免疫印迹（immunoblotting）又称蛋白质印迹（Western blotting），是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法。该法是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种新的免疫生化技术。由于免疫印迹具有 SDS-PAGE 的高分辨力和固相免疫测定的高特异性和敏感性，现已成为蛋白分析的一种常规技术。免疫印迹常用于鉴定某种蛋白，并能对蛋白进行定性和半定量分析。

**主要实验步骤**如下：  
1.蛋白质抽提  
a．实验对象为组织样品，取适量（250～500mg）新鲜组织样品或正确保存的组织样品，加1ml含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂（或核蛋白抽提试剂），匀浆后抽提总蛋白（或核蛋白）。  
b.实验对象为细胞样品，每份样品取1×106～1×107细胞，PBS清洗细胞，去PBS加0.1ml～1ml含蛋白酶抑制剂的总蛋白抽提试剂（或核蛋白抽提试剂）抽提总蛋白（或核蛋白）。

2.蛋白质定量：  
按KCTMBCA蛋白质定量试剂盒操作说明操作，测定样品浓度。

3.变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳(SDS-PAGE)  
将准备好的样品液和生物素标记的蛋白质分子量标准分别上样，标准加进第一个孔中，电泳分离蛋白。

4.蛋白质转移到硝酸纤维膜或PVDF膜按Bio-Rad蛋白转移装置说明组装滤纸凝胶纤维素夹层，30mA恒流条件下，4°C转移过夜。

5.膜的封闭和抗体孵育  
a．膜在5％BSA溶液中室温孵育1小时以封闭膜上的非特异结合。  
b.封闭过的膜加入一级抗体室温孵育1.5小时，抗原抗体结合。  
c.加入HRP标记的二级抗体以结合一级抗体及HRP标记的抗生物素抗体以结合分子量标准，室温孵育膜1小时。加入HRP标记的GAPDH抗体可同时检测GAPDH含量。

6.结果检测：  
化学发光法检测，膜与化学发光底物孵育，经X胶片曝光显影。图片扫描保存为电脑文件，并用ImageJ分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。

7.数据分析：  
目的蛋白的灰度值除以内参GAPDF的灰度值以校正误差，所得结果代表某样品的目的蛋白相对含量。

8.实验报告，包括详细的实验方法及免疫印迹实验结果的相关图表。