**COLORAZIONE ALCIAN BLUE (Protocollo modificato da Walker and Kimmel 2007)**

SOLUZIONI NECESSARIE

* Staining Soluzion: Alcian Blue 0,1 mg/ml, MgCl2 60 mM, Etanolo 70%. Soluzione fornita
* Bleach Solution: H2O2 3%, KOH 0,5% in acqua. Preparare 1.5 ml per gruppo (poco prima dell’uso) a partire da stock concentrati forniti. (soluzioni Stock: H2O2 30% e KOH 2%).
* Storage Solution 2 (50% Glicerolo, KOH 0.25%). Fornita dai Tutors

N.B. Per ogni classe si possono formare 4 gruppi di lavoro: ad ogni gruppo verrà fornita una vial con 5-6 embrioni a 4 gg di sviluppo in una soluzione di etanolo al 95%. Gli embrioni a 4gg sono stati preparati in precedenza, fissati, lavati, disidratati fino a etanolo 95% e conservati a -20°C fino alla colorazione.

PROCEDURA

* INDOSSARE GLI OCCHIALI DI PROTEZIONE
* Togliere con una pasteur a punta fine la soluzione di etanolo presente all’interno della vial facendo molta attenzione a non prelevare ed eliminare gli embrioni. E’ necessario eseguire l’operazione con una base nera che evidenzia gli embrioni che appariranno bianchi. Se si dovessero aspirare gli embrioni si rimette la soluzione dentro la vial e si tenta nuovamente. L’importante è non eliminarli nei rifiuti.
* Aggiungere 1 mL di soluzione di Alcian Blu in modo che copra gli embrioni. Fare attenzione che tutti gli embrioni siano immersi nella soluzione e non rimangano a secco adesi alla parete della vial.
* Incubare una notte a temperatura ambiente coprendo la vial con della stagnola.
* Preparare al momento 2 ml di Bleach Solution partendo dagli stock forniti.
* Sostituire la soluzione di colorazione (utilizzando la pasteur a punta fine) con la Bleach Solution preparata poco prima e incubare per 30 minuti. Nel passaggio di sostituzione della soluzione usare le stesse accortezze descritte nel primo passaggio. Questa volta gli embrioni dovrebbero essere più evidente perché colorati di blu.
* Togliere la soluzione utilizzando una pasteur a punta fine e aggiungere un volume di Storage Solution fino a metà vial circa, utilizzando sempre la stessa pasteur.
* Trasferire per rovesciamento gli embrioni all’interno di una piccola piastra petri. Se nel rovesciamento non si fossero trasferiti tutti, utilizzare altra soluzione di Storage e riprovare. In alternativa si possono aspirare con una pasteur a punta grossa e trasferirli tutti in un pozzetto.
* Procedere con l’osservazione degli embrioni con uno stereomicroscopio per valutare la colorazione e confrontare con quanto descritto nell’articolo scientifico fornito.

N.B. La pasteur a punta fine può essere riutilizzata nei vari passaggi, è sufficiente sciacquare con acqua.