

免疫组化技术

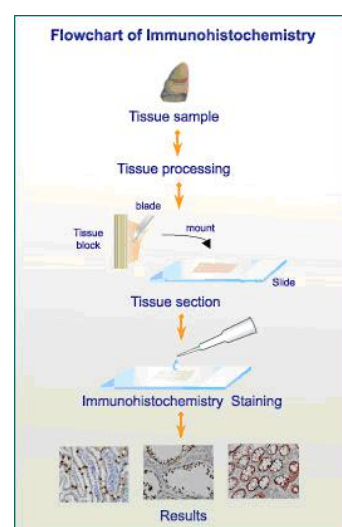
免疫组化技术的全称为免疫组织化学技术（Immunohistochemistry, IHC）。免疫组化于上世纪 40 年代出现，在 60 年代后发展迅速，经历了几十年的快速发展，该技术应用范围已覆盖到医学各个学科，已经成为当今生物医学形态、功能、代谢综合研究的一项有力工具。

什么是免疫组化技术（IHC）？

免疫组化，是用标记的特异性抗体对组织内抗原的分布进行定性，定位分析的检测技术。

免疫组化技术原理

免疫组化技术原理是：从待检测组织或细胞中提取蛋白作为抗原，通过[免疫动物获得特异性抗体](#)，利用抗体探测并结合组织（或细胞）中的抗原。再利用带显色剂标记的二抗检测，对细胞复染显示细胞轮廓，通过显微镜观察，可以实现对组织或细胞内蛋白的定性、定位研究。



免疫组化技术与 WB、ELISA 区别

免疫组化、Western Blot、ELISA 被称为免疫学三大工具，分别用于定位，定性和定量检测。

	免疫组化	Western Blot	ELISA
实验原理	免疫反应；化学显色反应	免疫反应；化学显色反应	免疫反应；化学显色反应
检测样品	组织石蜡切片或冰冻切片	蛋白	血清、细胞、组织培养上清等
定位检测	是	否	否
定性检测	是	是	是
定量检测	半定量 ^[1]	半定量	定量检测

表 1：免疫组化、Western Blot、ELISA 的区别

免疫组化技术应用

定位和定性是免疫组化最大的优势。相比于其他蛋白检测方法，免疫组化具有定位较直接准确、定性灵敏度高，是定位检测分析首选方法，尤其对于有些因子的转位研究十分有用。免疫组织化学的临床应用主要包括以下几方面：

恶性肿瘤的诊断与鉴别定性；

确定转移性恶性肿瘤的原发部位；

对某类肿瘤进行进一步的病理分型；

软组织肿瘤诊断；

为临床提供治疗方案的选择；

近年来，随着免疫组织化学技术的发展和各种特异性抗体的出现，使许多疑难肿瘤得到了明确诊断。免疫组化在肿瘤诊断和鉴别诊断中的实用价值受到了普遍的认可，其在低分化或未分化肿瘤的鉴别诊断时，准确率可达50%-75%。

免疫组化实验步骤

根据标记物的不同（标记物有荧光染料、放射性同位素、酶、铁蛋白、胶体金等），免疫组化方法可以分为：免疫酶法、免疫荧光法、亲和组织化学法、免疫铁蛋白法、免疫金法及放射免疫自影法等。其中比较常用的是免疫酶法、免疫荧光法、亲和组织化学法，本文以免疫酶法为例，对免疫组化的操作流程做一介绍。

实验步骤

免疫酶法的实验流程为：对事先制备好的组织石蜡切片进行脱蜡与水化→细胞通透→抗原修复→封闭特异性蛋白→孵育及染色→脱水、封片、镜检。根据孵育与显色反应等步骤操作方法的不同，可以将免疫酶法进一步分为 Elivision 二步法、SP 法（链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法）、ABC 法（卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法）、SABC 法（链霉卵白素-辣根酶标记生物素法）等方法。

即用型 Elivision 快速酶免疫组化二步法的孵育及显色流程：一抗+酶标二抗+辣根酶底物显色。

SP 法的孵育及显色流程：一抗+生物素二抗+滴加试剂 SP（链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物）+辣根酶底

物显色，SP 是最常用的实验方法。

ABC 法的孵育及显色流程：一抗+生物素二抗+滴加试剂 ABC（卵白素-生物素-过氧化物酶复合物）+辣根酶底物显色。

SABC 法的孵育及显色流程：一抗+生物素二抗+滴加试剂 SABC（链霉卵白素-辣根酶标记生物素复合物）+辣根酶底物显色。

- 脱蜡与水化：脱蜡与水化的目的是确保抗体能够充分与组织中抗原结合发生反应。
- 细胞通透：细胞通透的目的是使抗体能充分的进入胞内进行结合反应。一般用 Triton X-100、蛋白酶 K 等通透液对细胞进行通透。
- 封闭内源性过氧化物酶：封闭内源性过氧化物酶的主要目的是降低内源性过氧化物酶活性。在传统的 ABC 法和 SP 等方法中，免疫组化反应结果容易受到内源性过氧化物酶的影响，必须用 H₂O₂ 等进行灭活。
- 抗原修复、暴露抗原决定簇：在石蜡切片制备过程中，组织中部分抗原由于发生了蛋白之间交联及醛基的封闭作用从而失去抗原性，需要通过抗原修复，使细胞内抗原决定簇重新暴露。
- 封闭非特异性蛋白：组织切片上有些剩余的位点可以与抗体非特异性结合，造成后续结果的假阳性，因此要进行非特异性蛋白封闭。封闭血清通常选择与二抗同来源的非免疫血清，血清中有一些动物自身的抗体，预先能和组织中有交叉反应的位点发生结合，从而避免了抗体与组织切片的非特异性结合。
- 一抗孵育：通过孵育使一抗特异性的结合底物。
- 二抗孵育：二抗带有生物素标记（二步法二抗带有的标记为显色标记），孵育后二抗与一抗结合，目的是检测一抗。
- 染色：常用的染色方法有 SP 法、ABC 法、SABC 法等。其原理是利用抗生物素蛋白或卵白素与二抗上的生物素结合，从而间接达到将显色剂与二抗结合的目的。
- 显色：在免疫组化中，由于抗原抗体形成的复合物本身没有颜色，不能直接观察，只能借助于其他某些化学基团的显色作用（例如酶与底物的显色反应），使复合物显色，便于在显微镜下观察。

- 复染：复染的目的是形成细胞轮廓，从而更好地对目标蛋白进行定位，常用的复染试剂为苏木素。
- 脱水、透明、封片、镜检

结果分析

免疫组化实验通常需要设置阳性对照、阴性对照（或替代对照）（阳性对照是排除方法和实验系统有无问题；阴性对照与替代对照是排除有无非特异性染色）。

一般情况下，阳性对照颜色的特点为：Ag 定位，包浆、胞核、胞膜、间质具有结构性。且染色的强度不同（颜色深浅不一）；阴性对照的特点为：染色细胞与组织无区别，颜色具有弥散性，分布均匀。

阳性对照	阴性对照 (或替代对照)	实验组	结论
-	-	-	操作错误
+	+	+	非特异性反应
+	+	-	阴性对照含定位 Ag
-	-	+	阳性对照不含定位 Ag
-	-	+	受检组织非特异性染色
+	-	+	受检组织不含定位 Ag
+	-	+	受检组织含定位 Ag

表 2：免疫组化实验可能出现结果分析对照表

注：+表示实验有特异性染色；-表示实验无特异性染色

上表为免疫组化实验中可能出现的结果，由上表可以看出，只有 6、7 组的实验结果有意义。1~5 的实验结果因 IHC 技术操作存在错误等原因使对照组的实验结果失去对照意义，必须重复实验或者换用 Ab。

说明：免疫组化实验可以对结果进行定量分析，但要实验得到的必须是高质量的染色切片，要求背景染色浅且特异性染色较深，这样分析的结果才会比较准确。

实验失败常见问题分析：

- 为什么在显微镜下观察发现所有的切片都成阴性？

答：这种现象主要是由操作不当导致，可能的原因有：

1. 染色操作不当，致使染色失败；
2. 漏加一种抗体或者制备出的抗体没有活性；
3. 缓冲液中有叠氮化钠，抑制了酶的活性；
4. 复染或脱水剂使用不当等。建议逐一排查，找到原因后重新进行实验。



- 在显微镜下观察发现所有的切片都成阳性，这是为什么？

答：与上一个问题类似，出现的原因也是试验操作存在问题，可能的原因有：1.切片在染色过程中抗体过浓，或者干片了；使用的呈色底物溶液已变色或呈色反应时间过长；3.抗体温育的时间过长等。

- 在显微镜下观察发现切片的背景很深，这是为什么？

答：以下几方面会导致切片的背景过深：

1. 蛋白质封闭不够或所用血清溶血，造成抗体的非特异性反应；
2. 内源性过氧化酶没有完全阻断，显色过程中过氧化酶与酶底物反应，造成背景；3.底物呈色反应时间过长或呈色反应后漂洗不彻底。

注意事项

- 切片脱蜡和水化要充分，加反应液时要覆盖组织充分；每次加液前甩干洗涤液，同时防止干片。
- 一抗的冲洗原则：单独冲洗，防交叉反应污染；温柔冲洗，防止切片脱落；推荐浸洗方式。
- 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。

注释：[1] 半定量是介于定性与定量之间的一种分析方法，指虽然可以得到一个量值，但是这个量值只能从趋势上进行分析，例如大量、少量、微量、痕量等，而得不到一个具体的数值（例如浓度等）。

