

Клітини HEK293-Rpn11-НТВН | 305719

Загальна інформація

Description

Стабільні клітини HEK293-Rpn11-НТВН — 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 НТВН (гексагістидин-TEV-пептид-акцептор біотину-гексагістидин) дозволяє проводити афінне очищення комплексів, що містять Rpn11, у нативних умовах, завдяки чому ця клітинна лінія особливо підходить для очищення протеасомних комплексів та досліджень інтерактома.

Цю клітинну лінію можна застосовувати у 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. Її також використовують для афінного очищення нативних протеасомних комплексів та як модель для вивчення біології деубіквітаз у контексті протеасоми. Система мічення НТВН дозволяє здійснювати високочутливе очищення біотинільованих комплексів за допомогою методу пулдауну на основі стрептавідину.

Organism

Людина

Tissue

Нирка

Disease

Трансформована/увічнена нирка плода (на основі клітинної лінії HEK293; трансген Rpn11-НТВН)

Applications

Біологія 26S-протеасоми; функція Rpn11/PSMD14; убіквітин-протеасомальний шлях; очищення протеасомального комплексу; біологія деубіквітиназ; афінне очищення за допомогою НТВН-тегу; дослідження інтерактома протеасоми

Характеристики

Morphology

Епітеліальноподібні

Cell type

Епітеліальні клітини

Growth properties

Адепт

Нормативні дані

Citation

Стабільні клітини HEK293 — Rpn11-НТВН (номер у каталозі Cytion 305719)

Biosafety level

1

Клітини HEK293-Rpn11-НТВН | 305719

NCBI_TaxID 9606**GMO Status** GMO-S1: Цей похідний штам HEK293 містить стабільно інтегровану касету експресії Rpn11-НТВН (Rpn11/PSMD14, мічений гексагістидином-TEV-біотиновим акцепторним пептидом-гексагістидином). Ця класифікація застосовується 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 × 10⁴ клітин/см²**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-НТВН | 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, зануливши 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 $200 \times g$ 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% CO_2 , волога атмосфера.

**Shipping
Conditions**

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78°C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і без зволікань перемістіть флакони у відповідне місце 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