

## 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(注文 Cat.No.:BBPM1L1)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を用い、下記表に示した必要培地量で、細胞濃度を  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> に調製し、播種する。

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

- ⑥ インキュベーター内(37°C、5%CO<sub>2</sub>)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  $3-5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 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 $\mu$ L	14.4mL
48well プレート	500 $\mu$ 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 <sup>2</sup> フラスコ	20mL	20.0mL
25cm <sup>2</sup> フラスコ	7mL	7.0mL

- ⑨ インキュベーター内(37°C、5%CO<sub>2</sub>)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を取り除き、3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地(注文 Cat.No.:BBDM2L1)に交換し、3 日間培養する。
- ⑫ 3T3-L1 脂肪前駆細胞分化培地を取り除き、3T3-L1 脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.:BBAM1L1)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。

## 株式会社 ケー・イー・シー

### 試薬事業部

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20

(お問い合わせ窓口)

TEL: 06-6435-9747 FAX: 06-6435-9748

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

E-mail: [cs-info@kacnet.co.jp](mailto:cs-info@kacnet.co.jp)