

Proyecto: estudio de la expresión génica en biopelículas de E. coli a partir de microscopía de hoja de luz

Protocolo para crecimiento y observación de biopelícula en el microscopio SPIM¹

Materiales

- * Plato con E.coli de no más de 15 días de recuperado de -80°C (ver protocolo de recuperación de stock desde -80°C).
- * LB (50 mL).
- * Chip PDMS/laminilla (ver protocolo de preparación de chips para experimentos de microfluidos en SPIM)
- * Etanol filtrado, se agrega media hora antes de ser utilizado para evitar evaporación.
- * Kanamicina 25 mg/mL, se agrega el día del experimento (o día anterior) para evitar degradación.
- * Manguera de microfluídos
- * Conectores para manguera de microfluídos
- * 3 Jeringas, 2 de 10 mL y otra de 5 o 10 mL.
- * 3 tubos falcon de 50 mL
- * Frasco de vidrio para cultivo overnight (ON)

Equipos

- * Shaker
- * Incubadora (puede usarse shaker, si es posible detener movimiento para incubación)
- * Centrífuga
- * Bomba de Jeringa
- * Microscopio SPIM
- * Powermeter
- * Lámpara LED para imagen transmitida en SPIM
- * Cabina de flujo laminar (o mechero, para ambiente estéril)
- * Agitador vórtex

Procedimiento

Día 1 (tiempo ~ 1 hora)

1. (3:00 PM) preparación de ON de E. coli RpoH, dejar tubo de vidrio con colonia en 10 mL de LB y 10 µL de Kan, en shaker a 30°C por 18 horas.

¹ Este protocolo se diseñó para la cepa comercial RpoH de la compañía Dharmacon (E. coli Promoter Collection, PEC3876). Antibiótico: Kan. Las horas entre paréntesis pueden usarse como referencia.

2. Preparar 2 tubos falcon de 50 mL c/u con 10 mL de LB + 10 μ L de Kan, uno para dilución y otro para alimentar el chip de microfluídos (medio para jeringa). Dejar precalentando en incubadora o en shaker (si los medios están expuestos a la luz cubrir con papel aluminio), a 30°C.

Día 2 (tiempo ~ 6 horas)

1. (9:30AM) Realizar dilución 1:1000, agregando 10 μ L del ON del día anterior en el frasco de dilución precalentado a 30°C.
2. Si no se hizo el día anterior, precalentar el medio para alimentación del chip.
3. Preparación del SPIM:
 - a) Llenar la celda del SPIM con dH₂O y poner a precalentar a 30°C.
 - b) Medir potencia después del último iris, debe estar entre 4 y 4.7 mW, equivalentes a una potencia sobre la muestra de ~2 mW. Si se cambia algo en el camino óptico del microscopio esta relación deberá ser recalculada.
 - c) Realizar alineación inicial con muestra de esferas de 500 nm en agar dentro de capilar de vidrio. Esta alineación facilita la del paso siguiente.
 - d) Alinear con laminilla con esferas de 500 nm en agar. Adquirir una secuencia de una de las esferas en la muestra y guardar como PSF (barrido con pasos de 250 nm). Dejar muestra montada hasta el montaje del chip.
4. (12:00M) Precalentar centrífuga a 30°C (7000 rpm/1.5 horas)
5. Cargar jeringa con LB y pasar medio por el chip para lavado inicial.
6. (1:30PM) Centrifugar las células (5000 rpm durante 5 min a 30°C)
7. Descartar parte del sobre nadante, dejando aproximadamente 1.5 mL de medio para re-suspender las células usando el agitador vórtex.
8. Cargar las células en la jeringa de 5 o 10 mL e inocular dos chips (uno de respaldo en caso que haya daño de chip durante montaje) en posición horizontal
9. Dejar los chips durante una hora en la incubadora, en posición horizontal a 30°C.
10. **▲ Paso crítico:** Cargar jeringa de 10ml con LB + Kan precalentado a 30°C, verificando que no quede **ninguna** burbuja de aire en la jeringa.
11. Montaje en el SPIM:
 - a) **▲ Paso crítico:** Desmontar muestra de esferas en laminilla (el soporte de la muestra puede desplazarse verticalmente sin trasladar el stage del microscopio ni cambiar la posición de la hoja de luz), teniendo mucho cuidado de **no hacer contacto** con el objetivo de detección. Introducir el soporte nuevamente y ajustar a una altura que permita introducir el chip y fijarlo al soporte con los imanes en la parte superior. Una vez fijo desplazarlo lentamente en dirección vertical, intentando llevarlo a la posición de muestra con las esferas de calibración. **▲ Sugerencia: puede usarse la iluminación láser para verificar que la hoja de luz esté incidiendo sobre el canal del chip.**
 - b) Montar la jeringa con el medio precalentado en la bomba y conectar la manguera de microfluídos (de 47 cm de longitud) con el conector de acople en el otro extremo. Empujar el medio hasta llenar la manguera completamente con el medio. Iniciar el flujo en la bomba de jeringa, a 0.1 mL/h.

- c) Conectar el acople que viene de la jeringa a la entrada superior del chip. Fijar la manguera de salida a recipiente de descarte, asegurándola con cinta al recipiente para evitar derrames. El frasco de descarte debe quedar sobre la mesa óptica.
- 12. En el software del SPIM seleccionar los parámetros de adquisición deseados (láser de iluminación, filtro de detección, tiempo de exposición, carpeta para almacenamiento de archivos) y activar la imagen en vivo de fluorescencia. Seleccionar la región de interés donde se realizará el barrido (rango típico de 80 μm , con pasos de 1 μm).
- 13. Hacer un lavado inicial empujando el medio desde la bomba para eliminar las células no adheridas a la laminilla.
- 14. Verificar la región de interés y si es necesario re-seleccionar el rango.
- 15. Iniciar la adquisición con la función *time lapse* del software SPIM, indicando el espaciamiento entre pasos. ▲ *apagar la pantalla del computador antes de ejecutar la orden de inicio para minimizar la luz de fondo en las medidas.*
- 16. Almacenar el falcon restante con 10 mL de LB + 10 μL de Kan en incubadora a 30°C.

Día 3 (tiempo ~ 1 hora)

- 1. (8:30AM) Retirar 500 μL del medio precalentado y agregar 500 μL de etanol filtrado. Utilizar el vórtex para asegurarse que la mezcla quede homogénea y cargar la jeringa de 10mL.
- 2. (9:00AM) Revisión del SPIM: Detener la adquisición para chequear la región seleccionada y alineación de la hoja de luz. ▲ *El software del SPIM retorna a filtro de inicio entre adquisiciones del time lapse, por lo que deberá reconfigurarse según parámetros de adquisición deseados.* Reiniciar el timelapse, seleccionando nueva carpeta y reduciendo el tiempo entre tomas a 20 minutos.
- 3. Cambio de medio:
 - a) Detener flujo en bomba de jeringa.
 - b) ▲ Paso crítico: Sin desconectar la jeringa con el medio de crecimiento, desensamblarla de la bomba de jeringa y dejarla una posición **horizontal** y a una **altura similar** a la que estaba anteriormente.
 - c) Instalar jeringa con nuevo medio en bomba.
 - d) Empujar medio para asegurarse que no quede aire y reiniciar flujo a 0.1 mL/hr
 - e) ▲ Paso crítico: en el menor tiempo posible y manteniendo ambas jeringas cerca, desconectar y trasladar el conector con la manguera a la jeringa con el medio nuevo ya instalada en la bomba.