

Celice HEK293-Rpn11-HTBH | 305719**Splošne informacije****Description**

Stabilne celice HEK293-Rpn11-HTBH so stabilno transfektirana derivata celične linije HEK293 (človeške embrionalne ledvice 293), ki je bila genetsko spremenjena za izražanje označene različice Rpn11 (znanega tudi kot PSMD14 ali POH1), podenote deubikvitinaze kompleksa pokrova 26S proteasoma. Rpn11 je Zn²⁺-odvisna deubikvitinaza z domeno JAMM, ki med proteasomsko razgradnjo odstranjuje verige ubikvitina s substratov, vezanih na proteasom. Oznaka HTBH (heksahistidin-TEV-biotin-akceptorski peptid-heksahistidin) omogoča afinitetno čiščenje kompleksov, ki vsebujejo Rpn11, v naravnih pogojih, zaradi česar je ta linija še posebej primerna za čiščenje proteasomskih kompleksov in študije interaktoma.

To celično linijo je mogoče uporabiti v raziskavah biologije 26S proteasoma, regulacije ubikvitin-proteasomskega poteka (UPS), funkcije Rpn11/PSMD14 pri nadzoru kakovosti beljakovin, sestavljanja in dinamike proteasoma ter mehanizma delovanja zaviralcev proteasoma. Uporablja se tudi za afinitetno čiščenje nativnih proteasomskih kompleksov ter kot model za preučevanje biologije deubikvitinaz v kontekstu proteasoma. Sistem označevanja HTBH omogoča izredno strogo čiščenje biotiniliranih kompleksov s pomočjo pulldownov na osnovi streptavidina.

Stabilne celice HEK293-Rpn11-HTBH se gojijo kot adhezivna kultura v DMEM, dopoljenem z 10 % FBS in ustreznim selekcijskim antibiotikom za ohranjanje ekspresije transgena pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Celice se subkultivirajo z Accutase pri 80–90 % konfluenci (razmerje delitve 1:5 do 1:10). Gojišče se obnavlja vsakih 2–3 dni.

Organism

Človek

Tissue

Ledvice

Disease

Transformirana/imortalizirana plodova ledvica (linija HEK293; transgen Rpn11-HTBH)

Applications

biologija proteasoma 26S; delovanje Rpn11/PSMD14; ubikvitin-proteasomski sistem; čiščenje proteasomskega kompleksa; biologija deubikvitinaz; afinitetno čiščenje z oznako HTBH; raziskave interaktoma proteasoma

Značilnosti**Morphology**

Epitelijam podobni

Cell type

Epitelijske celice

Growth properties

Pripadajoče

Regulativni podatki**Citation**

Stabilne celice HEK293 – Rpn11-HTBH (kataloška številka Cytion 305719)

Celice HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**GMO Status** GMO-S1: Ta derivat celic HEK293 vsebuje stabilno vgrajeno kaseto za izražanje Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14, označen s sekvenco heksahistidin-TEV-biotin-sprejemni peptid-heksahistidin). Ta klasifikacija velja le v Nemčiji in se drugod lahko razlikuje.**Biomolekularni podatki****Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glukoze, w: 4 mM L-glutamina, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM natrijevega piruvata (številka izdelka Cytion 820300a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS**Dissociation Reagent** Večina celic se v PBS-ju odlepi; po potrebi dodajte Accutase in pustite delovati 5 minut pri sobni temperaturi**Doubling time** približno 24 do 36 ur**Subculturing** Odstranite gojišče, sperite s PBS brez kalcija in magnezija, prekrijte z Accutase, inkubirajte 8–10 minut pri sobni temperaturi, ponovno suspendirajte v gojišču, centrifugirajte pri 300×g 3 minute, odlijte supernatant, ponovno posejte v sveže gojišče.**Split ratio** od 1 do 10**Seeding density** 2 do 4 × 10⁴ celic/cm²**Fluid renewal** Vsakih 2 do 3 dni**Freeze medium** Kot gojišče za krioprezervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi.

Celice HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa krioviala razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $200 \times g$ 5 minut, supernatant, ki vsebuje gojišče za zamrzovanje, previdno zavržite.
7. Izvedite postopek, opisan v poglavju Obnova po odmrzovanju

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Shranjevanje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA