

Summary -2025-11-07

11-06

分别得到R菌和W菌的噬菌体waste富集液

开展Spot实验

11-07

根据Spot实验结果，初步认为都存在噬菌体

使用9至11次稀释，开展Plaque实验

11-08

分别得到R菌和W菌不同噬菌体吞噬空洞

选取单克隆点进行富集（R菌噬菌体4种，W菌噬菌体2种）

第一次提纯：

R菌噬菌体（4种）分别富集

W菌噬菌体（2种）分别富集

11-09

分别得到R菌（4种）噬菌体和W菌（2种）噬菌体的富集液

第一次提纯：

R菌噬菌体（4种）分别以9、10、11、12次稀释开展Plaque实验

W菌噬菌体（2种）分别以9、10、11、12次稀释开展Plaque实验

11-10

第一次提纯结果：

R菌Plaque实验失败（四种噬菌体分别在板上浓度过高）

W菌Plaque实验成功（两种噬菌体分别在板上较为明显，但是仍掺有少量其他类型噬菌体）

第二次提纯：

R菌：稀释10次和15次后，分别对四种噬菌体开展Plaque实验

W菌：挑选噬菌体单克隆点，富集

准备硬Agar板

11-11

第二次提纯结果：

R菌：获得Plaque盘，但是仍掺有较多其他类型噬菌体，继续选点富集。

W菌：获得富集液，计划今日进行第三次提纯（9\11\13次稀释，开展Plaque实验）

11-12

第二次提纯结果 及 第三次提纯实验：

W菌：

选点继续富集

1. 此前的细小的点消失了，不知道为什么，但是既然是一个不稳定的噬菌体，在未来实验中可能也是一个潜在的风险，因此也就不再强留了。
2. 不确定是否是两种不同的噬菌体，因此两个都保留了。
3. 目前一共提取了两种噬菌体，继续富集，准备第三次提纯。（希望是两种）

第二次提纯实验：

R菌：离心后过滤，冰箱保存

未知原因，昨日使用旧R菌重新过夜培养，但是LB溶液清澈，判断其中可能无菌。因此，今日重新培育R菌，明天再做板。

重新从细菌盘种选取单克隆点培育细菌备用（每周更换新的细菌）

11-13（周四）

W菌-第四次提纯：离心，Plaque实验（9/11/13次稀释），保存剩余至冰箱

R菌-第三次提纯：Plaque实验（9/11/13次稀释）

11-14日（周五）

W菌-第四次提纯后富集（保留2种形态噬菌体）

R菌-第三次提纯后富集（保留3种形态噬菌体）

11-15日（周六）

W菌-第五次提纯：离心，Plaque实验（9/11/13次稀释），保存剩余至冰箱

R菌-第四次提纯：Plaque实验（9/11/13次稀释），保存剩余至冰箱

11-16日（周日）

观测到，W菌基本已经纯净，但是还是有一点掺咋，富集

R菌情况类似。富集

推测可能是因为之前使用接种环，头粗容易刮到周围。

昨日使用移液枪头，所以这次效果好一些？后续可以都使用枪头。

11-17日（周一）

离心富集液，冰箱保存。

修 autoclave

11-18（周二）

制备硬Agar

11-19 (周三)

plaque实验 (10、12、14次稀释)

11-20 (周四)

得到结果:

1. R3 14次稀释后仍然太多了, 下次R3特殊对待, 14、16、18次稀释
2. W1分出两种, 命名W1和W2,
3. W3也需要进一步稀释, 14、16、18稀释试试

还是有一点点不纯, 进一步纯化。还是移液枪头好用。

制备Agar板

11-21 (周五)

plaque,

11-22

观察结果, 不纯就再挑点, 纯的话就富集制备stock

11-24 ~ 11-30

测定stock浓度 (plaque实验) (然后送检DNA测序及TEM)

host range实验

morphaology documentation

killing curve

host range

记录

周日养菌

周一 plaque 实验

周二结果显示，W 有两种噬菌体，干净了

但是 R 所有浓度都高了，看不清板子。还得稀释。

可以对 W 进行 stock 了。

问题：

1. 需要采购：50 mL移液管，碘伏？（Monique每两个月来一次，统计好一并带过来）（已解决）
2. 需要采购 LB粉、移液枪头。

Plans-2025-11-12

11-19（周三）

如果结果好，则进行R/W-细菌/噬菌体的交叉验证

如果不好，进一步富集和Plaque实验

如果顺利，则：

1. 测形态
2. 测浓度
3. 浓度放大储存
4. 交叉检测
5. 杀菌曲线

关于未来两个月可以开展的实验 及 希望得到的结果与数据：

1. 11月第四周：对噬菌体种类的确定：DNA测序（可能有三-四种）
2. 12月第一周：对所得噬菌体，分别对两种细菌进行效力检测（killing curve），确定最终计划使用的噬菌体
3. 12月第一周-第二周（也可能第三周？）：噬菌体形态电镜（这个成本是不是比较贵，或许可以再往后放一放）、蛋白质组成检测
4. Characterize the fundamental pharmacokinetics of phages by analyzing their uptake, trafficking, and stability in various *in vitro* cellular models.
 - 1) 12月第四周-一月第一周（也可能第二周？）：**1** 建立细胞系；**2** 药效：感染/预防感染/不加菌只给噬菌体，三种情况，检测细胞的存活率、炎症因子变化情况；
 - 2) 12月动力学：选择哪些细胞开展摄取（以及摄取后细胞内机制）和稳定性探究呢？胃肠道细胞，免疫细胞。

总结，可以得到：

1. 噬菌体质量表征：DNA序列，蛋白质组成，噬菌体形态电镜图
2. 噬菌体药效？（先做药效是因为如果没有药效，后续的所有递送也都没有意义，无法做出差异）