

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：(实验) SOP-3.10 版次：01

B16-F0 肺部转移模型评价药物对肿瘤生长抑制作用的标准操作规程		修订年份：2012 年
修 订 人：刘晓庆	审 核 人：	批 准 人：
修订日期：2012.9	审核日期：	批准日期：
颁发部门：	分发部门：	生效日期：

B16-F0 肺部转移模型评价药物对肿瘤生长抑制作用的标准操作规程

1. 目的：

规范 B16-F0 肺部转移模型模型（H460）评价抗肿瘤药物抑瘤作用的操作规程。

2. 适用范围：

ECNU-NDT 联合实验室生物组

3. 责任人：

4. 试剂、设备及材料

4.1 实验动物：C576J/BL，7-8 周（20-22g）、雌性，购自北京维通利华（VTR）实验动物中心

4.2 仪器、材料和试剂：1ml 注射器、0.4 规格的注射针头、75%酒精、分析天平、PBS（pH7.4）或生理盐水、Marker 笔、小鼠笼、小鼠固定器、计时器、手术器械，组织匀浆器、解剖显微镜、OCT：PBS=1：1 溶液，Bouins 溶液。

5. 操作步骤

5.1 根据实验方案，In vivo 实验负责人 与 In vitro 实验负责人讨论确定实验的具体实施日程，包括动物订购时间、到达时间、细胞皮下接种时间、所需细胞数量、细胞密度及分散介质（至少于皮下接种前十天进行），填写《细胞使用申请表》。

5.2 In vitro 实验负责人根据动物实验计划,准备实验所需细胞,具体操作参见《细胞培养标准操作规程》。

5.3 In vivo 实验负责人与协调员沟通,订购所需实验动物,准备实验原始数据记录表格,根据 protocol 合理安排给药和组织采集时间。

5.4 In vivo 实验负责人安排接收动物,查验动物数量,规格,发票以及合格证。填写《动物接收登记表》。

5.5 肿瘤细胞接种细胞当天,由 In vivo 工作人员准备好冰块或冰盒,供保存收集好的细胞,以减少细胞在接种过程中的活力损失。

5.6 In vivo 负责人应密切关注细胞收集进程,应于细胞收好前 5 min 准备好细胞接种过程中需要使用到的注射器、笼具等,并准备好要接种的动物,等待细胞送到,以节省细胞放置的时间。

5.7 In vitro 工作人员将细胞送到动物实验室。由 In vitro 工作人员负责抽取细胞,供 In vivo 工作人员进行细胞尾静脉注射。并记录开始细胞接种的时间。将完成细胞接种的动物放入一个大笼盒内。

注意: 在抽取细胞前,应将细胞充分摇匀,不得出现肉眼可见团块。

抽取细胞的工作人员应密切配好细胞接种工作人员的节奏,抽入注射器内的细胞应及时使用。

5.8 动物分组:细胞接种完成后,In vivo 实验负责人应根据 protocol 要求立即对已经尾静脉注射的小鼠进行随机分组(体重:20-22g)。例如:欲将 15 只动物分成 5 组,则先将 15 只动物放入一个鼠笼内,另取五个小笼,分别编号 1、2、3、4、5。随机抓取动物,先按照 1、2、3、4、5 的顺序每笼各放入一只,再按照 5、4、3、2、1 的顺序每组再个放入一只,如此循环,直至分完所有动物。填写笼盒标签,随机将各笼动物分配给各实验时间点。

注意: 药物注射需在细胞接种 2 小时候进行。

5.9 编号及称重:以 Ear Tag 对各组动物进行编号,并称重,记录结果。

5.10 药物配制:根据 protocol 确定的给药剂量,药物的载药量,动物体重,动物数量,按照 10ml/kg 的给药体积,计算需称取的药物量加入的溶剂体积。加入指定溶剂后,振摇至药物完全溶解后方可进行尾静脉注射。

计算:称取化合物重量 = 给药剂量/1000/载药量×动物体重×动物数量×1.3

配制体积 = 动物体重 × 动物数量 × 1.3 × 给药体积

注意： 药物必需彻底溶解， 否则注射会导致动物死亡；

药物配制过程需要两人配合进行， 保证 double check；

药物溶液应在配制后 24h 内使用。放置时需于 4℃ 保存；

剩余的药物溶液应于-80℃ 保存， 备查。

5.11 给药。具体操作参见《小鼠尾静脉注射标准操作规程》。根据设计的时间表对每只实验动物进行尾静脉注射。注射时应根据动物的反应确定给药速度，不宜过快，防止动物猝死。注射完成时，在原始记录—给药采血时间表上记录给药的实际时间。

5.12 日常数据收集。自给药当日起至实验结束，每日收集动物体重数据，并密切观察动物给药后的反应。

5.13 取样前准备：取样前一天检查或准备 Bouin's 溶液是否足够，准备样品保存所需离心管（15ml）并做好标记，另外准备一个装有 Bouin's 溶液的培养皿，供清洗组织样品用。至阴性对照组单叶肺黑色结节数量为 100-200 时，收集肺样品。

5.14 肺样品收集：脱颈椎处死小鼠。以 OCT: PBS 溶液灌注气管，然后分取全肺。清洗后置于装有 Bouin's 溶液的离心管中，放置过夜。具体方法参见《组织采集标准操作规程》

5.15 计数。取以放置过夜的样品，吸干表面的 Bouin's 溶液，用手术刀片切下一叶肺片，置于解剖显微镜下计数黑色结节。

注意：同一实验中，不同动物应分取同一片肺叶用于计数。计数结果为正反两面结果的累加。

5.16 数据分析。根据计数结果，分析比较实验组对 B16F0 肺转移肿瘤生长抑制的作用。

5.17 整理原始数据，提交实验报告。