

Стандартная операционная процедура
«Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток мыши»

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

Содержание и назначение: Протокол цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) мыши, эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, широко используются в медико-биологических исследованиях. Одно из ключевых свойств ПСК – способность сохранять стабильный кариотип *in vitro*. Однако при длительном культивировании многие линии ПСК накапливают большое число хромосомных нарушений (трисомий, делеций, дупликаций и т.д.), которые негативно влияют на плюрипотентность, например, снижают вклад этих клеток в гаметы при химеризации [1]. Согласно литературным данным, чтобы линия ПСК дала вклад в зародышевый путь, нужно как минимум 50 % клеток с нормальным кариотипом [2]. Поэтому для характеристики ПСК необходимо использовать методы классической цитогенетики, а именно подсчет хромосом и анализ метафазных пластинок на основе окрашивания DAPI.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток мыши. 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.: Стандартинформ. 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

- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 мл.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ и 37 °С).
- Термостат на 37 °С.
- Холодильники на –20 °С и +4 °С.
- Инвертированный микроскоп
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный охлаждаемой CCD-камерой.
- Система обработки изображений ISIS (MetaSystems).
- Вентилятор с подогревом.
- Персональный компьютер для систем Ikaros и Isis.

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.

- Этидиум бромид.
- Демеколцин (колцеид) (ROCHE 10295892001).
- KCL.
- NaCl.
- Na₃C₆H₅O₇.
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Ледяная уксусная кислота.
- Метанол.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Чашка Петри диаметром 60 мм.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Центрифужные пробирки с коническим дном, объемом 10 мл.
- Пробирки на 1,5 мл.
- Предметные стекла (76 × 26 мм).
- Покровные стекла (24 × 24 мм).
- Глицерин.
- DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane).
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).
- Высокие стеклянные стаканы на 50 мл – 10 штук.

Подготовка материалов

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Приготовить фиксатор метанол:уксусная кислота (3:1), держать на льду
- Приготовить гипотонический раствор: 0,25 % KCl и 0,2 % CH₃COONa в воде.
- Приготовить раствор 20 × SSC из 175,3 г NaCl и 88,2 г Na₃C₆H₅O₇ в 1 л воды. Довести рН до 7,0–7,1. Автоклавировать. Из 20 × SSC приготовить 2 × SSC, разведя водой в 10 раз.
- Приготовить антифейд (1 % DABCO в 90 % глицерине в НФБ).
- Приготовить стоковый раствор 0,2 % DAPI на 2 × SSC (хранить на 4 °С).
- Приготовить рабочий раствор DAPI на 2 × SSC. Растворить 25 мл стокового раствора в 50 мл 2 × SSC.

Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток мыши

День 1. Фиксация клеток

- 1) В культуральную среду добавить 1,25 мМ раствора этидиум бромид (5 мкл /мл среды).
- 2) Через 15 мин в культуральную среду стерильно добавить колцемид, в дозе 0,1 мкг/мл.
- 3) Спустя 3 ч клетки промыть НФБ и нанести 0,05 % раствор трипсина в НФБ, выдержать 5 мин.
- 4) В чашку с клетками добавить гипотонический раствор и поставить в термостат на 37 °С на 20 мин.

5) После этого в чашку добавить несколько (2-3) капель фиксатора (3:1 метанол – уксусная кислота).

6) Клетки смыть с чашки с помощью автоматической пипетки, перенести в 10 мл коническую пробирку.

7) Суспензию центрифугировать (1000 об/мин, 5 мин). Супернатант слить.

8) К осадку добавить, охлажденный во льду, свежеприготовленный фиксатор. Поставить в лед на 20 мин.

9) Клетки пипетировать и центрифугировать (1000 об/мин, 5 мин). Супернатант слить.

10) К осадку снова добавить фиксатор, пипетировать и поставить на лед еще на 10 мин.

11) Повторить п. 8.

12) К осадку добавить фиксатор, пипетировать и раскатать на охлажденные влажные стекла.

13) Стекла высушить под теплым воздухом из вентилятора. Положить в сухое, прохладное место примерно на сутки.

День 2. Окраска препаратов

14) Препараты поместить в стакан с раствором DAPI на 5 мин. Затем прополоскать последовательно в $2 \times$ SSC и воде.

15) Высушить.

16) Нанести раствор антифейда и закрыть покровным стеклом.

17) Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе.

День 3–4 Анализ метафазных пластинок

18) Сфотографировать 50–60 метафазных пластинок.

19) Произвести подсчет хромосом на 40–50 метафазных пластинках. 10–20 из которых использовать для кариотипического анализа.

При подготовке СОП «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 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.

2 Longo L., Bygrave A., Grosveld F.G., Pandolfi P.P. The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism // *Transgenic Res*. 1997. 6. 321–328.