Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)

产品信息

产品名称	产品编号	产品规格
Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	IMC-603-1 mL	1 mL

产品描述

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(puror)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10mg/mL包装经过滤除菌，可以直接用于细胞培养。

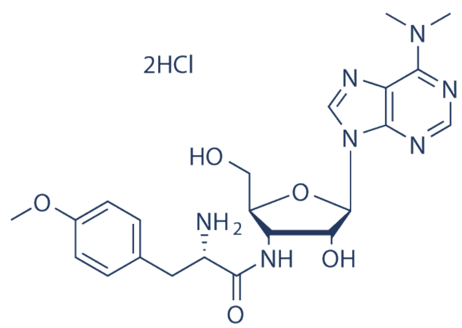
Puromycin的特点是快速作用于细胞，一般2天内可以杀死99%的不表达pac基因的细胞。

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。例如，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puror)，从而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。

化学性质

化学名	(2S)-2-amino-N-[(2S,3S,4R,5R)-5-[6-(dimethylamino)purin-9-yl]-4-hydroxy-2-(hydroxymethyl)oxolan-3-yl]-3-(4-methoxyphenyl)propanamide;dihydrochloride
化学式	$C_{22}H_{29}N_7O_5 \cdot 2HCl$
分子量	544.43
CAS号	58-58-2
纯度	>98%



本产品10mg/mL包装配制在20mM HEPES(pH7.4)溶液中，浓度为10 mg/mL，经0.22μm滤膜过滤除菌，可以直接用于细胞培养。本产品250mg包装为粉末装。

储存与运输

-20°C保存，至少一年有效。10 mg/mL包装避免反复冻融。

试剂盒组成

产品名称	产品编号	产品规格
Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	IMC-603-1 mL	10 mg/mL x 1 mL
说明书	一份	

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

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	1-2μg/ mL
B16	Mouse melanocytes	1-2μg/ mL
ES cell	Human embryonic stem cells	0.5-5μg/ mL
H1299	Non-small cell lung carcinoma	1-3μg/ mL
HEK293	Human embryonic kidney	0.5-3μg/ mL
HeLa	Human cervical cancer	1-2μg/ mL
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	0.5-2μg/ mL
HT1080	Human fibrosarcoma	0.5-2μg/ mL
MCF-7	Human breast cancer	0.5-2μg/ mL
MDA-MB-231	Human breast cancer	0.5-5μg/ mL
MEF	Mouse fibroblasts	1-5μg/ 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5~8×104cells/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、10μg/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.本产品对人体有害，操作时请小心，并注意有效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。