

Komórki HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Informacje ogólne

Description

Stabilne komórki HEK293-Rpn11-HTBH to stabilnie transfekowana odmiana linii komórkowej HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), zmodyfikowanej genetycznie w celu ekspresji znakowanej wersji białka Rpn11 (znanego również jako PSMD14 lub POH1), podjednostki deubikwitynazy kompleksu pokrywającego proteasom 26S. Rpn11 jest zależną od Zn^{2+} deubikwitynazą z domeną JAMM, która usuwa łańcuchy ubikwityny z substratów związanych z proteasomem podczas degradacji proteasomalnej. Znacznik HTBH (heksahistydyna-TEV-peptyd akceptorowy biotyny-heksahistydyna) umożliwia oczyszczanie powinowactwowe kompleksów zawierających Rpn11 w warunkach natywnych, dzięki czemu linia ta nadaje się szczególnie do oczyszczania kompleksów proteasomowych oraz badań interakomicznych.

Linia komórkowa ta znajduje zastosowanie w badaniach nad biologią proteasomu 26S, regulacją szlaku ubikwityna-proteasom (UPS), funkcją Rpn11/PSMD14 w kontroli jakości białek, montażem i dynamiką proteasomu oraz mechanizmem działania inhibitorów proteasomu. Wykorzystuje się ją również do oczyszczania powinowactwowe natywnych kompleksów proteasomowych oraz jako model do badań nad biologią deubikwitynaz w kontekście proteasomu. System znakowania HTBH umożliwia bardzo rygorystyczne oczyszczanie kompleksów biotynylowanych przy użyciu metod pulldown opartych na streptawidynie.

Stabilne komórki HEK293-Rpn11-HTBH są hodowane jako hodowla przylegająca w pożywce DMEM uzupełnionej 10% FBS oraz odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym w celu utrzymania ekspresji transgenu w temperaturze 37°C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO_2 . Komórki poddaje się subkulturowaniu przy użyciu Accutase przy 80–90% konfluencji (współczynnik podziału 1:5 do 1:10). Pożywkę wymienia się co 2–3 dni.

Organism

Człowiek

Tissue

Nerka

Disease

Zmodyfikowana/unieśmierteliona nerka płodu (linia komórkowa HEK293; transgen Rpn11-HTBH)

Applications

Biologia proteasomu 26S; funkcja białka Rpn11/PSMD14; szlak ubikwityna-proteasom; oczyszczanie kompleksów proteasomowych; biologia deubikwitynaz; oczyszczanie powinowactwowe z wykorzystaniem tagu HTBH; badania interakomów proteasomu

Charakterystyka

Morphology

Podobny do nabłonka

Cell type

Komórki nabłonkowe

Growth properties

Adherent

Dane regulacyjne

Komórki HEK293-Rpn11-HTBH | 305719**Citation** Stabilne komórki HEK293 – Rpn11-HTBH (numer katalogowy Cytion 305719)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Ta odmiana komórek HEK293 zawiera stabilnie zintegrowaną kasetę ekspresyjną Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14 oznaczone sekwencją heksahistydyna-TEV-peptyd akceptorowy biotyny-heksahistydyna). Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie na terenie Niemiec i może się różnić w innych krajach.**Dane biomolekularne****Obsługa****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)**Supplements** Uzupelnic podloze 10% FBS**Dissociation Reagent** Wiecezosc komorek odrywa sie w roztworze PBS; w razie potrzeby dodac Accutase na 5 minut w temperaturze pokojowej**Doubling time** ok. 24–36 godzin**Subculturing** Usunac pozywke, przemyc komorki roztworem PBS bez wapnia i magnezu, zalac preparatem Accutase, inkubowac przez 8–10 minut w temperaturze pokojowej, zawiesic komorki w pozywce, odwirowac przy 300xg przez 3 minuty, odrzucic supernatant, ponownie zasiac komorki w swiezej pozywce.**Split ratio** od 1 do 10**Seeding density** od 2 do 4×10^4 komorek/cm²**Fluid renewal** Co 2 do 3 dni**Freeze medium** Jako pozywki do kriokonserwacji uzywamy kompletnej pozywki wzrostowej + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej zywotnosci po rozmrozeniu.

Komórki HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otwórz zdezynfekowaną fiolkę i przenieś zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $200 \times g$ przez 5 minut, ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pożywkę do zamrażania.
7. Postępować zgodnie z procedurą opisaną w sekcji Odzyskiwanie po rozmrożeniu

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA