

权 利 要 求 书

1、一种小鼠胸腺或脾脏 T 淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1，获取试验小鼠的胸腺或脾脏组织，制备单细胞悬液；

5 步骤 2，吸取所述胸腺或脾脏单细胞悬液，分别加入两支流式上机管中一支管中加入抗小鼠的 CD3、CD4、CD8 单克隆抗体，旋涡混匀，于 4℃避光染色，用作检测管；另一支用作阴性设置管；

步骤 3，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 4，分析检测结果，获得小鼠胸腺或脾脏各亚群 T 淋巴细胞的百分比；

所述制备单细胞悬液，具体为：将获取的胸腺或脾脏组织用机械破碎法获得单细胞，过滤、洗涤后，用预冷的 PBS 液稀释细胞，获得浓度为 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个/mL 单细胞悬液，于 4℃保存备用；

15 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，使组织细胞团位于散点图的中央区；选取胸腺细胞并设门；用阴性设置管设定阴性区；用检测管调节通道的荧光补偿，完成样品的数据获取；

20 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，使细胞位于侧向散射光轴的中段；调节前向散射光通道的电流线性增益参数，使组织细胞与细胞碎片分开；

所述设定阴性区具体为：用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%；

25 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，分别读取 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^-$ 、 $CD4^+CD8^+$ 和 $CD4^+CD8^+$ T 淋巴细胞百分比，从而获得小鼠胸腺或脾脏 T 淋巴细胞亚群比例。

2、根据权利要求 1 所述的小鼠胸腺或脾脏 T 淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，其特征在于，所述染色时间为 30min。

3、根据权利要求1所述的小鼠胸腺或脾脏T淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，其特征在于，所述洗涤具体是以600-1000r/min的转速离心5分钟。

5 4、根据权利要求1所述的小鼠胸腺或脾脏T淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，其特征在于，所述调节通道的荧光补偿，具体为：在CD4和CD8的双参数图中，调节脾脏CD4⁺CD8⁺细胞的比例小于5%；胸腺CD4⁺CD8⁺细胞的比例大于60%；同时，左上角和右下角的CD4和CD8单阳性细胞与左下角的阴性细胞之间有较明显的分界。

10 ~~5、根据权利要求1所述的小鼠胸腺或脾脏T淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，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，分别读取CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺和CD4⁺CD8⁺T淋巴细胞百分比，从而获得小鼠胸腺或脾脏T淋巴细胞亚群比例。~~

15 65、根据权利要求51所述的小鼠胸腺或脾脏T淋巴细胞亚群的流式细胞术检测方法，其特征在于，所述圈取目标细胞并设门要求圈取除碎片以外98%以上的胸腺或脾脏组织细胞。