

М Е Т О Д Ы   В   Б И О Л О Г И И



Р. Я. Фрешни

# КУЛЬТУРА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

КУЛЬТУРА  
ЖИВОТНЫХ  
КЛЕТОК

R. Jan Freshney

# **CULTURE OF ANIMAL CELLS**

**A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE  
Fifth Edition**

**R. Jan Freshney**

Cancer Research UK Centre for Oncology and Applied Pharmacology  
Cancer Research UK Beatson Laboratories  
University of Glasgow

 **WILEY-LISS**

---

A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION

Р. Я. Фрешни

# КУЛЬТУРА ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

**ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО**

Перевод с 5-го английского издания  
д-ра биол. наук Ю. Н. Хомякова,  
канд. мед. наук Т. И. Хомяковой



Москва  
БИНОМ. Лаборатория знаний  
2010

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, 2010. — 691 с. : ил., [24] 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, медиков, а также исследователей, специалистов биофармацевтических центров и сотрудников диагностических лабораторий.

УДК 57.08  
ББК 28.03

**По вопросам приобретения обращаться:  
«БИНОМ. Лаборатория знаний»  
Телефон: (499) 157-5272  
e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>**

ISBN 978-5-94774-596-2

Copyright © 2005 by John Wiley & Sons. Inc.  
Все права защищены. Перевод  
с английского языка по договору.  
© БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010

# 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.....	30	Упражнение 12. Подсчет клеток в гемоцитометре и электронном счетчике.....	45
1.2.1. Контроль окружения.....	30	Упражнение.....	46
1.2.2. Характеристика и однородность образца.....	31	Упражнение 13. Рост субкультуры клеток в суспензии.....	46
1.2.3. Экономичность, эффективность и автоматизация процесса.....	31	Упражнение.....	47
1.2.4. Моделирование <i>in vitro</i> условий <i>in vivo</i> .....	31	Упражнение 14. Рост субкультуры постоянной клеточной линии в монослое.....	47
1.3. Ограничения метода культуры ткани.....	31	Упражнение.....	48
1.3.1. Наличие специальных навыков.....	31	Упражнение 15. Окрашивание монослойной клеточной культуры по Гимза.....	49
1.3.2. Затраты.....	32	Упражнение.....	50
1.3.3. Дифференцировка и селекция.....	32	Упражнение 16. Построение и анализ кривой роста.....	50
1.3.4. Происхождение клеток.....	32	Упражнение.....	50
1.3.5. Нестабильность.....	32	2.3. Упражнения повышенной сложности.....	51
1.4. Основные отличия культуры <i>in vitro</i> .....	32	Упражнение 17. Криоконсервация культивируемых клеток.....	51
1.5. Типы культуры ткани.....	33	Упражнение.....	52
ГЛАВА 2. ТРЕНИРОВОЧНЫЕ ПРОГРАММЫ.....	36	Упражнение 18. Обнаружение микоплазм.....	52
2.1. Цели и задачи главы.....	36	Упражнение.....	54
2.2. Упражнения для начинающих (основной курс).....	36	Упражнение 19. Характеристика клеточных линий.....	54
Упражнение 1. Асептический метод I: Пипетирование и перенос жидкостей.....	38	Упражнение.....	55
Упражнение.....	38	Упражнение 20. Первичная культура.....	55
Упражнение 2. Введение в технику ведения культуры ткани.....	39	Упражнение.....	56
Упражнение.....	39	Упражнение 21. Клонирование в монослое.....	56
Упражнение 3. Асептический метод II: Приготовление питательной среды.....	40	Упражнение.....	57
Упражнение.....	41	2.4. Специализированные упражнения.....	57
Упражнение 4. Смена среды в монослойной культуре.....	41	ГЛАВА 3. БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК.....	58
Упражнение.....	41	3.1. Влияние окружающей среды на культуру клеток.....	58
Упражнение 5. Мытье и стерилизация стеклянной посуды.....	42	3.2. Клеточная адгезия.....	58
Упражнение.....	42	3.2.1. Молекулы клеточной адгезии.....	58
Упражнение 6. Подготовка и стерилизация воды.....	42	3.2.2. Межклеточные контакты.....	59
Упражнение.....	42	3.2.3. Внеклеточный матрикс.....	60
Упражнение 7. Подготовка и стерилизация фосфатно-буферного раствора для среды Дюльбекко (D-PBS) без $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ .....	43	3.2.4. Цитоскелет.....	61
Упражнение.....	43	3.2.5. Клеточная подвижность.....	61
Упражнение 8. Приготовление стандартных растворов для контроля pH.....	43	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
<b>3.5. Передача клеточных сигналов .....</b>	<b>66</b>	<b>5.5. Хранение .....</b>	<b>101</b>
<b>3.6. Энергетический метаболизм .....</b>	<b>67</b>	5.5.1. Холодильники и морозильники .....	101
<b>3.7. Получение первичной культуры .....</b>	<b>67</b>	5.5.2. Контейнеры для криоконсервации .....	102
<b>3.8. Эволюция клеточных линий .....</b>	<b>68</b>	5.5.3. Морозильники с управляемым процессом замораживания .....	102
3.8.1. Старение .....	68	<b>5.6. Лабораторные приборы .....</b>	<b>102</b>
<b>3.9. Возникновение постоянных клеточных линий .....</b>	<b>68</b>	5.6.1. Компьютеры и сети .....	102
<b>3.10. Происхождение культивируемых клеток .....</b>	<b>70</b>	5.6.2. Прямой микроскоп .....	102
		5.6.3. Низкотемпературный морозильник .....	102
<b>ГЛАВА 4. СТРУКТУРА И ПЛАНИРОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОМЕЩЕНИЙ .....</b>	<b>72</b>	5.6.4. Конфокальный микроскоп .....	103
4.1. Планирование .....	72	5.6.5. Термоциклер .....	103
4.2. Обслуживающие системы и вспомогательные службы .....	76	<b>5.7. Специальное оборудование .....</b>	<b>103</b>
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	<b>5.8. Расходные материалы .....</b>	<b>104</b>
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
<b>ГЛАВА 5. ОБОРУДОВАНИЕ .....</b>	<b>85</b>	<b>ГЛАВА 6. МЕТОДЫ АСЕПТИКИ .....</b>	<b>106</b>
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	<b>6.3. Стерилизующие манипуляции .....</b>	<b>109</b>
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
<b>5.3. Инкубация .....</b>	<b>94</b>	6.3.4. Манипуляции с бутылками и колбами .....	110
5.3.1. Инкубатор .....	94	6.3.5. Пипетирование .....	110
5.3.2. Влажный CO <sub>2</sub> -инкубатор .....	94	6.3.6. Переливание .....	112
5.3.3. Регистратор температуры .....	95	<b>6.4. Ламинарный поток .....</b>	<b>112</b>
5.3.4. Роллерные штативы .....	96	<b>6.5. Стандартная процедура .....</b>	<b>113</b>
5.3.5. Магнитная мешалка .....	96	6.5.1. Чашки Петри и многоруночные планшеты .....	113
<b>5.4. Подготовительные работы и стерилизация .....</b>	<b>96</b>	<b>6.6. Приборы и оборудование .....</b>	<b>114</b>
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 .....</i>	<i>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 <sub>2</sub> .....	119
5.4.7. Магнитная мешалка с подогревом .....	99	<b>ГЛАВА 7. БЕЗОПАСНОСТЬ, БИОЭТИКА И ВАЛИДАЦИЯ .....</b>	<b>120</b>
5.4.8. Автоматический диспенсер .....	100	7.1. Лабораторная безопасность .....	120
5.4.9. Измеритель электропроводности (кондуктометр) .....	100	7.2. Оценка риска .....	120

<b>7.3. Стандартные операционные процедуры</b> . . . . .	<b>120</b>	<i>Протокол 9.1. Приготовление стандартов РН</i> . . . . .	150
<b>7.4. Контроль безопасности</b> . . . . .	<b>120</b>	9.2.2. СО <sub>2</sub> и бикарбонат натрия . . . . .	150
<b>7.5. Общая безопасность</b> . . . . .	<b>122</b>	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	<b>9.3. Сбалансированные солевые растворы</b> . . . . .	<b>154</b>
7.5.7. Ожоги . . . . .	126	<b>9.4. Полные питательные среды</b> . . . . .	<b>154</b>
<b>7.6. Пожар</b> . . . . .	<b>126</b>	9.4.1. Аминокислоты . . . . .	155
<b>7.7. Ионизирующее излучение</b> . . . . .	<b>126</b>	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
<b>7.8. Биологическая опасность</b> . . . . .	<b>129</b>	9.4.7. Антибиотики . . . . .	158
7.8.1. Уровни биологической защиты . . . . .	129	<b>9.5. Сыворотка</b> . . . . .	<b>159</b>
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
<b>7.9. Биоэтика</b> . . . . .	<b>136</b>	9.5.7. Ингибиторы . . . . .	160
7.9.1. Ткани животных . . . . .	136	<b>9.6. Выбор среды и сыворотки</b> . . . . .	<b>160</b>
7.9.2. Ткани человека . . . . .	136	9.6.1. Резервирование партии сыворотки . . . . .	161
<b>7.10. Валидация</b> . . . . .	<b>137</b>	9.6.2. Тестирование сыворотки . . . . .	162
7.10.1. Подтверждение аутентичности . . . . .	138	9.6.3. Тепловая инактивация . . . . .	163
7.10.2. Происхождение . . . . .	138	<b>9.7. Другие добавки</b> . . . . .	<b>163</b>
7.10.3. Контаминация . . . . .	138	9.7.1. Гидролизат аминокислот . . . . .	163
		9.7.2. Эмбриональный экстракт . . . . .	163
		9.7.3. Кондиционированная среда . . . . .	163
<b>ГЛАВА 8. ПОСУДА И СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК</b> . . . . .	<b>139</b>	<b>ГЛАВА 10. БЕССЫВОРОТОЧНЫЕ СРЕДЫ</b> . . . . .	<b>164</b>
<b>8.1. Субстрат</b> . . . . .	<b>139</b>	<b>10.1. Недостатки сыворотки</b> . . . . .	<b>164</b>
8.1.1. Прикрепление и рост клеток . . . . .	139	<b>10.2. Преимущества бессывороточных сред</b> . . . . .	<b>168</b>
8.1.2. Материалы . . . . .	139	10.2.1. Селективные среды . . . . .	168
<b>8.2. Выбор сосудов для культивирования клеток</b> . . . . .	<b>139</b>	10.2.2. Регуляция пролиферации и дифференцировки . . . . .	168
8.2.1. Клеточный выход в культуральном сосуде . . . . .	140	<b>10.3. Недостатки бессывороточных сред</b> . . . . .	<b>168</b>
8.2.2. Суспензионная культура . . . . .	142	<b>10.4. Замена сыворотки</b> . . . . .	<b>170</b>
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
<b>8.3. Специализированные системы</b> . . . . .	<b>145</b>	10.4.5. Белки и полиамины . . . . .	171
8.3.1. Проницаемые подложки . . . . .	145	10.4.6. Матрикс . . . . .	171
<b>8.4. Обработка поверхности</b> . . . . .	<b>145</b>	<b>10.5. Выбор бессывороточной среды</b> . . . . .	<b>171</b>
8.4.1. Покрытие матриксом . . . . .	145	10.5.1. Имеющиеся в продаже бессывороточные среды . . . . .	176
<i>Протокол 8.1. Приготовление ВКМ</i> . . . . .	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	<b>10.6. Разработка бессывороточной среды</b> . . . . .	<b>178</b>
8.4.4. Металлические субстраты . . . . .	148	<b>10.7. Приготовление бессывороточной среды</b> . . . . .	<b>179</b>
8.4.5. Неадгезивные субстраты . . . . .	148	<b>10.8. Среда, не содержащие белков</b> . . . . .	<b>179</b>
<b>ГЛАВА 9. СРЕДЫ ОПРЕДЕЛЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И ДОБАВКИ К СРЕДАМ</b> . . . . .	<b>149</b>	<b>10.9. Заключение</b> . . . . .	<b>179</b>
<b>9.1. Составление сред</b> . . . . .	<b>149</b>	<b>ГЛАВА 11. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ И СТЕРИЛИЗАЦИЯ</b> . . . . .	<b>180</b>
<b>9.2. Физико-химические свойства</b> . . . . .	<b>149</b>	<b>11.1. Приготовление реактивов и материалов</b> . . . . .	<b>180</b>
9.2.1. рН . . . . .	149		



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

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

17.7.1. Межклеточные взаимодействия . . . . .	325	19.3.1. Визуально определяемая микробная контаминация . . . . .	355
<i>Паракринные факторы роста</i> . . . . .	326	19.3.2. Микоплазма . . . . .	357
17.7.2. Системные или экзогенные факторы . . . . .	327	<i>Протокол 19.2. Выявление микоплазмы методом флюоресценции</i> . . . . .	357
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 ПЦР для детекции микоплазм . . . . .	358
17.7.5. Давление кислорода . . . . .	329	<i>Протокол 19.3. Выявление микоплазмы с помощью ПЦР</i> . . . . .	359
<b>17.8. Дифференцировка и злокачественность</b> . . . . .	<b>330</b>	<i>Интерпретация результатов</i> . . . . .	360
<b>17.9. Практические аспекты</b> . . . . .	<b>330</b>	19.3.5. Альтернативные методы детекции микоплазмы . . . . .	361
<b>ГЛАВА 18. ТРАНСФОРМАЦИЯ И ИММОРТАЛИЗАЦИЯ</b> . . . . .	<b>332</b>	19.3.6. Вирусная контаминация . . . . .	361
<b>18.1. Роль в характеристике клеточных линий</b> . . . . .	<b>332</b>	<b>19.4. Устранение контаминации</b> . . . . .	<b>361</b>
<b>18.2. Что такое трансформация?</b> . . . . .	<b>332</b>	19.4.1. Бактерии, грибы и дрожжи . . . . .	361
<b>18.3. Генетическая нестабильность</b> . . . . .	<b>332</b>	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
<b>18.4. Иммуортализация</b> . . . . .	<b>335</b>	<i>Протокол 19.4. Ликвидация микробной контаминации</i> . . . . .	362
18.4.1. Контроль физиологического старения . . . . .	336	<b>19.5. Перекрестная контаминация</b> . . . . .	<b>363</b>
18.4.2. Иммуортализация с использованием вирусных генов . . . . .	336	<b>19.6. Заключение</b> . . . . .	<b>363</b>
18.4.3. Иммуортализация человеческих фибробластов . . . . .	337	<b>ГЛАВА 20. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ</b> . . . . .	<b>365</b>
<i>Протокол 18.1. Иммуортализация фибробластов</i> . . . . .	338	<b>20.1. Предпосылки метода замораживания</b> . . . . .	<b>365</b>
18.4.4. Теломераза-индуцированная иммуортализация . . . . .	340	<b>20.2. Получение клеточных линий для криоконсервации</b> . . . . .	<b>365</b>
18.4.5. Трансгенные мыши . . . . .	341	<b>20.3. Принципы криоконсервации</b> . . . . .	<b>365</b>
<i>Протокол 18.2. Иммуортализация мезенхимальных стволовых клеток человека с помощью теломеразы</i> . . . . .	341	20.3.1. Теоретическое обоснование замораживания клеток . . . . .	365
<b>18.5. Аберрантный контроль роста</b> . . . . .	<b>343</b>	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</i> . . . . .	344	20.3.5. Морозильные камеры . . . . .	369
18.5.3. Зависимость от сыворотки . . . . .	345	<i>Протокол 20.1. Замораживание клеток</i> . . . . .	372
18.5.4. Онкогены . . . . .	346	20.3.6. Протоколирование работы морозильника . . . . .	373
<b>18.6. Туморогенность</b> . . . . .	<b>346</b>	<i>Протокол 20.2. Размораживание замороженных клеток</i> . . . . .	374
18.6.1. Малигнизация . . . . .	346	20.3.7. Размораживание хранившихся ампул . . . . .	374
18.6.2. Опухолевая трансплантация . . . . .	347	<b>20.4. Планирование и контроль замораживания культур клеток</b> . . . . .	<b>377</b>
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	<b>20.5. Банки клеток</b> . . . . .	<b>378</b>
<b>ГЛАВА 19. КОНТАМИНАЦИЯ</b> . . . . .	<b>350</b>	<b>20.6. Транспортировка клеточных культур</b> . . . . .	<b>379</b>
<b>19.1. Источники контаминации</b> . . . . .	<b>350</b>	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	<b>ГЛАВА 21. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ</b> . . . . .	<b>380</b>
19.1.3. Использование и поддержание в рабочем состоянии ламинарного шкафа . . . . .	350	<b>21.1. Подсчет клеток</b> . . . . .	<b>380</b>
19.1.4. Инкубаторы с увлажнением . . . . .	353	21.1.1. Гемоцитометр . . . . .	380
<i>Протокол 19.1. Обработка инкубаторов</i> . . . . .	353	<i>Протокол 21.1. Подсчет клеток при помощи гемоцитометра</i> . . . . .	380
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</i> . . . . .	384
19.1.7. Привезенные клеточные линии и биопсийные образцы . . . . .	354	21.1.3. Окрашенные монослои . . . . .	386
19.1.8. Карантин . . . . .	354	<b>21.2. Вес клеток</b> . . . . .	<b>386</b>
<b>19.2. Виды микробной контаминации</b> . . . . .	<b>354</b>		
<b>19.3. Контроль контаминации</b> . . . . .	<b>355</b>		

<b>21.3. Содержание ДНК</b> .....	<b>386</b>	<i>Протокол 22.3. Клоногенный анализ</i>	
<b>21.4. Белок</b> .....	<b>386</b>	<i>прикрепившихся клеток</i> .....	410
21.4.1. Солюбилизация образца .....	387	22.3.3. Анализ, основанный на клеточной	
<b>21.5. Скорость синтеза</b> .....	<b>387</b>	пролиферации .....	413
21.5.1. Синтез ДНК .....	387	22.3.4. Метаболический анализ	
<i>Протокол 21.3. Оценка содержания ДНК</i>		цитотоксичности .....	413
<i>с использованием красителя НОЕСНСТ 33258</i> ...	387	22.3.5. Микротитрационный анализ .....	413
<i>Протокол 21.4. Оценка содержания белка</i>		<i>Протокол 22.4. Оценка цитотоксичности</i>	
<i>методом Брэдфорда</i> .....	387	<i>при помощи МТТ-теста</i> .....	414
<i>Протокол 21.5. Оценка уровня синтеза ДНК</i>		22.3.6. Сравнительная оценка	
<i>методом включения Н<sup>3</sup>-тимидиновой метки</i> .....	388	микротитрационного и клоногенного	
21.5.2. Синтез белка .....	389	анализа выживания .....	417
<i>Протокол 21.6. Синтез белка</i> .....	389	22.3.7. Взаимодействие лекарственных	
<b>21.6. Приготовление образцов</b>		препаратов .....	417
<b>для ферментного и иммуноферментного</b>		<b>22.4. Применение исследования</b>	
<b>анализа</b> .....	<b>390</b>	<b>цитотоксичности</b> .....	<b>418</b>
<b>21.7. Цитометрия</b> .....	<b>390</b>	22.4.1. Скрининг противораковых	
21.7.1. Мечение <i>in situ</i> .....	390	препаратов .....	418
21.7.2. Проточная цитометрия .....	390	22.4.2. Прогностические исследования	
<b>21.8. Увеличение количества образцов</b>		противоопухолевых препаратов .....	418
<b>для статистического анализа</b> .....	<b>390</b>	22.4.3. Фармацевтическое тестирование .....	419
21.8.1. Получение данных .....	391	<b>22.5. Трансформация и мутагенез</b> .....	<b>419</b>
21.8.2. Анализ данных .....	391	22.5.1. Анализ мутагеназа методом обмена	
<b>21.9. Клеточная пролиферация</b> .....	<b>391</b>	сестринских хроматид .....	419
21.9.1. Планирование эксперимента .....	391	<i>Протокол 22.5. Обмен сестринских хроматид</i> .....	419
21.9.2. Цикл роста .....	392	22.5.2. Канцерогенность .....	421
<i>Протокол 21.7. Кривая роста монослоя</i>		<b>22.6. Воспаление</b> .....	<b>422</b>
<i>во флаконах</i> .....	393	<b>ГЛАВА 23. КУЛЬТУРЫ СПЕЦИФИЧЕСКИХ</b>	
<i>Протокол 21.8. Кривая роста монослоя</i>		<b>ТИПОВ КЛЕТОК</b> .....	<b>423</b>
<i>в многолуночном планшете</i> .....	394	<b>23.1. Клеточные культуры</b>	
21.9.3. Анализ кривой роста монослоя .....	395	<b>специализированных</b>	
21.9.4. Объем среды, концентрация		<b>клеток</b> .....	<b>423</b>
и плотность клеток .....	396	<b>23.2. Эпителиальные клетки</b> .....	<b>423</b>
21.9.5. Суспензионные культуры .....	396	23.2.1. Эпидермис .....	424
21.9.6. Фазы цикла роста .....	397	<i>Протокол 23.1. Эпидермальные кератиноциты</i> .....	425
<i>Протокол 21.9. Кривая роста суспензионной</i>		23.2.2. Роговица .....	428
<i>культуры</i> .....	397	<i>Протокол 23.2. Эпителиальные клетки роговицы</i> .....	429
21.9.7. Данные, получаемые при исследовании		<i>Протокол 23.3. Эпителий молочной железы</i> .....	430
кривой роста .....	399	23.2.3. Молочная железа .....	430
<b>21.10. Эффективность культивирования</b> .....	<b>399</b>	23.2.4. Шейка матки .....	431
<i>Протокол 21.10. Определение эффективности</i>		<i>Протокол 23.4. Цервикальный эпителий</i> .....	431
<i>посева на чашках Петри</i> .....	400	23.2.5. Желудочно-кишечный тракт .....	433
21.10.1. Анализ формирования колоний .....	401	<i>Протокол 23.5. Выделение и культивирование</i>	
21.10.2. Автоматический счетчик колоний .....	402	<i>клеток крипт толстого кишечника</i> .....	434
<i>Протокол 21.11. Индекс мечения Н<sup>3</sup>-тимидином</i> .....	402	23.2.6. Печень .....	435
<b>21.11. Индекс мечения</b> .....	<b>403</b>	<i>Протокол 23.6. Выделение гепатоцитов крысы</i> .....	436
21.11.1. Фракция пролиферирующих		23.2.7. Поджелудочная железа .....	437
клеток .....	404	<i>Протокол 23.7. Поджелудочный эпителий</i> .....	437
21.11.2. Митотический индекс .....	404	23.2.8. Почка .....	438
21.11.3. Индекс пролиферации .....	404	<i>Протокол 23.8. Эпителий почки</i> .....	439
<i>Протокол 21.12. Определение фракции</i>		<i>Протокол 23.9. Бронхиальный и трахеальный</i>	
<i>пролиферирующих клеток</i> .....	404	<i>эпителий</i> .....	440
<b>21.12. Время клеточного цикла</b> .....	<b>405</b>	23.2.9. Бронхиальный и трахеальный	
<b>21.13. Клеточная миграция</b> .....	<b>405</b>	эпителий .....	440
<b>ГЛАВА 22. ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ</b> .....	<b>406</b>	23.2.10. Эпителий ротовой полости .....	441
<b>22.1. Жизнеспособность, токсичность</b>		<i>Протокол 23.10. Кератиноциты ротовой</i>	
<b>и выживаемость</b> .....	<b>406</b>	<i>полости</i> .....	441
<b>22.2. Ограничения <i>in vitro</i></b> .....	<b>407</b>	<i>Протокол 23.11. Эпителий простаты</i> .....	442
<b>22.3. Природа исследований</b> .....	<b>407</b>	23.2.11. Простата .....	442
22.3.1. Жизнеспособность .....	407	<b>23.3. Мезенхимные клетки</b> .....	<b>444</b>
<i>Протокол 22.1. Оценка жизнеспособности</i>		23.3.1. Соединительная ткань .....	444
<i>методом отторжения красителя</i> .....	408	23.3.2. Жировая ткань .....	444
<i>Протокол 22.2. Оценка жизнеспособности</i>		<i>Протокол 23.12. Первичная культура</i>	
<i>методом поглощения красителя</i> .....	408	<i>адипоцитов</i> .....	445
22.3.2. Выживаемость .....	409		

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

<b>26.2. Крупномасштабное производство монослойных культур</b> .....	<b>510</b>	<i>Протокол 27.13. Устойчивая трансфекция методом электропорации</i> .....	553
26.2.1. Многослойные пропэгаторы (культиваторы).....	510	27.11.4. Другие методы переноса ДНК.....	554
<i>Протокол 26.2. Система NUNC CELL FACTORY</i> .....	511	27.11.5. Репортерные гены.....	555
26.2.2. Многоцелевые диски, спирали и пробирки.....	512	<i>Протокол 27.14. Окраска in situ на <math>\beta</math>-галактозидазу</i> .....	555
26.2.3. Роллерные культуры.....	512	<i>Протокол 27.15. Определение активности хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT ASSAY)</i> .....	556
<i>Протокол 26.3. Роллерная бутылочная культура</i> ...	514		
26.2.4. Микроносители.....	514		
<i>Протокол 26.4. Микроносители</i> .....	516		
26.2.5. Макроносители.....	516		
26.2.6. Перфузионные монослойные культуры.....	516		
<b>26.3. Контроль процесса</b> .....	<b>518</b>		
<b>ГЛАВА 27. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ</b> .....	<b>520</b>	<b>ГЛАВА 28. РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ</b> .....	<b>557</b>
<b>27.1. Методы выделения и исследования лимфоцитов</b> .....	<b>520</b>	<b>28.1. Медленный рост клеток</b> .....	<b>557</b>
<i>Протокол 27.1. Приготовление лимфоцитов</i> .....	520	28.1.1. Проблемы, ограниченные вашими собственными исходными культурами.....	557
27.1.1. Бласттрансформация.....	521	28.1.2. Более общие проблемы, возникающие и у других сотрудников.....	557
<b>27.2. Авторадиография</b> .....	<b>521</b>	28.1.3. Не было ли у вас в лаборатории каких-либо изменений?.....	558
<i>Протокол 27.2. ФГА-стимуляция лимфоцитов</i> .....	521	<b>28.2. Среда</b> .....	<b>558</b>
<i>Протокол 27.3. Микрорадиография</i> .....	522	28.2.1. Выбор среды.....	559
<b>27.3. Съёмка в режиме замедленного времени</b> .....	<b>526</b>	28.2.2. Нестабильные реактивы.....	559
<i>Протокол 27.4. Видеозапись в замедленном режиме времени</i> .....	526	<b>28.3. Чистота составляющих частей</b> .....	<b>560</b>
<b>27.4. Конфокальная микроскопия</b> .....	<b>528</b>	28.3.1. Правильно ли работает система очистки воды?.....	560
<b>27.5. Синхронизация клеток</b> .....	<b>528</b>	28.3.2. Бикарбонат.....	560
27.5.1. Разделение клеток.....	528	28.3.3. Антибиотики.....	560
27.5.2. Блокирование клеточного цикла.....	529	28.3.4. Сыворотка.....	560
<b>27.6. Культура амниоцитов</b> .....	<b>529</b>	<b>28.4. Пластиковая посуда</b> .....	<b>560</b>
<i>Протокол 27.5. Культура амниоцитов</i> .....	529	<b>28.5. Стеклопосуда</b> .....	<b>561</b>
<b>27.7. Культуры клеток пойкилотермных животных</b> .....	<b>534</b>	28.5.1. Мытье посуды.....	561
27.7.1. Клетки рыб.....	535	<b>28.6. Микробиологическая контаминация</b> .....	<b>561</b>
<i>Протокол 27.6. Культуры клеток эмбриона полосатого даио</i> .....	536	28.6.1. Контаминация, ограниченная одним исследователем.....	561
27.7.2. Клетки насекомых.....	538	28.6.2. Распространенная контаминация.....	562
<i>Протокол 27.7. Культуры клеток насекомых</i> .....	538	28.6.3. Идентификация контаминации.....	563
<b>27.8. Молекулярная гибридизация in situ</b> .....	<b>539</b>	28.6.4. Деконтаминация.....	563
27.8.1. Анализ экспрессии генов РНК методом гибридизации in situ.....	539	<b>28.7. Химическая контаминация</b> .....	<b>563</b>
<i>Протокол 27.8. Авторадиографическая гибридизация in situ</i> .....	539	28.7.1. Стеклопосуда.....	563
27.8.2. Флюоресцентная гибридизация in situ (FISH) при анализе генов и хромосом.....	543	28.7.2. Пипетки.....	563
<i>Протокол 27.9. FISH с использованием однокопийных геномных зондов и хромосомных красителей</i> .....	543	28.7.3. Очистка воды.....	564
<b>27.9. Слияние соматических клеток</b> .....	<b>545</b>	28.7.4. Другие реактивы.....	564
<i>Протокол 27.10. Гибридизация клеток</i> .....	545	28.7.5. Порошки и аэрозоли.....	564
27.9.1. Ядерный перенос.....	547	<b>28.8. Первичная культура</b> .....	<b>564</b>
<b>27.10. Продукция моноклональных антител</b> .....	<b>547</b>	28.8.1. Низкий выход клеток в первичной культуре.....	564
<i>Протокол 27.11. Продукция моноклональных антител</i> .....	548	28.8.2. Неверно выбраны клетки.....	565
<b>27.11. Перенос ДНК</b> .....	<b>551</b>	28.8.3. Контаминация.....	565
27.11.1. Копреципитация с фосфатом кальция.....	551	<b>28.9. Дифференцировка</b> .....	<b>565</b>
27.11.2. Липофекция.....	551	28.9.1. Клетки не дифференцированы.....	565
<i>Протокол 27.12. Транзиторная трансфекция методом липофекции</i> .....	552	28.9.2. Снижение образования продукта.....	565
27.11.3. Электропорация.....	553	<b>28.10. Смена среды</b> .....	<b>565</b>
		28.10.1. Обычные монослои.....	565
		28.10.2. Клоны.....	565
		<b>28.11. Субкультура</b> .....	<b>566</b>
		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
		<b>28.12. Клонирование</b> .....	<b>566</b>
		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	<b>ГЛАВА 29. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>571</b>
28.12.5. Неприкрепляющиеся клетки.....	567		
<b>28.13. Перекрестная контаминация .....</b>	<b>567</b>	<b>Приложение I. ПРИГОТОВЛЕНИЕ</b>	
28.13.1. Симптомы перекрестной		<b>РЕАКТИВОВ .....</b>	<b>572</b>
контаминации .....	567		
28.13.2. Предупреждение перекрестной		<b>Приложение II. ИСТОЧНИКИ</b>	
контаминации .....	568	<b>ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ .....</b>	<b>579</b>
28.13.3. Элиминация перекрестной			
контаминации .....	568	<b>Приложение III. ПРОИЗВОДИТЕЛИ</b>	
<b>28.14. Криоконсервация .....</b>	<b>568</b>	<b>ПРОДУКЦИИ И ДРУГИЕ ИСТОЧНИКИ .....</b>	<b>601</b>
28.14.1. Плохое восстановление .....	568		
28.14.2. Изменение внешнего вида культуры		<b>Приложение IV. СЛОВАРЬ</b>	
после криоконсервации .....	568	<b>УПОТРЕБЛЯЕМЫХ ТЕРМИНОВ</b>	
28.14.3. Контаминация .....	569	<b>[по Schaeffer, 1990] .....</b>	<b>633</b>
28.14.4. Утрата рабочей культуры .....	569		
<b>28.15. Грануляция клеток .....</b>	<b>569</b>	<b>Приложение V. ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА ..</b>	<b>640</b>
<b>28.16. Подсчет клеток .....</b>	<b>569</b>	<b>Список литературы .....</b>	<b>641</b>
28.16.1. Гемоцитометр.....	569		
28.16.2. Электронный счетчик клеток		<b>Предметный указатель .....</b>	<b>689</b>
посредством измерения			
сопротивления при пропускании			
через дроссель .....	569		
<b>28.17. Жизнеспособность .....</b>	<b>570</b>		
28.17.1. Морфологические признаки.....	570		
28.17.2. Определение жизнеспособности.....	570		
28.17.3. Цитотоксичность .....	570		

# Список рисунков

- 1.1. Рост количества публикаций по культуре тканей
- 1.2. Области применения культуры тканей
- 1.3. Типы клеточных культур
- 2.1. Упражнение по замораживанию
- 3.1. Клеточная адгезия
- 3.2. Межклеточные контакты
- 3.3. Рост клеток A549 на матрикеле
- 3.4. Клеточный цикл
- 3.5. Регуляции клеточного цикла
- 3.6. Дифференцировка из стволовых клеток
- 3.7. Клеточное взаимодействие и передача сигнала
- 3.8. Развитие клеточной линии
- 3.9. Количество хромосом в клетках конечной и постоянной клеточных линий
- 4.1. Небольшая лаборатория культивирования тканей
- 4.2. Лаборатория культивирования тканей средних размеров
- 4.3. Лаборатория культивирования тканей с прилегающими препаративными комнатами
- 4.4. Большая лаборатория культивирования тканей
- 4.5. Термальная комната
- 4.6. Раковина для мойки и моечная машина для пипеток
- 4.7. Хранилище для жидкого азота и морозильное оборудование
- 5.1. Ламинарный шкаф
- 5.2. Удаление среды с помощью насоса
- 5.3. Вакуумный насос Integra
- 5.4. Инвертированный микроскоп
- 5.5. Пипетирующее устройство
- 5.6. Автоматическая пипетка (пипеттор)
- 5.7. Градуированный бутылочный диспенсер
- 5.8. Пипетка с многократно дозируемым объемом
- 5.9. Автоматический диспенсер
- 5.10. Многоканальная пипетка
- 5.11. Автоматическое заполняющее устройство
- 5.12. Планшетный сканер
- 5.13. Устройство для переноса
- 5.14. Замкнутая телевизионная система
- 5.15. CO<sub>2</sub>-инкубатор
- 5.16. Устройство CO<sub>2</sub>-инкубатора
- 5.17. Очиститель воды
- 5.18. Настольный автоклав
- 5.19. Напольный автоклав
- 5.20. Диспенсер, соединяющийся с бутылкой
- 5.21. Моечная машина для стекла
- 5.22. Микроманипуляторы и подогреваемый столик
- 6.1. Возможность заражения
- 6.2. Возможное расположение оборудования в рабочей зоне ламинарного шкафа
- 6.3. Плохо организованное расположение предметов в рабочей зоне
- 6.4. Планировка рабочей зоны в ламинарном шкафу с горизонтальным воздушным потоком
- 6.5. Планировка рабочей зоны на открытом столе
- 6.6. Способ удерживания груши и крышки от флакона в руке
- 6.7. Воздушные потоки в ламинарном шкафу
- 6.8. Стакан для слива
- 6.9. Правильное введение пипетки в пипетирующее устройство
- 6.10. Чашки Петри в коробке
- 6.11. Заполнение флакона газом
- 7.1. Переполненные цилиндры для использованных пипеток
- 7.2. Правильное введение пипетки в пипетирующее устройство
- 7.3. Хомут для баллона
- 7.4. Колба для спиртовой стерилизации инструментов
- 7.5. Ламинарный шкаф биологической безопасности
- 8.1. Количество клеток и площадь поверхности
- 8.2. Многолуночные плашки
- 8.3. Чашки Петри
- 8.4. Пластиковые флаконы
- 8.5. Многопластинчатый флакон
- 8.6. Маленькие флаконы с перемешиванием
- 8.7. Вентилируемые чашки Петри
- 8.8. Вентилируемые флаконы
- 8.9. Пузырьки и флаконы с закручивающимися крышками
- 8.10. Случайный рост
- 8.11. Культивирование на полых волокнах
- 8.12. Морфология фидерных слоев
- 9.1. Осмометр
- 11.1. Мытье и стерилизация лабораторного стекла
- 11.2. Механические щетки для мытья бутылок
- 11.3. Стерилизованные бутылки
- 11.4. Сифонное моеющее устройство для пипеток
- 11.5. Мытье и стерилизация пипеток
- 11.6. Полуавтоматическое устройство для затыкания пипеток ватными пробками (Bellco)
- 11.7. Стерилизационный шкаф
- 11.8. Упаковка закручивающихся крышек для стерилизации



- 11.9. Отношения между давлением и температурой
- 11.10. Очистка воды
- 11.11. Стерилизация фильтрацией
- 11.12. Одноразовые стерилизационные фильтры
- 11.13. Фильтрационная установка большой мощности
- 11.14. Фильтрация при помощи перистальтического насоса
- 11.15. Крупномасштабная стерилизация фильтрацией с использованием большого встроенного комплекта фильтров
- 11.16. Фильтры многократного использования
- 11.17. Предварительный фильтр
- 12.1. Общий вес и выход клеток мышинового эмбриона
- 12.2. Мышиные эмбрионы
- 12.3. Препарирование мыши
- 12.4. Извлечение куриного эмбриона из яйца
- 12.5. Варианты первичной культуры
- 12.6. Культура первичного эксплантата
- 12.7. Деагрегация с помощью теплого трипсина
- 12.8. Клеточное сито
- 12.9. Деагрегация в холодном трипсине
- 12.10. Теплая и холодная трипсинизация
- 12.11. Препарирование куриного эмбриона
- 12.12. Деагрегация ткани с помощью коллагеназы
- 12.13. Механическая деагрегация
- 13.1. Плохое состояние культуры
- 13.2. Кривая роста и поддержание культуры
- 13.3. Субкультивирование монослоя
- 13.4. Серийное субкультивирование
- 13.5. Перемешиваемая культура
- 13.6. Параллельные культуры и антибиотики
- 14.1. Изменение числа клеток при клонировании
- 14.2. Клонирование с разведением
- 14.3. Клонирование в планшетах для микротитрации
- 14.4. Фидерные слои
- 14.5. Клонирование в суспензии
- 14.6. Клонирование в метилцеллюлозе
- 14.7. Кольца для клонирования
- 14.8. Выделение монослойного клона
- 14.9. Выделение суспензионных клонов
- 14.10. Селективные фидерные слои
- 14.11. Рост клеток меланомы, фибробластов и глии в суспензии
- 14.12. Рост клеток в смешанной культуре
- 15.1. Разделение клеток по их плотности
- 15.2. Устройство для создания градиента
- 15.3. Градиент, полученный с помощью центрифугирования
- 15.4. Центрифужный элютриаторный ротор (Beckman)
- 15.5. Разделительная камера элютриаторного ротора
- 15.6. Магнитный сортинг
- 15.7. Магнитный сортинг клеток (MACS® Technology)
- 15.8. Флюоресцентно-активируемый сортер клеток (FACS)
- 15.9. Проточная цитометрия
- 15.10. Распечатка, полученная после измерения на FACS II
- 16.1. Куполообразные образования
- 16.2. Примеры морфологии клеток в культуре
- 16.3. Культуральные сосуды для цитологии
- 16.4. Цитоцентрифуга
- 16.5. Цитологический фильтр
- 16.6. Приготовление препарата хромосом
- 16.7. Окрашивание хромосом
- 16.8. Препарат кариотип
- 16.9. ДНК-фингерпринтинг
- 16.10. Сиквенирование ДНК
- 16.11. Изучение профиля ДНК
- 16.12. Изоферментный электрофорез
- 16.13. Прибор для иммуноанализа Agilent
- 17.1. Регуляция дифференцировки
- 17.2. Реципрокное паракринное взаимодействие
- 18.1. Клональные вариации
- 18.2. Хромосомные aberrации
- 18.3. Фокусы трансформации
- 18.4. Совокупное количество периодов удвоения популяции (PD) иммортализованных клеток hTERT по сравнению со стареющими контрольными клетками
- 18.5. Ограничение клеточной пролиферации
- 18.6. Эксперимент с использованием сердца цыпленка
- 18.7. Инвазия в фильтрующей лунке
- 18.8. Активатор плазминогена (PA)
- 19.1. Типы контаминации
- 19.2. Детекция микоплазмы с помощью ПЦР
- 20.1. Кривая замораживания
- 20.2. Ампулы на стержне
- 20.3. Пробка для узкогорлого морозильника
- 20.4. Охлаждающее устройство Nalge Nunc Cooler
- 20.5. Программируемый морозильник
- 20.6. Морозильники с жидким азотом
- 20.7. Конструкция азотного морозильника
- 20.8. Замораживание клеток
- 20.9. Размораживание клеток
- 20.10. Серийное возобновление культуры
- 20.11. Контейнер для транспортировки клеток
- 21.1. Использование гемоцитометра
- 21.2. Электронный счетчик клеток CASY
- 21.3. Схема работы счетчика клеток CASY
- 21.4. Аналоговая распечатка результатов подсчета клеток на электронном счетчике CASY
- 21.5. Электронный счетчик клеток Beckman Coulter Vi-CELL
- 21.6. Кривая роста
- 21.7. Внешний вид многолуночных планшетов
- 21.8. Интерпретация кривой роста
- 21.10. Разведение клеток для клонирования
- 21.11. Линейность эффективности посева
- 21.12. Автоматический счетчик колоний
- 21.13. Индекс мечения
- 21.14. Направление сканирования препаратов или чашек
- 21.15. Фракции роста
- 22.1. Клоногенные исследования монослойных клеток
- 22.2. Кривая выживания
- 22.3. Интерпретация кривых выживания
- 22.4. Влияние фидерного слоя на долю выживания клеток

- 
- 22.5. Микротитрационное исследование
  - 22.6. Кривая ингибирования
  - 22.7. Продолжительность исследования
  - 22.8. Кривая падения IC50
  - 22.9. Корреляция между микротитрационным и клоногенным методами исследования выживания
  - 22.10. Органотипическое исследование
  - 23.1. Вид кровеносных сосудов в пупочном канатике человека
  - 23.2. Клетки сосудистого эндотелия в культуре
  - 23.3. Иссечение обонятельной луковицы
  - 23.4. Культура меланоцитов
  - 24.1. Конфлюэнтные фидерные слои
  - 24.2. Клеточные линии карциномы желудка
  - 24.3. Клеточные линии рака поджелудочной железы
  - 24.4. Культуры глиомы человека
  - 25.1. Влияние клеточной плотности на экспрессию GFAP в клетках C6
  - 25.2. Гистотипическая и органотипическая культура
  - 25.3. Органная культура
  - 25.4. Разделение клеток в сфероидах
  - 25.5. Вращающаяся камерная система
  - 25.6. Вращающаяся система для культуры клеток Synthecon Rotatory Cell Culture System
  - 25.7. Вкладыши в фильтровальный колодец
  - 25.8. Вкладыши Transwells
  - 25.9. Каркасы и матрицы
  - 25.10. MRI-мониторинг клеток в 3D конструктах
  - 25.11. MRI конструкта хряща
  - 26.1. Большой сосуд для перемешивания
  - 26.2. Перемешиваемая культура
  - 26.3. Биостат
  - 26.4. Ферментер с барботированием
  - 26.5. Аэратор культуры BelloCell
  - 26.6. Перфузия на полых волокнах
  - 26.7. Система Membroferm
  - 26.8. Система Nunc Cell Factory для культуры клеток
  - 26.9. Заполнение системы Nunc Cell Factory
  - 26.10. Система для культуры клеток Corning Cell-Cube
  - 26.11. Бутыли для ролерных культур на стеллажах
  - 26.12. Схема работы роллерной системы культуры
  - 26.13. Примеры бутылей для роллерных культур
  - 26.14. Барабанный роллерный аппарат
  - 26.15. Реакторы с неподвижным слоем
  - 26.16. Реакторы с псевдооживленным слоем
  - 26.17. Системы контроля биореактора
  - 26.18. ЯМР-анализ клеток
  - 27.1. Микроавторадиография
  - 27.2. Микроавторадиографы
  - 27.3. Гибридизация соматических клеток
  - 27.4. Получение гибридом
  - 27.5. Перенос ДНК

# Список цветных вкладок

1. Первичная культура, человеческая
2. Первичная культура, эксплантат, холодная трипсинизация и коллагеназа
3. Первичная культура, эмбрион цыпленка
4. Фазы ростового цикла
5. Субкультивирование методом трипсинизации
6. Клонирование клеток
7. Клонирование клеток. Морфологическое разнообразие
8. Конечные клеточные линии
9. Постоянные клеточные линии из опухоли человека
10. Постоянные клеточные линии из нормальных тканей животных
11. Иммунное окрашивание
12. Морфологическая дифференцировка эпителиальных клеток
13. Дифференцировка клеток Friend и глиальных клеток человека
14. Трансформация
15. Свойства трансформированных клеток
16. Примеры контаминации
17. Жизнеспособность и цитотоксичность
18. Сфероиды, инкапсуляция и микроносители
19. Органотипическая культура в фильтрующей лунке
20. Органотипическая культура кожи
21. Токсичность в органотипической модели *in vitro*
22. Приготовление среды, культуральные системы и флаконы для криоконсервации
23. Магнитноактивированный клеточный сортинг
24. Микроматричный анализ экспрессии генов (Affymetrix UK)

*Благодарю за помощь и поддержку на протяжении многих лет моих друзей и коллег. Без них не было бы этой книги.*

# Предисловие

Настоящее издание книги «Культура животных клеток» по структуре сходно с предыдущим изданием, но содержит некоторые значительные изменения. Введена новая глава «Тренировочные программы», которая по своему построению, так же как сноски и ссылки, должна облегчить использование этой книги преподавателями в качестве учебного пособия. Содержание данной главы предполагает овладение новыми практическими навыками учащимися или техническим персоналом, поэтому включает в некоторых протоколах как экспериментальные, так и расчетные элементы. Все это сделает процесс обучения интереснее, информативнее и несколько разнообразнее.

Приведенные в книге ссылки тщательно выверены и усовершенствованы. Отдельные разделы теперь имеют нумерацию, соответствующую нумерации главы. Биномиальная ссылка, например 4.1, означает гл. 4, раздел 1. Триномиальная ссылка 14.6.2 отсылает к гл. 14, разделу 6, подразделу 2. Поэтому первая цифра ссылки, независимо от того, относится она к тексту, таблице или иллюстрации, будет всегда означать соответствующую главу. Такая структура книги, в частности, вызвана необходимостью облегчить создание гиперссылок в будущей электронной версии книги, которая должна появиться на веб-сайте издательства Wiley ([www.wiley.com](http://www.wiley.com)) вскоре после выхода печатного издания.

Количество цветных вкладок увеличено вдвое. На рис. 16.2 представлены изображения примерно сорока различных клеточных линий, а также первичных культур, оборудования и стадий рабочего процесса. Я глубоко благодарен Ивонне Рейд и Грэггу Сайкису из АТСС, Питеру Трэвису из ЕСАСС и многим другим за любезно предоставленные новые иллюстрации. Надеюсь, что это воодушевит читателей, позволит им взглянуть на клетки, с которыми они работают, более внимательно и разовьет чуткость к любым изменениям, которые могут возникнуть в ходе повседневной работы.

В целом я сохранил акцент, который был в предыдущих редакциях, и сосредоточил внимание на основных методах работы с культурами животных клеток, описав особые приемы работы со специализированными культурами.

Эти методы приведены подробно, с использованием пошаговых протоколов, которые должны дать полную информацию о порядке проведения всей процедуры без обращения к другим литературным источникам. Каждому протоколу в книге предшествует вводный

материал, который дает теоретическое обоснование и дополнительную информацию для проведения альтернативных процедур и применения данного протокола. Некоторые основные понятия биологии объясняются в тексте, но подразумевается, что читатель обладает начальными знаниями в анатомии, гистологии, биохимии, клеточной и молекулярной биологии. Книга предназначена для тех, кто не имеет навыков или имеет незначительный опыт в работе с культурами тканей, включая лаборантов-исследователей, студентов старших курсов, дипломников, аспирантов и клиницистов, имеющих интерес к научно-исследовательской работе. Кажется нелогичным особо выделять молекулярные методы, тем более что точной границы между молекулярными и клеточными методами не существует.

Молекулярные методы, описанные в книге, имеют прямое отношение к культурам клеток. Не было даже попытки представить их все, поскольку такие методы доступно изложены в других работах [Samrook et al., 1989, Ausubel et al., 2002 и др.]. Тема повышения выхода клеточной массы близка области биотехнологии, и глава, посвященная этой проблеме, дает описание некоторых приемов и техник повышения количества получаемых клеток. Однако эта глава не рассматривает процессы производства биофармацевтической продукции.

Список оборудования и оснащения обновлен и ко времени публикации книги, надеюсь, еще будет соответствовать современному уровню. Однако меняются названия компаний, происходит слияние фирм, исчезают некоторые виды оборудования, поэтому достаточно трудно сохранять постоянство в этом отношении. Тем не менее я надеюсь, что в будущем этот аспект будет учитываться более эффективно на веб-сайте.

В тексте используются сокращения, которые приводятся отдельным списком после предисловия. Общеприняты такие условные обозначения, как D-PBSA (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ), UPW (сверхчистая вода, независимо от способа ее получения). Там, где это возможно, используются молярные концентрации. Реальным весом (в граммах) обычно пренебрегают, используя в списке питательных сред молярность, поскольку предполагается, что очень небольшое число людей попытается составлять собственные питательные среды из отдельных компонентов. Но возможно, что при необходимости сравнить компоненты будет полезным использовать молярные эквиваленты.

Протоколы выделены в тексте рамкой и особым фоном. Реагенты, специфические для данного отдельного протокола, указаны в материалах соответствующего протоколу раздела, прописи для общеупотребительных реагентов, таких как буферный раствор Хэнкса или трипсин, приводятся в Приложении II. Приложения также содержат подробные описания компаний, производящих реагенты, оборудование и другие ресурсы.

Как обычно, я должен выразить свою благодарность авторам, которые участвовали в разработке протоколов, а также помогали мне советами в тех областях, в которых мои знания несовершенны. Это Роберт Ауэрбах, Боб Браун, Кеннет Кельман, Ричард Хэм, Роб Хэй, Стэн Кей, Николь Кейт, Уолли Мак Киэн, Рона Мак Кай, Стефан Мерри, Джейн Плам, Питер Вогхэм, Поль Уокман, Роландж Графстрем и Джон Поль. Я был счастлив работать вместе с клиницистами Дэвидом И. Грэмом и Дэвидом Дж. Т. Томасом и Джоном Максвеллом Андерсеном.

На ранних этапах работы над книгой я получил большую пользу от бесед с Доном Дугласом, Питером Веккьо, Сергеем Федоровым и Майком Гэбриджем, Дженом Лундином, Джоном Райаном, Джимом Смитом и Чэрити Уэймаут. Я бесконечно благодарен Полю Чэпелю, который первым убедил меня в необходимости написать руководство по основным методам работы с культурами тканей и который недавно предложил перевести этот текст в мультимедийный формат и опубликовать в издательстве Wiley-Liss. Многие из иллюстраций этой книги были выполнены Джейн Джиллис и Мариной ла Дюк, хотя часть из них была заменена в связи с требованиями электронной публикации. Я очень признателен руководству Британских лабораторий Битсона по исследованию рака

за разрешение фотографировать их оборудование и использовать фотографии для иллюстрирования этой книги. Некоторые из данных, представленных в книге, были получены теми, кто работал со мной в течение многих лет, это: Шейла Браун, Ян Каннигэм, Лин Эванс, Маргарет Фрэйм, Элайн Харт, Кэрол Мак Кормик, Джон МакЛин, Элистар МакНэб, Диана Морган, Элисон Мюррей, Элисон Мэкки, Ирэн Оспрей, Мохаммед Зарин Хан и Наташа Евдокимова.

Мне посчастливилось получить отличные советы и поддержку от сотрудников издательства John Wiley&Sons. С искренней благодарностью я бы хотел упомянуть и всех тех, кто побеспокоился и прислал нам письма с своими советами и конструктивной критикой по поводу предыдущих редакций издания. Приятно и радостно слышать высказывания о том, что наша книга полезна, но еще более важно услышать от читателей критику по поводу недостатков книги, которые я попытаюсь учесть в дальнейшем. Можно лишь надеяться, что те из вас, кто использует книгу в работе, сохраняют в душе то же волнение, которое я ощущал, размышляя о будущих перспективах, открывающихся в этой области.

Я бы хотел поблагодарить мою дочь Джилиан и сына Норманна за помощь, которую они много лет назад оказывали мне в подготовке первого издания, за их постоянные советы и поддержку. Кроме того, я благодарен моей жене Мэри за те часы, которые она провела за составлением, правкой и другой работой. Без ее помощи и поддержки первоначальный текст никогда не был бы написан, и я не завершил бы подготовку этого переиздания к оговоренным срокам и не достиг бы необходимого уровня технической точности, которая является основным требованием хорошего руководства по культурам тканей.

*Ян Фрешни*

# Список сокращений

AFP	Альфа-фетопроtein	$\alpha$ -fetoprotein
Arg VP	Аргинин-вазопрессин	Arginin-Vasopressin
AST	Аспаратаминотрансфераза	Aspartate aminotransferase
ATCC	Американская коллекция культур клеток	American Type Culture Collection
BMP	Костный морфогенетический белок	Bone morphogenetic protein
bp	Нуклеотидная пара (нп)	Base pairs
BPE	Экстракт гипофиза быка	Bovine pituitare extract
bGH	Гормон роста быка	Bovine growth hormone
BrdU	Бромдезоксисуридин	Bromodeoxyuridin
BSA	Бычий сывороточный альбумин	Bovine Serum Albumine
BSL	Уровень биобезопасности	BioSafety Level
BSS	Сбалансированный солевой раствор	Balanced salt solution
BudR	Бромдеоксиуридин	Bromodeoxyuridine
CAM	Хориоаллантоисная мембрана	Chorioallantoic membrane
cAMP	Циклический аденозинмонофосфат	Cyclic adenosinmonophosphate
CAMs	Молекулы межклеточной адгезии	Cell adhesion molecules
CCD	Устройство с зарядовой связью	Charge-coupled device
CCTV	Встроенное телевизионное устройство	Closet-circuit television
CE	Эффективность клонирования	Cloning efficiency
CEA	Карциноэмбриональный антиген	Carcinoembryonic antigen
CMF	Солевой раствор без кальция и магния	Calcium- and magnesium –free saline
CMRL	Лаборатория Медицинских исследований Коннаута	Connaught Medical Research Laboratory
CPM	Число импульсов в минуту	Counts per minute
DAG	Диацилглицерин	Diacylglycerol
D-BPSB	Раствор $\text{Ca}^{2+}$ и $\text{Mg}^{2+}$ для добавления в D-PBSA	
DDAB	Диметилдиооктадециламмония бромид	Dimethyl dioctadecylammonium bromide
DEPC	Диэтилпиракарбонат	Diethyl pyrocarbonate
DHFR	Дигидрофолатредуктаза	Dihydrofolate reductase
DIC	Дифференциальный интерференционный контраст	Differential interference contrast
DMEM	Модификация Дюльбекко среды Игла	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Диметилсульфоксид	Dimetilsulphoxid
DOSPA	2,3-диолеилокси-N[2(сперминкарбокса- мид)этил]-N,N-диметил-1-пропанамин трифторацетат	2,3-dioleyloxy-N[2(spermincarboxamido) ethyl]-N,N-dimethyl-1-trifluoroacetate
DOPE	Диолеилфосфатидилэтаноламин	Dioleoylphosphatidylethanolamine
DOTMA	N-[1-(2,3диолеилокси)-пропил]-N,N,N- триметиламмония хлорид	N-[1-(2,3 dioleyloxy)-propyl]-N,N,N-tri- methylammonium chloride
D-PBS	Фосфатно-буферный солевой раствор Дюльбекко	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DPDE	Дифосфодиэфиры	Diphosphodiesters
DT	Время удвоения популяции	Doubling time population
DTT	Дитиотреитол	Dithiothreitol
EBSS	Сбалансированный солевой раствор Эрла	Earle's balanced salt solution

EBV	Вирус Эпштейна-Барра	Epstein-Barr virus
ECACC	Европейская коллекция животных культур клеток	European collection of Animal cell cultures
ECGF	Фактор роста эндотелиальных клеток	Endothelial cell growth factor
ECM	Внеклеточный матрикс	Extracellular matrix
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота	Etylendiamintetraacetat Diaminoethane tetraacetic acid
EGF	Эпидермальный фактор роста	Epidermal growth factor
EGTA	Этиленгликоль-бис-(β-аминоэтилэфир)-4п-тетрауксусная кислота	Ethylene glycol-bis(β-aminoethylether)-N,n,n,n-tetraacetic acid
EM	Электронный микроскоп	Electrone microscope
EMA	Эпителиальный мембранный антиген	Epithelial membrane antigene
FBS	Эмбриональная бычья сыворотка	Fetal bovine serum
FCS	Эмбриональная сыворотка теленка	Fetal calf serum
FGF	Фактор роста фибробластов	Fibroblasts growth factor
G6PD	Глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Gal – C	Галактоцеребросид	Galactocerebroside
GFAP	Глиальный фибриллярный кислый белок	Glial fibrillary acidic protein
GLP	Хорошая лабораторная практика	Good laboratory practice
GMP	Хорошая производственная практика	Good manufacturing practice
GPDH	Глиальный фибриллярный кислотный протеин	Glial fibrillary acidic Protein
GRP	Гастрин-высвобождающий пептид	Gastrin-releasing peptide
H&E	Гематоксилин/эозин	Hematoxlin&eosin
HAT	Гипоксантин, аминоптерин, тимидин	Hypoxantine, aminopterin, thymidine
HBGF	Гепарин-связывающий фактор роста	Heparin binding growth factor
HBS	Нерес-забуференный солевой раствор	Hepes- buffered saline
HBSS	Сбалансированный солевой раствор Хэнкса	Hanks' balanced salt solution
HC	Гидрокортизон	Hydrocortisone
hCG,	Человеческий хориональный гонадотропин	Human chorionic gonadotropin
HEPA	Высокоэффективный дисперсный воздушный поток	High-efficiency particulate air
HES	Гидроксилэтиловый крахмал	Hydroxyethylstarch
HGPRT	Гипоксантин гуанозин фосфорибозил трансфераза	Hypoxantinguanosine phosphoribosyl transferase
Hgh	Человеческий гормон роста	Human growth hormone
HITES	Гидрокортизон, инсулин, трансферрин, эстрадиол и селен	Hydrocortisone, insuline, transferrin, estradiol and selenium
Hmfg	Глобулярный белок молока человека	Human milk fat globule protein
HPV	Вирус папилломы человека	Human papilloma virus
Hspgs	Гепарансульфатпротеогликаны	Heparan sulfate proteoglycans
Ht	Гипоксантин/тимидин	Hypoxantine/timidine
ICAM	Межклеточная молекула адгезии клеток	Intercellular cell adhesion molecule
ISO	Международная организация стандартизации	International standardization organization
Its	Инсулин, трансферрин, селен	Insulin, transferrin, selen
IUdr	Иод-дезоксисуридин	Iododeoxiuridin
Kbm	Основная среда для кератиноцитов	Keratinocyte basal medium
Kdm	Селективная среда для выделения кератиноцитов	Keratinocyte-defined medium
Kgm	Среда для роста кератиноцитов	Keratinocyte growth medium
LI	Индекс мечения	Labeling index
M199	Среда 199	Medium 199
Маа	Микроматричный анализ	Microarray analysis,
MACs	Искусственные хромосомы млекопитающих	Mammalian artificial chromosomes
MACS	Магнитно-активируемый клеточный сортинг	Magnetic-activated cell sorting

Md	Малатдегидрогеназа	Malate dehydrogenase
MEM	Минимальная питательная среда игла	Eagle's minimal essential medium
MPI	Манноза-6-фосфат-изомераза	Mannose-6-phosphate isomerase
MSC	Микробиологические боксы биологической безопасности	Microbiological safety cabinet
NBCS	Сыворотка новорожденного теленка	Newborn calf serum
NCI	Государственный институт рака	National cancer institute
NP	Нуклеозидфосфорилаза	Nucleoside phosphorylase
NSE	Нейрон-специфическая эналаза	Neuron-specific enolase
O.D.	Оптическая плотность	Optical density
PA	Активатор плазминогена	Plasminogen activator
PBS	Фосфатно-буферный раствор	Phosphate-buffered saline
PBSA	Фосфатно-буферный раствор — а	Phosphate-buffered saline-a
PBSB	Фосфатно-буферный раствор — в	Phosphate-buffered saline-b
PCA	Перхлорная кислота	Perchloric acid
PCR	Полимеразная цепная реакция	Polymerase chain reaction
PCR	Фосфокреатин	Phosphocreatine
PDE	Фосфодиэфиры	Phosphodiesters
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста	Platelet-derived growth factor
PDT	Время удвоения популяции	Population doubling time
Pe	Эффективность культивирования	Plate efficiency
PE	Фосфатно-буферный раствор — а/эдта	Pbsa/edta
PEG	Полиэтиленгликоль	Polyethyleneglycol
PeP b	Пептидаза b	Peptidase b
PGA	Полигликолевая кислота	Polyglycolic acid
Pla	Полимолочная кислота	Polylactic acid
Pma	Форбол-миристиновокислая соль уксусной кислоты	Phorbol myristate acetate
Pme	Фосфомоноэфиры	Phosphomonoesters
Ptfe	Политетрафторэтилен	Polytetrafluorethylene
Pvp	Поливинилпирролидон	Polyvinylpyrrolidone
PHA	Фитогемагглютинин	Phytohemagglutinin
PWM	Митоген лаконоса	Pokeweed mitogen
Rt-pcr	ПЦР, основанная на использовании обратной транскриптазы	Reverse transcriptase pcr
Sces	Обмен сестринских хроматид	Sister chromatide exchange
Scid	Тяжелый комбинированный иммунодефицит	Severe combine immunodeficite syndrome
Sclc	Мелкоклеточная карцинома легких	Small cell lung cuncer
Sd	Плотность насыщения	Saturation density
SDS	Додecilсульфат натрия	Sodium dodecyl sulfate
Se	Эффективность посева	Seeding efficiency
Sit	Селен, инсулин, трансферрин	Selen, insulin, transferrin
Skdm	Селективная среда с добавками для выделения кератиноцитов	Supplemented kdm
Sls	Лаурилсульфат натрия	Sodium lauryl sulfate
Ssc	Цитрат натрия/хлорид натрия	Sodium citrate/sodium chloride
Sv40	Вирус обезьяны 40	Simian virus 40
Sv40lt	Ген sv40 для большого т-антигена	Sv40 gene for large t-antigene
Teb	Буфер трис/эдта	Tris/edta buffer
Teer	Трансэпителиальное электрическое сопротивление	Transepithelial electrical resistance
Tgf	Трансформирующий фактор роста	Transforming growth factor
Tk	Тимидинкиназа	Thymidine kinase
Toc	Общий органический углерод	Total organic carbone
UPW	Сверхчистая вода	Ultra pure water
VEGF	Фактор роста сосудистого эндотелия	Vascular endotelial growth factor
Vntrs	Вариабельное число tandemных повторов	Variable number tandem repeats
Yacs	Искусственные хромосомы дрожжей	Yeast artificial chromosomes



СОП	Стандартная операционная процедура
МЦ	Метилцеллюлоза
ТХУ	Трихлоруксусная кислота
ФГА	Фитогемагглютинин
Pi	Внеклеточный неорганический фосфор
УФ	Ультрафиолет
Птфэ	Политетрафторэтилен
ССР	Сбалансированный солевой раствор
мкм	Микрометр
мл	Миллилитр
мм	Миллиметр
кг	Килограмм
кПа	Килопаскаль

# Глава 1

## ВВЕДЕНИЕ

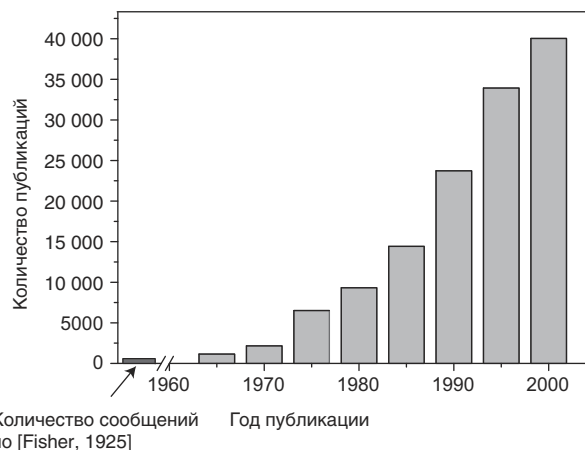
### 1.1. ИСТОРИЯ ВОПРОСА

Техника культуры ткани была впервые задумана и разработана в начале двадцатого века [Harrison, 1907; Carel, 1912] (табл. 1.1) для изучения свойств животных клеток, свободных от системных влияний, возникающих *in vivo* как при нормальном гомеостазе, так и в условиях стресса, вызванного экспериментом. Как видно из названия, эта технология первоначально разрабатывалась для незазагреегированных фрагментов тканей; рост культуры был ограничен возможностью миграции клеток из кусочка ткани и нерегулярностью митозов в первичном разрастании. Культивирование клеток из такого первичного эксплантата тканей доминировало в данной области более 50 лет [Fischer, 1925; Parker, 1961]. Поэтому неудивительно, что исходный термин «культура ткани» продолжает использоваться, несмотря на то что бурное развитие в этой области в течение второй половины XX в. (рис. 1.1) было связано с возможностью использования диспергированных клеточных культур.

Впервые возможность дезагрегации клеток эксплантата с последующим выращиванием на чашках диспергированных клеток была показана Роусом [Rous and Jones, 1916], хотя в то время чаще всего пересев культуры для создания клеточного штамма осуществляли путем оперативного отделения ее фрагмента. Первым клонированным клеточным штаммом был L929, выделенный из мышинных L-клеток методом капиллярного клонирования [Sanford et al., 1948]. В 1950-х годах для анализа вирусных бляшек на монослое клеточных культур Дюльбекко [Dulbecco, 1952] описал метод получения монослойных культур с использованием трипсина, который стал затем широко применяться в практике культивирования. Возможность создания клеточной суспензии из единичной клетки, полученной путем предварительной трипсинизации эксплантата, способствовала дальнейшему развитию клонирования клеточных линий. Первая постоянно пересеваемая клеточная линия человеческого происхождения HeLa была получена Геом [Gey et al., 1952]. Впоследствии она была клонирована Паком [Puck and Marcus, 1955] с использованием облученного рентгеном фидерного слоя клеток. Культура тканей стала в то время шире использоваться благодаря появлению антибиотиков, которые позволили разработать долгоживущие клеточные линии. Тогда же появились

первые предупреждения о риске существования скрытой или антибиотико-резистентной контаминации долгоживущей культуры [Parker, 1961]. Пятидесятые годы были также годами разработки и создания многих питательных сред с определенным составом [Morgan et al., 1950; Parker et al., 1954; Eagle, 1955, 1959; Weymouth, 1959], которые в конечном итоге легли в основу разработки бессывороточных сред [Ham, 1963, 1965] (см. разд. 10.6).

В тексте этой книги термин *культура ткани* используется как обобщенный термин, обозначающий как органную, так и клеточные культуры. Термин *органная культура* подразумевает трехмерную культуру незазагреегированной ткани, сохраняющей полностью или частично все гистологические особенности этой ткани *in vivo*. Термин *клеточная культура* имеет отношение к культуре, полученной от диспергированной исходной ткани из первичной культуры или из клеточного штамма путем ферментативной, механической или химической дезагрегации. Термин *гистотипическая культура* подразумевает, что клетки реагрегировали или выросли с формированием трехмерной структуры, соответствующей таковой в ткани. Гистотипическая культура формируется путем культивирования при высокой плотности клеток в ячейке фильтра, вторичном росте монослоя во флаконе или на чашке, в суспензии в агаре, в условиях реального или смоделированного



**Рис. 1.1. Рост количества публикаций по культуре ткани.** Количество сообщений в PubMed начиная с 1965 г. Количество публикаций до 1960 г. приводится по библиографии Fisher [1925]

Таблица 1.1. Ключевые события в развитии методов культивирования тканей и клеток

Год/годы	Событие	Ссылка
1907	Рост <i>in vitro</i> нервного волокна эмбриона лягушки	Harrison, 1907
1912	Эксплантаты соединительной ткани цыпленка, сокращение сердечной мышцы в течение 2–3 месяцев	Carrel, 1912; Burrows, 1912
1916	Трипсинизация и субкультура эксплантата	Rous & Jones, 1916
1920–30-е	Субкультуры клеточных линий фибробластов	Carrel & Ebeling, 1923
1925–26	Дифференцировка в органной культуре <i>in vitro</i>	Strangeways & Fell, 1925, 1926
1940-е	Внедрение использования антибиотиков в культуре ткани	Keilova, 1948; Cruikshank & Lowbury, 1952
1943	Создание линии L-клеток мышечных фибробластов; первая постоянная клеточная линия	Earle et al., 1943
1948	Клонирование L-клеток	Sanford et al., 1948
1949	Выращивание вирусов в клеточной культуре	Enders et al., 1949
1952	Использование трипсина для воспроизведения культуры; метод вирусных бляшек	Dulbecco, 1952 Dulbecco, 1952
1952–1955	Создание первой линии клеток человека HeLa из цервикальной карциномы	Gey et al., 1952
1952	Трансплантация ядра	См. Briggs & King, 1960
1954	Контактное торможение клеточной подвижности в культуре фибробластов Противополиомиелитная вакцина Солка, полученная в культуре клеток почек обезьян	Abercrombie & Heaysman, 1954 см. Griffiths, 1991
1955	Клонирование клеток HeLa на гомологичном фидерном слое Разработка питательных сред. Необходимость сывороточных факторов роста в питательных средах	Puck & Marcus, 1955; Eagle, 1955, 1959; Sanford et al., 1955
Конец 1950-х	Понимание важности инфицирования микоплазмами (PPLO)	Harris, 1959; Coriell et al., 1958; Rothblat & Morton, 1959; Nelson, 1960
1961	Объяснение конечности времени жизни нормальных клеток человека. Клеточное слияние — гибридизация соматических клеток	Hayflick & Moorhead, 1961; Sorieul & Ephrussi, 1961
1962	Создание и трансформация линии ВНК21. Поддержание дифференцировки (опухоль гипофиза и надпочечника)	Macpherson & Stoker, 1962; Buonassisi et al., 1962; Yasamura et al., 1966; Sato & Yasamura, 1966
1963	ЗТЗ клетки и спонтанная трансформация	Todaro & Green, 1963
1964	Плюрипотентность эмбриональных клеток Селекция трансформированных клеток в агаре	Kleinsmith & Pierce, 1964; Macpherson & Montagnier, 1964
1964–1969	Бешенство. Противокраснушная вакцина в культуре фибробластов легкого человека WI-38	Wiktor et al., 1964; Andzaporidze, 1968
1965	Клонирование клеток китайского хомяка в бессывороточной среде Гетерокарион-гибрид: человек-мышь	Ham, 1965; Harris & Watkins, 1965
1966	Фактор роста нервов Дифференцировка гепатомы крысы	Levi-Montalcini, 1966; Thompson et al., 1966
1967	Эпидермальный фактор роста Перекрестная контаминация клетками HeLa Ограничение клеточной пролиферации суспензии плотности Клетки линии лимфобластомы	Hooper & Cohen, 1967; Gartler, 1967; Stoker & Rubin, 1967; Moore et al., 1967; Gerper et al., 1969; Miller et al., 1971
1968	Поддержание уровня дифференцировки в культуре нормальных миобластов. Клеточная пролиферация, независимая от подложки	Yaffe, 1968; Stoker et al., 1968
1969	Формирование колоний гематопозитических клеток	Metcalf, 1969; see also Metcalf, 1990
1970-е	Изобретение ламинарных шкафов	see Kruse et al., 1991; Collins & Kennedy, 1999
1973	Перенос ДНК, фосфат кальция	Graham & Van der Eb, 1973
1975	Фактор роста фибробластов. Гибридомы. Моноклональные антитела	Gospodarowicz et al., 1975
1976	Тотипотентные эмбриональные стволовые клетки. Добавление факторов роста к бессывороточной питательной среде	Kohler & Milstein, 1975; Illmensee & Mintz, 1976; Hayashi & Sato, 1976

Таблица 1.1. Ключевые события в развитии методов культивирования тканей и клеток (окончание)

Год/годы	Событие	Ссылка
1977	Подтверждение перекрестной контаминации многих линий клеток клетками HeLa	Nelson-Rees & Flandermeyer, 1977; Rheinwald & Green, 1975
1978	ЗТЗ фидерный слой и культура клеток кожи МСДВ-селективная бессывороточная среда Взаимодействие с матриксом Форма клетки и контроль роста	Ham & McKeehan, 1978; Gospodarowicz et al., 1978b; Reid & Rojkind, 1979; Folkman & Moscona, 1978
1980-е	Регуляция экспрессии генов. Онкогенез, злокачественность и трансформация	e.g., Darnell, 1982; см. Weinberg, 1989
1980	Матрикс саркомы EHS (Позже Matrigel™)	Hassell et al., 1980
1983	Регуляция клеточного цикла. Иммуортализация культуры с использованием SV40	Evans et al., 1983; см. также Nurse, 1990; Huschtscha & Holliday, 1983
1980–1987	Разработка многих специализированных клеточных линий	Peehl & Ham, 1980; Hammond et al., 1984; Knedler & Ham, 1987
1983	Реконструированная культура клеток кожи	Bell et al., 1983
1984	Продукция рекомбинантного тканетипичного активатора плазминогена в клетках млекопитающих	Collen et al., 1984
1990-е	Культура трансфицированных клеток в промышленном масштабе для нужд биофармацевтики	Butler, 1991
1991	Культура мезенхимальных стволовых клеток взрослого человека	Caplan, 1991
1998	Выращенный в культуре хрящ	Aigner et al., 1998
1998	Культура эмбриональных стволовых клеток человека	Thomson et al., 1998

отсутствия силы тяжести либо инфильтрации трехмерного матрикса, такого как коллагеновый гель. *Органотипическая культура* подразумевает такую же процедуру, но с соединением клеток различных линий, например эпидермальных кератиноцитов в комбинированной культуре с фибробластами кожи, в попытке создать *тканевой эквивалент*.

В свое время Харрисон [Harrison, 1907] выбрал лягушку как источник ткани главным образом потому, что она является холоднокровным животным, и соответственно, культивирование не требовало инкубации. Кроме того, поскольку регенерация тканей более распространена у низших позвоночных, он, возможно, предположил, что рост выделенного образца будет более успешным, чем для ткани млекопитающих. Хотя его метод вызвал новую волну интереса к культивированию тканей *in vitro*, лишь некоторые ученые последовали примеру Харрисона в выборе вида организма. Влияние медицины обусловило развитие интереса к теплокровным животным, у которых как нормальное развитие, так и патологические процессы аналогичны процессам, протекающим в организме человека. Доступность различных тканей, многие из которых хорошо росли в культуре, сделала излюбленным объектом для исследования эмбрион из куриного яйца; однако развитие экспериментального животноводства, в том числе создание инбредных линий грызунов, вывели млекопитающих на передний край. Хотя куриные эмбриональные ткани могли обеспечить разнообразные клеточные линии в первичной культуре, ткани грызунов имели ряд преимуществ

при создании постоянных клеточных линий [Earle et al., 1943], а также предоставили широкий спектр перевиваемых опухолей. Создание технологии трансгенных мышей [Beddington, 1992; Peat et al., 1992] при наличии хорошо изученного генома мыши дало новый импульс выбору этого животного в качестве излюбленной модели для исследований в области культуры тканей.

Когда было продемонстрировано, что клетки человеческих опухолей, такие как HeLa, также могут давать начало постоянным клеточным линиям [Geu et al., 1952], интерес к человеческим тканям значительно возрос. Этому интересу позже способствовали работы Леонарда Хейфлика по исследованию клеточного цикла [Hayflick & Moorhead, 1961] и потребности вирусологов и молекулярных генетиков, работающих с человеческими клетками и тканями. Культивирование человеческих клеток получило дальнейший стимул тогда, когда был разработан ряд различных бессывороточных селективных сред для специфичных типов клеток, таких как эпидермальные кератиноциты, клетки бронхиального эпителия, а также сосудистого эндотелия (см. разд. 10.2.1.). Эти среды в настоящее время доступны, хотя стоимость их остается еще достаточно высокой по сравнению со стоимостью обычной питательной среды.

В течение многих лет низшие позвоночные и беспозвоночные не рассматривались в качестве объектов для культивирования тканей, хотя уникальные аспекты их развития (высокая способность к регенерации амфибий, метаморфоз у насекомых) сделали их

привлекательными для исследований молекулярных основ развития организма. Относительно недавно потребности сельского хозяйства в области контроля над насекомыми-вредителями простимулировали развитие токсикологических и вирусологических исследований на насекомых. Разработка генных технологий позволила предположить, что создание клеточных линий насекомых с бакуловирусами и другими векторами может стать полезным для создания клеток-продуцентов в связи со способностью включения крупных геномных последовательностей в вирусную ДНК и снижением риска распространения патогенных вирусов человека. Кроме того, экономическая важность рыбоводства и загрязнение морей и пресноводных источников стимулировали изучение клеток и тканей рыб при нормальном их развитии и патологических процессах. Методы работы и приемы манипуляций с клетками не млекопитающих организмов являются продолжением развития методов работы, разработанных для культур клеток млекопитающих. Кроме того, для работы с клетками рыб и насекомых разработано ограниченное число доступных специальных коммерческих сред (см. разд. 27.7.1 и 27.7.2).

Типы исследований, в которых могут быть использованы культуры тканей, представлены на рис. 1.2:

- 1) исследование внутриклеточных процессов, например репликации и транскрипции дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), синтеза белка, энергетического метаболизма, а также метаболизма лекарственных веществ;
- 2) внутриклеточные потоки веществ, например РНК, перемещение гормональных рецепторных комплексов и возникающие в результате процессы передачи сигнала, а также мембранный транспорт;
- 3) взаимодействие с окружающей средой, например питание, инфицирование, цитотоксичность, канцерогенез, действие лекарственных препаратов и лиганд-рецепторное взаимодействие;

- 4) межклеточное взаимодействие, например морфогенез, паракринный контроль, кинетика клеточной пролиферации, метаболическая кооперация, клеточная адгезия и подвижность, взаимодействие с матриксом и органотипические модели для медицинского протезирования и процессов приживления;
- 5) генетика, включая геномный анализ в норме и патологии, генетические манипуляции, трансформация и иммортализация;
- 6) образование и секреция клеточных продуктов, биотехнология, создание биореакторов, получение конечного продукта, технология производства и выделения целевого продукта.

Процесс разработки клеточных культур многим обязан двум основным отраслям медицинских исследований: производству противовирусных вакцин и исследованию механизмов новообразований. Стандартизация условий исследований и клеточных линий для производства вакцин и исследования механизмов действия вирусов, без сомнения, обеспечили стремительное развитие современной технологии получения культуры тканей, в частности оборудования, обеспечивающего выход большого количества клеток, пригодных для биохимических исследований. Все эти технические усовершенствования стали возможными благодаря коммерческому производству подходящих сред, сывороток и повышению контроля загрязнения, путем добавки антибиотиков в среду и создания свободного от микроорганизмов оборудования с ламинарными потоками воздуха. Эти успехи технологического прогресса позволили внедрить культуру тканей в разные области научных интересов.

Дополнительный вес исследованиям на культурах тканей придают протесты различных обществ защиты прав животных, выступающих против необоснованного использования большого количества животных для проведения экспериментов. Общепринята идея о необходимости использования животных в ходе

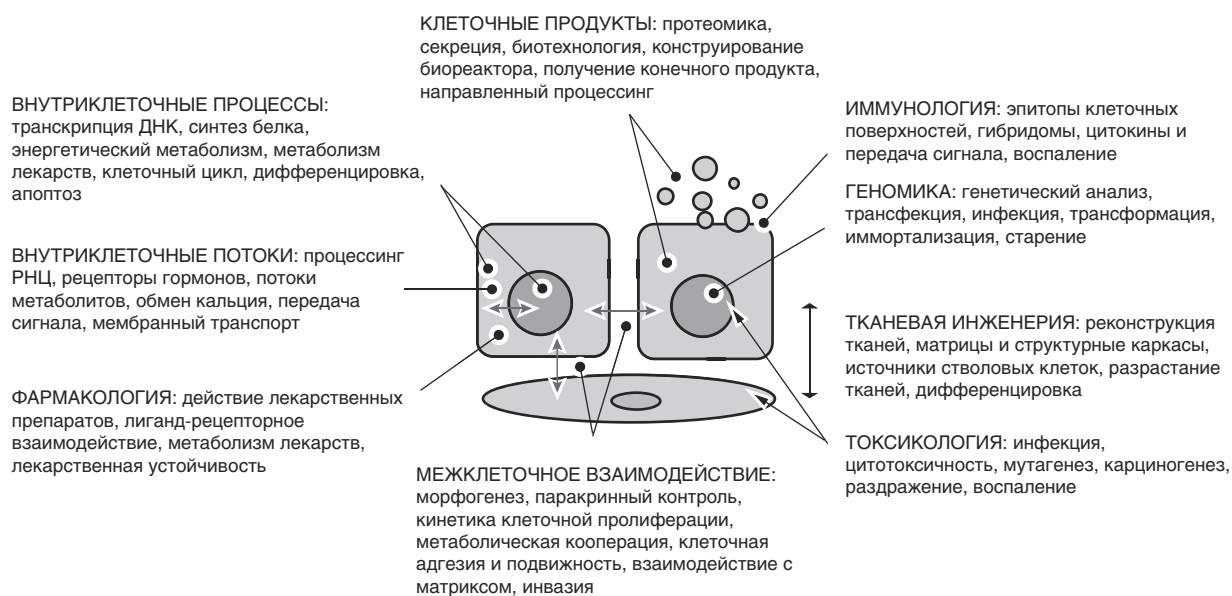


Рис. 1.2. Области применения культуры ткани

доклинических испытаний новых фармакологических препаратов, однако нет морального оправдания применению большого их количества в исследованиях косметических препаратов и других подобных экспериментах. Таким образом, сформировано и возрастает сообщество, в котором доминирует идея проведения наибольшего количества исследований *in vitro*, хотя эта идея связана с дополнительным подтверждением достоверности результатов и адекватностью модели *in vitro* процессам, протекающим в организме *in vivo*. Еще несколько лет назад перспектива перехода большинства исследований на модели *in vitro* казалась весьма отдаленной. Тем не менее появление более чувствительных методов анализа одновременно с совершенствованием технологий и оборудования сделало работу с культурами тканей доступной широкому кругу исследователей. Возможность исследования процессов воспаления *in vitro* обеспечила беспрецедентное расширение области применения культур тканей (см. разд. 22.4).

Помимо вирусологии и онкологии, от развития методов культуры тканей сильно зависят другие области исследования. Введение в методы клеточного слияния (гибридизации клеток, см. разд. 27.9.) и генетические манипуляции [Maniatis et al., 1978; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1996] определили генетический состав соматических клеток как основной компонент генетического анализа высших животных, включая человека. Широкий круг методов, используемых для генетической рекомбинации, в настоящее время включает перенос ДНК [Ravid & Freshney, 1998], монохромосомный перенос [Newbol & Cuthbert, 1998] и ядерный перенос [Kono, 1997], который дополнил метод соматической гибридации как инструмент генетического анализа и геной манипуляции. Перенос ДНК сам по себе породил много различных вариаций внесения ДНК в культуру клеток, включая использование фосфатно-кальциевой копреципитации, липофекции, электропорации и ретровирусное инфицирование (см. разд. 27.11).

Особенно бурное развитие генетика человека получила при реализации проекта Геном Человека [Baltimore, 2001]. Данные, полученные в ходе этих исследований, обусловили развитие методов анализа экспрессии множественных генов [Iyer et al., 1999].

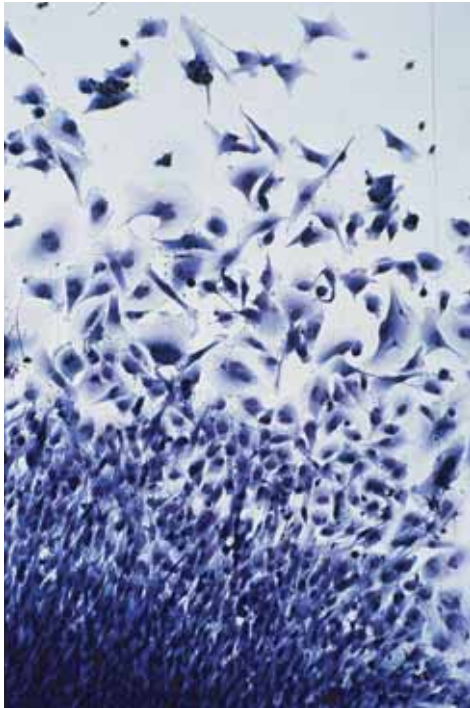
После появления моноклональных антител метод культуры тканей внес значительный вклад в иммунологические исследования и связанные с культивированием клеток методы получения и анализа гематопоэтических клеточных линий. Глубокое проникновение в механизм действия антител и возможность исследования структуры эпитопа методом моноклональных антител [Kohler & Milstein, 1975] явились, как и в случае метода слияния соматических клеток, прологом к развитию целой новой области генетических исследований. Возникновение этой области было обусловлено большим количеством основополагающих знаний о контроле транскрипции генов и новыми технологиями. В результате из возможности внедрять желаемый ген в прокариотическую и эукариотическую клетку выросла отрасль промышленности с много-

миллиардными бюджетами. Клеточные продукты, производимые клетками с внесенным геном, такие как гормон роста человека, инсулин, интерферон и др., в настоящее время стали повседневным явлением. Вместе с тем отсутствие у бактерий посттранскрипционных модификаций, таких как гликозилирование, позволяет предположить, что клетки млекопитающих могут обеспечить более качественный конечный продукт [Grampp et al., 1992], особенно в свете развития технологии получения иммортализованных клеточных линий (см. разд. 18.4).

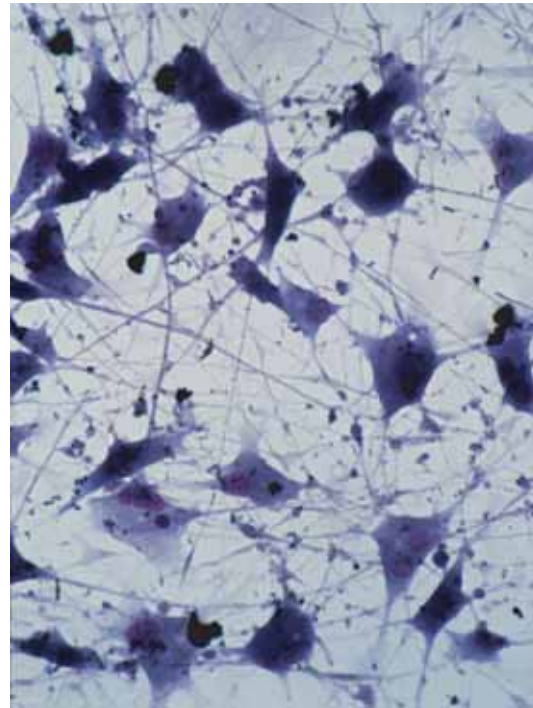
Другие области, связанные с развитием культуры тканей, включают в себя изучение межклеточного взаимодействия, внутриклеточных механизмов контроля дифференцировки и развития [Jessell and Melton, 1992; Ohmichi et al., 1998; Balkovetz & Lipschutz, 1999] и функций нейронов [Richard et al., 1998; Dunn et al., 1998; Haynes, 1999]. Успехи неврологических исследований еще не могут считаться значительными, поскольку работа с пересеваемыми клеточными линиями, полученными из нормальных клеток мозга или нервной ткани, пересев нейронов *in vitro* до настоящего времени еще невозможен без использования клеточной трансформации (см. разд. 18.4). Тем не менее успехи работы с эмбриональными стволовыми клетками [Thomson et al., 1998; Rathejen et al., 1998; Wolf et al., 1998; Webber & Minger, 2004] позволяют предположить, что этот подход может способствовать репликации культур, которые в последующем способны дифференцироваться в нейроны.

Технология культуры тканей также была применена во многих привычных областях медицины и промышленности. Хромосомный анализ клеток, полученных из амниотической жидкости пункцией плодного пузыря беременных (см. разд. 27.6), помогает обнаружить генетические нарушения у плода. Определение качества питьевой воды и токсического действия фармацевтических компонентов и веществ, загрязняющих окружающую среду, могут быть проведены на основе колониеобразующих и других методов анализа *in vitro* (см. разд. 22.3.1, 22.3.2, 22.4). Дальнейшие возможные приложения технологии культуры тканей к решению медицинских проблем связаны с обнаруженной у культуры эпидермальных клеток способностью формировать функционально активный клеточный пласт [Green et al., 1979], а у клеток сосудистого эндотелия — образовывать капилляры [Folkman & Haudenschild, 1980]. Такие способности открыли новые возможности в гомотрансплантации и восстановительной хирургии с использованием собственных клеток [Tuszynski et al., 1996; Gustafson et al., 1997; Limat et al., 1996], особенно в случае обширных ожогов [Gobet et al., 1997; Wright et al., 1998; Vunjak-Novakovic & Freshney, 2005] (см. также разд. 25.3.8). Вместе с внесением «нормальных» генов в генетически дефицитные клетки стало возможным возвращать такие «исправленные» клетки обратно в организм пациента. Показано, что трансфецированные клетки культуры бронхиального эпителия крыс, несущие репортерный ген  $\beta$ -gal, спо-

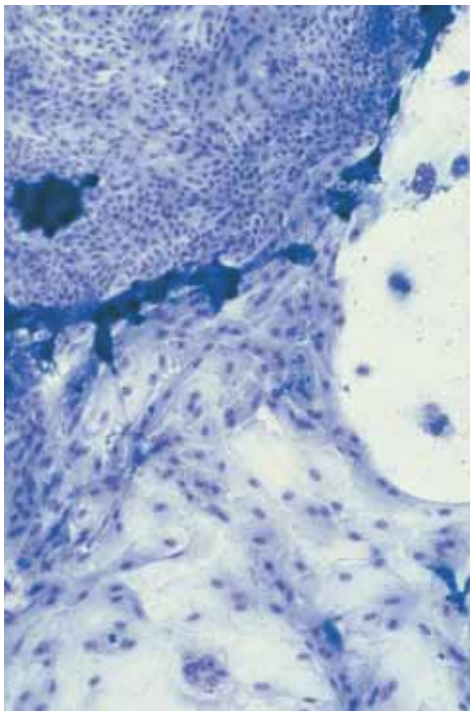
[ . . . ]



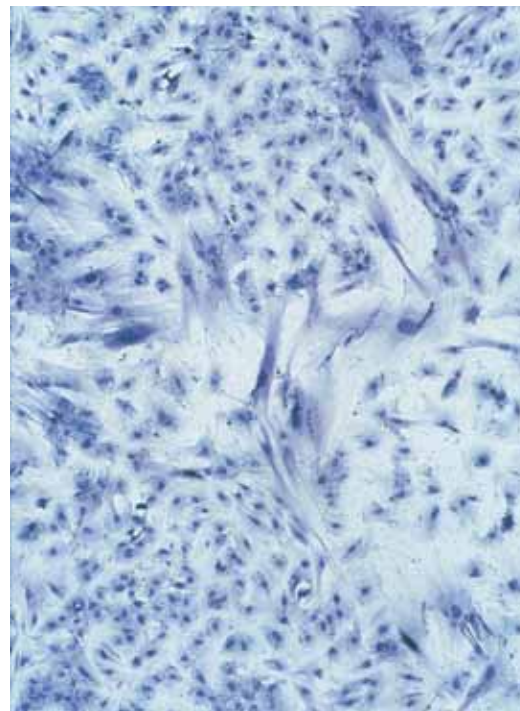
**а) Карцинома легкого человека.** Разрастание культуры из первичного эксплантата, полученного из сквамозно-клеточной карциномы легкого человека. MOG-L-DAN. Окрашивание по Гимза. Объектив 10х



**б) MOG-GP Астроцитома.** Астроглиальные клетки анапластической астроцитомы. Окрашивание по Гимза. Объектив 40х

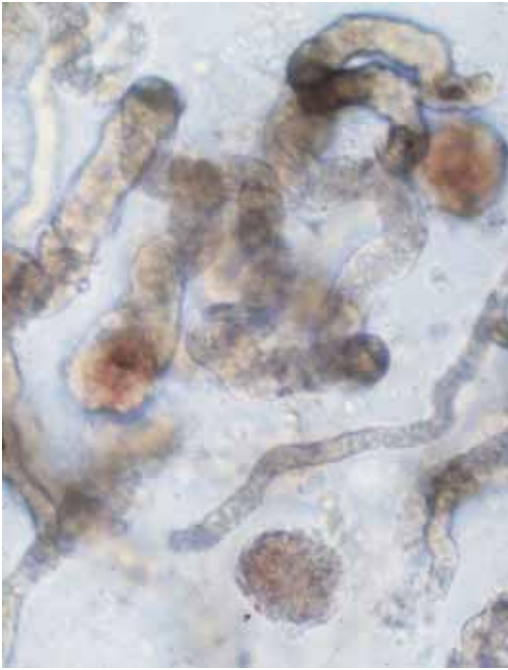


**в) Интраэпителиальная цервикальная неоплазия человека (CIN).** Первичная культура из цервикальной биопсии субкультивирована на фидерный слой 3Т3, некоторые дегенеративные клетки которого сохранились на препарате вверху справа. Окрашивание по Гимза. Объектив 10х. (С любезного разрешения M.G. Freshney.)



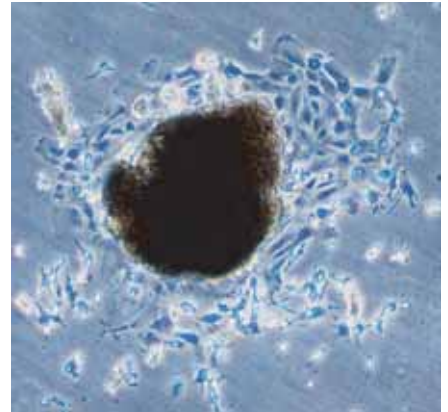
**г) Фибросаркома человека.** Первичная культура посажена на фидерный слой эмбрионального кишечника. Клетки фибросаркомы имеют веретенообразную форму, клетки фидерного слоя — многоугольной формы. Окрашивание по Гимза. Объектив 10х



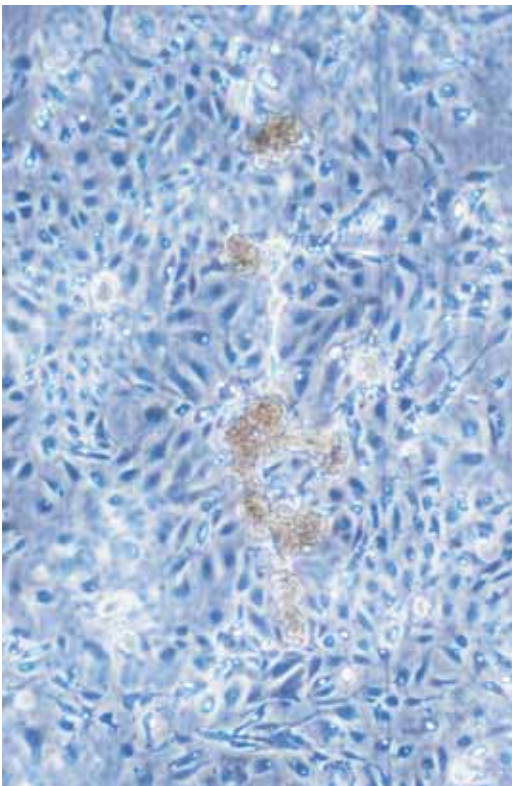
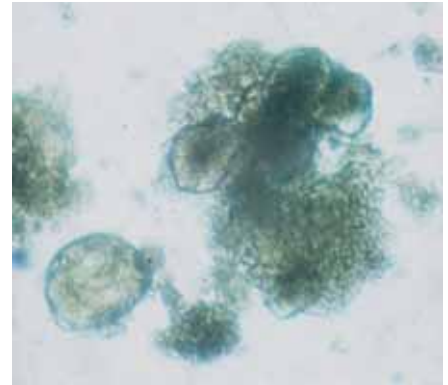


**а) Почечные каналцы мыши.** Дезагрегация почки новорожденной мыши методом холодной трипсинизации. Соединительная ткань диссоциирована, но фрагменты канальцев и клубочков остались целыми. Аналогичный препарат получен при коллагеназном расщеплении. Нормальное светлопольное освещение. Объектив 4х

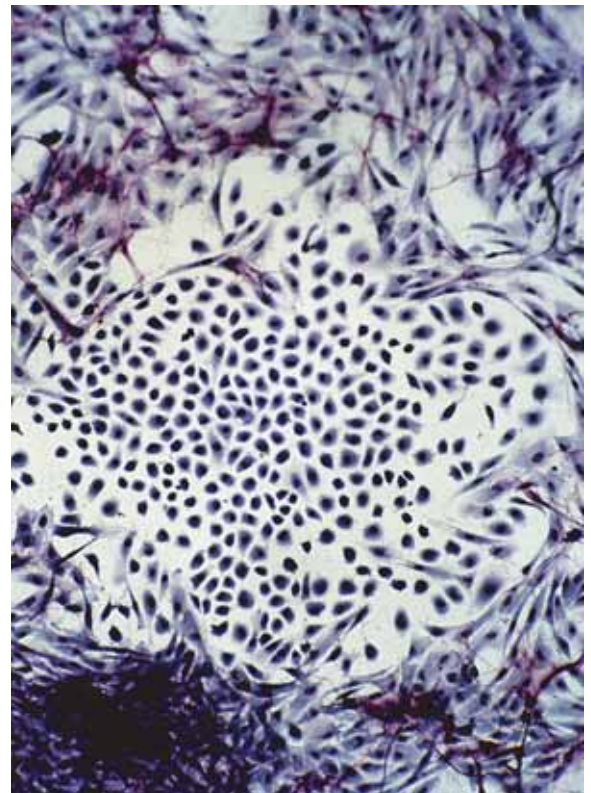
**б) Первичный эксплантат.** Клетки мышинной сквамозно-клеточной карциномы. Фазовый контраст. Объектив 10х



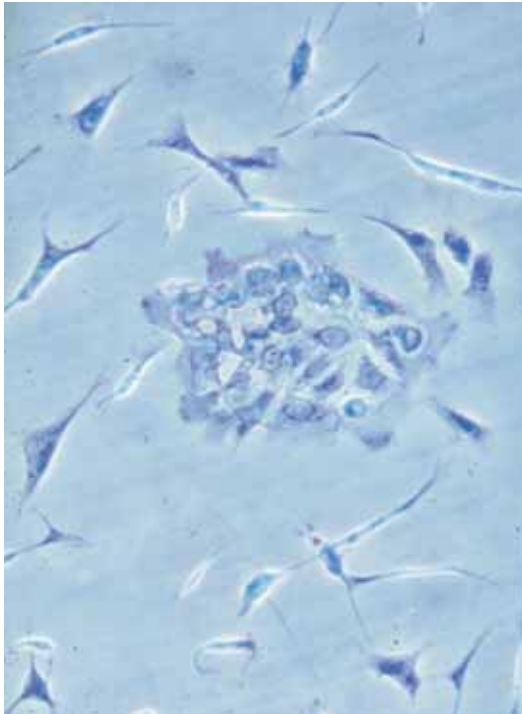
**в) Коллагеназное расщепление.** Карцинома толстой кишки человека. Светлопольное освещение. Объектив 4х



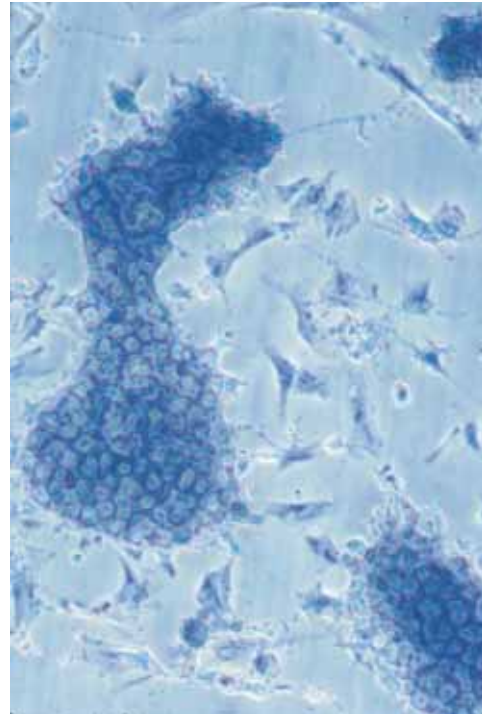
**г) Разрастание культуры из почечных канальцев.** Распространение клеток из прилипших фрагментов после дезагрегации методом холодной трипсинизации. Фазовый контраст. Объектив 10х



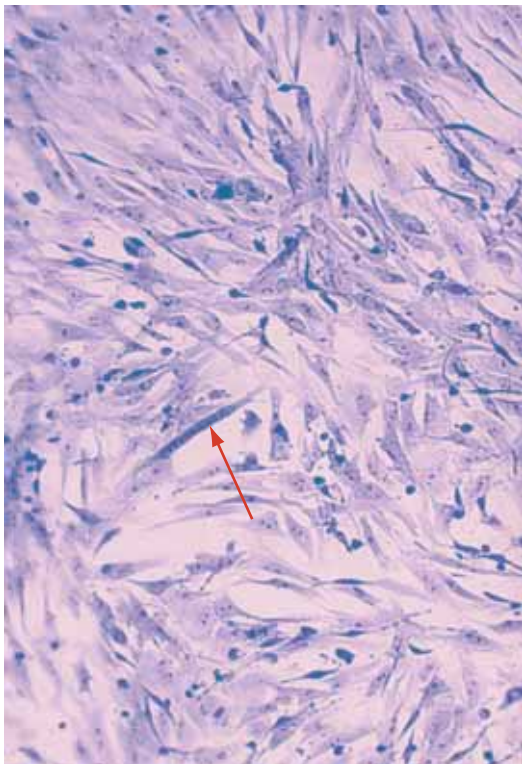
**д) Почка новорожденной крысы.** Первичная культура из трипсинизированной (холодным методом) почки новорожденной крысы. Окраска по Гимза. Объектив 10х. (С любезного разрешения М.Г. Freshney.)



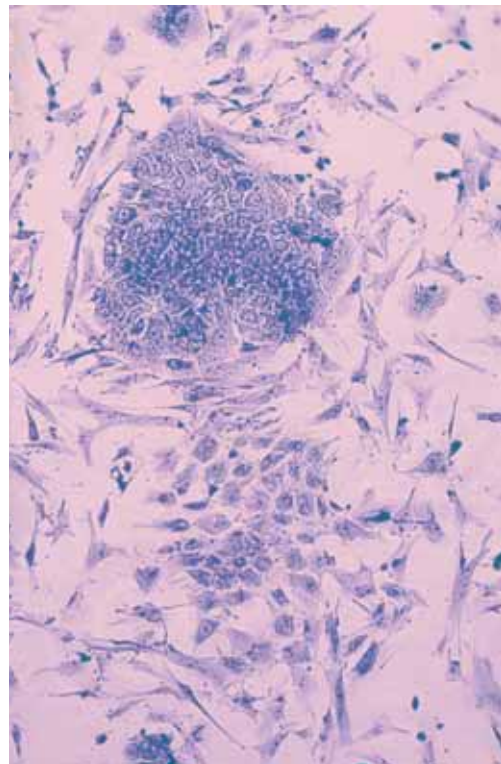
**а) Легкое эмбриона цыпленка.** Первичная культура легкого 13-дневного эмбриона цыпленка через 48 ч после дезагрегации методом холодной трипсинизации. Окрашивание по Гимза и фазовый контраст. Объектив 10×



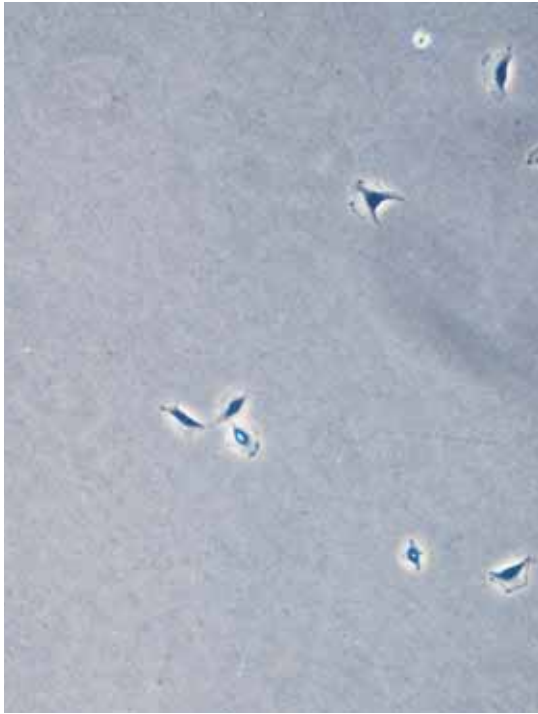
**б) Печень эмбриона цыпленка.** Детали см. (а)



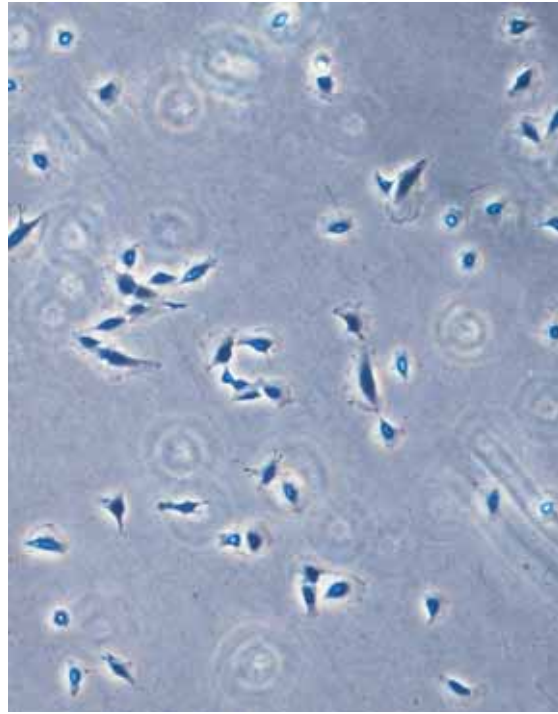
**в) Бедренная мышца эмбриона цыпленка.** Детали культуры как в (а). Обратите внимание на многоядерные мышечные волокна (красная стрелка), возникшая в результате слияния миоцитов (маленькие веретенообразные клетки темной окраски). Окрашивание по Гимза, светлопольное освещение. Объектив 10×



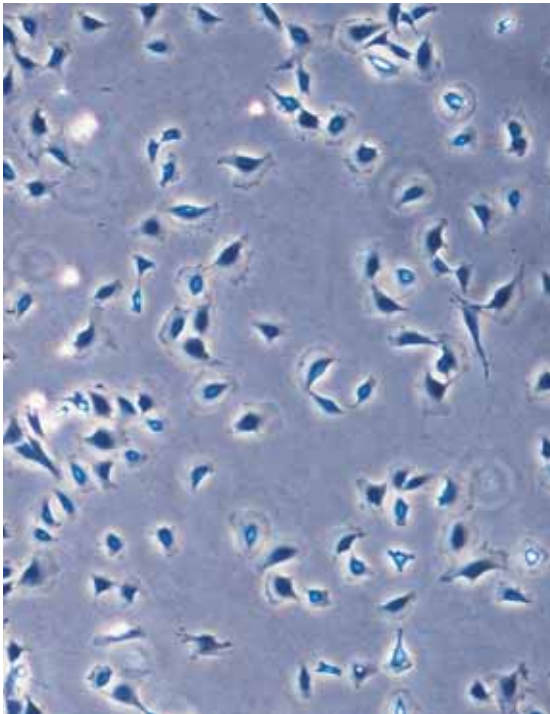
**г) Почка эмбриона цыпленка.** Детали культуры как в (а) Окрашивание по Гимза, светлопольное освещение. Объектив 10×



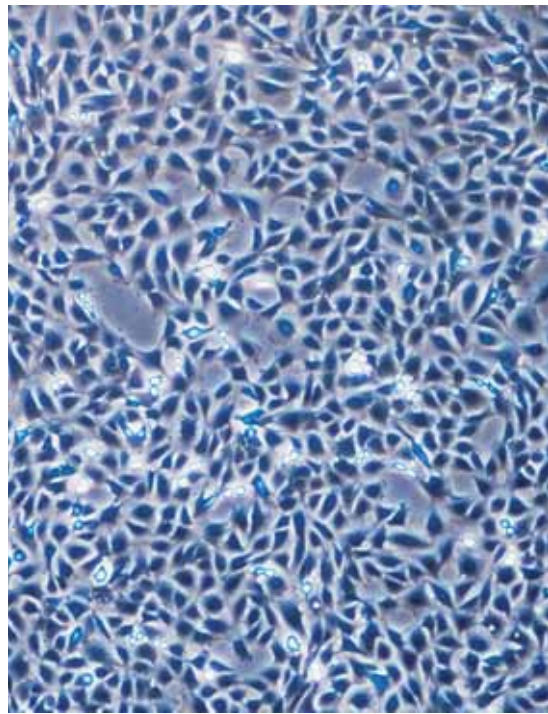
**а) Свежая монослойная субкультура.** Клетки NRK через 24 ч после пересадки. Фазовый контраст. Объектив 10×



**б) Переход в log-фазу.** Клетки NRK через 48 ч после пересадки. Фазовый контраст. Объектив 10×



**в) Середина log-фазы.** Клетки NRK через 3 дня после пересадки, готовы к замене питательной среды. Фазовый контраст. Объектив 10×



**г) Поздняя log-фаза.** Клетки NRK через 7 дней после пересадки, готовы к следующему субкультивированию. Фазовый контраст. Объектив 10×

***Цветная вкладка 4. Фазы ростового цикла***

[ . . . ]