

Abgabe, Aufbewahrung, Vermehrung und Reinigung von Phagen

Abgabe und Aufbewahrung von Phagen

Neu: die DSMZ überlässt ihren Kunden, welche der beiden Lieferformen sie bei Phagen wünschen, entweder Flüssigsuspension („Aktivkultur“) oder filtergetrocknete Phagen (in den DSMZ-üblichen Doppelglasampullen), s. FAQ, DSMZ- Phagenseite.

<http://www.dsmz.de/de/kataloge/katalog-mikroorganismen/organismengruppen-und-anwendungen-von-staemmen/phagen/faq.html>

Aktivkultur:

Phagen der DSMZ werden als bakterienfreie Lysate als 1 mL-Portionen im Wachstumsmedium des Wirtes abgegeben, wenn sie als „Aktivkultur“ bestellt wurden. Bakterienzellen und Debris wurden durch Zentrifugation und nachfolgende Membranfiltration eliminiert. Alle Chargen von Phagensuspensionen sind auf Titer, Plaquemorphologie und -einheitlichkeit geprüft. Von der DSMZ abgegebene Phagensuspensionen sind meist Hochtiter-Lösungen von 1×10^8 - 1×10^{11} pfu/mL (pfu/mL = **plaque forming units**/mL). Phagen sollten sofort nach Empfang kühl gelagert, jedoch ohne Gefrierschutzmittel keinesfalls eingefroren werden. Kühl gelagerte Phagen überleben ohne signifikante Verluste meist einige Monate, jedoch ohne Garantie seitens der DSMZ, bitte beachten Sie unsere Homepage-Informationen. Phagenlysate können tiefgefroren oder in flüssigem Stickstoff für Langzeitwecke unter Zugabe eines Gefrierschutzmittels gelagert werden, z.B. 10% (v/v; Endkonzentration) steriles Glyzerin.

Filtergetrocknete Phagen:

Zwecks besserer Stabilität während Langstreckentransporten (z.B. transkontinental) oder wenn Kunden die Phagen längere Zeit vor Experimentbeginn aufbewahren möchten, empfiehlt die DSMZ die Bestellung von filtergetrockneten Phagen. Diese liegen auf dem Filterpapierstreifen vor, welches im Vakuum in den DSMZ-typischen Doppelglasampullen getrocknet wurde. Bitte beachten Sie unsere speziellen Hinweise zur Ampullenöffnung und zur Revitalisierung dieser Phagen. <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/groups-of-organisms-and-their-applications/phages/phages-handling-of-freeze-dried-ampoules.html>

Allgemein:

Die DSMZ liefert biologische Material nur an entsprechend ausgerüstete autorisierte Labore zur sofortigen Verwendung und nur für Laborzwecke, s. **Allgemeinen Geschäftsbedingungen**. Alle Phagen sind unter Verwendung des empfohlenen Wirtsstammes getestet. Bitte beachten Sie die **FAQ** (Phagenseite) und spezielle Informationen zu jedem Phagen.

Vermehrung von Phagen

Bitte verwenden Sie für jeden Phagen nur den empfohlenen Wirtstamm.

Die DSMZ garantiert nicht für erfolgreiche Phagenvermehrung mit anderen Wirtsbakterien, unabhängig vom tatsächlichen Wirtsspektrum eines Phagen. Neue Hochtiter-Phagenlösungen können direkt durch einen ersten Vermehrungsschritt und „Hochtitern“ erhalten werden, ausgehend von Einzelplaques, von Phagensuspensionen oder von „Abwaschplatten“, die konfluente Lyse zeigen. Es sollte nur geeigneter Phagenpuffer benutzt werden. Lyse kann in Flüssigkultur des Wirtes oder auf Agarplatten (double agar layer Technik mit top und bottom Agar) durchgeführt werden. **Lyse auf Platten:** der bottom Agar ist die normale untere Agarschicht und trägt die top Agarschicht mit halber Agarkonzentration (Weichagar). Letztere enthält die Wirtsbakterien, beim Ausgießen auf den bottom Agar entsteht so eine dünne homogene Schicht, ein dünner Bakterienrasen kann anwachsen. Phagen können dann aufgetropft werden. Oder Phagen werden aus Suspension bereits mit in den Weichagar gemischt, um Plaques zu zählen (Titer) und ihre Morphologie zu beurteilen. Titer (Verdünnungsreihe!) und Reinheit eines Phagen können nur auf Platten ermittelt werden. **„Abwaschplatten“** mit konfluenter (hochgradiger) Lyse: sie werden mit einigen mL Phagenpuffer überschichtet und können einige Stunden langsam auf einem Plattenschüttler bewegt und dann „abgewaschen“ werden zum Erreichen hoher Titer, oder die Softagarschicht wird mit einem Spatel abgetragen. Es folgt Zentrifugation zur Entfernung von Agar und Zelltrümmern und Membranfiltration (0.45 µm). **Flüssiglyse:** wird durch Aufklaren der langsam bewegten (!) Kultur sichtbar, wobei die Kultur (Bakterien und Phagen gemeinsam inkubiert) gut zu beobachten ist, da phagenresistente Bakterien die lysierte Kultur überwachsen können und eine nicht erfolgte Lyse vortäuschen. Eintritt der Lyse kann kürzer oder länger dauern. Bei Aufklaren der Kultur folgen Zentrifugation und Membranfiltration (s.o.). Lyse auf Platten erzielt oft höhere Titer als Flüssiglyse (Agitations-Adsorptionsproblem).

Einzelplaque-Isolierung: Nach erheblichem Titerverlust kann eine neue Phagensuspension durch Einzelplaque-Isolierung hergestellt werden: ein Plaque wird mit einer Eppendorf-Spitze in einem Tropfen Phagenpuffer suspendiert. Dieser Tropfen kann zu einer kleinen Bakterienkultur zugegeben (Flüssiglyse) oder auf die Oberfläche einer Platte (Lyse auf Platten) aufgetropft werden. Durch weitere Schritte mit Volumensteigerung kann der Phage „hochgetitert“ werden. Zugleich ist dies eine Phagenreinigung, weil mit einem Einzelplaque begonnen wurde. So können Hochtiter-Phagenlösungen hergestellt werden.

Reinigung von Phagen

Generell kann das mikrobiologische Prinzip vergleichbar dem der Aufreinigung von Bakterien: Phagen können durch Isolierung einzelner Plaques gereinigt werden wie Bakterien aus Einzelkolonien, da beide das Ergebnis eines einzelnen Phagen bzw. einer Einzelzelle sind. Phagen können durch Ausstreichen auf Platten gemäß der Dreistrichtechnik verdünnt werden, dabei Double Agar Layer Technik anwenden, der Wirt befindet sich im Weichagar (top agar). Dafür sind Einmal-Impfösen mit kleiner Öse zu empfehlen. Mehrfaches Ausstreichen von Einzelplaques ist bei kontaminierten Phagenlösungen genauso durchführbar wie bei Bakterien. Ein Phage benötigt stets seinen Wirt zur Vermehrung, d.h. zur erfolgreichen Infektion und Lyse. Die Phagenausbeute hängt von mehreren Faktoren ab, z.B. von der „Wurfgröße“ des Phagen, von der moi (multiplicity of infection = Wirt-Phage-Verhältnis) etc. Phagen können für verschiedene Zwecke gereinigt werden, für neue Vorratslösungen oder für weitere Aufreinigungen, z.B. für Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM); dabei müssen andere Partikel wie Zelldebris entfernt werden, CsCl-Dichtegradienten sind vor TEM empfehlenswert, ebenso vor der Isolierung der Phagen-Nukleinsäure. Ganze Phagenpartikel bandieren als einzelne weißliche Bande. Details zur Dichtegradientenzentrifugation und Nukleinsäureisolierung werden hier nicht dargestellt. Phagen für jegliche therapeutische Anwendung müssen unter speziellen standardisierten anerkannten Methoden aufbereitet werden.

Häufig verwendetes Medium und häufig verwendeter Phagenpuffer:

General Growth Medium:

Difco Nutrient Broth	8g
NaCl	0.8g
Difco Bacto Agar	15g
Distilled Water to	1.0 L

Phage Buffer:

Na ₂ HPO ₄ anh.	7g
KH ₂ PO ₄ anh.	3g
NaCl	5g
0.1M MgSO ₄	10 mL
0.1M CaCl ₂	10 mL
Distilled Water to	1.0 L

Dr. Christine Rohde

Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Germany

Fon: + 49-531-2616-220

Fax: +49-531-2616-418

E-Mail: christine.rohde@dsmz.de

<http://www.dsmz.de>

DSMZ, August 2014