



(51) МПК
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011137686/10, 13.09.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 13.09.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.09.2011

(45) Опубликовано: 10.05.2013 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: KZ 22201 A4, 15.01.2010. KZ 23367 A4,
 15.12.2010. EP 0001424388 A1, 02.06.2004.

Адрес для переписки:

620028, г.Екатеринбург, ул. Репина, 3, ГБОУ
 ВПО УГМА, проректору О.П. Ковтун,
 рег.№ 874

(72) Автор(ы):

**Ястребов Анатолий Петрович (RU),
 Гребнев Дмитрий Юрьевич (RU),
 Маклакова Ирина Юрьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 профессионального образования "Уральская
 государственная медицинская академия
 Министерства здравоохранения и
 социального развития Российской
 Федерации" (ГБОУ ВПО УГМА
 Минздравсоцразвития России) (RU),
 Общество с ограниченной
 ответственностью "Центр клеточных
 технологий" (ООО "Центр клеточных
 технологий") (RU)**

**(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ
 ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области клеточной биологии, в частности к способу выделения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из пуповинной крови лабораторных животных. Способ заключается в выделении ГСК за счет удаления из суспензии, содержащей различные гемопоэтические клетки, элементов, не являющихся ГСК. В качестве буфера для иммуномагнитной сепарации (БИМС) используют коктейль для сепарации (КС) следующего состава: PBS+2%

раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+ 1% раствор антибиотиков на 100 мл КС: пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл, инкубирование клетки с частицами для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM производят при - 20°C в течение 3 мин. Способ позволяет получить существенное увеличение жизнеспособности выделенных ГСК. Изобретение может быть использовано в клеточной терапии различных заболеваний. 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011137686/10, 13.09.2011**

(24) Effective date for property rights:
13.09.2011

Priority:

(22) Date of filing: **13.09.2011**

(45) Date of publication: **10.05.2013 Bull. 13**

Mail address:

**620028, g.Ekaterinburg, ul. Repina, 3, GBOU VPO
UGMA, prorektoru O.P. Kovtun, reg.№ 874**

(72) Inventor(s):

**Jastrebov Anatolij Petrovich (RU),
Grebnev Dmitrij Jur'evich (RU),
Maklakova Irina Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe
uchrezhdenie vysshego professional'nogo
obrazovanija "Ural'skaja gosudarstvennaja
meditsinskaja akademija Ministerstva
zdravookhranenija i sotsial'nogo razvitija
Rossijskoj Federatsii" (GBOU VPO UGMA
Minzdravsotsrazvitija Rossii) (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Tsentr kletochnykh tekhnologij" (OOO "Tsentr
kletochnykh tekhnologij") (RU)**

(54) METHOD TO EXTRACT HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY METHOD OF IMMUNOMAGNETIC SEPARATION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: method consists in extraction of HSC due to removal of elements, which are not HSC, from a suspension containing different hematopoietic cells. A buffer for immunomagnetic separation (IMSB) is a separation cocktail (SC) of the following composition: PBS+2% solution of indispensable amino acids +2% FBS+1% solution of antibiotics

per 100 ml of SC: penicillin 100 units/ml + streptomycin 100 mkg/m, incubation of a cell with particles for separation of Streptavidin Particles Plus - DM is carried out at - 20°C for 3 min. The invention may be used in cell therapy of different diseases.

EFFECT: method makes it possible to get substantial increase of viability of extracted HSC.

3 ex

Изобретение относится к области клеточной биологии, в частности к способу выделения гемопоэтических стволовых клеток из пуповинной крови лабораторных животных (мыши), что может быть использовано в клеточной терапии различных заболеваний.

5 На сегодняшний день существуют различные способы выделения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

Наиболее близким способом выделения ГСК мыши к заявляемому способу можно считать способ выделения ГСК мыши методом непрямой иммуномагнитной
10 сепарации с использованием набора антител: EasySep Mouse hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Cocktail, а также EasySep Biotin Selection Cocktail (Catalog 2010 StemCell Technologies, Канада. P.244). Данный метод предполагает выделение ГСК за счет удаления из суспензии, содержащей различные гемопоэтические клетки, элементов, не являющихся ГСК. Недостатком прототипа является то, что согласно протоколу
15 производителя жизнеспособность выделенных клеток (ГСК) составляет 80-85%.

Изменение методики выделения ГСК методом непрямой иммуномагнитной сепарации заключается в замене предлагаемого производителем буфера для иммуномагнитной сепарации (БИМС) на разработанный заявителем коктейль для
20 сепарации (КС). Состав рекомендованного производителем БИМС: PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА. Состав разработанного заявителем КС: PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (на 100 мл КС: пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл). Также изменено время и условия инкубирования клеток с частицами для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM. Согласно методике
25 производителя клетки необходимо инкубировать 30 мин при 6-12°C. Заявитель рекомендует инкубирование клетки с частицами для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM при -20°C в течение 3 мин. Изменение методики: замена БИМС на КС, а также изменение времени (уменьшение на порядок) и условий инкубирования
30 приводит к существенному увеличению жизнеспособности выделенных ГСК. Содержание ГСК определялось с использованием антител к специфическим для ГСК антигенам на поверхности клеток. Положительные маркеры к ГСК мыши: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень). Отрицательные маркеры к ГСК мыши: Lin-; CD34. Жизнеспособность определялась с использованием стандартного красителя
35 трипановый синий.

Технический результат заключается в существенном увеличении жизнеспособности выделенных ГСК.

Способ выполняют следующим образом:

40 После получения пуповинной крови лабораторных мышей объем выделенной крови доводится до 1 мл с помощью буфера для окрашивания. При этом состав буфера для окрашивания следующий: фосфатный буфер без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} с добавлением 3% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS) и с добавлением 0,1% азидом натрия. Производится подсчет клеток в камере Горяева. К
45 полученной таким образом суспензии клеток добавляются мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. Инкубируется 15 мин на льду. После чего добавляется коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. Повторно инкубируется 15 мин на льду. Ресуспенсируется полученная суспензия клеток в КС (7
50 мл). Центрифугирование при 300 g в течение 7 минут. Полученный осадок клеток ресуспенсируется в КС до объема 1 мл. Добавляются частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. Охлаждение 3 мин при -20°C.

Меченые клетки переносятся в 5 мл пробирку Falcon. Инкубирование 12 мин на

иммуномагнитном сепараторе (ИМС). Супернатант удаляется в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК). Добавляется 1 мл КС и ресуспендируется 10-15 раз. Повторное инкубирование 12 мин на ИМС. Удаление супернатанта в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК). Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубируют 12 минут на ИМС. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция, обогащенная ГСК методом ИМС. Используя набор антител, определяют содержание гемопозитических стволовых клеток в полученной суспензии. Положительные маркеры к ГСК мыши: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень). Отрицательные маркеры к ГСК мыши: Lin-; CD34. Для определения количества живых клеток аликвоту суспензии (40 мкл) смешивают с равным количеством 0,4% раствора трипановый синий в PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}). Исходная концентрация клеток рассчитывается по формуле:

$$C (\text{cell/ml}) = 5 \cdot 10^5 \cdot (\text{количество клеток в одном большом квадрате}).$$

Живые клетки непроницаемы для трипанового синего, а мертвые проницаемы и окрашиваются.

Пример №1

А: (Действие согласно протоколу производителя).

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной distraction.
- 1'. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.
2. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.
3. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN_3).
4. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.
5. Получена суспензия клеток, содержащая 30 млн кл/мл (в буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN_3).
6. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 7,5 мкг CD16C/CD32).
7. Инкубировать 15 мин на льду.
8. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 150 мкл коктейля антител).
9. Инкубировать 15 мин на льду.
10. Добавить 10-кратный избыточный объем однократный буфер для иммуномагнитной сепарации БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) в соотношении 1:10.
11. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.
12. Полученный осадок клеток ресуспендировать в БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) до объема 1 мл.
13. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 150 мкл частиц для сепарации).
14. Охлаждать 30 мин при 6-12°C.
15. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.
16. Инкубировать 8 мин на ИМС.
17. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

18. Добавить 1 мл БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА).

19. Инкубировать 8 мин на ИМС.

20. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

21. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 8 минут.

22. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 350 тыс. (1,2% от исходного содержания всех клеток крови).

Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 78%.

Б. Действие согласно заявляемому способу.

Используя следующий состав коктейля для сепарации (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) вместо БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА):

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной дистракции.

2. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.

3. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.

4. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

5. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.

6. Получена суспензия клеток, содержащая 30 млн кл./мл (В буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

7. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 7,5 мкг CD16C/CD32).

8. Инкубировать 15 мин на льду.

9. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 150 мкл коктейля антител).

10. Инкубировать 15 мин на льду.

11. Добавить коктейль для сепарации: (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

12. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.

13. Полученный осадок клеток ресуспендировать в КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) до объема 1 мл.

14. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 150 мкл частиц для сепарации).

15. Охлаждать 3 мин при -20°C

16. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.

17. Инкубировать 12 мин на ИМС.

18. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с

помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

19. Добавить 1 мл КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

20. Инкубировать 12 мин на ИМС.

21. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

22. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 12 минут.

23. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 500 тыс. (1,7% от исходного содержания всех клеток крови).

Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 95%.

Пример №2

А: (Действие согласно протоколу производителя).

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной дистракции.
2. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.

3. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.

4. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

5. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.

6. Получена суспензия клеток, содержащая 15 млн кл./мл (в буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

7. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 3,75 мкг CD16C/CD32).

8. Инкубировать 15 мин на льду.

9. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 75 мкл коктейля антител).

10. Инкубировать 15 мин на льду.

11. Добавить 10-кратный избыточный объем однократный буфер для иммуномагнитной сепарации БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) в соотношении 1:10.

12. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.

13. Полученный осадок клеток ресуспендировать в БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) до объема 1 мл.

14. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 75 мкл частиц для сепарации).

15. Охлаждать 30 мин при 6-12°C.

16. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.

17. Инкубировать 8 мин на ИМС.

18. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, содержит обогащенную фракцию ГСК).

19. Добавить 1 мл БИМС (PBS+0,5% FBS+2 mM ЭДТА).

20. Инкубировать 8 мин на ИМС.

21. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

22. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 8 минут.

23. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 130 тыс. (0,87% от исходного содержания всех клеток крови).

Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 83%.

Б. Действие согласно заявляемому способу.

Используя следующий состав коктейля для сепарации (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) вместо БИМС (PBS+0,5% FBS+2 mM ЭДТА):

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной дистракции.

2. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.

3. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.

4. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

5. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.

6. Получена суспензия клеток, содержащая 24 млн кл./мл (в буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

7. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 6 мкг CD16C/CD32).

8. Инкубировать 15 мин на льду.

9. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 120 мкл коктейля антител).

10. Инкубировать 15 мин на льду.

11. Добавить коктейль для сепарации: (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

12. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.

13. Полученный осадок клеток ресуспендировать в КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) до объема 1 мл.

14. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 120 мкл частиц для сепарации).

15. Охлаждать 3 мин при -20°C.

16. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.

17. Инкубировать 12 мин на ИМС.

18. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с

помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

19. Добавить 1 мл КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

20. Инкубировать 12 мин на ИМС.

21. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

22. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 12 минут.

23. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 320 тыс. (1,3% от исходного содержания всех клеток крови).

Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 98%.

Пример №3

А: (Действие согласно протоколу производителя).

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной дистракции.
2. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.

3. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.

4. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

5. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.

6. Получена суспензия клеток, содержащая 10 млн кл/мл (в буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

7. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 2,5 мкг CD16C/CD32).

8. Инкубировать 15 мин на льду.

9. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 50 мкл коктейля антител).

10. Инкубировать 15 мин на льду.

11. Добавить 10-кратный избыточный объем однократный буфер для иммуномагнитной сепарации БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) в соотношении 1:10.

12. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.

13. Полученный осадок клеток ресуспендировать в БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА) до объема 1 мл.

14. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 50 мкл частиц для сепарации).

15. Охлаждать 30 мин при 6-12°C.

16. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.

17. Инкубировать 8 мин на ИМС.

18. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

19. Добавить 1 мл БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА).

20. Инкубировать 8 мин на ИМС.

21. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

22. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 8 минут.

23. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 60 тыс. (0,6% от исходного содержания всех клеток крови).

Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 81%.

Б. Действие согласно заявляемому способу.

Используя следующий состав коктейля для сепарации (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS +1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) вместо БИМС (PBS+0,5% FBS+2 мМ ЭДТА):

1. Забой лабораторных животных осуществляется методом шейной дистракции.

2. Стерилизация лабораторного животного проводится путем помещения мыши на 5 минут в 90% раствор этилового спирта.

3. В стерильных условиях осуществляется получение пуповинной крови.

4. Доводится объем крови до 1 мл, используя буфер для окрашивания, рекомендованный производителем (PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

5. Подсчет клеток в камере Горяева: В маленькую пробирку (объемом 2-3 мл), содержащую 400 мкл 3% уксусной кислоты, добавляется 20 мкл (разведение 1:20) суспензии клеток костного мозга и перемешивается.

6. Получена суспензия клеток, содержащая 28 млн кл/мл (в буфере для окрашивания: PBS+3% FBS+0,1% NaN₃).

7. Добавить мышинные антитела к CD16C/CD32 в соотношении 0,25 мкг/млн кл. (т.о. всего 7 мкг CD16C/CD32).

8. Инкубировать 15 мин на льду.

9. Добавить коктейль антител в концентрации 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 140 мкл коктейля антител).

10. Инкубировать 15 мин на льду.

11. Добавить коктейль для сепарации: (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

12. Центрифугировать при 300 g в течение 7 минут.

13. Полученный осадок клеток ресуспендировать в КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл) до объема 1 мл.

14. Добавить частицы для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM 5 мкл/млн кл. (т.о. всего 140 мкл частиц для сепарации).

15. Охлаждать 3 мин при -20°C.

16. Перенести меченые клетки в 5 мл пробирку Falcon.

17. Инкубировать 12 мин на ИМС.

18. Удалить супернатант в новую пробирку Falcon (суспензия, полученная с

помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

19. Добавить 1 мл КС (PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков (пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/мл).

20. Инкубировать 12 мин на ИМС.

21. Удалить супернатант в прежнюю пробирку Falcon (суспензия, полученная с помощью негативной селекции, - содержит обогащенную фракцию ГСК).

22. Пробирку с суспензией клеток после негативной селекции инкубировать 12 минут.

23. Удалить супернатант - это и будет конечная фракция обогащенная ГСК методом ИМС.

ГСК мыши: на проточном цитометре уточняется содержание ГСК в полученной суспензии.

Отрицательные маркеры: Lin-; CD34.

Положительные маркеры: CD 38; Sca 1+; CD 117; CD 90 (низкий уровень).

Содержание ГСК 350 тыс. (1,25% от исходного содержания всех клеток крови). Жизнеспособность ГСК с использованием красителя трипанового синего составляет 95%.

Формула изобретения

Способ выделения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) методом иммуномагнитной сепарации, заключающийся в выделении ГСК за счет удаления из суспензии, содержащей различные гемопоэтические клетки, элементов, не являющихся ГСК, отличающийся тем, что в качестве буфера для иммуномагнитной сепарации (БИМС) используют коктейль для сепарации (КС) следующего состава: PBS+2% раствор незаменимых аминокислот +2% FBS+1% раствор антибиотиков на 100 мл КС: пенициллин 100 ед./мл + стрептомицин 100 мкг/м, инкубирование клетки с частицами для сепарации Streptavidin Particles Plus - DM производят при - 20°C в течение 3 мин.