

灌胃

1. 准备药物和灌胃器械
2. 抓取老鼠
3. 灌胃

注意事项：

- 1) 抓取老鼠时，可以戴大手套，但是操作起来会很不方便；建议只戴橡胶手套或不戴手套。左手大拇指和食指从耳后固定老鼠头部，将颈部皮肤抓紧，使头部不能转到（但也不要窒息），剩余手指将老鼠背部皮肤抓紧，使其身体不能扭动。使其和身体成一直线。可以两人配合，但是会浪费时间，更增加灌胃难度；强烈建议一人独立操作。
- 2) 老鼠抓好后，要正确持针，中指、无名指和拇指夹住针体，食指放在推塞上；针务必要沿口角进入，大概进入针体的 2/3 即可将药物注射入胃，注意进针不顺时切忌用力，应重新进针。如果当时药物没有流出，既可确认灌胃成功，如果流出则失败。
- 3) 在正式实验灌胃前，务必先练习。首先不要惧怕老鼠，其次不要先老鼠脏（清洁级老鼠很干净的），再次，不能生硬，不要让老鼠紧张。
- 4) **熟能生巧，边学习边练习边思考**方能学好。有不足之处，敬请各位老师同学批评指正，以使该实验更加臻美。若有不解之处，请咨询冯展波 13912294731，**或者免疫学技术交流群：85460640**。QQ:929108912 谢谢。

2VO 模型

1. 准备手术器械
2. 麻醉
3. 去除颈部毛
4. 切开中正颈部皮肤，分离肌肉、血管、神经
5. 分离目标血管，双线结扎，血管无需剪断
6. 缝合伤口

注意事项：

- 1) 缝合线用 4 号线；
- 2) 麻药目前本实验室暂时使用水合氯醛，一般是 10% 的，按照 350mg/kg 量给药，由于老鼠对药物的耐受差异较大，麻醉把握不好死亡率较高；麻醉不足时，补药不超过前总量的 10%，补药时非常容易导致死亡，且等待时间会明显延长；麻醉过度则可进行口腔插管和辅助呼吸，如果均不行，则死亡放弃。
- 3) 分离血管时务必不能将神经损伤。
- 4) 出麻醉状态的老鼠体温调节失衡，所以手术过程中注意保温；
- 5) 老鼠体重在 250-280g 左右最适合实验，死亡率最低；
- 6) 打麻药时注意：首先正确抓取老鼠（见灌胃操作规程），再次将老鼠头朝下倒置成 30 度角，右手持针，腹中线和两后腿中间连线相交处进针，回抽后，注射。此法标准、简便、快速。
- 7) 总之，在正式实验前**边学习边练习边思考**方能学好，**熟能生巧**。有不足之处，敬请各位老师同学批评指正，以使该实验更加臻美。若有不解之处，请咨询冯展波 13912294731 **或者免疫学技术交流群：85460640**。QQ:929108912 谢谢。

灌注

1. 准备好器械和灌注液；
2. 取老鼠，按照 350mg/kg 水合氯醛麻醉，可适当过量；
3. 将老鼠腹腔胸腔打开，分离出心脏；

4. 将针插入左心室，剪破右心耳；
5. 调节针头位置，使水流最大；
6. 血液颜色明显变浅后，换甲醛液，抽搐完成后，将水流调为每秒一滴；
7. 将针头和心脏固定；固定至少 40min 后取脑；
8. 将取出的大脑放在 4% 甲醛液保存。

注意事项：

- 1) 灌注液用量：0.9% 生理盐水每只 350ml~450ml，0.4% 甲醛 300ml~400ml 之间；生理盐水适当多一些可以保证血液冲洗完全；甲醛固定时间长些，大脑充分固定，有利于取脑和后续试验；
- 2) 进针前要保证针头处没有气泡，以免进入血管影响灌注；
- 3) 在抽搐完成前，最好不要将心脏用夹子夹，而是用手拿，这样可以保证水流速度和心脏完整；待抽搐完成后，再夹住；
- 4) 进针时，不能太猛，以免针头进入右心室内，进针后，适当调节，注意不要进入左心房；
- 5) 灌注完成后，将管道冲洗一下，收拾器械；
- 6) 取脑注意：
 - 第一，将大脑剪下，去除脑后肌肉和椎骨，露出枕骨大孔；
 - 第二，将头部皮肤剪开，并将两侧咬肌剥离；
 - 第三，然后用大剪刀将枕骨打孔纵向和横向切开三个口， \perp 字型切口；
 - 第四，用止血钳将头骨掀开，注意不要触到大脑；
 - 第五，头盖骨掀开后，小心将脑膜剥离；
 - 第六，将附着咬肌的两块骨头可适当掀开；（此步可以省略）
 - 第七，如果力气足够，可以一手将老鼠头握紧，另一手用力击打手腕，直接将大脑震抖出来，这样可以保证大脑完整，且节省时间；强烈建议此方法，女生基本都能抖出来。如果不行再进行第五步或第七步操作；
 - 第八，如果力气不够，则慢慢取出：1，小心将后脑掀开，剪断脑下链接的神经，2，看大脑可以自由活动时，再用力抖，可将大脑抖出，注意不要甩到地上；3，若不能抖出，再小心将前面的神经链接剪断即可出来。不过此方法很容易将大脑损伤，浪费时间，对技术要求很高，建议尽量不要用方法。
- 7) 总之，在正式实验前**边学习边练习边思考**方能学好，**熟能生巧**。有不足之处，敬请各位老师同学批评指正，以使该实验更加臻美。若有不解之处，请询冯展波 13912294731 或者**免疫学技术交流群：85460640**。QQ:929108912 谢谢。

切片

1. 将在甲醛中固定的大脑先浸泡到 20% 的蔗糖，使其沉下去，再转到 30% 的蔗糖，使其沉下，才能进行切片；
 2. 提前一天预约使用冰冻切片机；
 3. 取浸泡好的大脑，根据切片所需部位，对大脑进行修整，使其底端平整，易于放在载物钉上；
 4. 取载物钉放入切片机箱冷冻后，用 OCT 或 PBS 制作平台，平台厚度大约 3mm，将其面修平整；
 5. 将修平整的大脑放到载物钉上，用 PBS 固定，大约 10-15min，后可进行切片，根据实验需要对大脑进行再修正；
 6. 切片厚度根据实验所需，适当调整，一般脑片为 35-40 μm ；
 7. 一般切 5 张片子取一次，但更要根据实际情况取；
- 注意：
- 1) 蔗糖沉下去的标准是，震荡后仍能很快沉下；

- 2) 其他切片注意事项，见切片机上的注意事项；
- 3) 总之，在正式实验前**边学习边练习边思考**方能学好，**熟能生巧**。有不足之处，敬请各位老师同学批评指正，以使该实验更加臻美。若有不解之处，请咨询冯展波 13912294731 或者免疫学技术交流群：**85460640**。QQ:929108912 谢谢。

染色

HE 染色

丙酮固定 1-2min
水洗 5s
苏木精染色 4-5min
水洗 5s
分化液 7-8s
水洗
伊红 20-30s
水洗

Nissl 染色

氯仿 5min
丙酮 15min
100%酒精 30s
95%酒精 30s
70%酒精 30s
蒸馏水 过 2 次
焦油紫染色液 20min
水 过 3 次
70%酒精 60s
95%酒精 60s
100%酒精 90s
氯仿 5min
分化剂（拿进去即出来）
95%酒精 过一下
100%酒精 过一下
100%酒精 过一下
二甲苯 透明 1min 2min 3min 三次
附录：焦油紫染色配方：1%焦油紫溶液中加入冰醋酸， $\text{pH}=3.75-3.85$
尼氏分化剂：于 95%乙醇中滴加冰醋酸 $\text{pH}=4.1$ ，此 pH 很难调，有文献记载 1~3 滴冰醋酸。
H&E 分化液：0.3%氢氧化铵（氨水），或者 1%盐酸酒精（70%酒精 99ml+1ml 盐酸）。

注意：

- 1) 染色时间和冲洗时间要根据片子的厚度，适当调整染色时间和冲洗时间；
- 2) 很多染液有挥发性和毒性，实验时注意保护自己，最好在柜子中操作；
- 3) 染色前晾干标准是，片子周边泛白；
- 4) 总之，在正式实验前**边学习边练习边思考**方能学好，**熟能生巧**。有不足之处，敬请各位老师同学批评指正，以使该实验更加臻美。若有不解之处，请咨询冯展波 13912294731 或者免疫学技术交流

群：85460640。谢谢。Fzb200488@126.com QQ:929108912