

Bunky HMC3 | 300102**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia Human Microglial Clone 3 (HMC3) bola vyvinutá v roku 1995 tímom profesora Tardieua prostredníctvom imortalizácie mikrogliových buniek z ľudských miechových a kortikálnych tkanív, získaných z embryí vo veku 8 až 12 týždňov, v závislosti od SV40. Tieto primárne bunky, ktoré sa vyznačujú pomalým delením a komplexnou morfológiou, boli pred imortalizáciou spočiatku kultivované 10 - 15 dní. Bunky HMC3 si zachovali niekoľko kľúčových znakov primárnej mikroglie, ako napríklad rôznorodú expresiu myeloidných markerov, napríklad CD68, CD11b a CD14, hoci úroveň expresie sa výrazne líšili v závislosti od výberu primárnej protilátky, najmä v prípade CD68.

Po imortalizácii vykazovali bunky HMC3 zvýšenú mieru proliferácie s časom zdvojnásobenia medzi 24 a 48 hodinami, pričom si zachovali mnohé fenotypové a morfológické charakteristiky svojich primárnych náprotivkov. V porovnaní s primárnymi bunkami bol zaznamenaný vyšší podiel CD68 EBM/11 pozitívnych buniek a zníženie fagocytárnej aktivity. Stabilita antigénnej expresie sa potvrdila počas 35 pasáží, pričom bunky zostali pozitívne pre NSE, CD68 a CD11b, ale negatívne pre CD14, MHCII a CD4 za základných podmienok. Vystavenie interferónu- γ (IFN γ) však zvýšilo expresiu MHCII, čo sa viac zhoduje s odpoveďami primárnej kultúry na rovnakú liečbu.

Z funkčného hľadiska sa línia HMC3 vyznačovala vyššou produkciou interleukínu-6 (IL-6) za základných podmienok v porovnaní s ostatnými klonmi. Napriek tomu je priame porovnanie s produkciou cytokínov primárnymi mikrogliovými bunkami naďalej náročné vzhľadom na metodologické rozdiely. Odpoveď na stimuláciu lipopolysacharidom (LPS) v týchto imortalizovaných líniiach sa ukázala ako znížená v porovnaní s primárnymi kultúrami. V súlade s charakteristikami primárnych mikroglií HMC3 a ďalšie klonované línie neprodukovali tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF α), a to ani spontánne, ani po prozápalovej stimulácii, čo poukazuje na špecifickú vlastnosť ľudských embryonálnych mikroglií.

Organism Ľudské**Tissue** Mozog plodu**Applications** 3D bunkové kultúry, Neuroveda, Neuroinflamácia**Synonyms** Ľudský klon mikroglie 3, CHME-3, CHME3**Charakteristika****Age** Plod**Gender** Nešpecifikované**Morphology** Makrofágy**Cell type** Mikrogliová bunka

Bunky HMC3 | 300102**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** HMC3 (katalógové číslo Cytion 300102)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_I176**GMO Status** GMO-S1: Táto línia ľudských fetálnych mozgových mikroglií (HMC3) obsahuje konštrukt SV40 T-Antigen zavedený transfekciou, ktorý podporuje imortalizáciu. Vložka je stabilne prítomná v bunkách odvodených od mikrogliie. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Viruses** Genetický materiál SV40 je stabilne integrovaný do genómu bunky. Nedochádza k aktívnej produkcii alebo uvoľňovaniu kompletných vírusových častíc, čo zmierňuje potenciálne obavy z biologickej bezpečnosti.**Spracovanie****Culture Medium** DMEM:Ham's F12 (1:1), w: 3,1 g/l glukózy, w: 2,5 mM L-glutamínu, w: 15 mM HEPES, w: 0,5 mM pyruvátu sodného, w: 1,2 g/l NaHCO₃ (číslo výrobku Cytion 820400a)**Supplements** Doplníte médium o 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** 24 a 48 hodín**Subculturing** Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredíte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.

Bunky HMC3 | 300102

Freeze medium

Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Thawing and Culturing Cells

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri $300 \times g$ počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Na dosiahnutie optimálneho uchytenia a životaschopnosti po rozmrazení odporúčame používať **banky alebo platne s kolagénom**.

Bunky HMC3 | 300102

Freezing Procedure

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Shipping Conditions

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.