

Selezione dei mutanti *petite* in lievito

a cura di V. Soglio

I mutanti di lievito noti con il nome di 'petite' insorgono spontaneamente in una popolazione di lieviti selvatici e il loro numero può essere incrementato se questi ultimi vengono posti su un particolare terreno di crescita (vedi protocollo 'Insorgenza dei mutanti petite in lievito'). A parità di tempo di crescita, le dimensioni ridotte delle colonie rispetto al selvatico consentono una prima identificazione dei mutanti. Tuttavia questa differenza morfologica delle colonie non è sinonimo e garanzia che quei lieviti siano 'petite', è necessario svolgere dei saggi per l'identificazione. In questo protocollo si propone un metodo di selezione dei mutanti di facile realizzazione. Si ricorda che la certezza che si tratti di un mutante 'petite' è data solo dal sequenziamento del DNA mitocondriale e dal suo confronto con quello di un selvatico.

Obiettivo

Identificare i mutanti *petite* tramite crescita su un terreno selettivo.

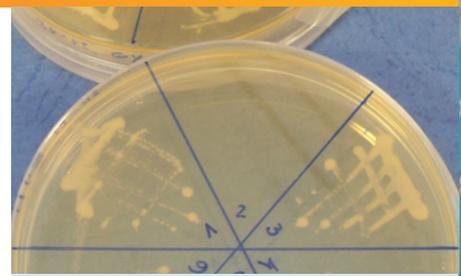
Procedimento

Preparazione di piastre con terreno di crescita selettivo

- Pesare 10 g di estratto di lievito e 20 g di peptone.
- Mettere l'estratto di lievito in un becker contenente 500 ml di acqua deionizzata e mescolare fino a quando la polvere si è sciolta.
- Aggiungere il peptone e mescolare fino a quando la polvere si è sciolta.
- Aggiungere 20 ml di glicerolo e portare il volume a 1 L con acqua deionizzata.
- Trasferire in una bottiglia, aggiungere 20 g di bacto agar e sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 121°C.
- Lasciare raffreddare il terreno e versarne 25 ml circa in ogni piastra.
- Quando il terreno si è solidificato, conservare le piastre in frigorifero.

Dopo aver generato possibili mutanti *petite* secondo il protocollo 'Insorgenza dei mutanti *petite* in lievito', è opportuno selezionarli procedendo come descritto di seguito.

1. Individuare le colonie di ridotte dimensioni cresciute sulle piastre glucosio+glicerolo. Testare tutti i possibili mutanti formati sulle 10 piastre preparate.
2. Toccare con uno stuzzicadente ciascuna colonia e fare uno striscio su una piastra con terreno selettivo. Per poter distinguere le colonie è fondamentale suddividere la piastra in spicchi, numerarli e fare lo striscio di una colonia in uno spicchio.
3. Con lo stesso stuzzicadente fare uno striscio anche su una piastra con terreno di crescita non selettivo, quello contenente il glucosio come fonte di carbonio (YPD, vedi protocollo 'Preparare il terreno di coltura per i lieviti'). Anche in questo caso suddividere le piastre in spicchi e numerarli. Deve esserci corrispondenza tra la piastra con terreno selettivo e quella con YPD.
4. Incubare le piastre a temperatura ambiente per due giorni o fino a quando le colonie diventano visibili.



Tempo previsto

- 40 minuti per la preparazione del terreno
- 40 minuti per l'esperimento

Materiali e reagenti

- ✓ Estratto di lievito
- ✓ Peptone
- ✓ Glicerolo
- ✓ Bacto-agar
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Becker
- ✓ Bottiglia
- ✓ Piastre Petri
- ✓ Piastre con terreno glucosio+glicerolo su cui sono cresciute colonie di lievito
- ✓ Piastre con terreno solido YPD
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)

Strumentazione

- ✓ Bilancia
- ✓ Autoclave

Osservazioni

- Il metodo di selezione dei mutanti *petite* descritto nel protocollo si basa sulla loro incapacità di respirare: il terreno usato contiene come fonte di carbonio, il glicerolo, che può essere solo respirato, pertanto solo i lieviti selvatici riusciranno a crescere.
- Lo striscio della stessa colonia su terreno selettivo e su quello non selettivo (YPD) consente di identificare i lieviti *petite* (quelli che non crescono sul terreno selettivo) e averli a disposizione (cresciuti su terreno non selettivo) per successivi esperimenti come il saggio funzionale descritto nel protocollo 'Prova funzionale dei mutanti *petite* in lievito'.

Nelle figure riportate di seguito si osserva la crescita delle stesse colonie di lievito su terreni diversi.

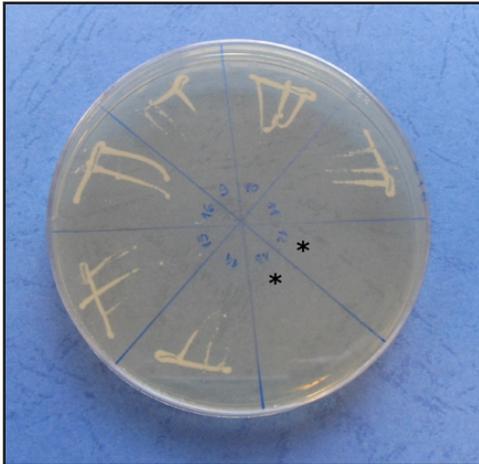


Figura 1

Lieviti cresciuti su piastra con terreno selettivo: le cellule che non hanno dato origine a delle colonie (asterisco) sono mutanti 'petite'.



Figura 2

Lieviti cresciuti su piastra con terreno non selettivo (YPD): i lieviti 'petite' identificati grazie alla mancata proliferazione su terreno selettivo sono invece cresciuti su questo tipo di terreno (asterisco).