

Zeocin Solution 博来霉素溶液 (100 mg/ml)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS2096-125mg	Zeocin Solution 博来霉素溶液 (100 mg/ml)	125mg

产品简介:

Zeocin 是博来霉素/腐草霉素 (bleomycin/phleomycin) 抗生素家族的成员之一, 从轮枝链霉菌 *Streptomyces verticillus* 中分离得到。作用谱广泛, 对细菌、真菌 (包括酵母菌)、植物和哺乳动物细胞具很强的毒性。

Zeocin 是腐草霉素 D1 的商业名称, 一种碱性、水溶性、铜离子螯合的糖肽抗生素。铜离子的存在使得溶液为蓝色, 此铜螯合的形式为无活性。当抗生素进入细胞后, 二价铜离子 (Cu^{2+}) 被还原为一价铜离子 (Cu^{+}), 并被细胞内的巯基化合物去除。铜离子被去除后, Zeocin 被活化, 嵌入 DNA 使其断裂, 最终导致细胞死亡。来自 *Streptoalloteichus hindustanus* 的 *Sh ble* 基因赋予 Zeocin 抗性, 该基因编码一种 13,665Da 大小的蛋白, 以化学计量方式结合 Zeocin, 抑制其 DNA 双链切割活性。因此, 能表达此蛋白的真核和原核宿主细胞被赋予 Zeocin 抗性。

Phleomycin (腐草霉素) (货号: NBS2094)也是博来霉素家族的糖肽抗生素, 其有效成分和 Zeocin (博来霉素)基本一致, 都为 Phleomycin D1, 抗性基因也都为 *Sh ble*。两者的配方有一定的区别, Zeocin 是以 Phleomycin D1 为主要成分的一种试剂, 添加了不同的辅料, 更适用于哺乳动物细胞的筛选; 而 Phleomycin 是结构相似抗生素的混合物, 它们的末端氨基有一定的区别, 建议用于对 Zeocin 不敏感的细胞, 如丝状真菌和一些酵母等。

本品为溶于去离子水的无菌溶液, 浓度为 100mg/ml, 细胞培养级别。

产品特性:

- 1) CAS NO.: 11006-33-0
- 2) 化学式: $\text{C}_{55}\text{H}_{83}\text{N}_{19}\text{O}_{21}\text{S}_2\text{Cu}$
- 3) 分子量: 1137.41 g/mol
- 4) 外观: 蓝色溶液 (100mg/ml in deionized, autoclaved water)

保存条件:

-20℃避光保存, 至少 1 年有效, 避免反复冻融。

建议工作浓度:

- 1) 大肠杆菌筛选: 25-50 μ g/mL (低盐 LB 培养基, NaCl 浓度不能超过 5g/L)
- 2) 酵母菌筛选: 50-300 μ g/mL (YPD 或基本培养基)
- 3) 哺乳动物细胞筛选: 50-1000 μ g/mL (合适培养基, 根据细胞系而不同)

操作步骤 (以哺乳动物细胞为例)

【注 1】: Zeocin 的杀灭机制不同于新生霉素 (neomycin) 和潮霉素 B (hygromycin B), 细胞不会聚集成团和从培养板表面脱落。一旦接触到 Zeocin, 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, 仅仅以细胞碎片的形式存在。

【注 2】: Zeocin 抗性细胞按正常周期分化产生不同于敏感细胞的克隆。抗性细胞在形态上, 与未接触 Zeocin 的正常细胞没有任何差异。

【注 3】: 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。

一、细胞对 Zeocin 敏感性的确定 (杀灭曲线建立)

- 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, 去除旧培养基。
- 2) 加入含不同浓度 Zeocin 的筛选培养基, Zeocin 浓度可设置为 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000 μ g/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。选择在合适时间 (1-2 周内) 杀死大多数细胞的浓度为最佳工作浓度。**【注】:** 若是难以在显微观察下区分活细胞, 建议使用台盼蓝染色来计算存活细胞的数量, 以确定 Zeocin 的最适浓度。

二、筛选稳定转染细胞系

- 1) 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。
- 2) 转染后, 用预热的 1X PBS 洗涤一次, 加入新鲜培养基。
- 3) 转染 48-72h 后, 用含有最佳浓度 Zeocin (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】：若待筛选细胞对 Zeocin 的抗性明显强于大部分细胞，按照以下方法克服此类耐性：用含 Zeocin 培养基进行细胞分盘，置于 37°C 孵育 2-3h，使得细胞贴壁。然后将细胞置于 4°C，2h。记得使用 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。

4) 每 3-4 天更换新鲜的选择培养基，直到出现细胞集落。

5) 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、稳定转染细胞系的维持培养

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 Zeocin 的筛选培养基来维持培养；
- 2) 降低 Zeocin 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 Zeocin 剂量来维持培养【根据杀灭曲线来判断】；

Zeocin 常用的工作浓度为 100µg/ml，但是，最佳的工作浓度需要根据细胞类型和实际的实验体系来确定。某些哺乳动物细胞的建议工作浓度列在下表：

细胞系	培养基	Zeocin 工作浓度 (µg/ml)
B16	RPMI	20-250
CHO	DMEM	100-500
COS	DMEM	100-400
HEK293	DMEM	100-400
HeLa	DMEM	50-100
J558L	RPMI	400
MCF-7	DMEM	100-400
MEFs	DMEM	200-400
THP-1	RPMI	200

注意事项：

1. Zeocin 对光敏感，需将抗生素，或含该抗生素的平板或培养基置于黑暗处。

2. 降低细菌培养基的盐浓度，调整 pH 到 7.5 使其保持活性，因高离子强度和酸或碱性都会抑制 Zeocin 活性。
3. 储存 Zeocin 在 -30°C~-10°C，使用前需冰上融化。
4. Zeocin 有毒，操作时需注意防护，切勿与身体或皮肤直接接触。
5. Zeocin™ 是 Invivogen 公司的商标产品。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

常用筛选抗生素及其使用浓度：

货号	名称	抗性基因	有效筛选浓度 (µg/mL)
NHB0003-1G	潮霉素 B (Hygromycin B)	大肠杆菌潮霉素抗性基因 (hyg, hph)	哺乳动物细胞：200-500 细菌/植物细胞：100-300 真菌：300-1000
NA0531-1ML	杀稻瘟菌素 S (Blasticidin S)	蜡样芽孢杆菌的 bsr 基因 土曲霉的 BSD 基因	哺乳动物细胞：1-10 大肠杆菌：25-100
NBS2094-1ml	腐草霉素 (Phleomycin)	Sh ble 基因 (Streptoalloteichus hindustanus bleomycin gene)	酵母菌：10 丝状真菌：25-150
NBS2095-100mg NBS2096-125mg	博莱霉素 (Zeocin)	Sh ble 基因 (Streptoalloteichus hindustanus bleomycin gene)	哺乳动物细胞：50-1000 大肠杆菌：25-50 酵母菌：50-300
NBS2099-1g	遗传霉素 (Geneticin, G418)	Tn601 (903)或 Tn5 来源的新霉素抗性基因 (neo)	哺乳动物细胞：200-2000 植物细胞：10-100 酵母细胞：500-1000 网柄菌属：10-100
NBS8833-1ml	嘌呤霉素 (Puromycin)	链霉菌来源的嘌呤霉素 N-乙酰转移酶基因 (pac)	哺乳动物细胞：1-10 大肠杆菌：100-125