Cell Stimulation MIX Kit

Cat. No: E-CK-A019 **Size: 50 Assays/200 Assays/500 Assays**

产品编号	产品名称	50 Assays	200 Assays	500 Assays	Storage
E-CK-A011	Cell Stimulation MIX Powder (50 μg)	50 μg × 1 vial	50 μg × 4 vials	50 μg × 10 vials	-20℃/-80℃, shading light
E-CK-A012	Cell Stimulation MIX Solvent	120 μL	480 μL	1200 μL	-20°C, 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® Cell Stimulation MIX Kit 是佛波酯(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, PMA)和离子霉素(Ionomycin)的混合物，可诱导多种细胞活化并分泌细胞因子。诱导后的细胞上清可以用免疫学的方法检测细胞因子，也可以在适当时间加入 Protein Transport Inhibitor MIX [E-CK-A013]，通过流式的方法检测细胞因子。

试剂配制

500× Cell Stimulation MIX：每管 Cell Stimulation MIX Powder (50 μg) 中加入 100 μL Cell Stimulation MIX Solvent，充分吹打混匀配制成 500× Cell Stimulation 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。

操作指南

应用一：细胞因子培养上清

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 1 mL 细胞悬液中，加入 2 μL 的 500× Cell Stimulation MIX，于 37°C、5% CO_2 培养箱中孵育细胞 4~18 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）。
3. 收集细胞培养上清进行后续检测或-80°C 冻存备用（上清即为含有多种细胞分泌的细胞因子上清，后续可通过 ELISA 或其他生化试剂检测细胞因子的含量及活性）。

应用二：胞内因子检测

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，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 [E-CK-A013]，于 37°C、5%CO_2 培养箱中继续孵育 5~16 h（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
未检测到细胞因子表达	细胞密度过大。	调整细胞密度为 1~2×10^6/mL。
	红细胞干扰。	含有较多红细胞的组织，先进行裂红处理。
	试剂失效。	合理保存试剂，并在有效期内使用。
	抗体效果不佳。	选用有效的抗体做阳性对照。
	细胞膜固定破膜效果不佳。	选择良好的固定破膜剂。
	诱导时间不够。	设置诱导时间梯度，选择最佳的诱导时间。
胞内因子表达过高	细胞状态差，死细胞较多。	诱导前确保细胞状态良好，排除死细胞的干扰。
	抗体的非特异性结合。	增加抗体封闭流程，降低非特异性结合。
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。