

Стандартная операционная процедура «Получение эмбрионных телц из  
плюрипотентных стволовых клеток человека»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения эмбрионных телц из  
плюрипотентных стволовых клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Эмбрионные телца (ЭТ) представляют собой трехмерные агрегаты, образованные в суспензии плюрипотентными стволовыми клетками (ПСК). Дифференцировка через формирование ЭТ является общей платформой для анализа плюрипотентности ПСК и получения целевых дифференцированных клеток из ПСК. Однако большинство протоколов формирования ЭТ содержат компоненты с неизвестным составом, такие как фетальная бычья сыворотка. Компоненты животного происхождения значительно ограничивают применение ЭТ для создания потенциально клинически значимых клеточных продуктов. В то же время неохарактеризованный состав может привести к невозпроизводимости результатов. Таким образом, крайне важно и формирование ЭТ и дальнейшую их дифференцировку проводить в химически определенных условиях без животных компонентов. Это позволит обеспечить лучшую воспроизводимость методов дифференцировки, а также более простой путь для перевода в клинически значимую продукцию.

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол получения ЭТ из ПСК, основанный на ранее опубликованных протоколах [1, 2].

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

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации получения эмбрионных телц из плюрипотентных стволовых клеток человека.

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

- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- 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).
- Среда mTeSR1 (Stemcell technology, 85850).
- TrypLE Reagents (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Corning Matrigel hESC-Qualified Matrix, (Corning, 354277).
- Агароза.
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- Планшет 6-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 720.113).
- Чашка Петри диаметром 100 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.
- 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.
- 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.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Среда для ЭТ: среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол.
- Matrigel: разморозить фасовку Matrigel на ледяной бане, развести в DMEM/F12, согласно фактору разведения, указанному в приложенном протоколе. 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.
- Агароза: приготовить 1 % водный раствор и прокипятить. Покрыть пластиковые чашки Петри или планшеты горячей агарозой, спустя 30 с убрать агарозу и оставить при комнатной температуре не менее чем на 30 мин.
- 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.

#### Получение ЭТ из плюрипотентных стволовых клеток человека

##### День –6. 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 и рассадить на 6-луночный планшет в среде mTeSR1 с добавлением ROCK-ингибитора до рабочей концентрации 10 мкМ, 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>) разморозку также проводить на одну ячейку.

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

День –5 и –4. Смена среды ПСК клеткам

5) Ежедневно смена среды на mTeSR1.

День –3. Пересадка ПСК

6) 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.

7) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить TgupLE, 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.

8) После появления четких границ у клеток по краю островков, ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды 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.

День –2, –1. Смена среды ПСК клеткам

9) Ежедневно смена среды на mTeSR1.

День 0. Создание висячих капель

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

11) 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 раскapat по 20 мкл на внутреннюю сторону крышки чашки Петри. Закрывать крышкой чашку и осторожно перенести в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Остатки ПСК заморозить.

12) 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

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

День 3–16. Смена среды

14) Каждый второй день смена среды на среду для ЭТ.

День 16.

15) ЭТ готовы к дальнейшему анализу.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» 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 Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., Gnirke A., Eggan K., Meissner A. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines // Cell. 2011. 144(3). 439–452.