

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/56
G01N 33/86



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815715.7

[43] 公开日 2003 年 11 月 26 日

[11] 公开号 CN 1458980A

[22] 申请日 2001.8.17 [21] 申请号 01815715.7
[30] 优先权
[32] 2000. 8. 28 [33] FR [31] 00/10999
[86] 国际申请 PCT/FR01/02628 2001.8.17
[87] 国际公布 WO02/18628 法 2002.3.7
[85] 进入国家阶段日期 2003.3.14
[71] 申请人 斯塔戈诊断公司
地址 法国阿涅尔
共同申请人 公共救济事业局 - 巴黎医院
[72] 发明人 B·S·S·米斯哈希 J·索里亚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 14 页

[54] 发明名称 可溶性纤维蛋白分析方法
[57] 摘要

本发明涉及分析样品中可溶性纤维蛋白的方法，其中将所述样品接触具有可溶性纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物 (PA - Fb sp)，通过测量可溶性纤维蛋白经 PA - Fb sp 降解后获得的纤维蛋白降解产物比例与样品接触 PA - Fb sp 之前测定的纤维蛋白降解产物基础比例之间的差异，测量样品中可溶性纤维蛋白含量。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 分析样品中可溶性纤维蛋白的方法，其中所述样品接触具有可溶性纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物(PA-Fb sp)，通过测量可溶性纤维蛋白经 PA-Fb sp 降解后获得的纤维蛋白降解产物数目与所述样品接触 PA-Fb sp 之前测定的纤维蛋白降解产物基础数目之间的差异，测量样品中可溶性纤维蛋白数目。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述测定的纤维蛋白降解产物是 D-二聚体。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其特征在于所述的具有可溶性纤维蛋白高亲和力的纤溶酶原激活物(PA-Fb sp)特异性针对纤维蛋白。

4. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述的 PA-Fb sp 选自：tPA 及其衍生物、VPA 或其衍生物、以及葡萄球菌激酶或其一种突变体。

5. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述的 PA-Fb sp 是 t-PA 或葡萄球菌激酶。

6. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述的血液样品为血浆。

7. 权利要求 1 的方法，其特征在于所述的纤维蛋白降解产物利用 ELISA 或 LIATEST 类型方法分析。

8. 权利要求 1-6 中任一项的方法，其特征在于所述的测试样品在 PA-Fb sp 存在下，于 37°C 温育 15 分钟。

9. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其特征在于所述的 PA-Fb sp 是样品的终浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 tPA。

10. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其特征在于所述的 PA-Fb sp 选自葡萄球菌激酶、bat-tPA、VPA、DSPAs、FEKP、EKP 和 KP。

11. 权利要求 1-7 中任一项的方法，其特征在于所述的 PA-Fb sp 是样品的终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的葡萄球菌激酶。

12. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其特征在于相对于阳性对照确定 PA-Fb sp 活化产生的可溶性纤维蛋白降解产物数目。

13. 权利要求 11 的方法，其特征在于从经过处理、体外诱导凝血活

化而不形成凝块的正常血浆中制备阳性对照。

14. 用于权利要求 1-12 中任一项的方法的阳性对照, 其特征在於由经过处理、体外诱导凝血活化而不形成凝块的正常血浆组成, 并且所述血浆在和应用于测试样品类似的条件下, 接触具有可溶性纤维蛋白高亲和力和/或高特异性的纤溶酶原激活物。

15. 具有纤维蛋白高亲和力的纤溶酶原激活物(PA-Fb sp)的用途, 用于通过产生特异性降解产物而分析可溶性纤维蛋白的方法。

16. 权利要求 15 的用途, 其特征在於所述的纤维蛋白降解产物是 D-二聚体。

17. 权利要求 15 的用途, 其特征在於所述的 PA-Fb sp 选自: tPA 及其衍生物、VPA 或其衍生物、以及葡萄球菌激酶或其一种突变体。

18. 权利要求 15 的用途, 其特征在於所述的 PA-Fb sp 是 tPA 或葡萄球菌激酶。

19. 分析样品中可溶性纤维蛋白的试剂盒, 其特征在於包含:

- 存在可溶性纤维蛋白的阳性对照;
- 由对照血浆组成的阴性对照;
- PA-Fb sp, 供单个样品的单份数量, 或者足够供多个样品的数量;
- 分析 D-二聚体的试剂; 以及
- 任选的稀释样品用缓冲液。

20. 权利要求 19 的试剂盒, 其特征在於所述的阳性对照和阴性对照血浆为冻干形式。

21. 权利要求 19 的试剂盒, 其特征在於所述的 PA-Fb sp 是 tPA。

22. 权利要求 19 的试剂盒, 其特征在於分析 D-二聚体的试剂是 ELISA、或对胶乳颗粒凝集方法灵敏的 LIATEST 类型测试试剂。

23. 权利要求 1-12 中任一项的方法的用途, 或者权利要求 19-22 中任一项的试剂盒, 用于监测凝血活化过程的变化, 并评价抗凝血药物的功效。

可溶性纤维蛋白分析方法

本发明涉及通过在血液样品中产生特异性降解产物而分析可溶性纤维蛋白的方法。

凝血活化时，产生凝血酶，导致形成纤维蛋白沉淀，并形成可溶性纤维蛋白。

凝血酶使血纤维蛋白肽 A 与纤维蛋白原分子分离，导致产生纤维蛋白单体，其上在纤维蛋白原中掩蔽的“A”聚合位点暴露，引起纤维蛋白单体的“A”位点与纤维蛋白原和纤维蛋白上可接近的“a”位点相互作用。然后释放血纤维蛋白肽 B，导致“B”聚合位点暴露，引起纤维蛋白单体分子的“B”位点与纤维蛋白原和纤维蛋白单体上可接近的“b”位点相互作用。

如果凝血酶的量非常高(体外测试)，全部纤维蛋白原转化为纤维蛋白单体，其然后通过位点“A”和“a”以及“B”和“b”的相互作用而聚合，产生纤维蛋白凝块。然而体内产生的凝血酶较少。产生的纤维蛋白单体较少暴露，因此，一部分纤维蛋白单体聚合产生纤维蛋白(血栓)，另一部分与带有可接近的a和b位点的纤维蛋白原反应，或者与纤维蛋白原降解产物反应，形成可溶性纤维蛋白，其中纤维蛋白单体与纤维蛋白原结合。

为了研究患者中是否存在凝血活化而测定可溶性纤维蛋白，在血液特别是血浆中存在可溶性纤维蛋白，为这种活化提供了证据。

该测定是分析组成血栓的纤维蛋白的纤维蛋白溶解作用形成的D-二聚体的必要补充，这也是凝血活化过程的标志。体内凝块降解时，血浆D-二聚体数目升高。为此，如果存在血栓，并处于降解过程，则无论凝血持续或停止，D-二聚体数目应该升高；相反，如果凝血停止，则可溶性纤维蛋白数目不再升高，反之，如果凝血持续可溶性纤维蛋白则升

高。

就 D-二聚体数目特异性测定血浆可溶性纤维蛋白含量能:

1. 测定患者在取样时是否存在凝血过程;

2. 评价凝-溶 (coagulo-lytic) 平衡。基础 D-二聚体数目反映体内血栓降解; 血浆加入溶栓剂后获得的 D-二聚体数目代表基础 D-二聚体以及来自循环中纤维蛋白的降解(或可溶性纤维蛋白)的 D-二聚体总数。

可引用的分析纤维蛋白的最早方法包括乙醇测试(1, 2, 9)、或硫酸鱼精蛋白测试(3, 4, 5, 7)。然而这些测试不是很特异(9, 10), 并不很灵敏(10)。另外, 大的纤维蛋白原数目(> 5 g/l)干扰乙醇测试和硫酸鱼精蛋白测试获得的结果。最后, 硫酸鱼精蛋白测试结果难于解释(6, 8)。

另一种检测可溶性纤维蛋白的方法是基于利用 Largo 所述方法(11, 12), 用纤维蛋白单体致敏的红细胞的血细胞凝集技术。此种测试例如 Diagnostica Stago 销售的 FS 测试。

该技术虽然简单, 有时缺少灵敏性, 特别适合于诊断弥散性血管内凝血。但不能检测少量的可溶性纤维蛋白(局部血栓形成, 探测抗凝药效果)。

目前, 分析可溶性纤维蛋白的其它技术基于利用单克隆抗体, 检测纤维蛋白暴露表位、以及纤维蛋白原掩蔽表位、或纤维蛋白或纤维蛋白原降解产物(13-14)。然而, 利用单克隆抗体直接分析导致可溶性纤维蛋白数目依所用商品化抗体而变化。

本发明作者提出不同于现有技术的方法, 来评价患者凝-溶平衡, 其特别简单、快速。这比上述血细胞凝集方法更为灵敏。与利用单克隆抗体的测试相比有优势, 它利用同样的方式检测循环的纤维蛋白(可溶性)以及已经体内降解的纤维蛋白, 因而提供凝-溶平衡的极准确评价。

在本发明方法中, 在样品与纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物(PA-Fb sp)温育期间, 于产生可溶性纤维蛋白降解产物之后, 测量样品中存在的可溶性纤维蛋白。可溶性纤维蛋白经 PA-Fb sp 降解获得的降

解产物数目，与样品接触 PA-Fb sp 前测量的基础纤维蛋白降解产物数目之间的差异，使得可以测定样品中血浆可溶性纤维蛋白数目。

因此，本发明提供了分析生物样品中可溶性纤维蛋白的方法，其中所述样品接触具有纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物 (PA-Fb sp)，通过测量可溶性纤维蛋白经 PA-Fb sp 降解获得的降解产物数目与所述样品接触 PA-Fb sp 之前测定的纤维蛋白降解产物基础数目之间的差异，测量样品的可溶性纤维蛋白数目。

本发明分析生物样品中可溶性纤维蛋白的方法，包含以下步骤：

- 分析血浆样品中含有的纤维蛋白降解产物；
- 在能够将样品含有的可溶性纤维蛋白降解为其降解产物的条件下，使血液样品接触具有纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物 (Pa-Fb sp)；
- 分析与 Pa-Fb sp 温育的样品中的纤维蛋白降解产物；
- 根据 Pa-Fb sp 温育后以及未处理样品中测定的纤维蛋白降解产物数目之间的差异，测定可溶性纤维蛋白。

选择用于分析降解产物的试剂，测量特定的降解产物。例如，使用对特定类型降解产物具有一定特异性的抗体。

生物样品优选生物液体，例如血液或血浆样品，或来自引流物 (drainage)。

本发明也涉及具有纤维蛋白高特异性的纤溶酶原激活物 (即，其只活化纤维蛋白中的纤溶酶原) 在通过产生特异性降解产物而分析可溶性纤维蛋白的方法中的用途。还涉及进行上述方法的试剂盒。

许多纤溶酶原激活物为人所知。但是某些既降解纤维蛋白原，又降解纤维蛋白，例如链激酶和尿激酶 (15)。这种化合物不适合本发明方法，因为它们引起纤维蛋白原降解，产生纤维蛋白原降解产物，其干扰纤维蛋白降解产物。

另一组纤溶酶原激活物由对降解纤维蛋白具有高特异性 (与降解纤维蛋白原比较) 的化合物组成。本发明方法优先利用该第二组化合物的特异性。

文献中已描述了具有该特异性(PA-Fb sp)的不同化合物。已知的实例有:

- 组织纤溶酶原激活物(t-PA)或其衍生物, 例如 TNK-tPA, 其是具有极高纤维蛋白特异性的 tPA 突变体(16);
- 来自普通吸血蝙蝠(*Desmodus rotundus*)唾液的活化剂(bat-tPA 或 vPA=吸血蝙蝠(Vampire bat)唾液纤溶酶原激活物)或其衍生物: DSPA=普通吸血蝙蝠唾液 PA, FEKP=DSPA α 1 和 α 2, EKP=DSPA β , KP=DSPA γ , (17);
- 葡萄球菌激酶(SAK), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)分泌的多肽(18-19)或其突变体之一(20)。

本发明方法优选利用血浆样品进行。通过测定经 PA-Fb sp 作用产生的降解产物, 测定可溶性纤维蛋白数目。如有必要, 将正常血浆经微量凝血酶处理, 诱导凝血活化, 以产生可溶性纤维蛋白, 而不引起凝块形成, 以此作为阳性对照, 用以确证该方法。

为了获得阳性血浆对照, 血浆先与凝血酶或其它凝血活化剂温育一定时间。然后加入活化剂抑制剂, 防止反应继续, 从而阻断随后启动的凝血过程。例如, 活化剂是凝血酶时, 将水蛭素或肝素用作抑制剂。

可方便确定血浆温育时间以及凝血活化剂和阻断抑制剂的浓度, 以获得凝块开始形成之前的全部凝血活化步骤。

在凝血活化剂(凝血酶)存在下温育优选温育时间 2 分钟、室温进行。然后加入大大过量的抑制剂, 以确保阻断凝血。

- 如果使用水蛭素, 对于凝血酶终浓度为 0.18 U/ml 时, 其优选使用终浓度为 100 μ g/ml。

- 如果使用肝素, 使用的凝血酶终浓度为 0.18 U/ml 时, 其使用终浓度为 500 U/ml。

本发明评价可溶性纤维蛋白, 首先用 PA-Fb sp 降解可溶性纤维蛋白, 然后测定经 PA-Fb sp 作用产生的特异性降解产物。

尽可能迅速地获得代表样品中存在的可溶性纤维蛋白数量的本发明方法的结果, 至关重要。为此, 必须确定 PA-Fb sp 的使用条件, 以迅

速降解可溶性纤维蛋白，而不伴有循环中血浆纤维蛋白原的降解“污染”，其产生降解产物，在分析中干扰来自可溶性纤维蛋白的降解产物。

选择 PA-Fb sp 的剂量，以引起阳性对照中纤维蛋白降解产物的最大升高，阴性对照(即，不用凝血活化剂)几乎不升高。

本发明范围内可以使用使纤维蛋白特异性降解的不同纤维蛋白溶解活化剂。PA-Fb sp 优选自上述活化剂，即：t-PA 或其衍生物、VPA 或其衍生物、以及葡萄球菌激酶或其突变体之一。优选使用 t-PA 或葡萄球菌激酶，更优选 t-PA。

样品于 37°C 温育 15 分钟，所用葡萄球菌激酶终浓度为 1-12 $\mu\text{g/ml}$ 范围内。最终滞留浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。温育时间可以变动，其变化决定于所用 PA-Fb sp 的天然功能和浓度。

t-PA 优选使用终浓度为 1-2.5 $\mu\text{g/ml}$ 范围内。t-PA 优选使用 2 $\mu\text{g/ml}$ 浓度。

存在不同的可以特异性检测的可溶性纤维蛋白降解产物。在优选实施方案中，测定 PA-Fb sp 作用于可溶性纤维蛋白产生的 D-二聚体数目，即测定 PA-Fb sp 作用于可溶性纤维蛋白产生的 D-二聚体浓度(PA-Fb sp 作用后的 D-二聚体 - PA-Fb sp 作用前的基础 D-二聚体)。

可以利用任何常规分析技术，例如 ELISA 类方法、胶乳粒凝集灵敏方法、免疫层析方法等，分析可溶性纤维蛋白在 PA-Fb sp 存在下降解产生的 D-二聚体。可以提到的不同商品化 D-二聚体分析检验的实例有，ASSERACHROM D-Di 或 STA LIATEST D-Di，均由 Diagnostica Stago 经销。然而在本发明范围内，可方便地改变 ASSERACHROM D-Di ELISA 检验的使用条件，以缩短检验(与固定化抗体温育 15 分钟，与过氧化物酶标记的抗体温育 15 分钟)。

除 DD/E 片段以外，存在可以测定的其它纤维蛋白降解产物，例如 YD/DY、YD/DXD 复合物。

如以下实施例所阐明(见实施例 3)，对于在开始治疗以前、或抗凝治疗期间、或停止抗凝治疗以后表现凝血活化的患者上，可以实行本发

明方法。其不仅能评价凝血活化过程、特别是在凝血活化诊断时的变化，而且能评价抗凝血治疗的效果。

另一方面，本发明涉及分析样品中可溶性纤维蛋白剂量的试剂盒，其特征在于包含：

- 存在利用上述方法获得的可溶性纤维蛋白的阳性对照；
- 由对照血浆组成的阴性对照；
- PA-Fb sp，供单个样品的单份数量，或者足够供多个样品的数量；
- 分析 D-二聚体的试剂；以及
- 任选的稀释样品用缓冲液，例如包含 0.1% 胎牛血清和 Tween 的 pH 7.4 磷酸缓冲液。

阳性和阴性血浆对照优选是冻干的。

优选 PA Fb sp 为 tPA。

例如，利用 ELISA 类型方法的试剂分析 D-二聚体，例如 ASSERACHROM D-Di，或者利用对胶乳颗粒凝聚灵敏的测试的试剂，例如 STA LIATEST D-Di，均由 Diagnostica Stago 经销。

以下实施例解释本发明。

实施例 1：

选择用于获得包含可溶性纤维蛋白的阳性血浆对照的凝血酶浓度：

利用以下方法制备阳性血浆对照：

正常血浆	300 μ l
人凝血酶(Stago ref. 00896), 2 u/ml	30 μ l
室温下温育 2 分钟	
水蛭素(Kno11)	100 μ g/ml (终浓度)
或肝素(Choay)	500 u/ml (终浓度)

证实：

- 试管中没有凝块形成。

• 商品化的可溶性纤维蛋白检测试验是阳性(例如, Stago 的 FS 测试)。

可以保持表 I 显示的两种可能性。

表 I

I-A: 管 2 保持。

管号	1	2	3	4
柠檬酸盐正常血浆	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
凝血酶	30 μ l (4U/ml)	30 μ l (2U/ml)	30 μ l (1U/ml)	30 μ l (0.5U/ml)
	室温温育 2 分钟			
出现凝块	+	-	-	-
肝素或 水蛭素	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g

I-B: 管 3 保持。

管号	1	2	3	4
柠檬酸盐正常血浆	300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l
凝血酶	30 μ l (4U/ml)	30 μ l (2U/ml)	30 μ l (1U/ml)	30 μ l (0.5U/ml)
	室温温育 10 - 15 分钟			
出现凝块	+	+	-	-
肝素或 水蛭素	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g	500 单位 100 μ g

实施例 2:

确定指定温育条件下使用的 PA-Fb sp 的量

为进行本发明方法, 样品中加入的活化剂的量必须使其诱导阳性对照血浆显著产生 D-二聚体(如实施例 1 所获得的那样), 并且阴性对照血浆(不经凝血酶处理的对照)产生 D-二聚体不明显。

对照血浆和阳性对照血浆(n=21)与不同剂量的 PA-Fb sp 于 37°C 温育 15 分钟。温育期结束时, 利用 Liatest 或快速 ELISA(D-Di Stago)

测定 D-二聚体(与俘获抗体 37℃ 温育 15 分钟, 与显示抗体 37℃ 温育 15 分钟)。

利用 ELISA 测试获得表 I 所示结果。

利用 Liatest (n=5) 获得基本类似的结果。

表 II: 通过提高 t-PA 和 SAK 的量降解可溶性纤维蛋白

	D-二聚体 (ng/ml)		可溶性纤维蛋白 (ng/ml)	
	阴性对照	阳性对照 (凝血酶处理)	阴性对照	阳性对照 (凝血酶处理)
不加入 PA Fb sp	375	375		
葡萄球菌激酶				
10µg/ml	400	1750	<50	1375
2µg/ml	390	1615	<50	1225
1.5µg/ml	375	1700	<50	1325
1µg/ml	350	1657	<50	1305
0.5µg/ml	410	1125	<50	715
t-PA				
2µg/ml	350	1790	<50	1415
1µg/ml	360	1420	<50	1045
0.5µg/ml	360	1210	<50	835

选择的 PA-Fb sp 剂量为其诱导:

- 未处理对照血浆(阴性对照)升高 < 300 ng/ml;
- 阳性对照血浆升高最大。

从这些结果来看, 似乎使用 PA-Fb sp 的优选终浓度为:

- 对于 t-PA 为 2 µg/ml: 在这些条件下, 能够被 PAI 中和的 t-PA 剂量可以忽略不计;
- 对于 SAK 为 10µg/ml (在某些患者或某些阳性对照中, 低剂量 SAK 引起的可溶性纤维蛋白降解较差, 可能因为样品中存在抗葡萄球菌激酶, 抗葡萄球菌激酶似乎是葡萄球菌感染造成的)。

实施例 3:

健康志愿者以及显示可疑的凝血活化(因 D-二聚体升高)
的患者获得的结果

利用下述程序对两个血浆样品实行该方法: 血浆在 t-PA(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
或 SAK(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)存在下 37°C 温育 15 分钟。

利用上述 ELISA 测试分析产生的 D-二聚体。

A. 健康志愿者获得的结果

表 III

	S. F. (ng/ml)
对照血浆+t-PA (n=21)	147 $\pm$ 100ng/ml
对照血浆+IIa+t-PA (n=21)	2128 $\pm$ 1219ng/ml (极值: 742 - 3660)
对照血浆+SAK (n=11)	64 $\pm$ 82ng/ml (极值: 0 - 215)
对照血浆+IIa+SAK (n=11)	1700 $\pm$ 1800ng/ml (极值: 250 - 5000)

B. D-二聚体数目升高的患者获得的结果 (通过快速 ELISA 进行实验)

表 IV

在我们的研究中发现的实例:

	加入 t-PA 后 D-二聚体数目 (ng/ml)	带入 t-PA 之前的 D-二聚体数目 (ng/ml)	可溶性纤维蛋白数目 (ng/ml)
第 1 组的病人	5420	510	4910
第 2 组的病人	1316	1234	82
第 3 组的病人	30162	20699	9463

结论:

本发明方法根据其可溶性纤维蛋白和 D-二聚体血浆数目，可以将患者分为三组。下表 V 概括了这三组中各组的特征：

	可溶性纤维蛋白	D - 二聚体	结论
组 1	>500	+/-	形成不降解的凝块
组 2	<300	+ /+++	出现血栓但凝血停止
组 3	>500	+++	凝血继续，伴随凝块的降解

如上所述，本发明方法不仅能跟踪凝血活化过程的变化，也可以评价抗凝血药物的功效，并可以确定药物再活化的凝血是否停止。

组 1：早期凝血活化，可溶性纤维蛋白升高，而 D-二聚体不升高。

组 2：凝血活化中断(有效药物)、但已经形成的凝血酶继续降解(可溶性纤维蛋白正常，D-二聚体数目升高)的患者。

组 3：表现凝块体内降解的凝血活化的患者(可溶性纤维蛋白和 D-二聚体同时升高)：药物不够有效。

实施例 4:

使用的技术概述：

试剂：

pH 7.4 缓冲液

纯化的人凝血酶(Stago, ref 00896)

t-PA(Boehringer)

抑酶肽(Aprotinin)。4°C 保存溶液。

D-二聚体试剂盒。

表 VI 概述了所使用的方法。

表 VI: 通过产生 D-二聚体分析可溶性纤维蛋白所使用的方法

血浆	200
t-PA (20 μ g/ml) (终浓度 2 μ g/ml)	20
37℃ 保持 15 分钟	
抑酶肽	20
稀释样品与基础 D-聚体的函数 (1/20-1/1000)	
铺板 Asserachrom D-Di	
稀释的样品	200
盖上孔并于 37℃ 保持 15 分钟	
洗三次	
用过氧化物酶标记的人抗-D 片段	200
盖上孔并于 37℃ 保持 15 分钟	
洗三次	
OPD/H ₂ O ₂ 底物	200
每个样品等待正好三分钟, 然后加入:	
或 3M H ₂ SO ₄	50
或 1M HCl	100
测量 492nm 处的吸光度	

参考文献

1. GODAL H. C., ABILGAARD U.: "Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol". Scand. J. Haematol., 3, 342-350, 1966.
2. BREEN F.A., TULLIS J.L. : "Ethanol gelation : a rapid screening test for intravascular coagulation" Ann. Intern. Med., 69, 1197-1206, 1968.
3. LIPINSKI B., WOROWSKI K. : "Detection of soluble fibrin monomer complexes in blood by means of protamine sulphate test". Thromb. Diath. Haemorrh., 20, 44-49, 1968.
4. SEAMAN A.J. : "The recognition of intravascular clotting. The plasma protamine paracoagulation test". Arch. Intern. Med., 125, 1016-1021, 1970.
5. LATALLO Z.S., WEGRZYNOWICZ S., BUDZUNKI A.Z. : "Effect of protamine sulphate on the solubility of fibrinogen, its derivatives and other plasma proteins". Scand. J. Haematol., suppl., 13, 151-162, 1971.
6. MUSUMECI V. : "Ethanol gelation test and protamine sulphate test in diagnosis of intravascular coagulation". Scand. J. Haematol., suppl. 13, 197-202, 1971.
7. NIEWIAROWSKI S., GUREWICH V.: "Laboratory identification of coagulation. The serial dilution protamine sulfate test for the detection of fibrin monomer and fibrin degradation products". J. Lab. Clin. Med., 77, 665-676, 1971.
8. KIDDER W.R., LOGAN L.J., RAPAPORT S.I., PATCH M.J.: "The plasma protamine paracoagulation test - Clinical and laboratory evaluation". A.J.C.P., 58, 675-686, 1972.
9. GUREWICH V., LIPINSKI B., LIPINSKA I. : "A comparative study of precipitation and paracoagulation by protamine sulphate and ethanol gelation tests". Thromb. Res., 2, 539-556, 1973.
10. GERRITS W.B.J., PRAKKE E.M., VAN DER MEER J., VREEKEN J. : "Causes of a negative ethanol gelation test in diffuse intravascular coagulation". Thromb. Diath. Haemorrh., 31, 299-308, 1974.

11. LARGO R., HELLER V., STRAUB P.W. : "Detection of soluble intermediates of the fibrinogen-fibrin conversion using erythrocytes coated with fibrin monomers". *Blood*, 47,991-1002, 1976.
12. SORIA J., SORIA C., DE RODRIGUEZ S., HORELLOU M.H., SAMAMA M., BILSKI-PASQUIER G. : "Recherche des complexes solubles de fibrine par un test d'hémagglutination - Applications cliniques". *Presse Méd.*, 6, 43, 4045-4048, 1977.
13. DEMPFFLE CE., DOLLMAN M., LILL H., PUZZOVIO D., DESSAUER A., HEENE DL.: "Binding of a new monoclonal antibody against N-terminal heptapeptide of fibrin alpha-chain to fibrin polymerization site "A": effects of fibrinogen and fibrinogen derivatives, and pretreatment of samples with NaSCN. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4, 79-86, 1993.
14. SOE G., KOHNO I., INUZUKA K., ITOH Y., MATSUDA M. : "A monoclonal antibody that recognizes a neo-antigen exposed in the E domain of fibrin monomer complexed with fibrinogen or its derivatives : its application to the measurement of soluble fibrin in plasma. *Blood*, 88, 2109-2117, 1996.
15. GUREWICH V., HYDE E., LIPINSKI B. : "The resistance of fibrinogen and soluble fibrin monomer in blood to degradation by a potent plasminogen activator derived from cadaver limbs". *Blood*, 46, 555-565, 1975.
16. CANNON CP, GIBSON CM, MCCABE CH, ADGEY AA, SCHWEIGER MJ, SEQUEIRA RF, GROLLIER G, GJUGLIANO RP, FREY M, MUELLER HS, STEINGART RM, WEAVER WD, VAN DE WERF F, BRAUNWALD E. : "TNK-tissue plasminogen activator compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction results of the TIMI 10B trial". *Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10B Investigators, Circulation* 98 (25), 2805-14, 1998.

-
17. BRINGMANN P, GRUBER D, LIESE A, TOSCHI, L, KRATZCHMAR J, SCHLEUNING WD, DONNER P.: "Structural features mediating fibrin selectivity of vampire bat plasminogen activators". J Biol Chem, 270,25596-603, 1995.
 18. COLLEN D. : "Staphylokinase : a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent". Nat Med, 4-279-84, 1998.
 19. SAKHAROV DV, BARRERTT-BERGSHOEFF M, HEKKENBERG RT, RIJKEN DC. : "Fibrin-specificity of a plasminogen activator affects the efficiency of fibrinolysis and responsiveness to ultrasound: comparison of nine plasminogen activators in vitro". Thromb Haemos, 81, 605-12,1999.
 20. COLLEN D, BERNAERTS R, DECLERCK, P, DE COCK F, DEMARSIN E, JENNE S. LAROCHE Y, LIJNEN HR, SILENCE K, VERSTREKEN M. : "Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization". Circulation, 94, 197-206, 1996.