

Zeocin (Powder) 博莱霉素 (粉末)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS2095-100mg	Zeocin (Powder) 博莱霉素 (粉末)	100mg
NBS2095-500mg	Zeocin (Powder) 博莱霉素 (粉末)	500mg
NBS2095-1g	Zeocin (Powder) 博莱霉素 (粉末)	1g

产品简介:

Zeocin 是一种作用于真核和原核细胞的选择性抗生素。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具有 Zeocin 抗性。

Zeocin 是腐草霉素 D1 (Phleomycin D1) 的商业名称, 是一种铜离子螯合的糖肽抗生素 (来源于链霉菌 *Streptomyces verticillus* 的突变株), 铜离子的存在使其呈蓝色, 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。Zeocin 作用谱广泛, 对细菌、真核微生物、植物和哺乳动物细胞具很强的毒性。

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 (博莱霉素)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。

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 25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (低盐 LB 培养基, NaCl 浓度不能超过 5g/L); 酵母筛选推荐浓度为 50~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (YPD 或基本培养基); 哺乳动物细胞筛选推荐浓度为 50~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (根据细胞类型选择合适的细胞培养液)。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。

产品特性:

- 1) CAS NO.: 11006-33-0
- 2) 外观: 蓝色

- 3) 内毒素: < 1 EU/mg
- 4) 溶解性: 易溶于水 (> 500 mg/ml)
- 5) 质量控制: 分别对 Zeocin 敏感或 Zeocin 耐性的哺乳动物细胞测定抗生素活性。

保存条件:

4°C干燥保存 (一年有效)。

母液制备

- 1) 将低温保存的 Zeocin 置于室温回温至少 20min, 加入适量 HEPES buffer (5g/L, pH 7.2±0.1), 充分溶解, 配制成 100mg/ml 溶液。
- 2) 用 0.22µm 滤膜过滤除菌。
- 3) 溶液置于 4°C保存 12 个月有效, 或-20°C保存, 18 个月有效。

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 50-1000µg/ml (平均常用浓度为 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。

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 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 粉末容易受潮，一定要注意干燥保存。每一次使用完后需盖紧管子。

2. Zeocin 是一种不稳定化合物，在高 pH 和低 pH 或存在弱氧化剂的情况下会发生不可逆变性。
3. Zeocin 对高浓度酸和碱都很敏感，但短期暴露在弱酸下能耐受。
4. 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。
5. Zeocin 有毒，操作时需注意防护，切勿与身体或皮肤直接接触。
6. Zeocin™ 是 Invivogen 公司的商标产品。
7. 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)
<u>NHB0003-1G</u>	<u>潮霉素 B</u> (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
<u>NA0531-1ML</u>	<u>杀稻瘟菌素 S</u> (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
<u>NBS2094-1ml</u>	<u>腐草霉素</u> (Phleomycin)	Sh ble 基因 (Streptoalloteichus hindustanus bleomycin gene)	酵母菌：10 丝状真菌：25-150
<u>NBS2095-100mg</u> <u>NBS2096-125mg</u>	<u>博莱霉素</u> (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
<u>NBS2099-1g</u>	<u>遗传霉素</u> (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
<u>NBS8833-1ml</u>	<u>嘌呤霉素</u> (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