

Elisa 间接法实验方案

间接 ELISA 法主要用于抗体的检测, 与直接 ELISA 相比, 间接 ELISA 用到酶标二抗, 具有更高的灵敏度, 只需要更少的标记抗体, 更经济。因为不同的一抗能够与单一标记的二抗一同使用, 所以间接 ELISA 还提供了更大的灵活性。间接 ELISA 实验的缺点是存在交叉反应 (酶标二抗直接与抗原结合), 可能会增加背景, 同时与直接 ELISA 相比, 间接 ELISA 实验多了二抗孵育的步骤, 实验周期增长。间接 ELISA 法适合测定样品中总抗体的浓度。

*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. 抗原包被

- (1) 加入 100 μ L 用碳酸氢盐/碳酸盐溶液稀释成一定浓度的抗原于 96 孔板中。
- (2) 用石蜡膜或塑料粘合剂盖住板, 并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。
- (3) 去除包被溶液, 用 200 μ 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) 加入 200 μ L 封闭缓冲液 (1%牛奶/PBS 或 1%BSA/PBS) 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 μ L PBST 洗板 2 次, 拍干多余液体。

3. 抗体孵育

- (1) 加入 100 μ L 预先用封闭缓冲液稀释到一定浓度的抗体。
- (2) 盖板上并在 37 $^{\circ}$ C下孵育 45 分钟。
- (3) 用 200 μ L PBST 洗板 2 次, 拍干多余液体。
- (4) 加入 100 μ L 预先用封闭缓冲液稀释好的偶联二抗。
- (5) 盖板上并在 37 $^{\circ}$ C下孵育 30 分钟。
- (6) 用 200 μ L PBST 洗板 2 次, 拍干多余液体。

4. 检测

- (1) 每孔加入 100 μ L 底物溶液。
- (2) 充分显色后, 向孔中加入 100 μ L 终止液。
- (3) 用酶标仪读取每个孔的吸光度。

5. 分析

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。