

Sincronizzazione di colture di ***C. elegans***

Obiettivo Allestire delle colture di *C. elegans* sincrone, che si trovano
cioè allo stesso stadio del ciclo vitale.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Piastre di *C. elegans* N2 (wild type)
- Acqua deionizzata sterile o tampone M9
- Pipette Pasteur
- Puntali sterili
- Provette da 15 ml
- Ipoclorito di sodio 4% (candeggina commerciale)
- NaOH 1M
- Piastre di crescita NGM agar con batteri



Strumenti

- Stereomicroscopio
- Centrifuga da banco
- Micropipette
- Timer



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

30 minuti circa



Procedimento

- 1.** Il punto di partenza di questo protocollo sperimentale sono 3-4 piastre di vermi ricche di esemplari adulti.
- 2.** Con una pipetta Pasteur trasferire 3 ml di acqua deionizzata oppure di tampone M9 sulla piastra. Agitare leggermente la piastra per permettere ai vermi di staccarsi dal terreno. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire i vermi in una provetta da 15 ml.
- 3.** Ripetere il punto 2 per tutte le piastre.
- 4.** Controllare le piastre di partenza allo stereomicroscopio per verificare di aver prelevato la maggior parte dei vermi. Nel caso ne siano rimasti molti sulla piastra, procedere con un altro lavaggio.
- 5.** Centrifugare i vermi per 2 minuti a 700 rpm con una centrifuga da banco.
- 6.** Prelevare il surnatante con una pipetta Pasteur pulita, facendo in modo che rimangano nella provetta 4 ml di soluzione.
- 7.** In una provetta da 15 ml pulita, preparare la bleaching solution 2X, che deve essere preparata fresca al momento ogni volta (adattare le quantità in funzione del numero di campioni che si stanno processando) in questo modo:
 - 0.5 ml di acqua deionizzata sterile;
 - 2.5 ml di NaOH 1M;
 - 1 ml di ipoclorito di sodio (candeggina commerciale).
- 8.** Trasferire 4 ml di bleaching solution fresca nella provetta con acqua e vermi. La concentrazione finale nella provetta sarà di 0.625M NaOH e NaOCl circa 1%. Chiudere il tappo e agitare per inversione la provetta in modo costante e vigoroso per permettere una buona aerazione della soluzione.
- 9.** Ad intervalli regolari, circa ogni 30 secondi, controllare in controluce la provetta per verificare che i vermi siano ancora visibili. Per monitorare i tempi utilizzare un timer.
- 10.** Allo scadere dei 3 minuti (o comunque quando i vermi iniziano a dissolversi e non sono più visibili), aprire velocemente il tappo, aggiungere 10 ml di acqua deionizzata sterile per diluire la soluzione di ipoclorito, fermando la reazione, e centrifugare per 2 minuti a 700 rpm.

- 11.** Scartare il surnatante, aggiungere 10 ml di acqua deionizzata sterile, agitare per inversione un paio di volte e centrifugare per 2 minuti a 700 rpm.
- 12.** Ripetere il punto 11 per un'altra volta.
- 13.** Scartare il surnatante, avendo cura di eliminare la maggior parte dell'acqua. A questo punto si dovrebbe vedere sul fondo della provetta un debole pellet costituito dalle uova.
- 14.** Con un puntale sterile, dopo aver agitato delicatamente il pellet, prelevare 50 µl di uova e trasferirle su una piastra pulita. Procedere in questo modo fino ad esaurimento del liquido.
- 15.** Mettere le piastre ad incubare alla temperatura desiderata, comunque compresa tra i 15°C e i 25°C.

Note

- Questo protocollo sperimentale consente, a partire dai vermi adulti raccolti dalle piastre, di ottenere uova che, una volta poste in piastra, si schiuderanno dando origine a una coltura sincrona di esemplari. Inoltre è usato per rimuovere contaminazioni ad opera di muffe e batteri che possono colonizzare le piastre di vermi.
- Il principio alla base di questo protocollo sperimentale è che i vermi (dallo stadio larvale L1 allo stadio adulto) sono sensibili alla soluzione di ipoclorito e NaOH, detta anche bleaching solution, mentre il guscio delle uova protegge gli embrioni. Il tempo di azione della bleaching solution è fondamentale: se il passaggio in ipoclorito è troppo breve c'è il rischio che non si riesca ad eliminare la contaminazione, se dura troppo, invece, l'ipoclorito potrebbe intaccare il guscio delle uova e compromettere la vitalità della coltura.
- Per la preparazione del tampone M9, pesare 5.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3.0 g KH_2PO_4 , 5.0 g NaCl e 0.25 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, aggiungere 800 ml di H_2O deionizzata e mescolare. Portare a 1L e sterilizzare tramite filtrazione con filtro da 0.22µm.
- Questa procedura sperimentale prevede l'utilizzo di candeggina, che di per sé non è pericolosa, se opportunamente manipolata. Utilizzare camice, guanti e occhiali da laboratorio per proteggersi da eventuali schizzi.