

## HMC3 rakud | 300102

## Üldine teave

## Description

Professor Tardieu tööühm töötas 1995. aastal välja inimese mikrogliaarakkude kloni 3 (HMC3) rakuliini, milleks kasutas SV40-lt sõltuvat mikrogliaarakkude immortaliseerimist inimese seljaaju ja kortikaalkudedest, mis saadi 8-12 nädala vanustest embrüotest. Neid esmaseid rakke, mida iseloomustab aeglane jagunemine ja keeruline morfoloogia, kasvatati esialgu 10-15 päeva enne immortaliseerimist. HMC3 rakud säilitasid mitmeid primaarse mikroglia põhijooni, nagu müeloidsete markerite nagu CD68, CD11b ja CD14 mitmekesine ekspressioon, kuigi ekspressiooni tase varieerus märkimisväärselt sõltuvalt primaarse antikeha valikust, eriti CD68 puhul.

Pärast immortaliseerimist näitasid HMC3 rakud suurenenud proliferatsioonikiirust, mille kahekordistumisaeg jäi vahemikku 24-48 tundi, säilitades samal ajal paljud nende primaarsete vastavate rakkude fenotüübi ja morfoloogilised omadused. Võrreldes primaarsete rakkudega oli suurem CD68 EBM/11-positiivsete rakkude osakaal ja vähenenud fagotsüütiline aktiivsus. Antigeeni ekspressiooni stabiilsus kinnitati 35 läbimise jooksul, kusjuures rakud jäid positiivseks NSE, CD68 ja CD11b suhtes, kuid negatiivseks CD14, MHCII ja CD4 suhtes algtingimustes. Interferoon- $\gamma$ -ga (IFN $\gamma$ ) kokkupuude tõstis siiski MHCII ekspressiooni, mis vastas rohkem primaarkultuuri reaktsioonidele samale ravile.

Funktsionaalselt erines HMC3 liin teiste kloonidega võrreldes suurema interleukiin-6 (IL-6) produktsiooni poolest baastingimustes. Sellest hoolimata on otsene võrdlus primaarsete mikrogliaarakkude tsütokiinide tootmisega meetodiliste erinevuste tõttu keeruline. Vastus lipopolüsahhariidi (LPS) stimulatsioonile tundus neil immortaliseeritud liinidel võrreldes primaarkultuuridega vähenenud. Kooskõlas primaarsete mikroglia omadustega ei tootnud HMC3 ja teised kloonitud liinid kasvaja nekroosifaktor-alfa (TNF $\alpha$ ) ei spontaanselt ega pärast põletikuvastast stimulatsiooni, rõhutades inimese embrüonaalse mikroglia spetsiifilist omadust.

**Organism** Inimene

**Tissue** Loote aju

**Applications** 3D rakukultuur, neuroteadus, neuroinfatsioon

**Synonyms** Inimese mikroglia kloon 3, CHME-3, CHME3

## Omadused

**Age** Loote

**Gender** Täpsustamata

**Morphology** Makrofaagid

**Cell type** Mikrogliaarakk

**Growth properties** Kinnipeetav

## HMC3 rakud | 300102

## Regulatiivsed andmed

<b>Citation</b>	HMC3 (Cytioni katalooginumber 300102)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_I176
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: See inimese loote aju mikroglia rakuliin (HMC3) sisaldab transfektsiooni teel sissetoodud SV40 T-antigeeni konstruktsiooni, mis toetab immortaliseerimist. Insert on mikrogliaist saadud rakkudes stabiilselt olemas. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

## Biomolekulaarsed andmed

<b>Viruses</b>	SV40 geneetiline materjal integreerub stabiilselt raku genoomi. Täielike viiruseosakeste aktiivset tootmist või vabanemist ei toimu, mis vähendab võimalikke bioloogilise ohutuse probleeme.
----------------	--

## Töötlemine

<b>Culture Medium</b>	DMEM:Ham's F12 (1:1), w: 3,1 g/L glükoosi, w: 2,5 mM L-glutamiini, w: 15 mM HEPES, w: 0,5 mM naatriumpüruvaati, w: 1,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytioni artikli number 820400a)
<b>Supplements</b>	Täiendada söötme 10% FBS-ga
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Doubling time</b>	24 ja 48 tundi
<b>Subculturing</b>	Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.
<b>Freeze medium</b>	Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

## HMC3 rakud | 300102

### Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla  $-150^{\circ}\text{C}$ , et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle  $37^{\circ}\text{C}$  veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , niisutatud atmosfäär.

### Flask Coating

Optimaalse kinnitumise ja elujõulisuse tagamiseks pärast sulatamist soovitame kasutada **kollageeniga kaetud koldeid või plaate**.

### Freezing Procedure

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu  $-78^{\circ}\text{C}$ . Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

### Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu  $-78^{\circ}\text{C}$ . Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

## HMC3 rakud | 300102

### Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

## Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

### Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.