

User Guide

CLindex™

Sample Multiplexing Kit for SD

单细胞多样同测试剂盒用户手册（常规芯片版）

本用户手册适用于新格元以下产品

目录号	品名	规格
1050064	CLindex™ Sample Multiplexing Kit	1 RXN （16 index *1）
1050065	CLindex™ Sample Multiplexing Kit	4 RXNs （16 index *4）

文件信息

- 文件编号：UG050061
- 文件名称：CLindex™ 单细胞多样同测试剂盒用户手册（SD 版）
- 版 本 号：2022/01
- 版本日期：2022.01

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

产品概况	4
1、产品说明	4
2、技术原理	4
3、产品组成	5
4、各模块组分	5
用户自备仪器设备和试剂耗材	8
实验操作流程	9
Step1 细胞标记	9
Step2 单细胞分离&细胞裂解	10
Step3 逆转录& cDNA 扩增	10
Step4 Sample Index 扩增富集&测序文库构建	12
常见问答	15

产品概况

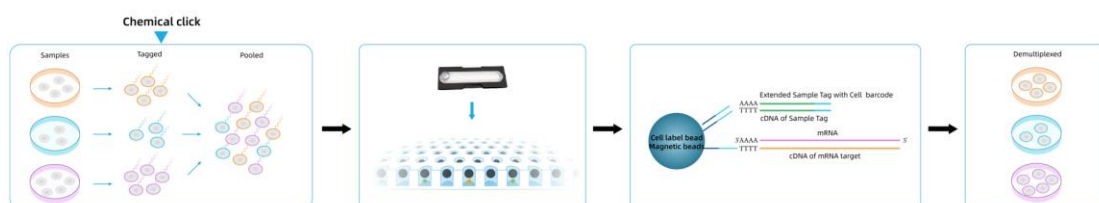
1、产品说明

CLindex™单细胞多样同测试试剂盒提供 16 种样本标签（Sample index），均带有 polyA 尾巴、特异性寡核酸序列及高效结合细胞膜表面蛋白的化学基团分子，产品突破跨物种标记的限制，可适用于大多数细胞类型，具有广谱性。

本产品可搭配 GEXSCOPE®海量单细胞转录组试剂盒联合使用，组分全面，可完整完成单细胞分离到转录组测序文库构建的全流程实验，可用于多样本平行处理研究，提升单细胞检测通量。

2、技术原理

利用 CLindex™分别标记不同样本的细胞，使其携带特异的 Sample index 信息，按比例进行多样本混合，随后利用 GEXSCOPE®微流控芯片捕获单细胞。待细胞裂解后，GEXSCOPE®分子标签磁珠通过与 poly-A 的特异性结合，使细胞内 mRNA 和 Sample index 被加上相同的 Cell Barcode。逆转录成 cDNA 之后，分别进行样本标签（Sample index）文库及单细胞转录组文库的构建和测序。测序数据通过生信分析按照样本标签（Sample index）信息进行样本拆分，并得到各样本的单细胞表达量信息。



3、产品组成

CLindex™ Sample Multiplexing kit

产品组分名称	储存条件
CLindex™ Sample Multiplexing kit	-25~-15℃

4、各模块组分

CLindex™ Sample Multiplexing Kit (1 RXN)

组分名称	数量	体积
Labeling Solution	4	10μL
CLindex primer 1	1	1200μL
Quencher Mix 1	1	800μL
Quencher Mix 2	1	100μL
2 × HiFi PCR Mix	1	720μL
CLindex Enrichment Mix1	1	100μL
CLindex Enrichment Mix2	1	100μL
CLindex Enrichment Mix3	1	100μL
CLindex Enrichment Mix4	1	100μL
CLindex Sample Index 1	1	60μL
CLindex Sample Index 2	1	60μL
CLindex Sample Index 3	1	60μL
CLindex Sample Index 4	1	60μL
CLindex Sample Index 5	1	60μL
CLindex Sample Index 6	1	60μL
CLindex Sample Index 7	1	60μL
CLindex Sample Index 8	1	60μL
CLindex Sample Index 9	1	60μL
CLindex Sample Index 10	1	60μL
CLindex Sample Index 11	1	60μL

CLindex Sample Index 12	1	60μL
CLindex Sample Index 13	1	60μL
CLindex Sample Index 14	1	60μL
CLindex Sample Index 15	1	60μL
CLindex Sample Index 16	1	60μL

CLindex™ Sample Multiplexing Kit (4 RXNs)

组分名称	数量	体积
Labeling Solution	6	10μL
CLindex primer 1	1	1200μL
Quencher Mix 1	1	1500μL
Quencher Mix 2	1	100μL
2 × HiFi PCR Mix	2	1440μL
CLindex Enrichment Mix1	1	100μL
CLindex Enrichment Mix2	1	100μL
CLindex Enrichment Mix3	1	100μL
CLindex Enrichment Mix4	1	100μL
CLindex Sample Index 1	1	240μL
CLindex Sample Index 2	1	240μL
CLindex Sample Index 3	1	240μL
CLindex Sample Index 4	1	240μL
CLindex Sample Index 5	1	240μL
CLindex Sample Index 6	1	240μL
CLindex Sample Index 7	1	240μL
CLindex Sample Index 8	1	240μL
CLindex Sample Index 9	1	240μL
CLindex Sample Index 10	1	240μL
CLindex Sample Index 11	1	240μL
CLindex Sample Index 12	1	240μL
CLindex Sample Index 13	1	240μL

CLindex Sample Index 14	1	240μL
CLindex Sample Index 15	1	240μL
CLindex Sample Index 16	1	240μL

序列信息			
组分名称	i5 接头序列	i7 接头序列	Barcode 序列信息
CLindex Enrichment Mix1	AAGGCTAT	TAAGGCGA	-
CLindex Enrichment Mix2	AAGGCTAT	CGTACTAG	-
CLindex Enrichment Mix3	AAGGCTAT	AGGCAGAA	-
CLindex Enrichment Mix4	AAGGCTAT	TCCTGAGC	-
CLindex Sample Index 1	-	-	CGTGTTAGGGCCGAT
CLindex Sample Index 2	-	-	GAGTGGTTGCGCCAT
CLindex Sample Index 3	-	-	AAGTTGCCAAGGGCC
CLindex Sample Index 4	-	-	TAAGAGCCCGGCAAG
CLindex Sample Index 5	-	-	TGACCTGCTTCACGC
CLindex Sample Index 6	-	-	GAGACCCGTGGAATC
CLindex Sample Index 7	-	-	GTTATGCGACCGCGA
CLindex Sample Index 8	-	-	ATACGCAGGGTCCGA
CLindex Sample Index 9	-	-	AGCGGCATTTGGGAC
CLindex Sample Index 10	-	-	TCGCCAGCCAAGTCT
CLindex Sample Index 11	-	-	ACCAATGGCGCATGG
CLindex Sample Index 12	-	-	TCCTCCTAGCAACCC
CLindex Sample Index 13	-	-	GGCCGATACTTCAGC
CLindex Sample Index 14	-	-	CCGTTCGACTTGGTG
CLindex Sample Index 15	-	-	CGCAAGACACTCCAC
CLindex Sample Index 16	-	-	CTGCAACAAGGTCGC

用户自备仪器设备和试剂耗材

Tips:

涉及到单细胞悬液制备、转录组文库构建相关的仪器耗材清单可参考《GEXSCOPE®海量单细胞转录组试剂盒用户手册（手动版/自动版）》：

步骤	类型	名称
细胞标记	仪器	细胞计数仪
		低温离心机（水平转子）
		恒温震荡摇床
	耗材	1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		血球计数板
		锡箔纸
		锥型低吸附无菌离心管 15mL（Falcon）
	试剂	Phosphate Buffered Saline (PBS) (BioLegend, Cat# 926201 or equivalent)
文库制备	仪器	全自动核酸片段分析仪 (安捷伦 FA™ -12 Automated CE System)
		Qubit™ 3 (Thermo Fisher Scientific, Cat# Q33226)
	耗材	0.6mL 无色离心管（Qubit 定量）
	试剂	Ampure XP 纯化磁珠
		Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Cat# Q32854/Q32851)
其他必需	仪器	PCR Thermocycler (Bio-Rad, T100™ Thermal Cycler)
	耗材	TempAssure PCR 8-strips (USA Scientific, Cat# 1402-4700)
		不同规格无菌&无核酸酶吸头
		1.5mL 无菌&无核酸酶离心管
		0.2mL 无菌&无核酸酶八联排管
		不同量程单道移液器
		DynaMag™-PCR 磁力架/492025/Thermo
	试剂	Nuclease-Free Pipette Tips (e.g. Thermo Fisher Scientific AM12650, AM12660 or equivalent)
		Nuclease-free Water (Thermo Fisher, Cat# AM9937)
		Ethanol (Sigma, Cat# E7023-500ML)

实验操作流程

Step1 细胞标记

Tips:

- 请按照适当的方法准备各样本单细胞悬液；
- 各样本需准备 1-2 Million 细胞，用 1ml PBS 重悬置于 15mL 离心管；
- 如标记后观察到细胞活率过低，则建议进行活细胞富集（例如，通过流式细胞术）；
- 10 × PBS 易出现结晶现象，使用前需摇匀，确保淬灭 Mix 中 PBS 浓度为 1 ×；

1. 各样本分别取 $1.0 - 2.0 \times 10^6$ 个细胞置于 15mL 低吸附管中，350g，离心 3min，去上清；加入 1mL PBS 重悬细胞沉淀，轻柔吹吸混匀。重复清洗共计 2 遍；加入 1mL PBS 重悬，记录标记起始细胞浓度及活性。
2. 提前取出 CLindex Sample Index 单管和 Labeling Solution 避光融化，将上一步的细胞悬液，350g，离心 3min，去上清备用，从 CLindex Sample Index 单管取出 50μL 至 1.5mL 离心管中，并向 1.5mL 离心管中加入 0.5μL Labeling Solution 混匀制得标记 Mix，立即加入对应样本的细胞沉淀中（*记录在册，切勿搞混）轻轻重悬细胞，记录 CLindex Sample Index 编号以及对应样本编号。
3. 将 15mL 离心管包上锡箔纸，倾斜放置在摇床中 180 rpm 常温避光孵育 15 min，反应完成后，350 g，离心 3min，去上清（避免接触管底，尽可能去除上清），收集细胞沉淀。
4. 提前在冰上按照下表配制淬灭 Mix，其中 Quencher Mix 2 在淬灭时最后加入，现配现用。

组分	1 × (μL)	N × (+10%) (μL)
Quencher Mix 1	10	
Quencher Mix 2	1	
10 × PBS	5	
Nuclease-free Water	34	
Total	50	

5. 加入 50 μ L 配置好的淬灭剂，轻轻重悬标记后的细胞，放置在摇床中 180rpm 混匀，常温避光反应 5min，并提前配置清洗液（1 $\times$ PBS + 2% Quencher Mix 1）。
6. 淬灭反应结束后，350 g 离心 3min，去上清（避免接触管底），收集细胞沉淀。
7. 每个样本加入 200 μ l 清洗液，轻轻重悬后，常温静置 1min，350 g 离心 3min，去上清，重复该步骤，共洗涤 2 次。
8. 加入 100 μ L PBS 轻轻重悬标记细胞，计数每个完成标记后的样本细胞浓度和活率。
9. 按适当的比例混合细胞（建议先混合高浓度细胞悬液，再稀释到细胞浓度 1.5-3 $\times 10^5$ cell/mL，计数验证），混好细胞后即可进行单细胞实验流程。

Step2 单细胞分离&细胞裂解

Tips:

- 相关步骤需参考《GEXSCOPE®单细胞转录组试剂盒用户手册（手动版/自动版）》进行操作；
- 芯片预处理；
- 试剂准备；
- 细胞裂解&RNA 捕获；
- 回收磁珠；

Step3 逆转录& cDNA 扩增

Tips:

- 需参考《GEXSCOPE®海量单细胞转录组试剂盒用户手册（手动版/自动版）》进行操作；
- 逆转录
- Ampure XP 纯化磁珠使用前需混匀，准确移取相应的体积；
- cDNA 纯化步骤的上清液务必要保留，用于 Sample Index 的回收；
- cDNA 扩增后的纯化产物置于 4 $^{\circ}$ C 可保存 72h，置于 -20 $^{\circ}$ C 可保存一周。

1. 在 cDNA 扩增步骤，按照以下表格配置体系：

组分	×1 (μL)	×2.2 (μL)
Amplification Master Mix*	172	378.4
A Primer Mix*	32	70.4
CLindex Primer 1	12	26.4
Amplification Enzyme*	8	17.6
Nuclease-free Water*	176	387.2
Total	400	880

* 除 CLindex Primer 1 外，其余试剂为 GEXSCOPE®海量单细胞转录组试剂盒试剂。

2. 扩增产物纯化

- 1) Ampure XP 纯化磁珠（后简称纯化磁珠）需提前 30min 从 4℃中取出，恢复至室温。
- 2) 将 PCR 扩增产物收集到 1.5mL 离心管中，短暂离心，量取体积。加入 0.6×纯化磁珠（例如量取的产物体积为 400μL，则加入 $0.6 \times 400 = 240\mu\text{L}$ 体积的纯化磁珠）涡旋混匀后，室温孵育 5min；短暂离心，并置于 1.5mL 规格磁力架上静置 5min，至液体透明澄清，小心吸取上清液转移至新的 1.5mL 离心管中，标记为上清（含标签 index），务必要保留（置于 4℃可保存 72h，置于-20℃可保存一周，或者可直接进一步纯化，获取 Sample Index）。
- 3) 保持离心管始终处于磁力架上，加入 800μL 新配制的 80%乙醇漂洗纯化磁珠。开盖室温孵育 30s，小心吸去上清液。
- 4) 重复步骤 3，共计洗涤 2 次。
- 5) 取下离心管，短暂离心，再次置磁力架上，使用 200μL 枪头吸去多余酒精（尽可能除干净），开盖晾干约 2min（不要超过 5min）。
- 6) 向离心管中加入 20μL Buffer EB 润洗磁珠，涡旋混匀，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，直至液体透明澄清。
- 7) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为 cDNA 纯化产物。

注：将样品置于 4℃可保存 72h，置于-20℃可保存一周，或者可直接进行 cDNA 的 QC 和定量，cDNA 质控定量的标准参考 GEXSCOPE®海量单细胞转录组试剂盒要求，符合要求即可继按照转录组试剂盒流程进行转录组文库构建。

3. 标签模板的回收

- 1) 从扩增产物纯化步骤保留的上清中吸取 200μL 至新的 1.5mL 离心管，按照产物实际量 ($200\mu\text{L}/1.6=125\mu\text{L}$) 加入 0.6×纯化磁珠 ($125\mu\text{L}\times0.6=75\mu\text{L}$) 至离心管中涡旋混匀后，室温孵育 5min；短暂离心，置于磁力架上静置 2min，至液体透明澄清，小心移除上清至新的 1.5mL 离心管中，暂留。
- 2) 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。开盖室温孵育 30s，小心移除上清。
- 3) 重复步骤 2，共计洗涤 2 次。
- 4) 取下离心管，短暂离心，再次置于磁力架上，使用 200μL 枪头吸去多余酒精（尽可能除干净），开盖晾干约 2min（不超过 5min）。
- 5) 取下离心管，加入 20μL Buffer EB 润洗磁珠，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。
- 6) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为标签（sample index）纯化产物。

Step4 Sample Index 扩增富集&测序文库构建

Tips:

- Ampure XP 纯化磁珠使用前需混匀，准确移取相应的体积；
- 文库纯化产物置于 4℃可保存 72h，置于-20℃可保存一周。
- 文库纯化产物浓度过高时需要将样品稀释到 3-5 ng/μL，防止浓度过高，影响质检。

1. CIndex Sample Index 富集

- 1) 取 10μL 上一步骤获得的 Sample Index 产物，将 PCR 管置于冰上，按照如下表格配制 PCR Mix，涡旋混匀并短暂离心。

#2 PCR 组分	1 × (μL)
2 × HiFi PCR Mix	75
CLindex Enrichment Mix 1	4.5
Template	10
Nuclease-free Water	60.5
Total	150

*可根据需求更换 CLindex Enrichment Mix 引物

2) 使用涡旋仪轻柔充分混匀后平均分装至 3 个 PCR 管中, 将反应管置于 PCR 仪中, PCR 仪根据下表设置反应体系 50μL, 热盖温度 105°C, 并运行反应:

步骤	温度	时间
1	95°C	0:03:00
PCR 2 cycle = 6~10	98°C	0:00:30
	65°C	0:00:30
	72°C	0:01:00
	72°C	0:05:00
3	72°C	0:05:00
4	4°C	Hold

注: 可根据上一步骤获得的 Sample Index 产物的浓度确认循环数, 一般推荐:

Template 浓度 (ng/μL)	循环数
< 5	10
5~10	9
10~15	8
15~20	7
> 20	6

2. 文库扩增产物纯化

1) 纯化磁珠提前 30min 从 4°C 中取出, 恢复室温。

2) 将 PCR 管中的液体, 瞬离, 收集至 1.5mL EP 管中, 移液器量取体积。加入 180μL 磁珠 (1.2×产物体积), 吹打混匀后, 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。

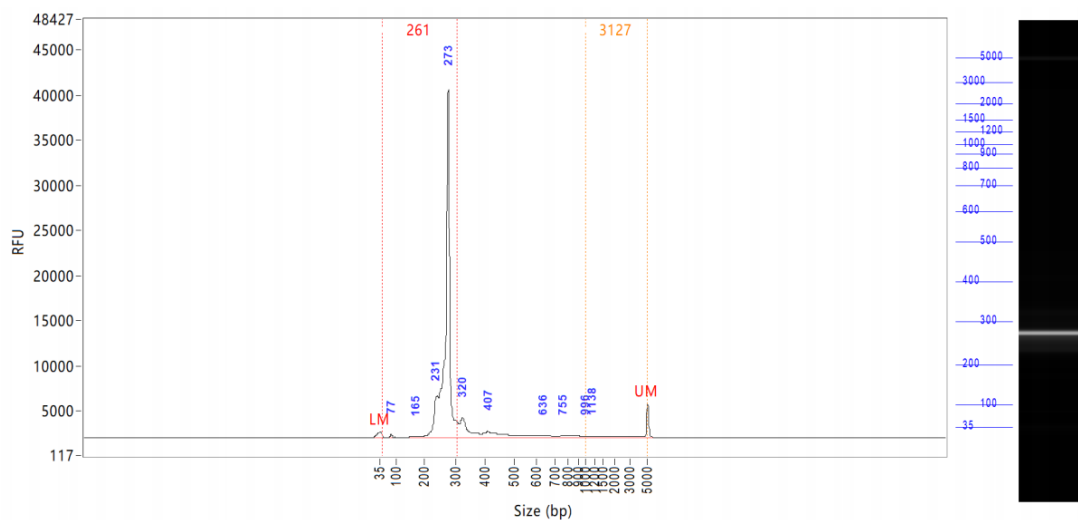
- 3) 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 800 μ L 新配制的 80%乙醇漂洗磁珠。开盖室温孵育 30s，小心移除上清。
- 4) 重复 3，共计洗涤 2 次。
- 5) 取下 PCR 管，短暂离心，再次置于磁力架上，使用 200 μ L 枪头吸去多余酒精（尽可能除干净），开盖晾干约 2min（不超过 5min）。
- 6) 取下 PCR 管，加入 20 μ L Buffer EB，吹吸混匀磁珠，室温孵育 5min，短暂离心后静置于磁力架上，至液体透明澄清。
- 7) 吸取上清并转移至新的 EP 管中，即为纯化产物。

注：将样品置于 4 $^{\circ}$ C 可保存 72h 或在 -20 $^{\circ}$ C 保存一周，或者直接进行 Sample index 文库扩增纯化后的 QC 和定量。

3. 扩增纯化产物质检

- 1) 取 1 μ L 样品进行 Qubit 浓度检测。
- 2) 取 6ng 样品进行片段大小检测。

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。



标签文库富集产物质检图

常见问题

1. 如何减少标记时细胞量和细胞活率的损失？

答：标记起始量控制在实验要求范围，标记后细胞量损失的合理范围是 40-60%，降低活性的范围是 10-20%；在细胞标记过程中，收集细胞沉淀时，尽量不接触管底，轻轻去除上清；重悬细胞时尽量动作轻柔，轻轻吹打，以上操作可以降低细胞量和细胞活性的损失。

2. 细胞的形状大小是否影响标记？

答：本产品适用于多种细胞类型，细胞形状大小不影响 Sample index 标记。

3. 推荐 Sample index 富集文库的测序量

答：标签文库推荐测 10G。

4. Sample index 富集文库主峰大小是多少？

答：理论值约为 273 bp，实际大小可能因检测机器精度而略有偏差。

5. 标记细胞悬液存在杂质，是否影响 Sample Index 标记？

答：少量杂质不影响细胞的标记，当细胞悬液中杂质过多时，考虑去除杂质后再开展细胞标记。

6. 当富集文库浓度过低时，如何解决？

答：当富集文库总量低于 30 ng 送测量时，可以将暂留剩余的 Sample Index 上清重新纯化，构建富集文库时可考虑适当增大模板投入量。

7. 本产品的适用细胞类型有哪些？

答：本产品可完成常见的多种组织类型细胞，该产品在人源和鼠源的骨髓，肺，睾丸，PBMC 等多种组织类型有较为成熟应用。目前暂不适用于神经类细胞。



新格元生物科技有限公司

电 话：025-58862675

电子邮件：sgr_support@singleronbio.com

网 址：www.singleronbio.com

地 址：南京市江北新区药谷大道 11 号加速器二期 06 栋 4-5 层（南京）

苏州市工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B4 楼 401 单元（苏州）