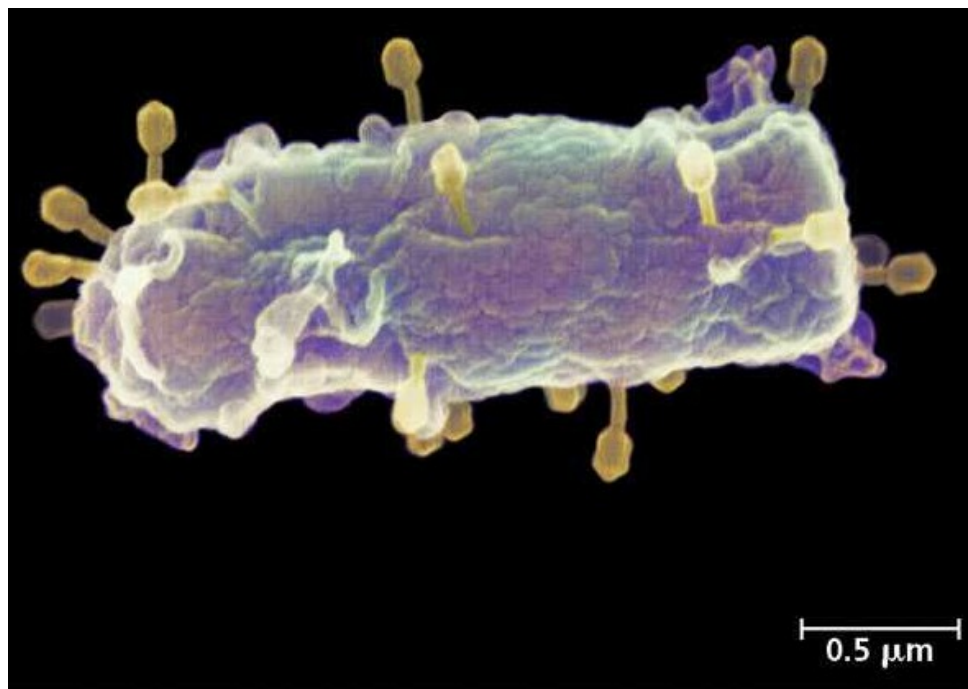


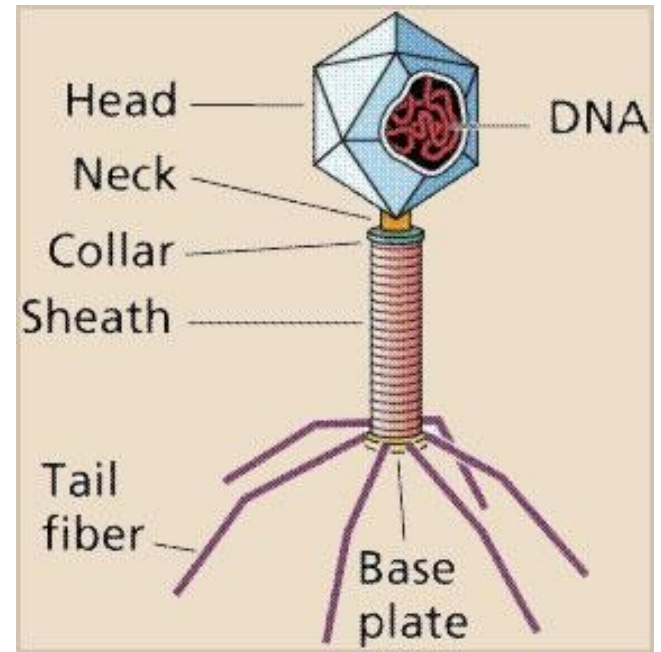
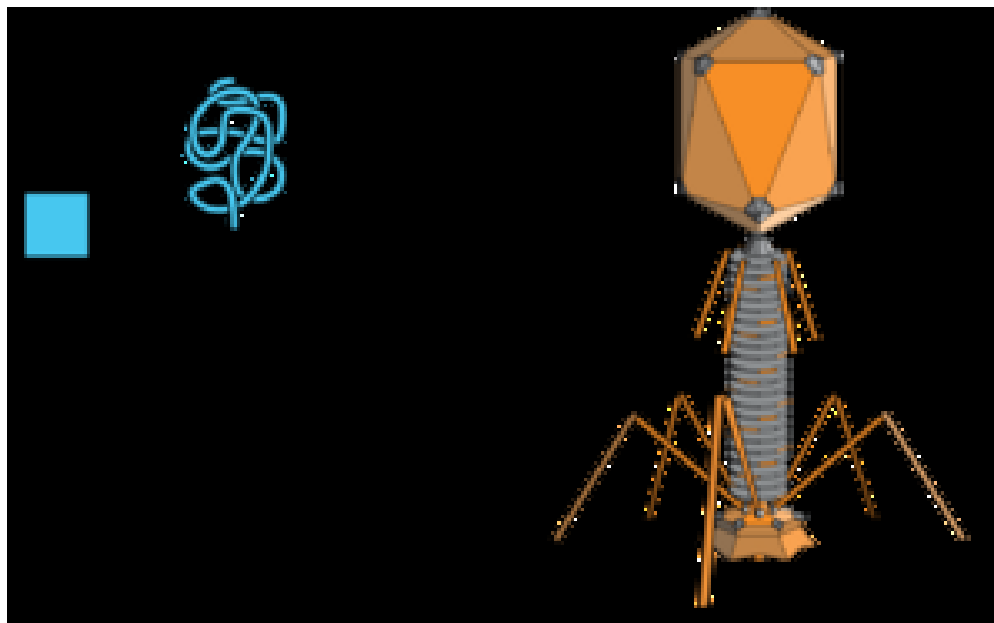
Práce s bakteriofágem

Cíl: Stanovit titr fágového lyzátu metodou dvouvrstvého agaru

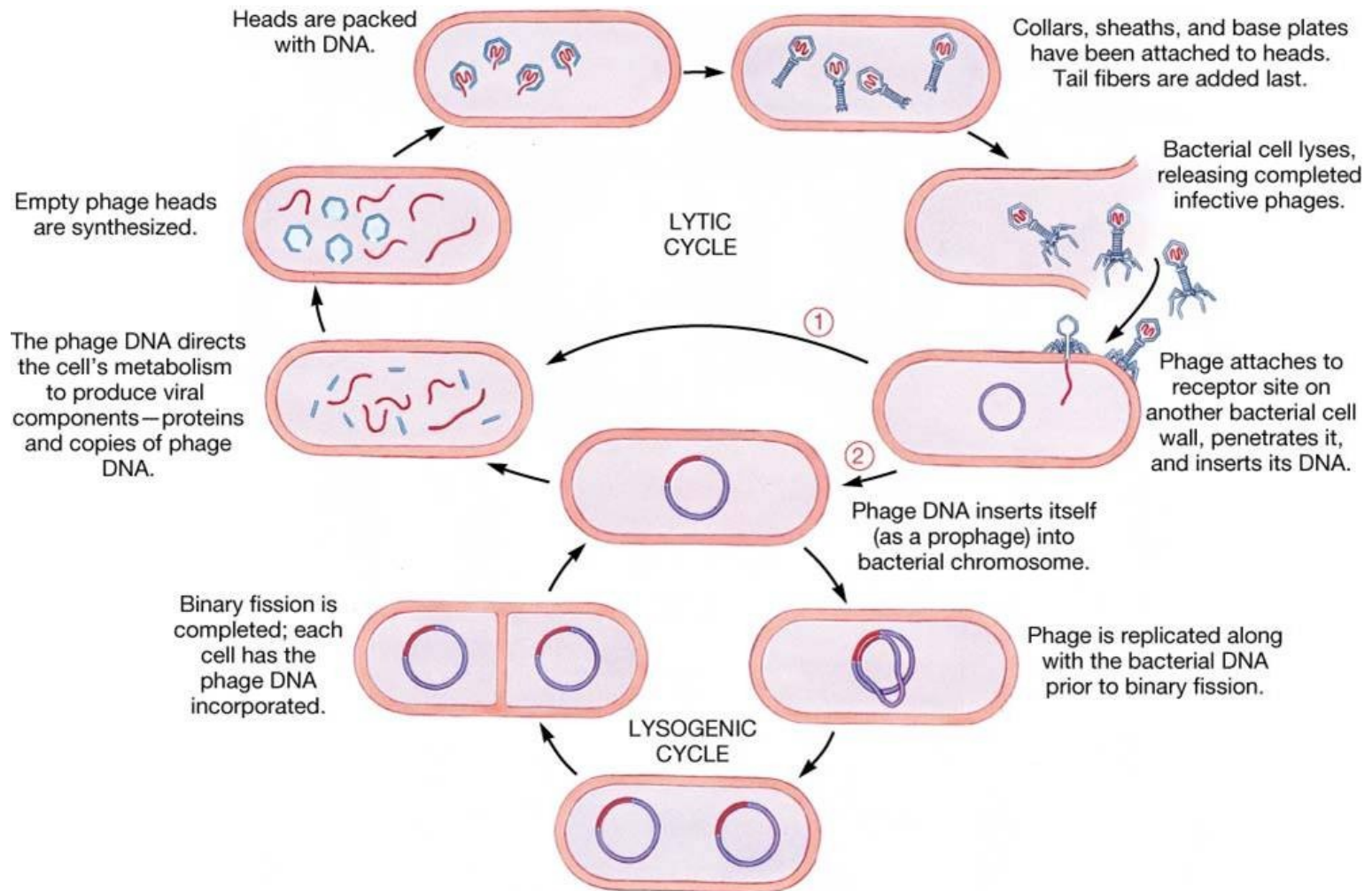
Bakteriofágy

- Podskupina virů infikující bakterie → menší než bakterie
- Velice početná skupina
- Užívání i k léčbě – vyhubí bakterie
- Rozdíly v rozmezí hostitele
- Virulentní X temperované fágy – jiný životní cyklus



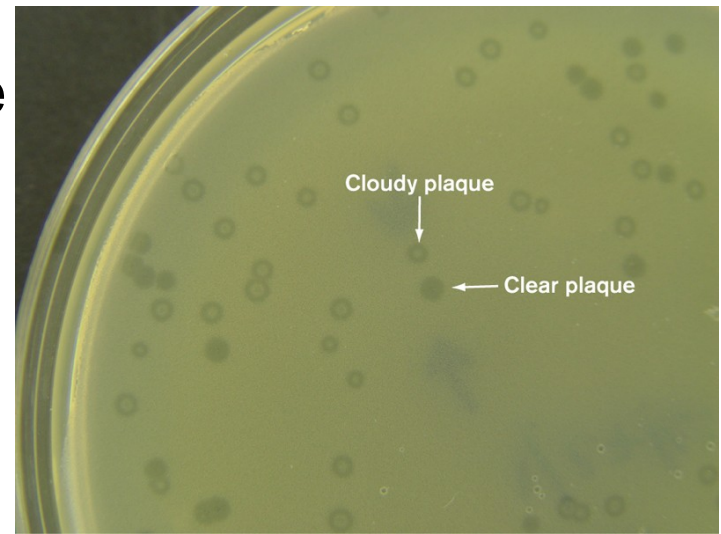


Životní cyklus fága



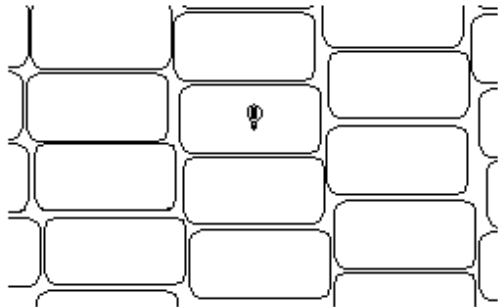
Virulentní fág – lytický ŽC

1. Adsorpce virionu na povrch citlivé buňky
 2. Penetrace nukleové kyseliny do buňky
 3. Replikace fágové DNA, syntéza bílkovin fága a kompletace nových virionů
 4. Uvolnění virionů do prostředí – lyze buňky
 5. Infekce další buňky
- tekuté médium – projasnění, **tzv. fágový lyzát** (zbytky buněk, virové částice, nenapadené buňky, vylité obsahy buněk)
 - nárůst na misce – plaky
- Plaka** = potomstvo 1 fágové částice

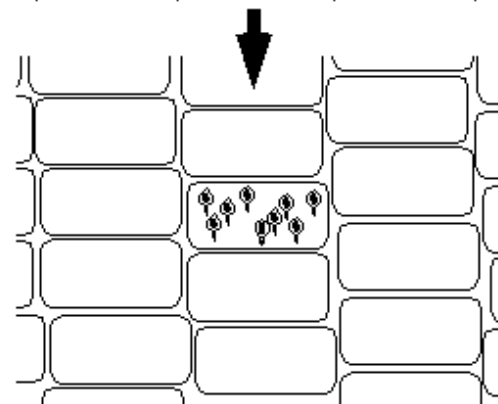


Tvorba plak

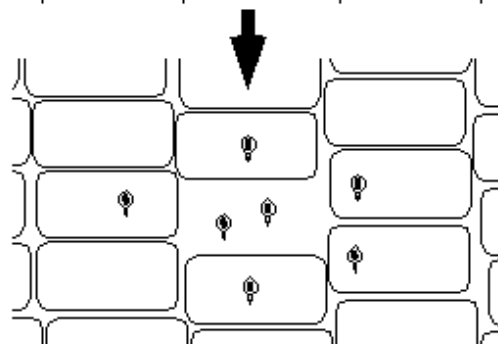
základem je mít buňky ve větším množství než fágové částice, aby se fágy mohli pomnožit



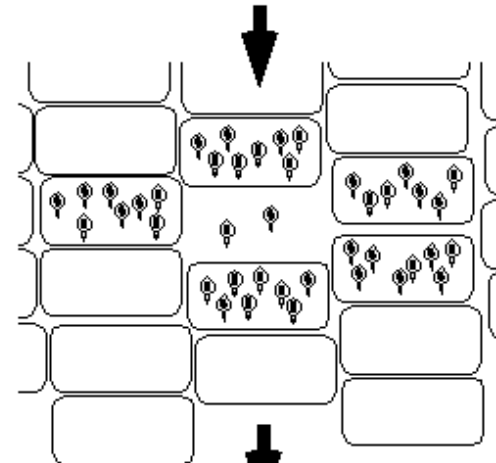
A phage infects a single cell in a lawn of sensitive, growing bacteria.



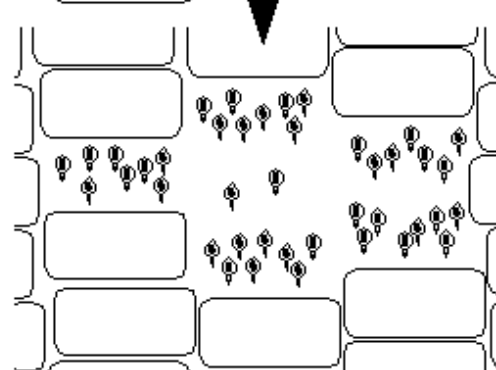
Phage reproduces in the cell, typically yielding about 50 progeny phage per infected cell.



Lysis of the cell releases phage into the medium. The phage diffuses through the medium and infects adjacent cells.



Phage reproduces in these cells, releasing 50 additional progeny phage per infected cell.



These cells lyse, releasing more phage which can then diffuse outward and infect the surrounding cells. Lysis of the cells results in a circular clearing in the lawn of bacteria. This region of visible lysis is called a plaque.

Příprava fágového lyzátu

- 2 ml narostlého 24h inokula *S.aureus* SA 812 očkujeme do 100 ml čerstvého MPB v provzdušňovací lahvi a za intenzivního provzdušňování pokračujeme v kultivaci další 4h při stejné teplotě (30 C)
- Po 4h asepticky přidáme 10 ml sterilního 0,22% CaCl₂ a 5 ml zásobního lyzátu fága 812 a pokračujeme v kultivaci
- Po 60 min přemístíme provzdušňovací láhev do temna a pokojové teploty
- Za 12 - 24h se médium vyčereí, ale zůstane určitý počet necitlivých buněk, proto se lyzát sterilizuje přidavkem chloroformu (5 - 10 kapek na 10 ml lyzátu) 1 - 2 hod
- Lyzát se přenese do baňky a uchovává se při 4 C (v této formě se významně nemění počet aktivních fágových částic po dobu 1 - 2 měsíců)

Příprava hostitelských buněk

- ze zásobní kultury *S.aureus* SA 812 naočkujeme 20 ml sterilního MPB (ve 100 ml baňce) a kultivujeme 24 hodin při teplotě 30 C

Stanovení počtu virionů

- Lyzát fága 812 zředíme ve sterilním Tris HCl pufru
(**0,1 ml lyzátu** / předchozího ředění **do 0,9 ml pufru**, na každé ředění používáme čistou pipetu, dobře mícháme)
- Připravíme si sterilní zkumavky, které budou obsahovat 3 ml 0,7% MPA, rozvařeného a vytemperovaného na 45 C
- K hostitelským buňkám se sterilně přidají 2 ml 0,22% CaCl_2 (do 20 ml), poté se pipetuje 0,3 ml inokula do každé zkumavky
- Na misky s 2% MPA se pipetuje 0,1 ml příslušných ředění fága
-
- Miska se ihned zalije obsahem jedné zkumavky, krouživým pohybem se agar promíchá s napipetovanou kapkou a ve vodorovné poloze nechá utuhnout
- kultivace při 30 C 12 - 24 hodin

Hodnocení

- počítáme počet plak na miskách s nejvhodnějším ředěním (20 – 200; méně než 10 plak nehodnotíme)
- Výsledek je v PFU/ml

Příklad výpočtu:

- Na 3 Petriho miskách naočkovaných 0,1 ml vzorku ředěného 10^{-5} se vytvořil následující počet plak: 122, 132, 139.
Aritmetický průměr z těchto hodnot je **131**.
- Titr lyzátu je:
 $131 \cdot 10^5 = \mathbf{1,31 \cdot 10^7}$ v 0,1 ml tedy $\mathbf{1,31 \cdot 10^8}$ v 1 ml neředěného vzorku

Toto číslo ve skutečnosti vyjadřuje počet fágových částic schopných vytvářet plaky, nikoliv absolutní počet virionů, výsledek se proto uvádí v tzv. PFU = plaques forming units.

Titr našeho fágového lyzátu je tedy **$1,31 \cdot 10^8$ PFU/ml.**

