

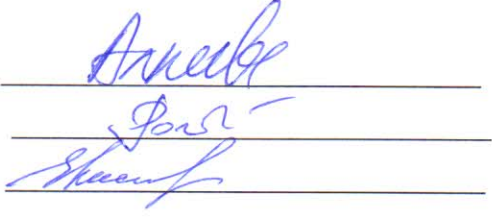


ПРОЕКТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

Центр коллективного пользования

Стандартная операционная процедура
«Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных»

Москва, 2016

<p>Содержание и назначение: Определяет порядок идентификации и характеристики вновь поступающих клеточных линий, может быть применена для целей инвентаризации</p>	<p>Пересмотр через: 1 год</p>
<p>Местонахождение: ИБР РАН</p>	<p>Распространение: ЦКП ИБР РАН</p>
<p>Номер версии: В 1.0</p>	<p>Дополнительные документы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Лабораторные методики получения культур первичных клеток человека и животных 2. Лабораторные методики анализа клеточных популяций
<p>Составлено: Алпеева Е.В., к.б.н., нс Роговая О.С., к.б.н., мнс Киселева Е.В., к.б.н. снс</p>	
<p>Проверено: Борисова О.В., инженер-нормоконтроллер</p>	
<p>Утверждено: Воротеляк Е.А., руководитель коллекции, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной биологии ИБР РАН</p>	
<p>Заменяет версию: Не применимо (1-я версия)</p>	
<p>Изменения, внесенные в последнюю утвержденную версию: Не применимо (1-я версия)</p>	

СОДЕРЖАНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

IV. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА (КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ)

V. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

5.1 Оборудование и материалы

5.2 Выявление контаминации микоплазмой

5.3 Построение кривых роста и вычисление времени удвоения популяции (ВУП)

5.4 Кариотипирование

5.5 Определение экспрессии маркеров при помощи иммуоцитохимического анализа

5.6 Иммуногистохимия

5.7 Получение и культивирование эмбрионных телец для подтверждения плюрипотентности (на примере линии иПСК-ДП)

5.8 Приготовление срезов эмбрионных телец и их окрашивание

5.9 Тест на активность теломеразы в иПСК (для подтверждения репрограммирования до плюрипотентного состояния, при котором происходит реактивация теломеразы)

VI. УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Архив – специализированное хранилище, используемое для сохранения, защиты, контроля, поддержания подлинности и целостности информации, а также гарантирующее доступ к данной информации в течение всего срока ее хранения;

Архивирование информации – безопасное хранение информации в целостном и неизменном виде для дальнейшей отсылки к его содержанию или сохранения всей истории данной информации;

Аттестация оборудования – определение нормированных точностных характеристик испытательного оборудования, их соответствия требованиям нормативных документов и установление пригодности этого оборудования к эксплуатации;

Биологический материал - биологические жидкости, ткани, клетки, секреты и продукты жизнедеятельности человека, физиологические и патологические выделения, мазки, соскобы, смывы, биопсийный материал;

Дифференцировка клеток — процесс приобретения клетками свойств и характеристик функционально зрелых клеток, относящихся к специализированному клеточному типу и обеспечивающих функции органов и тканей организма;

Клеточная линия - стандартизованная популяция клеток одного типа с воспроизводимым клеточным составом, полученная путем изъятия из организма человека биологического материала с последующим культивированием клеток вне организма человека;

СОП – стандартная операционная процедура.

I. ПРЕДМЕТ И ОБЪЕКТ

В условиях опережающего развития биологических и биомедицинских исследований, регенеративной биологии и медицины, клеточных, молекулярно-генетических исследований, особое значение приобретает инфраструктурное обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными, охарактеризованными в соответствии с международными нормами клеточными культурами человека и животных.

В соответствии с Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах», ФЗ -180, подписанном Президентом Российской Федерации В.В. Путиным 23.06.2016 г., в Российской Федерации формируется обращение биомедицинских клеточных продуктов, что требует инфраструктурного обеспечения исследований и разработок, направленных на внедрение в клиническую практику биомедицинских клеточных продуктов, содержащих в своем составе клеточные линии человека. Одновременно повышаются и требования к исследовательской деятельности в разных областях клеточной биологии и эмбриологии, которые должны соответствовать международным стандартам «Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines» (<http://www.isscr.org/docs/default-source/guidelines/isscr-guidelines-for-stem-cell-research-and-clinical-translation.pdf>).

Общемировая практика создания и поддержания клеточных коллекций демонстрирует широкое распространение и масштабность имеющихся в мире подобных ресурсов. В развитых странах имеются национальные или континентальные коллекции клеточных культур:

- В США: American Type Culture Collection (ATCC) www.atcc.org
- Европе: European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) <http://www.phe-culturecollections.org.uk/>
- В Германии: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen <https://www.dsmz.de/>

- В Японии: Riken BRC Cell Engineering Division -Cell Bank-
<http://cell.brc.riken.jp/en/guide>

Данные коллекции насчитывают тысячи клеточных линий. Каждая клеточная линия идентифицируется с применением современных методов, и на каждую заводится паспорт. Поскольку идентификация и описание клеточных линий осуществляются в соответствии с принятыми стандартами GLP, требованиями WHO, FDA и локальных органов, данные линии могут использоваться в научных и клинических целях.

Имеются сообщения о том, что порядка 15% всех клеточных линий, используемых мировым научным сообществом, неправильно идентифицировано в результате загрязнения или несовершенства методологии лабораторных исследований (Masters, 2012; “Identity Crisis” Nature 457, 935-936, 19 February 2009)

<http://www.nature.com/nature/journal/v457/n7232/full/457935b.html>

В результате использования ошибочно идентифицированных клеточных линий в научных работах ученые получают неверные данные, вынуждены публиковать опровержения опубликованных изысканий и не могут повторно воспроизвести результаты исследований. Применение ошибочно идентифицированных клеточных линий приводит к нерациональному использованию ресурсов, направляемых на поддержку научных работ.

Еще одним важным фактором, обуславливающим необходимость развития Коллекции клеточных культур, является развитие совершенно новых технологий клеточной биологии, включая технологии, основанные на использовании плюрипотентных клеток и редактировании генома.

Таким образом, становится очевидной необходимость создания национальной Коллекции клеточных культур, отвечающей современным требованиям и стандартам. При создании коллекций клеток человека и животных актуальна разработка новых регламентов и стандартов их культивирования и криоконсервации. Унификация требований к

депонированным клеточным культурам является необходимым и обязательным элементом клеточной коллекции.

II. ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» разработана в качестве стандарта для обеспечения качественного процесса идентификации и характеристики клеточных линий человека и животных, закладываемых на хранение и для последующего распространения в Коллекцию клеточных культур ИБР РАН.

Цель разработки стандартной операционной процедуры (СОП) состоит в:

- Определении инфекционной чистоты клеточной линии в части заражения внутриклеточными инфекциями (микоплазмой);
- Определении параметров роста клеточной линии;
- Кариотипировании клеточной линии;
- Определении плюрипотентного статуса клеточной линии;
- Характеристике фенотипа клеточной линии, в том числе соответствие эталонному фенотипу;

Разработанная СОП рекомендована для использования в подразделениях, работающих с культурами клеток человека и животных.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

1. Правила лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н)
2. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартиформ. – 2010. – 12 с.

IV. КОНТРОЛЬ СОБЛЮДЕНИЯ СТАНДАРТА, ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

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.

V. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

5.1 Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов операционной:

5.1.1 Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

1. Стерилизатор воздушный MOV-112S (90л) (Sanyo, Panasonic, Япония);
2. Автоклав лабораторный, горизонтальный, автоматический 3850E, 64 л (Tuttnauer, Израиль);
3. Лабораторная установка для получения дистиллированной воды GFL-2012 (GFL, Германия);

4. Оптический инвертированный микроскоп, просмотровый (Carl Zeiss, Германия);
5. Прибор для автоматизированного подсчета клеток TC20 (Bio-Rad, США);
6. CO₂-инкубатор MCO 20-AIC (Sanyo, Panasonic, Япония);
7. Ламинарный шкаф, рабочая ширина 180 см SafeFAST Elite218S (Faster, Италия);
8. Автоматическое дозирующее устройство S-1 для пластиковых и стеклянных пипеток (Thermo Fisher Scientific, США);
9. Источник тока (Power Pac HC Biorad, США);
10. Холодильник-витрина MPR-514, 489 л, от +2 до +14°C (Sanyo, Panasonic, Япония);
11. Комплект автоматических одноканальных дозаторов (пипеток) Eppendorf Research plus (3 штуки в комплекте – диапазон 0,5-10 мкл, диапазон 10-100 мкл, диапазон 100-1000 мкл) (Eppendorf, Германия);
12. Центрифуга CM64 (ELMI, Латвия);
13. Криостат CM 1900 (Leica, Германия);
14. Инвертированный микроскоп IX51 с флуоресцентной лампой (Olympus, Япония);
15. Термостат TC-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);
16. Холодильник низкотемпературный DW-86L388 (Haier, Китай);
17. Сосуд Дьюара Locator 8 (Thermo Scientific, США);
18. Микротом HM 430 (Micom, Германия);

19. Нагревательный столик для сушки парафиновых срезов HI 1220 (Leica, Германия);

20. Лабораторные весы LA-60 (ACCULAB, Германия).

5.1.2 Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

1. Посуда медицинская пластиковая для лабораторной диагностики и иммунологических исследований (Corning Inc., США);
2. Изделия из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro* (Eppendorf AG, Германия);
3. Перчатки хирургические, стерильные (TRO-SENSOSURGE, «Троге Медикал ГмбХ» Германия);
4. Иглы для мезотерапии (Meso-relle, Biotekle SRK, Италия);
5. Питательная среда ДМЕМ (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
6. Питательная среда 199 x10 концентрат (Биолот, Россия);
7. Сыворотка крови эмбриональная телячья (ЭТС) (Gibco, Life Technologies, США);
8. Раствор трипсин/ЭДТА 0,125% или 0,05% (Gibco, Life Technologies, США);
9. Раствор Версена (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
10. Питательная среда ДМЕМ/F12 (1:1) (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);
11. L-глутамин (Sigma-Aldrich, США);
12. PBS (phosphate buffer saline) – фосфатно-солевой буфер (ООО «НПП «ПанЭко», Россия);

13. ПФА – параформальдегид 4% (Bio-Optica, Италия);
14. Гидроксид натрия (Мосхимфарм, Россия);
15. Бикарбонат натрия (ПанЭко, Россия);
16. DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, США);
17. Стекла для криосрезов (Thermo scientific, США);
18. Стекла предметные (Menzel Glasser, Германия);
19. Стекла покровные (Menzel Glasser, Германия);
20. Среда для оптимальной резки криоблоков OCT (Tissue-Tek, Sakura Fineter, Нидерланды);
21. Авертин – 2,2,2-трибромэтанол (Sigma-Aldrich, США);
22. 70%-ный этиловый спирт (Константа-Фарм М, Россия);
23. Воск для депиляции (Beauty Image, Испания);
24. 0,9% раствор хлорида натрия (Мосфарм, Россия);
25. Ножницы хирургические (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
26. Пинцет тканевый (ОАО «Медико-инструментальный завод им. М.Горького», Россия);
27. Инсулиновые шприцы Micro-Fine Plus (Vecton, Dickinson and Company, США);
28. 2-х компонентные шприцы 10мл с иглой (SFM, Германия);
29. Парафиновая среда Гистомикс (Biovitrum, Россия);
30. Синтетическая монтирующая среда «Био маунт» (Bio-Optica, Италия);

31. Эозин (Biovitrum, Россия);
32. Гематоксилин Майера (Biovitrum, Россия);
33. Формалин 10% (Appllichem, Германия);
34. Перекись водорода 30% (Sigma-Aldrich, США);
35. Набор для иммуногистохимического окрашивания ImmPress Reagent kit MP-7401 (Vector Laboratories, США);
36. Набор для визуализации пероксидазы с помощью диаминобензидина DAB Substrate kit SK-5200 (Vector Laboratories, США);
37. Бычий сывороточный альбумин (БСА) (BioWest, Ирландия);
38. Triton X-100 (AppliChem, Германия);
39. 2,5 % сыворотка козы (Vector Laboratories, США);
40. Ксилол (Sigma-Aldrich, США);
41. Хлороформ (Sigma-Aldrich, США);
42. Парафильм (Pechiney, США);
43. Первичные антитела к белку Ki 67, кератин 5 (Abcam, Великобритания);
44. Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, США);

5.2 Выявление контаминации микоплазмой

Наличие заражения микоплазмой нельзя определить с помощью обычной микроскопии, увидеть можно только ухудшение состояния культуры. Для детекции микоплазмы предлагается применение методов

флуоресцентного окрашивания, ПЦР (полимеразной цепной реакции), ИФА (иммунофлуоресцентного анализа), иммуноокрашивания, автордиографии или микробиологические исследования. Нам представляются наиболее простыми в применении метод флуоресцентного окрашивание ДНК красителями и использование специальных общедоступных наборов разных производителей для детекции на основе ПЦР.

А) Окрашивание флуорохромами

Так как микоплазмы содержат ДНК, их легко обнаружить по характерным флуоресцирующим частицам или нитям на поверхности клеток и, в случае обширной контаминации, в межклеточном пространстве. Монослойные культуры клеток можно зафиксировать и окрасить непосредственно. При исследовании на микоплазму суспензионной культуры после центрифугирования суспензии культуральную среду добавляют к индикаторным клеткам (т.е. к монослойной культуре), гарантированно не зараженным микоплазмой, но являющимся легко восприимчивыми к микоплазме и хорошо распластанным, и инкубирует их в этой среде несколько суток (McGarrity, Varile, 1983). Для этого подходят клетки линий Vero, 3T6, NRK, A549. Далее выявляют микоплазму стандартным методом для монослойных культур. Кроме того, методы, основанные на окрашивании ДНК, практически неприменимы к клеткам с относительно крупными ядрами и тонким "ободком" цитоплазмы (например, лимфоцитам). Для их исследования также необходимо использовать индикаторные культуры.

При выявлении ДНК с помощью интеркалирующих флуорохромов чаще всего используют краситель бисбензимида (Hoechst 33258) (Chen, 1971) или краситель 4'-6-диамино-2-фенилидол (DAPI), реже – интеркалирующий антибиотик оливомицин (Михайлова и др., 1982). Эти флуоресцентные красители быстро связываются с ДНК, образуя стабильные комплексы.

Основной раствор Hoechst 33258 готовят растворением 0,5 мг реактива в 10 мл дистиллированной воды (срок хранения при 4°C до года). Рабочий

раствор готовится в растворе Хэнкса без индикатора в концентрации 0,05 мкг/мл непосредственно перед употреблением. Рабочий раствор оливомицина (20 мкг/мл) готовят на дистиллированной воде с добавлением 0,02 М Mg⁺⁺ (MgCl₂ или MgSO₄). При 4°C раствор может храниться до полугода. Для окрашивания анализируемые клетки выращивают на покровных стеклах в течение 2-3 сут, трижды отмывают раствором Хэнкса или фосфатным буфером (рН 7.2), затем фиксируют в смеси метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1) при дальнейшем окрашивании Hoechst 33258 (в течение 10 мин), либо в 70%-ном этиловом спирте при дальнейшем окрашивании оливомицином (в течение 15-60 мин), подсушивают на воздухе, наносят каплю рабочего раствора красителя, оставляют при комнатной температуре в темноте. Время окрашивания рабочим раствором Hoechst 33258 10-15 мин, рабочим раствором оливомицина – 2 часа. После промывки дистиллированной водой покровные стекла монтируют на предметных в глицерине с дистиллированной водой (1:1) и просматривают под флуоресцентным микроскопом при увеличении ок.10х, объектив 100х (масляная иммерсия).

Окраска DAPI. При этом методе можно окрашивать как фиксированные, так и живые клетки. Краска готовится на фосфатном буфере (рН 6,5—7,0) с концентрацией 50 мкг/мл и хранится при 4°C полгода. Рабочий раствор готовится непосредственно перед использованием, концентрация 0,1 мкг/мл. При окраске живых клеток в пробирки со стеклами вносят 3 мл красителя, пробирки инкубируют 15-30 мин при 37°C, затем дважды отмывают фосфатным буфером и просматривают в люминесцентном микроскопе. Для фиксации используют 96%-ный этиловый спирт или смесь метанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Длительность окраски такая же, как и для живых клеток. Как и при окраске Hoechst-33258, флюоресцируют и ядра, и микоплазмы, иногда заметно слабое свечение цитоплазмы.

В контаминированных культурах микоплазмы обнаруживаются в виде отдельных мелких (0,1-0,3 мкм диаметром) гранул, а также их скоплений,

расположенных вне клеток или на их поверхности. На препаратах клеток, свободных от микоплазм, наблюдается флуоресценция ядер, а цитоплазма почти не светится. Флуоресценция ДНК митохондрий в условиях окрашивания, рекомендуемых для выявления микоплазм, практически незаметна. При определенных навыках эти методы позволяют обнаруживать микоплазмы даже в случае сравнительно низкой множественности инфекции. Окраска флуорохромами оказывается особенно эффективной при уровне зараженности, соответствующем 10⁵ микоплазм на 1 мл культуральной среды (и выше). Непосредственная подготовка препаратов занимает не более часа. Окраску флуорохромами рекомендуют как метод экспресс-диагностики микоплазменных заражений (Drexler, Uphoff, 2000).

Недостатками метода являются неизбежная субъективность количественной оценки степени зараженности, а также возможность артефактов за счет флуоресценции обломков клеточных ядер и фонового свечения, которое оказывается особенно значительным при культивировании клеток в присутствии антибиотиков. А также при слабом уровне заражения не все клетки культуры могут быть инфицированы, поэтому необходимо просматривать как можно больше препаратов перед тем, как делать вывод, что культура неинфицирована.

Б) Использование стандартных наборов реагентов на основе ПЦР

ПЦР является очень чувствительным и специфичным методом для прямого определения микоплазмы в культуре клеток при низких затратах труда, времени и средств. Метод отличается простотой, объективностью интерпретации, воспроизводимостью и документальной обоснованностью результатов.

Используется набор реагентов MycoReport (Евроген) для определения контаминации микоплазмами клеточных линий. Данный набор позволяет выявить геномную ДНК шести наиболее распространенных видов микоплазмы и может применяться как для исследования культуральной жидкости, так и для анализа ДНК, выделенной из культуры клеток. ПЦР

проводится по конечной точке, амплифицируются видоспецифичные участки 16S рРНК. Риск получения ложноположительных результатов снижен в результате применения в наборе урацил-ДНК-гликозилазы, риск ложноотрицательных результатов снижен благодаря выполнению реакции с внутренним контролем. К набору прилагается подробное описание проведения анализа.

Следует дополнительно выделять ДНК для дальнейшего исследования (с помощью набора «Экспресс-ДНК-Био» фирмы Алкор Био), что в протоколе не описано, но рекомендуется при ингибировании ПЦР. Для выделения ДНК действуют по инструкции производителя данного набора: отделяют клетки от среды путем центрифугирования (необходимо получить порядка 25000-50000 клеток), затем добавляют 50 мкл транспортного раствора и 150 мкл лизирующего буфера из набора, инкубируют 10 мин при 95°C, центрифугируют 10 минут при 13000 об/мин. В качестве матрицы для ПЦР используют 1 мкл супернатанта.

При использовании данного метода необходимо иметь в виду, что избыток ДНК в реакционной среде может приводить к ингибированию амплификации. Если реакция ПЦР не проходит, то можно попробовать уменьшить количество исследуемой ДНК.

5.3 Построение кривых роста и вычисление времени удвоения популяции (ВУП)

После субкультивирования клетки развиваются по определенной схеме, проходя через этапы lag-фазы, экспоненциальной, или log-фазы, и стационарной или фазы плато. Построение кривой роста клеточной культуры дает возможность вычисления ВУП при использовании участка графика, который представляет собой экспоненциальную фазу. Значение ВУП варьирует от 12-15 ч в быстрорастущей культуре до 24-36 ч во многих прикрепленных постоянных клеточных линиях и даже до 60-72 ч в медленно

растущих конечных клеточных линиях. Поэтому для получения кривой роста для быстрорастущих клеточных линий при начале культивирования следует выбрать клеточную концентрацию 2×10^4 кл./мл, для медленно растущих – 1×10^5 кл./мл. Последующее повторение кривой роста с более высокой и более низкой посевной концентрацией позволит скорректировать величину посевной концентрации и установить интервал субкультивирования.

Трипсинизировать клетки на стадии log-фазы, как при обычном субкультивировании, и посеять несколько 12-ти луночных планшетов по 2 мл клеточной суспензии с необходимой концентрацией клеток в зависимости от предполагаемой скоростью роста популяции (смотри выше). Необходимо добавлять клеточную суспензию медленно от центра ячейки, что позволит избежать ее завихрения по стенкам лунок, а также избегать встряхивания планшетов. Поместить планшеты во влажный CO₂ инкубатор. Каждые 24 часа доставать планшет (сначала первый, потом последующие) и подсчитывать количество клеток в 3-х лунках. Для этого полностью удалить из них среду, добавить 0,5 мл смеси трипсина (неочищенного, 0,25%) с 10 мМ EDTA в каждую, инкубировать планшет 15 мин. Далее добавить 0,5 мл среды (с 26 мМ NaHCO₃) с сывороткой, диспергировать клетки, перенести 0,4 мл суспензии в 19,6 мл D-PBSA и подсчитать в электронном счетчике клеток. После 3-х суток культивирования необходимо продолжать отбор образцов быстрорастущих культур каждые 24 ч, а медленно растущих – каждые 48 часов, пока не будет достигнута фаза плато. Необходимо периодически менять среду в оставшихся лунках по мере падения в ней значения pH. По результатам измерений построить график зависимости клеточной плотности (кл./мл) от времени (сутки) и определить с помощью него время lag-фазы и ВУП.

5.4 Кариотипирование

Для цитогенетического анализа добавить в среду для культивирования клеток колцемид (Colcemid, Gibco). Инкубировать в углекислотном

инкубаторе при 37°C в присутствии 0,1 мкг/мл колцемида в течение 2 ч. При помощи раствора трипсин:Версен (1:1) (ПанЭко) клетки снять с пластиковой подложки, осадить центрифугированием 5 мин при 1000 об/мин, осторожно промыть PBS и инкубировать в гипотоническом растворе 60 мМ KCl при 37°C в течение 60 мин с последующим осаждением на центрифуге. После этого растворить осадок в охлажденном до -20°C фиксаторе (3 части метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение 10 мин, а затем поменять фиксирующий раствор на новый 1-2 раза. Полученную суспензию раскapat на охлажденные до -20°C предметные стекла с высоты 25-30 см, далее поджечь фиксатор на стекле. Препараты сушить в течение 1-2-х суток в термостате при +37°C.

Для дифференциального окрашивания хромосомные препараты обрабатывают флуоресцентными красителями 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и 7-амино-актиномицином D (7-AAD). Препараты окрашивают раствором 7-AAD в концентрации 5 мкг/мл в течение 30 мин, после чего раствором DAPI в концентрации 5 мкг/мл еще 15 мин. После отмывки в дистиллированной воде препараты заключают под покровные стекла. Фотографии хромосомных препаратов получают с помощью флуоресцентного микроскопа.

5.5 Определение экспрессии маркеров при помощи иммуоцитохимического анализа

Для иммуофлуоресцентного анализа клетки промыть от среды PBS и произвести фиксацию в растворе 4 % параформальдегида в PBS 10-15 мин. Затем отмыть PBS 3 раза по 5 мин и инкубировать в растворе PBS с 10% FBS (BioWest), 0,1% Triton X-100 (AppliChem), 0,01% Tween 20 (Appllichem) в течение 30-60 мин для пермеабелизации мембран и блокировки неспецифического связывания антител. После этого инкубировать ночь при 4°C с растворами первичных антител в PBS с 5% FBS (BioWest). Отмыть 3 раза по 5 мин в PBS с 0,01% Tween 20 и инкубировать со вторичными

антителами Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 или Texas Red 1 час при комнатной температуре. Снова отмыть в PBS с 0,01% Tween 20 и обработать 0,1 мкг/мл DAPI в PBS 10 мин при комнатной температуре (Vector Laboratories). После стандартной отмывки 3 раза по 5 мин в PBS с 0,01% Tween 20 окрашенные флуоресцентной меткой препараты анализировать с помощью флуоресцентного микроскопа.

Тест на тератомообразование для подтверждения плюрипотентности (для стволовых клеток и иПСК)

Для проверки плюрипотентного статуса индуцированных клеток проводят стандартный *in vivo* тест на образование тератом. Около 5 млн. клеток инъецируют подкожно в бедренную область иммунодефицитным мышам линии Nude. Спустя 6-7 недель наблюдают образование опухоли в месте инъекции клеток. Умерщвляют мышей, хирургическими ножницами вырезают опухоль, фиксируют ее в 10% ПФ, заключают в парафиновые блоки и на микротоме получают срезы толщиной 5-7 мкм, которые наслаивают на положительно заряженные предметные стекла. Для части срезов проводят иммуногистохимический анализ, а другую часть окрашивают гематоксилином – эозином и проводят гистологический анализ тканей под микроскопом.

5.6 Иммуногистохимия

Демаскировку антигенов проводят обработкой в цитратном буфере pH = 6,0 в течение 5-9 мин в микроволновой печи при 690 Вт. Промывают несколько раз в воде и блокируют эндогенную пероксидазу инкубацией в 3% растворе пероксида водорода в течение 15 мин. Отмывают в PBS 2 раза по 5 мин. Блокируют неспецифическое связывание антител р-ром 1% бычьего сывороточного альбумина в течение 20 мин при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами проводят ночь при +4°C. После отмывки от излишка антител срезы обрабатывают вторичными антителами Dako REAL™ EnVision™ Detection System (K5007). Заключение в Bio

Mount (Bio-Optica) препараты анализируют при помощи флуоресцентного микроскопа.

5.7 Получение и культивирование эмбрионных телц для подтверждения плюрипотентности (на примере линии иПСК-ДП)

Колонии плюрипотентных стволовых клеток снять с подложки с помощью 1 мг/мл диспазы в DMEM (STEMCELL Technologies). Клетки отмыть от фермента центрифугированием в избытке PBS 5 мин при 900 об/мин. Осадок диссоциировать на небольшие агрегаты пипетированием в среде AggreWell™ (STEMCELL Technologies), либо в DMEM/F12 (Gibco), содержащей 20% KSR (Gibco), 1x NEAA (Gibco), 1x GlutaMAX (Gibco), 50 ЕД/мл пенициллин / 50 мкг/мл стрептомицин (ПанЭко). Эмбрионные телца формируются в висячей капле в течение примерно трех суток при добавлении к среде 10 мкМ Y-27632 ROCK Inhibitor (Sigma) для выживаемости единичных клеток и улучшения агрегации. После этого эмбрионные телца переносят и растят в суспензии без прикрепления клеток к пластику в Ultra Low Adhesion Plates (Corning). Смену среды необходимо производить каждый день.

5.8 Приготовление срезов эмбрионных телц и их окрашивание.

Эмбрионные телца промыть в PBS. Фиксировать в 3% параформальдегиде в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре, затем инкубировать в 15% растворе сахарозы в PBS в течение 3 ч при комнатной температуре. Избыток жидкости можно удалить с помощью кратковременного контакта капли с осадком с фильтровальной бумагой. ЗаклЮчить эмбрионные телца в Tissue-Tek® OCT™ Compound (Sakura) и замораживать в парах жидкого азота в течение 3-5 мин. Затем получают срезы толщиной 7,5 мкм на криотоме и наслаивают на положительно-

заряженные предметные стекла. Для блокирования неспецифического связывания срезы инкубируют с антителами, как описано выше.

5.9 Тест на активность теломеразы в иПСК (для подтверждения репрограммирования до плюрипотентного состояния, при котором происходит реактивация теломеразы)

Проверку наличия теломеразы в клетках можно провести с помощью TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit (Millipore), в качестве фермента для ПЦР-реакции использовать полимеразу Encyclo (Евроген). С помощью данного набора определяют наличие или отсутствие теломеразной активности TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) в исследуемых культурах клеток. Принцип реакции заключается в том, что на первой стадии (Telomerase Extension) активная теломераза добавляет большое количество теломерных повторов (GGTTAG) к 3'-концу праймер-субстрата (TS), то есть происходит его удлинение; на следующей стадии удлиненные продукты подвергаются амплификации Taq полимеразой с помощью ПЦР. В результате на электрофорезе, в случае положительного сигнала, в геле можно увидеть «лестницу», когда продукты разделяются на 6 пар оснований: 61 п.о., 67 п.о., 73 п.о., 79 п.о. и т.д.

Примерно 0,5 млн. клеток лизируют в 200 мкл CHAPS Lysis Buffer с 100 ЕД/мл ингибитором РНКаз (Силекс), после чего инкубируют суспензию на льду 30 мин. Центрифугируют лизат при 13000 об/мин в течение 20 минут при +4°C. Далее отбирают 160 мкл надосадочной жидкости, которые разаликвочивают и хранят при -70°C или используют сразу. Замороженный экстракт стабилен в течение года, если не допускать повторных циклов замораживания-оттаивания. Для отрицательного контроля отбирают по 10 мкл образца и инактивируют теломеразу нагреванием до +85°C в течение 10 мин. Для одной TRAP реакции объемом 20 мкл смешивают 2 мкл клеточного экстракта, 4 мкл 5X TRAPEze XL Reaction Mix, 0,4 мкл 50X Encyclo Polymerase (Евроген) и 13,6 мкл деионизованной очищенной воды в ПЦР-

пробирках на 200 мкл (Axygen). Смесь инкубируют при 30°C в течение 35 мин в ПЦР-амплификаторе (BioRad) – это первая стадия. Для осуществления второй стадии выставляют следующие параметры ПЦР: 30 сек при +95°C, 30 сек при +59°C, 1 мин при +72°C, количество циклов = 36; затем 3 мин при +72°C и 25 мин при +55°C. Продукты реакции хранят при -20°C. Результаты TRAP реакции выявляют при помощи разделения продуктов амплификации в 15% полиакриламидном гель-электрофорезе в 0,5X трис-боратном буфере при 70В. Гель окрашивают бромистым этидием (Helicon) в концентрации 0,5 мкг/мкл в 0,5X трис-боратном буфере в течение 5 мин при покачивании. Визуализацию проводят с помощью УФ-анализатора гелей (BioRad).

5.10 STR-профилирование

Рекомендуется отдавать образцы клеточных линий на аутсорсинг. Так, в Москве существует несколько компаний, которые проводят данное исследование. Например, компании Гордиз (gordiz.ru) и Акрус (www.acrus.ru). Первая делает это с помощью своего набора COrDIS Plus для капиллярного электрофореза, а вторая – с помощью набора PowerPlex® 18D Kit (производства Promega). Анализ проводится по 17-20 маркерам, в том числе по рекомендованным 8 STR локусам стандарта ASN-0002 (ANSI/ATCC) и локусу амелогенина для половой идентификации человеческих линий. Отчет по исследованию включает все исходные данные, полученные электрофореграммы и список локусов, сравнение с базой данных ATCC. Для исследования требуется выделенная ДНК или клеточная масса.

VI УКАЗАТЕЛЬ МЕТОДИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

При подготовке СОП «Идентификация и характеристика клеточных линий человека и животных» были использованы следующие литературные источники:

1. Чермных Э.С., Радюхина Н.В., Руткевич П.Н., Шевелев А.Я., Власик Т.Н., Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Терских В.В. // Цитология. 2010. Т. 52. № 3. С. 219–224.
2. Дьяконов Л. Коллекции клеточных культур фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии // Ветеринарная патология. 2003. Том . №1 : С.10-20
3. “The Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications”, 6th Edition, R. Ian Freshney, 2010 (Wiley-Blackwell).
4. “Cell-line authentication: End the scandal of false cell lines” John R. Masters (13 December 2012), Nature 492, p.186.