



TERRENI DI COLTURA

5 - Trypan blue and Tetracycline medium (TB-T)

Componenti	Concentrazione (g/L)
Glucosio (soluzione stock)	2
L-asparagina (soluzione stock)	1
NaHCO ₃	1
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O (soluzione stock)	0.1
Trypan blue (soluzione stock)	0.05
Tetraciclina (soluzione stock)	0.02

PROCEDURA:

Preparare le seguenti soluzioni stock in H₂O distillata:

- Glucosio 50% (conservare a temperatura ambiente)
- MgSO₄ · 7H₂O 10g/L (conservare a temperatura ambiente)
- Trypan blue 0.1% (conservare a + 4 °C)
- L-asparagina 1.5% (conservare a + 4 °C)

Preparare la seguente soluzione stock in etanolo 50%:

- Tetraciclina 12.5mg/ml (conservare al buio a -20 °C)

Autoclavare a 121 °C per 15 min le soluzioni stock di glucosio e MgSO₄ · 7H₂O e sterilizzare per filtrazione (pori 0,22 µM) le soluzioni stock di L-asparagina, tetraciclina e trypan blue.

Sciogliere NaHCO₃ e KH₂PO₄ nel volume appropriato di H₂O distillata, tenendo conto del volume degli altri componenti, preparati come soluzioni stock, che devono essere aggiunti dopo la sterilizzazione. Regolare il pH a 5,5 con acido fosforico al 10% (4ml/L) e autoclavare a 121 °C per

20 minuti. Dopo la sterilizzazione, aggiungere glucosio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, trypan blue, L-asparagina e tetraciclina. Per preparare il terreno solido, aggiungere agar (20 g/L) prima della sterilizzazione.