اساس کار و انواع روش‌های وسترن بلات (Western Blotting)

داود قاسمی[۱]، نوشین زمان‌پور[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات آلرژی و بیماری‌های آلرژیک، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲-دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده:

وسترن بلات (پروتئین بلات، ایمونوبلات) روشی نیرومند برای آشکارسازی پروتئین‌ها پس از الکتروفورز می‌باشد که به ویژه در مورد پروتئین‌های با غلظت پایین مناسب است. این تکنیک در سال ۱۹۷۹ توسط توبین[۱] و همکاران ابداع گردید. این مقاله مروری انواع مختلفی از روش‌ها که برای انتقال پروتئین از ژل به غشا وجود دارد، مانند: انتشار ساده[۲]، جریان حلال وابسته به خلأ[۳] و جداسازی الکتروفورتیک[۴] را معرفی می‌کند و در نهایت مختصری درباره‌ی روش‌هایی که به منظور آشکارسازی آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود بیان می‌گردد.

واژگان کلیدی: وسترن بلات، سدیم دو دسیل سولفات پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورزیس[۵]، نیتروسلولوز؛ غشاء پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید[۶]؛ روش‌های آشکارسازی.

مقدمه:

استفاده از توان حل‌کنندگی بالای الکتروفورز برای اهداف محدودی بود، به این دلیل که جداسازی پروتئین‌ها در ماتریکس ژل بخاطر عدم دسترسی به جستجوگرهای مولکولی محدود و البته سخت بود، تا اینکه تکنیکی معرفی گردید که اجازه می‌داد پروتئین‌ها از ژل به غشای جاذب

---

[۱] Towbin
[۲] simple diffusion
[۳] vacuum-assisted solvent flow
[۴] electrophoreticelution
[۵] Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
[۶] Polyvinylidene difluoride

منتقل گردند. ساترن[۷] در سال ۱۹۷۵ روش DNA بلاتینگ را ابداع کرد و آن را ساترن بلات[۸] نامید (۱) و سپس الوین[۹] و کمپ[۱۰] در سال ۱۹۷۷ RNA Blotting را ابداع کردند و آن را نوترن بلات[۱۱] نامیدند (۲) و پس از آن توبین در سال ۱۹۷۹ پروتئین بلاتینگ را ابداع کرد (۳). به منظور حفظ نامگذاری جغرافیایی که به وسیله ساترن صورت گرفته بود، بورنت[۱۲] واژه وسترن بلات را برای آنچه که توبین ابداع کرده بود برگزید (۴).این روش ابزاری نیرومند برای ردیابی پروتئین‌های چندگانه بود، بویژه در مورد پروتئین‌هایی که فراوانی کمتری دارند. این روش شامل انتقال پروتئین‌های جداشده بر روی SDS-PAGE بر روی یک غشا یا فاز جامد دیگر است (۳).

جدا نمودن پروتئین‌ها بر روی یک فاز جامد امکان انجام آزمایشات متعدد را بر روی این پروتئین‌ها فراهم می‌آورد. قدم بعدی طراحی Ab برضد پروتئین‌های چسب شده به نیتروسلولوز می‌باشد که موجب انقلابی در علم ایمونولوژی شد.

۱. راندمان بلاتینگ پروتئین:

دو فاکتور اصلی بر روی کارایی پروتئین اثرگذار است:

۱) کارایی الوت کردن پروتئین به خارج از ماتریکس ژل
۲) کارایی اتصال پروتئین به غشا

۱،۱،۱) کارایی الوت کردن پروتئین به خارج از ماتریکس ژل:

همه تکنیک‌های بلاتینگ نیازمند انتقال موفقیت‌آمیز پروتئین از ژل به یک فاز جامد هستند، بنابراین بیشتر ملاحظات می‌بایست بر روی ماهیت ژل مورد استفاده باشد. به طور کلی پایین‌ترین درصد از آکریل‌آمید و اتصال متقاطع[۱۳] موجب انتقال آسان‌تر از ژل به فاز جامد می‌شود. در صورت استفاده از ژل‌های نازک، انتقال آسان‌تر و کامل‌تر خواهد بود اما ممکن است موجب مشکلاتی در جابجایی گردد. استفاده از ژل‌های خیلی نازک[۱۴] می‌تواند موجب مشکلات انتقالی

---

[۷] Southern
[۸] Southern blot
[۹] Alwine
[۱۰] Kemp
[۱۱] Northernblot
[۱۲] Burnette
[۱۳] Cross-linker
[۱۴] Ultra-thin

گـردد و غشـاهای بـا ضـخامت کمتـر از 0.4mm دارای محـدودیت‌هـای کـاربردی هسـتند (۵). بـلات کـردن پـروتئین‌هـا بـا وزن مولکـولی بـالا روی SDS-PAGE ضـعیف بـوده و منجـر بـه میـزان پـایینی از ایمونوبلاتینگ[۱۵] می‌شود، بنـابراین محققـانی کـه بـر روی پـروتئین‌هـای بـزرگ کـار مـی‌کننـد بـه دنبـال افزایش راندمان انتقال پـروتئین بـه وسـیله افـزایش میـزان مهـاجرت پروتئینـی از ژل بـه غشـا بـه وسـیله روش‌هـایی کـه دامنـه آنهـا از تکـه‌تکـه کـردن ژل تـا تجزیـه پروتئـولیتیکی جزئـی پـروتئین‌هـا پـیش از انتقال می‌باشند، هستند (۸-۶).

۱،۱،۲) کارایی اتصال به غشا (۵)

در این قسـمت نـوع و ماهیـت غشـای مـورد اسـتفاده بسـیار تأثیرگـذار اسـت کـه در زیـر انـواع غشـاهای استفاده شده در روش وسترن بلاتینگ بیان می‌شود.

نیتروسلولوز، پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (PVDF) کـه یـک کاغـذ فعـال شـده یـا نـایلون فعـال شـده اسـت که بـه صـورت موفقیـت‌آمیـزی بـرای اتصـال بـه پـروتیئن‌هـای انتقـال‌یافتـه اسـتفاده مـی‌شـود (۹،۷،۳). بیشترین غشای استفاده شده نیتروسلولوز اسـت کـه البتـه دارای معـایبی نیـز مـی‌باشـد؛ بـرای نمونـه بـه صـورت کـووالان بـه پـروتئین‌هـا چسـب نمـی‌شـود، هنگـام خشـک شـدن بسـیار شـکننده اسـت، پروتئین‌های کوچک تمایل دارنـد بـه سـرعت از میـان غشـای نیتروسـلولوزی عبـور کننـد و تنهـا قطعـات کوچکی از مقدار کل پروتئین‌هـا متصـل بـاقی مـی‌ماننـد. ایـن مشـکل مـی‌توانـد بـا اسـتفاده از غشـاهایی بـا سـوراخ‌هـای کوچـک‌تـر برطـرف گـردد. در مـورد نیتروسـلولوز فشـار مکـانیکی روی غشـا نشـان داده است که می‌تواند باعث بهبود ترتیب شـبکه پلـی‌اسـتری غشـا شـود کـه بـه موجـب آن باعـث جابجـایی[۱۶] راحت‌تر می‌شـود. یکـی از مزایـای الکتروبلاتینـگ پـروتئین‌هـا بـر روی غشـا PVDF ایـن اسـت کـه ایـن غشـا را مـی‌تـوان بـا رنـگ CBB (Coomassie Brilliant Blue) رنـگ کـرد امـا غشـای نیتروسـلولوزی را نمی‌توان با آن رنگ کرد.

غشاهای فعال شده (با گروه‌های دیازو) موجـب مـی‌شـوند کـه پـروتئین‌هـا بـه صـورت کـووالان بـه آن‌هـا چسب شـوند امـا نقطـه ضـعف اساسـی آن‌هـا ایـن اسـت کـه پیونـد بـا آمـین آغـازی برقـرار مـی‌کننـد و بنـابراین بـرای الکتروفـورز نیازمنـد بـافری ویـژه هسـتیم و بنـابراین گـروه‌هـای بـدون آمـین آزاد مـی‌بایسـت بـا ایـن غشـاها الکتروبلاتینـگ شـوند. عـلاوه بـراین، ایـن غشـاها گـران بـوده و گـروه‌هـای واکنش‌گر نیز دارای نیمه عمر پایینی هستند.

---

[۱۵] Immunoblotting
[۱۶] Handeling

۲) روش‌هایی برای انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشا:

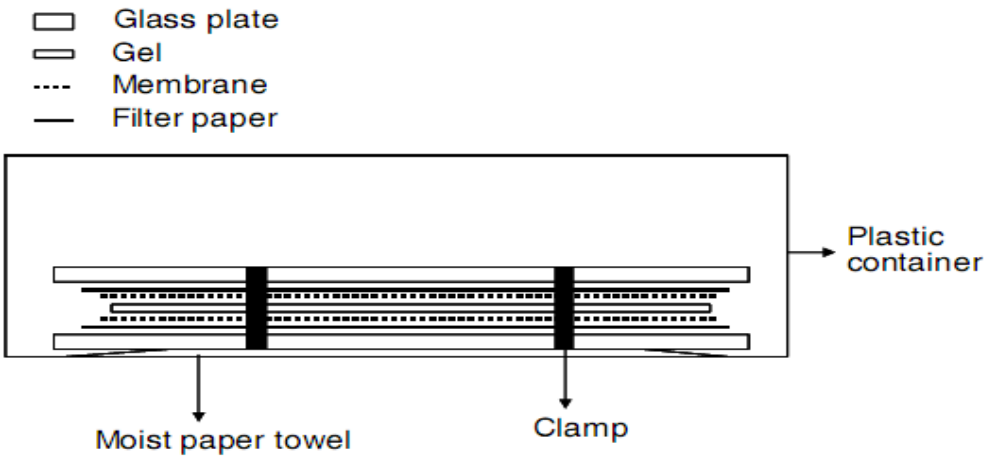
انتقال پروتئین‌ها از ژل SDS-PAGE به غشا از ۳ راه مختلف امکان‌پذیر است:

۱. انتشار ساده (Simple diffusion)
۲. جریان حلال وابسته به خلأ (vacuum blotting)
۳. وسترن بلاتینگ (Electro blotting)

۲,۱) انتشار ساده (۱۰،۶)

لکه‌گذاری انتشاری نخستین بار به عنوان روشی برای انتقال پروتئین‌های جداسازی شده به وسیله ایزوالکتریک فوکوسینگ روی ژل‌های نازک بر روی غشا توسعه یافت (۱۱،۱۰). این روش نیازمند خشک کردن غشا با کاغذ فیلتری که روی غشا قرار می‌گیرد می‌باشد. همچنین یک صفحه‌ی شیشه‌ای و یک جسم با وزن مخصوص (تامین فشار لازم) روی مجموعه‌ی مذکور به منظور سهولت انتشار قرار داده می‌شود. در سال ۱۹۹۷ کورین[۱۷] و اسکوفید[۱۸] روش جدیدی را ابداع کردند؛ آن‌ها ژل را بین دو غشا قرار دادند که این غشاها همراه با فیلتر و ظرف شیشه‌ای بود و در نتیجه لکه‌گذاری روی دو غشا ایجاد می‌شد (شکل ۱) (۱۰). اما این پروتوکل به دلیل اینکه انتقال کمی[۱۹] از پروتئین نبود با اقبال مواجه نشد تا اینکه از تکنیک ایمونوبلاتینگ چندگانه استفاده نمودند و موجب شد که علاقه قابل ملاحظه‌ای در انتقال پروتئین با واسطه این روش فراهم شود. بزرگترین برتری لکه‌گذاری با انتشار ساده در مقایسه با الکتروبلاتینگ این است که انتقال‌های چندتایی یا نقشه‌گذاری را می‌توان از یک ژل بدست آورد و آنتی‌سرم‌های مختلف را روی یک نقشه آزمایش نمود.

[۱۷] Kurien
[۱۸] Scofield
[۱۹] quantity



شکل ۱: انتشار ساده دوطرفه، انتقال غیرالکتروفورتیک پروتئین از ژل SDS-PAGE

۲,۲). جریان حلال وابسته به خلأ (vacuum blotting):

پفرون[۲۰] و همکارانش در سال ۱۹۸۲ یک روش بلاتینگ ساده را بعنوان یک آلترناتیو برای لکه‌گذاری با انتشار ساده و الکتروبلاتینگ معرفی کردند (۱۲). آنها از قدرت مکش یک پمپ متصل به یک سیستم خشک‌کن ژل ورقه‌ای برای جدا کردن قطعات پلی‌پپتیدی از ژل به غشا استفاده کردند. این روش امکان جدا کردن پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا و پایین را فراهم می‌آورد؛ موقعی که پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین استفاده می‌شود نویسنده پیشنهاد می‌کند که غشای نیتروسلولوزی با اندازه سوراخ‌های کوچک (۰/۱-۰/۲µm) استفاده شود. اما نقطه‌ی ضعف این روش آن است که اگر پروسه جدا کردن پروتئین‌ها بیشتر از ۴۵ دقیقه طول بکشد ژل خشک می‌شود و بنابراین در این گونه موارد می‌بایست بافر کافی استفاده شود. همچنین در بعضی از موارد غلظت پایینی از پلی‌آکریل‌آمید به صورت چسبیده به غشا باقی می‌ماند که در این گونه موارد نویسنده پیشنهاد می‌کند که ژل را دوباره آبدهی کنیم که این کار موجب تورم شده و غشای نیتروسلولوزی به آسانی از ژل جدا می‌شود.

۲,۳) وسترن بلاتینگ (Electro blotting)

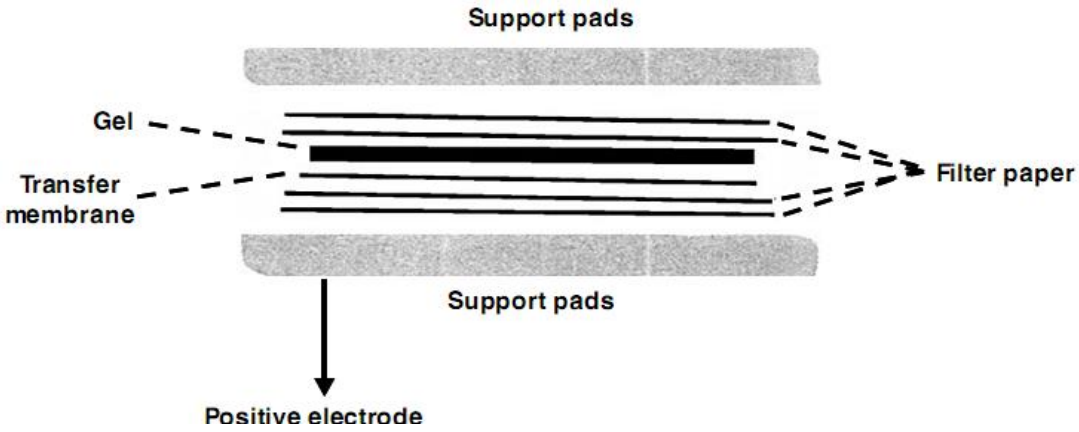
[۲۰] Peferoen

الکتروبلاتینگ یا وسترن بلات رایج‌ترین روش استفاده شده برای انتقال پروتئین‌ها از یک ژل به غشا می‌باشد. مزایای آن عبارت از سرعت و انتقال کامل در مقایسه با Simple diffusion و Vacuum blotting است. الکتروبلاتینگ را می‌توان از ۲ طریق به انجام رساند:

۱. غوطه‌ور کردن کامل ژل غشا در بافر[۲۱]
۲. قرار دادن ساندویچ ژل غشا بین کاغذ جاذب خیس شده در بافر[۲۲]

Wet transfer (۲،۳،۱

در انتقال مرطوب، ساندویچ ژل و غشا در تانک بافر به همراه الکترودهای پلاتینیوم قرار داده می‌شوند (شکل ۲)



شکل ۲: غشای انتقالی بین ژل و کاغذهای صافی به صورت ساندویچ قرار گرفته. غشای انتقالی به سمت آند می‌باشد.

Semi-dry transfer (۲،۳،۲:

در مورد انتقال نیمه‌خشک ساندویچ ژل- غشا بین صفحات الکترود کربنی قرار داده می‌شوند. بلاتینگ نیمه‌خشک یا افقی[۲۳] از دو صفحه الکترودی (استیل ضدخش یا صفحات کربن/گرافیکی)

[۲۱] Wet transfer
[۲۲] Semi _ dry transfer
[۲۳] Horizontal

تشکیل شده که به منظور یکنواخت کردن جریان الکتریکی در یک برهه زمانی کوتاه استفاده می‌شود و ساندویچ ژل- غشا بین آنها قرار داده می‌شوند.

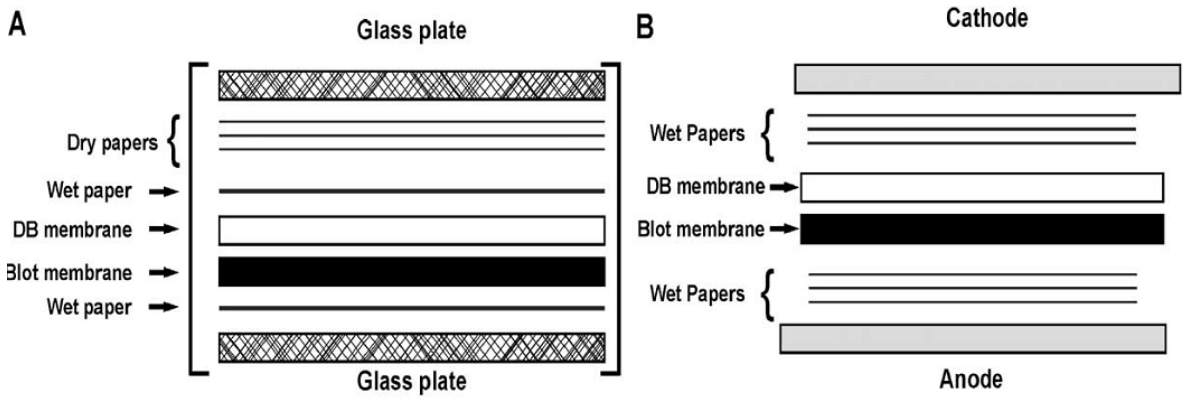
۳) تغییرات الکتروبلاتینگ:

تمام تغییرات انجام شده بر روی پروتوکول اولیه‌ی الکتروبلاتینگ به منظور افزایش میزان انتقال پروتئین‌ها از ژل به روی غشا صورت می‌گیرد. در زیر به نمونه‌هایی از این تغییرات صورت گرفته اشاره می‌شود.

۳,۱) لکه‌گذاری دوگانه[۲۴]:

این پروتوکل به منظور کاهش نتایج مثبت کاذب به دلیل اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی‌های ثانویه توسعه یافت (۱۳). در این روش، الکتروبلاتینگ یا لکه‌گذاری نقطه‌ای[۲۵] به وسیله شیرخشک بدون چربی متوقف شده که این کار موجب می‌شود که تنها آنتی‌بادی‌های اولیه یا اصلی در طول انکوباسیون به پروتئین متصل شوند و پس از آن عمل شستشو انجام می‌گیرد.

اصول بلاتینگ دوگانه انتقال آنتی‌بادی‌های اولیه بطور جداگانه از غشای لکه[۲۶] به یک پشتیبان جدید که غشای Double blot نامیده می‌شود، است (شکل۳).



شکل ۳: لکه‌گذاری دوگانه فشاری (A) و لکه‌گذاری الکتریکی (B)

[۲۴] Double blotting
[۲۵] Dot blotting
[۲۶] Blot membrane

دو گونه از لکه‌گذاری دوگانه با موفقیت ایجاد شده است:

Pressure double blot: که از الکتروفورزیس استفاده نمی‌شود و تنها از اصول انتشار ساده بهره می‌برد.

Electro double blot: که در این روش الکتروفورزیس نیز صورت می‌گیرد.

(۳,۱,۱ Pressure double blot:

در این روش، غشای PVDF دوم که غشای DB نیز نامیده می‌شود به اندازه غشای Dot-blot بریده می‌شود و سپس با متانول و محلول گلیسین/HCL0.1M که دارای PH=2.5 است مرطوب می‌شود. غشا Blot در زیر غشای DB قرار گرفته و به وسیله یک کاغذ فیلتری مرطوب شده با مقداری بافر پوشیده شده است. این مجموعه بین دو صفحه شیشه‌ای قرار گرفته و به وسیله دو گیره محکم شده است (شکل A۳).

(۳,۱,۲ Electro double blot:

غشای DB در محلول ۰٫۷% استیک اسید قرار می‌گیرد و سپس غشای Blot آن را همراهی می‌کند. این دو بین دو دسته از کاغذهای فیلتر مرطوب شده با مقداری محلول بافری قرار می‌گیرند. در این مورد نیز PH پایین به جداسازی Ab از Ag کمک می‌کند. با این روش می‌توان آنتی‌بادی اولیه را از غشای اولیه به غشای Capture منتقل کرد، بنابراین آنتی‌بادی‌های اولیه از آنتی‌ژن اختصاصی خود جدا شده و به غشای DB منتقل می‌شوند (شکل 3B).

(۳,۲ Slice blotting:

لو[۲۷] و همکاران در سال ۱۹۹۹ یک روش ساده از بلاتینگ یا لکه‌گذاری را توسعه دادند که می‌توانست نحوه آزاد شدن سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، جاذب‌های شیمیایی، آنزیم‌ها و دیگر سیگنال‌ها را در سیستم‌های خاص مانند بافت مغزی و زیر شرایط خاص ترسیم کند (۱۴). در این روش یک تکه از بافت در یک غشای انتقالی قرار داده می‌شود و سپس مواد درون تکه بافتی مانند نوروترانسمیترها، پروتئین‌ها و پپتیدها آزاد شده و مولکول‌ها به غشا انتشار می‌یابند.

[۲۷] Lowe

۳،۳) Tissue printing (چاپ بافت)

چندین محقق ثابت کردند که انتقال پروتئین‌ها به غشای نیتروسلولوزی صورت خواهد گرفت در صورتی که یک قطعه بریده شده از بافت بر روی سطح غشا فشار داده شود. این پروسه بعنوان چاپ بافتی نامیده می‌شود (۱۶،۱۵).

۳،۴) Native electrophoresis and western blot analysis:

در این روش به هیچ عنوان از SDS استفاده نمی‌شود که در این صورت پروتئین‌ها ساختار و عملکرد خود را حفظ می‌کنند. در این روش Sample buffer عاری از SDS یا DTT می‌باشد. پروتئین‌ها بسیاری از فاکتورهای خود از قبیل اندازه، شکل و ماهیت بار خود را حفظ می‌کنند. البته کیفیت الکتروفورزیس با این روش قابل مقایسه با SDS-PAGE نیست، اما این تکنیک زمانی مفید خواهد بود که ساختار بکر و یا فعالیت آنزیمی یک پروتئین قرار باشد ارزیابی شود.

۳،۵) Grid-immunoblotting:

این روش به وسیله Reese و همکاران در سال ۲۰۰۱ توسعه یافت که روشی است که امکان آزمایش بیش از ۲۰ نمونه مختلف برای آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر ضد بیش از ۲۰ آنتی‌ژن مختلف یا آلرژن را تنها بر روی یک ورقه کاغذی از نیتروسلولوز فراهم می‌آورد (۱۷). در این روش تنها حدود ۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر از نمونه موردنیاز است که این میزان از نمونه قابل قیاس با حجم موردنیاز برای ELISA[۲۸] نیست.

این روش شامل سه مرحله است:

۱. پروتئین‌ها روی غشا ثابت می‌شوند.
۲. لکه برای اتصال با آنتی‌بادی اختصاصی انکوبه می‌شود.
۳. اتصالات اختصاصی ارزیابی می‌شود.

۴) آشکار ساختن آنتی‌ژن‌ها (Antigen detection)

۴،۱) آشکارسازی آنتی‌ژن بوسیله رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها

[۲۸] Enzyme linke Immuno Sorbent Assay

پروتئین‌هایی که پس از ایمونوبلاتینگ بر روی غشا قرار گرفته‌اند را می‌توان بوسیله رنگ‌های ارگانیک مانند پانسو رد، آمینوبلاک، fast green، CBB، و همچنین با استفاده از مارکرهای فلورسنت و انواعی از روش‌های رنگ‌آمیزی نقره و ذرات کلوئیدی مانند طلا، نقره، مس، آهن یا مرکب چین شناسایی کرد (۱۸).

۴،۲) Immunodetection of Ag:

دو روش رایج برای شناسایی پروتئین‌ها پس از اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه به لکه پروتئینی که بلاک شده است استفاده می‌شود:

۱. رادیواکتیو
۲. نشانگرهای وابسته به آنزیم

۴،۲،۱) رادیواکتیو:

برهمکنش Ag-Ab می‌تواند با پروتئین A استاف اورئوس متصل شده به I^{125} (۱۹) یا پروتئین استرپتوکوک G متصل به I^{125} (۲۰) و سپس اوتورادیوگرافی آن متصور شود. پروتئین A رادیولیبل شده به Ab اولیه متصل می‌شود و این Ab به آنتی‌ژن اختصاصی خود که روی غشا، بلات شده متصل می‌شود.

۴،۲،۲) نشانگرهای وابسته به آنزیم:

آشکارسازی با استفاده از آنتی‌بادی‌های لیبل شده با آنزیم تا پیش از ظهور روش‌های کمی‌لومینسانس یک روش پرطرفدار بوده است. معمولاً Horseradish peroxidase یا Alkalin phosphatase متصل شده به آنتی‌بادی (۲۱) با رنجی از سوبستراهای محلول که تولید محصولات رنگی نامحلول را می‌کنند استفاده می‌شود. نقطه ضعف این روش آن است که نمی‌توان نتایج کمی (quantity) را به دست آورد و همچنین نقطه ضعف دیگر آن کنتراست پایین بین رنگ و غشاء می‌باشد.

۴،۲،۳) آشکارسازی با طلا:

پروتئین A متصل به ذرات طلا بمنظور آشکارسازی کمپلکس‌های ایمنی روی Western blot استفاده می‌شود (۲۲)، بنابراین به آن Golden blot می‌گویند. آشکارسازی با این روش قابل مقایسه با روش Radiolabeling است.

References:

1) E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975) 503–517.
2) J.C. Alwine, D.J. Kemp, G.R. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977) 5350–5354.
3) H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 4350–4354.
4) W.N. Burnette, Anal. Biochem. 112 (1981) 195–203.
5) E. Harlow, D. Lane, Immunoblotting, in: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1988.pp.471-510.
6) J. Renart, J. Reiser, G.R. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979)3116–3120.
7) K.B. Elkon, P.W. Jankowski, J.L. Chu, Anal. Biochem. 140 (1984)208–213.
8) W. Gibson, Anal. Biochem. 118 (1981) 1–3.
9) J.M. Gershoni, G.E. Palade, Anal. Biochem. 131 (1983) 1–15.
10) B.T. Kurien, R.H. ScoWeld, J. Immunol. Methods 205 (1997) 91–94.
11) H. Chen, G.D. Chang, Electrophoresis 22 (2001) 1894–1899.
12) M. Peferoen, R. Huybrechts, A. De Loof, FEBS Lett. 145 (1982) 369–372.
13) F. Lasne, J. Immunol. Methods 253 (2001) 125–131.
14) G. Lowe, J. Neurosci. Methods 90 (1999) 117–127.
15) G.I. Cassab, J.E. Varner, J. Cell Biol. 105 (1987) 2581–2588.
16) R.F. Pont-Lezica, J.E. Varner, Anal. Biochem. 182 (1989) 334–337.
17) G. Reese, D. Schmechel, R. Ayuso, S.B. Lehrer, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 756 (2001) 151–156.
18) C. Merril, in: A. Chrambach, M. Dunn, B. Radola (Eds.), Advances in Electrophoresis, vol. 1, VCH, Weinheim, Germany, 1987, pp. 111, 2000.
19) R.L. Dimond, W.F. Loomis, J. Biol. Chem. 25 (1976) 2680–2687.
20) D.R. Harper, H.O. Kangro, R.B. Heath, J. Med. Virol. 25 (1988)387–398
21) D.A. Knecht, R.L. Dimond, Anal. Biochem. 136 (1984) 180–184.
22) D. Brada, J. Roth, Anal. Biochem. 142 (1984) 79–83.