

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

Проректор по научной деятельности



МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК
РАЗЛИЧНОГО ТИПА

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)

1. Назначение и область применения

Настоящая лабораторная методика предназначена для проведения совместного ко-культивирования различных типов эукариотических клеток.

2. Принцип методики

Методика основана на совместном ко-культивировании эукариотических клеток в частности, в качестве модели, культуры раковых клеток нейробластомы человека (SH-SY5Y) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из зачатков третьих моляров человека меченных *in vitro* мембранными флуоресцентными красителями РКН26 (Red Fluorescent Cell Linker) (красный) и РКН67 (Green Fluorescent Cell Linker Kits) (зеленый).

3. Оборудование и материалы.

3.1. Оборудование для культивирования клеток и их последующего анализа

- 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. CO₂ инкубатор MCO-15AC (Sanyo)
- 3.1.6. Инвертированный флуоресцентный микроскоп исследовательского класса AxioObserver.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)

3.2. Материалы.

- 3.2.1. Клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y, ATCC (American Type Culture Collection, USA), ATCC номер: CRL-2266.
- 3.2.2. 0,25% раствор трипсин-EDTA (Sigma, USA).
- 3.2.3. Среда DMEM (Dulbecco's modified essential medium (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 Мезенхимальных стволовые клетки из зачатков третьих моляров человека (МСК из ЗТМ)
- 3.2.14 Планшеты культуральные 96-, 48-, 24- луночные, для монослойных культур клеток, с крышкой, плоскодонные, стерильные (Jet Biofil)
- 3.2.15 Мембранный флуоресцентный краситель PKH26 (красный) (Sigma, США)
- 3.2.15 Мембранный флуоресцентный краситель PKH67 (зеленый) (Sigma, США)

4. Методика проведения ко-культивирования эукариотических клеток

4.1. Окрашивание клеток мембранными флуоресцентными красителями

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из зачатков третьих моляров человека и клетки нейробластомы человека (SH-SY5Y) наращивали на среде DMEM, с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 1% раствора пенициллин-стрептомицина при 37°C, во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂. Пассирование клеток проводили согласно стандартному протоколу с использованием 0,25% раствора трипсин-EDTA. После получения необходимого количества клеток, МСК метили с использованием мембранного флуоресцентного красителя PKH67 (зеленый), а клетки линии SH-SY5Y метили с использованием мембранного флуоресцентного красителя PKH26 (красный). Мечение клеток проводили в соответствии с инструкцией фирмы производителя (Sigma). Вкратце, МСК и клетки линии SH-SY5Y трипсинизировали и ресуспензировали буферном растворителе-С (diluent-С) и затем смешали с двух кратным рабочим раствором красителя, состоящим из растворителя-С и флуоресцентного красителя (PKH67 для МСК или PKH26 для SH-SY5Y). Впоследствии суспензии клеток осторожно перемешивали легким пипетированием и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Для блокирования окраски добавляли небольшое количество FBS. Окрашенные клетки дважды промывали полноценной питательной средой DMEM.

4.2. Ко-культивирование клеток и их визуализация

Меченные клеточные типы (МСК-PKH67, SH-SY5Y-PKH26) смешивали в hfdys[пропорциях и высевали в 12-луночные культуральные планшеты. Ко-культуры поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и 1% раствора пенициллин-стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂. Анализ проводили спустя 72 часа с момента культивирования с применением инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с компьютерной системой фотодокументации.

В процессе инкубации клеток МСК и SH-SY5Y с мембранными флуоресцентными красителями PKH67 и PKH26, соответственно, происходит окрашивание всей клеточной популяции (Рис. .. Это характерно как для МСК так и для SH-SY5Y. При последующем ко-культивировании, меченые клетки (МСК-PKH67, SH-SY5Y-PKH26) легко различимы при флуоресцентной микроскопии по своему уникальному спектру, SH-SY5Y (красная флуоресценция) (Рис. , А) и МСК (зеленая флуоресценция) (Рис. , В) Окрашивание позволяет легко дифференцировать один клеточный тип от другого даже при их совместном продолжительном культивировании. Несмотря на то, что обе клеточные популяции вносили в ко-культуру одновременно и в одинаковых пропорциях в виде смешанной моноклеточной суспензии, происходило быстрое расхождение клеточных типов. Также можно видеть самоорганизацию клеток МСК и SH-SY5Y, имеющую вид канальных и островковых структур.

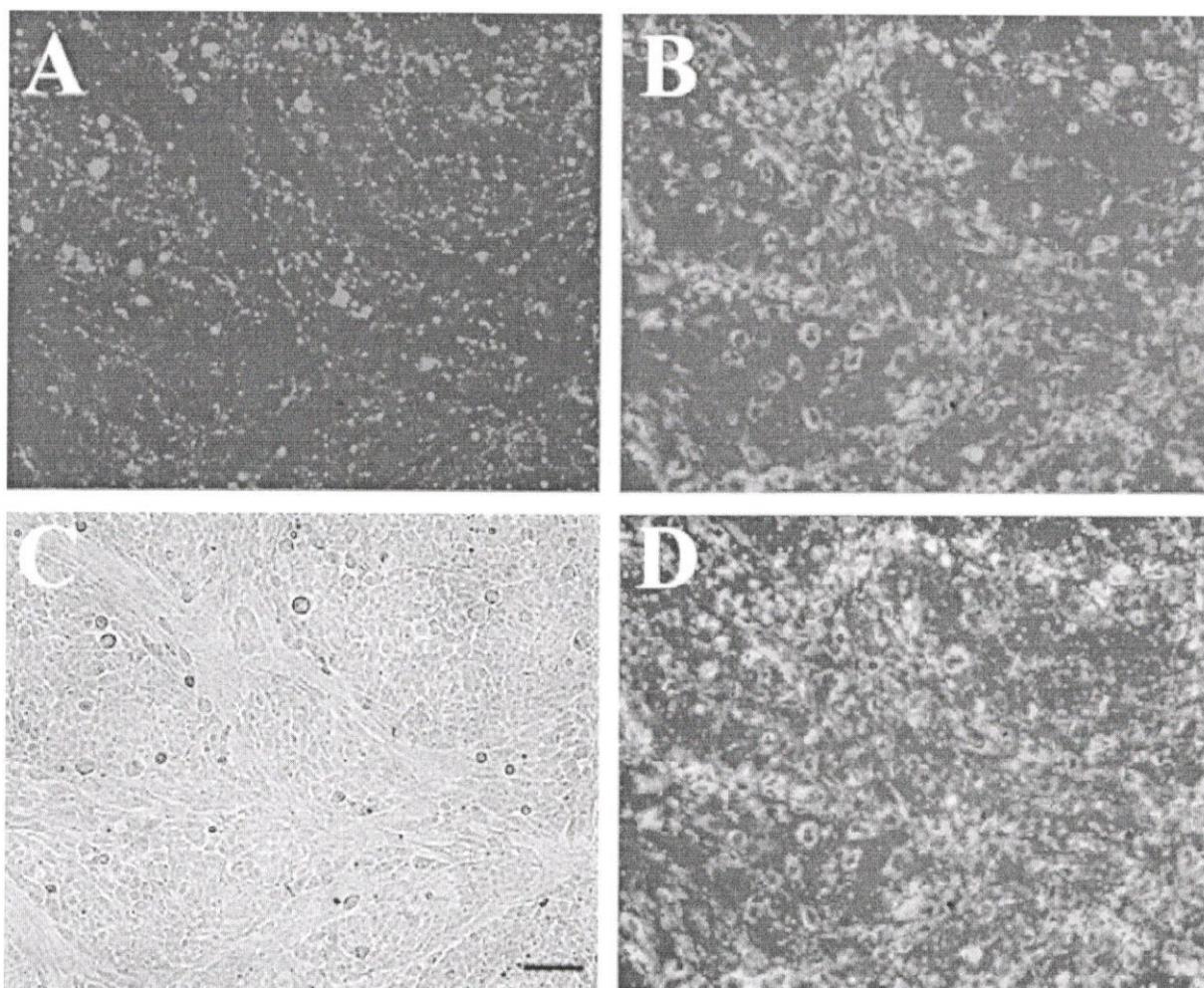


Рис. 1. Клетки МСК и SH-SY5Y в процессе ко-культивирования, 72 часа после объединения клеточных типов. Наблюдается самоорганизацию клеток, при которой МСК формируют канало-подобную структуру (зеленая флуоресценция), а клетки линии SH-SY5Y приобретают островково-подобную структуру (красная флуоресценция). **А.** Клетки линии SH-SY5Y окрашенные красным мембранным красителем – PKH26. **В.**

Клетки МСК окрашенные зеленым мембранным красителем – РКН67 (зеленая флуоресценция). С. Фазово-контрастная световая микроскопия, представлены каналоподобные и островково-подобные структуры. (D) объединенные изображения панелей А и В. Масштаб шкалы: 100 мкм.

5. Список использованных источников и нормативных документов.

1. Pollard, J.W. and Walke, J.M. Basic cell culture protocols [Book]: Humana Press, 1997.
2. Rizvanov A.A. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuro-blastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: a novel system for modeling cancer cell micro-environment / A.A. Rizvanov, M.E. Yalvaç, A.K. Shafigullina, I.I. Salafutdinov, N.L. Blatt, F. Sahin, A.P. Kiyasov, A. Palotás // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2010. – Vol.76, №2. – P.253-259.
3. Yalvac M.E. Neuroprotective Effect of Human Tooth Germ Stem Cells after Long Term Cryopreservation / M.E. Yalvac, M. Ramazanoglu, M. Tekguc, O.F. Bayrak, A.K. Shafigullina, I.I. Salafutdinov, N.L. Blatt, A.P. Kiyasov, F. Sahin, A. Palotás, A.A. Rizvanov // Current Neurovascular Research. – 2010. – Vol.7, №1. – P.49-58.