免疫组化原理技术

免疫组化是应用免疫学基本原理——抗原抗体反应，即抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质)，对其进行定位、定性及定量的研究，称为免疫组织化学技术(immunohistochemistry)或免疫细胞化学技术(immunocytochemistry)。

众所周知，抗体与抗原之间的结合具有高度的特异性。免疫组化正是利用这一特性，即先将组织或细胞中的某些化学物质提取出来，以其作为抗原或半抗原去免疫小鼠等实验动物，制备特异性抗体，再用这种抗体(第一抗体)作为抗原去免疫动物制备第二抗体，并用某种酶(常用辣根过氧化物酶)或生物素等处理后再与前述抗原成分结合，将抗原放大，由于抗体与抗原结合后形成的免疫复合物是无色的，因此，还必须借助于组织化学方法将抗原抗体反应部位显示出来(常用显色剂 DAB 显示为棕黄色颗粒)。通过抗原抗体反应及呈色反应，显示细胞或组织中的化学成分，在显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能够在细胞或组织原位确定某些化学成分分布、含量。组织或细胞中凡是能作抗原或半抗原的物质，如蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、磷脂、受体、酶、激素、核酸及病原体等都可用相应的特异性抗体进行检测。

免疫组织化学技术按照标记物的种类可分为免疫荧光法、免疫酶法、免疫铁蛋白法、免疫金法及放射免疫自影法等。

用于病理诊断的主要有免疫荧光法和免疫酶法。免疫荧光法是现代生物学和医学中广泛应用的方法之一，包括荧光抗体和荧光抗原技术，具有抗原抗体反应的特异性，染色技术的快速性，在细胞或组织上定位的准确性，以及荧光效应的灵敏性等优势。但是，由于免疫荧光法必须具有荧光显微镜，荧光强度随时间的延长而逐渐消退，结果不易长期保存等缺点，在普及应用上受到一定限制，而逐渐被免疫酶法所取代。

免疫组化技术优点

(1) 特异性强

免疫学的基本原理决定了抗原与抗体之间的结合具有高度特异性，因此，免疫组化从理论上讲也是组织细胞中抗原的特定显示，如角蛋白(keratin)显示上皮成分，LCA 显示淋巴细胞成分。只有当组织细胞中存在交叉抗原时才会出现交叉反应。

(2) 敏感性高

在应用免疫组化的起始阶段，由于技术上的限制，只有直接法、间接法等敏感性不高的技术，那时的抗体只能稀释几倍、几十倍；现在由于 ABC 法或 SP 法的出现，使抗体稀释上千倍、上万倍

甚至上亿倍仍可在组织细胞中与抗原结合，这样高敏感性的抗体抗原反应，使免疫组化方法越来越方便地应用于常规病理诊断工作。

(3) 定位准确、形态与功能相结合

该技术通过抗原抗体反应及呈色反应，可在组织和细胞中进行抗原的准确定位，因而可同时对不同抗原在同一组织或细胞中进行定位观察，这样就可以进行形态与功能相结合的研究，对病理学研究的深入是十分有意义的。

免疫组化实验步骤

1 仪器设备

- (1) 18cm 不锈钢高压锅或电炉或医用微波炉；
- (2) 水浴锅

2 试剂

- (1) PBS 缓冲液 (pH7.2~7.4)：NaCl 137mmol/L，KCl 2.7mmol/L，Na₂HPO₄ 4.3mmol/L，KH₂PO₄ 1.4mmol/L。
- (2) 0.01mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (CB, pH6.0, 1000ml)：柠檬酸三钠 3g，柠檬酸 0.4g。
- (3) 0.5mol/L EDTA 缓冲液 (pH8.0)：700ml 水中溶解 186.1gEDTA • 2H₂O，用 10 mmol/L NaOH 调至 pH8.0,加水至 1000ml。
- (4) 1mol/L 的 TBS 缓冲液 (pH8.0)：在 800ml 水中溶解 121gTris 碱，用 1N 的 HCl 调至 pH8.0,加水至 1000ml。
- (5) 酶消化液：a、0.1%胰蛋白酶液：用 0.1%CaCl₂(pH7.8) 配制。 b、0.4%胃蛋白酶液：用 0.1N 的 HCl 配制。
- (6) 3%甲醇-H₂O₂ 溶液：用 30%H₂O₂ 和 80%甲醇溶液配制。
- (7) 封裱剂：
a 甘油和 0.5mmol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.0~9.5) 等量混合；

b 油和 TBS(或 PBS)配制。

(8) TBS/PBS pH9.0~9.5, 适用于荧光显微镜标本; pH7.0~7.4 适合于光学显微镜标本。

3 操作流程

(1) 脱蜡和水化

脱蜡前, 应将组织芯片在室温中放置 60 分钟或 60℃恒温箱中烘烤 20 分钟。

1)组织芯片置于二甲苯中浸泡 10 分钟, 更换二甲苯后再浸泡 10 分钟;

2)无水乙醇中浸泡 5 分钟;

3)95%乙醇中浸泡 5 分钟;

4)70%乙醇中浸泡 5 分钟;

(2) 抗原修复

用于福尔马林固定的石蜡包埋组织芯片。

1)抗原热修复

在沸水中加入 EDTA (pH8.0) 或 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液 (pH6.0)。盖上不锈钢高压锅的盖子, 但不进行锁定。将玻片置于金属染色架上, 缓慢加压, 使玻片在缓冲液中浸泡 5 分钟, 然后将盖子锁定, 小阀门将会升起来。10 分钟后, 去除热源, 置入凉水中, 当小阀门沉下去后打开盖子。本方法适用于较难检测或核抗原的抗原修复。

2)煮沸热修复

电炉或者水浴锅加热 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 至 95℃左右, 放入组织芯片加热 10~15 分钟。

3)微波热修复

在微波炉里加热 0.01M 枸橼酸钠缓冲溶液 (pH6.0) 至沸腾后将组织芯片放入, 断电, 间隔 5~10 分钟, 反复 1-2 次。适用的抗原有: AR, Bax, Bcl-2, C-fos, X-jun, C-kit, C-myc, E-cadherin,

Chromogranin A, Cyclin, ER, Heat shock protein, HPV, Ki-67, MDMZ, p53, p34, p16, p15, P-glycoprotein, PKC, PR, PCNA, ras, Rb, Topoismerase II 等。

4)酶消化方法

常用 0.1%胰蛋白酶和 0.4%胃蛋白酶液。胰蛋白酶使用前预热至 37℃，切片也预热至 37℃，消化时间约为 5~30 分钟；胃蛋白酶消化 37℃时间为 30 分钟。适用于被固定遮蔽的抗原，其中有：Collagen, Complement, Cytokeratin, C-erB-2, GFAP, LCA, LN 等。

(3) 免疫组织化学染色

SP 法

- 1)脱蜡、水化；
- 2) PBS 洗 2~3 次各 5 分钟；
- 3)3%H₂O₂（80%甲醇）滴加在 TMA 上，室温静置 10 分钟
- 4)PBS 洗 2~3 次各 5 分钟；
- 5)抗原修复；
- 6)PBS 洗 2~3 次各 5 分钟；
- 7)滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟。甩去多余液体。
- 8)滴加 I 抗 50 μl，室温静置 1 小时或者 4℃过夜或者 37℃1 小时。
- 9)4℃过夜后需在 37℃复温 45 分钟。
- 10)PBS 洗 3 次各 5 分钟；
- 11)滴加 II 抗 40~50 μl，室温静置，或 37℃1 小时；
- 12)抗中可加入 0.05%的 tween-20。
- 13)BS 洗 3 次各 5 分钟；
- 14)DAB 显色 5~10 分钟，在显微镜下掌握染色程度；
- 15)PBS 或自来水冲洗 10 分钟；

16)苏木精复染 2 分钟，盐酸酒精分化；

17)自来水冲洗 10~15 分钟；

18)脱水、透明、封片、镜检。

SABC 法

1)脱蜡、水化。

2)PBS 洗两次各 5 分钟。

3)用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 ，室温封闭 5~10 分钟，蒸馏水洗 3 次。

4) 抗原修复。

5) PBS 洗 5 分钟。

6) 滴加正常山羊血清封闭液，室温 20 分钟。甩去多余液体。

7) 滴加 I 抗,室温 1 小时或者 4℃过夜或者 37℃1 小时（4℃过夜后在 37℃复温 45 分钟）。

8) PBS 洗三次每次 2 分钟。

9) 滴加生物素化二抗,20℃~37℃20 分钟。

10)PBC 洗 3 次每次 2 分钟。

11)滴加试剂 SABC，20℃~37℃20 分钟。

免疫组化技术之免疫荧光法

免疫荧光法是最早建立的免疫组织化学技术，免疫荧光法的基本原理是抗原抗体特异性结合的原理,将已知的抗体或抗原分子标记上荧光素，当与其相对应的抗原或抗体起反应时，在形成的复合物的上就带有一定量的荧光素，以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原，在荧光显微镜下就可以看见发出荧光的抗原抗体结合部位，从而可确定组织中某种抗原的定位，进而还可进行定量分析。由于免疫荧光技术特异性强、灵敏度高、快速简便，所以在临床病理诊断、检验中应用比较广。

常用的荧光素有：

①异硫氰酸荧光素（fluorecein isothiocyante, FITC），为黄色、橙黄色或褐黄色结晶粉末，有两种异构体，易溶于水和酒精等溶剂。分子量为 389，最大吸收光谱为 490~495，最大发射光谱为 520~530nm，呈现明亮的黄绿色荧光，是最常用的标记抗体的荧光素。

②四甲基异硫氰酸罗达明（tetramethylrhodamine isothiocyante, TRITC），是一种紫红色粉末，较稳定，是罗达明（rhodamine）的衍生物。最大吸收光谱 550nm，最大发射光谱 620nm 呈橙红色荧光，与 FITC 发射的黄绿色荧光对比鲜明，常用于双标记染色。

按照抗原抗体反应的结合步骤，免疫荧光法可分为以下三种：

1) 直接法

用荧光素标记的特异性抗体直接与相应的抗原结合，以检查出相应的抗原成分。

2) 间接法

先用特异性抗体与相应的抗原结合，洗去未结合的抗体，再用荧光素标记的抗特异性抗体（间接荧光抗体）与特异性抗体相结合，形成抗原—特异性抗体—间接荧光抗体的复合物。在此复合物上带有比直接法更多的荧光抗体，所以，此法较直接法灵敏。

3) 补体法

用特异性的抗体和补体的混合液与标本上的抗原反应，补体就结合在抗原抗体复合物上，再用抗补体的荧光抗体与之相结合，就形成了抗原—抗体—补体—抗补体荧光抗体的复合物。荧光显微镜下所见到的发出荧光的部分即是抗原所在的部位。补体法具有敏感性强的优势，同时适用于各种不同种属来源的特异性抗体的标记显示，在各种不同种属动物抗体的检测上为最常用的技术方法。

4) 双重免疫荧光法

在对同一组织细胞标本上需要检测两种抗原时，可进行双重荧光染色，即将两种特异性抗体（例如抗 A 和抗 B）分别以发出不同颜色的荧光素进行标记，抗 A 抗体用异硫氰酸荧光素标记发出黄绿色荧光，抗 B 抗体用四甲基异硫氰酸罗明达标记发出橙红色荧光，将两将荧光抗体按适当比例混合后，加在标本上（直接法）就分别形成抗原抗体复合物，发出黄绿色荧光的即抗 A 抗体结合部位，发出橙红色荧光的即抗 B 抗体结合的部位，这样就明确显示两种抗原的定位。

免疫组化技术之免疫酶法

免疫酶法是借助酶细胞化学等手段显示组织抗原（或抗体）的新技术，是在免疫荧光法的基础上发展起来的。免疫酶法的基本原理与免疫荧光法有所相似，免疫酶法是将酶以共价键的形式结合在抗体上，制成酶标抗体，再借助酶对底物的特异催化作用，生成有色的不溶性产物或具有一定

电子密度的颗粒，于光镜或电镜下进行细胞表面或细胞内部各种抗原成分的定位。已如前述，免疫荧光法具有操作简便、灵敏、特异性高、省时的优势，但同时也具有令人遗憾的不足，特别是荧光标本不能长期保存以及需要价格昂贵的荧光显微镜才能观察的问题。为此，Nakane 等人（1966）尝试了用酶代替荧光素来标记抗体的方法，从而成功地开创了酶标记抗体的新技术（酶标抗体法）。Sternbenger 等人又将非标记抗体过氧化物酶法成功地引入，使免疫酶法有了很大的进步，成为当今使用最为广泛的免疫组织化学技术。

免疫酶法与免疫荧光法相比较，具有以下优点：酶反应产物呈现的颜色不仅能在一般的普通生物显微镜下观察，而且其产物因具有一定的电子密度也可在电镜下观察（免疫电镜技术），光镜与电镜的结合，使灵敏度进一步提高，标本又能长期保存，并能加设 HE 染色等其他复染，有利于将被检测物质与病变的形态学改变联系起来（定性及定位），弥补了免疫荧光法的不足。

从理论上讲，用细胞化学方法能显示的酶，均可用于标记抗体进行免疫酶法染色，但实际上能用于免疫组织化学技术的酶并不多。Sternbenger 等人指出：用于标记的酶应具备以下六点：

- 1) 酶催化的底物必需是特异的，而且容易被显示，即催化反应所形成的产物易于在光镜和电镜下观察。
- 2) 酶反应的终产物所形成的沉淀必须稳定，即终产物不能从酶活性部位向周围组织弥散，而影响组织学定位。
- 3) 较易获得纯的酶分子。
- 4) 中性 PH 值时，酶分子应稳定。
- 5) 在酶标过程中，酶连接在抗体上，不能影响二者的活性。
- 6) 被检组织中，不应存在与标记酶相同的内源性酶或类似的物质，否则结果将难以判定。

上述六点中以 1、2 两点最为重要，因为并非所有的容易显示的酶均能形成不溶性的复合物。符合上述要求的，最为常用的酶是辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase, HRP: HRP）。其次是碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, AKP），除此两种外，还有葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase, GOD）等，但因其形成的不溶性色素扩散作用较大，在应用上受到很大限制。HRP 广泛分布于植物界，因其辣根含量最高而得名。它是由无色酶蛋白和深棕色的铁叶结合组成的一种糖蛋白（糖占 18% 左右），分子量为 40000 道尔顿，等电点 3~9，最适 PH 为 5.0 左右。HRP 易溶于水和 58% 以下的饱和硫酸铵溶液，其活性部分为铁叶琳，称辅基。酶的蛋白部分无活性。酶蛋白和铁叶琳辅基的最大吸收光谱分别为 275nm 和 403nm；HRP 的纯度用两者的光密度比值（M03 人工卫 75）来衡量，以 RZ（Reinheitzahl）来表示。一般认为，标记酶的 RZ 值为 3.0 左右，不应 < 2.8，RZ 值越小，酶的纯度越差，对于纯度低，质量差的酶，需经纯化后才能使用。

AKP 是一种磷酸酶的水解酶，磷酸单酯酶对于连接于作用物磷酸基上的醇基没有特异性，因它可以水解多种有机磷酸酯，生成醇和磷酸盐离子。该酶在许多人体组织或动物组织中有分布，如肝、胎盘、白细胞、肾、小肠等。AKP 的分子量为 80KD，最适 PH 为 9.8，其活性受底物及浓度、缓冲

液及其离子浓度等因素影响，如用二乙醇胺缓冲液（1mol/L，PH9.8）对 AICI' 具有活化作用，酶的活性高，而用甘氨酸—NaOH 缓冲液则对 AKP 有抑制作用。AKP 的活化剂有镁和锰离子，Mg⁺⁺的适应浓度为 10mol/L。甘氨酸、柠檬酸盐，EDTA 等对 AKP 有抑制作用。AKP 对温度具有较高的敏感性，从 25℃ 增加到 35℃，其催化反应速度增加 1.5 倍。当选用不同的底物时，AKP 可催化形成不同颜色的终产物。例如，萘酚—AS—MX 和快蓝（Fast blue, Fh）为底物时生成蓝色产物，可与 HRP 催化的产物形成鲜明的对比，用快红（Fast red）代替快蓝则生成红色不溶性产物，而且内源性 AKP 较易清除，可以较好地避免内源性酶的干扰，使其具备了某些独特的优点而日益备受重视。

GOD 所催化的底物为葡萄糖，电子供体为对硝基蓝四隆（Paranitroblue Tetrazolium），终产物比较稳定，为不溶性的蓝色沉淀。从理论上讲，GOD 较 AKP 和 HRP 为佳，因为哺乳动物组织内不存在内源性葡萄糖氧化酶，这样可以很好地避免内源性酶的干扰。但是，GOD 的分子较 HRP 大三倍，具有较多的氨基，在标记时易形成广泛的聚合，而影响酶的活性。

免疫酶法与免疫荧光法大致相同，也可以分为以下几种。

（1）直接法

用酶标记的特异性抗体直接与标本中的相应抗原反应结合，再与酶的底物作用产生有色的产物，沉积在抗原抗体反应的部位，即可对抗原进行定性、定位以至定量研究。

直接法的第一步是特异的——即酶催化底物的反应，其余步骤则是非特异的，可用各种电子供体介导。以 HRP 为例，HRP 的底物是巴 H₂O₂，在分解已过程中，与 H₂O₂ 形成初级复合物，无电子供体存在时，反应不再继续进行，当电子供体存在时，反应以一定的速度形成第二种复合物，继之 HRP 催化 H₂O₂ 所形成的中间型产物，迅速生成水，酶被还原，电子供氢体被氧化，聚合，再经氧化环化，最后形成引哚胺多聚体，于酶反应部位，形成不溶性棕褐色沉淀，与组织对比清晰，达到定位、定性、定量的目的。

直接法简便、快速、特异性强，非特异性背景反应低。其缺点是，每种抗原必须分别用其抗体的酶标记物，且敏感性较间接法低。

免疫组化技术之免疫金银法

免疫金银法（Immurogold-silver method, IGSM）或称免疫金银染色（Immurogold-silver staining, IGSS）是一种新的免疫组织化学技术，近年来又不断改进，已成为最为灵敏而又经济的方法之一。免疫金银法实际上是在免疫金法的基础之上发展形成。

免疫金和免疫金银法都是利用胶体金作为标记物。胶体金系指金的水溶胶，溶胶是一种物质以大或小的微小粒子分散在另一种物质中所形成的体系，被分散的物质叫分散相，容纳分散相的物质叫分散介质。按分散相离子的大小可将分散体系分为三种，相分散分散体系（分散相粒子直径大

于 10nm)；胶体分散体系(分散相粒子直径在 1~100 nm 之间)；低分子一离子分散体系(分散相粒子直径 < 1 nm)。胶体金属属于胶体分散体系，是指金以微小的粒子分散在水中所形成的金溶胶。它能迅速而稳定地吸附蛋白，对蛋白的生物学活性则没有明显的影响。因此，用胶体金标记一抗、二抗或其他能特异性结合免疫球蛋白的分子(如葡萄球菌 A 蛋白)等作为探针，就能对组织或细胞内的抗原进行定性、定位，甚至定量研究。由于胶体金有不同大小的颗粒，且胶体金的电子密度高，所以免疫胶体金技术特别适合于免疫电镜的单标记或多标记定位研究。由于胶体金本身呈淡至深红色，因此也适合进行光镜观察。如应用银加强的免疫金银法则更便于光镜观察。溶胶的颜色取决于分散相物质的颜色，对同一种物质的溶胶而言，粒子大小不同，颜色也不同。若粒子为 20-40nm 的金溶胶因主要吸收波长为 530nm 的绿光而呈深红色，60nm 的金溶胶因主要吸收波长为 600nm 的橙黄色光而呈紫蓝色。在光镜水平应用的胶体金粒直径不能小于 10nm，否则无可见的红色。

1. 免疫金法

免疫金法是将用胶体金(直径>20 nm)标记的间接抗体或 A 蛋白再与特异性抗体结合，在光镜下就可见红色的反应物出现，不需进行呈色反应。但该法要求金标抗体浓度高，因此，价格昂贵，既不经济同时也不够敏感。

2. 免疫金银染色(IGSS)

免疫金银染色是在免疫金染色的基础上，在对苯二酚存在的情况下，通过含银离子的显影液中的还原反应，使在抗原抗体反应部位的金粒子周围形成很多沉淀层，光镜下就可看到阳性反应部位呈清晰的棕黑色，从而显示不易被光镜定位的金粒，显示出组织中抗原的部位。这种方法不仅提高灵敏度，同时金标记抗体可以稀释 10 倍以上后应用，此外还可避免使用具有致癌危险的有机色素。

IGSS 法的主要优点是：

- (1) 敏感性高。与其他的免疫组织化学技术相比，IGSS 法被认为是最敏感的方法，尤其适合于只含微量抗原的组织标本。
- (2) 应用范围广。IGSS 法不仅可以在冰冻切片，细胞涂片以及培养细胞、石蜡切片上进行光镜观察，而且还能应用于树脂包埋的切片的电镜观察，并且能准确定位抗原。
- (3) 定位准确。IGSS 法的银颗粒沉积在搞原体反应部位，一般无扩散，定位较为准确。
- (4) 方法简便、安全、成本低、经济、同时标本也可以长期保存。
- (5) 用醋酸银代替硝酸银和乳酸银，不仅保持了原有方法的敏感性、特异性、低背景、对比度好的特点，而且整个显影过程可以在常光下进行，从而弥补了在暗室显色的不足。

IGSS 法的主要问题是非特异性背景，由于其非特异性背景染色影响了 IGSS 法在常规免疫组织化学鉴别诊断上的应用。但若较好地控制染色的各关键环节，如特异性抗体的纯度，特异性；切片的消化以及显影液的配制和显影时间的控制等，能较好地解决这一问题。

免疫组化操作要点及技巧

(1) 固定：最好用 4% 的多聚甲醛固定液。对于冰冻切片，甲醛固定有时比冰冻丙酮好；但对于不同的组织和抗原，可选用不同的固定液。有时候商品化的抗体会比较适合而推荐的固定液，请于购置前注意说明书。

Bouin S 固定液：饱和苦味酸 750ml，甲醛 250ml，冰醋酸 50ml，其对组织的穿透力较强，固定较好，结构完整，但因偏酸，对抗原有一定损害，且组织收缩明显，不适于组织标本的长期保存。

PLP 液：即高碘酸钠-赖氨酸-多聚甲醛，适于固定石蜡切片。适于富含糖类组织，对超微结构及许多抗原的抗原性保存较好。

(2) 组织脱水，透明：时间不能太长，否则在切片时容易碎片，切不完整。

(3) 切片时展片：有些组织在切片后难以在水中展开，这时可适当地在水中加入几滴乙醇。

(4) 烤片：60℃ 30 分钟或 37℃ 过夜，温度太高或时间太长，抗原容易丢失。

(5) 蜡块及切片的保存：最好在 4℃ 保存

(6) 脱片问题：

Poly-L-Lysine(多聚赖氨酸)为目前免疫组化染色工作中最常用的一种防脱片剂，6ml 的多聚赖氨酸溶液可按 1:10 稀释成 60ml 的工作液，适合于需要酶消化、微波、高温高压的防脱片处理。如不行，可用双重处理 (APES 和 Poly-L-Lysine) 的切片。在以上两种条件都行不通的情况下，可用如下方法：切片在脱蜡前，放在 APES 1: 50 丙酮溶液中浸泡 3 分钟，晾干，即可进行下一步。

(7) 灭活内源性酶：HRP 系统：3%双氧水灭活；AP 系统：3%HAc 灭活。

(8) 暴露抗原：对于石蜡切片的免疫组化实验时，必须采用高温加热抗原修复，这将有助于暴露抗原决定簇，从而增加免疫组化染色的强度(不同抗体的最佳修复液请参阅抗体说明书)。对于不同的组织，不同的抗原，不同的抗体，所采用的方法应不一样，可进行热修复、胰酶消化、既不修复也不消化。胶原还可以用胃蛋白酶消化等。

(9) 封闭：在山羊血清封闭，非特异性染色仍然较强时，可延长封闭时间或用浓缩血清封闭

(10) 抗体稀释：应遵循“现用现配”的原则，对于 PBS 稀释的抗体一定要当天使用。

(11) 背景高：在抗体浓度、反应时间、反应温度等合适的条件下，如果背景依旧高，可采用含 1% Tween20 的 PBS 洗，特别是在显色之前要多洗。

(12) 返蓝：在苏木素复染后，可用碱性缓冲液（如 PBS）或 Na₂HPO₄ 的饱和溶液返蓝。

(13) 显色：一定要在显微镜下观察，注意控制背景。

(14) 在整个操作过程中，切片千万不能干燥，否则会有非特异性染色。

(15) 拍照

1) 更换样品时，除了调整焦距和视野外，显微镜上的其他部件都不能动！所有的样品必须一次拍摄完全。特别是在拍摄过程中，不要一会用高倍镜，一会用低倍镜，来回切换物镜。

2) 数码相机必须设置为手动曝光，并且保持每张照片用同样的曝光条件，同样的曝光时间，同样的光圈。特别要注意的是，一定要将数码相机的自动白平衡功能给关掉

3)免疫组化切片一般染色不太深，因此拍摄出的照片颜色较浅，就让它浅。拍摄出的照片中空白部位应尽可能呈现纯白色。测量其灰度应在 250 左右。如果呈现淡蓝色，一般是相机自动白平衡在起作用。另外一个因素是显微镜灯光电压不正确。要使灯光本身的色温正确。既不偏黄，也不偏蓝。

免疫组化技术的关键问题

1.组织处理

恰当的组织处理是做好免疫组化染色的先决条件，也是决定染色成败的内部因素，在组织细胞材料准备的过程中，不仅要求保持组织细胞形态完整，更要保持组织细胞的抗原性不受损或弥漫，防止组织自溶。如果出现自溶坏死的组织，抗原已经丢失，即使用很灵敏的检测抗体和高超的技术，也很难检出所需的抗原，反而往往由于组织的坏死或制片时的刀痕挤压，在上述区域易出现假阳性结果。

1) 组织及时取材和固定

组织标本及时的取材和固定是做好免疫组化染色的关键第一步，是有效防止组织自溶坏死，抗原丢失的开始，离体组织应尽快地进行取材，最好 2h 内，取材时所用的刀应锐利，要一刀下去切开组织，不可反复切拉组织，造成组织的挤压，组织块大小要适中，一般在 $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm} \times 0.2\text{cm}$ ，切记取材时组织块宁可面积大，千万不能厚的原则，(也就是说组织块的面积可以大到 $3\text{cm} \times 5\text{cm}$ ，但组织块的厚度千万不能超过 0.2cm ，否则将不利于组织的均匀固定)。固定液快速渗透到组织内部使组织蛋白能在一定时间内迅速凝固。从而完好的保存抗原和组织细胞形态。

对于固定液的选择，原则上讲，应根据抗原的耐受性来选择相应的固定液，但除非是专项科研项目，在病理常规工作很难做到这一点，因为病理的诊断和鉴别诊断都是在常规 HE 病理诊断的基础上决定是否进行免疫组化的染色，而 HE 染色的常规组织处理是采用 10%的中性缓冲福尔马林或 4%缓冲多聚甲醛 4 倍于组织体积进行组织固定，利用其渗透性强，对组织的作用均匀进行固定，但组织固定时间最好在 12h 内，一般固定时间不应超过 24 小时。随着固定时间的延长对组织抗原的检出强度将逐渐降低。

2) 组织脱水、透明、浸蜡

组织经固定后进行脱水、透明、浸蜡和包埋。掌握的原则是脱水透明要充分但不能过，浸蜡时间要够，温度不能高，否则造成组织的硬脆使组织切片困难，即使能切片，由于组织的硬脆，也使切片不能完好平整，染色过程中极易脱片，对免疫组化染色抗原的定位及背景都不利，所以无水酒精脱水和二甲苯透明的时间不宜过长，正常大小的组织无水酒精脱水 $1\text{h} \times 3$ 次，二甲苯透明 $1\text{h} \times 2$ 次即可，浸蜡及包埋石蜡温度不要超过 65°C 。

2.切片

组织得到很好处理后在进行切片之前还应对玻璃片进行处理，由于我们检测抗原是多种多样的，因染色操作程序复杂，时间较长，有些抗原是要进行各种抗原修复处理，如微波、高压、水溶酶等，玻片如果得不到很好的处理，将易造成脱片，为保证免疫组化实验的正常进行，要求在贴片前对载玻片作适当处理，必须在清洗干净的玻片上进行粘合剂的处理以防脱片。

1) Poly-L-Lysine (多聚左旋赖氨酸)

一般采用分子量 30000 左右的 0.5% 多聚赖氨酸最好，也可用试剂公司出售的其浓溶液以 1: 10 去离子水稀释。方法是将玻片浸泡其中，倾尽余液，在 60℃ 温箱中烤干备用，此方法的优点是可以用于多种组织化学、免疫组化及分子学检测中的应用，粘贴效果最好，但价格稍贵。

2) 明胶硫酸铬钾法

将 2.5g 明胶加热溶于 500ml 蒸馏水中，完全溶解冷却后加入 0.25g 硫酸铬钾搅匀充分溶解即可使用。方法是将玻片浸泡其中 2 min，取出控尽液体入温箱中烤干备用。此法价格便宜、方法简单，任何实验都可以使用，特别适用于大批量的使用，但应注意，如果液体变蓝或粘稠状停用。

3) APES (3-氨丙基-乙氧基甲硅烷)

此法必须现用现配。将洗净玻片入 1:50 丙酮稀释的 APES 中，浸泡 20s，取出稍停再入丙酮或蒸馏水中刷去未结合的 APES 晾干即可。用此方法粘合的玻片应垂直烤片不能平烤，否则组织片中易出现气泡。

切片必须保持切片刀锐利，切片要薄而平整、无皱摺、无刀痕，如有上述问题的切片在进行免疫组化染色都将出现假阳性现象，切片厚度一般为 3~4 μm，切好的切片在 60℃ 温箱中过夜，注意烤片的温度不宜过高，否则易使组织细胞结构破坏，而产生抗原标记定位弥漫现象。

3. 免疫组化染色

S—P 免疫组化染色试剂盒采用生物素标记的第二抗体与链霉菌抗生物素蛋白连接的过氧化物酶及底物色素混合液来测定细胞和组织中的抗原。

S—P 免疫组化染色步骤：

- 1) 石蜡切片脱蜡和水化后，用 PBS(pH7.4) 冲洗三次，每次 3 分钟(3×3')。
- 2) 根据每一种抗体的要求，对组织抗原进行相应的修复。
- 3) 每张切片加 1 滴或 50ul 过氧化物酶阻断溶液(试剂 A)，以阻断内源性过氧化物酶的活性，室温下孵育 10 分钟。
- 4) PBS 冲洗 3×3' 。
- 5) 甩去 PBS 液，每张切片加 1 滴或 50ul 的非免疫性动物血清(试剂 B)，室温下孵育 10 分钟。

- 6) 甩去血清，每张切片加 1 滴或 50ul 的第一抗体(用户自选)，室温下孵育 60 分钟或 4℃过夜，建议参阅每种抗体的说明书。
- 7) PBS 冲洗 3×5' 。
- 8) 甩去 PBS 液，每张切片加 1 滴或 50ul 生物素标记的第二抗体（试剂 C），室温下孵育 10 分钟。
- 9) PBS 冲洗 3×3' 。
- 10)甩去 PBS 液，每张切片加 1 滴或 50ul 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 D)，室温下孵育 10 分钟。
- 11)PBS 冲洗 3×3' 。
- 12)甩去 PBS 液，每张切片加 2 滴或 100ul 新鲜配制的 DAB 或 AEC 溶液，显微镜下观察 3—10 分钟，阳性显色为棕色或红色。
- 13)自来水冲洗，苏木素复染，0.1%HCL 分化，0.1%氨水或 PBS 冲洗返蓝。

免疫组化染色注意事项

免疫组化染色方法已不是什么很难的问题，操作步骤简单也易掌握，但要染好免疫组化，其中方法的技巧将是每位操作者在实际工作中不断摸索和探讨的事，但最基本的应从以下方面加以注意：

（1）去除内源酶及内源性生物素

一般我们进行免疫组化标记的都是一些生物体组织，其中自身含有一定量的内源酶和内源性生物素，而免疫组化各种染色大部分是用过氧化物酶来标记抗体的，酶的作用是催化底物，使显色剂显色，而组织中的内源性酶同样也能催化底物，使其显色，这就影响免疫组化的特异性，所以在标记抗体的过氧化物酶进入组织切片之前就应设法将组织内的内源性各种酶灭活，以保证免疫组化染色在特异性情况下进行。

1) 去除内源酶

常用的去除内源性酶的方法是 3%过氧化氢水溶液。但在含有丰富血细胞的标本中，由于其中含有大量的具有活性的过氧化物酶，能与过氧化氢反应，出现气泡现象，易对组织结构和细胞形态产生一些不良影响，但用 3%过氧化氢的方法，能够去除大部分内源性酶，即使有些血细胞在显色后也出现棕黄色反应，但由于其形态结构与组织细胞不同，也易鉴别，而且此方法比较通用易操作，但应注意过氧化氢的浓度不能过高，一般为 3%—5%，时间不宜过长，最好室温 10min。

2) 去除内源性生物素

在正常组织细胞中也含有生物素，特别是肝、脾、肾、脑，皮肤等组织中，在应用亲和素试剂的染色中，内源性生物素易结合卵白素，形成卵白素-生物素复合物，导致假阳性，所以在采用生物素方法染色前也可以将组织切片进行 0.01% 卵白素溶液室温处理 20min，使其结合位点饱和，以消除内源性生物素的活性。

3) 灭活碱性磷酸酶

最常用的方法是将左旋咪唑(以每毫升加 24mg)加入底物液中并保持 pH 值为 7.6~8.2，能除去大部分内源性碱性磷酸酶，对于仍能干扰染色的酸性磷酸酶可用 0.05mol/L 酒石酸抑制。

(2) 抑制非特异性背景着色

非特异性着色最常见的情况是抗体吸附到组织切片中高度荷电的胶原和结缔组织成分上，而出现背景着色，为了防止这种现象，最好用特异性抗体来源的同种动物灭活的非免疫血清在特异性抗体之前进行处理，以封闭荷电点，不让一抗与之结合，但这种方法一般实验室很难实现，一般常见实用的血清是 2%~10% 羊血清或 2% 牛血清白蛋白在室温下作用 10~30min 即可，但应注意此种结合是不牢固结合，所以最好不要冲洗，倾去余液直接加一抗，对于多克隆抗体来讲，易产生背景着色，在稀释特异性抗体时可采用含 1% 非免疫血清的 pH7.4 的 PBS 液。

(3) 缓冲液

免疫组化染色标记是对生物体组织抗原进行标记，抗原抗体最适合的 pH 值为 7.2~7.6，最常用的是 0.01 mol / L pH7.4 磷酸缓冲液(PBS)。简易配方：5000ml 蒸馏水中分别加入 1g NaH₂PO₄、15.6g Na₂HPO₄、42.5g NaCl。但如果是采用碱性磷酸酶(AP)作为标记物底物的方法时可以用 0.02mol/L TBS pH8.2 缓冲液比较好。

(4) 抗原修复

经甲醛固定的部分组织细胞，可使免疫组化标记敏感性明显降低，这是因为甲醛固定过程中形成醛键或保存的甲醛会形成羧甲基而封闭部分抗原决定簇。因此，在染色时，有些抗原需先进行修复或暴露。

抗原修复方法可分为化学方法和物理方法。化学方法是以酶消化方法，常用胰蛋白酶及胃蛋白酶，配制浓度与消化时间要适度。常用的物理方法有单纯加热、微波处理和高压加热。在选用这三种加热法时，浸泡切片的缓冲液的离子强度和 pH 值、加热的温度和时间均影响着抗原修复效果。目前最常用的修复方法有如下几种：

1) 胰蛋白酶(Trypsin)

主要用于细胞内抗原的修复。一般使用浓度为 0.1%，37℃ 作用 10min。

配方：0.1g 胰蛋白酶加入到 0.1% pH7.8 CaCl₂(无水)水溶液中溶解后即可。

2) 胃蛋白酶(Pepsin)

主要用于细胞间质或基底膜抗原的修复。一般浓度为 0.4%，37℃作用 30min。

配法：0.4g 胃蛋白酶溶于 0.1mol/L HCl 水溶液中。

3) 热引导的抗原决定簇修复(Heat Induced Epitope Retrieval, HIER)

HIER 对大多数的抗体有益，尤其是对核抗原的修复作用更加明显，最常用的抗原修复液是 pH6.0 的枸橼酸缓冲液和 pH8.0 的 EDTA 缓冲液，它们的作用原理是通过钠离子的螯合而实现的。抗原修复液的 pH 值非常重要，有效的抗原修复 pH 值要比修复液的化学成分更重要，同样的修复液随着 pH 值的升高染色的强度逐渐增强，但最佳 pH 值范围为 6.0~10.0，对于大多数抗原这个范围的 pH 值都能进行有效的修复，有些抗体(如 Ki-67、ER)则在 pH 值 1.0~3.0 和 6.0~8.0 更为有效。作为通用修复液碱性 pH 值的修复液要比酸性的有效，而对固定很长时间旧的存档组织，酸性 pH 值的修复液则优于碱性的修复液，所以两种抗原修复液可作为相互替补的进行抗原修复。在进行 HIER 过程中应防止切片的干燥，加热时必须达到规定的温度，保温时间要足够，对于一些不要抗原修复的抗体最好不要采用 HIER 处理，否则对染色无益，但有些抗体则需要利用多种修复联合应用。

HIER 方法有：

1)水浴加热法

将脱蜡水后的切片放入盛有修复的容器中，放入加热煮沸水中，当修复液温度达到 95℃左右时计时 15min，自然冷却，PBS 洗 3min×3 次。

2)微波加热法

将切片放入修复液中微波加热使温度在 96℃左右，计时 10min，在微波炉中停留 2min，室温自然冷却，PBS 洗 3min×3 次。

3)高压加热法

将修复液在高压锅中煮沸，切片插在染色架上，放入锅中(要使修复液淹没切片)开始喷气时盖上压力阀。计时 2min，冷水冲至室温取出切片，PBS 洗 3min×3 次。

(5) 显色

免疫组化染色的显色是最后的关键问题，一般辣根过氧化物酶(HRP)的检测系统选用 DAB 或 AEC 显色系统进行显色。但要得到最佳的显色效果，必须在镜下严格控制，以检出物达到最强显色而背景无色为最终点，尤其 DAB 显色时间短着色浅，时间长背景又深，都将影响结果判断，根据经验 DAB 在配制完后最长宜放置 30min 以内，过时不能使用，DAB 加到组织切片时作用时间最长不宜超过 10min(最好在 5min 内)，否则不管有无阳性都应终止反应。对一些含有内源性酶较高的组织用 DAB 显色时极易出现背景色更应尽早在镜下控制，以达到最佳的分辨效果(棕色)。AEC 显

色系统（红色）的弊端是易溶于有机溶剂，所以封片时应以水性封片剂为主，同时染色的切片也不能久存。

如果是碱性磷酸酶(AP)最好选用 NBT/BCIP 作为显色系统（结果染为蓝黑色）。

（6）结果判断

免疫组化的结果判断有两种方法：

一是对以检测结果阳性细胞指数来定性(如核抗原的标记)，判断方法是以一个视野中的阳性细胞数与总细胞的百分比，再取 10 个相同视野算取平均指数。

另一种方法以染色阳性强度和阳性检出率相结合而定，一般阳性细胞数在 0~25 为阴性，25~50 为十，50~75 为十十，75 以上为十十十。此种判定方法容易出现人为误差现象。

有条件的实验室最好能用图像分析系统进行结果检测定量分析更为准确。一切的判定方法都是力求使免疫组化染色结果判断更标准，但各单位采取的标准不尽相同，所以判断标准化问题还有待长期实践中病理学术界商讨判定标准。

IHC 中常见的抗原表达模式有以下几种：

- 1) 细胞浆内弥漫性分布，多数胞浆型抗体的反应如此，如细胞角蛋白(cytokeratin, CK)和波形蛋白(vimentin)等；
- 2) 细胞核周的胞浆内分布，其判别要点是细胞核的轮廓被勾画得很清楚，如 CD3 多克隆抗体的染色；
- 3) 胞浆内局限性点状阳性，如 CD15 抗体的染色；
- 4) 细胞膜线性阳性，大多数淋巴细胞标记的染色如此，如 CD20、CD45RO；
- 5) 细胞核阳性，如 Ki-67 及雌、孕激素受体蛋白 ER、PR 等。一种抗体可同时出现细胞浆和细胞膜的阳性表达，如 EMA 可呈膜性和胞浆内弥漫性阳性反应；CD30 抗体可同时呈膜性和胞浆内点状阳性反应等。

（7）对照片的设置

免疫组化的质量取决于正确使用各种对照，没有对照的免疫组化结果是毫无意义的。对照包括阴性对照、阳性对照和自身对照。在实践中可用染色组织切片中不含抗原的组织作为阴性对照，而用含抗原的正常组织作阳性对照，这种自我对照具有节约的意义。观察染色结果时，先观察对照组织的结果，如阳性对照组织中阳性细胞呈强阳性，阴性对照细胞呈阴性，内源酶阴性，背景无非特异性染色时，表明本次实验的全部试剂和全过程技术操作准确无误，待检组织中的阳性细胞也就是可信的正确结果。免疫组化染色中对照片的设置非常重要，它是判断您的染色是否成功的关键依据，而且也是检测每一个抗体的质量标准，常设的对照如下，一般实验最常用的只选第二种方法。

- 1) 空白对照(阴性对照) 第一抗体由 PBS 或非免疫血清取代。
- 2) 阳性对照 用已知含有要检测抗原的切片作阳性对照。
- 3) 回收实验阴性对照 已知抗原与相应的第一抗体混合，发生结合沉淀，再用此沉淀抗体复合物进行免疫组化实验，结果为阴性。
- 4) 替代对照 用于第一抗体同种动物的血清或无关抗体代替第一抗体结果为阴性。
- 5) 自身对照 在同一切片上，应将不同组织成分中的阳性或阴性结果与检测的目的物对照比较。如 actin、CD34 在正常组织中的血管壁肌层应为阳性，vimentin 可以间质细胞，对照 desmin 以血管壁及肌束为对照，S-100 蛋白以小神经末梢为对照等，如果应为阳性的组织是阳性，则免疫组化技术正确，如为阴性，则表明染色技术有问题或免疫试剂质量有问题。