Distribucija leptinskog receptora u hipokampusu genetički izmijenjenog miša B4GalNt1

Markulak, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:482153

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

1xPBS-om kojom ispiremo krv iz organizma. Provjera dobre perfuzije je postupno blijeđenje jetre. Nakon što je sva krv isprana iz organizma, u isto mjesto u srcu se uvodi igla sa fiksativom (4% paraformaldehid). Indikacija uspješne perfuzije je potpuna ukočenost tijela miša. Nakon toga slijedi dekapitacija miša i odvajanje kože glave te rezanje lubanje. Izdvajamo mozak koji prvo fiksiramo u 4% paraformaldehidu 24 sata na +4°C te krioprotektiramo u gradijentu 10% i 20% saharoze. Nakon toga se mozak smrzava u pothlađenom izopentanu i pohranjuje na -80°C do daljnje analize. Za imunohistokemijsku analizu mozgovi su rezani na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany) debljine 35 μm i prikupljani u 1xPBS u mikrotitarsku pločicu s jažicama.

2.3.3. Imunohistokemija

Kako bismo zasitili endogene peroksidaze, rezove stavljamo u 1% vodikov peroksid u 1xPBS-u na 30 min. Za blokiranje nespecifičnih reakcija i bolje vezanje protutijela, rezove inkubiramo u blokingu koji se sastoji od 1%-tnog goveđeg seruma (BSA) i 5%-tnog kozjeg seruma u 1xPBS-a, 45 minuta na sobnoj temperaturi uz neprekidno miješanje. Sljedeći koraci su:

- inkubacija u primarnom anti-ObR protutijelu koje je pripremljeno u omjeru 1:50 u blokingu tijekom 2 noći na +4°C uz neprekidno miješanje;
- ispiranje 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u; inkubacija u otopini sekundarnog kozjeg anti-zečjeg IgG antitijela konjugiranim s biotinom na 2 sata na sobnoj temperaturi:
- ispiranje 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u;
- inkubacija u tercijarnom kompleksu avidin-biotin konjugiran s peroksidazom iz hrena 1 sat;
- ispiranje 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u;
- razvijanje rezova u otopini diaminobenzidina (DAB) koji je supstrat za peroksidazu; prekid reakcije vraćanjem rezova u 1xPBS
- premještanje rezova na predmetna stakalca i prekrivanje sa Vectamount pokrivalom.