

Małgorzata Małodobra, Anna Jonkisz, Elżbieta Kowalczyk, Arleta Lebioda, Beata Bartnik, Barbara Świątek

Wydajność trzech komercyjnych zestawów do izolacji DNA i RNA ze zróżnicowanego materiału klinicznego i dowodowego, przy użyciu automatycznej stacji Janus

Efficiency of three commercial kits dedicated to DNA and RNA isolation from various clinical and forensic materials using the Janus automated workstation

Z Zakładu Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. B. Świątek

Izolacja materiału genetycznego jest niezwykle ważnym etapem w pracowni biologii molekularnej. Wzrastające zapotrzebowanie pociąga za sobą doskonalenie metod pozyskiwania materiału genetycznego w kierunku zwiększenia dokładności i przyspieszenia pracy. Automatyzacja w pracowni biologii molekularnej znajduje coraz szersze zastosowanie w wielu dziedzinach naukowych, głównie medycynie i kryminalistyce. Celem niniejszej pracy było opracowanie metodyki automatycznej izolacji kwasów nukleinowych z użyciem automatycznej stacji Janus (Perkin Elmer). Wydajność i czystość automatycznej izolacji DNA była zadowalająca. Pomimo licznych prób automatyzacji preparacji RNA, nie udało się uzyskać RNA, które pracowałyby w sposób oczekiwany w dalszych aplikacjach jak RT-PCR i *Real-Time* PCR.

Isolation of genetic material is a crucial stage in molecular biology. Increasing needs for DNA analysis cause continuous improving of genetic material isolation methods toward higher accuracy and output. Automatization in molecular biology is widely seen, especially in clinical and forensic medicine. The objective of this research was optimization of methods for automatic nucleic acid isolation using the Janus automated workstation, Perkin Elmer. The efficiency and purity of isolated DNA was satisfactory. Despite numerous attempts at achieving automatic RNA isolation, we did not succeed in obtaining RNA working in other applications, such as RT-PCR or *Real-Time* PCR.

WSTĘP

Pozyskiwanie i sposoby izolacji materiału genetycznego z tkanek bądź płynów ustrojowych jest niezwykle ważnym etapem w pracowni biologii molekularnej. Od tego etapu zależy możliwość przeprowadzenia dalszych analiz. Niezwykle ważną cechą charakteryzującą materiał genetyczny jest uzyskana ilość oraz jego czystość. Dąży się do uzyskania wyników pozwalających na otrzymanie wysokiej jakości DNA o dużej wydajności izolacji oraz o odpowiedniej czystości uzyskanego eluatu [1].

W dobie rozwoju badań molekularnych analizy DNA i RNA stosowane są w wielu dziedzinach medycyny [2, 3], technologii, kryminalistyki [4] czy też biotechnologii. Ponadto identyfikacja osobnicza za pomocą profilu markerów genetycznych, jest referencyjną metodą stosowaną do celów identyfikacyjnych zwłok w przypadku katastrof, wypadków czy żywiołów natury [4]. Analiza RNA także znalazła zastosowanie w medycynie sądowej. Możliwa jest identyfikacja śladów biologicznych, znajdowanych na miejscach zbrodni, na podstawie profilu ekspresji genów specyficznych dla określonej tkanki. Dzięki zmianom w profilu ekspresji genów można określać czas jaki upłynął od momentu pozostawienia śladu na miejscu zbrodni [5, 6, 7], a także czas jaki upłynął od momentu zadania rany do czasu zgonu. Pojawiły się ponadto doniesienia o próbach wykorzystania w medycynie sądowej microRNA (miRNA), którego zaletą jest większa stabilność w porównaniu z mRNA [8].

Wzrastające zapotrzebowanie pociąga za sobą doskonalenie metod pozyskiwania materiału genetycznego, w kierunku wzrostu przepustowości i możliwości izolacji kwasów nukleinowych, z dużej ilości próbek w stosunkowo krótkim czasie. Metoda manualna izolacji materiału genetycznego ma ograniczone możliwości i w sytuacji konieczności izolacji materiału z setek czy też tysięcy próbek, w krótkim przedziale czasowym, nie jest możliwa. Taką możliwość zapewniają roboty automatyczne [9, 10, 11].

Automatyzacja w pracowni biologii molekularnej nie jest nowym pojęciem. Wiele doniesień literaturowych podaje sukcesywne próby automatyzacji izolacji kwasów nukleinowych w wielu dziedzinach naukowych, głównie medycyny i kryminalistyki. Automatyczna izolacja kwasów nukleinowych w medycynie znalazła zastosowanie głównie w diagnostyce zakażeń bakteryjnych i wirusowych [12, 13]. Podjęto także próby automatyzacji izolacji kwasów nukleinowych z trudnego materiału, jakim są tkanki z blochków parafinowych [14] czy też izolacji DNA płodowego z osocza matki [15]. Automatyzacja DNA znalazła szerokie zastosowanie w medycynie sądowej ze względów przede wszystkim małej ilości materiału, ponadto konieczności analiz wielu próbek w ograniczonym czasie [4, 11, 16]. Szereg pozycji literaturowych donosi także o możliwości i pozytywnych wynikach automatyzacji preparacji RNA z różnego materiału [17], także z tkanek parafinowych [14].

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody automatycznej izolacji kwasów nukleinowych, zarówno DNA jak i RNA, z użyciem automatycznej stacji Janus, Perkin Elmer. Próby izolacji przeprowadzono z użyciem różnych komercyjnych zestawów oraz ze zróżnicowanych materiałów zarówno klinicznych jak i sądowych.

MATERIAŁY I METODY

Materiał poddany badaniu.

Automatyzację izolacji DNA i RNA testowano wykorzystując bardzo szeroki rodzaj materiału klinicznego i dowodowego. Materiał kliniczny stanowiły przede wszystkim krew pobrana na antykoagulant, osocze, limfocyty krwi obwodowej w liczbie 3×10^6 komórek. Analizowano także wydajność izolacji materiału genetycznego z mięśnia szkieletowego oraz tkanki nowotworowej (guz nerki). DNA z osocza

izolowano bezpośrednio po pobraniu i oddzieleniu od elementów morfotycznych krwi. Izolacji DNA z krwi poddano krew świeżą, sekcyjną oraz mrożoną (-20°C). Limfocyty izolowano przez wirowanie na Gradisolu G w gradiencie stężeń i przechowywano w temperaturze -75°C , mięsień i tkankę nowotworową również przechowywano w temperaturze -75°C w obecności stabilizatora RNA Later (Ambion) w celu stabilizacji RNA.

Materiał dowodowy stanowiły plamy krwi oraz kości kriogenicznie sproszkowane. Materiał ten poddano odpowiedniej obróbce przez trawienie 48h w temperaturze 56°C w obecności buforu lizującego oraz proteiny K (20 mg/ml).

Wykaz zestawów do izolacji kwasów nukleinowych.

Do prób dopracowania automatyzacji izolacji materiału genetycznego użyto komercyjnych testów różnych firm. Ponieważ stacja automatyczna Janus posiada możliwość izolacji przy wykorzystaniu kulek magnetycznych, do testowania wybrano zestawy wykorzystujące tę aplikację. Zapoznano się z wieloma protokołami dotyczącymi izolacji materiału genetycznego z użyciem kulek magnetycznych. Jednym z głównych kryteriów doboru odpowiedniego zestawu była łatwość implementacji na platformie pipetującej Janus.

Badano następujące zestawy: NucleoMag96 Tissue (Macherey-Nagel), miniMAG NucliSens (Bio-merieux), Illustra™ triplePrep™ kit (GE Healthcare). Ilość przeprowadzonych eksperymentów – izolacji była różna w zależności od użytych zestawów i rodzaju materiału. Tabela nr I zawiera ilość przeprowadzonych doświadczeń.

Izolację prowadzono według protokołów załączonych przez producentów, w temperaturze pokojowej. Jedynie wstępny etap lizy komórek prowadzono w temperaturze 56°C , czas inkubacji był różny dla różnych materiałów i wynosił od 10 min dla krwi, do 48h dla kości. Tkanek mięśniową i nowotworową, podobnie jak plamy krwi, inkubowano 3h. Izolując materiał genetyczny z mięśnia kostnego, nie uwzględniono wstępnie, procedury odwapniania. Takie postępowanie miało na celu udzielenie nam odpowiedzi na postawione przez nas pytanie: Czy etap odwapniania, stosowany w metodzie manualnej, który jest pracochłonny, a według niektórych nieskuteczny, da się pominąć przy użyciu auto-

matyzacji. Dalszą procedurę izolacji prowadzono zgodnie z zalecanym przez producenta protokołem. Ilości, wielkości materiałów biologicznych, z których izolowany był materiał genetyczny ujęto w tabeli nr II.

Tabela I. Charakterystyka materiału klinicznego i dowodowego oraz parametry charakteryzujące uzyskany materiał genetyczny z użyciem automatycznej stacji Janus.

MN - Macherey-Nagel, B – Biomerieux, GE - GE Healthcare.

Table I. Characteristics of clinical and forensic samples and parameters of genetic material obtained using the Janus automated workstation.

MN - Macherey-Nagel, B – Biomerieux, GE - GE Healthcare.

Rodzaj materiału Type of material	Test Test	Materiał genetyczny Genetic material	Stężenie [ng/μl] Concentration [ng/μl]	R ²⁶⁰ / ₂₈₀ R ²⁶⁰ / ₂₃₀	Ilość powtórzeń Number of repeats	Wynik dodatni w PCR Positive PCR result
Osocze Plasma	MN, B	DNA	6,3±2,5	0,89 0,03	4	-
Plama krwi Bloodstain	MN, B	DNA	2,4±1,2	1,4 0,01	110	+
Krew pełna świeża Fresh whole blood	B	DNA	33,8±12	1,16 0,24	4	+
Krew pełna mrożona Frozen whole blood	B	DNA	14,7±3,6	1,04 0,11	4	+
Limfocyty Lymphocytes	B, GE	DNA/RNA	7,0±0,2/ 5,9±0,6	1,53/ 1,87 0,11/ 0,21	4	+;-
Mięsień szkieletowy Skeletal muscle	B, GE	DNA/RNA	6,0±1,2/ 6,1±3,4	1,22/ 0,9 0,01/ 0,01	10	+;-
Guz nerki Renal tumor	B, GE	DNA/RNA	6,8±2,6/ 5,8±2,3	1,12/ 1,09 0,01/ 0,01	4	+;-
Kości Bones	NM, B	DNA	1,2±0,5	0,23 0,01	4	-

Tabela II. Ilości materiału biologicznego, z którego izolowano materiał genetyczny z użyciem automatycznej stacji Janus.

Table II. The amount of material used for nucleic acids isolation using the Janus automated workstation.

Rodzaj materiału / Type of material	Materiał genetyczny / Genetic material	Ilość / Amount	Wielkość / Size
Osocze / Plasma	DNA	1000ul	-
Plama krwi / Bloodstain	DNA	-	2-8mm/ 3mm
Krew pełna świeża i mrożona / Fresh and frozen whole blood	DNA	100ul	-
Limfocyty / Lymphocytes	DNA/RNA	3x10 ⁶ lub 1x10 ⁷	-
Mięsień szkieletowy / Skeletal muscle	DNA/RNA	25mg	-
Guz nerki / Renal tumor	DNA/RNA	25mg	-
Kości / Bones	DNA	0,2g	-

Testy analityczne prowadzone w celu analizy przydatności materiału genetycznego.

Stężenie uzyskanego materiału genetycznego oraz stopień czystości ($R^{260/280}$ oraz $R^{260/230}$) oceniano spektrofotometrycznie z użyciem aparatu NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific).

Materiał genetyczny poddano amplifikacji w testach stosowanych do ustalania spornego ojcostwa (AmpFISTR Identyfiker PCR Amplification Kit, Applied Biosystems) oraz do analizy osobniczej (AmpFISTR Y-filer PCR Amplification Kit, Applied Biosystems). Materiał kliniczny analizowano z zastosowaniem klasycznego PCR, środowisko reakcji zapewniał Qiagen Multiplex PCR Kit, Qiagen). RNA w pierwszej kolejności poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystems, następnie cDNA amplifikowano z użyciem starterów dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* (1000pz) w obecności Qiagen Multiplex PCR Kit, Qiagen. Warunki reakcji oraz profil temperaturowy dobierano odpowiednio dla każdego odczynnika zgodnie z rekomendowanym przez firmę protokołem.

WYNIKI

Analiza jakości i czystości kwasów nukleinowych.

Parametry charakteryzujące kwasy nukleinowe wyizolowane za pomocą automatycznej stacji Janus przedstawiono w tabeli numer I. Uzyskane DNA posiadało stężenie oraz współczynniki czystości $R^{260/280}$ oraz $R^{260/230}$ zadowalające, odpowiednie do dalszych aplikacji. Oceniając RNA uzyskane za pomocą stacji Janus, stężenie RNA było zadowalające, natomiast współczynniki czystości nie spełniały oczekiwań.

Analiza przydatności zastosowania uzyskanego DNA.

Uzyskane z użyciem automatycznej stacji Janus DNA zostało poddane analizie sprawdzania przydatności użycia w rutynowo stosowanych testach dla celów klinicznych oraz medycyny sądowej. DNA izolowane z plam (plamy pobrane od rodzin, u których dochodzono spornego ojcostwa) poddano amplifikacji z użyciem zestawu AmpFISTR Identyfiker PCR Amplification Kit. Uzyskane produkty były specyficzne, wydajność reakcji była porównywalna

do wyników uzyskanych z użyciem DNA izolowanego rutynową metodą manualną.

DNA izolowane z krwi pełnej świeżej i mrożonej oraz plam krwi i izolaty z kości analizowano z użyciem testu do amplifikacji polimorfizmów Y-STR, AmpFISTR Y-filer PCR Amplification Kit. Produkt PCR powstały po amplifikacji DNA uzyskanego za pomocą stacji Janus, był w praktyce nieodróżnialny od wyników analiz z wykorzystaniem DNA izolowanego rutynową metodą manualną. Nie uzyskano produktu amplifikacji DNA izolowanego z kości.

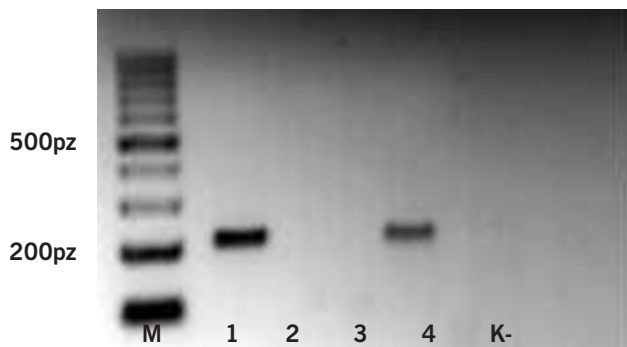
DNA uzyskane z materiałów do badań klinicznych, jak mięśnie szkieletowe, tkanka nowotworowa, czy limfocyty, poddawano amplifikacji w klasycznym PCR z użyciem starterów specyficznych dla genu *VDR* (Gen Receptora Witaminy D), region 3'UTR. Wielkość otrzymanego produktu wynosiła 220pz. Analizę produktów PCR przedstawiono na rycinie 1. Uzyskano produkt amplifikacji dla DNA izolowanego z limfocytów, tkanki mięśniowej, tkanki nowotworowej, krwi pełnej świeżej oraz mrożonej. Nie udało się uzyskać produktu dla DNA izolowanego z kości i z osocza.

Analiza przydatności zastosowania uzyskanego RNA.

Wyizolowane RNA poddano w pierwszej kolejności reakcji odwrotnej transkrypcji w celu przepisania informacji z RNA na cDNA. Następnie cDNA amplifikowano w reakcji RT-PCR z użyciem starterów specyficznych dla cDNA. Przykładowy rozdział elektroforetyczny przedstawiono na rycinie 2. Wynik dodatni uzyskano jedynie dla izolacji RNA wykonywanej manualnie (rutynowa metoda izolacji). Brak było produktu amplifikacji cDNA uzyskanego z RNA izolowanego z limfocytów i guza nerki izolowanego przy użyciu automatycznej stacji Janus.

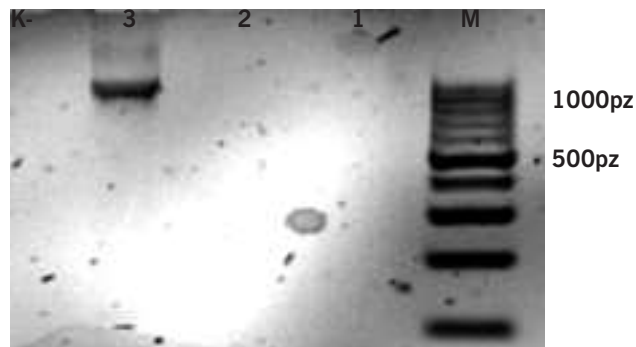
DYSKUSJA

W niniejszej pracy przedstawiliśmy wyniki świadczące o skuteczności automatycznej izolacji DNA z różnych materiałów klinicznych oraz dowodowych. Wydajność automatycznej izolacji DNA, podobnie jak jego czystość, była zadowalająca porównywalna do rutynowo stosowanych metod manualnych. Jednakże pomimo licznych prób au-



Ryc. 1. Wynik elektroforezy PCR z wykorzystaniem DNA izolowanego z użyciem stacji Janus (1 – limfocyty, 2 – kości, 3 – osocze, 4 – guz nerki, K – kontrola ujemna). Wynik dodatni dla izolacji z limfocytów i guza nerki. Wielkość produktu PCR 220pz.

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products using DNA isolated with the Janus automated workstation (1 – lymphocytes, 2 – bones, 3 – plasma, 4 – renal tumor, K – negative control). Positive results are seen for lymphocytes and renal tumor. Product size 220bp.



Ryc. 2. Wynik elektroforezy RT-PCR z wykorzystaniem RNA izolowanego za pomocą automatycznej stacji Janus (1 – limfocyty, 2 – guz nerki) oraz metodą manualną (3 – limfocyty). K – kontrola ujemna. Wynik dodatni tylko dla izolacji manualnej, produkt dla GAPDH – 1000pz.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products using DNA isolated with the Janus automated workstation (1 – lymphocytes, 2 – renal tumor) and using a manual method (3 – lymphocytes). K – negative control. Positive result for manual isolation only. GAPDH product – 1000bp.

tomatyzacji preparacji RNA, nie udało się uzyskać RNA, które pracowałyby w sposób oczekiwany w dalszych aplikacjach, jak RT-PCR i *Real-Time* PCR. RNA jest cząsteczką bardzo labilną i ulega bardzo szybkiej degradacji już w temperaturze pokojowej. Planowane jest w przyszłości dokupienie elementów chłodzących, co pozwoli wyeliminować degradację RNA w czasie izolacji, jako potencjalną przyczynę niepowodzeń.

Wyniki przedstawione w pracy stanowią potwierdzenie wyników uzyskanych przez inne zespoły badawcze, również wdrażające automatyzację preparacji kwasów nukleinowych w laboratoriach [9, 10, 11, 17]. W niniejszej pracy skupiliśmy się głównie na materiale klinicznym dla projektów naukowych oraz dla celów medycyny sądowej. Udało nam się pozyskać DNA z szerokiej bazy materiału klinicznego oraz dowodowego. W przeciwieństwie do Huang et al. [15], nie powiodła się

amplifikacja DNA izolowanego z osocza. Brak dodatniego wyniku mógł być spowodowany nieprawidłowym oddzieleniem osocza od elementów morfotycznych krwi, bądź też niewystarczającym wiązaniem DNA do złoża, jakim w naszym przypadku były kulki magnetyczne. Dalsze analizy z wykorzystaniem innych zestawów muszą być przeprowadzone.

Automatyzacja w medycynie sądowej jest szeroko prowadzona na całym świecie. Liczne dane literaturowe donoszą, iż uzyskane DNA metodą automatycznej izolacji jest wysokiej jakości [11, 16]. Co więcej, automatyzacja pomaga w uzyskaniu produktu amplifikacji, nawet przy bardzo małej ilości materiału dowodowego bądź zdegradowanego [4]. Uzyskaliśmy bardzo dobre wyniki automatycznej izolacji DNA z próbek dla celów medycyny sądowej. Uzyskane metodą automatycznej izolacji DNA w sposób zadowalający pracowało w dalszych

aplikacjach analiz zarówno w celu ustalenia spornego ojcostwa, jak i dla analizy personalnej z wykorzystaniem markerów STR na chromosomie Y (Y-STRs). Udało się nam uzyskać pełny profil o satysfakcjonującej wydajności amplifikacji. Jedynie próby izolacji DNA z kości z wykorzystaniem stacji Janus zakończyły się porażką. Otrzymane DNA nie posiadało zadowalających parametrów oraz nie dało dodatniego wyniku w dalszych analizach.

W literaturze można doszukać się licznych doniesień odnośnie automatyzacji preparacji RNA z różnorodnego materiału [14, 17]. Pomimo podjętych licznych prób izolacji RNA z wykorzystaniem stacji Janus, nie udało nam się uzyskać RNA, które pracowałyby w sposób zadowalający w aplikacjach diagnostycznych i eksperymentalnych. Brak wyniku

mógł być spowodowany wieloma czynnikami, dla przykładu brakiem systemu chłodzącego zautomatyzowanego z aparatem. Dalsze testy w kierunku automatycznej izolacji RNA będą sukcesywnie wykonywane.

Podsumowując, udało nam się opracować automatyczną izolację DNA z różnorodnych tkanek, dobrze pracujących w dalszych aplikacjach stosowanych w badaniach klinicznych i naukowych oraz dla celów medycyny sądowej. Dzięki wykorzystaniu opisanych badań nasze laboratorium jest przystosowane do szybkiej, jednoczesnej analizy wielu próbek, co w stanach klęski żywiołowej bądź katastrof pozwoli na szybką i dokładną analizę identyfikacyjną. Dalsze prace w kierunku automatyzacji RNA będą przedmiotem odrębnego doniesienia.

PIŚMIENICTWO

1. Słomski R.: Analiza DNA. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008.

2. Spiegel A. M., Libutti S. K.: Future diagnostics and therapeutic trends in endocrine cancers. *Semin. Oncol.* 2010, 37(6): 691-695.

3. Aw W., Ota I., Toyoda Y., Lezhava A., Sakai Y., Gomi T., Hayashizaki Y., Ishikawa T.: Pharmacogenomics of Human ABC Transporters: Detection of Clinically Important SNPs by SmartAmp2. *Method Curr. Pharm. Biotechnol.* 2010, [Epub ahead of print].

4. Schiffner L. A., Bajda E. J., Prinz M., Sebestyen J., Shaler R., Caragine T. A.: Optimization of a simple, automatable extraction method of recover sufficient DNA from low copy number DNA samples for generation of short tandem repeats profile. *Croat, M J.* 2005, 46: 578-586.

5. Vennemann M., Koppelkamm A.: mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations *Forensic Science International.* 2010, 203: 71-75.

6. Haas C., Klessner B., Kratzer A., Bär W.: mRNA profiling for body fluid identification *Forensic Science International: Genetic Supplement.* 2008, 1: 37-38.

7. Visser M., Zubakov D., Ballantyne K. N.: mRNA-based skin identification for forensic appli-

cations *Int J Legal Med.* 2010, 125: 253-263.

8. Courts C., Madea B.: Micro-RNA – A potential for forensic science? *Forensic Science International.* 2010, 203: 106-111.

9. Kachel V., Sindelar G., Grimm S.: High-throughput isolation of ultra-pure plasmid DNA by a robotic system. *BMC Biotechnol.* 2006, 16: 6-9.

10. Fangan B. M., Dahlberg O. J., Deggerdal A. H., Bosnes M., Larsen F.: Automated system for purification of dye-terminator sequencing products eliminates up-stream purification of templates. *Biotechniques.* 1999, 26(5): 980-983.

11. Kishore R., Hardy W. R., Anderson V. J., Sanchez N. A., Bouncristiani M. R.: Optimization of DNA extraction from low yield and degraded samples using the BioRobot® EZ1 and BioRobot® M48. *J. Forensic. Sci.* 2006, 51(5).

12. Dauphin L. A., Huthins R. J., Bost L. A., Browen M. D.: Evaluation of automated and manual commercial DNA extraction methods for recovery of *Brucella* DNA from suspensions and spiked swabs. *Journal of Clinical Biology.* 2009, 49: 3920-3926.

13. Raggam R. B., Wagner J., Bozic M., Michelin B. D., Hammerschmidt S., Homberg C., Kessler H. H.: Detection and quantitation of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in EDTA whole blood samples using automated sample preparation and real time PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2010, 48(3): 413-418.

14. Hennig G., Gehrman M., Stropp U.,

Brauch H., Fritz P., Eichelbaum M., Schwab M., Schroth W.: Automated extraction of DNA and RNA from a single formalin-fixed paraffin-embedded tissue section for analysis of both single nucleotide polymorphisms and mRNA expression. *Clinical Chemistry*. 2010, 56: 1845-1853.

15. Huang D. J., Mergenthaler-Gatfield S., Hahn S., Holzgreve W., Zhong X. Y.: Isolation of cell-free DNA from maternal plasma using manual and automated systems. *Methods Mol. Biol.* 2008, 444: 203-208.

16. Tack L., Thomas M., Reich K.: Automated forensic DNA purification optimized for FTA card punches and Idetifiler STR-based PCR analysis. *JALA*. 2005, 10: 231-236.

17. Hourfar M. K., Michelsen U., Schmidt M., Berger A., Seifried E., Roth W. K.: High-throughput purification of viral RNA based on novel aqueous chemistry for nucleic acid isolation. *Clin. Chem.* 2005, 51(7): 1217-1222.

Adres do korespondencji:

Małgorzata Małodobra

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 52

50-369 Wrocław

tel. +48 71 784 15 95

fax: +48 71 784 01 15

e-mail: malmal@forensic.am.wroc.pl