

微孔板化学发光免疫分析法检测人血清中三碘甲状腺原氨酸

汪阿恋^{①②}, 肖勤^②, 应希堂^③, 陈国南^①, 林金明^{②*}

① 福州大学化学化工学院, 福州 350002;

② 清华大学化学系, 北京 100084;

③ 北京科美东雅生物技术有限公司, 北京 100094

* 联系人, E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn

2009-05-11 收稿, 2009-09-27 接受

摘要 建立了一种定量人血清中三碘甲状腺原氨酸(T_3)的化学发光免疫分析方法, 使用辣根过氧化物酶(HRP)标记 T_3 抗原, HRP 催化鲁米诺-过氧化氢化学发光为检测体系. 对几种影响因素, 如包被抗体、酶标物的滴度进行选择, 对温育及检测时间等进行优化. 进行了方法学评价: 灵敏度为 0.07 ng/mL; 批内和批间变异均小于 10%; 回收率在 80%~90%之间; 与结构相似物 T_4 及 rT_3 均无明显交叉. 使用本方法与现有的发光试剂盒进行比对, 相关性良好, 相关系数为 0.9547.

关键词

三碘甲状腺原氨酸
化学发光免疫分析
辣根过氧化物酶

甲状腺作为人体最大的内分泌腺体, 分泌的主要活性物质有四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T_4), 三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T_3), 它们对于蛋白质合成、体温调节、能量产生和调节有着极为重要的作用. 甲状腺机能失调可导致形态突变、紊乱(甲减或甲亢)、炎症、恶性肿瘤等病症^[1]. T_3 可由甲状腺直接分泌后释放到血液中, 但是大部分是由游离 T_4 在外周组织脱去一个碘原子而释放入血^[2]. T_4 的含量是 T_3 含量的 4 倍左右, 然而 T_3 的作用是 T_4 的 10 倍左右^[3,4]. T_3 在判断人体生理状况上扮演重要角色^[5], 所以检测血清中 T_3 含量有重要意义.

99.70%的 T_3 与蛋白质结合, 游离型 T_3 (free triiodothyronine, FT $_3$)只占 0.3%. 为了测总 T_3 的含量, 需采取一些方法来避免连接蛋白的影响, 常用方法有: 结合蛋白的热钝化; 乙醇提取 T_3 ; 使用化学阻断剂, 如水杨酸盐^[6], 苯妥英钠^[7], 8-苯氨基萘-1-磺酸铵盐(ANS)等. Fang 和 Refetoff^[8]研究发现, 使用热钝化会使溶液浑浊而造成灵敏度低, 而使用乙醇提取 T_3 后很难再次溶解. 从反应的灵敏度和回收率看, 使用

ANS 较为合适, 所以本实验采用 ANS 将 T_3 从结合蛋白上解离出来从而测定血清中总 T_3 含量.

目前检测 T_3 最成熟的方法是放射免疫分析法(RIA)^[7-11]. 但 RIA 方法由于试剂具有放射性, 有效期短, 操作周期长, 检测仪器昂贵, 逐渐被其他方法取代. 酶联免疫分析法(ELISA)也可用来检测 T_3 ^[12-14], 但它灵敏度低, 步骤繁琐, 易受环境干扰, 容易出现假阳性现象. 此外, 电化学发光免疫分析^[15]、高效液相色谱免疫分析法^[16]、电喷雾串联质谱技术^[17]、顺序注射免疫分析法(SIIA)^[18,19]等方法也用来检测 T_3 , 它们可实现较高的灵敏度, 技术也可实现自动化, 但往往需要专门配套的仪器, 而且仪器、试剂价格昂贵, 限制了其广泛应用.

化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)基于放射免疫分析的基本原理, 将酶的化学发光与免疫反应结合起来而建立的一种临床诊断方法^[20,21]. 它综合了免疫分析和化学发光检测的优点, 灵敏度高、线性范围宽、标记物的有效期长、无放射性危害、可实现全自动化等^[22-26]. 本课题采用

英文引用格式: Wang A L, Xiao Q, Ying X T, et al. Microplate chemiluminescence immunoassay for determination of triiodothyronine in human serum (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 20-25, doi:10.1360/972009-995

微孔板式化学发光竞争免疫分析法对血清中 T_3 含量进行测定, 结果表明该方法稳定可靠, 可以用于诊断试剂盒的研发, 为临床疾病诊断、疗效评估等提供准确和可靠的依据, 具有重要的意义。

1 实验

1.1 仪器和试剂

BHP9504 微孔板化学发光分析仪(北京滨松光子技术有限公司); DEM-III 型洗板机(北京拓普分析仪器有限公司); 机械移液器(上海大龙医疗器械有限公司); HH.W21-Cr000 电热恒温水箱(北京长安科学仪器厂); WZ-2A 型微量振荡器(北京海淀电子医疗仪器厂); XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

羊抗 T_3 抗体(民海生物公司), T_3 抗原(美国 Fitzgerald 公司); HRP(美国 Sigma 公司); 临床血样来自于北京 301 医院; 底物液(鲁米诺、 H_2O_2 、发光增强剂等)及 T_3 化学发光免疫试剂盒均购自美国 Monobind 公司。

包被液: 0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH 9.6)。封闭液: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 含 0.5% BSA 和 0.05% Proclin-300); 洗涤液: 0.05 mol/L PBST (含 0.05% Tween-20)。

1.2 实验设计

本实验采用竞争的免疫化学发光法来检测 T_3 。首先利用微孔板材料聚乙烯的物理吸附作用将羊抗 T_3 抗体包被于微孔板表面, 制成固相抗体; 用 HRP 标记 T_3 抗原制成酶标记物; 反应时先将浓的酶标记物用酶稀释液以一定比例稀释以制成酶工作液, 然后依次加入待检测抗原和酶工作液。恒温下反应, 酶标抗原和待测抗原就在固相抗体上进行竞争反应, 分别形成酶标抗原-固相抗体及待测抗原-固相抗体的复合物。通过洗涤, 除去未结合的酶标抗原和待测抗原后, 将发光底物液加入微孔板中, 检测相对发光强度, 对应与标准曲线来得到待测浓度。

1.3 实验方法

(1) 固相抗体的制备。用碳酸盐缓冲液将羊抗 T_3 抗体以 20000 倍进行稀释, 制成包被液, 往 96-微孔板各孔中加入 150 μ L 该溶液, 4 $^{\circ}$ C 下包被 24 h。然后用 PBST 洗涤液洗 3 次, 拍干。加入国产 BSA 封闭液 200 μ L, 于 4 $^{\circ}$ C 下放置 20 h 后甩去封闭液, 拍干,

室温下干燥 12 h, 装入铝箔袋, 抽真空密封后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 酶标抗原(HRP- T_3)的制备。HRP 标记 T_3 抗原为本实验室自己标记, 方法为改良的过碘酸钠标记法^[27]。操作过程如下: 取 5 mg HRP 溶于 1 mL 蒸馏水中; 加入 0.5 mL 新鲜配置的 0.1 mol/L $NaIO_4$, 室温搅拌 30 min; 用 0.01 mol/L pH 4.4 醋酸钠缓冲液于 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 换洗 3 次; 加入 2.5% 乙二醇 1 mL, 室温下轻微搅拌 1 h, 终止反应; 加入待标记抗原 5 mg, 用 1.0 mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液, 调节 pH 值至 9.0; 加入硼氢化钠溶液 0.1 mL, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 3 h; 过柱纯化酶结合物, 贮存备用。

(3) T_3 标准品的配制。使用去激素人血清作为校准品的基质, 按照比例将 T_3 原料加入基质血清中, 调成一系列标准品。标准品浓度分别为 0.5(S_1), 1.0(S_2), 2.5(S_3), 5.0(S_4), 7.5(S_5) ng/mL, 校准品基质作为 S_0 点, 分装, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

(4) 血清样品中 T_3 的化学发光免疫分析。将需要的试剂于室温平衡 15 min。将浓的 HRP- T_3 用酶稀释液稀释 1000 倍以制成酶工作液。往固相抗体中依次加入校准品或待测样品 50 μ L, 酶工作液 100 μ L, 振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。洗板 5 次, 在吸水纸上拍干。加入 100 μ L 发光底物液, 避光反应 5 min, 用化学发光分析仪测量其相对发光强度(relative light unit, RLU)。

(5) 数据处理。采用双对数坐标, $\logit Y$ 为纵坐标, $\log X$ 为横坐标, 其中 X 为浓度, 而 $\logit Y$ 为:

$$\logit Y = \ln [y/(1-y)],$$

式中, $y = B/B_0$, B_0 和 B 分别指零校准孔和其他校准孔(或样品孔)的发光计数。

2 结果与讨论

2.1 包被缓冲液及抗体稀释度选择

在抗体稀释度为 1/5000, 1/20000, 1/40000, 1/80000 下, 分别使用磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液及碳酸缓冲液对抗体进行稀释制成包被液。包被及封闭的条件如 1.3 节(1)步骤所示。酶标记物稀释比例暂定为 1/1000。测 S_0, S_1, S_5 点的 RLU。实验结果见表 1, 可见碳酸缓冲液包被效果较好, 各点 RLU 均较高。综合考虑 RLU 和抑制率(RLU_{S_1}/RLU_{S_0} , 竞争法中需在 85% 左右), 选择碳酸盐缓冲液作为包被缓冲液, 包被抗体稀释

表1 包被缓冲液及抗体稀释度选择^{a)}

	T ₃ 抗体稀释度	RLU _{S0}	RLU _{S1}	RLU _{S5}	RLU _{S1} /RLU _{S0} (%)
磷酸盐缓冲液	1/5000	1.02×10 ⁶	9.63×10 ⁵	3.47×10 ⁵	94.4
	1/20000	9.01×10 ⁵	8.26×10 ⁵	2.32×10 ⁵	91.7
	1/40000	4.09×10 ⁵	3.02×10 ⁵	1.11×10 ⁵	73.8
	1/80000	3.12×10 ⁵	2.09×10 ⁵	5.80×10 ⁴	67.0
柠檬酸缓冲液	1/5000	7.54×10 ⁵	6.89×10 ⁵	1.22×10 ⁵	91.4
	1/20000	6.92×10 ⁵	5.31×10 ⁵	7.19×10 ⁴	76.7
	1/40000	5.66×10 ⁵	3.79×10 ⁵	4.64×10 ⁴	67.0
	1/80000	2.57×10 ⁵	1.13×10 ⁵	1.77×10 ⁴	44.0
碳酸缓冲液	1/5000	1.52×10 ⁶	1.43×10 ⁶	3.44×10 ⁵	94.1
	1/20000	1.25×10 ⁶	1.08×10 ⁶	2.04×10 ⁵	86.4
	1/40000	1.09×10 ⁶	7.64×10 ⁵	1.14×10 ⁵	70.1
	1/80000	7.65×10 ⁵	4.73×10 ⁵	6.43×10 ⁴	61.8

a) 实验条件: 酶标记物的稀释度为 1/1000, 37℃温育 1 h, 加入 100 μL 发光底物液 5 min 后进行检测

度为 1/20000.

2.2 酶标抗原稀释度的选择

用酶稀释液对 HRP-T₃ 进行系列稀释(1/400, 1/800, 1/1000, 1/1500), 得到各个稀释度下的发光值 (RLU_{S0}, RLU_{S1}, RLU_{S5}) 及 RLU_{S1}/RLU_{S0}, RLU_{S5}/RLU_{S0} 的值. 结果见表 2. 在竞争法中, 要求 RLU_{S1}/RLU_{S0} 在 85%左右, 以保证合适的灵敏度和线性范围, 而 RLU_{S5}/RLU_{S0} 在 15%左右, 以这两个指标为标准, 考虑相关系数 *r*, 最终选择酶标抗原的稀释比例为 1/1000.

2.3 温育时间的优化

在 37℃下分别选择温育时间在 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 min 时进行检测. 结果见图 1, 可以发现, 在 5~60 min 内发光强度上升较快, 在 60 min 后趋于平缓, 于是选择 60 min 为免疫反应温育时间.

2.4 化学发光动力学曲线

选择使用混合血清按 1.3(4)节的方法测定, 加入

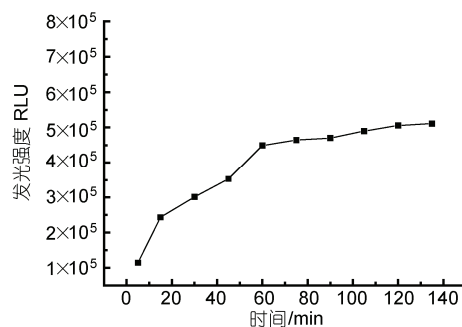


图1 温育时间的优化

实验条件: 包被抗体的稀释度为 1/20000, 酶标记物稀释度为 1/1000, 37℃温育 1 h, 加入 100 μL 发光底物液 5 min 后进行测量

发光底物后, 每 5 min 检测一次 RLU, 连续监测 80 min (图 2). 从图 2 可以看出, 5~35 min 为化学发光平台期, 35 min 后发光强度开始下降. 于是选择加入底物后 5~35 min 之间为最佳检测时间.

2.5 校准品稳定性考察

将包被板、标准品、酶标记物分别在 4℃及 37℃下放置 7 d, 通过对实际样品的检测来进行稳定性考

表2 酶标抗原稀释度的选择^{a)}

HRP-T ₃ 稀释度	RLU _{S0}	RLU _{S1}	RLU _{S3}	RLU _{S5}	RLU _{S1} /RLU _{S0}	RLU _{S5} /RLU _{S0}	相关系数 <i>r</i>
1/400	1.65×10 ⁶	1.64×10 ⁶	1.24×10 ⁶	8.13×10 ⁵	99.4	49.3	0.9843
1/800	9.09×10 ⁵	8.63×10 ⁵	4.26×10 ⁵	2.28×10 ⁵	94.9	25.1	0.9834
1/1000	6.54×10 ⁵	5.19×10 ⁵	1.99×10 ⁵	9.39×10 ⁴	79.4	14.4	0.9990
1/1500	5.89×10 ⁵	4.05×10 ⁵	1.72×10 ⁵	8.24×10 ⁴	68.8	14.0	0.9987

a) 实验条件: 包被抗体的稀释度为 1/20000, 37℃温育 1 h, 加入 100 μL 发光底物液 5 min 后进行测量

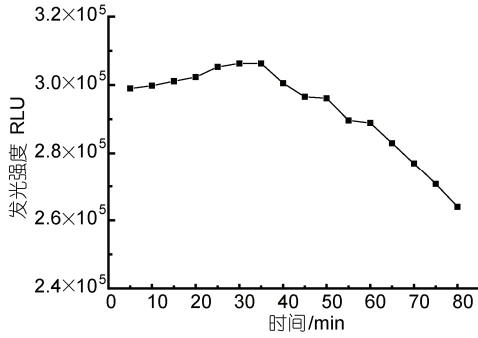


图2 化学发光动力学曲线

实验条件: 包被抗体的稀释度为 1/20000, 酶标记物稀释度为 1/1000, 37℃温育 1 h, 加入 100 μL 发光底物液, 室温下检测

察. 结果表明, 标准品及包被板稳定性好, 而 37℃下放置的酶标记物发光强度虽有所下降, 但是所测得标准曲线的相关系数及实际随机血样的测定值并无太大的变化. 通过在酶标记物中加入 0.1%酶稳定剂后, 酶标记物在 37℃下放置 7 d 后 RLU₅₀ 无明显变化, 稳定性良好.

2.6 方法学评价

(1) 校准曲线. 在优化条件下, 建立了测定血清中 T₃ 含量的化学发光免疫方法, 6 个标准点浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 ng/mL, 以 logX 为横坐标, logitY 为纵坐标, 两者呈线性相关, 相关系数大于 0.99.

(2) 灵敏度和精密度. 对零标准点平行测定 10 次, 求发光平均值及其标准偏差, 再由发光平均值减去两倍标准偏差后的值代入校准曲线所求得的浓度. 该值为灵敏度, 重复实验 3 次, 得平均灵敏度为 0.07 ng/mL.

对高、中、低 3 个不同浓度的质控品分别进行 3 次 10 孔平行测定, 计算测得浓度的批内及批间变异. 所测得的批内及批间变异均小于 10%. 结果见表 3.

表 3 化学发光免疫方法对 T₃ 测定的精密度^{a)}

	样品号	平均值/ng·mL ⁻¹	变异(%)
批内 (n = 10)	1	6.62	3.7
	2	3.24	8.1
	3	2.01	4.6
批间 (n = 30)	1	6.73	6.1
	2	3.26	8.4
	3	1.94	7.1

a) 实验条件: 包被抗体的稀释度为 1/20000, 酶标记物稀释度为 1/1000, 37℃温育 1 h, 加入 100 μL 发光底物液 5 min 后进行测量

(3) 回收率. 使用正常人血清: S₅ 点标准品 = 7:3 配成混合血样. 该血样再用正常人血清进行 1:1 稀释, 然后再以 1:1 稀释, 这样制成的 3 种混合溶液进行双孔测定, 分析结果与理论值进行对比, 重复实验 3 次, 测得平均回收率为 85.7%, 87.3% 及 82.4%. 回收值低于理论值(100%), 可能由于正常人血清中含一定值的 T₃, 在一定程度上受基质效应的影响, 但其回收值均在方法学误差范围之内.

(4) 健全性. 用零标准品对高值的标准(7.5 ng/mL) 进行依次倍比稀释, 得到稀释度分别为 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 和 1/32 的样品, 每个样品进行双孔平行测定以得到 T₃ 的浓度, 以稀释度作为 X 轴, 浓度为 Y 轴, 作图所得线性拟合方程为 Y = 7.4285X - 0.1175, 相关系数为 0.9943, 表明该分析体系有良好的健全性.

(5) 特异性. 特异性是评价免疫分析方法最重要的指标之一, 通常用交叉反应率表示. 交叉反应率越低, 所用抗体的特异性越高, 方法的测定结果越真实. 交叉反应率按照下面的公式计算:

$$\text{交叉反应}(\%) = \frac{\text{抑制}50\% \text{时所需} T_3 \text{的浓度}}{\text{抑制}50\% \text{时所需} T_3 \text{结构类似物的浓度}}$$

其中 T₄ 对 T₃ 抗体的交叉反应率为 0.064%, rT₃ 对 T₃ 的交叉反应率为 0.131%, 证明该方法具有较高的特异性, 可以满足实际测定的要求.

(6) 实际样品的检测及与 Monobind 试剂盒测定值的比较. 使用该方法对 70 例血样进行检测, 并与 Monobind 试剂盒测定值进行对比, 以本方法测定值为 X 轴, Monobind 测定值为 Y 轴, 作图得相关性曲线, 如图 3 所示. 该曲线方程为 Y = 0.0489X + 0.9882, 相

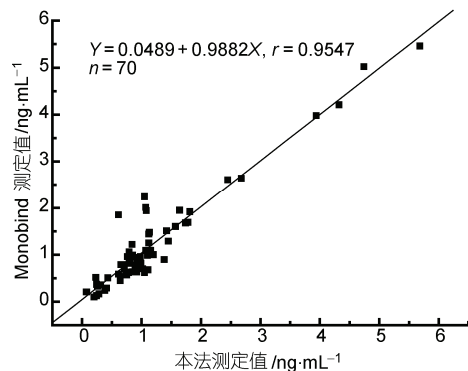


图 3 本方法测定值与 Monobind 试剂盒测定值的相关性

实验条件: 包被抗体的稀释度为 1/20000, 酶标记物稀释度为 1/1000, 37℃温育 1 h, 加入 100 mL 发光底物液 5 min 后进行测量

关系数为 0.9547。两者相关性良好,可见该法可用于试剂盒开发,用于实际应用。

3 结论

本文通过优化标记反应、竞争免疫反应条件和化学发光反应条件等,采用 HRP 催化 luminol-H₂O₂ 化

学发光体系,建立了一种测定人血清中 T₃ 的高灵敏、高特异、简便快速的微板式化学发光酶免疫分析方法。本法测定了 70 份临床血清,并与市售商品化试剂盒进行了对照,显示了良好的相关性,表明本法可完全用于构建 T₃ 诊断试剂盒,并在临床分析与检测中得到应用。

参考文献

- 1 Julia K, Heike H, Bianca N. Enantiorecognition of triiodothyronine and thyroxine enantiomers using different chiral selectors by HPLC and micro-HPLC. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, 70: 1254—1260
- 2 Inada M, Kasagi K, Kurata S, et al. Estimation of thyroxine and triiodothyronine distribution and of the conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in man. *J Clin Invest*, 1975, 55: 1337—1348
- 3 Lerman J. The physiological activity of L-triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab*, 1953, 13: 1341
- 4 Green W L. Guidelines for treatment of myxedema. *Med Clin N Amer*, 1968, 52: 431
- 5 Nauman J A, Nauman A, Werner S C. Total and free triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest*, 1967, 46: 1346—1355
- 6 Larsen P R. Direct immunoassay of triiodothyronine in human serum. *J Clin Invest*, 1972, 51: 1939—1949
- 7 Lieblich J, Utiger R D. Triiodothyronine radioimmunoassay. *J Clin Invest*, 1972, 51: 157—166
- 8 Fang V S, Refetoff S. Radioimmunoassay for serum triiodothyronine: Evaluation of simple techniques to control interference from binding proteins. *Clin Chem*, 1974, 20: 1150—1154
- 9 Sekadde C B, Slaunwhlte W R, Aceto T. Rapid radioimmunoassay of triiodothyronine. *Clin Chem*, 1973, 19: 1016—1021
- 10 Alexander N M, Jennings J F. Radioimmunoassay of serum triiodothyronine on small, reusable sephadex columns. *Clin Chem*, 1974, 20: 1353—1361
- 11 Rugg N E, Hasler M J, Bjornsen R E, et al. A fully automated solid-phase radioimmunoassay for triiodothyronine. *Clin Chem*, 1977, 23: 851—854
- 12 Gustaiisson J E C. Homogeneous enzyme immunoassay for thyroxine compared with a radioimmunoassay technique. *Clin Chem*, 1979, 25: 1476—1479
- 13 Yamamoto R, Hattori S, Inukai T, et al. Enzyme immunoassay for thyroxine and triiodothyronine in human serum, with use of a covalent chromatographic separation method. *Clin Chem*, 1981, 27: 1721—1723
- 14 Karapitta C D, Sotiroidis T G, Papadimitriou A, et al. Homogeneous enzyme immunoassay for triiodothyronine in serum. *Clin Chem*, 2001, 47: 569—574
- 15 Marta S C, Maurim A, Alfayate R. Analytical and clinical evaluation of TSH and thyroid hormones by electrochemiluminescent immunoassays. *Clin Biochem*, 1999, 32: 395—403
- 16 Gika H, Lämmerhofer M, Papadoyannis I, et al. Direct separation and quantitative analysis of thyroxine and triiodothyronine enantiomers in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 2004, 800: 193—201
- 17 Zhang Y, Conrad A H, Conrad G W. Detection and quantification of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 1781—1786
- 18 Dieter D, Christine K. Flow-injection and sequential-injection immunoassay for triiodothyronine using acridinium ester chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta*, 1999, 398: 183—190
- 19 Silvaieh H, Wintersteiger R, Schmid M G, et al. Enantioselective sequential-injection chemiluminescence immunoassays for 3,3',5-triiodothyronine (T₃) and thyroxine (T₄). *Anal Chim Acta*, 2002, 463: 5—14
- 20 林金明, 赵利霞, 王翔, 编著. 化学发光免疫分析. 北京: 化学工业出版社, 2008
- 21 靳辉, 王翔, 辛天兵, 等. 微孔板化学发光酶免疫分析法定量检测肿瘤标志物 CA72-4 的方法学研究. *科学通报*, 2008, 53: 2958—2963
- 22 Li Z, Zhao L, Lin J M, et al. Development of a highly sensitive, second antibody format chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of 17 β -estradiol in wastewater. *Anal Chim Acta*, 2006, 558: 290—295
- 23 Siangproh W, Dunchai W, Lin J M, et al. Development of a sensitive micro-magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of carcinoembryonic antigen. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387: 1965—1971

- 24 石根, 王栩, 唐宝军, 等. 微孔板化学发光免疫分析法定量分析人血清中游离前列腺特异性抗原(f-PSA). 分析化学, 2007, 35: 1541—1547
- 25 Wang X, Ying X, Lin J M, et al. Evaluation of carbohydrate antigen 50 (CA50) in human serum using magnetic particle-based chemiluminescence enzyme immunoassay. *Anal Chim Acta*, 2007, 598: 261—267
- 26 王栩, 林金明. 化学发光免疫分析技术新进展. 分析实验室, 2007, 26: 111—122
- 27 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 1983, 3: 97—100

Microplate chemiluminescence immunoassay for determination of triiodothyronine in human serum

WANG ALian^{1,2}, XIAO Qin², YING XiTang³, CHEN GuoNan¹, LIN JinMing²

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002;

²Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084;

³Beijing Chemclin Biotech Co., Ltd., Beijing 100094

A microplate chemiluminescence immunoassay (CLIA) was developed for the clinical determination of Triiodothyronine(T₃) in human serum, and the luminal-hydrogen peroxide was used as chemiluminescence system catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). Several physicochemical parameters such as the dilution ratios of coated antibody and HRP-T₃ conjugate was chose, the incubation time and detection time were optimized. Methodology evaluation was done: the detection limit was 0.07 ng/mL; intra-assay and inter-assay coefficient of variation (CV) was less than 10%; the recovery was 80%—90%; there was not have obviously cross-reactivity of T₄ and rT₃ with the similar structure. Compared with a commercial CLIA kit, there was a good correlation between the two methods, the correlation coefficient was 0.9547.

triiodothyronine, chemiluminescence immunoassay, horseradish peroxidase

doi: 10.1360/972009-995