

Analisi di vitalità di lievito dopo esposizione ad agenti ossidanti (H_2O_2)

a cura di C.V. Segré, G. Nappo e A. Croce

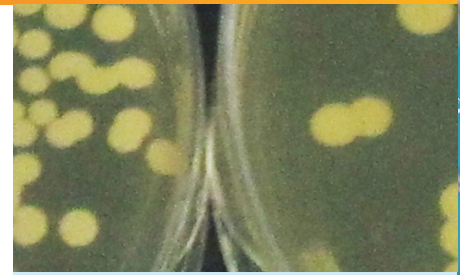
L'integrità del DNA può essere danneggiata dall'azione di diversi agenti mutageni. Alcuni di essi sono sostanze prodotte dal metabolismo, come il perossido di idrogeno, o acqua ossigenata (H_2O_2). L' H_2O_2 è un forte ossidante, che reagisce con le macromolecole biologiche, come il DNA, danneggiandolo. Se la concentrazione di H_2O_2 è troppo elevata, le cellule non riparano i danni e possono andare incontro a morte. Grazie a questa proprietà, l' H_2O_2 viene anche utilizzata come disinfettante. In questa esperienza sarà possibile valutare gli effetti del danno ossidativo sulla vitalità di una popolazione di cellule di lievito

Obiettivo

Analizzare le differenze di vitalità di lievito dopo trattamento con un agente mutageno chimico ossidante, il perossido di idrogeno (H_2O_2).

Procedimento

1. Pesare 0,2g di lievito in polvere e scioglierlo in 2ml di terreno liquido YPD.
2. Prelevare 10 μ l di lievito sciolto e trasferirli in 10ml di terreno liquido YPD (diluizione 1:1000).
3. Versare 240ml di terreno liquido YPD in una fiasca da 500ml e aggiungere i 10ml di lievito diluito 1:1000.
4. Far crescere la coltura in agitazione a 28°C/30°C per una notte o a temperatura ambiente per un giorno e una notte.
5. Preparare 4 provette da 1.5ml come segue: "0mM H_2O_2 ", "5mM H_2O_2 ", "7.5mM H_2O_2 " e "10mM H_2O_2 ".
6. Mettere 15ml di terreno liquido YPD in un tubo da 50ml.
7. Prelevare 30 μ l di coltura di lievito cresciuta la notte e diluirla nei 15ml di terreno YPD. Mescolare bene (spipettando o col vortex) e poi aggiungere 500 μ l di coltura diluita in ciascuna provetta.
8. Aggiungere in ogni provetta il volume appropriato di H_2O_2 , per raggiungere la concentrazione indicata, calcolata su un volume finale di 600 μ l.
9. Portare tutti i tubi allo stesso volume finale di 600 μ l con terreno liquido YPD.
10. Ricoprire le provette con carta stagnola e porre in oscillazione a 28°C (o a temperatura ambiente) per 20 minuti.
11. Nel frattempo, preparare le piastre correttamente nominate, corrispondenti alle diverse condizioni sperimentali.
12. Trascorsi i 20 minuti di trattamento, mescolare bene le colture (spipettando o col vortex) e prelevare 50 μ l.
13. Depositare le cellule sulle piastre e spatolarle bene con un'ansetta fino a che non sono asciugate.
14. Incubare le piastre a 28°C/30°C per 1-2 giorni o a temperatura ambiente per 2-3 giorni fino a che non sono visibili le colonie.
15. Confrontare i numeri di colonie cresciute nei campioni trattati e non trattati con agente ossidante.



Tempo previsto

20 minuti per inoculo coltura
1 ora per trattamento con H_2O_2
1-2 giorni per la crescita delle colonie

Materiali e reagenti

- ✓ Lievito in polvere (acquistabile al supermercato)
- ✓ Piastre per lievito con bacto-agar
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Provette da 50ml
- ✓ Fiasca da 500ml
- ✓ Cilindro graduato da 500ml
- ✓ Ansette a L sterili
- ✓ Carta stagnola (acquistabile al supermercato)
- ✓ Acqua ossigenata 10 volumi (acquistabile al supermercato)

Strumentazione

- ✓ Agitatore
- ✓ Bilancia
- ✓ Oscillatore
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali

Osservazioni

- Una soluzione commerciale di H_2O_2 10 volumi ha una concentrazione di 893mM.
- La crescita della coltura madre di lievito per la notte precedente è funzionale all'esperimento: le cellule infatti, per poter rispondere al meglio ai danni al DNA, devono essere in attiva crescita, nella cosiddetta crescita esponenziale. Se sciogliessimo il lievito in polvere e lo trattassimo immediatamente con H_2O_2 le cellule non avrebbero tempo di adattarsi e, sottoposte direttamente allo stress ossidativo, morirebbero tutte.
- L' H_2O_2 , a causa della sua estrema reattività chimica, è una molecola instabile, soprattutto in piastra solida: ecco perché occorre somministrare l' H_2O_2 ad una coltura liquida e solo successivamente piastrare le cellule.