

## 遗传霉素 (Geneticin) 使用说明书

### ■ 产品包装和保存条件

产品名称	货号	规格	浓度	纯度
遗传霉素 (Geneticin)	HB-G418-500	500 $\mu$ L	10 mg/mL	>95%(HPLC)
遗传霉素 (Geneticin)	HB-G418-1000	1 mL	10 mg/mL	>95%(HPLC)

注: a. 建议分装保存, 避免反复冻融, 否则活性受到影响。

b. 遗传霉素为了达到最理想的稳定状态和最长的保质期, 最好存放于 $-20^{\circ}\text{C}$ , 保质期为 1 年。

### ■ 产品简介

遗传霉素 (Geneticin, G418) 是一种氨基糖苷类抗生素, 在分子遗传试验中, 是稳定转染最常用的抗性筛选试剂之一。它通过抑制转座子 Tn601, Tn5 的基因, 干扰核糖体功能而阻断蛋白质合成, 对原核和真核等细胞产生毒素, 包括细菌、酵母、植物和哺乳动物细胞, 也包括原生动物和蠕虫。当 neo 基因被整合进真核细胞 DNA 后, 则能启动 neo 基因编码的序列转录为 mRNA, 从而获得抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶的高效表达, 使细胞获得抗性而能在含有 G418 的选择性培养基中生长。G418 的这一选择特性, 已在基因转移、基因敲除、抗性筛选以及转基因动物等方面得以广泛应用。

不同细胞对 G418 的敏感度不同, 在筛选之前, 要通过预实验确定 G418 的最佳筛选浓度, G418 推荐用 100~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围筛选合适的浓度, G418 最常用的工作浓度为 100~700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , G418 的作用时间是 10-14 天, 可参考文献并进行预实验摸索。

### ■ 产品使用

使用步骤: (哺乳动物细胞筛选)

▶遗传霉素杀灭曲线的确定 (目的稳定转染细胞株, 仅作参考)

为了筛选得到稳定表达目的细胞株，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) Day0: 未转化细胞按照 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。

(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) Day1: 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的工作浓度。

#### ▶遗传霉素筛选稳定转染细胞

(1) 转染 48 h 后，待细胞状态稳定后，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。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。

### ■ 遗传霉素 (Geneticin) 推荐使用浓度

细胞名称	G418
CV1	500 µg/mL
CHO	700 ~ 800 µg/mL
A431	400 µg/mL
Madin-Darby	500 µg/mL
其他哺乳动物	a) 400 -1000 µg/mL (用于筛选) b) 200 µg/mL (用于维持生长)
植物	a) 25-50 µg/mL (用于筛选) b) 10 µg/mL (用于维持生长)
酵母	a) 500 µg/mL (用于筛选) b) 125-200 µg/mL (用于维持生长)
细菌	16 µg/mL (用于筛选)

### ■ 参考文献

- [1] Davies J , Jimenez A . A new selective agent for eukaryotic cloning vectors.[J]. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 1980, 29(5 Suppl):1089-1092.
- [2] Canaani D , Berg P . Regulated expression of human interferon beta 1 gene after transduction into cultured mouse and rabbit cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(17):5166-5170.
- [3] Ursic D , Kemp J D , Helgeson J P . A new antibiotic with known resistance factors, G418, inhibits plant cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1981, 101(3):1031-1037.
- [4] Jimenez A , Davies J . Expression of Transposable Antibiotic Resistance Elements in Saccharomyces[J]. Nature, 1980, 287(5785):869-871.
- [5] Waitz J A , Sabatelli F , Menzel F , et al. Biological Activity of Antibiotic G-418, a New Micromonospora-Produced Aminoglycoside with Activity Against Protozoa and Helminths[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1974, 6(5):579-581.