

NTM infected in Macrophages

20200207 Quan HL

➤ Materials

- 7H9 broth (BD, 271310)
- BD BBL Middlebrook OADC Enrichment (BD 212351)
- Shaking incubator (37 °C, 150 rpm)
- Centrifuge
- Complete Media: RPMI + 10% FBS +1% PS + 1% 2-Mercaptoethanol
- 24-well Plate (Corning 3524)
- LB Agar plate (90π dish)

➤ Process

Step 1: Mycobacteria culture

- 7H9 broth (+ 10% OADC) 5 ml 에 *M. abscessus* OD 0.5~0.8 까지 shaking incubator 에서 배양 함 (37 °C, 150 rpm)
 - ✓ Broth 는 ADC, Agar 는 OADC 를 권장

Step 2: Mycobacteria infection

- 배양 한 균을 원심분리 (4,000 rpm, 15 min, RT)
- 상층 액을 버리고 pellet 을 PBS (+1% Tween80)로 풀어 줌 (vortexing, 필요하면 G30 syringe 사용)
- 원심분리 (4,000 rpm, 10 min, RT)
- 상층 액을 버리고 w/o FBS media 로 풀어 줌 ($OD_{600}=1$ (5×10^8 /mL))
- Seeding 하여 놓은 세포에 원하는 농도로 Infection

Step 3 : CFU counting

- Infected macrophages PBS washing x 2 times
- 1% Triton-X (in DW 권장) 37 °C, 10 min
- 1mL 파이펫으로 세포를 깸
- PBS 으로 series dilution Agar plate 를 4 등분하여 50 μL 씩 duplicate 로 떨어뜨려 접종
- 3.5~4 일 37 °C 에서 키운 후 colony 카운팅

Step 4 : Mycobacteria Staining (Fast-Acid Staining)

- Glass plate 에 seeding 한 macrophages 에 mycobacteria infection
- PBS washing x 2 times
- Air dry
- 고정: 불꽃 위로 2-3 회 통과

- Carbol fuchsin을 올려놓고 나무 집게로 slide glass를 집어서 알콜램프 위에서 가열하여
- 증기가 오르면 빼낸다. (끓지 않게 주의) 염색약을 보충하고 가열하는 것을 반복하며 이를 5분간 지속
- Acid alcohol로 15~20 초 동안 세척
- 물로 세척하여 acid alcohol의 작용 중지시킨 후 메틸렌 블루로 20 초 동안 대조 염색
- 물로 세척, 건조 후 permount 로 고정 후 검경