**Extracción de células de bazo y ganglios linfáticos.**

1. Colocar 5mL de medio RPMI completo en una placa de 6 pozos y colocar un filtro de 70 m en cada pozo a utilizar. Mantener a 4°C
2. Extraer bazo y ganglios linfáticos (inguinales y axilares).
3. Colocar bazo y ganglios linfáticos en el filtro.
4. Macerar con el émbolo de una jeringa (idealmente de 3 ó 5 mL).
5. Trasladar a Tubos Falcon de 15 mL y centrifugar (todos las centrifugaciones deben hacerse a 350-400 g, 5-7 minutos a 4°C).
6. Agregar Buffer de Lisis para esplenocitos (1-3 mL por ratón) e incubar a 4°C por 90 segundos
7. Parar con PBS hasta llenar tubo (al menos 10 volúmenes del buffer de lisis).
8. Centrifugar.
9. Descartar sobrenadante.
10. Resuspender en PBS.
11. Si se encuentra que el botón celular aún tiene eritrocitos, volver a repetir paso 6 pero disminuyendo volumen a 1mL por 60 segundos.
12. Parar con PBS como en punto 7.
13. Centrifugar a 350g por 5-7 minutos a 4°C.
14. Descartar sobrenadante.
15. Resuspender en PBS (aproximadamente 7-10 mL para bazo y ganglios linfáticos de un ratón B6 normal).
16. Contar células en cámara de Neubauer (Dilución 1:10 con Azul Tripano).