



## 酶联免疫 (ELISA) 通用试剂盒 (HRP)

产品编号: 2021-1 抗人, 2021-2 抗兔, 2021-3 抗鼠

酶联免疫 (ELISA) 通用试剂盒是一种通用的酶联免疫 (ELISA) 检测抗原或抗体的试剂盒, 含有 ELISA 实验所必须的通用试剂组份, 对反应条件、操作步骤、各试剂的浓度进行了优化, 保证了检测结果的灵敏度和重复性。

蛋白检测酶标试剂盒可用于检测小鼠、兔或人的抗体。适用于初次接触 ELISA 技术的实验者, 或者为节省时间并保证检测结果具有高灵敏和可重复性的科研工作者。

### 1. 试剂盒组分

- 1.1. 包被缓冲液(10×浓缩) 25ml ×1 瓶
- 1.2. BSA 稀释液/封闭液 (10×浓缩) 100ml ×1 瓶
- 1.3. 洗涤缓冲液 ((20×浓缩) 100ml ×1 瓶
- 1.4. TMB 显色液 100ml ×2 瓶
- 1.5. 终止液(10×浓缩) 25ml ×1 瓶
- 1.6. HRP 标记抗体: 1ml
  - 1.6.1 HRP 标记抗人 IgG (H+L) 0.1 mg
  - 1.6.2 HRP 标记抗兔 IgG (H+L) 0.1 mg
  - 1.6.3 HRP 标记抗鼠 IgG (H+L) 0.1 mg

储存在 2~8℃, 有效期 2 年, 可以完成 20 块 96 孔酶标板检测。

### 2. 试剂盒不提供的试剂或耗材

- 2.1. 人、小鼠或兔的一抗
- 2.2. 亲和层析纯化的未标记捕获抗体
- 2.3. 酶标板 (不建议用组织培养板)
- 2.4. 吸水纸、毛巾或棉布
- 2.5. 蒸馏水或纯化水
- 2.5. 移液器试剂瓶等
- 2.6. 多通道排枪和加液槽
- 2.7. 手套
- 2.8. 枪头

### 3. 检测原理

#### 3.1 杂交瘤筛选

可以检测杂交瘤培养液中的特异性抗体, 使用适当标记二抗, 可以检测抗原特异性的人、鼠和兔抗体。

#### 3.2 检测抗原或抗体

**3.2.1 直接 ELISA:** 是检测抗原的最简单方法, 包被抗原, 加标记的检测抗体。

**3.2.2 间接抗体 ELISA:** 可以检测抗原或抗体, 取决于哪种是未知的。包被抗原, 加一抗或含抗体的血清或腹水, 最常用于检测动物特异性抗体的水平, 也可用于检测杂交瘤培养上清中的单克隆抗体。

**3.2.3 双抗体夹心法:** 是检测抗原的一种高度敏感性的方法。用高度纯化的抗体分别作为包被抗体和检测抗体, 检测抗体可直接标记酶, 如果包被抗体和检测抗体不是来源同种动



物，检测抗体也可不标记，而加针对检测抗体动物种属的酶标二抗，此法适用于抗原浓度过低，不能直接包被到酶标板上或者含有未知成分干扰的抗原检测。

## 4. 确定反应条件

### 4.1 杂交瘤筛选

用间接 ELISA 方法筛选抗体

### 4.2 检测抗原或抗体

按照推荐的方法和步骤可以满足大多数实验的要求，反应时间、温度和试剂浓度等可以根据实验需要进行调整

每一步都应该进行系统性评价以便获得最佳的实验条件。试剂通过倍比稀释以确定最佳浓度。选择合适的对照，以确定实验中存在的问题，发现引起错误结果和高本底的原因。确定实验方案和样品数量后，可以准备所需要的各种材料和试剂。实验前，建议所有的试剂恢复到室温并混匀。

### 4.3 检测条件概述

#### 4.3.1 包被酶标板

多种包被条件：抗原或抗体浓度、pH、离子强度、温度和孵育时间都影响包被效率。此外，结合蛋白的数量与分子量成反比。试剂盒中包被液为优化的磷酸盐缓冲液，适用于大多数抗原和抗体的包被。微孔板应选择专用于 ELISA 的酶标板，不建议使用组织培养板。包被时，抗原或抗体在包被缓冲液中稀释后加入到酶标板中室温孵育，尽可能使用最纯的抗原或抗体。一般来说 1~10  $\mu\text{g/ml}$  室温 1 小时能够包被饱和。为方便，2~8 $^{\circ}\text{C}$  过夜可以到满意的包被效果。

包被后，酶标板用 BSA 稀释/封闭液封闭 5 分钟，稀释/封闭液中含 1%BSA，能够通过封闭未反应部位减少非特异性结合并保护包被上的蛋白质活性。如果暂时不继续实验，可以用塑料膜覆盖酶标板后冷藏保存，需要时再恢复室温继续实验。

#### 4.3.2 洗板

加标本和酶标抗体后需要洗涤，通过洗涤可以去掉未反应试剂帮助降低本底。满意的洗涤方法是孔与孔之间均匀一致并且没有液体的相互污染。洗涤时将板子翻转并将液体甩掉拍净。洗涤液中含有 0.05%吐温-20 以抑制非特异性结合。如果实验过程中断，应该将酶标板中加入洗涤液以避免酶标板干燥。

#### 4.3.3 HRP 标记抗体

HRP 标记的抗体作为检测抗体，与底物反应后，使底物显色。实验过程中避免接触叠氮钠，叠氮钠可使 HRP 失活。

#### 4.3.4 底物

使用 TMB 底物，一般来说，产生的颜色与待测物成正比。

#### 4.3.5 对照和标本

每次实验都要包含适当的对照以用于分析检测体系的效能。定量 ELISA 要以标准品进行比较。每次实验要设以下对照：

**4.3.6 本底对照：**不加标本，其它试剂都加，可以帮助分析非特异性本底的原因。将实验结果减去本底以保证实验之间的可比性。

**4.3.7 阴性对照：**加已知的阴性参考品。

**4.3.8 阈值对照：**加强阳性参考品用于确定阳性的临界值。

**4.3.9 阳性对照：**加强阳性参考品以确定最大线性信号。

对照和标本都用 BSA 稀释/封闭液进行稀释以保证最低本底，所有实验最好做双份。

## 5. 试剂配制



所有试剂当日配制

**5.1 1X 包被液:** 用蒸馏水稀释浓缩洗涤液 (1ml 浓缩包被液+9ml 蒸馏水)

注意: 如果在 10X 中出现结晶, 加热到室温或 37°C 混匀并再溶解。

**5.2 1X BSA 稀释/封闭液:**

**杂交瘤筛选:** 稀释浓缩 BSA 稀释/封闭液 (2ml 浓缩 BSA 稀释/封闭液+8ml 蒸馏水)

其它检测: 稀释浓缩 BSA 稀释/封闭液 (5ml 浓缩 BSA 稀释/封闭液+45ml 蒸馏水)

注意: 如果在 10X 中出现结晶, 加热到室温或 37°C 混匀并再溶解。

**5.3 1X 洗涤液:**

浓缩洗涤液 20 倍稀释 (15ml 浓缩洗涤液+285ml 蒸馏水)。稀释的洗涤液室温稳定至少 6 个月。

**5.4 二抗工作液:**

二抗浓缩液浓度为 0.1mg/ml, 2~8°C 稳定至少 1 年, 使用前用 1X BSA 稀释/封闭液稀释, 对大多数实验而言, 0.1~2.0  $\mu$ g/ml 工作浓度。

**5.5 TMB 显色液:** 直接使用。

**5.6 终止液:** 直接使用

**5.7 标本:**

**5.8 对照**

## 6. 实验优化

通过 3 个变量来优化 ELISA 条件: 试剂浓度、温度、孵育时间。一般情况下, 室温反应对大多数实验能够得到很好的结果。

优化不同试剂浓度和不同孵育时间, 选择最佳的实验条件。在优化最佳浓度时, 第一个试剂倍比稀释, 然后第二个试剂倍比稀释, 每一孔都对应于第一个试剂和第二个试剂的某一个稀释度的组合。

### 棋盘滴定确定试剂的最佳浓度

1. 加 100  $\mu$ l 稀释液到 2~12 列的每孔。

2. 加 200  $\mu$ l 稀释的试剂到第一列的每孔中。

3. 从第 1 列的孔中取 100  $\mu$ l 转移到第二孔中, 混匀用枪吹吸 3~5 次。

4. 重复步骤 3 向后稀释, 一直到第 11 列, 吸取第 11 列 100  $\mu$ l 弃去, 第 12 列作为对照。

重复以上的操作, 从 A 排至 G 排, 稀释第二个试剂, H 排作为对照。

## 7. 操作步骤

### 7.1 杂交瘤筛选

**包被液:** 在 1X 包被液中稀释抗原至合适的浓度 (一般 1~10  $\mu$ g/ml)。

**一抗工作液:** 含有单克隆抗体的培养液。

**二抗工作液:** 取 25  $\mu$ l 的酶标二抗稀释到 5.0 ml 1X BSA 的稀释/封闭液中

#### 7.1.1 包被抗原

1. 加抗原到酶标板中。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

#### 7.1.2 封闭酶标板

1. 加 150  $\mu$ l 1X BSA 稀释/封闭液到每孔中。

2. 孵育 5-15 分钟, 甩掉板中液体并拍净残液。

#### 7.1.3 与含单克隆抗体的培养液反应



1. 每孔中加 50 uL 含单克隆抗体的培养液。

2. 室温反应 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

#### 7.1.4 洗板

1. 加入 1X 洗涤液。

2. 甩掉板中液体并拍净残液。

3. 重复 3~5 次。

#### 7.1.5 加二抗

1. 每孔加 50 uL 二抗。

2. 室温反应 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液，洗板。

4. 最后一次浸在洗涤液中 5 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

#### 7.1.6 显色反应

1. 每孔加 50 uL 底物，室温反应 15 分钟。

2. 每孔加 50ul 终止液。

3. 测 OD 值，检测波长 450nm。

#### 7.2 直接 ELISA

抗原包被液：将抗原稀释在 1X 包被液中，浓度 1~10  $\mu$ g/ml。

酶标抗体：稀释到 1X BSA 稀释/封闭液中，稀释度参考条件优化方法。

##### 7.2.1 加抗原

1. 在酶标板中每孔加入 100  $\mu$  抗原包被液。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

##### 7.2.2 封闭

1. 每孔加 300  $\mu$  1X BSA 稀释/封闭液。

2. 反应 5 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

##### 7.2.3 加酶标抗体

1. 每孔加入 100  $\mu$ l 酶标抗体。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

##### 7.2.4 洗板

1. 加入 1X 洗涤液。

2. 甩掉板中液体并拍净残液。

3. 重复 3~5 次。

4. 最后一次浸在洗涤液中 5 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

##### 7.2.5 显色反应

1. 每孔加 50 uL 底物，室温反应 15 分钟。

2. 每孔加 50ul 终止液。

3. 测 OD 值，检测波长 450nm。

#### 7.3 间接抗体 ELISA

抗原包被液：将抗原稀释在 1X 包被液中，浓度 1~10  $\mu$ g/ml。

一抗/二抗工作液：将抗体稀释到 1X BSA 稀释/封闭液中，稀释度参考条件优化方法。

##### 7.3.1 加抗原



1. 在酶标板中每孔加入 100  $\mu$  抗原包被液。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.3.2 封闭

1. 每孔加 300  $\mu$ l 1X BSA 稀释/封闭液。

2. 反应 5~15 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.3.3 加一抗

1. 每孔中加入 100  $\mu$ l 一抗

2. 室温反应 1 小时

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.3.4 洗板

1. 加入 1X 洗涤液。

2. 甩掉板中液体并拍净残液。

3. 重复 3~5 次。

### 7.3.5 加二抗

1. 每孔加入 100  $\mu$ l 酶标二抗。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 重复 3~5 次。

4. 最后一次浸在洗涤液中 5 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.3.6 显色反应

1. 每孔加 100  $\mu$ l 底物，室温反应 15 分钟。

2. 每孔加 100 $\mu$ l 终止液。

3. 测 OD 值，检测波长 450nm。

## 7.4 双抗体夹心 ELISA

包被液：将抗原稀释在 1X 包被液中，浓度 1~10  $\mu$ g/ml。

抗原标本：将抗原标本稀释到 1X BSA 稀释/封闭液中。

二抗工作液：将抗体稀释到 1X BSA 稀释/封闭液中，稀释度参考条件优化方法。

### 7.4.1 加捕获抗体

1. 在酶标板中每孔加入 100  $\mu$  抗体包被液。

2. 室温孵育 1 小时。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.4.2 封闭

1. 每孔加 300  $\mu$ l 1X BSA 稀释/封闭液。

2. 反应 5~15 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.4.3 加抗原

1. 每孔中加入 100  $\mu$ l 标本液

2. 室温反应 1 小时直至过夜。

3. 甩掉板中液体并拍净残液。

### 7.4.4 洗板

1. 加入 1X 洗涤液。

2. 甩掉板中液体并拍净残液。

3. 重复 3~5 次。

### 7.4.5 加标记抗体



1. 每孔加入 100  $\mu$ l 标记。
2. 室温孵育 1 小时。
3. 甩掉板中液体并拍净残液。
4. 重复 3~5 次。
5. 最后一次浸在洗涤液中 5 分钟，甩掉板中液体并拍净残液。

#### 7.4.6 显色反应

1. 每孔加 100  $\mu$ L 底物，室温反应 15 分钟。
2. 每孔加 100 $\mu$ l 终止液。
3. 测 OD 值，检测波长 450nm。

### 8.可能出现的问题和解决办法

#### 8.1 以下结果表示实验有效:

阴性对照：无色

背景对照：OD 值低于 0.2

阈值对照：中度显色

强阳性对照：深度显色，OD $\geq$ 1.0

#### 8.2 希望增加特异性信号

1. 增加酶标抗体的浓度或延长孵育时间或提高孵育温度。
2. 延长底物的孵育时间。
3. 增加包被抗原浓度或延长孵育时间。
4. 用纯化的抗原。
5. 封闭时间缩短或增加 BSA 稀释/封闭液的稀释度。
6. 减少洗板次数或操作更轻柔。

#### 8.3 减少非特异性信号

1. 减少包被抗原浓度或缩短孵育时间。
2. 减少酶标抗体的浓度或缩短孵育时间或降低孵育温度。
3. 缩短底物的孵育时间。
4. 增加洗板次数或延长洗涤液浸泡时间。
5. 通过加低浓度包被抗原或捕获抗体到稀释的酶标物中以减少结合物的交叉反应。

#### 8.4. 背景忽高忽低，检查洗板机功能是否正常。

### 9. REFERENCES

1. Clark, B.R. and Engval, E. (1980). Enzyme Immunoassay, CRC Press, Inc., Boca Raton,FL.
2. Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A. (1979). The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), A Guide With Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Laboratories Inc. Alexandria, VA.
3. Fleming, J.O. and Pen, L.B. (1988). J. Immunol. Methods, 1110: 11 – 18