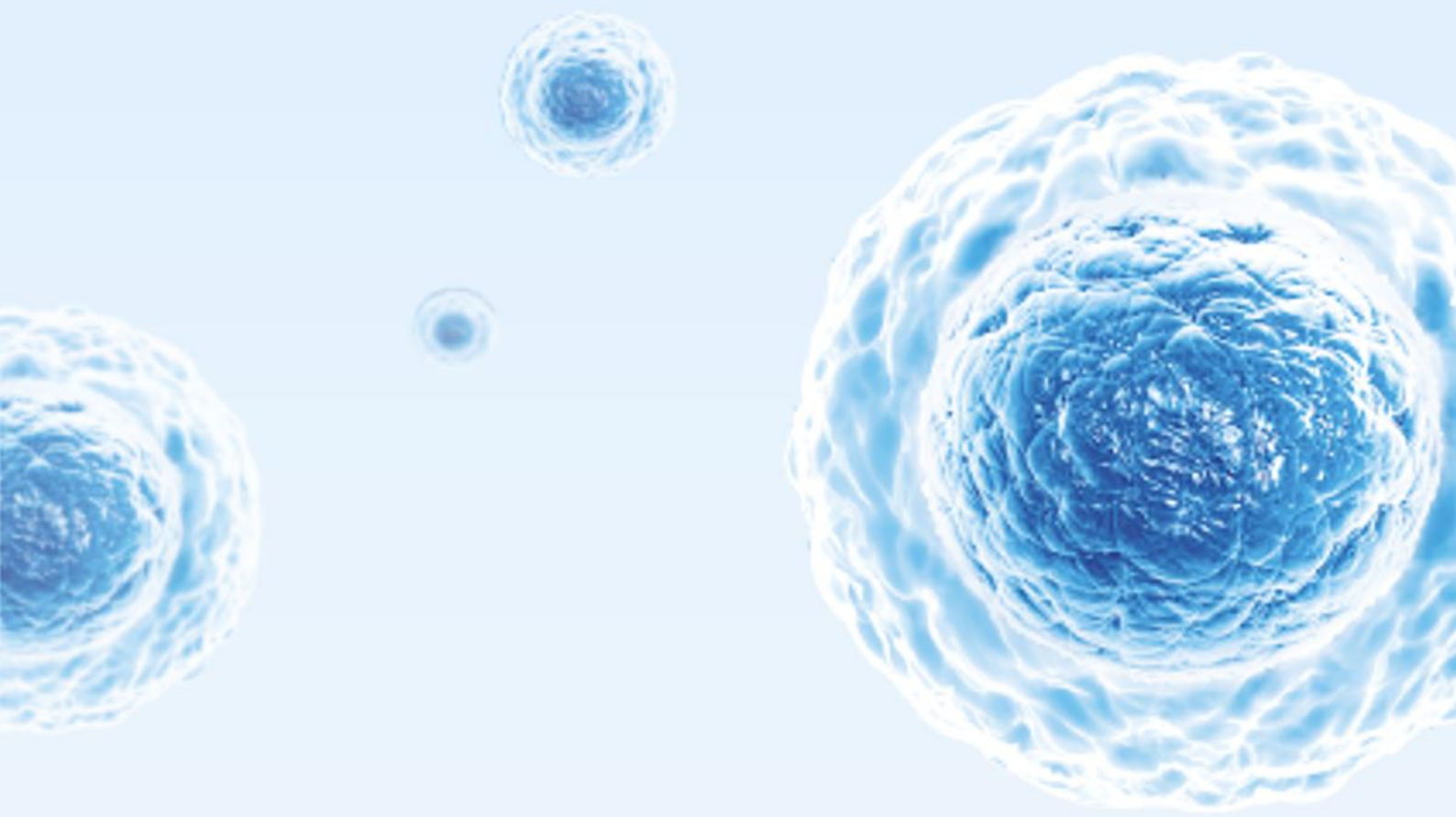




**sCircle[®] Single Cell Full Length Immuno_BCR Library Kit
(Rabbit) Manual**

单细胞全长免疫受体 BCR 建库试剂盒（兔）用户手册·手动版

本产品适用于以下产品：

目录号	产品名称	规格
1154211	sCircle® Single Cell Full Length Immuno_BCR Library Kit (Rabbit) Manual	2 RXNs

文件信息

- 文件名称：sCircle®单细胞全长免疫受体 BCR 建库试剂盒(兔)用户手册（手动）
- 版 本 号：2025/04
- 版本日期：2025.04

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
2. 自备仪器耗材试剂	8
3. 工作流程和操作时间	10
4. 实验准备	11
4.1 准备 Lysis Buffer 和 FL Barcoding Beads	11
4.2 细胞和微流控芯片准备	12
4.3 loading 细胞	13
4.4 loading FL Barcoding Beads	14
4.5 loading Lysis Buffer	14
4.6 细胞裂解&mRNA 捕获	14
4.7 取出 FL Barcoding Beads	15
5. 反转录 cDNA 扩增	16
5.1 反转录	16
5.2 PCR 扩增	17
5.3 产物纯化	19
5.4 扩增纯化产物质检	20
6. 转录组文库构建	22
6.1 片段化	22
6.2 接头连接	23
6.3 接头连接后产物纯化	24
6.4 PCR 富集	25
6.5 扩增产物片段分选	26
6.6 文库质检	27
7. 环化	29
7.1 cDNA 环化	29
7.2 酶切	29

8. 全长免疫受体（BCR）富集	32
8.1 全长免疫受体（BCR）第一轮富集	32
8.2 全长免疫受体（BCR）第二轮富集	33
8.3 全长免疫受体（BCR）第三轮富集	36
9. 全长免疫受体富集文库构建	39
9.1 片段化	39
9.2 接头连接	40
9.3 接头连接后产物纯化	40
9.4 PCR 富集	42
9.5 扩增产物片段分选	42
9.6 文库质检	44
附录 A 技术原理	46
A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集	46
A2 cDNA 富集	47
A3 转录组文库构建	47
A4 BCR 富集及文库构建	47
附录 B 纯化后 cDNA 含量少于 150ng 解决方案	49
附录 C: 生物废弃物分类及处理标准	52

1. 基本信息

1.1 产品概述

sCircle®单细胞兔全长 BCR 免疫受体建库试剂盒可完成单细胞分选至 BCR 免疫受体富集文库构建全部流程。sCircle®单细胞兔全长 BCR 免疫受体建库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 BCR 免疫受体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、BCR 免疫受体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万个细胞中的 mRNA 进行测序，同时获得 BCR 免疫受体全长基因序列信息。

1.2 产品组分

以下适用于：

sCircle® Single Cell Full Length Immuno_BCR Library Kit Cell （Rabbit）（2 RXNs）

Box 1: Single Cell Full Length Immunoreceptor RNA Amplification SD & 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	1500 µL	绿色
RNase Inhibitor	1	50 µL	绿色
100 mM DTT	1	400 µL	绿色
RT master Mix	1	400 µL	紫色
Reverse Transcriptase	1	50 µL	紫色
TS Primer	1	50 µL	紫色
Amplification Master Mix	2	400 µL	透明
Amplification Enzyme	2	20 µL	透明
G primer Mix	1	20 µL	淡紫色
Circle master mix	1	30 µL	淡紫色
Cyclicase	1	10 µL	淡紫色
Fragmentation Buffer V3	1	17 µL	橙色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	6 µL	橙色
1× TE	1	800 µL	橙色
Ligation Mix	1	72 µL	蓝色
Ligation booster	1	4 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix V3	1	60 µL	白色
Indexing Primer Mix 1(ATCACGTT)	1	30 µL	白色
Indexing Primer Mix 2(CGATGTTT)	1	30 µL	白色

Box 2: SCOPE-Chip SD & FL 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	
FL Barcoding Beads SD	1	1.8 mL	黑色
Wash Buffer A	1	7 mL	白色
Wash Buffer B	1	1.8 mL	白色
SCOPE-Chip SD	2	—	—
Singleron Magnetic Rack	1	—	—

Box 3: Full Length Immunoreceptor BCR Enrichment Set/S

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	
HiFi PCR PreMix	1	30 µL	淡绿色
MP Master mix	2	60 µL	淡绿色
Rab B cell Mix 1	1	10 µL	淡绿色
Rab B cell Mix 2	1	10 µL	淡绿色
FL Mix 3	1	10 µL	淡绿色
Fragmentation Buffer V3	1	17 µL	橘色
Fragmentation Enzyme Mix V3	1	6 µL	橘色
1× TE	1	800 µL	橘色
Ligation Mix	1	72 µL	蓝色
Ligation booster	1	4 µL	蓝色
Adaptor	1	50 µL	蓝色
Library Amp Mix V3	1	60 µL	白色
TE Adapter Mix1 (TAAGGCGA)	1	30 µL	白色
TE Adapter Mix2 (CGTACTAG)	1	30 µL	白色

注意:

- 按照各自的保存温度存放试剂。
- Barcoding Beads 禁止保存在低于 0℃的环境，避免结冰。

2. 自备仪器耗材试剂

通用试剂耗材

- 无水乙醇
- 无核酸酶水
- 1.5 mL 或 2 mL 无核酸低吸附离心管
- 15 mL 和 50 mL 锥形离心管
- 巴氏吸管
- 1mg 精度的电子秤
- 不同量程单通道移液器
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 小型离心机
- 涡旋混匀仪
- DynaMag™-2 磁力架/12321D/Thermo 或其他兼容 1.5mL 离心管的磁力架

单细胞悬液制备和芯片加载 (Pre-PCR)

- RNase Away 或其他同类产品
- 不同规格无菌&无核酸酶吸头
- 兼容 15 mL 和 50 mL 锥形离心管的高速冷冻离心机
- 40 μ m 细胞过滤网
- 医用眼科钳(10 厘米)和医用眼科剪刀
- 倒置显微镜
- 血球计数板
- 1×PBS (不含 Ca^{2+} Mg^{2+})
- 0.4%台盼蓝染液
- 10 % Tween-20

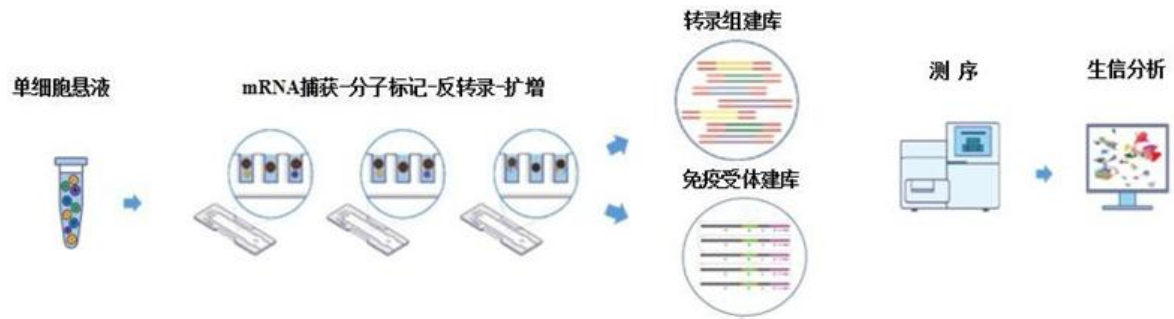
cDNA 扩增和文库构建 (Post-PCR)

- 恒温振荡金属浴

- PCR 仪
- 全自动核酸片段分析仪，如 Agilent Fragment Analyzer 5200
- Qubit 4.0 荧光定量仪
- 0.6mL PCR 透明薄壁管（Qubit 定量，推荐 Axygen）
- AMPure XP 纯化磁珠（Beckman）
- 10mM Tris-HCl pH 8.5 或 Elution Buffer
- 0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管或 PCR 管

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
注入细胞	1h	Stop, $-80^{\circ}\text{C} \leq 48\text{h}$
注入 FL Barcoding Beads		
mRNA 捕获		
反转录&扩增	3-4h	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	9h	Stop, $-20^{\circ}\text{C} \leq 30\text{days}$
全流程时长	16-17h	

表 1: 工作流程和操作时间

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”。这些步骤包括细胞提取、单细胞分离和 mRNA 捕获、反转录。对于 RNA 相关的工作，用 RNase Away(或同类产品) 清洁所有工作表面和移液器。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。

4.1 准备 Lysis Buffer 和 FL Barcoding Beads

准备材料：

- Lysis Buffer, Stock (绿色) ；
- 100 mM DTT (绿色) ；
- RNase Inhibitor (绿色) ；
- FL Barcoding Beads SD (黑色) 。

自备材料：

- 1×PBS 缓冲液；
- 不同量程单通道移液器；
- 1.5 mL 离心管；
- DynaMag™-2 磁力架。

1. 体系配置：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 FL Barcoding Beads：将 FL Barcoding Beads 用移液器（1mL 量程）轻柔吹打 15 次混匀后，吸取 900 μL FL Barcoding Beads（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；

- 取下离心管，用 PBS 重悬定容至 60 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 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

4.2 细胞和微流控芯片准备

准备材料：

- 微流控芯片；
- 细胞悬液。

自备材料：

- PBS 缓冲液；
- 10% Tween-20；
- 无水乙醇；
- 不同量程单通道移液器；
- 15cm X 15cm 培养皿。

- 按下表配制 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

- 按照目标捕获细胞数投入适量细胞，如下表：用预冷的 PBS 将细胞悬液稀释至 $1.5 \times 10^5 - 5.0 \times 10^5$ cells/mL 即可用于芯片实验。

目标细胞数	建议细胞浓度
3000-5000	$(1.5-2.0) \times 10^5$ cells/mL
5000-7000	$(2.0-2.5) \times 10^5$ cells/mL
7000-9000	$(2.5-3.0) \times 10^5$ cells/mL
9000-10000	$(3.0-3.5) \times 10^5$ 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. 将微流控芯片置于干净的培养皿上，用 200 μ L 的移液器吸取 200 μ L 无水乙醇从进样口注入芯片，时间控制在 10s，可使用移液器在芯片中来回抽吸无水乙醇直至芯片中不再出现气泡，及时移除出样口处液体。
5. 重复步骤 4 的冲洗过程 2-3 次（重复时不用反复抽吸）。
6. 移除出样口处液体后，吸取 200 μ L 0.02% PBST（PBS 中包含 0.02% Tween-20）从进样口处注入芯片，时间控制在 10s 以内，及时移除出样口处液体（不用反复抽吸），重复此步骤冲洗过程 2 次后，及时移除出样口液体。

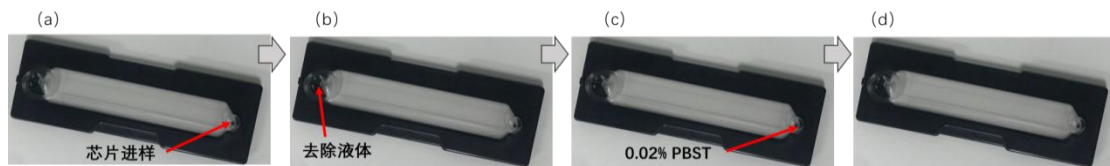


图 2 微流芯片准备前处理

4.3 loading 细胞

1. 移除进出样口多余液体，加 200 μ L PBS 润洗芯片（注入时间控制在 10s 以内），然后移除出样口及进样口多余液体，重复润洗 1 次。
2. 吸取 100 μ L 重悬好的细胞，缓慢匀速（约 30s）注入芯片，立即移除出样口多余液体。
3. 静置 5min 使细胞落入微孔内，静置期间可在显微镜下观察细胞落入微孔情况。
4. 待细胞落入微孔内，吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速（约 30s）注入芯片冲洗掉多余细胞，立即移除进出样口液体。
5. 重复 1 次步骤 4，冲洗掉留在表面未落入微孔内的细胞。

注：在显微镜下观察表面黏附的多余细胞是否去除干净，若还有残留，可继续加 PBS 冲洗（冲洗时应缓慢匀速）。

6. （选做）在显微镜下拍照计数各视野的细胞数，记录数据。

4.4 loading FL Barcoding Beads

1. 吸取 60 μ L 重悬好的 FL Barcoding Beads，缓慢匀速（约 30s）加入进样口，将 FL Barcoding Beads 注入芯片。
2. 多次吸取 100 μ L PBS，缓慢匀速（约 30s）加入进样口，使 FL Barcoding Beads 缓慢流动，并及时吸取出样口 FL Barcoding Beads，直至达到芯片的另一端，在此期间收集进出样口的多余 FL Barcoding Beads。
3. 吸取 200 μ L PBS 缓慢匀速注入芯片（约 30s），吸去进出样口多余液体。
4. 重复 1-3 次步骤 3，至冲洗掉多余的 FL Barcoding Beads。

注：①在显微镜下观察多余 FL Barcoding Beads 是否去除干净，若还有残留，继续加 PBS 冲洗。②在没有确定达到要求以前，进出样两端的 FL Barcoding Beads 都应回收。

5. 显微镜下观察 FL Barcoding Beads 掉入孔中的情况，若芯片进口端 FL Barcoding Beads 空缺较多，可将回收的 FL Barcoding Beads 置于磁力架上，吸除上清液提高 beads 密度后再次注入到 beads 空缺处，静置 10 s 后再冲洗；同理，若芯片出口端 FL Barcoding Beads 空缺较多，可将回收的 FL Barcoding Beads 注入到出口槽处，用移液器从进口端将 beads 吸入空缺处，静置 10 s 后再冲洗。

注：推液体时要保证芯片两端口处有适量的 PBS 以防止气泡进入芯片。

4.5 loading Lysis Buffer

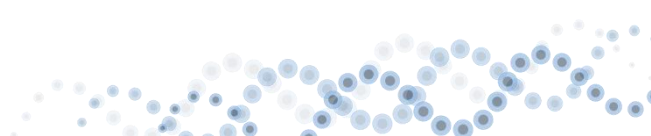
1. 吸取 100 μ L Lysis Buffer 从进样口缓慢注入芯片，时间约 30 s，立即移除进出样口多余液体。

注：Lysis Buffer 较为粘稠且容易产生气泡，加样时需留意勿将气泡注入芯片。

4.6 细胞裂解&mRNA 捕获

1. 室温静置 15 min 用于裂解细胞并释放 mRNA，让 FL Barcoding Beads 捕获 mRNA。

注：完成捕获后可直接进行下一步反转录，也可将芯片放置在 -80°C 保存 1 天。 -80°C 保存后，若欲进行下一步取出 FL Barcoding Beads 的操作，需将芯片取出，室温平衡静置 2-5min，待芯片内试剂恢复液体状态即可。



4.7 取出 FL Barcoding Beads

1. 提前取 1.5 mL 离心管和 Wash Buffer A，标记后置于冰上备用。
2. 保持 Singleron Magnetic Rack 置于芯片底部，用 200 μ L 预冷的 Wash Buffer A 加入到出样口凹槽，快速润洗出样口凹面，润洗完毕后立即移除液体，重复润洗 3 次。
3. 用 200 μ L 预冷的 Wash buffer A 加入出样口，将 Singleron Magnetic Rack 转移置于芯片顶部，静置 1min，保持 Singleron Magnetic Rack 在芯片顶部，将 200 μ L 移液器吸头插入进样口，吸取 200 μ L 液体，收集到的含有 FL Barcoding Beads 的液体转移至预冷的 1.5mL 离心管内，每次转移液体后都应及时合上 1.5mL 离心管管盖。
4. 重复 2 次步骤 3，收集捕获到 mRNA 的全部 FL Barcoding Beads。

注：在显微镜下观察，若孔内剩余 *FL Barcoding Beads* 很多，可重复操作步骤，直至 95%以上的 *FL Barcoding Beads* 被取出。

5. 反转录 cDNA 扩增

5.1 反转录

准备材料：

- RT master Mix (紫色) ;
- TS primer (紫色) ;
- Reverse Transcriptase (紫色) ;
- RNase Inhibitor (绿色) ;
- Wash Buffer A (白色) ;
- Wash Buffer B (白色) ;
- 回收的 FL Barcoding Beads (来自 4.7) 。

自备材料：

- Nuclease-free Water;
- 恒温震荡金属浴;
- 涡旋仪;
- 不同量程单通道移液器;
- 1.5mL 离心管;
- DynaMag™-2 磁力架。

注意

(1) 为防止 RNA 降解，实验开始前用 RNase away 喷洒实验台，5min 后擦干。

(2) 恒温震荡金属浴提前预热，并保持在 42℃

1. 体系配制：提前室温解冻“RT master Mix”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。

- 将 4.7 步骤的装有 FL Barcoding Beads 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 预冷的 Wash Buffer A，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。
- 从磁力架上取下离心管，加入 500 μ L 预冷的 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。
- 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 FL Barcoding Beads。
- 迅速取下离心管，加入 200 μ L 配好的 RT Mix，并涡旋混匀。
- 置于提前设置好的金属浴中，42℃，转速 1300 rpm，反应 90min（提前预热）。

注：42℃反应 90min 后，若无法立即进行下一步，将反转录产物 70℃（关闭振荡）灭活 15min 后可室温放置 15h（可在金属浴上过夜）。

5.2 PCR 扩增

准备材料：

- Amplification Master Mix（透明）；
- G Primer Mix（淡紫色）；
- Amplification Enzyme（透明）；
- 反转录产物（来自 5.1）。

自备材料：

- Nuclease-free Water;
- PCR 仪;
- 不同量程单通道移液器;
- 1.5mL 离心管;
- 八联排管;
- DynaMag™-2 磁力架。

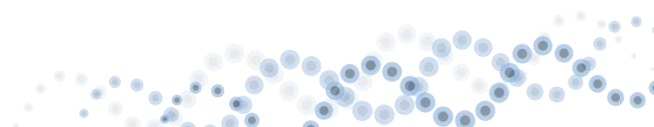
1. 体系配制：提前室温解冻 “Amplification Master Mix”，“G Primer Mix”，涡旋离心然后置于冰上，按照如下表格在冰上配制 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	1 RXN (μL) $\times 1$	2 RXNs (μL) $\times 2.2$
Amplification Master Mix	172	378.4
G Primer Mix	3.2	7
Amplification Enzyme	8	17.6
Nuclease-free Water	216.8	477
Total	400	880

2. 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。
3. 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 50 μL 。
4. 盖好八联排管管盖，置于 PCR 仪中进行扩增，设置热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ，反应体积 50 μL ，PCR 程序见下表。

步骤	温度	运行时间
1	95 $^{\circ}\text{C}$	0:03:00
2 cycle=4	98 $^{\circ}\text{C}$	0:00:20
	65 $^{\circ}\text{C}$	0:00:45
	72 $^{\circ}\text{C}$	0:03:00
	98 $^{\circ}\text{C}$	0:00:20
3 cycle=10	67 $^{\circ}\text{C}$	0:00:20
	72 $^{\circ}\text{C}$	0:03:00
	72 $^{\circ}\text{C}$	0:05:00
4	72 $^{\circ}\text{C}$	0:05:00
5	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

注：PCR 程序运行结束后，可将扩增产物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 48h 和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存一周，或者直接进行 cDNA 扩增纯化。



5.3 产物纯化

准备材料：

- PCR 扩增产物（来自 5.2）。

自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新配制的 80% 乙醇；
- Elution Buffer；
- 不同量程单通道移液器；
- 1.5mL 离心管；DynaMag™-2 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。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 $0.6 \times 400 = 240\mu$ L 纯化磁珠）。
2. 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。

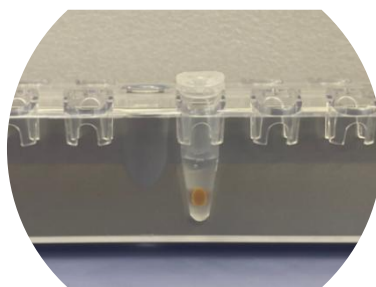


图 3 AMPure Beads 在磁力架上吸附示意图

3. 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。

4. 重复步骤 3，共计漂洗 2 次。
5. 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 5min。
6. 取下离心管，加入 20 μ L Elution Buffer，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。
7. 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。

注：将样品于 4℃可保存 72h，在 -20℃可保存 3 个月，或者可直接进行 cDNA 扩增纯化后的 QC 和定量。

5.4 扩增纯化产物质检

准备材料：

- cDNA 产物（来自 5.3）。

自备材料：

- Qubit 4.0 荧光定量仪及配套试剂；
 - 全自动核酸片段分析仪及配套试剂；
 - 单通道移液器。
1. 取适量（建议 1 μ L）样品进行 cDNA 浓度检测。推荐使用 Qubit 进行 cDNA 浓度检测，具体实验操作参见 *Qubit 荧光定量仪操作与维护规程*。
 2. 取适量（建议 5ng）样品进行 cDNA 片段大小检测。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 *Agilent 片段分析仪使用说明手册*。
 3. 质检结果请参照图 4，合格 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%。

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

注：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”。

4. cDNA 二次纯化操作（选做）

若质检发现 cDNA 300bp 以下片段占比在 10–40% 时，需要进行二次纯化，二次纯化后若 cDNA 满足上表“合格”要求，也可直接建库：

- 1) 将剩余 cDNA 的体积用 NF 水补充到 100 μ L；
- 2) 按照如下表格的推荐纯化磁珠的比例加入纯化磁珠；

40bp–300bp 占比	纯化磁珠比例
10%–20%	0.8 $\times$
20%–35%	0.7 $\times$
>35%	0.6 $\times$

*cDNA 总量低于 40ng、小片段占比>40%的，0.7 $\times$ 纯化； cDNA 二次纯化比例不能低于 0.6 $\times$ 。

- 3) 其余操作方式与 5.3 相同，最终用 15 μ L 的 Elution Buffer 洗脱 cDNA。
- 4) 二次纯化后一般只需要测定 Qubit 值，不再需要核酸片段的质检。

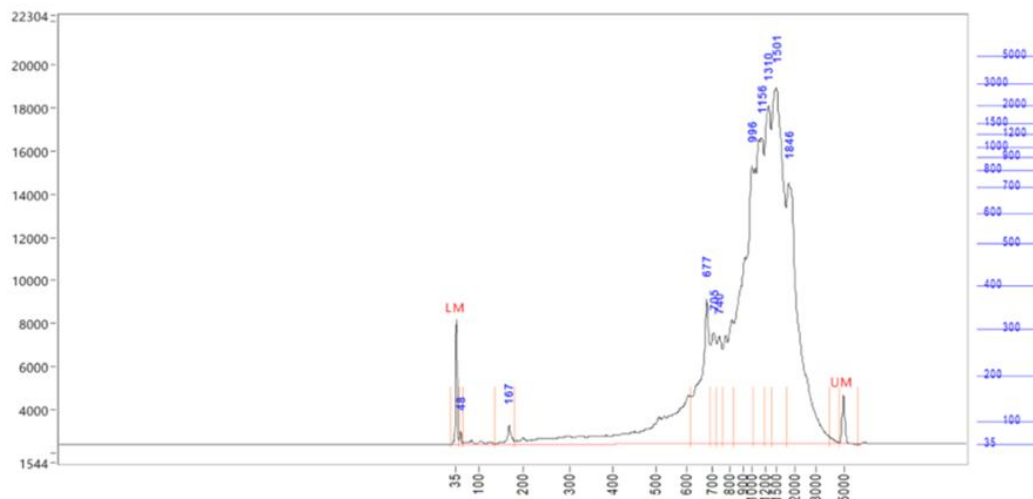


图 4 cDNA 质检图

6. 转录组文库构建

6.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 (橙色)；
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色)；
- 1×TE (橙色)；
- cDNA 产物 (来自 5.3)。

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 PCR 程序，反应体积 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75℃。

步骤	温度	运行时间
1	37℃	0:10:00
2	65℃	0:30:00
3	4℃	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；使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡后，置于冰上备用。

3. 将灭菌的 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系：

组分	体积 (μ L)
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
cDNA (质检合格 Step 5.3 产物)	Variable (10ng/50ng)
1×TE	Variable
Total	35

注：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。建议 cDNA 预留二次建库的量。

4. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬离后将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行 PCR 程序。
5. 完成反应后立即进行下一步接头连接。

6.2 接头连接

准备材料：

- Ligation Mix (蓝色)；
- Ligation booster (蓝色)；
- Adaptor (蓝色)；
- 片段化产物 (来自 6.1)。

自备材料：

- PCR 仪；
 - 不同量程单通道移液器。
1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体系 70 μ L，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。

步骤	温度	运行时间
1	20℃	0:15:00
2	4℃	Hold

2. 室温解冻 Adaptor，涡旋混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 和 Ligation booster 涡旋 10s 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)。
3. 将上一步反应的 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系：

组分	体积 (μ L)
片段化产物 (Step6.1 产物)	35
Ligation Mix	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

4. 涡旋混匀并瞬离，将反应管置于 PCR 仪中。

6.3 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）；
- 接头连接产物（来自 6.2）。

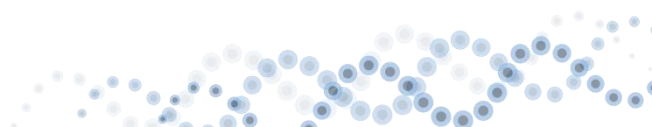
自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 不同量程单通道移液器；
- 无菌 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

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 0.2×产物总体积。例如：片段化产物体积为 68.5μL，则应使用 0.2 × 68.5=13.7μL AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。
2. 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菌 PCR 管中，暂时留存。
3. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 200μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
4. 重复步骤 3，总计漂洗 2 次。
5. 从磁力架上取下纯化磁珠所在 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）。
6. 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 17μL 0.1×TE，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。



7. 将纯化磁珠所在 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-20℃保存一周。

6.4 PCR 富集

准备材料：

- Library Amp Mix V3（白色）；
- Indexing Primer Mix（白色）；
- 接头连接后纯化产物（来自 6.3）。

自备材料：

- PCR 仪；
- 不同量程单通道移液器。

1. 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（Step6.3 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 程序，并使 PCR 仪热盖保持在 105℃，反应体积 50 μ L。

步骤	温度	运行时间
1	98℃	0:00:30
2（循环数参见下表）	98℃	0:00:10
	65℃	0:01:15
3	65℃	0:05:00
4	4℃	Hold

扩增循环数需按 cDNA 投入量进行选择，选择要求如下：

投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

6.5 扩增产物片段分选

准备材料：

- PCR 富集产物（来自 6.4）。

自备材料：

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

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. 纯化磁珠提前 30min 从 4℃中取出，恢复室温备用。将 6.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，并用 Nuclease-free Water 水补齐至 50μL。涡旋混匀磁珠，取 25μL 磁珠加入到 PCR 产物中，盖上 PCR 管盖，涡旋混匀并瞬时离心，室温孵育 5min。
2. 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。
3. 涡旋振荡混匀磁珠并吸取 7.5μL 加入至上清液 PCR 管中，涡旋振荡充分混匀，室温孵育 5min。
4. 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。

5. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 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。
6. 重复步骤 5，总计漂洗 2 次。
7. 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）。
8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Elution Buffer 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
9. 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）小心吸取上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中，该产物即为转录组文库。

注意：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃可以保存三个月。

6.6 文库质检

准备材料：

- 片段分选产物（来自 6.5）

自备材料：

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂;
 - Qubit 4.0 荧光定量仪及配套试剂;
 - 单通道移液器
1. 取适量（建议 1 μ L）样品进行浓度检测。推荐使用 Qubit 进行浓度检测，具体实验操作参见 Qubit 荧光定量仪操作与维护规程。
 2. 取适量（建议 5ng）样品进行片段大小检测。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 *Agilent 片段分析仪使用说明手册*。
 3. 质检图参照图 5，主峰片段范围须在 400bp-700bp 之间，900bp-5000bp 占比<10%。若存在 200bp 左右小尖峰凸起，可 0.8 $\times$ 纯化后建库送测。

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

4. 质检合格的文库,可直接送测序,也可置于-20℃冰箱保存 30 天,如文库没有直接送测,送测前需再进行一次质检。

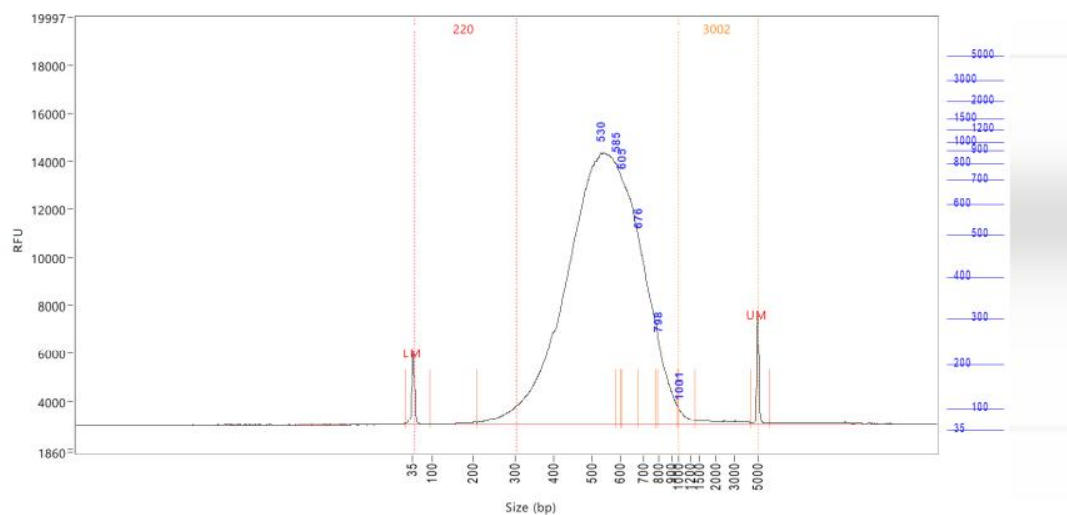


图 5 文库质检图

7. 环化

7.1 cDNA 环化

准备材料：

- cDNA (来自 5.3)；
- Circle master mix (淡紫色)。

自备耗材：

- 涡旋仪；
- 掌上离心机。

1. 取 200ng cDNA 产物，PCR 管置于冰上按照如下表格配制环化 mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	体积 (μL)
Circle master mix	10
cDNA (200ng)	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

注：1) 建议保留 10–20ng cDNA，预防实验失败，可通过 cDNA 的再扩增重复整个实验流程。（再扩增方法可参考附录 B）

2) 若转录组得率低于 200ng，则留足建库及预留 cDNA 的量，剩余 cDNA 全部投入环化体系中，最低环化投入量不得低于 150ng，若低于 150ng，解决方法可参考附录 B。

2. 使用移液器轻柔充分混匀，短暂离心后将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖 85℃：

热盖温度 85℃		
步骤	温度	运行时间
1	50℃	1:00:00
2	75℃	0:10:00
3	4℃	Hold

7.2 酶切

准备材料：

- 环化产物（来自 7.1）；
- Cyclicase（淡紫色）。

自备耗材：

- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达；
- AMPure XP 纯化磁珠；
- 涡旋仪；
- 掌上离心机。

1. 环化后产物不纯化，加入 Cyclicase 进行酶切。将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制酶切体系。

组分	体积（ μL ）
上一步环化产物	50
Cyclicase	0.5
Total	50.5

2. 使用移液器轻柔充分混匀，短暂离心后将反应管置于 PCR 仪中，PCR 仪根据下表设置并运行反应，PCR 仪热盖关闭：

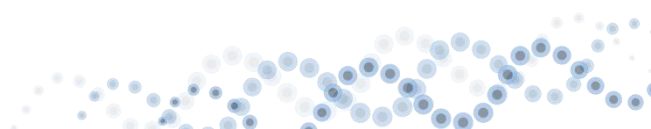
热盖温度：关闭		
步骤	温度	运行时间
1	37℃	30:00
2	4℃	Hold

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 1.3x 体积的纯化磁珠（例如：产物总体积为 50 μL ，则加入 $50 \times 1.3 = 65 \mu\text{L}$ 纯化磁珠），涡旋混匀后，室温孵育 5 min，短暂离心，置于磁力架上静置 5 min；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 30 s, 小心移除上清。
- 3) 重复步骤 2, 共计漂洗两次。
- 4) 取下 PCR 管, 短暂离心, 再次置于磁力架上, 吸去多余酒精, 晾干约 2min (不超过 5min)。
- 5) 取下 PCR 管, 加入 20 μ L Nuclease-free Water, 涡旋混匀磁珠, 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, 无需定量。

注意: 此步骤结束后可以将样品于-20℃可以保存 24h。

8. 全长免疫受体（BCR）富集

8.1 全长免疫受体（BCR）第一轮富集

准备材料：

- MP master Mix (淡绿色) ；
- Rab B cell Mix1 (淡绿色) ；
- 酶切产物 (来自 7.2) 。

自备耗材：

- PCR 管；
- Nuclease-free water；
- Buffer EB；
- AMPure XP 磁珠；
- 80%乙醇；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

1. 取 10 μ L step 7.2 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	体积 (μ L)
MP master mix	25
Rab B cell Mix1	3.4
Nuclease-free Water	Variable
Step 7.2 产物	10
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀并短暂离心，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	运行时间
1	95 $^{\circ}$ C	0:15:00
2 10 cycles	94 $^{\circ}$ C	0:00:30
	60 $^{\circ}$ C	0:01:30
	72 $^{\circ}$ C	0:01:30
	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，计算产物体积。加入 0.6x 纯化磁珠（例如产物体积为 50 μ L，则加入 $50 \times 0.6 = 30\mu\text{L}$ ）。
- 2) 涡旋混匀后，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。
- 3) 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。
- 4) 重复 步骤 3，共计漂洗 2 次。
- 5) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，吸去多余酒精，晾干磁珠约 2min（不超过 5min）。
- 6) 取下 PCR 管，加入 20 μ L Buffer EB（或 Nuclease-free water），涡旋混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 7) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为纯化产物。

注意：此步骤结束后可以将样品于 4℃ 可保存 72h 或在 -20℃ 保存 3 个月。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测。推荐使用 Qubit 进行浓度检测，具体实验操作参见 Qubit 荧光定量仪操作与维护规程。

8.2 全长免疫受体（BCR）第二轮富集

准备材料：

- MP master Mix（淡绿色）；
- Rab B cell Mix2（淡绿色）；
- BCR 第一轮富集产物（来自 8.1）。

自备耗材：

- PCR 管；

- Nuclease-free water;
- Buffer EB;
- AMPure XP 磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

1. 取 20ng Step 8.1 产物, 若一轮产物不足 20ng 则产物全部投入二轮富集体系, 将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第二轮富集 PCR mix。

组分	体积 (μL)
MP master mix	25
Rab B cell Mix2	3.5
Nuclease-free Water	variable
Step 9.1 产物 (20 ng)	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℃:

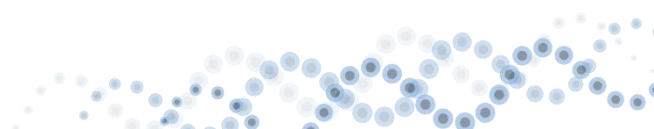
步骤	温度	运行时间
1	95℃	0:15:00
2 10 cycles	94℃	0:00:30
	60℃	0:01:30
	72℃	0:01:30
	72℃	0:10:00
3	72℃	0:10:00
4	4℃	Hold

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 管瞬离, 量取 PCR 产物体积, 加入 0.6x 纯化磁珠 (例如产物体积为 50μL, 则加入 $50 \times 0.6 = 30\mu\text{L}$), 涡旋振荡或使用移液器吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。



- 2) 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 5 min), 小心转移上清至一个新有无菌 PCR 管中。
- 3) 保持 PCR 管始终处于磁力架上, 加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30 s, 小心移除上清。
- 4) 重复 步骤 3, 总计漂洗 2 次。
- 5) 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, 晾干磁珠约 2min (不超过 5min)。
- 6) 将 PCR 管从磁力架上取出, 加入 20 μ L Buffer EB (或 Nuclease-free water) 洗脱。涡旋混匀磁珠, 室温孵育 5 min。
- 7) 吸取上清并转移至新的 EP 管中, 即为纯化产物。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取适量 (建议 1 μ L) 样品进行浓度检测。推荐使用 Qubit 进行浓度检测, 具体实验操作参见 *Qubit 荧光定量仪操作与维护规程*。
- 2) 取适量 (建议 5ng) 样品进行片段大小检测。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测, 具体实验操作参见 *Agilent 片段分析仪使用说明手册*。
- 3) 质检结果请参照图 6, 显示一条特异条带, 在 700bp 左右。

注意: 样品浓度过高时需要将样品稀释到 3-5 ng/ μ L, 防止浓度过高, 影响质检结果。

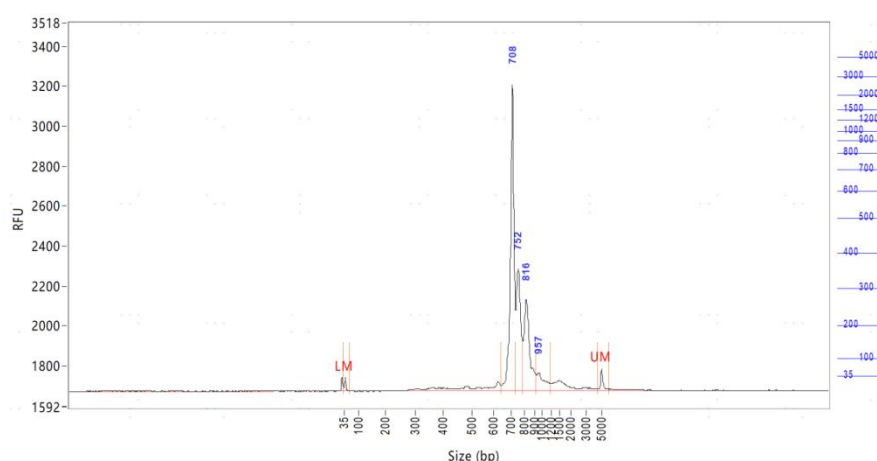


图 6 全长 BCR 二轮富集产物质检图

8.3 全长免疫受体（BCR）第三轮富集

实验材料：

- HiFi PCR PreMix（淡绿色）；
- FL Mix3（淡绿色）；
- BCR 第二轮富集产物（来自 8.2）。

自备耗材：

- PCR 管；
- Nuclease-free water；
- Buffer EB；
- AMPure XP 磁珠；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

1. 取 20ng 第二轮富集产物，将 PCR 管置于冰上按照如下表格配制第三轮富集 PCR mix，涡旋混匀并短暂离心。

组分	体积（ μL ）
HiFi PCR PreMix	12.5
FL Mix3	3
第二轮富集产物（20 ng）	Variable
Nuclease-free Water	Variable
Total	50

2. 使用涡旋仪轻柔充分混匀并短暂离心，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	运行时间
1	98℃	0:03:00
2 cycle=6	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 管瞬离，量取 PCR 产物体积，加入 0.6x 纯化磁珠（例如产物体积为 50 μ L，则加入 50 $\times$ 0.6 = 30 μ L），涡旋振荡或使用移液器吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 2) 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 5 min)，小心转移上清至一个新有无菌 PCR 管中。
- 3) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠。室温孵育 30 s，小心移除上清。
- 4) 重复 步骤 3，总计漂洗 2 次。
- 5) 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，晾干磁珠约 2min（不超过 5min）。
- 6) 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB（或 Nuclease-free water）洗脱。涡旋混匀磁珠，室温孵育 5 min。
- 7) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为纯化产物。

4. 扩增纯化产物质检

- 1) 取适量（建议 1 μ L）样品进行浓度检测。推荐使用 Qubit 进行浓度检测，具体实验操作参见 *Qubit 荧光定量仪操作与维护规程*。
- 2) 取适量（建议 5ng）样品进行片段大小检测。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 *Agilent 片段分析仪使用说明手册*。
- 3) 质检结果请参照图 7，显示一条特异条带，在 750bp 左右。

注意：样品浓度过高时需要将样品稀释到 3–5 ng/ μ L，防止浓度过高，影响质检结果。

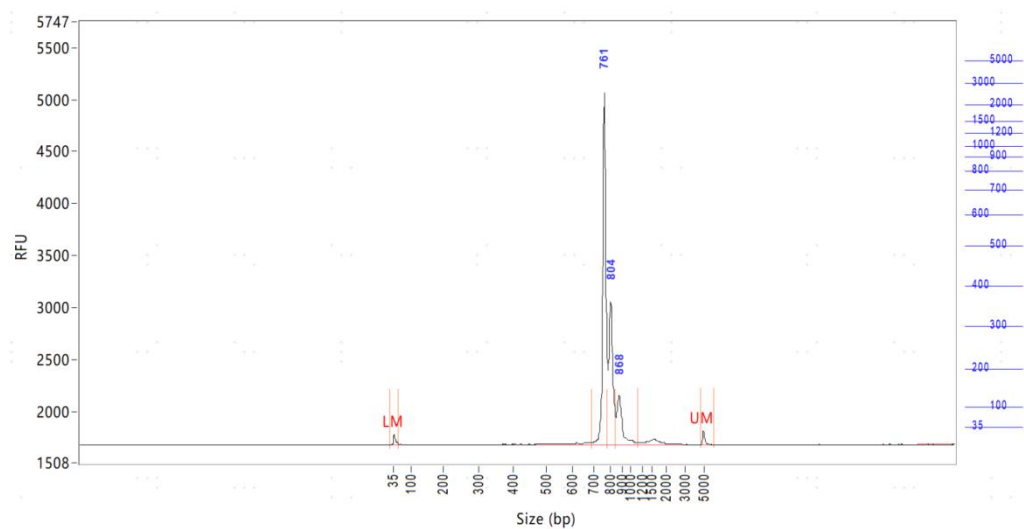


图 7 全长 BCR 第三轮富集产物质检图

9. 全长免疫受体富集文库构建

9.1 片段化

准备材料：

- Fragmentation Buffer V3 (橙色)；
- Fragmentation Enzyme Mix V3 (橙色)；
- 1x TE (橙色)；
- Step 8.3 产物。

自备耗材：

- 0.2 mL PCR 管。

1. 提前按照下表设置 PCR 程序，反应体积 35 μ L，并使 PCR 仪热盖保持在 75 $^{\circ}$ C。

步骤	温度	运行时间
1	37 $^{\circ}$ C	0:10:00
2	65 $^{\circ}$ C	0:30:00
3	4 $^{\circ}$ C	Hold

2. 室温解冻 Fragmentation Buffer V3 和 1 $\times$ TE，确保完全融化，涡旋混匀并短暂离心后冰上备用；使用前将 Fragmentation Enzyme Mix V3 涡旋振荡后，置于冰上备用。
3. 将灭菌的 PCR 管置于冰上，配置如下反应体系：

组分	体积 (μ L)
Fragmentation Buffer V3	7
Fragmentation Enzyme Mix V3	2
富集产物 (质检合格 Step 8.3 产物)	Variable (10ng/50ng)
1 $\times$ TE	Variable
Total	35

注意：1) 富集产物总量在 10–50ng 时，选择 10ng 投入量进行建库。

2) 富集产物总量在 50ng 以上时，选择 50ng 投入量进行建库。

3) 建议 Step 8.3 产物预留二次建库的量。

4. 用移液器轻柔吹打充分混匀，瞬离后将 PCR 管置于 PCR 仪中。
5. 完成反应后立即进行下一步接头连接。

9.2 接头连接

实验材料:

- Adaptor (蓝色) ;
- Ligation booster (蓝色) ;
- Ligation Mix (蓝色) ;
- Step 9.1 产物。

自备耗材:

- 0.2 mL PCR 管。

- 提前按照下表设置 PCR 程序, 反应体系 70 μ L, 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。

步骤	温度	运行时间
1	20 $^{\circ}$ C	0:15:00
2	4 $^{\circ}$ C	Hold

- 提前室温解冻 Adaptor, 涡旋 10s 混匀后冰上备用。使用前将 Ligation Mix 和 Ligation booster 涡旋 10s 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, 配置如下反应体系:

组分	体积 (μ L)
片段化产物(Step9.1 产物)	35
Ligation Mix	30
Ligation booster	1
Adaptor	2.5
Total	68.5

- 使用移液器轻柔吹打 15 次以上混匀并瞬离。将反应管置于 PCR 仪中。

9.3 接头连接后产物纯化

准备材料:

- 0.1 $\times$ TE (使用 Nuclease-free Water 按 1:9 稀释 1 $\times$ TE) ;
- 接头连接产物 (来自 9.2) 。

自备材料：

- AMPure XP 纯化磁珠；
- 新鲜配制的 80%乙醇；
- 不同量程单通道移液器；
- 无菌 PCR 管；
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

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 $0.2 \times$ 产物总体积。例如：片段化产物体积为 $68.5\mu\text{L}$ ，则应使用 $0.2 \times 68.5 = 13.7\mu\text{L}$ AMPure XP 纯化磁珠，室温孵育 5min。
2. 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菌 PCR 管中，暂时留存。
3. 保持 PCR 管置于磁力架上，用 $200\mu\text{L}$ 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
4. 重复 步骤 3，总计漂洗 2 次。
5. 从磁力架上取下纯化磁珠所在 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）。
6. 将纯化磁珠所在 PCR 管从磁力架上取下，加入 $17\mu\text{L}$ $0.1 \times \text{TE}$ ，涡旋振荡 15s 混匀磁珠，室温孵育 5min。
7. 将纯化磁珠所在 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 $15\mu\text{L}$ 上清至新的灭菌 PCR 管中用于步骤 9.4 PCR 富集。

注意：此步骤结束后可以将样品于 -20°C 保存一周。

9.4 PCR 富集

实验材料:

- Step 9.3 产物;
- Library Amp Mix V3 (白色);
- TE Adapter Mix (白色)。

自备耗材:

- 0.2 mL PCR 管。
1. 将 PCR 管置于冰上, 配置如下反应体系, 使用移液器轻柔吹打 5 次 (45 μ L 量程) 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 9.3 产物)	15
TE Adapter Mix	10
Library Amp Mix V3	25
Total	50

注: TE Adapter Mix 包括多种, 任意选择一种即可, 一个样本对应一个 TE Adapter Mix。

2. 提前按照下表设置 PCR 程序, 并使 PCR 仪热盖保持在 105 $^{\circ}$ C, 反应体积 50 μ L。

步骤	温度	运行时间
1	98 $^{\circ}$ C	0:00:30
2 (循环数参见下表)	98 $^{\circ}$ C	0:00:10
	65 $^{\circ}$ C	0:01:15
3	65 $^{\circ}$ C	0:05:00
4	4 $^{\circ}$ C	Hold

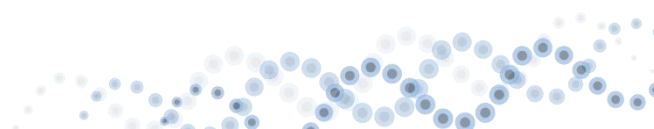
扩增循环数需按富集产物投入量进行选择, 选择要求如下:

投入量	参考循环数
50ng	10
10ng	12

9.5 扩增产物片段分选

准备材料:

- PCR 富集产物 (来自 9.4)



自备材料：

- Buffer EB;
- Nuclease-free Water
- AMPure XP 纯化磁珠;
- 新鲜配制的 80%乙醇;
- 不同量程单通道移液器;
- 无菌 PCR 管;
- 1.5mL 离心管;
- 磁力架/TND08-C-A/深圳拓能达。

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. 纯化磁珠提前 30min 从 4℃中取出，恢复室温备用。将 9.4 产物 PCR 管短暂离心，用移液器测量体积，并用 NF 水补齐至 50μL。涡旋混匀磁珠，取 25μL 磁珠加入到 PCR 产物中，盖上 PCR 管盖，涡旋混匀并瞬时离心，室温孵育 5min。
2. 将 PCR 管短暂离心后置于 0.2mL 规格磁力架上静置，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。
3. 涡旋振荡 15s 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。
4. 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。
5. 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。
6. 重复 步骤 5，总计漂洗 2 次。
7. 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）。

8. 将 PCR 管从磁力架上取出，加入 20 μ L Buffer EB 洗脱。涡旋振荡 15s 混匀纯化磁珠，室温孵育 5min。
9. 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）小心吸取上清至新的灭菌 1.5mL 离心管中，该产物即为免疫组库富集文库。

注意：此步骤结束后可以将样品于-20℃或-80℃可以保存三个月。

9.6 文库质检

准备材料：

- 片段分选产物（来自 9.5）。

自备材料：

- 全自动核酸片段分析仪及配套试剂；
- Qubit 4.0 荧光定量仪及配套试剂；
- 单通道移液器。

1. 取适量（建议 1 μ L）样品进行产物浓度检测。推荐使用 Qubit 进行浓度检测，具体实验操作参见 *Qubit 荧光定量仪操作与维护规程*。
2. 取适量（建议 1 μ L）样品进行产物片段大小检测。推荐使用 Agilent 片段分析仪进行片段大小检测，具体实验操作参见 *Agilent 片段分析仪使用说明手册*。
3. 质检图参照图 8，主峰片段范围须在 500bp-650bp 之间，30bp-400bp 占比<10%，富集文库会出现 800bp 打不断的片段，属于正常现象，特异峰占比应不超过 45%。若存在 200bp 左右小尖峰凸起，可 0.8 $\times$ 纯化后送测。

质控等级	评判标准	对应处理
合格	Qubit 检测总量>100ng, 主峰 500bp-650bp 之间, 30bp-400bp 占比<10%。	建议直接上机测序
风险	Qubit 检测总量在 50-100ng, 主峰 500bp-650bp 之间, 30bp-400bp 占比<10%	可尝试风险上机测序
不合格	Qubit 检测总量<50ng, 无明显主峰	不建议上机测序

4. 质检合格的文库，可直接送测序，也可置于-20℃冰箱保存 30 天，如文库没有直接送测，送测前需再进行一次质检。

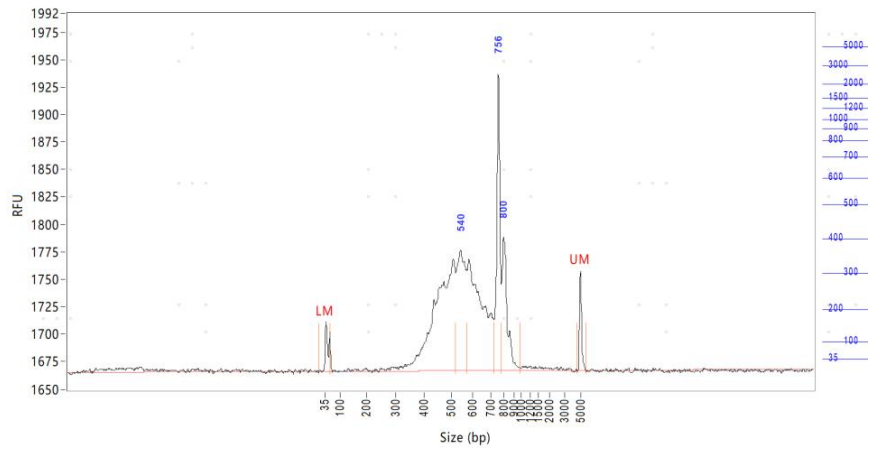


图 8 全长免疫受体富集文库质检图

附录 A 技术原理

利用 SCOPE-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 FL Barcoding Beads 加入到芯片微孔中，确保每个微孔内只落入 1 个 FL Barcoding Beads。细胞裂解后，带有独特细胞标签（Barcode）及分子标签（UMI）的 FL Barcoding Beads 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 FL Barcoding Beads，将 FL Barcoding Beads 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。

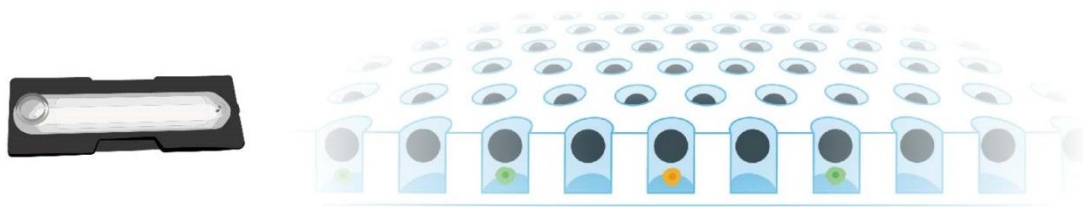


图 A1: SCOPE-Chip 微流控芯片外形（左）及细微结构（右）

A1 单细胞分选、mRNA 捕获、反转录及 PCR 富集

通过进样口将一定数量的细胞注入到 SCOPE-Chip 微流控芯片，根据“泊松分布”的原理完成单个细胞的分离，利用 Single Cell FL Barcoding Beads 完成单个细胞的 mRNA 的捕获和标记。FL Barcoding Beads 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。

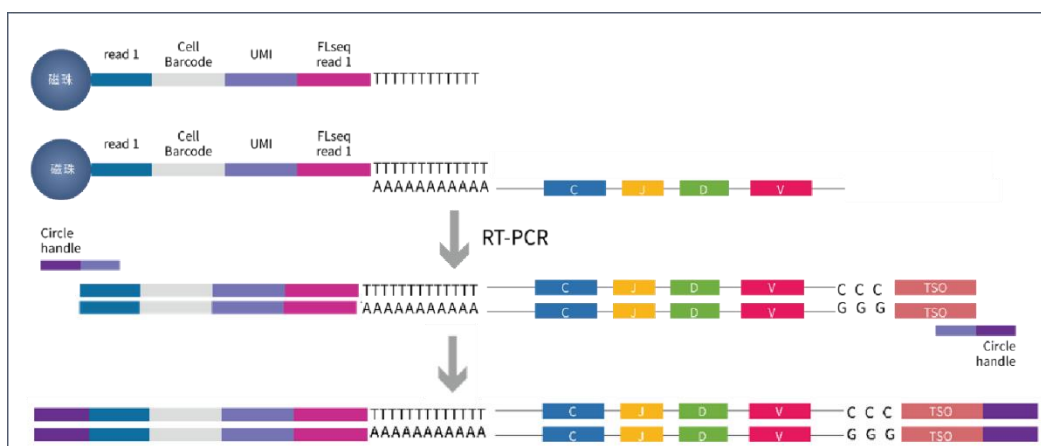


图 A2: 磁珠捕获 mRNA 及反转录原理图

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。

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。

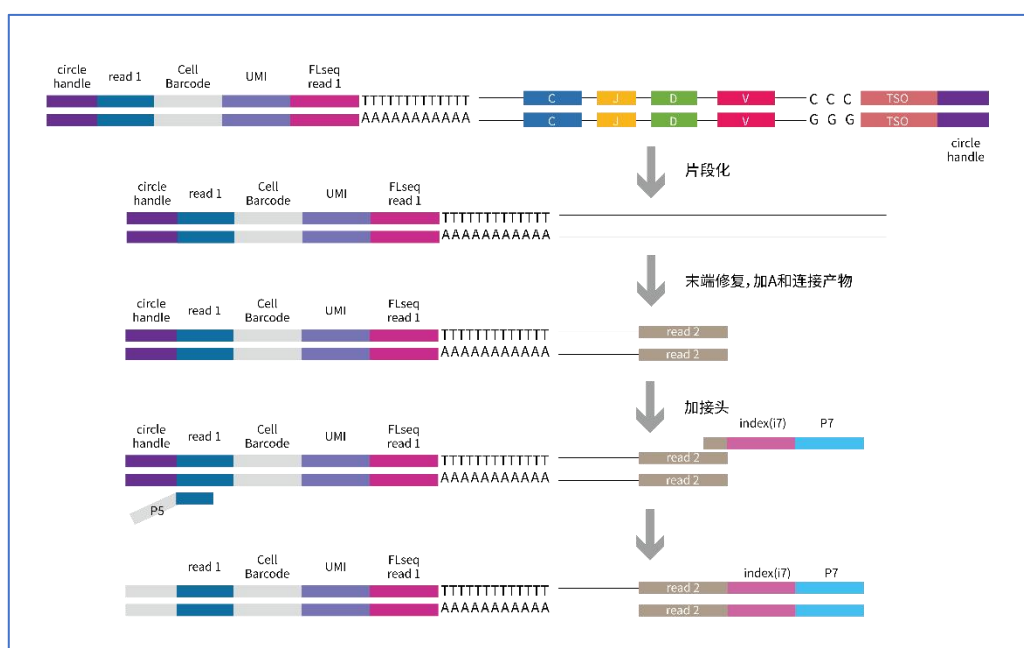


图 A3: 转录组文库构建原理图

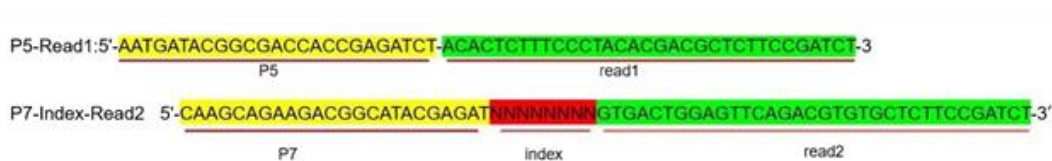


图 A3: 转录组 illumina 文库结构图 (左右两侧序列)

A4 BCR 富集及文库构建

将获得的 cDNA 先环化酶切, 再利用 FL Barcoding Beads 上的 Universal 序列和免疫受体特异性引物 (C 区序列) 进行 PCR 扩增, 完成全长免疫受体富集。取 10ng/50ng 全长免疫受体富集产物进行文库构建。

● 全长免疫受体富集

cDNA环化、线性双链DNA切除及第一轮富集

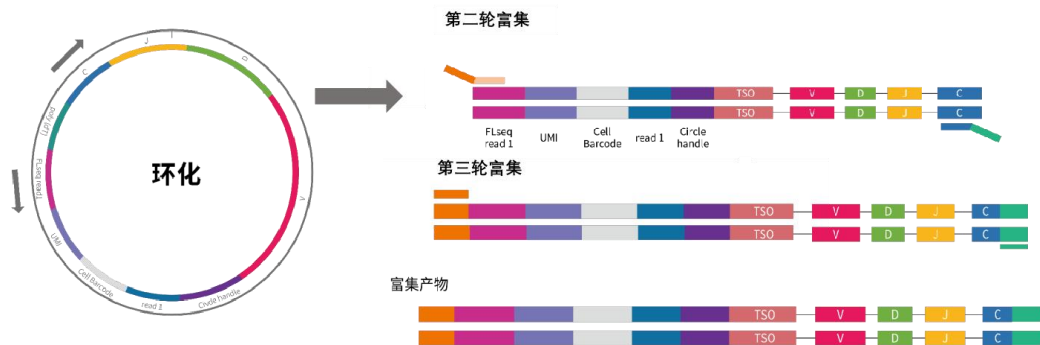
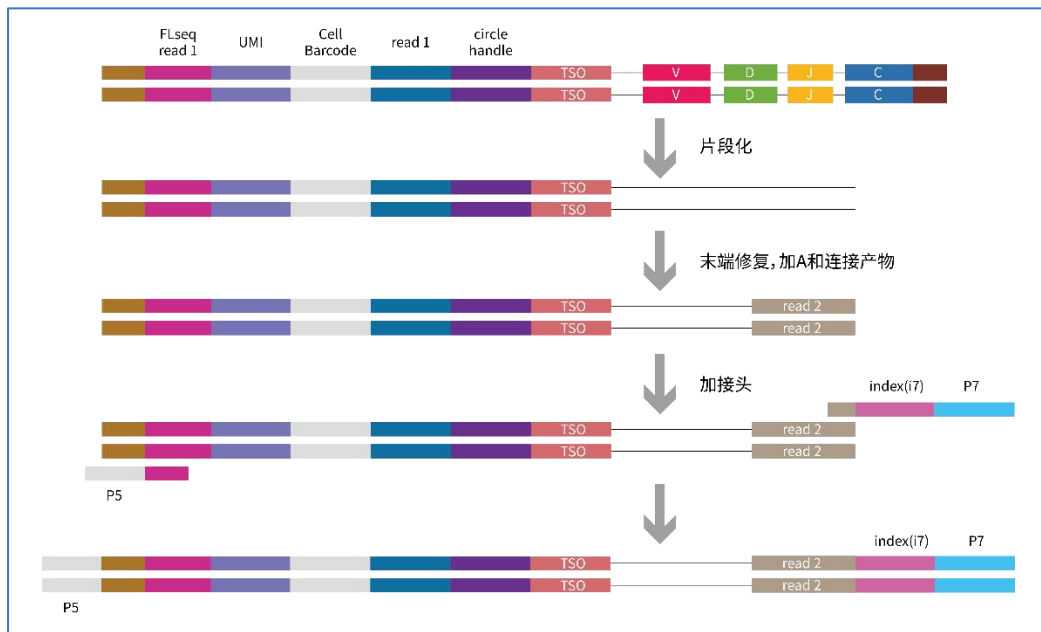


图 A4: BCR 环化

● 全长免疫受体富集文库构建



P5-Read1: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCT-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

P7-Index-Read2: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXX-CTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-3'

图 A5: BCR 富集文库构建

附录 B 纯化后 cDNA 含量少于 150ng 解决方案

若 cDNA 的总量小于 150ng，则可以通过以下步骤进行 cDNA 再扩增。再扩增的 cDNA 对富集结果没有影响。

准备材料：

- Amplification Master Mix;
- G Primer Mix;
- Amplification Enzyme;
- cDNA (来自 5.3 产物)

自备材料：

- Nuclease-free Water;
- PCR 仪;
- 不同量程单通道移液器;
- 1.5mL 离心管;
- 八联排管;
- DynaMag™-2 磁力架

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

组分	体积 (μL)
Amplification Master Mix	86
G Primer Mix	1.6
Cold nuclease-free water	Variable
Amplification Enzyme	4
cDNA (来自 5.3 产物, 20 ng/10 ng)	Variable
Total	200

2. 将 200μL 在扩增 PCR Mix，一边吹打混匀一边分装到 PCR 管中，每管分装液体体积为 50μL。

3. 盖好 PCR 管盖, 置于 PCR 仪中进行扩增, 设置热盖温度 105℃, 反应体积 50μL, PCR 程序见下表。

热盖温度 105℃	反应体系 50μL	
步骤	温度	运行时间
1	95℃	3 min
2 cycles = 6-8	98℃	20 sec
	67℃	20 sec
	72℃	3 min
	72℃	5 min
4	72℃	5 min
5	4℃	Hold

注: 若 cDNA 投入量为 20ng, 则扩增 6 个循环; 若 cDNA 投入量为 10ng, 则扩增 8 个循环。

4. 扩增产物纯化

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) 每反应准备 1 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 200 μL, 则加入 $0.6 \times 200 = 120\mu\text{L}$ 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。
- 4) 保持离心管始终处于磁力架上, 加入 800μL 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 5min。

- 7) 取下离心管，加入 20 μ L Buffer EB，涡旋混匀磁珠 15s 左右，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 8) 吸取上清并转移至新的 1.5mL 离心管中，即为纯化产物。

重要提示: 此步骤结束后可以将样品于 4℃可保存 72h，在 -20℃可保存 3 个月。

5. 再扩增产物 QC (质检方法同 cDNA QC，即步骤 5.4)

附录 C: 生物废弃物分类及处理标准

● 生物废弃物分类及处理目的

规范实验室在生产过程中所产生的危险性废弃物的收集、贮存、处置的行为，加强危险性废弃物的安全管理，防止生物污染，保护环境，保障人员健康。

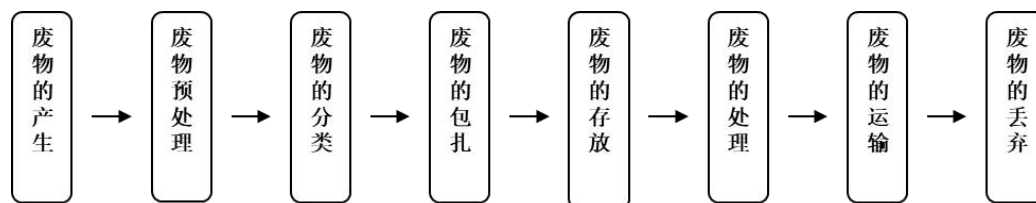


图 C 危险性废弃物管理工作守则流程图

● 生物废弃物分类

样本制备的过程，主要废弃物包含液体生物废弃物(废液槽，以及各个使用后剩余残留的试剂)，以及固体生物废弃物(微流控芯片，连接模块)，一般非生物医疗废弃物，各废弃物分类定义如下，在操作中所产生的废弃物需依照定义分类回收，并依照对应的处理方法进行处理。

凡与危险性废弃物产生有关的人均须接受培训，使其能辨认该类废弃物并作适当分类，以确保废弃物包扎正确及安全妥当回收。

1. 实验废弃液、废弃培养基及初次清洗废弃水（此类主要是化学性废弃物）。

实验废弃液：实验过程中所使用的试剂、试剂的混合物、试剂与其它物质（细胞悬液、磁珠等）的混合物所产生的废弃的液态或半固态物质。比如：PBS、HBSS 等（Nuclease-free Water 除外）。

2. 废弃包装、容器、废弃实验耗材等。

1) 试剂或化学品的内包装：直接与试剂或化学品接触的瓶、管、盒、塑料等。

2) 废弃样本：组织样本、细胞样本、血液样本等的剩余样本。需要单独分开存放、收

集和放置;此类主要是感染性废弃物、病理性废弃物。

3) 非生物医疗性废弃物 (生活垃圾): 由实验室在生产过程中产生的, 但无潜在传染性的废弃物, 如试剂的外包装、打印的废弃报告单、各种辅助材料外包装等无接触到危险性或生物医疗废弃物质。

● 生物废弃物的收集、存放与处理

1. 实验室应当用有盖的废弃物桶来收集废弃物 (医疗废弃物标志如下图)。
2. 非危险性废弃物由生物安全员收集后放在指定的废弃物存放处。
3. 生物安全员收集的危险性废弃物在入库前, 固态危废需检查是否包装捆扎好, 检查有无破损溢出的情况, 相应标识是否粘贴, 确认正常后进行称重, 然后进行入库操作, 入库后放入吨袋中, 整齐有序地进行堆放; 液态危废先将小号废液桶里的废液进行称重, 检查有无泄漏, 相应标识是否粘贴, 确认正常后进行入库操作, 倒入危废暂存间内的 50L 的大危废储存桶内, 并及时进行密封。
4. 非危险性废弃物及生活废弃物由平台公司的人员收集处理。
5. 危险性废弃物丢置注意事项:
 - 1) 经污染的利器是唯一会对处理者构成感染危险的危险性废弃物。它们必须弃置于非刺穿的利器盒内, 以便送至专业处理地。
 - 2) 化学性废弃物中批量的废化学试剂、废消毒剂应当交由专门机构处置。
 - 3) 包装好或容器内的感染性废弃物、病理性废弃物、损伤性废弃物不得取出。



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）