

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

1 Časová náročnost

příprava vzorků
24 hod.

vlastní pracovní postup
24 hod.

2 Zpracování vzorku

2.1 Množství vzorku

Odebírá se:

masných výrobek

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

3 Vlastní pracovní postup

3.1 Příprava parafínových řezů

- fixaci vzorku v 10% formaldehydu minimálně 24 h

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
paraplast I	180 min
paraplast II	12 hod
zalití do parafínu	

3.2 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.

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.
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)	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 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!

3.2.1 Barvení pozadí - modifikovaný Calleja

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
kolagenní vazivo	modře
sójový 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

4 Výsledky

Hnědě zbarven sójový protein.

Morfologický popis:

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

5 Fotodokumentace

