Product sheet

Клітини HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Загальна інформація

Description	Стабільні клітини HEK293-Rpn11-HTBH — це стабільно трансфікований варіант клітинної лінії HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), модифікована для експресії міченої версії Rpn11 (також відомого як PSMD14 або POH1) — субодиниці деубіквітинази комплексу кришки 26S-протеасоми. Rpn11 — це Zn^{2+}-залежна деубіквітиназа з доменом JAMM, яка видаляє ланцюги убіквітину з субстратів, зв'язаних із протеасомою, під час протеасомального розщеплення. Мітка HTBH (гексагістидин-TEV-пептид-акцептор біотину-гексагістидин) дозволяє проводити афінне очищення комплексів, що містять Rpn11, у нативних умовах, завдяки чому ця лінія особливо підходить для очищення протеасомних комплексів та досліджень інтерактома. Цю клітинну лінію можна застосовувати в дослідженнях біології 26S-протеасоми, регуляції убіквітин-протеасомального шляху (UPS), функції Rpn11/PSMD14 у контролі якості білків, збірки та динаміки протеасоми, а також механізму дії інгібіторів протеасоми. Вона також використовується для афінної очистки нативних протеасомних комплексів та як модель для вивчення біології деубіквітиназ у контексті протеасоми. Система мічення HTBH дозволяє здійснювати високочутливу очистку біотинільованих комплексів за допомогою пулдаунів на основі стрептавідину. Стабільні клітини HEK293-Rpn11-HTBH культивують у вигляді адгезивної культури в середовищі DMEM, доповненому 10 % FBS та відповідним селективним антибіотиком для підтримання експресії трансгену, при температурі 37 °C у зволоженій атмосфері з 5 % CO_2. Клітини пересівають за допомогою Accutase при 80–90 % конфлюентності (співвідношення поділу 1:5 до 1:10). Середовище оновлюють кожні 2–3 дні.
Organism	Людина
Tissue	Нирка
Disease	Трансформована/увічнена нирка плода (на основі клітинної лінії HEK293; трансген Rpn11-HTBH)
Applications	Біологія 26S-протеасоми; функція Rpn11/PSMD14; убіквітин-протеасомальний шлях; очищення протеасомального комплексу; біологія деубіквітиназ; афінне очищення за допомогою HTBH-мітки; дослідження взаємодій протеасоми

Характеристики

Morphology	Епітеліальноподібні
Cell type	Епітеліальні клітини
Growth properties	Адепт

Нормативні дані

Клітини HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Citation	Стабільні клітини HEK293 — Rpn11-HTBH (номер у каталозі Cytion — 305719)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
GMO Status	GMO-S1: Цей похідний штам HEK293 містить стабільно інтегровану касету експресії Rpn11-HTBH (Rpn11/PSMD14, мічений гексагістидином-TEV-біотиновим акцепторним пептидом-гексагістидином). Ця класифікація діє лише на території Німеччини і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Обробка

Culture Medium	ДМЕМ, w: 4,5 г/л Глюкоза, w: 4 мМ L-глутамін, w: 3,7 г/л NaHCO3, w: 1,0 мМ піруват натрію (цит. номер 820300a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS
Dissociation Reagent	Більшість клітин відокремлюються в PBS; за необхідності додайте Accutase на 5 хвилин при кімнатній температурі
Doubling time	приблизно від 24 до 36 годин
Subculturing	Видалити середовище, промити PBS без кальцію та магнію, залити Accutase, інкубувати 8–10 хв при кімнатній температурі, ресуспендувати в середовищі, центрифугувати при 300×g протягом 3 хв, злити супернатант, пересіяти в свіже середовище.
Split ratio	від 1 до 10
Seeding density	від 2 до 4 × 10^4 клітин/$см^2$
Fluid renewal	Кожні 2-3 дні
Freeze medium	В якості середовища для кріоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після розморожування.

Клітини HEK293-Rpn11-HTBH | 305719

Thawing and Culturing Cells

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.

2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C, щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.

3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануривши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C, обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.

4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям.

5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.

6. Центрифугуйте суміш при 200 x g протягом 5 хвилин, обережно відкиньте надосадову рідину, що містить заморожувальне середовище.

7. Виконайте процедуру, описану в розділі Відновлення після відтавання

Incubation Atmosphere	37°C, 5% $_{CO2}$, волога атмосфера.
Shipping Conditions	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.
Storage Conditions	Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості та молекулярний аналіз