**Kompetitivna ekskluzija *E. coli* 3014**

20.05.2022.

- pripremiti i razliti Rapid agar ploče

25.05.2022.

- precijepiti sojeve MC1 i *E. coli* 3014 iz zamrzivača (-80 °C) – staviti MC1 (anaerobno) i *E. coli* (aerobno) na 37 °C

26.05.2022.

- precijepiti sojeve MC1 (u 4 paralele) i *E. coli* 3014 (u 8 paralela) ­– staviti MC1 (anaerobno) i *E. coli* (aerobno) na 37 °C

27.05.2022.

-kompetitivna ekskluzija *E. coli*

- ispituju se tri slučaja (+ kontrola test-mo):

1. samo soj MC1
2. soj + EPS (u koncentraciji od 1 mg/mL)
3. samo EPS (u koncentraciji od 1 mg/mL)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ecoli  (I) | Ecoli  (II) | Ecoli  (III) |
| MC1 (I)  + Ecoli | MC1 (I)  + Ecoli | MC1 (I)  + Ecoli |
| MC1 + EPS (I)  + Ecoli | MC1 + EPS (II)  + Ecoli | MC1 + EPS (III)  + Ecoli |
| EPS (I)  + Ecoli | EPS (II)  + Ecoli | EPS (III)  + Ecoli |

**Slika 1.** Raspored nanošenja na 24-well plates

- prebaciti po 4 paralele soja MC1 u Falconicu od 15 mL

- po 8 paralela test-mikroorganizma *Escherichia coli* 3014 prebaciti u 1 Falconicu od 50 mL

- centrifugirati (5 min pri 4200 o/min) i talog stanica isprati u 5 mL fiziološke otopine

- centrifugirati (5 min pri 4200 o/min) i talog resuspendirati u 10 mL fiziološke otopine – 100 µL suspenzije svakog soja uzeti za mjerenje optičke gustoće (OD620)

- potrebno je podesiti OD na 1 prema formuli c1 \* V1 = c2 \* V2

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **SOJ** | **izmjereni OD** | **dodani V (mL)** | **željeni OD** | **potreban V (mL)** |
| **MC1** | 1,21 | 10 | 1 | **12,1** |
| **Ecoli** | 1,4869 | 10 | 1 | **14,869** |

- resuspendirati u MEM mediju u izračunatom volumenu – slučaj 2 resuspendirati u MEM + EPS, a slučaj 1 i kontrolu u normalnom MEM mediju

\* prije resuspendiranja u MEM (+ EPS) odvojiti po 1 mL *E. coli* u epicu – služi za određivanje broja stanica prije inkubacije i bez dodatka BMK

- prije inkubacije BMK, Caco-2 stanice je potrebno isprati 3 puta u 1 mL PBS-a (pH 7,4)

- zatim se doda 1 mL suspenzije BMK i/ili EPS i stanice se inkubiraju 1 h pri 37 °C – raspored nanošenja uzoraka napisan je na slici 1

- nakon inkubacije s BMK, Caco-2 stanice se ispiru s 1 mL PBS-a (pH 7,4) te se u jažice dodaje 1 mL suspenzije patogene bakterije *E. coli* i nastavlja se inkubacija 1 h pri 37 °C

- nakon inkubacije s patogenim bakterijama jažice se ispiru 3 puta s 1 mL PBS-a (pH 7,4) kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu vezale na Caco-2 stanice, a adhezirane stanice se inkubiraju 10 min s 1 mL 0,05% (v/v) otopini Triton X-100

- sadržaj svake jažice se prebaci u epicu i centrifugira (5 min pri 13000 o/min) – talog se resuspendira u 1 mL PBS-a (pH 7,4)

- slijedi određivanje broja stanica indirektnom metodom – na Rapid agar nacijepljivati 2 paralele od -1 do -6 razrjeđenja

- sve ploče staviti na aerobnu inkubaciju na 37 °C te nakon 48 h slijedi brojanje izraslih kolonija – rezultat se izrazi kao CFU/mL

29.05.2022.

- brojanje CFU/mL