Genomeditech (Shanghai) Co., Ltd.
Order: +86 021-50432825/50432826
Email: service@genomeditech.com

V 1.0.0

G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素

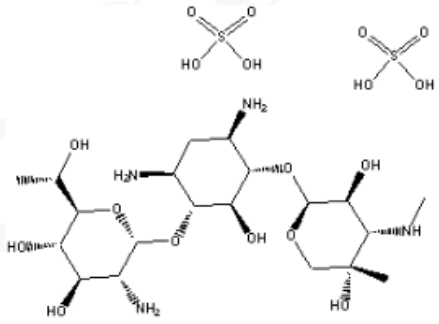
产品介绍：

G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素是一种由红橙小单孢菌属产生的氨基糖苷类抗生素，其结构与庆大霉素 B1（Gentamycin B1）相似。它主要用于选择和维持表达 neo 基因的真核细胞。G418 通过抑制转座子 Tn601 和 Tn5 的基因，干扰核糖体（80S）的功能，从而阻断蛋白质合成。这种抗生素对原核微生物（如细菌）、真核微生物（如酵母菌和真菌）以及哺乳动物细胞均具有毒性。

在哺乳动物细胞中，当 neo 基因整合进真核细胞基因组后，它编码的氨基糖苷磷酸转移酶（amino-glycoside 3'-phosphotransferase，APH(3')II）能够使 G418 失活。因此，G418 可用于筛选和维持成功转染了 neo 抗性基因的原核或真核细胞的培养。

化学特性：

CAS: 108321-42-2
分子式: $C_{20}H_{40}N_4O_{10}.2H_2SO_4$
分子量: 692.7
结构式：



产品信息：

产品编号	产品名称	规格
GM-040402-1	G418 Sulfate (Geneticin) 遗传霉素	1 g
GM-040402-2		5 × 1 g

保存条件：

常温运输。粉末-20℃避光保存，有效期 3 年。储存液-20℃避光保存，有效期 1 年。避免受潮，否则会降低抗生素活力。

使用说明：

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/A_0）×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 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 1000/750×50 mg/mL=66.67 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 666.7 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 μm 针头式过滤器，除尽水。之后使用此滤器过滤，除菌后分装成单次使用的小量（如 1mL）放到-20 ℃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 μg/mL；植物细胞：10-100 μg/mL；酵母细胞：500-1000 μg/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 μg/mL b) 30 μg/mL	a） 培养在培养液中 b） 培养在冻干细菌上	Hirth,et. al., Proc. Natl. Acad. Sci., v. 79, 7356-7360 (1982).
哺乳动物	a) 400 -1000 μg/mL b) 200 μg/mL	a） 用于筛选 b） 用于维持生长	Canaani and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci., v. 79, 5166-5170 (1982).
植物	a) 25-50 μg/mL b) 10 μg/mL	a） 用于筛选 b） 用于维持生长	Ursic, et. al., Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 101:3, 1031-1037 (1981).
酵母	a) 500 μg/mL b) 125-200 μg/mL	a） 用于筛选 b） 用于维持生长	Jimenez and Davies, Nature, v. 287, 869-871 (1980).
细菌	16 μg/mL	用于筛选	Waitz, et. al., Antimicrob. Agents Chemother., v. 6:5, 579-581 (1974).

3. 杀灭曲线的建立

【注意事项】

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，37 ℃，CO_2 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。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及工作液。
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。
7. 本产品仅作科研用途！