

Elabscience®

Focus on your research Service for life science

Elabscience®



## ELISA实验技术指南

让您的实验 >>>  
更省时、省力、省心!

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司  
Elabscience Biotechnology Co., Ltd

🌐 [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

☎ 027-65022280

✉ [marketing@elabscience.cn](mailto:marketing@elabscience.cn)

© 武汉市东湖新技术开发区高新大道858号生物医药园二期B18栋



官网二维码



微信公众号



技术支持微信

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

[www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)



## 关于我们

Elabscience®是一家专注于免疫检测类试剂研发、生产与销售的高科技公司，总部位于国家生物产业基地——光谷生物城，建有美国分公司与休斯顿研发中心。主要产品为ELISA试剂盒、流式抗体、代谢测定试剂盒、细胞功能检测试剂盒、标记试剂盒、抗体、蛋白、免疫相关试剂等。



**129** 项  
已授权发明专利 & 实用新型专利



**10000**<sup>+</sup> 篇  
SCI文献引用数量

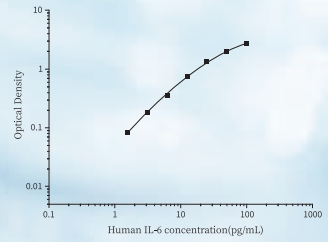


**46000**<sup>+</sup>  
总影响因子



# + CONTENTS 目录

ELISA实验原理	03	1
ELISA实验操作步骤	11	2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 直接法ELISA 11</li> <li>• 间接法ELISA 12</li> <li>• 夹心法ELISA 14</li> <li>• 竞争法ELISA 16</li> <li>• ELISA实验操作注意事项 18</li> </ul>		3
ELISA实验结果分析	21	4
<ul style="list-style-type: none"> <li>▮ 初始数据判读 21</li> <li>▮ 异常结果分析 22</li> <li>• 整板无信号或OD值偏低 22</li> <li>• 标曲OD值异常 23</li> <li>• 样本OD值异常 24</li> <li>• 标曲/样本复孔差异大 25</li> <li>• 空白孔背景值高 26</li> <li>• 标曲或样本全阳孔 27</li> </ul>		5
ELISA实验结果计算	20	6
ELISA实验FAQs	28	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 试剂盒类型 28</li> <li>• 样本类型 32</li> <li>• 数据处理类型 36</li> </ul>		



# 酶联免疫吸附(ELISA)

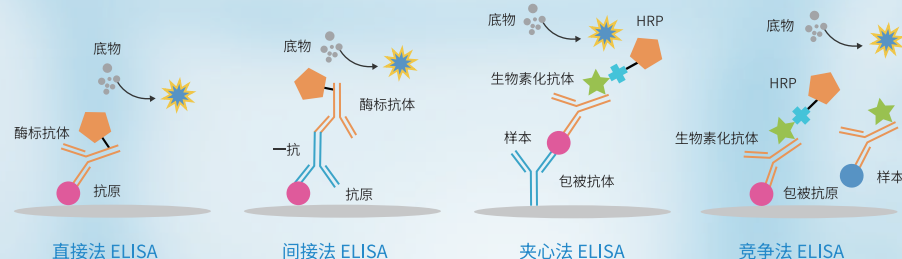
Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

ELISA  
实验原理

酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是目前应用最广泛的免疫学检测技术。它将抗原-抗体反应的特异性与酶催化作用的高效性相结合,通过酶作用于底物后的显色反应来判定结果。一般用酶标仪测定吸光度(OD值),来反映抗原或抗体的含量,灵敏度可达每毫升纳克(ng)水平甚至皮克(pg)水平。由于酶的催化效率很高,间接放大了免疫反应的结果,该测定方法能达到很高的敏感度。

## ◆ ELISA实验原理

目前,常用的ELISA方法有直接法、间接法、夹心法、竞争法。夹心法一般用于大分子蛋白的检测,竞争法一般用于小分子蛋白或化合物的检测。



## ◎ 直接法 (Direct ELISA)

### 原理

利用固相抗原与酶标一抗之间的特异性反应来检测抗原含量的一种方法。因为酶标抗体直接与固相抗原反应,故称为直接法。

## ◎ 间接法 (Indirect ELISA)

### 原理

间接法ELISA是检测抗体常用的方法。其原理是利用酶标记的二抗来检测与固相抗原结合的受检抗体,故称为间接法。

## ◎ 夹心法 (Sandwich ELISA)

### 原理

夹心法分为双抗体夹心法和双抗原夹心法,适用于检测具有多个识别位点的大分子蛋白等。

**双抗体夹心法ELISA**的原理,是先将特异性抗体结合在固相载体上,形成固相抗体,与待检样本中的相应抗原结合成抗原-抗体免疫复合物,再加酶标抗体,与免疫复合物中的抗原结合形成固相抗体-抗原-酶标抗体复合物,加底物显色,最后判断抗原含量。最终显色结果与待检抗原的量成正比。

**双抗原夹心法ELISA**的反应模式与双抗体夹心法ELISA类似。用固相抗原和酶标抗原,分别代替固相抗体和酶标抗体,即可测定样品中的抗体含量。最终显色结果与待检抗体的量成正比。

## ◎ 竞争法 (Competitive ELISA)

### 原理

竞争法主要用于检测只有一个识别位点的小分子蛋白。其原理是将特异性抗原结合在固相载体上,形成固相抗原,同时加入待检样本和酶标抗体,待检样本中的抗原和固相抗原会竞争性地与酶标抗体结合,然后加入底物显色。待检样本中的抗原越多,与酶标抗体结合的固相抗原就越少,显色也越浅。最终显色结果与待检抗原(或抗体)的量成反比。

ELISA  
实验原理

◆ ELISA常见样本处理方法

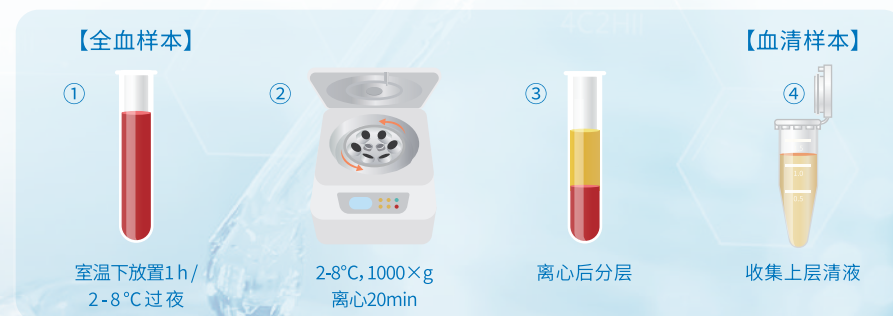
■ 四种ELISA方法的比较

方法分类	直接法	间接法	夹心法	竞争法
适用性	在实际中运用较少，只能测定酶标记的分子。	在临床诊断中是检测标志性抗体的重要手段。	适用于检测具有多个识别位点的大分子蛋白等。	适用于小分子抗原的测定，如激素和药物类。
优势	① 实验步骤少，检测速度快； ② 不需要用到二抗，避免了交叉反应，测定结果不容易出错。	① 不加酶标记的一级抗体能保留更多的免疫反应性，具有更高的灵敏度； ② 需要更少的标记抗体(二抗一般为多抗，可标记多个酶分子)，更经济。	高灵敏、高特异性，抗原无须事先纯化。	可适用于比较不纯的样本，数据重现性高。
劣势	① 由于抗原不是特异性固定，实验背景会比较高，灵敏度低； ② 检测对象有限，只能测定酶标记的分子。	① 发生交叉反应的机率较高(酶标二抗直接与抗原结合)； ② 实验中多了二抗孵育的步骤，实验周期延长。	① 抗原一定要拥有两个以上的抗体结合部位； ② 对配对抗体要求高，事先应优化降低捕获抗体与检测抗体之间的交叉反应性。	整体的敏感性和特异性都较差。

用于ELISA实验的样本有多种类型，包括血清、血浆、细胞培养上清、组织匀浆以及唾液、尿液等。不同样本类型的预处理方法存在差异。合适的样本预处理，是确保ELISA实验准确性的第一步。

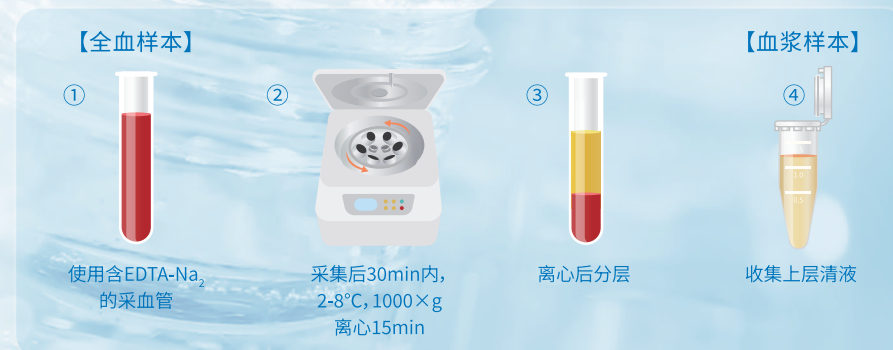
● 血清

使用不含抗凝剂的采血管收集血液样本，将样品于室温下放置1h或2-8°C过夜后，于2-8°C，1000×g离心20min，取上清，即可检测。



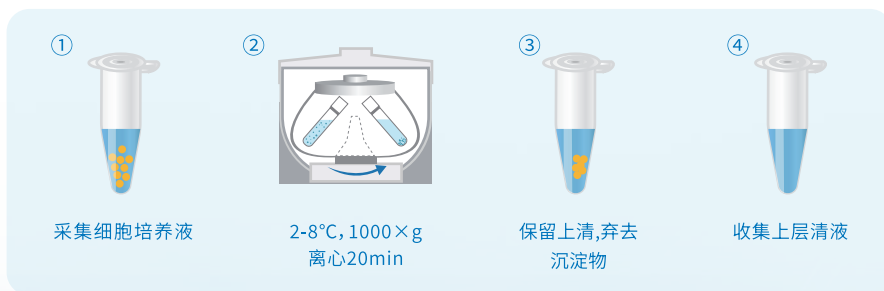
● 血浆

使用含抗凝剂的采血管收集血液样本，抗凝剂推荐使用EDTA-Na<sub>2</sub>，样品采集后30min内，于2-8°C，1000×g离心15min，取上清，即可检测。



## ● 细胞培养上清

将细胞培养上清液吸入离心管中,在2-8°C条件下,以1000×g离心20min,除去细胞碎片和杂质,取上清,即可检测。



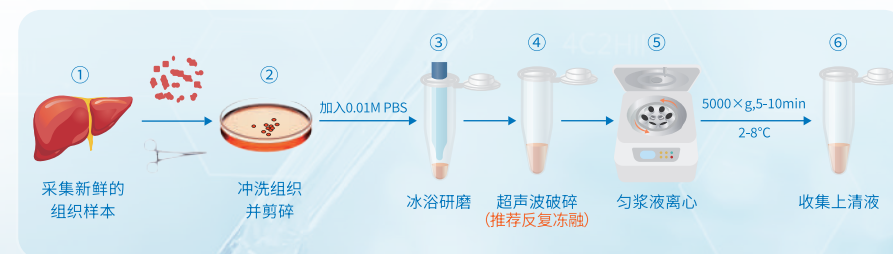
## ● 细胞提取液

- ① 用冷的PBS轻轻清洗贴壁细胞,使用胰蛋白酶消化,1000×g离心5min后收集细胞;悬浮细胞可直接离心收集;
- ② 将收集到的细胞用冷的PBS洗涤3次。每10<sup>6</sup>个细胞中,加入150-200μL PBS重悬(推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂,若含量很低,可减少PBS的体积),并通过反复冻融或超声使细胞破碎;
- ③ 将提取液于2-8°C,1500×g离心10min,取上清检测。



## ● 组织匀浆

- ① 用预冷的PBS(0.01M, pH7.4)冲洗组织,除去表面残留的血液或杂质;
- ② 将组织块称重,再切成尽可能小的碎块,以便充分匀浆;
- ③ 加入适量的预冷PBS(一般按1:9的重量体积比,比如1g组织样品对应9mL PBS,具体体积可根据实验需要适当调整,并做好记录。推荐在PBS中加入蛋白酶抑制剂),用玻璃匀浆器在冰上或冰浴中充分匀浆。为了进一步裂解组织细胞,可以对匀浆液进行超声破碎,或反复冻融;
- ④ 将匀浆液吸入离心管中,2-8°C条件下,以5000×g离心5-10min,取上清检测。



## ● 尿液

使用无菌容器收集尿液样本,在2-8°C条件下,以1000×g离心20min,除去杂质,取上清,即可检测。

## ● 唾液

使用无菌EP管收集唾液后,在2-8°C条件下,以4000×g离心10min,除去杂质,取上清,即可检测。建议使用新鲜的唾液样本。

## ● 乳汁

使用无菌容器收集乳汁样本,在2-8°C条件下,以1000×g离心15min,取澄清部分,再重复此过程2次,取澄清液,即可检测。

## ● 粪便

使用无菌容器收集粪便样本，以9mL/g的比例，向粪便中添加PBS缓冲液(0.01M, pH=7.4;可选择性添加0.05M EDTA)，置于冰上振荡15min。在2-8°C条件下，5000×g离心5-10min，取上清，即可检测。

## ● 其他生物体液

收集液体后，于2-8°C，1000×g离心20min，除去杂质及细胞碎片，取上清检测。

## ■■■ 样本注意事项

### 01 样本收集

- ⊗ 采集血液样本时，应尽可能**避免溶血现象**，同时也应**避免细菌污染**，以免造成假阳性结果。
- ⊗ **避免使用高血脂样本**。脂质会影响样本的均一性，且会影响抗原抗体的结合，从而导致测值准确性的降低。

### 02 样本保存

- ⊗ 样品收集处理后，若在**1周内**进行检测，可保存于**2-8°C**环境中；若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于**-20°C (1个月内检测)**或**-80°C (3个月内检测)**环境中，避免反复冻融。实验前，建议再次离心，除去沉淀物。

### 03 样本稀释

- ⊗ **试剂盒的检测范围不等同于样本的浓度范围**。如果样本中待测物的浓度高于标准品的最高值，请根据实际情况，做适当倍数稀释(建议查阅文献，并做预实验)。

## 04 样本成分

- ⊗ **处理细胞提取液或组织样本时，不建议使用商品化的裂解试剂**。裂解试剂中的部分成分，可能会破坏蛋白的空间构象，影响抗原抗体的结合，或造成基质干扰，最终影响实验结果。

## ■■■ 样本稀释方案

请提前预估样本的浓度范围，并通过**预实验**或**咨询技术支持**确定待检样本的稀释倍数。

如果您的检测样本需要稀释，稀释方案参考如下：

- ⊗ **稀释100倍**：一步稀释。取5μL样本到495μL标准品&样本稀释液内，做100倍稀释；
- ⊗ **稀释1000倍**：两步稀释。取5μL样本到95μL标准品&样本稀释液内，做20倍稀释，再取5μL 20倍稀释样本到245μL标准品&样本稀释液内，做50倍稀释，总共稀释1000倍；
- ⊗ **稀释100000倍**：三步稀释。取5μL样本到195μL标准品&样本稀释液内，做40倍稀释，再取5μL 40倍稀释样本到245μL标准品&样本稀释液内，做50倍稀释，最后取5μL 2000倍稀释样本到245μL标准品&样本稀释液内，做50倍稀释，总共稀释100000倍；
- ⊗ 每步稀释时取液量不少于3μL，稀释倍数不超过100倍。每步稀释都需混合均匀，避免气泡。

# ELISA实验操作步骤

## ● 直接法ELISA

直接法在实际中的运用较少,主要用于测定酶标记的分子。Elabscience®研发的ELISA试剂盒中,不含有直接法原理试剂盒(以下直接法操作步骤仅供参考)。

实验前,应将各试剂平衡至室温(试剂不能直接在37°C溶解)。稀释试剂或样品时,应确保混匀,同时尽量避免气泡。

### 操作步骤

- 1. 加样:** 每孔(除空白孔外)加HRP酶标记的待检抗体100 $\mu$ L, 酶标板加上覆膜, 37°C 孵育60min。
- 2. 洗板:** 甩尽孔内液体, 在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液350 $\mu$ L, 浸泡1min, 吸去或甩掉酶标板内的液体, 拍干。重复此洗板(可以使用洗板机)步骤5次。  
(注意:洗板完成后,请立即进行下一步操作,不要让微孔板干燥)
- 3. 加底物:** 每孔(含空白孔)加底物溶液(TMB)90 $\mu$ L, 酶标板加上覆膜, 37°C避光孵育15min左右。  
(注意:可根据实际显色情况,酌情缩短或延长时间,但不可超过30min。提前15min打开酶标仪预热)
- 4. 加终止液:** 每孔(含空白孔)加终止液50 $\mu$ L, 终止反应。  
(注意:终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同)
- 5. 酶标仪读数:** 立即用酶标仪在450nm波长处测量各孔的光密度(OD值)。

## 直接法ELISA操作步骤图 >>>



## ● 间接法ELISA

### 操作步骤

- 1. 加样:** 分别设定阳性对照、阴性对照、空白孔和样本孔。在对应板孔中, 分别加入100 $\mu$ L对照品和100 $\mu$ L待测样品, 空白孔中除了添加底物溶液和终止液外, 不额外添加任何试剂。给酶标板覆膜, 37°C孵育45min。  
(注意:加样时将样品加于酶标板底部, 尽量不触及孔壁, 轻轻晃动混匀, 避免产生气泡。加样时间宜控制在10min内)
- 2. 洗板:** 甩尽孔内液体, 在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液350 $\mu$ L, 浸泡1min, 吸去或甩掉酶标板内的液体, 拍干。重复此洗板(可以使用洗板机)步骤3次。  
(注意:洗板完成后,请立即进行下一步操作,不要让微孔板干燥)

3. **加酶标抗体**:每孔(除空白孔外)加HRP酶标抗体工作液100 $\mu$ L,酶标板上覆膜,37 $^{\circ}$ C孵育30min。
4. **洗板**:甩尽孔内液体,洗板5次,方法同步骤2。
5. **加底物**:每孔(含空白孔)加底物溶液(TMB)90 $\mu$ L,酶标板上覆膜,37 $^{\circ}$ C避光孵育15min左右。  
(注意:可根据实际显色情况,酌情缩短或延长孵育时间,但不可超过30min。提前15min打开酶标仪预热)
6. **加终止液**:每孔(含空白孔)加终止液50 $\mu$ L,终止反应。  
(注意:终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同)
7. **酶标仪读数**:立即用酶标仪在450nm波长处测量各孔的光密度(OD值)。

### 间接法ELISA操作步骤图 >>>



## ● 双抗体夹心法ELISA

实验前,应将各试剂平衡至室温(试剂不能直接在37 $^{\circ}$ C溶解)。稀释试剂或样品时,应确保混匀,同时尽量避免气泡。

### 操作步骤

1. **加样**:分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入100 $\mu$ L倍比稀释的标准品,空白孔加入100 $\mu$ L标准品&样本稀释液,其余孔加入100 $\mu$ L待测样本。给酶标板覆膜,37 $^{\circ}$ C孵育90min。  
(注意:加样时将样品加于酶标板底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀,避免产生气泡。加样时间宜控制在10min内)
2. **加检测抗体**:甩尽孔内液体,不用洗涤。每孔中加入生物素化抗体工作液100 $\mu$ L,酶标板上覆膜,37 $^{\circ}$ C孵育1h。
3. **洗板**:甩尽孔内液体,在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液350 $\mu$ L,浸泡1min,吸去或甩掉酶标板内的液体,拍干。重复此洗板(可以使用洗板机)步骤3次。洗板完成后,请立即进行下一步操作,不要让微孔板干燥。
4. **加HRP酶**:每孔加HRP酶结合物工作液100 $\mu$ L,酶标板上覆膜,37 $^{\circ}$ C温育30min。
5. **洗板**:甩尽孔内液体,洗板5次,方法同步骤3。
6. **加底物**:每孔加底物溶液(TMB)90 $\mu$ L,酶标板上覆膜,37 $^{\circ}$ C避光孵育15min左右。  
(注意:可根据实际显色情况,酌情缩短或延长孵育时间,但不可超过30min。当标准孔出现明显梯度时{前4个显色孔出现明显蓝色梯度},即可终止。提前15min打开酶标仪预热)
7. **加终止液**:每孔加终止液50 $\mu$ L,终止反应。  
(注意:终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同)
8. **酶标仪读数**:立即用酶标仪在450nm波长处测量各孔的光密度(OD值)。



## 双抗体夹心法ELISA操作步骤图 >>>



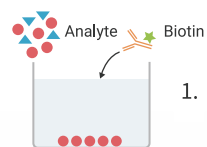
## ● 竞争法ELISA

实验前，各试剂应平衡至室温（试剂不能直接在37 $^{\circ}$ C溶解）。试剂或样品稀释时，确保混匀，同时尽量避免气泡。

### 操作步骤

1. **加样、加检测抗体**：分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入50 $\mu$ L倍比稀释的标准品，空白孔加入50 $\mu$ L标准品&样本稀释液，其余孔加入100 $\mu$ L待测样本。立即每孔加入配好的生物素化抗体工作液50 $\mu$ L。给酶标板覆膜，37 $^{\circ}$ C孵育45min。  
(注意：加样时将样品加于酶标板底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，避免产生气泡。加样时间宜控制在10min内)
2. **洗板**：甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干。每孔加洗涤液350 $\mu$ L，浸泡1min，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板（可以使用洗板机）步骤3次。洗板完成后请立即进行下一步操作，不要让微孔板干燥。
3. **加HRP酶**：每孔加酶结合物工作液100 $\mu$ L，酶标板上覆膜，37 $^{\circ}$ C温育30min。
4. **洗板**：甩尽孔内液体，洗板5次，方法同步骤2。
5. **加底物**：每孔加底物溶液（TMB）90 $\mu$ L，酶标板上覆膜，37 $^{\circ}$ C避光孵育15min左右。  
(注意：根据实际显色情况酌情缩短或延长，但不可超过30min。当标准孔出现明显梯度时（前4个显色孔出现明显蓝色梯度），即可终止。提前15min打开酶标仪预热)
6. **加终止液**：每孔加终止液50 $\mu$ L，终止反应。  
(注意：终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同)
7. **酶标仪读数**：立即用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度（OD值）。

## 竞争法ELISA操作步骤图 &gt;&gt;&gt;



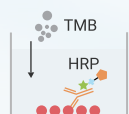
1. 对应板孔中加入50 $\mu$ L标准品工作液或样本后,立即每孔加入50 $\mu$ L生物素化抗体工作液,37 $^{\circ}$ C孵育45min



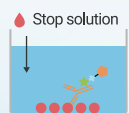
2. 弃掉板内液体,洗板3次



3. 每孔加入100 $\mu$ L HRP酶结合物工作液,37 $^{\circ}$ C孵育30min左右,弃掉板内液体,洗板5次



4. 每孔加入90 $\mu$ L底物溶液,37 $^{\circ}$ C孵育15min左右



5. 每孔加入50 $\mu$ L终止液



6. 立即在450nm波长下读数,处理数据

## ELISA实验操作注意事项

## 试剂盒的准备

实验中最重要检测工具就是ELISA试剂盒。对于ELISA试剂盒,我们要仔细阅读产品说明书,重点关注试剂盒的组成与保存条件、注意事项及产品性能,检查试剂盒效期是否在保质期内、各组分试剂溶液是否澄清足量、是否能够混用等。

如出现以上异常情况,需更换新的ELISA试剂盒。

**注意:**实验开始前,试剂盒各试剂组分均应平衡至室温(18-25 $^{\circ}$ C)。过程中使用的各工作液和洗涤液应现配现用。

## 加样

加样(移液)的一致性确保实验重复性的关键。加样时必须保持平稳、一致的速度。

加样时,应将待加物加在ELISA板孔的底部,避免加在孔壁上。尤其需要注意,不可溅出,不可产生气泡。

标准品和样品一般建议用微量加样器加样。每次加样时,应更换枪头,避免产生交叉污染。**加标准品时,需遵循“浓度由低到高依次加入,同一浓度平行加入”的原则。**

加酶结合物工作液、底物溶液和终止溶液时,可采用定量多道加液器,使加液过程迅速完成。整板加样时间建议不超过10min。

## 孵育

进行孵育操作前,需要检查加样是否有遗漏。若没有,需在酶标板上贴上大小合适的覆膜,并做上相应标记,水平拿酶标板框两侧,放入37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育。

**孵育过程中,须严格控制孵育温度及孵育时间。每一次孵育都要更换新的覆膜。**

## ◆ ELISA结果计算

## ● 洗涤

洗涤的具体操作包括弃液和洗涤，操作时需要注意：

**弃液操作：**将酶标板从恒温箱取出之后，应快速垂直甩尽酶标板孔中液体，避免孔间交叉污染，再在干净的吸水纸上拍干。每次拍板建议更换吸水纸，避免同一位置反复拍板，切不可让孔内液体自然干燥。

**洗涤操作：**可以手动洗涤或利用洗板机洗涤。洗板步骤需根据说明书中要求，重复洗涤3次或5次。洗涤过程中，洗涤液应现配现用、避免污染。同时应注意控制洗涤液的体积、洗涤次数和浸泡时间。

## ● 显色和比色

显色是ELISA实验中的最后一步孵育反应。加样前要观察显色液的颜色，若呈现淡蓝色或蓝色，需要立即更换为新的无色透明显色液。显色反应要避光进行，按规定控制反应温度与反应时间。

比色是整个ELISA实验的最后一步。在加入终止液终止反应后，应立即使用酶标仪，在450nm波长处，测量各孔的光密度(OD值)。

上机检测前，应注意提前15min打开酶标仪预热，设置好相应的参数，并应保证酶标板底部干燥、干净。如有水渍，需轻轻擦拭，保持洁净。

ELISA实验中，标准品或样本通常要设置1~2个复孔进行检测，分别计算出标准品、样本的平均OD值。

## ☞ 夹心法试剂盒

标准品和样本的OD平均值均要减去标准品浓度为0时的OD平均值，得到校正值；

## ☞ 竞争法试剂盒

标准品和样本的OD平均值不需要减去标准品浓度为0时的OD平均值。

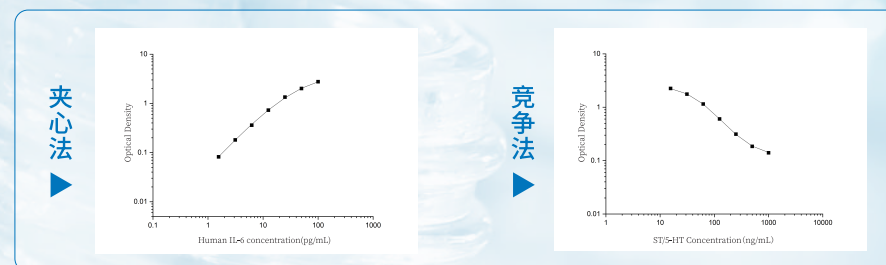
## ☞ 标准曲线拟合

以标准品浓度为横坐标，对应的OD值为纵坐标，用作图软件在双对数坐标上绘制出四参数逻辑曲线，此曲线即为标准曲线。

## ☞ 样本浓度计算

将样本OD值带入到标曲中，即得到相应的浓度。若实验前样本有进行稀释，样本实际浓度应为标准曲线上获得的浓度乘以稀释倍数。

## ELISA标准曲线图



推荐使用Origin软件进行拟合 ▶



关于Origin的详细操作步骤可参考官网：

<https://www.elabscience.cn/List-detail-198.html>

或关注Elabscience微信公众号-ELISA技术资源获取 ▶



## ◆ ELISA结果分析

### ● 初始数据判读

1. 空白对照OD值 $\leq 0.1$ (夹心法), 标曲最大OD值一般在1.2以上;
2. 样本OD值应落在标曲浓度范围内;
3. 精密度(SD/Mean\*100%) $\leq 10\%$ ;
4. 标准曲线线性系数 $R^2$ 应 $\geq 0.99$ 。

样本布局	1	2	3
A	standard 1	standard 1	Serum(neat)
B	standard 2	standard 2	Serum(neat)
C	standard 3	standard 3	Serum(1:50)
D	standard 4	standard 4	Serum(1:50)
E	standard 5	standard 5	Serum(1:1000)
F	standard 6	standard 6	Serum(1:1000)
G	standard 7	standard 7	--
H	blank 1	blank 2	--

OD值	1	2	3
A	2.289	2.263	2.972
B	1.627	1.617	3.013
C	1.104	1.088	0.886
D	0.651	0.612	0.893
E	0.382	0.375	0.059
F	0.211	0.202	0.067
G	0.119	0.115	--
H	0.040	0.042	--

#### 注意

1. 标曲光密度OD值范围:0-3.5之间;
2. 夹心法标曲拟合与样本浓度计算需采用校正OD值;
3. 不建议通过Excel进行直线或多项式标曲拟合;
4. 如果样本稀释倍数过大, 建议采用分步稀释。

▫ 样本OD值异常?

▫ 标曲/样本CV大?

▫ 空白背景值高?

▫ 标曲OD值异常?

▫ 整板无信号或OD值偏低?

▫ 标曲和样本全阳孔?

### ● 异常结果分析

#### 1. 整板无信号或OD值偏低



可能原因	相应对策
a. 试剂盒组分失活	使用新的试剂盒, 按照说明书要求保存试剂盒
b. 试剂盒组分未平衡	试剂盒每个组分都需要平衡至室温后进行实验
c. 试剂混用或混合不充分	保证使用试剂盒内完整的一套试剂进行实验; 保证溶液充分混合
d. 洗液被污染或洗板错误	配制新的洗液, 按照说明书的要求进行操作
e. 孵育时间不充分	保证充足的孵育时间
f. 孵育温度不稳定	检查恒温箱, 确保孵育温度稳定
g. 生物素化抗体或HRP酶结合物不足	保证浓缩液取量准确且稀释完全
h. 生物素化抗体或酶结合物稀释不正确或步骤颠倒	按照说明书的步骤和要求进行操作
i. 未加终止液	反应结束时, 确保每孔加入终止液, 终止反应

## 2. 标曲OD值异常

### 1) 标曲稀释线性差

标准品		可能原因	相应对策
2.590	2.598	a、标准品稀释不正确, 未充分混匀	每一步倍比稀释过程均需充分混匀, 使粉末完全溶解(吹打20次左右)
1.560	1.639		
1.222	1.240	b、吸液或加液不正确	检测移液器和吸头, 使用校准好的移液器和正确的移液方法
0.611	0.581		
0.661	0.618	c、孔间交叉污染	弃液时动作迅速, 拍板更换吸水纸
0.207	0.183		
0.150	0.155	d、洗涤不完全	保证洗涤时间、洗涤次数及每孔加样量
0.089	0.086	e、孵育温度不正确	按照说明书提供的孵育温度进行孵育
		f、上样时存在较大气泡	混匀时动作轻柔, 减少大气泡的产生

### 2) 标曲整体偏低

标准品		可能原因	相应对策
0.585	0.706	a、试剂盒保存不当	严格按照试剂盒说明书存放
0.341	0.307	b、试剂在使用之前未平衡至室温	实验前将试剂盒室温放置20min左右
0.211	0.226	c、工作液配置时间较久	使用前15min左右配置
0.112	0.122	d、工作液稀释比例不正确	需将100×工作液配置成1×工作液
0.082	0.091	e、试剂体积不够或漏加	检查洗液或加液过程, 保证所有试剂按顺序足量添加
0.075	0.066		
0.07	0.062	f、温育时间/温度未达到要求	采用37°C恒温箱孵育
0.053	0.073	g、底物作用时间较短, 显色不足	可延长显色时间, 一般不超过25min

## 3. 样本OD值异常

### 1) 标曲线性佳, 样本OD值偏低

标准品		样本	
2.442	2.439	0.165	0.123
1.801	1.799	0.341	0.307
1.165	1.164	0.411	0.426
0.639	0.641	0.212	0.222
0.411	0.409	0.227	0.291
0.347	0.341	0.375	0.366
0.258	0.275	0.107	0.162
0.046	0.033	0.253	0.173

可能原因	相应对策
a、基质效应	稀释样本可以降低基质效应
b、钩状效应	预估样本浓度, 选择合适的稀释倍数, 并通过预实验选择最佳稀释倍数
c、靶蛋白丰度不足	重复实验, 浓缩样本或选用灵敏度更高的试剂盒
d、样本处理或保存不当	确保正确采集与保存样本, 避免反复冻融
e、样本类型不适用	检测的样本类型不分泌检测的因子、不是均质澄清溶液(高脂/粘稠溶剂)、重组蛋白不能匹配抗体。应选择与检测样本类型相匹配的ELISA试剂盒

### 2) 标曲线性佳, 样本OD值高

标准品		样本	
2.442	2.439	3.165	3.723
1.801	1.799	2.341	2.307
1.165	1.164	3.411	3.426
0.639	0.641	3.412	3.422
0.411	0.409	2.827	2.791
0.347	0.341	1.375	1.366
0.258	0.275	1.607	1.662
0.046	0.033	1.253	1.173

可能原因	相应对策
a、样本浓度过高	稀释样本, 查找文献/咨询技术支持后, 通过预实验确定样本的最佳稀释倍数
b、样本处理或保存不当(含干扰显色的内源性成分)	确保正确采集与保存样本, 避免反复冻融
c、基质效应	稀释样本, 可以降低基质效应

### 4. 标曲/样本复孔差异大

标准品		样本	
2.458	2.306	0.765	0.423
1.566	1.327	0.341	0.307
0.953	0.945	0.211	0.426
0.46	0.852	0.412	0.422
0.277	0.264	0.827	0.791
0.168	0.174	0.675	0.366
0.12	0.137	0.607	0.662
0.046	0.053	0.453	0.473

精密度  
(SD/Mean\*100%) ≤10%

### 5. 空白孔背景值高

标准品		样本	
2.442	2.439	0.765	0.723
1.801	1.799	0.341	0.307
1.165	1.164	0.411	0.426
0.639	0.641	0.412	0.422
0.411	0.409	0.827	0.791
0.347	0.341	0.375	0.366
0.258	0.275	0.607	0.662
0.184	0.202	0.253	0.173

空白对照

一般建议夹心法  
指标空白孔OD值 ≤0.1

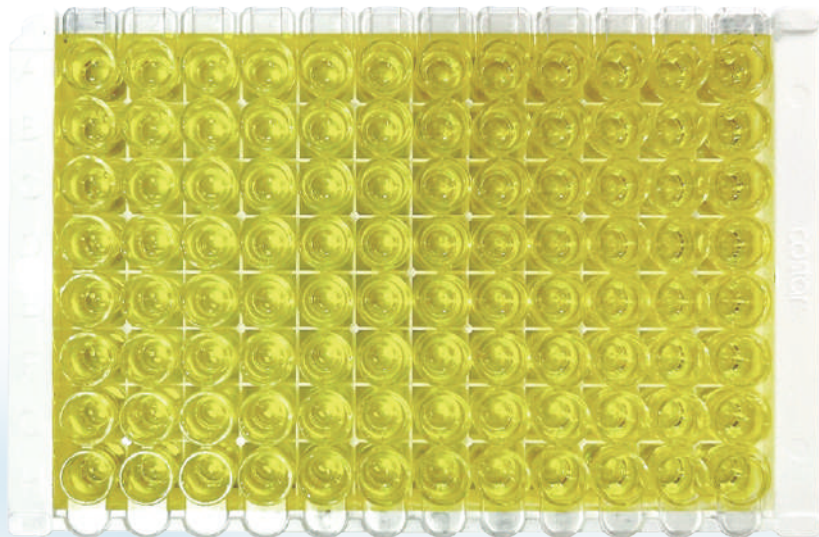
ELISA  
结果分析

可能原因	相应对策
a、加样量孔间不一致	检测加样情况, 使用校准好的移液器和正确的移液方法
b、加样时, 加在孔壁上部非包被区	加样枪头不要贴壁和触底
c、混用其他试剂盒试剂	保证使用试剂盒内完整的一套试剂进行实验, 不同品牌及不同批次间的试剂可能存在不匹配现象
d、样品或试剂混合不充分	保证样品和试剂充分混匀
e、洗板不彻底	按照说明书规定, 进行洗板操作
f、加入底物溶液和终止液的顺序不一致	确保所有加液步骤顺序的一致性
g、酶标板孔溶液存在气泡	加液时应规范操作, 避免产生气泡, 确保读取酶标板前不存在气泡
h、试剂盒组分未平衡	确保酶标板和每个组分均平衡至室温后, 再进行实验
i、样本保存不当	确保正确采集与保存样本, 避免反复冻融
j、终止不充分	终止后的溶液, 需要在完成振板操作后, 再进行读数

ELISA  
结果分析

可能原因	相应对策
a、试剂盒组分失活	使用新的试剂盒, 按照说明书要求保存试剂盒
b、试剂盒组分未平衡	试剂盒每个组分都需要平衡至室温后进行实验
c、混用其他试剂盒试剂	保证使用试剂盒内完整的一套试剂进行实验, 不同品牌及不同批次间的试剂可能存在不匹配现象
d、洗液被污染	配制新的洗液
e、检测抗体/酶结合物工作液浓度过高	使用说明书中推荐的稀释倍数
f、酶标板洗涤不充分	保证每步洗涤完全, 洗板时使用试剂盒配备的洗涤液, 防止交叉污染
g、酶标板拍板不完全	充分拍板至孔内无明显残留液体
h、孵育温度过高	检查恒温箱, 确保孵育温度稳定在37°C
i、孵育时间过长	按照说明书的反应时间进行孵育

## 6. 标曲和样本全阳孔



## ◆ ELISA实验FAQs

## 试剂盒

Q<sub>1</sub> 96T试剂盒能检测多少样本？是否需要做复孔？

A<sub>1</sub> 为了保证实验结果的准确性，我们建议标准品和样品都做复孔，但并不要求ELISA实验一定要做复孔/三复孔，您可以根据自己的需求设定复孔实验。详细信息见下表：

规格	标曲	样本	可检测样本数
96T	不做复孔	不做复孔	88
	做复孔	不做复孔	80
	不做复孔	做复孔	44
	做复孔	做复孔	40

Q<sub>2</sub> 试剂盒中的标准品稀释后还能再使用吗？

A<sub>2</sub> 由于标准品本身是冻干粉，溶解后会发生形态改变，且浓度降低，相对于粉末状，其稳定性会降低许多，如果直接溶解并放置于室温，直至做完整个实验，是不能再次使用的。

如果确实需要做多次实验，且中间存在时间间隔，建议将刚溶解充分的标准品进行分装(2-3支)，1支做本次试验，剩余即刻放-20℃(恒定该温度)保存，半月内使用基本无明显影响。

可能原因	相应对策
a、试剂盒组分被污染	使用新的试剂盒，按照说明书要求保存试剂盒
b、试剂配制不正确	按照试剂盒说明书的步骤，配制相应的试剂溶液
c、吸液或加液不正确	检测移液器和吸头，使用校准好的移液器和正确的移液方法
d、混用其他试剂盒试剂	保证使用试剂盒内完整的一套试剂进行实验，不同品牌及不同批次间的试剂可能存在不匹配现象
e、洗涤次数不够	按照说明书的洗涤次数进行操作
f、孵育温度不正确	按照说明书提供的孵育温度进行孵育
g、孵育时未覆膜，导致溶液挥发污染	加封口膜，或者加盖进行孵育
h、显色时间过长	根据实际显色情况，酌情缩短或延长时间，一般为15min左右，但不可超过30min
i、酶标仪设置错误	在酶标仪上检查波长和滤光片设置

### 试剂盒内/试剂盒间各个组分可以混用吗？样本稀释液可以用生理盐水/PBS替代吗？

Q3

试剂盒内各种稀释液不能混用。不同批次试剂盒内各组分不能混用(终止液除外)。

试剂盒内配有专门的标准品&样本稀释液,可用于稀释样本。如果样本稀释液缺漏,不建议直接用生理盐水/PBS替代。这两种溶剂跟试剂盒体系不能完全匹配,可能对测值结果的准确性造成影响。

A3

### 试剂盒要使用多次,但样本较多,是否可以只做一次标曲？

Q4

虽然ELISA的操作步骤是相同的,但每次实验的各种影响因素都有所变化的,所以每次实验时,必须重新制作标准曲线,以便得到更准确可靠的检测结果。

如果需要做多次实验,溶解后的最高浓度标准品可以分装保存于-20℃下,避免反复冻融,半月内使用有效(若说明书有额外强调溶解后标准品的保存和使用,请参照说明书的要求)。

A4

### 需检测的样品较多,可否减少标曲的孔数？

Q5

为保证结果的准确度,不建议减少标曲的孔数,请确保能够检测至少6个不同的标准品浓度(含空白孔)。

A5

Q6

### 试剂盒96孔板,第一次使用后可以间隔3个月后再用吗？

A6

我们的试剂盒有效期为半年,拆封后,您只需按照说明书上的存放温度,分组分保存即可。试剂盒在存储无问题的情况下,3个月后使用问题不大,但需要注意:4℃下放置试剂时,不要贴冰箱内壁存放,可能会因为冰箱出霜冻结而影响试剂的活性。

如果您需要进行多次实验,请将不用的板条提前拆卸,并放置于铝箔袋中,按照说明书要求的温度密封保存。

Q7

### 样本/试剂体积不够,可否统一减少上样体积？

A7

不能统一减少样本/试剂上样体积后检测。

ELISA实验中,每一步的上样体积都需要严格遵照说明书要求,否则,实验体系改变,结果会不准确。如果您的样本体积确实不够,请及时联系技术支持,确认样本是否能够稀释,并通过预实验判断样本浓度情况。如果试剂体积不够,请根据实际体积减少待测孔数,不能稀释后再检测。

Q8

### 试剂盒的准确性和稳定性如何？

A8

试剂盒的准确性和稳定性都是很好的。所有产品在发货前必须经过严格的三步质检,来保证产品质量。另外,我司自主研发了试剂盒的特殊稳定剂,可以很好地保障各组分的活性。



## 科研试剂盒与临床试剂盒的区别？

Q<sub>9</sub>

### 【行业监管】

科研试剂盒无专门机构监管，受科技、动物防疫等方面主管部门管理。无专门强制法律规定，产品无需注册。

临床试剂盒由国家食品药品监督管理局等管理；有十分严格的法律、法规监管体系。检测试剂需经过临床验证，取得医疗器械注册证。

### 【产品应用】

科研试剂盒用户主要为科研工作者，最终目的在基础性研究中取得实验数据和实验结论。要求产品的多样性（样本类型广、检测范围宽等）、检测的准确性、产品开发速度及技术服务的完善。单个产品批量小，但产品品种繁多。

临床试剂盒属于应用性研究，对研究成果的安全性和有效性有更严格的要求。因直接涉及人类健康，指标偏少但产品标准化程度高，单个产品批量大。

A<sub>9</sub>

## 试剂盒的保质期有多久？货期多久？如何运输？

Q<sub>10</sub>

试剂盒的有效期为6个月；货期为2-3个工作日，加冰袋顺丰发货，保证稳定的4℃运输条件。

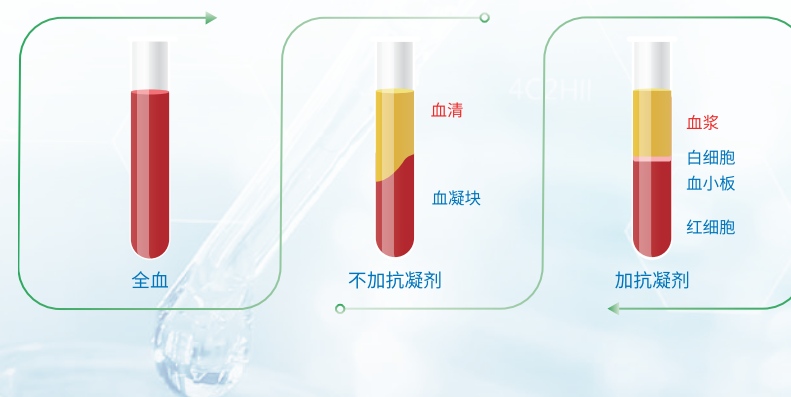
A<sub>10</sub>

## 血清与血浆的区别？

A<sub>1</sub>

根据收集的条件不同，全血分为不抗凝和抗凝两种。

不抗凝分离出的上层黄色液体，我们称之为血清；抗凝分离出的上层黄色液体，我们称之为血浆。**血清中不含有纤维蛋白原和某些凝血因子。**



## 血清血浆样本应该选用哪种真空采血管收集？

A<sub>2</sub>

**【血清】**选择不含抗凝剂的采血管或含促凝剂采血管，血液会凝固。

根据管盖颜色通常分为：

- 红色：不含添加剂，不含抗凝剂；
- 橘色：含促凝剂；
- 黄色：含促凝剂和惰性分离胶。

**血浆：**选择含抗凝剂采血管，血液不会凝固。

根据管盖颜色通常分为：

- 紫色：含EDTA盐抗凝剂；
- 绿色：含肝素盐抗凝剂。

## 大小鼠可以采集多少血量？

Q<sub>3</sub>

根据实验方案所需采血量的要求，我们可以选择不同的采血方式。

A<sub>3</sub>

采血方法	适宜动物	采血量 (mL)	采血次数	操作难易	应用
鼠尾采血	小鼠	0.1~0.2	可多次	较易	适用于少量采血， 损伤较小
	大鼠	0.2~0.4			
眼眶静脉丛采血	小鼠	0.2~0.3	可多次	易	适用于多次采血， 损伤较小
	大鼠	0.4~0.6			
摘眼球采血法	小鼠	0.6~1.0	不可多次	较易	采血后被处死， 损伤较大
	大鼠	较少用			
心脏采血	小鼠	0.5~0.8	不可多次	较难	适用于终末期 采血，损伤大
	大鼠	1.0~1.5			
断头采血	小鼠	0.8~1.2	不可多次	较易	采血后被处死， 损伤大
	大鼠	3.0~8.0			

## 如何避免溶血的产生？

Q<sub>4</sub>

溶血可由多种理化因素和毒素引起。在体外，机械性强力振荡、低温冷冻等诱因均可引起溶血。为避免溶血对检测结果产生影响，

A<sub>4</sub>

**应注意：**

- (1) 静脉采血时，回抽压力不宜过大；
- (2) 一次性采血量不宜过少；
- (3) 采集的全血不宜激烈振荡；
- (4) 离心转速不宜过大；
- (5) 收集的全血需尽快处理成血清/血浆，全血不能冻融；
- (6) 若需要麻醉采血，需使用没有溶血作用的麻醉剂。

Q<sub>5</sub>

## 高脂样本该如何处理？

A<sub>5</sub>

高脂样本含有脂肪，不是均质溶液，若直接上样，会影响抗原抗体的结合，导致测值不准确。建议先大转速 (5000×g) 离心，静置10min后，取中层较澄清液体，再用大转速 (≥5000×g) 离心一次，取中下层清液，用于检测。

Q<sub>6</sub>

## 组织或细胞样本收集时“反复冻融”的操作方法：

A<sub>6</sub>

**【组织样本】**完成组织研磨后，将其于-80℃放置1h/液氮放置0.5h，再置于30℃水浴锅中轻微振荡，使其迅速融化。此操作反复1-2次即可。

**【细胞样本】**按上述冻融的操作反复2-3次。若为膜蛋白，可适当超声，但需要控制好超声的温度和频率。

建议在样本中提前加入蛋白酶抑制剂。常规推荐使用PMSF。

Q<sub>7</sub>

## 组织或细胞样本收集时“超声处理”的操作方法：

A<sub>7</sub>

使用超声波细胞破碎器，超声处理悬浮液来裂解细胞 (参考：用Soniprep150超声波发生器，以振幅14μm超声处理30s，破碎细胞；或者用超声破碎仪，200W，2s/次，间隙3s，总时间3-5min或者400安培，5s/次，间隙10s，反复3-5次)，再于2-8℃，以1500×g离心10min，除去细胞碎片，收集上清液。超声过程中应注意温度。

## 能否使用商品化/自配的裂解液？

Q<sub>8</sub>

不建议使用商品化/自配的裂解试剂。

不同的产品组成有差异，且裂解能力也不同，如果试剂含有SDS等表面活性剂，会对目的蛋白的天然构象造成影响，可能会出现测值明显降低或者假阴性。此外，由于是新引入的溶剂，不确定基质干扰的情况，可能会造成本底升高，从而影响测值准确性。

A<sub>8</sub>

## 如何判断我的样本是否需要稀释？

Q<sub>9</sub>

试剂盒的检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。建议实验前通过相关文献预估样本中待测物的浓度，并通过预实验确定样本的实际浓度情况。

如果是常规样本类型，可以咨询ELISA技术支持，以获取样本的推荐稀释倍数，并安排预实验检测。

如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。如果样本中的分析物浓度远低于试剂盒的最低检测限，建议选择灵敏度更高的试剂盒来检测。

A<sub>9</sub>

## 炎症因子要检测细胞提取液还是细胞培养液呢？

Q<sub>10</sub>

细胞提取液与细胞上清液一般都是可以检测的，具体要看您的实验目的和研究内容。但细胞提取液样本组分复杂，且制备较为繁琐，建议优先考虑检测细胞上清液。

A<sub>10</sub>

## 样本推荐的保存方法？

Q<sub>11</sub>A<sub>11</sub>

样品收集处理后，若在1周内进行检测，可保存于2-8℃条件下，若不能及时检测，请按一次使用量分装，冻存于-20℃(1个月内检测)或-80℃(3个月内检测)条件下，避免反复冻融。检测前，应将冷冻过的样本缓慢融化并离心，除去冻融过程中产生的沉淀物。室温下混匀后再使用。

## 数据处理

### Q<sub>1</sub> 标准曲线使用的是什么拟合函数？可以用Excel来制作标曲吗？为什么我做出的标准曲线不是一条直线？

A<sub>1</sub>

推荐使用Origin软件，或者其他含有4-PL(四参数logistic)函数模型的软件，去拟合得到标准曲线。4-PL拟合方式能够更精确地反映浓度和吸光度的线性关系，从而更准确地获得样品中待测物质的浓度值。Excel拟合方式一般为直线和多项式，这两种拟合方程均不推荐作为ELISA标曲的拟合方式。

### Q<sub>2</sub> ELISA标准曲线的R<sup>2</sup>多少合格？

A<sub>2</sub>

R<sup>2</sup>可以判断拟合标曲的可靠性，R<sup>2</sup>>0.99的标曲才能保证样本计算结果的准确性。如果个别标曲孔由于操作误差而影响了标曲的拟合线性，可以减少/剔除个别标曲孔后拟合，不会明显影响样本结果的计算。

## 说明书中的标曲可以直接用来计算吗？我的实际标曲的OD值及图像与说明书上有差异是什么原因？

Q<sub>3</sub>

说明书上的标曲是指示标曲，主要是用于呈现拟合后标曲的形态以及最高/最低OD值的质控范围，不能直接使用。此外，受实验操作、实验环境以及仪器参数设定等因素的影响，您实际做的标曲OD值可能会跟说明书不完全一致（整体偏高或偏低）。这种情况下，建议在显色阶段控制前4个蓝色孔有明显颜色梯度，以及标曲最大OD值在1.2以上，标曲的相关系数在0.99以上，即可作为有效标曲。

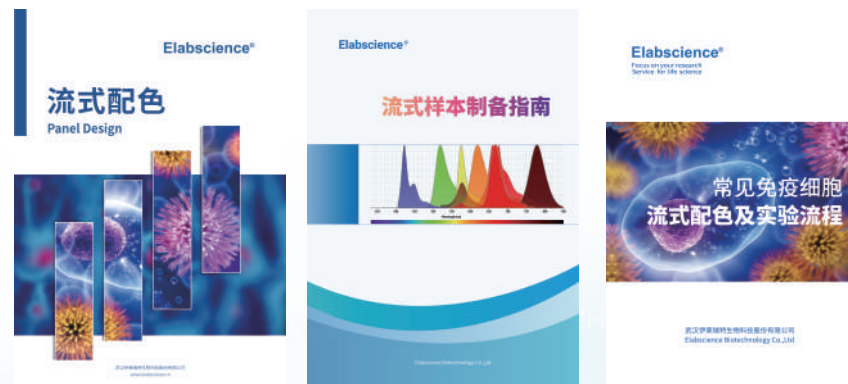
A<sub>3</sub>

如果您在使用Elabscience®产品的过程中，有任何产品售后或技术相关问题，可以扫描下方二维码进行咨询（建议及时对显色结果拍照，保留实验数据、所用板条及未使用的试剂）。技术支持团队24h在线服务，只为协助您顺利完成实验！

技术支持微信 ▶



## 其他技术资料



## 技术平台

