

Клетка в культуре

Клеточная и генная инженерия

-2

Криоконсервация клеток

- DMSO, 10% (5-15%)
- Кондиционированная среда или среда с повышенным содержанием сыворотки
- Клетки в экспоненциальной фазе роста, а не в стационарной
- Адаптация к криопротектору – 10-20 минут, затем желательно начать охлаждение
- Замораживание по программе с помощью специального оборудования или помещение в контейнере из пористого полипропилена в холодильник на -70 градусов с дальнейшим хранением в жидком азоте или в холодильнике -120-130градусов.
- При -70о клетки сохраняют жизнеспособность в течение 2-3 месяцев, при -120о – несколько лет, в жидком азоте – практически вечно.

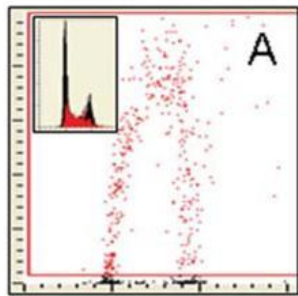
Флюорохромы для исследования ДНК методом проточной цитометрии

Краситель	Класс	Цвет флюоресценции
Бромистый этидий	Интеркалятор	Кирпично-красный
Йодистый пропидий	Интеркалятор	Кирпично-красный
Оливомицин	G-C связывание	Зелено-жёлтый
Митромицин	G-C связывание	Зелено-жёлтый
Хромомицин	G-C связывание	Зелено-жёлтый
Хёхст 33258 Hoechst	A-T связывание	Голубой
(Bisbensimide H 33258 Fluorochrome)	A-T связывание	Голубой
DAPI (4,6-	Реакция Фельгена	Зеленый
диамидино-2-	A-T связывание +	Кирпично-красный
фенилидол)	Интеркалятор	
Акрифлавин		
Оливомицин +		
бромистый этидий		

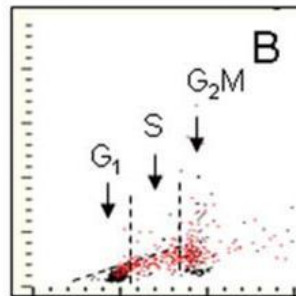
Методом проточной цитометрии проводят:

- 1. Анализ синтеза ДНК
- 2. Анализ содержания ДНК
- 3. Определение доли живых и мертвых клеток
- 4. Анализ содержания ДНК - общий белок
- 5. Анализ содержания ДНК – РНК
- 6. Статмокинетический анализ

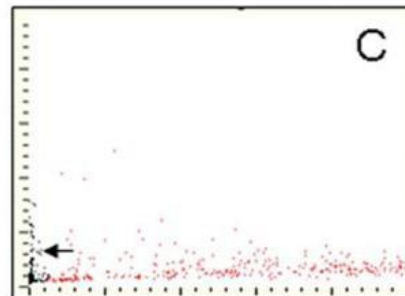
EdU incorporation



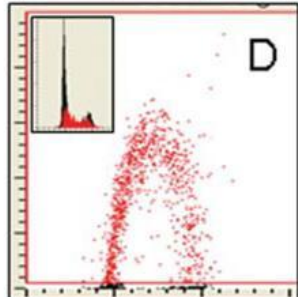
A



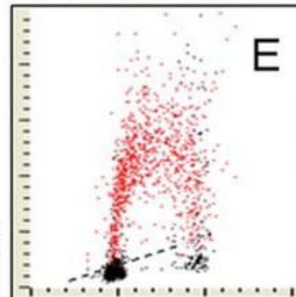
B



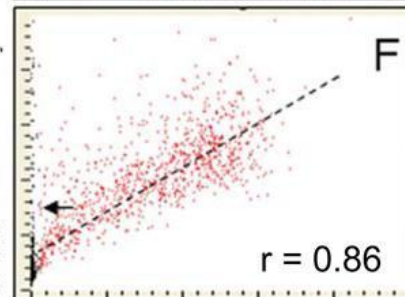
C



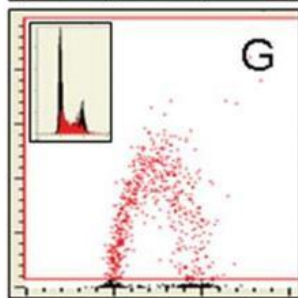
D



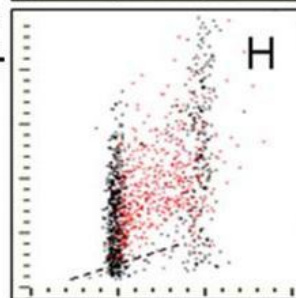
E



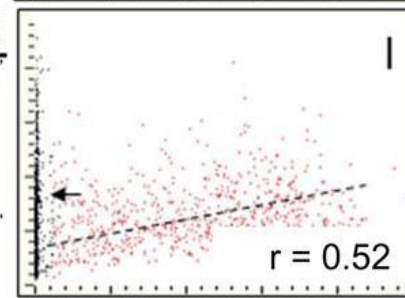
F



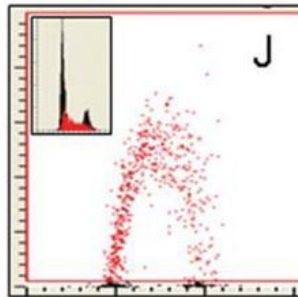
G



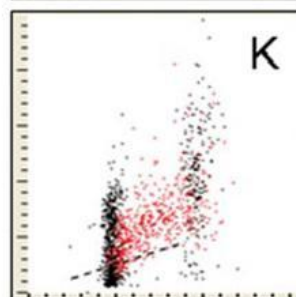
H



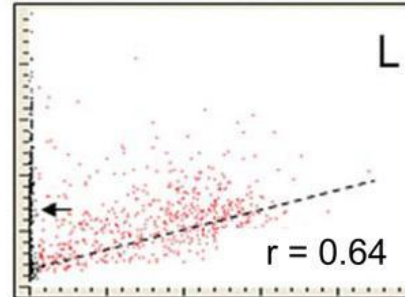
I



J



K



L

γH2AX

γH2AX

DNA content

EdU incorporation

Ctrl

Tpt

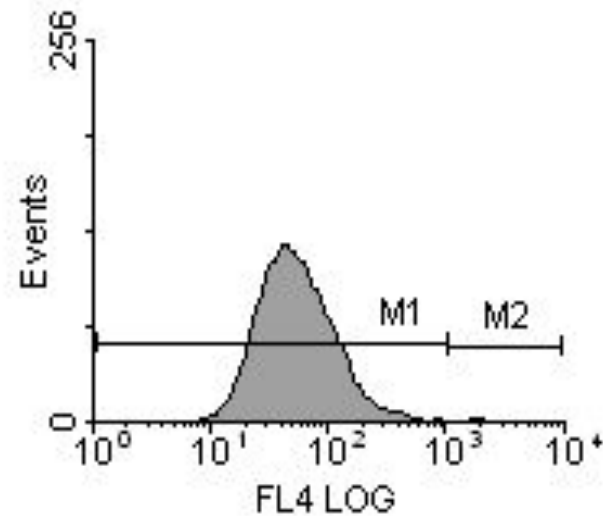
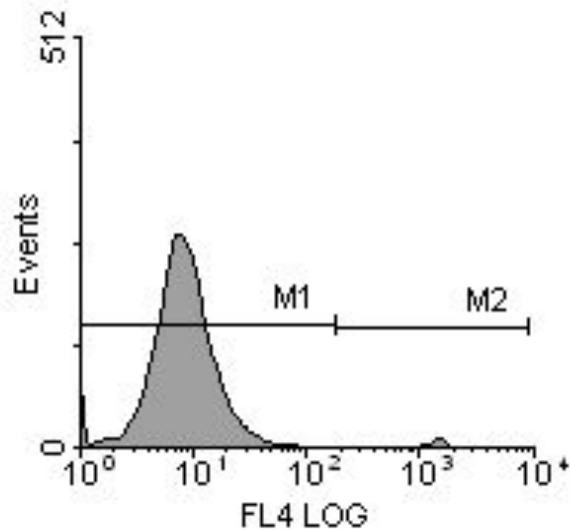
Mxt

Etp

Correlation between induction of H2AX by Cpt, Mxt, and Etp and DNA replication in A549 cells

Exponentially growing A549 cells were exposed to EdU for 30 min and then (still in the presence of EdU) were treated either with Cpt (D, E, F), Mxt (G, H, I), or Etp (J, K, L) for 2 h. Control cells (A—C) were exposed only to EdU for 2.5 h. The cells were then fixed and their blue (DAPI), green (EdU), and red (γH2AX) fluorescence were measured

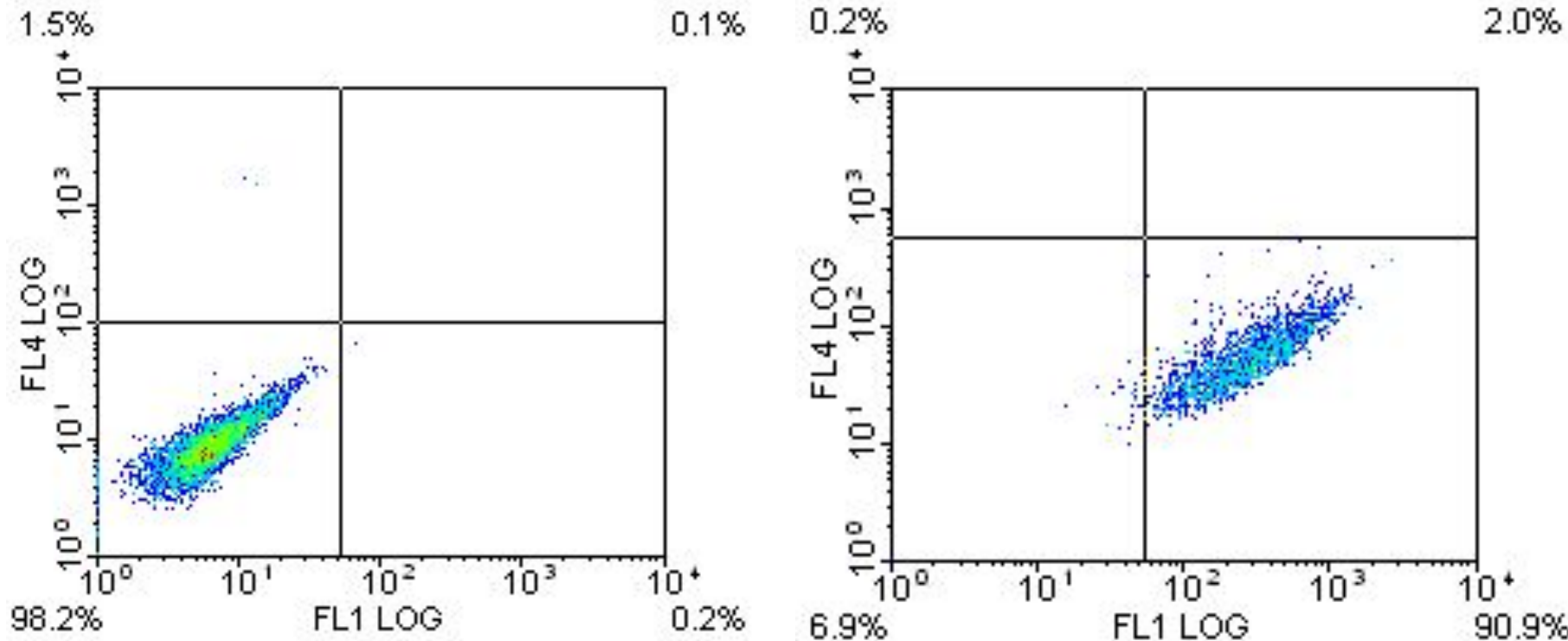
Доля мертвых клеток и в опыте и в контроле одинакова – 2%



- K- 98% (“live”), M2-2% (“dead”)

- complex -98% and 2% respectively

Все живые клетки несут меченую ДНК



- Вся метка сначала в зоне «живых», а потом вся «перемещается» в зону «содержащих меченую ДНК»

- Практически все клеточные технологии основаны на принципе взаимной комплементации различных клеточных штаммов. Создание таких штаммов является одной из важнейших первоочередных задач. Для создания генетически маркированных клеточных штаммов можно применять различные селективные системы.
- В результате мы получаем штаммы клеток-продуцентов с различными свойствами: ауксотрофы, термочувствительные\термостабильные варианты, варианты обладающие повышенной чувствительностью\устойчивостью к ядам и антибиотикам.

Принципы селекции

- Селекция на устойчивость к тому или иному агенту может быть одношаговой или многошаговой.
- При посеве клеток для изучения устойчивости следует помнить, что ведущую роль играют 2 параметра – концентрация селективного агента и плотность культуры клеток.
- Концентрацию селективного агента следует подбирать таким образом, чтобы клоны резистентных клеток обнаруживались с частотой, соответствующей мутационной (10^{-4} – 10^{-5}). В выбранной концентрации данный агент должен убивать основную массу клеток, не позволяя им размножаться. К таким агентам относятся 8-азогуанин, убаин, пактомицин и некоторые другие.

- Для большинства агентов этот принцип «напрямую» не работает и для определения нужной концентрации необходимо провести анализ эффективности клонирования клеток при различных концентрациях данного агента. 5 чашек по 200 клеток на чашку – даст нам частоту 10⁻³. Увеличение начальной плотности больше 10⁴-10⁵ на чашку может привести к изменению частоты выявления устойчивых вариантов.
- Были проведены опыты по реконструкции, при которых 200 резистентных клеток смешали с клетками дикого типа различной плотности (10³-10⁶) и вели селекцию. При плотности посева выше 5-10⁵ **резистентные клоны не выявлялись**. При изменении плотности в заданном диапазоне количество выросших резистентных клонов практически не менялось. Причинами ингибирования роста резистентных клеток могут быть высокая токсичность продуктов распада гибнущих клеток и способность чувствительных клеток метаболизировать яды, превращая их в токсичные для резистентных клеток продукты.

Частота выявления мутантов

- Частота обнаружения устойчивых вариантов определяется по формуле $F=C/EN$, где F – частота обнаружения устойчивых вариантов, C – общее число клонов устойчивых клеток, E – эффективность клонирования исходных клеток (выраженная в долях единицы), N – число посеянных клеток.

Мутагены

- Для повышения выхода количества резистентных к селективному агенту клонов можно предварительно обработать клетки агентами, вызывающими мутации (ЭМС, ММС, МННГ, метилнитрозмочевина и т.п.). Обработка мутагенами должна производиться в концентрации, достаточной для гибели 30-80% клеток, что является оптимальным для индукции мутантных вариантов.
- В течение длительного времени (порядка длины клеточного цикла) обработку можно проводить только некоторыми мутагенами, например, ЭМС.
- Обработку большинством мутагенов нужно проводить в течение 0.5-4 часов в бессывороточной среде, так как они в присутствии сыворотки нестабильны.
- В воде мутагены, как правило, плохо растворимы, поэтому их необходимо предварительно растворять в ДМСО, этиловом спирте, ацетоне – а уж затем в фосфатном буфере, растворе Хэнкса или бессывороточной среде.

Мутагены

- Обработка этил-метансульфонатом – 16-18 час (200-300мкг/мл)
- Обработка метил-нитро-нитрозгуанидином – 3-4 час (1.5-3 мкг/мл)
- Выбор времени проявления признака, на который ведется селекция, зависит от времени фиксации индуцированных мутагеном повреждений ДНК и от периода полужизни белка-фермента. Например, ГГФРТ имеет время полужизни 24 часа, то есть на 7 сутки его количество будет составлять 1/128 от исходного уровня.
- Обычно используют следующие сроки: 1) клетки высевают на селекцию сразу же после обработки мутагеном (0 сут); 2) на 3-4 сут без предварительного пересева; 3) на 7-9 сутки, в середине этого срока проводят 1-2 пересева.

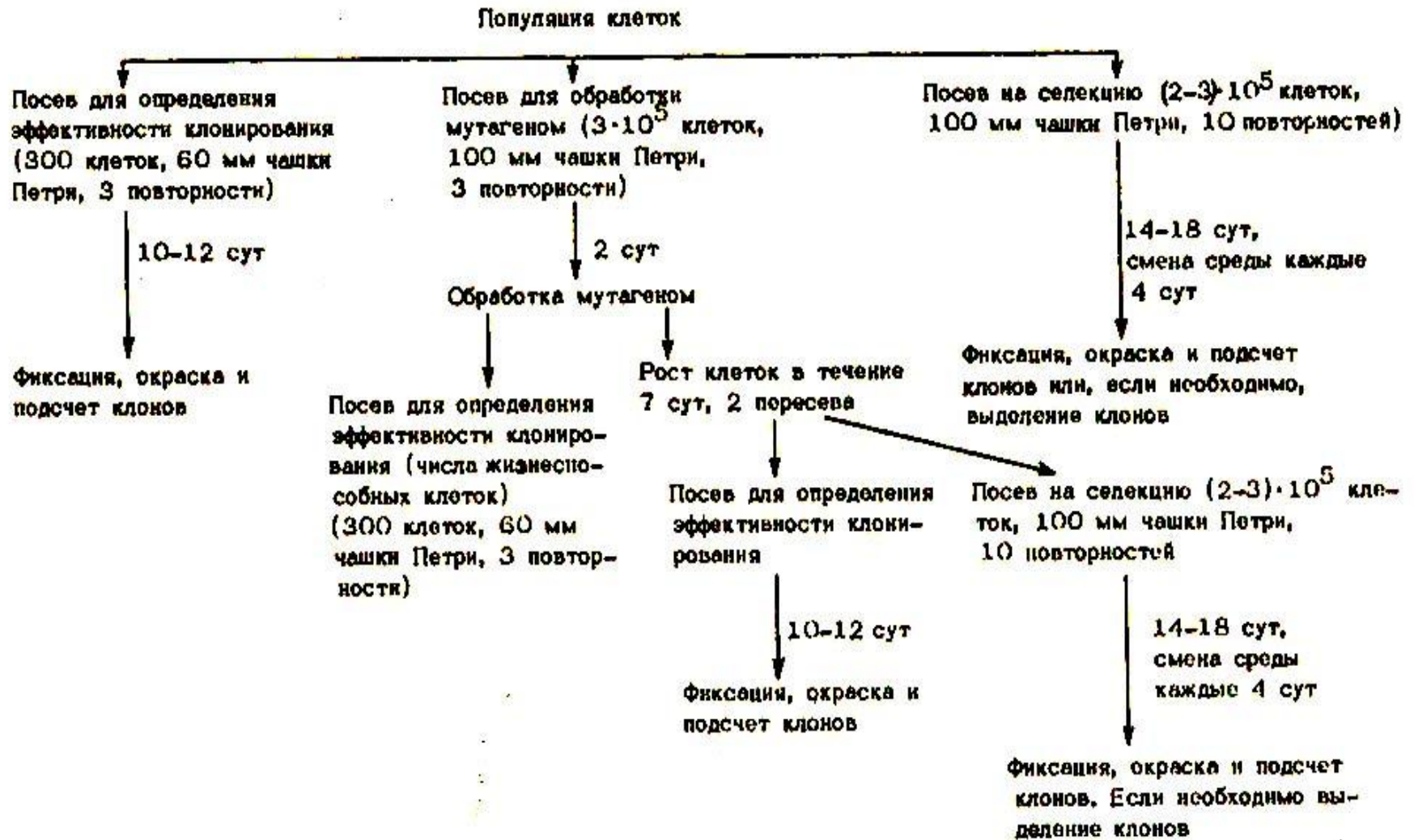
Устойчивость к аналогам нуклеотидов

- Сами по себе 8-азагуанин и 6-тиогуанин не токсичны для соматических клеток до тех пор, пока фермент ГГФРТ (гуанозил\гипоксантин фосфо-рибозил-трансфераза) или АФРТ (аденозил-фосфо-рибозил-трансфераза) не превратят их в токсичные нуклеозиды. Ген ГГФРТ (HPRRT) локализован на X-хромосоме у грызунов и человека. Оба фермента участвуют в синтезе пуринов *de novo* и не являются жизненно необходимыми для роста и размножения клеток в культуре.
- После отбора клеток на среде с 8-азагуанином или 6-тиогуанином выживают те, у которых ген ГГФРТ поврежден и которые не способны превращать эти аналоги в токсичные соединения.

Мутации, затрагивающие ген ГГФРТ легко изучать, так как:

- 1) ГГФРТ- клеточные штаммы устойчивы к 8-азагуанину и 6-тиогуанину , имеют стабильный генотип и могут быть получены практически из любой линии (включая первичные);
- 2) для селекции устойчивых клеток создана специальная среда ГАТ, в состав которой входят гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Нормальные клетки на этой среде легко размножаются, а клетки без ГГФРТ - нет, так как аминоптерин ингибирует синтез пуринов и пиримидинов *de novo*.
- 3) Обработка мутагенами (ММС, МННГ и пр.) значительно повышает число устойчивых штаммов;
- 4) существуют антитела к ГГФРТ, что облегчает возможный анализ полученных штаммов

Примерная схема селекции



Селекция клеток на устойчивость к 8-азагуанину

Определить эффективность клонирования (обычно и так знаем) и вести некоторое время клетки на среде ГАТ.

- Посеять по 3×10^5 клеток в 2-3 флакона Карреля, через 36-40 часов обработать в бессывороточной среде МННГ (1мг МННГ растворить в 1мл ДМСО, 2.5 мкл раствора на 1 мл среды – конечная концентрация 2.5 мкг мутагена на мл) в течение 2 часов, затем сменить среду и через 3-4 часа рассеять (на опыт и для определения эффективности клонирования).
- Пересеять через 3 суток еще раз, затем через 4-6 суток
- Посеять по 10×5 ($1-3 \times 10 \times 5$) клеток (контрольных и после действия мутагена) на чашки 10 см – 5-10 чашек – для определения количества клонов без ГГФРТ активности. После прикрепления клеток (через 4-5 часов) добавить в чашки 8-азагуанин до конечной концентрации 30 мкг на мл. Для контроля – то же на эффективность клонирования. Среду с 8-азагуанином менять 2 раза в неделю.
- Через 15 суток выделить выросшие клоны и перенести в чашки Петри или флаконы. Желательно провести контрольный рассев на среду ГАТ и проверить устойчивость к 8-АГ через какое-то время после выделения.

Селекция на устойчивость к аналогам пиримидинов

Чаще всего применяют:

- 3-фтортимидин,
- 5-бромдезоксиуридин,
- 5-йоддезоксиуридин и
- 5-фтордезоксиуридин.
- Клетки, устойчивые к этим агентам, лишены тимидинкиназы (ТК-), поэтому аналоги не фосфорилируются и не включаются в ДНК. Используются для гибридомной технологии.

Селекция клеток на устойчивость к бромистому этидию

- Время проявления селективной устойчивости – 7-9 суток, то есть клетки после обработки мутагеном следует дважды пересеять.
- Рассеваем по 1-3х10х5 клеток на чашку 10 см, после прикрепления добавляем 10 мкл БЭ (1000 мкг/мл) до конечной концентрации 1 мкг/мл. Среду с БЭ менять 2 раза в неделю. Через 3 недели выделить клоны, размножить и заморозить. Затем провести второй этап селекции на более высоких концентрациях БЭ (5, 10, 15, 25 мкг/мл).
- Устойчивость клеток к БЭ связана с изменением проницаемости клеточной мембраны, таким образом устойчивые клетки можно отличить от чувствительных непосредственно под микроскопом по свечению БЭ, проникшего в клетки

Приготовление растворов

- х100 раствор тимидина и гипоксантина (ТГ): 300 мг гипоксантина растворяют в 2мл 1н NaOH, добавляют 500 мг дезокситимидина и доводят объем до 100 мл H₂O. Стерилизуют фильтрацией, разливают по 5 мл и хранят при -20о. На 500 мл среды добавляют 5 мл раствора ТГ.
- х1000 раствор аминоптерина готовят, растворяя 15 мг аминоптерина в 1 мл концентрированной HCl. Добавляют 14 мл H₂O. После стерилизации раствор разливают по 0.5-1 мл и хранят при -20о. На 500 мл среды добавляют 0.5-1 мл раствора.
- Концентрации других стоковых растворов: 3-фтортимидин – 100 мкг/мл; 5-бромдезоксиуридин – 5000 мкг/мл; 6-тиогуанин – 0.5 мг/мл; 8-азагуанин - 3 мг/мл; метотрексат – 4 мг/мл; бромистый этидий – 1 мг/мл. 6-тиогуанин и 8-азагуанин и метатриксат предварительно растворяют в небольшом количестве 1 н NaOH, другие – непосредственно в деионизированной воде. Стерилизуют фильтрованием. Хранить при -20о.
- Раствор 12×10^{-3} М уабаина (ингибитор активности Na⁺/K⁺ АТФазы) готовят на среде без сыворотки, хранят только при +4о.

Гибридизация клеток животных

- Слияние клеток иногда наблюдается в естественных условиях – многоядерные мышечные клетки, остеокласты и пр. В культуре спонтанное слияние происходит крайне редко и не может быть использовано в опытах по гибридизации клеток.
- Наиболее широкое распространение получили два агента, вызывающие слияние клеток – инактивированный вирус Сендай и полиэтиленгликоли (ПЭГ) с молекулярной массой 1000-6000. Главный плюс вируса Сендай – отсутствие токсичности. Главная беда ПЭГ – высокая токсичность.
- Электрослияние

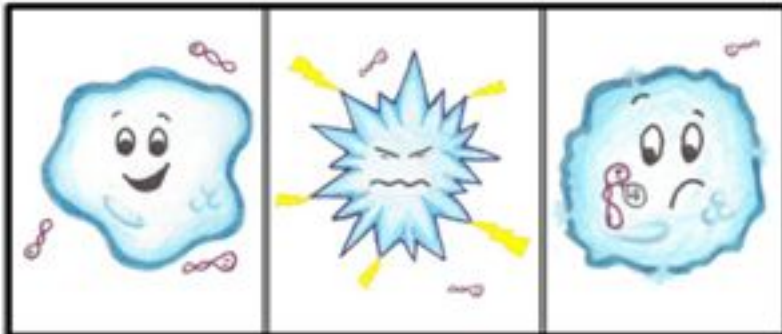
Слияние с помощью полиэтиленгликоля

- 50% ПЭГ готовят путем разведения навески в культуральной среде: автоклавирование навески (5 г) с последующим разведением расплавленного ПЭГ 5 мл культуральной среды. Оптимальный pH раствора – 7.8-8.0, доводится 0.05 мл 1н NaCl.
- Для слияния берут несколько десятков миллионов клеток.
- 1. Смешивают суспензии клеток и центрифугируют.
- 2. Супернатант убирают пипеткой.
- 3. Добавляют 1мл 50% ПЭГ, по каплям, аккуратно перемешивают,.
- 4. Через 1 мин в пробирку вносят 1 мл теплой среды без сыворотки, перемешивают
- 5. Через 1 мин в пробирку вносят еще 2мл среды,
- 6. Через 1 мин средой доводят объем суспензии до 10 мл, инкубируют еще 10 мин при 37о.
- 7. Центрифугируют, убирают надосадочную жидкость
- 8. Ресуспензируют клетки в среде с 20% сыворотки (можно брать кондиционированную среду)

Электрослияние (электропорация)



Юрий Александрович Чизмадзе (род. 15 декабря 1931, [Тифлис](#)) — советский и российский биофизик.



Создание гибридом

Схема иммунизации животных для растворимых белков

Сутки до слияния	Доза антигена (мкг на мышь), способ введения
15	100 подкожно с полным адъювантом Фрейнда
8	50 внутрибрюшинно с полным адъювантом Фрейнда
4	50 внутрибрюшинно
3	50 внутрибрюшинно, 50 внутривенно
2	50 внутрибрюшинно, 50 внутривенно
1	Антиген не вводится
0	слияние

Адъювант (*adjuvant*) — соединение или комплекс веществ, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно симмуногеном. В отличие от иммуномодуляторов, они применяются для усиления конкретного иммунного ответа (например, при вакцинации) чаще всего в здоровом организме, а не для нормализации нарушенных реакций иммунной системы при патологии.

Адъюванты

- Основное свойство большинства адъювантов - способность их *депонировать* антиген, то есть адсорбировать его на своей поверхности и длительное время сохранять в организме, что увеличивает продолжительность его влияния на иммунную систему.
- Наиболее сильные адъюванты содержат в своем составе микроорганизмы ослабленных штаммов или какие-либо субстанции, извлеченные из них. Эти компоненты являются *стимуляторами клеток врожденного иммунитета*, таких как макрофаги и другие антигенпрезентирующие клетки.
- Иногда для *направленной доставки антигена* в используют липосомы, что позволяет точно дозировать антиген и избежать его влияния на структуры, не вовлеченные в формирование иммунного ответа.
- Адъювантами могут быть вещества неорганические: фосфаты алюминия и кальция, хлористый кальций и др., и органические: агар, глицерол, протамины (протамины - низкомолекулярные белки из ядер сперматозоидов большинства групп животных. Составляют фракцию основного белка в зрелой сперме рыб.) и др.

Адъювант Фрейнда (Freund adjuvant)

- **Неполный адъювант Фрейнда**
- Представляет собой водно-жировую эмульсию, содержащую вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Депонирует антиген и усиливает его захват фагоцитами.
- **Полный адъювант Фрейнда**
- Включает в себя, кроме вышеперечисленных компонентов, БЦЖ или мурамилдеипептид. Это позволяет ему дополнительно активировать макрофаги и костимулировать Т-клетки.

2.Иммунизация *in vitro*

- Клетки селезенки мышей, которым вводили 50 мкг антигена внутривбрюшинно за 2 недели до этого, культивируют 4 сут в среде, содержащей 10 мкг/мл антигена и интерлейкин-2, дифференцировочный В-клеточный фактор, EL -клеточный фактр роста (кондиционированная среда от клеток тимомы EL-4, стимулированной в течение 48 час 10 нг/мл форболмеристатацетатом).

3.Получение спленоцитов

- Из селезенки шприцем многократными укалываниями вымыть спленоциты (10 мл среды без сыворотки), перенести их в пробирки и центрифугировать (7-10 мин, 700g). Осадок клеток ресуспензировать в 5 мл среды без сыворотки, подсчитать и проверить жизнеспособность (витальными красителями, феносафранином или трипановым синим). Обычно выход клеток 10-15 x 10⁶, жизнеспособность близка к 100%.

Счетчик леток ТС-20

- Краситель Трипановый синий для использования со счетчиком клеток ТС10 или ТС20, на 1500 измерений, 0.4% и 0.81% хлорида натрия и 0,06% фосфата калия двузамещенный раствор, стерильный, 10 пробирок по 1,5 мл



1. Заполнить камеру



2. Вставить слайд



3. Получить результат

4. Подготовка миеломных клеток

- Sp 2/0 Ag14, X63Ag 8 6.5.3. Обе эти линии являются производными линии РЗК, полученной из миеломы мышей BALB. Они не способны синтезировать собственные иммуноглобулины, дефектны по ГГФРТ (то есть устойчивы к 8-азагуанину и чувствительны к среде ГАТ). Плотность насыщения для этих линий $1.5-1 \times 10^6$.

5.Слияние

- Клетки берут в соотношении миелома/спленоциты 1/3 - 1/5 {(10-12) x10 x 6 миеломных клеток и (30-60)x10 x 6 спленоцитов}. 1 мл 50% ПЭГ добавляют к осажденным клеткам на 1 мин, затем в течение 1-2 мин добавляют 9 мл среды без сыворотки. Встряхивают и 10 мин центрифугируют. Осадок ресуспензируют в 50-60 мл полной среды. Среду DMEM обогащают глюкозой до 4.5 г/л, добавляют 20% эмбриональной сыворотки.

6. Клонирование

- Разливают суспензию по 96-луночным платам (100 мкл в лунку), через 24 час добавляют по 100 мкл 2-кратной среды ГАТ. Для повышения выхода гибридом добавляют меркаптоэтанол (5×10^{-5} М).

7. Фидерные (питающие) клетки

- Есть специальные линии (фетальных мезенхимных стволовых клеток человека — FetMSC, SC5-MSC), но лучше использовать макрофаги мышей. 5 мл среды вводится в брюшную полость забитой мыши, затем этим же шприцем собирается суспензия клеток. Выход макрофагов – (3-5)х 10 в 6. Этого хватает на 5-6 плат (по 0.5-1х10 в 4 макрофагов на лунку).

Рост колоний

- 8. Колонии становятся видны через 5-7 сут. Среду менять не раньше, чем по достижении колоний примерно 100 клеток.
- 9. Последовательное клонирование для получения реального штамма-продуцента. (10-30 клеток на плату!!!)

10.Рост гибридом in vitro

- Перевод на бессывороточную среду (Мураками с соавт):
- инсулин 5 мкг/мл
- трансферрин 35 мкг/мл
- этаноламин 0.02M
- селенит $2 \times 10^{-3}M$
- HEPES $15 \times 10^{-3}M$

- 11. Рост гибридом *In vivo*. Вводятся сингенным мышам, при этом образуются опухоли, затем – асцит.
- 12. Криоконсервация гибридом проводится при 45% сыворотки.

Генетическая трансформация клеток

- 1. Введение плазмид
- 2. Введение «голой» ДНК и целых хромосом.
- 3. Введение рекомбинантных ретровирусов.
- 4. Трансформация вирусами (лентивирусные системы дают выход ~ 90% трансформантов).

Способы прямого введения генов в клетку

- **Микроинъекция ДНК** в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора (рис. 45). Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду рBR322, были инъецированы в ТК-клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.
- **Электропорация**
- **«Мини-клетки»** получают путем блокирования донорных клеток митозе колцемидом. При продолжительной обработке клеток колцемидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.
- **Упаковка в липосомы**
- **Электронная пушка**

Электронная пушка

- Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолиственной пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.
- Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.
- С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбриогенную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигамноидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

- Методы получения временной экспрессии чужеродных генов
- Методы получения стабильной трансформированной клеточной линии
- Для введения ДНК в клетки нужны агенты, защищающие её от вне- и внутриклеточных нуклеаз и облегчающие проникновение ДНК в клетки.
- Классический способ – преципитат фосфата кальция.

- Все среды, используемые при трансформации должны содержать полный набор неосновных аминокислот.
- 100-кратный раствор НОА - неосновных аминокислот (в мг на 1 л раствора) : аланин — 890, глицин — 750, аспарагиновая кислота — 1330, глутаминовая кислота — 1470, пролин — 1150, серин — 1050, аспарагин-гидрат— 1500. Аминокислоты растворить в указанной последовательности при легком нагревании, за исключением аспарагин-гидрата, который следует растворить в последнюю очередь после охлаждения раствора до комнатной температуры. Стерилизовать фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Хранить (по 5 мл) при —20 °С. Раствор стабилен в этих условиях в течение года и более. На 500 мл ростовой среды добавлять 5 мл 100-кратного раствора НОА.

**Обработка клеток
кальцийфосфатным
преципитатом ДНК**

Составы растворов, используемых при введении в клетки ДНК:

- 1. 10-кратный буфер А (в г):
- HEPES — 50,
- NaCl — 80,
- KCl — 3.7,
- Na₂HPO₄ • 2H₂O — 1.25,
- D-глюкоза — 10.
- Растворить компоненты в 800 мл H₂O, довести pH до 7.05 1 М раствором NaOH (около 35 мл), добавить H₂O до объема 1 л, простерилизовать фильтрованием, хранить при 4 °С. Раствор стабилен в течение года.
- 2-кратный буфер А – разведение 10x с доведением pH
- Хотя раствор стабилен при 4 °С в течение года, лучше готовить его непосредственно перед использованием.

Составы растворов, используемых при введении в клетки ДНК:

- **2.** Буфер Б (в мг):
 - Трис — 121,
 - ЭДТА • NH₄ — 33.
 - Растворить компоненты в 800 мл H₂O, проверить pH — он должен быть равен 9.0, в противном случае довести pH 9.0 растворами NaOH или HCl, добавить H₂O до 1 л, простерилизовать фильтрованием. Раствор стабилен при 4 °С.
- **3.** 10 %-ный раствор CaCl₂ (0.9 M): используется стерильный коммерческий фармацевтический раствор для инъекций.
- **4.** 15 %-ный (масса/объем) раствор глицерина: к 15 г глицерина (по массе) прибавить 85 мл ростовой среды (без сыворотки). Взвешенный глицерин стерилизуют автоклавированием (1 атм, 30 мин); после охлаждения стерильно добавляют ростовую среду. Раствор(стабилен в течение нескольких недель при 4 °С, но лучше его готовить незадолго до использования).
- **5.** 15 %-ный раствор ДМСО: к 15 мл ДМСО прибавить 85 мл ростовой среды (без сыворотки). Компоненты стерильно смешивают непосредственно перед употреблением.

Раствор векторной ДНК

- от 5 до 50 мкг плазмидной ДНК в растворе поместить в пластиковые пробирки и осадить этанолом; оставить на ночь осадок ДНК под 96 %-ным этанолом для стерилизации (пробирки должны быть полностью заполнены спиртом); растворить в стерильных условиях подсушенный осадок ДНК в соответствующем количестве буфера Б. Обычно мы работаем с раствором векторной ДНК в концентрации 0.2 мкг/мкл.

- Процедура введения ДНК может быть представлена в виде ряда последовательных этапов

- **1.** За 18-24 ч до трансформации рассеять клетки так, чтобы к моменту обработки кальций-фосфатным преципитатом ДНК они достигли 30— 50 % насыщающей плотности. Для этого мы рассеиваем 1 полностью заросший флакон диаметром 8 см либо на 2 флакона (клетки человека линии HeLa, клетки зеленой мартышки линий Vero и CV1 и клетки мыши линии LMtk-), либо на 3 флакона (клетки китайского хомячка линий A238 и V-79, а также клетки мыши линий C127 и NIH3T3). Росточная среда на этом этапе не должна содержать антибиотиков (поскольку они образуют агрегаты с кальцийфосфатным преципитатом ДНК).

- 2. За 1 ч до трансформации клеток приготовить кальцийфосфатный преципитат ДНК.
- Для этого к раствору ДНК в буфере Б добавить 10 %-ный (0.9 М) раствор CaCl_2 до конечной концентрации 0.25 М (конечная концентрация ДНК — 40 мкг/мл). При использовании малых количеств векторной ДНК добавить в раствор ДНК-носитель.
- На 1 флакон с клетками диаметром 8 см мы используем 1,5 мл кальций-фосфатного преципитата ДНК, поэтому готовим 0.75 мл раствора ДНК в 0.25 М растворе CaCl_2 .
- а) Вариант без ДНК-носителя (в мкл): раствор векторной ДНК (с концентрацией 0.2 мкг/мкл) — 150, H_2O — 390, 10 %-ный раствор CaCl_2 -210.
- б) Вариант с ДНК-носителем (в мкл): раствор векторной ДНК (с концентрацией 0.2 мкг/мкл) — 25, раствор ДНК-носителя (с концентрацией 1 мг/мл) — 25, H_2O — 490, 10 %-ный раствор CaCl_2 - 210.
- В качестве ДНК-носителя используют ДНК из спермы лосося (Salmon sperm) или тимуса теленка (Calf thymus). 50 μg - 100 μg -200 μg

- **3.** После приготовления раствор ДНК в 0.25 М растворе СаС1а по каплям и при перемешивании добавить к равному объему (750 мкл) 2-кратного буфера А. Инкубировать 40—60 мин при 4 °С (в сосуде со льдом) для формирования преципитата.
- **4.** Тщательно слить среду из флакона с клетками и прилить кальций-фосфатный преципитат ДНК. Инкубировать 40—60 мин при 37 °С. Добавить около 7 объемов (по отношению к объему преципитата) ростовой среды с 2 % СЭК (10 мл на флакон с 1.5 мл преципитата)

- **5.** Спустя 4—10 ч заменить среду на ростовую среду с 10 % СЭК. В этот момент клетки могут быть обработаны для повышения эффективности трансформации 15 %-ными растворами глицерина или ДМСО: слить среду с 2 % СЭК, промыть ростовой средой без сыворотки и прилить 10 мл раствора глицерина или ДМСО. Инкубировать от 30 с до нескольких минут при комнатной температуре (в зависимости от линии клеток). Слить раствор глицерина (или ДМСО), промыть клетки 2 раза ростовой средой по 10 мл, добавить ростовую среду с 10 % СЭК.
- **6.** На следующие сутки рассеять клетки на чашки Петри по 1-2 • 10⁶ клеток на чашку диаметром 9 см (для большинства систем «ген—селективная среда») на ростовую среду с 10-15% СЭК.
- **7.** Спустя 5—6 ч после посева или на следующие сутки сменить ростовую среду на селективную.

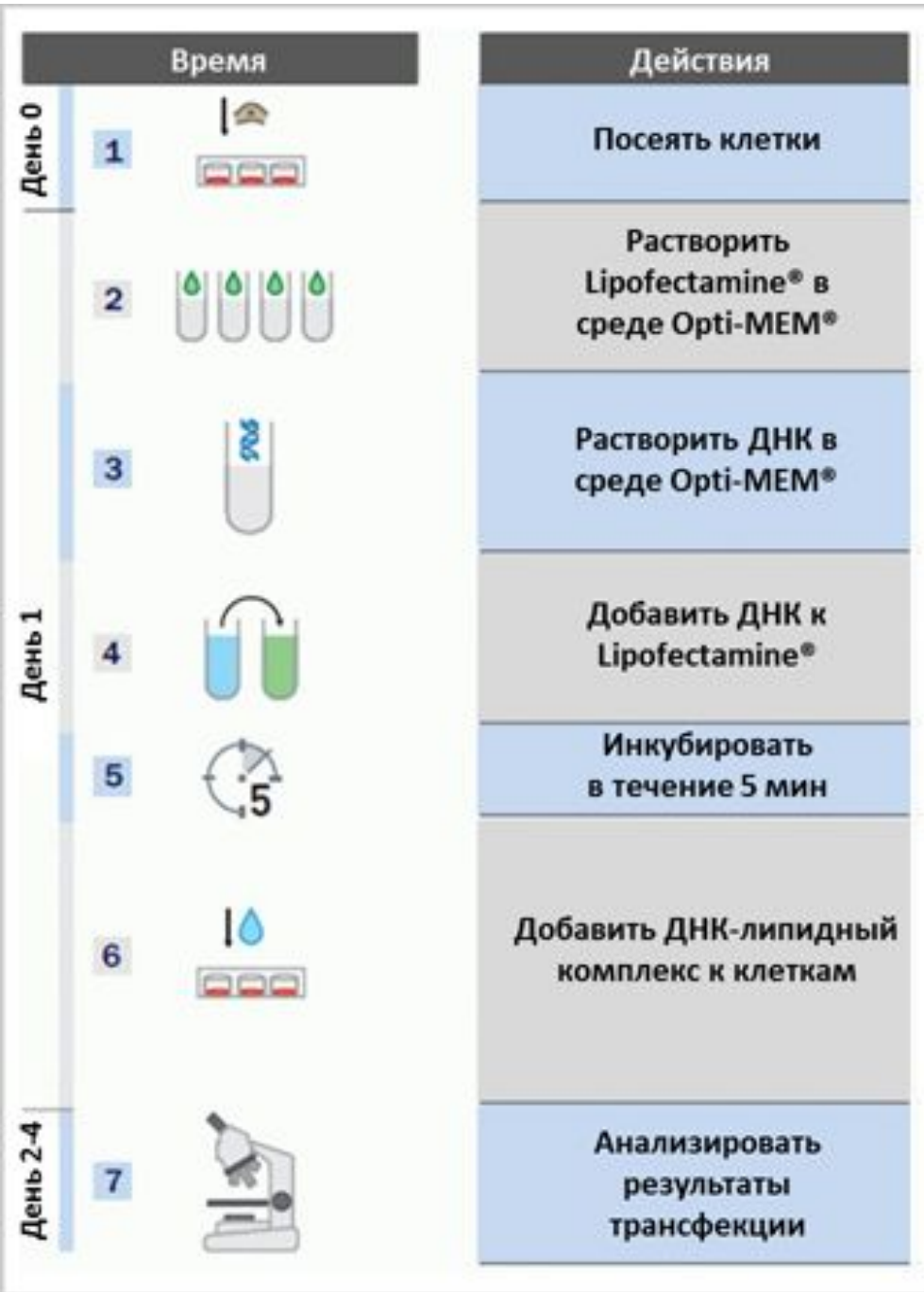
- 8. Селекция на антибиотиках.
- G-418 (генетицин). Сходен по структуре с гентамицином, неомицином и канамицином, но в отличие от них в клетках эукариот блокирует синтез белка, связываясь с 80S рибосомой.
- 100-кратный р-р: 500мг растворить в 10 мл H₂O, стерилизовать фильтрованием, хранить при -20.

Липофектамин



- **Катионные липиды**

Lipofectamine® существуют на рынке уже более 25 лет и используются в ведущих лабораториях многих стран мира.



- Lipofectamine® Lipofectamine®
- Lipofectamine® Lipofectamine®
- Lipofectamine® 2000
- Lipofectamine® LTX
- Lipofectamine® 3000
- Lipofectamine® 2000
- Lipofectamine® RNAiMAX
- Lipofectamine® RNAiMAX
- Lipofectamine® Mes
- Lipofectamine® MessengerMAX™
- Reagent PLUS™
- Reagent PLUS™

- Трансформация тотальной ДНК для получения «фокусов» трансформации

Трансформация клеток

- Питательную среду с клеток тщательно удаляют пастеровской пипеткой и на клеточный монослой наносится ДНК в составе кальций-фосфатного преципитата. После этого клетки сразу же помещают в CO₂-инкубатор, для того чтобы избежать колебаний pH, и выдерживают в течение 1 ч. Для повышения эффективности трансфекции через 1 ч проводят глицериновый шок -15 %-ным раствором глицерина в течение 2 мин при температуре 37 °С, либо 10—20 %-ным раствором ДМСО на среде без сыворотки в течение 2—4 мин при комнатной температуре. На 60 мм чашку добавляется по 1 мл среды с указанными агентами.
- После шока клетки 2—3 раза промывают бессывороточной средой, заливают среду с 2—5 % эмбриональной сыворотки коров и культивируют еще в течение 16—18 ч в CO₂ инкубаторе. Затем клетки снимают и засевают по 100 000 клеток на 60 мм пластиковые чашки в среде с 5 - 10 % эмбриональной сыворотки. Смену среды на свежую проводят каждые 3 сут.

- «Фокусы» морфологической трансформации на клетках Н1Н3Т3 при трансформации препаратами тотальной ДНК начинают формироваться через 18—20 сут. Выглядят они как зоны многослойного роста на монослое нетрансформированных клеток.
- Эффективность трансформации оценивают по частоте появления «фокусов» морфологической трансформации, возникающих при обработке 1000 000 клеток 1 мкг ДНК. Эта частота может варьировать от 10^{-4} до 10^{-5} , однако описаны случаи значительно более низкой частоты «фокусов» морфологической трансформации при переносе онкогенных последовательностей препаратами тотальной ДНК. Учитывая частоту возникновения «фокусов» морфологической трансформации, можно рекомендовать в экспериментах по тестированию трансформирующей способности тотальной ДНК из опухолевых клеток обрабатывать кальций-фосфатным преципитатом ДНК не менее $(3—4) \cdot 10^6$ в 6 клеток. Для анализа трансформантов лучше брать «фокусы» независимого происхождения, из разных чашек.

Электропорация

- **Электропорация** основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.
- Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.
- **Электропорация** — физический, а не биохимический метод, и это, по-видимому, обуславливает его широкое применение. Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений.

Лимфобластоидные линии

- Первые лимфобластоидные линии были получены от больных инфекционным мононуклеозом.
- Успешное получение лимфобластоидных линий от взрослых серопозитивных людей и обезьян сейчас вопрос техники культивирования, так как к настоящему времени от любого серопозитивного индивидуума можно получить лимфоидную клеточную линию. Большинство таких линий имеет В-клеточную, а часть — Т-клеточную природу; кроме того, некоторые из них не относятся ни к той, ни к другой.

- Получение лимфоидных суспензионных культур клеток из гемато-поэтических тканей осуществляется различными методами:
- 1. культивирование всей клеточной массы органа;
- 2. совместное культивирование моноклеарной клеточной фракции органа с летально (при 6Gy) облученными клетками культур, продуцирующими трансформирующие вирусы (лимфотропные герпесвирусы, ретровирусы);
- 3. трансформация моноклеарной клеточной фракции гематопоэтических тканей клинически здоровых индивидуумов после инфицирования клеток вирусами, обладающими трансформирующей активностью – вирус Эпштейн-Барр
- 4. культивирование стимулированных митогеном (ФГА) лимфоцитов.

Культивирование

- Асептически взятые кроветворные ткани (кровь, селезенка, костный мозг, лимфатические узлы), а при наличии опухоли - ее кусочки тотчас подвергают обработке. Селезенку, лимфатические узлы и опухоль после контакта с антибиотиками тщательно измельчают ножницами и суспензируют в питательной среде. При необходимости суспензию фильтруют через марлевый фильтр для удаления крупных комочков ткани. Кровь берут в пробирку с гепарином (40—50 ед гепарина на 10 мл крови). Гепарин предварительно разводят и хранят при 4 °С.

Центрифугирование в градиенте фиколл-верографина

- Градиент готовят следующим способом:
- Три объема крови, разведенной питательной средой (без сыворотки) 1 : 4, или суспензию органа, содержащую (3—5) • 10 в 6 клеток/мл, наслаивают на градиент и центрифугируют на холоде (4 °С) в течение 30 мин при 1200 об/мин.
- Количество фиколл-верографина – 1/3-1/4 от разведенной крови
- Мононуклеарную фракцию, состоящую в основном из лимфоцитов, сосредоточенных в интерфазе, отсасывают пастеровской пипеткой, дважды отмывают питательной средой от градиента, подсчитывают и ресуспензируют в питательной смеси, состоящей из питательной среды RPM1-1640 в сочетании с 15 % эмбриональной сыворотки. Инкубирование осуществляют в стационарном состоянии в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Контроль лимфобластоидных культур

- Микроскопирование культур проводят ежедневно, а смену среды в начале культивирования через 1 — 2 сут по 1/3 — 1/5 объема, затем раз в неделю, а после становления культуры — по мере закисления.
- Подсчет количества живых клеток осуществляют с помощью 0.2 %-ного раствора трипанового синего, который в равном объеме соединяют с клеточной суспензией.
- Время удвоения клеточной массы в логарифмическую фазу роста рассчитывают по формуле
- $T = t / 3.3 \lg x / x_0$
- где T — интервал времени в часах, x_0 — начальная концентрация, x — конечная концентрация клеток, t — время культивирования.

Получение лимфоидных линии клеток путем трансформации лимфоцитов крови здоровых приматов лимфотропными вирусами герпеса

- Метод основан на способности лимфотропных вирусов герпеса трансформировать лимфоциты приматов, что приводит к появлению перевиваемых лимфобластоидных линий.
- Методы культивирования этих линий не отличались от обычных, а способ получения был простым.
- Для получения таких линий клеток мононуклеары, отмытые от фиколл-верографина, ресуспензировали в среде культивирования в количестве $1 \cdot 10^6$ клеток/мл, центрифугировали. К осадку клеток на 18 ч добавляли 0.2—0.5 мл вируссодержащей культуральной жидкости, освобожденной от клеток фильтрованием через фильтр фирмы «Millipore» с размером пор 0.45 мкм. Инкубирование проводили в термостате без CO₂. На следующие сутки вирус убирали, добавляли среду и культивировали обычным способом, меняя среду один раз в неделю. Через 3—4 нед, в редких случаях позже, формировались суспензионные культуры.