МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОСИИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГАОУ ВО КФУ)

Проректор по научной деятельности
ФГАОУ ВО КФУ
_____ Д.К. Нургалиев
«___» _____ 2015 г.

МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ЕДИНИЧНЫХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

разработана в рамках Соглашения № 14.594.21.0003 от 15.08.2014 о предоставлении субсидии по теме «Развитие протеогеномного направления Междисциплинарного ЦКП КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе»
(уникальный идентификатор проекта RFMEFI59414X0003)

КАЗАНЬ 2015

Ключевые слова: Изоляция клеток, проточная цитометрия, единичная клетка, сепарация клеток, FACS

1. Назначение и область применения

Для экспериментальных и клинических исследований часто необходимы высоко очищенные насыщенные отдельные клеточные популяции или единичные клетки. В настоящее время предложен широкий перечень методов для получения единичной эукариотической клетки выбор оптимального метода зависит от инструментальной базы и целей преследуемыми исследователями. Исторически первым и наиболее простым методом не требующим наличия специализированного инструментария является метод лимитирующих разведений, в то же время, метод имеет широкий перечень ограничений, связанных как с воспроизводимостью, так и с надежностью получения клеток. Наряду с методом лимитирующих разведений широкое распространение на заре развития секвенирования единичных клеток получил метод отбора клеток пипеткой. Последующие подходы, были основаны на использовании инструментальных методов: диэлектрофорез (разделение с помощью электрического поля), оптический пинцет, бесконтактное распределение/печатание, лазерная микродиссекция (Laser-Capture Microdissection (LCM)), автоматизированных методах выделения и процессирования – микрофлуидика. До настоящего времени одним их лидирующих подходов изолирования единичных клеток продолжает оставаться проточная цитометрия в варианте клеточныого сортинга с возбуждением флуоресценции (Flow cytometry using fluorescence-activated cell sorting (FACS)). Преимуществами получения клеток на проточном цитометре является высокая воспроизводимостью метода, выживаемость и чистота получаемых клеток (до 99.9% позитивных клеток в отсортированной фракции). Возможность сортировать клетки по любым комбинациям детектируемых параметров. Данный метод позволяет отсортировывать любое количество клеток, вплоть до единичных клеток, что является незаменимым в технологиях связанных с клонированием, секвенированием и оценкой функционирования единичных клеток.

Настоящая лабораторная методика предназначена для выделения единичных эукариотических клеток и использованием проточного цитометра с сортером.

2. Принцип методики

Принцип метода базируется на технике проточной цитометрии, что подразумевает регистрацию флуоресценции и светорассеяния от каждой единичной клетки в определенной клеточной суспензии. Методика получения единичных клеток основана на

сортировке клеток с использованием проточного цитометра BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) и применением специфических антител.

3. Оборудование и материалы

3.1. Оборудование для культивирования, изоляции и визуализации клеток

3.1.1. Автоматические пипетки Eppendorf (США)

3.1.2 Автоматические пипетки Ленпипет (Thermo Fisher Scientific, США)

3.1.3. Настольная центрифуга Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Латвия)

3.1.4. Настольная центрифуга MiniSpin Plus (Eppendorf, США)

3.1.5. CO_2 инкубатор MCO-15AC (Sanyo)

3.1.6. Инвертированный флуоресцентный микроскоп исследовательского класса AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с компьютерной системой фотодокументации

3.1.7. Ламинарный бокс 2 класса защиты SafeFAST Elite Class II (FASTER, Италия)

3.1.8. Центрифуга BIOSAN LMC-3000 (Латвия)

3.1.9. Одной из наиболее широко используемой и популярной системой, во всем мире, для изолирования клеточных популяций, а также для получения отдельных клеток является проточный цитофлуориметр BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) . Оптическая система проточного цитофлуориметра BD FACSAria III позволяет регистрировать до 20 оптических параметров. Система снабжена шестью различными цветными лазерами возбуждения и одновременно способна анализировать до 18 параметров флуоресценции и 2 параметра светорассеяния (FACS-Aria III brochure, BD, 2015, http://static.bdbiosciences.com/documents/ BD_FACSAria_III_brochure.pdf). Система способна генерировать до 100000 отдельных капель в секунду и анализировать до 70000 событий в секунду, позволяет проводить одновременную сортировку 4 фракций клеток (FACSAria III technical data sheet, BD, 2015, http://static.bdbiosciences.com/documents/ BD_FACSAria_III_tech_specs.pdf).

3.2. Материалы

3.2.1. Стволовые клетки из жировой ткани человека (hADSCs) трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом, стабильно экспрессирующие молекулу клеточной адгезии нервных клеток-1 (NCAM1)

3.2.2. 0,25% раствор трипсина-EDTA (Sigma, USA).

3.2.3. Среда alpha MEM (Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma, USA).

3.2.4. Фетальная бычья сыворотка (FBS) (Sigma, США)

3.2.5. L-глутамин (Invitrogen, США)

3.2.6. Антибиотики (раствор пенициллина-стрептомицина) (Invitrogen, США)

3.2.7. Пробирки LoBind tubes 1,5 мл (Eppendorf, США)

3.2.8. Серологические пипетки объемом 2, 5,10 мл с фильтром

3.2.10. Наконечники объемом 10, 100, 200, 1000 мкл с фильтром OmniTip (ULPlast, Польша)

3.2.11. Дозирующее устройство (пипеттор) 1-100 мл (Thermo Fisher Scientific)

3.2.12. Раствор Дюльбекко фосфатно-солевой, стерильный (ПанЭко, Россия)

3.2.13 Чешуйчатый лед

3.2.14 Пластик культуральный для работы с адгезивными культурами клетками: флаконы культуральные "Т-25" с крышкой, планшеты культуральные 96-, 48-, 24- луночные, для монослойных культур клеток, плоскодонные, стерильные (Jet Biofil)

3.2.15 Бычий сывороточный альбумин (BSA)

3.2.16 Одноразовые флаконы на 15 мл (12 х 75 мм полистироловые пробирки)

3.2.17 Штативы для пробирок

3.2.18 Гемоцитометр (камера Горяева)

3.2.19 Фосфатно-солевой буфер (PBS)

3.2.20 Буфер для окрашивания: Фосфатно-солевой буфер (PBS) + 3% фетальная бычья сыворотка (FCS)

3.2.21 Трипановый синий

3.2.22 Суспензионный буфер: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 25 mM HEPES + 3% FCS

3.2.23 Сотовый фильтр (Cell strainer (40 µm Nylon))

3.2.24 Бидсы для компенсации (Compensation beads)

3.2.25 Пробирки для сбора клеток: 12 х 75 мм полистироловые пробирки (содержащие 300 µl FCS и 25 mM HEPES), или 12 х 75 мм полистироловые пробирки (содержащие буфер для выделения ДНК или РНК)

3.2.26 96 луночные планшеты содержащие культуральную среду или необходимый лизисный буфер

4. Изолирование единичных клеток с использованием проточной цитометрии

4.1. Получение клеток трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом

Все процедуры с клетками проводятся в асептических условиях ламинарного шкафа. Стволовые клетки из жировой ткани человека (hADSCs) трансдуцированные

рекомбинантным лентивирусом, стабильно экспрессирующие молекулу клеточной адгезии нервных клеток-1 (NCAM1) наращиваются на среде alpha MEM, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 1% раствора пенициллин-стрептомицина при 37°C, во влажной атмосфере с содержанием 5% CO_2. Пассирование клеток проводят согласно стандартным протоколам с использованием 0,25% раствора трипсин-EDTA.

4.2. Подготовка клеток

1. Трансдуцированные клетки трипсинизировать и снять с пластика
2. Клетки дважды отмыть раствором PBS
3. Внести блокирующий буффер: 1% BSA (bovineserum albumin – бычий сывороточный альбумин) (Sigma, США, кат.№A9418-5G) и инкубировать в течение 20 минут для того, чтобы подавить неспецифическое связывание антител.
4. Клетки промыть раствором PBS
5. С клеток осторожно удалить супернатант и ресуспендировать их в буфере для окрашивания
6. Внести антитела против NCAM1 ((Neural Cell Adhesion Molecule 1), конъюгированные с флуорохромом Alexa 488 (Biolegend, США, кат.№ 318311) в растворе PBS в разведении 1:100.
7. Инкубировать клетки с антителами в течении 30 минут в недоступном для света месте .
8. Клетки трижды промыть раствором PBS.
9. Клетки ресуспендировать в культуральной среде, и определить их жизнеспособность используя раствор трипанового синего.
10. Клетки профильтровать через сотовый 40 μm Nylon фильтр
11. Клетки ресуспендировать в соотношении $1.5*10^6$ клеток/мл
12. Провести грубую оценку экспрессии целевого антигена с использованием флуоресцентного микроскопа.
13. Подготавливить среду для сбора клеток (альфа MEM с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамина и 1% раствора пенициллин-стрептомицин)

4.3. Флуоресцентно-активированная сортировка клеток

Единичные клетки получают в ходе сортировки клеток с использованием проточного цитометра BD FACS AriaIII, в предварительно стерилизованной ультрафиолетом комнате.

1. Включить клеточный сортер – FACS AriaIII (BD) и открыть програмное обеспечение Diva

2. Провести настройку и оптимизацию клеточного сортера (проводился выбор насадки (100 um nozzle, предобработанный ультразвуком), стерилизация инструмента, валидация лазеров с помощью бидсов, и устанавливаются системы сбора клеток и настраиваются потоки)

3. Провести компенсацию, используя негативный контрольный образец и единичный позитивный контроль, компенсация необходима для удаления перекрытия спектра между двумя детекторами

4. Загрузить образцы в проточный цитометр FACSAria III записать экспериментальные значения для сортировки, используя заданные гейты установить параметры для определения интересуемых популяций.

5. В проточном цитофлуориметре BD FACS AriaIII струя обжимающей жидкости (Sheath Fluid) с суспензией клеток по центру разбивается на отдельные капли (Рисунок 1 А). Проходя сквозь заряжающее кольцо, капля может приобретать положительный или отрицательный заряд в зависимости от того, какая клетка содержится внутри капли. Пролетая мимо отклоняющих пластин капля с клеткой притягивается к ним, выходит из основного потока и попадает в пробирку (Рисунок 1 Б).

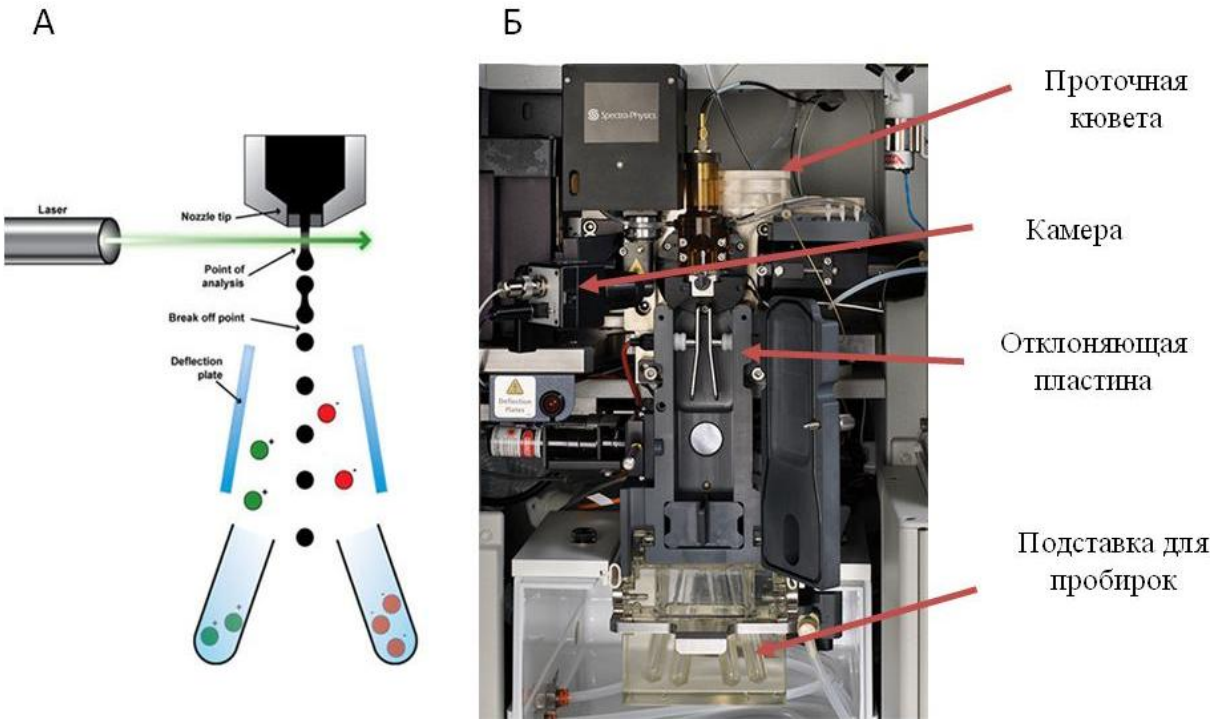

Рисунок 1. А Схематическое представление строения и принцип работы (Б) проточного сортера – BD FACS Aria III.

4.4. Отбор чистой популяции клеток

С целью получения чистой популяции и единичных клеток трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом hADSCs, стабильно экспрессирующих молекулу адгезии нервных клеток-1 (NCAM1) – CD56-позитивных клеток, осуществить сортировку иммуноокрашенных антителом CD56-FITC (Biolegend, США) hADSCs на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACS AriaIII (BD Bioscience, США).

На рисунке 2 представлены данные проточной цитофлуориметрии культуры hADSCs, окрашенных специфичным антителом CD56-FITC до и после сортировки с помощью проточного цитофлуориметра-сортера BD FACS AriaIII. Были заданы следующие параметры: по вертикали – Count (от англ. – число) – показывающее количество клеток, по горизонтали – FITC-A (Fluoresceinisothiocyanate, от англ. – флуоресцинизоцианит) – отражающий интенсивность флуоресценции.

Как видно из рисунка процент CD56-позитивных клеток был повышен с 10% до 85%. Следует отметить, что процент целевых клеток, получаемых после сортировки, зависит от настроек, указываемых на приборе BD FACS AriaIII в установленном программном обеспечении FACS Diva8.

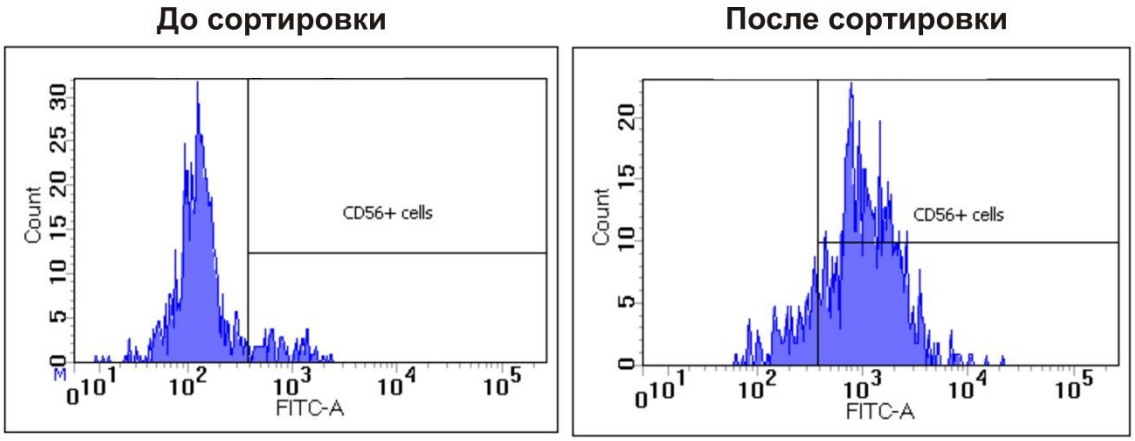

Рисунок 2. Данные проточной цитофлуориметрии культуры hADSCs, окрашенных специфическими антителами CD56-FITC до и после сортировки с помощью проточного цитофлуориметрасортера BD FACS AriaIII (Гомзикова М.О.)

4.5. Изолирование единичных клеток с использованием проточной цитометрии

Сортировка единичных клеток проводится в 96 луночные культуральные планшеты содержащие 100 мкл питательной среды. В ходе сортировки получают единичные клетки Рисунок 3. Последующая оценка единичных клеток осуществляется с использованием

инвертированного флуоресцентного микроскопа исследовательского класса AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с компьютерной системой фотодокументации. После выделения клетки содержат в инкубаторе MCO-15AC (Sanyo) при 37°C, во влажной атмосфере с содержанием 5% CO_2 или используют в других.

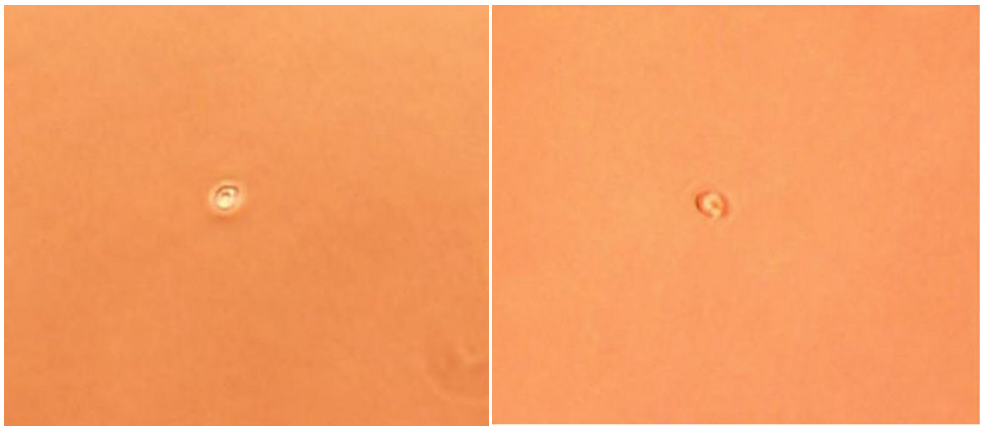

Рисунок 3. Единичные стволовые клетки из жировой ткани человека (hADSCs) трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом, стабильно экспрессирующие молекулу клеточной адгезии нервных клеток-1 (NCAM1). Фазово-контрасная световая микроскопия, увеличение X200 раз.

5. Список использованных источников и нормативных документов.

1. Pollard J.W. and Walke J.M. Basic cell culture protocols [Book]: Humana Press, 1997.
2. FACS Facility FACSAria Sorting Guide *http://microbiology.columbia.edu/fcc/ariaii_sample_preparation_guide.pdf*
3. Sample Preparation for FACSAria Cell Sorter *http://www2.unil.ch/facs/downloads/sortinfo.pdf*
4. Basu S. Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) /S. Basu, H. Campbell, B. Dittel, A. Ray// J Vis Exp. 2010; (41): 1546.
5. Gross A. Technologies for Single-Cell Isolation /A. Gross, J. Schoendube, S. Zimmermann, M. Steeb, R. Zengerle, P. Koltay// Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 16897-16919
6. J.Wang, Z. Min, M. Jin, X. Wang Protocol for Single Cell Isolation by Flow Cytometry. X. Wang (ed.), 2015, Single Cell Sequencing and Systems Immunology, Translational Bioinformatics 5, DOI 10.1007/978-94-017-9753-5_11