

## **Mitogenassay mit Balb/c 3T3-Zellen (96-well Platte)**

### **Material und Reagenzien:**

- 1% Gelatine in PBS oder ddH<sub>2</sub>O
- Wachstumsmedium: DMEM (4,5g Glucose), 1% Pen/Strep, 1% Glutamin, 10% Calf Serum (HyClone, Cat.No. SH30072.03)
- Basalmedium: DMEM, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin, 2,5% CS
- <sup>3</sup>H-Thymidin 1mCi/ml (1:40 verdünnt in PBS [0,025mCi/ml])
- PBS, Methanol, 5% TCA, ddH<sub>2</sub>O, 0,3M NaOH (alle Lsg. eiskalt)

### **Protokoll:**

- Balb/c 3T3-Zellen in Wachstumsmedium (10% CS) expandieren
- Zellen bei ca. 70-90% Konfluenz für den Versuch ausplattieren
- 96well-Platte mit Gelatine beschichten und ca. 15 min bei 37°C inkubieren  
⚠ wegen der Verdunstung zumindest in die äußere Reihe PBS pipettieren!
- Zellen mit 2x10<sup>3</sup> c/well in Basalmedium (2,5% CS) ausplattieren
- 7 bis 14 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubieren.
- Stimulation mit den gewünschten Faktoren, als Positivkontrolle 10µl CS einsetzen
- Zugabe von 20 µl Thymidin/well
- 36 bis 64h inkubieren
- Medium vorsichtig absaugen.
- mit 250µl PBS/well waschen.
- 2 x 5min Methanol (250µl/well)
- 2 x 10min 5% TCA (250µl/well)
- mit 250µl ddH<sub>2</sub>O waschen
- Lysieren der Zellen mit 250µl 0,3M NaOH.
- Szintillationsröhrchen mit 2,5ml Flüssigkeit füllen.
- Zugabe des Zelllysates, Röhrchen umschwenken und im β-Counter auszählen