE®单细胞免疫受体 (VDJ) 试剂盒可与 Singleron Matrix NEO®自动化单细胞测序文库构建系统配套使用, 完成单细胞分离至免疫受体 TCR & BCR 富集文库构建全部流程。GEXSCOPE®单细胞免疫受体 (VDJ) 试剂盒包括微流控微孔芯片、分子标签磁珠、扩增试剂、转录组文库构建及免疫受体 (TCR&BCR) 富集及富集文库构建试剂。本产品可高效无偏好性地完成反转录、cDNA 扩增及文库构建、免疫受体 (TCR&BCR) 富集及富集文库构建, 显著提高测序文库产物得率及同等测序深度下的基因检出率, 从而完成对数百至数十万个细胞中的免疫受体 (TCR&BCR) 进行测序。

本产品可高效无偏好性地完成反转录、cDNA 扩增及文库构建, 显著提高测序文库产物得率及同等测序深度下的基因检出率, 从而完成对数百至数十万个细胞中的 mRNA 进行测序。

1.2 产品组成

以下适用于

GEXSCOPE® Single Cell Human Immuno-TCR&BCR Kit for NEO (4 RXNs)

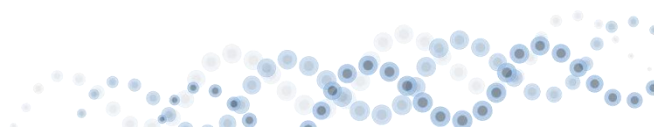
Box 1: Single Cell RNA Amplification NEO Chip & Library Reagents cell

收到试剂盒后，请及时保存在-25℃~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	1	1500μL	绿色
RNase Inhibitor	2	50μL	绿色
100 mM DTT	1	400μL	绿色
RT master Mix	2	400μL	紫色
Reverse Transcriptase	2	50μL	紫色
TS Primer	2	50μL	紫色
Amplification Master Mix	2	400μL	透明
A primer Mix	1	200μL	透明
Amplification Enzyme	2	20μL	透明
Fragmentation Buffer V3	2	17μL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	2	6μL	橙色
1 × TE	1	800μL	橙色
Ligation Mix	2	72μL	蓝色
Ligation booster	2	4μL	蓝色
Adaptor	1	50μL	蓝色
Library Amp Mix V3	2	60μL	白色
Indexing Primer Mix 1	1	30μL	白色
Indexing Primer Mix 2	1	30μL	白色
Indexing Primer Mix 3	1	30μL	白色
Indexing Primer Mix 4	1	30μL	白色

Box 2: NEO-Chip & VDJ Barcoding Beads

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。



组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
VDJ Barcode Beads SD	2	1.8mL	黑色
Wash Buffer A	2	7mL	白色
Wash Buffer B	2	1.8mL	白色
NEO Chip	4	—	—

Box 3: Human TCR&BCR Enrichment Set/M

收到试剂盒后，请及时保存在-25℃~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
MP Master Mix	2	220μL	淡绿色
TCR R1 Primer Mix	1	80μL	淡绿色
TCR R2 Primer Mix	1	80μL	淡绿色
BCR R1 Primer Mix	1	250μL	淡蓝色
BCR R2 Primer Mix	1	150μL	淡蓝色
T1 Primer	1	50μL	淡绿色
T2 Primer	1	50μL	淡绿色
AL Buffer	2	50μL	淡紫色
dNTP Mix	2	10μL	淡紫色
AL Enzyme	2	10μL	淡紫色

以下适用于

GEXSCOPE® Single Cell Human V(D)J Kit Cell (16 RXNs)

Box 1: NEO-Chip (NEO)

收到试剂盒后，请及时保存在 2~35℃。

组分	SD
	数量
NEO Chip	16

Box 2: VDJ Barcoding Beads SD

收到试剂盒后，请及时保存在 2~8℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
VDJ Barcode Beads SD	8	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	8	7 mL	白色
Wash Buffer B	6	1.8 mL	白色

Box 3: Single Cell Amplification Reagents SD

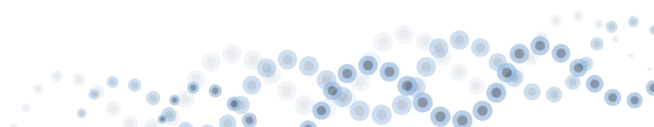
收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
Lysis Buffer, Stock	2	1500 μ L	绿色
RNase Inhibitor	1	300 μ L	绿色
100 mM DTT	1	400 μ L	绿色
RT Master Mix	2	1500 μ L	紫色
Reverse Transcriptase	1	400 μ L	紫色
TS Primer	1	250 μ L	紫色
Amplification Master Mix	2	1600 μ L	透明
A Primer Mix	1	750 μ L	透明
Amplification Enzyme	1	160 μ L	透明

Box 4: Library Prep Reagents

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Fragmentation Buffer V3	1	135 μ L	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	40 μ L	橙色
1 $\times$ TE	1	800 μ L	橙色
Ligation Mix	1	576 μ L	蓝色
Ligation booster	1	20 μ L	蓝色
Adaptor	1	50 μ L	蓝色
Library Amp Mix V3	1	480 μ L	白色



Box 5: Library Adapters

收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	数量	体积	管盖颜色
Indexing Primer Mix1 (ATCACGTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix2 (CGATGTTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix3 (TTAGGCAT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix4 (TGACCACT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix5 (ACAGTG GT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix6 (GCCAATGT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix7 (CAGATCTG)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix8 (ACTTGATG)	1	30 µL	白色

Box 6: Human TCR&BCR Enrichment Set/L

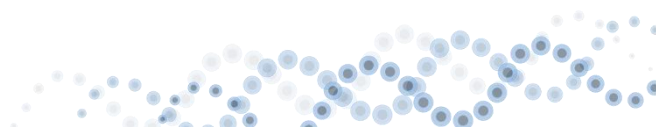
收到试剂盒后，请及时保存在-25~-15℃。

组分	SD		管盖颜色
	数量	体积	
MP Master Mix	1	1760µL	淡绿色
TCR R1 Primer Mix	1	80µL	淡绿色
TCR R2 Primer Mix	1	80µL	淡绿色
BCR R1 Primer Mix	1	250µL	淡蓝色
BCR R2 Primer Mix	1	150µL	淡蓝色
T1 Primer	1	50µL	淡绿色
T2 Primer	1	50µL	淡绿色
AL Buffer	1	360µL	淡紫色
dNTP Mix	1	60µL	淡紫色
AL Enzyme	1	40µL	淡紫色

2. 自备仪器耗材试剂

2.1 自备仪器耗材试剂

		名称
反转录和扩增环节	仪器	恒温振荡金属浴
		荧光倒置显微镜
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
		PCR 仪
		Qubit 4.0 荧光定量仪
	试剂	无水乙醇（分析纯）
		RNase away
		1×PBS（不含 Ca^{2+} Mg^{2+} ）
		Tween 20
		Ampure XP 纯化磁珠（Beckman）
		Buffer EB
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS assay kit
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		DynaMag™ -2 磁力架/12321D/Thermo
建库环节	设备	医用冷藏冷冻箱
	仪器	全自动核酸片段分析仪（推荐安捷伦 FA™ -12 Automated CE System）
		Qubit 4.0 荧光定量仪
		掌上离心机
		振荡涡旋仪
	试剂	Ampure XP 纯化磁珠（Beckman）
		80%乙醇（用无水乙醇配制，现配现用）



		Buffer EB
		Nuclease-free Water
		Qubit dsDNA HS assay kit
		核酸片段分析仪定量试剂
	耗材	不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
	工具	不同量程单道移液器
		DynaMag™ -PCR 磁力架/492025/Thermo

注意：试剂耗材必须是无菌、无核酸酶的。

3. 工作流程和操作时间

步骤		时间	终止&保存
Pre-PCR station	细胞准备	0.5-1h	
	试剂添加		
	仪器运行	NEO 仪器操作	0.5-1h
	完成制备和收样		Stop, $-80^{\circ}\text{C} \leq 48\text{h}$
	反转录	1.5-2h	$4^{\circ}\text{C} \leq 15\text{h}$
Post-PCR station	扩增	2-3h	Stop, $4^{\circ}\text{C} \leq 72\text{h}$ or $-20^{\circ}\text{C} \leq 7\text{days}$
	建库	3h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30\text{days}$
	免疫受体富集&建库	6.5h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30\text{days}$
全流程时长		14-16.5h	

4. 实验准备

我们建议用户为所有需要无尘室条件的 PCR 前步骤建立一个“pre-PCR 区”。这些步骤包括细胞核提取、单细胞核分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作,用 RNase Away(或同类产品)清洁所有工作台面和移液器。佩戴适当的口罩和实验室手套,以避免污染和 RNA 降解。

设立第二个实验区(Post-PCR),进行 cDNA 扩增、纯化和 QC,以及文库制备和 QC。

5. 单细胞分离和 mRNA 捕获

5.1 准备 Lysis Buffer 和 VDJ Barcode Beads SD

准备材料：

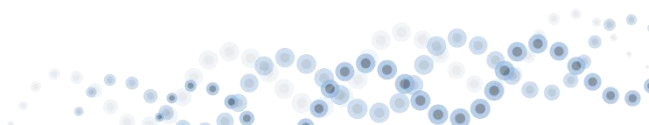
- Lysis Buffer, Stock;
- 100mM DTT;
- RNase Inhibitor;
- VDJ Barcode Beads SD。

自备材料：

- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架;
 - PBS
1. 体系配制：室温解冻“Lysis Buffer, Stock”和“100mM DTT”，涡旋离心然后置于冰上。
在冰上按下表格配制 Lysis Buffer，涡旋混匀并短暂离心，置于冰上备用。

组分	1 RXN (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
Lysis Buffer, Stock	92.5	203.5
100mM DTT	5	11
RNase Inhibitor	2.5	5.5
Total	100	220

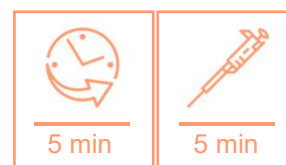
2. 清洗 VDJ Barcode Beads SD：将 VDJ Barcode Beads SD 用移液器（1mL 量程）轻柔吹打 15 次混匀后，吸取 900 μL VDJ Barcode Beads SD（1RXN）于 1.5 mL 离心管中，短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架（DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo，本小节磁力架同规格）上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清。清洗时需将离心管从磁力架上取下，加入 1mL PBS，瞬离后置于磁力架上，静置 1min，待溶液澄清后，小心移除上清，清洗 3 次即可；
3. 取下离心管，用 PBS 重悬定容至 80 μL 。若 1h 内使用，可放置在常温待用；若超过一小时不用，置于 4℃ 冰箱待用。



5.2 细胞悬液和微流控芯片准备

准备材料:

- NEO Chip
- 单细胞悬液



自备材料:

- PBS 缓冲液;
- 0.02%PBST (PBS 中包含 0.02%Tween-20);
- 无水乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 干净的培养皿。

1. 按下表制备 PBST(包含 0.02% v/v Tween-20 的 PBS) , 随后涡旋混匀并瞬时离心。

PBST:

组分	1 RXN (μL)	2 RXNs (μL)
PBS	998	1996
10% Tween-20	2	4
Total	1000	2000

2. 分离后的细胞重悬于预冷的 PBS 内, 按照目标捕获细胞数加入适量细胞, 如下表: 用 PBS 将细胞悬液稀释至 $1.5 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$ cells/mL, 建议细胞活性 $\geq 85\%$ 即可用于芯片实验。

目标细胞数	建议细胞浓度
8000-10000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells/mL
10000-13000	$(3.0-3.5) \times 10^5$ cells/mL
13000-15000	$(3.5-4.0) \times 10^5$ cells/mL

3. 取出微流控芯片确认进样口与出样口, 如图 1。

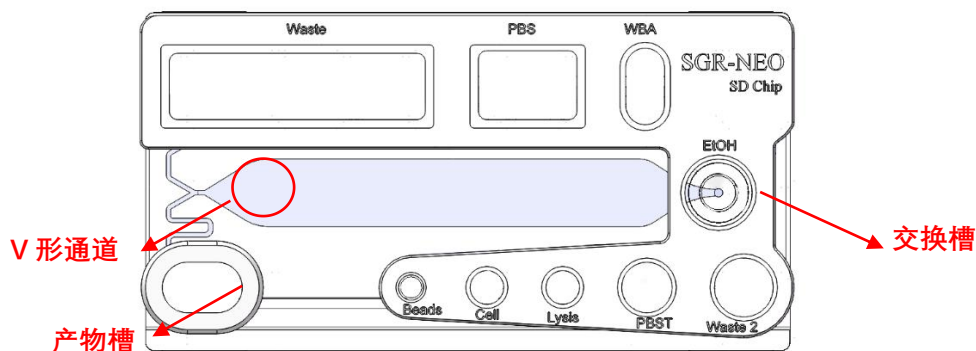


图 1 微流控芯片示意图

4. 将微流控芯片置于无菌的培养皿上, 用移液器(200 μ L 量程)吸取无水乙醇从交换槽注入芯片, 确保无水乙醇注满芯片通道且无白色气泡。

试剂名称	芯片类型	体积
无水乙醇	NEO Chip SD	105 μ L

注意:

- 1) 在添加无水乙醇时, 确保液体不会进入交换槽周围小孔内, 在到达 V 形通道前停止。如果观察到无水乙醇进入到产物槽内, 用移液器移除产物槽中的无水乙醇, 并用 500ul Wash Buffer A 润洗产物槽 2 次。
- 2) 如果观察到通道内有白色气泡, 请抽出无水乙醇, 并注入新无水乙醇以排除气泡。

5.3 仪器操作

准备材料:

- Singleron Matrix NEO[®] ;
- Wash Buffer A (白色) ;
- Lysis Mix、VDJ Barcode Beads SD (来自 5.1 步骤) ;
- 微流控芯片 (NEO-chip SD) ;
- 细胞悬液 (来自 5.2 步骤) 。

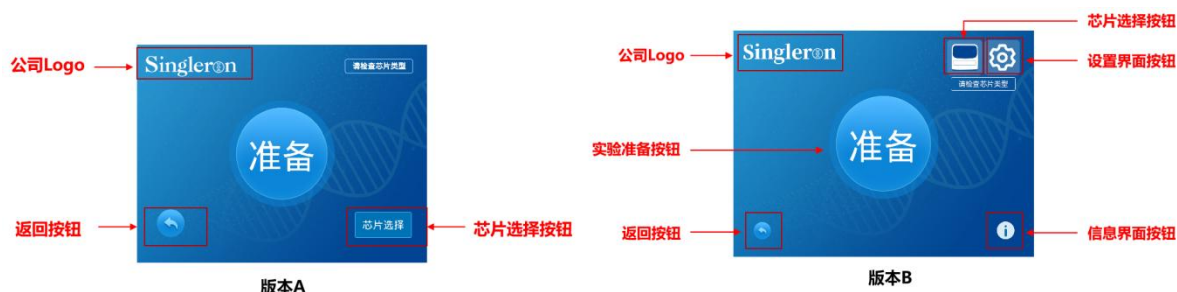
自备材料:

- PBS 缓冲液;
- 不同量程单通道移液器;
- 1.5mL 离心管。

1. 准备界面介绍

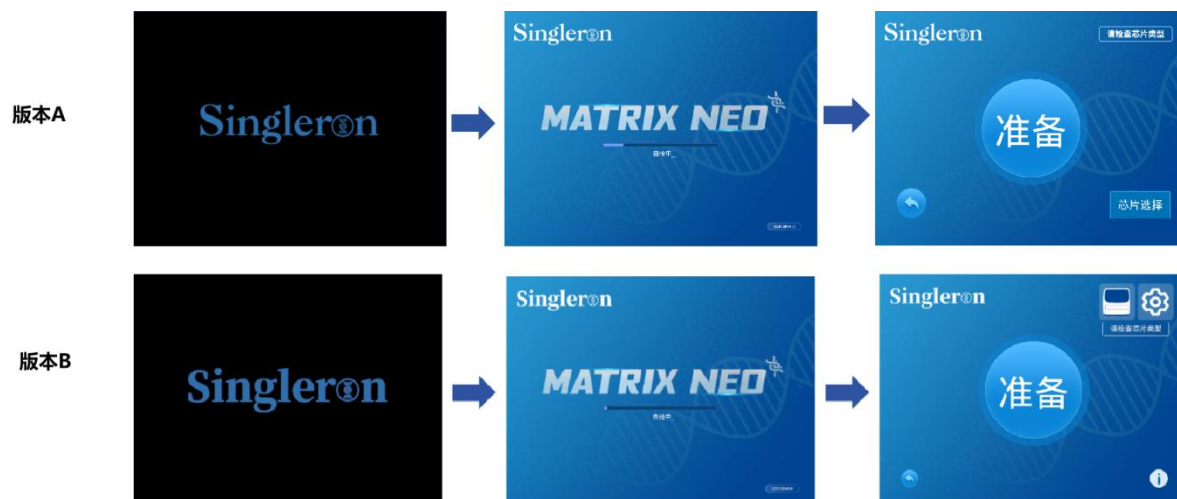
本仪器提供两种界面版本：版本 A 和版本 B。两种界面在布局及部分操作方式上有所不同。

以下是两种版本准备界面的具体介绍：



2. 开机自检

打开仪器电源，屏幕将显示“Singleron” Logo，随后进入自检界面，显示自检进度条及“自检中”字样。系统自检完成后，自动进入准备界面。



3. 芯片选择

本仪器支持两种芯片类型：NEO SD Chip(标准芯片)和 NEO HD Chip(高密度芯片)。

版本 A：点击屏幕右下角“芯片选择”按钮，根据需求，选择对应芯片类型，点击“保存”后出现“芯片参数保存成功”字样，再点击“返回”按钮退回准备界面。

版本 B：点击屏幕右上角显示仪器图标芯片选择项，根据需求选择对应芯片类型。全部选择完成后，点击“保存”，屏幕显示“芯片参数保存成功”，再点击“返回”按钮回到准备界面。



4. 试剂添加

点击“准备”按钮，系统将对各部件状态进行检测及复位，完成检测及复位后，“准备”字样变成“准备中”，同时载台推出，系统进入开始界面。此时，请放置芯片并依次添加相应试剂。



NEO SD Chip 加样体积：

试剂名称	体积
VDJ Barcode Beads SD	80 μ L
细胞悬液	100 μ L
Lysis	150 μ L
PBST	300 μ L
Wash Buffer A	500 μ L

PBS

1400μL

重要提示:

1. Lysis 配置参考“5.1 准备 Lysis Mix 和 VDJ Barcode Beads SD”。
2. 细胞悬液加样需在最后一步进行。

5. 实验开始

点击“开始”按钮进入实验倒计时界面，同时载台推入仪器，仪器运行时间为 39 分 30 秒。



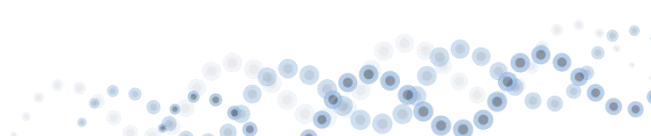
6. 实验完成

实验完成后，系统弹出“实验已结束”对话框，点击“确认”按钮后系统回到“已完成”界面，同时载台推出，且在完成后灰色“已完成”按钮恢复亮度。



7. 完成制备与收样

使用 200 μ L 的移液枪将产物槽中的产物尽快回收至预冷的 1.5mL 离心管内，并用 200 μ L 的移液枪吸取 200 μ L Wash Buffer A 重复冲洗产物槽 2-3 次，直至产物槽内 Barcode Beads 无残留，产物回收后应置于冰上，及时进行后续实验操作，以免影响实验结果。收样结束后，点击仪器“已完成”按钮后系统回到“准备”界面，同时载台收回。



6. 反转录 cDNA 扩增

6.1 反转录

准备材料：

- Wash Buffer A;
- Wash Buffer B;
- RT Master Mix;
- TS Primer;
- RNase Inhibitor;
- Reverse Transcriptase;
- 上一步骤收集的 VDJ Barcode Beads SD。



自备材料：

- Nuclease-free water;
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。

1. 体系配制：提前室温解冻“RT Master Mix”，“100mM DTT”和“TS primer”，涡旋 10s 后短暂离心然后置于冰上，在冰上按照如下表格配制 RT Mix，涡旋 10s 混匀并短暂离心（若 RT Master Mix 试剂溶液中有沉淀物，请用手指轻弹试剂管壁）。

组分	1 RXN (μ L) $\times$ 1	2 RXNs (μ L) $\times$ 2.2
RT Master Mix	120	264
TS primer	10	22
Reverse Transcriptase	20	44
RNase Inhibitor	5	11
Nuclease-free Water	45	99
Total	200	440

注：移液器轻轻吹打混匀试剂溶液，确保试剂溶液澄清后再使用。

2. 将 5.3 步骤的装有 VDJ Barcode Beads SD 的离心管短暂离心后置于 1.5mL 规格磁力架（DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo，本小节磁力架同规格）上，待溶液澄清后，小

心吸除上清液。从磁力架上取下离心管，用 1mL 移液器加入 1mL 稀释后的 Wash Buffer B，涡旋混匀后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。

3. 从磁力架上取下离心管，加入 500 μ L 稀释后的 Wash Buffer B，涡旋混匀后短暂离心，置于磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。
4. 取下离心管，短暂离心后再置于磁力架上，用 20 μ L 的移液器吸取残余的液体。只留下离心管底部的 VDJ Barcode Beads SD。
5. 迅速取下离心管，加入 200 μ L 配好的 RT Mix，并涡旋混匀。
6. 置于提前设置好的金属浴中，42 $^{\circ}$ C，转速 1300 rpm，反应 90min（提前预热）。

注意：42 $^{\circ}$ C反应 90min 后，若无法立即进行下一步，将反转录产物 70 $^{\circ}$ C（关闭振荡）灭活 15min 后，可室温放置 15h（可在金属浴上过夜）。

6.2 cDNA 扩增

准备材料：

- Amplification Master Mix；
- A Primer Mix；
- Amplification Enzyme；
- 上一步的反转录产物。



自备材料：

- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管；
- Nuclease-free water；
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。

1. 根据下表，在 PCR 仪上设置 cDNA 扩增程序。PCR 仪的热盖设置为 105 $^{\circ}$ C。

热盖温度 105℃		反应体系 50μL	
步骤	温度	时间	
1	95 °C	3 min	
	98 °C	20 sec	
2	65 °C	45 sec	
Cycles = 4	72 °C	3 min	
	98 °C	20 sec	
3	67 °C	20 sec	
Cycles = 9	72 °C	3 min	
4	72 °C	5 min	
5	4 °C	Hold	

2. 体系配制：提前室温解冻“Amplification Master Mix”，“A Primer Mix”，涡旋离心然后置于冰上，按照如下表格在冰上配制 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心。

PCR Mix:

组分	1 RXN (μL) ×1	2 RXNs (μL) ×2.2
Amplification Master Mix	172	378.4
A Primer Mix	32	70.4
Amplification Enzyme	8	17.6
Nuclease-free Water	188	413.6
Total	400	880

3. 将反转录产物短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上，待溶液澄清后小心移除上清。
4. 将离心管从磁力架上取下，向管中加入 400 μL PCR Mix，一边吹打混匀，一边分装到八联排管中，每管分装液体体积为 50μL。

注意： 后续的步骤应当在“Post-PCR”区进行，避免实验环境污染。

5. 盖好八联排管管盖，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105℃，反应体积 50μL。
6. PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4℃保存 48h 和 -20 °C保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。

6.3 产物纯化

准备材料：



- 上一步扩增后的 cDNA。

自备材料：

- 1.5mL 离心管；
- 无水乙醇；
- 无核酸酶水；
- Buffer EB；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- DynaMagTM-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架。

注意：

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

1. 每反应准备 2 mL 80%乙醇。
2. 将 PCR 扩增产物收集到 1.5mL 离心管中,短暂离心,用移液器测量体积,加入 AMPure XP 纯化磁珠体积为 PCR 扩增产物总体积的 0.6x。例如：PCR 扩增产物总体积为 400 μ L，则加入 $0.6 \times 400 = 240\mu\text{L}$ 纯化磁珠。
3. 涡旋 15s 混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于 1.5mL 规格磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心吸除上清液至新的 1.5mL（或 2mL）离心管中，暂留。

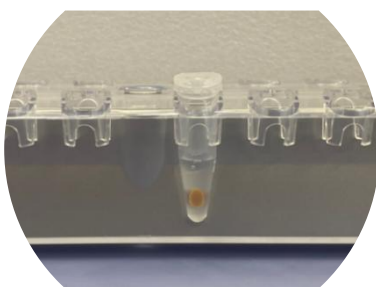


图 3. AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

4. 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800 μ L 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
5. 重复步骤 4，共计漂洗 2 次。
6. 取下离心管,短暂离心,再次置于磁力架上,吸去多余酒精,开盖晾干约 2min(不要超过 5min)。

- 取下离心管，加入 20μL Buffer EB，充分涡旋混匀，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。

注意:

此步骤结束后可以将样品于 4℃ 保存 72h，在-20℃可保存一周，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

6.4 扩增纯化产物质检

准备材料:

- cDNA（来自 6.3）。

自备材料:

- Qubit 4.0 荧光定量仪；
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）；
- 全自动核酸片段分析仪，如 Agilent Fragment Analyzer 5200。

- 取 1 μL 纯化后的 cDNA 产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
- 取约 5ng cDNA，用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
- 合格的 cDNA 应同时满足以下几个条件：主峰片段大小应在 900–2000bp 左右；1000bp–5000bp 占比大于 15%；300bp 以下片段占比小于 40%。cDNA 评级分布见下表。
(若在满足“合格”类条件下同时存在基线上调或拖尾严重情况，评级评定为“风险”)

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量 > 30ng，质检主峰 900bp–2000bp 之间，1000bp–5000bp 占比>15%，300bp 以下片段占比<10%	建议直接进行建库
风险	不满足“合格/不合格”任一评级条件	尝试风险建库
不合格	Qubit 检测总量<30 ng，质检主峰<500bp 或主峰不明显	不建议进行建库实验

- 若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10–40%时，将剩余 cDNA 的体积用无核酸酶水补充到 100μL，然后按下表的磁珠比例进行二次纯化，二次纯化后满足步骤 3 的“合格”要

求仍可直接建库。

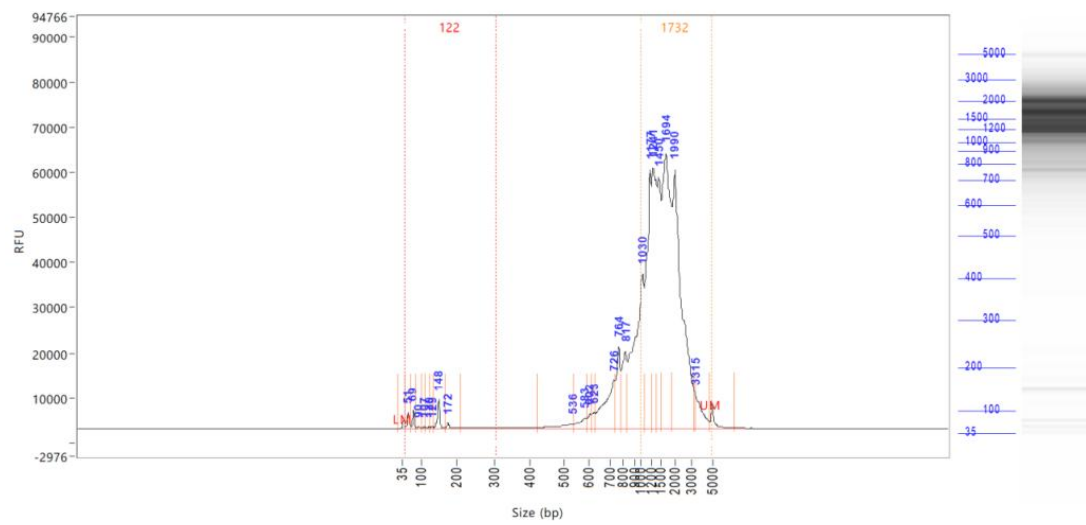


图 4. cDNA 质检图

7. 转录组文库构建

7.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3;
- Fragmentation Enzyme Mix V3 ;
- 1× TE;
- Step 6.4 的 QC 合格的 cDNA 产物。

自备材料：

- PCR 仪;
- 不同量程单通道移液器;
- 灭菌的 PCR 管。

1. 提前按照下表设置片段化 PCR 程序，反应体积 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

热盖温度：75° C		反应体积：35 μ L
步骤	温度	运行时间
1	37 °C	10 min
2	65 °C	30 min
3	4 °C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3，确保完全融化，涡旋混匀（5–8 秒）并短暂离心后冰上备用；如果看到沉淀，涡旋混匀至沉淀消失，溶液变澄清。
3. 使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡（5–8 秒）并瞬离，置于冰上备用。
4. 按照以下建议的 cDNA 模板投入量进行建库：
 - ① cDNA 总量大于 300ng 时，投入 50ng 进行建库。
 - ② cDNA 总量小于 300ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。
 - ③ 建议 cDNA 预留二次建库的量。
5. 将 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

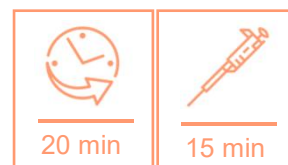
片段化反应体系：

组分	体积 (μL)
Diluted cDNA (10ng 或 50ng)	Variable
1 X TE	Variable
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
Total	35

- 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬时离心后将 PCR 管置于预热的 PCR 仪中并运行片段化程序。
- 完成反应后立即进行下一步接头连接。

7.2 接头连接

准备材料：



- Ligation Mix;
- Ligation Booster;
- Adaptor;
- Step 7.1 的片段化产物。

- 提前按照下表设置接头连接 PCR 程序，反应体系 70μL，并关闭 PCR 仪热盖加热功能，若 PCR 仪无此功能，将热盖设置到最低温度。

热盖温度：OFF		反应体积：70μL
步骤	温度	运行时间
1	20 °C	15 min
2	4 °C	Hold

- 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 涡旋混匀，短暂离心后置于冰上备用。
- Ligation Mix 较粘稠，吸取时注意量取准确体积（多反应体系时建议 Adaptor 单独加入）。
- 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配制如下反应体系：

接头连接反应体系*：

组分	体积 (μL)
Fragmented cDNA	35
Ligation Mix**	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

*多反应体系时不建议配制成一个 *master mix*。

**Ligation Mix 比较粘稠，小心移液确保体积准确。

5. 涡旋混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中立即运行接头连接程序。

7.3 接头连接后产物纯化

准备材料：

- 0.1×TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1×TE)；
- Step 7.2 的接头连接产物。

自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 无水乙醇；
- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器；
- 无核酸酶 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。



注意：

- AMPure XP 纯化磁珠 (以下简称磁珠) 提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。

- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

- 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇和 25 μ L 0.1 X TE 溶液（将 1 X TE 与无核酸酶水以 1:10 稀释）。
- 将产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠，AMPure XP 纯化磁珠体积为 0.2x 产物总体积。（例如：片段化产物体积为 68.5 μ L，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7$ μ L AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。）
- 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心移除上清至一个新的无核酸酶 PCR 管中，暂时留存。
- 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
- 重复步骤 4，总计漂洗 2 次。
- 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 2min（不要超过 5min）。
- 将 PCR 管从磁力架上取下，加入 17 μ L 0.1 $\times$ TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
- 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心吸取 15 μ L 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 6.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃保存 72 小时，-20℃保存一周。

7.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3;
- Indexing Primer Mix;
- Step 7.3 的接头连接后纯化产物。

- 将 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系，涡旋混匀并短暂离心，将反应管置于 PCR 仪中。

组分	体积 (μ L)
接头连接纯化后产物 (Step 7.3 产物)	15



Library Amp Mix V3	25
Indexing Primer Mix	10
Total	50

注: Indexing Primer Mix 包括 2 种, 任意选择一种即可, 一个样本对应一个 Indexing Primer Mix。

2. 提前按照下表设置 PCR 富集程序, 并使 PCR 仪热盖保持在 105℃, 反应体积 50μL。

热盖温度: 105℃		反应体积: 50 μL
时间	温度	运行时间
1	98 °C	30 sec
2 (循环数参见下表)	98 °C	10 sec
	65 °C	75 sec
3	65 °C	5 min
4	4 °C	Hold

3. 扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择, 选择要求如下:

cDNA 投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	13

7.5 扩增产物片段分选

准备材料:

- 步骤 7.4 的 PCR 富集产物。



自备材料:

- Buffer EB;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 无核酸酶 PCR 管;
- 1.5mL 离心管;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达或 DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

注意:

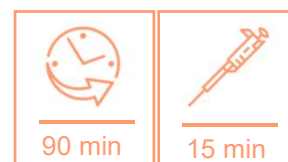
- AMPure XP 纯化磁珠（以下简称磁珠）提前 30min 从 4℃ 中取出，恢复室温备用。
- 磁珠使用前需充分涡旋 15s 振荡混匀。
- 磁珠比较粘稠，应确保精确量取，缓慢加入，否则可能导致分选的片段长度与预期不一致。
- 离心管放置到磁力架上后不应再旋转，因此摆放时需确定离心管开盖方向，离心时，离心管开盖方向朝内放置。

1. 每个反应准备 0.5mL 80%乙醇。
2. 将 7.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，涡旋混匀磁珠并吸取 25μL 加入至 50μL 产物中（如体积不足 50μL 使用 Nuclease-free Water 补足），涡旋振荡 15s 充分混匀，室温孵育 5min。
3. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架（磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达，本小节磁力架同规格）上静置，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心回收上清液至一个新的无菌 PCR 管中，丢弃纯化磁珠。
4. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5μL 加入至上清中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
5. 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min），小心转移上清液置于新的 PCR 管暂时留存。
6. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
7. 重复步骤 6，总计漂洗 2 次。
8. 从磁力架上取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，开盖晾干磁珠 1min（不要超过 2min）。
9. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20μL Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
10. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架上，使纯化磁珠与液体分离，待溶液澄清后（约 5min）小心吸取 18μL 上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中。

注意：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃保存三个月。

7.6 文库质检

准备材料：



○ Step 7.5 的纯化产物。

自备材料：

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂；
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit；
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）。

1. 取 1 μ L 分选后的产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
2. 取约 5ng 分选后的产物，用 Agilent Fragment Analyzer 5200 进行片段分布分析。
3. 理想的文库应符合以下标准：
 - a. 在分析区间设定为 300 bp 至 2000 bp 时，主峰片段范围应在 400 bp 至 700 bp 之间。
 - b. 900 bp 至 1500 bp 之间的片段占比小于 10% 。
 - c. 300 bp 以下的片段占比小于 10% 。
4. 质控标准及处理方案如下：

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng，主峰 400bp-700bp 之间，900bp-5000bp 占比 <10%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量>50ng，主峰 400b-700bp 之间，900bp-5000bp 占比 10%-20%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 值<50ng，主峰<400bp， 225bp-500bp 占比<30%	不建议上机测序

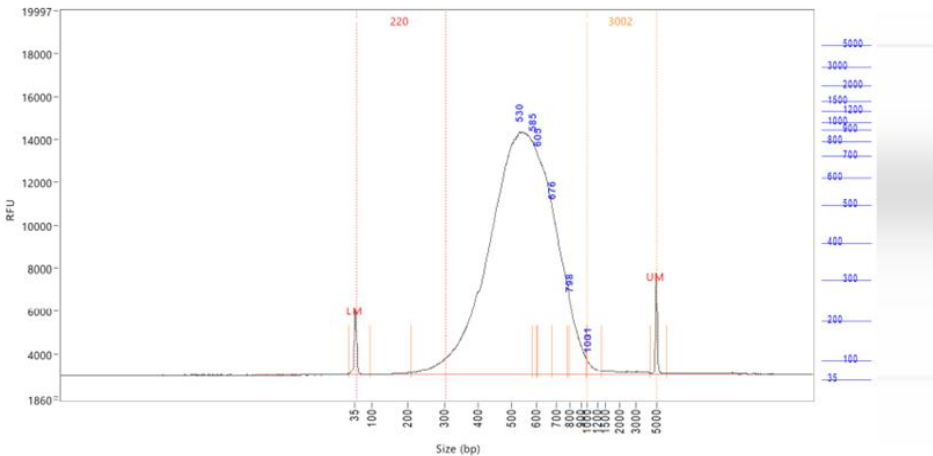


图 5. 文库质检图

8. 免疫受体 (TCR&BCR) 富集

8.1 免疫受体 (TCR) 第一轮富集

准备材料:

- Step 6.3 的纯化产物;
- MP master mix;
- TCR R1 primer;
- T1 primer。

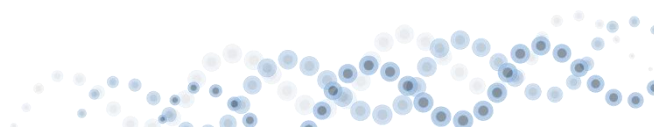
自备材料:

- Nuclease-free Water;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- Buffer EB;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit;
- 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen) ;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

1. 取 10ng cDNA 产物, 将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第一轮富集 PCR mix:

组分	1 RXN (μ L)
MP master mix	25
TCR R1 primer	4.44
T1 primer	1.5
扩增产物 cDNA (Step 6.3, 10ng)	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀, 将反应管置于 PCR 仪中, PCR 仪根据下表设置并运行反应, PCR 仪热盖 105℃:



步骤	温度	时间
1	95℃	0:15:00
2 cycle=10	94℃	0:00:30
	62℃	0:01:30
	72℃	0:01:30
	72℃	0:10:00
4	4℃	Hold

3. 产物纯化

注意:

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

- 1) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积。加入 40μL AMPure XP 纯化磁珠（ $0.8 \times$ 产物体积），吹打混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 2) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复 2)，共计漂洗 2 次。
- 4) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干。
- 5) 取下 PCR 管，加入 20μL Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 6) 吸取上清并转移至新的离心管中，即为纯化产物。

注意:

将样品置于 4℃可保存 72h 或在 -20℃保存一周，或者直接进行后续 QC 和定量。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1μL TCR 一轮富集产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。

8.2 免疫受体（BCR）第一轮富集

准备材料：

- Step 6.3 的纯化产物；
- MP master mix；
- BCR R1 primer；
- T1 primer。

自备材料：

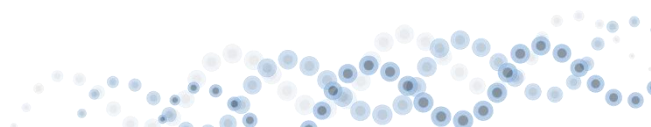
- Nuclease-free Water；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- Buffer EB；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit；
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

1. 取 20ng cDNA 产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第一轮富集 PCR mix，

组分	1 RXN (μ L)
MP master mix	25
BCR R1 primer	11.25
T1 primer	1.25
扩增产物 cDNA (step 6.3, 20ng)	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 105℃：

步骤	温度	时间
1	95℃	0:15:00
2 cycle=10	94℃	0:00:30
	60℃	0:01:30



	72℃	0:01:30
3	72℃	0:10:00
4	4℃	Hold

3. 产物纯化

注意:

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

- 1) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积。加入 40μL 磁珠 ($0.8 \times$ 产物体积)，吹打混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 2) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复 2)，共计漂洗 2 次。
- 4) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干。
- 5) 取下 PCR 管，加入 20μL Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 6) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为纯化产物。

注意:

将样品置于 4℃可保存 72h 或在 -20℃保存一周，或者直接进行后续 QC 和定量。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1μL BCR 一轮富集产物，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。

8.3 免疫受体 (TCR) 第二轮富集

准备材料:

- Step 8.1 的纯化产物;
- MP master mix;

- TCR R2 primer;
- T2 primer。

自备材料:

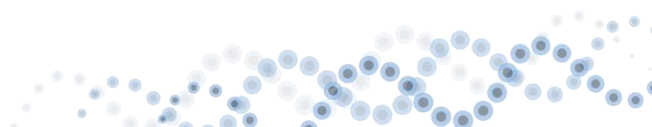
- Nuclease-free Water;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- Buffer EB;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂;
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit;
- 0.6mL PCR 透明薄壁管 (Qubit 定量, 推荐 Axygen) ;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

1. 取 10 μ L 第一轮富集产物, 将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第二轮富集 PCR mix, 涡旋混匀并短暂离心。

组分	1 RXN (μ L)
MP master mix	25
TCR R2 primer	3
T2 primer	1.5
第一轮富集产物 (step8.1)	10
Nuclease-free Water	10.5
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀, 将反应管置于 PCR 仪中, PCR 仪根据下表设置并运行反应, PCR 仪热盖 105 $^{\circ}$ C:

步骤	温度	时间
1	95 $^{\circ}$ C	0:15:00
2 cycle=10	94 $^{\circ}$ C	0:00:30
	64 $^{\circ}$ C	0:01:30
	72 $^{\circ}$ C	0:01:30
	72 $^{\circ}$ C	0:10:00
3	72 $^{\circ}$ C	0:10:00
4	4 $^{\circ}$ C	Hold



3. 产物纯化

注意:

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

- 1) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积。加入 40 μ L AMPure XP 纯化磁珠（0.8 $\times$ 产物体积），吹打混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 2) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复 2)，共计漂洗 2 次。
- 4) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干。
- 5) 取下 PCR 管，加入 20 μ L Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 6) 吸取上清并转移至新的离心管中，即为纯化产物。

注意:

将样品置于 4℃可保存 72h 或在 -20℃保存一周，或者直接进行后续 QC 和定量。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
- 2) 取 2 μ L 样品进行片段大小的检测，用核酸片段分析仪进行片段分布分析。（注意：样品浓度过高时需要将样品稀释到 3-5ng/ μ L，防止浓度过高，影响质检结果。）
- 3) TCR 质检结果请参照图 6，显示在 400bp、1000bp 左右具有明显主带。

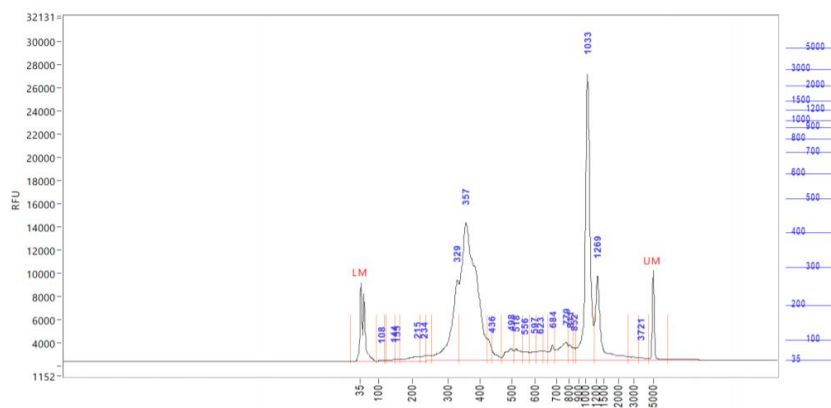


图 6. 第二轮 TCR 富集产物质检图

8.4 免疫受体（BCR）第二轮富集

准备材料：

- Step 8.2 的纯化产物；
- MP master mix；
- BCR R2 primer；
- T2 primer。

自备材料：

- Nuclease-free Water；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- Buffer EB；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂；
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit；
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

1. 取 20ng 第一轮富集产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第二轮富集 PCR mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	1 RXN (μ L)
MP master mix	25

BCR R2 primer	7.5
T2 primer	1.25
第一轮富集产物 (step8.2)	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 105℃：

步骤	温度	时间
1	95℃	0:15:00
2 cycle=10	94℃	0:00:30
	60℃	0:01:30
	72℃	0:01:30
	72℃	0:10:00
3	72℃	0:10:00
4	4℃	Hold

3. 产物纯化

注意：

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

- 1) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积。加入 40μL AMPure XP 纯化磁珠（0.8×产物体积），吹打混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 2) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200μL 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复 2)，共计漂洗 2 次。
- 4) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干。
- 5) 取下 PCR 管，加入 20μL Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 6) 吸取上清并转移至新的离心管中，即为纯化产物。

注意:

将样品置于 4℃可保存 72h 或在-20℃保存一周，或者直接进行后续 QC 和定量。

5. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1μL 样品进行 Qubit 浓度检测，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
- 2) 取 2μL 样品进行片段大小的检测，用核酸片段分析仪进行片段分布分析。（注意：样品浓度过高时需要将样品稀释到 3-5ng/μL，防止浓度过高，影响质检结果。）
- 3) BCR 质检结果请参照图 7，显示 400bp(±100bp)左右，800bp(±100bp)左右具有明显主带。

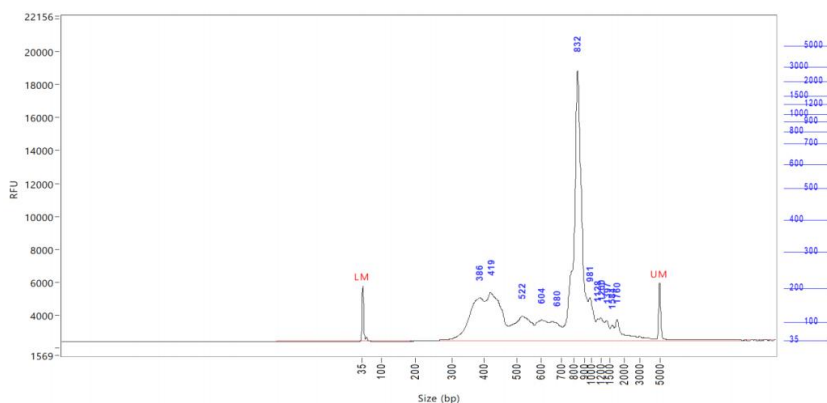


图 7. 第二轮 BCR 富集产物质检图

8.5 免疫受体（TCR 或 BCR）富集文库构建

准备材料:

- Step 8.3 或 8.4 的纯化产物;
- AL buffer;
- dNTP mix;
- AL Enzyme;
- Indexing Primer Mix。

自备材料:

- Nuclease-free Water;
- AMPure XP 纯化磁珠;
- Buffer EB;

- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂；
- Qubit 1x dsDNA HS assay kit；
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达 或 DynaMagTM-PCR 磁力架/492025/Invitrogen。

1. 分别取 20ngTCR 或 BCR 第二轮富集产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制富集文库构建 PCR mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	1 RXN (μ L)
AL buffer	10
dNTP mix	1.5
AL Primer mix	7.5
TCR 或 BCR 第二轮富集产物	Variable
AL Enzyme	1
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀，将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 105℃：

步骤	温度	时间
1	95℃	0:03:00
2 cycle=8 (TCR) 或 6 (BCR)	98℃	0:00:20
	64℃	0:00:30
	72℃	0:01:00
	72℃	0:05:00
3	72℃	0:05:00
4	4℃	Hold

3. 产物纯化

注意：

- 1、AMPure XP 纯化磁珠需提前 30min 取出，恢复至室温后，方可使用。使用前需充分涡旋混匀。
- 2、AMPure XP 纯化磁珠比较粘稠，应缓慢吸取和加入，确保吸取和加入的体积精准。否则将导致分选的片段长度与预期不一致。

- 1) 将 PCR 管中的液体，瞬离，计算体积。加入 40 μ L AMPure XP 纯化磁珠（0.8 $\times$ 产物体积），吹打混匀后，室温孵育 5min，短暂离心，置于磁力架上静置 5min；至液体透明澄清，小心移除上清至新的 PCR 管中，暂留。
- 2) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复 2)，共计漂洗 2 次。
- 4) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干。
- 5) 取下 PCR 管，加入 20 μ L Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 6) 吸取上清并转移至新的离心管中，即为纯化产物。

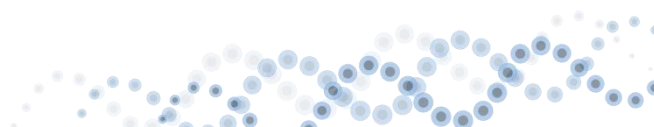
注意:

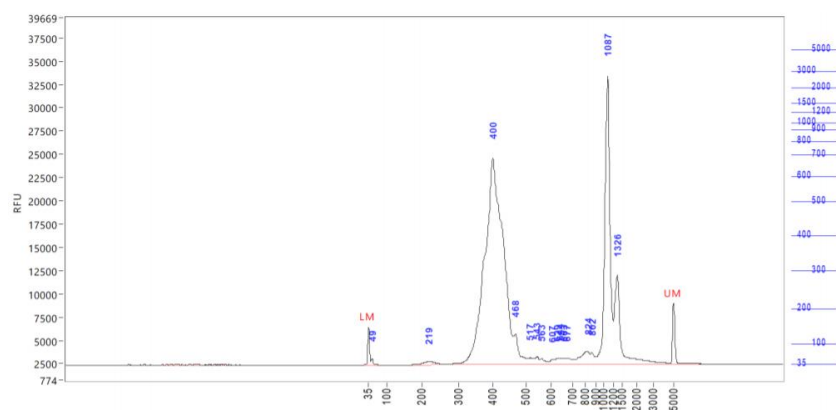
将样品置于 4℃可保存 72h 或在-20℃保存一周，或者直接进行后续 QC 和定量。

4. 扩增纯化产物质检

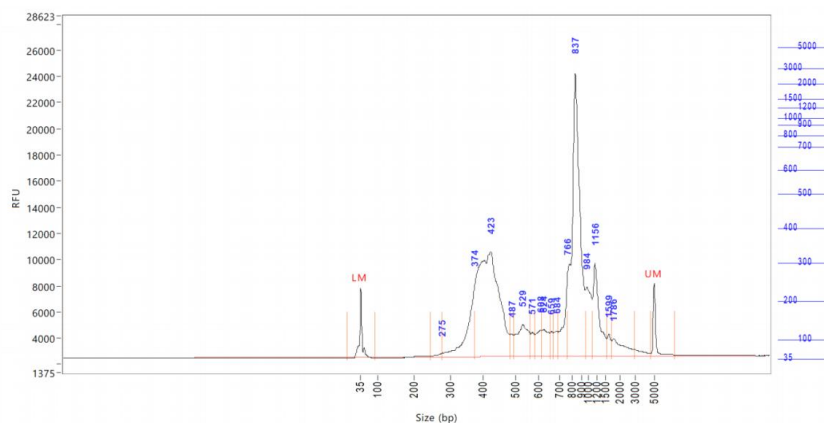
- 1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测，用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行浓度定量。
- 2) 取 2 μ L 样品进行片段大小的检测，用核酸片段分析仪进行片段分布分析。（注意：样品浓度过高时需要将样品稀释到 3-5ng/ μ L，防止浓度过高，影响质检结果。）
- 3) TCR 富集文库质检结果请参照图 8，分别在 400bp、1000bp 左右有明显主带。BCR 富集文库质检结果请参照图 9，显示 400bp($\pm$ 100bp)左右，800bp($\pm$ 100bp)左右具有明显主带。
- 4) TCR 文库质检等级：

质检等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng，同时出现两个 450bp 和 1100bp 左右的主峰；450bp 和 1100bp 占比均在 45%~50% 或 450bp 主带占比>50%，1100bp 主带占比>30%	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量 20ng-100 ng；450bp 和 1100bp 左右主峰出现其中一条，且主峰片段占比大于 50% 或 450bp 主带占比<30%，1100bp 主带占比>50%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 检测总量小于 20 ng；450bp 和 1100bp 左右的主峰占比小于 20%；无明显主峰，条带呈弥散状	不建议上机测序





5) BCR 文库质控等级:



附录 A 技术原理

利用 NEO-chip 微流控芯片捕获单细胞，并将数百万个携带独特细胞标签（Cell Barcode）的 VDJ Barcoding Beads SD 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内只落入 1 个 VDJ Barcoding Beads SD。细胞裂解后，带有独特细胞标签（Barcode）及分子标签（UMI）的 VDJ Barcoding Beads SD 通过与 mRNA 上的 poly（A）尾结合捕获 mRNA，对细胞及 mRNA 进行标记。收集芯片中的 VDJ Barcoding Beads SD，将 VDJ Barcoding Beads SD 捕获的 mRNA 反转录为 cDNA 并扩增。将 cDNA 经过片段化、连接接头等步骤后构建适用于 illumina 测序平台的测序文库。

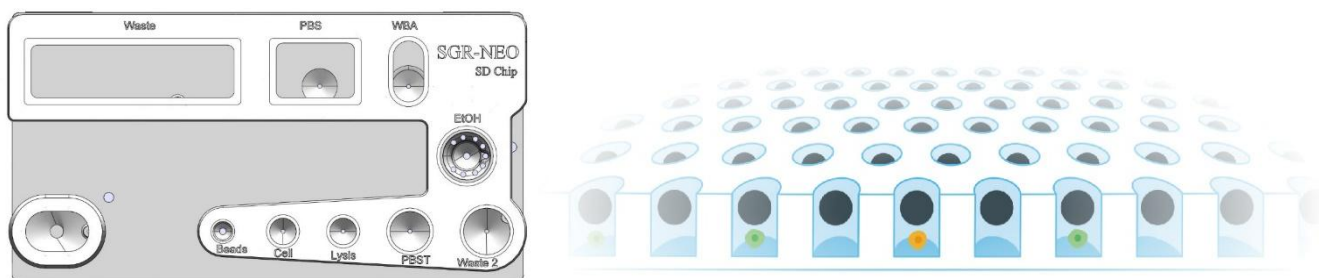


图 A1: NEO-chip 微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录

利用 NEO-chip 微流控芯片捕获单细胞，根据“泊松分布”原理完成单个细胞的分离，利用 VDJ Barcoding Beads SD 完成单个细胞的 mRNA 的捕获和标记。VDJ Barcoding Beads SD 的 Oligo 序列包含 illumina Read 1 测序引物序列，细胞标签（Cell Barcode），分子标签(UMI)和 PolyT 核苷酸序列。

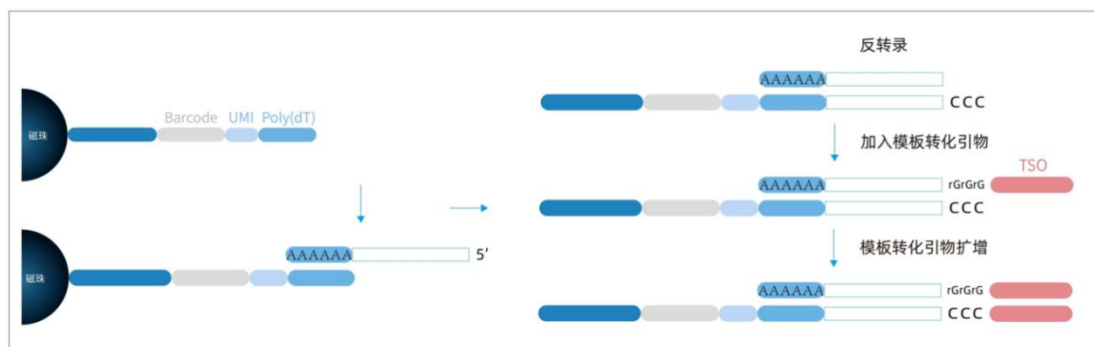


图 A2: 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

注：模板转化引物（TS Primer），简称 TSO（Template Switching Oligo）。

A2 cDNA 富集

通过磁珠 5' 端的 PCR handle 序列（适配 illumina 二代测序平台的测序引物）及反转录过程中添加上的 TSO 序列，扩增完成全长转录组的富集。

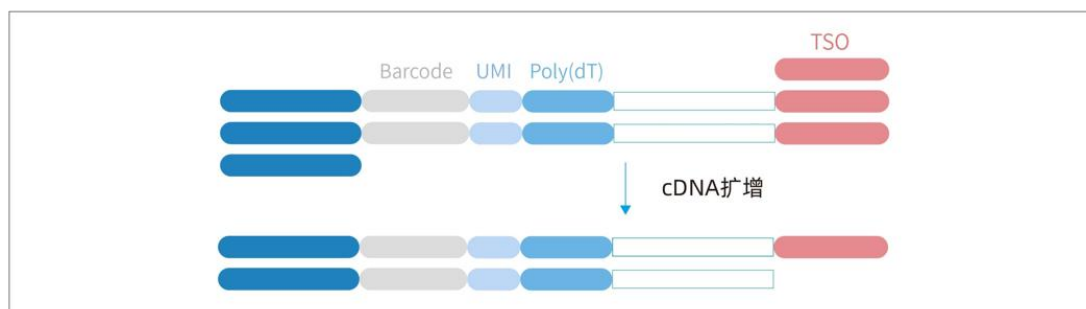


图 A3: cDNA 富集扩增原理图

A3 转录组文库构建

为满足二代测序对测序文库长度的要求，逆转录扩增获取到的 cDNA 需要进行片段化（Fragment），首先利用化学方法将 cDNA 打断成约 500bp 左右的片段，cDNA 片段化、末端修复和加 A，并进行 cDNA 片段筛选，P7 Adapter 接头连接并通过 PCR 扩增引入样品 Index，最后进行片段筛选从而得到 cDNA 文库。

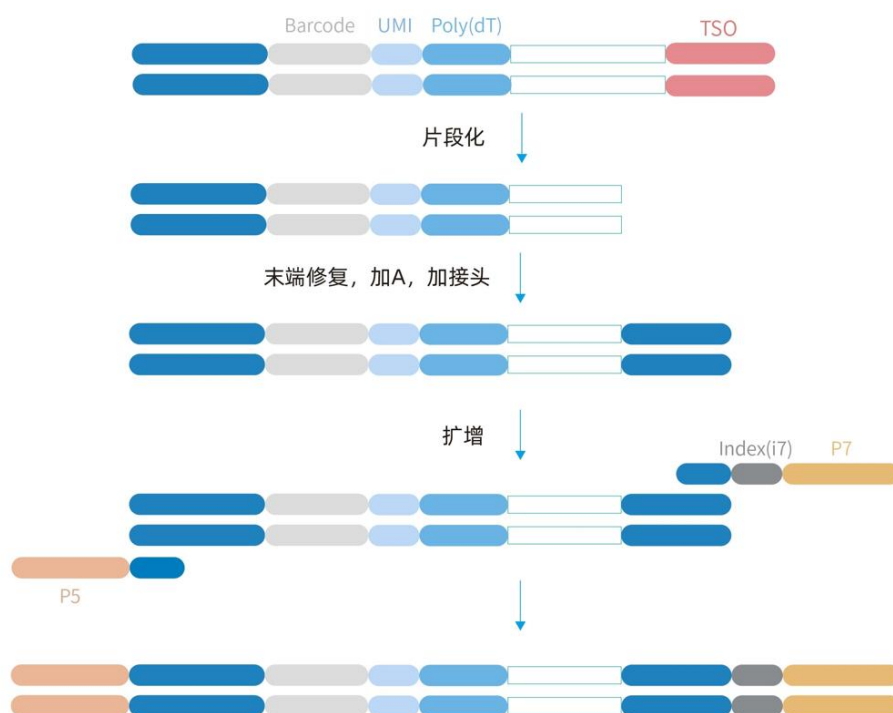


图 A4：转录组文库构建原理图

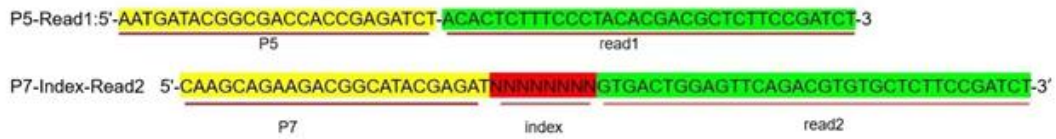


图 A5：转录组 illumina 文库结构图（左右两侧序列）

A4 TCR&BCR 富集及文库构建

取余下的部分 cDNA,使用磁珠上的 Universal 序列和 TCR&BCR 特异性引物(V 区序列) 进行 PCR 扩增, 完成 TCR&BCR 富集。TCR&BCR 文库构建, 通过在建库中引入 P5, P7 和 read2 序列, 完成富集文库的构建。

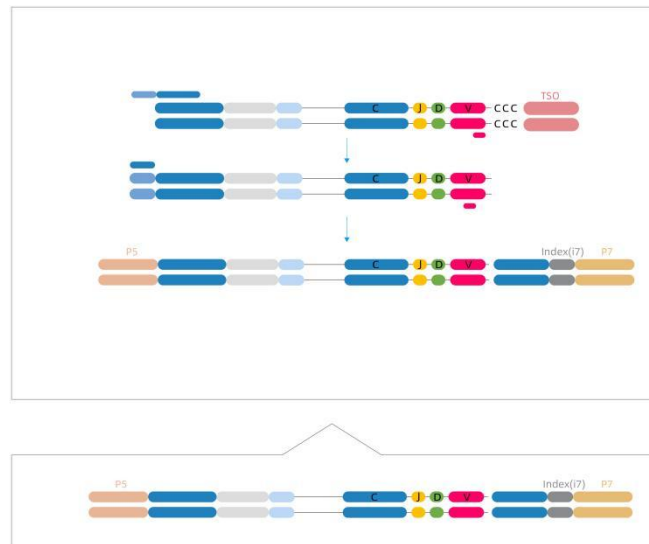


图 A6：TCR&BCR 富集文库构建原理



新格元生物科技有限公司

电 话：025-58862675

电子邮件：product-service-support@singleronbio.com

网 址：www.singleronbio.com

地 址：苏州市工业园区新泽路 1 号生物医药产业园三期 A 区 1 号楼 401 单元（苏州）
南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 3-4 层（南京）