

(4046) 聚丙烯醯胺膠體電泳法

一、前言

本法適用於製劑內蛋白質鑑別及評估蛋白質同質性 (homogeneity) 等定性分析，評估蛋白質分子量及測定純化蛋白質之次單元 (subunit) 組成，亦可作為純度管制與定量分析。以市售之預製電泳凝膠及試劑進行試驗時應注意其適用性，且須符合試驗方法確效之要求。

二、聚丙烯醯胺膠體之特性

聚丙烯醯胺凝膠之聚合反應立體網狀結構，係由過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS) 與四甲基乙二胺 (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED) 系統所產生之自由基，催化雙丙醯胺 (bisacrylamide) 與聚丙烯醯胺鏈發生聚合反應，交錯連結所組成。如是凝膠充滿纖維及孔洞結構，具分子篩特性，其孔徑大小由丙醯胺及雙丙醯胺之濃度決定，影響蛋白質之篩選效果。

丙醯胺及雙丙醯胺之濃度愈高則凝膠有效孔徑 (effective pore size) 愈小，蛋白質的泳動速率愈慢，且凝膠易碎不易掌握，故應調整丙醯胺至適當之濃度範圍，以適用於特定蛋白質分析。此外，蛋白質的泳動能力亦取決於其帶電基團之 pK 值及分子量大小，並受緩衝液之種類、濃度及 pH 值、電泳時之溫度及電場強度、以及支撐材料之性質所影響。

(一) 變性聚丙烯醯胺膠體電泳 (denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

本法適用於分析單體分子量範圍 14,000~100,000 道爾頓 (Dalton, Da) 之多肽，亦可搭配濃度梯度凝膠或特殊緩衝液系統等其他技術，擴大適用之分子量範圍，如，三(羥甲基)甲基甘胺酸-硫酸十二酯鈉 (tricine-sodium dodecyl sulfate, SDS) 凝膠，以三(羥甲基)甲基甘胺酸替代甘胺酸，作為電泳液之尾隨離子 (trailing ion)，可分離分子量範圍 10,000 ~ 15,000 Da 之非常小的蛋白質及肽。

含有硫酸十二酯鈉之變性聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 常用於評估蛋白質藥品之品質。取蛋白質檢品預先與陰離子界面活性劑 (如：SDS) 混合，加熱處理後分離為多肽鏈單體，再加樣至凝膠進行變性聚丙烯醯胺膠體電泳。無論蛋白質形態為何，經變性後其多肽鏈與 SDS 結合，會均勻攜帶負電荷，維持固定荷質比 (charge-to-mass ratio)。多肽鏈與 SDS 之結合量與其分子量大小成正比，而與其胺基酸序列無關，因此 SDS 與多肽鏈複合物在聚丙烯醯胺凝膠中的泳動能力係取決於多肽鏈之分子量大小。

攜帶負電的 SDS- 多肽鏈複合物朝向正極泳動，且分子量小的蛋白質泳動速度較分子量大的蛋白質

快。於校正過的 SDS-PAGE 中，蛋白質檢品可依其相對泳動能力推算出分子量，由單一區帶相對於其他非預期區帶之強度表現可評估其純度。

由於 SDS 無法完全與醯類結合，此點異於其與多肽鏈結合之情形，因此，具醯化修飾 (如 *N* 鏈結或 *O* 鏈結) 之多肽鏈其荷質比無法保持一致，取決於蛋白質醯基化及其他轉譯後修飾之程度，由膠體電泳法獲得之蛋白質分子量實測值有時並無法真實反應其多肽鏈分子量理論值。

1. 還原條件 (reducing condition)

蛋白質通常以雙硫鍵 (disulfide bond) 維持其多肽鏈次單元及立體結構，於還原條件下進行 SDS-PAGE 分析之目的係利用還原雙硫鍵的方式破壞蛋白質之立體結構。以 2- 巰基乙醇 (2-mercaptoethanol, β -ME) 或二硫蘇糖醇 (dithiothreitol, DTT) 處理蛋白質檢品，使其多肽鏈骨架展開並與 SDS 結合。在還原條件下，分析人員可以適當之分子量標準品建立線性迴歸，合理地計算多肽鏈次單元之分子量 (或以更精確的非線性回歸計算之)。

2. 非還原條件 (nonreducing conditions)

進行某些分析時，應避免將蛋白質完全分離成多肽鏈次單元。在未加入 2- 巰基乙醇或二硫蘇糖醇等還原劑破壞雙硫鍵的條件下，可維持蛋白質之寡聚體結構。SDS 與寡聚體蛋白質組成之複合物 (oligomeric SDS-protein complexes)，其泳動速率較 SDS 與多肽鏈組成之複合物慢；此外，非還原態之蛋白質可能無法與 SDS 充分結合，致使無法產生固定的荷質比。而且分子形狀受鏈內 (intrachain) 雙硫鍵限制，通常會減少分子之斯托克斯半徑 (Stokes radius)，進而降低其分子量實測值。相較於分析完全變性之多肽，以此方法較無法直接判斷蛋白質分子量，須使用與蛋白質檢品立體構型相似之蛋白質標準品，才能進行有效的比對。

(二) 非連續性膠體電泳系統之特性

非連續性膠體電泳由上下二層相鄰但不相同之凝膠組成，普遍用於分析複雜之蛋白質混合物。此系統中上層膠為聚集層 (stacking gel)，下層膠為分離層 (resolving gel 或稱 separating gel)；二層凝膠具有不同的孔徑、 pH 值及離子強度，且膠體與電極緩衝液也含有不同的流動離子 (mobile ions)。藉由膠體之不連續性可將大量體積之檢品集中於聚集層內，提高電泳解析度。

電泳時，電流通過檢品溶液產生電壓差 (voltage drop)，驅使蛋白質泳動進入聚集層。電泳緩衝液中的氯離子 (chloride ion) 泳動速率較快，而甘胺酸根離子 (glycinate ion) 泳動速率較慢，二者間迅

速形成具高電壓梯度之移動區間，SDS 與蛋白質複合物即被夾在該區間中移動，漸聚集為薄層。不論加樣體積多寡均濃縮在此狹小薄層空間內，累積為高密度之蛋白質待進入分離層膠體。聚集層膠體之大孔徑特性不會阻礙大多數蛋白質的泳動，僅作為防止檢品溢散之介質。

當蛋白質於聚集層與分離層交接面上，因分離層孔徑變小及不連續之緩衝液，使泳動急遽變慢，此有助於蛋白質調焦；進入分離層後，蛋白質受介質之分子篩作用，持續緩慢的泳動。當甘胺酸根離子泳動追上蛋白質後，SDS 與蛋白質複合物即於三羥甲基胺基甲烷 (tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 及甘胺酸所形成之均勻酸鹼值環境中，依其分子量進行泳動分離。

(三) 垂直非連續性硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體製備

1. 膠體儲備溶液製備

- (1) 30% 丙烯醯胺 - 雙丙烯醯胺溶液 (Acrylamide-Bisacrylamide solution) — 製備每 L 水含有丙烯醯胺 290 g 及亞甲基雙丙烯醯胺 (methylene bisacryl-amine) 10 g，過濾得之。
- (2) 過硫酸銨 (ammonium persulfate) 溶液 — 製備過硫酸銨溶液少量，濃度為 100 g/L。過硫酸銨提供丙烯醯胺與雙丙烯醯胺發生聚合反應所需之自由基。因過硫酸銨分解快速，故應每日新鮮配製。
- (3) 四甲基乙二胺 (TEMED) — 使用電泳級 (electrophoresis-grade) 試劑。
- (4) 硫酸十二酯鈉溶液 — 製備濃度為 100 g/L 之電泳級硫酸十二酯鈉溶液。
- (5) 1.5 M 緩衝溶液 — 取 Tris 90.8 g 溶於水 400

mL，以鹽酸調整其 pH 值至 8.8，加水稀釋至 500.0 mL，混勻。

- (6) 1 M 緩衝溶液 — 取 Tris 60.6 g 溶於水 400 mL，以鹽酸調整其 pH 值至 6.8，加水稀釋至 500.0 mL，混勻。

2. 鑄膠模具組裝

- (1) 以適當清潔劑清潔玻璃板 2 片 (約長 10 cm × 寬 8 cm)、齒梳 (comb)、隔板 (spacers) 2 片及矽膠條 (直徑約 0.6 mm × 長 35 cm)，以水洗淨後再使用無水乙醇沖洗，最後置於室溫下乾燥。
- (2) 以非矽型潤滑劑 (nonsilicone grease) 塗抹隔板及矽膠條後，取 2 片隔板分別置於一玻璃板之左右二側，其與玻璃邊緣 (側緣及下緣) 皆保留 2 mm 距離。取矽膠條沿玻璃板上二側隔板外圍及一側長邊 (下緣) 擺放，呈 “U” 字型圍繞。
- (3) 取第二片玻璃板對齊蓋上，按壓固定，再以夾子固定模具之二側短邊及長邊。
- (4) 確認矽膠條穩固圍繞玻璃板邊緣且未受夾子擠壓變形或脫出，即完成鑄膠模具組裝。

3. 膠體製備

- (1) 由於上、下層膠體使用之丙烯醯胺 - 雙丙烯醯胺組成、緩衝液及 pH 值皆不同，先倒入下層膠溶液，待其凝固後再倒入上層膠溶液。
- (2) 依表一依序混合各成分，製備含適當丙烯醯胺濃度之適量下層膠溶液於錐形瓶中。可於加入過硫酸銨溶液及四甲基乙二胺前，以醋酸纖維素材質濾膜 (孔徑 0.45 μm) 真空過濾，過濾過濾溶液時，溶液應保持真空直到無氣泡產生。

表一、下層膠製備

製備1片膠體所需之各成分體積(mL)								
成分	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%丙烯醯胺								
水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M緩衝溶液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
四甲基乙二胺	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%丙烯醯胺								
水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M緩衝溶液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5

四甲基乙二胺	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%丙烯醯胺								
水	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M緩衝溶液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
四甲基乙二胺	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%丙烯醯胺								
水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M緩衝溶液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
四甲基乙二胺	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
14%丙烯醯胺								
水	1.4	2.7	3.9	5.3	6.6	8.0	10.6	13.8
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
1.5 M緩衝溶液	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
四甲基乙二胺	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%丙烯醯胺								
水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M緩衝溶液	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
硫酸十二酯鈉溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
過硫酸銨溶液	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
四甲基乙二胺	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

表二、上層膠製備

製備1片膠體所需之各成分體積(mL)								
成分	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30%丙烯醯胺-雙丙烯醯胺溶液	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0M緩衝溶液	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
硫酸十二酯鈉溶液	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
過硫酸銨溶液	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
四甲基乙二胺	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(3)依表一加入適量過硫酸銨溶液及四甲基乙二胺後，混勻，立即倒入鑄膠模具內，並預留空間

(約為齒梳下方 1 cm) 供鑄造上層膠之用。加入水飽和 (water-saturated) 之異丁醇溶液覆蓋

下層膠，將膠體垂直擺放，置室溫約 30 分鐘待其聚合完成。

(4)下層膠聚合後，倒出異丁醇溶液，以水沖洗數次以去除殘留之異丁醇及未聚合之丙烯醯胺，倒出殘留水分並以紙巾邊緣吸乾。

(5)依表二依序混合各成分，製備含適當丙烯醯胺濃度之適量上層膠溶液於錐形瓶中。可於加入過硫酸銨溶液及四甲基乙二胺前，以醋酸纖維素材質濾膜（孔徑 0.45 μm ）真空過濾，並移除溶液中氣泡。

(6)依表二加入適量過硫酸銨溶液及四甲基乙二胺後，混勻，立即倒入鑄膠模具內並插入齒梳，過程中應避免氣泡產生。取上層膠溶液填滿齒梳間空隙，將膠體垂直擺放，置室溫約 30 分鐘待其聚合完成。

4. 檢品製備

除非產品正文另有規定，一般檢品製備如下：

(1)濃縮檢品緩衝液—取 Tris 1.89 g、SDS 5.0 g、溴酚藍 (bromophenol blue) 50 mg 溶於水，並加入甘油 25.0 mL 後，加水稀釋至 100 mL。以鹽酸調整其 pH 值為 6.8，再加水至 125 mL。

(2)濃縮檢品緩衝液（還原條件）—取 Tris 3.78 g、SDS 10.0 g、溴酚藍 (bromophenol blue) 100 mg 溶於水，並加入甘油 50.0 mL 後，加水稀釋至 200 mL。加入 2-巰基乙醇 25.0 mL 後，以鹽酸調整 pH 值至 6.8，再加水至 250.0 mL。此外，可以 DTT 取代 2-巰基乙醇作為還原劑，在此情形下，取 Tris 3.78 g、SDS 10.0 g、溴酚藍 100 mg 及甘油 50.0 mL 溶於水 200 mL。以鹽酸調整其 pH 值至 6.8，再加水至 250.0 mL，於使用前新鮮添加 DTT 至最終濃度 100 mM。

(3)電泳緩衝液—取 Tris 151.4 g、甘氨酸 721.0 g 及 SDS 50.0 g 溶於水中再稀釋至 5000 mL，作為儲備溶液。使用前取適量儲備溶液加水做 10 倍稀釋，混勻，並調整其 pH 值為 8.1~8.8。

(4)檢品溶液（非還原條件）—取水及製備溶液或對照溶液之混液，與濃縮檢品緩衝液等量混和。

(5)檢品溶液（還原條件）—取水及製備溶液或對照溶液之混液，與含還原劑 2-巰基乙醇或 DTT 之濃縮檢品緩衝液等量混和。產品正文中所述之濃度可依蛋白質及染色方法而有所不同。將所得之檢品置於沸水浴中或設定為 100° 之乾浴槽中 5 分鐘後冷卻。（注意，因為在熱處理過程中，可能會發生蛋白裂解，故可調整加熱之溫度與時間。）

5. 於電泳裝置上安裝凝膠與電泳分離

(1)上層膠體聚合後，小心移除齒梳。以水或電泳緩衝液沖洗凝膠孔槽內未聚合之聚丙烯醯胺。若孔槽間隔之膠體歪曲，可用針頭調整之。暫時移開短邊上的夾子，移除圍繞於周邊之矽膠條並清除四周殘膠後再夾回位。以相同步驟處理另一短邊及長邊。

(2)將膠體安裝至電泳槽內，倒入電泳緩衝液，以針頭移除膠體底部玻璃板間之氣泡。載入檢品（加樣）前不可通電，以免破壞非連續性膠體系統，並以電泳緩衝液小心沖洗凝膠孔槽。

(3)依產品正文規定，取檢品及標準品分別加入適量之檢品緩衝液，混勻，依序加樣至上層膠之各孔槽內。

(4)開始電泳。市售膠體之表面積及厚度可能不同，應依使用說明設定適當之電泳時間及電流 / 電壓，以取得最佳分離效果。

(5)觀察前驅染劑 (dye front) 之泳動，當其泳動至下層膠底部即停止電泳。將膠體組件自電泳槽內取出，拆解玻璃板及隔板後取出膠體，切除上層膠，立即染色。

(四)硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠體電泳 - 濃度梯度膠體
梯度膠體（分離膠體）的聚丙烯醯胺濃度從膠體頂部至底部逐步提高。製備時需要梯度形成裝置。現市面上已有製備好可隨取隨用之梯度膠體。

相較固定濃度膠體，梯度膠體具特定優勢，如某些蛋白質在固定濃度膠體內會共同泳動，但可在梯度膠體內分離。又在蛋白質泳動時，會因孔徑過小而阻礙前進，產生堆垛效應 (stacking effect) 形成更清晰的區帶。根據表三，相較固定濃度膠體，梯度膠體可一次分離更大分子量範圍之蛋白質。

表三列出與適當的蛋白質分子量範圍相對應之聚丙烯醯胺濃度線性梯度建議範圍，如為特定應用之目的，亦可以其他梯度型態（如凹型梯度）製備。梯度膠體也可用於分子量及蛋白質純度之測定。

(五)膠體內蛋白質檢測

考馬氏染色法 (Coomassie staining) 及銀染色法 (silver staining) 是最常見的蛋白質染色法，將在下面做更詳細的討論。此外另有其他數種市售染色劑、檢測方法及染色套組，例如可使用螢光影像系統觀測螢光染色結果，此法在涵蓋數個量級（視不同蛋白質而可能有所差異）的蛋白質濃度範圍內，通常仍能提供一線性反應關係。

考馬氏染色法個別蛋白質區帶之偵測極限約為 1~10 μg ；銀染色法則為最靈敏之膠體內蛋白質染色法，個別蛋白質區帶之偵測極限約為 10~100 ng，在正常操作下，要達到前述的靈敏度多半不會有太大問題，甚至已有文獻報告指出其靈敏度可再增加

一或二個量級。考馬氏染色法濃度與反應間之線性關係較銀染法為佳，但其反應及範圍取決於蛋白質及染色時間。若染色時間依主觀方式決定，亦即由分析者來認定是否已得到滿意的染色結果而終止染色時，無論是考馬氏染色法或是銀染法的再現性都會較低。另需注意對照蛋白質應具較大線性偵測範圍，如此將有助於評估同次實驗內的靈敏度及線性關係。所有染色步驟皆於室溫下溫和搖晃進行，操作時應穿戴手套避免染劑沾染皮膚。

1. 試液製備

- (1)退染液—配製水、甲醇、冰醋酸(5:4:1)之混液。
- (2)考馬氏染液—取酸性藍 83 (acid blue 83) 1.25 g 溶於 1 L 之退染液中，混勻並過濾之。
- (3)固定液—取甲醇 250 mL 加入甲醛 0.27 mL，再加水稀釋至 500.0 mL，混勻。
- (4)硝酸銀 (silver nitrate) 染液—取濃度 200 g/L 之硝酸銀溶液 8 mL，逐滴加入含 1 M 氫氧化鈉溶液 40 mL 及氨水 (ammonium hydroxide) 3 mL 之混合溶液並持續攪拌，再加水至 200 mL，混勻。
- (5)呈色液 (developing solution)—取濃度 20 g/L 檸檬酸 (citric acid) 溶液 2.5 mL 及甲醛 0.27 mL，加水稀釋至 500.0 mL，混勻。
- (6)阻隔液 (blocking solution)—10% v/v 醋酸溶液。

2. 考馬氏染色步驟

- (1)將膠體浸於考馬氏染液，置室溫至少 1 小時。
- (2)倒掉染液，加入退染液置室溫，更換退染液數次直到膠體背景透明，可清楚分辨蛋白質區帶為止。
- (3)膠體退染愈徹底，愈能檢出微量蛋白質。退染時可放入陰離子交換樹脂或海綿加速退染。
- (4)含酸醇之考馬氏染液無法完全將蛋白質固定於膠體上，染色及退染過程中將喪失部分小分子蛋白質。染色前可將膠體浸於水、甲醇、三氯乙酸 (trichloro-acetic acid) (5:4:1) 之混液中 1 小時，以固定蛋白質。

3. 銀染步驟

- (1)將膠體浸於固定液中 1 小時，更換固定液，再浸置至少 1 小時或隔夜。
- (2)倒掉固定液，將膠體浸於大量水 1 小時，再浸於 1%v/v 戊二醛 (glutaraldehyde) 15 分鐘。以水清洗膠體 2 次，每次 15 分鐘。
- (3)將膠體浸於新鮮配製之硝酸銀染液，避光反應 15 分鐘。
- (4)以水清洗膠體 3 次，每次 5 分鐘，再將膠體浸於呈色液約 1 分鐘，直到蛋白質區帶呈現。

(5)將膠體浸於阻隔液 15 分鐘，以水洗淨。

4. 結果紀錄

可於膠體仍為潮濕狀態或經適當的乾燥程序處理過後，以拍照或掃描的方式記錄結果，目前已有市售的膠體掃描系統，可對潮濕膠體加以照相記錄並立即進行分析。

膠體乾燥：

- (1)乾燥前膠體處理方式依染色方法而異，考馬氏染色膠體於退染後，浸於 100 g/L 甘油溶液至少 2 小時或隔夜；銀染膠體以水洗淨後，浸於 20 g/L 甘油溶液 5 分鐘。
- (2)取多孔纖維膜 (porous cellulose film) 2 張浸於水 5~10 分鐘，取 1 張固定於膠體乾燥框架上，將膠體平鋪其上，小心移除氣泡。
- (3)以水適量加至膠體周圍，取另 1 張纖維膜平鋪其上，小心移除氣泡。
- (4)固定膠體乾燥框架，置烘箱內或放置室溫以乾燥之。

(六)分子量測定

取已知分子量之適當標記蛋白質 (protein markers)，以前述之濃縮檢品緩衝液作適當稀釋後，連同蛋白質檢品分別加樣至同一片膠體之不同孔槽內，經相同電泳分離及染色後，作為蛋白質檢品分子量之判定標準。

電泳開始後，觀察溴酚藍追蹤染料之移動情形，判斷電泳離子前緣已泳動之距離。染色後，觀察各標記蛋白質及檢品蛋白質之區帶位置，測定其與分離層膠體頂端之距離。

將蛋白質之泳動距離除以追蹤染料之泳動距離進行校正 (normalization)，該比值即為蛋白質之相對移動率 (R_f)。以標記蛋白質分子量 (M_R) 之對數值與其對應區帶之 R_f 作圖，進行線性迴歸分析。前述作圖所得之曲線會略呈 S 形，若檢品蛋白質區帶之相對移動率落於曲線圖之線性部份，即可由內插法求得檢品蛋白之分子量。

三、試驗確效

除非已經由適當分子量標記之分佈情形來證明已達膠體的目標解析度範圍，如分佈橫跨 80% 之膠體長度，否則該試驗無效。檢品蛋白質區帶之分離結果，其 M_R 對數值與 R_f 間應呈線性關係。如曲線圖出現 S 型，則只有落於曲線圖線性部份之數據可計算使用。其它確效條件依產品正文規定。靈敏度也需被確效，取預期偵測極限濃度之對照蛋白質對照組與檢品同時進行電泳試驗，可用於確認試驗之系統適用性。

四、不純物定量

SDS-PAGE 常用來檢驗不純物之限量。不純物之含量可由與主要區帶 (使用積分密度計 (integrating densitometer) 或圖像分析 (image analysis)) 比對而

得，惟須確認反應（區帶強度）與含量間呈線性關係。根據前述(四)膠體內蛋白質檢測一節所述，依檢測方式與蛋白質之不同，線性範圍也會有變化，但可經由每次試驗時使用一或多種含適當濃度之對照標準品進行評估克服此問題。

不純物限量依產品正文規定。將檢品溶液稀釋至不純物限量之濃度作為對照溶液，如：若不純物限量為5%，則將檢品溶液 20 倍稀釋作為對照溶液。經膠體電泳分離及染色後，檢品溶液之主要區帶以外，不得有任一區帶之強度較對照溶液之主要區帶強。於經確效之有效試驗中，不純物之含量可由與主要區帶（使用積分密度計或圖像分析）比對而得。

表三、與預期的蛋白質分子量範圍相對應之丙烯醯胺濃度梯度建議範圍

丙烯醯胺（%）	蛋白質分子量範圍（kDa）
5～15	20～250
5～20	10～200
10～20	10～150
8～20	8～150