

杀稻瘟菌素 (Blasticidin) 使用说明书

■ 产品包装和保存条件

产品名称	货号	规格	浓度	纯度
杀稻瘟菌素 (Blasticidin)	HB-BSD-500	500 μ L	2 mg/mL	>95%(HPLC)
杀稻瘟菌素 (Blasticidin)	HB-BSD-1000	1 mL	2 mg/mL	>95%(HPLC)

注：a. 建议分装保存，避免反复冻融，否则活性受到影响。

b. 杀稻瘟菌素为了达到最理想的稳定状态和最长的保质期，最好存放于-20°C，保质期为 1 年。

■ 产品简介

杀稻瘟菌素 (Blasticidin, BSD) 是一种来自 *Streptomyces griseochromogenes* 的核苷类抗生素，通过干扰核糖体中肽键的形成来特异性地抑制原核和真核生物的蛋白质合成。Blasticidin 用于筛选携带有 bsr 或 BSD 耐受基因的转染细胞。杀稻瘟菌素具有快速而强效的作用模式，很低的抗生素浓度便能导致细胞迅速死亡。

■ 抗性基因

目前已经克隆和测序的杀稻瘟菌素耐受基因有 3 种，一种是分离自产生菌 *Streptoverticillum* sp. 的乙酰基转移酶基因 bls, 另外两种是脱氨酶基因, 包括从 *Bacillus cereus* 中分离的 bsr 和从 *Aspergillus terreus* 中分离的 BSD 基因。Bsr 和 BSD 基因是常用的筛选标志，用于哺乳动物和植物细胞的基因转移实验，也可用于 E.Coli。

不同细胞对 BSD 的敏感度不同，在筛选之前，要通过预实验确定 BSD 的最佳筛选浓度，BSD 推荐用 1~100 μ g/mL 的范围筛选合适的浓度，BSD 在哺乳动物中最常用的工作浓度为 1~30 μ g/mL，BSD 的作用时间是 10 天左右，可参考文献并进行预实验摸索。

■ 产品使用

使用步骤：（哺乳动物细胞筛选）

▶ 杀稻瘟菌素杀灭曲线的确定（目的稳定转染细胞株，仅作参考）

为了筛选到稳定表达待研究目的的细胞株，确定杀死未转染细胞的最低浓度杀稻瘟菌素至关重要。

所以初次做实验的客户需要建立适合自己实验体系的杀死曲线（kill curve）。

- (1) 24 孔板内以 $5\sim 8\times 10^4$ cells/孔的密度铺板，铺足够量的孔以进行后续的梯度实验。细胞孵育过夜；
- (2) 准备筛选培养基-含不同浓度杀稻瘟菌素的新鲜培养基（如：0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，至少 5 个梯度）；
- (3) 细胞孵育过夜后加入筛选培养基，孵育细胞；
- (4) 约 3-4 天更换新鲜的筛选培养基；
- (5) 每日监测细胞观察存活细胞比例。杀稻瘟菌素的最佳作用时间一般在 10 天左右。
- (6) 最小的抗生素使用浓度就是指从抗生素筛选开始 1-10 天内杀死所用细胞的最低筛选浓度。

▶ 杀稻瘟菌素筛选稳定转染细胞

Blasticidin 通常使用浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。携带 bsr 或 BSD 基因的质粒转染到细胞中，在含有 Blasticidin 的正常生长培养基中孵育，用于筛选稳定转染细胞株。

- (1) 转染 48h 后，待细胞状态稳定后，用含有适宜浓度 Blasticidin 的新鲜培养基将细胞传代（注：细胞处于活跃分裂期时抗生素工作好。细胞密度太高，抗生素效率降低。细胞分盘时覆盖率好不超过 25%）；
- (2) 每 3-4 天去除培养基，加入含抗生素的新鲜培养基；
- (3) 7-10 天后检测细胞集落形成。根据宿主细胞种类和转染/筛选效率，集落形成可能需要增加一周或更久。
- (4) 转移 5-10 个耐受克隆到 35mm 细胞盘中，加入选择培养基维持培养 7-10 天。随后用细胞毒性实验进行检测。

■ 杀稻瘟菌素 (Blasticidin) 推荐使用浓度

细胞名称	Species	Blasticidin (ug/ml)
Hela	Human	5-10
293	Human	3-10
THP-1	Human	10
CHO	Mouse	5-10
Neuro2a	Mouse	10-30
B16	Mouse	3-10
PC1.0	Hamster	10-30
其他哺乳动物	/	1-30
细菌	/	25-100

■ 参考文献

- [1] Masako IzuMi and Hiroshi Miyazawa and Takashi Kamakura and Isamu Yamaguchi and Toyoshige Endo and Fumio Hanaoka. Blasticidin S-resistance gene (bsr): A novel selectable marker for mammalian cells[J]. Experimental Cell Research, 1991.
- [2] Ochiai H , Harashima H , Kamiya H . Silencing of Exogenous DNA in Cultured Cells[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2006, 29(6):1294-6.
- [3] 张立群, 段文元, 许雪青,等. B7-H1 慢病毒的制备及其在 B16F10 细胞中的表达鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(001):24-27.
- [4] Svidritskiy E , Ling C , Ermolenko D N , et al. Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome[J]. Pnas, 2013, 110(30).