**Adhezija na proteine ECM-a**

- ispituje se sposobnost adhezije bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa (laminin, fibronektin i kolagen) uz dodatak egzopolisaharida

01.06.2022.

- precijepiti soj MC1 i D12 u svježi MRS bujon – anaerobna inkubacija pri 37°C

02.06.2022.

- bakterijske stanice soja MC1 i D12 uzgojene do kasne eksponencijalne faze prikupljene su centrifugiranjem, isprane i resuspendirane u fosfatnom puferu (pH = 7) izračunatih volumena do postizanja koncentracije koja odgovara OD620 = 1

- izmjereni početni OD620 nakon centrifugiranja i resuspendiranja u 5 mL PBS-a te izračunati potreban volumen PBS-a u kojemu je potrebno resuspendirati talog nakon centrifugiranja kako bi OD620 iznosio 1:

c1 – izmjereni OD620

V1 = 5 mL

c2 = 1 (željeni OD620)

V2 = ?

- budući da se ispitivala adhezija MC1 i D12 uz dodatak egzopolisaharida različitih koncentracija, iz Falconice je u 3 epice otpipetirano po 1 mL suspenzije OD620 = 1 – u prvu epicu je dodano 0,5 mg (0,5 mg/mL), u drugu 1 mg (1 mg/mL)

- PRIPREMA PLOČICA: adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM) ispitana je na Corning®BioCoatTM (Corning Inc., SAD) pločicama s 96 jažica presvučenih lamininom, kolagenom i fibronektinom

- jažice sa proteinima se isperu s 200 µL PBS-a (pH 7) 3 puta

- zatim su blokirane tijekom 1h dodatkom 100 µL fosfatnog pufera + 1 % Tween 20

\* 100 µL Tween 20 + 9,9 mL PBS-a = 10 mL PBS + 1 % Tween 20

- nakon sat vremena ukloni se sloj fosfatnog pufera + 1 % Tween 20 te se u jažice doda po 100 µL priređenih suspenzija ispitivanih sojeva u 3 paralele – inkubacija preko noći na 4 °C

03.06.2022.

- nakon prekonoćne inkubacije neadhezirane stanice su uklonjene ispiranjem dva puta s 200 µL fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 te su pločice ostavljene 1h na sobnoj temperaturi da se osuše

\* 25 µL Tween 20 + 49,975 mL PBS-a = 50 mL PBS + 0,05 % Tween 20

- adhezirane bakterijske stanice su detektirane bojanjem kristal-violetom (Sigma-Aldrich, SAD) koncentracije 1 mg/mL tijekom 45 min – po 100 µL u svaku jažicu

\* koncentracija kristal-violeta bila je 10 g/L pa je bilo potrebno razrijediti 10 puta – 1 mL kristal-violeta (10 g/L) + 9 mL vode

- boja se zatim ispire PBS-om te se dodatkom 100 µL citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4) u svaku jažicu otpušta bojilo

- pločice se ostave sat-dva te se onda mjeri apsorbancija pri 620 nm

\* jažice u koje je dodan čisti fosfatni pufer služile su kao slijepa proba čije su vrijednosti apsorbancije oduzimane od vrijednosti apsorbancija jažica s adheziranim bakterijskim stanicama

POTREBNO:

- Corning®BioCoatTM (Corning Inc., SAD) pločice s 96 jažica presvučenih lamininom, kolagenom i fibronektinom

- mikrotitarska pločica

- jedna paralela soja MC1

- EPS izolirani iz soja MC1

- jedna paralela soja D12

- EPS izolirani iz soja D12

- pipetmani i sterilni nastavci

- sterilne epice i Falconice

- 50 mL fosfatnog pufera (pH = 7)

- 50 mL fosfatnog pufera + 1 % Tween 20

- 50 mL fosfatnog pufera + 0,05 % Tween 20

- otopina kristal-violeta (10 mL) 1 mg/mL

- 20 mL citratnog pufera