

Стандартная операционная процедура «Получение эмбрионидных 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 эмбрионидных телец из плюрипотентных стволовых клеток мыши

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Эмбрионидные 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 эмбрионидных 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 эмбрионидных 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.: 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. 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<sub>2</sub>-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С).
- Термостат на 37 °С.
- Холодильники на –20 °С и +4 °С.
- 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, TSP011024).
- 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 эмбрионидных 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 эмбрионидных 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.