

Allestimento di colture di ***E. coli* OP50**

Obiettivo Preparare colture liquide di batteri *E. coli* OP50 da utilizzare come fonte di crescita per i nematodi.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Ceppo *E. coli* OP50
- Anse sterili monouso a occhiello
- Terreno di crescita LB liquido
- Beuta da 500 ml (o bottiglia da 500 ml con tappo) sterile
- Cilindro sterile da 50 ml
- Piastre NGM agar
- Puntali sterili
- Anse a L sterili monouso
- Parafilm®



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare
- Termostato a 37°C con agitatore incluso
- Micropipette



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

10 minuti per l'inoculo
1 notte per la crescita dei batteri
20 minuti per la semina delle piastre



Procedimento

- 1.** Sotto cappa biologica a flusso laminare, con un cilindro sterile trasferire 50 ml di terreno di crescita LB liquido in una beuta sterile da 500 ml o in una bottiglia sterile dotata di tappo da 500 ml.
- 2.** Con un'ansa sterile monouso, prelevare una colonia singola dalla piastra di *E. coli* OP50 e stemperarla nel terreno di crescita nella beuta. Buttare l'ansa dopo l'utilizzo.
- 3.** Incubare per una notte la beuta nel termostato a 37°C e in agitazione a 200-220 rpm.
- 4.** A incubazione terminata, il terreno nella beuta risulterà torbido.
- 5.** Portare a temperatura ambiente le piastre NGM agar, preparate seguendo il protocollo "Preparazione del terreno NGM agar per la crescita su piastra di *C. elegans*".
- 6.** Con un puntale sterile, trasferire la coltura batterica sulle piastre e distribuirle con un'ansa a L sterile monouso fino a completo assorbimento. Indicativamente, per una piastra da 90 mm utilizzare 200 µl di coltura, mentre per una piastra da 60 mm usarne 100 µl. Per le piastre da 30 mm è sufficiente trasferire una singola goccia di batteri senza spatolare.
- 7.** Incubare a 37°C per una notte in condizioni statiche.
- 8.** A crescita ultimata, i batteri avranno formato un unico strato confluyente di cellule. Avvolgere le piastre con del Parafilm® e conservarle a 4°C per qualche settimana.

Note

- Questo protocollo sperimentale viene usato per allestire colture liquide del ceppo *E. coli* OP50 che viene solitamente utilizzato come substrato di crescita su piastra per i nematodi.
- Il ceppo non possiede resistenze ad antibiotici pertanto è molto importante lavorare in condizioni di sterilità. Per impedire la contaminazione da parte di altri microrganismi, le operazioni vanno effettuate sotto cappa biologica a flusso laminare. In alternativa, è possibile utilizzare un banco da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70% ed eseguire le operazioni accanto a un becco Bunsen (pericolo di incendio!).
- In mancanza del termostato è possibile far crescere i batteri a temperatura ambiente per un paio di giorni, meglio se in condizioni di aerazione del terreno di crescita (con agitazione).
- In mancanza di un termostato dotato di agitatore, è possibile far crescere le colture anche in condizioni statiche. La biomassa prodotta alla fine della nottata di incubazione statica a 37°C sarà però inferiore.
- I batteri *E. coli* OP50 possono essere acquistati da diversi rivenditori, tra cui Carolina Biological Supply Company.