

Стандартная операционная процедура «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью сверхэкспрессии *Ngn2*»

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 сверхэкспрессии *Ngn2*

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

В 2006 году Синъя Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и с-Мус. 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) 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 актуально развитие методов направленной дифференцировки, позволяющих получать однородные популяции целевых клеток с высоким выходом. Имеющиеся методы дифференцировки ПСК человека в нейроны часто громоздки, медленны и слабо воспроизводимы. В настоящей СОП описан подробный протокол получения нейронов из ПСК человека с почти 100 % выходом и чистотой за три недели сверхэкспрессией одного транскрипционного фактора [1].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью сверхэкспрессии *Ngn2*» 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) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола получения нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью сверхэкспрессии *Ngn2*.

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

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.
- CO<sub>2</sub>-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4°C.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.

- Водяная баня.
- Проточный цитофлуориметр.
- 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/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда mTeSR1 (Stemcell technology, 85850).
- Среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, In-21103049).
- 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).
- 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific, 21985023).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- TrypLE Reagents (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Matrigel hESC-Qualified Matrix (Corning™, 354277).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- N-2 Supplement (Thermo Fisher, 17502048).
- B-27™ Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher, 17504044).
- Доксициклин (Sigma, D9891).
- Пурамицин (Thermo Fisher A1113803).
- BDNF (PeproTech, 450-02).
- Ламинин (Sigma, L2020).

- NT-3 (PeproTech, 450-01).
- 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 60 мм, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 702.115).
- 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 = 30мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30мм, диаметр пор 0,45 микрометра (Jet Biofil, FPV403030).
- Шприц пластиковый стерильный, 10 мл.
- Шприц пластиковый стерильный, 1 мл, с иглой 26GX5/8.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- Гипохлорит натрия («Белизна», «Domestos гель»).
- Пакеты для отходов автоклавируемые, класс «Б».
- Обработанные митомицином С клетки глии, полученные из новорожденных мышей CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Подготовка материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Линии ПСК человека.
- Lentivirusные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), FUW-TetO-Ng2-P2A-EGFP-T2A-puromycin, M2RtTA и FUW-TRE EGFP.

#### *Подготовка материалов*

- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 °C FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

- Среда mTeSR1: приготовить согласно инструкции производителя, дополнительно добавить ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для наработки вирусов: среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол.
- Среда D0: DMEM/F12, ×1 N-2 Supplement, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 10 нг/мл BDNF, 10 нг/мл NT-3.
- Среда B-27: Neurobasal, ×1 B-27 Supplement, ×1 GlutaMAX, ×1 пенициллин-стрептомицин, 10 нг/мл BDNF, 0,2 мкг/мл ламинин.
- 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 °С, при +4 °С хранить не более недели.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавировать. Рабочий раствор – 0,1 % в НФБ. Покрыть 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.
- Matrigel: разморозить фасовку Matrigel на ледяной бане, развести в DMEM/F12, согласно приложенному протоколу. Покрыть пластиковые чашки Петри или планшеты и оставить при комнатной температуре не менее чем на 1 ч. Убрать Matrigel и добавить среду для культивирования клеток.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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.
- Гипохлорит натрия (дезинфицирующий раствор): приготовить 20 % раствор «Белизны» или «Domestos гель», хранить не более недели.
- Приготовление фидерных клеток: развести митомицин С в воде до 200 мкг/мл, рекомендуемая рабочая концентрация 10 мкг/мл, мы используем 5 мкг/мл. Обработать клетки глины, полученные из новорожденных мышей CD-1 (получены из ЦКП «SPF-виварий» ФИЦ ИЦиГ СО РАН) на 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).

## Получение нейронов из плюрипотентных клеток человека при помощи сверхэкспрессии

### *Ngn2*

День –6. Разморозка ПСК; Разморозка клеток Phoenix

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 °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.

Разморозка клеток Phoenix

6) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для Phoenix.

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

8) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку (или чашку Петри с 10 мл среды). Площадь рассадки может соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, или быть больше.

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

День –5, –4. Смена среды ПСК

10) Каждый день смена среды ПСК на mTeSR1.

День –3. Пересадка ПСК; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ПСК

11) 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.

12) 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.

13) После появления четких границ у клеток по краю островков, ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для mTeSR1, до образования суспензии единичных клеток, 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.

#### Пересадка клеток Phoenix

14) Убрать культуральную среду, аккуратно промыть НФБ не допуская открепления клеток, 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.

15) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для клеток Phoenix до образования суспензии единичных клеток и рассадить по 0,7–1,3 млн кл./10 см<sup>2</sup> на 3 лунки желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на следующий день их плотность была 70–90 %.

День -2. Смена среды ПСК; Трансфекция клеток Phoenix

Смена среды ПСК

16) Смена среды ПСК на mTeSR1.

Трансфекция клеток Phoenix

17) Добавить в 1,5 мл пробирку 375 мкл Opti-MEM I и 16,8 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

18) Добавить в три 1,5 мл пробирок по 125 мкл Opti-MEM I, смесь упаковочных плазмид pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и pCMV-VSV-G и, в индивидуальные пробирки, векторы: FUW-TetO-Ng2-P2A-EGFP-T2A-puromycin, M2RtTA и FUW-TRE EGFP (всего 2,5 мкг ДНК), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать. Добавить по 5 мкл реагента P3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге. Соотношение количества ДНК плазмид следующее: pRSV-Rev:pMDLg/pRRE:pCMV-VSV-G:Vector = 5:10:2:10. На лунку 6-луночного планшета необходимо 2,5 мкг ДНК и 5 мкл P3000.

19) Добавить смесь ДНК и P3000 к раствору Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд, подождать 10–15 мин.

20) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на Opti-MEM I (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

21) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

День –1. Пересадка ПСК; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ПСК

22) Минимум за 2 ч до планируемой пересадки в среду к ПСК добавить ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ.

23) Рассадить ПСК на одну чашку Петри (диаметром 6 см) в концентрации 28–47 тыс кл./см<sup>2</sup> и две лунки 24-луночного планшета предварительно покрытые Matrigel. Остатки заморозить. Одна лунка будет использоваться для определения MOI (multiplicity of infection, «число вирусов на клетку») по свечению GFP, вторая лунка – как отрицательный контроль свечения GFP и, при желании, как отрицательный безвирусный контроль, чашка Петри – для получения нейронов.

24) 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.

Смена среды клеткам Phoenix

25) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для наработки вирусов. Не допускать пересушивания и отслоения клеток. Для дезинфекции вирусов необходимо среды и пластик, контактировавшие с вирусами, помещать в 1 % раствор гипохлорита натрия (20 % разведение «Белизны» или «Доместос» в воде, готовить свежий раствор каждую неделю). После дезинфекции необходимо проводить автоклавирование. Автоклавирование всех выбрасываемых материалов проводится до дня 7 культивирования.

День 0. Трансдукция ПСК; смена среды клеткам Phoenix

26) Собрать среду с лентивирусами, несущими *Ngn2* и *TA*, в пробирку 50 мл, среду с *GFP* – в пробирку 5 мл.

27) Профильтровать среду с лентивирусным вектором GFP через фильтр 0,45 мкм в 5 мл пробирку, отобрать в новую пробирку 0,2 мл, добавить 1,8 мл среды для наработки вирусов, ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

28) Профильтровать среду с лентивирусными векторами через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить 1 мл отфильтрованной среды с лентивирусным вектором GFP, равный объем среды для наработки вирусов, ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

29) В чашке Петри с ПСК для получения нейронов поменять среду на смесь с лентивирусами и полибренном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для наработки вирусов.

День 1. Смена среды

30) Отмыть клетки НФБ.

31) Поменять среду на D0, с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ и доксициклина до рабочей концентрации 2 мкг/мл.

День 2. Смена среды; определение MOI

Смена среды

32) Поменять среду на D0 с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ, доксициклина до рабочей концентрации 2 мкг/мл и пуромидина до рабочей концентрации 1 мкг/мл.

Определение MOI

33) Интеграция вектора, содержащего GFP, позволяет провести грубую оценку эффективности трансдукции остальными вирусами. Для определения MOI необходимо провести проточную цитофлуориметрию на присутствие белка GFP. Клетки с контрольной и обработанной вирусом с GFP лунок снять трипсином-ЭДТА, центрифугировать, промыть НФБ, центрифугировать, фиксировать в 1 % параформальдегиде 5 мин, центрифугировать, ресуспендировать в НФБ и определить процент клеток, имеющих GFP, на проточном цитофлуориметре.

34) Подсчет MOI:  $MOI = -\ln(1 - [\text{доля GFP+ клеток}])$ . Например, если 63,2 % клеток имели флуоресценцию GFP,  $MOI = -\ln(1 - 0,632) = 1$ , то есть в среднем один вирус на клетку или, точнее, соотношение числа вирусов к числу клеток – единица. Так как использовалось 10 % разведение вируса, реальный MOI = 10. Сделаем качественную оценку MOI, предположим, что MOI для вирусов OKSM не отличается от такового для GFP, тогда MOI в опыте также равен 10. Разбавление среды вдвое соответственно уменьшило MOI, а вторая трансдукция – увеличила в два раза, итого, по грубой оценке, в клетках должно быть около 10 вирусных частиц. Для получения нейронов MOI должен быть более 4. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен.

День 3. Смена среды; разморозка фидерных клеток

Смена среды

35) Отмыть клетки НФБ.

36) Поменять среду на среду B-27, с добавлением доксициклина до рабочей концентрации 2 мкг/мл.

Разморозка фидерных клеток

37) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для Phoenix.

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

39) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и ресуспендировать в среде В-27 с добавлением доксициклина до рабочей концентрации 2 мкг/мл. Рассадить на чашку Петри с трансдуцированным вирусом ПСК в концентрации 15–25 тыс кл./см<sup>2</sup>.

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

Дни 5-15. Смена среды

41) Каждый второй день смена среды на среду для В-27 с доксициклином.

Дни 16-25. Смена среды

42) Каждый второй день смена среды на среду для В-27.

43) Ко дню 25 на чашке Петри должна быть плотная сеть нейронов.

При подготовке СОП «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью сверхэкспрессии *Nggn2*» использованы следующие литературные источники:

1 Zhang Y., Pak C., Han Y., Ahlenius H., Zhang Z., Chanda S., Marro S., Patzke C., Acuna C., Covy J., Xu W., Yang N., Danko T., Chen L., Wernig M., Südhof T.C. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells // *Neuron*. 2013. 78(5). 785-798.