



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校教材 供法医、法律、医学法学、临床医学类专业用

法医物证学实验指导

主编 张林 副主编 庞灏



人民卫生出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校教材

供法医、法律、医学法学、临床医学类专业用

法医物证学实验指导

主 编 张 林

副主编 庞 灏

编 者 (以姓氏笔画为序)

许冰莹 (昆明医学院)	陈国弟 (四川大学)
孙宏钰 (中山大学)	庞 灏 (中国医科大学)
李英碧 (四川大学)	黄代新 (华中科技大学)
李剑波 (重庆医科大学)	梁伟波 (四川大学)
李淑瑾 (河北医科大学)	赖江华 (西安交通大学)
张 林 (四川大学)	

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

法医物证学实验指导/张林主编. —北京:人民卫生出版社,2008.8

ISBN 978-7-117-10414-2

I. 法… II. 张… III. 物证-法医学鉴定-实验
IV. D919.2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 104971 号

本书本印次封底贴有防伪标,请予识别。

法医物证学实验指导

张林 著

张林 主编

(法医物证学实验指导) 张林

(学大川四) 张林 著 (学大川四) 张林 著

(学大川四) 张林 著 (学大川四) 张林 著

(学大川四) 张林 著 (学大川四) 张林 著

(学大川四) 张林 著 (学大川四) 张林 著

法医物证学实验指导 (学大川四) 张林 著

(学大川四) 张林 著

主 编:张 林

出版发行:人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址:北京市丰台区方庄芳群园3区3号楼

邮 编:100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线:010-67605754 010-65264830

印 刷:北京人卫印刷厂

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:12.25

字 数:283千字

版 次:2008年8月第1版 2008年8月第1版第1次印刷

标准书号:ISBN 978-7-117-10414-2/R·10415

定 价:23.00元

版权所有,侵权必究,打击盗版举报电话:010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前 言

进入 21 世纪,我国高等医学教育正面临前所未有的发展机遇,也面临着新的挑战。作为高等医学院校法医学专业的核心课程,法医物证学同样面临新的发展。法医物证学是一门实践性和综合性很强的学科,它是生物检材的成分和特性来证明案件的事实,它是侦破案件的向导,查明事实的依据,审查证据的手段。法医物证学实验技术是法医物证学应用于实践的关键,它涵盖面广,交叉性强,是各个学科先进技术在生物性检材检验中的集中体现,因而法医物证学实验教程是法医物证学教学的核心和关键。

为了将法医物证学理论运用于实践,也为了适应法医物证学日新月异的发展,我们编写了《法医物证学实验指导》。同时,根据国家“十一五”规划教材的编写要求,我们对本书的编写注重了实验教程在专业教学中的地位和作用,贯彻了经典实验技术与现代实验技术相结合的主导思想,从 20 世纪 70 年代的法医血型血清学技术,到今天应用最广泛最有效的 DNA 分型技术,本书都详细描述了各种实验技术的具体操作方法,也包括最新的研究成果。从血液、精液的检验,到毛发、指甲的分析,本教材涉及了法医物证学实验的各种生物检材,做到了全面细致,使法医物证学实验指导更加具有实用性和前瞻性,力求教材的编写与生物技术的发展相适应,努力使本实验教程成为一套系统全面、科学先进、可读性与操作性强的实验教材。

本书全面阐述了法医物证学实验的理论基础、技术原理和技术方法,全书共分 14 章,第 1~9 章包括绪论、血液、精液、唾液、尿液、指甲、毛发和软组织的检验;第 10~14 章包括核 DNA、线粒体 DNA 的分析;在附录中简单介绍了法医物证实验室的标准化。

《法医物证学实验指导》是一部能适应现代需求的高层次刑事科学技术教科书、法庭科学的技术指南和法医物证学的实践教材。它可供普通高等学校法医学专业必修课和医学类专业选修课使用,也可作为刑事侦查、科学研究人员从事业务工作的参考书。

《法医物证学实验指导》在编写过程中得到全国众多高校法医学院(系)老师的大力支持,谨此致以诚挚的谢意!

由于我们知识水平和经验有限,本书难免有不足乃至错误之处,祈盼各院校师生不吝指正,以期更正和提高。

编 者

2008 年 6 月

目 录

31	三十二
32	四十二
33	五十二
33	六十二
32	六十二
30	六十二
1	第一章 绪论.....	1
4	第二章 血液及血痕检验.....	4
4	第一节 预实验.....	4
4	实验一 联苯胺实验.....	4
5	实验二 酚酞实验.....	5
6	实验三 无色孔雀绿实验.....	6
6	实验四 鲁米诺实验.....	6
7	第二节 确证实验.....	7
7	实验五 显微分光镜检查.....	7
9	实验六 血细胞的检查.....	9
9	实验七 血色原结晶实验.....	9
10	实验八 氯化血红素结晶实验.....	10
11	第三节 种属实验.....	11
11	实验九 种属鉴定——胶体金标记法.....	11
12	实验十 抗人血清(抗人血红蛋白)——环状沉淀反应.....	12
13	实验十一 抗人血清(抗人血红蛋白)——免疫扩散实验.....	13
14	第四节 ABO 血型检验.....	14
14	实验十二 ABO 血型的吸收实验检测.....	14
16	实验十三 ABO 血型的解离实验检测.....	16
17	实验十四 ABO 血型的红细胞粘连实验检测.....	17
18	实验十五 ABO 血型的免疫组化 ABC 法检测.....	18
19	实验十六 血痕凝集素的测定.....	19
20	第五节 其他实验.....	20
20	实验十七 Gc 型的检测.....	20
22	实验十八 Hp 型的检测.....	22
24	实验十九 EsD 型的检测.....	24
26	实验二十 PGM1 型的检测.....	26
28	实验二十一 月经血抗纤维蛋白(原)血清实验.....	28
30	第三章 精液及精斑检验.....	30
30	第一节 肉眼检查.....	30
30	实验二十二 精斑的肉眼及紫外线检查.....	30
31	第二节 精斑预实验.....	31

实验二十三	碘化钾结晶实验	31
实验二十四	磷酸苯二钠实验(Kind-King 实验)	32
第三节	精斑确证实验及种属鉴定	33
实验二十五	精子直接检出实验	33
实验二十六	抗人精液血清环状沉淀反应	35
实验二十七	P30 实验	36
实验二十八	胶体金标记 P30 试剂条检测	38
第四节	精斑的个人识别	39
实验二十九	精斑 ABO 血型中和实验检测	39
实验三十	精斑 ABO 血型间接斑点 ELISA 实验	41
实验三十一	精斑 DIA3 型测定(等电聚焦法)	42
第四章	精液与阴道分泌液混合斑检验	44
实验三十二	混合斑的细胞学检查	44
实验三十三	混合斑 ABO 血型测定——中和实验	46
实验三十四	混合斑 α_2 -SGP 的 ABH 抗原测定	49
实验三十五	混合斑中抗人精液独特蛋白血清检测——斑点酶联免疫吸 附法	50
实验三十六	混合斑中精子 ABO 血型的直接检测——间接酶标抗体免疫组 化法	52
第五章	唾液及唾液斑检验	55
实验三十七	唾液及唾液斑的收集	55
实验三十八	淀粉消化实验	57
实验三十九	口腔黏膜脱落上皮细胞检查	58
实验四十	唾液 ABO 血型的测定——中和实验	59
实验四十一	唾液酸性富含脯氨酸蛋白多态性检测	61
第六章	尿液及尿斑检验	64
实验四十二	尿类黏蛋白的双抗体夹心 ELISA 法检测	64
实验四十三	尿斑的肌酸酐检测法	66
实验四十四	尿液及尿斑 ABO 血型的斑点 ELISA 测定法	66
第七章	指甲与趾甲检验	69
实验四十五	指(趾)甲 ABO 血型的解离实验测定	69
第八章	毛发检验	72
实验四十六	毛发的显微镜检查	72
实验四十七	毛发 ABO 血型检验——标记抗体法	74

实验四十八	毛发角蛋白检验——SDS-PAGE 电泳法	74
第九章 人体软组织检验		
实验四十九	软组织 ABO 血型测定(ABC 法)	77
第十章 生物检材的 DNA 提取		
第一节 DNA 提取方法		
实验五十	酚-氯仿法提取 DNA	80
实验五十一	Chelex-100 法提取 DNA	82
实验五十二	磁珠法提取 DNA	83
实验五十三	盐析法提取 DNA	85
第二节 法医生物检材的 DNA 提取		
实验五十四	血液(血痕)DNA 提取	86
实验五十五	精液(精斑)DNA 提取	89
实验五十六	混合斑 DNA 提取	91
实验五十七	唾液(唾液斑)DNA 提取	93
实验五十八	尿液(尿斑)DNA 提取	95
实验五十九	粪便(粪便斑)DNA 提取	97
实验六十	毛发 DNA 提取	98
实验六十一	软组织 DNA 提取	100
实验六十二	绒毛 DNA 提取	101
实验六十三	骨组织 DNA 提取	103
实验六十四	牙组织 DNA 提取	105
实验六十五	指(趾)甲线粒体 DNA 提取	106
实验六十六	羊水 DNA 提取	107
实验六十七	微量 DNA 提取	108
第三节 DNA 定量		
实验六十八	琼脂糖凝胶半定量法	110
实验六十九	紫外分光光度法	111
实验七十	荧光实时定量 PCR 技术进行 DNA 定量	112
第十一章 多态性蛋白的基因型检测		
实验七十一	ABO 基因型的测定	115
实验七十二	Lewis 基因型的测定(PCR-SBT)	119
实验七十三	HLA II 类基因型测定	120
实验七十四	H _p 型基因型测定	123
实验七十五	G _c 型基因型测定	124
实验七十六	α_1 -AT 型基因型测定(PCR-RFLP)	125
实验七十七	Tf 型基因型测定	126

47	实验七十八	AHSG 型基因型测定	127
	实验七十九	Gm(IgG2) 型基因型测定	128
77	实验八十	C8A 型基因型测定	129
77	实验八十一	EAP 基因型测定	130
	实验八十二	EsD 基因型测定	131
08	实验八十三	PGM1 基因型测定	132
08	实验八十四	GPT 基因型测定	133
08	实验八十五	ADA 基因型测定	135
58	实验八十六	FUCA1 基因型测定	136
58			
	第十二章 STR 分析		138
68	第一节	STR 银染检测分析	138
68	实验八十七	STR 单基因座银染检测分析	138
68	实验八十八	STR 多基因座检测分析	143
16	第二节	STR 荧光检测分析	146
69	实验八十九	STR 单基因座荧光检测分析	147
29	实验九十	STR 多基因座荧光检测分析	149
77	第三节	性染色体 STR 检测分析	154
89	实验九十一	X-STR 检测	154
100	实验九十二	Y-STR 检测	158
101			
	第十三章 SNP 分析		165
101	实验九十三	微测序法检测 Y-SNP	165
601	实验九十四	等位基因特异性杂交(Luminex 100 法)检测 HLA-A 基因座多态性	168
101			
801	实验九十五	TaqMan 法检测 SNP 的基因型	171
110			
	第十四章 线粒体 DNA 分析		174
111	实验九十六	线粒体 DNA 序列变异筛选	174
112	实验九十七	线粒体 DNA 序列多态测定	176
	实验九十八	细胞色素 B 基因种属鉴定检验	178
111			
	附录 实验室标准化简介		180
	参考文献		184
150			
151			
154			
154			
152			
156			

ABO 血型系统以后,半个世纪内至少 21 种细胞血型系统得以完成;1958 年 Dausset 通过发现 HLA-A₂ 确立了白细胞系统;60 年代以来,通过各种电泳技术进行了血清型和酶型的检测;70 年代以来通过等电聚焦技术发现了多种血清型和酶型的亚型;80 年代 DNA 多态性被应用于法医物证学,先后发展了 DNA 指纹、聚合酶链反应和 DNA 测序等技术。伴随生命科学日新月异的发展,法医物证学实验有了质的飞跃,由常量检测发展到微量及超微量检测,由蛋白质水平检测发展到分子水平检测。

一方面,随着法医物证学发展成为法医血清学、法医分子生物学、法医人类学及法医牙科学等分支学科,法医物证学实验的内容涉及多种学科,如遗传学、人类学、物理学、化学、生物化学、分子生物学和相关临床医学等学科的实验内容和技术手段。另一方面,由于法医物证包括的范围极广,实验对象包括人体血液、精液、阴道液、毛发、指甲、各种软组织和骨骼等生物检材。这造就了法医物证学实验成为一门利用各种学科实验技术,对各种生物检材进行检验的交叉性实践学科。法医物证学实验总是与生命科学各学科的发展保持几乎一致的速度,及时而有效地将各种实验技术的创新和完善应用于法医物证鉴定中,极大地丰富了法医物证学实验的研究方法。

三、法医物证学实验检材的发现、提取和送检

法医物证学实验的检材主要指各种生物检材,包括体液、分泌液、排泄物,比如血液、精液、尿液、阴道分泌物、羊水及其斑痕等等,也包括各种组织器官、毛发、骨骼、牙齿等等。善于对法医物证学实验检材的发现、提取、送检,是充分发挥物证作用的前提,是开展法医物证学实验的首要条件。

1. 检材的发现 一般情况下是通过现场的勘查来发现检材。勘查过程中,关键是做到全面搜索、仔细检查,不放过现场的任何一点细节。比如,在现场的地面、墙面、凶器、门把手、开关、指甲缝、鞋底等部位搜索血痕的存在;在受害人的衣裤、被褥、腹壁、大腿、阴毛等部位搜索精斑;现场的烟头、口香糖、吸管、饮料容器等可能残留唾液斑;由于搏斗,在被害人或嫌疑人的指甲缝和凶器上可能发现皮肤及其他脏器组织碎块;而现场的地面、床褥、凶器、被害人手中也可能留下毛发等物证检材。

2. 检材的提取 提取检材前,应该进行原位拍照登记,详细记录检材的种类、形态、大小及发现部位。提取时应根据检材的不同种类和不同的附着载体,采用不同的方法。原则是保证检材的不损失、不污染、不破坏其可检测性。对于较小载体上的检材,可将该载体全部提走;对于附着在较大且不易携带载体上的检材,应该用剪切、刮削、擦拭、吸敷、浸泡等方法来提取。凡从各种载体上提取的检材,必须提取检材附近部位的材料作为空白对照检材。检材提取后注意防腐,新鲜体液应尽快检验,否则制成纱布斑痕;组织脏器应冷冻保存或浸泡于 75% 乙醇中,避免甲醛溶液浸泡。

3. 检材的送检 提取检材后,对每件检材应单独包装,避免交叉污染。采用纸袋包装斑痕类检材,用离心管或试管保存体液类检材。低温存放各种检材,以冷冻效果为佳。对检材的送检应该详细的记录,包括送检单位、送检人、检材的性状、数量及包装方式、送检目的等等。送检单位和收检单位应该仔细地核对送检的检材。

四、法医物证学鉴定结论的法律相关问题

法医物证学是通过遗传标记分析为案件侦查提供线索,为审判提供科学证据,作出法医物证学鉴定结论的学科。但鉴定结论不等于司法鉴定结论。只有当法医物证学鉴定结论经过司法人员审查,认为其正确可信,方具有法律效力,才能作为一种法律证据。法医物证学鉴定结论的法律效力取决于以下条件:

1. 法医物证学鉴定人或鉴定单位必须得到司法机关的认可 《刑事诉讼法》第119条规定:“为了查明案情,需要解决案件中某些专门性问题的時候,应当指派、聘请有专门知识的人进行鉴定。”因此,只有受司法机关指派或聘请的法医物证学鉴定人或鉴定单位,做出的法医物证学鉴定才具有法律效力。当然,法医物证学鉴定人和鉴定单位的资格必须满足一系列条件,经过严格审查之后才能具备。

2. 法医物证学鉴定程序必须符合法律要求 法医物证学鉴定必须具备委托、受理和鉴定三个规范的法律程序。只有受司法机关委托,全面检验,操作规范,经过科学分析后作出的法医物证学鉴定结论,再经司法人员审定后,才是具有法律效力的鉴定结论。

3. 法医物证学鉴定结论必须内容完整,格式规范 法医物证学鉴定结论一般包括以下内容:委托进行鉴定的单位;鉴定的目的和要求;提交的材料;鉴定的时间和地点;鉴定的方法;实验分析结果;鉴定结论;鉴定单位及鉴定人签名。

法医物证学鉴定结论具备证据的基本特征,同时,鉴定方法和原理具备科学性,鉴定结果具有实验的重复性。鉴定结论是针对案件中的专门性问题作出判断性结论,是对司法审判提供的科学证据,而不是对相关事实的法律评价。

张林

(张林)

【张林】

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

【张林】

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

【张林】

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

【张林】

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

张林,男,汉族,1975年10月10日出生,本科学历,学士学位,现任教于某大学,从事法医物证学教学工作多年。

注意:

1. 本法灵敏度高达1:200 000~1:500 000,故只需要微量检材即可,切勿剪取一大块,以免浪费检材。用来夹取或剪取阳性检材的镊子、剪刀用后必须擦洗干净,以防交叉污染。

2. 联苯胺能被氧化剂直接氧化成联苯胺蓝,故必须按冰醋酸→联苯胺→过氧化氢的顺序滴加试剂,不能颠倒。在加入过氧化氢前出现蓝色,说明检材含有氧化物质。

3. 经过预实验,检材已遭破坏,不能再做其他检验。因此,切勿将试剂直接滴在衣服、凶器或其他物体的斑痕上。

4. 本法特异性较差,据报道,大肠埃希菌、粪杆菌等许多细菌污染的检材也会出现假阳性反应。含植物过氧化物酶的检材在该实验中呈翠蓝色弱阳性反应。

5. 联苯胺有致癌作用,故操作中皮肤不要直接接触试剂。



思考题

1. 如何正确解释联苯胺实验的阳性、阴性结果?
2. 有哪些情况会导致假阳性结果的产生?该如何解决?

实验二 酚酞实验

【原理】

血痕中的血红蛋白或正铁血红素具有的过氧化物酶活性,能将过氧化氢分解成水和新生态氧,后者将无色的还原酚酞(酚酞咪)氧化成在碱性溶液中呈红色的酚酞。

【仪器及试剂】

1. 仪器 镊子,剪刀,滴管,滤纸,试管,组织针。
2. 试剂

A:无色还原酚酞液:氢氧化钠20g、酚酞1g溶于200ml水中,加20~30g锌粒,于回流冷凝集装置下煮沸至红色消失,冷却后,于上清液中加入少量锌粒,装入褐色瓶中备用。

B:3%过氧化氢。

【实验步骤】

1. 检材准备同联苯胺实验。
2. 先滴加无色还原酚酞液30秒后无红色反应,再滴加3%过氧化氢,立即出现红色为阳性反应。

也可取检材浸液1ml加5滴还原酚酞液,30秒后无红色反应,再加3%过氧化氢,立即出现红色为阳性反应。

或于试管内先加入2滴3% H_2O_2 和1ml还原酚酞液,再用干净组织针插刺可疑斑痕后,插入试管内的液体中,出现红色为阳性反应。

【实验结果分析】

同联苯胺实验。

注意:

1. 本法特异性较联苯胺实验好,据报道,植物过氧化物酶在该实验中呈阴性反应,

且酚酞实验无毒、安全；

2. 本法灵敏度 1:100 000 ~ 1:500 000, 不及联苯胺实验, 配制试剂亦繁琐。



思考题

1. 如何正确解释酚酞实验的阳性、阴性结果?
2. 与联苯胺实验比较, 本实验的优缺点分别有哪些?

实验三 无色孔雀绿实验

【原理】

血痕中的血红蛋白或正铁血红素具有的过氧化物酶活性, 使过氧化氢分解成水和新生态氧, 后者将无色孔雀绿氧化成绿色的醌类化合物。

【仪器及试剂】

1. 仪器 镊子, 剪刀, 滴管, 滤纸。
2. 试剂

A: 无色孔雀绿 0.5g、冰醋酸 1ml, 加蒸馏水 50ml。如无无色孔雀绿, 则可将孔雀绿经褪色处理后用: 孔雀石绿 0.1g, 无水亚硫酸钠 0.4g, 蒸馏水 50ml, 搅拌溶解后过滤, 再加冰醋酸 10ml, 装于棕色瓶中备用。

B: 3% 过氧化氢。

【实验步骤】

实验方法同联苯胺实验, 出现青蓝色为阳性反应。或取 8ml 试剂 A 与 2ml 试剂 B 混合, 在微量检材上滴加 1 滴混合试剂, 出现青蓝色为阳性反应。

【实验结果分析】

同实验一。

注意:

1. 本法灵敏度较低, 1:10 000 ~ 1:20 000, 特异性较联苯胺实验好。
2. 干燥检材呈阳性反应者有重铬酸钾、硫酸亚铁、硫酸铁、氯化铁、氯化亚铁。植物中仅水芹银杏芽呈阳性, 其他有的花草、野菜呈阳性。



思考题

1. 如何正确解释无色孔雀绿实验的阳性、阴性结果?
2. 有哪些情况会导致假阳性结果的产生? 该如何解决?

实验四 鲁米诺实验

【原理】

血痕中的血红蛋白或正铁血红素具有的过氧化物酶活性, 使过氧化氢分解成水和新生态氧, 后者在碱性溶液中氧化鲁米诺而产生化学发光。

【仪器及试剂】

1. 仪器 喷雾器。

2. 试剂

A: 鲁米诺 0.1g、过氧化钠 0.5g, 加蒸馏水 100ml。

B: 鲁米诺 0.1g、无水碳酸钠 5g、3% 过氧化氢 15ml, 加蒸馏水 100ml。

【实验步骤】

将试剂用喷雾器向可疑斑迹处喷雾, 有血痕部位立即出现青白色发光现象, 为阳性反应。

【实验结果分析】

同实验一。

注意:

1. 本法具有较高的灵敏度, 尤其适用于在夜间或黑暗处较大范围内发现血痕。
2. 鲁米诺试剂易氧化失效, 必须临用时配制, 加适量的 4-碳酸异吡唑或尿酸可减弱自身发光现象。
3. 该实验特异性较好, 唾液、黏液、尿、精液、乳汁、脓液及粪便均呈阴性反应, 但一些油脂和金属物可呈阳性反应。



思考题

1. 如何正确解释鲁米诺实验的阳性、阴性结果?
2. 有哪些情况会导致假阳性结果的产生? 该如何解决?

第二节 确证实验

实验五 显微分光镜检查

【原理】

有色物质能吸收一定波长的光, 当日光通过这类物质后再经过分光镜时, 其中某些波长的光被吸收, 在连续光谱上出现黑色的吸收线。不同物质吸收线的位置与数量不相同。血红蛋白及其衍生物均为有色物质, 各有其特殊的吸收光谱, 在显微分光镜下检见这些特定的吸收线, 便可确定血痕。

【仪器及试剂】

1. 仪器 镊子, 剪刀, 载玻片, 盖玻片, 分离针, 显微分光镜。
2. 试剂 33% 氢氧化钠, 多硫化铵, 高山试剂, 浓硫酸。

【实验步骤】

以燃烧氯化钠结晶的钠光校对分光镜标尺, 使钠的黄色吸收线位于波长 589 ~ 589.5nm 处。

1. 碱性血色原吸收光谱的检查 取少量检材, 按血色原结晶实验方法, 通过显微镜观察, 选择红色最强部位(最好红色充满整个视野), 用分光镜取代目镜观察吸收线。亦可用 33% 氢氧化钠和多硫化铵溶液各 1 滴代替高山试剂制备碱性血色原。若检出血色原的吸收光谱, 可确定检材为血痕。用高山试剂制备的吡啶血色原有 2 条吸收线, 分别位于黄色区(波长为 554 ~ 565nm)和绿色区(波长 523 ~ 536nm), 前者较明显, 后者稍淡。用

多硫化胺制备的血色原的吸收线位于波长为 555 ~ 560nm 和 528 ~ 530nm 处。

2. 酸性血卟啉吸收光谱的检查 取少量检材置于载玻片上,加浓硫酸 1 滴或 2 滴,盖上盖玻片,通过显微镜观察,选择紫色或灰绿色部位,再用分光镜检查酸性血卟啉的吸收线。酸性血卟啉的吸收线也有 2 条,一条位于橙色区,波长为 607 ~ 594nm,不明显;另一条位于黄绿色区,波长为 548 ~ 589nm,宽而明显。

3. 血红蛋白及其衍生物吸收光谱的检查 血痕较新鲜的,可用少量生理盐水或蒸馏水浸泡检材,将浸液滴于载玻片上用显微分光镜检查。若检出血红蛋白或其衍生物的吸收线,可确定检材有血痕。血红蛋白及其衍生物的吸收峰波长见表 5-1。

表 5-1 血红蛋白及其衍生物的吸收峰波长

化合物名称	主要吸收峰波长 (nm)
氧合血红蛋白 (HbO)	576 ~ 578, 540 ~ 542
还原血红蛋白 (Hb)	556 ~ 565
碳氧血红蛋白 (COHb)	568 ~ 572, 538 ~ 540
硫化血红蛋白 (SHb)	618, 578, 540
酸性正铁血红蛋白 (酸性 MHB)	630, 576, 540, 500
碱性正铁血红蛋白 (碱性 MHB)	600, 577, 540
氰化正铁血红蛋白 (CNMHB)	540
肌红蛋白 (Mb)	582, 542, 518
高铁血红素白蛋白 (MHA)	624, 540, 500
亚铁血红素	575, 558, 550, 528
酸性正铁血红素	630 ~ 635, 540, 510
碱性正铁血红素	610 ~ 615
高铁血红素	558, 530
酸性高铁血红素	662, 582, 540, 505
碱性高铁血红素	610
吡啉血色原	554 ~ 565, 523 ~ 536
硫化胺制备血色原	555 ~ 560, 528 ~ 530
酸性血卟啉	594 ~ 607, 548 ~ 589

【实验结果分析】

有些物质具有类似血痕的吸收光谱,故结果判断要谨慎。显微分光镜下见特定的吸收线,可确定检材是血痕,但阴性结果不能否定检材是血痕,只能说未能检见血痕。

注意:

1. 显微分光镜检查操作简便、快速、灵敏度比结晶实验高,只要 0.1mg 血痂即可检出。检查时若发现有氰化正铁血红蛋白、碳氧血红蛋白等物质的吸收线,提示出血者有氰化物、一氧化碳中毒。

2. 血色原的吸收线能保持较长时间,如用凡士林封闭盖玻片周围,则保持的时间更长。

3. 酸性血卟啉检查尤其适用于极其陈旧的血痕和经高温、暴晒、潮湿等因素作用的血痕。但胆汁、粪便因含有原卟啉和次卟啉,该检查也呈阳性结果,必须排除此类物质的干扰后,才能下结论。

4. 做吸收光谱检查确证血痕,如操作技术熟练,一般不会发生错误的结果。但有些物质具有类似血痕的吸收光谱,应再做化学反应观察吸收线的变化,以确定检材是否有血痕。例如品红的稀释液或卡红的氨溶液,有类似氧合血红蛋白的2条吸收线,但加醋酸或还原剂后,品红及卡红的吸收线不变,血液的则变。



思考题

1. 如何正确解释显微分光镜检查的阳性、阴性结果?
2. 有哪些情况会导致假阳性、假阴性结果的产生?该如何解决?

实验六 血细胞的检查

【原理】

血液中有红细胞、白细胞,若在检材中检出血细胞,即可确认检材有血痕。

【仪器及试剂】

1. 仪器 镊子,剪刀,载玻片,盖玻片,分离针,显微镜。
2. 试剂 5%白蛋白液。

【实验步骤】

新鲜未干的血痕,直接取少量检材涂片。织物纤维上的血痕,取少量纤维,撕松,加5%白蛋白液浸湿、固定;少量血痂置于载玻片上,加5%白蛋白液浸湿后,分离血痂。以上涂片干燥后染色,显微镜观察。可采用HE染色法、过氧化物酶染色法,也可用一般血液涂片染色法染色。

【实验结果分析】

同血色原结晶实验。

注意:

1. 做血色原结晶或绿化血红素结晶实验时,若检出血细胞,也可确认血痕。
2. 若查见有核红细胞,说明该血痕不是哺乳类动物的血痕。



思考题

1. 如何正确解释血细胞检查的阳性、阴性结果?
2. 有哪些情况会导致假阳性、假阴性结果的产生?该如何解决?

实验七 血色原结晶实验

【原理】

又称为高山结晶实验。血红蛋白在碱性溶液中分解为正铁血红素和变性珠蛋白,正铁血红素在还原剂作用下被还原为血红素,后者与变性珠蛋白及其他含氮化合物(如吡啶、烟碱、氨基酸)结合,形成有特殊吸收光谱的血色原结晶。

【仪器及试剂】

1. 仪器 镊子,剪刀,载玻片,盖玻片,分离针,保湿盒,显微镜。
2. 试剂 高山试剂:30%葡萄糖10ml、10%氢氧化钠3ml、吡啶3ml的混合液。