Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

1 Popis vzorku

Podle tohoto postupu lze vyšetřit vzorky různých druhů masných výrobků na přítomnost parenchymatických tkání a proteinů podzemnice olejné.

2 Detekční limit vyšetření

Detekční limit byl dle níže uvedeného postupu stanoven na **0,1 %** hmotnostního přídavku podzemnice olejné do výrobku.

3 Časová náročnost

příprava vzorků	**vlastní pracovní postup**
24 hod.	**24 hod.**

4 Zpracování vzorku

4.1 Množství vzorku

Vzorky se odebírají v dostatečném množství, tak aby bylo možno provést požadovaná vyšetření.

Odebírá se:

masných výrobek 1 kus v balení z tržní sítě
minimálně však 30g v kuse

4.2 Odběr vzorků

Masné výrobky se odebírají v tržní síti, kde jsou nabízeny spotřebiteli. Mohou se však zpracovávat také vzorky dodané výrobcem (včetně masného díla) chlazené nebo zmražené.

4.3 Vlastní zpracování vzorků

Vzorky se co nejdříve po odebrání fixují v 10 % roztoku neutrálního formolu, nejlépe přímo na místě odběru. Zmrazené vzorky se zpracovávají po rozmrazení.

Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

Zásady při fixaci :

- odebraný vzorek musíme vložit do fixační tekutiny co nejdříve po odběru
- vzorek se dává do fixační tekutiny ve speciálních krabičkách nebo zabalený do gázy, kdy průměr vzorku, by neměl být větší než 1 cm
- množství fixační tekutiny musí alespoň 20x až 50x převyšovat objem fixovaného vzorku,
- tekutina musí mít ze všech stran přístup ke vzorku, proto vzorek podkládáme např. vatou nebo filtračním papírem.

5 Metoda

5.1 Chemikálie a roztoky:

- alkohol
- dvojchroman draselný
- formol
- chlorid hlinitý
- chlorid sodný
- chlorid draselný
- dihydrogen fosforečnan draselný
- hydrogen fosforečnan sodný
- hydroxid sodný
- tvrdý parafín strouhaný
- síran hlinito-draselný
- syntetická pryskyřice
- vodovodní voda
- destilovaná voda
- xylen čistý
- xylen p. a.
- peroxid vodíku farmaceutický 30%
- indigokarmín
- kyselina pikrová
- zeleň světlá žlutavá

- 3,3´diaminobenzidín
- ředidlo na protilátky
- trisfosfátový pufer (trisphosphate bufered saline)
- TWEEN R 20
- primární protilátka proti sezamu získaná z drůbeže (IGY)
- sekundární biotinilovaná protilátka proti drůbeží IGY z králika
- avidin biotin komplex

5.2 Přístroje a zařízení

(používané přesně dle pracovního návodu dodaného s přístrojem)

- autotechnikon
- mikrotom
- digestoř stolní
- barvící kyvety
- mikropipeta 10 – 100 µl
- mikropipeta 100 – 1000 µl
- mikropipeta 0,1 – 2 µl
- mikropipeta 1 – 10 ml
- mini centrifuga MPW 15
- destilační přístroj
- váhy
- pH metr
- lednice
- mrazící box
- topné hnízdo
- termostat
- vlhčená komůrka

5.3 Laboratorní pomůcky

- gáza
- pinzety
- skalpel
- nůž
- ochranné rukavice
- mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml
- pasteurova pipeta plastová 1 ml
- pasteurova pipeta plastová 3,5 ml
- podložka na krájení
- zalévací komůrky
- popisovací tužky
- liquid blocker super panpen
- teploměry (1 jako etalon)
- vata
- vatové tampóny
- filtrační papír
- magnetické míchadlo

5.4 ***Laboratorní sklo*** (kalibrované)

- pipeta 5ml
- pipeta 10ml
- kádinky 200 ml
- kádinka 2000 ml
- podložní skla pro imunohistochemické vyšetření
- krycí skla
- nálevky

Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

6 Vlastní pracovní postup

6.1 Příprava parafínových řezů

Tento postup zahrnuje:

- fixaci vzorku v 10% formalínu minimálně 24 h
- odvodnění vzorků:

a/ ručně

vypírání formalínu vodou	.....	30 min
alkohol	20%.....	30 min
	40%.....	60 min
	50%.....	60 min
	70%.....	120 min
	80%.....	přes noc
	96%.....	60 min
	100%.....	120 min
methylsalicylát I	.....	60 min
methylsalicylát II	.....	60 min
methylsalicylát III	.....	přes noc
xylen I	.....	15 min
xylen II	.....	15 min
xylen III	.....	15 min
parafin I (čistý)	.....	120 min
parafin II (p. a.)	.....	120 min
parafin III (p. a.)	.....	přes noc
zalití	.....	4. den

b/ v autotechnikonu

vypírání formalínu vodou	.....	30 min
alkohol	50%.....	40 min
	70%.....	20 min
	96%.....	60 min

	96%.....	100 min
	96%.....	60 min
	100%.....	60 min
	100%.....	60 min
aceton	.....	20 min
xylen I (čistý)	.....	20 min
xylen II (p. a.)	.....	20 min
parafin I	.....	180 min
parafin II	.....	12 hod
zalití	.....	

6.2 Zalévání

K zalévání použijeme komerčně připravené zalévací medium, jehož základem je parafín upravený včelím voskem. Jedná se o medium nerozpustné ve vodě. Vzorek prosycený parafínem, se zalévá v zalévacích komůrkách na zalévací lince a po zchladnutí získáme bloček připravený ke krájení.

Pro každý vzorek připravíme alespoň 1 bloček.

6.3 Krájení bločků

Krájení vzorků pro imunohistochemické vyšetření se provádí podle uvedeného schématu. Pro vyšetření jednoho vzorku připravíme 6 řezů (vyšetřujeme minimálně 3 řezy).

Schéma krájení řezů

1. řez – asi 50 µm odkrojit – **2. řez** – asi 50 µm odkrojit – **3. řez -** asi 50 µm odkrojit – **4. řez** – asi 50 µm odkrojit – **5. řez -** asi 50 µm odkrojit – **6 . řez**

Tkáně zalité v parafinu se krájejí na mikrotomu. Tloušťka řezů se nastaví 4 µm.

Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

6.4 Imunohistochemické zpracování

Řezy je nutné pro lepší přilnutí řezů ke sklíčku před vlastním zpracováním nechat 1 hodinu na vyhřívací ploténce. Používat skla superfrost +, nebo jiné s adhezivama. Vlastní zpracování je z důvodu přizpůsobení prostředí pro úspěšnou vazbu antigen – protilátka zahájeno odparafinováním řezů. Parafín se v řezech rozpouští rozpouštědlem (xylen) a sestupnou alkoholovou řadou se vzorky převedou do vody.

Celý postup se provádí ručně ve speciálních kyvetách. Reakční směsi, protilátky a barviva se aplikují dle popsaného postupu.

6.4.1 Postup metody ABC

1	**Termostat** (60°C)	6 min
2	**Xylen I** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	10 min.
3	**Alkoholeter** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	10 min.
9	**Čerstvá vodovodní voda** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	7 min.
10	**Destilovaná voda** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	7 min.
11	**PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	5 min.
12	**4% pufr – $AlCl_3$** (připraven před použitím, v mikrovlnce 5 min. při 650W, pak nechat chladnout)	5 min.
13	**Chladnutí v 4% pufru – $AlCl_3$** (nechat v původním roztoku, při pokojové teplotě)	20 min
14	**Chladnutí v PBS**	5 min.
15	**3% roztok H_2O_2 v PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	20 min.
16	**PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
17	**Mléko proti nespecifické vazbě** 5% roztok v TBS s TWEEN 20 /0,5g do 10ml TBS + 5µl TWEEN 20)	20 min.
18	**Mléko odsát filtračním papírkem**	
19	**Primární protilátka (polyklonální)** Anti-Peanut Protein (ředěná ředidlem na protilátky DakoCytomation (1:500), ve vlhčené komůrce, při teplotě 8ºC)	12 hod. přes noc
20	**PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
21	**Příprava Vectastain Elite ABC KIT** (ABC reagents) (ABC reagents připravíme podle návodu: 2 kapky reagentu A do 5ml TBS a přidat 2 kapky reagetu B, nutné 30 min před použitím)	
22	**Sekundární protilátka** biotinylovaná Anti-Chicken IgY (protilátky ředeny s ředidlen na protilátky DakoCytomation v poměru 1:500, ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	30 min.
24	**PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
25	**Vectastain Elite ABC KIT (ABC reagents)**	30 min.

	(ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	
26	**PBS** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
27	**DAB** (1 kapka DAB činidla do 1ml DAB ředidla, nutná kontrola zabarvení)	3 min.
28	**Destilovaná voda** (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	5 min.
29	**Barvení pozadí** (modifikovaný Calleja)	viz dále

Použité protilátky

Primární protilátka

Anti-Peanut Protein, Code: APP, Quantity: 0.1 mg, Volume: 0.1 ml

Gallusimunotech inc., USA: 412 Waverly Hills Drive Cary, NC 27519

Host: Chicken, Type: Affinity purified

Physical State: liquid, Concentration: 1.0 mg/ml

Diluent: Phosphate buffered saline, pH 7.2

Procedure: Chickens were immunized with peanut (Arachis hypogaea) protein immunoglobulin fraction prepared. Antibodies were immunoaffinity purified

Sekundární protilátka

Anti-Chicken IgY (H+L), Quantity: 0.5 mg, Volume: 0.5 ml

Gallusimunotech inc., USA: 412 Waverly Hills Drive Cary, NC 27519

Host: Donkey, Type: Biotin conjugated

Physical State: liquid, Concentration: 1.0 mg/ml

Diluent: Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, 50% glycerol

Příprava roztoků:

Fosfátový pufr – zásobní roztok PBS (phosphate buffered saline):

2000 ml	destilovaná voda
160 g	chlorid sodný
4 g	chlorid draselný
4 g	dihydrogen fosforečnan draselný
46,8 g	hydrogen fosforečnan sodný
2 pecky	hydroxid sodný

- roztok je nutné přefiltrovat! a jeho pH upravit na 7,4

- před použitím 10x ředit

4% Pufr – $AlCl_3$

500 ml destilovaná voda

20 g chlorid hlinitý

- roztok je nutné přefiltrovat a jeho pH upravit na 3,2!

Tris buffered saline (TBS):

1000 ml destilovaná voda

1 ks sáček TBS

- zásobní roztok uchovávat v lednici!

6.4.2 Barvení pozadí

Dobarvení preparátu (pozadí) se používá ke zvýraznění ostatních struktur ve vyšetřovaném vzorku, pro dosažení přehlednosti celého řezu a vhodného barevného kontrastu. Pro možnost vyšetřování i dalších mikroskopicky posouditelných parametrů výrobku je pro dobarvení preparátu zvoleno barvení modifikovaným Calleja, které zároveň poskytuje odpovídající barevný kontrast pro případnou kvantifikaci výsledků (obrazovou analýzou či stereologickými postupy).

modifikovaný Calleja

Postup barvení:

roztok B Calleja		5 minut
destilovaná voda		oplach
destilovaná voda		oplach
odvodnění	alkohol 96%	oplach
	alkohol 100%	oplach
projasnění	xylen I (čistý)	7 minut
	xylen II (p. a.)	7 minut

Výsledek barvení:

svalová tkáň	zeleně s červenými jádry
elastické vazivo	žlutě
kolagení vazivo	modře

podzemnice olejná	**hnědě**
škrob a neutrální tuky	nebarví se

Příprava roztoku:

Roztok B Calleja:

100 ml	destilovaná voda
1 g	indigokarmín
200	ml kyselina pikrová

- roztok přefiltrujeme

6.5 Uzavírání obarvených řezů

Dobře nabarvený preparát se uzavírá mezi podložní a krycí sklo do vhodného média, např. syntetické pryskyřice. Obvykle se jako montovací médium používají látky nerozpustné ve vodě, a proto je nutné řezy převést vzestupnou alkoholovou řadou (odvodnit) do rozpouštědla (xylenu).

Postup při montování :

Kapka média se umístí na okraj řezu, krycí sklíčko se přiloží v úhlu 45^{o} a opatrně se spouští. Důležité je spouštět sklíčko pomalým pohybem, aby nevznikly bubliny. Preparát se nechá přes noc zaschnout v termostatu při 60 °C a po zatvrdnutí pryskyřice se opatrně očistí okraje alkoholem a žiletkou.

7 Vyšetření preparátů a hodnocení výsledků

Zpracované a dobarvené řezy jsou vyšetřovány ve světelném mikroskopu při zvětšení 100x a 400x, pro studium detailů je používáno většího zvětšení. Obvykle se jedná o kvalitativní vyšetření. Pro fotodokumentaci volíme zvětšení 400x, v případě nutnosti zobrazit větší detaily volíme zvětšení např. 600x. Sleduje se přítomnost jednotlivých druhů tkání ve vyšetřovaných vzorcích se zřetelem na přítomnost proteinů podzemnice olejné, která je zvýrazněn DAB chromogenem hnědě. Pozitivní nález je částečně možné opřít také o nález škrobových zrn (5 - 15 μm) (viz protokol histochemické stanovení podzemnice olejné). Při

Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

identifikaci tkání živočišného i rostlinného původu je nutné vycházet z údajů v literatuře, pro srovnávání používat vzorky připravené v laboratoři a dále také schématické obrázky a fotodokumentaci z literatury.

8 Dokumentace

O každém vyšetřovaném vzorku je veden laboratorní protokol s těmito údaji – datum odběru, druh výrobku, výrobce, složení (pokud bylo známé), postup zpracování (fixace, barvení), výsledek vyšetření. Aby nedošlo k záměně vzorků, je třeba označit nádobku názvem vzorku a číslem, pod kterým je vzorek veden v laboratorním protokolu, příp. i datem odběru, a dále i druh použité fixační tekutiny. Stejným způsobem označíme bločky a mikroskopická skla.

Všechny zhotovené preparáty jsou uchovány, podle potřeby je zhotovena fotodokumentace.

9 Výsledky

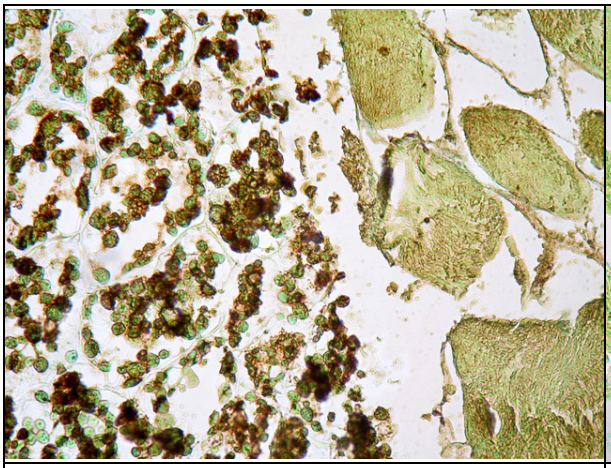
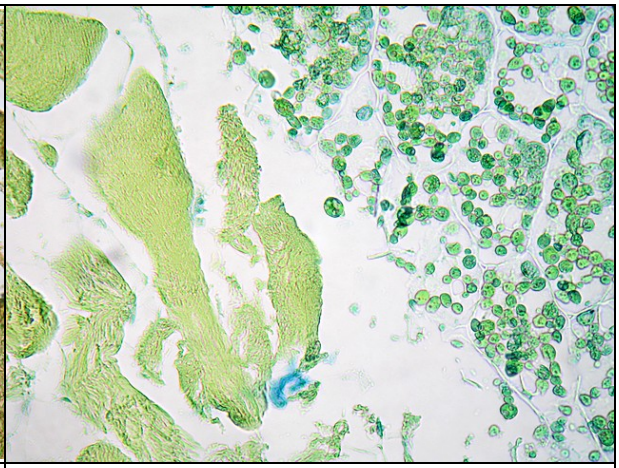
Hnědě zbarven protein podzemnice olejné

Morfologický popis:

Lze pozorovat endosperm podzemnice olejné ve kterém jsou hnědě obarveny aleuronové zrna (proteiny). V jejich blízkosti jsou četná neobarvená škrobová zrníčka.

Protokol 06	
Sledovaná složka potraviny	Podzemnice olejná
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Zkrácený protokol/plná verze	Plná verze

10 Fotodokumentace

	
Modelový výrobek, hnědě proteiny podzemnice olené, zvětšeno 400x.	Kontrolní vzorek, příčný řez osemením podzemnice olejné, zvětšeno 400x.

11 Seznam použitých zkratek

- ABC ..... avidin biotin komplex
- DAB chromogen ..... 3,3´diaminobenzidín
- TBS ..... trisfosfátový pufer (trisphosphate bufered saline)
- PBS ..... polyfosfátový pufer (phosphate bufered saline)
- IgY.....drůbeží imunoglobulin