

M5 SuperZeocin Selection Antibiotic (100 mg/mL) 博来霉素使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 SuperZeocin Selection Antibiotic (100 mg/mL)	1.25 ml	MF454-01

【储存条件】

-20℃保存

【产品简介】

SuperZeocin 是博来霉素/腐草霉素抗生素家族的一个成员，是从 *Streptomyces verticillus* 中分离的水溶性、铜离子螯合糖蛋白抗生素，铜离子存在使得溶液呈蓝色。这种铜离子螯合形式是没有活性的，当抗生素进入细胞后，Cu²⁺被还原成 Cu⁺，并被细胞中的巯基化合物除去。此时，SuperZeocin 才被活化并与 DNA 结合，对 DNA 进行切割，从而引起细胞死亡。而 SuperZeocin 耐受基因 (Sh ble) 编码的蛋白质可以与 SuperZeocin 结合，并抑制 SuperZeocin 切割 DNA。SuperZeocin 作用谱非常广，其对细菌，真菌（包括酵母菌）、植物和哺乳动物细胞都有很强的抗菌活性，因此 SuperZeocin 常用作一种非常有效的工具抗生素，用来筛选携带 Sh ble 抗性基因并能稳定表达分子量为 13.665kDa 的一种 SuperZeocin 抗性蛋白的细胞株。

【化学式】

C₅₅H₈₃N₁₉O₂₁S₂Cu 分子量 1137.41

【浓度】

100 mg/ml

【使用浓度】

- 1、大肠杆菌 (*E. coli*): 25-50 µg/ml, 用低盐 LB 培养基筛选 (NaCl 浓度不能超过 5g/L);
- 2、酵母菌: 50-300 µg/ml, 用 YPD 或基本培养基 (minimal medium) 筛选;
- 3、哺乳动物细胞: 50-1000 µg/ml, 根据细胞选择合适的培养基。

【操作步骤】

操作步骤 (以哺乳动物细胞筛选为例)

注意:

- 1、SuperZeocin 用于筛选哺乳动物稳定转染细胞的浓度范围为 50-1000µg/ml, 平均工作浓度范围为 250-400µg/ml。影响筛选浓度的主要因素包括离子强度, 细胞类型, 细胞密度以及生长速率。以下步骤仅作参考, 请根据自身实验体系做适当调整。
- 2、SuperZeocin 的杀灭机制不同于新生霉素 (neomycin) 和潮霉素 (hygromycin), 细胞不会聚集成团或从培养板表面脱落。一旦接触到 SuperZeocin, 敏感细胞会出现如下的形态变化: 1) 细胞体积明显增加 (类似于巨细胞病毒感染容纳性细胞引起的肿大效应); 2) 异常的细胞形状包括细胞长臂 (long appendages) 出现; 3) 胞浆内出现大型空泡 (源于内质网、高尔基体或支撑蛋白的破裂); 4) 质膜和核膜破裂, 导致膜上出现许多孔。这些敏感细胞最终会完全破损, 仅以细胞碎片的形式存在。
- 3、SuperZeocin 抗性细胞继续正常生长, 长成不同于敏感细胞的克隆。形态上, 其与未接触 SuperZeocin 的正常细胞没有差异。

一、建立杀灭曲线

- 1、重新铺板或者将满盘细胞重新分盘, 使得细胞密度约 25%, 按照 8 个平板/组准备, 培养 24h。
- 2、去除旧培养基。加入含不同浓度 SuperZeocin 的筛选用培养基, SuperZeocin 浓度可设置为 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000

µg/ml, 每个浓度做 3 个平行; 也可根据自身实验体系, 设置不同的浓度梯度。

3、每 3-4 天更换新鲜的筛选培养基, 并观察存活细胞的比例。选择在合适的时间 (1-2 周内) 杀死大多数细胞的浓度为最佳工作浓度。

注意: 若是难以在显微观察下区分活细胞, 也可用台盼蓝染色来计算存活细胞的数量, 以确定 SuperZeocin 的最适浓度。

二、筛选稳定转染细胞

4、转染细胞, 用 100mm 培养皿进行培养。以未转染的细胞作为阴性对照。

5、转染后, 用预热的 1X PBS 洗涤一次, 加入新鲜培养基。

6、转染 48-72h 后, 用含有最佳浓度 SuperZeocin (由灭杀曲线确定) 的新鲜培养基筛选细胞。为了更好的鉴定和筛选细胞集落, 建议将细胞按比例稀释成一系列浓度。

注意: 若待筛选细胞对 SuperZeocin 的抗性明显强于大部分细胞, 或者细胞快速分裂导致低浓度情况 SuperZeocin 的筛选效果不明显, 按照以下方法克服此类耐性: a) 将细胞直接用含 SuperZeocin 的筛选培养基进行分盘; b) 37°C 孵育 2-3h 直至细胞贴壁; c) 从培养箱内取出细胞并于 4°C 放置 2h, 一定要确保培养基内含有 HEPES。【此步的目的在于短时间内终止细胞分裂活动, 从而允许 SuperZeocin 抗性得以发挥, 杀死细胞。】c) 细胞重新放回 37°C 培养箱内培养。

7、每 3-4 天加入选择培养基, 直到出现细胞集落。

8、挑选并转移克隆到 96 或 48 孔板中。在进行更大孔径培养板或培养皿上扩大培养之前, 确保培养细胞密度近 100%。

三、维持培养稳定转染细胞

可采取以下方式维持培养稳定转染细胞, 1) 使用含相同剂量 SuperZeocin 的筛选培养基来维持培养; 2) 降低 SuperZeocin 剂量为原来的一半进行维持培养; 3) 使用正好能预防敏感细胞生长但不足以致死的 SuperZeocin 剂量来维持培养【参考杀灭曲线】;



【注意事项】

本产品具有一定的光敏感型, 操作与培养过程尽量暗处进行。产品保存尽量避光。

本产品有毒害, 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。