

耳鼻咽喉科实验技术

主 编 姜泗长 翟所强

人民军医出版社

耳鼻咽喉科实验技术

ERBIYANHOUKE SHIYAN JISHU

主 编 姜泗长 翟所强

编 者 (以姓氏笔画为序)

于黎明 王 丰 王大君 王沛英

孙建和 杨卫平 杨贵舫 苏振伦

胡博华 黄靖香 翟所强

绘 图 杨贵舫

人 民 军 医 出 版 社

(京)新登字 128 号

图书在版编目(CIP)数据

耳鼻咽喉科实验技术/姜泗长,翟所强主编;于黎明等编写. —北京:人民军医出版社,
1999.10

ISBN 7-80157-000-6

I. 耳… I. ①姜… ②翟… ③于… III. 耳鼻咽喉科学-实验方法 IV. R76-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 46136 号

人民军医出版社出版

(北京市复兴路 22 号甲 3 号)

(邮政编码:100842 电话:68222916)

人民军医出版社激光照排中心排版

空军指挥学院印刷厂印刷

新华书店总店北京发行所发行

开本:787×1092mm 1/16 印张:10.75·字数:245 千字

1999 年 10 月第 1 版 1999 年 10 月(北京)第 1 次印刷

印数:0001~5000 定价:19.00 元

ISBN 7-80157-000-6/R·000

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书以先进、实用为出发点,参考国内外最新文献,结合作者丰富的实践经验,系统介绍了耳鼻咽喉科常用实验技术和操作方法。包括实验室基本建设、组织制片、组织化学、内耳电镜样品制备、分子生物学实验、膜片钳记录、活体动物耳蜗微循环观察、听生理实验、标本及标本缸制作、鼻粘膜上皮细胞的分离与培养等实验技术。内容丰富新颖,是从事耳鼻咽喉科基础、临床研究和实验教学的重要参考读物。

主要读者对象:耳鼻咽喉科研究人员、临床医生、实验技术人员和研究生等。

责任编辑 杨磊石 黄栩兵

前 言

耳鼻咽喉科疾病的理论研究,常借助于动物实验制出各种模型,从形态上观察其变化规律,认清疾病的本质,为其预防和治疗提供有价值的实验依据,而完成这些实验必然要采用一些实验技术,因此,耳鼻咽喉科实验技术是医学院校、各级医院及有关科研单位在实践和研究中广泛应用的一项必需技术。

为适应耳鼻咽喉科学研究日新月异的发展和培养耳鼻咽喉科专门人才的需要,我们将有关研究方法和新技术,结合 20 余年来耳鼻咽喉科各科实验技术的操作经验,系统地编撰成书,以供教学和科研参考。

本书包括耳鼻咽喉科常用的基本实验方法,如实验室设备和试剂、切片、铺片、标本制作技术以及近年发展起来的最先进的实验手段和方法,如免疫组织化学、电子显微镜制样和观察技术、分子生物学技术、微循环技术、细胞培养及膜片钳技术等。是一本有很高理论价值和实用价值的技术手册。

在本书的策划、立项和编著中,得到了解放军总医院研究生处袁云娥处长的支持和指导,得到了人民军医出版社各级领导的鼓励和大力支持,我们谨表衷心的感谢。

参加本书编写的各位专家,尽管自身科研任务繁重,仍全身心投入,使本书得以顺利出版。本书在编写中,拜读并引用了许多有关书籍及文献资料。谨此向诸位作者、编者深致谢意。

由于科学技术进展极其迅速,编著者限于水平,力不从心,错误之处敬祈阅者指正。

编 者

1998 年 12 月 28 日

目 录

第一章 实验室布局、常用设备及试剂	(1)
第一节 实验室布局	(1)
第二节 实验室及常用物品	(3)
第三节 实验室常用药品和染料	(6)
第二章 实验动物	(8)
第一节 豚鼠	(8)
第二节 大鼠	(12)
第三节 小鼠	(13)
第四节 兔	(15)
第五节 动物模型	(16)
第三章 组织制片技术	(19)
第一节 概述	(19)
第二节 全耳蜗基底膜铺片术	(23)
第三节 人体标本切片制作	(27)
第四节 动物标本切片制作	(36)
第四章 组织化学技术	(40)
第一节 基本要求和技术要点	(40)
第二节 常用方法	(42)
第三节 免疫组织化学技术	(49)
第五章 内耳电镜样品制备技术	(57)
第一节 内耳透射电镜样品制备技术	(57)
第二节 内耳扫描电镜样品制备技术	(61)
第六章 分子生物学实验技术	(67)
第一节 常用仪器设备	(67)
第二节 质粒 DNA 的提取与纯化	(68)
第三节 真核细胞核酸的分离与纯化技术	(70)
第四节 DNA 的凝胶电泳	(73)
第五节 多聚酶链反应技术	(75)
第六节 原位杂交技术	(76)
第七章 膜片钳记录	(79)
第一节 基本设备	(79)
第二节 排除电噪声干扰	(81)
第三节 制备实验标本	(82)
第四节 制作微电极	(82)

第五节 形成封接	(84)
第六节 单通道记录	(85)
第七节 全细胞记录	(86)
第八节 膜片钳记录数据分析	(87)
第八章 活体动物耳蜗微循环观察技术	(91)
第九章 听生理实验技术	(96)
第一节 概述	(96)
第二节 耳蜗电图	(102)
第三节 听觉脑干反应	(107)
第四节 听觉其他诱发电位	(112)
第五节 耳声发射	(117)
第十章 标本及标本缸制作技术	(123)
第一节 颞骨迷路标本	(123)
第二节 肺、支气管标本	(124)
第三节 原色标本与头颅骨漂白标本	(125)
第四节 有机玻璃标本缸制作	(127)
第十一章 鼻粘膜上皮细胞的分离与培养	(129)
第十二章 常用实验技术	(135)
第十三章 医学绘图、摄影和幻灯片制作技术	(139)
第一节 医学绘图技术	(139)
第二节 医学摄影技术	(146)
第三节 医学幻灯片制作技术	(148)
【附录 1】 实验室管理通则	(149)
【附录 2】 中国实验动物管理法规	(150)
【附录 3】 医学实验动物合格证暂行条例	(152)
【附录 4】 北京医学实验动物检定暂行标准	(153)
【附录 5】 溶液浓度表示和计算法	(157)
【附录 6】 常用溶液配方	(159)
【附录 7】 化学试剂的分级与包装	(164)

第一章 实验室布局、常用设备及试剂

第一节 实验室布局

耳鼻咽喉科建立实验室,是开展实验研究的必备条件。实验室的面积应大于 30m^2 , 并应根据工作需要将其分隔为饲养间、实验间、制片间和暗室(图 1-1)。

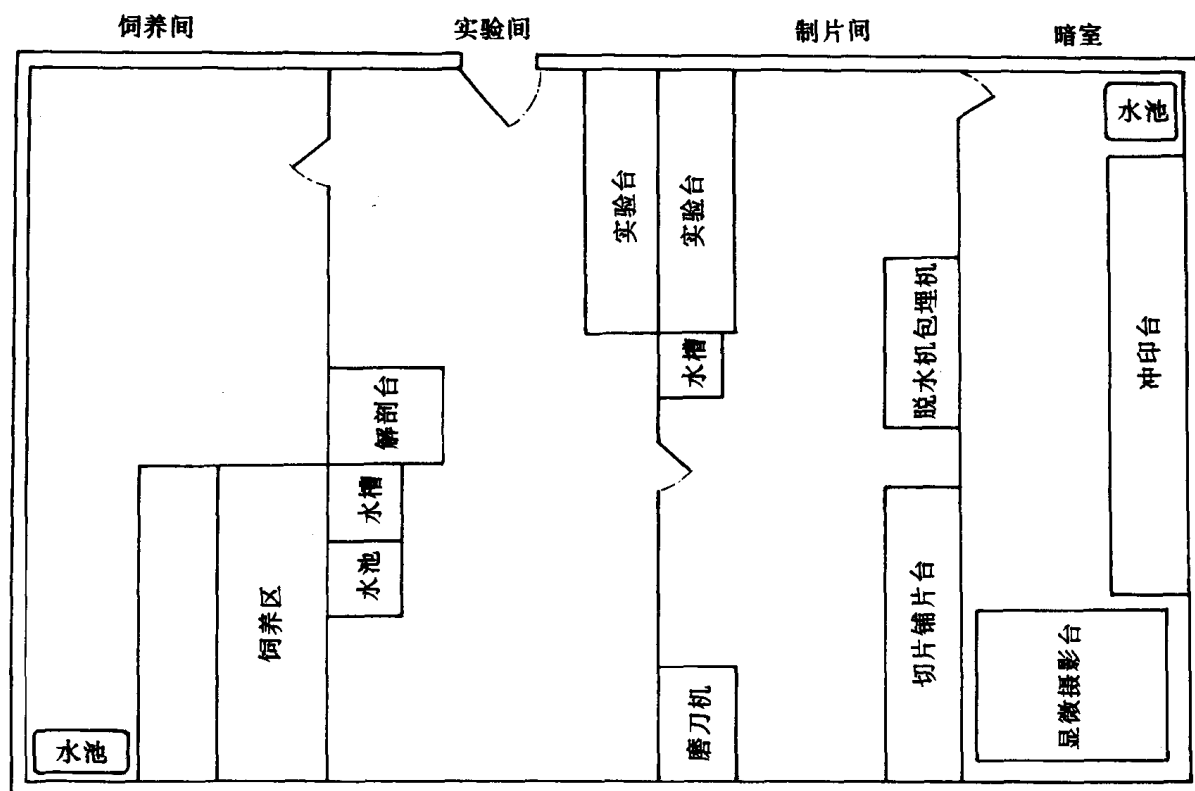


图 1-1 实验室平面布局

实验室除了暗室有特殊的灯光要求外, 饲养间、实验间和制片间都应装置白炽日光灯, 一般不安装钨丝有色光线灯照明, 以免在实验中改变组织的自然色彩。所有分隔间都不应安装电风扇, 尤其不能安装吊扇, 以防止细菌和动物身上的寄生虫及有毒试剂的粉末

随风播散。

实验室地面为水磨石铺就, 并设有地面排水管口。墙壁用瓷砖或白色水磨石自地面铺达 1.5m 以上, 以利洗刷清扫。实验室各间在避开门、窗和水槽的墙壁上, 距地面 1.5m 处至房顶, 都可安装壁橱。壁橱宽为 33cm 左

右,长和高可视房间具体情况而定,并装有玻璃橱门。壁橱可根据各间工作需要分别用于存放试剂、资料和器械等,以代替试剂柜、资料柜、切片柜和器械柜,从而有利于充分利用实验室的空间。电源均应安装在距地面1.50m以上的墙壁上,既便于使用,又可防止清洁房间墙壁时受潮。实验室内应有解剖台、实验台等。

一、实验间

实验间是专门进行动物实验、处死动物和固定标本的场所。实验间面积应不小于 8m^2 ,宜坐北朝南,有明亮的南窗保持空气流通和环境舒适。房间内装有排水管道的水泥瓷砖解剖台和稳固的实验台。实验间内严禁烟火和污染。

要求解剖台长1m,宽0.5m,不仅能进行大鼠、豚鼠等手术解剖和安装电极,还可进行兔、猫等较大动物的剖验。解剖台高度以适合操作为宜,一般在80cm左右。台面边缘稍凸起,台角有排水口通特制水槽。解剖台周围留有一定的余地,以便操作和放置盐水瓶等冲洗用品。台下可放置吸引器、电钻等解剖用具。解剖台须与特制水槽相连。特制水槽分为冲水台和水池两部分,冲水台较解剖台略低,并渐向水池倾斜 5° 左右,冲水台宽40cm,长60cm。在近解剖台端装有自来水管,主要用于标本流水冲洗、清洗手术器械和解剖台冲洗排水。水池与冲水台相连,并低于冲水台10cm左右,长和宽均为40cm,在靠墙的池壁上方装有木制晾干架。水池主要用于清洗玻璃器皿和洗手。

实验台应为长2m,宽60cm,高80cm,主要用来进行各种实验。实验间壁柜中主要存放实验资料、实验器材和化学试剂等等。

二、制片间

制片间面积应大于 8m^2 ,房间内有条件的应装空调和通风设备,避免阳光照射房

间。制片间内除安装白瓷质水槽外,还要配备两张实验台。在制片间内进行冰冻切片、石蜡切片、火棉胶切片、内耳膜迷路取材和铺片,以及内耳组织普通HE染色、特殊染色、组织化学染色和电镜样品的初步制备等。制片间内严禁烟火与污染,须保持干燥和清洁。

制片间可与实验间和暗室相通,以便利实验操作和工作。实验台上可放置冰冻切片机、石蜡切片机和火棉胶切片机,进行内耳切片。另一实验台可放置解剖显微镜、天平、标本缸架。可在实验台上进行标本脱水、透明、染色和试剂的配制。制片间内壁柜中可存放各种化学试剂、制片资料和磨刀设备等,以利实验中取拿方便,制片间可摆放电冰箱和恒温箱。电冰箱用于存放各种配制溶液和需低温保存的试剂,免疫组化切片 4°C 冰箱中过夜。恒温箱用于各种组织化学反应、烘片和标本的包埋等。

三、暗室

暗室是专门进行显微摄影、底片冲洗和照片印放等工作的场所,应与制片间相通,面积可在 2m^2 左右。要配备电源、水源和隔光布置。显微摄影台高为70cm,长1m,宽0.5m。用水泥瓷砖铺制,上置显微摄影仪和放大机。冲印台高为65cm,长130cm,宽40cm。专门进行显影、定影等照片制作。水池用于底片和照片漂洗。暗室壁柜中可置摄影器具、显影剂、定影剂、上光机及切纸刀等。

四、饲养间或动物观察间

有条件单位,动物最好在动物实验中心统一饲养,统一管理。但是,许多单位,特别是基层单位并无动物实验中心,可自己设置饲养间。

饲养间内应有洗手池、饲养池和简易动物笼搁置铁架。面积不小于 4m^2 ,要有明亮的门窗,充足的光线,良好的排气通风设备,要保持房间内干燥和温度。

饲养池池壁需用水磨石砌就,地面排水口安装在池壁角落处,上用塑料板覆盖。饲养池主要用于豚鼠等动物饲养。饲养间简易笼搁置铁架,可饲养大鼠、小鼠或兔子。地面应

有下水槽,以利冲洗清洁用。在饲养间一角,可安放水泥瓷砖台,便于给动物标号,称重等。饲养间壁柜中应备有混合饲料、动物实验登记簿,清洁工具等。

第二节 实验室及常用物品

耳鼻咽喉科实验室的设备,主要有用于手术的手术显微镜,用于观察标本的显微镜和制作标本的各种必要的设施及工具等。

一、显微镜

显微镜是观察组织结构不可缺少的精密仪器。显微镜的种类很多,型号各异。实验室应备有手术显微镜、解剖显微镜、生物显微镜和显微摄影仪。除此外,还应有各种功能的显微镜,如荧光、偏振光、倒置、暗视野以及大型万能显微镜等几大类。

1. 常规显微镜的结构 主要由机械部分和光学部分组成,机械部分包括镜座与镜臂,载物台、镜筒,物镜转换盘和调焦轮或调焦旋钮。光学部分包括目镜、物镜、聚光器、反光镜或灯光源照明。

2. 显微镜的使用 显微镜安放地点最好是避开来往走动人多的地方。将光源调好后就可开始镜检。习惯的使用法是目镜用 $10\times$,物镜先从最低倍起(如 $5\times$ 或 $10\times$),调焦找到所需检查的组织部位后,移至视野中央再换 $40\times$ 物镜。一般显微镜的设计上, $10\times$ 以上物镜的转换都是合焦的,所以在换成 $40\times$ 后,只需用细调焦旋钮调节即可。用油镜观察时,为了安全,应先用粗调焦轮将镜筒旋高(有的显微镜设计是将载物台降低),将油镜转到位,并分别在物镜镜面处及标本观察点上各加上一滴显微镜油,然后用粗调焦轮调到油镜恰好与载玻片的油剂接触,再在目镜观察由细调焦轮调节至图像清晰为止。镜检完毕,借粗调焦轮使油镜与载玻片分离,再用擦镜纸滴加二甲苯分别擦净,对油镜物镜还

应用干擦镜纸轻擦一次。

3. 手术显微镜 主要用于中耳和内耳的手术以及电极的安装,还可用于内耳活体灌注等精细的实验操作。解剖显微镜是进行内耳膜迷路取材和铺片,电镜制样的必不可少的仪器。显微摄影仪是一种高级的研究用显微镜,配备有内光源、双筒目镜和摄影装置,是摄影用的精密仪器。

4. 显微镜的保管 显微镜为贵重仪器,最忌潮湿,必须注意保管。凡久藏未用,取出时不能立刻应用,因镜面有尘垢,而欠清晰。镜面尘垢宜用拭镜纸拭之。日常应用的显微镜,宜放在一定位置。每次用毕,即时拭去镜上垢污,盖上玻璃罩或胶袋,不仅使用方便,并且可避尘,也可减少移动,便于对光。油浸镜若经常用,宜放存在干燥器内,或放回原盒。注意防潮。显微镜每天用后,须留意物镜及载物台等是否完全清洁,镜座螺旋部分,宜时常用点无酸性滑机油并拭净涂漆部分。显微镜的各光学部件,除有经验者外,不要随便拆卸。显微镜的灯,以及浸镜用香柏油和拭镜用二甲苯要备好,以便使用。

二、切片机

切片机一般可分为三种。

1. 石蜡切片机 这是一种旋转式切片机,切片机右侧有一圆形重轮,摇动轮的手柄转动重轮时,传动机内一组齿轮及螺纹中轴,使中轴前端的组织块固定架即按所调节的切片厚度(μm)向前推进,并上下运动,让组织块经过前下方的切片刀而切成一定厚度的切片。每个转动重轮都设有一个长锁,在切片操

作前应先检查长锁是否卡紧,如已卡紧,重轮即不能转动。此后,将组织块装紧于固定架,最后再装切片刀。组织块及切片刀先后装牢固后才可掀开卡锁。慢慢转动重轮使装有组织块的中轴稍下降到接近刀刃处,调整刀的前、后进度,使刀刃即将接触组织块。调整刀的进度时,不让刀刃接触组织块,以免第一次切到时崩落组织块。此时将组织块进度调节器,调到 $20\mu\text{m}$ 开始切片,待组织块切到所需的组织断面时,再调节到所需的切片厚度,如 $5\mu\text{m}$ 或其它厚度。在装组织块前,可将组织蜡块予以修整;如切成方形的断面使组织周围的空白蜡勿超过 3mm 宽,组织前面的蜡也尽量切去到能清晰看到组织本身,这样在切片机上切片时可节省不少的切片时间。在切片机上切片时,如发现因切片刀有缺口而致组织块出现划痕时,应稍向左、右移动切片刀避开缺口,再正式切片。旋转式切片机一般不宜切大块组织,切片时转动重轮的速度也要均匀适宜,太快或太慢均不易切成石蜡连续切片带。

2. 火棉胶切片机 这是一种滑动式切片机,多用于较大块组织切片。切片机有一长条水平滑行轨道,切片刀固定器就装在滑行轨道上,操作时无论是靠手动或机械操作都是使切片刀在轨道上滑动,经过可调节高度的组织块固定器将切片切下来。切片操作前先修整组织块再在固定夹上固定,同时在组织块面上滴加 70% 乙醇。切片刀固定时,切片刀凹面向上并加满 70% 乙醇。切片时应将刀倾斜,这种倾斜有两个要求;一是调整刀刃与组织块表面平行,一是尽量在切片过程中,让刀刃能全部切过组织块,切忌使切片刀与组织块没有任何斜角的切过。组织切片的厚度有赖于组织块固定器的升高。这种升高,有的切片机是手动调节,即每切一片就要升高调节器一次,有的切片机的组织块升高是联动式,即每切一次能自动升高。至于升高多少是根据调节器来控制,例如将调节器调到

$20\mu\text{m}$,则每次切片均为 $20\mu\text{m}$ 厚。切成的切片厚薄与火棉胶包埋时的处理有关,包埋组织块的火棉胶硬度低,一般都切不成较薄的切片。由于火棉胶切片都是用来切大块组织,切的过薄并不适用。切片时还应注意随时保持组织块上及切片刀凹面上充满 70% 乙醇。切片刀经过组织块时动作也不宜太快,因为在切过组织时,切片会在切片刀刃处卷成筒状,所以在未切下切片前,用毛笔轻轻将它推展平再一刀切下,然后用毛笔托出切片放在先已备好盛有 70% 乙醇的培养皿内,这在以后染色或其他处理时方便得多。

3. 冷冻切片机 这种切片机一般是藉切片刀的运动将组织切下。不过,在切片前应先将组织块冷冻,同时也应将切片刀冷冻。冷冻方法:用液态二氧化碳或氮喷于组织块及切片刀上使之立即深度冻凝,或装上半导体致冷器于组织块固定器及刀背上,启动后即能冻凝。这种半导体致冷器使用时比较方便,效果完好。切下切片后,用毛笔将切片从刀刃处轻轻推入预先准备好的盛水(或其他操作液)的培养皿内。恒冷切片箱(cryostat)这是一种将旋转切片机型的切片机装在一急速制冷的低温冰箱内,转动重轮设在箱外,切片过程可由箱前面的玻窗监控。用恒冷切片箱切片可获得较薄的冷冻切片,特适于作组织化学或免疫组织化学切片。

切片机是制作组织切片的重要仪器,必须保持清洁和干燥,每次使用后都要擦净并涂机油,防止机械部分生锈和微动装置磨损。切片机要放在稳固的操作台上,每次用毕罩上切片机罩。

4. 切片刀 切片刀是切片过程中最重要的工具之一,它的种类有下列几种:平凹型,平楔型,双凹型等等,切片刀的长度往往随着用途的不同而异,长度约在 8cm ,宽度也较窄。火棉胶切片和石蜡切片用刀其长度通常为 $14\sim 20\text{cm}$ 。

使用切片刀必须掌握磨刀法,否则虽有

良好切片机,也切不出好片。切片刀的研磨有用机械磨刀机研磨的、有用手工研磨的。机械磨刀机有国产和进口的,它可以定时翻刀,定时磨刀时间,省力。手工研磨,操作时应遵循如下手续:磨刀时先以软布拭净磨刀石面上尘垢;将刀柄紧旋于刀之一端,并装上刀背夹;把磨刀油滴在刀石上,并把刀平放于刀石之一端;右手紧握刀柄,左手紧按刀之上端,注意刀口与刀石平贴接触;磨刀时首先把刀口向外及向左斜上,徐徐推前,直至刀石末端,那时应恰将一边刀口全面磨完;把刀口向上翻过,同时刀背不要离石,并将刀口移转向内,拉之向左斜下,使另一边刀口全面磨完;依照上述动作,反复上落,把刀灵活地推动,不要缓慢,也不用过急,并须注意刀口平贴石面,掌握两手用力均匀;每次用石磨完,需用磨刀皮反复磨之,磨时刀背向前推动刀刃向后形式,使刀移动至皮革的一端后,刀背紧贴皮革翻转后似以刀背向前按原来方向拉回。

切片刀用过,稍觉粗钝,立即要磨或磨,切莫使刀口过于损耗,而难以修正。要避免用后刀上有水,防止生锈,操作时要小心伤手,用完后必须用干布擦干,放入切片刀盒内以保安全。

三、贴片工具

贴片工具也是实验室切片必需设备,它需要有盛水盆,通常用来作切片附贴,张展切片,亦有用各种自制的器具来展片。同时需要毛笔、尖镊子、长铁针、弯针、玻璃针等,用以提取切片展开切片皱折。

四、自动脱水机

这种设备有利于大量组织块或切片的脱水、染色、透明等处理的自动化。有的还可安排浸蜡的自动过程。进口和国产的均有,使用者可按随机所附的说明书,安排定时转换。

五、常用器械

常用手术器械是解剖刀、尖头剪、静脉剪、持针器、血管钳、有齿镊、钻孔尖针、剥离子、皮肤牵开器、骨锯、骨剪、凿子、锤子、尖镊、缝针、手术刀。做膜迷路取材需用小而锐的器械,有眼科尖剪、鼠齿镊、游丝镊、分离针、钢挺等。

六、常用玻璃器皿

实验室常用玻璃器皿有烧瓶、烧杯、量筒、量杯、漏斗、吸管、磨口瓶、染色缸、移液管、试管、标本冲洗瓶、硫酸干燥器、玻璃皿、载玻片、盖玻片等等。

玻璃器皿应用之前一定要清洗,对染色缸和标本瓶的清洗应用毛刷沾肥皂粉或去污粉将染色缸、标本瓶表里擦洗,自来水中冲净,再用蒸馏水过洗一次即可。如肥皂水尚不能洗净时,可用洗涤液倒入缸内,浸泡数小时至1天,再用肥皂水或清水充分洗之,然后用蒸馏水过洗,烘干备用。

七、洗涤液

配制方法:重铬酸钾 300g,浓硫酸 300g,蒸馏水 300ml 将重铬酸钾溶于热水中,用玻璃棒充分搅和使重铬酸钾全部溶化,冷却后,慢慢加入硫酸。

载玻片一般用 $1.5\text{mm} \times 76\text{mm} \times 26\text{mm}$,盖玻片最常用为 $18\text{mm} \times 18\text{mm}$,载片和盖片的擦洗方法有多种,常用的有煮沸洗涤法:即用适量的洗衣粉加水浸没玻片(约1%洗衣粉水溶液),加热煮沸约15~20min,冷却后以自来水充分洗涤,用干净的白棉布擦拭贮藏于纸盒或玻璃器皿内备用。洗液浸泡法:即将新玻片浸入洗液中浸泡半天,取出经自来水充分冲洗后,擦干备用。新的盖片可一片片投入洗液中,使盖片的两面都接触到液体,浸泡1~2h后,流水冲洗干净后用白绸布拭干备用。亦可把盖片浸入1%盐酸液中,清洗后

再擦干备用。

八 其他

(1)染色缸、染色或切片架、载玻片、盖玻片以及常用的玻璃器皿等都是通用的设备,实验室必须常规配备这类用品。

(2)电冰箱,恒温箱,离心机,天平,酸度,吸引器,电钻,定时钟等是实验室通用设备,有条件应备齐。另外,若想开展分子生物学方面实验研究,除上述设备外,还需要配备PCR仪,摇床,低温冰箱,电泳仪等仪器设备。

第三节 实验室常用药品和染料

实验室所用药品和染料种类繁杂,购买时应注意药品的化学成分。凡属生物染料,都有一定的有效期限,在限期内当不致失效。为慎重起见,最好标记每一药品的购入日期,登记造册,分门别类贮存。注意染料因具有复杂的有机化学成分,应特别避光,最好贮藏于暗冷地方。对剧毒、易燃、易爆、腐蚀性药品要有严格的保管制度。

一、常用药品

1. 消毒剂 75%乙醇、2%碘酒、煤酚皂、消毒液等。
2. 固定剂 甲醛、多聚甲醛、戊二醛、四氧化锇、丙酮、氯化汞、苦味酸、乙醇。
3. 脱钙剂 甲酸、乙二胺四乙酸二钠、盐酸、硝酸。
4. 脱水剂 乙醇、丙酮。
5. 透明剂 二甲苯、氯仿、苯酚。
6. 包埋剂 石蜡、火棉胶、明胶。
7. 麻醉剂 戊巴比妥钠、水合氯醛、乌拉坦、硫贲妥钠、乙醚、阿托品。

二、常用染料

1. 碱性核染色剂 用于动物组织学、细胞学、病理学及细菌学等,有碱性品红、天青-A、次甲蓝、甲基紫或龙胆紫、甲苯胺蓝、洋红、甲苯胺紫、苏木素、中性红、碘绿、结晶紫。
2. 酸性胞浆染色剂 苦味酸、孔雀绿、橘黄-G、坚牢绿、酸性品红、甲基橙、甲基蓝、鸡冠花红、水溶苯胺蓝、伊红Y、伊红B、伊红

S、刚果红、焰红、油溶红。

3. 脂肪染色剂 苏凡红■、油溶红-O、苏丹红IV、尼罗蓝硫酸盐、苏丹黑-B。

4. 活体染色剂 菊橙-Y、中性红、结晶紫、甲苯胺蓝、亚甲蓝、甲基紫、俾士麦棕-Y、硫堇。

5. 荧光染色剂 吖啶黄、吖黄素、荧光素、吖啶橙、酸性品红。

三、其他试剂

1. 封片剂 甘油、明胶甘油、中性树脂。
2. 常用组织化学试剂和免疫组织化学试剂 这类试剂种类很多,将在组织化学和免疫组化章节中介绍。实验室中最常用的几种化学试剂溶液介绍:

(1)各级浓度乙醇:除无水乙醇外,各级浓度的乙醇均由95%乙醇加蒸馏水配成。如配70%乙醇,是用95%乙醇70ml加蒸馏水25ml。余类推。在使用各级乙醇时,如按95%、75%、50%、30%等序列,即所用的乙醇浓度依次分级减少,习惯上常称“梯度乙醇下行”,反之称“梯度乙醇上行”。

(2)盐酸乙醇:多用于多种染色过程中的分色,如苏木素染色后分色。配法是70%乙醇内加0.5%~1%的浓盐酸。用盐酸乙醇分色后要经自来水充分冲洗组织切片,去除所含的酸再作其他处理。

3. 生理盐水 以氯化钠0.85~1g溶于100ml蒸馏水配成的生理盐水适用哺乳动物。鸟类用NaCl量0.75%,冷血动物用

0.65%,海水动物用 1.5%~2.6%。

4. 碘酒 每 100ml 的 70%~75%乙醇内加碘 2.5~5g。碘酒可用于经含有升汞的固定组织液所制切片去除汞结晶,也可作杀菌消毒。

参 考 文 献

1 苗明三. 实验动物和动物实验技术. 北京. 中

国中医药出版社,1997

2 丁大连,等. 豚鼠内耳解剖检验技术手册. 南京. 南京铁道医学院出版社,1989

3 杜卓民. 实用组织学技术. 第 2 版. 北京. 人民卫生出版社,1998

(翟所强)

第二章 实验动物

第一节 豚 鼠

豚鼠属于啮齿目,豚鼠科,豚鼠属的动物。在分类上更接近于豪猪、栗鼠。原产南美大陆西北部,16世纪由西班牙人带入欧洲,后向全世界传播。有多种称呼,如荷兰猪,天竺鼠,海猪等。习惯上把应用于动物实验的叫豚鼠。

一、生物学特性

豚鼠性情温顺,轻易不伤人,胆小易惊,喜群居和干燥清洁的生活环境。不易于攀登和跳跃,40cm高的饲养笼或池,足以使其不致跑出。嗅觉、听觉较发达,对各种刺激有较高的反应,如空气混浊、气温突变、寒冷或炎热等,都会引起豚鼠体重减轻,厌食,妊娠末期流产,仔鼠发育迟缓,甚至诱发肺炎等多种疾病。受到惊吓,特殊音响持续刺激,会使动物出现一系列不良反应。对抗生素极为敏感,尤其是对青霉素及四环素的致敏性很高。豚鼠体内缺乏合成维生素C的酶,故其肝和肠内不能合成维生素C,所需维生素C必须来源于饲料中。豚鼠自动调节体温的能力较差,易受外界温度变化的影响,新生仔鼠更为明显,主要依靠室内温度的恒定和母体的抚育来维持其正常的体温,温度过高或过低都会降低豚鼠的抵抗力。

豚鼠出生后1h即可走动,数小时能吃饮料,2~3d可吃青饲料或混合料,4~5月吃块料,豚鼠生长发育快,25月龄时体重可为初生重3倍左右。

二、解剖生理特性

豚鼠耳蜗较发达,故听觉敏锐,音域广,两眼明亮。耳壳较薄,血管鲜红明显,上唇分裂。肺分7叶,右肺4叶,左肺3叶。胸腺在颈部,位于下颌角到胸腔入口之间,有两个光亮,淡黄细长椭圆形充分分叶的腺体。肝分5叶,嚼肌发达,胃壁很薄,主要是皱襞。肠管较长,约为体长10倍,盲肠极大,占腹腔容积1/3,充分满时,大约占体重15%。雄性豚鼠精囊很明显,通过腹股沟进入腹腔,上面布满直和弯曲的输精小管,阴茎端有两个特殊的角形物,呈圆锥形。雌鼠有左右两个完全分开的子宫角,汇合后形成子宫颈。有阴道闭合膜,一对乳腺,位于鼠蹊部,左右各一个。

三、种 类

豚鼠一般可分为短毛种,长毛种和硬毛种三种。短毛种豚鼠被覆的毛较短而且柔软,毛多为白色、黄色和黑色所组成,故又可分为白色、黄色或黑色的单色豚鼠、两色豚鼠和三色豚鼠。其中两色和三色豚鼠是杂种,体质较健壮,单色豚鼠是纯种,其中白色豚鼠的体质较其他颜色豚鼠的体质为弱。长毛种其遍体长毛遮盖着头和脚。长毛豚鼠较难饲养,并易患各种疾病。硬毛种其被毛呈蔷薇花状且又短又硬。硬毛种豚鼠体质弱,易感染各种疾病。

四、生理、生殖正常指标

初生	50~80g
1 周	100~120g
1 月	150~200g
2 月	200~280g
3 月	300~350g
4 月	350~400g
6 月	450~500g
1 年	700g
寿命	6~8 年
体温	37.8~39.5℃
呼吸	100~150 次/min
心跳	230~390 次/min
血压	0.87/1.60kPa
总血量	占体重 6.4%
成熟体重	250~900g
性成熟(第 1 次交配)	6 个月
性周期	14~17d
交配期	4~5d
雄性生产期限	2.5~3 年
雌性生产期限	3~4 年
每次产仔数	1~6 只
孕期	60~68d
1 年内产仔次数	3~5 次
哺乳期	21~30d
断乳期	3~5 周

五、饲养与繁殖

1. 豚鼠的饲养方法 幼年豚鼠(200g 体重以下)在池内的饲养密度为 20 只/m²。成年豚鼠饲养密度为 10 只/m²。饲料的选择要从精饲料和青饲料两方面给予充分的供应。精饲料可用含麸子 80%，燕麦 30%，鲜豆皮 10%，豆饼 10%，黑豆 20%，玉米粉 10%，鱼粉 3%，食盐 1% 的配方配制，或用免食混和饲料。青饲料富含维生素 C，是维持豚鼠生命健康日常不可缺少的重要辅食。有小白菜、菠菜、包心菜、苋菜、青草、大白菜、油菜等。投饲

前要洗净其上附着的污泥、肥料和农药。

白天要保持饲养池内有充足的清洁饲料，夜间应将饲料取出，以免饲料被豚鼠粪溺污染变质，再予饲用可致食物中毒。冬季可将稻草扎成束置于饲料池中，稻草束既有利于保持饲养池干燥和温暖，又可供豚鼠食用。豚鼠会因青饲料缺少而缺少维生素 C 而患坏血病，出现牙齿松动、关节肿胀，食欲不振，全身软弱等症状，甚至因此而死亡，因此要及时补给豚鼠青饲料。豚鼠易因潮湿而患肺炎，易因食用不洁饲料而腹泻，易因环境潮湿阴暗而生跳蚤，因此，在饲养过程中，一旦发现豚鼠有咳嗽、脓肿、流涎、拉稀、精神萎顿、被毛蓬松等情况，应及时将病鼠隔离或淘汰，并彻底清扫饲养池。

2. 选种、交配、繁殖 豚鼠雄种生产年限为 3 年，雌种生长年限 4 年。选种时最好选雄种体重 700g 以上，体格发育良好，肌肉丰满，四肢有力，脊背平直，睾丸大小相等的。选雌种体重应在 600g 以上，体健有力，乳头凸起的。每次用 1 只雄鼠与 6~10 只雌鼠进行交配，交配同居期为 3 周，同居期满后，雄鼠调出，休息两周后方能再行交配，雌鼠则留在池内等待妊娠检查与分娩。孕期大约 60d，每次可产仔 1~6 只，哺乳期为 3~5 周。若母鼠患病或死亡，仔鼠可由其他母鼠代乳。并且做好标记，因为代乳仔鼠成年后不宜作为种鼠使用。离乳母鼠要求休息一周后方可再行交配。

六、实验技术

1. 选择和抓取方法

(1) 选择豚鼠做为实验对象要挑选眼睛明亮，瞳孔清晰，被毛致密柔软有光泽，鼠背部平直，臀部匀称，四肢骨骼发育良好，行动活泼者。一般选用体重在 300~400g 的健康豚鼠作为受试对象，最好选择同一品种、同一年龄、同一体重的，性别尽可能保持一致，并且最好选用雄鼠。杂种豚鼠不宜作慢性实验，

短毛种中的白色纯种豚鼠进行内耳损害的慢性实验可使实验结果相对较为集中。硬毛种和长毛种豚鼠易感染各种疾病,一般不适用于做耳科实验。在诸多豚鼠种类中,除白色红目豚鼠外,所有黑目豚鼠的内耳血管纹和膜半规管上都有点状的黑色素,以及椭圆囊囊壁和三个壶腹嵴两侧半月面都有片状的黑色素。这种黑色素常常干扰染色结果,尤其对组织化学的呈色观察影响较大,因此,在选用时,应考虑用白色红目豚鼠作为耳科受试对象。

(2) 抓取豚鼠时先用手掌扣住豚鼠背部,抓住其肩胛上方,拇、食指环扣颈部,另一只手轻托住臀部。有时可用纱布将豚鼠头部轻轻盖住,操作人员轻轻扶住其背部或者让其头部钻到实验人员的臂下,然后进行实验操作。豚鼠性情温和,胆小易惊,一般不易伤人,抓取时要求快、稳。

2. 实验编号 豚鼠实验编号的方法有许多种,各实验室根据情况而定。白色豚鼠编号是3%苦味酸在豚鼠左前支,右前支,左后支,右后支,鼻尖为1~5,鼻尖加左前支,右前支,左后支,右后支为6~9,两眼间为10,两耳间为20,颈后30,背中40,背尾50,尾部60……,余其记录。另有方法是个位数用3%苦味酸在豚鼠左侧、背部和右侧身体依次前、中、后进行标记编号。十位数用0.5%中性红在豚鼠身体上从左到右,从前到后依次标记编号。花色豚鼠用铝制编号脚圈或金属颈圈编号。有的在耳郭上打印编号。

3. 耳科检查方法 首先应在电耳镜下观察豚鼠外耳道及鼓膜状况。若有耵聍栓塞者应取出并清理干净外耳道。对患有中耳炎的豚鼠不能作耳科实验动物用,应淘汰。

用吹口哨方式,观察豚鼠的耳郭反射状况,若听力好的动物耳郭反射明显。有条件单位可用电测听器,声刺激频率采用2KHz和4KHz,声音强度在80dB左右,突然给声测定豚鼠耳郭反射,耳郭反射灵敏的豚鼠可做

为耳蜗功能和病理的受试对象。

选择内耳前庭功能和病理的受试对象,可用0℃的冰水0.2ml对豚鼠每耳进行微量冰水诱发眼震的检测,筛选出肉眼观察诱发眼震的持续时间在40~70s的豚鼠,无诱发眼震的豚鼠不能作为前庭功能检测的受试对象,应当淘汰。

4. 麻醉技术 豚鼠实验时常采用麻醉,麻醉成功与否直接影响实验进行。因此,麻醉豚鼠的技术是较重要的。最常用的麻醉剂是1%戊巴比妥钠,按每千克体重40mg的剂量应用,还可用10%水合氯醛;每千克体重150mg,2%硫苯妥钠,每千克体重40mg,上述三种麻醉药均采取腹腔注射,一般10min左右后进入全麻。吸入麻醉可将豚鼠放入容器内,容器内有浸润乙醚的棉球或纱布,开始时动物出现兴奋,进而出现抑制,自行倒下,当角膜反射迟钝、肌张力降低,即可开始实验,并随时追加乙醚吸入量,维持其麻醉深度和时间。在实验过程中也会经常使用一些局部麻醉或同全身麻醉合并使用的方法。如在做耳后切口等时,可用1%普鲁卡因作为手术局部浸润麻醉,剂量按所需麻醉面的大小而定。

5. 给药途径和方法 在对豚鼠动物实验中,需将药物注入其体内,才能观察其对药物的反应:

(1) 剂量:在给豚鼠用药时,所采用的剂量与人的药量比例是15:1或20:1,即豚鼠每千克体重用药量是人每千克体重用药量的15~20倍。当给药途径不同时,剂量要相应有所增减。当以口服量为100时,灌肠量为100~200,皮下注射量应为30~50,肌肉注射量为25~30,静脉注射量为25。在进行药物最小量、最大量、中毒量和致死量的动物实验中,要先以少量豚鼠进行预试。化学药品可参考化学结构相似的已知药物的剂量,植物粗制剂可按生药剂量折算。实验用逐渐加大剂量的方法进行,在比较几个剂量的实验结