

Стандартная операционная процедура  
«Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки»

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

Содержание и назначение: Протокол цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

В 1993 году в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены эмбриональные стволовые клетки ценного пушного зверя, американской норки (*Neovison vison*) [1]. В 2015 году мы получили индуцированные стволовые клетки американской норки и показали репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов [2]. Одно из ключевых свойств ПСК – способность сохранять стабильный кариотип *in vitro*. Однако при длительном культивировании многие линии ПСК накапливают большое число хромосомных нарушений (трисомий, делеций, дупликаций и т. д.), которые негативно влияют на плюрипотентные свойства клеток [2]. Поэтому для характеристики ПСК необходимо использовать методы классической цитогенетики: подсчет хромосом и анализ метафазных пластинок на основе окраски DAPI.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток норки для ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общеприкладного и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в унификации протокола цитогенетического анализа плюрипотентных стволовых клеток норки. 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

- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Пипеточный дозатор 0,5–100 мл.
- Центрифуга для пробирок 10 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.
- Флуоресцентный микроскоп, оборудованный охлаждаемой CCD-камерой.
- Система обработки изображений ISIS (MetaSystems).
- Вентилятор с подогревом.
- Персональный компьютер для систем Ikaros и Isis.

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.

- Демеколцин (колцемид) (ROCHE 10295892001).
- KCL.
- NaCl.

- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ .
- Трипсин-ЭДТА 0,25 % (Thermo Fisher Scientific, 25200-056).
- Ледяная уксусная кислота.
- Метанол.
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Чашка Петри диаметром 60 мм
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Центрифужные пробирки с коническим дном, объемом 10 мл.
- Пробирки на 1,5 мл.
- Предметные стекла (76 × 26 мм).
- Покровные стекла (24 × 24 мм).
- Глицерин.
- DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane).
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).
- Высокие стеклянные стаканы на 50 мл – 10 штук.

#### *Подготовка материалов*

- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавировать.
- Приготовить фиксатор метанол:уксусная кислота (3:1), держать на льду.
- Приготовить гипотонический раствор: 0,56 % KCl в воде.
- Приготовить раствор 20 × SSC из 175,3 г NaCl и 88,2 г  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  в 1 л воды. Довести pH до 7,0–7,1. Автоклавировать. Из 20 × SSC приготовить 2 × SSC, разведя водой в 10 раз.
- Приготовить антифейд (1 % DABCO на 90 % глицерине в НФБ).
- Приготовить стоковый раствор 0,2 % DAPI на 2 × SSC (хранить на 4 °C).
- Приготовить рабочий раствор DAPI на 2 × SSC. Растворить 25 мл стокового раствора в 50 мл 2 × SSC.

#### Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки

##### День 1. Фиксация клеток

- 1) В культуральную среду стерильно добавить колцемид, 0,1 мкг/мл.
- 2) Спустя 3 ч клетки промыть PBS и нанести раствор трипсина 0,25 % в PBS, выдержать 8–10 мин.
- 3) Клетки снять пипетированием в 10 мл центрифужную пробирку.
- 4) Центрифугировать на 1000 об/мин 5 мин. Супернатант слить.

- 5) К осадку добавить гипотонический раствор 3 мл (0,56 % KCl) и поставить в термостат на 37 °С на 15 мин.
- 6) После этого в пробирку добавить несколько (2–3) капель свежеприготовленного фиксатора (3:1 метанол – уксусная кислота).
- 7) Суспензию центрифугировать (1000 об/мин, 5 мин). Супернатант слить.
- 8) К осадку добавить, охлажденный во льду, свежеприготовленный фиксатор. Поставить в лед на 20 мин.
- 9) Клетки пипетировать и центрифугировать (1000 об/мин, 5 мин). Супернатант слить.
- 10) К осадку снова добавить фиксатор, пипетировать и поставить на лед еще на 10 мин.
- 11) Повторить п. 8.
- 12) К осадку добавить фиксатор, пипетировать и раскапать на охлажденные влажные стекла.
- 13) Стекла высушить под теплым воздухом из вентилятора.
- 14) Положить в сухое, прохладное место примерно на сутки.
- 15) День 2. Окраска препаратов
- 16) Препараты поместить в стакан с раствором DAPI на 5 мин. Затем прополоскать последовательно в  $2 \times$  SSC и воде.
- 17) Высушить.
- 18) Нанести раствор антифейда и закрыть покровным стеклом.
- 19) Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе.
- 20) День 3–4. Анализ метафазных пластинок
- 21) Сфотографировать 50–60 метафазных пластинок.
- 22) Произвести подсчет хромосом на 40–50 метафазных пластинках, 10–20 из которых использовать для кариотипического анализа.

При подготовке СОП «Цитогенетический анализ плюрипотентных стволовых клеток норки» использованы следующие литературные источники:

1 Sukoyan M.A., Vatolin S.Y., Golubitsa A.N., Zhelezova A.I., Semenova L.A., Serov O.L. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies // Mol Reprod Dev. 1993. 36(2). 148–158.

2 Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cirera S., Anistoroaei R., Serov O.L.

Comparison of American mink embryonic stem and induced pluripotent stem cell transcriptomes  
// BMC Genomics. 2015. 16 Suppl 13:S6.