

## G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素 (冻干粉)

| 产品编号         | 产品名称                                              | 包装规格 |
|--------------|---------------------------------------------------|------|
| NBS2099-1g   | G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素 (冻干粉)               | 1g   |
| NBS2099-5g   | G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素 (冻干粉)               | 5g   |
| NBS2099-20ml | G418 Sulfate (Geneticin) (50mg/mL) 遗传霉素 (50mg/mL) | 20ml |

### 产品简介:

G418, 又称为 G418 硫酸盐 (G418 Sulfate), 遗传霉素 (Geneticin), 是一种氨基糖苷类抗生素, 结构上类似于庆大霉素 B1 (Gentamicin B1), 对细菌、酵母菌、原虫和蠕虫、以及高等植物和哺乳动物细胞都有毒性。由红橙小单孢菌 (*Micromonospora rhodorangea*) 代谢产生, 与核糖体结合, 引起翻译中无意义突变链的产生, 最终抑制多肽合成和蛋白延伸。G418 在分子遗传学实验中普遍用作一种筛选抗生素。对 G418 的抗性主要由新霉素抗性基因(neo)赋予, 位于转座子 Tn601(903) (氨基糖苷磷酸转移酶 3' [I]或 APH 3' [I]) 和 Tn5 (氨基糖苷磷酸转移酶 3' [II]或 APH 3' [II])。这些基因源自细菌, 但可在真核细胞中表达。将这些基因中的任何一个导入细胞均可以使细胞获得 G418 抗性, 从而能在含 G418 的培养基中生长。

哺乳动物细胞中, 当抗性基因 neo 整合进入真核细胞基因组, 使其能编码氨基糖苷磷酸转移酶 3' [II] (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 G418 抗性。

植物细胞中, 当抗性基因 nptII 导入细胞内, 其也能编码氨基糖苷磷酸转移酶, 从而使得多种抗生素丧失活性, 包括 G418, 卡那霉素和巴龙霉素。

### 我司提供两种形式的 G418 硫酸盐,

一种以冻干粉形式提供 (货号: NBS2099-1g, NBS2099-5g), 易溶于水 (50mg/mL)。需过滤除菌后使用。

一种以溶于水的储存液形式提供 (货号: NBS2099-20ml), 无菌溶液, 可直接使用。

对于基因筛选实验, 需要建立杀灭曲线 (剂量反应曲线) 确定能够杀死无抗性细胞的最低有效浓度。

### 产品特性:

- 1) CAS NO.: 108321-42-2
- 2) 同义名: G-418; G418; Antibiotic G418 sulfate; G 418 disulfate salt; Geneticin;

Glycoside-418, Sulfate; BRN 1669188; G418 硫酸盐; G-418 硫酸盐; G418 二硫酸盐; 遗传霉素;

3) 分子式:  $C_{20}H_{40}N_4O_{10} \cdot 2H_2SO_4$

4) 分子量: 692.7

5) 外观: 白色至类白色粉末

6) 纯度:  $\geq 98\%$  (HPLC)

7) 活性:  $\geq 700 \mu\text{g}/\text{mg}$  (基于干重)

## 保存条件:

冻干粉-20℃干燥保存, 至少 3 年有效, 防止受潮, 否则会引起抗生素活性降低。

储存液-20℃保存, 至少 2 年有效。

## 产品使用:

### 一、 G418 储存液的制备

#### 1.1 对于 G418 冻干粉 (货号: NBS2099-1g, NBS2099-5g)

##### 1) 活力单位的换算

公式:  $(1000/A_0) \times A_1 = A_2$ , 其中  $A_0$  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。 $A_1$  是想配制的 G418 活性浓度。 $A_2$  是实际称重的粉末与体积比浓度。

示例: 若所用批次的 G418 活力值为:  $720 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 要配制  $50\text{mg}/\text{mL}$  的 G418 活性浓度, 则实际要配制的粉末浓度为  $1000/720 \times 50 \text{ mg}/\text{ml} = 69.44 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

如果配制 10ml 的 G418 储存液 (活性浓度,  $50 \text{ mg}/\text{ml}$ ), 则需要称取 694.4mg 粉末。

##### 2) 除菌和保存

根据上述换算得到的实际粉末称重, 加入 10 ml 去离子水内使其完全溶解。

先用 5ml 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℃冻存, 2 年稳定。

【注意】: 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。

#### 1.2 对于 G418 储存液 (货号: NBS2099-20ml)

本品是基于 G418 活性浓度配制的无菌溶液, 活性浓度为  $50\text{mg}/\text{mL}$ , 收到货第一次使用, 可将本品按照更小规格分装, -20℃保存, 以延长本品的保存周期。若使用频繁, 可将本品置于 2-8℃保存, 至少 1 年稳定。

## 二、 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  $\mu\text{g/mL}$ ；网柄菌属：10-100 $\mu\text{g/mL}$ ；

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 | 有效浓度                                                     | 应用                          |
|------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 网柄菌属 | a) 10 $\mu\text{g/mL}$<br>b) 30 $\mu\text{g/mL}$         | a) 培养在培养液中；<br>b) 培养在冻干细菌上； |
| 哺乳动物 | a) 400 -1000 $\mu\text{g/mL}$<br>b) 200 $\mu\text{g/mL}$ | a) 用于筛选<br>b) 用于维持生长        |
| 植物   | a) 25-50 $\mu\text{g/mL}$<br>b) 10 $\mu\text{g/mL}$      | a) 用于筛选<br>b) 用于维持生长        |
| 酵母   | a) 500 $\mu\text{g/mL}$<br>b) 125-200 $\mu\text{g/mL}$   | a) 用于筛选<br>b) 用于维持生长        |
| 细菌   | 8-16 $\mu\text{g/mL}$                                    | 用于筛选                        |

### 三、 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（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。

3.1 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°C，CO<sub>2</sub> 培养过夜；【注意】：对于需要更高密度来检测活力的细胞，可增加接种量。

3.2 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  $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 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。

3.4 接下来每 3-4 天更换新的含药物培养基。

3.5 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。

### 四、 稳定转染细胞的筛选

- 4.1 转染 48h 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）。【注意】：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%。
- 4.2 每隔 3-4 天更换含有药物的筛选培养基。
- 4.3 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。
- 4.4 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。
- 4.5 之后更换正常培养基培养即可。

#### 注意事项：

1. 不要将 G418 和其他抗生素/抗真菌剂（如青霉素/链霉素）共同使用，因为这些抗生素是 G418 的竞争性抑制剂。其他抗生素也有可能产生交叉反应。
2. 本品以粉末形式提供，非无菌的。因此，配制的溶液需经 0.2 $\mu$ m 滤膜过滤除菌后再使用。不可高压灭菌。G418 储存液置于 -20 $^{\circ}$ C 可稳定保存高达 24 个月，或置于 2-8 $^{\circ}$ C 稳定保存高达 6 个月。
3. 配制 G418 溶液，一定要根据 G418 实际批次的活性（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。
4. G418 溶于水呈酸性的，直接加入培养基通常会导致瞬间的 pH 变化，在含酚红的培养基内会容易看到颜色变化。如果培养基本身具有良好的缓冲性，经几分钟至数小时 pH 会回复到正常。如果 pH 变化是很看重一个因素，可选择用缓冲液溶液比如 100mM HEPES 来配制 G418 储存液。
5. 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。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究，不得用于医学诊断及其它用途！