

**Protocole 12.1 : Préparer la couche supérieure de gélose molle (Middlebrook 1X Top Agar pour *M*. *smegmatis*)**

**Objectif** **:** Préparer un mélange de gélose molle / milieux de culture pour la croissance de tapis bactériens sur des plaques de gélose

**But** **:** Mélanger une petite quantité de bactéries avec de la gélose molle et l'étaler sur la surface d'une plaque de gélose donne un tapis bactérien lisse, parfait pour observer les plages de lyse de bactériophages. Lorsque vous travaillez avec *M*. *smegmatis*, la gélose molle est préparée en mélangeant le Middlebrook Top Agar 2X avec un volume égal de milieu liquide 7H9.

**Matériel requis** **:**

* Solution de CaCl2 100 mM (stérile) (1 ml)
* Milieu liquide 7H9 (aliquote de 50 ml)
* Gélose molle 2X (aliquote de 50 ml)

**Protocole :**

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et réunissez le matériel requis.
2. Préparez le milieu 7H9.
3. En utilisant une technique aseptique, ajouter 1 ml de CaCl2 à un aliquote de 50 ml de milieu 7H9.
4. Placez dans un bain à 55°C.
5. Faire fondre la gélose molle 2X au micro-ondes.
6. Assurez-vous que le capuchon n’est pas complètement fermé !
7. La gélose molle 2X doit bouillir mais ne doit pas déborder.
8. La gélose doit être complètement fondue, alors agitez doucement la bouteille et vérifiez qu'il n'y a plus de particules solides en suspension.
9. Une fois la gélose complètement fondue, placez-la dans un bain à 55°C.
10. Combinez aseptiquement la gélose 2X chaude et le mélange 7H9 / CaCl2 pour faire la gélose molle 1X.
11. Conservez à 55°C jusqu'à utilisation.
12. Le CaCl2 précipitera hors de la solution et formera une couche trouble au fond de la bouteille. Agitez doucement le mélange pour dissoudre le CaCl2 avant son utilisation.