

PREPARATION OF HIGH TITER PHAGE
(Adapted from Kauffman and Polz 2018)

Introduction

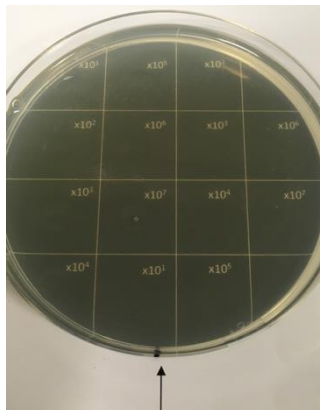
Ce protocole permet d'obtenir un stock de phages de 5 à 10 mL contenant 10^8 à 10^{11} CFU /mL. Ce stock doit être conservé à 4°C et à -80°C (en glycérol 25%) car les phages sont plus ou moins stables.

Matériel (exemple pour *V. crassostreae*)

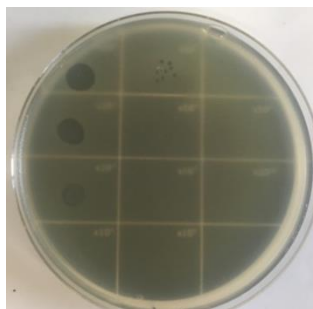
- Marine broth (MB)
- Marine agar (MA)
- Top agar (entre 0.4 et 0.2% selon les phages)

Méthode

1. Étendre un volume de culture nocturne de l'hôte sur des plaques MA avec un recouvrement d'agar frais (100 ul hôte+2,5 ml d'agar supérieur pour les petites plaques ; 250 ul hôte+7,5 ml d'agar supérieur pour les grandes plaques). Utiliser de petites (8,5 cm) ou de grandes plaques (13,5 cm) en fonction du nombre de phages par hôte. Sécher les plaques brièvement sur la pailleasse.
2. À partir d'un stock de phages purifiés, préparer des séries de dilutions décimales dans des milieux adaptés à l'hôte (10^{-1} à 10^{-7}) (par exemple, 5 ul phage+45 ul milieu). Si vous ne souhaitez pas connaître le titre du stock purifié, des dilutions de 10^{-1} à 10^{-3} suffisent (recommandé). Pipeter 10 ul gouttes sur une nouvelle plaque de gélose hôte (utiliser la certaine grille comme modèle). Ensuite, ne retirez pas ces plaques et tubes de dilution avant d'avoir terminé le titrage élevé (si vous avez besoin d'un enrichissement précédent, voir ci-dessous, ils sont très utiles pour obtenir de bonnes plaques ou si vous avez besoin d'une répétition).



3. Une fois que des plaques se sont formées dans la série de gouttes, identifier la dilution qui permet d'obtenir une lyse confluyente, mesurer la goutte et calculer la surface de la goutte. Calculer le volume nécessaire pour obtenir une lyse confluyente sur la grande plaque en tenant compte de la surface de la grande plaque ($A=\pi r^2=3,14 \times 6,75^2= 143 \text{ cm}^2$).



4. Préparer un mélange de 250 ul de culture hôte d'une nuit et du volume adéquat calculé précédemment. Distribuer ce mélange sur un fond d'agar dans un petit ou large plat avec une pelouse de recouvrement d'agar (7,5 ml pour le large), agiter pour mélanger et incubé.

5. Préparer également un contrôle négatif dans une petite boîte de Pétri contenant 100 ul d'hôte et 2,5 ml de gélose supérieure qui sert de référence utile pour évaluer le développement de la plaque.
6. Vérifier si les phages atteignent une lyse confluyente ou presque confluyente sur la pelouse de l'hôte (voir les plaques à contre-jour). Ajouter 12 ml de MB sur la pelouse avec le lysat de phage et incubé la plaque à 4°C pendant la nuit pour permettre aux phages d'éluer de la gélose supérieure.
7. Recueillir la MB par décantation dans un tube Falcon (une partie du volume d'élution sera perdue pendant l'incubation, le volume final est d'environ 10 ml). Centrifuger à 5000xg pendant 20 min et filtrer le surnageant sur 0,2 µm et conserver à 4°C. Pour un stockage à long terme, il est recommandé de préparer des stocks de glycérol à 25 % (volume final) pour un stockage à -20 °C et -80 °C, ainsi que du lysat brut à 4 °C.
8. Déterminer le titrage du stock « à titre élevé » (titrage prévu 10^9 - 10^{10} PFU/ml). Préparer une série de dilutions de 10^0 à 10^{-8} (par exemple, 4 tubes 10 µl de phage + 990 µl de milieu approprié pour l'hôte) et transférer le volume adéquat de chaque tube (par exemple, 10 µl) dans le tube suivant. Préparer un mélange de 100 ul de culture hôte d'une nuit et 10 ul de phage de la dilution 10^{-6} pour obtenir une dilution 10^{-8} sur la plaque. Préparer un autre mélange en utilisant 100 ul phage de la dilution 10^{-8} pour obtenir une dilution 10^{-9} sur la plaque. Distribuer ces mélanges sur la gélose de fond dans une petite boîte de Pétri, mélanger et incubé. Enfin, calculer le titrage du stock de phages.

NOTE : Si le volume calculé au point 3 est un facteur limitant, vous pouvez résoudre ce problème en créant un enrichissement primaire à petite échelle : liquide ou en utilisant une petite plaque.

Reference

Kauffman KM, Polz MF. Streamlining standard bacteriophage methods for higher throughput. *MethodsX*. 2018 Jan 31;5:159-172. doi: 10.1016/j.mex.2018.01.007.