

HMC3-solut | 300102

Yleisiä tietoja

Description

Professori Tardieun työryhmä kehitti vuonna 1995 Human Microglial Clone 3 (HMC3) -solulinjan SV40-riippuvaisesti kuolemattomaksi tekemällä mikroglia-soluja 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 mikroglia-solujen 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 kaksinkertaistumisaika oli 24-48 tuntia, mutta ne säilyttivät monia primaaristen solujensa fenotyyppejä 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 (IFN γ) altistuminen lisäsi kuitenkin MHCII:n ilmentymistä, mikä vastasi paremmin primaariviljelmien vasteita samalle hoidolle.

Toiminnallisesti HMC3-linja erottautui muista kloonista tuottamalla enemmän interleukiini-6:ta (IL-6) perusolosuhteissa. Tästä huolimatta suora vertailu primaaristen mikroglia-solujen 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 (TNF α) spontaanisti tai pro-inflammatorisen stimulaation jälkeen, mikä korostaa ihmisen alkion mikroglia-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 Mikroglia-solu

HMC3-solut | 300102

Growth properties	Tarttuva
--------------------------	----------

Säätelytiedot

Citation	HMC3 (Cytionin luettelonumero 300102)
-----------------	---------------------------------------

Biosafety level	1
------------------------	---

NCBI_TaxID	9606
-------------------	------

CellosaurusAccession	CVCL_I176
-----------------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: Tämä ihmisen sikiöaivojen mikrogliaisolulinja (HMC3) sisältää SV40 T-antigeenikonstruktiota, joka on tuotu transfektiolla ja tukee kuolemattomuutta. Insertti on stabiilisti läsnä mikrogliaista peräisin olevissa soluissa. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.
-------------------	---

Biomolekyyli tiedot

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 NaHCO ₃ (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 tuoreessa väliaineessa 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 syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, 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 antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä 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 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Optimaalisen kiinnittymisen ja elinkelpoisuuden saavuttamiseksi sulatuksen jälkeen suosittelemme **kollageenipinnoitettujen pullojen tai levyjen** käyttöä.

HMC3-solut | 300102

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 tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

Sterility

Mykoplasmaakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.