

Analisi di vitalità di lievito dopo esposizione a raggi UV

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

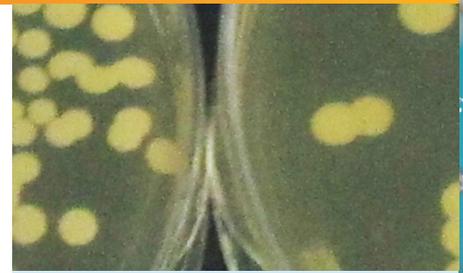
L'integrità del DNA può essere danneggiata dall'azione di diversi agenti mutageni, come le radiazioni ultraviolette (raggi UV). Questi inducono mutazioni nel DNA, contribuendo all'instabilità genomica, che è una delle cause primarie dei tumori. Le cellule possiedono dei meccanismi per identificare e riparare i danni al DNA, i checkpoint; se il danno al DNA è troppo esteso, come dopo eccessiva esposizione a raggi UV, i checkpoint inducono la morte delle cellule. Per questo, i raggi UV sono utilizzati in procedure di sterilizzazione, nei laboratori di ricerca ma anche nell'industria alimentare. In questa esperienza sarà possibile valutare gli effetti del danno da raggi UV sulla vitalità di una popolazione di cellule di lievito.

Obiettivo

Analizzare le differenze di vitalità di lievito dopo trattamento con un agente mutageno fisico, le radiazioni ultraviolette (raggi UV).

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 diverse piastre di bacto-agar etichettate come segue: "no UV", "30 secondi UV", "1 minuto UV" "5 minuti UV".
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) .
8. Prelevare 50 μ l di coltura, depositare le cellule sulle piastre di bacto-agar e distribuirle bene con un'ansetta a L fino a che non sono asciutte.
9. Sistemare le piastre, ad eccezione del controllo, senza coperchio con l'agar rivolto verso la fonte di raggi UV.
10. Accendere la lampada UV e trattare le piastre per i tempi indicati: 30 secondi, 1 minuto, 5 minuti.
11. Allontanare le piastre dalla fonte UV, rimettere il coperchio e avvolgere le piastre in carta stagnola.
12. Incubare le piastre a 28°C/30°C per 1-2 giorni o a temperatura ambiente per 2-3 giorni o fino a che non sono visibili le colonie.
13. Valutare le differenze nel numero di colonie cresciute nelle diverse condizioni sperimentali.



Tempo previsto

20 minuti per inoculo coltura
45 minuti per trattamento con UV
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)

Strumentazione

- ✓ Agitatore
- ✓ Bilancia
- ✓ Transilluminatore o lampada UV
- ✓ Oscillatore
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali

Osservazioni

- La crescita della coltura madre di lievito i 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 il giorno stesso dell'irradiazione le cellule non avrebbero tempo di adattarsi e, sottoposte direttamente ai raggi UV, morirebbero tutte.
- I tempi di irradiazione sono stati calcolati per un transilluminatore con due lampade da 6W l'una.
- La luce attiva la fotoliasi, un enzima che ripara i danni al DNA dovuti da radiazioni UV, come i dimeri di pirimidina, in un processo chiamato fotoreversione. Per evitare questo processo durante l'esperimento, le piastre devono essere tenute al buio avvolte in carta stagnola.
- I raggi UV sono le radiazioni a minor energia; esse infatti non penetrano in profondità nell'acqua o nei liquidi. Per questo motivo l'irradiazione avviene su cellule già piastrate.
- I raggi UV sono mutageni e cancerogeni. Quando si utilizza il transilluminatore o la lampada UV è opportuno indossare dei dispositivi di protezione, come un camice a maniche lunghe, guanti e occhiali protettivi, e non guardare mai direttamente la fonte di UV.