

免疫组化技术规范

欧美国家相继开展了免疫组化质量控制工作，建立了一套比较完善的质量控制方法和程序。中国病理工作者委员会（CCP）免疫组化研究中心借鉴国外的先进经验并结合我国当前的实际情况开始探索一种适合我国免疫组化质控的方法，同时，发现和推广标准化的染色程序，改善和提高免疫组化实验的可靠性，使免疫组化技术更具标准化，免疫组化结果更具可靠性和重复性。尽管免疫组化在许多实验室中已常规开展，但它是一个多步骤、多因素决定的一种实验方法，由于各实验室采用的修复方法、染色方法、试剂厂家、抗体克隆号、检测系统等有所不同，染色结果会出现较大差异，相当部分的实验室对免疫组化标准化的认识尚欠足够重视，致使不良的染色结果对病理诊断引起误导，因此免疫组化染色结果的可靠性受到了极大的关注。

在实际工作当中有许多因素影响免疫组化的结果，包括技术人员是否熟练掌握整个实验的操作程序、抗体的特异性、方法的敏感性、标本的固定、组织的处理、是否进行抗原修复、修复液的PH值等等因素。为了让每个实验室能够持续稳定地完成可靠的实验染色结果，应当将免疫组化染色技术中的全部流程纳入标准化。

一、免疫组化成功的要素

病理科医生要有相当的免疫组化诊断知识和免疫组化技术经验，要清楚认识免疫组化技术是一门实验性、技术性非常强的技术，要多了解多种抗体在组织中的表达情况，以及影响免疫组化结果的各种因素，只有提高医生的免疫组化诊断水平才能避免错误的判断，才能确保免疫组化诊断的准确性。病理技术人员是免疫组化实验成功的关键因素，操作人员要有丰富的免疫组化的理论知识及熟练的免疫组化染色技术，十分清楚每一个步骤的应用原理，使实验结果更具可靠性。可靠的实验试剂和实验方法是每个实验室的必备条件。由于实验方法多种多样，抗体的品种繁多，每个实验室都应当确保高质量高效价的试剂，并摸索出最佳的实验条件。优质的免疫组化取决于有效的抗原修复、敏感的检测系统、合适的实验质控对照及熟练和有责任心的技术人员。

二、免疫组化染色前处理技术规范

1. 取材：理想的取材厚度是 0.2cm~0.3cm，大多数实验室都认为组织在加热抗原修复过程中造成脱片的主要原因是取材过厚或脱水浸蜡处理不当所致。良好的取材、固定、脱水过程是免疫组化质控的前提，如果 H&E 切片都做不出满意的染色结果，那么免疫组化染色也将无从谈起，根本无法保证染色质量。

2. 固定：在众多的组织固定液中（如甲醛、乙醇、戊二醛、多聚甲醛等），不同的实验方法在使用上各有千秋。但在保持组织细胞结构的完整性、抗原可测定性、组织渗透性以及试剂的价格上，福尔马林是最好、既经济又通用。而含酸或含汞的固定液对抗原保存均不理想。组织离体后固定一般不要超过 30 分钟，在常温条件下固定时间为 8-24 小时。同时还要注意避免福尔马林过度固定造成的组织抗原丢失，有研究发现新鲜组织经过福尔马林一周固定后组织抗原丢失严重，抗原几乎不能被检测，因为组织固定后会引发蛋白或蛋白分子之间形成交联，导致抗原位点遮盖，可以通过抗原修复方法来修正，若加抗体前不采用抗原修复，则免疫组化染色常不能到达理想结果或不成功。组织同样不能长时间放置在 70%的乙醇中，酒精固定后的组织形态不如福尔马林固

定的组织。脱钙液对抗原破坏较为严重，因此在组织脱钙前最好在福尔马林液中固定 48 小时，若组织没有固定透则酸会破坏抗原，脱钙液中酸的浓度与脱钙时间都必须尽量控制在最低的限度。

3. 浸蜡：我们认为浸蜡温度应控制在 58~60℃左右，浸蜡用的石蜡应经常更换，以减少石蜡中二甲苯的含量。高温下的二甲苯容易使组织发脆，细胞收缩，更容易掉片。

4. 切片厚度：用于免疫组织化学染色的切片厚度为 3-4 微米。为防止在染色过程中脱片，需要使用硅化玻片裱片。

5. 硅化玻片的制备：载玻片经酸洗冲洗干净后烤干；2%APES 丙酮或无水酒精中浸泡 1~2min；丙酮或无水酒精洗 1~2 分钟；蒸馏水浸洗 1~2min；烤干备用。

6. 烤片：切片在 60℃~65℃烤箱中烤片 30—60 分钟左右。有些实验室采用烤片过夜。有报导烤片温度超过 60℃时，烤片时间超过 18 小时的切片，免疫组化染色强度比烤 4 小时的切片要略弱。温度过高或时间过长均会影响抗原的活性，原因是在高温干燥条件下可以加速组织切片中抗原的氧化。

7. 切片保存：一些实验室研究人员习惯将组织蜡块连续切片后长期保存在室温条件下，切片后的组织在室温下长期保存抗原可以损失。迈新实验室在实验中发现蜡块切片后，在室温下保存三个月以上，免疫组化染色结果会出现减弱或阴性情况。并进行了新、旧切片的保存时间对照实验，选择 11 种不同组织蜡块每例连续切片 10 片，共 110 片，常温空气中放置一个月、三个月、半年、一年与新切片进行成对对照实验。实验结果表明：组织蜡块切片后在室温下保存三个月，抗原对多数抗体的敏感性约下降一半，部分切片丢失更多。切片保存半年多数的抗体不能出现阳性标记结果，保存一年以上仅有个别的切片能够有微弱的阳性表达，尤其核表达的抗原丢失更为突出。国外也有类似的资料报道。其原因可能与空气中的氧化作用有关，所以在实际工作可以采用蜡封切片来避免抗原损失以便长期保存，也可 4℃冰箱冷藏保存，尤其是用于科研集中实验的切片更应注意切片的保存。

8. 脱蜡：免疫组化的脱蜡步骤与常规 H&E 脱蜡步骤相同，免疫组化实验室中脱蜡需与 H&E 常规脱蜡分离，以保证脱蜡彻底，否则可能导致染色结果的异常。

三、免疫组化实验中的抗原修复

1. 酶消化：如胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白水解酶

2. 抗原热修复：高压法、微波法、水煮法

众所周知，免疫组化染色中最关键的莫过于抗原修复，而绝大多数常用抗体的修复是通过加热来完成的，热抗原修复优于酶消化，更有效，染色结果更易一致，操作单一。

3. 修复时间：既要获得最强的染色结果，又要保持组织形态的完整性。许多抗原修复存在的问题是组织固定时间过短时，强烈的抗原修复可引起形态破坏、脱片及组织完全消化，解决的方法可采用较短时间的热修复或减少酶的消化时间。

4. 抗原修复缓冲液：有柠檬酸盐缓冲液（pH6.0）、Tris (pH7-8)、EDTA(pH8.0~9.0)、EGTA(pH9.0) 等，柠檬酸盐缓冲液（pH6.0）的优点是染色背景清晰，适合于大多数抗体，Tris 和 EDTA 两种修复液对部分抗原修复效果较强，但其染色背景同时加深，如使用不当易造成假阳性结果的判断。目前还没有一种抗原修复液能适合于所有的抗体，柠檬酸缓冲液（pH6.0）可作为免疫组化常规使用的抗原修复缓冲液，但也不能除外某些抗体适用于 EDTA 和 EGTA 缓冲修复液，一般抗原比较难于表达的抗体多选择高 pH 值的修复液。例如：ER、PR、Bcl-2、Bcl-6、TdT、Ki-67、Cyclin D1 等。

5. 抗原热修复注意事项：无论哪一步都不要让切片干涸，加热后需要冷却 15—30 分钟。充分的抗原修复是影响染色结果的唯一重要因素，加热的温度和时间可导致修复不足或过度修复。

6. 抗原热修复对组织中内源性生物素的影响：抗原热修复在增强抗原决定簇表达的同时，也增强了组织中内源性生物素的反应。采用卵白素-生物素（Avidin-biotin）检测系统，组织中内源性生物素容易出现人为假象，在加热抗原处理条件完全相同的阴性对照片中可以观察到较强的内源性生物素的反应，没有经过热抗原处理的切片中没有出现类似的情况。在细胞浆中呈均一的细颗粒状的浅棕色阳性，有时表达也非常强，与真阳性的结果表达很相似，在以往的免疫组化染色中内源性生物素的影响对诊断造成许多的误差，却常常被忽略。值得提醒的是在概念上一定要十分清楚，阴性对照片必须与一抗的抗原修复处理条件完全相同，才能准确发现内源性生物素出现的部位。

7. 内源性生物素封闭方法：一般在抗原修复以后，加抗体前使用卵白素进行生物素阻断处理，也可使用非生物素的检测系统，如：EliVision、EnVision、SuperVesion 等。

四、免疫组化染色实验操作规范

1. 脱蜡：二甲苯 ——→ 酒精 ——→ 蒸馏水

2. 内源性过氧化物酶的消除：采用过氧化物酶的检测系统，必须进行内源性过氧化物酶封闭处理。如果不进行处理，组织中的红细胞、粒细胞会干扰染色结果的判断。常用 0.3% H₂O₂ 作用切片 10 分钟，对染色结果及抗原保存都没有影响，封闭效果比较显著。

3. 血清封闭：在加入一抗前需用二抗的正常血清进行封闭，可以减少非特异性结合。目前使用的二步法检测系统可以免去这一步骤。

4. 抗体使用：已有大量的即用型抗体供实验室使用，厂家已进行过多次的实验检测，可按厂家提供的条件进行操作。浓缩型抗体一般按照厂家提供的建议稀释度，进行对倍稀释预实验。选定最佳的稀释滴度后再进行批量实验。染色背景深大多是抗体浓度过高所致。抗体孵育温度一般以常温 25℃ 为基准或 37℃ 30 分钟，也可 4℃ 冰箱过夜。

5. 冲洗：常用的冲洗液为 PBS 或 TBS 缓冲液，要严格执行冲洗步骤，防止因冲洗不净引起的背景着色，缓冲液中加入 Tween20 可以增强冲洗效果。

6. 检测系统：通用的检测系统有生物素标记的 ABC、SP、LSAB 等，此类检测系统较为经济，目前仍有不少医院在使用。非生物素类检测系统价钱较贵，由于不需通过生物素的结合，可以避免内源性生物素的干扰，其特点：敏感、省时、方便、背景低。

7. 显色系统：由于检测系统采用的是辣根过氧化物酶，因此选择 DAB（棕色）和 AEC（红色）作为酶的底物，若采用碱性磷酸酶系统则选择 BCIP/NBT（蓝紫色），常规免疫组化显色首选的仍然是 DAB，定位清晰，易于保存。AEC 不能耐受酒精及敏感性低，BCIP/NBT 阳性虽鲜艳，但阳性定位不准确。

8. 复染：衬染步骤十分简单，但衬染的好坏对染色最终结果的质量影响很大。有的选用 Harris 苏木素，有的用 Mayer's 苏木素，且与 DAB 染色对照效果最好，在绝大多数实验室中使用简单方便。也有实验室使用甲基绿衬染衬染，但不能经有机溶剂，容易退色。

五、染色结果的观察

1. 阳性结果应定位在细胞相应的部位，在细胞膜表达的抗原阳性结果应定位在细胞膜上，在其他部位

的阳性反应均为非特异性染色。不当的抗原修复会导致抗原在组织细胞中定位的改变。根据所检测抗原的不

同，抗原分别定位在：

- （1）细胞膜：如 LCA 和 CD3、CD20 等；
- （2）细胞质：如 Cytokeratin、GFAP、S100、CgA、AFP 等；
- （3）细胞核：如 Ki-67、ER、PR、TTF-1、HPV-Ag、Cyclin D1、TDT 等。

2. 组织的周边、气泡、刀痕、皱折等部位往往呈现非特异性阳性表达。

3. 染色结果呈阴性并非都是抗原不表达，要考虑是否与组织中的抗原受到破坏有关。

4. 组织切片背景深与下列因素有关：

- （1）石蜡切片脱蜡不干净；
- （2）第一抗体浓度过高或孵育时间过长，温度过高；
- （3）显色剂 DAB 浓度过高或 H₂O₂ 太多；
- （4）抗体不纯；
- （5）抗体孵育后切片清洗不干净。

六、免疫组化实验对照

为证实抗体和检测试剂盒效价是否可靠，染色操作是否正确，一般需要进行实验对照，以避免试剂失效或操作失当而出现假阴性和假阳性，确保染色结果的可靠性。

1. 阳性对照:选用已知染色中度阳性以上的组织切片染色，阳性切片应呈阳性，此外组织中的内对照也是很好的阳性对照。

2. 阴性对照:选用已知染色阴性的组织切片染色，其结果应为阴性。每次实验中增加 Vimentin 染色作为对照，目的是观察组织经福尔马林固定后预期抗原表达的敏感性，按福尔马林固定后抗原损伤的程度来进行分析。Vimentin 几乎在任何组织中都有表达，尤其适合活检组织中的免疫组化染色观察。在与上皮组织相连接的间质中存在着大量的血管 Vimentin 可阳性表达，如果在同一张切片的间质中出现 Vimentin 染色微弱或部分区域变弱的情况，表明是不当的固定导致抗原破坏。所以在每批次实验中应常规加入 Vimentin 染色，用于指导观察福尔马林固定后抗原表达敏感性情况。

七、抗体的保存和稀释

一般来说，抗体应放在 4℃冰箱中保存，第一抗体可分成小包装于-20℃保存，使用时存放在 4℃，不宜反复存放于 4℃和-20℃之间，反复冻融会使抗体效价下跌。检测系统一般不宜于-20℃保存，因为反复冻融使得与抗体结合的酶容易分解，导致检测的敏感度降低。浓缩的抗体在染色前应根据说明书要求或自行摸索出的最佳工作浓度进行稀释。可将抗体稀释至 1: 10，染色前再稀释成工作液。浓缩液抗体保存的时间较长，反之稀释后的抗体保存的期限较短，如使用即用型抗体，经过一定时间后应注意其效价时否有所降低，避免出现假阴性染色。

Nestin、PDGFR 可用于胃肠间质瘤的诊断指标，尤其对 CD117 阴性胃肠间质瘤在诊断上有很大的帮助，在国外已有文献报导。这两种抗体可用于常规固定的石蜡切片，经实验证明 Nestin 用 PH8.0 EDTA 高压修复，PDGFR 用 PH6.0 柠檬酸微波修复效果较好。