

潮霉素 B（液体）

货号：H8080

规格：10ml（1g）

保存：2-8℃避光保存，有效期 4 年。

产品参数：

CAS：31282-04-9

英文名称：Hygromycin B

别称：Hygromix；O-6-Amino-6-deoxy-L-glycero-D-galactoheptopyranosylidene-(1-2-3)-O-β-Dtalopyranosyl- (1-5)-2-deoxy -N3-methyl-D-streptamine；潮霉素 B 溶液；湿霉素乙；效高素

外观（性状）：无色至浅黄色澄清溶液

分子式：C₂₀H₃₇N₃O₁₃

分子量：527.52

浓度：100mg/mL in water

酶活/效价：1100units/mg

危险代码：R：26/27/28-41-42/43 S：22-26-28-36/37/39-45

产品说明：

潮霉素 B（Hygromycin B）是由吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）代谢产生的一种氨基糖苷类抗生素，通过干扰 70S 核糖体易位和诱导对 mRNA 模板的错读而抑制蛋白合成，从而杀死原核（如细菌）、真核（如酵母菌，真菌）和高等哺乳动物真核细胞。是一种蛋白质合成抑制剂，可用于植物细胞培养等生化研究。

大肠杆菌（*Escherichia coli*）来源的潮霉素抗性基因（*hyg* 或 *hph*），编码潮霉素 B 磷酸转移酶，将潮霉素 B 转化成不具有生物活性的磷酸化产物，从而起到解毒作用。针对这一原理，潮霉素 B 是一种非常有用的选择性标记，用来筛选和维持培养成功转染潮霉素抗性基因的原核或者真核细胞。另外，由于作用模式的差异，常与 G-418 (Cat: G8161)，Zeocin (Cat: Z8020) 和 Blasticidin S (Cat: B9300) 联合使用进行双抗性阳性细胞株的选择。潮霉素 B 还能用作抗病毒剂，因其选择性渗透进入因病毒感染增强通透性的细胞，且具有抑制翻译的功效。还可混合入动物饲料中起到驱虫功能。

选择抗性细胞的工作浓度为 25-100ug/ml。哺乳动物细胞常用的选择浓度为 200ug/ml，植物细胞和细菌细胞为 20-200ug/ml，真菌为 200-1000ug/ml。具体最佳浓度应该通过实验来测试。

使用说明（仅供参考）：

本品是无菌的潮霉素 B 溶液（100mg/ml），可直接用培养液稀释使用。

1. 常用筛选浓度

注意：潮霉素 B 用来筛选稳转株的工作浓度需要根据细胞类型，培养基，生长条件和细胞代谢率而变化，推荐使用浓度为 50-1000μg/mL。对于第一次使用的实验体系建议通过建立





杀灭曲线 (kill curve), 即剂量反应性曲线, 来确定最佳筛选浓度。

一般而言, 哺乳动物细胞 50-500 $\mu\text{g/mL}$; 细菌/植物细胞 20-200 $\mu\text{g/mL}$; 真菌 200-1000 $\mu\text{g/mL}$ 。

2. 杀灭曲线的建立

注意: 为了筛选得到稳定表达目的蛋白的细胞株, 需要确定能够杀死未转染宿主细胞的抗生素最低浓度, 可通过建立杀灭曲线 (剂量反应曲线) 来实现, 至少选择 5 个浓度。

1) 第一天: 未转化的细胞按照 20-25% 的细胞密度铺在合适的培养板上, 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 培养过夜; 注: 对于需要更高密度来检测活力的细胞, 可增加接种量。

2) 根据细胞类型, 设定合适范围内的浓度梯度。以哺乳动物细胞为例, 可设定 50, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。先用去离子水或者 PBS buffer 按照 1:20 的比例将母液稀释到 5 mg/ml, 然后按照下表稀释到相应浓度的工作液。

终浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	培养基体积 (ml)	5mg/ml 潮霉素 B 加入体积 (ml)
50	9.9	0.1
100	9.8	0.2
250	9.5	0.5
500	9.0	1.0
750	8.5	1.5
1000	8.0	2.0

3) 第二天: 替换旧的培养基, 换用新鲜配制的含有相应浓度药物的培养基。每个浓度做三个平行孔。

4) 接下来每 3-4 天更换新的含药物培养基。

5) 按照固定的周期 (如每 2 天) 进行活细胞计数来确定阻止未转染细胞生长的恰当浓度。选择在理想的天数 (通常是 7-10 天) 内能够杀死绝大多数细胞的最低浓度为稳定转染细胞筛选的工作浓度。

3. 稳定转染细胞的筛选

1) 转染 48h 后, 用含有适当浓度的潮霉素 B 筛选培养基来传代细胞 (直接传代或者稀释后传代)。

注意: 细胞处于活跃分裂状态时抗生素的杀伤效果最好。则当细胞过于稠密, 其效率会降低。为了得到较好的筛选效果, 最好将细胞稀释至丰度不超过 25%。

2) 每隔 3-4 天更换含有药物的筛选培养液。

3) 筛选 7 天后观察并评估细胞克隆 (集落) 的形成情况。集落的形成可能还需要一周或者更多的时间, 这取决于宿主细胞类型, 转染, 以及筛选效果。

4) 挑取并转移 5-10 个抗性克隆于 35mm 细胞培养板, 继续用含药物的筛选培养液维持培养 7 天。

5) 之后更换正常培养基培养即可。

常见问题:

1. 非转染细胞如何逃避抗生素选择?

如果抗生素浓度过低或平板上细胞密度过高, 细胞就会逃避选择。此外, 快速增殖的细胞比缓慢增殖的细胞死亡得快。对照组细胞应在添加抗生素后 5-7 天内死亡, 从而在 10-14 天内形成耐药细胞群。



2. 如何确定毒性浓度？

不同细胞类型培养基中加入的不同浓度的潮霉素 B。通过对每种细胞类型进行滴定实验，以确定杀死非转染细胞所需的潮霉素 B 的用量。哺乳动物细胞选择的工作浓度通常在 50ug/ml 至 1mg/ml 之间，植物细胞：20-200ug/ml，细菌：20-200ug/ml，真菌：200ug-1mg/ml。应通过实验确定合适的浓度。

3. 如何绘制剂量反应曲线？

确定杀死非转染宿主细胞系所需的最低抗生素浓度：

- 1) 测试浓度范围 (5-6)，以确保确定细胞系所需的最低浓度。
- 2) 将汇合度约为 20-25% 的细胞接种到适当数量的平板上，让细胞粘附过夜。对于需要更高密度才能存活的细胞，可增加接种细胞的数量。
- 3) 第二天，培养基换成含有不同浓度抗生素的培养基。
- 4) 每隔 3-4 天补充一次选择性培养基。
- 5) 定期计数活细胞的数量，以确定阻止非转染细胞生长的抗生素的适当浓度。选择能在所需天数（通常为 7-10 天）内杀死大部分细胞的浓度。

4. 如何维持转染细胞系的耐潮霉素 B 表型？

为了保持转染细胞株的耐潮霉素 B 表型，可定期用含初始筛选所用相同浓度的潮霉素 B 培养基培养细胞。

5. 培养基的更换？

只有当培养的细胞消耗了营养成分时，培养基会酸化，此时需要更换含有潮霉素 B 的培养基。使用酚红或含有酚红的培养基可以检测酸化。当培养基变成黄色，则证明培养基酸化，需更换培养基。

6. 潮霉素 B 对酸敏感吗？

潮霉素 B 对高浓度的酸敏感，但短暂处于稀酸中并不影响其稳定性。

7. 我们能提高细胞对抗生素的敏感性吗？

可以通过提高培养基的 pH 值来提高细胞对潮霉素 B 的敏感性。盐浓度越低，敏感性越高。

8. 什么酶可以使潮霉素 B 失活？

潮霉素磷酸转移酶(hpt)通过磷酸化使抗生素失活。潮霉素磷酸转移酶基因(hpt, hph 或 aphIV)编码潮霉素磷酸转移酶，并被用作植物和动物系统的选择性标记基因。

注意事项：

1. 潮霉素 B 的抗性基因 (hyg 或 hph) 除了来自 E. Coli. 之外，还发现于其他的菌株，包括 *Streptomyces hygroscopicus* 和 *Klebsiella pneumoniae*。
2. 本品为有毒化合物，对眼睛和皮肤有刺激性，带好防护具并局部通风，小心操作。
3. 产品信息仅供参考，如有疑问请致电 400-968-6088 咨询。
4. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。

