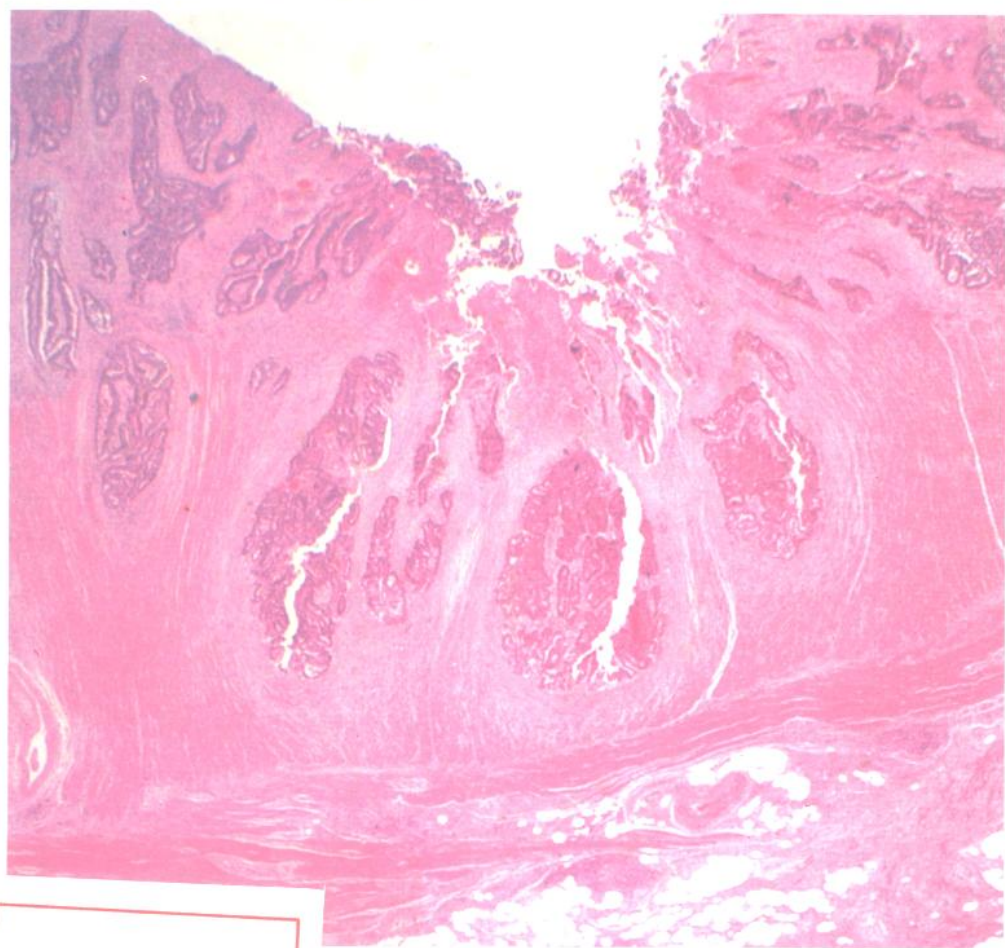


实用免疫组织 化学技术与图谱

于颖彦 张 伟 [日]冈田 茂 编著



R392.11-64
YYY

...AS OF APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY

北医大图书馆

实用免疫组织化学技术与图谱

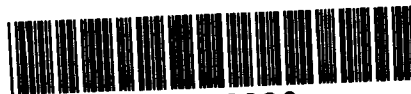
Technique and Atlas of Applied Immunohistochemistry

于颖彦 张 伟 编著
[日] 冈田 茂



上海科学普及出版社

R392.11-64
YYY



A1C01198930

(沪)新登字第 305 号

责任编辑 丁有如

实用免疫组织化学技术与图谱

于颖彦 张伟 编著

[日] 冈田茂

上海科学普及出版社出版

(上海曹杨路 500 号 邮政编码 200063)

新华书店上海发行所发行 上海市印刷七厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 6.5

1996 年 6 月第 1 版 1996 年 6 月第 1 次印刷

印数 1—3000

ISBN 7-5427-1076-1/R·78 定价:68.00 元

前 言

自70年代中期杂交瘤技术与单克隆抗体问世,特别是敏感而简便的免疫酶标技术能够应用于常规福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片,使免疫组织化学方法广泛应用于临床病理及医学科学研究。目前,在日本等发达国家,该方法的应用范围已不仅局限于实验室研究领域,在一般大、中型医院(具有病理检查室)的临床病理鉴别诊断中,已作为辅助手段常规使用。该方法能够从形态和功能两个方面较为客观地反映疾病的性质,可明显提高医院的诊断准确率。

80年代初期,我国一些大专院校及科研机构,逐渐引进该项技术用于医学科学研究。随着近年改革开放的深化,国外各种单克隆、多克隆抗体,通过多种渠道源源流入我国,国内不少研究机构及生物制品公司也不断推出各种抗体,使免疫组织化学方法作为常规辅助检查手段进入我国日常病理诊断指日可待。国内80年代末期及90年代初期,虽然陆续有关于免疫组织化学及单克隆抗体技术等方面的专著问世,但多缺乏可供实用的彩色图片。有些书即使附有少量图片,也均为黑白照片,无法真实地再现免疫组织化学反应的鲜明色彩,对于未从事过该项工作的广大读者来说,不免有难以理解之感。

本书中方作者多年留学于国外医科大学研究室及医院病理科,从事免疫组织化学方法的临床及医学科学的研究,不但具有较丰富的实践经验,还积累了数十种单克隆及多克隆抗体在人体不同组织及肿瘤表达情况的照片数百余幅,实属珍贵。本书作者之一日本冈山大学医学部病理学教授冈田茂先生多年来热心于中日两国之间的文化交流,为两国间的人才培养及共同研究等方面作出了贡献,并为本书的撰写及出版策划等方面给予了热心的指导。在中日双方的共同努力下使该书得以与读者见面。

本书精选200余幅彩色照片,并附加注释,注重实用性,力求达到一书在手即可进行免疫组织化学方法的病理诊断及医学科学的研究。由于目前各类抗体商品化的普及,有关抗原提取和抗体制备等复杂操作过程在此不作过多介绍。

本书在原始资料的积累及整理过程中,得到日本冈山大学医学部病理学教室获野哲也医学博士的大力支持与协助,在此深表谢意。由于本书涉及内容广泛,缺点与错误在所难免,恳请读者批评指正。

编 者

1995年6月

目 录

第一章 基本理论与方法	(1)
第一节 免疫球蛋白.....	(1)
第二节 免疫组织化学基本方法.....	(2)
第三节 组织学标本中免疫酶组织化学染色程序.....	(6)
第四节 细胞学标本中免疫酶组织化学染色程序.....	(8)
第五节 设立对照.....	(8)
第六节 非特异性染色的处理.....	(9)
第七节 评价染色结果	(10)
第八节 细胞增殖能解析中常用抗体	(11)
第九节 肿瘤诊断中常用抗体	(14)
第十节 抗体的管理	(15)
第十一节 制成标本的摄影技巧	(16)
第十二节 本书涉及抗体的简称、全名及用途一览.....	(16)
第二章 图解免疫酶组织化学	(19)
第一节 软组织及其肿瘤	(19)
第二节 淋巴造血系统	(25)
第三节 神经系统	(43)
第四节 消化系统	(50)
第五节 泌尿生殖系统及乳腺	(61)
第六节 神经内分泌系统与其它	(75)
附录一 与本书有关试剂的配制方法	(97)
附录二 英汉名词对照索引	(99)


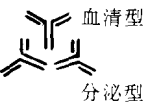



第一章 基本理论与方法

第一节 免疫球蛋白

免疫球蛋白 (Immunoglobulin) 即所谓的抗体蛋白, 简称 Ig。是一组具有免疫活性、在结构上有一定联系的不同种蛋白质。现已证明由 B 淋巴细胞受抗原刺激后增殖衍化而成的浆细胞所分泌。Ig 可根据其大小、分子量、结构、功能以及其它性状分为 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。它们的生物学性状归于表 1-1。免疫组织化学方法中所用的抗体多数为 IgG, 仅有少量为其它 Ig。

免疫球蛋白在结构上是由四条多肽链组成, 总体上呈 Y 字形, 图 1-1 为免疫球蛋白结构模式图。两条长链为重链 (Heavy chain), 免疫球蛋白根据重链抗原性的不同又分为五类, 即 γ 、 μ 、 α 、 σ 及 ϵ 。两条短链为轻链 (Light chain), 所有免疫球蛋白分子的轻链只有两种, 即 κ 链和 λ 链。 κ 型占 65%, λ 型占 35%。不同人与不同种族之间略有差异。重链与轻链之间依靠 S-S 二硫键结合而连在一起。IgG 分子靠近氨基端 (N 末端) 的部分为可变区 (Variable Region), 可变区决定与抗原结合的特异性, 故可变区依抗体不同而有别。其余各部分则各种抗体都一致, 称为恒定区 (Constant region)。用植物性蛋白分解酶木瓜蛋白酶 (Papain) 分解的 IgG 断裂成两个 Fab 片断 (Fragment antigen binding) 及一个 Fc 片断 (Fragment crystallizable), 这一片断可以结晶。用胃蛋白酶 (Pepsin) 可将 IgG 断裂为一个 $F(ab')_2$ 片断及一个 Fc' 片断。 $F(ab')_2$ 片断 C 末端的二硫键被还原后则称为 2Fab' 片断。Fab 单片的分子量约为 4.5 万, $F(ab')_2$ 双片的分子量约为 10 万, 均比 Ig 全分子量小, 但两者却完整地保留与相应抗原结合的能力。因此在免疫组织化学染色中可以代替全 Ig 分子应用。由于其分子量小, 对组织及细胞的穿透力强, 故适用于细胞涂片、印片或冰冻厚切片时完整细胞胞浆内抗原的定位。

表 1-1 免疫球蛋白种类与性状

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
沉降系数	6.65S	7S (11S)	19S	7S	8S
分子量 (万)	15	17 (40)	90	18	20
电泳图	γ (β)	β (γ)	γ - β	γ - β	γ β
H 链	γ	α	μ	δ	ϵ
L 链	κ 、 λ	κ 、 λ	κ 、 λ	κ 、 λ	κ 、 λ
链构成	$\kappa_2\gamma_2$ $\lambda_2\gamma_2$	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ $(\lambda_2\alpha_2)_n$	$(\kappa_2\mu_2)_5$ $(\lambda_2\mu_2)_5$	$\kappa_2\delta_2$ $\lambda_2\delta_2$	$\kappa_2\epsilon_2$ $\lambda_2\epsilon_2$
正常值 (mg/ml)	12.4	2.8	1.2	0.03	0.0003
通过胎盘	++++	-	-	-	---
构造模式					

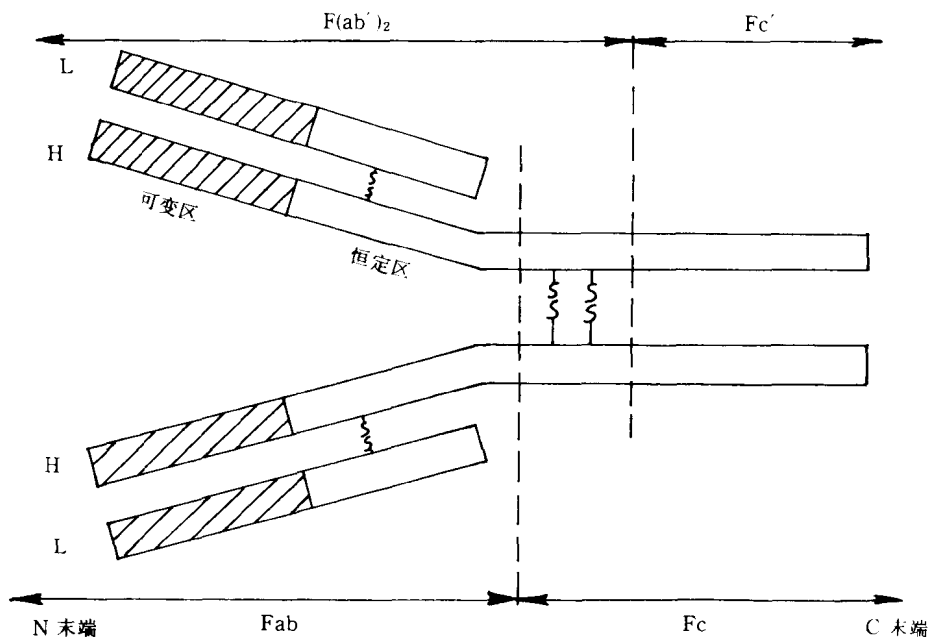


图 1-1 免疫球蛋白的分子构造模式图

自然界的抗原物质一般都有多个抗原决定簇，因此所诱导浆细胞产生的抗体都是针对许多抗原决定簇的混合物，也即由多个 B 细胞株同时受到刺激发生转化而产生的抗体，习惯上称之为多克隆抗体 (Polyclonal antibody)。由单一 B 淋巴细胞株 (又称克隆) 对单一抗原决定簇所产生的抗体称之为单克隆抗体 (Monoclonal antibody)。制取单克隆抗体需要在体外将小鼠 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞相融合，通过细胞融合后的杂交瘤细胞可以与骨髓瘤细胞一样在细胞培养中长期存活，并且和 B 淋巴细胞一样产生抗体。这种杂交瘤细胞产生的抗体是单克隆抗体。

第二节 免疫组织化学基本方法

免疫组织化学方法包括范围广泛，按与抗体结合的标记物种类可分为免疫荧光法、免疫酶组织化学法、免疫金银法、免疫铁蛋白法和放射免疫自显影法等。本章仅就免疫组织化学技术中常用的免疫荧光法和免疫酶组织化学法介绍如下。

一、免疫荧光法

有些物质在紫外线照射下可发出荧光，称为荧光物质或荧光素。常用的荧光素为异硫氰酸荧光素 (FITC)，其次为四乙基若丹明 B 或称丽丝氨若丹明 B (RB₂₀₀)，FITC 呈黄绿色荧光，RB₂₀₀ 荧光效率较低，特异性染色稍差，但因呈橙红色荧光，可以与发黄绿色荧光的 FITC 作对比染色。免疫荧光法的基本原理是将已知抗体分子标记上荧光素，再与其对应的抗原起反应，形成的抗原抗体复合物带有一定量的荧光素，在荧光显微镜下可以观察到发出荧光的抗原抗体结合部位。按照抗原抗体反应的结合步骤，免疫荧光染色方法主要有以下三种。图 1-2 为免疫荧光法原理模式图。

(一) 直接法

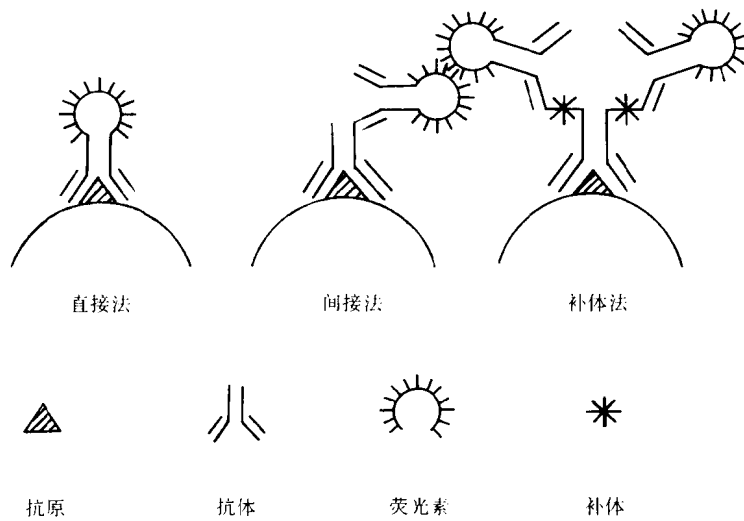


图 1-2 免疫荧光染色原理模式图

如图 1-2 所示,直接法是利用标有荧光素的特异性抗体直接与标本中相应抗原相结合来检测未知抗原的方法。优点是简单、需时短、特异性高;缺点是一种标记抗体只能检测一种抗原,且敏感性较差,观察时须用高分辨力的荧光显微镜。

染色方法如下。

1. 新鲜组织冷冻切片或涂片先用甲醇或丙酮固定,冷风吹干。
2. 用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 1~2 次。
3. 滴加适当稀释的荧光抗体液于切片上, 37℃, 30 分钟。
4. PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 分钟。
5. 荧光显微镜观察或用无自发荧光的 50% 缓冲甘油封片。为防止干燥,可用石蜡封堵盖玻片周围,暂存冰箱中过夜。

(二) 间接法

间接法需用两种抗体,即第一抗体和标有荧光素的第二抗体。本法中未标记的第一抗体对标本中的抗原来说起抗体作用,但对标记有荧光素的第二抗体来说又起着抗原作用。该法优点是一种荧光素标记的抗体可应用于多种第一抗体,只要第一抗体是从同一种动物中产生的均可应用,而且敏感性较直接法高 10 倍左右。缺点是参加反应的因子较多,产生非特异性染色的机会也增多,且染色时间较长。

染色方法如下。

1. 切片固定同直接法。
2. PBS 液冲洗。
3. 滴加未标记的第一抗体, 37℃, 30 分钟。
4. PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 分钟。
5. 滴加标记荧光素的第二抗体, 37℃, 30 分钟。
6. PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 分钟。
7. 荧光显微镜观察或用 50% 缓冲甘油封片, 冰箱中保存。

(三) 补体法

如图 1-2 所示,补体法是间接法的一种改良方法。它是用特异性抗体同新鲜补体混合后再与切片上的抗原反应,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补体结合,形成抗原-抗体-补体-抗补体荧光抗体复合物。补体法不仅具有间接法的敏感性,而且荧光抗体不受免疫血清的动物种属限制,一种荧光抗体就能检测所有的抗原抗体系统。缺点是较间接法更容易出现非特异性染色,且补体不稳定,故每次均要采取新鲜血清,操作上比较麻烦。

染色方法如下。

1. 切片固定同直接法。
2. PBS 液冲洗。
3. 滴加 1:1 适当稀释的抗体及补体混合物, 37℃, 30 分钟。
4. PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 分钟。
5. 滴加适当稀释的抗补体荧光抗体, 37℃, 30 分钟。
6. PBS 液冲洗 2 次, 每次 5 分钟。
7. 荧光显微镜观察或用 50% 缓冲甘油封片, 冰箱中保存。

(四) 荧光染色注意事项

1. 染色反应最好在湿盒内进行,以避免标本上染色试剂的干燥。染色试剂的干燥是造成非特异性染色反应的原因之一。

2. 染色反应的酸碱度以接近体液环境为宜(pH7.4 左右),因此切片冲洗液及抗体稀释液均应注意酸碱度的调整。

3. 组织要求新鲜,最好使用冰冻切片。

4. 切片经荧光染色后,应及时观察并照相,不宜长期保存,以免褪色。切片在 4℃ 冰箱中过夜,其特异性荧光约褪色 30%,保存 1 周,约褪色 50% 以上。

5. 抗体稀释度以获得最佳染色效果、背景非特异性染色最小为标准。因此对每一批抗体必须试验摸索,以找出最佳稀释度。

6. 各染色步骤之间应使用缓冲液充分洗涤,最好使用磁力振荡器,以减少背景非特异性染色。

7. 为防止抗体效价下降,应尽量减少抗体溶液的冻溶次数。

8. 若非特异性染色过强时,在染色反应之前可先将荧光抗体液离心,去除沉淀物后再使用。

9. 缓冲甘油的配制方法:纯甘油 20ml,加入 0.5M pH9.5 碳酸缓冲液 20ml,充分混匀。

10. 必须同时进行对照染色,以区别真假阳性反应。可供选择的对照染色方法有以下几点。

(1) 阻断试验:先用非荧光标记的特异抗体与标本内的相应抗原反应,再用荧光标记的特异性抗体进行染色反应,结果应该阴性。

(2) 吸收试验:用已知抗原与荧光标记抗体反应,然后离心除去反应液中的沉淀物。再用上清液与标本内的抗原反应,结果应该阴性。

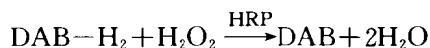
(3) 阳性对照:即用已知存在某种相应抗原的组织标本同时染色。

(4) 空白对照:用不存在特异性抗体的血清(正常血清)进行染色,结果应该为阴性。

二、免疫酶组织化学法

免疫酶组织化学法(Enzyme labelled immunohistochemical method)是用酶蛋白作为标

记物来标记抗体的一种方法。它通过免疫反应后追加标记物酶催化底物的组织化学反应，得到具有一定电子密度的有色产物。反应结果既可以用光学显微镜观察，也可以用电子显微镜观察，且不需要荧光显微镜等特殊设备。作为标记物使用的酶有多种，但利用率最高的是由西洋辣根中提取出的植物性过氧化酶，通常称为辣根过氧化酶 (Horseradish peroxidase)，简称 HRP。HRP 是分子量约为 4 万的糖蛋白，通过以过氧化氢 (H₂O₂) 作为受氢体，以还原型 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 作为供氢体来催化氧化还原反应。通过反应生成有色的氧化型 DAB 产物。氧化型 DAB 为暗褐色沉淀。其反应方程式如下。



免疫酶组织化学染色根据其抗原抗体的反应形式不同，有以下四种主要方法 (图 1-3)。

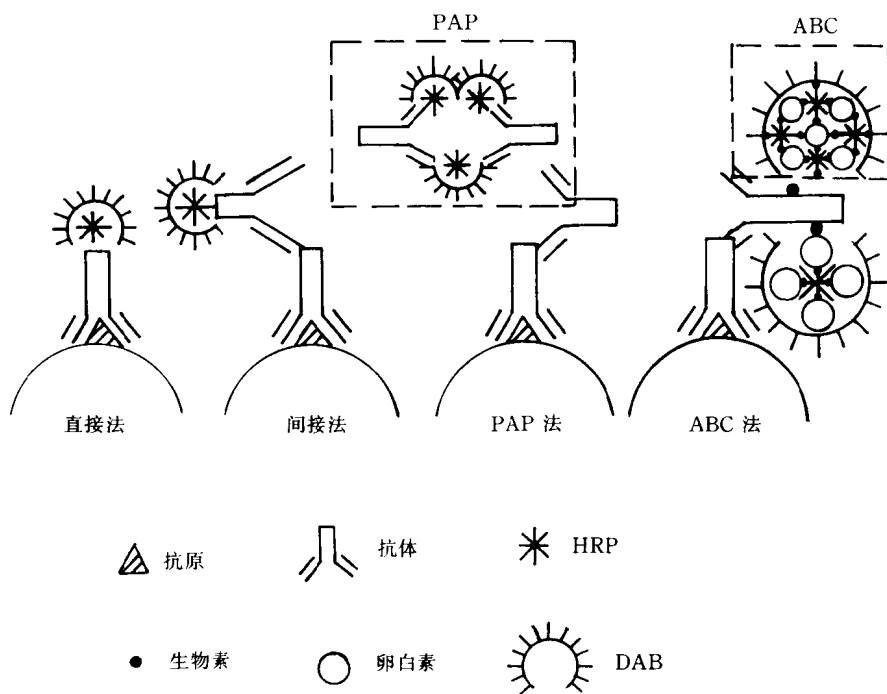


图 1-3 免疫酶组织化学方法模式图

(一) 直接法

如图 1-3 所示，直接法是将 HRP 标记的抗体直接与标本中相应的抗原结合，再与酶的底物作用产生有色产物。此法操作简便，时间短，反应次数少，产生非特异性反应的机会也少。缺点是一种标记抗体只能检测一种抗原，手中无所需抗体时只能自行制备或改用其它方法。直接法最常用于肾活检组织以及结缔组织病皮肤活检标本的 IgG、IgA、IgM 和 C₃ 等的检测。

(二) 间接法

间接法中作为检出抗原用的第一抗体为未标记状态，然后用针对第一抗体的酶标记第二抗体相作用，最后经 DAB 显色，间接地把标本中的抗原显示出来。此法比直接法应用广泛，因为只要是同种动物产生的第一抗体，无论针对何种抗原，均能用同一种动物产生的酶标记第二抗体，并且敏感性较直接法高。间接法主要用来检查血清中的抗体，如抗核抗体、抗甲状腺抗体、抗线粒体抗体、抗单纯疱疹病毒抗体等。如以病人血清作为第一抗体与标本中的

抗原相互作用,然后用酶标记抗人免疫球蛋白作为第二抗体,若病人血清中有针对标本中抗原的抗体存在,则即可出现阳性反应。

(三) 过氧化酶抗过氧化酶法

过氧化酶抗过氧化酶法(Peroxidase antiperoxidase method,简称PAP法)中有第一抗体、第二抗体和PAP复合物三种关键试剂。第一抗体为抗原特异性抗体,第二抗体是联结第一抗体与PAP的桥梁。第一抗体与PAP复合物产生于同一种动物中。PAP法比直接法和间接法更敏感,特别适用于石蜡切片中微量抗原和抗原性减弱抗原的检测。但PAP法步骤较多,花费时间较长,因此不适用于临床常规检查。PAP法主要用于肿瘤的鉴别诊断,特别是对低分化癌和转移性肿瘤,由于它可用于石蜡包埋切片的染色,故可用于回顾性研究。

(四) 卵白素生物素法

卵白素生物素法(Avidin biotin complex method,简称ABC法)是利用生物素与卵白素之间具有牢固结合力的特性而发展出来的一种方法,并非抗原抗体反应。卵白素上有4个蛋白亚基可供生物素或酶偶联,因此可作为桥梁联结生物素标记的抗体或生物素化的过氧化酶。卵白素与生物素之间的亲和力较抗原抗体反应的结合力高100倍以上,故此方法较PAP法敏感性高。一般说来,卵白素与生物素化的过氧化酶是按1:1的比例混合使用。目前,混合好的ABC复合物在国外也已商品化,通常与生物素化的抗体一起作为试剂盒出售,故使用起来极为方便。ABC法与PAP法一样可以用来检查石蜡切片中的抗原。由于本法敏感性高,第一抗体及第二抗体可以高度稀释,减少了背景非特异性染色。

第三节 组织学标本中免疫酶组织化学染色程序

本节主要介绍几种常用免疫酶组织化学法在组织学标本中的染色程序和主要试剂的配制方法。

一、直接法染色程序

1. 冰冻切片风干后用丙酮固定5~10分钟,然后用0.3%的过氧化氢甲醇溶液室温处理25~30分钟,或3%的过氧化氢甲醇溶液处理5分钟,以阻断内源性过氧化酶。

石蜡切片常规脱蜡至水,用上述方法消除内源性过氧化酶后,根据需要酌情使用胰蛋白酶液进行消化处理,以便充分暴露抗原物质,消化之后水洗。

2. 缓冲液(PBS或Tris)冲洗。

3. 根据情况使用无关动物血清或小牛血清,室温下处理20分钟。

4. 滴加适当稀释的酶标记抗体,室温、湿盒中作用30~60分钟。

5. PBS冲洗,5分钟,3次。洗涤过程中最好放置于磁力振荡器上振荡。

6. 使用DAB液进行发色反应。此步骤应在显微镜观察下进行。以出现清晰阳性结果、且无背景非特异性染色为适度,用流水终止发色反应。发色时间一般不超过10分钟。

7. 使用苏木素或甲基绿复染核,脱水、透明、封片。

二、间接法染色程序

1~3. 步骤同直接法。

4. 滴加适当稀释的第一抗体,室温、湿盒中作用30~60分钟。

5. PBS冲洗或振洗5分钟,3次。

6. 滴加适当稀释的酶标记第二抗体,室温、湿盒中作用30分钟。

7. PBS 冲洗或振洗 5 分钟，3 次。
8. 使用 DAB 液进行发色反应，并用流水终止。
9. 复染核，脱水、透明、封片。

三、PAP 法染色程序

- 1~5. 步骤同间接法。
6. 滴加未标记的第二抗体，室温下作用 30 分钟。
7. PBS 液冲洗或振洗 5 分钟，3 次。
8. 滴加 PAP 复合物，室温下作用 30 分钟。
9. PBS 液冲洗或振洗 5 分钟，3 次。
10. 使用 DAB 液进行发色反应，并用流水终止。
11. 苏木素或甲基绿复染核，脱水、透明、封片。

四、ABC 法染色程序

- 1~5. 步骤同间接法。
6. 滴加生物素化的第二抗体，室温、湿盒中作用 30 分钟。
7. PBS 液冲洗或振洗 5 分钟，3 次。
8. 滴加 ABC 试剂，室温、湿盒中作用 30 分钟。
9. PBS 液冲洗或振洗 5 分钟，3 次。
10. 使用 DAB 液进行发色反应，并用流水终止。
11. 苏木素或甲基绿复染核，脱水、透明、封片。

五、实验室常用试剂的配制方法

1. 0.05M pH7~7.6 磷酸缓冲液 (PBS): Na_2HPO_4 2.8g, NaH_2PO_4 7.8g, NaCl 43.8g, 加蒸馏水或去离子水至 5L。免疫酶组织化学染色中使用的如为多克隆抗体时，可直接使用按上述方法配制的缓冲液。若是单克隆抗体时，则应将按上述方法配制的缓冲液稀释 1 倍后使用。原因是 ABC 复合物或单克隆抗体与抗原的结合在周围离子强度高时容易解离。而应用多克隆抗体时，可利用较高离子强度的缓冲液冲洗掉非特异性结合的抗体，从而减少背景的非特异性染色。

2. 0.05M, pH7.6 Tris 缓冲液: Tris 6.1g 溶解于 50ml 蒸馏水中，用 1N 盐酸调整 pH 值至 7.6 (约需 1mol/L 盐酸 37ml)，加蒸馏水至 1L。

3. 0.85% 生理盐水: NaCl 8.5g 加蒸馏水至 1L。

4. 0.1% 胰蛋白酶 (Trypsin) 消化液: 胰蛋白酶 10mg, 氯化钙 10mg, 0.05M Tris 缓冲液 10ml。注意勿使用 0.05M PBS，因为磷酸与钙结合产生磷酸钙沉淀。

5. 0.3% 内源性过氧化氢阻断液: 30% 的过氧化氢液 1.5ml 加甲醇至 150ml。

6. DAB- H_2O_2 发色液: DAB 30mg 加 PBS 150ml，使用前加 3% 过氧化氢 300 μl 。如出现沉淀则用前最好过滤。

7. 防腐抗体稀释液、贮存液: 小牛血清白蛋白 (BSA) 1g, 叠氮钠 (NaN_3) 0.1~1g, 加 PBS 100ml。

六、实验室常用器具

1. 一般实验室用玻璃器皿等。
2. 有机玻璃制或搪瓷制的反应湿盒。
3. 滤纸或其它吸水性软纸。

4. 洗涤用磁力振荡器。
5. 风干机或整发用吹风机。
6. 化学天平, 分析天平。
7. pH 检测仪。
8. 离心机。
9. 微量取样器 (10~1000 μ l 范围) 及取样吸头。
10. 观察用显微镜以及显微摄影装置。

第四节 细胞学标本中免疫酶组织化学染色程序

免疫酶组织化学技术不仅广泛用于组织切片, 而且也可应用于细胞学诊断, 通过直接观察抗原在细胞中的存在证实和解决许多常规染色难以判定的问题。如 CEA 抗体经常用于乳腺癌细胞学、妇科细胞学、呼吸道细胞学以及胸、腹水细胞学的诊断。从事细胞学涂片进行免疫酶组织化学染色, 与石蜡切片不同之处在于涂片中的细胞由于未进行切割处理, 其细胞膜相对完整, 故检查细胞内部抗原时, 最好选用抗体的 Fab' 或 Fab 这样的小片段, 使它们能较好地渗透到细胞内部, 获得理想的染色效果。本文以最常用的 ABC 染色法为例, 介绍免疫酶组织化学的染色程序。

1. 制备涂片或印片标本, 充分风干。
2. 95%乙醇或丙酮固定10分钟以上。
3. 0.3%过氧化氢甲醇液作用 30 分钟或 3%过氧化氢甲醇液作用 5 分钟, 以消除内源性过氧化酶。
4. PBS 液洗涤10分钟。
5. 酌情使用正常血清作用15分钟。
6. 滴加适当稀释的第一抗体, 室温、湿盒中作用30~60分钟。
7. PBS 液洗涤或振洗5分钟, 3次。
8. 滴加生物素化的第二抗体, 室温、湿盒中作用15~30分钟。
9. PBS 液洗涤或振洗5分钟, 3次。
10. 滴加 ABC 复合物, 室温、湿盒中作用15~30分钟。
11. PBS 液洗涤或振洗5分钟, 3次。
12. 使用 DAB 液进行发色反应, 用显微镜观察发色情况, 适时流水终止发色反应。发色时间一般不超过10分钟。
13. 苏木素或甲基绿复染核, 一般在10秒钟左右。
14. 脱水、透明、封片。

第五节 设立对照

免疫酶组织化学染色中, 即使出现阳性结果, 若没能证明它的确是抗原抗体反应所致, 也无法判断染色结果的特异性。因此, 任何一个未知标本染色时都必须同时进行阳性对照和阴性对照。从理论上讲, 人为地降低抗原性或抗体活性后, 染色反应就应当相应减弱, 当抗原性或抗体活性降为零时, 染色反应就应当变成阴性, 否则应考虑为非特异性染色。设立对照

有多种方法，现介绍两种最常用的方法。

一、阳性对照

一般选用含已知待测抗原的组织切片与被测标本同时染色。例如，欲判定某一被检病例标本是否为肌肉来源而进行 Desmin 抗体染色时，最好选用肌组织（横纹肌或平滑肌均可）作阳性对照。

二、阴性对照

除可选用不含相应抗原的组织标本外，还可以使用空白对照法，即染色过程中不滴加第一抗体或使用缓冲液代替第一抗体作阴性对照。

第六节 非特异性染色的处理

理想的免疫酶组织化学染色应该只有特异性染色，即抗体只与相应的抗原起反应，切片中只有含相应抗原的部位染色阳性。凡是不属于上述特异性反应的染色，通常称为非特异性染色或背景染色。造成非特异性染色的原因很多，如抗体蛋白质容易吸附在富含电荷的胶原纤维和结缔组织上，造成非特异性染色；组织中的内源性过氧化酶可以与 DAB 反应产生棕褐色产物造成非特异性染色；抗体浓度过高、不适当的反应温度以及反应时间过长，试剂变干燥等均能造成非特异性染色。本节将消除非特异性染色的几种方法介绍如下。

一、蛋白性液体封闭切片

各类组织特别是胶原纤维组织，变性坏死的细胞常常带有一定量的电荷，容易吸附抗体蛋白。无论是酶标记的还是非标记的抗体，均可造成非特异性染色。避免这种非特异性染色反应的有效办法是在滴加第一抗体之前先加一种无害蛋白性液体，使这些蛋白先封闭带电荷的部位，这样第一抗体就不会再吸附上去。最常用的蛋白质为正常动物血清，如羊、猪血清或是产生第二抗体动物的正常血清。正常血清白蛋白应用浓度为1:5~1:10，小牛血清白蛋白应以2%的浓度进行吸附。

二、内源性过氧化酶阻断

红细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞等细胞内均含有内源性过氧化酶。它们可以与过氧化氢反应，使 DAB 氧化产生棕褐色产物，出现与免疫酶标特异性染色相同的假阳性。消除这种非特异性染色的方法是在免疫染色前先消除切片内的内源性过氧化酶活性。具体方法是将切片置0.3%过氧化氢甲醇溶液中处理30分钟，即可阻断大部分内源性过氧化酶反应。

三、胰蛋白酶消化

染色前用胰蛋白酶液消化处理切片，可使组织内由于固定和包埋而隐蔽的抗原暴露，提高免疫反应性。因此可提高抗体的稀释倍数，减少非特异性染色。

四、增加第一抗体稀释度

第一抗体稀释度与阳性细胞检出率及背景非特异性染色关系密切，所以要根据情况适当调整第一抗体稀释度，以出现强阳性细胞和背景着色最弱时为最佳稀释度。

五、调整孵育时间及反应温度

多数抗体孵育时间为30分钟，为减轻背景非特异性染色而提高抗体稀释度时，孵育时间可适当延长。抗原抗体结合的最适温度是37℃左右，超过此温度时，可引起抗体蛋白变性，减低抗原的结合能力。高温还可以加速液体蒸发，使标本易于干燥，增加非特异性染色。孵育温度降低时应适当延长孵育时间，如放置于4℃冰箱时，可以过夜。

六、内源性生物素处理

人体肝、肾、胰腺和中性白细胞内含有大量的内源性生物素或生物素样物质，在冰冻切片应用 ABC 法进行免疫酶组织化学染色时，常常出现非特异性染色。因此，在免疫染色前可先用卵白素液（25mg/ml）处理15分钟，经缓冲液洗涤后再进行染色，可消除内源性生物素物质。

七、消除醛类固定液所致的非特异性染色

组织标本经醛类固定液（如福尔马林）固定后，留在组织内的醛基能与酶标记抗体结合，产生非特异性染色，若先用0.01%~0.02%硼氢化钠水溶液处理2~10分钟后再进行染色，可消除醛基所致的非特异性染色。

八、避免染色过程中标本干枯

染色过程中应时刻保持切片湿润，每一步孵育反应均应在湿盒内进行。切片一旦干枯，会使抗体蛋白等牢固粘附于玻片上，无法清洗干净而引起非特异性染色。每张切片的边缘部位往往由于这种非特异性染色而浓染，判断结果时应当避开边缘区域。

第七节 评价染色结果

在评价免疫酶组织化学染色结果时应该注意以下几个问题。

一、固定液所致染色性的差异

在细胞学领域中常常使用酒精固定标本，但酒精可以造成某些抗原物质如固醇类、多肽激素和某些酶类等的流失和失活。角蛋白属不溶性蛋白类，其抗原性可不受酒精的影响。生物素（也称维生素 H）是人体必需的辅酶，存在于多种正常细胞之中，用酒精或丙酮固定的肾或肝脏标本中，内源性生物素与试剂中卵白素相结合会导致假阳性反应。而醛类固定液可以使内源性生物素失活，故福尔马林固定的标本不会发生这种由固定液所致的假阳性反应。因此，要求正确选择抗原的固定液。有关固定液的选择请参照表1-2。

表1-2 待测抗原与固定液的关系

抗 原	适用固定液*
免疫球蛋白	10%福尔马林，95%酒精，100%丙酮，Bouin 液
补 体	95%酒精，100%丙酮，10%福尔马林，Bouin 液
酶、蛋白类	10%福尔马林，Bouin 液，95%酒精，100%丙酮
肽类激素	10%福尔马林，Bouin 液，95%酒精，100%丙酮
固醇类	10%福尔马林，Bouin 液
淋巴细胞表面抗原	100%丙酮，95%酒精，10%福尔马林，Bouin 液

注：*按先后顺序选用

二、从抗原在局部的表达方式判断染色结果是否特异

由于每种抗原物质各自性质不同，其细胞的局部表达方式也各异。通常有三种特异染色模式，即细胞浆内、细胞核内和细胞表面。多数抗原存在于细胞浆内，视抗原的多少可占据细胞胞浆的部分或全部。此外还有膜蛋白、核内蛋白等。例如 PCNA（增殖细胞核抗原）若在细胞胞浆内出现时应怀疑其特异性。一般说来特异性染色定位于细胞，非特异性背景染色多出现于胶原纤维和结缔组织。只限于红细胞和白细胞的阳性染色一般为内源性过氧化酶所致的非特异性染色。

三、染色方法对染色效果的影响

在免疫酶组织化学染色中,即使有高特异性抗体,如未选择好合适的染色方法也未必会取得理想的染色结果。如使用 PAP 法,在抗原过剩部位可能出现假阴性。理由是在 PAP 法染色中,第二抗体的抗原结合部位一方为第一抗体,另一方为 PAP 复合物。在抗原过剩区域,第二抗体的抗原结合部位均被第一抗体占据,游离部位就明显减少,不能与足够的 PAP 复合物结合,造成抗原密度高的区域染色反应反而减弱或呈现阴性的假象。使用间接法或 ABC 法则不会出现这样的假阴性反应,但 ABC 法可以出现内源性生物素与卵白素非特异性结合。

四、阴性结果的判定

染色结果阴性时并不能说明该种抗原物质不存在,只有阳性染色结果才可以积极评价其意义。尤其是在鉴别低分化肿瘤时,肿瘤分化程度越低,缺乏特异性抗原的可能性就越大。如在未分化癌,可以是角蛋白抗体阴性而波形蛋白抗体阳性,而恶性淋巴瘤时波形蛋白抗体可以阴性。

五、人为假象的判定

制作不佳的切片常常有非特异性染色。如切片过厚时,抗体试剂可在两层细胞之间滞留,造成非特异性染色。同样在有皱褶之处也可出现非特异性染色。因此在切片的周边、刀痕、折叠区出现的阳性染色多为非特异性染色。坏死细胞、受挤压的细胞以及自溶和出血组织也经常出现非特异性染色。少数情况下特异性染色也可干扰染色结果的评价。如当血清内含有高浓度特异性抗原时,标本中出现强的特异性背景染色,有时会影响细胞内抗原定位的观察。巨噬细胞如果吞噬了含有特异性抗原的细胞,有时也显示特异性染色,干扰染色结果的评价。

第八节 细胞增殖能解析中常用抗体

研究肿瘤细胞增殖能力有助于阐明恶性肿瘤的发生机制,选择有效的治疗方法以及推测预后。当前研究恶性肿瘤增殖能力的手段主要包括流式细胞计数(FCM)和免疫酶组织化学。FCM 是利用荧光色素标记细胞悬浮液中的恶性肿瘤细胞,进行快速检测、电脑分析多项指标的尖端技术。但其标本制作比较复杂,被测标本不能长期保存,样本不能重复测定,并且不能进行形态学观察。进入80年代,许多与细胞增殖能力有关的单克隆抗体相继问世,且由于免疫酶组织化学方法具有标本制作简单、可以永久保存、能够重复测定以及可以进行形态学观察等优点,在肿瘤细胞增殖能力研究中广泛应用。

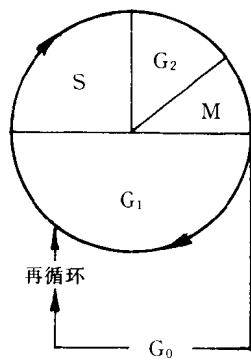


图1-4 细胞周期模式图

图1-4是细胞周期(Cell cycle)模式图。恶性肿瘤细胞是按图1-4所示进行分裂增殖。通常,一个细胞经一个周期分裂成二个,其增殖速度依细胞种类而异。一个细胞增殖周期分为G₁,S,G₂和M四个期。其中G₁,S及G₂期称中间期,M期称分裂期,四期统称增殖期。分裂期之后完全不显示增殖的细胞称休止细胞或冬眠细胞,此时进入细胞的休止期或G₀期。G₁期是DNA合成前期,S期是DNA合成期,G₂期为DNA合成后期,M期为分裂期。癌细胞处于增殖期越多,其发育速度就越快。因此分析肿瘤细胞增殖能力有助于判定其生物学恶性程度。在肿瘤增殖能力分析中常用的标记抗体有 Br-dU, PCNA, DNA 多聚酶 α 和 Ki-67。表1-3概括了这几种抗体的特性。

表1-3 增殖细胞标记抗体的特性

抗 体	生化特性	细胞周期特性	抗原种属特异性
BrdU	胸腺嘧啶衍化物	S 期	无
DNA 多聚酶 α	合成酶	全周期	中度
PCNA	核蛋白,分子量36000, DNA 多聚酶 δ 的辅助蛋白	全周期(以 G_1 期后半至 S 期前半为主)	低度
Ki-67	核内抗原,主要见于核仁,功能不详	全周期(G_1 初期除外)	高度

BrdU (Bromodeoxyuridine) 是胸腺嘧啶核苷衍生物,在组织或细胞测定前30~60分钟注入体内或加入细胞培养液中,利用抗 BrdU 抗体进行免疫酶组织化学染色,检测 S 期增殖细胞。尽管已有手术中对人体投用 BrdU 进行脑肿瘤评价的先例,但由于 BrdU 注入人体后一旦组合到 DNA 之中,将永久停留在体内,故应用于人体仍需慎重,目前主要用于动物实验或细胞培养。应用单克隆抗体测定之前必须先先用盐酸或 DNA 酶进行短时间处理,使 DNA 双链解离,暴露已组合到双链中的 BrdU,然后再进行免疫酶组织化学染色。

DNA 多聚酶 α 是细胞周期 G_1 期到 M 期阶段出现的 DNA 合成酶之一,其单克隆抗体有一定的种属特异性。如人与牛的抗体可以通用,但不能用于大鼠。

PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, 增殖细胞核抗原) 是从 G_1 期后半至 S 期前半过程中核内急剧增多的一种核蛋白质,分子量36000,是 DNA 多聚酶 δ 表达活性时的辅助蛋白。其种属特异性较低。

Ki-67 是出现于所有进入细胞周期细胞的核仁以及核分裂期染色体上功能不详的抗原成分。Ki-67 有严格的种属特异性,抗人 Ki-67 抗体不能用于大鼠和小鼠。

最近发现,癌基因产物也与肿瘤的恶性程度有密切关系。例如癌抑制基因产物 P^{53} 蛋白在恶性肿瘤细胞核为阳性反应,而在正常及良性病变细胞核则呈阴性。因此, P^{53} 也常常作为恶性肿瘤标记用于肿瘤诊断。

人体细胞能合成数万种蛋白质是受核蛋白体 RNA (rRNA) 的调控。细胞核内与 rRNA 前体生成有关的 DNA 片段称核仁形成体部位 (Nucleolar organizer regions, 简称 NORs)。在休止期细胞,它存在于核仁;在分裂期细胞,它存在于13号、14号、15号、21号和22号5条染色体的短臂上。rRNA 基因依靠 RNA 多聚酶 I 进行转录,成为45S rRNA 前身,然后与蛋白进一步结合形成大的核蛋白颗粒。该颗粒在需要时分解成大、小两种亚单位由细胞核进入细胞浆,分别与蛋白结合形成40S 和60S 亚单位,指导蛋白质合成。可见, NORs 实质上是蛋白质合成源泉。与45S rRNA 前体结合的 C_{23} RNA 结合蛋白, RNA 多聚酶 I 以及 B_{23} 蛋白等则被称之为 NORs 相关蛋白。近年发现这些 NORs 相关蛋白具有嗜银染色性,经过银染色后很容易在显微镜下观察到这种 NORs 相关蛋白。据此特性,被称之为核仁形成体部位嗜银蛋白 (Argyrophilic Proteins of the nucleolar organizer regions, 简称 AgNORs)。由于 NORs 关系到蛋白质合成,与增殖等细胞活动性密切相关,故通过观察 AgNORs 可以了解细胞的生物学特性,鉴别肿瘤的良恶性。肿瘤细胞由于倍体增加,使含 NORs 的染色体数量增多,或由于转录活性增加,而使 NORs 更加明了等缘故使 AgNORs 数目增多。在恶性肿瘤,通常是恶性度越高, AgNORs 数目也就越多,且该染色结果与应用 Ki-67 抗体, DNA 多聚酶 α 抗体等进行的免疫组织化学染色结果呈正相关,故目前常用于进行细胞增殖能研究。现将 AgNORs 方法的操作要点进行扼要介绍。