

## G418

货号: G4180

储存条件: 2-8℃避光保存, 有效期 3 年。避免受潮, 否则会降低抗生素活力。

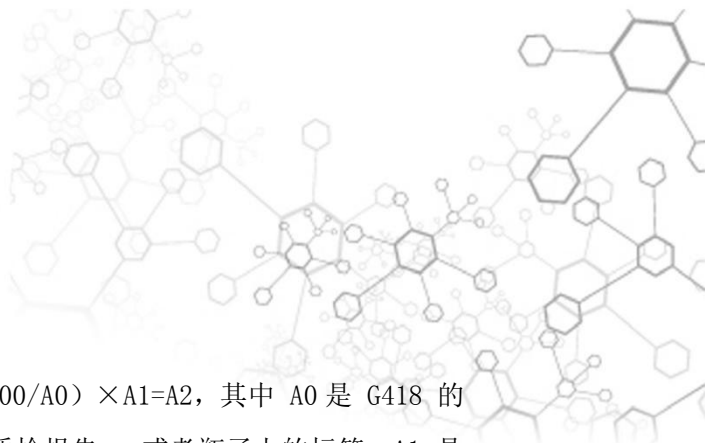
## 产品描述

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。

## 产品性质

英文同义名 (English synonym)	Antibiotic G418; G418 Sulfate
中文同义名 (Chinese synonym)	G418 硫酸盐; 遗传霉素;
CAS 号 (CAS No.)	108321-42-2
分子式 (Molecular formula)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> · 2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
分子量 (Molecular weight)	692.7 g/mol
外观 (Appearance)	白色粉末
活力 (Potency) (anhydrous)	>700 U/mg
溶解性 (Solubility)	溶于水





## 使用方法

### 1. G418 储存液的配制 (50 mg/mL, 活性浓度)

1) 活力单位的换算 根据此公式进行换算： $(1000/A0) \times A1=A2$ ，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：750 U/mg，要配制 50 mg/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 10 mL 的 G418 储存液 (活性浓度, 50 mg/mL)，则需要称取 663.3 mg 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 10 mL 无菌去离子水内使其完全溶解。先用 5 mL 无菌去离子水预湿润 0.22  $\mu\text{m}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 200-2000  $\mu\text{g/mL}$ ；植物细胞：10-100  $\mu\text{g/mL}$ ；酵母细胞：500-1000  $\mu\text{g/mL}$ ；

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	引用文献
网柄菌属	a) 10 $\mu\text{g/mL}$	a) 培养在培养液中；	Hirth, et. al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , v. 79, 7356-7360 (1982).
	b) 30 $\mu\text{g/mL}$	b) 培养在冻干细菌上；	
哺乳动物	a) 400 -1000 $\mu\text{g/mL}$	a) 用于筛选	Canaani and Berg, <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , v. 79, 5166-5170 (1982).
	b) 200 $\mu\text{g/mL}$	b) 用于维持生长	
植物	a) 25-50 $\mu\text{g/mL}$	a) 用于筛选	Ursic, et. al., <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , v. 101:3, 1031-1037 (1981).
	b) 10 $\mu\text{g/mL}$	b) 用于维持生长	
酵母	a) 500 $\mu\text{g/mL}$	a) 用于筛选	Jimenez and Davies, <i>Nature</i> , v. 287, 869-871 (1980).
	b) 125-200 $\mu\text{g/mL}$	b) 用于维持生长	
细菌	16 $\mu\text{g/mL}$	用于筛选	Waitz, et. al., <i>Antimicrob. Agents Chemother.</i> , v. 6:5, 579-581 (1974).





### 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。

- 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℃，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。
- 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。

### 4. 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】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 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。

### 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。





兰博利德 LABLEAD

高新技术企业

4) 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。

5) 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。

6) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

