

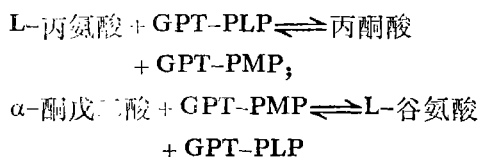
# 中国人(广州地区)红细胞 GPT 遗传性多态现象的特点及 血痕 GPT 的可测性研究

陈跃龙 郭景元

(法医系物证教研组)

谷丙转氨酶 (Glutamic-Pyruvic Transaminase, GPT) 是一种具有遗传性多态现象的细胞酶。它在机体各器官组织中广泛存在, 尤以肝细胞含量最高。红细胞内 GPT 含量较少, 但也有相当的活性。GPT 有两种形式, 分别存在于细胞质 (可溶性型) 和线粒体 (线粒体型) 之中。GPT 分子由两个亚基组成, 分子量约 114,000 道尔顿。

GPT 催化丙氨酸和谷氨酸的氨基互换, 反应以磷酸吡哆醛 (PLP) 为辅酶, 具有很高的底物专一性。反应式如下:



GPT 的多态性研究是七十年代初开始的。1971 年, Chen, S. H. 等<sup>[1]</sup>采用淀粉凝胶电泳法分离并经特殊染色, 首次确定了可溶性 GPT 的三种常见的电泳表型。三种表型是由常染色体 GPT 结构基因位点上一对共显的等位基因所控制的。GPT 基因位点在 16 号染色体短臂上<sup>[2]</sup>。进一步研究表明, GPT 位点还存在 9 个稀有等位基因。随着研究工作的开展, GPT 在亚、非、欧、美各洲不同群体中的表型分布和基因频率有广泛报道<sup>[3-5]</sup>。根据现有资料, GPT 两个常见等位基因的频率在大多数欧亚群体都比较接近, 其父权排除率和个体识别率较高, 因而可作为法医学亲权鉴定的一个标记系统。此外, 国外一些学者还探讨了血痕检材中 GPT 的可测性。目前, GPT 型

判定在法医鉴定中已逐步开展, 而国内尚未见 GPT 分型的报道。

本文研究了广州地区中国人 GPT 多态性特点, 计算出 GPT 型的父权排除率和个体识别率, 同时对不同基质血痕 GPT 的分型及其在不同温度下的可测时间进行了探讨。

## 材料和方法

### 一、样品

1. 血样来源 新鲜血样是由中山医科大学一附院血库和妇产科提供的 277 例健康成人的静脉血, 制备血痕的血样取自 13 例正常志愿献血者的静脉血。

2. 溶血产物制备 将 ACD 抗凝血 0.5~1ml 加 5 倍量生理盐水离心洗涤 3 次。取 1 份压积红细胞和一份双蒸水混匀, 冷冻过夜, 检测前于室温下温融。

3. 血痕及血痕浸出液制备 直接抽取静脉血, 分别滴在纱布、滤纸、白棉布和玻璃上凉干, 在 4℃、25℃ 和 37℃ 干燥环境下保存。检测前用 0.05M 的 DTT 浸泡血痕。

### 二、淀粉凝胶电泳

1. 电极缓冲液 为 0.1M Tris-马来酸 (pH 7.5); 凝胶缓冲液按 1:10 的比例将电极缓冲液用双蒸水稀释而成。

2. 混合淀粉凝胶制备 取马铃薯淀粉 (生化试剂, 上海化学试剂采购供应站经销) 5.5 克, 可溶性淀粉 (分析纯, 广东台山化工厂产品) 2.5 克, 置 200ml 圆底烧瓶内, 加凝胶缓冲液 80ml 和 β-巯基乙醇 0.05ml, 在喷火酒精

灯上边摇边加热，至成透明糊状，随即用负压吸引器抽气至出现大泡为止。待温度下降到约50℃时，倾入水平放置的19×14×0.3cm横框内，室温下成形1小时。

3.加样和电泳：用滤纸片吸附样品，仔细插入凝胶（滤纸和棉布血痕则用DTT浸泡至Hb微溶时直接插入）。电泳槽于4℃冰箱内水平放置，用双层滤纸搭桥，固定电压100伏，电泳16小时。

### 三、聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳

1.缓冲液 为75mM Tris-20mM 硼酸(pH 8.9)。电极缓冲液和凝胶缓冲液相同。

2.凝胶制备 胶浓度5%(Acr/Bis=5/0.25)。将乳酸脱氢酶(LDH, Sigma公司产品)聚合在凝胶内(150U/40ml)，聚合时间控制在1~2分钟<sup>[6]</sup>。

3.加样和电泳 将溶血液与40%蔗糖——1mM EDTA 钠溶液按1:1混合，加样15μl。在4℃下固定电压90伏、电泳16小时。

### 四、电泳后 GPT 活性区带的显示

#### 1.原理

GPT 催化 L-丙氨酸和 α-酮戊二酸转变为 L-谷氨酸和丙酮酸，生成的丙酮酸通过乳酸脱氢酶的催化转变为乳酸，在乳酸生成的过程中伴有还原型辅酶 I(NADH) 氧化为辅酶 I(NAD)。

在365nm 紫外灯照射下，NADH 发荧光而 NAD 不发荧光。

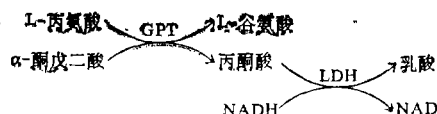


图1 GPT 显色原理示意

#### 2.操作

显色液配制：L-丙氨酸140mg，α-酮戊二酸10mg，NADH(Sigma公司)7mg，PLP(Sigma公司)0.1mg 和0.1M Tris-HCl(pH7.8)5ml，加入 LDH (500U/ml) 40μl。聚丙烯酰胺胶使用的显色液则不再加 LDH。

用双层滤纸饱浸显色液，覆盖于电泳后的凝胶表面，于37℃湿盒内温育1.5~2小时，然后揭去滤纸，在3650Å 长波紫外分析仪下观察结果。

### 五、红细胞 GPT 活性测定<sup>[7,8]</sup>

1.红细胞溶血液制备 将 ACD 抗凝血用生理盐水离心洗涤3次，取0.2ml 压积红细胞加稳定液(0.05ml β-巯基乙醇，1.0ml 10.27M EDTA 加双蒸水至100ml) 2ml，摇匀，置4℃冰箱10分钟备用。

2.反应系统光密度变化值测定 在石英比色杯中，按下列剂量加入试剂：

试剂	空白杯(μl)	标本杯(μ)
0.5M Tris-HCl-5mM EDTA, pH8.1	100	100
0.1M L-丙氨酸	100	100
2mM NADH	100	100
LDH(50U/ml)	10	10
0.4mMPLP	50	50
H <sub>2</sub> O	620	520
1:20溶血液	20	20

37℃温育10分钟后，在标本杯中加入0.01M α-酮戊二酸100μl，立即用日本岛津UV120-02型分光光度计于340nm 测定光密度，空白杯为B<sub>1</sub>，标本杯为S<sub>1</sub>。37℃反应10分钟后再测定光密度，空白杯为B<sub>2</sub>，标本杯为S<sub>2</sub>。10分钟内光密度变化值(ΔOD) = S<sub>1</sub> - S<sub>2</sub> - (B<sub>1</sub> - B<sub>2</sub>)。

3.血红蛋白测定 在2.0ml Drabkin 试剂[5.2mgKCN, 20mg K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.1g NaHCO<sub>3</sub> 加双蒸水至100ml] 中加0.2ml 溶血液，15分钟后，以 Drabkin 试剂作空白对照，在540nm 波长测定光密度为H。

#### 4.酶活性计算

$$\begin{aligned}
 \text{酶活性} &= \frac{\Delta OD}{6.22} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{0.02} \times 100 \\
 &\div \frac{H \times 64458 \times 11}{44 \times 10 \times 10^3} \\
 &= \frac{\Delta OD}{H} \times 49.88 \text{ (EU/gHb)}
 \end{aligned}$$

式中 6.22 是 NADH 的克分子消光系数, 100 为 1ml 换算为 100ml, 0.02 为溶血液量;  
 $\frac{H \times 64458 \times 11}{44 \times 10 \times 10^3}$  是由 Hb 浓度的计算公式而来, 分母部分的 44 为 Hb 的克分子吸光系数, 10 为 1 L 换算成 100ml,  $10^3$  为 Hb 浓度单位 mg/100ml 换算成 g/100ml, 分子部分的 64458 为 Hb 分子量, 11 为 Hb 测定中溶血液的稀释倍数  $\left(\frac{2.2}{0.2}\right)$ 。

## 结 果

### 一、广州地区中国人 GPT 遗传性多态现象的特点

表 1 中国人 (广州地区) GPT 表型频率和基因频率

表 型	基 因 型	例 数	表型频率 (%)	基 因 数	
				Gpt <sup>1</sup>	Gpt <sup>2</sup>
GPT1	Gpt <sup>1</sup> Gpt <sup>1</sup>	82	29.60	164	
GPT2-1	Gpt <sup>2</sup> Gpt <sup>1</sup>	127	45.85	127	127
GPT2	Gpt <sup>2</sup> Gpt <sup>2</sup>	68	24.55		136
总 计		277	100.00	291	263
基因频率				0.525	0.475

表 2 为 GPT 型别与遗传平衡间符合程度的  $\chi^2$  检验。期望数和观察数的差异无显著

性, 被检群体可看作是符合 Hardy-Weinberg 定律的样品群体。

表 2 中国人 (广州地区) GPT 型别与遗传平衡间符合程度

基 因 型	期望频率	期望数	观察数	$\chi^2$
Gpt <sup>1</sup> Gpt <sup>1</sup>	0.2759	76.35	82	0.418
Gpt <sup>2</sup> Gpt <sup>1</sup>	0.4988	138.15	127	0.980
Gpt <sup>2</sup> Gpt <sup>1</sup>	0.2256	62.50	68	0.484
合 计	1.00000	277.00	277	1.802

0.1 < P < 0.2

2. GPT 表型与活性的关系 测定 35 例正常成人红细胞溶血液的 GPT 活性, 同时进行电泳分型, 结果见表 3。GPT<sub>1</sub> 与 GPT<sub>2-1</sub> 和 GpT<sub>2</sub> 的活性差异有显著性。

1. 表型频率和基因频率: 用混合淀粉凝胶和聚丙烯酰胺凝胶对 277 例正常人的红细胞 GPT 进行电泳分离, 电泳图谱见图 2。表型频率和基因频率见表 1。



图 2 GPT 电泳图谱 (淀粉凝胶)

### 二、GPT 的父权排除率和个体识别率

本文被检群体的父权排除率为 0.187, 个体识别率为 0.642。

### 三、血痕 GPT 检测结果

表3 GPT 三种电泳表型的活性

表型	例数	$\bar{X}$	SD	实测值	P
1	11	4.433	0.643	3.234—5.442	
2-1	16	2.900	0.835	1.394—3.762	<0.01
2	8	2.345	0.870	1.320—3.396	<0.01
	35	3.255	1.135	1.320—5.442	

从表4中可见, 纱布、白棉布、滤纸和玻璃血痕在4℃保存, 两周以内全部可以检出, 其中玻璃血痕的可测时间略长; 25℃保存时, 4天以内可以检出; 37℃保存则1~2天内可以检出。

表4 不同温度下血痕 GPT 的可测时间

基质	例数	可测时间(天)		
		4℃	25℃	37℃
纱布	7	14	4	1
白棉布	3	15	4	1
滤纸	2	15	5	
玻璃	5	19	5	2

实验中, 4℃15~21天、25℃5~7天和37℃2~3天的血痕, 1型可检出而2-1型和2型则活性消失。

#### 四、血液和血痕 GPT 盲测

将已知 GPT 型的静脉抗凝血 8 例, 由别人编号, 测定结果全部正确。

已知 GPT 型的血痕盲测结果如下:

表5 25℃保存的血痕盲测结果

基质	例数	时间(天)	正确	*不能判定	错误
	13	3	13/13	0	0
白棉布	13	4	13/13	0	0
	8	5	6/8	2/8	0

\* 不能判定, 系 GPT 活性区带消失

## 讨 论

### 一、GPT 基因频率的种族差异

GPT 基因频率存在种族差异。在所有黑人群体中, Gpt<sup>1</sup> 频率均在0.8以上。亚洲的日本和台湾 Gpt<sup>1</sup> 频率在0.5~0.6之间, 而南亚地区一般低于0.5。欧美的白人与日本和台湾群体相似。在西南太平洋群岛, 由于地域的隔离, Gpt<sup>1</sup> 频率的差异甚大。到目前为止, Gp<sup>1t</sup> 的最高频率是伊里安群岛的 Auyu 群体, 为0.9686, 最低频率为阿撒巴斯卡 Ahtna 群体的0.260。

本文测定的 Gpt<sup>1</sup> 频率为0.525, 此结果与白种人及亚洲的日本和台湾人群的差异无显著性, 而与黑人及菲律宾群体的差异有极显著意义。

产生上述差异的主要因素可能是: 不同地区的自然选择作用使某些等位基因和等位基因的某些组合优先存在, 从而影响基因频率。

### 二、GPT 的稳定性及表型与活性的关系

GPT 的稳定性较差。血清 GPT 25℃时可稳定3天, 0~4℃可稳定1周。本文血痕测定的结果也表明, 温度对 GPT 活性影响甚大。

GPT 的活性存在型别差异。本文3种 GPT 表型的活性比例为1:0.65:0.53, 1型与2-1型和2型的活性差异有显著性。这与国外同类实验结果相似。因此有理由认为, 血痕中3种表型的可测时间不同与它们自身的活性差异有关。

### 三、GPT 型判定在法医学中的应用

1. 亲权鉴定 在白人、黑人和日本人中,

从父权排除率来看, GPT 都是起主要作用的酶之一<sup>[9]</sup>。本文报告的 GPT 父权排除率为 0.187, 略高于其它酶标记。可以认为, GPT 可作为法医亲权鉴定中的重要标记系统之一。

2. 血痕测定 从理论上说, GPT 的个体识别效能较高。但由于血痕 GPT 的持续时间较短, 因而在实际工作中受到一定限制。然而若能将血痕检材冷藏和及时送检, 血痕 GPT 检测也有一定的实用价值。

### 小 结

一、广州地区中国人 GPT 表型频率为: 1 型 29.60%, 2-1 型 45.85%, 2 型 24.55%; Gpt<sup>1</sup> 频率 0.525, Gpt<sup>2</sup> 频率 0.475。被检群体处于 Hardy-Weinberg 遗传平衡状态。

二、GPT 的活性为: 1 型  $4.433 \pm 0.643$  EU/gHb, 2-1 型  $2.900 \pm 0.835$  EU/gHb, 2 型  $2.345 \pm 0.870$  EU/gHb。1 型与 2-1 型和 2 型的活性差异有显著性。

三、GPT 的父权排除率为 0.187, 可作为法医学亲权鉴定的主要标记系统之一。

四、纱布、滤纸、棉布和玻璃血痕的可测时间相似。在 4℃ 两周、25℃ 4 天和 37℃ 1 天以内, 3 种表型均能判定。25℃ 4 天的血痕盲测全部正确。

### 参 考 文 献

- [1] Chen SH. Polymorphism of soluble glutamic-pyruvic transaminase: A new genetic marker in men. *Science* 1971, 173:148.
- [2] Wijnen JMM, et al. Assignment of GPT to human chromosome 16. *Cytogenet Cell Genet* 1982, 32:327.
- [3] Blake NM. GPT and EsD types in the Asian-Pacific area. *Hum Genet* 1976, 35:91.
- [4] Akira Kido, et al. Genetic polymorphism of red cell enzymes in Yamanashi prefecture. *Jap J Legel Med* 1983, 37:362.
- [5] Kompf J, et al. Polymorphism of alanine amino transferase: common and rare alleles. *Hum Genet* 1979, 51:287.
- [6] Mclellan T. Two previously undetected variants of GPT found by acidic polyacrylamide gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1982, 34:623.
- [7] Beutler E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 2nd ed. Grune & Stratton, New York 1975, 32-34:81.
- [8] 杜传书. 红细胞磷酸果糖激酶测定法及中国人正常值. *中华血液学杂志* 1985, 6:237.
- [9] Sensabaugh GF. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, Vol 11. The utilization of polymorphic enzymes in science. New York 1983.

# Studies on the Genetic Polymorphism of the Red Cell GPT in Chinese (in Guangzhou) and Determination of the GPT Types from Blood Stains

Chen Yuelong    Guo Jingyuan

(Department of Forensic Serology)

## Abstract

Genetic polymorphism of soluble Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT) was first described by Chen et al in 1971. Three common phenotypes were found. The three phenotypes are controlled by a pair of alleles Gpt<sup>1</sup> and Gpt<sup>2</sup> at an autosomal locus. The polymorphism of GPT have been studied in different population groups and so far little information is available for China.

This paper reported the polymorphism of GPT examined in 277 normal unrelated donors living in Guangzhou. Enzyme typing was carried out for starch-gel and polyacrlamide-gel electrophoresis and the specific enzyme staining. The gene frequencies of Gpt<sup>1</sup> and Gpt<sup>2</sup> were estimated at 0.525 and 0.475. The observed numbers of the phenotypes were in good agreement with the numbers expected under the Hardy-Weinberg equilibrium ( $\chi^2 = 1.802$ ,  $0.2 > P > 0.1$ ). The paternity exclusion rate and DP (Discrimination Power) were estimated at 0.187 and 0.642. The activity of the three phenotypes were measured in the red cell lysates. The mean activity of GPT phenotypes were  $4.433 \pm 0.643$  EU/gHb for GPT<sub>1</sub>,  $2.900 \pm 0.835$  EU/gHb for GPT<sub>2-1</sub> and  $2.345 \pm 0.870$  EU/gHb for GPT<sub>2</sub>. The GPT phenotypes of blood stains adhered to gauze, filter paper, white cotton cloth and glass plate can be detected at 4℃ for two weeks, 25℃ for four days and 37℃ for one day. GPT<sub>1</sub> has longer examinable time than GPT<sub>2-1</sub> and GPT<sub>2</sub>.

It may be seen that the examination of GPT phenotypes is one of the available technique for determination of paternity and identification.