

LINEA GUIDA

MANTENERE DROSOPHILA MELANOGASTER IN LABORATORIO

SOMMARIO

1.	SCOPO.....	2
2.	FONTI E NORME DI RIFERIMENTO	2
3.	ACRONIMI E SIGLE.....	2
4.	AMBITI DI RIFERIMENTO DELLA LINEA GUIDA.....	2
4.1.	AMBIENTE.....	2
4.2.	RISORSE UMANE	3
4.3.	STRUMENTI.....	3
4.4.	MATERIALI	4
4.5.	METODI.....	4
4.5.1.	PREPARAZIONE DEL MEZZO DI CRESCITA.....	4
4.5.2.	ADDORMENTAMENTO DEI MOSCERINI.....	5
4.5.3.	MANTENIMENTO DEI CEPPI	5
4.5.4.	RACCOLTA DELLE FEMMINE VERGINI	6
4.5.5.	ALLESTIMENTO DI INCROCI SPERIMENTALI	6
4.5.6.	NOMENCLATURA GENETICA PER DROSOPHILA MELANOGASTER.....	7
4.5.7.	RIFIUTI.....	7
4.5.8.	CONTAMINAZIONI	7
4.5.8.1.	BATTERI.....	7
4.5.8.2.	MUFFE	7
4.5.8.3.	ACARI	7
5.	MODULISTICA.....	8
6.	SERVIZI A CUI FARE RIFERIMENTO E RECAPITI	8
7.	AUTORI E REVISORI.....	8
7.1.	GRUPPO REDATTORE	8
7.2.	COLLABORATORI	8
7.3.	REVISORI.....	8
8.	DOCUMENTAZIONE A CORREDO	9

REVISIONI

Ed.	Data	Descrizione modifica	Autore della modifica	Approvazione
0	20.05.2013	EDIZIONE PER PUBBLICAZIONE	Digilio A. ⁽¹⁾ , Lacerra G. ⁽¹⁾ , Barra A. ⁽¹⁾ , Lanati A. ⁽²⁾ , Liguori G.L. ⁽¹⁾ (1) qPMO-LdA1, IGB-CNR (2) Consulente VQ	qPMO-LdA1, IGB-CNR
Ed.	Data	Descrizione	Gruppo di redazione	Approvazione



1. SCOPO

Di seguito sono riportate le linee guida per lavorare con il dittero *Drosophila melanogaster*. Sono pratiche sperimentali per la cura, il mantenimento e la manipolazione di colture di laboratorio, stilate con l'intento di facilitare chi già lavora con questo organismo e per coloro che si avvicinano a questo sistema modello.

2. FONTI E NORME DI RIFERIMENTO

<http://flystocks.bio.indiana.edu>

<http://flybase.org>

[Lindsley and Zimm \(1992\)](#), *The genome of Drosophila melanogaster* (Academic Press);

LG: Redazione di linee guida per un laboratorio di ricerca scientifica secondo i principi della qualità. Lacerra G, Digilio FA, Lanati A, Liguori GL. Edizione 0 del 11.03.2013

Decreto Legislativo 12 aprile 2001 n. 206

Testo unico Decreto Legislativo 81/08 e successive modifiche

3. ACRONIMI E SIGLE

Acronimo	Significato
CO ₂	anidride carbonica
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
F2	seconda generazione
Lab Dm	laboratorio per <i>Drosophila melanogaster</i>
LdA1	Linea di attività 1
qPMO	quality Project Management Open-Lab
TA	Temperatura Ambiente
VQ	Valore Qualità

4. AMBITI DI RIFERIMENTO DELLA LINEA GUIDA

4.1. AMBIENTE

Organizzazione

Il Lab Dm deve essere adeguato ad assicurare le corrette operazioni di manipolazione, crescita, e controllo delle colture.

La zona destinata alla preparazione dei mezzi di crescita deve essere separata dalla zona di lavoro con la *Drosophila* o deve avere la possibilità di essere isolata mediante una funzionale compartimentazione per ridurre al minimo le contaminazioni. Nel laboratorio vanno allestite postazioni di lavoro ciascuna corredata di: uno stereomicroscopio, un generatore di luce fredda, un lettino con membrana porosa (tipo il flypad della [FlyStuff](#)) collegato a bombole di CO₂ tramite un impianto che permette di regolare il flusso di gas necessario ad addormentare le mosche ed alcuni materiali necessari per lavorare con le stesse.

Per evitare un eccessivo numero di moscerini in libertà nel Lab Dm, si devono allestire le trappole, ovvero barattoli di vetro chiusi con un imbuto di plastica e riempiti con aceto di vino e alcune gocce di sapone liquido. E' consigliato non usare questo tipo di trappole nelle stanze termostatate/incubatori a causa dell'effetto corrosivo dell'aceto. In alternativa, in questi spazi, i vassoi contenenti le colture possono essere coperti con fogli di garza di cotone.

Le postazioni di lavoro e i materiali sono assegnati dal Ricercatore-responsabile del Lab Dm e vanno rispettati. Ogni unità di personale gestirà nel laboratorio Dm la postazione di lavoro assegnata.



Pulizie

Il Lab Dm deve essere mantenuto sempre libero da qualunque infestazione mediante adeguate misure preventive.

Per la pulizia di banchi, incubatori, apparecchiature, utensili, corredo di vetreria e strumentazione è consigliato usare: Alcool denaturato e/o Alcool etilico al 70%.

Eventuali detriti presenti nel vassoio che contiene le colture, vanno rimossi con una spugnetta imbevuta con etanolo al 70% o con alcool etilico denaturato.

Per pulire i contenitori, è buona norma congelarli se al loro interno sono presenti mosche. Quindi, rimosso il cibo e lavati, vanno autoclavati per 20 minuti a 121° C (se i contenitori sono di plastica ci si deve assicurare che possono essere autoclavati) o sciacquati in una soluzione al 10% di candeggina.

Alla fine della propria attività ogni unità di personale è tenuta a lasciare in ordine e pulita la propria postazione. Tutto il personale afferente, insieme con il tecnico-responsabile, è tenuto a partecipare ai turni per la pulizia della stanza di crescita/incubatore ed alle pulizie periodiche che si effettuano ogni sei mesi circa secondo un calendario stabilito dal tecnico-responsabile (Modulo 1).

4.2. RISORSE UMANE

Per la gestione ottimale del Lab Dm è opportuno individuare figure professionali dedicate alle specifiche mansioni.

Ricercatore-responsabile

- E' il responsabile del laboratorio in cui si svolgono le sperimentazioni sulla Drosophila.
- Individua il tecnico-responsabile e garantisce l'adeguata formazione di tutto il personale afferente al Lab Dm.

Tecnico-responsabile della collezione di Dm

- E' designato dal Ricercatore-responsabile del Lab Dm.
- Ha il compito di curare e mantenere le colture di laboratorio, aggiornare l'elenco ceppi, coadiuvare ricercatori e formandi nelle manipolazioni sperimentali, programmare e gestire le operazioni di pulizia delle camere termostate/incubatori e dei piani di lavoro, garantire la manutenzione di apparecchi e attrezzature, ordinare il materiale necessario e rifornire con lo stesso il personale afferente al Lab Dm, affinché tutti possano lavorare in condizioni ottimali.
- Va contattato ogni qualvolta si verificano problemi attinenti alle colture e/o alle attrezzature.

Personale afferente al Lab Dm

- Ricercatori e formandi (studenti, specializzandi, borsisti, dottorandi, ecc) che partecipano allo svolgimento dei progetti di ricerca del Lab Dm.

4.3. STRUMENTI

Stanze termostate e/o armadi-incubatore con lampade al neon temporizzate per ricreare cicli luce-buio (è consigliato un ciclo di 12 ore) e con un tasso di umidità all'incirca del 60%: gli incubatori vanno assolutamente tenuti liberi da mosche in libertà, puliti da carcasse di mosche e altri contaminanti. E' raccomandato dotare queste apparecchiature di un allarme remoto o di un dispositivo che interrompa l'erogazione di corrente, in caso di malfunzionamento accidentale sul controllo della temperatura.

Stereomicroscopio con luce fredda dall'alto.



E' raccomandato pulire lo stereomicroscopio, il banco, il lettino della CO₂ e i pennelli, prima e dopo aver maneggiato le mosche, con etanolo al 70% o con alcool etilico denaturato.

Manutenzione e cura delle apparecchiature sono a carico del tecnico-responsabile che si può avvalere di servizi interni all'Istituto ed esterni, con registrazione dati, data e firma (Modulo 2).

4.4. MATERIALI

Bombole di CO₂ ad uso alimentare: queste devono essere allocate in opportuni spazi al di fuori del laboratorio o, se messe all'interno di quest'ultimo, devono essere ancorate a parete secondo le normative vigenti.

Materiale necessario per la manipolazione di *Drosophila melanogaster*: pennelli tipo acquerello a punta sottile e morbida, lettino di membrana porosa, una superficie bianca -tipo cartoncino-, un contenitore "obitorio" (un barattolo riempito con alcool, in cui buttare le mosche morte o quelle in eccesso, sotto anestesia), contenitori per la crescita dei moscerini, barattoli di vetro, imbuti, ovatta idrofoba, garza di cotone, eterizzatore, vassoi per riporre le colture, carta sottile e assorbente, capsule Petri in vetro e/o in plastica, contenitori per ghiaccio dove poggiare vetrini da microscopia, occorrente per la preparazione del mezzo di crescita (pentola, dispensatore automatico, polenta, lievito, agar, zucchero, Nipagina).

I contenitori in cui mettere il mezzo di crescita sono cilindretti chiusi ad una estremità il cui diametro può variare da 20-30 mm fino a dimensioni maggiori, di vetro o di plastica. Per motivi di sicurezza e di praticità si consiglia l'uso di contenitori di plastica che possono essere acquistati presso fornitori di articoli per *Drosophila* ([FlyStuff](#)) o per laboratorio ([Kalttek](#), [Sarstedt](#)).

I contenitori di dimensioni maggiori sono consigliati per mantenere larghe popolazioni di moscerini, mentre per il mantenimento dei ceppi nelle collezioni di laboratorio è preferibile usare contenitori più piccoli.

Nel caso si vogliano riutilizzare i contenitori per le colture, come accade nel caso si usino quelli di vetro, è importante pulirli completamente e sterilizzarli, per prevenire contaminazioni, come indicato.

Tutti i contenitori possono essere chiusi con diversi tappi, ma è consigliabile usare tappi di cotone idrofobo da non riutilizzare in nessun caso a fine crescita.

Per evitare contaminazioni fra i vari ceppi, il tappo di cotone accidentalmente caduto sul pavimento deve essere buttato e sostituito con uno nuovo.

Per crescite particolari, il tappo di cotone può essere avvolto in foglietti di garza idrofila che serve a tenere più asciutte colture sovra-affollate.

Un altro accorgimento da seguire per ridurre l'umidità di colture sovra-affollate è l'inserimento di piccoli pezzi di carta assorbente nel terreno di crescita.

Detergenti: Alcool denaturato, Alcool al 70%, candeggina diluita almeno al 10% e detergenti specifici.

4.5. METODI

4.5.1. PREPARAZIONE DEL MEZZO DI CRESCITA

Si conoscono diversi mezzi nutritivi adatti ad allevare *Drosophila melanogaster* in laboratorio. Le caratteristiche fondamentali di un mezzo di crescita, indipendentemente dalla ricetta che si decide di seguire, sono:

- una giusta consistenza e idratazione in modo che le mosche non anneghino dentro;
- la capacità di inibire la crescita delle muffe, quasi sempre presenti nell'aria e sulle mosche.

La ricetta e le modalità di preparazione di un mezzo di crescita sono riportate nel protocollo allegato: Preparazione mezzo di crescita Dm.



La giusta consistenza e il giusto grado di idratazione del mezzo vanno calibrati sperimentalmente perché sono legati a variabili esterne, come il grado di umidità del luogo in cui si opera. Per aggiustare questi due parametri si possono modificare o la quantità di agar utilizzato o i tempi di raffreddamento/asciugatura del mezzo. E' importante eseguire quest'ultimo passaggio in condizioni controllate in modo da impedire l'ingresso di mosche all'interno dei contenitori (Preparazione mezzo di crescita Dm).

4.5.2. ADDORMENTAMENTO DEI MOSCERINI

Per addormentare i moscerini adulti si possono utilizzare:

- l'etere, sconsigliato perché infiammabile, con un odore penetrante e in grado di uccidere i moscerini in caso di sovradosaggio. E' raccomandato il suo utilizzo in caso di dissezione di adulti su vetrino;
- il Flynap (marchio di fabbrica del [Carolina Biological](#)), che presenta un odore poco gradevole;
- la CO₂ che, utilizzata in erogazione continua ai livelli minimi sufficienti per addormentare i moscerini, permette di tenerli immobili per alcuni minuti con nessun effetto collaterale;
- il raffreddamento, che è un metodo semplice consigliato soprattutto per studi di comportamento perché non danneggia la neurologia della mosca, e per immobilizzare le larve.

Le pratiche sperimentali suggerite per ogni metodo sono riportate nel protocollo allegato: Addormentare *D. melanogaster*.

4.5.3. MANTENIMENTO DEI CEPPI

I ceppi possono essere mantenuti a TA, ma non devono essere esposti alla luce diretta del sole e/o a correnti di aria. E' preferibile mantenere i ceppi in stanze termostate/incubatori, in condizioni di temperatura e umidità controllate.

Su ogni contenitore contenente i moscerini, vanno trascritti sia il nome che la data di inoculo. Il nome può essere un numero che riporta ad un elenco o, in alternativa, l'intero genotipo del ceppo.

E' importante avere un elenco dei vari ceppi presenti nella collezione, in cui sono riportati il genotipo, le caratteristiche generiche e le esigenze particolari; questo elenco deve essere costantemente aggiornato da parte del tecnico-responsabile, sotto supervisione del ricercatore-responsabile del Lab Dm (Modulo 3).

La maggior parte dei ceppi può essere mantenuta trasferendo periodicamente gli adulti in contenitori con cibo fresco, previo controllo allo stereomicroscopio, per garantire che entrambi i sessi siano presenti e che il loro fenotipo risponda all'atteso.

E' importante evitare le colture troppo sovraffollate, per cui è consigliato il trasferimento di circa una ventina di mosche in nuovi contenitori.

La frequenza dei trasferimenti dipende dalla temperatura di mantenimento; infatti, la durata del ciclo vitale di *D. melanogaster* varia in funzione di questo parametro, ed è di 10 giorni a 25°C e di 21 giorni a 18°C. E' consigliato rinfrescare i ceppi ogni 14-16 giorni se tenuti a 25°C, o ogni 25-30 giorni se mantenuti a 18°C. E' importante non superare mai i 30 giorni perché i contenitori vecchi sono maggiormente esposti a infezioni.

I ceppi della collezione, che non sono usati in maniera quotidiana, devono essere mantenuti in incubatori o camere termostate ad una temperatura di 18°C. E' consigliato mantenere, per ogni ceppo, almeno due colture indipendenti, possibilmente sfalsate di circa 2 settimane di distanza.

All'atto del rinfrescamento è buona norma mantenere le vecchie colture per 2 settimane a 18°C dopo il trasferimento, in modo che possano essere utilizzate come scorta se i nuovi contenitori si rovinano per qualsiasi ragione.

Ad ogni trasferimento, è importante ricopiare sul contenitore fresco, tutte le indicazioni riguardo il tipo di mosca. Va prestata grande attenzione a non commettere errori di trascrizione.



Alcuni ceppi possono richiedere una particolare selezione ad ogni generazione, ed è importante che il tecnico-responsabile conosca e riporti sull'elenco ceppi eventuali condizioni speciali per mantenere un determinato ceppo (Modulo 3).

Il tecnico-responsabile della collezione di moscerini replicherà i ceppi richiestigli dal personale afferente al Lab Dm quando richiestogli. Le repliche saranno gestite dall'operatore che avrà cura di utilizzare vassoi diversi da quelli della collezione per conservarli e di apporre un proprio codice identificativo. Le repliche non devono rientrare nella collezione ceppi.

E' consigliato avere, fra i ceppi, un "vassoio ospedale", ovvero, un luogo dove conservare i ceppi malati, o in condizione di crisi, e che richiedono una particolare attenzione.

4.5.4. RACCOLTA DELLE FEMMINE VERGINI

In un incrocio genetico in cui è necessario conoscere il genotipo di entrambi i genitori, bisogna utilizzare femmine che non si sono accoppiate, dette vergini. Infatti, la femmina di *Drosophila melanogaster* conserva nel suo addome gli spermatozoi ricevuti durante gli accoppiamenti e con questi feconda numerose uova. Poiché le femmine non si accoppiano nelle prime 10-12 ore dopo la schiusa dall'involucro pupale a 18°C, è possibile raccogliere tranquillamente le vergini seguendo il protocollo allegato: Raccolta vergini di *D. melanogaster*.

E' importante che ad ogni raccolta le femmine vengano messe in contenitori indipendenti che vanno controllati dopo 2-3 giorni per cercare eventuali larve: in questo caso, le femmine non sono utilizzabili. E' da tener presente che le femmine vergini depongono, sebbene in numero ridotto, uova, per cui segno di non verginità è la presenza delle larve.

E' importante raccogliere più vergini del necessario per compensare eventuali errori e/o morte dei moscerini. Se si salta una raccolta, o se servono solo poche vergini per uno o pochi incroci particolari, le femmine vergini possono essere identificate dalla presenza di una macchia scura nella regione addominale (Raccolta vergini di *D. melanogaster*).

4.5.5. ALLESTIMENTO DI INCROCI SPERIMENTALI

Risulta impossibile fornire regole universali per allestire o controllare gli incroci, perché il preciso protocollo varia da esperimento a esperimento.

Sebbene gli incroci possono essere allestiti con una singola coppia di genitori, è consigliato usare 3-5 femmine, e 2-5 maschi/contenitore piccolo (diametro di circa 20 mm) o 30 femmine e 10-20 maschi/barattolo (diametro di circa 50 mm), per avere una maggiore probabilità di riuscita.

Per rendere massimo il numero della progenie, gli incroci vanno duplicati ogni 2-4 giorni, trasferendo i genitori in contenitori con mezzo di crescita fresco sulla cui superficie è stata distribuita un po' di pasta di lievito di birra (opzionale ma consigliato).

Quando si analizza la progenie, è importante farlo almeno una volta al giorno per almeno 9 giorni a partire dalle prime nascite, poiché molti genotipi presentano un ritardo nello sviluppo e/o una diversa durata del ciclo vitale. E' importante smettere di analizzare la progenie dopo 9 giorni a 25°C, perché comincia a nascere la F2.

Quando si allestiscono gli incroci, particolare attenzione deve essere posta nel registrare date degli incroci, risultati degli incroci, commenti connessi alla tecnica, e risultati degli esperimenti su opportuni registri di laboratorio.



4.5.6. NOMENCLATURA GENETICA PER DROSOPHILA MELANOGASTER

Per garantire una nomenclatura sistematica e non ridondante è consigliato usare le regole adottate da [Flybase](#).

I nomi dei geni sono solitamente scritti in corsivo.

Il nome comincia con una lettera minuscola nel caso il fenotipo mutante sia recessivo rispetto al selvatico in normale diploidia. Il nome comincia con una lettera maiuscola nel caso il fenotipo mutante sia dominante rispetto al selvatico in normale diploidia. Geni che prendono il nome dalle caratteristiche del prodotto proteico o da altre caratteristiche molecolari cominciano con una lettera minuscola.

Il cromosoma 1 si riferisce al cromosoma sessuale ed è indicato normalmente come X.

La convenzione di scrittura dei genotipi è X/Y; 2°/2°; 3°/3° (Ad es: y,w;Cy/lf;Sb/+).

L'allele selvatico si indica con il simbolo +.

E' consigliato consultare il libro di [Lindsley and Zimm \(1992\)](#), *The genome of Drosophila melanogaster*, o il sito [Flybase](#), per una dettagliata descrizione dei cromosomi bilanciatori e dei numerosi alleli mutanti.

4.5.7. RIFIUTI

I contenitori con le mosche vanno buttati nelle scatole di rifiuti speciali forniti dall'Ufficio di Prevenzione e Protezione senza necessità di autoclavarli.

Tutto il personale afferente al Lab Dm è tenuto a chiudere bene la scatola dei rifiuti solidi, quando questa è piena. A turno si provvederà a riporla fuori il giorno del ritiro dei rifiuti (Modulo 4).

La raccolta dei rifiuti in vetro o taglienti viene effettuata in appositi contenitori forniti dall'Ufficio di Prevenzione e Protezione. Il vetro non deve fuoriuscire dagli stessi e una volta riempiti vanno chiusi e posti nella scatola dei rifiuti solidi.

4.5.8. CONTAMINAZIONI

I contaminanti più comuni che affliggono le colture di *D. melanogaster* sono i batteri e le muffe del mezzo di crescita, nonché gli acari.

4.5.8.1. BATTERI

Il più comune problema batterico è dato da batteri che producono muco sul cibo, oltre ad un eventuale pigmento rosso-bruno (per es., *Acinetobacter* sp.). Rimedi sono forniti nel protocollo allegato: Rimedi alle contaminazioni di *D. melanogaster*.

4.5.8.2. MUFFE

Le muffe, soprattutto le specie dei generi *Penicillium* o *Aspergillus*, sono un problema comune, perché il mezzo di crescita della mosca è un substrato ideale anche per la loro crescita. Quando i ceppi sono in salute, le mosche competono naturalmente con i funghi. Il problema nasce con ceppi malati o deboli o per le colture a bassa densità. E' buona norma seguire il protocollo Rimedi alle contaminazioni di *D. melanogaster*.

4.5.8.3. ACARI

La più seria minaccia per le colture di *Drosophila melanogaster* è rappresentata da una infestazione di acari. Le migliori precauzioni contro gli acari (dettagliate nel protocollo allegato Rimedi alle contaminazioni di *D. melanogaster*) sono:

- mettere in quarantena i ceppi che arrivano in laboratorio da altri laboratori e/o dagli stock centers;
- rinfrescare regolarmente i ceppi di laboratorio;
- seguire le norme di pulizia indicate.



In caso di contaminazioni da acari è necessario:

- informare il tecnico-responsabile;
- buttare il contenitore contaminato al di fuori del Lab Dm;
- pulire come indicato nella sezione pulizie (4.1; 4.3) qualunque cosa sia venuta in contatto con il contenitore contaminato;
- controllare tutti i contenitori vicini a quello contaminato alla ricerca di acari.

Se è necessario recuperare un ceppo infestato da acari, si devono selezionare 2-3 femmine e 1-2 maschi dalla coltura contaminata, assicurarsi che i loro corpi non portino acari o loro uova, e porli in un tubino fresco in quarantena.

5. MODULISTICA

Modulo 1 Turni di Pulizia Lab Dm

Modulo 2 Manutenzione e Pulizia Apparecchiature Lab Dm

Modulo 3 Formato suggerito per elenco ceppi Lab Dm

Modulo 4 Rimozione rifiuti Lab Dm

6. SERVIZI A CUI FARE RIFERIMENTO E RECAPITI

Ufficio di Prevenzione e Protezione Responsabile **Telefono**

Per scatole rifiuti solidi, contenitori per rifiuti taglienti, taniche per rifiuti liquidi.

Servizio di Supporto Tecnico Responsabile **Telefono**

Per stanza termostata/incubatore, impianto CO₂.

7. AUTORI E REVISORI

All'edizione per pubblicazione (versione 0) hanno contribuito i seguenti gruppi:

7.1. GRUPPO REDATTORE

qPMO-LdA1, IGB-CNR

F. Anna Digilio

Giuseppina Lacerra

Adriano Barra

Giovanna L. Liguori

Consulente VQ

Antonella Lanati

7.2. COLLABORATORI

IGB-CNR

Daniela Cavaliere, Pamela Santonicola, Roberto Nicodemi

7.3. REVISORI

qPMO

Marta Di Carlo, Antonella Bongiovanni (IBIM, CNR)

Gianni Colotti (IBPM, CNR)

LINEA GUIDA MANTENERE DROSOPHILA MELANOGASTER IN LABORATORIO LDA1	DATA 20/05/2013	REV. 0	PAGINA 8/8
--	-----------------	--------	------------



Annamaria Cirafici, Anna Mascia, Annamaria Kisslinger (IEOS, CNR)

Revisori Esterni

Ennio Giordano (Università degli Studi di Napoli Federico II)

Francesca Di Cara (University of Alberta, Canada)

8. DOCUMENTAZIONE A CORREDO

Preparazione mezzo di crescita per *D. melanogaster*

Addormentare *D. melanogaster*

Raccolta vergini di *D. melanogaster*

Rimedi alle contaminazioni delle colture di *D. melanogaster*