

免疫组建库一体化试剂盒(MGI)

使用说明书 (Version1.0)

目录

01 产品概述/ 1

02 产品组分/1-2

03 保存条件/2

04 使用范围/2

05 自备材料/2

06 注意事项/2-4

实验室流程/5

01 PBMC 获得与 RNA 提取环节/5-6

02 全长 cDNA 富集/6-9

03 TCR 扩增流程/9-12

04 BCR 扩增流程/12-14

05 免疫组文库流程/15-17

01 产品概述

该免疫组一体化建库试剂盒是针对MGI高通量测序平台定向优化而成的文库构建试剂盒。本试剂盒集合并优化了从全血的PBMC的收集到RNA提取、全长cDNA富集、TCR/BCR目的片段扩增和免疫组文库构建的一整套实验方案。试剂盒中提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证，最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

02 产品组分

试剂模块	试剂组分名称	颜色	24 rxns	48 rxns	96 rxns	储存温度
反转录模块	Lysis Buffer Mix	灰色	27ul	53ul	106ul	-30 ~ -15°C
	Oligo-dT30VN-2	浅蓝色	51ul	101ul	202ul	-30 ~ -15°C
	DNTP-mix	浅蓝色	27ul	53ul	106ul	-30 ~ -15°C
	Nuclease-free ddH2O	无色	1ml x 3 支	1ml x 3 支	1ml x 3 支	4 ~ 8°C
	FS Buffer	橙色	51ul	101ul	202ul	-30 ~ -15°C

	DTT	13ul	25ul	49ul	-30 ~ - 15°C
	RNase 抑制剂	13ul	25ul	49ul	-30 ~ - 15°C
	RT-oligo	13ul	25ul	49ul	-85 ~ - 65°C
	反转录酶	13ul	25ul	49ul	-30 ~ - 15°C
	ISPCR Oligo-1	27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
	cDNA ampRev-2	27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
	2 x PCR 混合液	291ul	581ul	1162ul (581ul x 2 支)	-30 ~ - 15°C
	DNA Clean Beads	6.5ml	12ml	25ml	4 ~ 8°C
	Equalbit 1x dsDNA Working Solution	21ml	40ml	78ml	4 ~ 8°C, 避 光
TCR/BCR 扩增模块	2x Hieff PCR Master Mix	603ul	1205ul	2410 (1205ul x 2 支)	-30 ~ - 15°C
	HumanTCR-1 Mix	27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C

			27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
			27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
			27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
			27ul	53ul	106ul	-30 ~ - 15°C
建库模块	DNA 末端修复 Mix		360ul	720ul	1440ul(720ul x 2 支)	-30 ~ - 15°C
	Ligation buffer		600ul	1200ul	2400ul(1200ul x 2 支)	-30 ~ - 15°C
	DNA ligase		120ul	240ul	480ul	-30 ~ - 15°C
	通用接头		120ul	240ul	480ul	-30 ~ - 15°C
	DNA Barcode Num.		10ul each, 24 种	10ul each, 48 种	10ul each, 96 种	-30 ~ - 15°C
	文库扩增 Mix		600ul	1200ul	2400ul (1200ul x 2 支)	-30 ~ - 15°C

提取模块	4ml ficoll 分离管		24 支/盒	48 支/盒	2 盒装 (48 支/盒)	常温, 避光
	Lysis Buffer		13ml	25ml	49ml	常温
	Elution Buffer		2ml	3ml	8ml	常温
	RNA 纯化柱 (带收集管)		24 支/包	48 支/包	2 包 (48 支/包)	常温
	Wash Buffer 混液		13ml	25ml	49ml	常温

03 保存条件

见02 产品组分中的存储温度所示。

04 适用范围

适用于制备 MGI 高通量测序平台专用文库。

05 自备材料

材料：Nuclease-free ddH₂O、无水乙醇、灭菌超纯水、0.1 × TE；低吸附无核酸酶的PE管、低吸附无核酸酶的PCR管、200ul磁力架、80%乙醇（现配现用）、1X PBS。

主要仪器：DNA片段质检仪（Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer或Qsep100等）、qubit荧光定量仪、NanoDrop仪。

06 注意事项

受样本、方案、设备、操作等诸多因素影响，免疫组文库构建流程参数可能需

要根据实际情况进行调整。为了能够获得高质量的测序文库，请务必仔细阅读下述

注意项。

1. 关于 RNA 提取过程中的注意事项

▲ RNA 提取需要在专用的无 RNA 酶的超净台中操作，避免 RNA 在提取过程中被 RNA 酶降解。

▲ 整个 RNA 提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上(直至洗脱离心后得到 RNA 方可置于冰上)，以避免其间产生不溶物堵塞离心柱。

▲ 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整(一般 20~50ul，最少不可少于 10ul，否则无法充分溶解 RNA)，以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至 5 分钟均可提高 RNA 产量。

2. 关于全长 cDNA 富集过程中注意事项

▲ 本产品使用Oligo dT Primer扩增带poly A序列的RNA，请确保体系中无带poly A序列DNA 的干扰。

▲ 使用RNA作为起始模板时，请确保RNA是完整并且无污染的。

▲ 本产品检测灵敏度高，实验操作应在正压的超净工作台中完成，**请勿与普通PCR操作平台交叉使用。**

▲ 本产品中所有组分应储存于无核酸和核酸酶污染的环境中，以免导致实验失败。

3. 关于免疫组建库过程中的注意事项

1) 关于通用接头

通用接头的质量和用量直接影响建库效率和文库的质量。通用接头投入量过高可能会导致二聚体残留；投入量不足又会影响连接效率进而导致文库产出降低。以下列举了不同 TCR/BCR 量推荐的通用接头使用量。

TCR/BCR	通用接头稀释倍数
> 1ug	不稀释, 直接投入 5ul 建库
100 - 999ng	1:2 稀释后投入 5ul 建库
50ng	1:5 稀释后投入 5ul 建库

注: 使用 $0.1 \times TE$ 进行倍数稀释

2) 关于 DNA Clean Beads

- ▲ 磁珠使用前应先平衡至室温(室温放置30 min), 否则会导致得率下降、分选效果不佳。
- ▲ 磁珠每次使用前都应充分振荡混匀或使用移液器上下吹打充分混匀。
- ▲ 样品与磁珠充分混匀后置于磁力架上进行分离时, 请于溶液彻底澄清后再吸取上清, 吸取上清时应余留 2 - 3 μ l。若不慎吸到磁珠, 会造成得率下降、分选效果不佳甚至影响后续酶反应。此时可将磁珠混匀重新置于磁力架上再次分离即可。由于磁力架吸力不同等原因, 默认分离时间有时可能需要延长, 以彻底分离磁珠和液体。
- ▲ 磁珠漂洗应使用新鲜配制并平衡至室温的80%乙醇。漂洗过程中EP管应始终置于磁力架中, 请勿扰动磁珠。
- ▲ 产物洗脱前应将磁珠置于室温干燥。干燥不充分容易造成无水乙醇残留影响后续反应; 过分干燥又会导致磁珠开裂进而降低纯化得率。通常情况下, 室温干燥5 - 10 min 足以让磁珠充分干燥, 请勿加热干燥(如置于37°C烘箱干燥)。

▲通常情况下，推荐使用洗脱液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 8.5)进行产物洗脱，这样更有利于产物的稳定保存。然而，当后续需对文库进行靶向捕获时，为了利于捕获前文库干燥浓缩且避免对后续捕获反应产生影响，应使用灭菌超纯水进行产物洗脱。

▲洗脱产物可于4°C稳定保存一周；长期保存时应置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

3) 关于文库扩增循环数

文库扩增需要严格控制扩增循环数。循环数不足，会导致文库产出不足；循环数过多，又会导致过度扩增、偏好性增加、重复度增加、嵌合产物增加、扩增突变积累等多种不良后果。以下列举了当使用 100ng - 1 µg 高质量 TCR/BCR 产物时，获得 100 ng 或 1 µg 文库推荐的扩增循环数。

TCR/BCR 产物	Number of cycles required to generate
100 ng	1
100 ng	6-8
250 ng	3-4
500 ng	3-5
1 µg	3-5

4. 其他注意事项

▲使用前请将试剂盒各组分置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。

▲配制各步骤反应液时推荐使用移液器吹打混匀，剧烈振荡可能会造成文库产出下降。

▲为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。

▲推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。

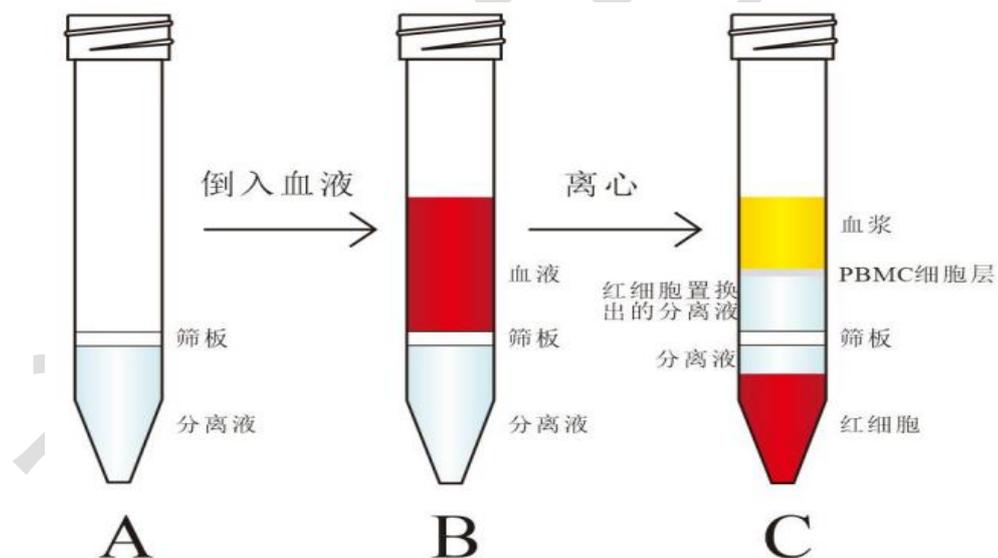
▲PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，我们推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁(使用 0.5%次氯酸钠或 10%漂白剂进行擦拭清理)，以保证实验环境的洁净度。

实验流程如下：

01 PBMC 获得与 RNA 提取环节

步骤一：全血分离 PBMC

1. 检查。如图 (A) 所示。取出 ficoll 分离管，观察筛板材料之上是否有游离的分离液，筛板下方是否有气泡。如果有，请用离心机 20°C, 800 g, 离心 1 min。
2. 倒入血液。血液样品必须为抗凝全血，无需稀释。如图 (B) 所示。
3. 离心。20°C, 800 g, 30 min。设置较慢的加速与减速（如果共有十档且第十档为最高档，加速调整为第三档与减速应该调整到第 0 档）。
4. 将部分血浆吸出后，直接将筛板上方剩余的少量血浆、PBMC 细胞层和少量分离液直接倒入干净的离心管中。如图 (C) 所示，PBMC 层在血浆下面，分离液上面。用 1xPBS 洗涤 1-2 次 (20°C, 800 g, 5 min)，弃去上清液。



5. 向样品中加入 500 μ l 的 Lysis Buffer，用力吹吸 10 次，涡旋震荡 10 秒钟以充分裂解细胞；
6. 向裂解的细胞中加入**等体积的无水乙醇**充分混匀（可能会产生沉淀，这是正常现象，继续进行操作即可）。可将离心管颠倒几次，或用移液器用力吹吸 10 次使可能产生的沉淀分散开，然后将液体加入离心柱中。

7. 12000 rpm 离心 1 分钟，倒掉废液，将 RNA 柱装回收集管。

步骤二：柱清洗

8. 向 RNA 柱中加入 500 ul 的 Wash Buffer，12 000rpm 离心 1 分钟。**离心结束后取出柱子时注意不要让收集管内的废液接触到 RNA 柱，以免污染。**可以倒掉废液，将 RNA 柱装回收集管，空管离心一次，能完全去除可能残留的 Wash Buffer。

9. 将柱子放到干净的无 RNA 酶的 1.5ml 离心管上，开盖晾干 2 分钟。

步骤三：RNA 洗脱

10. 在 RNA 柱的膜中心部位加入 20 ~ 50 μ l 的 Elution Buffer，室温静置 2 分钟。

11. 12000 rpm 离心 1 分钟（洗脱下来的 RNA 溶液重新加入柱中，静置 5 分钟，再次离心可提高洗脱效率，得到更多 RNA）。（RNA 洗脱下来后，建议置于冰上。）

12. 测定洗脱的 RNA 浓度，以便于后续实验使用。提取出来的 RNA 可立即用于后续实验，也可保存在-80 $^{\circ}$ C 备用。

步骤四：RNA 质检

本试剂盒提取的 RNA 使用 NanoDrop 等微量分光光度计测定 OD 260/280 在 1.90~2.2 之间均属正常(因不同仪器之间存在误差,若 OD 比值略有超出,但上下不超过 0.1, 且吸光度曲线正常, 则亦可接受)。

02 全长 cDNA 富集

步骤一：第一链 cDNA 合成(请在超净台中操作)

1. 取 1-5 μ l 纯化后的 RNA 样品至 200 μ l RNase-free PCR 管中。样品体积不足 5 μ l 时，用 Nuclease-free ddH₂O 补足 5 μ l，加入 1 μ l 的 Lysis Buffer Mix，冰上操作。

组分	待测样品
Lysis Buffer Mix	1ul
Nuclease-free ddH2O	0 - 4ul
目标 RNA	1-5ul
Total	6ul

2. 将Oligo-dT30VN-2、DNTP-mix解冻后颠倒混匀，瞬离后置于冰上待用，于无核酸酶的PCR管中配制如下反应：

组分	体积
步骤 1 RNA	6 μ l
Oligo-dT30VN-2	2 μ l
DNTP-mix	1 μ l
Total	9 μ l

3. 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上。将有热盖功能的PCR仪提前预热至72°C，按照以下程序运行：

温度	时间
72°C	3 min
立即置于冰上	2 min

▲ 请将PCR仪提前预热至72°C,反应结束后请立即取出，置于冰上至少2 min。

4. 将PCR仪预热至42°C备用。各组分使用前请轻弹管壁混匀，切勿涡旋混匀，短暂离心收集后置于冰上。按下表配制反应体系：

组分	体积
----	----

步骤 2 产物	6.25 μ l
FS Buffer	2 μ l
DTT	0.5 μ l
RNase 抑制剂	0.25 μ l
RT-oligo	0.5 μ l
反转录酶	0.5 μ l
Total	10 μ l

5. 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置置于冰上，将PCR管放入预热至42°C的PCR仪中，运行以下程序：

温度	时间
42°C	90 min
70°C	15 min
4°C	Hold

注意：此处反应产物可储存在4°C过夜，放置时间请勿超过12 h。

步骤二：全长cDNA扩增(请在超净台中操作)

1.将PCR反应所需的试剂取出，置于冰上溶解，所有组分充分溶解后振荡混匀并短暂离心收集后置置于冰上，按照下表配制反应体系：

组分	体积
第一链 cDNA 合成产物	10 μ l
ISPCR Oligo-1	1 μ l

cDNA ampRev-2	1 μ l
	12
2 x PCR 混合液	μ l
	24
Total	μ l

2. 使用移液器轻轻混匀，短暂离心收集后置于冰上，在PCR仪中运行以下程序：

温度	时间	循环数
98°C	1 min	1
98°C	10 sec	18 cycles
65°C	15 sec	
72°C	6 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

注意：此处反应产物可储存在4°C过夜，放置时间请勿超过12h。

之后的步骤在普通实验环境下进行。

步骤三：cDNA扩增产物纯化

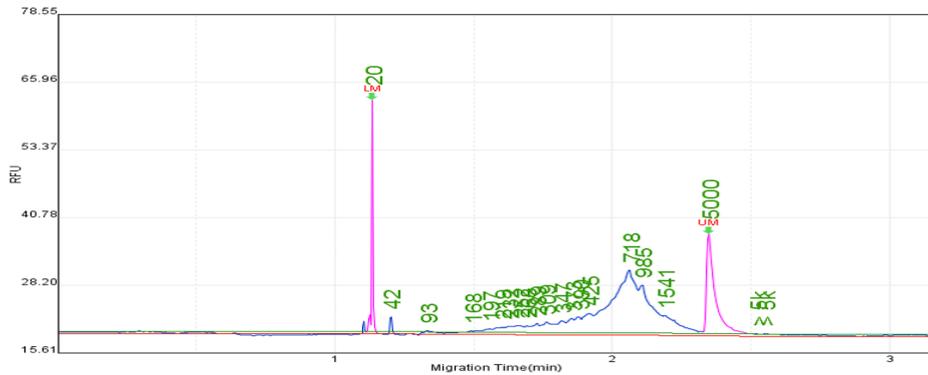
1. 涡旋DNA Clean Beads使其充分混匀，加26ul Nuclease-free ddH₂O将产物补至50ul，加50ul DNA Clean Beads 到上述 cDNA扩增反应体系中，使用移液器混匀10次以上保证整个体系均匀。
2. 室温孵育5 min，使cDNA结合到磁珠上。

-
3. 将反应管短暂离心并置于磁力架上分离磁珠和液体。
 4. 保持PCR管始终处在磁力架上，待溶液澄清(约5 min)后，小心移除上清，注意不要扰动到磁珠。
 5. 保持PCR管始终处在磁力架上，加入200ul新鲜配制的80%乙醇，注意加入乙醇时不要扰动磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。
 6. 重复步骤5，总共漂洗两次。
 7. 短暂离心将样品收集至PCR管底，并置于磁力架上30 sec，用移液器吸走所有残留液体。
 8. 开盖空气干燥2 -3 min。
 - ▲ 确保磁珠只是刚刚晾干，磁珠此时看起来没有光泽。若磁珠没有完全晾干，酒精仍然残留在样品中，酒精会降低cDNA的洗脱速率，并可能干扰下游反应。若磁珠晾的太干，也会降低cDNA的洗脱效果，最终降低产量。
 9. 磁珠晾干后，将PCR管从磁力架上取下，加入17ul ddH₂O覆盖磁珠，使用移液器吹打混匀磁珠，室温孵育7 min。
 10. 将PCR管短暂离心收集后置于磁力架中，分离磁珠和液体直到溶液澄清(约5 min)。
 - ▲ 如果少量的磁珠不再吸附在磁力架上，用移液器在上清中吹打混匀未吸附的磁珠，使其重新悬浮，继续孵育直至没有磁珠残留在上清中。
 12. 小心吸取15 ul上清转移到新的低吸附EP管中，-20°C保存，后续用于TCR/BCR扩增。

步骤四：cDNA扩增产物质检

通常情况下，扩增好的目的cDNA产物可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

一般情况下，根据使用的起始模板不同，分布于400 - 2000 bp 即可。



产物浓度检测:

使用本试剂盒中 1 x dsDNA Working Solution 组分即可，使用方法: 1 x dsDNA Working Solution 199ul 加 1ul 产物混匀后测浓度。

03 TCR 扩增流程

步骤一：第一轮 TCR 扩增

1. 将 Human TCR-1 Mix、ISPCR Oligo-1, 2x Hieff PCR Master Mix 解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应:

组分	体积 (ul)
cDNA 投入量 (> 10ng)	X
2x Hieff PCR Master Mix	25
ISPCR Oligo-1	1
HumanTCR-1Mix	1

ddH ₂ O	23-X
Total Volume	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间	循环数
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	15 cycles
63°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

3. 第一轮 TCR 产物磁珠分选

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 27.5ul DNA Clean Beads 至 50 ul 上述 TCR 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，轻轻吸净上清至新的 PCR 管中，弃去磁珠 (**注意**)。
- 4) 在上清中加入 7.5ul DNA Clean Beads，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。

5) 将反应管短暂离心放在磁力架上 2min, 直至溶液澄清, 小心废弃上清, 注意不要干扰到磁珠。

6) 保持 PCR 管始终在磁力架上, 加入 200ul 的新鲜配制的 80%乙醇, 注意加入乙醇时不要扰动磁珠, 室温孵育 30s, 小心移除上清。

7) 重复步骤 6) 一次, 总共漂洗两次。

8) 短暂离心将样品收集至 PCR 管底部, 并置于磁力架上 30s, 用移液器吸走所有残留液体, 开盖空气晾干 2min。

9) 加入 22.5 ul ddH₂O 洗脱, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀, 于室温放置 2 min, 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置, 待溶液澄清后(约 5 min), 小心移取 20 ul 上清至新的 PCR 管中, 进行下一步反应。

步骤二：第二轮 TCR 扩增

1. 将 HumanTCR-2 Mix、ISPCR Oligo-2, 2x Hieff PCR Master Mix 解冻后颠倒混匀,

于灭菌 PCR 管中配制如下反应:

组分	体积 (ul)
第一轮 PCR 纯化产物	20
2x Hieff PCR Master Mix	25
ISPCR Oligo-2	1
HumanTcell TCR-2 Mix	1
ddH ₂ O	3
Total Volume	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀), 并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中, 进行如下反应:

温度	时间	循环数
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	15 cycles
65°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

3. 第二轮 TCR 产物磁珠分选

- 1) 磁珠平衡至室温后, 涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 27.5ul DNA Clean Beads 至 50 μ l 上述 TCR 产物中, 涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体, 待溶液澄清后(约 5 min), 轻轻吸净上清至新的 PCR 管中, 弃去磁珠 (注意)。
- 4) 在上清中加入 7.5 μ l DNA Clean Beads, 使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀, 室温孵育 5 min。
- 5) 将反应管短暂离心放在磁力架上 2min, 直至溶液澄清, 小心废弃上清, 注意不要干扰到磁珠。
- 6) 保持 PCR 管始终在磁力架上, 加入 200ul 的新鲜配制的 80%乙醇, 注意加入乙醇时不

要扰动磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。

7) 重复步骤 6) 一次，总共漂洗两次。

8) 短暂离心将样品收集至 PCR 管底部，并置于磁力架上 30s，用移液器吸走所有残留液体，开盖空气晾干 2min。

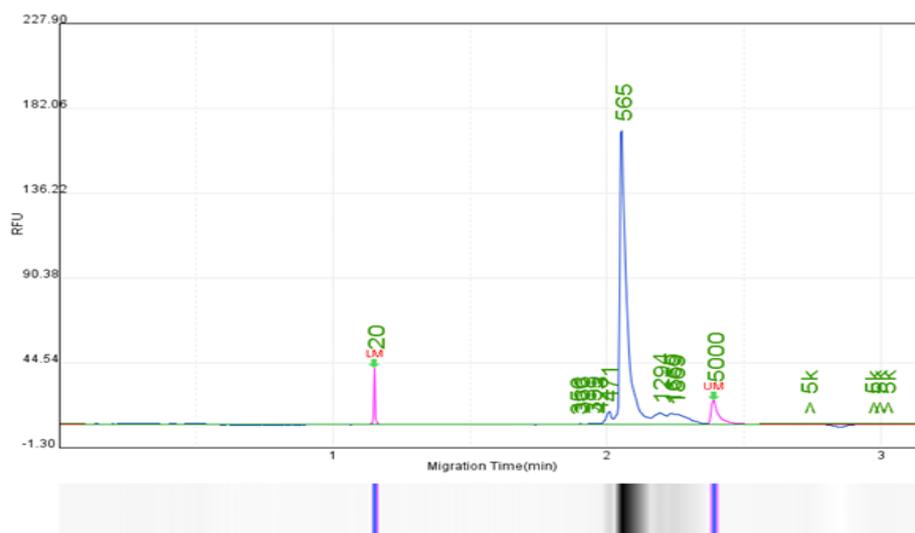
9) 加入 22.5 ul ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移取 20ul 上清至新的 EP 管中，用于下游免疫组建库。

注：此处样品可于 4℃稳定保存一周。长期保存置于-20℃，避免不必要的反复冻融。

步骤三：TCR 终产物质控

通常情况下，扩增好的目的TCR产物可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

最终 TCR 产物长度分布，主峰明显即可，如下图所示：



产物浓度检测：

使用本试剂盒中 1 x dsDNA Working Solution 组分即可，使用方法：1 x dsDNA

Working Solution 199ul 加 1ul 产物混匀后测浓度。

04 BCR 扩增流程

步骤一：第一轮 BCR 扩增

1. 将 Human BCR-1 Mix、ISPCR Oligo-1, 2x Hieff PCR Master Mix 解冻后颠倒混匀, 于灭菌 PCR 管中配制如下反应:

组分	体积 (ul)
cDNA 投入量 (> 10ng/ul)	X
2x Hieff PCR Master Mix	25
ISPCR Oligo-1	1
Human BCR-1Mix	1
ddH2O	23-X
Total Volume	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀), 并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中, 进行如下反应:

温度	时间	循环数
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	25 cycles
63°C	30 sec	
72°C	1 min	

72°C	5 min	1
4°C	Hold	

3.第一轮 BCR 产物磁珠分选

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 27.5ul DNA Clean Beads 至 50ul 上述 TCR 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，轻轻吸净上清至新的 PCR 管中，弃去磁珠 **(注意)**。
- 4) 在上清中加入 5 ul DNA Clean Beads，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 5) 将反应管短暂离心放在磁力架上 2min，直至溶液澄清，小心废弃上清，注意不要干扰到磁珠。
- 6) 保持 PCR 管始终在磁力架上，加入 200ul 的新鲜配制的 80%乙醇，注意加入乙醇时不要扰动磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
- 7) 重复步骤 6) 一次，总共漂洗两次。
- 8) 短暂离心将样品收集至 PCR 管底部，并置于磁力架上 30s，用移液器吸走所有残留液体，开盖空气晾干 2min。
- 9) 加入 22.5 ul ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移取 20 ul 上清至新的 PCR 管中，进行下一步反应。

步骤二： 第二轮 BCR 扩增

1. 将 HumanBCR-2 Mix、 ISPCR Oligo-2, 2x Hieff PCR Master Mix 解冻后颠倒混匀, 于灭菌 PCR 管中配制如下反应:

组分	体积 (ul)
第一轮 BCR 纯化产物	20
2x Hieff PCR Master Mix	25
ISPCR Oligo-2	1
Human BCR-2 Mix	1
ddH ₂ O	3
Total Volume	50

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀), 并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中, 进行如下反应:

温度	时间	循环数
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	25 cycles
65°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

3. 第二轮 BCR 产物磁珠分选

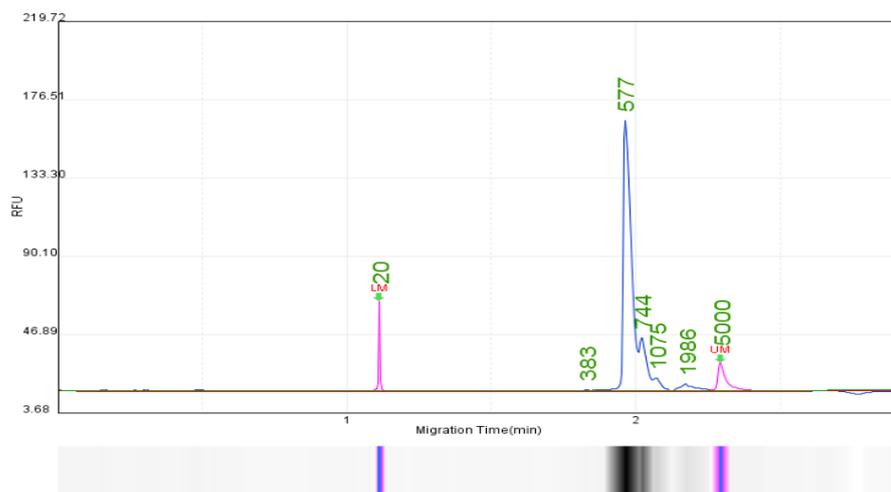
- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 27.5ul DNA Clean Beads 至 50ul 上述 TCR 产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，轻轻**吸净上清至新的 PCR 管中，弃去磁珠 (注意)**。
- 4) 在上清中加入 5 ul DNA Clean Beads，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 5) 将反应管短暂瞬离放在磁力架上 2min，直至溶液澄清，小心废弃上清，注意不要干扰到磁珠。
- 6) 保持 PCR 管始终在磁力架上，加入 200ul 的新鲜配制的 80%乙醇，注意加入乙醇时不要扰动磁珠，室温孵育 30s，小心移除上清。
- 7) 重复步骤 6) 一次，总共漂洗两次。
- 8) 短暂离心将样品收集至 PCR 管底部，并置于磁力架上 30s，用移液器吸走所有残留液体，开盖空气晾干 2min。
- 9) 加入 22.5 ul ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移取 20ul 上清至新的 EP 管中，用于下游免疫组建库。

注：此处样品可于 4°C 稳定保存一周。长期保存置于 -20°C，避免不必要的反复冻融。

步骤三：BCR 终产物质控

通常情况下，扩增好的目的 BCR 产物可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

最终 BCR 产物长度分布，主峰明显即可，如下图所示：



产物浓度检测：

使用本试剂盒中 1 x dsDNA Working Solution 组分即可，使用方法：1 x dsDNA

Working Solution 199ul 加 1ul 产物混匀后测浓度。

05 免疫组建库流程

(推荐) 策略一：TCR 与 BCR 产物等量混合，建议总产物 > 100ng 投入到步骤一中，混合

建库测序：

步骤一：末端连接修复

1. 将 DNA 末端修复 Mix 解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
TCR 产物+BCR 产物	X ul

DNA 末端修复 Mix	15 ul
ddH2O	To 65 ul

策略二：只针对 TCR 或 BCR 产物单一产物建库，建议单一产物投入也大于 100ng。

组分	体积
TCR 产物或 BCR 产物	X ul
DNA 末端修复 Mix	15 ul
ddH2O	To 65 ul

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间
热盖 105°C	On
20°C	15 min
65°C	15 min
4°C	Hold

步骤二：通用接头连接

1. 根据 TCR/BCR 的投入量稀释 DNA 通用接头，将 Ligation buffer 解冻后颠倒混匀，置于冰上备用，在 PCR 管中配制如下反应：

组分	体积
步骤一产物	65 ul

Ligation buffer	25 ul
DNA ligase	5 ul
DNA 通用接头	5ul
总计	100ul

注：DNA 通用接头使用稀释倍数和体积如下：

Input DNA	DNA 通用接头稀释倍数	使用体积
25ng	1:10	5ul
50 ng	1:5	5ul
100 ng	1:2	5ul
1 μ g	不稀释	5ul

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底，将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行如下反应：

温度	时间
热盖 105°C	On
20°C	15 min
4°C	Hold

3. 产物纯化：

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 60 ul DNA Clean Beads 至 100 ul 上述产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，**小心移**

除上清。

4) 保持PCR管始终置于磁力架中，加入200 ul新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec后，移除掉上清，**务触碰到到磁珠。**

5) 重复步骤4) ，总计漂洗两次。保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。

6) 加入 22.5ul ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移取 20 ul 上清至新 EP 管中，切勿触碰磁珠。

注：此处样品可于 4°C稳定保存一周。长期保存置于-20°C，避免不必要的反复冻融。

步骤三：文库扩增

1. 将 DNA Barcode Num.、文库扩增 Mix 解冻后颠倒混匀，于灭菌 PCR 管中配制

如下反应：

组分	体积
步骤二产物	20 ul
文库扩增 Mix	25 ul
DNA Barcode Num.	5ul
总计	50ul

2. 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	循环数
----	----	-----

95°C	3 min	1
98°C	20 sec	3~5cycles
60°C	15 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	1
4°C	Hold	

3. 产物纯化:

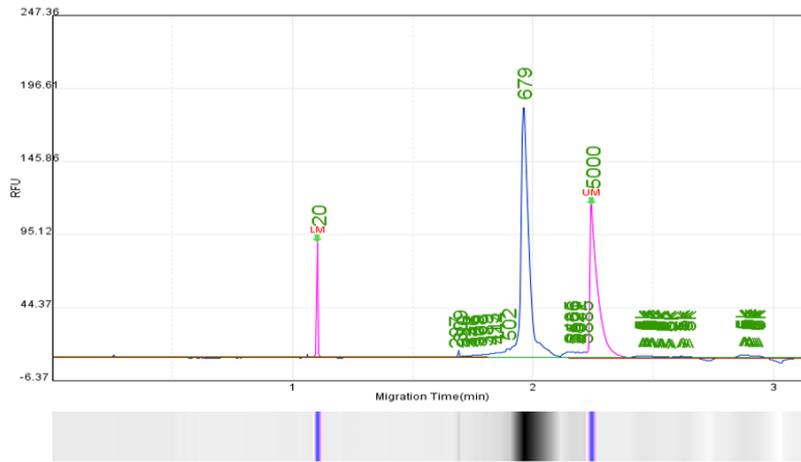
- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀 DNA Clean Beads。
- 2) 吸取 45ul DNA Clean Beads 至 50 ul 扩增产物中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀，室温孵育 5 min。
- 3) 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，**小心移除上清。**
- 4) 保持PCR管始终置于磁力架中，加入200ul 新鲜配制的80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育30 sec后，**移除掉上清，务触碰到到磁珠。**
- 5) 重复步骤4)，总计漂洗两次。保持PCR管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠5 - 10 min至无乙醇残留。
- 6) 加入 22.5 ul ddH₂O 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 2 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移取 20ul 上清至新 EP 管中，切勿触碰磁珠。

注：此处样品可于 4°C 稳定保存一周。长期保存置于 -20°C，避免不必要的反复冻融。

步骤四: 免疫组文库质控

通常情况下, 构建好的免疫组文库可通过长度分布检测和浓度检测来进行质量评价。

最终免疫组文库产物长度分布, 主峰明显, 检测如下图所示:



产物浓度检测:

使用本试剂盒中 1 x dsDNA Working Solution 组分即可, 使用方法: 1 x dsDNA Working Solution 199ul 加 1ul 产物混匀后测浓度。