



小鼠 Treg 试剂盒操作步骤

【操作步骤】

1. 对于脾脏组织，采集新鲜样本后通过适当的方法制备成单细胞悬液，并去除团块，于当天进行检测。
2. 在每个流式管中加入 100 μ l 准备好的细胞悬液，细胞数约为 1×10^6 个。
3. 按照细胞表面抗原染色方法标记表面抗原。按照说明书加入适量的 CD4 和 CD25 抗体（联科流式抗体用量一般是 5 μ l）。按个人要求设置空白管、对照管、补偿管和样本管。室温避光孵育 15 分钟。
4. 用 2ml 流式染色缓冲液洗涤细胞，离心去上清。
5. 将 Fixation/Permeabilization Concentrate 和 Fixation/Permeabilization Diluent 按 1:3 比例制备成 1 \times 工作液（Cat# IC001 组分，联科生物）。在流式管中染色，每个样本需要 1ml。保存勿超过 1 天。
6. 旋涡震荡重悬细胞后加入 1ml 1 \times Fixation/Permeabilization 工作液，并再次旋涡混匀。室温避光孵育 30 - 60 分钟。
7. 用蒸馏水将 10 \times Permeabilization Buffer 稀释为 1 \times 工作液。在流式管中染色，每个样本需要 8.5ml。剩余溶液在 2 - 8 $^{\circ}$ C 最多保存 1 周。
8. 无需洗涤，每管加入 2 ml 1 \times Permeabilization Buffer（Cat# IC001 组分，联科生物）。室温下 300 - 400 \times g 离心 5 分钟，弃去上清。
9. （可选）重复上一步操作。
10. 用 100 μ l 1 \times Permeabilization Buffer 重悬沉淀。通常洗涤后残留的液体量就已足够。
11. （可选）细胞悬液中加入 2 μ l Anti-Mouse CD16/CD32 (2.4G2), Purified（Cat#AM016，联科生物）进行阻断，室温避光孵育 15 分钟。
12. 无需洗涤，加入 Foxp3 抗体或同型对照（用破膜缓冲液工作液进行稀释），室温避光孵育至少 30 分钟。
13. 加入 2ml 1 \times Permeabilization Buffer，室温下 300 - 400 \times g 离心 5 分钟，弃去上清。
14. （可选）重复上一步操作。
15. 用适量体积的 Flow Cytometry Staining Buffer（Cat#S1001，联科生物）重悬细





胞，并上机检测并分析。注：由于染色过程中使用了细胞固定和破膜，对比起活细胞在形态上会有一定变化，因此 FSC/SSC 图中圈门时需要做一定调整。

以上说明书仅供参考，具体实验请对照厂商说明书操作。

【相关产品】

供应商	产品名称	货号	规格
MultiSciences	抗小鼠 CD4, FITC (克隆号: GK1.5)	AM00401	50/100/250T
MultiSciences	抗小鼠 CD25, APC (克隆号: PC61.5)	AM02505	50/100/250T
MultiSciences	抗小鼠 FoxP3, PE (克隆号: 3G3)	AM0F04	50/100/250T
MultiSciences	抗小鼠 CD16/CD32, 纯化 (克隆号: 2.4G2)	AM016	20/50/100µg
MultiSciences	小鼠 IgG1 同型对照, PE	CMG104	10/20/50µg
MultiSciences	大鼠 IgG2b 同型对照, FITC	CRG2b01	10/20/50µg
MultiSciences	大鼠 IgG1 同型对照, APC	CRG105	10/20/50µg
MultiSciences	FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Kit	IC001	100T
MultiSciences	红细胞裂解液 (不含固定剂) (10×)	LYS	100/250/500T
MultiSciences	流式染色缓冲液	S1001	125 mL
MultiSciences	4% 多聚甲醛	F0001	100ml
Thermo Fisher	补偿调节微球	01-1111-41	25 tests

