

Protocole pour monter un Zebrafish état larvaire vivant dans l'agarose :

1. S'il n'y en a plus de disponible, produire 50 mL d'agarose 1,4 % dans un milieu de culture E3.
 - a. Identifier environ 30 microtubes.
 - b. Dans un bécher de 100 mL, insérer 50 mL de milieu de culture E3 ().
 - c. Peser 0,7 g d'agarose à l'aide d'une balance électronique.
 - d. Déposer une tige agitatrice dans le bécher et déposer le tout sur une plaque agitatrice. Insérer doucement l'agarose pesé préalablement.
 - e. Si l'agarose est en agrégats, poursuivre le brassage. Sinon, faire dissoudre complètement l'agarose en chauffant au microonde jusqu'à ce que le mélange bout (environ 1 minute). Vérifier qu'il ne reste plus d'agrégats d'agarose dans le mélange.
 - f. Déposer environ 1,5 mL d'agarose dans chaque microtube.
 - g. Prendre deux microtubes pour poursuivre l'expérience et laisser gélifier le reste au frigo à 4°C.
2. Avant d'entrer dans la salle de culture, se laver les mains et mettre des gants.
3. Déposer les deux microtubes d'agarose sur une plaque chauffante à basse température.
4. Avant de poursuivre, vérifier que la température de l'agarose est d'environ 35°C. Une température trop haute peut affecter le développement du poisson, pouvant aller jusqu'à l'ébullition et la mort.
5. À l'aide d'une pipette stérile de plastique de 2 mL, pêcher un poisson vivant dans le bocal en aspirant du liquide.
6. Déposer le poisson dans le premier microtube d'agarose et le repêcher directement après à l'aide de la même pipette de plastique.
7. Déposer le poisson dans le deuxième microtube d'agarose et le repêcher directement après à l'aide de la même pipette de plastique.
8. Déposer le poisson immergé dans l'agarose sur une plaquette carrée conçue pour la visualisation au microscope.
9. À l'aide d'une petite tige, déplacer doucement le poisson dans l'agarose afin qu'il ait la position désirée pour l'imagerie. Compte tenu de la petite grosseur du poisson, utiliser un microscope optique conventionnel mis à la disposition pour faire cette étape.
10. Attendre 2 minutes que l'agarose se gélifie. Il est possible de vérifier sa texture en touchant une partie non-importante de l'agarose avec la petite tige.
11. À l'aide de la pipette de plastique, ajouter juste assez de milieu de culture E3 sur le poisson figé dans l'agarose pour que le liquide couvre l'agarose.
12. Placer une lamelle de verre par-dessus le montage. Si le milieu de culture E3 ne touche pas à la lamelle, en ajouter un peu à l'aide de la pipette de plastique. Il est préférable de ne pas avoir d'air entre la lamelle de verre et l'agarose contenant le poisson vivant.
13. Replacer le bocal avec tous les autres poissons dans l'incubateur de 28°C.
14. Poursuivre l'expérience d'imagerie (voir *Protocole pour utiliser le microscope deux photons de Feng* si ce microscope est utilisé dans l'expérience).
15. Si l'expérience s'est faite hors de la salle de culture, se laver les mains et remettre des gants.
16. Pour sortir le poisson de l'agarose, laisser le milieu de culture E3 ; lorsque le poisson est libéré de l'agarose, il doit être capable de nager par lui-même dans la paquette carrée.
17. Utiliser une pince à cils, la petite tige ou ce qui est facile d'utilisation pour l'expérimentateur pour enlever l'agarose et libérer le poisson. Cette étape peut être longue et laborieuse ; une patience et une certaine dextérité sont de mise. Il ne faut pas avoir peur de toucher (doucement!) au poisson. Le microscope optique conventionnel est recommandé pour faire cette étape.

Astuce : Enlever l'excès d'agarose autour du poisson en premier. Ensuite, pour enlever l'agarose qui l'entoure, pincer doucement les côtés du poisson pour l'aider à se propulser par lui-même hors de l'agarose.
18. Dès que le poisson est capable de nager par lui-même dans le milieu de culture E3, utiliser la pipette de plastique pour le remettre dans son bocal.
19. Replacer le bocal avec tous les poissons dans l'incubateur de 28°C.

20. Nettoyer les instruments lavables avec de l'isopropanol stérile 70% et jeter les instruments jetables dans la bonne poubelle (tout ce qui a touché de près ou de loin au poisson doit aller dans la poubelle des déchets biomédicaux).
21. Nettoyer la surface de travail avec de l'isopropanol stérile 70%.
22. Jeter les gants dans la poubelle des déchets biomédicaux et se laver les mains.