**三、蛋白的Western blot免疫印迹分析**

1. 配胶：聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE胶）的配制。

1. 将玻璃板洗净，用ddH2O冲洗，烘干备用。
2. 按照试剂配方配制10%的分离胶(tris-HCl ,8.8，两块10ml)，先灌注分离胶，注入后加无水乙醇至满→压线，待分离胶聚合后，弃去无水乙醇，dd水洗，用纸吸干。
3. 待分离胶凝固后，配制并灌注浓缩胶(tris-HCl6.8，两块6ml)，插入加样梳。密封放置4℃过夜确保凝胶充分聚合。使用前拔除加样梳，用枪取ddH2O冲洗加样孔后加样。

(根据目的蛋白的大小选取分离胶的浓度，蛋白分子量越大，选择分离胶浓度越低)

2. 加样：每孔加样体积20μl。同时取3μl和1μl蛋白预染Marker加入样品前后两端的上样孔，以明确蛋白位置及上样顺序。

3. 电泳：10\*电泳液配1\*电泳液：100ml 10\*电泳+900ml ddH2O。

浓缩胶电压为80V、约20min电泳，（蛋白进入分离胶后：maker跑开）换120V,待目的蛋白被分离开（溴酚蓝指示剂到达分离胶底部）后停止电泳。

4. 转膜（放冰盒里）：10\*电转液配1\*电转液：100ml 10\*电泳+200ml无水乙醇/甲醇+700ml ddH2O。或使用快速转膜液转膜。

电泳结束后取下凝胶，切除浓缩胶部分，将分离胶置于电转缓冲液浸泡。选择2张与凝胶大小一样的滤纸和一张PVDF膜，（PVDF膜剪去一小角作方位标记）。

其中PVDF膜在甲醇中浸泡20s(激活)后，和滤纸一起转移至转膜缓冲液中。从黑色面到白色面按 海绵-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-海绵 的顺序叠放整齐，置于湿转夹板上，冰上（加水）220mA恒流转膜90min（分子量小时可适当减小电流及转膜时间），转膜完成后，取出PVDF膜。

注意转膜时胶与膜的放置，使转膜后，膜的蛋白面朝上时，对应蛋白顺序为加样顺序

5. 封闭：将转膜成功的PVDF膜先置于1\*TBS-T液中漂洗5-10min。后转至含5%的脱脂奶粉的1\*TBST溶液中室温封闭1h；或使用快速封闭液封闭。

1. 一抗孵育：再依据目的蛋白的kd,在marker的对应kd左右将膜剪断成小片段，分别放入1\*TBS-T稀释的一抗中4℃、过夜（12-16h，或常温3个小时）。（一抗稀释比例需参照说明书。）
2. 二抗孵育：次日将膜取出，回收一抗。用1\*TBS-T洗涤3次，每次10min（若曝光的背景模糊，可增加洗膜次数及时间）。然后加入用5%的脱脂奶粉以一定比例稀释的辣根过氧化物酶（HRP）偶联的二抗，室温孵育1h，1\*TBS-T洗涤3次，每次10min。（回收二抗体。）

8. 化学发光法检测目的蛋白：化学发光液A和B等体积（1:1）混合（如A,B液各500ul混匀后避光加200ul混合液均匀加入），滴在目的蛋白片段上，置于曝光仪曝光。

注：电泳时间、电压以及转膜电流、时间并不是固定的，需要根据具体目的蛋白进行调整。一抗的稀释浓度也需要参考说明书。是用BSA还是1\*TBS-T稀释抗体也需要看实际情况以及说明书的要求，一般来说磷酸化的抗体需要用BSA来配。