

Rinnovo delle colture di *C. elegans*: **picking e chunking**

Obiettivo Allestire e rinnovare colture di nematodi *C. elegans* in piastra.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Ceppo *C. elegans* N2 (wild type)
- 4 piastre di NGM agar con *E.coli* OP50
- Pennarello indelebile
- Scatole di cartone



Strumenti

- Stereomicroscopio
- Pick (da costruire)
- Bisturi
- Becco Bunsen
- Termostato a 20°C



Sicurezza

- Camice



Tempo

10 minuti il chunking
20 minuti per il picking
Qualche giorno per la crescita dei vermi



Procedimento

- 1.** Con un pennarello indelebile, marcare il lato delle 4 piastre NGM agar con i batteri *E. coli* OP50, preparate seguendo il protocollo “Allestimento di colture di *E. coli* OP50”, con la dicitura “N2” e la data.
- 2.** CHUNKING: sterilizzare la lama di un bisturi alla fiamma per qualche secondo. Lasciare raffreddare la lama e, allo stereomicroscopio, tagliare un quadratino di una piastra con esemplari di *C. elegans*. Trasferire il quadratino (chunk) su una piastra NGM agar pulita con batteri, capovolgendo il quadratino in modo che i vermi si trovino a diretto contatto con la nuova piastra. Chiudere la piastra e procedere nello stesso modo con la seconda.
- 3.** Costruire il pick, lo strumento che consentirà di prelevare singolarmente gli esemplari di *C. elegans*. Procurarsi un puntale giallo per le micropipette, un po' di nastro adesivo e qualche sopracciglio. Agganciare un ciglio al puntale utilizzando il nastro adesivo, eventualmente eliminare la parte più sottile del ciglio (l'estremità della punta) per permettere allo strumento di agganciare meglio gli esemplari senza perdere la sua flessibilità.
- 4.** PICKING: allo stereomicroscopio osservare una piastra di esemplari di *C. elegans* e con il pick raccogliere un esemplare. Trasferire l'esemplare su una piastra NGM agar pulita con batteri. Procedere in questo modo fino a trasferire circa 4-5 esemplari su ogni piastra pulita. Trasferire preferibilmente esemplari adulti (sono più facili da agganciare).
- 5.** Porre le piastre nelle scatole di cartone e incubarle per qualche giorno a una temperatura compresa tra i 15°C e i 20°C. A intervalli regolari, monitorare la crescita dei vermi allo stereomicroscopio.

Note

- *Chunking e picking sono le due modalità principali per propagare colture di *C. elegans* in piastra. Il chunking viene usato quando è necessario amplificare le colture e produrre molte piastre di crescita: è una tecnica veloce, che non distingue tra gli individui trasferiti pertanto è usata quando si vogliono propagare popolazioni miste per età degli individui. Il picking, pur essendo più laborioso e pur richiedendo una maggiore manualità, consente di scegliere l'individuo da trasferire nella piastra ed è la tecnica elettiva per allestire gli incroci (e selezionare gli individui da incrociare nella popolazione).*
- *Il chunking è una tecnica a minor rischio di contaminazione rispetto al picking, dal momento che il bisturi viene sterilizzato alla fiamma prima del prelievo dei vermi. Il picking, invece, si avvale dell'uso di un ciglio, che non può essere sterilizzato, e pertanto espone i trasferimenti a una probabilità maggiore di contaminazioni (soprattutto ad opera di muffe e batteri). Per ridurre questa evenienza è possibile prima della sessione di lavoro, incubare il pick in una provetta con Etanolo 70% per qualche minuto e poi farlo asciugare all'aria.*
- *Un'alternativa al pick con il ciglio consiste nell'utilizzare un pick sterilizzabile alla fiamma, come ad esempio un pezzetto di filo di platino, montato all'estremità di una bacchetta in legno o di una pipetta Pasteur in vetro. In questo caso è necessario appiattire l'estremità del filo di platino e sagomarlo a forma di una freccia per agevolare la presa dell'esemplare. Il pick di platino ha il vantaggio di essere sterilizzabile e quindi di ridurre la propagazione di contaminazioni, ma allo stesso tempo produce tagli sulle piastre (dentro cui tendono ad annidarsi i vermi) ed, essendo meno flessibile rispetto al pick con il ciglio, è più probabile danneggiare gli esemplari mentre vengono trasferiti.*
- *La temperatura di incubazione delle piastre influenza la velocità di crescita degli esemplari di *C. elegans* e quindi anche la frequenza con cui rinnovare le colture. La temperatura ottimale è compresa nell'intervallo tra 15°C e 25°C. Per completare un ciclo vitale, passando dallo stadio embrionale (uovo) ad adulto capace di deporre uova, *C. elegans* impiega circa 2 giorni e mezzo a 25°C, 3 giorni e mezzo a 20°C, 6 giorni a 15°C. Temperature inferiori ai 15°C possono essere utilizzate per conservare i ceppi (10°-12°C, mai 4°C), mentre temperature superiori ai 25°C costituiscono un fattore di stress per gli esemplari. Come riferimento utile per programmare i rinnovi delle colture, considerare che a 25°C *C. elegans* cresce 2.1 volte più velocemente che a 15°C, e 1.3 volte più veloce a 20°C che a 15°C.*