



Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки: протокол

И.Е. Пристяжнюк¹, А.Г. Мензоров^{1, 2}

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Возможность репрограммирования генома млекопитающих активно исследуется более полувека. В 1962 г. Гёрдон впервые показал возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки факторами энуклеированного ооцита. В 2006 г. 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 соответствуют 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 г. в Институте цитологии и генетики СО РАН были получены ЭС клетки ценного пушного зверя – американской норки (*Neovison vison*), благодаря чему появилась уникальная возможность сравнить индуцированные и полученные из эмбриона плюрипотентные клетки. В 2015 г. нами получены ИПСК американской норки и показано репрограммирование генома фибробластов на уровне анализа экспрессии генов: часть генов была успешно репрограммирована, часть имела промежуточную между фибробластами и ЭС клетками экспрессию, часть не репрограммировалась, и наконец, присутствовали гены, экспрессия которых отличалась от обоих типов клеток. Таким образом, еще для одного вида животных стало возможным изучать плюрипотентность и дифференцировку на двух типах плюрипотентных клеток: ЭС и ИПСК. В настоящей статье представлен подробный протокол получения ИПСК американской норки с использованием векторов, несущих гены *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* человека. Кратко описан необходимый набор методов анализа: морфология ИПСК, цитогенетический анализ, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией на присутствие «маркирующих» плюрипотентность генов и тест на формирование тератом в иммунодефицитных мышах. Данный протокол позволяет воспроизводимо и эффективно получать ИПСК из фибробластов американской норки.

Ключевые слова: ИПСК; плюрипотентность; *Neovison vison*; американская норка.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Пристяжнюк И.Е., Мензоров А.Г. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток американской норки: протокол. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Pristyazhnyuk I.E., Menzorov A.G. Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):701-709. DOI 10.18699/VJ17.288 (in Russian)

Generation of American mink induced pluripotent stem cells: a protocol

I.E. Pristyazhnyuk¹, A.G. Menzorov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Mammalian genome reprogramming has been studied for more than half a century. First, Sir John Gurdon showed the possibility of differentiated cell genome reprogramming by enucleated oocyte factors in 1962. Dr. Shinya Yamanaka produced induced pluripotent stem (iPS) cells from mouse fibroblasts by the use of just four transcription factors in 2006: Oct4, Klf4, Sox2, and c-Myc. Generation of iPS cells put a question about the reprogramming completeness: do genes derived from fibroblasts retain their expression? And are the features of iPS cells in compliance with those of embryonic stem (ES) cells that serve as a standard? To date, iPS cells have been produced for tens of species, while ES cells, for less than twenty. In 1993 American mink (*Neovison vison*) ES cells were produced in the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. That created a unique opportunity for comparison of induced and embryo-derived pluripotent cells. In 2015 we produced American mink iPS cells and showed fibroblast genome reprogramming at the level of gene expression and divided genes into four groups: reprogrammed, with intermediate expression, non-reprogrammed, and the ones with a “novel” expression pattern. Thus, an opportunity to study pluripotency and differentiation on two pluripotent cell types, ES and iPS cells, was added for one more species. In this article we present a detailed protocol for generation of American mink iPS cells with human *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC* genes. In addition, we briefly describe necessary methods for their analysis: morphology, cytogenetic analysis, PCR with reverse transcription for the presence of pluripotency “marker” genes, and teratoma formation test in immunodeficient mice. This protocol allows reliable and efficient generation of American mink iPS cells from embryonic fibroblasts.

Key words: iPS cells; pluripotency; *Neovison vison*; American mink.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006), человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) и других видов открыло новую страницу в изучении плюрипотентности, эмбрионального развития и дифференцировки. Простота методического подхода позволила к настоящему времени получить ИПСК для десятков видов. В то же время эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, которые можно считать стандартом плюрипотентности, получены менее чем для 20 видов.

В Институте цитологии и генетики СО РАН в 1993 г. были впервые получены ЭС клетки американской норки (Sukoyan et al., 1993). В 2015 г. нами получены ИПСК американской норки, и, таким образом, появилась уникальная возможность сравнения полученных из эмбриона и индуцированных плюрипотентных клеток на новом, сравнительно мало исследованном виде (Menzogov et al., 2015). Ключевые транскрипционные факторы, позволяющие индуцировать плюрипотентность в геноме дифференцированных клеток, достаточно консервативны, что позволяет использовать для репрограммирования дифференцированных клеток различных видов гены человека, например для получения ИПСК собаки (Baird et al., 2015). Так, представленная система репрограммирования генома с минимальными модификациями была успешно применена нами для получения ИПСК как человека и мыши (неопубл. данные), так и американской норки. Мы предполагаем, что дифференцированные клетки других видов также могут быть репрограммированы после незначительной модификации данного протокола. Ниже представлен подробный и эффективный протокол получения ИПСК американской норки из эмбриональных фибробластов с использованием набора лентивирусных векторов, несущих гены *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* и *c-MYC* человека.

Материалы

Перечисленные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому для части пластиковых расходных материалов производитель не указан. В разделе «Ожидаемые результаты» необходимые материалы приведены в тексте.

- 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 – 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).
- Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, L3000008).
- 2-меркаптоэтанол (Amresco, Am-0482-0.1).
- Полибрен (Merck Millipore, TR-1003-G).
- Вальпроевая кислота, натриевая соль (Sigma-Aldrich, P4543).
- Параформальдегид (Sigma-Aldrich, 158127).
- 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 мкм (Jet Biofil, FPV203030).
- Насадка фильтровальная на шприц, d = 30 мм, диаметр пор 0.45 мкм (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 «Подготовка 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 *Neovison vison* (эмбрионы предоставлены О.В. Трапезовым).
- 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 (векторы предоставлены С.В. Киселевым).

Подготовка материалов

- Среда для культивирования фибробластов мыши (среда для ЭФМ): среда DMEM, 10 % FBS, 1X пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования клеток линии Phoenix (среда для Phoenix): среда DMEM/F12, 10 % инактивированной 30 мин при 56 ° С FBS, 1X GlutaMAX, 1X NEAA, 1X пенициллин-стрептомицин. Среду Phoenix можно использовать и для культивирования фибробластов мыши.

ВАЖНО! Считается, что для эффективной наработки лентивирусов необходимо инактивировать комплемент в FBS, поэтому сыворотка подвергается тепловой инаktivации.

- Среда для культивирования эмбриональных фибробластов американской норки (ЭФН) (среда для ЭФН): среда MEM α , 15 % FBS, 1X пенициллин-стрептомицин.
- Среда для культивирования ИПСК американской норки (среда для ИПСК): среда MEM α , 15 % FBS для ЭС клеток, 1X GlutaMAX, 1X NEAA, 1X 2-меркаптоэтанол, 1X пенициллин-стрептомицин.
- НФБ: растворить таблетку в воде в соответствии с рекомендацией производителя, проавтоклавирировать.
- Желатин: приготовить 1 % водный раствор и проавтоклавирировать. Рабочий раствор – 0.1 % в НФБ. Покрыть пластиковые чашки Петри или планшеты 0.1 % желатином и поместить на 37 °C 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 °C, при +4 °C 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 °C. Рабочая концентрация 1 мМ.

ВАЖНО! После разморозки вальпроевую кислоту не хранить при +4 °C больше суток. В среду для культивирования добавлять свежие аликвоты вальпроевой кислоты.

- 2-меркаптоэтанол: развести 70 мкл в 20 мл стерильного НФБ (раствор X500).
- Гипохлорит натрия (дезинфицирующий раствор): приготовить 20 % раствор «Белизны» или «Domestos гель», хранить не более недели.
- Параформальдегид 1 %: нагреть 4/5 объема НФБ до ~60 °C при помешивании, добавить 1 % параформальдегида и несколько капель 1 M NaOH, растворить, долить НФБ и довести с помощью HCl pH до 6.9. Аликвотировать и заморозить на –20 °C.
- Приготовление фидерных клеток: развести митомицин C 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» ФИЦ ИЦиГ СО РАН) на втором-третьем пассаже митомицином C 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./см². Один из вариантов протокола получения фидерных клеток из эмбрионов мыши описан в работе (Takahashi et al., 2007).

ВАЖНО! Митомицин C очень токсичен для клеток, поэтому необходимо промыть клетки НФБ не менее трех раз.

Оборудование

Для большей части оборудования производитель не указан, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также может быть заменен 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.
- CO₂-инкубатор (культивирование клеток производится при 5 % CO₂ и 37 °C).
- Термостат на 37 °C.
- Холодильники на –80 °C, –20 °C и +4 °C.
- Инвертированный микроскоп.
- Автоклав.
- Криохранилище с жидким азотом.
- Водяная баня.
- Проточный цитофлуориметр.

Протокол получения ИПСК американской норки

Ниже приведен протокол получения ИПСК американской норки по дням. Несколько общих замечаний по протоколу:

- Общая схема эксперимента представлена на рис. 1. День заражения лентивирусами (трансдукции) назван днем 0, номер пассажа клеток с этого дня – также 0.
- Культивирование клеток производится в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °C. Среды, НФБ и трипсин-ЭДТА хранятся при +4 °C, перед работой с клетками прогреваются до комнатной температуры. При наработке лентивирусов в клетках Phoenix и при разморозке клеток среда прогревается до 37 °C.
- Работа с клетками проводится в стерильных условиях в ламинарном шкафу II класса защиты.
- Площадь лунки 12-луночного планшета составляет около 4 см², 6-луночного планшета – 10 см², а чашки Петри диаметром 10 см – 55 см², для культивирования добавлять 1, 2 или 10 мл среды соответственно.
- Работа с лентивирусами опасна и требует соблюдения техники безопасности, необходимо обязательно проконсультироваться со специалистами. Базовые рекомендации приведены по указанным ниже ссылкам (http://www.ohsu.edu/xd/about/services/integrity/policies/upload/IBC-EHRS-Form_Lentiviral-Vector-Safety-Manual.doc; http://ehs.uky.edu/docs/pdf/bio_viral_vectors_0001.pdf).

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 °C. Дождаться, пока клетки разморозятся, но еще будет оставаться кусочек льда.

ВАЖНО! Криопротектор ДМСО токсичен для клеток, разморозка проводится при 37 °C быстро, чтобы минимизировать время взаимодействия с ДМСО.

3. Перенести в пробирку с теплой средой, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать супернатант и рассадить

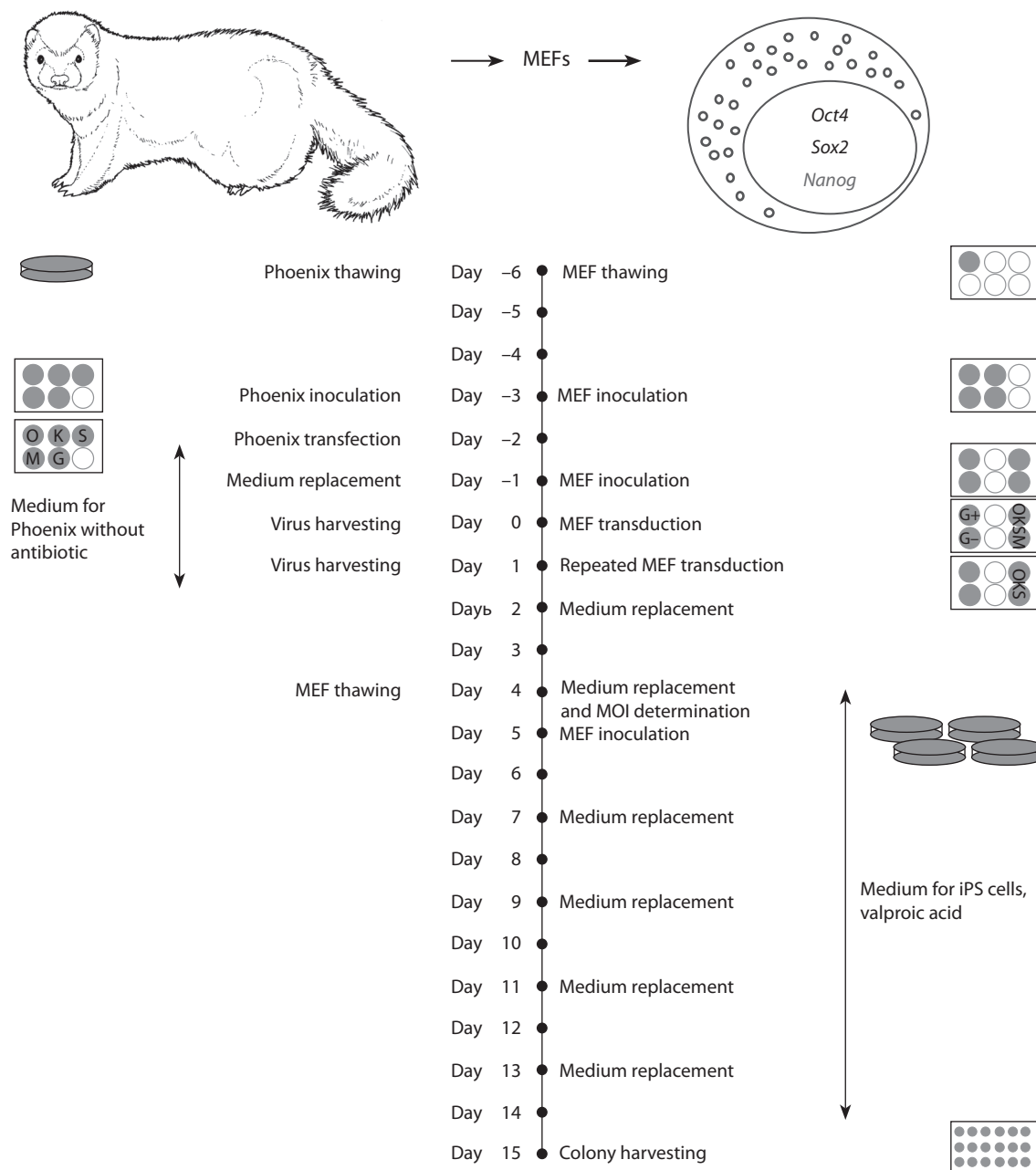


Fig. 1. Derivation of American mink iPS cells from embryonic fibroblasts.

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 см²) разморозку также проводить на одну ячейку.

4. Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO₂-инкубатор. **ВАЖНО!** В зависимости от количества замороженных клеток и эффективности разморозки можно культивировать ЭФН и в другом удобном режиме. Важно на день –1 получить культуру ЭФН с плотностью 70–95 %. Пересев клеток нужно вести при плотности 80–95 %. Считается, что клетки на ранних пассажах более эффективно репрограммируются в ИПСК.

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 °C. 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 CO₂-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 °С. 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).

ВАЖНО! Клетки не должны пересыхать. Если добавлено слишком много трипсина-ЭДТА, необходимо после открепления клеток от пластика добавить равный объем среды для ЭФН, ресуспендировать до одноклеточной суспензии, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать осадок, ресуспендировать в среде и рассадить.

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 °С. 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 см² на 5 лунок желатинизированного 6-луночного планшета (см. рис. 1). Число клеток необходимо подобрать заранее так, чтобы на день –2 плотность Phoenix была 70–90 %.

ВАЖНО! Клетки не должны пересыхать. Если добавлено слишком много трипсина-ЭДТА, необходимо после открепления клеток от пластика добавить равный объем среды для клеток Phoenix, ресуспендировать до одноклеточной суспензии, центрифугировать при 300 g 3 мин, убрать осадок, ресуспендировать в среде и рассадить.

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.

ВАЖНО! Мы используем среднее количество Lipofectamine 3000 от рекомендованных производителем минимального и максимального, т. е. 5.6 мкл на лунку 6-луночного планшета.

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.

ВАЖНО! Соотношение количества ДНК плазмид следующее: pRSV-Rev:pMDLg/pRRE:pCMV-VSV-G:Vector = 5:10:2:10. На лунку 6-луночного планшета необхо-

димо 2.5 мкг ДНК и 5 мкл P3000. Рекомендуем заранее приготовить смесь упаковочных плазмид и выравнивать концентрации векторов.

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.
- ВАЖНО! Считается, что антибиотики токсичны при трансфекции клеток, поэтому рекомендуется проводить трансфекцию без антибиотиков.*
17. По каплям добавить липидные комплексы ДНК к клеткам, аккуратно перемешать покачиванием планшета и перенести в CO₂-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./см² (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 (см. рис. 1).
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 °С. 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 переувлажнения и отслоения клеток.

ВАЖНО! 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.

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 (см. рис. 1). Начиная с этого дня будущим ИПСК присваивается пассаж 0.

День 1. Трансдукция ЭФН

25. Для получения ИПСК может быть достаточно однократной трансдукции клеток лентивирусами, однако для надежности в день 1 предлагается провести повторную трансдукцию лентивирусами. Трансдукция проводится так же, 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.

ВАЖНО! Если значительная часть клеток Phoenix открепилась от поверхности, не следует использовать среду, так как титр вируса невозможно определить. Для повторной трансдукции можно использовать среду, собранную в день 0 и хранившуюся при +4 °C. Вирусы можно также замораживать на –80 °C, но при этом титр падает примерно на порядок.

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.
- ВАЖНО! На второй день после трансдукции лентивирусами векторы эффективно экспрессируются и можно проводить определение MOI (см. день 4).*

День 4. Смена среды. Разморозка фидерных клеток.

Определение MOI

Смена среды

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

ВАЖНО! Вальпроевая кислота ингибирует деацетилазу гистонов и, соответственно, делает хроматин более доступным для действия транскрипционных факторов. В разных протоколах используют вальпроевую кислоту от 7 до 14 дней, в этом протоколе взят средний срок – 10 дней.

Разморозка фидерных клеток

29. Желатинизировать необходимое число чашек Петри (см. раздел «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 °C. 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./см².

ВАЖНО! Необходимо заранее разморозить аликвоту фидерных клеток и на следующий день подсчитать число живых клеток, чтобы знать реальное количество клеток после разморозки.

33. Покачиванием плато равномерно распределить клетки по поверхности пластика и перенести в CO₂-инкубатор.

ВАЖНО! Фидерные клетки необходимо использовать на первый-второй день после разморозки. При необходимости пересадки клеток в день рассадки фидерных клеток должно пройти не менее трех часов после их разморозки.

Определение MOI

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

ВАЖНО! При фиксации параформальдегидом может пропадать флуоресценция GFP. В этом случае можно использовать антитела против GFP. Кроме того, с помощью антител возможно определить также число фибробластов, зараженных, например, OCT4, и таким образом точно узнать процентное содержание клеток с интеграцией трансгена (см. протокол окраски: <https://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/facsprotocol.htm>).

35. Подсчет MOI: $MOI = -\ln(1 - [\text{доля GFP+ клеток}])$. Например, если 63.2 % клеток имели флуоресценцию GFP, $MOI = -\ln(1 - 0.632) = 1$, т. е. в среднем один вирус на клетку или, точнее, соотношение числа вирусов к числу клеток равно единице. Так как использовалось 10 % разведение вируса, реальный MOI = 10. Сделаем качественную оценку MOI, предположив, 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.

ВАЖНО! Для увеличения эффективности трансдукции в данном протоколе используется полибрен. Если не удастся достичь необходимого титра вируса, можно использовать спинокуляцию: центрифугировать клетки со средой с вирусами в 6-луночном планшете при 650 g 60 мин при 32 °C.

День 5. Пересадка ЭФН

36. Убрать среду фидерных клеток, промыть НФБ, добавить среду для ИПСК и свежую аликвоту вальпроевой кислоты до концентрации 1 mM.
37. ЭФН, обработанные векторами, несущими OKSM, пересадить в соотношении 1:10 на чашки Петри с фидерными клетками в ИПСК среде. Например, клетки

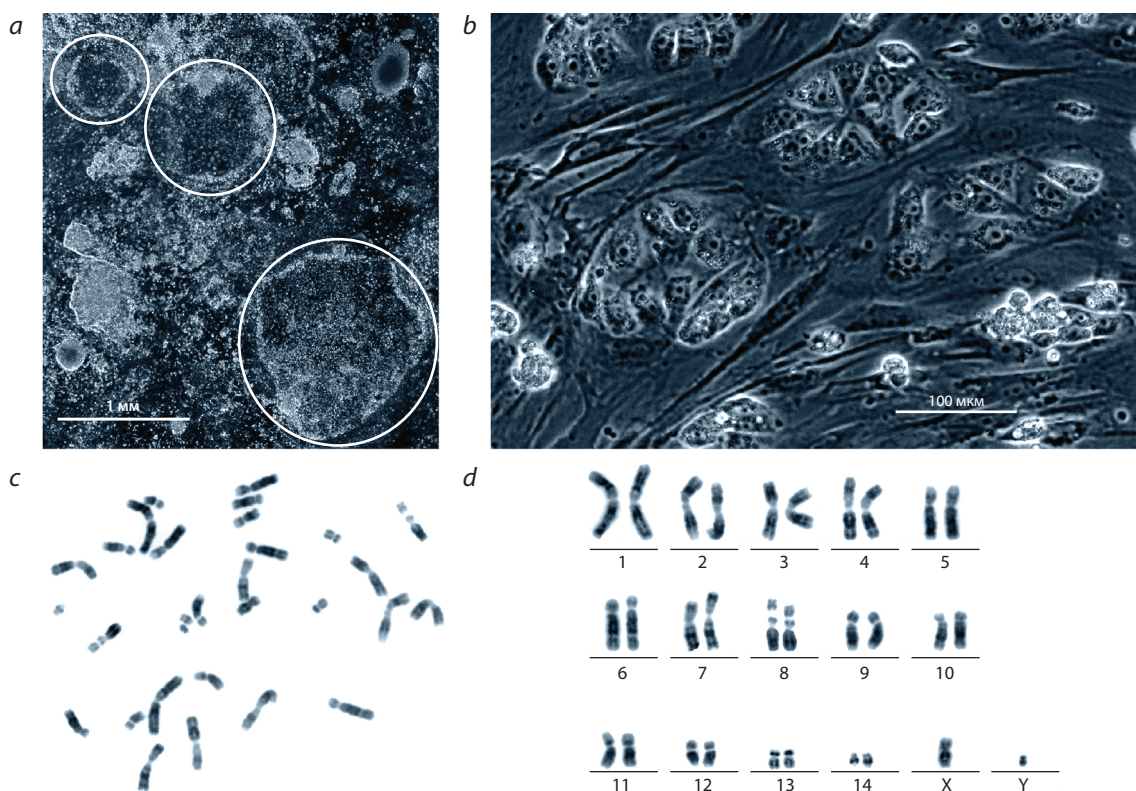


Fig. 2. iPS cell morphology and chromosome set.

(a) Morphology of primary iPS cell colonies on day 15. White circles indicate colonies with mink iPS cell morphology; (b) iPS cell colonies on days 1–2 after passage; (c) iPS cell metaphase plate; (d) iPS cell chromosome set.

с одной лунки 6-луночного планшета перенести на две чашки Петри.

ВАЖНО! Если колоний ИПСК будет слишком много, к моменту снятия они могут начать сливаться. В этом случае необходимо использовать большее разведение клеток.

Дни 7–11. Смена среды

38. Каждый второй день проводить смену среды на среду для ИПСК с вальпроевой кислотой.

ВАЖНО! Если колонии слишком маленькие для снятия, продолжать культивирование без добавления вальпроевой кислоты.

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 15. Снятие колоний ИПСК

41. Ко дню 15 на чашках Петри должны быть десятки–сотни колоний, из них около половины с морфологией, соответствующей ИПСК (рис. 2, а). 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 (~50 мкл) и трипсина-ЭДТА (~20 мкл).

44. Обвести выбранные колонии иглой шприца на 1 мл, скосырнуть 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 °С.

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

Дни 16–30. Размножение и характеристика 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 °С.

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 ИПСК: 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°C . На следующий день или не позже чем через три дня перенести в криохранилище с жидким азотом.
50. Параллельно с заморозкой можно проводить анализ ИПСК (см. раздел «Ожидаемые результаты»).

Ожидаемые результаты

Морфология ИПСК. В эксперименте можно получить десятки колоний ИПСК. Морфология ИПСК должна соответствовать плюрипотентным клеткам американской норки (Sukoyan et al., 1993; Menzorov et al., 2015). На рис. 2, б показаны маленькие колонии ИПСК. Колонии монослойные, при перерастании начинают формироваться плавающие полые «шары», пересадку клеток следует делать, не допуская этой стадии. ИПСК американской норки содержат круглые гранулы, вероятно липидные. Эти гранулы хорошо видны в отраженном свете.

Цитогенетический анализ. Следующий этап характеристики ИПСК – анализ кариотипа, который у американской норки имеет 30 хромосом (см. рис. 2, в, г). По нашим наблюдениям, хромосомный состав плюрипотентных клеток норки стабилен по сравнению с ЭС клетками мыши. Для получения препаратов метафазных хромосом ИПСК американской норки за 3–4 ч до фиксации в среду добавить колцемид (Sigma-Aldrich, 10295892001) в концентрации 0.1 мкг/мл. Клетки промыть НФБ и снять с чашки Петри с помощью 0.25 % трипсина-ЭДТА. Трипсин инактивировать средой для ЭФН. Суспензию клеток перенести в 10 мл пробирку и центрифугировать при 300 g 5 мин. Супернатант слить, к осадку добавить 3 мл гипотонического раствора (0.56 % KCl) и инкубировать при 37°C 20 мин. После этого к суспензии добавить 100 мкл свежеприготовленного фиксатора (метанол : уксусная кислота в соотношении 3:1). Клетки центрифугировать при 300 g 5 мин, слить супернатант. К осадку аккуратно добавить 2 мл охлажденного фиксатора и выдержать на льду 20 мин. Клетки ресуспендировать и центрифугировать при 300 g 5 мин, осадок ресуспендировать в 1–1.5 мл

фиксатора, повторить процедуру. Полученную суспензию клеток раскатать на обезжиренные охлажденные мокрые предметные стекла (Thermo Scientific Menzel-Gläser, 76×26 мм) и высушить в потоке горячего воздуха.

Для анализа метафазных пластинок препараты окрасить раствором DAPI (Sigma-Aldrich, D9542) (2 мг/мл в НФБ), накрыть покровным стеклом, под которое поместить несколько капель антифэйда ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, P36934). Метафазные пластинки анализировать на флуоресцентном микроскопе, оснащенном камерой для съемки препаратов. Для анализа хромосомного состава произвести подсчет хромосом на 50 метафазных пластинках, 20 из которых использовать для кариотипического анализа. Хромосомный состав анализировать согласно номенклатуре, предложенной в (Mandahl, Fredga, 1975). В анализе используются митотические пластинки округлой формы, хромосомы в которых лежат отдельно, без большого числа наложений, при этом на препарате вблизи метафазных пластинок не должно быть отдельных, свободно лежащих хромосом.

Анализ плюрипотентности. Для подтверждения плюрипотентности ИПСК используется ОТ-ПЦР-анализ на «маркирующие» плюрипотентность гены и тест на формирование тератом в иммунодефицитных мышах. Дополнительно можно проверить, произошло ли ожидаемое в плюрипотентных клетках замолкание внесенных в геном трансгенов.

Для выявления экспрессии генов выделить суммарную РНК из клеток с помощью Aurum Total RNA mini kit (Bio-Rad, 732-6820) или TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424) в соответствии с рекомендациями производителя, обработать ДНКазой I (Fermentas, #EN0521) и синтезировать кДНК (Fermentas, #1612). Затем произвести амплификацию транскриптов генов *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* и эндогенного контроля *Hprt* и *Gapdh* (см. таблицу). Условия амплификации: начальная денатурация при 95°C 3 мин, 30 циклов из 95°C – 15 с, 58°C – 15 с, 72°C – 30 с и заключительная элонгация в течение 3 мин. Плюрипотентные клетки американской норки экспрессируют маркеры плюрипотентности *Nanog*, *Sox2* и *Oct4*.

В плюрипотентных клетках происходит замолкание лентивирусных вирусных последовательностей, в том числе введенных вирусами трансгенов. Поскольку в

Primers for RT-PCR

Gene	Forward prime	Reverse primer	Amplicon size, bp.
<i>Nanog</i> (<i>N. vison</i>) ¹	TGCAGAGGAGAGAACTGGGA	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	137
<i>Oct4</i> (<i>N. vison</i>) ¹	GATCAGCCACATTGCCCCAG	CGTTGCGAATAGTCACTGCT	159
<i>Sox2</i> (<i>N. vison</i>) ¹	CCATCTCCGTGGTCTTCTTT	ATTACCAACGAAGTCAACCT	131
<i>c-MYC</i> (<i>H. sapiens</i>) ²	TGCCTCAAATTGGACTTTTG	GATTGAAATTCTGTGTAAGTGC	192
<i>KLF4</i> (<i>H. sapiens</i>) ²	GCCACCCACACTTGTGATT	TCCACTCACAAGATGACTCAGT	408
<i>Hprt</i> (<i>N. vison</i>) ³	CTTTGCTGACCTGCTGGATT	CACCAATGACTTTGATGTCCC	134
<i>Gapdh</i> (<i>N. vison</i>) ³	AATGCCTCCTGTACCACCAA	GGTCATGAGTCCCTCCACAA	84

References: ¹ (Menzorov et al., 2015); ² (Mathew et al., 2010); ³ (Rouvinen-Watt et al., 2012).

качестве трансгенов были использованы гены человека, можно их специфически амплифицировать, не затрагивая гомологи американской норки. В таблице приведены праймеры для специфической амплификации генов *KLF4* и *c-MYC* человека.

Тест на формирование тератом. Плюрипотентные клетки способны образовывать тератомы с клетками — производными всех трех зародышевых листков, при введении иммунодефицитным мышам. Несмотря на критику (Buta et al., 2013), тератомный тест широко применяется для анализа плюрипотентности клеток различных видов, в том числе ЭС клеток и ИПСК американской норки.

Для получения тератом использовать стандартный протокол (Hogan et al., 1994). От 5 до 15 млн ИПСК в среде для ИПСК подкожно инъецировать иммунодефицитным мышам линии SCID в заживочную область. Через две-три недели после инъекции проводится анализ выросших до диаметра 0.5–1 см тератом (Hentze et al., 2009; Кизилова, 2016). Плюрипотентные клетки должны дифференцироваться в клетки всех трех зародышевых листков, но единичные тератомы могут не иметь все типы клеток, поэтому желательно анализировать не менее трех тератом на линию клеток.

Заключение

Представленный протокол получения ИПСК американской норки позволяет быстро получить плюрипотентные клетки, которые можно использовать в исследованиях раннего развития американской норки, изучения плюрипотентности и, в дальнейшем, для трансгенеза. Полученные нами ИПСК и ЭС клетки американской норки депонированы и доступны в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепрограммического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН (<http://ckp.icgen.ru/cells/>; <http://cells.biores.cytogen.ru/cells/>).

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-00644, and by the program of the development of bioresource collections, Federal Agency for Scientific Organizations. Use of Shared Access Center equipment was supported by the Russian Federation Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015. The authors are grateful to S.L. Kiselev (Institute of General Genetics, Moscow) for kindly provided lentiviral vectors and to O.V. Trapeznov for kindly provided American mink embryos. The authors acknowledge the work of the staff of the Shared Access Center SPF vivarium (RFMEFI61914X0005 and RFMEFI62114X0010); Shared Access Center for Microscopic Analysis of Biological Objects, Siberian Branch of the RAS, Shared Access Center for Flow Cytometry; and Shared Access Center "Collection of Human and Mammalian Pluripotent

Cell Cultures for General Biology and Biomedicine, ICG, Novosibirsk. The authors thank M.S. Pristiyazhnyuk for the drawing of an American mink.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Baird A., Barsby T., Guest D.J. Derivation of canine induced pluripotent stem cells. *Reprod. Domest. Anim.* 2015;50(4):669-676. DOI 10.1111/rda.12562.
- Buta C., David R., Dressel R., Emgård M., Fuchs C., Gross U., Healy L., Hescheler J., Kolar R., Martin U., Mikkers H., Müller F.J., Schneider R.K., Seiler A.E., Spielmann H., Weitzer G. Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res.* 2013;11(1):552-562. DOI 10.1016/j.scr.2013.03.001.
- Hentze H., Soong P.L., Wang S.T., Phillips B.W., Putti T.C., Dunn N.R. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.* 2009;2(3):198-210. DOI 10.1016/j.scr.2009.02.002.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy L. *Manipulating the Mouse Embryo*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Kizilova E.A. Optimization of the teratoma formation test. *Geny i kletki = Genes & Cells*. 2016;11(2):119-128. (in Russian)
- Mandahl N., Fredga K. Q-, G- and C-band patterns of the mink chromosomes. *Hereditas*. 1975;81(2):211-220.
- Mathew R., Jia W., Sharma A., Zhao Y., Clarke L.E., Cheng X., Wang H., Salli U., Vrana K.E., Robertson G.P., Zhu J., Wang S. Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency. *FASEB J.* 2010;24(8):2702-2715. DOI 10.1096/fj.09-148973.
- Menzorov A.G., Matveeva N.M., Markakis M.N., Fishman V.S., Christensen K., Khabarova A.A., Pristiyazhnyuk I.E., Kizilova E.A., Cira 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. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S6.
- Rouvinen-Watt K., Harris L., Dick M., Pal C., Lei S., Mustonen A.M., Nieminen P. Role of hepatic *de novo* lipogenesis in the development of fasting-induced fatty liver in the American mink (*Neovison vison*). *Br. J. Nutr.* 2012;108(8):1360-1370. DOI 10.1017/S0007114511006775.
- 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. DOI 10.1002/mrd.1080360205.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2007;2(12):3081-3089. DOI 10.1038/nprot.2007.418.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-1920. DOI 10.1126/science.1151526.