

产品说明书

嘌呤霉素

产品名称	目录号	产品规格	储存条件	保质期
嘌呤霉素	SP00318	5 mL	-20°C	12 个月

1 产品说明:

Puromycin是来源于Streptomyces alboniger的一种氨基核苷类抗生素，中文名为嘌呤霉素，常用于筛选通过质粒转染/转化、病毒感染等方法能表达pac基因(puror)的真核或原核多克隆或单克隆细胞。Puromycin不仅用于稳定细胞株的筛选，也用于稳定细胞株的维持。本产品的10 mg/mL包装经过滤除菌，可以直接用于细胞培养。

Puromycin产品的特点是快速作用于细胞，一般2天内可以杀死99 %的不表达pac基因的细胞；带有广谱性，对真核和原核生物均有效，但更常用于哺乳动物细胞；具有水溶性，易溶于水或缓冲液，配制方便。

在革兰氏阳性菌、动物或昆虫细胞中，嘌呤霉素通过抑制蛋白质合成而抑制或杀死细胞。其作用机制为嘌呤霉素是氨酰-tRNA分子3'末端的类似物，能够与核糖体的A位点结合并掺入到延伸的肽链中。嘌呤霉素与A位点结合后，不会参与随后的任何反应，从而导致蛋白质合成的提前终止并释放出C-末端含有嘌呤霉素的成熟多肽。

Pac基因表达嘌呤霉素N-乙酰转移酶(Puromycin N-acetyl-transferase)，该基因是在Streptomyces alboniger中发现的。如果表达基因，就会对嘌呤霉素产生抗性，这一特性目前普遍应用于筛选表达pac基因的哺乳动物稳定细胞株等。例如，很多商业化的慢病毒载体都携带pac基因(一般在质粒图谱上标记为puror)，从而利用嘌呤霉素筛选特定基因的稳定表达细胞株。嘌呤霉素也可以用来筛选表达pac基因的大肠杆菌菌株、酵母菌株等。

2 使用方法:

推荐工作浓度: 推荐的作用于哺乳动物细胞的嘌呤霉素浓度一般为1-10 $\mu\text{g/mL}$ ，但最佳工作浓度需要通过剂量反应曲线来确定。

嘌呤霉素剂量反应曲线的确定: (以shRNA转染或者慢病毒感染为例)

嘌呤霉素的有效筛选浓度跟细胞类型、生长状态、细胞密度、细胞代谢及细胞所处细胞周期等因素相关。为了筛选到稳定表达的shRNA或感染病毒的细胞株，确定杀死未转染/感染细胞的最低浓度嘌呤霉素非常重要。对于初次使用的细胞，一般需要通过实验来确定适合自身实验体系的剂量反应曲线(dose-response curve or kill curve)。

- 第一天: 24孔板中以 $5\sim 8 \times 10^4$ cells/孔的密度接种细胞，接种够量的孔以便进行后续的剂量梯度实验。细胞培养箱内培养过夜。
- 第二天: 在培养过夜后的细胞中更换新鲜配制的筛选培养基，该筛选培养基为含不同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基(如0、1、2.5、5、7.5、10 $\mu\text{g/mL}$ 等)，更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。
- 第三天后: 由于嘌呤霉素可以快速作用于细胞，一般2天内可以杀死99 %的未表达pac基因的细胞，所以在加嘌呤霉素后的1-2天就可以进行观察细胞存活率，从而确定有效杀死正常细胞的药物最低浓度。如果细胞耐药性比较强，需要每日观察，一般4-10天内即可确定嘌呤霉素的最低浓度。

哺乳动物稳定表达细胞株的筛选:

转染含有pac基因的质粒或者感染含有该基因的病毒后，即可筛选稳定表达株。



a. 细胞转染或感染48小时后，将细胞置于含有适当浓度嘌呤霉素的新鲜培养基中培养，此为处理组。

注意：当细胞处于分裂活跃期时，抗生素作用最明显。细胞过于密集，抗生素产生的效力会明显下降，所以细胞的密度最好不超过25%。建议同时做一个正常细胞的对照组。转染或感染48 h后，如果细胞过密也可以消化后重新接种细胞，培养过夜后即可进行嘌呤霉素筛选。

b. 每隔2-3天，更换含有嘌呤霉素的培养基。

c. 筛选7天后，对照组正常细胞应该100%死亡，处理组中存活的细胞为表达pac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。

注意：每日进行细胞生长状态的观察。嘌呤霉素的筛选至少需要24小时，有效浓度嘌呤霉素的筛选周期一般在2-10天。

d. 待细胞可以稳定生长后，嘌呤霉素的浓度可以减半用于后续的培养。在得到稳定表达细胞株后，一般建议嘌呤霉素也须持续加入，并2-3天更换含有嘌呤霉素的新鲜培养液。

表1. 部分常见哺乳动物细胞的推荐工作浓度表

细胞名称	细胞类型	嘌呤霉素浓度
A549	Lung cancer	1-2 µg/mL
B16	Mouse melanocytes	1-2 µg/mL
ES cell	Human embryonic stem cells	0.5-5 µg/mL
H1299	Non-small cell lung carcinoma	1-3 µg/mL
HEK293	Human embryonic kidney	0.5-3 µg/mL
HeLa	Human cervical cancer	1-2 µg/mL
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	0.5-2 µg/mL
HT1080	Human fibrosarcoma	0.5-2 µg/mL
MCF-7	Human breast cancer	0.5-2 µg/mL
MDA-MB-231	Human breast cancer	0.5-5 µg/mL
MEF	Mouse fibroblasts	1-5 µg/mL

3 注意事项:

- 1、本产品对人体有急性毒性，操作时请特别小心，并确保有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 2、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。
- 3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

免责声明：本公司将不为任何不正常使用此产品时所发生的意外负责。

