

关于 G418

G418 Sulfate (G418 硫酸盐), 也称作 Geneticin (遗传霉素), 是一种结构类似于庆大霉素 B1 (Gentamycin B1) 的氨基糖苷类抗生素, 通过影响 80S 核糖体功能和阻断延伸步骤来干扰蛋白合成, 对原核和真核等细胞都有毒性, 包括细菌、酵母、高等植物和哺乳动物细胞, 也包括原生动物和蠕虫。其抗性基因 (主要为 neo 基因) 位于转座子 Tn601 (903) 或 Tn5 (来源于细菌), 但是可以在真核细胞中表达。通过基因重组技术将这些抗性基因导入细胞, 使其获得对 G418 的耐药性, 从而用来筛选和维持培养携带抗性基因的原核或者真核细胞。

哺乳动物细胞中, 当抗性基因 neo 被整合进真核细胞基因组后, 使其编码表达氨基糖苷磷酸转移酶 (amino-glycoside 3'-phosphotransferase, *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抗性。稳转细胞株筛选实验, 需要建立杀灭曲线 (剂量反应曲线) 确定杀死无抗性细胞的最低有效浓度。

植物细胞中, 通过转染携带 nptII 基因的抗性质粒繁育其抗性。nptII 基因也能编码表达氨基糖苷磷酸转移酶, 这个酶使得多种抗生素丧失活性, 包括 G418, 卡那霉素和巴龙霉素。

使用方法

1. G418 储存液的配制 (50 mg/mL, 活性浓度)

1、活力单位的换算

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

例如: G418 活力值为: 750 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 要配制 50 mg/mL 的 G418 活性浓度, 则实际要配制的粉末浓度为 $1000/750 \times 50 \text{ mg/mL} = 66.33 \text{ mg/mL}$ 。如果配制 10 mL 的 G418 储存液 (活性浓度, 50 mg/mL), 则需要称取 663.3 mg 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 无菌去离子水内使其完全溶解。0.22 μm 过滤, 除菌后分装放到 -20°C 冻存, 1 年稳定。

注: 不建议使用液体培养基、氯化钠溶液、磷酸盐溶液, 或者有机溶剂来制备储存液。

2. 常用筛选浓度

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 $\mu\text{g/mL}$ 。

刚开始筛选转化子需要高浓度的 G418，后续用较低浓度的 G418 维持培养。生长条件、细胞类型、环境因素都可能影响 G418 的用量，因此建议新建实验体系通过杀灭曲线（kill curve），即剂量反应性曲线，来确定最佳筛选浓度。

不同细胞类型使用 G418 筛选使用的浓度：

细胞类型	激活浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）	应用
网柄菌属	10	培养液培养
	30	冻干细菌培养
哺乳动物	400-1000	筛选
	200	维持生长
植物	25-50	筛选
	10	维持生长
酵母	500	筛选
	125-200	维持生长
细菌	8-16	筛选

3. 杀灭曲线的建立

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 $\mu\text{g/mL}$ 。

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。

1、按照 20-25%的细胞密度将未转化的细胞铺在合适的培养板上，37 $^{\circ}\text{C}$ ，CO₂过夜培养（需要更高密度，可增加接种量）。

2、根据细胞类型，设定合适的浓度梯度。以哺乳动物细胞为例，可设定 50，100，250，500，750，1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

3、第 2 天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、按照每 2 天进行活细胞计数，来确定杀灭未转染细胞的恰当浓度。通常 7-10 天内能够杀死绝大多数细胞的最低浓度为筛选用的工作浓度。

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。则当细胞过于稠密，其效率会降低，最好将细胞稀释至丰度低于 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、后续更换正常培养基培养即可。

注意事项

1、G418 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。其它的抗生素会产生交叉活性。

3、配制 G418 溶液时，要换算不同批次 G418 的活力值（potency），从而得到需要活性浓度的储存液以及工作液。

4、加入 G418 的培养体系，未转染的细胞未被杀死，可能因为药物浓度过低，或者细胞密度过高。快速分裂的细胞相对于缓慢增殖细胞，更容易被杀死。添加抗生素 5-7 天后可能才会杀死对照细胞（未转染），转染细胞（抗性克隆子）的克隆需要 10-14 天形成。

5、加入致死剂量的 G418，细胞可能还会继续分裂 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。