

ELISA 实验问题与解决

ELISA 实验的优点在于其灵敏度高，特异性较好，技术要求比较低，适合样品的大批量处理和在基层推广。但是实际操作中的各个环节对实验检测效果影响较大，如不注意，可能会导致结果不理想。

以下总结了在实验环节中可能出现的问题和解决方法，以供参考。

1. 标准品无颜色变化或者无相应数值

可能原因	解决方法
试剂使用顺序混乱，或者操作步骤出错。	遵循实验说明重复实验。
使用了错误的抗体，或者二抗配制错误、失效。	确保抗体来自同一试剂盒，所有抗体不同批次之间有一定的差异，确保二抗的配制无误。
TMB底物失效。	使用新的TMB底物。

2. 低吸光度 (OD 值)

可能原因	解决方法
试剂过期，或者不同的批次混用。	查证过期试剂和批次。
洗液配制错误。	使用试剂盒提供的洗液，正确配制。
过多次洗涤。	按照说明书要求进行洗涤。
孵育时间过短。	按照说明书要求，严格计算好时间。
实验室温度过低。	保持实验室温度在20-25℃，不要在空调风口或者寒冷的窗户旁进行实验。
试剂或者微孔板温度过低。	确保试剂或者微孔板完全回温，在实验开始前，将试剂放置盒子外最少1小时。
使用错误波长读数，或者酶标仪失灵。	确保450nm波长读数，检查酶标仪。
试剂盒处于极端的条件。	检查试剂盒从冰箱拿出使用的次数，检查试剂盒是否放置极端温度（过冷或者过热）时间太长。

3. 过高的背景值或吸光度 (OD 值)

可能原因	解决方法
使用了质量差的水。	如果使用的水可疑, 尝试使用蒸馏水配制洗液。
底物失效。	确保加入微孔板前, 底物是无色的。
洗涤不当或者洗板机洗板效果不好。	采用说明书建议的洗涤次数, 每次每孔至少加入 250 μ L 洗液。 检查洗涤系统, 排除故障。
酶标仪失灵。	如果 OD 值读数很高而颜色很浅, 那个这是非常可能的情况。 使用校正微孔板检查酶标仪, 检查光源。
实验室温度过高。	保持实验室温度 20-25 $^{\circ}$ C, 避免在热源或者阳光直射处实验。
试剂混淆, 被污染或者配制不当。	确保使用正确的试剂, 准确配制, 避免污染。

4. 板内差异性大

可能原因	解决方法
加入标准品, 试剂和样品的时间不一致。	确保所有试剂可用, 尽可能使用多道枪加样, 加标准品, 试剂和样品途中, 不能中断。
多道枪使用不当。	校准多道枪, 检查吸嘴是否套紧, 确保吸液量一致。
洗涤系统出现故障。	检查洗涤系统, 保持良好运行。

5. 板间差异性大

可能原因	解决方法
板与板之间孵育时间相差太大。	独立计时, 确保一致的孵育时间。
板与板之间不一致的洗涤过程。	确保相同的洗涤次数, 保证洗涤系统正常运作。
使用移液枪不当。	检查移液枪, 确保吸取相同液量。
微孔板, 试剂, 标准品和样品处于不同温度。	确保微孔板, 试剂, 标准品和样品充分回到室温, 如果试剂体积较大则需要回温较长时间。不能用温水浴回温样品。
不同批次的试剂混用, 或者试剂盒过期。	注意试剂不要混用, 不同的试剂盒可能显示不同的OD值, 但是相对吸光值是有很好的对比性的。通常阴性标准品的OD值小于 0.6显示试剂质量下降。

6. 一个或者多个标准品数据点超出曲线范围

可能原因	解决方法
标准品添加顺序混乱，或者放置于错误位置。	按照说明要求重复实验，保证标准品添加正确。
标准品被污染或者与其他标准品混淆了。	改用新的标准品，按照由低浓度到高浓度的顺序添加标准品。
洗涤不一致或者洗涤系统失灵。	遵循一如既往的洗涤方式，检查洗涤系统。
加入标准品和试剂的时间不一致。	确保一切就绪，由低浓度到高浓度添加标准品并保证不被干扰，使用多道枪移液。
多道枪使用不当。	校准多道枪，检查吸嘴是否套紧，确保吸液量一致。