

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.: Стандартиформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности, проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов:

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей.

- 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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
Кроличыи 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 общеприкладного 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 °С 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 X-100 0,8 % (стоковый раствор): в 100 мл НФБ добавить 80 мкл тритон X-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 парафилом 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 парафилом 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 3X3 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 О.С.Т. 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 буфера при помощи небольших кусочков бумажного полотенца. Нанести 100 мкл раствора первичных антител, накрыть парафильмом и инкубировать ночь при 4 °С.

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 °С.

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.