

Vinnsla og vöruþróun  
Processing and Product  
Development

Líftækni  
Biotechnology



Matvælaöryggi  
Food Safety



# Þróun aðferða við myndgreiningu matvæla. Notkun myndgreiningar til að meta hryggsúlugalla strax á lirfustigi þorskeldis

Jónína Þ Jóhannsdóttir  
Rut Hermannsdóttir  
Rannveig Björnsdóttir

Vinnsla og vöruþróun

Skýrsla Matís 02-09  
Janúar 2009

ISSN 1670-7192

Titill / Title	<b>Þróun aðferða við myndgreiningu matvæla - Notkun myndgreiningar til að meta hryggsúlugalla strax á lirlustigi þorskeldis / Development of analytical methods – The use of image analysis for detection of spinal deformities of fish larvae</b>		
Höfundar / Authors	Jónína Þ Jóhannsdóttir, Rut Hermannsdóttir, Rannveig Björnsdóttir		
Skýrsla / Report no.	02-09	Útgáfudagur / Date:	Janúar 2009
Verknr. / project no.	1303-1838		
Styrktaraðilar / funding:	Matvælasetur Háskólans á Akureyri		
Ágríp á íslensku:	<p>Rannsóknir hafa sýnt að mikill munur er á gæðum matvara eftir uppruna þeirra og mismunandi meðhöndlun og því mikilvægt að geta fylgst með gæðum vinnsluhræfna og matvöru með sem auðveldustum og áreiðanlegustum hætti. Myndgreining er mjög áhugaverður kostur sem getur gefið upplýsingar sem eru aðgengilegar og sýna vel uppbyggingu vefja og áhrif mismunandi þátta á samsetningu og eiginleika afurða.</p> <p>Ýmiskonar gallar eru algeng vandamál í þorskeldi og talið er að þetta geti m.a. takmarkað vaxtarmöguleika og valdið auknum afföllum. Beinagrindargallar s.s. hausfetta koma ekki í ljós fyrr en á seinni stigum lirlufeldis og því mikilvægt að þróa auðvelða aðferð til greiningar fyrr í ferlinu. Við myndgreiningu á þorsk- og lúðulirfum var stuðst við litunaraðferð með tvöfaldri litunarlausn þar sem bein og brjósk eru lituð (Alazarin red og Alcian blue). Ýmsar útgáfur voru prófaðar við aðlögun aðferðarinnar sem reyndist nauðsynlegt til þess að fá sem skýrasta mynd af útliti hryggsúlunnar. Best reyndist að lita yfir lengri tíma (yfir nótt) en lengja þarf aflitunar tímamann (<i>bleaching</i>) frá upphaflegri aðferðalýsingu til að minnka lit í holdinu.</p> <p>Niðurstöður gefa vísbendingar um að myndgreining sé góð aðferð til að meta gæði lirfa og best sé að lita eingöngu beinin því brjósk í uggum og andliti geta skyggt á efsta hluta hryggsúlunnar.</p> <p><b>Verkefnið er styrkt af Matvælasetri Háskólans á Akureyri.</b></p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Myndgreining, beinagrindargallar, tvöföld litunarlausn</i>		
Summary in English:	<p>Research reveal variable quality of food products, depending on the origin, processing and other treatment of the product. Hence, it is considered of importance to be able to easily monitor the quality of the raw material. Image analysis is considered an interesting choice of analytical method which allows detection of tissue structures and analysis of the effects of various factors on tissue structure and various quality parameters.</p> <p>Various deformities are commonly observed in aquacultured fish and may limit growth and contribute to reduced survival. Spinal deformities do not appear until late during the larval stages and therefore it is important to develop an accessible method for early detection of these deformities. Cod and halibut larvae were analysed using image analysis following double staining of bone and cartilage (Alazarin red and Alcian blue). Various adjustments of the method were tested in order to get a clear view of the spinal cord. The most successful results were obtained when staining was carried out over night and the bleaching time extended in order to minimize staining of the flesh.</p> <p>The results indicate that image analysis using staining is practical for detection of spinal deformities of fish larvae. The most successful results were obtained using staining of only the bone tissue as staining of the cartilage as well would predominate the uppermost part of the spine.</p> <p><b>The project was funded by the Matvælasetur of the University of Akureyri</b></p>		
English keywords:	<i>Image analysis, spinal deformities, double staining</i>		

## EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR.....	1
2. FRAMKVÆMD .....	2
2.1. Framkvæmd litunar.....	3
2.2. Undirbúningur lausna .....	3
2.3. Aðlögun aðferðar .....	4
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR.....	5
5. ÞAKKARORÐ .....	7
6. HEIMILDIR .....	7
7. VIÐAUKI I.....	8

## 1. INNGANGUR

Mikilvægt er að stuðla að hámarks gæðum vinnsluhráefna og matvöru og því nauðsynlegt að hægt sé að sýna með auðveldum hætti fram á gæði vörunnar. Rannsóknir sýna að mikill munur getur verið á gæðum matvara eftir mismunandi meðhöndlun auk þess sem uppruni matvæla getur haft áhrif á gæðin. Sem dæmi um þetta má nefna þorsk úr eldi samanborið við villtan þorsk en þar sýna rannsóknir að umtalsverður munur er á uppbyggingu og eiginleikum fiskvöðvans.

Gæði matvæla eru rannsökuð með ýmsum hætti og má sem dæmi nefna skynmat, efnasamsetningu, fitusýrugreiningar á lifur og vatnsheldni í holdi. Einnig má með litun vöðvans og myndgreiningu sýna fram á röðun vöðvafruma, fitusöfnun á afmörkuðum svæðum og ýmsar þær frumgerðir og efni sem áhugavert er að staðsetja í vöðvanum. Myndgreining er jafnframt áhugaverður kostur til þess að greina ástæður fyrir þeim mun sem efnarannsóknir sýna að geta verið á gæðum vinnsluhráefna og jafnframt til að skoða nánar áhrif. innsprautunar og annarrar meðhöndlunar á matvælum. Myndgreining á matvælum og hráefni ýmiskonar gefur upplýsingar sem eru afar aðgengilegar fyrir almenning (myndrænar) og er þessi aðferð því ákjósanleg leið til þess að sýna uppbyggingu vefja og áhrif eldisaðferða, vinnslu, geymslueiginleika og ýmissa annarra þátta á samsetningu og eiginleika afurða. Aukin þekking á notagildi myndgreiningar við mat á gæðum matvæla stuðlar að auknum notkunarmöguleikum og gera má ráð fyrir að myndgreining verði í framtíðinni fastur liður í gæðamati afurða/matvæla í rannsóknum sem beinast að gæðum og vinnslueiginleikum matvæla.

Hausfetta er eitt af þeim vandamálum sem fylgja þroskun þorskseiða og er almennt álitid að þessir gallar hamli eðlilegum vexti seiðanna, auki jafnvel afrán og stuðli almennt að auknum afföllum í eldinu. Hausfetta kemur ekki í ljós fyrr en seint í eldisferlinu en með myndgreiningu gefst möguleiki á greiningu mun fyrr eða á miðju lirfustigi eldisins. Lirfurnar eru fóðraðar á lifandi fóðurdýrum fyrstu 6-7 vikurnar og er kostnaður við fyrstu stig lirfueldis því mikill. Ef nýta má myndgreiningu til þess að greina hátt hlutfall hausfettu í einstaka lirfuhópum á fyrri stigum (20-30 daga gamlar lirfur) mætti minnka fóðurstofnað og annan eldiskostnað til viðbótar við vinnutíma sem varið er til umönnunar lirfa og seiða sem betur færi á að farga um leið og nema má gallana.

Rannsóknir sýna að ýmsir þættir hafa áhrif á þroska lirfa og ber þar helst að nefna umhverfisaðstæður og gæði fóðurs á fyrstu stigum lirfueldis. Ef lirfur eru eingöngu fóðraðar á hjóldýrum hefur reynst lítið um beinagrindargalla en þá verður í auknum mæli vart annarra galla svo sem kjaftskekkju og uggagalla, en almennt er talið að 10-20% seiða sé hent vegna einhverskonar galla (Steinarsson, 2008). Sé saltvatnsrækja (artemía) gefin með hjóldýrunum hefur gallaprósantan verið lægri eða um 5% en aftur á móti er þá meira um beinagrindargalla (Steinarsson, 2008).

Rannsóknir hafa verið gerðar á áhrifum vítamína, steinefna og fóðursamsetningar á galla í beinabyggingu ýmissa fisktegunda svo sem lúðu (Lewis *et al.*, 2004; Lewis & Lall 2006),

gullfleck (sea bream) (Fernández *et al.*, 2008) og sólflúru (senegal sole) (Gavaia *et al.*, 2002). Áhrif genabreytinga m.t.t. líkamsþyngdar, galla á beinabyggingu og kynþroska í þorski hafa einnig verið rannsökuð (Kolstad *et al.*, 2006). Helstu litunaraðferðir til rannsókna á beinabyggingum fiska er tvöföld litun með Alazarin red og Alcian blue. Alazarin red litar bein en alcian blue litar brjósk og þar af leiðandi er hægt að skoða bæði beinabyggingu og brjósk með þessari aðferð. Einnig er hægt að nota röntgenmyndir (x-ray) til að meta beinagalla í fiski (Fjellidal *et al.*, 2007) en sú aðferð er bæði kostnaðarsöm og krefst mikils tækjabúnaðar.

Verkefnið í heild sinni er styrkt af Matvælasetri Háskólans á Akureyri og er framkvæmt á árunum 2008-2009 í samstarfi Matís ohf., Háskólans á Akureyri, Hafrannsóknastofnunar (þorskseiðaldi á Stað við Grindavík) og Fjallalamb hf. Í upphafi var gert ráð fyrir að unnin yrðu sýni úr verkefni þar sem rannsökuð væru áhrif mismunandi fóðurs á gæði og eiginleika þorskholds. Við endurskoðun áætlunar var tekin ákvörðun um að nýta fjármagnið til þess að sýna fram á notagildi aðferðarinnar við gæðamat matvæla í sem víðtækustu samhengi. Verkefnið styrkir jafnframt rannsóknastarfsemi á sviði matvæla á Akureyri í samstarfi Matís, MHA og HA. Var því tekin ákvörðun um að skipta verkefninu í tvo afmarkaða verkþætti:

- **Notkun myndgreiningar til að meta hryggsúlugalla strax á lirfustigi þorskeldis.**  
Unnið af sérfræðingum Matís/HA í samstarfi við Hafrannsóknastofnun. Verkefni unnið af nemanda sem lauk rannsóknatengdu meistaranámi á auðlindasviði HA á haustönn 2008 (Rut Hermannsdóttir), í samstarfi við sérfræðinga Matís ohf.
- **Notkun myndgreiningar til að meta áhrif mismunandi fóðrunar á vöðvavöxt og gæði lambakjöts við slátrun að hausti.**  
Unnið af sérfræðingum Matís/HA í samstarfi við fyrirtæki (Fjallalamb hf.) og framleiðendur (Félagsbúið Sandfellshaga). Verkefni unnið af nemanda í rannsóknatengdu BSc námi á auðlindasviði við HA og eru áætluð námslok vorið 2009 (Eyrún Harpa Hlynsdóttir).

Þessi skýrsla fjallar um fyrri hluta verkefnisins sem framkvæmdur var á árinu 2008. Þróuð var aðferð til myndgreiningar á lúðu- og þorsklirfum í frumfóðrun, í því markmiði að meta stoðgrindargalla (bein og brjósk).

## 2. FRAMKVÆMD

Þorsklirfur voru fengnar frá seiðaeldisstöð Hafrannsóknastofnunar á Stað við Grindavík og lúðuseiði frá seiðaeldisstöð Fiskeyjar hf. á Hjalteyri.

Við litun á lirfum var notuð tvöföld litun með Alazarin red og Alcian blue. Litunaraðferð sú sem stuðst var við er lýst af M.B. Walker og C.B. Kimmel (2007) í aðlagaðri útgáfu Bjarna K. Kristjánssonar og Cammille Leblanc, sérfræðinga við Hólaskóla. Aðferðin hafði með góðum árangri verið notuð þar til að lita bleikju svo og hrogn og lirfur zebrafisks (sjá aðferð í viðauka I). Nauðsynlegt reyndist að aðlaga litunaraðferðina að nýjum efnivið til að fá sem bestar niðurstöður við litun þorsk- og lúðulirfa.

## 2.1. Framkvæmd litunar

Við þróun aðferðar var prófað að lita bæði heilar lirfur svo og sneiðar af lirfum sem skornar höfðu verið með frystiskurði (langskurður) og síðan komið fyrir á sýnaglerjum. Samkvæmt aðferðalýsingu er við sýnatökur mikilvægt að koma lirfum samstundis fyrir í formaldehyde eða paraformaldehyde lausn til varðveislu beina og brjósk en hér var einnig prófað að lita lirfur sem höfðu verið varðveittar í lími (tissue tech) frá sýnatöku.

Litun lirfa var framkvæmd í 2.5 ml eppendorfglösum. Fyrir litun eru lirfurnar fixeraðar í 4% paraformaldehyde-lausn í phosphate buffered saline (PBS) í 2 klst. og því næst eru sýnin afvötnuð í 50% etanól-lausn undir vægum hristingi við herbergishita í 10 mín. Etanólið er því næst fjarlægt og 1 ml af sýru-lausri tvöfaldri litunarlausn (blanda Alazarin red og Alcian blue) bætt í glasið og sett í væga hristingu við herbergishita að lágmarki 4 klst eða yfir nótt. Litalausninni er því næst hellt af sýnum sem eru síðan skoluð með 1 ml af vatni og umsnúningi og vatninu því næst hellt af. Síðan er 1 ml af aflitunarlausn (bleaching lausn) bætt í og látið standa við herbergishita í 20 mín. Aflitunarlausnin er því næst fjarlægð og 1 ml af lausn með 20% glyseróli og 0.25% KOH bætt í glasið sem sett er í væga hristingu við herbergishita í 30 mín. Lausninni er hellt af og 1 ml af 50% glyseróli og 0.25% KOH bætt í og glasið sett í væga hristingu við herbergishita yfir nótt. Skoða þarf sýnin í víðsjá á þessu stigi til þess að kanna hvort aflitun er fullnægjandi en lirfurnar að lokum geymdar í lausn af 50% glyseróli og 0.1% KOH við 4°C þar til liturinn hefur hreinsast vel úr holdinu og bein og brjósk eru orðin greinileg. Lirfurnar eru að lokum myndaður með digital myndavél sem er tengd við víðsjá.

### Atriði sem huga þarf að við framkvæmd litunar:

- Mikilvægt er að nota væga blöndun/hristingu á vöggum þar sem við á til að fá sem jafnasta litun á lirfum.
- Best er að koma lirfum fyrir í litlu íláti s.s. eppendorf við litun til að lágmarka notkun á litalausn.
- Best er að láta sporðinn liggja í botninum á eppendorf glasinu og hausinn upp til að tryggja einsleita litun.
- Beita þarf mjúklegum handtökum til að meðhöndla lirfurnar sem eru mjög viðkvæmar.

## 2.2. Undirbúningur lausna

### Sýru-lausn: tvöföld litunar lausn:

Lausn A: 5 ml 0.4% Alcian blue 8GX (Fluka 05500) í 70% etanóli (\*)  
70 ml 95% etanól  
60 mM MgCl<sub>2</sub> = 0.57126 g af MgCl<sub>2</sub> bætt út í  
Fyllt með dH<sub>2</sub>O upp í 100ml.

(\*) Til að útbúa 0.4% Alcian blue í 70% etanóli: Alcian blue dufti er bætt í lítið rúmmál af 50% etanóli, sett í vægan hristing við 37°C og blandað annað slagið með umsnúningi til að leysa upp. Blanda þarf lítið af lausninni því það þarf einungis 5 ml í 100 ml af lausn A. Bæta við 95% etanóli og vatni þar til loka styrk er náð.

*Lausn B:* 0.5% Alizarin red S (Fluka 05600) duft leyst upp í vatni.

*Lausn A og B geymist við herbergishita í nokkra mánuði, jafnvel allt að ár.*

Sýru-lausn (tvöföld litunar lausn) inniheldur 10µl af *lausn B* og 1 ml of *lausn A* sem er blandað rétt áður en litað er.

#### Bleaching lausn:

Blanda jafn miklu magni af 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 2% KOH til að gefa loka styrk 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og 1% KOH.

### **2.3. Aðlögun aðferðar**

Ýmsar breytingar voru prófaðar til þess að aðlaga litunaraðferð að mismunandi efnivið sem var heilar lirfur og sneiðar á gleri.

*Breytingar á aðferð þar sem heilar lirfur eru litaðar:*

- Lirfa varðveitt í lími og geymd við -80°C. Lím skolað af með vatni, fixað yfir nótt, litað í 4:30 klst. Önnur skref samkvæmt aðferð.
- Lirfa varðveitt í lími og geymd við -80°C. Lím skolað af með vatni, fixerað í 2 klst, litað yfir nótt, bleaching 30 min. Önnur skref samkvæmt aðferð.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde til geymslu og fixingu, annars farið eftir aðferð.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, síðan komið fyrir í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst og loks litað í 2 klst. Önnur skref eftir aðferð.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, sett í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst, litað í 2.5 klst, bleaching 1 klst. Önnur skref samkvæmt aðferð.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, sett í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst, litað í 3 klst, blönduð var ný bleaching lausn.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, sett í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst, litað í 3 klst, blönduð var ný og sterkari bleaching lausn.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, sett í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst. Eingöngu litað með Alazarin red, litunartími 1 klst, bleaching 30 min en að öðru leiti farið eftir aðferð.
- Lirfur varðveittar í 36.5% formaldehyde í 3 sólahringa, sett í 10% formaldehyde (þynnt í dH<sub>2</sub>O) í 2 klst. Eingöngu litað með Alcain blue, litað í 4 klst, en að öðru leiti farið eftir aðferð.

*Breytingar á aðferð þar sem sneiðar af lirfum eru litaðar:*

- Fixað yfir nótt í 4% paraformaldehyde í PBS. Afvötnun 5 min, litun 4 klst, bleaching 10 min, dropi af 50% glycerol + 0.1 KOH settur á gler og dekkler sett yfir.

### 3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

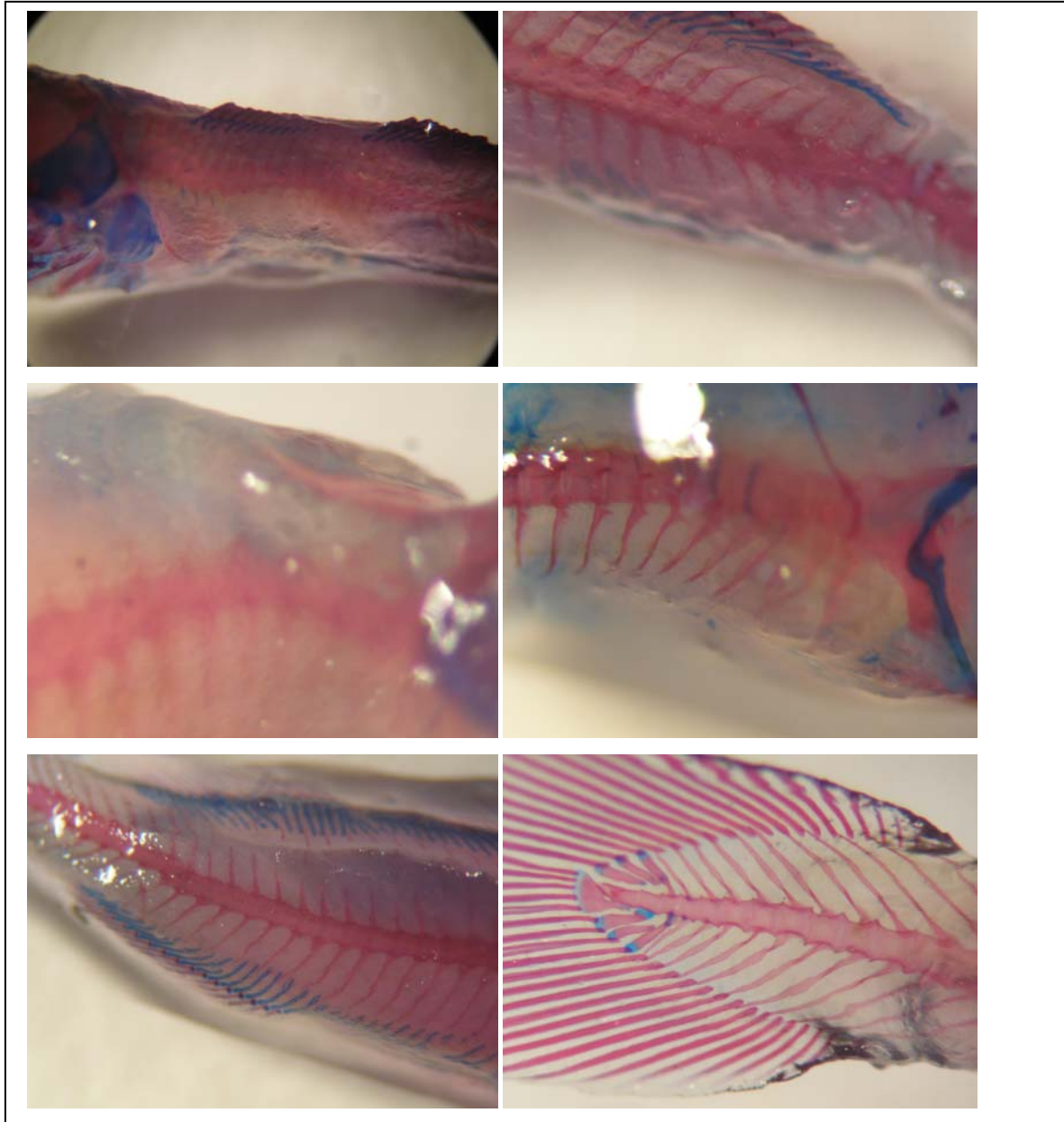
Litun á lirfum með þeirri aðferð sem hér var prófuð gekk mjög vel og hægt var að greina bæði bein og brjósk í litlum lirfum í víðsjá. Hinsvegar reyndist nauðsynlegt að prófa mismunandi útgáfur af aðferðinni í tilraun til þess að fá sem skýrasta mynd af útliti hryggsúlu.

Svo virðist sem meðhöndlun lirfa fyrir litun hefði ekki mikil áhrif á útkomuna þ.e. hvort lirfur væru varðveittar í lími eða settar beint í formalín. Í öllum útgáfum af aðferðinni gekk erfiðlega að ná Alazarin red litnum úr holdi lirfanna og því varð hryggsúlan ekki nægilega skýr. Prófaður var mismunandi litunartími og virtist sem geyma þyrfti lirfur í nokkuð langan tíma eftir litun þangað til best væri að skoða þær. Sem dæmi þá var litur farinn úr holdinu og hryggsúla þorsklirfa orðinn mjög skýr og greinileg þegar litað var yfir nótt og lirfur síðan geymdar í 50% glyseroli + 0.1% KOH við 4°C í 10-15 daga fyrir skoðun. Aftur á móti er nauðsynlegt að lita yfir nótt til þess að liturinn nái inn í beinin en þegar litunartíminn var stytur hjá lúðulirfunum virtist liturinn ekki ná inn í hrygginn og enginn litur situr eftir í beinunum þótt hann fari úr holdinu.

Greinilegt er að aðlaga þarf upprunalegu aðferðina þegar heilar lirfur eru litaðar. Best er að halda litunartímanum yfir nótt, því annars nær liturinn ekki inn að hrygg, en aftur á móti þarf að lengja bleaching tímarn í 30-40 mín (háð stærð lirfanna) auk þess sem lengja þarf clearing tímarn í allt að sólarhring en ekki bara yfir nótt. Eftir geymslu í 3-4 daga í kæli reyndist vera hægt að skoða lirfurnar og meta beinagalla og hausfettu lirfa þar sem liturinn hafði þá minnkað í holdinu.

Brjósklitunin sem er framkvæmd með Alcain blue kom mjög vel út og er skýr og greinileg. Engin vandamál tengjast því þessari litun. Til þess að greina hausfettu virðist því best að lita eingöngu með Alazarin red, því brjóskið í uggum og andliti skyggja á beinin og heftir sýn efst á hryggsúluna (sjá mynd 1).





Mynd 1. Lirfur (21-42 dph) litaðar með tvöfaldri litunarlausn, Alizarin red og Alcain blue. Bein litast rauð og brjósk litast blátt. Lirfurnar voru varðveittar í lími (TissueTek medium).

Niðurstöður benda því til að hægt sé að nota myndgreiningaraðferð til þess að greina byggingargalla (hausfettu) í smáum lirfum þorsks og lúðu mun fyrr en gert er með hefðbundnum aðferðum. Best þykir að nota eingöngu beinalitun með Alizarin red til að greina hausfettu því þá skyggir brjósk í uggum og höfði ekki á efsta hluta hryggsúlunnar. Myndgreining með þessari aðferð tekur hins vegar allt frá 3 dögum upp í 7 daga sem þykir vera nokkuð langur tími þegar meta á hvort henda eigi úr heilum kerjum til að spara í eldiskostnaði. Hins vegar er þetta mjög góð aðferð til þess að leggja mat á gæði lirfa.

## 5. ÞAKKARORÐ

Starfsmenn verkefnisins vilja þakka Matvælasetri Háskólans á Akureyri veittan styrk auk þess sem Bjarna K. Kristjánssyni og Camille Leblanc hjá Hólaskóla er þakkað fyrir veitta aðstoð og tilsögn við þróun litunaraðferðar.

## 6. HEIMILDIR

- Fernández I., Hontoria F., Ortiz-Delgado J.B., Kotzamanis Y., Estévez A., Zambonino-Infante J.L. & Gisbert E.** 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 283: 102-115
- Fjellidal P.G., Hansen T.J. & Berg A.E.** 2007. A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 273: 721-728.
- Gavaia P.J., Dinis M.T. & Cancela M.L.** 2002. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211: 305-323.
- Kolstad K., Thorland I., Refstie T. & Gjerde B.** 2006. Genetic variation and genotype by location interaction in body weight, spinal deformity and sexual maturity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared at different locations off Norway. *Aquaculture* 259: 66-73.
- Lewis L.M. & Lall S.P.** 2006. Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture* 257: 124-135.
- Lewis L.M., Lall S.P. & Witten P.E.** 2004. Morphological descriptions of the early stages of spine and vertebral development in hatchery-reared larval and juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 241: 47-59.
- Walker M.B. & Kimmel C.B.** 2007. A two-color acid-free cartilage and bone stain for Zebrafish larvae. *Biological Stain Commission Biotechnic & Histochemistry* 82(1): 23-28.
- Steinarsson A.** 2008. *Munnleg heimild.*

## 7. VIÐAUKI I

### **Acid-free double stain solution – Frá Hólum!** (adapted from Walker & Kimmel, 2006)

#### Fixation:

Embryo or larvae were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline during **2 hours**.

Then, they were washed and dehydrated with 50% ethanol with rocking at room temperature for **10 minutes**.

#### Staining:

Remove the 50% ethanol solution and add 1 ml of acid-free double stain solution and rocked at room temperature at least **4 hours or overnight**.

#### Bleaching:

Remove the stain solution and add 1ml of water mixed by inversion and remove. Add 1 ml of the bleached solution and wait for **20 minutes** at room temperature.

#### Clearing:

Add 1 ml of a solution of 20% glycerol + 0,25% KOH, rock at room temperature for **30 minutes**.

Replaced this solution by 1 ml of 50% glycerol + 0,25% KOH and rock at room temperature for **overnight**.

Check the staining under microscope.

#### Storage:

In a solution of 50% glycerol + 0,1% KOH at 4°C.

Photograph the fish with a dissecting microscope with a digital camera attached.

### Preparation of solution:

#### Acid- free double stain solution:

*Part A:* 5 ml 0,4% Alcian blue in 70% ethanol (\*)  
70 ml 95% ethanol  
60 mM MgCl<sub>2</sub> = 0,57126 g of MgCl<sub>2</sub>  
Fill with distilled water to reach 100ml.

(\*) to prepare the 0,4% Alcian blue in 70% ethanol solution: add the powder to a smaller volume of 50% ethanol, incubated at 37°C and occasionally mixed to dissolve. Prepare a small amount of such solution as we only need 5 mL for 100ml solution A. Add 95% ethanol and water to obtain final concentration.

*Part B:* 0,5% Alizarin red S powder dissolved in water.

**Acid- free double stain solution containing 10µl of *part B* and 1 ml of *part A* was mixed just prior staining.**

*Part A and B can be stored at room temperature for several months up to a year.*

#### Bleaching solution:

Mixed an equal volume of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2% KOH to give final concentration 1,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1% KOH.

### Recommendations:

- Respect the rocking during the coloration
- Use eppendorf tube for each fish you want to stain (Arctic charr embryo and juveniles).
- place the fish tail down head up in the eppendorf to ensure a homogeneous staining.
- use soft forceps to manipulate delicately the fish