

酶联免疫吸附试验（ELISA）

酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）是一种固相酶免疫测定技术。它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（测定其中的抗体或抗原）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。ELISA 的主要类型有双抗体夹心法、间接法、竞争法、捕获法等。

试剂准备

1. 包被液（碳酸盐缓冲液pH9.6）： Na_2CO_3 1.59g； NaHCO_3 2.93g；加 800ml水溶解，定容至 1000ml加 0.02% NaN_3 ，0.22 μm 膜过滤，4℃保存。
2. 洗涤缓冲液（PBST）： NaCl 9g； KCl 0.25g； Na_2HPO_4 3.63g； KH_2PO_4 0.25g；加水溶解，定容至 1000ml加 0.2% Tween20 混匀。
3. 封闭液：10%小牛血清（1ml 小牛血清加到 9ml 1×PBS 中混匀）。
4. 底物缓冲液（磷酸盐-柠檬酸缓冲液pH6.0）： Na_2HPO_4 56.77g；柠檬酸 5.6g；加水 800ml 溶解，定容至 1000ml，过滤 0.22 μm 膜，4℃保存。

5. 终止液：1mol/L H_2SO_4 至数小时）；如果抗原抗体的性质不稳定，则选择低温（4℃）

长时间（24 小时）反应。

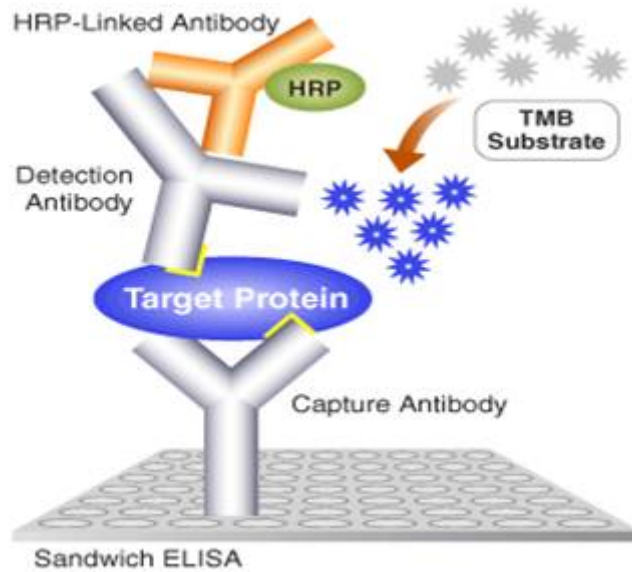
5. 清洗酶标板，加底物显色液，每孔 100ul 闭光反应 5 分钟。

6. 终止液终止反应每孔 100ul。

7. 酶联免疫检测仪 492nm 读数。以测定的 OD 值绘制线性回归标准曲线，以标准抗原浓度为横坐标，以标准抗原试验孔的 OD 值为纵坐标，绘制出一条标准曲线（竞争法），根据待测样本的实验结果计算出样本中的抗原浓度。

一、双抗体夹心法检测抗原

双抗体夹心法用于检测抗原。它是利用待测抗原上的两个抗原决定簇 A 和 B 分别与固相载体上的抗体 A 和酶标记抗体 B 结合，形成抗体 A-待测抗原-酶标抗体 B 复合物，复合物的形成量与待测抗原含量成正比。



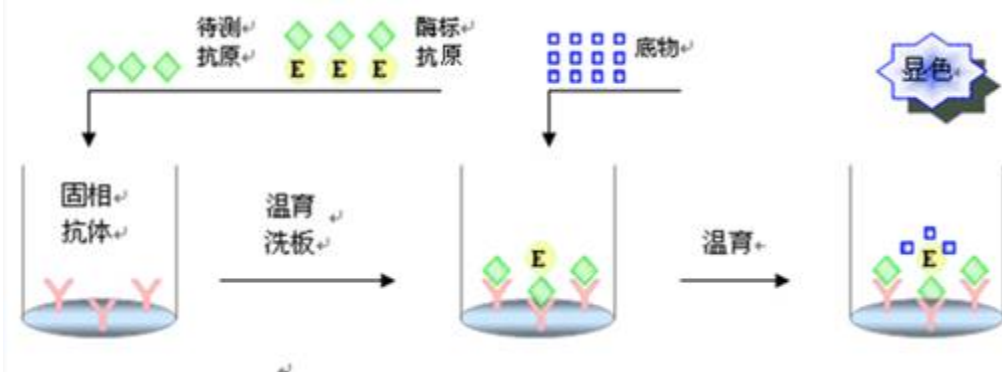
图一 双抗体夹心法基本原理

实验步骤

1. 用包被液稀释包被抗体至合适浓度，包被酶联板，每孔 100 μ L。湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。也可 37 $^{\circ}$ C，2 小时包被，但此方法不建议使用。包被抗体即可以是单抗，也可以是多抗。但抗体的包被浓度应当通过预实验确定。包被的板条可以在 4 $^{\circ}$ C 保存数月。
2. 每孔加入 100ul 洗涤缓冲液，清洗酶联板 3-5 次。
3. 10%小牛血清封闭，每孔 200 μ L，湿盒中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时。也可以用 1.5%酪蛋白或者 0.25%的 BSA 封闭。
4. 每孔加入 100ul 洗涤缓冲液，清洗酶联板 3-5 次。最后一次在吸水纸上扣干。
5. 加标准样品及样本。
 - (1) 标准曲线：用 1 \times PBS 稀释标准品分别至 1000ng/ml、500ng/ml、250 ng/ml、125 ng/ml、62.5 ng/ml、31.25 ng/ml、15.625 ng/ml、7.18 ng/ml。
 - (2) 待测样品：用 1 \times PBS 稀释（不同样品的稀释倍数不同，一般稀释原则为稀释后的样品浓度应在标准曲线之内）。
 - (3) 以上下做平行孔，前两孔作空白加入 1 \times PBS，其余依次加入标准曲线、待测样品。加入体积每孔 100ul。湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。
- 抗原抗体反应比较快，一般 1~2 小时就达到峰值。延长反应时间容易出现非特异结合。
6. 每孔加入 100ul 洗涤缓冲液，清洗酶联板 3-5 次。最后一次在吸水纸上扣干。
7. 加酶标二抗，根据抗体使用说明用 1 \times PBS 稀释，每孔 100ul 湿盒中室温反应 40 分钟。二抗的使用浓度应当进行预实验确定，二抗的反应时间不能过长，容易出现非特异反应。
8. 每孔加入 100ul 洗涤缓冲液，清洗酶联板 3-5 次。最后一次在吸水纸上扣干。
9. 加底物显色液：称取 OPD（邻苯二胺）4mg 用 10ml 底物缓冲液充分溶解，加入 15ul H2O2 每孔 100ul 闭光反应 5 分钟。OPD 要充分溶解，否则容易出现个别孔颜色太深。
10. 终止液终止反应每孔 100ul 终止液。
11. 酶联免疫检测仪 492nm 读数。
12. 以测定的 OD 值绘制线性回归标准曲线，以标准品蛋白浓度 LN 值为横坐标，相应的 OD 值为纵坐标，绘制出一条标准曲线并添加线性回归趋势线，其相关系数 R² 应大于 0.95，根据方程计算出样品中的目标蛋白含量。

二、竞争法

竞争法是用酶标抗原（抗体）与待测的非标记抗原（抗体）竞争性的与固相载体上的限量抗体（抗原）结合，待测抗原（抗体）多，则形成非标记复合物多，酶标抗原与抗体结合就少，也就是酶标记复合物少，因此，显色程度与待测物含量成反比。竞争法即可用于检测抗原又可用于检测抗体。



图二 竞争法基本原理

实验步骤

1. 用包被液稀释特异性抗体至合适浓度，包被酶联板，每孔 100ul。湿盒中 4℃ 过夜。
实验中应设立阳性对照、阴性对照以及空白孔对照。每个样品浓度至少设 3 个重复孔。
在竞争法实验中，是利用待测抗原与标记抗原竞争结合限量的抗体；因此，包被抗体的浓度应该预实验确定。可以用不同浓度的抗体包被后，以定量的标记抗原去结合，与底物反应后显色。抗体的浓度选择饱和浓度以下为宜；同时选用该预实验中所用的标记抗原浓度作为相应的实验浓度。
2. 每孔加入 100ul 洗涤缓冲液，清洗酶联板 3-5 次。最后一次在吸水纸上扣干。
3. 10%小牛血清封闭，每孔 200ul，湿盒中 37℃ 封闭 1 小时；清洗酶标板。
4. 加待测样品盒标准抗原：用 PBS-Tween20 缓冲液不同倍数稀释标准抗原或待测抗原；和定量的标记抗原混合后分别加入酶联板中。同时设阴性对照；空白对照管只加抗体稀释液。至 37℃ 孵育。
如果抗原抗体性质稳定，且含量较高，可以选择室温或 37℃ 反应较短时间（半个小时至数小时）；如果抗原抗体的性质不稳定，则选择低温（4℃）长时间（24 小时）反应。
5. 清洗酶标板，加底物显色液，每孔 100ul 闭光反应 5 分钟。
6. 终止液终止反应每孔 100ul。
7. 酶联免疫检测仪 492nm 读数。以测定的 OD 值绘制线性回归标准曲线，以标准抗原浓度为横坐标，以标准抗原试验孔的 OD 值为纵坐标，绘制出一条标准曲线（竞争法），根据待测样本的实验结果计算出样本中的抗原浓度。