

HEK293-Rpn11-HTBH-celler | 305719**Generell informasjon****Description**

Stabile HEK293-celler – Rpn11-HTBH er et stabilt transfisert derivat av HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)-cellelinjen, utviklet for å uttrykke en merket versjon av Rpn11 (også kjent som PSMD14 eller POH1), deubiquitinase-underenheten i 26S-proteasomets lokkkompleks. Rpn11 er et Zn²⁺-avhengig deubiquitinase med JAMM-domene som fjerner ubiquitin-kjeder fra proteasombundne substrater under proteasomal nedbrytning. HTBH-merket (heksahistidin-TEV-biotin-akseptorpeptid-heksahistidin) muliggjør affinitetspurifisering av Rpn11-holdige komplekser under naturlige betingelser, noe som gjør denne cellelinjen spesielt egnet for rensing av proteasomkomplekser og interaktomstudier.

Denne cellelinjen kan brukes i studier av 26S-proteasombiologi, regulering av ubiquitin-proteasom-veien (UPS), Rpn11/PSMD14-funksjon i proteinkvalitetskontroll, proteasom-sammenstilling og -dynamikk, samt virkningsmekanismen til proteasominhibitorer. Den brukes også til affinitetspurifisering av native proteasomkomplekser og som modell for å studere deubiquitinase-biologi i sammenheng med proteasomet. HTBH-merkingssystemet muliggjør svært streng rensing av biotinyllert komplekser ved hjelp av streptavidin-baserte pulldowns.

Stabile HEK293-celler (Rpn11-HTBH) opprettholdes som en vedheftende kultur i DMEM tilsatt 10 % FBS og det aktuelle seleksjonsantibiotikumet for å opprettholde transgenuttrykk ved 37 °C i en fuktet atmosfære med 5 % CO₂. Cellene subkultiveres med Accutase ved 80–90 % konfluens (delingsforhold 1:5 til 1:10). Mediet skiftes ut hver 2.–3. dag.

Organism

Menneskelig

Tissue

Nyre

Disease

Transformert/immortaliserte fosternyrer (HEK293-bakgrunn; Rpn11-HTBH-transgen)

Applications

26S-proteasombiologi; Rpn11/PSMD14-funksjon; ubikvitin-proteasom-veien; rensing av proteasomkomplekser; deubikvitinase-biologi; affinitetsrensing med HTBH-tag; studier av proteasom-interaktomet

Kjennetegn**Morphology**

Epitel-lignende

Cell type

Epitelceller

Growth properties

Vedhengende

Regulatoriske data**Citation**

Stabile HEK293-celler – Rpn11-HTBH (Cytion-katalognummer 305719)

HEK293-Rpn11-HTBH-celler | 305719

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Dette HEK293-derivatet inneholder en stabilt integrert Rpn11-HTBH-ekspresjonskasset (Rpn11/PSMD14 merket med heksahistidin-TEV-biotin-akseptorpeptid-heksahistidin). Denne klassifiseringen gjelder kun i Tyskland og kan være annerledes andre steder.**Biomolekylære data****Håndtering****Culture Medium** DMEM, m: 4,5 g/L glukose, m: 4 mM L-glutamin, m: 3,7 g/L NaHCO₃, m: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikkelnummer 820300a)**Supplements** Suppler mediet med 10 % FBS**Dissociation Reagent** De fleste celler løsner i PBS; tilsett om nødvendig Accutase i 5 minutter ved romtemperatur**Doubling time** ca. 24 til 36 timer**Subculturing** Fjern mediet, vask med PBS uten kalsium og magnesium, tilsett Accutase, inkuber i 8–10 minutter ved romtemperatur, resuspender i mediet, sentrifuger ved 300×g i 3 minutter, kast supernatanten, og så på nytt i ferskt medium.**Split ratio** 1 til 10**Seeding density** 2 til 4×10^4 cell^{er}/cm²**Fluid renewal** Hver 2. til 3. dag**Freeze medium** Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium + 10 % DMSO for å sikre tilstrekkelig levedyktighet etter optining.

HEK293-Rpn11-HTBH-celler | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $200 \times g$ i 5 minutter, og kast supernatanten som inneholder frysemedium, forsiktig.
7. Følg prosedyren som er beskrevet under Post-Thaw Recovery

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , befuktet atmosfære.

Shipping Conditions

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lagring ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA