

产品使用说明书 Product Manual

潮霉素 B 溶液 (50 mg/mL)

品牌	Chinook 钦诺克
货号	CN250231
中文名称	潮霉素 B 溶液 (50 mg/mL)
英文名称	Hygromycin B Solution (50 mg/mL)
产品别名	潮霉素 B 溶液 (50 mg/mL, 无菌)
用途	用于细胞培养相关实验
成分:	
潮霉素 B Hygromycin B	1.0g
PBS(0.01 M)	20mL
产品介绍:	
<p>潮霉素 B(Hygromycin B)是由吸水链霉菌(<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)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)、植物和高等哺乳动物真核细胞。</p> <p>大肠杆菌(<i>Escherichia coli.</i>)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。</p> <p>另外, 由于作用模式的差异, 常与 G418(Geneticin™), Zeocin™ 和 Blasticidin S 联合使用进行双抗性阳性细胞株的选择。因潮霉素 B 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, 还能用作抗病毒剂。还可混合入动物饲料中起到驱虫功能。</p>	
使用方法:	
<p>1. 工作浓度的筛选</p> <p>潮霉素 B 用来筛选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(kilcurve), 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 μg/mL; 细菌/植物细胞 20-200μg/mL; 真菌 300-1000μg/mL。</p> <p>2. 杀灭曲线的建立</p>	

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

(1)按照 20-25%的细胞密度将未转化的细胞铺在合适的培养板上, 37°C, CO₂ 过夜培养(需要更高密度, 可增加接种量)。

(2)根据细胞类型, 设定合适的浓度梯度。以哺乳动物细胞为例, 可设定 50, 100, 250, 500, 750,1000µg/mL

(3)第 2 天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)按照每 2 天进行活细胞计数, 来确定杀灭未转染细胞的恰当浓度。通常 7-10 天内能够杀死绝大多数细胞的最低浓度为筛选用的工作浓度。

4、稳定转染细胞的筛选

(1)转染 48h 后, 用含适当浓度的潮霉素 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。但细胞过于稠密, 其效率会降低, 最好将细胞稀释至丰度低于 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(取决于宿主细胞类型, 转染, 以及选效果)。

(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)后续更换正常培养基培养即可。

储存方式:

冰块运输, 2-8°C 保存; 贮存期一年。

注意事项:

1. 潮霉素 B 不能高压灭菌。
2. 潮霉素 B 的抗性基因(hyg 或 hph)来自 E. Coli.、Streptomyces hygrosopicus 和 Klebsiella pneumoniae。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

废物处理:

检测之后带菌物品置于 121°C下高压灭菌 30 分钟后处理。

附录：

微生物培养基正确配置方法及注意事项

步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

步骤二：溶解

1. 搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水**并用玻璃棒小幅度搅拌**。

注意：一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

2. 加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热**；相反**含有琼脂**，需要用**本生灯/电磁炉加热煮沸**。

注意：

(1) 琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

(2) 不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

(3) 琼脂溶解不充分导致非常严重的后果，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。

3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，**防止焦化**。

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。

注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

①其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

步骤三：调培养基 pH

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

(1) 如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸**。

(2) 然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠**或 **1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4 ~ 7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需将 pH 调至比要求值高 0.1 ~ 0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~ 0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

步骤四：培养基过滤

1.如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。

2.培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121°C 高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

步骤五：培养基分装

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。

用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37°C 培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

(1) 高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121°C 十五分钟

②对于大份：121°C 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115°C/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化。**

(2) 煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

(3) 过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

(1) 倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。

(2) 在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。

(3) 试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。

(4) 不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开灭菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高, 否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水; 温度太低, 培养基容易凝固成块状, 不能做成平板。

2.倒平板时, 要靠近酒精的火焰 (以此防止外来细菌落入盘中)。左手托住培养皿, 右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞, 烧灼烧瓶口, 用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝, 直到烧瓶口刚好伸进去, 倒入培养基, 直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一, 迅速盖上盖子, 放在桌上后轻轻旋转培养皿, 使培养基分布均匀, 凝结后即可。24 小时后检查, 如培养基未长杂菌, 即可用来培养微生物。

步骤八：培养基摆斜面

灭菌完成后, 将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上, 并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。(斜面长度不超过试管的二分之一)

步骤九：微生物培养基质检

1. 检验培养基灭菌后, 若发现有破损, 浸水, 颜色异常, 棉塞被培养基污染。所有这些问题, 都必须丢弃, 不能重复使用, 并确定其最终 pH 值。

2.无菌检查和效果检查也是必需的。

(1) 无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基, 37°C 孵育一两天, 确认无细菌生长。

(2) 效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格, 准备好的培养基就可以使用了。