

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по науке ИЦиГ СО РАН


д.б.н. В.А. Мордвинов
«17» сентября 2018 г.



Сортировка клеток, выделение клеточной популяции обладающей определенными свойствами: анализ минорных клеточных популяций (стволовые клетки; дендритные клетки; тетрамеры; клетки, экспрессирующие флуоресцентные белки)

Научный сотрудник ЦГР

ИЦиГ СО РАН


Орищенко К.Е., к.б.н.

Новосибирск, 2018



Содержание

1 Общие положения	4
2 Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний	4
3 Нормативные ссылки	4
4 Требования к погрешности измерений	5
5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы	5
6 Метод измерений	6
7 Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
8 Требования к квалификации операторов	8
9 Требования к условиям измерений	9
10 Подготовка к работе и выполнение измерений	9
11 Обработка результатов измерений	11
12 Контроль точности результатов измерений	13
13 Оформление результатов измерений	13
14 Литература	15

ПРЕДИСЛОВИЕ

1. РАЗАРАБОТАНА Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Руководитель ИЦиГ СО РАН: директор Кочетов Алексей Владимирович

Адрес: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лавренътева, 10, тел. +7(383) 3634980

ИСПОЛНИТЕЛЬ: Центр генетических ресурсов лабораторных животных, сформированный на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН

2. Введена впервые

3. СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

В соответствии с п.2 статьи 5 Закона «Об обеспечении единства измерений» от 26.06.2008 № 102-ФЗ настоящая методика измерений не подлежит аттестации, поскольку основана на прямом измерении оптического сигнала.

Настоящая методика не может быть полностью или частично воспроизведена, тиражирована и распространена без разрешения ИЦиГ СО РАН.

1 Общие положения

1.1 Настоящая методика описывает процесс анализа и выделения специфических клеточных популяций методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) за счет окрашивания поверхностных клеточных маркеров антителами, прижизненными красителями или экспрессии клетками флуоресцентных белков.

1.2 Назначение и область применения метода – FACS широко используется для выделения популяций и отдельных клеток в зависимости от их размера, гранулярности и флуоресценции. Помимо фундаментальных исследований, технология FACS может применяться в ветеринарии (например, для сортировки сперматозоидов) и медицине (в диагностике онкогематологии (дендритные клетки); в иммунологии для анализа малых субпопуляций лимфоцитов, таких как T-reg, T_H1/T_H2, α/γ -T-лимфоциты; в исследовании процессов апоптоза, некроза, аутофагии (стволовые клетки; тетрамеры) и др.)

1.3 Данная методика включает перечень необходимых операций и служит общим руководством для получения высокоочищенных популяций, а также единичных клеток, экспрессирующих требуемые маркеры, методом проточной цитометрии. Настоящая методика может быть использована для проведения анализа и выделения минорных клеточных популяций различных типов клеток (стволовые клетки; дендритные клетки; тетрамеры; клетки, экспрессирующие флуоресцентные белки; раковые клетки и др.).

2 Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний

Исследования в соответствии с данной методикой требуют специального помещения. Пробоподготовка (культивирование, снятие и, при необходимости, окраска клеток) проводится в чистом помещении, оборудованном ламинарами, инкубаторами и другим оборудованием для работы с культурами клеток или животными. Для непосредственного анализа образцов и проведения сортировки требуется чистое термостатированное помещение, в котором размещается оборудование.

3 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений;

ГОСТ Р 51350-99 Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Общие требования;

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;

ГОСТ 12.1.045-84 Система стандартов безопасности труда. Электростатические поля.

4 Требования к погрешности измерений

Погрешность измерений по прямому светорассеянию (FSC), которое является производным от размера измеряемого объекта, составляет не более 20 % (коэффициент вариации для гомогенной суспензии частиц с абсолютно одинаковым размером). Разрешающая способность позволяет достоверно различать объекты, отличающиеся по линейным размерам в 1.5 и более раз.

Минимальный размер анализируемых частиц, позволяющий достоверно отличать их от шума, – 2 мкм.

Коэффициент вариации для измерений по боковому светорассеянию (SSC), которое является производным от степени внутренней неоднородности анализируемых объектов (наличие оптически плотных органелл внутри клетки), составляет ~ 50 %, с достаточно точной верхней границей (~ 10 % от среднего значения) и очень растянутой нижней (~ 40 % от среднего). Разрешающая способность позволяет достоверно отличать по этому параметру лимфоциты от моноцитов.

Коэффициент вариации (CV) для измерений флюоресценции зависит от длины волны испускаемого света: для более коротковолнового (FITC, Alexa 488 и др.) CV составляет около 15 %, для самого длинноволнового (APC, APC-Cy7 и др.) – около 40 %.

Разрешающая способность позволяет достоверно различать субпопуляции частиц с разницей во флюоресценции в 2 и более раз (при условии, что сами частицы внутри каждой субпопуляции имеют абсолютно одинаковую теоретическую светимость).

Эффективная точность сортировки (чистота получаемой популяции) зависит от используемого сопла: для сопла 70 мкм минимальная чистота получаемой популяции составляет 99.5 %, для сопла 130 мкм – 98 %.

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы:

- 5.1 Проточный цитофлуориметр – сортировщик для анализа и высокоскоростной сортировки клеток BD FACSAria III™ (Becton Dickinson, США) 2B/3R/3V/5YG, не требующий пользовательской юстировки. Основные характеристики: оптическая система на основе проточной кюветы; волоконная оптика для подачи возбуждающего излучения и сбора флуоресцентного сигнала; 4 независимых блока детекторов для установленных лазеров; программно-контролируемая сортировка; автоматическое выключение сортировки и защита собираемых фракций при нарушении стабильности сортировки.
- 5.2 Система автоматизированной подачи растворов для сортера BD FACSAria III – подкатная платформа для размещения емкостей для проточной жидкости, отработанного раствора, жидкостей для обслуживания (этиловый спирт, промывающий раствор, дистиллированная вода); встроенный компрессор.
- 5.3 Управляющая рабочая станция FACStation на основе компьютера HP.
- 5.4 Универсальное программное обеспечение BD FACSDiVa™ для сбора и анализа данных.
- 5.5 Конические пробирки объемом 15 мл для сбора сортированных клеток (содержащие 1 мл FCS + 25 mM HEPES).
- 5.6 Конические пробирки объемом 15 мл для окрашивания клеток.
- 5.7 Буфер для окрашивания клеток: фосфатно-солевой буфер (PBS) с добавлением 3 % эмбриональной бычьей сыворотки (FCS).
- 5.8. Антитела с флуоресцентной меткой.
- 5.9 BD FACS AccuDrop Beads – калибровочные частицы для настройки параметра задержки капли.
- 5.10 BD CompBead Anti-mouse Ig, k – калибровочные частицы для настройки компенсаций по одноцветным компенсационным контролям.
- 5.11 BD Cytometer Setup & Tracking Beads Kit – набор частиц для настройки базовой линии цитофлуориметра и мониторинга состояния прибора.
- 5.12 Буфер для суспендирования клеток: Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 25 mM HEPES + 3 % FCS
- 5.13 Краситель трипановый синий, гемоцитометр.
- 5.14 Cell strainer – одноразовые фильтры для получения одноклеточной суспензии клеток.

6 Метод измерений

Экспериментальные и клинические исследования зачастую требуют выделения высокоочищенных популяций клеток. Технология FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting – сортировка клеток с активированной флуоресценцией) представляет собой способ

очистки и выделения популяций клеток требуемого фенотипа. Существуют другие способы очистки – такие как, клеточный пэннинг, подавление за счет системы комплемента и разделение на магнитных частицах. Однако FACS имеет несколько преимуществ по сравнению с другими доступными методами. FACS является предпочтительным методом, когда требуется очень высокая чистота очистки целевой популяции клеток или когда целевая популяция клеток экспрессирует маркеры на низком уровне, а также когда разделение клеточных популяций основано на дифференциальной плотности маркера. Кроме того, FACS является единственным доступным методом очистки и выделения клеток на основе окрашивания внутриклеточных маркеров или экспрессии флуоресцентных белков (Sorensen et. al., 1999). FACS позволяет очищать отдельные клетки в зависимости от размера, гранулярности и флуоресценции (Hewitt et. al., 2006; Walker and Parkhill, 2008) (рисунок 1).

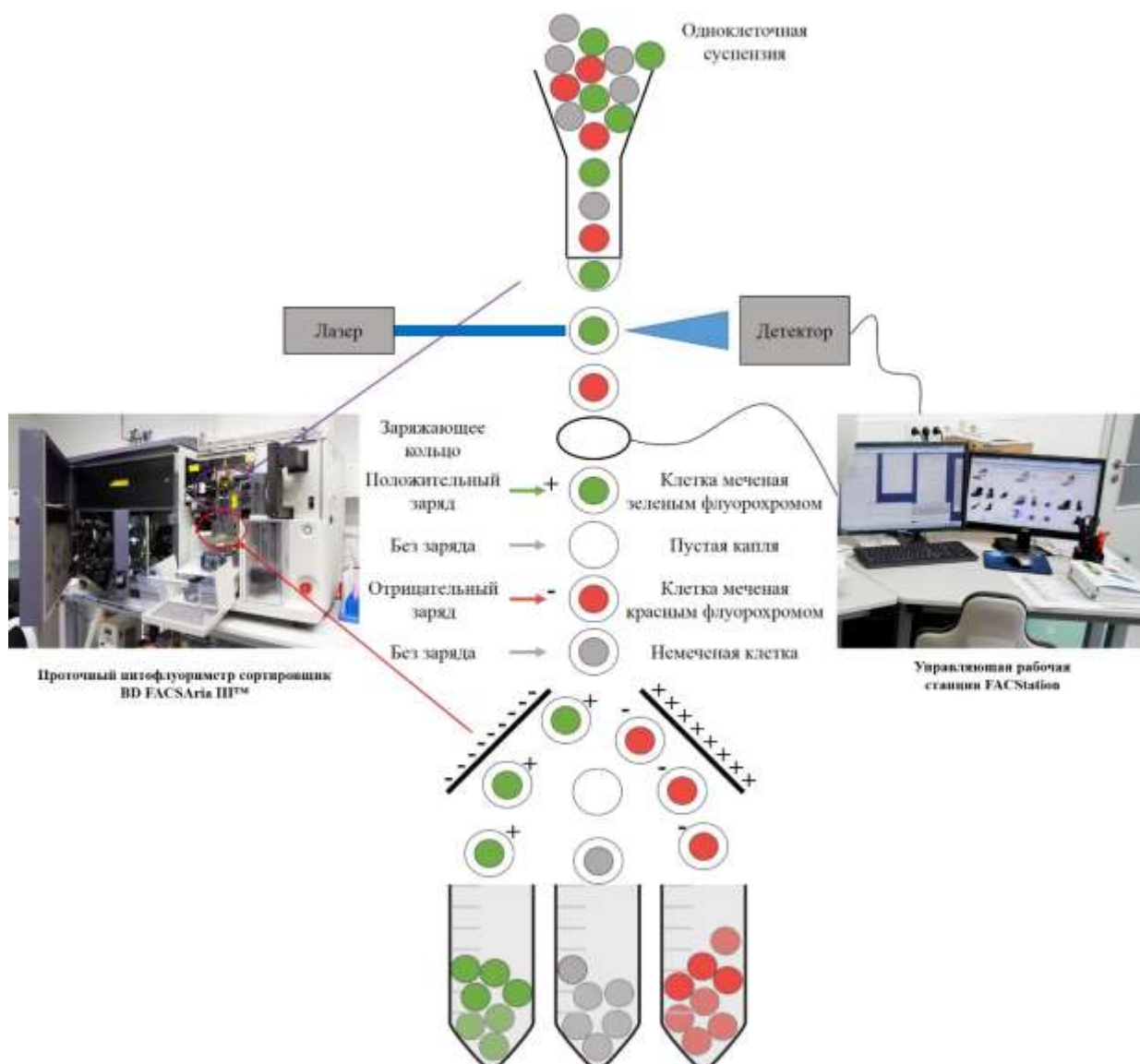


Рисунок 1. Схематическое изображение процесса сортировки клеток.

Для очистки клеток, представляющих интерес, они сначала окрашиваются флуоресцентно мечеными антителами, которые распознают специфические поверхностные маркеры в требуемой популяции клеток, либо возможен отрицательный отбор неокрашенных ячеек (Herzenberg and De Rosa, 2000). Для технологии FACS требуется проточный цитометр с возможностью сортировки и соответствующим программным обеспечением. Суспензия клеток подается в измерительную кювету где за счет гидрофокусировки формируется тонкий поток, содержащий данные клетки (рисунок 1). Проходя в составе потока через луч лазера клетки вызывают рассеяние света, которое фиксируется детекторами прямого и бокового светорассеяния, а также генерируют специфический сигнал флуоресценции. На основе этих параметров система детектирует клетки, представляющие интерес. Далее поток, за счет пьезоэлемента, разбивается на отдельные капли, и капли, содержащие целевые клетки, получают электростатический заряд за счет которого отклоняются от общего потока и попадают в нужную пробирку или лунку планшета (Givan, 2001). Параметры сортировки можно регулировать в зависимости от требований чистоты и скорости сбора целевой популяции клеток. Несмотря на то, что FACS требует специализированного оборудования и обучения оператора, этот метод является предпочтительным для изоляции высокоочищенных популяций клеток.

7 Требования безопасности, охраны окружающей среды

7.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 51350.

7.2 Необходимо соблюдать стандарты безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.1.005-8 и ГОСТ 12.1.045-84.

7.3 При выполнении измерений соблюдают требования безопасности в соответствии с документами производителей оборудования.

8 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица:

- не моложе 18 лет;
- не имеющие медицинских противопоказаний;
- имеющие высшее образование;
- изучившие устройство и принцип работы проточного цитометра;

- прошедшие и усвоившие соответствующий курс обучения работе в области проточной цитометрии и сортировки клеток;
- прошедшие инструктаж по охране труда на рабочем месте;
- изучившие настоящую методику измерений и эксплуатационную документацию на применяемое оборудование.

9 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха в рабочих помещениях, °С – от +18 до +22;
- относительная влажность воздуха, не более 60 % при температуре 22-24 °С;
- атмосферное давление, кПа – от 84 до 106,7;
- напряжение питания в сети, В – 220;
- частота электрической сети, Гц – 50 ± 5 .

10 Подготовка к работе и выполнение измерений

Перед началом сортировки все растворы охлаждаются до температуры 4 °С. Суспензию клеток необходимо однократно промыть холодным буфером для окрашивания клеток. Осаждение клеток осуществлять при помощи центрифугирования в течение 5 мин при температуре 4 °С с ускорением 300 g. После отмывки клетки ресуспендировать в буфере для окрашивания в концентрации 50×10^6 мл. Возьмите аликвоту для использования ее в последующем в качестве контроля как неокрашенные клетки.

Для окрашивания добавить к клеточной суспензии первичные антитела против маркера, характерного для целевой популяции клеток. Концентрацию антител использовать согласно рекомендациям производителя. Инкубировать клетки на льду в течение 20-30 мин в темноте. Далее промыть клетки два раза буфером для суспендирования, осаждение клеток осуществлять при помощи центрифугирования в течение 5 мин при температуре 4 °С с ускорением 300 g. Если первичные антитела не конъюгированы с флуорохромом, используйте соответствующие вторичные антитела. Процедуру окрашивания проводить аналогично окраске с использованием первичных антител, концентрацию антител использовать согласно рекомендациям производителя. Промыть клетки два раза буфером для суспендирования и ресуспендировать клетки в среде для культивирования. Возьмите аликвоту и при помощи окраски трипановым синим и гемоцитометра определите концентрацию и жизнеспособность клеток.

Ресуспендируйте клетки в пробирке объемом 15 мл в концентрации $15-20 \times 10^6$ мл в буфере для суспендирования. Чтобы избежать закупоривания сопла клеточными конгломератами или крупными частицами тканей и остановки сортировки в процессе работы, рекомендуется профильтровать клеточную суспензию через cell strainer. Диаметр пор подбирается в зависимости от размера сортируемых клеток. Дополнительно можно перед сортировкой обогатить клеточную популяцию целевыми клетками при помощи магнитного сортирования или другим способом, что позволит значительно сократить время сортировки в случае, если в образце низкая концентрация целевых клеток.

Заблаговременно до начала сортировки включите проточный цитофлуориметр сортировщик BD FACSAria III™ и при помощи набора BD Cytometer Setup & Tracking Beads Kit проверьте настройки базовой линии цитофлуориметра и состояние прибора. Убедитесь, что набор лазеров и фильтров подходит для проведения анализа или сортировки клеток с используемыми в эксперименте антителами.

Также перед началом работы необходимо провести компенсацию – настройку прибора для исключения свечения флуорохрома в соседних каналах (Tung et. al., 2007). Характеристики установленных на проточном цитометре светофильтров таковы, что их область пропускания соответствует максимуму спектра испускания флуорофора. Но за счет того, что спектр испускания флуорофора может быть достаточно широким, часть его излучения может проходить сквозь другие светофильтры, настроенные на регистрацию излучения другого флуорофора. То есть, к примеру, некоторая доля излучения от красителя FITC будет регистрироваться в канале, предназначенном для фикоэритрина, искажая результаты измерения. Для исключения данного эффекта необходимо уменьшать сигнал с детектора пропорционально сигналу с соседнего детектора, компенсируя таким образом свечение соседних флуорохромов. Величина компенсации зависит от многих параметров: напряжения на фотоумножителе и, как следствие, его чувствительности; спектра используемых флуорохромов; производителя реактивов (меченые антитела от разных производителей имеют разное соотношение белок/флуорофора, соответственно одни и те же образцы, окрашенные различными антителами, будут давать сигналы разной интенсивности).

Настройку компенсаций можно провести с помощью специальных частиц, конъюгированных с антителами, специфичными против антител мыши, крысы, хомяка или других животных, которые планируется использовать в эксперименте для окрашивания клеток. Например, для настройки компенсаций по одноцветным компенсационным контролям можно использовать калибровочные частицы BD CompBead Anti-mouse Ig, k.

Программное обеспечение, поставляемое с прибором и используемое для его управления, содержит уже готовый конвейер для автоматического определения компенсаций. В этом случае необходимо приготовить суспензию специальных частиц CompBeads и запустить данный конвейер через штатные возможности ПО.

В некоторых случаях необходимо выполнять настройки компенсаций вручную. В этих случаях готовятся «положительные контроли» анализируемых объектов для всех используемых флуорохромов. Проводятся измерения их флюоресценции и далее выставляются параметры компенсации таким образом, чтобы уровень сигнала в неспецифических каналах детекции совпадал с уровнем сигнала неокрашенного образца.

После того, как проведена настройка компенсаций, образец помещают в прибор и проводят анализ и сортировку клеток.

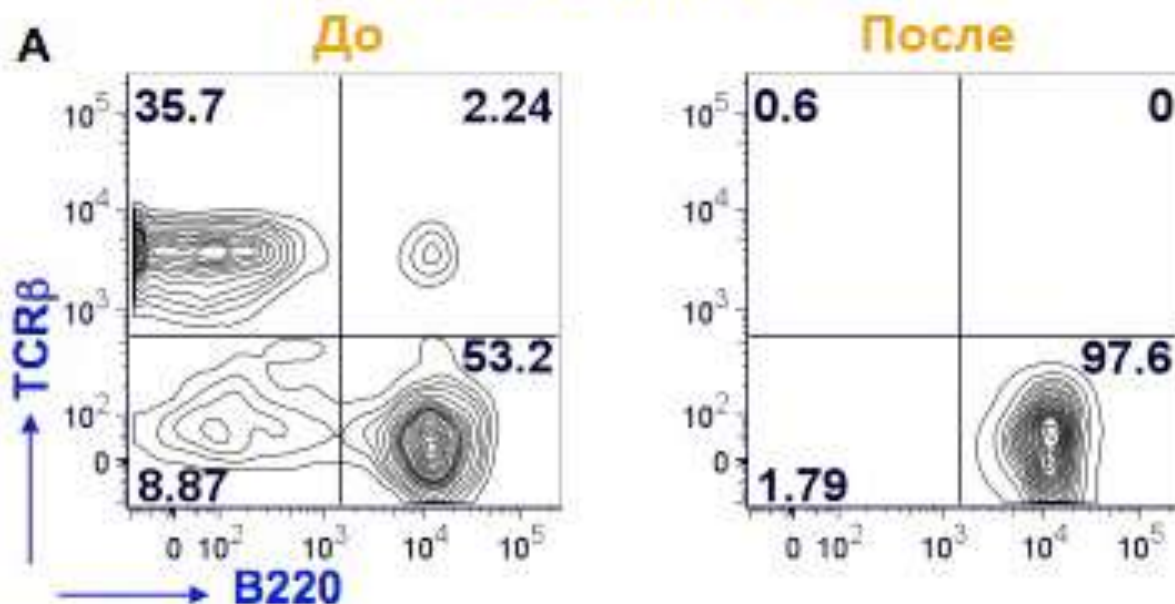
11 Обработка результатов измерений

Универсальное программное обеспечение BD FACSDiVa™ позволяет собирать данные и проводить расширенный статистический анализ исследуемых объектов, на основании которого определяются границы (гейты) популяций и субпопуляций клеток. Для анализа необходимо наличие отрицательного контрольного образца, сигнал от которого принимается за базовый.

В качестве примера представлены результаты сортировки спленоцитов и CD4 Т-клеток мыши (рисунок 2).

Спленоциты окрашивали антителами против B220 мыши, конъюгированными с PE Texas Red, антителами против TCR-beta мыши, конъюгированными с FITC, и антителами против CD4 мыши, конъюгированными с Alexafluor-700, для идентификации сортировки В-клеток ($B200^+ TCR-beta^-$) и CD4 Т-клеток ($CD4^+ TCR-beta^+$) мыши. Сортировку проводили на проточном сортирующем цитофлуориметре BD FACSAria III™. Чистота сортировки В-клеток составила > 97 %, а для CD4 Т-клеток – > 98 %.

Чистота сортировки В-клеток



Чистота сортировки CD4 Т-клеток

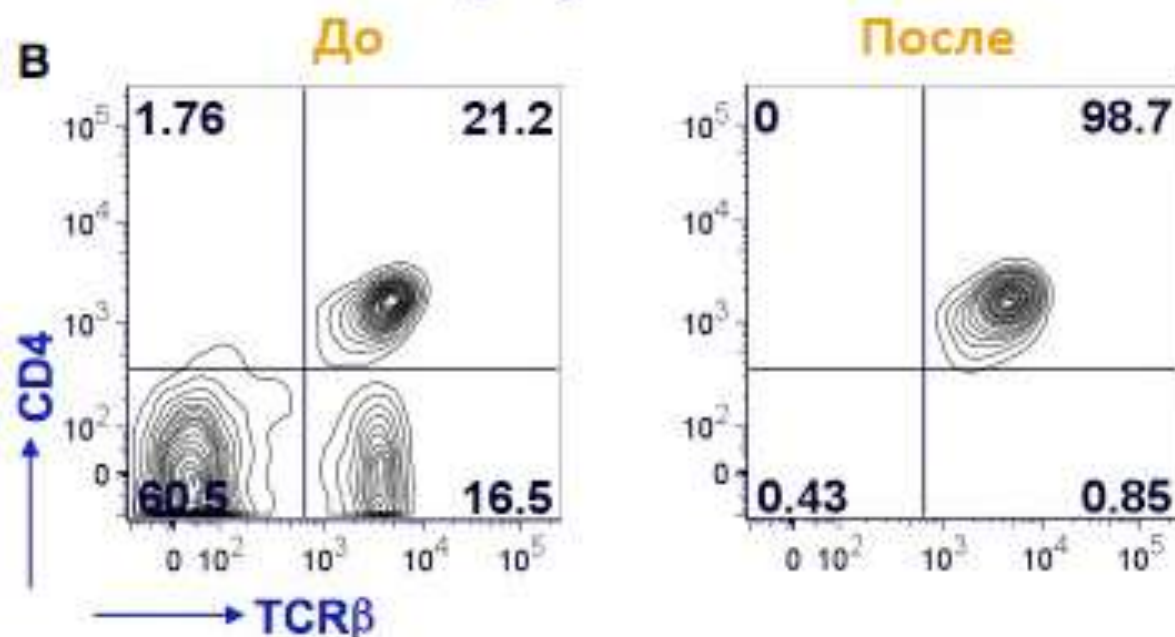


Рисунок 2. Пример сортировки клеток. Спленоциты мыши были окрашены антителами против B200, TCR-beta и CD4. Сортировка В-клеток проводилась на проточном сортирующем цитофлуориметре BD FACSAria III™.

А – сортировка популяции В-клеток B200⁺ TCR-beta⁻.

Б – сортировка популяции CD4 Т-клеток TCR TCR-beta⁺ CD4⁺.

12 Контроль точности результатов измерений

В клеточной сортировке основными показателями качества получаемых популяций клеток является их чистота и выживаемость. Эти параметры зависят от правильности выбора диаметра сопла для сортировки, скорости сортировки, доли целевой популяции в образце относительно общего количества клеток, времени сортировки, специфичности используемых антител и интенсивности флуоресценции флуорохромов, конъюгированных с антителами. Необходимо, чтобы частота сортировки была не менее 99 % при максимальной выживаемости клеток.

13 Оформление результатов измерений

Результаты проточной цитометрии и сортировки клеток представляются в виде гистограмм и/или псевдо-3D дот-плотов, а также таблиц, содержащих результаты статистического анализа полученных измерений (рисунок 3).

Дот-плот FSC-A–SSC-A – псевдо-3D график, показывающий распределение событий (клеток) по параметрам прямого и бокового светорассеяния. Каждая точка представляет единичное событие (клетку) с определенными значениями FSC-A и SSC-A.

Дот-плот FSC-A–FSC-H позволяет разделить единичные события (клетки) и агрегаты (дуплеты, триплеты и др.), поскольку соотношение FSC-A к FSC-H у синглетов ниже, чем у агрегатов. На данном графике синглеты выделены в субпопуляцию P1 и обозначены красным цветом.

Дот-плот FSC-H–FITC-A – псевдо-3D график, показывающий распределение событий по параметрам прямого светорассеяния и флуоресценции в канале детекции FITC. P2 – зона, в которой находятся объекты с гарантированным положительным свечением относительно уровня сигнала от негативного контроля.

На таблице в верхней части рисунка 3 представлены данные об общем количестве событий, выделенных популяциях и их соотношении.

В таблице в нижней части рисунка 3 представлены данные (среднее значение и медиана) об интенсивности флуоресцентного сигнала для каждой из популяций клеток.

Таким образом, на основании данной методики будет внедрена новая услуга для пользователей ЦГР – сортировка клеток и выделение клеточных популяций, обладающих определенными свойствами: анализ минорных клеточных популяций (стволовые клетки; дендритные клетки; тетрамеры; клетки, экспрессирующие флуоресцентные белки).

FACSDiva Version

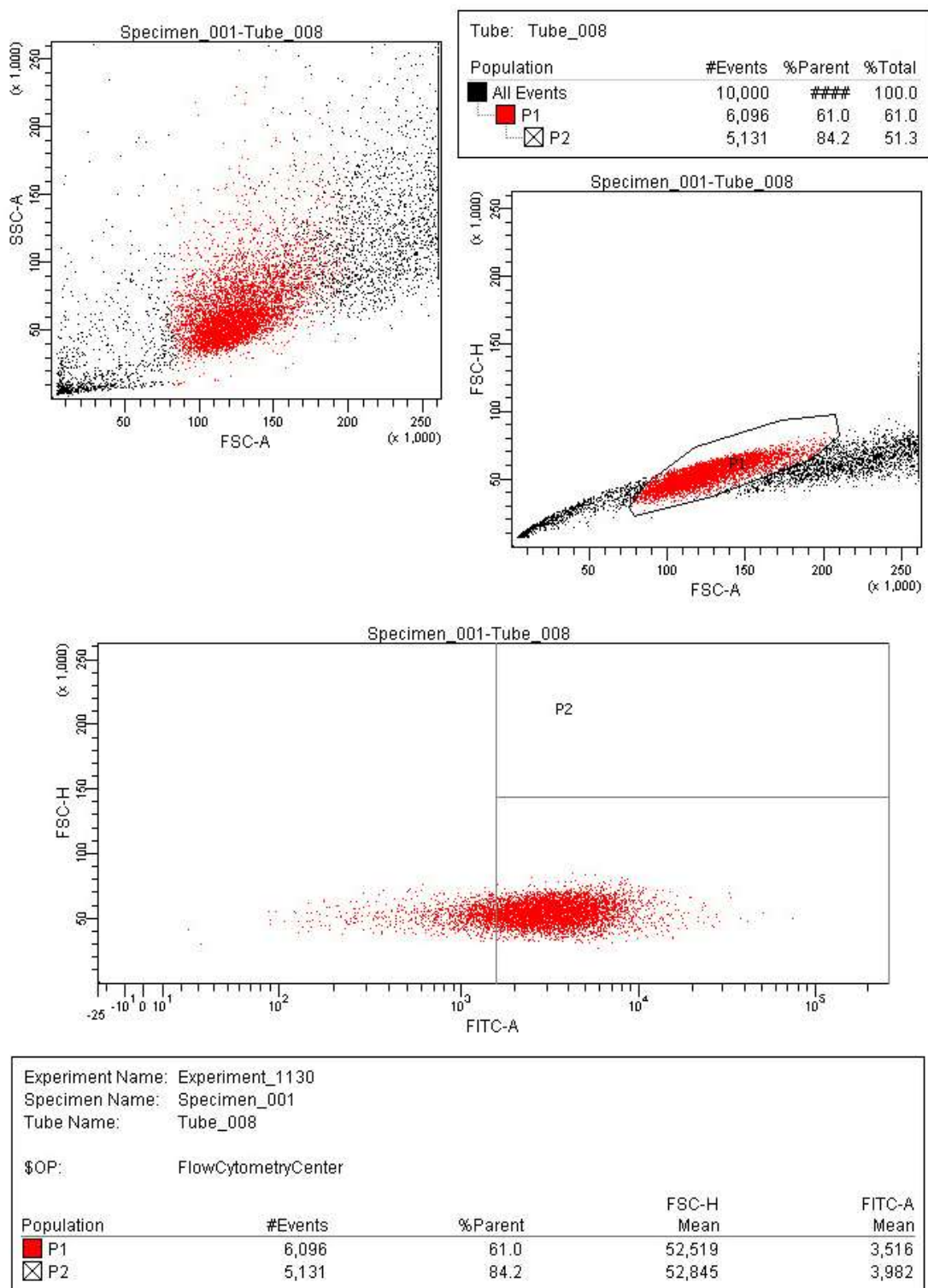


Рисунок 3. Обработка результатов проточной цитометрии.

Для анализа были использованы клетки эмбриональной почки человека (линия НЕК 293) трансфицированные плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок TurboGFP. Анализ клеток проводился через 48 часов после трансфекции.

14 Литература

1. Givan A.L. Flow cytometry first principles. Wiley-Liss, New York. 2001, 273 p.
2. Herzenberg L.A., De Rosa S.C. Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine // Immunol Today. 2000, 21: 383-390.
3. Hewitt Z., Forsyth N.R., Waterfall M., Wojtacha D., Thomson A.J., McWhir J. Fluorescence-activated single cell sorting of human embryonic stem cells // Cloning Stem Cells. 2006, 8: 225-234.
4. Sorensen T.U., Gram G.J., Nielsen S.D., Hansen J.E. Safe sorting of GFP-transduced live cells for subsequent culture using a modified FACS vantage // Cytometry. 1999, 37: 284-290.
5. Tung J.W., Heydari K., Tirouvanziam R., Sahaf B., Parks D.R., Herzenberg L.A. Modern flow cytometry: a practical approach // Clin Lab Med. 2007, 27: 453-468.
6. Walker A., Parkhill J. Single-cell genomics // Nat Rev Microbiol. 2008, 6: 176-177.