

V 1.0.0

Puromycin Dihydrochloride

嘌呤霉素盐酸盐

产品介绍:

嘌呤霉素 (Puromycin) 是由白黑链霉菌 (*Streptomyces alboniger*) 发酵代谢产生的一种氨基糖苷类抗生素, 通过抑制蛋白质合成而杀死革兰氏阳性菌, 各种动物和昆虫细胞。某种特殊情况下有效作用大肠杆菌。作用机制在于嘌呤霉素是氨酰-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。嘌呤霉素同 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。

嘌呤霉素产生菌 *Streptomyces alboniger* 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的特性有关, 现在商业化的慢病毒载体多数都携带 *pac* 基因。在某些特定情况下, 嘌呤霉素亦可以用来筛选转化携带 *pac* 基因质粒的大肠杆菌菌株。

化学特性:

CAS: 58-58-2

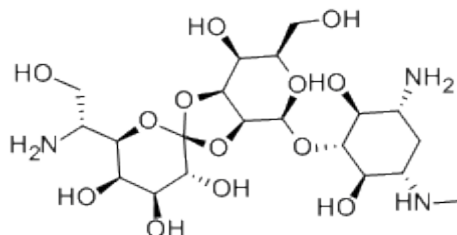
分子式: $C_{22}H_{29}N_7O_5 \cdot 2HCl$

分子量: 544.43

纯度: >95% (HPLC)

溶解度: 在纯水中, 最大溶解度为 50 mg/mL

结构式:



产品信息:

产品编号	产品名称	规格
GM-040401-1	Puromycin dihydrochloride	25 mg
GM-040401-2	Puromycin dihydrochloride	100 mg
GM-040401-3	Puromycin dihydrochloride	250 mg
GM-040401-4	Puromycin dihydrochloride	500 mg
GM-040401-5	Puromycin dihydrochloride	1 g

注: 本产品为粉末。

保存条件:

冰袋运输。-25~-15℃干燥保存, 有效期 2 年。

使用方法:

1. 建议使用浓度

哺乳动物细胞: 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 最佳浓度需要杀灭曲线来确定。

大肠杆菌: LB 琼脂培养基筛选稳定转化 *pac* 基因的大肠杆菌, 使用浓度为 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【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。溶解后使用 0.22 μm 过滤器进行过滤除菌。

2. 嘌呤霉素杀灭曲线的确定 (以 shRNA 转染或者慢病毒转导为例)

嘌呤霉素有效筛选浓度跟细胞类型、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, 铺足够量的孔以进行后续的梯度实验。37℃细胞孵育过夜。

2) Day 2: ①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); ②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℃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) 每日监测细胞, 观察存活细胞率, 从而确定抗生素筛选开始 4-6 天内有效杀死非转染或所有非转导细胞的药物最低浓度。

3. 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 48 h 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】: 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】: 每日进行细胞生长状态的观察。嘌呤霉素的筛选至少需要 48 h, 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. 嘌呤霉素是一种有毒化合物, 请小心拿放;
2. 嘌呤霉素对大肠杆菌有效性较低, 但对哺乳动物细胞中的有效性则较强。在转染实验中, 它可以替代新霉素系统。
3. 本产品仅用于科研用途, 禁止用于人身上。