

免疫组化染色对照的方法

* 目的

- * 排除假阳性或假阴性
- * (非特异性染色或交叉反应)
- * 正确评价免疫组化染色结果

阴性对照----用确知不存在相应靶抗原的组织标本染色, 结果应为阴性

- * 空白对照
- * 替代对照
- * 抑制试验
- * 吸收试验

* 阳性对照----用已经证实含有靶抗原的组织切片与待检标本同样染色, 结果应为阳性

* 自身对照

空白对照

* 用磷酸缓冲液(PBS)替代第一抗体(特异性抗体)

* 假阳性原因

- * 自发荧光, 色素及内源性酶
- * 第二抗体或桥抗体
 - * PBS 替代—> 阴性
 - * 无关血清(羊抗兔)替代—> 阴性

替代对照

* 用与第一抗体来源的同一动物前血清, 来替代第一抗体, 染色结果应为阴性

- * 保留免疫前动物的血清
- * 用未经免疫的同种动物血清或正常血清替代第一抗体

* 排除非特异性染色(坏死组织、嗜酸性粒细胞及胶原组织吸附Ig)

抑制试验

* 待检标本先与未标记的特异性抗体反应后再与标记的特异性抗体染色, 结果明显减弱或转阴性

* 两步抑制试验

- * 待检组织切片两张, 一张先加未标记特异性抗血清, 后加标记特异性抗血清, 染色被抑制(阴性)
- * 另一张先加未标记同种正常血清, 后加标记特异性抗血清, 未起封闭作用, 阳性染色

抑制试验

* 一步抑制试验

- * 将标记抗体和未标记抗体混合(等量或1:9)后染色, 对照组用标记抗体与PBS混合, 对照组染色强

吸收试验

* 用过量的已知相应的纯化抗原与第一抗体反应, 抗体结合点全部与抗原结合, 这种被抗原吸收的抗体不能再与组织内的抗原反应, 染色结果应为阴性

* 使用一种新的抗血清和对新的组织标本染色时, 应做吸收试验。但抗原不易得到, 所以少做

阳性对照

* 用已经证实含有靶抗原的组织切片与待检标本同样染色, 结果应为阳性

* 排除待检标本假阴性的可能

* 阳性对照片阴性-抗原保存、染色方法与抗体效价

自身对照

* 用同一组织切片或涂片上与靶抗原无关的其他结构做对照

* 阴性部位可用于阳性自身对照; 如靶抗原与血细胞无关, 则可用内源性过氧化物酶做阳性对照

免疫组化染色对照设计注意点

* 每次试验同时做阳性对照和阴性对照

* 阴性对照应同时做空白对照和替代对照

* 间接法第一抗体阴性对照结果阳性时, 应考虑第二抗体或桥抗体的替代对照

* 阳性对照	空白对照	替代对照	待测切片	结果判断
* (-)	(-)	(-)	(-)	抗体失活或操作有误
* (+)	(+)	(+)	(+)	非特异性染色
* (+)	(-)	(+)	(+)	非特异性染色
* (+)	(-)	(-)	(-)	阴性结果可靠
* (+)	(-)	(-)	(+)	阳性结果可靠

*

非特异性染色及消除方法

非特异性染色

* 特异性染色指抗体只与相应的靶抗原决定簇反应，并在含靶抗原的部位显示特异性阳性染色，凡不属于特异性反应的染色，均为非特异性染色或背景染色

* 非特异性染色因素

* 靶组织或细胞（自发荧光、内源性酶、生物素和色素）

* 标记物

* 抗体

* 靶组织与抗体的相互作用

非特异性染色及消除方法

* 自发荧光：蓝绿色或蓝白色

* 组织不经荧光素染色，在紫外光或短光波照射下所呈现的荧光

* 存在的组织

* 陈旧组织标本、经甲醛固定和石蜡包埋的组织、厚切片

* 胶原纤维、弹力纤维、脂褐素（肝、心肌、神经等）

非特异性染色及消除方法

* 自发荧光：蓝绿色或蓝白色

* 消除方法（使背景细胞和组织染成红色）

* 荧光抗体染色后用**0.1%~0.05%** 伊文斯兰染2~5秒

* 用**0.05%** 伊文斯兰稀释抗体

* 用**0.1mg/ml** 硼氢化钠处理切片10分钟，消除醛基作用

非特异性染色及消除方法

* 内源性酶

* 内源性过氧化物酶（与**DAB** 反应产生棕褐色产物）

* 存在于中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、组织内

* 内源性碱性磷酸酶

* 存在于造血细胞、肠、脑、肝

非特异性染色及消除方法

* 内源性酶

* 消除方法

* 石蜡切片置**0.3%~0.5%** 过氧化氢甲醇溶液中15~30分钟

* 冷冻切片用**3%** 过氧化氢水溶液中3~10分钟

* 其他

非特异性染色及消除方法

* 内源性生物素或生物素样物质（冰冻切片）

* 存在于人肝、肾、胰和中性粒细胞

* 消除方法

* 染色前先用卵白素液（**25mg/ml**）处理**15**分钟

* 醛类固定液可使内源性生物素失活

非特异性染色及消除方法

* 标记物

* 非特异性染色因素

* 荧光素和酶质量差—暗黄色

* 不纯、保存过久降解—降解分子吸附蛋白质—**F/P** 值低

* 标记过量—标记抗体带过多的阴电荷

* 存在游离的标记物与蛋白质结合

非特异性染色及消除方法

* 标记物

* 消除方法

* 使用高特异性、高效价抗体和优质荧光素和酶

* 制备标准化的荧光或酶标抗体，**F/P**值1~2间，**RZ**≥3

* 染色前用**SephadexG-25**除去游离荧光素

* 用**DEAE**—纤维素柱除去未标记的蛋白或过度标记的抗体

* 用**0.1%~0.05%**胰蛋白酶消化、正常血清或用肝粉吸收

非特异性染色及消除方法

* 免疫金-银染色法

- * 充分洗涤
- * 洗涤缓冲液中加入**NaCl** 至**2.5%** 或**0.1%BSA** 或**1%**明胶
- * 显影后用**7.5%**高铁氰化钾及**2.0%**硫代硫酸钠洗涤
- * 洗涤时在显微镜下控制褪色程度

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* 抗体蛋白的非特异性吸附

组织与抗体蛋白间的疏水性结合

经标记或未标记的抗体蛋白都带电荷，而各类组织也带一定的电荷—静电吸引

* 部位：纤维结缔组织、变性坏死细胞、嗜酸性粒细胞、切片边缘和刀痕

* 鉴别：用同种血清对一抗和二抗进行替代对照区分非特异性吸附

消除方法—高速离心去除凝集的抗体蛋白

0.1%BSA 或 **HAS**（人白蛋白）封闭切片

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* 特异性抗血清不纯

* 抗原不纯—>杂抗体

* 消除方法—改善抗原提纯、抗体制备方法

* 将抗原与抗体结合的沉淀线（抗原、抗体和琼脂）切下、捣碎后免疫动物

* 不含靶抗原的组织匀浆或干粉置于**37℃** 1小时吸收抗血清离心取上清

* 使用**McAb**

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* **IgG** 的交叉反应

* 羊抗兔（鼠）血清与人的**IgG** 发生交叉反应（不同种系的**IgG** 分子结构相似）

* 消除方法

* 稀释羊抗兔抗血清，但不低于染色效价

* 改用不起交叉反应的血清

* 用**5%**的人血清作为第二抗体的稀释液，起吸收作用

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* 共同抗原决定簇

* 靶抗原中存在其他组织的共同抗原决定簇—> 抗血清中含多种抗原决定簇的抗体

* 消除方法

* 使用**McAb**

* 尽可能稀释一抗，采用敏感的免疫组化方法

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* 单一决定簇抗体的异质性

* 针对一个抗原决定簇抗体，也存在许多个体型的抗体，抗抗体**1 IgG**是异质性的

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* 特异性抗原弥散

* 固定不及时、自溶、组织坏死、炎症

非特异性染色及消除方法

* 抗体

* **IgG** 受体干扰

***IgG** 的**FC** 段受体广泛存在于淋巴细胞（**B**）、巨噬细胞等（但亲和力较抗原抗体反应弱）

* 消除方法

* 采用敏感方法（**ABC**），高度稀释抗体

* 用福尔马林固定以破坏**FC** 受体

非特异性染色及消除方法

* 其他

- * 抗体浓度过高、不适当的反应温度、反应时间过长、试剂变干燥、切片过厚
- * 其他消除方法
 - * 加一抗前加正常血清（与二抗血清相同）、或用含**0.1%BSA**的稀释液稀释抗体
 - * 染色前蛋白酶消化—使组织内由于固定和包埋而隐蔽的抗原暴露，提高免疫反应性
 - * 增加一抗稀释度—以出现强阳性细胞和背景着色最弱时为最佳稀释度

非特异性染色及消除方法

- * 其他
 - * 抗体浓度过高、不适当的反应温度、反应时间过长、试剂变干燥、切片过厚
 - * 其他消除方法
 - * 延长孵育时间—抗原抗体结合最佳温度为37℃，过高—抗体变性，标本干燥
 - * 避免染色过程中标本干枯—湿盒中进行（以免抗体蛋白粘附）、避开边缘部位、刀痕、折叠区
 - * **0.1mg/ml NaBH4**（硼氢化钠）处理切片10min以消除醛类固定液（福尔马林）所致色素

非特异性染色及消除方法

- * **DAB**氧化物
 - * 用时配制（**0.03%~0.04%**）
 - * 使用前应过滤，加入**H₂O₂**

免疫组织化学染色结果的判断

- * 怎样判断特异性染色结果
 - * 特异性染色表现
 - * 阳性产物明显、细颗粒状，背景清晰—鲜明对比
 - * 阳性染色强度深浅不一、阴性细胞和阳性细胞交叉存在
 - * 定位明确—胞内（膜、浆、核）、胞外
 - * 分布
 - 定性定量：
 - * 染色的阳性强度
 - * 阳性细胞的密度
 - 定位：
 - * 阳性细胞着色形态
 - * 阳性细胞组织分布
 - * 胞膜型、胞核型、胞浆型

免疫染色的阳性强度

根据显色程度分：

弱阳性（淡黄色）	+	1分
中度阳性（棕黄色）	++	2分
强阳性（棕黑色）	+++	3分

阳性细胞密度

根据阳性细胞在细胞中所占比例分：

弱阳性，阳性细胞数<25%	+
中阳性，阳性细胞数25%~50%	++
强阳性，阳性细胞数>50%	+++

综合计量，计算公式为：

$$(+)\% \times 1 + (++)\% \times 2 + (+++)\% \times 3$$

最终结果（至少随机观察5-10个HPF）：

总数值 < 1 (+)

总数值 1.0-1.5 (++)

总数值 >1.5 (++++)

免疫组化出现假阳性原因

- 内源性酶、生物素和色素显色
- 抗体与多种抗原有交叉反应（抗原决定簇、IgG受体干扰、IgG交叉反应、抗体不纯
- 抗体与组织中某些成分非特异性结合
- 抗体浓度过高
- 孵育时间过长、温度过高和显色时间过长
- 抗原弥散
- 操作过程中冲洗不充分、脱蜡不彻底
- 切片折叠、干燥、脱蜡和粘片剂过厚等

免疫组化出现假阴性原因

- 抗体
 - 失活、浓度过低、抗体与试剂盒不配
- 标本固定或修复方式不当（抗原丢失或遮蔽）
- 方法敏感度低
- 组织处理及实验操作步骤不当
 - 冲洗后切片残留过多缓冲液
 - 染色顺序、孵育温度时间、底物显色

要点：

免疫组化染色对照的设计

免疫组化各种对照的概念

非特异性染色及消除方法

- 特异性染色和非特异性染色的概念
- 非特异性染色的主要因素（标记物及组织内源性成分等）及消除方法
- 特异性染色的表现
- 免疫组化出现假阳性或假阴性的原因