Product sheet

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 deubikvitinaasi alarühm. Rpn11 on Zn^{2+}-sõltuv JAMM-domeeniga deubikvitinaas, 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 biotiniilitud komplekside väga ranget puhastamist streptavidiinipõhiste pulldown-meetodite abil.
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

Citation	Stabiilsed HEK293-rakud – Rpn11-HTBH (Cytioni kataloginumber 305719)
Biosafety level	1

HEK293-Rpn11-HTBH rakud | 305719

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 NaHCO3, 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, tsentrifuugige 300×g 3 minutit, valage supernatant ära, külvake uuesti värskesse kasvukeskkonda.
Split ratio	1–10
Seeding density	$2–4 \times 10^4$ rakku/cm²
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 viaal 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 viaali 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 viaali ettevaatlikult ja viige rakususpensioon 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% $_{CO2}$, 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 viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.
Storage Conditions	Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll ja molekulaaranalüüs