



人 PBMC Treg 检测

【操作步骤】

1. 制备 PBMC，并调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。
2. 在每个流式管中加入 $100 \mu\text{l}$ 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 CD4 和 CD25。根据说明书和抗体管上的标识确定抗体用量（联科流式抗体用量一般是 5ul ）。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， $300-400 \text{ g}$ 离心 5 分钟，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 $1\times$ 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 $2 - 8^\circ\text{C}$ 最多保存 1 周。
8. 无需洗涤，每管加入 2ml $1\times$ Permeabilization Buffer（Cat# IC001 组分，联科生物）。室温下 $300 - 400 \times \text{g}$ 离心 5 分钟，弃去上清。
9. （可选）重复上一步操作洗涤细胞。
10. 加入 $100 \mu\text{l}$ PBS 重悬细胞。
11. （封闭可选）体系中加入 2% 的大鼠血清 2ul ，室温避光孵育 15 分钟。
12. 体系加入适量的 Foxp3 抗体，对照管中加入适量的同型对照，具体用量参照说明书（联科流式抗体用量一般是 5ul ），室温避光孵育至少 30 分钟。
13. 加入 2ml $1\times$ Permeabilization Buffer，室温下 $300 - 400 \times \text{g}$ 离心 5 分钟，弃去上清。
14. 重复上一步操作洗涤细胞。
15. 用适量体积的 Flow Cytometry Staining Buffer（Cat# S1001 组分，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，对比活细胞在形态上会有一定变化（一般是变小），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 | 抗人 CD4, FITC (克隆号: RPA-T4) | AH00401 | 20/50/100T |
| MultiSciences | 抗人 CD25, APC (克隆号: BC96) | AH02505 | 20/50/100T |
| MultiSciences | 抗人 FoxP3, PE (克隆号: PCH101) | AH0F04 | 20/50/100T |
| MultiSciences | 大鼠 IgG2a 同型对照, PE | CRG2a04 | 10/20/50µg |
| MultiSciences | 小鼠 IgG1 同型对照, FITC | CMG101 | 10/20/50µg |
| MultiSciences | 小鼠 IgG1 同型对照, APC | CMG105 | 10/20/50µg |
| MultiSciences | FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Kit | IC001 | 100T |
| MultiSciences | 正常大鼠血清 | NRS500 | 500µl |
| MultiSciences | 人淋巴细胞分离液 | LSM01 | 200ml |
| 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 |

