

Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче»

Составлено: М.М. Гридина к.б.н., н.с., А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол получения нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью спонтанной дифференцировки в эмбрионидных тельцах

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, культивируемых без фидера, для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека: индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток. Получение, свойства и культивирование этих клеток описаны ранее в публикациях [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ПСК американской норки для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепедагогического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

В ходе работы мы руководствовались правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434–2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе

обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

## Оборудование и материалы

### *Перечень необходимого оборудования и расходных материалов*

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Ламинарный шкаф II класса защиты.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100–0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO<sub>2</sub>-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С).
- Термостат на 37 °С.
- Холодильники на –80 °С, –20 °С и +4 °С.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан.

- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- Среда mTeSR1 (Stemcell Technology, 85850).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- TrypLE Reagent (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Matrigel hESC-Qualified Matrix (Corning™, 354277).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Планшет 6-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 720.113).
- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).

#### *Подготовка материалов*

- Среда mTeSR1: приготовить согласно инструкции производителя, дополнительно добавить ×1 пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Matrigel: разморозить фасовку Matrigel на ледяной бане, развести в DMEM/F12, согласно фактору разведения, указанному в приложенном производителем протоколе. Покрывать пластиковые чашки Петри или планшеты и оставить при комнатной температуре не менее чем на 1 ч. Убрать Matrigel и добавить среду для культивирования клеток.
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR и 10 % ДМСО. Вместо KSR можно использовать FBS. Среду для заморозки можно однократно замораживать на –20 °С, при +4 °С хранить не более двух недель.
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.

Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека, культивируемых без фидера,  
к выдаче

Разморозка ПСК человека

- 1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды mTeSR1.
- 2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ПСК и поместить на водяную баню на 37 °С. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.
- 3) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант, ресуспендировать в среде mTeSR1 с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ.
- 4) Рассадить на 6-луночный планшет, предварительно покрытый Matrigel. Рабочий объем 2 мл среды на лунку 6-луночного планшета. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например, при заморозке ПСК с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (9,5 см<sup>2</sup>) заморозку также проводить на одну ячейку.
- 5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Размножение ПСК человека

- 6) Ежедневно менять среду на mTeSR1.
- 7) При достижении плотности более 70–90 % проводить пересадку ПСК. Минимум за 2 ч до планируемой пересадки в среду к ПСК добавить ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ.
- 8) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить TrypLE, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 °С. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.
- 9) После появления четких границ у клеток по краю островков, добавить 5–10 объемов среды mTeSR1, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин. Осадок ресуспендировать в среде mTeSR1 с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ и рассадить в соотношении 1:4–1:10 на 6-луночный планшет, предварительно покрытый Matrigel.
- 10) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ПСК: после снятия клеток и центрифугирования осадок с лунки 6-луночного планшета ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 °С. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126(4). 663–676.

2 Beers J., Gulbranson D.R., George N., Siniscalchi L.I., Jones J., Thomson J.A., Chen G. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions // Nat Protoc. 2012. 7(11). 2029–2040.