





## 使用方法

### 1.G418 储存液的配制(50mg/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，具体见瓶子的标签。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 $\mu$ g/mg，要配制 50mg/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 10mL 的 G418 储存液(活性浓度，50mg/mL)，则需要称取 663.3mg 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 10mL 无菌去离子水使其完全溶解。

先用 5mL 无菌去离子水预湿润 0.22 $\mu$ 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 $^{\circ}$ C 冻存，1 年稳定。【注】：不要对混浊的溶液进行过滤，因为混浊的溶液意味着药物未完全溶解，过滤过程中会造成药物损失，降低活性；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；配制 G418 溶液时，一定要根据相应批次 G418 标注的活力值(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。

### 2.建议使用浓度

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 维持培养。生长条件，细胞类型和其它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剂量反应性曲线(dose-response curve or kill curve)，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 $\mu$ g/mL；植物细胞：10-100 $\mu$ g/mL；酵母细胞：500-1000 $\mu$ g/mL。

表 1.部分哺乳动物细胞的推荐工作浓度表。

细胞名称	细胞类型	浓度
B16	Mouse melanocytes	400-1000 $\mu$ g/mL
CHO	Chinese hamster ovarian cells	400-800 $\mu$ g/mL
Hela	Human uterine cells	200-400 $\mu$ g/mL
HEK293	Human embryonic kidney cells	200-500 $\mu$ g/mL
THP-1	Human monocytes	250 $\mu$ g/mL

### 3.遗传霉素剂量反应曲线的建立

遗传霉素的有效筛选浓度跟细胞类型、生长状态、细胞密度、细胞代谢及细胞所处细胞周期等因素相关。为了筛选得到稳定表达目的蛋白的细胞株，确定能够杀死未转染宿主细胞的遗传霉素最低浓度非常重要，对于初次使用的细胞，一般需要通过实验来确定适合自身实验体系的剂量反应曲线(dose-response curve or kill curve)，曲线建立时至少应设置 6 个遗传霉素浓度。遗传霉素处理分裂期的细胞时活性最强，因此在添加遗传霉素之前需要先将细胞培养一段时间。

(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 $^{\circ}$ C，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 $\mu$ 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遗传霉素的培养基。每个浓度做三个平行孔。更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。
- (4) 接下来每 3-4 d 更换新的含药物培养基。
- (5) 按照固定的周期(如每 2 d)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 d)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。

#### 4. 稳定转染细胞株的筛选

- (1) 细胞转染 48h 后, 将细胞置于含有适当浓度遗传霉素的新鲜培养基中培养, 此为处理组。【注】: 当细胞处于分裂活跃期时, 抗生素作用最明显。当细胞过于密集, 抗生素产生的效力会明显下降, 所以细胞的密度最好不超过 25%。建议同时做一个正常细胞的对照组。转染或感染 48 h 后, 如果细胞过密也可以消化后重新接种细胞, 培养过夜后即可进行遗传霉素筛选。每隔 3-4 d 更换含有遗传霉素的培养液。
- (2) 筛选 7 d 后观察并评估细胞克隆(集落)的形成情况。对照组正常细胞应该 100%死亡, 处理组中存活的细胞为表达 neo 基因的细胞。根据宿主细胞种类和转染/筛选效率不同, 集落的形成可能需要一周或者更多的时间。
- (3) 克隆形成后, 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 d。
- (4) 之后更换正常培养基培养即可。

#### 注意事项

1. 本产品仅限于科学实验研究使用, 不得用于临床诊断、治疗等领域。
2. 用于细胞实验, 溶解后, 须用一次性针头滤器过滤除菌。
3. 本产品不可高压灭菌。
4. G418 不要和其它抗生素/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。其它的抗生素也会产生交叉活性。
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)可能在添加抗生素 5-7 d 后才能被杀死, 转染细胞(抗性克隆子)的克隆需要 10-14 d 形成。
6. 即使加入有效剂量的 G418, 细胞可能会继续分裂 2-3 次。G418 的药效通常在 2 d 后才变得明显。
7. 本产品可能对人体有一定的毒害作用, 请注意适当防护, 以避免直接接触人体或吸入体内, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
8. 抗生素不稳定, 请在有效期内尽快使用。
9. 以上数据均来自公开文献, 和元李记暂未对本产品进行独立验证, 仅供参考。

#### 相关产品推荐

嘌呤霉素 (Puromycin Dihydrochloride) (货号: AB11L241)