

Стандартная операционная процедура «Получение эмбриональных стволовых клеток мышы»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения эмбриональных
стволовых клеток мышы

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мышы широко используются для исследования раннего развития и получения трансгенных животных. Данный протокол описывает основные этапы получения ЭС клеток мышы. Получение и свойства этих клеток описаны ранее в публикациях [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение эмбриональных стволовых клеток мышы» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса выдачи ПСК мышы 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 эмбриональных стволовых клеток мышы.

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.
- 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).
- 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, 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 Приготовление материалов).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ЭС клеток мыши с 20 % KSR (среда «KSR»): среда DMEM, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.
- Среда для культивирования ЭС клеток мыши с 20 % FBS (среда «FBS»): среда DMEM, 20 % FBS для ЭС клеток, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавирировать.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавирировать. 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./см².

Получение эмбриональных стволовых клеток мыши

День –1. Разморозка фидерных клеток

- 1) Желатинизировать необходимое число культуральных планшетов (см. раздел Подготовка реагентов).
- 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 (0,5 мл на лунку 24-луночного планшета) с плотностью 15 тыс кл./см².
- 5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO₂-инкубатор.

День 0. Рассадка эмбрионов мыши

6) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить в лунки 24-луночного планшета 1 мл среды «КСR».

7) Рассадить 3,5-дневные бластоцисты мыши (например линий мышей 129, C57BL или BALB) без зоны пеллюцида на фидерные клетки.

День 6. Пересадка прикрепившихся бластоцист

8) Снять колонию клеток пластиковым носом, промыть НФБ, инкубировать 5–10 мин в 2,5 % трипсине, ресуспендировать в 1 мл среды «FBS» и перенести на фидерные клетки.

День 7. Пересадка прикрепившихся бластоцист

9) Сменить среду на «КСR».

День 8 и далее

10) Менять среду на «КСR» ежедневно. При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний проводить пересадку ЭС клеток. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть 0,05 % трипсином-ЭДТА, поместить на 3 мин на 37 °С.

11) Добавить один объем среды «FBS», ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

12) На следующий день и до следующей пересадки менять среду на «КСR».

13) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ЭС клеток: 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 «Получение эмбриональных стволовых клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Bryja V., Bonilla S., Cajánek L., Parish C.L., Schwartz C.M., Luo Y., Rao M.S., Arenas E. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. 24(4). 844–849.

2 Menzorov A., Pristyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O. Cytogenetic analysis and Dlk1-Dio3 locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages // *Cytotechnology*. 2016. 68(1). 61–71.