

EXTRACCIÓN DE ADN CON RESINA CHELEX EN EL ANÁLISIS DE LA AMPLIFICACIÓN ONCOGÉNICA EN CARCINOMAS DE CABEZA Y CUELLO

L. A. GARCÍA GONZÁLEZ*, J. P. RODRIGO TAPIA**, P. SÁNCHEZ LAZO***, S. RAMOS***, C. SUÁREZ NIETO**

*SERVICIO DE ORL. HOSPITAL CARMEN Y SEVERO OCHOA. ASTURIAS. **SERVICIO DE ORL. HOSPITAL CENTRAL DE ASTURIAS. INSTITUTO DE ONCOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE OVIEDO. ***DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. INSTITUTO DE ONCOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE OVIEDO.

RESUMEN

La extracción de ADN de tejido tumoral puede ser el proceso más laborioso y complejo en la amplificación de ADN mediante PCR cuando se utiliza el procedimiento con fenol-cloroformo. Comparamos este método de extracción extenso, lento y caro con otras dos técnicas basadas en el uso de resina Chelex-100. Esta resina quelante ha sido utilizada para la extracción de ADN de diferentes tejidos para su uso con la PCR. Estos procedimientos son

simples, rápidos y no requieren múltiples pasos. En este trabajo comparamos la extracción de ADN procedente de 30 carcinomas epidermoides de cabeza y cuello utilizando la precipitación con solventes orgánicos, resina Chelex-100 con y sin procesamiento previo con proteinasa K. Los resultados evidencian que el procedimiento con proteinasa K y resina Chelex-100 es un método tan eficaz como la precipitación con fenol-cloroformo.

PALABRAS CLAVE: Tumores de cabeza y cuello. Factores de crecimiento fibroblástico. Extracción de ADN. Amplificación de oncogenes. Reacción en cadena de polimerasa. Resina Chelex-100.

ABSTRACT

DNA EXTRACTION USING CHELEX RESIN FOR THE ONCOGENIC AMPLIFICATION ANALYSIS IN HEAD AND NECK TUMOURS

DNA extraction from tissues can be the most laborious and complex step in amplifying DNA by PCR when phenol-chloroform procedure is used. We compare this lengthy, slow and expensive extraction method with other two based in the use of Chelex-100 resin. This chelating resin has been applied for extracting DNA from different tissues to use with the PCR. These procedu-

res are simple, rapid and do not require multiple steps. In this study we compared DNA extraction from 30 head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) using organic solvent precipitation, Chelex 100 resin with and without proteinase K pretreatment. The results show that proteinase K-Chelex 100 procedure is as efficient as the phenol-chloroform one.

KEY WORDS: Head and neck cancer. Fibroblastic growth factors. DNA extraction. Oncogene amplification. Polymerase chain reaction. Chelex 100-resin.

Correspondencia: L. A. García González. Servicio de ORL. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Sienna, 11. Cangas del Narcea. 33800 Asturias. E-mail: lgarciag@hcsa.sespa.es

Fecha de recepción: 10-12-2003

Fecha de aceptación: 29-1-2004

INTRODUCCIÓN

Actualmente el conocimiento de las alteraciones moleculares en la carcinogénesis ha permitido obtener información sobre la posible evolución y pronóstico de los tumores. El mejor conocimiento de las características genéticas tumorales se relaciona directamente con el avance de las técnicas de la biología molecular. La aplicación de la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) permite detectar secuencias específicas de amplificación de ADN sin la necesidad de fragmentos de alto peso molecular, realizándolo con alta especificidad y resultando un método óptimo para el procesamiento de una gran cantidad de muestras simultáneamente. Estas muestras de ADN pueden proceder de pequeñas cantidades de tumor (piezas quirúrgicas, biopsias, muestras en parafina, tejidos procedentes de punción-aspiración). Complementariamente, es deseable aplicar un método de extracción de ADN cómodo y simple, que evite la contaminación de las muestras; éste es un posible inconveniente del método de precipitación con fenol-cloroformo. Existen técnicas de extracción de ADN, como la incubación con SDS^{1,2} o la sonicación³, las cuales son rápidas y de fácil aplicación, pero que requieren grandes cantidades de tejido. En este trabajo hemos utilizado resina Chelex-100, una resina quelante de cationes aplicada para la extracción de ADN, con y sin digestión previa con proteinasa K, y estos procedimientos han sido comparados con los resultados de la purificación con solventes orgánicos y precipitación con etanol. Aunque existen estudios previos sobre la utilidad de la extracción de ADN con resina Chelex-100⁴⁻⁹, los estudios sobre la aplicación clínica son escasos¹⁰. Hemos realizado este trabajo analizando la tasa de amplificación de los oncogenes *INT2* y *HST1*, los cuales pertenecen a la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos. Estos se relacionan con los procesos de angiogénesis tumoral, presentes en el desarrollo de metástasis ganglionares en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello¹¹.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras y tumorales y extracción de ADN

Muestras tumorales procedentes de 30 carcinomas epidermoides de cabeza y cuello fueron obtenidas durante la resección quirúrgica del tumor. De la pieza quirúrgica se obtuvo una porción de tejido tumoral sin áreas necróticas, que inmediatamente se congeló y almacenó en nitrógeno líquido a -70°C hasta la extracción de ADN. Las muestras tumorales

son cortadas y procesadas siguiendo los siguientes métodos de extracción (A-C):

Método A

Extracción del ADN según el clásico método de precipitación con fenol-cloroformo¹² siguiendo los siguientes pasos. En primer término, la muestra tumoral todavía sin descongelar, con un tamaño medio de 10x10 mm, es cortada minuciosamente en pequeñas piezas. Después es homogeneizada mediante agitación en 5 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0, EDTA 0,025 M, NaCl 0,1 M and SDS 0,2%). A continuación se añade 10 μl de ARNasa (10 mg/ml; Boehringer Mannheim) y la mezcla se incuba a 37°C durante una hora con agitación continua. El siguiente paso consiste en añadir 20 μl de proteinasa K (25 mg/ml; Boehringer Mannheim) e incubar la mezcla y agitarla en constante agitación durante 5 horas a 37°C . Este paso se repite en 2 ocasiones. Después de esto, la solución se deja enfriar a temperatura ambiente, añadiéndole un volumen equivalente de fenol equilibrado con Tris-HCl 0,5 M pH 8,0. A continuación, la solución se centrifuga durante 15 minutos a 2500 revoluciones por minuto (rpm), formándose una fase orgánica inferior y una fase líquida superior. La fase líquida se separa a un tubo, donde se le añade un volumen equivalente de isoamilalcohol-fenol-cloroformo. Esta mezcla se centrifuga durante 15 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante obtenido se diluye en 2 volúmenes de isopropanol a -20°C . En este paso el ADN precipita y se extrae. El ADN precipitado se lava en etanol al 70%. Finalmente la hebra de ADN se seca y disuelve en 500 μl de Tris-EDTA 10:1, guardando la solución a -20°C .

Método B

Una muestra de tejido (de aproximadamente 1x1x1 mm) se introduce en un tubo de Eppendorf y se mezcla en 500 μl de una solución de resina Chelex-100 al 10%. Esta se prepara previamente disolviendo la resina a la proporción reseñada en agua estéril desionizada a 60°C y removiéndola. Se añade a la solución 15 μl de proteinasa K (Boehringer Mannheim) a una proporción de 10 mg/ml, incubando la mezcla a 55°C en agitación continua durante una hora. A continuación, la mezcla se introduce durante 15 minutos a 100°C para intensificar la desnaturalización de las proteínas. Los tubos que contienen el ADN extraído y la resina Chelex en unión con las proteínas degradadas se almacenan a 4°C o -20°C . Antes de utilizarlo se agita en un vórtex y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 segundos para

depositar la masa que forman la resina y las proteínas. Posteriormente, se vuelve a centrifugar el tubo durante 10 minutos para diferenciar la porción superficial en la que se encontrará el ADN y la inferior que incluye a la resina Chelex-100, las proteínas desnaturizadas y otros elementos.

Para la utilización en la PCR, se toman 2 µl del sobrenadante por cada 10 µl de volumen final de la mezcla para la PCR.

Método C

Este método utiliza el mismo protocolo, pero no se añade la proteinasa K en la mezcla de tejido y resina Chelex-100.

Cebadores de oligonucleótidos y análisis PCR. La mezcla para la PCR contiene 0,2-0,5 µg de ADN, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador, 1 µM y 1 U de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) en un volumen total de 50 µl, depositándose sobre la mezcla 50 µl de aceite mineral. El proceso de realización de la PCR incluye: 1 minuto a cada una de las siguientes temperaturas, 94°C, 56°C y 72°C, teniendo lugar 30 ciclos y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos. Dos diferentes tipos de cebadores, uno para los genes a estudiar, *INT2* y *HST1*, u otro para el gen que se utiliza como control en el estudio (tirosina hidroxilasa), se introducen en la mezcla de la reacción de PCR diferencial¹³. En nuestro estudio hemos utilizado el gen de la tirosina hidroxilasa (TH) por estar localizado en el mismo cromosoma que los oncogenes analizados. Las cadenas de los cebadores fueron diseñadas de secuencias genómicas procedentes del GenBank. Los cebadores para el oncogén *INT2* (número de acceso GenBank NM005247) eran 5'- TGG AGG TGG GCA TTG TGG- 3' y 5'- ACC GCT ACT CCG TCA GCG - 3'. El fragmento amplificado constaba de 128 pares de bases (pb). Por su parte, los cebadores de oncogén *HST1* (número de acceso GenBank MN002007) eran 5'- TGA GCA TCT TGC GCG TGG- 3' and 5'- GCC ACG AGC CTG CTA GCC - 3', amplificando un fragmento de ADN de 136 pb. Los cebadores del gen TH (número de acceso GenBank D00269) eran 5'- GCC CCA GCT GCA TCC TAC- 3' and 5'- CTT GGC AGA CAC CTG GGG - 3', dando lugar en la reacción a un fragmento de 188 pb. Los cebadores fueron obtenidos del laboratorio MWG-Biotech (Mannheim, Germany). Muestras de tejido normal (amígdalas) obtenidas de pacientes no fumadores fueron utilizadas como controles negativos. Como controles positivos se utilizaron una mezcla de ADN procedente de teji-

dos normales con cantidades crecientes de secuencias amplificadas de los oncogenes a estudio, lo que simulaba diferentes grados de amplificación.

Electroforesis y cuantificación de los resultados de la PCR. Después de la PCR, 10 µl de cada muestra fue sometida a electroforesis sobre geles formados por agarosa NuSieve al 3% (FMC, Rockland, ME) durante 1,5 horas a 65 V en una solución tampón 40 mM Tris-Acetate, 2 mM EDTA. Los geles se teñían con bromuro de etidio, y las imágenes a la luz ultravioleta eran captadas mediante una cámara digital y almacenadas en un ordenador. Las bandas que se ponían de manifiesto en los geles eran cuantificadas mediante sistemas de análisis densitométrico computerizado (Kodak Digital Science 10, Eastman Software, Billerica, MA). De esta forma se obtenían ratios de amplificación de los oncogenes *INT2* y *HST1* en comparación con el gen control, TH. Los resultados de la densitometría y la calidad de la reacción (presencia de ausencia de bandas no esperadas) se inspeccionaban tomando como referencia los marcadores de pesos moleculares que se introducían en los geles.

RESULTADOS

La amplificación de la PCR de fragmentos de 128 pb correspondientes al oncogén *INT2*, a fragmentos de 136 pb del oncogén *HST1* y de fragmentos de 188pb pertenecientes al gen de la TH se analizaron utilizando los 3 métodos anteriormente descritos en las 30 muestras tumorales. En el análisis de los geles fueron evaluadas la presencia de bandas no específicas y los ratios de amplificación *INT2*/TH y *HST1*/TH. Experimentalmente, la amplificación génica se define como el incremento del ratio gen diana/gen control mayor de 2, en comparación con las proporciones en tejidos normales, tomados como controles negativos. Atendiendo al clásico método A como referencia, 17 (56,6%) de las 30 muestras presentaban amplificación del oncogén *INT2* (ratio *INT2*: TH entre 2 y 15,6). Para el oncogén *HST1*, 15 de las muestras mostraban amplificación (50%) (ratio *HST1*: TH entre 2,5 y 12,4).

Utilizando el método B se hallaron resultados equivalentes a los hallados con el clásico protocolo de precipitación con solventes orgánicos. Estos resultados se objetivaron cuantitativa y cualitativamente. La tasa de amplificación media con del oncogén *INT2* fue de 3,75 en las muestras tratadas con el método A, mientras que fue de 3,78 en aquellas en las que se usó el protocolo con resina Chelex y proteinasa K (Tabla 1). En el estudio del

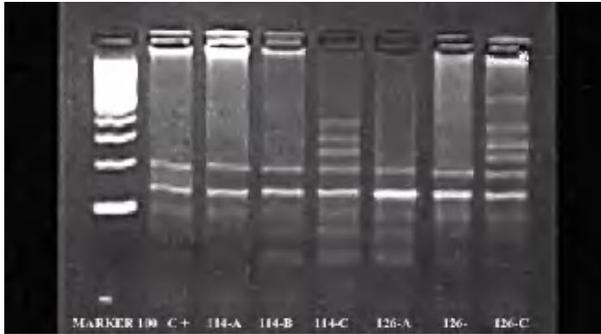


Figura 1. PCR diferencial de la amplificación del oncogén *HST1* para varios tumores utilizando los 3 métodos a estudio. El análisis densitométrico de las imágenes muestra resultados equivalentes, pero cualitativamente en las muestras en las que se empleó el método C aparecen bandas inespecíficas.

oncogén *HST1*, el tratamiento con fenol-cloroformo obtuvo una tasa media de amplificación de 3,37, mientras que al usar la técnica con la resina y digestión con proteinasa K la tasa media de amplificación media era de 3,44 (Tabla 1). Desde el punto de vista cualitativo no se hallaron diferencias remarcables, sin que tuviese lugar la aparición de bandas inespecíficas (Figuras 1 y 2).

La tercera técnica empleada, tratamiento con resina Chelex-100 sin digestión con proteinasa K, es más sencilla y rápida que las otras dos, pero no se obtuvieron resultados tan satisfactorios para los 2 genes estudiados como con las anteriores. Hemos hallado la presencia de bandas inespecíficas y gran variabilidad en las tasa de amplificación en comparación con lo resultados obtenidos con los otros métodos (Figuras 1 y 2). Para el oncogén *INT2* la amplificación media encontrada era de 3,44, mientras que para el oncogén *HST1* la tasa media de amplificación era de 3,23. Estos resultados muestran una menor eficacia frente a los métodos previos (Tabla 1). Esta variabilidad es más evidente en el caso de

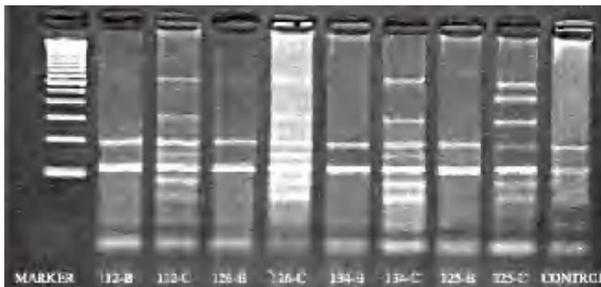


Figura 2. Imagen de muestras tumorales estudiadas para la amplificación del oncogén *INT2* comparando los métodos B y C. Cuantitativamente se aprecia una menor proporción de amplificación *INT2/TH* cuando previamente no se ha tratado la muestra con proteinasa K, evidenciándose algunas bandas inespecíficas en el gel de agarosa.

las muestras con mayores tasas de amplificación. La calidad de los gels cuando se utilizaba el método C era menor que la de aquellos en los que se había empleado cualquiera de los otros 2 procedimientos. Esto se relacionaba a la presencia de bandas inespecíficas de variable intensidad que hacía ambigua y dificultosa la interpretación de los resultados.

DISCUSIÓN

Aunque la precipitación con fenol-cloroformo proporciona fragmentos de ADN de alto peso molecular, adecuado para complejas investigaciones de biología molecular, este método requiere múltiples pasos lentos y costosos. Este proceso puede hacerse dificultoso para realizarse a gran escala en la práctica clínica¹⁴. Actualmente una de las principales aplicaciones de este método es en la PCR, la cual tiene la capacidad de poder realizarse en pequeñas muestras y obtener adecuados resultados con pequeños fragmentos de ADN^{5,7,8}. En la práctica clínica el objetivo de la aplicación del método de la PCR es la búsqueda de características moleculares en el ADN relacionándolo con el pronóstico. Con éste se persigue aplicar tratamientos lo más adecuados posibles a cada uno de los pacientes. En estas situaciones el tamaño de la muestra a estudiar conviene que sea pequeño, procedente de una biopsia o incluso de muestras obtenidas mediante punción-aspiración¹⁰. El objetivo de este estudio es el comparar la eficacia de los métodos de extracción de ADN utilizando resina Chelex-100 en comparación con el clásico procedimiento de precipitación con solventes orgánicos. La resina Chelex actúa como una resina quelante de iones metálicos polivalentes, que actuarían como catalizadores en la ruptura de ADN a altas temperaturas pudiendo inhibir la PCR^{10,15}. Estudios previos muestran que el uso de la resina Chelex sin proteinasa K proporciona una adecuada cantidad de ADN para amplificar⁷. Sin embargo, estos estudios también indican algunos límites considerando el tamaño de los productos que pueden ser amplificados. Podría ser posible amplificar fragmentos de hasta 650 pb en muestras tratadas sólo con la resina Chelex-100, y fragmentos de hasta 1000 pb en las que se ha utilizado la resina y digestión con proteinasa K. Todos los fragmentos de ADN que se amplifican en este trabajo tienen un pequeño tamaño (128-188 pb), por lo que la aplicación de los métodos basados en la resina Chelex-100 no presentan esta dificultad técnica. Algunos estudios han puesto de manifiesto un descenso en la amplificación de fragmentos mayores de 600 pb cuando se utilizan muestras almacenadas con proteinasa K, quizás debido a una mayor ruptura del ADN¹⁶.

Tabla 1: Ratios de amplificación de las muestras estudiadas con cada uno de los 3 métodos. Los asteriscos (*) indican aquellas muestras que evidenciaron la presencia de bandas inespecíficas. El 1 representa los casos que mostraban amplificación y el 0 los casos en los que no se evidenció. En el caso del oncogén *INT2* se encontraron bandas inespecíficas al utilizar el método C en 24 casos (80%), mientras que éstas estaban presentes en 21 de los casos para el oncogén *HST1* (70%)

| nº de caso | Amplificación | AMPLIFICACION <i>INT-2</i> | | | Amplificación | AMPLIFICACION <i>HST-1</i> | | |
|--------------|---------------|----------------------------|-------------|-------------|---------------|----------------------------|-------------|-------------|
| | | Método A | Método B | Método C | | Método A | Método B | Método C |
| 101 | 1 | 15.6 | 15.8 | 13.7* | 1 | 12.4 | 12.56 | 11.8* |
| 110 | 0 | 1.64 | 1.67 | 1.58 | 0 | 1.52 | 1.56 | 1.58 |
| 111 | 1 | 2 | 2 | 2* | 0 | 1.8 | 1.79 | 1.77* |
| 112 | 1 | 5.3 | 5.2 | 4.2* | 1 | 5.4 | 5.61 | 5.21* |
| 113 | 1 | 3.1 | 3 | 2.89* | 1 | 2.6 | 2.63 | 2.67* |
| 114 | 1 | 4.7 | 4.81 | 4.42* | 1 | 3.9 | 3.98 | 3.72* |
| 115 | 1 | 5.6 | 5.66 | 5.11* | 1 | 4.6 | 4.71 | 4.66* |
| 116 | 0 | 1.76 | 1.77 | 1.68 | 0 | 1.51 | 1.5 | 1.44 |
| 117 | 0 | 1.85 | 1.89 | 1.75* | 1 | 2.24 | 2.3 | 2.1* |
| 118 | 1 | 4.9 | 5 | 4.61* | 1 | 5.1 | 5.26 | 4.86* |
| 119 | 0 | 1.2 | 1.2 | 1 | 0 | 1.51 | 1.54 | 1.5 |
| 120 | 0 | 1.45 | 1.43 | 1.24* | 0 | 1.62 | 1.65 | 1.64* |
| 121 | 0 | 1.36 | 1.35 | 1.33* | 0 | 1.5 | 1.53 | 1.5* |
| 122 | 1 | 2.18 | 2.2 | 2.21* | 0 | 1.65 | 1.68 | 1.61 |
| 123 | 1 | 7 | 7.2 | 6.51* | 1 | 7.8 | 7.95 | 6.84* |
| 124 | 1 | 3.4 | 3.43 | 3.05* | 1 | 2.9 | 3 | 2.86* |
| 125 | 1 | 7.52 | 7.57 | 6.4* | 1 | 6.57 | 6.61 | 6.49* |
| 126 | 1 | 8 | 8.21 | 8.68* | 1 | 6.1 | 6.31 | 5.65* |
| 127 | 0 | 1.84 | 1.86 | 1.8* | 0 | 1.75 | 1.78 | 1.72* |
| 128 | 1 | 4.4 | 4.3 | 3.74* | 1 | 3.6 | 3.68 | 3.35* |
| 129 | 0 | 1.36 | 1.37 | 1.32 | 0 | 1.42 | 1.47 | 1.44 |
| 130 | 0 | 1.69 | 1.74 | 1.6* | 0 | 1.65 | 1.7 | 1.64 |
| 131 | 1 | 3.15 | 3.23 | 2.67* | 0 | 1.69 | 1.7 | 1.7* |
| 132 | 0 | 1.63 | 1.67 | 1.59* | 0 | 1.59 | 1.6 | 1.56* |
| 133 | 0 | 1.58 | 1.56 | 1.54 | 0 | 1.32 | 1.35 | 1.29 |
| 134 | 1 | 9 | 8.94 | 8.1* | 1 | 7.8 | 8 | 7.12* |
| 135 | 0 | 1.26 | 1.31 | 1.27 | 0 | 1.38 | 1.4 | 1.36 |
| 136 | 1 | 3.7 | 3.78 | 3.41* | 1 | 4.1 | 4.07 | 3.86* |
| 137 | 1 | 2.7 | 2.8 | 2.24* | 1 | 2.5 | 2.64 | 2.27* |
| 138 | 0 | 1.64 | 1.69 | 1.62* | 0 | 1.84 | 1.83 | 1.78 |
| Media | | 3.75 | 3.78 | 3.44 | | 3.37 | 3.44 | 3.23 |

Las equivalencias en los resultados entre el método A y B, si bien no se habían descrito en la muestras de tejido en fresco, sí habían sido descritas en células sanguíneas^{17,18}, materiales de estudio forense^{4,6,19,20}, muestras microbiológicas²¹⁻²³, tejidos sólidos^{24,25}, tejidos parafinados²⁶, muestras de tumores cervicales⁷ e incluso de saliva humana²⁷.

CONCLUSIONES

Hemos comprobado que para la utilización de resina Chelex-100 se precisan menores cantidades

de tejido, equivalentes a muestras de tejido, lo cual generalmente no es posible cuando se procesan las muestras con el método A. Además, la laboriosidad del proceso y los múltiples pasos hacen que este protocolo no sea adecuado para su aplicación rutinaria y simultánea a una gran cantidad de casos. Atendiendo a los hallazgos obtenidos hemos encontrado una fuerte correlación cuantitativa y cualitativa entre los métodos A y B, que permite realizar los estudios de amplificación de una forma eficaz y ágil.

Financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (97/1092).

REFERENCIAS

- 1.- Lench N, Stanier P, Williamson R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet* 1988; 8599: 1356-8.
- 2.- Miller DN, Bryant JE, Madse EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4715-24.
- 3.- Heller MJ, Robinson RA, Burgart LJ, TenEyck CJ, Wilke WW. DNA extraction by sonication: a comparison of fresh, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain reaction assays. *Mod Pathol* 1992; 5: 203-6.
- 4.- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material *Biotechniques* 1991; 10: 506-13.
- 5.- Zandotti C, de Lamballerie X, Guignole-Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A Rapid DNA extraction method from culture - and clinical samples. Suitable for the detection of human cytomegalovirus by the polymerase chain reaction. *Acta Virol* 1993; 37: 106-8.
- 6.- Ellegren H. Genomic DNA from museum bird feathers. In: Herrman B, Hummel S (eds.) *Ancient DNA*, New York: Springer-Verlag 1994; pp 211-7.
- 7.- Sepp R, Szabó I, Uda H, Sakamoto H. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J Clin Pathol* 1994; 47: 318-23.
- 8.- Vignoli C, de Lamallerie X, Zandotti C, Tamalet C, de Micco P. Advantage of a rapid extraction method of HIV1 DNA suitable for polymerase chain reaction. *Res Virol* 1995; 146: 159-62.
- 9.- Estoup A, Largiadèr CR, Perrot E, Chourront D. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1996; 5: 295-8.
- 10.- Gill P, Kimpton CP, Sullivan K. A rapid polymerase chain reaction method for identifying fixed specimens *Electrophoresis* 1992; 13: 173-5.
- 11.- JP. Rodrigo, LA. García, PS. Lazo, S. Ramos, C. Suárez. PCR analysis of INT-2 oncogene amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1996; 115: 82.
- 12.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 9.16-9.19 pp.
- 13.- Rodrigo Tapia JP, García LA, Sánchez Lazo P, Ramos S, C Suárez Nieto. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3177-82.
- 14.- Giraffa G, Rossetti L, Neviani E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J Microbiol Methods* 2000; 42: 175-84.
- 15.- Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* 1989; 3: 11.
- 16.- Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, editor. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 153-6.
- 17.- Attal J, Cajero-Juarez M, Houdébine LM. A simple method of DNA extraction from whole tissues and blood using glass powder for detection of transgenic animals by PCR. *Transgenic Res* 1995; 4: 149-50.
- 18.- Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods. *Br J Haematol* 1998; 101: 349-51.
- 19.- Jung JM, Comey CT, Baer DB, Budowle B. Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ alpha gene. *Int J Legal Med* 1991; 104: 145-8.
- 20.- Vandenberg N, van Oorschot RA, Mitchell RJ. An evaluation of selected DNA extraction strategies for short tandem repeat typing. *Electrophoresis* 1997; 18: 1624-6.
- 21.- de Lamballerie X, Zandotti C, Vignoli C, Bollet C, de Micco P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol* 1992; 143: 785-90.
- 22.- Muñoz C, Jane M, González-Cuevas A, Juncosa T, Gene A, Varea V et al. Evaluation of a simple rapid polymerase chain reaction (PCR) technique for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in childhood. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1999; 17: 119-25.
- 23.- Mohlenhoff P, Muller L, Gorbushina AA, Petersen K. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiol Letts* 2001; 195: 169-73.
- 24.- Panaccio M, Georgesz M, Hollywell C, Lew A. Direct PCR from solid tissues without DNA extraction. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 4656.
- 25.- Liu YS, Thomas RJ, Phillips WA. Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1640.
- 26.- Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: e12.
- 27.- Ohhashi A, Aoki T, Matsugo S, Simasaki C. PCR-based typing of human buccal cell's DNA extracted from whole saliva and saliva stains. *Nippon Hiogaku Zasshi* 1993; 47: 108-18.