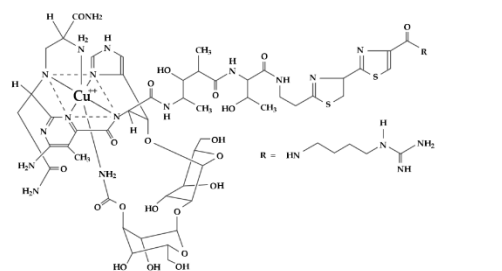


## Phleomycin (腐草霉素)

产品编号	产品名称	包装
ST1449-5mg	Phleomycin Powder (腐草霉素粉末)	5mg
ST1449-25mg	Phleomycin Powder (腐草霉素粉末)	25mg
ST1449-0.25ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	0.25ml
ST1449-1ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	1ml

### 产品简介:

- Phleomycin是以Phleomycin D1为主的结构类似的糖肽类抗生素混合物, 中文名称为腐草霉素, 是从轮状链霉菌(*Streptomyces verticillus*)的一个突变体菌株中分离而来。它对细菌、真菌(包括酵母)、植物和哺乳动物细胞均有抑制作用和细胞毒性。标准的Zeocin是以Phleomycin为有效成分, 添加了辅料后的混合物。很多时候也把Phleomycin或Phleomycin D1称为Zeocin。标准的Zeocin添加了辅料, 导致其中的有效成分含量下降, 使用的时候请注意适当调整用量和浓度。
- Phleomycin是一种碱性、水溶性的、铜离子螯合的糖肽抗生素。Cu<sup>2+</sup>螯合的Phleomycin溶液呈现蓝色, 无活性。当其进入细胞后, Phleomycin上的Cu<sup>2+</sup>被还原为一价铜离子(Cu<sup>+</sup>), 并被细胞内的巯基化合物(sulfhydryl compound)清除, 导致Phleomycin被活化, 能够结合到细胞内DNA上并使其断裂, 最终导致细胞死亡。
- 对Phleomycin产生抗性的蛋白是来源于印度链球菌(*Streptoalloteichus hindustanus*)的*Sh ble*基因编码一种14kDa大小的蛋白[1], 它能够以一定比率结合Phleomycin, 使其不能结合细胞DNA, 抑制其DNA断裂活性, 从而使细胞对Phleomycin产生抗性。因此, Phleomycin可用来筛选表达Phleomycin抗性基因的多克隆或单克隆细胞, 或用于相应的多克隆或单克隆细胞的维持性培养。
- Phleomycin对于绝大多数好氧细胞均有效, 常用于细菌(如大肠杆菌)、真核微生物(如酵母)及动植物细胞的筛选。大肠杆菌筛选推荐浓度为5μg/ml (低盐LB培养基, NaCl浓度不能超过5g/L); 酵母筛选推荐浓度为10μg/ml (YPD或基本培养基); 哺乳动物细胞筛选推荐浓度为5~50μg/ml (根据细胞类型选择合适的细胞培养液)。实际应用时, 应针对不同的细胞系测试Phleomycin的浓度梯度, 以确定最佳使用浓度。
- Zeocin (博莱霉素) (ST1450/ST1451)也是博来霉素家族的糖肽抗生素, 其有效成分和Phleomycin (腐草霉素)基本一致, 都为Phleomycin D1, 抗性基因也都为*Sh ble*。两者的配方有一定的区别, Zeocin是以Phleomycin D1为主要成分的一种配方, 添加了不同的辅料, 更适用于哺乳动物细胞的筛选; 而Phleomycin是结构相似抗生素的混合物, 它们的末端氨基有一定的区别, 建议用于对Zeocin不敏感的细胞, 如丝状真菌和一些酵母等。
- **化学性质(主要组分为Phleomycin D1):**

化学名	(7R)-N1-[4-[[Amino(imino)methyl]amino]butyl]-7,8-dihydrobleomycinamide, hydrochloric	
化学式	C <sub>55</sub> H <sub>85</sub> O <sub>21</sub> N <sub>20</sub> S <sub>2</sub> Cu, HCl	
CAS号	11006-33-0	
内毒素水平	< 1EU/mg	
分子量	1525	
溶解性	H <sub>2</sub> O: ≥20mg/ml	

- 本产品溶液包装配制在HEPES溶液中, 浓度为20mg/ml, 经0.22μm滤膜过滤除菌, 可以直接用于细胞培养。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
ST1449-5mg	Phleomycin Powder (腐草霉素粉末)	5mg
ST1449-25mg	Phleomycin Powder (腐草霉素粉末)	25mg
ST1449-0.25ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	0.25ml
ST1449-1ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	1ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C避光保存, 至少一年有效。20mg/ml溶液包装适当避免反复冻融。

## 注意事项:

- Phleomycin Powder易吸潮, 粉末装每次使用后须旋紧盖子。
- Phleomycin对人体有害, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 高离子强度、酸或碱性都会抑制Phleomycin的活性, 该抗生素在过高或过低pH及弱氧化剂的条件下不稳定, 且变性不可逆。在培养细菌时, 需适当降低细菌培养基的盐浓度(低盐LB培养基, NaCl浓度不能超过5g/L)并调整pH至7.5, 从而使其保持活性。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

### 1. 细菌的筛选(以大肠杆菌为例)。

- 使用不含Tn5转座子元件的宿主细胞如Top10、DH5和DH10等进行筛选
- 需使用低盐LB培养基(10g胰蛋白胨, 5g NaCl, 5g酵母提取物, 调整pH至7.5, 加水定容至1L)以维持Phleomycin的活性。
- Phleomycin筛选的推荐浓度为5 $\mu$ g/ml。

### 2. 真菌的筛选(以酵母为例)。

- 适用于酿酒酵母和毕赤酵母。
- 培养基的选择: 含1M山梨醇的YPD培养基(适用于电穿孔法转染细胞); YPD或基本培养基(适用于化学法转染细胞)。调整培养基pH至6.5~8.0, 并选择使用最低有效浓度的Phleomycin进行筛选。
- 转染方法: 需使用电穿孔或锂离子转染法。不要使用酵母原生质球(spheroplasting)进行Phleomycin抗性的转染及筛选, 因为Phleomycin会导致原生质球的完全死亡。
- Phleomycin筛选的推荐浓度为10 $\mu$ g/ml。具体浓度与酵母菌株、培养基pH以及离子强度有关。对于丝状真菌(filamentous fungi), Phleomycin筛选的推荐浓度为25-150 $\mu$ g/ml。

### 3. 哺乳动物稳定表达细胞株的筛选。

Phleomycin用于哺乳动物细胞筛选常用浓度为5-50 $\mu$ g/ml。影响筛选浓度的主要因素包括离子强度、细胞类型、细胞生长密度以及生长速率。根据细胞类型的不同, 需要1-2周可以筛选到Phleomycin抗性的细胞。在筛选稳定表达细胞株之前, 需要先确定能够杀死未转染细胞的Phleomycin最佳工作浓度。Phleomycin的最佳工作浓度需要通过剂量效应曲线来确定。

#### a. 细胞对Phleomycin敏感性的确定(杀灭曲线的建立)。

- 接种细胞使得细胞密度约为25%, 按照8、16或24个细胞培养孔(分别为单个培养孔、复孔和三复孔)准备培养的细胞, 培养24h。
- 去除细胞培养液, 换成含不同浓度Phleomycin的新鲜筛选培养液(0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu$ g/ml或更高)。
- 每2-4天更换新鲜的筛选培养液, 观察存活细胞的比例, 选择在1-2周内杀死所有细胞的最低浓度作为最佳工作浓度。

#### b. 筛选Phleomycin抗性的稳定细胞株。

- 按照20%-30%的细胞密度接种细胞, 培养过夜。
- 转染携带Phleomycin抗性基因的质粒或感染携带Phleomycin抗性基因的病毒, 同时设置没有转染质粒或感染病毒的细胞作为对照。**说明:** 没有转染质粒或感染病毒的细胞, 也需要同样进行转染质粒或感染病毒的相应实验操作。
- 转染或感染48-72h后, 换成含有最佳工作浓度的Phleomycin (由步骤a中的杀灭曲线确定)的新鲜培养液, 继续培养。如果有必要, 可以对细胞进行传代, 略稀释后进行筛选培养。
- 每2-4天更换含有Phleomycin的新鲜筛选培养液。
- 对照组正常细胞100%死亡, Phleomycin抗性组中存活的细胞即为表达Phleomycin抗性基因的细胞。然后根据实验目的进行多克隆或单克隆细胞的筛选。根据细胞种类和转染/筛选效率, 单克隆细胞株的形成可能需要一周或更多的时间。  
注意: 若待筛选细胞对Phleomycin的抗性明显强于大部分细胞, 则按照以下方法克服此类耐受性: 用含Phleomycin培养液进行细胞接种培养, 置于37 $^{\circ}$ C孵育2-3h, 使得细胞贴壁。然后将细胞置于4 $^{\circ}$ C, 2h。需要使用HEPES作为培养基的缓冲体系。重新将细胞置于37 $^{\circ}$ C孵育。4 $^{\circ}$ C孵育细胞的目的是短时间内终止细胞分化, 使得Phleomycin能发挥作用, 杀死细胞。

#### c. 稳定细胞株的维持培养。

可采取如下几种方式之一来维持培养稳定细胞株。

- 使用含有与上述筛选稳定转染细胞株相同浓度的Phleomycin筛选培养液来维持培养。
- 降低Phleomycin浓度为筛选浓度的一半进行维持培养。
- 使用刚好能预防敏感细胞生长但不足以致死的Phleomycin浓度来维持培养(根据杀灭曲线来判断)。

## 参考文献:

- Li Z, Bock R. Nat Commun. 2018. 9(1):3451.

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
ST018-1ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml $\times$ 1ml
ST018-5ml	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg/ml $\times$ 5ml
ST018-10mg	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	10mg
ST018-50mg	Blasticidin S HCl (灭瘟素S)	50mg

ST039A	Doxycycline hyclate(盐酸强力霉素)	1g
ST039B	Doxycycline hyclate(盐酸强力霉素)	50g
ST081-1ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×1ml
ST081-5ml	G418 (遗传霉素)	50mg/ml×5ml
ST081-1g	G418 (遗传霉素)	1g
ST081-5g	G418 (遗传霉素)	5g
ST551-10mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×1ml
ST551-50mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×5ml
ST551-250mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	250mg
ST1389-50mg	Hygromycin B (潮霉素B)	50mg
ST1389-250mg	Hygromycin B (潮霉素B)	250mg
ST1389-1g	Hygromycin B (潮霉素B)	1g
ST1389-5g	Hygromycin B (潮霉素B)	5g
ST1449-5mg	Phleomycin Power (腐草霉素粉末)	5mg
ST1449-25mg	Phleomycin Power (腐草霉素粉末)	25mg
ST1449-0.25ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	0.25ml
ST1449-1ml	Phleomycin Solution (腐草霉素溶液, 20mg/ml)	1ml
ST1450-20mg	Zeocin (博莱霉素)	20mg
ST1450-100mg	Zeocin (博莱霉素)	100mg
ST1450-0.25ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×0.25ml
ST1450-1ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×1ml
ST1451-100mg	Zeocin Power (博莱霉素粉末)	100mg
ST1451-500mg	Zeocin Power (博莱霉素粉末)	500mg
ST1451-1ml	Zeocin Solution (博莱霉素溶液, 100mg/ml)	1ml
ST1451-5ml	Zeocin Solution (博莱霉素溶液, 100mg/ml)	1ml×5

Version 2023.10.26