

КУЛЬТУРА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

Р. Я. Фрешни

Перевод 6-го английского издания

5-е издание, электронное



Москва
Лаборатория знаний
2022

УДК 57.08
ББК 28.03
Ф87

А

Переводчики:
д-р биол. наук Ю. Н. Хомяков,
канд. мед. наук Т. И. Хомякова

Фрешни Р. Я.

Ф87 Культура животных клеток : практическое руководство / Р. Я. Фрешни ; пер. 6-го англ. изд. — 5-е изд., электрон. — М. : Лаборатория знаний, 2022. — 791 с. — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-974-9

Учебное издание, написанное ведущим специалистом в данной области, содержит наиболее полное описание теоретических основ и практических приемов работы с культурами животных клеток, а также необходимого оборудования, включая лабораторный дизайн. В достаточном объеме освещены вопросы техники безопасности. Подробно обсуждаются методика подготовки сред, приемы работы с первичной культурой и клеточными линиями. Описано специальное оборудование, в том числе для манипуляций с культурами животных клеток. Книга прекрасно иллюстрирована и удобна для использования как руководство в лаборатории.

Для студентов-биологов, биотехнологов, медиков, а также исследователей, специалистов биофармацевтических центров и сотрудников диагностических лабораторий.

УДК 57.08
ББК 28.03

Приведенные в книге показания к применению, противопоказания и дозировки препаратов настоятельно рекомендуются сверять с информацией их производителей и соотносить с клиническими процедурами. Авторы, редакторы и издатель не несут никакой юридической ответственности за любые содержащиеся в тексте и иллюстрациях ошибки или упущения.

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

Copyright © 2010 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Все права защищены. Авторизованный перевод издания на английском языке, опубликованного John Wiley & Sons Limited. Ответственность за точность перевода полностью возложена на издательство Лаборатория знаний и не является ответственностью John Wiley & Sons Limited. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме без письменного разрешения первоначального правообладателя, John Wiley & Sons Limited.

© Перевод на русский язык, оформление, Лаборатория знаний, 2015

ISBN 978-5-00101-974-9

А

Оглавление

Список иллюстраций	16	2.7.4.	Трансформация и развитие постоянных клеточных линий	54
Список цветных вклеек	19	Глава 3	СТРУКТУРА, ПЛАНИРОВКА И ОБОРУДОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ	56
Список протоколов	20	3.1.	Планировка, меблировка и оборудование	56
Список таблиц	22	3.1.1.	Требования к помещениям	57
Предисловие и благодарности	24	3.1.2.	Обслуживание	60
Список сокращений	26	3.1.3.	Вентиляция	61
Глава 1	ВВЕДЕНИЕ	3.2.	Планировка	61
1.1.	Исторические сведения	3.2.1.	Помещение для стерильных манипуляций	61
1.2.	Преимущества культуры ткани	3.2.2.	Ламинарное оборудование	62
1.2.1.	Контроль окружающей среды	3.2.3.	Служебный лабораторный стол	62
1.2.2.	Характеристика и однородность образцов	3.2.4.	Карантин и изоляция	63
1.2.3.	Экономичность, эффективность и автоматизация процесса	3.2.5.	Инкубация	63
1.2.4.	Моделирование <i>in vitro</i> условий <i>in vivo</i>	3.2.6.	Зона подготовительных работ	66
1.3.	Ограничения	3.2.7.	Хранение	67
1.3.1.	Наличие специальных навыков	Глава 4	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	70
1.3.2.	Затраты	4.1.	Потребности лаборатории культуры ткани	70
1.3.3.	Дифференцировка и селекция	4.2.	Асептическая зона	70
1.3.4.	Происхождение клеток	4.2.1.	Ламинарные шкафы	70
1.3.5.	Нестабильность	4.2.2.	Сервисные тележки	74
1.4.	Основные отличия культуры <i>in vitro</i>	4.2.3.	Стерильные манипуляции с жидкостями — пипетирование и дозирование	75
1.5.	Типы культуры ткани	4.2.4.	Инвертированный микроскоп	79
Глава 2	БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК	4.2.5.	ССD-камера и монитор	79
2.1.	Влияние окружающей среды на культуру клеток	4.2.6.	Препаровальная лупа	79
2.2.	Клеточная адгезия	4.2.7.	Центрифуга	80
2.2.1.	Молекулы клеточной адгезии	4.2.8.	Подсчет клеток	80
2.2.2.	Межклеточные контакты	4.3.	Инкубация и культура	80
2.2.3.	Внеклеточный матрикс	4.3.1.	Инкубатор	80
2.2.4.	Цитоскелет	4.3.2.	Влажный CO ₂ -инкубатор	81
2.2.5.	Клеточная подвижность	4.3.3.	Регистратор температуры	83
2.3.	Клеточная пролиферация	4.3.4.	Роллерные штативы	83
2.3.1.	Клеточный цикл	4.3.5.	Магнитная мешалка	83
2.3.2.	Контроль клеточной пролиферации	4.3.6.	Культуральные сосуды	83
2.4.	Дифференцировка	4.4.	Препаративные работы и стерилизация	83
2.4.1.	Поддержание дифференцировки	4.4.1.	Мытье посуды	83
2.4.2.	Дедифференцировка	4.4.2.	Приготовление сред и реактивов	84
2.5.	Передача клеточных сигналов	4.4.3.	Стерилизация	86
2.6.	Энергетический метаболизм	4.5.	Хранение	88
2.7.	Происхождение культивируемых клеток	4.5.1.	Расходные материалы	88
2.7.1.	Получение первичной культуры			
2.7.2.	Эволюция клеточных линий			
2.7.3.	Старение			

4.5.2.	Холодильники и морозильники	88	6.5.3.	Стеклянные и острые предметы	108
4.5.3.	Контейнеры для криоконсервации	88	6.5.4.	Химическая токсичность	110
4.5.4.	Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг с управляемым процессом замораживания	89	6.5.5.	Газы	111
4.6.	Дополнительное лабораторное оборудо- вание	89	6.5.6.	Жидкий азот	111
4.6.1.	Компьютеры и сети	89	6.5.7.	Ожоги	111
4.6.2.	Прямой микроскоп	89	6.6.	Пожар	112
4.6.3.	Низкотемпературный морозильник	89	6.7.	Ионизирующее излучение	112
4.6.4.	Конфокальный микроскоп	90	6.7.1.	Попадание в организм	112
4.6.5.	PCR-термоциклер (ДНК-амплификатор)	90	6.7.2.	Утилизация радиоактивных отходов	112
4.7.	Специальное оборудование	90	6.7.3.	Излучение от меченых реагентов	112
4.7.1.	Установка для микроинъекций	90	6.7.4.	Излучение от высокоэнергетических ис- точников	113
4.7.2.	Счетчик колоний	90	6.8.	Биологическая опасность	113
4.7.3.	Центрифужный элютриатор	90	6.8.1.	Уровни биологической защиты	113
4.7.4.	Проточный цитометр	90	6.8.2.	Ламинарные шкафы микробиологиче- ской защиты	113
Глава 5	МЕТОДЫ АСЕПТИКИ	91	6.8.3.	Человеческий биопсийный материал	116
5.1.	Цели асептики	91	6.8.4.	Манипуляции с генетическим материалом	119
5.1.1.	Риск контаминации	91	6.8.5.	Уничтожение биологически опасных от- ходов	120
5.1.2.	Поддержание стерильности	91	6.8.6.	Дезинфекция окуриванием	120
5.2.	Элементы асептического окружения	91	6.9.	Биоэтика	120
5.2.1.	Ламинарный поток	92	6.9.1.	Ткани животных	120
5.2.2.	Стерильная зона	94	6.9.2.	Ткани человека	120
5.2.3.	Рабочая поверхность	95	6.10.	Обеспечение качества	121
5.2.4.	Личная гигиена	96	6.10.1.	Процедуры	122
5.2.5.	Реагенты и среды	96	6.10.2.	Контроль качества	122
5.2.6.	Культуры	96	6.11.	Валидация	122
5.3.	Стерильные манипуляции	97	6.11.1.	Подтверждение аутентичности	122
5.3.1.	Протирание поверхностей	97	6.11.2.	Происхождение	122
5.3.2.	Закрывание емкостей	97	6.11.3.	Контаминация	123
5.3.3.	Работа с горелкой	97	Глава 7	ПОСУДА И СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИ- ВИРОВАНИЯ КЛЕТОК	124
5.3.4.	Манипуляции с бутылками и колбами	97	7.1.	Субстрат	124
5.3.5.	Пипетирование	98	7.1.1.	Прикрепление и рост клеток	124
5.3.6.	Переливание	99	7.1.2.	Общепринятые материалы для субстрата	124
5.4.	Стандартная процедура	99	7.1.3.	Альтернативные субстраты	124
	Протокол 5.1. <i>Асептический метод ра- боты в вертикальном ламинарном по- токе</i>	100	7.2.	Обработка поверхности	125
	Протокол 5.2. <i>Работа на открытой по- верхности</i>	102	7.2.1.	Покрытие матриксом	125
	Протокол 5.3. <i>Работа с планшетами и чашками</i>	103	7.2.2.	Протокол 7.1. <i>Приготовление ЕСМ</i>	126
5.5.	Приборы и оборудование	104	7.2.3.	Фидерные слои	126
5.5.1.	Инкубаторы	104	7.3.	Выбор культуральных сосудов	127
5.5.2.	Коробки для влажного инкубатора	104	7.3.1.	Клеточный выход	127
5.5.3.	Культивирование в атмосфере CO ₂	104	7.3.2.	Суспензионная культура	129
Глава 6	БЕЗОПАСНОСТЬ, БИОЭТИКА И ВАЛИ- ДАЦИЯ	105	7.3.3.	Вентиляция	130
6.1.	Лабораторная безопасность	105	7.3.4.	Отбор и анализ проб	130
6.2.	Оценка риска	105	7.3.5.	Неравномерный рост	132
6.3.	Стандартные рабочие процедуры	107	7.3.6.	Расходы	133
6.4.	Контроль безопасности	107	7.4.	Специализированные системы	133
6.5.	Общая безопасность	107	7.4.1.	Проницаемые подложки	133
6.5.1.	Оператор	108	7.4.2.	Трехмерные матриксы	134
6.5.2.	Оборудование	108	Глава 8	СРЕДЫ И ДОБАВКИ	135
			8.1.	Составление сред	135
			8.2.	Физико-химические свойства	135
			8.2.1.	Значение pH	135

8.2.2.	СО ₂ и бикарбонат	136	9.6.	Разработка бессывороточной среды	165
8.2.3.	Буферная система	137	9.7.	Приготовление бессывороточной среды	165
8.2.4.	Кислород	138	9.8.	Среда, не содержащая животных белков	166
8.2.5.	Осмотическое давление	138	9.9.	Заключение	166
8.2.6.	Температура	139			
8.2.7.	Вязкость	142	Глава 10	ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ	167
8.2.8.	Поверхностное натяжение и пенообразование	142	10.1.	Приготовление реактивов и материалов	167
8.3.	Сбалансированные солевые растворы	142	10.2.	Стерилизация оборудования и жидкостей	167
8.4.	Полная среда	142	10.3.	Оборудование	168
8.4.1.	Аминокислоты	143	10.3.1.	Стеклянная посуда	168
8.4.2.	Витамины	143		Протокол 10.1. Подготовка и стерилизация изделий из стекла	169
8.4.3.	Соли	143	10.3.2.	Стеклянные пипетки	173
8.4.4.	Глюкоза	143		Протокол 10.2. Подготовка и стерилизация стеклянных пипеток	173
8.4.5.	Органические добавки	144	10.3.3.	Завинчивающиеся крышки	175
8.4.6.	Гормоны и факторы роста	144		Протокол 10.3. Подготовка и стерилизация завинчивающихся крышек	175
8.4.7.	Антибиотики	144	10.3.4.	Выбор детергента	176
8.5.	Сыворотка	145	10.3.5.	Прочее оборудование	177
8.5.1.	Белки	145	10.3.6.	Стерилизационные фильтры многократного использования	177
8.5.2.	Факторы роста	145		Протокол 10.4. Стерилизация комплекта фильтров	178
8.5.3.	Гормоны	146	10.4.	Реагенты и среды	178
8.5.4.	Питательные вещества и метаболиты	146	10.4.1.	Вода	178
8.5.5.	Липиды	146		Протокол 10.5. Приготовление и стерилизация сверхчистой воды (UPW)	179
8.5.6.	Неорганические вещества	146	10.4.2.	Техническое обслуживание водоочистительной установки	180
8.5.7.	Ингибиторы	146	10.4.3.	Сбалансированный солевой раствор (BSS)	180
8.6.	Выбор среды и сыворотки	146		Протокол 10.6. Приготовление и стерилизация D-PBSA	181
8.6.1.	Резервирование партии сыворотки	147	10.4.4.	Приготовление и стерилизация среды	181
8.6.2.	Тестирование сыворотки	148		Протокол 10.7. Приготовление среды из концентрата с кратностью 1×	182
8.6.3.	Термическая инактивация	149		Протокол 10.8. Приготовление среды из концентрата с кратностью 10×	182
8.7.	Другие добавки	149	10.4.5.	Порошкообразные среды	184
8.7.1.	Гидролизаты аминокислот	149		Протокол 10.9. Приготовление среды из порошка	184
8.7.2.	Эмбриональный экстракт	149	10.4.6.	Специализированная среда	184
8.7.3.	Кондиционированная среда	149		Протокол 10.10. Приготовление специализированной среды	185
Глава 9	БЕССЫВОРОТОЧНЫЕ СРЕДЫ	150	10.5.	Стерилизация среды	185
9.1.	Недостатки сыворотки	150	10.5.1.	Автоклавируемые среды	185
9.2.	Преимущества бессывороточных сред	154	10.5.2.	Стерилизация методом фильтрации	185
9.2.1.	Определение стандартной среды	154		Протокол 10.11. Стерилизация с использованием фильтрующих насадок на шприцы	186
9.2.2.	Селективные среды	154		Протокол 10.12. Стерилизация с использованием фильтрующей вакуумной насадки на колбу	188
9.2.3.	Регуляция пролиферации и дифференцировки	154			
9.3.	Недостатки бессывороточных сред	156			
9.4.	Замена сыворотки	156			
9.4.1.	Коммерчески доступные бессывороточные среды	156			
9.4.2.	Заменители сыворотки	156			
9.4.3.	Бессывороточная субкультура	157			
9.4.4.	Гормоны	157			
9.4.5.	Факторы роста	158			
9.4.6.	Питательные вещества сыворотки	158			
9.4.7.	Белки и полиамины	158			
9.4.8.	Вязкость	158			
9.5.	Выбор бессывороточной среды	158			
9.5.1.	Специфичность клеток или продукта	158			
9.5.2.	Адаптация клеток к бессывороточной среде	165			

10.5.3.	Сыворотка	192	11.3.9.	Разделение жизнеспособных и нежизнеспособных клеток.	220
	Протокол 10.13. <i>Стерилизация с использованием малого встроенного фильтра</i>	189		Протокол 11.10. <i>Обогащение доли жизнеспособных клеток</i>	220
	Протокол 10.14. <i>Стерилизационная фильтрация с использованием большого проточного фильтра</i>	190	11.3.10.	Первичная культура, краткие выводы	222
	Протокол 10.15. <i>Сбор и стерилизация сывороток</i>	192	11.3.11.	Первичная документация	222
	Протокол 10.16. <i>Диализ сывороток</i>	194	Глава 12	СУБКУЛЬТУРА И КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ	223
10.5.4.	Приготовление и стерилизация других реагентов.	196	12.1.	Субкультивирование	223
10.6.	Контроль, проверка качества и хранение сред	196	12.1.1.	Перекрестная контаминация и неправильная идентификация	223
10.6.1.	Контроль качества	196	12.1.2.	Микоплазменная контаминация	227
10.6.2.	Проверка стерильности	196	12.1.3.	Терминология	228
10.6.3.	Проверка культуральных свойств.	197	12.1.4.	Маркировка клеточной культуры	228
10.6.4.	Хранение.	198	12.1.5.	Возраст культуры	229
Глава 11	ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА	199	12.2.	Выбор клеточной линии	229
11.1.	Инициация первичной культуры клеток	199	12.3.	Обычный порядок поддержания культуры	230
11.1.1.	Ферменты, используемые для дезагрегации.	199	12.3.1.	Значение клеточной морфологии	230
11.1.2.	Общие характеристики дезагрегации	199	12.3.2.	Замена среды	231
11.2.	Выделение образцов ткани	200	12.3.3.	Стандартный протокол замены среды	232
11.2.1.	Мышиный эмбрион	201		Протокол 12.1. <i>Питание монослойной культуры во флаконах</i>	232
	Протокол 11.1. <i>Выделение мышиногo эмбриона</i>	201		Протокол 12.2. <i>Питание монослойной культуры в чашках и планшетах</i>	233
11.2.2.	Куриный эмбрион.	204	12.4.	Субкультивирование	233
	Протокол 11.2. <i>Выделение куриного эмбриона</i>	204	12.4.1.	Критерии субкультивирования	234
11.2.3.	Биопсийный материал человека	204	12.4.2.	Стандартный протокол субкультивирования клеток, образующих монослой.	236
	Протокол 11.3. <i>Передача и получение биопсийного материала человека</i>	206		Протокол 12.3. <i>Субкультивирование клеток, образующих монослой</i>	236
11.3.	Типы первичной культуры	206	12.4.3.	Цикл роста и индекс разведения	238
11.3.1.	Первичный эксплантат	206	12.4.4.	Концентрация клеток в субкультуре	239
	Протокол 11.4. <i>Первичные эксплантаты</i>	206	12.4.5.	Размножение в суспензии	239
11.3.2.	Ферментативная дезагрегация	208	12.4.6.	Субкультивирование клеток, растущих в суспензии	240
11.3.3.	Теплый трипсин	209		Протокол 12.4. <i>Суспензионное субкультивирование</i>	240
	Протокол 11.5. <i>Дезагрегация ткани теплым трипсином</i>	209	12.4.7.	Стандартизация условий культивирования	241
11.3.4.	Трипсинизация с преинкубацией на холоде	212	12.4.8.	Использование антибиотиков	242
	Протокол 11.6. <i>Дезагрегация ткани в холодном трипсине</i>	212	12.4.9.	Ведение документации	242
11.3.5.	Рудиментарные органы куриного эмбриона	213	Глава 13	КЛОНИРОВАНИЕ И СЕЛЕКЦИЯ	244
	Протокол 11.7. <i>Рудиментарные органы куриного эмбриона</i>	213	13.1.	Клонирование клеток	244
11.3.6.	Дезагрегация с использованием других ферментов.	215		Протокол 13.1. <i>Клонирование с разведением</i>	245
11.3.7.	Коллагеназа.	215	13.2.	Стимуляция эффективности посева	247
	Протокол 11.8. <i>Дезагрегация ткани с помощью коллагеназы</i>	215	13.2.1.	Условия, которые улучшают клональный рост	248
11.3.8.	Механическая дезагрегация	219	13.2.2.	Кондиционированные среды.	249
	Протокол 11.9. <i>Механическая дезагрегация ткани путем просеивания</i>	220		Протокол 13.2. <i>Приготовление кондиционированной среды</i>	249
			13.2.3.	Фидерные слои.	250
				Протокол 13.3. <i>Приготовление фидерных слоев</i>	250
			13.3.	Суспензионное клонирование	251

13.4.	Протокол 13.4. <i>Клонирование в агаре</i>	251	15.5.2.	Протокол 15.1. <i>Использование инвертированного микроскопа</i>	284
	Протокол 13.5. <i>Клонирование в Methocel</i>	252		Окрашивание	285
	Выделение клонов	255	15.5.3.	Протокол 15.2. <i>Окрашивание по Гимзе</i>	285
	Протокол 13.6. <i>Выделение клонов с использованием колец для клонирования</i>	255		Протокол 15.3. <i>Окрашивание кристалвиолетом</i>	286
	Протокол 13.7. <i>Выделение клеточных колоний путем облучения</i>	257	15.5.4.	Культуральные сосуды для цитологии: монослойные культуры	286
13.4.1.	Другие методы выделения монослойных клонов	257		Приготовление суспензионной культуры для цитологии	286
13.4.2.	Суспензионные клоны.	257		Протокол 15.4. <i>Подготовка суспензионной культуры клеток для цитологических исследований методом цитоцентрифугирования</i>	287
	Протокол 13.8. <i>Выделение суспензионных клонов</i>	257		Протокол 15.5. <i>Фильтрационная цитология</i>	288
13.5.	Получение репликативных колоний	258	15.5.5.	Микрофотография	288
13.6.	Селективные ингибиторы	259		Протокол 15.6. <i>Цифровая фотография на микроскопе</i>	289
13.7.	Выделение генетических вариантов	259	15.6.	Конфокальная микроскопия	289
	Протокол 13.9. <i>Метотрексат-резистентность и DHFR-амплификация</i>	259	15.7.	Хромосомный состав	290
13.8.	Взаимодействие с субстратом	261		Протокол 15.7. <i>Приготовление хромосомного препарата</i>	290
13.8.1.	Селективная адгезия	261	15.7.1.	Дифференциальное окрашивание хромосом	292
13.8.2.	Селективное открепление	261	15.7.2.	Хромосомный анализ	293
13.8.3.	Природа субстрата	261	15.8.	Анализ ДНК	293
13.8.4.	Селективные фидерные слои	261	15.8.1.	Гибридизация ДНК	293
13.8.5.	Селекция на полужидкой среде	261	15.8.2.	Фингерпринтинг ДНК	293
			15.8.3.	Анализ профиля ДНК	294
Глава 14	РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК	263		Протокол 15.8. <i>Анализ STR-профиля ДНК клеточных линий</i>	296
14.1.	Плотность клеток и изопикническая седиментация	263	15.9.	Рнк и экспрессия белка	298
	Протокол 14.1. <i>Разделение клеток центрифугированием в градиенте плотности</i>	263	15.10.	Активность ферментов	298
14.2.	Размер клеток и скорость седиментации	266	15.10.1.	Изоферменты	298
14.2.1.	Гравитационная седиментация	266	15.10.2.	Изоферментный электрофорез с набором для определения аутентичности Authentikit	300
14.2.2.	Элютирация центрифугированием	266		Протокол 15.9. <i>Изоферментный анализ</i>	300
14.3.	Методы, основанные на применении антител	266	15.11.	Антигенные маркеры	303
14.3.1.	Иммунный пэннинг	267	15.11.1.	Иммунное окрашивание	304
14.3.2.	Магнитный сортиг	268		Протокол 15.10. <i>Непрямая иммунофлуоресценция</i>	304
	Протокол 14.2. <i>Магнитно-активированный клеточный сортиг (MACS)</i>	269	15.11.2.	Иммунный анализ	305
14.4.	Флуоресцентно-активируемый клеточный сортиг	270	15.12.	Дифференцировка	306
14.5.	Другие методы	272			
14.6.	Подходы для начинающих к освоению клеточного сортига	273	Глава 16	ДИФФЕРЕНЦИРОВКА	307
Глава 15	ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК	274	16.1.	Экспрессия фенотипа <i>in vivo</i>	307
15.1.	Необходимость характеристики	274	16.1.1.	Дедифференцировка	307
15.2.	Аутентификация	274	16.1.2.	Линейная селекция	307
15.3.	Ведение документации и происхождение клеток	275	16.2.	Стадии дифференцировки	307
15.4.	Параметры характеристики	275	16.3.	Пролиферация и дифференцировка	308
15.4.1.	Видовая идентификация	275	16.4.	Коммитирование и линии дифференцировки	308
15.4.2.	Происхождение тканевых маркеров	276	16.5.	Пластичность стволовых клеток	309
15.4.3.	Уникальные маркеры	277	16.6.	Маркеры дифференцировки	310
15.4.4.	Трансформация	278	16.7.	Индукция дифференцировки	311
15.5.	Морфология клеток	278	16.7.1.	Межклеточные взаимодействия	311
15.5.1.	Микроскопия	284			

16.7.2.	Системные факторы.	313	18.1.7.	Доставленные клеточные линии и образцы биопсии.	342
16.7.3.	Взаимодействия клетки с матриксом.	315	18.1.8.	Карантин.	342
16.7.4.	Полярность и форма клетки.	316	18.2.	Виды микробной контаминации.	342
16.7.5.	Давление кислорода.	316	18.3.	Контроль контаминации.	342
16.8.	Дифференцировка и злокачественность.	317	18.3.1.	Визуально определяемая микробная контаминация.	343
16.9.	Практические аспекты.	317	18.3.2.	Микоплазмы.	343
Глава 17	ТРАНСФОРМАЦИЯ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ.	318	18.3.3.	Флуоресцентное окрашивание микоплазм.	345
17.1.	Роль в характеристике клеточных линий.	318	Протокол 18.2. <i>Выявление микоплазм методом флуоресценции.</i>	<i>345</i>	
17.2.	Что такое трансформация?	318	18.3.4.	Использование PCR для обнаружения микоплазм.	346
17.3.	Генетическая нестабильность и гетерогенность.	318	Протокол 18.3. <i>Использование PCR для обнаружения микоплазм.</i>	<i>346</i>	
17.3.1.	Генетическая нестабильность.	318	18.3.5.	Альтернативные методы детекции микоплазм.	348
17.3.2.	Хромосомные aberrации.	320	18.3.6.	Сервисные службы по обнаружению микоплазм.	350
17.4.	Иммортализация.	321	18.3.7.	Вирусная контаминация.	350
17.4.1.	Контроль физиологического старения.	322	18.4.	Уничтожение контаминированных культур.	350
17.4.2.	Иммортализация с использованием вирусных генов.	322	18.5.	Устранение контаминации.	350
17.4.3.	Иммортализация человеческих фибробластов.	323	18.5.1.	Бактерии, грибы и дрожжи.	350
Протокол 17.1. <i>Иммортализация фибробластов.</i>	<i>324</i>		Протокол 18.4. <i>Устранение микробной контаминации.</i>	<i>350</i>	
17.4.4.	Теломеразоиндуцированная иммортализация.	326	18.5.2.	Устранение микоплазм.	351
Протокол 17.2. <i>Иммортализация мезенхимальных стволовых клеток человека с помощью теломеразы.</i>	<i>327</i>		Протокол 18.5. <i>Устранение микоплазменной контаминации.</i>	<i>351</i>	
17.4.5.	Иммортализация лимфоцитов.	329	18.5.3.	Устранение вирусной контаминации.	352
17.4.6.	Трансгенные мыши.	329	18.5.4.	Персистирующая контаминация.	352
17.5.	Аберрантный контроль роста.	329	18.6.	Перекрестная контаминация.	354
17.5.1.	Независимость от прикрепления к субстрату.	329	18.7.	Заключение.	354
17.5.2.	Контактное ингибирование.	330	Глава 19	КРИОКОНСЕРВАЦИЯ.	355
Протокол 17.3. <i>Ограничение клеточной пролиферации плотностью суспензии.</i>	<i>330</i>		19.1.	Предпосылки метода замораживания.	355
17.5.3.	Зависимость от сыворотки.	331	19.2.	Подготовка к криоконсервации.	355
17.5.4.	Онкогены.	332	19.2.1.	Валидация.	356
17.6.	Туморогенность.	332	19.2.2.	Когда нужно замораживать.	356
17.6.1.	Малигнизация.	332	19.3.	Принципы криоконсервации.	356
17.6.2.	Опухолевая трансплантация.	333	19.3.1.	Теоретическое обоснование замораживания клеток.	356
17.6.3.	Инвазивность.	333	19.3.2.	Концентрация клеток.	356
17.6.4.	Ангиогенез.	334	19.3.3.	Среда для замораживания.	356
Протокол 17.4. <i>Исследование ангиогенеза in vitro.</i>	<i>335</i>		19.3.4.	Скорость охлаждения.	357
17.6.5.	Активатор плазминогена.	337	19.3.5.	Ампулы.	359
Глава 18	КОНТАМИНАЦИЯ.	338	19.3.6.	Криоморозильники.	359
18.1.	Источники контаминации.	338	19.3.7.	Замораживание культивируемых клеток.	362
18.1.1.	Техника работы.	338	Протокол 19.1. <i>Замораживание клеток.</i>	<i>362</i>	
18.1.2.	Окружающая среда.	338	19.3.8.	Протоколирование работы морозильника.	364
18.1.3.	Использование и обслуживание ламинарного шкафа.	338	19.3.9.	Размораживание хранившихся ампул.	364
18.1.4.	Инкубаторы с увлажнением.	341	Протокол 19.2. <i>Размораживание клеток.</i>	<i>364</i>	
Протокол 18.1. <i>Обработка инкубаторов.</i>	<i>341</i>		19.3.10.	Флаконы для замораживания.	367
18.1.5.	Холодильные камеры.	342	19.4.	Витрификация.	367
18.1.6.	Стерильные материалы.	342	19.4.1.	Криоконсервация эмбриональных стволовых клеток человека (hES).	367
			Протокол 19.3. <i>Криоконсервация hES-клеток путем витрификации.</i>	<i>367</i>	

19.4.2.	Размораживание hES-клеток.	368	20.9.4.	Объем среды, концентрация и плотность клеток	393
	Протокол 19.4. <i>Размораживание hES-клеток, криоконсервированных путем витрификации.</i>	368	20.9.5.	Суспензионные культуры	394
19.5.	Дизайн и контроль замороженных запасов	369		Протокол 20.9. <i>Кривая роста суспензионной культуры.</i>	394
19.5.1.	Инвентарный контроль морозильника. . .	369	20.9.6.	Фазы цикла роста.	394
19.5.2.	Периодическая замена запасов культур. .	370	20.9.7.	Производные кривой роста.	395
19.6.	Банки клеток	370	20.10.	Эффективность культивирования	396
19.7.	Транспортировка клеточных культур. .	371		Протокол 20.10. <i>Определение эффективности посева на чашки Петри</i>	397
19.7.1.	Замороженные ампулы	371	20.10.1.	Анализ формирования колоний	399
19.7.2.	Живые культуры.	371	20.10.2.	Автоматический счетчик колоний	399
			20.11.	Индекс мечения	399
Глава 20	КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ	373		Протокол 20.11. <i>Индекс мечения [³H]-тимидином.</i>	400
20.1.	Подсчет клеток	373	20.11.1.	Ростовая фракция.	401
20.1.1.	Гемоцитометр.	374		Протокол 20.12. <i>Определение фракции пролиферирующих клеток.</i>	401
	Протокол 20.1. <i>Подсчет клеток при помощи гемоцитометра</i>	374	20.11.2.	Митотический индекс	401
20.1.2.	Электронный счетчик	377	20.11.3.	Индекс пролиферации.	401
	Протокол 20.2. <i>Электронный подсчет клеток на основе электрического сопротивления</i>	378	20.12.	Время клеточного цикла	402
20.1.3.	Окрашенные монослои	380	20.13.	Миграция клеток	402
20.1.4.	Проточная цитометрия	380			
20.2.	Вес клеток	381	Глава 21	ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ	403
20.3.	Содержание ДНК	382	21.1.	Жизнеспособность, токсичность и выживаемость	403
	Протокол 20.3. <i>Оценка содержания ДНК с использованием красителя Hoechst 33258</i>	382	21.2.	Ограничения in vitro	404
20.4.	Белок.	382	21.2.1.	Фармакокинетика.	404
20.4.1.	Солубилизация образца	382	21.2.2.	Метаболизм.	404
20.4.2.	Метод исследования белка по Брэдфорду. .	382	21.2.3.	Тканевой и системный ответы	404
	Протокол 20.4. <i>Оценка содержания белка методом Брэдфорда.</i>	382	21.3.	Характер исследований	404
20.5.	Скорость синтеза	384	21.3.1.	Жизнеспособность.	405
20.5.1.	Синтез ДНК	384		Протокол 21.1. <i>Оценка жизнеспособности методом отторжения красителя</i>	405
	Протокол 20.5. <i>Оценка уровня синтеза ДНК методом включения [³H]-тимидиновой метки.</i>	384		Протокол 21.2. <i>Оценка жизнеспособности методом поглощения красителя</i>	405
20.5.2.	Синтез белка.	385	21.3.2.	Выживаемость	406
	Протокол 20.6. <i>Синтез белка.</i>	385		Протокол 21.3. <i>Клоногенный анализ прикрепленных клеток.</i>	406
20.6.	Приготовление образцов для ферментного и иммуферментного анализа . .	386	21.3.3.	Анализ, основанный на клеточной пролиферации.	410
20.7.	Цитометрия	386	21.3.4.	Метаболический анализ цитотоксичности	410
20.7.1.	Мечение <i>in situ</i>	386	21.3.5.	Микротитрационный анализ.	410
20.7.2.	Проточная цитометрия	386		Протокол 21.4. <i>Оценка цитотоксичности при помощи МТТ-теста</i>	411
20.8.	Репликация образцов	386	21.3.6.	Сравнительная оценка микротитрационного и клоногенного анализа выживания. . . .	414
20.8.1.	Сбор данных.	387	21.3.7.	Взаимодействие лекарственных препаратов	415
20.8.2.	Анализ данных	387	21.4.	Применение исследования цитотоксичности	415
20.9.	Клеточная пролиферация.	387	22.4.1.	Скрининг противораковых препаратов . .	415
20.9.1.	Разработка эксперимента	387	21.4.2.	Прогностические исследования противоопухолевых препаратов.	415
20.9.2.	Цикл роста	389	21.4.3.	Фармацевтическое тестирование	416
	Протокол 20.7. <i>Кривая роста монослоя во флаконах.</i>	391	21.5.	Генотоксичность.	416
	Протокол 20.8. <i>Кривая роста монослоя в многоруночном планшете.</i>	391			
20.9.3.	Анализ кривых роста монослоя	392			

21.5.1.	Анализ мутагенеза методом обмена сестринских хроматид.	416	Протокол 22.15. <i>Культура отдельного мышечного волокна скелетной мышцы</i>	450	
	Протокол 21.5. <i>Обмен сестринских хроматид</i>	416	22.3.4. Хрящи	451	
21.5.2.	Канцерогенность	418	Протокол 22.16. <i>Хондроциты на альгинатных бусинах</i>	451	
21.6.	Воспаление	419	22.3.5. Кости	453	
Глава 22	КУЛЬТУРЫ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ КЛЕТОК	420	Протокол 22.17. <i>Остеобласты</i>	454	
22.1.	Клеточные культуры специализированных клеток	420	22.3.6. Эндотелий	455	
22.2.	Эпителиальные клетки	422	Протокол 22.18. <i>Выделение и культивирование клеток сосудистого эндотелия</i>	455	
22.2.1.	Эпидермис	423	22.4. Нейроэктодермальные клетки	459	
	Протокол 22.1. <i>Эпидермальные кератиноциты</i>	424	22.4.1. Нейроны	459	
22.2.2.	Роговица	427	Протокол 22.19. <i>Выделение и культивирование тучных клеток мозжечка</i>	459	
	Протокол 22.2. <i>Эпителиальные клетки роговицы</i>	427	22.4.2. Глиальные клетки	460	
22.2.3.	Молочная железа	429	Протокол 22.20. <i>Первичная культура астроцитов человека</i>	461	
	Протокол 22.3. <i>Получение эпителиальных клеток молочной железы из тканей, отобранных при маммопластике</i>	429	Протокол 22.21. <i>Обонятельные клетки</i>	463	
22.2.4.	Шейка матки	431	22.4.3. Эндокринные клетки	465	
	Протокол 22.4. <i>Цервикальный эпителий</i>	431	22.4.4. Меланоциты	465	
22.2.5.	Желудочно-кишечный тракт	433	Протокол 22.22. <i>Культура меланоцитов</i>	466	
	Протокол 22.5. <i>Выделение и культивирование клеток крипт толстого кишечника</i>	433	22.5. Гематopoэтические клетки	467	
22.2.6.	Печень	434	22.6. Гонады	469	
22.2.7.	Первичная культура гепатоцитов	434	22.6.1. Яичники	469	
	Протокол 22.6 А. <i>Выделение гепатоцитов крысы</i>	435	22.6.2. Тестикулы	469	
22.2.8.	Гепатоциты человека НераRG	436	Глава 23	СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, ГАМЕТЫ И АМНИОЦИТЫ	470
	Протокол 22.6 Б. <i>Очистка гепатоцитов человека НераRG</i>	437	23.1. Стволовые клетки	470	
22.2.9.	Поджелудочная железа	438	23.1.1. Эмбриональные стволовые клетки	470	
	Протокол 22.7. <i>Эпителий поджелудочной железы</i>	438	23.1.2. Происхождение эмбриональных стволовых клеток мыши	470	
22.2.10.	Почка	439	Протокол 23.1. <i>Получение и первичное культивирование эмбриональных стволовых клеток мыши</i>	471	
	Протокол 22.8. <i>Эпителий почки</i>	440	23.1.3. Субкультура и размножение эмбриональных стволовых клеток мыши	474	
22.2.11.	Бронхиальный и трахеальный эпителий	441	Протокол 23.2. <i>Размножение эмбриональных стволовых клеточных линий мыши</i>	474	
	Протокол 22.9. <i>Бронхиальный и трахеальный эпителий</i>	441	23.1.4. Первичная культура эмбриональных стволовых клеток человека	476	
22.2.12.	Эпителий ротовой полости	442	Протокол 23.3. <i>Получение эмбриональных стволовых клеток человека</i>	476	
	Протокол 22.10. <i>Кератиноциты ротовой полости</i>	442	23.1.5. Пересадка hES-клеток	477	
22.2.13.	Простата	443	Протокол 23.4. <i>Пересадка hES-клеток</i>	477	
	Протокол 22.11. <i>Эпителий простаты</i>	444	23.1.6. Плюрипотентные стволовые клетки из эмбрионов рыбы	478	
22.3.	Мезенхимальные клетки	445	Протокол 23.5. <i>Культуры клеток эмбриона данио-рерио</i>	479	
22.3.1.	Соединительная ткань	445	23.2. Половые клетки	481	
22.3.2.	Жировая ткань	445	23.3. Экстраэмбриональные клетки	481	
	Протокол 22.12. <i>Первичная культура адипоцитов</i>	446	23.3.1. Культура амниоцитов	481	
22.3.3.	Мышцы	447	Протокол 23.6. <i>Культура амниоцитов</i>	482	
	Протокол 22.13. <i>Выделение и культивирование гладкомышечных клеток</i>	447	23.3.2. Неонатальные и ювенильные клетки	485	
	Протокол 22.14. <i>Культура миобластов взрослой скелетной мышцы</i>	448	23.3.3. Мультипотентные стволовые клетки взрослых	485	
			23.3.4. MSC из костного мозга человека	486	

23.3.5.	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки.	488	24.8.5.	Поджелудочная железа	512
	Протокол 23.8. <i>Перепрограммирование человеческих дермальных фибробластов для генерации плюрипотентных стволовых клеток</i>	489	24.8.6.	Яичники	512
23.3.6.	Долгоживущие культуры костного мозга мыши	491	24.8.7.	Простата	513
	Протокол 23.9. <i>Долгоживущие гематopoэтические клеточные культуры из костного мозга мыши</i>	491	24.8.8.	Мочевой пузырь	513
23.3.7.	Долгоживущие культуры человеческих примитивных гематopoэтических клеток	493	24.8.9.	Кожа	513
	Протокол 23.10. <i>Исследование иницирующих долгоживущую культуру человеческих клеток (LTC-IC)</i>	493	24.8.10.	Шейка матки	513
23.3.8.	Исследование гематopoэтических колониеобразующих клеток	496	24.8.11.	Глиома	514
	Протокол 23.11. <i>Исследование гематopoэтических колониеобразующих клеток</i>	496	24.8.12.	Нейробластома	514
Глава 24	КУЛЬТУРА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	499	24.8.13.	Сперматоцитомы	514
24.1.	Проблемы культивирования опухолевых клеток	499	24.8.14.	Лимфома и лейкемия	514
24.2.	Получение образцов	500		Протокол 24.5. <i>Определение постоянных клеточных линий лейкемии и лимфомы</i>	515
24.2.1.	Селекция репрезентативных клеток	500	Глава 25	ТРЕХМЕРНАЯ КУЛЬТУРА	516
24.2.2.	Сохранение тканей замораживанием	500	25.1.	Межклеточное взаимодействие и фенотипическая экспрессия	516
	Протокол 24.1. <i>Замораживание образцов биопсии</i>	500	25.1.1.	Роль плотности клеточной суспензии	516
24.3.	Дезагрегация	501	25.1.2.	Реципрокные взаимодействия	516
24.4.	Первичная культура	501	25.1.3.	Выбор моделей	517
24.5.	Селективная культура опухолевых клеток	502	25.2.	Органная культура	517
24.5.1.	Селективные среды	502	25.2.1.	Обмен питательных веществ и газов	517
24.5.2.	Конфлюэнтные фидерные слои	502	25.2.2.	Структурная целостность	519
	Протокол 24.2. <i>Рост на конфлюэнтных фидерных слоях</i>	503	25.2.3.	Рост и дифференцировка	519
24.5.3.	Суспензионное клонирование	505	25.2.4.	Ограничения метода органной культуры	519
24.5.4.	Ксенотрансплантаты	505	25.2.5.	Типы органных культур	520
24.6.	Размножение клеточных линий	505		Протокол 25.1. <i>Органная культура</i>	520
24.6.1.	Субкультивирование первичной опухолевой культуры	505	25.3.	Гистотипическая культура	521
24.6.2.	Постоянные клеточные линии	506	25.3.1.	Метод геля и губки	521
24.7.	Характеристика культур опухолевых клеток	506	25.3.2.	Полые волокна	522
24.7.1.	Гетерогенность опухолевых культур	506	25.3.3.	Сфероиды	522
24.7.2.	Гистотипическая культура	507		Протокол 25.2. <i>3D-культуры в сфероидах</i>	523
24.8.	Специфические опухолевые культуры	507	25.3.4.	Система вращающихся камер	525
24.8.1.	Молочная железа	507	25.3.5.	Иммобилизация живых клеток в альгинате	525
	Протокол 24.3. <i>Культивирование клеток опухоли молочной железы</i>	508	25.3.6.	Фильтрационные вкладыши для лунок	526
24.8.2.	Легкое	509		Протокол 25.3. <i>Фильтрационные вкладыши для лунок</i>	526
24.8.3.	Желудок	509	25.3.7.	Культуры нейрональных агрегатов	528
24.8.4.	Толстый кишечник	509		Протокол 25.4. <i>Нейрональные агрегаты</i>	528
	Протокол 24.4. <i>Культура колоректальных опухолей</i>	510	25.4.	Органотипическая культура	529
			25.4.1.	Тканевые эквиваленты	529
			25.4.2.	Тканевая инженерия	529
			25.5.	Создание трехмерных изображений клеток (3D-реконструкций)	531
			Глава 26	УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВА КЛЕТОК И АВТОМАТИЗАЦИЯ	532
			26.1.	Увеличение производства суспензионных культур	532
				Протокол 26.1. <i>Перемешивание 4-литровой партии суспензионной культуры</i>	533
			26.1.1.	Постоянная культура	535
			26.1.2.	Масштаб и сложности	536
			26.1.3.	Перемешивание и аэрация	536
			26.2.	Крупномасштабное производство монослойных культур	539
			26.2.1.	Мультиповерхностные культиваторы	539

Протокол 26.2. Система Nunc Cell Factory	539	Упражнение 4. Приготовление и стерилизация фосфатного буферного раствора Дульбекко (D-PBS) без Ca^{2+} и Mg^{2+} (D-PBSA)	573
26.2.2. Роллерные культуры	542	Упражнение 5. Приготовление стандартных pH-растворов	574
Протокол 26.3. Культура в роллерных бутылках	542	Упражнение 6. Приготовление основной питательной среды из порошка и стерилизация методом фильтрования	575
26.2.3. Микроносители	544	28.3. Основные методы работы с культурой клеток	577
Протокол 26.4. Микроносители	544	Упражнение 7. Наблюдение за культурой клеток	577
26.2.4. Крупные микроносители	546	Упражнение 8. Приготовление стерильной питательной среды	579
26.2.5. Перфузионные монослойные культуры	546	Упражнение 9. Смена среды в монослойной культуре	580
26.3. Управление процессом	547	Упражнение 10. Приготовление полной среды из концентрата 10×	582
26.4. Автоматизация	549	Упражнение 11. Подсчет клеток с помощью гемоцитометра и электронного счетчика	584
26.4.1. Роботизированная система культуры клеток	550	Упражнение 12. Субкультивирование клеток, растущих в суспензии	587
26.4.2. Высокопроизводительный скрининг	550	Упражнение 13. Субкультивирование клеточных линий, растущих в монослое	589
Глава 27 СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ	551	Упражнение 14. Окрашивание монослойной клеточной культуры по Гимзе	591
27.1. Методы подготовки и исследования лимфоцитов	551	Упражнение 15. Построение и анализ кривой роста	592
27.1.1. Выделение по плотности	551	28.4. Упражнения повышенной сложности	595
Протокол 27.1. Подготовка препарата лимфоцитов	551	Упражнение 16. Характеристика клеточных линий	595
27.1.2. Бласттрансформация	552	Упражнение 17. Обнаружение микоплазм	596
Протокол 27.2. РНА-стимуляция лимфоцитов	552	Упражнение 18. Криоконсервация культивируемых клеток	597
27.2. Авторадиография	552	Упражнение 19. Первичная культура	600
Протокол 27.3. Микроавторадиография	554	Упражнение 20. Клонирование клеток, растущих в монослое	604
27.3. Съемка в режиме замедленного времени	557	28.5. Специализированные упражнения	606
Протокол 27.4. Видеосъемка в режиме замедленного времени	557	Глава 29 РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ	607
27.4. Синхронизация клеток	559	29.1. Аномальный внешний вид клеток	607
27.4.1. Разделение клеток	559	29.2. Медленный рост клеток	608
27.4.2. Блокирование пролиферации	559	29.2.1. Проблемы, ограниченные вашими собственными культурами	608
27.5. Культуры клеток пойкилотермных животных	559	29.2.2. Более общие проблемы. Проблемы, с которыми столкнулись другие исследователи	608
27.5.1. Клетки рыб	560	29.3. Среда	610
27.5.2. Клетки насекомых	560	29.3.1. Состав, приготовление и хранение	610
Протокол 27.5. Культивирование клеток насекомых	560	29.3.2. Нестабильные реагенты	612
27.6. СЛИЯНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК	561	29.3.3. Чистота компонентов среды	612
27.6.1. Клеточная гибридизация	561	29.4. Субстраты и контейнеры	613
Протокол 27.6. Клеточная гибридизация	561	29.5. Микробиологическая контаминация	614
27.6.2. Ядерный перенос	563	29.5.1. Контаминация, ограниченная одним исследователем	614
27.7. Продукция моноклональных антител	563	29.5.2. Широко распространенная контаминация	616
Протокол 27.7. Продукция моноклональных антител	564		
Глава 28 ТРЕНИРОВОЧНЫЕ ПРОГРАММЫ	567		
28.1. Цели и задачи главы	567		
28.2. Навыки препаративных работ и обращения с оборудованием	567		
Упражнение 1. Стерильное пипетирование и перенос жидкостей	569		
Упражнение 2. Мытье и стерилизация стеклянной посуды	571		
Упражнение 3. Приготовление и стерилизация воды	572		

29.5.3.	Системы подачи воздуха и ламинарные боксы	618	29.13.2.	Измененный внешний вид после криоконсервации	629
29.5.4.	Специфическая контаминация	618	29.13.3.	Потеря ростовой культуры	629
29.6.	Химическое загрязнение.	619	29.14.	Подсчет клеток	630
29.6.1.	Стекло	619	29.14.1.	Гемоцитометр	630
29.6.2.	Пипетки.	619	29.14.2.	Электронный счетчик с измерением сопротивления в капилляре.	630
29.6.3.	Система очистки воды.	620	Глава 30	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	631
29.6.4.	Криоконсерванты.	620	Приложение I	РАСЧЕТЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ	632
29.6.5.	Порошки и аэрозоли	620	Приложение II	ИСТОЧНИКИ ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ	640
29.7.	Первичная культура	620	Приложение III	КОМПАНИИ-ПОСТАВЩИКИ И ДРУГИЕ РЕСУРСЫ.	664
29.7.1.	Недостаточное количество взятых клеток в первичной культуре.	620	Приложение IV	СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ [по Schaeffer, 1990]	677
29.7.2.	Неправильная селекция клеток.	622	Приложение V	КОНТАМИНИРОВАННЫЕ ИЛИ НЕПРАВИЛЬНО ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ	684
29.7.3.	Контаминация.	622	Приложение VI	ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА	707
29.8.	Дифференцировка	622	Список литературы	709	
29.9.	Питание культуры	623	Предметный указатель	758	
29.9.1.	Простые монослойные культуры	623			
29.9.2.	Клонирование клеток.	623			
29.10.	Субкультура	624			
29.10.1.	Недостаточное количество взятых клеток или медленный рост	624			
29.10.2.	Неравномерное развитие культуры	624			
29.11.	Клонирование	625			
29.11.1.	Слишком мало колоний в чашке.	625			
29.11.2.	Слишком много колоний в чашке.	626			
29.11.3.	Неравномерное распределение.	627			
29.12.	Перекрестная контаминация и неверная идентификация.	627			
29.13.	Криоконсервация.	628			
29.13.1.	Плохое восстановление.	628			