

Стандартная операционная процедура «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью спонтанной дифференцировки в эмбрионидных тельцах»

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

В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. В 2007 году с использованием тех же факторов были получены ИПСК человека. Это событие открыло новую эру в изучении механизмов развития заболеваний человека. Целый ряд заболеваний затрагивает только определенный тип клеток, недоступный для исследователя в силу морально-этических законов, или же проявляется только на определенном этапе развития, также недоступном для изучения. Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), эмбриональные стволовые и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, позволяют провести дифференцировку *in vitro*, получить необходимый исследователю тип клеток и создать модель заболевания или же проводить на этом типе клеток скрининг лекарственных препаратов. Поэтому особенно актуально развитие методов направленной дифференцировки, позволяющих получать однородные популяции целевых клеток с высоким выходом. Имеющиеся методы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека нейроны часто громоздки, медленны и слабо воспроизводимы. В настоящей СОП описан подробный протокол получения нейронов из ПСК человека с помощью эмбрионидных телец (ЭТ) на основе [1, 2]. Использование ЭТ позволяет имитировать нормальное развитие.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью спонтанной дифференцировки в эмбрионидных тельцах» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения нейронов из плюрипотентных клеток человека 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 протокола получения нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека через стадию эмбрионных телес.

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.
- 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. В разделе Ожидаемые результаты необходимые материалы приведены в тексте.

- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда mTeSR1 (Stemcell technology, 85850).
- Среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, In-21103049).
- 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).
- Гепарин (Sigma, H4784-1G).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- TrypLE Reagents (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Раствор Версена (Thermo Fisher Scientific, 15040033).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Corning Matrigel hESC-Qualified Matrix, (Corning™, 354277).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- N-2 Supplement (Thermo Fisher, 17502048).
- B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher, 17504044).
- bFGF (Invitrogen, PHG0026).
- EGF (Invitrogen, PHG0314).
- Аскорбиновая кислота (Sigma, A92902-100G).

- cAMP (Sigma, A6885-100MG).
- BDNF (PeproTech, 450-02).
- GDNF (PeproTech, 450-10).
- IGF-1 (PeproTech, 100-11).
- Ламинин (Sigma, L2020).
- Поли-L-орнитин гидробромид (PLO, Sigma-Aldrich, P3655–100M).
- 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).
- Чашка Петри диаметром 100 мм, для работы с адгезивными культурами клеток (Corning, 4301).
- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Стеклянные капилляры (BLAUBRAND, Ald-BR7087 44).
- 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).
- Линии ПСК человека.

Подготовка материалов

- Среда mTeSR1: приготовить согласно инструкции производителя, дополнительно добавить ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для ЭТ: среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол.
- Среда H2: DMEM/F12, ×1 N-2 Supplement, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 2 мкг/мл гепарин.
- Среда H2/B27: DMEM/F12, ×1 N-2 Supplement, ×1 B-27 Supplement, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 2 мкг/мл гепарин.
- Среда для дифференцировки нейронов: Neurobasal, ×1 N-2 Supplement, ×1 B-27 Supplement, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 200 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мМ cAMP, 10 нг/мл BDNF, 10 нг/мл GDNF, 10 нг/мл IGF-1.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.

- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (ROCK-ингибитор) развести стерильной водой до концентрации 10 мМ, аликвотировать и хранить на -20°C , при $+4^{\circ}\text{C}$ хранить не более недели.
- Matrigel: разморозить фасовку Matrigel на ледяной бане, развести в DMEM/F12, согласно приложенному протоколу. 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.
- Агароза: приготовить 1 % водный раствор и прокипятить. Покрывать пластиковые чашки Петри или планшеты горячей агарозой, спустя 30 с убрать агарозу и оставить при комнатной температуре не менее чем на 30 мин.
- Поли-L-орнитин: приготовить стоковый раствор в стерильной воде 20 мг/мл. Разаликвотить, хранить при -20°C .
- Ламинин: приготовить стоковый раствор в стерильной воде 5 мг/мл. Аликвотить, хранить при -20°C .
- Поли-L-орнитин/Ламинин (PLO/L): 6 мкл стокового раствора поли-L-орнитина развести в 6 мл стерильной воды, покрыть пластиковый планшет и оставить при 37°C на ночь. 6 мкл стокового раствора ламинина развести в 6 мл стерильной воды, покрыть пластиковый планшет и оставить при 37°C на ночь.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор $\times 500$).
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR и 10 % ДМСО. Вместо KSR можно использовать FBS. Среду для заморозки можно однократно замораживать на -20°C ,
при $+4^{\circ}\text{C}$ хранить не более двух недель.

Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека при помощи
спонтанной дифференцировки в эмбрионидных тельцах

День –6. Разморозка ПСК

- 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°C . 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 см²) разморозку также проводить на одну ячейку.

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

День -5, -4. Смена среды ПСК

6) Каждый день смена среды на mTeSR1.

День -3. Пересадка ПСК

Пересадка ПСК

7) ПСК должны иметь плотность 60–70 %. 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, ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для mTeSR1, до образования суспензии единичных клеток, центрифугировать 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.

День -2, -1. Смена среды ПСК клеткам

10) Ежедневно смена среды на mTeSR1.

День 0. Создание висячих капель

11) ПСК должны иметь плотность 60–80 %. Минимум за 2 ч до начала работы с ПСК добавитк ним ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ.

12) Снять ПСК, подсчитать, ресуспендировать в концентрации 100–400 тыс кл./мл в среде mTeSR1 с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ. В чашку Петри диаметром 100 мм налить 12 мл НФБ. Суспензию ПСК раскапать по 20 мкл на внутреннюю сторону крышки чашки Петри. Закрыть крышкой чашку и осторожно перенести в CO₂-инкубатор. Остатки ПСК заморозить.

13) Заморозка ПСК: 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 °С. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

День 2. Перенос сформированных ЭТ

14) Ко второму дню в каплях должны быть плотные шаровидные агрегаты. Перенести сформированные ЭТ в чашки Петри, предварительно покрытые 1 % агарозой в среду для ЭТ, перенести в CO₂-инкубатор.

День 4. Смена среды ЭТ

15) Сменить среду на среду для ЭТ.

День 5. Смена среды ЭТ

16) Сменить среду на среду H2.

День 7. Перенос ЭТ

17) Перенести ЭТ в среду H2 на лунки 6-луночного планшета, предварительно покрытого Matrigel. Переносить по 15–20 ЭТ на лунку.

День 9–16. Смена среды ЭТ

18) ЭТ должны прикрепиться ко дну лунок и начать расплываться. Среду следует менять через день на среду H2.

День 17. Перенос нейральных розеток

19) К 17 дню должны сформироваться четко видимые нейральные розетки. Стеклянным капилляром перенести несколько нейральных розеток на лунки 12-луночного планшета в среду H2, предварительно покрытого PLO/L.

День 18, 20 Смена среды нейральным розеткам

20) Сменить среду на среду H2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF.

День 21. Пересадка НКП

21) НКП должны иметь плотность 60–70 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить раствор Версена, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

22) После округления клеток, убрать раствор Версена ресуспендировать в среде H2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF, до образования суспензии клеток и рассадить в соотношении 1:4 на лунки, предварительно покрытые PLO/L. Остатки НКП заморозить.

23) Заморозка НКП: 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 °С. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

День 23. Смена среды НКП

24) Сменить среду на среду H2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF.

День 24. Смена среды НКП

25) НКП должны иметь плотность 40–50 %. Сменить среду на среду для дифференцировки нейронов.

День 25–55. Смена среды

26) Раз в два дня менять половину объема среды на среду для дифференцировки нейронов.

27) Ко дню 55 на чашке Петри должна быть плотная сеть нейронов.

При подготовке СОП «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека через стадию эмбрионидных телец» использованы следующие литературные источники:

1 Lin Y., Chen G. Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media // StemBook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. 2008–2014.

2 Muratore C.R., Srikanth P., Callahan D.G., Young-Pearse T.L. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols // PLoS One. 2014. 9(8):e105807.