

Two-hit zebrafish model

2020.02.09 made by Gyo Jeong Gu

Materials

LPS (*Salmonella* spp.), *E.coli*, Phenol red, Agarose dish, Tricaine, injection needle, PBS, cuvette

Method

Step 1 (1일차)

1. 30 hpf의 zebrafish larvae의 chorion을 제거해서 미리 준비한다.

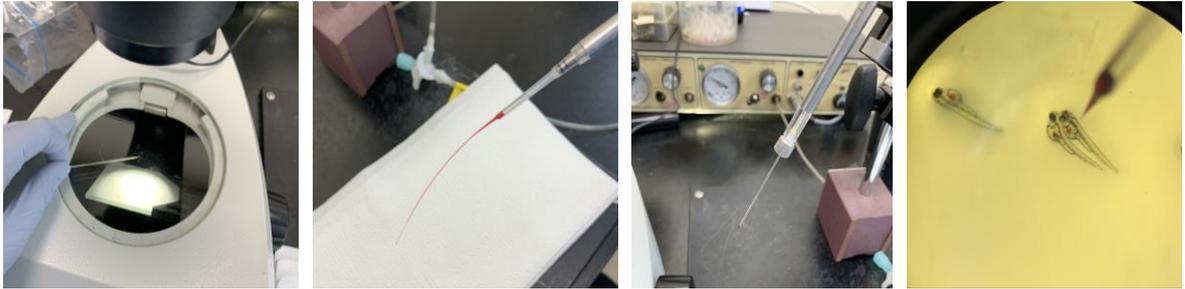


2. LPS 50ug/ml (dissolved in egg water)로 침전시킨다.
3. *E.coli* 감염을 위해서 LB broth 10ml에 *E. coli* stock을 tip으로 따서 37°C shaking incubator에 준비한다.

Step 2 (2일차)

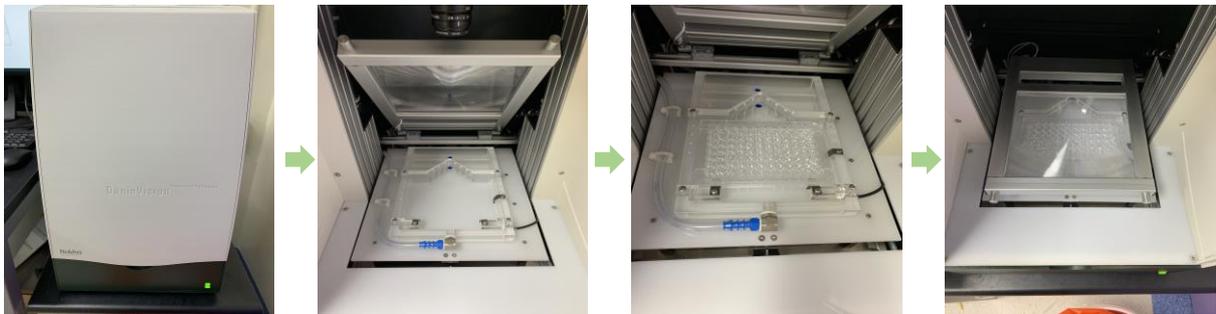
1. *E.coli* 감염을 위해서 LB broth에 키운 *E.coli*를 4000rpm, 10min, 4°C centrifuge
2. 상층액을 제거하고 PBS로 suspension 후에 다시 한번 washing 진행 (4000rpm, 10min, 4°C centrifuge)
3. 1ml의 PBS에 resuspension 후에 OD₆₀₀=1 로 맞추어 준비한다.
4. 준비된 균을 PBS로 1:1 로 희석하여 E tube에 준비한다. (10ul :10ul 정도면 충분)
5. 희석 된 균을 phenol red 5ul와 1 : 1 로 희석하여 준비한다.

6. Injection needle에 5ul 따서 준비 한다.
7. LPS 로 침전된 zebrafish larvae는 PBS로 2번 washing 해서 준비한다.
(Control 군도 준비)
8. Tricaine으로 마취한 zebrafish larvae를 Agarose plate에 준비 놓고, injector를 이용하여 York sac 에 injection 해준다.
9. Injection 이 끝나면 egg water 로 다시 plate에 모아서 이 후 실험을 진행한다.

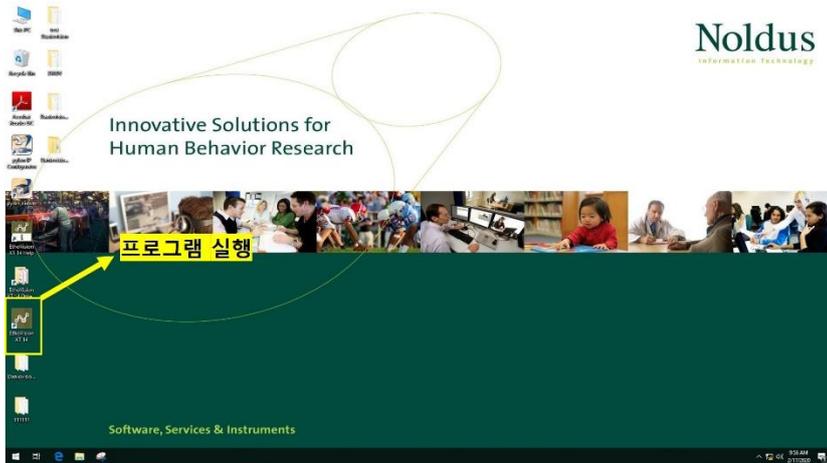


Method (DanioVision 이용한 survival check)

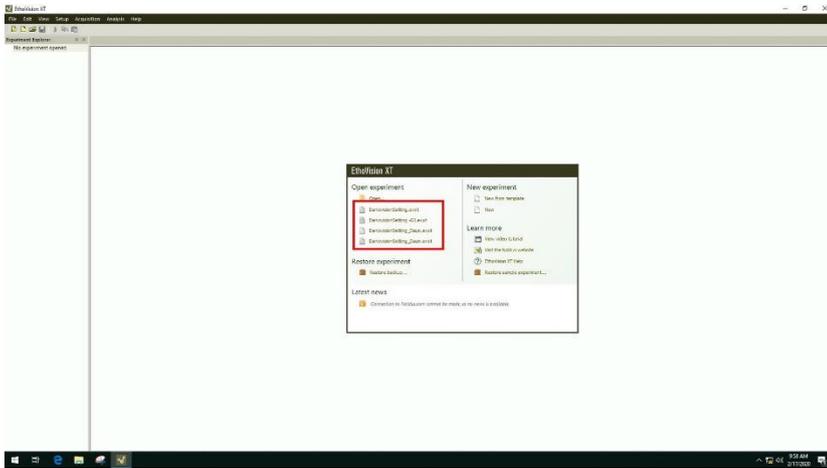
1. Plate를 아래의 사진과 같이 기기 안에 loading 해준다.



2. 컴퓨터 전원을 켜고, 프로그램 EthoVision XT을 실행한다.



3. Experiment를 open해주고, 실험 설계에 맞추어 setting 한뒤에 Acquisition을 누른다.



4. 빨간색 버튼을 눌러서 실험을 진행한다. (survival 관찰을 위해서 5분동안 촬영함)

