6.2 ELISA

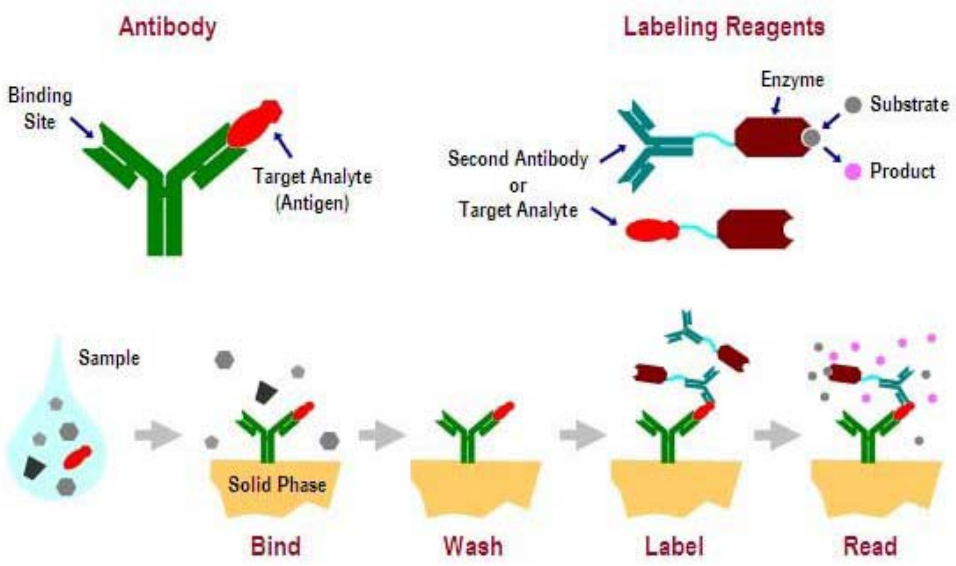
6.2.1 原理：

ELISA 的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。加入酶标记的抗原或抗体，通过反应也结合在固相载体上。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，根据呈色的深浅进行定性或定量分析。酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

6.2.2 特点：

某些分泌型蛋白，用 siRNA 干扰后可以用 ELISA 进行检测。

6.2.3 ELISA 实验流程示图（以双抗体夹心法为例）：



6.2.4 试剂与耗材：

1） 包被缓冲液（pH 9.6　0.05 M 碳酸盐缓冲液）：

Na_2CO_3	1.59 g
$NaHCO_3$	2.93 g
dd H_2O	至 1000 mL

2）洗涤缓冲液 (pH 7.4　0.15 M PBS)：

KH_2PO_4	0.20 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.90 g
NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Tween - 20	0.50 mL
dd H_2O	至 1000 mL

3）稀释液：

牛血清白蛋白（BSA）	0.10 g
洗涤液	至 100 mL

或

羊血清、兔血清等血清	10 mL
洗涤液	至 100 mL

4）终止液(2 MH_2SO_4)：

dd H_2O	178.3 mL
浓硫酸	至 200 mL
在水中逐滴沿壁加入浓硫酸，边加边搅拌	

5）底物缓冲液 (pH 5.0)：

0.2 M Na_2HPO_4（28.4 g/L）	25.7 mL
0.1 M 柠檬酸 (19.2 g/L)	24.3 mL
ddH_2O	至 50 mL

6）四甲基联苯胺(TMB)使用液:

TMB (10 mg/5ml 无水乙醇)	0.5 mL
底物缓冲液	10.0 mL
0.75%　H_2O_2	32.0 μL

7）2,2’-连氮基-双-3-乙基-苯丙噻唑啉磺胺（ABTS）使用液:

ABTS	0.5 mg
底物缓冲液	1.0 mL
3%　H_2O_2	2 .0 μL

8）抗原、抗体和酶标记抗体：按说明书处理。

9）标准品：用稀释液稀释成梯度浓度溶液。

10）96 孔聚苯乙烯塑料板 (酶标板)。

6.2.5 实验步骤（双抗体夹心法）：

1）包被：用包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为 1-10 μg/mL。在酶标板反应孔中加 0.1 mL，4°C 过夜。次日，弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗板 3 次，每次 3 min。

2）加样：加一定浓度稀释的待检样品（同时做空白对照，阴性对照孔及阳性对照）0.1 mL 于上述已包被的反应孔中，置湿盒中，37°C， 1 hr。用洗涤缓冲液洗板 3 次，每次 3 min。

3）加酶标抗体：于各反应孔中，加入新鲜稀释的酶标抗体 (经滴定后的稀释度) 0.1ml。37°C，0.5 - 1 hr，用洗涤缓冲液洗板 3 次，每次 3 min。

4）加底物液显色：于各反应孔中加入现配的 TMB 底物溶液 0.1 mL，37 ^{o}C，10 - 30 min。

5）终止反应：于各反应孔中加入终止液 0.05 mL。

6）结果判定：将酶标板在酶标仪上，于 450 nm (若 ABTS 显色，读 410 nm)，读数，输出到 Excel 中。

7）以标准品浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，生成标准曲线和直线回归方程式，根据公式计算未知样品的浓度，并记录。