Protein Transport Inhibitor MIX

Cat. No: E-CK-A013 **Size: 50 Tests/200 Tests/500 Tests**

产品编号	产品名称	50 Tests	200 Tests	500 Tests	Storage
E-CK-A013	Protein Transport Inhibitor MIX Powder（200 μg）	200 μg × 1 vial	200 μg × 4 vials	200 μg × 10 vials	-20℃/-80℃, shading light
说明书			一份		

保存条件

1. 干粉试剂-20°C 避光可保存 1 年，-80°C 避光可保存 2 年。
2. 干粉溶解后可-20°C 避光保存 6 个月，也可以分装后-80°C 避光保存 1 年。

产品简介

Elabscience® Protein Transport Inhibitor MIX 主要由莫能菌素（Monensin）和布雷菲德菌素 A（Brefeldin A）组成，可以和 Cell Stimulation MIX [E-CK-A019]联合使用，可阻止细胞因子转运流失，细胞破膜后，可以对细胞因子进行检测。也可以单独使用，进行细胞高尔基体和内质网的蛋白运输阻断。

试剂配制

1000×Protein Transport Inhibitor MIX：每管 Protein Transport Inhibitor MIX Powder（200 μg）中加入 50 μ L 33%DMSO 水溶液（自备），充分吹打混匀配制成 1000× Protein Transport Inhibitor MIX。

注：试剂配制请前将干粉在 8000~10000×g 离心 1 min，使干粉聚集于管底后再溶解配制；33%DMSO 水溶液可使用 670 μL 无菌超纯水或无菌去离子水加入 330 μL 无水 DMSO 混匀配制而成，配制后-20℃避光保存。

操作指南

1. 用完全培养基（自备）将样本制备成单细胞悬液，并调整细胞密度为 1~2×10^6/mL。
   注：细胞密度不可过高，最大密度不超过 2×10^6 个/mL，细胞密度过高会影响细胞的激活效率；关注细胞状态，对于新鲜制备的原代细胞，先观察确认细胞状态良好后再诱导检测。
2. 每 1mL 细胞悬液中，加入 2 μL 的 500× Cell Stimulation MIX [E-CK-A019]，于 37°C、5% CO_2 培养箱中孵育细胞 0.5~1 h。
3. 每 1mL 细胞悬液中，加入 1 μL 1000× Protein Transport Inhibitor MIX，于 37°C、5%CO_2 培养箱中继续孵育 5~16 h（建议根据所需检测的细胞因子设置不同的诱导时间，常见诱导时间可参考附表 1）。
4. 收集细胞悬液，250~300×g 离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀，固定后即可用于后续的胞内因子检测。

附表 1：胞内因子诱导条件参考

种属	靶细胞	细胞因子/趋化因子	诱导时间
Mouse	脾脏 T 淋巴细胞	IL-17A	5~6 h
		IFN-γ	5~6 h
		IL-4	5~6 h
		IL-2	5~6 h
		IL-10	5~6 h
		IL-6	5~6 h
Human	外周血 T 淋巴细胞	IL-17A	5~6 h
		IFN-γ	5~6 h
		IL-4	5~6 h
		IL-2	5~6 h
		IL-6	5~6 h
		IL-10	5~6 h
		IL-21	5~6 h

常见问题及解决方案

现象	可能原因	建议
上清中检测到细胞因子而胞内未检测到	阻断剂孵育时间过短。	适当增加 1000×Protein Transport Inhibitor MIX 阻断时间。
细胞损失较多	离心条件不合适。	未固定的活细胞离心力不超过 300×g，升速不超过 3，降速不超过 2，可以极大降低离心带来的细胞损失。
	细胞数太多，固定不充分。	增加固定液体积和延长固定的时间。

注意事项

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 由于 Protein Transport Inhibitor MIX 中布雷菲德菌素 A 对 CD69 的影响，建议在检测 CD69 时，不加 Protein Transport Inhibitor MIX。但此操作可能会导致胞内因子分泌到细胞外而检测不到。
3. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 请按照合适的温度保存本产品，以免失效。