

EAE 造模操作指南

配套产品：百日咳毒素 PTX (abs42024902/abs42024900) | 爱必信 (Absin)

描述：

百日咳毒素 (Pertussis toxin, PTX) 由百日咳鲍特菌 (*Bordetella pertussis*) 代谢纯化所得，是一种多亚基毒素，与大多数哺乳动物培养细胞结合并特定靶向 G 蛋白，抑制 G 蛋白及其在信号通路中的生理功能。PTX 的生理效应因 G 蛋白功能不同而变化。正是依赖 Gi 家族的蛋白偶联受体来抑制信号通路的能力，PTX 是细胞生物学研究中的一种重要工具。PTX 通过抑制和调节各种宿主对 *Bordetella pertussis* 的免疫反应在传染方面发挥重要作用。

PTX 是构建实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) 模型的关键辅助剂，该模型是研究多发性硬化症 (Multiple Sclerosis, MS) 最常用的动物模型。PTX 在 EAE 模型中的作用机制是多方面的：它通过改变血脑屏障的通透性，促进炎症细胞进入中枢神经系统；同时调节免疫细胞的功能，偏向于促炎性 Th1 和 Th17 细胞的分化，抑制抗炎性 Th2 细胞反应。研究发现，PTX 驱动髓样细胞产生 IL-1 β ，这是初始 T 细胞分化为致病性 Th1/Th17 细胞的先决条件。这种免疫调节功能对于打破自身抗原的免疫耐受，建立稳定的自身免疫反应至关重要。

PTX 通过与髓鞘特异性抗原 (如 MOG₃₅₋₅₅ (abs815889)、[Ser140]-PLP₁₃₉₋₁₅₁ (abs45152261)、PLP₁₃₉₋₁₅₁ (abs45153151)、MBP₆₉₋₈₈ (abs45152786) 等免疫肽) 联合注射，可显著提高 EAE 模型的诱导成功率。应用最多的 EAE 模型是将免疫原性表位 MOG₃₅₋₅₅ 悬浮在含高浓度热灭活结核分枝杆菌 H37 Ra 的弗氏完全佐剂 (FCA, abs90351) 中充分乳化后进行免疫，并在免疫当天及两天后注射 PTX。C57BL/6 小鼠在免疫后 10-14 天内出现“经典”自限性单相 EAE，表现为进行性上升性神经功能缺损，急性期表现为弛缓性瘫痪，之后疾病进入平台期并开始自限性恢复。小鼠每天使用临床评分系统进行评估，连续观察 30 天或更长时间。

使用方法

本方案主要参考文献 [1-8]，为通用基础指导，仅供实验参考。EAE 模型的建立受动物品系、周龄、性别、抗原种类与剂量、佐剂 (FCA) 组成、PTX 剂量与给药时点、免疫途径及检测终点等多因素影响，不同文献的免疫原剂量 (MOG₃₅₋₅₅ 100–300 μ g/只) 与 PTX 用量 (100–1000 ng/只) 差异较大，且模型类型随品系-抗原组合而改变 (C57BL/6 + MOG₃₅₋₅₅ 多呈单相病程，SJL + PLP₁₃₉₋₁₅₁ 多呈复发-缓解型)。具体实施时，建议结合多篇文献及预实验结果，依据您的实验目的 (发病时程、药物干预窗口、终点指标等) 对剂量与时间点进行相应调整。

一、EAE 造模方法

- 1、实验动物：通常选择 6-8 周龄的雌性 C57BL/6 小鼠。根据实验设计，每组至少需要 10 只动物以确保统计学意义。
- 2、动物适应：将动物在实验环境中适应 1 周，保持温度、湿度和光照条件稳定，并使它们能够自由获取食物和水。所有操作应符合所在机构动物伦理委员会规定，当达到预设人道终点 (如评分 $\geq$ 4 分、体重下降 $>$ 20% 或出现严重痛苦) 时，立即实施安乐死。
- 3、EAE 模型建立

(1) PTX 溶液配制：免疫当天，取 50 μ g 百日咳毒素冻干粉，加入 500 μ L ddH₂O (双蒸水) 复溶。轻轻混匀至完全溶解。严禁涡旋震荡或无菌过滤，以免蛋白损失。分装后于 4 $^{\circ}$ C 保存 (尽快使用完)。此时浓度为 100 μ g/mL (即 100 ng/ μ L)。免疫当天，用无菌 PBS 将储备液稀释 50 倍，得到浓度为 2 ng/ μ L 的 PTX 工作

液，现配现用。

警告： PTX 具有多种生物学效应。避免吸入、摄入以及与皮肤和眼睛接触。穿戴适当的实验室服装，包括实验服、手套和护目镜。处理冻干粉时应在生物安全柜中进行，建议佩戴丁腈手套，避免产生粉尘和气溶胶。使用前，应轻柔摇晃，不要进行剧烈漩涡震荡，使悬液混合均匀。实验后残留 PTX 溶液及接触物品应按照生物危险品规范处理，避免环境污染。

（2）MOG₃₅₋₅₅ 工作液配制：精确称取 MOG₃₅₋₅₅ 多肽粉末（abs815889），先加入适量 ddH₂O（双蒸水）溶解，配制成较高浓度的储备液，待完全溶解后，用 PBS 缓冲液稀释至终浓度 2.0 mg/mL。

注意： 多肽溶解后长期储存容易失效，并且会有冻融稳定性风险，建议现配现用。此外，多肽易吸附在离心管上，建议用低吸附离心管配制溶液。

（3）抗原乳液制备：按照 1:1 体积比将 MOG₃₅₋₅₅ 多肽溶液和 FCA 溶液（abs90351）加入两支 5 mL 玻璃注射器中，并通过三通连接两支注射器（需提前将器具灭菌处理，防止杂菌污染破坏毒素和抗原活性），在冰上反复推注 40 min-2h，将抗原乳化至油包水状态，MOG₃₅₋₅₅ 多肽浓度达到 1.0 mg/mL。

警告： 热灭活的结核分枝杆菌刺激先天免疫反应，避免吸入、摄入以及与皮肤和眼睛接触。制备佐剂时严格避免针刺伤，因为它可能导致肉芽肿或诱发自身免疫反应。

注意： ①建议使用纯度>98%的合成肽段，以保障免疫原性并减少非特异性反应；②在制作乳液的过程中，损失量是很大的（一般损失 1/3—1/2）。理论上一只小鼠需注射 MOG 肽 200μg，十只鼠 2mg，但加上损失量，免疫十只鼠需称取 4mg，以防损失后不够用。肽和 FCA 乳液形成后，可以在 4℃ 下保存几个小时或立即使用；③乳液制备不建议使用塑料注射器，避免有机溶剂干扰，防止蛋白质吸附。为防止蛋白吸附，建议在乳化前用 1.0 mg/mL MOG₃₅₋₅₅ 多肽溶液润洗玻璃注射器。

乳化质量严格验证

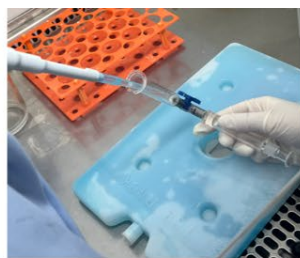
①直观与离心双重检测：合格的乳化液呈均匀白色黏稠状，将其滴入水面后应不扩散，这是判断油包水状态的直观标准，也可将乳化液转入离心管，以 3000r/min 离心 1 分钟，若无明显分层则说明乳化完全。

②微观粒径辅助判断：显微镜下观察乳化液，需保证油包水结构的粒径<5μm 的占比超 90%，粒径过大或分布不均会导致抗原释放不均，进而造成动物个体间模型症状差异大，影响实验重复性。

乳化流程图：



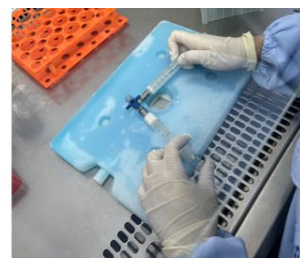
①



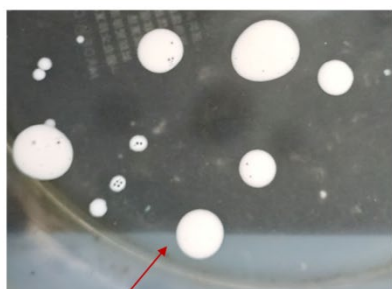
②



③



④



完全乳化：液体圆润，不扩散



未充分乳化：液滴铺展，边缘扩散

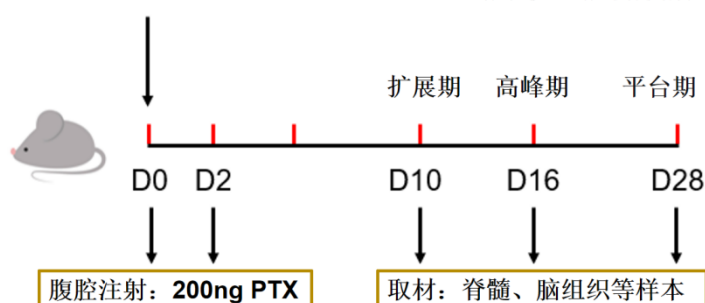
(4) 麻醉小鼠：使用异氟烷麻醉小鼠

(5) EAE 造模：首先对麻醉后小鼠剃毛，在背部脊椎两侧皮下区域（避免刺入肌肉层）四点各注射 50 μ L 乳液（确保皮下形成一个球状肿块，该肿块应在整个实验过程中持续存在），共 200 μ L（总量 200 μ g）。免疫当天（D0）和免疫后 48 小时（D2）各腹腔注射 1 次 PTX，每次 200 ng /只。

注意：在小鼠尾根部进行颜色标记，可以轻松识别个体小鼠以进行每日评估。当小鼠临床评分 ≥ 2 分（出现后肢无力）时，应在笼底放置软食和饮水瓶，确保其可轻松获取。



皮下注射乳剂：200 μ g MOG₃₅₋₅₅+ FCA（含高浓度热灭活结核分枝杆菌）



二、EAE 模型验证

EAE 模型的验证需通过临床评估、行为学、组织病理学、分子生物学等多维度进行，以下是系统的验证方法分类及操作要点。

(1) 临床评分验证

① 标准化评分系统 0-5 分量表（最常用）：从第 0 天开始，连续观察 30 天或更长时间。

评分标准：0 分：无症状。1 分：尾部无力或瘫痪。2 分：后肢无力。3 分：后肢瘫痪。4 分：四肢瘫痪。5 分：死亡。

② 体重监测：EAE 小鼠发病后常伴体重下降，与临床评分平行变化，可作为疾病进展的辅助指标。免疫后应每日称重并记录；当体重下降达基线 20% 或呈持续下降趋势时，须按伦理批件中预设的人道终点及时干预（必要时给予营养支持或安乐死）。

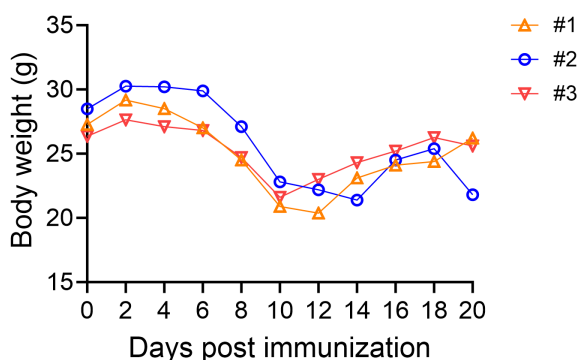


图 1：EAE 模型小鼠体重变化

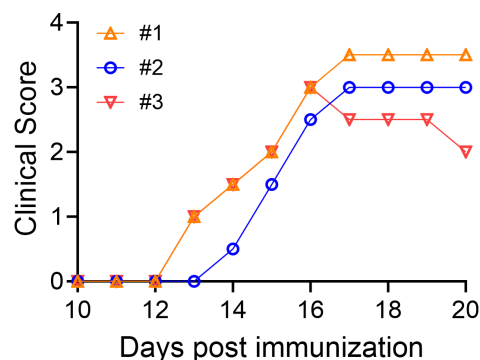


图 2：EAE 模型小鼠临床评分随时间变化

（2）组织病理学验证

①取材与处理

灌注固定：4%多聚甲醛灌注后取脊髓（腰膨大段）和脑组织。

切片制备：石蜡切片（5μm）或冷冻切片（10μm）。

②染色方法

染色类型	检测目标	结果判读
HE 染色(abs9217)	炎性细胞浸润	血管周围“袖套样”浸润（评分 0-3 分）
LFB 染色(abs90814)	髓鞘脱失	蓝染区域缺失百分比（ImageJ 定量）
免疫组化	小胶质细胞（Iba1）、星形胶质细胞（GFAP）	阳性细胞密度/活化形态

（3）分子生物学验证

①流式细胞术

细胞亚群分析：Th1（CD4+IFN-γ+）、Th17（CD4+IL-17+）、Treg（CD4+FoxP3+）。

样本来源：脾脏、淋巴结、中枢神经系统单细胞悬液。

②细胞因子检测

ELISA/液相芯片：促炎因子：TNF-α、IL-6、IL-17

抗炎因子：IL-10、TGF-β

qPCR：脊髓/脑组织中细胞因子 mRNA 表达。

③蛋白表达分析

Western Blot:

炎症通路蛋白：NF-κB p65、pSTAT3

神经保护标志物：BDNF、NGF

（4）行为学检测（可选）

可通过转棒实验评估运动协调能力衰退。如需评估伴随的抑郁样行为，可进行强迫游泳或悬尾实验。

三、模型成功标准与评价体系

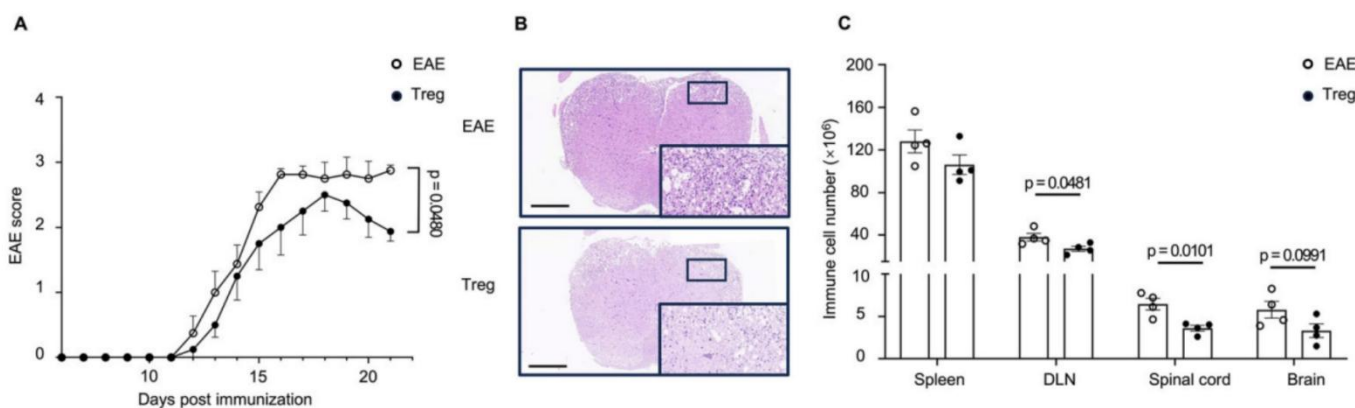
基础标准：通常在免疫后 10-14 天开始发病，发病率>80%（临床评分≥1）；组织病理学可见明确的炎性细胞浸润和髓鞘脱失。

高级标准：行为学异常（Rotarod 时间降低 50%）；分子标志物：Th17 比例升高 2 倍，CNS 中 IL-17 水平显著升高。

注：在实际研究中，我们不仅看发病率，还会关注平均临床评分和疾病累积积分。一个稳健的模型，其平均临床评分通常会稳步上升，并稳定在一个较高的水平（例如 2-3.5 分，即出现后肢瘫痪）。

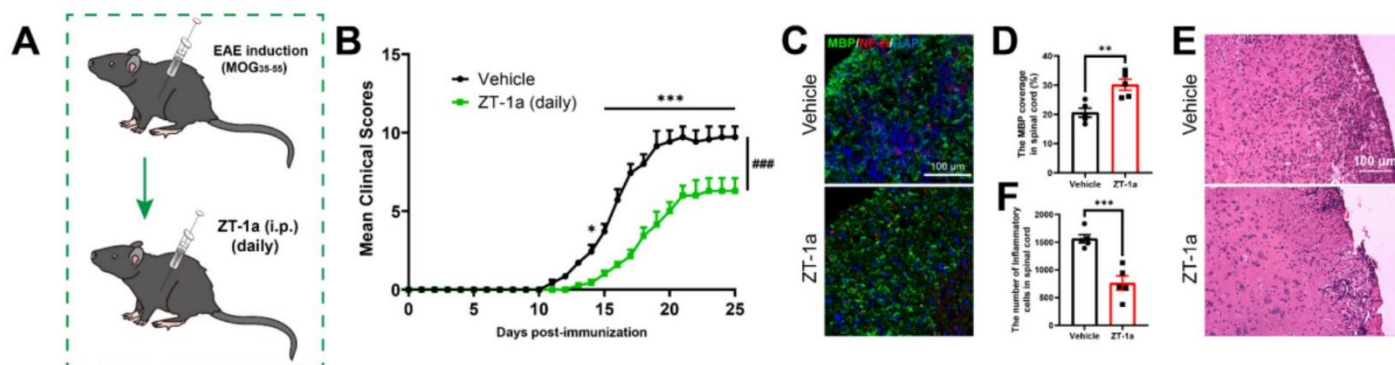
四、实验结果

应用实例 1：PTX 构建 C57BL/6 小鼠 EAE 模型，验证抗原特异性调节性 T 细胞（Treg）过继治疗是否能促进 Th17 细胞的生成。



引用文献：Nat Commun. 2025 Aug 16;16(1):7644. IF:15.7

应用实例 2：PTX 构建 C57BL/6 小鼠 EAE 模型，揭示 SPAK 信号通过调控脉络丛屏障驱动 MS 病理的核心作用，并为 SPAK-NKCC1 抑制剂治疗 MS 提供了临床前证据。



引用文献：J Neuroinflammation. 2025 Mar 13;22:80. IF:9.3

五、常见问题解答

Q1：造模后无明显症状是什么原因？

A1：EAE 模型诱导的成功率受多种因素的影响，包括小鼠的种类和性别、百日咳毒素的剂量、佐剂的使用以及丰富的实验基础和建模经验。此外，在特定应用中，每个批次都要确定最佳剂量。根据经验，造模后无明显症状最可能的原因是抗原与佐剂未充分乳化，判断是否乳化完全可参考说明书“乳化质量严格验证”排查原因。

Q2：注射部位鼓包异常巨大或多个鼓包融合成一大片。

A2：注射过浅（如误入皮内）会导致局部组织严重坏死，乳剂无法被有效递呈。应严格确保进行的是皮下注射，并在注射后观察是否形成了典型的“水泡”（通常直径几毫米），这是判断注射深度是否合适的最直观标志。

Q3: 注射点看不到任何局部反应。

A3: 注射过深（误入肌肉）无法有效地、持续地刺激局部的抗原递呈细胞和引流淋巴结。应严格确保进行的是皮下注射，并在注射后观察是否形成了典型的“水泡”（通常直径几毫米），这是判断注射深度是否合适的最直观标志。

Q4: 死亡率高

A4: 可能是 PTX 过量或感染，可降低 PTX 剂量，严格无菌操作。

Q5: 病理结果阴性

A5: 可能是取材时间过早，建议延至发病峰值（免疫后 18-21 天）

Q6: PTX 复溶后呈浑浊状且未完全溶解，会影响实验结果吗？

A6: 这属于正常现象，产品可正常使用。使用百日咳毒素实现最佳效果的几点注意事项如下：①严格按照产品说明书复溶百日咳毒素；②用移液管将复溶后的百日咳毒素溶液轻轻吸入再排出（放回产品瓶中），进行混匀；③混匀时吸出溶液时，沿瓶内壁轻轻移液，确保所有毒素从玻璃瓶内壁释放，因为蛋白质可能会吸附在玻璃表面；④每次取样前，务必按上述方法轻轻混匀，确保每次都能获得均匀混悬液；⑤请勿对百日咳毒素溶液进行涡旋振荡或超声处理；⑥请勿对本产品进行无菌过滤，否则会导致蛋白质损失。

Q7: 有操作视频可以参考吗？

A7: 有的，我们已为您提供详细的操作视频和讲座指导。可通过以下两种方式观看：

1. 官网观看：登录爱必信（Absin）官网，进入对应产品页面，在“技术文章与解决方案”板块中查找并在线观看。
2. 公众号观看：关注“爱必信”官方微信公众号，在对话框输入关键词“EAE”，即可获取相关视频内容。

参考文献：

- [1] Cheng H, Nan F, Ji N, et al. Regulatory T cell therapy promotes TGF- β and IL-6-dependent pro-inflammatory Th17 cell generation by reducing IL-2. *Nat Commun.* 2025;16(1):7644. Published 2025 Aug 16.
- [2] Ge Y, Guan H, Li T, et al. Discovery of Yersinia LcrV as a novel biased agonist of formyl peptide receptor 1 to bi-directionally modulate intracellular kinases in triple-negative breast cancer. *Acta Pharm Sin B.* 2025;15(7):3646-3662.
- [3] Qi C, Wang Y, Li X, et al. Target inhibition of SPAK in choroid plexus attenuates T cell infiltration and demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation.* 2025;22(1):80. Published 2025 Mar 13.
- [4] Wang Z, Zhang Y, Chai J, Wu Y, Zhang W, Zhang Z. Roflumilast: Modulating neuroinflammation and improving motor function and depressive symptoms in multiple sclerosis. *J Affect Disord.* 2024;350:761-773.
- [5] 谢名宗,王响,何静文,等.参茸复方对自身免疫性脑脊髓炎小鼠 DOR- β -arrestin1-Bcl-2 信号通路的影响[J].

中药材, 2023, 46(9):2284-2290.

[6] 王伟伟.神经肽受体 GPR103 信号转导机制研究[D].浙江大学[2025-11-25].

[7] Wang W, Tian Y, Shi X, et al. N-glycosylation of the human neuropeptide QRFP receptor (QRFP) is essential for ligand binding and receptor activation. J Neurochem. 2021;158(2):138-152.

[8] 王莉,郑润璞,叶滕倩,等.雷帕霉素对小鼠实验性变态反应性脑脊髓炎大脑小胶质细胞活化的影响[J].中国临床神经科学, 2019, 27(2):6.DOI:CNKI:SUN:LCSK.0.2019-02-004.

相关产品推荐:

货号	品名	主要作用	规格
abs815889	MOG(35-55)	EAE 模型抗原	5mg
abs45152261	[Ser140]-PLP (139-151)	EAE 模型抗原	5mg
abs45153151	PLP (139-151)	EAE 模型抗原	1mg
abs45152963	PLP (178-191)	EAE 模型抗原	5mg
abs45152786	MBP (69-88)	EAE 模型抗原	1mg
abs45131577	MBP(1-11)	EAE 模型抗原	5mg
abs90351	弗氏完全佐剂（EAE 专用）	免疫佐剂	10mL
abs9270	弗氏完全佐剂	免疫佐剂	10mL
abs9271	弗氏不完全佐剂	免疫佐剂	10mL
abs962	PBS 缓冲液（1×）	PTX&抗原稀释液	500mL
abs9217	苏木素-伊红（HE）染色试剂盒	病理染色（观察炎性细胞浸润）	100mL
abs90814	Luxol Fast Blue 髓鞘染色液	病理染色（观察髓鞘脱失）	50mL×3