

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potravin</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potravin</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená 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 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.

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potravin</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potravin</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená verze

## 4.1 Postup metody ABC

**Tab. 1 Postup imunohistochemického vyšetření**

<b>Krok č.</b>	<b>Fáze</b>	<b>Popis kroku</b>	<b>Čas</b>
1	<b>Fixace</b>	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	<b>Odparafinování</b>	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		lázeň ve vodovodní vodě	7 min.
7	<b>Příprava pro IHC vyšetření</b>	lázeň v destilované vodě	7 min.
8		lázeň v PBS (80 g/l NaOH, 2g/l KCl, 2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 23,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O, 0,16 g/l NaOH, upravit pH na 7,4, ředění 1:10)	7 min.
9		lázeň v citrátovém pufru, zahřátí v mikrovlnce po dobu při 650W	5 min.
10		chlazení	20 min.
11		oplach v PBS	5 min.
12		lázeň v 200 ml PBS s 6,7 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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		inkubace s primární protilátkou v množství 45 μl na jeden řez	1 hod. při teplotě 24°C
17	<b>Vlastní IHC vyšetření</b>	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.

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potravin</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potravin</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená verze

<b>Krok č.</b>	<b>Fáze</b>	<b>Popis kroku</b>	<b>Čas</b>
26		lázeň v destilované vodě	5 min.
27	<b>Barvení</b>	lázeň v barvicím roztoku/roztocích	dle použitých roztoků
28		oplach v destilované vodě	–
29	<b>Odvodnění</b>	lázeň v alkoholu	10 min.
30		lázeň v acetonu	3 min.
31	<b>Projasnění</b>	lázeň v xylenu I	5 min.
32		lázeň v xylenu II	5 min.
<b>Výsledky barvení</b>		pšeničná bílkovina	hnědě
		ostatní komponenty	dle použitého barvení

#### 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

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potravin</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potravin</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená verze

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

**Tab. 2 Postup dobarvení pozadí toluidinovou modří**

Krok č.	Fáze	Popis kroku	Čas
1	<b>Barvení</b>	lázeň v roztoku toluidinová modř	3–5 min.
2		oplach v destilované vodě	–
3	<b>Odvodnění</b>	lázeň v 96% alkoholu	10 min.
4		lázeň ve 100% alkoholu	3 min.
5	<b>Projasnění</b>	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

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potraviny</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potraviny</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená verze

pšeničná bílkovina – hnědě (bledě modrozeleně)  
 stěny rostlinných buněk – fuchsinově  
 škrob a neutrální tuky – nebarví se

## **5 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 streologickými metodami nebo analýzou obrazu.

## **6 Dokumentace**

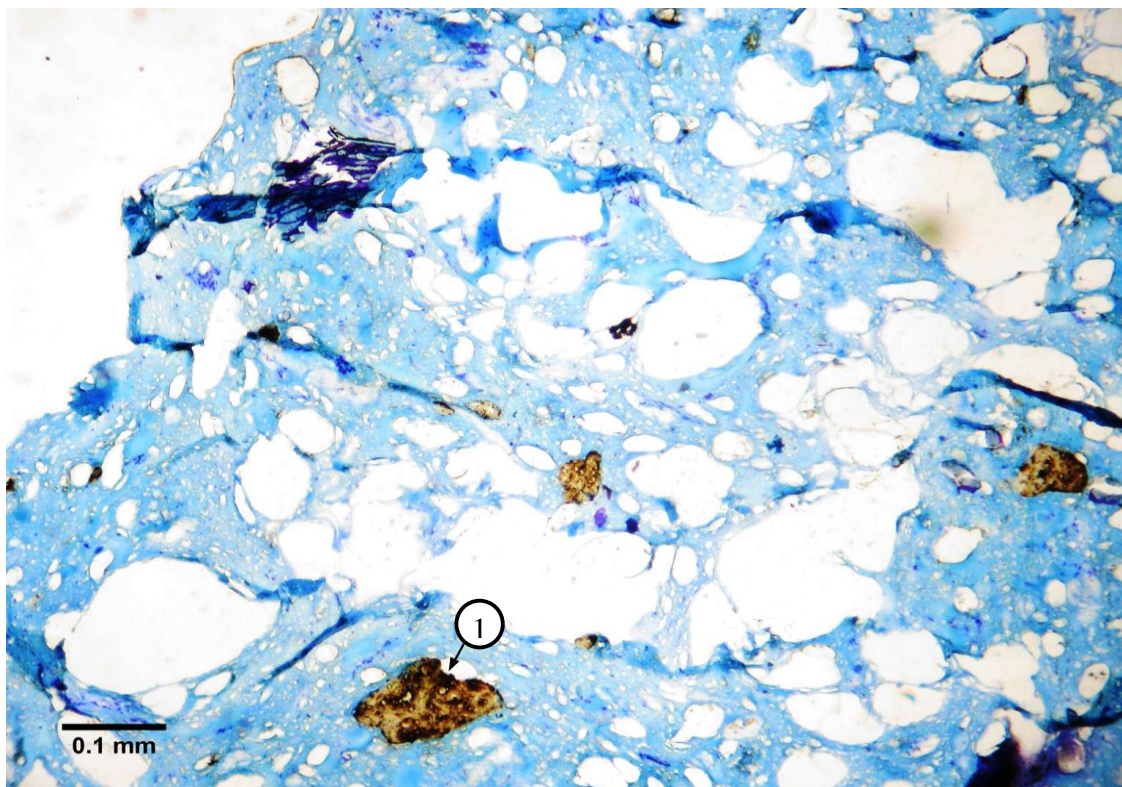
O každém vyšetřovaném vzorku je veden laboratorní protokol s těmito údaji – datum odběru, druh výrobku, výrobce, složení (pokud bylo známé), postup zpracování (fixace, barvení), výsledek vyšetření. Aby nedošlo k záměně vzorků, je třeba označit nádobku názvem vzorku a číslem, pod kterým je vzorek veden 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.

<b>Protokol 04</b>	
<b>Sledovaná složka potravin</b>	pšeničná bílkovina
<b>Druh potravin</b>	masné výrobky
<b>Způsob vyšetření vzorku</b>	imunohistochemické vyšetření
<b>Verze protokolu</b>	zkrácená verze

## 7 Výsledky

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

## 8 Fotodokumentace



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

## 9 Seznam použitých zkratk

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