

免疫组织化学技术

MIANYIZUZHIHUA XUEJISHU

石善溶 编著

杨光华 邓尚平 审校



四川科学技术出版社

免疫组织化学技术

石善溶 编著
杨光华 邓尚平 审校

四川科学技术出版社

责任编辑：杜英杰
封面设计：刘永坚
技术设计：杨璐璐

免疫组织化学技术

石善溶 编著

杨光华 邓尚平 审校

四川科学技术出版社出版

(成都盐道街三号)

四川省新华书店发行

四川煤田地质公司印刷厂印刷

统一书号：14298·98

1986年7月第一版 开本787×1092 1/32

1986年7月第一次印刷 字数 103 千

印数 1-8,000 册 印张 5.75 插页 4

定 价：1.30 元

前 言

免疫组织化学技术的飞速发展，正在改变着组织病理学的面貌。由于免疫组化技术在病理学中的应用，除解决了不少病理诊断的难题外，还提出了肿瘤组织发生学和病理分类的新概念，为组织病理学提供了更多的研究途径。迄今为止，为数众多的标记抗体，尤其是单克隆抗体，可以更准确地把各类肿瘤区分开来。所谓“居间纤维分类法” (intermediate filament typing)，是自1983年以来形成的一个肿瘤病理诊断分类体系，可作为免疫组织化学技术应用于病理学的一个典型代表。免疫组织化学技术在病理学中的应用，正在改变着一些传统的观念，从而孕育着在组织病理学领域里的革命性演变。这种变化的一个例子，就是利用精确的免疫组织化学定位技术，把那些争论不休、众说纷纭的肿瘤病理诊断难题，统一到科学认识的基础上来。

免疫组织化学技术与超微结构研究同为近代研究形态学的有力手段。但从形态与功能相结合的观点来说，免疫组织化学技术更有其突出的优点。如上述居间纤维分类法；在电镜下无法进一步分类的居间纤维，还可以用免疫组织化学技术划分为五种不同的纤维，作为五大类基本细胞分类的基础。

作者自1981~1984年在美国马萨诸塞总医院免疫病理研究室从事角质的免疫组织化学定位的研究工作，后又赴明尼苏达大学东区研究所完成内耳免疫组织化学技术的探讨，较

熟练地掌握了此技术，并积累了实践经验和资料。鉴于目前我国尚缺乏此类专著，作者在系统整理研究资料的同时，重点复习有关文献，编写成《免疫组织化学技术》一书。主要意图是介绍免疫组化技术基本的操作技术和应用概况，使初学者阅后能筹备和开展这一技术。本书特别详细地叙述了常用的免疫组织化学染色方法，结合作者本人实践经验加以介绍，俾有助于读者掌握操作要领而避免走弯路。在书末附录常用试剂配方、美国部分商品抗体和试剂的订购地址，以方便读者。对免疫组织化学技术在专科病理的应用举例，是为了说明本技术应用的价值和使用概况，不能概括专科免疫组织化学的全部内容。由于内耳免疫组织化学乃作者从事的专业，并且此专业尚处于萌芽状态，故亦列为专章介绍。

本书取材主要为作者资料。主要参考资料有：Current Concepts in Surgical Pathology (Massachusetts General Hospital, 1983)； Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods (Boume JA, DAKO)； Techniques in Immunocytochemistry, Volume 1 (Bullock GR, Petrusz P, 1982)； Immunocytochemistry, Practical Application in Pathology and Biology (Polak JM, Van Noorden S, 1983)。作者在学习免疫组织化学技术时，得到以下美国师友的热情帮助，如 Drs. Harold F. Schuknecht, Max L. Goodman, Atul K. Bhan, Ben Z. Pilch, Lan Bo Chen, Tung-Tien Sun, Michael M. Paparella, Steven K. Juhn, Chen-en Lu 以及 Bruce Kaynor 等，以及马萨诸塞总医院病理科和明大东区研究所技术人员。在

此，谨表谢忱。作者对我院耳鼻喉科和病理科全体同志的大力帮助，亦表示衷心的感谢。作者感谢我校况金贵、廖德荣、汪茂源、范德全等同志对出版发行本书的大力友持。感谢徐丽蓉、洪邦泰、孙维纲、刘正明四位主任、王寿仙医师、刘永惠医师及白好儒等对建立耳鼻喉病理实验室的支持。本书在编写中，蒙刘开凤、饶文裕、许国章、罗汉超医师等对部分章节或译名提供宝贵意见，在此一并致谢。

作者希望本书能有助于促进对形态学研究的现代化，并促成我国商品抗体生产体系的迅速发展。本书可供组织学、病理学及其他医学、生物医学研究工作者参考，本书也适用于一些从事基础研究的临床工作者和从事肿瘤研究的工作者阅读并可作为医学研究生与医学生的参考书。

本书提供的免疫组织化学方法学和基本概念，希望对肿瘤研究能有所裨益。

最后，限于作者水平，对于免疫组织化学技术这门日新月异科学来说，难免挂一漏万，尚希同道批评指正。

编者谨识

于华西医科大学

1986年3月3日

目 录

第一章 引言.....	1
第二章 免疫组织化学技术.....	5
一、免疫组化染色方法的基本分类.....	6
(一)直接法.....	7
(二)间接法.....	7
(三)非标记抗体桥法(四层法).....	8
(四)改良非标记桥法或PAP法(三层法).....	8
(五)ABC法.....	9
二、免疫组化染色步骤.....	10
(一)免疫荧光组织染色法.....	10
(二)免疫酶组织染色法.....	11
三、免疫组化染色基本技术操作和注意事项.....	14
(一)试验计划.....	14
(二)抗体稀释度.....	14
(三)滴加抗体在玻片上的技术.....	18
(四)PBS洗涤法.....	19
(五)湿盒孵育技术.....	20
(六)抗体孵育时间.....	20
(七)蛋白酶消化处理.....	21
(八)光镜控制显色方法.....	22
四、对照组和染色结果的评价.....	23
五、固定法和切片制作技术.....	30
(一)固定法.....	31
(二)包埋和切片方法.....	35
六、双重标记染色法.....	37

(一) 单酶法·····	38
(二) 双酶法·····	40
七、免疫组化染色在电镜观察、培养细胞和 整块组织染色方面的技术·····	43
(一) 电子显微镜观察标本的免疫组化技术(免疫电镜技术)·····	43
(二) 培养细胞的免疫组化染色·····	47
(三) 整块组织免疫组化染色·····	49
第三章 免疫组织化学技术在外科病理学中的 应用·····	50
一、淋巴组织及其肿瘤·····	51
(一) 正常淋巴组织的免疫组化染色·····	51
(二) 恶性淋巴瘤的免疫组化染色特点·····	61
二、居间纤维分类法·····	63
(一) 基本原理·····	63
(二) 免疫组化技术要点·····	66
(三) 居间纤维分类法用例·····	68
三、酶和激素·····	81
四、肿瘤胚胎抗原·····	84
五、肿瘤特异性标记抗原的探索·····	86
六、免疫组化技术在病理诊断中的用例·····	87
第四章 免疫组织化学技术在肾和皮肤病理方 面的应用·····	89
一、免疫组化技术对肾病的诊断价值·····	89
(一) 免疫复合物肾小球病·····	91
(二) 肾病主要的综合征·····	97
(三) 全身性轻链病(轻链肾病或轻链肾小球硬化)·····	100
(四) 免疫荧光染色对肾小管间质性肾病的诊断价值·····	100
二、免疫荧光染色技术对皮肤病的诊断价值·····	102
(一) 结果评定注意事项·····	103

(二) 细胞间反应.....	103
(三) 基底膜带 (BMZ) 反应.....	104
(四) 血管反应.....	106
(五) 表皮结构内能结合循环抗体的抗原.....	106
(六) 其他.....	107
第五章 内耳免疫组织化学研究方法.....	110
一、方法学.....	111
(一) 石蜡包埋切片法.....	111
(二) 冰冻超薄切片法.....	112
(三) Epon 等材料包埋后切片法.....	114
(四) 塑料包埋不脱钙颞骨切片法.....	117
(五) 快速冰冻和冻干切片法.....	119
二、免疫组化技术对内耳自身免疫病的研究.....	119
(一) 设计这项研究的依据.....	120
(二) 建立耳免疫病动物模型的方法.....	120
(三) 主要研究结果.....	121
三、内耳细胞支架蛋白分布的免疫组化研究.....	124
附录A 常用试剂配方	
一、缓冲液.....	129
(一) 磷酸缓冲液 (PBS).....	129
(二) Tris 缓冲液.....	130
(三) 醋酸缓冲液.....	13
二、固定液配方.....	131
(一) 10% 中性缓冲甲醛液.....	131
(二) 4% 多聚甲醛.....	131
(三) 戊二醛.....	132
(四) Karnovsky 氏固定液.....	132
(五) B-5 固定液.....	132
(六) Zenker 氏固定液.....	132
(七) Bouin 氏固定液.....	133

(八) 甲醛—醋酸—酒精 (FAA) 固定液	133
(九) Clarke 氏固定液	134
(十) Carnoy 氏固定液	134
(十一) Heidenhain's Susa 固定液	134
(十二) Rossman 氏固定液	134
(十三) 醋酸—甲醛—盐液	134
三、酶作用底物的配制方法	135
(一) 3 氨基 9 乙基吡唑 (AEC)	135
(二) 3, 3'-四盐酸二氨基联苯胺 (DAB)	135
四、对比染色用染料	135
五、封固剂	136
六、载玻片涂粘固剂法	137
七、抗体稀释计算法	138
附录 B 美国部分商品抗体和试剂目录	
一、Vector Laboratories 公司	140
二、Becton Dickinson Monoclonal Center 公司	143
三、Ortho Diagnostic Systems 公司	147
四、DAKO Corporation 公司	148
五、其他	152
参考文献	155

第一章

引 言

免疫组织化学或免疫细胞化学（以下简称免疫组化），是利用免疫反应以定位组织中某类抗原成分分布的一门新兴技术。借助于荧光素、酶等标记抗体与组织切片中的相关抗原相结合，由于荧光素所发荧光可用荧光显微镜检出，而酶可经一定的显色处理，呈现醒目的阳性色彩，从而可准确定位欲测定的抗原物质。这种利用显微镜的高度精确性与抗原抗体反应的高度敏感性相结合的方法，就发展成一门崭新的学科——免疫组织化学。

虽然免疫组化的发展历史已超过40余年，但直到最近10多年，才突飞猛进地发展，而被广泛用于外科病理学及其他研究领域。促进免疫组化发展的主要因素，为一系列技术上的革新。当Albert H. Coons (1941) 发表免疫荧光方法后，曾被看作是一项艰难的技术。经过Coons等不断努力改进方法，终于在60年代使免疫荧光法得以推广，而成为一项常规技术。不过，即使在10多年前，免疫组化的精确性仍然受到怀疑，仅能用来补充生化检验已证实的结果。Sternberg等(1979)应用免疫组化技术，首次发现外周神经系统中也有髓磷脂相关的糖蛋白。在此之前，生化分析仅证实中枢神经系统中存在该种蛋白。只是在免疫组化提供了这一新发现

后，再次采用生化分析法方获得肯定的结果，也就是说，免疫组化具有更高的敏感性和精确性，从而开创了雨后春笋般地应用这一新兴技术的热潮。免疫酶技术的应用，更加扩大了免疫组化的领域。鉴于间接酶染色法的第二抗体（抗IgG）不仅能结合已与特异性抗原（即欲测抗原）相结合的第一抗体，而且能同组织中非特异性抗原相结合构成背景污染，Mason 等创用免疫球蛋白酶桥法，Sternberger 等发展的过氧化酶—抗过氧化酶抗体复合物技术（PAP 法），在免疫组化技术发展史上开辟了非标记酶法的时代。由于 PAP 法系用高度纯化的过氧化酶作抗原免疫动物制得高效价的抗酶抗体，然后再与辣根过氧化酶（HRP）反应，形成可溶性的酶—抗酶抗体复合物，可以避免酶桥法仍具有的结合非酶特异性免疫球蛋白的弊端。研究证明，PAP 法的敏感性远较一般标记法为高，在某些方面甚至与放射免疫方法并驾齐驱。Hsu 等（1981）发展了一种更为敏感的卵白素—生物素过氧化酶复合物技术（Avidin—Biotin Peroxidase Complex technique，简称 ABC 法），大量的比较研究和临床应用等，已肯定 ABC 法为目前最敏感的免疫组化染色技术。

由于 ABC 法和 PAP 法的高度敏感性，使得免疫组化技术不再局限于冰冻切片或其他特殊处理的切片，也可以用于普通外检常规制备的石蜡切片。这在免疫组化的发展史上，算得上一个重要的里程碑。因为只有通过普通石蜡切片的应用，才使免疫组化能在外科病理学中生根开花结果，成为常规诊断手段之一，并且能够作为回顾性研究方法。迄今为止，大量的文献已经显示了免疫组化的无限潜力，成为当

前外科病理学工作者最感兴趣的技术。1982年，杰出的组织化学专家Pearse教授，对免疫组化作了这样的评价：“不久前，免疫组织化学超过了酶组织化学而成为这门学科的前锋。”美国从80年代以来，已逐步发展成一个广泛的实验研究—抗体、试剂生产供应体系—临床应用系统，大大促进了免疫组化的临床应用。目前几乎各大医院均已将免疫组化技术列为常规方法之一，在诊断和研究方面产生了巨大的影响。图1为作者于1981~1984年期间在美国马萨诸塞总医院免疫病理室研究角质的免疫组织化学定位专题时，一例鼻咽癌活检标本石蜡切片所显示的癌细胞因为单克隆抗角质抗体AEI所标记，其背景十分清楚，完全没有交叉反应。这对研究鼻咽癌组织的生长浸润规律，探讨其组织发生学和病理分型等均极有价值。尤为可贵的是，储藏了多年的普通活检石蜡块，经过远涉重洋，仍然可以在国际科学研究合作的舞台上焕发出光彩。如果考虑到一系列制备蜡块的步骤，包括加热60℃以上，储藏在普通室温之下数年，再切作5~6微米的切片等条件，那一点点极其微量的抗原在饱经风霜之后，居然还能准确无误地再现出来，这的确是近代免疫组化技术创造的奇迹。

目前，免疫组化在外科病理学中的应用，几乎涉及每个角落。如淋巴瘤的诊断和分型、自身免疫病、异常激素产物、细胞成分、肿瘤相关抗原、病毒等微生物的鉴定等。1983年以来，更基于近代细胞生物学者对细胞支架(cytoskeleton)研究的进展开辟了一条新的诊断途径——居间纤维分类法(intermediate filament typing)，为肿瘤鉴别诊断、分类等提供了十分有用的工具。

免疫组织化学将细胞生物学等基础医学、生物学研究成果等，直接同组织病理学连接起来，并把组织病理学提高到分子水平的研究领域，把形态学方法与功能变化结合起来，大大加深了对疾病本质的认识。加以其操作方便，设备远较电子显微镜简单，并且能解决电镜不能解决的问题。免疫组化使得已经显得古老了的光学显微镜形态学方法焕发了青春，为病理学的发展开辟了广阔的前景。

多少年来，病理诊断基本上依靠经验，即使杰出的权威也不无一漏。对于诊断困难的肿瘤，往往只能取决于最后的主观判断。虽然电子显微镜的应用，在很大程度上可以克服这一困难，但是设备复杂、费时、昂贵，加以难于作回顾性检查等缺点，限制了电镜的普遍使用。从这一点来评价，免疫组化具有更大的优越性，使之有可能成为常规诊断方法而成为组织病理学一块更加坚实的基石。如果将病理学家比作一只鹰，具有一双明察秋毫的锐眼。则现代化的病理学家更需要强有力的双翼——超微结构诊断和免疫组化技术。毫无疑问，现代化的病理学者们，一定会飞得更高。

第二章

免疫组织化学技术

免疫组化技术并不困难。有些染色过程虽然包括很多步骤，但基本操作方法简单，设备也不复杂，一般病理实验室均可进行。主要条件是必需有质量高的抗体。所以，只要有了商品抗体生产系统，极易推广普及。当然，必须特别强调，在一切试验过程中，严格按照科学要求，仔细操作每一步骤，并且必须认真处理一切化学试剂，尤其是各种酶作用底物（DAB、AEC等），严禁倾入水槽，污染水源或食物，因其可能具有致癌性。如果一切防癌研究的结果反而造成致癌物污染环境，则医学科学研究将失去意义。

整个免疫组化染色过程应注意三个原则：①了解每个步骤的操作要点及其意义；②实验和对照组的合理配伍和处理；③尽量消除非特异性交叉反应和内源性过氧化酶的活性，以达到良好的切片背景对比条件，即所谓讯噪比率（signal—noisy ratio）。免疫组化虽然是高度敏感和准确的技术，但如果抗体或其他试剂不纯，操作失当，缺乏对照或鲜明对比等，均可导致错误判断而失去意义。因而应该要求技术人员了解必要的基本原理，掌握上述三个原则，以科学态度严格认真进行各项操作。

一、免疫组化染色方法的基本分类

荧光素与HRP为目前最常用的免疫组化标记物。常用的荧光素为异硫氰酸荧光素(FITC)发绿色荧光与罗达明B200(RB200)发红色荧光。免疫荧光法的操作方法简便,对比鲜明,对于一些皮肤和肾脏免疫性疾病等的诊断,仍占主要地位,HRP用作抗体标记物时,具有以下优点:①易于提纯;②较稳定,在加工、储存和应用过程中不易变性;③易控制内源性过氧化酶活性,因组织中仅有少量酶存在;④可利用数种底物使之显色;⑤其分子较小,不致阻止抗体在相邻部位上的结合。目前已将HRP作为常规使用的免疫酶标记物,成为免疫组化染色法中使用最广泛的方法。以下将荧光素与HRP作为标记材料时所用的免疫组化技术分类概述于下(图2)。

图例

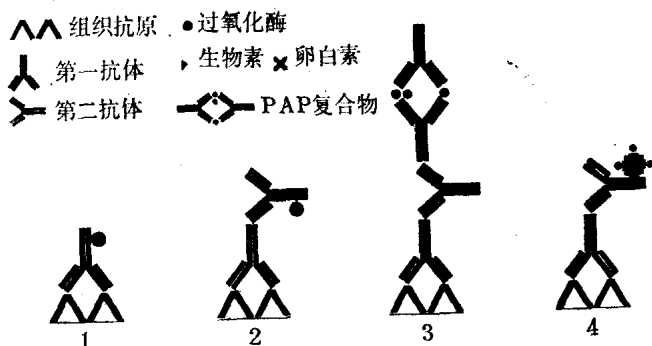


图2 免疫组化染色技术分类图示

1.直接法 2.间接法 3.PAP法 4.ABC法

(一) 直接法

直接用荧光素或HRP 标记单一特异性抗体,使此种标记抗体与组织中的相关抗原相结合。可藉荧光显微镜识别荧光所在部位或使酶显色而定位。此法简便快速,较少非特异性反应。其最大缺点为必须标记每一种抗体,颇难购得全部需要的商品标记抗体,且在制备标记抗体过程中常降低抗体的敏感性。直接免疫酶法多用于肾病活检标本或SLE 等结缔组织病的皮肤标本之免疫球蛋白、补体和免疫复合物沉着。其最常需要证实的抗原为IgG、IgA、IgM、C₃及C₄。

(二) 间接法

未标记的抗体(第一抗体)与组织中的抗原相结合,为了观察其结合的部位,另用荧光素或HRP 标记的抗体(第二抗体)结合第一抗体。如第一抗体为兔血清,则第二抗体必为其他动物抗兔免疫球蛋白抗体(如羊抗兔)。此法较直接法方便,因只需标记一种抗体,就可以用于许多种由同一种动物制备的不同种类抗体。当然所需染色时间,将延长约1倍,且有较多机会出现非特异性反应。但其敏感性较直接法高。间接法常用于证实自身免疫病患者血清中的抗体或一些抗细菌与寄生虫的抗体;将病人血清加于包含有相关抗原的组织切片上使之结合。再使用标记的抗人免疫球蛋白的抗体。假如患者血清中有能够结合组织中一定抗原的抗体存在,则标记的第二抗体(抗人IgG抗体)将与此种已与组织抗原相结合的病人抗体相结合而呈阳性结果,由此可获得证实。如患者血清中无该种抗体,则第二抗体不能结合而呈