

工具病毒注射方法

AAV 注射方法主要可分为系统性注射和原位注射两种方法，下面简要介绍：

系统性注射

尾静脉注射

- 1) 提取小鼠，将其放置于固定器上适当安抚；
- 2) 放置于固定器中，朝外露出尾部；
- 3) 酒精擦拭小鼠尾部，随后可用热水加热使尾部血管扩张；
- 4) 拉直尾部，能清晰可见红色静脉；
- 5) 距尾尖 1/3 处进针，回血后注射药物；若无回血或进针受阻，可退出后进针；
- 6) 棉球按压注射点 1 min 止血后，将小鼠从固定器上取下，放归笼中。

腹腔注射

- 1) 提取小鼠，将其放置于手背上适当安抚；
- 2) 左手握住小鼠，拇指和食指捏住小鼠颈背部，无名指和小指固定尾部和后肢，腹部朝上，头呈低位；
- 3) 右手持注射器，与小鼠腹部成 30° 插入，注射部位为下腹部离腹白线约 0.5 cm 处；刚刺入时有明显抵抗力，抵抗力消失后即成功刺入腹部，回抽无回血则说明没有进入脏器，可进行注射；
- 4) 注射完成后，缓缓拔出并旋转针头，以防漏液；
- 5) 将小鼠放归笼中，继续饲养观察。

原位注射

脑立体定位注射

- 1) 麻醉小鼠，用 1% 戊巴比妥钠以腹腔注射的方式麻醉小鼠，剂量为 80 mg/100 g 小鼠；
- 2) 麻醉剂起效后用剃毛器剔除小鼠头部毛发，并固定到立体定位仪上，保证小鼠头部不能晃动、鼻对正中且提尾不掉；
- 3) 用剃刀或脱毛膏去除需手术部位毛发，暴露皮肤；
- 4) 用手术刀划开小鼠头部皮肤，去除颅骨表面结缔组织，暴露前后囟；
- 5) 根据预实验和脑图谱，确定注射位置参数，以 Bregma 为 0 点，按照设定好的路径打开颅骨，形成大小合适的骨窗；
- 6) 用 PBS 冲洗微量注射器 3-5 次后，组装微量注射器，根据确定好的深度下降注射器；
- 7) 恢复小鼠脑部切开部位，做好缝合后放归笼中，继续饲养观察；为防止感染可给予含抗生素的饲料。

肝原位注射

- 1) 肝脏一般使用尾静脉注射（详见“系统性注射——尾静脉注射”中操作步骤），或肝门静脉注射（原位注射），用量与尾静脉类似；
- 2) 原位注射需要麻醉小鼠后打开腹腔，寻找到肝门静脉；
- 3) 提起肝叶，下方即为肝门静脉；用注射器注射病毒，穿刺后压迫止血；

4) 恢复手术部位，缝合后放归笼中，继续饲养观察；为防止感染可给予含抗生素的饲料。

角膜下原位注射

- 1) 手术前麻醉小鼠（麻醉方法详见“脑立体定位注射”），固定小鼠于固定器上，突出眼球部分；
- 2) 夹紧小鼠头部，对角膜缘处进行扎孔，期间一般选择角膜 1 mm 位置，避开血管；
- 3) 判断是否扎孔成功，成功后垂直进针后倾斜，注射病毒。

心脏原位注射

- 1) 确定注射部位，包括颈静脉、心腔内、心肌内定点和心包内注射；
- 2) 颈动脉注射仅需固定小鼠，同时剔除部分颈部毛发后即可注射；
- 3) 心腔内、心肌内定点和心包内注射需要打开胸腔，需要辅助呼吸，且手术操作要求较高；
- 4) 心腔内注射需要结合主动脉钳夹进行，同时缓慢注射。

注：尾部静脉注射感染心脏，相比其他器官需要更大病毒量；而原位注射在注射局部点附近表达量较高，扩散有限。

肺原位注射

- 1) 使用鼻内滴注法进行；
- 2) 使动物处于深度麻醉状态，防止动物运动或对给予溶液反应而咳嗽/喷嚏，液需要防止动物过度麻醉而死亡；
- 3) 以俯卧位固定，向动物鼻腔（通过鼻孔内壁）缓慢悬滴病毒悬液；
- 4) 为了保证最大的肺部感染效率，病毒悬液最小给予体积为 50 μL ，最大体积为 75 μL ；
- 5) 待动物恢复正常呼吸后，以相同方法再次给予病毒悬液 75 μL ；
- 6) 滴注完成后，取下小鼠小幅度垫高动物头部和胸部，保证其呼吸顺畅；苏醒且恢复自主呼吸后，放归笼中。

注：鼻内滴注法进行肺原位注射时，病毒颗粒容易沉积上呼吸道和肠胃道（包括鼻道、鼻窦和咽部）；如需病毒到达下呼吸道，需要大剂量病毒给予完成。

注意事项：

- 1) 在脑定位图谱上确定目标核团形状和坐标，结合相关文献中的坐标值，最终确定合适注射点；
- 2) 其后为了确定核团定位是否准确，可进行荧光、有色染料预实验。可选择神经顺行示踪 Dil 染料或神经逆行示踪 CTB 染料确定注射位点是否准确；其后再进行病毒注射，提高实验成功率；
- 3) 注射和固定时注意观察小鼠状态，因俯卧位和脑定位仪的夹持，小鼠易窒息死亡，故需要确定实验进行中小鼠气道通畅；
- 4) 对于手术切开部位，可适当滴加生理盐水，防止伤口干燥。