

# SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5'转录组及免疫组库试剂盒操作说明书

V1.3

K00202-0201 & K00501-0202 & K00501-0203 & K00202-0204 & K00202-0205 & K00501-0206  
K00202-0801 & K00501-0802 & K00501-0803 & K00202-0804 & K00202-0805 & K00501-0806  
K00601-0201 & K00701-0201 & K01101-0201 & K01201-0201  
K00601-0801 & K00701-0801 & K01101-0801 & K01201-0801

**Envision the Future**  
预见未来

北京寻因生物科技有限公司

# 目录

产品简介 .....	3
实验原理 .....	3
实验流程 .....	4
1. 单细胞 5'转录组实验流程图解 .....	4
2. 单细胞免疫组库实验流程图解 .....	5
样本要求 .....	5
1. 样本类型要求 .....	5
2. 样本质量要求 .....	5
3. 样本储存要求 .....	5
上样量建议 .....	6
产品组分及保存条件 .....	6
保存条件 .....	9
Index 序列 .....	9
参数说明 .....	10
配套使用的仪器和耗材 .....	11
需自备的仪器和其他试剂 .....	12
1. 自备仪器及耗材 .....	12
2. 自备试剂/试剂盒 .....	12
实验操作步骤 .....	13
Step 1 油包水生成及 Barcode 标记 .....	13
Step 1-1 准备单细胞混合液 .....	13
Step 1-2 向 Chip S3 加入试剂 .....	15
Step 1-3 运行 SeekOne® DD .....	16
Step 1-4 转移生成的油包水 .....	17
Step 1-5 油包水逆转录反应 .....	18
Step 2 样本回收和 cDNA 扩增 .....	18
Step 2-1 油包水破乳 .....	18
Step 2-2 cDNA 扩增 .....	19
Step 2-3 cDNA 富集产物纯化 .....	20
Step 2-4 cDNA 富集产物质检标准 .....	21
Step 3 5' 转录组文库构建 .....	22
Step 3-1 DNA 片段化与末端修复 .....	22
Step 3-2 打断后分选 .....	22
Step 3-3 接头连接 .....	23
Step 3-4 连接产物纯化 .....	23
Step 3-5 文库扩增 .....	23
Step 3-6 片段分选 .....	24
Step 3-7 文库质控标准 .....	25
Step 4 全长 V(D)J 片段富集 .....	26
Step 4-1 全长 V(D)J 片段第一次富集 .....	26
Step 4-2 V(D)J 富集产物片段分选 .....	26
Step 4-3 全长 V(D)J 片段第二次富集 .....	27
Step 4-4 富集产物片段分选 .....	27
Step 4-5 全长 V(D)J 富集产物质检标准 .....	28

---

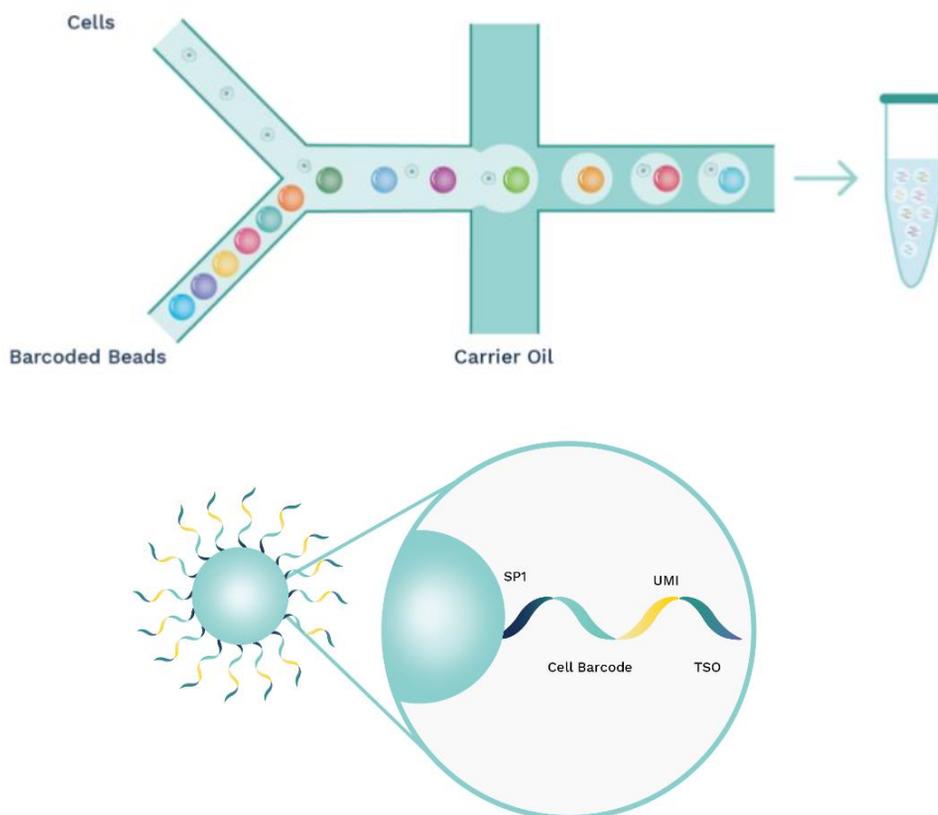
Step 5 V(D)J 文库构建 .....	29
Step 5-1 DNA 片段化与末端修复 .....	29
Step 5-2 接头连接 .....	29
Step 5-3 连接产物纯化 .....	30
Step 5-4 文库扩增 .....	30
Step 5-5 片段分选 .....	31
Step 5-6 文库质控标准 .....	31
附录 1: 高通量测序 .....	33
附录 2: 生物信息学分析 .....	34
附录 3: SeekOne® 数字液滴仪使用说明 .....	34
附录 4: SeekOne® 数字液滴仪故障处理 .....	34
附录 5: 包装符号释义 .....	37
附录 6: 修订历史 .....	38

## 产品简介

SeekOne® DD (Digital Droplet) 单细胞 5' 转录组及免疫组库试剂盒是由北京寻因生物科技有限公司自主研发的国内首款商业化的利用微流控数字液滴和 **Barcoded Beads** 技术用于高通量单细胞 5' 转录组及免疫组库建库的试剂盒。该试剂盒需配合本公司自主研发的 SeekOne® 数字液滴系统 (SeekOne® Digital Droplet System, 简称 SeekOne® DD) 完成从单细胞核酸标记到文库构建全过程, 同时配备单细胞数据分析软件 SeekSoul Tools, 为您提供一站式单细胞 5' 转录组及免疫组库解决方案。

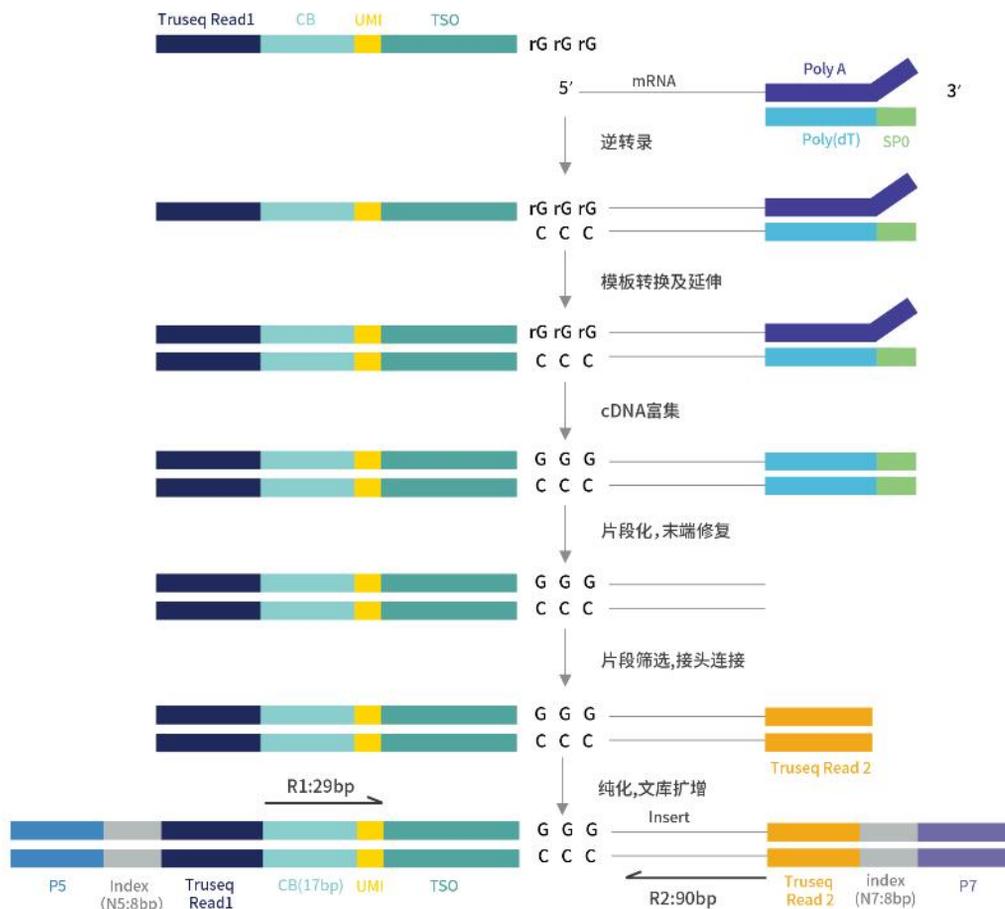
SeekOne® DD 单细胞 5' 转录组及免疫组库试剂盒包括: 芯片 (SeekOne® DD Chip S3, 简称 Chip S3)、垫片 (Gasket)、油 (Carrier Oil)、凝胶微珠 (SeekOne® DD 5' Barcoded Beads, 简称 Barcoded Beads)、扩增试剂、免疫组库富集试剂、文库构建试剂以及单细胞数据分析软件 (SeekSoul Tools)。该试剂盒基于微流控技术原理, 通过油包水实现单细胞分离捕获, 并利用核酸修饰的 Barcoded Beads 对不同细胞来源的 RNA 分别进行分子标记, 其中一部分标记产物直接用于构建 5' 基因表达文库, 另外一部分产物通过巢式扩增富集 TCR/BCR 的 V(D)J 全长序列后构建免疫组库文库, 最终获得适配真迈生物和 Illumina 测序平台的高通量单细胞 5' 转录组文库和配对的免疫组库文库, 可用于肿瘤免疫微环境探索、免疫细胞调节机制探究、免疫治疗靶点筛选、感染性疾病研究及疫苗筛选等研究。

## 实验原理

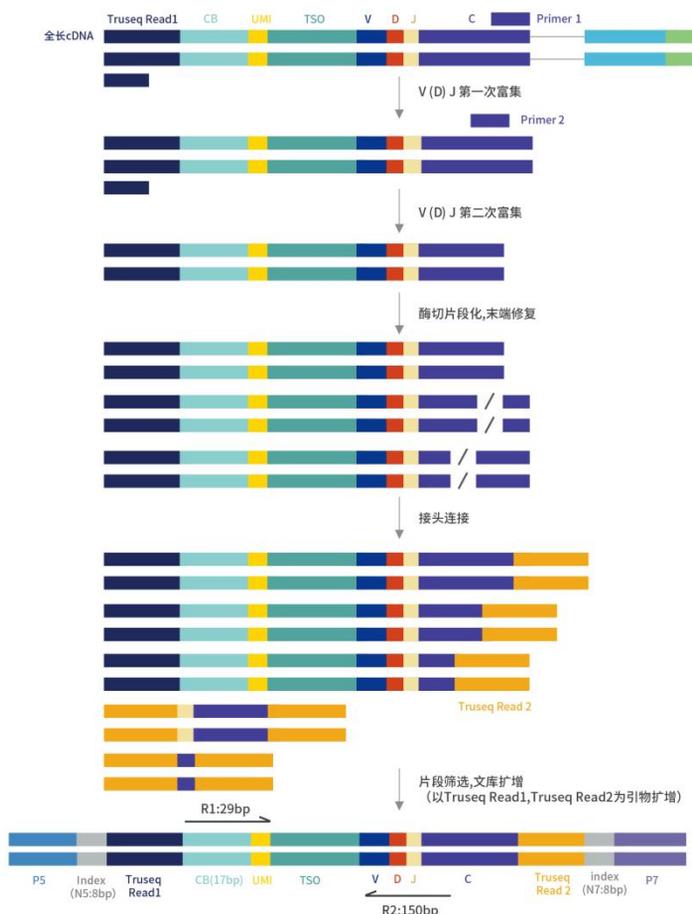


# 实验流程

## 1. 单细胞 5' 转录组实验流程图解



## 2. 单细胞免疫组库实验流程图解



### 样本要求

#### 1. 样本类型要求

- 单细胞悬液：不能存在大颗粒沉淀物，如存在大颗粒沉淀物需使用 40  $\mu\text{m}$  细胞过滤器过滤细胞悬液；无钙镁离子，且 FBS $\leq$ 2%，BSA $\leq$ 0.1%（过高的 BSA 浓度会导致破油不完全从而影响细胞捕获率和基因数）；
- 细胞直径：5-40  $\mu\text{m}$ 。

#### 2. 样本质量要求

- 细胞数：细胞建议活细胞量 5 万以上，最低投入细胞数不少于 1,000；
- 细胞活性：细胞活率 $>$ 90%分析效果最佳（细胞计数仪进行计数）；
- 细胞结团率 $<$ 10%，细胞有核率 $>$ 70%。

#### 3. 样本储存要求

新鲜单细胞悬液，冰上放置，20 min 内完成油包水捕获实验效果最佳。时间超过建议使用 4 mL 的 1640+2%FBS 离心重悬清洗一次。

注：实验开始前，需利用细胞计数仪对单细胞悬液进行细胞计数以及活细胞率计算。

## 上样量建议

使用 RPMI 1640 培养基重悬细胞，推荐活细胞浓度范围：700~1,200 cells/ $\mu$ L。

## 产品组分及保存条件

SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5' 转录组试剂盒按照试剂功能及储存条件分为：SeekOne<sup>®</sup> DD S3 芯片试剂盒、SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞纯化试剂盒、SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5' 微珠试剂盒、SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5' 逆转录试剂盒、SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5' cDNA 扩增试剂盒和 SeekOne<sup>®</sup> DD 文库构建试剂盒。

表 1 SeekOne<sup>®</sup> DD 单细胞 5' 转录组试剂盒, 2 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne <sup>®</sup> DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0201	-	SeekOne <sup>®</sup> DD Chip S3	R0003001	2 张
	-	Gasket	R0003101	2 张
	●	Carrier Oil	R0003201	0.6 mL
	●	Demulsion Agent	R0003301	0.5 mL
SeekOne <sup>®</sup> DD 单细胞 5' 微珠试剂盒 V1.3 K00501-0202	○	Single Cell 5' Barcoded Beads	R0006201	45 $\mu$ L $\times$ 2 管
	○	Enhancer	R0011601	10 $\mu$ L
	●	3x RT Buffer	R0008401	80 $\mu$ L
SeekOne <sup>®</sup> DD 单细胞 5' 逆转录试剂盒 V1.3 K00501-0203	●	RT Enzyme	R0003801	15 $\mu$ L
	●	RT Primer	R0006301	10 $\mu$ L
	●	Reducing Buffer	R0003901	100 $\mu$ L
	●	2 $\times$ PCR Master Mix	R0002101	60 $\mu$ L
SeekOne <sup>®</sup> DD 单细胞 5' cDNA 扩增试剂盒 V1.3 K00501-0206	●	cDNA Primers	R0004001	10 $\mu$ L
	●	Human Additive	R0011701	10 $\mu$ L
	●	Fragmentation Buffer	R0004101	15 $\mu$ L
	●	Fragmentation Enzyme	R0004201	24 $\mu$ L
	●	Ligation Buffer	R0004301	60 $\mu$ L
	●	DNA Ligase	R0004401	15 $\mu$ L
	●	Adaptor	R0004501	15 $\mu$ L
	●	2 $\times$ PCR Master Mix	R0002101	60 $\mu$ L
	●	N501	R0004601	25 $\mu$ L
	●	N502	R0004701	25 $\mu$ L
SeekOne <sup>®</sup> DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0204	●	N701	R0005001	25 $\mu$ L
	●	N702	R0005101	25 $\mu$ L
	○	Cleanup Beads	R0003401	0.5 mL
	○	SeekOne <sup>®</sup> DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0205		
	○			

表 2 SeekOne® DD 单细胞 5' 转转录组试剂盒, 8 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD S3 芯片试剂盒 V1.0 K00202-0801	-	SeekOne® DD Chip S3	R0003001	8 张
	-	Gasket	R0003101	8 张
	●	Carrier Oil	R0003202	1.2 mL ×2 管
	●	Demulsion Agent	R0003302	1.8 mL
SeekOne® DD 单细胞 5'微珠试剂盒 V1.3 K00501-0802	○	Single Cell 5' Barcoded Beads	R0006201	45 μL ×8 管
	○	Enhancer	R0011602	20 μL
SeekOne® DD 单细胞 5'逆转录试剂盒 V1.3 K00501-0803	●	3x RT Buffer	R0008402	280 μL
	●	RT Enzyme	R0003802	50 μL
	●	RT Primer	R0006302	20 μL
	●	Reducing Buffer	R0003901	100 μL
SeekOne® DD 单细胞 5'cDNA 扩增试剂盒 V1.3 K00501-0806	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL
	●	cDNA Primers	R0004002	20 μL
	●	Human Additive	R0011702	20 μL
SeekOne® DD 文库构建试剂盒 V1.0 K00202-0804	●	Fragmentation Buffer	R0004102	50 μL
	●	Fragmentation Enzyme	R0004202	100 μL
	●	Ligation Buffer	R0004302	240 μL
	●	DNA Ligase	R0004402	50 μL
	●	Adaptor	R0004502	50 μL
	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL
	●	N501	R0004601	25 μL
	●	N502	R0004701	25 μL
	●	N503	R0004801	25 μL
	●	N504	R0004901	25 μL
SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒 V1.0 K00202-0805	○	Cleanup Beads	R0003402	1.75 mL
	○			
	○			
	○			
	○			
	○			
	○			
	○			

SeekOne® DD 单细胞免疫组库试剂盒按照试剂功能及储存条件分为：SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人）、SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人）、SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠）、SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠）、SeekOne® DD 文库构建试剂盒。

表 3 SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人），2 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL×2 管
K00601-0201	●	Human TCR Primers 1	R0006501	10 μL
	●	Human TCR Primers 2	R0006601	10 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0204）同表 1

表 4 SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人），8 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL×2 管
K00601-0801	●	Human TCR Primers 1	R0006502	30 μL
	●	Human TCR Primers 2	R0006602	30 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0804）同表 2

表 5 SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人），2 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL×2 管
K00701-0201	●	Human BCR Primers 1	R0006701	10 μL
	●	Human BCR Primers 2	R0006801	10 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0204）同表 1

表 6 SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人），8 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL×2 管
K00701-0801	●	Human BCR Primers 1	R0006702	30 μL
	●	Human BCR Primers 2	R0006802	30 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0804）同表 2

表 7 SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠），2 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL×2 管
K01101-0201	●	Mouse TCR Primers 1	R0007601	10 μL
	●	Mouse TCR Primers 2	R0007701	10 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0204）同表 1

表 8 SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠），8 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL×2 管
K01101-0801	●	Mouse TCR Primers 1	R0007602	30 μL
	●	Mouse TCR Primers 2	R0007702	30 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0804）同表 2

表 9 SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠），2 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	2 tests
SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002101	60 μL×2 管
K01201-0201	●	Mouse BCR Primers 1	R0007801	10 μL
	●	Mouse BCR Primers 2	R0007901	10 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0204）同表 1

表 10 SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠），8 tests

名称	管盖颜色	组分	REF	8 tests
SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠） V1.3	●	2×PCR Master Mix	R0002102	240 μL×2 管
K01201-0801	●	Mouse BCR Primers 1	R0007802	30 μL
	●	Mouse BCR Primers 2	R0007902	30 μL

SeekOne® DD 文库构建试剂盒（K00202-0804）同表 2

## 保存条件

SeekOne® DD S3 芯片试剂盒：室温保存，常温运输；

SeekOne® DD 单细胞纯化试剂盒：2~8℃保存，常温运输；

SeekOne® DD 单细胞 5' 微珠试剂盒：-80℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 5' 逆转录试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 5' cDNA 扩增试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 文库构建试剂盒：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（人）：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（人）：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 TCR 扩增试剂盒（小鼠）：-20±5℃保存，干冰运输；

SeekOne® DD 单细胞 BCR 扩增试剂盒（小鼠）：-20±5℃保存，干冰运输。

## Index 序列

Index 号	正向序列
●N501	ACTAGAGC
●N502	TGCCTATA
●N503	GCAGCTGT
●N504	ACGTTAAG
●N701	TCAAGTAT
●N702	CACTTCGA
●N703	GCCAAGAC
●N704	AAACATCG

注 1: Index 正向序列是指与 Illumina 官方提供的序列方向相一致, 如果是在 HiSeq XTen 平台上测序, N5 Index 需提供反向互补序列;

注 2: 本试剂盒提供的 Index 序列可最多标记 16 个样品;

注 3: 文库的接头序列如下:

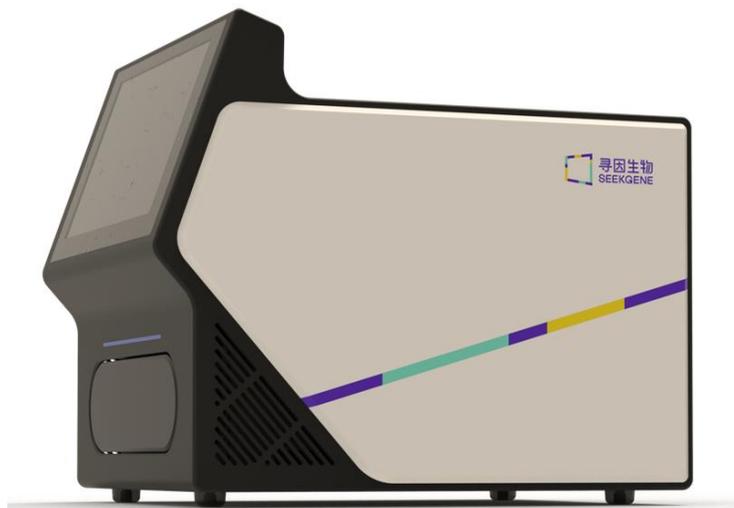
N5	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[N5]ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT 3'
N7	5' GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC[N7]ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG 3'

## 参数说明

1. 样本通量: Chip S3 是单通道芯片, 根据需要单次可灵活运行 1- 8 个样品;
2. 细胞捕获范围: 单通道可捕获 500-12,000 个细胞;
3. 油包水速率: 3 min 生成 15 万个油包水液滴;
4. 双胞胎率: 1,000 个细胞约 0.3%。

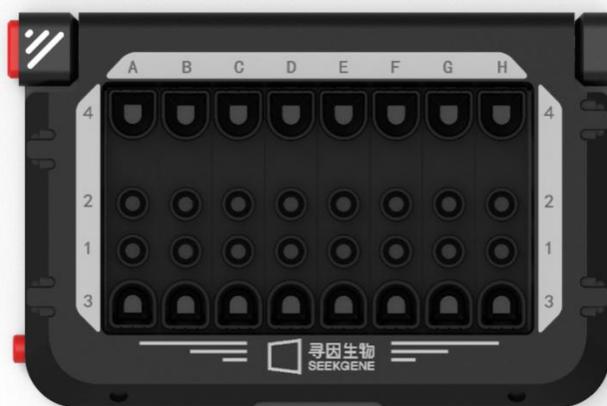
## 配套使用的仪器和耗材

1. SeekOne® 数字液滴仪（SeekOne® Digital Droplet System）。



2. SeekOne® DD 配件（SeekOne® DD Accessories）：每台仪器配置 1 套该配件，包括以下两个部分：

- 1) **SeekOne® DD 芯片夹具（SeekOne® DD Chip Holder，简称 Chip Holder）**：与 SeekOne® 数字液滴仪及 Chip S3 配套使用；
- 2) **占位芯片（Placed Chip，简称 Chip P）**：放置于芯片夹具中（每台仪器附带 8 张 Chip P）；样本量不足 8 个时，Chip P 置于未添加样品孔位。



## 需自备的仪器和其他试剂

### 1. 自备仪器及耗材

自备仪器以及耗材名称	推荐品牌及货号
细胞计数设备	Countstar, IN030101 北京寻因生物, M002C
0.2 mL 24 孔磁力架	Mich Scientific, Magpow-24
1.5 mL 12 孔磁力架	-
移液器	Eppendorf /RAININ (2.5 $\mu$ L/10 $\mu$ L/20 $\mu$ L/200 $\mu$ L/1,000 $\mu$ L) Agilent, G2991AA (Agilent 4200 TapeStation 系统)
核酸片段分析仪	Agilent, G2939BA (Agilent 2100 生物分析仪) Bioptic, Qsep400 (Qsep400)
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific, 4375786 Long Gene, A300 深模 BioRad, 1851196 (C1000)
0.2 mL PCR 管	Axygen, PCR-02-L-C
0.2 mL 八联排管	Axygen, PCR-2CP-RT-C
Qubit 4.0	Thermo Fisher Scientific, Q33238
50 mL 离心管	Corning, 430829
微型离心机	天根生化, OSE-MP25
振荡仪	IKA (MS3 basic 圆周振荡器及附件)
恒温混匀仪	杭州瑞城, TCS10
DNase/RNase-free 低吸附 EP 管	Axygen, MCT-150-L-C
低吸附滤芯枪头	Axygen, T-300-L-R-S, T-200-C-L-R-S/ T-1000-C-L-R-S

### 2. 自备试剂/试剂盒

试剂名称	推荐品牌及货号
1 $\times$ PBS	HyClone, SH30256.LS
无水乙醇 (分析纯)	Millipore Sigma, E7023-500ML
Nuclease-free Water	Thermo Fisher Scientific, AM9937
DNA 分选磁珠	Beckman Coulter, B23318 或 A63882 诺唯赞, N411-03
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Q32854
High Sensitivity D1000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5592/ 5067-5593
High Sensitivity D5000 ScreenTape/Reagents	Agilent, 5067-5584/ 5067-5585
RPMI 1640 培养基	Gibco, 11875093
S2-标准定量试剂盒	Bioptic, C105201/C105801/C405101
S1-高分辨率定量试剂盒	Bioptic, C105202/C105802/C405102

## 实验操作步骤

### Step 1 油包水生成及 Barcode 标记

#### 实验前准备

- 提前准备冰盒；
- 提前将 3x RT Buffer、Reducing Buffer、RT Primer 从-20℃取出解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- RT Enzyme 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
- 提前从-80℃冰箱取出 Barcoded Beads，室温平衡 30 min 备用；
- 提前将 Enhancer 从-80℃取出解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 确保 SeekOne® 数字液滴仪水平放置，运行在室温，无震动碰撞。
- 开启 SeekOne® 数字液滴仪，放置占位芯片，运行自检程序，自检成功等待后续实验使用。
- 深孔 PCR 仪程序设置运行程序。

注：提前预备的胶珠如果中途实验取消不进行上机，待胶珠平衡至 30 min 彻底融化再收回-80℃冰箱，短时间内的冻融容易导致胶珠密度、粘稠度改变。

### Step 1-1 准备单细胞混合液

1. 按照下表冰上配制 Mix，吹吸 15 次混匀，瞬时离心（一定要先按下表配制成反应 Mix 后再使用）；

组分	体积/样本
● 3x RT Buffer	26.6 μL
● RT Enzyme	5.2 μL
● RT Primer	2.0 μL
○ Enhancer	1.0 μL
● Reducing Buffer	1.6 μL
Total	36.4 μL

注 1：3x RT Buffer 试剂呈粉红色，若颜色改变或有沉淀析出，则弃用。

注 2：RT Enzyme 粘滞度较高，取液时枪头不宜插入液面过深，避免挂壁导致的试剂不足。

2. 确定捕获细胞数，先加入相应体积【43.6 (μL) - 下表对应的单细胞悬液体积 (μL)】的 Nuclease-free Water 至 Mix 吹打混匀；再加入下表对应的单细胞悬液（单细胞悬液加入前需吹打混匀）；最终单细胞混合液总体积为 80 μL。

Cell Stock Concentration (Cells/μL)	Targeted Cell Recovery												
	500	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000	11,000	12,000
300	3.3	6.7	13.3	20.0	26.7	n	n	n	n	n	n	n	n
400	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	n/a	n	n	n	n	n
500	2.0	4.0	8.0	12.0	16.0	20.0	24.0	28.0	32.0	n	n	n	n
600	1.7	3.3	6.7	10.0	13.3	16.7	20.0	23.3	26.7	30.0	n	n	n
700	1.4	2.9	5.7	8.6	11.4	14.3	17.1	20.0	22.9	25.7	28.6	31.4	n
800	1.3	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0
900	1.1	2.2	4.4	6.7	8.9	11.1	13.3	15.6	17.8	20.0	22.2	24.4	26.7
1,000	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	16.0	18.0	20.0	22.0	24.0
1,100	0.9	1.8	3.6	5.5	7.3	9.1	10.9	12.7	14.5	16.4	18.2	20.0	21.8
1,200	0.8	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	11.7	13.3	15.0	16.7	18.3	20.0
1,300	0.8	1.5	3.1	4.6	6.2	7.7	9.2	10.8	12.3	13.8	15.4	16.9	18.5
1,400	0.7	1.4	2.9	4.3	5.7	7.1	8.6	10.0	11.4	12.9	14.3	15.7	17.1
1,500	0.7	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	9.3	10.7	12.0	13.3	14.7	16.0
1,600	0.6	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	8.8	10.0	11.3	12.5	13.8	15.0
1,700	0.6	1.2	2.4	3.5	4.7	5.9	7.1	8.2	9.4	10.6	11.8	12.9	14.1
1,800	0.6	1.1	2.2	3.3	4.4	5.6	6.7	7.8	8.9	10.0	11.1	12.2	13.3
1,900	0.5	1.1	2.1	3.2	4.2	5.3	6.3	7.4	8.4	9.5	10.5	11.6	12.6
2,000	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0

注 1: Nuclease-free Water 不能直接加到细胞悬液中，需要加到 Mix 中。多样本同时上机待所有样本补水完成后再加入混匀的单细胞悬液，减少操作时间，防止细胞长时间在 Mix 中活性降低；

注 2: 表格中红色字体为细胞上样体积，蓝色背景标注为最佳的单细胞悬液原液浓度范围；

注 3: 细胞上样体积=目标捕获数 (Targeted Cell Recovery) /50%/最终悬液浓度。

## Step 1-2 向 Chip S3 加入试剂

1. 取出对应样本数量的 Chip S3（开封后 24H 内使用），替换芯片夹具中对应位置的 Chip P，然后盖上芯片夹具（如下图所示）；



**注 1：不加样位置必须安放 Chip P。**

**注 2：从包装袋中取出对应样本数量的 Chip S3 开封后 24 h 内使用。**

2. 将单细胞悬液用移液器吹吸混匀后吸取 78  $\mu\text{L}$ ，吸头尖稍倾斜插入标签 1 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置，缓慢注入，不要产生气泡，静置 30 sec；

3. 将平衡至室温的 Barcoded Beads 充分振荡 30 sec，瞬时离心 5 sec，确保 Barcoded Beads 液体中没有气泡，用移液器吸取 38  $\mu\text{L}$ ，吸头尖稍倾斜插入标签 2 对应的孔位底部中心稍高于底部平面位置，缓慢注入，不要产生气泡；

**注 1：加试剂时，移液器吸头随着液面移动，始终保持吸头尖在液面 3 mm 以下，避免产生气泡；**

**注 2：Barcoded Beads 液体粘稠，吸取到设定量程后枪尖在试剂管中等待 5 sec 再取出加样。**

4. 使用 200  $\mu\text{L}$  移液器吸取 120  $\mu\text{L}$  Carrier Oil，插入标签 3 对应的孔位，斜靠内壁，缓慢注入，不要产生气泡；重复此步骤一次，共加入 240  $\mu\text{L}$  Carrier oil。

**注：Carrier Oil 添加失败，可能导致油包水生成失败或损坏仪器。**

5. 按图示将 Gasket 挂载于芯片夹具上层，确保 Gasket 孔和芯片孔对齐。



**注：手不得触碰 Gasket 光滑面，取用时捏住两端空白处。**

### Step 1-3 运行 SeekOne® DD

1. 点击 SeekOne® DD 上的“出仓”按钮，弹出托盘；



2. 根据图示将覆盖 Gasket 的芯片夹具放入托盘，确保夹具水平放置，点击“进仓”按钮，收回夹具托盘；



3. 在仪器屏幕上点击“5”程序和“确认”按钮，启动程序；

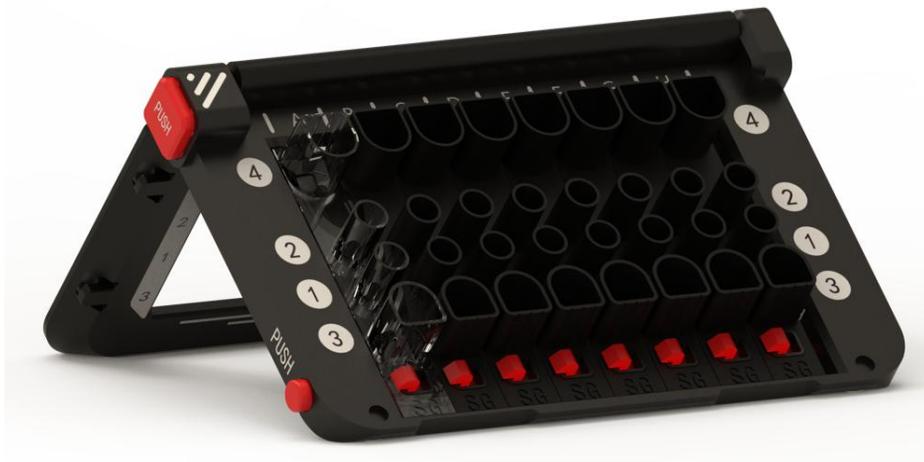


4. 程序运行结束后，点击“出仓”按钮，取出夹具。立即进行下一步实验。



### Step 1-4 转移生成的油包水

1. 在冰上放置一个新的 0.2 mL PCR 管；
2. 取下 Gasket，根据图示按住 PUSH 按钮，打开夹具盖，使芯片与水平面成 45°放置；



3. 观察标签 1 和 2 对应孔中的单细胞混合液和 Barcoded Beads 溶液体积，任一孔剩余液体高度异常表明芯片有堵塞；

注：1 号孔剩余应 <math>< 10 \mu\text{L}</math>，2 号孔剩余应 <math>< 15 \mu\text{L}</math>，产物总体积约 120  $\mu\text{L}</math>。$

4. 使用移液器从标签 4 号对应的孔中缓慢吸取全部油包水液体；

注 1：吸取生成的油包水时，枪尖保持在产物液体中悬空，不紧贴芯片底部吸取，防止挤裂油包水结构，如果底部有多余透明的油，可以用 0.5-10  $\mu\text{L}$  的小量程枪头吸掉，注意不要带吸走生成的粉色油包水产。

注 2：多芯片同时运行时，会小概率观察到个别芯片的标签 4 号对应的孔道中出现气泡，这属于正常现象，不会影响文库及后续结果。

5. 观察吸头内的液体情况，正常液相呈均一不透明乳浊状；



注：若出现左二管现象，说明存在堵塞。

6. 将吸头内的油包水沿着置于冰上的 PCR 管壁缓慢 (~20 sec) 注入冰上的 PCR 管中，不可离心、震荡，转出的油包水立即进行逆转录反应。

### Step 1-5 油包水逆转录反应

1. 将 Step1-4 中装有油包水的 PCR 管，放入 PCR 仪中运行下列程序，PCR 热盖 85℃，体积 100 μL：

步骤	温度	时间
1	42 °C	90 min
2	85 °C	5 min
3	4 °C	Hold

注：若液面高度高于加热块高度，则讲油包水产物均一分成两管进行逆转录反应，结束后离心合并成一管。

**STOPPING POINT：**逆转录后的油包水可在 4℃ 最长储存 72 h 或 -20℃ 最长储存 1 week。

### Step 2 样本回收和 cDNA 扩增

实验前准备

- 提前准备冰盒；
- 提前从 -20℃ 取出 2×PCR Master Mix、cDNA Primers、Reducing Buffer、Human Additive 冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本 1.5 mL；
- 提前将 Cleanup Beads 和 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

#### Step 2-1 油包水破乳

1. 室温下，向每管油包水液体中加入 100 μL Demulsion Agent，室温静置 2 min；



注 1：最后形成的混合液（如上图所示）包括 Demulsion Agent/Carrier Oil（透明）和水相反应液（粉红）。

注 2：如果水相反应液过少，芯片可能存在堵塞现象（如上图左二所示）。

2. 按照下表要求配制 Cleanup Mix:

组分	体积/样本
○ Cleanup Beads	175.5 $\mu$ L
● Reducing Buffer	4.5 $\mu$ L
Total	180 $\mu$ L

3. 从 PCR 管底部缓慢吸取去除 130  $\mu$ L Demulsion Agent/Carrier Oil 混合液，底部留 2~5  $\mu$ L 体积的透明混合液，防止吸到粉红色水相反应液；

注：如果破油后步骤 1 仍出现雾状浑浊上部水相反应液，可以再次重复 1 和 3 步骤进行二次破油。

4. 向每管样本中加入 180  $\mu$ L 振荡混匀后的 Cleanup Mix，缓慢吹吸至少 15 次，室温孵育 10 min，中间 5 min 时缓慢吹打 10 次；

注：加液时混匀时移液器吸头尖随着液面上下移动，防止液面太满撒漏污染。

5. 孵育结束后，将 PCR 管置于 0.2 mL 磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

6. 保持在磁力架上加入 300  $\mu$ L 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

注：80%乙醇清洗前要注意一直保持开盖状态，防止盖子沾染磁珠混合液，影响后续实验。

7. 将闭盖的 PCR 管瞬时离心，用 10  $\mu$ L 移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；

8. 开盖室温静置 1 min 干燥磁珠至呈暗哑色以使乙醇完全挥发，加入 23  $\mu$ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min；

注 1：磁珠干燥至呈现暗哑色不干裂大约需要 1 min，不超过 1.5 min。如室内温度过高或过低，根据磁珠干燥状态缩短或者延长干燥时间，否则磁珠太过干燥容易成团难以混匀。

注 2：充分悬浮磁珠推荐先涡旋震散 10-15 s，再用枪头吹吸 15 次。

9. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 22  $\mu$ L 上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

### Step 2-2 cDNA 扩增

1. 配制 cDNA 扩增 Mix:

1.1 若样本是人的相关组织或细胞:

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25μL
● cDNA Primers	2 μL
● Human Additive	1 μL
Total	28μL

1.2 若样本是其他物种（非人源）的相关组织或细胞：

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25 μL
● cDNA Primers	2 μL
Nuclease-free Water	1 μL
Total	28 μL

2. 将配制好的 28 μL cDNA 扩增 Mix 加入到 Step 2-1 步骤纯化后的 22 μL cDNA 产物中，吹吸混匀 10 次，瞬时离心，然后进行 PCR。设置 PCR 程序如下，热盖温度 105℃，体积 50 μL：

扩增循环数	温度	时间
	98℃	3 min
11-16 (见下表)	98℃	20 sec
	63℃	30 sec
	72℃	1 min
	72℃	5 min
	4℃	Hold

细胞直径	上样细胞数	推荐扩增循环数
≤10 μm	500-5,000 个	16
	5,000-15,000 个	14
	15,000-24,000 个	13
>10 μm	500-5,000 个	14
	5,000-15,000 个	12
	15,000-24,000 个	11

### Step 2-3 cDNA 富集产物纯化

1. 吸取 30 μL (0.6×) 充分混匀的 DNA 分选磁珠加入 step 2-2 产物中，吹吸 10 次或振荡混匀；

注：0.6×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μL / 50 μL=0.6×。

2. 将混匀后的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 200 μL 80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

4. 将闭盖的 PCR 管瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
5. 开盖室温静置使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色，不干裂，约 3-5 min），加入 41  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
6. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 40  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

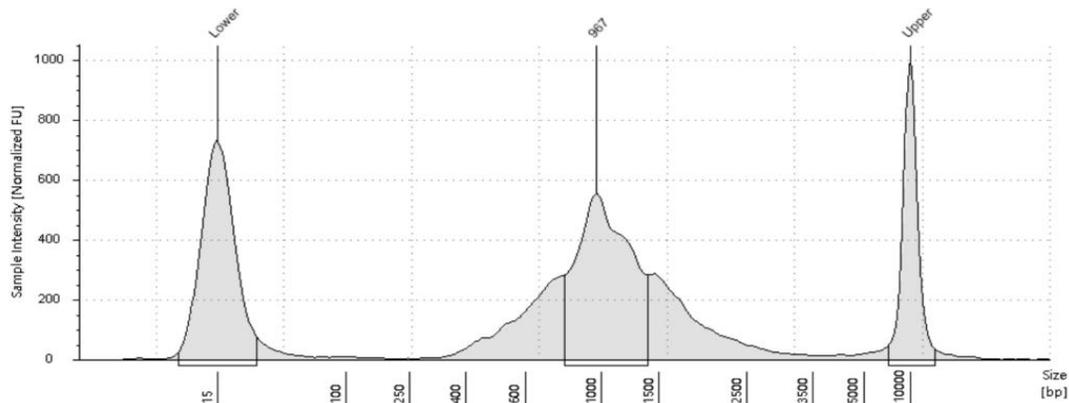
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

**STOPPING POINT: cDNA 富集产物纯化后可在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下储存不超过 1 个月或 $4^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 72 h。**

### Step 2-4 cDNA 富集产物质检标准

1. 捕获 500-5000 个细胞，cDNA 富集产物浓度(Qubit) $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250-5000 bp，主峰在 750-2500 bp 范围（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；
2. 捕获 6000-10000 个细胞，cDNA 富集产物浓度 $\geq 3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250-5000 bp，主峰在 750-2500 bp 范围，判定合格；
3.  $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{cDNA 富集产物浓度} < 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250-5000 bp，主峰在 750-2500 bp 范围，或 cDNA 富集产物浓度 $\geq 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，检测峰图范围在 250-5000 bp，主峰不在 750-2500 bp 范围，提示风险；
4. cDNA 富集产物浓度 $< 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，或产物峰形检测在 250-5000 bp 无目的片段，无明显主峰，判定不合格；

注：如果有小片段再进行一次 0.6 $\times$ 纯化，直至无小片段。



### Step 3 5' 转录组文库构建

#### 实验前准备

- 提前准备冰盒；
- 提前从-20℃取出 Fragmentation Buffer、Ligation Buffer、Adaptor、2×PCR Master Mix 冰上解冻，充分振荡后，瞬时离心，置于冰盒上备用；
- Fragmentation Enzyme、DNA Ligase 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间不得超过 24 h），单个样本 1.5 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

#### Step 3-1 DNA 片段化与末端修复

1. 按照下表设置程序，并运行 PCR 仪，PCR 仪热盖 70℃，体积 50 μL：

步骤	温度	时间
1	4℃	Hold
2	32℃	5 min
3	65℃	30 min
4	4℃	Hold

2. 按照下表配制反应体系，振荡混匀，瞬时离心，冰上备用；每个样本取 50-100 ng cDNA 富集产物为模板，计算模板加样体积，补加对应体积的无酶水完成体系配置；若 cDNA 总量不足 50 ng，则每个样本取 15 μL cDNA 富集产物进行打断反应。

注：例如 cDNA 浓度 5 ng/μL，取 50 ng 建库的模板体积 10 μL=50 ng/(5 ng/μL)。

组分	体积/样本
cDNA 富集产物	X μL
Nuclease-free Water	(35-X) μL
● Fragmentation Buffer	5 μL
Total	40 μL

3. 每个反应体系中冰上加入 10 μL Fragmentation Enzyme，冰上吹吸 15 次，瞬时离心；
4. 立即将混匀好的反应试剂放入已运行的 PCR 仪中，点击“下一步”继续运行 PCR 程序。

#### Step 3-2 打断后分选

1. 反应结束后瞬时离心，加入 30 μL (0.6×) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹打 10 次混匀或振荡混匀；

注：0.6×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 30 μL / 50 μL=0.6×。

2. 室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架上吸附至溶液澄清，吸取上清到另一含有 10 μL (0.8×) DNA 分选磁珠的 PCR 管中；用移液器吹打 10 次混匀；

注 1：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

注 2：0.8×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即（第一次 30 μL+第二次 10 μL）/ 50 μL=0.8×。

3. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

4. 加入 200 μL 80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇；重复此步骤一次；

5. 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
6. 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；
7. 加入 51  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
8. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移上清 50  $\mu\text{L}$  至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

### Step 3-3 接头连接

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● Ligation Buffer	20 $\mu\text{L}$
● DNA Ligase	5 $\mu\text{L}$
● Adaptor	5 $\mu\text{L}$
Nuclease-free Water	20 $\mu\text{L}$
Total	50 $\mu\text{L}$

2. 将 50  $\mu\text{L}$  反应体系加入到片段化产物中，用移液器吹吸 15 次混匀，瞬时离心；
3. 按照下表设置 PCR 程序，进行反应，PCR 仪热盖 30 $^{\circ}\text{C}$ 或关闭热盖，体积 100  $\mu\text{L}$ ：

步骤	温度	时间
1	20 $^{\circ}\text{C}$	15 min
2	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

### Step 3-4 连接产物纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 80  $\mu\text{L}$  (0.8 $\times$ ) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 80  $\mu\text{L}$  / 100  $\mu\text{L}$ =0.8 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 10 min 后闭盖瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；  
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。
3. 保持在磁力架上加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；
4. 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的酒精，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
5. 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；
6. 加入 24  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
7. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 23  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

### Step 3-5 文库扩增

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25 μL
● N5	1 μL
● N7	1 μL
Total	27 μL

注：若样本多可以采购 96 孔板 index 单品，此单品 index 种类更多，且是单孔是 I5 和 I7 混合标签，用于样本量大、包 lane 的测序策略，使用前混匀后直接吸取 2 μl 添加到扩增体系中，产品货号 K02001-96。

- 取 27 μL 反应体系加入到连接纯化产物中，用移液器吹吸 15 次混匀，瞬时离心；
- 按照下列条件设置 PCR 程序，进行反应，热盖 105℃，体积 50 μL：

扩增循环数	温度	时间
	98℃	3 min
	98℃	20 sec
11-16	54℃	30 sec
(见下表)	72℃	20 sec
	72℃	5 min
	4℃	Hold

cDNA 投入量	推荐扩增循环数
cDNA ≤ 10 ng	16
10 ng < cDNA ≤ 25 ng	14
25 ng < cDNA ≤ 50 ng	13
50 ng < cDNA ≤ 75 ng	12
75 ng < cDNA ≤ 100 ng	11

### Step 3-6 片段分选

- 反应结束后瞬时离心，加入 25 μL (0.5×) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；

注：0.5×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 25 μL / 50 μL=0.5×。

- 室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架上吸附至溶液澄清，吸取上清到另一个含有 15 μL (0.8×) DNA 分选磁珠的 PCR 管中，用移液器吹打 10 次混匀；

注：0.8×是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 (第一次 25 μL+第二次 15 μL) / 50 μL=0.8×。

- 将混匀好的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

- 加入 200 μL 80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；
- 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10 μL 移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
- 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不开裂）；
- 加入 31 μL Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；

8. 然后置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 30  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

注 1：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

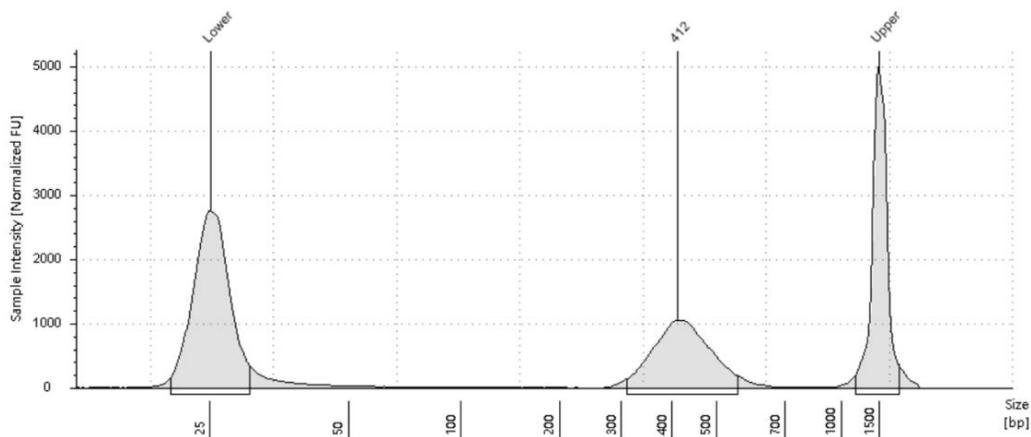
注 2：管壁上同时也记录文库浓度，样本名称，index 编号。

**STOPPING POINT：文库产物纯化后可在  $-20^{\circ}\text{C}$  最长储存 6 months。**

### Step 3-7 文库质控标准

1. 文库浓度 (Qubit)  $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，无小片段污染，主峰在 350-750 bp 范围 (Agilent 4200 TapeStation)，判定合格；
2.  $1 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq$  文库浓度  $< 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  无小片段污染，主峰在 350-750 bp 范围，可风险上机；
3. 文库浓度  $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，主峰在 350-750 bp 范围，但有小片段污染，小片段高度低于目标片段高度，可风险上机；
4. 文库浓度  $< 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，无明显主峰，或小片段高度高于目标片段高度，判定不合格。

注：如果有小片段存在需再进行一次 0.75 $\times$ 纯化，直至无小片段。



## Step 4 全长 V(D)J 片段富集

### 实验前准备

- 提前准备冰盒；
- 提前从  $-20^{\circ}\text{C}$  取出对应物种(人或小鼠)的 TCR 或 BCR 富集试剂冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间不得超过 24 h），单个样本 1.5 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

### Step 4-1 全长 V(D)J 片段第一次富集

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心，冰上备用；

组分	体积/样本
● 2×PCR Master Mix	25 $\mu\text{L}$
● Human TCR Primers 1/ ● Mouse TCR Primers 1	3 $\mu\text{L}$
或者	
● Human BCR Primers 1/ ● Mouse BCR Primers 1	3 $\mu\text{L}$
Nuclease-free Water	19 $\mu\text{L}$
Total	47 $\mu\text{L}$

2. 取 3  $\mu\text{L}$  Step 2 步骤中的 cDNA 产物加入到上述配制好的 47  $\mu\text{L}$  反应体系中，用移液器吹吸 10 次混匀，瞬时离心；
3. 按照下表设置 PCR 程序，进行反应，热盖为  $105^{\circ}\text{C}$ ，体积 50  $\mu\text{L}$ ：

扩增循环数	温度	时间
	$98^{\circ}\text{C}$	3 min
	$98^{\circ}\text{C}$	20 sec
T 细胞: 12	$60^{\circ}\text{C}$	30 sec
B 细胞: 10	$72^{\circ}\text{C}$	1 min
	$72^{\circ}\text{C}$	5 min
	$4^{\circ}\text{C}$	Hold

### Step 4-2 V(D)J 富集产物片段分选

1. 反应结束后瞬时离心，加入 25  $\mu\text{L}$  ( $0.5\times$ ) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；

注： $0.5\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即  $25\ \mu\text{L} / 50\ \mu\text{L}=0.5\times$ 。

2. 室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架上吸附至溶液澄清，吸取上清到另一含有 15  $\mu\text{L}$  ( $0.8\times$ ) DNA 分选磁珠的 PCR 管中；用移液器吹吸 10 次混匀；

注： $0.8\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即（第一次 25  $\mu\text{L}$ +第二次 15  $\mu\text{L}$ ）/ 50  $\mu\text{L}=0.8\times$ 。

3. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

4. 加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

5. 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
6. 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；
7. 加入 23  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
8. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 22  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

**STOPPING POINT:** 纯化产物可在 4 $^{\circ}\text{C}$  最长储存 72 h 或 -20 $^{\circ}\text{C}$  最长储存 1 month。

#### Step 4-3 全长 V(D)J 片段第二次富集

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心，冰上备用；

组分	体积/样本
● 2 $\times$ PCR Master Mix	25 $\mu\text{L}$
● Human TCR Primers 2/	3 $\mu\text{L}$
● Mouse TCR Primers 2	
或者	
● Human BCR Primers 2/	3 $\mu\text{L}$
● Mouse BCR Primers 2	
Total	28 $\mu\text{L}$

2. 将配制好的 28  $\mu\text{L}$  富集 Mix 加入到 Step 4-2 步骤纯化后的 22  $\mu\text{L}$  富集产物中，吹吸混匀 10 次，瞬时离心，然后进行 PCR。
3. 按照下表设置 PCR 程序，进行反应，热盖为 105 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 50  $\mu\text{L}$ 。

扩增循环数	温度	时间
T 细胞: 10 B 细胞: 10	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec
	60 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min
	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

#### Step 4-4 富集产物片段分选

1. 反应结束后瞬时离心，加入 25  $\mu\text{L}$ (0.5 $\times$ )充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；  
注：0.5 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 25  $\mu\text{L}$  / 50  $\mu\text{L}$ =0.5 $\times$ 。
2. 室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架上吸附至溶液澄清，吸取上清到另一含有 15  $\mu\text{L}$  (0.8 $\times$ ) DNA 分选磁珠的 PCR 管中；用移液器吹吸 10 次混匀；  
注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即（第一次 25  $\mu\text{L}$ +第二次 15  $\mu\text{L}$ ）/ 50  $\mu\text{L}$ =0.8 $\times$ 。
3. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；  
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。
4. 加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

5. 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu$ L 移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；
6. 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；
7. 加入 51  $\mu$ L Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；
8. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 50  $\mu$ L 上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

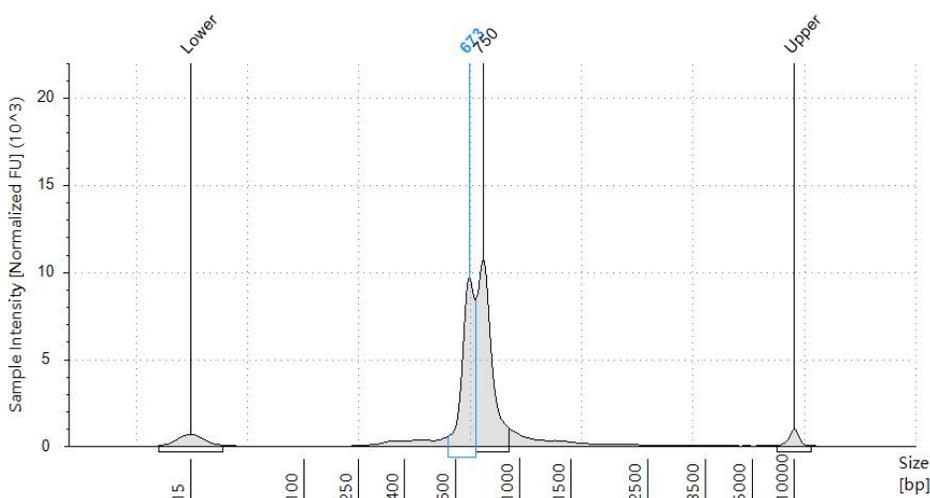
注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

**STOPPING POINT:** 纯化产物可在 4 $^{\circ}$ C 最长储存 72 h 或 -20 $^{\circ}$ C 最长储存 1 month。

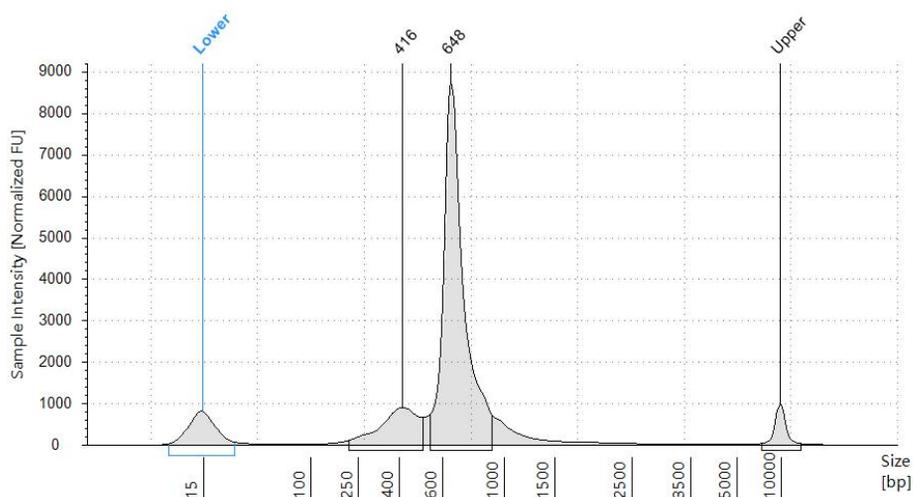
#### Step 4-5 全长 V(D)J 富集产物质检标准

1. 捕获 500-5000 个细胞，TCR/BCR 浓度(Qubit) $\geq$ 5 ng/ $\mu$ L，产物峰形片段范围在 250-2000 bp，特异性尖峰在 500-1000 bp 范围内（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；
2. 捕获 6000-10000 个细胞，TCR/BCR 浓度 $\geq$ 10 ng/ $\mu$ L，产物峰形片段范围在 250-2000 bp，特异性尖峰在 500-1000 bp 范围内，判定合格；
3. 0.5 ng/ $\mu$ L $\leq$ TCR/BCR 浓度 $<$ 1 ng/ $\mu$ L，TCR/BCR 产物峰形片段在 500-1000 bp 范围存在特异性峰；TCR/BCR 浓度 $\geq$ 1 ng/ $\mu$ L 或 TCR/BCR 在 500-1000 bp 范围内特异性尖峰不明显，提示风险；
4. TCR/BCR 浓度 $<$ 0.5 ng/ $\mu$ L，或产物峰形检测在 500-1000 bp 无无明显主峰，判定不合格；

注：如果有小于 200 bp 的小片段存在需再进行一次 0.75 $\times$  纯化，直至无小片段。



BCR 富集产物峰型参考图



TCR 富集产物峰型参考图

## Step 5 V(D)J 文库构建

### 实验前准备

- 提前准备冰盒；
- 提前将 Fragmentation Buffer、Ligation Buffer、Adaptor、2× PCR Master Mix 从-20℃取出冰上解冻，充分振荡后瞬时离心，置于冰盒上备用；
- Fragmentation Enzyme、DNA Ligase 使用前从-20℃取出，瞬时离心后立即使用；
- 按需配制 80%乙醇（现用现配，放置时间小于 24 h），单个样本 1.5 mL；
- 提前将 DNA 分选磁珠平衡至室温备用。

### Step 5-1 DNA 片段化与末端修复

- 按照下表设置程序，并运行 PCR 仪，PCR 仪热盖 70℃，体积 50 μL：

步骤	温度	时间
1	4℃	Hold
2	32℃	2 min
3	65℃	30 min
4	4℃	Hold

- 按照下表配制反应体系，振荡混匀，瞬时离心，冰上备用。每个样本取 50-100 ng 富集产物为模板，计算模板加样体积，补加对应体积的无酶水完成体系配置；若不足 50 ng，每个样本取 15 μL 富集产物进行后续打断反应。

组分	体积/样本
V(D)J 富集产物	X μL
Nuclease-free Water	(35-X) μL
● Fragmentation Buffer	5 μL
Total	40 μL

- 每个反应体系中冰上加入 10 μL Fragmentation Enzyme，冰上吹吸 15 次，瞬时离心；
- 立即将混匀好的反应试剂放入已运行的 PCR 仪中，点击“下一步”继续运行 PCR 程序。

### Step 5-2 接头连接

- 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● Ligation Buffer	20 μL
● DNA Ligase	5 μL
● Adaptor	5 μL
Nuclease-free Water	20 μL
Total	50 μL

- 将 50 μL 反应体系加入到片段化分选产物中，用移液器吹吸 15 次混匀，瞬时离心；
- 按照下表设置 PCR 程序，进行反应，PCR 仪热盖 30℃或关闭热盖，体积 100 μL。

步骤	温度	时间
1	20℃	15 min
2	4℃	Hold

### Step 5-3 连接产物纯化

1. 反应结束后瞬时离心，加入 80  $\mu\text{L}$  (0.8 $\times$ ) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即  $80 \mu\text{L} / 100 \mu\text{L} = 0.8\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 10 min 后闭盖瞬离，置于磁力架上吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 保持在磁力架上加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇，约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

4. 经闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的上清酒精，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；

5. 室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；

6. 加入 24  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；

7. 置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 23  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

### Step 5-4 文库扩增

1. 按照下表配制反应体系，充分振荡混匀，瞬时离心；

组分	体积/样本
● 2 $\times$ PCR Master Mix	25 $\mu\text{L}$
● N5	1 $\mu\text{L}$
● N7	1 $\mu\text{L}$
Total	27 $\mu\text{L}$

注：若样本多可以采购 96 孔板 index 单品，此单品 index 种类更多，且是单孔是 I5 和 I7 混合标签，用于样本量大、包 lane 的测序策略，使用前混匀后直接吸取 2 $\mu\text{L}$  添加到扩增体系中，产品货号 K02001-96。

2. 取 27  $\mu\text{L}$  反应体系加入到连接纯化产物中，用移液器吹吸 15 次混匀，瞬时离心；

3. 按照下列条件设置 PCR 程序，进行反应，热盖 105 $^{\circ}\text{C}$ ，体积 50  $\mu\text{L}$

扩增循环数	温度	时间
6-10 (见下表)	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec
	54 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	20 sec
	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

V(D)J 富集产物投入量	推荐扩增循环数
V(D)J 富集产物 $\leq$ 10 ng	10
10 ng < V(D)J 富集产物 $\leq$ 25 ng	9
25 ng < V(D)J 富集产物 $\leq$ 50 ng	8
50 ng < V(D)J 富集产物 $\leq$ 75 ng	7
75 ng < V(D)J 富集产物 $\leq$ 100 ng	6

### Step 5-5 片段分选

1. 反应结束后瞬时离心，加入 40  $\mu\text{L}$  (0.8 $\times$ ) 充分混匀的 DNA 分选磁珠，用移液器吹吸 10 次或振荡混匀；

注：0.8 $\times$ 是指加入的 DNA 分选磁珠与 PCR 产物的体积比，即 40  $\mu\text{L}$  / 50  $\mu\text{L}$ =0.8 $\times$ 。

2. 将混匀好的产物室温静置 5 min 后闭盖瞬离，放置于磁力架吸附至溶液澄清，去除上清；

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

3. 加入 200  $\mu\text{L}$  80%乙醇（保持放置在磁力架上），约 30 sec 后小心去除上清乙醇，重复此步骤一次；

4. 将闭盖的 PCR 管进行瞬时离心，用 10  $\mu\text{L}$  移液器去除所有残留的上清乙醇，离心时磁珠吸附管面朝外侧，防止离心将磁珠甩飞至管壁；

5. 开盖室温静置 3-5 min 使乙醇完全挥发（磁珠呈现暗哑色且不干裂）；

6. 加入 31  $\mu\text{L}$  Nuclease-free Water 充分悬浮磁珠，室温静置 2 min 后瞬离；

7. 然后置于磁力架上吸附至溶液澄清，转移 30  $\mu\text{L}$  上清液至新的 0.2 mL PCR 管中。

注：吸附时使用移液器吸头朝吸附磁珠面的对侧轻吸混 5 次，加速磁力吸附。

**STOPPING POINT: 文库产物分选后可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 最长储存 6 months。**

### Step 5-6 文库质控标准

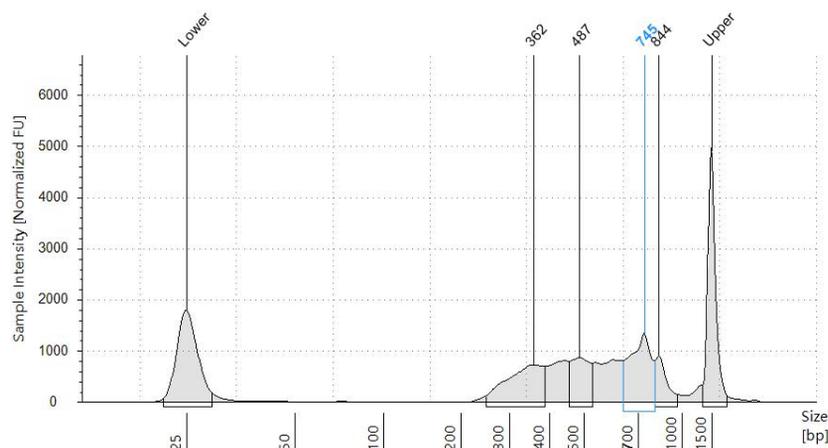
1. 文库浓度(Qubit) $\geq 5$  ng/ $\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250 bp-1500 bp，无小片段污染，主峰在 350-850 bp 范围（Agilent 4200 TapeStation），判定合格；

2. 1 ng/ $\mu\text{L}$  $\leq$ 文库浓度 $< 5$  ng/ $\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250 bp-1500 bp，无小片段污染，主峰在 350-850 bp 范围，可风险上机；

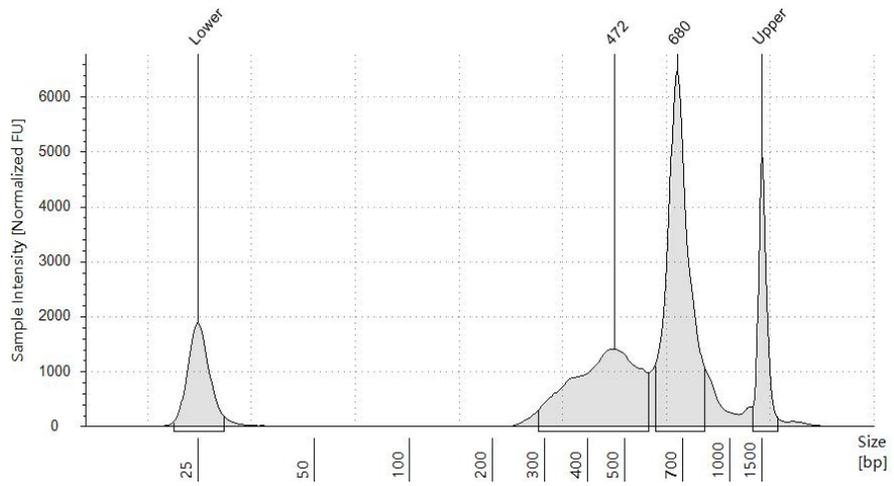
3. 文库浓度 $\geq 5$  ng/ $\mu\text{L}$ ，产物峰形片段范围在 250 bp-1500 bp，主峰在 350-850 bp 范围，但有小片段污染，小片段高度低于目标片段高度，可风险上机；

4. 文库浓度 $< 1$  ng/ $\mu\text{L}$ ，或产物无明显主峰，或小片段高度高于目标片段高度，判定不合格；

注：如果有小于 200 bp 的小片段存在需再进行一次 0.75 $\times$ 纯化，直至无小片段。



BCR 文库峰型参考图



TCR 文库峰型参考图

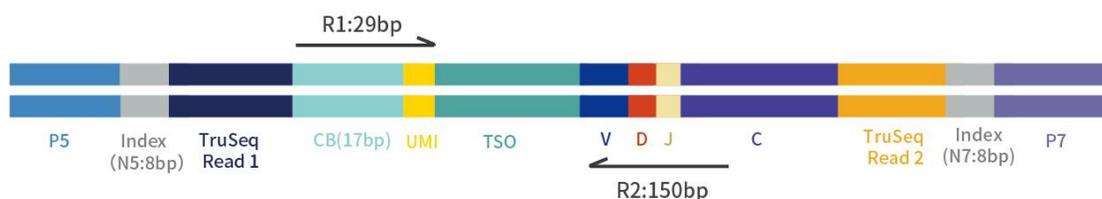
## 附录 1：高通量测序

1. 测序文库：SeekOne® DD 单细胞 5'转录组及 V(D)J 文库以 P5 开始，P7 结束，其中 cell barcode (CB) 包含 17 bp，UMI 包含 12 bp，样本双端 index 分别为 8 bp 的 N5 和 N7。通过文库的测序，可以获得用于单细胞 5'转录组及 V(D)J 标准分析的基本数据 FASTQ。

### 单细胞 5' 转录组文库



### 单细胞 V(D)J 文库



## 2. 测序平台

此试剂盒构建的单细胞文库可适配于真迈测序和 Illumina 测序平台。

真迈平台：SURFSeq5000

Illumina 平台：MiSeq、NextSeq500/550/2000、HiSeq2500(Rapid Run)、HiSeq3000/4000、NovaSeq。

## 3. 文库测序深度及运行参数

	单细胞 5'转录组文库	单细胞 V(D)J 文库
测序深度	≥20,000 reads/cell 建议 50,000 reads/cell	≥5,000 reads/cell
测序类型	双端测序	双端测序
测序读长	Read1: 29 bp N7 Index: 8 bp N5 Index: 8 bp Read2: 90 bp	Read1: 29 bp N7 Index: 8 bp N5 Index: 8 bp Read2: 150 bp

注 1：建议测序量：单细胞转录组≥50,000 reads/cell，单细胞免疫组库≥5,000 reads/cell，以确保单细胞测序数据分析的准确性。

注 2：建议测序读长：双端测序，其中 Read1 端读长至少 29 bp，确保获取到完整的 Cell Barcode 和 UMI 的序列；单细胞转录组 Read2 端读长至少 90 bp 进行后续数据分析；免疫组库 Read2 端读长至少 150 bp 进行后续数据分析，读长越长越有利于全长 VDJ 的拼接。

#### 4. 文库上样量

平台	仪器	上样浓度 (pM)	PhiX (%)
Illumina 平台	MiSeq	10	1
	NextSeq500	1.5	1
	HiSeq2500(RR)	10	1
	HiSeq 4000	180	1
	NovaSeq	150*/300	1
	NextSeq 2000	650	1

注：其他测序平台信息请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。

#### 5. 文库 pooling

考虑到 5'基因表达文库或 V(D)J 文库可能会被 pooling 到一条 lane 进行测序要求同时上样测序的文库中不能使用相同 index，相同 index 的样本不能在后续分析中进行样本间数据的拆分。

当 5'基因表达文库和 V(D)J 文库合并测序时，由于混合文库对测序深度需求存在差异，因此混样时可根据所需测序深度比例进行：

	测序深度 reads/cell	文库混样比例
V(D)J 文库	5,000	1
5' 基因表达文库	50,000	10

## 附录 2：生物信息学分析

分析软件：单细胞数据分析采用北京寻因生物自主研发的 SeekSoul Tools；SeekSoul Tools 可识别细胞标签 barcode，比对定量，得到下游分析的细胞表达矩阵，用于后续的细胞聚类 and 差异分析。

1) 输入文件：FASTQ

2) 输出文件：bam,html,csv,matrix(filtered\_feature\_bc\_matrix,raw\_feature\_bc\_matrix)

3) 操作系统：Linux 点击 <http://seeksoul.seekgene.com/zh/v1.2.0/index.html> 可获得该软件包及安装说明。

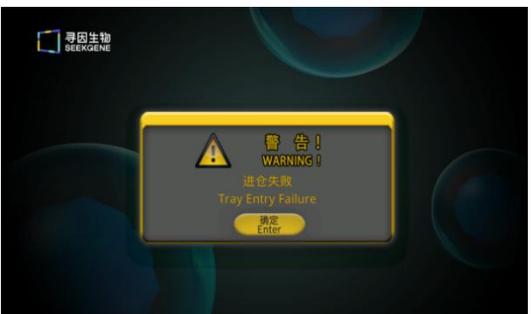
软件获得：点击 <http://seeksoul.seekgene.com/zh/v1.2.0/index.html> 可获得该软件包及安装说明。

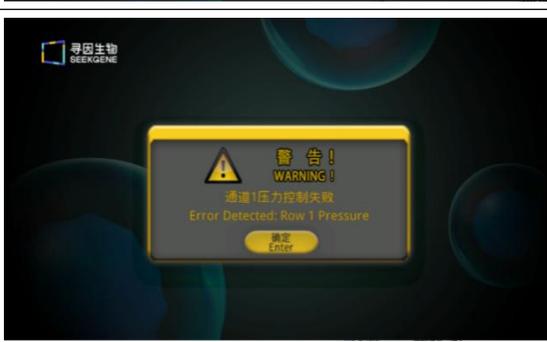
## 附录 3：SeekOne® 数字液滴仪使用说明

详见《SeekOne® 数字液滴仪使用说明》。

## 附录 4：SeekOne® 数字液滴仪故障处理

设备在运行过程中，可能会出现故障。下表为故障类型及处理方法。在设备出现故障时，用户可以先根据下表进行故障排查并处理，如果不能将故障排除，请及时与我公司联系。

故障类型	解决方案
	<p>请确保设备正确安装，点击“确定”可重新自检，或重新启动设备。若反复出现该信息，内部硬件可能出现问题，强制使用将导致仪器损坏，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。</p>
	<p>进出仓运行有可能受阻，请确认运行路径上无物体阻挡后点击提示窗的“确定”按钮后，仪器会继续下一步动作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。</p>
	<p>进出仓运行有可能受阻，请确认运行路径上无物体阻挡后点击提示窗的“确定”按钮后，仪器会继续下一步动作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。</p>
	<p>请再次重试或重新开机操作。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。</p>
	<p>请确认密封垫是否被正确安装在芯片夹具上，并重新定位芯片夹具。检查芯片仓表面是否有异物存在，并清洁表面。若反复出现该信息，请联系（support@seekgene.com）以获得进一步帮助。</p>

	<p>重新启动设备，如反复出现，请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。</p>
	<p>请检查密封垫上是否洁净，芯片外观是否有残缺，芯片夹具是否正确安装。如果有密封垫污垢或芯片外观残缺，请更换密封垫或芯片后重新尝试。如果再次出现错误信息，请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。</p>
	<p>请检查密封垫上是否洁净，芯片外观是否有残缺，芯片夹具是否正确安装。如果有密封垫污垢或芯片外观残缺，请更换密封垫或芯片后重新尝试。如果再次出现错误信息，请联系 (support@seekgene.com) 以获得进一步帮助。</p>

## 附录 5：包装符号释义

	制造商		欧盟代表
	体外诊断产品		保质期
	产品批次		产品货号
	试剂盒货号		试剂瓶货号
	产品识别码		查阅使用说明书
	避免雨淋		避光保存
	如果包装损坏，请不要使用		注意
	生物危害		易碎
	储存温度为 -25 ~ -15°C		CE 标识
	储存温度为 2 ~ 8°C		储存温度为 -80°C

## 附录 6：修订历史

序号	变更类型	生效日期
1	新建	2022. 08. 05
2	升版	2023. 02. 28
3	升版	2023. 12. 19
4	修订	2024. 01. 26
5	修订	2024. 04. 01
6	修订	2024. 06. 14