Product sheet

HMC3-solut | 300102

Yleisiä tietoja

Description	Professori Tardieun työryhmä kehitti vuonna 1995 Human Microglial Clone 3 (HMC3) -solulinjan SV40-riippuvaisesti kuolemattomaksi tekemällä mikrogliasoluja ihmisen selkäydin- ja aivokuoren kudoksista, jotka oli saatu 8-12 viikon ikäisistä alkioista. Näitä primaarisoluja, joille on ominaista hidas jakautuminen ja monimutkainen morfologia, viljeltiin aluksi 10-15 päivää ennen kuolemattomaksi tekemistä. HMC3-solut säilyttivät useita primaaristen mikrogliasolujen keskeisiä piirteitä, kuten myeloidisten merkkiaineiden, kuten CD68, CD11b ja CD14, monipuolisen ilmentymisen, vaikka ilmentymistasot vaihtelivat huomattavasti primaarisen vasta-aineen valinnasta riippuen, erityisesti CD68:n osalta. Immortalisoinnin jälkeen HMC3-soluilla oli lisääntynyt proliferaatiovauhti, ja niiden kaksinkertaistumisajat olivat 24-48 tuntia, mutta ne säilyttivät monia primaaristen solujensa fenotyyppisiä ja morfologisia ominaisuuksia. Erityisesti CD68 EBM/11 -positiivisten solujen osuus oli suurempi ja fagosyyttinen aktiivisuus väheni primaarisoluihin verrattuna. Antigeeniekspression vakaus vahvistettiin 35 passagea myöten, ja solut pysyivät positiivisina NSE:n, CD68:n ja CD11b:n suhteen, mutta negatiivisina CD14:n, MHCII:n ja CD4:n suhteen perusolosuhteissa. Interferoni-γ:lle (IFNγ) altistuminen lisäsi kuitenkin MHCII:n ilmentymistä, mikä vastasi paremmin primaariviljelmien vasteita samalle hoidolle. Toiminnallisesti HMC3-linja erottautui muista klooneista tuottamalla enemmän interleukiini-6:ta (IL-6) perusolosuhteissa. Tästä huolimatta suora vertailu primaaristen mikrogliasolujen sytokiinituotantoon on edelleen haastavaa menetelmien erojen vuoksi. Vaste lipopolysakkaridistimulaatioon (LPS) näissä kuolemattomiksi muuttuneissa linjoissa näytti olevan heikompi kuin primaariviljelmissä. Ensisijaisten mikroglialien ominaisuuksien mukaisesti HMC3- ja muut kloonatut linjat eivät tuottaneet tuumorinekroositekijä-alfaa (TNFα) spontaanisti tai pro-inflammatorisen stimulaation jälkeen, mikä korostaa ihmisen alkion mikroglioiden erityispiirrettä.
Organism	Ihminen
Tissue	Sikiön aivot
Applications	3D-soluviljely, neurotiede, neuroinflammaatio, neurotiede
Synonyms	Ihmisen mikroglia-klooni 3, CHME-3, CHME3, CHME3

Ominaisuudet

Age	Sikiö
Gender	Määrittelemätön
Morphology	Makrofagit
Cell type	Mikrogliasolu

HMC3-solut | 300102

Growth properties	Tarttuva

Sääntelytiedot

Citation	HMC3 (Cytionin luettelonumero 300102)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_II76
GMO Status	GMO-S1: Tämä ihmisen sikiöaivojen mikrogliasolulinja (HMC3) sisältää SV40 T-antigeenikonstruktiota, joka on tuotu transfektiolla ja tukee kuolemattomuutta. Insertti on stabiilisti läsnä mikrogliasta peräisin olevissa soluissa. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyylitiedot

Viruses	SV40-geenimateriaali integroituu pysyvästi solun genomiin. Täydellisiä virushiukkasia ei tuoteta tai vapauteta aktiivisesti, mikä vähentää mahdollisia bioturvallisuusongelmia.

Käsittely

Culture Medium	DMEM:Ham's F12 (1:1), w: 3,1 g/L glukoosia, w: 2,5 mM L-glutamiinia, w: 15 mM HEPES, w: 0,5 mM natriumpyruvaattia, w: 1,2 g/L NaHCO3 (Cytionin artikkelinumero 820400a)
Supplements	Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 ja 48 tuntia
Subculturing	Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

HMC3-solut | 300102

Freeze medium	Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.
Thawing and Culturing Cells	1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädytettynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäässä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana. 2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä. 3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäästä on jäljellä pieni jäämöhkäle. 4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista. 5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen. 6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia. 7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi. 8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.
Incubation Atmosphere	37 °C, 5 % $_{CO2}$, kostutettu ilmakehä.
Flask Coating	Ei mitään
Freezing Procedure	Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

Shipping Conditions	Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.
Storage Conditions	Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen typpeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen typpeen.

Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi

Sterility	Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä. Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.