

河南普诺易生物制品研究院有限公司
Henan Proteineasy Biological Products Research Institute CO., LTD
嘌呤霉素 (Puromycin) , 10 mg/mL

货号: CA1009

规格: 1 mL

产品简介:

嘌呤霉素 (Puromycin) 是由白黑链霉菌 (Streptomyces alboniger) 在发酵代谢过程中产生的氨基糖苷类抗生素, 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。嘌呤霉素同 A 位点结合后, 不会参与随后的任何反应, 从而导致翻译的提前终止并释放出 C-末端含有嘌呤霉素的未成熟多肽。能抑制蛋白质合成并而杀死动物和昆虫细胞以及革兰氏阳性菌、大肠杆菌等。

白黑链霉菌内发现的 pac 基因编码嘌呤霉素 N-乙酰转移酶 (PAC), 赋予机体对嘌呤霉素产生抗性。这一特性如今普遍应用于筛选特定携带 pac 基因质粒的哺乳动物稳定转染细胞株。嘌呤霉素在细胞稳转株筛选中的普遍应用与慢病毒载体携带 pac 基因特性有关。嘌呤霉素在特殊情况下可以用来筛选携带 pac 基因质粒的大肠杆菌菌株。

保存条件:

-30 ~-10 °C保存, 一年有效。

使用说明:

1.建议使用浓度

哺乳动物细胞: 1~10 µg/mL, 最佳浓度需要杀灭曲线来确定;

大肠杆菌: 推荐使用浓度为 125 µg/mL。注: 使用嘌呤霉素筛选大肠杆菌稳转株需要精确的 pH 值调节, 而且受宿主细胞本身的影响。

2.溶解方法

用注射用水制成 50 mg/mL 的母液, 经 0.1 µm 滤膜过滤除菌后分装于-20°C冻存; 甲醇溶解亦可, 配制成 10 mg/mL 的储存液。

3.嘌呤霉素杀灭曲线的确定 (以 shRNA 转染或者慢病毒转导为例)

嘌呤霉素有效浓度与细胞类型、生长状态、细胞密度、细胞代谢情况及细胞所处细胞周期位置等有关。为了筛选到稳定表达的 shRNA 细胞株, 确定杀死未转染/转导细胞的最低浓度嘌呤霉素至关重要。建议初次做实验的客户一定要建立适合自身实验体系的杀死曲线 (kill curve)。

1) Day 1: 24 孔板内以 $5\sim 8\times 10^4$ cells/孔的密度铺板, 以进行后续的梯度实验。37°C细

河南普诺易生物制品研究院有限公司
Henan Proteineasy Biological Products Research Institute CO., LTD
嘌呤霉素 (Puromycin) , 10 mg/mL

胞孵育过夜；

- 2) Day 2: a) 准备筛选培养基：含不同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基（如 0~15 $\mu\text{g/mL}$ ，设置五个以上的梯度）；
b) 往孵育过夜后的细胞内更换新鲜配制的筛选培养基；之后 37°C 孵育细胞；
- 3) Day 4: 更换新鲜的筛选培养基，并观察细胞存活率；
- 4) 根据细胞的生长状态，约 2~3 天更换新鲜的筛选培养基；
- 5) 每日观察细胞存活率，从而确定抗生素筛选开始 4~6 天内有效杀死非转染细胞的药物最低浓度。

4. 哺乳动物稳定转染细胞株的筛选：

等转染含有 pac 基因的质粒后，细胞在含有嘌呤霉素的培养基中增殖，以筛选出稳定转染子；

1) 细胞转染 48h 后，将细胞（原样或稀释）置于含有适当浓度嘌呤霉素的新鲜培养基中培养；

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。最好进行细胞分盘使其密度不超过 25%；

2) 每隔 2~3 天，移除和更换含有嘌呤霉素的培养基；

3) 筛选 7 天后评估细胞形成的病灶。病灶可能需要额外的一周或者更多时间，这依赖于宿主细胞系和转染筛选效率。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 48h，有效浓度嘌呤霉素的筛选周期一般在 3~10 天。

4) 转移和放置 5~10 个抗性克隆到一个 35 mm 的培养皿中，用选择培养基继续培养 7 天。此次富集培养是为日后的细胞毒性实验做准备。

注意事项：

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
2. 嘌呤霉素为有毒化合物，操作时请小心拿放；
3. 本产品仅供科研和生产使用，用于组织和细胞的体外培养，禁止临床使用。