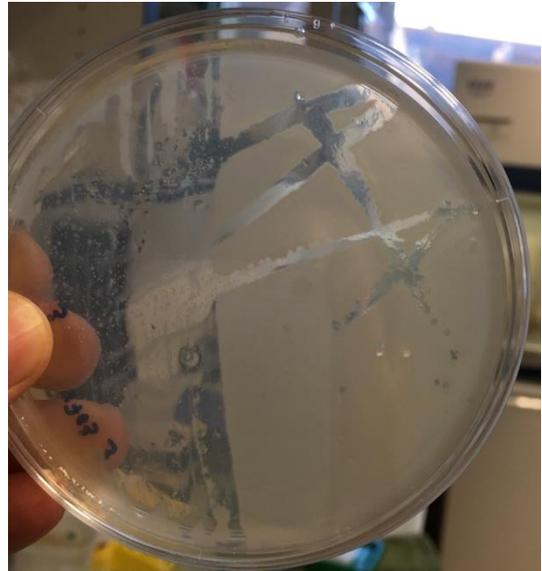
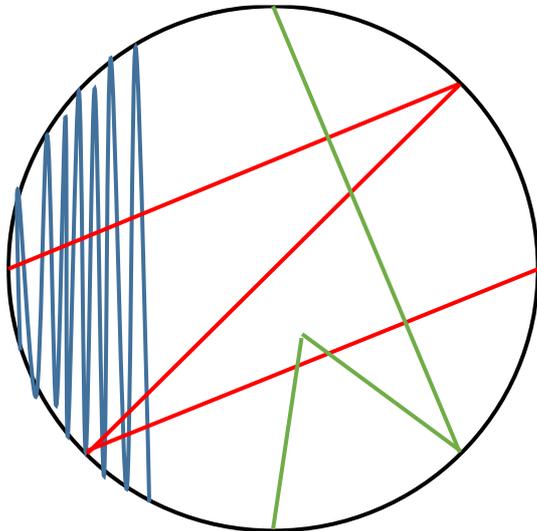


Purificación en serie de los fagos por estriado

(Adaptado de Kauffman y Polz 2018)

Introducción

Tras aislar un fago de una placa y antes de producir un stock de alto título, es necesario volver a aislarlo al menos dos veces.



Materiales (ejemplo para *V. crassostreae*)

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

Protocolo:

1. Hervir fuertemente el frasco superior de agar y comprobar que el medio está completamente líquido y homogéneo. Mantener a 55°C con agitación.
2. Dispensar 100 ul de cultivo nocturno del hospedador en placas MA secas con una capa de agar fresco de 2,5 ml (si el agar superior tiene «grumos» desecharlo o hervirlo de nuevo). Los siguientes pasos deben realizarse rápidamente ya que el agar superior debe estar fundido.
3. Rápidamente, inserte el tip amarillo en la placa o fuente de fago líquida y espárzala (desde el borde de la placa hacia el centro) sobre la capa de agar aún fundida (línea azul en la figura).
4. Utilice un segundo tip amarillo para hacer tres trazos separados (Z) desde la zona inicial a través del agar superior (**¡nunca regrese cuando esté haciendo la Z!**) (línea roja en la figura).
5. Por último, utilice un tercer tip amarillo para hacer una nueva Z a través de los trazos realizados en el paso 4 (línea verde en la figura).
6. Incube las placas por 24h. Una vez que aparezcan las placas, utiliza esta placa como fuente de fagos y repite el proceso desde el paso 2 dos veces.
7. Recoger una sola placa utilizando un tip de 1 ml (previamente, cortar un poco la punta) de la tercera purificación en serie. Expulsar los tapones de agar de la placa en Eppendorf con 750

ul de MB y permitir la elución de las partículas de fago en el medio durante toda la noche a 4°C.

8. Después del remojo, utilice una jeringa para filtrar los fagos por 0,2 µm en un tubo nuevo (perderá volumen debido a la filtración, aprox. su volumen final será de 300 µl). El stock de fagos purificados puede almacenarse a 4°C (o a -80°C con un 25% de glicerol) o utilizarse para la preparación de stocks de títulos altos.

Tip importante!

La mayoría de los fagos de nuestra colección (Caudovirale) se aíslan utilizando agar TOP al 0,4%. Los esquizoteatrovirus requieren agar TOP al 0,2% elaborado con agar VWR J637-500G.

Referencia

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.