

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.: 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.

- Микроскоп Axio Imager.M1 (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.
- 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 °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 0,1 % : в 10 мл НФБ добавить 10 мкл тритон X-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 °С.
- 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 °С.
- 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 °С.

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.