

**Protocole 6.1 : Test de plages de lyse pour la purification**

**Objectif :** Générer des plages de lyse bien isolées

**But :** Avant de commencer à caractériser un phage, vous devez vous assurer d'avoir une population clonale de phages. Le processus consiste à diluer en série, soit une culture enrichie positive, soit une plage de lyse provenant de cycles de purification, puis à effectuer un test de plages de lyse avec les échantillons dilués. En répétant ce processus une ou deux fois, et en repiquant toujours une plage de lyse bien isolée et séparée des plages de lyse adjacentes, vous obtiendrez une population clonale de phages.

**Matériel requis** **:**

* Échantillons de phages à purifier
* Tampon de phage
* Microtubes
* Bactérie hôte
* Plaques de gélose
* Gélose molle
* Pipettes sérologiques de 5 ml

**Protocole :**

Il ne s'agit pas en fait d'un nouveau protocole, mais d'une combinaison de protocoles que vous avez déjà utilisés. Les protocoles mentionnés ici se trouvent dans les chapitres précédents ainsi que dans la boîte à outils.

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et réunissez le matériel requis.
2. Réunissez vos échantillons de phages.
	1. Si vous partez d'un isolement après enrichissement dont le test de dépôt de gouttes est positif pour la présence de phages, passez à l'étape D.
	2. Si votre échantillon de phages provient d’une plage de lyse, tracez un cercle autour de la plage de lyse d'intérêt sous la plaque et identifiez-la. Notez les détails dans votre cahier de laboratoire.
3. Suivez le protocole **Repiquage d’une plage de lyse** (5.4) pour repiquer la ou les plages que vous souhaitez purifier.
	1. Il est préférable de ne sélectionner que des plages bien isolées (espacées d'au moins 1.5 cm) d'une plaque fraîchement préparée.
	2. À la fin du protocole **Repiquage d’une plage de lyse**, vous aurez des échantillons de phages liquides.
4. Diluez vos échantillons de phages liquides selon le protocole **Dilutions en série** (6.2).
5. Préparez vos plaques de gélose.
	1. Réunissez autant de plaques de gélose que vous avez d'échantillons de phages à purifier.
	2. Identifiez le dessous des plaques avec votre nom, la date et une référence à l'échantillon.
6. Inoculez les plaques avec vos dilutions selon le protocole du **Test du dénombrement des plages de lyse** (5.3).
7. Après avoir incubé les plaques pendant 24 à 48 heures, notez vos résultats dans votre cahier de laboratoire. Considérez les questions suivantes :
* Combien de plages de lyse y a-t-il sur chaque plaque ? Le nombre de plages de lyse sur vos plaques correspond-t-il aux dilutions en série comme vous vous en attendiez ?
* Toutes vos plages de lyse partagent-elles la même morphologie ?
* Si vous avez plusieurs morphologies différentes, en quoi diffèrent-elles ?
* Si vous pensez que vous avez encore plus d'un type de phages dans votre échantillon, que devriez-vous faire ensuite ?
1. Une fois que vous êtes certain d'avoir une seule population de phages, vous pouvez passer au protocole **Collecter des lysats de phages à la surface d’une boîte de Pétri** (6.3) comme indiqué par votre enseignant.
	1. Pour collecter les lysats des plaques, utilisez la meilleure plaque presque confluente de votre cycle final de purification des phages.

**Conseils utiles** **:**

* Il n'est pas rare qu'un phage forme des plaques qui ont plus d'une morphologie. Si vous continuez à observer des plaques de morphologies multiples, même après avoir effectué soigneusement un ou deux cycles de purification, vous pouvez avoir un tel phage.
* La morphologie des phages est également connue pour changer en fonction de la concentration. Il n'est pas rare que les plages de lyse paraissent plus petites lorsqu'elles sont plus rapprochées à des concentrations plus élevées.
* Lors de la purification d'un phage, sa taille n'est pas le trait morphologique le plus fiable car la taille peut parfois varier. Au lieu de cela, la présence ou l'absence de halos ou de contours définis, ainsi que la turbidité des plages de lyse, sont plus fiables.