

УДК 57.08
ББК 28.03
Ф87

Фрешни Р. Я.

Ф87 Культура животных, клеток : практическое руководство /
Р. Я. Фрешни ; пер. 5-го англ. изд. - М. : БИНОМ. Лаборатория
знаний, 2017. — 691 с.: ил., f241 с. цв. вкл.

ISBN 978-5-94774-596-2

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 практическое руководство в лаборатории.

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

УДК 57.08
ББК 28.03

Оглавление

Список рисунков.....	15	Упражнение.....	43
Список цветных вкладок.....	18	Упражнение 9. Приготовление основной питательной среды из порошка и стерилизация методом фильтрования.....	44
Предисловие.....	19	Упражнение.....	44
Список сокращений.....	21	Упражнение 10. Приготовление полной среды из концентрата 10х.....	44
ГЛАВА 1. ВВЕДЕНИЕ.....	25	Упражнение.....	45
1.1. История вопроса.....	25	Упражнение 11. Приготовление полной среды из порошка.....	45
1.2. Преимущества метода культуры ткани... 1.2.1. Контроль окружения.....	30	Упражнение 12. Подсчет клеток в гемоцитометре и электронном счетчике.....	45
1.2.2. Характеристика и однородность образца.....	31	Упражнение.....	46
1.2.3. Экономичность, эффективность и автоматизация процесса.....	31	Упражнение 13. Рост субкультуры клеток в суспензии.....	46
1.2.4. Моделирование <i>in vitro</i> условий <i>in vim</i>	31	Упражнение.....	47
1.3. Ограничения метода культуры ткани.....	31	Упражнение 14. Рост субкультуры постоянной клеточной линии в монослое.....	47
1.3.1. Наличие специальных навыков.....	31	Упражнение.....	48
1.3.2. Затраты.....	32	Упражнение 15. Окрашивание монослойной клеточной культуры по Гимза.....	49
1.3.3. Дифференцировка и селекция.....	32	Упражнение.....	50
1.3.4. Происхождение клеток.....	32	Упражнение 16. Построение и анализ кривой роста.....	50
1.3.5. Нестабильность.....	32	Упражнение.....	50
1.4. Основные отличия культуры <i>in vitro</i>	32	2.3. Упражнения повышенной сложности.....	51
1.5. Типы культуры ткани.....	33	Упражнение 17. Криоконсервация культивируемых клеток.....	51
ГЛАВА 2. ТРЕНИРОВОЧНЫЕ ПРОГРАММЫ.....	36	Упражнение.....	52
2.1. Цели и задачи главы.....	36	Упражнение 18. Обнаружение микоплазм.....	52
2.2. Упражнения для начинающих (основной курс).....	36	Упражнение.....	54
Упражнение 1. Асептический метод I: Пипетирование и перенос жидкостей.....	38	Упражнение 19. Характеристика клеточных линий.....	54
Упражнение.....	38	Упражнение.....	55
Упражнение 2. Введение в технику ведения культуры ткани.....	39	Упражнение 20. Первичная культура.....	55
Упражнение.....	39	Упражнение.....	56
Упражнение 3. Асептический метод II: Приготовление питательной среды.....	40	Упражнение 21. Клонирование в монослое.....	56
Упражнение.....	41	Упражнение.....	57
Упражнение 4. Смена среды в монослойной культуре.....	41	2.4. Специализированные упражнения.....	57
Упражнение.....	41	ГЛАВА 3. БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК.....	58
Упражнение 5. Мыты и стерилизация стеклянной посуды.....	42	3.1. Влияние окружающей среды на культуру клеток.....	58
Упражнение.....	42	3.2. Клеточная адгезия.....	58
Упражнение 6. Подготовка и стерилизация воды.....	42	3.2.1. Молекулы клеточной адгезии.....	58
Упражнение.....	42	3.2.2. Межклеточные контакты.....	59
Упражнение 7. Подготовка и стерилизация фосфатно-буферного раствора для среды Дюльбекко (D-PBS) без Ca^{2+} и Mg^{2+}	43	3.2.3. Внеклеточный матрикс.....	60
Упражнение.....	43	3.2.4. Цитоскелет.....	61
Упражнение 8. Приготовление стандартных растворов для контроля pH.....	43	3.2.5. Клеточная подвижность.....	61
		3.3. Клеточная пролиферация.....	62
		3.3.1. Клеточный цикл.....	62
		3.3.2. Контроль клеточной пролиферации ...	62
		3.4. Дифференцировка.....	63

3.4.1. Поддержание и индукция дифференцировки.....	63	5.4.10. Осмометр.....	100
3.4.2. Дедифференцировка.....	64	5.4.11. Моечная машина для стеклянной посуды.....	100
3.5. Передача клеточных сигналов.....	66	5.5. Хранение.....	101
3.6. Энергетический метаболизм.....	67	5.5.1. Холодильники и морозильники.....	101
3.7. Получение первичной культуры.....	67	5.5.2. Контейнеры для криоконсервации	102
3.8. Эволюция клеточных линий.....	68	5.5.3. Морозильники с управляемым процессом замораживания.....	102
3.8.1. Старение.....	68	5.6. Лабораторные приборы.....	102
3.9. Возникновение постоянных клеточных линий.....	68	5.6.1. Компьютеры и сети.....	102
3.10. Происхождение культивируемых клеток...70		5.6.2. Прямой микроскоп.....	102
ГЛАВА 4. СТРУКТУРА И ПЛАНИРОВАНИЕ		5.6.3. Низкотемпературный морозильник ...	102
ЛАБОРАТОРНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ	72	5.6.4. Конфокальный микроскоп.....	103
4.1. Планирование.....	72	5.6.5. Термоциклер.....	103
4.2. Обслуживающие системы и вспомогательные службы.....	76	5.7. Специальное оборудование.....	103
4.3. Планирование асептических комнат или блоков.....	76	5.7.1. Установка для микроинъекций.....	103
4.3.1. Помещение для стерильных манипуляций.....	77	5.7.2. Счетчик колоний.....	103
4.3.2. Ламинарное оборудование.....	77	5.7.3. Центрифужный элютриатор.....	104
4.3.3. Карантин и изоляция.....	78	5.7.4. Проточный цитометр.....	104
4.3.4. Помещения для сервисных служб..	78	5.8. Расходные материалы.....	104
4.4. Инкубация.....	78	5.8.1. Пипетки.....	104
4.4.1. Инкубаторы.....	78	5.8.2. Гемоцитометр.....	104
4.4.2. Термальная комната.....	78	5.8.3. Культуральные сосуды.....	105
4.5. Помещения для подготовительных работ...81		5.8.4. Стерильные контейнеры.....	105
4.5.1. Приготовление сред.....	81	5.8.5. Шприцы и иглы.....	105
4.5.2. Помещение для мытья посуды.....	81	5.8.6. Стерилизационные фильтры.....	105
4.5.3. Хранение.....	82	5.8.7. Бумажные полотенца и салфетки... 105	
		5.8.8. Дезинфектанты.....	105
ГЛАВА 5. ОБОРУДОВАНИЕ.....	85	ГЛАВА 6. МЕТОДЫ АСЕПТИКИ.....	106
5.1. Потребности лаборатории культур тканей ..85		6.1. Цели асептики.....	106
5.2. Асептическая зона.....	85	6.1.1. Поддержание стерильности.....	106
5.2.1. Ламинарные шкафы.....	85	6.2. Объекты асептического окружения.....	106
5.2.2. Цилиндры для пипеток.....	87	6.2.1. Стерильная зона.....	106
5.2.3. Аспирационный насос.....	87	6.2.2. Рабочая поверхность.....	107
5.2.4. Сервисные тележки.....	88	6.2.3. Личная гигиена.....	108
5.2.5. Инвертированный микроскоп.....	88	6.2.4. Реагенты и среды.....	109
5.2.6. Центрифуга.....	89	6.2.5. Культуры.....	109
5.2.7. Манипуляции с жидкостями в стерильных условиях — пипетирование и дозирование.....	89	6.3. Стерилизующие манипуляции.....	109
5.2.8. Счетчик клеток.....	92	6.3.1. Протирание поверхностей.....	109
5.2.9. CCD-камера и монитор.....	93	6.3.2. Закрывание емкостей.....	110
5.2.10. Препаровальная лупа.....	93	6.3.3. Работа с горелкой.....	110
5.3. Инкубация.....	94	6.3.4. Манипуляции с бутылками и колбами.....	110
5.3.1. Инкубатор.....	94	6.3.5. Пипетирование.....	110
5.3.2. Влажный CO ₂ -инкубатор.....	94	6.3.6. Переливание.....	112
5.3.3. Регистратор температуры.....	95	6.4. Ламинарный поток.....	112
5.3.4. Роллерные штативы.....	96	6.5. Стандартная процедура.....	113
5.3.5. Магнитная мешалка.....	96	6.5.1. Чашки Петри и многолуночные планшеты.....	113
5.4. Подготовительные работы и стерилизация.....	96	6.6. Приборы и оборудование.....	114
5.4.1. Мытье посуды.....	96	6.6.1. Инкубаторы.....	114
5.4.2. Очиститель воды.....	96	<i>Протокол 6.1. Асептические методы работы в вертикальном ламинарном потоке.....</i>	<i>115</i>
5.4.3. Стерилизация и сушильные шкафы ...97		<i>Протокол 6.2. Работа на открытой поверхности... 116</i>	
5.4.4. Паровой стерилизатор (автоклав)... 98		<i>Протокол 6.3. Манипуляции с чашками и планшетами.....</i>	<i>118</i>
5.4.5. Весы.....	98	6.6.2. Коробки для влажного инкубатора 119	
5.4.6. pH-Метр.....	99	6.6.3. Культивирование в атмосфере CO ₂ ... 119	
5.4.7. Магнитная мешалка с подогревом.. 99		ГЛАВА 7. БЕЗОПАСНОСТЬ, БИОЭТИКА И ВАЛИДАЦИЯ.....	120
5.4.8. Автоматический диспенсер.....	100	7.1. Лабораторная безопасность.....	120
5.4.9. Измеритель электропроводности (кондуктометр).....	100	7.2. Оценка риска.....	120

7.3. Стандартные операционные процедуры.....	120	Протокол 9.1. Приготовление стандартов pH.....	150
7.4. Контроль безопасности.....	120	9.2.2. CO ₂ и бикарбонат натрия.....	150
7.5. Общая безопасность.....	122	9.2.3. Буферизация.....	151
7.5.1. Оператор.....	122	9.2.4. Кислород.....	152
7.5.2. Оборудование.....	122	9.2.5. Осмотическое давление.....	152
7.5.3. Стекланные и острые предметы.....	123	9.2.6. Температура.....	153
7.5.4. Химическая токсичность.....	124	9.2.7. Вязкость.....	154
7.5.5. Газы.....	125	9.2.8. Поверхностное натяжение и пенообразование.....	154
7.5.6. Жидкий азот.....	126	9.3. Сбалансированные солевые растворы.....	154
7.5.7. Ожоги.....	126	9.4. Полные питательные среды.....	154
7.6. Пожар.....	126	9.4.1. Аминокислоты.....	155
7.7. Ионизирующее излучение.....	126	9.4.2. Витамины.....	155
7.7.1. Попадание в организм.....	127	9.4.3. Соли.....	155
7.7.2. Утилизация радиоактивных отходов ..	127	9.4.4. Глюкоза.....	155
7.7.3. Излучение от меченых реагентов.....	127	9.4.5. Органические добавки.....	158
7.7.4. Излучение от высокоэнергетичных источников.....	127	9.4.6. Гормоны и факторы роста.....	158
7.8. Биологическая опасность.....	129	9.4.7. Антибиотики.....	158
7.8.1. Уровни биологической защиты.....	129	9.5. Сыворотка.....	159
7.8.2. Ламинарные шкафы микробиологической защиты.....	129	9.5.1. Белки.....	159
7.8.3. Человеческий биопсийный материал..	131	9.5.2. Факторы роста.....	160
7.8.4. Манипуляции с генетическим материалом.....	135	9.5.4. Питательные вещества и метаболиты..	160
7.8.5. Уничтожение биологически опасных отходов.....	136	9.5.5. Липиды.....	160
7.8.6. Дезинфекция окуриванием.....	136	9.5.6. Неорганические элементы.....	160
7.9. Биоэтика.....	136	9.5.7. Ингибиторы.....	160
7.9.1. Ткани животных.....	136	9.6. Выбор среды и сыворотки.....	160
7.9.2. Ткани человека.....	136	9.6.1. Резервирование партии сыворотки	161
7.10. Валидация.....	137	9.6.2. Тестирование сыворотки.....	162
7.10.1. Подтверждение аутентичности.....	138	9.6.3. Тепловая инактивация.....	163
7.10.2. Происхождение.....	138	9.7. Другие добавки.....	163
7.10.3. Контаминация.....	138	9.7.1. Гидролизат аминокислот.....	163
		9.7.2. Эмбриональный экстракт.....	163
		9.7.3. Кондиционированная среда.....	163
ГЛАВА 8. ПОСУДА И СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК.....	139	ГЛАВА 10. БЕССЫВОРОТОЧНЫЕ СРЕДЫ	164
8.1. Субстрат.....	139	10.1. Недостатки сыворотки.....	164
8.1.1. Прикрепление и рост клеток.....	139	10.2. Преимущества бессывороточных сред.....	168
8.1.2. Материалы.....	139	10.2.1. Селективные среды.....	168
8.2. Выбор сосудов для культивирования клеток.....	139	10.2.2. Регуляция пролиферации и дифференцировки.....	168
8.2.1. Клеточный выход в культуральном сосуде.....	140	10.3. Недостатки бессывороточных сред.....	168
8.2.2. Суспензионная культура.....	142	10.4. Замена сыворотки.....	170
8.2.3. Вентилирование.....	143	10.4.1. Компоненты для бессывороточного культивирования.....	170
8.2.4. Отбор и анализ проб.....	143	10.4.2. Гормоны.....	170
8.2.5. Неравномерный рост.....	144	10.4.3. Факторы роста.....	171
8.2.6. Стоимость.....	144	10.4.4. Питательные вещества сыворотки ...	171
8.3. Специализированные системы.....	145	10.4.5. Белки и полиамины.....	171
8.3.1. Проницаемые подложки.....	145	10.4.6. Матрикс.....	171
8.4. Обработка поверхности.....	145	10.5. Выбор бессывороточной среды.....	171
8.4.1. Покрытие матриксом.....	145	10.5.1. Имеющиеся в продаже бессывороточные среды.....	176
Протокол 8.1. Приготовление ВКМ.....	146	10.5.2. Заменители сыворотки.....	176
8.4.2. Фидерные слои.....	146	10.5.3. Адаптация клеток к бессывороточной среде.....	176
8.4.3. Трехмерные матриксы.....	147	10.6. Разработка бессывороточной среды.....	178
8.4.4. Металлические субстраты.....	148	10.7. Приготовление бессывороточной среды.....	179
8.4.5. Неадгезивные субстраты.....	148	10.8. Среда, не содержащие белков.....	179
ГЛАВА 9. СРЕДЫ ОПРЕДЕЛЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ДОБАВКИ К СРЕДАМ.....	149	10.9. Заключение.....	179
9.1. Составление сред.....	149	ГЛАВА 11. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ	180
9.2. Физико-химические свойства.....	149	11.1. Приготовление реактивов и материалов.....	180
9.2.1. pH.....	149		

11.2. Стерилизация оборудования и жидкостей.....	180	12.2.2. Куриный эмбрион.....	215
11.3. Оборудование.....	180	Протокол 12.2. Извлечение куриных эмбрионов.....	216
11.3.1. Стеклянная посуда.....	180	12.2.3. Биопсийный материал человека..	216
Протокол 11.1. Подготовка и стерилизация изделий из стекла.....	182	12.3. Первичная культура.....	217
11.3.2. Стеклянные пипетки.....	183	Протокол 12.3. Биопсийный материал человека.....	218
11.3.3. Завинчивающиеся крышки.....	183	12.3.1. Первичный эксплантат.....	218
11.3.4. Выбор детергента.....	184	12.3.2. Ферментативная дезагрегация.....	219
11.3.5. Прочее оборудование.....	186	Протокол 12.4. Первичные эксплантаты.....	220
Протокол 11.2. Подготовка и стерилизация стеклянных пипеток.....	187	12.3.3. Теплый трипсин.....	221
Протокол 11.3. Подготовка и стерилизация завинчивающихся крышек.....	188	12.3.4. Трипсинизация с преинкубацией на холоду.....	221
11.3.6. Стерилизационные фильтры многократного использования.....	190	Протокол 12.5. Дезагрегация ткани теплым трипсином.....	222
Протокол 11.4. Стерилизация комплекта фильтров.....	190	12.3.5. Рудиментарные органы куриного эмбриона.....	224
11.4. Реагенты и среды.....	191	12.3.6. Дезагрегация с использованием других ферментов.....	224
11.4.1. Вода.....	191	Протокол 12.6. Дезагрегация ткани холодным трипсином.....	225
Протокол 11.5. Приготовление и стерилизация сверхчистой воды (UPW).....	192	Протокол 12.7. Рудиментарные органы куриного эмбриона.....	226
11.4.2. Сбалансированный солевой раствор (BSS).....	193	12.3.7. Коллагеназа.....	226
Протокол 11.6. Приготовление и стерилизация D-PBSA.....	193	12.3.8. Механическая дезагрегация.....	227
11.4.3. Приготовление и стерилизация среды.....	194	Протокол 12.8. Дезагрегация ткани с помощью коллагеназы.....	230
Протокол 11.7. Приготовление среды из концентрата с кратностью 1 х.....	194	12.3.9. Разделение жизнеспособных и нежизнеспособных клеток.....	230
Протокол 11.8. Приготовление среды из концентрата с кратностью 10 х.....	196	12.3.10. Первичная культура, краткие выводы.....	231
11.4.4. Порошкообразные среды.....	197	12.3.11. Первичная документация.....	231
11.4.5. Специализированная среда.....	198	Протокол 12.9. Механическая дезагрегация путем просеивания.....	233
Протокол 11.9. Приготовление среды из порошка ...	198	Протокол 12.10. Обогащение жизнеспособных клеток.....	234
11.5. Стерилизация среды.....	199		
11.5.1. Автоклавируемые среды.....	199		
11.5.2. Стерилизация методом фильтрации ..	199		
Протокол 11.10. Приготовление специализированной среды.....	199		
Протокол 11.11. Стерилизация с использованием фильтрующих насадок на шприцы.....	200		
Протокол 11.12. Стерилизация с использованием фильтрующей вакуумной насадки на колбу.....	202		
Протокол 11.13. Стерилизация с использованием малого встроенного фильтра.....	202		
11.5.3. Сыворотка.....	203		
Протокол 11.14. Стерилизация с использованием большого встроенного фильтра.....	205		
Протокол 11.15. Сбор и стерилизация сывороток...	206		
Протокол 11.16. Диализ сыворотки.....	207		
11.5.4. Приготовление и стерилизация других реагентов.....	208		
11.6. Контроль, проверка качества и хранение сред.....	208		
11.6.1. Контроль качества.....	208		
11.6.2. Проверка стерильности.....	209		
11.6.3. Проверка культуральных свойств ...	209		
11.6.4. Хранение.....	210		
ГЛАВА 12. ПЕРВИЧНАЯ КУЛЬТУРА.....	211		
12.1. Типы первичных культур клеток.....	211		
12.2. Выделение образцов ткани.....	211		
Протокол 12.1. Выделение мышинного эмбриона.....	212		
12.2.1. Мышиный эмбрион.....	212		
		ГЛАВА 13. СУБКУЛЬТУРА И КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ.....	235
		13.1. Субкультивирование.....	235
		13.2. Терминология.....	235
		13.3. Возраст культуры.....	235
		13.4. Маркировка клеточной культуры.....	240
		13.5. Выбор клеточной линии.....	240
		13.6. Обычный порядок поддержания культуры.....	241
		13.6.1. Необходимость исследования клеточной морфологии.....	241
		13.6.2. Замена среды.....	242
		13.7. Субкультура.....	243
		Протокол 13.1. Смена среды в монослойной культуре.....	243
		13.7.1. Критерии субкультивирования....	244
		Протокол 13.2. Субкультивирование монослойной культуры клеток.....	246
		13.7.2. Цикл роста и индекс разведения..	248
		13.7.3. Концентрация клеток в субкультуре..	249
		13.7.4. Культивирование в суспензии.....	250
		13.7.5. Субкультура клеток, растущих в суспензии.....	250
		Протокол 13.3. Субкультивирование суспензионной культуры клеток.....	251
		13.7.6. Стандартизация условий культивирования.....	252
		13.7.7. Использование антибиотиков.....	252
		13.7.8. Ведение документации.....	253

ГЛАВА 14. КЛОНИРОВАНИЕ И СЕЛЕКЦИЯ	255
14.1. Клонирование клеток.....	255
<i>Протокол 14.1. Клонирование с разведением</i>	256
14.2. Стимуляция эффективности посева.....	257
14.2.1. Условия, которые улучшают клональный рост.....	258
<i>Протокол 14.2. Приготовление кондиционированной среды</i>	260
<i>Протокол 14.3. Приготовление фидерных слоев</i>	260
14.2.2. Кондиционированные среды.....	260
14.2.3. Фидерные слои.....	261
14.3. Суспензионное влонирование.....	261
<i>Протокол 14.4. Клонирование в агаре</i>	262
<i>Протокол 14.5. Клонирование в метилцеллюлозе</i> . . .	264
14.4. Выделение клонов.....	265
<i>Протокол 14.6. Выделение клонов с использованием колец для клонирования</i>	266
<i>Протокол 14.7. Выделение клеточных колоний путем облучения</i>	266
14.4.1. Другие методы выделения монослойных клонов.....	267
<i>Протокол 14.8. Выделение суспензионных клонов</i>	268
14.4.2. Суспензионные клоны.....	268
14.5. Получение репликативных колоний.....	268
14.6. Селективные ингибиторы.....	268
<i>Протокол 14.9. Метотрексат-резистентность и DHFR-амплификация</i>	270
14.7. Выделение генетических вариантов.....	270
14.8. Взаимодействие с субстратом.....	272
14.8.1. Селективная адгезия.....	272
14.8.2. Селективное открепление.....	272
14.8.3. Природа субстрата.....	272
14.8.4. Селективные фидерные слои.....	273
14.8.5. Селекция на полужидкой среде....	273
ГЛАВА 15. РАЗДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК.....	274
15.1. Плотность клеток и изопикническая седиментация.....	274
<i>Варианты</i>	274
15.2. Размер клеток и скорость седиментации ...	275
15.2.1. Седиментация в поле силы тяжести.....	275
15.2.2. Элюатриационное центрифугирование.....	276
<i>Протокол 15.1. Разделение клеток центрифугированием в градиенте плотности</i> ...	276
15.3. Методы, основанные на применении антител.....	277
15.3.1. Иммунный пэннинг.....	278
15.3.2. Магнитный сортинг.....	278
<i>Протокол 15.2. Магнитно-активированный клеточный сортинг (MACS)</i>	279
15.4. Флюоресцентно-активируемый клеточный сортинг.....	281
15.5. Другие методы.....	283
15.6. Советы начинающему.....	283
ГЛАВА 16. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК.....	285
16.1. Необходимость характеристики.....	285
16.2. Ведение документации и происхождение клеток.....	285
16.3. Подтверждение аутентичности.....	285
16.3.1. Видовая идентификация.....	286
16.3.2. Маркеры дифференцировки или маркеры ткани.....	286
16.3.3. Уникальные маркеры.....	288
16.3.4. Трансформация.....	288
16.4. Морфология клеток.....	288
16.4.1. Микроскопия.....	289
<i>Протокол 16.1. Использование инвертированного микроскопа</i>	289
<i>Протокол 16.2. Окрашивание по Гимза</i>	290
16.4.2. Окрашивание.....	290
16.4.3. Культуральные сосуды для цитологии: монослойные культуры.....	291
<i>Протокол 16.3. Окрашивание кристалливиолетом</i> ...	291
<i>Протокол 16.4. Подготовка суспензионной культуры клеток для цитологических исследований методом цитоцентрифугирования</i>	292
16.4.4. Приготовление суспензионной культуры для цитологии.....	292
<i>Протокол 16.5. Фильтрация суспензии клеток для цитологического исследования</i>	298
16.4.5. Микрофотография.....	298
<i>Протокол 16.6. Цифровая фотография на микроскопе</i>	300
16.5. Хромосомный состав.....	300
<i>Протокол 16.7. Приготовление хромосомного препарата</i>	301
<i>Варианты</i>	302
16.5.1. Дифференциальное окрашивание хромосом.....	302
16.5.2. Хромосомный анализ.....	303
16.5.3. Окрашивание хромосом.....	304
16.6. Содержание ДНК.....	305
16.6.1. Гибридизация ДНК	305
<i>Протокол 16.8. Мультилокусный фингерпринтинг ДНК клеточных линий</i>	306
16.6.2. Фингерпринтинг ДНК.....	306
<i>Протокол 16.9. STR-анализ профиля ДНК клеточных линий</i>	310
16.6.3. Анализ профиля ДНК.....	310
16.7. РНК и экспрессия белка.....	312
16.8. Активность ферментов.....	313
16.8.1. Изоферменты.....	313
16.8.2. Изоферментный электрофорез при помощи Authentikit.....	314
16.9. Антигенные маркеры.....	315
<i>Протокол 16.10. Изоферментный анализ</i>	316
<i>Протокол 16.11. Непрямая иммунофлюоресценция</i> ..	318
16.9.1. Иммунное окрашивание.....	318
<i>Варианты</i>	318
16.9.2. Иммунный анализ.....	320
16.10. Дифференцировка.....	320
ГЛАВА 17. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА.....	321
17.1. Экспрессия фенотипа <i>in vivo</i>	321
17.1.1. Дедифференцировка.....	321
17.1.2. Линейная селекция.....	321
17.2. Стадии дифференцировки.....	321
17.3. Пролиферация и дифференцировка.....	322
17.4. Коммитирование и линии дифференцировки.....	322
17.5. Пластичность стволовых клеток.....	324
17.6. Маркеры дифференцировки.....	324
17.7. Индукция дифференцировки.....	325

17.7.1. Межклеточные взаимодействия... 325	19.3.1. Визуально определяемая микробная контаминация..... 355
<i>Паракринные факторы роста..... 326</i>	19.3.2. Микоплазма..... 357
17.7.2. Системные или экзогенные факторы...327	<i>Протокол 19.2. Выявление микоплазмы методом флюоресценции..... 357</i>
17.7.3. Взаимодействия клетки с матриксом...327	19.3.3. Окрашивание микоплазмы флюоресцентными красителями. 358
17.7.4. Полярность и форма клетки.... 329	19.3.4. Использование ГПЦР для детекции микоплазм.....358
17.7.5. Давление кислорода..... 329	<i>Протокол 19.3. Выявление микоплазмы с помощью ПЦР..... 359</i>
17.8. Дифференцировка и злокачественность_ 330	<i>Интерпретация результатов..... 360</i>
17.9. Практические аспекты..... 330	19.3.5. Альтернативные методы детекции микоплазмы..... 361
ГЛАВА 18. ТРАНСФОРМАЦИЯ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ 332	19.3.6. Вирусная контаминация..... 361
18.1. Роль в характеристике клеточных линий..... 332	19.4. Устранение контаминации..... 361
18.2. Что такое трансформация?..... 332	19.4.1. Бактерии, грибы и дрожжи..... 361
18.3. Генетическая нестабильность..... 332	19.4.2. Устранение микоплазмы..... 362
18.3.1. Хромосомные aberrации..... 334	19.4.3. Устранение вирусной контаминации.. 362
18.3.2. Изменение содержания ДНК..... 335	19.4.4. Персистирующая контаминация. 362
18.4. Иммортализация..... 335	<i>Протокол 19.4. Ликвидация микробной контаминации..... 362</i>
18.4.1. Контроль физиологического старения..... 336	19.5. Перекрестная контаминация..... 363
18.4.2. Иммортализация с использованием вирусных генов..... 336	19.6. Заключение..... 363
18.4.3. Иммортализация человеческих фибробластов..... 337	ГЛАВА 20. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ.....365
<i>Протокол 18.1. Иммортализация фибробластов. . . 338</i>	20.1. Предпосылки метода замораживания.... 365
18.4.4. Теломераза-индуцированная иммортализация..... 340	20.2. Получение клеточных линий для криоконсервации..... 365
18.4.5. Трансгенные мыши..... 341	20.3. Принципы криоконсервации..... 365
<i>Протокол 18.2. Иммортализация мезенхимальных стволовых клеток человека с помощью теломеразы..... 341</i>	20.3.1. Теоретическое обоснование замораживания клеток..... 365
18.5. Абберрантный контроль роста..... 343	20.3.2. Концентрация клеток..... 366
18.5.1. Независимость от прикрепления к субстрату..... 343	20.3.3. Среда для замораживания..... 366
18.5.2. Контактное торможение..... 344	20.3.4. Скорость охлаждения..... 367
<i>Протокол 18.3. Ограничение клеточной пролиферации в зависимости от плотности культуры..... 344</i>	20.3.5. Морозильные камеры..... 369
18.5.3. Зависимость от сыворотки..... 345	<i>Протокол 20.1. Замораживание клеток..... 372</i>
18.5.4. Онкогены..... 346	20.3.6. Протоколирование работы морозильника..... 373
18.6. Туморогенность..... 346	<i>Протокол 20.2. Размораживание замороженных клеток..... 374</i>
18.6.1. Малигнизация..... 346	20.3.7. Размораживание хранившихся ампул..... 374
18.6.2. Опухолевая трансплантация..... 347	20.4. Планирование и контроль замораживания культур клеток..... 377
18.6.3. Инвазивность..... 347	20.4.1. Контроль за состоянием запасов клеток в морозильнике..... 377
18.6.4. Ангиогенез..... 348	20.4.2. Периодическая замена культивируемых клеток..... 377
18.6.5. Активаторы плазминогена..... 349	20.5. Банки клеток..... 378
ГЛАВА 19. КОНТАМИНАЦИЯ 350	20.6. Транспортировка клеточных культур..... 379
19.1. Источники контаминации..... 350	20.6.1. Замороженная ампула..... 379
19.1.1. Основные приемы стерильной работы..... 350	20.6.2. Живые культуры..... 379
19.1.2. Состояние внешней среды..... 350	ГЛАВА 21. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ . 380
19.1.3. Использование и поддержание в рабочем состоянии ламинарного шкафа..... 350	21.1. Подсчет клеток..... 380
19.1.4. Инкубаторы с увлажнением..... 353	21.1.1. Гемоцитометр..... 380
<i>Протокол 19.1. Обработка инкубаторов..... 353</i>	<i>Протокол 21.1. Подсчет клеток при помощи гемоцитометра..... 380</i>
19.1.5. Холодильные камеры..... 354	21.1.2. Электронный подсчет клеток..... 383
19.1.6. Стерильные материалы..... 354	<i>Протокол 21.2. Электронный подсчет клеток на основании электрического сопротивления . . . 384</i>
19.1.7. Привезенные клеточные линии и биопсийные образцы..... 354	21.1.3. Окрашенные монослои..... 386
19.1.8. Карантин..... 354	21.2. Вес клеток..... 386
19.2. Виды микробной контаминации..... 354	
19.3. Контроль контаминации..... 355	

21.3.	Содержание ДНК.....	386
21.4.	Белок.....	386
21.4.1.	Солюбилизация образца.....	387
21.5.	Скорость синтеза.....	387
21.5.1.	Синтез ДНК.....	387
<i>Протокол 21.3. Оценка содержания ДНК с использованием красителя НОЕСНСТ33258 ...</i>		
<i>Протокол 21.4. Оценка содержания белка методом Брэдфорда.....</i>		387
<i>Протокол 21.5. Оценка уровня синтеза ДНК методом включения H³-тимидиновой метки.....</i>		
21.5.2.	Синтез белка.....	389
<i>Протокол 21.6. Синтез белка.....</i>		
21.6.	Приготовление образцов для ферментного и иммуноферментного анализа.....	390
21.7.	Цитометрия.....	390
21.7.1.	Мечение zwsita.....	390
21.7.2.	Проточная цитометрия.....	390
21.8.	Увеличение количества образцов для статистического анализа.....	390
21.8.1.	Получение данных.....	391
21.8.2.	Анализ данных.....	391
21.9.	Клеточная пролиферация.....	391
21.9.1.	Планирование эксперимента.....	391
21.9.2.	Цикл роста.....	392
<i>Протокол 21.7. Кривая роста монослоя во флаконах.....</i>		
<i>Протокол 21.8. Кривая роста монослоя в многоруночном планишете.....</i>		394
21.9.3.	Анализ кривой роста монослоя....	395
21.9.4.	Объем среды, концентрация и плотность клеток.....	396
21.9.5.	Суспензионные культуры.....	396
21.9.6.	Фазы цикла роста.....	397
<i>Протокол 21.9. Кривая роста суспензионной культуры</i>		
21.9.7.	Данные, получаемые при исследовании кривой роста.....	399
21.10.	Эффективность культивирования.....	399
<i>Протокол 21.10. Определение эффективности посева на чашках Петри.....</i>		
21.10.1.	Анализ формирования колоний	401
21.10.2.	Автоматический счетчик колоний ..	402
<i>Протокол 21.11. Индекс меченая H³-тимидином</i>		
21.11.	Индекс мечения.....	403
21.11.1.	Фракция пролиферирующих клеток.....	404
21.11.2.	Митотический индекс.....	404
21.11.3.	Индекс пролиферации.....	404
<i>Протокол 21.12. Определение фракции пролиферирующих клеток.....</i>		
21.12.	Время клеточного цикла.....	405
21.13.	Клеточная миграция.....	405
ГЛАВА 22. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ.....406		
22.1.	Жизнеспособность, токсичность и выживаемость.....	406
22.2.	Ограничения <i>in vitro</i>	407
22.3.	Природа исследований.....	407
22.3.1.	Жизнеспособность.....	407
<i>Протокол 22.1. Оценка жизнеспособности методом отторжения красителя.....</i>		
<i>Протокол 22.2. Оценка жизнеспособности методом поглощения красителя.....</i>		408
22.3.2.	Выживаемость.....	409
<i>Протокол 22.3. Клоногенный анализ прикрепившихся клеток.....</i>		
22.3.3.	Анализ, основанный на клеточной пролиферации.....	413
22.3.4.	Метаболический анализ цитотоксичности.....	413
22.3.5.	Микротитрационный анализ.....	413
<i>Протокол 22.4. Оценка цитотоксичности при помощи МП-теста.....</i>		
22.3.6.	Сравнительная оценка микротитрационного и клоногенного анализа выживания.....	417
22.3.7.	Взаимодействие лекарственных препаратов.....	417
22.4.	Применение исследования цитотоксичности.....	418
22.4.1.	Скрининг противораковых препаратов.....	418
22.4.2.	Прогностические исследования противоопухолевых препаратов... ..	418
22.4.3.	Фармацевтическое тестирование	419
22.5.	Трансформация и мутагенез.....	419
22.5.1.	Анализ мутагеназа методом обмена сестринских хроматид.....	419
<i>Протокол 22.5. Обмен сестринских хроматид.....</i>		
22.5.2.	Канцерогенность.....	421
22.6.	Воспаление.....	422
ГЛАВА 23. КУЛЬТУРЫ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ТИПОВ КЛЕТОК..... 423		
23.1.	Клеточные культуры специализированных клеток.....	423
23.2.	Эпителальные клетки.....	423
23.2.1.	Эпидермис.....	424
<i>Протокол 23.1. Эпидермальные кератиноциты.....</i>		
23.2.2.	Роговица.....	428
<i>Протокол 23.2. Эпителальные клетки роговицы</i>		
<i>Протокол 23.3. Эпителий молочной железы.....</i>		
23.2.3.	Молочная железа.....	430
23.2.4.	Шейка матки.....	431
<i>Протокол 23.4. Цервикальный эпителий.....</i>		
23.2.5.	Желудочно-кишечный тракт.....	433
<i>Протокол 23.5. Выделение и культивирование клеток крипт толстого кишечника.....</i>		
23.2.6.	Печень.....	435
<i>Протокол 23.6. Выделение гепатоцитов крысы.....</i>		
23.2.7.	Поджелудочная железа.....	437
<i>Протокол 23.7. Поджелудочный эпителий.....</i>		
23.2.8.	Почка.....	438
<i>Протокол 23.8. Эпителий почки.....</i>		
<i>Протокол 23.9. Бронхиальный и трахеальный эпителий.....</i>		
23.2.9.	Бронхиальный и трахеальный эпителий.....	440
23.2.10.	Эпителий ротовой полости.....	441
<i>Протокол 23.10. Кератиноциты ротовой полости.....</i>		
<i>Протокол 23.11. Эпителий простаты.....</i>		
23.2.11.	Простата.....	442
23.3.	Мезенхимные клетки.....	444
23.3.1.	Соединительная ткань.....	444
23.3.2.	Жировая ткань.....	444
<i>Протокол 23.12. Первичная культура адипоцитов.....</i>		

Протокол 23.13. Выделение и культивирование гладкомышечных клеток.....	446
23.3.3. Мышцы.....	446
Протокол 23.14. Культура миобластов взрослой мышцы взрослого человека.....	447
Протокол 23.15. Культура отдельных мышечных волокон скелетных мышц.....	449
Протокол 23.16. Хондроциты на альгинатных бусинах.....	450
23.3.4. Хрящ.....	450
23.3.5. Кость.....	453
Протокол 23.17. Остеобласты.....	453
23.3.6. Эндотелий.....	454
Протокол 23.18. Выделение и культивирование клеток сосудистого эндотелия.....	455
23.4. Нейроэктодермальные клетки.....	458
23.4.1. Нейроны.....	458
Протокол 23.19. Гранулярные клетки мозжечка . . .	459
23.4.2. Глиальные клетки.....	460
Протокол 23.20. Ольфакторные капсульные клетки (ОЕС).....	461
23.4.3. Эндокринные клетки.....	463
23.4.4. Меланоциты.....	463
Протокол 23.21. Меланоциты.....	464
23.4.5. Подтверждение идентичности меланоцитов.....	465
23.5. Гематopoэтические клетки.....	465
23.5.1. Долгоживущие культуры клеток костного мозга.....	467
Протокол 23.22. Долгоживущая культура гематopoэтических клеток костного мозга.....	467
Протокол 23.23. Анализ колониеобразования культуры гематopoэтических клеток.....	468
23.5.2. Анализ колониеобразования культуры гематopoэтических клеток..	468
23.6. Гонады.....	469
23.7. Стволовые клетки.....	470
23.7.1. Эмбриональные стволовые клетки... 470	
23.7.2. Мультипотентные стволовые клетки взрослого организма.....	470
23.7.3. Источники стволовых клеток и работа с ними.....	471
ГЛАВА 24. КУЛЬТУРА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК.....	472
24.1. Проблемы культивирования опухолевых клеток.....	472
24.2. Взятие образцов.....	473
24.3. Дезагрегация.....	473
24.4. Первичная культура.....	474
24.5. Характеристика.....	474
24.6. Размножение клеточных линий.....	475
24.6.1. Постоянные клеточные линии.....	476
24.7. Селективная культура опухолевых клеток.....	476
24.7.1. Селективные среды.....	476
24.7.2. Конфлюэнтные фидерные слои....	476
Протокол 24.1. Выращивание клеток на конфлюэнтном фидерном слое.....	477
24.7.3. Суспензионное клонирование.....	478
24.7.4. Гистотипическая культура.....	478
24.7.5. Ксенотрансплантат.....	479
24.7.6. Характеризация культур опухолевых клеток.....	479
24.7.7. Сохранение тканей замораживанием..	479
Протокол 24.2. Замораживание биопсии.....	479
24.8. Специфические опухолевые культуры 480	
24.8.1. Молочная железа.....	480
24.8.2. Легкое.....	480
24.8.3. Желудок.....	481
24.8.4. Толстый кишечник.....	481
Протокол 24.3. Культура колоректальных опухолей.....	482
24.8.5. Поджелудочная железа.....	483
24.8.6. Яичники.....	484
24.8.7. Простата.....	484
24.8.8. Мочевой пузырь.....	484
24.8.9. Кожа.....	484
24.8.10. Шейка матки.....	485
24.8.11. Глиома.....	485
24.8.12. Нейробластома.....	485
24.8.13. Сперматоцитомы.....	486
24.8.14. Лимфома и лейкомия.....	486
ГЛАВА 25. ОРГАНОТИПИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА	487
25.1. Межклеточное взаимодействие и фенотипическая экспрессия.....	487
25.1.1. Роль клеточной плотности.....	487
25.1.2. Реципрокные взаимодействия.....	487
25.1.3. Выбор модели.....	488
25.2. Органная культура.....	490
25.2.1. Обмен питательных веществ и газов.....	490
25.2.2. Структурное единство.....	490
25.2.3. Рост и дифференцировка.....	490
25.2.4. Ограничения метода органной культуры.....	491
25.2.5. Типы органных культур.....	491
Протокол 25.1. Органная культура.....	491
25.3. Гистотипическая культура.....	492
25.3.1. Метод геля и губки.....	492
25.3.2. Пустотелые волокна.....	493
25.3.3. Сфероиды.....	493
Протокол 25.2. Сфероиды.....	494
25.3.4. Вращающиеся камерные системы ...	496
25.3.5. Иммобилизация живых клеток в альгинате.....	496
Протокол 25.3. Альгинатное капсулирование.....	497
Протокол 25.4. Вкладыши для фильтрационных лунок.....	498
25.3.6. Вкладыши для фильтрационных лунок.....	498
25.3.7. Культуры нейрональных агрегатов ..	500
25.3.8. Тканевой эквивалент и тканевая инженерия.....	501
Протокол 25.5. Нейрональные агрегаты.....	501
25.4. Создание трехмерных изображений клеток (3-О-реконструкция).....	504
ГЛАВА 26. КРУПНОМАСШТАБНОЕ ПРОИЗВОДСТВО КЛЕТОК.....	505
26.1. Крупномасштабное производство суспензионных культур.....	505
Протокол 26.1. Перемешивание 4-литровой емкости с суспензионной культурой.....	506
26.1.1. Постоянная культура.....	507
26.1.2. Масштаб и комплексность.....	508
26.1.3. Перемешивание и аэрация.....	508

26.2. Крупномасштабное производство монослойных культур.....	510
26.2.1. Многослойные пропагаторы (культиваторы).....	510
Протокол 26.2. Система NUNC CELL FACTORY. ...	511
26.2.2. Многоцелевые диски, спирали и пробирки.....	512
26.2.3. Роллерные культуры.....	512
Протокол 26.3. Роллерная бутылочная культура ...	514
26.2.4. Микроносители.....	514
Протокол 26.4. Микроносители.....	516
26.2.5. Макроносители.....	516
26.2.6. Перфузионные монослойные культуры.....	516
26.3. Контроль процесса.....	518

ГЛАВА 27. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ.....520

27.1. Методы выделения и исследования лимфоцитов.....	520
Протокол 27.1. Приготовление лимфоцитов.....	520
27.1.1. Бласттрансформация.....	521
27.2. Авторадиография.....	521
Протокол 27.2. ФГА-стимуляция лимфоцитов.....	521
Протокол 27.3. Микрорадиография.....	522
27.3. Съемка в режиме замедленного времени.....	526
Протокол 27.4. Видеозапись в замедленном режиме времени.....	526
27.4. Конфокальная микроскопия.....	528
27.5. Синхронизация клеток.....	528
27.5.1. Разделение клеток.....	528
27.5.2. Блокирование клеточного цикла..	529
27.6. Культура амниоцитов.....	529
Протокол 27.5. Культура амниоцитов.....	529
27.7. Культуры клеток пойкилотермных животных.....	534
27.7.1. Клетки рыб.....	535
Протокол 27.6. Культуры клеток эмбриона полосатого данио.....	536
27.7.2. Клетки насекомых.....	538
Протокол 27.7. Культуры клеток насекомых.....	538
27.8. Молекулярная гибридизация <i>in situ</i>	539
27.8.1. Анализ экспрессии генов РНК методом гибридизации <i>in situ</i>	539
Протокол 27.8. Авторадиографическая гибридизация <i>in situ</i>	539
27.8.2. Флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) при анализе генов и хромосом.....	543
Протокол 27.9. FISH с использованием однокопийных геномных зондов и хромосомных красителей.....	543
27.9. Слияние соматических клеток.....	545
Протокол 27.10. Гибридизация клеток.....	545
27.9.1. Ядерный перенос.....	547
27.10. Продукция моноклональных антител.....	547
Протокол 27.11. Продукция моноклональных антител.....	548
27.11. Перенос ДНК.....	551
27.11.1. Копреципитация с фосфатом кальция.....	551
27.11.2. Липофекция.....	551
Протокол 27.12. Транзиторная трансфекция методом липофекции.....	552
27.11.3. Электропорация.....	553

Протокол 27.13. Устойчивая трансфекция методом электропорации.....	553
27.11.4. Другие методы переноса ДНК.....	554
27.11.5. Репортерные гены.....	555
Протокол 27.14. Окраска <i>in situ</i> на β -галактозидазу.....	555
Протокол 27.15. Определение активности хлорамфениколацетилтрансферазы (CATASSAY).....	556

ГЛАВА 28. РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ.....557

28.1. Медленный рост клеток	557
28.1.1. Проблемы, ограниченные вашими собственными исходными культурами.....	557
28.1.2. Более общие проблемы, возникающие и у других сотрудников.....	557
28.1.3. Не было ли у вас в лаборатории каких-либо изменений?.....	558
28.2. Среда.....	558
28.2.1. Выбор среды.....	559
28.2.2. Нестабильные реактивы.....	559
28.3. Чистота составляющих частей.....	560
28.3.1. Правильно ли работает система очистки воды?.....	560
28.3.2. Бикарбонат.....	560
28.3.3. Антибиотики.....	560
28.3.4. Сыворотка.....	560
28.4. Пластиковая посуда.....	560
28.5. Стеклопосуда.....	561
28.5.1. Мытье посуды.....	561
28.6. Микробиологическая контаминация.....	561
28.6.1. Контаминация, ограниченная одним исследователем.....	561
28.6.2. Распространенная контаминация.....	562
28.6.3. Идентификация контаминации.....	563
28.6.4. Деконтаминация.....	563
28.7. Химическая контаминация.....	563
28.7.1. Стеклопосуда.....	563
28.7.2. Пипетки.....	563
28.7.3. Очистка воды.....	564
28.7.4. Другие реактивы.....	564
28.7.5. Порошки и аэрозоли.....	564
28.8. Первичная культура.....	564
28.8.1. Низкий выход клеток в первичной культуре.....	564
28.8.2. Неверно выбраны клетки.....	565
28.8.3. Контаминация.....	565
28.9. Дифференцировка.....	565
28.9.1. Клетки не дифференцированы.....	565
28.9.2. Снижение образования продукта.....	565
28.10. Смена среды.....	565
28.10.1. Обычные монослои.....	565
28.10.2. Клоны.....	565
28.11. Субкультура.....	566
28.11.1. Фазы клеточного цикла при субкультуре.....	566
28.11.2. Старение.....	566
28.11.3. Среда.....	566
28.11.4. Неравномерный рост.....	566
28.12. Клонирование.....	566
28.12.1. Низкая эффективность посева.....	566
28.12.2. Диффузные колонии.....	567
28.12.3. Слишком много колоний на чашку..	567

28.12.4. Неслучайное распределение.....	567	ГЛАВА 29. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	571
28.12.5. Неприкрепляющиеся клетки.....	567		
28.13. Прекрестная контаминация.....	567	Приложение I. ПРИГОТОВЛЕНИЕ	
28.13.1. Симптомы перекрестной		РЕАКТИВОВ	572
контаминации.....	567		
28.13.2. Предупреждение перекрестной		Приложение II. ИСТОЧНИКИ	
контаминации.....	568	ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ	579
28.13.3. Элиминация перекрестной			
контаминации.....	568	Приложение III. ПРОИЗВОДИТЕЛИ	
28.14. Криоконсервация.....	568	ПРОДУКЦИИ И ДРУГИЕ ИСТОЧНИКИ.....	601
28.14.1. Плохое восстановление.....	568		
28.14.2. Изменение внешнего вида культуры		Приложение IV. СЛОВАРЬ	
после криоконсервации.....	568	УПОТРЕБЛЯЕМЫХ ТЕРМИНОВ	
28.14.3. Контаминация.....	569	[по Schaeffer, 1990].....	633
28.14.4. Утрата рабочей культуры.....	569		
28.15. Грануляция клеток.....	569	Приложение V. ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА .	640
28.16. Подсчет клеток.....	569		
28.16.1. Гемоцитометр.....	569	Список литературы.....	641
28.16.2. Электронный счетчик клеток		Предметный указатель.....	689
посредством измерения			
сопротивления при пропускании			
через дроссель.....	569		
28.17. Жизнеспособность.....	570		
28.17.1. Морфологические признаки.....	570		
28.17.2. Определение жизнеспособности....	570		
28.17.3. Цитотоксичность.....	570		