



ELISA 检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器有限公司	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司	Multiskan FC
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
5ml 离心管	科兔生物	KTL-50-P
50ml 尖底离心管	科兔生物	KTL-500-P
200 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H200-W
1000 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H1000-W
1250 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H1200-W
单道移液枪 2-20 μ L	科兔生物	KTY-20
单道移液枪 5-50 μ L	科兔生物	KTY-50
单道移液枪 10-100 μ L	科兔生物	KTY-100
单道移液枪 20-200 μ L	科兔生物	KTY-200
单道移液枪 100-1000 μ L	科兔生物	KTY-1000

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
XX ELISA 检测试剂盒		

二、实验步骤

1. 样本处理:

使用血清分离管,使样品在室温下凝结 30 分钟,然后在 1000×g 下离心 15 分钟。立即取出血清并进行测定或等分装样品,将样品储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 的温度下。避免重复冻融循环。

2. 试剂准备

(1) 使用前将所有试剂置于室温平衡 30 分钟左右。

(2) 洗涤液/稀释液配置:如果洗涤液/稀释液(20×)有晶体析出,需在 37°C 下加热至晶体全部溶解。用蒸馏水 1:20 稀释(例如:1mL 浓缩洗涤液加入 19mL 的蒸馏水)。

(3) 标准品配置:试剂盒中取出标准品,准备 7 个试管,先从标准品按需吸取一定量用 1×稀释液稀释,随后在 6 个试管中分别加入 500 μL 的 1×稀释液,在这 6 个单独的试管中标准品依次 2 倍倍比稀释至 6 个梯度,共配制 7 个浓度的标准品,从最高浓度标准品溶液中吸取 500 μL 标准品到下一个试管中,轻轻吹打混匀,以此类推进行标准品的倍比稀释,1×稀释液用作零浓度标准品(0ng/mL)。

(4) 抗体工作液配置:使用前 10 分钟,用 1×稀释液将 100×生物素化抗体稀释成 1×生物素化抗体工作液,根据所需用量配置。

(5) 酶结合物工作液配置:使用前 10 分钟,用 1×稀释液将 100×SA-HRP 稀释成 1×SA-HRP 工作液,根据所需用量配置。

3. 实验流程

(1) 酶标板准备:确定试验所需要的孔数,取下未使用的酶标条放回装有干燥剂的铝箔袋。

(2) 样本孵育:每孔分别加入 100 μL 不同浓度的标准品以及预处理过的待测样品,盖上封板胶纸,37°C 避光反应 1.5h。孵育结束后,每孔加入 300 μL 1×洗涤缓冲液,轻轻晃动 30 秒,甩干并在纸上拍干,以这种方式清洗 3 次。

(3) 抗体孵育:每孔加入 100 μL 生物素化抗体工作液,轻轻混匀,盖上封板胶纸,37°C 避光反应 1h。孵育结束后,重复步骤 2 中的清洗方式清洗 4 次。

(4) 酶标孵育:每孔加入 100 μL 1×SA-HRP 工作液,盖上封板胶纸,37°C 避光反应 30 分钟,清洗 4 次,拍干。

(5) 底物显色:每孔首先加入 50 μL 显色液 A,随后加入 50 μL 显色液 B,轻轻混匀,盖上封板胶纸,37°C 避光反应 15 分钟。(根据样品和对照抗体的颜色,自行控制显色时间)。

(6) 终止反应:待显色反应结束后,每孔加入 50 μL 终止液,轻轻混匀,5 分钟内用预热完成



的酶标仪在 450nm 处测吸光值。

4. 结果计算

计算标准品和样本复孔的平均 OD 值并减去空白孔的 OD 值作为校正值。以浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出四参数逻辑函数的标准曲线(作图时去掉空白组的值)。或者使用能够生成四参数逻辑(4-P)曲线拟合的计算机软件来创建标准曲线。

若样品 OD 值高于标准曲线上限, 应适当稀释后重测并在计算样本浓度时乘以相应的稀释倍数。

计算出各样本含量, 以 EXCLE 表发送结果。

仅供科研用途, 不可用于临床诊断!