ELISA 检测原理与实验设计

从抗体配对方式到标曲拟合，ELISA 的可靠性取决于一连串可以被验证的假设。本页说明每个环节的判断依据，以及在什么情况下结论会失效。

撰写与审核：瑞迪生物技术支持团队 | 最后更新：2026-11-03 | 内容与审核政策

两种基本原理

酶联免疫吸附测定（ELISA）的核心是**抗原–抗体的特异性结合**，通过偶联酶催化底物显色， 把结合量转换成可读的光信号。按抗体与抗原的结合方式，分两大类。

双抗体夹心法（Sandwich ELISA）

固相载体上包被**捕获抗体**，样本中的抗原被捕获后，再由**检测抗体**识别抗原的另一个表位， 形成「抗体–抗原–抗体」夹心结构。检测抗体通常带生物素，通过链霉亲和素-辣根过氧化物酶（SA-HRP）放大信号。

信号强度与抗原浓度**正相关**。由于需要两个抗体同时识别同一位点簇，夹心法对靶点的**表位数量与空间可及性**有要求： 小分子（分子量小于约 1000 Da）、多肽片段往往缺乏两个独立表位，不适合夹心法。

竞争法（Competitive ELISA）

样本中的抗原与固定量的酶标抗原**竞争**有限的抗体结合位点。样本抗原越多，酶标抗原结合越少， 信号越弱，因此信号与浓度**负相关**。

竞争法适用于**小分子、半抗原、激素、药物残留**等无法同时结合两个抗体的靶点。 代价是标准曲线需要反向解读，数据处理时通常先对信号取倒数或做对数变换再用 4-PL 拟合。

如何选择方法

判断维度	夹心法	竞争法
靶点分子量	通常 > 5 kDa，具备两个以上表位	小分子、半抗原、短肽
信号与浓度关系	正相关	负相关
灵敏度	通常更高（双抗体识别带来特异性放大）	相对较低，受竞争平衡限制
常见应用	细胞因子、激素、大分子标志物	类固醇、前列腺素、药物小分子

在实际选型中，靶点分子量与预期浓度区间是两个硬约束。若目标样本的预期值低于试剂盒灵敏度，即使方法学正确也无法定量，此时应更换更高灵敏度的产品，或先做浓缩富集。

标准曲线与拟合

标准曲线是把光信号换算成浓度的唯一桥梁。ELISA 的响应曲线呈 S 形， 常用**四参数逻辑回归（4-PL）**拟合：

> $y = d + (a - d) / [1 + (x / c)^b]$
>
> y = 吸光度；x = 浓度；a = 上渐近线；d = 下渐近线；c = 半最大效应浓度（EC_{50}）；b = 斜率因子

本站产品页给出的标曲数据包含三列：**标称浓度**、**实测 OD_{450}**、**校正 OD_{450}**（扣除空白孔）。校正 OD 是拟合的输入值，原始 OD 用于判断底物显色是否正常。

判断拟合质量不能只看 R^2。R^2 对高浓度端的偏差不敏感，而定量区间下端的误差往往更大。 更实用的做法是回算：把各标准点的实测 OD 代入拟合方程，得到**回算浓度**， 再与标称浓度比较，偏差应控制在 ±20% 以内（最低点可放宽到 ±25%）。

关于 R^2：本站在产品页不标注 R^2。原因是不同批次的 R^2 取决于标准点分布与浓度跨度， 跨产品比较没有意义；回算偏差与验证数据才是可比较的指标。

钩状效应

当样本中抗原浓度极高时，游离抗原会分别饱和捕获抗体与检测抗体， 导致形成的夹心复合物反而减少，信号随浓度升高而**下降**。 曲线在高浓度端出现「钩状」回落，此时检测结果会严重低估真实浓度。

识别方法：对疑似高浓度样本做 2–3 个梯度的稀释，若稀释后读数**乘以稀释倍数**高于原倍读数， 说明存在钩状效应。处理方式是提高稀释倍数后复测，并在报告中注明。

本站产品页的「验证数据」区块中，样本线性部分给出 2/4/8/16 倍稀释的实测回收率， 可直接判断该产品在高浓度区间的表现。

基质效应

血清、血浆、组织匀浆中的蛋白质、脂质、盐浓度会干扰抗体结合或酶活性，导致同一浓度的靶点在不同基质中读数不同。这是 ELISA 结果不可重复的最常见原因之一。

评估基质效应的标准做法是**加标回收**：向真实基质中加入已知量的标准品，测定回收率。

- 回收率 80–120%：基质干扰可接受，样本可直接检测或按说明书稀释
- 回收率低于 80%：可能存在抑制，建议提高稀释倍数或改用配套稀释液
- 回收率高于 120%：可能存在基质本身含靶点或非特异结合，需做基质空白

本站产品页分别给出**血清、EDTA 血浆、肝素血浆**三种基质的回收率与样本线性数据， 便于在选型阶段就判断哪种基质适用。

实验设计要点

1. **先做预实验确定稀释倍数。**取 3–5 例代表性样本，做 1:2、1:5、1:10 梯度稀释， 选择读数落在标曲中段的倍数。
2. **标准品与样本同批检测。**不同批次的酶标板、底物与显色时间都会影响读数， 跨批次比较必须各自带标曲。
3. **复孔与位置。**标准品与样本均建议双复孔；避免使用酶标板最外圈， 边缘孔蒸发速率不同，读数易偏高。

4. **显色时间一致。**底物加入后应统一计时，在相同终止条件下读数。 显色过深（OD > 3.0）会超出酶标仪线性范围。
5. **记录批次号。**不同批次的抗体效价存在差异，方法学部分应注明试剂盒批号。

方法局限

为了不给出过度承诺，以下几点需要明确：

- **ELISA 测的是免疫反应性，不是生物学活性。**抗体识别的可能是有活性或无活性的片段、 前体或降解产物，结果反映的是「可被抗体识别的总量」。
- **跨种属不可直接套用。**同靶点不同种属的抗体表位可能不同，交叉反应性需逐一验证。
- **不能替代临床诊断。**本站所有产品标注为科研用途（Research Use Only）， 未按体外诊断试剂注册，不得用于临床决策。

具体的参数定义与判定标准，见 验证参数释义；样本前处理细节见 样本处理指南。