

## Western Blot

### Western Blot

#### ÖZET

Western Blot (WB) tekniği, herhangi bir örnekten istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için moleküler biyolojide kullanılan eski ve güvenilir bir yöntemdir. Proteinlerin uyarılara karşı verdiği yanıtların araştırılmasında, protein ifadesinin var-yok ya da artmış-azalmış olarak değerlendirilmesinde, hücre spesifik protein izoformlarının belirlenmesinde, genetik hastalıkların ortaya çıkışından sorumlu proteinlerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir metottur. Yapılan bu derlemede, WB tekniğinin prensibi, protokolü ve virolojide kullanımını hakkında bilgi verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metot, Viroloji, Western Blot,

#### ABSTRACT

The Western Blot technique is an old and reliable method used in molecular biology to uniquely detect a single protein from any sample. It is a frequently used method for investigating the responses of proteins to stimuli, evaluating protein expression as either absent or increased-decreased, determining cell specific protein isoforms and determining proteins responsible for the occurrence of genetic diseases. In this composition, information has been provided about principle, protocol and use of Western Blot technique in virology.

**Keywords:** *Unio terminalis*, nacre, pearl pouch, mantle, graft

## GİRİŞ

Blotting (blotlama), bir karışımdaki moleküllerin varlığını ölçmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknik ile çeşitli ayırım ve tespit yöntemleri kombine edilerek, hücrelerin farklı moleküllerinin sentezi belirlenir, antijenleri identifiye edilerek analizi yapılabilir. Çeşitli tipleri olan blotlama; teknik yönden üç kısımda incelenir,

### Southern blot

Genomik DNA (gDNA) restriksiyon enzimleriyle kesilerek, fragmentlerine ayrılır. Bu fragmentler büyüklüklerine göre agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayrıldıktan sonra, blot yöntemi ile de filtreye geçirilir. Bölgeye özgü prob (radyoaktif veya diğer tespit edilebilir bir iz ile işaretlenmiş olan; klonlanmış bir DNA veya RNA molekülüdür. Bu moleküller hibridizasyon ile onun komplementer (eş) dizisinin bulunmasında kullanılır), yalnızca kendisine tümleyici bazıları içeren DNA fragmentleriyle hibridize olur ve bu da filtre üzerine uygulanan otoradyografi işlemiyle bantlar üzerinde görünür hale getirilir (Schlickeiser & Pleyer, 2007).

#### How to cite this article

Ashm, HP., Bulut O. (2021). Western Blot. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 6(1), 45-56. <https://doi.org/10.31797/vetbio.799660>

### Review Article

Hatice Pelin ASLIM<sup>1a</sup>

Oya BULUT<sup>1b</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology,  
Faculty of Veterinary  
Medicine, Selcuk University,  
Konya, Turkey

#### ORCID-

<sup>a</sup>[0000-0001-9160-1255](https://orcid.org/0000-0001-9160-1255)

<sup>b</sup>[0000-0002-2407-7390](https://orcid.org/0000-0002-2407-7390)

#### Correspondence

Hatice Pelin ASLIM

[hpelinucan@gmail.com](mailto:hpelinucan@gmail.com)

#### Article info

Submission: 24-09-2020

Accepted: 02-01-2021

Online First: 19-02-2021

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a  
Creative Commons Attribution 4.0

International License



## Nothern blot

m(RNA) ya da virus RNA'sının saptanması amacıyla kullanılır. Test; RNA-DNA ya da RNA-RNA hibridizasyonu oluşturarak yine filtre üzerine otoradyografi yapılarak gerçekleştirilir (Schlickeiser & Pleyer, 2007).

## Western blot

WB hücre ve moleküler biyolojide kullanılan çok önemli bir tekniktir. WB tekniği hücrelerden ekstrakte edilmiş proteinlerin kompleks karışımından spesifik proteinlerin identifiye edilmesinde kullanılan bir teknik olup üç temel adımdan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla, (1) farklı boyutlara sahip olma prensibine dayanılarak yapılan ayırım, (2) katı bir faza (membrana) aktarım, (3) görünür hale getirmek için uygun birincil ve ikincil antikorları kullanarak hedef proteini işaretlemedir (Şekil 1) (Memelink vd., 1994).

Immüno blotlama olarak da adlandırılan WB tekniği, belirli bir protein veya protein profilini analiz etmeye yarayan yüksek hassasiyetli ve yarı kantitatif (semi-quantitative) moleküler bir tekniktir (Kurien & Scofield, 2006).

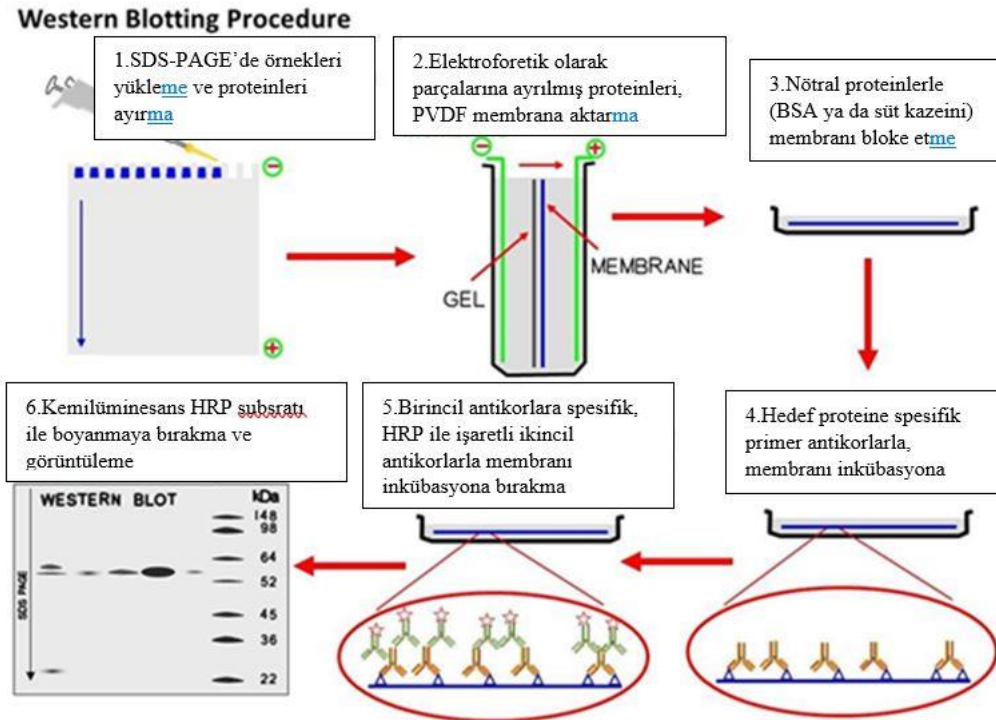
WB tekniği, ilk kez 1970 yılında Ulrich Laemmli tarafından poliakramid jelde

elektriksel güç vasıtasıyla molekül ayırım prensibi kullanılarak geliştirilmiştir. Bu yüzyılın sonunda, Towbin (1979) proteinlerin poliakramid-üre jelden nitroselüloz membranlara transferi tanımlamıştır. İki yıl sonra Burnette, poliakramid jel ve sodyum dodesil sülfat (SDS-PAGE) kullanılan WB tekniğini bildirmişlerdir. Günümüzde WB, enfeksiyöz, otoimmün, romatizmal ve onkolojik hastalıkların teşhisi için biyomedikal alanda anahtar bir teknik haline gelmiştir (Martínez-Flores vd., 2017).

## TEKNİK

### Protein ekstraksiyonu ve hücre lizisi

WB, hayvansal ve bitkisel dokulardan, hücre kültürlerinden, bakterilerden ve mayalardan proteinleri belirleyebilen çok yönlü bir tekniktir. Sonuçları düzgün bir şekilde elde etmek için, mekanik ve kimyasal metotlarla yapılabilen iyi bir protein ekstraksiyonu gereklidir. Aşındırıcı kullanarak yapılan sonikasyon, cam veya metal boncuklarla yapılan homojenizasyon gibi yöntemler en çok kullanılan mekanik metotlardır (Martínez-Maqueda vd., 2013).



Şekil 1. Western Blot prosedürü (CUSABIO 2018)

Kimyasal metotlar; proteinleri çözdürme yeteneğine sahip tamponların kullanımını içerir. Bu tamponlarda sodyum dodesil sülfat (SDS), deoksikolat ve setil trimetilamonyum bromür (CTAB) gibi iyonik deterjanlar mevcuttur. Ayrıca iyonik olmayan veya zwitteriyonik kimyasallar gibi başka deterjanları kullanmak da mümkündür ve seçim, istenen ekstraksiyon verimliliği ile litik etkinin hızına bağlıdır. Örneğin; SDS saniyeler içinde hücreyi lize edebilir ancak proteinleri de denatüre edebilir. Triton X-100, protein denatürasyonu veya protein kompleksinin parçalanmasından sakınarak; hücreleri düzgünce ve yavaşça lize edebilen iyonik olmayan bir deterjandır. Bu metot, protein yapısı veya protein aktivitesini içeren testler için tavsiye edilir. [(3-kolamidopropil) dimetilamonyum], -1-propansülfonat gibi zwitteriyonik deterjanlar çözünmüş proteinin yükü ya da net yük etkilenmeden kullanılabilir. Proteinleri çözdürmedeki verimliliği açısından en çok kullanılan tamponlardan biri, proteazın ticari bir inhibitörü, pH 7.5 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, %0,5 sodyum deoksilat, %0,1 SDS ve 5 mM EDTA içeren radyoimmünopresipitasyon testi tamponu (RIPA)'dur. Kolon kanseri hücre hattı HT-29'da bu içerikler sitoplazmik proteinleri çözerek yüksek verimlilik gösterir (Flores ve ark 2017). RIPA'ya ilaveten, Tris-Triton (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 Triton X-100, %10 gliserol, %0,1 SDS, %0,5 deoksilat) ve 20 mM Tris-HCl pH 7.5 gibi sitoplazmik proteinlerin ekstraksiyonu için tamponlarda vardır. Lizis tampon solüsyonlarına ilave edilen proteaz inhibitörlerinin kullanım amacı protein yapılarının korunmasıdır. Sonuç olarak, lizis işleminden sonra alt-hüresel fraksiyonlar diferensiyel santrifüjlerle ayrılır; tortuda membran proteinlerini, süpernatantta çözünen proteinleri elde etmek mümkündür (MacPhee vd., 2010; Jensen, 2012).

### Protein miktarı

Elektroforez işleminden önce; protein konsantrasyonlarını belirlemek ve jelin kuyularında bulunan miktarı homojenize etmek için, protein içeriği miktarının belirlenmesi gereklidir. Çok fazla proteinin olması testin yanlış sonuç vermesine sebep olur. Proteinlerin

nicelleştirilmesi için farklı metotlar vardır. En çok kullanılanlar Lowry, Bradford ve bisinkoninik asit (BCA)'tir. Bu kalorimetrik testler, bazı protein aminoasitlerinin farklı reaktiflerle reaksiyona girdiği zaman, şekillenen renk değişimine dayanır (Sapan vd., 1999).

### Lowry protein testi

Bu metot Follin reaktif ve bakırın kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. 750 nm dalga boyunda tespit edilir ve renk yoğunluğu protein konsantrasyonunu verir (Martínez-Flores vd., 2017).

### Bradford protein testi

Bu yöntemde; proteinlere bağlanabilen ve 465-595 nm dalga boyunda belirlenebilen renk değişimine sebep olan "Coomasie Brilliant Blue" boyası kullanılır (Martínez-Flores vd., 2017).

### Bisinkoninik testi

Bisinkoninik asit (BSA) ile protein testi oldukça yüksek duyarlılığa sahiptir. BSA olarak bilinen; yüksek duyarlılıkla  $Cu^{2+}$  iyonlarını tespit edebilen bir reaktifin varlığında,  $Cu^{2+}$  iyonlarıyla proteinlerin reaksiyonunu içerir. Proteinlerin makromoleküler yapıları ve dört spesifik peptidleri (sistin, sistein, triptofan ve tirozin); 562 nm dalga boyunda belirlenebilen örneklerin rengindeki, mora dönüşten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Martínez-Flores vd., 2017).

1. Soğuk PBS eklenerek hücre kültürü şişesinde hücreler yıkanır ve nazikçe sallanır. PBS uzaklaştırılır (öneri: doku kültürü tabağı buzun üstünde tutulmalıdır).
2. Tekrar PBS eklenir ve hücreleri yüzeyden kaldırmak için bir hücre sıyrıcı kullanılmalıdır. Karışım mikrosantrifüj tüplerinde pipetlenir.
3. 1500 rpm'de santrifüj işlemi uygulanır ve süpernatant uzaklaştırılır.
4. 20 µL taze proteaz inhibitör karışımı ile 180 µL soğuk hücre lizis tamponu (Tris-HCl çözeltisi, üre, SDS, gliserol, β-merkaptotanol, bromfenol mavisi) eklenir. Öneri: eğer protein konsantrasyonu yeterince yüksek değilse, proteaz inhibitör karışımının daha yüksek konsantrasyonda eklenmesi ve prosedürün tekrarlanması tavsiye edilir).

5. Buzda 30 dk inkübasyona bırakılır ve sonra +4°C'de 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak lizat (hücre duvarı veya hücre zarının parçalanması ile açığa çıkan hücre içeriği) elde edilir.

6. Yeni bir tüpe süpernatant (ya da protein karışımı) aktarılırak -20°C ya da -80°C'de dondurularak ya da buz içerisinde muhafaza edilir.

7. Spektrofotometrik olarak protein konsantrasyonları ölçülür.

### Örnek Hazırlama

1. Konsantrasyon = kütle/hacim

Her gözde 50 µg olacak şekilde protein ekstralarının hacmi belirlenir.

2. Numuneye 5 µL numune tamponu eklenir ve iki kez damıtılmış distile su kullanılarak, her şeritteki hacim eşit hale getirilerek iyice karıştırılır (öneri: şerit başına toplam 15 µL tavsiye edilir).

3. Numuneler 100°C'de 5 dk ısıtılır. Böylelikle proteinler primer yapısına dönüşür (Mahmood & Yang, 2012).

### Jel elektroforez

Proteinleri ayırmak için kullanılan birkaç metot vardır, bunların çoğu; çözünürlüğü geliştiren bir nişasta jeli olan selüloz asetat kâğıdı içerir. Fakat bunların gözenek boyutu üzerinde kontrol sağlayamadığı belirlenmiştir. Son zamanlarda poliakramid jeller, akrilamid (%T olarak anılır) ve bisakrilamid (%C olarak anılır) yüzdesinin düzenlemesi sayesinde gözenek büyüklüğünü kontrol etmek için kullanılmaktadır. Akrilamidin daha yüksek bir yüzdesiyle (%10-20 T) gözenek büyüklüğü azaltılır ve jel düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (50 kDa'den küçük), ayrılması için ideal hale getirilir. Akrilamidin daha düşük yüzdesine sahip jeller (<%10 T) daha yüksek molekül ağırlığına sahip (100 kDa'den daha büyük) proteinleri ayırmak için tavsiye edilmektedir. Amonyum persülfat ve tetrametilendiamin (TEMED) ilavesi, akrilamid polimerizasyonunu hızlandıran serbest radikaller oluşturur. Poliakramid jeller için olan tamponların çok çeşitli oluşu, proteinleri ayırmak ve tanımlamak için hızlı bir metot sağlar (Martínez-Flores vd., 2017).

### Jel tipleri

Poliakramid jeller sayesinde proteinlerin ayrılması denatüre edici koşullar altında gösterilebilir. Denatüre etmeyen poliakramid jeller (ND-PAGE) protein yapısını üç boyutlu şekilde korur ve ayrılma elektriksel yük, boyut ve şekle dayalı olarak şekillenir. Protein yapısını korumak için; indirgeyici ve denatüre olmayan, pH aralığı 8.3-9.5 olan tri-glisin ya da 7.0-8.5 pH'da tris-borat ve 7.2-8.5 pH'da tris-asetat gibi tampon solüsyon kullanılır. Aksine, denatüre eden poliakramid jellerde (SDS-PAGE) protein yapıları, bir anyonik deterjanın (SDS), bir indirgeyici ajanın (beta-merkaptotanol) ve ısı'nın kombinasyonunu kullanarak peptidlere ayrılmıştır. Beta-merkaptotanol ve ısı, disülfid köprülerini (Cys-S-S-Cys) kırar ve polipeptid zincirlerinde olan tiol gruplarına (Cys-SH) ayrıştırır, SDS ise proteinlere negatif yük sağlar ve bağlar (Martínez-Flores vd., 2017).

### Jel kalıbının oluşturulması

İki cam, aralarına iki çubuk (Spacer) yerleştirdikten sonra arka arkaya konarak düzeneğe yerleştirilir. Altan sızıntı olmaması için aşağı doğru bastırılır.

Ayrıştırıcı jel (seperating gel) karışımı hazırlandıktan sonra, pipetle hızlıca ve dikkatli bir şekilde kenarından kalıpların arasına dökülür, bu esnada kabarcık oluşmamasına dikkat edilir. Bu işlem çok hızlı yapılmalıdır çünkü, katalizörler eklendikten sonra jel solüsyonu 5-10 dakika içerisinde tamamen donmaktadır. Üst kısmın düzgün bir yüzey oluşturması ve hava almaması için 0,5 cc kadar "Bütanol veya İzopropopranol (alkol)" yavaşça eklenir. Jel iyice polimerleştikten sonra konan alkol geri boşaltılır ve üzerine istifleme jeli (stacking gel) hazırlanarak aynı şekilde dökülür. Döker dökmez, son olarak "tarak (comb)" yerleştirilerek jel polimerleşmeye bırakılır, böylece "kuyular (well)" oluşturulmuş olur (Kurien & Scofield, 2009).

### SDS-PAGE

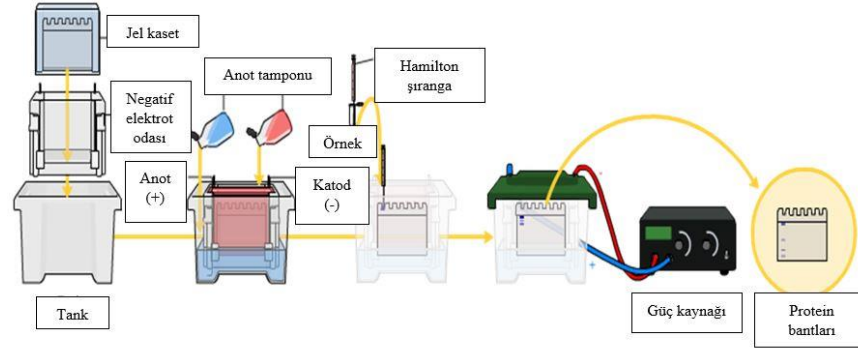
#### SDS

Oligomerik proteinleri alt birimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan polipeptidlere

bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu oluşan kompleks polipeptidlerin negatif yüklü kalmasını sağlar (Anonim, 2020a).

## PAGE

Elektriksel çekim kuvveti kullanılarak proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan ortama denir (Schägger, 2006).



Şekil 2. SDS-PAGE şeması (Anonim, 2009) SDS-PAGE

### Proteinlerin jel üzerinde görünür hale getirilmesi-Jelin boyanması

- 1- Jel sistem üzerinden çıkartılır.
- 2- Jel üzerindeki proteinler boyanmadan önce jel üzerine sabitlenmelidir (fiksasyon).
- 3- Fiksatiften geçirilen jel hafif distile su ile yıkandıktan sonra boyama işlemine alınır (%40 metanol, %10 asetik asit içeren bir çözelti).
- 4- Coomassie brilliant blue (CBB) ile boyama (etanol, asetik asit ve Coomassie parlak mavisi) yapılarak işlem tamamlanır (Mahmood ve Yang, 2012).

### Devamlı ve devamsız tampon sistemleri

Tampon türlerinin bağlı olduğu iki elektroforez sistemi vardır. Birincisi Weber ve Osborn'un sürekli tampon sistemleri; ki bunlarda, aynı çalışan tampon, tek ayrıştırıcı jel ve tankta kullanılır İkincisi Laemmli'nin sistemidir ve iki tip jel kullanılır. Bunlar; %4'lik akrilamid ile yapılan büyük gözenekli istifleme jeli (stacking gel) ve istifleme jelinde polimerizasyon yapan küçük gözenekli çözücü jel (resolving gel)'dir. Süreksiz sistemde, her jelde kullanılan tamponlar farklıdır ve bunlar pH ve iyonik güce göre değişir (Martínez-Flores vd., 2017).

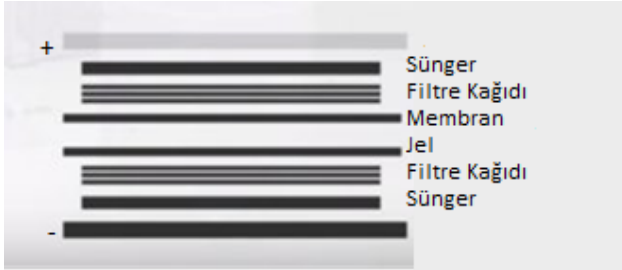
### Elektrotransfer (proteinlerin membrana aktarılması)

Bu teknikte, proteinler; membran gibi dirençli katı bir desteğe aktarılmalıdır. Böylece proteinler kolaylıkla spesifik antikorla

immünodetection sürecinde ele alınabilir ve kullanılabilir. Membran jel ile pozitif elektrot arasına yerleştirilir ve proteinler, jeldeki yerlerine göre membrana tutunur. Transfer, yarı-kuru veya ıslak sistemlerden biri vasıtasıyla gösterilebilir (Şekil 2). Transferin her iki tipinde de farklı tamponların kullanımı tavsiye edilir, örneğin; Tris-glisin'in; %20 methanolla veya methanolsüz, 8.3-9.2 pH'da ve %0,025-0,1'lik konsantrasyonda SDS'le, 9.9 pH'da bikarbonat tamponuyla ya da 1x TBE (Tris-borat 90 mM, EDTA 1 mM) ile %0,025-0,1'lik SDS ile kullanımı gibi farklı konsantrasyonları mevcuttur. %20 methanolla, %0,1 SDS içeren 8.3 pH'daki Tris-glisin tamponu en çok kullanılan tampondur. Metanolsüz tampon SDS-PAGE jel için evrenseldir. Methanol iki ana göreve sahiptir. Bunlar; SDS'nin proteine ayrışmasını tetiklemesi ve SDS'nin varlığında membranlarda proteinlerin adsorbsyonunu önemli derecede geliştirmesidir. Fakat bu etkiler proteinler arasında değişkenlik gösterebilir. Transferde sıklıkla kullanılan destekler; sonucu etkileyebilecek özelliklere sahip nitroselüloz ya da poliviniliden diflorid (PVDF) gibi mikro gözenekli yüzeylerdir. Nitroselülozun aksine PVDF membranı daha güçlüdür ve proteinlere daha iyi bağlama sağlar. Yinede, nitroselüloz membranda daha az non-spesifik bağlanmalar gözlenir. Nitroselüloz membranla karşılaştırıldığında, PVDF membranlar yüksek hidrofobik yapıya sahip oldukları için işlem öncesi metanol ya da etanol

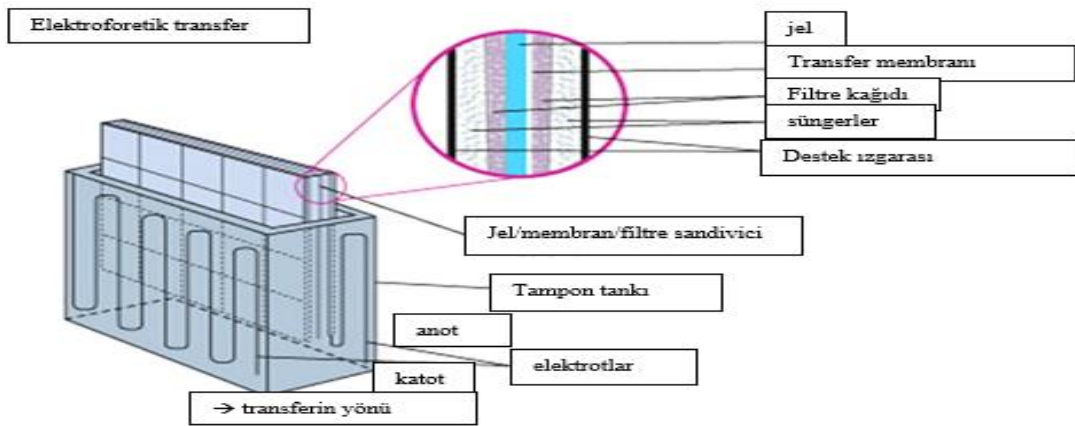
ile nemlendirilmelidir ve onların herhangi bir sürfaktanı yoktur. Son zamanlarda, non-spesifik bağlanmaları azaltmak için düşük otofloresans membranlar kullanılmaktadır (Martínez-Flores vd., 2017).

Elektroforez gerçekleştirilmeden önce, örnekler yükleme tamponu (loading buffer) olarak bilinen (bu tampon herhangi bir sızıntıdan kaçınmak ve kuyucuklara örnekleri yüklemeye olanak sağlamak için örneklere ağırlık, yoğunluk ve renk sağlamayı amaçlar) bir tamponda 70-95 °C arası bir sıcaklıkta ısıtılır. Bu tampon 6.8 pH'da 62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% gliserol, 100 mM dithiothreitol (DTT) ve %0.01 bromofenol mavisi içerir. Bu içerikler arasında, DTT ve betamerkaptoetanol disülfid bağlarını kıran, indirgeyici ajanlardır. Öte yandan, SDS; primer yapıya sahip proteinlerin denatürasyonunu sağlar ve onları negatif yükle kaplar, böylece proteinlerin molekül ağırlığına göre ayrılması mümkün hale gelir. Buna ek olarak, indirgeme ve denatürasyon, antikorun birleşme bölgesine ulaşmasına izin verir. Jelde, düşük molekül ağırlığı (MW)'na sahip proteinler, dibeye göç eder ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip olanlar yukarıda kalır (Martínez-Flores vd., 2017).



Şekil 3. Elektroforetik Transfer Sandivici

WB “stacking (istifleme)” ve “seperating (ayırıştırıcı)” denilen iki farklı agoroz jel tipi kullanılır. Üst kısımda bulunan istifleme jeli biraz asidiktir (pH 6.8) ve proteinin zayıf şekilde ayrıldığı ince, ancak keskin bantların oluşmasına olanak sağlayan gözenekli bu jel düşük akrilamid konsantrasyonuna sahiptir. Ayırıştırıcı ya da “resolving” denilen alt kısımda yer alan jel ise esastır (pH 8.8) ve jelin gözeneklerini darlaştıran poliakramidin daha yüksek konsantrasyonuna sahiptir. Daha küçük proteinler, daha büyük proteinlerden daha kolay ve hızlı bir şekilde taşındığı için, protein bu jelde boyutları vasıtasıyla daha çok ayrılır. Jel üzerine yüklendiğinde proteinler negatif yüke sahiptir çünkü ısıtılarak denatüre edilirler ve voltaj uygulandığı zaman pozitif elektrota doğru hareket edeceklerdir. Bu teknikte jel, protokol bölümünde açıklanan solüsyonlar kullanılarak iki cam ya da plastik plaka arasına dökülerek hazırlanır. Numuneler ve bir marker her bir kuyucuğa yüklenir ve boş kuyucuklar numune tamponuyla yüklenir. Daha sonra jel tankı güç kaynağına bağlanır ve çalıştırılır. Protein karışımının ayrılmasından sonra membrana transfer edilir. Transfer jelin yüzeyine dik bir elektrik alan kullanılarak yapılır; bu da proteinlerin jelin dışına çıkmasına ve membranın üzerine geçmesine neden olur. Transferin bu tipine “elektroforetik transfer” denir. Bunun için Sünger-Filtre kâğıdı-Jel-Membran-Filtre kâğıdı-Sünger sandivici oluşturulur ve transfer aparatına yerleştirilir (Şekil 3, 4) (Mahmood & Yang, 2012).

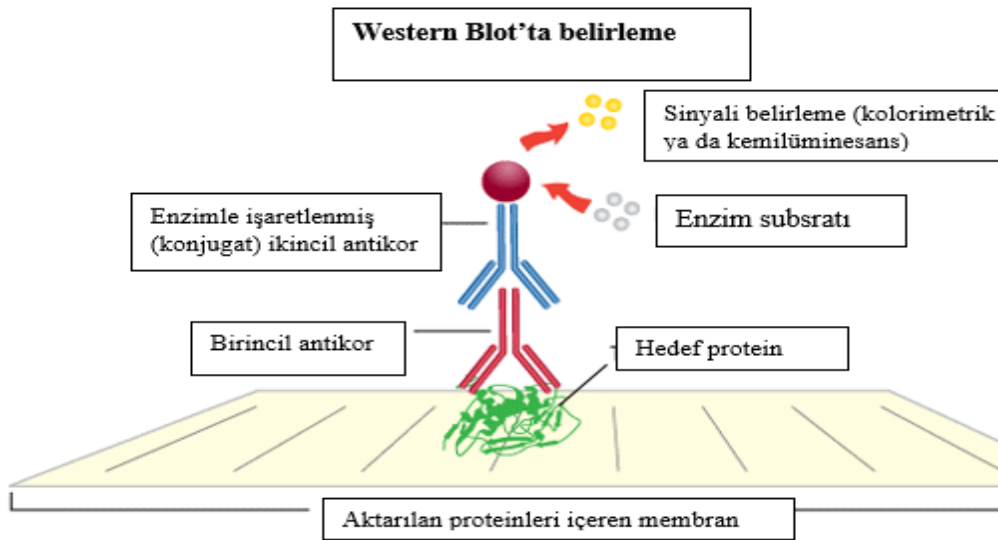


Şekil 4. Elektroforetik Transfer

## Blokaj ve antikor inkübasyonu

Blokaj, membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır. Blokaj, dilue protein çözeltisi içinde (BSA-Bovin Serum Albumin veya Yağsız Süt tozu-TBST karışımı) oda sıcaklığında bir saat çalkalayıcıda bekletilerek gerçekleştirilir. Yağsız Süt tozu-TBST solüsyonundaki proteinler membran üzerinde, hedef proteinin bulunmadığı tüm bölgeyi kaplar. Böylece kullanacağımız primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanmaları sağlanır. Bağlanmayan primer antikor yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, konjuge enzim ya da boya içeren

sekonder antikor ile inkübasyona bırakılır. Primer antikora bağlı sekonder antikor kompleksi oluşur (Mahmood & Yang, 2012). Primer antikorun elde edileceği tür, örnek türden farklı olmalıdır. Bu, sekonder anti-immüoglobulin antikorunun numunedeki endojen immüoglobulinlerle çapraz reaktivasyonunu önlemek içindir. Örneğin, bir fare proteini üzerinde çalışılacaksa, fare dışındaki bir türden elde edilmiş bir birincil antikor seçilmelidir. Tavşanda oluşturulan primer antikor ve anti-tavşan sekonder antikoruna uygun bir seçim olacaktır. İkincil antikorlar, kullandığımız birincil antikorun konakçı türlerine karşı olmalıdır (Anonim, 2020b).



Şekil 5. Western Blot'ta hedef proteinin belirlenmesi

## Proteinlerin *immünodetectionu*

### Kemilüminesans *immünodetection*

Kemilüminesans tarafından yapılan *immünodetection*, ışıldayan bir bileşikle (luminol) reaksiyonu sonucunda ışık biçiminde enerji yayabilen, peroksidaz ya da fosfotaz enzimleri kullanır. Bu şekilde antijen-antikor bağlanmasının belirlenmesine olanak sağlanmış olur. Işık reaksiyonu otoradyografik filmde geliştirilir ve son zamanlarda protein ilgisini belirlemek için dijital kamera ile dijital olarak yakalamak için kullanılmaktadır (Şekil 5) (Martínez-Flores vd., 2017).

### Floresans ile *immünoalgılama*

Bu metotta ikincil antikorlar bir floresan marker veya floroforla birleşir ve doğrusal bir algılama sinyali oluştururlar, uyarıldıklarında ışık

yayarlar. Farklı dalga boylarının filtrelerine sahip bir dijital kamera, yayılan ışığı belirler. Kemilüminesans tarafından ortaya çıkan görüntülere benzerdir ve ortaya çıkan görüntüler aynı prensiple analiz edilir. Fakat kemilüminesans immüno algılama metodunun aksine, sonuç sinyalinin stabilitesinden dolayı niceldir (Martínez-Flores vd., 2017).

## VİROLOJİK ÇALIŞMALARDA WESTERN BLOT'IN KULLANIMI

Antiserumların antijen spesifikliğinin belirlenmesine izin verebilecek bir tekniğe duyulan ihtiyaç, 1970'lerin sonuna doğru WB tekniğinin keşfine yol açmıştır (MacPhee, 2010). Bu metotla etkene ait proteinlerin bir membrana bağlanmadan önce bir jel üzerinde ayrıldığı için spesifik proteinlere karşı antikor

yanıtı değerlendirilebilmektedir. Böylelikle, diğer testlerin sonuçlarını doğrulamayı sağlar. WB, bireysel patojen proteinlerine karşı antikor tespit ettiğinden, diğer analizlerden daha spesifiktir. Böylelikle antikorun spesifik olmayan proteinlerle, yanlış pozitif sonuçlar vermesinde kaçınılır (Kennedy vd., 2005). WB, virusa spesifik antikor yanıtını tespit etmek için yapılan *lentivirus*, *herpesvirus*, *coronavirus poxvirus* ve *adenovirus* gibi birçok farklı virus familyasıyla yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Whetstone vd., 1991; Martins vd., 2001; Woo vd., 2004; Goldberg vd., 2008; Li vd., 2011).

Streckert vd. (1986) yaptıkları bir çalışmada; tavşanların SV40 virusunun VP2 ve VP3 proteinlerinin karboksi-terminal bölgesine tekabül eden Arg-Asn-Arg-Ser-Ser-Arg-Ser dizisinin sentetik bir heptapeptid aşısı ile aşıladıklarını bildirmişlerdir. Sentezlenen antikorlar, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ve WB analizinde viral proteinleri tanımıştır. Antipeptid antikorlarının spesifitesinin normal antikorlardan yüksek olduğu protein elektroblot analizi ve karşılaştırma testleri ile ortaya koymuşlardır. Antikorların immünofloresans testi ile enfekte hücrelerdeki VP2 ve VP3'ü tanıdığını fakat virionlar ile hiçbir etkileşim gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Schaller vd. (1999) yaptıkları bir çalışmada; sığır ve koyun hastalıklarına özgü, proteaza dirençli prion proteini (PrPSc) tespit etmek için Prionics Western Blotting (PWB) prosedürünün hassasiyetini, özgüllüğünü ve güvenilirliğini test eden birkaç bağımsız çalışmanın sonuçlarını bildirmişlerdir. PWB tekniği ile BSE ile enfekte sığırların, klinik olarak normal hayvanlardan ya da BSE ile ilişkili olmayan nörolojik hastalıklı sığırlardan ayrımı ile ortaya konulmuştur. Genel olarak, bu tekniğin çok yüksek duyarlılığa, özgüllüğe ve güvenilirliğe sahip olduğu ifade edilmiştir. Doğru bir teşhis için, hayvanların beyin bölgesinin doğru örneklenmesinin ve protein ekstraksiyonu için kullanılan yöntemin ne kadar önemli bir faktör olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlarla, hızlı bir teşhis aracı olarak subklinik hayvanları tanımlanmada PWB prosedürünün güvenilir olduğunu belirtmişlerdir.

Sosnovtsev ve Green, (2000) yaptıkları çalışmada; Kedi calicivirus (FCV) virionlarında molekül kütlesi 8.5 ve 15.5 kDa olan iki küçük protein tespit etmişlerdir. Sekans analizi sonucunda 8.5 kDa proteininin N-terminal dizisinin, FCV genomunun open reading frame 3'ü (ORF3) tarafından kodlandığını göstermişlerdir. 15.5 kDa proteininin N-terminal dizisinin ise FCV ORF1 poliproteininin 961-980 amino asitlerine karşılık geldiğini ve calicivirus VPg (viral protein genome-linked)'nin genomik konumuna eşlendiğini belirtmişlerdir. WB analizlerinde, VPg'nin N-terminal ucundaki 20 aminoasite veya ORF3'e karşı oluşan antikorların, saflaştırılmış FCV virionlarında ve FCV ile enfekte hücrelerde mevcut olan proteinlerle reaksiyona girdiğini belirlemişlerdir. Virion proteinlerine dahil edilen radyoaktivitenin karşılaştırmalı bir analizinin, ORF3 proteininin muhtemelen virion başına bir ya da iki kopyasının olduğunu belirtmişlerdir. Virionlarda bulunan ORF3 proteinin hareketliliğinin, FCV ile enfekte olmuş hücrelerde bulunan veya bakteriler kullanılarak eksprese edilen ORF3 proteininin hareketliliğine benzediği ifade edilmiştir. Bakteriyel ekspresyon sisteminde eksprese edilerek elde edilen saflaştırılmış ORF3 proteininin direkt N- ve C- terminal sekans analizi; bozulmamış, açılmamış terminallerin varlığını göstermiştir ve buda; SDS-PAGE'de hesaplanan ve görüntülenen kütleler arasındaki farkın, proteinin proteolitik işlenmesinden kaynaklanmadığını akla getirdiğini ifade etmişlerdir.

Minafra vd. (2000) yaptıkları bir çalışmada; Kaliforniya Grapevine rupestris stem-pitting-associated virus (GRSPaV) izolatının tüm genom sekans analizine dayalı olarak, uygun primerlerle GRSPaV'ın "*coat protein*" genini amplifiye etmişlerdir. Tavşanlardan antiserum elde etmek için *Escherichia coli*'de eksprese edilen rekombinant GRSPaV *coat protein*'ini antijen kaynağı olarak kullanmışlardır. Dot immunobinding veya WB yöntemiyle enfekte asma yaprak ekstratlarında tespit edilen virus çeket proteinini ile başarılı bir şekilde antiserum elde edilmiştir. Antiserum titresini WB'la 1:5.000 olarak tespit etmişlerdir.



Liu vd. (2001) yaptıkları bir çalışmada; klonlanmış circovirus DNA'sı ile bir domuz retina hücre hattının (VIDO R1) transfeksiyonundan sonra, enfeksiyöz domuz circovirus tip 2 (PCV2)'yi üretmişlerdir. Enfeksiyondan sonraki 24 saatte open reading frame 2 (ORF2) geni, ORF2 spesifik poliklonal antikor kullanarak WB ile belirlenmiş ve enfeksiyon boyunca giderek artmıştır. Dahası, ORF2 proteini saflaştırılmış PCV2 virusunda da tespit edilmiştir; bu, ORF2'nin PCV2 viral kapsidinin yapısal bir bileşeni olduğunu kanıtlar şeklinde ifade etmişlerdir.

He vd. (2004) çalışmalarında; şiddetli akut solunum sendromu (SARS) coronavirus enfeksiyonu için hızlı bir serolojik tanı kiti geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla kullanılacak antijenik bir determinanı tanımlamak ve insanlarda SARS coronavirus enfeksiyonu sırasında oluşan immun yanıtı incelemek için, nükleokapsid geninin tam uzunluğunu ve kesilmiş altı parçasını klonlayarak eksprese ettiklerini belirtmişlerdir. Daha sonra bölgeleri glutatyon S-transferaz etiketli rekombinant proteinler olarak saflaştırmışlardır. 33 SARS coronavirus pozitif serum, 66 negatif serum ve diğer hayvan coronaviruslarına karşı oluşan antikorları içeren bir antikor paneline karşı bu rekombinant proteinlerin reaktivasyonunu incelemişlerdir. SARS coronavirusuna karşı antikorları tespit edebilen güçlü bir nükleokapsid proteininin (N195) C-terminalinden ayrılmış bir amino asit parçası belirlediklerini bildirmişlerdir. N195 proteini ve tavuk, domuz ve köpek coronaviruslarına karşı oluşan antikorlar arasında, çapraz reaksiyon bulunmadığını ifade etmişlerdir. SARS coronavirusuna karşı oluşan antikorları tespit etmek için N195 proteini kullanarak geliştirdikleri bu WB tekniği ile 274 numune inceleyen araştırmacılar, bu testin spesifitesini ve sensitivitesini sırasıyla %98,3 ve %90,9 olarak ifade etmişlerdir. Sonuç olarak N195 proteininin, WB'ta antijen olarak uygun bir protein olduğu ve SARS coronavirus enfeksiyonunun saptanması için diğer muhtemel testlerde de kullanılabileceği belirtilmiştir.

Thiry vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada; Hepatitis E Virus (HEV)'unun serolojik analizi için 383 yaban domuzu, 189 alageyik ve 235

karaca serumu toplamışlardır. Alageyik'te %1 ve karacada %3 ve yaban domuzunda %34'lük bir seroprevalans bulmuşlardır. ELISA tarama prevalansını değerlendirmek için, WB analizleri yapılmış ve WB'a göre değişen ELISA spesifiteleri analiz etmişlerdir. Alıcı çalışma karakteristiği Receiver Operating Characteristic (ROC), eğrisine sahip olan ve referans test olarak kabul edilen WB testini, ELISA'nın CO noktasını (optimum kesimi) araştırmak için kullanmışlardır. Değişen ELISA spesifiteleri, WB'ye göre, yaban domuzunda HEV seroprevalansını analiz etmek için kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, yaban domuzunda, 69 serumdan 4'ü HEV RNA'sı için pozitif olarak tespit edilmiş ve bu sebeple yaban domuzunun, virusun konakçı rezervuarı olarak düşünülebileceğini ifade etmişlerdir.

Hassan vd. (2017) yaptıkları bir çalışmada; Sığır adenovirusu tip 3 (BAdV-3) E1 bölgesinin dizi analizi, diğer AdV'lerde gözlenmeyen yeni bir 155R ORF varlığını ortaya koymuşlardır. BAdV-3 ile enfekte olmuş hücrelerdeki 155R gen ürünleri; sekanslama ve 155R spesifik antikor kullanarak yapılan WB analizleri ardından Northern blot ve reverse transkriptaz PCR ile identifiye edilmiştir. 155R'nin, geç bir protein gibi görüldüğünü ve saflaştırılmış BAdV-3 partiküllerinde mevcut olduğunu bildirmişlerdir. 155R ORF'da bir (BAdV / 155R / mt1) ya da iki (BAdV / 155R / mt2) stop kodonuna sahip BAdV mutantlarının çoğalma kinetiği, BAdV-3'ünkiyle karşılaştırıldığında 155R'nin hücre kültüründe virüs replikasyonu için gerekli olmadığını belirtmişlerdir.

Siedler vd. (2017) çalışmasında, BoHV-1 ve BoHV-5'de yüksek oranda korunmuş bölgeler içeren gE'nin, bir kodon optimize sentetik dizisini, *Pichia pastoris*'te eksprese etmişlerdir. Ekspresyondan sonra, rekombinant gE (rgE) salgılanmıştır ve kültür ortamından saflaştırmışlardır. rgE'yi, BoHV-1 ve/veya BoHV-5 ile doğal olarak enfekte olan sığırlardan ya da deneysel olarak vahşi tip BoHV-5 ile enfekte edilmiş sığırlardan alınan serumları kullanarak WB ile araştırmışlardır. BoHV-5 gI/ gE/US9 marker aşısı ile aşılanmış sığırdan toplanan serumun, rgE'yi tanımadığını bildirmişlerdir. *P.pastoris*'te, rgE'nin ekspresyonu ile çok miktarda rgE üretimine olanak sağlandığı da bildirmişlerdir.

Böylelikle aşılınmış ya da doğal olarak enfekte olmuş sığırların birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılacak olan immünotestlerde, rGE'nin ekspresyonunun kullanılmasının uygun olduğunu ifade etmişlerdir.

Hemmatzadeh ve Kazemimanesh, (2017) yaptıkları bir çalışmada, dokuz adet Newcastle disease virus (NDV) ile enfekte numuneyi. embriyolu tavuk yumurtalarında çoğalttıktan sonra konsantre etmişler ve ultra- santrifüj işlemi ile saflaştırmışlardır. Daha sonra numuneleri, spesifik antikoları kullanarak %12,5 SDS-PAGE ve Western blotlama işlemine tabi tutmuşlardır. SDS-PAGE'de tüm velojenik ve aşı suşları aynı elektroforetik modeli göstermişlerdir. Tespit edilen bantların 15, 38, 46, 48, 53, 55, 68, 74 ve 220 kDa ağırlığında proteinler olduğunu bildirmişlerdir. WB analizinde mono-spesifik antikolar, 15, 38, 48, 55, 74, 220 kDa'luk viral proteinlere spesifik olarak ve 53 kDa'lık viral proteine ise non-spesifik olarak reaksiyona girmiştir. Sonuçta, spesifik anti-NDV antikolarlarının hemaglutinin-nöraminidaz ve füzyon gibi glikoproteinlerle spesifik olarak reaksiyona girdiğini, ancak nükleoprotein ve matriks protein gibi internal proteinlerine tepki vermediğini ifade etmişlerdir.

Jayne ve Field, (2015) yaptıkları bir çalışmada, toplamda 21 tür olmak üzere 464 yarasadan orofarengeal swap numunesi toplamışlardır. Domuzların Reston Ebolavirus (REST)'unu serolojik ve virolojik yönden incelemişlerdir. WB ile anti-RESTV antikolarını üç yarasada tespit etmişlerdir.

Melo vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada, SARS-CoV-2'nin MERS-CoV, SARS-CoV-1, insan parainfluenza virüsü 3 (HPIV3), solunum sinsityal virüsü (RSV) gibi diğer solunum virüsleri ile transkripsiyonel yanıtını karşılaştırmak için, enfekte olmuş hücrelerden poli (A) RNA toplamışlar ve viral yükü tahmin etmek için RNA sekanslama (RNA-seq) gerçekleştirmişlerdir. Bazı hücrelerde düşük enfeksiyon oranının görülmesinin viral reseptör olan ACE2'nin düşük ekspresyonunun bir sonucu olduğunu varsaymışlardır. Daha sonra yaptıkları WB analizlerinin RNA-seq verilerini doğruladığını ve SARS-CoV-2 nükleokapsid (N) ekspresyonunun sadece ACE2'ye sahip hücrelerde gerçekleştiğini ifade etmişlerdir.

## SONUÇ

Western Blot, temel araştırmalarda ve birçok klinik vakayı doğrulamak için kullanılan önemli bir tekniktir. WB diğer birçok immünolojik laboratuvar tekniklerinde elde edilemeyecek kadar değerli bilgiler kazanılmasını sağlar. Jel elektroforez aşamasında proteinler ağırlıklarına göre ayrıldığından ve spesifik olarak yönlendirilmiş bir antikor tarafından tespit edildiğinden, prosedür esas olarak bir hedef proteinin kimliğini doğrulamak üzerine çalışır. Spesifik bir proteinin varlığını hem büyüklüğüne göre hem de bir antikorun bağlanması yoluyla açıkça gösterebilme yeteneği sayesinde, hücrelerde protein ekspresyon seviyeleri değerlendirilebilir ve protein saflaştırma sırasında fraksiyonları izlenebilir. Benzer şekilde, bir hedef proteinin çeşitli dokulardan ekspresyonlarını karşılaştırmada veya belirli bir proteinin hastalığa veya ilaç tedavisine nasıl tepki verdiğini belirlemede önemli bir tekniktir. WB, hem araştırma hem de testlerin sonuçların doğrulanmasını sağlar. Gelecekteki çalışmalarda, WB antikor dizilerinden elde edilen sonuçların doğrulanmasında değer taşımaya ve proteomik araştırmalarda kullanıma uygun hale getirmeye devam edeceği ileri sürülebilir.

## TEŞEKKÜR / AÇIKLAMALAR

**Çıkar çatışması:** Yazarlar, bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

## KAYNAKLAR

- Anonim,** (2009). [Polyacrylamide gel electrophoresis.](https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide) <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide> gel electrophoresis Erişim tarihi: 27.07.2020
- Anonim,** (2020a, 27 Temmuz). Western blot. [https://en.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot#:~:text=SDS%20is%20generally%20used%20as,%2C%20negatively%2C%20or%20neutrally%20charged.&text=The%20gel%20electrophoresis%20step%20is,the%20cross%2Dreactivity%20of%20antibodies](https://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot#:~:text=SDS%20is%20generally%20used%20as,%2C%20negatively%2C%20or%20neutrally%20charged.&text=The%20gel%20electrophoresis%20step%20is,the%20cross%2Dreactivity%20of%20antibodies)
- Anonim,** (2020b, 27 Temmuz). Choosing a primary antibody or secondary antibody. <https://www.abcam.com/protocols/choosing-an-antibody>

- CUSABIO, (2018, 27 Temmuz 2020 ). Laboratory technical manual western blotting. Erişim adresi: [https://www.cusabio.com/protocols/Western Blotting \(WB\) Protocol.pdf](https://www.cusabio.com/protocols/Western%20Blotting%20(WB)%20Protocol.pdf)
- Flores, M.K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C.A., & López-Reyes, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigacion en Discapacidad*, 3, 128-137.
- Hassan, A.O., Vemula, S.V., Sharmal, A., Bangaril, D.S., Mishral, K.K., & Mitta, S.K. (2017). 155R is a novel structural protein of bovine adenovirus type 3, but it is not essential for virus replication. *Journal of General Virology*, 98, 749-753.
- He, Q., Chong, K.H., Chng, H.K., Leung, B., Ling, A.E., Wei, T., Chan, S.W., Ooi, E.E.I., & Kwang, J. (2004). Development of a Western blot assay for detection of antibodies against coronavirus causing severe acute respiratory syndrome. *American society for microbiology*, 11, 417-422.
- Hemmatzadeh, F., & Kazemimanesh, M. (2017). Detection of specific antigens of newcastle disease virus using an absorbed Western blotting method. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18, 92-96.
- Jayme, S.I., Field, H.E., Jong, C.D., Olival, K.J., Marsh, G., Tagtag, A.M., Hughes, T., Bucad, A.C., Barr, J., Azul, R.R., Retes, L.M., Foord, A., Yu, M., Cruz, M.S., Santos, I.J., Lim, T.M.S., Benigno, C.C., Epstein, J.H., Wang, L.F., Daszak, P., & Newman, S.H. (2015). Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats. *Virology Journal*, 12,107.
- Jensen, E.C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295, 369–371.
- Kennedy, M. (2005). Methodology in diagnostic virology. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 8, 7–26.
- Goldberg, T.L., Chapman, C.A., Cameron, K., Saj, T., Karesh, W.B., Wolfe, N.D., Wong, S.W., Dubois, M.E., & Slifka, M. (2008). Serologic evidence for novel poxvirus in endangered red colobus monkeys, Western Uganda. *Emerging Infectious Disease*, 5, 801.
- Kurien, B.T., Scofield, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38, 283-293.
- Smith, A.G., Jayaram, J, Johnson, C.B., Ellis, E.A., Vitha, S., Collisson, E.W., & Holzenburg, A. (2009). *Improved Protein Detection Using Cold Microwave Technology*. In: Protein blotting and detection methods and protocols. Ed. Kurien, B.T., Scofield, R. (pp. 533-544). Human Press, Oklohama City, OK, USA.
- Li, G., Kawashima, H., Ogoose, A., Ariizumi, T., Xu, Y., Hotta, T., Urata, Y., Fujiwara, T., & Endo, N. (2011). Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137, 1037-1051.
- Liu, Q., Suresh, K.T., & Babiuk, L.A. (2001). Nuclear Localization of the ORF2 Protein Encoded by Porcine Circovirus Type 2. *Virology*, 285, 91–99.
- MacPhee, D.J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61, 171-177.
- Mahmood, T., & Yang, P.C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal Medical Sciences*. 9, 429–434.
- Martínez-Flores, K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C.A., & López-Reyes, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigacion en Discapacidad*, 3, 128-137.
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J.Á. (2013). *Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion*. In: Proteomics in Foods. Ed: Toldra F., Nollet L.M.L., (pp. 21-50). Springer, New York, USA.
- Martins, T.B., Woolstenhulme, R.D., Jaskowski, T.D., Hill, H.R., & Litwin, C.M. (2001). Comparison of four enzyme immunoassays with a Western blot assay for the determination of type-specific antibodies to herpes simplex virus. *Microbiology and Infectious Disease*, 2, 272-277.
- Melo, D.M., Payant, B., Liu, W.C., Uhl, S., Hoagland, D., Moller, R., Jordan, T.X., Oishi, K., Panis, M., Sachs, D., Wang, T.T., Schwartz, R.E., Lim, J.K., Albrecht, R.A., & TenOever, B.R. (2020). Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*, 181(5), 1036-1045.
- Memelink, J., Swords, K.M.M., Staeheln, L.A., & Hoge, J.H.C. (1994). Southern, Northern and Western blot analysis. *Plant Molecular Biology Manual*, 1, 1-23.
- Minafra, A., Casati, P., Elicio, V., Rowhani, A., Saldarelli, P., Savino, V., & Martelli, G.P. (2000). Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPa V) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Vitis*, 3, 115-118.
- Sapan, C.V., Lundblad, R.L., & Price, N.C. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 99-108.

- Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveld, M., Heim, D., Oesch, B., & Moser, M. (1999).** Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathologica*, 98, 437–443.
- Schägger H. (2006).** *Tricine-sds-page*. *Nature Protocols*, 1, 1-16.
- Siedler, B.S., Roloff, B.C., Sa, G.L.D., Neis, A., Conceição, F.R., Hartwig, D.D., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Campos, F.S., Roehe, P. M., Hartleben, C.P., & McBride, A.J.A. (2017).** Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. *Protein Expression and Purification*, 130, 21-27.
- Schlickeiser, S., & Pleyer, U. (2007).** *Western, Northern, and Southern Blotting*. In: *Basic Science Techniques in Clinical Practice*. Ed: Patel, H.R.H., Arya, M., Shergill, I.S. (pp. 48-57). Springer, London, England.
- Sosnovtsev, S.V., & Green, K.Y. (2000).** Identification and Genomic Mapping of the ORF3 and VPg Proteins in Feline Calicivirus Virions. *Virology*, 277, 193–203.
- Streckert, H.J., Bürüssow, H., Sure, K., & Werchau, H. (1986).** Antipeptide Antibodies Directed Against the Carboxy-Terminal Region of SV40 Structural Proteins VP2 and VP3. *Journal of Cellular Biochemistry*, 31, 277-287.
- Thiry, D., Mauroy, A., Saegerman, C., Licoppe, A., Fett, T., Thomas, I., Brochier, B., Thiry, E., & Linden, A. (2017).** Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64, 764–773.
- Whetstone, C.A., VanDerMaaten, M.J., & Miller, J.M. (1991).** A western blot assay for the detection of antibodies to bovine immunodeficiency-like virus in experimentally inoculated cattle, sheep, and goats. *Archives of Virology*, 116, 119-131.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Tsoi, H-w., Chan, K-h., Wong, B.H., Che, X-y., Tam, V.K.P., Tam, S.C.F., Cheng, V.C.C., & Hung, I.F.N. (2004).** Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. *The Lancet*, 363, 841-845.