

## Aulas Práticas 5 e 6

### Isolamento e quantificação de bacteriófagos

**Objetivo:** Observar lise bacteriana decorrente de infecção viral e quantificação das partículas

**Materiais:**

- **Meio LB:** 20 g de meio LB, 08 g de Agar Bacteriológico, água ultrapura q.s.p 1L.
- **Top Agar:** 10 g de Bacto-triptona, 1 g de Bacto-extrato de levedura, 8 g de Bacto-ágar, 8 g de NaCl, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,2% de glucose. Dissolver em água ultrapura (q.s.p. 1 litro). Após esterilização em autoclave, suplementar com 5-10 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,1 M de MgSO<sub>4</sub>.
- **Solução de cálcio-magnésio (MC):** MgSO<sub>4</sub> 0,1 M e CaCl<sub>2</sub> 5 mM

**Preparação do lisado de fago P1**

1. Cultivar uma cultura de *E. coli* a 37°C durante a noite em meio LB.
2. Diluir a suspensão bacteriana a 1: 100 em 10 ml de meio LB contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,2% de glucose.
3. Crescer as bactérias novamente a 37°C até obter densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (OD600) em torno de 0,3 a 0,5. Então adicionar 0,1 a 0,2 ml de um lisado de P1.
4. Aerar as células durante 2-3 horas a 37 ° C (observar a formação de lise);
5. Adicionar 500 µl de clorofórmio aos 10 ml de meio. Incubar por 5 minutos e então centrifugar para remover os restos de células.
6. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar mais 500 µl de clorofórmio. Incubar por 5 minutos e centrifugar. O lisado pronto (sobrenadante) é mantido sob refrigeração até o uso.

**Titulação do lisado**

1. Adicionar 100 µl de uma suspensão de *E.coli* cultivada durante a noite a 3-4 ml de Top-ágar fundido (mantido a  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ ). Colocar imediatamente a mistura sobre uma placa contendo agar LB.
2. Diluir os fagos (ate 10<sup>-7</sup>) em solução salina (NaCl 0,9%).
3. Aplicar uma gota de 10 µl de cada diluição sobre o Top-ágar contendo as bactérias. Inclinar a placa para cerca até que as gotas escorram para outra extremidade da placa.
4. Deixar a placa secar e incubar durante 6-12 h a 37 °C.
5. Contar as placas e calcular a concentração de fagos no lisado (Unidades Formadoras de Placa/volume)

$$\frac{UFP}{mL} = \text{no. de placas de lise} \times \text{inverso da diluição}$$