



先简要介绍几个概念。

免疫组化最常用的是 DAB (二氨基联苯胺) 染色法, 其检测原理主要是首先通过酶标羊抗小鼠 / 兔 IgG 聚合物识别连接在组织切片上的一抗, 再加入 DAB 染色液后, 聚合物上的辣根过氧化物酶可以催化 DAB 中的 H_2O_2 分解, 使联苯胺氧化成联苯亚胺, 从而使组织切片中一抗结合的抗原位点出现黄色或黄棕色。此外, 还需要用苏木素将组织切片细胞核复染成蓝色。

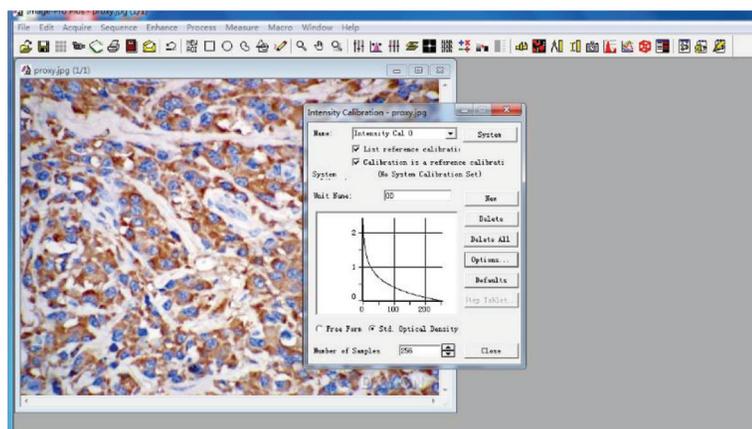
免疫组化图片数据可以使用图像分析软件进行定量分析。累积光密度 (IOD), 就是把图片上每个棕色点的光密度值全部累加起来得到的值。平均光密度 (Mean density) 就是用 IOD 除以有效目标分布

区域的面积 (area) 所得到的值。免疫组化照片主要是比较组别间平均光密度的大小。今天给大家介绍最常用的图像分析软件: ImagePro Plus 的基本使用方法。

1. 校正图片光密度

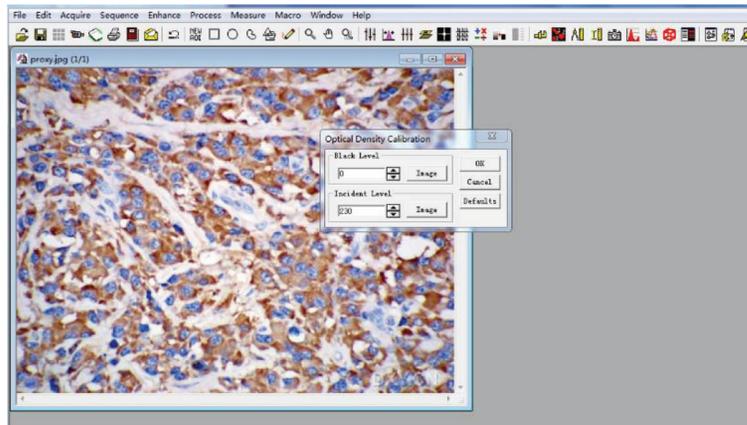
(1) 点击 file-open, 打开一张图片, 然后点击: measure -calibration- intensity, 调出 intensity 校正窗口。

(2) 在窗口里点 new, 新建一个 calibration set, 然后选择 std option density, 这时窗口中的直线变成了反向的曲线。



(3) 定白点，扣除背景。点 option，在弹出的小窗口里设置 black level 为 0，点 image 按钮，然后在图片上各个最白的地方点一下，在其显示的数值中

选择一个差不多的整数，比如 230，或 220。最后在 incident level 中把默认的 255 改为 230 或 220。点击 OK。

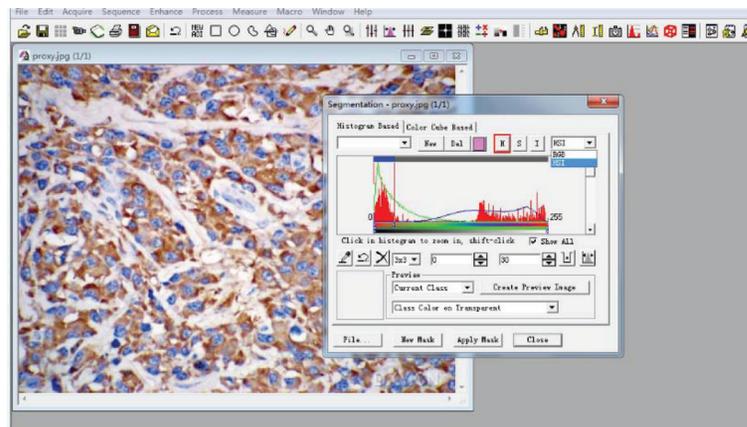


(4) 点击右上角的 system 按钮，最后点击 close 关闭窗口。设置后测量的光密度值与样品浓度呈正比关系。

2. 选色

点击 process，在 segmentation 中点击右上角的下拉菜单，选择使用 HSI 颜色系统，H 为色调，

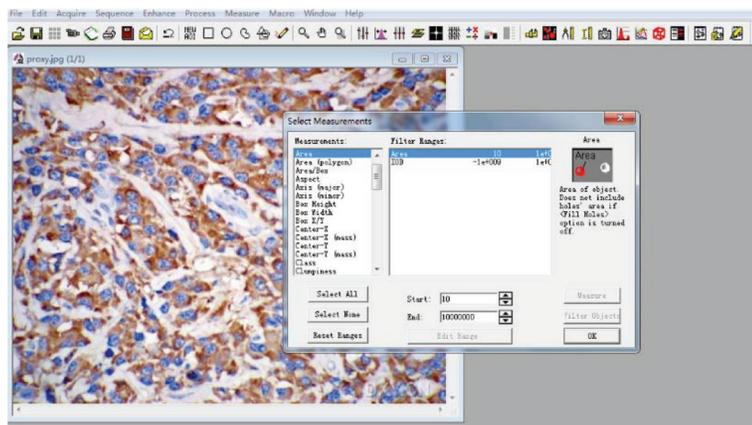
S 为色饱和度，I 为强度。设置 H:0-30、S:0-255、I:0-230，然后点 file-save file。默认的保存文件名是 rgb24.rge。注意 HSI 的选择范围是根据图片情况调整。



3. 设置分析环境

(1) 点击 measure，选择 count/size，点击 se-

lect measurement。一般选择 IOD 和默认的 area 进行测量。(area 的过滤值，默认为 10，可以设置到 25-50，去掉小的杂点)



(2) 点击 option, outline 下拉选择 filled, label style 下拉选择 none, smoothing 设置 1, 其他的不选。点击 OK。

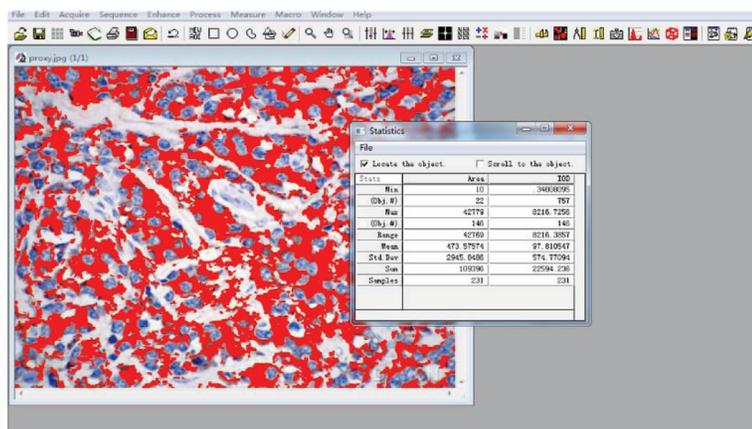
(3) 在 count/size 窗口中点 file--file save settings。保存环境设置文件。

4. 测量

(1) 用 irregular 工具画出测量区域。

这里需要区别是否要圈定测量区域：当测量整张照片的光密度时，就不必画测量区域。如果照片有些地方需要剔除，例如有个角正处于切片边缘，没有细胞，需要把这个角上的空白面积扣掉，此时画的“测量区域”就应该沿着样品的边缘来画。

(2) 点击 count 按钮。测量数据在 view statistics 窗口中，读取 IOD SUM 数值，作为这张照片的累积光密度值。



5. 数据处理

(1) 测量每张照片的 IOD SUM，如果有选定测量区域，还需测量 area。平均光密度，反映了这张照片上免疫反应物的表达强度。mean density = (IOD SUM)/area, mean density 和 IOD 都是个相对值，所

以是没有单位的。

首先分别测量出每组中每个样品几张照片的 mean density，然后算出平均值作为这个样品的 mean density。一个实验组的几个样品测量值可以计算其平均值与标准差，最后用这个平均值来统计各组间的差异。