

实验步骤: 夹心法ELISA

注意:

酶联免疫吸附试验(ELISA)结合了抗体专一性与简单酶测定的灵敏度,夹心法ELISA利用两层抗体(捕获抗体或检测抗体)测量抗原的量,此方法可用来测量未纯化样品中的抗原浓度。夹心法ELISA的步骤较难调整且需要成对的抗体,因此,请使用测试过夹心法ELISA专一性的抗体。

材料/试剂/缓冲液

1. 抗原(蛋白或载体标记的胜肽)
2. 一抗(捕获抗体或检测抗体)
3. HRP标记的二抗
4. 高结合力96孔板(NUNC maxisorb圆底微孔板或Costar strip well板)
5. 包被溶液(0.1 M Bicarbonate/carbonate buffer pH9.6或PBS pH7.4)
6. 封闭液: 常用的封闭液有1 % BSA, 5% 血清, 5 %脱脂牛奶, 2.5 % casein(酪蛋白)或1 % gelatin (溶在PBS)
7. 洗涤溶液: 含有0.05% (v/v) Tween 20的PBS或TBS (pH7.4)
8. TMB底物: 根据制造商的说明书配制底物溶液
9. 终止溶液: 1M H_3PO_4 (磷酸)或2N H_2SO_4 (硫酸)

仪器

ELISA板清洗机(可不用)

ELISA读板机

方法

1. 用包被溶液将一抗稀释成1-10 ug/ml的浓度,加入100 ul稀释后的抗原至微孔板进行包被,抗体浓度可以视情况调整
2. 用封板膜盖上微孔板,于室温孵育4小时或放在4°C过夜,如果需要可调整孵育时间
3. 将板内的液体倒干,每个孔用300 ul洗涤溶液洗3次,最后一次洗板后,将板子倒过来在吸水纸上拍打,以移除残余的液体
4. 每个孔加入200 ul封闭溶液,以进行非专一性结合封闭作用
5. 用封板膜盖上微孔板,在室温孵育至少1个小时或放在4°C过夜
6. (可略过此步骤) 如果封闭后没有马上使用,可将微孔板密封,并保存于-70°C
7. 将板内的液体倒干,按照上述步骤3,用洗涤溶液清洗2次
8. 除空白孔,其余每个孔中加入100 ul稀释后的样品(抗原)

注意:用封闭溶液稀释样品,为了精确计算定量结果,使用已知浓度的样品制作标准曲线,比较未知样品的信号与标准曲线的信号,标准品(加双孔或3个孔)和空白组与样品必须在同一个微孔板上操作,以确定信号准确度

方法

9. 用封板膜盖上微孔板,在室温孵育2小时或放在4°C过夜(如果ELISA信号微弱)
 10. 按照上述步骤3,用洗涤溶液重复清洗微孔板共3次
 11. 根据制造商的说明书,用封闭溶液稀释抗体,除空白孔,其余每个孔中加入100 ul稀释后的一抗(检测抗体)
 12. 用封板膜盖上微孔板,在室温孵育1到2小时,如果检测抗体已经标记了HRP,直接跳到步骤17
 13. 按照上述步骤3,用洗涤溶液重复清洗微孔板共3次
 14. 根据制造商的说明书,用封闭溶液将HRP标记二抗稀释至适合的浓度
- 注意: 需使用前新鲜配制,因为azide会使HRP失去活性,请勿用含有azide的缓冲液
15. 除空白孔,其余各孔加入100 ul稀释后的HRP标记二抗
 16. 用封板膜盖上微孔板,在室温孵育1到2小时
 17. 按照上述步骤3,重复清洗微孔板共5次
 18. 每个孔加入100 ul TMB溶液,在室温孵育15-30分钟
 19. 加入100 ul终止溶液
 20. 使用ELISA读板机读取450 nm的吸光值
 21. 分析数据以得到定性测量结果:将X轴作为浓度,Y轴作为吸光值,用标准品的系列稀释数据画出标准曲线,利用此标准曲线,内插法计算出样品浓度



GeneTex 简介

ABOUT

GeneTex 背景

1997年GeneTex由一群科学家成立于美国德克萨斯州,为抗体制造商,成立宗旨“专注生物相关试剂生产,加速科学研究与发展,在每一个产品里你将看到我们对质量的要求与坚持”。

成立之初,科学家致力于寻找引发癌症的分子新靶点,并开发抗体供科研使用。之后, GeneTex专注抗体开发,网罗世界各地人才,至今已开发出50,000个产品,产品线横跨癌症、病毒、遗传学、神经学、免疫学、细胞分子传递、干细胞研究、斑马鱼等多个领域,并提供完善的定制抗体制备服务。

GeneTex 承诺

在我们制造产品时,坚持我们的理念与方法,通过研究、开发与严格的测试提供最可信的试剂给研究人员,并驱动生命科学的发展。我们将持续开发多元的抗体产品,提供科学家探索有限生物医药知识所使用。

GeneTex 联系

任何跟产品相关的问题,我们技术与销售团队将竭诚为您服务; GeneTex支持中英文等多种语言并建构全球经销商网络,任何问题,您可以使用习惯的语言与我们联系。

