

权 利 要 求 书

1、流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，包括以下步骤：

5 步骤 1，取鸡外周静脉血，制备抗凝血，用淋巴细胞分离液处理获得外周血白细胞；

步骤 2，用 PBS 液对所述外周血白细胞离心洗涤后，制备单细胞悬液；

步骤 3，吸取所述单细胞悬液，分别加入抗鸡 CD3、CD4、CD8 单克隆抗体，旋涡混匀，于 4℃避光染色，作为检测管；同时准备好阴性设置管；

步骤 4，染色后，用 PBS 液洗涤并重悬细胞，使用流式细胞仪进行检测；

10 步骤 5，分析检测结果，获得鸡外周血 T 淋巴细胞亚群比例；

所述用淋巴细胞分离液处理获得外周血白细胞，具体为：于流式管中按照体积比 1:1 先后添加淋巴细胞分离液和抗凝血，保证抗凝血与淋巴细胞分离液分界清晰，离心分离后获得外周血白细胞；

15 所述制备单细胞悬液具体为：将外周血白细胞用预冷的 PBS 液洗涤后重悬，调整为细胞浓度 1×10^6 - 1×10^7 个/mL 的单细胞悬液，于 4℃保存备用；

所述使用流式细胞仪进行检测，包括：在前向散射光/侧向散射光双参数图中调节电压和电流线性增益参数，使淋巴细胞与周围细胞分开；选取淋巴细胞并设门；用阴性设置管设定阴性区，用检测管调节荧光补偿；

20 所述分析检测结果，包括：圈取目标细胞并设门、分别在 CD3/CD4、CD3/CD8、CD4/CD8 象限图中准确界定双阴性区、单阴性区和双阳性区，读取 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 和 $CD3^+CD8^+$ T 淋巴细胞百分比，从而获得鸡外周血 T 淋巴细胞亚群比例。

2、如权利要求 1 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，所述离心分离的转速为 2500r/min，时间为 15min。

25 3、如权利要求 1 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，所述染色的时间为 30min。

4、如权利要求 3 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法

法，其特征在于，所述调节电压和电流线性增益参数，具体为：调节侧向散射光通道的电压，将淋巴细胞群与周围细胞分开；调节前向散射光通道的电流增益，使细胞团与细胞碎片分开。

- 5 5、如权利要求 3 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，所述设定阴性区具体为：取阴性设置管上流式细胞仪，设定散点图中十字门左下方的区域为阴性区，调节电压使阴性区内细胞百分比大于 98%。

- 10 ~~6、如权利要求 1 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，所述分析检测结果，包括：圈取目标细胞并设门、分别在 CD3/CD4、CD3/CD8、CD4/CD8 象限图中准确界定双阴性区、单阴性区和双阳性区，读取 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺和 CD3⁺CD8⁺T 淋巴细胞百分比，从而获得鸡外周血 T 淋巴细胞亚群比例。~~

- 15 ~~76、如权利要求 61 所述的流式细胞术检测鸡外周血 T 淋巴细胞亚群的方法，其特征在于，所述圈取目标细胞并设门要求圈取靠近前向散射光轴的细胞团。~~