

Bunky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719**Všeobecné informácie****Description**

Stabilné bunky HEK293-Rpn11-HTBH sú stabilne transfekovaným derivátom bunckej línie HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), geneticky upravené tak, aby exprimovali značenú verziu Rpn11 (známeho aj ako PSMD14 alebo POH1), podjednotky deubikvitinázy komplexu viečka 26S proteazómu. Rpn11 je Zn²⁺-dependentná deubikvitináza s doménou JAMM, ktorá odstraňuje reťazce ubikvitínu zo substrátov viazaných na proteazóm počas proteazómovej degradácie. Značka HTBH (hexahistidín-TEV-biotínový akceptorový peptid-hexahistidín) umožňuje afinitnú purifikáciu komplexov obsahujúcich Rpn11 za natívnych podmienok, vďaka čomu je táto bunková línia obzvlášť vhodná na purifikáciu proteazómových komplexov a štúdium interaktómu.

Táto bunková línia je vhodná na štúdium biológie 26S proteazómu, regulácie ubikvitín-proteazómovej dráhy (UPS), funkcie Rpn11/PSMD14 pri kontrole kvality proteínov, zostavovania a dynamiky proteazómu, ako aj mechanizmu účinku inhibítorov proteazómu. Používa sa tiež na afinitnú purifikáciu natívnych proteazómových komplexov a ako model na štúdium biológie deubikvitinázy v kontexte proteazómu. Systém značenia HTBH umožňuje vysoko selektívnu purifikáciu biotinylovaných komplexov pomocou pulldownov na báze streptavidínu.

Stabilné bunky HEK293-Rpn11-HTBH sa kultivujú ako adhezívna kultúra v médiu DMEM doplnenom o 10 % FBS a príslušné selekčné antibiotikum na udržanie expresie transgénu pri teplote 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s 5 % CO₂. Bunky sa subkultivujú pomocou Accutase pri 80–90 % konfluencii (pomer rozdelenia 1:5 až 1:10). Médium sa obnovuje každé 2–3 dni.

Organism

Ľudské

Tissue

Obličky

Disease

Transformovaná/nesmrtelná fetálna oblička (na pozadí buniek HEK293; transgén Rpn11-HTBH)

Applications

biológia proteazómu 26S; funkcia Rpn11/PSMD14; ubikvitín-proteazómová dráha; purifikácia proteazómového komplexu; biológia deubikvitinázy; afinitná purifikácia pomocou HTBH-tagu; štúdie interaktómu proteazómu

Charakteristika**Morphology**

Epitelu podobné

Cell type

Epitelové bunky

Growth properties

Adherent

Regulačné údaje**Citation**

Stabilné bunky HEK293 – Rpn11-HTBH (katalógové číslo Cytion 305719)

Bunky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Tento derivát buniek HEK293 obsahuje stabilne integrovanú expresnú kazetu Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14 označený sekvenciou hexahistidín-TEV-biotínový akceptorový peptid-hexahistidín). Táto klasifikácia platí iba v Nemecku a v iných krajinách sa môže líšiť.**Biomolekulárne údaje****Spracovanie****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplňte médium o 10 % FBS**Dissociation Reagent** Väčšina buniek sa uvoľní v PBS; v prípade potreby pridajte Accutase na 5 minút pri izbovej teplote**Doubling time** približne 24 až 36 hodín**Subculturing** Odstráňte médium, premyte PBS bez vápnika a horčíka, zalejte Accutase, inkubujte 8–10 minút pri izbovej teplote, resuspendujte v médiu, odstreďte pri 300×g po dobu 3 minút, supernatant zlikvidujte a znovu naočkujte do čerstvého média.**Split ratio** 1 až 10**Seeding density** 2 až 4 × 10⁴ buniek/cm²**Fluid renewal** Každé 2 až 3 dni**Freeze medium** Ako médium na kryokonzerváciu používame kompletne rastové médium + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení.

Bunky HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 200 x g počas 5 minút, supernatant obsahujúci zmrazovacie médium opatrne zlikvidujte.
7. Postupujte podľa postupu opísaného v časti Obnova po rozmrazení

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 %_{CO2}, zvlhčená atmosféra.

Shipping Conditions

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA