Crioconservazione del C. elegans

Materiali e reagenti

* 4 piastre NGM-agar con batteri *E.coli* OP50
* Piastre con vermi da prelevare
* Tampone M9
* Soluzione di congelamento
* Provette da 15 ml sterili
* Pennarello indelebile
* Scatola di polistirolo
* Provette da 2 ml adatte al congelamento

Strumenti

* Stereomicroscopio
* Pick (da costruire)
* Centrifuga da banco
* Freezer -80°C
* Termostato a 15°C o a 20°C

Tempo

* 10 minuti per il picking
* 1 settimana per la crescita dei vermi
* 30 minuti per il congelamento

Procedimento

1. Con il pick trasferire circa 20 esemplari adulti su ciascuna delle 4 piastre NGM-agar da 90 mm con batteri freschi. Incubare nel termostato per far compiere un intero ciclo vitale: ci vorrà una settimana se la temperatura del termostato è di 15°C, circa 4 giorni se la temperatura è di 20°C.
2. Controllare periodicamente le piastre e assicurarsi che non ci siano contaminazioni. Le piastre sono pronte quando i vermi avranno esaurito il cibo, ci saranno molti esemplari agli stadi larvali L1 e L2 e allo stesso tempo sulla piastra saranno presenti delle uova (segno che gli adulti non sono rimasti a lungo senza cibo).
3. Con una pipetta Pasteur, trasferire (anche a più riprese) in ogni piastra 5 ml di Tampone M9. Agitare delicatamente la piastra per permettere ai vermi di staccarsi e di nuotare nel tampone.
4. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire il liquido in una provetta da 15 ml pulita (serviranno 2 provette, il volume finale sarà di circa 10 ml per ogni provetta).
5. Centrifugare le provette per 2 min. a 1200 rpm.
6. Aspirare quanto più surnatante possibile senza toccare il pellet di vermi. Eliminare il surnatante.
7. Aggiungere 15 ml di tampone M9 e ripetere i punti 5 e 6 per un paio di volte. Alla fine, lasciare circa 3 ml di surnatante in ciascuna provetta.
8. Aggiungere un ugual volume (quindi 3 ml) di soluzione di congelamento. Chiudere il tappo e agitare delicatamente per mescolare i due liquidi.
9. Trasferire 2 ml di soluzione con i vermi in ognuna delle provette per il congelamento, precedentemente marcate con il nome del ceppo, la data di congelamento e il numero progressivo del campione.
10. Trasferire le provette in contenitore adatto al congelamento (Mr. Frosty; Cool cell)
11. Dopo un mese dal congelamento, scongelare una sola provetta per verificare l’efficacia del congelamento. Scaldare la provetta tra le mani finché il contenuto si sarà sciolto e poi trasferirlo in una piastra di NGM-agar con batteri *E.coli* OP50. Lasciare il coperchio aperto per permettere al liquido di asciugarsi. Se il congelamento è stato efficace, dopo pochi minuti dovreste osservare i primi vermi muoversi e in un paio di giorni dovrebbero esserci almeno una ventina di esemplari vivi in piastra.

**Note**

1. Per la preparazione del tampone M9, pesare 5.8 g Na2HPO4, 3.0 g KH2PO4, 5.0 g NaCl e 0.25 g MgSO4, aggiungere 800 ml di H2O deionizzata e mescolare. Portare a 1L e sterilizzare tramite filtrazione con filtro da 0.22 μm.
2. Per la preparazione della soluzione di congelamento, pesare 5.8 g NaCl in un becher, aggiungere 6.8 gr 1M KH2PO4, 300 gr glicerolo 100% e 5.6 ml di 1M NaOH. Aggiungere 710 ml di H2O deionizzata. Sterilizzare a 121°C per 15 min. Quando la soluzione si è raffreddata, aggiungere 30 μl 1M MgSO4 ogni 100ml di soluzione.
3. Gli esemplari che resistono meglio al congelamento-scongelamento sono le larve nei primi stadi larvali (L1 e L2), pertanto è importante partire con piastre ricche di questi esemplari. Un’altra opzione rispetto a quella proposta è quella di sincronizzare le colture di vermi e arricchirle così di esemplari L1.