

# ELISA >>>



实验小白必看

「雷区」



## ELISA实验的常见问题及原因分析

华美生物，您身边的科研好搭档。我们总结了ELISA实验中常见问题及解决方案，问题涵盖了背景高、白板（无显色）、信号弱、标准曲线差和重复性不好等常见原因。



### 问题1

#### 高背景/非特异性染色

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
终止后，整板结果显示均一的黄色或淡黄色；或标曲有线性但背景过高	整板发黄现象可能由于错加其他试剂造成	实验前检查试剂的组分及批号，确认所有组分均属于对应的试剂盒。不同试剂盒或不同批号的试剂不能混用。
	未充分清洗酶标板	确保清洗过程中每个微孔所加入洗涤液量一致。清洗完成后，将酶标板用力按压在吸水纸上，以除去残余的缓冲液。
	孵育时间过长	严格按照说明书操作。
	酶标记物污染了吸头及盛放显色剂容器或阳性对照污染了微孔	吸取不同的试剂时应更换吸头，配置不同的试剂组分时，应使用不同的储液器皿。操作时请使用移液器。
	检测抗体或Avidin-HRP的浓度过高	检查浓度计算是否正确或进一步稀释后再使用。



### 问题2

#### 白板

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
显色步骤结束后，酶标板所有孔均无颜色；阳性对照不显色	组分试剂混淆使用	配制或使用时应看清楚标签。
	洗板及加样过程中，酶标物受污染失活失去催化显色剂显色的能力	确认盛酶标的容器不含酶抑制剂（如NaN3等），确认配制洗液的容器已洗干净。
	遗漏了某种试剂或某个步骤	详细审阅说明书，并严格遵循操作步骤。



### 问题3

#### 显色淡

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
包括标曲、样本在内的所有板孔颜色均较淡	试剂盒超过有效期或储存不当	请在有效期内使用，并按照说明书推荐的保存条件保存，避免污染。


**标准曲线不佳/重复性不好**

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
包括标曲、样本在内的所有板孔颜色均较淡	试剂、样品用前未平衡	所有试剂、样品应置室温平衡 30min 左右。
	移液器吸量不足，移液抽吸排放太快，吸头内壁挂液太多或内壁不清洁	校正移液器，吸头要配套，每次吸头要吻合紧密。移液不宜过快，排放应完全。吸头内壁要清洁，最好一次性使用。
	孵育反应时间不足	定时器准确定时
	显色反应时间不足	一般在 15-30min，20min 为佳，特殊除外。
	显色剂加入顺序颠倒（双组分）	请严格按说明书。
	洗涤次数增加，浓缩洗液稀释倍数不符合要求	减少洗涤冲击力，按说明书要求稀释浓缩洗液、洗涤时间，准确记录洗涤次数及用量。
	蒸馏水水质有问题	配制好的洗液一定要检测 PH 值是否呈中性。
	洗板及加样过程中，酶标物受污染失活而失去催化显色剂显色的能力	确认盛酶标的容器不含酶抑制剂（如 Na <sub>3</sub> N 等），确认配制洗液的容器已洗干净，确认配制洗液的纯化水达到要求且未受污染。
标曲正常，样本显色较淡	样本使用 Na <sub>3</sub> N 防腐，抑制了酶的反应	样本不可使用 Na <sub>3</sub> N。
	待测标本中可能不含强阳性标本，故结果可能是正常的	如有怀疑，可复检。
目测结果正常，但酶标仪读值偏低	读取吸光值时使用了错误的滤光片	TMB 为底物时应在 450nm 波长读取吸光值，并以 650nm 作为校正波长。

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
重复性差	标准品配制有误	严格按照说明书标准品配制进行操作。仅使用推荐的稀释液对标准品进行稀释。
	试剂盒储存方法不当或储存环境太差	请在说明书推荐的保存条件下保存，不要将复悬后的组分在室温放置时间过长。
	过早稀释各工作组分	各工作组分请在使用前 10 分钟配制，并立即加入到微孔中。
	样本加入后未混匀	针对同时加入多种试剂组分，加样后在混匀器上充分混匀。注意稳拿稳放，防止外溅。
	酶标仪测定重复性差	校准酶标仪。
	孵育时间、洗涤条件、显色条件、操作人员不一致	重复测定标本，反应条件、人员等尽可能与上次保持一致。
	洗涤不正确	移液器准确加入 200μl/孔洗涤液或注满各孔，但不要溢出。洗板机洗板时不应有堵孔，洗涤应充分。
	孵育温度恒温效果不好	保证温度恒定，避免局部温度过高过低。
	加液时，过多残留于孔壁上	加液时，吸头在不碰到孔底的前提下尽量沿着孔壁下方加液。
	耗材重复使用	吸取不同的试剂时应更换吸头，配置不同的试剂组分时，应使用不同的储液器皿。

结果描述	可能的原因	建议或预防措施
重复性差	微孔底部被划伤或存在污垢	操作时细心，注意不要触碰底部。擦拭酶标板底部，以去除污垢或指纹。
	阈值附近时阴时阳	同一样品做3个复孔，以2个（含2个以上相同结果为准）。
	加样时交叉污染	加标本时尽量避免交叉污染。
出现随机性的花板、跳孔现象	手工洗板造成的交叉污染	手工洗板时前3次注洗液后应立即弃去，后几次再设定浸泡时间，可减少交叉污染。
	拍板时交叉污染	拍板时用合适的吸水纸巾，不要把无关物质拍进板孔，并尽量不要在同一位置拍，以免交叉污染。
	洗板机加液头堵塞导致加液不满或吸液残留量较大，造成花板、跳孔	疏通加液头，使洗板时每孔均注满洗液，吸液时残留量要小。
	样本离心处理不全，致使反应孔内发生凝血现象或存在沉淀物或残留细胞成分干扰	血清血浆应充分离心，3000rpm 6min以上。
	样品放置时间过长，污染	样品应保持新鲜，或低温保存，防止污染。
	洗涤液配制有误或直接误用浓缩洗涤液	按说明书配制。

## 华美ELISA产品优势

### 即用型

试剂盒成分无需特殊处理，操作简单。

### 超过10,000篇已发表文献

超10,000篇文献发表在国际知名期刊上，比如：*Nature*、*Science*、*Cell*、*Nature Medicine*、*Cell Metabolism*、*Nature Immunology*和*Gastroenterology*等。

### 涵盖种属多

涉及人、牛、鼠、鸡、兔等20多个种属。

### 检测样本多样性

血清、血浆、体液如尿液、细胞培养上清液和细胞/组织裂解液等。

### 高性能

试剂盒从原料到出库均采用高标准质控以保证产品质量。

## 热销ELISA试剂盒

靶点	货号	种属	样本类型	灵敏度	检测范围	已发表文献数
TNF	CSB-E11987r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	1.56 pg/mL	6.25 pg/mL-400 pg/mL	254
TNF	CSB-E04741m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	3.9 pg/mL	15.6 pg/mL-1000 pg/mL	188
IL6	CSB-E04640r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.078 pg/mL	0.312 pg/mL-20 pg/mL	182
IL6	CSB-E04639m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates	0.39 pg/mL	1.56 pg/mL-100 pg/mL	145
IL1B	CSB-E08055r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	15.6 pg/mL	62.5 pg/mL-4000 pg/mL	144
IL6	CSB-E04638h	Human	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, urine	2.453 pg/mL	7.8 pg/mL-500 pg/mL	125
IL1B	CSB-E08054m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	7.8 pg/mL	31.25 pg/mL-2000 pg/mL	125
TNF	CSB-E04740h	Human	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, cell lysates	1.95 pg/mL	7.8 pg/mL-500 pg/mL	87
CASP3	CSB-E08857r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.078 ng/mL	0.312 ng/mL-20 ng/mL	87
INS	CSB-E05071m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, cell lysates	3.9 nIU/mL	15.6 nIU/mL-1000 nIU/mL	80
IL10	CSB-E04595r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	0.78 pg/mL	3.12 pg/mL-200 pg/mL	76
T	CSB-E05100r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	0.06 ng/mL	0.13 ng/mL-25.6 ng/mL	75

靶点	货号	种属	样本类型	灵敏度	检测范围	已发表文献数
FSH	CSB-E06869r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.07 mIU/mL	0.3 mIU/mL-10 mIU/mL	75
LH	CSB-E12654r	Rat	serum, plasma	0.15 mLU/mL	0.3 mLU/mL-60 mLU/mL	71
IgM	CSB-E12045Fh	Fish	serum, plasma, tissue homogenates	1.25 µg/mL	1.25 µg/mL-50 µg/mL	63
INS	CSB-E05070r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates	3.9 nIU/mL	15.6 nIU/mL-1000 nIU/mL	62
LPS	CSB-E13066m	Mouse	serum, plasma, tissue homogenates	0.039 ng/mL	0.156 ng/mL-10 ng/mL	51
IL1B	CSB-E08053h	Human	serum, cell culture supernates, urine, cerebrospinal fluid (CSF)	31.25 pg/mL	125 pg/mL-8000 pg/mL	51
VEGFA	CSB-E11718h	Human	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, cell lysates, urine	25.297 pg/mL	31.25 pg/mL-2000 pg/mL	49
IL10	CSB-E04594m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	0.78 pg/mL	3.12 pg/mL-200 pg/mL	48
hs-CRP	CSB-E08617h	Human	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	0.156 ng/mL	0.625 ng/mL-40 ng/mL	45
TSH	CSB-E05115r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates	0.3 µIU/mL	0.6 µIU/mL-24 µIU/mL	39
IFNG	CSB-E04578m	Mouse	serum, plasma, tissue homogenates, cell culture supernates	3.9 pg/mL	15.6 pg/mL-1000 pg/mL	39
E2	CSB-E05110r	Rat	serum, plasma	40 pg/ml	40 pg/ml-1000 pg/ml	39
TGFB1	CSB-E04725h	Human	serum, plasma, cell culture supernates	0.747 ng/mL	0.78 ng/mL-50 ng/mL	38

靶点	货号	种属	样本类型	灵敏度	检测范围	已发表文献数
ANG- II	CSB-E04494r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, cell lysates	1.17 pg/mL	4.7 pg/mL-300 pg/mL	37
CORT	CSB-E07014r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL-40 ng/mL	35
BCL2	CSB-E08854r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.078 ng/mL	0.312 ng/mL-20 ng/mL	34
VEGFA	CSB-E04757r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.97 pg/mL	3.9 pg/mL-250 pg/mL	33
TGFB1	CSB-E04727r	Rat	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	1.56 pg/mL	6.25 pg/mL-400 pg/mL	33
LPS	CSB-E09945h	Human	serum, plasma, tissue homogenates	1.56 pg/mL	6.25 pg/mL-400 pg/mL	33
CK-MB	CSB-E14403r	Rat	serum, urine, tissue homogenates, plasma	0.078 ng/mL	0.312 ng/mL-20 ng/mL	33
CAT	CSB-E15928Fh	Fish	serum, plasma	62.5 mU/mL	125 mU/mL-2000 mU/mL	33
8-OHdG	CSB-E10140h	Human	serum, urine	3.12 ng/mL	3.12 ng/mL-800 ng/mL	33
SOD	CSB-E15929Fh	Fish	serum, plasma, tissue homogenates	0.625 ng/mL	1.25 ng/mL-20 ng/mL	31
IL10	CSB-E04593h	Human	serum, urine, cell culture supernates, ascitic fluid, cerebrospinal fluid (CSF), saliva	3.12 pg/mL	12.5 pg/mL-800 pg/mL	31
MMP9	CSB-E08008r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.195 ng/ml	0.78 ng/ml - 50 ng/ml	30
IFNG	CSB-E08550Ch	Chicken	serum, plasma, tissue homogenates	3.125 pg/mL	3.125 pg/mL-800 pg/mL	30

靶点	货号	种属	样本类型	灵敏度	检测范围	已发表文献数
DA	CSB-E08660r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.039 ng/mL	0.156 ng/mL-10 ng/mL	30
CCL2	CSB-E07430m	Mouse	serum, plasma, tissue homogenates	19.5 pg/mL	78 pg/mL-5000 pg/mL	30
ADP	CSB-E07270h	Human	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates, urine	1.102 ng/mL	1.562 ng/mL-100 ng/mL	30
IL6	CSB-E06903Rb	Rabbit	serum, plasma, tissue homogenates	3.9 pg/mL	15.6 pg/mL-1000 pg/mL	29
Aβ1-42	CSB-E10684h	Human	serum, plasma, tissue homogenates, cerebrospinal fluid (CSF)	0.078 ng/mL	0.312 ng/mL-20 ng/mL	29
IL35	CSB-E13126h	Human	serum, cell culture supernates, urine, tissue homogenates	15.6 pg/mL	62.5 pg/mL-4000 pg/mL	28
COR	CSB-E08487f	Fish	serum, plasma, tissue homogenates	0.0023 ng/mL	0.0023 ng/mL-10 ng/mL	28
CD81	CSB-EL004960HU	Human	serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates	0.039 ng/mL	0.156 ng/mL-10 ng/mL	28
PG-E2	CSB-E07967r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates	0.25 pg/mL	0.5 pg/mL-100 pg/mL	27
LEP	CSB-E07433r	Rat	serum, plasma, tissue homogenates	0.068 ng/ml	0.068 ng/ml - 50 ng/ml	27
IL4	CSB-E04634m	Mouse	serum, plasma, tissue homogenates, cell culture supernates	0.39 pg/mL	1.56 pg/mL-100 pg/mL	27
IL18	CSB-E04609m	Mouse	serum, plasma, cell culture supernates, tissue homogenates	0.39 pg/mL	1.56 pg/mL-100 pg/mL	27