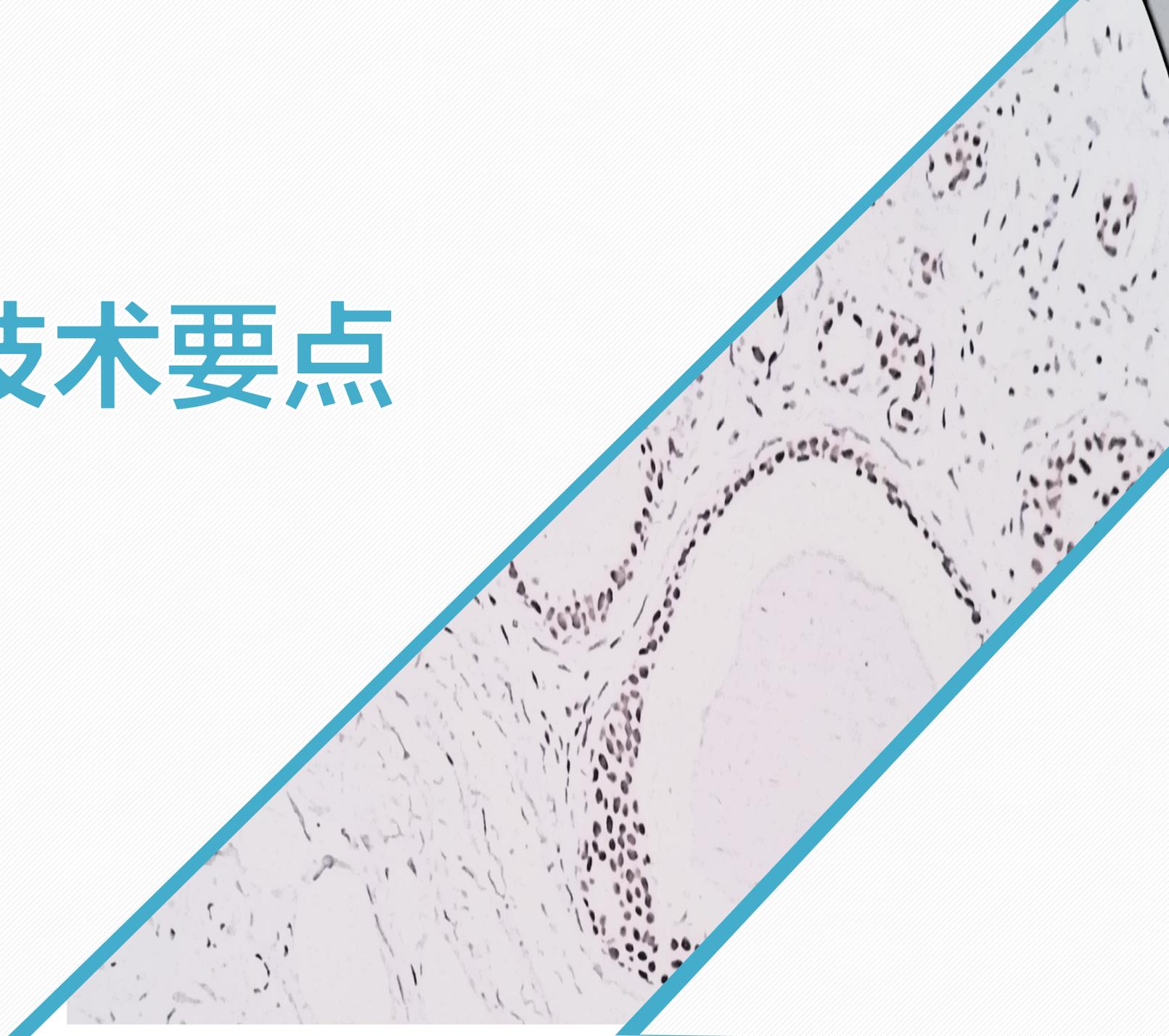


昆明医科大学
第一附属医院 **病理科**

免疫组化技术要点

赵晓玮、雷梓



目录

1

IHC基本原理

2

IHC操作规范

3

IHC质量控制



1

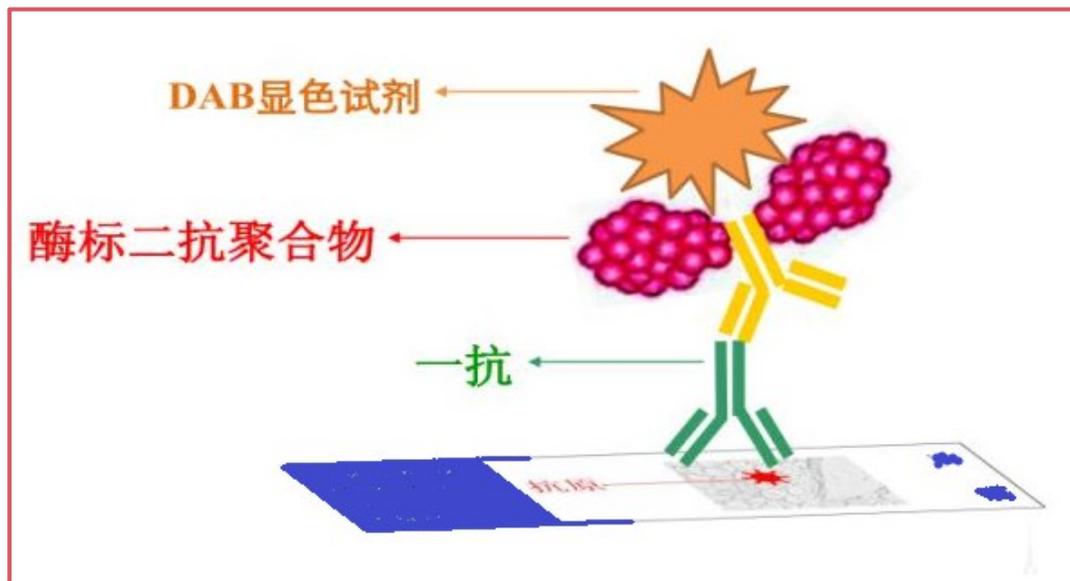
IHC基本原理

General Principle of immunocytochemistry



1.1

IHC基本原理



IHC 原理

抗原暴露

在组织原位 (In Situ) 暴露待测抗原性物质

多重抗体放大效应

通过抗体与抗原结合，形成抗原-抗体复合体，再用生物活性物标记的二次抗体进行再结合，形成放大效应。

显色 (可观察效应)

通过DAB等可检测物质与二抗上的生物活性物质反应，形成可观测效应，并再次放大抗原反应



**Her-2 (C-erbB-2)完整膜阳性
(+++)的乳腺癌患者建议采用曲
妥珠单抗分子靶向药物治疗。**

鉴别

对肿瘤组织起源进行鉴别分析和确定诊断

对肿瘤的良好性进行综合判断

发现微小转移灶

定位

激素受体的检测以指导临床治疗

激素类细胞的定性和定位

指导

指导肿瘤分期

指导肿瘤预后的判断

免疫性疾病的辅助诊断

2

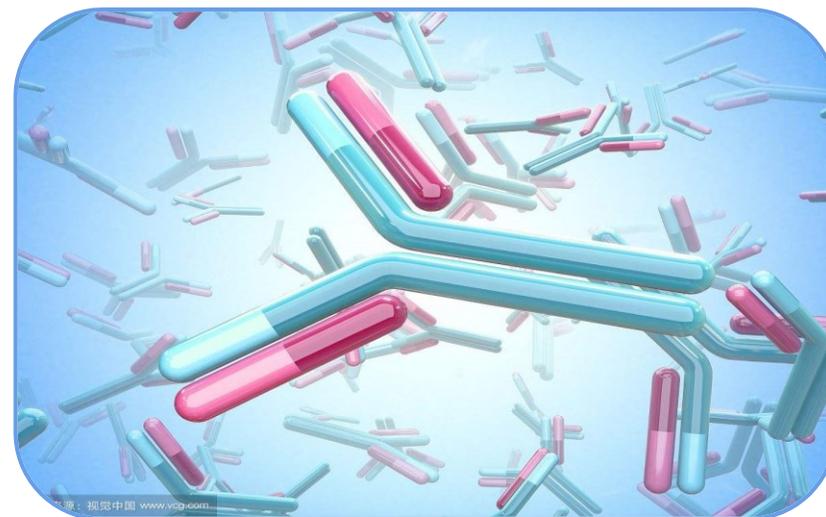
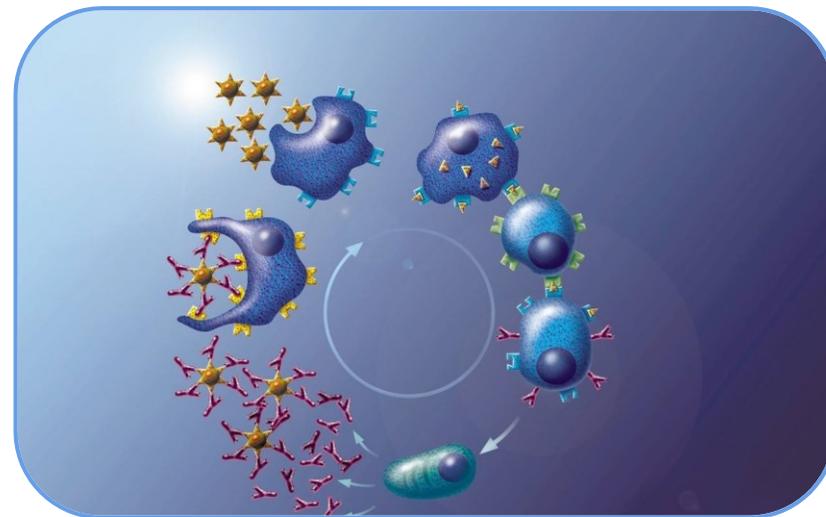
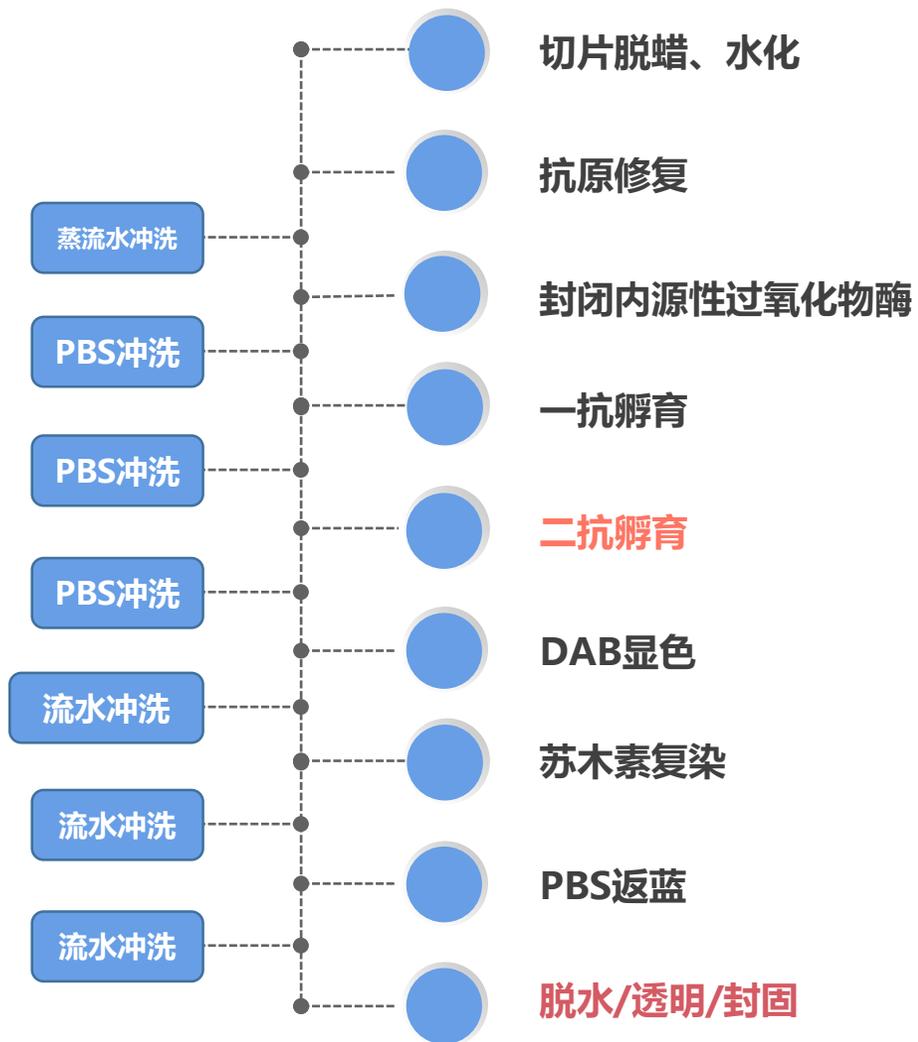
IHC操作规范

Operation specification of immunocytochemistry



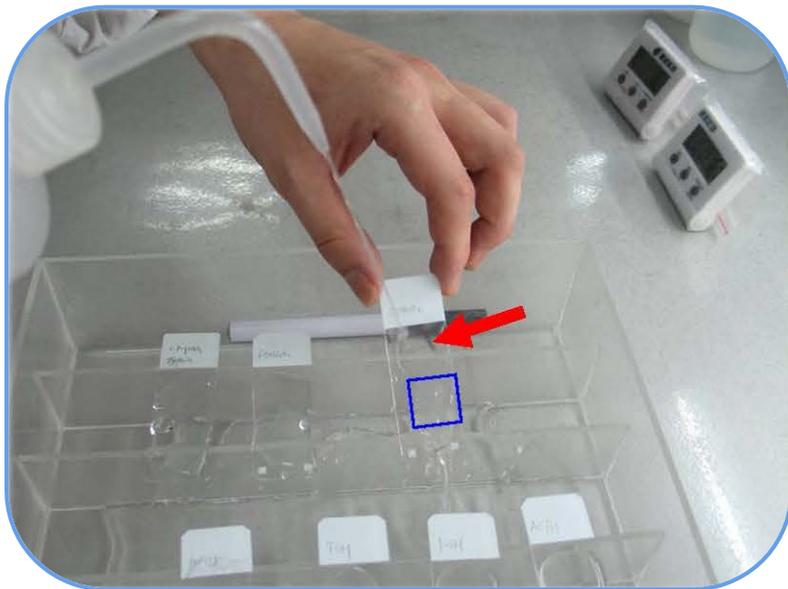
2.1

基本操作流程



2.2

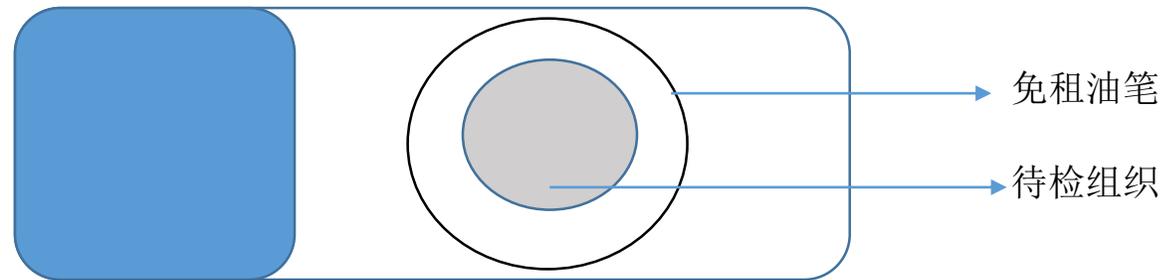
PBS冲洗方式



可能存在抗体交叉污染

Tween 20的作用

- ◆ 增加组织通透性，且不破坏抗原结构；
- ◆ 使抗体的延展性更好，且与一抗和检测系统无交叉反应；
- ◆ 去除抗体的非特异性结合，使洗涤更干净，减少非特异性背景染色；
- ◆ 提高抗原抗体的特异性结合



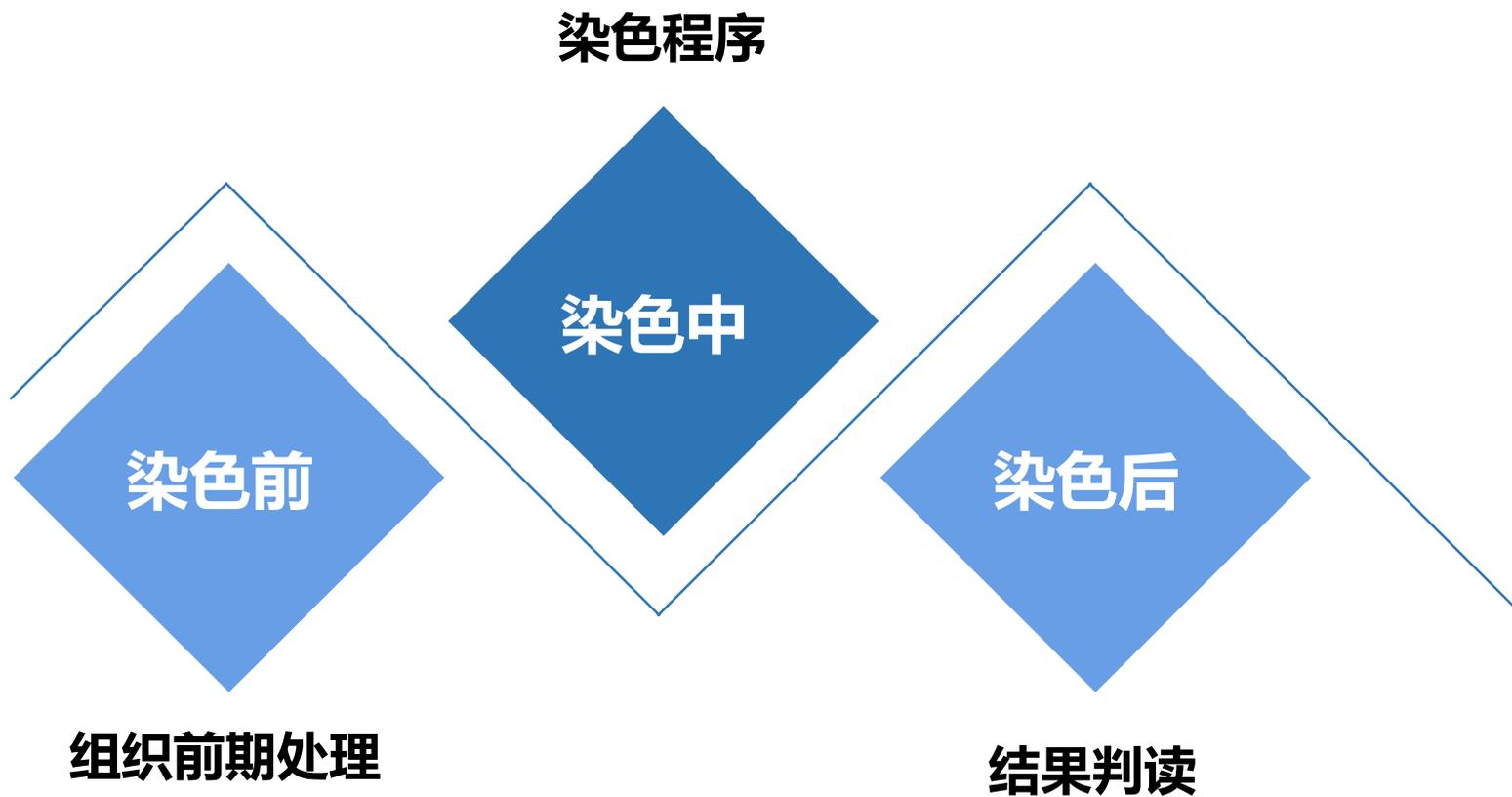
使抗体均匀的扩散到免疫组化油笔所划圈内，避免阴阳脸的出现。

3

IHC质量控制

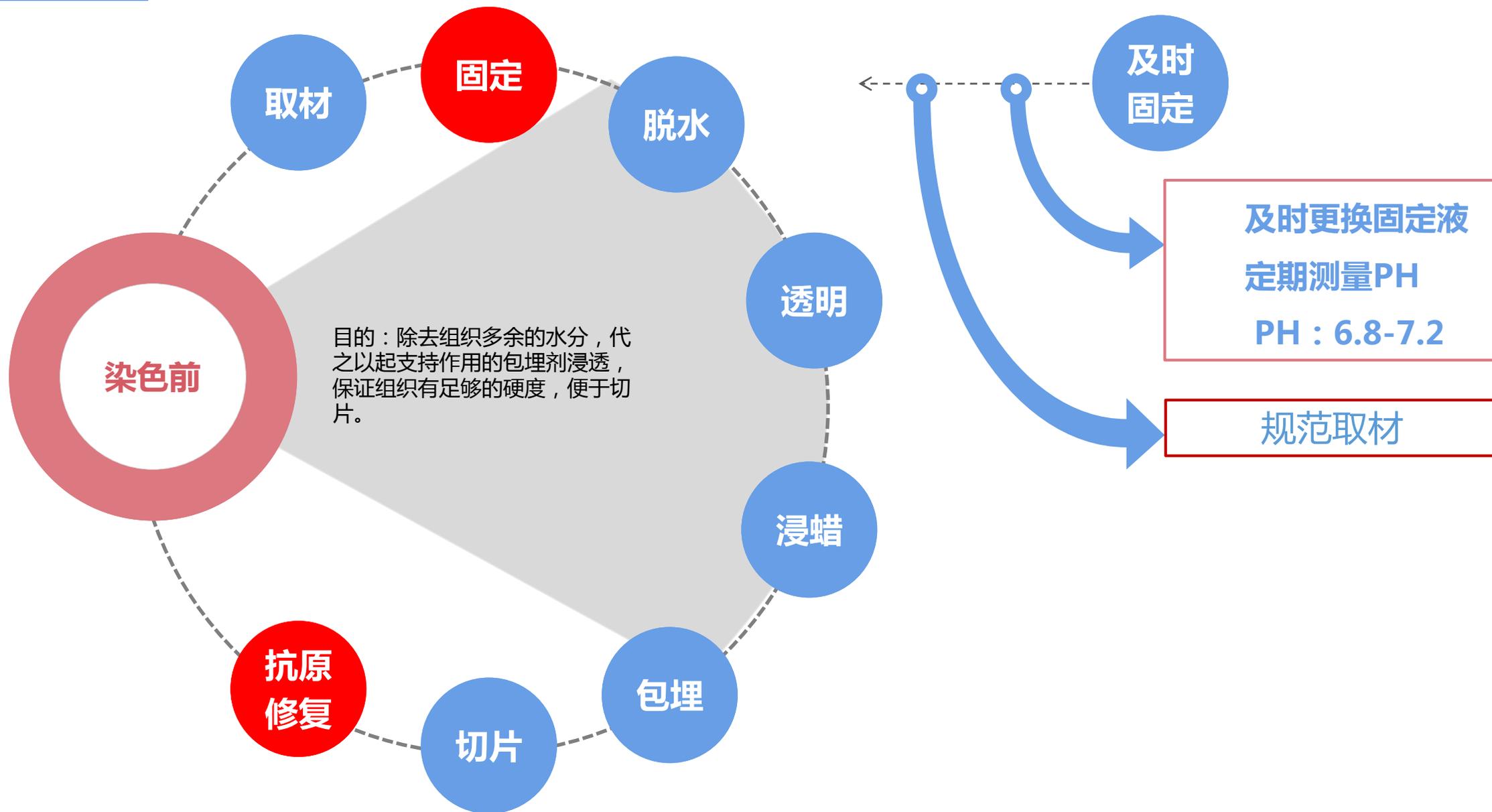
Quality Control of immunocytochemistry





3.2

染色前处理



3.3

组织前处理—固定

组织固定： 为了防止组织自溶与腐败；防止细胞内蛋白质（抗原），核酸等成分的分分解。

常用固定液： 10%中性缓冲福尔马林



离体及时固定（大标本剖开固定）

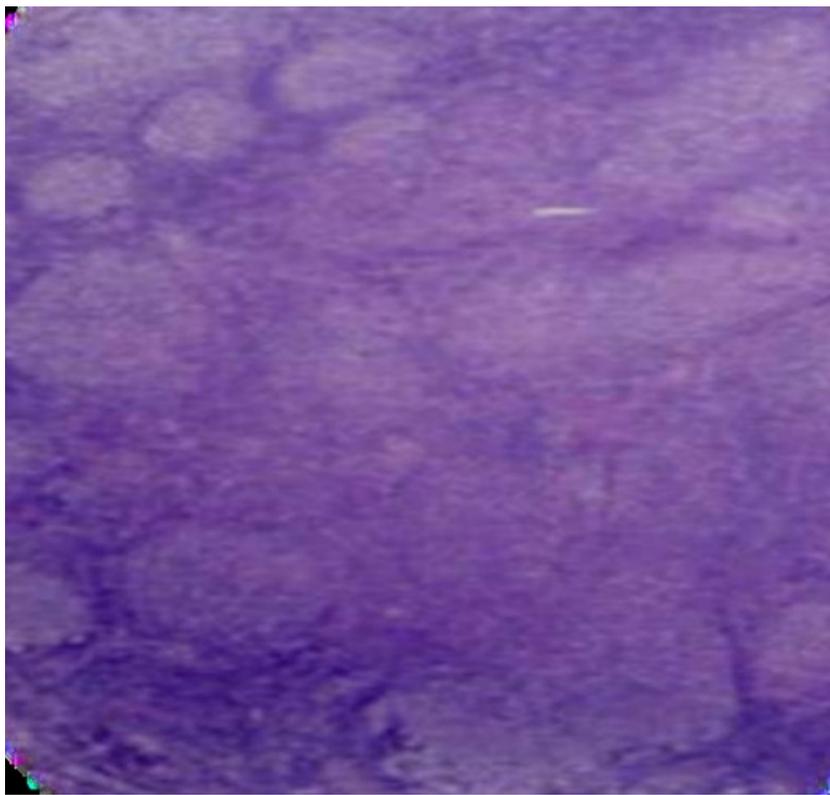


材块大小：

(1-1.5cm) * (1-1.5cm) * (0.2-0.3cm)

3.3

组织的前处理—固定



HE染色 淋巴结

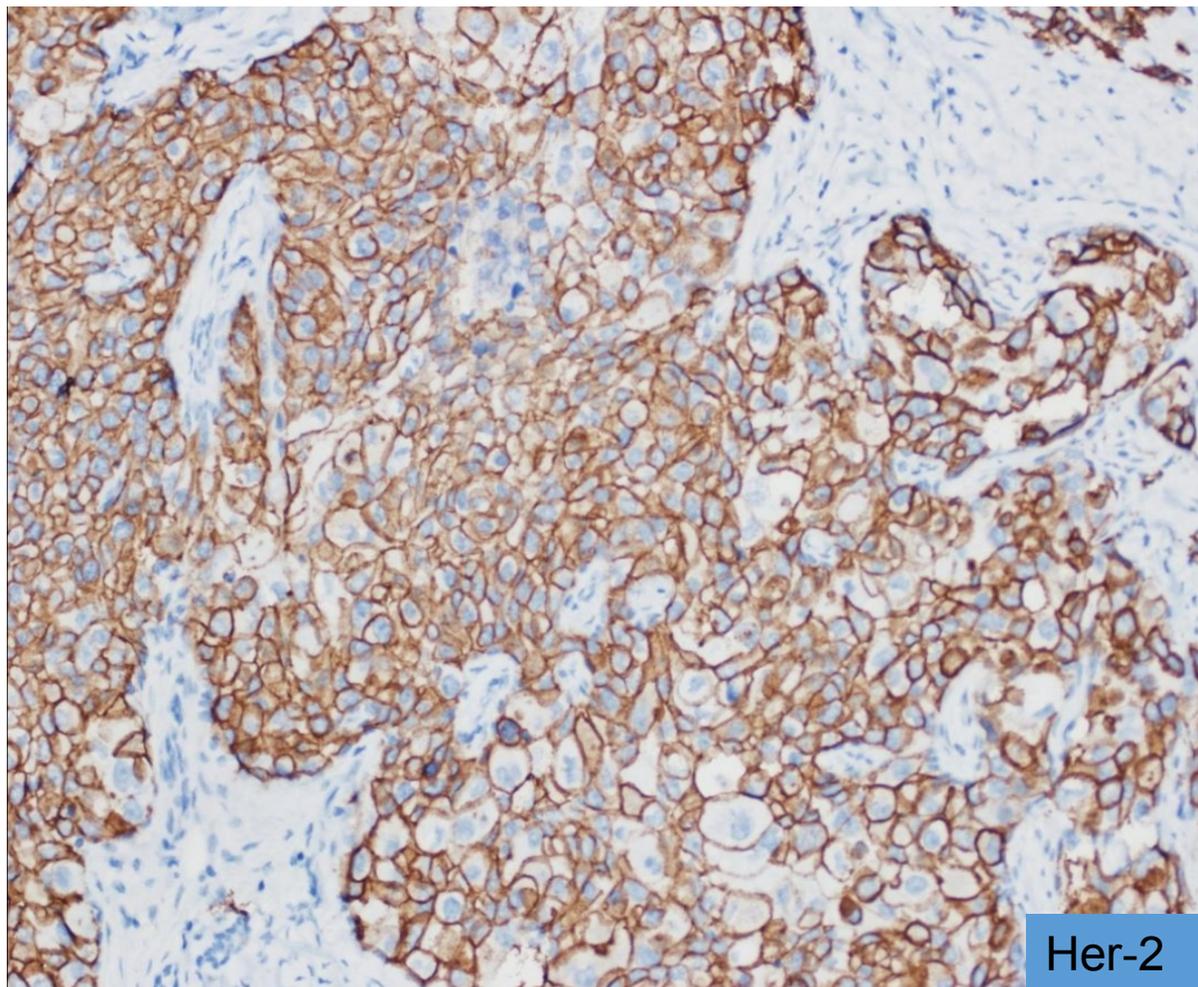


CD20 免疫组化染色

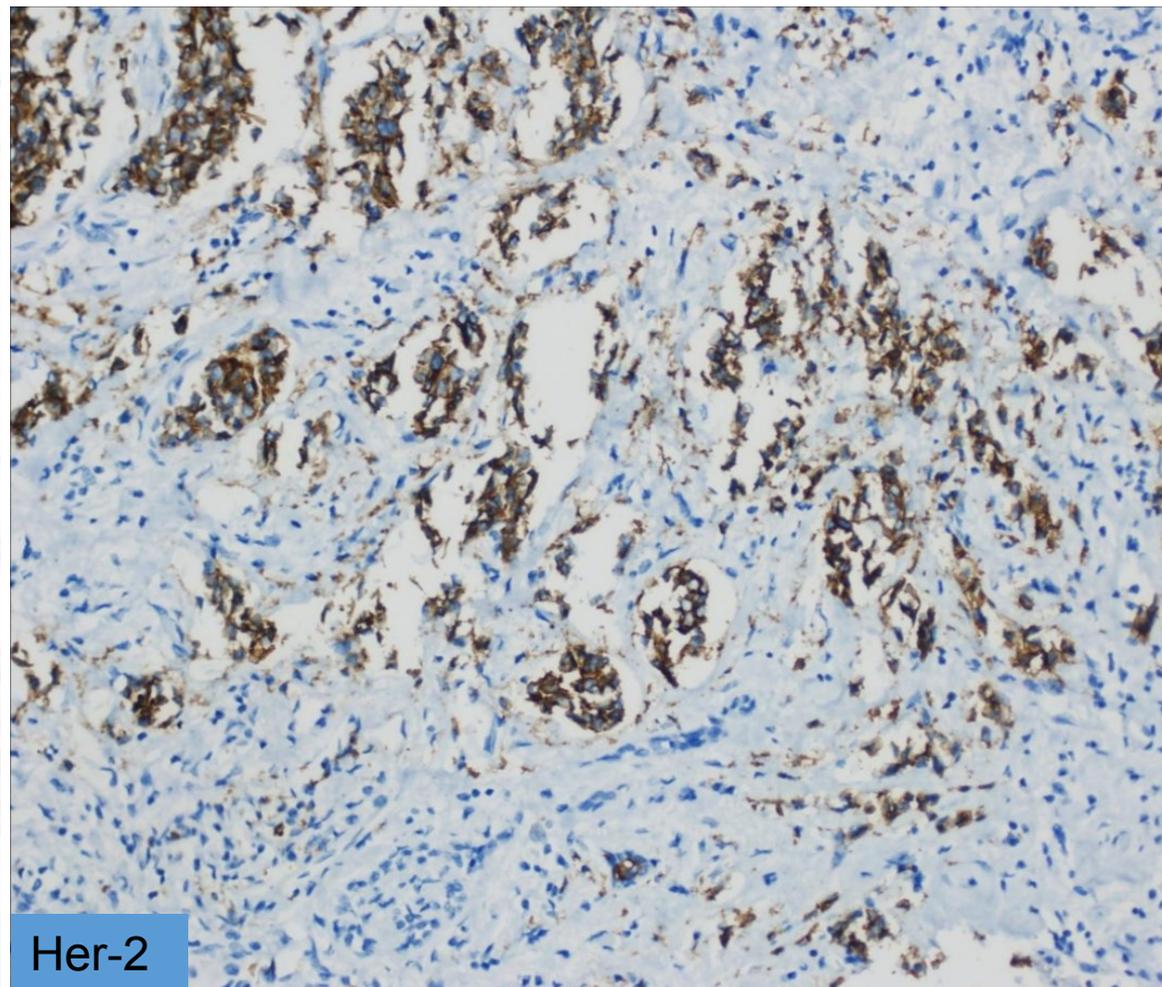
组织固定不足造成样本中央组织结构破坏，IHC染色较周围组织偏弱甚至加阴性。

3.3

组织前处理—固定



固定良好

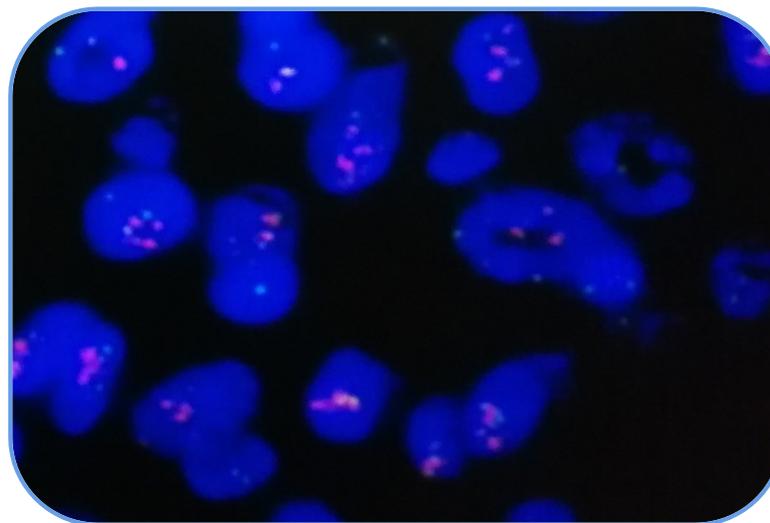
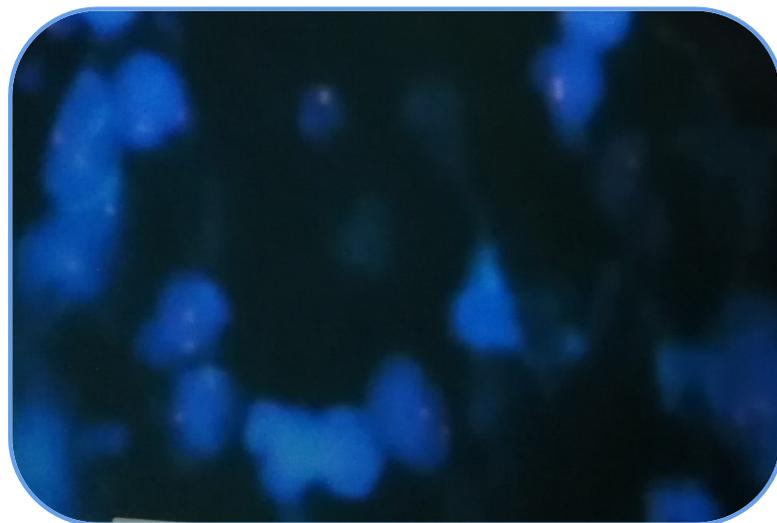
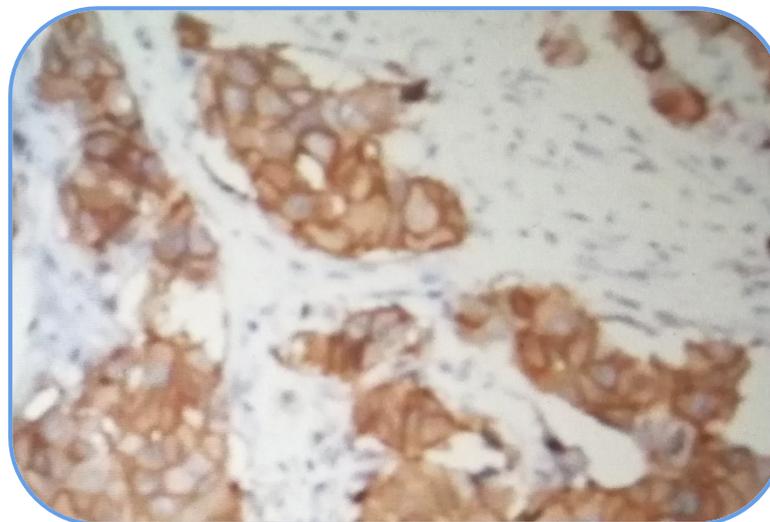
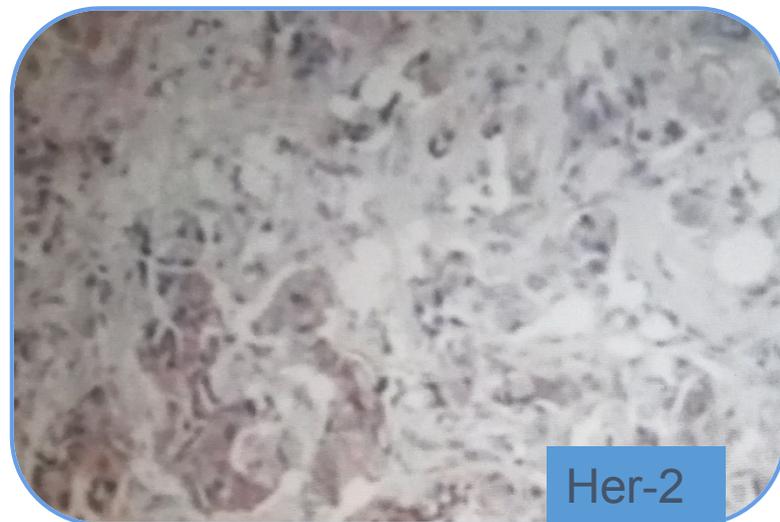
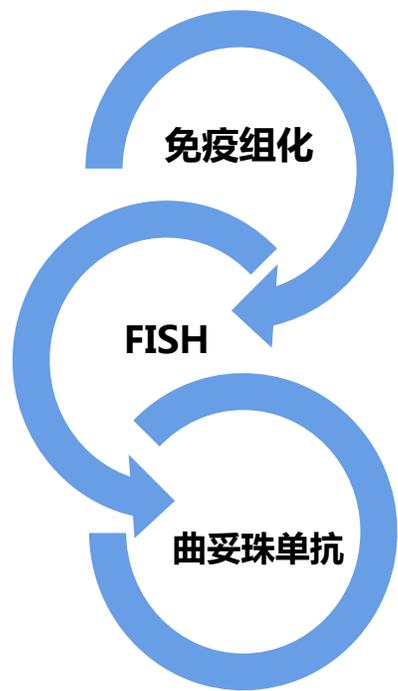


固定不及时

固定不及时（材块过大）造成组织自溶，组织结构破坏，且抗原弥散于包外，影响判读。

3.3

组织前期处理—固定

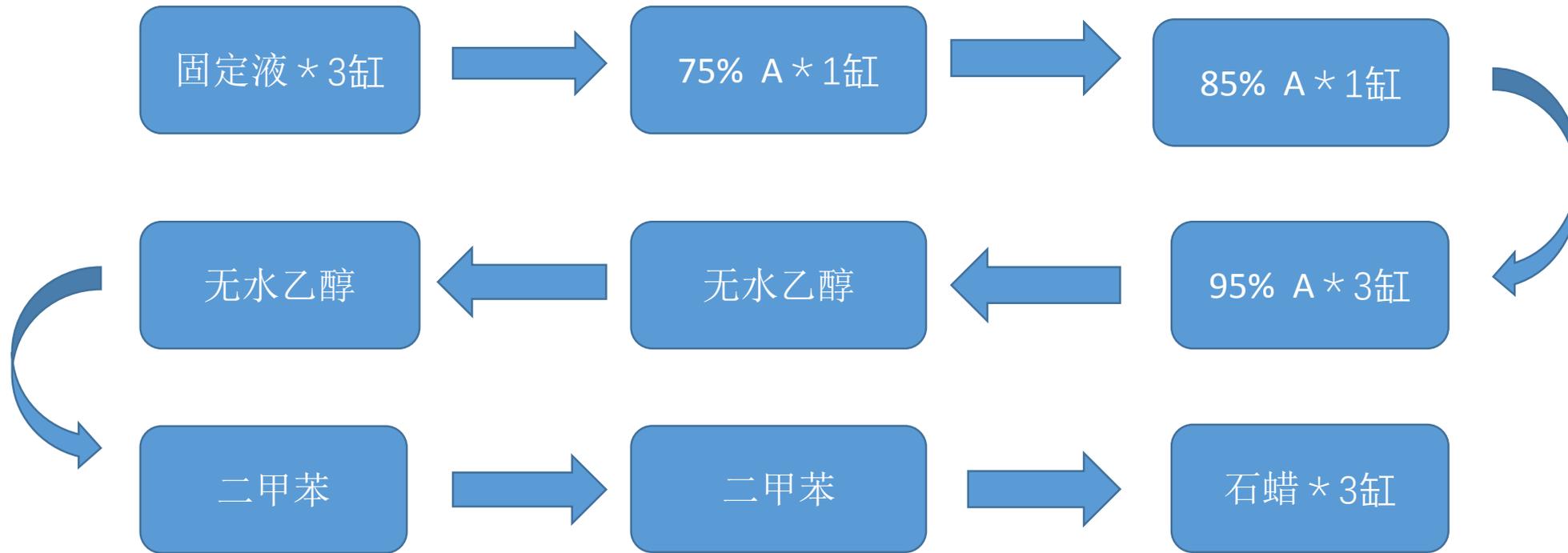


左侧：固定不足

右侧：固定良好

3.3

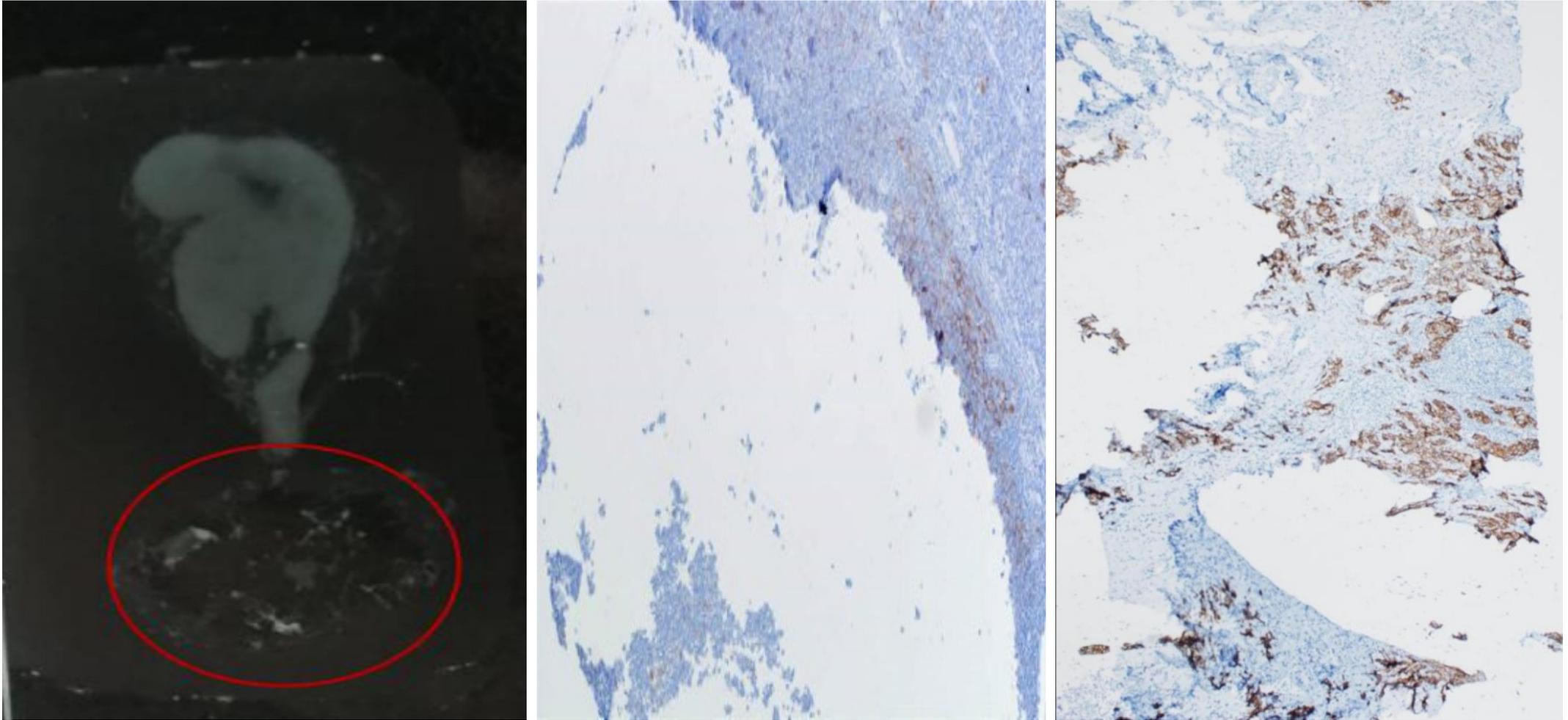
组织前处理—脱水



注意：组织避免在二甲苯和高浓度乙醇中长时间浸泡，否则可能会导致组织干脆，无法制片；

3.3

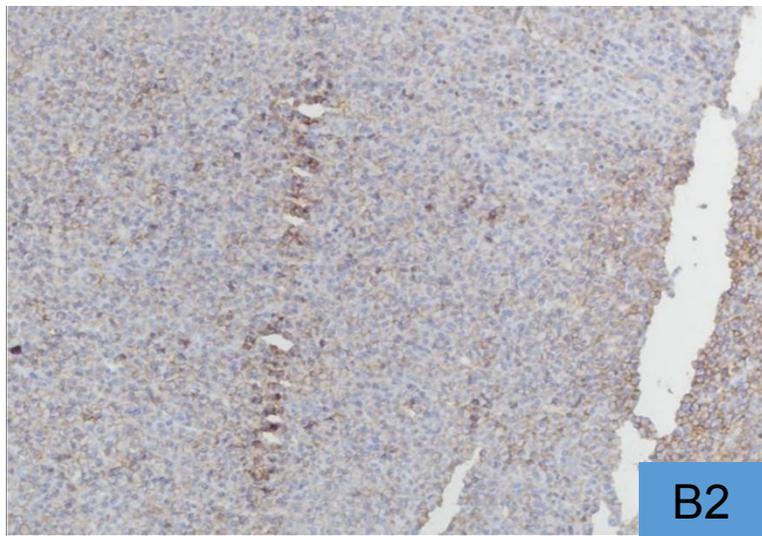
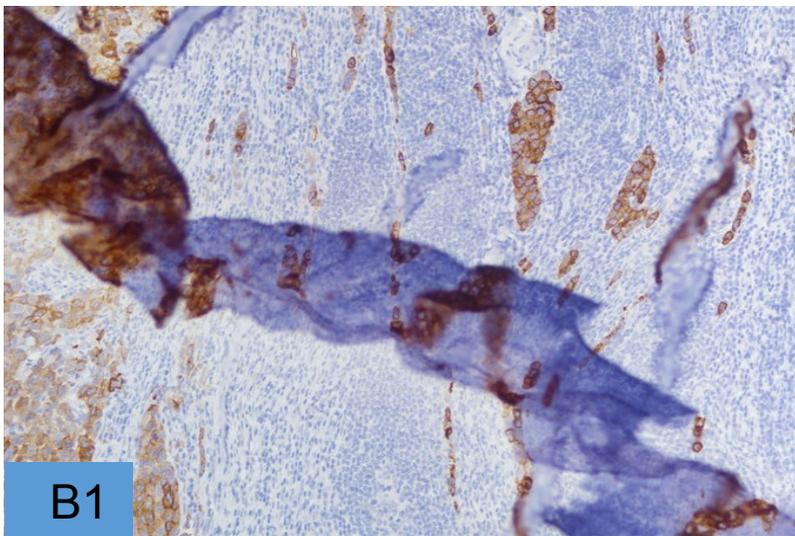
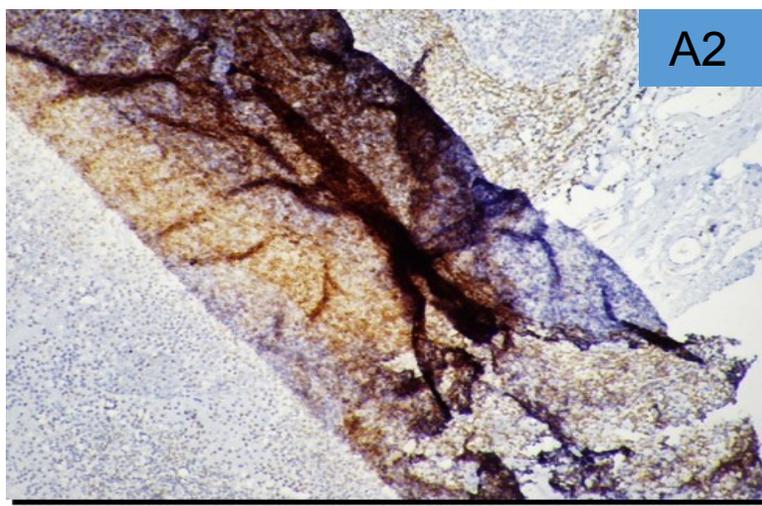
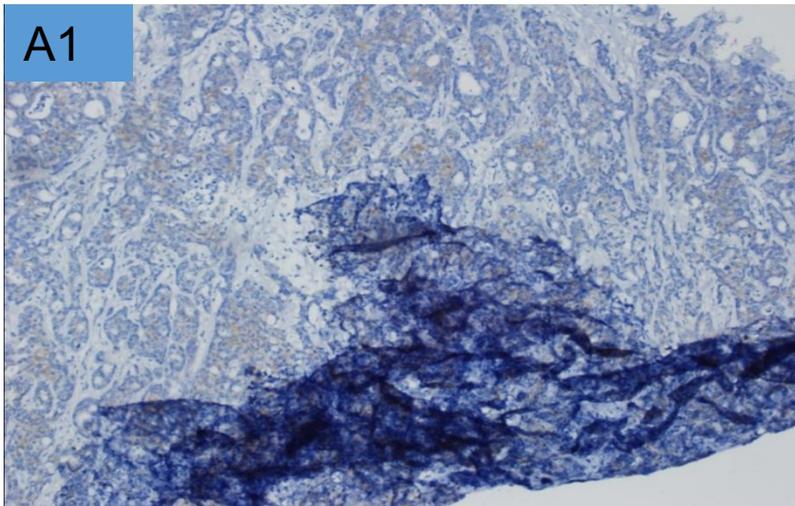
组织前处理—脱水



影响因素：脱水不足致组织展片困难，免疫组化易掉片且染色结果偏弱。

3.3

组织的前处理—切片



A1

A2

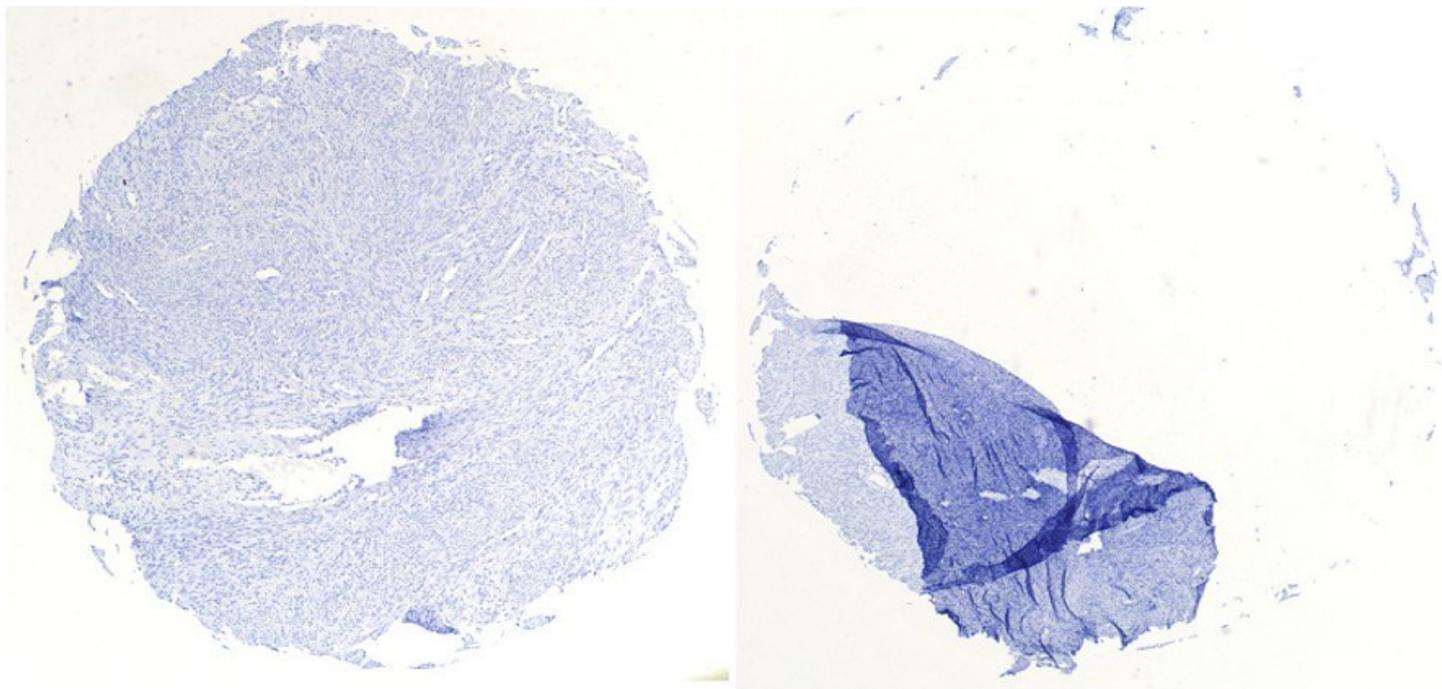
B1

展片时组织皱褶
(二次展片法)

B2: 刀痕造成色原堆积
(使用锋利的刀片切片)

3.3

组织的前期处理—烤片



68° 2小时

68° 1小时

修复方式: EDTA

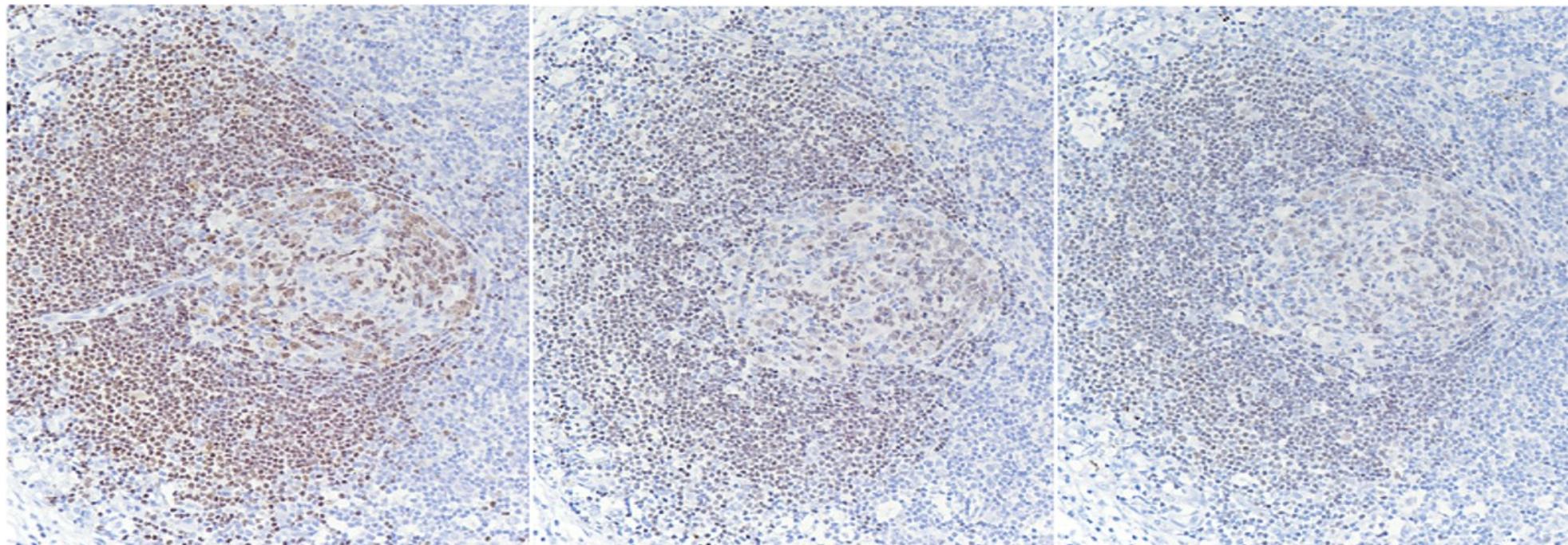
一抗: CD10

显色系统: DAB 5min

烤片温度高于石蜡熔点2-4°，烤片时间2-4小时（平躺式烤片）。

3.3

组织的前期处理—烤片



68° 2小时

78° 2小时

88° 2小时

抗原修复：EDTA

一抗：PAX-5

显色系统：DAB



BCL-6



BCL-6

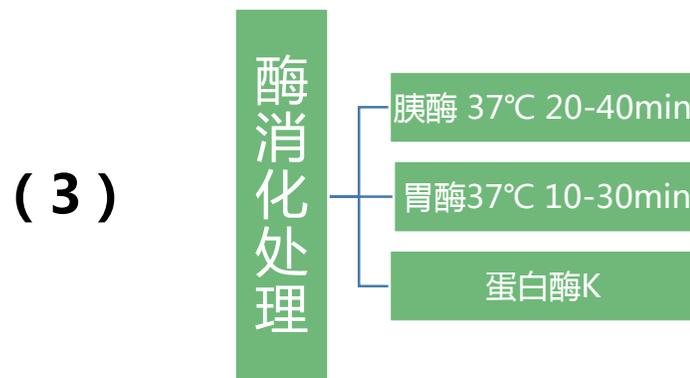
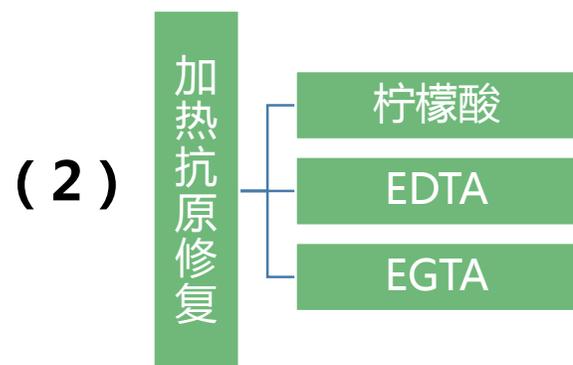
问题：斑块状不着色—抗体和复染试剂均不染色

现象：组织部分区域染色良好，部分区域呈不透明白色，即无阳性染色
也无复染剂的颜色。

解决方案：1.确保脱蜡液完全覆盖切片，延长脱蜡时间。

- 抗原修复的原因
- 常规石蜡切片标本大多用10%的中性缓冲福尔马林固定，结果使：
- 抗原性物质形成醛键，羧甲键而使部分抗原决定簇被封闭了；
- 蛋白质之间发生交联而使抗原决定簇隐蔽。

(1) 无需修复。



(4) 双修复 (加入抗原修复+酶消化抗原修复)

加热抗原修复

- 直接：高压锅高温高压修复、直接煮沸修复、微波炉修复
- 间接：高压锅隔水修复、水浴锅修复



高压锅直接修复



直接煮沸修复



微波炉修复



高压锅隔水间接修复





喷气后计时1.5-2min



室温自然冷却10min





保温状态计时20min

室温自然冷却10min

- 加热抗原修复

- 修复液的选择

- 修复结束后的冷却方式

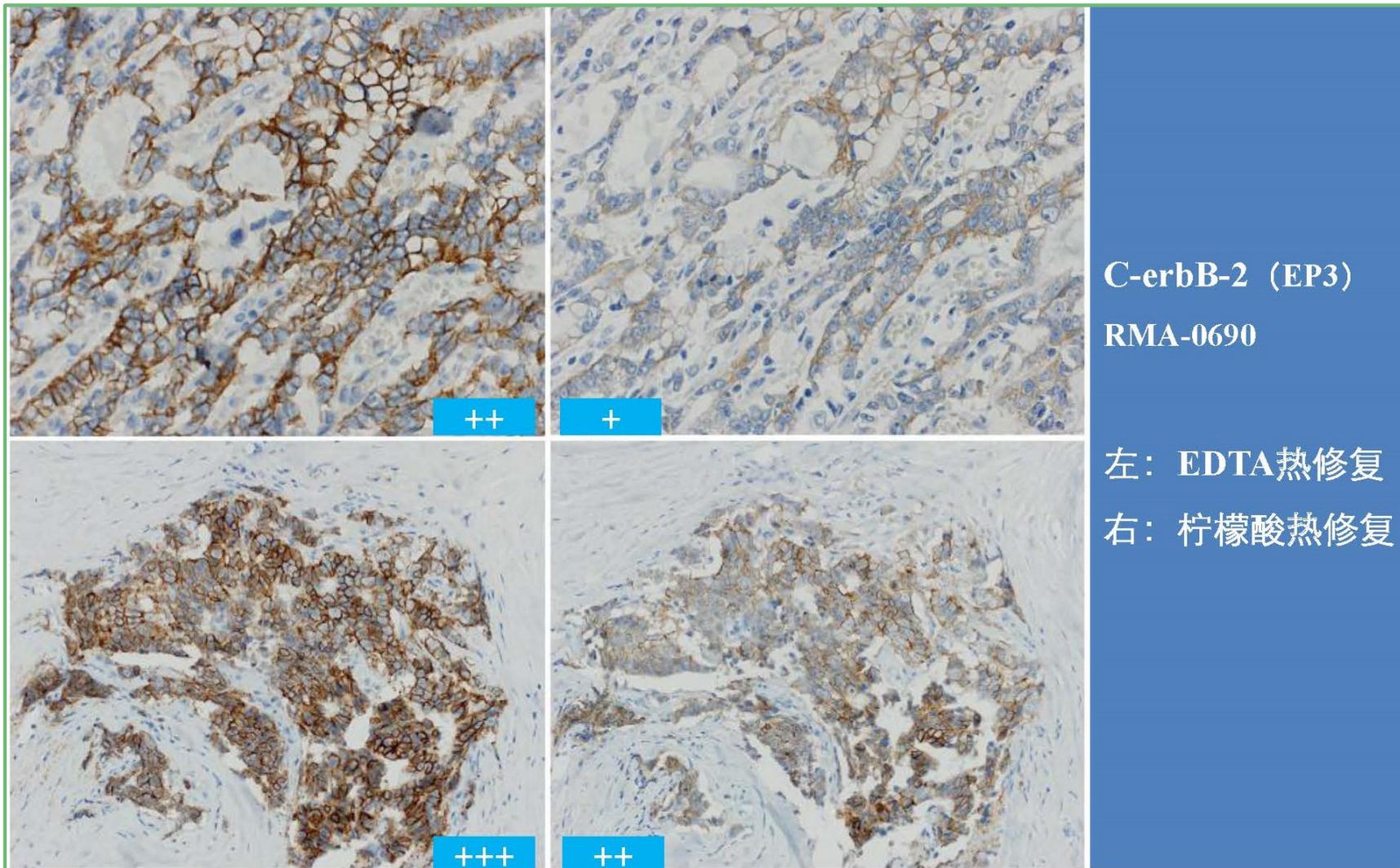
- 直接修复与间接修复的差异

- 酶消化抗原修复

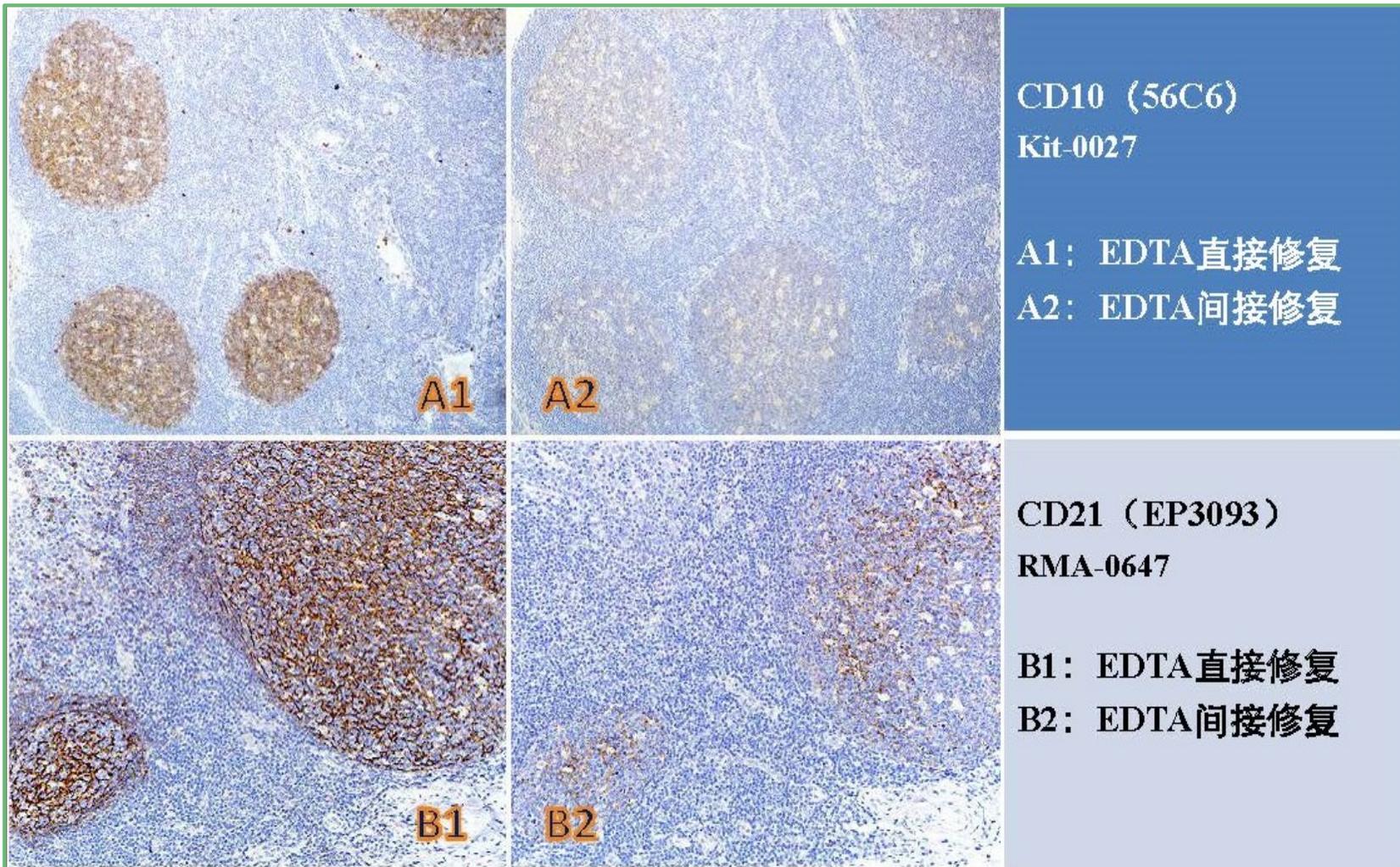
- 修复温度为37°C

- 孵育盒内加入一定量的水并提前放入37°C温箱内预热

抗原修复不当造成的弱阳性染色

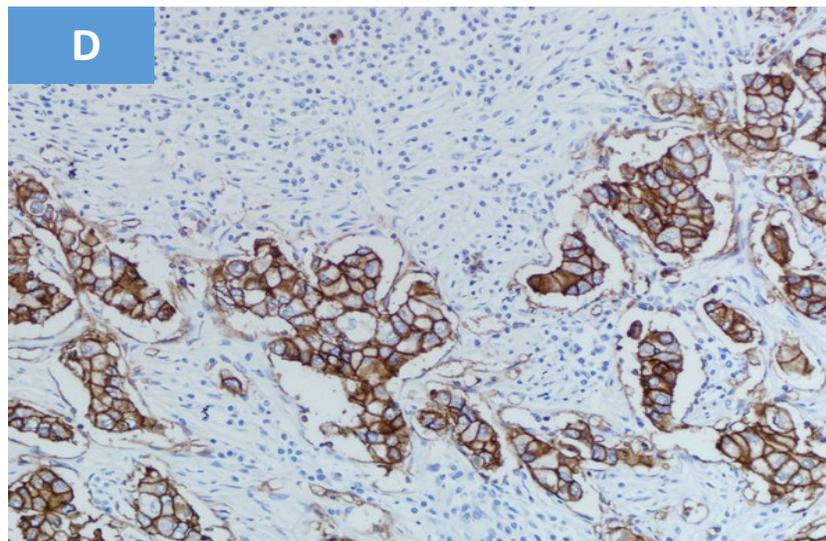
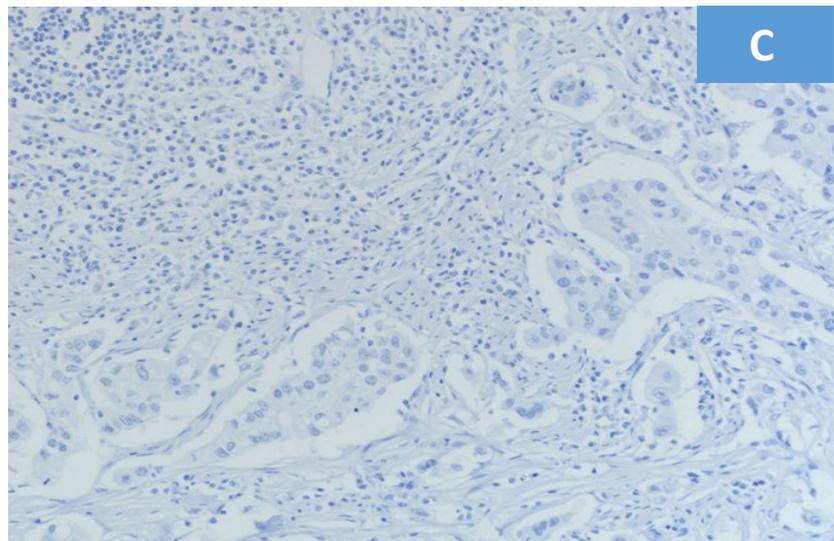
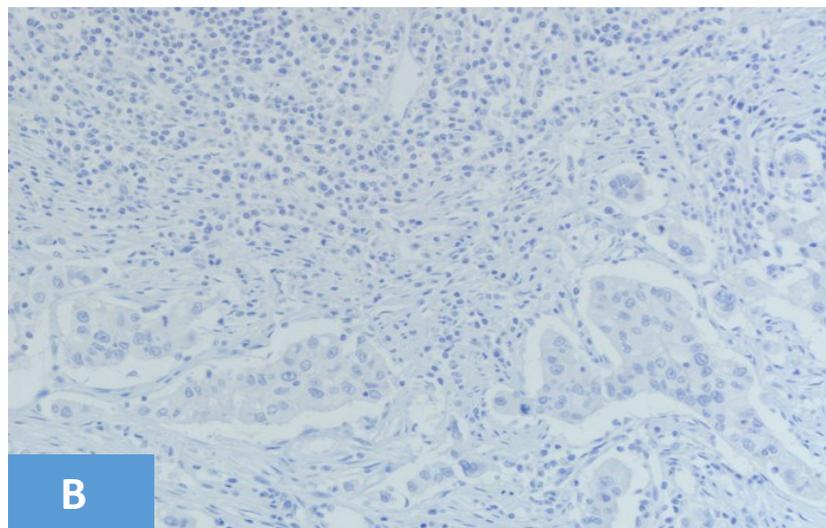
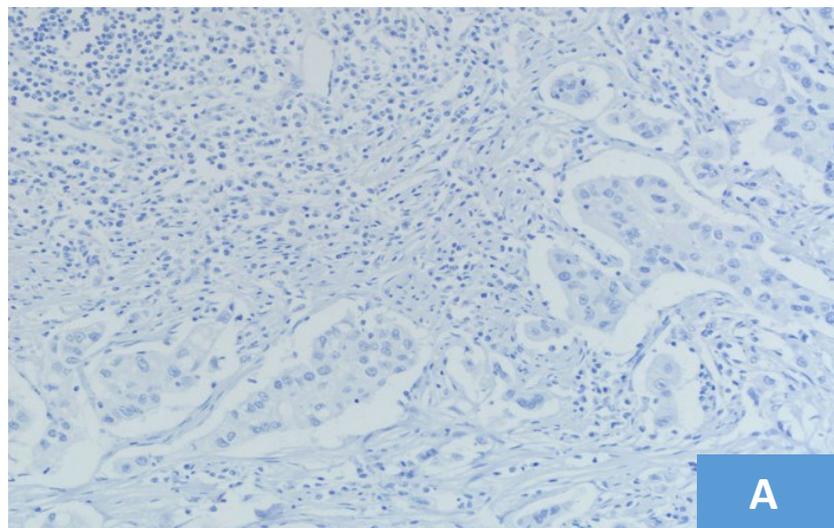


直接与间接修复的差异



3.4.4

抗原修复规范



A: 柠檬酸热修复

B: EDTA热修复

C: 胰酶消化修复

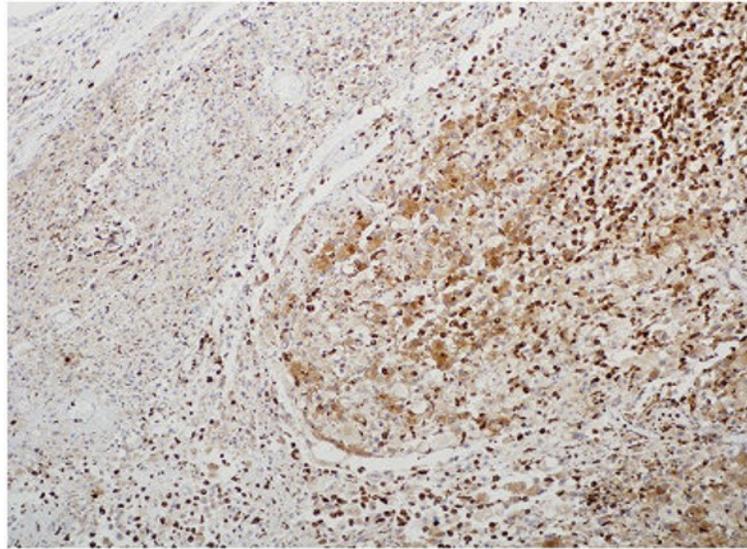
D: 胃酶消化修复

抗体: MOC-31

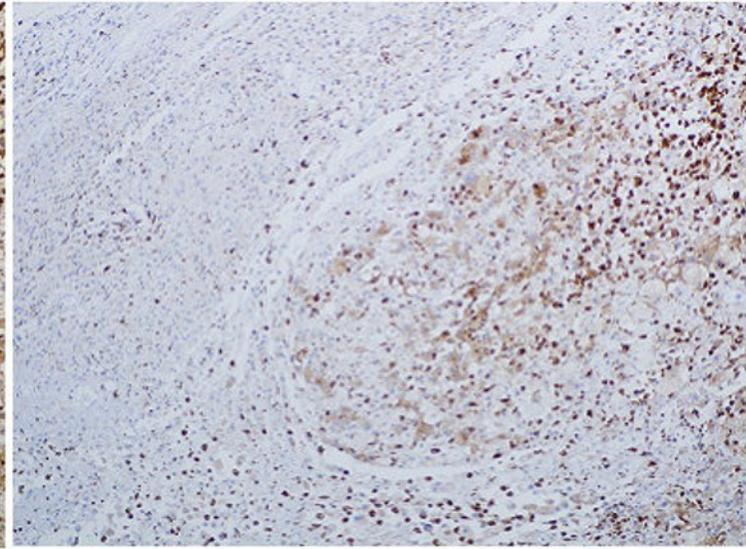
DAB显色: 5 min

3.4.5

抗原修复规范



修复时间：5min

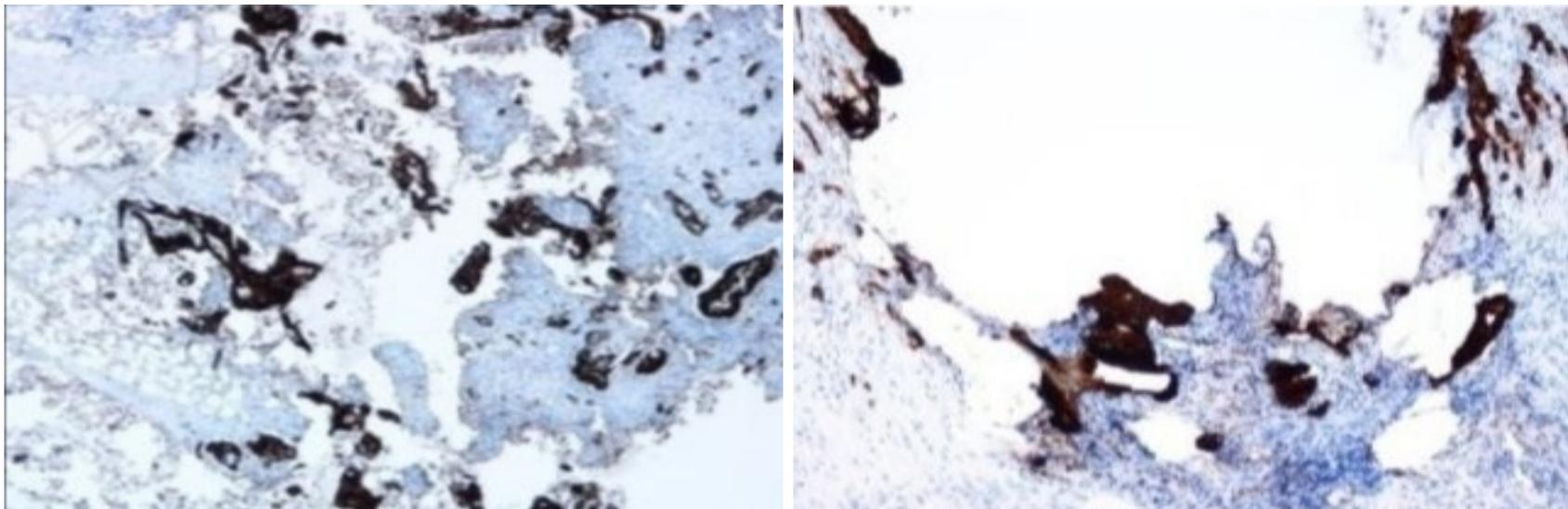


修复时间：2.5min

抗原修复：柠檬酸热修复

一抗：CD68

显色系统：DAB 5min



问题：组织破损严重

现象：组织切片外观粗糙，组织形态破坏

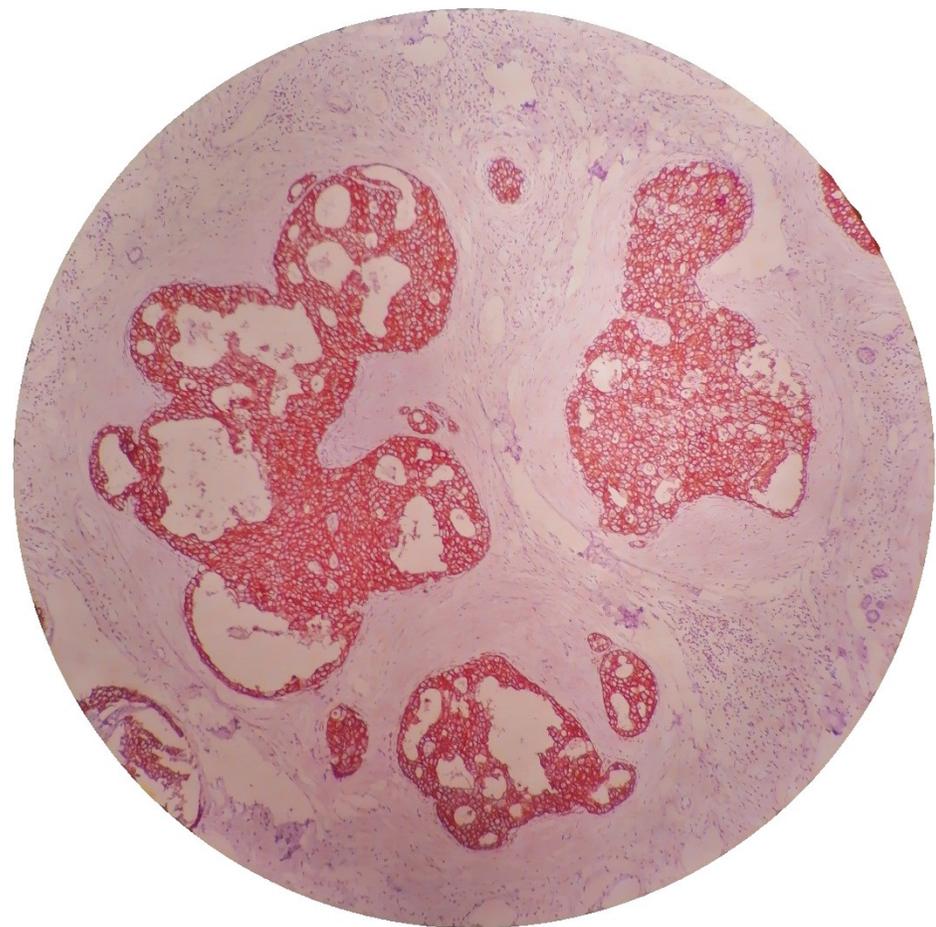
- 原因
1. 抗原修复过度或修复结束后快速冷却；
 2. 组织固定或处理不良；
 3. 切片太厚，不均匀，皱褶等；
 4. 烤片温度过低，时间短；

解决方案：严格按照说明进行抗原修复，规范组织的处理操作流程。

★ 新抗体在使用前必须摸索和优化其前期处理条件

- ◆ 不同抗体抗原修复方式不同
- ◆ 不同抗原修复方法，效果不同
- ◆ 抗原修复的影响因素：温度，时间，PH，冷却方式
- ◆ 不同组织处理（特别时固定）的条件，对抗原修复的要求也不相同
- ◆ 关键是当前使用的修复方法，是否适用于本实验室？

- (1) 内源性过氧化物酶的灭活
- (2) 血清封闭
- (3) 一抗孵育
- (4) 二抗孵育
- (5) 显色剂显色
- (6) 复染，返蓝，脱水，透明，封片。



除去内源性酶及内源性生物素

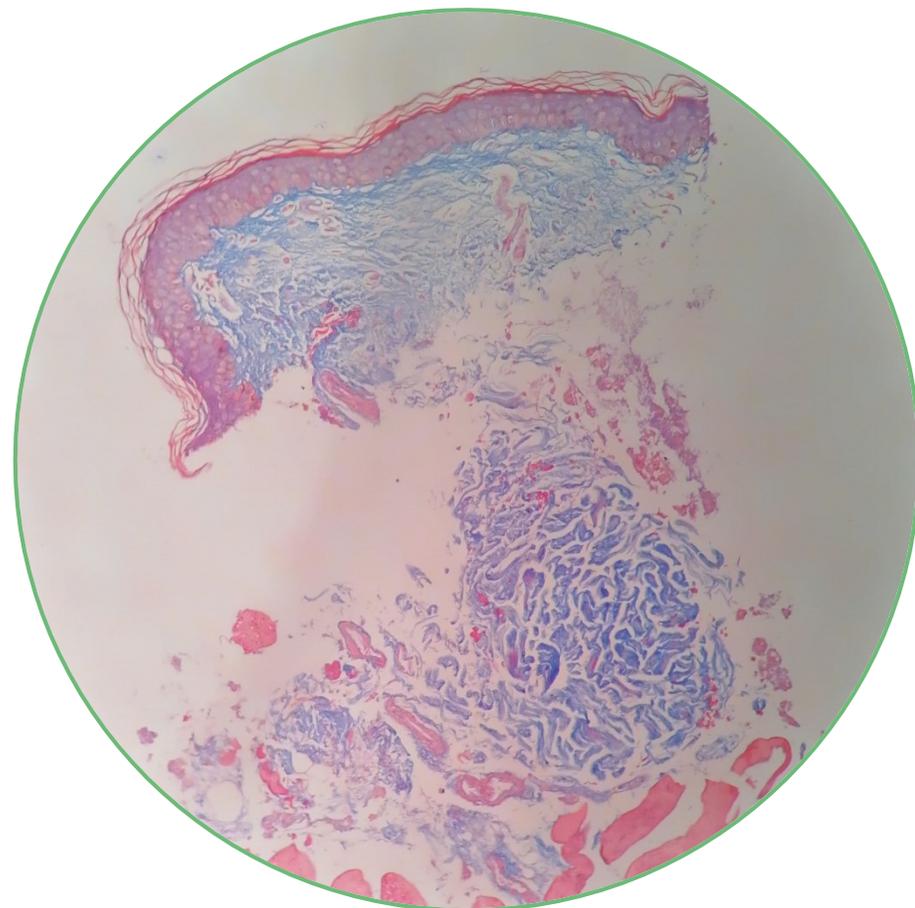
组织自身含有内源性酶和内源性生物素，影响特异性，故需将组织内各种内源性酶灭活。

(1) 除去内源性酶 过氧化氢 10-15min

(2) 除去内源性生物素 0.01%生物素溶液 室温20min

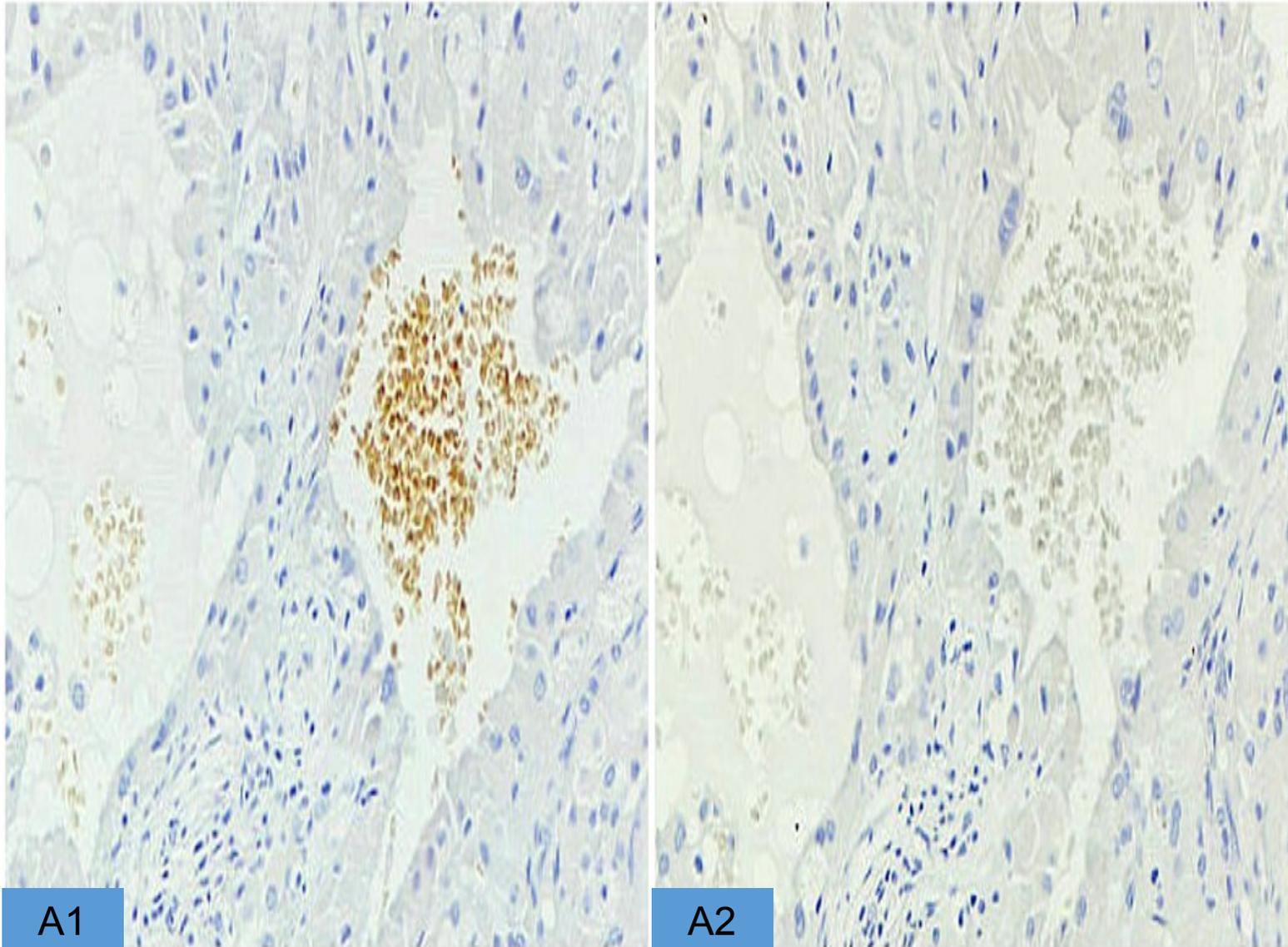
(3) 灭活碱性磷酸酶 左旋咪唑加入PH7.6-8.2的底物液 5min

• 血清封闭目的：抑制非特异性背景着色



3.5.2

染色中的质量控制

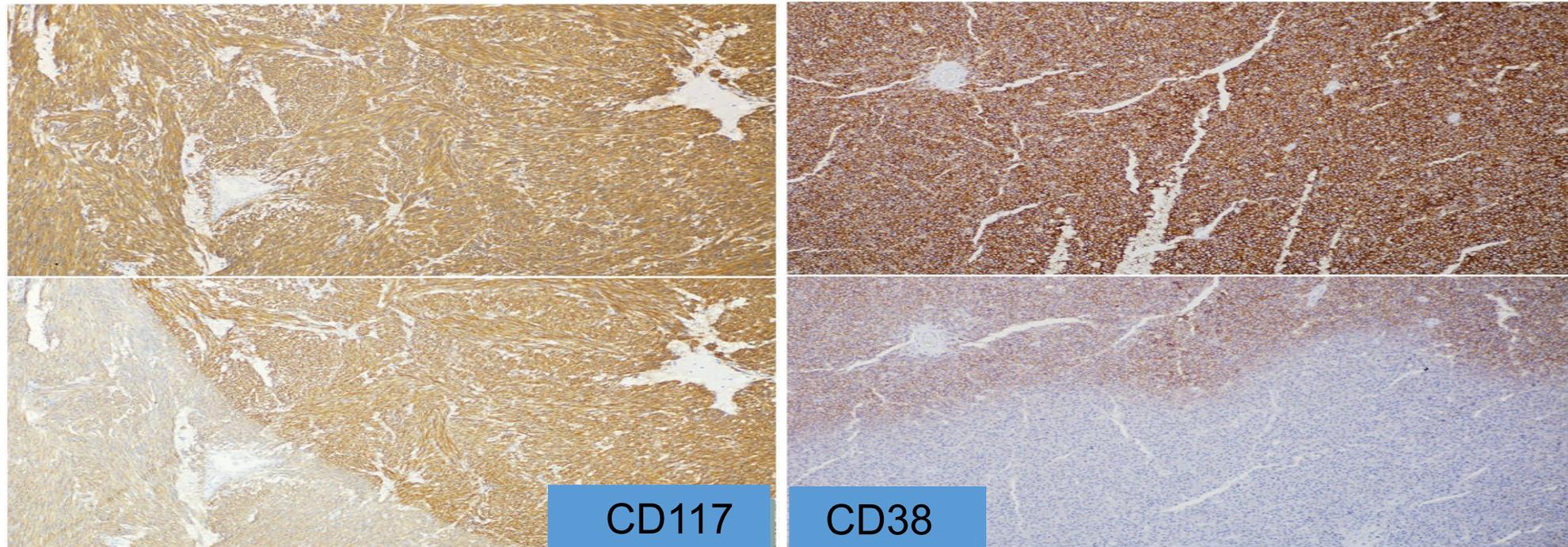


A1:无处理

A2: 3%H₂O₂ 15min

3.5.3

阴阳脸的现象



问题：染色不均匀

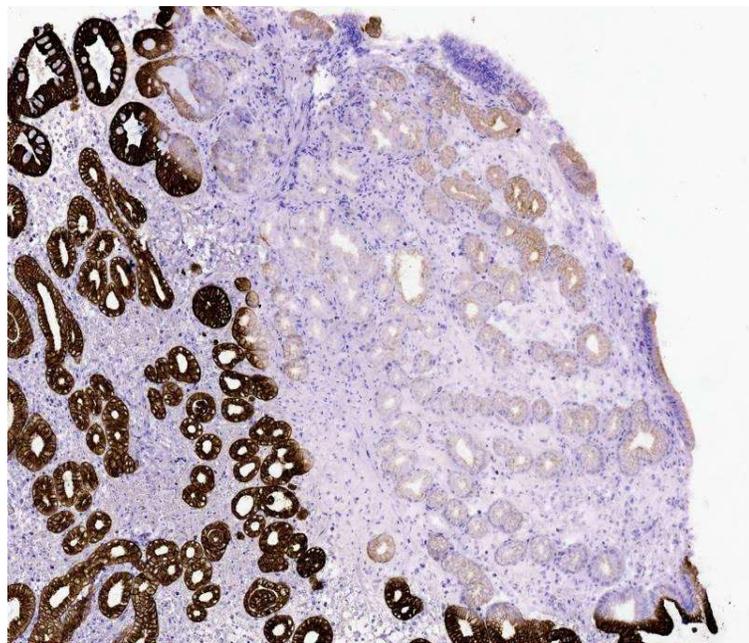
现象：着色区和未着色区界限明显

原因：试剂未完全混合，有气泡；划圈时油笔离组织太近

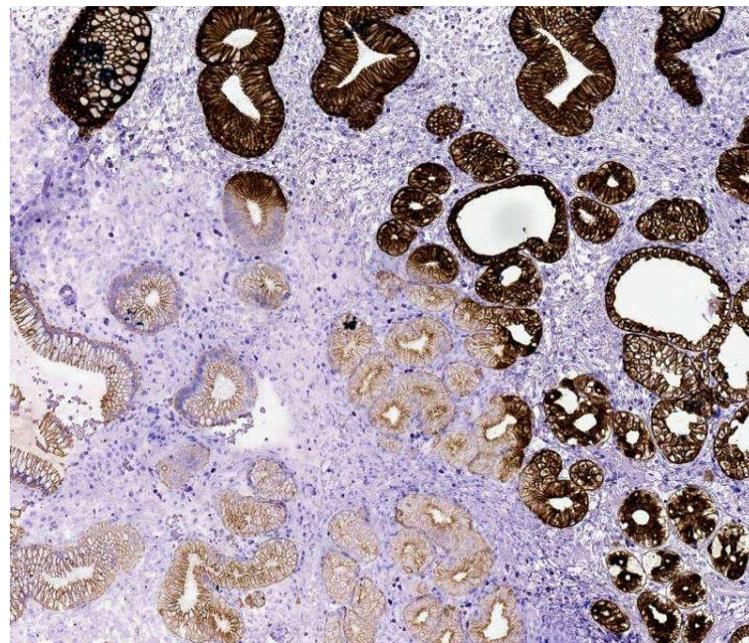
解决方案：加抗体前离心，除去气泡，油笔划圈时离组织3-4mm

3.5.3

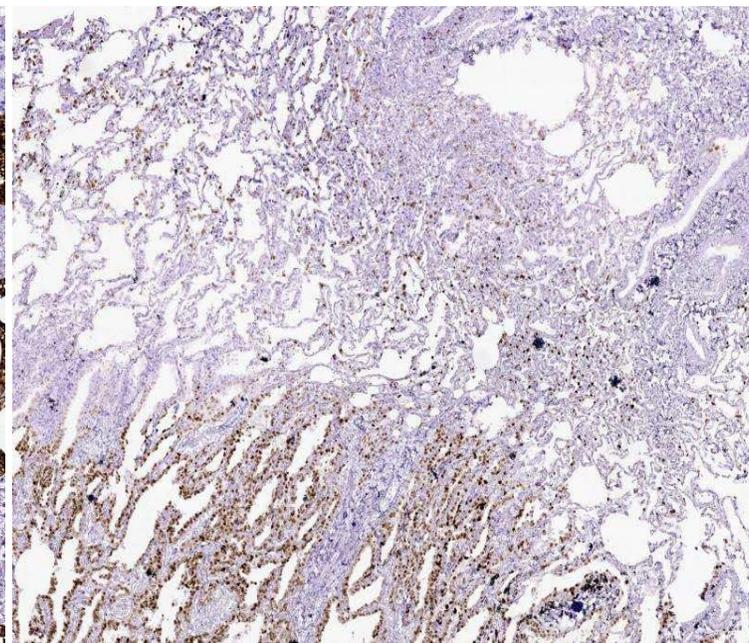
阴阳脸的现象



CK7



CK20



KI-67

问题：染色不均

现象：通常在强染色区和弱染色区域有一条明确的线

原因：操作台倾斜，抗体孵育不均；组织干片

解决方案：确保操作台水平，试剂覆盖

3.5.4

组织切片出现边缘效应

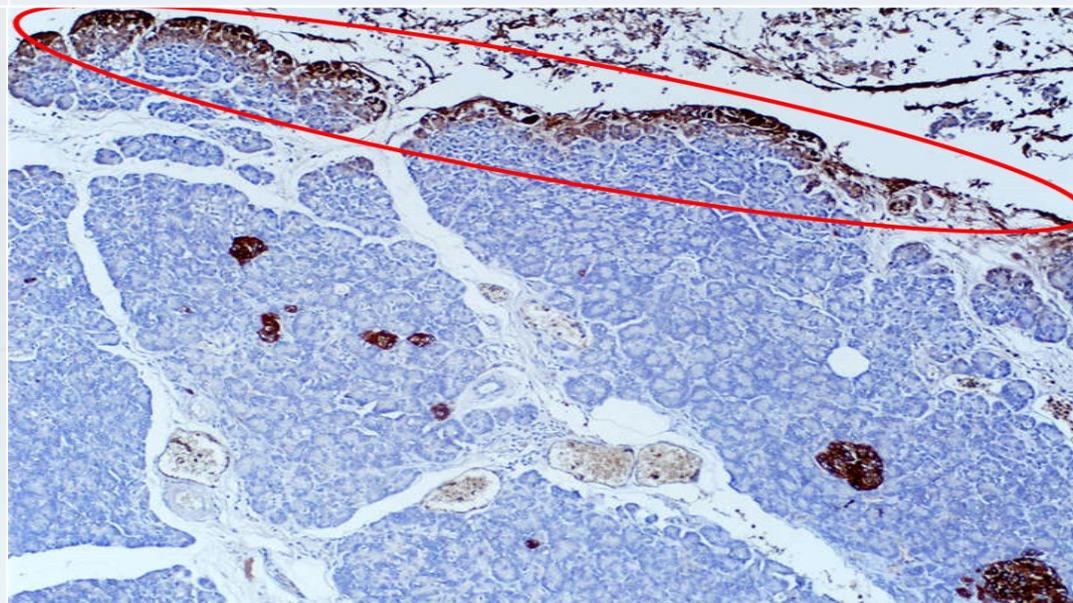
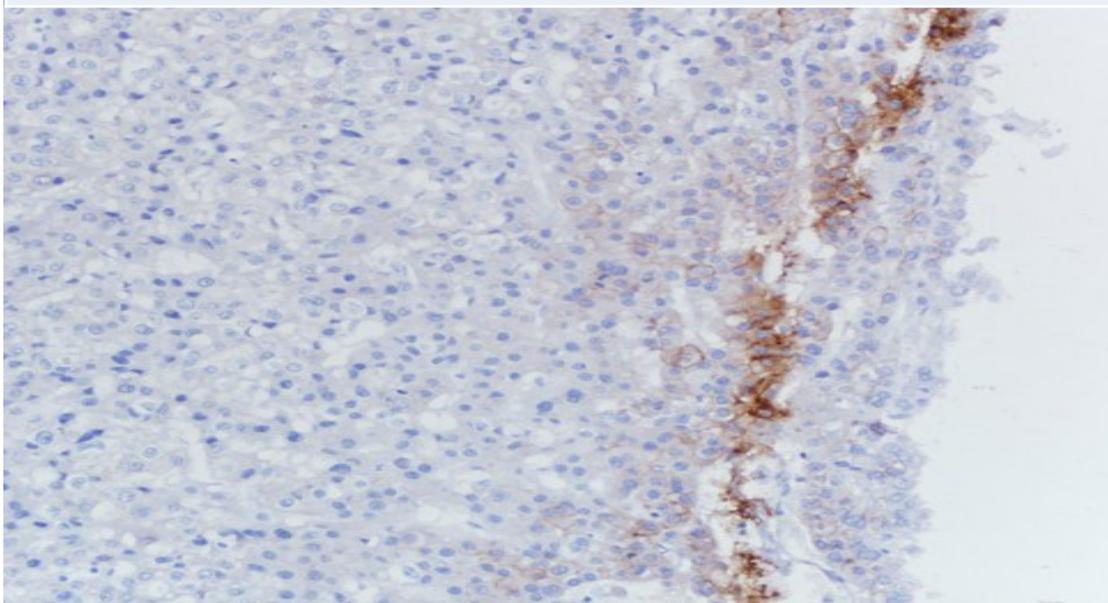
原因分析

1. 组织切片质量差或与载玻片黏贴不牢
2. 滴加试剂时，试剂未充分覆盖组织

解决方案

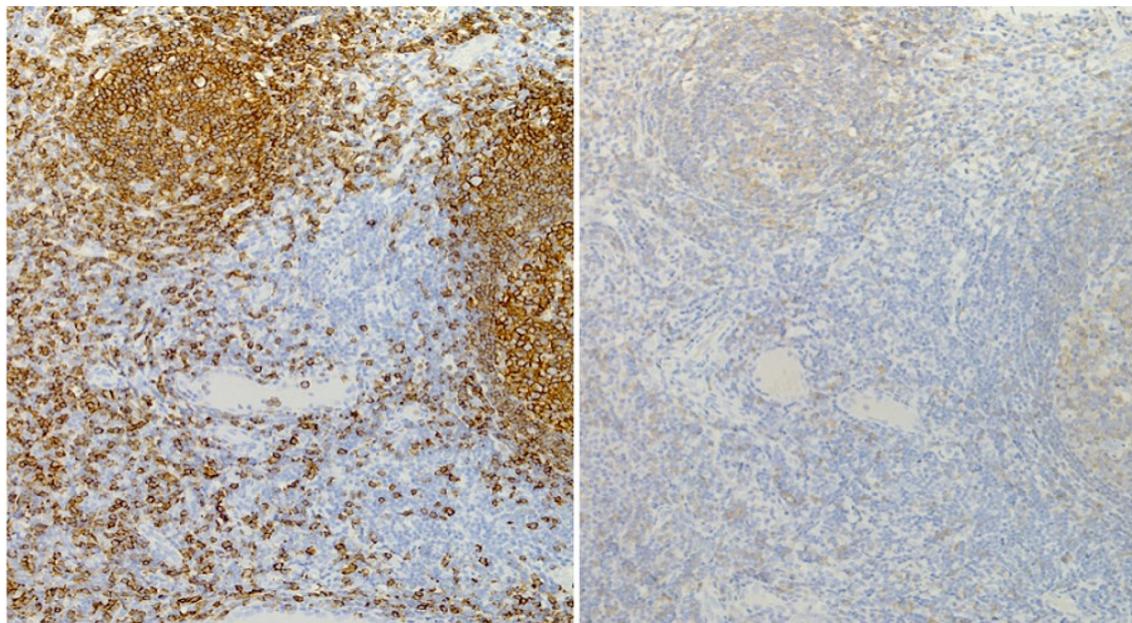
组织前期处理规范，切片厚度适中，使用防脱性能良好的载玻片，冲洗轻柔

滴加试剂时务必使试剂充分覆盖组织



3.5.5

使用已过期的试剂



一抗未过期

一抗已过有效期

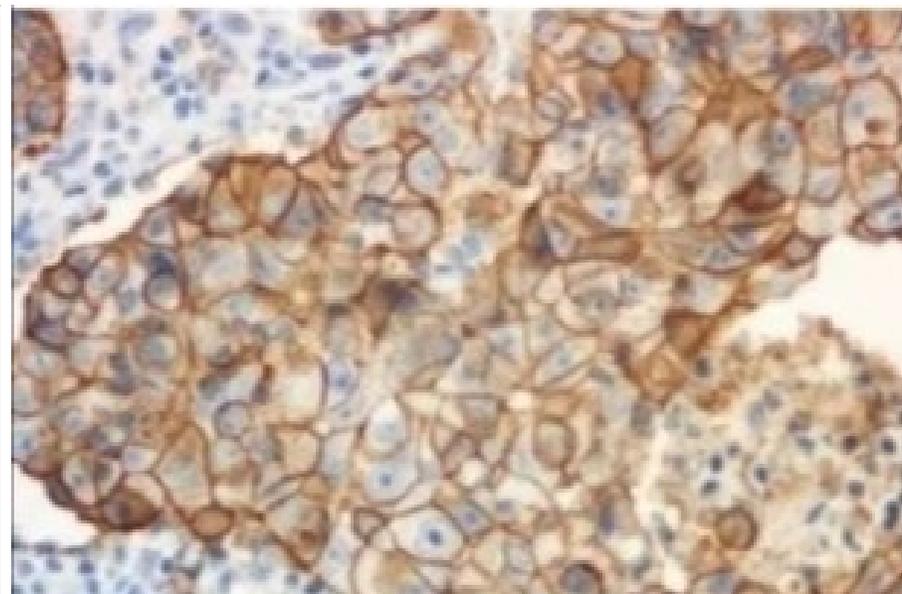
抗原修复：柠檬酸热修复

一抗：CD3

显色系统：DAB 5min



Her-2 阳性以胞质为主，而不是包膜



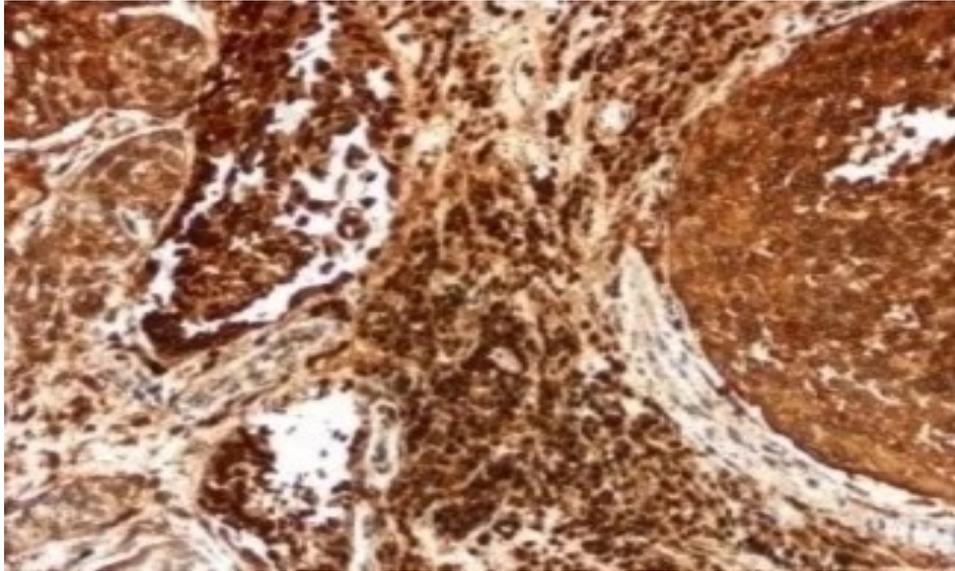
Her-2 阳性物质特异性定位于包膜

问题：染色定位不正确

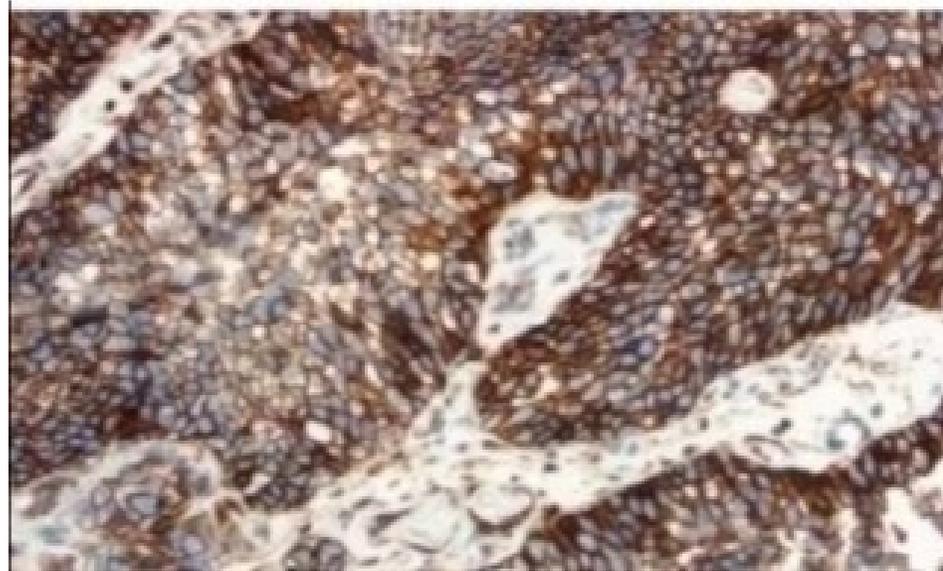
现象：组织切片染色没有显示细胞内定位

原因：抗体不纯或被污染；组织延迟固定或坏死区导致阳性物质弥散

解决方案：选择正确的抗体，避开坏死组织取材



使用多克隆的 E-cad 几乎所有成分均着色

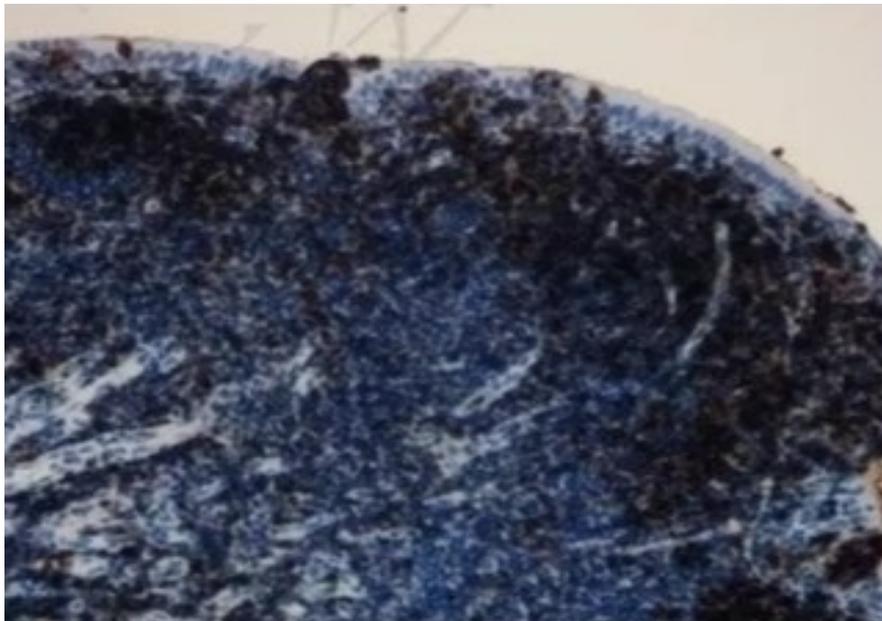


E-cad使用单克隆抗体厚后仅肿瘤细胞膜阳性染色

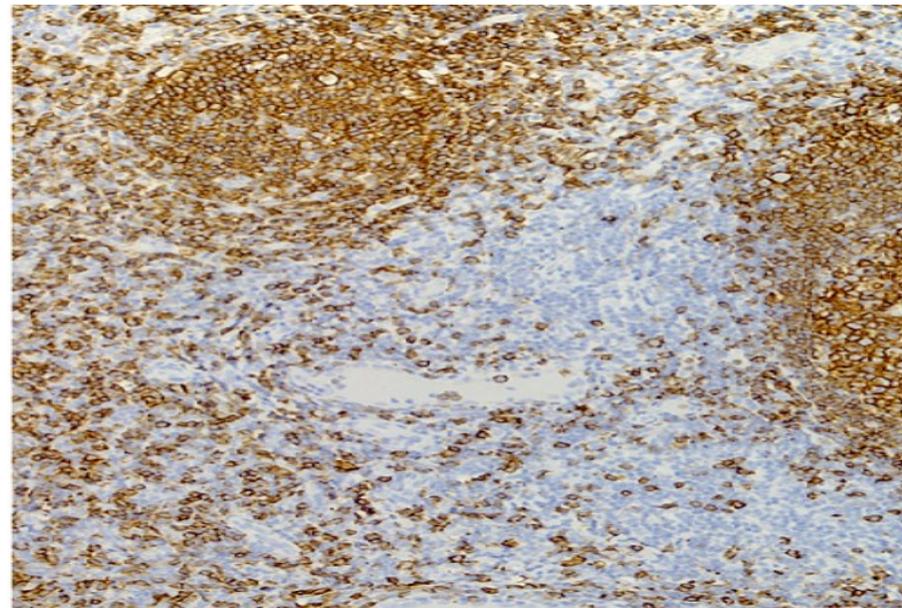
问题：受检组织和对照组织所有成分均着色

原因：1.抗体不纯或抗体污染
2.抗原修复过度
3.一抗/二抗浓度过高，孵育时间过长，孵育温度过高
4.DAB显色时间过长

解决方案：1.优选抗体，按规定稀释/分装/储存试剂
2.参照说明书修复，摸索适合自己实验室的修复方式
3.降低试剂浓度，缩短孵育时间和降低孵育的温度
4.镜下控制显色时间，常规显时间5min，不超过10min



CD20 阳性细胞被深染的苏木素掩盖

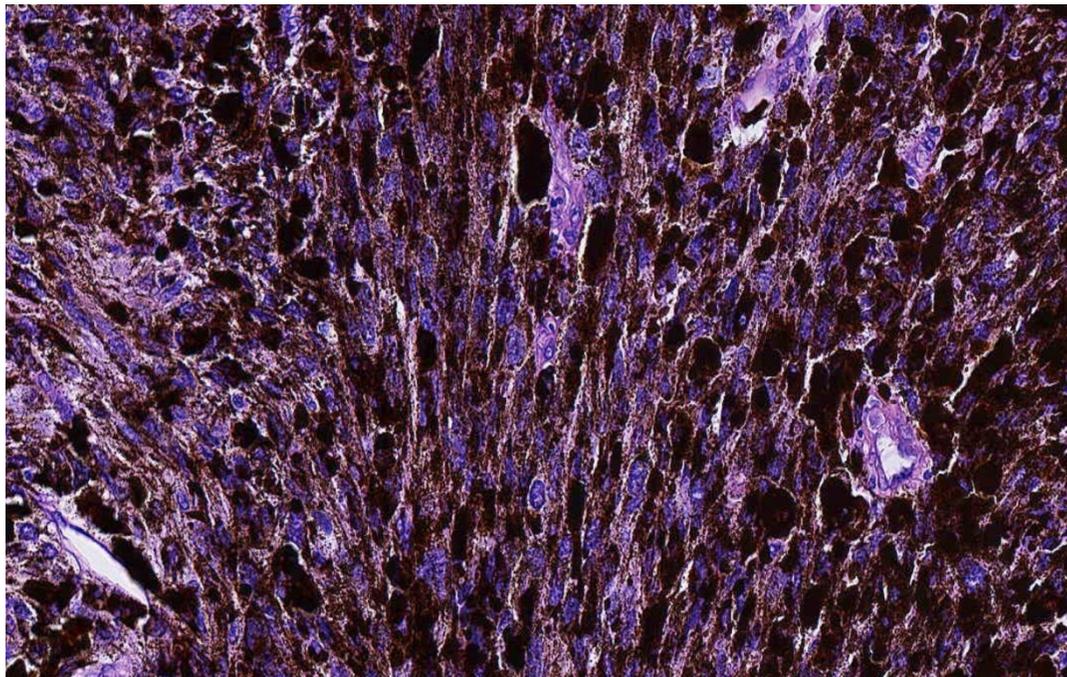


CD20恰当复染

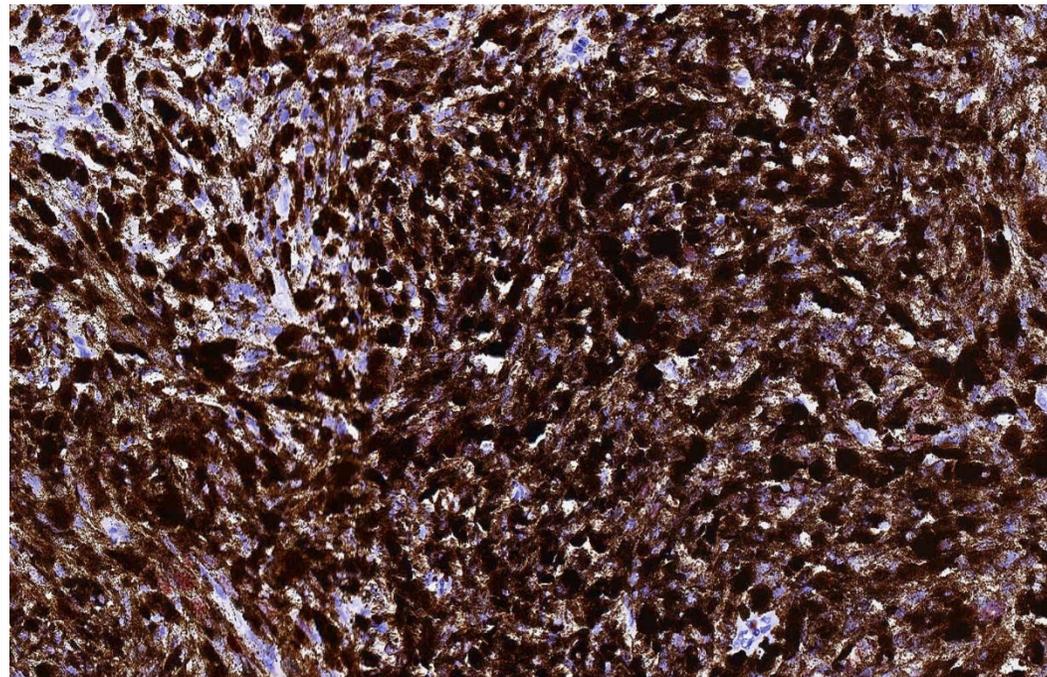
问题：复染过度

原因：复染时间太长或复染剂浓度过高

解决方案：减少苏木素复染时间或使用稀释的苏木素染色



常规HE染色

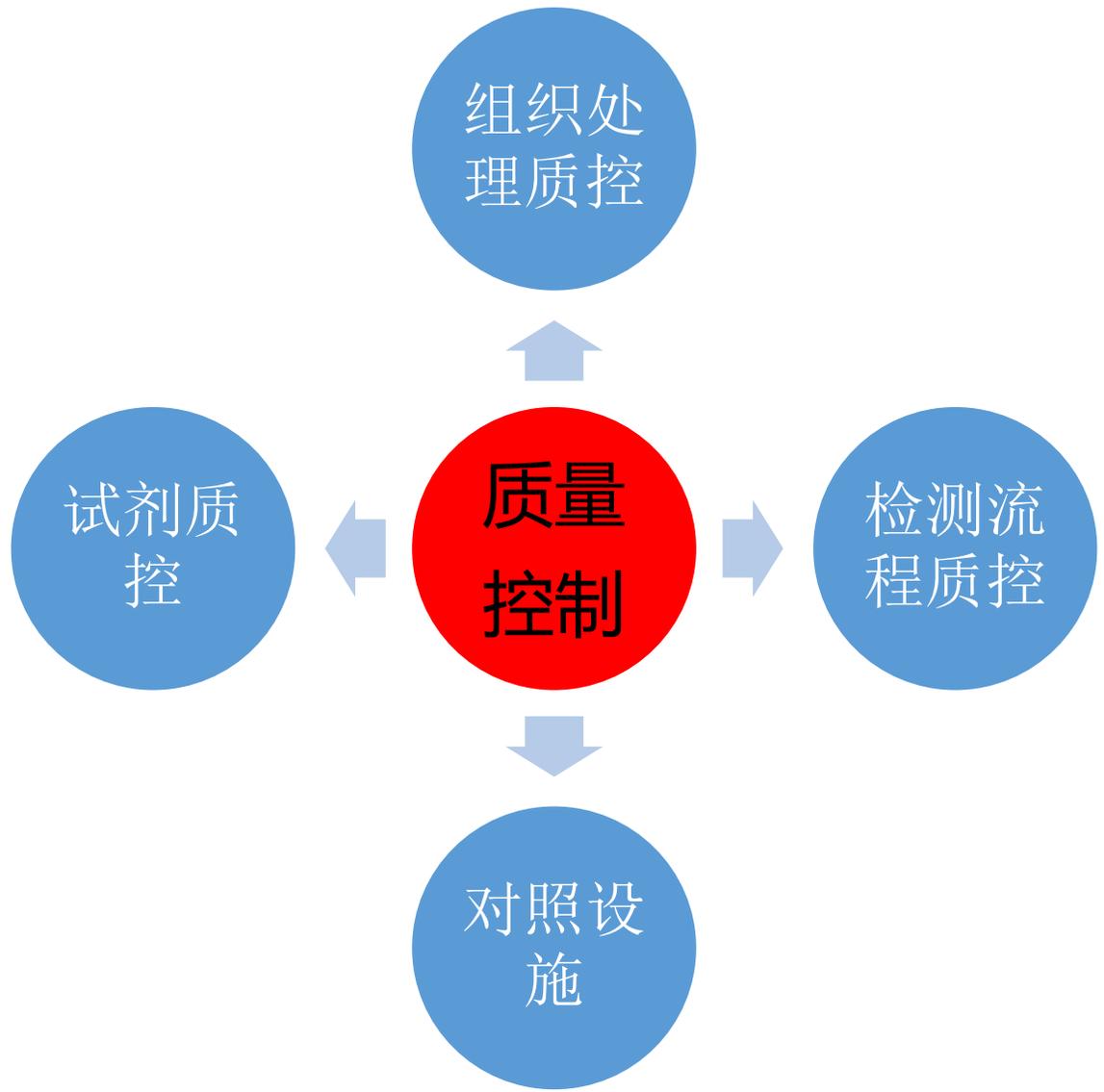


HMB-45免疫组化染色

现象：免疫组化阳性着色颜色与组织自身颜色有冲突

解决方案：常规组织脱蜡至水：

1. 0.5%高锰酸钾 10-20min $\xrightarrow{\text{水洗}}$ 2%草酸 1-3min
2. 使用AEC显色液



3.6.1

染色后的质量控制

01

阳/阴性对照

结果判定必须建立在对照成立的基础上

02

阳性结果

表达在预期对应组织结构中抗原特定部位上，且定位清晰准确，无背景染色

03

弱阳性判读

在预期特定的组织结构中哪怕只有少数抗原表达也要考虑为阳性表达

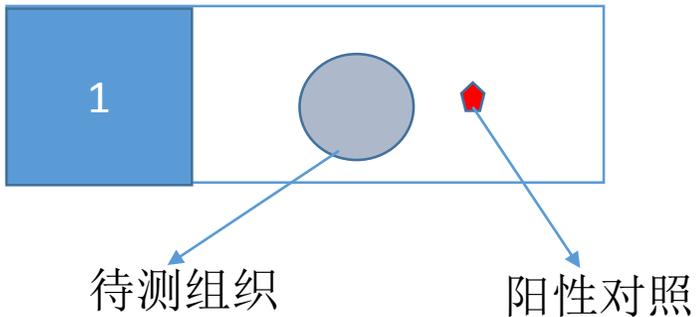
04

综合判断

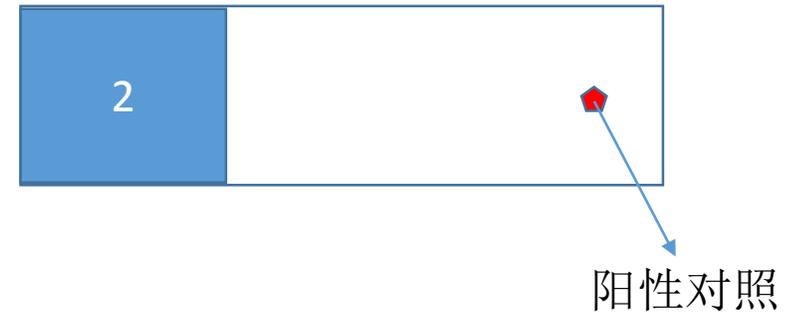
免疫组化结果同HE诊断不一致时，因再结合临床资料综合分析

免疫组化对照设立的原则

- ◆ 与药物治疗相关的免疫组化（三类试剂），每张切片至少放一个对照组织
- ◆ 提供诊断辅助信息者（一类）：使用组织内对照及组织外对照
- ◆ 凡染色结果有疑问者，设立阳性对照重新染免疫组化



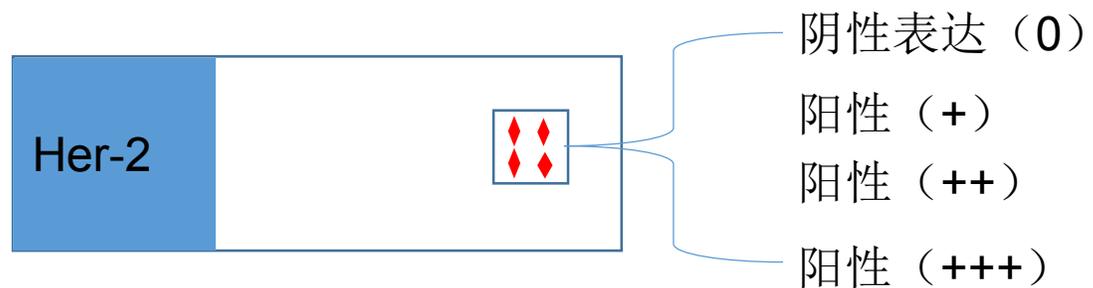
注：图一将阳性对照做成蜡块，现用现切；



图二阳性对照切好4° 冰箱进行保存。

免疫组化阳性对照的制备

- ◆ 选用兼顾原则，一种组织作为多种抗体的对照
- ◆ 验证阳性对照表达的均一性，稳定性的评估
- ◆ 阳性对照片在有效期内使用



3.6.3

常见抗体阳性对照

扁桃体： Bcl-2 Bcl-6 CD45 CD3 CD5 CD10 CD20 CD21 CD30 CD35 CD45R0 EMA Pax-5等。

脑组织： CD56 GFAP NF S-100

甲状腺： CK CK7 CK19 MOC-31 TTF-1 TG

胸腺瘤： CD1a CD99 CK EGFR P16 P53 TDT

子宫肌瘤： HHF-35 CD117 CK7 CK20 Des ER PR

阑尾： CK CK8/18 CK19 CK20 CK(L) CEA EMA SMA HMB45 VIM S-100 CD68 F8 Lys 等

结肠： CEA CD15 CD68 CD117 CD138 CD163 CDX-2 CgA CK CK20 Des E-Cad MUM-1等。

前列腺（增生）： AR CD57 CK CK(H) CK5/6 CK7 EMA P53 PSA PSAP

胎盘羊膜： CA125 CD31 CD34 F8 各对照血管均为阳性。

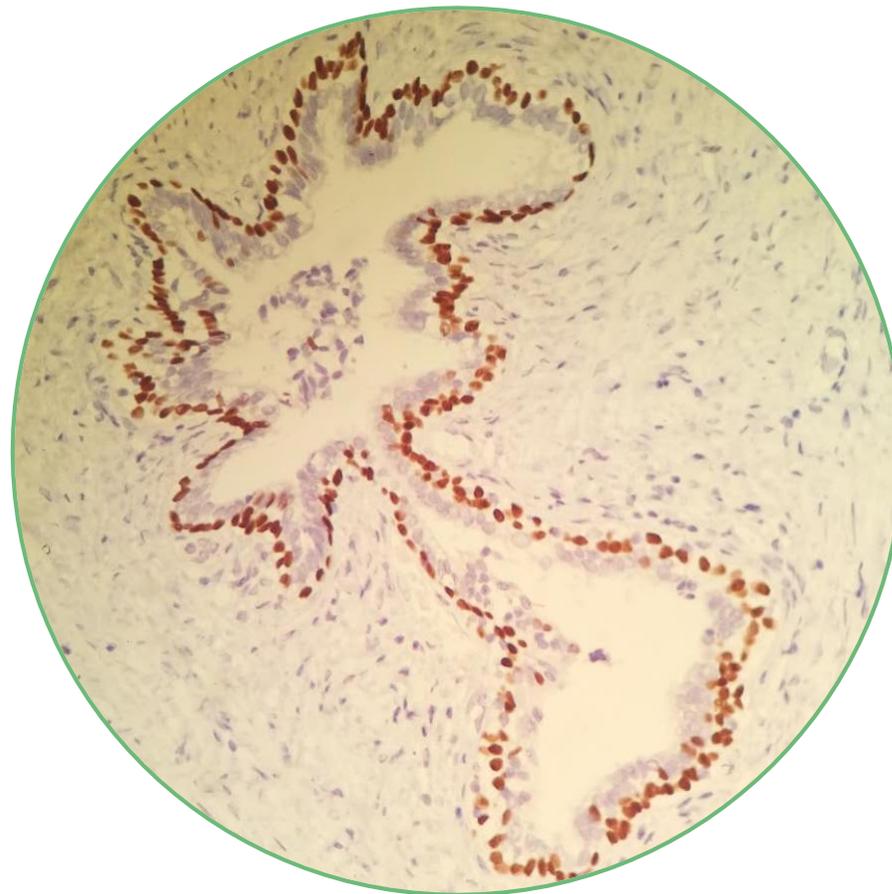
室间质控的目的：**发现和解决检测中的问题，提**

高实践水平

- ◆ 验证本实验室检测结果的准确性
- ◆ 验证本实验室检测方法
- ◆ 统一检测标准
- ◆ 缩小地区差异
- ◆ 促进同行交流

常见的抗体表达定位模式

- 细胞核
- 细胞膜
- 细胞质
- 细胞质/细胞膜
- 细胞质/细胞核
- 细胞外基质
- 其它...



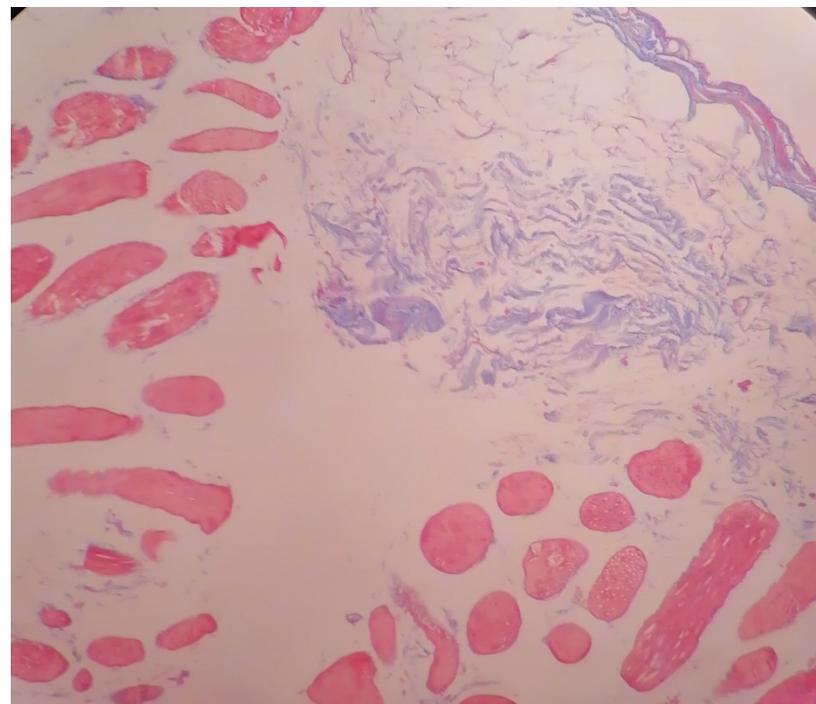
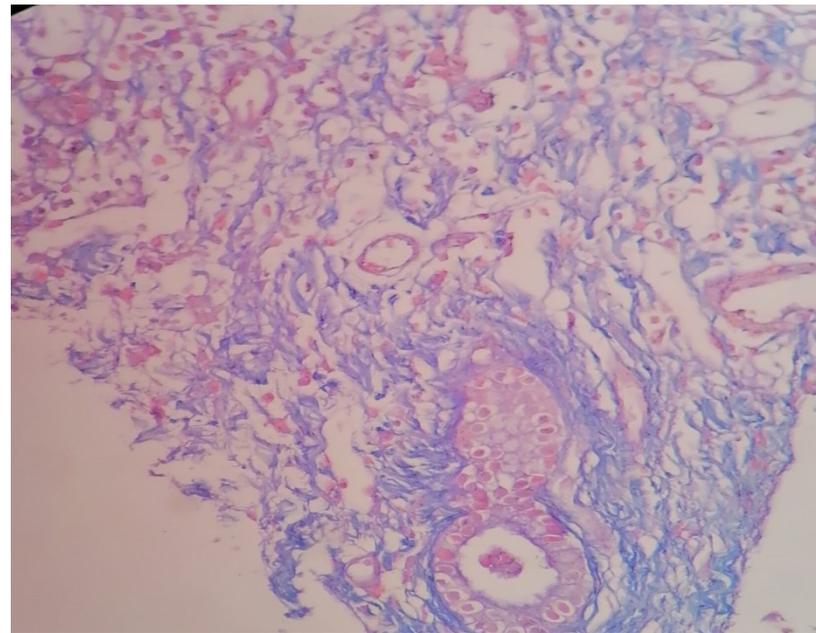
◆ 定性：鉴别诊断

阴性 (-) .阳性 (+)

◆ 半定量：预后指标.增值指数.靶向治疗.激素受体

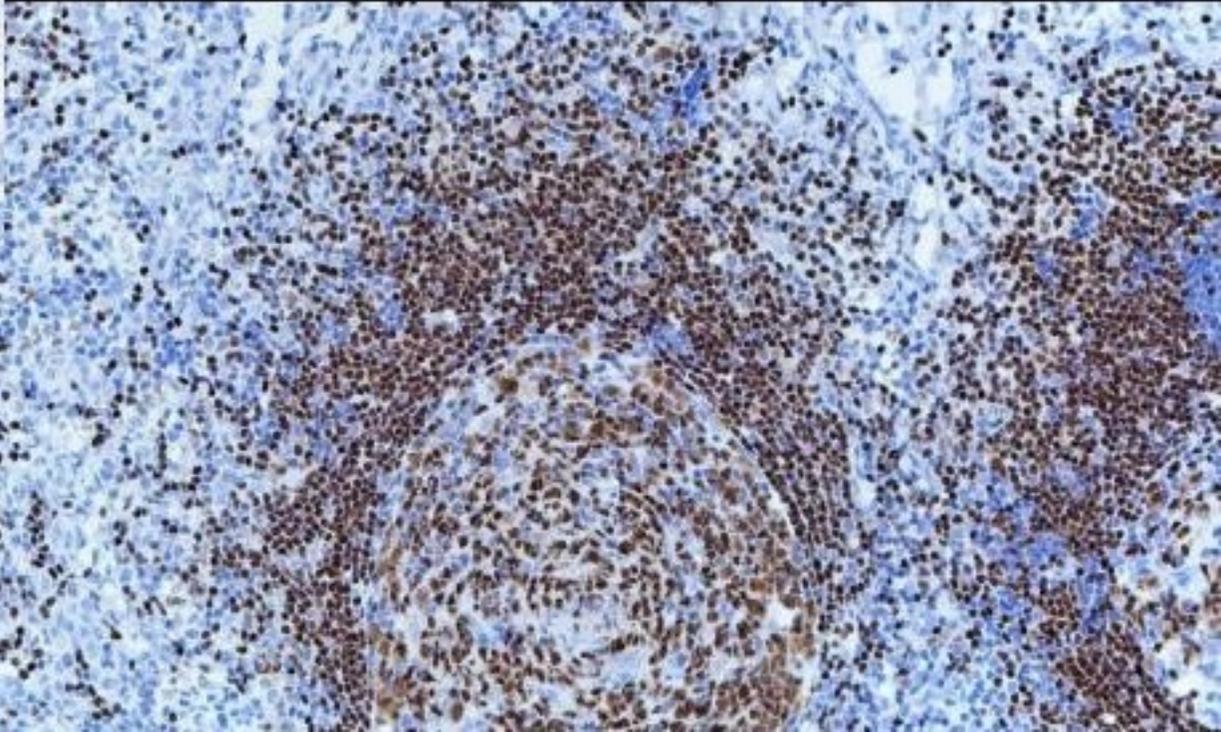
染色强度： 阴性 (-)
弱阳性 (1+)
中等阳性 (2+)
强阳性 (3+)

◆ 阳性细胞比例：阳性细胞占待评细胞群的百分比

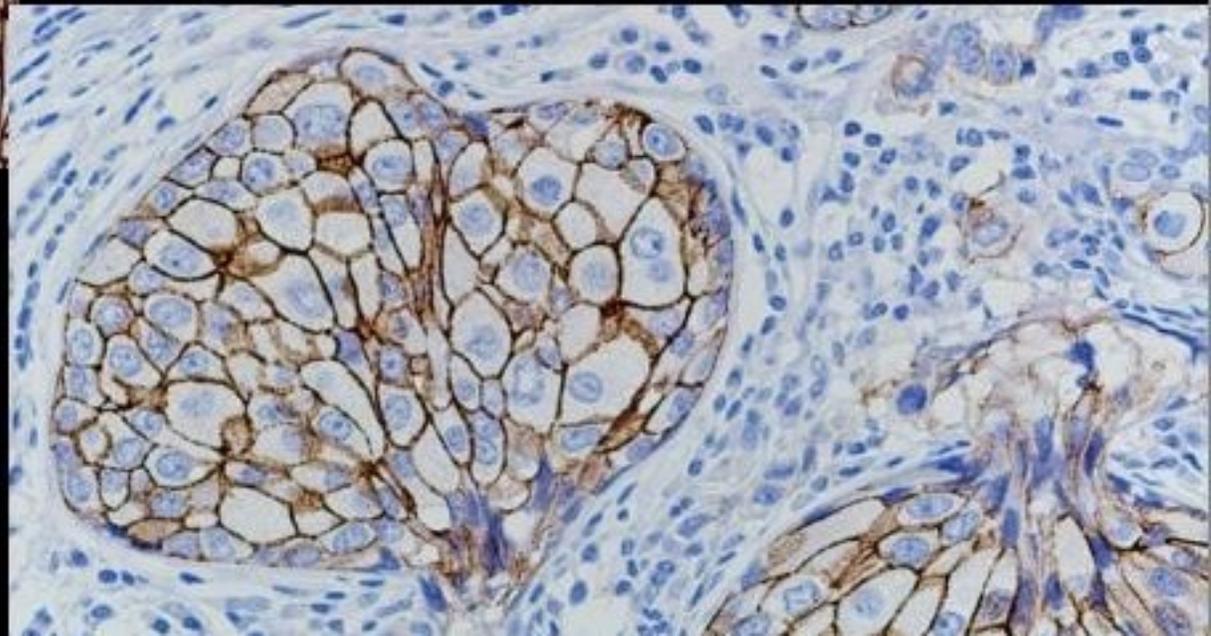
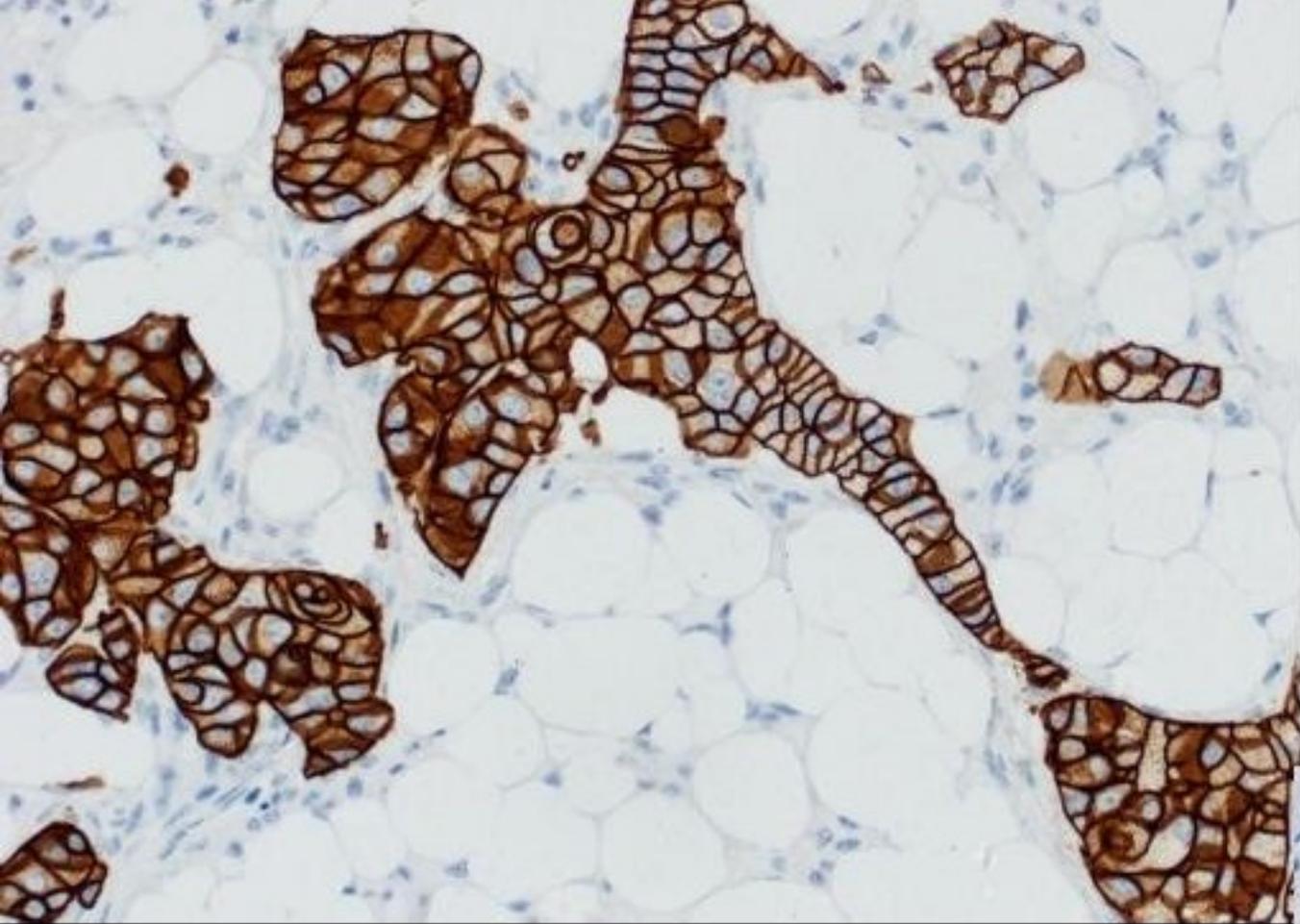


结果判读：陷阱与挑战

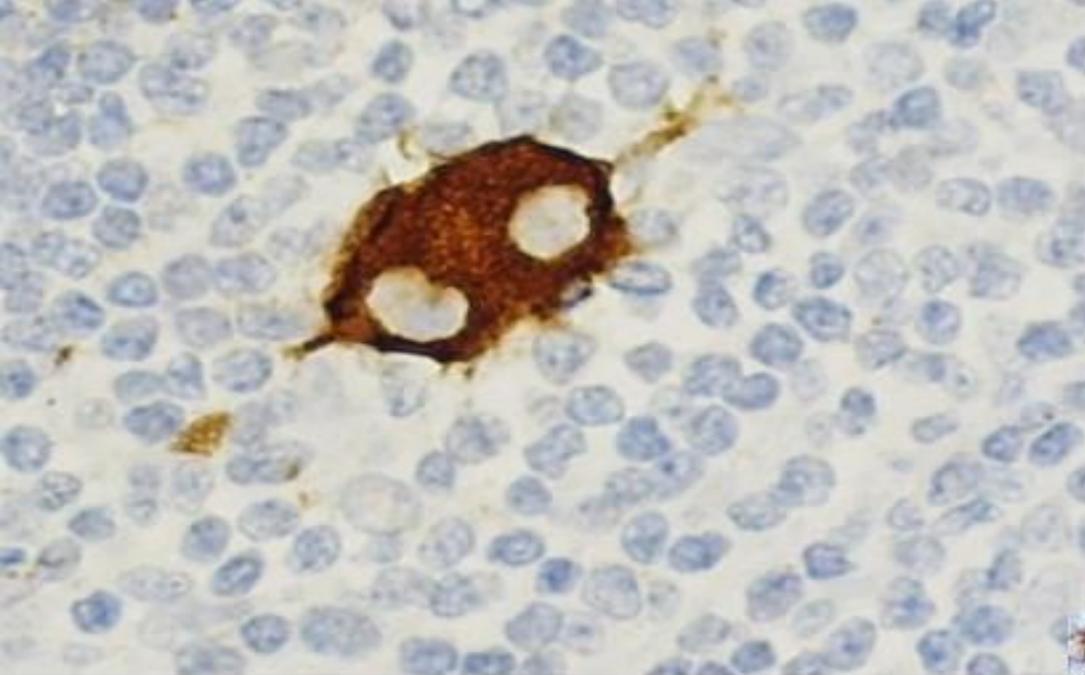
- ◆ 生理因素或者检测前（分析前）因素会影响抗原在细胞中的定位
- ◆ 抗体不同克隆号表达存在差异。
 Ki-67（clone: MIB-1）：膜表达
 脂肪细胞，细支气管肺泡壁
- ◆ 不同肿瘤类型抗体表达部位不同。
 P120. B-catenin 等。
- ◆ 某些抗原阴性表达具有临床意义。
 MMR. SDHB . INI-1等。



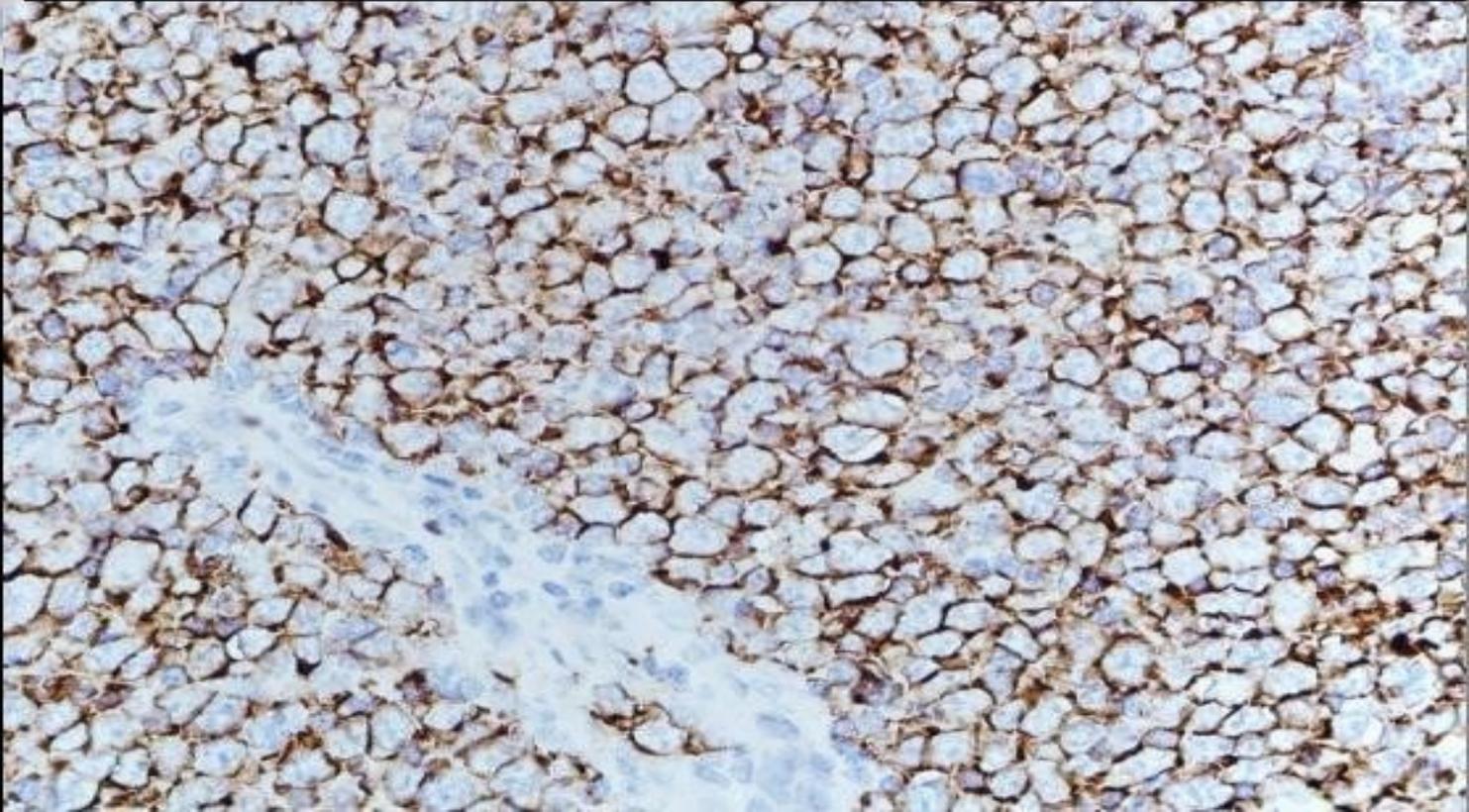
细胞核表达

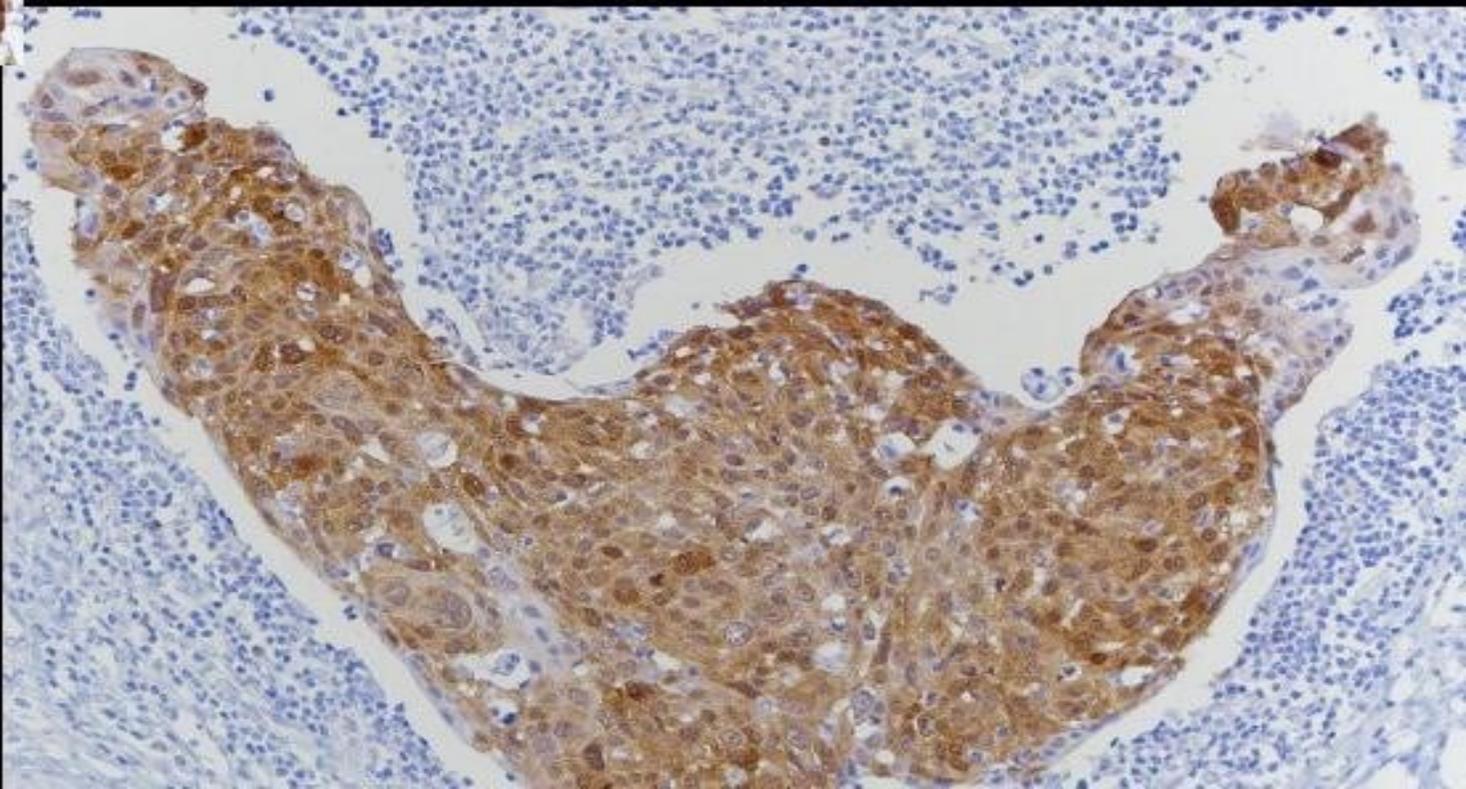
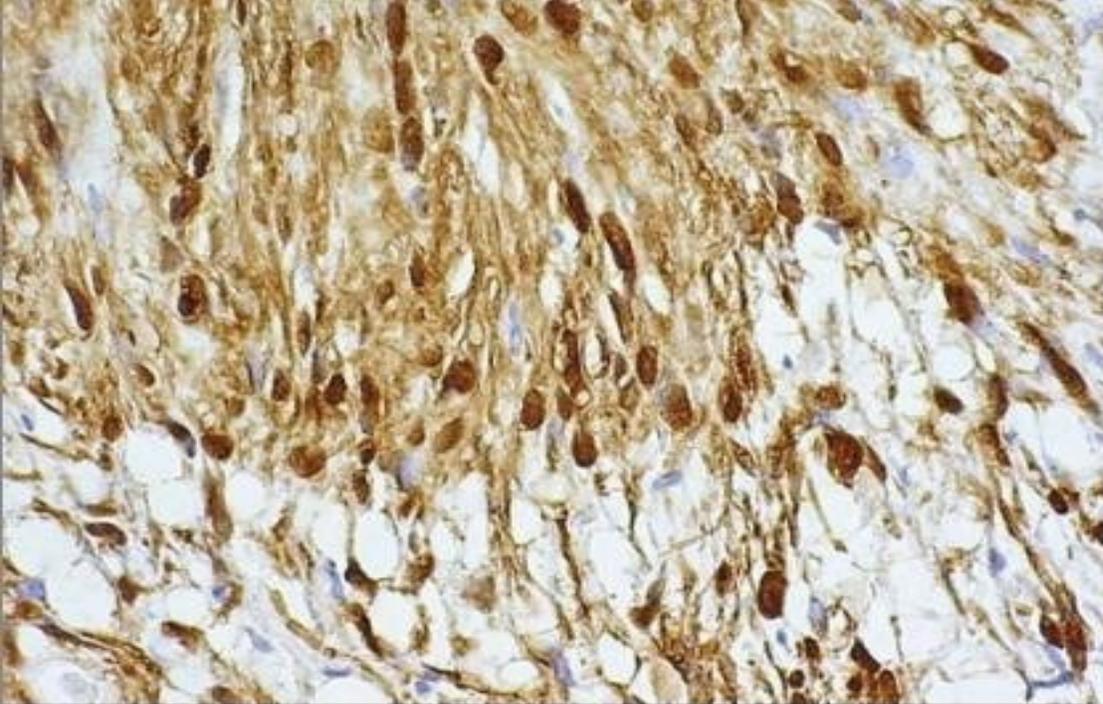


细胞膜表达

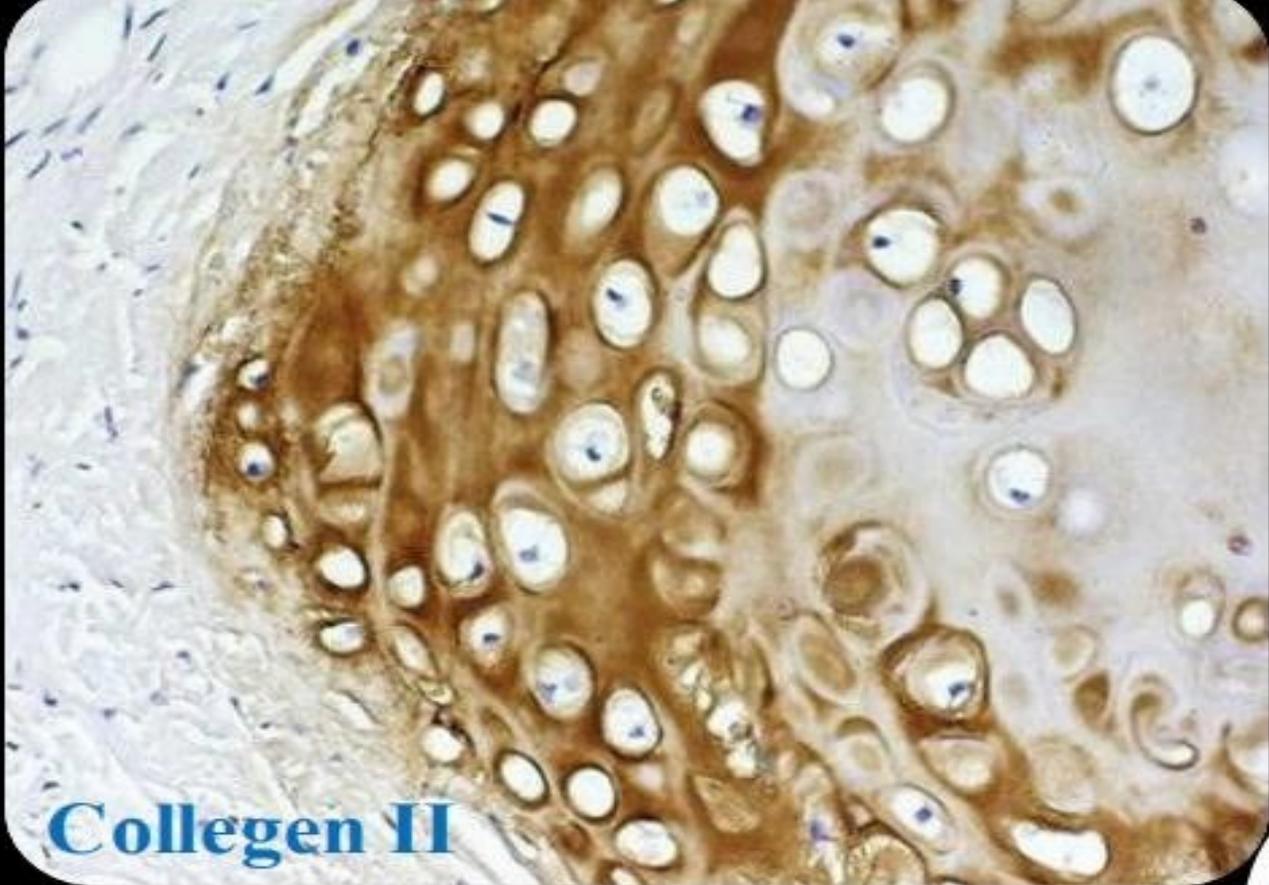


细胞膜/质表达



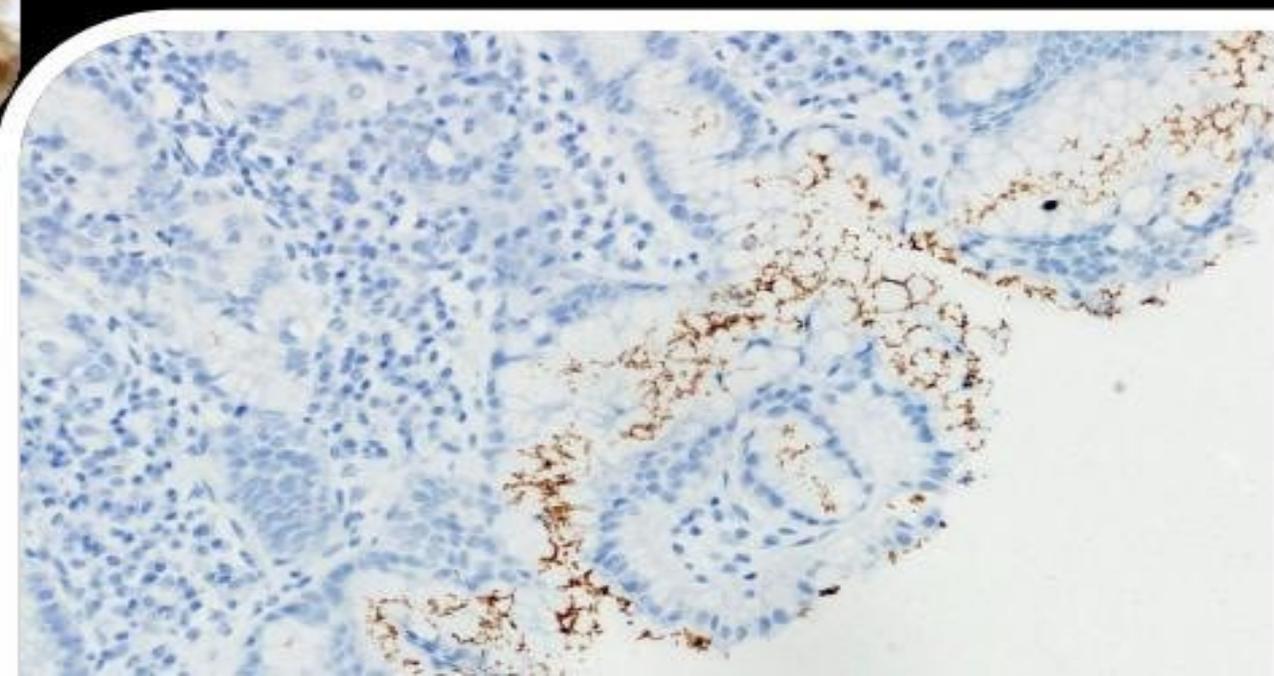


细胞核/质表达



Collegen II

细胞外基质表达



谢谢聆听

THANK YOU FOR YOUR ATTENTION

幻灯片由病理科技技术组副组长赵晓玮老师提供！

读懂每一张切片背后的故事

看清每一个细胞隐藏的真相

在微米的世界感受生命的力量！