

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

1 Popis vzorku

Podle protokolu č. 04 lze vyšetřit vzorky různých druhů masných výrobků na přítomnost pšeničné bílkoviny.

2 Detekční limit vyšetření

Přítomnost pšeničné bílkoviny lze spolehlivě prokázat, pokud je její množství ve výrobku větší než 10 g/kg a více s pravděpodobností nad 95 % při vyšetření alespoň třech řezů z různých odběrových míst.

3 Časová náročnost

Příprava vzorku: 72 hodin

Vlastní pracovní postup: 9 hodin

4 Odběr a fixace vzorku

4.1 Množství vzorku

Vzorky je potřeba odebrat v dostatečném množství tak, aby bylo možno provést požadovaná vyšetření. Odebírá se celý masných výrobek (1 kus v balení z tržní sítě) nebo minimálně 30g v kuse.

4.2 Odběr vzorku

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

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

4.3 Fixace vzorku

Vzorky se co nejdříve po odebrání fixují v 10 % roztoku neutrálního formolu, po 24 hodin před dalším zpracováním. Zmrazené vzorky se zpracovávají po pozvolném rozmrazení (při teplotě 27°C).

Zásady při fixaci:

- odebraný vzorek musí být vložen do fixační tekutiny co nejdříve po odběru do fixační tekutiny ve speciálních krabičkách nebo zabalený do gázy
- 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, vzorek je vhodné podkložit např. vatou nebo filtračním papírem.

5 Materiál a vybavení

5.1 Chemikálie a roztoky

- alkohol
- dvojjchroman draselný
- formol
- kyselina citrónová
- chlorid sodný
- chlorid draselný
- dihydrogen fosforečnan draselný
- hydrogen fosforečnan sodný
- hydroxid sodný
- tvrdý parafin strouhaný
- síran hlinito-draselný
- syntetická pryskyřice

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

- vodovodní voda
- destilovaná voda
- xylén čistý
- xylén p. a.
- peroxid vodíku farmaceutický 30%
- toluidinová modř
- 3,3'-diaminobenzidín
- ředidlo na protilátky
- trisfosfátový pufer (trisphosphate buffered saline)
- TWEEN R 20
- primární protilátka proti pšeničné bílkovině (gliadin) získaná na králíkoví
- avidin biotin komplex se sekundární protilátkou proti králičí primární protilátce

5.2 Přístroje a zařízení

(používané přesně dle pracovního návodu dodaného s přístrojem)

- autotechnikon
- mikrotom
- digestoř stolní
- barvicí 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

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

- mrazicí box
- topné hnízdo
- termostat
- vlhčená komůrka

5.3 Laboratorní pomůcky

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

5.4 Laboratorní sklo (kalibrované)

- pipeta 5ml
- pipeta 10ml
- kádinky 200 ml
- kádinka 2000 ml

Protokol 04	
Sledovaná složka potraviny	pšeničná bílkovina
Druh potraviny	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

- podložní skla pro imunohistochemické vyšetření
- krycí skla
- nálevky

6 Vlastní pracovní postup

6.1 Příprava parafinových bločků

Příprava parafinových řezů zahrnuje fixaci vzorku v 10% formalínu 24 h (pokud vzorky nejsou již vyxované) a odvodnění vzorků dle tabulky 1 (ruční zpracování) nebo dle tabulky 2 (zpracování v autotechnikonu).

Tab. 1 Ruční příprava parafinových bločků

Krok č.	Popis kroku/použitá chemikálie	Čas
1	vypírání formalínu vodou	30 min.
2	alkohol 20%	30 min.
3	alkohol 40%	60 min.
4	alkohol 50%	60 min.
5	alkohol 70%	120 min.
6	alkohol 80%	přes noc
7	alkohol 96%	60 min.
8	alkohol 100%	120 min.
9	methylnalicylát I	60 min.
10	methylnalicylát II	60 min.
11	methylnalicylát III	přes noc
12	xylen I	15 min.
13	xylen II	15 min.
14	xylen III	15 min.

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

15	parafin I (čistý)	120 min.
16	parafin II (p. a.)	120 min.
17	parafin III (p. a.)	přes noc
18	zalití	4. den

Tab. 2 Příprava parafinových bločků v autotechnikonu

Krok č.	Popis kroku/použitá chemikálie	Čas
1	vypírání formalínu vodou	30 min.
2	alkohol 50%	40 min.
3	alkohol 70%	20 min.
4	alkohol 96%	60 min.
5	alkohol 96%	100 min.
6	alkohol 96%	60 min.
7	alkohol 100%	60 min.
8	alkohol 100%	60 min.
9	aceton	20 min.
10	xylen I (čistý)	20 min.
11	xylen II (p. a.)	20 min.
12	parafin I	180 min.
13	parafin II	12 hod.
14	zalití	

6.2 Zalévání parafinových bločků

K zalévání parafinových bločků použijeme komerčně připravené zalévací medium, jehož základem je parafin upravený včelím voskem. Jedná se o medium nerozpustné ve vodě. Vzorek prosycený parafinem se zalévá v zalévacích komůrkách na zalévací lince. Po zchlazení získáme bloček připravený ke krájení. Pro každý vzorek připravíme alespoň 1 bloček.

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

6.3 Krájení bločků

Tkáň zalité v parafinu se krájí na mikrotomu o tloušťce řezů 4 µm. Krájení vzorků pro imunohistochemické vyšetření se provádí podle uvedeného schématu.

Schéma krájení řezů

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

6.4 Imunohistochemické zpracování

Řezy je nutné před vlastním zpracováním nechat 1 hodinu na vyhřívací ploténce. Vlastní zpracování je z důvodu přizpůsobení prostředí pro úspěšnou vazbu antigen – protilátka zahájeno odparafinováním řezů. Parafin se v řezech rozpouští rozpouštědlem (xylen) a sestupnou alkoholovou řadou se vzorky převedou do vody. Celý postup se provádí ručně ve speciálních kyvetách nebo v automatu pro imunohistochemické zpracování. Reakční směsi, protilátky a barviva se aplikují dle popsaného postupu.

6.5 Postup metody ABC

Tab. 3 Postup imunohistochemického vyšetření

Krok č.	Fáze	Popis kroku	Čas
1	Fixace	potření podložních skel do roztoku 0,5 g želatiny rozpuštěné ve 100 ml teplé vody s přídavkem 0,05 g síranu chromitodraselného a 1 ml poly-L-lysinu	
2	Odparafinování	lázeň v xylenu	7 min.
3		lázeň v xylenu	7 min.
4		lázeň ve 100% alkoholu	7 min.
5		lázeň ve 100% alkoholu	7 min.
6	Příprava pro IHC vyšetření	lázeň ve vodovodní vodě	7 min.
7		lázeň v destilované vodě	7 min.
8		lázeň v PBS (80 g/l NaOH, 2g/l KCl, 2 g/l	7 min.

Protokol 04

Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

Krok č.	Fáze	Popis kroku	Čas
		KH ₂ PO ₄ , 23,4 g/l Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O, 0,16 g/l NaOH, upravit pH na 7,4, ředění 1:10)	
9		lázeň v citrátovém pufru, zahřátí v mikrovlnce po dobu při 650W	5 min.
10		chladnutí	20 min.
11		oplach v PBS	5 min.
12		lázeň v 200 ml PBS s 6,7 ml H ₂ O ₂	20 min.
13		lázeň v PBS	5 min.
14		lázeň v PBS	5 min.
15		inkubace řezů s roztokem o složení 0,25 g sušeného mléka do 5 ml TBS + 5μl Tweenu	20 min.
16	Vlastní IHC vyšetření	inkubace s primární protilátkou v množství 45 μl na jeden řez	1 hod. při teplotě 24°C
17		lázeň v PBS s přídavkem Tweenu	5 min.
18		lázeň v PBS s přídavkem Tweenu	5 min.
19		inkubace se sekundární biotinilovanou protilátkou v množství 45 μl na jeden řez	30 min.
20		lázeň v PBS	5 min.
21		lázeň v PBS	5 min.
22		inkubace s ABC reagentem (5 ml TBS, 2 kapky reagentu A a 2 kapky reagentu B)	30 min.
23		lázeň v PBS	5 min.
24		lázeň v PBS	5 min.
25		inkubace s DAB	3–5 min.
26		lázeň v destilované vodě	5 min.
27		Barvení	lázeň v barvicím roztoku/roztocích
28	oplach v destilované vodě		–
29	Odvodnění	lázeň v alkoholu	10 min.
30		lázeň v acetonu	3 min.
31	Projasnění	lázeň v xylenu I	5 min.
32		lázeň v xylenu II	5 min.
Výsledky barvení		pšeničná bílkovina	hnědě
		ostatní komponenty	dle použitého barvení

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

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

Citrátový pufr – zásobní roztok

- 2000 ml destilovaná voda
- 42 g kyselina citrónová
- 18 g hydroxid sodný
- roztok je nutné přefiltrovat a jeho pH upravit na 6,0
- před použitím 10x ředit, pravidelně kontrolovat pH

Tris buffered saline (TBS)

- 1000 ml destilovaná voda
- 1 ks sáček TBS
- zásobní roztok uchovávat v lednici

6.5.1 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 doporučeno přehledné barvení toluidinovou modří, které zároveň poskytuje odpovídající barevný kontrast pro případnou kvantifikaci výsledků (obrazovou analýzou či stereologickými postupy).

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

Tab. 4 Postup dobarvení pozadí toluidinovou modří

Krok č.	Fáze	Popis kroku	Čas
1	Barvení	lázeň v roztoku toluidinová modř	3–5 min.
2		oplach v destilované vodě	–
3	Odvodnění	lázeň v 96% alkoholu	10 min.
4		lázeň ve 100% alkoholu	3 min.
5	Projasnění	lázeň v xylenu I	5 min.
6		lázeň v xylenu II	5 min.

Příprava roztoku:

Roztok toluidinové modře

- 100 ml destilované vody
- 0,7 g toluidinové modři
- k 70 ml tohoto roztoku přidáme 30 ml glycerolu a 1,01 g fenolu
- roztok přefiltrujeme a pH vyrovnáme na 7,0
- vždy před použitím roztoku zkontrolujeme pH a případně upravíme na 7,0

Výsledek barvení:

- svalovina – modrá s červenofialovými jádry
- elastická vlákna – tyrkysová
- kolagenní tkáň – bledě lososová s modrofialovými fibroblasty
- pšeničná bílkovina – hnědě (bledě modrozeleně)
- stěny rostlinných buněk – fuchsinově
- škrob a neutrální tuky – nebarví se

6.6 Uzavírání obarvených řezů

Dobře nabarvený preparát se uzavírá mezi podložní a krycí sklo do vhodného média, které neinterferuje s barvou obarveného řezu, např. syntetické pryskyřice. Obvykle se jako montovací

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

médium používají látky nerozpustné ve vodě, a proto je nutné řezy převést vzestupnou alkoholovou řadou (odvodnit) do rozpouštědla (xylenu).

Postup při ručním montování:

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

6.7 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. Sledujeme přítomnost jednotlivých druhů tkání ve vyšetřovaných vzorcích se zřetelem na přítomnost pšeničné bílkoviny, která je zvýrazněná DAB chromogenem hnědě. Při 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. Vyšetření je možné doplnit o kvalitativní zpracování získaných obrazů stereologickými metodami nebo analýzou obrazu.

6.8 Dokumentace

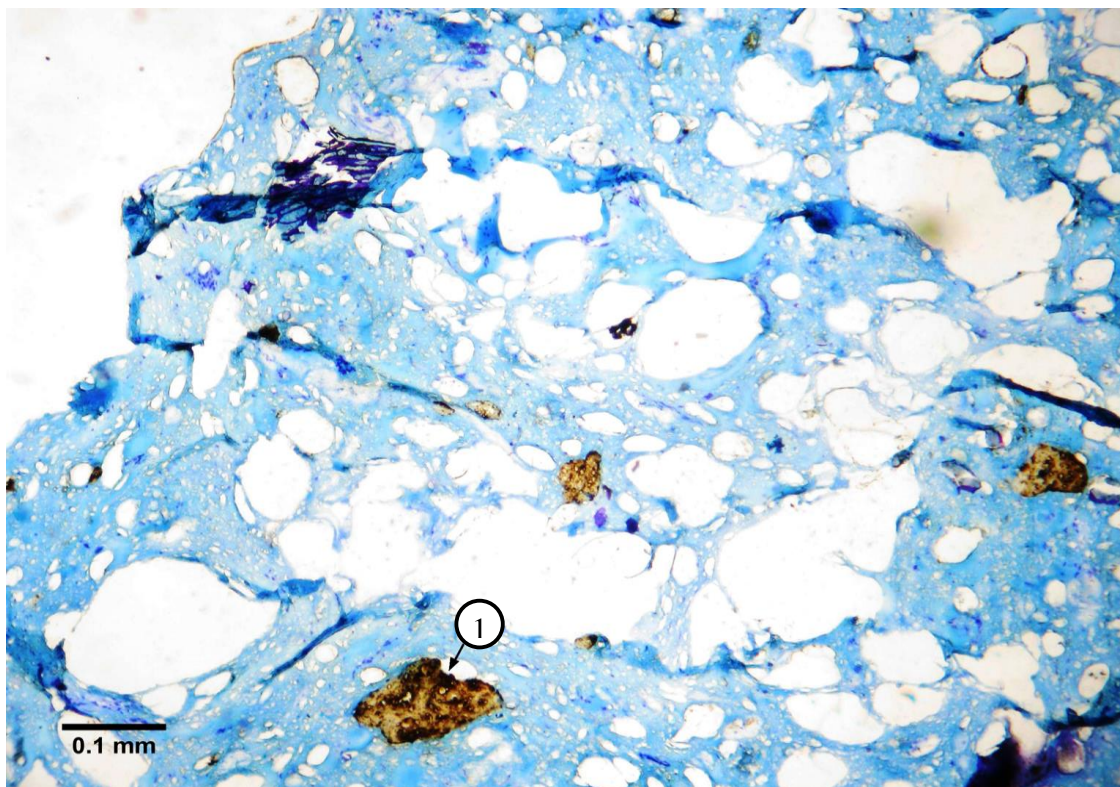
O každém vyšetřovaném vzorku je veden laboratorní protokol s těmito údaji – datum odběru, druh výrobku, výrobce, složení (pokud bylo známé), postup zpracování (fixace, barvení), výsledek vyšetření. Aby nedošlo k záměně vzorků, je třeba označit nádobku názvem vzorku a číslem, pod kterým je vzorek veden v laboratorním protokolu, příp. I datem odběru, a dále i druh použité fixační tekutiny. Stejným způsobem označíme bločky a mikroskopická skla. Vzorky je možné označit a identifikovat také čárovým kódem. Všechny zhotovené preparáty jsou uchovány a podle potřeby je zhotovena fotodokumentace.

Protokol 04	
Sledovaná složka potravin	pšeničná bílkovina
Druh potravin	masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	plná verze

6.9 Výsledky

Hnědě zbarvená pšeničná bílkovina tvoří houbovitě struktury s otvory a nepatrnými zbytky škrobu.

7 Fotodokumentace



Popis obrázku: pšeničná bílkovina (1), zvětšení 100x

8 Seznam použitých zkratk

- ABC avidin biotin komplex
- DAB chromogen 3,3'diaminobenzidín
- TBS trisfosfátový pufer (trisphosphate buffered saline)
- PBS polyfosfátový pufer (phosphate buffered saline)