



## Zeocin (100mg/ml) 博莱霉素

### 产品简介

Zeocin 是博莱霉素/腐草毒素 (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,对细菌、真菌(包括酵母菌)、植物和哺乳动物细胞具有很强的毒性。来自 *Streptoalloteichus hindustanus* 的 *Sh ble* 基因赋予 Zeocin 抗性。

Zeocin 是腐草毒素 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。一旦进入细胞后,二价铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )被还原为一价铜离子( $\text{Cu}^{+}$ ) 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。

抗性基因:Zeocin"抗性由编码一种 13,665Da 大小蛋白的 *Sh ble* 基因( *Streptoalloteichus hindustanus bleomycingene* )赋予, 该蛋白化学计量方式结合 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。

### 基本特性

- 1) CAS : 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 )
- 5) 运输: 冰袋运输, 保存:  $-30^{\circ}\text{C}$ 至 $-10^{\circ}\text{C}$  ,至少 1 年有效
- 6) 大肠杆菌筛选: 25-50ug/mL (低盐 LB 培养基, NaCl 浓度不能超过 5g/L)
- 7) 酵母菌筛选: 50-300ug/mL ( YPD 或基本培养基)
- 8) 哺乳动物细胞筛选: 50-1000ug/mL (合适培养基;根据细胞系而不同)

### 产品组成

名称	编号	FS0018	FS0018	Storage
Zeocin (100mg/ml) 博莱霉素		125mg	8*125mg	$-20^{\circ}\text{C}$
使用说明书		1 份		

### 使用方法(应用举例):

#### 1) 大肠杆菌(E. Coli)

宿主:不能包含 Tn5 转座子(比如: Top10 , DH5 r DH10)

培养基:使用低盐 LB ( 10g Trypton , 5g NaCl , 5g Yeast extract ) , pH 7.5 ,防止 Zeocin"失活

**选择浓度:** 25-50ug/mL 用于大肠杆菌筛选。

#### 2) 酵母菌(Yeast)

宿主:酿酒酵母( *Saccharomyces cerevisiae* ),毕赤酵母( *Pichia pastoris* )

培养基:含 1M 山梨醇的 YPD (电转化细胞); YPD 或基本培养基(化学转化细胞);测试培养基调 pH 到 6.5-8.0, 选择 pH 值, 允许使用最低浓度 Zeocin"。

**转化方法:**电转法,使用锂离子步骤或使用 EasyComp 试剂盒。不能使用原生质体用于酵母转发,因 Zeocin"会引起完整细胞死亡。

**选择浓度:** 50-300ug/mL ,取决于酵母菌类型、培养基 pH 和离子强度。建立杀灭曲线确定能杀死未转化宿主最低 Zeocin"浓度。



### 3) 哺乳动物细胞 (Mammalian cells)

通常 50-1000ug/mL 用于筛选稳定转染的细胞系(平均常用浓度为 250-400ug/mL)。取决于细胞系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) 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  $\mu$ g/ml,每个浓度做 3 个平行;也可根据自身实验体系,设定不同的浓度梯度。
- 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。

**[注]:** Zeocin"的杀灭机制不同于新生霉素(neomycin)和潮霉素 B(hygromycinB),细胞不会聚集成团和从培养板表面脱落。一旦接触到 ZeocinTM,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弓起的肿大效应);
- 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。

#### 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%。

#### 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];

#### 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) 存储 Zeocin" 在 -30°C~-10°C,使用前需水上融化。
- 4) Zeocin"有毒,为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 相关产品

产品货号	产品名称	规格
FS0017	Zeocin 博莱霉素 Phleomycin 腐草霉素(powder)	100mg
FS0018	博莱霉素 Phleomycin 腐草霉素 (100 mg/ml)	125mg
FS0012	Hygromycin B 潮霉素 B (50 mg/ml)	20ml