Технологический паспорт ККК ИЦиГ СО РАН

Технологический паспорт ККК ИЦиГ СО РАН включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции ККК ИЦиГ СО РАН. Технологический паспорт размещен на интернет-сайте коллекции ККК ИЦиГ СО РАН (http://ckp.icgen.ru/cells/documents/). СОПы находятся в Приложениях Б–4, научно-техническое обоснование смет – после перечисления СОПов:

- Приложение Б Стандартная операционная процедура «Поддержание единиц хранения».
- Приложение В Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки».
- Приложение Г Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека».
- Приложение Д Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши».
- Приложение Е Стандартная операционная процедура «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью сверхэкспрессии Ngn2».
- Приложение Ж Стандартная операционная процедура «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека при помощи спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах».
- Приложение И Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче».
- Приложение К Стандартная операционная процедура «Получение эмбриональных стволовых клеток мыши».
- Приложение Л Стандартная операционная процедура «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека».
- Приложение М Стандартная операционная процедура «Трансфекция клеток млекопитающих».
- Приложение Н Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ церебральных органоидов человека».
- Приложение П Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ нейронов».
- Приложение Р Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных клеток человека к выдаче».

- Приложение С Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных клеток мыши к выдаче».
- Приложение Т Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных клеток американской норки к выдаче».
- Приложение У Стандартная операционная процедура «Получение эмбриоидных телец из плюрипотентных клеток человека».
- Приложение Ф Стандартная операционная процедура «Получение эмбриоидных телец из плюрипотентных клеток мыши».
- Приложение Х Стандартная операционная процедура «Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями».
- Приложение Ц Стандартная операционная процедура «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток человека».
- Приложение Ш Стандартная операционная процедура «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток мыши».
- Приложение Щ Стандартная операционная процедура «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки».
- Приложение Э Стандартная операционная процедура «Получение гибридных стволовых клеток мыши».
- Приложение Ю Стандартная операционная процедура «Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas».
- Приложение Я Стандартная операционная процедура «Тестирование клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР».
- Приложение 1 Стандартная операционная процедура «Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР».
- Приложение 2 Стандартная операционная процедура «STR-профилирование клеток человека».
- Приложение 3 Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ плюрипотентных стволовых клеток».
- Приложение 4 Стандартная операционная процедура «Элиминация микоплазмы из культур клеток».

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления ИЦиГ СО РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении

материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
2) Выполнение научно-исследовательских работ.
3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения 28 СОП, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования. Обобщенный пример расчета стоимости СОП приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Расчет стоимости СОП «Получение эмбриональных стволовых клеток мыши»

№, п/п	Статья расходов	Сумма, руб.
1	Оплата труда	3 436,08
2	Приобретение материалов	10 190,16
3	Иные затраты	–
4	Содержание оборудования	107,06
	Итого:	13 733,30

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» (ССЫЛКА НА ОТЧЕТ). Полный набор данных представлен на портале «Биоресурсные коллекции ФАНО России» (ССЫЛКА).

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составил руб., из которых руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Стандартная операционная процедура «Поддержание единиц хранения»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол поддержания единиц хранения

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Основными задачами «Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) являются идентификация, сохранение и распространение идентифицированных и охарактеризованных клеточных линий, свободных от контаминации, а также пополнение Коллекции новыми линиями, необходимо, чтобы Коллекция отвечала следующим требованиям [1]:

1 Линии клеток человека и животных в Коллекции должны быть идентифицированы, охарактеризованы с помощью современных методов, должна быть показана их микробиологическая чистота. Процедуры идентификации и проверки микробиологической чистоты должны быть валидированы и проводиться периодически. Указанные процедуры описаны в Проекте унифицированного протокола для идентификации и характеристики клеточных линий человека и животных.

2 В Коллекции должна иметься система документирования (для каждой линии клеток человека и животных, находящейся в Коллекции, должен иметься мастер файл, в котором отражается вся информация, касающаяся данной линии и манипуляций с ней, начиная с момента донорства биоматериала или иных путей попадания в Коллекцию), а также удобная и практичная система маркировки, исключающая потерю и кросс – контаминацию биоматериала.

3 Хранилища, в которых содержится Коллекция, помещения, в которых ведется работа по получению и культивированию линий клеток человека и животных, используемые материалы, оборудование и процедуры должны отвечать разработанной системе требований по контролю качества и безопасности в соответствии с российскими и международными регламентами, должны быть стандартизованы и унифицированы.

4 Каждая линия клеток человека и животных должна иметь паспорт с информацией об истории создания клеточной линии человека и животных, ее идентификации и характеристиках, микробиологической чистоте, характере генетической модификации линии клеток человека и животных, условиях культивирования, копия которого должна

выдаваться получателям данной линии, а также должен существовать электронный каталог имеющихся в Коллекции клеточных линий с их паспортами, доступный в сети интернет.

5 Должны соблюдаться этические нормы и требования к донорству биологического материала в соответствии с ФЗ 180 «О биомедицинских клеточных продуктах», а также должна быть разработана система по защите прав интеллектуальной собственности авторов клеточных линий.

6 В соответствии с утвержденной процедурой необходимо вести постоянную работу над пополнением Коллекции посредством приобретения (из внешних источников) и получения новых линий клеток человека и животных, а также по разработке и усовершенствовании методов культивирования и хранения, идентификации, определения контаминации в соответствии с российскими и международными стандартами и требованиями.

В дополнение к вышеизложенным требованиям предлагается следующий порядок депонирования линий клеток:

Этап 1 – основной сток

Полученную линию клеток следует размножить и заморозить 3–5 ампул основного стока культуры клеток. На этом этапе необходимо проверить культуру на контаминацию бактериями, грибами и микоплазмой, а также подтвердить видовую принадлежность с помощью анализа кариотипа и специфических маркеров ДНК.

Этап 2 – рабочий сток

На втором этапе размораживается одна ампула основного стока, клетки размножаются и криоконсервируется 10–100 ампул. В конце этого этапа также необходимо провести проверку культуры клеток.

Этап 3 – пользовательский сток

На третьем этапе размораживается одна ампула рабочего стока и снова после размножения замораживаются 10–100 ампул с оценкой культуры. Эти ампулы предоставляются заказчикам культур клеток.

Такой протокол депонирования дает возможность получить большое количество материала стандартного качества. При этом число пассажей культуры до получения пользовательского стока минимально. Это позволяет минимизировать риск контаминации и сохранить свойства линий клеток.

Фактически поддержание Коллекции заключается в обеспечении хранения клеточного материала для того, чтобы при необходимости выполнять различные работы в соответствии с СОПами.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Поддержание единиц хранения» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса поддержания единиц хранения ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола поддержания единиц хранения Коллекции.

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)

- Криоконтейнер (Thermo Fisher Scientific, 5100-0001).
- Компьютер.
- Расходные материалы и реактивы.
- Жидкий азот.

Поддержание единиц хранения

- Еженедельная заливка жидкого азота в криохранилище.
- Обновление информации в электронном каталоге Коллекции.

При подготовке СОП «Поддержание единиц хранения» использованы следующие литературные источники:

1 Мензоров А.Г., Серов О.Л. Зачем нужны коллекции линий клеток // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. 20(6). 945–948.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения индуцированных стволовых клеток американкой норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 году Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются стандартом. В настоящее время ИПСК получены для десятков видов животных, однако ЭС клетки – менее чем для двадцати. В 1993 в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены ЭС клетки ценного пушного зверя, американской норки (*Neovison vison*) [1]. Это создало уникальную возможность сравнить индуцированные и полученные из эмбриона плюрипотентные клетки. В 2015 году мы получили ИПСК американской норки и показали репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов: часть генов были успешно репрограммированы, часть имела промежуточную между фибробластами и ЭС клетками экспрессию, часть не репрограммировалась и, наконец, присутствовали гены, экспрессия которых отличалась от обоих типов клеток [2]. Таким образом, для еще одного вида животных появилась возможность изучать плюрипотентность и дифференцировку на двух типах плюрипотентных клеток: ЭС и ИПСК. В настоящей СОП описан подробный протокол получения ИПСК американской норки с использованием векторов, несущих гены *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* человека.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК американской норки для ЦКП

«Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки.

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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- 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 с 4,5 г/мл глюкозы и GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32430-100).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- 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).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).

- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- 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.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, 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 эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Приготовление материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты *N. vison*.
- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC.

Подготовка материалов

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

стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

- Среда для культивирования эмбриональных фибробластов американской норки (ЭФН) (среда для ЭФН): среда MEM α, 15 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК американской норки (среда для ИПСК): среда MEM α, 15 % FBS для ЭС клеток, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- 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 ºС 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 ºС, при +4 ºС хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81,31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0,22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 ºС. Рабочая концентрация 1 мМ.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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 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./см^2.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки

День –6. Разморозка ЭФН; Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ЭФН

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФН.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФН и поместить на водяную баню на 37 ºС. 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 с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например, при заморозке ЭФН с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка клеток Phoenix

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

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

7) 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.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ЭФН; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ЭФН

9) ЭФН должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 ºС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

10) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для ЭФН до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:2–1:4.

Пересадка клеток Phoenix

11) 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 ºС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

12) 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^2 на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13) Добавить в 1,5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

14) Добавить в пять 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: pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (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.

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

16) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

17) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День –1. Пересадка ЭФН; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ЭФН

18) Рассадить ЭФН на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс кл./см^2 (150 тыс кл./лунку). 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 получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК.

19) Заморозка ЭФН: 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 ºС. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. 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 ЭФН; смена среды клеткам Phoenix

21) Собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с *GFP* – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.

22) Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23) 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 Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

24) В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix. Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФН

25) Однократной трансдукции клеток лентивирусами может быть достаточно для получения ИПСК, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится также, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4, KLF4, SOX2*, но не c-MYC, среда с GFP не требуется.

26) В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27) Поменять среду во всех лунках на среду для ЭФН.

День 4. Смена среды; разморозка фидерных клеток; определение MOI

Смена среды

28) Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

Разморозка фидерных клеток

29) Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. разделе Подготовка реагентов).

30) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

31) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

32) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс кл./см^2.

33) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Определение MOI

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

35) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [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 ИПСК MOI должен быть более 4. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 ºС.

День 5. Пересадка ЭФН

36) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.

37) ЭФН, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки с 1 лунки 6-луночного планшета перенести на 2 чашки Петри.

Дни 7-11. Смена среды

38) Каждый второй день смена среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

День 13. Смена среды; разморозка фидерных клеток

39) Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

40) Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 14. Снятие колоний ИПСК

41) Ко дню 14 на чашках Петри должны быть десятки–сотни колоний, из них около половины с морфологией, соответствующей ИПСК. Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.

42) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.

43) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА (около 20 мкл).

44) Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, сковырнуть индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА и инкубировать 10 мин при 37 ºС.

45) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ИПСК и перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа ИПСК с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеризация ИПСК

46) Менять среду на среду для ИПСК раз в два дня.

47) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний (появление дифференцированных клеток, появление «пузырей» и плавающих «шаров») проводить пересадку ИПСК американской норки. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 ºС.

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

49) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ИПСК: 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 ºС. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки» использованы следующие источники:

1 Sukoyan M.A., Vatolin S.Y., Golubitsa A.N., Zhelezova A.I., Semenova L.A., Serov O.L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies // Mol Reprod Dev. 1993. 36(2). 148-158.

2 Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cirera S., Anistoroaei R., Serov O.L. Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes // BMC Genomics. 2015. 16 Suppl 13:S6.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения индуцированных стволовых клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Получение индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из фибробластов человека (ФЧ) в настоящий момент один из ключевых методок клеточной биологии и медицины [1]. Разработаны методы трансформации полученных таким образом стволовых клеток человека в кроветворные стволовые клетки, кардиомиоциты, стволовые клетки нервной ткани и гепатоциты с помощью различных репрограграммирующих факторов. Наиболее широко эта технология используется для моделирования болезней и оценки влияния на клетки различных веществ, в том числе лекарств и токсинов. Перспективным направлением считается выращивание здоровых клеток и органов из собственных стволовых клеток человека. Кроме этого, возможность получения неограниченного количества разных типов клеток человека позволяет проводить эксперименты по влиянию генотипа и внешних условий на экспрессию различных генов, клеточный цикл, апоптоз и малигнизацию. Особенно интересно получение клеток, которые сложно или невозможно получить у человека методом биопсии в виду её травматичности. Примером могут быть клетки сетчатки и хрусталика глаза, хондроциты. ИПСК человека можно использовать для анализа экспрессии генов в разных типах клеток у пациентов, как с широко распространёнными мультифакториальными, так и с редкими генетическими заболеваниями. Этот подход даёт возможность изучать патофизиологию различных заболеваний, моделируя их развитие в разных органах и тканях. Полученные в таких исследованиях данные дают материал для поиска новых подходов к ранней диагностике и терапии заболеваний. Данная СОП описывает получение ИПСК человека из фибробластов.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК человека 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 протокола получения индуцированных 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.: 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).

- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- 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).
- 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).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- 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.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, 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 эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Приготовление материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты человека.

- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC.
- Human iPSC Enhancer Kit (Selleckchem, K2010).
- bFGF (Thermo Fisher Scientific, PHG0026).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM/F12, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 ºC FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол, ×1 пенициллин-стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

- Среда для культивирования фибробластов человека (ФЧ) (среда для ФЧ): среда DMEM/F12, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 NEAA, ×1 GlutaMAX.
- Среда для культивирования ИПСК человека (среда для ИПСК): среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 10 нг/мл bFGF. В первые 10–14 дней культивирования клеток на среде ИПСК добавляется Human iPSC Enhancer Kit (×1).
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- 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 ºС 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 ºС, при +4 ºС хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81,31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0,22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 ºС. Рабочая концентрация 1 мМ.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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 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./см^2.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

День –6. Разморозка ФЧ; Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ФЧ

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ФЧ.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ФЧ и поместить на водяную баню на 37 ºС. 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 с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например, при заморозке ФЧ с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка клеток Phoenix

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

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

7) 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.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ФЧ; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ФЧ

9) ФЧ должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 ºСС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

10) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для ФЧ до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:2–1:4.

Пересадка клеток Phoenix

11) 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 ºС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

12) 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^2 на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13) Добавить в 1,5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

14) Добавить в пять 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: pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (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.

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

16) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

17) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День -1. Пересадка ФЧ; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ФЧ

18) Рассадить ФЧ на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс кл./см^2 (150 тыс кл./лунку). 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 получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК.

19) Заморозка ФЧ: 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 ºС. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. 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 ФЧ; смена среды клеткам Phoenix

21) Собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с *GFP* – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.

22) Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23) 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 Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

24) В лунке (лунках) с ФЧ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix. Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ФЧ

25) Однократной трансдукции клеток лентивирусами может быть достаточно для получения ИПСК, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится также, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4, KLF4, SOX2*, но не c-MYC, среда с GFP не требуется.

26) В лунке (лунках) с ФЧ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27) Поменять среду во всех лунках на среду для ФЧ.

День 4. Смена среды; разморозка фидерных клеток; определение MOI

Смена среды

28) Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

Разморозка фидерных клеток

29) Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. разделе Подготовка реагентов).

30) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

31) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

32) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс кл./см^2.

33) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Определение MOI

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

35) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [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 ИПСК MOI должен быть более 4. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 ºС.

День 5. Пересадка ФЧ

36) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.

37) ФЧ, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки с 1 лунки 6-луночного планшета перенести на 2 чашки Петри.

Дни 7–11. Смена среды

38) Каждый второй день смена среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой и Human iPSC Enhancer Kit.

День 13. Смена среды; разморозка фидерных клеток

39) Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой и Human iPSC Enhancer Kit.

40) Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 14. Снятие колоний ИПСК

41) Ко дню 14 на чашках Петри должны быть десятки, часть с морфологией, соответствующей ИПСК. Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.

42) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.

43) Сменить среду.

44) Нарезать колонии шприцом 1 мл с иглой на несколько кусочков.

45) Перенести кусочки колоний перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа ИПСК с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеризация ИПСК

46) Менять среду на среду для ИПСК каждый день. Human iPSC Enhancer Kit используется в течение 10–14 дней.

47) Колонии клеток пересаживать при достижении «многослойности», когда сверху колоний появляются черные мертвые клетки. Поменять среду, нарезать шприцом с иглой на кусочки 0,3 х 0,3 мм.

48) Ресуспендировать и рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

49) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ИПСК: 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 ºС. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131(5). 861–872.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартная операционная процедура

«Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения индуцированных стволовых клеток американкой норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 году Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc [1]. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются стандартом. Получение ИПСК мышей открывает широкие возможности изучения репрограммирования и моделирования заболеваний человека. В настоящей СОП описан подробный протокол получения ИПСК мыши с использованием векторов, несущих гены *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* человека.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК мыши для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола получения индуцированных 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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 с 4,5 г/мл глюкозы и GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32430-100).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- 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).
- LIF (PolyGene, PG-A1140-0100).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- 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.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, 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 эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Приготовление материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты мыши (линии мышей 129, C57BL, BALB и гибриды с участием этих линий).
- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC.

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- 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 для культивирования эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.

- Среда для культивирования ИПСК мыши (среда для ИПСК): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.
- 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 °C 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 °C, при +4 °C хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81,31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0,22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 °C. Рабочая концентрация 1 мМ.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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 эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 из эмбрионов стадии 13,5 дней (получены из ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ 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./см^2.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши

День –6. Разморозка ЭФМ; Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ЭФМ

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

2) 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.

3) 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. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например при заморозке ЭФМ с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка клеток Phoenix

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

6) 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.

7) 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.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ЭФМ; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ЭФМ

9) ЭФМ должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, 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.

10) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для ЭФМ до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:2–1:4.

Пересадка клеток Phoenix

11) 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.

12) 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^2 на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13) Добавить в 1,5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

14) Добавить в пять 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: pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (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.

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

16) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

17) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День –1. Пересадка ЭФМ; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ЭФМ

18) Рассадить ЭФМ на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс кл./см^2 (150 тыс кл./лунку). 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 получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК.

19) Заморозка ЭФМ: 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 °C. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. 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 ЭФМ; смена среды клеткам Phoenix

21) Собрать среду с лентивирусами, несущими OCT4, KLF4, SOX2 и c-MYC (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с GFP – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.

22) Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23) 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 Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

24) В лунке (лунках) с ЭФМ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix. Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФМ

25) Однократной трансдукции клеток лентивирусами может быть достаточно для получения ИПСК, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится также, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими OCT4, KLF4, SOX2, но не c-MYC, среда с GFP не требуется.

26) В лунке (лунках) с ЭФМ для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27) Поменять среду во всех лунках на среду для ЭФМ.

День 4. Смена среды; разморозка фидерных клеток; определение MOI

Смена среды

28) Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

Разморозка фидерных клеток

29) Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. разделе Подготовка реагентов).

30) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

31) 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.

32) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс кл./см^2.

33) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Определение MOI

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

35) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [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 ИПСК MOI должен быть более 4. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 °С.

День 5. Пересадка ЭФМ

36) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.

37) ЭФМ, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки с 1 лунки 6-луночного планшета перенести на 2 чашки Петри.

Дни 7–11. Смена среды

38) Каждый второй день смена среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

День 13. Смена среды; разморозка фидерных клеток

39) Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

40) Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 14. Снятие колоний ИПСК

41) Ко дню 14 на чашках Петри должны быть десятки-сотни колоний, часть с морфологией, соответствующей ИПСК. Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.

42) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.

43) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА 0,05 % (около 20 мкл).

44) Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, сковырнуть индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА 0,05 % и инкубировать 5–10 мин при 37 °С.

45) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ИПСК и перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа ИПСК с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеризация ИПСК

46) Менять среду на среду для ИПСК каждый день.

47) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний проводить пересадку ИПСК. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА 0,05 %, поместить на 10 мин на 37 °С.

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

49) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ИПСК: 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 °C. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126(4). 663–676.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

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 c-Myc. 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_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4ºС.
- 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).
- Пуромицин (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.
- Лентивирусные 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 ºC 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 ºС, при +4 ºС 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 ºС 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 ºСС, при +4 ºС 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 глии, 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 ºС. 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^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-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 ºС. 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_2-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 ºС. 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 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 ºС. 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^2 на 3 лунки желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на слдующий 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_2-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^2 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 ºС. 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 полибреном, 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 пуромицина 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 цитофлуорометрию на присутствие белка GFP. Клетки с контрольной и обработанной вирусом с GFP лунок снять трипсином-ЭДТА, центрифугировать, промыть НФБ, центрифугировать, фиксировать в 1 % парафармальдегиде 5 мин, центрифугировать, ресуспендировать в НФБ и определить процент клеток, имеющих GFP, на проточном цитофлуориметре.

34) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [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 глии и поместить на водяную баню на 37 ºС. 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 B-27 с добавлением доксициклина до рабочей концентрации 2 мкг/мл. Рассадить на чашку Петри с трансдуцированными вирусом ПСК в концентрации 15–25 тыс кл./см^2.

40) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Дни 5-15. Смена среды

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

Дни 16-25. Смена среды

42) Каждый второй день смена среды на среду для B-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 *Ngn2*» 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Стандартная операционная процедура «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах»

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 спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. 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), эмбриональные стволовые и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, 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 особенно актуально развитие методов направленной дифференцировки, позволяющих получать однородные популяции целевых клеток с высоким выходом. Имеющиеся методы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека нейроны часто громоздки, медленны и слабо воспроизводимы. В настоящей СОП описан подробный протокол получения нейронов из ПСК человека с помощью эмбриоидных телец (ЭТ) на основе [1, 2]. Использование ЭТ позволяет имитировать нормальное развитие.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека с помощью спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах» 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) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола получения нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека через стадию эмбриоидных телец.

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. 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_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- 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).
- Среда mTeSR1 (Stemcell technology, 85850).
- Среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, In-21103049).
- 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).
- Гепарин (Sigma, H4784-1G).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- TrypLE Reagents (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Раствор Версена (Thermo Fisher Scientific, 15040033).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Corning Matrigel hESC-Qualified Matrix, (Corning™, 354277).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- N-2 Supplement (Thermo Fisher, 17502048).
- B-27 Supplement (50X), serum free (Thermo Fisher, 17504044).
- bFGF (Invitrogen, PHG0026).
- EGF (Invitrogen, PHG0314).
- Аскорбиновая кислота (Sigma, A92902-100G).

- cAMP (Sigma, A6885-100MG).
- BDNF (PeproTech, 450-02).
- GDNF (PeproTech, 450-10).
- IGF-1 (PeproTech, 100-11).
- Ламинин (Sigma, L2020).
- Поли-L-орнитин гидробромид (PLO, Sigma-Aldrich, P3655–100M).
- 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 (Corning, 4301).
- Стерильные серологические пипетки объемом 5, 10 и 25 мл.
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Стеклянные капилляры (BLAUBRAND, Ald-BR7087 44).
- 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.
- Среда для ЭТ: среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол.
- Среда Н2: DMEM/F12, ×1 N-2 Supplement, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 2 мкг/мл гепарин.
- Среда Н2/Б27: DMEM/F12, ×1 N-2 Supplement, ×1 B-27 Supplement, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 2 мкг/мл гепарин.
- Среда для дифференцировки нейронов: Neurobasal, ×1 N-2 Supplement, ×1 B-27 Supplement, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 200 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мМ cAMP, 10 нг/мл BDNF, 10 нг/мл GDNF, 10 нг/мл IGF-1.
- 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.
- 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.
- 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.
- Поли-L-орнитин: приготовить стоковый раствор в стерильной воде 20 мг/мл. Разаликвотить, хранить при –20 °С.
- Ламинин: приготовить стоковый раствор в стерильной воде 5 мг/мл. Аликвотить, хранить при –20 °С.
- Поли-L-орнитин/Ламинин (PLO/L): 6 мкл стокового раствора поли-L-орнитина развести в 6 мл стерильной воды, покрыть пластиковый планшет и оставить при 37 °С на ночь. 6 мкл стокового раствора ламинина развести в 6 мл стерильной воды, покрыть пластиковый планшет и оставить при 37 °С на ночь.
- 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 нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека при помощи спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах

День –6. 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^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –5, –4. Смена среды ПСК

6) Каждый день смена среды на mTeSR1.

День –3. Пересадка ПСК

Пересадка ПСК

7) 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.

8) 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.

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

10) Ежедневно смена среды на mTeSR1.

День 0. Создание висячих капель

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

12) 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 раскапать по 20 мкл на внутреннюю сторону крышки чашки Петри. Закрыть крышкой чашку и осторожно перенести в CO_2-инкубатор. Остатки ПСК заморозить.

13) 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

14) Ко второму дню в каплях должны быть плотные шаровидные агрегаты. Перенести сформированные ЭТ в чашки Петри, предварительно покрытые 1 % агарозой в среду для ЭТ, перенести в CO_2-инкубатор.

День 4. Смена среды ЭТ

15) Сменить среду на среду для ЭТ.

День 5. Смена среды ЭТ

16) Сменить среду на среду Н2.

День 7. Перенос ЭТ

17) Перенести ЭТ в среду Н2 на лунки 6-луночного планшета, предварительно покрытого Matrigel. Переносить по 15–20 ЭТ на лунку.

День 9–16. Смена среды ЭТ

18) ЭТ должны прикрепиться ко дну лунок и начать распластываться. Среду следует менять через день на среду Н2.

День 17. Перенос нейральных розеток

19) К 17 дню должны сформироваться четко видимые нейральные розетки. Стеклянным капилляром перенести несколько нейральных розеток на лунки 12-луночного планшета в среду Н2, предварительно покрытого PLO/L.

День 18, 20 Смена среды нейральным розеткам

20) Сменить среду на среду Н2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF.

День 21. Пересадка НКП

21) НКП должны иметь плотность 60–70 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить раствор Версена, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

22) После округления клеток, убрать раствор Версена ресуспендировать в среде Н2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF, до образования суспензии клеток и рассадить в соотношении 1:4 на лунки, предварительно покрытые PLO/L. Остатки НКП заморозить.

23) Заморозка НКП: 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 °C. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

День 23. Смена среды НКП

24) Сменить среду на среду Н2/Б27 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF.

День 24. Смена среды НКП

25) НКП должны иметь плотность 40–50 %. Сменить среду на среду для дифференцировки нейронов.

День 25–55. Смена среды

26) Раз в два дня менять половину объема среды на среду для дифференцировки нейронов.

27) Ко дню 55 на чашке Петри должна быть плотная сеть нейронов.

При подготовке СОП «Получение нейронов из плюрипотентных стволовых клеток человека через стадию эмбриоидных телец» 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 Muratore C.R., Srikanth P., Callahan D.G., Young-Pearse T.L. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols // PLoS One. 2014. 9(8):e105807.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче»

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 спонтанной дифференцировки в эмбриоидных тельцах

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, культивируемых без фидера, для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека: индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток. Получение, свойства и культивирование этих клеток описаны ранее в публикациях [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ПСК американской норки 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 подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче.

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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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.

- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor (Stemcell technology, 72307).
- Среда mTeSR1 (Stemcell Technology, 85850).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- TrypLE Reagent (Thermo Fisher Scientific, 12604013).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Matrigel hESC-Qualified Matrix (Corning™, 354277).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 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).

Подготовка материалов

- Среда mTeSR1: приготовить согласно инструкции производителя, дополнительно добавить ×1 пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Matrigel: разморозить фасовку Matrigel на ледяной бане, развести в DMEM/F12, согласно фактору разведения, указанному в приложенном производителем 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.
- Среда для заморозки клеток млекопитающих: 90 % KSR и 10 % ДМСО. Вместо KSR можно использовать FBS. Среду для заморозки можно однократно замораживать на –20 °C, при +4 °C хранить не более двух недель.
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.

Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека, культивируемых без фидера, к выдаче

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, 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^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Размножение ПСК человека

6) Ежедневно менять среду на mTeSR1.

7) При достижении плотности более 70–90 % проводить пересадку ПСК. Минимум за 2 ч до планируемой пересадки в среду к ПСК добавить ROCK-ингибитор до рабочей концентрации 10 мкМ.

8) 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.

9) После появления четких границ у клеток по краю островков, добавить 5–10 объемов среды mTeSR1, ресуспендировать, 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.

10) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ПСК: после снятия клеток и центрифугирования осадок с лунки 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 «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека в бесфидерных условиях культивирования к выдаче» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126(4). 663–676.

2 Beers J., Gulbranson D.R., George N., Siniscalchi L.I., Jones J., Thomson J.A., Chen G. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions // Nat Protoc. 2012. 7(11). 2029–2040.

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Стандартная операционная процедура «Получение эмбриональных стволовых клеток мыши»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения эмбриональных стволовых клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

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

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение эмбриональных стволовых клеток мыши» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса выдачи ПСК мыши 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 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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, проавтоклавировать.
- 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.
- 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./см^2.

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./см^2.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День 0. Рассадка эмбрионов мыши

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

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 «KSR».

День 8 и далее

10) Менять среду на «KSR» 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 «KSR».

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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Стандартная операционная процедура «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Человеческий мозг является одним из самых сложных органов. Он имеет как сложную клеточную архитектуру, так и выполняет сложные функциональные задачи. Не удивительно, что исследователей давно интересовали процессы его развития, становления и функционирования, однако недоступность органа для различных экспериментальных манипуляций всегда препятствовала прогрессу в этой области. Многие выдающиеся результаты были получены на модельных животных, прежде всего грызунах и человекообразных обезьянах. Однако данные объекты слишком далеки в структурном отношении от мозга человека. Стремительное развитие методов клеточной биологии позволило реконструировать некоторые аспекты пространственной организации нервной ткани человека и процесса её дифференцировки. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка системы церебральных органоидов (ЦО) из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека, которая позволяет реконструировать трёхмерную цитоархитектонику некоторых отделов головного мозга [1, 2]. Данная технология представляет собой абсолютно новую и уникальную модель, позволяющую воссоздавать начальные этапы развития головного мозга человека и исследовать поведение нервных клеток в условиях максимально приближенных к in vivo. Особую ценность ЦО представляют для изучения патологических изменений фетального головного мозга, вызванных различными хромосомными [3, 4] или инфекционными заболеваниями [5]. Установление молекулярно-генетических и клеточных патологических механизмов многих болезней на модели ЦО может помочь в разработке потенциальных лекарственных препаратов [6] и, в конечном итоге, служить уникальной системой для их тестирования [7].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных клеток человека» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ЦО человека 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 церебральных органоидов 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.: 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Орбитальный шейкер.
- Маленький пинцет.
- 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 mTeSR1 (StemCell Technology, 858450).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, 21103049)
- FBS (fetal bovine serum, сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- KSR (knockout serum replacement, нокаутный заменитель сыворотки) (Thermo Fisher Scientific, 10828-028).
- Stem Pro Accutase Cell Dissociation Reagent (Thermo Fisher Scientific, A1110501).
- GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038).
- NEAA (non-essential amino acid, не незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific, 1985023).
- bFGF (basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов) (Thermo Fisher Scientific, 13256029).
- BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин) (Sigma-Aldrich, A3311).
- Гепарин (Sigma-Aldrich, H3149).
- Y-27632 (ингибитор ROCK-киназ) (StemCell Technologies, 72302).
- Добавка N-2 (Thermo Fisher Scientific, 17502048).
- Добавка B-27 без витамина A (Thermo Fisher Scientific, 12587010).
- Добавка B-27 (Thermo Fisher Scientific, 17504044).

- Инсулин (раствор), (Sigma-Aldrich, i9278).
- Matrigel (Corning, 356234).
- Планшет 96-луночный с U-образным дном и низкоадгезивной поверхностью (Corning, CLS7007).
- Планшет 24-луночный, для работы с суспензионными культурами клеток (Eppendorf, 0030722019)
- 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).
- Parafilm® M (парафильм), 5 см x 7600 см
- Линии ПСК человека (ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования ПСК человека mTeSR1 (среда для ПСК): mTeSR1 (подготавливается в соответствии с рекомендациями производителя), ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования эмбриоидных телец (среда для ЭТ): среда DMEM/F12, 20 % KSR, 3 % FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, 100 мкМ 2-меркаптоэтанол, bFGF в рабочей концентрации 4 нг/мл.
- Среда для нейральной индукции ПСК: среда DMEM/F12, ×1 N-2, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, гепарин в рабочей концентрации 1 мкг/мл, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования церебральных органоидов (среда для ЦО): Среда DMEM/F12 и Neurobasal в соотношении 1:1, ×0,5 N-2, ×0,5 B-27, ×0,5 NEAA, ×1 GlutaMAX, инсулин в рабочей концентрации 1 мкг/мл, ×1 пенициллин-стрептомицин, 100 мкМ 2-меркаптоэтанол.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.

- Сток bFGF: растворить 10 мкг bFGF в 200 мл DMEM/F12 с 10 % KRS для получения раствора с концентрацией 50 мкг/мл. Приготовить аликвоты и заморозить для дальнейшего хранения при –20 °C.
- Гепарин: растворить 50 мг гепарина в 1 мл ×1 НФБ для получения стокового раствора с концентрацией 50 мг/мл. Хранить приготовленный раствор можно при 4 °C в течение двух лет.

Получение церебральных органоидов из плюрипотентных клеток человека

День –5. Разморозка ПСК человека

1) Подготовить 6-лучный планшет для культивирования ПСК человека. Для этого предварительно разморозить на льду аликвоту матригеля объёмом 50 мкл, растворить в 10 мл холодной среды DMEM/F12 и заполнить лунки раствором, равномерно распределив по всей поверхности. Поместить планшет в термостат на 37 °C и оставить минимум на 30 мин. После полимеризации матригеля пробыть два раза теплой средой DMEM/F12. Подготовленные таким образом планешеты для культивирования ПСК человека могут храниться до 7 дней на 4 °C.

2) Налить в 10 мл пробирку 9 мл среды для ЭТ.

3) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ПСК человека и поместить на водяную баню на 37 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

4) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 500 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку. Для увеличения выживаемости клеток в среду добавить ингибитор ROCK киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ПСК человека

6) ПСК должны иметь плотность 70–90 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить 0,5 мкл Stem Pro Accutase и перенести в термостат на 37 °C. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

7) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ПСК до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:3–1:6. В течение первых трех дней в среду для культивирования ПСК добавлять ингибитор ROCK

киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ для того, чтобы повысить выживаемость клеток.

День 0–6. Формирование ЭТ из ПСК человека

8) ПСК должны иметь плотность 70–90 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить 0,5 мкл Stem Pro Accutase и перенести в термостат на 37 °С. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

9) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ПСК до образования суспензии единичных клеток и рассадить в 96-луночные планшеты с U-образным дном в среду для культивирования ЭТ в количестве 9000 клеток/лунку. Объем среды в каждой лунке должен быть не менее 150 мкл.

10) Производить смену среды в течение следующих 5-ти дней с добавлением ингибитора ROCK киназ Y-27632 в конечной концентрации 1 мМ и наблюдать за изменением морфологии и размеров ЭТ (они должны иметь шарообразную форму с четко различимыми границами).

День 6–11. Индукция нейральной дифференцировки в ЭТ.

11) К этому дню ЭТ должны достигнуть 500–600 мкм в диаметре и иметь гладкую поверхность. Перенести каждое ЭТ в 24-луночный планшет для культивирования суспензионных клеток в 500 мкл среды для нейральной индукции. Для предотвращения механических повреждений ЭТ перенос следует осуществлять пластиковым носом на 200 мкл, предварительно обрезав его узкую часть.

12) Сменить среду через 48 ч после переноса ЭТ в 24-луночный планшет. Наблюдать за морфологическими изменениями ЭТ при индукции нейральной дифференцировки. При просмотре под световым микроскоп через 3–5 дней должны появляться области нейроэпителя с характерной радиальной организацией и псевдостратификацией клеточных слоев.

День 12–90. Перенос ЦО с индуцированной нейроэпителиальной дифференцировкой в матригелевый каркас и культивирование.

13) Разморозить на льду аликвоту матригеля объёмом 500 мкл.

14) Подготовить подложку из парафильма для формирования капель матригеля. Для этого наложить квадрат парафильма на поверхность пустого лотка для пластиковых носов 200 мкл, аккуратно надавить на каждое отверстие в лотке для формирования небольших лунок в парафильме. Поскольку парафильм не стерилен, провести стерилизацию полученных подложек, обработав УФ в течение 30 мин, предварительно поместив их в чашки Петри.

15) Перенести каждый ЦО в лунку подложки из парафильма. Для предотвращения механических повреждений ЦО перенос следует осуществлять пластиковым носом на 200 мкл с обрезанной узкой частью. Так же необходимо предотвратить пересыхание ЦО в момент переноса и заключения в матригелевый каркас. Для этого настоятельно рекомендуется одновременно осуществлять перенос не более 16 ЦО.

16) Полностью удалить остатки среды, окружающей ЦО в лунках подложки и сразу же добавить каплю матригеля объемом 25–30 мкл. При помощи пластикового носа на 10 мкл выровнять и установить ЦО в центре капли матригеля.

17) Поместить чашки Петри с подложками из парафильма и заключенными в матригелевый каркас ЦО для полимеризации внеклеточного матрикса в CO_2-инкубатор при 37 °C на 30 мин.

18) Добавить в новую чашку Петри 12 мл среды для ЦО. Аккуратно перенести ЦО, заключенные в капли матригеля в среду, используя пластиковые носики на 10 мкл и маленький пинцет. В первые 4 дня культивирования среда должна содержать добавку B-27 без витамина A. Переместить чашки Петри в CO_2-инкубатор.

19) Сменить среду для ЦО через 48 ч и продолжить культивирование ещё в течение 48 ч.

20) Сменить среду для ЦО, содержащую добавку B-27, содержащую витамин A. Смену среду производить не полностью, оставляя 2–3 мл, для того чтобы избежать подсушивания ЦО.

21) Расположить в CO_2-инкубаторе орбитальный шейкер, установив рабочий режим 85 об/мин и поместить чашки Петри с ЦО на платформу орбитального шейкера.

22) Культивировать ЦО, меняя среду каждые 3–4 дня. Продолжительность культивирования зависит от целей эксперимента (от 1 до 9 месяцев).

При подготовке СОП «Получение церебральных органоидов из плюрипотентных стволовых клеток человека» использованы следующие литературные источники:

1 Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // Nat Protoc. 2014. 9(10). 2329–2340.

2 Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurles M.E., Homfray T., Penninger J. M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // Nature 2013. 501(7467). 373–379.

3 Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Nene A., Wynshaw-Boris A., Kriegstein A.R. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of

Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia // Cell Stem Cell. 2017. 20(4). 435–449.

4 Iefremova V., Manikakis G., Krefft O., Jabali A., Weynans K., Wilkens R., Marsoner F., Brändl B., Müller F.J., Koch P., Ladewig J. An Organoid-Based Model of Cortical Development Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome // Cell Rep. 2017. 19(1). 50–59.

5 Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure // Cell. 2016. 165(5). 1238–1254.

6 Li C., Deng Y.Q., Wang S., Ma F., Aliyari R., Huang X.Y., Zhang N.N., Watanabe M., Dong H.L., Liu P., Li X.F., Ye Q., Tian M., Hong S., Fan J., Zhao H., Li L., Vishlaghi N., Buth J.E., Au C., Liu Y., Lu N., Du P., Qin F. X., Zhang B., Gong D., Dai X., Sun R., Novitch B.G., Xu Z., Qin C.F., Cheng G. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model // Immunity. 2017. 46(3). 446–456.

7 Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells // Nature. 2008. 455(7213). 627–632.

ПРИЛОЖЕНИЕ М

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.: 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. 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 °C, –20 °C и +4 °C.
- 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 P3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге.

3) Добавить смесь ДНК и P3000 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_2-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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Стандартная операционная процедура «Иммуногистохимический анализ церебральных органоидов человека»

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

Содержание и назначение: определяет протокол иммуногистохимического анализа церебральных органоидов человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Человеческий мозг является одним из самых сложных органов среди всех животных. Он имеет как сложную клеточную архитектуру, так и выполняет сложные функциональные задачи. Не удивительно, что исследователей давно интересовали процессы его развития, становления и функционирования, однако недоступность органа для различных экспериментальных манипуляций всегда препятствовала прогрессу в этой области. Многие выдающиеся результаты были получены на модельных животных, прежде всего грызунах и человекообразных обезьянах. Однако данные объекты слишком далеки в структурном отношении от мозга человека. Стремительное развитие методов клеточной биологии позволило реконструировать некоторые аспекты пространственной организации нервной ткани человека и процесса её дифференцировки. Одним из самых выдающихся достижений последних лет является разработка системы церебральных органоидов (ЦО), которая позволяет реконструировать трёхмерную цитоархитектонику некоторых отделов головного мозга [1, 2]. Данная технология представляет собой абсолютно новую и уникальную модель, позволяющую воссоздавать начальные этапы развития головного мозга человека и исследовать поведение нервных клеток в условиях максимально приближенных к *in vivo*. Особую ценность ЦО представляют для изучения патологических изменений фетального головного мозга, вызванных различными хромосомными [3, 4] или инфекционными заболеваниями [5]. Установление молекулярно-генетических и клеточных патологических механизмов многих болезней на модели ЦО может помочь в разработке потенциальных лекарственных препаратов [6] и, в конечном итоге, служить уникальной системой для их тестирования [7].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Иммуногистохимический анализ церебральных органоидов человека» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ЦО человека 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 иммуноцитохимического анализа церебральных органоидов 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.: 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.

- Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 META Zeiss (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).
- Криотом HM 550 (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН)
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.

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.

- FBS (fetal bovine serum, сыворотка крови телят) для ЭС клеток (Thermo Fisher Scientific, 16141079).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин) (Sigma-Aldrich, A3311).
- Планшет 24-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030722019).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Parafilm® M (парафильм), 5 см × 7600 см
- Параформальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, P6148).
- Тритон X-100 (Медиген, A4975,0100).
- Стекла предметные Super Frost Plus Gold Slides (Thermo Fisher Scientific, FT4981GLPLUS)
- Покровные стекла.
- Среда для заключения препаратов под покровное стекло.
- Первичные антитела (приведены в таблице Н.1).
- Вторичные антитела (приведены в таблице Н.1).

Таблица Н.1 – Антитела для иммуногистохимического анализа ЦО

Название	Кат. номер	Производитель
Первичные антитела		
Anti-Tbr2 antibody	ab23345	Abcam
Anti-Pax6 antibody	ab5790	Abcam
Anti-Casp3(cleaved) antibody	9661S	Cell Signaling
Anti-pVim antibody	D076–3	MBL
Anti-FOXG1 antibody	ab18259	Abcam
Anti-TBR1 antibody	ab31940	Abcam

Anti-SATB2 antibody	ab51502	Abcam
Anti-Ctip2 antibody	ab18465	Abcam

Продолжение таблицы Н.1

VGLUT1 Antibody	NB100–1837	Novus Biologicals
Антитела Purified Mouse Anti-N-Cadherin	610920	BD Bioscience
BrdU Monoclonal Antibody (MoBU-1)	B35128	Thermo Fisher Scientific
Anti – Reelin Antibody	MAB5366	Millipore
Anti-MAP2 antibody	ab32454	Abcam
Anti-Doublecortin antibody	Ab18723	Abcam
Anti-Nestin antibody	PRB315C	Covance
Anti-Tau-1, clone PC1C6	MAB3420	Millipore
Neuronal Class III β-Tubulin (Tuj1) Antibody	MMS-435P	Covance
Anti-NeuN, clone A60	MAB377	Millipore
Anti-Ki67 antibody	ab15580	Abcam
Contactin 6 antibody	OSC00023W	Thermo Fisher Scientific
Кроличьи поликлональные антитела к Sox2	NCB 1601	РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан
Synaptophysin Monoclonal Antibody	MMS-618R	Covance
Anti-PSD95 antibody	ab18258	Abcam
Anti-GFAP antibody	Ab7260	Abcam
Вторичные антитела		
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488	A32723	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A11003	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A-11010	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A11008	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647	A32733	Thermo Fisher Scientific

Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A21208	Thermo Fisher Scientific

- Краситель DAPI.
- Сахароза.
- Заливочная среда для изготовления срезов из замороженных образцов (O.C.T. Compound, Sakura Finetek).
- Коробки для хранения предметных стекол.
- Микротомные лезвия.
- Формы для заключения образцов, квадратные (E6032, Sigma-Aldrich)
- Кисти для рисования (№ 2 и 4).
- Алюминиевая фольга.
- Шпатель медицинский.
- Маленький пинцет.
- Бумажные полотенца.
- ЦО человека (ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН).

Подготовка материалов

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя.
- Параформальдегид 4 %: нагреть 4/5 объема НФБ до ~60 ºСС при помешивании, добавить 4 % параформальдегида и несколько капель 1 М NaOH, растворить, долить НФБ и довести с помощью HCl pH до 6,9. Сделать аликвоты и заморозить на –20 °С.
- Тритон Х-100 0,8 % (стоковый раствор): в 100 мл НФБ добавить 80 мкл тритон Х-100. Тщательно перемешать и сделать аликвоты (5 или 1 мл). Хранить на 4 °С не более недели, на –20 °С до года.
- Сывороточный альбумин 4 % (стоковый раствор): в ~96 мл НФБ растворить 4 г альбумин в течение 30 мин регулярно помешивая. Сделать аликвоты. Хранить на 4 °С не более недели, на –20 °С до года.
- Сахароза, раствор 15 и 30 %: растворить 15 и 30 г сахарозы соответственно в 100 мл НФБ. Рекомендуется работать со свежеприготовленными растворами.
- Блокирующий буфер: 2 % раствор альбумина, 2 % раствор тритона, 5 % FBS.
- Раствор первичных антител: основа – блокирующий буфер. Добавить необходимое количество соответствующих антител (согласно рекомендациям производителей). При

окрашивании одновременно двумя антителами и более необходимо учитывать происхождение антител (сыворотка каких животных использовалась для получения) и не использовать с одинаковым.

- Раствор вторичных антител: основа – НФБ. Добавить необходимое количество соответствующих антител (согласно рекомендациям производителей). При окрашивании одновременно двумя антителами и более необходимо учитывать происхождение антител (сыворотка каких животных использовалась для получения).
- Влажная камера: на дно чашки Петри (диаметр 20 см) положить бумажные полотенца или фильтровальную бумагу, смочить водой или НФБ. В качестве держателей для окрашиваемых препаратов использовать обмотанные парафильмом предметные стекла, помещенные на дно чашки Петри.

Иммуногистохимический анализ церебральных органоидов человека

День 1. Фиксация ЦО

1) Перенести ЦО из чашки Петри для культивирования в лунки 24-луночного планшета (по 1–2 ЦО на лунку). Перенос следует осуществлять пластиковым носом на 1000 мкл, предварительно его обрезав, для предотвращения механического повреждения ЦО.

2) Промыть ЦО в 1 мл НФБ 1 раз в течение 5 мин, после добавить 0,5–1 мл 4 %-го раствора ПФА. В зависимости от размеров органоидов время фиксации в ПФА может варьироваться: для ЦО размером менее 0,5 см в диаметре время фиксации составляет 1–1,5 ч при комнатной температуре, при большем размере ЦО необходимо увеличить время фиксации до 12–16 ч при 4 °С.

3) Промыть ЦО НФБ 3 раза по 10 мин. Для последующего хранения залить образцы НФБ и замотать 24-луночный планшет парафильмом для предотвращения испарения буфера. Хранить ЦО в таком виде можно не более 1 месяца при 4 °С.

День 2–4. Подготовка и замораживание образцов ЦО (с предварительной дегидратацией)

Дегидратация:

4) Убрать из лунок НФБ и добавить 1 мл 15 % раствора сахарозы. Из-за разности в осмотическом давлении раствора и образца ЦО будет всплывать к поверхности лунки. Постепенное выравнивание осмотических давлений приводит к тому, что образец опускается на дно лунки. По положению образца в растворе сахарозы можно контролировать процесс дегидратации. Для ЦО размером менее 0,5 см данный процесс в среднем занимает 3–5 ч при 4 °С. Если размер ЦО превышает это значение, то образцы необходимо оставить в растворе сахарозы на 12–16 ч при 4 °С.

5) Повторить предыдущий шаг с 30 % раствором сахарозы. До процесса замораживания клетки могут находиться в данном растворе не более 1 недели.

Заморозка образцов

6) При помощи шпателя перенести ЦО на бумажное полотенце и тщательно обсушить со всех сторон. Перенести ЦО в формы для заморозки образцов (1–2 ЦО на форму). Для предотвращения попадания влаги изготовить из фольги крышку размером 3Х3 см и накрыть форму с образцами. Быстро перенести форму с образцами на –80 °С. Полная заморозка длится 2–4 ч после чего можно приступать к изготовлению срезов. На –80 °С образцы могут храниться несколько лет.

День 5. Изготовление криосрезов ЦО

7) За 1 ч до начала работы подготовить криотом, установив следующие параметры: «температура рабочей камеры» –22 °С, «температура объектодержателя» –24 °С. Установить микротомные лезвия. В камеру криотома поместить кисточки для работы со срезами. Любые манипуляции со срезами кисточками комнатной температуры приводят к их повреждению. Так же предварительно следует охладить держатели для образцов.

8) Быстро перенести формы с замороженными ЦО в камеру криотома. На охлажденный держатель добавить среду для заморозки О.С.Т в количестве необходимом для закрепления образца (0,5 – 1 мл). Перенести при помощи пинцета ЦО на держатель и закрепить в среде O.C.T. Compound, распределив среду по бокам образца. Дождаться полной заморозки среды и фиксации образца на держателе.

9) Закрепить держатель с образцом на объектодержателе, установить необходимую толщину срезов (15–50 мкм) и приступить к нарезке. Сворачивающиеся срезы необходимо аккуратно расправлять кисточками.

10) Серию из 5–10 изготовленных срезов (в зависимости от размеров) перенести на предметное стекло Super Frost Plus Gold Slides. Для этого необходимо расположить срезы на столике криотома в нужном порядке и ориентации, затем приложить к срезам предметное стекло на 5–10 с. Для лучшего расправления и размещения срезов необходимо использовать предметные стекла комнатной температуры. Хранить полученные стекла со срезами следует в специальных коробках на –80 °С.

День 6–7. Иммуногистохимический анализ срезов ЦО

11) Достать необходимое количество стекол со срезами и просушить в течение 1 ч при комнатной температуре для удаления влаги.

12) Переместить стекла во влажную камеру и промыть НФБ 3 раза по 10 мин для удаления остатков среды для заморозки О.С.Т.

13) Нанести блокирующий буфер 150 мкл на стекло, накрыть кусочком парафильма соответствующего размера и инкубировать 1 ч при комнатной температуре.

14) Аккуратно снять парафильм и удалить остатки блокирующего буффера при помощи небольших кусочков бумажного полотенца. Нанести 100 мкл раствора первичных антител, накрыть парафильмом и инкубировать ночь при 4 °C.

15) Промыть стекла НФБ 3 раза по 15 мин. Нанести 100 мкл раствора вторичных антител, накрыть парафильмом и инкубировать 1–2 ч при комнатной температуре. Все манипуляции со вторичными антителами и окрашенными ими срезами производить в темноте.

16) Промыть стекла НФБ 3 раза по 15 мин. Для окраски ядер нанести 100 мкл раствора DAPI и инкубировать 10 мин при комнатной температуре. Промыть стекла НФБ 2 раза по 5 мин.

17) Просушить препараты в течение 10 мин, оставив на рабочем столе. Нанести несколько капель среды для заключения препаратов и накрыть покровным стеклом. Готовые стекла (в горизонтальном положении) положить в коробку и оставить на ночь при 4 °C.

День 8–15. Микроскопический анализ образцов

18) Флуоресцентная микроскопия полученных препаратов с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META Zeiss (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).

19) Обработка и анализ изображений (ImageJ, PhotoShop, ZEN).

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» использованы следующие литературные источники:

1 Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // Nat Protoc. 2014. 9(10). 2329–2340.

2 Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., Wenzel D., Bicknell L.S., Hurles M.E., Homfray T., Penninger J. M., Jackson A.P., Knoblich J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // Nature 2013. 501(7467). 373–379.

3 Bershteyn M., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Di Lullo E., Nene A., Wynshaw-Boris A., Kriegstein A.R. Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia // Cell Stem Cell. 2017. 20(4). 435–449.

4 Iefremova V., Manikakis G., Krefft O., Jabali A., Weynans K., Wilkens R., Marsoner F., Brändl B., Müller F.J., Koch P., Ladewig J. An Organoid-Based Model of Cortical Development

Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome // Cell Rep. 2017. 19(1). 50–59.

5 Qian X., Nguyen H.N., Song M.M., Hadiono C., Ogden S.C., Hammack C., Yao B., Hamersky G.R., Jacob F., Zhong C., Yoon K.J., Jeang W., Lin L., Li Y., Thakor J., Berg D.A., Zhang C., Kang E., Chickering M., Nauen D., Ho C.Y., Wen Z., Christian K.M., Shi P.Y., Maher B.J., Wu H., Jin P., Tang H., Song H., Ming G.L. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure // Cell. 2016. 165(5). 1238–1254.

6 Li C., Deng Y.Q., Wang S., Ma F., Aliyari R., Huang X.Y., Zhang N.N., Watanabe M., Dong H.L., Liu P., Li X.F., Ye Q., Tian M., Hong S., Fan J., Zhao H., Li L., Vishlaghi N., Buth J.E., Au C., Liu Y., Lu N., Du P., Qin F. X., Zhang B., Gong D., Dai X., Sun R., Novitch B.G., Xu Z., Qin C.F., Cheng G. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model // Immunity. 2017. 46(3). 446–456.

7 Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells // Nature. 2008. 455(7213). 627–632.

ПРИЛОЖЕНИЕ П

Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ нейронов»

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

Содержание и назначение: определяет протокол иммуноцитохимического анализа нейронов

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ нейронов» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного анализа нейронов 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 иммуноцитохимического анализа нейронов.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных. СОП основана на протоколе [1].

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.

- Микроскоп Axio Imager.M1 (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- 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.
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404–100).
- BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин) (Sigma-Aldrich, A3311).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030722019).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Parafilm M (парафильм), 5 см x 7600 см.
- Параформальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, P6148).
- Тритон X-100 (Медиген, A4975,0100).
- Tween 20 (Sigma, P9416–50ML).
- Стекла предметные (Thermo Fisher Scientific, 10143562BEF).
- Первичные антитела (приведены в таблице П.1).
- Вторичные антитела (приведены в таблице П1).
- Краситель DAPI.
- ProLong® Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, P36934).
- Коробки для хранения предметных стекол.
- Маленький пинцет.
- Бумажные полотенца.
- Культура нейронов, выращенных на покровных стеклах (Thermo Fisher Scientific, A10143263NR1), ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и

Таблица П.1 – Антитела для иммуногистохимического анализа ЦО

Название	Кат. номер	Производитель
Первичные антитела		
Anti-Tbr2 antibody	ab23345	Abcam
Anti-Pax6 antibody	ab5790	Abcam
Anti-Casp3(cleaved) antibody	9661S	Cell Signaling
Anti-pVim antibody	D076–3	MBL
Anti-FOXG1 antibody	ab18259	Abcam
Anti-TBR1 antibody	ab31940	Abcam
Anti-SATB2 antibody	ab51502	Abcam
Anti-Ctip2 antibody	ab18465	Abcam
VGLUT1 Antibody	NB100–1837	Novus Biologicals
Антитела Purified Mouse Anti-N-Cadherin	610920	BD Bioscience
BrdU Monoclonal Antibody (MoBU-1)	B35128	Thermo Fisher Scientific
Anti – Reelin Antibody	MAB5366	Millipore
Anti-MAP2 antibody	ab32454	Abcam
Anti-Doublecortin antibody	Ab18723	Abcam
Anti-Nestin antibody	PRB315C	Covance
Anti-Tau-1, clone PC1C6	MAB3420	Millipore
Neuronal Class III β-Tubulin (Tuj1) Antibody	MMS-435P	Covance
Anti-NeuN, clone A60	MAB377	Millipore
Anti-Ki67 antibody	ab15580	Abcam
Contactin 6 antibody	OSC00023W	Thermo Fisher Scientific
Кроличьи поликлональные антитела к Sox2	NCB 1601	РГП «Национальный центр биотехнологии», Казахстан
Synaptophysin Monoclonal Antibody	MMS-618R	Covance
Anti-PSD95 antibody	ab18258	Abcam
Anti-GFAP antibody	Ab7260	Abcam
Вторичные антитела		
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488	A32723	Thermo Fisher Scientific

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A11003	Thermo Fisher Scientific

Продолжение таблицы П.1

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A-11010	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A11008	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647	A32733	Thermo Fisher Scientific
Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A21208	Thermo Fisher Scientific

млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН).

Подготовка материалов

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя,
- Параформальдегид 4 %: нагреть 4/5 объема НФБ до ~60ºСС при помешивании, добавить 4 % параформальдегида и несколько капель 1 М NaOH, растворить, долить НФБ и довести с помощью HCl pH до 6,9. Сделать аликвоты и заморозить на –20 °С.
- Тритон Х-100 0,1 %: в 10 мл НФБ добавить 10 мкл тритон Х-100. Тщательно перемешать.
- Блокирующий буфер (5 % BSA): в 10 мл НФБ растворить 500 мг альбумина. Тщательно перемешать.
- Буфер для нанесения антител готовится на основе НФБ, куда добавляют 2,5 % BSA, 0,1 % Tween 20.
- Антитела разводят в концентрации, указанной в инструкции производителя, в буфере для нанесения антител.
- Буфер для отмывок: НФБ с добавлением 0,2 % Tween 20.
- Раствор DAPI: 5 мкл DAPI растворить в 10 мл НФБ.

Иммуноцитохимический анализ нейронов

1) Для иммуноцитохимического анализа нейроны должны быть выращены на покровных стеклах в лунках 12-луночного планшета.

2) В лунки 12-луночного планшета добавить 4 % раствор ПФА по 1 мл на лунку на 15 мин при комнатной температуре.

3) Промыть препараты 1 мл НФБ три раза по 5 мин. Для последующего хранения залить препараты НФБ и замотать 12-луночный планшет парафильмом для предотвращения испарения буфера. Хранить препараты в таком виде можно не более 1 месяца при 4 ºС.

4) В лунки 12-луночного планшета налить блокирующий буфер 1 мл на стекло, инкубировать 1 ч при комнатной температуре.

5) Удалить блокирующий буфер. Нанести 300 мкл раствора первичных антител, инкубировать ночь при 4 ºС.

6) Промыть стекла 1 мл буфера для отмывок три раза по 5 мин.

7) Нанести 300 мкл раствора вторичных антител, инкубировать 1–2 ч при комнатной температуре. Все манипуляции со вторичными антителами и окрашенными ими препаратами проводить в темноте.

8) Промыть стекла 1 мл буфера для отмывок три раза по 5 мин.

9) Для окраски ядер нанести 300 мкл раствора DAPI и инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Промыть стекла 1 мл НФБ три раза по 5 мин.

10) Промыть стекла 1 мл дистиллированной воды.

11) Просушить препараты в течение 10 мин, оставив на рабочем столе. Нанести 7 мкл ProLong® Gold Antifade Mountant на предметное стекло и накрыть окрашенным препаратом. Готовые стекла (в горизонтальном положении) положить в коробку и оставить на ночь при 4оС.

12) Флуоресцентная микроскопия полученных препаратов с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Axio Imager.M1 Zeiss (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).

13) Обработка и анализ изображений (ImageJ, PhotoShop, ZEN).

При подготовке СОП «Иммуноцитохимический анализ нейронов» использованы следующие литературные источники:

1 Gridina M.M., Serov O.L. Bidirectional reprogramming of mouse embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells is initiated at the heterokaryon stage // Cell Tiss Res. 2010. 342. 377–389.

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче»

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

Содержание и назначение: определяет протокол подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека: индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток. Получение и свойства этих клеток описаны ранее [1].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ПСК американской норки 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 подготовки плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче.

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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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 (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 Подготовка материалов).
- bFGF (Thermo Fisher Scientific, PHG0026).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК человека (среда для ИПСК): среда DMEM/F12, 20 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 10 нг/мл bFGF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- 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.

- 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./см^2.

Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче

Разморозка фидерных клеток

1) Желатинизировать необходимое число культуральных планшетов (см. разделе Подготовка материалов).

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 (1 мл на лунку 12-луночного планшета или 2 мл на лунку 6-луночного) с плотностью 15 тыс кл./см^2.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка ПСК человека

6) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

7) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ПСК.

8) 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.

9) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты с фидерными клетками.

Размножение ПСК человека

10) Менять среду на среду для ПСК каждый день.

11) Колонии клеток пересаживать при достижении «многослойности», когда сверху колоний появляются черные мертвые клетки. Поменять среду, нарезать шприцом с иглой на кусочки 0,3 х 0,3 мм.

12) Ресуспендировать и рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

13) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ПСК: 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 «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток человека к выдаче» использованы следующие литературные источники:

1 Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131(5). 861–872.

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток мыши к выдаче»

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

Содержание и назначение: определяет протокол подготовки плюрипотентных стволовых клеток мыши к выдаче

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток мыши для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) мыши: индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток. Получение и свойства этих клеток описаны ранее в публикациях [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток мыши к выдаче» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса выдачи ПСК мыши 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 подготовки плюрипотентных стволовых клеток мыши к выдаче.

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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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 ПСК мыши (среда для ПСК): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.

- 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.
- 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» ФИЦ 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./см^2.

Подготовка плюрипотентных клеток мыши к выдаче

Разморозка фидерных клеток

1) Желатинизировать необходимое число культуральных планшетов (см. разделе 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 (1 мл на лунку 12-луночного планшета или 2 мл на лунку 6-луночного) с плотностью 15 тыс кл./см^2.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка ПСК мыши

6) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

7) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ПСК.

8) 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.

9) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты с фидерными клетками.

Размножение ПСК мыши

10) Менять среду на среду для ПСК каждый день.

11) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний проводить пересадку ПСК. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 3 мин на 37 °С.

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

13) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ПСК: 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 «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток мыши к выдаче» 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 Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. 126(4). 663–676.

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

Стандартная операционная процедура «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток американской норки к выдаче»

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

Содержание и назначение: определяет протокол подготовки плюрипотентных стволовых клеток американской норки к выдаче

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных стволовых клеток американской норки для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) американской норки (*Neovison vison*): индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и эмбриональных стволовых клеток. Получение и свойства этих клеток описаны ранее в публикациях [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток американской норки к выдаче» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ПСК американской норки 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 подготовки плюрипотентных стволовых клеток американской норки к выдаче.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных. Нормативные ссылки: Правила 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- 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).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- 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).
- 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 ПСК американской норки (среда для ПСК): среда MEM α, 15 % FBS для ЭС клеток, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- 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 ºС 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 ºС, при +4 ºС хранить не более двух недель.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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» ФИЦ 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./см^2.

Подготовка плюрипотентных клеток американской норки к выдаче

Разморозка фидерных клеток

1) Желатинизировать необходимое число культуральных планшетов (см. разделе 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 ºС. 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 (1 мл на лунку 12-луночного планшета или 2 мл на лунку 6-луночного) с плотностью 15 тыс. кл./см^2.

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка ПСК американской норки

6) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

7) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ПСК.

8) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ПСК и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

9) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты с фидерными клетками.

Размножение ПСК американской норки

10) Менять среду на среду для ПСК раз в два дня.

11) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний (появление дифференцированных клеток, появление «пузырей» и плавающих «шаров») проводить пересадку ПСК. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 ºС.

12) Добавить один объем среды для ПСК, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2-1:12 в зависимости от плотности клеток.

13) После получения достаточного количества клеток заморозить 5-10 ампул ПСК: 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 –80ºС. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Подготовка плюрипотентных стволовых клеток американской норки к выдаче» использованы следующие литературные источники:

1 Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cirera S., Anistoroaei R., Serov O.L. Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes // BMC Genomics. 2015. 16 Suppl 13:S6.

2 Sukoyan M.A., Vatolin S.Y., Golubitsa A.N., Zhelezova A.I., Semenova L.A., Serov O.L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies // Mol Reprod Dev. 1993. 36(2). 148-158.

ПРИЛОЖЕНИЕ У

Стандартная операционная процедура «Получение эмбриоидных телец 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 эмбриоидных телец из плюрипотентных стволовых клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Эмбриоидные тельца (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 невоспроизводимости 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 эмбриоидных телец 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 общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации получения эмбриоидных телец 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.: 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. 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_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-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 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.

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 добавитьк 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 раскапать по 20 мкл на внутреннюю сторону крышки чашки Петри. Закрыть крышкой чашку и осторожно перенести в CO_2-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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ф

Стандартная операционная процедура «Получение эмбриоидных телец из 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: определяет протокол получения эмбриоидных телец из плюрипотентных стволовых клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Эмбриоидные тельца (ЭТ) – это сферические агрегаты, образуемые плюрипотентными стволовыми клетками (ПСК), эмбриональными стволовыми клетками и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками, при культивировании в суспензионной культуре и имитирующие предимплантационную стадию развития эмбриона *in vitro*. В процессе культивирования ПСК в виде ЭТ в них появляются маркеры, специфичные для трех зародышевых листков. Таким образом, анализ экспрессии генов-маркеров трех зародышевых листков в ЭТ является общепризнанным методическим подходом для исследования клеток на плюрипотентность.

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол получения ЭТ из ПСК мыши, частично основанный на ранее опубликованном [1].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение эмбриоидных телец из плюрипотентных стволовых клеток мыши» разработан в качестве базового стандарта для характеристики ПСК мыши на плюрипотентность 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 эмбриоидных телец из 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. 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.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- 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).
- 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).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- Трипсин-ЭДТА 0,05 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Планшет 24-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (BIOFIL, TCP011024).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- 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 1,5 мл.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Агароза.

Подготовка материалов

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Агароза: приготовить 1 % водный раствор и прокипятить. Покрыть пластиковые чашки Петри и 24-луночные планшеты горячей агарозой, спустя 30 с убрать агарозу и оставить при комнатной температуре не менее чем на 30 мин.
- Среда для культивирования ПСК мыши (среда для ПСК): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF.

- Среда для культивирования ЭТ из ПСК мыши (среда для ЭТ): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол.
- Трипсин-ЭДТА 0,05 %: развести трипсин-ЭДТА 0,5 % в 10 раз в стерильном НФБ.
- 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.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).

Получение эмбриоидных телец из плюрипотентных стволовых клеток мыши

День 1. Разморозка ПСК

1) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

2) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ПСК.

3) 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.

4) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные планшеты с фидерными клетками.

День 3. Размножение ПСК мыши

5) Менять среду на среду для ПСК каждый день.

6) Перед пересадкой ПСК убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ПСК.

7) При достижении плотности ПСК более 90 % или при изменении морфологии колоний проводить пересадку. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 3 мин на 37 °С.

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

День 5. Создание «висячих капель»

9) По достижении плотности ПСК примерно 70 %, убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 3 мин на 37 °С.

10) Добавить один объем среды для ЭТ, ресуспендировать. Подсчитать количество клеток при помощи камеры Горяева. Центрифугировать при 300 g 3 мин.

11) Ресуспендировать клетки в среде для ЭТ, концентрация клеток 1200 тыс/мл.

12) В 10 см чашку Петри налить НФБ. Нанести капли суспензии клеток по 25 мкл на крышку чашки Петри автоматической пипеткой. Крышку аккуратно перевернуть.

День 8

Через три дня после рассадки в каплях должны быть плотные шаровидные агрегаты клеток – ЭТ.

13) ЭТ перенести автоматической пипеткой из каждой капли в отдельную ячейку со средой для ЭТ в лунки 24-ячеечного планшета, предварительно покрытые 1 % агарозой.

14) Среду менять каждые 2 дня.

15) ЭТ снимать на 5, 7 и 9 дни после нанесения капель: промыть в 1 мл НФБ, осадок заморозить в жидком азоте.

При подготовке СОП «Получение эмбриоидных телец из плюрипотентных стволовых клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Behringer R., Gertsenstein M., Nagy K.V., Nagy A. Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies by Hanging-Drop Cultures // Cold Spring Harb Protoc. 2016. 2016(12). pdb.prot092429.

ПРИЛОЖЕНИЕ Х

Стандартная операционная процедура

«Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Контаминация клеточных линий бактериями, микоплазмами и грибами является одной из важнейших проблем исследователей. Источниками заражения могут быть лабораторное оборудование, реактивы, сами исследователи, а также другие клеточные линии. Тем не менее существует ряд мер, позволяющих минимизировать последствия подобных инфекций. Однако первостепенной задачей является выявление самой инфекции и её возбудителя. Заражение клеточных культур грибами и бактериями довольно легко установить при помощи светового микроскопа. Однако в случае с микоплазмой это невозможно и выявление является довольно затруднительным процессом. К настоящему моменту установлено, что микоплазмой контаминировано порядка 5–10 % всех клеточных линий. Для её детекции были разработаны различные подходы, в том числе ПЦР-анализ [1]. Отсутствие контаминации бактериями, микоплазмой и грибами в культурах является необходимым условием достоверности получаемых в ходе исследований результатов и их правильной интерпретации.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями» разработан в качестве стандарта для обеспечения контроля контаминации клеточных линий человека и животных для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит унификации протокола тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями.

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. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга – вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Термошейкер для пробирок 1,5 мл.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Камера для горизонтального электрофореза.
- Столик для выравнивания агарозного геля.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.
- Лед.
- Термоконтейнер (в том числе пенопластовые коробки).
- Микроволновая печь.

- Весы.
- Химическая стеклянная колба (термостойкая).

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.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Набор для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-color (×2) (Биолабмикс, MHC010-1020).
- Праймеры (Биосет).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Протеиназа К.
- Лизирующий буфер.
- Вакуумная смазка (Corning).
- Изопропанол.
- 70 % этанол.
- Фенол.
- Хлороформ.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий
- ДНК-маркер 100 – 1500 пар оснований.
- Клеточная суспензия, полученная при пересадке соответствующих линий.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением ДНК клеточную суспензию промыть в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –20 ºС до момента выделения ДНК.

- ×50 ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации ×50 буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Агарозный гель для проведения электрофореза ДНК: взвесить 3 г агарозы и растворить в 100 мл ×1 буфера ТАЕ, нагревая раствор в микроволновой печи. Добавить раствор бромистого этидия до рабочей концентрации 5 мкг/мл. Залить в столик для выравнивания геля и поместить лопатки для формирования карманов.
- Лизирующий буфер: Tris-HCl pH 7,5 10 мМ, ЭДТА 10 мМ, NaCl 10 мМ, SDS 0,5 %.

Выделение ДНК

1) К клеточному осадку добавить лизирующий буфер из расчёта 300 мкл на образец и протеиназу К в рабочей концентрации 100 мкг/мл.

2) Пробирки поместить в термошейкер при 55 °С и 500–700 об/мин и дождаться полного растворения образцов (1–2 ч).

3) К полученному клеточному лизату добавить фенол и хлороформ в соотношении 1:1 (объем каждого раствора должен быть не менее 300 мкл) и перемешать. К каждому образцу добавить вакуумной смазки (~ шарик с диаметром до 0.5 см).

4) Центрифугировать при 14000 g 10 мин. Полученный супернатант, располагающийся над слоем вакуумной смазки, перенести в чистую пробирку.

5) Добавить 1 мл изопропанола, перемешать и центрифугировать при 14000 g 10 мин. Убрать супернатант и промыть полученный осадок ДНК 1 мл 70 % этанола.

6) Убрать супернатан и просушить осадок ДНК в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Растворить осадок ДНК в небольшом объеме деионизованной воды (20–50 мкл) и измерить концентрацию (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы ДНК могут храниться при –20 °С.

ПЦР анализ

7) Разморозить реакционную смесь для ПЦР, осторожно и тщательно перемешать.

8) В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color – 25 мкл, прямой и обратный праймер (конечная концентрация каждого 1 нМ), ДНК-матрица (конечное количество 0,2–1 мкг), стерильная вода (до 50 мкл). Замешивать реакционные смеси для ПЦР следует в пробирках, помещенных в лед. Осторожно перемешать реакционную смесь и сбросить капли, используя центрифугу.

9) Прогреть термоциклер до 95 °С и быстро переместить в него готовую реакционную смесь. Провести ПЦР в следующих условиях: предварительная денатурация

– 95 °C 5 мин, дегатурация – 95 °C 30 с, отжиг 55–56 °C (в зависимости от праймеров) 30 с, элонгация – 72 °C 1 мин, финальная элонгация – 72 °C 5 мин. Количество циклов 35 (для праймеров Bact – 25). Последовательности праймеров и соответствующая информация о них приведена в таблице Х.1. Для тестирования на контаминацию микоплазмой использовать следующие пары праймеров: MycoF-MycoR; MycoF1-MycoR1; MycoF2-MycoR3; MycoF3-MycoR1; MycoF4-MycoR1; MycoF5-MycoR1; MycoF5-MycoR2; MycoF6-MycoR1; MycoF7-MycoR1.

Таблица Х.1 – Праймеры для тестирования клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями

Название	Последовательность	Т отжига, ºС
BactF	5’- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’	56
BactR	5’- GGACTACCAGGGTATCTAAT-3’	56
FungiF	5’- GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3	56
FungiR	5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3	56
MycoF	5’- GAT CAG CCA CAT TGC CCA G -3’	56
MycoR	5’- CGT TGC GAA TAG TCA CTG CT -3’.	56
MycoF1*	5’- CGCCTGAGTAGTACGTCCGC- 3’	55
MycoF2*	5’- CGCCTGAGTAGTACGTACGC- 3’	55
MycoF3*	5’- TGCCTGGGTAGTACATTCGC- 3’	55
MycoF4*	5’- TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3’	55
MycoF5*	5’- CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3’	55
MycoF6*	5’- CACCTGAGTAGTATGCTCGC-3’	55
MycoF7*	5’- CGCCTGGGTAGTACATTCGC -3’	55
MycoR1*	5’- GCGGTGTGTACAAGACCCGA -3’	55
MycoR2*	5’- GCGGTGTGTACAAAACCCGA -3’	55
MycoR3*	5’- GCGGTGTGTACAAACCCCGA -3’	55
* Праймеры из [1]		

10) Поместить агарозный гель в камеру для электрофореза. Нанести по 8–10 мкл ДНК-образцов в карманы агарозного геля. Для определения размеров амплифицированных продуктов нанести ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.

11) Провести горизонтальный гель-электрофорез при напряжении 5 В/см^2. Зафиксировать результаты ПЦР при помощи гель-документирующей системы.

В норме клеточные культуры не должны содержать ДНК бактерий, микоплазмы и грибов.

При подготовке СОП «Тестирование клеток на контаминацию микоплазмой, грибами и бактериями» использованы следующие литературные источники:

1 Pisal R.V., Hrebíková H., Chvátalová J., Kunke D., Filip S., Mokrý J. Detection of Mycoplasma Contamination Directly from Culture Supernatant Using Polymerase Chain Reaction // Folia Biol (Praha). 2016. 62(5). 203–206.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ц

Стандартная операционная процедура

«Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток человека»

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 человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Плюрипотентные клетки человека (ПСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки, широко используются в различных медико-биологических исследованиях. Одним из ключевых свойств ПСК является их 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. Поэтому для характеристики ПСК необходимо использовать методы классической цитогенетики, а именно подсчет хромосом и анализ метафазных пластинок на основе окрашивания DAPI. Данный протокол частично основан на ранее опубликованном [1].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Цитогенетический анализ плюрипотентных клеток человека» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного цитогенетического анализа плюрипотентных клеток человека 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 протокола цитогенетического анализа 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.: 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –20 ºС и +4 ºС.
- Инвертированный микроскоп.
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный охлаждаемой CCD-камерой.
- Система обработки изображений ISIS (MetaSistems).
- 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.

- Демеколцин (колцемид) (ROCHE 10295892001).
- KCL.

- NaCl.
- $Na_3C_6H_5O_7$.
- 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: 0,28 % KCl в воде.
- Приготовить раствор 20 × SSC из 175,3 г NaCl и 88,2 г $Na_3C_6H_5O_7$ в 1 л воды. Довести pH 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 °C).
- Приготовить рабочий раствор DAPI на 2 × SSC. Растворить 25 мл стокового раствора в 50 мл 2 × SSC.

Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток человека

День 1. Фиксация клеток

1) В культуральную среду стерильно добавить колцемид, 0,1 мкг/мл.

2) Спустя 3 ч клетки промыть НФБ и нанести раствор трипсина 0,05 % в НФБ, выдержать 5 мин.

3) В чашку с клетками добавить гипотонический раствор (0,28 % KCl) и поставить в термостат на 37 °C на 25 мин.

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

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

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

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

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

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

10) Повторить п. 8.

11) К осадку добавить фиксатор, пипетировать и раскапать на охлажденные влажные стекла.

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

13) День 2. Окраска препаратов

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

15) Высушить.

16) Нанести раствор антифейда и закрыть покровным стеклом.

17) Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе.

18) День 3–4 Анализ метафазных пластинок

19) Сфотографировать 50–60 метафазных пластинок.

20) Произвести подсчет хромосом на 40–50 метафазных пластинках.

21) Кариотипировать 10–20 метафазных пластинок.

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

1 Prokhorovich M.A., Lagar'kova M.A., Shilov A.G., Karamysheva T.V., Kiselyov S.L., Rubtsov N.B. Cultures of hESM human embryonic stem cells: chromosomal aberrations and karyotype stability // Bull Exp Biol Med. 2007. V. 144. P. 126–129.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ш

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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –20 ºС и +4 ºС.
- Инвертированный микроскоп
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный охлаждаемой CCD-камерой.
- Система обработки изображений ISIS (MetaSistems).
- 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 (колцемид) (ROCHE 10295892001).
- KCL.
- NaCl.
- $Na_3C_6H_5O_7$.
- 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 pH 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 °C).
- 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 бромида (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 °C 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 раскапать 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 × 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Щ

Стандартная операционная процедура

«Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки»

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 норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

В 1993 году в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены эмбриональные стволовые клетки ценного пушного зверя, американской норки (*Neovison vison*) [1]. В 2015 году мы получили индуцированные стволовые клетки американской норки и показали репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов [2]. 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 плюрипотентные свойства клеток [2]. Поэтому для характеристики ПСК необходимо использовать методы классической цитогенетики: подсчет хромосом и анализ метафазных пластинок на основе окраски DAPI.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток норки 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 протокола цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток норки. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –20 ºС и +4 ºС.
- Инвертированный микроскоп.
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный охлаждаемой CCD-камерой.
- Система обработки изображений ISIS (MetaSistems).
- 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.

- Демеколцин (колцемид) (ROCHE 10295892001).
- KCL.
- NaCl.

- $Na_3C_6H_5O_7$.
- 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: 0,56 % KCl в воде.
- Приготовить раствор 20 × SSC из 175,3 г NaCl и 88,2 г $Na_3C_6H_5O_7$ в 1 л воды. Довести pH до 7,0–7,1. Автоклавировать. Из 20 × SSC приготовить 2 × SSC, разведя водой в 10 раз.
- Приготовить антифейд (1 % DABCO на 90 % глицерине в НФБ).
- Приготовить стоковый раствор 0,2 % DAPI на 2 × SSC (хранить на 4 °C).
- Приготовить рабочий раствор DAPI на 2 × SSC. Растворить 25 мл стокового раствора в 50 мл 2 × SSC.

Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки

День 1. Фиксация клеток

1) В культуральную среду стерильно добавить колцемид, 0,1 мкг/мл.

2) Спустя 3 ч клетки промыть PBS и нанести раствор трипсина 0,25 % в PBS, выдержать 8–10 мин.

3) Клетки снять пипетированием в 10 мл центрифужную пробирку.

4) Центрифугировать на 1000 об/мин 5 мин. Супернатант слить.

5) К осадку добавить гипотонический раствор 3 мл (0,56 % KCl) и поставить в термостат на 37 °C на 15 мин.

6) После этого в пробирку добавить несколько (2–3) капель свежеприготовленного фиксатора (3:1 метанол – уксусная кислота).

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 раскапать на охлажденные влажные стекла.

13) Стекла высушить под теплым воздухом из вентилятора.

14) Положить в сухое, прохладное место примерно на сутки.

15) День 2. Окраска препаратов

16) Препараты поместить в стакан с раствором DAPI на 5 мин. Затем прополоскать последовательно в 2 × SSC и воде.

17) Высушить.

18) Нанести раствор антифейда и закрыть покровным стеклом.

19) Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе.

20) День 3–4. Анализ метафазных пластинок

21) Сфотографировать 50–60 метафазных пластинок.

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

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

1 Sukoyan M.A., Vatolin S.Y., Golubitsa A.N., Zhelezova A.I., Semenova L.A., Serov O.L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies // Mol Reprod Dev. 1993. 36(2). 148–158.

2 Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cirera S., Anistoroaei R., Serov O.L.

Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes // BMC Genomics. 2015. 16 Suppl 13:S6.

ПРИЛОЖЕНИЕ Э

Стандартная операционная процедура «Получение гибридных клеток мыши»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения гибридных клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Репрограммирование генома соматической клетки к плюрипотентному состоянию может быть достигнуто несколькими способами. Среди них – отмеченные Нобелевской премией по физиологии и медицине за 2012 год – перенос ядра дифференцированной клетки в энуклеированный ооцит («клонирование») и индукция плюрипотентности с помощью сверхэкспрессии репрограммирующих транскрипционных факторов, Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc. Существует еще один альтернативный подход к возвращению клетке плюрипотентности, основанный на слиянии эмбриональных стволовых клеток с соматическими. Полученные клетки называются гибридными и обладают свойствами плюрипотентных клеток: они способны к дифференцировке в производные трех зародышевых листков, а также дают вклад в образование химерных животных, что является одним из наиболее строгих тестов на плюрипотентность.

Кроме плюрипотентных клеток при гибридизации также образуются клетки с фенотипом и свойствами дифференцированного партнера по слиянию.

Модель гибридных клеток представляет большой интерес для фундаментальной науки, позволяя изучать не только молекулярные основы индукции и поддержания плюрипотентности, но и то, как два разных генома воздействуют друг на друга [1].

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол получения гибридных клеток между эмбриональными стволовыми (ЭС) клетками и эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ).

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение гибридных клеток мыши» 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) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации получения гибридных 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. 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_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 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.

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).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- 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, незаменимые аминокислоты) (Thermo Fisher Scientific, 11140050).
- Пенициллин-стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, 15140122).
- 2-меркаптоэтанол (Thermo Fisher Scientific, 21985023).
- LIF (PolyGene, PG-A1140–0100).
- Трипсин-ЭДТА 0,5 % (X10) (Thermo Fisher Scientific, 15400054).
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Полиэтиленгликоль 1500 (ПЭГ-1500, Roche, 10783641001).
- Добавка к среде HAT (Sigma-Aldrich, H0262-10VL)
- Пуромицин (Thermo Fisher A1113803).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- Планшет 24-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030 721.110).
- 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.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- ЭС клетки мыши с делецией в гене *Hprt* и устойчивостью к пуромицину.
- ЭФМ.

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ЭС клеток мыши (среда для ЭС клеток): среда DMEM, 7,5 % FBS для ЭС клеток, 7,5 % KSR, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-стрептомицин, ×1 2-меркаптоэтанол, LIF.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- 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 °C 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 °C, при +4 °C хранить не более двух недель.

Получение гибридных клеток

День –6. Разморозка ЭС клеток мыши; Разморозка ЭФМ

Разморозка ЭС клеток мыши

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭС клеток.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭС клетками 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 осадок в среде для ЭС клеток и рассадить на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином. 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 ЭС клеток с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (9,5 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка ЭФМ

5) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

6) 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.

7) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант, ресуспендировать осадок в среде для ЭФМ и рассадить на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином. 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 ЭФМ с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (9,5 см^2) разморозку также проводить на одну ячейку.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO2-инкубатор.

День –5 и –4. Смена среды ЭС клеткам

9) Каждый день смена среды на среду для ЭС клеток.

День –3. Пересадка ЭС клеток; Пересадка ЭФМ

Пересадка ЭС клеток

10) ЭС клетки должны иметь плотность 70–90 %.

11) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, 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.

12) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ЭФМ, до образования суспензии единичных клеток, центрифугировать при 300 g 3 мин.

Осадок ресуспендировать в среде для ЭС клеток и рассадить в соотношении 1:4–1:10 на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином.

13) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Пересадка ЭФМ

14) ЭФМ должны иметь плотность 70–90 %.

15) Убрать культуральную среду, промыть НФБ, 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.

16) После округления клеток ресуспендировать в 2–3 кратном избытке среды для ЭФМ, до образования суспензии единичных клеток, центрифугировать центрифугировать при 300 g 3 мин. Осадок ресуспендировать в среде ЭФМ и рассадить в соотношении 1:4–1:10 на нужное число культуральных флаконов площадью 25 см^2.

День –2, –1. Смена среды ЭС клеткам

17) Смена среды на среду для ЭС клеток.

День 0. Слияние ЭС клеток и ЭФМ

18) ЭС клетки должны иметь плотность 60–80 %.

19) Пассировать ЭС клетки, ресуспендировать в среде для ЭФМ, подсчитать клетки.

20) Пассировать ЭФМ, ресуспендировать в среде для ЭФМ, подсчитать клетки.

21) Смешать одинаковое число ЭС клеток и ЭФМ, центрифугировать при 300 g 5 мин. Ресуспендировать осадок в 8 мл среды DMEM, центрифугировать при 300 g 10 мин. Остатки ЭС клеток и ЭФМ заморозить.

22) Ресуспендировать осадок в 8 мл НФБ, центрифугировать при 300 g 10 мин.

23) Супернатант слить, удалить последнюю каплю НФБ.

24) На осадок налить 300 мкл ПЭГ-1500, предварительно подогретого до 37 ºС, оставить при комнатной температуре на 60 с.

25) Налить сверху 8 мл НФБ, не пипетировать, инкубировать 10 мин при 37 ºС.

26) Центрифугировать при 300 g 10 мин.

27) Ресуспендировать осадок в 8 мл среды DMEM, центрифугировать при 300 g 10 мин.

28) Ресуспендировать осадок в 8 мл среды для ЭФМ, центрифугировать при 300 g 10 мин.

29) Ресуспендировать осадок в среде для ЭС клеток, рассадить в концентрации 50–100 тыс. кл./см^2 на 6-луночный планшет, предварительно покрытый желатином.

30) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

31) Заморозка ЭС клеток и ЭФМ: после пассирования 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 1. Селекция гибридных клеток

32) Сменить среду на селективную: среда для ЭС клеток с добавлением 5 мкг/мл пуромицина и ×1 HAT.

День 2–10. Смена среды гибридным клеткам

33) Смена среды на среду для ЭС клеток с добавлением 5 мкг/мл пуромицина и ×1 HAT.

День 11–15. Снятие колоний гибридных клеток

34) К 11–15 дню на лунке должны быть десятки с морфологией, соответствующей ЭС клеткам и фибробластам.

35) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА (около 20 мкл).

36) Сковырнуть выбранные колонии индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА и инкубировать 10 мин при 37 ºС.

37) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ЭС клеток с добавлением ×1 HAT и перенести в индивидуальные лунки 24-луночного планшета, предварительно покрытые желатином. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа гибридных клеток с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение гибридных клеток

38) Менять среду на среду для ЭС клеток ежедневно.

39) При достижении плотности 70–90 % проводить пересадку гибридных клеток. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 °С.

40) Добавить один объем среды для ЭФМ, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на предварительно покрытые желатином лунки в соотношении 1:2–1:8 в зависимости от плотности клеток.

41) После получения достаточного количества клеток заморозить гибридные клетки: 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 перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение гибридных клеток мыши» использованы следующие литературные источники:

1 Gridina M.M., Serov O.L. Bidirectional reprogramming of mouse embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells is initiated at the heterokaryon stage // Cell Tiss Res. 2010. 342. 377–389.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ю

Стандартная операционная процедура «Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол получения векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Технология CRISPR/Cas за последние несколько лет совершила прорыв в области редактирования геномов. В силу высокой эффективности и простоты сборки отдельных компонент в условиях современной лаборатории, система CRISPR/Cas применяется огромным количеством исследователей в самых разных областях биологии. После появления оригинальной статьи о редактировании генома млекопитающих системой CRISPR/Cas9 разработано множество методов, предлагающих те или иные модификации белков семейства Cas или направляющих РНК. Целый ряд работ посвящен использованию технологий, основанных на системе CRISPR/Cas для самых неожиданных целей – не только для редактирования геномов, но и для контроля экспрессии определенных генов, локализации и визуализации отдельных локусов ДНК в пространстве ядра, изменения статуса метилирования заданных сайтов в геноме млекопитающих и многое другое [1].

Система CRISPR/Cas состоит из двух основных частей. Первой является белок, нуклеаза Cas, которая способна вносить двухцепочечный разрыв в молекулу ДНК. Вторая представляет собой небольшую молекулу РНК размером около 120 нуклеотидов – химерную направляющую РНК (guide RNA, gRNA). Последовательность направляющей РНК можно условно разделить на две части. Около 100 нуклеотидов, расположенные на 3’-конце, являются одинаковыми для всех направляющих РНК, и обеспечивают формирование специфической пространственной структуры, которая узнается белком Cas. Около 20 нуклеотидов, расположенные на 5’-конце направляющей РНК, определяют последовательность ДНК, с которой свяжется белок Cas9. Белок Cas вносит двухцепочечной разрыв в молекулу ДНК в месте, которое комплементарно 5’-последовательности хнРНК при условии, что непосредственно за комплементарным хнРНК участком находится специфическая последовательность, которая называется PAM (protospacer adjacent motif, мотив, прилегающий к протоспейсеру). Последовательность PAM может быть различной у разных представителей семейства белков Cas.

Белок Cas вносит двухцепочечный разрыв в ДНК на небольшом расстоянии от PAM при условии, что в клетках присутствует хнРНК и в геноме клеток есть последовательность, комплементарная 5’-концу хнРНК, следом за которой находится последовательность PAM. На этом работа системы CRISPR/Cas9 заканчивается, и дальнейшая модификация генома происходит при участии системы репарации ДНК клетки.

Несмотря на огромное потенциальное разнообразие способов использования системы CRISPR/Cas, наиболее часто она применяется именно для редактирования геномов. И, несмотря на кажущуюся простоту, существует ряд технических сложностей, с которыми может столкнуться научный коллектив, использующий эту технологию впервые. В этой стандартной операционной процедуре мы подробно описываем протокол сборки генно-инженерных конструкций, необходимых для использования системы CRISPR/Cas для внесения мутаций в геном млекопитающих.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения плазмидных конструкций, содержащих компоненты системы CRISPR/Cas 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 протокола получения векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/Cas.

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.

- Компьютер.
- 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 0,5 и 1,5 мл с возможностью центрифугирования на скоростях более 12 тыс. g.
- Центрифуга для пробирок 10 и 50 мл.
- Термостатируемый шейкер с возможностью поддержвания температуры 37 ºС.
- Программируемый амплификатор
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Автоклав.
- Камера для горизонтального гель-электрофореза, гребенки, блок питания
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.

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. Часть необходимых материалов приведены в тексте.

- Деионизованная вода (ddH_20) с удельным сопротивлением более 18 МОм·см, например Sigma 7732-18-5.

- Плазмидные вектора-бекбоны. Вектора выбираются в зависимости от выбранного типа клеток и дизайна эксперимента. Поставщик Addgene.
- Олигонуклеотиды.
- Полинуклеотид киназа фага T4 (T4 PNK, NEB M0201S) и соответствующий буфер (10X T4 PNK Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Лигаза фага T4 (T4 DNA ligase, NEB M0202S) и соответствующий буфер (T4 DNA Ligase Buffer, поставляется вместе с ферментом).
- Эндонуклеазы (NEB RXXXXS).
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), концентрация 20 мг/мл, качество пригодное для молекулярно-биологических работ (например, NEB B9000S).
- Компетентные клетки *Escherichia coli* (например, NEB C3019).
- Антибиотики Ампициллин (например, Sigma 69-53-4), Канамицин (например, Sigma 25389-94-0), концентрация стока 100 мг/мл.
- Жидкая среда LB (на 100 мл содержит: триптон 1 г (Медиген 440210); бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г (Медиген 450250); NaCl 0.5 г (Медиген 141659-1000). Среда автоклавируется перед использованием.
- Агаризованная среда LB (на 100 мл содержит: триптон 1 г; бактериально-дрожжевой экстракт 0.5 г; NaCl 0.5 г; агар 1.5 г (Медиген A0949,0250). Среда автоклавируется перед использованием.
- Наборы для выделения плазмидной ДНК, мини-, миди- или макси-«преп».
- Реактивы для гель-электрофореза: Tris-Base (Sigma T6066), Tris-HCl (Sigma T3253), EDTA (6381-92-6), уксусная кислота (Медиген 64-19-7).
- Чашки Петри 60–150 мм (например, Медиген 91).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0.2, 0.5 и 1.5 мл.

Получение векторов для направленной модификации генома с использованием системы CRISPR/CAS

Выбор системы клонирования

Выбор системы клонирования проводится можно разбить на два этапа [1]:

Анализ последовательностей целевых локусов генома

Анализ проводится, используя свободное программное обеспечение, например, https://crispr.med.harvard.edu/.

Результатом проведенного анализа являются последовательности gRNA, необходимые для узнавания системой CRISPR/Cas данного локуса.

Одновременно с выбором последовательности gRNA необходимо выбрать систему CRISPR/Cas9 для модификации генома. Выбор системы CRISPR/Cas9 зависит от наличия в целевых локусах PAM-последовательностей, специфичных для той или иной CRISPR/Cas9 системы. Например, для PAM-последовательности NGG можно использовать системы spCas9, а для PAM NNGRRT – saCas9. Соответствие различных вариантов PAM-последовательности и системы Cas9 указаны, например, в ресурсе https://crispr.med.harvard.edu/ и на сайте https://www.addgene.org/crispr/mammalian/.

Выбор базового вектора для клонирования

После выбора системы CRISPR/Cas необходимо выбрать базовый вектор для клонирования gRNA и для экспрессии нуклеазы Cas. Базовые вектор для клонирования приведены на сайте https://www.addgene.org/ (в частности – https://www.addgene.org/crispr/mammalian/) с каталожными номерами.

Разработка дизайна эксперимента по клонированию последовательностей gRNA

Протокол клонирования предполагает гидролиз базового вектора в специфической позиции, добавление к нему олигонуклеотидов, содержащих последовательности gRNA (вставки), и последующее лигирование базового вектора и вставки. Участки гидролиза и соответствующие им ферменты гидролиза, а также последовательности олигонуклеотдов, необходимых для проведения клонирования, выбираются исследователем исходя из карт базовых векторов, доступных на сайте https://www.addgene.org/. Ниже будет приведен типовой протокол для клонирования олигонуклеотидов, соответствующих системе SpCas9 в вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI.

Вектор gRNA_Cloning_Vector_BsmBI содержит бактериальный ориджин репликации, ген устойчивости к канамицину, промотор U6, два сайта рестрикции *Bsm*BI и терминатор транскрипции. При обработке рестриктазой *Bsm*BI из вектора удаляется небольшой фрагмент, расположенный между промотором U6 и конститутивной частью gRNA. Поскольку фермент *Bsm*BI относится типу ферментов IIS, он узнает асимметричный сайт (CGTCTC) и вносит двухцепочечный разрыв на некотором расстоянии от него. Поэтому в результате гидролиза вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI из него удаляются сайты узнавания фермента *Bsm*BI и образуются липкие концы для лигирования фрагмента ДНК, кодирующего специфическую последовательность gRNA. Таким образом, обработку ферментом BI и лигирование можно проводить в одной реакции.

Для выбранной последовательности gRNA вида G (N)19 NGG и комплементарной ей последовательности CCX (X)19 C (где азотистые основания X комплементарны соответствующим основаниями N), необходимо заказать химический синтез двух

олигонуклеотидов: gRNA_F 5’- CACCG (N)19 GTT- 3’ и gRNA_R 5’- CTAAAAC (X)19 C - 3’.

Для секвенирования полученных векторов необходимо заказать олигонуклеотид M13F: 5’- TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3’.

Протокол клонирования на примере вектора gRNA_Cloning_Vector_BsmBI

Подготовительный этап

Полученные олигонуклеотиды должны быть разведены до концентрации 100 мкМ в ddH_2O.

Отжиг и фосфорилирование нуклеотидов

Смешайте в пробирке в указанном порядке:

1) 6,5 мкл ddH_20.
2) По 1 мкл каждого из двух олигонуклеотидов gRNA_F и gRNA_R.
3) 1 мкл 10X T4 PNK Buffer.
4) 0,5 мкл T4 PNK.

Объем реакции составляет 10 мкл.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

5) 37 °C → 30 мин.
6) 95 °C → 5 мин.
7) Равномерное снижение температуры до 25°C по 5°C/мин.

Реакция рестрикции-лигирования.

Смешайте в пробирке в указанном порядке:

8) 6,5 мкл ddH_20.
9) 1 мкл T4 DNA Ligase Buffer*.
10) 0,1 мкл BSA.
11) 0,4 мкл реакционной смеси, полученной на шаге I (содержит фосфорилированные двухцепочечные фрагменты ДНК).
12) 1 мкл плазмиды gRNA_Cloning_Vector_BsmBI.
13) 0,5 мкл T4 DNA Ligase.
14) 0,5 мкл *Bsm*BI.

Перемешайте содержимое пробирки пипетированием, затем инкубируйте в следующем температурном режиме:

15) 37 °C → 5 мин.
16) 20 °C → 5 мин.

17) Повторить шаги 1 и 2 15–35 раз.

Трансформация бактериальных клеток

18) Используйте 0,5–1 мкл продукта реакции II для трансформации компетентных клеток *E. coli*. Высадить трансформированные бактериальные клетки необходимо на чашку Петри на твердую агаризованную среду LB (20–25 мл), содержащую селективный антибиотик канамицин с конечной концентрацией 50 мкг/мл. Убрать чашки с бактериями в термостат, инкубировать при 37 °C в течение 12–18 ч.

19) Скрининг трансформантов

20) Выбрать 2–4 клона из полученных трансформантов. Нарастить соответствующие бактериальные культуры и выделите плазмидные ДНК как описано в руководствах к соответствующим наборам. Провести секвенирование плазмидной ДНК с использованием праймера M13F, чтобы удостовериться в корректности последовательности gRNA.

21) Наработка полученных векторов в препаративных масштабах

22) Для клонов, секвенограмма которых соответствует ожидаемой, провести наработку плазменной ДНК набором макси- или миди-«преп» в соответствии с протоколом, составленным производителем. Провести тестирование выделенной плазмидной ДНК при помощи гель-электрофореза.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ Я

Стандартная операционная процедура

«Тестирование клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол тестирования клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) экспрессируют гены, которые можно использовать как маркеры плюрипотентности.

Эмбриоидные тельца (ЭТ) – это сферические агрегаты, образуемые ПСК при культивировании в суспензионной культуре и имитирующие предимплантационную стадию развития эмбриона *in vitro*. В процессе культивирования ПСК в виде ЭТ, в них происходит экспрессия молекулярных маркеров, специфичных для трех зародышевых листков. Таким образом, формирование ЭТ, с их последующим анализом, являются общепризнанным методическим подходом для исследования клеток на плюрипотентность.

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол тестирования клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР, частично основанный на ранее опубликованных протоколах [1, 2].

Стандартная операционная процедура (СОП) «Тестирование клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР» разработан в качестве стандарта для обеспечения контроля контаминации клеточных линий человека и животных 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 протокола тестирования клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР.

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. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга с охлаждением и ротором для пробирок на 1,5 мл.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Камера для горизонтального электрофореза.
- Столик для выравнивания агарозного геля.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.
- Лед.
- Термоконтейнер (в том числе пенопластовые коробки).
- Микроволновая печь.
- Весы.
- Химическая стеклянная колба (термостойкая).

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.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Набор для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-color (×2) (Биолабмикс, МНС010-1020).
- Праймеры (Биосет).
- Набор реагентов RevertAid™ RT Kit для синтеза первой цепи кДНК (Thermo Fisher Scientific, K1691).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Реагент для выделения РНК TRI reagent (Sigma-Aldrich, T9424).
- Изопропанол.
- Хлороформ.
- 70 % этанол.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий.
- ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.
- ПСК и ЭТ человека.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением РНК из ПСК или ЭТ промыть их в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –80 ºС.
- ×50 ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации ×50 буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Агарозный гель для проведения электрофореза ДНК: взвесить 3 г агарозы и растворить в 100 мл ×1 буфера ТАЕ, нагревая раствор в микроволновой печи. Добавить раствор

бромистого этидия до рабочей концентрации 5 мкг/мл. Залить в столик для выравнивания геля и поместить лопатки для формирования карманов.

Тестирование клеток человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Выделение РНК

1) Лизировать ЭТ в 1 мл TRI Reagent, тщательно пропипетировать. Оставить на 5 мин при комнатной температуре.

2) Добавить 200 мкл хлороформа, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

3) Центрифугировать образцы 15 мин при 4 ºС и 12000 g. Смесь должна разделиться на 3 фазы: красную органическую (содержащую белки), промежуточную фазу (содержащую ДНК) и бесцветную водную фазу (содержащую РНК).

4) Перенести в новую пробирку водную фазу, содержащую РНК. Добавить 500 мкл изопропанола, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

5) Осадить РНК центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g и 4 ºС. Удалить супернатант.

6) Промыть полученный осадок РНК 1 мл 70 % этанола. Центрифугировать 5 мин при 7000 g и 4 ºС. Убрать супернатант.

7) Просушить осадок РНК при комнатной температуре в течение 10 мин и растворить в небольшом объеме воды (30–50 мкл). Измерить концентрацию РНК в образцах на спектрофотометре (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы РНК могут храниться при –80 ºС.

Синтез кДНК

Данный этап работы выполняется при помощи набора реагентов RevertAid™ RT Kit (Thermo Fisher Scientific).

8) Обработать Дезоксририбонуклеазой I (ДНКаза I) образцы с РНК для удаления возможных примесей геномной ДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 1 мкл ×10 реакционного буфера для ДНКазы, 1 мкл ДНКазы I, 1 мкг РНК и довести стерильной водой, не содержащей нуклеаз, до конечного объема 10 мкл. Инкубировать 30 мин при 37 ºС.

9) Обработанную ДНКазой РНК использовать для синтеза кДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 4 мкл ×5 реакционного буфера, 1 мкл смеси случайных гексамерных праймеров, 1 мкл ингибитора РНКазы, 2 мкл 10 мМ смеси деоксинуклеотидов, 1 мкл обратной транскриптазы, 2 мкл РНК (обработанной ДНКазой) и 9 мкл стерильной воды, не содержащей нуклеаз. Инкубировать 5 мин при 25 ºС, затем 1 ч при 42 ºС. Полученный раствор кДНК может храниться на –20 ºС.

ПЦР анализ

10) В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color – 25 мкл, прямой и обратный праймер (конечная концентрация каждого1 нМ), ДНК-матрица (количество 0,2–1 мкг), стерильная вода (до 50 мкл). Замешивать реакционные смеси для ПЦР следует в пробирках, помещенных в лед. Осторожно перемешать реакционную смесь и сбросить капли, используя центрифугу.

11) Прогреть термоциклер до 95 ºС и быстро переместить в него готовую реакционную смесь. Провести ПЦР в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 ºС 5 мин, денатурация – 95 ºС 30 с, отжиг 58 ºС 30 с, элонгация – 72 ºС 1 мин, финальная элонгация – 72 ºС 5 мин. Количество циклов 35. Все последовательности праймеров и соответствующая информация о них приведена в таблице Я.1.

Таблица Я.1 – Праймеры для тестирования ПСК и ЭТ человека на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Название гена	Прямой праймер, 5’→3’	Обратный прймер, 5’→3’
SOX1[2]	CACAACTCGGAGATCAGCAA	GGTACTTGTAATCCGGGTGC
PAX6[1]	GTCCATCTTTGCTTGGGAAA	TAGCCAGGTTGCGAAGAACT
MAP2[1]	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG	CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG
BRACHYURY[1]	AATTGGGTCCAGCCTTGGAAT	CGTTGCTCACAGACCACA
FLK[1]	TGATCGGAAATGACACTGGA	CACGACTCCATGTTGGTCAC
AFP[1]	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT	GCCACAGGCCAATAGTTTGT
SOX17[1]	CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACG	TAGTTGGGGTGGTCCTGCATGTGCTG
NANOG[2]	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
SOX2[2]	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
OCT4[2]	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
REX1[2]	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT
ACTIN	CAATGTGGCCGAGGAACTTTG	CATTCTCCTTAGAGAGAAGTGG

[1] Праймеры из [1]
[2] Праймеры из [2]

12) Поместить агарозный гель в камеру для электрофореза. Нанести по 8–10 мкл полученными ДНК-образцов в карманы агарозного геля. Для определения размеров амплифицированных продуктов нанести ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.

13) Провести горизонтальный гель-электрофорез при напряжении 5 В/см^2. Зафиксировать результаты ПЦР при помощи гель-документирующей системы.

В ПСК должны экспрессироваться гены-маркеры плюрипотентности: *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* и *REX1*. В полученных из ПСК ЭТ должна быть экспрессия молекулярных маркеров всех трех зародышевых листков: *SOX1*, *PAX6*, *MAP2* – маркеры эктодермы, *BRACHYURY*, *FLK1* – маркеры мезодермы, *AFP*, *SOX17* – маркеры энтодермы. *ACTIN* – ген домашнего хозяйства, используется в качестве контроля.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» использованы следующие литературные источники:

1 Huangfu D., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Snitow M., Chen A.E., Melton D.A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds // Nat Biotechnol. 2008. 26. 795–797.

2 Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. 131. 861–872.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Стандартная операционная процедура

«Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР»

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

Содержание и назначение: Определяет протокол тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) экспрессируют гены, которые можно использовать как маркеры плюрипотентности.

Эмбриоидные тельца (ЭТ) – это сферические агрегаты, образуемые ПСК при культивировании в суспензионной культуре и имитирующие предимплантационную стадию развития эмбриона *in vitro*. В процессе культивирования ПСК в виде ЭТ, в них происходит экспрессия молекулярных маркеров, специфичных для трех зародышевых листков. Таким образом, формирование ЭТ, с их последующим анализом, являются общепризнанным методическим подходом для исследования клеток на плюрипотентность.

В настоящей СОП описан подробный оптимизированный протокол тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР» разработан в качестве стандарта для обеспечения контроля контаминации клеточных линий человека и животных 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 протокола тестирования клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР.

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. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Центрифуга с охлаждением и ротором для пробирок на 1,5 мл.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Камера для горизонтального электрофореза.
- Столик для выравнивания агарозного геля.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Гель-документирующая система BioRad ChemiDoc MP (BioRad).
- Металлический держатель для пробирок на 200 и 500 мкл.
- Лед.
- Термоконтейнер (в том числе пенопластовые коробки).
- Микроволновая печь.
- Весы.
- Химическая стеклянная колба (термостойкая).

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.

- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Набор для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-color (2X) (Биолабмикс, МНС010-1020).
- Праймеры (Биосет).
- Набор реагентов RevertAid™ RT Kit для синтеза первой цепи кДНК (Thermo Fisher Scientific, K1691)
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Реагент для выделения РНК TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424).
- Изопропанол.
- Хлороформ.
- 70 % этанол.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий.
- ДНК-маркер 100–1500 п.о.
- ПСК и ЭТ мыши.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением РНК из ПСК или ЭТ промыть их в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –80 °С.
- 50X ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации 50X буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Агарозный гель для проведения электрофореза ДНК: взвесить 3 г агарозы и растворить в 100 мл ×1 буфера ТАЕ, нагревая раствор в микроволновой печи. Добавить раствор

бромистого этидия до рабочей концентрации 5 мкг/мл. Залить в столик для выравнивания геля и поместить лопатки для формирования карманов.

Тестирование клеток мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Выделение РНК

1) Лизировать ЭТ в 1 мл TRI Reagent, тщательно пропипетировать. Оставить на 5 мин при комнатной температуре.

2) Добавить 200 мкл хлороформа, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

3) Центрифугировать образцы 15 мин при 4 °С и 12000 g. Смесь должна разделиться на 3 фазы: красную органическую (содержащую белки), промежуточную фазу (содержащую ДНК) и бесцветную водную фазу (содержащую РНК).

4) Перенести в новую пробирку водную фазу, содержащую РНК. Добавить 500 мкл изопропанола, перемешать и инкубировать 10 мин при комнатной температуре.

5) Осадить РНК центрифугированием в течение 10 мин при 12000 g и 4 °С. Удалить супернатант.

6) Промыть полученный осадок РНК 1 мл 70 % этанола. Центрифугировать 5 мин при 7000 g и 4 °С. Убрать супернатант.

7) Просушить осадок РНК при комнатной температуре в течение 10 мин и растворить в небольшом объеме воды (30–50 мкл). Измерить концентрацию РНК в образцах на спектрофотометре (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы РНК могут храниться при –80 °С.

Синтез кДНК

Данный этап работы выполняется при помощи набора реагентов RevertAid™ RT Kit (Thermo Fisher Scientific).

8) Обработать дезоксририбонуклеазой I (ДНКаза I) образцы с РНК для удаления возможных примесей геномной ДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 1 мкл 10X реакционного буфера для ДНКазы, 1 мкл ДНКазы I, 1 мкг РНК и довести стерильной водой, не содержащей нуклеаз, до конечного объема 10 мкл. Инкубировать 30 мин при 37 °С.

9) Обработанную ДНКазой РНК использовать для синтеза кДНК. В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты: 4 мкл 5X реакционного буфера, 1 мкл смеси случайных гексамерных праймеров, 1 мкл ингибитора РНКазы, 2 мкл 10 мМ смеси деоксинуклеотидов, 1 мкл обратной транскриптазы, 2 мкл РНК (обработанной ДНКазой) и

9 мкл стерильной воды, не содержащей нуклеаз. Инкубировать 5 мин при 25 °С, затем 1 ч при 42 °С. Полученный раствор кДНК может храниться на –20 °С.

ПЦР анализ

10) В тонкостенные пробирки для ПЦР добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color – 25 мкл, прямой и обратный праймер (конечная концентрация каждого1 нМ), ДНК-матрица (количество 0,2–1 мкг), стерильная вода (до 50 мкл). Замешивать реакционные смеси для ПЦР следует в пробирках, помещенных в лед. Осторожно перемешать реакционную смесь и сбросить капли, используя центрифугу.

11) Прогреть термоциклер до 95 °С и быстро переместить в него готовую реакционную смесь. Провести ПЦР в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 ºС 5 мин, денатурация – 95 °С 30 с, отжиг 58 °С 30 с, элонгация – 72 °С 1 мин, финальная элонгация – 72 °С 5 мин. Количество циклов 35. Все последовательности праймеров и соответствующая информация о них приведена в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Праймеры для тестирования ПСК и ЭТ мыши на плюрипотентность с помощью ОТ-ПЦР

Название гена	Прямой праймер, 5’→3’	Обратный пріймер, 5’→3’
Sox17	TTTGTGTATAAGCCCGAGATGG	AAGATTGAGAAAACACGCATGAC
Foxa2	TGGCTGCAGACACTTCCTACT	CAACATCAGTACAACCCTCTGGT
Transferrin	TCCTGCTGATTCCGAATG	TGGCACAGGAACACTTTG
Brachyury	AACTTTCCTCCATGTGCTGAGAC	TGACTTCCCAACACAAAAAGCT
Goosecoid	ATGCTGCCCTACATGAACGT	CAGTCCTGGGCCTGTACATT
Nestin	CTCTCCCTGACTCTACTCCCT	CATCTTCTTCCTCTCCCTCTT
Neurofilament	GGAAAATGAACTTCGGGG	GAGGGCTGTCGGTGTGTG
Nanog	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Oct4	CTCGAACCACATCCTTCTCT	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC
Esg1	GAAGTCTGGTTCCTTGGCAGGATG	ACTCGATACACTGGCCTAGC
Rex1	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT
Actin	ACGCACGATTTCCCTCTCAGC	GGCCCAGAGCAAGAGAGGTATCC

12) Поместить агарозный гель в камеру для электрофореза. Нанести по 8–10 мкл полученными ДНК-образцов в карманы агарозного геля. Для определения размеров амплифицированных продуктов нанести ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.

13) Провести горизонтальный гель-электрофорез при напряжении 5 В/см^2. Зафиксировать результаты ПЦР при помощи гель-документирующей системы.

В ПСК должны экспрессироваться гены-маркеры плюрипотентности: *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Esg1* и *Rex1* [1]. В полученных из ПСК ЭТ должна быть экспрессия молекулярных маркеров всех трех зародышевых листков: *Nestin*, *Neurofilament* – маркеры эктодермы, *Brachyury*, *Goosecoid* – маркеры мезодермы, *Sox17*, *Foxa2*, *Transferrin* – маркеры энтодермы. *Actin* – ген домашнего хозяйства, используется в качестве контроля.

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий мыши и животных» 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Стандартная операционная процедура «STR-профилирование клеток человека»

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

Содержание и назначение: определяет протокол STR-профилирования клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Для идентификации линий клеток человека необходимо использовать полиморфные маркеры ДНК. COrDIS Plus – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 19 локусов, содержащих короткие тандемные повторы (STR-локусы) и локуса гена амелогенина в геномной ДНК человека. Из 19 анализируемых STR-локусов 13 составляют стандартную панель CODIS (системы комбинированного индекса ДНК: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, и VWA), 5 локусов рекомендованы ENFSI (Европейской Сетью Институтов Криминалистики) для расширения европейских национальных баз данных (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 и D22S1045) и локус SE33 - наиболее полиморфный из известных STR-маркеров. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20 локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов < 420 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены четырьмя флуоресцентными красителями детектируемыми в каналах Blue, Green, Yellow, Red. Стандарт длины S550 мечен пятым, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале Orange одновременно с продуктами ПЦР.

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. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Термошейкер для пробирок 1,5 мл.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Лед.
- Термоконтейнер (в том числе пенопластовые коробки).

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.

- Набор реагентов для STR-профилирования ДНК человека COrDIS Plus (Gordis, CP-192S).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.

- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Протеиназа К.
- Лизирующий буфер.
- Вакуумная смазка (Corning).
- Изопропанол.
- 70 % этанол.
- Фенол.
- Хлороформ.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий.
- ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.
- Клеточная суспензия, полученная при пересадке соответствующих линий.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением ДНК клеточную суспензию промыть в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на –20 ºС до момента выделения ДНК.
- 50X TAE буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации 50X буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Лизирующий буфер: Tris-HCl pH 7,5 10 мМ, ЭДТА 10 мМ, NaCl 10 мМ, SDS 0,5 %.

STR-профилирование клеток человека

Выделение ДНК

1) К клеточному осадку добавить лизирующий буфер из расчёта 300 мкл на образец и протеиназу К в рабочей концентрации 100 мкг/мл.

2) Пробирки поместить в термошейкер при 55 ºС и 500–700 об/мин и дождаться полного растворения образцов (1–2 ч).

3) К полученному клеточному лизату добавить фенол и хлороформ в соотношении 1:1 (объем каждого раствора должен быть не менее 300 мкл) и перемешать. К каждому образцу добавить вакуумной смазки (~ шарик с диаметром до 0.5 см).

4) Центрифугировать при 14000 g 10 мин. Полученный супернатант, располагающийся над слоем вакуумной смазки, перенести в чистую пробирку.

5) Добавить 1 мл изопропанола, перемешать и центрифугировать при 14000 g 10 мин. Убрать супернатант и промыть полученный осадок ДНК 1 мл 70 % этанола.

6) Убрать супернатан и просушить осадок ДНК в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Растворить осадок ДНК в небольшом объеме деионизованной воды (20–50 мкл) и измерить концентрацию (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы ДНК могут храниться при –20 ºС.

STR-профилирование

7) В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Затем внести до 20 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0,2–2 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – 0,5 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет 20 мкл. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

8) После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать до гомогенного состояния 5–8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. При необходимости, собрать раствор на дне пробирки коротким центрифугированием. Тщательное перемешивание необходимо для максимальной эффективности реакции.

9) С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контроль (0,5 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один отрицательный контроль (деионизованная вода вместо ДНК).

10) Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева 0,3 °С/с. на этапе повышения с температуры с 59 до 72 °С. В связи с высокой сложностью амплификации с участием большого количесва пар праймеров данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.

11) 94 °С 3 мин

12) 98 °С 30 с

13) 59 °С 120 с 4 цикла

14) 72 °С 90 с

15) 94 °С 30 с

16) 59 °C 120 с 6 циклов
17) 72 °C 90 с
18) 90 °C 30 с
19) 59 °C 120 с 18 циклов
20) 72 °C 75 с
21) 68 °C 10 мин
22) 15 °C ∞
23) Рекомендуемая скорость нагрева с 59 до 72 °C – не более 0,3 °C/1 с.
24) Отдать образцы для проведения капиллярного электрофореза.
25) Проанализировать результаты.

При подготовке СОП «STR-профилирование клеток человека» использованы следующие литературные источники:

1 GORDIZ [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://gordiz.ru/index.php/produkty/kriminalistika/analiz-str-lokusov-cheloveka/3-cordis-plus, свободный. — Загл. с экрана.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Стандартная операционная процедура «Иммуноцитохимический анализ плюрипотентных стволовых клеток»

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

Содержание и назначение: определяет протокол иммуноцитохимического анализа плюрипотентных стволовых клеток

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Стандартная операционная процедура (СОП) «Иммуноцитохимический анализ плюрипотентных стволовых клеток» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного анализа плюрипотентных стволовых клеток 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 протокола иммуноцитохимического анализа плюрипотентных стволовых клеток.

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных. В качестве базового протокола использовали [1].

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.

- Микроскоп Axio Imager.M1 (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- 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.
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- BSA (bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин) (Sigma-Aldrich, A3311).
- Планшет 12-луночный, для работы с адгезивными культурами клеток (Eppendorf, 0030722019).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.
- Пробирки стерильные 50 мл (Corning, 430291).
- Parafilm® M (парафильм), 5 см x 7600 см.
- Параформальдегид (ПФА) (Sigma Aldrich, P6148).
- Тритон X-100 (Медиген, A4975,0100).
- Tween 20 (Sigma, P9416-50ML).
- Стекла предметные (Thermo Fisher Scientific, 10143562BEF).
- Первичные антитела (приведены в таблице 3.1).
- Вторичные антитела (приведены в таблице 3.1).
- Краситель DAPI.
- ProLong® Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, P36934).
- Коробки для хранения предметных стекол.

- Маленький пинцет.
- Бумажные полотенца.

Таблица 3.1 – Антитела для иммуногистохимического анализа ЦО

Название	Кат. номер	Производитель
Первичные антитела		
Anti-Oct4 antibody	ab19857	Abcam
Anti-Nanog antibody	ab21624	Abcam
Anti-Sox2 antibody	ab97959	Abcam
Anti-TRA1-60 antibody	ab16288	Abcam
Anti-SSEA antibody	ab16287	Abcam
Anti-TRA1-81 antibody	41-1100	Thermo Fisher Scientific
Anti-E-Cadherin antibody	13-1700	Thermo Fisher Scientific
Вторичные антитела		
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488	A32723	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A11003	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546	A-11010	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	A11008	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647	A32733	Thermo Fisher Scientific

- Культура плюрипотентных стволовых клеток, выращенных на покровных стеклах (Thermo Fisher Scientific, A10143263NR1, ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН).

Подготовка материалов

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя.
- Параформальдегид 4 %: нагреть 4/5 объема НФБ до ~60 ºСС при помешивании, добавить 4 % параформальдегида и несколько капель 1 М NaOH, растворить, долить НФБ и довести с помощью HCl pH до 6,9. Сделать аликвоты и заморозить на –20 ºС.
- Тритон Х-100 0,1 %: в 10 мл НФБ добавить 10 мкл тритон Х-100. Тщательно перемешать.
- Блокирующий буфер (5 % BSA): в 10 мл НФБ растворить 500 мг альбумина. Тщательно перемешать.
- Буфер для нанесения антител готовится на основе НФБ, куда добавляют 2,5 % BSA, 0,1 % Tween 20.
- Антитела разводят в концентрации, указанной в инструкции производителя, в буфере для нанесения антител.
- Буфер для отмывок: НФБ с добавлением 0,2 % Tween 20.
- Раствор DAPI: 5 мкл DAPI растворить в 10 мл НФБ.

Иммуноцитохимический анализ плюрипотентных стволовых клеток

1) Для иммуноцитохимического анализа плюрипотентные стволовые клетки должны быть выращены на покровных стеклах в лунках 12-луночного планшета.

2) В лунки 12-луночного планшета добавить 4 % раствор ПФА по 1 мл на лунку на 15 мин при комнатной температуре.

3) Промыть препараты 1 мл НФБ три раза по 5 мин. Для последующего хранения залить препараты НФБ и замотать 12-луночный планшет парафильмом для предотвращения испарения буфера. Хранить препараты в таком виде можно не более 1 месяца при 4 ºС.

4) В лунки 12-луночного планшета налить блокирующий буфер 1 мл на стекло, инкубировать 1 ч при комнатной температуре.

5) Удалить блокирующий буфер. Нанести 300 мкл раствора первичных антител, инкубировать ночь при 4 ºС.

6) Промыть стекла 1 мл буфера для отмывок три раза по 5 мин.

7) Нанести 300 мкл раствора вторичных антител, инкубировать 1–2 ч при комнатной температуре. Все манипуляции со вторичными антителами и окрашенными ими препаратами проводить в темноте.

8) Промыть стекла 1 мл буфера для отмывок три раза по 5 мин.

9) Для окраски ядер нанести 300 мкл раствора DAPI и инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Промыть стекла 1 мл НФБ три раза по 5 мин.

10) Промыть стекла 1 мл дистиллированной воды.

11) Просушить препараты в течение 10 мин, оставив на рабочем столе. Нанести 7 мкл ProLong® Gold Antifade Mountant на предметное стекло и накрыть окрашенным препаратом. Готовые стекла (в горизонтальном положении) положить в коробку и оставить на ночь при 4 ºС.

12) Флуоресцентная микроскопия полученных препаратов с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Axio Imager.M1 Zeiss (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН).

13) Обработка и анализ изображений (ImageJ, PhotoShop, ZEN).

При подготовке СОП «Получение гибридных клеток» использованы следующие литературные источники:

1 Gridina M.M., Serov O.L. Bidirectional reprogramming of mouse embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells is initiated at the heterokaryon stage // Cell Tiss Res. 2010. 342. 377–389.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Стандартная операционная процедура «Элиминация микоплазмы из культур клеток»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения элиминация микоплазмы из культур клеток

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Культивирование клеток проводится в условиях, близких к стерильным, однако иногда культуры клеток контаминируются бактериями или грибами. Для предотвращения роста бактерий в среду для культивирования добавляют антибиотики, обычно это смесь пенициллина и стрептомицина, хотя риск контаминации сохраняется даже при соблюдении всех правил безопасности. Кроме того, некоторые лаборатории даже рекомендуют постоянно вести культуры без антибиотиков, так как в некоторых случаях бактерии могут выживать в присутствии антибиотиков, и, постепенно приобретать к ним устойчивость. Среди особо злостных патогенов следует выделить микоплазму – смесь эндосимбиотических бактерий, не имеющую клеточной стенки. Контаминация клеточных культур микоплазмой осложняется тем, что изменяется физиологическое состояние клеток, и, нередко, возникают перестройки хромосом. Исследования, проведенные на клетках, зараженных микоплазмой, не могут быть полноценными, поскольку искажаются физиологические параметры клеток [1]. Для обнаружения контаминации клеток оптимально использовать чувствительные молекулярно-биологические методы, например, ПЦР. В случае контаминации уникальных культур клеток необходимо проводить лечение культур.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Элиминация микоплазмы из культур клеток» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК мыши 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 элиминации микоплазмы из культур 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.: 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.

- Водяная баня.

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Для культивирования клеток используются стандартные реактивы. Для элиминации микоплазмы используется коммерческий набор антибиотиков.

- BM Cyclin (Sigma-Aldrich, 10 799 050 001).

Подготовка материалов

- Развести лиофилизированные компоненты BM Cyclin в соответствии с рекомендациями производителя.

Элиминация микоплазмы из культур клеток

Для элиминации микоплазмы из культур клеток проводится стандартное культивирование в течение двух недель с добавлением антибиотиков из набора BM Cyclin по графику. При пересадке клеток между добавлением антибиотика BM Cyclin добавляется дополнительно.

1) День 0 – BM Cyclin 1 4 мкл/мл среды для культивирования.
2) День 3 – BM Cyclin 2 4 мкл/мл среды для культивирования.
3) День 7 – BM Cyclin 1 4 мкл/мл среды для культивирования.
4) День 10 – BM Cyclin 2 4 мкл/мл среды для культивирования.

При подготовке СОП «Элиминация микоплазмы из культур клеток» использованы следующие литературные источники:

1 Drexler H.G., Uphoff C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention // Cytotechnology. 2002. 39(2). 75–90.