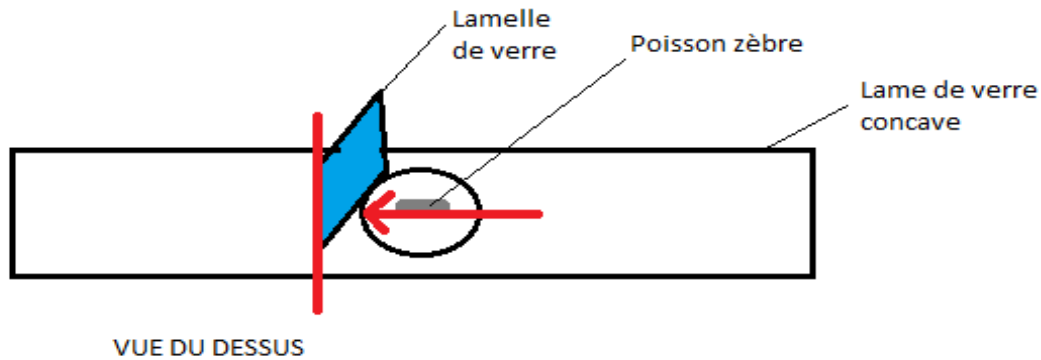


PROTOCOLE POUR ANESTHÉSIE DES POISSONS ZÈBRES ET LES FIXER SUR UNE LAME DE VERRE À DES FINS D'IMAGERIE

1. Produire la solution d'anesthésie TMS
 - a. Dégeler la solution concentrée de TMS à température pièce.
 - b. Lorsque dégelée, introduire 8 mL de TMS dans un cylindre gradué de 100 mL.
 - c. Remplir jusqu'à 100 mL avec de l'eau distillée déionisée.
 - d. Transférer la solution dans une bouteille en verre de 200 mL.
 - e. Insérer dans la bouteille en verre une tige agitatrice et placer le tout sur une plaque agitatrice.
 - f. Ajouter à la solution 0,1 g de bicarbonate de sodium afin de neutraliser la solution. Attendre quelques secondes que le bicarbonate de sodium se dissout dans la solution diluée de TMS.
 - g. Vérifier le pH de la solution à l'aide d'un pH-mètre. Le pH doit être autour de 7.
 - h. Isoler la bouteille de la lumière ambiante en l'enrobant de papier d'aluminium. Identifier la bouteille de verre.
2. À l'aide d'une pipette de plastique de 2 mL, pêcher le nombre de poissons désirés et les déposer dans une petite boîte de Pétri préalablement identifiée. Séparer les différentes lignées de poissons dans différentes boîtes de Pétri si nécessaire. Faire attention pour ne pas trop insérer de milieu de culture E3 dans la boîte de Pétri.
3. Immerger les poissons pêchés de l'étape précédente de solution de TMS diluée fraîchement préparée de l'étape 1 (environ 3 mL).
4. Refermer adéquatement la solution de TMS diluée et conserver dans le frigo à 4°C pendant 24 heures au plus.
Astuce : Enrober fermement la bouteille de TMS de papier d'aluminium pour pouvoir conserver la solution plus longtemps.
5. Mettre la boîte de Pétri dans l'incubateur des poissons à 28°C et attendre une heure.
6. Enlever la solution de TMS diluée de la boîte de Pétri et la disposer dans un contenant approprié.
7. Laver deux fois les poissons avec du milieu de culture E3 sans bleu de méthylène.
8. Fixer les poissons dans du paraformaldéhyde (PFA).
*Tout ce qui implique l'utilisation et la manipulation de PFA doit être fait sous une hotte chimique. Ce qui sort de cette hotte doit être bien celé.
 - a. Sous une hotte chimique, immerger les poissons de PFA, toujours dans la même boîte de Pétri.
 - b. Celer la boîte de Pétri et la solution de PFA avec du Parafilm.
 - c. Enrober la solution de PFA de papier d'aluminium et conserver dans le frigo à 4°C.
 - d. Placer la boîte de Pétri contenant les poissons anesthésiés et la solution de PFA sur une plaque agitatrice dans une chambre froide à 4°C. Attendre 24 heures.
 - e. Disposer de tout instrument/outil/objet ayant touché à la PFA dans la poubelle appropriée.
9. Après 24 heures, faire trois lavages des poissons avec du PBS 1%.
 - a. Sous une hotte chimique, enlever délicatement le PFA de la boîte de Pétri à l'aide d'une pipette en verre reliée à un **système de succion**.
 - b. À l'aide d'une pipette de plastique de 2mL, insérer juste assez de PBS 1% dans la boîte de Pétri pour immerger les poissons. Brasser doucement les poissons dans le PBS.
 - c. Enlever le PBS avec la même pipette de verre utilisée à l'étape 9(a).
 - d. Recommencer les étapes 9(a) à 9(c) deux autres fois.
10. Si les poissons zèbres doivent être conservés pour usage ultérieur à cette étape, les immerger dans du PBS 1% et envelopper la boîte de Pétri de Parafilm pour protéger son contenu. Laisser la boîte de Pétri dans le frigo à 4°C jusqu'à utilisation.
Si les poissons doivent être fixés sur une lame de verre pour imagerie, poursuivre à la prochaine étape.
11. Sous un microscope optique conventionnel, placer une lame de verre concave.

12. Déposer une goutte de DAKO sur la partie concave de la lame de verre.
13. À l'aide d'une petite tige de plastique, recueillir un poisson fixé et le déposer dans le DAKO.
14. En utilisant le microscope optique conventionnel, placer le poisson dans la position désirée pour l'imager. Il est aussi possible d'utiliser des pinces à cils pour le déplacer dans la bonne orientation. Cette étape peut être difficile et il est essentiel d'user de patience et de minutie. Il faut s'assurer que le poisson est bien en équilibre et que déposer la lamelle par-dessus ne modifiera pas sa position.

Astuce : Placer le poisson de façon perpendiculaire à la base de la lamelle avant de la laisser tomber sur le poisson (voir le tracé rouge sur le schéma ci-dessous). Aussi, déposer qu'une ou deux gouttes de DAKO permettra de ne pas trop créer de courant lorsque la lamelle de verre sera déposée.



15. Laisser le montage sécher environ 5 minutes.
16. Sceller la lamelle de verre sur la lame de verre avec du verni à ongle ; en déposer sur tous les côtés de la lamelle pour assurer l'étanchéité du montage. Laisser sécher environ 5 minutes.
17. Le poisson est maintenant prêt à être imager.