Product sheet

Клетки HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Обща информация

Description	Стабилните HEK293-Rpn11-HTBH клетки са стабилно трансфектиран дериват на клетъчната линия HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), модифицирана да експресира маркирана версия на Rpn11 (известен също като PSMD14 или POH1) – деубиквитиназната субединица на капачния комплекс на 26S протеазомата. Rpn11 е Zn^{2+}-зависима деубиквитиназа с JAMM-домен, която отстранява убиквитинови вериги от субстрати, свързани с протеазомата, по време на протеазомната деградация. HTBH-маркерът (хексахистидин-TEV-биотин-акцепторен пептид-хексахистидин) позволява афинитетно пречистване на комплекси, съдържащи Rpn11, при естествени условия, което прави тази клетъчна линия особено подходяща за пречистване на протеазомни комплекси и изследвания на интерактома. Тази клетъчна линия намира приложение в изследвания на биологията на 26S протеазомата, регулацията на убиквитин-протеазомния път (UPS), функцията на Rpn11/PSMD14 в контрола на качеството на протеините, сглобяването и динамиката на протеазомата, както и механизма на действие на протеазомните инхибитори. Тя се използва също за афинитетно пречистване на нативни протеазомни комплекси и като модел за изучаване на биологията на деубиквитиназите в контекста на протеазомата. Системата за маркиране HTBH позволява изключително строго пречистване на биотинилирани комплекси чрез пулдауни на базата на стрептавидин. Стабилните HEK293 клетки-Rpn11-HTBH се поддържат като адхезивна култура в DMEM, допълнен с 10% FBS и подходящ селекционен антибиотик за поддържане на експресията на трансгена при 37°C във влажна атмосфера с 5% CO_2. Клетките се субкултивират с Accutase при 80–90% конфлуентност (съотношение на разделяне 1:5 до 1:10). Средата се подновява на всеки 2–3 дни.
Organism	Човек
Tissue	Бъбреци
Disease	Трансформирани/увековечени фетални бъбреци (на фона на HEK293; трансген Rpn11-HTBH)
Applications	Биология на 26S протеазомата; функция на Rpn11/PSMD14; убиквитин-протеазомният път; пречистване на протеазомния комплекс; биология на деубиквитиназите; афинитетно пречистване с HTBH-маркер; изследвания на протеазомния интерактома

Характеристики

Morphology	Подобни на епител
Cell type	Епителни клетки
Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Клетки HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Citation	Стабилни HEK293 клетки – Rpn11-HTBH (каталожен номер на Cytion 305719)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
GMO Status	GMO-S1: Това производно на HEK293 съдържа стабилно интегрирана касета за експресия на Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14, маркиран с хексахистидин-TEV-биотин-акцепторен пептид-хексахистидин). Тази класификация важи само в Германия и може да се различава в други държави.

Биомолекулярни данни

Работа с

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO3, w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS
Dissociation Reagent	Повечето клетки се отделят в PBS; ако е необходимо, добавете Accutase за 5 минути при стайна температура
Doubling time	приблизително 24 до 36 часа
Subculturing	Отстранете средата, измийте с PBS без калций и магнезий, покрийте с Accutase, инкубирайте 8–10 минути при стайна температура, ресуспендирайте в средата, центрофугирайте при 300×g в продължение на 3 минути, изхвърлете супернатантата, презасейте в свежа среда.
Split ratio	от 1 до 10
Seeding density	от 2 до 4 × 10^4 клетки/$см^2$
Fluid renewal	На всеки 2 до 3 дни
Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна хранителна среда + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване.

Клетки HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.

2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.

3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.

4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.

5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно.

6. Центрофугирайте сместа при 200 x g в продължение на 5 минути, внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща средата за замразяване.

7. Следвайте процедурата, описана в раздел "Възстановяване след размразяване"

Incubation Atmosphere

37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.

Shipping Conditions

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Storage Conditions

За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството и молекулярен анализ