

## C3H/10T1/2, Clone 8 (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-035

### 一、产品描述

C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化培养基专门为C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化而开发, 针对C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 的特性优化分化试剂的配方, 可增加C3H/10T1/2, Clone 8 (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
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化专用基础培养基A Basal Medium For C3H/10T1/2, Clone 8 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation A	177 mL
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化专用胎牛血清 (FBS) Fetal Bovine Serum For C3H/10T1/2, Clone 8 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation	20 mL
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化添加物A① Supplement For C3H/10T1/2, Clone 8 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation A①	2.8 mL
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化添加物A② Supplement For C3H/10T1/2, Clone 8 (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
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化专用基础培养基B Basal Medium For C3H/10T1/2, Clone 8 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation B	177.2 mL
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化专用胎牛血清 (FBS) Fetal Bovine Serum For C3H/10T1/2, Clone 8 (Mouse embryonic fibroblasts) Adipogenic Differentiation	20 mL
C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂分化添加物B Supplement For C3H/10T1/2, Clone 8 (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) C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化培养基的准备

- 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)**
- 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。
- 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。
- 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。
- 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：1) 配制好的完全培养基，需放置4°C避光保存，1个月内用完；**

**2) 若短期内无法用完全培养基，建议分批配制（首先将试剂按套装内各成分比例分装，建议分装不超过4份，然后取出其中一份按比例配制完培，剩余成分严格按各自条件保存，不可多次冻融）。**

**3) 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。A②液添加的时候注意需更换新的无液体的枪头吸取A②液添加到基础液体培养基中，不可向A②液中加入基础培养基，会产生沉淀，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) C3H/10T1/2, Clone 8 (小鼠胚胎成纤维细胞) 成脂诱导分化操作指导

#### ● 温馨提示：

- 试剂准备：此过程需要准备C3H/10T1/2, Clone 8(小鼠胚胎成纤维细胞)完全培养基、0.25%胰酶、1×PBS以及C3H/10T1/2, Clone 8(小鼠胚胎成纤维细胞)成脂诱导分化培养基(PD-035)。
- 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”。
- 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C3H/10T1/2, Clone 8（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C3H/10T1/2, Clone 8（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/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种在六孔板中，每孔加入2 mL的C3H/10T1/2, Clone 8（小鼠胚胎成纤维细胞）完全培养基。
  3. 将均匀接种好的C3H/10T1/2, Clone 8（小鼠胚胎成纤维细胞）置于37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。
  4. 当细胞融合度达到80-95%时，小心的将孔内完全培养基吸走，向六孔板中加入2 mL C3H/10T1/2, Clone 8（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 C3H/10T1/2, Clone 8（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%多聚甲醛溶液（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%多聚甲醛溶液，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。

