

遗传霉素储存液 (50mg/ml)

产品货号: K10045

产品规格: 1ml/5ml/1ml×5

产品简介:

G418 Sulfate (G418硫酸盐), 也称作Geneticin (遗传霉素), 是一种结构类似于庆大霉素B1 (Gentamycin B1) 的氨基糖苷类抗生素, 通过影响80S核糖体功能和阻断延伸步骤来干扰蛋白合成, 对原核和真核等细胞都有毒性, 包括细菌、酵母、高等植物和哺乳动物细胞, 也包括原生动物和蠕虫。其抗性基因 (主要为neo基因) 位于转座子Tn601 (903) 或Tn5 (来源于细菌), 但是可以在真核细胞中表达。通过基因重组技术将这些抗性基因导入细胞, 使其获得对G418的耐药性, 从而用来筛选和维持培养携带抗性基因的原核或者真核细胞。哺乳动物细胞中, 当抗性基因neo被整合进真核细胞基因组后, 使其编码表达氨基糖苷磷酸转移酶 (amino-glycoside 3'-phosphotransferase, APH(3')II)。此酶通过共价修饰G418的氨基或羟基功能, 抑制抗生素-核糖体间的相互作用, 从而使得抗生素失活。这一特性赋予细胞产生抗性。稳转细胞株筛选实验, 需要建立杀灭曲线 (剂量反应曲线) 确定杀死无抗性细胞的最低有效浓度。植物细胞中, 通过转染携带nptII基因的抗性质粒繁育其抗性。nptII基因也能编码表达氨基糖苷磷酸转移酶, 这个酶使得多种抗生素丧失活性, 包括G418, 卡那霉素和巴龙霉素。

产品组成:

产品名称	规格	保存条件
遗传霉素储存液 (50mg/ml)	1ml/5ml/1ml×5	-20°C, 避光

使用方法:

1. G418储存液的配制 (50mg/mL, 活性浓度):

1) 活力单位的换算 根据此公式进行换算: $(1000/A_0) \times A_1 = A_2$, 其中A₀是G418的活力值 (Potency), 因批次而异。可见批次对应的质检报告, 或者瓶子上的标签。A₁是想配制的活性G418浓度。A₂是实际称重的粉末与体积比浓度。比如若所用批次的G418活力值为: 750U/mg, 要配制50mg/mL的G418活性浓度, 则实际要配制的粉末浓度为 $1000/750 \times 50 \text{mg/mL} = 66.33 \text{mg/mL}$ 。如果配制10mL的G418储存液 (活性浓度, 50mg/mL), 则需要称取663.3mg粉末。

2) 除菌和保存 根据上述换算得到的实际粉末称重量, 加入10mL无菌去离子水内使其完全溶解。先用5mL无菌去离子水预湿润0.22μm针头式过滤器, 除尽水。之后使用此过滤器过滤, 除菌后分装成单次使用的小量 (如1mL) 放到-20°C冻存, 1年稳定。

【注】①不要对混浊的溶液进行过滤, 因为混浊的溶液意味着未完全溶解, 过滤过程中会造成药物损失, 降低终液的活性。②不建议使用液体培养基, NaCl, 磷酸盐溶液或者有机溶剂来制备储存液。

2. 常用筛选浓度:

一般来说, 刚开始筛选转化子需要高浓度的G418, 并用一个较低浓度的G418用于维持培养。生长条件, 细胞类型和其他的环境因素都可能影响G418的用量, 因此第一次使用的实验体系建议通过杀灭曲线 (kill curve), 即剂量反应性曲线, 来确定最佳筛选浓度。通常情况, 哺乳动物细胞筛选范围200-2000μg/mL; 植物细胞: 10-100μg/mL; 酵母细胞: 500-1000μg/mL。

3. 杀灭曲线的建立

【注】为了筛选得到稳定表达目的蛋白的细胞株, 需要确定能够杀死未转染宿主细胞的抗生素最低浓度, 可通过建立杀灭曲线 (剂量反应曲线) 来实现, 至少选择6个浓度。处理分裂期的细胞时G418的活性最强, 因此在添加G418之前需要让细胞培养一段时间。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

- 1) 第一天：未转化的细胞按照20-25%的细胞密度铺在合适的培养板上，37°C，CO₂培养过夜；【注】对于需要更高密度来检测活力的细胞，可增加接种量。
 - 2) 根据细胞类型，设定合适范围内的浓度梯度。以哺乳动物细胞为例，可设定0，50，100，200，400，800，1000µg/mL。
 - 3) 第二天：去除旧的培养基，换用新鲜配制的含有相应浓度药物的培养基。每个浓度做三个平行孔。
 - 4) 接下来每3-4天更换新的含药物培养基。
 - 5) 按照固定的周期（如每2天）进行活细胞计数来确定阻止未转染细胞生长的恰当浓度。
选择在理想的天数（通常是7-10天）内能够杀死绝大多数细胞的最低浓度为稳定转染细胞筛选用的工作浓度。
4. 稳定转染细胞的筛选
- 1) 转染48h后，用含有适当浓度的G418筛选培养基来传代细胞（直接传代或者稀释后传代）。【注】细胞处于活跃分裂状态时抗生素的杀伤效果最好。则当细胞过于稠密，其效率会降低。为了得到较好的筛选效果，最好将细胞稀释至丰度不超过25%。
 - 2) 每隔3-4天更换含有药物的筛选培养液。
 - 3) 筛选7天后观察并评估细胞克隆（集落）的形成情况。集落的形成可能还需要一周或者更多的时间，这取决于宿主细胞类型，转染，以及筛选效果。
 - 4) 挑取并转移5-10个抗性克隆于35mm细胞培养板，继续用含药物的筛选培养液维持培养7天。
 - 5) 之后更换正常培养基培养即可。

注意事项：

1. 本品不可高压灭菌。
2. G418不要和其他的抗生素/抗真菌剂（如青霉素/链霉素）共同使用，因为它们是G418的竞争性抑制剂。其他的抗生素也会产生交叉活性。
3. 配制G418溶液时，一定要根据G418批次不同的活力值（potency）来进行换算，从而得到需要活性浓度的储存液以及工作液。

储存条件：-20°C避光保存，有效期3年。避免受潮，否则会降低抗生素活力。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com