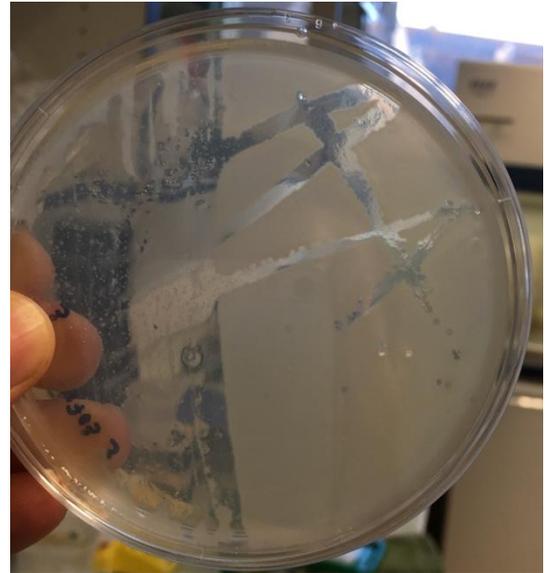
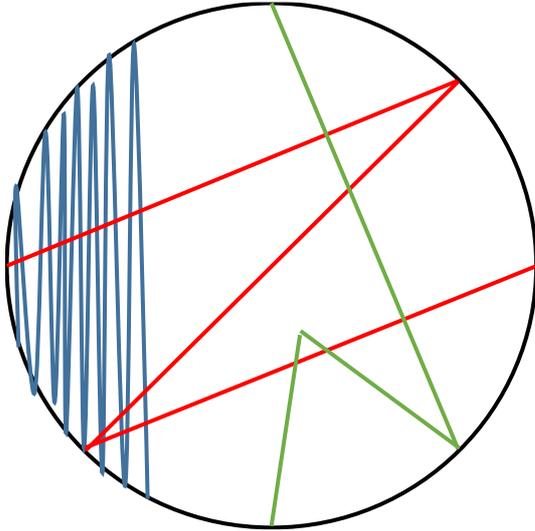


## Purification en série des phages par streaking

(Adapté de Kauffman et Polz 2018)

### Introduction

Après avoir isolé un phage à partir d'une plaque et avant de produire un stock à haut titre, il est nécessaire de le réisoler au moins deux fois.



### Matériel (exemple pour *V. crassostreae*)

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

### Protocole:

1. Faire bouillir abondamment la bouteille d'agar supérieure et vérifier que le milieu est complètement liquide et homogène. Maintenir à 55°C en agitant.
2. Distribuer 100 µl de la culture de l'hôte pendant la nuit sur des plaques MA sèches avec un recouvrement d'agar frais de 2,5 ml (si l'agar supérieur présente des « grumeaux », le jeter ou le faire bouillir à nouveau). Les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement car l'agar supérieur doit être fondu.
3. Insérer rapidement la pointe du tip jaune dans la plaque ou la source de phage liquide et l'étaler (du bord de la plaque vers le centre) sur la couche d'agar encore fondue (ligne bleue sur la figure).
4. Utiliser une deuxième pointe jaune pour faire trois traits distincts (Z) à partir de la zone initiale à travers la gélose supérieure (**ne jamais revenir lorsque vous faites le Z !**) (ligne rouge sur la figure).
5. Enfin, utilisez une troisième pointe jaune pour faire un nouveau Z à travers les traits faits à l'étape 4 (ligne verte sur la figure).

6. Incuber les plaques 24h. Lorsque des plaques apparaissent, utiliser cette plaque comme source de phage et répéter le processus de l'étape 2 deux fois.
7. Recueillir une seule plaque à l'aide d'un tip de 1 ml (précédemment, couper un peu le tip de 1 ml) à partir de la troisième purification en série. Éjecter les bouchons d'agar de la plaque dans un Eppendorf avec 750 µl de MB et permettre l'élution des particules de phage dans le milieu pendant la nuit à 4°C.
8. Après trempage, utiliser une seringue pour filtrer les phages par 0,2 µm dans un nouveau tube (vous perdrez du volume à cause de la filtration, votre volume final sera d'environ 300 µl). Le stock de phages purifiés peut être conservé à 4°C (ou -80°C avec 25% de glycérol) ou utilisé pour la préparation de stocks à titre élevé.

**Tip Importante:**

La plupart des phages de notre collection (Caudovirale) sont isolés en utilisant un TOP agar 0.4%. Les Schizotequatrovirus requièrent un TOP agar à 0.2% réalisé avec de l'agar de VWR J637-500G.

**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.