

沉淀血清的种属反应及特异性

沉淀血清的制备*

郭景元

指导者：陈安良教授

(中山医学院病理解剖学教研组法医学小组)

种属反应现象早被学者们注意到,最近(1952年)Weitz氏^[1]作了系统的分析研究,阐明了种属反应的存在,并建议用各种方法来避免或鉴别。但是学者们对种属反应最严重程度的认识以及免除种属反应的方法并未一致,因而实践上很少应用。为了法医学鉴定的严格正确性,我们认为必须重新正视这问题,并研究能应用于实践的最简便方法,现将初步结果报告于下,供同志们参考,并请指正。

沉淀血清的种属反应

本试验所用的各种沉淀血清是我们自己免疫家兔^[2-3]而制得的。

应用抗人血清和抗人血红蛋白沉淀素与家常动物和猕猴 (*Macacus rhesus*) 血液(稀释至 1/1,000) 逐一作环状沉淀试验,发现猕猴血液与抗人血沉淀素的作用和人血几乎无区别,如第 11 号抗人血红蛋白沉淀素效价为 1:100,000,对猕猴血红蛋白的反应也达 1:50,000,两者反应出现时间也相差不大(表 1、3)。此外,我们还证明猫血与多数抗人血沉淀素也发生很高的交叉反应(表 1、3)。

同样,人血清与抗猴血清沉淀素,牛血与抗山羊血沉淀素反应效价也很高(表 4、5)。

实验结果还表明,这些种属反应现象与沉淀素的制备方法、途径,以及抗原状态似无关系。因如第 10、23、74 号沉淀素,是用血清滴眼免疫而制得的;第 63 号是血清结合膜下注射来的;11 和 19 号是腹腔内注射血红蛋白的溶液;72 号则是凝固血清注射腹腔;43 和 86 号是结合膜内注射血红蛋白而得。虽然免疫途径和抗原不同,种属反应则很相象。

为了阐明是否由于我们制备的沉淀素血清效价太高,以致非特异反应特别灵敏,我们将沉淀血清经生理盐水稀释后进行试验。结果证明,当抗人血沉淀素稀释至 10 倍时,与猫血虽不再发生反应,对猴血则在更高倍稀释时也仍然不能与人血区别(表 1)。

以上试验所用抗原都是新鲜的液状的。为了判明血痕(法医学鉴定实践上遇到的多是血痕)是否仍发生种属反应,我们用猴和猫血痕作试验,得到肯定的结果。稀释到 1,000 倍的猴或猫血痕浸出液,仍能与抗人血沉淀素发生阳性反应(表 2)。

由上述试验可以看到,用普通的沉淀素作血痕种属鉴定,是不能得到严格可靠的结果的。

* 1958年8月5日收到。

表 1 沉淀素稀释后的效价变化

抗原及其稀释度 反应时间 (分)		人					猴				猫			
		1,000 ×	10,000 ×	20,000 ×	50,000 ×	100,000 ×	1,000 ×	10,000 ×	20,000 ×	50,000 ×	100 ×	1,000 ×	10,000 ×	20,000 ×
11 号 抗人血 紅 蛋白 沉淀 素	未稀释	0.5*	0.5	0.5	3	30	0.5	0.5	0.5	9	5	10	40	60
	1:5	0.5	0.5	0.5	30	30	0.5	0.5	2	10	60	60	60	
	1:10	0.5	0.5	1.0			0.5	0.5	2		—	—	—	
	1:20	0.5	2				2	3	2		—	—	—	
	1:50	10	15				15	20			—	—	—	
	1:100	±	—				±	—			—	—	—	
10 号 抗人血 紅 蛋白 沉淀 素	未稀释	0.5	3	14.5	19	—	0.5	4	13		20	45	60	
	1:5	2	15	15			15	15	15		15	—	—	
	1:10	15	15				15	15			—	—		
	1:20	15	15				15	15			—	—		
74 号 抗猴血 紅 蛋白 沉淀 素	未稀释	0.5	12	60			0.5	10	12		40	60	60	
	1:5	1	12	—			1	12	60		60	—	—	
	1:10	10	12				10	12			—	—		
	1:20	12	15				10	15			—	—		

* 表内数字代表白环出现时间(以分钟计算)。“±”表示反应结果不明显,“—”表示 60 分钟未出现反应,空白者为未进行试验。

表 2 猴、猫血痕与抗人血清,抗人血紅蛋白的反应

反应时间 (分)	抗原 抗原保存时间	猴 血 痕*		猫 血 痕*	
		10 天	15 天	10 天	15 天
沉淀素					
	10 抗人血清沉淀素	14**	40	54	—
	19 号抗人血紅蛋白沉淀素	0.5	0.5	19	10

* 血痕浸出液的浓度约为 1000 × (用浓硝酸法及醋酸黄血盐法证明)。

** 表示反应出现的时间(分钟), 60 分钟阴性反应者以“—”表示。

特异性沉淀血清的制备

我們用吸收法制备特异性沉淀血清。选择高效价的沉淀血清, 加入适量的近亲动物血清、紅血球或血紅蛋白溶液(即, 抗人血清沉淀素用猴血清吸收, 抗人血紅蛋白沉淀素用猴血紅蛋白或猴紅血球吸收, 抗猴血清沉淀素用人血清吸收, 抗山羊全血沉淀素用牛紅血球吸收), 充分振搖, 置室温中 2 小时, 冰箱中隔夜。次日取出, 离心沉淀, 取上清液作灵敏度和特异性的测定。其灵敏度和特异性的变化见表 3—5。

实验结果表明: 加入抗原愈多者, 吸收愈完全, 特异性亦愈高, 但灵敏度显著下降。而当抗原减少时, 灵敏度提高(接近于未吸收前), 特异性则降低。根据我們的經驗, 加入 4% 至 10% 的抗原似尚合适。

表3 抗人血清和抗人血紅蛋白沉淀素吸收前后的效价变化

沉淀血清	吸收		效价 (对人血)					效价 (对猴血)					效价 (对猫血)			
	所加抗原	量	1,000×	10,000×	20,000×	50,000×	100,000×	100×	1,000×	10,000×	20,000×	50,000×	100×	1,000×	10,000×	20,000×
10号抗人血清沉淀素	吸收前		0.5*	3	14.5	19	—		0.5	4	13			20	45	60
	吸收后	猴血清	5%	10	50				—	—	—			—	—	
72号抗人血清沉淀素	吸收前		0.5	0.5	0.5	12	45		0.5	4	12	50	2	3	8	50
	吸收后	猴血清	20%	50	—				—	—			—	—		
	吸收后	猴血清	10%	42	60				—	—			—	—		
63号抗人血清沉淀素	吸收前		0.5	0.5	2	60	—		0.5	20	60	—	0.5	7	60	
	吸收后	猴血清	3%	0.5	2	—		30	—	—			—	—		
23号抗人血清沉淀素	吸收前		0.5	1	2	15	—		0.5	1	14	15	0.5	2	5	
	吸收后	猴血清	10%	10	40	—	—		—	—			—	—		
11号抗人血紅蛋白沉淀素	吸收前		0.5	0.5	0.5	3	30		0.5	0.5	0.5	9	5	10	40	60
	吸收后	10%猴血紅蛋白	10%	10	15				—	—				—		
	吸收后	10%猴血紅蛋白	5%	0.5	5				—	—				—		
	吸收后	猴血紅球	10%	2	5	10		士	—	—			士	—		
	吸收后	猴血紅球	4%	1	3.5	7	60		士	—			士	—		
43号抗人血紅蛋白沉淀素	吸收前		0.5	0.5	2	6	23		4	5	8	20		2	5	15
	吸收后	10%猴血紅蛋白	7%	0.5	2	9	50		—	—				—	—	
	吸收后	猴血紅球	10%	2	4	6	60		—	—				—	—	
19号抗人血紅蛋白沉淀素	吸收前		0.5	0.5	0.5	2	45		0.5	0.5	2			5	45	—
	吸收后	猴血紅球	10%	0.5	5	10	45		5				5	—		
86号抗人血紅蛋白沉淀素	吸收前		0.5	4	17	60			0.5	2	60			—	—	
	吸收后	猴血紅球	4%	0.5	8	60	—		—	—						

* 反应出现时间以分钟计算,在60分钟内未出现反应者,以“—”表示。“士”则表示反应结果不明显。

表4 抗猴血清沉淀素用人血吸收前后的效价变化

74号抗猴血清沉淀素	吸收		效价 (对猴血清)				效价 (对人血清)			
	所加抗原	量	100×	1,000×	10,000×	20,000×	100×	1,000×	10,000×	20,000×
吸收前			0.5*	0.5	10	12	0.5	0.5	12	60
吸收后	人血清	10%	2	30	士	—	33	—		
吸收后	人血清	5%	2	30	35	—	20	—		

* 同表3註。

表5 抗山羊血沉淀素用牛血吸收前后的效价变化

9号抗山羊血沉淀素	吸 收		效价 (对山羊血紅蛋白)				效价 (对牛血紅蛋白)		
	所加抗原	量	1,000×	10,000×	20,000×	50,000×	100×	1,000×	10,000×
吸收前			2*	7	50	60		27	27
吸收后	牛紅血球	10%	10	20	60		—	—	
吸收后	牛紅血球	5%	6	20	50		—	—	

* 同表3註。

实验结果还表明：抗血紅蛋白沉淀素用近亲动物的紅血球吸收后，效果最好，效价仍达标准（1:20,000，60分钟內）。抗血清沉淀素用近亲动物血清吸收后，效价最高者只1:10,000。用近亲动物血紅蛋白吸收后，则沉淀素紅染，影响沉淀环的观察。用紅血球吸收时，沉淀素必須預先破坏补体（加温 56°C 半小时），以免溶血。紅血球抗原的制备見作者另文^[2]，取洗过的血球泥应用。

为了探討沉淀血清中特异成分和非特异成分的性质，我們还用貓血吸收抗人沉淀素后，对貓血虽不再发生反应，对猴血的种属反应則仍存在（表6）。

表6 抗人血清，抗人血紅蛋白沉淀素用貓血吸收后效价的变化

沉 淀 素	吸 收		效价 (对人)				效价 (对猴)			效价 (对猫)			
	所加抗原	量	1,000×	10,000×	20,000×	50,000×	1,000×	10,000×	20,000×	100×	1,000×	10,000×	20,000×
10号抗人血清沉淀素	貓血清	10%	1*	5			1	26			—	—	—
	貓血清	5%	1	5			1	9			7	—	
43号抗人血紅蛋白沉淀素	貓血紅蛋白	10%	2	3	6	14.5	10	20	30	—	—	—	

* 表示反应出現的时间(分钟)。在60分钟未出現反应者，以“—”表示。

特异性沉淀血清的保存，我們还在繼續观察中，現有材料証明，加适量硼酸（0.25%）并保存于冰箱，經8个月之久，其效价和特异性均无多大变化。

最后，我們应用特异性沉淀血清檢驗未知血痕。未知血痕是預先准备好，由科內同志

表7 未知血痕檢驗結果

試驗日期	沉 淀 素	反应時間(分)	未知血痕列号														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
56年8月15日	43号抗人血紅蛋白		11*	11	13.5	60	17	2	3								
	特异性抗人血紅蛋白		—	30	—	—	—	2	24								
	43号稀釋2倍		30	8.5	60	—	20	2	10								
	16号抗人血清		11	4	15	60	20	23	4								
56年8月31日	86号抗人血紅蛋白								5	—	30	30	30	—	2		
	特异性抗人血紅蛋白								5	—	—	—	—	—	4		
推 測				猴	人	猴	猫	猴	人	人	人	?	猴	猴	猴	?	人
实 际				猴	人	猴	猫	猴	人	人	人	猫	人	猴	猴	狗	人
(数目字表示采血日期)				56.4.	53.12.	56.6.	56.6.	56.4.	56.6.	55.2.	54.10.	56.6.	53.12.	56.6.	56.4.	56.6.	56.6.

* 同表3註。

任意选取编号送检。实验结果如表 7, 只有个别错误(第 10 号是人血, 检验阴性), 可能是由于血痕浸出液浓度太低, 沉淀血清灵敏度不足发生反应。

讨 论

沉淀血清的种属反应, 各学者的实验结果有所不同, 前已述及。试以抗人血沉淀素为例说明: Weitz 氏^[1]的实验, 其抗人血清沉淀素效价达 50 万倍, 对牛、绵羊、马、猪、狗的种属反应亦高达数万至数十万倍。Hektoen 氏的抗人血清^[4]效价达 1:5,000, 对猴血清 1:100, 对猫等仅 1:10; 而其抗人血血红蛋白沉淀素^[5]的效价为 1:5,000 倍, 对猴血血红蛋白则有 1:3,200 倍。在另一实验里^[6], 猫血清或血红蛋白与抗人血清或血红蛋白沉淀素均不起反应。而 Блюменфельд 氏等^[7]证明猫血对砷的抵抗力与人血最相近。一般认为抗人血清很难区别人血和猴血。但法医学实践上, 只将抗原稀释成 1,000 倍, 或仅以羊、鸡等家畜动物血作对照。虽然, 猴血或其他猿类血液并不普遍, 但猫血是常见的, 而猴血也不是绝对遇不到。按我们的实验看来, 猴血与人血确难区别, 而猫血甚至稀释 1,000 倍仍与抗人血沉淀素发生反应。因此通常的血痕鉴定结果是否正确, 并不能保证, 尤其在国家未统一规定沉淀素规格或统一制备前。这是值得引起注意的问题。

结 论

实验证明, 一般的沉淀血清对近亲动物, 甚至某些非近亲动物, 均能发生高倍的非特异反应, 这就使沉淀反应的价值受到影响。

吸收法是制备特异性沉淀血清的最简单有效的方法, 文中报告的用吸收法制得的特异性抗人血血红蛋白沉淀素血清有实用价值。

参 考 文 献

- [1] Weitz: *Jour. Hyg.* 50(3): 275—294, 1952.
- [2] 郭景元: *微生物学报*, 5(4): 400—405, 1957.
- [3] 郭景元: *微生物学报*, 5(4): 406—410, 1957.
- [4] Hektoen: *J. A. M. A.*, 70: 1273—1278, 1918.
- [5] Hektoen: *Jour. Inf. Dis.* 31: 32—39, 1922.
- [6] Hektoen, *Jour. Inf. Dis.*, 33: 224—229, 1923.
- [7] Блюменфельд: Простой метод отличия крови человека от кровл животных, *Вопросы Судебно-Медицинской экспертизы*. 2: 323—326, 1955.

CROSS REACTION AND THE PREPARATION OF SPECIFIC PRECIPITIN SERA

Kuo, C. Y.

(Chung-shan Medical College, Canton)

In the present report, besides confirming the well known fact of the cross reaction between anti-human and anti-simian sera, as well as anti-sheep and anti-beef sera, the author has now shown that anti-human serum would react with cat blood to a rather high titre. Even when the latter was diluted 1000 fold, definite precipitation reaction still appeared. It is considered to be of importance in medical legal practice, and the author undertook to try absorption to remove this cross reactivity. It was found that the blood cells of cat removed this non-specificity best, while serum and hemoglobin of the same species were less satisfactory. When the precipitin serum were preserved with 0.25% boric acid and stored in the ordinary refrigerator, the potency remained unchanged for as long as 8 months.