



生物化学实验

免疫学实验技术

6.5 酶联免疫吸附测定-间接法 测定抗血清效价

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- **酶联免疫吸附测定 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 简称ELISA)** 是基于抗原抗体的特异性反应和酶的高效催化作用相结合的实验技术，可用于测定抗原或抗体，是酶免疫测定中应用最广泛的技术。
- **ELISA实验具有灵敏度高、特异性强、分析快速及通量高等优点，广泛用于生物学研究、医学临床诊断等领域。**

实验原理

- ELISA测定是基于抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记，加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与样品中待测目的物的量直接相关，由此可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。
- ELISA测定过程中包括一次或数次免疫学反应和一次酶促反应，反应是在**微量反应板（酶标板）的测定孔表面**进行，首先是抗原与抗体之间的特异性结合，然后加入酶标记的抗原或抗体，再加入酶相应的底物，发生酶促反应生成有色产物，通过酶标仪测定产物的吸光值，定性或定量测定抗原或抗体。

常用ELISA测定法

间接法

- 检测特异性抗体的常用方法
- 测定抗体的效价

双抗体夹心法

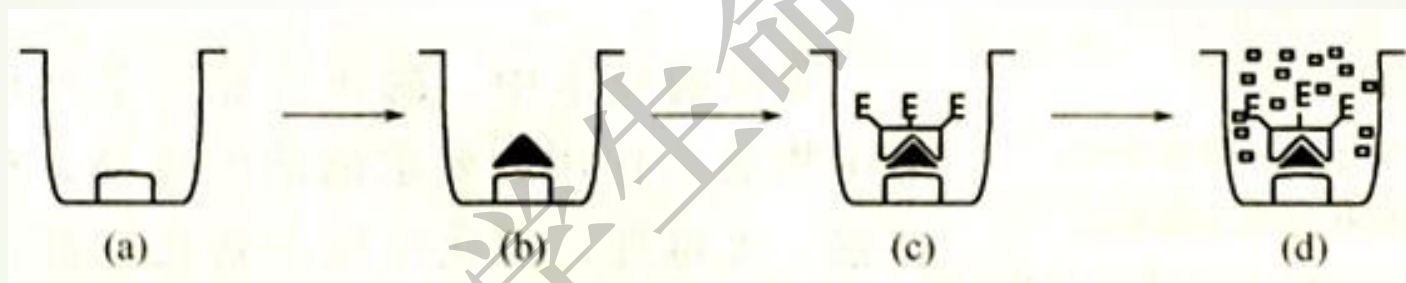
- 检测抗原最常用的方法
- 常用于检测大分子的可溶性抗原

竞争法

- 适用于小分子半抗原的定量测定
- 可用于测定抗体

间接法测定抗体效价

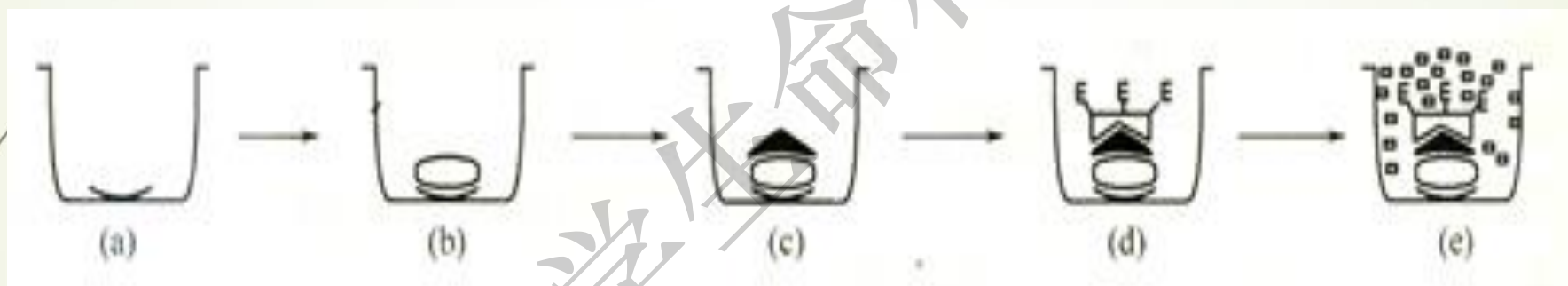
- 间接法是检测抗体常用的方法。其原理为利用酶标记的抗抗体（抗人免疫球蛋白抗体）检测与固相抗原结合的待测抗体，故称为间接法。



- (a) 将抗原吸附于固相载体表面；
- (b) 加入待测抗体，温育，生成抗原-抗体复合物；
- (c) 加入酶标记抗抗体，温育，生成抗原-抗体-酶标记的抗抗体复合物；
- (d) 加入底物生成有色产物，测定吸光值。

双抗体夹心法测定抗原量

- 双抗体夹心法常用于检测血清、脑脊液、细胞培养上清、腹水等各种液相中的可溶性抗原。



- (a) 将抗原免疫第一种动物获得的抗体吸附于固相载体表面；
- (b) 加入抗原，温育后形成抗原-抗体复合物；
- (c) 加抗原免疫第二种动物获得的抗体，温育后形成抗体-抗原-抗体复合物；
- (d) 加入抗第二种动物抗体的酶标记抗抗体，温育；
- (e) 加入底物生成有色产物，测定光吸收值。

实验目的

1. 了解酶联免疫吸附测定ELISA的实验原理及实验过程
2. 掌握间接法测定抗血清效价的实验方法

实验器材

材料

- 抗原：纯化的GFP蛋白（浓度 3 mg/mL）
- 待测抗体（anti-GFP的兔抗血清）
- 酶标抗抗体（HRP酶标羊抗兔抗体）

仪器

- 电热恒温培养箱
- 酶标仪
- 8孔可拆卸酶标条
- 可调式移液器

实验试剂及配方

- **包被液:** 50 mmol/L, pH9.5的磷酸盐溶液
 - 配制方法: 称取0.159 g Na_2CO_3 , 0.294 g的 NaHCO_3 , 加去离子水溶解定容至100 mL。
- **PBST溶液 (1 L) :**
 - 配制方法: 称取 NaCl 8.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, 去离子水搅拌溶解并定容后, 加入1 mL Tween-20, 混匀。
- **封闭液:** 含1%的牛血清白蛋白BSA的PBST溶液。
 - 配制方法: 10 mL PBST中加入100 mg BSA, 振荡混匀。
- **底物应用液:** 配制方法见下页
- **终止液:** 2 mol/L H_2SO_4

底物应用液

- 底物应用液由底物溶液1、2、3组成：

- 底物溶液1：磷酸钠盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH6.0) , 100 mL的配方为：

称取0.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.37 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 去离子水溶解并定容。

- 底物溶液2：为TMB贮液 (60 mg TMB溶于10 mL的二甲亚砜DMSO, 4°C避光保存) 。

- 底物溶液3：30% H_2O_2 。



- 使用时须现用现配，并注意避光保存。

实验步骤

1. 抗原包被
及封闭

2. 待测抗体
孵育

3. 酶标抗抗
体孵育

4. 显色
及终止

5. 测定

1. 抗原包被及封闭

- **1.1 抗原稀释：**将3 mg/mL的抗原GFP蛋白用包被液稀释500倍，浓度为6 $\mu\text{g/mL}$ 。
- **1.2 抗原包被：**取2条8孔酶标条平行操作，将含GFP的包被液按100 μL /孔加入酶标条的反应孔中，置37°C恒温孵育1 h（或4°C过夜）。
- **1.3 洗涤：**将微孔内的液体甩干，每个凹孔加满PBST洗涤液，静置片刻后倾去PBST，将酶标条在吸水纸上倒扣拍干，洗涤3次。
- **1.4 封闭：**每孔加120 μL 的封闭液，室温放置0.5 h。
- **1.5 洗涤：**PBST洗涤酶标条3次，方法同上。

2. 待测抗体孵育

- **2.1 稀释待测抗体**（本次实验所测抗体为：**anti-GFP的兔抗血清**）
- 先将含待测抗体的抗血清用PBST稀释200倍，然后按照下面的加样表，1：5的比例稀释，即稀释倍数为 1×10^3 ， 5×10^3 ， 2.5×10^4 ，...
- **2.2 加待测一抗**
- 用PBST作为阴性对照，按下面加样表，将稀释的抗体溶液、阴性对照按100 μ L /孔加到反应孔中，每个浓度平行做2个复孔。将酶标条置37℃恒温孵育40~60 min。
- **2.3 洗涤**：PBST洗涤酶标条3次，方法同上。

[illegible]

3. 酶标抗抗体孵育

- **3.1 加酶标抗抗体（本次实验为：HRP标记的羊抗兔抗体）**
 - 按照抗体说明书，用PBST将HRP标记的羊抗兔抗体稀释1000倍后（酶标抗抗体稀释比为 1:1000），按100 μ L/孔加入酶标孔。
 - 将酶标条置37℃恒温箱温育40~60 min。
- **3.2 洗涤：**用PBST洗5次，去离子水洗3次。

4. 显色

- **4.1 显色：**加入新鲜配制的底物应用液，100 μL /孔，室温暗处反应10 min，目测阳性对照显示明显的蓝色。
- **4.2 终止反应：**加入2 mol/L H_2SO_4 终止液，50 μL /孔（**小心使用移液器移取**），溶液颜色由蓝变黄。

5. 测定

- **测定方法1:**

- 目测法，以比阴性对照颜色深的最高稀释倍数为抗体效价。

- **测定方法2:**

- 使用酶标仪检测，测定波长450 nm处各孔的吸光值。
- 以PBST空白孔为阴性对照，计算阳性样品与阴性对照的吸光值之比（positive/negative, P/N），当 $P/N \geq 2.0$ 时为阳性， $1.5 \leq P/N < 2.0$ 为可疑， $P/N < 1.5$ 为阴性。

阳性反应的最大稀释度为待测样品的效价。

实验注意事项

- 1. ELISA实验具有高度特异性，要求参加反应的抗原和抗体纯度高，以消除非特异性反应和假阳性反应，避免交叉反应。
- 2. 酶标板板使用时，溶液宜垂直滴入凹孔中间，相继加入的溶液都应覆盖相同的载体表面积。操作中**避免剧烈振摇和搅拌，以保证恒定的吸附容量。**
- 3. ELISA实验的洗涤目的是洗去非特异性吸附于固相载体的干扰物质，**洗涤时要避免相邻孔内液体互相污染。**
- 4. PBST洗涤液中所加入的Tween-20可减少非特异性吸附。