

人红细胞G6 PD缺陷症及
人红细胞G6 PD同工酶检测技术

聂崇兴 编 著

一九九〇年六月

目 录

前言	1
第一章 G6PD 的功能及一般测定方法	2
第二章 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	11
第三章 凝胶电泳的凝胶浓度和交联度的正确选择	19
第四章 等电聚焦原理及其操作技术	25
第五章 等电聚焦技术操作中的几点改进	33
第六章 薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦技术测定 人红细胞 G6PD 同工酶	35
第七章 我国 172 名正常人红细胞 G6PD 同工酶的测定	47
第八章 微量血样中人红细胞 G6PD 同工酶的薄层 等电聚焦分析	51
第九章 180 名新生儿红细胞 G6PD 同工酶的分析	57
后 记	63

前 言

人红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase, E. C. 1. 1. 1. 49; D-葡萄糖-6-磷酸; NADP^+ 氧化还原酶; G6PD)缺陷症在人类遗传性酶病中发病率最高, 该病患者在全世界估计达1亿人以上, 我国该病发生率约6%左右。全球目前至少已发现G6PD变异型达363种, 在中国人群中已报道的G6PD变异型达23种, 在中国大陆报道18种。这些变异型的研究均按照WHO颁布的标准化方案和命名法进行, 尽管这种标准化鉴定方法对G6PD总酶性质的测定相当全面, 但没有对G6PD同工酶进行检测, 仍难以反映人红细胞G6PD缺陷症的本质。因此在临床和基础医学各领域中, 对人红细胞G6PD缺陷症和变异型研究时, 应该注意对人红细胞G6PD同工酶进行检测和研究。

经编著者多年的研究, 建立了一套人红细胞G6PD同工酶检测方法, 其论文曾在国际权威杂志《生物化学与生物物理方法学杂志》上发表, 并得到国内、外同行的认可。最近又对该法作了一些改进, 使加样血量由2 ml减少至20 μ l, 并勿须对样品作任何额外的处理, 使这种检测方法在实际运用中更简单, 快速。实践证明: 该项检测技术可运用在血液病学、遗传学、围产医学、儿科学、临床检验及寄生虫学等学科中。为了使科学技术尽快的转化为生产力, 我们将大力推广这项先进的检测技术。为此, 编著者编写了这本小册子, 并希望它能成为初学此技术者一本较好的参考文章。但由于编著者水平有限, 难免有不少缺点错误, 希望读者给予批评指正。

— 编著者 —

第一章 人红细胞G6PD的功能及一般测定方法

人类对人红细胞G6PD缺陷症的认识首先来源于有些人吃蚕豆后引起急性溶血。随着对该病研究的深入，终于查明红细胞G6PD缺陷是引起多种原因造成溶血的真正内因，并且还可以通过X染色体连锁遗传给后代。目前已经确认该病在人类遗传性缺陷中发病率最高。近年来对该病的报道综述、讲座、专著越来越多，但对人红细胞的G6PD同工酶测定的报道尚属少见。本文仅就G6PD同工酶检测技术及牵涉到其他有关基础知识，内容和进展作些整理和叙述，仅供参考。

一、G6PD的理化特性及其基因基础：

G6PD的分子组成在早先的报道中，各有细微的差别，直到最近才由Takizawa等(1985)和Kanno等(1989)定下来。人红细胞G6PD是一种低聚物，按其物理性状可分为四聚体和二聚体，每个亚单位的分子量为58000，在体内G6PD多半是以二聚体的形式存在。测定人红细胞G6PD氨基酸序列，发现它由532个氨基酸组成。(图1)，每个二聚体含有大约18个SH基团，表面的SH基与G6PD活性有关，溶液中有适当量的 Mg^{++} 、 Na^{+} 、 K^{+} 均可促进G6PD活性，在低浓度的Triton X-100和β-巯基乙醇溶液中，G6PD活性也会增强，但有还原型辅酶II(NADPH)和ATP时，可抑制其活性。

1966年才将G6PD基因定位在X染色体长臂2区8带(Xq28)即在X染色体长臂末端。定位于Xq28的基因尚有肾上腺皮质激素、红绿色盲，甲型血友病，X隐性部位，Emery肌营养不良。直到最近Kanno等(1989)报道了Xq28染色体上的G6PD基因cDNA整个片段已经克隆化，其核苷酸顺序已经搞清楚，它由2153个核苷酸编码(图2)。

二、G6PD 缺陷症的遗传方式：

现在已经肯定人红细胞G6PD缺陷症的遗传方式为X连锁不完全显性遗传，通过遗传规律和对伯氨喹啉诱发溶血和蚕豆病病例家系的实际调查，可产生五种遗传方式：

图 3：

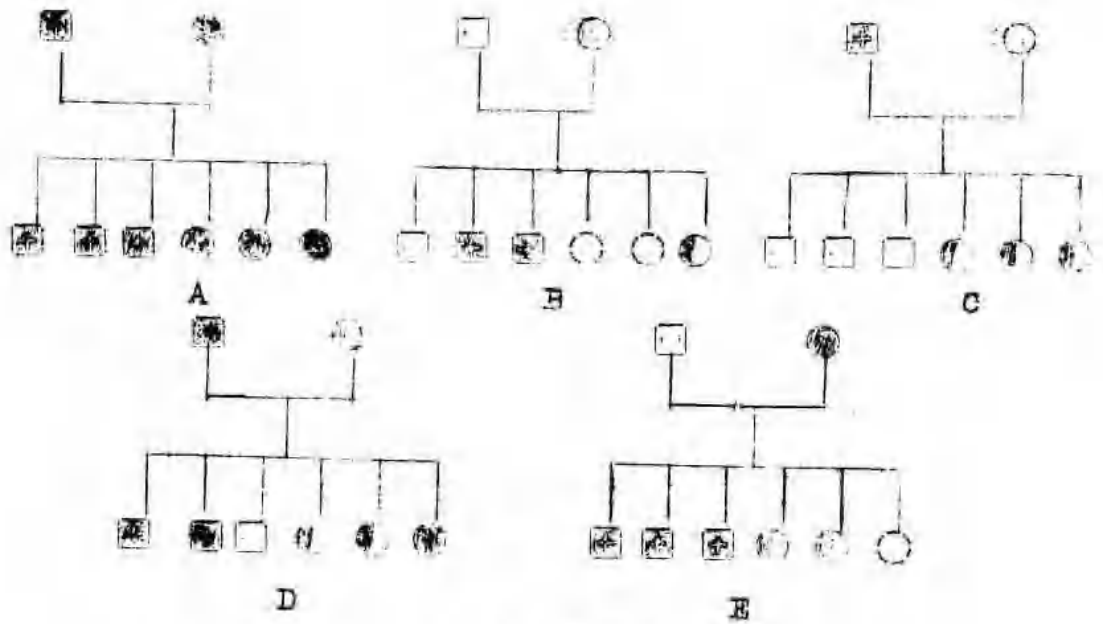


图 3：G6PD 缺陷症家系的五种遗传方式

图例：□ 男性正常；○ 女性正常；◻ 男性半合子；

◻ 女性杂合子；● 女性纯合子；

即：父亲为半合子，母亲为纯合子，子代中儿子全部为半合子，女儿全部为纯合子；（图 3 - A）

父亲为正常；母亲为杂合子，子代中儿子一半为正常，一半为半合子，女儿一半为正常，一半为杂合子（图 3 - B）；父亲为半合子，母亲为正常，子代中儿子全部正常，女儿全部为杂合子（图 3 - C）；父亲为半合子，母亲为杂合子，子代中儿子一半正常，一半为半合子，女儿中一半为杂合子，一半为纯合子（图 3 - D）；父亲为正常，母亲为纯合子，子代中儿子全部为半合子，女儿中一半为杂合子，一半为正常（图 3 - E）；

这里特别要指出的是女性杂合子和男性半合子作G6PD总酶活性测定数值波动范围很大，大多数居中间值，但少数可表现为显著缺乏或在正常范围内，具有广范围的表现度，因此光作总酶测定不能确定是否为男性半合子或女性杂合子。但作G6PD同工酶检测，他们的G6PD同工酶谱均为酶带部分缺失，可确定男性半合子和女性杂合子。

在计划生育中，由于严格贯彻独生子女政策和优生优育，如若做到普及产前G6PD同工酶检测技术。即对产前早孕胎儿绒毛，中孕胎儿脐血的G6PD同工酶测定及分析，可很好地保护后代G6PD缺陷症的发生和阻止该一遗传病继续传代。

三、G6PD缺陷症的临床类型：

1、蚕豆病：

该病系进食蚕豆后发生急性溶血性贫血，发病年龄以1~4岁最多，男性与女性之比约为7:1，母亲吃蚕豆还可以通过母乳使婴儿发病。发病高峰多在蚕豆收获季节，在南方主要在3、4月份。但进食干蚕豆、油炸蚕豆也可引起蚕豆病，尚无进食蚕豆制成粉丝引起蚕豆病的报道。

进食鲜、干蚕豆引起蚕豆病的机理是蚕豆内含有蚕豆嘧啶(DiVICINE)和异黄酮(Isouramil)等物质。它可使红细胞内的谷胱甘肽(GSH)含量降低，蛋白质在红细胞膜上聚集，使红细胞的变形性下降；还使红细胞对吞噬细胞的作用更敏感。

主要症状有精神倦怠，头晕，食欲不佳、恶心、呕吐、腹痛、腹泻或便秘，发热黄疸、烦渴、尿呈酱油色，红色或茶色，严重时可有谵妄、抽搐、昏迷、病理反射，脱水酸中毒等。检查多有肝肿大，少数伴有脾肿大，红细胞计数及血红蛋白显著下降。

2、药物性溶血：

由于服用伯氨喹啉引起溶血症在药物性溶血中占有重要地位，因此又称为伯氨喹啉性溶血。大多数药物引起溶血都与红细胞G6PD缺陷症有关，能引起红细胞G6PD缺陷症患者溶血的药物和化合物种类很多，共有几十种，见表一：

表一： 诱发G6PD缺陷症者溶血的药物和化合物

抗疟药：伯氨喹啉，扑疟嘧啶，阿的平、奎宁、五烧唑、疟疾平
解热止痛药：安替比林、非那西汀、阿斯匹林、乙酰苯胺
硝基呋喃类：呋喃西林、呋喃坦啶、呋喃唑酮
磺胺类：SMZ SMP、磺胺、磺胺吡啶、氨基磺胺、磺胺嘧啶、水杨酰磺胺、磺胺吡啶。
砷类：4, 4, 二氨基二砷, 二氨基二砷, 噻唑砷、硫福宋砷
其它：砷、氯霉素、三硝基甲苯、美蓝、异烟肼、二巯基丙醇、奎尼丁、丙磺舒 Vitk及类似物、苯胺、乙酰苯胺、对氨基水杨酸。

其症状和体征同蚕豆病：

3、新生儿黄疸：

新生儿黄疸即新生儿高胆红素血症，在新生儿中发生率为0.5~21%，由G6PD缺陷症引起的黄疸，占新生儿黄疸的25—30%，我国以广东、云南等南方各省较为多见。常见的诱因是感染和药物。往往发病的原因不明。该病在出生后24小时即可发病，但多数在48—96小时之间。主要症状为苍白，黄疸，在2~4天黄疸达高峰，约半数可有肝肿大，部分病例可有脾肿大。部分病例可发展为核黄疸，其发病率为7.7%左右。核黄疸即胆红素脑病，由于血浆中过多的胆红素能弥散入组织而损伤脑组织的豆状核。表现为全身肌肉强直，角弓反张，肌肉抽搐或全身惊厥，死亡率高，或发生痴呆，下肢强直性麻痹，手及手指震颤等后遗症。新生儿G6PD缺陷症所致核黄疸发生率比ABO溶血病高，且发生核黄疸时血清胆红素水平比较低。

实验室检查，红细胞及血红蛋白轻度至中度下降，严重降低的偶见，血清间接胆红素增加，在黄疸出现后第2—4天达到高峰，胆红素常达20—50 mg/dl或更高。涂片用甲紫染色和相差显微镜检查，可发现含有Heinz小体的红细胞。

湖南医科大学附一院儿科曾收治一例新生儿黄疸患儿，用其他

实验室检查查不出病因。我们用微量血测定人红细胞G6PD同工酶，发现酶谱为部分缺失型而得以确诊。因此在围产医学和儿科中对黄疸新生儿常规开展G6PD同工酶测定以确诊G6PD缺陷症，将是这两个领域里的新课题。

4、人红细胞G6PD缺陷症与疟疾：

两者之间似乎有着密切的关系，这表现在如下几个方面：

1、G6PD缺陷症者服用抗疟药易致溶血发生；2、G6PD缺陷症者患有疟疾时易导致黑尿病；3、恶性疟流行区往往也是G6PD缺陷症的高发区；4、G6PD缺陷症者的红细胞能抑制恶性疟原虫的生长。

1、2 两点的机理目前认为是G6PD缺陷的红细胞膜的成份较正常的不同，如前者的 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATP酶活性显著增加，一些抗疟药的代谢物能抑制这些酶的活性而导致溶血。

前者的谷胱甘肽(GSH)显著的少于后者，而谷胱甘肽又是红细胞膜避免氧化性损害的保护剂。

3、4 两点已通过大量的流行病学调查及体内、外实验得到证实。早在1961年Allison报道了在G6PD缺陷症的儿童中，疟原虫在血中繁殖率及密度均显著低于G6PD正常的对照组。在445名女孩中，G6PD缺陷体的疟原虫感染率显著低于正常女孩，因而恶性疟流行区，G6PD缺乏的个体受到“保护”(即不易因恶性疟感染而遭致死亡)。年长累月，G6PD缺陷基因在群体中将会增加，以致最后保持一个较高的G6PD缺陷率的水平。

G6PD缺陷的红细胞对疟原虫有选择性的机理目前还不十分清楚，但是G6PD缺陷红细胞的GSH含量降低，不利于疟原虫生长及在G6PD缺陷的红细胞中，恶性疟原虫孢子识别红细胞的受体血型糖蛋白A(GPA)较正常少，这两点比较得到公认。至于恶性疟原虫本身有没有G6PD酶，能否产生自己的G6PD或需不需要吞噬宿主的G6PD来加以利用一直在进行争论，七十年代许多实验证明疟原虫没有自己的G6PD，但到八十年代又有许多实验证明疟原虫有自己的G6PD。编著者最近用柏氏疟原虫(*P. berghei*)感染小

白鼠，在感染前和感染后 1、3、5、7、9……天抽取小鼠血作 G6PD 同工酶测定，发现在感染 3 天以后，有低 PH G6PD 同工酶带出现，说明疟疾疟原虫在感染宿主红细胞过程中能产生自己的 G6PD。

5、遗传性非球形细胞溶血性贫血 (HMHA)：

这种贫血主要是由于红细胞酶的缺乏所致，最常见的是 G6PD 缺乏，在 G6PD 变异型中已有 30 余种可致 HMHA。患者常于婴儿期或儿童期起即有慢性溶血性贫血，脾肿大常见。

6、G6PD 缺陷症与其它血红蛋白病：

G6PD 缺陷症往往还伴有其它血红蛋白病。我们在对黄疸新生儿 G6PD 同工酶测定时，除发现 G6PD 同工酶带异常外，还发现数例血红蛋白的异常带。

四、G6PD 的一般检查方法：

G6PD 测定的方法很多，可参考杜传书、许延波、胡修平等《临床检验》一书（人民卫生出版社 1987 年第一版）P170—193。其中仅介绍四氢唑蓝 (NBT) 定量测定法和 NBT 纸片法。

1、NBT 定量测定法：（参阅中华血液学杂志 2(3)：133—132，1981。）

(1) 试剂配制：① 0.25M Tris-HCl 缓冲液 PH7.4：Tris 7.6g 溶于蒸馏水 (H₂O) 100ml，加入 1NHCl 3 0ml，将调至 PH7.4 再加蒸馏水至 200 ml。

② 0.06% 吩嗪二甲磺硫酸盐 (PMS)：PMS 6 mg + H₂O 10ml，用 0.01NHCl 调至 PH3.8

③ 0.3% NBT：NBT 15mg + H₂O 5ml

④ 6.25mM 葡萄糖-6-磷酸钠 (G6P-Na) G6P-Na 10mg + 试剂① 4 ml。

⑤ 6.25mM 氧化型辅酶 II (NADP) NADP 10 mg + 试剂① 2 ml

⑥ 0.12M MgCl₂

⑦ 7M 尿素，尿素 210g + H₂O 500ml

⑧ Drabkin 试剂：NaHCO₃ 1g，高铁氰化钾 0.2g，氰

化并0.052g加H₂O至1000 ml。

⑨ 反应试剂0.06% PMS 0.1ml, 0.3% NBT 0.5ml, 6.25mM G6P-Na 0.4ml, 6.25mM NADP 0.1ml, 0.12M MgCl₂ 0.1ml, 混合, 当天配制。

10、对照试剂, 配法同⑨, 不加G6P-Na和NADP, 改加试剂①0.5ml, 当天配制。

(2) 操作方法: ① 取抗凝全血0.1ml, 用生理盐水洗涤红细胞3次, 除去上清液。

② 于上述红细胞悬液中加入H₂O 4ml, 使其溶血, 混匀, 放置10分钟。

③ 取0.4 ml上述溶血液加入4 ml Drabkin试剂, 放置5—15分钟, 用721或751型分光光度计以Drabkin试剂作空白对照, 于540 nm波长处测光密度(D)。

④ 取试管3支, 每支加入溶血液0.1ml。

⑤ 于第一管中加入对照试剂0.1ml, 摇匀, 第二管中加入反应试剂0.1ml, 摇匀, 放入37℃水浴中30分钟。

⑥ 30分钟时两管各加入7%冰醋酸2.5ml, 以终止反应。

⑦ 用分光光度计650 nm波长处测, 以第一管作空白对照, 测定光密度(S)。

⑧ 计算: G6PD总酶活性 = $S / D \times 20.7 U$

(3) 正常值: 正常人平均值 $13.6 \pm 1.6 U$ (5.6~26.9^U), 男性平均值 $13.4 \pm 4.3 U$ (5.6~26.9^U), 女性平均值 14.1 ± 5.2 (7.3~26.1^U)。

2、NBT纸片法: (参阅《蚕豆病》杜传书等著P 132~133)。

(1) 试剂: 同NBT定性测定法

(2) 操作方法: ① 取耳垂或指尖血一滴, 滴于定性滤纸上, 血迹直径1 cm左右, 自然晾干。

② 用小打孔机打出一小圆血迹片(直径约5 mm), 将其置于血清凝集反应板(或免疫反应板)小孔内, 加H₂O一小滴, 摇匀, 静置5分钟, 使红细胞完全溶解。

③ 加入反应试剂一小滴，摇匀，加盖，于37℃水浴箱中10~30分钟，以对照试剂取代反应试剂作对照。

结果观察：酶活性正常时滤纸片呈紫蓝色；缺陷者仍为红色；杂合体为淡紫红色。

(袁崇兴编)

A

(Met) Pro Arg Ile Asp Ala Asp Leu Lys Leu Asp
 Phe Lys Asp Val Leu (15)
 Leu Arg Pro Lys Arg Ser Ser Leu Lys Ser
 Arg Ala Glu Val Asp (30)
 Leu Glu Arg Thr Phe Thr Phe Arg Asn Ser
 Lys Glu Thr Thr Ser (45)
 GLY Ile Pro Ile Ile Val Ala Asn Met Gly
 Ala Ser Sly Asp Leu (60)
 Ala Lys Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Ile Trp
 Trp Leu Phe Arg Asp (75)
 Gly Leu Leu Pro Glu Asn Thr Phe Ile Val
 Gly Tyr Ala Arg Ser (90)
 Arg Leu Thr Val Ala Asp Ile Asp Lys Gln
 Ser Glu Pro Phe Phe (115)
 Lys Ala Thr Pro Glu Glu Lys Leu Lys Leu
 Glu Asp Phe Phe Ala (120)
 Arg Asn Ser Tyr Val Ala Gly Gln Tyr Asp
 Asp Ala Ala Ser Tyr (135)
 Gln Arg Leu Asn Ser His Met Asn Ala -
 - Leu COOH (532)

图 1: 人红细胞GGPD氨基酸顺序

B

	AGA	GGC	AGG	GGC	TGG	CCT	GGG	ATC	
CGC	GCG	CAC	CTC	CCC	TCG	CCC	CGC	CCC	GCC
CGC	ACG	AGG	GGT	GGT	GGC	CGA	GGC	CCC	GCC
CCG	CAC	GCC	TCG	CCG	AGG	CGG	GTC	CGC	TCA
GCC	CAC	GCG	CCC	GCC	CCC	GCC	CCC	GCC	GAT
TAA	ATC	GGC	CGG	CGG	GGC	TCA	GCC	CCC	GGA
AAC	GGT	CGT	ACA	CTT	GGG	GGC	TGC	GAC	CGC
GGA	GGC	CGA	CGA	CGA	CGA	AGC	GCA	GAC	AGC
GTC	ATC	GCA	GAC						
	(Met)	Ala	Glu						
CAG	GTC	GCC	CTG	AGC	CGG	ACC	CAG	GTG	TGC
Gln	Val	Ala	Leu	Ser	Arg	Thr	Gln	Val	Cys
GGG	ATC	CTC	CGG	GAA	GAG	CTT	TTC	CAG	GGC
GLY	Ile	Leu	Arg	Glu	Glu	Leu	Phe	Gln	GLY
GAT	GCC	TTC	CAT	CAG	TCG	GAT	ACA	CAC	ATA
Asp	Ala	Phe	His	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Ile
TTC	ATC	ATC	ATC	GGT	GCA	TCG	GGT	GAC	CTG
Phe	Ile	Ile	Met	GLY	Ala	Ser	GLY	Asp	Leu
GCC	AAG	AAG	AAG	ATC	TAC	CCC	ACC	ATC	TGG
Ala	Lys	Lys	Lys	Ile	Tyr	Pro	Thr	Ile	Trp
TGG	CTG	TTC	CGG	GAT	GGC	CTT	CTG	CCC	GAA
Trp	Leu	Phe	Arg	Asp	GLY	Leu	Leu	Pro	Glu
AAC	ACC	TTC	ATC	CTG	GGC	TAT	GCC
Asn	Thr	Phe	Ile	Val	GLY	Thr	Ala

图2: X染色体上人G6PD基因cDNA的核苷酸顺序及其相应的10氨基酸顺序。

第二章 聚丙烯酰胺凝胶电泳

自从1964年 Davis 利用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Disc PAGE) 成功地分离了人血清以来, 20多年来, 该项技术已得到了迅速的发展。已由单一的盘状 PAGE 发展到垂直板型 (Vertical PAGE), 平板型 PAGE, 薄膜型 PAGE, 琼脂糖—PAGE, SDS—PAGE, 等电聚焦凝胶电泳 (IEF), 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 双向凝胶电泳, PAGE 免疫电泳和酶联免疫电泳印渍技术等多项技术。它已成为人类对蛋白质、酶和核酸这些极其复杂的大分子化合物分析的一种极为有利的武器, 使它在生物学的多个学科领域内得到广泛的应用。

一、原理: 由于蛋白质分子是一种典型的两性电解质, 在一定的 pH 条件下, 就会解离而带电, 带电的性质和多少决定于蛋白质分子的性质及溶液的 pH 值和离子强度。当蛋白质分子在某种介质中, 当介质的 pH 小于蛋白质的等电点 (PI) 时, 则蛋白质分子会带正电荷, 它们在电场中就会向负极移动。反之, 当介质的 pH 大于蛋白质的 PI 时, 则蛋白质分子会带负电荷, 它们在电场中就会向正极移动。这将使各种蛋白质分子在电场中按带电荷的多少不同而区分开来。此即一般区带电泳的原理。

聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成的凝胶, 它是由丙烯酰胺单体和甲叉双丙烯酰胺交联剂在催化剂作用下聚合而成。

PAGE 技术是在区带电泳原理的基础上, 以孔径大小不同的聚丙烯酰胺凝胶作为支持物, 使蛋白质在电场中进行电泳分离。

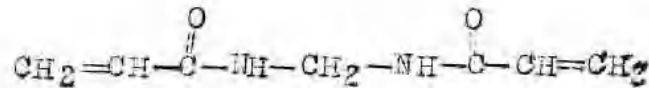
二、主要试剂:

(一) 丙烯酰胺 (Acrylamide; Acr):

分子式: $\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$, 分子量: 71.08

(二) N, N-亚甲基双丙烯酰胺 (N, N-Methylene-diacrylamide; Bis):

分子式:



分子式: 154.17

(三) 四甲基乙二胺 (TEMED)

分子式: $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

分子式: 116.21

(四) 过硫酸铵 (Ammonium persulfate; AP):

分子式: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 分子式: 228.19

(五) 核黄素 (VitB₂)

分子式: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_4$, 分子式: 376.36

三、聚丙烯酰胺的聚合及性质:

聚丙烯酰胺是用 Acr 和交联剂 Bis 在催化剂的作用下聚合而成。聚丙烯酰胺聚合的催化体系有两种:

(一) 化学聚合: 化学聚合的催化剂通常用 AP, 当 AP 溶解于水中时, 在 TEMED 作为加速剂参与下, AP 形成氧自由基。当这些自由基与 Acr 接触, 则发生反应, 是自由基保留于 Acr 分子中, 这种“活化了的”Acr 能够再以相同方式与一系列 Acr 分子起反应, 产生多聚体长链, 这种多聚体链的溶液尽管粘稠, 却不能形成凝胶。由于这些长链能够在彼此旁边滑过, 不能彼此束缚, 故不发生凝结。(图 4)

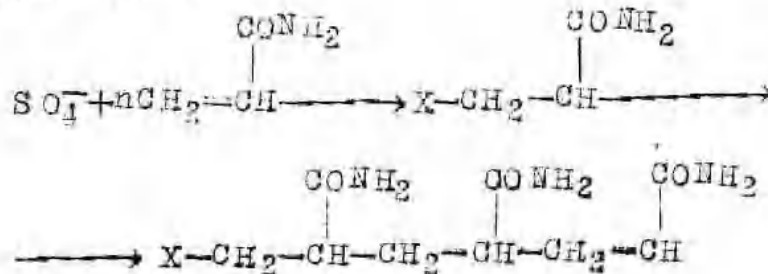


图 4: 聚丙烯酰胺长链形成的反应

凝胶的形成需要把不同的链钩连在一起或者使它们相互交联。这种交联作用是在 Bis 存在下进行聚合作用而发生的。Bis 可以

看作是二个 Acr 分子在它们的非反应末端头对头地相联的一种化合物，并以这种聚合反应的方式产生一种网孔状的丙烯酰胺链。

图 5。

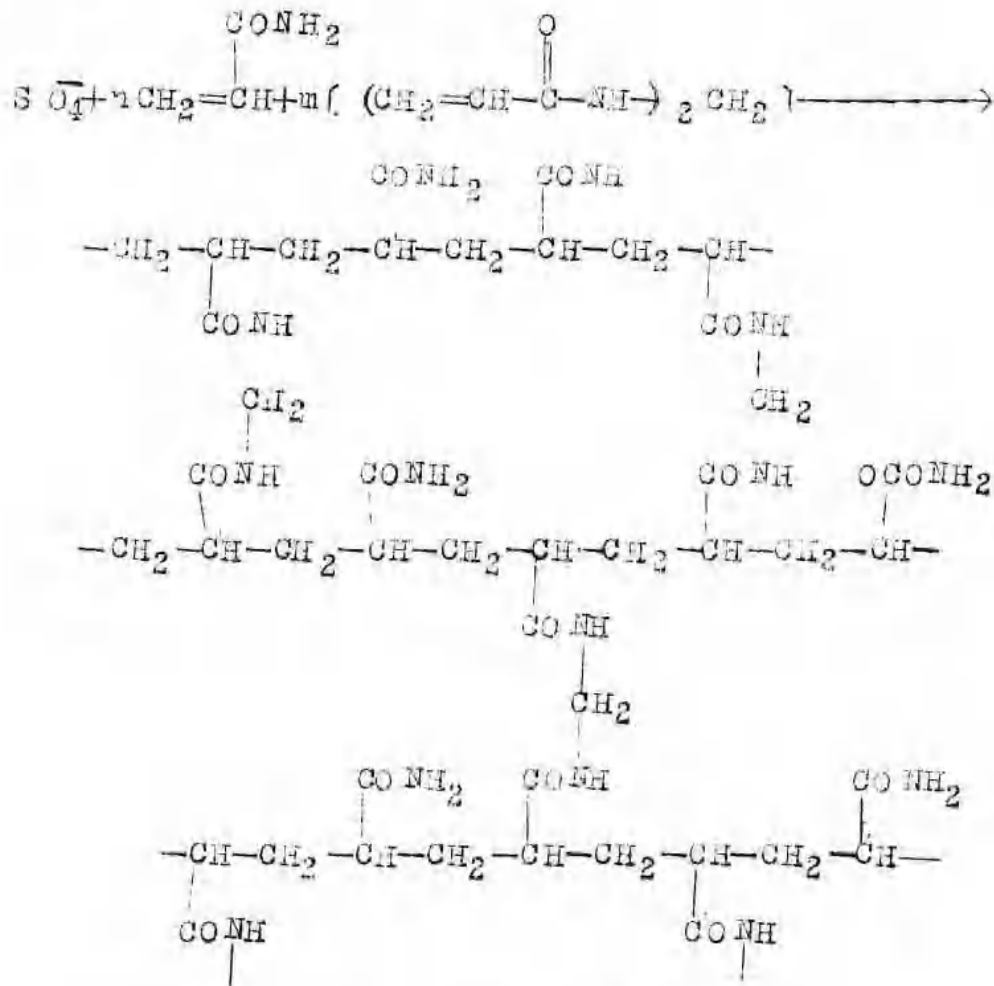


图 5： 丙烯酰胺链交联时的反应

丙烯酰胺聚合产生的网孔状丙烯酰胺链，其网孔大小由两个参数决定：(1) 每单位体积反应介质中所使用的 Acr 的数量；(2) 交联的程度。从表 1 中可以看出，不管每单位体积中 Acr 的总量有多少，当 Bis 占 Acr 总量的 5% 时，平均孔径的大小即达到最小值。因此，配制时通常多将 Bis 含量固定在 Acr 总量的 5%，而且不

加以改变，以此作为控制孔径大小的一个方法。另一方面，孔径大小则通过改变 Acr 的总量来控制。

表 2：聚丙烯酰胺凝胶浓度对平均孔径的影响

丙烯酰胺总量 %	半 径 (A°) ^a			
	1%	5%	15%	25% ^b
6.5	24	19	28	—
8.0	23	16	24	36
10.0	19	14	20	30
12.0	17	9	—	—
15.0	14	7	—	—

a 占凝胶体积 50% 的分子是有效的；

b Bis 在丙烯酰胺总量中的浓度。

(一) 光聚合：用核黄素作为催化剂。在氧及紫外线存在下，核黄素经光解作用而生成含有自由基的产物。这些自由基的功能与上述的化学聚合中过硫酸铵的一样。光源可用日光灯或普通钨丝灯泡，也可用直接日光或室内强散射光。

聚丙烯酰胺凝胶的机械强度高，有弹性，透明，相对地化学稳定，对 PH 和温度变化较稳定，在很多溶剂中不溶，没有吸附和电泳作用。

四、缓冲系统：

在配制凝胶过程中，还需要考虑加一个缓冲系统的问题。

缓冲液有两个方面的作用：

(一) 保持电泳槽和丙烯酰胺凝胶内 PH 的恒定。

(二) 作为电解质能在电场中传导电流。但所选择的缓冲液却不能与待分离的高分子起反应，以免影响到高分子在电场中泳动的速度；同时，在电泳时，电泳环境的 PH 必须使待分离的高分子化合物带电，但又不变性。

目前常用的分离胶缓冲系统有三大类：高 PH (PH) 9.0 左右)。

低PH (PH₄ 左右) 和中性。

五、凝胶浓度与高分子化合物分子大小的关系：

已于前述，丙烯酰胺聚合时产生网孔状的丙烯酰胺链，其网孔大小即是电泳时高分子化合物分子通过丙烯酰胺凝胶的孔径，即起着所谓分子筛的作用。

丙烯酰胺凝胶的孔径大小又与凝胶浓度呈一定的比例，即凝胶愈浓时，分子筛孔径愈小，所分离的物质所受的阻力愈大，反之亦然。

因此，在实际使用时，常按样品分子量的大小来选择适宜的凝胶孔径。

表3： 凝胶适宜浓度的选择

	蛋 白 质		R N A	
分子筛范围	<10 ⁴	1~4 × 10 ⁴	<10 ⁴	10 ⁴ ~ 10 ⁵
	4 × 10 ⁴	~ 1 × 10 ⁵	10 ⁵	~ 2 × 10 ⁶
	1~5 × 10 ⁵	> 5 × 10 ⁵		
适用的凝胶 浓度 %	20 ~ 30	15 ~ 20	15 ~ 20	5 ~ 10
	10 ~ 15	5 ~ 10	2 ~ 2.5	
	2 ~ 5			

同时还应考虑凝胶浓度对凝胶的机械性能的影响。如凝胶浓度小于5%以下，则凝胶太软，如液糊状，难以成形。如若大于10%，则凝胶太硬而脆，极易折断。

一般7.5%的凝胶为标准凝胶浓度，大多数生物体内蛋白质在此凝胶中电泳可得到满意的结果。其凝胶的机械性能良好，有弹性，如液状，透明无色，易于观察结果，且又易于保存。

我们一般在分析一个未知样品时，常先用7.5%的或用4~10%的凝胶浓度来试测，选出适宜的凝胶浓度。

六、凝胶浓度的测定