

# **Теоретические основы иммуногистохимического метода исследований**

Санкт-Петербург

# Определения

**Иммуногистохимия** — это метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с мечеными антителами.







# Определения

**Антиген** — любое вещество, которое при попадании в ткани восприимчивого организма вызывает иммунный ответ, в результате которого формируются специфические антитела, которые затем связываются с данным веществом.

Antigen = Antibody + generation

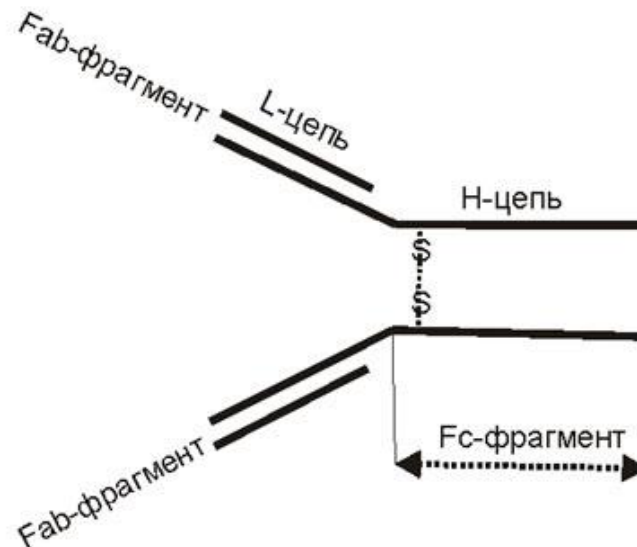


# Тканевая локализация антигенов

Тканевая локализация	Примеры	Окраска
Ядерные	Tdt, TTF-1, ER/PR	
Ядерные и цитоплазматические	S-100, Calretinin	
Цитоплазматические	Cytokeratins, Thyroglobulin	
Мембранные	CD45, C-erb-B2, Villin	
Мембранные и содержащиеся в органеллах	CD30, CD15	
Внеклеточные	IV Collagen, Laminin	

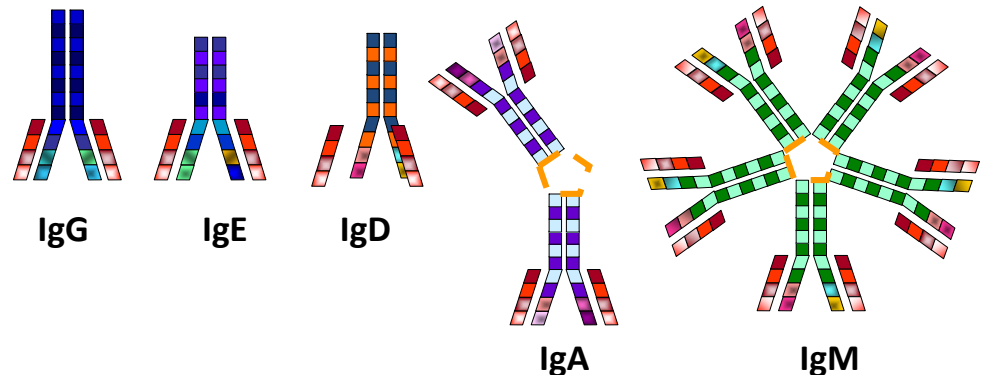
# Определения

**Антитела** — это растворимые гликопротеины глобулиновой фракции сыворотки крови, образующиеся в ответ на проникновение антигена в организм теплокровных.



# Структура антител

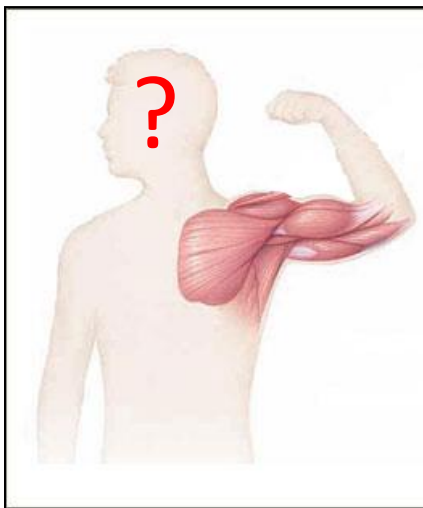
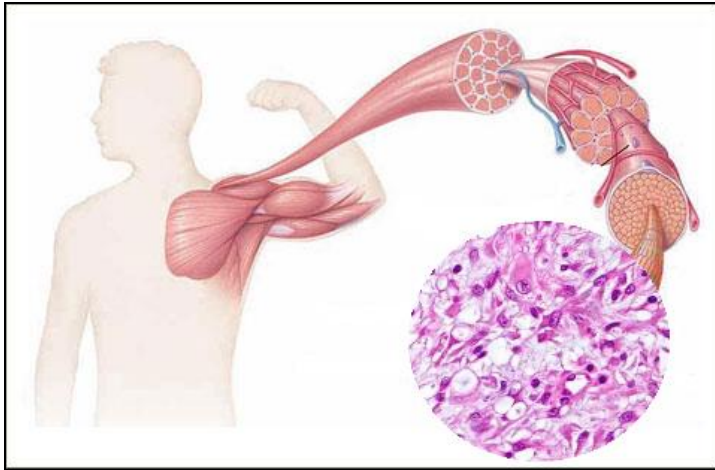
- 5 типов H-цепей:  
g (gamma), a (alpha), m (mu), e (epsilon), d (delta)
- 2 типа L-цепей:  
k (каппа), l (lambda)
- Антитела называются по их тяжёлым цепям:
  - g heavy chains  $\Rightarrow$  IgG
  - a heavy chains  $\Rightarrow$  IgA
  - m heavy chains  $\Rightarrow$  IgM
  - e heavy chains  $\Rightarrow$  IgE
  - d heavy chains  $\Rightarrow$  IgD



# Иммунная реакция



# Иммунная реакция





# Антитела

По происхождению:

- Мышиные
- Кроличьи
- Козьи
- Овечьи
- ...

# Антитела

По клональности:

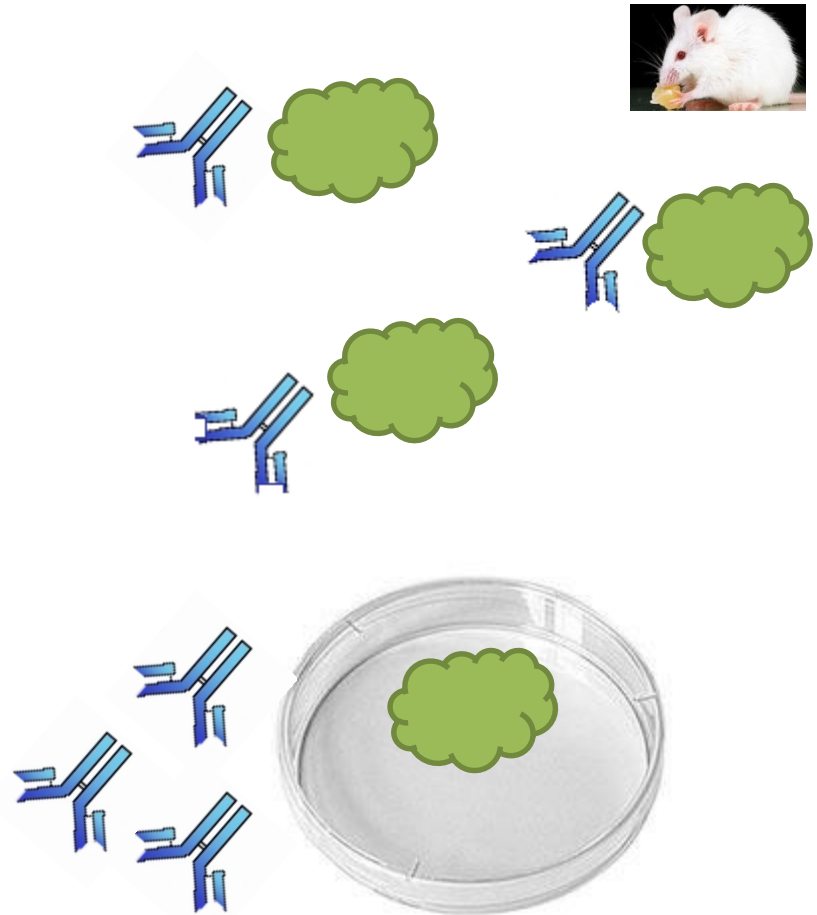
- Поликлональные



- Моноклональные



- Коктейли



# Моноклональные антитела

Различные клоны – к различным эпитопам одного антигена



анти- *эпитоп А*



анти – *эпитоп В*



анти – *эпитоп С*



анти – *эпитоп D*



# Коктейль моноклональных антител

Смесь различных моноклональных антител в одном флаконе



анти- *эпитоп А*



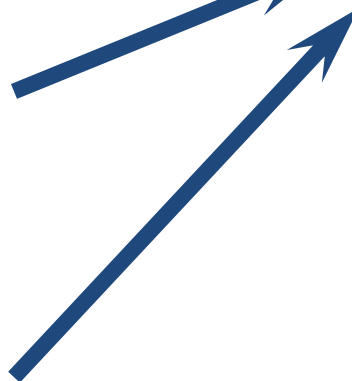
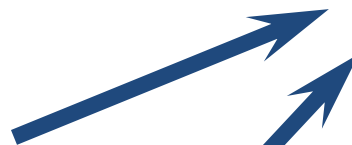
анти – *эпитоп В*



анти – *эпитоп С*

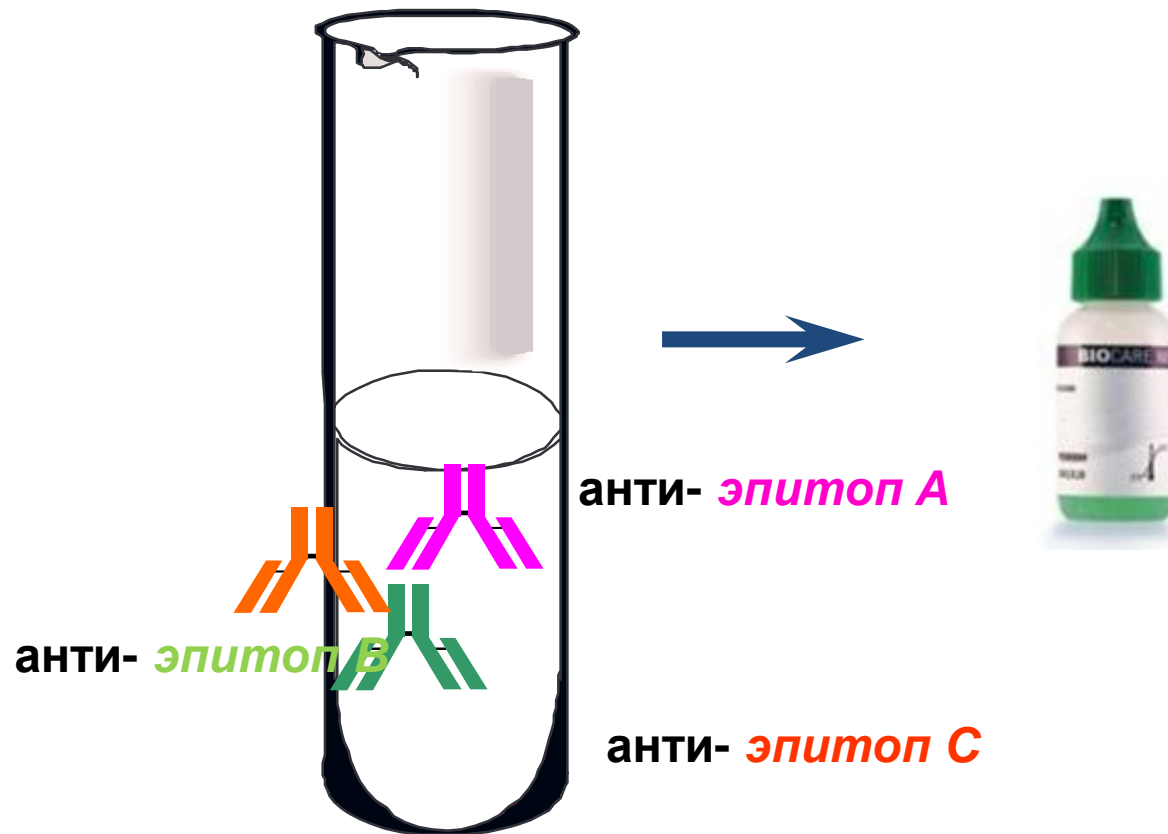


анти – *эпитоп D*



# Поликлональные антитела

Смесь различных клонов к различным эпитопам в одном флаконе



# Антитела

	Моноклональные	Поликлональные
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"><li>• Связываются с определённым эпитопом – более специфичны</li><li>• Меньше фонового окрашивания</li><li>• Культуры могут поддерживаться независимо</li><li>• Большая воспроизводимость</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Легче в производстве</li><li>• Более распространены</li><li>• Более чувствительные (против большего количества эпитопов)</li><li>• Удобны для скрининга</li></ul>
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"><li>• Сложнее в производстве</li><li>• Не такие чувствительные, как поликлональные</li><li>• Обычно требуют большей концентрации</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Менее специфичны</li><li>• Чаще дают фоновое окрашивание</li><li>• Вариабельны лот от лота</li><li>• Тренд на моноклоны</li></ul>

# Антитела

По концентрации:

- Готовые к употреблению (RTU – Ready to use)
- Концентрированные (см. разведение 1:50, 1:100, 1:200...)

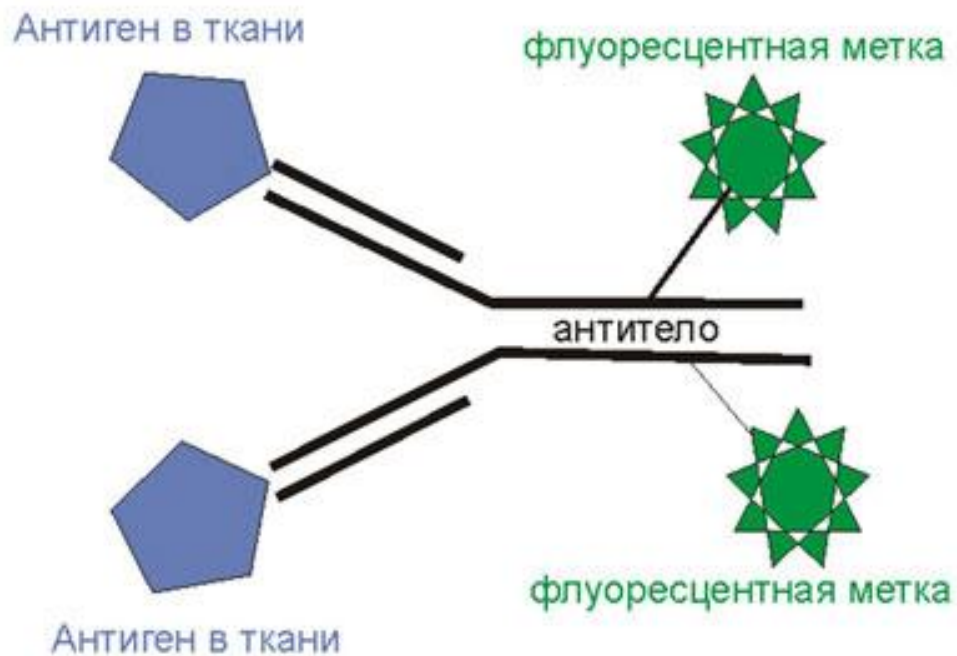
# Визуализация = Детекция

- Прямой метод
- Непрямой метод



# Визуализация = Детекция

- Прямой метод



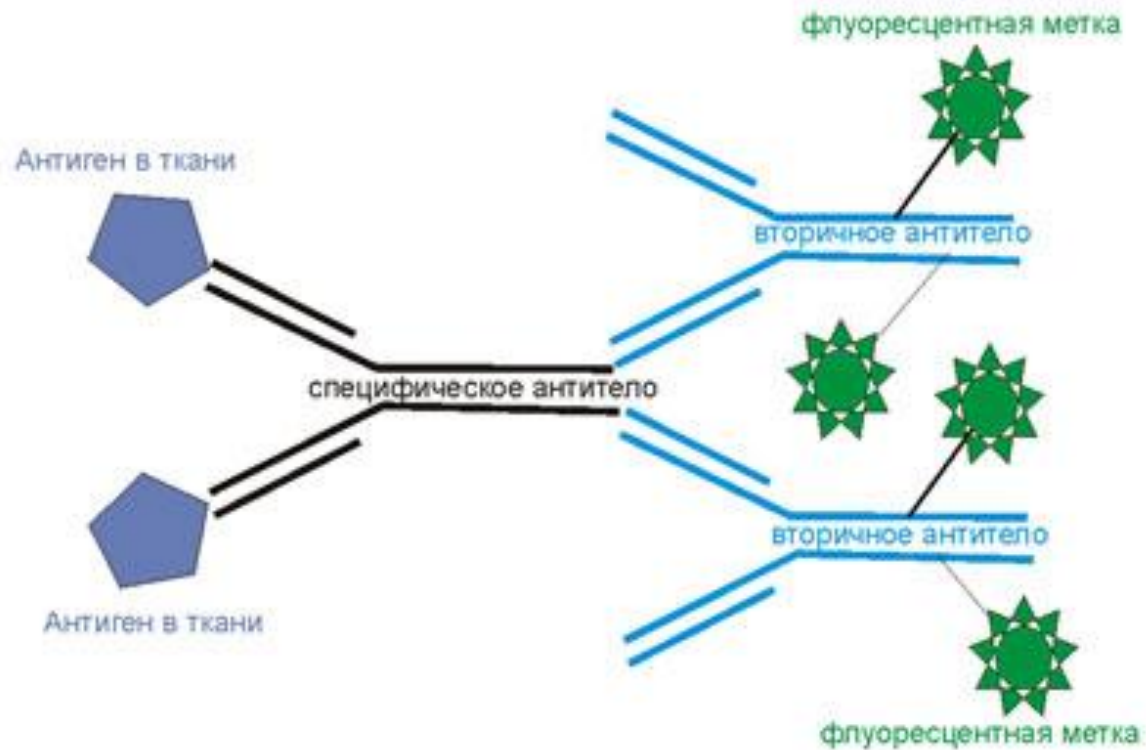
# Визуализация = Детекция

- Прямой метод

Достоинства	Недостатки
Простота в применении	Сложная технология получения антител → редкие и дорогие реагенты
Протокол короче	Не все антитела возможно конъюгировать с меткой
Нет перекрёстной реакции	Меньше чувствительность

# Визуализация = Детекция

- Непрямой метод



# Визуализация = Детекция

- Непрямой метод

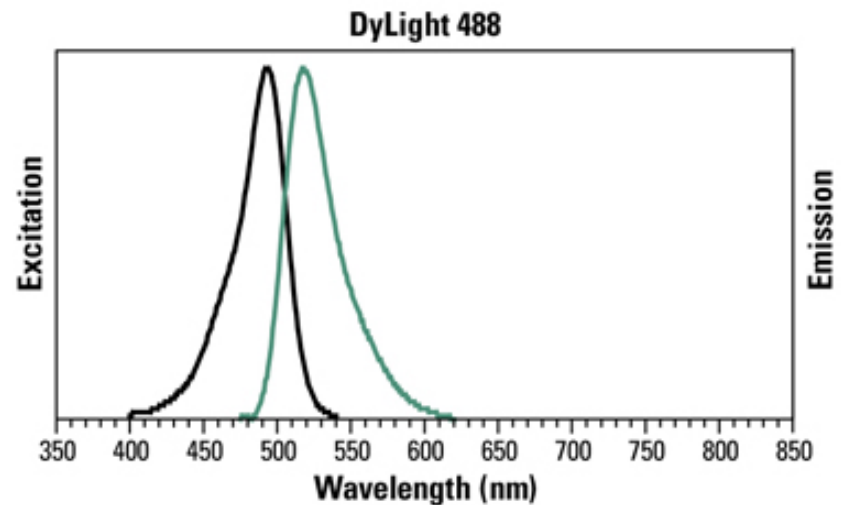
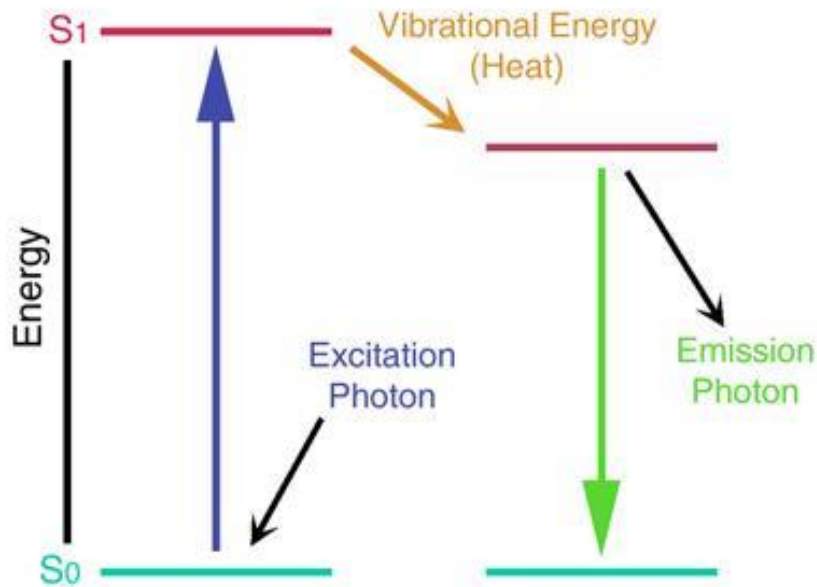
Достоинства	Недостатки
Чувствительность выше	Возможны перекрёстные реакции
Первичные антитела легче проникают в ткани	

# Визуализация = Детекция

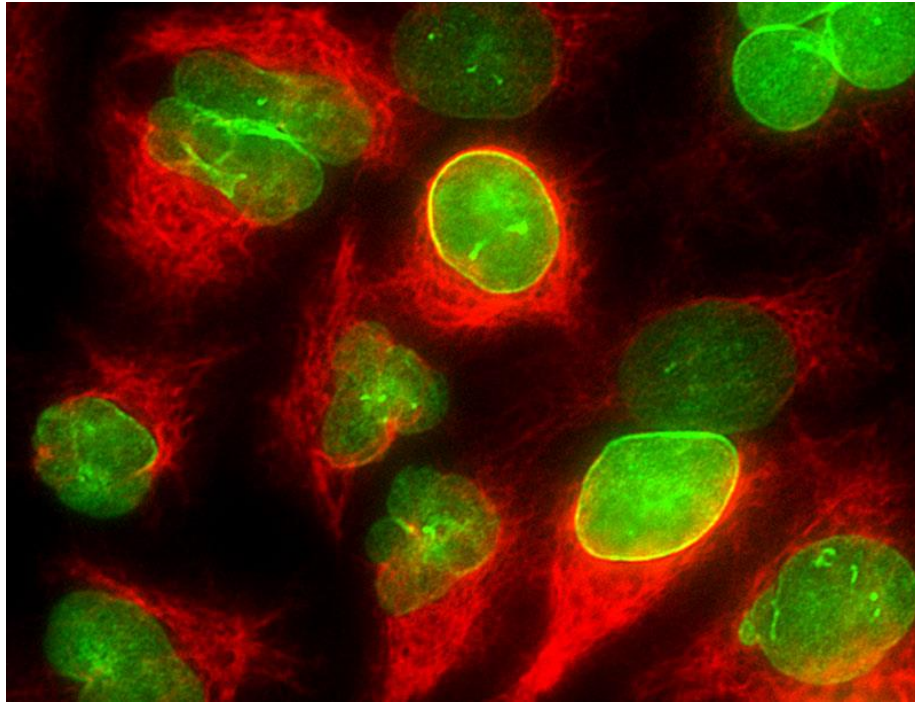
- флюорохромы;
- ферменты;
- металлы и металлопротеиды;
- радиоизотопы;
- промежуточные связующие вещества, например, биотин, дигоксин.

# Флуоресцентная метка

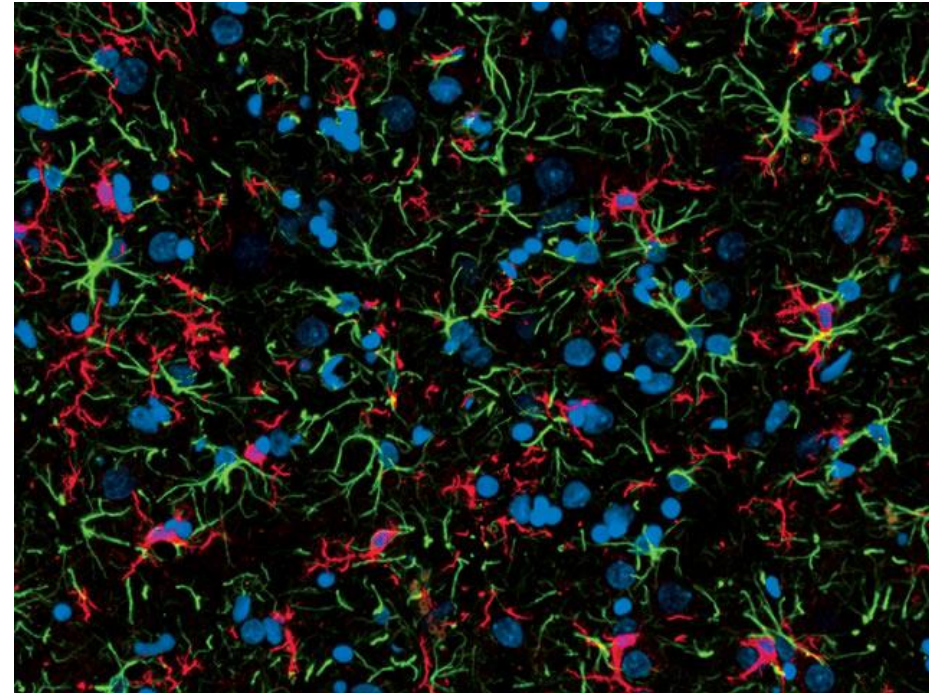
**Флуорохром** — молекула, испускающая при возбуждении свет определённой длины волны.



# Флуоресцентная метка



Cytokeratin 18 (red) and Lamin A (green) in A549 cells were fluorescently labeled with specific primary antibodies and DyLight 594-Conjugated Highly Cross-Adsorbed Goat Anti-Rabbit or DyLight 488-Conjugated Goat Anti-Mouse



Rat spinal cord labeled with an antibody cocktail of GFAP (DyLight 488) + Microglia (DyLight 549) and detected with a secondary cocktail of goat-anti-mouse 488 and goat-anti-rabbit 549

# Флуоресцентная метка

Достоинства	Недостатки
Наглядные красочные препараты	необходимость специального флуоресцентного микроскопа с набором барьерных фильтров
Возможность выявить несколько антигенов на одном препарате	низкая чувствительность метода
	сложность подготовки препаратов
	быстрое затухание флуоресценции, даже при использовании реагентов, снижающих данный эффект
	полученные препараты нельзя хранить
	не возможно оценить морфологию



# Металлы и металлопротеиды

Для получения препаратов с длительным сроком хранения можно использовать металлы, например, коллоидное золото. В результате реакции «антиген-антитело» в месте скопления антител в световом микроскопе обнаруживается окрашивание в темный цвет.

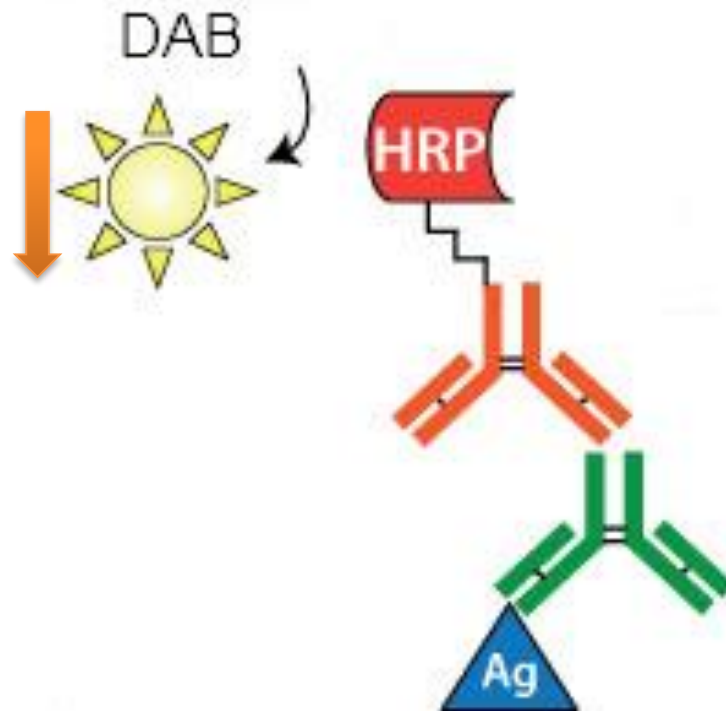
# Радиоизотопы

Радиоизотопы также используются очень редко из-за высокой опасности облучения персонала. Меченные радиоактивными метками антитела в данный момент используются только для исследований на живых культурах клеток. После обработки культуры ткани антителами с радиоактивными метками по степени излучения можно судить о количестве искомого антигена в тканях.

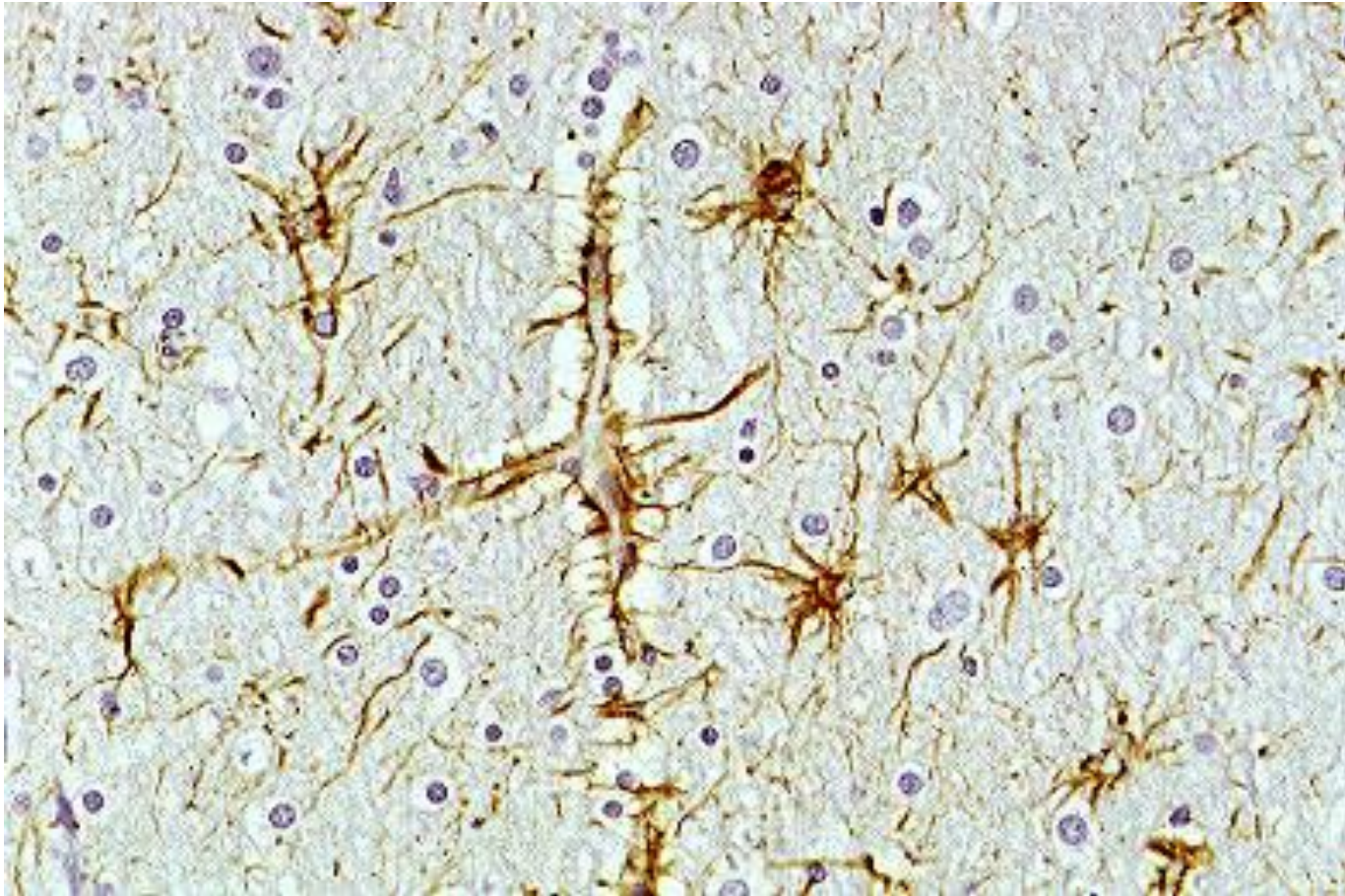
# Ферментная метка

- Иммуноферментные методы основаны на взаимодействии фермента, которым помечены антитела, с субстратом и образовании окрашенного конечного продукта реакции.
- Одна молекула фермента, конъюгированная с антителом, способна «обработать» большое количество молекул субстрата. Образовавшийся нерастворимый краситель накапливается в ткани вокруг фиксированного к антигену антитела

# Ферментная метка



# Ферментная метка



Астроциты в мозжечке

# Ферментная метка

Чаще всего в качестве ферментной метки используются:

- пероксидаза хрена (HRP),
- щелочная фосфатаза (AP),
- глюкозооксидаза.

# Ферментная метка

Пероксидаза и щелочная фосфатаза есть и в тканях организма, поэтому иногда можно получить ложноположительные результаты. При окраске активность эндогенных ферментов блокируется добавлением специальных растворов. Обычно они входят в состав системы детекции.

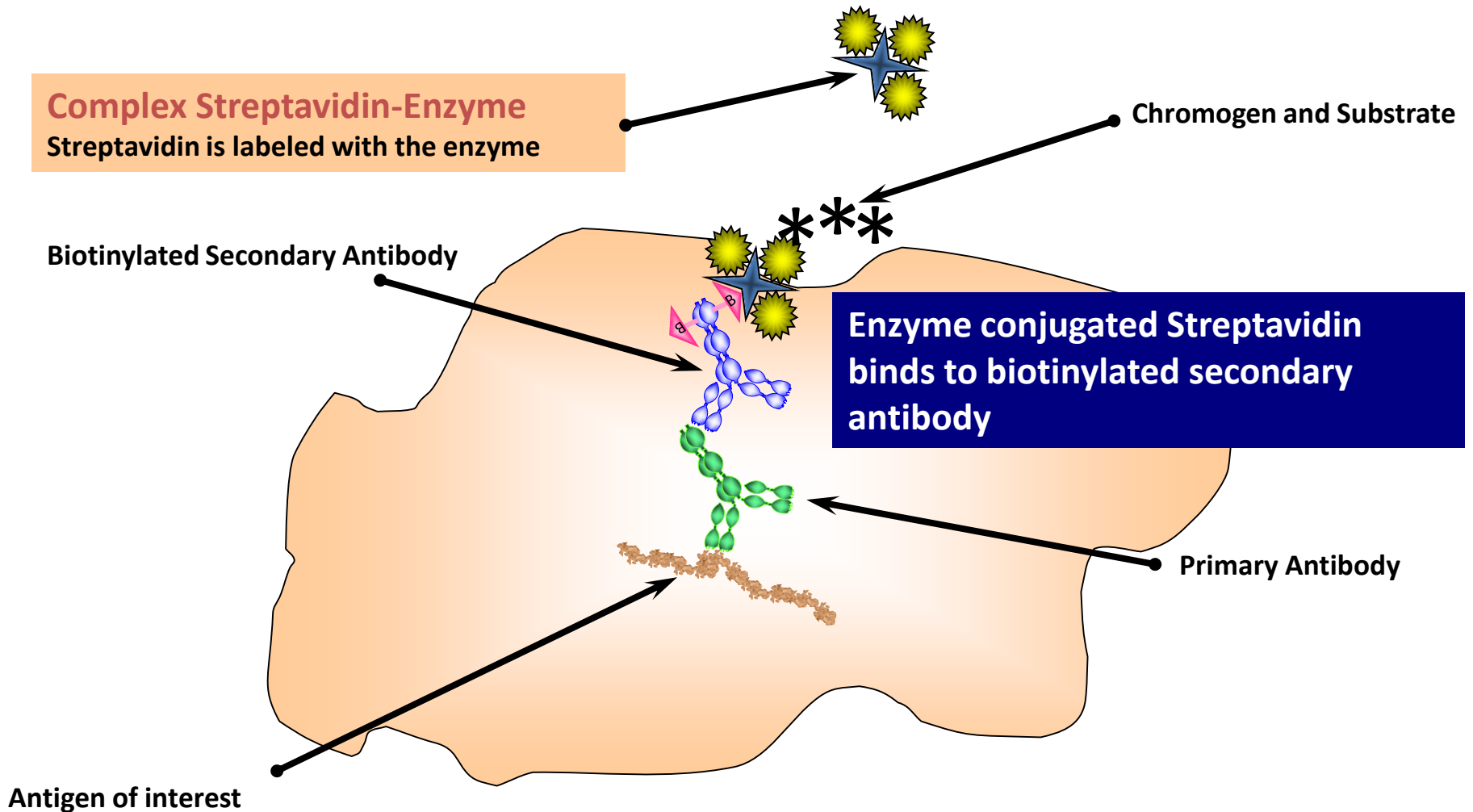
# Системы детекции (визуализации)

Это готовые к употреблению наборы реагентов для выявления первичных антител.





# Биотиновые системы



# Indirect Detection Systems

## ☑ Avidin-Biotin detection systems disadvantages

### ⇒ Possibility of non-specific reaction

- ✓ due to cross-reactivity of the secondary antibody (link)
- ✓ due to binding of endogenous biotin (typically enhanced with antigen retrieval)

*Note : All tissues have some amount of endogenous biotin and certain tissues have more than others :  
Kidney, Liver, Heart & Brain*

### ⇒ Cross-reactivity may occur with cell adhesion molecules

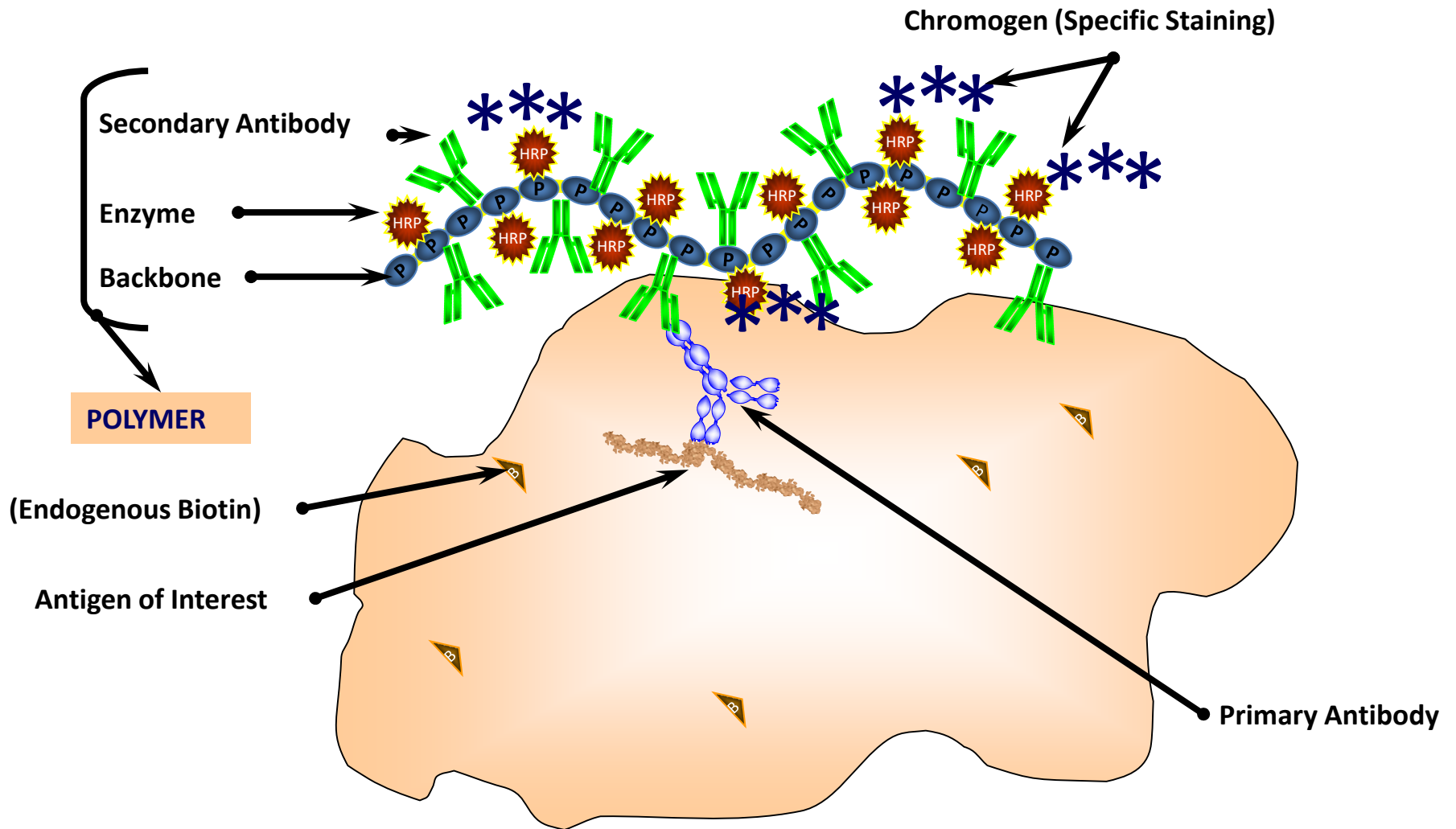
- ✓ Streptavidin has some homologous sequences to fibronectin.

Fibronectin is a general cell adhesion molecule found throughout the body used to anchor cells to collagen (“molecular glue”)

### ⇒ Protein blockers are required in the diluent to saturate all the aspecific protein binding sites (or a separate protein block step has to be employed)

- ✓ Eliminate background

# Полимерные системы



# Системы детекции (визуализации)

По структуре

- Биотиновые (ABC, LSAB)
- Безбиотиновые — полимерные и мультимерные
- Другие (PAP, APAAP, ...)

По специфичности:

- Моноспецифичные (антимышинные, антикроличьи)
- Универсальные

По протоколу использования

- 1-шаговые
- 2-шаговые
- 3-шаговые

# Системы детекции (визуализации)

По ферментной метке:

- HRP
- AP

По используемому хромогену

- DAB
- AEC
- другие

# Вспомогательные реагенты

- Промывочный буфер
- Разбавитель антител
- Блокирующие реагенты
- Буферы для демаскировки

# Промывка

- Вода. Следует использовать только деионизированную или дистиллированную воду.
- Промывочный буфер.  
Фосфатно-солевой (PBS) pH=7,4.  
Трис-буфер с твин 20.

# Разбавитель антител

- Следует использовать только специально предназначенный разбавитель.

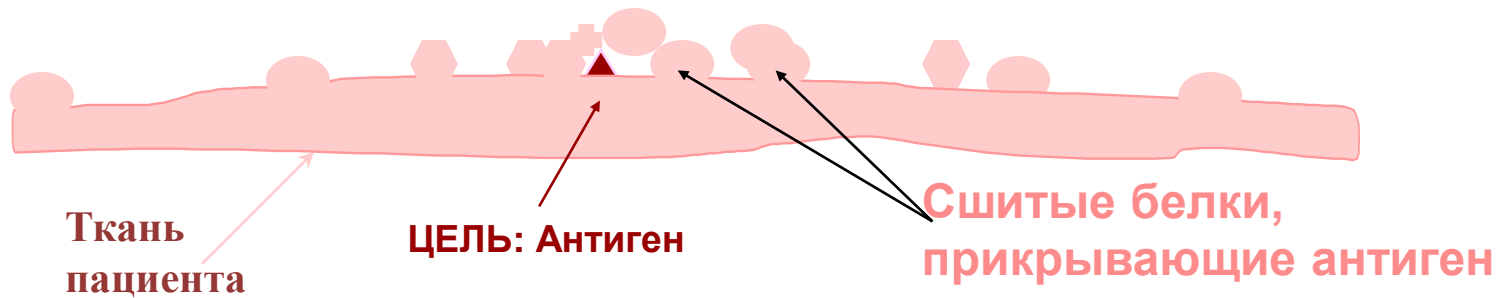




# Блокировки

- Блокировка эндогенной пероксидазы
- Блокировка эндогенной щелочной фосфатазы
- Блокировка эндогенного биотина
- Блокировка неспецифического связывания

# Демаскировка

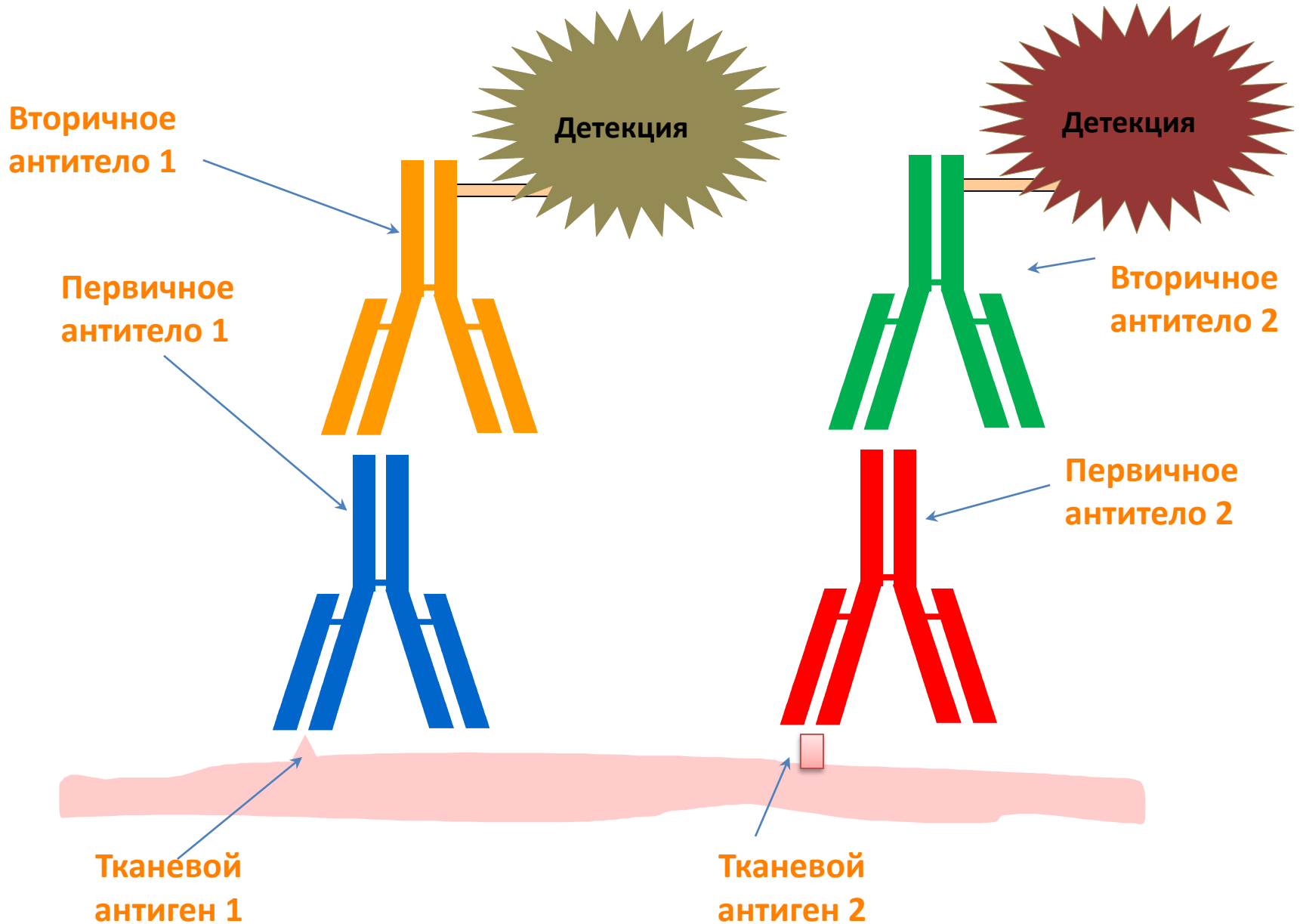


# Демаскировка

- Тепловая
- Протеолитическая












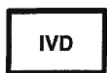





# Двойная метка



# Маркировка реагентов

- IVD – in vitro diagnostic
- RUO – research use only
- CE – разрешены к применению в Евросоюзе
- FDA approved – разрешены к применению в США

# Маркировка реагентов

	Do not reuse		Manufacturer		Temperature limitation
	Use by YYYY- MM-DD		Authorized representative		Keep stand up
	Lot number		Contains sufficient for <n> tests		Fragile
<b>SN</b>	Serial number		In Vitro diagnostic medical device		Keep out of humidity
	Part number		Upper limit of temperature		
	Consult instruction for use		Lower limit of temperature		

# Контроли

- Положительный контроль антигена
- Отрицательный контроль антигена
- Отрицательный контроль антител

# Пробоподготовка

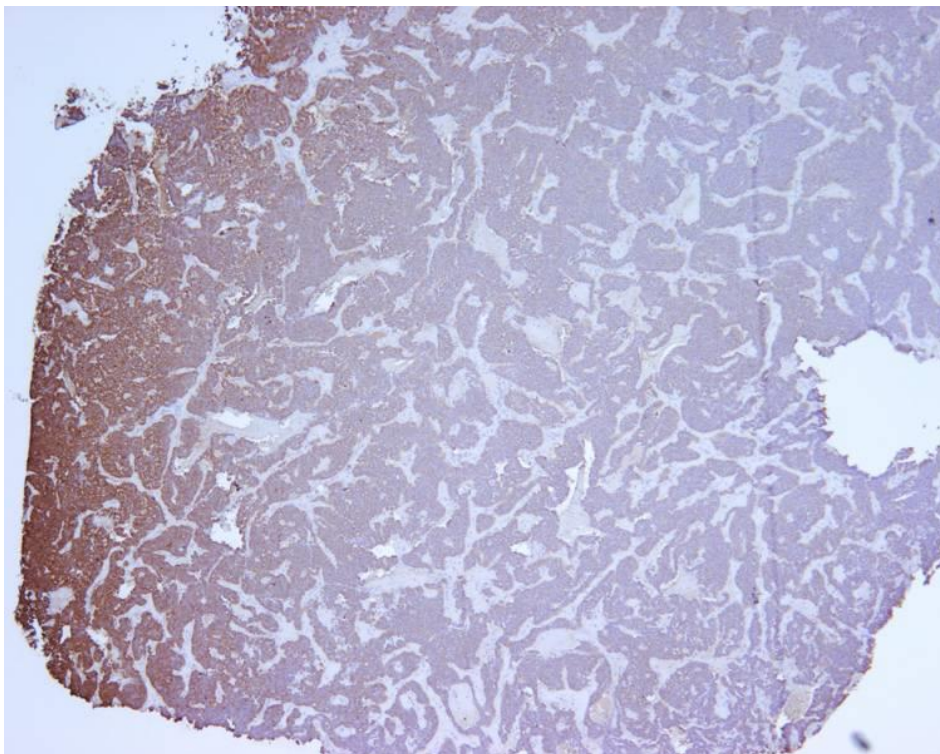
Факторы влияющие на качество ИГХ-окрашивания

- Фиксация
- Проводка
- Заливка
- Микротомия
- Используемые стёкла и адгизивы
- Условия демаскировки
- Используемые реагенты
- Соблюдение условий протокола

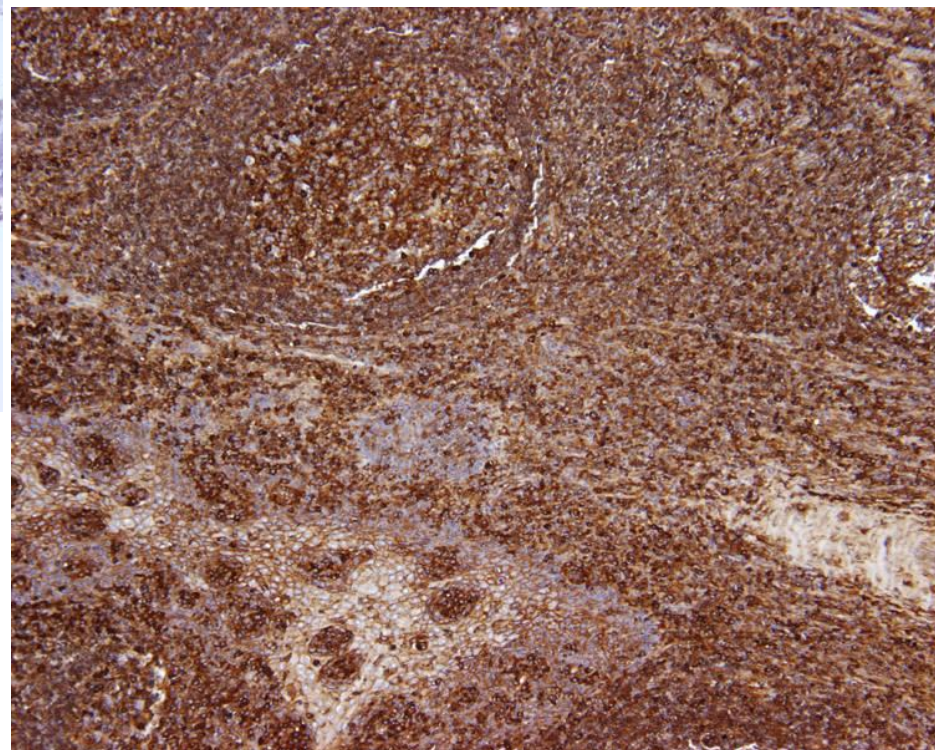


# Фиксация

Недофиксированная ткань



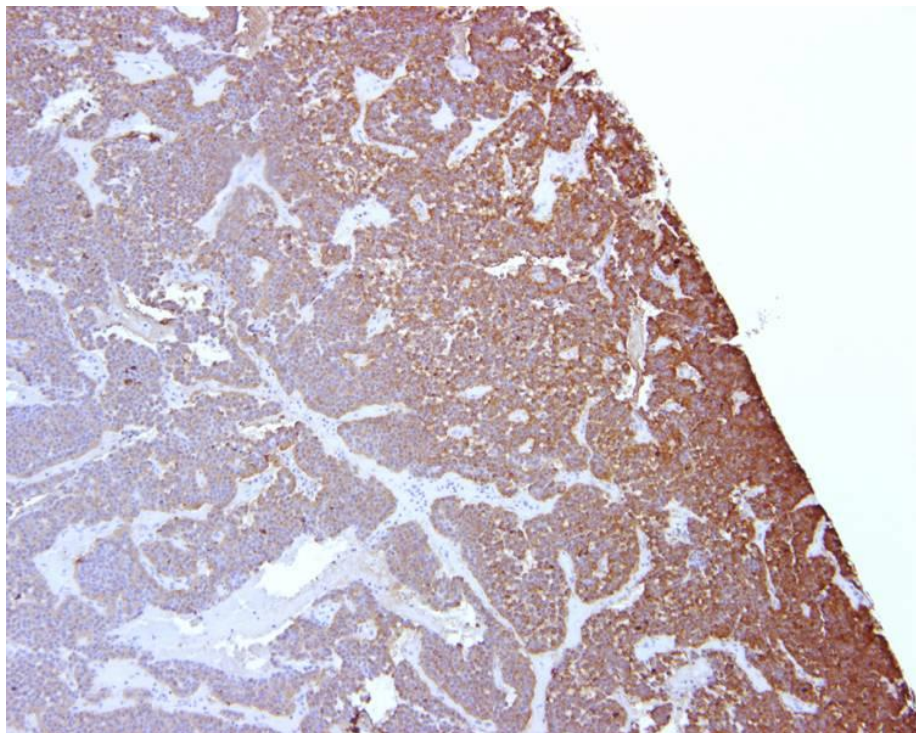
Перефиксированная ткань



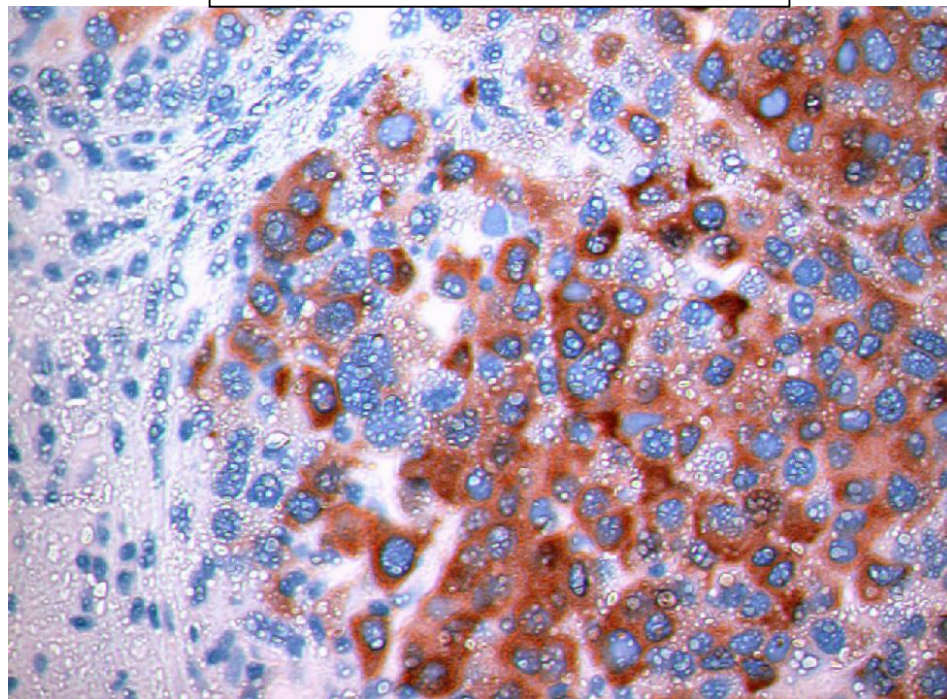


# Проводка и заливка

Краевой эффект из-за старого спирта



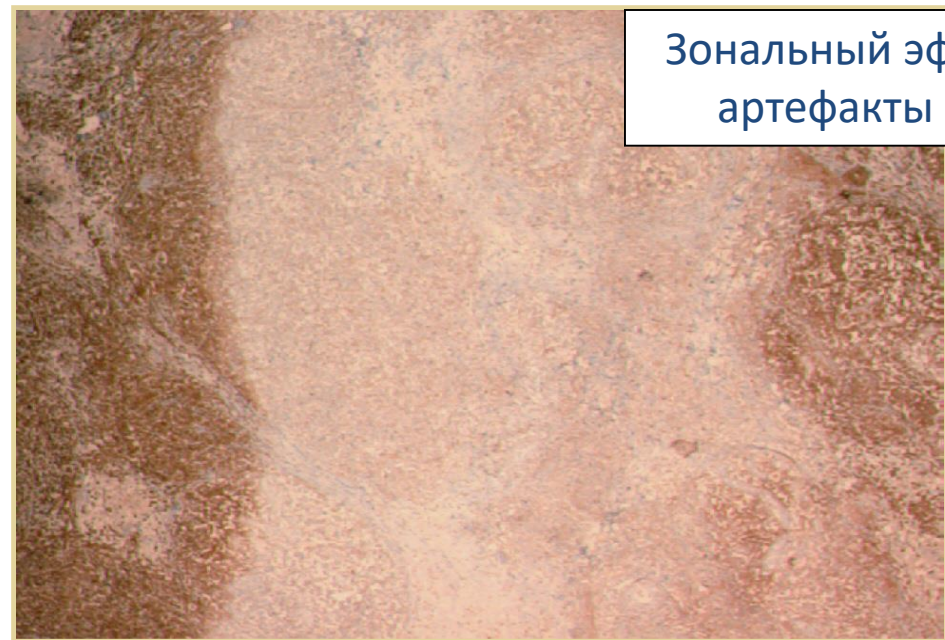
Эффект «пузырьков» — парафин низкого качества



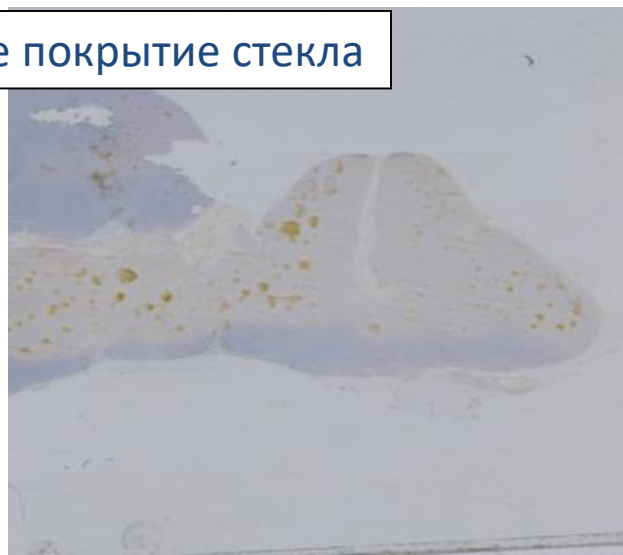
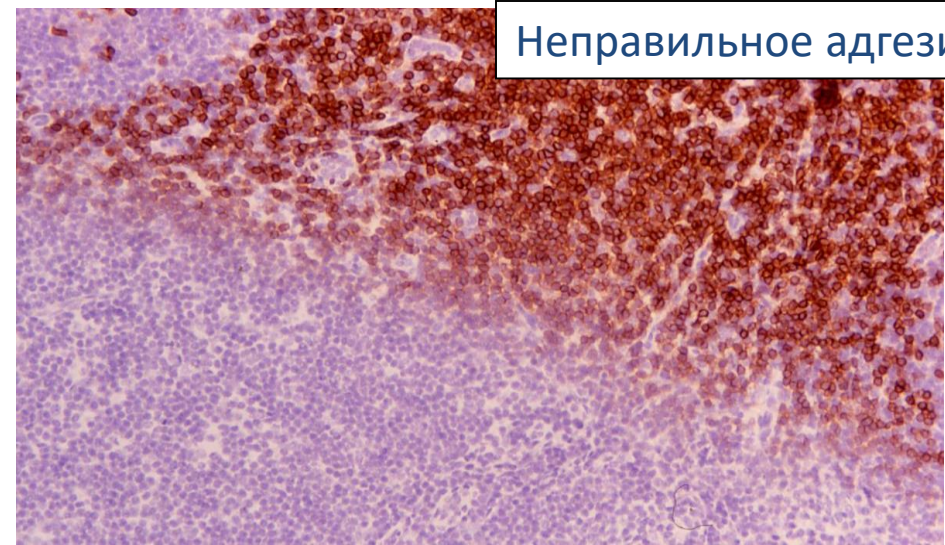


# Подготовка препаратов

Зональный эффект, волны —  
артефакты микротомии



Неправильное адгезивное покрытие стекла

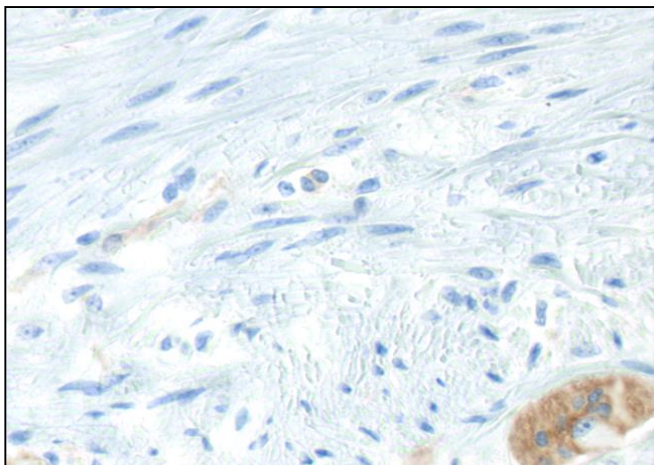




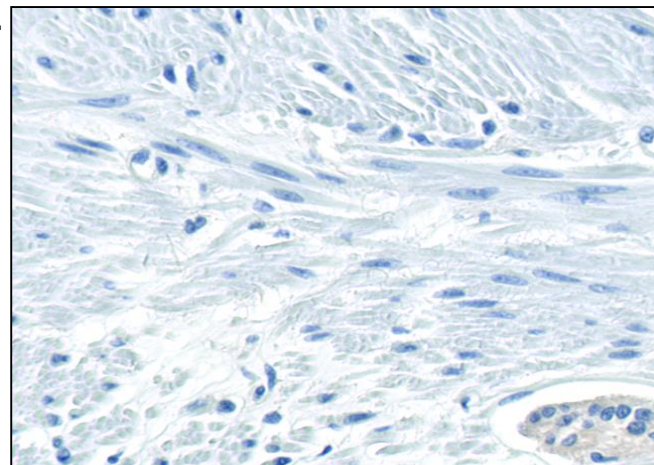
# Демаскировка антигенов

## Ручная демаскировка

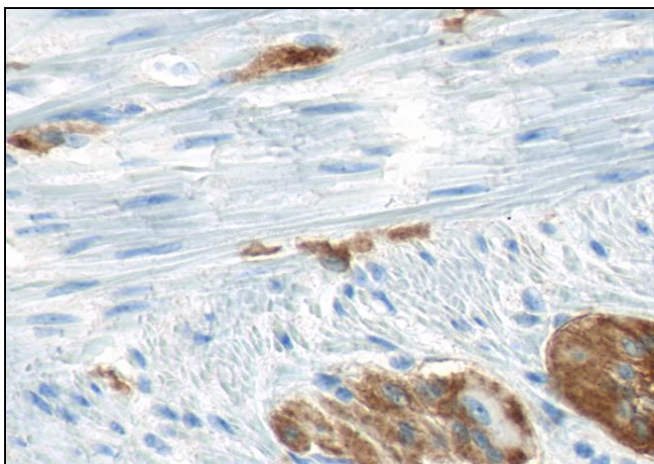
**СВЧ 250 Ватт**  
**EDTA буфер pH=9 — 30 мин.**  
**CD56 — 32 мин.**



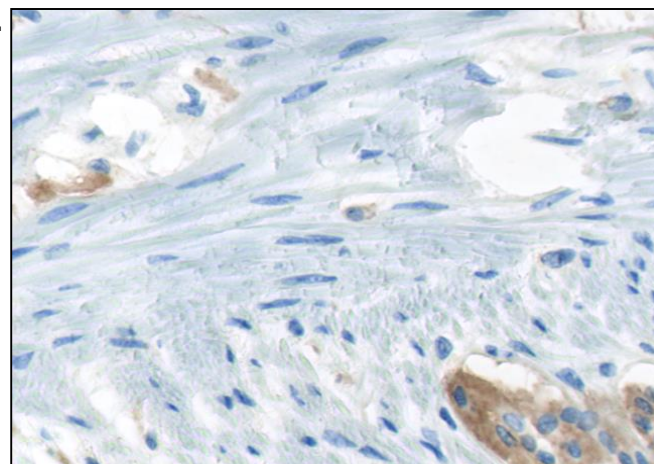
**СВЧ 250 Ватт**  
**Боратный буфер pH=7 — 30 мин.**  
**CD56 — 32 мин.**



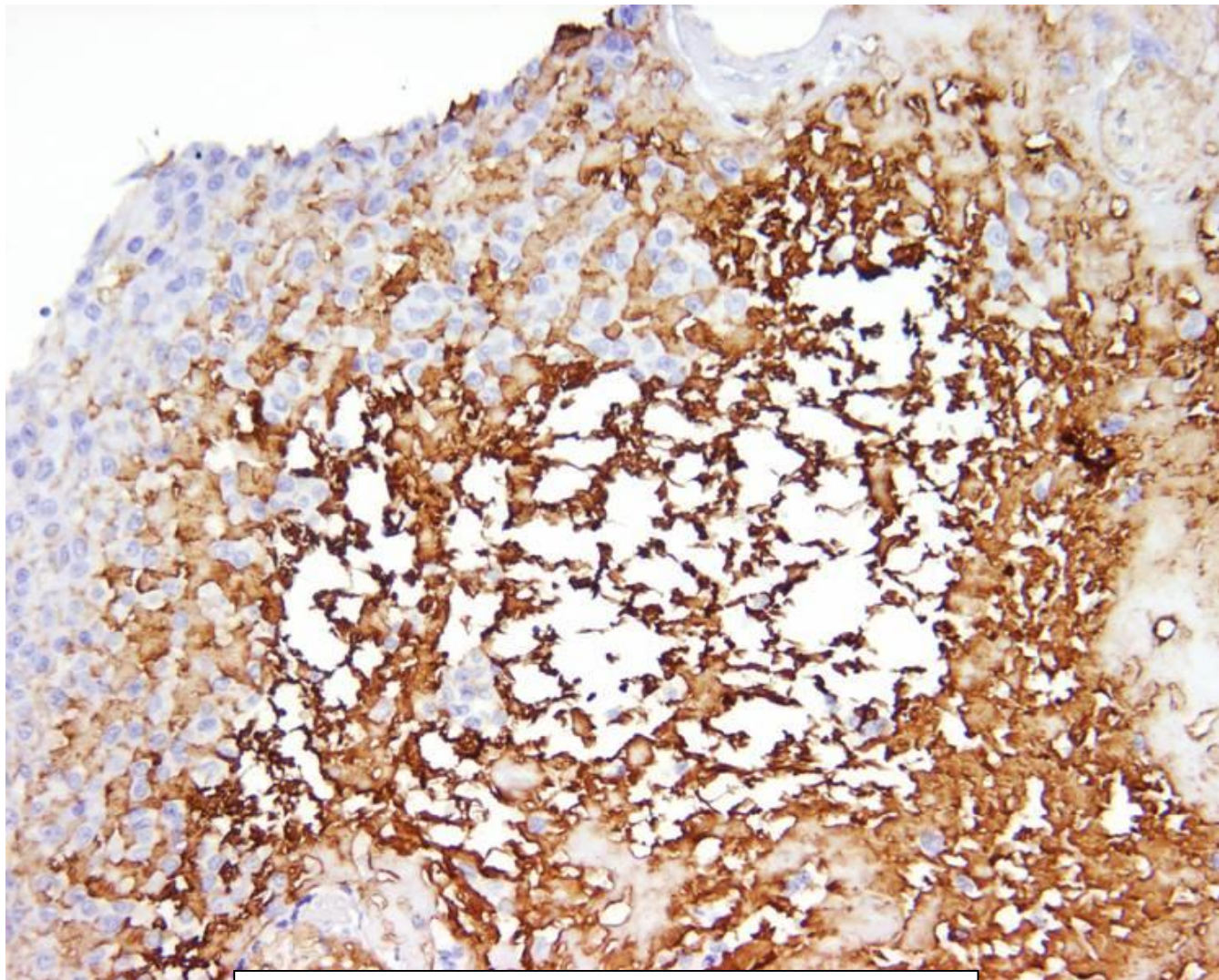
**СВЧ 350 Ватт**  
**EDTA буфер pH=9 — 30 мин.**  
**CD56 — 32 мин.**



**СВЧ 350 Ватт**  
**Цитратный буфер pH=7,3 — 30 мин.**  
**CD56 — 32 мин.**



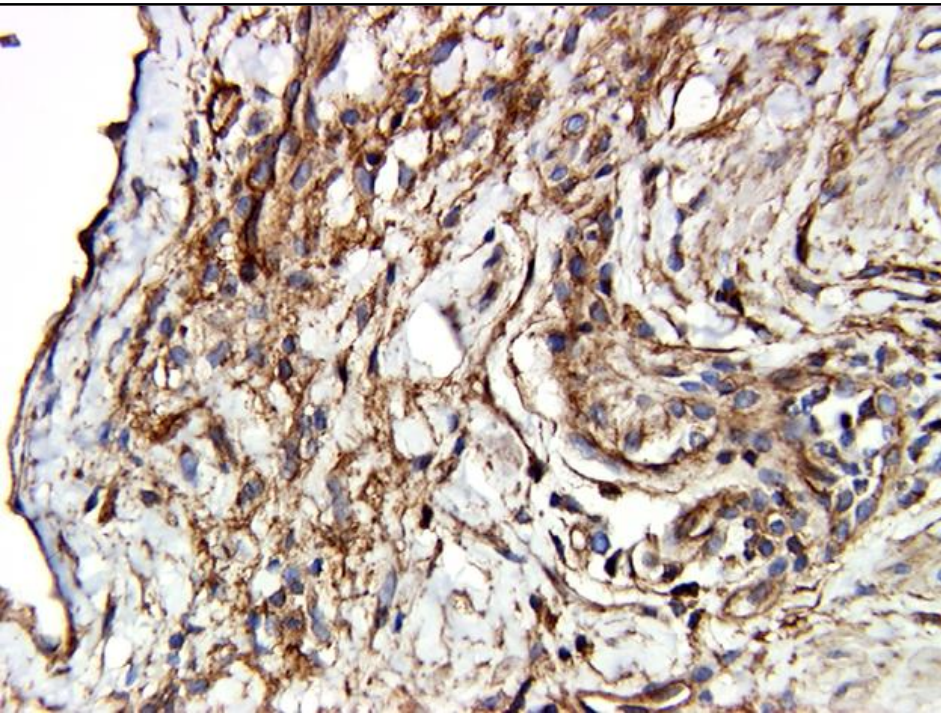
# Демаскировка антигенов



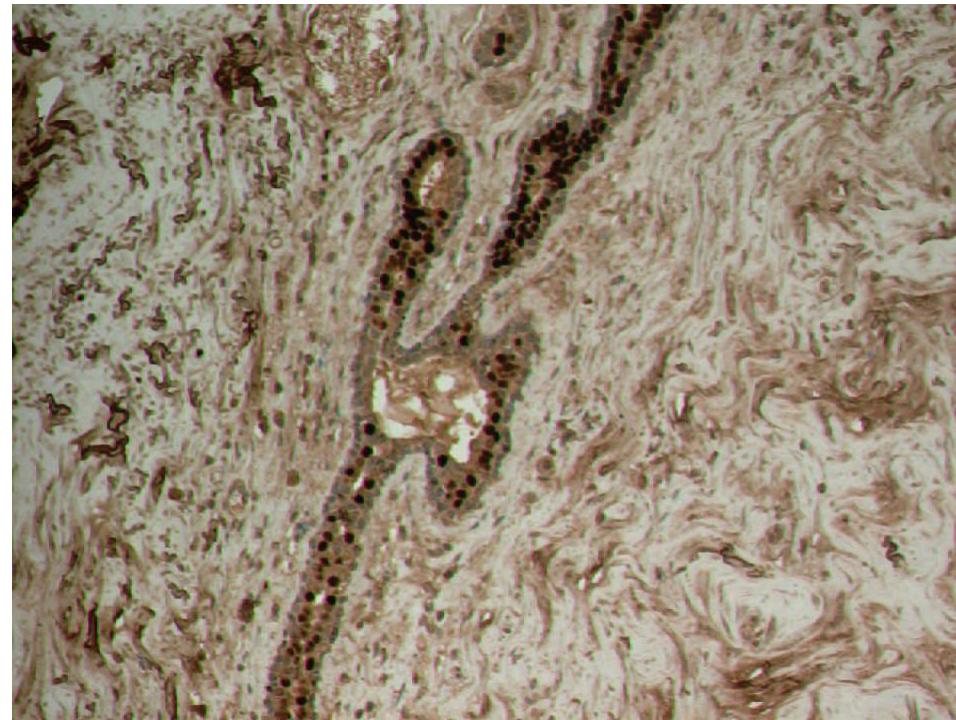
Неадекватные условия демаскировки



# Инкубация в антителах



Отсутствие специфической реакции



Слишком высокая  
концентрация антител

# Стандартизация приготовления препаратов



# Протокол окраски

- Депарафировать срезы в ксилоле и регидратировать в серии спиртов нисходящей концентрации.
- Провести демаскировку антигенов. Условия демаскировки указаны в инструкции к первичным антителам.
- Промыть 3 раза в фосфатно-солевом буфере pH=7,4 (PBS).
- Можно обвезти срезы гидрофобным карандашом.
- Нанести на стекло несколько капель (так, чтобы покрыть образец) раствора для блокировки эндогенной пероксидазы. Инкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре во влажной камере.
- Промыть 2 раза PBS.
- Нанести на стекло несколько капель раствора для блокировки неспецифического связывания антител и инкубировать 10 мин при комнатной температуре во влажной камере. Это необходимо для того, чтобы убрать неспецифическое фоновое окрашивание.



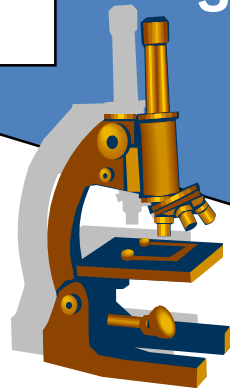
# Протокол окраски

- Не промывая слить раствор для блокировки неспецифического связывания антител.
- Нанести первичные антитела и инкубировать во влажной камере в соответствии с инструкцией производителя.
- Промыть 3 раза в буфере PBS.
- Нанести последовательно компоненты системы в соответствии с инструкцией производителя. Инкубацию проводить во влажной камере. Между этапами может потребоваться промывка в PBS. Интенсивность окрашивания хромогеном рекомендуется контролировать под микроскопом.
- Промыть 3 раза в буфере PBS.
- Подкрасить гематоксилином (если требуется) в течение 1 мин.
- Промыть водой.
- Дегидратировать и заключить как обычный препарат.

# Протокол окраски



Депарафинизация  
Демаскировка  
Первичные АТ  
Детекция  
Подкраска  
Заключение

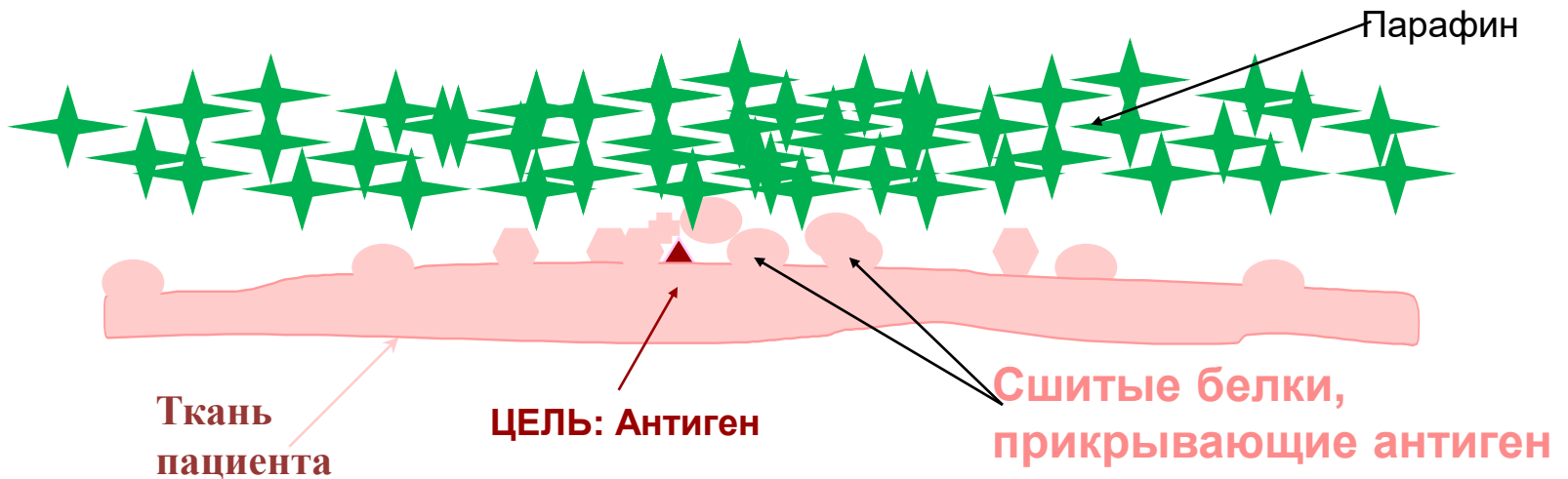


**Анализ в микроскопе**

# Начало

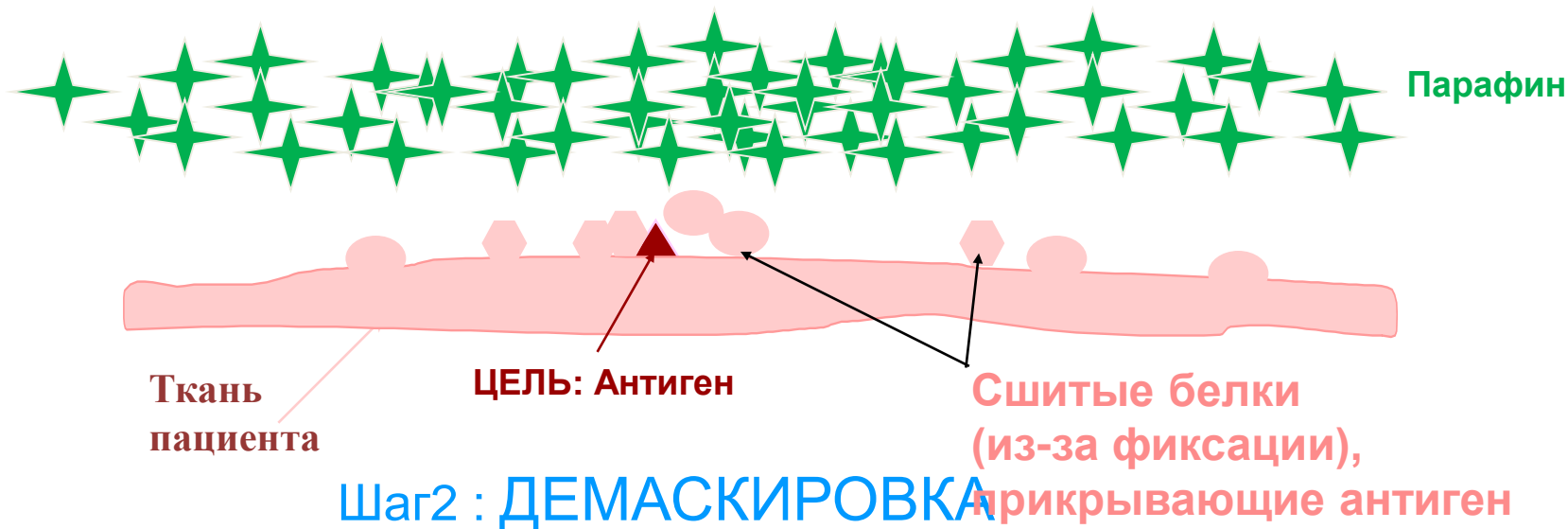


**Фиксированная в формалине и залитая в парафин  
ткань. Срез не стекле.**



# Депарафинизация и демаскировка

## Шаг 1 : ДЕПАРАФИНИЗАЦИЯ

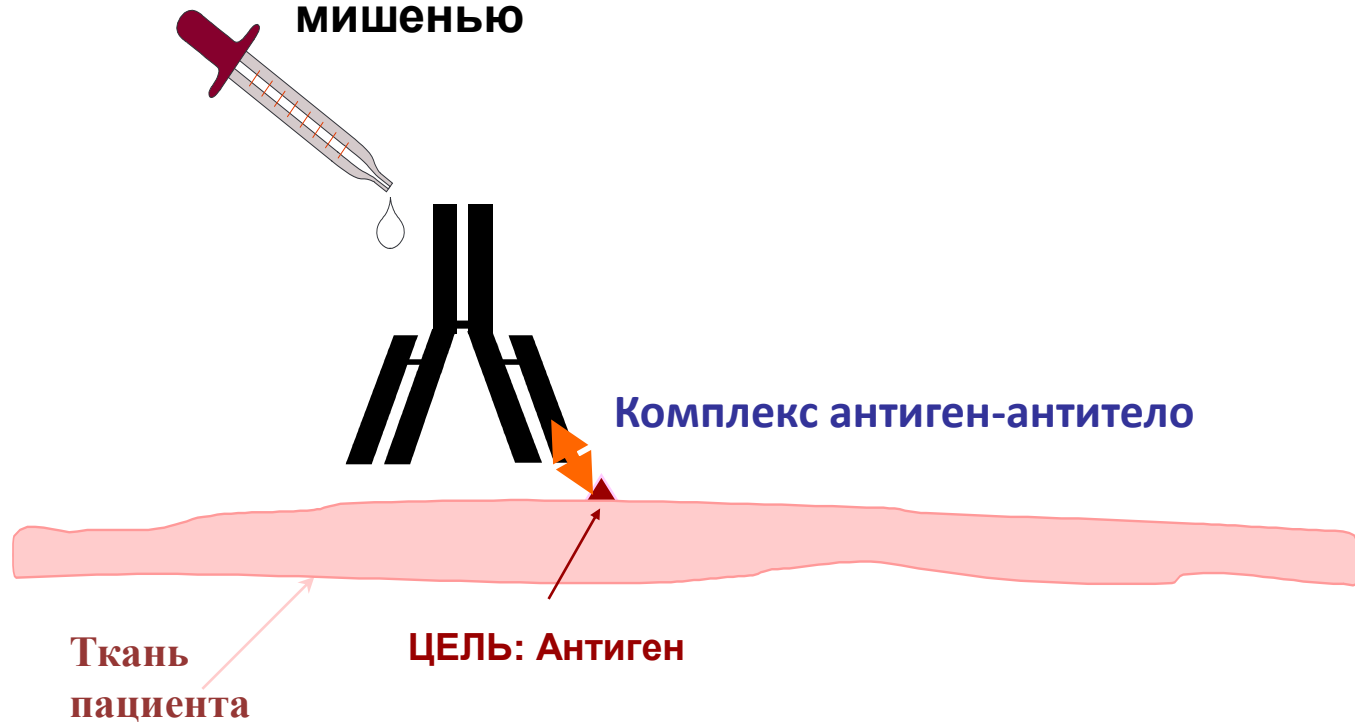


(удаление белков, прикрывающих антиген)

# Создание комплекса антиген-антитело

Шаг3 : ИНКУБАЦИЯ В ПЕРВИЧНЫХ  
АНТИТЕЛАХ

**Антитело связывается с  
мишенью**



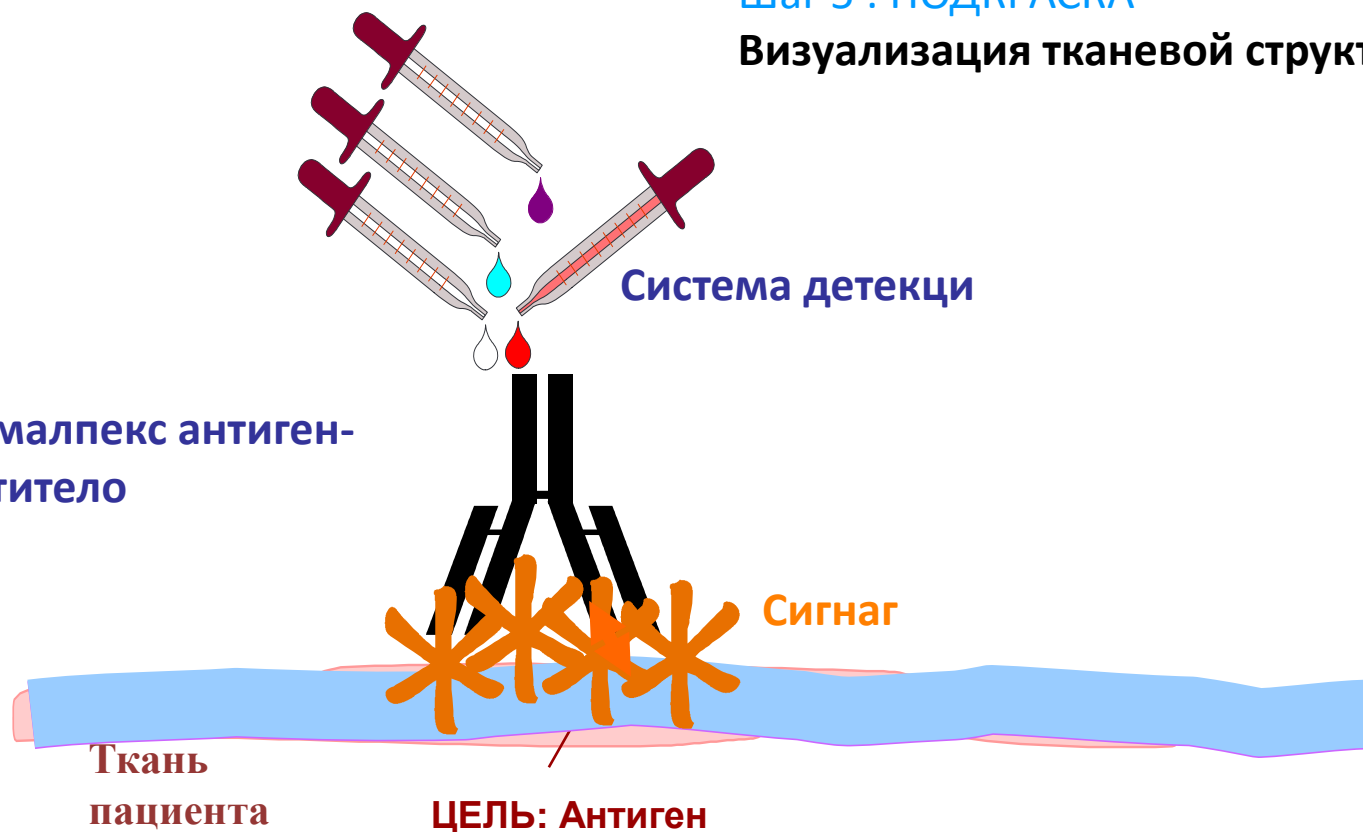
# Визуализация и подкраска

Шаг 4 : ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Комплекса антиген-антитело

Шаг 5 : ПОДКРАСКА

Визуализация тканевой структуры



## Заключение:

Дегидратация,  
Монтирующая среда.  
Покровное стекло



# Автоматизация ИГХ





**Благодарю за внимание!**