مروری بر روش های بلاتینگ

حسن زحمتکش[۱]*

zahmatkehhassan@uoz.ac.ir
zahmatkehhassan68@gmail.com

صالحه گنجعلی [۲]

saleheganjali@uoz.ac.ir

محمود سلوکی[۳]

Mahmood.Solouki@gmail.com

دانشجوی دکترای، گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل[۱]
استادیار، گروه بیوتکنولوژی ،دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل[۲]
استاد، گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل[۳]

چکیده :

استفاده از فناوری بلات برای روشن شدن بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مفید ، و پایه و اساس درک ما در آزمایشگاههای مهندسی ژنتیک و مولکولی می باشد و به محقق اجازه می دهد تا مولکول های مورد نظر از جملهDNA ، RNA و پروتئین را در مخلوط پیچیده ای از مولکول های مرتبط شناسایی و مشخص نماید. هر یک از روش های بلاتینگ وابسته به اندازه مولکول‌ها ، انتقال به یک تکیه‌گاه جامد، و در نهایت استفاده از یک کاوشگر تعریف‌شده برای تشخیص مولکول خاص مورد نظر بستگی دارند. بسیاری از این روش ها با سرعت و ارزان هستند ، همچنین می توانند به صورت مکملی همراه با سنجش های دیگر مورد استفاده قرار گیرند. روش های بلاتینگ نویدبخش اکتشافات بزرگتر در آینده می باشند .

کلمات کلیدی : بلاتینگ ، پروتئین ، روش، DNA، RNA

مقدمه :

واژه بلاتینگ به انتقال نمونه های بیولوژیک از ژل به غشا وسپس ارزیابی آنها در سطح اشاره دارد[۱]. لکه گیری یا بلاتینگ تکنیکی می باشد که در آن یک مولکول بزرگ مانند DNA، RNA یا پروتئین در یک ماتریس ژلی حل شده ، به یک تکیه گاه جامد منتقل می شود و با یک کاوشگر خاص تشخیص داده می شود[۷۰]. یکی از سنگ بناهای زیست شناسی مولکولی مدرن ، استفاده از یک تکنیک قوی و حساس به نام لکه گیری یا بلاتینگ برای شناسایی وجود مولکول های زیستی خاص در یک نمونه می باشد[۷۲]. اصل بلات استفاده از کاوشگر دارای برچسب رادیویی یا غیر تابشی یا فلورسانس است[۲۳]. تکنیکی می باشد که در آن مولکول ها در الکتروفورز ژل جدا شده و به غشای نیتروسلولزی منتقل می شوند روش لکه گیری را می توان با توجه به انواع مولکول ها مانند سادرن بلات برای مولکول DNA ، نوردن بلات برای MRNA وRNA وسترن بلات برای تشخیص پروتئین[۶]. و ایسترن بلات برای تشخیص گلیکوزیلاسیون پروتئین تقسیم بندی نمود[۳۱].

روش‌های بلاتینگ یک روش کمکی برای الکتروفورز ژل، روشی برای جداسازیDNA ، RNA و پروتئین‌ها با قدرت تفکیک استثنایی است. آنها امکان تشخیص مولکول های خاص را در میان مخلوط جدا شده در ژل می دهند. همه روش‌ها مرحله‌ای

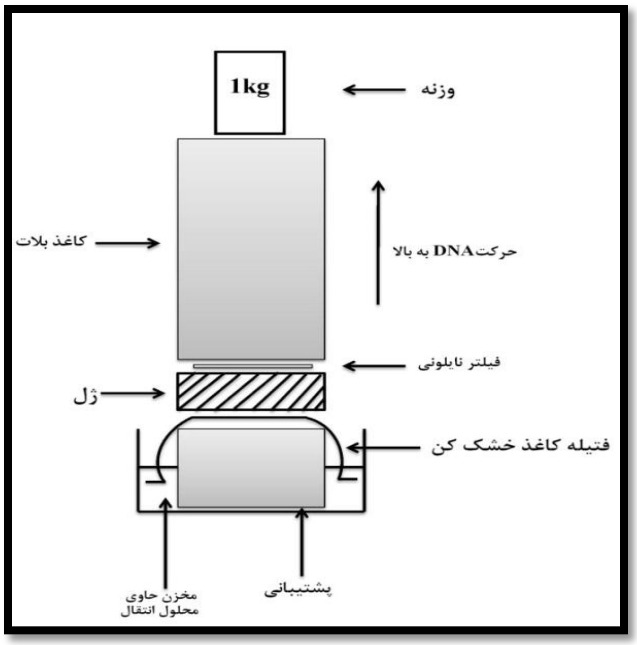
مشترک دارند که در آن مولکول‌ها از ژل به یک غشای متخلخل منتقل می‌شوند که اغلب با خیساندن محلول از طریق ژل و غشاء با استفاده از کاغذ جاذب حاصل می‌شود[۸۴]. روش های بلاتینگ نسبتاً ساده و معمول هستند و شامل چهار مرحله جداگانه می باشند: جداسازی الکتروفورتیک پروتئین یا قطعات اسید نوکلئیک ، حمایت کردن ، اتصال کاوشگر تحلیلی به هدف مولکول روی کاغذ؛ و تجسم پروب محدود شده [۳۰] .در اینجا به انواع روش های بلاتینگ می پردازیم :

روش سادرن بلاتینگ(Southern blotting)

سادرن نام دانشمندی بود که نخستین بار در سال ۱۹۷۵ روش مزبور ساترن بلاتینگ از آن برگرفته شده است و نام گرفته است [۵]. روش سادرن بلات ، که در دهه ۱۹۷۰ توسعه یافت ، روشی ارزان و سریع برای تعیین وجود یا عدم وجود یک توالی DNA خاص در یک حوضه بزرگ قطعات ناشناخته است [۱۳]. در این روش قطعات DNA از یک ژل الکتروفورز به غشای نایلون یا نیتروسلولزی منتقل می شود. سپس ، آنها روی غشا ثابت شده و بی حرکت می شوند. در فرآیند بی حرکتی قطعات DNA اختصاصی به صورت انتخابی به آغازگرهای دارای برچسب شناخته شده هیبرید می شوند و با اتورادیوگرافی تجسم می شوند[۹]. بنابراین غشا یک بازتولید نیمه دائمی از الگوی نوار ژل را انجام می دهد[۱۵] .

مراحل انجام روش سادرن بلاتینگ :

۱ – جداسازی DNA ۲– هضم با آنزیم محدود کننده (DNA را در توالی های خاص قطع می کند) ۳– الکتروفورز ژل (قطعات DNA را بر اساس اندازه جدا می کند) ۴ – رنگ آمیزی و ژل عکاسی ۵ – ژن را خنثی کنید ، DNA را به کاغذ فیلتر نیتروسلولز منتقل کنید (BLOT) ۶ – هیبرید با DNA خاص (PROBE) ۷ – تشخیص توالی DNA خاص [۴۴] .دستاورد بزرگ ساترن ابداع روشی ساده و قابل اعتماد برای استخراج قطعات DNA از ژل به روشی می باشدکه امکان تجزیه و تحلیل ساده را فراهم می کند (شکل ۱) [۴۶] .

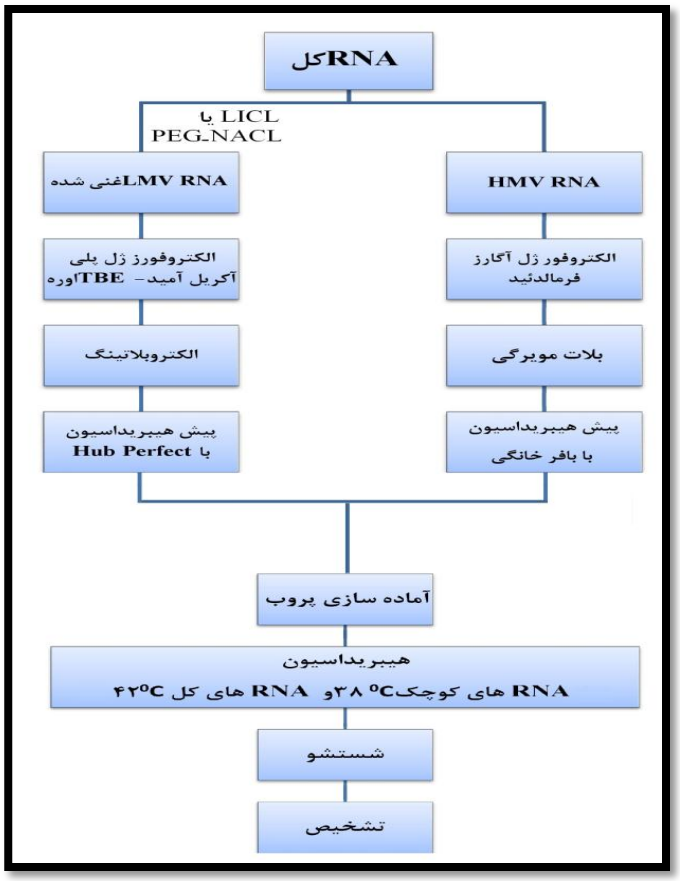


شکل ۱ : برگرفته ازKelly (۱۹۹٦)،روش سادرن بلات به تجهیزات خاصی برای انجام انتقال DNA نیاز ندارد. با ادامه فرآیند، کاغذ لکه به صورت انباشته خیس می شود و می توان آن را جایگزین کرد تا از انتقال کامل DNA به فیلتر نایلونی اطمینان حاصل شود [٤٦] .

مزایا سادرن بلات: نسبت به آنالیزهای مبتنی بر PCR سطوح نسبتاً پایین مثبت کاذب و عدم برآورد بیش از حد حذفیات اصلی است[۱۰۰]. می تواند الگوهای متیلاسیون دوربرد را نشان دهد که با توالی ژنومی قابل شناسایی نیستند، به خصوص در تکرارهای پشت سر هم، و نتایجی را از میانگین جمعیت تمام نسخه های توالی مورد بررسی ارائه می دهد[۷۳]. **معایب:** یک روش کند می باشد(۷-۱۴ روز) که اغلب در شرایط تشخیص غیرقابل قبول است و بهترین نتایج با کاوشگرهای دارای برچسب رادیویی که مشکلات ایمنی و دفع را به همراه دارند به دست می آید. علاوه بر این ، تجزیه و تحلیل ساترن بلات به مقادیر زیادی DNA دست نخورده با وزن مولکولی بالا نیاز دارد و بنابراین به تعداد زیادی سلول بدخیم زنده نیاز دارد و همچنین یک روش بسیار گران در محیط آزمایشی می باشد[۸]. روش ساترن بلات روش، فنی و بسیار پرهزینه در محیط تشخیصی است[۴۷].

روش نوردن بلات (Northern blot): به روش انتقال مولکول RNA از یک ژل به غشا را که در سال ۱۹۷۷ توسط ALwine و Kemp ایداع شده است نوردن بلاتینگ گفته می شود[۵]. نوردن بلات می تواند همچنین مکمل مفیدی برای کشف ، تشخیص و شناسایی mRNA باشد[۲۲]. تجزیه و تحلیل Northern blot از گونه های RNA کوچک مانند miRNA ها ، یک تکنیک گسترده برای ارزیابی سطح تجمع miRNA های مورد نظر است. این تکنیک ، همراه با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ، امکان بررسی ویژگی های بیان miRNA های هدف ، تعیین اندازه آنها و اعتبار سنجی miRNA های پیش بینی شده را فراهم می کند [۱۰۱].

مزایا : مزیت اصلی تجزیه و تحلیل نوردن بلات در سهولت آن نهفته است[۷۷].نقطه قوت این روش سادگی آن می باشد. توالی هایی با همولوژی حتی جزئی می توانند به عنوان پروب های هیبریداسیون استفاده شوند. اندازه رونویسی mRNA را می توان تشخیص داد. اتصال RNA قابل مشاهده است زیرا متن های جایگزین را می توان تشخیص داد. هزینه راه اندازی بسیاری از ژل ها پس از راه اندازی تجهیزات کم است. لکه ها را می توان برای چندین سال ذخیره کرد و در صورت لزوم دوباره عیب یابی شد. کمیت و کیفیت RNA را می توان به راحتی پس از الکتروفورز و قبل از انجام پردازش بیشتر تأیید کرد[۸۵].**معایب:** اصلی نوردن بلات در عدم حساسیت و عدم اختصاصیت آناتومیک آن نهفته است[۷۷].خطر تخریب mRNA در طول الکتروفورز: کیفیت و کمی بیان به طور منفی تحت تأثیر قرار می گیرد. دوزهای زیاد رادیواکتیویته و فرمالدئید برای کاربران و محیط زیست خطرناک است. حساسیت نوردن بلات در مقایسه با RT-PCR نسبتاً پایین است. تشخیص با چندین کاوشگر دشوار می باشد[۸۵]. معایب نوردن بلات، روشی زمان‌بر، محدوده تشخیص دینامیکی نسبتاً کوچک و همچنین مشکلات در تعیین کمیت سیگنال است [۳۶].روش مرسوم برچسب‌گذاری پروب مبتنی بر ترکیب رادیو ایزوتوپ‌ها با پرایمینگ تصادفی برای تشخیص رونوشت‌های خاص بر روی یک بلات کل RNA/mRNA و برچسب‌گذاری ۵۰ انتهایی الیگونوکلئوتیدهای DNA با (واکنش کیناز وγATP) برای تشخیص موارد کوچک است[۴۲]. بیشتر تشخیص‌های نوردنRNA کوچک عمدتاً با استفاده از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی نشاندار شده رادیویی انجام می‌شوند (شکل۲). [۱۰۸, ۱۰۶,۸۶, ۵۷, ۱۷,۴۵].



شکل ۲ : برگرفته از JinوGassmann (۲۰۱۲)، **تجزیه و تحلیل نوردن بلات RNA کل و همچنین RNA های کوچک** [۴۲].

روش نوردن معکوس (Reverse Northern): متداول‌ترین رویکرد با توان متوسط برای مطالعه بیان رونوشت‌های ژن، miRNAهای شناخته شده، miRNAهای جدید و siRNAها، «بلات معکوس» است. یک روش مقرون به صرفه و کاربر پسند برای تجزیه و تحلیل سطوح بیان چندین RNA به طور همزمان می باشد. در این روش، قطعات EST یا cDNA (در صورت رونوشت‌ها) یا الیگونوکلئوتیدها (در صورت وجود RNAهای کوچک) توسط یک نقطه‌بلاتر یا نقطه‌بین روباتیک روی یک غشاء لکه می‌شوند، که سپس با RNA تام نشاندار شده یا RNAهای کوچک به عنوان پروب هیبرید می‌شوند [۹۹,۱۱۰ , ۴۲,۹۳].

روش وسترن بلاتینگ (Western blotting): وسترن بلاتینگ یا ایمونو بلاتینگ (Immunoblotting) [۸۹,۷۱,۵].که در واقع به عنوان بلات ایمنی شناخته می شود[۳۳,۱۰۳] ، وسترن بلات، روشی حساس می باشد که بیشتر برای بررسی بیان و تشخیص ایمنی پروتئین ها استفاده می شود[۵۵,۵۲]. و همچنین تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین ها استفاده می شود[۶۹]. نسخه توسعه یافته تر این روش در سال ۱۹۸۱ به وسیلهW. Meat Burnette در مرکز تحقیقات فرد هاجینسون در واشنگتن آمریکا ابداع گردید و آن را وسترن بلاتینگ نامیدند. نامگذاری این روش به این دلیل بود که این آزمایشگاه در سواحل غربی امریکا قرار داشت. شیوه نامگذاری روش ساترن بلاتینگ که در سال ۱۹۷۵ ابداع شد و برای تشخیصDNA مورد استفاده قرار می گیرد بر اساس گوگل اسکالر مقاله Harry Towbin در ۳۸ سال گذشته بیش از ۵۴۰۰۰ بار ارجاع داده شده است[۴]. وسترن بلاتینگ به عنوان شاخه جدیدی از انتقال مولکول ها به غشا معرفی شده است ، همچنین از آنجائیکه غالباً وسترن بلاتینگ را به کمک اتصال

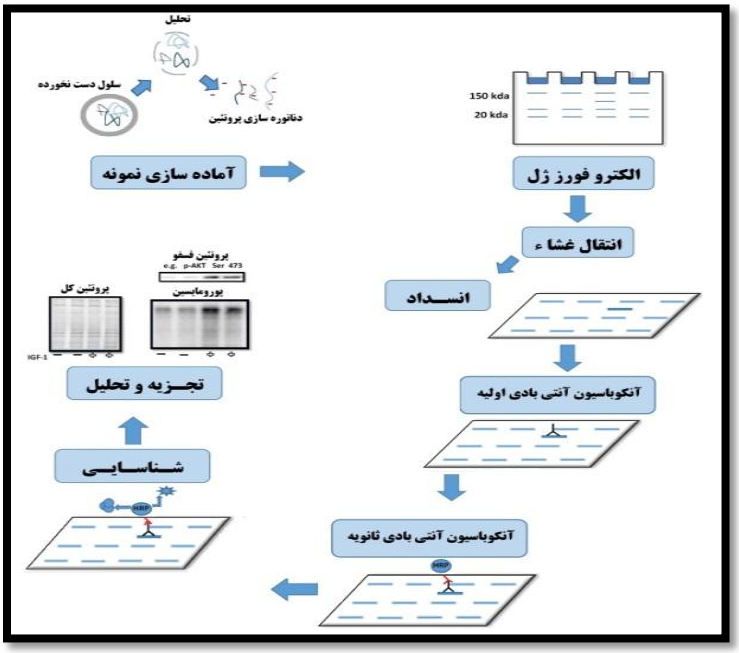
آنتی بادی ها مورد تحلیل و بررسی قرار می دهند. این روش به سرعت به ابزاری قدرتمند و رایج برای شناسایی و تعیین مشخصات پروتئین ها تبدیل شد[۵]. با استفاده از وسترن بلات ، محققان می توانند پروتئین های خاصی را از مخلوط پیچیده ای از پروتئین های استخراج شده از سلول ها شناسایی کنند. این تکنیک از سه عنصر برای انجام این کار استفاده می کند: (۱) جداسازی بر اساس اندازه ، (۲) انتقال به یک پشتیبان جامد (۳) علامت گذاری پروتئین هدف با استفاده از یک آنتی بادی اولیه و ثانویه مناسب برای تجسم[۶۰]. وسترن بلات یک تکنیک تحلیلی مبتنی بر آزمایشگاهی است که به طور گسترده انجام می شود، به ویژه در زیست شناسی مولکولی. برای شناسایی پروتئین های مورد نظر در یک نمونه مشخص و وزن مولکولی پروتئین مانور داده می شود[۴۸].وسترن بلات ، که به آن لکه پروتئینی نیز گفته می شود، از DNA سادرن بلات و RNA نوردن بلات تکامل یافته است. اصطلاح وسترن بلات برای توصیف روش کمی از روش (توبین و همکاران) اصلاح شده بود ، ابداع شد. وسترن بلات امکان انتقال پروتئین ها از ژل پلی اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS) به غشای جاذب را می دهد. پروتئین های لکه دار یک کپی دقیق از ژل را تشکیل می دهند و ثابت شده است که مرحله اولیه آزمایش های مختلف می باشد . استفاده بعدی از پروب های آنتی بادی علیه پروتئین های متصل به نیتروسلولز ، جنبه ایمونولوژی را متحول کرده است[۵۰]. وسترن بلات (WB) برنامه های متنوعی برای بررسی رویدادهای مولکولی تنظیم کننده متابولیسم انرژی ، گردش پروتئین و سازگاری های فیزیولوژیکی مزمن دارد. به عنوان مثال ، می توان از آنها برای بررسی فراوانی پروتئین ، فعالیت کیناز ، محل سلولی ، فعل و انفعالات پروتئین و پروتئین یا نظارت بر تغییرات پس از ترجمه به عنوان مثال ، رویدادهای برش ، فسفوریلاسیون ، گلیکوزیلاسیون ، متیلاسیون و سومولیزاسیون استفاده کرد[۱۱].

کاربردهای وسترن بلاتینگ : در آزمایشگاههای طبی از وسترن بلاتینگ (یا ایمونوبلاتینگ) برای مواردی نظیر تایید تشخیص بیماریهای عفونی و انگلی، بیماریهای خود ایمنی و آلرژی استفاده می شود همچنین وسترن بلاتینگ به عنوان آزمایش تأییدی برای تشخیص عفونت HIV و همچنین بیماری جنون گاوی، در نظر گرفته می شود. از دیگر کاربرد ها :بررسی میزان بروز مولکولهای پروتئینی توسط آنالیز کمی نتایج وسترن بلاتینگ و شناسایی ارگانیسم های تغییر یافته با مهندسی ژنتیک در صنایع غذایی [۵]. همچنین شامل شناسایی آنتی بادی، تشخیص، بیان ژن و تجزیه و تحلیل اصلاح پس از ترجمه نیز می باشد[۷۱]. از این تکنیک برای ارزیابی تغییرات در بیان پروتئین های دخیل در تنظیم چرخه سلولی استفاده می شود[۶۲].

مزایای وسترن بلاتینگ : وسترن بلات را می توان بر روی نمونه های متعددی انجام داد. با این روش می توان میزان بیان پروتین ها را نیز بررسی نمود[۱]. سادگی، سرعت و حساسیت از قابلیت های این روش است. ایمونوبلات می تواند اشکال مختلف مولکولی آنتی ژن را تشخیص دهد[۲۱]. نسبت به روشهای دیگر سریع تر می باشد و ، برای خدمات آزمایشگاهی تشخیصی نیز استفاده می شود[۱۰۵]. با وسترن بلات می توان باندهای پروتئینی را به صورت جداگانه برای تعیین تغییرات در یک آلرژن خاص تجزیه و تحلیل کرد و در این روش تجزیه و تحلیل نسبتاً سریع، آسان و ارزان است[۸۸].

معایب وسترن بلات : می توان به هزینه بالای آن ،اشاره کرد[۱۶]. این روش در مورد وزن مولکولی پروتئین ها اطلاعاتی در اختیار ما قرار نمی دهد. همچنین ممکن است در این روش ایزوفرم های پروتئین (که در اثر تغییرات بعد از ترجمه به وجود می آید) نیز همراه با پروتئین اصلی اندازه گیری شوند[۱]. ورود پروتئین های متعدد به یک ناحیه ، نتایج آزمایش های ناسازگار در آزمایشگاه ها به دلیل تفاوت در کیفیت و غلظت واکنش دهنده های مورد استفاده و هزینه است. همانند سایر روش های آنتی بادی ، تعداد زیادی از وسترن بلات در صورت عدم وجود نوارهای کلیدی می تواند بی نتیجه باشد[۵۹]. **وسترن بلات از سه مرحله تشکیل شده است:** به تفکیک نمونه پروتئینی در الکتروفورز روی ژل انتقال پروتئین های جداشده به غشا شناسایی یک پروتئین

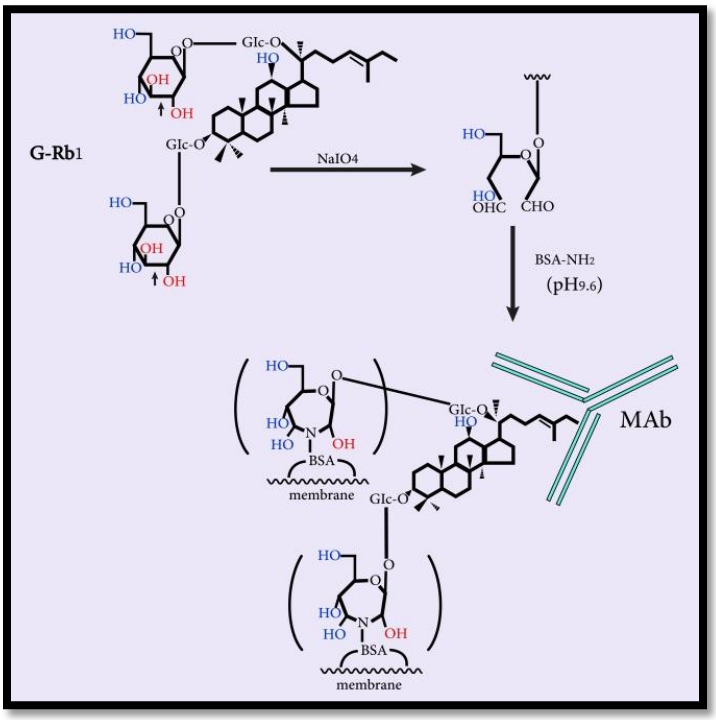
اختصاصی بر روی غشا[۱].به منظور اینکه پروسه وسترن بلات موفقیت آمیز باشد، چهار مورد بایستی رعایت گردد: **دفع از ژل:** پروتئین بایستی در طی انتقال از زل جدا شده وبه غشا منتقل شود. اگر پروتئین در روی ژل باقی بماند هیچ گونه آنالیزی را نمی توان بر روی آن انجام داد. **جذب به غشا:** در طی پروسه انتقال، پروتئین ها بایستی به غشا جذب شوند. در غیر این صورت، آنالیز آن در بلات با مشکل مواجه می شود **باقی ماندن پروتئین بر روی غشا در طول پردازش:** یک پروتئین بایستی در طی پردازش های بعد از انتقال همچنان متصل به غشا باقی بماند. **در دسترس بودن در طول پردازش:** پروتئین هایی که به غشا متصل شده اند بایستی در دسترس محقق باشند تا وی بتواند پروتئین مورد نظر خود را شناسایی نماید. اگر دسترسی به پروتئین امکانپذیر نباشد شناسایی پروتئین مورد نظر مقدورنخواهدبود[۱]. اصل (WB)تشخیص پروتئین (ها) از طریق اتصال و شناسایی آنتی بادی ها (Ab) به یک یا چند هدف است. این برهمکنش باید بین بخشی از آنتی ژن (پروتئین) یا اپی توپ و مکان های شناسایی خاص موجود در ناحیه اتصال به آنتی ژن (Fab) آنتی بادی که پاراتوپ نامیده می شود، بسیار خاص باشد (شکل ۳) [۴۹].



شکل ۳: برگرفته از Bass و همکاران (۲۰۱۷)مراحل متوالی فرآیند وسترن بلات [۱۱]

روش ایسترن بلات (Eastern blotting): یک روش رنگ آمیزی ایمنی جدید برای تجزیه و تحلیل گلیکوزیدها، مانند سولاسودین گلیکوزیدها، جینسنوزیدها و گلیسیریزین ایجاد شد که در آن از MAbs (آنتی بادی های مونوکلونال)خاصی استفاده شد که برای اصلاح مولکولی گیاهان دارویی استفاده می شود[۲۴,۲۵,۸۰,۹۲,۹۸] . این تکنیک که بعداً ایسترن بلات نام گرفت[۱,۹۰,۹۱,۱۰۹,۸۱]. روش ایسترن بلات اصلاح وسترن بلات می باشد که شامل تشخیص آنزیم های پروتئین های پس از ترجمه است[۹۴,۷۴]. پروتئین های غشای PVDF یا نیتروسلولز برای اصلاح با استفاده از بسترهای خاص بررسی می

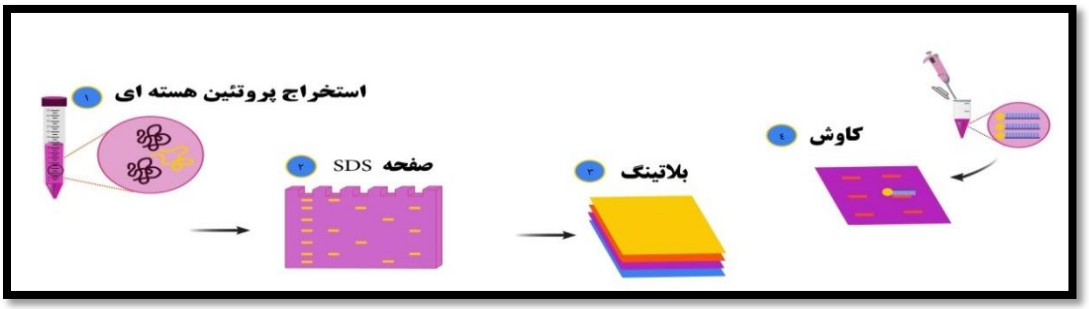
شوند[۷۴,۱۱].که به صورتی می باشد که پروتئین ها با مواد شوینده معروف به استیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) تغییر رنگ می دهند[۷۰]. در نتیجه، پروتئین های متصل به CTAB به جای آند به کاتد مهاجرت می کنند. این روش تنها در هنگام کار با پروتئین‌های با بار بالا یا گلیکوپروتئین‌هایی که حاوی تعداد زیادی کربوهیدرات با بار منفی هستند استفاده می‌شود که تحت شرایط استاندارد الکتروفورز و انتقال که ازSDS استفاده می‌کنند، به خوبی رفتار نمی‌کنند [۱۸]. تکنیک ایسترن بلات برای تعیین و شناسایی GC (گلیسیریزین) استفاده می شود .ایسترن بلات را نمی توان برای سنجش کمی ایمنی استفاده کرد[۶۵]. مزایای روش ایسترن بلات نسبت به ویژگی رنگ آمیزی اسید سولفوریک ، واضح تر و آسان است[۶۶]. در اینجا روش جدیدی را برای جداسازی مولکول G-Rb1 به دو بخش کاربردی ارائه می شود قطعات قند اکسید می شوند و دی آلدئید می دهند که با گروه های آمینه لیزین و/یا آرژنین پروتئین که می تواند به شدت به غشای جاذب PVDF متصل شود واکنش نشان می دهد .بخش آگلیکون مولکول G-Rb1 توسط MAb ضد G-Rb1 برای تجسم G-Rb1 توسط آنتی بادی خاص نشاندار شده با آنزیم محدود شده است(شکل ۴) [۹۱].



شکل ٤:برگرفته از Tanaka و همکاران (۲۰۰۷)،مکانیسم ایسترن بلاتینگ[۹۱].

روش بلاتینگ جنوب غربی یا سات وسترن بلات (Southwester blotting):

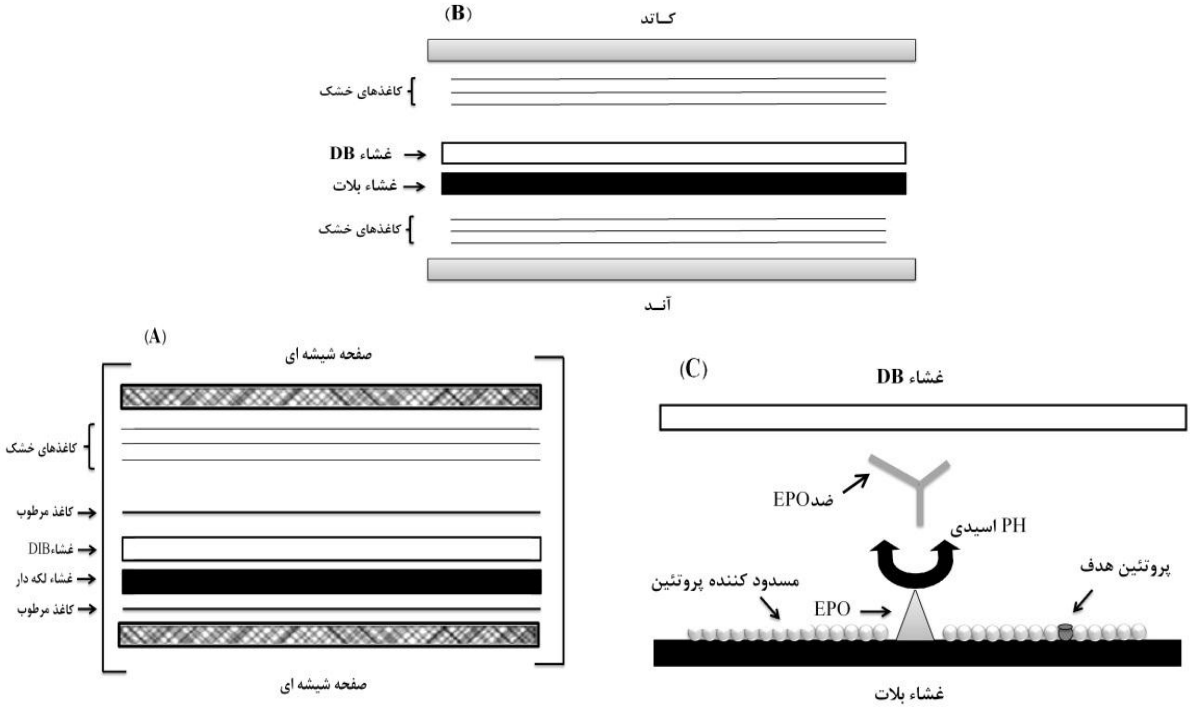
این روش پروتئین های جدا شده توسط SDS-PAGE یک بعدی را که معمولاً برای مشخص کردن فاکتورهای رونویسی و پروتئین هایی که DNA را با میل ترکیبی بالا (معمولا nM>) متصل می کنند و رونویسی ژن ها را تنظیم می کنند، استفاده می شود .اخیراً، بلات Southwestern ژل الکتروفورز دو بعدی (2 DGE) گزارش شده است و برای مشخص کردن فاکتورهای رونویسی به LC-MS/MS متصل شده است[۴۰]. سات وسترن بلات یا لکه های جنوب غربی (SWB) یک تکنیک برای توصیف سریع پروتئین های اتصال دهنده DNA و/یا TFs استروش SWB مشابه وسترن بلات معمولی (WB) می باشد، به جز مرحله کاوشگری که در آن غشای لکه دار با الیگونوکلئوتیدهای DNA از پیش طراحی شده با برچسب رادیویی کاوش می شود. در مرحله نهایی ، از روشهای پروتئومیکس برای شناسایی پروتئین های برچسب دار استفاده می شود (شکل ۵) [۶۴,۳۹].



شکل ۵: برگرفته از Meftahi و همکاران (۲۰۲۱) مراحل Southwestern blotting [٦٤].

روش بلاتینگ شمال غربی (Northwestern blotting): روش لکه گیری شمال غربی توسط براون و همکاران انجام شد[۳۴]. برای شناسایی پروتئین هایی که به قطعه RNA متصل می شوند از این روش استفاده می شود [۲۶]. همچنین برای تشخیص قطعات پلی پپتیدی اتصال دهنده اسید نوکلئیک بکار گرفته می شود[۱۰۷]. **روش بلاتینگ نقطه ای و لکه ای (Dot & Slot):** دو نمونه از روش های بلاتینگ هستند که در بیولوژی مولکولی و بیوشیمی کاربرد دارند. در این روشها، پروتئین ها توسط الکتروفورز از هم تفکیک نمی شوند، بلکه به صورت مستقیم با استفاده از دستگاه خلاء پروتئین ها به شکل نقطه (دات) یا لکه (اسلات) بر روی غشا منتقل می گردد[۱].اگر بخواهیم وجود یا عدم وجود یک توالی خاص در یک نمونه خاص از DNA را دریابیم، تشخیص DNA نمونه مستقیماً بر روی فیلتر غشایی نیتروسلولزی یا نایلونی و سپس بررسی نقطه حاصل از DNA امکان پذیر است .این روش بلاتینگ نقطه ای نامیده می‌شود[۱۰۲]. شرط کلیدی بلاتینگ نقطه این موضوع می باشد که DNAپس از انتقال به طور کامل دناتوره (تغییر ماهیت) شود. یا حداقل تمام نمونه ها به همان میزان دناتوره شوند[۱۴]. این دو تکنیک تکنیک نقطه/لکه ای بلات چندین مزیت از جمله حساسیت بالا و امکان تجزیه و تحلیل خواص اتصال PAR پروتئین ها در وضعیت اصلی آنها را ارائه می دهد[۶۳]. در روش بلات لکه ای، DNAاز طریق شکاف‌های منیفولد به غشاء اعمال می‌شود .سپس غشاء توسط یکی از انواع مختلف روش هیبریداسیون جنوبی بررسی می شود. در مقایسه با سادرن بلات، روش بلات لکه ای ساده تر و دقیق تر است، به طوری که می توان تعداد زیادی از نمونه ها را تجزیه و تحلیل کرد[۷۸]. در بلاتینگ های نقطه ای ولکه ای (Dot & Slot)، از روش های فیلتراسیون استفاده می شود. در این دو روش از وسایلی استفاده می شود که اجازه می دهد. نمونه ها به شکل نقطه یا لکه برروی غشا منتقل گردند. این تکنیک را می توان به عنوان روش کیفی برای غربالگری تعداد زیادی نمونه استفاده نمود.

همچنین از این روش نام عنوان روش کمی برای آنالیز نمونه های مشابه استفاده نمود[۱]. **روش بلاتینگ مضاعف(Double blotting)**: این روش برای کاهش موارد مثبت کاذب ناشی از اتصال غیراختصاصی در اثر آنتی بادیهای ثانویه در وسترن بلانینگ و یا دات بلاتینگ ابداع گردید. در این روش پس از پوشاندن جایگاههای غیراختصاصی غشای بلات شده توسط معرف اشباع کننده غشا را طبق معمول با آنتی بادی اولیه مجاور نموده و به دنبال آن شستشو داد می شود. اساس بلاتینگ مضاعف (DB)انتقال آنتی بادی اولیه به طور جداگانه از غشای بلات شده به غشای دیگر می باشد .در حال حاضر دو نوع بلانینگ مضاعف وجود دارد، (۱) بلاتینگ مضاعف فشاری که نیازی به الکتروترانسفر ندارد و فقط در اثر پدیده انتشار ساده صورت می گیرد و (۲) الکترو بلاتینگ مضاعف که برای انجام آن از الکتروترانسفر و پدیده الکتریسیته استفاده می شود. در این قسمت به اصول عملی بلاتینگ مضاعف فشاری پرداخته می شود [۵]. غشای دوم PVDF و آنتی بادی های ثانویه ایجاد شده است[۵۱]. این روش در سال ۲۰۰۱ میلادی توسط Lasne برای کاهش باندهای غشاء بلاتینگ مضاعف به ابعاد غشای لکه بریده شد و در متانول خیس شد و در ، در آب شستشو داده و در ۰.۱ تعادل داده می شود. غشای لکه روی غشای بلاتینگ مضاعف لایه لایه قرار گرفت و با یک ورق کاغذ فیلتر مرطوب با همان بافر پوشانده شد. این مجموعه بین دو صفحه شیشه ای قرار داده شده و توسط دو گیره محکم شده است ، همانطور که در(شکل ۵) نشان داده شده است. تماس به مدت ۵ دقیقه حفظ شد[۵۴].غشای DB در محلول ۰.۷ استیک اسید قرار گرفت . سپس بین دو دسته کاغذ فیلتر مرطوب شده با محلول یکسان در دستگاه بلات نیمه خشک الکتروفورتیک با غشای لکه و غشای DB رو به روی آند و کاتد به ترتیب روی غشای لکه قرار گرفت.. بنابراین آنتی بادی اولیه از آنتی ژن مربوطه دفع و به غشای DB منتقل شد (شکل۶) [۵۴].



شکل ٦ : برگرفته از Lasne (۲۰۰۱)، (A):تنظیم آزمایشی برای فشار مضاعف ، (B): راه اندازی آزمایشی برای electro-DB، (C) :اصل دو لکه شدن [٥٤].

جدول ۱ : ویژگی های پنج تکنیک مختلف از بلاتینگ :

مولفه ها	سادرن بلاتینگ	نوردن بلاتینگ	وسترن بلاتینگ	ایسترن بلات	سات وسترن بلات
مولکول قابل تشخیص	DNA[۳۳].	RNAو mRNA[۳,۳۳,۱۰۱].	پروتئین [۳۳].	پروتئین [۷۴].	DNA – پروتئین [۵۶,۳۸].
ژل مورد استفاده برای جداسازی	آگارز/پلی اکریل آمید ، با NaOH دناتوره[۷۵].	آگارز ، دناتوره شده توسط فرمالدئید[۳۵].	پلی اکریل آمید ، با استفاده از SDS دناتوره [۱۰۴,۲].	متیل آمونیوم بروماید (CTAB)[۷۹].	الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) [۴۳,۸۷].
روش لکه گیری	مویرگی[۲۷].	مویرگی[۱۰,۱۲].	الکتروبوتینگ[۳۳].	ELISA[۹۱].	ELISA[۵۳,۲۸].
کاوشگر مورد استفاده برای هیبریداسیون	DNA تک رشته مکمل[۳۲].	DNA تک رشته مکمل[۳۳].	آنتی بادی های اولیه و ثانویه[۹۵].	آنتی بادی مونوکلونال[۱۹].	DNAنشاندار[۳۷,۹۷].
تشخیص کاربردی	رادیوگرافی[۳۳,۲۹].	رنگ سنجی/ رادیوگرافی[۲۰,۹۶].	رنگ سنجی[۶۸,۵۸].	رنگ سنجی [۴۱].	رنگ سنجی[۲۸].
غشا مورد استفاده	غشا نایلونی [۷].	غشا نایلونی[۶۷].	غشاهای پلی وینیلیدین فلوراید(PVDF)و نیتروسلولز (NC)[۱۰۴].	غشاهای پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) و نیتروسلولز(NC) [۷۶].	غشاهای پلی وینیلیدین فلوراید(PVDF)[۸۲].

نتیجه گیری :

استفاده از نقش مکملی تکنیک های بلات بدون شک در آینده ادامه و افزایش خواهد یافت ,و می توانند سایر زمینه های پیشرفت تکنولوژی را تکمیل کنند . تجزیه و تحلیل بلات می تواند جزئیات مختلفی را در مورد ماهیت مولکول های مورد مطالعه در اختیار قرار دهد. این تکنیک‌های قدرتمند به محقق اجازه می‌دهد تا مولکول‌های خاص را در ترکیب پیچیده‌ای از موارد مرتبط شناسایی و مشخص کند. تکنیک‌های بلات که امکان تشخیص مواد یا پروتئین‌های ژنومی را نسبتاً ساده و ارزان با ویژگی بالا می‌دهد، به طور گسترده در حوزه های مختلف علوم استفاده می‌شود .با این وجود، نتایج بدست آمده به خلوص مواد مورد استفاده در آزمایش و مهارت فنی کاربران نیز بستگی دارد. این روش ها برای تشخیص غلظت‌های پایین پروتئین‌های خاص مناسب می باشد و امکان شناسایی ، آنتی‌بادی، آلرژن‌ها، اتوآنتی ژن‌ها ،پاتوژن‌ها، تومورها را در سرم‌های انسان و حیوان فراهم می‌کند. برای درمان موثر و تشخیص دقیق بیماری های مختلف، تشخیص عفونت بیماری که توسط سیستم ایمنی سرکوب‌شده اند ، شناسایی ناقلان بدون علامت و تشخیص زودهنگام قبل از ایجاد علائم در شاخه های کشاورزی و انسان و دام نقش بسزایی را ایفا می کنند .

مراجع:

۱. آیت اللهی، حسین و حیدری زرنق ، حافظ ؛ روش های بلاتینگ پروتئین ها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد،۱۳۸۷،صفحات ۹۵- ۱۰
۲. گرتا نجف اف ، ایاز و هوجای، وسترن بلات ؛ ترجمه : اشرف بخشی مفرد کاشانی و سایرین ، انتشارات گروه تالیفی دکتر خلیلی،۱۳۹۷ ،صفحه ۱۱.
۳. نجف اف ، ایاز؛ چکیده بیولوژی سلولی و مولکولی و مهندسی ژنتیک، ترجمه : منصور پور ابراهیم و وحدت پورطهماسبی پیله سوار ،انتشارات بشری ، آذر۱۳۹۴،صفحه ۲۴۴.
۴. نجف اف ، ایاز؛ راهنمای وسترن بلات ، ترجمه محسن آقائی و محمد یحیی وحیدی ، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹ ،صفحه ۷.
۵. سانکیان ،مجتبی و همکاران ؛ وسترن بلاتینگ ، راهنما نظری و عملی ، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه فردوسی مشهد ، ۱۳۸۷ ، صفحات ۸۲- ۱۶.

6. Akansha, K. *et al*, Disease surveillance and diagnostic techniques in fishes-a review. *Journal of Experimental Zoology, India*, 2015, 18.2: 557-562.
7. Al-Thuwaini, T. M. Association of antidiabetic therapy with shortened telomere length in middle-aged Type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2021, 20.2: 1161-1168.

8. Angulo, Rudy I., *et al*.The usefulness of a rapid PCR methodology to detect rearranged Ig heavy chain genes in lymphoproliferative disease in a diagnostic setting. *Pathology*, 1995, 27.4: 352-357.
9. Arjmand, B. (Ed.). *Genomics, Proteomics, and Metabolomics: Stem Cells Monitoring in Regenerative Medicine*. Springer Nature, 2019.
10. Barde, Luka Yelwa, *et a*l. Gene expression and its application in biotechnology. *GSC Advanced Research and Reviews*, 2021, 8.1: 012-021.
11. Bass, Joseph J., *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 2017, 27.1: 4-25.
12. Beneventi, Giulia, *et al*. The small Cajal body-specific RNA 15 (SCARNA15) directs p53 and redox homeostasis via selective splicing in cancer cells. *NAR cancer*, 2021, 3.3: zcab026.
13. Bickel, Peter J., *et al.* An overview of recent developments in genomics and associated statistical methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 2009, 367.1906: 4313-4337.
14. Brown, T. Dot and slot blotting of DNA. *Current protocols in molecular biology*, 1993, 21.1: 2.9. 15-2.9. 20.
15. Brown, T. Southern blotting. *Current Protocols in Protein Science*, 1998, 13.1: A. 4G. 1-A. 4G. 8.
16. Brun, Susana, *et al*. Assessing autophagy in sciatic nerves of a rat model that develops inflammatory autoimmune peripheral neuropathies. *Cells*, 2017, 6.3: 30.
17. Buhtz, Anja, *et al*. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC plant biology*, 2010, 10.1: 1-13.
18. Buxbaum, E. Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins. *Analytical biochemistry*, 2003, 314.1: 70-76.
19. Chopra, Priyanka, *et a*l. Phytochemistry of ginsenosides: Recent advancements and emerging roles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 1-28.
20. de Mattos-Shipley, K. M., Foster, G. D., & Bailey, A. M. Cprp-An unusual, repetitive protein which impacts pleuromutilin biosynthesis in the basidiomycete Clitopilus passeckerianus. *Frontiers in Fungal Biology*, 2021, 2: 8.
21. Du, Y., & Chen, B.. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia. *Drug Design, Development and Therapy*, 2017, 11: 1255.
22. Koscianska, Edyta, *et al*. Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers. *BMC molecular biology*, 2011, 12.1: 1-7.
23. Fakruddin, M., Mannan, K. S. B., & Andrews, S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
24.Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y .Applications of ELISA, western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of Panax species and traditional Chinese herbal medicines. *Analyst*, 2000, 125.8: 1425-1429.
25. Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y. Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 24.10: 1157-1160.
26. Gomila, R. C., & Gehrke, L. Biochemical approaches for characterizing RNA–protein complexes in preparation for high resolution structure analysis. In: *Plant Virology Protocols*. Humana Press, 2008. p. 279-291.
27. Goswami, R. S., & Harada, S. An Overview of Molecular Genetic Diagnosis Techniques. *Current Protocols in Human Genetics*, 2020, 105.1: e97.
28. Hammam, Elie, et al. Discovery of a new predominant cytosine DNA modification that is linked to gene expression in malaria parasites. *Nucleic acids research*, 2020, 48.1: 184-199.
29. Haruyama, Naoto, et al. Leucine rich amelogenin peptide prevents ovariectomy-induced bone loss in mice. *PloS one*, 2021, 16.11: e0259966.
30. Hayes, P. C., Wolf, C. R., & Hayes, J. D. Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins. *BMJ: British Medical Journal*, 1989, 299.6705: 965.
31. He, M., & Herr, A. E. Amy E. Automated microfluidic protein immunoblotting. *Nature protocols*, 2010, 5.11: 1844-1856.
32.Hofreiter, Michael, *et al*. Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 2021, 54: 102538.

33. Raj, G. M., & Raveendran, R., Ramasamy. *Introduction to basics of pharmacology and toxicology: Volume 1: General and molecular pharmacology: Principles of drug action*. Springer Singapore, 2019.
34. Huang, C., & Wu, C. Y. Characterization and expression of the pseudorabies virus early gene UL54. *Journal of virological methods*, 2004, 119.2: 129-136.
35. Ito, Katsutoshi, *et al*. Differences of two polychaete species reflected in enzyme activities. *Marine biology*, 2011, 158.6: 1211-1221.
36. Jäck, H. M., & Wittmann, J., Jürgen. MicroRNAs and Biomarker Discovery. In: *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery*. Academic Press, 2013. p. 379-392.
37. Jeon, B., & Zhang, Q. Cj0011c, a periplasmic single-and double-stranded DNA-binding protein, contributes to natural transformation in Campylobacter jejuni. *Journal of bacteriology*, 2007, 189.20: 7399-7407.
38. Jia, Y., Jiang, D., & Jarrett, H. W.Repeated probing of Southwestern blots using alkaline phosphatase stripping. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217.45: 7177-7181.
39. Jia, Y., Nagore, L., & Jarrett, H. Harry. Southwestern blotting assay. In: *DNA-Protein Interactions*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 85-99.
40. Jiang, Daifeng, *et al*.. Two-dimensional southwestern blotting and characterization of transcription factors on-blot. *Journal of proteome research*, 2009, 8.7: 3693-3701.
41. Jiang, Lingli, *et al*. Preparation and characterization of DNA aptamers against roxithromycin. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1164: 338509.
42. Jin, H., & Gassmann, W. *RNA abundance analysis: methods and protocols*. Humana Press, 2012.
43. Jorrin-Novo, Jesus V., *et a*l. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics!. *Journal of proteomics*, 2019, 198: 1-10.
44. Karcher, S. J. Non-radioactive DNA hybridization experiments for the undergraduate laboratory: the Southern blot analysis. *Tested Studies for Laboratory Teaching*, 1991, 1-31.
45. Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. Discovery of pathogen-regulated small RNAs in plants. *Methods in enzymology*, 2007, 427: 215-227.
46.Kelly, K. F. 'Southern blotting', *Proc Nutr Soc*,1996, 55: 5.۷-۹۱
47. Khalil, S. H., Siegrist, K., & Akhtar, M. Application of polymerase chain reaction to detect rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in lymphoproliferative disease. *Annals of Saudi Medicine*, 1997, 17.4: 395-398.
48. Kondo, Yukari, et al. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One*, 2018, 13.1: e0191532.
49. Kurien, Biji T., *et al*. An overview of Western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Signal Transduction Immunohistochemistry*, 2011, 55-67.
50.Kurien, B. T., & Scofield R. H.. 'Western blotting', *Methods*, 2006, 38: 283-93.
51. Kurien, B. T *et al*. Electrophoresis—blotting techniques. *Elsevier reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. Elsevier, Waltham, MA. doi*, 2015, 10.
52. Kurien, B. T. *Western Blotting for the Non-Expert*. Springer International Publishing, 2021.
53. Lahiri, Debomoy K., *et al*. PuF, an antimetastatic and developmental signaling protein, interacts with the Alzheimer's amyloid-β precursor protein via a tissue-specific proximal regulatory element (PRE). *Bmc Genomics*, 2013, 14.1: 1-28.
54. Lasne, Françoise. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *Journal of immunological methods*, 2001, 253.1-2: 125-131.
55. Li, Xiaoming, *et al*. Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *Journal of experimental botany*, 2011, 62.14: 4763-4772.
56. Lim, Youngbin, *et al* .Comparative Single-Molecule Kinetic Study for the Effect of Base Methylation on a Model DNA–Protein Interaction. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2020, 11.19: 8048-8052.
57.Lu, Cheng, et al. Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105.12: 4951-4956.
58. Lubbers, R. J., & de Vries, R. P. Production of protocatechuic acid from p-hydroxyphenyl (H) units and related aromatic compounds using an Aspergillus niger cell factory. *MBio*, 2021, 12.3: e00391-21.
59.Magnarelli, L. A. Current status of laboratory diagnosis for Lyme disease. *The American journal of medicine*, 1995, 98.4: 10S-14S.

60. Mahmood, T., & Yang, P. C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 2012, 4.9: 429.
61. Maiti, S. I., & Saikia, S. K. An approach for quantifying western blots: the case of signal intensity and the statistical analysis. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 2021, 24.2.
62. Malacrida, A., Cavaletti, G., & Miloso, M. Rigosertib and Cholangiocarcinoma: A Cell Cycle Affair. *International journal of molecular sciences*, 2021, 23.1: 213.
63. Malanga, M., & Althaus, F. R.Noncovalent protein interaction with poly (ADP-ribose). In: *Poly (ADP-ribose) Polymerase*. Humana Press, Totowa, NJ, 2011. p. 67-82.
64. Meftahi, Gholam Hossein, *et al*. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2021, 49.4: 509-517.
65. Morinaga, Osamu, *et al*. An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2005, 383.4: 668-672.
66. Morinaga, Osamu, *et al*. Development of eastern blotting technique for sennoside A and sennoside B using anti-sennoside A and anti-sennoside B monoclonal antibodies. *Phytochemical Analysis*, 2009, 20.2: 154-158.
67. Morisaki, Ikuko, *et al*. Modeling a human CLP1 mutation in mouse identifies an accumulation of tyrosine pre-tRNA fragments causing pontocerebellar hypoplasia type 10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 570: 60-66.
68. Mossa M, Abubakr H., *et al*. Deleterious impact of nerve growth factor precursor (proNGF) on bladder urothelial and smooth muscle cells. *Cellular Signalling*, 2021, 81: 109936.
69.Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V.. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 2017, 14.11: 1037-1053.
70. Negritto, M. C., & Manthey, G. M. Overview of blotting. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2016, 13.1: 8.1. 1-8.1. 22.
71. Ni, Duojiao, *et al.* Protein blotting: immunoblotting. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2016, 12.1: 8.3. 1-8.3. 40.
72. Nicholas, M. W., & Nelson, K. North, south, or east? Blotting techniques. *The Journal of investigative dermatology*, 2013, 133.7: e10.
73. Nishiyama, Rie, et al. Both hypomethylation and hypermethylation in a 0.2-kb region of a DNA repeat in cancer. *Molecular cancer research*, 2005, 3.11: 617-626
74.Orakpoghenor, O., & Markus, T. P. Diagnostic Techniques in Molecular Biology–An Overview. *MedRead J Fam Med*, 2020, 1.2: 1008.
75. Pan, Te-Cheng, et al A mouse model for dominant collagen VI disorders: heterozygous deletion of Col6a3 Exon 16. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289.15: 10293-10307.
76. Petit, Marie, et al. Longitudinal Pathogenic Properties and N-Glycosylation Profile of Antibodies from Patients with Pemphigus after Corticosteroid Treatment. *Biomedicines*, 2021, 9.10: 1411.
77.Richtand, N. M. Analysis of gene expression in striatal tissue by multiprobe RNase protection assay. In: *Drugs of Abuse*. Humana Press, 2003. p. 181-192.
78. Rogers, S. O., Beaulieu, G. C., & Bendich, A. J. [18] Comparative studies of gene copy number. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1993. p. 243-251.
79.Sanders, B. J., Kim, D. C., & Dunn, R. C.. Recent advances in microscale western blotting. *Analytical Methods*, 2016, 8.39: 7002-7013.
80.Shan, S. J., TANAKA, H., & Shoyama, Y. Western blotting method for the immunostaining detection of glucuronides of glycyrrhetic acid using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1999, 22.2: 221-223.
81.Shan, S., Tanaka, H., & Shoyama, Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Analytical Chemistry*, 2001, 73.24: 5784-5790.
82.Siu, F. K., Lee, L. T., & Chow, B. K. Southwestern blotting in investigating transcriptional regulation. *Nature protocols*, 2008, 3.1: 51-58.
83.Southern, E.The early days of blotting. In: *Western Blotting*. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 1-3.
84.Southern, E.Southern blotting. *Nature protocols*, 2006, 1.2: 518-525.

85.Streit, Sylvia, *et al*.. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nature protocols*, 2009, 4.1: 37-43.
86.Sunkar, R., & Zhu, J. K.Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2004, 16.8: 2001-2019.
87.Szeberényi, J.. Problem-solving test: S outhwestern blotting. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2014, 42.5: 443-445.
88. Shriver, S. K., & Yang, W. W. Thermal and nonthermal methods for food allergen control. *Food Engineering Reviews*, 2011, 3.1: 26-43.
89.Talebi, H., Farahpour, M. R., & Hamishehkar, H.The effectiveness of Rutin for prevention of surgical induced endometriosis development in a rat model. *Scientific reports*, 2021, 11.1: 1-7.
90.Tanaka, H., Fukuda, N., & Shoyama, Y.. Identification and differentiation of Panax species using ELISA, RAPD and eastern blotting. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 2006, 17.1: 46-55.
91.Tanaka, H., Fukuda, N., & Shoyama, Y.. Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginseng saponins in the field of traditional Chinese medicines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2007, 55.10: 3783-3787.
92.Tanaka, Hiroyuki, *et a*l. A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS letters*, 1997, 404.2-3: 279-282.
93.Tang, Xiaoqing, *et al*. A simple array platform for microRNA analysis and its application in mouse tissues. *Rna*, 2007, 13.10: 1803-1822.
94.Thomas, Sunil, *et a*l.Antigenic protein modifications in Ehrlichia. *Parasite immunology*, 2009, 31.6: 296-303.
95.Tie, Lu, et al.A brief guide to good practices in pharmacological experiments: Western blotting. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2021, 42.7: 1015-1017.
96.Tran, H. V., & Piro, B. Recent trends in application of nanomaterials for the development of electrochemical microRNA biosensors. *Microchimica Acta*, 2021, 188.4: 1-23.
97.Treiber, Daniel K., *et al*. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91.12: 5672-5676.
98.Uto, Takuhiro, *et al*.Immunological Separation of Bioactive Natural Compounds from Crude Drug Extract and Its Application for Cell-Based Studies. *Antibodies*, 2021, 10.4: 48.
99.Valdés-López, Oswaldo, et al.MicroRNA expression profile in common bean (Phaseolus vulgaris) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist*, 2010, 187.3: 805-818.
100.Varanasi, S. S., & Datta, H. K. Southern analysis of mitochondrial DNA in cortical bone of elderly patients undergoing knee and hip arthroplasty. *The Journal of Pathology*, 2001, 193.4: 557-562.
101.Wang, Z., & Yang, B.. Northern blotting and its variants for detecting expression and analyzing tissue distribution of miRNAs. In: *MicroRNA Expression Detection Methods*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 83-100.
102.Wickenden, C., Malcolm, A. D., & Coleman, D. V. DNA hybridization of cervical tissues. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1987, 25.1: 1-18.
103.Wu, Liuji, *et al*.Valid application of western blotting. *Molecular biology reports*, 2014, 41.5: 3517-3520.
104.Xiang, Yufang, *et al*. Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Scientific Reports*, 2021, 11.1: 1-11.
105.Xie, Y., et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis. *Letters in applied microbiology*, 2016, 62.4: 336-343.
106.Xin, Mingming, *et al*. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (Triticum aestivum L.). *BMC plant biology*, 2010, 10.1: 1-11.
107.Zhong, B. X., Shen, Y. W., & Omura, T.RNA-binding domain of the key structural protein P7 for the Rice dwarf virus particle assembly. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 2005, 37.1: 55-60.
108.Zhu, Qian-Hao, *et al*.A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome research*, 2008, 18.9: 1456-1465.
109.Zhu, Shu-hang, *et al.* Eastern blotting and use of anti-saikosaponin a monoclonal antibodies for detection of saikosaponins. *Journal of natural medicines*, 2007, 61.2: 178-183.
110.Zou, Xiling, *et al*.Identification of transcriptome induced in roots of maize seedlings at the late stage of waterlogging. *BMC plant biology*, 2010, 10.1: 1-16.