

Buňky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719**Obecné informace****Description**

Stabilní buňky HEK293-Rpn11-HTBH představují stabilně transfekovanou odvozeninu buněčné linie HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), geneticky upravené tak, aby exprimovaly značenou verzi Rpn11 (známého také jako PSMD14 nebo POH1), podjednotky deubiquitinázy komplexu víčka 26S proteasomu. Rpn11 je Zn^{2+} -dependentní deubiquitináza s doménou JAMM, která odstraňuje ubikvitinové řetězce ze substrátů vázaných na proteasom během proteasomální degradace. Značka HTBH (hexahistidin-TEV-biotinový akceptorový peptid-hexahistidin) umožňuje afinitní purifikaci komplexů obsahujících Rpn11 za nativních podmínek, díky čemuž je tato buněčná linie obzvláště vhodná pro purifikaci proteasomových komplexů a studium interakomů.

Tato buněčná linie je použitelná ve studiích biologie 26S proteasomu, regulace ubikvitin-proteasomové dráhy (UPS), funkce Rpn11/PSMD14 při kontrole kvality proteinů, sestavování a dynamiky proteasomu a mechanismu účinku inhibitorů proteasomu. Používá se také k afinitní purifikaci nativních proteasomových komplexů a jako model pro studium biologie deubiquitináz v kontextu proteasomu. Systém značení HTBH umožňuje vysoce selektivní purifikaci biotinylovaných komplexů pomocí pulldownů na bázi streptavidinu.

Organism

Člověk

Tissue

Ledviny

Disease

Transformovaná/imortalizovaná fetální ledvina (na pozadí HEK293; transgen Rpn11-HTBH)

Applications

Biologie proteasomu 26S; funkce Rpn11/PSMD14; ubikvitin-proteasomová dráha; purifikace proteasomového komplexu; biologie deubikvitináz; afinitní purifikace pomocí HTBH-tag; studie interaktomu proteasomu

Charakteristika**Morphology**

Epitelu podobné

Cell type

Epitelové buňky

Growth properties

Adherentní

Regulační údaje**Citation**

Stabilní buňky HEK293 – Rpn11-HTBH (katalogové číslo Cytion 305719)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

Buňky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

GMO Status GMO-S1: Tento derivát buněk HEK293 obsahuje stabilně integrovanou expresní kazetu Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14 značený sekvencí hexahistidin-TEV-biotinový akceptorový peptid-hexahistidin). Tato klasifikace platí pouze v Německu a v jiných zemích se může lišit.

Biomolekulární data**Zpracování**

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)

Supplements Doplněte médium o 10% FBS

Dissociation Reagent Většina buněk se v PBS uvolní; v případě potřeby přidejte Accutase a nechte působit 5 minut při pokojové teplotě

Doubling time přibližně 24 až 36 hodin

Subculturing Odstraňte médium, promyjte PBS bez vápníku a hořčíku, zalijte Accutase, inkubujte 8–10 minut při pokojové teplotě, resuspendujte v médiu, odstředte při 300×g po dobu 3 minut, supernatant vylijte a znovu naočkujte do čerstvého média.

Split ratio 1 až 10

Seeding density 2 až 4 × 10⁴ buněk/cm²

Fluid renewal Každé 2 až 3 dny

Freeze medium Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium + 10% DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení.

Buňky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmražená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení buď okamžitě uložte kryovialku při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 200 x g po dobu 5 minut, supernatant obsahující mrazicí médium opatrně zlikvidujte.
7. Postupujte podle postupu popsaneho v části Obnova po rozmrazení

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 %_{CO2}, zvlhčená atmosféra.

Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiwa, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality a molekulární analýza