

## 细胞因子激活和蛋白阻断试剂盒

### Cell Stimulation and Protein Transport Inhibitor Kit

货号: K083

规格: 50T/100T/200T

#### 试剂盒组份:

Reagents	50T	100T	200T	Storage
Cell Stimulation MIX Powder	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g*2	50 $\mu$ g*4	-20°C , away from light
Cell Stimulation MIX Solvent	120 $\mu$ L	240 $\mu$ L	480 $\mu$ L	-20°C , away from light
Protein Transport Inhibitor MIX Powder	200 $\mu$ g	200 $\mu$ g*2	200 $\mu$ g*4	-20°C , away from light

#### 保存条件:

-20°C 避光保存一年, -80° C 避光可保存 2 年。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。

**运输条件:** 冰袋

#### 实验原理:

细胞因子激活和蛋白阻断试剂盒 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。

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  $\mu\text{g}$  ) 中加入 100  $\mu\text{L}$  Cell Stimulation MIX Solvent, 充分吹打混匀, 配制成 500 $\times$ Cell Stimulation MIX。

## 2) 1000 $\times$ Protein Transport Inhibitor MIX

每管 Protein Transport Inhibitor MIX Powder ( 200  $\mu\text{g}$  ) 中加入 50  $\mu\text{L}$  无水乙醇 ( 自备 ), 充分吹打混匀配制成 1000 $\times$ Protein Transport Inhibitor MIX。

注: 使用前可以在 2000-10000 $\times g$  离心数秒后开盖使用。无水乙醇易挥发, 请妥善密封保存。

## 实验步骤:

### 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  $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ 。

注: 细胞密度不可过高, 最大密度不超过  $2\times 10^6$  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  $\mu\text{L}$  的 500 $\times$ Cell Stimulation MIX, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 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 $^\circ\text{C}$  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  $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ 。

注: 细胞密度不可过高, 最大密度不超过  $2\times 10^6$  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  $\mu\text{L}$  的 500 $\times$ Cell Stimulation MIX, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育细胞 0.5-1 h。

3. 每 1mL 细胞悬液中, 加入 1  $\mu\text{L}$  1000 $\times$ Protein Transport Inhibitor MIX, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 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 $\times g$  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**

Host	target cell	cytokines	Induction time
Mouse	Spleen T lymphocytes	IL-17A	5-6h
		IFN- $\gamma$	5-6h
		IL-4	5-6h
		IL-2	5-6h
		IL-10	5-6h
		IL-6	5-6h
Human	Peripheral blood T lymphocytes	IL-17A	5-6h
		IFN- $\gamma$	5-6h
		IL-4	5-6h
		IL-2	5-6h
		IL-10	5-6h
		IL-6	5-6h
		IL-21	5-6h

**注意事项:**

1. 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。
2. 为了您的安全和健康, 请穿上实验服, 戴上一次性手套。
3. 本产品仅供科学研究使用。