

博莱霉素 (91-02-0113)

[产品描述]

博莱霉素，是从轮状链霉菌(*Streptomyces verticillus*)的一个突变体菌株中分离而来的博莱霉素/腐草霉素(bleomycin/phleomycin)的抗生素家族成员。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。

博莱霉素是一种碱性、水溶性的、铜离子螯合的糖肽抗生素。Cu²⁺螯合的博莱霉素溶液呈现蓝色，无活性。当其进入细胞后，博莱霉素上的 Cu²⁺被还原为一价铜离子(Cu⁺)，并被细胞内的巯基化合物(sulfhydryl compound)清除，导致博莱霉素被活化，能够结合到细胞内 DNA 上并使其断裂，最终导致细胞死亡。

对博莱霉素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，它能够以一定比率结合博莱霉素，使其不能结合细胞 DNA，抑制其 DNA 断裂活性，从而使细胞对博莱霉素产生抗性。因此，博莱霉素可用来筛选表达博莱霉素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。

博莱霉素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 25~50μg/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 50~300μg/ml (YPD 或基本培养基)；哺乳动物细胞筛选推荐浓度为 50~1000μg/ml (合适培养基，根据细胞系的类型而不同)。实际应用时，应针对不同的细胞系测试博莱霉素的浓度梯度，以确定最佳使用浓度。

本产品溶液包装配制在去离子水中，浓度为 20mg/ml，经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌，可以直接用于细胞培养。

产品名称	货号	规格	储存条件	保质期
博莱霉素	91-02-0113	1mL	-20℃	1 年

[保存条件]

-20℃，避光保存，至少一年有效。20mg/ml 溶液包装避免反复冻融。

[注意事项]

- 博莱霉素对人体有害，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。
- 博莱霉素对光敏感，需避光保存于-20℃。含有该抗生素的平板或培养基也需避光保存。
- 高离子强度、酸或碱性都会抑制博莱霉素的活性，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)

- a. 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
- b. 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)以维持博莱霉素的活性。
- c. 博莱霉素筛选的推荐浓度为 25~50 μ g/ml。

2. 真菌的筛选(以酵母为例)

- a. 适用于酿酒酵母和毕赤酵母。
- b. 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博莱霉素进行筛选。
- c. 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)进行博莱霉素抗性的转染及筛选，因为博莱霉素会导致原生质球的完全死亡。
- d. 博莱霉素筛选的推荐浓度为 50~300 μ g/ml。具体浓度与酵母菌株、培养基 pH 以及离子强度有关。

3. 哺乳动物稳定表达细胞株的筛选

博莱霉素用于哺乳动物细胞筛选常用浓度为 50-1000 μ g/ml (平均常用浓度为 250-400 μ 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 周可以筛选到博莱霉素抗性的细胞。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博莱霉素最佳工作浓度。博莱霉素的最佳工作浓度需要通过剂量效应曲线来确定。下表中列出了部分细胞中博莱霉素的筛选浓度范围以供参考。

表 1. 部分常见哺乳动物细胞的博莱霉素推荐筛选浓度表

细胞类型	培养基	博莱霉素浓度
B16 (Mouse melanocytes)	RPMI	20-250µg/ml
CHO (Chinese hamster ovarian cells)	DMEM	100-500µg/ml
COS (Monkey kidney cells)	DMEM	100-400µg/ml
HEK293 (Human embryonic kidney cells)	DMEM	100-400µg/ml
HeLa (Human uterine cells)	DMEM	50-100µg/ml
J558L (Mouse melanocytes)	RPMI	400µg/ml
MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cells)	DMEM	100-400µg/ml
MEFs (Mouse embryonic fibroblasts)	DMEM	200-400µg/ml
THP-1 (Human monocytes)	RPMI	200µg/ml

a. 细胞对博莱霉素敏感性的确定(杀灭曲线的建立)

(a) 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)准备培养细胞，培养 24h。

(b) 去除细胞培养液，换成含不同浓度博莱霉素的新鲜筛选培养液(0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 和 1000µg/ml)。

(c) 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 Zeocin 抗性的稳定细胞株

(a) 按照 20%-30%的细胞密度接种细胞，培养过夜。

(b) 转染携带博莱霉素抗性基因的质粒或感染携带博莱霉素抗性基因的病毒，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。

(c) 转染或感染 48-72h 后，换成含有最佳工作浓度的博莱霉素(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。

(d) 每 2-4 天更换含有博莱霉素的新鲜筛选培养液。

(e) 对照组正常细胞 100%死亡，博莱霉素抗性组中存活的细胞即为表达博莱霉素抗性基因的细胞。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：若待筛选细胞对博莱霉素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：用含博莱霉素培养液进行细胞接种培养，置于 37°C 孵育 2-3h，使得细胞贴壁。然后将细胞置于 4°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°C 孵育。4°C 孵育细胞的目的是短时间内终止细胞分化，使得博莱霉素能发挥作用，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。

(a) 使用含有与上述筛选稳定转染细胞株相同浓度的博莱霉素筛选培养液来维持培养。

(b) 降低博莱霉素浓度为筛选浓度的一半进行维持培养。

(c) 使用刚好能预防敏感细胞生长但不足以致死的博莱霉素浓度来维持培养(根据杀灭曲线来判断)。