

PREPARACIÓN DE FAGOS DE ALTO TÍTULO

(Adaptado de Kauffman y Polz 2018)

Introducción

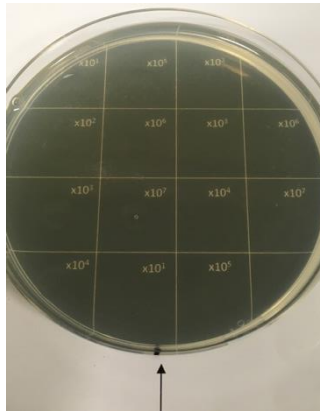
Este protocolo produce un stock de fagos de 5 a 10 mL que contiene de 10^8 a 10^{11} UFC /mL. Este stock debe almacenarse a 4°C y -80°C (en glicerol al 25%), ya que los fagos son más o menos estables.

Materiales (ejemplo para *V. crassostreae*)

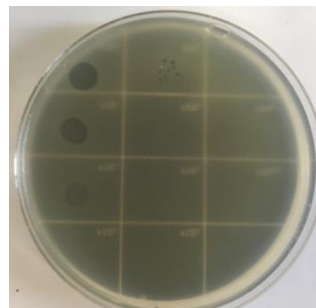
- Marine broth (MB)
- Marine agar (MA)
- Top agar (entre 0.4 y 0.2% dependiendo de los fagos)

Método

1. Extienda un volumen de cultivo nocturno del hospedador en placas MA con una capa de agar fresco (100 ul hospedador+2,5 ml de agar superior para placas pequeñas; 250 ul hospedador+7,5 ml de agar superior para placas grandes). Utilice placas pequeñas (8,5 cm) o grandes (13,5 cm) en función del número de fagos por hospedador. Secar las placas durante un tiempo en la mesada.
2. A partir de un stock de fago purificado, prepare series de dilución decimal en medios apropiados para el hospedador (10^{-1} a 10^{-7}) (por ejemplo, 5 ul fago+45 ul medio). Si no le interesa conocer el título del stock purificado, diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} serían suficientes (recomendado). Pipetee 10 ul de gota en una nueva superposición de agar huésped (utilice la rejilla determinada como plantilla). Después, no retire estas placas y tubos de dilución hasta que termine la titulación alta (si necesita un enriquecimiento previo, vea más abajo, son muy útiles para obtener buenas placas o si necesita repetir).



3. Una vez desarrolladas las placas en la serie de gotas, identificar la dilución que permite una lisis confluyente, medir la gota y calcular su superficie. Calcular el volumen necesario para conseguir una lisis confluyente en la placa grande teniendo en cuenta la superficie de la placa grande ($A=\pi r^2=3,14 \times 6,752=143 \text{ cm}^2$).



4. Preparar una mezcla de 250 μ l de cultivo de hospedador de una noche y el volumen adecuado calculado previamente. Dispensar esta mezcla sobre el fondo de agar en una placa pequeña o grande con césped superpuesto de agar (7,5 ml para la grande), agitar para mezclar e incubar.
5. Preparar también un control negativo en una placa Petri pequeña que contenga 100 μ l de hospedador y 2,5 ml de agar superior que sirva como referencia para evaluar el desarrollo de la placa.
6. Comprobar si los fagos alcanzan confluencia, o casi confluencia, lisis en el césped del hospedador (ver placas a contraluz). Añadir 12 ml de MB en el césped con el lisado de fagos e incubar la placa a 4°C durante la noche para permitir que los fagos eluyan del agar superior.
7. Recoger el MB decantándolo en un tubo Falcon (una parte del volumen de elución se perderá durante la incubación, volumen final aprox. 10 ml). Centrifugar a 5000xg durante 20 min y filtrar el sobrenadante por 0,2 μ m y almacenar a 4°C. Para el almacenamiento a largo plazo se recomienda preparar reservas de glicerol al 25% (volumen final) para su almacenamiento a -20°C y -80°C, así como lisado a 4°C.
8. Determinar la titulación del stock de «título alto» (titulación esperada 10^9 - 10^{10} PFU/ml). Preparar series de dilución 100x de 10^0 a 10^{-8} (por ejemplo, 4 tubos de 10 μ l de fago+ 990 μ l de medio apropiado del hospedador) y transferir el volumen adecuado de cada tubo (por ejemplo, 10 μ l) al tubo siguiente. Preparar una mezcla de 100 μ l de cultivo del hospedador de una noche y 10 μ l de fago de la dilución 10^{-6} para conseguir una dilución 10^{-8} en placa. Preparar otra mezcla utilizando 100 μ l fagos de la dilución 10^{-8} para conseguir una dilución 10^{-9} en placa. Dispense estas mezclas sobre el fondo de agar en una placa Petri pequeña, agite para mezclar e incube. Por último, calcule la titulación del stock de fagos.

NOTA: Si el volumen calculado a partir del punto 3 es un factor limitante, podría resolver este problema creando un enriquecimiento primario a pequeña escala: líquido o utilizando una placa pequeña.

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.