

小鼠心脏灌流、脑组织解剖与固定

Transcardiac Perfusion of Mouse Brain Dissection and Fixation

蔡予琦[#], 吴锦云[#], 吴晓阳, 应玥, 邵一琳, 何苗^{*}

复旦大学脑科学研究院, 中国, 上海市东安路 131 号, 邮编 200032

[#]共同第一作者/同等贡献

^{*}通讯作者邮箱: hem@fudan.edu.cn

引用格式: 蔡予琦, 吴锦云, 吴晓阳, 应玥, 邵一琳, 何苗. (2020). 小鼠心脏灌流、脑组织解剖与固定. *Bio-101* e1010353. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010353.

How to cite: Cai, Y. Q., Wu, J. Y., Wu, X. Y., Ying, Y., Tai, Y. L. and He, M. (2020). Trans-cardiac Perfusion of Mouse Brain Dissection and Fixation. *Bio-101* e1010353. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010353. (in Chinese)

摘要: 在对脑组织进行切片和免疫染色或原位杂交等实验之前, 为了排除血液对实验的干扰, 通常会用生理盐水对小鼠心脏灌流后再进行解剖和切片。在灌流时, 既可以在左心室插针, 也可以经由左心室对主动脉进行插针, 后者有助于提升灌流速度和成功率。生理盐水灌流结束后, 通常继续灌流多聚甲醛固定脑组织, 并在剥离取脑后再进行更长时间的后固定, 以便后续切片开展实验。

关键词: 小鼠, 心脏灌流, 主动脉, 多聚甲醛, 固定

材料与试剂

1. 量筒 (蜀牛)
2. 烧杯 (蜀牛)
3. 温度计
4. 生理盐水 (0.9%氯化钠溶液)
5. 1.5%戊巴比妥钠溶液 (溶于生理盐水中)
6. NaH₂PO₄·2H₂O (沪试, catalog number: 20040718)
7. Na₂HPO₄·12H₂O (沪试, catalog number:10020318)
8. 多聚甲醛 (Sigma, catalog number: 158127)
9. NaOH (沪试, catalog number: 10019718)

10. HCl (生工, catalog number: 10011018)
11. 去离子水
12. 4%多聚甲醛溶液 [溶于 0.1 M 磷酸缓冲液 (PB), pH 7.0~7.4, 见溶液配方]

仪器设备

1. 通风橱
2. 解剖镊 (瑞沃德, catalog number: F12018-13)
3. 眼科镊 (瑞沃德, catalog number: F12006-10)
4. 止血钳 (瑞沃德, catalog number: F21002-12)
5. 解剖剪 (瑞沃德, catalog number: S13052-12)
6. 精细剪 (瑞沃德, catalog number: S12005-10)
7. 血管夹 (瑞沃德, catalog number: R33001-48)
8. 称量勺 (Fisher Brand, catalog number: 21-101-10)
9. 1 毫升无菌注射器 (洪达, catalog number: zsq08)
10. 4 号或 5 号静脉输液针 (丰临)
11. 20 毫升注射器 (洪达, catalog number: zsq08)
12. (可选) 恒流泵 (LONGERPUMP, catalog number: BT100-2J)
13. 带加热装置的磁力搅拌器 (SCILOGEX, catalog number: MS7-H550-Pro)
14. 分析天平 (SARTORIUS, catalog number: BSA124S)
15. 微型台式真空泵 (LONGERPUMP, catalog number: BT100-2J)
16. 50 毫升离心管 (THERMO, catalog number: 339652)
17. 0.22 微米 PVDF 瓶顶过滤器 (Thermo Fisher, catalog number: 291-4520)



图 1. 手术器械

实验步骤

1 术前准备

- 1.1 称量小鼠体重并记录 (精确到克)。根据小鼠体重, 按照每 10 克体重注射 0.06 毫升的剂量, 用 1 毫升无菌注射器吸取适量 1.5% 戊巴比妥钠溶液备用。
- 1.2 拎起小鼠尾部, 将小鼠置于笼架上。一手拉住小鼠尾部使其抓紧笼架、身体绷直, 另一只手按住小鼠颈部后, 尽可能多地捏住小鼠颈部皮肤, 固定小鼠身体, 保证小鼠在注射过程中不会移动。

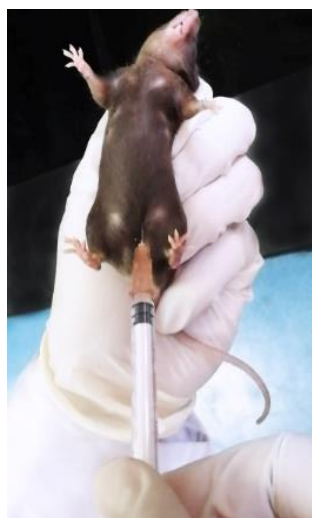


图 2. 小鼠抓取与腹腔注射

1.3 将小鼠翻转至腹部朝上，在偏左或偏右的下腹部进针，腹腔注射 1.5%戊巴比妥钠溶液。进针不需太深以避免刺入脏器，有明显穿透感但无阻碍感即可 (图 2)。

1.4 将小鼠放回笼内，等待约 5 分钟，挤压小鼠脚趾或尾部，观察其是否失去反应，以确认是否进入深度麻醉状态。

注：对于出生 6 天以内的新生小鼠，可采用低温麻醉。将新生小鼠放入纸筒、塑料管或包裹在乳胶手套中 (可剪下乳胶手套的拇指部分用于放置小鼠)，用碎冰埋至颈部，保持 10~15 分钟以达成深度麻醉状态。麻醉状态在常温下仅能保持约 10 分钟，因此不能将小鼠长时间留在手术台上，应尽快进行手术。

1.5 (从此步骤起，在通风橱中进行操作) 确认小鼠进入麻醉状态后，将其腹部向上摆放在聚苯乙烯泡沫塑料板或软木材质的手术台上，四肢用胶带或针头/大头针固定，使其在灌流过程中无法随意移动。

注：若麻醉过量导致小鼠心脏停跳，应尽快开始灌流，避免凝血导致灌流不畅。

1.6 剪去中国国家标准 4 或 5 号 (对应于国际通用标准的 25 G 或 27 G) 静脉注射针针头尖端的一部分，使其略微变钝 (图 3)，以防进针时刺破主动脉壁。

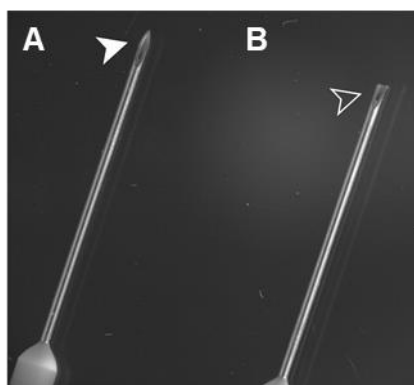


图 3. 修剪针头 (A) 未修剪针头 (B) 修剪后针头

1.7 将静脉注射针连接到提前吸满生理盐水的 20 毫升注射器上。

1.8 取另一 20 毫升注射器，吸满 4%多聚甲醛溶液备用。

2 主动脉灌流

2.1 用眼科镊拉起胸腔外侧皮毛，用解剖剪剪去皮肤，暴露白色剑突。

2.2 用眼科镊拉起剑突，用解剖剪沿剑突下方横向剪开肌肉层，暴露横膈膜。

2.3 用精细剪小心剪开横膈膜，注意不要伤到上方的心脏。

2.4 沿胸骨外侧剪开两侧肋骨，翻开胸廓前壁并用止血钳固定 (或者将此部分组织完全剪除)，以使得心脏完全暴露，可看到颜色较深的右心室 (静脉血) 以及颜色较浅的左心室 (动脉血) (图 4)。

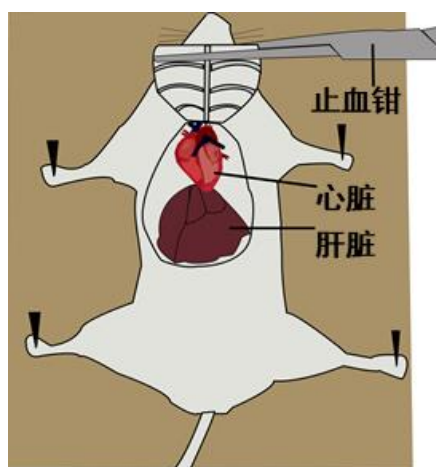


图 4. 开胸后示意图

2.5 用眼科镊及解剖镊清理心脏周围脂肪组织，暴露升主动脉。

2.6 用眼科镊固定心脏，从左心室紧靠心尖处，以大致平行于心脏左右中线的角度刺入注射针 (图 5A)。由于针尖已经修钝，进针时会有一定的阻力感；成功穿透心室壁时，会有明确的穿透感 (图 5B)。切忌用力过猛，或角度过偏，否则有可能穿过左右心室的间隔，进入右心室，或是直接扎穿整个心脏。

2.7 继续沿着初始方向进针，若方向准确，将不会感到明显阻力，并在针头进入主动脉时透过主动脉壁，观察到针头 (图 5C~D)。即刻用血管夹夹在针头处 (图 5C 箭头位置)，将其固定于主动脉内。

注：

- a. 如果不能成功将针头插入主动脉中，也可将其留置于左心室中 (进针约 0.5 厘米深度)，用止血钳夹持固定 (图 5B 箭头位置)，或者用大头针或针头插在手术台上辅助固定。成功进针后，随着心脏的搏动可见回血。
- b. 小于一周龄的幼鼠由于心脏很小，主动脉进针难度很大，且不使用血管夹或止血钳固定针尖与心脏，可考虑采用 10 毫升手持注射器进行心室灌流。

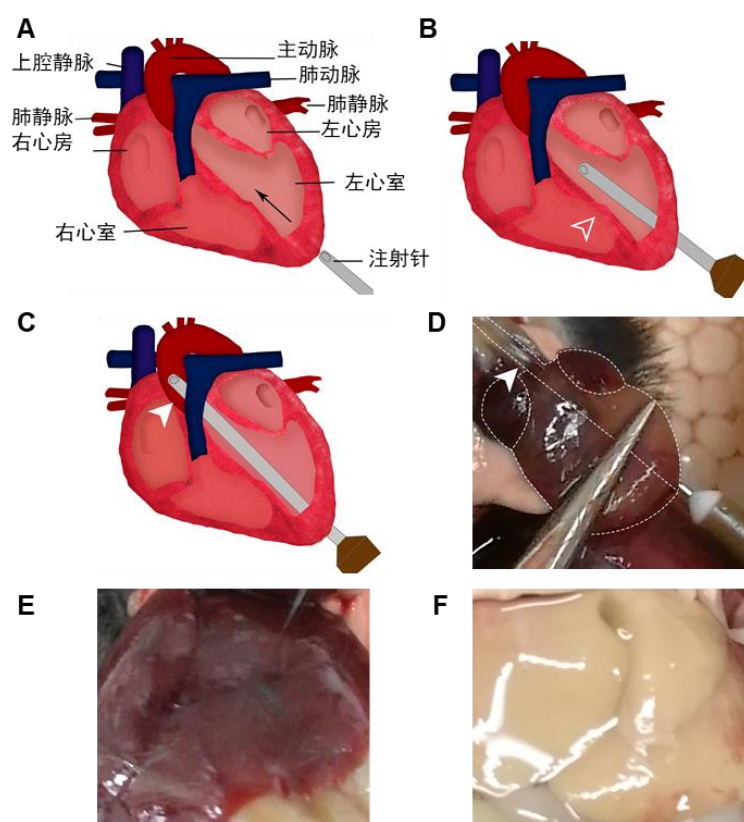


图 5. 进针步骤。 (A) 于左心室尖端，以大致平行于心脏左右中线的角度刺入注射针。(B) 进针约 0.5 厘米后，可将针头留置于左心室中进行灌流。注意进针方向，避免刺穿左右心室之间的隔膜 (空心箭头)。(C~D) 继续进针，即可将针头送入主动脉中 (C, 白色箭头)，透过主动脉壁能够观察到针头所在 (D, 白色箭头)。利用血管夹固定后，即可进行灌流。(A~C) 为示意图。(D) 为实际进针情况。(E) 灌流前肝脏呈深红色。(F) 生理盐水灌流后失血的肝脏。若一直保持血色或有不均匀的血块，则说明灌流效果不佳。

2.8 用精细剪在右心房上剪开一个小口，将观察到深红色血液流出。

2.9 手持针管，匀速推注生理盐水，速度约为每 5 秒 1 毫升。当针头留置在心室而非主动脉时，应适当调慢速度。除针筒外，也可使用蠕动泵灌注，以更好地控制速度。若进针位置正确，左右心室间隔无破损，将观察到右心房持续流出血液，肝脏逐渐失血 (图 5E~F)。若进针位置不准，致使生理盐水直接进入右心室，可能会观察到肺部膨大，甚至有液体从鼻尖流出。若肝脏不能完全失血，保留不均匀的红色，则说明灌流效果不佳。

注：若进针角度有误或过深导致扎穿心脏或进入右心室，应及时退针重进，一般不会影响灌流效果。

2.10 待观察到流出液体变澄清，肝脏完全失血后，可停止生理盐水灌流。一般成年小鼠生理盐水的灌流量约为 15~20 毫升。

3 4% PFA 灌流

3.1 将静脉注射针换连到提前吸满 4% 多聚甲醛的 20 毫升注射器上，注意不可引入气泡。

3.2 手持针管，匀速推注多聚甲醛，速度约为每 5 秒 1 毫升。当 4% 多聚甲醛流经小鼠身体时，可观察到肌肉收缩、胸腔上拱、尾巴翘起摆动等现象，用手触摸颈部可感到较为僵硬，肝脏颜色略微变黄。一般成年小鼠灌流用量约为 15~20 毫升。

3.3 灌流结束后拔出针头，将小鼠从手术台上取下。整个小鼠身体将呈僵直状。

4 剥离鼠脑

4.1 用解剖剪断颈，剪下小鼠头部 (图 6 水平虚线，从颈部向鼻尖方向剪开头部上方的皮毛 (图 6 带箭头虚线)，暴露出颅骨。

- 4.2 用解剖剪切除脑干，用精细剪剪除颅骨周围肌肉，暴露颅骨底部枕骨。
- 4.3 将精细剪单侧刀刃平行于鼠脑底部插入枕骨下方，向外分别剪断两侧颅骨。
- 4.4 用解剖镊小心摘除覆盖小脑的颅骨。
- 4.5 将精细剪的单侧刀刃从颅骨中缝处插入，刀刃一侧朝向颅骨，避免损伤脑组织，沿中缝剪开大脑上方至嗅球上方颅骨。直于鼠脑顶部插入中缝剪开颅骨，用解剖镊小心剥离。

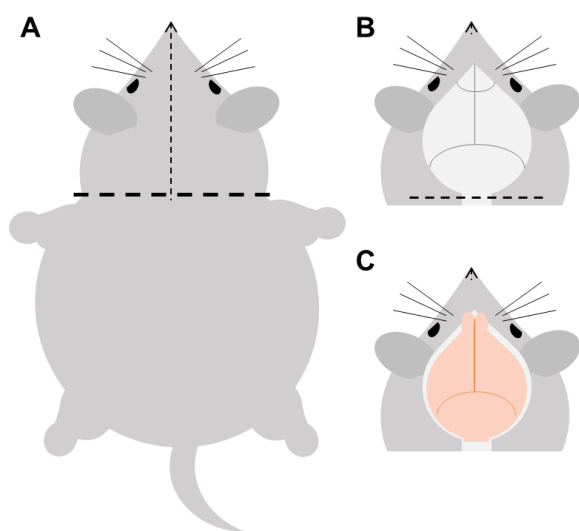


图 6 剥离鼠脑。 (A) 断颈，从颈部朝鼻尖方向 (虚线) 剪开头部上方皮毛，暴露颅骨。(B-C) 沿虚线剪除脑干以下的颅骨，依次移除小脑和大脑部位的颅骨，暴露脑组织。

- 4.6 用称量勺 (或其他平面钝头工具) 从鼠脑底部平行插入到嗅球底部，切断下方神经束，取出鼠脑。
- 4.7 将鼠脑放入 4% 多聚甲醛溶液，4 度后固定过夜。

注：成功灌流的鼠脑颜色呈浅黄色，组织较硬；若血液灌流不彻底，则可能整体或局部呈现血红色，组织较软。后固定后鼠脑体积缩小，颜色加深 (图 7)。

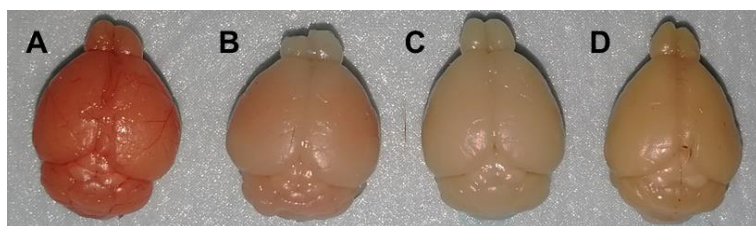


图 7. 不同灌流状态鼠脑外观。(A) 未灌流鼠脑,外观呈红色,可见明显红色血管分布;(B) 灌流失败鼠脑,整体外观呈现粉红色;(C) 灌流成功且未进行后固定鼠脑,整体颜色较白;(D) 后固定后鼠脑体积略微缩小,颜色略微加深。

4.8 将后固定结束的鼠脑转入含有 0.01%叠氮钠的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中, 4 度保存; 或转入 30%蔗糖溶液, 待沉底后负 20~80 度冰冻保存。

失败经验

表 1 常见问题分析及解决方案

问题	原因分析	解决方案
①灌流中液体从右心房以外位置流出	进针位置不当或穿透心脏/血管	停止灌流, 抽出针头重新进针
②灌流中肺膨胀变白、口鼻流出液体	针尖进入右心室	
③灌流中肝脏未变白		
取脑后鼠脑有明显血迹或浅红色区域	灌流开始前小鼠死亡凝血	降低麻醉剂量, 加快手术速度
	进针位置不当, 血液未能完全清除	进针时准确找到主动脉位置
	多聚甲醛溶液中含有颗粒, 阻塞血管	进针时准确找到主动脉位置, 避免移动

鼠脑偏软	多聚甲醛溶液失效	储存多聚甲醛溶液后用 0.22 微米滤膜过滤
	灌流效果不佳	使用新鲜配置的多聚甲醛 溶液；大批预配的多聚甲醛 溶液需低温冻存 练习灌流操作，避免失误

溶液配方

1. 4%多聚甲醛的配制 (以 4 L 为例，配制其他体积可参见表 2)

- a. 用去离子水清洗量筒、烧杯等；
- b. 使用一次性称量船，分别用分析天平称取 12.481 克二水合磷酸二氢钠与 114.605 克十二水合磷酸氢二钠，溶于 2 升去离子水中；
- c. 将溶液放置于微波炉中最高火加热，每隔 3~5 分钟取出测量温度，直至溶液温度到达 60 度；
- d. 用分析天平称取多聚甲醛干粉 160 克，倒入烧杯底部，避免粉末飞溅；
注：需穿戴好口罩等防护用品，避免吸入粉末。
- e. 在通风橱内将预热后的磷酸缓冲液倒入盛有多聚甲醛的烧杯；
- f. 将烧杯置于磁力搅拌器上，加入磁力搅拌子，开启磁力搅拌器；打开加热板，设置恰当的加热档，保持烧杯内溶液温度在 50~60 度之间。待多聚甲醛充分溶解后，加去离子水定容至 4 升。

注：可加入 1 毫升 5 摩尔/升氢氧化钠溶液助溶，待多聚甲醛溶解完全后，加入等摩尔量的盐酸中和。若使用 12 摩尔/升盐酸，则需加入 0.4 毫升。

配置 5 摩尔/升氢氧化钠溶液：在 50 毫升离心管中称量约 2 克氢氧化钠，加入 10 毫升去离子水，轻柔摇晃溶解。氢氧化钠溶解时大量产热，故切勿盖盖或剧烈摇晃，以防离心管爆炸或溶液飞溅；

- g. 将 0.22 微米 PVDF 瓶顶过滤器与微型台式真空泵相连，过滤多聚甲醛溶液；

h. 过滤后的溶液分装入 50 毫升离心管，-20 度冻存；

注：每管体积不超过 45 毫升，以防冰冻后体积增大，溶液溢出。

i. 冻存后的多聚甲醛溶液使用前可放置 4 度或室温融化，并充分颠倒混匀。

表 2. 配制不同体积 4%多聚甲醛的药品配比

药品	分子量	工作浓度	1 升所需 (克)	2 升所需 (克)	4 升所需 (克)	5 升所需 (克)
二水合磷酸	156.01	0.020	3.1202	6.2404	12.4808	15.601
二氢钠		摩尔/升				
十二水合磷	358.14	0.080	28.651	57.302	114.605	143.256
酸氢二钠		摩尔/升				
多聚甲醛	30.03	4%	40	80	160	200

注：由于甲醛干粉易飞，溶液挥发也会刺激眼睛和呼吸道粘膜，称量和分装需佩戴口罩、护目镜等护具。

伦理学声明

本实验对小鼠进行的所有研究行为均遵循和符合国家《实验动物管理条例》和有关动物保护与使用的法律和法规，并获得复旦大学实验动物中心动物伦理委员会批准。

参考文献

1. Gage, G. J., Kipke, D. R. and Shain, W. (2012). [Whole animal perfusion fixation for rodents. J Vis Exp\(65\).](#)
2. https://www.mcgill.ca/research/files/research/305-transcardiac_perfusion_-_jan_2018_1.pdf
3. https://www.mbl.edu/bie/files/2015/01/mouse_transcard_perf11.pdf