

 病毒脑区注射实验方法总结

对于动物体内实验，想要达到预期实验效果，所需病毒量一般都比较较大。不同的注射部位，不同的感染方式，所需要的病毒注射量和体积都不一样。一般而言，用于动物在体注射的病毒，慢病毒小鼠一般需要  $5 \times 10^8$  PFU 的病毒，而大鼠一般要  $1 \times 10^9$  PFU，腺病毒则需要达到  $1 \times 10^{11}$  PFU。

不同的种属，不同的注射部位，需要注射不同的病毒总量以达到效果，因此，根据病毒的大致使用量，除以滴度，可以得到需要注射的病毒体积。然而，更多的时候，动物目的部位所能容纳的体积有较高的要求，而这也是注射的时候往往容易被忽略的问题。不同的注射部位和方式，注射体积不一样。比如脑区只能接收极小体积（1-5ul）的注射体积，尾静脉为 100-500ul，而腹腔则可以接受 ml 级别的病毒注射量。下面我们将大小鼠不同部位的病毒注射操作方法和所能注射的体积进行总结一下。

本技术文件讨论脑区病毒注射，其他相关的动物体内实验请参考汉恒的其他相关技术文件，详情登录汉恒官网 [www.hanbio.net](http://www.hanbio.net) 或电话咨询汉恒生物动物实验技术工程师。

 脑部注射

注射体积：小鼠不超过 2ul，大鼠不超过 5ul<sup>[1,2,3]</sup>

操作方法：

### 1、脑室注射

大鼠:经腹腔注射 10%的水合氯醛（0.4g/kg 体重）麻醉后，固定于脑立体定位仪上<sup>[4]</sup>，头顶部去毛，消毒皮肤，头顶部正中切口，暴露前囟，按大鼠脑立位图谱，向实验组大鼠第三脑室注射病毒，脑室立体定向坐标为：AP=-1mm,VD=4.5mm;微量注射器自脑表面垂直进针

2.6mm。

小鼠：用 0.2m L 0.4% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,将小鼠固定在定位仪上<sup>[5]</sup>,剪开头顶部皮肤,酒精棉擦拭,暴露出前囟。采用右侧脑室定位,自前囟向后 2m m,矢状缝旁开 1.5m m处,即为侧脑室的体表部位。用微量注射器在此位置穿一小孔,深度为颅骨表面向下 2.5m m处<sup>[1]</sup>,快速恒速注射。

## 2、海马注射

大鼠：1%戊巴比妥钠麻醉，固定于脑立体定位仪上，头顶部去毛，消毒皮肤，头顶部正中切口，暴露前囟，按大鼠脑立位图谱，于前囟后 3.0mm，中线右侧 2.0mm 处，微量注射器自脑表面垂直进针 2.8mm<sup>[1]</sup>，向双侧海马缓慢注入，-20 度保存，，每侧注射时间 5min，留针 2min，缓慢退针<sup>[6]</sup>。所有操作均在无菌条件下进行，皮肤切开处用青霉素抗菌，缝合伤口。

小鼠：1%戊巴比妥钠麻醉，立体定向仪固定小鼠（bromega 2.3mm, L:1.8mm, V:2.0mm），根据所需注射部位，按小鼠脑立体定向定位，在钻孔后注射，速度 0.2ul/15 秒，注射完毕后留针 2min，然后每分钟退针 1mm。整个注射过程不到 10min，注射效果好的话，小鼠很快从麻醉（气体）中恢复。

注意事项：

I、固定头颅时一定要准确插入双耳固定棒，不能太紧，也不能靠颈部，这样容易刺激迷走神经而引起呼吸停止，难以抢救。

II、钻孔时一定要控制好，宁慢勿快，很容易在颅骨钻通后一不小心钻头进入脑组织。

III、麻醉很关键。腹腔注射剂量不好掌握，用多了小鼠死亡率很高，鼠在手术过程中稍有挣扎，就会对定位有影响，且对操作不利。

## 3、核团注射

操作方法:

小鼠: 按照 50 mg/kg 给小鼠注射戊巴比妥钠进行麻醉, 固定于脑立体定位仪上, 按照 AcbC (AP: +1.1 mm; ML: 1.0 mm; DV: 3.8 mm), the medial AcbSh (AP: +0.98 mm; ML: 0.5 mm; DV: 4.0 mm), and the ventral AcbSh (AP: +1.10 mm; ML: 1.0 mm; DV: 5.0 mm)<sup>[7]</sup> 分别钻孔并用外部尖端直径为 10-20um 的玻璃微量注射器进行压力注射。缓慢注射, 要持续注射 15 分钟左右以使得病毒液可以在脑内可以较大范围分布, 注射完后, 留针 10 分钟, 缓慢抽回注射器, 缝合伤口。

注意事项:

I、固定头颅时一定要准确。

II、钻孔时一定要控制好, 宁慢勿快。

III、要在无菌条件下操作。



#### 4、VTA 区注射

操作方法:

小鼠: 1% 戊巴比妥钠麻醉, 固定于脑立体定位仪上, 头顶部去毛, 消毒皮肤, 头顶部正中切口, 暴露前囟, 在 (AP: 前囟-3.2 mm, L: 中间线+0.5 mm, DV: 硬脑膜下 4.3mm<sup>[8]</sup>) 插入探针钻孔, 钻孔后注射, 速度 1ul/min<sup>[9]</sup>, 注射完毕后, 留针 10min, 慢慢抽回注射器, 除去套管, 进行伤口缝合, 进行进一步处理或者灌注前, 需将注射后的小鼠单独培养 3 到 5 天。

大鼠: 1% 戊巴比妥钠麻醉, 固定于脑立体定位仪上, 头顶部去毛, 消毒皮肤, 头顶部正中切口, 暴露前囟, 按大鼠脑立位图谱, 于前囟后 4.7mm, 中线右侧 1.6mm 处, 微量注射器自脑表面垂直进针 8mm, 插入探针钻孔, 钻孔后注射, 插入探针钻孔, 钻孔后注射, 速度

1ul/min<sup>[9]</sup>,注射完毕后,留针 5min,慢慢抽回注射器,除去套管,进行伤口缝合,进行进一步处理或者灌注前,需将注射后的小鼠单独培养 3 到 5 天。

注意事项:

I、所有操作要在无菌条件下进行;

II、使用 500nl Hamilton<sup>[8]</sup>注射器进行注射;



### 病毒动物实验方法总结

部位		注射器材	可注射体积	病毒量	预计费用/鼠	推荐病毒类型	参考文献
脑室	大鼠	30-33GHamilton 针	不超过 5ul	10 <sup>9</sup>	¥150	腺病毒	[2,3,4]
	小鼠	30-33GHamilton 针	不超过 2ul	10 <sup>8</sup>	¥15	腺病毒	[1,5]
核团	大鼠	直径为 10-20um 的玻璃微量注射器	不超过 5ul	10 <sup>9</sup>	¥150	腺病毒	[7]
	小鼠	直径为 10-20um 的玻璃微量注射器	不超过 2ul	10 <sup>8</sup>	¥15	腺病毒	[7]
VTA	大鼠	直径为 10-20um 的玻璃微量注射器	不超过 5ul	10 <sup>9</sup>	¥150	腺病毒	[8,9]
	小鼠	直径为 10-20um 的玻璃微量注射器	不超过 2ul	10 <sup>8</sup>	¥15	腺病毒	[8,9]
海马	大鼠	30-33GHamilton 针	不超过 5ul	10 <sup>9</sup>	¥150	腺病毒	[1]
	小鼠	30-33GHamilton 针	不超过 2ul	10 <sup>8</sup>	¥15	腺病毒	[6]



注:不同部分具体注射体积根据病毒浓度决定,注射的病毒滴度也要根据具体注射的体积相应调整。

### 参考文献

- [1] Hsu W, Lesniak MS, Tyler B, Brem H. Local delivery of interleukin-2 and adriamycin is synergistic in the treatment of experimental malignant glioma. *J Neurooncol* 2005;74:135–140.
- [2] Lesniak MS, Gabikian P, Tyler BM, Pardoll DM, Brem H. Dexamethasone mediated inhibition of local IL-2 immuno-therapy is dose dependent in experimental brain tumors. *J Neurooncol* 2004;70:23–28.
- [3] Lesniak MS, Upadhyay U, Goodwin R, Tyler B, Brem H. Local delivery of doxorubicin for the treatment of malignant brain tumors in rats. *Anticancer Res* 2005;25:3825–3831.
- [4] 李慧,王春华,罗姗,王红冰,黄肖武. 关于小鼠脑内不同注射手法的探讨. *Laboratory Animal Science* 2013 April;Vol.30 No.2.
- [5] AM Sonabend, IV Ulasov, Y Han, CE Rolle, S Nandi, D Cao, MA Tyler, and MS Lesniak. Biodistribution of an oncolytic adenovirus after intracranial injection in permissive animals: a comparative study of Syrian hamsters and cotton rats. *Cancer Gene Ther.* 2009 April; 16(4): 362–372. doi:10.1038/cgt.2008.80.
- [6] Rebecca L. Lowery, Ania K. Intracranial Injection of Adeno-associated Viral Vectors. *Journal of Visualized Experiments.*2010.
- [7] Jian-Ping Zhang, Qi Xu, Xiang-Shan Yuan, Yoan Cherasse, Serge N. Schiffmann, Alban de Kerchove d'Exaerde, Wei-Min Qu, Yoshihiro Urade, Michael Lazarus, Zhi-Li Huang and Rui-Xi Li. Projections of nucleus accumbens adenosine A2A receptor neurons in the mouse brain and their implications in mediating sleep-wake regulation. *Frontiers in Neuroanatomy* www.frontiersin.org December 2013, Volume 7, Article 43, 1.
- [8] Mi-La Kim, Shengjun Han, Sat-Byol Lee, Jung Hye Kim, Hee Kyung Ahn, Youngbuhm Huh. Evaluation of recombinant adenovirus-mediated gene delivery for expression of tracer genes in catecholaminergic neurons. *Anat Cell Biol* 2010 43:157~164.
- [9] Paul A. Lapchak, Dalia M. Araujo, Dana C. Hilt, Jackie Sheng, Shoushu Jiao. Adenoviral vector-mediated GDNF gene therapy in a rodent lesion model of late stage Parkinson's disease. *Brain Research* 1997 777:153–160.