

[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



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Standardowe metody izolacji DNA z różnych materiałów biologicznych cz.2

W celu szybkiej diagnostyki zarówno chorób genetycznych jak i wirusowych, czy bakteryjnych, opracowuje się coraz to nowsze metody diagnostyczne. Większość z nich oparta jest na rutynowej izolacji materiału genetycznego (z różnych materiałów biologicznych), a następnie na jego amplifikacji za pośrednictwem reakcji PCR. W związku z tym ciągle dąży się do opracowania szybkich i skutecznych metod izolacji DNA, by zredukować koszty diagnostyki molekularnej, a także przyspieszać otrzymywanie wyników.

Słowa kluczowe: krew obwodowa, żywica Chelex-100, filtry papierowe, Koi Herpesvirus (KHV), jądrzaste erytrocyty, PCR, wysokocząsteczkowy i niskocząsteczkowy DNA, archiwizowane tkanki,

genomowe DNA.



Isolacja DNA z krwi obwodowej jest początkowym etapem w badaniach klinicznych (np. do identyfikacji mutacji DNA), w których przeprowadza się reakcje PCR. Tradycyjne procedury izolacji zapewniają obfite ilości wysoko oczyszczonego DNA ,które w zasadzie przekraczają (zarówno w ilości jak i jakości) standardy wymagane do pomyślnego przeprowadzenia reakcji PCR , ponadto są to procedury stosunkowo drogie, powolne i pracochłonne, a dodatkowo zawierają wiele transferów i narażenia na toksyczne substancje chemiczne [6].

Aby przezwyciężyć te problemy opracowano alternatywne metody ekstrakcji, które są ulepszone i uproszczone pod względem przetwarzania danej próbki. Ponadto, dostępne są także komercyjne produkty, w których wyeliminowano wykorzystanie toksycznych substancji i skrócono czas przetwarzania danych (na przykład, zestaw krwi QIAamp, Qiagen Inc, Chatsworth, Kalifornia, USA) [6].

Celem badania J.M. Polski i wsp.(1998), było określenie, czy Chelex100 może być używana do krwi obwodowej impregnowanej na filtrach papierowych (szybkie przetwarzanie) w celu opracowania efektywnej procedury odzyskiwania DNA opartej na technice PCR , w celu wykorzystania DNA do badań diagnostycznych- badania schorzeń dziedzicznych [6].

Chelex-100 jest żywicą chelatującą o wysokim powinowactwie do jonów metali wielowartościowych. Wiążąc i usuwając jony podczas izolacji DNA (po podgrzaniu) zapobiega uszkodzeniom DNA i redukuje inhibitory polimerazy TaqDNA. Razem te dwa czynniki pozwalają na efektywne wykorzystanie minimalnie przetworzonych próbek krwi w reakcji PCR. Procedura izolacji DNA oparta na wykorzystaniu żywicy Chelex-100 jest uniwersalna, nie wymaga przygotowania warstwy buforu i można w niej wykorzystywać zaschniętą krew jako źródło DNA [6].

Chelex-100 używa się do odzyskiwania DNA z różnych próbek biologicznych , w tym z: próbek do medycyny sądowej, zaparafinowanych tkanek stałych, pełnej krwi myszy, suszonych plam krwi na filtrach papierowych (dla testów wirusologicznych), kultur lub próbek klinicznych (do badań mikrobiologicznych) [6].

W doświadczeniu przeprowadzonym przez J.M. Polski i wsp (1998), próbki krwi obwodowej (5 ml każda) wykorzystano do przygotowania buforu (wg instrukcji) i rutynowych izolacji DNA za pomocą Qiagen QIAamp blood kit (kontrola DNA), zgodnie z zaleceniami w instrukcji producenta. Krótko mówiąc, 200µl buforu inkubowano z proteinazą K, zmieszano z etanolem i zwirowano na kolumnie (QIAamp spin kolumn). Po wirowaniu kolumnę przemyto, DNA eluowano rozgrzanym buforem [6].

Szybka metoda ekstrakcji genomowego DNA (Polski J.M i wsp. 1998) [6].

Dysk papierowego filtra (bibuła filtracyjna, 7mm, Whatman 3M), podziurkowano bezpośrednio w 500µl sterylnych probówkach używając sterylnego dziurkacza. 10 µl krwi obwodowej nakropiono na papierowy filtr w probówce wirówkowej . Po 30 minutach suszenia w temperaturze pokojowej, na filtr dodano 500 µl sterylnej wody (millipore) , a następnie próbkę wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut [6].

Po całkowitym usunięciu supernatantu (niezbędnego dla pewnej amplifikacji), dodano 200 µl 5% żywicy Chelex-100 (Bio Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Próbkę inkubowano w termocyklerze (Barnstead Thermolyne, Dubuque, Iowa, USA) przez 90 minut w 56°C, a następnie przez 10 minut w temperaturze 99°C. Po ochłodzeniu próbkę krótko wortexowano i zwirowano. Otrzymany supernatant był używany jako substrat w reakcji PCR [6].

Wyniki przeprowadzonego badania (Polski J.M. i i wsp., 1998) wskazują, że odzyskanie DNA z bibuły filtracyjnej nasyconej pełną krwią jest użyteczną metodą przygotowania DNA do PCR (w celu wykorzystania do testów genetycznych). Metoda ta jest opłacalna, efektywna, nietoksyczna i łatwa w stosowaniu, a większość czynności można wykonać w termocyklerze. Ponadto cała procedura odbywa się w jednym pojemniku, zmniejszając szanse na zanieczyszczenie próbki, straty próbki lub błędy. DNA z krwi na filtrze z papieru impregnowanego pozostaje stosunkowo stabilne w temperaturze pokojowej przez co najmniej 4.5 miesiąca [6].

Polski J.M i wsp. (1998) na podstawie przeprowadzonego doświadczenia, stwierdzili, że metoda z wykorzystaniem Chelex-100 i filtru papierowego może być metodą alternatywną w warunkach klinicznych do izolacji DNA. Jest metodą łatwą, stabilną i niedrogą, zapewniającą stabilny DNA dla wielu testów. Możliwość zanieczyszczenia próbki jest ograniczona, ponadto metoda pozwala na łatwe przechowywanie i transport próbek od momentu rejestracji [6].

W wyniku reakcji PCR (Polski J.M i wsp, 1998), uzyskano identyczne wyniki z DNA izolowanego rutynowymi metodami jak i z wykorzystaniem filtru papierowego i Chelex-100 [6].

Izolowanie DNA z jądrzastych erytrocytów [1], [7].

Koi Herpesvirus (KHV) jest wysoce zaraźliwą chorobą wirusową, która powoduje znaczne zachorowalności i śmiertelności w karpia (*Cyprinus carpio*) i jej ozdobnej formy udomowionej, karp koi. Choć wirus jest obecnie uważany za DNA wirusów należących do rodziny Herpesviridae, niektóre raporty mają wątpliwości tej klasyfikacji i zmieniono nazwę wirusa jako Carp Nephritis i Gill Necrosis Virus, CNGV. Niedawno, raporty na podstawie morfologii i genetyki wykazały mocne dowody, że KHV jest rzeczywiście herpeswirusem [7].

Koi Herpesvirus (KHV) dotyczy zarówno młodych jak i dorosłych karp i koi, i jest szczególnie zabójczy dla narybku. Wysoka śmiertelność spowodowana przez chorobę wywarła negatywny wpływ na handel międzynarodowy. Do wykrywania KHV stosowane są różne techniki diagnostyczne, w tym: izolacja wirusa w hodowli komórkowej, mikroskopia elektronowa, kilka testów PCR, ELISA, hybrydyzacji in situ. Wszystkie te metody są czasochłonne, pracochłonne i wymagają specjalistycznego sprzętu [7].

W celu szybkiej diagnostyki zakażenia wirusem KHV stosuje się coraz to nowsze metody identyfikacji, oparte zazwyczaj na izolacji kwasów nukleinowych z komórek ryb (głównie z jądrzastych erytrocytów), a następnie na ich amplifikacji (PCR). Aktualnie, jedną z najnowszych metod jest tzw. reakcja LAMP (amplifikacji kwasu nukleinowego za pośrednictwem izotermicznej amplifikacji, oparta na przesunięciu syntezy nici DNA przez polimerazę Bst DNA). W reakcji tej wykorzystuje się specjalnie zaprojektowane dwa wewnętrzne i dwa zewnętrzne startery, w celu poprawy specyficzności [7].

U kręgowców takich jak: ryby, płazy, gady i ptaki występują jądrzaste erytrocyty (Andrew 1965). U ryb występuje średnio od 500 000 - 2 600 000 erytrocytów w 1 mm³. Z kolei, erytrocyty pstrąga zawierają ok. 5,6 pg DNA na jądro (Mirsky i Ris 1949). W związku z tym, możliwe jest uzyskanie (wyzolowanie) stosunkowo dużej ilości DNA z niewielkiej ilości krwi [1], [5].

Opisana metoda opiera się na odbiałczaniu do którego używa się roztworu NaCl, powodującego odwodnienie i wytrącenie białek zawartych w komórkach krwi. Materiałem w przedstawionej

metodzie jest krew ryby np. krew z żyły ogonowej pstrąga lub karpia [1], [5].

Krew, z której będzie izolować się DNA należy pobrać na antykoagulant (np. EDTA) do probówki o pojemności 5 ml (probówka musi znajdować się w lodzie). Następnie krew należy odwirować (1300 x g, temp. 4°C, 30 min). Po wirowaniu, erytrocyty tworzące osad (ok. 10-100µl) zawiesić w 3 ml buforu do lizy (tj. 10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA(pH=8.2)) w probówce o poj. 15 ml. Do probówki dodać 0,2 ml SDS (1% roztwór SDS w 2 mM EDTA o pH=8.2) oraz 0,5 ml proteinazy K (stężenie 2 mg/ml) [1], [5].

Całość inkubować w 50°C przez 2 h, od czasu do czasu łagodnie wytrząsając w celu strawienia białek jądrowych i komórkowych. Strawione białka wytrącić przez dodanie 1 ml 6 M roztworu NaCl, energicznie wytrząsając przez 15 sekund. Po wytrząsaniu próbkę odwirować (1300 x g, 4°C, 15 min). Otrzymany w wyniku wirowania supernatant przenieść do nowej probówki. Następnie przeprowadzić 2-krotne wysalanie białek (tj. dodać 1 ml 6M roztworu NaCl, wytrząsać energicznie przez 15 sekund, odwirować, a otrzymany supernatant przenieść do nowej probówki). Po ostatniej ekstrakcji powinno się otrzymać całkowicie przejrzysty supernatant [1], [5].

Otrzymany supernatant wytrącać 2 objętościami etanolu (96% roztwór etanolu) o temperaturze pokojowej. DNA odzyskać przez nawinięcie na bagietkę. Otrzymane DNA płukać 2-krotnie 70% roztworem etanolu, a dalej wysuszyć je na powietrzu. Wysuszone DNA rozpuścić w 200 µl buforu TE o pH=7.6 (tj. 10 mM Tris/HCl, 0,2 mM EDTA).

Wydajność przedstawionej metody wynosi 220 µg DNA ze 100 µl upakowanych (pod wpływem wirowania) erytrocytów pstrąga lub karpia. Otrzymany DNA nadaje się jako substrat do reakcji PCR. Należy pamiętać, że w przypadku gdy objętość upakowanych erytrocytów przekracza 200 µl, to powinno się wydłużyć czas trawienia proteinazą K nawet do co najmniej 8 godzin.

DNA zabezpieczone buforem TE można poddać inkubacji w 95°C w celu usunięcia DNaz [1], [5].

Izolowanie DNA z archiwizowanych tkanek w celu zastosowania w reakcji PCR [2], [5].

Dzięki poznaniu metody archiwizowania tkanek w parafinie możliwe jest badanie tych próbek na poziomie molekularnym nawet po upływie wielu lat. Pozwala to tym samym na działania o charakterze retrospektywnym, które mogą dotyczyć dużej liczby osobników, a dodatkowo możliwe jest śledzenie w dużych przedziałach czasowych zmian genetycznych, bądź też czynników infekcyjnych, które to związane są z różnymi chorobami [2].

Analiza na poziomie klinicznym istotnych zmian DNA tkanek, które archiwizowane były przez długi czas w parafinie w ogromnej mierze zależy od umiejętności prawidłowego i zarazem efektywnego izolowania materiału genetycznego (DNA) [2], [5].

W przedstawionej metodzie izolacji DNA jako materiału używa się tkanek archiwizowanych w postaci bloków parafinowych [2], [5].

Pierwszym krokiem w izolacji jest sporządzenie z bloków parafinowych skrawków o grubości ok. 5-10 µm. W tym celu bardzo użyteczny staje się mikrotom, pozwalający na precyzyjne cięcie takich skrawków. Pocięte skrawki należy umieścić w probówkach o pojemności 1,5 ml (jeden skrawek w jednej probówce). Do każdej probówki należy dodać 1 ml ksylenu, a następnie mieszać przez 30 min. Próbkę odwirować (14 000 x g, temp. pokojowa, 5 min). Po wirowaniu usunąć supernatant (etap z dodawaniem ksylenu, mieszaniem i wirowaniem ponownie powtórzyć) [2].

Po wirowaniu do probówki dodać 0,5 ml absolutnego etanolu, a całość wymieszać przez delikatne odwracanie probówki. Odwirować (14 000 x g, temp. pokojowa, 5 min), po wirowaniu usunąć starannie jak największą ilość etanolu. Znowu dodać etanol (jak wcześniej), wymieszać odwirować (14 000 x g, temp. pokojowa, 5 min) i usunąć etanol. Probówkę wysuszyć w aparacie próżniowym w celu całkowitego odparowania etanolu [2], [5].

Następnie do probówki dodać 100 µl buforu do trawienia zawierającego proteinazę K (tj. 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, 0,5% Tween 20 o pH=9.0, proteinaza K w stężeniu 200 µg/ml)- w przypadku dużych próbek ilość dodawanego buforu do trawienia można zwiększyć do 200µl. Próbkę z buforem inkubować w temp. 55°C przez 3 godziny. Po inkubacji krótko odwirować dla

usunięcia cieczy z górnej części probówki. Znów inkubować w temp. 95°C przez 8-10 minut, w celu inaktywacji proteiny K. Nie należy przekraczać 10 minut inkubacji inaktywując proteinę K. Otrzymany preparat DNA przechowywać w temperaturze -20°C [2], [5].

Metody izolacji wysokocząsteczkowego i niskocząsteczkowego DNA

Izolowanie wysokocząsteczkowego DNA z krwi [3], [5].

Z przeprowadzonych badań wynika, że konwencjonalne metody nie nadają się do izolacji wysokocząsteczkowego DNA, ze względu na jego dużą podatność na uszkodzenia. Zwiększona wrażliwość wysokocząsteczkowego DNA spowodowana jest konsekwencją dużej wartości stosunku długości do średnicy heliksu wysokocząsteczkowego DNA [3], [5].

W trakcie izolacji wysokocząsteczkowego DNA wykorzystuje się działanie destabilizujące i denaturujące izotiocyanian guanidyny, który działa na makrocząsteczki- w tym też na enzymy trawiące DNA. Rozpuszczone w roztworze izotiocyanian guanidyny DNA, można wytrącić stosując w tym celu standardowo alkohol izobutylowy. Przedstawiona poniżej metoda oprócz zastosowania do izolacji genomowego DNA, może być także używana do oczyszczania plazmidów i kosmitów. Jedną z głównych zalet tej metody jest krótki czas jej wykonywania [3], [5].

Krew, z której ma być izolowane wysokocząsteczkowe DNA mieszać z 5 objętościami buforu do lizy erytrocytów (tj. 140 mM NH₄Cl, 100 mM Tris/HCl o pH=7.6) ogrzanego do temperatury 37°C. Po dodaniu buforu próbkę inkubować w 37°C przez 5 minut. Następnie odwirować (1000 x g, temp. 25°C, 10 min). Otrzymany po wirowaniu supernatant ostrożnie usunąć. Powstały osad leukocytów zawiesić w 10 ml 0,85% roztworu NaCl. Znów wirować (jak wyżej), otrzymany osad leukocytów zawiesić w 10 ml 0,85% roztworu NaCl (schemat ten powtarzać aż do momentu uzyskania zadowolającego niskiego poziomu zanieczyszczenia erytrocytami) [3], [5].

Po ostatnim wirowaniu, osad leukocytów zawiesić w buforze HTE (bufor HTE o pH=8.0 tj. 100 mM Tris/HCl, 40 mM Na₂EDTA). Po dodaniu buforu HTE, należy przeprowadzić lizę leukocytów, wykonując szybką iniekcję (strzykawką z igłą nr 18) 2 ml roztworu SDS (tj. 0,2% roztwór SDS w buforze HTE) do zawiesiny leukocytów. Do tak zlizowanych komórek dodać 1,5 objętości roztworu izotiocyanian guanidyny (tj. 6 M roztwór izotiocyanian guanidyny), całość próbki wymieszać przez odwracanie probówki. Po tym etapie przeprowadzić ekstrakcję białek komórkowych za pomocą równej objętości mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamyłowy (25:24:1).

Ekstrakcję powtarzać do momentu zaniku interfazy (zazwyczaj do całkowitego zaniku interfazy wystarczy powtórzenie 2-3 ekstrakcji) [3], [5].

Do fazy wodnej zachowanej po ostatniej ekstrakcji, dodać równą objętość alkoholu izobutyłowego, w celu wytrącenia DNA. Wielkocząsteczkowy DNA odzyskać używając w tym celu pipety ze ściętym końcem. DNA płukać w 70% roztworze etanolu (bez wirowania). Tak wyizolowane DNA rozpuścić w buforze TE (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH=8.0) w temperaturze 4°C, przez co najmniej 24h [3], [5].

Izolując tą metodą otrzymujemy DNA, które jest stabilne w roztworze izotiocyanian guanidyny przez co najmniej 2 miesiące. Wydajność przedstawionej metody przekracza niemal 2-krotnie wydajność tradycyjnie stosowanej metody fenolowej [3], [5].

Izolowanie niskocząsteczkowego DNA [4], [5].

W trakcie enzymatycznego trawienia jąder komórkowych może dochodzić do sytuacji, w której w chromatynie będą występować krótkie, powtarzające się fragmenty DNA. Ich masa cząsteczkowa może wahać się w granicach 45 000 - 65 000. Podobnie in vivo, w wątrobie lub w trzustce, mogą formować się fragmenty tej samej długości, w związku z czym wysokocząsteczkowe DNA może być także izolowane z tych narządów [4], [5].

Przedstawiona poniżej metoda izolacji niskocząsteczkowego DNA opiera się na izolowaniu jąder komórkowych, a następnie ekstrakcji DNA za pomocą rozpuszczalników organicznych [4], [5].

W przypadku izolacji DNA ze świeżo pobranej wątroby szczura, należy ją najpierw wypłukać

w zimnym roztworze 0,25 M sacharozy, a dalej homogenizować w homogenizatorze nożowym w chłodni. Następnie, rozdrobnioną w ten sposób wątrobę należy homogenizować w buforze do homogenizacji (tj. 2,2 M sacharoza, 3 mM CaCl₂), w temp. 4°C, używając w tym celu 12 części buforu na 1 część zmielonej tkanki. Otrzymany homogenat odwirować (40 000 x g, 4°C, 1 godzina). Otrzymany po wirowaniu osad jąder, zawiesić w roztworze o składzie 1 M sacharoza, 1 mM CaCl₂. Próbkę zwirować (1000 x g, temp. 4°C, 10 minut). Zebrać osad oczyszczonych jąder komórkowych i zawiesić je w buforze do lizy (tj. 1% SDS, 1 mM EDTA), używając 1-2 ml buforu na ilość jąder otrzymaną z 1 g tkanki [4], [5].

Następnie dodać RNazę (RNaza o stężeniu 10 mg/ml w 0,15 M roztworze NaCl, pH=5.0) do końcowego stężenia 200µg/ml, poddając ją wstępnej inkubacji (w temperaturze 90°C przez 10 min), a dalej inkubować w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Po inkubacji do próbki dodać pronazę (pronaza o stężeniu 20 mg/ml) do końcowego stężenia 300 µg/ml i inkubować w 37°C przez 2 godziny. Próbkę odwirować (10 000 x g, 4°C, 30 minut). Otrzymany po wirowaniu supernatant zachować! [4], [5].

Do supernatantu dodać 4 M roztwór NaClO₄ w takiej ilości, aby końcowe stężenie wynosiło 1 M. Ekstrahować próbkę 4 razy mieszaniną alkohol izoamyłowy/chloroform (objętość 1:5), wirując po każdej ekstrakcji (10 000 x g, 4°C, 30 minut) [4], [5].

Otrzymane DNA wytrącić za pomocą 2 objętości zimnego etanolu, a dalej odzyskać je przez wirowanie (27 000 x g, temp. 4°C, 30 minut). DNA rozpuścić w buforze TE o pH=7.6 (tj. 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA) [4], [5].

Wydajność przedstawionej metody izolacji wynosi ok. 95% [4], [5].

Literatura:

- [1]. Medrano J.F., Aasen E., Sharrow L, 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8:43
- [2]. Sepp R., Szabo I., Uda H., Sakamoto H, 1994. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J.Clin. Pathol.*, 47:318-323.
- [3]. Nelson J.E., Krawetz S.A, 1992. Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/izobutyl alkohol fractionation. *Anal. Biochem.*, 207:197-201.
- [4]. Rossi R., Viola-Magni M.P., 1978. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 158:117-122.
- [5]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. *Ćwiczenia z biochemii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 366-381
- [6]. Polski J.M., Kimzey S, Percival R. W., Grosso L.E., 1998. Rapid and effective processing of blood *Pathol Mol Pathol: Clin J Chelex-100*. and paper retilfi using PCR diagnostic for specimens 1998;51:215-217.
- [7]. Soliman H., El-Matbouli M., 2005. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification, 2005. *Virology Journal* 2005, 2:83

<http://laboratoria.net/arttykul/13163.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W](#)

[przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy