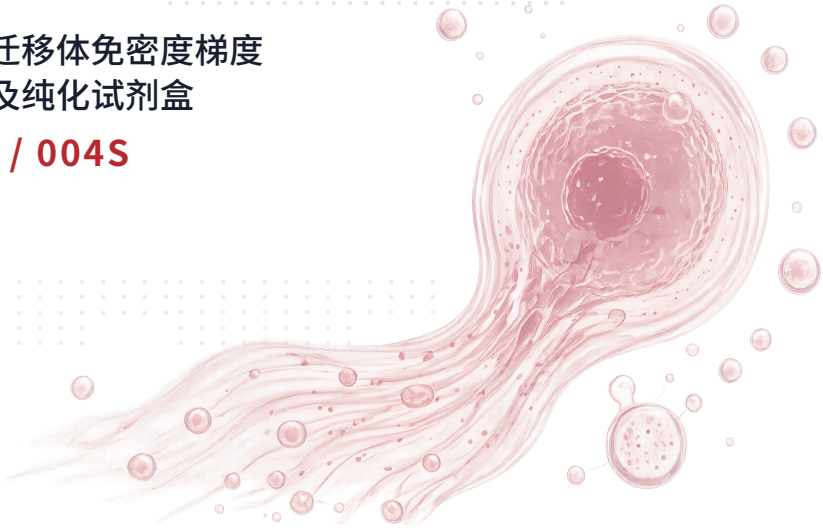
Migrasome Therapeutics

北京迈格松生物科技有限公司

MigraPrep™ Turbo

培养细胞迁移体免密度梯度快速生产及纯化试剂盒

PRC004 / 004S



使用说明书

MigraPrep™ Turbo
培养细胞迁移体免密度梯度快速生产及纯化试剂盒

货号	规格
PRC004	50T (提取50盘150mm培养皿)
PRC004S	10T (提取10盘150mm培养皿)

重要提示：本试剂盒专为科学研究设计，不适用于临床诊断目的。请参阅下页的详细风险及责任声明，并确保在使用本产品前仔细阅读。

产品简介

本试剂盒专用于从培养细胞中提取迁移体。

本试剂盒具有快速、高效、操作简单等特点，提取的迁移体产物质量稳定可靠、蛋白污染程度低，可用于迁移体计数、蛋白提取分析、RNA 提取分析、细胞功能检测等生物学实验。

产品内容

产品组成	PRC004 (50 tests)	PRC004S (10 tests)
基质液 A	1.5 mL	300 μL
缓冲液 B	50 mL	10 mL
精提液 C	200 μL	40 μL
磁珠液 D	400 μL	80 μL
说明书	一份	一份

用户自备试剂及必需仪器

1. 细胞培养相关试剂和耗材（胰酶、培养皿等）
2. 1×PBS溶液：必须无菌
3. 收集管（低吸附1.5 mL EP 管、15 mL离心管、50 mL 离心管）
4. 低吸附移液枪枪头
5. 磁力架

保存和运输

4℃运输，收到试剂盒后基质液A请于-20℃保存，其余试剂请于4℃冰箱保存，有效期6个月（精提液C可于-20℃保存更长时间，但需避免反复冻融）；磁珠液D应避免结冰。

操作步骤

1 铺种细胞

1. 按照PBS:缓冲液B为9:1的比例配制B稀释液;

2. 按基质液A:B稀释液为1:300的比例(最适浓度需用户自行摸索)配制预处理液,每个15 cm皿9 mL预处理液,37℃培养箱孵育1 hr以上;

3. 吸除预处理液,提前按需准备好一定数量的细胞,按需要的密度接种于15 cm皿中;

   注:需提前确定提取迁移体的最适密度,该密度应明显小于最适培养密度,详情见注意事项2;

4. 按照细胞培养条件培养过夜;

   注:需提前确定细胞培养的最适条件,详情见注意事项3;

2 粗提迁移体

1. 弃去培养基，用PBS冲洗一次，洗去剩余培养基；

2. 用适宜浓度的胰酶消化细胞后，加入培养基终止消化，收集细胞及迁移体的悬液；

   注：需提前确定最适消化条件，以确保尽可能多且完整地消化下迁移体；建议使用全培养基提前封闭收集细胞及迁移体悬液的50 mL离心管，可有效减少因吸附到管壁而导致的损失。

3. 4℃ 300×g 离心5 min，取上清；

4. 4℃ 2,500×g离心10 min，取上清；

   注：本说明书2-3~2-4两步所用转速通过L929细胞优化获得，用户可自行尝试更适合的低速离心或用滤器替代该步离心；

5. 4℃ 18,000×g离心60 min，去上清；

3 精提迁移体

1. 根据沉淀量，用50~100 μL左右的PBS重悬2-⑤的沉淀，经BCA测定蛋白浓度后（L929 Tspan4-GFP细胞粗提迁移体约为5~10 μg/15cm皿），取适量的粗提迁移体到新的Ep管中；

2. 按5 μL精提液C/10 μg粗提迁移体的比例，向粗提迁移体中加入精提液C，并用低吸附枪头轻柔充分吹打10次（确保使用移液器充分吹打，直至无明显颗粒物，其充分程度将直接影响分离效果）；

3. 置于4 ℃冰箱孵育15 min，于8 min时再用低吸附枪头轻柔吹打10次；

4. 4℃ 18,000×g离心20 min，尽可能吸除上清，并保留沉淀进入下一步；

5. 加入100 μL PBS充分重悬沉淀（该步骤需使用移液器充分重悬沉淀，直至无明显颗粒物，其充分将程度直接影响分离效果）。

6. 使用涡旋仪涡旋至少10 s以充分混匀磁珠液D后，按10 μL磁珠液D/10 μg粗提迁移体的比例加入磁珠液D，并用PBS将体系补至500 μL；

7. 置于4℃冰箱10~15 rpm旋转孵育45 min；

8 使用低吸附1 mL大枪头充分轻柔吹打15次，置于4℃冰箱中用磁力架吸附15 min；

9 避开磁珠，用低吸附200 μL中枪头将上清转入新的1.5 mL低吸附管。离心前检查棕色磁珠残留；如有，先二次磁吸（不离心）。取上清于4℃、18,000×g离心45 min；

10 先去除绝大部分上清后，瞬离后尽可能吸除上清，并保留沉淀；所得沉淀即为精提培养细胞迁移体，后续实验及保存条件详见注意事项7。

注意事项

1. 可迁移的细胞系和原代细胞均可产生迁移体，产生能力与细胞本身性质相关，需要使用者进行测试摸索。推荐使用贴壁且迁移能力较强的细胞，或者在过表达Tspan4 等促进迁移体产生的基因后，贴壁且迁移能力变强的细胞。不推荐使用悬浮的细胞，但可尝试使用细胞外基质或基因编辑后使其贴壁。建议正式生产迁移体前，使用 WGA 染料对迁移体进行原位染色，并在镜下观测迁移体生产效果；

2. 迁移体需要在细胞迁移过程中产生，细胞不宜过于密集，根据我们的经验，考虑到不同细胞的迁移速率，应将收集时细胞汇聚度控制在20%-40%之间，迁移较快的细胞密度应适当降低；

3. 迁移体生产时间需要严格控制，时间过长过短都会降低迁移体生产效率，根据我们的经验，建议在12~16 hr 左右；

4. 迁移体生产依赖于细胞表面与培养介质表面的互相作用，不同细胞在不同的细胞外基质上的迁移体的产量可能有所不同；另外，需测试最适消化方式，过弱的消化方式会残留较多迁移体，降低产量，过强的消化及吹打则会增加细胞破碎几率，降低样品纯度；

5. 低速离心时建议使用水平转子，高速离心时建议使用倾斜角度>45°的角转子；

6. 正常情况下，推荐上样量在50 μg左右；L929细胞精提的得率约为50%左右，不同细胞可能会有较大差异；

7. 粗提及纯化后的迁移体保存方式应依据后续实验进行选择。关注内容物的实验，如核酸提取、WB、质谱等，可以在高速离心后，去除上清，将迁移体沉淀保存于-80℃以待后续实验；关注形态、数量、表面性质、活性的后续实验，例如共聚焦成像、囊泡计数、流式检测、普通负染电镜、细胞功能实验等，推荐4℃保存，经过多次测试，迁移体在一周内4℃保存对其形态、数量影响均较小。-20℃及-80℃冻存后，迁移体会发生聚团及一定的破裂现象，且不同细胞来源的迁移体有一定不同，若样品因各种原因需要冻存，推荐进行一定预实验进行测试。

重要风险与责任声明

本试剂盒仅供科研用途，并已按照科研试剂相关标准和法规要求进行设计和生产。客户使用前，请仔细阅读产品说明书，必须保证遵守所有适用的生物安全、法律、伦理和隐私法规等法律与规定，包括但不限于：

1. 合规性：本产品不得用于任何临床诊断、治疗或其他医疗用途。
2. 生物安全：用户应采取适当的生物安全措施，避免感染风险，并严格遵循生物危害物料的处理和存储规程。
3. 伦理与隐私：样本采集须遵守所有相关的伦理审查标准，保护个人隐私，且需获得相应的知情同意。
4. 交叉污染：用户需按照本说明书操作，以避免样本交叉污染，并确保实验结果的准确性。
5. 存储与稳定性：正确存储本试剂盒以保持其稳定性和有效性。未按说明存储的产品可能导致性能下降。
6. 废弃物处理：使用后的试剂及样本需按照当地法规安全处置。
7. 产品性能限制：本说明书中已详细描述了产品性能及使用限制。任何超出说明书指导的使用方式，本公司概不负责。

本公司不对因不当使用本产品或未遵守适用法规造成的任何直接或间接后果承担法律责任。如有任何疑问或需要进一步信息，请联系客户服务部门。

Migrasome Therapeutics

单位名称：北京迈格松生物科技有限公司
单位地址：北京市昌平区医疗园路9号院2号楼4层
邮　编：102200
电　话：010-53671078
邮　箱：service@migrasome.com
公司网址：www.migrasome.com