

# ELISA

## 1.准备

- 1.1 试剂及 96 孔板室温平衡 30 min
- 1.2 配洗涤液 PBS + 0.05 % Tween-20, 500 mL
- 1.3 配封闭液 PBS + 3–5 % BSA, 过滤除菌

## 2.包被

- 2.1 捕获抗体 2–10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (碳酸盐缓冲 pH 9.6)
- 2.2 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 室温 2 h 或 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜
- 2.3 倒液, PBS/T 300  $\mu\text{L}$  洗 3  $\times$

## 3.封闭

- 3.1 每孔加 200  $\mu\text{L}$  5 % BSA
- 3.2 室温轻摇 1 h
- 3.3 PBS/T 洗 3  $\times$

## 4.加样

- 4.1 标准梯度 + 样本各 100  $\mu\text{L}$
- 4.2 室温 1 h 轻摇或 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜
- 4.3 PBS/T 洗  $\geq 5 \times$

## 5.检测 抗体

- 5.1 稀释至 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$
- 5.2 室温轻摇 1 h
- 5.3 PBS/T 洗  $\geq 5 \times$

## 6.显色

- 6.1 加 100  $\mu\text{L}$  TMB, 避光 15–20 min
- 6.2 最高标准 OD $\approx$ 1.0–1.5 即停

## 7.终止

- 7.1 加 50  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 混匀显黄

## 8.读板

- 8.1 450 nm (参 620 nm) 5–30 min 内读取
- 8.2 4PL 标准曲线,  $R^2 \geq 0.98$ , 乘稀释因子得浓度

## 常见问题解析

### 1. 无信号或信号弱怎么办？

① 先确认标准曲线正常；若标准品也弱，检查HRP-检测抗体和TMB底物是否失活或反复冻融。② 捕获或检测抗体浓度不足：捕获抗体提升至4-10  $\mu\text{g/mL}$ ，检测抗体0.2-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ，并将孵育时间延长至2 h或4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。③ 目标蛋白低于检出限：减少样本稀释倍数或先浓缩，必要时采用链亲和素-HRP放大体系。④ 包被缓冲或pH不当：确保使用pH 9.6的碳酸盐缓冲液并充分吸附。

### 2. 背景值高或整板发蓝怎么办？

① 洗板不足是主要原因：每孔 $\geq 300 \mu\text{L}$  PBS/0.05 % Tween-20静置30 s，重复 $\geq 5$ 次并彻底吸干残液。② 封闭不完全：使用3-5 % BSA室温1 h或4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜充分封闭。③ TMB被污染或显色时间过长：TMB应透明无色，显色统一控制在15-20 min，当最高标准OD $\approx 1.0-1.5$ 即终止。④ HRP-抗体浓度过高：按推荐浓度减半或做梯度优化。

### 3. 重复孔CV高、数据跳动怎么办？

① 移液不一致：使用已校准的8/12道移液器，45 $^{\circ}$ 贴孔壁缓慢加样，避免气泡。② 摇板不足：孵育时保持200 rpm轻摇，促进液体覆盖孔面。③ 试剂混匀不充分：所有抗体与底物使用前轻颠倒混匀，勿剧烈涡旋。④ 洗板机喷头高度或堵塞：定期检查喷头与抽液针，确保各孔冲洗均匀。

### 4. 边缘效应如何处理？

① 温差和蒸发是主因：孵育时放湿盒或在板边空孔加PBS，维持湿度。② 操作节奏要一致：多通道加样从板中心开始，最后处理边缘孔，减少时间差。③ 避免冷凝：读板前擦干底面水珠，防止光路干扰。

### 5. 样本OD超出最高标准怎么办？

① 对样本做1:5、1:10递增稀释，再测定确保OD落入标准曲线范围。② 若仍偏高，可缩短TMB显色至5-10 min或将检测抗体浓度降低50 %。③ 计算浓度时乘以最终稀释因子，得到准确结果。

## 参考文献

- [1] Yoo SM, Kang JY, Lee J, et al. Rapid quantitative sandwich ELISA in a 96-well microfluidic plate [J]. STAR Protocols, 2022, 3(2):101511.
- [2] Li H, Tighe SW. Multiplexed sandwich ELISA for simultaneous cytokine quantification [J]. STAR Protocols, 2024, 5(1):101987.