****

**Protocole 5.6 : Technique du dépôt de gouttes**

**Objectif** **:** Tester la présence de phages dans un échantillon

**But** **:** Les plages de lyse sont des zones claires sur un tapis bactérien qui se forment lorsque les phages infectent, se répliquent et lysent les bactéries. Des tests de dépôt de la goutte (« spot test » en anglais) peuvent être utilisés pour cribler des cultures enrichies ou vérifier la présence de phages dans des plages de lyse incertaines. En « déposant » un échantillon sur un tapis de bactéries fraîchement préparé, vous pouvez confirmer la présence de phages si une zone clarifiée se développe après l'incubation.

**Matériel requis :**

* Échantillon liquide de phages (soit une plage de lyse prélevée à partir d'un isolement direct, soit un isolement enrichi)
* Plaques de gélose
* Bactérie hôte (250 μl / plaque)
* Gélose molle
* Tampon de phage
* Pipette sérologique de 5 ml

**Protocole :**

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et rassemblez le matériel requis.
2. Rassemblez les échantillons liquides de phages qui doivent être testés.
3. Préparez un tapis bactérien en utilisant les techniques aseptiques.
4. Marquez le fond d'une plaque d'agar.
	1. Divisez la plaque en autant de sections que vous avez d'échantillons en dessinant sur le fond de la plaque. (Voir la Figure 5.6-1 pour des exemples sur les façons de diviser la plaque en sections.) Identifiez chaque section en fonction de vos échantillons.
5. Obtenez une culture de 250 µl de bactéries hôtes.
6. Pour cette partie de l'expérience, vous aurez besoin de 3 ml de gélose molle par plaque. Cette solution vous sera peut-être fournie par votre enseignant ou vous devrez peut-être la faire selon le protocole trouvé dans la boîte à outils.
	1. À l'aide d'une pipette stérile de 5 ml, transférez 3 ml de gélose molle dans un tube de culture contenant des bactéries hôtes, puis aspirez immédiatement la solution dans la même pipette.

Important : essayez d'éviter de faire ou de retirer des bulles, car elles peuvent ressembler à des plages de lyse sur les plaques de gélose.

1. Distribuez le mélange de gélose-bactéries sur une plaque de gélose.
	1. La gélose supérieure ne doit pas rester dans la pipette pendant plus que quelques secondes car elle commencera à se solidifier.
	2. Inclinez doucement, mais rapidement, la plaque dans plusieurs directions jusqu'à ce que le mélange de gélose molle recouvre uniformément la plaque de gélose.
2. Laissez la plaque reposer sans bouger pendant 20 minutes ou jusqu'à ce que la gélose molle se solidifie complètement.

|  |
| --- |
| https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/16338/ckfinder/images/Figure%205_6_1%20spot%20plate%20patterns(2).jpg |
| Figure 5.6-1. Modèles possibles de gouttes. |

1. Déposez les échantillons liquides de phages et les contrôles sur le tapis bactérien préalablement préparé.
2. Transférez aseptiquement 10 μl de chaque échantillon, un par un, sur l'emplacement approprié sur le tapis bactérien.
	1. Placez l’embout légèrement au-dessus de l'agar et expulsez lentement la goutte pour éviter les éclaboussures.
	2. Assurez-vous de déposer vos échantillons au bon endroit ! N'oubliez pas que les marques sous la plaque sont des images miroir (c'est-à-dire qu'elles apparaîtront à l'envers) de votre schéma d'identification lorsque la plaque est retournée.
3. Déposez 10 µl de tampon de phage stérile sur la plaque comme contrôle négatif.
4. Laisser les gouttes pénétrer dans la gélose (généralement 10 à 15 minutes).
5. Sans inverser les plaques, les incuber à la bonne température pendant 24 à 48 heures.
6. Vérifiez les plaques pour la présence de zones clarifiées aux endroits des dépôts des gouttes.
7. Après au moins 24 heures, vérifiez chaque dépôt sur la plaque de gélose. Si vous voyez une zone clarifiée pour l'un de vos échantillons, félicitations ! Votre échantillon d'origine contenait un phage !
8. Assurez-vous que votre contrôle négatif ne montre PAS de signes de phages.
9. Notez les détails de votre plaque dans votre cahier de laboratoire.
10. Vous pouvez maintenant passer au Chapitre 6, **Purification de votre phage**!

**Conseils utiles :**

* Vous ne devriez pas déposer plus de 10 échantillons sur une seule plaque.
* Une zone claire dans un test ponctuel n'est PAS une plage de lyse ; ce sont plutôt de nombreuses plages de lyse qui se chevauchent et qui apparaissent comme une seule grande zone claire.
* Il n'est pas recommandé de procéder à la purification d’un phage à partir d'une plaque sur laquelle plusieurs phages ont été déposés.