

## Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче»

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

Содержание и назначение: определяет протокол подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека 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 и свойства этих клеток описаны ранее [1].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека 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 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.

- Среда DMEM с 4,5 г/мл глюкозы и GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32430–100).
- FBS (Thermo Fisher Scientific, 10270106).
- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828–028).
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038).

- NEAA (non-essential amino acid, не незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200–056).
- Трипсин-ЭДТА 0,5 % (X10) (Thermo Fisher Scientific, 15400054).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404–100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482–0.1).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- 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).
- Обработанные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Подготовка материалов).
- bFGF (Thermo Fisher Scientific, PHG0026).

#### *Подготовка материалов*

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК человека (среда для ИПСК): среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 10 нг/мл bFGF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавировать. Рабочий раствор – 0,1 % в НФБ. Покрывать пластиковые чашки Петри или планшеты 0,1 % желатином и

поместить на 37 °С не менее чем на 30 мин. Убрать желатин 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.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.
- Приготовление фидерных клеток: развести митомицин С в воде до 200 мкг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 10 мкг/мл, мы используем 5 мкг/мл. Обработать эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 из эмбрионов стадии 13,5 дней (получены из ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН) на 2–3 пассаже митомицином С в течение 2–3 ч. Трижды промыть клетки НФБ, снять трипсином-ЭДТА, инактивировать трипсин средой с FBS (не менее чем одним объемом), подсчитать количество клеток, центрифугировать, заморозить аликвоты в среде для заморозки (от 1 до 5 млн кл./мл). За день до использования фидерных клеток разморозить в среде для ЭФМ, рассадить на желатинизированные чашки Петри в концентрации 15 тыс кл./см<sup>2</sup>.

#### Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче

##### Разморозка фидерных клеток

1) Желатинизировать необходимое число культуральных планшетов (см. разделе Подготовка материалов).

2) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

3) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 °С. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

4) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты со средой для ЭФМ (1 мл на лунку 12-луночного планшета или 2 мл на лунку 6-луночного) с плотностью 15 тыс кл./см<sup>2</sup>.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

##### Разморозка ПСК человека

6) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

7) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ПСК.

8) 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.

9) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты с фидерными клетками.

Размножение ПСК человека

10) Менять среду на среду для ПСК каждый день.

11) Колонии клеток пересаживать при достижении «многослойности», когда сверху колоний появляются черные мертвые клетки. Поменять среду, нарезать шприцом с иглой на кусочки 0,3 x 0,3 мм.

12) Ресуспендировать и рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

13) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ПСК: после снятия клеток и центрифугирования осадок с лунки 12- или 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 к выдаче» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131(5). 861–872.