

Insorgenza di mutazioni in lievito dopo trattamento con raggi UV

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

Gli agenti mutageni come le radiazioni ultraviolette minacciano l'integrità dell'informazione genetica danneggiando il DNA e aumentando la frequenza di mutazioni. Le mutazioni possono far perdere una funzione, come ad esempio la capacità di crescere in assenza di un nutriente, o farne acquisire di nuove, come la capacità di crescere in presenza di una molecola tossica, ad esempio un antibiotico. In questa esperienza verrà valutato come aumenta il tasso di insorgenza di mutazioni in cellule di lievito esposte a raggi UV rispetto a cellule non esposte, utilizzando un terreno che seleziona positivamente i mutanti.

Obiettivo

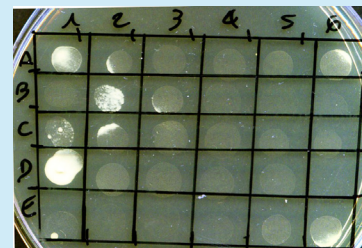
Valutare l'aumentata frequenza di insorgenza di mutazioni in cellule di lievito dopo esposizione a un agente mutageno.

Procedimento

1. Preparare delle piastre di bacto-agar contenenti l'antibiotico Amfotericina B come descritto nel protocollo "Preparare il terreno di crescita di lievito con antibiotico".
2. Sottoporre le cellule di lievito al trattamento con radiazioni UV come descritto nel protocollo "Analisi di vitalità di lievito dopo esposizione a raggi UV" con le seguenti tempistiche di irradiazione: "no UV" (1-2 piastre) e "30 secondi UV" (4-5 piastre).
3. Quando le piastre di bacto-agar con Amfotericina B sono solidificate, preparare la griglia per lo spotting delle colonie e lo screening dei mutanti come indicato nella Figura 1.
4. Quando le colonie delle piastre irradiate sono cresciute, selezionare almeno 50 colonie per condizione (irradiato e non irradiato). Con uno stuzzicadenti sterile toccare una colonia alla volta e spottarla ognuna in un quadratino della griglia sia della piastra di controllo che di quella con amfotericina, nelle stesse posizioni. Utilizzare quindi due piastre normali e due piastre con Amfotericina B per condizione, per un totale di 8 piastre con griglia.
5. Avvolgere le piastre in carta stagnola e incubarle 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 sulla piastra di controllo.
6. Calcolare la frequenza di mutanti per le due condizioni (irradiato e non irradiato) come: numero di colonie cresciute su Amfotericina B/numero totale colonie seminate

Osservazioni

- I raggi UV, oltre a indurre mutazioni nel DNA, riducono anche la vitalità cellulare: per avere un numero sufficiente di colonie irradiate da testare, è necessario irradiare almeno 4-5 piastre.
- Le piastre con griglia di bacto-agar senza antibiotico sono un controllo sperimentale molto importante: permette di valutare quando la colonia è cresciuta correttamente e quindi di poter valutare se è cresciuto o no sulla



Tempo previsto

- 20 minuti per inoculo coltura
- 50 minuti per preparazione piastre di bacto-agar con Amfotericina B
- 45 minuti per trattamento con UV
- 1-2 giorni per la crescita delle colonie
- 2 ore per la preparazione delle griglie e gli spot
- 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
- ✓ Tubi da 50ml
- ✓ Fiasca da 500ml
- ✓ Cilindro graduato da 500ml
- ✓ Ansette a L sterili
- ✓ Carta stagnola (acquistabile al supermercato)
- ✓ Antibiotico Amfotericina B
- ✓ Stuzzicadenti sterili

Strumentazione

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

piastra contenente il terreno di selezione. Se la crescita sulle due piastre è comparabile, la colonia deriva da un mutante in grado di crescere in presenza di Amfotericina. Se vi è crescita solo sulla piastra di controllo, la colonia non è in grado di crescere su Amfotericina. Se non vi è crescita nemmeno sulla piastra di controllo, nulla si può dire sull'insorgenza di eventuali mutazioni.

- L'Amfotericina uccide i lieviti legando un componente della loro membrana, l'ergosterolo (simile al colesterolo): crea una sorta di poro nella membrana causando un flusso massiccio di ioni K^+ fuori dalla cellula, determinandone la morte. In questa esperienza viene valutato il tasso di insorgenza di mutazioni indotte da UV che conferiscono alle cellule la capacità di crescere in presenza di Amfotericina, tuttavia non permette di comprendere il meccanismo molecolare.
- Potrebbero verificarsi alcune situazioni intermedie: colonie che crescono in presenza di antibiotico ma di dimensioni ridotte rispetto alla condizione di controllo. Presumibilmente si tratta di mutanti la cui crescita è rallentata dalla presenza dell'antibiotico ma non inibita. In questa esperienza questi vengono considerati come mutanti positivi.
- Il tasso di insorgenza di mutazioni valutato in questa esperienza è certamente sottostimato rispetto al valore reale, poiché è misurato solo sulla comparsa di uno specifico fenotipo. Tutte le altre possibili mutazioni insorte a causa del trattamento non vengono rilevate. Per avere una stima precisa della quantità di mutazioni causate dal trattamento con raggi UV, occorrerebbe estrarre il DNA da lieviti trattati e non trattati ed effettuare un sequenziamento.

Figura 1.

