

AULA 9: Estudo do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*) 3 - hibridações *in situ* para marcação de sómitos

Biologia do Desenvolvimento Animal

Parte A - Revelação de embriões submetidos a hibridação *in situ* para *myoD* e a sua análise à lupa ao longo da aula.

Dia 3 do protocolo de hibridação *in situ* (protocolo completo no Fénix):

Cada grupo terá um eppendorf com alguns embriões no fundo.

1. Lavagens:

Lavar 6 x 15 min em PBT (já foram feitas 5 lavagens previamente). Cuidado para não sugar os embriões com a pipeta (são muito pequenos e frágeis).

2. Colocar os embriões em solução de coloração:

(100 mM Tris HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

Mudar 3 x por 5 minutos.

3. Revelação:

Os embriões devem ser colocados pela professora em placas de 12 poços com fundo plano e incubados em solução de coloração à temperatura ambiente e no escuro (embrulhar com papel de alumínio).

4. Retirar a solução anterior com cuidado para não sugar os embriões e adicionar a solução de revelação na hotte (feita pela professora):

22,5 ul de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) 50 mg/ml

17,5 ul de BCIP (5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate) 50 mg/ml

Diluídos em 5ml de solução de coloração.

5. A reação vai começar imediatamente e deve ser monitorizada rapidamente de 15 em 15 minutos à lupa com luz incidente e um fundo branco. Quando o sinal é suficientemente visível e sem background devemos parar a reação com PFA 4% na hotte e depois lavar em PBT antes de passar para 50% glicerol e 50% PBT.

6. Proceder à contagem de sómitos marcados e captação de imagens com os telemóveis na lupa.

7. Guardar os embriões em tubos de 1.5ml e rotular e datar.

Parte B: Observação da somitogénese ao vivo em embriões de peixe zebra. Gravação de vídeos.

Montar um ou mais embriões com o lado dorsal para cima num molde de agarose previamente feito e filmar/observar a formação dos novos sómitos (em peixe-zebra cada sómito demora 30 minutos a 28 °C).

Material geral por turma: 8 lupas com iluminador (2 por bancada), 50% glicerol; 50% PBT; 8 eppendorfs de fundo redondo, 4 caixas de 12 poços, 8 moldes de agarose, 8 caixas de Petri, 10 pipetas Pasteur plástico, 2 rolos de papel, pinças, hair-loops, tesoura, solução de coloração e de revelação, 8 conjuntos de pipetas de 200ul, pontas amarelas, luvas, 4 copos para descarga de lavagens da solução de coloração e um na hoste para a solução de revelação (tóxico com halogenados).