

## **Комплекс оборудования для оценки эффективности соединений на клеточных моделях**

Комплекс оборудования для оценки эффективности соединений на клеточных моделях соответствует требованиям пункта 2.1 Задания:

- дооснащение приборно-аналитической базы ЦКП современным дорогостоящим оборудованием для оценки эффективности исследуемых соединений на оригинальных клеточных (*in vitro*) моделях нейродегенеративных заболеваний человека и их токсичности для нормальных клеток

Комплекс оборудования для оценки эффективности соединений на клеточных моделях предназначен для проведения скрининговых исследований на моделях *invitro* и оценки действия тестируемых соединений для отбора наиболее перспективных веществ, а также оценки их токсичности.

Данный комплекс был модернизирован следующим оборудованием:



Рисунок 28 – CO<sub>2</sub>-Инкубатор Galaxy 170S, Eppendorf

Инкубатор CO<sub>2</sub> Eppendorf Galaxy 170 S с рабочим объемом 170 л обеспечивает высокую степень защиты от воздействия факторов окружающей среды. Рабочий диапазон температур - до 50°C.

Внешние размеры инкубатора – 48 x 48 x 65 см. Размеры внутренней камеры - 53 x 44 x 69 см.

Имеются 4 полки для размещения рабочего материала.

LED-дисплей позволяет оперативно контролировать уровень влажности и CO<sub>2</sub>, температуру камеры, предположительное время работы и состояние закрытия/открытия двери инкубатора.

Для подключения дополнительного лабораторного оборудования предусмотрены интерфейсы RS-232 и 25 мм.

Прямой шестисторонний нагрев рабочей камеры.

Отсутствие принудительной вентиляции (встроенного вентилятора).

Рабочая камера из нержавеющей стали с закругленными углами, без швов.

Внутренняя стеклянная дверь (для моделей 170R, 170S).

Инфракрасный датчик CO<sub>2</sub> .

Автоматическое обнуление ИК датчика.

HEPA-фильтр на входе CO<sub>2</sub>

Порт доступа 25мм, разъем RS-232 для подключения к ПК.

### **Криохранилище Locator 6 Plus**

Для длительного хранения различных биологических образцов при температуре жидкого азота.

Емкость, л — 184;

подвесные штативы с коробками для криопробирок;

ручное и компьютерное управление;

встроенный монитор контроля уровня жидкого азота;

замок-петля на крышке от несанкционированного доступа;

ультразвуковой монитор уровня жидкого азота;

звуковая сигнализация низкого уровня жидкого азота (опция);

подставка на колесах (аксессуар);

диаметр горловины, мм — 215;

скорость статич. испарения, л/день — 0,99;

стационар. время удерживания при хранении, сут. — 185;

количество подвесных штативов (коробки не входят), шт. — 8;

вместимость пробирок 1,2-2 мл, шт. — 6000.

## Спектрофотометр для микрообъемов NanoDrop 2000C, Thermo



Рисунок 29 – Спектрофотометр NanoDrop 2000C для микроколичеств образцов

Диапазон длин волн, нм — 190 — 840;

погрешность установки длины волны, нм —  $\pm 1$ ;

спектральная ширина щели, нм — 1,8;

диапазон измерения:  $\nu$  оптическая плотность, А — 0,04-300 (эквив. 10мм);

$\nu$  предел обнаружения dsDNA, нг/мкл — 2;

$\nu$  макс. концентрация dsDNA без разбавления, нг/мкл — 15000;

точность измерения оптической плотности (1 мм опт. путь), А — 0,002;

воспроизводимость измерения оптической плотности 0,74А при 340 нм, % — 3;

время измерения, с — 5;

оптическая схема — однолучевая;

рабочий объем образца, мкл — 0,5-2,0;

длина оптического пути, мм — 0,05 — 1;

нанесение образца на поверхность измеряющей микроячейки; не требует наличия кювет;

предустановленные методы: концентрация и чистота нуклеиновых кислот, белок 280А, метод Брэдфорда, Лоури, метод Смита (BCA), Пирса 660 нм, протеины и метки, микрочипы, клеточные рост, диагностические исследования;

источник света — ксеноновая лампа;

материал ячейки — нержавеющая сталь, кварцевое волокно;

наличие стандартного кюветного отделения, для кювет, мм — 12,5×12,5×45;

длина оптического пути, мм — 1, 2, 5, 10;

кинетические методы; термостатирование при 37°C;

перемешивание образца, об/мин — 150 — 850;

диапазон оптической плотности, А — 0,008 — 1,5;

диапазон измерения  $ds_{\text{ДНК}}$ , нг/мкл — 0,4-750

### **Холодильная камера Unichromat 1500, UniEquip**



Рисунок 30 – Холодильная камера Unichromat 1500, UniEquip

Холодильные камеры серии Unichromat предназначены для размещения хроматографических систем, при использовании которых требуется соблюдение определенного температурного режима.

Особенности хроматографических холодильников Unichromat:

внутренние и фронтальные панели из нержавеющей стали  
белый корпус с порошковым напылением  
цифровой контроль температуры с системой сигнализации  
цифровой дисплей  
самозакрывающаяся, изолированная дверь из небьющегося стекла  
запирающее устройство  
автоматическая система размораживания  
полки из нержавеющей стали  
специальная выдвижная полка для хроматографических систем  
монтажные отверстия для кабелей (на правой и левой стороне камер)  
защитное устройство с сенсором от отклонения температуры от  
рабочего диапазона  
внутреннее освещение с внешним включением  
вентилятор для циркуляции воздуха  
внутренние влагоустойчивые розетки.

## Генератор льда IceFlaker KF- 45A, Porkka



Рисунок 31 – Генератор льда IceFlaker KF- 45A, Porkka

Ледогенераторы предназначены для производства кристально чистого льда без минеральных примесей в форме кубиков, чешуек или наггетов.

Сухие и сплошные чешуйки льда производятся при температуре — 0,5°C из чистой питьевой воды;

корпус из нержавеющей стали;

беспрерывное изготовление льда;

воздушное охлаждение;

хладагент R404A.

Модель KF 45 A:

производительность, кг/сут. — 35;

емкость бункера, кг — 10.

## **Портативный автоматический автоклав, Allamerican.**



Рисунок 32 – Портативный автоматический автоклав

Полностью автономный стерилизатор имеет погружной нагревательный элемент, автоматический терморегулятор, автоматический выпускной клапан и сигнальную лампочку. Гарантирует полную, эффективную стерилизацию. Для работы требуется лишь небольшое количество воды, и сухой пар при температуре минимум 121°C стерилизует инструменты за 30 мин.

Стерилизатор изготовлен из высококачественного алюминия, включает штампованную бесшовную алюминиевую вставку-корзину, металлическую выпускную трубку, манометр, уплотнение с металлическими кольцами (без резиновых прокладок), контроллер температуры Fenwal.

### **Применение**

#### **Ведение клеточных культур**

Адгезивная перевиваемая клеточная линия нейробластомы человека была получена из SH-SY5Y из Европейской коллекции клеточных культур (European Collection of Cell Cultures - ECACC), каталожный No 94030304. Культуру вели на матрасах (Corning Flask, 25см<sup>2</sup>) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (GalaxyR) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, относительной влажности воздуха 80%. Пассаж проводился каждые 4-5 дней. Клетки использовали не более, чем 20 пассажа.

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Galaxy) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, относительной влажности воздуха 80% и пересевали культуры в состоянии

суб-монослоя, когда они занимали 80-90% поверхности культивации. К промытым ФСБ клеткам добавляли раствор 0,25% трипсина и 0,5 мМ ЭДТА по 1 мл на матрас или 2 мл на чашку Петри Ø 10 см, помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 5 минут. Трипсин инактивировали добавлением среды с сывороткой, тщательно пипетировали, переносили в пробирку, центрифугировали при 1000xg 5 минут, осадок ресуспендировали и проводили подсчет в камере Hawksley. Рассевали по 2x10<sup>5</sup> на матрас или 5x10<sup>5</sup> 500К на чашку Петри Ø 10 см.

### **Культивирование на покровных стеклах**

Приготовление стекол с полилизинным покрытием.

Стекла диаметром Ø 10 мм помещали по одному в каждую лунку 4х луночного планшета. Заливали этанолом, через несколько минут его отбирали и промывали лунки со стеклами дважды стерильной дистиллированной водой высокого качества, оставляли высохнуть на несколько часов (обычно на ночь) под ламинаром. На сухие стекла аккуратно добавляли по 80 мкл раствора полилизина, разведенного вдвое. Капли на стелках оставляли на 3 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Промывали стерильной дистиллированной водой высокого качества, оставляли высохнуть.

Приготовление стекол с коллагеновым покрытием.

Приготовление 0,01% стерильного раствора коллагена.

Для получения 0,01% раствора коллагена 5 мкг сухой коллаген (Collagen Type IV Sigma) растворяли в 50 мл 0,1 М уксусной кислоты при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 часов. Добавляли для стерилизации раствора 5 мл хлороформа и оставляли при +4°C на ночь. Отбирали верхний слой стерильного раствора коллагена, хранили в стеклянной бутылке на +4°C.

На подготовленные как и для полилизина стекла добавляли по 80 мкл раствора коллагена, оставляли стекла под каплей на 6 часов (или на ночь) в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Промывали стекла стерильным ФСБ дважды.

Рассев клеток на стекла.

На подготовленные стекла засеивали в аккуратной капле (по 80 мкл)  $10^3$  клеток на стекло. Оставляли на 3-5 часов в инкубаторе, чтобы клетки могли прикрепиться, и добавляли по 100 мкл полной среды на лунку.

### **Дифференцировка клеточной культуры SH-SY5Y**

Недифференцированные клеточные культуры рассеивали на Ø 10 мм стекла из расчета расчета  $5 \times 10^3$  клеток на лунку. На следующий день меняли среду на свежую, с добавлением ретиноевой кислоты до конечной концентрации 10 мкМ (all-trans retinoic acid, Sigma, США). Среду с ретиноевой кислотой меняли каждые 2 дня.

### **Исследование цитотоксичности соединений**

Клетки выращивали на 96-луночных планшетах (Nuclon). Через заданное в эксперименте время вносили исследуемые соединения в различной концентрации методом разведения. Обычно делали 4 повтора на каждую точку. После 24-часовой экспозиции исследуемых образцов фотометрически измеряли суммарную метаболическую активность клеток в каждой лунке в CellTiter-Blue тесте. Данный тест основан на способности живых метаболически активных клеток переводить ресазурин (темно-синий, почти не флуоресцирующий с максимум поглощения при 605 нм) в резорурфин (розовый, с высоким уровнем флуоресценции и максимальным поглощением при 573 нм).

Для проведения теста на цитотоксичность использовали набор CellTiter-Blue (Promega), следуя протоколу производителя. Степень клеточной гибели измеряли по CellTiter-Blue флуоресценции при 530 нм (поглощение)/560 нм (испускание).

### **Трансфекция**

Транзиентную трансфекцию клеток при плотности 80% проводили с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США). Для разведения

реагента и плазмидной ДНК использовали среду DMEM. При трансфекции на покровных стеклах в 24-луночных планшетах и 60-мм чашках использовали 0,6 мкг и 4 мкг плазмидной ДНК соответственно. В среднем эффективность трансфекции составляла 20%.

### **Микроскопический и иммуно-цитохимический анализ**

#### **Фиксация клеток.**

Непосредственно перед фиксацией готовили свежий 4%-ный раствор параформальдегида в ФСБ, нейтрализованный NaOH, подогревая на водяной бане. Планшеты с клетками помещали на лед, среду удаляли отсосом, клетки промывали холодным ФСБ, добавляли по 1 мл охлажденного свежеприготовленного 4% параформальдегида на лунку и оставляли на льду на 15 мин. Отмывали лунки от параформальдегида дважды промывали ФСБ. Добавляли холодный 100% метанол на 5 мин, промывали ФСБ. Далее фиксированные на стеклах клетки либо окрашивали либо монтировали на предметные стекла с помощью среды для заключения ImmuMount (Thermo Electron corporation, США).

#### **Иммуно-цитохимическое окрашивание.**

К фиксированным клеткам добавляли блокирующий раствор 5% сыворотки козы в ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в течение часа. Первичные антитела разводили в соответствующих концентрациях в ФСБ, содержащем 1% сыворотки козы, инкубировали при комнатной температуре в течение часа и промывали холодным ФСБ дважды, после чего добавляли раствор вторичных антител в ФСБ, содержащем 1% сыворотки козы в ФСБ, инкубировали при комнатной температуре в течение часа (в темноте в случае использования флуоресцентных антител), отмывали несколько раз холодным ФСБ. Для иммунофлуоресцентной детекции использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами Alexa546 или Alexa488 против иммуноглобулинов кролика или мыши, в разведении 1:200 (Molecular Probes, Invitrogen, США), инкубировали 3 часа,

после чего промывали, проводили окраску ядер клеток с помощью DAPI и заключали в среду Vectashield (Vector Laboratories, США). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510/Axioplan 2.

**Подсчет числа агрегатов.**

Через 16 часов после добавления исследуемых веществ, клеточные препараты фиксировали и подсчитывали число флюоресцентных включений, размер которых был не менее пяти микрон. Считали включения на всей площади стекла, для каждого препарата брали среднее значение трех стекол. В каждом эксперименте за 100% принимали количество включений в контрольных культурах, которые инкубировались после трансфекции без добавления препаратов. Число включений в образцах, культивируемых с добавлением Димебона, DF-203 или DF-213, выражали в процентном отношении к контрольным.

### **Последовательная экстракция белков**

Клетки наращивали на 60-мм чашках, через 24 часа после трансфекции промывали холодным ФСБ на льду, аккуратно соскребали скребком для снятия клеток (Orange Scientific, Бельгия) с поверхности чашки в том же буфере, переносили в пробирку и центрифугировали при 3000 об/мин, 4°C в течение 5 мин. Отбирали супернатант, осадок промывали холодным ФСБ, добавляли холодный высокосолевого буфер (ВСБ; 50 мМ ТрисHCl рН 7,5, 750 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА), содержащий ингибиторы протеаз (MiniProtean, Roche, США; 1 таблетка на 10 мл буфера) в соотношении 1:10 (мас:об) и немедленно гомогенизировали с помощью ручного гомогенизатора (TechWare, Sigma, США).

Для получения осветленного постмитохондриального супернатанта получившийся гомогенат центрифугировали при 13 000 об/мин, 4°C в течение 20 мин. Полученный супернатант переносили в толстостенные пробирки Special Beckman Eppendorf и центрифугировали при 48 000 об/мин в течение 20 мин при 4°C, ультрацентрифуга Optima, ротор TLA.120.2 (все

BeckmanCoulter, США). Полученный супернатант соответствовал растворимой фракции (водорастворимые белки). Нерастворимый осадок промывали ВСБ, ресуспендировали в ВСБ с добавлением Тритон X-100 (1%) и снова центрифугировали при 48 000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Полученный супернатант соответствовал Тритон X-100-растворимой (Тр.Х-100, детергент-растворимой) фракции. Нерастворимый в ВСБ-ТХ-100 осадок промывали этим же буфером и ресуспендировали в буфере RIPA (50 мМ ТрисHClpH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% NP40, 0,25% дезоксихолат натрия, 1мМ фенилметилсульфонилфторид) и снова центрифугировали при 48 000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Полученный супернатант соответствовал RIPA-растворимой фракции. Нерастворимый в буфере RIPA осадок лизировали в двукратном буфере Леммли для денатурирующего электрофореза, содержащем додецилсульфат натрия (детергент-нерастворимая фракция). Для каждой конструкции использовали одинаковое количество материала, выделение белка проводили в идентичных условиях.

В случае последовательной экстракции из ткани головного и спинного мозга мышей животное немедленно после эвтаназии вскрывали, извлекали головной и/или спинной мозг и замораживали в сухом льду. В день проведения экстракции белков добавляли ВСБ непосредственно к замороженным тканям, все последующие этапы производили, как описано выше. Для получения тотального белка обонятельные луковицы гомогенизировали в ВСБ с ингибиторами протеаз и центрифугировали в течение 20 мин при 15 000 об/мин при 4°C, отбирали осветленный супернатант и немедленно замораживали при -80°C.

Для субклеточного фракционирования к клеткам после осаждения и отмывки добавляли гипотонический буфер (10 мМ ТрисHCl, 40 мМКCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, ингибиторы протеаз), гомогенизировали и центрифугировали при 2000 об/мин 5 мин при 4°C. Супернатант отбирали (цитоплазматическая фракция). К осадку добавляли буфер для лизиса ядер (10 мМ ТрисHCl, 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 1% Тритон-X100, ингибиторы протеаз), оставляли на 30 мин на льду

с периодическим встряхиванием. Центрифугировали 13 000 об/мин 5 мин при 4°C. Супернатант отбирали (ядерная фракция). Дальнейшую обработку образцов проводили, как описано ниже.

### **Денатурирующий гель-электрофорез по Леммли**

Перед нанесением на гель к анализируемым образцам добавляли равный объем двукратного буфера Лэммли для нанесения проб (100 мМ ТрисHCl pH 6,8, 20% глицерина, 4% ДСН, 0,2% бромфенолового синего, 200 мМ 2-β-меркаптоэтанола), кипятили в течение 5 мин и немедленно помещали в ледяную баню. При нанесении образцов на дорожки по сравнению с фракцией растворимых белков количество ТритонХ-100- и RIPA-фракций для каждой конструкции увеличивали в два раза, детергент-нерастворимой фракции – в 1,5 раза. Разделяющий гель содержал 10 или 16% (в зависимости от молекулярной массы белка) акриламида/бисакриламида (из 30%-ного готового раствора, Sigma, США), 300 мМТрисHClpH 8,8, 0,1% персульфата аммония, 0,1% ДСН, 0,01% тетраметилэтилендиамина; концентрирующий гель – 6% акриламида/бисакриламида, 300 мМТрисHClpH 6,8, 0,1% персульфата аммония, 0,1% ДСН, 0,01% тетраметилэтилендиамина). Для электрофореза использовали буфер, содержащий 25 мМ ТрисHCl, 192 мМ глицина, 0,1% ДСН. Электрофорез проводили в течение 50 мин при постоянном напряжении 200 В и переменной силе тока (камера Bio-Rad Mini-Protean® 3 Cell и источник питания PowerPac Basic, Bio-Rad, США).

### **Иммуноблоттинг**

После разделения в геле белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану Hybond-P (Amersham, Великобритания) методом полусухого электроблоттинга. Мембрану перед переносом инкубировали сначала в 100% метаноле, промывали водой MilliQ и оставляли в буфере для переноса (25 мМТрис, 0,15 мМ глицина, 20% метанола) при покачивании на 5-10 мин. Отдельно инкубировали в этом же

буфере полученный гель. Помещали гель с плотно прижатой мембраной между двумя листами бумаги Wathman 3 MM, смоченной в буфере для переноса, в аппарат для полусухого блоттинга (TechWare, Sigma, США) и переносили белки на мембрану в течение 90 мин при токе 50 мА на 50 см<sup>2</sup>.

После электроблоттинга промывали мембрану в Трис-Твин буфере (ТТБ; 50 мМ ТрисHCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,1% Твин-20) 3 раза по 5 мин. Блокировали мембрану в 4% растворе обезжиренного сухого молока в ТТБ 1 час при комнатной температуре, затем инкубировали с первичными антителами в том же растворе при 4°C в течение ночи. Для детекции слитых с GFP белков использовали кроличьи поликлональные антитела Living Colors® (Clontech, США; 1:500), для детекции FUS – мышинные поликлональные анти-FUS антитела к эпитопу на C-концевом участке белка FUS (Santa Cruz Biotechnology, США; 1:500). После инкубации с первичными антителами промывали мембрану в ТТБ 3 раза по 5 мин, и инкубировали с вторичными антителами (против IgGмыши или IgGкролика, конъюгированными с пероксидазой хрена; Amersham, Великобритания; 1:3000) 1,5 ч при комнатной температуре. После инкубации мембрану отмывали в ТТБ 3 раза по 5 мин. Детекцию специфического связывания антител проводили с помощью реагентов ECL Plus (Amersham, Великобритания) согласно инструкции производителя. Для детекции хемилюминесценции использовали рентгеновскую пленку (Kodak, Франция) и набор реагентов для проявления и фиксации Ренмед-плюс (Вымпелмед, Россия).