

**Protocole 6.4 : Titration par dépôt de gouttes**

**Objectif** **:** Déterminer la concentration de particules phagiques dans un lysat à l'aide d'un test par dépôts de gouttes

**But** **:** Le nombre total de particules de phage dans votre lysat peut être calculé en effectuant des dilutions en série, suivi d'un test de dépôt de gouttes pour chaque dilution, puis en comptant le nombre de plages de lyse formées. En tenant compte du volume et de la dilution utilisés pour générer ces plages de lyse, vous pouvez calculer la concentration, ou le titre, de votre lysat de phages. Parce que chaque plage de lyse est formée à partir d'une seule particule de phage, cette particule de phage d'origine est appelée une unité formatrice de plages de lyse (UFP). La concentration d'un lysat est présentée comme le nombre d'unités formatrice de plages de lyse dans chaque millilitre de lysat, ou UFP / ml.

La titration par dépôt de gouttes est un test de plages de lyse modifié qui utilise une seule plaque de gélose pour jusqu'à huit dilutions de lysat, ce qui vous permet de calculer le titre de votre lysat. L'inconvénient de l'utilisation d'une telle titration est que le nombre de plages de lyse mesurables par goutte est faible, ce qui introduit une grande marge d'erreur. Par conséquent, une titration par dépôt de gouttes est utilisée pour estimer les dilutions que vous devriez utiliser lors de l'exécution d'une titration entière sur boîte de Pétri.

**Matériel requis :**

* Lysat à titrer
* Plaque de gélose
* Culture bactérienne hôte
* Gélose molle
* Tampon de phage
* Microtubes
* Pipettes sérologiques de 5 ml

**Protocole** **:**

1. Préparez votre paillasse pour travailler dans des conditions aseptiques et rassemblez le matériel requis.
2. Identifiez une plaque de gélose pour une titration par dépôt de gouttes.
	1. Identifiez le dessous d'une plaque de gélose avec votre nom, la date et la notation « titration par dépôt de gouttes ».
	2. À l'aide d'un marqueur, divisez la plaque en autant de sections que d'échantillons. N'oubliez pas d'inclure une section pour un contrôle négatif. Voir la Figure 6.4-1 pour des exemples de la meilleure façon de diviser la plaque en sections. Identifiez chaque section en fonction de vos échantillons.

|  |
| --- |
| https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%206_4_1_%20spot%20titers.jpg |
| Figure 6.4-1. Deux exemples de plaques de titration par dépôt de gouttes. |

1. Préparez un tapis bactérien en utilisant des conditions aseptiques. (Pour cette partie de l'expérience, vous aurez besoin de 3 ml de gélose molle par plaque. Votre enseignant peut vous le fournir ou vous devrez peut-être le faire selon le protocole trouvé dans la boîte à outils).
	1. À l'aide d'une pipette stérile de 5 ml, aspirez 3 ml de gélose molle.
	2. Transférez la gélose dans un tube de culture contenant 250 µl de bactéries hôtes, mélangez doucement et aspirez rapidement de nouveau cette solution dans la même pipette.
	3. Versez le mélange gélose-bactéries sur une plaque de gélose.
	4. Inclinez doucement, mais rapidement la plaque dans plusieurs directions jusqu'à ce que le mélange de gélose molle recouvre uniformément la plaque de gélose.
	5. Laissez la plaque reposer *sans la bouger* jusqu'à ce qu'elle se solidifie complètement. Cela prendra au moins 10 minutes.
2. Effectuez le protocole **Dilutions en série** (6.2) sur l'échantillon que vous souhaitez titrer.
	1. Les lysats doivent être dilués à 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7 et 10-8 dans un tampon de phage.
3. Déposez les dilutions et les contrôles sur le tapis bactérien préparé.
	1. Un à la fois, transférez aseptiquement 3 μl de tous les échantillons sur l'emplacement approprié sur le tapis bactérien.
	2. Utilisez 3 µl de tampon de phage stérile comme contrôle négatif.
	3. Laissez le liquide des gouttes s’absorber dans la gélose pendant 30 minutes ou plus.
	4. Incubez les plaques (gouttes vers le haut, donc, non inversées) à la bonne température pendant 24 à 48 heures.
4. Après incubation des plaques, comptez le nombre de plages de lyse.
	1. Après au moins 24 heures, vérifiez chaque goutte sur la plaque de gélose.
	2. Le nombre de plages de lyse à chaque endroit est-il logique ? Par exemple, y a-t-il une réduction du nombre de plages de lyse de 10 fois, selon les dilutions effectuées ? Si tel est le cas, choisissez la ou les dilutions qui contiennent un nombre mesurable de plages de lyse.
5. Calculez le titre en UFP / ml en utilisant la formule :

Titre (UFP / ml) = (# UFP / volume utilisé en μl) x (103 μl / ml) x facteur de dilution\*

\*Le facteur de dilution est l'inverse de la dilution utilisée. Pour une dilution 10-7, le facteur de dilution est 107.

Exemple : Si 12 plages de lyse ont été observées sur une goutte créé par 3 μl d'une dilution 10-7 :

Titre (UFP / ml) = (12 UFP / 3 μl) x (103 μl / ml) x (107)

= (4 x 103 x 107) UFP / ml

= 4 x 1010 UFP / ml

*Essentiellement, vous divisez le nombre de plages de lyse par le volume de l’échantillon utilisé. Ensuite, vous multipliez ce nombre par l'inverse des dilutions utilisées pour préparer cette goutte et convertissez μl en ml pour obtenir le titre en UFP / ml.*

1. Voir le protocole **Titration entière sur boîte de Pétri** (6.5) pour savoir comment utiliser votre titration par dépôt de gouttes pour décider des dilutions à utiliser pour effectuer une titration plus précise.

**Conseils utiles :**

* Lorsque les nombres exponentiels sont multipliés, les exposants sont additionnés. Par exemple, 105 x 104 = 109.
* Les tapis bactériens peuvent être préparés à l'avance, réfrigérés pendant la nuit et utilisés le lendemain pour le protocole de titration par dépôt de gouttes.
* Lorsque vous déposez vos gouttes, évitez de toucher la gélose avec l’embout de la micropipette. Tenez l’embout légèrement au-dessus de la gélose et expulsez lentement la goutte en évitant les éclaboussures.
* N'oubliez pas que les marques en dessous d'une plaque de gélose sont des images miroir (c'est-à-dire qu'elles apparaîtront à l'envers) de votre schéma d'identification lorsque la plaque est retournée. Assurez-vous de déposer vos échantillons au bon endroit !
* Un lysat à titre élevé a un titre d'au moins 5 x 109 UFP / ml. (Si vous avez au moins trois plages de lyse dans la dilution de 10-7, vous avez un titre suffisamment élevé pour isoler l'ADN et archiver votre lysat.)

Exemple de problème : Calcul du titre à partir d'une titration par dépôt de gouttes.

****

La plaque de titration par dépôt de gouttes ci-dessus contient des gouttes de 10 μl de dilutions de 10–1 à 10–10. Les dilutions 10–1 à 10–5 forment des gouttes complètement claires et aucune plage de lyse n'est visible sur les taches 10–9 ou 10–10. Cependant, des plages de lyse individuelles sont visibles sur les gouttes de dilution 10–6, 10–7 et 10–8. La goutte de la dilution 10–7 ci-dessus montre 28 plages de lyse et la dilution 10–8 en montre 3. Les deux gouttes donnent approximativement le même titre. La différence entre 2.8 x 1010 et 3 x 1010 est le reflet de l'erreur inhérente entre le comptage de 28 vs. 3 plages de lyse.

28 UFP / 10 μl x 1000 μl / 1 ml x 107 = 2.8 x 1010 UFP / ml

OU

3 UFP /10 μl x 1000 μl/1 ml x 108 = 3.0 x 1010 UFP/ml