

# ELISA 步骤、试剂及注意事项

## 操作步骤

方法一 用于检测未知抗原的双抗体夹心法:

1. 包被: 用 0.05M PH9.轴碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1 ~ 10 $\mu$ g / ml。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1ml, 4 $^{\circ}$ C过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 分钟。(简称洗涤, 下同)。
2. 加样: 加一定稀释的待检样品 0.1ml 于上述已包被之反应孔中, 置 37 $^{\circ}$ C孵育 1 小时。然后洗涤。(同时做空白孔, 阴性对照孔及阳性对照孔)。
3. 加酶标抗体: 于各反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度)0.1ml。37 $^{\circ}$ C孵育 0.5 ~ 1 小时, 洗涤。
4. 加底物液显色: 于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1ml, 37 $^{\circ}$ C10 ~ 30 分钟。
5. 终止反应: 于各反应孔中加入 2M 硫酸 0.05ml。
6. 结果判定: 可于白色背景上, 直接用肉眼观察结果: 反应孔内颜色越深, 阳性程度越强, 阴性反应为无色或极浅, 依据所呈颜色的深浅, 以 “+” 、 “-” 号表示。也可测 O·D 值: 在 ELISA 检测仪上, 于 450nm(若以 ABTS 显色, 则 410nm)处, 以空白对照孔调零后测各孔 O·D 值, 若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍, 即为阳性。

方法二 用于检测未知抗体的间接法:

用包被缓冲液将已知抗原稀释至 1 ~ 10 $\mu$ g / ml, 每孔加 0.1ml, 4 $^{\circ}$ C过夜。次日洗涤 3 次。加一定稀释的待检样品(未知抗体)0.1ml 于上述已包被之反应孔中,置 37 $^{\circ}$ C孵育 1 小时, 洗涤。(同时做空白、阴性及阳性孔对照)于反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标第二抗体(抗抗

体)0.1ml, 37°C孵育 30-60 分钟, 洗涤,最后一遍用 DDW 洗涤。其余步骤同“双抗体夹心法”的 4、5、6。

## 试剂器材

### 1. 试剂

(1) 包被缓冲液(PH9.6 0.05M 碳酸盐缓冲液):NaCO<sub>3</sub>?1.59 克 NaHCO<sub>3</sub> 2.93 克  
加蒸馏水至 1000ml

(2) 洗涤缓冲液(PH7.4 PBS): 0.15M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 克 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9 克  
NaCl 8.0 克 KCl 0.2 克 Tween-20 0.05% 0.5ml 加蒸馏水至 1000ml

(3) 稀释液:牛血清白蛋白(BSA) 0.1 克 加洗涤缓冲液至 100ml 或以羊血清、兔血清等 血清与洗涤液配成 5 ~ 10%使用。

(4) 终止液(2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) : 蒸馏水 178.3ml, 逐滴加入浓硫酸(98%)21.7ml。

(5) 底物缓冲液(PH5.0 磷酸枣柠檬酸):0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(28.4 克 / L) 25.7ml 0.1M  
柠檬酸(19.2 克 / L) 24.3ml 加蒸馏水 50ml。

(6) TMB(四甲基联苯胺)使用液:TMB(10mg / 5ml 无水乙醇) 0.5ml 底物缓冲液(PH5.5)  
10ml0.75%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 32μl

(7) ABTS 使用液:ABTS 0.5mg 底物缓冲液(PH5.5) 1ml 3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2μl

(8) 抗原、抗体和酶标记抗体。

(9) 正常人血清和阳性对照血清。

### 2. 器材:

(1) 聚苯乙烯塑料板(简称酶标板)40 孔或 96 孔, ELISA 检测仪, 50μl 及 100μl 加样器, 塑料滴头, 小毛巾, 洗涤瓶。

(2) 小烧杯、玻璃棒、试管、吸管和量筒等。

(3) 4℃冰箱，37℃孵育箱。

## 注意事项

1. 正式试验时，应分别以阳性对照与阴性对照控制试验条件，待检样品应作一式二份，以保证实验结果的准确性。有时本底较高，说明有非特异性反应，可采用羊血清、兔血清或 BSA 等封闭。

2. 在 ELISA 中，进行各项实验条件的选择是很重要的，其中包括：

(1) 固相载体的选择：许多物质可作为固相载体，如聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺和纤维素等。其形式可以是凹孔平板、试管、珠粒等。目前常用的是 40 孔聚苯乙烯凹孔板。不管何种载体，在使用前均可进行筛选：用等量抗原包被，在同一实验条件下进行反应，观察其显色反应是否均一性，据此判明其吸附性能是否良好。

(2) 包被抗体(或抗原)的选择：将抗体(或抗原)吸附在固相载体表面时，要求纯度要好，吸附时一般要求 PH 在 9.0~9.6 之间。吸附温度，时间及其蛋白量也有一定影响，一般多采用 4℃18~24 小时。蛋白质包被的最适浓度需进行滴定：即用不同的蛋白质浓度(0.1、1.0 和 10μg / ml 等)进行包被后，在其它试验条件相同时，观察阳性标本的 OD 值。选择 OD 值最大而蛋白量最少的浓度。对于多数蛋白质来说通常为 1~10μg / ml。

(3) 酶标记抗体工作浓度的选择：首先用直接 ELISA 法进行初步效价的滴定(见酶标记抗体部份)。然后再固定其它条件或采取“方阵法”(包被物、待检样品的参考品及酶标记抗体分别为不同的稀释度)在正式实验系统里准确地滴定其工作浓度。

(4) 酶的底物及供氢体的选择：对供氢体的选择要求是价廉、安全、有明显地显色反应，而本身无色。有些供氢体(如 OPD 等)有潜在的致癌作用，应注意防护。有条件者应使

用不致癌、灵敏度高的供氢体，如 TMB 和 ABTS 是目前较为满意的供氢体。底物作用一段时间后，应加入强酸或强碱以终止反应。通常底物作用时间，以 10-30 分钟为宜。底物使用液必须新鲜配制，尤其是  $H_2O_2$  在临用前加入。