

## Стандартная операционная процедура «Трансфекция клеток млекопитающих»

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

Содержание и назначение: определяет протокол трансфекции клеток млекопитающих

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Внесение генетических изменений удобно проводить *in vitro* на культурах клеток. В этом случае можно осуществлять выбор клонов, в которых произошло желаемое изменение генома, и даже последовательно вносить несколько генетических модификаций. В зависимости от цели и удобства для отбора генетически модифицированных клонов можно использовать флуоресцентные белки (GFP и т.д.) и/или устойчивость к антибиотикам.

В настоящей СОП описан подробный протокол трансфекции клеток млекопитающих.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Трансфекция клеток млекопитающих» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса трансфекции клеток млекопитающих 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 процесса получения генетически модифицированных клеток.

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.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- Холодильники на –80 °С, –20 °С и +4 °С.
- Автоклав.
- 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.

- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- 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 (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.
- Генетические конструкции для модификации генома.

### Трансфекция клеток млекопитающих

#### День 1

Плотность клеток в день трансфекции должна быть 50–80 %. Далее указан расход реагентов для трансфекции культуры клеток на одной лунке 6-луночного планшета. Для 12-луночного планшета и чашек Петри диаметром 10 см необходимо произвести пересчет.

1) Добавить в 1,5 мл пробирку 125 мкл Opti-MEM I и 5,6 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

2) Добавить в 1,5 мл пробирку 125 мкл Opti-MEM I, 2,5 мкг ДНК, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать. Добавить 5 мкл реагента Р3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге.

3) Добавить смесь ДНК и Р3000 к раствору Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд, подождать 10–15 мин.

4) Аккуратно поменять культуральную среду на среду без добавления антибиотиков (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета).

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

#### День 2

6) Поменять среду. Дальнейшее культивирование в зависимости от задач может проводиться с добавлением антибиотиков.

При подготовке СОП «Трансфекция клеток млекопитающих» использованы следующие литературные источники:

1 Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20(6). С. 930–944.