**ELISA实验操作流程**

1. **实验前准备工作**

**实验前样本和试剂盒室温平衡1小时。若样本是冻存样本，应提前拿到2-8摄氏度进行解冻（不建议直接室温解冻）。**

准备好实验所需耗材：蒸馏水（去离子水）。

1. **ELISA实验操作流程**
   1. **酶标板排版。**

将要进行实验的板孔进行设定好，标准品孔（建议做双标曲）、空白孔（只需设一个孔）、样本孔。

* 1. **稀释标准品。**

准备好5个EP管，在每个EP管中加入150微升标准品稀释液，编上编码，分别为1、2、3、4、5号。在1号管中加入150微升标准品，**用枪头反复吹打10次左右**（注意控制幅度不要过大容易产生气泡），如果有涡旋仪可以在涡旋仪上涡旋5秒左右，然后**换枪头**，在1号管中取150微升加入到2号管，后面过程以此类推，最后稀释完。前面4个管中每管液体在150微升，5号管为300微升，浓度是从大到小。

* 1. **标准品孔、样本孔、空白孔加样。**

标准孔是每个浓度点2个孔（复孔），每孔加入50微升，**加样过程中注意换枪头**；样本孔中每孔加入50微升（10微升样本+40微升样本稀释液），**加样过程中注意换枪头**；空白孔加入50微升蒸馏水。特别要说明的是，标准孔加样和样本孔加样尽量控制在**15分钟内**加完，如果时间拖的太长，会导致前面孔先反应，后面孔才开始反应，这样数值偏差过大。加完样后**贴上封板膜**，至37摄氏度孵育30分钟。

* 1. **洗板。**

在孵育过程中可以将洗涤液配好，20ml，30倍浓缩洗涤液用蒸馏水或者去离子水定容到600ml即可。每孔加入**250-300微升**的洗涤液（不要漫过板孔），（如果有震荡仪，可以将酶标板放入震荡仪上5秒左右，然后静止三十秒，没有请忽略次过程）。将酶标板在桌上晃动5秒左右，然后静置30秒，甩干，拍板。需要注意**甩干过程尽量要快**，1秒内就可以完成，不要慢慢倾斜倒掉液体，直接翻板甩掉液体即可。拍板过程需要在桌上垫一层吸水纸或者滤纸，板孔朝下拍几下，拍干区别主要看吸水纸和滤纸上没有明显的水渍为完成。

* 1. **加酶标试剂，即HRP。**

每孔加入50微升酶标试剂，此处在白孔中不需要加（空白孔为空），孵育30分钟。

* 1. **洗板同步骤4。**
  2. **显色。**

先每孔中加入50微升的显色A液，然后每孔中加入50微升显色B液。避光37摄氏度显色15分钟。（也可先将显色A、B液混匀，一起加入酶标板中。）

* 1. **终止。**

每孔加入50微升的终止液。**加完终止液必须在15分钟内读数**，超过时间读数无效，在规定时间内读数都是有效的。

**备注：**

◆在做整个实验之前，仪器最好**预热半小时**，也可以将仪器一直开着，直到整个实验结束。

◆在加液过程中**不要使枪头触及到酶标板底部**。一般枪头都悬空，可以将枪头靠在孔边缘，但枪头尖悬空，若枪头上残留液体看整体多少量，不要吹打下去，特别忌讳在板孔内壁流向板孔。整个加液过程不要产生气泡（洗涤液除外）。

◆试剂盒内通用的试剂有：**洗涤液、显色A、B液、终止液**。

◆**不参与实验的孔，需在实验前拆除**，密封放置2-8°保存。

◆封板膜是一次性物品，根据实验孔数，用多少剪多少。