

**Progetto " Un Laboratorio per l'ambiente"
a cura di Mariella Cappella**

IIS" Enrico Mattei" SAN DONATO Milanese

- Protocolli sperimentali Biologia

- 1 PREPARAZIONE DEL TERRENO SOLIDO NGM-AGAR
per la coltivazione di *C. elegans*
- 2 PREPARAZIONE DEL TERRENO LIQUIDO LB
per la crescita e SEMINA DI *E. coli* OP50
- 3 TRASFERIMENTO DI *C. elegans* IN PIASTRA: PICKING - CHUNKING
- 4 RICONOSCIMENTO DEGLI STADI LARVALI E DELL' ERMAFRODITA ADULTO
- 5 RICONOSCIMENTO DELLA LARVA DAUER
- 6 STRESS TERMICO (EFFETTO SERRA)
7. PREPARAZIONE DEL TERRENO SOLIDO NGM-AGAR con inquinante
8. Protocollo IFOM per l'allestimento dell'esperimento di ricerca

-

Bibliografia e Link utili

PROTOCOLLI SPERIMENTALI BIOLOGIA

ITIS E.MATTEI :

UNA SCUOLA ESTIVA PER LA RICERCA

1. PREPARAZIONE DEL TERRENO SOLIDO NGM-AGAR per la coltivazione di *C. elegans*

MATERIALI

Terreno di coltura (NGM-AGAR) preparato nel seguente modo:

- 3 g NaCl
- 2.5 g Bacto-peptone
- 17 g Bacto-agar

Sciogliere in 800 ml di acqua deionizzata. Portare il volume a 1 litro e sterilizzare in autoclave. Dopo la sterilizzazione, trasferire la bottiglia del terreno in un bagnetto a 50°C, per evitare che si solidifichi.

Aggiungere successivamente nel seguente ordine: 1 ml di colesterolo (5 mg/ml in Etanolo assoluto), 1 ml 1M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄ e 25 ml 1 M KH₂PO₄ pH 6. Mescolare bene dopo ogni aggiunta per evitare la precipitazione di cristalli.

- Acqua distillata
- Piastra riscaldante
- Bilancia
- Autoclave
- Beuta
- Cilindro
- Petri sterili da 5mm o da 9 mm Ø
- Parafilm
- Frigorifero

PROCEDIMENTO

1. Calcolare il volume del terreno da preparare secondo lo schema

CONTENITORE	TIPO TERRENO	VOLUME UNITARIO (ml)
Provette	LB BROTH	ml
Petri da 30 mm Ø	LB AGAR	4 ml
Petri da 60 mm Ø	LB AGAR	10 ml
Petri da 90 mm Ø	LB AGAR	25 ml

2. Prelevare in un cilindro il volume di acqua distillata calcolato
3. Pesare la polvere di terreno in rapporto al volume prescelto
4. Dissolvere il terreno a freddo e sterilizzare a 121°C per 20'
5. Mantenere la beuta sterilizzata a bagnomaria per evitare la solidificazione dell'agar (50°C)
6. Aggiungere successivamente nel seguente ordine: 1 ml 1M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄ e 25 ml 1 M KH₂PO₄ pH 6. Mescolare bene dopo ogni aggiunta per evitare la precipitazione di cristalli.
7. Lasciare solidificare. Tenere le piastre sul bancone per una notte (per far evaporare tutta la condensa).
8. Il giorno successivo, seminare la coltura di batteri liquida *E.coli* OP50 (preparata precedentemente) su ogni piastra (sono sufficienti 100-200 □I).
9. Lasciare crescere tutta la notte a 37°C (oppure tenere un paio di giorni a temperatura ambiente).
10. Una volta pronte, le piastre possono essere conservate a 4°C per 3 settimane (parafilmate!).

2. PREPARAZIONE DEL TERRENO LIQUIDO LB per la crescita e SEMINA DI *E. coli* OP50

E. coli OP50 è un ceppo batterico che costituisce il substrato nutritivo per *C. elegans*.

MATERIALI

- Terreno di coltura (LB broth) in provetta
- Ceppo di *E.coli* OP50
- Ansa sterile
- Micropipetta o Pipetta pasteur
- Parafilm
- Termostato a 37°C

Terreno di coltura (LB broth) preparato nel seguente modo:

- 10 g triptone
- 5 g estratto di lievito
- 10 g NaCl

Aggiungere 950 ml di dH₂O, portare il pH a 7.0 con 5 N NaOH. Portare a volume di 1 L con dH₂O. Sterilizzare in autoclave. Il terreno solido viene ottenuto aggiungendo 15 g/L di Bacto Agar.

PROCEDIMENTO

A. ARRICCHIMENTO E RIVITALIZZAZIONE DI *E. coli*

1. Trasferire un'ansata di *E. coli* da una precedente coltura in una provetta contenente 5 ml di LB Broth
2. Incubare a 37°C per una notte (o a temperatura ambiente per 2-3 gg) fino a che il brodo diventi opaco

B. SEMINA SU PIASTRA

1. Trasferire alcune gocce di coltura liquida di *E. coli* sul terreno sulla centro della piastra Petri secondo lo schema

CONTENITORE	VOLUME DI SEMINA (µl)
Piastra da 30 mm Ø	50 µl
Piastra da 60 mm Ø	100 µl
Piastra da 90 mm Ø	200 µl

2. Conservare le piastre chiuse ai bordi con Parafilm a T ambiente per 24 h e utilizzarle
3. Conservare le piastre inutilizzate a 4°C per qualche giorno

3. TRASFERIMENTO DI *C. elegans* IN PIASTRA: PICKING- CHUNKING

Il trasferimento deve esser periodico (circa ogni 5-6 giorni), per assicurare una continua disponibilità di nutrienti per la crescita del verme.

Il trasferimento può avvenire per trasporto di singoli vermi (picking) o per trasferimento di porzioni di agar (chunking) in nuove piastre.

a. TECNICA DI PICKING

MATERIALI

- Piastre nutritive (con *E. coli* OP50) (da 30 - 60 o 90 mm)
- Pick (ciglio montato su puntale di micropipetta)
- Fornelletto
- Stereomicroscopio o microscopio a 10x

PROCEDIMENTO

1. Porre la piastra all'osservazione allo stereomicroscopio
2. Identificare il verme da prelevare
3. Agganciare il verme con lo strumento di picking a disposizione, facendo attenzione a non danneggiarlo
4. Trasferire il verme nella nuova piastra
5. Incubare per la crescita secondo lo schema:

TEMPERATURA	SCOPO
12°C	Interruzione della crescita - Mantenimento dei ceppi
15°C	Temperatura minima di crescita - Crescita lenta
20°C	Temperatura ottimale di crescita - Crescita veloce e ottimale
25°C	Temperatura massima di crescita - Crescita accelerata

b. TECNICA DI CHUNKING

MATERIALI

- Piastre nutritive (con *E. coli*) OP50 (da 30 - 60 o 90 mm)
- Bisturi
- Fornelletto
- Stereomicroscopio o microscopio a 10x
- Termostato

PROCEDIMENTO

1. Disinfettare il bisturi sulla fiamma
2. Tagliare con il bisturi un quadrato di agar di un cm di lato
3. Prelevare il chunk e trasferirlo nella nuova piastra rovesciandolo in modo da seminare i vermi
4. Strisciare il chunk sull'agar e posizionarlo lateralmente nella piastra
5. Incubare per la crescita secondo lo schema precedente

4. RICONOSCIMENTO DEGLI STADI LARVALI E DELL' ERMAFRODITA ADULTO

MATERIALI

- Piastre nutritive
- Piastre con *C. elegans* N2 in stadio L4
- Pick
- Fornelletto
- Stereomicroscopio o microscopio a 10x
- Termostato a 20°C

PROCEDIMENTO

1. Prelevare con il pick da una piastra di *C. elegans* in stadio uno o due vermi (madre) e trasferirli in una piastra nutritiva
2. Incubare a T di 20° C, osservando periodicamente gli stadi di sviluppo :

STADIO LARVALE	CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE
L1	Dimensioni piccole - non si distinguono gli organi
L2	Dimensioni piccole - non si distinguono gli organi
L3	Piccole dimensioni; si riconosce l'intestino e si può osservare la faringe
L4	Si possono osservare la faringe , la vulva nell'ermafrodita. Sul corpo è riconoscibile una mezzaluna bianca
ADULTO	Si possono osservare la presenza delle uova ai primi di sviluppo

5. RICONOSCIMENTO DELLA LARVA DAUER

MATERIALI

- Piastre nutritive
- Piastre con *C. elegans* N2
- Pick
- Fornelletto
- Stereomicroscopio o microscopio a 10x
- Termostato a 25°C

PROCEDIMENTO

1. Prelevare con il pick da una piastra di *C. elegans* in stadio uno o due vermi (madre) e trasferirli in una piastra nutritiva.
2. Incubare (o far crescere a T 25°). In queste condizioni ambientali si sviluppa la larva dauer. Si tratta di uno stadio larvale specializzato per resistere a lungo a condizioni ambientali sfavorevoli. La larva dauer si presenta molto affusolata e allungata rispetto a un normale stadio larvale L2

6. STRESS TERMICO (EFFETTO SERRA)

MATERIALI

- Piastre nutritive
- Piastre con *C. elegans* CL 2070 (il ceppo risponde allo stress termico con emissioni di fluorescenza verde)
- Pick
- Fornelletto
- Stereomicroscopio a fluorescenza
- Termostato a 30° C

PROCEDIMENTO

1. Porre la piastra all'osservazione allo stereomicroscopio
2. Identificare il verme da prelevare
3. Agganciare il verme con lo strumento di picking a disposizione, facendo attenzione a non danneggiarlo
4. Trasferire il verme nella nuova piastra
5. Incubare a 30° C per una notte (stress termico)

N.B. *C.elegans* W.T. è comunque sensibile a temperature di 30° C o simili e può sostituire senza problemi il ceppo modificato; i danni indotti dalla temperatura sono comunque evidenti

BIBLIOGRAFIA E LINK UTILI

<http://elegans.swmed.edu>
<http://wormbase.org>
<http://wormbook.org>