

## M5 HiPure G-418 Sulfate 遗传霉素溶液 (50mg/ml) 即用型, 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPure G-418 Sulfate 遗传霉素溶液 (50mg/ml)即用型	2ml	MF368-T
M5 HiPure G-418 Sulfate 遗传霉素溶液 (50mg/ml)即用型	20ml	MF368-01

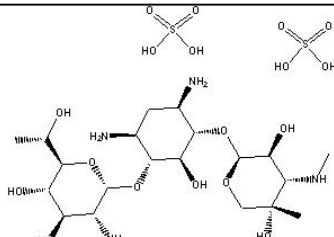
**【储存条件】** 冰袋运输。-20℃保存，避免反复冻融。

### 【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 基因的抗性质粒孵育其抗性。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。

### 【产品特性】

	G418 硫酸盐; 遗传霉素
<b>CAS 号 (CAS No.)</b>	108321-42-2
<b>分子式</b>	$C_{20}H_{40}N_4O_{10} \cdot 2 H_2SO_4$
<b>分子量</b>	692.7 g/mol
<b>纯度 (Purity)</b>	~98%
<b>结构式 (Structure)</b>	

### 【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，因为它们都是 G418 的竞争性抑制剂。其他的抗生素也会产生交叉活性。
- 3) G418 加入培养体系中未转染的细胞有可能不会被杀死，原因在于药物浓度过低，或者细胞密度过高。另外，快速分裂的细胞相对于缓慢增殖细胞，更容易被杀死。对照细胞 (未转染) 可能抗生素添加 5-7 天后才能杀死，转染细胞 (抗性克隆子) 的克隆需要 10-14 天形成。
- 4) 即使加入杀死剂量的 G418，细胞可能会继续分裂 2-3 次。G418 的药效通常在 2 天后才变得明显。
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**【操作步骤】****1. 常用筛选浓度**

通常，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 200-2000 µg/mL；植物细胞：10-100 µg/mL；酵母细胞：500-1000 µg/mL。

以下是一些细胞类型使用 G418 筛选使用的浓度，可做参考。

细胞类型	激活浓度	应用
网柄菌属	a) 10 µg/mL b) 30 µg/mL	a) 培养在培养液中 b) 培养在冻干细菌上
哺乳动物	a) 400 -1000 µg/mL b) 200 µg/mL	a) 用于筛选 b) 用于维持生长
植物	a) 25-50 µg/mL b) 10 µg/mL	a) 用于筛选 b) 用于维持生长
酵母	a) 500 µg/mL b) 125-200 µg/mL	a) 用于筛选 b) 用于维持生长
细菌	16 µg/mL	用于筛选

**2. 杀灭曲线的建立**

**注意：**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。

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，CO<sub>2</sub> 培养过夜。

**注意：**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, 1000 µg/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。

**3. 稳定转染细胞的筛选**

1) 转染 48 h 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）。

**注意：**细胞处于活跃分裂状态时抗生素的杀伤效果最好。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 35 mm 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。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。