

概述 .....	1
ELISA 的种类及原理 .....	1
直接 ELISA .....	2
间接 ELISA .....	3
夹心 ELISA .....	4
竞争抑制 ELISA .....	7
ELISA 实验的操作 .....	10
将抗原或抗体吸附到固相载体上 .....	10
封闭 .....	12
加入待检样品以及后续试剂 .....	12
温育 .....	12
洗涤去掉游离未结合的反应物 .....	13
加入酶检测底物 .....	13
结果的判读 .....	13
ELISA 实验常用试剂详解 .....	13
ELISA 常见问题及分析 .....	16

## 概述

1971 年瑞典的 Engvall 等人分别以纤维素和聚苯乙烯试管作为固相载体吸附抗原/抗体,建立了酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 简称 ELISA),后来人们改用板式反应孔进行 ELISA,大大地提高了实验通量。ELISA 实验具有极高的灵活性,实际操作中人们可以根据自己的需要以及手上已有的材料进行灵活的组合而进行各种可变的 ELISA 进行反应测定,另外 ELISA 实验中的相关试剂和耗材都已经商品化,所以 ELISA 被广泛地应用于生物学的各种研究中。通过 ScienceDirect 搜索可以看出,1975 年只有 1 篇文献是研究 ELISA 的,1976 年为 6 篇,但是到 2010 年这一数字上升到 1994 篇,历年文献累计达 29490 篇,足见其研究之广。

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性,酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性,又保留酶的活性。在测定时,受检标本(测定抗体或抗原)与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体,也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化成为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,间接地放大了免疫反应的结果,使测定方法达到很高的敏感度。

## ELISA 的种类及原理

关于 ELISA 的分类众说纷纭,不同文献从原理或操作上都有不同的分类意见。这里先将 ELISA 分为以下四大类,然后针对每一类进行详细讲解:(1)直接 ELISA;(2)间接 ELISA;(3)夹心 ELISA;(4)竞争抑制 ELISA。其它的 ELISA 都隶属于这四类 ELISA 或由这四类 ELISA 组合衍生。

## 直接 ELISA

直接 ELISA 是所有 ELISA 中步骤最简单的一种,其方法是将抗原按一定的比例用包被缓冲液稀释好包被到固相载体上,包被完成后简单洗涤,再加入封闭液,封闭结束后再次洗涤除去多余封闭液,加入稀释好的特异性的酶标抗体,37℃温育一小时或4℃温育过夜后,洗涤除去多余的抗体,加入底物显色并判读结果。最后显色的深浅与加入的酶标抗体量成正比。直接 ELISA 的原理如图 1:

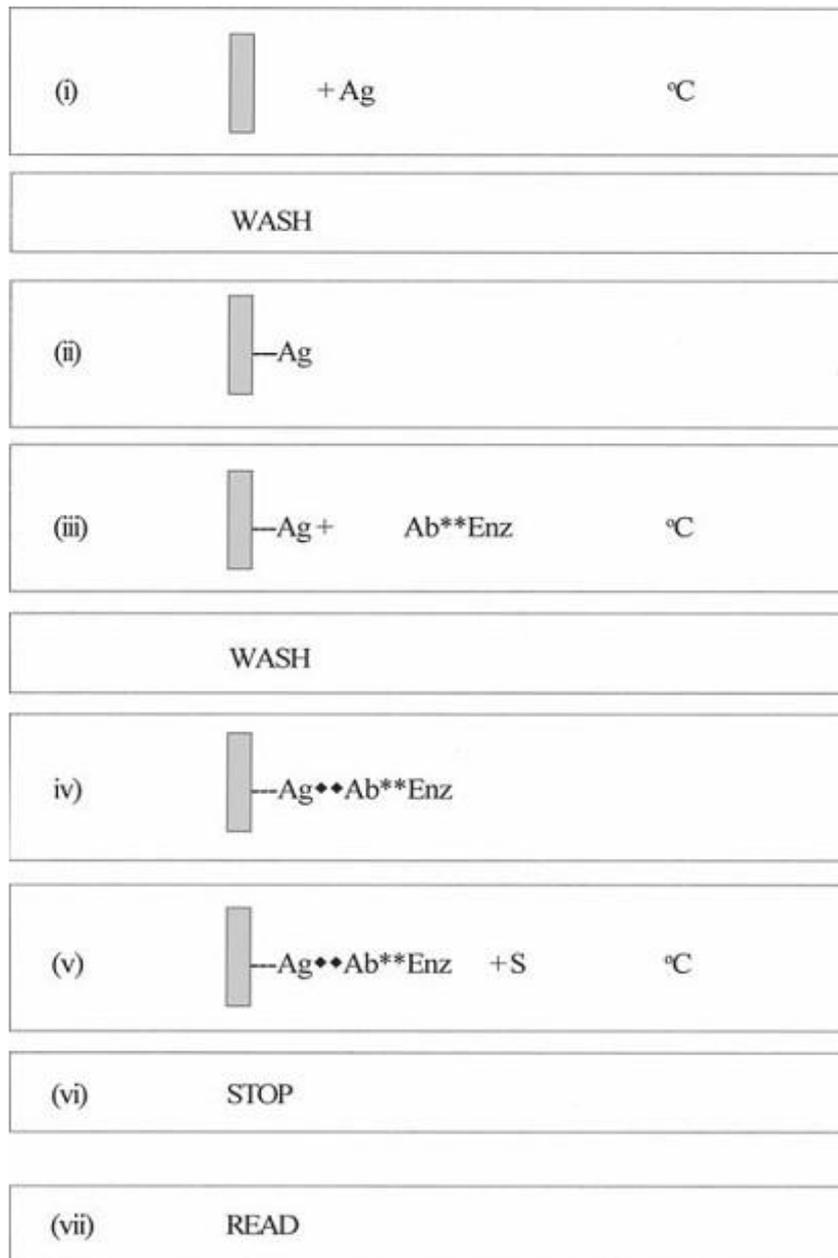


图 1 直接 ELISA 原理

一个很常见的直接 ELISA 实例就是检测单抗亚型，实际操作中可以将经过亲和纯化的单抗包被在酶标板上，封闭后加入酶标分型二抗，最后加底物显色即可。此外用直接 ELISA 可以检测血清种属，也有人用直接 ELISA 进行单克隆抗体制备中的初步筛选。不过虽然直接 ELISA 操作很简单，步骤也比较简练，但是其应用范围还是非常有限的，一个重要的原因是这种 ELISA 中只经过了一步信号放大（酶的放大），所以其灵敏度不是很高，另外其测定的对象也非常有限，只能测定酶标记的分子。

## 间接 ELISA

间接 ELISA 的步骤与直接 ELISA 步骤前面的部分基本一致，不同的是，间接 ELISA 中与包被好的抗原结合的不是酶标抗体，而是非酶标的，另外再引入第二种抗体（即二抗），二抗是经过酶标的，它可以与第一种抗体（与抗原直接结合的抗体，即一抗）特异性结合。最后加入底物显色并判读结果。当二抗的浓度一定的时候，最终的显色结果与一抗的量是正相关的。间接 ELISA 的操作如图 2，同直接 ELISA 将抗原包被到酶标板上，洗涤后封闭，再次洗涤后加入稀释好的待检抗体（一抗），温育后洗掉未与抗原结合的一抗，再加入酶标二抗，再次温育，此时酶标二抗即可与一抗结合，最后加入底物显色。

由于二抗一般为多抗，因此一个一抗分子上可以结合多个二抗分子，同时一个二抗分子上可以标记上多个酶分子，所以当待测抗体为多抗时（可以由多个一抗分子与抗原结合），信号经过两步放大，最终提高了检测的灵敏度。另外由于二抗制备比较容易，而且很早就开始商品化，所以操作者无需要将一抗进行酶标，大大缩减了工作量。在检测抗体的效价、血清的效价以及单克隆抗体的筛选过程中，间接 ELISA 都是非常重要的实验过程，在临床诊断中，间接 ELISA 也是检测标志性抗体的重要手段。

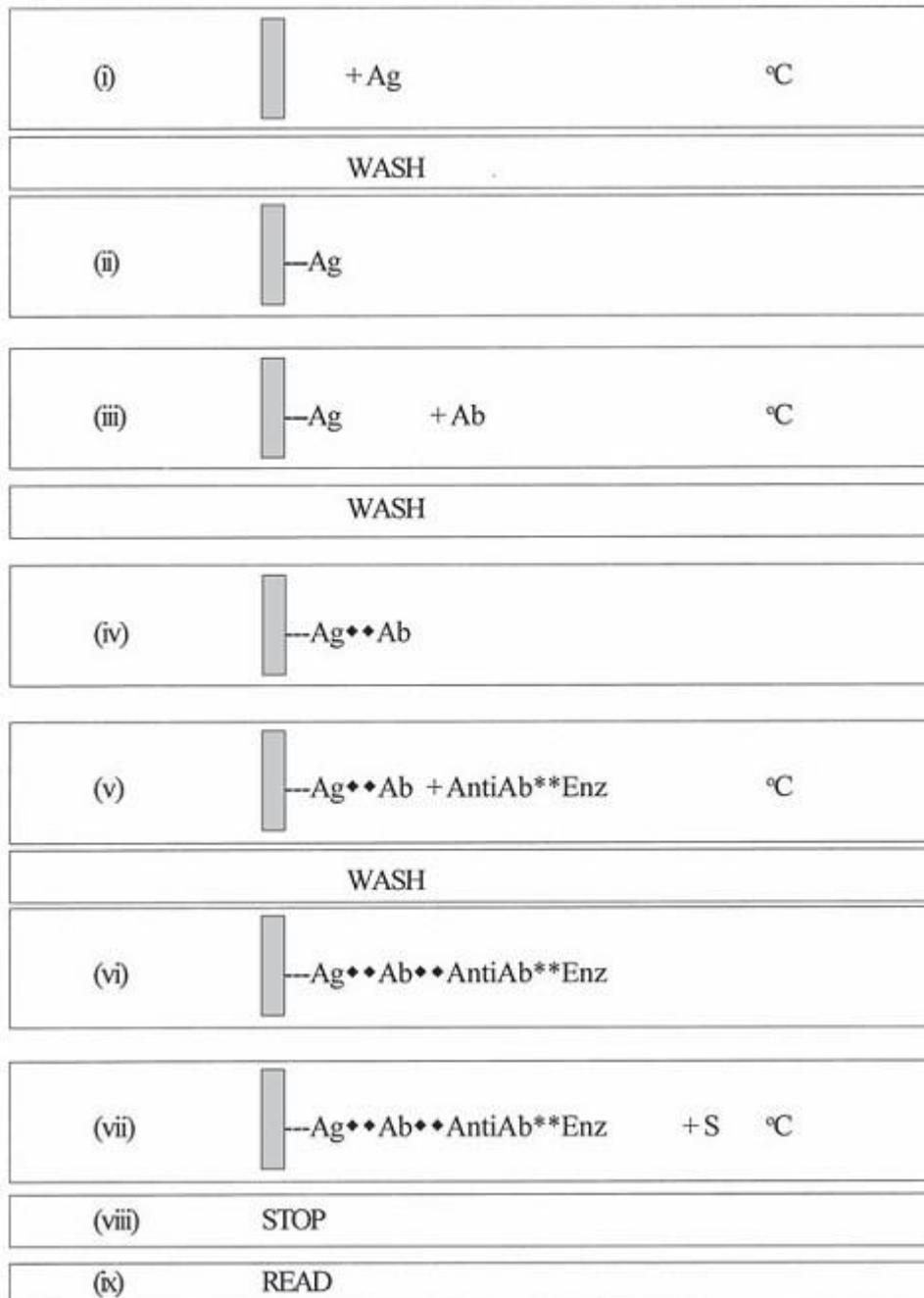


图 2 间接 ELISA 原理

## 夹心 ELISA

夹心 ELISA (Sandwich ELISA) 总体上可以分为两种：直接夹心 ELISA 和间接夹心 ELISA。

**直接夹心 ELISA** 直接夹心 ELISA 又分为双抗夹心 ELISA 和双抗原夹

心 ELISA。双抗夹心 ELISA 的方法是：将第一种抗体（捕获抗体）包被在固相载体上，封闭后加入待检抗原，温育后加入第二种抗体（检测抗体），捕获抗体和检测抗体可以是针对不同表位的两种单抗，也可以是针对同一抗原的一种单抗与一种多抗，但是检测抗体需要经过酶标。双抗原夹心 ELISA 的原理和操作与双抗夹心基本相同，不同的是包被的是抗原，待检对象是抗体，然后加入酶标抗原，再加底物显色。直接夹心 ELISA 的原理如图 3。

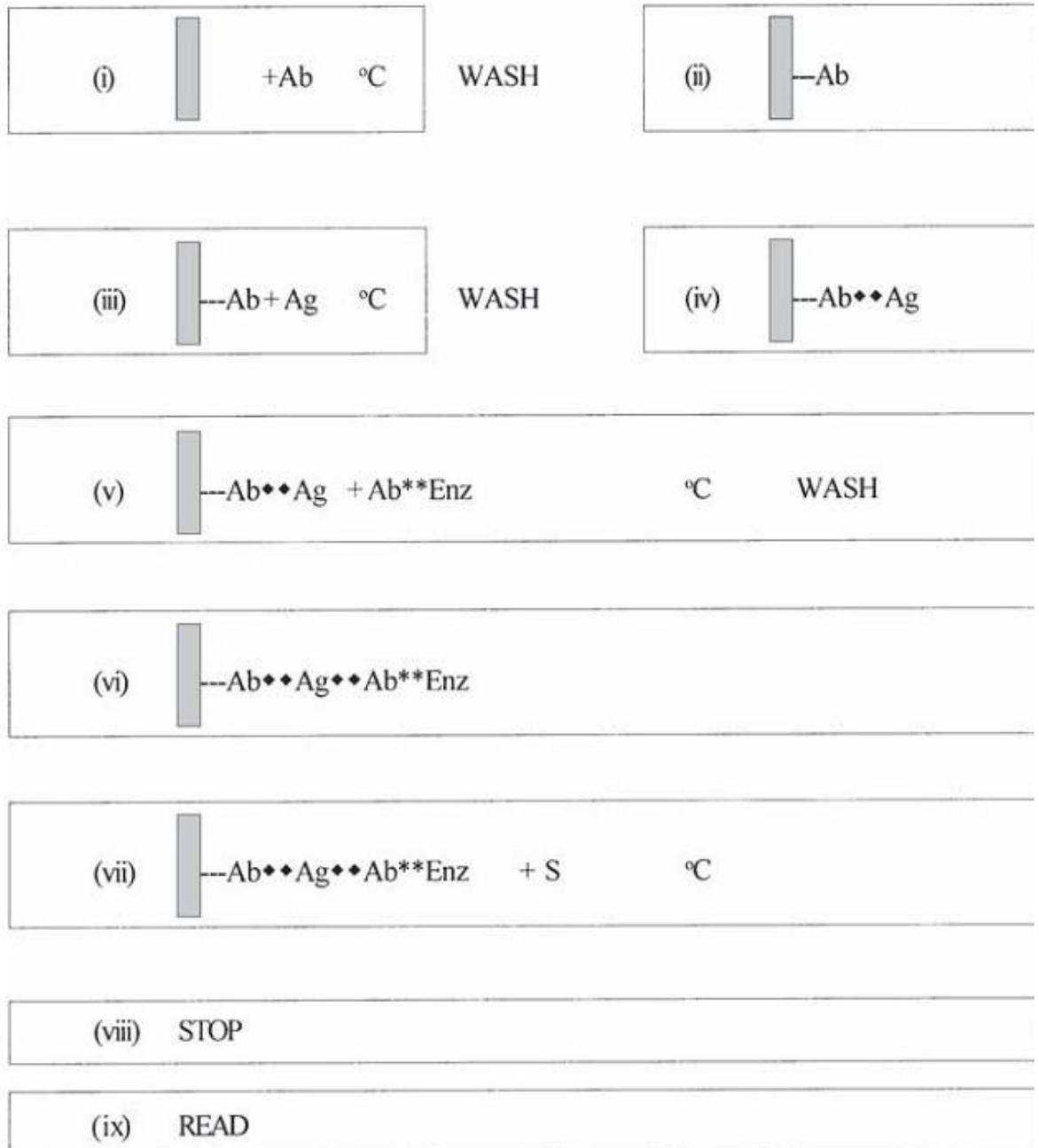


图 3 直接夹心 ELISA 原理

对于双抗夹心 ELISA，待检对象必须包括两个或者两个以上的表位，否则检测抗体无法与待检抗原结合，例如半抗原和小分子抗原都是不能用双抗夹心 ELISA 检测的。对于双抗原夹心 ELISA，其操作与间接 ELISA 基本相同，但利用特异性的抗原代替酶标二抗，所以特异性比间接法更好。另外，由于间接 ELISA 中使用的二抗一般只能识别 IgG，而双抗原夹心 ELISA 中任何类似的免疫球蛋白都可以被检测出，因此双抗原夹心 ELISA 比间接 ELISA 也更灵敏。

**间接夹心 ELISA** 间接夹心 ELISA 是基于两种不同种属来源的抗体的夹心 ELISA，其原理是将一种种属来源的特异性抗体包被于固相载体上（作为捕获抗体），封闭，加入待检抗原，温育，洗涤后加入另一种种属来源的特异性抗体（非酶标，作为检测抗体），最后加入酶标二抗（特异性识别检测抗体），再加底物显色。间接夹心 ELISA 的原理如图 4。与直接双抗夹心 ELISA 相比，间接夹心 ELISA 中引入了特异性识别检测抗体的酶标二抗，相当于整个体系的信号增加了一步放大系统，于是最终的结果比直接双抗夹心 ELISA 更灵敏。同时，由于间接夹心 ELISA 中的酶标二抗仅能识别检测抗体，而不能识别捕获抗体，所以体系的特异性也得到了保障。值得提出的是，间接夹心 ELISA 并不是严格要求捕获抗体与检测抗体来源于同一物种，也可以是这种情形：仅用特异性的抗体的 Fab 片段包被固相载体作为捕获抗体，而用未经处理的同种属来源的特异性抗体作为检测抗体，酶标二抗选用只针对检测抗体的 Fc 段的二抗，这样的酶标二抗同样不能识别捕获抗体，从而使这种体系里的捕获抗体与检测抗体起到类似于不同种属来源的效果。间接夹心 ELISA 涉及的体系比较复杂，用到的试剂也比其它的 ELISA 复杂，但是其检测灵敏度上的优越性使它在检测那些低丰度抗原的样品中应用得十分广泛。

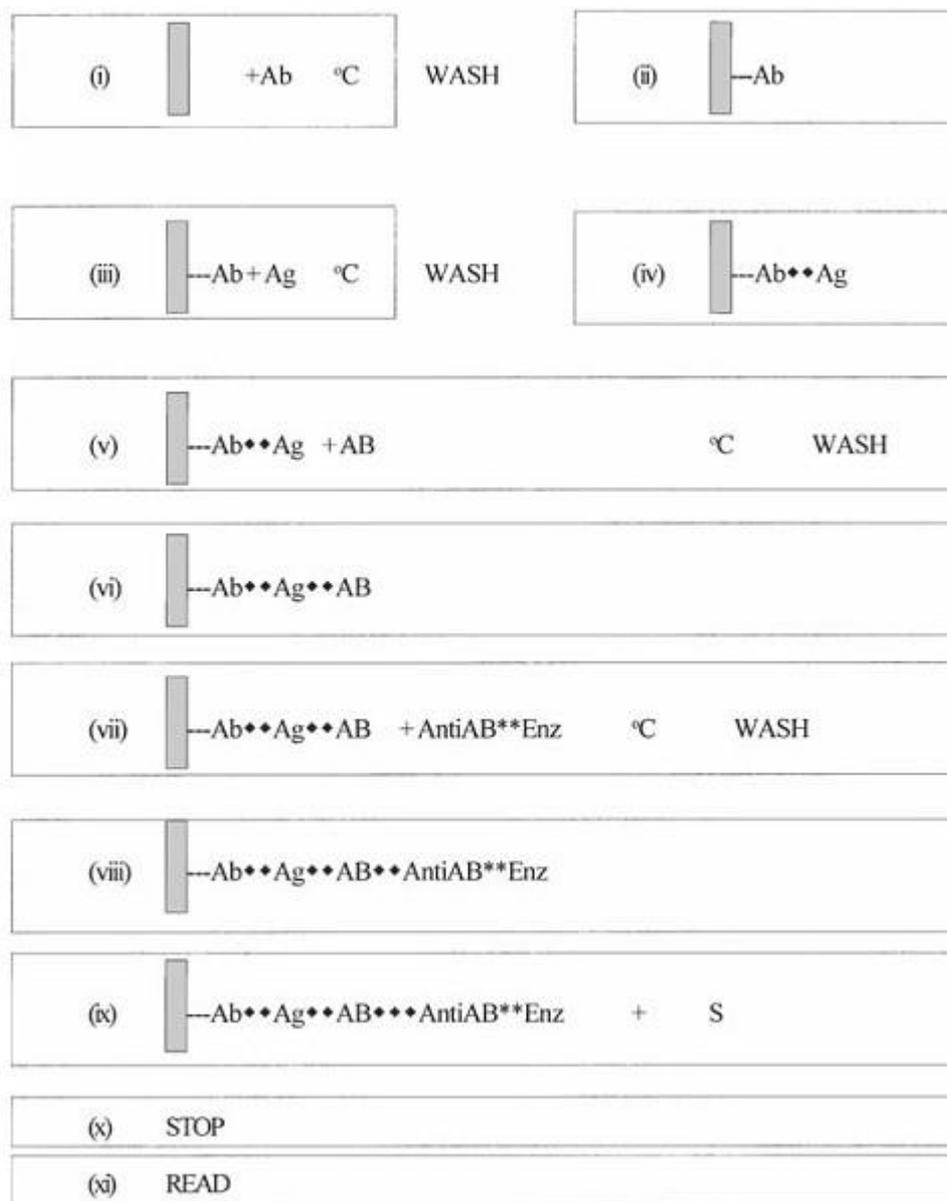


图 4 间接夹心 ELISA

## 竞争抑制 ELISA

竞争抑制 ELISA 又叫封闭 ELISA，其主要原理是用待检抗原或抗体去干扰已经预先设计好的体系，最终显色的结果与待检抗原或抗体的干扰程度成负相关。竞争抑制 ELISA 灵活性很强，可以在此基础上设计出更复杂的实验方案，从而派生出所谓的直接竞争抑制 ELISA、间接竞争抑制 ELISA、夹心竞争 ELISA 等特殊的 ELISA 方法。这里仅以直接竞争抑制 ELISA 和间接竞争

抑制 ELISA 为例简单阐述原理。

**直接竞争抑制 ELISA** 直接竞争抑制 ELISA 中, 预先将抗原包被在固相载体上, 并加入酶标的特异性抗体。实验时, 加入待检抗原 (或抗体), 如果待检对象是抗原, 则待检抗原就与预先包被在固相载体上的抗原竞争结构酶标抗体; 如果待检测对象是抗体, 则待检抗体就与系统中原有的酶标抗体竞争结合包被在固相载体上的抗原。洗涤过程就可以洗掉被竞争下的酶标抗体, 最后加底物显色。最终显色的结果与待检原 (或抗体) 量成反比。直接竞争抑制 ELISA 的原理如图 5。注意在直接竞争抑制 ELISA 中, 同一预制备的体系既可以测定抗原, 也可以测定抗体。

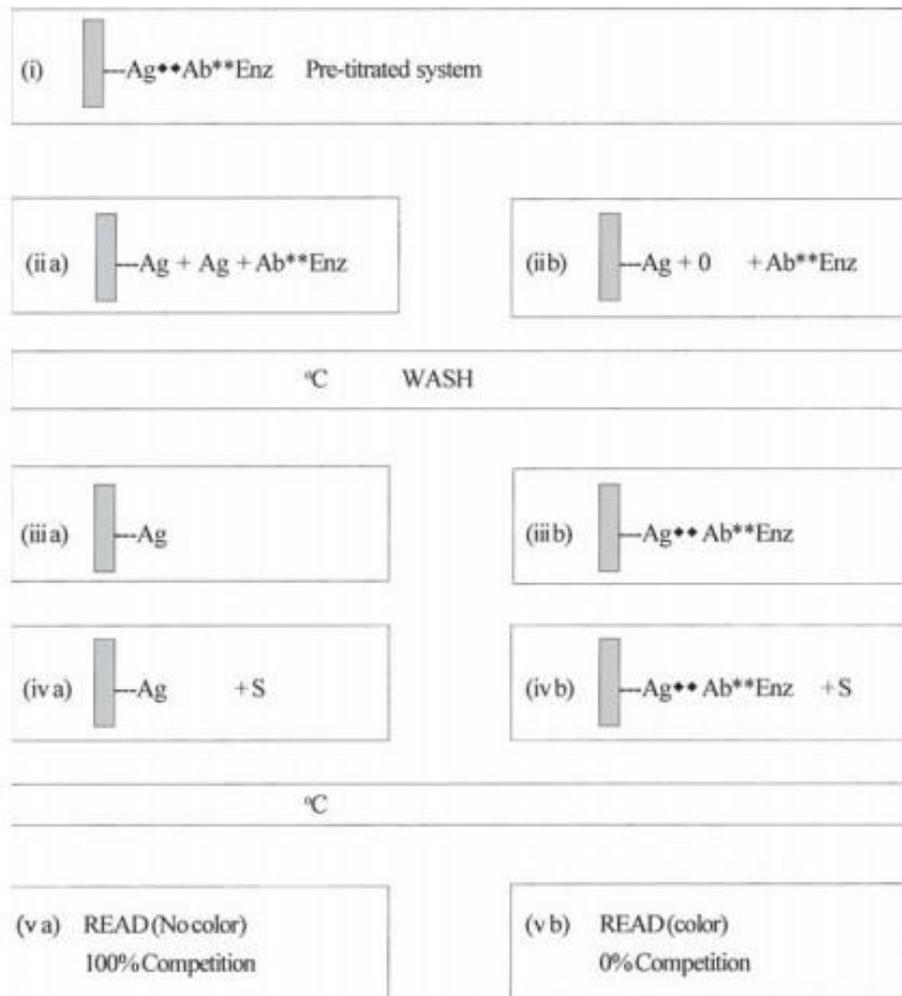


图 5 直接竞争抑制 ELISA 原理

如同间接 ELISA 一样, 直接竞争抑制 ELISA 也有两步信号放大的过程, 因此其灵敏度也比较高, 但是预先包被好固相载体并加入酶标抗体后, 实验时

只需要将待检抗原或抗体稀释后加到体系中进行反应即可,大大简化了 ELISA 的操作过程。

**间接竞争抑制 ELISA** 间接竞争抑制 ELISA 可以看作是用待检抗原或待检抗体干扰一个预先制备的间接 ELISA 系统。其具体原理是：将抗原包被于固相载体上,依次加入特异性的抗体以及此抗体对应的酶标二抗作为预制备的体系。实验时,加入稀释好的待检抗原(或抗体),待检标本中的抗原(或抗体)就和预制备体系中固相载体上结合的抗原(或抗体)竞争结合特异性的抗体(或固相载体上结合的抗原)。间接竞争抑制 ELISA 的原理如图 6。

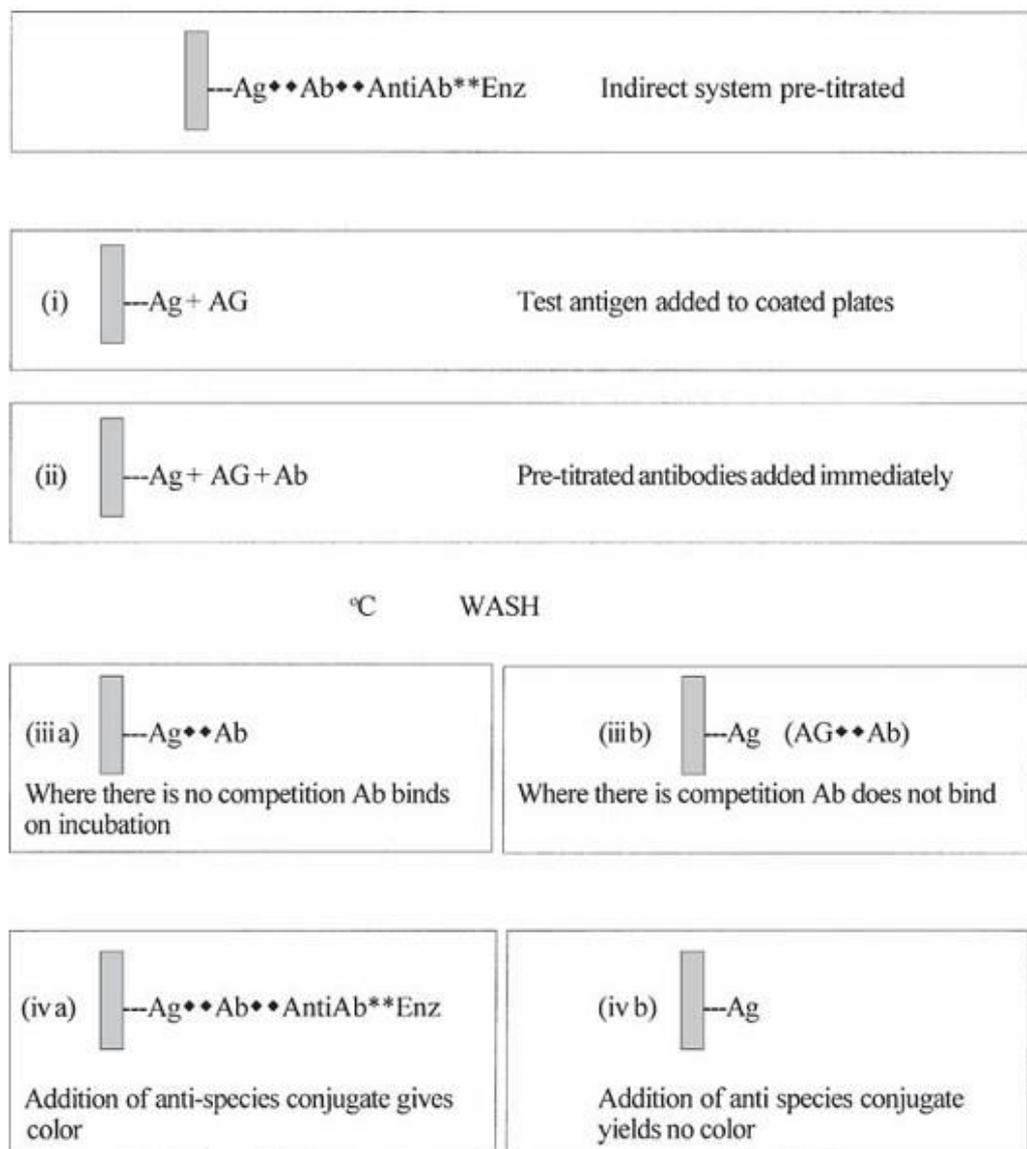


图 6 间接竞争抑制 ELISA 原理

同间接 ELISA 一样,间接竞争抑制 ELISA 也有三步信号放大的过程,所

以其灵敏度也比直接竞争抑制 ELISA 高。

从上述原理可以看出，竞争抑制 ELISA 对试剂的要求非常少，不管是单抗还是多抗都可以用于实验，更重要的是不管被检对象是大分子物质还是多肽、小分子药物、小分子激素等只有一个表位的分子不能使用夹心 ELISA 的都可以使用竞争抑制 ELISA 检测。另外，像乙肝标志物检测中，e 抗原很不稳定，容易降解变为核心抗原，因此在检测 e 抗体时不能用夹心 ELISA 检测而只能选用竞争抑制 ELISA。

除以上介绍的几种基本的 ELISA 外，人们还可以根据自己的实际需要灵活设计其它类型的 ELISA，例如可以引入生物素-亲和素提高系统的放大倍数，再如引入非酶标二抗或者 Protein A、Protein G 等增加固相载体的载量或者增加系统的特异性等。

## ELISA 实验的操作

不管是哪一种 ELISA，它的操作都由以下几种基本的操作组合而成：（1）将抗原或抗体吸附到固相载体上；（2）封闭；（3）加入待检样品以及后续试剂；（4）温育；（5）洗涤去掉游离未结合的反应物；（6）加入酶检测底物；（7）结果的判读。这里针对每一个单独步骤进行讲解，请读者根据实验原理部分的讲解体会操作过程。

### 将抗原或抗体吸附到固相载体上

这一步又叫包被，是 ELISA 操作中非常关键的一步，包被的好坏直接影响到 ELISA 的灵敏度和特异性。包被过程至少应该考虑以下影响因素：

**固相载体的选择** 固相载体有多种多样的形式，它可以是微孔板、小试管、微珠或者膜，其中 96 孔板是应用最广泛的形式。固相载体的材料也有很多种，常见的材料有聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、纤维素等，它们都能非特异性吸附蛋白质，这种吸附是基于抗原疏水特性而发生的物理性吸附，并未发生化学变化，所以抗原被吸附到固相载体上后仍然保持其免疫学活性。聚苯乙烯因其价格低廉、对蛋白的吸附能力强，所以应用最广泛。需要注意的是，所有酶标板因厂商生产工艺的差别，不同厂商或同一厂商不同批次之间的酶标

板对蛋白吸附能力都不同,所以每次更换新的酶标板前都应该设计预实验确定酶标板的均一性是否良好。

**包被的温度与时间** 前面讲过,包被是根据抗原或抗体与固相载体间的疏水作用而发生吸附的,一般来讲,温度越高,蛋白质的疏水作用就越明显,因此对于蛋白质抗原或抗体来说适当提高温度有利于包被的进行,但是温度过高会影响抗原或抗体的结构。一般包被都在 37℃ 进行 1-3 小时,如果包被的温度较低,则需要延长包被时间,例如 4℃ 包被一般都需要过夜。包被的时间不能太短,否则包被不能充分进行。

**包被缓冲液** 包被缓冲液一个主要作用就是提高抗原或抗体的疏水性但不至于破坏其免疫活性。理论上讲,对于蛋白质类抗原或抗体的最佳包被 pH 应该比其 PI 高 1-2 个单位,这是因为在 PI 以及更低的 pH 条件下,蛋白质总是倾向于将亲水基团暴露在外而将疏水基团包裹在内部,而偏碱性的条件有利于其疏水基团的暴露,从而增强其与固相载体的结合。然而实际操作中,每种蛋白质的 PI 都是很难确定的,所以包被缓冲液首选公认比较好用的缓冲液,如 50mM pH 9.6 的碳酸盐缓冲液。另外也可以尝试 20mM Tris-HCl, pH 8.5,还可以尝试 10mM PBS, pH 7.2。有时候提高缓冲液的离子浓度也可以提高抗原或抗体的疏水性,此时可以尝试向缓冲液中加入 0.6M 左右的 NaCl。有些小分子物质比较难以包被,可以采取特殊的方法包被,例如对于脂类分子的包被,可先将其溶解于酒精中,然后加至酶标板孔,最后自然条件下放置使酒精挥发充分从而最终只留下脂类分子。对于某些小分子多肽也可以采用类似的方法,如采用低浓度的 Tris-HCl 将多肽稀释好,加到酶标板孔内,自然放置晾干也可以达到比较好的包被效果。

**最佳包被量** 最佳包被量是需要通过实验来确定的,最常用的办法是棋盘滴定法,即做多个平行实验,采用不同浓度的抗原或抗体包被,另外再对系统里其它的试剂也做不等浓度的平行实验,最终根据反应的灵敏度和信噪比确定最佳包被量。对于初学 ELISA 的实验者或者不是很严格的实验来说,一般按 1-10ug/ml,每孔 50-100ul 左右的蛋白类抗原或抗体包被比较合理,然后再在此基础上进行向上或向下调节。

## 封闭

抗原或抗体包被完成后，固相载体表面依然存在未被占用的位点，这些位点还可以继续结合抗原或抗体，为了排除这些位点对 ELISA 后继步骤的干扰，就需要引入一些无关的物质将这些位点占用，这个过程就是封闭。最常用的办法就是使用惰性蛋白封闭，常见的惰性蛋白可以是 0.05-0.5% BSA、1% 明胶、5% 脱脂奶粉、10% 小牛血清，1-3% Casein，也可以采用去垢剂进行封闭，如 Triton X-100，Tween-20 等。其中 5% 脱脂奶粉价格最便宜，在一般实验室常规实验中应用较多，但是由于奶粉的成份复杂，批次间差异非常大，所以一般很少应用于试剂盒中。试剂盒中应用较多的是成份相对简单的 BSA 和明胶，需要注意的是有些厂商生产的 BSA 里含有较高浓度的牛抗体，在实验中有可能与二抗进行结合从而造成假阳性的情况。

## 加入待检样品以及后续试剂

加样过程最关键的要点就是移液器的正确使用。在 ELISA 操作中几乎每一步都需要用移液器，移液器应不定期校正、吸取液体后是否会因为漏气而液体自动滴出、移液器内是否有脏物堵塞等。取液时，先将移液器调至正确量程，再将移液器按至第一停点，将 Tip 头浸入液面以下 1cm 左右轻轻吸取液体，打出液体时先打至第一停点，稍等片刻后再打至第二停点以全部排出液体，加样至酶标板孔时应倾斜 45 度左右加样，Tip 头不可以伸入酶标板孔与孔壁或底部接触。同一 Tip 头不可取用两种不同的试剂。

## 温育

抗原-抗体的反应一般都在 37℃ 进行，大多实验都在 1 小时左右为宜，也有采用 4℃ 反应过夜。37℃ 一般采用恒温摇床进行，摇床内酶标板尽量不堆叠以保证同一块板各孔受热均匀。

## 洗涤去掉游离未结合的反应物

洗涤过程比较简单，直接用洗涤液洗涤掉孔内未结合的反应物，可以手工洗板，也可以用洗板机进行。常见的洗涤液是 PBS 或 PBST（即添加 0.2% 的 Tween-20 的 PBS），一般的洗涤程序都是每次 5min，洗涤三次，也可以根据实际需要增加洗涤次数和延长洗涤时间。每次洗涤完后，用力甩掉板孔内液体，再在毛巾上用力拍干。

## 加入酶检测底物

ELISA 的底物一般都先配成母液，用前临时配成工作液使用，配制工作液时注意防止污染，如金属离子的污染、酶标抗原或抗体的污染等。加底物时注意不要溅出至临近的孔内。

## 结果的判读

ELISA 的结果可以根据需要采用肉眼判读或用酶标仪判读。肉眼判读只适用于定性 ELISA，如果需要定量则必须使用酶标仪，并且一般都需要用终止液终止反应才能判读。使用酶标仪时也应该注意结合肉眼观察的结果大致判断仪器读出的结果是否异常。读完结果后，需要定性的根据判定依据给出“阳性”或“阴性”结论，需要定量的，先作出标准曲线，再通过标准曲线确定检测的样品中抗原或抗体浓度。

## ELISA 实验常用试剂详解

### 抗原和抗体

ELISA 中用到的抗原可以是纯化的天然抗原、重组抗原、人工合成多肽、小分子化合物等，天然的抗原具有天然的构象，保持了天然的免疫原特性，但是一般来说纯化难度都很大，而且天然的抗原丰度都较低，获取难度非常大，重组抗原相对制备比较容易，但是实验中难以避免引入工程菌菌体自身的蛋白，如果纯化不好容易对实验造成干扰。人工合成多肽特异性较好，但是所含

的表位很少, 仅能检测与其相对应的抗体的系统。另外由于多肽分子量小, 而且疏水性不是很强, 所以包被难度较大, 如果常规方法不能很好地包被则需要考虑与载体蛋白相偶联然后再包被。

ELISA 中用到的抗体应该具有较强的亲和力和较高的特异性, 而且一般来讲纯度越高越好, 推荐使用抗原亲和纯化(多抗)或使用 Protein A, G 纯化(单抗), 减少目标抗体对实验的干扰。也有少数情况下直接用小鼠腹水包被的。

### 包被

关于包被液的讲解请参考“将抗原或抗体吸附到固相载体上”一部份, 这里只简要给出几种包被液的配方。

#### (1) 50mM pH 9.6 的碳酸盐缓冲液:

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>      1.59g

NaHCO<sub>3</sub>      2.63g

加蒸馏水至 1 L

#### (2) 20mM pH 8.5 的 Tris-HCl

Tris      2.42g

加蒸馏水至 1 L, 用 HCl 调 pH 至 8.5

#### (3) 10mM pH 7.2 PBS

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      0.2g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O      2.9g

NaCl                              8.0g

加蒸馏水至 1 L

### 封闭

封闭试剂一般都用 PBST 溶解, 即在上述 10mM pH 7.2 PBS 的基础上加入 0.2% Tween-20 即可。

### 抗原或抗体稀释液

抗原或抗体稀释液可以是 PBS、PBST、封闭液、生理盐水等, 理论上讲封闭液是最理想的抗原或抗体稀释液, 但有时候为了节省试剂和操作, PBS 作为稀释液应用更广泛。

## 酶标抗原或抗体

酶标抗原或抗体是 ELISA 中最重要的试剂，也是 ELISA（酶联免疫吸附测定）名称的由来原因。目前在 ELISA 体系中可以引入的作为标记用的酶主要有四种：辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（AP）、β-半乳糖苷酶（β-Galactosidase, BG）、脲酶（Urease）。下表将它们各自的底物以及显色反应结果一一列出。

▲ ELISA 中可用来标记的酶及其底物反应特征

酶	底物	显色物质	反应颜色	终止颜色	反应吸光波长	终止吸光波长	终止液
HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	TMB	蓝	黄	650 nm	450 nm	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OPD	绿/橙	橙/棕	450 nm	492 nm	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ABTS	绿	绿	414 nm	/	不终止
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5-AS	棕		450 nm	/	不终止
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	DAB	棕		沉淀	/	不终止
AP	PNP P	PNPP	黄/绿	黄/绿	405 nm	405 nm	2M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
BG	ONP G	ONPG	黄	黄	420 nm	420 nm	2M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Urease	Urea	溴甲酚紫	紫	紫	588 nm	588 nm	1% 硫柳汞

HRP 酶最初从植物辣根中提取，它一共至少有七种同工酶，目前商业化的 HRP 酶至少有一半以上是同工酶 C，商业化的 HRP 酶活性一般都非常强，其主要作用底物是过氧化氢（也可以作用于过氧化脲），但是高浓度的过氧化氢对其活性有很强的抑制作用，因此在使用时过氧化氢的浓度非常关键。

(1) OPD（邻苯二胺）是早些年 ELISA 中最常用的底物，其工作浓度一般为 0.4mg/ml，底物缓冲液用 0.1M pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液。商业化的 OPD 有预先称好质量的片剂，使用前直接溶解在指定体积的缓冲液中即可，OPD 体系中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度一般为 0.004%

(2) TMB（3,3',5,5'-四甲联苯胺）毒性低，而且颜色对比很明显，近些年来非常受欢迎。其工作浓度从 0.0005%-0.01% 范围内都可以使用，实验中一般使用其盐酸盐，因为其盐酸盐的溶解性比其本身溶解性强。TMB 底物体

系中过氧化氢的浓度也在 0.004% 左右比较合适。其底物缓冲液一般使用 0.1M pH 5.0 柠檬酸钠缓冲液或 0.1 M pH 5.6 醋酸盐缓冲液。

(3) ABTS (2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)) 使用的工作浓度也为 0.4mg/ml, 系统中过氧化氢浓度在 0.002% 左右适宜。底物缓冲液一般用 0.1 M pH 4.0 磷酸盐/柠檬酸盐缓冲液。ABTS 也有商业化的片剂销售。

(4) 5-氨基水杨酸灵敏度较差, 现在基本已不用。

(5) DAB (二氨基联苯胺) 底物的终产物为棕色沉淀, 不方便用酶标仪进行判读结果, 所以在 ELISA 中应用较少, 但在 Western Blot 中应用较多, 其使用浓度一般在 0.5mg/ml, 过氧化氢使用浓度为 0.02%, 底物缓冲液用 pH 7.4 PBS 或者 Tris-HCl。

碱性磷酸酶源于牛小肠或大肠杆菌, 不同来源的碱性磷酸酶使用的缓冲液也不一样。对于大肠杆菌来源的碱性磷酸酶, 其缓冲液一般用 0.1M pH 8.1 Tris, 含 0.01% MgCl<sub>2</sub>。对于小肠来源的碱性磷酸酶, 其缓冲液一般用 pH 9.8 的 10% 二乙醇胺 (含 0.5mM MgCl<sub>2</sub>)。其底物对硝基苯酚磷酸盐 (PNPP) 工作浓度一般为 1mg/ml, 反应结束后用 0.1 倍体积的 2M 碳酸钠终止反应。

$\beta$ -半乳糖苷酶底物是 ONPG (邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖苷), 其使用浓度一般为 0.7mg/ml, 底物缓冲液用 0.1 M pH7.0 磷酸氢二钾缓冲液, 并包含 1mM MgCl<sub>2</sub> 和 0.01 M 2-巯基乙醇, 反应结束后用 0.25 倍体积的 2M 碳酸钠终止反应。

脲酶底物尿素可被脲酶分解释放出氨, 使 pH 升高, 溴甲酚紫在弱酸性条件(pH 4.8)条件下显黄色, 随着反应的 pH 升高, 其颜色变为紫色。反应完后每孔用 10ul 硫柳汞终止。

## ELISA 常见问题及分析

ELISA 操作是需要非常细心的工作。操作者在进行 ELISA 前应该对实验有充分的了解, 并对预期结果十分清楚。实验室 ELISA 失败的原因有 10% 左右是由于水质引起的, 另外 90% 则是操作上的失误引起的, 包括未意识的操作失误, 或者明知操作原则但想偷懒而未按正确要求操作。另外还有少量失败案例是由于设备的管理不当或设备状况太差引起的。ELISA 常见问题以分析

对策总结如下:

### 显色极浅或不显色

- (1) 底物漏加成份、底物失效、底物配制浓度计算错误;
- (2) 整个 ELISA 过程中存在抗原或抗体不匹配;
- (3) 整个 ELISA 过程中样品稀释过度;
- (4) 稀释体系错误。如使用含蛋白成份的试剂进行包被。

### 全板阳性

- (1) 酶标抗原或抗体浓度过高, 尝试降低浓度;
- (2) 使用的封闭试剂不正确, 或者未封闭;
- (3) 酶标抗原或抗体与体系中其它试剂有结合;
- (4) 底物被酶标抗原或抗体污染。

### 不均匀显色

- (1) 酶标板质量问题, 重新检测酶标板均一性。
- (2) 包被或加样过程中有部份孔漏加、少加等情况, 可能是操作者不细心, 也可能是移液器漏气;
- (3) 加样时移液器打入太多气泡;
- (4) 选购的酶标板不正确, 可能误选其它用途的板子;
- (5) 温育过程中板子叠放过厚;
- (6) 加样或稀释过程中试剂没有充份混匀, 或稀释梯度计算错误;
- (7) 洗板失误, 部份孔未加洗涤液或洗涤液加入去垢剂后未充分混匀, 或洗涤过程中带入气泡。

### 显色过快

- (1) 酶标抗原或抗体浓度过高;
- (2) 某一试剂浓度过高。

### 显色过慢

- (1) 酶标抗原或抗体浓度过底, 或者标记效率低, 或者标记后免疫活性受影响;
- (2) 试剂被污染, 如 HRP 酶标记的抗原或抗体被叠氮钠污染;
- (3) 反应温度过低;

- (4) 底物缓冲液 pH 不正确;

#### 背景深

- (1) 酶标抗原或抗体浓度过高;
- (2) 抗体的非特异性结合;
- (3) 抗原或抗体不纯;
- (4) 二抗的种属交叉识别;