

# Preparazione del terreno **NGM agar** per la crescita su piastra di ***C. elegans***

**Obiettivo** Preparare il terreno NGM agar in forma solida per la crescita di esemplari di *C. elegans* in piastra.

**Autore** Assunta Croce, PhD



# Materiali e reagenti

- NaCl in polvere
- Bacto Peptone
- Agar
- Acqua deionizzata
- Colesterolo 5 mg/ml in Etanolo 100%
- $\text{CaCl}_2$  1M
- $\text{MgSO}_4$  1M
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M pH 6
- Cilindro da 1L
- Becher da 1L
- Bottiglia da 1L resistente al calore
- Spatola
- Scotch da autoclave
- Pennarello indelebile
- Piastre Petri in plastica sterili monouso



## Strumenti

- Bilancia
- Autoclave
- Bagnetto termostato



## Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Guanti per il calore



## Tempo

Circa 90 minuti (compresa la sterilizzazione del terreno in autoclave e la solidificazione delle piastre)



# Procedimento

- 1.** Per preparare 1L di terreno NGM agar, pesare rispettivamente 3 g di NaCl, 2.5 g di Bacto Peptone e 17 g di agar in polvere e trasferirli nel becher da 1L.
- 2.** Con un cilindro da 1L, misurare 800 ml di acqua deionizzata e trasferirli nel becher. Mescolare.
- 3.** Portare il volume del terreno a 1L e trasferirlo in una bottiglia da 1L resistente al calore, marcando con una etichetta la tipologia di terreno e la data di preparazione.
- 4.** Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a 121°C.
- 5.** Trasferire la bottiglia in un bagnetto termostato impostato a 50°C, così da mantenere il terreno allo stato liquido.
- 6.** Aggiungere nel seguente ordine un reagente per volta e, dopo ogni aggiunta, mescolare:
  - 1 ml di colesterolo 5mg/ml in etanolo assoluto;
  - 1 ml di  $\text{CaCl}_2$  1M;
  - 1 ml di  $\text{MgSO}_4$  1M;
  - 25 ml di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M a pH 6.
- 7.** Dopo l'aggiunta delle soluzioni saline il terreno è pronto per essere colato nelle piastre.
- 8.** Predisporre circa 40-50 piastre Petri sterili da 90 mm sul banco da lavoro (precedentemente pulito con una soluzione di Etanolo 70%) o sotto cappa biologica a flusso laminare.
- 9.** Trasferire il terreno di coltura nelle piastre, considerando che ogni piastra da 90 mm è in grado di ospitare 20-25 ml di terreno. Lasciare solidificare mantenendo il coperchio semichiuso.
- 10.** Quando il terreno è perfettamente solido, chiudere i coperchi e conservare le piastre a 4°C.

## Note

- Il terreno NGM agar così preparato può essere conservato per qualche settimana a 4°C. Se le piastre devono essere conservate più a lungo, si consiglia di avvolgerle nel Parafilm® per evitare che si disidratino.
- Per la crescita di esemplari di *C. elegans* si possono usare piastre Petri di diverse dimensioni secondo la tabella sottostante che riassume anche i principali scopi sperimentali.

TIPOLOGIA DI PIASTRA (DIAMETRO)	QUANTITA' DI TERRENO	N° PIASTRE PER 1L DI TERRENO	SCOPI SPERIMENTALI
90 mm	25 ml	40 piastre	Culture con grandi quantità di esemplari (es. per congelamento)
60 mm	10 ml	100 piastre	Mantenimento dei ceppi
30 mm	4 ml	250 piastre	Allestimento di incroci

- *C. elegans* non è in grado di sintetizzare il colesterolo ex novo, pertanto deve essere fornito nel terreno di crescita. Nell'ambiente naturale, i nematodi acquisiscono il colesterolo da residui organici come resti di piante, funghi o feci animali.