

## 嘌呤霉素无菌溶液(10mg/ml)

产品编号	产品名称	包装
MA0318	嘌呤霉素无菌溶液(10mg/ml)	1ml

### 产品简介:

嘌呤霉素 (Puromycin) 是来源于 *Streptomyces alboniger* 的一种氨基核苷类抗生素, 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<sup>r</sup>)的真核或原核多克隆或单克隆细胞。嘌呤霉素不仅用于稳定细胞株的筛选, 也用于稳定细胞株的维持。

嘌呤霉素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。

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未成熟多肽。

本产品为 10mg/ml 包装, 配制在 20mM HEPES(pH7.4)溶液中, 经 0.22μm 滤膜过滤除菌, 可以直接用于细胞培养。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
1	嘌呤霉素无菌溶液(10mg/ml)	1ml
2	说明书	1份

### 保存条件:

-20℃ 保存, 至少一年有效, 避免反复冻融。

### 使用说明:

**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 1-10μg/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	嘌呤霉素浓度
A549	Lung cancer	1-2 $\mu$ g/ml
B16	Mouse melanocytes	1-2 $\mu$ g/ml
ES cell	Human embryonic stem cells	0.5-5 $\mu$ g/ml
H1299	Non-small cell lung carcinoma	1-3 $\mu$ g/ml
HEK293	Human embryonic kidney	0.5-3 $\mu$ g/ml
HeLa	Human cervical cancer	1-2 $\mu$ g/ml
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	0.5-2 $\mu$ g/ml
HT1080	Human fibrosarcoma	0.5-2 $\mu$ g/ml
MCF-7	Human breast cancer	0.5-2 $\mu$ g/ml
MDA-MB-231	Human breast cancer	0.5-5 $\mu$ g/ml
MEF	Mouse fibroblasts	1-5 $\mu$ g/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  $5\sim 8\times 10^4$  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。

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 $\mu$ g/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 4-10 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。

#### 注意事项：

1. 本产品可能对人体有一定的毒害作用，请注意适当防护，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。