Metody identyfikacji i fenotypowania populacji komórek macierzystych

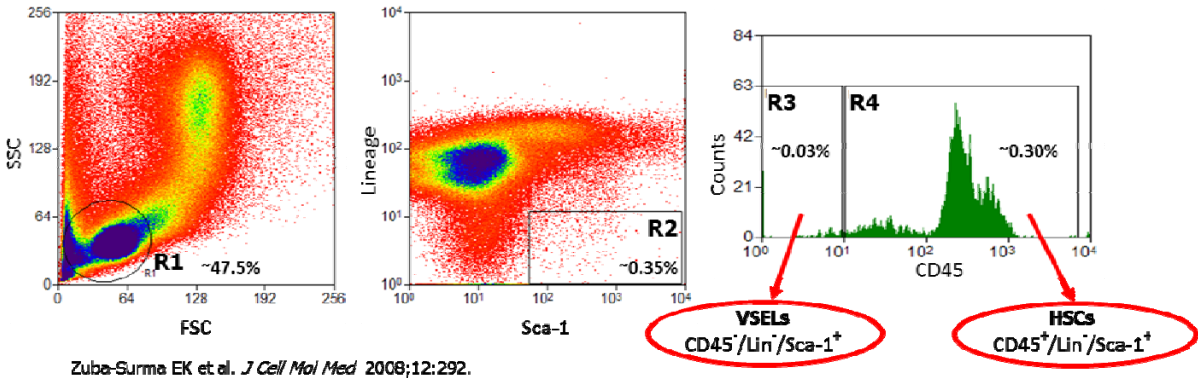
Wstęp

Szpik kostny zawiera hematopoetyczne (HSC) oraz niehematopoetyczne komórki macierzyste (KM). Do niehematopoetycznych KM należą: komórki progenitorowe śródbłonka naczyń (EPC), mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), multipotencjalne komórki progenitorowe z dorosłych tkanek (MAPC), komórki MIAMI, multipotencjalne komórki macierzyste z dorosłych tkanek (MASC), a także bardzo małe komórki macierzyste o charakterze embrionalnym (VSEL).

Kluczem służącym do identyfikacji oraz izolacji różnych populacji komórek macierzystych jest ich profil wieloantygenowy. Fenotypy wybranych typów KM przedstawiono w tabeli poniżej.

Rodzaj komórek	**Profil antygenowy**
MSC	Sca-1+/CD90+/CD105+/CD106+/CD29+/CD44+/CD45-/CD11b-
VSEL	Sca-1+/CD184+/CD34+/Oct-4+/Nanog+/SSEA-1/4+/Tra-1-60/81+/CD106+-/Flk-1+-/CD45-/Lin-
HSC	Sca-1+/CD31+/CD34+/CD44+/CD45+/CD90+/CD105+/CD106+/ CD117+/CD184+/CD338+/Lin-

Cytometria przepływowa jest techniką umożliwiającą szybką identyfikację różnych rodzajów KM. Poniżej przedstawiono strategię analizy oraz izolacji komórek VSEL oraz HSC z mysiego szpiku kostnego. Bardzo małe komórki o niskiej ziarnistości (FSC^{low}/SSC^{low}) z bramki R1 są wizualizowane pod kątem występowania na ich powierzchni markerów komórek linii hematopoetycznych oraz antygenu Sca-1. W bramce R2 zawarto obiekty Lin- oraz równocześnie Sca-1+. Komórki Lin-/Sca-1+ są następnie analizowane pod względem występowania na ich powierzchni lub braku antygenu CD45. Komórki o fenotypie Sca-1+/Lin-/CD45- są komórkami VSEL, natomiast komórki Sca-1+/Lin-/CD45+ komórkami HSC.



Rys. 1. Strategia analizy oraz izolacji komórek VSEL oraz HSCs.

Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest identyfikacja oraz ocena fenotypu różnych populacji KM za pomocą technik cytometrycznych oraz obrazowych, w tym komórek adherentnych oraz nieadherentnych.

Przebieg doświadczenia:

Doświadczenie jest kontynuacją eksperymentu rozpoczętego na poprzednich zajęciach. Praca w zespołach trzyosobowych.

I. <u>Pasaż komórek MSC:</u>

1. Ocenić konfluencję komórek w hodowli pod mikroskopem.
2. Z naczynia zlać płyn hodowlany (poniższe kroki proszę wykonywać sprawnie tak żeby komórki nie wyschły).
3. Delikatnie zalać komórki 5 ml roztworu PBS (bez Ca^{2+}, Mg^{2+}), przepłukać je, a następnie zlać PBS. Powtórzyć płukanie PBS. Inkubować 1-2 min.
4. Zalać komórki 0,5-1 ml 0.25% roztworu trypsyny/EDTA.
5. Naczynie hodowlane umieścić w inkubatorze hodowlanym (37°C, 5%CO_2).
6. Po upływie 3 min sprawdzić pod mikroskopem czy komórki już oderwały się od podłoża. W razie konieczności inkubować komórki w trypsynie przez kolejne 2-3 min. *(Uwaga! Jeśli komórki zaokrąglą się, można oderwać je mechanicznie poprzez 2-3 krotne uderzenie w naczynie hodowlane).*

7. Niezwłocznie po oderwaniu się komórek od podłoża dodać do naczynia 2 ml medium hodowlanego DMEM/F12 + 10% FBS w celu inaktywacji trypsyny.
8. Uzyskaną zawiesinę komórek przenieść do probówki 15 ml. Przepłukać naczynie hodowlane 3 ml DMEM/F12 + 10% FBS, a następnie zawiesinę dodać do probówki wirowniczej.
9. Komórki zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
10. Po odwirowaniu nadsącz zlać jednym szybkim ruchem, natomiast pelet zawiesić w 0,5 ml medium hodowlanego DMEM/F12+2%FBS.
11. Policzyć komórki w komorze Burkera.
12. 10^5 komórek przeniesieść do probówki typu Eppendorf. Dodać 200 µl buforu RL zawierającego 1% Bond Breaker (β-merkaptoetanol). Zworteksować. Homogenizować przy użyciu strzykawki 1 ml z igłą. Przechowywać w -80°C. (Materiał na Ćw. 3)

II. Przygotowanie komórek MSC do analizy ekspresji markerów komórek mezenchymalnych techniką cytometrii przepływowej

1. Komórki MSC przenieść do probówki cytometrycznej, a następnie wybarwić immunofluorescencyjnie przeciwciałami wymienionymi w tabeli, zgodnie z poniższym schematem:

Nazwa Próbki	**Przeciwciało znakowane fluorescencyjnie**
MSC	1. PE Rat anti- mouse CD11b = 3 µl/ próbkę 2. FITC Rat anti-mouse CD45 = 3 µl/ próbkę 3. APC Rat anti- mouse CD90.2 = 3 µl/ próbkę 4. PE/Cy7 Rat anti-mouse CD105 = 3 µl/ próbkę
Komp./ Empty*	Próbka niebarwiona
Komp./ PE*	PE Rat anti- mouse CD11b = 2 µl
Komp./ FITC*	FITC Rat anti-mouse CD45 = 2 µl
Komp./ APC*	APC Rat anti- mouse CD90.2 = 2 µl
Komp./ PE/Cy7*	PE/Cy7 Rat anti-mouse CD105 = 2 µl

**Próbki kompensacyjne zostaną przygotowane przez Asystenta.*

2. Barwić 20 min., na lodzie, bez dostępu światła.
3. Po zakończeniu barwienia do każdej probówki dodawać po 2 ml DPBS (bez Mg^{2+}, Ca^{2+}).

4. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
5. Odciągnąć nadsącz, pelet zawiesić w 300µl DMEM/F12 + 2% FBS, rozpipetować.
6. Analizować profil antygenowy komórek MSC przy użyciu cytometru BD FACS Aria III.

III. Przygotowanie komórek mysiego szpiku kostnego oraz subpopulacji CD45- i CD45+ do analizy zawartości procentowej komórek HSC oraz VSEL techniką cytometrii przepływowej

1. Utrwalone podczas poprzednich zajęć komórki szpiku kostnego, a także wysortowane subpopulacje CD45+ oraz CD45- zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
2. Pelety zawiesić w 300 µl DPBS+2%FBS, a następnie policzyć komórki w komorze Burkera.
3. Do dziewięciu probówek cytometrycznych dodawać po 100 µl DMEM/F12 + 2% FBS, a następnie wybarwić komórki immunofluorescencyjnie przeciwciałami wymienionymi w tabeli zgodnie z poniższym schematem:

Nr próbki	Nazwa Próbki	Rodzaj komórek	Liczba komórek	Przeciwciała znakowane fluorescencyjnie
1	**SzK**	Komórki szpiku kostnego po lizie erytrocytów	$5x10^6$	1. Panel markerów linii hematopoetycznych (Lin): PE Rat anti- mouse Ly-6G and Ly-6C; PE Rat anti- mouse CD11b; PE Rat anti- mouse CD45R/B220; PE Rat anti- mouse Ter-119; PE Hamster anti- mouse γδ T- Cell Receptor; PE Hamster anti- mouse TCR β Chain) po 1 µl każdego = 6 µl/ próbkę 2. PE/Cy5 anti- mouse Ly-6A/E (Sca-1) = 3 µl/ próbkę 3. FITC Rat anti-mouse CD45 = 5 µl/ próbkę
	Komp./ Empty		$0,5x10^6$	Próbka niebarwiona
	Komp./ PE		$0,5x10^6$	Panel markerów linii hematopoetycznych Lin = 2 µl
	Komp./ FITC		$0,5x10^6$	FITC Rat anti-mouse CD45 = 2 µl

	Komp./ PE-Cy5		$0,5x10^6$	PE/Cy5 anti- mouse Ly-6A/E (Sca-1) = 2 µl
2	**CD45+**	CD45+	$5x10^6$	**Barwienie jak dla próbki Nr 1.**
	CD45+/ Empty	CD45+	$0,5x10^6$	Próbka niebarwiona
3	**CD45-**	CD45-	$5x10^6$	**Barwienie jak dla próbki Nr 1.**
	CD45-/ Empty	CD45-	$0,5x10^6$	Próbka niebarwiona

4. Barwić 20 min., na lodzie, bez dostępu światła.
5. Po zakończeniu barwienia do każdej probówki dodawać po 2 ml DPBS (bez Mg^{2+}, Ca^{2+}).
6. Probówki z komórkami zwirować (1500 rpm., 5 min., RT).
7. Odciągnąć nadsącz, pelet zawiesić w 300µl DPBS, rozpipetować.
8. Analizować zawartość procentową komórek HSC oraz VSEL w szpiku kostnym, a także subpopulacjach CD45- i CD45+ przy użyciu cytometru BD FACS Aria III.