

Optimalisatie van een kraakbeen- en botkleuring in de zebravislarve

Jente Hoyberghs
Universiteit Antwerpen
Jente.Hoyberghs@student.uantwerpen.be

ABSTRACT

Zebravisembryo's worden door verschillende farmaceutische bedrijven gebruikt als een alternatief model om teratogene stoffen te detecteren. In vergelijking met dierproeven in zoogdieren komen echter nog steeds vals-negatieve resultaten voor, waardoor teratogene stoffen gemist worden tijdens de genesmiddelenontwikkeling. In het zebravismodel worden nog geen skeletale eindpunten bekeken in tegenstelling tot studies in zoogdieren. Het doel van deze studie was om een dubbelkleuring op punt te stellen waarbij kraakbeen en bot in zebravislarven kan worden geëvalueerd. Uit deze experimenten bleek dat het mogelijk was om verschillende skeletstructuren aan te kleuren met een zuurvrije kleuringmethode.

Keywords

Zebravis, *Danio rerio*, botkleuring, kraakbeenkleuring, alizarine rood, alciaan blauw, teratogeniciteit

INLEIDING

Het zebravisembryo (*Danio rerio*) is een belangrijk gewerveld diermodel voor onderzoek in onder andere de toxicologie [1]. Het model is hiervoor zeer geschikt om verschillende redenen: de embryonale ontwikkeling is gelijkaardig aan deze van de mens [2], ze hebben een korte voortplantingscyclus en de eieren en embryo's zijn transparant, waardoor afwijkingen goed opgevolgd kunnen worden [1, 3]. Ook op ethisch gebied is het makkelijker om proeven op de zebravisembryo's te doen aangezien deze niet als proefdier beschouwd worden tot een leeftijd van 120 hpf (hours post-fertilisation). Het gebruik van zebravisembryo's voor wetenschappelijk onderzoek kan op deze manier mogelijk het aantal proefdieren sterk reduceren [4]. Bovendien werd ook reeds nagegaan hoe goed dit model toxiciteit of teratogeniciteit in zoogdieren kan voorspellen [5, 6]. Zebravissen en zoogdieren herkennen vaak dezelfde genesmiddelen als teratogeen. Toch komen zowel vals-positieve als vals-negatieve resultaten nog steeds voor. Om het zebravisembryo als gevalideerd model te kunnen gebruiken, moeten vooral deze vals-negatieve resultaten eerst verder worden onderzocht. Eén van de verschilpunten met de *in vivo* studies in rat en konijn is het gebrek aan een skeletale kleuring in het zebravisembryomodel. Bot- en kraakbeenkleuringen bij knaagdieren leveren immers de nodige informatie op om afwijkingen aan deze weefsels na te gaan [7]. Er zijn reeds geoptimaliseerde bot- en kraakbeenkleuringen voor adulte zebravissen beschreven, maar omdat zebravislarven tot 120 hpf nog niet als proefdier

beschouwd worden, zou het beter zijn een geoptimaliseerde kleuring te vinden die kraakbeen en bot aankleurt op 120 hpf. De traditionele methode van Dingerkus en Uhler kan gebruikt worden om de densiteit van de botmatrix in adulte zebravissen na te gaan. De kleurstoffen die bij deze methode gebruikt worden, zijn alciaan blauw en alizarine rood. Alciaan blauw (AB) kleurt kraakbeen en alizarine rood (AR) kleurt botweefsel. Omdat het bot echter nog zeer fragiel is bij dergelijke jonge larven, is het niet mogelijk deze techniek op dit stadium te gebruiken. De reden hiervoor is dat alizarine rood afhankelijk is van mineralisatie van de botmatrix en het zuur in alciaan blauw de matrix net ontkalkt [8]. Door gebruik te maken van een zuurvrij alciaan blauw wordt de fragiele botmatrix niet aangetast. Het zuur, dat differentiërend werkt, werd in deze studie vervangen door magnesiumchloride. Er werd dus op deze manier getracht om een geoptimaliseerd protocol te ontwikkelen voor een kraakbeen- en botkleuring bij de zebravislarve. De onderzoeksvraag luidt dan ook als volgt: "Wat is de meest optimale bot- en kraakbeenkleuring om zebravislarven aan te kleuren?" Er werd om praktische redenen gebruik gemaakt van zebravislarven met een leeftijd van 132 hpf. Het uiteindelijke streefdoel blijft immers 120 hpf, omdat zebravislarven dan niet als proefdier beschouwd worden.

MATERIAAL EN METHODEN

Huisvesting volwassen zebravissen en eiproductie

Volwassen wildtype zebravissen (*Danio rerio*) werden gebruikt als broedstock. De watertemperatuur van deze vissen werd ingesteld op $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, de pH van het water bedroeg $7,5 \pm 0,3$ en de geleidbaarheid bedroeg $500 \pm 80 \mu\text{S/cm}$. De grenzen voor de ammoniak-, nitriet- en nitraatgehalten waren respectievelijk $< 0,02 \text{ mg/L}$, $< 0,3 \text{ mg/L}$ en $\leq 12,5 \text{ mg/L}$. De vissen werden dagelijks gevoederd met ontdooide *Artemia nauplii*, *Daphnia* of rode muggenlarven (Aqua Mila, Diest, België) en eveneens met droogvoer (Sera, Heinsberg, Duitsland). De vissen hadden een lichtcyclus van 14/10 uur licht/donker. Door middel van een net waar de eieren door vallen, werd er voorkomen dat de vissen de eieren zouden opeten vooraleer deze gecollecteerd werden.

Om de feces en gecoaguleerde eieren te verwijderen werden de embryo's gewassen in *embryo solution*, wat gemaakt werd door Instant Ocean Sea Salt (Blacksburg, VA, Verenigde Staten) en natriumbicarbonaat (Sigma, Diegem, België) op te lossen in reverse-osmosis water. De embryo's werden vervolgens geïncubeerd in *embryo solution* bij $28,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Regelmatig verwijderen van gecoaguleerde embryo's was vereist om schimmelvorming te voorkomen. De embryo's werden geëthanaseerd met 1 g/l tricaine methaansulfonaat (MS-222) (Sigma) waarvan de pH ingesteld werd op 7,4.

'Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted under the conditions of the Creative Commons Attribution-Share Alike (CC BY-SA) license and that copies bear this notice and the full citation on the first page''

Kleuringprotocol bij zebravissen van 132 en 156 hpf

De zebravislarven met een leeftijd van 132 hpf werden aangekleurd volgens drie verschillende protocols. Protocol 1 is gelijkaardig aan dat van Walker en Kimmel (2007) en werd reeds beschreven bij zebravislarven met een leeftijd van 156 hpf [8]. Hierbij werden 10 geëuthanaseerde larven achtereenvolgens: 2u gefixeerd in 1,5 ml 4% paraformaldehyde (PFA) (Fisher Chemical, Leicestershire, Verenigd Koninkrijk), 10 minuten gewassen in 50% ethanol (JT Baker, Deventer, Nederland), overnacht gekleurd met 10 µl mix B en 1 ml mix A1 of A2, 20 minuten gebleekt met 1,5% H₂O₂ (Acros Organics, Geel, België) en 1% KOH (Merck, Darmstadt, Duitsland) in ultrapuur water, 30 minuten tot overnacht geklaard met 20% glycerol (Fisher Chemical) en 0,25% KOH (Merck) in ultrapuur water, nogmaals geklaard met 50% glycerol (Fisher Chemical) en 0,25% KOH (Merck) in ultrapuur water en vervolgens werden de larven bewaard op 4°C in 50% glycerol (Fisher Chemical) en 0,1% KOH (Merck) in ultrapuur water.

Protocol 3 was naar het voorbeeld van Ovchinnikov (2009), een protocol dat routinematig gebruikt wordt voor bot- en kraakbeenkleuringen bij muizen en ratten [7]. Hierbij ondergingen 10 geëuthanaseerde larven volgend protocol: overnacht gefixeerd in 1,5 ml 95% ethanol (JT Baker), kort gewassen in ultra puur water, overnacht gekleurd met mix A1 of A2, 6-8 uur gewassen in 70% ethanol (JT Baker), waarbij de ethanol elk uur vervangen werd, overnacht geklaard in 1% KOH (Merck), enkele uren tot overnacht gekleurd met 10 µl mix B, 2 dagen geklaard in 1% KOH (Merck) / 20% glycerol (Fisher Chemical) in ultrapuur water en tot slot op 4°C bewaard in 1:1 glycerol:ethanol. Protocol 2, dat ook toegepast werd op 10 larven, is een combinatie van protocol 1 en 3. De eerste 2 stappen, fixeren en wassen, verliepen hetzelfde als in protocol 1. De volgende stappen, kleuren, wassen, klaren en nogmaals kleuren, verliepen volgens protocol 3. De laatste stappen (bleken, twee maal klaren en bewaren) gebeurden weer op exact dezelfde manier als in protocol 1.

In de 3 protocols werd de vorige oplossing zo nauwkeurig mogelijk verwijderd vooraleer een nieuwe oplossing toe te voegen. Bovendien werd elk protocol uitgevoerd met zowel 20 mM (mix A1) als 60 mM (mix A2) magnesiumchloride om na te gaan welke de beste differentiatie bewerkstelligde. Mix B bevat 0,5% alizarine rood (Sigma) opgelost in water. Mix A1 en A2 bevatten 0,4% alciaan blauw (Sigma) in 70% ethanol (JT Baker), 95% ethanol (JT Baker), 20 mM (A1) of 60 (A2) mM MgCl₂ (Acros Organics) en water. Alle stappen werden uitgevoerd op kamertemperatuur en op een schudtafel, tenzij anders vermeld. Als controle werd protocol 1 eveneens uitgevoerd bij zebravislarven met een leeftijd van 156 hpf. Hierbij werd opnieuw gebruik gemaakt van 20 mM (mix A1) en 60 mM (mix A2) magnesiumchloride. Zo kon nagegaan worden of een afwijkende kleuring te wijten was aan de leeftijd of aan het protocol.

Varianten op protocol 1

Bij de verschillende varianten op protocol 1 werd er steeds gebruikt gemaakt van het standaardprotocol volgens Walker en Kimmel (2007) [8], zoals hierboven reeds beschreven is. De verschillende protocols (zie tabel

1) werden steeds uitgevoerd bij 10 zebravislarven met een leeftijd van 132 hpf en/of 156 hpf. Bij sommige protocols is de hoeveelheid alizarine rood (AR) verdubbeld tegenover de originele hoeveelheid van 10 µl. Dit omdat in eerdere resultaten de botten onvoldoende aangekleurd waren. Ook werd er gebruik gemaakt van verschillende concentraties magnesiumchloride, namelijk: 20 mM (mix A1), 60 mM (mix A2) en 120 mM (mix A3; bevat verder dezelfde componenten als mix A1 en A2). Zo werd getracht een betere differentiatie van kraakbeen en de andere weefsels te bekomen. De eerste twee protocols (1C en 1D) bevatten geen AB kleuring en magnesiumchloride. Het laatste protocol (1K) werd uitgevoerd met een nieuw fixatief, *i.e.* een mengeling van paraformaldehyde en ethanol, omdat uit de 3 hoofdprotocols bleek dat bij fixatie in ethanol de structuren duidelijker werden en bij fixatie in PFA de larve niet uit elkaar viel.

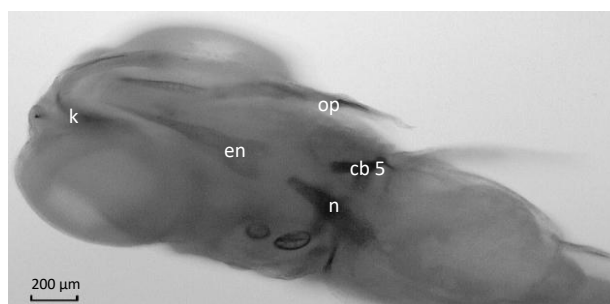
Tabel 1: De verschillende varianten op protocol 1. Verder werd het protocol volgens Walker en Kimmel (2007) gevolgd.

	Leeftijd	Fixatief	AR	MgCl ₂
1C	132 hpf	4% PFA	10 µl	Geen, want geen AB
1D	156 hpf	4% PFA	10 µl	Geen, want geen AB
1E	132 hpf	4% PFA	20 µl	20 mM
1F	132 hpf	4% PFA	20 µl	60 mM
1G	156 hpf	4% PFA	20 µl	20 mM
1H	156 hpf	4% PFA	20 µl	60 mM
1I	132 hpf	4% PFA	10 µl	120 mM
1J	156 hpf	4% PFA	10 µl	120 mM
1K	156 hpf	90% ethanol en 4% PFA	10 µl	60 mM

RESULTATEN

Protocol 1, 2 en 3 bij 132 hpf

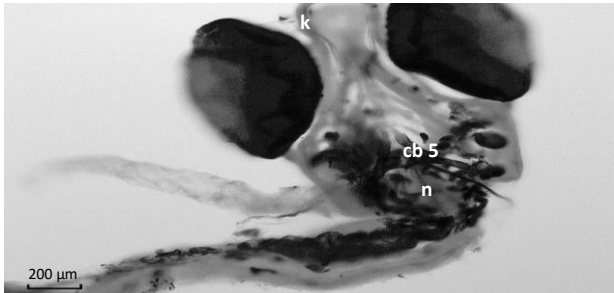
Er was reeds een onderscheid waarneembaar tussen bot en kraakbeen bij protocol 1 (1A) (zie figuur 1). Toch viel meteen op dat de larven over het algemeen veel te blauw gekleurd waren, waardoor het bot meer paars aangekleurd leek en niet enkel kraakbeen blauw aangekleurd werd.



Figuur 1: Resultaat na kleuring volgens protocol 1. Er was geen verschil in resultaat bij gebruik van 20 mM of 60 mM magnesiumchloride waar te nemen. Positief AR-gekleurde structuren: ceratobranchiaal V (cb5), entopterygoid (en), kaakstructuren (k), notochord (n), operculum (op).

Ondanks het feit dat bij de kleuring volgens protocol 2 de zichtbare botstructuren opvallend paars aangekleurd waren, was het duidelijk dat het pigment nog te overheersend was. Hierdoor konden verschillende kopstructuren niet duidelijk waargenomen worden. Ook hier is de blauwe kleur weer zeer overheersend. De

wervels werden ook niet rood aangekleurd. Het meest opvallende aan protocol 3 was dat ogen los kwamen, de staart helemaal bij elkaar krulde en de lichaamsdelen over het algemeen moeilijk herkenbaar waren. Ook hier waren het pigment en de blauwe kleur nog te sterk aanwezig, terwijl de alizarine rood kleuring nauwelijks waar te nemen was (zie figuur 2).



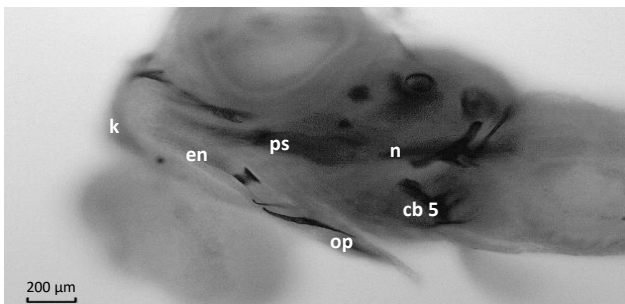
Figuur 2: Resultaat na kleuring volgens protocol 3. Er was geen verschil in resultaat bij gebruik van 20 mM of 60 mM $MgCl_2$ waar te nemen. Positief AR-gekleurde structuren: ceratobranchiaal V (cb5), kaakstructuren (k), notochord (n).

Protocol 1 bij 156 hpf

Bij protocol 1B was er een duidelijk onderscheid waarneembaar tussen bot en kraakbeen bij zowel de larven met 20 mM als met 60 mM $MgCl_2$. Ondanks het feit dat sommige larven langer ontkleurd werden dan anderen, omdat er getracht werd een duidelijker onderscheid tussen de kleuren rood en blauw te bekomen, was het uiteindelijke resultaat bij alle groepen ongeacht de klaringsstijd hetzelfde. De blauwe kleur overheerste ook hier weer.

Varianten van protocol 1

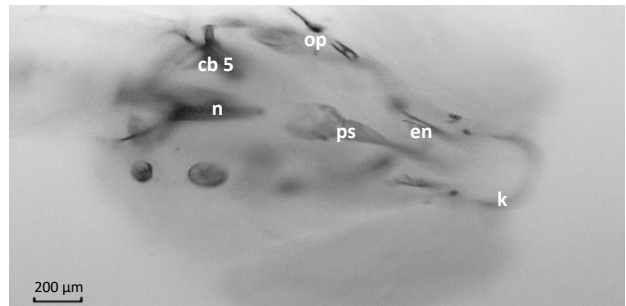
Beide protocols met enkel alizarine rood gaven een vergelijkbaar resultaat. Verschillende botstructuren, waaronder enkele vertebrae, het operculum en het notochord, werden lichtroze aangekleurd. Het enige op te merken verschil tussen protocol 1C en 1D was dat larven van protocol 1D qua aantal meer rood aangekleurde vertebrae hadden dan deze van 1C. De resultaten bij protocols 1E en 1F waren vergelijkbaar met die van protocol 1. De zebrafishlarve is over het algemeen weer veel te blauw gekleurd, maar de botstructuren waren wel een stuk donkerder gekleurd, namelijk donkerpaars in plaats van rood. Hierdoor was het bot veel duidelijker waar te nemen.



Figuur 3: Dubbele kleuring van de kop a.d.h.v. protocol 1G, 1H en 1I. Positief AR-gekleurde structuren: ceratobranchiaal V (cb5), entopterygoid (en), kaakstructuren (k), notochord (n), operculum (op), parasphenoid (ps).

Ook bij protocols 1G, 1H en 1I (zie figuur 3) zijn deze donkerpaars gekleurde botstructuren duidelijk waar te nemen. Ondanks het verschil in leeftijd en de hoeveelheid

alizarine rood en $MgCl_2$, zagen de larven er hetzelfde uit: de kop was opvallend donkerblauw gekleurd, terwijl de rest van het lichaam lichter blauw was. De botstructuren in de kop waren donkerpaars aangekleurd en de vertebrae eerder roodpaars. Bij protocol 1J is de blauwe achtergrondkleuring duidelijk fel verminderd. Hierdoor is er een verschil in blauw te zien, waarbij nu ook het kraakbeen kan waargenomen worden. Zowel in de kop als het lichaam zijn de botstructuren rood aangekleurd. Bij protocol 1K (zie figuur 4) is de blauwe achtergrondkleuring nog lichter. In het achterlijf zijn bepaalde delen bijna doorschijnend. Hierdoor zijn de vertebrae mooi rood aangekleurd. De kop is iets blauwer dan het lijf, maar ook hier zijn de verschillende kraakbeen- en botstructuren erg duidelijk waar te nemen.



Figuur 4: Dubbele kleuring van de kop a.d.h.v. protocol 1K. Positief AR-gekleurde structuren: ceratobranchiaal V (cb5), entopterygoid (en), kaakstructuren (k), notochord (n), operculum (op), parasphenoid (ps).

Tabel 2: Overzicht van het belangrijkste minpunt of pluspunt van elk protocol.

	Opmerking		Opmerking
1A & B	AB kleuring overheerst	1J	AB kleuring minder overheersend
1C & D	Geen meerwaarde om enkel AR te gebruiken	1K	AB kleuring nog minder overheersend dan bij 1J
1E, F, G, H & I	AR kleuring beter dan bij 1A & B	2	Te veel pigment
		3	Lichaamsdelen lossen

DISCUSSIE

Van de drie protocols bleek protocol 1 het beste te werken. Dit omdat bij protocol 2 en 3 nog veel pigment aanwezig was, waardoor de rood aangekleurde botstructuren moeilijker waar te nemen waren. Een mogelijke oplossing hiervoor bestaat er in de larve langer te laten bleken, waardoor het pigment verdwijnt. In protocol 3 werd er dan ook geen bleekoplossing gebruikt, wat de grote hoeveelheid aan pigment verklaart.

Ondanks het feit dat de normale lichaamsbouw van de larve verloren ging bij protocol 3, wat aangeeft dat de methode van de rat zeker niet optimaal is voor de zebrafish, waren de botstructuren hier wel mooier aangekleurd dan bij protocol 1. Mogelijk zag de larve er slecht uit omdat ethanol niet geschikt is als fixatief bij zebrafishlarven. Een verklaring hiervoor was echter niet te vinden in de literatuur. Daarom werd er besloten een protocol op te stellen met zowel PFA als ethanol als fixatief, omdat bij fixatie in ethanol de structuren duidelijker werden en bij fixatie in PFA de larve niet uit elkaar viel. Met protocol 2 en 3 werd niet meer verder gewerkt. De larven gefixeerd met 4% PFA en 70%

ethanol gaven het beste resultaat: het bot was roodroze gekleurd, kraakbeen blauw en de achtergrondkleuring was veel minder dan bij protocol 1. Toch waren de resultaten bij Walker en Kimmel (2007) over het algemeen nog lichter, waardoor een nieuw protocol met een hogere concentratie $MgCl_2$ mogelijk nog voor betere resultaten kan zorgen. Ook moet deze methode nog getest worden bij zebravislarven met een leeftijd van 132 hpf.

Protocol 1 werd eveneens uitgevoerd met verschillende concentraties $MgCl_2$ en alizarine rood, in een poging de rode kleuring duidelijker te maken en de blauwe achtergrondkleur te verdringen zodat enkel kraakbeen nog blauw aangekleurd zou worden. Protocol 1 bleek dus een goede basis te zijn om verschillende varianten op te proberen. Algemeen bleek uit deze resultaten dat hoe hoger de concentratie $MgCl_2$ was, hoe lichter de blauwe achtergrondkleuring werd, dus hoe duidelijker de bot- en kraakbeenstructuren gekleurd werden. Door gebruik te maken van nog hogere concentraties $MgCl_2$, kunnen misschien nog betere resultaten bekomen worden. Ook was duidelijk dat er een groot verschil in helderheid van blauwe kleuring was tussen larven van 132 hpf en 156 hpf, beiden behandeld met 120 mM magnesiumchloride. Enkel door gebruik te maken van meer replicaten kan aangetoond worden dat leeftijd wel degelijk een effect heeft op de differentiatie van de blauwe kleur. Want nu kan het toeval zijn dat enkel de oudere larven duidelijk lichter zijn.

Bij de zebravislarven met een dubbele hoeveelheid van alizarine rood werd er niet meteen een groot verschil opgemerkt in vergelijking met de larven met de gewone hoeveelheid AR. Toch is het mogelijk dat ook hier een grotere hoeveelheid $MgCl_2$ nodig is vooraleer er een duidelijk verschil in rode kleur kan optreden. Protocols 1C en 1D bevatten enkel alizarine rood, waardoor alleen de botstructuren aangekleurd werden. Omdat bij andere protocols de rode kleuring eveneens duidelijk waar te nemen was en bij deze protocols bovendien ook kraakbeen aangekleurd wordt met alciaan blauw, is het beter om met deze protocols verder te werken omdat ze meer info verschaffen dan enkel de botkleuring.

Over het algemeen was wel reeds duidelijk dat de kleuringen ook bij jonge larven uitgevoerd kunnen worden. Ondanks het feit dat er minder wervels rood aangekleurd worden door het vroeger stadium in verbening, is er ook bij de jonge zebravislarven al duidelijk kraakbeen en bot aanwezig dat aangekleurd wordt.

CONCLUSIE

Het is mogelijk om verschillende bot- en kraakbeenstructuren aan te kleuren bij een zebravislarve met een leeftijd van 132 hpf. Protocols 1K en 1J gaven de mooiste kleuring. Omdat deze protocols enkel zijn uitgevoerd bij larven van 156 hpf, dient in de toekomst nagegaan te worden of hetzelfde resultaat bekomen wordt bij larven met een leeftijd van 132 hpf. Ook is het opmerkelijk dat de larven een lichtere blauwe kleur hadden bij hogere concentraties $MgCl_2$. De combinatie van protocol 1K en 1J, waarbij de larven dan behandeld

zouden worden met het 90% ethanol en 4% PFA fixatief en ook met 120 mM $MgCl_2$, dient in de toekomst ook onderzocht te worden in een poging om een nog betere kleuringstechniek te vinden waar het achtergrondblauw nog nauwelijks waar te nemen is bij larven van 132 hpf. Ook dienen deze kleuringprotocols nog getest te worden op larven van 120 hpf, omdat dit het streefdoel blijft. Een geoptimaliseerd protocol zal waarschijnlijk ook gebruikt kunnen worden om bot- en kraakbeenafwijkingen na te gaan in teratogeniciteitsexperimenten met zebravislarven.

ROL VAN DE STUDENT

Onder toezicht van promotor Prof. Dr. Steven Van Cruchten en doctorandus Casper Pype heeft Jente Hoyberghs de reeds eerder vermelde experimenten uitgevoerd en mee nagedacht over mogelijke aanpassingen in het protocol en vervolgentoelichtingen die beter zouden kunnen werken. Het onderwerp en de artikels waar het protocol op gebaseerd werd, werden aangebracht door de promotor. Het volledige schriftelijk werk inclusief opzoekwerk naar aanvullende wetenschappelijke artikels werden gedaan door de bachelorstudent zelf.

DANKBETUIGING

Ik bedank graag alle medewerkers van het laboratorium voor Toegepaste Diergeneeskundige Morfologie aan de Universiteit Antwerpen, met in het bijzonder mijn promotor Prof. Dr. Steven Van Cruchten en de begeleidende doctorandus Casper Pype. Ook wil ik Dr. Marleen Eyckmans bedanken voor de ondersteuning gedurende het hele Honours College, met inbegrip van de stage en dit werkstuk.

REFERENTIES

1. Parnig, C., et al., *Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening*. ASSAY and Drug Development Technologies, 2004. **1**(1).
2. Dooley, K. and Zon, L.I., *Zebrafish: a model system for the study of human disease*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(3): p. 252-6.
3. Mattsson, A., et al., *Albendazole causes stage-dependent developmental toxicity and is deactivated by a mammalian metabolism system in a modified zebrafish embryotoxicity test*. Reprod Toxicol, 2012. **34**(1): p. 31-42.
4. Strahle, U., et al., *Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations*. Reprod Toxicol, 2012. **33**(2): p. 128-32.
5. *Albendazole*, in *Committee dor medicinal products for veterinary use*. 2004, European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections: London. p. 4.
6. Carlsson, G., et al., *Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos*. Reprod Toxicol, 2011. **32**(1): p. 129-37.
7. Ovchinnikov, D., *Alcian Blue/Alizarin Red Staining of Cartilage and Bone in Mouse*. Cold Spring Harbor Protocols, 2009.
8. Walker, M.B. and Kimmel C.B., *A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae*. Biotech Histochem, 2007. **82**(1): p. 23-8.