

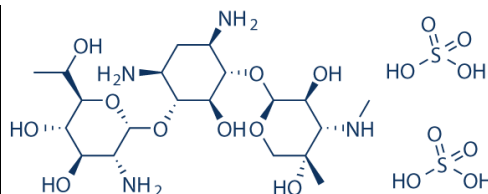
G418 (遗传霉素)

产品编号	产品名称	包装
ST081-1ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×1ml
ST081-5ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×5ml
ST081-1g	G418 (遗传霉素)	1g
ST081-5g	G418 (遗传霉素)	5g

产品简介:

- G418 Sulfate (G418硫酸盐), 也称作Geneticin (遗传霉素)、G418、G 418或者G-418, 是一种结构类似于庆大霉素B1 (Gentamycin B1)的氨基糖苷类抗生素, 来源于Micromonospora rhodorangea, 常用于筛选表达neo基因的真核或原核多克隆或单克隆细胞。G418不仅用于稳定细胞株的筛选, 也用于稳定细胞株的维持。本产品的50mg/ml包装经过过滤除菌, 可以直接用于细胞培养。
- 在细菌、酵母、原生动物、蠕虫、高等植物和哺乳动物中, 遗传霉素通过抑制蛋白合成而抑制或杀死细胞。其作用机制为遗传霉素能够与70S和80S核糖体结合, 从而阻断肽链延伸, 干扰蛋白合成。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), 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, 使细胞表达抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶(amino-glycoside 3'-phosphotransferase, *APH(3)II*), 从而获得对G418的耐药性, 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, 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而能在含有G418的选择性培养基中生长。进行稳转细胞株筛选实验时, 需要建立剂量反应曲线(dose-response curve or kill curve)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。
- 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。
- 化学性质

化学名	(2S,3S,4S,5S)-2-[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3-amino-4,5-dihydroxy-6-(1-hydroxyethyl)oxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyclohexyl]oxy-5-methyl-4-(methylamino)oxane-3,5-diol;sulfuric acid
化学式	C ₂₀ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ ·2H ₂ SO ₄
分子量	692.71
CAS号	108321-42-2
纯度	~98%



- 本产品50mg/ml包装为水溶液, 经0.22μm滤膜过滤除菌, 可以直接用于细胞培养。本产品1g和5g包装为粉末装。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
ST081-1ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×1ml
ST081-5ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×5ml
ST081-1g	G418 (遗传霉素)	1g
ST081-5g	G418 (遗传霉素)	5g
—	说明书	1份

保存条件:

粉末装4℃保存, 长期保存可置于-20℃, 避免受潮, 至少三年有效, 溶液装-20℃保存避免反复冻融。

注意事项:

- 本品不可高压灭菌。
- G418不要和其它抗生素/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。其它的抗生素也会产生交叉活性。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. G418储存液的配制(50mg/ml，活性浓度)

a. 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 A_0 是G418的活力值(Potency)，因批次而异，具体见瓶子的标签。 A_1 是想配制的活性G418浓度。 A_2 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：750 μ g/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 50mg/ml=66.33mg/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。

b. 除菌和保存

根据上述换算得到的实际粉末称重量，加入10ml无菌去离子水使其完全溶解。

先用5ml无菌去离子水预湿润0.22 μ m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 $^{\circ}$ C冻存，1年稳定。

注：不要对混浊的溶液进行过滤，因为混浊的溶液意味着药物未完全溶解，过滤过程中会造成药物损失，降低活性；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；配制G418溶液时，一定要根据相应批次G418标注的活力值(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。

2. 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 μ g/ml；植物细胞：10-100 μ g/ml；酵母细胞：500-1000 μ 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 μ g/ml
CHO	Chinese hamster ovarian cells	400-800 μ g/ml
Hela	Human uterine cells	200-400 μ g/ml
HEK293	Human embryonic kidney cells	200-500 μ g/ml
THP-1	Human monocytes	250 μ g/ml

3. 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 $^{\circ}$ 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。

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 μ 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。

4. 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。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
ST018-1ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml×1ml
ST018-5ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml×5ml
ST018-50mg	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	50mg
ST039A	Doxycycline hyclate(盐酸强力霉素)	1g
ST039B	Doxycycline hyclate(盐酸强力霉素)	5g
ST081-1ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×1ml
ST081-5ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×5ml
ST081-1g	G418 (遗传霉素)	1g
ST081-5g	G418 (遗传霉素)	5g
ST551-1ml	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×1ml
ST551-5ml	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×5ml
ST551-250mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	250mg
ST905-1ml	Hygromycin B (潮霉素B)	50mg/ml×1ml
ST905-5ml	Hygromycin B (潮霉素B)	50mg/ml×5ml
ST905-1g	Hygromycin B (潮霉素B)	1g
ST986-1ml	Zeocin (博来霉素)	100mg/ml×1ml
ST986-5ml	Zeocin (博来霉素)	100mg/ml×5ml

Version 2022.01.20