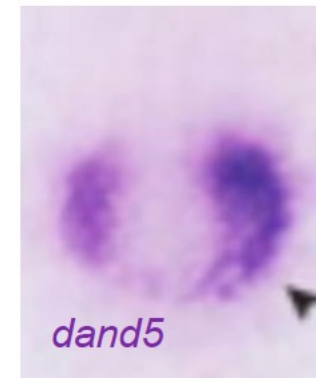
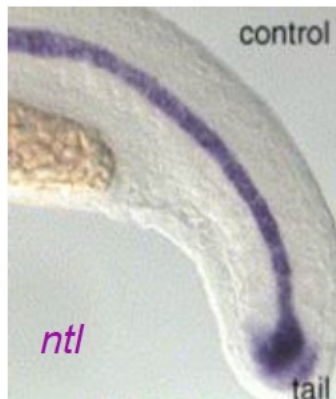
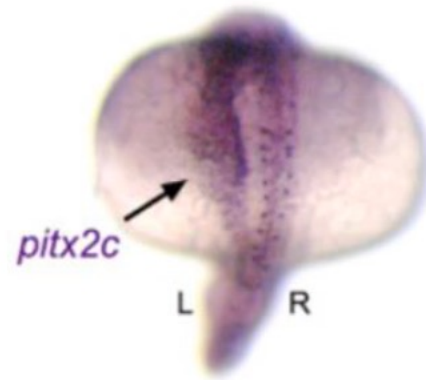
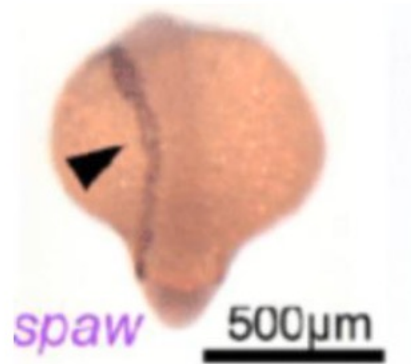


# Hibridação *in situ* – localização espacial (*in situ*) de mRNAs

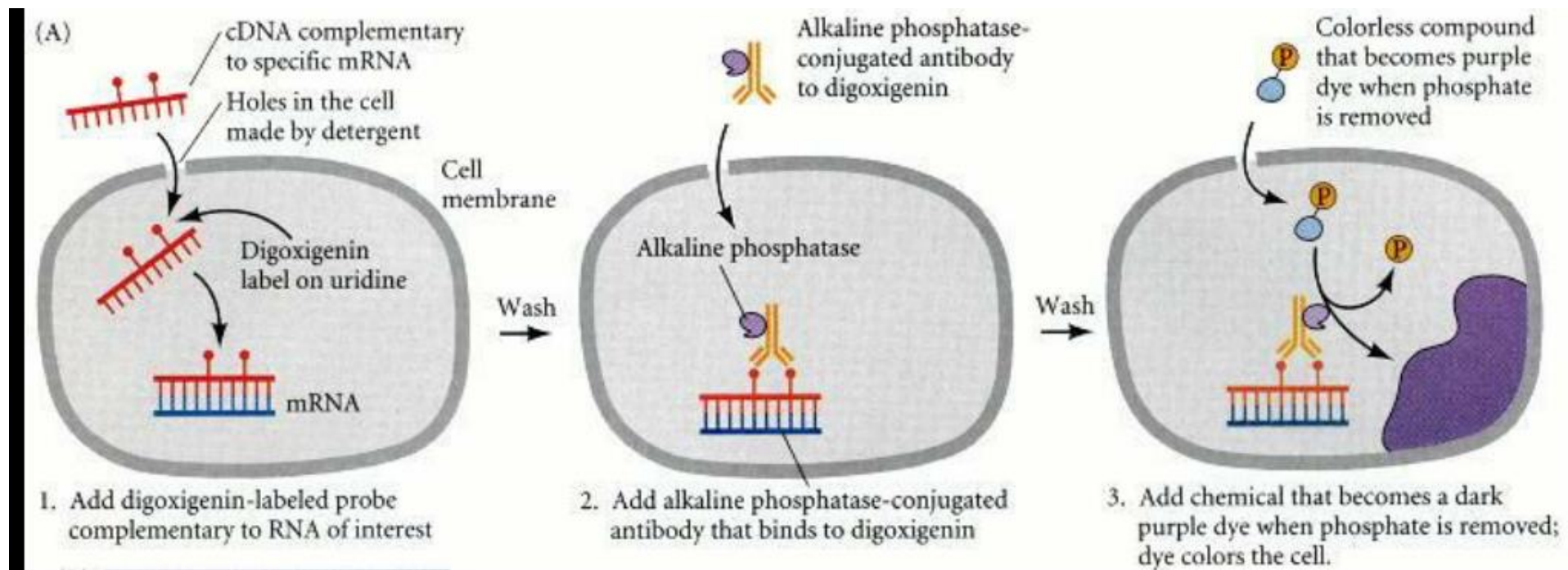
Método qualitativo

Nesta aula vamos aprender uma técnica que emprega RNA sintetizado *in vitro* marcado com digoxigenina uridina-5'-trifosfato (UTP) para determinar a expressão de genes em embriões de peixe-zebra em whole-mount (no embrião inteiro) e em larvas jovens.

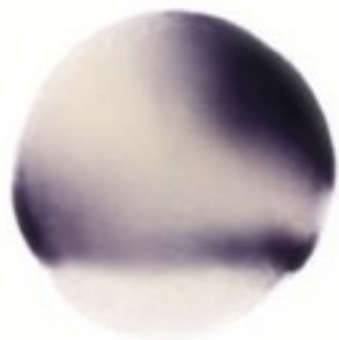
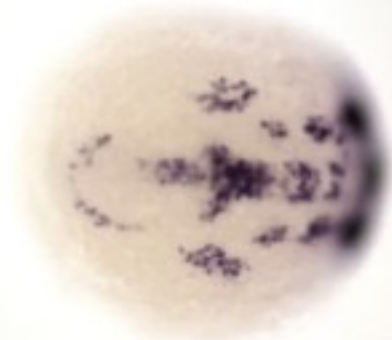
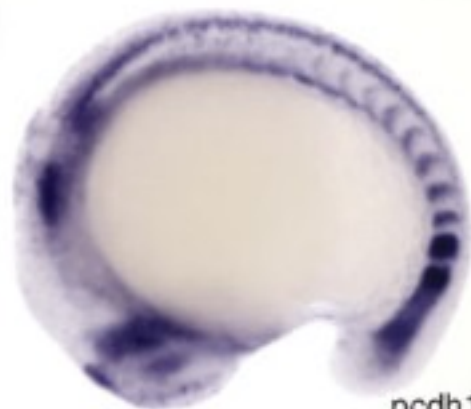
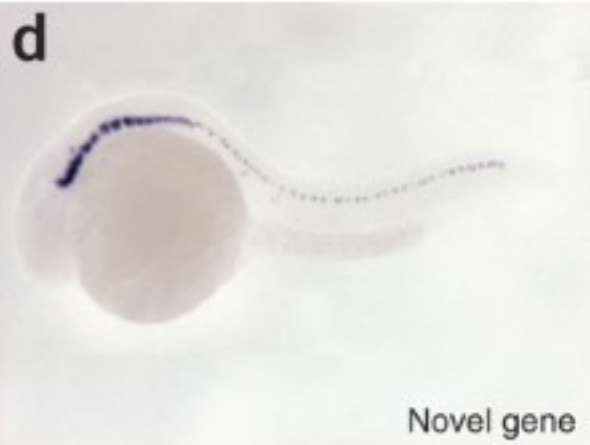
Na última aula observámos a localização de 7 mRNAs diferentes em “whole-mount embryos”



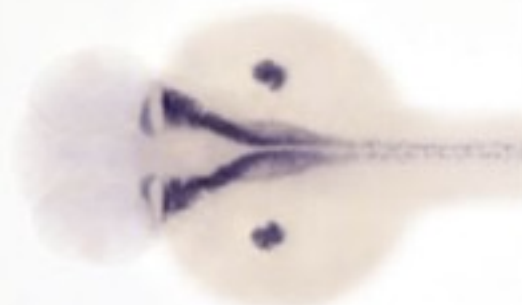
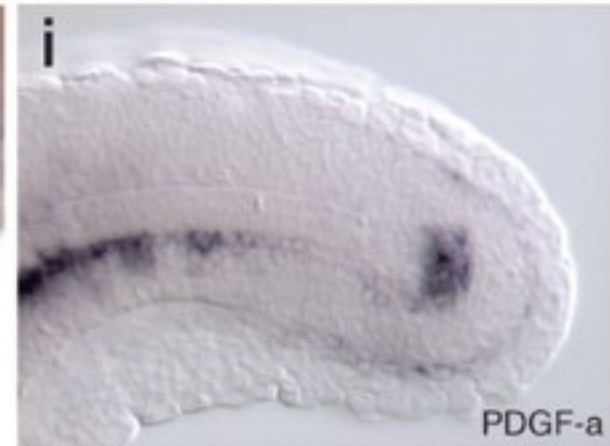
## Como marcamos o mRNA?



Após a hibridização, a localização do transcrito específico é visualizada imuno-histoquimicamente usando um anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina que hidrolisa o 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) em 5-bromo-4-cloro-3-indol e fosfato inorgânico. O 5-bromo-4-cloro-3-indol pode ser oxidado pelo NBT, que forma um precipitado insolúvel após a redução.

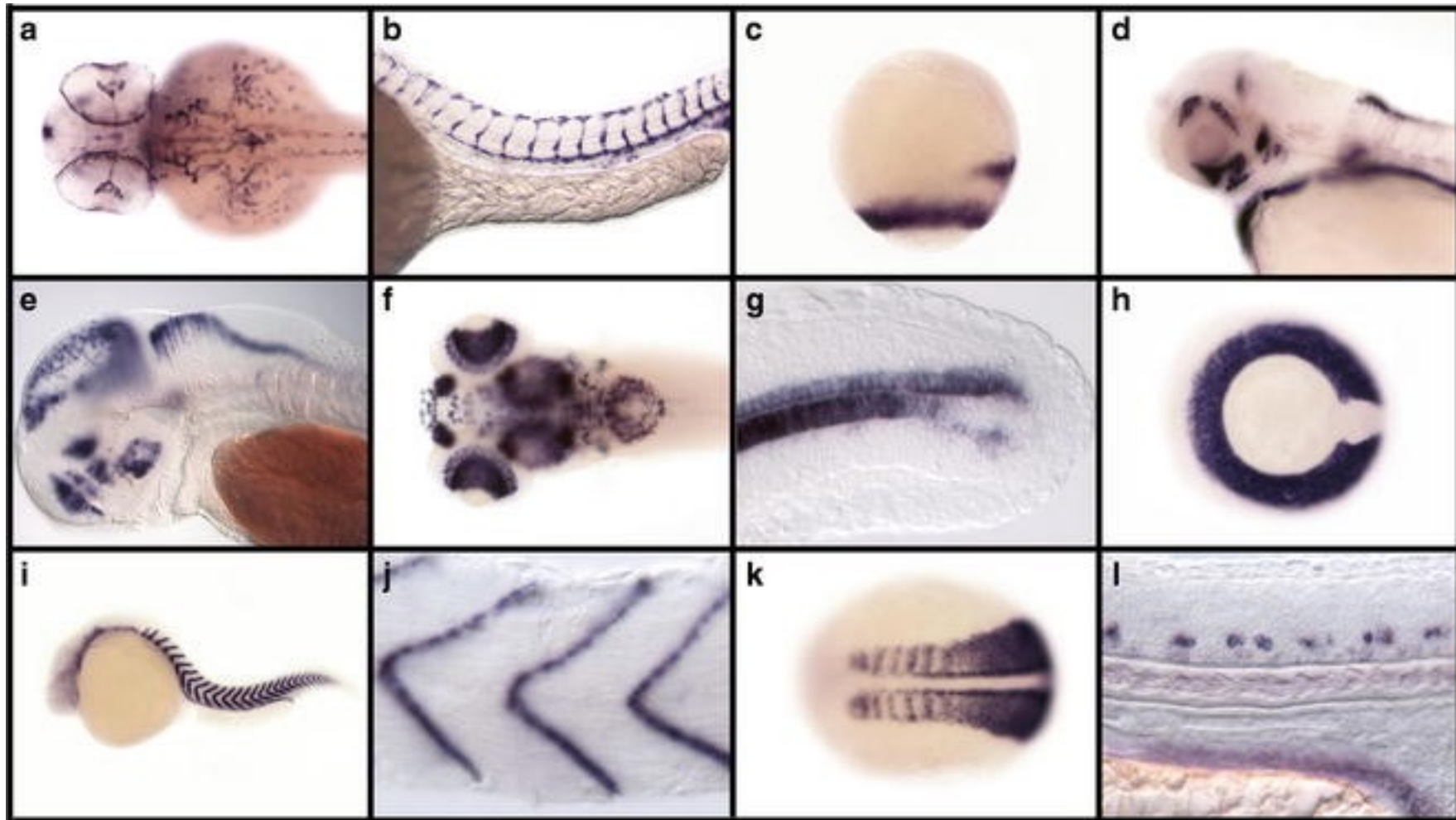
**a***cyp26a***b***ngn1***c***pcdh10b***d**

Novel gene

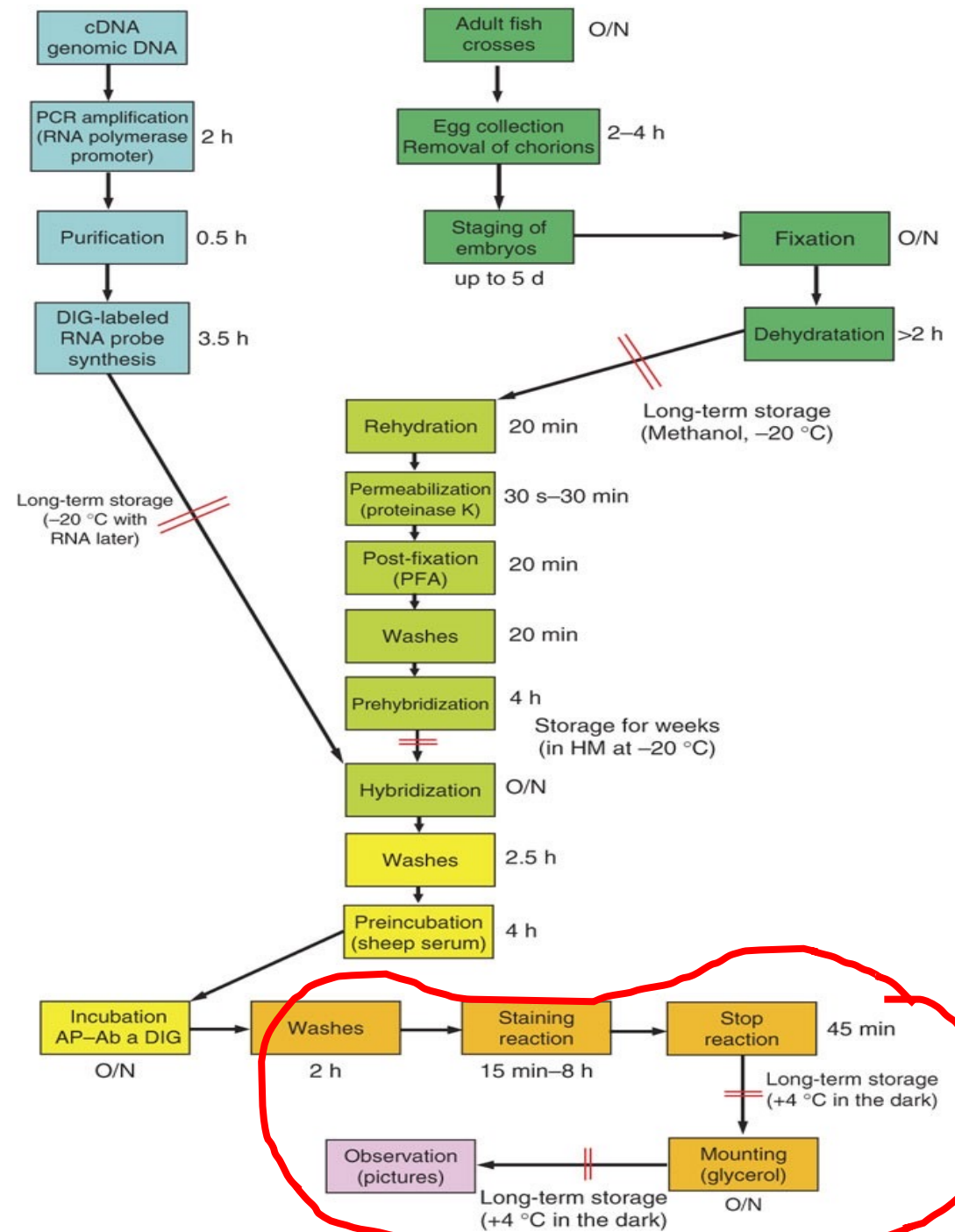
**e***lbx2***f***vsg1***g***Cyp26b***h***nurr1***i**

PDGF-a





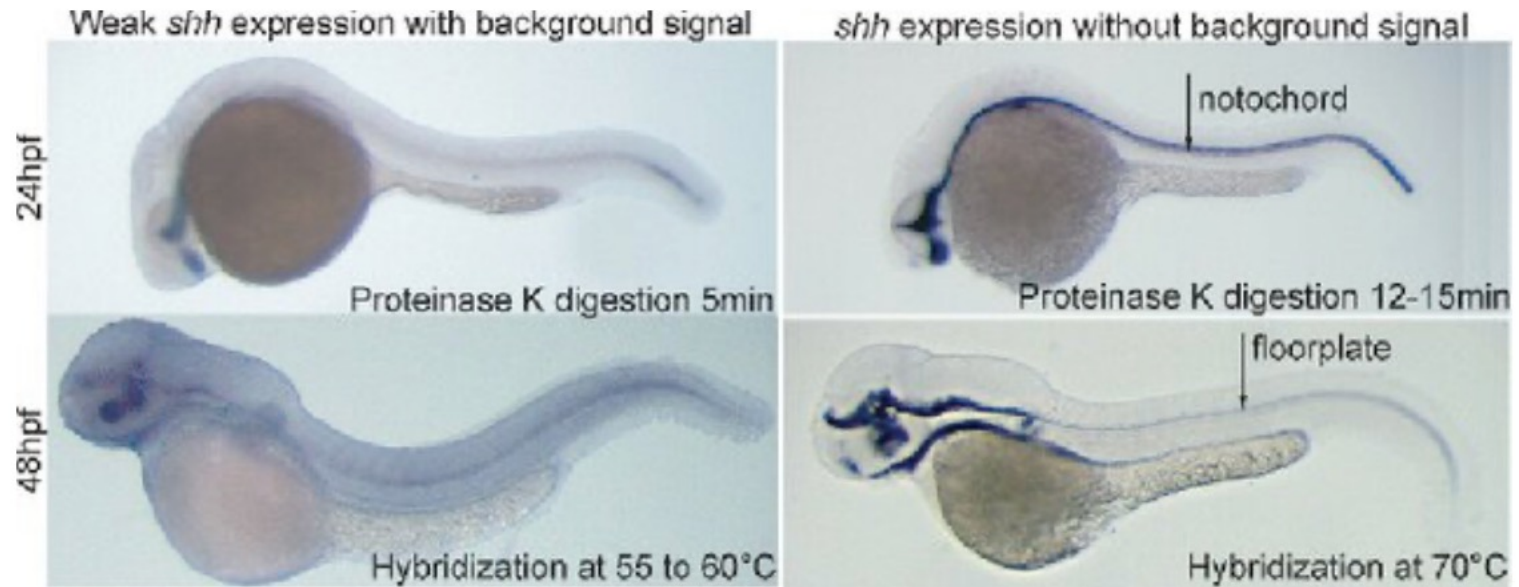
As etapas completas:



## A importância da permeabilização com Proteinase K

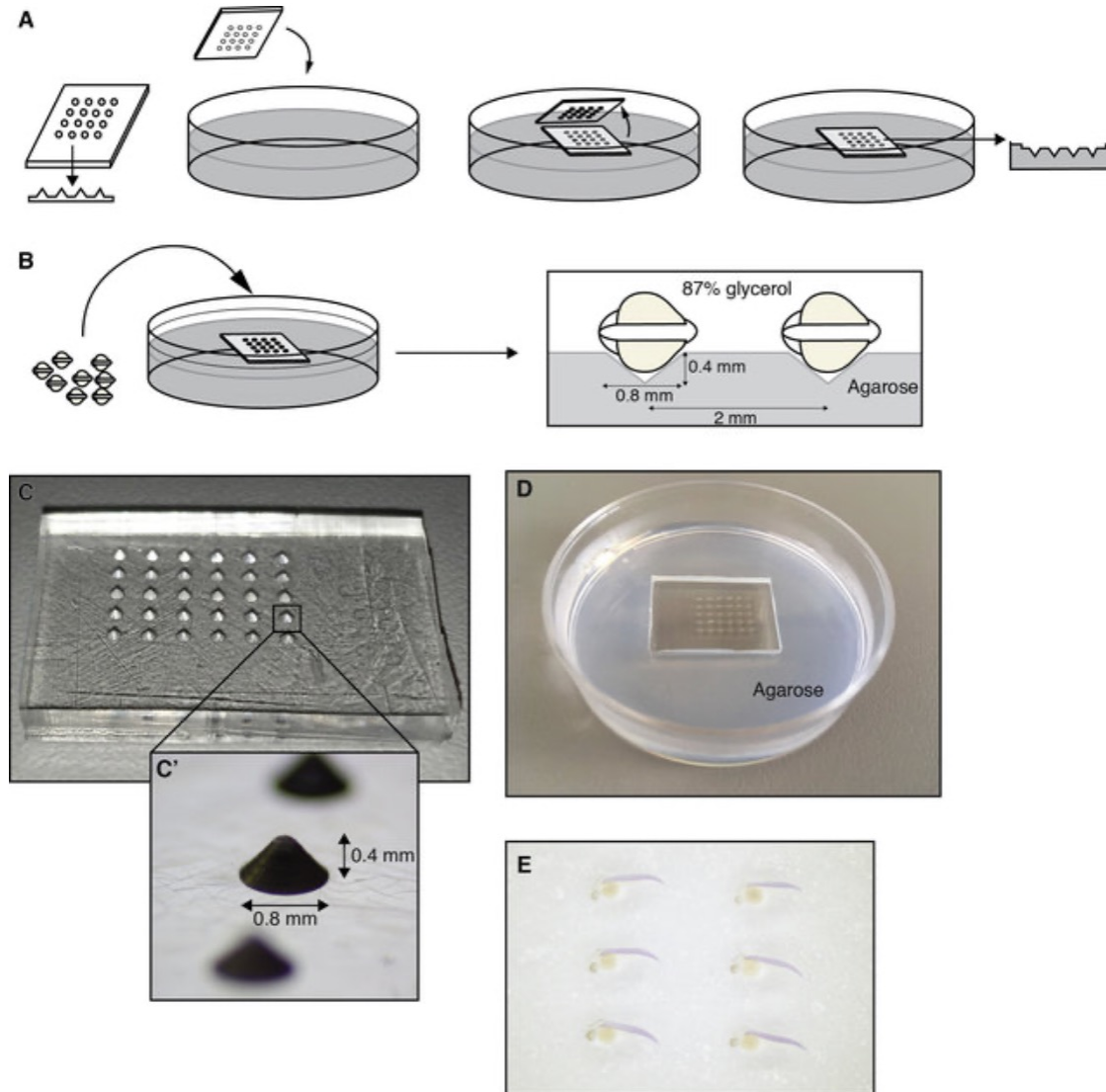
<b>Embryonic Stage (hours post fertilization)</b>	<b>Digestion Period (Proteinase K)</b>
Up to 6	15 sec
6-12	30 sec
12-18	3 min
24	12-15 min
48	25-30 min
72	40 min
96-120	50 min

## Como evitar ruído ou “background signal”

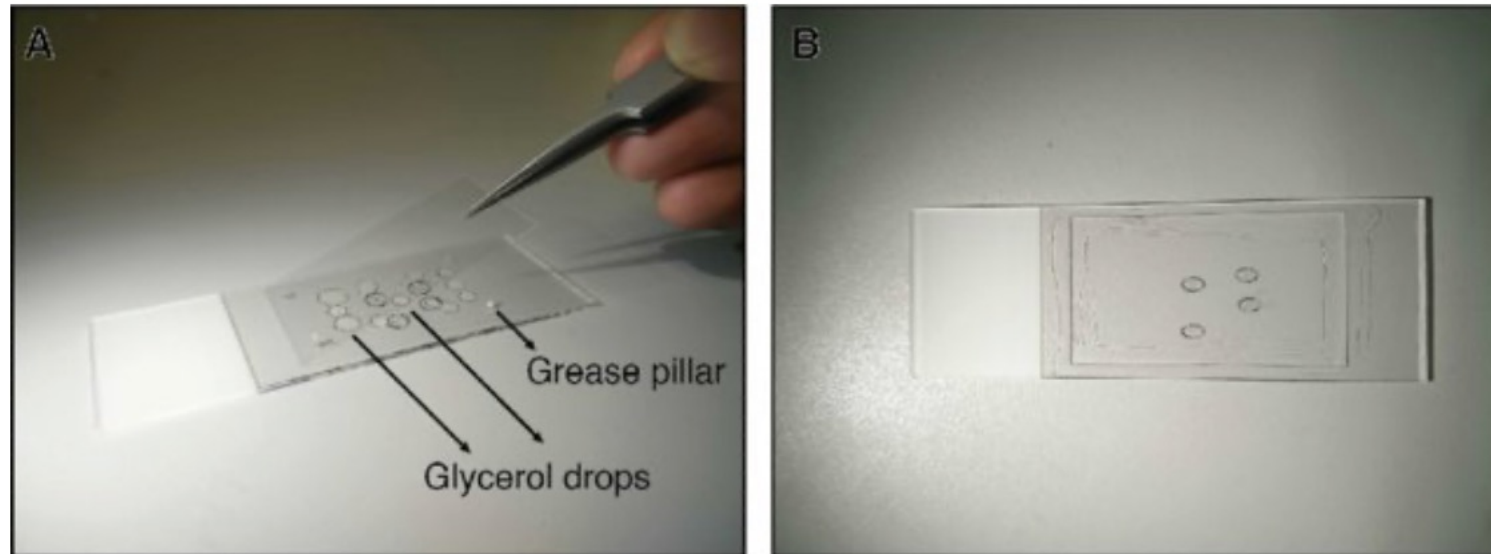




# Montagem para fotografar e reportar os resultados – moldes de agarose



## Montagem para fotografar e reportar os resultados – “flat mount”



Preparing a flat mount. A. Placing drops of glycerol next to de-yolked embryos (circled) and gently lowering a coverslip on the slide that will be held in place by grease pillars at the corners. B. The finished slide with flat mounted embryos (circled) and coverslip edges sealed with transparent nail varnish.

# O que vamos revelar?

- **MyoD**, myoblast determination protein 1, é um factor de transcrição que tem um papel crucial na regulação da diferenciação muscular. É um gene expresso cedo no embrião para especificar músculo.

