

## HEK293-Rpn11-HTBH rakud | 305719

## Üldine teave

## Description

Stabiilsed HEK293-rakud – Rpn11-HTBH on HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) rakuliini stabiilselt transfekteeritud derivaat, mis on loodud ekspresseerima märgistatud versiooni Rpn11-st (tuntud ka kui PSMD14 või POH1), mis on 26S proteasoomi kaanekompleksi deubikvitiinaasi alarühm. Rpn11 on Zn<sup>2+</sup>-sõltuv JAMM-domeeniga deubikvitiinaas, mis eemaldab proteasoomiga seotud substraatidelt ubikvitiiniahelad proteasoomse lagundamise käigus. HTBH-märgis (heksahistidiin-TEV-biotiini aktseptorpeptiid-heksahistidiin) võimaldab Rpn11-d sisaldavate komplekside afiinset puhastamist loomulikes tingimustes, mistõttu sobib see rakuliin eriti hästi proteasoomi komplekside puhastamiseks ja interaktome uuringuteks.

Seda rakuliini saab kasutada 26S proteasoomi bioloogia, ubikvitiin-proteasoomi rada (UPS) regulatsiooni, Rpn11/PSMD14 funktsiooni valkude kvaliteedikontrollis, proteasoomi kokkupaneku ja dünaamika ning proteasoomi inhibiitorite toimemehhanismi uurimisel. Seda kasutatakse ka natiivse proteasoomi komplekside afiinsuspuhastamiseks ning mudelina deubikvitiinaasi bioloogia uurimiseks proteasoomi kontekstis. HTBH-märgistamissüsteem võimaldab biotüülitud komplekside väga ranget puhastamist streptavidiinipõhiste pulldown-meetodite abil.

Stabiilseid HEK293-rakke (Rpn11-HTBH) hoitakse adhesiivkultuurina DMEM-is, millele on lisatud 10% FBS ja sobiv selektsioonantibiootikum transgeeni ekspressiooni säilitamiseks 37 °C juures niisutatud 5% CO<sub>2</sub>-atmosfääris. Rakke subkultiveeritakse Accutase'iga 80–90% konfluentsuse juures (jagamissuhe 1:5 kuni 1:10). Kasvukeskkonda vahetatakse iga 2–3 päeva järel.

**Organism** Inimene

**Tissue** Neerud

**Disease** Muundatud/immortaliseeritud loote neer (HEK293 taust; Rpn11-HTBH transgeen)

**Applications** 26S proteasoomi bioloogia; Rpn11/PSMD14 funktsioon; ubikvitiin-proteasoomi rada; proteasoomi kompleksi puhastamine; deubikvitiinaasi bioloogia; HTBH-märgise afiinsuspuhastamine; proteasoomi interaktome uuringud

## Omadused

**Morphology** Epiteelilaadsed

**Cell type** Epiteelirakud

**Growth properties** Kinnipeetav

## Regulatiivsed andmed

**HEK293-Rpn11-HTBH rakud | 305719**

**Citation** Stabiilsed HEK293-rakud – Rpn11-HTBH (Cytioni katalooginumber 305719)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**GMO Status** GMO-S1: See HEK293-derivaat sisaldab stabiilselt integreeritud Rpn11-HTBH ekspressioonikassetti (heksahistidiin-TEV-biotiini aktseptorpeptiid-heksahistidiiniga märgistatud Rpn11/PSMD14). See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

**Biomolekulaarsed andmed****Töötlemine**

**Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)

**Supplements** Täiendada söötme 10% FBS-ga

**Dissociation Reagent** Enamik rakke eraldub PBS-is; vajaduse korral lisage Accutase'i ja hoidke 5 minutit toatemperatuuril

**Doubling time** umbes 24–36 tundi

**Subculturing** Eemaldage kasvukeskkond, peske PBS-ga, milles ei ole kaltsiumi ega magneesiumi, katke Accutase'iga, inkubeerige 8–10 minutit toatemperatuuril, suspendeerige uuesti kasvukeskkonnas, tsentrifugeerige 300×g 3 minutit, valage supernatant ära, külvake uuesti värskesse kasvukeskkonda.

**Split ratio** 1–10

**Seeding density**  $2-4 \times 10^4$  rakku/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** Iga 2 kuni 3 päeva tagant

**Freeze medium** Krüosäilitusvedelikuna kasutame täielikku kasvukeskkonda + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist.

## HEK293-Rpn11-HTBH rakud | 305719

### Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150 °C, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vial kiiresti, kastes selle 37 °C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud vial ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Tsentrifuugige segu 5 minutit 200 x g juures, visake ettevaatlikult ära külmutusvedelikku sisaldav supernatant.
7. Järgige punktis "Taastamisjärgne taastamine" kirjeldatud menetlust

### Incubation Atmosphere

37°C, 5%  $\text{CO}_2$  niisutatud atmosfäär.

### Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

### Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage vialid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

## Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA