

## ELISA 实验 FAQ

**问题一：请问一下，平时怎么挑选 Elisa 试剂盒，有哪些方面是要重点注意的？**

答：首先要明确检测何种指标、指标的种属以及指标的大致浓度（可参阅文献了解）；其次就是试剂盒本身（使用的抗体类型单/多抗、检测原理、样本类型、加样量、灵敏度、线性范围等相关产品参数）；最后就是考虑试验操作的简便性、产品价格的经济性以及厂家的知名度。

**问题二：TMB 的使用量，对结果有什么影响呢？我看不同试剂盒的 TMB 不一样？**

答：TMB 的使用量，对结果不会有影响，操作时按照说明书要求进行准确加液即可。关于 TMB 国外通常是底物液单管组装，国内是底物液 A、B 分别组装，从使用上来说，二者没多大区别，都是符合各自的工艺体系，无非就是试验操作过程中双管分别加样比单管加样多了道步骤，但是深层次来讲的话，差异还是有的，主要体现在底物的原料不同以及成品的稳定性上（相比来说）。

**问题三：做 Elisa 的酶标板高吸附和低吸附的话该怎么去选择呢？是不是吸附性越高越好？**

答：酶标板酶标板高吸附和低吸附的区别主要是体现在结合能力上，并不是吸附性越高越好，需要根据检测的分子量去匹配筛选，另外在使用不同的酶标板时，也要根据其自身的吸附性选择匹配的封闭液进行使用，以达到一个最佳的包被效果。

**问题四：初次使用 Elisa 试剂盒，需要做样本浓度的预实验吗？**

答：预实验目的就是防止样本浓度过高或过低拿不到好结果，浪费样本及试剂盒。不同的是实验环境及条件下，开展检测都需要通过预实验去验证我们的仪器、耗材等是否满足试验要求以及摸索出样本的最佳稀释比，最后才能用于制定正式实验方案，提高工作效率并节约成本。

**问题五：第一次使用血清样本做预实验时，如何设置稀释梯度，用什么缓冲液进行稀释？**

答：ABclonal 大部分指标都已经过测试，预实验时血清样本原倍加样即可。涉及其他需要稀释使用的样本，可以根据待测指标的大致含量（翻阅文献等）以及试剂盒本身的一个线性区间来拟

定一个或多个稀释比去进行预实验分析，稀释时用试剂盒自带的标准品/样本稀释液（R1）组分即可。

**问题六：检测激素精确度高么？如果同时检测多种小鼠血清的激素，有一个试剂盒包含多种激素检测吗？还是检测 N 种激素就必须买 N 种试剂盒？**

答：产品目前的批内差、批间差以及回收率等指标皆在行业标准以内甚至于跟严格，且对标的国外知名品牌。目前 ABclonal 推出全新的多重液相平台，可以满足多指标联检的需求（50ul 样本一次最多检测 50 不同指标）。

**问题七：对于小鼠血清有些许溶血，用 Elisa 试剂检测，误差会很大吗？有什么方法可以减小误差吗？**

答：溶血以及高血脂样本在血清学检测中属于干扰因素的存在，样本溶血后会导致检验结果不准确（背景值高，ABclonal 避免使用溶血、高血脂血清/血浆样本）

**问题八：洗涤液选择 PBS 吗？洗涤液的吸出有哪些注意事项？**

答：不同厂家的洗涤液成分有所不同，大多数是基于 PBS 的基础上添加了自身特色的配方，使用的时候按照说明书要求进行稀释配比即可。

**问题九：细胞实验的 Elisa 检测，直接收集作用过细胞上的含药血清，用于 elisa 检测就可以吗？**

答：检测的靶标个人理解还是蛋白，胞外检测使用上清就可以。

**问题十：血清保存的条件是多少度？-20 就可以吗？-40 或者-80 可以嘛？可以保存多长时间呢？**

答：使用血清分离管，分离血清前让样品凝结 30 分钟，1000 xg（3000 转）离心 10 分钟并及时检测；或将样本分装置于-20℃至-80℃中至少可保存一年，避免反复冻融（不同的靶标样本存储时间也不尽相同，复溶使用前建议进行预实验分析或咨询相应试剂盒厂家），24 小时内检测可置于 2-8℃。

**问题十一：拍板的时候需要拍到一点水渍没有吗？分析数据的时候，减掉空白孔后，还需要减校正吗？如果我们检测的靶标含量一直不高，可以针对我们的样本给做特有的抗体吗？**

答：①无论是机器还是人工洗板，按流程操作洗板完成，都应在吸水纸上进行拍干，勤换吸水纸，拍 3-5 次即可，板孔反应需要湿润环境，微量的残存洗液不影响试验结果。②分析数据的时候，可以使用单波 450nm 减去空白值分析，也可以使用双波长校正波长设置为 570 nm 或 630 nm（常见的酶标仪大都可以满足此类波长），但是使用双波校正波长的话可以消除溶血、板孔划痕、板底污渍等因素的干扰。③对于靶标含量一直不高的可以使用爱博泰克公司的高敏系列产品，也可以选择试剂盒定制服务。

**问题十二：细胞上清液需要浓缩么？如果细胞上清液不浓缩的话检测指标会不会浓度太低，因为检测只需要 100ul，而细胞上清可能很大量？需要浓缩的话，该如何浓缩？**

答：可以通过参阅文献或者咨询厂家了解细胞上清样本中指标的大致浓度，在绝大多数的样本中细胞因子的含量非常高（相对于血清/血浆而言），通常情况下细胞上清样本会进行预试验来决定合适的稀释倍数。如果需要浓缩的话，可以参考分子量选择最适宜的方法，现在常用的有透析、超滤等。

**问题十三：血清 Elisa 检测出来值很低很低 是什么原因呢？**

答：造成检测出来值很低很低的原因大致有如下几种：试剂盒不符合检测需求（灵敏度不高）、试剂盒质量问题、试剂盒存储不当或已过效期（部分组分效价降低）、试验操作不当（加液错误或其他步骤有误）、样本本身含量不高。对于以上几种原因，我们可以通过标曲、复孔、文献查询等手段一一排除，另外经过验证血清样本相比其他样本类型来说，含量相对低，通常建议原倍使用。

**问题十四：我们把试剂盒里的标准品换成自己的产品对检测有什么影响？**

答：作为定量试剂盒来说，试剂盒的标准品就是本身质量的一个体现，标曲数据正常是试验成立的先决条件，原则上来说不应对标准品进行替换，但如果经验证可行，替换蛋白可以满足于该试剂盒的检测工艺体系，可以进行尝试。

**问题十五：手动洗板有什么需要注意的吗？另外，建议 37 度水浴孵育，我们之前是使用烘箱进行 37 度孵育会不会有什么影响？**

答：手动洗板需要注意每孔的加液量（避免液体溢出造成窜孔污染）以及浸泡时间均一性（按照从左至右、从右至左循环往复加液，尽量保证每孔浸泡累计时间条件一致）。建议 37°C 水浴孵育，是因为水浴温度的稳定性；由于烘箱使空气传热，如果使用的话需要①贴紧封板膜，避免时间过久液体蒸发，影响反应的内在环境；②避免多次的开关门，造成温度骤降；③可以额外用托盘、纱布、纯化水等物品在烘箱内部营造一个水浴的环境。