Puromycin Dihydrochloride

产品编号：LT019 / LT019-T

包装规格：50 µl / 200 µl (10 mg/mL)

储存条件：-20℃，可保持稳定至少 12 个月，冰袋运输。

■ 产品概述

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(puro^r)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。

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不成熟多肽。

Pac 基因表达嘌呤霉素 N-乙酰转移酶(Puromycin N-acetyl-tranferase)，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。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 puro^r)，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。

■ 注意事项

1. 为了您的健康安全，请注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
2. 尽量减少反复冻融的次数，以免效价降低。
3. 注意无菌操作，避免污染。
4. 本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及治疗。

■ 使用方法

1. **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 µg/mL，但最佳工作浓度需要通过剂量反应曲线来确定。

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	推荐浓度
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

2. 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)。

A. 第一天：24 孔板中以 5~8×10^4 cells/孔的密度接种细胞，设置剂量梯度及复孔，以便进行后续的剂量梯度实验。细胞培养箱内培养过夜。

B. 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 μg/mL 等)，更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。

C. 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 3-10 天内即可确定嘌呤霉素的最低浓度。

3. 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 小时后，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。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。

易锦生物 iGeneBio
地址：广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器F区F801 邮编：510663
客服电话：020-28069233 E-mail：support@igenebio.com 网址：www..igenebio.com