

嘌呤霉素 (Puromycin) 使用说明书

■ 产品包装和保存条件

| 产品名称 | 货号 | 规格 | 浓度 | 纯度 |
|------------------|------------|-------------|---------|------------|
| 嘌呤霉素 (Puromycin) | HB-PU-500 | 500 μ L | 2 mg/mL | >95%(HPLC) |
| 嘌呤霉素 (Puromycin) | HB-PU-1000 | 1 mL | 2 mg/mL | >95%(HPLC) |

注：a. 建议分装保存，避免反复冻融，否则活性受到影响。

b. 嘌呤霉素为了达到最理想的稳定状态和最长的保质期，最好存放于 -20°C ，保质期为1年。

■ 产品简介

嘌呤霉素 (Puromycin) —pac 基因筛选抗生素 Puromycin 是由 Streptomyces alboniger (白黑链霉菌) 产生的一种肽基核苷抗生素，可抑制原核细胞和真核细胞的肽基转移。Puromycin 可抑制革兰氏阳性菌和多种动物细胞和昆虫细胞的增殖，但是真菌和革兰氏阴性菌对 Puromycin 具有抗性，在一些特殊的情况下，Puromycin 也可用于大肠杆菌。目前，Puromycin 最重要的应用是用于选择携带 pac 抗性基因的转染细胞。

不同细胞对 Puromycin 的敏感度不同，在筛选之前，要通过预实验确定 Puromycin 的最佳筛选浓度，推荐用 $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围筛选合适的浓度，Puromycin 最常用工作浓度为 $1\sim 3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，Puromycin 的作用时间是 3-10 天之间，可参考文献并进行预实验摸索。

■ 产品使用

使用步骤：（哺乳动物细胞筛选）

▶ 嘌呤霉素杀灭曲线的确定（目的稳定转染细胞株，仅作参考）

为了筛选到稳定表达待研究目的的细胞株，确定杀死未转染细胞的最低浓度嘌呤霉素至关重要。所以初次做实验的客户需要建立适合自己实验体系的杀死曲线 (kill curve)。

- (1) 24 孔板内以 $5\sim 8\times 10^4$ cells/孔的密度铺板，铺足够量的孔以进行后续的梯度实验。细胞孵育过夜；
- (2) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，至少 5 个梯度）；
- (3) 细胞孵育过夜后加入筛选培养基，孵育细胞；
- (4) 约 2-3 天更换新鲜的筛选培养基；
- (5) 每日监测细胞观察存活细胞比例。嘌呤霉素的最佳作用时间一般在 1-4 天之间。
- (6) 最小的抗生素使用浓度就是指从抗生素筛选开始 1-4 天内杀死所用细胞的最低筛选浓度。

▶ 嘌呤霉素筛选稳定转染细胞

- (1) Day0: 24 孔板内以 $5\sim 8\times 10^4$ cells/孔的密度铺板，孵育过夜；
- (2) 制备筛选培养基：含有最佳筛选浓度嘌呤霉素（由杀灭曲线确定）的新鲜培养基；
- (3) Day1: 筛选第一天，去除旧的培养基，加入一定量 MOI 的病毒颗粒；（加入无血清培养基的总量必须充分覆盖住细胞）
- (4) 病毒转导后约 6-8 h，再添加 1 ml 完全培养基（血清和双抗，如果已经使用双抗）到细胞内，然后孵育过夜；
- (5) 病毒转导后 48 h，待细胞状态稳定后，使用嘌呤霉素筛选培养基替换旧的完全培养基。孵育。
- (6) 约每 2-3 天替换新鲜配制的筛选培养基。

每天检测细胞并观察活细胞生长比例，以及 GFP 表达的水平及所占比例。在某一个时间点几乎所用存活细胞都可以表达 GFP。嘌呤霉素最佳的作用时间在 3-10 天之间。

注：病毒的 MOI 越高，每个细胞含有的目的拷贝和嘌呤霉素抗性基因越多。在做嘌呤霉素筛选时，需记住越高 MOI，含越多 pac 拷贝的细胞能耐受更高的嘌呤霉素浓度。调整嘌呤霉素的浓度去筛选预定量的转染细胞，但是嘌呤霉素的量不能低于杀死曲线建立的最低浓度。

■ 嘌呤霉素 (Puromycin) 推荐使用浓度

| Cell line | Species | Puromycin(ug/ml) |
|------------|---------|------------------|
| Hela | Human | 3 |
| 293 | Human | 3 |
| MCF-7 | Human | 1-3 |
| MDA-MB-xxx | Human | 1-3 |
| HepG2 | Human | 2 |
| HT1080 | Human | 1 |
| A549 | Human | 1.5 |
| H1299 | Human | 2 |
| hESCs | Human | 1 |
| B16 | Mouse | 1-3 |
| MC3T3-E1 | Mouse | 10 |
| H9C2 | Rat | 1 |
| PC1.0 | Hamster | 10 |

■ 文献引用

- [1] Geneva D M , Francesca F , David P . The extreme C-terminal region of G α s differentially couples to the luteinizing hormone and beta2-adrenergic receptors.[J]. Molecular Endocrinology, 2011, 25(8):1416-1430.
- [2] Van Lith M , Tiwari S , Pediani J , et al. Real-time monitoring of redox changes in the mammalian endoplasmic reticulum[J]. Journal of Cell Science, 2011, 124(Pt 14):2349.
- [3] Dantas T J , Wang Y , Lalor P , et al. Defective nucleotide excision repair with normal centrosome structures and functions in the absence of all vertebrate centrins[J]. Journal of Cell Biology, 2011, 193(2):307-18.