

## 一、单细胞悬液制备【请根据样本类型选择对应的单细胞悬液制备方法】

### (1) 人 PMBC 样本单细胞悬液制备

抽取人外周血 5ml 至 EDTA 抗凝管中，用等量 1×PBS 稀释全血。50ml 离心管中加入等体积淋巴细胞分离液(Ficoll)，将稀释后的血液缓慢平铺于淋巴细胞分离液上，20℃，水平转子 2000rpm 离心 20min，break 设置为 0。小心吸取中间白膜层(PBMC)细胞到新的 15ml 离心管中。用 10ml 1×PBS 洗涤白膜层细胞。300g，离心 10min。弃上清，再用 5ml cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬细胞，300g 离心 10min 洗涤 2 次后，弃上清，用 1ml cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬细胞，BD Rhapsody™ Scanner 计数单细胞悬液浓度和细胞活率。

### (2) 组织样本单细胞悬液制备

用手术刀(或手术剪)从 XXX (物种)新鲜采集 XXX 组织。无菌条件下，用预冷的 RPMI 1640+0.04%BSA 培养基洗涤 2 次。用手术剪刀将组织充分剪碎成约 0.5mm<sup>3</sup> 的小块，放入新鲜配置的酶解液(酶解液组分、浓度、品牌)中，37℃ 恒温培养箱中酶解消化 30-60 min (参考文献)，每隔 5-10min 颠倒混匀一次。消化好的细胞悬液用 BD 40µm 细胞筛过滤 1-2 次，4℃，300g 离心 5min。沉淀用适量培养基重悬后，加入等体积的红细胞裂解液(MACS，货号 130-094-183)，混匀后 4℃静置 10 min，细胞悬液 300g 离心 5min，弃上清。沉淀用 cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 洗涤 1 次，300g 离心 5min，弃上清，细胞沉淀用 100µl cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬，BD Rhapsody™ Scanner 计算细胞浓度和活率。

【可选】去除死细胞(如果解离报告中“死细胞去除”为“否”，则无需此段内容)：死细胞去除按照 MACS Dead Cell Removal Kit (130-090-101) 操作说明进行。细胞悬液中加 100µl 磁珠，吹打混匀，室温孵育 15min 后过柱，洗脱的细胞悬液 4℃、300g 离心 5min 洗涤 2 次后，用 50-100µl cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬，BD Rhapsody™ Scanner 计算细胞浓度和活率。

【可选】免疫细胞磁珠分选：制备好的单细胞悬液利用美天旎鼠/人 CD45 MicroBeads 富集 CD45+ (或 CD45-) 免疫细胞，操作流程依照 MACS 产品说明书进行。分选后的细胞 BD Rhapsody™ Scanner 计数后用于 scRNA-seq。

### (3) 体液类样本单细胞悬液制备

样本用 BD 40µm 细胞筛过滤后，4℃、300g 离心 5min 收集细胞，沉淀用 1ml cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬，300g 离心 5min 洗涤 2 次，沉淀用 100µl cold Sample Buffer (BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit) 重悬，BD Rhapsody™ Scanner 计算细胞浓度和活率。

## 二、BD WTA 文库构建与测序

将新鲜制备的单细胞悬液调整细胞浓度为 200-8000 cell/μl，在 BD Rhapsody™ Scanner 计算好细胞上样体积后，依照 BD Rhapsody™ Cartridge Reagent Kit（货号：633731）及 BD Rhapsody™ cDNA Kit（货号：633773）操作说明书进行细胞捕获和 cDNA 文库扩增。DNA 文库构建采用 BD Rhapsody WTA Amplification Kit（货号：633801）。构建好的文库确认碱基平衡后采用 PE150 测序模式于 Illumina Nova 6000 平台进行测序。