

#### Slajd 1:

W tym wykładzie omówię gdzie i jak izolować fagi oraz jak uzyskać czyste izolaty fagowe i je przechowywać.

#### Slajd 2:

Fagi występują niemal w każdym środowisku, ale środowisko wodne jest najczęstszym miejscem ich izolacji. Wysokie miana fagów występują w wodach morskich, słodkich i oczyszczalniach ścieków. Dodatkowo fagi izoluje się z próbek glebowych, gdzie są przyłączone do cząstek gleby. Ponadto, zakażone zwierzęta są ważnym źródłem izolacji bakteriofagów. W procesie izolacji fagów wykorzystuje się ścieki z gospodarstw, próbki treści jelitowej, próbki odchodów i ściółek hodowlanych. Powszechnym źródłem fagów w leczeniu ludzi są sami zakażeni pacjenci. Ponieważ pacjenci są zakażeni daną bakterią, prawdopodobnie są również nosicielami fagów specyficznych dla tej bakterii. Fagi te są izolowane z próbek kału, wymazu skóry, śliny, a nawet płytki nazębnej. Podobnie, zdrowi ludzie mogą być bogatym źródłem fagów dla bakterii komensalnych. Fagi te można łatwo wyizolować z wydzielin z nosa. Fagi można też izolować z miejsc niesprzyjających egzystencji, takich jak gorące źródła i lodowce.

#### Slajd 3:

Gdy próbka jest dostępna to można izolować fagi. Po pierwsze, próbka poddawana jest wstępnej obróbce zarówno fizycznie, na przykład przez ekstrakcję w roztworze buforowym przez odwirowanie lub filtrację, jak również chemicznie przez zastosowanie chloroformu zabijającego obecne w próbce bakterie. Po wstępnej obróbce następuje etap namnażania. Wiąże się to z inkubacją próbki wraz z pożądanym gospodarzem (gospodarzami) w hodowli płynnej, często przez noc, w zależności od gospodarza, w celu amplifikacji każdego faga w próbce. Spowoduje to zwiększenie miana poświadanych fagów w próbce, co umożliwi łatwiejszą izolację. Następnie przeprowadza się eksperyment metodą dwuwarstwowych płytek lanych, w której miesza się bakterie i próbkę w agarze półpłynnym, a następnie hoduje. Jeśli fagi infekują swojego gospodarza z wystarczającą wydajnością, tworzą się tysinki.

#### Slajd 4:

Po izolacji fagów z próbki, czyste izolaty są generowane przez oczyszczanie tysinek. Tysinki tworzone są metodą dwuwarstwowych płytek lanych jak opisano wcześniej, Następnie uzyskane tysinki są wyodrębniane z podłoża stałego, eluowane, a następnie rozcieńczane przed inkubacją z świeżą hodowlą gospodarza, w celu utworzenia nowych pojedynczych tysinek. Ten proces oczyszczania tysinek powtarza się co najmniej trzykrotnie, aby upewnić się, że końcowa próbka nie zawiera dodatkowych zanieczyszczeń fagowych.

#### Slajd 5:

Kiedy dostępny jest czysty izolat fagowy, możemy przygotować preparat zawierający czyste cząstki faga w wysokim o wysokim mianie. Oczyszczoną tysinkę izoluje się i inkubuje razem z pożądanym gospodarzem (gospodarzami) w hodowli płynnej. Po całonocnej inkubacji dodaje się chloroform w celu zabicia bakterii obecnych w hodowli. Resztki komórek usuwa się przez odwirowanie. Supernatant zawierający fagi jest oddzielany i dodaje się ponownie chloroform. Przeprowadza się analizę liczebności tysinek poprzez serię rozcieńczeń w celu określenia miana faga w preparacie (PFU/ml).

#### Slajd 6:

Fagi można też wyizolować z bakterii lizogennych. Lizogeny są bakteriami, w których genom faga jest zintegrowany z ich chromosomem. Fag wbudowany w genom to profag. Profag może być wyindukowany, a tym samym uwolniony z chromosomu gospodarza podczas uszkodzenia DNA, co

spowoduje uruchomienie systemu SOS aktywującego białko RecA. Białko to blokuje represor CI, który normalnie blokuje promotor zaangażowanych w cykl lityczny faga. Zaburzenie działania represora powoduje ekspresję promotora cyklu litycznego, i profag może opuścić chromosom bakteryjny. Typowe metody indukujące uszkodzenia DNA u bakterii to np. promieniowanie UV i mitomycyna C.