

HEK293-Rpn11-HTBH solut | 305719

Yleisiä tietoja

Description

Stable HEK293 Cells-Rpn11-HTBH on HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) -solulinjasta, joka on muokattu ilmentämään merkittävää versiota Rpn11:stä (tunnetaan myös nimillä PSMD14 tai POH1), joka on 26S-proteasomin kansikompleksin deubikitiinaasi-alayksikkö. Rpn11 on Zn^{2+} -riippuvainen JAMM-domeeninen deubikitiinaasi, joka poistaa ubikitiiniketjut proteasomiin sitoutuneista substraateista proteasomaalisen hajoamisen aikana. HTBH-tunniste (heksahistidiini-TEV-biotiini-akseptoripeptidi-heksahistidiini) mahdollistaa Rpn11:tä sisältävien kompleksien affiniteettipuhdistuksen natiiviolosuhteissa, minkä ansiosta tämä solulinja sopii erityisen hyvin proteasomikompleksien puhdistukseen ja interaktomitutkimuksiin.

Tätä solulinjaa voidaan käyttää 26S-proteasomin biologian, ubikitiini-proteasomireitin (UPS) säätelyn, Rpn11/PSMD14:n toiminnan proteiinien laadunvalvonnassa, proteasomin kokoonpanon ja dynamiikan sekä proteasomin estäjien vaikutusmekanismien tutkimuksissa. Sitä käytetään myös natiivien proteasomikompleksien affiniteettipuhdistukseen sekä mallina deubikitiinaasibiologian tutkimiseen proteasomin kontekstissa. HTBH-merkintäjärjestelmä mahdollistaa biotinyloitujen kompleksien erittäin tiukan puhdistuksen streptavidiinipohjaisten pulldown-menetelmien avulla.

Organism

Ihminen

Tissue

Munuaiset

Disease

Muunnettu/ikuistettu sikiön munuainen (HEK293-tausta; Rpn11-HTBH-transgeeni)

Applications

26S-proteasomin biologia; Rpn11/PSMD14:n toiminta; ubikitiini-proteasomireitti; proteasomikompleksin puhdistus; deubikitiinaasien biologia; HTBH-tag-affiniteettipuhdistus; proteasomin vuorovaikutusverkoston tutkimukset

Ominaisuudet

Morphology

Epiteelin kaltainen

Cell type

Epiteelisolut

Growth properties

Tarttuva

Säätelytiedot

Citation

Vakaat HEK293-solut – Rpn11-HTBH (Cytion-tuotenumero 305719)

Biosafety level

1

HEK293-Rpn11-HTBH solut | 305719

NCBI_TaxID 9606

GMO Status GMO-S1: Tämä HEK293-johdannainen sisältää vakaasti integroidun Rpn11-HTBH-ilmentymiskasetin (heksahistidiini-TEV-biotiini-akseptoripeptidi-heksahistidiinillä merkitty Rpn11/PSMD14). Tämä luokitus koskee ainoastaan Saksaa, ja se voi olla erilainen muualla.

Biomolekyylitiedot

Käsittely

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)

Supplements Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä

Dissociation Reagent Suurin osa soluista irtoaa PBS-liuoksessa; lisää tarvittaessa Accutasea ja anna vaikuttaa 5 minuuttia huoneenlämmössä

Doubling time noin 24–36 tuntia

Subculturing Poista elatusaine, pese PBS-liuoksella, josta on poistettu kalsium ja magnesium, lisää Accutasea, inkuboi 8–10 minuuttia huoneenlämmössä, suspendoi uudelleen elatusaineeseen, sentrifugoi 300×g:ssa 3 minuuttia, heitä supernatantti pois ja siirrä solut uuteen elatusaineeseen.

Split ratio 1–10

Seeding density $2-4 \times 10^4$ solua/cm²

Fluid renewal 2-3 päivän välein

Freeze medium Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa + 10 % DMSO:ta, jotta elinkelpoisuus olisi riittävä sulatuksen jälkeen.

HEK293-Rpn11-HTBH solut | 305719**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädettynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 200 x g:n voimakkuudella 5 minuuttia ja hävitä varovasti pakastusmediaa sisältävä supernatantti.
7. Noudatetaan kohdassa Sulattamisen jälkeinen talteenotto kuvattua menettelyä

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 %_{CO2}, kostutettu ilmakehä.

**Shipping
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

**Storage
Conditions**

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi