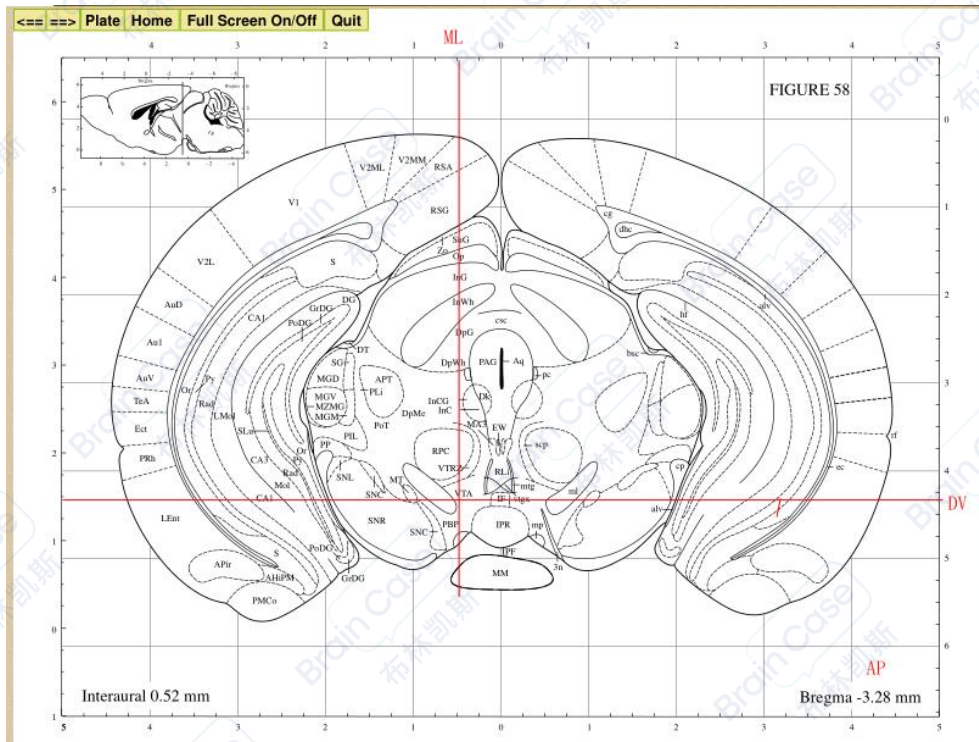


脑立体定位病毒注射操作流程

1、查阅图谱，确定注射位点坐标



2、玻璃电极和微量进样器准备

微量进样器和玻璃电极中分别灌注液体石蜡油，然后把电极套在微量进样器尖端，保证里面没有气泡，然后用热熔胶密封连接处，静置待胶凝固。把制作好的微量进样器固定在立体定位仪上，确保进样器垂直并且牢固的固定在定位仪上。

3、老鼠麻醉与固定

用 5%水合氯醛（或者 1%戊巴比妥钠，按 0.20ml/20g 剂量 IP 注射麻醉）腹腔注射麻醉小鼠，大约 5 分钟后动物进入深层麻醉状态。用剃毛器把头骨上面的毛剃干净，将小鼠固定在适配器上，眼睛涂抹眼膏。将双侧耳杆固定在小鼠的外耳道，微调使左右耳杆刻度一致并拧紧螺丝，使小鼠的头处于正中。将小鼠的门齿固定于适配器门齿固定器上，门齿夹不宜拧太紧。

4、鼠脑调平

暴露颅骨：70%酒精消毒小鼠头皮，随后用剪刀将头皮剪开一条长约 2cm 的创口，用干的卫生棉球擦掉颅骨表面的软组织，完全暴露颅骨。

定前囟：将注射针尖移至中缝线靠前部位，接触颅骨表面，以前囟位置（bregma 点）为参考点，刚接触到表面时，停针，将数字显示仪的 X, Y, Z 轴坐标读数归零。下针的时候，用显微镜观察针尖位置，以免折断针头！

左右调平：将进样器向上提起少许，以免碰到颅骨表面，然后以 bregma 为中点左右移动相同的距离（推荐 3.0mm/2.5mm/2mm）并下针接触颅骨表面，分别读对应点 Z 坐标，通过 Z 坐标的数值来确定左右是否齐平，如果读数相差 0.03mm 以内，则认为小

鼠脑袋左右齐平。通过调整两边的耳杆高度将左右调平，调整过程中，移动耳杆后必须重新定位 bregma 零点。

前后调平：前囟点和后囟点调平，方法同左右调平。

5、病毒注射

开颅：调平后，通过数显仪开始定位自己的目标脑区，以 VTA 坐标为例，AP:-3.2mm ML: ± 0.45 mm DV:-4.3mm，Y 轴向后移动 3.2mm，X 轴向右移动 0.45mm，下针，接触颅骨表面的一瞬间停针，观察颅骨表面特征并记住或做个标记，提针至较高处，然后用颅钻在目标位点磨孔，暴露脑组织。

吸取病毒：打开控制泵，设置好需要的体积、速度和模式，用生理盐水清洗玻璃电极尖端，将针尖浸没到液面下，按 start 开始吸取液体，吸液结束后再用生理盐水擦拭针头。

注射：然后将进样器移至目标脑区，根据坐标开始下针，下针过程必须足够缓慢，下到目标脑区的深度，设置体积、速度（一般 40-80nl/min）和模式，然后按 start 注射病毒。病毒注射完成后，停针 10 分钟，然后将注射针缓慢提起。

术后处理：用医用针线缝合头部皮肤并进行消毒，处理完后将小鼠放回鼠笼，必要时放在加热垫上保暖。

6、心脏灌流

开胸：将小鼠麻醉后固定在泡沫板上，用左手持镊子夹起腹部皮肤，右手持剪刀在剑突下剪一小口，向左右两侧剪开腹部皮肤。止血钳夹持剑突上提，剪开胸腹隔膜，沿左右两侧向上剪断肋骨至下颌，上翻胸廓，暴露心脏。

左心室穿针：左手用镊子轻轻夹住心脏，右手将灌流针由心尖插入左心室（此时液体是关闭上的），有落空感证明扎进去了，固定灌流针，剪开右心耳，开放血液流出通道。（注意针不能扎得太深，以免扎进右心室，进入肺循环后将影响灌流效果。）

生理盐水冲洗及 4% 多聚甲醛固定：打开蠕动泵开关（蠕动泵流速为 35-40rpm），先用生理盐水冲，以小鼠四肢、舌头、肝脏变白了为冲洗完毕的判定指标，之后将导管放入 4% 多聚甲醛溶液中，待小鼠四肢及尾巴僵硬结束灌流。

7、剥取鼠脑

沿小鼠颈部剪下头颅，用箭头剪开头皮暴露白色头盖骨，将延髓上包被的软骨剪开，除去多余的结缔组织。用镊子将头盖骨小心剥开，露出白色的脑部。最后将脑下部连接的神经逐条剪断（可看到视神经交叉），待全部剪断后将脑整个剥离出来。

8、沉糖脱水

将剥离出来的脑浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中，后固定 6~24 h，之后用 30%蔗糖进行脱水（防止冷冻切片时形成冰晶和孔洞），初始脱水时脑袋会浮在液体上方，待完全脱水后脑会沉底，此时可将脑取出进行冷冻切片。

9、切片、贴片、封片

利用冰冻切片机对小鼠脑组织进行组织切片，每片厚度为 40 μ m。将切好的脑片收集在装有防冻液（PBS:丙三醇:乙二醇=5:2:3）的 24 孔板中，并于 -20℃ 冰箱保存。挑取目的脑片，用 PBS 清洗 3 遍，每遍 5 min。用 DAPI 染色 10-15min 后，用 PBS 清洗 3 遍，每遍 5 min，将脑片贴于载玻片上，最后用 70%甘油封片。

脑立体定位病毒注射操作注意事项

- 1、制作微量进样器时，针管内不要有气泡，避免注射剂量产生误差。
- 2、密封之后，推一下活塞检查是否漏液，未密封会导致注射剂量出现严重误差，病毒注射不进去。
- 3、小鼠固定时门齿夹不要拧太紧，小鼠上颚刚好不能活动为宜，避免夹断小鼠鼻骨。
- 4、调平过程中一定要在镜下观察针尖，下降幅度不要太大，避免针尖折断。
- 5、颅骨钻孔的时候，不要用力往下压，避免损伤脑组织。
- 6、颅骨磨薄之后可以用弯尖镊，剥开颅骨，用针挑破脑膜，避免出现病毒注射在脑膜外的情况。
- 7、通过观察石蜡油与病毒之间形成液面的升降，判断病毒是否吸取或注射成功，避免病毒注射失败的情况。
- 8、吸取病毒前后必须用生理盐水轻轻擦拭针尖，避免污染样品，也可以减少病毒在针道残留。
- 9、注射结束之后，切勿立即拔出注射针，应该将针停留 10min 待病毒在组织内充分扩散之后，再缓慢拔出注射针，避免快速拔针，病毒被抽吸，导致注射剂量误差和针道残留。
- 10、手术结束之后，将未苏醒的小鼠放置加热垫保暖，温度适中，避免小鼠因麻醉体温过低而死亡。
- 11、灌流时，麻醉小鼠切勿麻醉致死，小鼠死亡血液凝固会影响灌流效果。
- 12、灌流固定效果不佳，或者目的脑区不易剥离时，可以将脑组织连同颅骨一起浸泡在固定液里，待固定好之后，再剥离脑组织。
- 13、样本浸泡在 4% PFA 固定液里，4℃ 存放，建议不超过一个月。
- 14、在不影响后期实验的前提下，可以在 37℃ 温箱里进行沉糖。
- 15、沉糖后的样本可以保存在 4℃ 冰箱，建议尽快处理样本，存放时间过久会影响后期成像效果。
- 16、冰切之后的脑片，浸泡在 PBS 里，4℃ 冰箱可以短时间存放，浸泡在防冻液里，- 20℃ 冰箱可以保存 2-3 年。