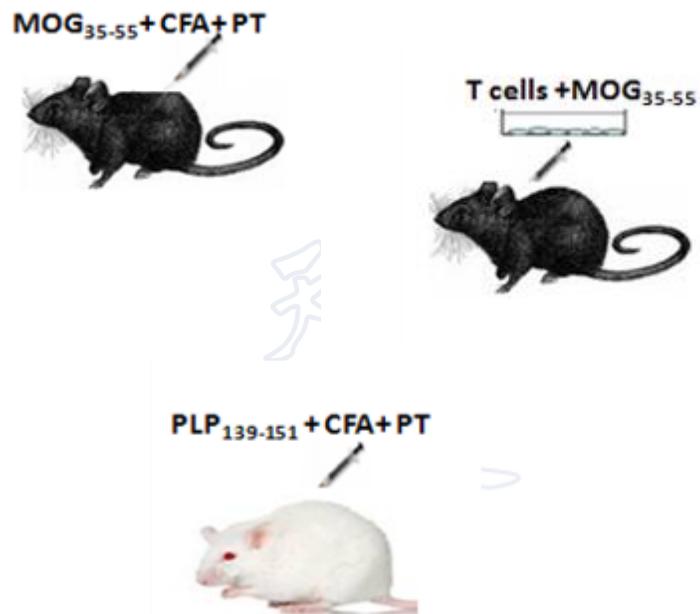




EAE模型诱导和细胞培养

张颖 20220519

实验性自身免疫性脑脊髓膜炎小鼠模型 (EAE)



实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 是一种以特异性致敏的CD4⁺T细胞介导为主的, 以中枢神经系统内小血管周围出现单个核细胞浸润及髓鞘脱失为特征的自身免疫性疾病, 是人类多发性硬化 (MS) 的理想动物模型, 在临床神经免疫学的研究具有重要意义。

实验动物及试剂的选择



实验动物：C57 8-10周 雌性小鼠

实验试剂：① 抗原的选择：MOG₃₅₋₅₅多肽

MOG可激活体内 T 细胞，使之穿过血脑屏障，攻击自身神经髓鞘的MOG抗原，从而导致中枢神经白质脱髓鞘，引起EAE。

②佐剂的选择：完全弗氏佐剂

抗原佐剂为非特异性免疫增强剂，它可改变抗原的物理性状，延长抗原在体内的储留时间，刺激抗原提呈细胞及淋巴细胞，从而增强和扩大免疫应答效果，它还能引起迟发性血脑屏障通透性增加和自身免疫反应。

③百日咳菌素（PT）的选择

百日咳毒素毒素能增加血管壁的通透性和血管表面粘附分子的表达，有利于致敏的T细胞透过血脑屏障，攻击神经髓鞘，造成对脑、脊髓组织的免疫损伤。

具体试剂信息



	厂家	货号	
肽段	南京金斯瑞	-	
不完全弗氏佐剂	BD	263910	
PT	Listlab	LISTBio#181	
TB	BD	231141	

MOG35-55: 10mg/支, 以 1ml 无菌 DDW 溶解, 浓度为 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$

CFA+TB: 一支 TB 粉末 100mg, 溶于两支 AIF (20 ml) 中, 浓度为 $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$

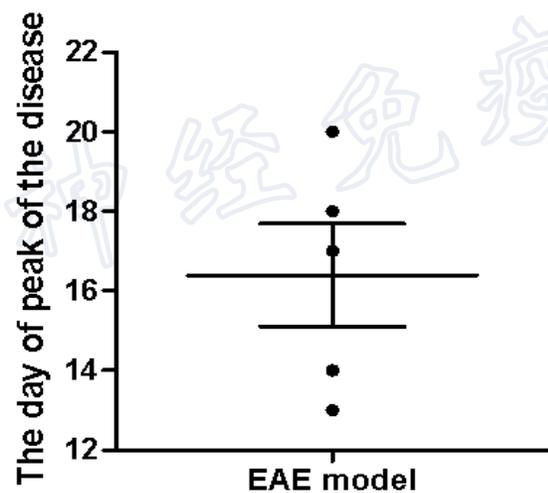
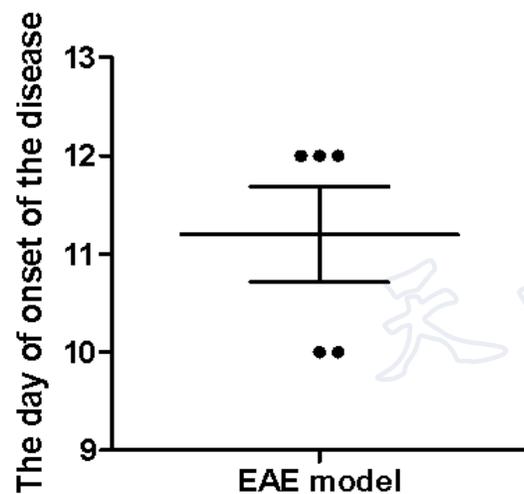
PT: 购买 PT 为 $50\mu\text{g}$ 每瓶, 加 $500\mu\text{l}$ 无菌 DDW, 浓度: $100\text{ng}/\mu\text{l}$

模型制备方法



- ① 乳化抗原 两实验人员配合，快速来回推送注射器针栓 1 小时以上，该操作于冰上进行。乳化完，取一器皿如培养皿盛放自来水，拧下一注射器，滴加乳剂于水上，观察乳剂是否快速弥延散。若弥散，应长乳化时间。若无弥散，则为“油包水”状态，可用于免疫动物。
(开始时阻力会非常大)
- ② PT 注射液准备: 按 200 μ l/只小鼠，计算免疫所需体积，因针头残留等原因，实际准备体积 v 应大于所需体积。将上述准备好的 PT 溶液用 PBS 稀释 100 倍，置于 15ml 离心管中。将稀释后的 PT 包裹锡箔纸避光，置于冰上备用。
- ③ 免疫小鼠 麻醉、编号：水合氯醛麻醉，腹腔注射(左)，marker 笔标记尾巴。2) 腹腔注射 PT 200 μ L (右) 3) 将 1ml 注射器连于三通管，推送 10ml 注射器将乳剂推送至 1ml 注射器。注意控制用力，防止注射器滑脱。于两后肢连线及两前肢连线与后正中中线交点部皮下各注射 100 μ l 乳化的抗原。注射后局部应有凸起。4) 48h 后，再次免疫，腹腔注射 PT 200 μ l。

发病时间及发病高峰统计



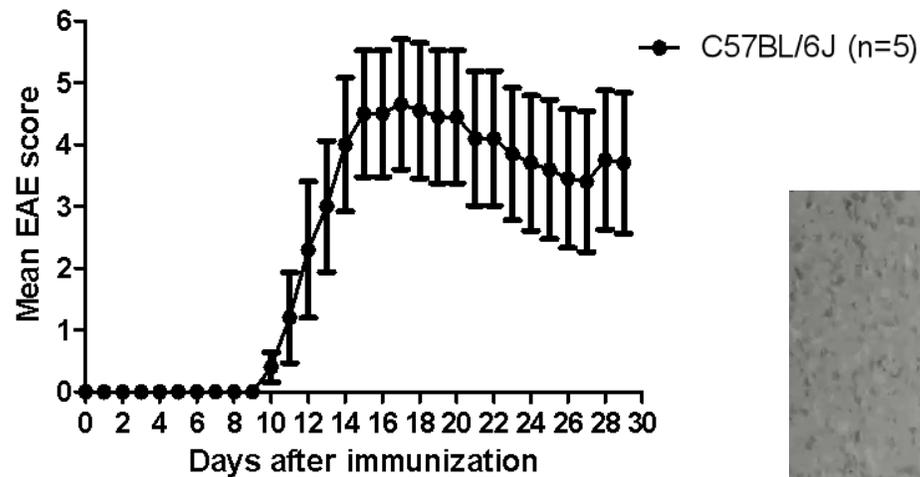
1. 开始发病集中在免疫接种后的第10天至第12天。
2. 发病高峰期在第17天左右，发病周期约为30天。

评分标准



Clinical score :

0=没有行为变化	
1. 0=尾巴瘫痪	
2. 0=后肢轻度瘫痪	
3. 0=后肢完全瘫痪	
4. 0=四肢完全瘫痪	
5. 0=濒死的	



EAE是由针对CNS髓鞘发生免疫攻击的CD4+T介导的自身免疫性疾病，抗原致敏的T细胞穿过血脑屏障进入中枢，诱发对自身髓鞘抗原的免疫应答，导致脑及脊髓的免疫损伤。EAE是人类MS的经典动物模型，通过对EAE发病机制、病情发生发展规律、临床及病理改变、治疗及预防等方面的深入研究，能够为MS的治疗提供充分的实验依据。

细胞培养的概念



细胞培养 (cell culture) 是指在体外模拟体内环境 (无菌、适宜温度、酸碱度和一定营养条件等), 使之生存、生长、繁殖并维持主要结构和功能的一种方法。细胞培养也叫细胞克隆技术, 在生物学中的正规名词为细胞培养技术。不论对于整个生物工程技术, 还是其中之一的生物克隆技术来说, 细胞培养都是一个必不可少的过程, 细胞培养本身就是细胞的大规模克隆。细胞培养技术可以由一个细胞经过大量培养成为简单的单细胞或极少分化的多细胞, 这是克隆技术必不可少的环节, 而且细胞培养本身就是细胞的克隆。细胞培养技术是细胞生物学研究方法中重要和常用技术, 通过细胞培养既可以获得大量细胞, 又可以借此研究细胞的信号转导、细胞的合成代谢、细胞的生长增殖等。

细胞培养的基本要求和细胞生存条件



一. 培养操作基本要求

1. 无菌操作

① 操作台消毒：紫外线灯30分钟

② 洗手和着装：75%酒精

③ 操作过程中的耗材和试剂：无菌

二. 培养环境

1. 温度：37°C

2. 气体环境和酸碱度：95%空气+5%CO₂ PH值为7.2~7.4

3. 生存所需基本物质：糖、氨基酸、促生长因子、其他物质

4. 渗透压：等渗

5. 培养基：天然培养基和合成培养基



细胞培养的分类



一. 原代培养

1. 概念：是从工体获取组织后的首次培养。原代培养中的细胞在接种之后可能经过多次细胞分裂活动而产生多个子细胞。

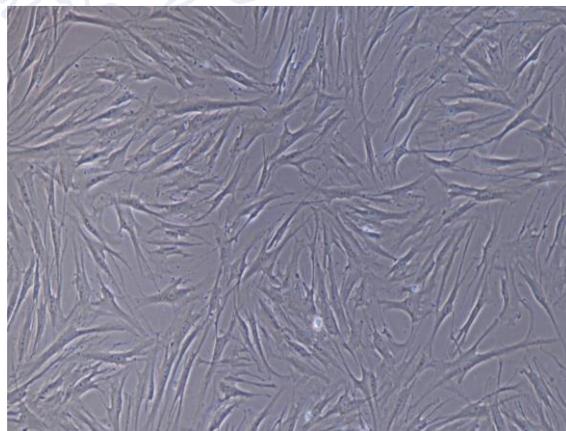
2. 方法：消化法

贴块法

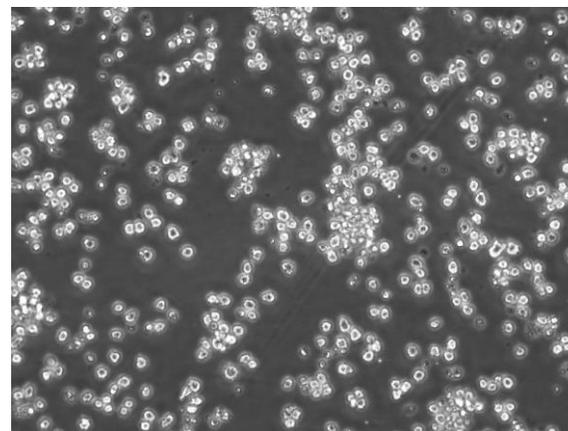
二. 传代培养

1. 贴壁依赖性细胞

2. 悬浮培养细胞



牙髓干细胞



T细胞

以牙髓干细胞为例

消化法：

1. 准备：紫外线消毒超净台半小时
2. 处理组织：用生理盐水洗几次
3. 剪切：在培养皿盖子上剪切成2~3mm
4. 消化：加入消化酶，在37°C 5%CO₂培养箱中，大概消化45分钟，每15分钟拿出来轻弹几下
5. 过筛：100um的网筛除去小块组织和残渣
6. 离心、接种、培养

贴壁依赖性细胞：

1. 吸出旧培养液
2. 润洗一次：无菌PBS冲洗
3. 消化：加入1ml胰酶放入培养箱中，2分钟，当细胞变圆，间隙增大时可终止消化
4. 吸出消化液，直接加入培养基，反复吹打，但是不能用力过猛
5. 分装冻存或继续培养

细胞冻存和复苏



一. 要点：慢冻快融

冻：梯度降温

融：37°C水浴箱快速复苏

二. 原理：10%的DMSO或甘油

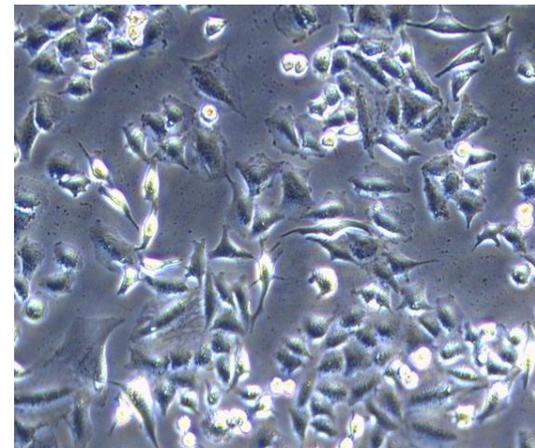
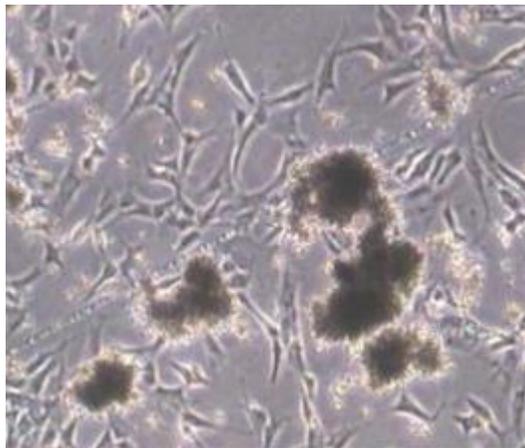
三. 冻存环境：-80°C或者液氮中



细胞培养中常见的污染



1. 真菌污染：白色或浅黄色点漂浮于培养液表面，镜下观察为丝状、管状或树枝状菌丝
2. 细菌感染：清澈透明变为浑浊，橙红色变为黄色
3. 支原体感染：常来源于血清，0.2~2微米，使细胞增殖缓慢、部分细胞变圆、从瓶壁脱落。有些微细变化会由于传代和换液而被缓解。
4. 病毒污染





天坛神经免疫中心

谢谢收听!