

DAB 染色后切片着色呈阴性结果解决方案

背景：

其实免疫组化在 DAB 染色后一般有四种情况：阳性染色效果很好、阴性染色、非特异性染色很深、阴阳脸（染色不均匀）。而阴性染色是许多初学者经常遇到的头疼问题。我身边有个研究生同学在我们实验室初次涉入免疫组化，听说步骤不难，跟我后面做了几次之后，就自己开始做了，连续做了三次，结果均是阴性染色。很扫兴，不知是什么原因导致的。

问题及其解答：免疫组化染色呈阴性结果的原因有哪些？

- 1、抗体浓度和质量问题以及抗体来源选择错误。不知抗体是进口的还是国产的工作液，怎么这么高稀释度也没能做出阳性结果？另外，不是抗体浓度越高就越易出现阳性结果，抗原抗体反应有前带和后带效应，必须摸索最佳浓度。
- 2、抗原修复不全，对于甲醛固定的组织必须用充分抗原修复来打开抗原表位，以利于与抗体结合；建议微波修复用高火 4 次*6min 试试。有人做过实验，这是最佳的时间和次数。若不行，还可高压修复。
- 3、组织切片本身这种抗原含量低；
- 4、血清封闭时间过长。
- 5、DAB 孵育时间过短。
- 6、细胞通透不全，抗体未能充分进入胞内参与反应。
- 7、开始做免疫组化，我建议你一定要首先做个阳性对照片，排除抗体等外的方法问题。

我的实际解决方案：

- 1、首先，排除组织切片内的抗原有无丢失及其含量多少。免疫组化中两个最重要的因素是抗原和抗体。（1）抗原有无丢失主要看组织切片的新鲜程度，一般切片室温保存超过 3-6 个月，可能切片内的抗原丢失很严重（有文献支持），此时可以通过重新用石蜡块切片来进一步验证（蜡块需要低温保存）。（2）石蜡切片在制作过程中可能因醛基对抗原决定族的封闭，这需要通过抗原修复来充分暴露，从而增加抗原抗体结合反应，提高阳性率，我一般用 6min*4 次中火微波抗原修复，用枸橼酸钠缓冲液。（3）组织切片中本身抗原含量的多少？这方面我有教训的，我做胎鼠睾丸间质细胞鉴定，用 1：200 一抗效果很好；但我用 1：200 一抗孵育成年睾丸间质细胞检测，几乎呈阴性，后来证实是因为两者抗原含量相差甚远，则一抗也要适当提高浓度。
- 2、其次，检查抗体有无选择错误和抗体孵育条件是否不适。（1）一抗选择单克隆抗体易出现

阴性结果，因为灵敏度低但特异性好；一抗的 *species reactivity* 中无检测组织的种属，这是比较常见的错误；一抗选择 *rat*，而二抗是抗 *mouse/rabbit* 等均有可能出现阴性结果。（2）抗体孵育时间过短，容易导致阴性结果。一般一抗我建议 4 度孵育过夜和 37 度复温 45min；二抗我一般 37 度 30min。我不喜欢参照二抗染色试剂盒说明书。（3）抗体浓度过低。这是阴性结果的最可能原因。必须提高稀释度，我一般初次做一种新抗体，喜欢先用说明书建议的低浓度和高浓度做一次，然后决定是向高还是低方向摸索。一般先决定二抗的浓度（工作液就好办了，直接滴加），重点摸索一抗的最适浓度。注意：免疫反应中存在前带和后带效应，这提示不是浓度越高，阳性率就越高，反之亦然。（4）重要原因排除之后，也不要忽视抗体的质量：原装抗体一般比较稳定，效果较好；而进口分装次之；工作液可能要注意质量问题。

3、同时，DAB 的孵育时间可能要适当延长，在镜下观察，有时可延长至 30min。但一般 3-10 min 最好，此时背景也较浅。否则，说明抗体浓度不合适。

4、最后，血清封闭时间也可相应缩短。一般 10-30min，但这个时间可以调整，封闭主要是降低切片的总体背景着色。

5、此外，细胞通透也不可忽视。许多战友认为石蜡切片一般不需细胞通透，因为切片时可能已经把细胞切开了，但对于胞核蛋白，建议还是通透一下，促进抗体等试剂充分进入参与反应。

6、以上原因，都是针对实际中常见原因来进行分析的，前提是排除操作者的操作错误而引起阴性结果，这就需要新手还是要设置阳性对照以排除方法的问题。还有抗体稀释液的 PH 值过低等其它原因的干扰。

总之，要想把免疫组化做好，可能每一个环节都很重要，但也存在主次之分，出现问题了，需要通过先排除主要的，再依次排除次要的--这是衡量你对免疫组化原理掌握与否的关键所在。