

HEK293-Rpn11-HTBH ląstelės | 305719

Bendra informacija

Description

Stabilios HEK293 ląstelės – Rpn11-HTBH – yra stabiliai transfekuotas HEK293 (žmogaus embrioninių inkstų 293) ląstelių linijos stabiliai transfekuotas darinys, sukurtas ekspresuoti pažymėtą Rpn11 (taip pat žinomo kaip PSMD14 arba POH1) versiją – 26S proteasomos dangčio komplekso deubikvitinazės subvienetą. Rpn11 yra Zn²⁺ priklausoma JAMM domeno deubikvitinazė, kuri proteasominio skilimo metu pašalina ubikvitino grandines iš su proteasomu susietų substratų. HTBH žymė (heksahistidinas-TEV-biotino akceptorius peptidas-heksahistidinas) leidžia atlikti Rpn11 turinčių kompleksų afinitetinį gryninimą natūraliomis sąlygomis, todėl ši ląstelių linija ypač tinka proteasomų kompleksų gryninimui ir sąveikų tinklo tyrimams.

Ši ląstelių linija tinka 26S proteasomos biologijos, ubikvitino-proteasomos kelio (UPS) reguliacijos, Rpn11/PSMD14 funkcijos baltymų kokybės kontrole, proteasomos surinkimo ir dinamikos bei proteasomos inhibitorių veikimo mechanizmo tyrimams. Ji taip pat naudojama natūralių proteasomų kompleksų afinitetiniam gryninimui ir kaip modelis deubikvitinazės biologijos tyrimams proteasomos kontekste. HTBH žymėjimo sistema leidžia atlikti itin griežtą biotinuotų kompleksų gryninimą naudojant streptavidino pagrįstus pulldown metodus.

Stabilios HEK293 ląstelės-Rpn11-HTBH auginamos kaip adhezyvinė kultūra DMEM terpėje, papildytoje 10 % FBS ir atitinkamu selekcinio antibiotiku, siekiant išlaikyti transgeno ekspresiją 37 °C temperatūroje drėgnoje 5 % CO₂ atmosferoje. Ląstelės perauginamos naudojant „Accutase“ esant 80–90 % konfluencijai (padalijimo santykis 1:5 iki 1:10). Terpė keičiama kas 2–3 dienas.

Organism

Žmogus

Tissue

Inkstai

Disease

Transformuotas/nemirtingas vaisiaus inkstas (HEK293 fonas; Rpn11-HTBH transgenas)

Applications

26S proteasomos biologija; Rpn11/PSMD14 funkcija; ubikvitino-proteasomos kelias; proteasomos komplekso gryninimas; deubikvitinazės biologija; HTBH-žymės afinitetinis gryninimas; proteasomos sąveikų tinklo tyrimai

Charakteristikos

Morphology

| epitelį panašus

Cell type

Epitelio ląstelės

Growth properties

Priglundęs

Reguliavimo duomenys

Citation

Stabilios HEK293 ląstelės – Rpn11-HTBH (Cytion katalogo numeris 305719)

HEK293-Rpn11-HTBH ląstelės | 305719

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Šis HEK293 darinys turi stabiliai integruotą Rpn11-HTBH ekspresijos kasetę (Rpn11/PSMD14, pažymėtą heksahistidinu-TEV-biotino akceptoriaus peptidu-heksahistidinu). Ši klasifikacija galioja tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.**Biomolekuliniai duomenys****Tvarkymas****Culture Medium** DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO₃, š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)**Supplements** Papildykite terpę 10 % FBS**Dissociation Reagent** Dauguma ląstelių atsiskiria PBS tirpale; jei reikia, įpilkite „Accutase“ ir palikite 5 min. kambario temperatūroje**Doubling time** maždaug nuo 24 iki 36 valandų**Subculturing** Pašalinkite terpę, nuplaukite PBS tirpalu be kalcio ir magnio, užpilkite „Accutase“, inkubuokite 8–10 min. kambario temperatūroje, vėl suspenduokite terpėje, centrifuguokite 300×g 3 min., išpilkite supernatantą, persėkite į šviežią terpę.**Split ratio** nuo 1 iki 10**Seeding density** $2-4 \times 10^4$ ląstelių/cm²**Fluid renewal** Kas 2-3 dienas**Freeze medium** Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo.

HEK293-Rpn11-HTBH ląstelės | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 200 x g greičiu 5 minutes, atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpe.
7. Atlikite procedūrą, aprašytą skyriuje "Atkūrimas po atšildymo"

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkeltite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug $-150\text{--}196\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Laikymas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeltiant į skystąjį azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA