



实验动物配子与胚胎 实验操作技术

滕春波 安铁洙 主编



SHIYAN DONGWU PEIZI YU PEITAI SHIYAN CAOZUO JISHU

东北林业大学出版社

东北林业大学出版社



责任编辑：姜俊清
封面设计：彭 宇



ISBN 978-7-81076-989-1



9 787810 769891 >

定价：9.50 元

实验动物配子与胚胎 基本操作技术

主编 滕春波 安铁洙

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

实验动物配子与多胚胎基本操作技术/腾春波, 安铁洙主编. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2007.3

ISBN 978-7-81076-989-1

I. 实… II. ①滕… ②安… III. ①实验动物—配子 ②实验动物—胚胎学
IV. Q954.6-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 033927 号

责任编辑: 姜俊清

封面设计: 彭 宇



NEFUP

实验动物配子与多胚胎基本操作技术

Shiyan Dongwu Peizi Yu Duopeitai Jiben Caozuo Jishu

腾春波 安铁洙 主编

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东北林业大学印刷厂印装

开本 787 × 1092 1/16 印张 5.5 字数 126 千字

2007 年 3 月第 1 版 2007 年 3 月第 1 次印刷

印数 1 - 1 000 册

ISBN 978-7-81076-989-1

Q·135 定价: 9.50 元

《实验动物配子与胚胎基本操作技术》

编 委 会

主 编 滕春波 安铁洙
副主编 谭建华 岳占碰 张学明
编 者 (以姓氏笔画为序)
王春生 安铁洙 池鹤松 朴善花
张学明 张丽新 岳占碰 单春华
罗 芳 梁 洋 谭建华 滕春波
主 审 周 虚

前 言

动物发育生物学是建立在动物胚胎学基础上的一门新兴学科,近年来取得了突飞猛进的发展,已成为当代最活跃的生命科学研究领域之一。发育生物学的核心问题之一是动物胚胎发育的分子机理。利用实验动物作为哺乳动物发育研究的模型,已在哺乳动物配子发生、受精机制、卵裂和早期胚胎发育等方面获得了大量研究结果。为了适应发育生物学、动物繁殖学和动物胚胎工程研究的需要和高等院校相关课程教学的需求,我们编写了这本用于研究哺乳动物胚胎发育机制和哺乳动物胚胎工程基本实验技术的教材。

本书以追求科学性、系统性、完整性与实用性为目标,在参考国内外大量相关专著和文献资料的同时,结合近年来发育生物学、动物繁殖学及胚胎工程的研究进展,并综合我们的研究成果和科研体会,较全面和深入地介绍了实验动物配子及胚胎的基本实验方法。全书共分4章,分别介绍了实验准备、精子实验、卵子实验和基本实验内容。书中文字叙述言简易懂,且安排了42幅插图,使其内容全面系统,具有很高的实际应用价值。本书可供发育生物学、动物繁殖学和动物胚胎工程等专业作为实验指导书,此外,也可供生命科学科技工作者阅读参考。

尽管我们为编写本书付出了很大努力,但是水平有限,加之时间仓促,疏漏之处,诚恳希望同行和读者提出批评和建议,以便再版时修改。

编 者
2006年9月

目 录

1 实验准备	(1)
1.1 实验器具的清洗、消毒和灭菌	(1)
1.1.1 器具的清洗	(1)
1.1.2 器具和培养液的灭菌	(1)
1.2 培养液(培养基)的制备	(2)
1.2.1 培养液的现称现溶配制法	(2)
1.2.2 培养液的等渗液混合配制法	(3)
1.3 处死实验动物	(5)
1.3.1 安乐处死法的种类	(5)
1.3.2 颈椎脱臼法	(6)
1.3.3 麻醉药法	(6)
1.4 生殖器的摘出	(6)
1.5 麻醉法	(8)
1.5.1 小型实验动物巴比妥麻醉法	(8)
1.5.2 家兔巴比妥麻醉法	(8)
1.6 阴道涂片检查法	(8)
1.6.1 小鼠、大鼠阴道涂片检查法	(9)
1.6.2 豚鼠阴道涂片检查法	(10)
2 精子实验	(12)
2.1 精液(精子)的采集	(12)
2.1.1 附睾尾部精子的采集	(12)
2.1.2 家兔精液的采集	(12)
2.2 精液(精子)检查法	(14)
2.2.1 肉眼检查	(14)
2.2.2 精子的显微镜检查	(14)
2.3 精液(精子)的保存法	(18)
2.3.1 精子或精液的液态保存	(18)
2.3.2 精液(精子)的冷冻保存	(18)
2.4 精子顶体反应的判定	(20)
2.5 精子获能的判定	(22)
2.6 人工授精法	(25)
2.6.1 小鼠和大鼠的人工授精	(25)
2.6.2 家兔的人工授精	(25)
3 胚胎(卵子)实验	(27)

3.1 胚胎(卵子)的采集	(27)
3.1.1 采集胚胎的准备	(27)
3.1.2 输卵管胚胎的采集	(27)
3.2 诱发排卵法	(31)
3.2.1 超数排卵法	(31)
3.2.2 诱发排卵法	(33)
3.3 胚胎的长期保存	(33)
3.3.1 小鼠胚胎的冷冻保存	(34)
3.3.2 小鼠胚胎的玻璃化保存	(35)
3.4 胚胎的培养	(37)
3.5 胚胎移植	(39)
3.5.1 输卵管结扎鼠	(39)
3.5.2 小鼠胚胎移植	(40)
3.5.3 家兔胚胎移植	(42)
3.6 卵子核相判定法	(44)
3.7 免疫手术(内细胞团分离)法	(46)
3.7.1 小鼠囊胚内细胞团细胞的分离	(46)
3.8 卵子(胚胎)的染色体标本制作	(48)
4 基本实验	(52)
4.1 卵母细胞的体外成熟	(52)
4.2 小鼠的体外受精	(53)
4.3 胚胎分割(同卵双生法)	(54)
4.3.1 2-8 细胞期胚卵裂球的分离法	(55)
4.3.2 分离 2 细胞胚制作同卵双生子	(55)
4.4 嵌合体制作	(57)
4.4.1 制作嵌合体的集合法	(57)
4.4.2 制作嵌合体的注入法	(58)
4.5 诱发孤雌生殖法	(59)
4.5.1 酒精处理法	(60)
4.5.2 电刺激法	(61)
4.5.3 锶诱导法	(62)
4.6 4 倍体胚制作	(62)
4.6.1 细胞电融合法	(63)
4.6.2 细胞骨架抑制剂法	(63)
4.7 胚胎性别 PCR 法鉴定	(64)
4.7.1 有关 PCR 法	(64)
4.7.2 胚胎的操作	(65)
4.7.3 胚胎的 PCR 法鉴定性别	(65)
4.8 克隆动物的核移植技术	(67)

4.8.1 用于核移植的器械与仪器	(67)
4.8.2 核移植操作	(67)
4.9 转基因动物制作法	(71)
4.10 显微授精法	(72)
4.11 胚胎干细胞系的建立	(74)
参考文献	(77)

1 实验准备

1.1 实验器具的清洗、消毒和灭菌

哺乳动物配子（精子，卵子）实验过程中所使用的器具和培养液必须经过严格消毒和灭菌。近年来，虽然市场上已有多种无菌一次性实验器具，但某些需反复利用，因此需要自己动手对其进行清洗、消毒或灭菌。以下介绍常用的清洗、消毒和灭菌方法。

1.1.1 器具的清洗

由于配子对洗涤剂非常敏感，因此，在清洗器具时，不仅要完全去污，还要用流水充分去除洗涤剂。在选择洗涤剂时，应考虑其清洗能力的强弱、所使用的温度范围、自身去除的难易程度及其对细胞的毒性等因素。一般情况下，选用碱性洗涤剂清洗普通器具，而对于培养器具，最好使用中性洗涤剂。

【方法与步骤】

（1）先用家用中性洗洁剂预洗，然后对于培养器具和普通器具分别用 5% 中性洗涤剂和 2% 碱性洗涤剂浸泡一夜。浸泡液使用 2~3 周后，即要重新配制。

（2）经洗涤剂浸泡过的器具，用自来水充分洗涤，在流水中漂洗 3~4 h。吸管类可用虹吸式自动清洗器清洗。

（3）普通器具用蒸馏水冲洗 3~5 次，培养器具再用双蒸水（经两次蒸馏）冲洗 2 次或超纯净水冲洗 5 次，然后进行干燥。量筒、量瓶等器具应避免高温干燥。

注意事项：由于黏附在器具上的细胞或血清干燥后不易去除，因此，器具使用后应及时清洗并浸泡。

1.1.2 器具和培养液的灭菌

1.1.2.1 器具的消毒与灭菌

器具的消毒与灭菌一般包括干热灭菌法、高压蒸气灭菌法和煮沸消毒法。

（1）干热灭菌法 是指使用烘箱，通过高温、干燥进行灭菌的方法。通常需要 160℃ 下 90 min，或 180℃ 下 60 min。该法适用于试管、吸管、表面皿等玻璃器皿及刀、剪、镊等金属器械。灭菌前，烧杯和试管须用锡箔纸分别封口；表面皿将 6~8 个叠起用锡箔纸包裹；吸管类则需用棉塞堵住两端并装入不锈钢灭菌罐中。灭菌结束后，温度必须充分下降后才可取出器具。如果在高温状态下打开烘箱门时，由于外界冷空气的快速流入，常常引起器具破损、火灾发生或杂菌污染等情况发生。

（2）高压蒸气灭菌法 是使用高压锅，通过高温、高压灭菌的一种方法。适用于玻璃、金属及耐热塑料等器具的灭菌。对灭菌的器具，须先用锡箔纸包裹封口，或装入铝制饭盒中，再用牛皮纸包裹；或装入用密封材料密封的袋内；或用聚乙烯塑料膜包裹后

进行灭菌。用聚乙烯塑料膜包裹时,应在膜上打开一个小孔,灭菌后再用密封材料封闭保存。灭菌后的器具,须在干燥箱中完全干燥后方可使用。该法需要干燥残留的水分,因此玻璃及金属器具最好用干热灭菌法。

(3) 煮沸消毒法 是使用煮沸消毒器,在 100℃ 开水中煮沸 15 min 进行灭菌的方法。在不具备煮沸消毒器的情况下,可用一般锅代替。该法不能杀灭耐高温的细菌,因此,不适合用于与培养有关器具的灭菌。

1.1.2.2 培养液的灭菌

配子的操作液、培养液和保存液等,通常使用过滤除菌器(带有 0.22~0.45 μm 孔径滤膜)过滤除菌。对不易受热变质的溶液(盐类溶液等)也可以用高压灭菌法灭菌。在对液体高压灭菌时,将溶液倒入带盖的玻璃容器中,使容器盖子略微松动,再用两层锡箔纸封住容器口后进行灭菌。为了防止溶液沸腾溢出,在容器中只倒入 7~8 成溶液。灭菌后经充分冷却后取出,盖紧容器盖后备用或保存。

1.2 培养液(培养基)的制备

当所采集到的配子需在体外进行短时间实验操作时,可用生理盐水、林格氏液、磷酸缓冲液(PBS)等简单的无机盐类溶液作为保存液或操作液。但在精子预培养、卵细胞体外成熟、体外受精、胚胎体外培养和保存等实验操作过程中,需要根据动物种类配制适用于配子(胚胎)的操作、培养和保存等的溶液。溶液配制包括对所需试剂边称量边溶解的现称现溶配制法和混合事先配制保存的各试剂的等渗液混合配制法。

1.2.1 培养液的现称现溶配制法

培养液包括在盐类溶液中添加必要添加物的简单培养液(表 1-1)和组成复杂的合成培养液,如 TCM 199、HamF 10、DMEM 等,后者有市售的成品液体或粉末制剂。因此,一般情况下,在实验室仅配制盐类培养液。配制培养液时,将组成培养液的各种基本成分称量后,用纯水溶解。在此基础上,根据需要添加其他所需成分,如能量源、血清、抗生素等,并调整 pH 值。

表 1-1 各种溶液和培养液的组成

g/L (mmol/L)

溶液	PBS	M2	M16	TYH	mKRB
NaCl	8.000 (136.9)	5.534 (94.7)	5.528 (94.59)	6.976 (119.37)	5.528 (94.6)
KCl	0.200 (2.68)	0.356 (4.78)	0.356 (4.78)	0.356 (4.78)	0.356 (4.78)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.132 (0.90)	0.251 (1.71)	0.251 (1.71)	0.251 (1.71)	0.251 (1.71)
KH ₂ PO ₄	0.200 (1.47)	0.162 (1.19)	0.162 (1.19)	0.162 (1.19)	0.162 (1.19)
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.293 (1.19)	0.293 (1.19)	0.293 (1.19)	0.293 (1.19)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.100 (0.49)				
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.879 (8.04)				
NaHCO ₃		0.336 (4.00)	2.106 (25.07)	2.106 (25.07)	2.106 (25.07)

续表 1-1

g/L (mmol/L)

溶液	PBS	M2	M16	TYH	mKRB
HEPES		5.005 (21.0)			
乳酸钠		4.352 (23.3)	4.348 (23.28)		4.030 (21.58)
丙酮酸钠	0.036 (0.33)	0.036 (0.33)	0.036 (0.33)	0.110 (1.00)	0.055 (0.50)
葡萄糖	1.002 (5.56)	1.002 (5.56)	1.002 (5.56)	1.002 (5.56)	1.002 (5.56)
BSA	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000
青霉素	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL
链霉素		50 μ g/mL	50 μ g/mL	50 μ g/mL	50 μ g/mL

* 使用此法时,若为无水 CaCl_2 和 Na_2HPO_4 时,须分别用 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 进行换算。乳酸钠以 60% 计算。此外,质量表示的生化用抗生素质,可用 IU 或效价变换。

采用现称现溶配制法时,根据表 1-1 中各成分的量进行称量,并用纯净水溶解,配制所需要的量。对于表中含有 Mg^{2+} 及 Ca^{2+} 的成分,必须分别溶解后再混合,否则所配制的溶液常发生白色混浊。

1.2.2 培养液的等渗液混合配制法

1.2.2.1 各种试剂等渗液的配制

在配制培养液时,应使用超纯水。如果没有制备超纯水的仪器时,也可使用去离子双蒸水(D. W.)。配制培养液应使用新制备的水。以下为常用试剂等渗液的配制方法:

(1) NaCl (相对分子质量 58.44) 称取 9.0 g NaCl 溶解于 1000 mL 超纯水。

(2) KCl (相对分子质量 74.56) 称取 1.148 g KCl 溶解于 100 mL 超纯水。

(3) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 147.01) 称取 1.617 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100 mL 超纯水。

(4) KH_2PO_4 (相对分子质量 136.09) 称取 2.096 g KH_2PO_4 溶解于 100 mL 超纯水。

(5) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 358.14) 称取 5.515 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 超纯水。

(6) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 246.48) 称取 3.796 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 超纯水。

(7) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (相对分子质量 203.30) 称取 3.131 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100 mL 超纯水。

(8) NaHCO_3 (相对分子质量 84.01) 称取 2.588 g NaHCO_3 溶于 200 mL 超纯水。

(9) 乳酸钠 (相对分子质量 112.06, 含 60%) 称取 2.876 g 乳酸钠溶于 100 mL 超纯水。

(10) 丙酮酸钠 (相对分子质量 110.04) 将 0.085 g 丙酮酸钠溶解于上述 10 mL NaCl 等渗溶液中作为浓储液,再取 4 mL 浓储液用 NaCl 等渗溶液进一步做 50 倍稀释 (定容至 200 mL)。

(11) HEPES (相对分子质量 238.31) 在 100 mL 烧杯中,分别加入 0.2 mol/L NaOH 31 mL、超纯水 40 mL 和 HEPES 3.67 g,用玻璃棒轻轻搅拌溶解;再用玻璃棒边搅拌边追加

0.2 mol/L NaOH, 使 pH 值调节为 7.3; 最后边清洗烧杯边移至容量瓶中, 定容至 100 mL。

(12) 10 000 IU/mL 青霉素 用带针头注射器吸取上述 NaCl 等渗溶液 0.5 mL, 注入含 10 万 IU 的结晶青霉素 G 钾瓶内, 待结晶完全溶解后, 再加入 9.5 mL NaCl 等渗溶液, 制成 1 万 IU/mL 的溶液; 用 1.5 mL 离心管分装, 每管 1.2 mL, 在 -20°C 条件下保存备用。

(13) 5 mg/mL 链霉素 用带针头的注射器吸取上述 NaCl 等渗溶液 2 mL, 注入到 1 000 mg/瓶的硫酸链霉素瓶内, 待结晶完全溶解后, 取 0.5 mL 用 49.5 mL NaCl 等渗溶液进行稀释, 制成链霉素浓度为 5 mg/mL 的溶液。用 1.5 mL 离心管分装, 每管 1.2 mL, 在 -20°C 条件下保存备用。

(14) 酚红: 用上述 NaHCO_3 等渗液配制 0.001 3 g/mL 的酚红溶液。

已配制的上述各溶液, 除特别注明外, 分别装于带有耐热螺口盖的瓶中, 保存于冷藏温度下。其中 8 液、10 液和 14 液每隔 1 周、其他液则每隔 1 月重新配制。12 液和 13 液在冷冻保存条件下可保存 1 年。

1.2.2.2 用等渗液配制各种培养液

利用上述预先配制保存的各等渗液, 按照一定的顺序混合配制各种培养液 (表 1-2)。混合时, 按表中由上至下的顺序, 取所需量依次加入 100 mL 烧杯中进行混合 (可用搅拌器搅拌)。当添加 BSA (牛血清白蛋白) 时停止搅拌, 应使添加的 BSA 自行溶解。另外, 虽然表中不含有酚红, 但可通过添加 0.001% 酚红溶液来检测溶液的 pH 值, 即当溶液偏酸时, 颜色变黄; 而偏碱时粉红色变深。常用培养液的 pH 值约为 7.3, 添加酚红后呈浅粉红色。

表 1-2 利用等渗液配制各种溶液和培养液的方法

mL

组成	PBS	M2	M16	TYH	mKRB
D. W.	1.34	0.98	1.02	0.01	2.16
NaCl	69.12	39.58	39.51	11.00	28.04
KCl	1.81	3.23	3.23	3.23	3.23
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.85	1.62	1.62	1.62	1.62
KH_2PO_4	0.99	0.80	0.80	0.80	0.80
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.43				
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.80	0.80	0.80	0.80
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.33				
NaHCO_3		1.90	16.13	16.13	16.13
乳酸钠		15.74	15.72		14.57
丙酮酸钠	22.29	22.29	22.29	67.53*	33.77
HEPES		14.18			
葡萄糖/mg	104	104	104	104	104
青霉素		1.04	1.04	1.04	1.04
链霉素		1.04	1.04	1.04	1.04
酚红	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
BSA/mg	416	416	416	416	416

* TYH 中, 丙酮酸钠添加顺序仅在 NaCl 之后。调制量均为 104 mL。

在配制溶液时, 所混合各成分等渗液的浓度若表示为 mmol/L (表 1-1) 时, 可通过下列公式进行换算。上述各等渗溶液原则上为 154 mmol/L, 而 CaCl_2 为 110 mmol/L、丙酮酸钠则为 1.54 mmol/L。

例如, M2 溶液中 KCl 为 4.78 mmol/L 的情况下, 可用 [等渗液浓度: 最终浓度 = 培养液制作量: 加入等渗液量] 公式换算, 即 $[154 \text{ mmol/L} : 4.78 \text{ mmol/L} = 104 \text{ mL} : X \text{ mL}]$, $X = 4.78 \times 104 \div 154 = 3.23 \text{ mL}$ 。

1.2.2.3 培养液的保存

当所添加的各种成分充分混合后, 在超净台内过滤除菌, 再分装于试管或烧瓶中并封盖, 保存于冰箱中。培养液配制后的使用期限通常为 1 个月。

1.3 处死实验动物

在采集实验动物配子时, 除少数采用射出精子法采集精液或者用外科手术法等采集精子或回收卵子外, 一般先将实验动物处死后采集配子。处死动物时, 应尽量采取能够减少动物痛苦的安乐处死法。以下介绍安乐处死法的种类及其具体实施方法。

1.3.1 安乐处死法的种类

安乐处死法大致可以分为过量麻醉剂注射法、化学法或物理法等。空气栓塞法和硝酸的土宁法会给动物造成很大痛苦, 因此, 不提倡使用。常用的实验动物处死法包括以下几种。

1.3.1.1 巴比妥钠静脉注射法

利用戊巴比妥钠等麻醉药, 以麻醉量的 2~4 倍, 快速注入静脉内而处死动物。该法最适用于家兔。通过腹腔注射后效果较慢, 但对不易静脉注射的小鼠、大鼠等小型实验动物仍可使用。

1.3.1.2 一氧化碳吸入法

将动物装入塑料袋中, 然后导入一氧化碳的方法。该法处死动物时, 不出现兴奋期。但需配备一氧化碳罐。

1.3.1.3 乙醚或氯仿吸入法

将动物放入含有乙醚或氯仿脱脂棉的密闭容器中, 经深麻醉后处死。使用该法时, 小鼠等小型动物会很快死亡, 但大鼠等较大的动物则呈现较长的痛苦期, 所以不宜使用。

1.3.1.4 颈椎脱臼法

人为使动物颈椎脱臼而处死的方法。由于该法能迅速使实验动物丧失意识而死亡, 因此适用于小鼠和大鼠等小型实验动物。

1.3.1.5 头部击打法

用力准确打击颈后部, 使动物快速死亡的方法。使用此法时, 应熟练掌握其技巧, 达到准确无误, 否则会増加动物的痛苦。

1.3.1.6 断头法

利用专用的断头器或锋利的剪子, 快速剪掉头的方法。动物会快速死亡, 但眼观非

常残忍, 尽量避免使用。--

1.3.2 颈椎脱臼法

颈椎脱臼法是小鼠、大鼠等小型实验动物最有效、最常用的安乐处死法。下面介绍其使用的器械和程序。

【器械】

铁丝网笼盖或铁丝笼。

【方法】

(1) 用左手握住动物尾部, 使动物用爪紧握铁丝网。

(2) 牵拉尾时, 动物抵抗地向前冲而出现身体伸直姿势, 此时可用右手手指或镊子、铅笔等器械牢固地固定头颈连接部, 然后用力牵引尾部, 以致其颈椎脱臼。采用此法可以很容易地处死小鼠, 但在处死大鼠时, 必须在牢固保定的同时紧握尾根部牵引, 否则尾部易被拉断或脱落。

1.3.3 麻醉药法

家兔一般采用吊死或用膝盖保定后颈静脉放血法处死, 但这些方法非常残忍, 因此, 通常采用注射麻醉药的安乐处死法。

【器具】

2 mL 一次性注射器。

【试剂】

戊巴比妥钠等麻醉药。

【方法】

(1) 用注射器抽吸约麻醉量 3 倍的戊巴比妥钠。

(2) 将兔子保定在保定架上, 用左手的拇指和食指将耳背水平伸张, 充分扩张血管后, 将注射针插入耳静脉内, 用拇指固定注射针, 并轻轻注入麻醉药。

(3) 观察麻醉过程, 确认死亡后, 立即用刀切断颈静脉放血。

1.4 生殖器的摘出

配子实验中, 除利用射出精子外, 均需从摘出的生殖器中采集配子, 即从睾丸和附睾尾或经交配的雌性子宫或阴道内获取精子, 而卵子(胚胎)则从卵巢、输卵管或子宫(有时从阴道)内获取。因此, 必须熟练掌握各种实验动物生殖器的形态、位置及其摘出方法。

以下以小鼠和大鼠为例, 讲述其生殖器的完全摘出法, 以便掌握小鼠、大鼠生殖器各部的形态、位置及其摘出方法。雌性和雄性大鼠生殖器模式图及名称如图 1-1 和图 1-2 所示。

【材料】

性成熟雌性和雄性小鼠或大鼠。

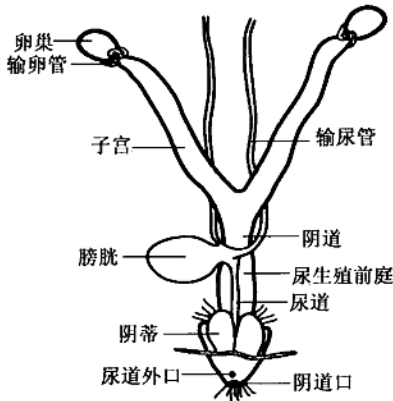


图 1-1 雌性大鼠的生殖器模式图

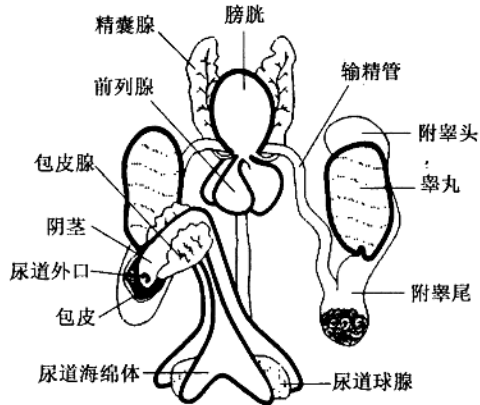


图 1-2 雄性大鼠的生殖器模式图

【器械】

眼科剪、眼科镊、外科剪、手术刀、垫板和滤纸。

【试剂】

生理盐水。

【方法】**(1) 小鼠生殖器摘出法的步骤**

① 用颈椎脱臼法处死小鼠，使其仰卧。

② 用眼科剪横向剪断胸部皮肤，以左手固定切口头侧，右手向尾侧牵拉皮肤，以广泛暴露腹肌（在此过程中，应尽量避免被毛脱落，以防污染）。

③ 从腹后部至横隔膜将腹肌和腹膜一起切成 U 字形以暴露脏器，然后用镊子将胃、肠推向胸部，翻找生殖器。

雄性生殖器：很容易看到骨盆前口附近乳白色呈羊角状的精囊腺，用镊子牵引附着在附睾头部的脂肪块，即可从阴囊内牵出睾丸；输精管呈白色，起始于附睾尾；包皮腺位于腹腔外的阴茎背侧。

雌性生殖器：很容易看到呈 V 字形的子宫；输卵管盘曲成块状，位于子宫角前端；卵巢被包在输卵管前端附近的卵巢囊内。

④ 雄性和雌性生殖器的末端均通过骨盆腔，用手术剪切开阔骨盆腔底壁的两侧后，可将其生殖器、脂肪块和骨盆腔断块一同摘出（在此过程中，应注意不要切断雄性阴茎和输精管）；

⑤ 将摘出的生殖器置于滤纸上，清除多余的组织和脂肪。

⑥ 在铺有滤纸的垫板上，用镊子将生殖器展开成活体腹腔内状态后，进行观察（为防止干燥，可用生理盐水浸润）。

(2) 大鼠生殖器的摘出步骤

① 用颈椎脱臼法或乙醚吸入法处死大鼠，并使其仰卧；

② 用外科剪沿腹正中线切开部分皮肤，再用手术刀或剪的尖端切开腹部的部分肌肉，达到可视腹腔内器官的程度，然后用外科剪从腹后部向横隔膜方向切开，露出脏器；

- ③ 将消化器官推向前部或牵出腹腔外，翻找生殖器（可见有与小鼠相近的生殖器，其中睾丸可用手挤至体外或腹腔内）；
- ④ 用外科剪切开骨盆腔底壁的两侧，摘出完整的生殖器；
- ⑤ 以下操作与摘出小鼠生殖器步骤的（5）和（6）相同。

1.5 麻醉法

胚胎移植时，为便于操作，应对雌性受体采取麻醉处理。此外，采用外科手术法，通过家兔输卵管或子宫采集胚胎或雄性输精管结扎手术时，也应对动物采取麻醉处理。

根据麻醉的深浅，通常将麻醉划分为局部麻醉和全身麻醉。根据作用时间的长短，又可分为短效麻醉和长效麻醉。此外，根据给药的方法，又可分为吸入麻醉和注射麻醉。在实施麻醉时，应根据手术的性质来选择麻醉方法。

在此主要介绍利用巴比妥注射液的全身麻醉法。在市售的巴比妥系列麻醉剂中，有人和动物共用的戊巴比妥注射液和动物用戊巴比妥注射液。

1.5.1 小型实验动物巴比妥麻醉法

小型实验动物，如小鼠、大鼠等通常采用戊巴比妥钠腹腔内注射法，注射量为 0.5 mL/kg 体重。注射后 15 ~ 30 min 即可达到麻醉效果，并可持续 20 ~ 120 min。由于所用的麻醉药量很少，因此，需用生理盐水稀释 5 ~ 10 倍后再使用，如戊巴比妥钠可稀释 10 倍后保存使用。若麻醉 25 ~ 30 g 体重的小鼠，注射已稀释的麻醉液 0.15 ~ 0.2 mL 即可。用该类麻醉药麻醉后，麻醉持续时间较长，因此，应注意护理，防止体温下降，待确认苏醒后再放回笼内。

1.5.2 家兔巴比妥麻醉法

家兔的耳静脉比较发达，因此，可参照第三节讲述的家兔耳静脉注射法注射麻醉药。麻醉药的注射剂量可参照上述的换算法换算。如 2 ~ 3 kg 体重雌性家兔静脉注射 0.7 ~ 0.9 mL。雄性家兔比雌性家兔多注射 0.1 mL 可以达到更好的效果。

1.6 阴道涂片检查法

性成熟雌性动物卵巢中出现卵泡发育、成熟、排卵、黄体形成和黄体退化等一系列周期性变化，此外，伴随排卵动物出现发情等一系列变化，这些变化均受丘脑下部 - 垂体前叶 - 卵巢激素的调节。一般将从发情开始到下一次发情之前的间隔，称为发情周期。小鼠、大鼠、仓鼠等实验动物，排卵后形成黄体。但在没有获得交配刺激情况下，其黄体将失去功能而退化。因此，发情周期在很短的时间内周而复始。各种常用实验动物发情周期见表 1 - 3。