

# DSS induced Colitis

20200217 Daun

## ➤ Materials

- CO<sub>2</sub> incubator (37°C)
- dextran sulfate sodium salt ( DSS; MP Biomedicals, 9011-18-1, 100g)
- water ( 동물실에서 사용하는 음수)
- Disease activity index sheet – for assessing disease severity of individual mice

## ➤ Process

### Step 1: DSS 음수 급수 (5마리 1cage 양으로 계산하여 기재)

- DSS 급수 전 당일 또는 하루 전에 정상상태의 체중을 측정해 둔다.
- 보통 2.5%~3%로 급수하며, 어릴수록 그리고 수컷보다는 암컷이 DSS 에 대한 반응도가 더 낮음.  
( ex;어리고 암컷인 경우 3%를 사용하고 나이가 많고 수컷인 경우 2~2.5% DSS 를 급수해야 한다)
- 5마리가 있는 1cage 에 5일동안 150ml 정도 급수함 (수컷 나이가 많은 경우 더 많이 급수해야 함)
  - DSS 파우더를 2.5g \*1.5= 3.75g 을 50ml conical tube 에 떨어둔다
  - 멸균한 새 시약병과 떨어진 DSS 를 챙겨서 동물실로 들어간다
  - 동물실에 있는 음수를 dss 가 들어있는 conical tube 에 넣어준 뒤 잘 녹도록 위아래로 흔들어준다.
  - DSS 가 어느정도 녹으면 50ml 눈금에 맞춰서 음수를 더 부어주고 멸균 시약병에 부어준다.
  - 150ml 양을 맞추기 위해 50ml 씩 두 번 더 conical tube 에 음수를 부어주고 흔든 뒤 시약병에 부어준다.
  - 덜 녹은 것이 없는지 150 DSS 음수를 눈으로 확인한 뒤 음수병에 넣어주어 급수한다.
  - 음수가 부족하지 않은지 3일차 정도에 음수량을 체크하고 필요하면 추가로 소량 만들어서 급수해 준다.

### Step 2 : Disease activity index (Day 1~실험종료까지)

- 마우스 1마리씩 분리 될 수 있도록 칸막이가 있는 통에 넣어준다 (1마리 씩 분리만 가능하다면 어떤 통이든 상관없음)
  - 혈변을 정확하게 측정하기 위해서는 Hemocult 를 사용하는 것이 좋으나 구매가 어려워 육안으로 혈변을 관찰함.
  - Day 5~8 일 정도는 변이 잘 나오지 않아 길면 2시간동안 변을 얻기 위해 기다려야 함.
- 변이 보이면 종이조각으로 변을 들어올린 뒤 흰종이에 올리고 종이를 변을 밀어 변의 딱딱한 정도 혈변 유무를 확인한다.



- 아래 table 을 참고하여 변의 상태에 따른 scoring 을 한다.
- 체중은 매일 또는 상황에 따라서 이틀에 한 번 씩 측정하며 Day 0 체중을 100% 로 하여 체중의 증감으로 scoring 한다 (table 1 참고)

**Table 1. Disease active index of DSS induced colitis**

Weight loss	score	Stool blood	score	Stool consistency	score
<1%	0	Absence	0	Formed and hard	0
1~5%	1			Formed but soft	1
5-10%	2	Presence	2	Loose stools	2
10-20%	3			Mild diarrhea	3
>20%	4	Gross bleeding	4	Gross diarrhea	4

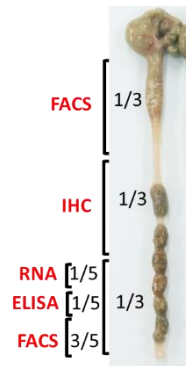
**Step 3 : 부검-조직 고정, lysate sampling, Blood sampling**

● **Blood sampling**

- 혈액이 응고되지 않도록 0.5M EDTA 로 washing 한 3CC 주사기를 미리 준비해둔다.
- EDTA washing 된 주사기를 사용하여 심장채혈 한 후 1.5ml tube에 혈액을 옮겨주고 inverting 해준다.
- Plasma sampling 시
  - 5000rpm 에 20min centri 돌려준 뒤 상층액을 새 tube 에 옮겨주고 얼렸다 녹였다 하지 않도록 목적에 따라서 plasma 를 여러 개로 분주하여 얼린다.
- FACS sampling 시
  - 미리 37 도에 데워 둔 ACK 10ml 에 샘플링해둔 blood 를 넣고 37도에 3분 incubation 한다
  - PBS를 50ml 까지 채워주고 1300pm, 5min centri 후 상층액은 버리고 pellet 을 다시 한 번 ACK 5ml 에 풀어주고 37도 3분 incubation 한다.
  - PBS를 50ml 까지 채워주고 1300pm, 5min centri 후 상층액은 버리고 pellet 을 FACS buffer 에 suspension 하고 FACS staining 전까지 ice 에 박아 둔다.

● **Paraffin block 용 sampling (보통 IHC 용)**

- 4% PFA 20ml 들어있는 50ml 사이즈 conical tube, 3M Paper, 압정을 준비해둔다.
- 맹장아래에서 직장을 3등분하고 가운데 부분을 조직 관찰에 사용한다.
- 가위를 사용하여 장을 세로로 가르고 장 내용물을 washing 해준다.
- 2~3번 washing 후 깨끗해진 장을 PBS 에 살짝 적셔 둔 3M paper 에 잘 펴서 올리고 위아래를 압정으로 고정한 뒤 4% PFA 가 들어있는 tube 에 넣어준다.
- 다음 날 압정을 떼어내고 압정 때문에 손상 된 부분을 blade 로 잘라낸 뒤 카세트에 넣어 병리실에 의뢰한다 (오래 고정하면 IHC staining 이 잘 되지 않을 수도 있어 하루 뒤에 processing에 들어가지 못하면 물로 옮겨 둔다)



● **Cryosection 용 sampling (보통 IF 용)**

- 액체 질소와 PBS 10ml 을 채워 둔 10CC 주사기를 미리 준비해둔다.
- 맹장아래부터 직장까지 자른 뒤 10CC 주사기를 사용하여 장 내용물을 washing 한다 (2~3회)
- 맹장아래에서 직장을 3등분하고 가운데 부분을 조직 관찰에 사용한다.
- Paper towel 에 올려 물기를 살짝 제거한 뒤 60파이 dish 에 장을 넣고 파라필름으로 sealing 해준 뒤 호일로 한 번 감싸주고 액체 질소에 넣어준다.
- 디프리지에 보관했다가 병리실에 cryosection 을 의뢰한다.

● RNA 확인 또는 lysate (ELISA,WB) 용 sampling

- Washing 이 끝난 장을, 맹장아래에서 직장을 3등분하고 가장 아랫부분의 1/5 정도를 RNA, lysate 용으로 사용한다.
- Paper towel 에 물기를 살짝 제거해주고 라벨 되어있는 1.5ml tube에 넣어준 뒤 액체 질소에 넣어 바로 얼려준다.
- 사용하기 전까지 디프리지에 보관해 둔다.
- RNA 용에는 Trizol 500ul, lysate 에는 homogenizer buffer (0.1M phosphate, 1mM EDTA, 10uM indomethacin) 300ul 넣어준다.
- Tube 1개에 microbead 2개 넣어준다.
- Tissue lyser 30.0 속도로 8min 진행하여 조직을 으깨 준다.
- Lysate 용
  - 8000g, 10min centri 돌린 후 상층액을 새 tube 에 옮겨준다.
  - 새 tube 에 옮겨주고 얼렸다 녹였다 하지 않도록 목적에 따라서 여러 개로 분주하여 얼린다
- RNA 용은 기존의 RNA protocol 대로 진행하여 RNA 를 얻는다.