

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



[Strona główna](#) > [Start](#)

Standardowe metody izolacji DNA z różnych materiałów biologicznych cz.1

Odkrycie kwasów nukleinowych spowodowało, że zaczęto wymyślać coraz to nowsze procedury ich izolacji, i udoskonalać te już istniejące. Ze względu na fakt, że materiał genetyczny jest matrycą do przeprowadzenia większości badań genetycznych, diagnostycznych i naukowych, opracowano wiele różnych metod wydajnej izolacji. Większość z nich opiera się na zastosowaniu w procedurze mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy, która to prowadzi do inaktywacji i usunięcia enzymów obecnych w środowisku zarówno DNA jak i RNA.

Opracowywane metody izolacji mają być szybkie, efektywne pod względem czystości i stężenia otrzymywanych kwasów nukleinowych i co najważniejsze tanie, by nie podnosić kosztów przeprowadzanych doświadczeń i badań.

Materiałem wyjściowym do izolacji DNA mogą być fragmenty tkanki stałej (np. grasicy, trzustki), bądź zawiesina komórek (np. krew). Używany może być też dowolny materiał biologiczny, który zawiera DNA lub RNA. W związku z tym, kwasy nukleinowe można izolować także ze śladów krwi lub

nasienia. Stosowane metody izolacji kwasów nukleinowych mają charakter uniwersalny w odniesieniu do materiału wyjściowego [3], [4], [2].

Słowa kluczowe: izolacja DNA, izolacja mitochondrialnego DNA (mtDNA), fenol/chloroform/alkohol izoamylowy, odsalanie białek, liza alkaliczna



Izolowanie kwasów nukleinowych z różnych materiałów jest wstępnym i podstawowym etapem wielu procedur stosowanych w biologii molekularnej. Odpowiednie wyizolowanie kwasów nukleinowych (pod względem czystości, jak i stężenia) zarówno DNA jak i RNA, ma krytyczne znaczenie dla przebiegu procedur badawczych [3].

Cząsteczki kwasów nukleinowych występujące w komórce zazwyczaj są mocno związane z innymi biomolekułami w niej występującymi. Zazwyczaj kwasy nukleinowe wiążą się z kationowymi białkami, w związku z czym kluczowym zadaniem podczas izolacji jest usunięcie zasocjowanych z nimi białek.

Etap usuwania białek można prowadzićkilkoma koncepcyjnie prostymi metodami. Tak więc , można przeprowadzić ekstrakcję wodnych roztworów kwasów nukleinowych stosując rozpuszczalniki organiczne. Wśród rozpuszczalników najczęściej stosuje się mieszaninę fenol/chloroform w postaci dwufazowego systemu (J.Sambrook i wsp. 1989) [3].

Wykorzystanie rozpuszczalników organicznych zwiększa efektywność oddzielania kwasów nukleinowych od związanych z nimi białkami. Dodatkowo, fenol denaturuje białka , ale nie powoduje całkowitego hamowania RNaz. Fenol jest także rozpuszczalnikiem dla cząsteczek RNA, które zawierają długo odcinek poliadenylowy. Z kolei, chloroform (z dodatkiem alkoholu izoamylowego) zapobiega parowaniu chloroformu. Chloroform ułatwia także rozdzielanie fazy wodnej i organicznej. Rozdział faz prowadzi do inaktywacji i usunięcia enzymów, które obecnie są w środowisku DNA i RNA. Wszelkie pozostałości fenolu z próbki usuwa się przez ekstrakcję samym chloroformem.

W przypadku, gdy kwasy nukleinowe mają być izolowane z mieszanin cząsteczek (np. z lizatów komórkowych), po ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym należy wprowadzić dodatkowe etapy, które podniosą efektywność izolacji kwasów nukleinowych. Takim dodatkowym etapem może być zastosowanie enzymów proteolitycznych, np. proteinyazy K [3].

Po etapie ekstrakcji, kwasy nukleinowe przeważnie znajdują się w roztworze wodnym. Zazwyczaj roztwór ten jest bardzo mocno rozcieńczony i zanieczyszczony, głównie związkami małowcząsteczkowymi. By temu zapobiec otrzymać DNA lub RNA o pożądanej czystości, a także o odpowiednim stężeniu, przeprowadza się etap zagęszczania, który połączony jest z usuwaniem zanieczyszczeń małowcząsteczkowych.

Zagęszczanie kw. Nukleinowych osiąga się przez wytrącanie cząsteczek etanolem. Następnie precypitat (DNA lub RNA) odzyskuje się przez wirowanie i przez rozpuszczanie otrzymanego po

wirowaniu osadu w odpowiednim buforze. Etap wytrącania kwasów przeprowadza się w temperaturze ok. 0°C, cały proces odbywa się w obecności kationów jednowartościowych tj. kationów amonowych, litowych i sodowych. Do wytrącania DNA stosuje się 2 objętości etanolu, a dla RNA 2,5-3 objętości etanolu [3].

Opcjonalnie do wytrącania kwasów nukleinowych można użyć etanol lub izopropanol. Stosując izopropanol wystarczy 1 objętość do wytrącenia DNA, dzięki czemu można zmniejszyć objętość cieczy do odwirowania. Należy jednak zaznaczyć, że izopropanol jest mniej lotny (w porównaniu do etanolu) przez co jest znacznie trudniejszy do usuwania [3].

By zwiększyć efektywność wytrącania małych fragmentów kwasów nukleinowych, do roztworu można dodać chlorku magnezowego (do stężenia 10 mmol/l).

Wytrącone kwasy nukleinowe należy przemyć (zazwyczaj z odwirowaniem) 2x w 70% roztworze etanolu, a następnie pozostawić w temperaturze pokojowej w celu odparowania składników ciekłych z próbki. Po wysuszeniu otrzymane próbki kw. nukleinowych powinny być łatwo rozpuszczalne w małej ilości buforu charakteryzującego się niską siłą jonową. W tym celu zazwyczaj stosuje się bufor TE (Tris/HCl-EDTA o pH=7,6) [3].

Używając zamrożonego fenolu, należy pamiętać by odpowiednio go przygotować przed użyciem do izolacji. W tym celu fenol należy doprowadzić do temperatury pokojowej, później podgrzać do 68°C (do jego stopienia). Wskazane jest także by do fenolu dodać hydroksycholinę (do stężenia 0,1%), gdyż jest ona przeciwutleniaczem, częściowym inhibitorem RNaz, a dodatkowo nadaje roztworom żółtą barwę, dzięki czemu łatwiejsze jest odróżnienie fazy wodnej od organicznej [3].

Następnie, do ciekłego fenolu należy dodać równą objętość buforu 0,5M Tris/HCl o pH=8,0, całość wymieszać używając mieszadła magnetycznego (ok. 15 min). Po oddzieleniu się faz podczas mieszania, pipetą usunąć górną (wodną) fazę, ponownie dodać bufor Tris/HCl, mieszać itd. Zabieg ten powtarzać do momentu, aż pH fenolu nie będzie większe od 7,8 [3].

Fenol w takiej postaci można przetrzymywać pod warstwą buforu 0,1M Tris/HCl (pH=8,0) w ciemnym naczyniu, w temp. 4°C przez okres nie dłuższy niż 1 miesiąc [3].

Przygotowując się do izolacji kwasów nukleinowych należy pamiętać o zachowaniu kilku podstawowych zasad. Wszystkie odczynniki (roztwory wyjściowe i robocze) powinno się sporządzać używając odczynników o największej dostępnej czystości, oraz wody podwójnie destylowanej i dejonizowanej. Wszystkie odczynniki oraz woda używana do ich sporządzania powinny być sterylizowane [3].

Standardowe metody izolacji DNA

Izolowanie DNA metodą ekstrakcji fenolowej (J. Sambrook i wsp.) [1].

W próbówce o pojemności 1,5 ml umieścić rozdrobnioną tkankę (25-50 mg) lub zawiesinę interfazową z 1-1,5 ml krwi. Następnie dodać 750 µl buforu ekstrakcyjnego (tj. 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl o pH=8,0, 0,5% SDS). Do próbki dodać 20 µl proteinazy K i całość dokładnie wymieszać przez powolne odwracanie próbki. Po wymieszaniu próbkę inkubować w temperaturze 55°C przez co najmniej 3 godziny (sugerowany, optymalny czas to 12 h).

Po inkubacji dodać 750 µl mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (w stosunku 25:24:1).

Zawartość próbki delikatnie mieszać, aż do momentu powstania emulsji. Próbkę odwirować (13 000 x g, temperatura pokojowa, 30 min). Otrzymaną górną warstwę wodną przenieść do nowej próbki o pojemności 1,5 ml. Następnie dodać 75 µl 4 M octanu amonu (5M roztwór CH₃COONH₄) i 750 µl izopropanolu (absolutny izopropanol co najmniej 99,7%). Próbkę umieścić na lodzie, na 30 min w celu wytrącenia DNA.

Po inkubacji na lodzie, próbkę odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 30 min). Powstały supernatant delikatnie usunąć, by nie naruszyć otrzymanego osadu DNA. Następnie dodać 500 µl 70% roztworu etanolu, całość wymieszać przez delikatne odwracanie próbki. Znow odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 30 sekund). Po wirowaniu ponownie usunąć supernatant z próbki, na koniec dotknąć brzeg próbki bibułą, aby przez działanie kapilarne usunąć jak najwięcej cieczy.

Otrzymany osad DNA suszyć w temperaturze pokojowej przez 10-20 minut. Wysuszony osad rozpuścić w 100 µl buforu TE o pH=8.0 (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA) przez co najmniej 12 godzin [1], [3].

Izolowanie DNA z pełnej krwi uproszczoną metodą ekstrakcji fenolowej [3], [5].

W metodzie tej najwyższą wydajność zapewnia zastosowanie trawienia proteinazą K, trawienie powinno być przeprowadzone przez co najmniej 12 h, w związku z czym procedura izolacji tą metodą trwa dłużej niż jeden dzień.

Krew z której ma być izolowane DNA pobrać bez użycia antykoagulantu, 500 µl krwi dodać do próbki (1,5 ml) zawierającej fenol a następnie energicznie wymieszać. Na etapie tym zachodzi inaktywacja krwi, którą można przechowywać w temp. pokojowej co najmniej przez kilka godzin. Przystępując do kolejnych etapów izolacji, próbkę krwi odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 5 min). Po wirowaniu zebrać fazę wodną, próbkę ekstrahować mieszaniną : fenol/chloroform/alkohol izoamylowy(25:24:1), a następnie przeprowadzić ekstrakcję chloroformem.

DNA wytrącić z ok. 300 µl fazy wodnej (otrzymanej po ostatniej ekstrakcji) 2 objętościami 96% roztworem etanolu, a dalej odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 10-30 min). Otrzymany osad przepłukać 70% roztworem etanolu, a dalej rozpuścić w 100 µl wody (lub opcjonalnie w buforze TE). Wydajność opisanej procedury wynosi ok. 20 µg DNA na 500 µl krwi. Tak otrzymany produkt DNA nadaje się do trawienia z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych, a także do zastosowania jako matryca w reakcji PCR [3], [5].

Izolowanie DNA metodą odsalania białek [6].

Odbiałczanie DNA zachodzi na skutek odsalania białek komórkowych, poprzez zastosowania odwodnienia i wytrącania z użyciem nasyconego roztworu NaCl. Metoda ta zaliczana jest to stosunkowo prostych i tanich [6].

W próbce o poj. 1,5 ml umieścić 25-50 mg rozdrobnionej tkanki stałej lub zawiesinę interfazową z 1-1,5 ml krwi. Do próbki dodać 400 µl buforu ekstrakcyjnego (tj. 3 M NaCl, 0.4 M Tris/HCl o pH=7.8, 20 mM EDTA), 20 µl proteinazy K (o stężeniu 10 mg/ml) oraz 10 µl roztworu SDS (25% roztwór SDS). Łagodnie mieszać przez powolne odwracanie próbki. Następnie próbkę inkubować w 55°C przez co najmniej 3 h (zalecane 12h). Po inkubacji dodać 250 µl nasyconego roztworu NaCl (6M roztwór NaCl). Próbkę wytrząsać ręcznie. Po wytrząsaniu dodać 650 µl chloroformu i znow łagodnie mieszać (delikatnie odwracając próbkę) do momentu utworzenia emulsji. Odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 30 min).

Otrzymaną po wirowaniu górną fazę wodną przenieść do nowej próbki o pojemności 1,5 ml, do fazy wodnej dodać 100 µl buforu Tris (tj. 10 mM bufor Tris/HCl o pH= 8.0) i 750 µl etanolu

(absolutny etanol) schłodzonego do temp. 0°C. Próbkę inkubować na lodzie przez 30 minut, w celu wytrącenia DNA. Po inkubacji próbkę odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 30 min).

Otrzymany po wirowaniu supernatant usunąć i dodać 700 µl etanolu. Całość delikatnie wymieszać przez delikatne obracanie probówki. Znow próbkę odwirować (13 000 x g, temp. pokojowa, 30 sekund), usunąć otrzymany supernatant, a brzeg probówki osuszyć bibułą, by przez działanie kapilarne usunąć jak najwięcej cieczy. Otrzymany osad DNA suszyć w temperaturze pokojowej przez 5-10 minut. Wysuszony osad rozpuścić w 100 µl buforu TE (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=8.0) w temp. 4°C przez dobę[3], [6].

Izolowanie DNA uproszczoną metodą odsalania białek [3], [7].

10 ml krwi obwodowej pobrać na antykoagulant (1% roztwór EDTA), dodać 30 ml buforu do lizy (tj. 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 M Tris/HCl o pH=7.4). Próbkę z buforem do lizy inkubować w temp. 0°C przez 30 minut, od czasu do czasu mieszając. Następni odwirować (2 000 x g, temp. 4°C, 10 min).Otrzymany osad leukocytów zawiesić ponownie w buforze do lizy, odwirować jak wyżej, czynność tą powtórzyć 3 - krotnie. Po ostatnim wirowaniu, do otrzymanego osadu dodać 5 ml buforu SE (tj. 75 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA pH=8.0). Do tego dodać 25 µl proteinazy K (stężenie 10 mg/ml), oraz 250 µl SDS (20 % roztwór SDS). Dokładnie wymieszać. Próbkę inkubować w 55°C przez 16 h. Otrzymany lizat ekstrahować nasyconym roztworem NaCl (6M roztwór NaCl) przez ok. 15 s, intensywnie mieszając. Odwirować (2 000 x g, temp.pokojowa, 15 min) [3], [7].

Otrzymane DNA wytrącać 2 objętościami etanolu (absolutny etanol), przemyć 70% roztworem etanolu (każdy etap kończąc wirowaniem : 2 000 x g, temp. pokojowa, 15 min). Otrzymany po wirowaniu osad DNA rozpuszczać w wodzie przez 24 h [3], [7].

Izolowanie DNA z pełnej krwi z użyciem chloranu (VII) (nadchloranu sodowego) zamiast fenolu

Krew, z której będzie izolowany materiał w postaci DNA, należy pobrać na antykoagulant. 10 ml krwi dodać do 35 ml buforu do lizy komórek (tj. 0.32 M sacharoza, 10 mM Tris/HCl o pH=8.0, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100). Próbkę inkubować w lodzie przez 10 min. PO inkubacji odwirować (1 000 x g, temp.pokojowa, 20 min). Tak otrzymany osad jąder komórkowych zawiesić w 9,8 ml buforu do lizy jąder (tj. 150 mM NaCl, 100mM EDTA, 50 mM Tris/HCl o pH=8.0). Następnie dodać 1 mg RNazy (stężenie 10 mg/ml) i inkubować w temp. pokojowej w 37°C przez 30 min. Po inkubacji do probówki dodać SDS (10%) do końcowego stężenia równego 1,5%, ponownie inkubować (temp. 60°C, 10 min).

Natychmiast po skończonej inkubacji dodać 2,5 ml świeżo przygotowanego NaClO₄ (5M roztwór), próbkę delikatnie wymieszać. Następnie wprowadzić równą objętość mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy (obj. 24:1), a dalej ekstrahować pod wyciągiem ok. 30 minut. Próbkę odwirować (10 000 x g, temp. 4°C, 10 min).

Otrzymaną fazę wodną przenieść do nowej probówki o poj. 50 ml. Dodać 2 objętości schłodzonego etanolu (96%), w celu wytrącenia DNA, DNA odzyskać przez nawinięcie na cienką bagietkę (najlepiej wygiętą na końcu na kształt litery U). DNA przenieść do buforu TE (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA , pH=7.5). Próbkę inkubować w 4°C przez 30 min. Po inkubacji ponownie wytrącić DNA przez dodanie 1/10 objętości CH₃COONa (5 M roztwór CH₃COONa o pH=7.0) i 2 objętości schłodzonego etanolu (96%). Używając bagietki lub pipety (ze ściętą końcówką) przenieść otrzymane DNA do nowej probówki (o pojemności 1,5 ml) zawierającej 1 ml 70% roztworu etanolu [3], [8].

Osad DNA należy płukać 2 razy 70% roztworem etanolu, wysuszyć na powietrzu, a na koniec rozpuścić w buforze TE (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=7.5). Rozpuszczanie DNA należy

przewieźć przez 24 godziny [3], [8].

W przedstawionej metodzie, DNA izoluje się bez użycia fenolu, a także bez długotrwałej inkubacji z proteinazą K. Dzięki temu procedura jest znacznie skrócona, a dodatkowo unika się warunków sprzyjających degradacji przez nukleazy [3], [8].

Izolowanie mitochondrialnego DNA ssaków metodą lizy zasadowej [9].

Analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA) wykorzystywana jest jako źródło cennych informacji w wielu różnych dziedzinach naukowych. Szybka i prosta metoda izolacji mitochondrialnego DNA ma bardzo duże znaczenie w genetyce i diagnostyce genetycznej. W tym celu potrzebne są czyste preparaty mtDNA, które pozwalają się trawić enzymami restrykcyjnymi, a także hybrydyzować metodą Southerna [3], [9].

Metoda lizy zasadowej (wzorowana na metodzie izolacji plazmidowego DNA), pozwala uniknąć używania drogiego chlorku cezu, a także długotrwałego ultrawierowania (charakterystycznych dla standardowych metod izolacji mtDNA). W przedstawionej metodzie, mitochondrialne DNA izoluje się z mitochondriów, otrzymywanych wg takich zasad zarówno z materiału zwierzęcego jak i roślinnego [3], [9].

Rozdrobnioną tkankę, z której ma być izolowane mtDNA (ok. 50 mg) homogenizować w buforze do homogenizacji (tj. 0,25 sacharoza, 10 mM EDTA, 30 mM Tris/HCl, pH=7.5). Homogenat przenieść do próbówki o pojemności 1,5 ml, zwirować (1 000 x g, temp. 4°C, 1 min)- w celu osadzenia jąder i fragmentów komórkowych. Powstały supernatant odwirować (12 000 x g, 4°C, 10 min), w celu osadzenia się mitochondriów. Otrzymany po wirowaniu supernatant usunąć, a osad zawierający mitochondria zawiesić w buforze (tj. 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH=8.0) [3], [9].

Całkowita objętość roztworu powinna wynosić 50 ul. Następnie dodać 100 µl NaOH w SDS (tj. świeżo przygotowany 0,18 M roztwór NaOH w 1% roztworze SDS). Próbkę wytrząsać krótko na wytrząsarce typu Vortex. Po wytrząsaniu, inkubować w lodzie przez 5 minut, dodać 75 µl roztworu do lizy alkalicznej (tj. roztwór octanu potasowego 3M względem potasu i 5M względem octanu: do 60 ml 5M roztworu CH₃COOK dodać 11,5 ml lodowatego CH₃OOH i 28,5 ml H₂O) schłodzonego do temp. ok. 0°C. Próbkę ponownie łagodnie wytrząsać na urządzeniu typu Vortex. Inkubować w lodzie (5 minut) [3], [9].

Po inkubacji próbkę odwirować (12 000 x g, 4°C, 5 minut). Zebrać powstały supernatant. Do supernatantu dodać równą objętość mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1). Mieszać energicznie przez wytrząsanie na Vortex'ie. Następnie odwirować (12 000 x g, temp. pokojowa, 2 min), Otrzymaną fazę wodną przenieść do nowej próbówki, dodać 2 objętości schłodzonego etanolu (etanol absolutny), mieszać przez wytrząsanie i pozostawić w temp. pokojowej przez ok. 15 minut. Po inkubacji, próbkę odwirować (12 000 x g, temp. pokojowa, 2 min) [3], [9]. Otrzymany osad mtDNA płukać w 1 ml 70% roztworu etanolu. Osad wysuszyć 1-3 minuty pod obniżonym ciśnieniem. Wysuszony osad rozpuścić w buforze TE zawierającym RNazę (tj. roztwór RNazy o stężeniu 20 µg/ml w buforze TE o pH=8.: 10 mM Tris'HCl, 1 mM EDTA) [3], [9].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Book 1-3.

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 9.14-9.23

[2]. Kapińska E, Szczerkowska Z, 2004. PERSONAL IDENTIFICATION BASED ON NUCLEAR DNA EXTRACTED FROM BONES OF DECEASED INDIVIDUALS. Problems of Forensic Sciences, vol. LX, 2004, 104-116

[3]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 366-381

[4]. Słomski R, 2008. Analiza DNA, teoria I praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008. S.44-53

[5]. Albarino C.C, Romanovski V, 1994. Mol. Cell. Probes, 8: 423-427.

[6]. Bilton D.T., Jaarola M, 1995. Isolation and purification of vertebrate DNAs.[in]: Methods In molecular biology, vol.50:Species diagnostic protocols: PCR and other nucleic acid method. Red. J.P. Clapp, Humana Press Inc., Totowa, s. 25-37.

[7]. Słomski R, 1997. Analiza struktury genów. Wyd. Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań, s.47

[8]. Johns L i wsp., 1998. Anal. Biochem., 180:276-278.

[9]. Tamura K, Aotsuka T, 1988: Rapid isolation metod of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochem. Genetics., 26:815-819.

<http://laboratoria.net/home/13162.html>

Informacje dnia: [Jak poradzić sobie z końcem wakacji? Zalecenia w sprawie mpox są racjonalne i adekwatne](#) [Przydatność organów do przeszczepu](#) [Naukowcy zbadali, jak powstają nowe słowa w mediach społecznościowych](#) [Telefony komórkowe nie powodują nowotworów mózgu](#) [Ryzyko zawału i udaru mózgu u kobiet](#) [Jak poradzić sobie z końcem wakacji? Zalecenia w sprawie mpox są racjonalne i adekwatne](#) [Przydatność organów do przeszczepu](#) [Naukowcy zbadali, jak powstają nowe słowa w mediach społecznościowych](#) [Telefony komórkowe nie powodują nowotworów mózgu](#) [Ryzyko zawału i udaru mózgu u kobiet](#) [Jak poradzić sobie z końcem wakacji? Zalecenia w sprawie mpox są racjonalne i adekwatne](#) [Przydatność organów do przeszczepu](#) [Naukowcy zbadali, jak powstają nowe słowa w mediach społecznościowych](#) [Telefony komórkowe nie powodują nowotworów mózgu](#) [Ryzyko zawału i udaru mózgu u kobiet](#)

Partnerzy