

*Make a leap-forward in Biosciences*

LeapWal<sup>TM</sup> 立谱沃生物  
BIOTECH

Hunan LeapWal Biotech Co., Ltd.



LeapWal<sup>TM</sup> Biotech 保留此产品技术文件的所有权利。未经 LeapWal<sup>TM</sup> Biotech 的书面许可，本文件的任何部分，不得改编或转载用作其他商业用途。

## Puromycin (10 mg/mL)

Catalog Number: PS610

Product Manual

Version 1.0

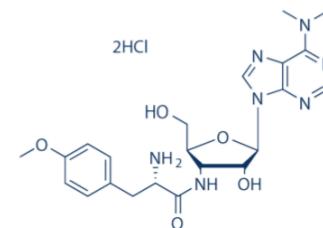
FOR RESEARCH USE ONLY  
Not for use in diagnostic procedures

# 目录 Contents

|                |    |
|----------------|----|
| 01/产品概述.....   | 02 |
| 02/产品组分.....   | 03 |
| 03/保存条件.....   | 03 |
| 04/产品特点.....   | 03 |
| 05/实验步骤.....   | 03 |
| 06/适用范围.....   | 05 |
| 07/注意事项.....   | 05 |
| 08/实验案例分析..... | 05 |
| 09/其他相关产品..... | 07 |

## 01/产品概述

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。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，从而杀死革兰氏阳性菌、各种动物和昆虫细胞。



Puromycin 常用于筛选通过质粒转染、病毒感染、转化等方法能表达 pac 基因 (puro<sup>r</sup>) 的真核或原核多克隆或单克隆细胞。pac 基因编码嘌呤霉素 N-乙酰转移酶 (PAC, Puromycin N-acetyl-transferase)，赋予机体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。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稳定表达细胞株。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。Puromycin 不仅用于稳定细胞株的筛选，也用于稳定细胞株的维持。在某些特定情况下，嘌呤霉素也可以用来筛选转化携带 pac 基因质粒的大肠杆菌菌株、酵母菌株等。

本品是无菌的嘌呤霉素盐酸盐溶液 (10 mg/mL)，经过滤除菌，可以直接用于细胞培养。

## 02/产品组分

| 组分                   | PS610-01 | PS610-05   |
|----------------------|----------|------------|
| Puromycin (10 mg/mL) | 1 mL     | 1 mL x 5 支 |

## 03/保存条件

冰袋 (wet ice) 运输。-20°C 保存，有效期 12 个月。建议分装保存，避免反复冻融。

## 04/产品特点

- ❖ 即用型试剂，无需进行试剂配置，简单方便。
- ❖ 无菌制剂，可直接加入细胞使用。

## 05/实验步骤

一、Dose-response curve or kill curve 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)。

1. 提前一天在 24 孔板中以  $5\sim8\times10^4$  cells/孔的密度接种细胞，设置剂量梯度及复孔，37°C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养过夜。
2. 次日，将培养过夜后的细胞更换含不同浓度嘌呤霉素的筛选培养基（新鲜配置），

如 0、1、2.5、5、7.5、10、15、20  $\mu$ g/mL 等浓度梯度，设置至少 5 个浓度梯度，37°C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中继续培养。

3. 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，所以在添加嘌呤霉素后的 1-2 天就可以观察细胞存活率，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，需要每日监测细胞，观察存活细胞率，约 2-3 天更换新鲜的筛选培养基，一般 4-10 天内即可确定嘌呤霉素的最低浓度。

### 二、建议使用浓度

哺乳动物细胞：1-10  $\mu$ g/mL，最佳浓度需根据嘌呤霉素剂量反应曲线来确定。

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  $\mu$ g/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，并受宿主细胞本身的影响。

### 三、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，即可使用嘌呤霉素筛选稳定表达株。

1. 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。

- 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 35%。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。

- 建议同时做一个空白正常细胞的对照组。

2. 每隔 2-3 天，更换含有嘌呤霉素的培养基。

3. 筛选 2-10 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。

- 应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。

4. 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。

## 06/适用范围

Puromycin 普遍应用于稳定细胞株的筛选和维持，也可以用来筛选转化携带 pac 基因质粒的大肠杆菌菌株、酵母菌株等。

## 07/注意事项

1. 为了您的健康安全，请规范操作，穿戴实验服与手套开展实验。
2. 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。
3. 本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及治疗。

## 08/实验案例分析

1. 提前一天使用 10 cm 细胞培养皿培养 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line (CL110001)，待细胞密度为 75% 左右开始包装慢病毒。
2. 使用 ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit (LP110-10) 进行慢病毒包装，具体步骤参考 LP110-10 产品说明书。
3. 收集慢病毒上清液，300xg 离心 10 分钟以除去细胞碎片，0.22 μm 滤器过滤，使用 ViralStars™ LC Lentivirus Concentration Solution 慢病毒浓缩试剂盒 (LC110R) 进行 20 倍浓缩，使用 1 mL ViralStars™ LS Lentivirus Storage Solution (LS110R) 重悬慢病毒颗粒。

4. 提前一天在 24 孔板中铺 HeLa 细胞，使用上述制备的慢病毒感染目的细胞 HeLa。在 EP 管中做病毒 10 倍梯度稀释，连续 6 个稀释梯度。稀释方法如下：准备 6 个无菌 EP 管，每个 EP 管中加入 450 μL 新鲜的完全培养基（含 10 μg/mL polybrene），取待测定病毒液 50 μL 加入到第一个 EP 管中（标记 50 μL），混匀后取 50 μL 病毒稀释液加入到第二个 EP 管中（标记 5 μL），以此类推，直到稀释到最后一管。弃去 24 孔板中原有的培养基，将稀释好的病毒依次加入孔中，并做好标记，小心操作，不要吹起细胞，置于培养箱中培养 16 h。
5. 慢病毒感染 16 h 后，吸去带有病毒的培养基，在每个孔中再加入 500 μL 预热的新鲜完全培养基。
6. 使用含 puromycin (5 μg/mL) 的筛选培养基进行筛选，对筛选 7 天后的细胞进行结晶紫染色，并拍照记录，实验结果如图 2 所示。

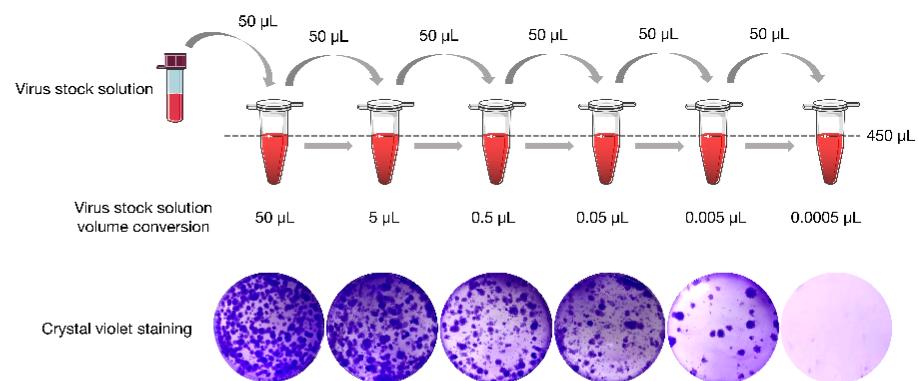


图2: 采用ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit (LP110-10) 及ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line (CL110001) 包装慢病毒 (puromycin, Control Plasmid)，对慢病毒进行倍比稀释后感染 HeLa 细胞，使用含puromycin (PS610, 5 μg/mL) 的筛选培养基进行筛选，对筛选7天后的细胞进行结晶紫染色。

## 09/其他相关产品

| 产品名称  | 货号                               | 规格                        |
|---|----------------------------------|---------------------------|
| ViralStars™<br>Lentivirus Packaging Cell Line       | CL110001                         | 3-5x10 <sup>6</sup> 个细胞/管 |
| ViralStars™ LP<br>Lentivirus Packaging Kit          | LP110-10<br>LP110-20<br>LP110-40 | 10T<br>20T<br>40T         |
| ViralStars™ LC<br>Lentivirus Concentration Solution | LC110R                           | 100 mL                    |
| ViralStars™ LS<br>Lentivirus Storage Solution       | LS110R                           | 100 mL                    |
| Polybrene (10 mg/mL)                                | PE110-01<br>PE110-05             | 1 mL<br>1 mL x 5 支        |