



蛋白质生物学

通用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方案

详细介绍采用比色检测、化学发光检测、荧光检测技术的夹心 ELISA 检测通用方案。并提供直接检测和间接检测的操作步骤。

比色夹心 ELISA 方案

比色夹心 ELISA 检测方案是一种采用生物素化抗体和链霉亲和素-HRP 的间接检测方案。采用四甲基苯 (TMB) 作为辣根过氧化物酶 (HRP) 的检测底物。

所需材料	推荐产品	货号
透明的 96 孔板	Thermo Scientific™ Pierce™ 聚苯乙烯8联排管	15031
包被缓冲液 (50 mM 碳酸盐缓冲液, pH 9.4, 或 10 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)	Thermo Scientific™ BupH™ 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液包	28382
封闭缓冲液	Thermo Scientific™ SuperBlock™ (TBS) 封闭缓冲液	37535
洗涤缓冲液 (TBS 缓冲液或含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 缓冲液)	Thermo Scientific™ Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 缓冲液, 或 Pierce™ 20X PBS Tween™ 20 缓冲液	28360 或 28352
孔板封膜机	Thermo Scientific™ 96 孔微孔板密封带	15036
加样槽	Thermo Scientific™ ELISA 试剂加样槽	15075
链霉亲和素-HRP	Thermo Scientific™ Pierce™ 高灵敏度链霉亲和素-HRP	21130
TMB 底物溶液	Thermo Scientific™ 1-Step™ Turbo TMB-ELISA 底物溶液	34022
终止液 (0.16 M 硫酸)	Thermo Scientific™ TMB 底物硫酸终止液	N600
其它所需材料		
捕获 (包被) 抗体、生物素化检测抗体、标准品和样品、蒸馏水或去离子水、光吸收微孔板酶标仪 (例如, Thermo Scientific™ Multiskan™ FC 酶标仪)		

方案步骤

1. 用包被缓冲液稀释捕获抗体, 制备包被溶液。请参考第 5 页的“抗体稀释建议”或试剂生产商的说明书。
2. 用每孔 100 μL 的包被溶液包被孔板。盖上孔板, 在室温下孵育 1 小时, 或者在 2-8°C 温度下孵育过夜 (12-18 小时)。
3. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μL 的洗涤缓冲液洗涤 1 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
4. 在室温下, 每孔加入 300 μL 封闭缓冲液, 封闭 1 小时。
5. 吸掉各孔的封闭液, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
6. 用封闭缓冲液制备标准品和样品稀释液。
7. 将 100 μL 标准品 (一式两份) 和样品加入指定的孔中。在室温下温和持续地摇上 1-2 小时 (约 500 rpm)。
8. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
9. 用封闭缓冲液稀释检测抗体, 制备检测抗体溶液。具体的推荐抗体稀释浓度, 请参考试剂生产商的说明书。
10. 向每孔加入 100 μL 的检测抗体溶液。在室温下温和持续地摇上 2 小时 (约 500 rpm)。
11. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
12. 用封闭缓冲液按照 1:5,000 的比例稀释, 制备链霉亲和素-HRP 工作液。例如, 要制备满足 1 个孔板需求的工作液, 可以将 2 μL 链霉亲和素-HRP 与 9.998 mL 的封闭溶液混合, 制备出 10 mL 的工作液。
13. 向每孔加入 100 μL 的链霉亲和素-HRP 工作液。在室温下温和持续地摇上 1 小时 (约 500 rpm)。
14. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
15. 向每孔加入 100 μL 的 TMB 底物溶液。在室温下孵育孔板 30 分钟或者更长时间, 直到溶液达到所需的颜色强度为止。
16. 向每孔加入 100 μL 的终止液。
17. 加入终止液的 30 分钟内, 用酶标仪在 450 nm 的波长下测量每孔溶液的吸光度。
18. 用双对数直线拟合或四参数曲线拟合计算结果。

使用碱性磷酸酶系统

如果用碱性磷酸酶 (AP) 代替 HRP 作为酶偶联物, 则必须使用 AP 特定底物。将第 15 步的 TMB 底物溶液替换为对硝基苯磷酸盐 (PNPP) 底物溶液, 推荐产品: Thermo Scientific™ 1-Step™ PNPP 底物溶液, 货号: 37621。在室温下孵育 15-30 分钟。换用 50 μL 2 N NaOH 作为终止液来终止反应。用酶标仪在 450 nm 的波长下测量每孔溶液的吸光度。

化学发光夹心 ELISA 方案

化学发光夹心 ELISA 检测方案共分为两种类型：采用 HRP-偶联抗体的直接检测方案，采用生物素化抗体和链霉亲和素-HRP 的间接检测方案。检测底物是基于鲁米诺的底物。

所需材料	推荐产品	货号
不透明的 96 孔板	Thermo Scientific™ Pierce™ 96 孔聚苯乙烯板, 白色不透明	15042
包被缓冲液 (50 mM 碳酸盐缓冲液, pH 9.4, 或 10 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)	Thermo Scientific™ BupH™ 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液包	28382
封闭缓冲液	Thermo Scientific™ StartingBlock™ T20 TBS 封闭缓冲液, 或 StartingBlock™ T20 PBS 封闭缓冲液	37543 或 37539
洗涤缓冲液 (TBS 缓冲液或含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 缓冲液)	Thermo Scientific™ Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 缓冲液, 或 Pierce™ 20X PBS Tween™ 20 缓冲液	28360 或 28352
化学发光底物	Thermo Scientific™ SuperSignal™ ELISA Pico 化学发光底物	37070
链霉亲和素-HRP (适用于生物素化检测抗体)	Thermo Scientific™ HRP-偶联链霉亲和素	N100
加样槽	Thermo Scientific™ ELISA 试剂加样槽	15075
孔板封膜机	Thermo Scientific™ 96 孔微孔板密封带	15036

所需其它材料
捕获 (包被) 抗体、检测抗体、蒸馏水或去离子水、化学发光微孔板酶标仪 (例如, Thermo Scientific™ Luminoskan™ 化学发光微孔板酶标仪)

* 方案提示: 化学发光检测用黑色孔板和白色孔板都可以。白色孔板通常会比黑色孔板有更高的信号值, 若背景信号较强, 容易干扰检测结果, 则应该选择黑色孔板。

方案步骤

1. 用包被缓冲液稀释捕获抗体, 制备包被溶液。请参考第 5 页的“抗体稀释建议”或试剂生产商的说明书。
2. 用每孔 100 μ L 的包被溶液包被孔板。盖上孔板, 在室温下孵育 1 小时, 或者在 2-8 $^{\circ}$ C 温度下孵育过夜 (12-18 小时)。
3. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μ L 的洗涤缓冲液洗涤 1 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
4. 在室温下, 每孔加入 300 μ L 封闭缓冲液, 封闭 1 小时。
5. 吸掉各孔的封闭液, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
6. 用封闭缓冲液制备标准品和样品稀释液。
7. 将 100 μ L 标准品 (一式两份) 和样品加入指定的孔中。在室温下温和持续地摇上 1-2 小时 (约 500 rpm)。
8. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μ L 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
9. 用封闭缓冲液稀释检测抗体, 制备检测抗体溶液。具体的推荐抗体稀释浓度, 请参考试剂生产商的说明书。
10. 向每孔加入 100 μ L 的检测抗体溶液。在室温下温和持续地摇上 2 小时 (约 500 rpm)。
11. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μ L 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。如果用 HRP-偶联抗体作为检测抗体, 请直接转到第 15 步。
12. 用生物素化抗体作为检测抗体: 用封闭缓冲液按照 1:5,000-1:20,000 的比例稀释, 制备链霉亲和素-HRP 工作液。例如, 要制备满足 1 个孔板需求的工作液, 可以将 2 μ L 链霉亲和素-HRP 与 9.998 mL 的封闭溶液混合, 制备出 10 mL 的工作液。最佳稀释度请以实验结果为准。
13. 用生物素化抗体作为检测抗体: 向每孔加入 100 μ L 的链霉亲和素-HRP 工作液。在室温下温和持续地摇上 1 小时 (约 500 rpm)。
14. 用生物素化抗体作为检测抗体: 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 μ L 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
15. 将鲁米诺溶液和稳定型过氧化物溶液 1:1 等体积混合, 制备化学发光底物工作液。
16. 向每孔加入 100 μ L 的化学发光底物工作液。在室温下孵育 1 分钟。
17. 加入底物工作液的 1-5 分钟内, 用化学发光酶标仪 (~425 nm) 测量每孔溶液的相对光强度。加入底物工作液后, 如果隔了更长时间才开始测量, 信号强度可能会降低。

使用碱性磷酸酶系统

如果用碱性磷酸酶 (AP) 代替 HRP 作为酶偶联物, 则必须使用 AP 特定底物。将第 16 步中的鲁米诺底物工作液替换为 100 μ L Invitrogen™ CDP-Star™ 底物 (0.4 mM 即用型)、含 Sapphire-II™ 增强剂; 货号: T2214。在室温下孵育 5-10 分钟, 然后每 5 分钟用酶标仪测量一次结果, 直到发光强度达到最高才停止测量。发光强度通常在加入底物后的 20-30 分钟以内达到最高。

荧光夹心 ELISA 方案

荧光夹心 ELISA 检测方案共分为两种类型：采用 HRP-偶联抗体的直接检测方案，采用生物素化抗体和链霉亲和素-HRP 的间接检测方案。检测用的是荧光过氧化物酶底物。

所需材料	推荐产品	货号
黑色 96 孔板	Thermo Scientific™ 黑色 96 孔板	437111
包被缓冲液 (50 mM 碳酸盐缓冲液, pH 9.4, 或 10 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)	Thermo Scientific™ BupH™ 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液包	28382
封闭缓冲液	Thermo Scientific™ StartingBlock™ T20 TBS 封闭缓冲液, 或 StartingBlock™ T20 PBS 封闭缓冲液	37543 或 37539
洗涤缓冲液 (TBS 缓冲液或含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 缓冲液)	Thermo Scientific™ Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 缓冲液, 或 Pierce™ 20X PBS Tween™ 20 缓冲液	28360 或 28352
荧光过氧化物酶底物	Thermo Scientific™ QuantaBlu™ 荧光过氧化物酶底物试剂盒	15169
链霉亲和素-HRP (适用于生物素化检测抗体)	Thermo Scientific™ HRP-偶联链霉亲和素	N100
加样槽	Thermo Scientific™ ELISA 试剂加样槽	15075
孔板封膜机	Thermo Scientific™ 96 孔微孔板密封带	15036
所需其它材料	捕获 (包被) 抗体、检测抗体、蒸馏水或去离子水、荧光微孔板酶标仪 (例如, Thermo Scientific™ Fluoroskan™ FL 荧光化学发光微孔板酶标仪)	

方案步骤

1. 用包被缓冲液稀释捕获抗体, 制备浓度为 5-10 µg/mL 的包被溶液。
2. 用每孔 50-100 µL 的包被溶液包被孔板。盖上孔板, 在室温下孵育 1 小时, 或者在 2-8°C 温度下孵育过夜 (12-18 小时)。
3. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 µL 的洗涤缓冲液洗涤 1 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
4. 在室温下, 每孔加入 300 µL 封闭缓冲液, 封闭 1 小时。
5. 吸掉各孔的封闭液, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
6. 用封闭缓冲液制备标准品和样品稀释液。
7. 将 100 µL 标准品 (一式两份) 和样品加入指定的孔中。在室温下温和持续地摇上 1-2 小时 (约 500 rpm)。
8. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 µL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
9. 用洗涤缓冲液稀释检测抗体, 制备浓度为 0.05-0.1 µg/mL 的检测抗体溶液。
10. 向每孔加入 100 µL 的检测抗体溶液。在室温下温和持续地摇上 1-2 小时 (约 500 rpm)。
11. 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 µL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。如果用 HRP-偶联抗体作为检测抗体, 请直接转到第 15 步。
12. 用生物素化抗体作为检测抗体: 用洗涤缓冲液制备浓度为 0.05-0.1 µg/mL 的链霉亲和素-HRP 工作液。最佳稀释度请以实验结果为准。
13. 用生物素化抗体作为检测抗体: 向每孔加入 50-100 µL 的链霉亲和素-HRP 工作液。在室温下温和持续地摇上 1 小时 (约 500 rpm)。
14. 用生物素化抗体作为检测抗体: 吸掉各孔的液体, 每孔加 300 µL 的洗涤缓冲液洗涤 5 次。洗涤后, 倒置孔板, 在吸水纸上轻轻拍打, 清除残余液体。
15. 将 QuantaBlu 荧光过氧化物酶底物和 QuantaBlu 稳定过氧化物底物缓冲液以 9:1 的比例混合, 制备 QuantaBlu 底物工作液。
16. 向每孔加入 100 µL 的 QuantaBlu 底物工作液。在室温或 37°C 下孵育 1.5-90 分钟。
17. 向每孔加入 100 µL 的 QuantaBlu 终止液。这时候反应会立刻终止, 因此无需孵育等待。
18. 要避免出现气泡, 因为气泡会造成光散射, 使测得的信号值不准确。可以短暂地离心孔板, 去除气泡, 如果有大气泡, 可以用移液枪去除。
19. 测量相对荧光强度。QuantaBlu 底物的最大激发波长为 325 nm, 最大发射波长为 420 nm。检测时, 激发波长可选择 315-340 nm, 发射波长可选择 370-470 nm。

使用荧光标记检测抗体如果使用的是荧光标记检测抗体, 则不需要使用任何酶偶联物, 也不需要任何底物。第 11 步的操作完成后, 即可直接测量孔板荧光强度。标记抗体或标记蛋白的工作液浓度通常为 2-4 µg/mL。

直接固定抗原

在孔板中直接固定包含抗原的样品时, 不需要任何捕获抗体。用包被缓冲液制备不同浓度的样品, 再向每孔中分别加入等量的不同浓度样品。请参考上一页荧光夹心 ELISA 方案步骤的第 1 步-第 11 步, 再按照指示跳转到第 15 步, 完成所有操作。

使用酶联标记二抗

如果采用的是非生物素化检测抗体 + 酶联标记二抗的方案, 那么相比使用生物素化检测抗体 + 链霉亲和素-HRP 的方案, 酶生物信号的放大幅度会略低。因此, 相比链霉亲和素-HRP 方案的常规浓度, 需要略微增加该方案的酶联标记二抗-酶偶联体的浓度。

抗体稀释溶液的推荐浓度

根据不同的 ELISA 组分, 我们总结了下面的抗体稀释溶液的推荐浓度表。这些推荐浓度仅作参考, 要获得最佳结果, 还需要单独优化相应的组分浓度。

下表是 ELISA 优化时, 推荐采用的包被溶液和检测抗体起始浓度范围。未纯化的抗体虽然可行, 但是背景噪声可能更高。通常推荐使用经过亲和纯化的抗体获得最佳信噪比。

抗体类型	包被抗体	检测抗体
多克隆抗体	5-15 µg/mL	1-10 µg/mL
粗制腹水	5-15 µg/mL	1-10 µg/mL
经过亲和纯化的多克隆抗体	1-12 µg/mL	0.5-5 µg/mL
经过亲和纯化的单克隆抗体	1-12 µg/mL	0.5-5 µg/mL

下表是不同 ELISA 检测系统的检测抗体推荐浓度。请查看用户指南的底物浓度部分, 了解更具体的酶偶联体推荐浓度范围。

酶	ELISA 检测系统	推荐浓度
HRP	比色系统	20-200 ng/mL
	荧光系统	25-50 ng/mL
	化学发光系统	10-100 ng/mL
AP	比色系统	100-200 ng/mL
	化学发光系统	40-200 ng/mL

了解更多信息, 请浏览 thermofisher.com/elisa



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC