

免疫组化技术全程原理

一、概念和常用方法介绍

1、定义

用标记的特异性抗体对组织切片或细胞标本中某些化学成分의 分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究，这种技术称为免疫组织化学（immunohistochemistry）技术或免疫细胞化学（immunocytochemistry）技术。

2、原理

根据抗原抗体反应和化学显色原理，组织切片或细胞标本中的抗原先和一抗结合，再利用一抗与标记生物素、荧光素等的二抗进行反应，前者再用标记辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AKP）等的抗生物素（如链霉亲和素等）结合，最后通过呈色反应或荧光来显示细胞或组织中化学成分，在光学显微镜或荧光显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物，从而能够在细胞爬片或组织切片上原位确定某些化学成分의 分布和含量。

3、分类

- 1) 按标记物质的种类，如荧光染料、放射性同位素、酶（主要有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶）、铁蛋白、胶体金等，可分为免疫荧光法、放射免疫法、免疫酶标法和免疫金银法等。
- 2) 按染色步骤可分为直接法（又称一步法）和间接法（二步、三步或多步法）。与直接法相比，间接法的灵敏度提高了许多。
- 3) 按结合方式可分为抗原-抗体结合，如过氧化物酶-抗过氧化物酶（PAP）法；亲和连接，如卵白素-生物素-过氧化物酶复合物（ABC）法、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结（SP）法等，其中 SP 法是比较常用的方法；聚合物链接，如即用型二步法，此方法尤其适合于内源性生物素含量高的组织抗原检测。

4、目前几种常用免疫组化方法简单介绍

1) 免疫荧光方法

是最早建立的免疫组织化学技术。它利用抗原抗体特异性结合的原理，先将已知抗体标上荧光素，以此作为探针检查细胞或组织内的相应抗原，在荧光显微镜下观察。当抗原抗体复合物中的荧光素受激发光的照射后即会发出一定波长的荧光，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、检验中应用较广。

2) 免疫酶标方法

免疫酶标方法是继免疫荧光后，于 60 年代发展起来的技术。基本原理是先以酶标记的抗体与组织或细胞作用，然后加入酶的底物，生成有色的不溶性产物或具有一定电子密度的颗粒，通过光镜或电镜，对细胞表面和细胞内的各种抗原成分进行定位研究。免疫酶标技术是目前最常用的技术。

本方法与免疫荧光技术相比的主要优点是：定位准确，对比度好，染色标本可长期保存，适合于光、电镜研究等。

免疫酶标方法的发展非常迅速，已经衍生出了多种标记方法，且随着方法的不断改进和创新，其特异性和灵敏度都在不断提高，使用也越来越方便。目前在病理诊断中广为使用的有 ABC 法、SP 三步法、即用型二步法检测系统等。

3) 免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是以胶体金这样一种特殊的金属颗粒作为标记物。胶体金是指金的水溶胶，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。

5、被检测的物质

组织或细胞中凡是能作为抗原或半抗原，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。

6、特点

1) 特异性强。免疫学的基本原理决定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 三步法的出现，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，对病理学领域开展深入研究是十分有意义的。

7、从蛋白水平检测角度，免疫组化技术与 Western blotting、ELISA 的异同

1) **Western blotting**：蛋白质免疫印迹，也是利用抗体抗原反应原理，结合化学发光等技术来检查组织或细胞样品内蛋白含量的检测方法。与免疫组化技术相比，定量可能更加准确；当然 **Western blotting** 也可定性和定位(通过提取膜蛋白或核蛋白、胞浆蛋白分别检测其中抗原含量，进而间接反映它们的定位)，但敏感性远远低于免疫组化技术。

2) **ELISA**：酶联免疫吸附试验，也是利用抗体-抗原-抗原结合反应原理来检查体液或组织匀浆中蛋白含量的检测。与免疫组化技术相比，定量最准确，是分泌性蛋白检测首选方法之一。

关键环节剖析

1、酶免疫组化的关键环节

1) **标本固定**：固定的目的是①防止标本从玻片上脱落；②除去妨碍抗原-抗体结合的类脂，使抗原抗体结合物易于获得良好的染色结果；③固定的标本易于保存。固定剂的选择一般用 4%多聚甲醛，但睾丸组织、眼可能要选用 Bouin's 液或 mDF 液效果较好。

2) **脱水、石蜡包埋和制片**：脱水用梯度乙醇（由低到高）充分脱水、对组织要完全浸蜡、切片时刀片要干净和锋利。否则，容易裂片和脱片等。

3) **脱蜡和水化**：这是为了后面的抗体等试剂能够充分与组织中抗原等结合反应。脱蜡可以先 60 度 20min，然后立即二甲苯 1-3 分别 10min（这个时间是由二甲苯新鲜程度和室温等综合决定的），但当天制好的切片一般先 60 度 3-4h。水化用梯度乙醇（由高到低）。若脱蜡和水化不全易出现局灶性反应和浸洗不全，而产生非特异性背景着色。

4) **抗原修复**：由于组织中部分抗原在甲醛或多聚甲醛固定过程中，发生了蛋白之间交联及醛基的封闭作用，从而失去抗原性；通过抗原修复，使得细胞内抗原决定簇重新暴露，提高抗原检测率。常用的修复方法从强到弱一般分为三种，高压修复、微波修复、胰酶修复。修复液也分为若干种（具体的可以查阅相关资料，大量的：中性的、高 pH 的等）。我们实验室一般用微波修复中火 6min*4 次，效果不错。注意微波修复后自然冷却 30min 左右（只要你觉得修复液的温度达室温即可）。

5) **细胞通透**：目的是使抗体能够充分地进入胞内进行结合反应。一般用 Triton X-100、蛋白酶 k 等通透液。如 Triton X-100 可以溶解细胞膜、细胞核膜、细胞器膜上的脂质而使抗体及大分子结构的物质进入胞浆和胞核内，故在细胞免疫组化时尤为推荐使用，这样抗体就能顺利进入胞内与相应抗原结合。在免疫组织化学（>10um 厚切片）和免疫细胞化学中一般用 Triton X-100 作为细胞通透剂，在膜上打孔。同时也是一种去污剂，一般在 PBS 中加入后终浓度是 0.05%即可，而前者终浓度是 0.5%-1%。石蜡切片 4um 左右可以不通透，因为细胞已经被切开了。

6) **灭活内源性过氧化物酶和生物素**：在传统的 ABC 法和 SP 法中，免疫组化反应结果容易收到内源性过氧化物酶和生物素的干扰，必须用过氧化氢和卵白素等进行灭活。灭活内源性 POD 一般 3%过氧化氢灭活时间短点，可以 10min 左右，而 0.3%过氧化氢则可以适当延长封闭时间，一般 10~30min；用甲醇配置过氧化氢比双蒸水或 PBS 可能好在保护抗原和固定组织作用，过氧化氢孵育时间过长易引起脱片；现用现配，配好后 4 度避光保存。不过，现在已有“第二代即用

型免疫组化试剂盒”避免内源性生物素的干扰，推荐使用。

7) **血清封闭**：组织切片上有剩余的位点可以与一抗非特异性结合，造成后续结果的假阳性；封闭血清一般是和二抗同一起来源的，血清中动物自身的抗体，预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合；也可以用小牛血清、BSA、羊血清等，但不能与一抗来源一致。一般室温 10-30min。但也要防止封闭过度

8) **一抗和二抗浓度和孵育时间**：一抗孵育条件在免疫组化反应中最重要，包括孵育时间、温度和抗体浓度。一抗孵育温度有几种：4度、室温、37度，其中4度效果最佳；孵育时间：这与温度、抗体浓度有关，一般37度1-2h，而4度过夜和从冰箱拿出后37度复温45min。具体条件还要摸索。二抗孵育条件：二抗一般室温或37度30min-1h，具体时间需要摸索，而浓度一般有工作液，若是浓缩液还要摸索浓度。但在免疫组化中我们一般先把二抗浓度和孵育时间先定下，然后去摸索一抗浓度和孵育时间。建议一抗反应在4度最佳，反应温和，但时间最好超过16~24h。

9) **抗体稀释液**：其实许多实验室抗体稀释液就用一般PBS即可，但专用的抗体稀释液中除PBS成份外，还加了叠氮化钠防腐剂、BSA稳定剂等组份，对抗体的多次回收利用较好。正因为这种原因，我一直用国产的专用抗体稀释液，一段时间在更换新抗体稀释液时实验结果出现了阴性结果（提示可能一抗没有结合），最后从抗体浓度和孵育时间、封闭时间等原因排除后，发现是新抗体稀释液的PH值偏酸，而使抗原抗体反应不佳，终而出现假阴性结果。

10) **切片清洗（浸洗、冲洗和漂洗）**：为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色，所以适当地加强清洗（延长时间和增多次数）尤为重要，我一般在一抗孵育前的清洗是3min*3次，而一抗孵育后的清洗均为5次*5min。注意：①单独冲洗，防止交叉反应造成污染。②温柔冲洗，防止切片的脱落。我喜欢用浸洗方式；③冲洗的时间要足够，才能彻底洗去结合的物质。④PBS的PH和离子强度的使用和要求。这方面我有惨痛教训，当时我买的抗体稀释液偏酸，结果背景一片黄（未见特异性染色），建议PH在7.4-7.6浓度是0.01M。（中性及弱碱性条件（PH7-8）有利于免疫复合物的形成，而酸性条件则有利于分解；低离子强度有利于免疫复合物的形成，而高离子强度则有利于分解）

11) **DAB显色**：背景的深浅和特异性染色的深浅均可以由DAB孵育条件决定。DAB显色时间不是固定的，主要由显微镜下控制显色时间，到出现特异性染色较强而本底着色较浅时即可冲洗；DAB显色时间很短（如几秒或几十秒）就出现很深的棕褐色，这很可能说明你的抗体浓度过高或抗体孵育时间过长，需要下调抗体浓度或缩短你的抗体孵育时间；此外，若很短时间就出现背景很深，还有可能你前面的封闭非特异性蛋白不全，需要延长封闭时间；DAB显色时间很长（如超过十几分钟）才出现阳性染色，一方面可能说明你的抗体浓度过低或孵育时间过短（最好一抗4度过夜）；另一方面就是封闭时间过长。

12) **复染**：目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位，经常用苏木素复染（胞核染料）。注意苏木素复染时间要看当时的室温、溶液的新旧、目标抗原的定位等情况，一般数秒-数分钟，胞浆蛋白可以适当时间长一点，而胞核蛋白则要短。不过这个如果染色不理想可以补救的。方法是：染色深则分化时间稍长些即可；染色浅则再置于苏木素中染色即可。盐酸酒精是分化，氨水是返兰。作用不同。片子复染完后流水振洗，然后置于盐酸酒精中数秒（一定动作要快）后拿出流水振洗，在放入氨水中返兰即可。

13) **封片**：为了长期保存，我们一般用中性树胶等封片，避免产生气泡，方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液，然后一手拿住盖片某一拐角，而另一手拿对面的那个拐角，接近封片液近端的拐角先降低，直至接触到液体时为止；当发现液体接触面在不断弥散时，则可以缓慢降低另一拐角，这样一般不会产生气泡。

2、免疫荧光方法中的重要环节

1) **冰冻切片制备**：建议用新鲜组织，否则组织细胞内部结构破坏，易使抗原弥散。选用干净锋利的刀片、组织一定要冷冻适度等，防止裂片和脱片严重。

2) **组织切片固定**：切好片风干后立即用冰丙酮等固定液进行固定 5-10min，尤其要较长时间保存的白片，一定要及时固定和适当保存。

3) **血清封闭**：为防止内源性非特异性蛋白抗原的结合，需要在一抗孵育前先用血清（与二抗来源一致）封闭，减弱背景着色。血清封闭的时间是可以调整的，一般 10-30min。

4) **一抗孵育条件**：在免疫组化反应中最重要，包括孵育时间和抗体浓度。一抗孵育温度有几种：4 度、室温、37 度，其中 4 度效果最佳；孵育时间：这与温度、抗体浓度有关，一般 37 度 1-2h，而 4 度过夜和从冰箱拿出后 37 度复温 45min。具体条件还要摸索。

5) **二抗孵育条件**：二抗一般室温或 37 度 30min-1h，具体时间需要摸索，而浓度一般有工作液，若是浓缩液还要摸索浓度，切记要避免光反应。但在免疫荧光中我们一般先把二抗浓度和孵育时间先定下，然后去摸索一抗浓度和孵育时间。最后，荧光素标记的二抗随着保存时间的延长，可能有大量的游离荧光素残留，需要注意配制时小包装和并进行适当的离心。

6) **复染**：目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位。一般常用 DAPI 复染。

7) **封片**：为了长期保存，我们一般用缓冲甘油等封片，此外还有专门的抗荧光淬灭封片液。避免产生气泡，方法是直接在载玻片组织上滴一滴封片液，然后一手拿住盖片某一拐角，而另一手拿对面的那个拐角，接近封片液近端的拐角先降低，直至接触到液体时为止；当发现液体接触面在不断弥散时，则可以缓慢降低另一拐角，这样一般不会产生气泡。

8) **切片清洗**：为了防止一抗、二抗等试剂残留而引起非特异性染色，所以适当地加强清洗（延长时间和增多次数）尤为重要，我一般在一抗孵育前的清洗是 3min*3 次，而一抗孵育后的清洗均为 5 次*5min。注意（1）单独冲洗，防止交叉反应造成污染。（2）温柔冲洗，防止切片的脱落。我喜欢用浸洗方式；（3）冲洗的时间要足够，才能彻底洗去结合的物质。（4）PBS 的 PH 和离子强度的使用和要求。这方面我有惨痛教训，当时我买的抗体稀释液偏酸，结果背景一片黄（未见特异性染色），建议 PH 在 7.4-7.6 浓度是 0.01M。（中性及弱硷性条件（PH7-8）有利于免疫复合物的形成，而酸性条件则有利于分解；低离子强度有利于免疫复合物的形成，而高离子强度则有利于分解）

9) **拍照**：有条件的话最好立即拍照，若不能及时拍照，也要封好片和用指甲油封固，保持避光和湿度。使用荧光显微镜注意严格按照荧光显微镜出厂说明书要求进行操作，不要随意改变程序；应在暗室中进行检查；防止紫外线对眼睛的伤害，在调整光源时应戴上防护眼镜；检查时间每次

以 1~2h 为宜, 超过 90min, 超高压汞灯发光强度逐渐下降, 荧光减弱 标本受紫外线照射 3~5min 后, 荧光也明显减弱或褪色; 激发光长时间的照射, 会发生荧光的衰减和淬灭现象; 所以最多不得超过 2~3h; 荧光显微镜光源寿命有限, 标本应集中检查, 以节省时间, 保护光源。天热时, 应加电扇散热降温, 新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再启用时, 须待灯光充分冷却后才能点燃。一天中应避免数次点燃光源。关闭汞灯至少在开启 15-30 分钟后; 标本染色后立即观察, 因时间久了荧光会逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃ 保存, 可延缓荧光减弱时间, 防止封裱剂蒸发; 使用的玻片等载体, 都必须厚度均匀, 无明显的自发荧光, 如果使用油镜, 还必须保证镜油为无荧光镜油; 电源最好装稳压器, 否则电压不稳不仅会降低汞灯的使用寿命, 也会影响镜检的效果。