

## G418 (遗传霉素)

Cat. No	产品名称	规格	储存条件	保质期
IMC-605-10 mL	G418 (遗传霉素)	50mg/mL*10 mL	-20℃	24 个月

### 产品简介

G-418 (Geneticin, 遗传霉素) 是一种结构类似于庆大霉素 B1 的氨基糖苷类抗生素, 在分子遗传试验中, 是稳定转染最常用的抗性筛选试剂。G-418 可以干扰 80S 核糖体的功能, 并影响真核细胞中蛋白质的合成, 主要用于哺乳动物、植物或酵母细胞的选择。G-418 对细菌、酵母、高等植物、哺乳动物细胞、原虫和蠕虫均有毒性, 其抗性基因为显性表型, 在 Tn601 (903) 和 Tn5 转座子上都有定位。虽然这个基因来源于细菌, 但也可以在真核细胞中表达。将抗性基因引入细胞可引起对 G-418 的抗性, 使细胞能够在含有 G-418 的培养基中生长。G418 的这一选择特性, 已广泛应用于基因转移、基因敲除、抗性筛选以及转基因动物等方面。

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。

G 418 与新霉素同为氨基糖苷类抗生素, 都可被 Neo 基因产物失活, 因此都可以用于筛选携带 Neo 抗性基因的细胞, 新霉素筛选的细胞都可以用 G418 替代。

### 产品信息

应用领域	细胞培养相关试剂
产品类别	细胞培养抗生素
产品外观	液体
原料来源	非动物源
无菌级别	过滤除菌

## 使用说明

### 一、建议使用浓度

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 维持培养。生长条件，细胞类型和其它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剂量反应性曲线(dose-response curve or kill curve)，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  $\mu\text{g/mL}$ ；植物细胞：10-100  $\mu\text{g/mL}$ ；酵母细胞：500-1000  $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1. 部分哺乳动物细胞的推荐工作浓度表

细胞名称	细胞类型	浓度
B16	Mouse melanocytes	400-1000 $\mu\text{g/mL}$
CHO	Chinese hamster ovarian cells	400-800 $\mu\text{g/mL}$
Hela	Human uterine cells	200-400 $\mu\text{g/mL}$
HEK293	Human embryonic kidney cells	200-500 $\mu\text{g/mL}$
THP-1	Human monocytes	250 $\mu\text{g/mL}$

### 二、遗传霉素剂量反应曲线的建立

遗传霉素的有效筛选浓度跟细胞类型、生长状态、细胞密度、细胞代谢及细胞所处细胞周期等因素相关。为了筛选得到稳定表达目的蛋白的细胞株，确定能够杀死未转染宿主细胞的遗传霉素最低浓度非常重要，对于初次使用的细胞，一般需要通过实验来确定适合自身实验体系的剂量反应曲线(dose-response curve or kill curve)，曲线建立时至少应设置 6 个遗传霉素浓度。遗传霉素处理分裂期的细胞时活性最强，因此在添加遗传霉素之前需要先将细胞培养一段时间。

a. 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：对于需要更高密度来检测活力的细胞，可增加接种量。

b. 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  $\mu\text{g/mL}$ 。

c. 第二天：去除旧的培养基，换用新鲜配制的含有相应浓度遗传霉素的培养基。每个浓度做三个平行孔。更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。

d. 接下来每 3-4 天更换新的含药物培养基。

e. 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的工作浓度。

### 3. 稳定转染细胞株的筛选

- a. 细胞转染 48h 后，将细胞置于含有适当浓度遗传霉素的新鲜培养基中培养，此为处理组。
- b. 注：当细胞处于分裂活跃期时，抗生素作用最明显。当细胞过于密集，抗生素产生的效力会明显下降，所以细胞的密度最好不超过 25%。建议同时做一个正常细胞的对照组。转染或感染 48 小时后，如果细胞过密也可以消化后重新接种细胞，培养过夜后即可进行遗传霉素筛选。每隔 3-4 天更换含有遗传霉素的培养液。
- c. 筛选 7 天后观察并评估细胞克隆(集落)的形成情况。对照组正常细胞应该 100%死亡，处理组中存活的细胞为表达 neo 基因的细胞。根据宿主细胞种类和转染/筛选效率不同，集落的形成可能需要一周或者更多的时间。
- d. 克隆形成后，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。
- e. 之后更换正常培养基培养即可。

#### 注意事项

1. 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)可能在添加抗生素 5-7 天后才能被杀死，转染细胞(抗性克隆子)的克隆需要 10-14 天形成。
2. 即使加入有效剂量的 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。
3. 本产品可能对人体有一定的毒害作用，请注意适当防护，以避免直接接触人体或吸入体内。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。