

# 用滴眼法製備沉澱素血清

郭景元

(中山醫學院病理解剖學教研組法醫學小組)

血液或血痕的檢驗，一直是法醫學鑑定的重要項目之一。遠在 13 世紀，偉大的祖國法醫學家宋慈<sup>[1]</sup>就應用滴血法和滴骨法作親權鑑定，並根據血痕多少和分佈情況作自殺與被殺的推斷。西歐各國自 16 世紀創立法醫學以來，血的檢驗也即被提到重要地位。到 19 世紀末期，雖然血痕可用化學法、顯微鏡法和分光鏡法得以證明，但是，血痕種族屬性的判定，則仍然沒有可靠的辦法。當時只能根據紅血球的大小和形狀、血液加硫酸後的氣味、血紅蛋白對鹼的穩定性、血紅蛋白結晶和脂肪酸以及白血球顆粒的形態等來鑑別<sup>[2]</sup>。這些方法對新鮮血液雖有一定意義，對陳舊血痕則實用上有困難，而且不可靠。自從 Kraus 氏於 1897 年發現細菌性沉澱反應，Чистович 氏及 Bordet 氏於 1899 年發現非細菌性沉澱反應，Uhlenhuth 氏於 1901 年應用沉澱反應於法醫學鑑定<sup>[3-5]</sup>。以後，血的種屬判定才有了科學的方法。到目前為止，雖然還有其他生物學方法，如補體結合反應、過敏反應等均可作血液種屬判定，但或則由於操作技術較複雜，不適用於一般實驗室應用，或則由於耗費較大，又未必準確，也不適於實際應用，因此，沉澱反應仍然是最普遍應用的一種方法。同時，沉澱反應不僅被應用於法醫學血痕鑑定，而且也在昆蟲吸血習性的研究、疾病診斷、菌種鑑別以及肉類乳品真偽的判斷方面獲得廣泛的應用。

進行沉澱反應，首先要製備抗體。一般是應用家兔或公雞非經口的途徑注射，以使產生沉澱素抗體。沉澱素優良與否首先決定於免疫方法。免疫方法很多，最常用的是腹腔內注射和靜脈內注射。此外還有皮膚塗擦、皮內注射、皮下注射、肌肉內注射以及最近田浩泉氏等<sup>[7-8]</sup>介紹的腦內、蜘蛛膜下腔和頸動脈竇內注射等。所有這些方法都各有優缺點，其中田浩泉氏所介紹的頸動脈竇內注射法需用抗原最少，抗體產生也較快，是其優點，但操作技術較複雜，恐難推廣應用。為了能適合一般實驗室——特別是那些設備比較簡單、人員比較缺乏的實驗室應用，就必須有更簡便可靠的免疫方法。我們面向這任務進行研討，發現了一種非常簡單的免疫法——滴眼法，認為有實用價值，茲介紹如下，尚希指正。

## 實 驗 材 料

抗原的準備：常用三種抗原：

1. 普通血清——取醫院作康氏或華氏反應用剩的人血清，或用動物血清。

2. 10% 凝固血清混懸液——取血清 1 毫升加生理鹽水 9 毫升，混和後再加飽和鹽水（濃度約 36%）2 毫升，混勻後加 2—3 滴冰醋酸，再振搖混勻，置於沸水浴上煮沸 5 分鐘，冷後過濾，將濾紙上的凝固物在室溫中自然乾燥，至半乾後加生理鹽水配成 10% 混懸液備用\*。

3. 10% 血紅蛋白溶液——將分離血清後的血塊，用 4 層以上的經生理鹽水浸濕的紗布包裹，置於研鉢內，加適量生理鹽水，用研槌輕輕壓迫，將紅血球壓出（纖維素等則留在紗布包內）。然後將溶液遠心沉澱，棄掉上清液，管底的紅血球反覆用生理鹽水洗滌及遠心沉澱，直至上清液不與高效價的抗血清沉澱素發生反應為止（即除去殘留血清，我們通常洗滌和沉澱 20 次左右）。如此製得相當純粹的紅血球泥，加以 9 倍容量蒸餾水使溶血，待溶血完全後，用高速離心機將紅血球包膜等分離，取上層溶液加適量氯化鈉結晶，使溶液的氯化鈉濃度為 0.85%。

抗原的處理過程要遵守無菌手續。各種準備好的抗原都保存於冰箱內備用。必要時可加少量氯仿防腐（氯仿不與水溶液相混，沉於容器底部，時時向上蒸發，發揮其防腐作用），臨用時取出於室溫內（或微加溫）若干時間，使抗原溫度接近於動物體溫，並使殘遺氯仿揮發。

免疫動物的選擇：我們一般應用體重 2 公斤上下的健康家兔（雌雄均可，雌兔必須無懷孕），免疫前均預先檢查血液，沉澱反應陰性者方可應用。

## 實 驗 方 法

免疫技術：先將抗原裝入附有橡皮頭的毛細滴管內（其尖端滴出的液體每滴約 1/40 毫升）。其次使兔站穩，一手持毛細滴管，並用手臂將兔固定，再用另一手的拇指和示指將兔的下眼瞼拉開；此時輕輕壓迫毛細滴管的橡皮頭，使抗原滴入眼內。每次兩眼都滴，每眼 2—3 滴，每日 1 次或 2 次。

對照組腹腔內注射和靜脈內注射均如常法進行。

效價測定：經相當次數免疫後（滴眼法一般在 10 次以後），在動物空腹時，用無菌手續自耳靜脈穿刺取血，取得血液（約 0.5 毫升）分離血清後，與不同稀釋度的抗原進行環狀實驗。抗原加入後記下時間，並立即在黑背景斜射強光（自然光或燈光均可）下觀察，以後每隔 0.5 分鐘觀察 1 次，觀察至 60 分鐘為止。兩液面出現清晰的白環為陽性反應，

\* 這種抗原是孔赫爾教授<sup>[9]</sup>介紹的，常做腹腔內注射用，其優點是可以保持無菌，並可長期保存。

如果對照管陰性，則出現陽性反應的最大稀釋的抗原濃度，即為該免疫血清的沉澱素效價。

沉澱素血清的採取和保存：如果家兔血清的沉澱素效價已達規定標準(20,000倍, 60分鐘內)，即以無菌技術放血，並分離血清，密封於小瓶內，置冰箱中保存。最好不加任何防腐劑，必要時可加硼酸(100毫升血清加硼酸0.25克)防腐。硼酸雖微使血清酸化，但不影響效價，更不會像常用的酚類那樣多少要使血清混濁。硼酸保存血清的有效期限，我們還在觀察中。但已有保存一年者，加硼酸的效價自50,000倍降至10,000倍，未加硼酸的則降至500倍(兩者由同一家兔取得，分別密封於安甌內，在同一冰箱中保存)。

## 實 驗 結 果

我們用滴眼法免疫了19隻家兔，其中11隻用人血清抗原，2隻用貓血清，4隻用10%人血紅蛋白溶液，其餘2隻用的是10%人凝固血清混懸液。對照組腹腔內注射共10隻，計人血清2隻，人血紅蛋白及凝固血清各4隻；靜脈內注射共6隻，3種抗原各2隻。實驗結果證明(表1)，所有用普通血清(包括人和貓)作抗原滴眼的家兔，其沉澱素效價均在2,000倍以上，其中達到及超過規定標準的有10隻(77%)；而用凝固血清和血紅蛋白免疫的，全部是陰性結果，不產生沉澱素。但滴眼法免疫各兔，沒有一個死亡例，在免疫終了大都維持原來體重，有的體重還增加。

表 1

滴眼次數	各 種 抗 原 及 滴 數 後 的 沉 澱 效 價				
	人血清每次每眼各2滴 (共9隻)	人血清每次每眼各3滴(共2隻)	貓血清每次每眼各2滴(共2隻)	10%人血紅蛋白各2滴(共4隻)	10%人凝固血清各2滴(共2隻)
5—10次		1,000; 1,000,	1,000; 1,000,		
10—20次	200(4)*, 500(5), 10,000(6) 5,000(8),	10,000; 20,000,	20,000; 20,000,	—, —,	
20—30次	10,000(1), 1,000(2), 10,000(7), 20,000(8), 10,000(5), 50,000(9),				
30—40次	2,000(2), 1,000(3), 5,000(4), 50,000(7), 50,000(8),			—, —,	—, —,
40—60次	20,000(1), 20,000(3), 10,000(4), 50,000(5), 50,000(6),				
60+ 次	50,000(1), 2,000(2), 100,000(3),				

\* 圓內數字是兔子號數。

對照組(表2)，腹腔內和靜脈內注射人血清者各2隻，雖也均無死亡，免疫次數和日期也不多，但沉澱素效價不高，達標準者僅1隻。至於用人血紅蛋白及凝固血清作靜脈內注射者，全部死亡；腹腔內注射者，效果雖較好，但死亡率仍高(共3隻)。

滴眼法的抗原用量，根據經驗，每眼2滴已够。用3滴的並未提高效價。這是由於

大部抗原迅即溢出眼外或流入鼻腔,更多抗原並不能增加吸收量的緣故。

表 2

免 疫 法	抗 原		免 疫		免 疫 注 射			最 高 效 價			
	種 類	%	總數	死亡	最高次數	最長日期	抗原總量 (毫升)	2,000— 10,000	10,000— 20,000	20,000— 40,000	50,000— 100,000
滴 眼	人 血 清	100	11	0	10—85	21—83	1.5—9	1	2	1	7
	人血紅蛋白	10	4	0	13—34	42—52	1.5—4	—			
	人凝固血清	10	2	0	34	42	4	—			
腹腔內注射	人 血 清	100	2	0	3	12	30	1	1		
	人血紅蛋白	10	4	2	3,9	12,28	30,45		1		1
	人凝固血清	10	4	1	4—7	14—22	14				3
靜脈內注射	人 血 清	100	2	0	3	12	3	1		1	
	人血紅蛋白	10	2	2							
	人凝固血清	10	2	2							

免疫間隔期,似以每天 1 次較為合適,每天 2 次者未見更好效果,隔天免疫又使時間拖長。

## 討 論

從表 1 可以看到,用普通血清抗原作滴眼法免疫時,均能產生沉澱素,效價大都達到標準或更高,尤其是免疫動物不致死亡,而對照組腹腔內注射和靜脈內注射者均有死亡。滴眼操作技術又特別簡單,任何一個實驗室都可能做到。因此,在製備抗血清沉澱素時滴眼法是合適的。其缺點是免疫次數較多,延續時間較長,又不能製備抗血紅蛋白沉澱素。

滴眼法的免疫機制,我們認為抗原是由粘膜(眼結合膜)吸收而進入血循環的。這可由用普通血清滴眼免疫能產生沉澱素抗體,而血紅蛋白和凝固血清未產生抗體得以證明(因前者蛋白顆粒較小,可通過眼結合膜,後二者顆粒較大而不能或難以通過)。而且,滴眼法抗體產生比較慢,是因為每次被吸收入血的抗原量很少之故。因而,這裏也證明了神經反射機制的的作用:既然每次吸收入血的抗原量很少,則滴眼法免疫全程所進入血液的抗原總量必遠較靜脈內或腹腔內注射者為小,然則所產生的沉澱素效價却仍然極高,這現象是理化學說所不能解釋的。顯然必須認為眼結合膜組織對抗原較敏感,因之該局部感受器所發出的衝動較強,提高了中樞神經系統的興奮性,反射地提高效應器(網狀內皮系統)的機能,待後雖然只有較少量的抗原與之接觸,也產生高效價的抗

體。這結果是比較符合於 Пешковский 氏的兩相學說<sup>[10]</sup>(即抗體的產生既與神經反射機制有關,抗原又必須接觸效應器),但是否正確,還須進一步證明之。

## 結 論

本文介紹滴眼法製備沉澱素血清。滴眼法的操作技術非常簡單,免疫動物安全,用普通血清作抗原免疫時效果可靠,大多數能得到高效價的沉澱素血清,一般實驗室是可以採用的。

實驗結果證明神經反射機制在免疫上的作用,並可能符合於兩相學說。

本項實驗承科內陳安良教授的領導以及本學院微生物學教研組主任白施恩教授的熱情指導,始得完成,特此一併致謝。

## 參 考 文 獻

- [1] 許植: 洗冤錄詳義, 第 30、90、91 頁, 清咸豐四年版。
- [2] М. И. Райский: Судебная Медицина, pp. 432—433, Медгиз, Москва, 1953.
- [3] А. С. Гаркави: Реакция преципитации в судебной медицине, Сборник Научный Работ по Судебной Медицине и Пограничным Областям, 2: 28—32, 1955.
- [4] 松下禎二: 免疫學, 第 2 版, 第 802 頁, 南江堂京都支店, 1925.
- [5] N. P. Sherwool: Immunology, p.p. 184—200, 1935.
- [6] S. Smith 著, 余小宋譯: 法醫學最近之進展, 第 114—118 頁, 商務印書館, 上海, 1937.
- [7] 田浩泉: 蜘蛛膜下腔或腦內注射法製備沉澱血清之進一步觀察, 山東大學學報, 5: 93—105, 1955.
- [8] 田浩泉: 沉澱血清製備方法之進一步觀察, 中華醫學雜誌, 42: 854—858, 1956.
- [9] 孔祿卿: 物證檢驗講義, 南京, 1952.
- [10] Пешковский: 神經系統活動與抗體形成關係問題, 蘇聯醫學科學代表團在廣州區講學活動資料彙編(下冊), 華南醫學院院長辦公室編印, 第 99—102 頁, 1955.

## PRODUCTION OF PRECIPITIN SERA BY THE CONJUNCTIVAL INSTILLATION METHOD

KUO CHING-YUAN

*Department of Pathological and Forensic Medicine, Chung Shan  
Medical College, Canton*

A new technic for the production of precipitin sera by the conjunctival instillation is described. Nineteen rabbits were used for the preparation of four different kinds of antisera by this method: 11 rabbits were immunized with normal human serum, and 2 rabbits with normal cat serum, All of these animals produced antisera with a titer that exceeds 1:2,000, and 10 animals (77%) with a titer of 1:20,000 or above. However all the remaining 6 rabbits receiving conjunctival instillation of coagulated serum and hemoglobin solution failed to produce antiserum. From these results, it may be inferred that absorption by the conjunctiva occurred freely with normal serum but more difficultly with coagulated serum and hemoglobin solution possibly because the particles of the protein of the latter two were too large for the conjunctiva to absorb. Thus the antigen could not be transported to the reticulo-endothelial system so that no antibody could be produced.

Immunization of an animal by the conjunctival instillation is a simple, safe and reliable method and require very small dose of antigen. However, the course of immunization is very long, and the kinds of antigens that are applicable to this method seem to be limited to the untreated serum.