

嘌呤霉素盐酸盐

Puromycin dihydrochloride

产品信息

产品名称	编号	规格
嘌呤霉素盐酸盐	DY80102	25mg/100mg

产品描述

嘌呤霉素(Puromycin)是一种黑链霉菌属产生的氨基核苷抗生素,广泛用于抑制蛋白合成。作用原理是因其具有与 tRNA 分子中腺苷相连接的氨基酸末端类似的结构,能够同氨基酸结合,代替氨酰化的 tRNA 同核糖体的 A 位点结合,并掺入到延伸的肽链中。虽然嘌呤霉素能够同 A 位点结合,但是不能参与随后的任何反应,因而导致蛋白质合成的终止并释放出 C-末端含有嘌呤霉素的未成熟的多肽。嘌呤霉素对原核和真核生物的翻译过程均有干扰作用。

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。用作蛋白质合成的抑制剂。抑制细菌、藻类原生物和哺乳动物细胞生长。

保存方式

-20°C 保存,有效期为两年;4°C 保存,有效期为一年;室温保存 3 个月。

操作说明

一、溶液浓度

用蒸馏水溶解嘌呤霉素配制成 50 mg/mL 的母液,经 0.22μm 滤膜过滤除菌后分装于-20°C 冻存;也可溶于甲醇,配制成 10 mg/mL 的储存液。哺乳动物细胞的推荐使用浓度为 1-15 μg/mL,最佳浓度需由杀灭曲线来确定。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 125μg/mL。(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。)

注意:嘌呤霉素为有毒化合物,使用试剂前,请带手套、口罩等防护措施。

二、细胞筛选步骤

1. 在哺乳动物细胞中进行细胞筛选前,应先进行浓度梯度实验确定适合该类细胞的最佳药物浓度即杀死所有宿主细胞的最低浓度(一般哺乳动物细胞选用的有效浓度范围为 1-15 μg/mL)。
2. 细胞转染 48h 后,换上加入了适宜浓度嘌呤霉素的新鲜培养基,然后放入细胞培养箱中培养。
3. 每隔 3-4 天换液,更换的培养基为含相同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基。
4. 筛选 7 天后,评估剩余存活细胞是否全部为转染成功克隆。另外,这些克隆的筛选时间主要依赖于宿主细胞系种类和转染筛选效率。
5. 筛选出的转染成功克隆用选择培养基培养 7 天,再进行后续实验。注意:需加抗生素筛选的细胞,应为生长状态良好的细胞。另外,如果细胞密度过大将会影响筛选效率,因此,接种细胞的汇合度应不超过 25%。

附:杀灭曲线确定方法

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等均有关。为了筛选到稳

定表达的细胞株，确定杀死未转染细胞的最低嘌呤霉素浓度至关重要。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灭曲线。若细胞对嘌呤霉素耐受性较高，则可能需要大于常规浓度。

- 1) 第 1 天:在 24 孔板中以 $6-8 \times 10^4$ /孔的细胞密度铺板，铺足够量的孔以进行后续的梯度实验。37°C 细胞孵育过夜。
- 2) 第 2 天:
 - a)准备筛选培养基:含不同浓度嘌呤霉素的新鲜培养基(如 1-15 μ g/mL，至少 5 个梯度，参考文献对应细胞相应杀灭大概浓度);
 - 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) 第 4 天: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或者所有非转导细胞的药物最低浓度。

本产品仅作科研用途