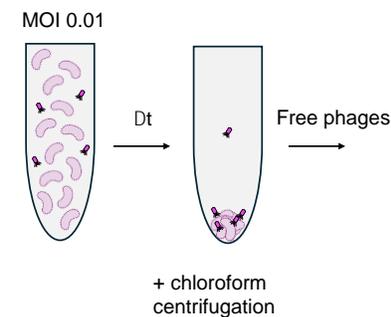


PRUEBA DE ADSORCIÓN

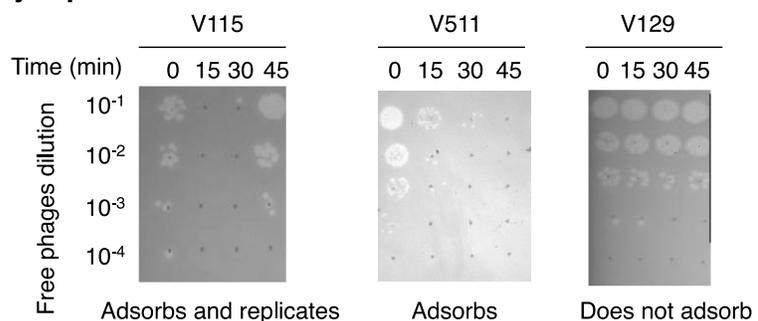
Introducción

La etapa inicial de la infección, denominada etapa externa, implica la adsorción del fago a un receptor (polisacárido o proteína extramembranosa). Esta adsorción atrapa a los fagos en la superficie de las células, lo que conduce a una disminución en la cantidad de fagos libres en el medio. Este fenómeno se mide en el ensayo descrito (consulte la figura a continuación). Idealmente, el ensayo se lleva a cabo a una baja multiplicidad de infección (MOI) para observar la completa desaparición de fagos libres. Después del tiempo de adsorción necesario (Foto izquierda, 15 min), se puede observar un aumento en los fagos libres (45 min), atribuido a la liberación de progenie. Este ensayo también permite la detección de resistencia mediada por mecanismos intracelulares. En tales casos, se observa una disminución en los fagos libres (foto central, 30 min), pero nunca un aumento (45 min). Se emplea cloroformo para lisar las células (deteniendo así el ensayo); después de la centrifugación, los fagos atrapados en la membrana se encuentran en el pellet.

Método



Ejemplo de resultados



Materiales

- Bacteria hospedadora
- Fago
- Marine Broth (MB) filtrado con 0.2mM para eliminar agregados
- Marine agar (MA)
- Erlenmeyers (control fago solo; bacteria+fago a MOI 0.01)
- Tubos Eppendorf 1.5mL etiquetados
- 1 placa petri mediana con MA para titrar a la bacteria hospedadora
- 1 placa petri grande con MA para titrar fagos
- 20 mL de Top agar en MB (0.2% para los fagos schizo; 0.4% para el resto de los fagos)
- Cloroformo

Método

Día -1

- Lanzar un cultivo bacteriano en 5mL de Marine Broth (MB), ON, 20°C en agitación suave (100 rpm).

Día 0: Test de adsorción

- Diluir el cultivo bacteriano inicial a 1/100 en 50 mL de MB en un Erlenmeyer.
- Cuando la suspensión haya alcanzado una DO de 0,3, tomar 1mL del cultivo, y realizar una dilución límite (10^{-1} a 10^{-8}) y colocar una gota de 5 ul de cada dilución en un gel MA=> esto permitirá confirmar los CFU/mL.
- Poner 10 mL de la suspensión bacteriana con un DO 0,3 en un Erlenmeyer pequeño.
- Lo mismo para el control del fago solo. Poner 10 mL del medio MB en un Erlenmeyer pequeño.
- A la suspensión bacteriana, agregar el fago para obtener una MOI 0.01, mezclar y dejar reposar a 20°C.
- Poner el mismo volumen de fagos en el control, mezclar y tomar 1mL para transferirlo a un tubo Eppendorf conteniendo 100uL de cloroformo. **Este será el T0.**
- A los siguientes tiempos: **T5, T10, T15, T30, T60, T120, T180, T240** tomar 1mL de la mezcla bacteria+fagos y colocarlos en un tubo Eppendorf que contenga 100uL de cloroformo, mezclar con vortex y guardar a 4°C hasta la titulación del fago.

Cuando la cinética haya terminado :

- Centrifugar por 5min a 13 000 rpm.
- Obtener 100 ul del sobrenadante (bien por encima del cloroformo) para una dilución límite en una placa de 96-pocillos (pura a 10^{-7}).
- Aplicar **5ul** sobre un césped bacteriano en top agar.

Tips importantes!

- Cada fago y huésped se comportan de manera diferente; por lo tanto, es crucial determinar sus tasas de crecimiento, la relación OD 0.3 a UFC/mL, el título de fagos considerando la disminución, etc. Por lo tanto, antes de comenzar:

- i) Evaluar la relación OD 0.3 a UFC/mL en tres experimentos separados.
- ii) El día anterior al experimento de adsorción, titular el fago.

- Es probable que la fase de crecimiento determine la expresión del receptor. Si los experimentos fallan en el OD 0.3 (después de al menos tres intentos), considerar probar otros valores de OD.

- Los resultados también pueden ser alcanzables con MOIs más altas (0.1 a 1) o mucho más bajas (<0.001).

- En el experimento inicial, realizar ensayos a largo plazo. Para el segundo y tercer experimento, centrarse en la ventana de disminución de fagos libres (tiempo máximo de adsorción) y el

aumento subsiguiente (inicio de la replicación lítica). El tiempo de adsorción varía significativamente, oscilando aproximadamente entre 1 minuto y 15-30 minutos para nuestros fagos.

- El cloroformo puede alterar ciertos fagos; por lo tanto, confirmar en el stock de fagos que no haya efecto en el título infeccioso.

- Para algunos fagos, se observa una disminución en la cantidad de fagos libres pero nunca una desaparición.

- Este protocolo proporciona una estimación aproximada del tiempo requerido para la producción de fagos. Sin embargo, dado que se utiliza cloroformo para lisar las células, este tiempo corresponde al eclipse (tiempo entre la inyección del genoma del fago y la producción de partículas en la célula) en lugar de la latencia (tiempo entre la inyección del genoma del fago y la liberación de partículas de la célula). Para estimar la latencia, no tratar con cloroformo; en su lugar, centrifugar las células y filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0.2 μm .

Referencia

Hyman, P. & Abedon, S. T. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* 501, 175-202, doi:10.1007/978-1-60327-164-6_18 (2009).