

## Elisa 夹心法实验方案

夹心 ELISA 实验需要用到配对抗体（捕获抗体和检测抗体），其实验原理是将捕获抗体结合到 ELISA 板上，通过捕获抗体固定抗原，随后通过直接 ELISA 或间接 ELISA 的方式进行检测。在夹心 ELISA 实验中，最重要的是对配对抗体进行验证，确保配对抗体能同时与抗原结合，以确保实验的顺利进行。

夹心 ELISA 实验先将捕获抗体固定于 ELISA 板孔中，然后加入分析物或样品，接着加入检测抗体。如果检测抗体是酶标抗体，则可称为直接夹心 ELISA；如果检测抗体不带有标记，则还需要使用酶标二抗与检测抗体结合，这种称为间接夹心 ELISA。

夹心 ELISA 的灵敏度高，它比直接或间接 ELISA 敏感 2-5 倍；同时夹心 ELISA 使用两种特异性抗体与抗原结合，拥有很高的特异性。另外夹心 ELISA 能够通过直接或间接的方式进行检测，有着不错的灵活性。夹心 ELISA 的缺点是对配对抗体要求很高，如果没有标准化的试剂盒或者已经通过测试的配对抗体，则需要对配对抗体定制并进行优化，因为降低捕获抗体与检测抗体之间的交叉反应是非常重要的。夹心 ELISA 尤其适用于复杂样品的分析，因为抗原不经纯化仍能具有高灵敏度和特异性（例如测量免疫应答中的细胞因子水平）。

\*该实验方案仅供参考。请优化程序，因为不同样品的实验条件可能有所不同。

### 1. 样品包被

- (1) 用 加入 100 $\mu$ L 用碳酸氢盐/碳酸盐溶液稀释成一定浓度的捕获抗体于 96 孔板中。
- (2) 用封口膜或塑料粘合剂覆盖板，并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。
- (3) 去除包被溶液，用 200 $\mu$ L 磷酸盐缓冲盐水 +0.05% Tween20 (PBST) 洗板 2 次。并在纸巾上倒扣酶标板去除多余液体。

### 2. 封闭

- (1) 每孔加入 200 $\mu$ L 封闭缓冲液用于封闭未结合的蛋白结合位点。
- (2) 盖板上并在室温 (RT) 下孵育 2 小时或 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。
- (3) 用 200 $\mu$ L PBST 洗板 2 次，拍干多余液体。

### 3. 加入样品

- (1) 加入 100 $\mu$ L 已预先稀释好的待测样品和标准品。  
注意：为了获得准确的定量结果，需要将待测样品的信号与标准曲线的信号时刻进行比较。标准品（一式两份和一式三份）和空白必须一起运行并分析以确保准确性。
- (2) 盖板上并在室温下孵育 2 小时或 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时。
- (3) 用 200 $\mu$ L PBST 洗板 2 次，拍干多余液体。

### 4. 加入检测抗体

(1) 每孔加入 100uL 稀释好的检测抗体。

注意: 请务必检查检测抗体是否识别目标蛋白上与捕获抗体不同的表位。这可以防止干扰抗体结合。

(2) 盖板上并在 37°C 下孵育 1 小时。

(3) 用 PBS 洗板 4 次, 拍干多余液体。

(4) 加入 100μL 偶联二抗。

(5) 盖板上并在或 37°C 下孵育 30 分钟。

(6) 用 PBS 洗板 4 次, 拍干多余液体。

## 5. 检测

(1) 每孔加入 100μL 底物溶液。

(2) 充分显色后, 向孔中加入 100μL 终止液。

(3) 用酶标仪读取每个孔的吸光度。

(4) 绘制标准曲线, 其中 X 轴为浓度, Y 轴为吸光度。通过待测样本的吸光度以及标准曲线, 就能推算出待测样本的浓度。