

3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞） 成脂诱导分化培养基操作手册

产品规格：400mL

产品货号：PD-031

一、产品描述

3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂诱导分化培养基专门为3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂诱导分化而开发，针对3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）的特性优化分化试剂的配方，可增加3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）的成脂分化效果。

本产品含血清成分，仅用于科研用途，不可用于诊断、治疗、临床及其他用途。

二、培养基组成成分

成脂诱导分化培养基A液：

成分名称	添加体积
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化专用基础培养基A Basal Medium For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Cells Adipogenic Differentiation A	177 mL
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation	20 mL
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化添加物A① Supplement For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation A①	2.8 mL
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化添加物A② Supplement For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation A②	200 μL

成脂诱导分化培养基B液：

成分名称	添加体积
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化专用基础培养基B Basal Medium For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation B	177.2 mL
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化专用胎牛血清（FBS） Fetal Bovine Serum For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation	20 mL
3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂分化添加物B Supplement For 3T3-L1 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation B	2.8 mL

注：各成分请根据试剂管上标签标示温度保存。



辅助试剂:

成分名称	添加体积
油红O染色液 Oil Red O Solution	10 mL
明胶包被液 Gelatin Solution	10 mL

三、操作流程

(一) 3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化培养基的准备

1. 前言: 本品为试剂盒型, 使用前需将试剂盒内各成分试剂混匀。 (请勿将A液与B液混淆)
2. 准备工作: 将血清于4°C解冻至完全融化; 将各添加物于室温解冻至完全融化, 轻轻摇晃A①、B混匀; A②短暂离心, 使试剂能全部收集至管底。
3. 血清离心: 血清中可能会存在白色絮状沉淀物, 这通常是胆固醇、脂肪酸酯以及一些蛋白质析出导致, 属于正常现象, 该现象不影响细胞的培养和诱导分化。若您欲去除这些絮状沉淀物, 可以将血清分装至无菌离心管内, 以400-600 g离心5 min, 取上清液使用。但是我们不建议您以过滤的方法去除这些絮状沉淀物, 一方面它可能会阻塞您的过滤膜; 另一方面, 过滤血清这种行为可能会导致血清中部分营养成分的流失。
4. A液配置: 按顺序将FBS (两支FBS无区别)、A①、A②先后加入到基础培养基A中; 混匀做标识, 即可使用。
3. B液配置: 按顺序将FBS (两支FBS无区别)、B先后加入到基础培养基B中; 混匀做标识, 即可使用。

注: 步骤3、4中无菌吸取试剂管中的试剂成分, 将枪头伸至培养基液面下方快速注入, 轻微吹打洗涤枪头。再吸取少量培养基洗涤试剂管, 尽可能将所有组分完整地加到基础培养基中, 可以更好得保证培养基的效果。

(二) 3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化操作指导

- 温馨提示:
 1. 试剂准备: 此过程需要准备3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞) 完全培养基、0.25%胰酶、1×PBS 以及3T3-L1 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化培养基 (PD-031)。
 2. 明胶包被: 明胶包被有助于减少细胞诱导过程中的细胞回缩、飘起、卷边、贴壁不牢等现象。操作步骤为“加适量明胶包被液, 覆盖孔板底部即可, 于超净台或细胞培养箱孵育30 min, 吸除明胶包被液, 即可用于实验接种”。
 3. 温度: 细胞培养基温度变化是引发细胞诱导过程中的飘起、卷边的主要影响因素。因此诱导培养基在换液前一定要预热至37°C, 在外观察细胞时间不可过长 (建议10 min以内)。
 4. 换液: 同时操作孔数不可过多 (建议6孔以内), 换液时建议沿孔板侧壁轻柔缓慢得注入。
- 本成脂诱导操作指导以六孔板为例:



1. 当您的3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）的融合度达到80-90%时，即可用0.25%胰酶进行消化。
2. 将消化下来的3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）进行计数，根据计数结果，按 $2-3 \times 10^4$ cells/cm²的细胞密度接种在六孔板中，每孔加入2 mL的3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）完全培养基。
3. 将均匀接种好的3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）置于37°C，5% CO₂ 的培养箱中进行培养。
4. 当细胞融合度达到100%时（**细胞过饱和有利于激发干细胞的成脂潜能**），小心的将孔内完全培养基吸走，向六孔板中加入2 mL 3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂诱导分化培养基A液完全培养基。
5. A液诱导2-3天后，吸走六孔板的诱导完全培养基，每孔加入2 mL 3T3-L1（小鼠胚胎成纤维细胞）成脂诱导分化培养基B液完全培养基维持1天。
注：A液诱导时长2-3天均可，诱导期间细胞出现形态变化为正常现象；“A 2天+B 1天”的方案对细胞的刺激更温和，新手使用较为稳妥；“A 3天+B 1天”的方案对细胞的刺激更强，在细胞状态优秀、操作者经验丰富的情况下可以加快实验进程。
6. A、B两种培养基交替诱导3-5次后，当观察到干细胞内出现明显的、足够多的脂滴后，可用B液继续培养3-6天（每2-3天换液一次），至直脂滴变得足够大和饱满，即可结束诱导，根据实验需求对细胞进行染色和后续鉴定。

（三）油红O染色液的使用

1. 当您的成脂诱导实验结束后，可进行油红O染色确定诱导效果（本试剂盒提供饱和油红O染色液，**需配制成工作液后使用**）。
2. 吸走孔板里的成脂诱导分化完全培养基，用1×PBS冲洗1-2遍。
3. 加入4%中性甲醛溶液（覆盖细胞表面即可），对细胞固定30 min。
4. 细胞固定期间，可配制油红O工作液（饱和油红O溶液：蒸馏水=3:2，混匀后用中性滤纸或尼龙材质滤膜过滤除去杂质）。
5. 吸走4%中性甲醛溶液，用1×PBS冲洗1-2遍。
6. 以六孔板为例，每孔加入1 mL油红O工作液，室温染色30 min。
7. 吸走油红O工作液，用1×PBS冲洗1-2次，把背景杂质洗干净，即可在显微镜下观察诱导和染色效果。

四、注意事项

1. 因为培养基的成分较多，请在配制过程中严格注意无菌操作；
2. A、B交替诱导是为了减轻A液中试剂对干细胞的影响，如果您的干细胞状态较好可在前7天先只使用A液进行刺激诱导（中途每2-3天更换新鲜A液），待脂滴快速出现后，再进行两种培养基交替诱导的操作。

