Стандартная операционная процедура «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки»

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

Содержание и назначение: определяет протокол получения индуцированных стволовых клеток американкой норки

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 году Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 году Яманака получил индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) мыши из фибробластов с помощью всего лишь четырех транскрипционных факторов: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc. Получение ИПСК поставило вопрос о полноте репрограммирования: остаются ли активными гены, экспрессирующиеся в исходных фибробластах? И насколько характеристики ИПСК соответствует эмбриональным стволовым (ЭС) клеткам, которые в данном случае являются стандартом. В настоящее время ИПСК получены для десятков видов животных, однако ЭС клетки – менее чем для двадцати. В 1993 в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены ЭС клетки ценного пушного зверя, американской норки (*Neovison vison*) [1]. Это создало уникальную возможность сравнить индуцированные и полученные из эмбриона плюрипотентные клетки. В 2015 году мы получили ИПСК американской норки и показали репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов: часть генов были успешно репрограммированы, часть имела промежуточную между фибробластами и ЭС клетками экспрессию, часть не репрограммировалась и, наконец, присутствовали гены, экспрессия которых отличалась от обоих типов клеток [2]. Таким образом, для еще одного вида животных появилась возможность изучать плюрипотентность и дифференцировку на двух типах плюрипотентных клеток: ЭС и ИПСК. В настоящей СОП описан подробный протокол получения ИПСК американской норки с использованием векторов, несущих гены *OCT4, KLF4, SOX2* и *c-MYC* человека.

Стандартная операционная процедура (СОП) «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки» разработан в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса получения ИПСК американской норки для ЦКП

«Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (Коллекции) ИЦиГ СО РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры состоит в получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской 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. 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.
- CO_2-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO_2 и 37 ºС).
- Термостат на 37 ºС.
- Холодильники на –80 ºС, –20 ºС и +4 ºС.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.
- Проточный цитофлуориметр.

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).
- Среда DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 31331-093).
- Среда MEM α с GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 32571-093).
- 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).
- Натрий-фосфатный буфер (НФБ) (Amresco, Am-E404-100).
- Желатин (Sigma, G1890).
- Митомицин С (Sigma, M4287).
- Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific, 11058021).
- ДМСО (диметилсульфоксид) (Amresco, Am-0231).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).

- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- 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).
- 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 0,5 и 1,5 мл.
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,22 микрометра (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0,45 микрометра (Jet Biofil, FPV403030).
- Шприц пластиковый стерильный, 10 мл.
- Шприц пластиковый стерильный, 1 мл, с иглой 26GX5/8.
- Пробирки стерильные, 5 мл (Axygen, SCT-5ML-S).
- Пробирки стерильные, 50 мл (Corning, 430291).
- Криопробирки, 1,8 мл (SSIbio, 6222-S0).
- Гипохлорит натрия («Белизна», «Domestos гель»).
- Пакеты для отходов автоклавируемые, класс «Б».
- Обработанные митомицином С эмбриональные фибробласты мышей линии CD-1 (фидерные клетки) (см. протокол приготовления в разделе Приготовление материалов).
- Клетки линии Phoenix-AMPHO (ATCC, CRL-3213), Phoenix-ECO (ATCC, CRL-3214), Phoenix-GP (ATCC, CRL-3215) или 293T (ATCC, CRL-3216).
- Эмбриональные фибробласты *N. vison*.
- Лентивирусные упаковочные плазмиды и векторы: pMDLg/pRRE (Addgene, 12251), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pLeGO-G2 (Addgene, 25917), pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2 и pLeGO-hc-MYC.

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 ºС FBS, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 пенициллин-

стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

- Среда для культивирования эмбриональных фибробластов американской норки (ЭФН) (среда для ЭФН): среда МЕМ α, 15 % FBS, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК американской норки (среда для ИПСК): среда МЕМ α, 15 % FBS для ЭС клеток, ×1 GlutaMAX, ×1 NEAA, ×1 2-меркаптоэтанол, ×1 пенициллин-стрептомицин.
- 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 ºС 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 ºС, при +4 ºС хранить не более двух недель.
- Вальпроевая кислота: развести 81,31 мг в 5 мл автоклавированной бидистиллированной воды (100 мМ), профильтровать через фильтр 0,22 мкм, аликвотировать и заморозить на –20 ºС. Рабочая концентрация 1 мМ.
- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор ×500).
- Гипохлорит натрия (дезинфицирующий раствор): приготовить 20 % раствор «Белизны» или «Domestos гель», хранить не более недели.
- 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» 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./см^2.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки

День –6. Разморозка ЭФН; Разморозка клеток Phoenix

Разморозка ЭФН

1) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФН.

2) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФН и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

3) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку. Площадь рассадки должна соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, например, при заморозке ЭФН с плотностью 90 % с 6-луночной ячейки (около 10 $см^2$) разморозку также проводить на одну ячейку.

4) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Разморозка клеток Phoenix

5) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для Phoenix.

6) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с клетками Phoenix и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

7) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на 6-луночный планшет с 2 мл среды на лунку (или чашку Петри с 10 мл среды). Площадь рассадки может соответствовать площади, с которой клетки были сняты на заморозку, или быть больше.

8) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

День –3. Пересадка ЭФН; Пересадка клеток Phoenix

Пересадка ЭФН

9) ЭФН должны иметь плотность 70–95 %. Убрать культуральную среду, промыть НФБ, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 ºС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

10) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для ЭФН до образования суспензии единичных клеток и рассадить в соотношении 1:2–1:4.

Пересадка клеток Phoenix

11) Убрать культуральную среду, аккуратно промыть НФБ не допуская открепления клеток, добавить трипсин-ЭДТА, чтобы раствор при покачивании плато покрывал клетки, и перенести в термостат на 37 ºС. Каждую минуту покачивать клетки и контролировать открепление от пластика под микроскопом.

12) После округления клеток ресуспендировать в 20–30 кратном избытке среды для клеток Phoenix до образования суспензии единичных клеток и рассадить по 0,7–1,3 млн кл./10 $см^2$ на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета. Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

День –2. Трансфекция клеток Phoenix

13) Добавить в 1,5 мл пробирку 625 мкл Opti-MEM I и 28 мкл Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать.

14) Добавить в пять 1,5 мл пробирок по 125 мкл Opti-MEM I, смесь упаковочных плазмид pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и pCMV-VSV-G и, в индивидуальные пробирки, векторы: pLeGO-hKLF4, pLeGO-hSOX2, pLeGO-hOCT3/4, pLeGO-hc-MYC и pLeGO-G2 (всего 2,5 мкг ДНК), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро отцентрифугировать. Добавить по 5 мкл реагента P3000 (входит в комплект Lipofectamine 3000), перемешать на вортексе несколько секунд и быстро сбросить на центрифуге. Соотношение количества ДНК плазмид следующее: pRSV-Rev:pMDLg/pRRE:pCMV-VSV-G:Vector = 5:10:2:10. На лунку 6-луночного планшета необходимо 2,5 мкг ДНК и 5 мкл P3000.

15) Добавить смесь ДНК и P3000 к раствору Lipofectamine 3000, перемешать на вортексе несколько секунд, подождать 10–15 мин.

16) Аккуратно поменять среду клеткам Phoenix на среду для Phoenix без добавления пенициллина-стрептомицина (2 мл среды на лунку 6-луночного планшета), клетки не должны отслоиться от поверхности.

17) По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO_2-инкубатор.

День –1. Пересадка ЭФН; смена среды клеткам Phoenix

Пересадка ЭФН

18) Рассадить ЭФН на три (или больше) лунок 6-луночного планшета в концентрации 15 тыс кл./$см^2$ (150 тыс кл./лунку). Остатки заморозить. Одна лунка будет использоваться для определения MOI (multiplicity of infection, «число вирусов на клетку») по свечению GFP, вторая лунка – как отрицательный контроль свечения GFP и, при желании, как отрицательный безвирусный контроль получения ИПСК, остальные лунки – для получения ИПСК.

19) Заморозка ЭФН: после снятия клеток и центрифугирования осадок ресуспендировать вибрацией или в 20 мкл среды, мягко ресуспендировать в 1 мл среды для заморозки, поместить в криоконтейнер и сразу поставить на –80 ºС. На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.

Смена среды клеткам Phoenix

20) Аккуратно отобрать среду в стеклянную банку с гипохлоритом натрия и добавить по 2 мл среды для Phoenix без пенициллина-стрептомицина. Не допускать пересушивания и отслоения клеток. Для дезинфекции вирусов необходимо среды и пластик, контактировавшие с вирусами, помещать в 1 % раствор гипохлорита натрия (20 % разведение «Белизны» или «Доместос» в воде, готовить свежий раствор каждую неделю). После дезинфекции необходимо проводить автоклавирование. Автоклавирование всех выбрасываемых материалов проводится до дня 7 культивирования.

День 0. Трансдукция ЭФН; смена среды клеткам Phoenix

21) Собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* (OKSM), в пробирку 50 мл, среду с *GFP* – в пробирку 5 мл. Поменять среду клеткам Phoenix, если планируется повторная трансдукция на день 1.

22) Профильтровать среду с лентивирусными векторами OKSM через фильтр 0,45 мкм в 50 мл пробирку, добавить равный объем среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

23) Профильтровать среду с лентивирусным вектором GFP через фильтр 0,45 мкм в 5 мл пробирку, отобрать в новую пробирку 0,2 мл, добавить 1,8 мл среды для Phoenix без антибиотиков и полибрен до рабочей концентрации 10 мкг/мл, перемешать.

24) В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунке для тестирования MOI – на 10 % смесь GFP, в отрицательном контроле – на среду для Phoenix. Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФН

25) Однократной трансдукции клеток лентивирусами может быть достаточно для получения ИПСК, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится также, как и в день 0, с минимальными изменениями: собрать среду с лентивирусами, несущими *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, но не c-MYC, среда с GFP не требуется.

26) В лунке (лунках) с ЭФН для получения ИПСК поменять среду на смесь с лентивирусами и полибреном, в лунках для тестирования MOI и отрицательном контроле – на среду для Phoenix.

День 2. Смена среды

27) Поменять среду во всех лунках на среду для ЭФН.

День 4. Смена среды; разморозка фидерных клеток; определение MOI

Смена среды

28) Поменять среду во всех лунках на среду для ИПСК с 1 мМ вальпроевой кислоты.

Разморозка фидерных клеток

29) Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. разделе Подготовка реагентов).

30) Налить в 5 мл пробирку 4 мл среды для ЭФМ.

31) Достать из криохранилища с жидким азотом криопробирку с ЭФМ и поместить на водяную баню на 37 ºС. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

32) Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить на желатинизированные чашки Петри с 10 мл среды на лунку с плотностью 15 тыс кл./см^2.

33) Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO_2-инкубатор.

Определение MOI

34) Интеграция вектора, содержащего GFP, позволяет провести грубую оценку эффективности трансдукции остальными вирусами. Для определения MOI необходимо провести проточную цитофлуорометрию на присутствие белка GFP. Клетки с контрольной и обработанной вирусом с GFP лунок снять трипсином-ЭДТА, центрифугировать, промыть НФБ, центрифугировать, фиксировать в 1 % парафармальдегиде 5 мин, центрифугировать, ресуспендировать в НФБ и определить процент клеток, имеющих GFP, на проточном цитофлуориметре.

35) Подсчет MOI: MOI = –Ln(1 – [доля GFP+ клеток]). Например, если 63,2 % клеток имели флуоресценцию GFP, MOI = –Ln (1 – 0,632) = 1, то есть в среднем один вирус на клетку или, точнее, соотношение числа вирусов к числу клеток – единица. Так как использовалось 10 % разведение вируса, реальный MOI = 10. Сделаем качественную оценку MOI, предположим, что MOI для вирусов OKSM не отличается от такового для GFP, тогда MOI в опыте также равен 10. Разбавление среды вдвое соответственно уменьшило MOI, а вторая трансдукция – увеличила в два раза, итого, по грубой оценке, в клетках должно быть около 10 вирусных частиц. Для получения ИПСК MOI должен быть более 4. Из-за токсичности вирусов подсчет выше неверен. Оптимально определять MOI по смеси 50% вирусных частиц с GFP, 50% среды и полибрена. Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удается достичь необходимого титра вируса можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 ºС.

День 5. Пересадка ЭФН

36) Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 мМ.

37) ЭФН, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки с 1 лунки 6-луночного планшета перенести на 2 чашки Петри.

Дни 7-11. Смена среды

38) Каждый второй день смена среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

День 13. Смена среды; разморозка фидерных клеток

39) Сменить среду на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

40) Разморозить фидерные клетки на необходимое число желатинизированных 12-луночных планшетов.

День 14. Снятие колоний ИПСК

41) Ко дню 14 на чашках Петри должны быть десятки–сотни колоний, из них около половины с морфологией, соответствующей ИПСК. Отметить тонким маркером снизу чашки Петри колонии с морфологией ИПСК для снятия.

42) Убрать среду с фидерных клеток, промыть НФБ, добавить по 1 мл среды для ИПСК без вальпроевой кислоты на лунку 12-луночного планшета.

43) Нанести на новые чашки Петри капли НФБ (около 50 мкл) и трипсина-ЭДТА (около 20 мкл).

44) Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, сковырнуть индивидуальным пластиковым носом на 200 мкл и перенести в 10 мкл среды в каплю НФБ. После переноса серии колоний индивидуальными пластиковыми носами перенести колонии из буфера в трипсин-ЭДТА и инкубировать 10 мин при 37 ºС.

45) Ресуспендировать колонии в 50 мкл среды для ИПСК и перенести в лунку с фидерными клетками. Покачивая плато равномерно распределить клетки по лункам. Номер пассажа ИПСК с этого момента 2, каждая пересадка добавляет номер пассажа. При заморозке номер пассажа не меняется, единица прибавляется при разморозке.

Дни 16–30. Размножение и характеризация ИПСК

46) Менять среду на среду для ИПСК раз в два дня.

47) При достижении плотности более 90 % или при изменении морфологии колоний (появление дифференцированных клеток, появление «пузырей» и плавающих «шаров») проводить пересадку ИПСК американской норки. Убрать среду, промыть НФБ, покрыть трипсином-ЭДТА, поместить на 10 мин на 37 ºС.

48) Добавить один объем среды для ИПСК, ресуспендировать, центрифугировать при 300 g 3 мин, рассадить на фидерные клетки в соотношении 1:2–1:12 в зависимости от плотности клеток.

49) После получения достаточного количества клеток заморозить 5–10 ампул ИПСК: 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 ºС. На следующий день перенести в криохранилище с жидким азотом.

При подготовке СОП «Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки» использованы следующие 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.