



Cholera Toxin B subunit 霍乱毒素 B 亚基

产品简介

霍乱毒素 B 亚单位(Cholera Toxin Subunit B, 简称 CTB)是霍乱肠毒素的重要组成部分,而霍乱肠毒素是霍乱弧菌分泌的主要致病因子。天然霍乱毒素采用 AB5 毒素结构模式,由一个具有酶活性的 A 亚单位和五个相同的 B 亚单位非共价结合形成的环状五聚体。该产品为重组形式,通过基因工程技术单独表达 B 亚单位,完全不含具有毒性的 A 亚单位,既保证了实验安全性,又不影响其功能特性。

CTB 的核心功能机制在于其能够特异性识别和结合细胞膜上的 GM1 神经节苷脂(monosialotetrahexosylganglioside)。GM1 神经节苷脂是一种广泛分布于真核细胞膜上的糖鞘脂,特别在神经元胞体、树突以及上皮细胞表面富集。CTB 与 GM1 的结合具有高度亲和力和特异性,这种结合特性是其多种应用场景的分子基础。CTB 可以在不引起细胞毒性反应的前提下,利用 CTB 的膜结合能力进行多种研究。

产品应用: 神经元逆行示踪剂、免疫佐剂、标记细胞膜上的脂筏

CTB 是公认的强效黏膜免疫佐剂。其作用机制在于: CTB 结合黏膜上皮细胞表面的 GM1 后,能够促进共价或非共价偶联的抗原被上皮免疫细胞(如 M 细胞、树突状细胞)摄取和呈递,同时诱导黏膜局部产生 IL-4、IL-10 等 Th2 型细胞因子,从而显著增强黏膜 IgA 抗体应答和系统性体液免疫。基于此特性,CTB 已被广泛应用于口服、鼻腔或舌下途径的疫苗递送研究,能够有效提高抗原的免疫原性,且安全性优于完整的霍乱毒素(CT)。

起初 CTB 作为非荧光示踪剂被应用于逆行示踪技术中,荧光结合形式 CTB 的出现让其逐渐转变为一种常用的荧光示踪剂,如 FITC-CTB(#FS1488)是用异硫氰基荧光素(FITC)标记的 CTB 产品。此外,我们还可以定制 AF488/AF594/AF647 等小分子荧光素标记的 CTB。

产品组成

名称	编号	FS1487	FS1487	Storage
Cholera Toxin B subunit 霍乱毒素 B 亚基		500ug	1mg	-20℃
使用说明书		1 份		

产品特性

CAS: 131096-89-4

中文名称: 荧光素标记的霍乱毒素 B 亚基;异硫氰基荧光素标记的霍乱毒素 B 亚基

英文名称: Fluorescein CTB, FITC CTB, Fluorescein Cholera Toxin Subunit B, FITC Cholera Toxin Subunit B, CTxB, Choleragenoid

分子量: 11.8kDa(还原)

形式: 重组型

外观: 粉末

叠氮化钠: 未添加



内毒素: $<0.2\text{EU}/\mu\text{g}$

纯度: 经 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 检测, 纯度 $>95\%$

储存及运输条件: 固体粉末, -20°C 储存, 有效期 5 年。使用前用无菌 $1\times\text{PBS}$ (PH7.4) 溶解成 1mg/mL 的储存液, 分装后于 -20 至 -80°C 保存, 有效期 6 个月。 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 1 周。避免反复冻融。

使用方法

一、神经元逆行示踪剂

1.1、CTB 试剂配制与储存

使用前取 1mg CTB 粉末, 加入 $100\mu\text{L}$ 无菌 $1\times\text{PBS}$ (PH7.4), 轻柔涡旋混匀, 避免剧烈震荡 (防止蛋白结构破坏), 配置成 10mg/mL (或配制 1% CTB 溶液 w:v) 的储存液, 于 -20 至 -80°C 分装保存, 避免反复冻融。

1.2、动物手术与 CTB 注射

立体定位: 将动物头部固定于立体定位仪上。

注射位点: 目标核团 (以 CSF-contact nucleus 为例), 需提前根据脑图谱确定精确的三维坐标。

注射体积: $0.2\mu\text{L}$ 。

注射浓度: 1% CTB 溶液。

注射工具: 使用 Hamilton 微量注射器 (33G 针头) 连接微量注射泵进行控制。

注射速度: 缓慢注射, 全程约 30 分钟。

针头停留: 注射完成后, 针头在原位停留 10-15 分钟, 然后缓慢退出, 以减少溶液沿针道回流。

1.3、灌注取脑与切片

存活期: 注射后让动物存活 7-10 天, 以保证 CTB 被神经元充分摄取并逆向运输至胞体。

灌注固定: 再次麻醉动物。先经心脏灌注 300mL 预冷的 $1\times\text{PBS}$ (PH7.4) 冲洗血液。紧接着灌注 300mL 4% 多聚甲醛 (溶于 $1\times\text{PBS}$, pH 7.4) 进行固定。

取脑与切片: 取出完整脑和脊髓, 在冷冻切片机上进行冠状切片, 片厚 $40\mu\text{m}$ 。收集切片于 PBS 或防冻液中备用。

1.4、免疫荧光染色

封闭与通透: 使用含 0.3% Triton X-100 的 $1\times\text{PBS}$ (PH7.4) 作为抗体稀释液和洗涤液, 以通透细胞膜并减少非特异性结合。

一抗孵育: 将脑片在 4°C 下孵育 48 小时。

二抗孵育: 用荧光标记的二抗, 将脑片在室温下避光孵育 2 小时。

细胞核复染: 使用 DAPI 对细胞核进行染色, 便于定位。

封片与观察: 甘油封片, 在荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察。CTB 阳性信号为绿色荧光 (FITC)。

1.5、图像采集与分析

采集: 使用 $10\times$ 物镜观察并定位阳性神经元分布区域, 使用 $40\times$ 物镜观察神经元细节形态。

分析: 使用 Image-Pro Plus 等软件定量分析特定脑区内 CTB 阳性神经元的密度 (个/ 0.2mm^2)。

三维重建: 可将阳性神经元的位置信息在标准脑图谱上配准, 使用 Imaris 等软件进行三维可视化重建。

二、免疫佐剂

2.1、溶液配置: 使用前取 CTB 粉末, 缓慢加入 $1\times\text{PBS}$ (PH7.4), 轻柔涡旋混匀, 避免剧烈震荡 (防止蛋白结构破坏), 配置成 1mg/mL 储存液, 于 -20 至 -80°C 分装保存, 正式实验前再用 PBS 稀释。

2.2、佐剂-抗原比例: 可根据不同抗原类型调整, 核心原则为 “佐剂剂量不超过抗原剂量的 1 倍” (需预实验优化比例, 混合溶液建议现配现用)。

2.3、使用浓度与剂量 (以口服免疫为例): 单只小鼠单次剂量: $10\mu\text{g}$ /只 (文献报道与 $15\mu\text{g}$ HA 的 H9N2



WIV 联合免疫)。按 100 μ L/只 给药体积计算, CTB 终浓度为 100 μ g/mL。免疫间隔: 0 天、7 天、14 天 (共 3 次免疫)。

三、脂筏标记

细胞膜脂筏的标记可以直接使用 CTB-FITC (#FS1488, 1mg/mL) 进行标记, 方法如下:

以下方案适用于对 1 个 2 mL 体系、浓度为 1×10^6 个/mL 的悬浮活细胞样本进行标记。对于在 18 mm $\times$ 18 mm 盖玻片上生长至亚汇合度 (70%-80%) 的贴壁细胞, 也可使用相同体积的试剂进行标记。若需标记多个样本, 可按比例扩大试剂用量; 若孵育体积小于 2 mL, 可按比例减少试剂用量。

3.1、细胞洗涤: 将细胞离心, 用预冷的 1 $\times$ PBS (PH7.4) 轻轻重悬细胞沉淀。

3.2、CTB 孵育条件

浓度优化: CTB-FITC (#FS1488, 1mg/mL) 推荐工作浓度 5-10 μ g/mL (不同细胞类型最适浓度有差异, 需预实验确定, 过高浓度增加背景), 工作液可用无菌 1 $\times$ PBS 稀释 (PH7.4)。

孵育时间与温度: 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟 (减少内吞作用, 保持膜表面 GM1 标记)。若需标记内化 GM1, 可改为 37 $^{\circ}$ C 孵育 15-30 分钟。孵育结束后, 用预冷的 1 $\times$ PBS (PH7.4) 轻轻洗涤细胞数次。

避光操作: CTB-FITC 对光敏感, 全程避光。

3.3、封片与观察标记细胞

若细胞无需用醛类固定以进行长期储存, 也无需固定后用去污剂透化以进行后续标记步骤, 则可直接进行此步骤; 否则跳过此步骤, 继续进行步骤 3.4。将细胞置于预冷的 1 $\times$ PBS (PH7.4) 中封片, 使用合适的滤光片组通过荧光显微镜观察细胞。

3.4、固定 (可选): 将细胞置于含 4% 甲醛的预冷 1 $\times$ PBS (PH7.4) 中, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下固定 15 分钟, 避免醛类过度交联破坏脂筏结构。甲醇/丙酮等有机溶剂固定会溶解脂筏, 不可使用。若细胞无需去污剂透化, 可直接进行步骤 3.6。

洗涤: 固定后用 1 $\times$ PBS (PH7.4) 轻柔洗涤 3 次, 防止脂筏破坏。

3.5、透化细胞 (可选): 脂筏的标记不建议透化处理, 如实验中无法避免透化, 可尝试将固定后的细胞置于含 0.1% Saponin 的 1 $\times$ PBS (PH7.4) 中, 在室温下透化 10 分钟。透化结束后, 用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞 1 次。

3.6、封片与观察固定后的细胞: 使用适宜的封片剂 (如#FSM0032) 对固定后的细胞 (或固定并透化后的细胞) 进行封片, 然后使用合适的滤光片组通过荧光显微镜观察细胞。

注意事项

- 1) 荧光染料都存在淬灭问题, 操作或保存过程中尽量避光, 减缓荧光淬灭。
- 2) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

相关产品

产品货号	产品名称	规格
FS1487	Cholera Toxin B subunit 霍乱毒素 B 亚基	500ug
FS1488	Cholera Toxin B subunit-FITC 霍乱毒素 B 亚基-FITC 标记绿色荧光	100ug
FS1489	Cholera Toxin B subunit-AF488 霍乱毒素 B 亚基-AF488 标记绿色荧光	100ug
FS1490	Cholera Toxin B subunit-AF594 霍乱毒素 B 亚基-AF594 标记绿色荧光	100ug
FSH055	1 $\times$ PBS 细胞培养级 (PH7.4)	500ml
FSM0032	抗荧光淬灭封片剂	5ml