

Establishment of zebrafish metastasis model

20200211 송주하

본 프로토콜은 Rouhi *et al.*, Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish, Nature Protocols volume 5, pages1911–1918(2010)을 기반으로 확립하였음.

[준비물]

Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit (DiD, Dil); Thermo, Cat.no: V22889

Zebrafish embryo

Needle

Microinjector

Microloader pipette tip; Eppendorf, Cat.no: 5242956003

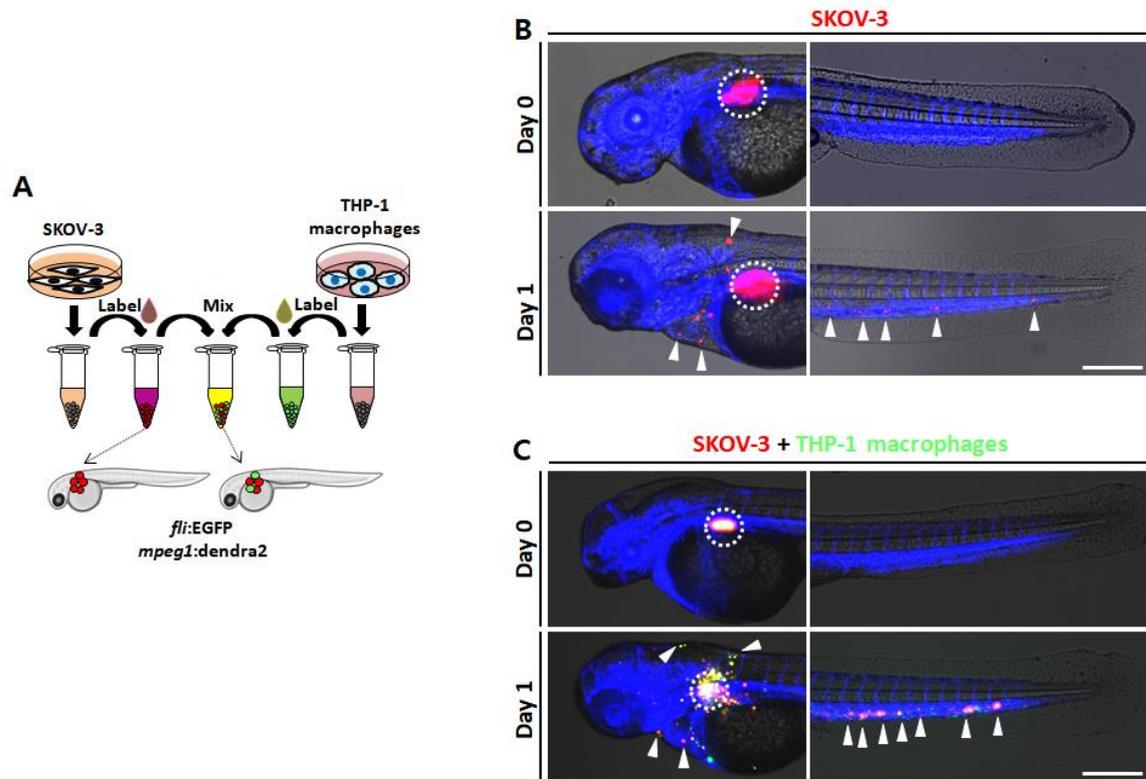
Phenol red solution; Sigma, Cat.no: P0290-100ml

1X Tricaine (MS-222); Sigma, Cat.no: E10521

1.5% Agarose plate (비스듬한 경사의 Morpholino injection용, 평평한 cancer cell injection 용)

Fluorescent microscopy

[Multicolor zebrafish tumor model 모식도]



[Cancer cell 준비]

1. Cancer cell을 trypsin을 이용하여 배양하고 있던 plate에서 떼어냄.
2. 떼어낸 세포를 카운팅 하고 centrifuge 후 plain media로 10^7 /ml이 되도록 띄움.
3. Cancer cell injection 농도: 30개/nl (= 6×10^5 / 20 μ l)
따라서 위의 세포 부유액 중 60 μ l (6×10^5)를 떼어 새로운 e-tube에 넣음.
4. 440 μ l의 plain media를 더 넣어주어 총 500 μ l의 세포 부유액을 만듦.
5. DiD cell labeling solution 2.5 μ l를 넣고 부드럽게 pipetting
6. 은박지로 차광 후, 37°C CO2 incubator에 넣고 30분 incubation.
7. Centrifuge 2500rpm 5분
8. 상층액을 suction하고 pellet에 1% FBS media 10 μ l + phenol red 10 μ l 넣어줌.
9. 부드럽게 pipetting 후 얼음에 꽂아 은박지로 위를 덮음.

[Cancer + macrophage coinjection 준비]

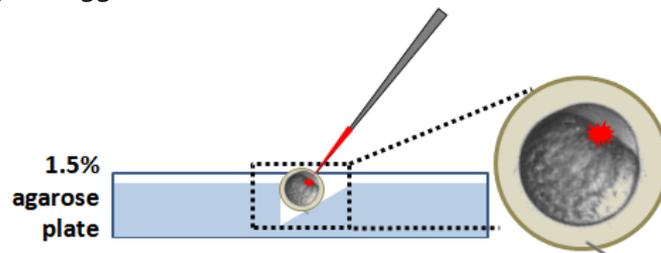
1. Coinjection 농도: (cancer cell 4×10^5 + macrophage 4×10^5) / 20 μ l
2. Cancer cell 염색
 - 1) 총 필요한 cancer cell 수 만큼 카운팅 하여 plain media에 띄워 e-tube에 담음
예를 들어, 함께 인젝션하는 Macrophage 군 수가 3개일 경우, cancer cell 단일 인젝션과 함께 총 4개에 cancer cell을 나누어 담아야 하므로, 총 $4 \times (4 \times 10^5)$ 개의 세포를 염색해야 함.
 - 2) plain media를 더 채워 넣어 총 1ml의 세포 부유액으로 만든 후 DiD cell labeling solution 5 μ l를 넣고 부드럽게 pipetting
 - 3) 은박지로 차광 후, 37°C CO2 incubator에 넣고 30분 incubation
 - 4) Centrifuge 2500rpm 5분
 - 5) 상층액을 suction하고 1% FBS media를 (10 X 총군 수) μ l로 부유시켜 부드럽게 pipetting
3. Macrophage 염색
 - 1) Macrophage도 plate에서 떼어낸 후 centrifuge하여 plain media로 띄워 10^7 /ml을 만듦.
 - 2) 위의 세포 부유액 40 μ l (4×10^5)를 새로운 e-tube에 담고 plain media를 160 μ l 넣어 총 200 μ l로 만듦.
 - 3) Dil cell labeling solution 1 μ l를 넣고 부드럽게 pipetting
 - 4) 은박지로 차광 후, 37°C CO2 incubator에 넣고 10분 incubation.
 - 5) Centrifuge 2500rpm 5분
 - 6) 상층액을 완전히 suction
4. Cancer cell + Macrophage 혼합
 - 1) 3번의 cancer cell 부유액 10 μ l을 마크로파지 pellet이 담겨있는 e-tube에 넣음.
 - 2) phenol red 10 μ l를 넣어주어 부드럽게 pipetting
 - 3) 얼음에 꽂아 은박지로 위를 덮음.

[Zebrafish embryo preparation]

1. 제브라피쉬를 mating 하여 embryo를 얻음.
2. 22~24hpf의 embryo의 egg water를 모두 빼주고 1X PTU 용액에 노출시켜줌.
3. 48hpf 때 chorion을 벗긴 후 injection을 실시함.

[Morpholino injection]

1. 2mM로 1 μ l씩 분주된 Morpholino를 인젝션 직전에 냉동고에서 꺼내와 65°C에서 10분 incubation.
2. Brief centrifuge 후 phenol red 1 μ l를 넣어 최종 1mM로 만든 후 microloader pipette tip으로 injection needle에 로딩함.
3. Zebrafish를 mating 시키고 알을 받은 직후, 1-cell stage (수정 후~약 45분)의 알을 모음.
4. 비스듬하게 경사를 만든 1.5% agarose plate (in DW)에 1-cell stage의 알을 일렬로 세우고 cell이 위에서 45도 경사로 약간 오른쪽으로 향하도록 위치시킴.
5. 킴와이프스로 가장자리부위에 넘치는 물기를 최대한 제거해주어 알이 움직이거나 구르지 않게 함.
5. Injection needle을 밀어 넣어 chorion을 뚫고 blastodisc 부위를 지나, cell 부위에 위치시킨 후 질소 pumping으로 인젝션 실시
6. 인젝션 된 embryo를 egg water에 넣음.



[Zebrafish cancer cell injection]

1. 48hpf 제브라피쉬의 chorion을 포셉이나 1ml 주사기로 조심스럽게 벗김.
2. 제브라피쉬를 0.5X tricaine (MS-222, Sigma) 마취제에 노출시켜 마취시킴.
3. 마취된 제브라피쉬를 평평한 1.5% agarose plate에 올려놓음.
4. 준비된 세포를 조심스럽게 pipetting 또는 tapping 후 microloader pipette tip에 로딩함.
5. 제브라피쉬의 perivitelline space 부위에 인젝션을 실시함.
6. 형광현미경으로 4일간 전이를 관찰함.
7. cancer cell이 이식된 부위로부터 head, 그리고 trunk 부위로 전이된 세포 수를 카운팅 함.