

Crioconservazione di colture di ***C. elegans***

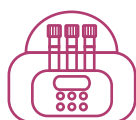
Obiettivo Preparare campioni di colture di nematodi *C. elegans* per la conservazione a lungo termine.

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- 4 piastre NGM agar con batteri *E. coli* OP50
- Piastre con vermi da prelevare
- Tampone M9
- Soluzione di congelamento
- Provette da 15 ml sterili
- Pennarello indelebile
- Scatola di polistirolo
- Provette da 2 ml adatte al congelamento



Strumenti

- Stereomicroscopio
- Pick (da costruire)
- Centrifuga da banco
- Freezer -80°C o -20°C
- Termostato a 15°C o a 20°C



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

10 minuti per il picking
1 settimana per la crescita dei vermi
30 minuti per il congelamento



Procedimento

- 1.** Con il pick, costruito seguendo il protocollo “Rinnovo delle colture di *C. elegans*: picking e chunking”, trasferire circa 20 esemplari adulti su ciascuna delle 4 piastre NGM agar da 90 mm con batteri freschi. Incubare nel termostato per far compiere un intero ciclo vitale: ci vorrà una settimana se la temperatura del termostato è di 15°C, circa 4 giorni se la temperatura è di 20°C.
- 2.** Controllare periodicamente le piastre e assicurarsi che non ci siano contaminazioni. Le piastre sono pronte quando i vermi avranno esaurito il cibo, ci saranno molti esemplari agli stadi larvali L1 e L2 e allo stesso tempo sulla piastra saranno presenti delle uova (segno che gli adulti non sono rimasti a lungo senza cibo).
- 3.** Con una pipetta Pasteur, trasferire (anche a più riprese) in ogni piastra 5 ml di Tampone M9. Agitare delicatamente la piastra per permettere ai vermi di staccarsi e di nuotare nel tampone.
- 4.** Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire il liquido in una provetta da 15 ml pulita (serviranno 2 provette, il volume finale sarà di circa 10 ml per ogni provetta).
- 5.** Centrifugare le provette per 2 minuti a 1500 rpm.
- 6.** Aspirare quanto più surnatante possibile senza toccare il pellet di vermi. Eliminare il surnatante.
- 7.** Aggiungere 15 ml di tampone M9 e ripetere i punti 5 e 6 per un paio di volte. Alla fine, lasciare circa 3 ml di surnatante in ciascuna provetta.
- 8.** Aggiungere un ugual volume (quindi 3 ml) di soluzione di congelamento (si vedano le note per la sua preparazione). Chiudere il tappo e agitare delicatamente per mescolare i due liquidi.
- 9.** Trasferire 2 ml di soluzione con i vermi in ognuna delle provette per il congelamento, precedentemente marcate con il nome del ceppo, la data di congelamento e il numero progressivo del campione.

10. Trasferire le provette in un pezzo di polistirolo, in cui sono stati fatti 6 buchi per alloggiare le provette. Avvolgere il polistirolo con 4-5 strati di fogli di carta da cucina, in modo che si crei uno strato protettivo. Porre il tutto dentro una scatola di polistirolo e congelare a -80°C o a -20°C .
11. Dopo un mese dal congelamento, scongelare una sola provetta per verificare l'efficacia del congelamento. Scaldare la provetta tra le mani finché il contenuto si sarà sciolto e poi trasferirlo in una piastra di NGM agar con batteri *E. coli* OP50. Lasciare il coperchio aperto per permettere al liquido di asciugarsi. Se il congelamento è stato efficace, dopo pochi minuti dovrete osservare i primi vermi muoversi e in un paio di giorni dovrebbero esserci almeno una ventina di esemplari vivi in piastra.

Note

- 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 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, aggiungere 800 ml di H_2O deionizzata e mescolare. Portare a 1L e sterilizzare tramite filtrazione con filtro da $0.22\mu\text{m}$.
- Per la preparazione della soluzione di congelamento, pesare 5.8 g NaCl in un becher, aggiungere 50 ml di KH_2PO_4 1M (pH 6.0), 240 ml di glicerolo 100%. Aggiungere 710 ml di H_2O deionizzata. Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Quando la soluzione si è raffreddata, aggiungere 30 μl di MgSO_4 1M ogni 100ml di soluzione.
- Gli esemplari che resistono meglio al congelamento-scongelo sono le larve nei primi stadi larvali (L1 e L2), pertanto è importante partire con piastre ricche di questi esemplari. Un'altra opzione rispetto a quella proposta è quella di sincronizzare le colture di vermi e arricchirle così di esemplari L1.
- Per aumentare l'efficienza di congelamento, è importante che la diminuzione della temperatura sia graduale: ecco perché le provette con i vermi vengono poste in due strati successivi di polistirolo.