

## Intracelulární značení FoxP3 na mikrotitračních deskách

Kit eBioscience

1. Rozkapeme do jamek buněčnou suspenzi v množství  $1 \times 10^6$  na jamku.
2. 1x promýt 200 $\mu$ l PBS (400g, 2min., 4°C)
3. označíme povrchové antigeny (viz. Povrchové značení)
4. 1x promýt 200 $\mu$ l PBS
5. protřepat
6. resuspendujeme buňky v 50 $\mu$ l čerstvě připraveného Fixačně/Permeabilizačního roztoku.:

*Příprava Fix./Perm, roztoku:*

*1 díl Fixation/Permeabilization Concentrate + 3 díly  
Fixation/Permeabilization Diluent. (př. 100 $\mu$ l +300 $\mu$ l)*

7. inkubace 30min. 4°C  
1x promýt 100 $\mu$ l 1x permeabilizačním roztokem

*Příprava 1x permeabilizačního pufu:*

*1 díl 10x Permeabilization Buffer + 9 dílů dd H<sub>2</sub>O  
(př. 1ml 10x Perm. Buf. +9ml ddH<sub>2</sub>O)*

8. Zablokujeme buňky 50 $\mu$ l 2% potkaního séra v 1x perm. Pufu
9. Inkubace 20min 4°C
10. Zcentrifugujeme, odcákneme
11. Rozředíme FoxP3 protilátku v příslušném titru v 1x perm. Pufu
12. Nakapeme ředěnou FoxP3 protilátku v množství 10 $\mu$ l na jamku
13. Inkubace 30min 4°C ve tmě
14. 2x propereme 200 $\mu$ l 1x perm. pufrem
15. Resuspendujeme buňky ve 100 $\mu$ l 1x perm. Pufu
16. změříme