

ELISA 样品制备指南

Elisa 是一种快速、灵敏、准确可靠的定性定量分析方法。样本的处理对于 Elisa 实验的成功起着关键的作用。处理样本的过程就是收集目标蛋白的过程，由于蛋白容易变性，降解，故该过程应尽量温和。样本处理之后的储存也非常重要，尤其注意不要反复冻融。样本处理之后可分装密封保存，最佳保存条件：2-8°C保存应小于 5 天，-20°C不应超过 6 个月，-80°C不应超过 2 年，超过以上时间应保存在液氮中。冻存的标本融化时，为了减少冰晶（0 度）对样品的破坏，应采用 15-25°C水浴快速融化，融化后可用于检测或暂存于 2-8°C。

利用 ELISA 进行检测的样本类型包括：血液（血清、血浆）、组织匀浆、细胞裂解液、细胞培养上清、尿液、粪便、肺泡灌洗液、唾液、脑脊液、胸腹水、前列腺液、精液、阴道分泌物等。常见的样本处理方法如下，仅供参考：

A, 血液样本

1, 血清：

- 1) 将收集于血清分离管的全血样本，在室温放置 2 小时或 2-8°C过夜。（这是一个让血液自然凝固的过程，温度越低，凝集越缓慢，可根据需要添加促凝剂。）
- 2) 1000×g 离心 20 分钟，取上清。
- 3) 可立即检测，或分装冻存于-20°C或-80°C。

2, 血浆 (柠檬酸, EDTA, 肝素) :

- 1) 血浆样本需要抗凝, 将全血收集到干净的含抗凝剂的试管中, 轻轻混匀。
- 2) 标本在采集后的 30 分钟内于 2-8°C 1000×g 离心 15 分钟, 取上清。
- 3) 可立即检测, 或分装冻存于 -20°C 或 -80°C。

抗凝剂的类型和选择:

根据待检测目标物的性质不同选取不同的抗凝剂。

枸橼酸钠(柠檬酸钠): Ca^{2+} 有凝血作用, 枸橼酸钠能与血液中的 Ca^{2+} 形成可溶性的螯合物, 从而阻止血液凝固。柠檬酸钠抗凝工作浓度一般为 0.25%。(使用 4.0% 浓度规格的抗凝剂时, 抗凝剂与血液的比例为 1:16)。

缺点: 血液中溶解度低, 抗凝作用较弱。

优点: 对凝血因子有很好的保护作用, 大部分凝血试验都可用枸橼酸钠抗凝。

乙二胺四乙酸 (EDTA) 盐: 与血液中的 Ca^{2+} 结合形成配位化合物, 从而阻止血液凝固。EDTA 的抗凝工作浓度为: 10ml 血液含 12mg EDTA。

优点: 对红细胞和白细胞形态影响小。

缺点: 影响血小板的聚集。不适用于凝血实验和血小板功能相关实验的检测。

肝素: 通过与抗凝血酶 III 结合, 增强抗凝血酶的作用, 灭活丝氨酸蛋白酶, 从而阻止凝血酶的形成和阻止血小板聚集, 阻止血液凝固。纯的肝素 10mg 能抗凝 65~125 ml 血液。

优点: 抗凝能力强, 不影响血细胞体积, 不易溶血, 能耐高温。

武汉菲恩生物科技有限公司.

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

电话: 027-86697005

邮箱: sales2@fn-test.com

网址: <https://www.fn-test.cn/>

缺点：引起白细胞聚集。肝素抗凝血应于短时间内使用，否则放置过久血液又可凝固。

血清/血浆的区别与选择：

血清是血液凝固后缺少纤维蛋白原的血浆，故血浆中除含有纤维蛋白原和抗凝剂外，其他成份均等同于血清。

由于血清中缺乏很多的凝血因子，但有凝血产物。如果检测凝血因子，建议选择血浆样本；

因血浆中有纤维蛋白原，如果纤维蛋白原对待检测指标有影响，建议选择血清样本；

大多数情况下二者均可以选择。

B, 组织样本：

组织样本一般制成组织匀浆，处理方法如下：

- 1) 使用干净的工具解剖目标组织，尽快置于冰上，以防被蛋白酶降解。（暂时不处理的组织，置于圆底微量离心管中，浸入液氮中“速冻”，在 -80°C 下存储样品备用）
- 2) 用预冷的 PBS 缓冲液 (0.01M, pH=7.4) 洗涤组织去除残留的血液，称重后备用。若组织块较大，需先剪碎。
- 3) 在冰上用研磨缓冲液（常用 PBS 缓冲液，但最好使用 50mM Tris+0.9%NaCl+0.1% SDS,PH 7.3。或者中等强度 RIPA 细胞裂解液，注意 RIPA 裂解液 PH 值需为 PH7.3，建议不要使用含 NP-40, Triton X-100 和高浓度 DTT 的组分，会抑制抗原抗体反应。）研磨组织匀浆（加入研磨缓冲液的体积取决于组织的重量。一般情况下，每 1 克组织碎片应使用 9ml 研磨缓冲液。另外建议在研磨缓冲液中加入

武汉菲恩生物科技有限公司。

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

电话: 027-86697005

邮箱: sales2@fn-test.com

网址: <https://www.fn-test.cn/>

入一些蛋白酶抑制剂，如 1mM PMSF)。得到的匀浆液可再利用超声破碎或反复冻融进一步处理（超声破碎过程中，需冰浴降温；反复冻融法可重复 2 次）。

4) 将制备好的匀浆液于 5000×g 离心 5 分钟，留取上清即可检测。或分装冻存于-20°C或-80°C。

5) 为便于统计分析数据，组织匀浆样本需先定量总蛋白，一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml。某些组织样本，如肝脏，肾脏，胰腺因含有较高浓度的内源性过氧化物酶，在样品浓度较高的情况下会和试剂盒底物反应出现假阳性。

6) 裂解液样本蛋白含量比较是通过 2 个数据得到的，1. 样本目标蛋白浓度，2. 样本总蛋白浓度，最终结果为目标蛋白浓度/总蛋白浓度，单位为 pg/mg 或者 ng/mg。

例如炎症相关模型，A 样本是模型组，炎症升高，炎症目标蛋白是 2ng/ml，总蛋白是 1mg/ml，最终结果为 2ng/mg 炎症蛋白，B 样本是对照组，炎症目标蛋白是 3ng/ml，总蛋白浓度是 4mg/ml，最终结果为 3/4=0.75ng/mg 炎症蛋白，数据比较表明 A 样品炎症比 B 样品高 2 倍多。

注意事项：

若为皮肤组织，离心后，需去除上层脂肪，以及下层沉淀，取中间层样本用于检测。

C, 细胞样本：

1, 细胞培养上清：

武汉菲恩生物科技有限公司。

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

电话: 027-86697005

邮箱: sales2@fn-test.com

网址: <https://www.fn-test.cn/>

- 1) 使用 96, 24, 6 孔板, (贴壁或悬浮) 细胞密度达到 60-90%。
- 2) 使用 6-10mm 培养皿, T25/T75 细胞培养瓶, (贴壁或悬浮) 细胞密度达到 60-90%。
- 3) 悬浮细胞: 2-8°C, 2500rpm 离心 5min, 收集澄清的细胞培养上清。
- 4) 贴壁细胞: 直接收集上清液, 2-8°C, 2500rpm 离心 5min, 收集澄清的细胞培养上清。
- 5) 立即用于检测, 或分装于-80°C冻存备用。

2, 细胞裂解液:

(1) 悬浮细胞:

- 1.1. 2-8°C, 2500rpm 离心 5min, 收集细胞。
- 1.2. 加入预冷的 PBS,轻轻混匀, 2-8°C, 2500rpm 离心 5min, 收集细胞。
- 1.3. 加入 0.5-1ml 中等强度 RIPA 细胞裂解液(注意 RIPA 裂解液 PH 值需为 PH7.3, 建议不要使用含 NP-40, Triton X-100 和高浓度 DTT 的组分, 会抑制抗原抗体反应。若无 RIPA 裂解液, 可使用 50mM Tris+0.9%NaCl+0.1% SDS,PH 7.3)及适量蛋白酶抑制剂 (如 PMSF, 工作浓度 1mmol/L) ,置于冰上, 裂解 30min-1h。裂解过程中可用枪头吹打或间断摇动离心管, 使蛋白充分裂解, 出现黏糊状是 DNA, 可以使用超声波破碎 DNA。(或用超声波 3-5mm 探头, 功率 150-300W, 冰上超声处理样品, 工作 1-2 s, 停止 30 秒, 3~5 个循环。)
- 1.4. 裂解或超声破碎完成, 2-8°C, 10000rpm 离心 10min, 上清移入 EP 管中。

1.5. 为便于统计分析数据, 需先使用 BCA 试剂盒定量总蛋白, 一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml。立即用于检测, 或分装于-80°C冻存备用。

1.6. 裂解液样本蛋白含量比较是通过 2 个数据得到的, 1. 样本目标蛋白浓度, 2. 样本总蛋白浓度, 最终结果为目标蛋白浓度/总蛋白浓度, 单位为 pg/mg 或者 ng/mg。例如炎症相关模型, A 样本是模型组, 炎症升高, 炎症目标蛋白是 2ng/ml, 总蛋白是 1mg/ml, 最终结果为 2ng/mg 炎症蛋白, B 样本是对照组, 炎症目标蛋白是 3ng/ml, 总蛋白浓度是 4mg/ml, 最终结果为 $3/4=0.75$ ng/mg 炎症蛋白, 数据比较表明 A 样品炎症比 B 样品高 2 倍多。

(2) 贴壁细胞:

1.1 吸走上清液, 加入预冷的 PBS 洗三次。

1.2 加入 0.5-1ml RIPA 细胞裂解液及适量蛋白酶抑制剂 (具体要求同悬浮细胞), 用细胞刮轻轻刮下贴壁细胞。

1.3 细胞悬液转入离心管中, 置于冰上, 裂解 30min-1h, 或者配合超声波破碎 (同悬浮细胞)。

1.4 裂解或超声破碎完成, 2-8°C, 10000rpm 离心 10min, 上清移入 EP 管中。

1.5 为便于统计分析数据, 需先使用 BCA 试剂盒定量总蛋白, 一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml。立即用于检测, 或分装于-80°C冻存备用。

1.6 裂解液样本蛋白含量比较是通过 2 个数据得到的, 1. 样本目标蛋白浓度, 2. 样本总蛋白浓度。最终结果为目标蛋白浓度/总蛋白浓度, 单位为 pg/mg 或者 ng/mg。例如炎症相关模型, A 样本是模型组, 炎症升高, 炎症目标蛋白是 2ng/ml, 总蛋白是 1mg/ml, 最终结果为 2ng/mg 炎症蛋白, B 样本

是对照组，炎症目标蛋白是 3ng/ml，总蛋白浓度是 4mg/ml，最终结果为 $3/4=0.75\text{ng/mg}$ 炎症蛋白，数据比较表明 A 样品炎症比 B 样品高 2 倍多。

注意事项：

细胞裂解液，建议使用超声波辅助破碎，超声波可有效打断 DNA，DNA 成为片段后不容易干扰试剂盒工作。

为便于统计分析数据，细胞裂解液样本需先定量总蛋白，一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml

细胞培养上清液/细胞裂解液的选择：

根据目的物所在部位，可选择细胞裂解液或细胞培养上清作为样本。

如果目的物是分泌型，（包括可分泌型的膜蛋白），即可选择细胞培养上清作为样本；

如果目的物主要存在于胞内，则建议选择细胞裂解液作为样本类型，部分包内蛋白也可能通过分泌或者细胞凋亡而泄露到培养基中而上清也可被检测。

D, 痰液

- 1) 选择痰液中较为粘稠部分称重，加两倍于痰量的 0.1% DTT(二硫苏糖醇,主要作用是溶解粘液)，反复吹打，漩涡器振荡 15s，37 度恒温水浴振荡 5 分钟；
- 2) 加两倍于痰量的 PBS 缓冲液，继续振荡 15-20 分钟，150 目的金属丝网过滤，1500 rpm 离心 10 分钟吸取上清液检测。

武汉菲恩生物科技有限公司.

湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号武汉光谷国际生物医药企业加速器 1.2 期 C22 栋一层、二层(430206)

电话: 027-86697005

邮箱: sales2@fn-test.com

网址: <https://www.fn-test.cn/>

E, 唾液/尿液/牛奶

用无菌管收集样品，2-8°C 下以 10,000 x g 离心 2 分钟。或 2000-3000rpm 离心 20 分钟，收集上清液，可立即检测，或分装冻存于-20°C或-80°C。尽量减少冻融循环。

F, 粪便

- 1) 尽量采集干的粪便，粪便过稀会较难处理且降低检测的准确性。采集的重量应大于 50mg。
- 2) 将粪使用 PBS 洗 3 次，离心收集沉淀后称重。
- 3) 加入 PBS 缓冲液（加入 PBS 缓冲液的体积取决于处理后粪便的重量。一般情况下，每 1 克粪便应使用 9ml PBS 缓冲液），用超声粉碎（或捣碎）。
- 4) 5000×g 离心 10 分钟，取上清检测。或分装冻存于-20°C或-80°C备用。

G, 精浆

- 1) 将精液收集于无菌容器中，正常精液射出体外呈稠厚的胶冻状，射出体外后需在室温或 37 度水浴箱中使其在前列腺分泌的纤维蛋白溶解酶的作用下液化变得稀薄。
- 2) 待精液完全液化后，将精液于 4000 rpm 离心 10 分钟分离精浆，进行检测，或分装冻存于-20°C或-80°C备用。

H, 脑脊液、肺泡灌洗液, 滑膜液, 腹水

采集样品, 于 1000×g 离心 20 分钟, 收集上清, 可立即检测, 或分装冻存于-20°C或-80°C。尽量减少冻融循环。

I, 乳汁

采集样品, 在 2-8°C下 12000rpm 离心 30 分钟, 去除上层脂肪, 以及下层沉淀, 取中间层样本用于检测。或分装冻存于-20°C或-80°C。尽量减少冻融循环。

J, 蛋黄 (检测鸟类 igY(也称 igG))

- 1) 取新鲜蛋黄, 用超纯水稀释 10 倍。
- 2) 用盐酸调 pH 至 5.0~ 5.2, 2-8°C静置 6h, 然后 10000rpm 离心 10min, 收集上清,调整 PH 至 7.2-7.4, 立即用于检测或分装冻存于-20°C或-80°C。

K, 外泌体

- 1) 首先, 使用商用外泌体抽提试剂盒, 提取外泌体颗粒。如果获得的外泌体浓度比较低, 可以使用超滤管浓缩。

- 2) 加入 0.1-0.5ml 中等强度 RIPA 细胞裂解液(注意 RIPA 裂解液 PH 值需为 PH7.3, 建议不要使用含 NP-40, Triton X-100 和高浓度 DTT 的组分, 会抑制抗原抗体反应。若无 RIPA 裂解液, 可使用 50mM Tris+0.9%NaCl+0.1% SDS,PH 7.3)及适量蛋白酶抑制剂 (如 PMSF, 工作浓度 1mmol/L) , 置于冰上, 裂解 30min-1h。裂解过程中可用枪头吹打或间断摇动离心管, 使蛋白充分裂解。(或用超声波 3-5mm 探头, 功率 150-300W, 冰上超声处理样品, 工作 1-2 s, 停止 30 秒, 3~5 个循环。)
- 3) 裂解或超声破碎完成, 2-8°C, 10000rpm 离心 10min, 上清移入 EP 管中。
- 4) 为便于统计分析数据, 需先使用 BCA 试剂盒定量总蛋白, 一般调整总蛋白浓度至 1-3mg/ml。立即用于检测, 或分装于-80°C冻存备用。
- 5) 裂解液样本蛋白含量比较是通过 2 个数据得到的, 1.样本目标蛋白浓度, 2.样本总蛋白浓度, 最终结果为目标蛋白浓度/总蛋白浓度, 单位为 pg/mg 或者 ng/mg。例如炎症相关模型, A 样本是模型组, 炎症升高, 炎症目标蛋白是 2ng/ml, 总蛋白是 1mg/ml, 最终结果为 2ng/mg 炎症蛋白, B 样本是对照组, 炎症目标蛋白是 3ng/ml, 总蛋白浓度是 4mg/ml, 最终结果为 $3/4=0.75$ ng/mg 炎症蛋白, 数据比较表明 A 样品炎症比 B 样品高 2 倍多。