

HyCyte® 遗传霉素 G418, 50 mg/mL

HyCyte® Geneticin, 50 mg/mL

货号: GUAC-R004 规格: 1 mL / 1 mL×10

产品描述

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。

产品信息

使用PBS溶液 (磷酸盐缓冲盐水) 作为溶剂, 产品浓度50 mg/mL。无菌。

使用说明

1. 确认抗生素筛选浓度

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 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1 杀灭曲线的建立

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, 培养箱培养过夜。
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 $\mu\text{g/mL}$ 。
- 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) 每3~4天更换新的含药物培养基, 观察存活细胞的比例, 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。

2. 筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。

- 1) 转染携带G418抗性基因的质粒或转导携带G418抗性基因的病毒, 同时设置没有转染质粒或转导病毒的细胞作为对照。
- 2) 转染或转导48~72h后, 换成含有最佳工作浓度的G418 (由杀灭曲线确定) 的新鲜培养液, 继续培养。如果有必要, 可以对细胞进行传代后进行筛选培养。
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, 最好将细胞传代稀释至汇合度不超过25%。
- 3) 每3~4天更换含有G418的新鲜筛选培养液。

为科研加速, 为工业赋能!



海星商城二维码



公众号二维码



4) 当对照组细胞100%死亡，G418抗性组中存活的细胞即为表达G418抗性基因的细胞。然后根据实验目的进行多克隆或单克隆细胞的筛选。

3. 稳定细胞株的维持培养。

可采取如下几种方式之一来维持培养稳定细胞株。

- 1) 使用含有与上述筛选稳定转染细胞株相同浓度的抗生素筛选培养液来维持培养。
- 2) 降低抗生素浓度为筛选浓度的一半进行维持培养。
- 3) 使用刚好能预防敏感细胞生长但不足以致死的抗生素浓度来维持培养(根据杀灭曲线来判断)。

| 保存条件

产品冰袋运输，保存条件为-20℃，避光保存。避免反复冻融。

产品保质期为 12 个月，请于保质期内使用。

| 注意事项

1. 本产品经 0.1μm 过滤除菌；
2. 使用本产品时应注意无菌操作，避免污染；
3. 本产品仅用于科研或进一步研究使用，不用于诊断和治疗。

为科研加速，为工业赋能！

CRISPR/Cas9细胞基因编辑

载体构建/病毒包装 分子诊断标准品/突变基因标准品/融合基因标准品

稳转细胞株 HyCyte®干细胞/原代细胞/细胞系产品 HyCyte®细胞培养试剂



海星商城二维码



公众号二维码

