



临床与科研领域

凝血和贫血



心肌标志物



D-二聚体和高分子量纤维蛋白降解产物



纤 维蛋白原是一种血液蛋白，在凝血和血栓形成过程中会导致纤维斑块的产生。它由两个相同的亚基组成，每个亚基都含有三条多肽，分别是α链、β链和γ链。在血液凝固过程中，纤维蛋白原会在凝血酶的作用下

降解为纤维蛋白，这些纤维蛋白单体会聚集为纤维蛋白凝块。在纤维蛋白溶解过程中，纤维蛋白凝块会被纤溶酶降解，形成不同分子量的纤维蛋白降解产物（fibrin degradation products, FDP），并释放到血液中（图1）。

D-二聚体（D-dimer，分子量180kDa）是纤维蛋白降解的最终产物。它由含有三条多肽（α链、β链和γ链）的纤维蛋白原降解产物通过二硫键交联而成。其二聚体结构通过γ链C末端之间的两个分子间异肽键形成交联结构而保持。

D-二聚体与诊断

在健康个体中，D-二聚体的水平低于0.5 μg/ml。在肺栓塞（PE）、深静脉血栓（DVT）和动脉粥样硬化患者血液中，D-二聚体的水平均有升高。D-二聚体被认为是一种可靠的病理性凝血标志物，后者是大多数心血管疾病的发病基础（1,2）。目前，D-二聚体被广泛用于深静脉血栓的排除诊断（3）。

尽管D-二聚体的临床应用已经有很长的历史，但是血浆样本中D-二聚体的定量测定仍然存在很多问题。患者血浆中不仅含有D-二聚体，也含有很多不同分子量的FDP。所有纤维蛋白降解产物都包含D-二聚体的抗原表位。因此，特异性识别D-二聚体的抗体也可以识别FDP。然而，不同检测系统的测定结果却存在着巨大的差异。这些差异是由抗体的特异性不同造成的；一些抗体或者抗体对更倾向识

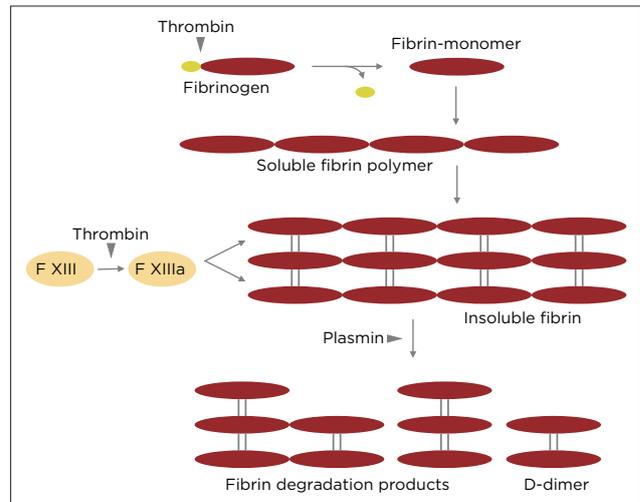


图1. 纤维蛋白的形成与降解示意图

别D-二聚体，而另一些抗体则更倾向于识别FDP。迄今为止，所有的标准化和协调的努力均未得到理想的结果，这会在日常实践中导致一连串的问题（4）。

为了准确测定所有的FDP和D-二聚体，同时也为了使D-二聚体标准化，所使用的特异性单抗应能够等克识别FDP和D-二聚体。此外D-二聚体检测系统不能与纤维蛋白原有反应，因为纤维蛋白原在血浆中的浓度比D-二聚体高1000倍以上。



临床应用

- ✓ 病理性凝血标志物
- ✓ 排除肺栓塞和深静脉血栓

免疫监测系统开发与抗体配对建议

针对于D-二聚体免疫分析检测系统的开发，我们可提供多种特异性识别D-二聚体和FDP的单克隆抗体。关于夹心免疫检测系统的抗体配对建议请参见表1。此外，我们所提供的D-二聚体纯品是由纤溶酶降解纤维蛋白原凝块所得到的。

人D-二聚体

十多年来，HyTest一直是全球领先的D-二聚体抗原供应商。我们提供从人血浆中高度纯化的D-二聚体。

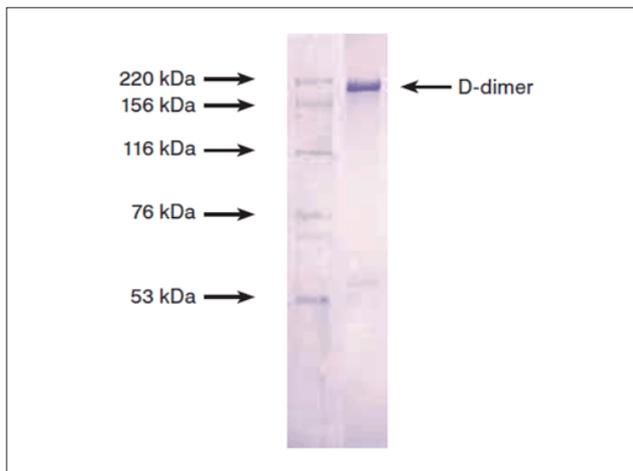


图2. 纯化的D-二聚体非还原性SDS-PAGE电泳凝胶染色为考马斯亮蓝R-250
泳道1：分子量标准品
泳道2：D-二聚体（3 μg）

识别D-二聚体和FDP的单抗

纤维蛋白凝块水解主要以FDP和D-二聚体的形式释放进入血液中。这些降解产物在血液中的比例并非固定不变，不同患者之间存在个体差异（图4）。为了降低这些降解产物定量测定的偏差，我们开发了一种可以等克识别FDP和D-二聚体的分析系统。这个概念很有可能成为推进D-二聚体检测标准化重要的一步。

等克识别D-二聚体和FDP的一步法定量免疫检测系统

HyTest提供的一对新的单抗（DD189-DD255）在一步法免疫荧光夹心检测系统中可以等克识别D-二聚体和高分子量纤维蛋白降解产物，可识别的抗原浓度高达1 μg/ml（图3）。用该系统进行样本测定时，血浆样本可以使用缓冲液稀释10倍（缓冲液成分为20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 包含 0.15 M NaCl）。

这两株单抗在还原性与非还原性的蛋白免疫印迹分析中均与D-二聚体有反应（图6A和6B）。

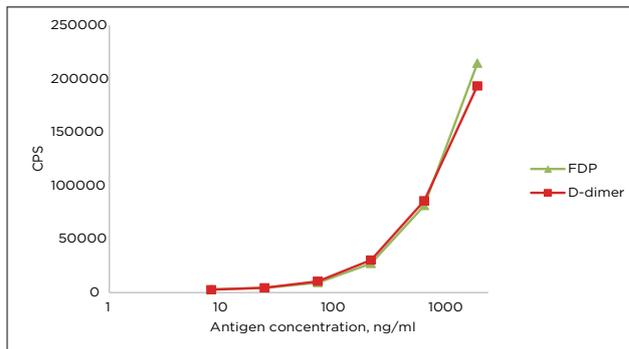


图3. 抗体对DD189-DD255等克识别FDP和D-二聚体。用100 μl DD189（PBS稀释至10 μg/ml）进行反应板包被并在室温下孵育1小时。在三次洗涤之后（洗涤液为TBS, 0.05% Tween 20），加入50 μl 标记的DD255（用Delfia assay buffer稀释至4 μg/ml）及25 μl D-二聚体或FDP稀释液，在室温下震荡混匀1小时。经洗涤之后，在每孔中加入300 μl Lanfia Solution，经过3分钟剧烈震荡之后，使用Victor 1420 Victor™ Multilabel Counter（Wallac, Finland）测定荧光信号。

不同患者之间D-二聚体与FDP比例的差异

我们用凝胶过滤分析了两个病人的血浆。结果显示两个病人血浆中的D-二聚体和FDP比例并不一致（图4）。该结果进一步佐证了等克识别D-二聚体与FDP的免疫分析检测系统可以更加准确地检测所有纤维蛋白降解产物的观点。

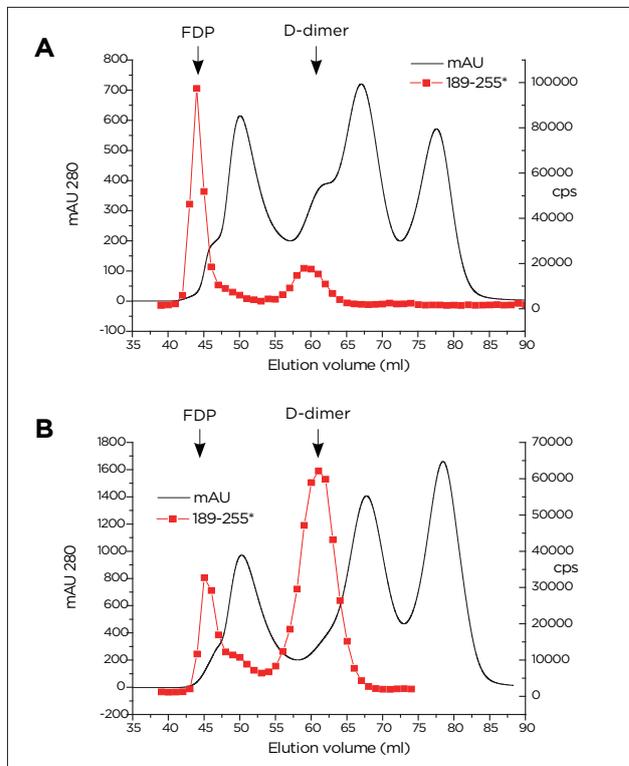


图4. 血栓病人（A）与外科手术病人（B）的血浆样本HPLC凝胶过滤分析。200-500 μl的血浆样本以流速 1ml/min 过层析柱（层析柱为Superdex 200 column 16/60）用抗体对DD189-DD255按图3所示的一步法免疫分析系统分析层析所得的1ml产物。

一步法和两步法定量检测系统的抗体推荐配对

推荐的抗体配对请参见表1。这些抗体特异性识别样本中的交联产物（D-二聚体和高分子量纤维蛋白降解产物）且与纤维蛋白原不存在交叉反应（图5）。

表1. 在夹心免疫检测系统中定量检测人血浆D-二聚体的推荐抗体配对
注意，这些推荐以及结论是基于我们内部的DELFI A®免疫分析检测平台的结果。

配对	备注
一步法夹心免疫分析系统	
DD189-DD255	等克识别D-二聚体与FDP
DD2-DD41	略微倾向于识别FDP
两步法夹心免疫分析系统*	
DD2-DD4	近似于等克识别D-二聚体与FDP

*由于检测抗体与纤维蛋白原存在交叉反应，我们强烈建议DD4仅用于两步法。为了可以在夹心免疫分析检测平台上进行D-二聚体定量测定，血浆必须稀释至少2倍（缓冲液为10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 1 M NaCl, 0.1 % Tween 20）以避免非特异性反应。

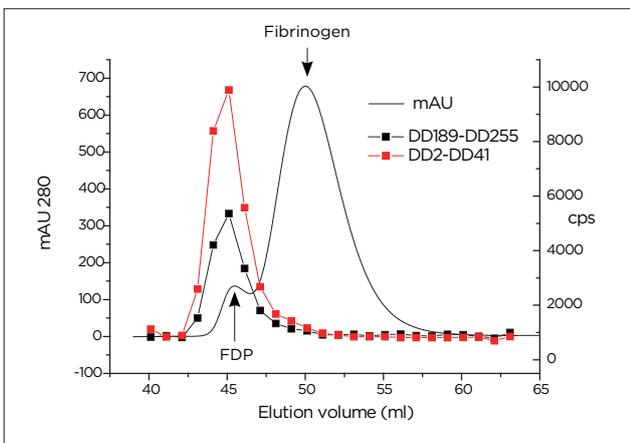


图5. 使用抗体对DD2-DD41和DD189-DD255的免疫分析检测系统与纤维蛋白原没有交叉反应。
5 mg的纤维蛋白原（Calbiochem）用PH=7.5的TBS缓冲液以流速为1 ml/min 过层析柱（层析柱为Superdex 200 column 16/60），用抗体对DD2-DD41和DD189-DD255按图3所示的一步法免疫分析系统分析层析所得的1ml产物。结果显示这些检测D-二聚体的分析系统并不识别纤维蛋白原，然而纤维蛋白原的制备过程中出现的一些高分子量纤维蛋白降解产物则被检测出来。

抗D-二聚体单抗可用于蛋白免疫印迹

抗D-二聚体单抗可在蛋白免疫印迹法中检测D-二聚体。所有抗体均与非还原性蛋白免疫印迹的D-二聚体产生反应，部分抗体也与还原性蛋白免疫印迹的D-二聚体产生反应。

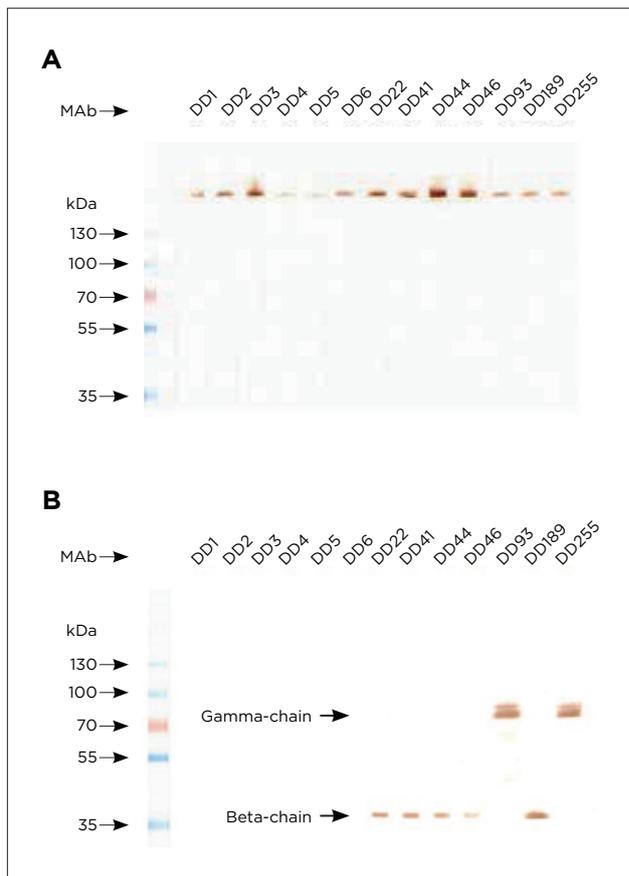


图6. D-二聚体的蛋白免疫印迹分析。
D-二聚体（货号8D70）分别进行非还原性（A）与还原性（B）SDS-PAGE电泳（分离胶为7.5-12.5%），然后转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用含有7%牛乳的PBST封闭30分钟，然后用不同的抗D-二聚体单抗通过Mini-Protean® II Multi Screen(Bio-Rad)给蛋白质条带染色。在经PBST洗涤过后，加入标记了辣根过氧化物酶的羊抗鼠Fc段特异性IgG并孵育1小时。再经过PBST洗涤后，通过DAB/辣根过氧化物酶将免疫复合物显色（反应环境为50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5）。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	备注
D-dimer	4D30	DD1	IgG2a	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD2	IgG2b	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD3	IgG2b	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD4 *	IgG2b	EIA,WB, 与纤维蛋白原存在交叉反应 (可作检测抗体)
		DD5 *	IgG2b	EIA,WB, 与纤维蛋白原存在交叉反应 (可作检测抗体)
		DD6 *	IgG2a	EIA,WB, 与纤维蛋白原存在交叉反应 (可作检测抗体)
		DD22	IgG2a	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD41	IgG2a	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD44	IgG2b	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD46	IgG2a	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD93	IgG1	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD189 *	IgG1	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应
		DD255 *	IgG1	EIA,WB, 与纤维蛋白原无交叉反应

*注意：用作捕获抗体时，对于使用溶栓酶治疗的患者可能会给出假阳性结果。

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
D-dimer	8D70	>90%	人血浆

参考文献

- Bounameaux H, et al.** (1994) Plasma measurement of D-dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview. *Thromb Haemost.* 71, 1-6.
- Rowbotham BJ, et al.** (1987) Measurement of crosslinked fibrin derivatives - use in the diagnosis of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 57, 59-61.
- Righini M, et al.** (2008) D-Dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost.* 6, 1059-71.
- Reber G. and de Moerloose P.** (2009) Standardization of D-dimer testing. *Quality in Laboratory and Thrombosis* 99-109.