

3T3-L1 脂肪細胞培養マニュアル

■ 3T3-L1 細胞の播種 ■

- ① 液体窒素から凍結アンプルを取り出し、37°Cの湯浴で、内容物(細胞)が約半分程度融解するまで攪拌する。この際、アンプルが暴発する恐れがあるので、プロテクターや手袋を装着して作業することが望ましい。
- ② 約半分程度融解したことを確認したら、湯浴から取り出し、アンプルを攪拌させながら、余熱ですべて融解する。
- ③ 15mLの遠沈管に3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(カタログ番号:F-PM-1-L1)を10mL入れ、アンプル中の細胞浮遊液を全量移し、数回ピペティングしたのち1,500rpmで1分間遠心する。
- ④ 上清を取り除き、3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を2mL添加し、細胞数を計測する。
- ⑤ 3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を用い、下記表に示した必要培地量で、細胞濃度を 5×10^4 cells/cm² に調製し、播種する。

培養容器	必要培地量
75cm ² フラスコ	20.0mL
25cm ² フラスコ	7.0mL

- ⑥ インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。
- ⑦ 24時間後に古い培養液を取り除き、新鮮な3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)に交換する。
- ⑧ 継代は85-90%コンフルエント時に行なう。
※ 培養液は1日おきに交換を行なう。

■ 3T3-L1 細胞の分化誘導 ■

- ① 古い培養液を取り除いたあと、取り除いた培地よりやや多めのPBS(-)を静かに加え、細胞層を洗浄する。
- ② PBS(-)を吸い取り、0.02%EDTA溶液を細胞層が浸る程度加え、細胞になじませる。
- ③ 0.02%EDTA溶液を吸い取り、0.25%トリプシン溶液を細胞が浸る程度加える。
- ④ 位相差顕微鏡で細胞の状態を観察し、細胞が円球化しつつあれば、3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を0.25%トリプシン溶液と等量加え、トリプシンの反応を止める。
- ⑤ パスツールピペットでピペティングを行い、細胞を培養容器から完全に剥がし、細胞全量を遠心管へ移す。
- ⑥ 遠心管に移した細胞浮遊液に培地を加え、パスツールピペットで10回程度ピペティングを行ったあと、1500rpmで1分間遠心する。
- ⑦ 上清を取り除き、3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を2mL添加し、細胞数を計測する。
- ⑧ 3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を用い、次ページ表に示した必要培地量で、細胞濃度を $3-5 \times 10^4$ cells/cm² に調製し、播種する。

培養容器	培地量/well	必要培地量
96well プレート	150 μ L	14.4mL
48well プレート	500 μ L	24.0mL
24well プレート	1.0mL	24.0mL
12well プレート	2.0mL	24.0mL
6well プレート	3.0mL	18.0mL
75cm ² フラスコ	20mL	20.0mL
25cm ² フラスコ	7mL	7.0mL

- ⑨ インキュベーター内(37°C、5%CO₂)でコンフルエントに達するまで培養する。この間は、3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)は1日おきに交換を行う。
- ⑩ コンフルエントに達したことを確認後、分化誘導を開始するまでさらに2日間培養を行なう。
- ⑪ 3T3-L1 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1-L1)を取り除き、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-DM-2-L1)に交換し、3日間培養する。
- ⑫ 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-DM-2-L1)を取り除き、3T3-L1 脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-AM-1-L1)に交換する。以降、実験まで2日おきに3T3-L1 脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-AM-1-L1)を交換する。
- 3T3-L1 細胞は分化誘導後7-14日目の細胞がもっとも実験に適する。

CEL-1/0807D

【お問い合わせ先】

大日本住友製薬グループ

DSファーマバイオメディカル株式会社

(受注・発注/学術的お問い合わせ先)

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33-94

TEL 06-6386-2164 FAX 06-6337-1606

URL: <http://www.dspbio.co.jp>

E-メール: labopro@bio.ds-pharma.co.jp