

## Protezione dei danni da radiazioni ultraviolette in lievito

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

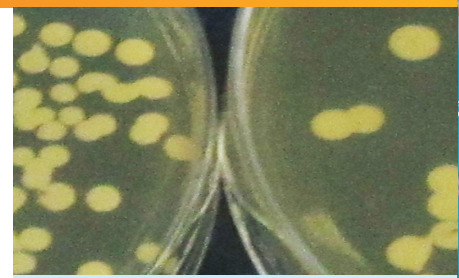
*Le radiazioni ultraviolette (raggi UV) sono agenti mutageni che danneggiano il DNA. Le cellule possiedono dei meccanismi di riparazione dei danni, i checkpoint, ma non sempre sono efficaci al 100%, soprattutto se la quantità di agente mutageno è grande e prolungata nel tempo; questo causa insorgenza di mutazioni e instabilità genomica. Per ridurre la quantità di raggi UV che penetrano in una cellula esistono diverse strategie, come l'utilizzo di "schermi" e fattori di protezione. La nostra arma più potente contro l'insorgenza di tumori è la prevenzione che si attua adottando misure di protezione. In questa esperienza vedremo l'effetto di alcuni fattori di protezione verso esposizione a raggi UV.*

### Obiettivo

Analizzare le differenze di vitalità cellulare di lievito dopo trattamento con radiazioni ultraviolette in presenza o assenza di fattori di protezione.

### Procedimento

1. Preparare una coltura di lievito in crescita esponenziale come descritto nel protocollo "Analisi di vitalità di lievito dopo esposizione a raggi UV" ai punti 1-3.
2. Preparare una piastra etichettata "no UV" e tre piastre di bacto-agar etichettate come segue: "1 minuto UV", "1 minuto + crema" e "1 minuto + lastra".
3. Mettere 15ml di terreno liquido YPD in un tubo da 50ml.
4. Prelevare 30µl di coltura di lievito cresciuta la notte e diluirla nei 15ml di terreno YPD. Mescolare bene (spipettando o col vortex).
5. Prelevare 50µl di coltura, depositare le cellule sulle piastre di bacto-agar e distribuirle bene con un'ansetta a L fino a che non sono asciutte.
6. Posizionare la piastra etichettata come "1 minuto" senza coperchio con l'agar rivolto verso la fonte di raggi UV.
7. Irradiare la piastra per 1 minuto.
8. Allontanare le piastre dalla fonte UV, rimettere il coperchio e avvolgere le piastre in carta stagnola.
9. Stendere della pellicola trasparente sulla superficie del transilluminatore, assicurandosi che sia ben adesa e tesa senza bolle di aria. Stendere 3g di crema solare sulla superficie, assicurandosi che lo strato di crema sia uniforme in tutti i punti.
10. Posizionare la piastra etichettata con "crema" senza coperchio sulla pellicola con l'agar rivolto verso la fonte di raggi UV. Irradiare le piastre come al punto 5.
11. Rimuovere la pellicola con la crema solare, rimettere il coperchio alle piastre e avvolgerle in carta stagnola.
12. Appoggiare sulla superficie del transilluminatore la lastra scura. Posizionare le piastre etichettate con "lastra" senza coperchio sulla lastra con l'agar rivolto verso la fonte di raggi UV.



### 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

### Strumentazione

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

13. Irradiare le piastre come al punto 5.
14. Avvolgere le piastre in carta stagnola.
15. 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.
16. Valutare le differenze nel numero e nelle dimensioni delle colonie cresciute nelle diverse condizioni.

### Osservazioni

- Se non si ha disposizione un transilluminatore ma lampade UV, posizionare la crema e la lastra come indicato nelle Figure 1A e 1B.
- La crescita della coltura madre di lievito la notte precedente è funzionale all'esperimento: le cellule, 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 da radiazioni UV, come i dimeri di pirimidina, in un processo chiamato fotoreversione. Per limitare questo processo, le piastre devono essere tenute al buio avvolte in carta stagnola.
- I raggi UV sono le radiazioni a minor energia, non penetrano in profondità nell'acqua o nei liquidi. Per questo motivo l'irradiazione avviene su cellule già piastrate e non in coltura.
- 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.

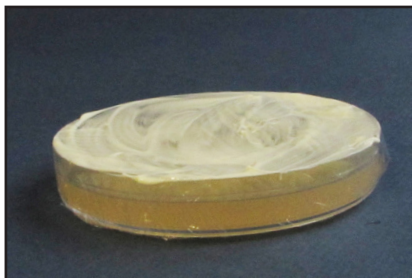


Fig. 1A

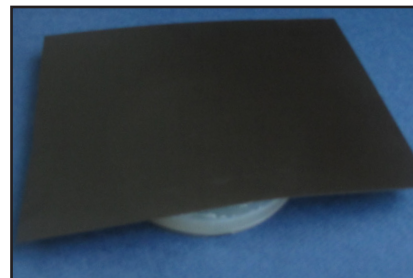


Fig. 1B