# ELISA 样本的处理

ELISA 检测的目的是为实验提供准确可靠的定量分析的实验依据。为了保证实验数据的可靠性，在实验过程中必须坚持全面和全程的质量控制。并且在收集标本前都必须有一个完整的计划。

## 注意事项

1. 每个标本量收集体积＝100ul ×检测种类，如要做复孔，标本量收集体积＝100ul ×检测 种类×2 。
2. 对于作某一个具体指标来说，最好先用一系列稀释度作一批标本测定，得出对实验有意义的一个稀释度（即测定剂量反应曲线），然后用一个最适稀释度测定即可。
3. 收集标本前必须清楚要检测的成份是否足够稳定。对收集后当天进行检测的标本，储存在 4 ℃备用，如有特殊原因需要周期收集标本，将标本及时分装后放在-20 ℃或-70 ℃条件下保存。避免反复冻融。标本 2-8 ℃可保存 48 小时， -20 ℃可保存 1 个月。-70℃可保存 6 个月。部分激素类标本需添加抑肽酶。
4. 血清标本采集时，应注意避免溶血，红细胞溶解时会释放出具有过氧化物酶活性的物质，以 HRP 为标记的 ELISA 测定中，溶血标本可能会增加非特异性显色。
5. 为了保证尿液检测结果的准确性，必须正确收集尿液标本和保存。盛尿容器要清洁干燥。最好使用一次性的容器（如塑料尿杯），避免因用药并清洗不干净而造成的污染，影响检测结果。尿液标本必须新鲜，留取后，应及时检测或保存，以免细菌繁殖。因在室温（尤其是夏季）中久置后尿中的磷酸盐等可析出结晶而干扰检测。
6. 标本宜在新鲜时检测。如有细菌污染，菌体中可能含有内源性 HRP，也会产生假阳性 反应。保存过久可发生聚合在 ELISA 中可使本底加深。
7. 冻结标本融解后，蛋白质局部浓缩，分布不均，应充分轻缓混匀，避免气泡，可上下颠倒混和，不要在混匀器上强烈振荡。
8. 混浊或有沉淀的标本应先离心或过滤，澄清后再检测。
9. 反复冻融会使蛋白效价降低，所以待测标本如需保存作多次检测，宜少量分装冰存。也可加入适当防腐剂。

## 标本类型

ELISA 常见的标本一般包括：

1. 液体类标本：包括血清、血浆、尿液、胸腹水、脑脊液、细胞培养上清等。
2. 培养细胞
3. 组织标本：这些标本收集的时间、方法和保存都有一定的要求。

## 标本的保存

1. 一般说来，在 5 天内测定的标本可放置于 4℃，超过一周测定的需低温冻存。
2. 对收集后当天进行检测的标本，储存在 4 ℃ 备用，如有特殊原因需要周期收集标本， 将标本及时分装后放在 -20 ℃ 或 -70 ℃ 条件下保存。避免反复冻融。
3. 标本 2 -8 ℃ 可保存 48 小时， -20 ℃ 可保存 1 个月。 -70 度可保存 6 个月。部 分标本也可加入适当防腐剂，激素类标本需添加抑肽酶。

## 标本的处理

1. 可用作 ELISA 测定的标本十分广泛，体液（如血清）、分泌物（唾液）和排泄物（如尿液）、细胞培养上清、细胞、组织等均可作标本以测定其中某种成份。有些标本可直 接进行测定，有些则需经预处理。
2. 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右（2000-3000 转 / 分）。收集上清。如有沉淀形成，应再次离心。
3. 血浆：应根据试剂盒的要求选择 EDTA 、柠檬酸钠或肝素作为抗凝剂，加入 10 %（ v/v ）抗凝剂（0.1M 柠檬酸钠或 1% heparin 或 2.0%EDTA.Na2）混合 10-20 分钟后，离 心 20 分钟左右（ 2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清。如有沉淀形 成，应再次离 心。
4. 尿液、胸腹水、脑脊液： 用无菌管收集。离心 20 分钟左右（ 2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清。如有沉淀 形成，应再次离心。
5. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右（ 2000-3000 转 / 分）。仔 细收集上清。检测细胞内的 成份时，用 PBS

（ PH7.2-7.4 ）稀释细胞悬液，细胞浓 度达到 100 万 /ml 左右。 通过反复冻融， 以使细胞破坏并放出细胞内成份。 离心 20 分钟左右（ 2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

6. 细胞：检测细胞的成份时，对于贴壁细胞，去除培养液，用 PBS、生理盐水或无血清培养液 洗一遍。加入适量裂解液。用枪吹打数下，使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触 细胞 10 秒后，细胞就会被裂解。对于悬浮细胞，离心收集细胞，用 PBS、生理盐水 或无血清培养液洗一遍.加入适量裂解液，用枪吹打把细胞吹散。用手指轻弹以充分裂 解细胞。充分裂解后应没有明显的细胞沉淀。如果细胞量较多，必需分装然后再裂解。 充分裂解后，10000-14000g 离心 3-5 分钟，取上清，即可进行后续操作。
7. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS 或组织蛋白萃取试剂，缓冲液中可加入蛋 白酶抑制剂。用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（ 2000-3000 转 / 分）。仔细收集上清置于 -20 度或 －70 度保存，如有必要，可以将样品浓缩干燥。分 装后一份待检测，其余冷冻备用。

*如果您在实验中遇到任何问题，敬请咨询 027-67845390。