

## 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.

Эмбрионидные 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 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.
- Термоконтэйнер (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 °С.
- ×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 °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 Дезоксирибонуклеазой I (ДНКазы 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 °С.
- 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 дезоксинуклеотидов, 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 каждого 1 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 °С 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 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 праймер, 5'→3'
SOX1 <sup>2</sup>	CACAACCTCGGAGATCAGCAA	GGTACTTGTAATCCGGGTGC
PAX6 <sup>1</sup>	GTCCATCTTTGCTTGGGAAA	TAGCCAGGTTGCGAAGAACT
MAP2 <sup>1</sup>	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGA GAGTG	CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG
BRACHYUR <sup>1</sup>	AATTGGGTCCAGCCTTGGGAAT	CGTTGCTCACAGACCACA
FLK <sup>1</sup>	TGATCGGAAATGACACTGGA	CACGACTCCATGTTGGTCAC
AFP <sup>1</sup>	AAATGCGTTTCTCGTTGCTT	GCCACAGGCCAATAGTTTGT
SOX17 <sup>1</sup>	CGCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACG	TAGTTGGGGTGGTCCTGCATGTGCTG
NANOG <sup>2</sup>	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
SOX2 <sup>2</sup>	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
OCT4 <sup>2</sup>	TCTTTCACCAAGGCCCGGCTC	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
REX1 <sup>2</sup>	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA	TATGACTCACTCCAGGGGGCACT
ACTIN	CAATGTGGCCGAGGAACTTTG	CATTCTCCTTAGAGAGAAGTGG
<sup>1</sup> Праймеры из [1] <sup>2</sup> 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<sup>2</sup>. 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.