



博莱霉素 (Zeocin)

产品描述

Zeocin 即 phleomycin D1, 中文名称博来霉素或者腐草霉素 D1, 是从轮状链霉菌(*Streptomyces verticillus*) 的一个突变体菌株中分离而来的博来霉素/腐草霉素(bleomycin/phleomycin)的抗生素家族成员。它对细菌、真菌(包括酵母)、植物和哺乳动物细胞均有抑制作用和细胞毒性。

Zeocin 是一种碱性、水溶性的、铜离子螯合的糖肽抗生素。Cu²⁺螯合的 Zeocin 溶液呈现蓝色, 无活性。当其进入细胞后, Zeocin 上的 Cu²⁺被还原为一价铜离子(Cu⁺), 并被细胞内的巯基化合物(sulfhydryl compound)清除, 导致 Zeocin 被活化, 能够结合到细胞内 DNA 上并使其断裂, 最终导致细胞死亡。

对 Zeocin 产生抗性的蛋白是来源于印度链球菌(*Streptoalloteichus hindustanus*)的 Sh ble 基因编码一种 14kDa 大小的蛋白, 它能够以一定比率结合 Zeocin, 使其不能结合细胞 DNA, 抑制其 DNA 断裂活性, 从而使细胞对 Zeocin 产生抗性。因此, Zeocin 可用于筛选表达 Zeocin 抗性基因的多克隆或单克隆细胞, 或用于相应的多克隆或单克隆细胞的维持性培养。

Zeocin 对于绝大多数好氧细胞均有效, 常用于细菌(如大肠杆菌)、真核微生物(如酵母)及动植物细胞的筛选。大肠杆菌筛选推荐浓度为 25~50μg/mL (低盐 LB 培养基, NaCl 浓度不能超过 5g/L); 酵母筛选推荐浓度为 50~300ug/mL (YPD 或基本培养基); 哺乳动物细胞筛选推荐浓度为 50~1000ug/mL (合适培养基, 根据细胞系的类型而不同)。实际应用时, 应针对不同的细胞系测试 Zeocin 的浓度梯度, 以确定最佳使用浓度。

订购信息

| 产品名称 | 货号 | 规格 |
|---------------|----------|--------|
| 博莱霉素 (Zeocin) | AB11L251 | 1.25mL |

运输与保存

蓝冰运输。-20°C避光保存, 有效期 12 个月。【注】: 避免反复冻融。

技术参数

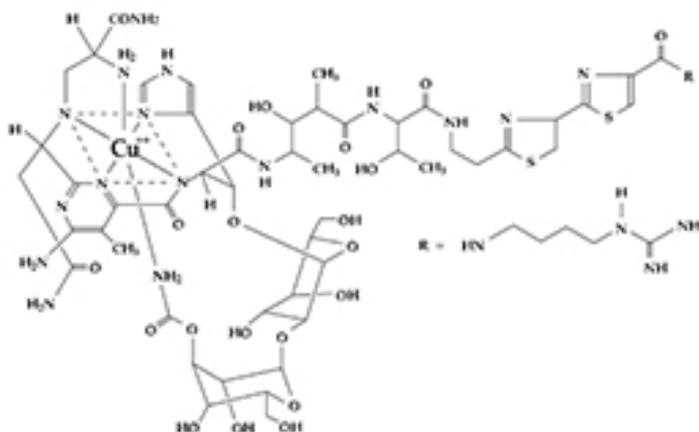
CAS: 11006-33-0

分子式: C₅₅H₈₅O₂₁N₂₀S₂Cu

分子量: 1474.03

溶解性: H₂O: 50 mg/mL

结构式:





使用方法

1. 细菌的筛选(以大肠杆菌为例)

- (1) 使用不含 Tn5 转座子元件的宿主细胞如 Top10、DH5 和 DH10 等进行筛选。
- (2) 需使用低盐 LB 培养基 (10g 胰蛋白胨, 5g NaCl, 5g 酵母提取物, 调整 pH 至 7.5, 加水定容至 1L) 以维持 Zeocin 的活性。
- (3) Zeocin 筛选的推荐浓度为 25~50 μ g/mL。

2. 真菌的筛选(以酵母为例)

- (1) 适用于酿酒酵母和毕赤酵母。
- (2) 培养基的选择: 含 1M 山梨醇的 YPD 培养基 (适用于电穿孔法转染细胞); YPD 或基本培养基 (适用于化学法转染细胞)。调整培养基 pH 至 6.5~8.0, 并选择使用最低有效浓度的 Zeocin 进行筛选。
- (3) 转染方法: 需使用电穿孔或锂离子转染法。不要使用酵母原生质球(spheroplasting)进行 Zeocin 抗性的转染及筛选, 因为 Zeocin 会导致原生质球的完全死亡。
- (4) Zeocin 筛选的推荐浓度为 50~300 μ g/mL。具体浓度与酵母菌株、培养基 pH 以及离子强度有关。

3. 哺乳动物稳定表达细胞株的筛选

Zeocin 用于哺乳动物细胞筛选常用浓度为 50-1000 μ g/mL (平均常用浓度为 250-400 μ g/mL)。影响筛选浓度的主要因素包括离子强度、细胞类型、细胞生长密度以及生长速率。根据细胞类型的不同, 需要 1-2 周可以筛选到 Zeocin 抗性的细胞。在筛选稳定表达细胞株之前, 需要先确定能够杀死未转染细胞的 Zeocin 最佳工作浓度。Zeocin 的最佳工作浓度需要通过剂量效应曲线来确定。下表列出了部分细胞中 Zeocin 的筛选浓度范围以供参考。

表 1. 部分常见哺乳动物细胞的 Zeocin 推荐筛选浓度表

| Cell Type | Culture Medium | Zeocin Concentration |
|---|----------------|----------------------|
| B16 (Mouse melanocytes) | RPMI | 20-250 μ g/mL |
| CHO (Chinese hamster ovarian cells) | DMEM | 100-500 μ g/mL |
| COS (Monkey kidney cells) | DMEM | 100-400 μ g/mL |
| HEK293 (Human embryonic kidney cells) | DMEM | 100-400 μ g/mL |
| HeLa (Human uterine cells) | DMEM | 50-100 μ g/mL |
| J558L (Mouse melanocytes) | RPMI | 400 μ g/mL |
| MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cells) | DMEM | 100-400 μ g/mL |
| MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) | DMEM | 200-400 μ g/mL |
| THP-1 (Human monocytes) | RMPI | 200 μ g/mL |

(1) 细胞对 Zeocin 敏感性的确定(杀灭曲线的建立)

- ① 接种细胞使得细胞密度约为 25%, 按照 8、16 或 24 个细胞培养孔(分别为单个培养孔、复孔和三复孔)准备培养的细胞, 培养 24h。
- ② 去除细胞培养液, 换成含不同浓度 Zeocin 的新鲜筛选培养液(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000 μ g/mL)。
- ③ 每 2-4 d 更换新鲜的筛选培养液, 观察存活细胞的比例, 选择在 1-2 周内杀死所有细胞的最低浓度作为最佳工作浓度。

(2) 筛选 Zeocin 抗性的稳定细胞株



- ① 按照 20%-30%的细胞密度接种细胞, 培养过夜。
- ② 转染携带 Zeocin 抗性基因的质粒或感染携带 Zeocin 抗性基因的病毒, 同时设置没有转染质粒或感染病毒的细胞作为对照。说明:没有转染质粒或感染病毒的细胞, 也需要同样进行转染质粒或感染病毒的相应实验操作。
- ③ 转染或感染 48-72 h 后, 换成含有最佳工作浓度的 Zeocin (由步骤 a 中的杀灭曲线确定)的新鲜培养液, 继续培养。如果有必要, 可以对细胞进行传代, 略稀释后进行筛选培养。
- ④ 每 2-4 d 更换含有 Zeocin 的新鲜筛选培养液。
- ⑤ 对照组正常细胞 100%死亡, Zeocin 抗性组中存活的细胞即为表达 Zeocin 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。根据细胞种类和转染/筛选效率, 单克隆细胞株的形成可能需要一周或更多的时间。【注】: 若待筛选细胞对 Zeocin 的抗性明显强于大部分细胞, 则按照以下方法克服此类耐受性: 用含 Zeocin 培养液进行细胞接种培养, 置于 37°C 孵育 2-3 h, 使得细胞贴壁。然后将细胞置于 4°C, 2 h。需要使用 HEPES 作为培养基的缓冲体系。重新将细胞置于 37°C 孵育。4°C 孵育细胞的目的是短时间内终止细胞分化, 使得 Zeocin 能发挥作用, 杀死细胞。

(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 Zeocin 筛选培养液来维持培养。
- ② 降低 Zeocin 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 Zeocin 浓度来维持培养(根据杀灭曲线来判断)。

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. Zeocin 人体有害, 操作时请小心, 并注意有效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。
4. Zeocin 对光敏感, 需避光保存于-20°C。含有该抗生素的平板或培养基也需避光保存。
5. 高离子强度、酸或碱性都会抑制 Zeocin 的活性, 该抗生素在过高或过低 pH 及弱氧化剂的条件下不稳定, 且变性不可逆。在培养细菌时, 需适当降低细菌培养基的盐浓度(低盐 LB 培养基, NaCl 浓度不能超过 5g/L)并调整 pH 至 7.5, 从而使其保持活性。
6. 抗生素不稳定, 请在有效期内尽快使用。
7. 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

盐酸强力霉素 (Doxycycline hyclate) (货号: AB11L115)