

抗生素杀伤曲线

背景

抗生素杀伤曲线是一种剂量反应。细胞培养过程中，通过增加抗生素的浓度，确定致死所有未转染细胞的最低抗生素用量。未转染细胞不含抗抗生素基因的表达；转染细胞含抗抗生素基因的表达。进行杀伤实验后，方能确定抗生素的使用浓度，才能筛选出转染细胞，并获得稳定增长的目标菌株。由于每种细胞对抗生素的敏感程度不同，所以对于不同的菌株和抗生素，建议分别进行杀伤曲线实验。

▶ 杀伤曲线方案

细胞生成杀伤曲线的步骤：

1. 所需要的：

健康的目标菌株、适配目标菌株的培养基、合适的抗生素

2. 步骤：

- 用胰蛋白酶消化附着细胞，或者使用温和的方法进行细胞破壁。
- 用培养基稀释细胞悬浮液，并在96孔板中接种，使得最终体积为100 μ L。一般抗生素反应时，建议细胞浓度为~50%。
- 抗生素处理前，一般建议细胞浓度为：附着细胞0.8-2.5 $\times 10^5$ 个/mL，悬浮细胞2.5-4.5 $\times 10^5$ 个/mL。
- 37 $^{\circ}$ C下反应过夜，或直至细胞处于最佳的生长阶段。

注：当细胞处于活跃生长阶段时，抗生素效果最佳；此时最佳的细胞浓度适用于大部分剂量反应。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	30 μ g/ml	40 μ g/ml	50 μ g/ml	60 μ g/ml	70 μ g/ml	80 μ g/ml	90 μ g/ml	100 μ g/ml
B	Blank	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	30 μ g/ml	40 μ g/ml	50 μ g/ml	60 μ g/ml	70 μ g/ml	80 μ g/ml	90 μ g/ml	100 μ g/ml
C	Blank	0 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	30 μ g/ml	40 μ g/ml	50 μ g/ml	60 μ g/ml	70 μ g/ml	80 μ g/ml	90 μ g/ml	100 μ g/ml
D												
E												
F												

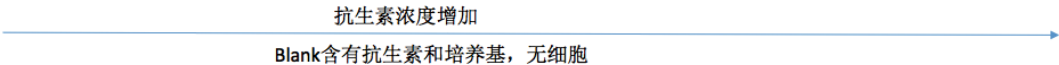


图1

- 将菌种转接入带不同抗生素浓度的新鲜培养基。如图1所示，96孔板中各浓度抗生素各进行3个平行样。
- 每48小时转接一次。
- 通常培养7-10天时，可用光学显微镜观察细胞。根据不同菌株，可适当延长培养时间至14天左右。
- 培养至第10天左右，可用MTT法或其他精准的细胞计数法测定各个孔中的细胞存活情况。
- 选择可以完全抑制细胞生长的抗生素浓度，并将此浓度的抗生素用于筛选具有抗性的已转染细胞。



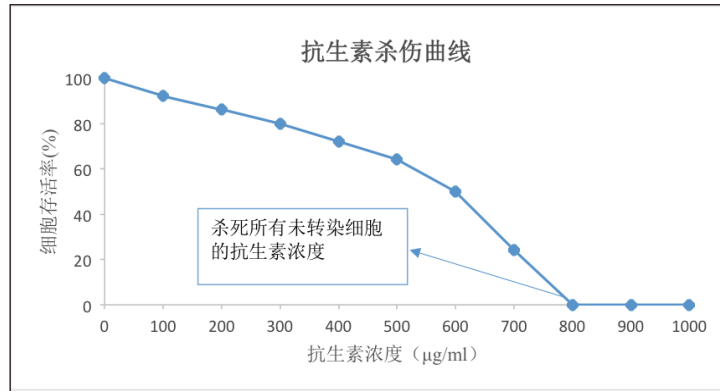


图2

要点

- 选择合适的Control和Blank:
 - 含有抗生素和培养基，无细胞
 - 含有培养基和细胞，不含抗生素
- 确保培养箱处于良好的工作状态，以避免培养基蒸发，否则会增加抗生素的浓度，造成错误读数。

推荐浓度

下表显示了剂量反应实验中可能采用的常用选择抗生素的浓度范围。

项目号	抗生素名称	规格	浓度范围
A105482	两性霉素B	80%, 750 µg/mg	0.25-2.50 mg/mL
B107423	硫酸博来霉素	1.5-2.0 units/mg	10-50 µg/ml
C113144	羧苄青霉素钠	USP级	100-1000 µg/ml
C100334	氯霉素	用于植物细胞培养	5-50 µg/ml
G110917	G-418 硫酸盐	potency: ≥650 µg per mg	100-800 µg/ml
G100391	硫酸庆大霉素	USP级	50-1000 µg/ml
G100392	硫酸庆大霉素	potency: ≥590 µg Gentamicin per mg	50-1000 µg/ml
H113147	潮霉素B	粉末, ≥60% (HPLC)	200-800 µg/ml
H113146	潮霉素B溶液	≥60% (HPLC), 45-60 mg/mL in H ₂ O	200-800 µg/ml
K103024	硫酸卡那霉素	USP grade, 来源于卡那霉素链霉菌	100-1000 µg/ml
K103025	硫酸卡那霉素	>94.0% (N), 来源于卡那霉素链霉菌	100-1000 µg/ml
M110918	霉酚酸	98%	10-100 µg/ml
N109017	硫酸新霉素	USP级, 600 I.U./mg	10-100 µg/ml
P160753	巴龙霉素硫酸盐	>94.0% (HPLC)	100-1000 µg/ml
P113126	嘌呤霉素盐酸盐	≥98%	10-100 µg/ml
R105455	利福平	97%	10-50 µg/ml

重要小提示:

剂量反应可能随被测细胞系而变化；浓度范围仅供参考；首次使用或在新细胞系上使用时，必须对每种选择的抗生素进行杀伤曲线。

