

HMC3 ląstelės | 300102

Bendra informacija

Description

1995 m. profesoriaus Tardieu komanda sukūrė žmogaus mikroglijos kloną 3 (HMC3) ląstelių liniją, nuo SV40 priklausomai imortalizuodama mikroglijos ląsteles iš žmogaus nugaros smegenų ir žievės audinių, gautų iš 8-12 savaičių amžiaus embrionų. Šios pirminės lėtai besidalijančios ir sudėtingos morfologijos ląstelės prieš imortalizaciją iš pradžių buvo auginamos 10-15 dienų. HMC3 ląstelės išlaikė keletą pagrindinių pirminių mikroglijų požymių, pavyzdžiui, įvairias mieloidinių žymenų, tokių kaip CD68, CD11b ir CD14, raiškas, nors raiškos lygis labai skyrėsi priklausomai nuo pasirinkto pirminio antikūno, ypač CD68.

Po imortalizacijos HMC3 ląstelės pasižymėjo didesniu proliferacijos greičiu, o jų padvigubėjimo trukmė buvo 24-48 valandos, kartu išsaugant daugelį fenotipinių ir morfologinių pirminių ląstelių savybių. Visų pirma, palyginti su pirminėmis ląstelėmis, jose buvo daugiau CD68 EBM/11 teigiamų ląstelių ir sumažėjo fagocitinis aktyvumas. Antigeninės raiškos stabilumas buvo patvirtintas per 35 ciklus, kai ląstelės išliko teigiamos NSE, CD68 ir CD11b, bet neigiamos CD14, MHCII ir CD4, esant pradinėms sąlygoms. Tačiau veikiant interferonu- γ (IFN γ) padidėjo MHCII raiška, o tai labiau atitiko pirminių kultūrų atsaką į tą patį gydymą.

Funkciniu požiūriu HMC3 linija išsiskyrė tuo, kad bazinėmis sąlygomis gamino didesnę interleukino-6 (IL-6) kiekį, palyginti su kitais klonais. Nepaisant to, tiesioginis palyginimas su pirminių mikroglijos ląstelių citokinų gamyba išlieka sudėtingas dėl metodologinių skirtumų. Šių imortalizuotų linijų atsakas į lipopolisacharido (LPS) stimuliaciją, palyginti su pirminėmis kultūromis, pasirodė sumažėjęs. Atsižvelgiant į pirminių mikroglijų savybes, HMC3 ir kitos klonuotos linijos negamino naviko nekrozės faktoriaus alfa (TNF α) nei spontaniškai, nei po prouždegiminės stimuliacijos, o tai rodo specifinį žmogaus embrioninių mikroglijų bruožą.

Organism Žmogus

Tissue Vaisiaus smegenys

Applications 3D ląstelių kultūra, Neuromokslai, Neuroinflammation

Synonyms Žmogaus mikroglijos klonas 3, CHME-3, CHME3

Charakteristikos

Age Vaisius

Gender Nenustatyta

Morphology Makrofagai

Cell type Mikroglijos ląstelė

Growth properties Prigludęs

HMC3 ląstelės | 300102

Reguliavimo duomenys

Citation	HMC3 (Cytion katalogo numeris 300102)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_I176
GMO Status	GMO-S1: šioje žmogaus vaisiaus smegenų mikroglijos ląstelių linijoje (HMC3) yra SV40 T-antigeno konstruktas, įvestas transfekcijos būdu ir palaikantis imortalizaciją. Įterptas elementas yra stabiliai esantis mikroglijos išvestose ląstelėse. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Viruses	SV40 genetinė medžiaga stabiliai integruojama į ląstelės genomą. Aktyviai negaminamos ir neišskiriamos visos viruso dalelės, o tai sumažina galimas biologinio saugumo problemas.
----------------	---

Tvarkymas

Culture Medium	DMEM:Ham's F12 (1:1), w: 3,1 g/l gliukozės, w: 2,5 mM L-glutamino, w: 15 mM HEPES, w: 0,5 mM natrio piruvato, w: 1,2 g/l NaHCO ₃ (Cytion gaminio numeris 820400a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 ir 48 valandos
Subculturing	Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkeltkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.
Freeze medium	Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

HMC3 ląstelės | 300102

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

HMC3 ląstelės | 300102

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.