

Protokol 09	
Sledovaná složka potraviny	Sojová bílkovina
Druh potraviny	Masné výrobky
Způsob vyšetření vzorku	Imunohistochemické vyšetření
Verze protokolu	Plná verze

1 Popis vzorku

Dle tohoto postupu se vyšetřují vzorky drobných masných výrobků, měkkých salámů a trvanlivých masných výrobků.

2 Detekční limit vyšetření

Detekční limit byl dle níže uvedeného postupu stanoven na **0,1 %** hmotnostního přídatku sójového proteinu do výrobku.

3 Časová náročnost

**příprava vzorků
24 hod.**

**vlastní pracovní postup
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 zmrazené.

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.

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
- dvojjchroman 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 buffered saline)
- TWEEN R 20

- primární protilátka proti sojové bílkovině získaná na králíkovi
- 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 μ l
- mikropipeta 100 – 1000 μ l
- mikropipeta 0,1 – 2 μ l
- mikropipeta 1 – 10 ml
- mini centrifuga MPW 15
- destilační přístroj
- váhy
- pH metr
- lednice
- mrazicí box
- topné hnízdo
- termostat
- vlhčená komůrka

5.3 Laboratorní pomůcky

- gáza
- pinzety
- skalpel
- nůž
- ochranné rukavice
- mikrokumavky 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 PapPen
- 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

6 Vlastní pracovní postup

6.1 Příprava parafínových řezů

Tento postup zahrnuje:

- fixaci vzorku v 10% formaldehydu 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
xylén I	15 min
xylén II	15 min
xylén 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
xylén I (čistý)	20 min
xylén 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 parafin 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** – asi 50 μm odkrojit – **7. řez** – asi 50 μm odkrojit – **8. řez** – asi 50 μm odkrojit – **9. řez**

Tkáně zalité v parafínu se krájí na mikrotomu. Tloušťka řezů se nastaví 4 μm .

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	Citrátový pufr (připravovaný ze zásobního roztoku, v mikrovlnce po dobu 5 min. při 650W)	5 min.

Protokol 09 – Imunohistochemická detekce sójového proteinu

13	Chladnutí v citrátovém pufru (nechat v původním roztoku, při pokojové teplotě)	20 min
14	Chladnutí v PBS	5 min.
15	3% roztok H₂O₂ 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 + TWEEN v množství 1μl na 1 ml roztoku)	20 min.
18	Mléko odsát filtračním papírkem	
19	Primární protilátka (polyklonální) (ředěná ředidlem na protilátky (1:500), ve vlhčené komůrce, při teplotě 8°C)	8 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 reagentu B, nutné 30 min před použitím)	
22	Příprava Vectastain Elite ABC KIT (biotinylovaná sekundární protilátka) (ABC kit připravíme podle návodu: 3 kapky séra do 10ml TBS a přidat 1 kapku biotin. protilátky, po aplikaci necháme ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	
23	Vectastain Elite ABC KIT (biotinylovaná sekundární protilátka) (ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	30 min.
24	PBS + TWEEN v množství 1μl na 1 ml roztoku (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
25	Vectastain Elite ABC KIT (ABC reagents) (ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	30 min.
26	PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
27	DAB (1 kapka DAB činidla do 1ml DAB ředidla, nutná kontrola zabarvení)	10sec. – 30min.
28	Destilovaná voda (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	5 min.
29	Barvení pozadí (modifikovaný Calleja)	viz dále

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!

6.4.2 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	xylén I (čistý)	7 minut
	xylén II (p. a.)	7 minut

Výsledek barvení:

svalová tkáň	zeleně s červenými jádry
elastické vazivo	žlutě
kolagení vazivo	modře
sojový protein	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 (xyleny).

Postup při 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. 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 sojové 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.

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.

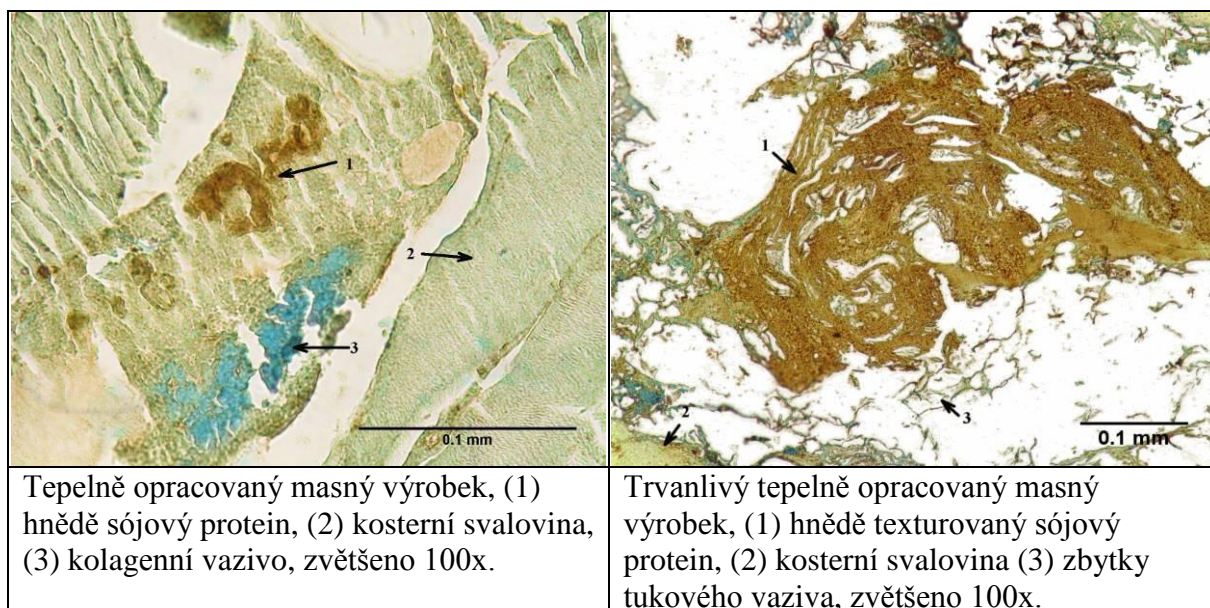
9 Výsledky

Hnědě zbarven sójový protein.

Morfologický popis:

Rostlinné bílkoviny lze pozorovat jako houbovitě, srpkovitě až kroužkovité útvary, které jsou doprovázené malými zbytky polysacharidů. Sójový protein tvoří kroužkovité, srpkovitě útvary v případě použití sójových izolátů a koncentrátů. Při použití sójového texturovaného proteinu pozorujeme vláknité struktury s častým nálezem palisádových buněk osemení sóje.

10 Fotodokumentace



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)