

# 抗体三明治ELISA标准操作流程- HRP法 (SOP)

## 实验用耗材及试剂信息

试剂 / 耗材 / 仪器名称	说明
ELISA 包被液	参考下述配方自行配制
ELISA 封闭液	参考下述配方自行配制
PBST 缓冲液	参考下述配方自行配制
TMB 显色液	需自行购买或准备
TMB 显色终止液 (常用 2M 硫酸)	需自行购买或准备
抗原	需自行购买或准备
捕获抗体	需自行购买或准备
HRP 标记检测抗体	需自行购买或准备
96 孔板	需自行购买或准备
酶标仪	需自行购买

## 试剂配制

### 1、ELISA包被液(1L配制量)

组分	用量
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.94 g
叠氮化钠	0.9 g
用去离子水定容至1 L	

### 2、PBST缓冲液(1L配制量)

组分	用量
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.9 g
用去离子水定容至1L	
吐温-20	0.5 mL

### 3、ELISA封闭液(1L配制量)

组分	用量
BSA	20 g
叠氮化钠	0.9 g
用PBST缓冲液定容至1 L	

\*备注:

- “去离子水”指经过纯化处理,去除杂质和离子水。
- 配制后的溶液需充分混匀,备用。

## 实验操作

### 1、包被捕获抗体:

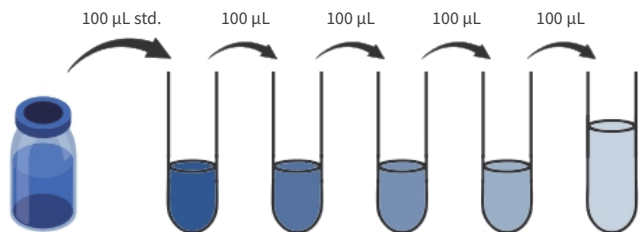
- 使用 ELISA 包被液将捕获抗体稀释至 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  或 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (可根据实验需求调整浓度),每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。
- 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

### 2、封闭:

- 孵育后,使用 PBST 缓冲液洗板三次,每次浸泡 5 分钟。
- 彻底弃去 PBST 缓冲液,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  ELISA 封闭液,室温孵育 1 小时。
- 孵育结束后,弃去封闭液。
- 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  ELISA 封闭液。

### 3、抗原倍比稀释(用于建立标准曲线)和待测样品的加入:

- 使用 ELISA 封闭液将抗原稀释至建议的工作浓度(一般是曲线的最高浓度点)。
- 取 100  $\mu\text{L}$  稀释的抗原加入首孔,进行倍比稀释至第 11 孔,第 12 孔为空白对照。
- 待测样品同样取 100  $\mu\text{L}$  加入到未使用的孔内,要减少系统误差可以每个样品做重复孔。



- 室温孵育 1 小时后,对每个有抗原或样品的孔使用 PBST 洗板三次,每次浸泡 5 分钟。
- 彻底弃去 PBST 缓冲液。

### 4、加入HRP标记链霉亲和素:

- 将 HRP 标记链霉亲和素用 PBST 稀释至建议浓度(具体见试剂说明)。
- 每个有抗原或样品的孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释的链霉亲和素,室温孵育 30 分钟。
- 孵育后,使用 PBST 缓冲液洗板三次,每次浸泡 5 分钟。
- 彻底弃去 PBST 缓冲液。

### 5、显色(TMB):

- 每个有抗原或样品的孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,加完首板后开始记录时间。
- 避光室温孵育,观察显色。
- 当显色达到预期效果时,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  TMB 显色终止液(如 2M 硫酸)终止反应。
- 擦掉底部水雾,酶标仪设置震荡 3s,在 450 nm 波长读取 OD 值,保存数据。
- 用已知抗原浓度和抗原的 OD 值拟合出标准曲线,将待测样本的 OD 值代入曲线算出样本浓度值。

注: TMB 显色液需要提前拿出放至室温后使用,显色需要使用 TMB 显色终止液进行终止。

### 注意事项:

- 所有操作应在室温下进行,除非另有说明。
- 洗板时,确保每次洗涤后彻底排空,以减少背景干扰。
- 显色反应时间应根据实验需求进行优化,避免过度或不足显色。
- Elisa 实验的数据拟合可以用网路上的共享拟合软件,如有需要也可向酶联生物讨要。