

J100 dil e T9002 ind TEST 05/06/09

Descrizione: misura di assorbanza e fluorescenza su diverse colture batteriche nell'arco di 24 ore, per misurare i valori basali e valutare la variazione di queste in funzione della diluizione delle colture. Verifica della correttezza del rate stimato di evaporazione

Motivazione: test qualitativo per valutare parametri importanti quali l'affidabilità delle misure al variare del numero di flash della lampada, la verifica del funzionamento del filtro per la GFP e l'andamento dell'assorbanza e della fluorescenza a seguito di dispensazione d'acqua per compensare l'evaporazione.

Metodi: non dobbiamo fare alcun assemblaggio, in quanto i tre Pcon (J100, J101, J118) sono già contenuti nel plasmide BBa_J61002, che porta il costrutto RBS-RFP-TT tra i siti di restrizione S-P.

La micropiastra conterrà TOP10(Pcon), LB+Amp da solo, TOP10(E240) (controllo negativo), diverse diluizioni di TOP10(J100) (100%, 50%, 20%, 10%, 1%), TOP10(T9002) indotto con 3OC6HSL e non indotto e TOP10(01-2008), un costrutto realizzato per la competizione dell'anno scorso (Pcon+GFP).

Protocollo:

Testo i costrutti:

- BBa_J23100
- BBa_J23101
- BBa_J23118
- BBa_T9002
- BBa_E0240
- 01 (2008)

Utilizzo: Utilizziamo colture incubate overnight a 37°C, 220 rpm.

Per il plasmide BBa-T9002 indotto con 3OC6HSL sono state utilizzate due colture differenti: la prima, realizzata il giorno prima rispetto a tutte le altre e la seconda, realizzata assieme a tutte le altre (overnight 37°C 220 rpm) prelevando un'aliquota dalla prima. Si è deciso di effettuare misurazioni su entrambe poiché la seconda, a differenza delle altre, non presentava un aspetto particolarmente torbido, suggerendo che la quantità di induttore utilizzata (200nM) fosse eccessiva. La piastra è stata riempita come mostrato in figura.

Le colture utilizzate sono state diluite 1:10 dal giorno prima.

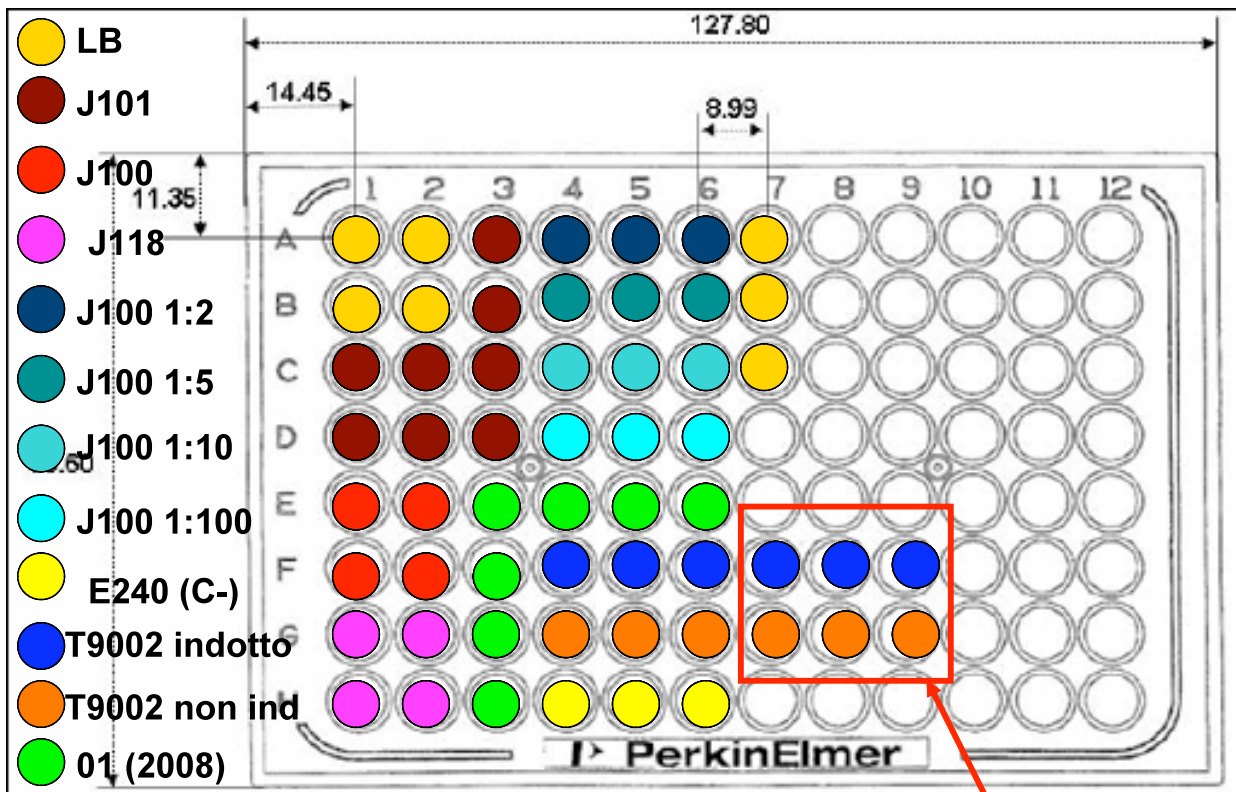
Le colture di J100 diluite sono state realizzate prelevando:

- 50%: 1ml J100 + 1ml LB+Amp
- 20%: 200 μ l J100+800 μ l LB+Amp ?? Controllare
- 10%: 1ml 20%+ 1ml LB+Amp ?? Controllare
- 100%: 200 μ l 10% + 1,8 ml LB+Amp

Tutti i pozzetti sono stati riempiti con volumi di 200 μ l, ad eccezione di:

A1, A2, B1, B2, A3, B3, C3, D3, E3, F3, G3, H3 riempiti con 100 μ l.

In questi pozzetti sono stati dispensati 100 μ l di H₂O per effettuare una lettura statica prima e dopo la dispensazione, al fine di valutare la variazione dell'assorbanza e della fluorescenza a seguito di una diluizione.



Colture del giorno prima

Per la realizzazione di misurazioni dinamiche, il setup sperimentale prevede:

- campionamento ogni 30' in cui si osservano dati di assorbanza, fluorescenza GFP e fluorescenza RFP
- per il rimanente tempo, incubazione a 37°C e shaking lineare (5mm)
- al fine di compensare l'evaporazione (rate stimato in precedenza: circa 60 μ l / 4 ore) si è deciso di dispensare 6 μ l ogni 30 minuti (48 μ l/4 ore) per evitare il trabocco dai pozzetti.

L'esperimento è iniziato circa alle ore 17.00 del 5/6/2009, pertanto si concluderà circa alle 17.00 del 6/6/2009.

A fine esperimento i pozzetti centrali sono risultati saturi: era infatti visibile una cupola data dalla tensione superficiale, mentre i pozzetti sul bordo risultavano contenere meno liquido (A7 <200 μ l, B7 circa 200 μ l, nel c7 >200 μ l). In A1 sono presenti <200 μ l, in A2 circa 200 μ l, in B1 >200 μ l, in B2 è evidente una contaminazione. Da un'ispezione visuale dei dati sembra che la contaminazione sia avvenuta durante le ultime ore dell'esperimento.

F9: <200 μ l, G9 circa 200 μ l. In F8 e G8 >200 μ l, in F7 e G7 >> 200 μ l. F2: poco meno di 400 μ l.

Nei pozzetti che presentano la cupola di tensione superficiale: G3: circa 400 μ l.

Target: fare crescere bene i batteri nel tempo, provando diverse diluizioni, per ottenere le curve di crescita riportate in letteratura.

Sarebbe opportuno ripetere l'esperimento con tutti i pozzetti pieni, per minimizzare la probabile non omogeneità di temperatura.

Nel prossimo esperimento proviamo a dispensare 4ul anziché 6ul, di modo da avere concentrazioni finali comprese tra 100 e 150 ul, per evitare il trabocco.

Quindi: nuovo esperimento con batteri e vedere come fare a farli crescere bene.