

Стандартная операционная процедура «Получение гибридных клеток мыши»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения гибридных клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Репрограммирование генома соматической клетки к плюрипотентному состоянию может быть достигнуто несколькими способами. Среди них – отмеченные Нобелевской премией по физиологии и медицине за 2012 год – перенос ядра дифференцированной клетки в энуклеированный ооцит («клонирование») и индукция плюрипотентности с помощью сверхэкспрессии репрограммирующих транскрипционных факторов, Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Существует еще один альтернативный подход к возвращению клетке плюрипотентности, основанный на слиянии эмбриональных стволовых клеток с соматическими. Полученные клетки называются гибридными и обладают свойствами плюрипотентных клеток: они способны к дифференцировке в производные трех зародышевых листков, а также дают вклад в образование химерных животных, что является одним из наиболее строгих тестов на плюрипотентность.

Кроме плюрипотентных клеток при гибридизации также образуются клетки с фенотипом и свойствами дифференцированного партнера по слиянию.

Модель гибридных клеток представляет большой интерес для фундаментальной науки, позволяя изучать не только молекулярные основы индукции и поддержания плюрипотентности, но и то, как два разных генома воздействуют друг на друга [1].

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол получения гибридных клеток между эмбриональными стволовыми (ЭС) клетками и эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ).

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение гибридных клеток мыши» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения нейронов из плюрипотентных клеток человека для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации получения гибридных клеток мыши.

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.: Стандартиформ. 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.
- Камера Горяева.
- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100-0001).
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ 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).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- FBS (fetal bovine serum, сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- 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, незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific, 21985023).
- LIF (PolyGene, PG-A1140-0100).
- Трипсин-ЭДТА 0,5 % (X10) (Thermo Fisher Scientific, 15400054).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Полиэтиленгликоль 1500 (ПЭГ-1500, Roche, 10783641001).
- Добавка к среде NAT (Sigma-Aldrich, H0262-10VL)
- Пуромицин (Thermo Fisher A1113803).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Планшет 24-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- 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.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- ЭС клетки мыши с делецией в гене *Hprt* и устойчивостью к пуромину.
- ЭФМ.

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ЭС клеток мыши (среда для ЭС клеток): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, LIF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавируют.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавируют. 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.

Получение гибридных клеток

День –6. Разморозка ЭС клеток мыши; Разморозка ЭФМ

Разморозка ЭС клеток мыши

- 1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭС клеток.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом пробирку с ЭС клетками 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 осадок в среде для ЭС клеток и рассадить на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином. 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 ЭС клеток с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (9,5 см²) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в СО₂-инкубатор.

Разморозка ЭФМ

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

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

7) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант, ресуспендировать осадок в среде для ЭФМ и рассадить на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином. 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 ЭФМ с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (9,5 см²) разморозку также проводить на одну ячейку.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в СО₂-инкубатор.

День –5 и –4. Смена среды ЭС клеткам

9) Каждый день смена среды на среду для ЭС клеток.

День –3. Пересадка ЭС клеток; Пересадка ЭФМ

Пересадка ЭС клеток

10) ЭС клетки должны иметь плотность 70–90 %.

11) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, 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.

12) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ЭФМ, до образования суспензии единичных клеток, центрифугировать при 300 g 3 мин.

Осадок ресуспендировать в среде для ЭС клеток и рассадить в соотношении 1:4–1:10 на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином.

13) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO₂-инкубатор.

Пересадка ЭФМ

14) ЭФМ должны иметь плотность 70–90 %.

15) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, 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.

16) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ЭФМ, до образования суспензии единичных клеток, центрифугировать центрифугировать при 300 g 3 мин. Осадок ресуспендировать в среде ЭФМ и рассадить в соотношении 1:4–1:10 на нужное число культуральных флаконов площадью 25 см².

День –2, –1. Смена среды ЭС клеткам

17) Смена среды на среду для ЭС клеток.

День 0. Слияние ЭС клеток и ЭФМ

18) ЭС клетки должны иметь плотность 60–80 %.

19) Пассировать ЭС клетки, ресуспендировать в среде для ЭФМ, подсчитать клетки.

20) Пассировать ЭФМ, ресуспендировать в среде для ЭФМ, подсчитать клетки.

21) Смешать одинаковое число ЭС клеток и ЭФМ, центрифугировать при 300 g 5 мин. Ресуспендировать осадок в 8 мл среды DMEM, центрифугировать при 300 g 10 мин. Остатки ЭС клеток и ЭФМ заморозить.

22) Ресуспендировать осадок в 8 мл НФБ, центрифугировать при 300 g 10 мин.

23) Супернатант слить, удалить последнюю каплю НФБ.

24) На осадок налить 300 мкл ПЭГ-1500, предварительно подогретого до 37 °С, оставить при комнатной температуре на 60 с.

25) Налить сверху 8 мл НФБ, не пипетировать, инкубировать 10 мин при 37 °С.

26) Центрифугировать при 300 g 10 мин.

27) Ресуспендировать осадок в 8 мл среды DMEM, центрифугировать при 300 g 10 мин.

28) Ресуспендировать осадок в 8 мл среды для ЭФМ, центрифугировать при 300 g 10 мин.

29) Ресуспендировать осадок в среде для ЭС клеток, рассадить в концентрации 50–100 тыс. кл./см² на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином.

30) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO₂-инкубатор.

31) Заморозка ЭС клеток и ЭФМ: после пассирования клеток и центрифугирования осадок 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 или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

День 1. Селекция гибридных клеток

32) Сменить среду на селективную: среда для ЭС клеток с добавлением 5 мкг/мл пурамицина и ×1 НАТ.

День 2–10. Смена среды гибридным клеткам

33) Смена среды на среду для ЭС клеток с добавлением 5 мкг/мл пурамицина и ×1 НАТ.

День 11–15. Снятие колоний гибридных клеток

34) К 11–15 дню на лунке должны быть десятки с морфологией, соответствующей ЭС клеткам и фибробластам.

35) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА (около 20 мкл).

36) Сковырнуть выбранные колонии индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА и инкубировать 10 мин при 37 °С.

37) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ЭС клеток с добавлением ×1 НАТ и перенести в индивидуальные лунки 24-луночного планшета, предварительно покрытые желатином. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа гибридных клеток с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение гибридных клеток

38) Менять среду на среду для ЭС клеток ежедневно.

39) При достижении плотности 70–90 % проводить пересадку гибридных клеток. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 °С.

40) Добавить один объем среды для ЭФМ, ресуспендировать, центрифугировать при 300 г 3 мин, рассадить на предварительно покрытые желатином лунки в соотношении 1:2–1:8 в зависимости от плотности клеток.

41) После получения достаточного количества клеток заморозить гибридные клетки: после снятия клеток и центрифугирования осадок ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на -80°C . На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение гибридных клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Gridina M.M., Serov O.L. Bidirectional reprogramming of mouse embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells is initiated at the heterokaryon stage // Cell Tiss Res. 2010. 342. 377–389.