



噬菌體培養及效價測定說明

噬菌體培養法

一. 液體培養法

1. 將指定之宿主細菌以液體培養法於指定溫度下培養，一般培養 16~24 小時。
2. 將噬菌體原液 100 μL 與宿主細菌懸浮液 300 μL 均勻混合，靜置 15 分鐘使其感染。
3. 將混合液接種至 10 mL 指定液體培養基中，於指定溫度下振盪培養約 8~24 小時，培養時間依噬菌體之不同而異。
4. 將培養液移入離心管中，以 10,000 rpm (5,000 g) 離心 10 分鐘，以沉澱宿主細菌。
5. 將上清液移至新試管中，再以 0.22 μm 孔徑之過濾器(filter)去除殘餘菌體，即得不含宿主細菌之噬菌體原液。但因噬菌體原液呈透明狀，無法以肉眼直接判斷其增殖效果，故應測定其效價以確認增殖培養之成效。

二. 雙層瓊脂培養法

1. 將指定之宿主細菌以液體培養法於指定溫度下培養，一般培養 16~24 小時。
2. 將噬菌體原液 100 μL 與宿主細菌懸浮液 300 μL 均勻混合，靜置 15 分鐘使其感染。
3. 將混合液加入 5 mL 冷卻至 45 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.7% 指定瓊脂培養基中，均勻混合後立即平鋪在已凝固的 1.8% 瓊脂培養基平板上。
4. 待上層瓊脂凝固後移至指定溫度之培養箱中，一般培養 8~24 小時，培養時間依噬菌體之不同而異。
5. 以上述相同之步驟製作另一不含噬菌體之對照組。
6. 將培養好的平板與對照組比較其澄清度，一般含噬菌體之平板呈澄清狀，而僅含宿主細菌之對照組則呈混濁狀。
7. 將含有噬菌體之平板置於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下 4~5 小時後，取出置於室溫下解凍。
8. 將解凍後產生的液體移入離心管中，以 10,000 rpm (5,000 g) 離心 10 分鐘以沉澱宿主細菌。
9. 將上清液移至新試管中，再以 0.22 μm 孔徑之過濾器(filter)去除殘餘菌體，即得不含宿主細菌之噬菌體原液。

三. 表面瓊脂培養法

1. 將指定之宿主細菌以液體培養法於指定溫度下培養，一般培養 16~24 小時。
2. 將宿主細菌懸浮液 3 mL 均勻平鋪於 1.8% 瓊脂培養基平板上，靜置 2 小時。
3. 將多餘的宿主細菌懸浮液吸出，再將噬菌體原液 0.3 mL 均勻塗抹於平板上。
4. 於指定溫度下培養約 16~24 小時，培養時間依噬菌體之不同而異。
5. 取 5 mL 指定液體培養基加入平板中，以 L 形玻棒刮洗下平板表面之菌體。
6. 將刮洗下之液體移入離心管中，以 10,000 rpm (5,000 g) 離心 10 分鐘以沉澱宿主細菌。
7. 將上清液移至新試管中，再以 0.22 μm 孔徑之過濾器(filter)去除殘餘菌體，即得不含宿主細菌之噬菌體原液。



噬菌體效價測定法

一. 點滴法

1. 將指定之宿主細菌以液體培養法於指定溫度下培養，一般培養 16~24 小時。
2. 取 300 μL 宿主細菌懸浮液加入 5 mL 冷卻至 45°C 的 0.7% 指定瓊脂培養基中，均勻混合後立即平鋪在已凝固的 1.8% 瓊脂培養基上，並靜置 30 分鐘以上使其凝固。
3. 以 1% peptone 為稀釋液，將噬菌體原液做 10 倍序列稀釋，一般稀釋至 10^7 倍即可。
4. 將平板劃分為八個區域，以 pipetman 取不同稀釋倍數之噬菌體稀釋液各 1 μL ，分別接種於不同的區域上。
5. 將平板置於指定溫度下，一般培養 8~24 小時，待溶菌斑產生後觀察並計算其數目。
一般噬菌體濃度太高的區域會融合成一個大的溶菌斑，而濃度適中的區域會形成肉眼可觀察的溶菌斑。

6. 噬菌體效價 (pfu/mL) = 溶菌斑數 \times 稀釋倍數 \times 取樣量折算數

例如：噬菌體原液稀釋倍數為 10^6 ，取樣測定量為 0.001 mL (則取樣量折算數為 1000)，三個滴定點的溶菌斑數目分別為 15、18、16，則噬菌體原液的效價為：

$$1/3(15+18+16) \times 10^6 \times 1000 = 1.63 \times 10^{10} \text{ (pfu/mL)}$$

二. 雙層瓊脂培養法

1. 將指定之宿主細菌以液體培養法於指定溫度下培養，一般培養 16~24 小時。
2. 以 1% peptone 為稀釋液，將噬菌體原液做 10 倍序列稀釋，一般稀釋至 10^7 倍即可。
3. 取噬菌體稀釋液 100 μL 與宿主菌液 300 μL 均勻混合，靜置 15 分鐘使其感染。
4. 將上述混合液加入 5 mL 冷卻至 45°C 的 0.7% 指定瓊脂培養基中，均勻混合後立即平鋪在已凝固的 1.8% 瓊脂培養基上。
5. 將平板置於指定溫度下，一般培養 8~24 小時，待溶菌斑產生後觀察並計算其數目。

6. 噬菌體效價 (pfu/mL) = 溶菌斑數 \times 稀釋倍數 \times 取樣量折算數

例如：噬菌體原液稀釋倍數為 10^7 ，取樣量測定量為 0.1mL (則取樣量折算數為 10)，三個平板的溶菌斑數目分別為 275、252、263，則噬菌體原液的效價為：

$$1/3(275+252+263) \times 10^7 \times 10 = 2.63 \times 10^{10} \text{ (pfu/mL)}$$