

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

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

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

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Данный протокол описывает основные этапы подготовки плюрипотентных
стволовых клеток мышы для выдачи исследователям в виде живой культуры или в ампулах
для криозаморозки. Протокол применим для плюрипотентных стволовых клеток (ПСК)
мышы: 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 мышы к выдаче» разработана в качестве стандарта для обеспечения
качественного процесса выдачи ПСК мышы для ЦКП «Коллекция плюрипотентных
культур клеток человека и млекопитающих общобиологического и биомедицинского
направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации
подготовки плюрипотентных стволовых клеток мышы 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.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ и 37 °С).
- Термостат на 37 °С.
- Холодильники на –80 °С, –20 °С и +4 °С.
- 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./см².

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./см².

5) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в СО₂-инкубатор.

Разморозка ПСК мыши

б) 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.