

酶标（ELISA）综述

张传锋

ELISA的发展

ELISA是酶联接免疫吸附剂测定 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)的简称。自上世纪70年代初问世以来，发展十分迅速，目前已被广泛用于生物学和医学科学的许多领域。

ELISA技术原理

1. 抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。
2. 结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性。
3. 酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。
4. 受检标本与固相载体表面的抗原或抗体起反应。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。
5. 此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。
6. 加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。测定方法具有很高的灵敏度（pg-ng/ml水平），并且重复性好。

以免疫学反应为基础，将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合起来的一种敏感性很高的试验技术

ELISA的方法

1. 检测抗体的间接法
2. 双抗原/抗体 夹心法
3. 检测小分子抗原或半抗原的抗原竞争法

酶标的实验设计方法比较多，但是最常使用

比较常用的是ELISA双抗体夹心法及ELISA间

ELISA 检测方法

1. Abs（吸收光）检测法
2. 荧光检测法
 - 荧光强度（FI）
 - 荧光寿命（FL）
 - 荧光偏振（FP）
 - 荧光共振能量转移（FRET）
3. 发光检测法
 - 化学发光
 - 生物发光

其中 发光有分为 快速发光法（闪光法）、慢速发光法（辉光法）

技术要点

1. 试剂的制备、材料的准备
2. 反应条件的选择
3. 操作的标准化

试剂及材料的准备

ELISA的主要试剂有

1. 固相的抗原或抗体
2. 酶标记的抗原或抗体
3. 与标记酶直接关联的酶反应底物

固相载体

ELISA 反应中最常用的固相载体为聚苯乙烯材料，聚苯乙烯具有较强的吸附蛋白质的性能。抗体或蛋白质抗原吸附其上后保留原来的免疫活性，聚苯乙烯为塑料，可制成各种形式。在ELISA测定过程中，它作为载体和容器，不参与化学反应。

抗原、抗体和其它生物分子通过多种机制吸附至载体表面，这包括通过疏水键、流水/离子键的被动吸附，通过引入其它活性基团如氨基和碳基的共价结合，以及通过表面改性后的亲水键结合。

酶标板

•高结合力酶标板(High Binding ELISA Plate):

经表面处理后蛋白结合能力大大增强,可达到400-500ng IgG/cm²,主要结合的蛋白分子量>10kD.使用该类板可提供敏感性,并可相对减少包被蛋白的浓度和用量,不足之处为较易产生非特异性反应.抗原或抗体包被后,以非离子去污剂无法有效地封闭未结合的部位,需使用蛋白作为封闭剂.

•中结合力酶标板(Medium Binding ELISA Plate):

经表面疏水键被动与蛋白结合,适合作为分子量>20kD的大分子蛋白的固相载体,其蛋白结合能力为200-300ng IgG/cm².由于该类板所具的仅与大分子结合的特性,适用于作为未纯化抗体或抗原的固相载体,可降低潜在的非特异性交叉反应.该类板可以惰性蛋白或非离子去污剂作为封闭液.

•氨基化酶标板(Aminated ELISA Plate):

经表面改性处理后拥有带正电荷的氨基,其疏水键由亲水键取代.该类酶标板适合作为小分子蛋白的固相载体.使用合适的缓冲液和pH值,其表面可通过离子键与带负电荷的小分子结合.由于其表面的亲水特性和可通过其它交联剂共价结合的能力,可用于固定溶于Triton-100、Tween 20等去污剂的蛋白分子.该类板的缺陷为由于降低了疏水性,一部分蛋白分子无法结合;此外,其表面需有效的封闭.由于亲水和共价的表面特性,使用封闭液必须能够与非反应性氨基集团和所选择的交联剂中任何官能基团如succinimide、aldehyde和maleimide发生作用。

酶标板种类	透光率变异 (CV)	结合作用	样品特性	推荐用封闭剂
高结合力酶标板 300-500ng/cm ² :	5.00%	疏水键	带正电荷的>10kD 的中/大分子蛋白	含 0.3%Tween 20 的 PBS,0.05%Tween 20 和 1%BSA 联用
中结合力酶标板 200-300ng/cm ² :	5.00%	疏水键 / 离子键	>20kD 的中/大分子 蛋白	去污剂 Tween 20 等与蛋白 如 BSA、脱脂牛奶、血清联 用
氨基化酶标板 100ng/cm ² :	5.00%	离子键 / 共价键	带负电荷的小分子 或具有合适官能基 团的分子	蛋白如 BSA、脱脂牛奶、血 清及 10%ethanolam 等小分子

聚氯乙烯

聚氯乙烯与聚苯乙烯是类似的塑料，也可作

为ELISA固相载体，聚氯乙烯板的特点为质软板薄，可切割，价廉、但光洁度不如聚苯

乙烯板。聚氯乙烯对蛋白质的吸附性能比聚

苯乙烯高，但空白值有时也略高。

UV分析板(紫外光分析板)

聚苯乙烯和聚氯乙烯板在紫外区有很强的吸收不能

用于蛋白核酸的定量。

- UV分析板可直接读取核酸及蛋白的浓度
- 在260nm/280nm低本底干扰
- UV板价格昂贵一般在150RMB左右

抗原和抗体

抗原和抗体的质量是实验是否成功的关键因素。本法要求所

用抗原纯度高，抗体效价高、亲和力强。

- 天然抗原（天然抗原取材于动物组织或体液、微生物培养物等，一般含有多种抗原成分，需经纯化，提取出特定的抗原成分后才可应用，因此也称提纯抗原（purified antigen）。）
 - 重组抗原
 - 合成多肽抗原
- （重组抗原（recombinant antigen）和多肽抗原（peptide antigen）均为人工合成品，使用安全，而且纯度高，干扰物质少。）

抗体

- 多克隆抗体
- 单克隆抗体

抗血清成分复杂，应从中提取IgG才可用于包被固相或酶标记。含单克隆

抗体的小鼠腹水中的特异性抗体含量较高，有时可适当稀释后直接进行

包被。制备酶结合物用的抗体的质量往往要求有较高的纯度。经硫酸铵

盐析纯化的IgG可进一步用各种分子筛层析提纯。也可用亲和层析法提纯

特异性IgG，如用酶消化IgG后提取的Fab片段，则效果更好。

包被

固相的抗原或抗体称为免疫吸附剂。将抗原或抗体固相化的过程称为包被 (coating)。

1. 抗原或抗体溶于缓冲液 (最常用的为pH9.6的碳酸缓冲液)。
2. 加于ELISA板孔中在4℃ 过夜。
3. 包被后再用1% ~ 5%牛血清白蛋白包被一次, 可以消除这种干扰。这一过程称为封闭 (blocking)。(封闭为可选步骤, 有利于降低本底值。)
4. 包被好的ELISA板在低温可放置一段时间而不失去其免疫活性。

酶和底物

1. 纯度高、催化反应的转化率高、专一性强、性质稳定、来源丰富、价格不贵。
2. 制备成的酶标抗体或抗原性质稳定，继续保留着它的活性部分和催化能力。
3. 受检标本中最好不存在与标记酶相同的酶。
4. 相应底物应易于制备和保存，价格低廉。
5. 有色产物易于测定，光吸收高。

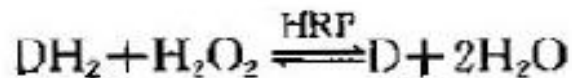
ELISA常用酶

辣根过氧化酶（HRP）

1. HRP在蔬菜作物辣根中含量很高。
2. 是一种糖蛋白，含糖量约18%；分子量为44kD。
3. 是一种复合酶，由主酶（酶蛋白）和辅基（亚铁血红素）结合而成的一种卟啉蛋白质。
4. 主酶为无色糖蛋白，在275nm波长处有最高吸收峰；辅基是深棕色的含铁卟啉环，在403nm波长处有最高吸收峰。

HRP的反应原理

HRP催化下列反应：



上式中DH₂为供氢体，H₂O₂为受氢体。HRP对受氢体的专一性很高，除H₂O₂外，仅作用于小分子醇的过氧化物和尿素的过氧化物。后者为固体，作为试剂较H₂O₂方便。许多化合物可作为HRP的供氢体，在ELISA中常用的供氢体底物为邻苯二胺（orthopenylenediamine，OPD）、四甲基联苯胺（3，3'，5，5'-tetramethylbenzidine，TMB）和ABTS[2，2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazolinesulfonate-6)]。

常用的酶反应底物

1. OPD（邻苯二胺）为在ELISA中应用最多的底物，灵敏度高，比色方便。缺点是配成应用液后稳定性差，而且具有致异变性。
2. TMB（四甲基联苯胺）没有OPD的缺点。TMB经酶作用后由无色变蓝色，目测对比鲜明；加酸停止酶反应后变黄色，可在比色计中定量；因此应用日见增多。
3. ABTS（2,2'-连氨基-2(3-乙基-并噻唑啉磺酸-6)铵盐），虽然灵敏度不如OPD和TMB，但空白值很低。

OPD反应原理

HRP催化OPD的反应如下：



HRP纯度、活力指标

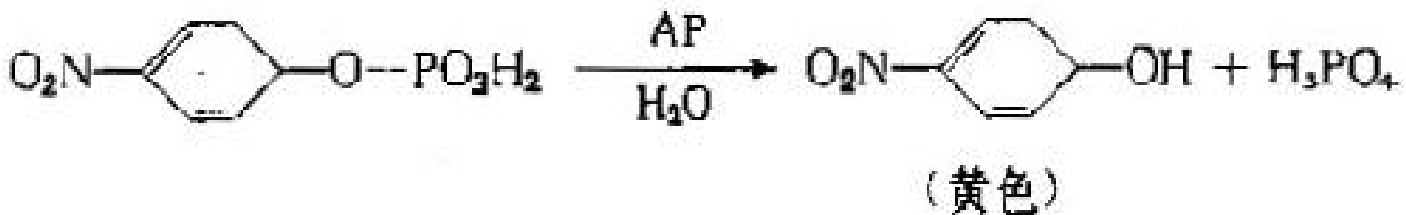
HRP的纯度用RZ (ReinheitZahl, 意为纯度数) 表示, 是403nm的吸光度与280nm的吸光度之比, 高纯度的HRP的RZ 3.0。应注意的是酶变性后, RZ可不变而活力降低, 故重用酶制剂时更重要的指标为活力。

酶活力以单位表示:

1min将1 μmol 的底物转化为产物的酶量为1个单位。

碱性磷酸酶 (AP)

- 大肠杆菌提取的AP分子量为80kD，酶作用的最适pH为8.0。
- 小牛肠粘膜提取的AP分子量为100kD，最适pH为9.6。
- 硝基苯磷酸酯 (p-nitrophenylphosphate, p-NPP) 作为底物。它可制成片状试剂，使用方便。
- 产物为黄色的对硝基酚，在405nm有吸收峰。用NaOH终止反应。



HRP与AP比较

1. AP系统的其敏感性一般高于HRP系统，空白值也较低。
2. 由于AP较难得到高纯度制剂，稳定性较HRP低。
3. AP价格较HRP高。
4. 制备酶结合物时AP得率较HRP低等。
5. 国内在ELISA中一般均采用HRP。

其它酶及比较

酶	底物	显色反应	测定波长
辣根过氧化物酶	邻苯二胺	橘红色	492*460**
	四甲替联苯胺	黄色	450
	氨基水杨酸	棕色	449
	邻联苯甲胺	兰色	425
	2,2'-连胺基-2(3-乙基-并噻唑啉磺酸-6) 铵盐	蓝绿色	642
碱性磷酸酯酶	4-硝基酚磷酸盐(PNP)	黄色	400
	萘酚-AS-Mx磷酸盐+重氮盐	红色	500
葡萄糖氧化酶	ABTS+HRP+葡萄糖	黄色	405,420
	葡萄糖+甲硫酚嗪+噻唑兰	深蓝色	
β -D-半乳糖苷酶	甲基伞酮基半乳糖苷(4MuG)	荧光	360,450
	硝基酚半乳糖苷(ONPG)	黄色	420

酶标结合物

酶标记的抗原或抗体称为结合物（conjugate）。抗原由于化学结构不同，

可用不同的方法与酶结合。如为蛋白质抗原，基本上可参考抗体酶

标记的方法。制备抗体酶结合物的方法通常有以下几种。

- 戊二醛交联法 戊二醛是一种双功能团试剂，可以使酶与蛋白质或其他抗原的氨基通过它而偶联。
- 过碘酸盐氧化法 只用于HRP的交联。

工作浓度

在ELISA测定中，应对包被抗原或抗体的浓度和酶标抗原或抗体的浓度予以选择，以达到最合适的测定条件和节省测定费用。

（一）间接法测抗体

1. 酶标抗抗体工作浓度的选择

- （1）用100ng/ml人IgG进行包被，洗涤。
- （2）将酶标抗人IgG用稀释液作一系列稀释后分别加入已包被的孔中，保温、洗涤。
- （3）加底物显色。加酸终止反应后，读取吸光度（A），绘制曲线如图15-10。读取A值在1.0时的酶标抗体稀释度，作为酶标抗体的工作浓度。该酶标抗人IgG的工作浓度应为1/1600。

包被液是法选择包被抗原工作浓度

- (1) 用包被液将抗原作一系列稀释后进行包被，洗涤。
- (2) 将强阳性参考血清、弱阳性参考血清和阴性参考血清用稀释液作1:100稀释，加样，保温，洗涤。
- (3) 加按工作浓度稀释的酶标抗人IgG抗体，保温，洗涤。
- (4) 加底物显色。加酸终止反应后读取A值。
- (5) 选择强阳性参考血清的A值为0.8左右、阴性参考血清的A值小于0.1
的包被抗的的稀释度作为工作浓度。

夹心法测抗原

在夹心法ELISA中可用棋盘滴定法同时选择包被抗体和酶标抗体的工
包被抗体的浓度及 参考抗原

酶标抗体稀释度	强阳性 (25ng/ml)	弱阳性 (1.5ng/ml)	阴性
10 μ g/ml			
1:1000	1.17	0.15	0.09
1:5000	0.46	0.03	0
1:25000	0.12	0	0
1 μ g/ml			
1:1000	>2	0.25	0.10
1:5000	0.91	0.12	0.01
1:25000	0.25	0.01	0
0.1 μ g/ml			
1:1000	0.42	0.13	0.13
1:5000	0.11	0.03	0.02
1:25000	0.03	0	0

夹心ELISA包被抗体和酶标抗体工作浓度的选择

1. 抗体免疫球蛋白用包被缓冲液稀释至蛋白浓度为10、1和0.1 $\mu\text{g/ml}$ ，分别在ELISA板上进行包被，每一浓度包括三个纵行，洗涤。
2. 在一个横行各包被孔中加入强阳性抗原液，另一横行加入弱阳性抗原液，第三横行加入阴性对照液，保温，洗涤。
3. 将酶标抗体用稀释液稀释成三个浓度，例如1:1000、1:5000和1:25000。分别加入每一包被浓度的一个纵行中，保温，洗涤。
4. 加底物显色。加酸终止反应后，读取A值。
5. 以强阳性抗原的A值在0.8左右、阴性参考的A值小于0.1的条件作最适条件，据此选择包被抗体和酶标抗体的工作浓度。从上表可看出包被抗体浓度可选用1 $\mu\text{g/ml}$ ，酶标抗体的稀释度可选为1:5000。为了进一步节省试剂，可以此浓度为基点，缩小间距再做进一步的棋盘滴定。

测定方法

- 制定测定方案
- 正确制备试剂
- 包被缓冲液、洗涤液、标本稀释液、结合物稀释液、底物工作液和酶反应终止液等，都要小心配制。
- 蒸馏水最好使用新鲜重蒸馏的。不合格的蒸馏水可使空白值升高。

测定步骤

- 加样
- 温浴
- 洗涤
- 读板

加样

- 除包被外都需45度加样
- 加样体积要准确
- 管底加样，不能加在管壁上
- 加样时不能产生气泡

温浴

- 加标本后和加结合物后，应立即放入按规定的反应温度的水浴箱。
- 各ELISA板不应叠在一起。
- 为避免蒸发，板上应加盖，或将板平放在底部垫有湿纱布的金属湿盒中。
- 加入底物后，反应的时间和温度通常不做严格要求。如室温高于20℃，ELISA板可避光放在实验台上，以便不时观察，待对照管显色适当时，即可终止酶反应。

洗涤

- 洗涤在ELISA过程中不是反应步骤，但却决定实验成败的关键。
- 目的是洗去反应液中没有与固相抗原或抗体结合的物质以及在反应过程中非特异性吸附于固相载体的干扰物质。

洗涤步骤

1. 吸干孔内反应液；
2. 将洗涤液注满板孔；
3. 放置2min，略作摇动；
4. 吸干孔内液，也可倾去液体后在吸水纸上拍干。洗涤的次数一般为3~4次，有时甚至需洗5~6次。

洗板机

手工洗涤流速较难控制，步骤繁琐且耗费时间，目前市面上多种洗板机可供选择，其中以美国Bio - Tek的ELX405洗板机最为突出

洗板机的应用范围

所有涉及到96/384孔板换液、孵育、洗涤的实验：

- ELISA
- 荧光ELISA
- 细胞洗涤
- In Cell Western
- Luminex
-

洗板机优势

- 自动化控制
- 精确度高
- 速度快（最快小于20S每板/每循环）



细胞包被层



手工洗涤或一般机器洗涤
角度不好，速度太快。



ELx405洗涤
速度可调、角度最佳，

洗板机厂家及比较

- Bio - Tek
 - 世界上第一品牌的洗板机生产厂家，占美国洗板机市场75%。国内由基因公司代理，应用、维修支持能力强、服务较好。
- MDC
 - 业界著名的酶标产品生产商，但在国内管理混乱，国内由九宇鑫泰、华粤行、吉泰、生泰、倍捷等公司代理，应用、维修支持能力较差。
- Tecan
 - 业界著名的酶标产品生产商，国内由东胜创新代理，厂家对中国的支持较差。

其它厂家雷杜、雷勃、普朗、科华、博赛等，优点：价格便宜
缺点：售后服务不行，维修困难。

读板

- 阴性对照颜色极浅，在定性测定中一般可采用目视比色。
- 如用酶标仪测定结果，准确性决定于ELISA板底的平整与透明度、酶标仪的质量和软件的算法。

酶标仪

- MD 公司
 - 业界老大，产品质量过硬，做工精细。但对中国支持服务较差、管理混乱。
- Bio - Tek 公司
 - 与MD公司伯仲之间，产品质量过硬，做工精细。进入中国市场十多年，市场占有率高，服务较好。
- PE公司
 - 著名的分析仪器生产商，但酶标产品单一、简单，后续支持不足。
- Tecan 公司
 - 著名的液体分装设备生产商，高端产品较好，底端产品较差。

软件排名

应用软件直接决定仪器的性能，应用范围等，没有软件的仪器就是一堆废铁。 - - - - 用户体会

1. Bio - Tek 公司最新软件 Gen5

窗口化设计程序、独立的功能模块，程序设计极为灵活、简单，功能强大，数据处理能力强，能完成各种数据分析，满足客户的各种需求。有中文版本，方便中国客户。

2. MD公司最新软件MaxPro6.0

软件功能强大，数据处理能力强，能完成各种数据分析，但界面有点乱，操作复杂，需要长时间的培训和摸索。

3. Bio - Tek公司 KC4、KCjunior

软件功能强大，数据处理能力强，能完成各种数据分析，但灵活性不足，限制了其应用范围。

酶标仪其它配件

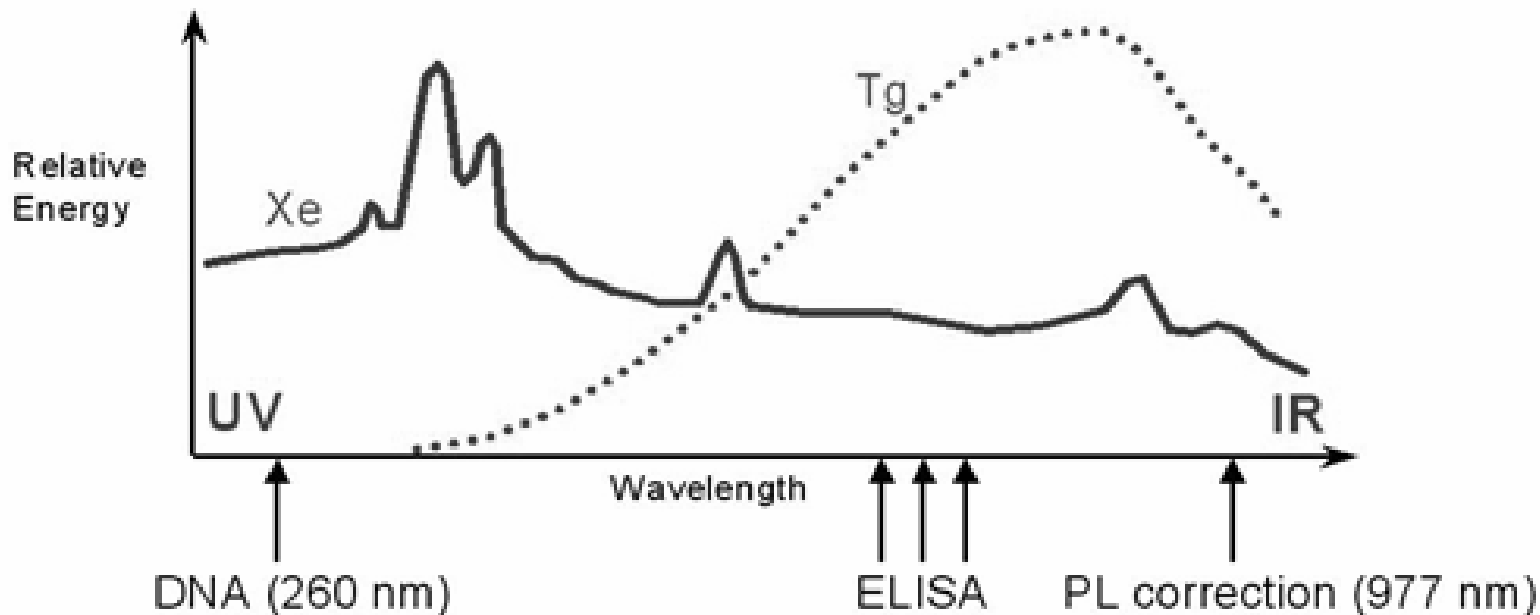
光源：

- 氙闪灯（波谱宽、低热辐射、寿命长，但是可见区能量低）

上表灯，不能用于此灯区，可见区能量低、

Xenon Flash Lamp

(Tungsten Halogen Lamp)



滤光片和单色器

滤光片和单色器各有优缺点，选择滤光片还是单色器和具体的实验要求有关。

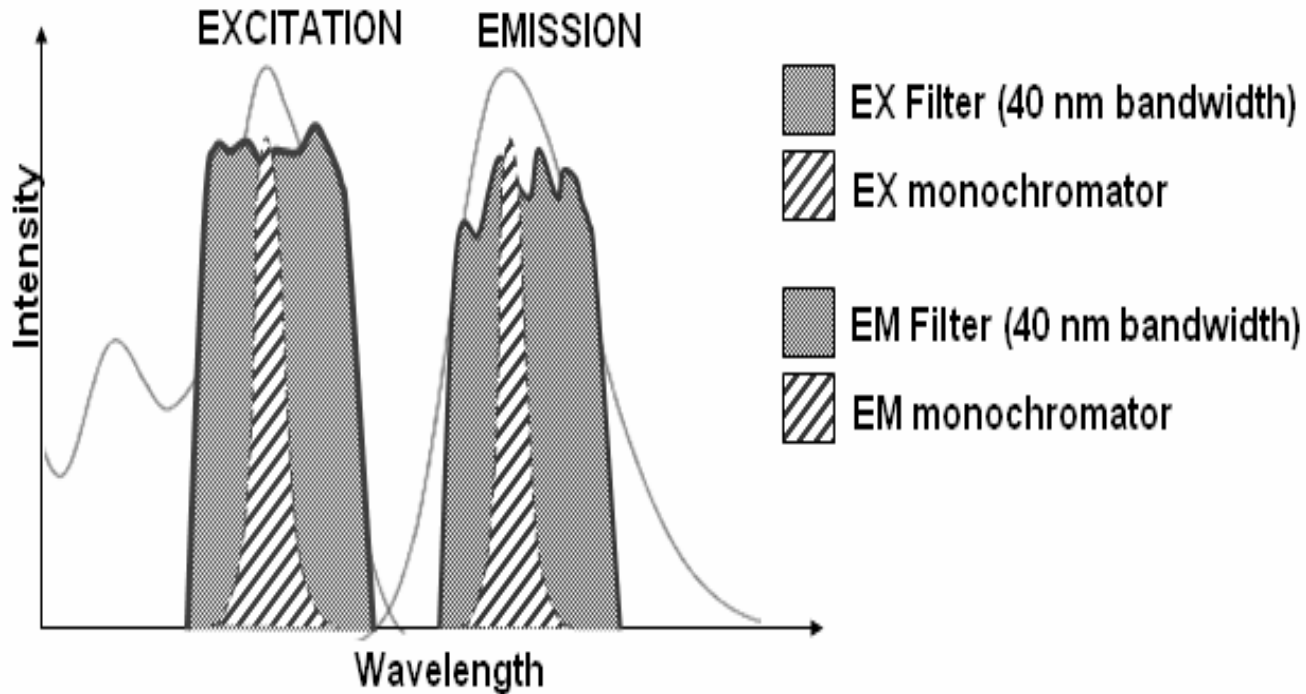
- 光吸收ELISA

单色器优于滤光片，由于卤素灯光强大，两者的灵敏度不相上下，单色器更为灵活、方便使用。

- 荧光检测ELISA

各有优缺点，单色器灵活，但是灵敏度低、特异性差；滤光片特异性好、灵敏度高，但灵活性不足。一般ELISA都是使用常用的荧光素，对科研工作者来讲滤光片较好，但是对荧光染料生产商来讲单色器较好。

濾光片和单色器比较



如图可以看到单色器的特异性和灵敏度较滤光片差很多，若要提高单色器的灵敏度和特异性，只有增加光源的强度和单色器的带宽，但是光源太强，会影响光源的寿命。增加单色器带宽会引起干涉现象，EX和EM出现较差。

其它酶标技术

化学发光免疫分析包括三大类型：

1. 标记化学发光物质的化学发光免疫分析
2. 标记荧光物质的荧光化学发光免疫分析
3. 标记酶的化学发光酶联免疫分析。

荧光的产生

一些化学物质能从外界吸收并储存能量（如光能、化学能等）而进入激发态，当其从激发态再回复到基态时，过剩的能量可以电磁辐射的形式放射（即发光）。

荧光物质检测的光都有 激发光（EX）和发射光（EM）

附 酶标基本步骤

用于检测未知抗原的双抗体夹心法:

1. 包被：用0.05M PH9. 钠碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为1 ~ 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1ml，4[°] 过夜。次日，弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液洗3次，每次3分钟。(简称洗涤，下同)。
2. 加样：加一定稀释的待检样品0.1ml于上述已包被之反应孔中，置37[°] 孵育1小时。然后洗涤。(同时做空白孔，阴性对照孔及阳性对照孔)。
3. 加酶标抗体：于各反应孔中，加入新鲜稀释的酶标抗体(经滴定后的稀释度)0.1ml。37[°] 孵育0.5 ~ 1小时，洗涤。
4. 加底物液显色：于各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液0.1ml，37[°] 10 ~ 30分钟。
5. 终止反应：于各反应孔中加入2M硫酸0.05ml。
6. 结果判定：可于白色背景上，直接用肉眼观察结果：反应孔内颜色越深，阳性程度越强，阴性反应为无色或极浅，依据所呈颜色的深浅，以“+”、“-”号表示。也可测O·D值：在ELX808酶标仪上，于450nm(若以ABTS显色，则410nm)处，以空白对照孔调零后测各孔O·D值，若大于规定的阴性对照OD值的2.1倍，即为阳性。

用于检测未知抗体的间接法

用包被缓冲液将已知抗原稀释至 $1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ，
每孔加 0.1ml ， 4°C 过夜。次日洗涤 3 次。



加一定稀释的待检样品 (未知抗体) 0.1ml 于上述已包被之反应孔中，置 37°C 孵育 1 小时，洗涤。(同时做空白、阴性及阳性孔对照)



于反应孔中，加入新鲜稀释的酶标第二抗体 (抗抗体) 0.1ml ，
 37°C 孵育 30-60 分钟，洗涤，最后一遍用 DDW 洗涤。



其余步骤同“双抗体夹心法”的 4、5、6。

用于检测未知抗体的间接法

1. 试剂

■ 包被缓冲液(PH9.6 0.05M碳酸盐缓冲液):

- Na₂CO₃ 1.59克
- NaHCO₃ 2.93克
- 加蒸馏水至1000ml

■ 洗涤缓冲液(PH7.4 PBS) : 0.15M

- KH₂PO₄ 0.2克
- Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9克
- NaCl 8.0克
- KCl 0.2克
- Tween-20 0.05% 0.5ml
- 加蒸馏水至1000ml

■ 稀释液 :

牛血清白蛋白(BSA) 0.1克加洗涤缓冲液至100ml或以羊血清、兔血清等血清与洗涤液配成5~10%使用。

■ 终止液(2M H₂SO₄) :

蒸馏水178.3ml, 逐滴加入浓硫酸(98%)21.7ml。

■ 底物缓冲液(PH5.0磷酸枣柠檬酸):

- 0.2M Na₂HPO₄ (28.4克 / L) 25.7ml
- 0.1M 柠檬酸(19.2克 / L) 24.3ml加蒸馏水50ml。

■ TMB(四甲基联苯胺)使用液:

- TMB(10mg / 5ml无水乙醇) 0.5ml

■ 底物缓冲液(PH5.5) 10ml

- 0.75% H₂O₂ 32 μl

■ ABTS使用液:

- ABTS 0.5mg

■ 底物缓冲液(PH5.5) 1ml

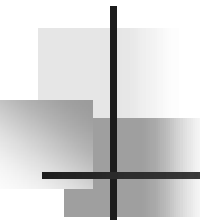
- 3% H₂O₂ 2 μl

■ 抗原、抗体和酶标记抗体。

正常人血清和阳性对照血清。

器材

1. 聚苯乙烯塑料板(简称酶标板)40孔或96孔，ELX808酶标仪，50 μ l及100 μ l加样器，塑料滴头，小毛巾，洗涤瓶。
2. 小烧杯、玻璃棒、试管、吸管和量筒等。
3. 4 冰箱，37 孵育箱。



以上资料均为网上收集整理，方便大家使用。 本人不保留任何版权，欢迎复制、引用。



感谢您的阅览！

欢迎有兴趣的朋友和我一起讨论ELISA ！

QQ : 25025740

MSN : rouke_zhang@hotmail.com