

HEK293-Rpn11-HTBH šūnas | 305719

Vispārīga informācija

Description

Stabilās HEK293 šūnas — Rpn11-HTBH — ir stabili transfekcijas ceļā modificēts HEK293 (cilvēka embrija nierēs 293) šūnu līnijas stabili transfekcijas ceļā iegūts atvasinājums, kas inženierijas ceļā radīts, lai ekspresētu marķētu Rpn11 (pazīstams arī kā PSMD14 vai POH1) versiju — 26S proteasomas vāka kompleksa deubikvitināzes apakšvienību. Rpn11 ir Zn^{2+} -atkarīga JAMM-domēna deubikvitināze, kas proteasomālās noārdīšanās laikā no proteasomai piesaistītiem substrātiem noņem ubikvitīna ķēdes. HTBH marķējums (heksahistidīns-TEV-biotīna akceptora peptīds-heksahistidīns) ļauj veikt Rpn11 saturošu kompleksu afinitātes attīrīšanu dabiskos apstākļos, padarot šo šūnu līniju īpaši piemērotu proteasomu kompleksu attīrīšanai un interaktomu pētījumiem.

Šo šūnu līniju var izmantot 26S proteasomas bioloģijas pētījumos, ubikvitīna-proteasomas ceļa (UPS) regulācijas pētījumos, Rpn11/PSMD14 funkcijas pētījumos olbaltumvielu kvalitātes kontrolē, proteasomas montāžas un dinamikas pētījumos, kā arī proteasomas inhibitoru darbības mehānisma izpētē. To izmanto arī dabisko proteasomu kompleksu afinitātes attīrīšanai un kā modeli deubikvitināzes bioloģijas pētīšanai proteasomas kontekstā. HTBH marķēšanas sistēma ļauj veikt ļoti precīzu biotinilēto kompleksu attīrīšanu, izmantojot uz streptavidīnu balstītus pulldown eksperimentus.

Organism

Cilvēks

Tissue

Nieres

Disease

Transformēta/imortalizēta augļa niere (HEK293 fons; Rpn11-HTBH transgēns)

Applications

26S proteasomas bioloģija; Rpn11/PSMD14 funkcija; ubikvitīna-proteasomas ceļš; proteasomas kompleksa attīrīšana; deubikvitināzes bioloģija; HTBH-tag afinitātes attīrīšana; proteasomas interaktoma pētījumi

Raksturojums

Morphology

Epitēlijevīdīgs

Cell type

Epitēlija šūnas

Growth properties

Adherent

Normatīvie dati

Citation

Stabilas HEK293 šūnas — Rpn11-HTBH (Cytion kataloga numurs 305719)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

HEK293-Rpn11-HTBH šūnas | 305719

GMO Status GMO-S1: Šīs HEK293 atvasinājums satur stabili integrētu Rpn11-HTBH ekspresijas kaseti (ar heksahistidīnu-TEV-biotīna akceptora peptīdu-heksahistidīnu marķētu Rpn11/PSMD14). Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un citās valstīs var atšķirties.

Biomolekulārie dati

Darbs ar

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM nātrija piruvāta (Cytion izstrādājuma numurs 820300a)

Supplements Papildināt barotni ar 10% FBS

Dissociation Reagent Lielākā daļa šūnu atdalās PBS vidē; ja nepieciešams, pievienojiet Accutase un ļaujiet iedarboties 5 minūtes istabas temperatūrā

Doubling time aptuveni 24 līdz 36 stundas

Subculturing Noņemiet barotni, nomazgājiet ar PBS bez kalcija un magnija, pārklājiet ar Accutase, inkubējiet 8–10 minūtes istabas temperatūrā, atkārtoti suspendējiet barotnē, centrifugējiet 300×g 3 minūtes, izlejiet supernatantu, pārstādiet svaigā barotnē.

Split ratio no 1 līdz 10

Seeding density 2 līdz 4×10^4 šūnas/cm²

Fluid renewal Ik pēc 2 līdz 3 dienām

Freeze medium Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni + 10% DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas.

HEK293-Rpn11-HTBH šūnas | 305719

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Maisījumu centrifugē pie 200 x g 5 minūtes, virsgatavumu, kas satur sasaldēšanas barotni, uzmanīgi izmet.
7. Veikt procedūru, kas aprakstīta sadaļā "Atjaunošana pēc atkausēšanas"

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

**Shipping
Conditions**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

**Storage
Conditions**

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starpposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole un molekulārā analīze