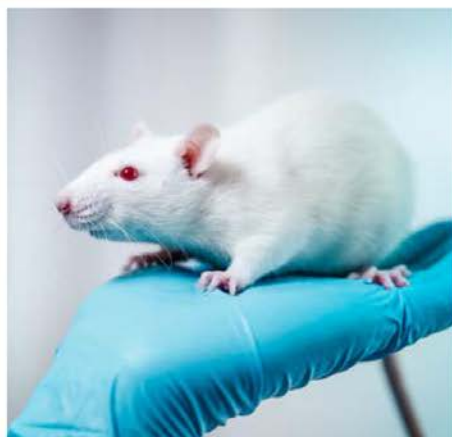


# 吉康医学动物实验操作手册

技术引领医学转化 专业创造行业口碑



北京吉康医学科技有限公司

[www.genecome.cn](http://www.genecome.cn)

## 目录

一、oligo in vivo 使用说明 .....	3
1 剂量.....	3
2 注射 oligo 途径：皮下/腹腔/静脉注射.....	3
3 给药方法.....	3
4 常用注射量（毫升） .....	4
5 检测.....	4
6 参考文献.....	4
二、virus in vivo 使用说明 .....	8
1 剂量.....	8
2 注射途径.....	8
3 注射周期和频率.....	8
三、常见动物实验操作简述.....	8
1 动物的抓取.....	9
a. 小鼠的抓取手法.....	9
b. 大鼠的抓取手法 .....	9
c. 豚鼠的抓取手法.....	10
d. 兔子的抓取手法 .....	10
2 动物的分组.....	10
a. 按体重大小随机分组.....	10
b. 建立对照组 .....	10
3 动物的编号.....	11
a. 颜料涂染.....	11
b. 打号法 .....	11
c. 挂牌法.....	11

- 4 注射途径..... 11
  - a. 皮下注射..... 11
  - b. 皮内注射..... 11
  - c. 腹腔注射..... 12
  - d. 静脉注射..... 12
- 5 取血方法..... 13
  - a. 剪尾采血..... 13
  - b. 摘除眼球采血..... 14
  - c. 心脏采血..... 14
  - d. 断头采血..... 14
  - e. 眼眶静脉丛采血..... 14
- 6 小鼠的处死方法..... 15
  - a. 颈椎脱臼处死法..... 15
  - b. 断头处死法..... 15
- 7 小鼠取组织步骤..... 15
  - a. 处死小鼠..... 15
  - b. 皮肤消毒..... 15
  - c. 打开腹腔、胸腔..... 15
  - d. 取脑组织..... 15

## 一、oligo in vivo 使用说明

### 1 剂量

siRNA 使用的剂量及浓度主要取决于注射 oligo 靶点的性质, 诸如肿瘤的类型, 组织的类型, 靶基因表达水平, 动物模型个体大小等等, 针对不同的研究模型, 最好先查阅相关资料。一般剂量为 2~10 mg siRNA/kg 动物体重。另外客户可根据实验具体情况再加大浓度。siRNA 溶于适当浓度 PBS/无 RNA 酶水/OptiMEM 中即可进行后续实验。

### 2 注射 oligo 途径: 皮下/腹腔/静脉注射

客户可根据具体组织进行适当的 oligo 注射。

a. 系统注射 oligo 推荐剂量使用: 建议每次注射 oligo: 0.15-0.2 nmol/g 体重

小鼠每次注射 oligo(体重约 15-20 g): 3-4 nmol(40-50 ug)

大鼠每次注射 oligo(体重约 150-200 g): 30-40 nmol(400-500 ug)

b. 注射 oligo 途径:

静脉注射 oligo: 适合心, 肝, 肺, 肾, 肿瘤组织等血流丰富的组织器官

呼吸道注射 oligo: 适合呼吸系统

颅内注射 oligo: 适合中枢神经系统

局部注射 oligo: 表皮, 皮下, 子宫腔等系统注射 oligo 难到达的部位

腹腔注射 oligo: 适合腹腔和盆腔内脏器, 胰, 脾, 肾, 卵巢等。

### 3 给药方法

siRNA 溶于适当浓度 PBS/无 RNA 酶水/OptiMEM 中, 注射入动物体内, 如需要较长时间检测, 可在 8 h, 24 h 重复注射。

迄今为止还没有明确的 siRNA 体内实验使用量的计算方式, 在实验前最好先从文献中查询是否已经有相关的文章发表。

对于常规实验, 一般使用 100  $\mu$ L 的注射体积, 浓度为 10~500  $\mu$ M。原先用 antisense 的研究表明, 当剂量大于 20 mg/kg/day (416 mM)时, 会观察到明显的毒性。最好针对您的实验绘制剂量反应曲线。

常规情况下, 给药剂量可以以~5 mg/kg/day 作为优化起点。需要注意的是, 这个剂量只是

一个预实验的起点，最后的给药剂量取决于动物模型、靶基因、靶组织和给药方式等因素。

#### 4 常用注射量 (毫升)

注射途径	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	狗
腹腔	0.2~1	1~3	2~5	5~10	5~15
肌肉	0.1~0.2	0.2~0.5	0.2~0.5	0.5~1	2~5
静脉	0.2~0.5	1~2	1~5	3~10	5~15
皮下	0.1~0.5	0.5~1	0.5~2	1~3	3~10

#### 5 检测

客户可根据具体实验目的进行 RNA、蛋白、整体等水平的检测。

#### 6 参考文献

Organ / System	Disease model / Process	Target	Formulation / Delivery Reagent	Injection / Delivery	Dosing / kg animal / injection	Volume/injection	Frequency	Reference
Brain	Alzheimer	APP	None	Intracerebral	8.5 mg	6 µl/day	4 weeks	Poster on IVGN website
	ADHD	Dopamine	None	Intracerebral	20 mg	6 µl to 12 µl/day	1 or 2 weeks	Thakker et al. 2004
		5-HT transporter	None	Intracerebral	20 mg	6 µl to 12 µl/day	1 or 2 weeks	Thakker et al. 2005
	Depression	Serotonin transporter	None	Intracerebral	20 mg	6 µl to 12 µl/day	1 or 2 weeks	Thakker et al. 2005
	Glutamate release	GluR2, COx-1	None	Intracerebral	N/A	N/A	Once	Akaneya et al. 2005
Eye	Ocular Inflammation and fibrosis	TGFβ RII	Liposome	Local	0.005	30 µl	Once	Nakamura et al. 2004
	Herpetic Stromal keratitis	VEGF/R	None	Local	0.5 mg	10 µl	at 6 hrs and 24 hrs	Kim et al. 2004
		VEGF/R	Pegylated	Intravenous	2 mg	100 µl	at 6 hrs and	Kim et al. 2004

		R	immunoliposomes				24 hrs	
Hearing	Hearing-autosomal dominant	GJB2	Liposome	Local	12.5 µg-50 µg	1-2 µl	Applied to gel foam, placed locally	Maeda et al. 2005
	Rheumatoid arthritis	TNFα	None	Local	0.5 mg	N/A	weekly (for 3 weeks)	Schiffelers et al. 2005
Inflammation		TNFα	PEI	Intravenous	2 mg	N/A	Once	Schiffelers et al. 2005
		IL-12p40	Oligofectamine™	Intraperitoneal	N/A	200 µl	N/A	Flynn et al. 2004
Spinal cord	Neuropathic pain	P2X3 cation channel	None	Intrathecal	20 mg	6 to 12 µl/day	Every day for 6-7 days	Dorn et al. 2004
	Phrenic long term facilitation	BDNF	Oligofectamine™	Intracerebral	0.6 mg	20 µl	Once	Baker-Herman et al. 2004
	Neuropathic pain	DOR	Cationic lipid	Intrathecal	0.1 mg	10 µl	Daily at 8 hrs and	Luo et al. 2005
	Acute liver Failure	Fas	None	Hydrodynamic	2.5 mg	1 ml	24 hrs	Song et al. 2003
Liver		Caspase 8	None	Hydrodynamic	0.325 mg	2.5 ml (tail Vein)	Once	Zender et al. 2003
		Caspase 8	None	Hydrodynamic	0.325 mg	1 ml portal vein	Once	Zender et al. 2003
	Ischemia/reperfusion	Caspase 8/3	10% lipiodol	Hydrodynamic	0.375 mg	1 ml portal Vein	Once	Contreras et al. 2004
	Hypercholesterolemia	ApoB	Modified-Cholesterol conjugate	Intravenous	1 mg	200 µl	Over 3 days	Soutschek et al. 2004
Kidney	Renal ischemia/reperfusion	Fas	None	Hydrodynamic	2.5 mg	1 ml	N/A	hamar et al. 2004
Lung	Ischemia/reperfusion	Heme oxygenase1	None	Intranasal	2 mg	50 µl	Once	Zhang et al. 2004
Metabolism	Obesity	AGRP	None	Intracerebral	0.2 mg	0.5 µl	Once	Makimura et al. 2002
Pancrea	Diabetes	Ins2	Lipofectamine™	Local injection	0.2 mg	100 µl	N/A	Bradley et al. 2005

s		2000						
		Ins2	PBS	Intravenous	5 mg	800 µl	N/A	Bradley et al. 2005
Bone cancer		EZH2, p110-a	atelocollagen	Intravenous	2.5 mg	200 µl	At 3, 6 and 9 Days	Takeshita et al. 2005
Breast cancer		CXCR 4	None	Intravenous	0.5 mg	N/A	Twice weekly	Liang et al. 2005
		Colony - stimulating factor	None	Local	0.5 mg	N/A	Every 3 days	Aharinejad et al. 2004
		RhoA	None	Local	6.75 µg	100 µl	Every 3 days (for 20 days)	Pille et al. 2005
		c-raf	liposome	Intravenous	7.5 mg	N/A	2 injections a day for 5 days	Chein et al.
		Raf-1	Polymere	Local	0.2 mg	N/A	Every 5 days	Leng et al. 2005
Cancer	Ewing's sarcoma	VEGF	PEI	Local	20 µg	N/A	Twice weekly	Guan et al. 2005
	Germ cell tumor	FGF4	atelocollagen	Local	0.125 mg	50 µl	Once	Minakuchi et al. 2004
	Liver cancer	bcl-2	Liposome	Intravenous	10 mg	N/A	Two 5-day cycles with daily injection	Yano et al. 2004
		Spingosine-1 phosphate-R	Liposome	Local	0.75 mg	60 µl	Every 3 days	Chae et al. 2004
	Lung cancer / Cervical cancer	Polo-like kinase 1	None (ATA-treated)	Intravenous	0.5 mg	500 µl PBS	3 times per week	Spankuch et al. 2004
	Melanoma	B-RAF	Ex vivo, electroporation	subcutaneous	N/A	N/A	NA	Sharma et al. 2005

	ErbB2	Oligofectamine	Intratumoral, Intravenous	2 mg	N/A	N/A	Song et al. 2005
Neuroblastoma	VEGF-R erbb2/n eu (HER2) )R	Ligand targeted	Intravenous	2 mg	200 µl	Every 3 Days	Schiffelers et al. 2004
Ovarian cancer		PEI-complex	Intraperitoneal	0.45 mg	N/A	Every 2-3 days	Urban-klein et al. 2005
Pancreatic cancer	bcl-2	None	Intraperitoneal	0.2 mg	120 µl	Daily for 24 Days	Ocker et al. 2005
	FAK	None	Intravenous	0.15 mg	50 µl	Twice weekly	Duxbury et al. 2003
	Epha2	None	Intravenous	0.15 mg	50 µl	Twice weekly	Duxbury et al. 2004
	CEAC AM6	None	Intravenous	0.15 mg	N/A	Twice weekly	Duxbury et al. 2004
Prostate cancer	EphB4	None	Intraperitoneal	10 mg	N/A	Daily for 2 weeks	Xia et al.
	VEGF	atelocollagen	Local./Intravenous	0.35 mg	50 µl	Every 10 Days	Takei et al. 2004
West Nile virus	viral genes	None	Hydrodynamic	9 mg	1.6 ml Ringer sol	Once	Bai et al. 2005
Hepatitis C virus	viral genes	None (use RNasin)	Hydrodynamic	2 mg	1.8 ml PBS	N/A	McCaffrey et al. 2002
Coxsackievirus B3	viral genes	None	Hydrodynamic	9 mg	1.6 ml NACl 0.9%	Once	Merl et al. 2005
RSV, Parainfluenza	viral genes	None/Liposome	Intranasal	3.5 mg	41 µl	N/A	Bitko et al. 2005
Influenza	viral genes	PEI	Intravenous/ Intranasal	3 mg	200 µl	Once	Ge et al. 2004
Infectious agents	viral genes	None	Hydrodynamic	2.8 mg	1 ml	Once	Tompkins et al. 2004
	viral genes	Oligofectamine™	Intranasal	1.15 mg	50 µl	Once	Tompkins et al. 2004
Hepatitis B	HBsAg	None	Hydrodynamic	1.25 mg	1.5 ml	Once	Giladi H et al. 2003
	HBsAg	None	Hydrodynamic	N/A	N/A	N/A	Klein et al. 2003



	HBsAg	None	Hydrodynamic	0.5 mg	2 ml	Once	McCaffrey et al. 2003
	Viral genes	SNALP	Intravenous	1,3 or 5 mg	N/A	N/A	Morrissey et al. 2005
Herpes simplex virus 2 (HSV-2)	Viral genes	Oligofectamine™	Intravaginal	0.36 mg	12 µl	Twice	Palliser et al. 2005
Sepsis	TNFα	None	Intraperitoneal	1.5 mg	N/A	Once	Sorensen et al. 2003

## 二、virus in vivo 使用说明

### 1 剂量

慢病毒注射的剂量为  $10^7$ - $10^9$  PFU viruses per mouse。腺相关病毒的滴度为  $10^8$ - $10^{12}$  PFU 一般用 PBS 稀释后,注射总体积为 5-100 ul。另外客户可以根据具体的实验情况调整浓度和剂量。

### 2 注射途径

尾静脉注射: 适合于慢病毒, 腺病毒, 腺相关病毒, 靶向于血流丰富的组织器官;

组织原位注射: 包括颅内注射, 局部注射, 可以直接到达靶向部位, 局部浓度大, 效果好;

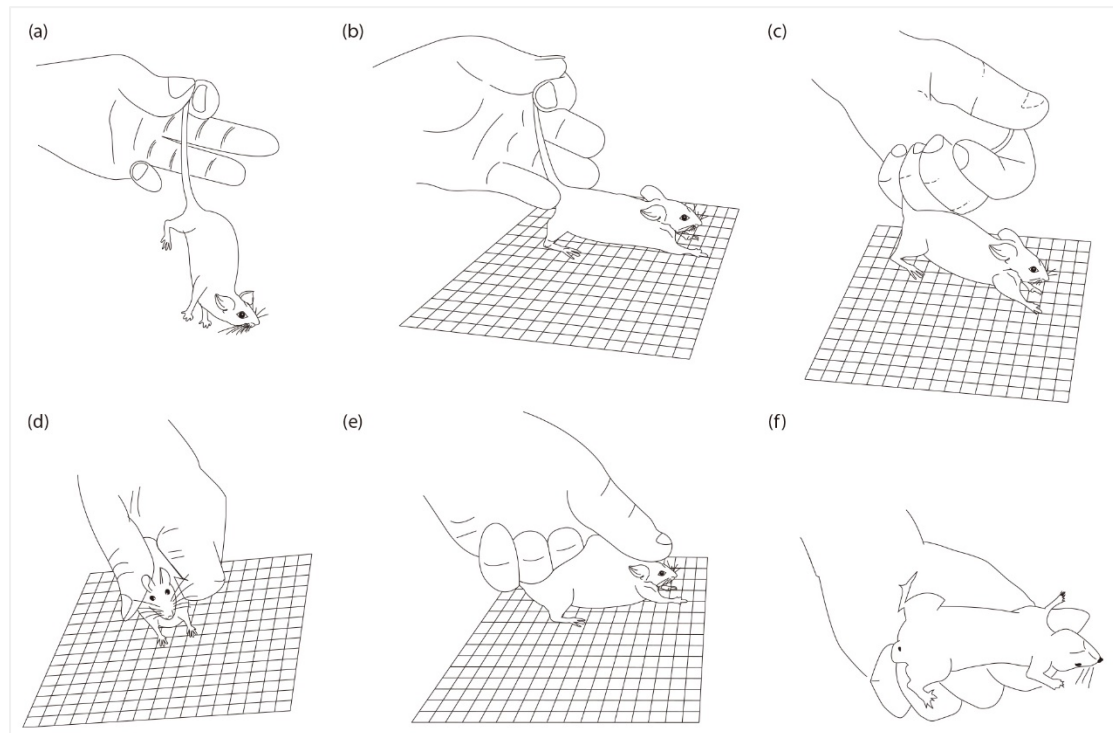
腹腔注射: 适用于腹腔器官, 包括脾脏, 肾脏, 卵巢等。

### 3 注射周期和频率

取适量病毒溶于 PBS 中, 注射如动物体内, 如果需要较长时间观察检测, 可以反复注射, 一般的频率为 2 天-15 天/次。

## 三、常见动物实验操作简述

## 1 动物的抓取



### a. 小鼠的抓取手法

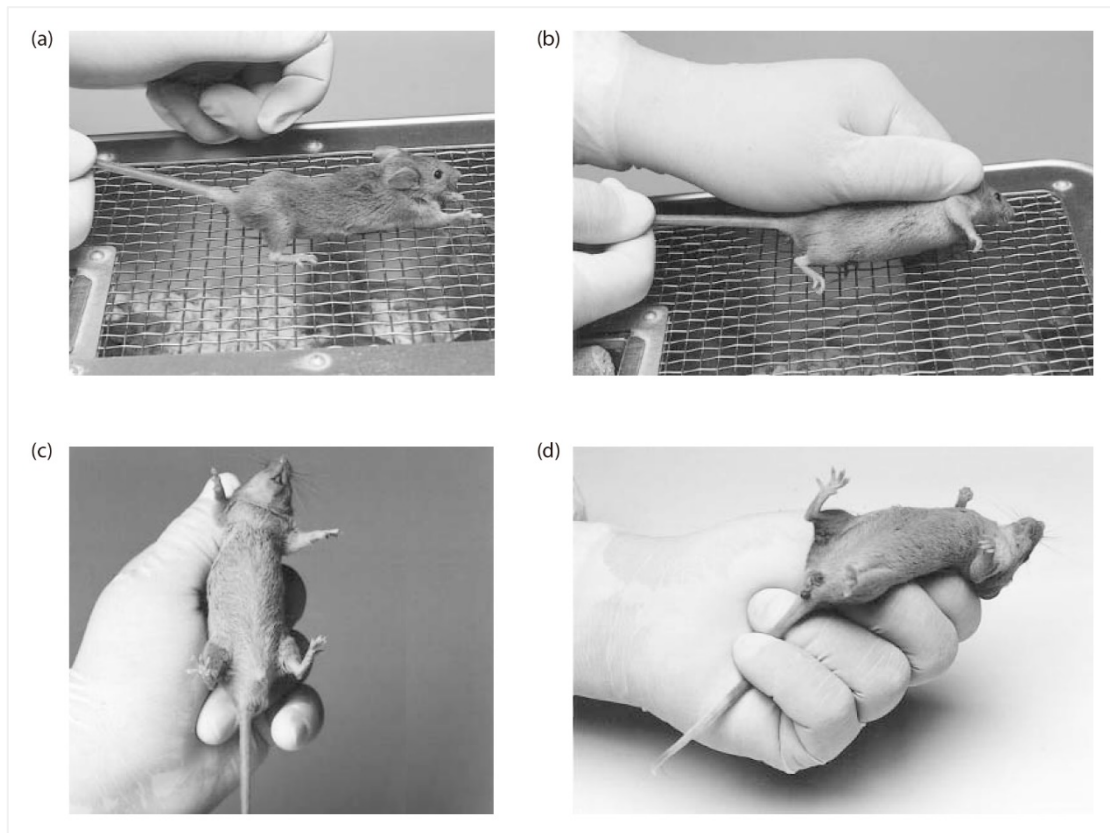
1. 用右手拇指和食指捏住小鼠尾巴中部将小鼠提起，放在饲养盒的面罩上；
2. 用左手拇指和食指迅速、准确的捏住小鼠的两耳后及颈背部的皮肤，将小鼠提起；
3. 翻转左手掌，以左手掌心和中指夹住小鼠背部的皮肤，使小鼠整个成一条直线；
4. 用左手无名指压住小鼠背部的皮肤，小指压住小鼠的尾巴根部；
5. 松开捏住小鼠尾巴的右手拇指和食指。此法适用于肌注、腹腔注射、灌胃等

### b. 大鼠的抓取手法

4-5 周内的大鼠，方法同小鼠。周龄较大的，则：

1. 首先戴好防护手套；
2. 将右手拇指和食指抓住大鼠尾巴中部将大鼠提起，放在大鼠饲养盒的面罩上；
3. 左手顺势按、卡在大鼠躯干背部，稍加压力向头颈部滑行；

4. 以左手拇指和食指捏住大鼠两耳后部的头颈皮肤，其余三指和手掌握住大鼠背部皮肤，完成抓取固定。



c. 豚鼠的抓取手法

1. 先用手掌迅速扣住鼠背；
2. 抓住其肩胛上方，以拇指和食指环握颈部，或像获取大鼠一样抓住双耳和颈背部皮肤；
3. 另一只手托住臀部；

d. 兔子的抓取手法

1. 右手抓住兔颈背部的毛皮提起，然后左手托其臀部，让其体重重量的大部分集中在左手  
上；
2. 家兔的固定分为盒式、台式。

## 2 动物的分组

- a. 按体重大小随机分组
- b. 建立对照组

自身对照组：是指实验数据而言； 平行对照组：有正对照和负对照。

### 3 动物的编号

#### a. 颜料涂染

这种标记方法在实验室最常使用，也很方便。

编号的原则：先左后右，从上到下。

#### b. 打号法

用刺数钳在动物耳上刺上号码，然后用棉签蘸着溶在酒精中的黑墨在刺号上加涂，烙印前最好对烙印部位预先用酒精消毒。

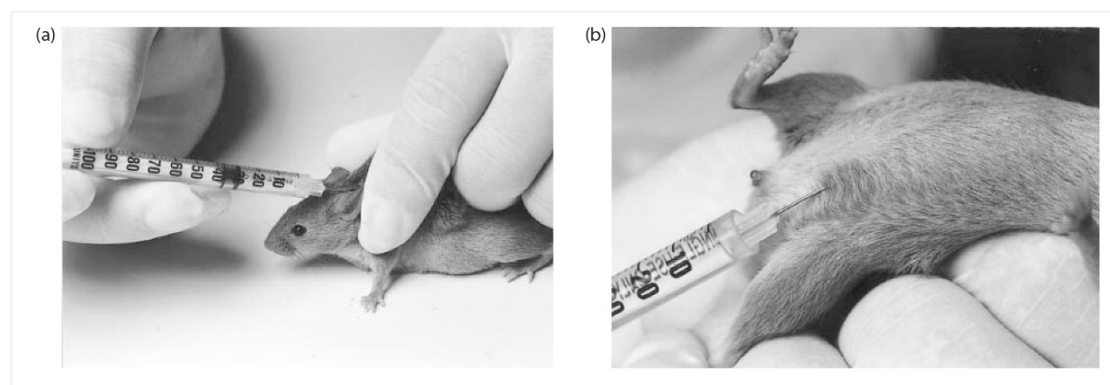
#### c. 挂牌法

用金属制的牌号固定于实验动物的耳上，大动物可系于颈上。对猴、狗、猫等大动物有时可不作特别标记，只记录它们的外表和毛色即可。

### 4 注射途径

#### a. 皮下注射

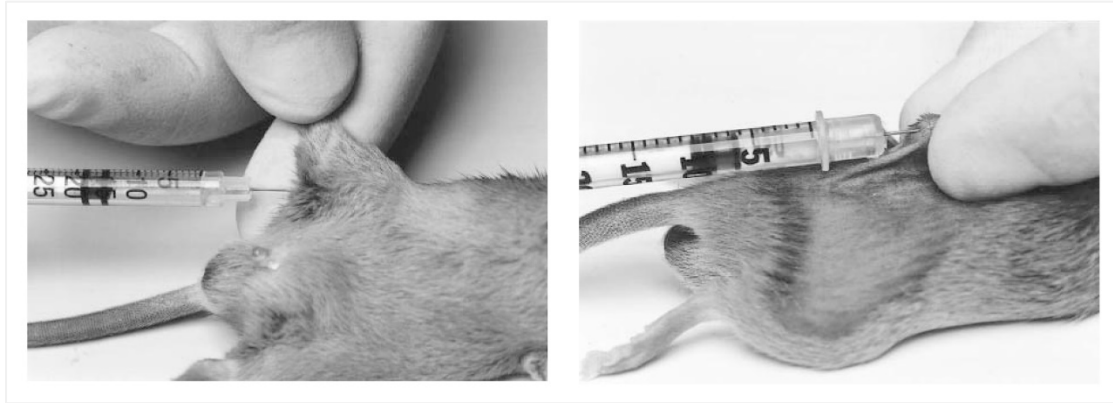
注射时以左手拇指和食指提起皮肤，将连有 5 号针头的注射器刺入皮下。皮下注射部位一般狗、猫多在大腿外侧，豚鼠在后大腿的内侧或小腹部；大白鼠可在侧下腹部；兔在背部或耳根部注射。



#### b. 皮内注射

注射时需将注射的局部脱去被毛，消毒后，用左手拇指和食指按住皮肤并使之绷紧，在两指之间，用结核菌素注射器连 4 号细针头，紧贴皮肤表层刺入皮内，然后再向上挑起并再稍刺入，即可注射药液，此时可见皮肤表面鼓起一白色小皮丘。

### c. 腹腔注射



用大、小白鼠做实验时，以左手抓住动物，使腹部向上，右手将注射针头于左（或右）下腹部刺入皮下，使针头向前推 0.5~1.0 cm，再以 45 度角穿过腹肌，固定针头，缓缓注入药液。为避免伤及内脏，可使动物处于头低位，使内脏移向上腹。若实验动物为家兔，进针部位为下腹部的腹白线离开 1 cm 处。

### d. 静脉注射

兔：兔耳部血管分布清晰。兔耳中央为动脉，耳外缘为静脉。内缘静脉深不易固定，故不用。外缘静脉表浅易固定，常用。先拔去注射部位的被毛，用手指弹动或轻揉兔耳，使静脉充盈，左手食指和中指夹住静脉的近端，拇指绷紧静脉的远端，无名指及小指垫在下面，右手持注射器连 6 号针头尽量从静脉的远端刺入，移动拇指于针头上以固定针头，放开食指和中指，将药液注入，然后拔出针头，用手压迫针眼片刻。

小白鼠和大白鼠：①对血管的选择小鼠尾部有三条静脉，中间一条较深不容易找到，建议不要选择，左右两边各一条而且比较浅，容易穿刺；另外穿刺选择尾部中下 1/3-1/2 处比较好，因为此处皮肤较薄，可以用 75% 的酒精反复擦拭穿刺部位血管，使其充盈，并使皮肤的角质层软化，便于穿刺。或者在注射之前，小鼠尾巴用水温大约 50 °C 的温水泡大约 2 min，使血管充分舒张。注射前用干棉球擦干，从远端往近端扎，以防一次扎不进，还可以继续使用此血管。②针的选择：一般选用 4 号半的 1 ml 的注射器，或者头皮针后接 1 ml 注射器，头皮针针头更小，对血管的损伤更小，适合连续多次给药，其次使用头皮针穿刺后，可以通过回血来判断穿刺是否成功。③注射手法：左手食指和中指上下夹住你所选择血管的靠近身体的一边，无名指和小指垫起鼠尾远端，拇指压住所选血管的尾尖端，上下夹住血管的距离应以不影响右手持针上下移动为宜。右手持穿刺针，针斜面向上，针与皮肤稍成-10°左右角度，进针后要将针头稍向上挑，然后将针向里送一点。如果在血管里，则无阻力，并且能看

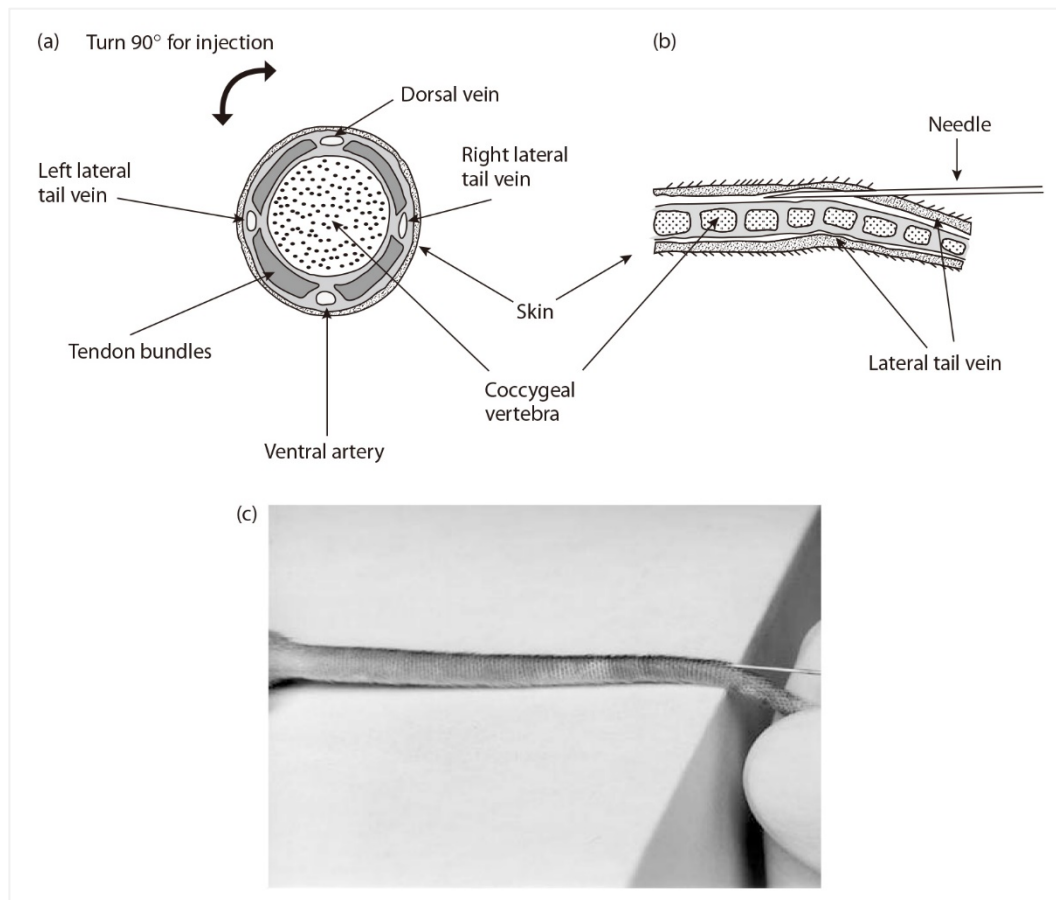


见针。若针看得很清晰，则扎到了皮下，若针看不清，则针扎深了。看到回血表明成功穿刺进入血管，还可以回抽，可以给药。④穿刺结束后，反折尾部进行止血。良好并彻底的止血对于血管可以起到很好的保护作用，这对于需要天天穿刺给药是非常有用的。一般小鼠需要按压时间很长，以免出血。注意：进针从鼠尾远端打起，打成功时进针会很顺畅，注药没有阻力，一般不会回血，若不成功再往近端打，一般一条血管打过三次还不成功的话最好先暂停，因为刺激后血管会收缩，很难打。

## 5 取血方法

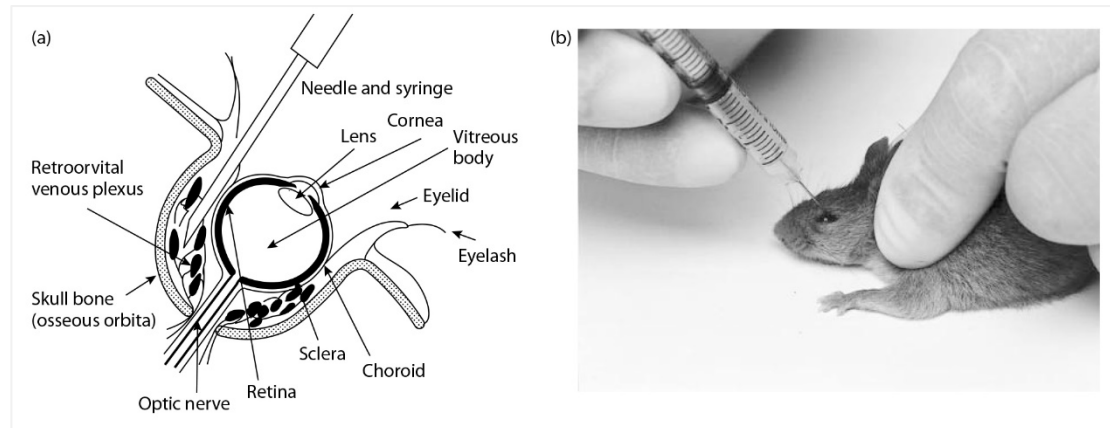
### a. 剪尾采血

小鼠每次采血量 0.1 ml, 大鼠每次采血量 0.3-0.5 ml 左手拇指和食指从背部抓住鼠颈部皮肤，将鼠头朝下，鼠稳定后将其尾巴置于 50 °C 热水中 浸泡数分钟，使尾部血管充盈。擦干尾部，再用剪刀或刀片剪去尾尖 1-2 mm，用试管接流出的血液，同时自尾根部向尾尖按摩。取血后用棉球压迫止血并用 6% 液体火棉胶涂在伤口处止血。



#### b. 摘除眼球采血

小鼠采血量 0.6-1 ml 左手抓住小鼠颈部皮肤，轻压在实验台上，取侧卧位，左手食指尽量将小鼠眼周皮肤往颈后压，使眼球突出。用眼科弯镊迅速夹去眼球，将鼠倒立，用器皿接住流出的血液。采血完毕立即用纱布压迫止血。大鼠少用。



#### c. 心脏采血

小鼠采血量 0.5-0.6 ml，大鼠采血量 1-1.5 ml 鼠仰卧位固定，剪去胸前区被毛，皮肤消毒后，用左手食指在左侧第 3-4 肋间触摸到心搏处，右手持带有 4-5 号针头的注射器，选择心搏最强处穿刺，当刺中心脏时，血液会自动进入注射器。

#### d. 断头采血

小鼠采血 0.8-1.2 ml，大鼠采血量 5-10 ml 左手拇指和食指从背部抓住鼠颈部皮肤，将鼠头朝下，右手用剪刀剪断鼠颈部约 1/2-4/5，让血液流入试管。

#### e. 眼眶静脉丛采血

小鼠采血量为 0.2-0.3 ml，大鼠采血量为 0.4-0.6 ml 取内径为 1.0-1.5 mm 的玻璃毛细管，临用前折断成 1~1.5 cm 长的毛细管段，浸入 1% 肝素溶液中，干燥后用。取血时左手抓住鼠两耳之间的颈背部皮肤以固定头部，轻轻向下压迫颈部两侧，引起头部静脉血液回流困难使眼眶静脉丛充血，右手持毛细管由内眦部插入结膜，再轻轻向眼底部方向推进，轻轻旋转毛细管以划破静脉丛，让血液顺毛细管流出，接收入事先准备的容器中。采血后纱布轻压眼部止血。小鼠、大鼠、豚鼠及家兔均可采取此法取血。刺入深度小鼠为 2-3 mm，可采血 0.2-0.3 ml；大鼠为 4-5 mm，可采血 0.4-0.6 ml。

## 6 小鼠的处死方法

### a. 颈椎脱臼处死法

此法是将实验动物的颈椎脱臼，断离脊髓致死，为小鼠最常用的处死方法。操作时实验人员用右手抓住鼠尾根部并将其提起，放在鼠笼盖或其他粗糙面上，用左手拇指、食指用力向下按压鼠头及颈部，右手抓住鼠尾根部用力拉向后上方，造成颈椎脱臼，脊髓与脑干断离，实验动物立即死亡。

### b. 断头处死法

此法适用于鼠类等较小的实验动物。操作时，实验人员用左手按住实验动物的背部，拇指夹住实验动物右腋窝，食指和中指夹住左前肢，右手用剪刀在鼠颈部垂直将鼠头剪断，使实验动物因脑脊髓断离且大量出血死亡。

## 7 小鼠取组织步骤

### a. 处死小鼠

### b. 皮肤消毒

用酒精棉球将小鼠腹部的皮肤消毒。

### c. 打开腹腔、胸腔

用手术剪将小鼠的腹部和胸部的皮肤剪开，然后用手术剪将腹腔和胸腔剪开，仔细取出小鼠腹腔和胸腔的各内脏器官，置于冻存管内，迅速放于液氮中冻存。

### d. 取脑组织

在人字缝那里横向剪得稍微深一点儿，把颅骨剪开，然后用小镊子把颅骨一点儿一儿的掰掉，当脑组织全部暴露出来的时候，就可以轻轻的取出，置于冻存管内，迅速放于液氮中冻存。