



G418 的用途及配制方法

G418：白色粉末，熔点 138~144℃，溶于水、甲醇。

CAS No.：[108321-42-2]

分子式：C₂₀H₄₀N₄O₁₀ · 2H₂SO₄ **分子量**：692.71

比旋：+104₀~+121₀

水分：≤10%

吸光值：≤0.015 (280nm, 1mg/ml), ≤0.1 (570nm, 100mg/ml)

贮存:4℃

G418 是一种氨基糖类抗生素，其结构与新霉素、庆大霉素、卡那霉素相似，它通过影响 80S 核糖体功能而阻断蛋白质合成，对原核和真核等细胞都有毒性，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。是稳定转染最常用的选择试剂。当 neo 基因被整合进真核细胞基因组合适的地方后，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。G418 的这一选择特性，已在基因转移、基因敲除、抗性筛选以及转基因动物等方面得以广泛应用。G418 有杀菌作用，本身有很好的杀菌效果，在用 G418 进行筛选的过程中很少会发生污染。

G418 和筛选

筛选之前

由于每种细胞对 G418 的敏感性不同，而且不同的厂家生产的相同浓度的 G418 的活性不尽相同，所以在筛选之前，一定要确定 G418 的最佳筛选浓度。具体如下：将细胞稀释到 1000 个细胞/mL，在 100ug/mL~1mg/mL 的 G418 浓度范围内进行筛选，选择出在 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。

由于每种细胞对 G418 的敏感性不同，一般变动在 100ug/ml~1000ug/ml 范围。而且不同的厂家生产的相同浓度的 G418 的活性不尽相同，所以在筛选之前，一定要确定细胞对这一批 G418 的最佳筛选浓度。尽管如此，特性明确的细胞系 G418 的最佳用量还是稳定的。《分子克隆》给出了几个常用细胞系所需 G418 的最佳用量。

细胞系或机体	G418 浓度 (ug/ml)
中国仓鼠卵巢细胞	700~800
Madin-Darby 犬肾细胞	500
人上皮 A431 细胞	400
猿 CV-1 细胞	500
盘基网柄菌属	10~35
植物	10
酵母	125~500

加药时间

由于基因转染到细胞内之后要一段时间才能表达出蛋白质。所以筛选不能太早；但是也不能太晚，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，一般要在转染 24 小时之后才开始加 G418 筛选。随着细胞的代谢 G418 的浓度和活性都回下降，所以每 3~5 天都要更换一次含有 G418 的筛选液。这时药物浓度可以降至 200ug/ml。

培养液

加药筛选约 6 天左右，细胞会大量死亡，孔中只剩下细胞寥寥无几。这时会出现两个问题：
1. 死亡的细胞会裂解释放出有害物质，导致那些有 neo 表达的阳性细胞死亡，即非选择性死亡。
2. 孔中细胞数目很少，细胞之间的信号会变得很弱，也会导致阳性细胞的状态不佳甚至死亡。这个时候需要一种特殊的培养液：假如你要转染 3T3 细胞，在 3T3 细胞汇合度达到 80% 的时候，换液，培养过夜之后收集培养液，通过滤器消毒，和新鲜的培养液按 1: 1 混合备用。再转染后筛选过程中就可以应用这种培养基。

挑选单克隆的优化

为了尽量减少阴性克隆的死亡给阳性克隆造成的不利影响以及增加阳性克隆的得率，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，阳性克隆和阴性克隆很容易辨认，在阳性克隆下用记号笔做个标记。然后刮除隐性克隆，消化阳性克隆后继续筛选培养；或则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。

鉴定之后

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。但是外源基因整合到基因组中的概率太小了，而且是随机整合，会导致表达的目的蛋白的量产生很大差异。随着培养时间的延续，那些丢失了外源基因的细胞和很少表达目的基因的细胞会占据优势，强表达目的蛋白的细胞会越来越少。这样再次筛选是不可避免的。只有经过 2 次以上的筛选之后才能找到那种我们想要的强分泌目的蛋白的，遗传稳定的细胞克隆。

1. G418 的配制： 取 1g G418 溶于 1ml 1M 的 HEPES 液中，加蒸馏水至 10ml，过滤消毒，4 度保存。

2. 细胞培养： 取待测培养细胞，制备成细胞悬液，按等量接种入多孔培养板中，培养 6 小时左右开始加药。

3. 制备筛选培养基： 在 100ug/ml~1000ug/ml 范围内确定几个梯度，比如先做个 100ug/ml、400ug/ml、800ug/ml、1000ug/ml，按梯度浓度用培养基稀释 G418 制成筛选培养基。

4. 加 G418 筛选：吸除培养孔中培养基，PBS 洗涤一次，每孔中加入不同浓度的筛选培养基。

5. 换液：根据培养基的颜色和细胞生长情况，每 3~5 天更换一次筛选培养基。方法同 4。

6. 确定最佳筛选浓度：在筛选 10~14 天内能够杀死所有细胞的最小 G418 浓度即为最佳筛选浓度。在第一轮就筛选出最佳 G418 浓度的可能性不大，最有可能的是出现这种情况：用某一浓度 G418 的量在筛选 14 天后还不能杀死细胞，而用下一个梯度的 G418 的量在 10 天前就看不到活细胞了。假如是 400ug/ml 不能杀死细胞，而 800ug/ml 在第 5 天就把所有细胞都杀死了，则可以再用 500ug/ml、600ug/ml、700ug/ml 进一步筛选，以确定最佳筛选浓度！心得：由于特性明确的细胞系 G418 的最佳用量还是比较稳定的，所以有时候不需要在这么大范围内进行筛选。比如说你要转染 NIH3T3 细胞，现在我告诉你我测试过 NIH3T3 细胞对 G418 的敏感性，我用的筛选浓度是 200 ug/ml。这时你就可以做 150ug/ml、200ug/ml、300ug/ml 三个浓度进行筛选。

通过预实验确定了最佳筛选浓度后，就可以做稳定转染了。

a 转染：转染后培养 24 小时或者更长，到细胞增长接近汇合时按 1: 4 密度传代，继续培养，待细胞密度增至 50%~70%汇合时；

b 加 G418：去掉培养液，PBS 洗一次，加入按最佳筛选浓度配制好的 G418 筛选培养基。

c 换液：根据培养基的颜色和细胞生长情况，每 3~5 天更换一次筛选培养基。当有大量细胞死亡时，可以把 G418 浓度减半维持筛选。筛选 10~14 天后，可见有抗性的克隆出现，停药培养，待

其逐渐增大后;

d 挑单克隆: 制备细胞悬液, 细胞计数, 用培养基稀释细胞到 1 个/10u1。在 96 孔板中加入培养基 150u1/孔, 再加入细胞悬液 10u1/孔。待其逐渐增大后转入到 48 孔中增殖。

e 单克隆鉴定: 细胞大量扩增后, 提取总 RNA, 做 RT-PCR 检测目的基因是否存在。



Shanghai ShineGene Molecular Bio-tech Co.,Ltd.

Add: Floor 2 ,Building A,328# Wuhe Road, Shanghai 200233

Tel: +86-21-54460832

Fax:+86-21-54460831

E-mail:master@shinegene.org.cn

Website: www.synthesisgene.com

