

Step4:

1. 准备八联管放置在冰上，加入 33ul DEPC+2ul 样品（来自 Step3）
2. 在冰上配置靶向富集反应混合液 1, 根据样品个数配置，一般取 1.05 倍，例如 3 个样品，需 DEPC 3*5*1.05ul，配置完混匀。

组分	1* (ul)
DEPC	5
AMP master mix	50
cDNA additive	5
T/B cell mix1	5

3. 向样品中加入 65ul 混合液 1，将移液枪调至 90ul 吹打混匀 5 次，短暂离心
4. 设置 PCR

热盖温度	反应体积	运行时长
105C°	100ul	约 25min

步骤	温度C°	时间
1	98	45s
2	98	20s
3	67	30s
4	72	60s
5	TCR(10 个循环) BCR (6 个循环)	
6	72	60s
7	4	HOLD

5. 将样品放入并运行 PCR
6. 混匀 SPR，向样品中加入 80ul，将移液枪调至 150ul 吹打（15 次）混匀样品。
7. 室温放置 5min
8. 将样品放入 HIGH-磁力架上，约两分钟后，溶液澄清，用移液枪吸取全部液体并丢弃
9. 加入 200ul 80%的乙醇 1，约 30 秒
10. 弃掉乙醇，再加入 200ul 80%的乙醇 2，约 30 秒
11. 弃掉乙醇，迅速转移到离心机上，注意将吸附 SPR 的管壁向外，迅速离心
12. 放置在 LOW-磁力架上，弃掉剩余乙醇，放置到 SPR 出现一层金属光泽的膜，切勿过于干燥。
13. 加入 35.5ul EB 缓冲液，并从磁力架上取下，用移液枪吹打混匀 SPR
14. 室温静置 2min
15. 放入 LOW-磁力架上，至溶液澄清，转移 35ul 液体至新的八联管中。
16. 在冰上配置靶向富集反应混合液 2, 根据样品个数配置，一般取 1.05 倍，例如 3 个样品，需 DEPC 3*5*1.05ul，配置完混匀。

组分	1* (ul)
DEPC	5
AMP master mix	50
cDNA additive	5
T/B cell mix2	5

17. 向样品中加入 65ul 混合液 2，将移液枪调至 90ul 吹打混匀 5 次，短暂离心

18. 设置 PCR

热盖温度	反应体积	运行时长
105C°	100ul	约 25min

步骤	温度C°	时间
1	98	45s
2	98	20s
3	67	30s
4	72	60s
5	TCR(10 个循环) BCR (8 个循环)	
6	72	60s
7	4	HOLD

19. 将样品放入并运行 PCR

20. 混匀 SPR，向样品中加入 50ul，将移液枪调至 145ul 吹打（15 次）混匀样品。

21. 室温放置 5min

22. 将样品放入 HIGH-磁力架上，约两分钟后，溶液澄清，用移液枪吸取液体 145ul 至新的八联管

23. 混匀 SPR，向样品中加入 30ul，将移液枪调至 150ul 吹打（15 次）混匀样品。

24. 室温放置 5min

25. 将样品放入 HIGH-磁力架上，约两分钟后，溶液澄清，用移液枪吸取全部液体并丢弃

26. 加入 200ul 80%的乙醇 1，约 30 秒

27. 弃掉乙醇，再加入 200ul 80%的乙醇 2，约 30 秒

28. 弃掉乙醇，迅速转移到离心机上，注意将吸附 SPR 的管壁向外，迅速离心

29. 放置在 LOW-磁力架上，弃掉剩余乙醇，放置到 SPR 出现一层金属光泽的膜，切勿过于干燥。

30. 加入 45.5ul EB 缓冲液，并从磁力架上取下，用移液枪吹打混匀 SPR

31. 室温静置 2min

32. 放入 LOW-磁力架上，至溶液澄清，转移 45ul 液体至新的八联管中。

33. 检测样品浓度，并将样品储存在-20C°。

Step5:

1. 根据样品浓度计算：50ng 需要多少体积样品，若体积超过 20ul，直接取 20ul 样品；若体积小于 20ul，取相应体积样品，加入 DEPC 补足至 20ul。

2. 设置 PCR

热盖温度	反应体积	运行时长
65C°	50ul	约 35min

步骤	温度C°	时间
1	4	HOLD
2	32	120s
3	65	30min
4	4	HOLD

- 混匀 FRA buffer
- 在冰上配置片段化混合液，配置完，吹打混匀，短暂离心，根据样品个数配置，一般取 1.05 倍，例如 3 个样品，需 DEPC 3*15*1.05ul

组分	1* (ul)
DEPC	15
FRA buffer	5
FRA enzyme blend	10

- 向 20ul 样品中加入 30ul 片段化混合液，移液枪调至 30ul 吹打混匀十五次，短暂离心
- 放入 PCR，按下 SKIP
- 在冰上配置接头连接混合液，配置完，吹打混匀，短暂离心，根据样品个数配置，一般取 1.05 倍，例如 3 个样品，需 DEPC 3*17.5*1.05ul

组分	1* (ul)
DEPC	17.5
ligation buffer	20
DNA ligase	10
Adaptor mix	2.5

- 取出样品，加入 50ul 接头连接混合液，移液枪调至 90ul，吹打混匀，短暂离心。
- 设置 PCR，放入样品

热盖温度	反应体积	运行时长
30C°	100ul	约 15min

步骤	温度C°	时间
1	20	15min
2	4	HOLD

- 混匀 SPR，向样品中加入 80ul，将移液枪调至 150ul 吹打（15 次）混匀样品。
- 室温放置 5min
- 将样品放入 HIGH-磁力架上，约两分钟后，溶液澄清，用移液枪吸取全部液体并丢弃
- 加入 200ul 80%的乙醇 1，约 30 秒
- 弃掉乙醇，再加入 200ul 80%的乙醇 2，约 30 秒
- 弃掉乙醇，迅速转移到离心机上，注意将吸附 SPR 的管壁向外，迅速离心
- 放置在 LOW-磁力架上，弃掉剩余乙醇，放置到 SPR 出现一层金属光泽的膜，切勿过于干燥。
- 加入 30.5ul EB 缓冲液，并从磁力架上取下，用移液枪吹打混匀 SPR
- 室温静置 2min
- 放入 LOW-磁力架上，至溶液澄清，转移 30ul 液体至新的八联管中。
- 从-20C°冰箱中拿出 index
- 在冰上配置样品 index PCR 混合液，根据样品个数配置，一般取 1.05 倍，例如 3 个样品，需 DEPC 3*8*1.05ul
-

组分	1* (ul)
DEPC	8
AMP master mix	50
SI-PCR Primer	2

23. 向 30ul 样品中加入 60ul 样品 index pcr 混合液
24. 再加入 10ul index, 注意记录 index 号, 例如第一行第一列记为 1A, 加一记一, 勿混
25. 移液枪调至 90ul, 吹打混匀, 短暂离心
26. 设置 PCR

热盖温度	反应体积	运行时长
105C°	100ul	约 25min

步骤	温度C°	时间
1	98	45s
2	98	20s
3	54	30s
4	72	20s
5	9 个循环	
6	72	60s
7	4	HOLD

27. 混匀 SPR, 向样品中加入 80ul, 将移液枪调至 150ul 吹打 (15 次) 混匀样品。
28. 室温放置 5min
29. 将样品放入 HIGH-磁力架上, 约两分钟后, 溶液澄清, 用移液枪吸取全部液体并丢弃
30. 加入 200ul 80%的乙醇 1, 约 30 秒
31. 弃掉乙醇, 再加入 200ul 80%的乙醇 2, 约 30 秒
32. 弃掉乙醇, 迅速转移到离心机上, 注意将吸附 SPR 的管壁向外, 迅速离心
33. 放置在 LOW-磁力架上, 弃掉剩余乙醇, 放置到 SPR 出现一层金属光泽的膜, 切勿过于干燥。
34. 加入 35.5ul EB 缓冲液, 并从磁力架上取下, 用移液枪吹打混匀 SPR
35. 室温静置 2min
36. 放入 LOW-磁力架上, 至溶液澄清, 转移 35ul 液体至新的 PCR 管中。
37. 填写记录本, 并按照记录本将样品信息及 index 信息记录在 A4 纸上, 随样本送测序, 放置在-20C°冰箱。

注意事项：

1. 试剂取用前, 需混匀, 短暂离心例如, T/B cell mix, cDNA Additive, AMP master mix, FRA buffer, Adaptor mix, ligation buffer, SI-PCR Primer
2. 试剂取用前离心, 例如, FRA enzyme blend, DNA ligase
3. 试剂配置尽量在冰上操作, 所有试剂放冰上。
4. SPR 加入样品混匀有气泡, 可在室温静置后, 短暂离心, 切勿长离
5. 在储液槽中的剩余乙醇做完丢弃, EB 需回收。
6. Step4 做完使用 Qubit 测浓度, 勿混错标准品, 一般 BCR 浓度较低。