

HEK293-Rpn11-HTBH-cellen | 305719

Algemene informatie

Description

Stabiele HEK293-cellen-Rpn11-HTBH is een stabiel getransfecteerde afgeleide van de HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) cellijn, die is gemanipuleerd om een gelabelde versie van Rpn11 (ook bekend als PSMD14 of POH1) tot expressie te brengen, de deubiquitinase-subeenheid van het 26S-proteasoom-lidcomplex. Rpn11 is een Zn^{2+} -afhankelijk deubiquitinase met een JAMM-domein dat ubiquitineketens verwijdert van aan het proteasoom gebonden substraten tijdens proteasoomafbraak. De HTBH-tag (hexahistidine-TEV-biotine-acceptorpeptide-hexahistidine) maakt affiniteitszuivering van Rpn11-bevattende complexen onder natuurlijke omstandigheden mogelijk, waardoor deze lijn bijzonder geschikt is voor de zuivering van proteasoomcomplexen en interactieonderzoek.

Deze cellijn is toepasbaar in onderzoek naar de biologie van het 26S-proteasoom, de regulatie van de ubiquitine-proteasoomroute (UPS), de functie van Rpn11/PSMD14 bij de kwaliteitscontrole van eiwitten, de assemblage en dynamica van het proteasoom, en het werkingsmechanisme van proteasoomremmers. De lijn wordt ook gebruikt voor affiniteitszuivering van native proteasoomcomplexen en als model voor het bestuderen van de biologie van deubiquitinases in de context van het proteasoom. Het HTBH-tagging-systeem maakt een zeer stringente zuivering van biotine-gelabelde complexen mogelijk met behulp van op streptavidine gebaseerde pulldowns.

Stabiele HEK293-cellen (Rpn11-HTBH) worden gekweekt als een hechtende cultuur in DMEM, aangevuld met 10% FBS en het juiste selectie-antibioticum om de transgenexpressie in stand te houden bij 37 °C in een bevochtigde atmosfeer met 5% CO₂. De cellen worden bij een confluentie van 80–90% gesubcultiveerd met Accutase (splittingsverhouding 1:5 tot 1:10). Het medium wordt om de 2–3 dagen ververs.

Organism

Mens

Tissue

Nieren

Disease

Getransformeerde/vereeuwigde foetale nier (HEK293-achtergrond; Rpn11-HTBH-transgen)

Applications

Biologie van het 26S-proteasoom; functie van Rpn11/PSMD14; ubiquitine-proteasoomroute; zuivering van proteasoomcomplexen; biologie van deubiquitinases; affiniteitszuivering met HTBH-tag; onderzoek naar het proteasoom-interactoom

Kenmerken

Morphology

Epitheelachtig

Cell type

Epitheelcellen

Growth properties

Aanhangend

Regelgevende gegevens

HEK293-Rpn11-HTBH-cellen | 305719**Citation** Stabiele HEK293-cellen – Rpn11-HTBH (Cytion-catalogusnummer 305719)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Dit HEK293-derivaat bevat een stabiel geïntegreerde Rpn11-HTBH-expressiecassette (Rpn11/PSMD14 gemerkt met hexahistidine-TEV-biotine-acceptorpeptide-hexahistidine). Deze classificatie geldt uitsluitend binnen Duitsland en kan elders afwijken.**Biomoleculaire gegevens****Omgaan met****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamine, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM Natriumpyruvaat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements** Vul het medium aan met 10% FBS**Dissociation Reagent** De meeste cellen komen los in PBS; voeg indien nodig Accutase toe en laat 5 minuten bij kamertemperatuur staan**Doubling time** ongeveer 24 tot 36 uur**Subculturing** Verwijder het medium, was de cellen met PBS zonder calcium en magnesium, bedek ze met Accutase, incubeer 8–10 minuten bij kamertemperatuur, breng ze opnieuw in suspensie in het medium, centrifugeer 300×g gedurende 3 minuten, gooi het supernatant weg en zaai de cellen opnieuw uit in vers medium.**Split ratio** 1 tot 10**Seeding density** 2 tot 4×10^4 c^{ellen}/cm²**Fluid renewal** Om de 2 tot 3 dagen**Freeze medium** Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedum + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien.

HEK293-Rpn11-HTBH-cellen | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open de gedesinfecteerde flacon voorzichtig en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 5 minuten bij $200 \times g$ en gooi het supernatant met vriesmedium voorzichtig weg.
7. Volg de procedure beschreven onder Herstel na ontdooien

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Opslag bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA