

Facultad de Ciencias, Sección Biología Celular

Curso de Biología del Desarrollo 2017

Módulo 4 – Desarrollo de *Drosophila*

Docente Responsable: Prof. Adj. Dra. Carmen Bolatto, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina

A) Realización de preparaciones para observar el clivaje superficial de los embriones de *Drosophila melanogaster*.

- 1) Se decorionizarán los embriones de *Drosophila melanogaster* de una puesta "overnight" con la finalidad de observar, reconocer los diferentes estadios embrionarios y seleccionar aquellos que estén en la etapa de blastodermo.
- 2) Se realizará la devitelinización manual de los embriones seleccionados.
- 3) Los embriones teñirán con sondas fluorescentes que permitan la detección de los filamentos de actina y los núcleos celulares.
- 4) Las preparaciones serán observadas utilizando microscopia de fluorescencia.

Decorionización, fijación, devitelinización y tinción de embriones

1. Colectar embriones de la placa de agar-jugo de uva utilizado PBST (Tritón 0.05%) y pincel. Los embriones se levantan con pipeta y se ponen en una malla la cual ayuda a transferir a los embriones por diferentes soluciones.
2. Decorionizar los embriones con hipoclorito/PBST (Tritón 0.05%) en proporción 1:1, bajo lupa. Ésto se realiza sumergiendo la malla con los embriones en una placa cuyos pocillos tengan el hipoclorito al 50%. El proceso de decorionización se sigue bajo lupa (se debe detectar la pérdida de los apéndices anteriores del embrión). Los embriones resultantes quedan con una superficie brillante y turgente (embrión recubierto por la membrana vitelina). Cuando la mayoría de los embriones han sido decorionizados, se enjuaga la malla en PBST repetidas veces.
3. Pasar los embriones decorionizados, utilizando una pipeta, a una placa de Petri con la finalidad de poder seleccionar los estadios embrionarios deseados.
4. Preparar un frasco de vidrio con una mezcla 1:1 de heptano: PFA 4% (mezclar y dejar reposar).
5. Agregar los embriones y agitar cada tanto el frasco con la mano para que las fases se "mezclen". Este proceso hay que hacerlo por 30 min.
6. Transferir los embriones fijados a un papel secante. No bien se evapora algo del heptano, se coloca sobre ellos un porta con cinta doble faz y se presiona suavemente bajo la lupa con los dedos (para que se adhieran todos los embriones).

7. Colocar rápidamente el porta (con la cinta y los embriones adheridos) dentro de placa de Petri con PBS.
8. Con una pinza o aguja adecuada se hace rotar el embrión hacia un lado y hacia el otro hasta romperla membrana vitelina, liberando al embrión.
9. Pasar los embriones devitelinizados a un eppendorf con PFA 4% por 10 min más.
10. Lavar 4 veces por 5 min con PBS-Tritón 0.05%
11. Bloquear utilizando buffer de bloqueo (BSA 1%, Tritón 0.1% en PBS) por 20 min. En este buffer se pueden dejar los embriones ON a 4C o se pueden agregar las sondas conjugadas a fluorocromos (faloidina-Alexa 488 1/800 y DAPI 1/500) e incubarlos 30 min, RT.
12. Enjuagar los embriones con cambios de PBST 3x10 min.
13. Montar en Glicerol 80%

B) Observación del patrón de expresión del gen de segmentación *engrailed* en *Drosophila melanogaster*.

- 1) Se decorionizarán los embriones de *Drosophila melanogaster* de una puesta "overnight" con la finalidad de observar y reconocer los diferentes estadios embrionarios.
- 2) Se evidenciará el patrón de expresión de *engrailed* (gen perteneciente al grupo polaridad de segmento) utilizando una cepa de moscas que porta una construcción *en-Gal4*; UAS-GFP
- 3) Las preparaciones serán observadas utilizando microscopia de fluorescencia.

Decorionización de embriones

1. Colectar embriones de la placa de agar-jugo de uva utilizado PBST (Tritón 0.05%) y pincel. Los embriones se levantan con pipeta y se ponen en una malla la cual ayuda a transferir a los embriones por diferentes soluciones.
2. Decorionizar los embriones con hipoclorito/PBST (Tritón 0.05%) en proporción 1:1, bajo lupa. Ésto se realiza sumergiendo la malla con los embriones en una placa cuyos pocillos tengan el hipoclorito al 50%. El proceso de decorionización se sigue bajo lupa (se debe detectar la pérdida de los apéndices anteriores del embrión). Los embriones resultantes quedan con una superficie brillante y turgente (embrión recubierto por la membrana vitelina). Cuando la mayoría de los embriones han sido decorionizados, se enjuaga la malla en PBST repetidas veces.
3. Pasar los embriones decorionizados, utilizando una pipeta, a una placa de Petri con la finalidad de poder seleccionar u observar los estadios embrionarios deseados.

Materiales, soluciones y reactivos:

- Lupas, pinzas/aguja de insulina, placas de colecta, pincel, placas de cultivo de 6 pocillos, placas de Petri de vidrio, canastas con malla, frascos de vidrio, cinta doble faz, portaobjetos, papel de filtro, tubos eppendorf de 0.5 ml, pipetas transfer plásticas, portaobjetos, cubreobjetos, la gotita.
- Hipoclorito, PBST (Tritón 0.05%), PBS, Paraformaldehído 4% en PBS, Heptano

- Phalloidina Alexa 488, DAPI