

Concentration des coliphages et bactériophages

- Protocole d'utilisation -

PREMIÈRE ÉTAPE : MATÉRIEL

Contenu du kit

- 100 membranes filtrantes 0,22 µm, 47 mm,
- 2 bouteilles de Binding Buffer (400 ml),
- 2 bouteilles d'Elution Buffer (500 ml),
- 100 tubes stériles,
- Le protocole d'utilisation.

Matériel additionnel

- Rampe de filtration et pompe à vide,
- Entonnoir, pince et ciseaux stériles,
- Pipette et pointes 1 ml,
- Bain à ultrasons,
- Vortex.



Pour conserver durablement l'Elution Buffer, nous vous recommandons de l'aliqoter par 5 ml dans les tubes stériles fournis en respectant les conditions de stérilité. Avant de commencer l'analyse, sortir du réfrigérateur le nombre de tubes nécessaires. Ce protocole est en accord avec les normes NF ISO 10705-1, -2 et -3.

DEUXIÈME ÉTAPE : PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON



1. Ajouter le Binding Buffer 50X dans le volume d'échantillon à analyser en respectant les proportions suivantes : 2 ml de Binding Buffer pour 100 ml d'échantillon.



2. Stériliser les frittés de la rampe de filtration par flambage à l'alcool. Laisser refroidir avant d'y déposer les membranes à l'aide d'une pince stérile.

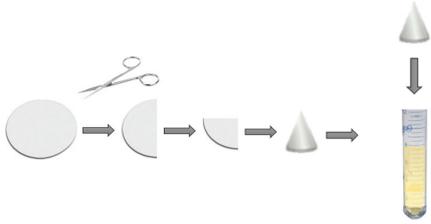
TROISIÈME ÉTAPE : TRAITEMENT DE L'ÉCHANTILLON



3. Placer les entonnoirs stériles (plastiques ou inox) sur les frittés. Remplir les entonnoirs avec les échantillons à analyser mélangés au Binding Buffer.



4. Filtrer les échantillons. Pour une rétention optimale, appliquer un vide entre 0,6 et 0,8 bar.



5. Dès que la filtration est finie, arrêter l'aspiration pour éviter de sécher les membranes. Découper chacune d'entre elles en 8 morceaux et les placer dans un tube contenant 5 ml d'Elution Buffer.



6. Placer les tubes dans un bain à ultrasons 4 min* puis vortexer 10 sec à 2000 RPM. Déposer en pluge de lyse 1 à 5 ml d'éluat ainsi que la membrane suivant la méthode sur gélose en double couche selon la norme 10705-1 ou -2**.

*Si vous ne disposez pas d'un bain à ultrasons, vous pouvez utiliser un vortex. Conditions optimales : 4 min, 37°C, 1000 RPM.

**Pour éviter la formation d'exsudat, utiliser 6 g/l d'agar dans le milieu semi-solide. Laisser sécher les boîtes avant incubation.