

# HyCyte® 嘌呤霉素, 10 mg/mL

## HyCyte® Puromycin (Puro), 10 mg/mL

货号: GUAC-R001 规格: 1 mL / 10×1 mL

### 产品描述

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,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。

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。

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),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puro<sup>r</sup>),从而利用嘌呤霉素筛选特定基因的 stable 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。

### 产品信息

浓度为10 mg/mL (10 mg/mL in H<sub>2</sub>O)。无菌。

### 使用说明

#### 1. 确认抗生素筛选浓度

Puro 用来筛选的工作浓度需要根据细胞类型、培养基、生长条件和细胞代谢率而适当调整,常用工作浓度为 1~10 μg/mL。对于第一次使用的实验体系建议通过建立杀灭曲线(kill curve),即剂量效应曲线,来确定最佳筛选浓度。一般而言,哺乳动物细胞: 1~10 μg/mL。

大肠杆菌: LB 琼脂培养基筛选稳定转化 pac 基因的大肠杆菌, pH 需调节至 7.5-8, 使用浓度为 100~125 μg/mL。

注: 嘌呤霉素在大肠杆菌中的活性较低。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。

#### 1.1 杀灭曲线的建立

为了筛选得到稳定表达目的蛋白的细胞株,需要确定能够杀死未转染宿主细胞的抗生素最低浓度,可通过建立杀灭曲线来实现,建议至少选择 5 个浓度。具体操作步骤可参考:

1) 第一天: 未转化的细胞按照20~25%的细胞密度铺在合适的培养板上,培养箱培养过夜。

注: 对于需要更高密度来检测活力的细胞,可增加接种量。

2) 第二天: 去除细胞培养液,根据细胞类型,设定浓度梯度,换成含不同浓度Puro的新鲜筛选培养液。

以哺乳动物细胞为例,可设立0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10 μg/mL。

为科研加速,为工业赋能!



关注海星公众号



关注海星视频号



- 3) 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2~3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。选择在理想的天数（通常是3天）内能够杀死绝大多数细胞的最低浓度为稳定转染细胞筛选的工作浓度。个别耐药性较强的细胞，需要延长观察时间或增加药物浓度。

## 2. 筛选稳定表达目的蛋白的细胞株。

- 1) 转染携带pac抗性基因的质粒或转导携带pac抗性基因的病毒，同时设置没有转染质粒或转导病毒的细胞作为对照。
- 2) 转染或转导48h后，换成含有最佳工作浓度的Puro（由杀灭曲线确定）的新鲜培养液，继续培养。如果有必要，可以对细胞进行传代后进行筛选培养。  
注：细胞处于活跃分裂状态时抗生素的杀伤效果最好。当细胞过于稠密，其效率会降低。为了得到较好的筛选效果，最好将细胞传代稀释至汇合度不超过25%。如果细胞过密可以消化后重新接种细胞，培养过夜后即可进行Puro筛选
- 3) 每2~3天更换含有Puro的新鲜筛选培养液。
- 4) 当对照组细胞100%死亡，Puro抗性组中存活的细胞即为表达Puro抗性基因的细胞。然后根据实验目的进行多克隆或单克隆细胞的筛选。

## 3. 稳定细胞株的维持培养。

可采取如下几种方式之一来维持培养稳定细胞株。

- 1) 使用含有与上述筛选稳定转染细胞株相同浓度的抗生素筛选培养液来维持培养。
- 2) 降低抗生素浓度为筛选浓度的一半进行维持培养。
- 3) 使用刚好能预防敏感细胞生长但不足以致死的抗生素浓度来维持培养(根据杀灭曲线来判断)。

## | 保存条件

产品冰袋运输，保存条件为-20℃，避光保存。避免反复冻融。

产品保质期为12个月，请于保质期内使用。

## | 注意事项

1. 本产品经0.1 μm 过滤除菌；
2. 使用本产品时应注意无菌操作，避免污染；
3. 本产品仅用于科研或进一步研究使用，不用于诊断和治疗。

为科研加速，为工业赋能！



关注海星公众号



关注海星视频号

