Cell Stimulation and Protein Transport Inhibitor Kit

Cat. No: E-CK-A091 **Size: 50 Assays/100 Assays/200 Assays/500 Assays**

产品编号	产品名称	50 Assays	100 Assays	200 Assays	500 Assays	Storage
E-CK-A011	Cell Stimulation MIX Powder (50 μg)	50 μg× 1 vial	50 μg× 2 vials	50 μg × 4 vials	50 μg× 10 vials	-20 ℃ /-80 ℃ , shading light
E-CK-A012	Cell Stimulation MIX Solvent	120 μL	240 μL	480 μL	1200 μL	-20°C, shading light
E-CK-A013	Protein Transport Inhibitor MIX Powder (200 μg)	200 μg × 1 vial	200 μg× 2 vials	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® Cell Stimulation and Protein Transport Inhibitor Kit 是一款经过优化的广谱的免疫细胞激活剂和阻断剂，可以在体外诱导刺激多种细胞产生细胞因子并阻断细胞将分泌蛋白运输到胞外。

Cell stimulation and Protein Transport Inhibitor Kit 主要由细胞活化诱导试剂 Cell Stimulation MIX 和蛋白转运抑制试剂 Protein Transport Inhibitor MIX 组成。Cell Stimulation MIX 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。

Protein Transport Inhibitor MIX（蛋白转运抑制剂）主要由莫能菌素（Monensin）和布雷菲德菌素 A (Brefeldin A)组成，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。

试剂配制

1) 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。

2) 1000×Protein Transport Inhibitor MIX

每管 Protein Transport Inhibitor MIX Powder (200 μg) 中加入 50 μL 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

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，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
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。