

12 Přílohy

Příloha č. 1

Protokol barvení podle Nissla

- | | |
|---|-------------------|
| 1. 96% ethanol (fa Bioferm) + chloroform 1:1 | 1 - 4 hod |
| 2. 100% ethanol | 10 min |
| 3. 90% ethanol | 10 min |
| 4. 70% ethanol | 5 min |
| 5. destilovaná H ₂ O okyselená 0,25 ml CH ₃ COOH | krátký oplach |
| 6. Kresol violet (Cresyl Violet acetate, C5042-10g, Sigma - Aldrich) | 10 - 15 min |
| 7. oplach v destilované H ₂ O okyselené 0,25 ml CH ₃ COOH
oplach pod tekoucí vodou | |
| 8. 70% ethanol | přibl. 3 min |
| 9. 90% ethanol + kontrola pod mikroskopem | přibl. 3 min |
| 10. 100% ethanol | přibl. 3 min |
| 11. 100% ethanol | přibl. 3 min |
| 12. aceton : xylen 2:1 | krátce |
| 13. aceton : xylen 1:1 | krátce |
| 14. aceton : xylen 1:2 | přibl. 2 min |
| 15. xylen | 5 - 10 min |
| 16. xylen | nejlépe do 2. dne |
| 17. montování krycích skel Solakrylem | |

Příloha č. 2

Protokol barvení Fluoro-Jade B

1. řezy na sklech sušit přes noc při 37 °C
2. inkubace 3 min v absolutním ethanolu
3 min v 70% ethanolu
2 min v H₂O
15 min v 0,06% kalium permanganátum
2 min v H₂O
30 min v 0,001% FJB (Fluoro-Jade B-200mg, HISTO-CHEM INC., USA) v
0,1% kys. octové
černou krabičku zakrýt víčkem a dát na třepačku na mírné kývání 4-5
3. oplach 3 x 1 min v H₂O
4. sušit přes noc při 37 °C
5. odvodnit 3 x 2 min v xylenu
6. překrýt krycími sklíčky

Příloha č. 3

Protokol přípravy vzorku na mikrodialýzu

A. Vysrážení proteinu a naředění vzorku

1. Smíchat 40 μ l fyziologického vzorku s 10 μ l sulfosalicylové kyseliny. Poté promíchat na vortexu a stočit v centrifuze při 10 000 g 2 minuty.
2. Přenést 10 μ l supernatantu do čisté zkumavky a přidat 40 μ l barvicího pufru, obsahujícího norvalin. Poté promíchat, stočit a uschovat vzorek pro opětovné barvení nebo pro volitelnou allo-isoleucinovou analýzu (viz krok B5)
3. Přenést 10 μ l supernatantu do čisté zkumavky

B. Barvení vzorků aTRAQ reagentem $\Delta 8$

1. Nechat temperovat aTRAQ reagent $\Delta 8$ na pokojovou teplotu, poté stočit v centrifuze.
2. Přidat 70 μ l isopropanolu, promíchat a stočit
3. Ke vzorku z kroku A3 přidat 5 μ l naředěného aTRAQ reagentu $\Delta 8$, promíchat, stočit a inkubovat při pokojové teplotě min. 30 minut
4. Přidat 5 μ l hydroxylaminu a inkubovat při pokojové teplotě min. 15 minut
5. (volitelné) pro allo-isoleucinovou analýzu přidat 5 μ l naředěného supernatantu z kroku A2

C. Kombinace vzorku obarveného aTRAQ reagentem $\Delta 8$ s aTRAQ interním standartem

1. Stočit zkumavku s aTRAQ reagentem $\Delta 8$
2. Zředit aTRAQ reagent $\Delta 8$ přibližně 8 ml standartního ředícího roztoku a promíchat na vortexu dokud se neodstraní sraženina
3. Přidat 32 μ l zředěného aTRAQ interního standartního roztoku do každého vzorku obarveného aTRAQ reagentem $\Delta 8$, promíchat a stočit
4. Snížit objem vzorků na cca 30 μ l pomocí vakuového koncentrátoru nebo inertní plynové evaporace. Pokud je objem vzorku menší než 15 μ l, přidat 20 μ l vody
5. Analýza vzorků pomocí LC/MS/MS.