www.bioss.com.cn
400-901-9800
sales@bioss.com.cn
support@bioss.com.cn

G418 溶液(20mg/ml)

Geneticin (20mg/ml)

货号： C7001

规格： 10ml

保存条件：

—20℃避光保存，有效期 12 个月。

简介：

G418 是一种氨基糖苷类抗生素，这种氨基糖类抗生素的结构和新霉素、庆大霉素、卡那霉素相似，在分子遗传试验中，是稳定转染最常用的抗性筛选试剂。它通过抑制转座子 Tn601，Tn5 的基因，干扰核糖体功能而阻断蛋白质合成，对原核和真核等细胞产生毒素，包括细菌、酵母、植物和哺乳动物细胞，也包括原生动物和蠕虫。当 neo 基因被整合进真核细胞 DNA 后，则能启动 neo 基因编码的序列转录为 mRNA，从而获得抗性产物氨基糖苷磷酸转移酶的高效表达，使细胞获得抗性而能在含有 G418 的选择性培养基中生长靠干扰核糖体功能阻断多肽合成。不是常用的标准抗生素，常用于选择新霉素抗药基因转染的原核和真核细胞。在基因转移、基因敲除、抗性筛选以及转基因动物等方面得以广泛应用。

使用方法：

1. 由于每种细胞对 G418 的敏感性不同，而且不同批次的 G418 的活性液不同，所以在筛选之前，需要确定 G418 的最佳筛选浓度，一般在 50～1000μg/ml 范围内进行筛选。
2. 将细胞制备成细胞悬液，并稀释到 1000 个/ml。
3. 加入不同量的 G418 solution (20mg/ml)，选择在 10~14 天内使细胞全部死亡的最低 G418 浓度来进行下一步的筛选试验。

注意事项：

1. 尽量减少反复冻融的次数，以免失效。
2. 基因转染到细胞内要一段时间才能表达出蛋白质，所以筛选不能太早。
3. 筛选也不宜太迟，一般要在转染 24h 之后才开始加 G418 筛选。因为转染了外源基因的细胞代谢负荷较大，增值较慢，时间长了就会被没有外源基因转入的细胞所淹没，最终导致筛选不出阳性克隆。
4. 随着细胞代谢，G418 的浓度和活性都会下降，应每 3~5 天更换一次含有 G418 的筛选液，这时药物浓度可以降至 200μg/ml。
5. 加药筛选约 5～7 天左右，细胞会大量死亡，为了减少死亡细胞对阳性克隆的不利影响以及增加阳性克隆的得到率，可以应用套环法或刮除法结合有限稀释法来筛选阳性克隆。加药后，在高倍镜下，刮除阴性克隆，消化阳性克隆后继续筛选培养。或者用套环套住阳性克隆，在套环内加胰蛋白酶或 EDTA 消化，把消化液吸到另外一个新的孔中培养，最后再用有限稀释法把阳性克隆在 96 孔板中筛选。
6. 一般经过 4 周左右的筛选，得到的阳性克隆都比较稳定。但是外源基因如果没有整合到基因组中的话，目的基因还是很容易丢失的，再次筛选往往是必不可少的，经过 2 次以上的筛选之后才能找到遗传稳定的细胞克隆。
7. 尽量避免污染。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。