**实验报告**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目名称：** | 小鼠外周血淋巴细胞流式检测 |

|  |  |
| --- | --- |
| **委托方（甲方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **受托方（乙方）：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **联系人：** |   |

|  |  |
| --- | --- |
| **日期：** | 年 月 日 |

# 1 实验信息

详见实验方案

# 2 仪器与试剂

## 2.1 主要仪器

**表1** 实验所用主要仪器

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **型号** | **生产商** |
| 低速离心机 | TD5 | 卢湘仪 |
| 真空吸液泵 | G6-802B | 其林贝尔 |
| A2 型二级生物安全柜 | 1800A2 | 上海知楚 |

## 2.2 主要试剂

**表2** 实验所用主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **名称** | **货号** | **生产商** |
| PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD3 | 100218 | BioLegend |
| FITC anti-mouse CD4 | 100405 | BioLegend |
| PE/Cyanine7 anti-mouse CD19 | 115519 | BioLegend |
| APC/Cyanine7 anti-mouse CD8a Antibody | 100714 | BioLegend |
| PE anti-mouse CD49b (pan-NK cells) | 108907 | BioLegend |
| 小鼠外周血淋巴细胞分离液试剂盒 | P8620 | Solarbio |

# 3 实验方法

# 3.1 稀释全血

取新鲜抗凝全血（EDTA、枸橼酸钠或肝素抗凝均可）或者去纤维蛋白血液，用等体积的全血及组织稀释液或者PBS稀释全血。

# 3.2 全血分离

3.2.1 在离心管中加入适量分离液（当稀释后血液体积小于3mL时，加入3mL分离液；大于等于3mL，加入等体积分离液。但二者的总体积不能超过离心管的三分之二，否则会影响分离效果），将稀释后的血液平铺到分离液液面上方，注意保持两液面界面清晰。（可以使用巴氏德吸管吸取血液，然后将血液小心的平铺于分离液上，因为两者的密度差异，将形成明显的分层界面。如果样品较多加样时间较长，在离心之前出现红细胞成团下沉属正常现象。）

3.2.2 室温，水平转子500~1000g，离心20~30min （血液的体积越大所需的离心力越大，离心时间越长，最佳的分离条件需摸索，离心转速最大不超过1200g）。

3.2.3 离心后将出现明显的分层：最上层是稀释的 血浆层，中间是透明的分离液层，血浆与分 离液之间的白膜层即为淋巴细胞层，离心管 底部是红细胞与粒细胞。

3.2.4 小心的吸取白膜层细胞到15mL洁净的离心 管中， 10mL PBS或细胞洗涤液洗涤白膜层细胞。250g，离心10min。

3.2.5 弃上清，5mL的PBS或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心10min。

3.2.6 弃上清，5mL的PBS或细胞清洗液重悬细胞，250g，离心10min。

3.2.7 弃上清，细胞重悬备用。



# 3.3 染色

3.3.1 将细胞转移至流式管中，并设置单染管和空白管。每个样本管中分别加入PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD3、FITC anti-mouse CD4、PE/Cyanine7 anti-mouse CD19、APC/Cyanine7 anti-mouse CD8a Antibody、PE anti-mouse CD49b (pan-NK cells)，加入抗体后轻轻混匀细胞，4℃避光孵育30min。

3.3.2每个流式管中分别加入2mL的PBS，250g，室温，离心5min，弃上清后每管加入2mL的PBS，混合均匀，250g，室温，离心5min，弃上清后加200 µL PBS，震荡均匀。

3.3.3上机检测。