



**PENGARUH H₂O pH 5,2 DAN TE BUFFER pH 7,8,
UNTUK PERBAIKAN EFISIENSI REAKSI qPCR
SKORING HER-2 KANKER PAYUDARA**

Farida Mirnawati¹, Abinawanto¹, Anom Bowolaksono¹, Dwi Wulandari², Bugi Ratno Budiarto², M. Ali Warisman², Henny Widyowati², Azamris³, Primariadewi Rustamadji⁴, Desriani²

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, University of Indonesia, ²Research Center for Biotechnology, Indonesian Institute of Science (LIPI),

³Division of Surgical Oncology Medical School of Andalas University, ⁴Division of Anatomy Pathology Medical School of Indonesia University

Email: gerodes@yahoo.com

DOI: [10.26418/jpmipa.v10i1.27628](https://doi.org/10.26418/jpmipa.v10i1.27628)

Abstract

qPCR reactions validity for diagnostic or detection technology applications is very important. High validity of qPCR reactions would increase high level of confidence of qPCR result. The value of the correlation coefficient (R^2), efficiency (E), and coefficient of variability (CV) were some of parameter to test the qPCR validity. Her-2 is a proto-oncogene protein as a prognostic and trastuzumab predictive factors biomarker. Determination scoring HER-2 status can be performed using Immunohistochemistry (IHC), fluorescence in situ Hybridization (FISH) and qPCR. Of the three above techniques, qPCR is a quantified approach. With this approach, HER-2 gene amplification and calibrator gene were needed to determine HER-2 scoring status. whn gene is one of the genes that can be used as a calibrator of HER-2scoring status. qPCR efficiency reportedly influenced by many factors, including the pH. pH is known effected to the polymerase activity and DNA integrity. In this study, the influence of two different solvents, H₂O pH 5.2 and TE buffer pH 7.8, to the efficiency of qPCR reactions scoring HER-2 were compared. Preparation pGEM-T easy whn were also be reported in this study using a standard technique, which can be used as a DNA template. Based on this research, Ct value of pGEM-T whn diluted with H₂O pH 5.2 had a lower Ct value than TE buffer pH 7.8, which significantly affected to qPCR efficiency. The R^2 and E value of qPCR reactions both for H₂O pH 5.2 and TE buffer pH 7.8 are: 0.98 and 115%; 0.99 and 99% for each respectively. Furthermore, the CV value for both were below 10% as theory requirement. Confirming of qPCR result with gel electrophoresis and melt peak analysis for both solvents showed as one single band with a targeted size 93 bp and as a single peak with $T_m \pm 81$ °C. As conclusions, TE buffer pH 7.8 is an ideal solvent than H₂O for qPCR efficiency which further could be applied for scoring in determining of HER-2 status in breast cancer patients based qPCR method.

Keyword: standard curve, qPCR, RNase-free water, TE buffer, R^2 , Efficiency

Received : 14/09/2018

Revised : 12/10/2018

Accepted : 30/01/2019

HER-2 merupakan proto onkogen dengan berat molekul 185kDa, terdiri dari protein reseptor, transmembran dan tyrosin kinase, digolongkan kepada *epidermal growth factor receptor* (EGFR) atau dikenal juga sebagai HER family disandikan oleh gen her-2 pada kromosom 17q21 (Clifford dan Hudis, 2007; Ross dkk., 2004). Dalam kondisi normal, protein ini bersama dengan protein HER lainnya membentuk homodimer ataupun heterodimer meregulasi berbagai fungsi sel termasuk proliferasi sel, apoptosis, diferensiasi, respon immune dan lain sebagainya. Protein HER-2, merupakan salah satu biomarker yang penting pada penyakit kanker payudara. Pada kondisi overekspresi HER-2, akan menjadi penyebab timbulnya kanker payudara sub type HER-2. Overekspresi proto-onkogen HER-2 terjadi 20-30% dari total kasus kanker payudara. Pemeriksaan status HER-2 akan menentukan terhadap prognosis, keganasan kanker, dan terapi yang diberikan kepada pasien. Pasien kanker payudara HER-2 identik dengan prognosis yang jelek, dan angka harapan hidup yang juga rendah. Untuk terapi pengobatannya, pasien kanker payudara HER-2 dilaporkan resisten terhadap pengobatan terapi endokrin dan akan lebih responsif serta dapat memperbaiki daya survival pasien pada pengobatan menggunakan antibodi *monoclonal trastuzumab* (Herceptin; Genetech, South San Fransisco, CA), baik pada penggunaan secara tunggal ataupun dikombinasi dengan agen kemoterapi lain. Metoda *Immunohistochemistry* (IHK), *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), merupakan metoda yang direkomendasikan

untuk penetapan status HER-2 (Ellis dkk, 2003). Kedua metoda tersebut sudah diakui oleh FDA, untuk penggunaan secara rutin IHK merupakan metoda yang paling banyak digunakan. Metoda qPCR juga dapat digunakan untuk menentukan status skoring HER-2. Dengan menggunakan qPCR, skoring HER-2 dapat dikuantifikasi. Disamping itu, keuntungan qPCR lainnya adalah sensitivitas, akurasi, dan fleksibilitas yang tinggi (Ginzinger, 2002).

Nilai E, R^2 , CV merupakan parameter yang penting untuk mengukur validitas suatu reaksi qPCR. Untuk menentukan nilai tersebut, diperlukan serial pengenceran untuk pembuatan kurva standar. Standar DNA yang digunakan untuk membangun kurva standar dapat menggunakan DNA plasmid, produk PCR, oligonukleotida sintetik, DNA genom, atau cDNA (Dorak, 2006; Hou dkk. 2010). Diantara standar tersebut, DNA plasmid adalah yang paling umum digunakan sebagai standar, karena produksi dan penanganannya yang relatif mudah. Meskipun dilaporkan unggul, akibat kesalahan dalam penanganan, penyimpanan, preparasi, dan perubahan konformasi DNA plasmid standar menjadi tidak tepat, akan berpengaruh terhadap akurasi analisis qPCR (Lin dkk., 2011). Disamping itu, pH juga berpengaruh terhadap efisiensi dan performa dari PCR. pH normal cenderung basa akan menjaga konsistensi reaksi PCR, sedangkan pH asam akan menyebabkan depurinasi DNA templat. Depurinasi DNA adalah proses tersingkirnya basa purin (adenin ataupun guanin) dari DNA. Hal lainnya yang juga dapat

dilakukan untuk mengukur efisiensi dan performa qPCR adalah dengan membandingkan DNA polymerase, sistem buffer yang digunakan, dan system labeling ataupun pewarna yang digunakan (Lin dkk., 2011; Dhanasekaran dkk., 2010; Wolfs dkk., 2003). Pada penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pelarut yang berbeda dengan pH yang juga berbeda (H₂O pH 5,2 dan Buffer TE pH 7,8) terhadap performa dan efisiensi qPCR. Parameter yang dilihat untuk mengukur validitas qPCR adalah nilai R², E, CV dan kemudian hasil analisis produk qPCR pada agarose 1% dan pola melt peak yang terbentuk. DNA template yang digunakan untuk pembuatan kurva standar adalah plasmid pGEM-T easy yang disisipkan gen *whn*, yang nantinya akan digunakan sebagai gen acuan untuk kuantifikasi HER-2. Gen ini digunakan karena terletak pada kromosom yang sama dengan gen target HER-2, yaitu kromosom 17, dan merujuk pada penelitian sebelumnya (Mendoza dkk, 2013). Pada penelitian sebelumnya juga dilaporkan bahwa nilai ekspresi untuk gen ini selama perhitungan menunjukkan konsistensi di semua sampel uji, dan hal ini merupakan syarat yang tepat untuk dijadikan kalibrator dalam perhitungan relatif *copy number* HER-2 dengan metode qPCR.

METODE

Preparasi pGEM-T easy *whn* untuk pengembangan kurva standar qPCR

Produk PCR dari gen acuan *whn* (93 bp) diamplifikasi dari DNA genom kanker payudara

menggunakan primer 10 pmol *whn*-F: 5'-GGT GGA ATG ACC GAA GCT AT-3' dan *whn*-R: 5'-GTC CTT CTG TGG CTC AAT CT-3' yang didesain sesuai dengan penelitian sebelumnya (Mendoza dkk., 2013). Produk PCR kemudian diklon ke dalam plasmid vektor pGEM-T easy (Promega ®) dan ditransformasikan ke sel kompeten *Escherichia coli* galur DH5a. Klon positif ditumbuhkan dalam media LB cair dengan 5 µl ampisilin. DNA plasmid selanjutnya diekstraksi mengikuti protokol High-Speed Mini Kit (Geneaid). Keberhasilan proses kloning dilihat hasil seleksi biru putih, PCR koloni dan hasil sekuensing.

Pengukuran konsentrasi dan pengenceran sampel DNA genom dan DNA plasmid

Sampel DNA genom dan DNA plasmid (pGEM-T *HER-2* dan pGEM-T *whn*) diukur terlebih dahulu konsentrasinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm untuk dapat dilakukan pengenceran. Pengenceran sampel DNA plasmid dilakukan secara serial dengan 2x faktor pengenceran, dengan konsentrasi awal 0,915 ng/µl hingga menghasilkan 9 titik pengenceran. Pengenceran dilakukan dengan H₂O pH 5,2 ataupun buffer TE pH 7,8 (10mM Tris HCl+1mM EDTA)

Uji Quantitative Real-time PCR

Uji qPCR dilakukan di dalam mesin CFX96™ Real-time PCR (Bio-Rad) dengan menggunakan KAPA SYBR Fast Kit. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *whn* adalah sama dengan sebe-

lumnya. Reaksi dilakukan dengan total campuran reaksi 10 µl, masing-masing terdiri dari 3 µl pelarut (H₂O pH 5,2 /TE buffer pH 7,8), 5 µl 2x KAPA SYBR Green I, masing-masing 0,5 µl primer forward dan reverse *whn* 10 pmol, dan 1 µl DNA template. Kondisi reaksi dijalankan dengan preheating pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti 35x siklus denaturation, annealing dan elongation masing-masing 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik, diikuti penambahan *melt curve* pada suhu 65°C ke 95°C selama 5 detik dengan kenaikan 0,2°C sebelum akhir reaksi. Setiap sampel dijalankan dalam tiga ulangan (triplo) untuk menghindari hasil positif palsu, dan nilai rata-rata digunakan untuk perhitungan lebih lanjut. Non template control juga diikutsertakan dalam setiap reaksi untuk memastikan tidak ada kontaminasi pada campuran reaksi. Masing-masing hasil reaksi amplifikasi diperiksa ada tidaknya produk PCR spesifik dengan elektroforesis gel agarose 1% dan analisis *melt peak*.

Pembuatan kurva standar

Kurva standar dibuat dengan memplot nilai log copy number terhadap nilai Ct yang dihasilkan dari pengenceran serial. Nilai log copy number didapatkan dari rumus umum (Mendoza dkk., 2013):

$$\frac{6,02 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{konsentrasi (g/}\mu\text{l)}}{\text{berat molekul (g/mol)}} = \text{copies}/\mu\text{l}$$

Evaluasi kualitas qPCR

Evaluasi kualitas qPCR ditentukan dengan melihat koefisien korelasi (R^2) yang terbentuk dari plot kurva standar dan menghitung nilai

efisiensi, didapatkan dari perhitungan (Dorak, 2006).

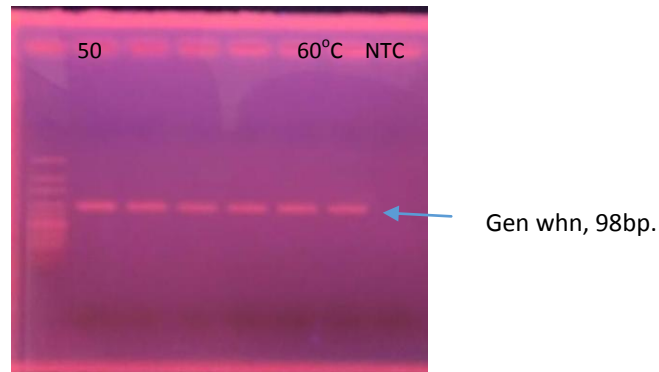
$$E = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] \times 100\%$$

Kualitas qPCR yang optimal ditentukan dengan nilai koefisien korelasi (R^2) >0,980 dan nilai persentase efisiensi (%E) dalam kisaran 90 – 105% (Bio-Rad Laboratories, 2006).

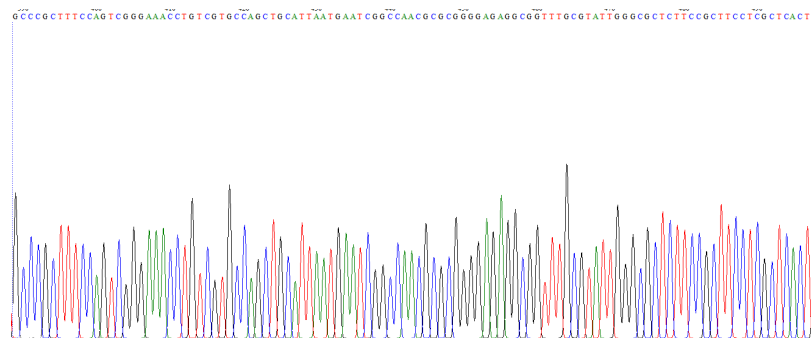
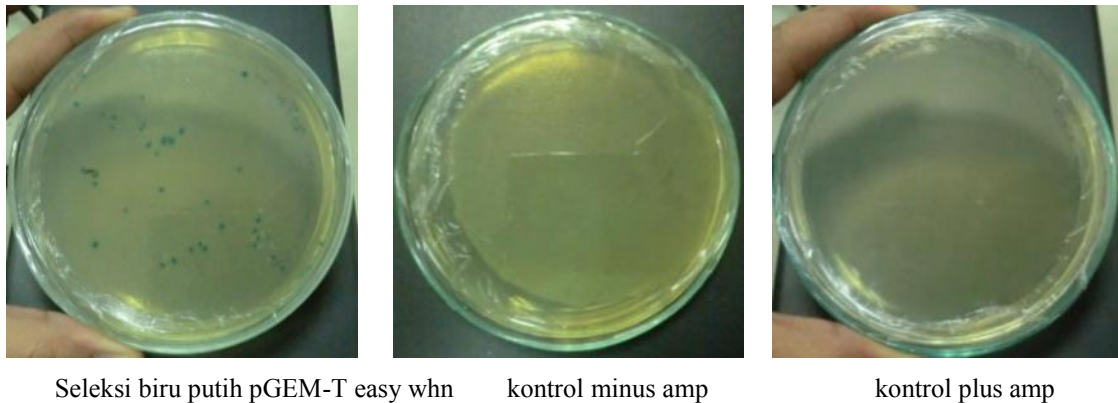
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kloning gen *whn* pada pGEM-T easy telah berhasil diisolasi (Gambar 1) dan diinsersi kedalam plasmid pGEMT-easy *whn* dikonfirmasi dengan seleksi biru putih dan sequencing (Gambar 2). Selanjutnya, pGEMT-easy *whn* digunakan sebagai bahan untuk pembuatan kurva standar. Hasil uji qPCR DNA plasmid standar pGEM-T *whn* dengan masing-masing pelarut (H₂O pH 5,2 dan TE buffer pH 7,8), diperoleh nilai Ct yang berbeda dari kurva amplifikasi yang terbentuk. Untuk pGEM-T *whn* yang dilarutkan dengan H₂O pH 5,2, nilai Ct yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan pGEM-T *whn* yang dilarutkan dengan TE buffer pH 7,8 (Tabel 1).

Nilai Ct kemudian digunakan untuk membangun kurva standar dengan memplot log copy number terhadap nilai Ct (Gambar. 3.). Dari plot regresi linier yang terbentuk, didapatkan nilai koefisien determinasi (R^2) dan nilai efisiensi dapat dihitung untuk masing-masing plasmid standar. Nilai R^2 dan efisiensi untuk masing-masing standar yaitu 0,98 dan 115% untuk pGEM-T *whn* yang diencerkan dengan H₂O pH 5,2; 0,99



Gambar 1 Hasil gradient PCR isolasi gen *whn*, dari rentang suhu 50-60°C (kiri ke kanan).



Gambar 2 Konfirmasi pGEM-T easy *whn* menggunakan metoda seleksi biru putih (atas) dan sequencing (bawah).

dan 99% untuk pGEM-T *whn* yang diencerkan dengan TE buffer pH 7,8.

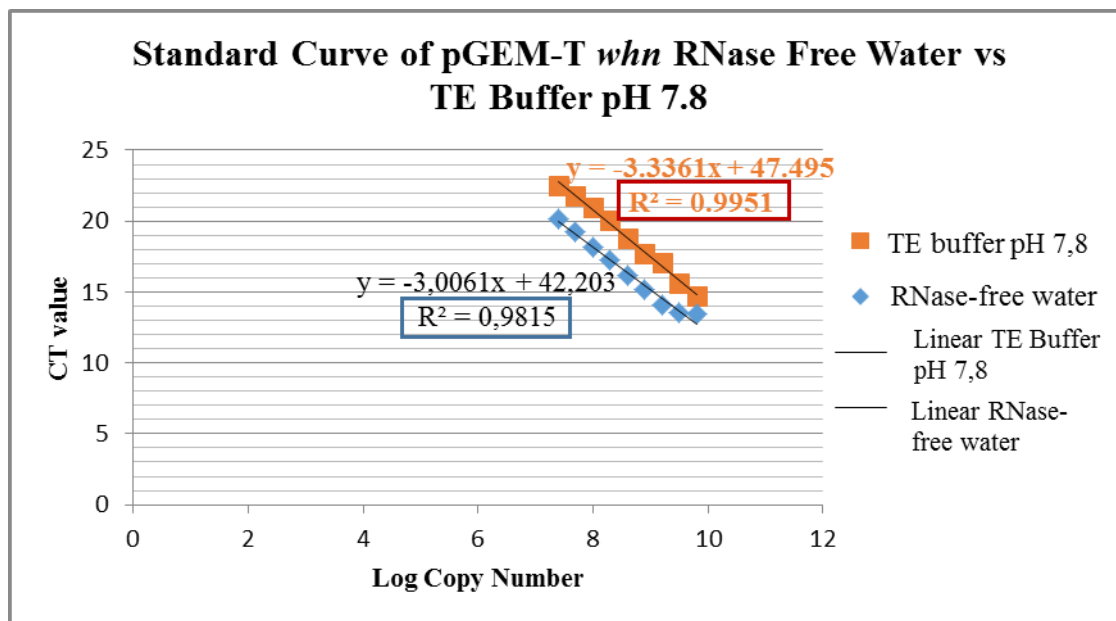
Hasil analisa *melt peak* dan elektroforesis agarose 1% menunjukkan spesifisitas primer dalam mengenali targetnya, yang diindikasikan dengan satu puncak tunggal

dengan nilai $T_m \pm 81^\circ\text{C}$ dan satu pita tunggal dengan ukuran 93 bp (Gambar 4).

Penilaian status skoring HER-2 pasien kanker payudara penting untuk dilakukan sebagai landasan untuk penentuan pengobatan dengan terapi

Tabel 1 Nilai rata-rata Ct plasmid standar pGEM-T *whn*.

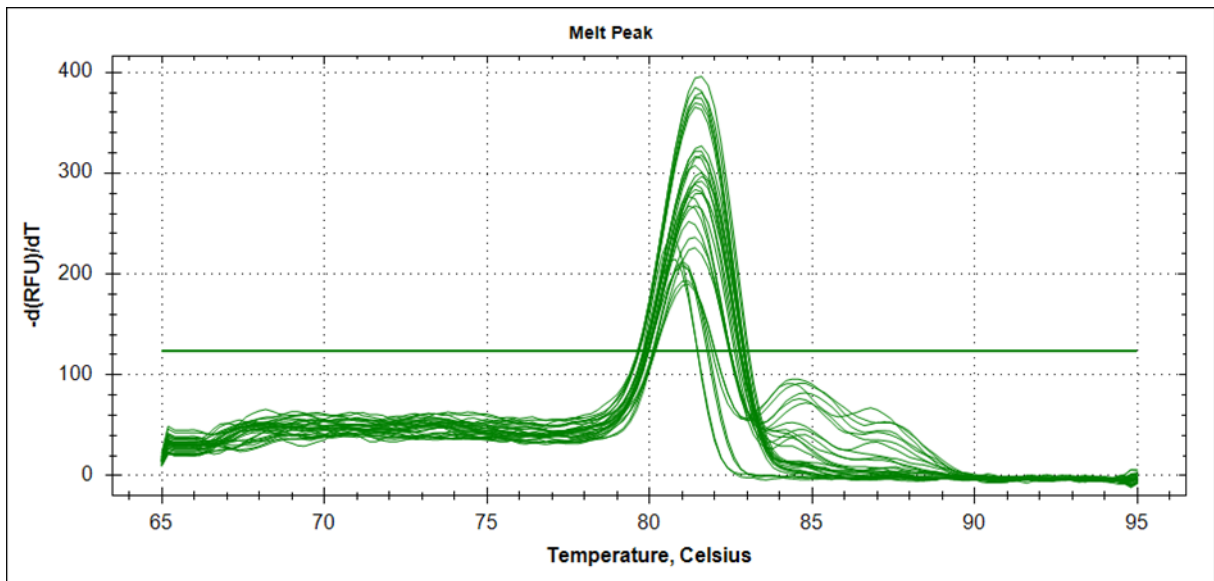
Concentration of pGEM-T <i>whn</i> (ng/μl)	CT value		Coefficient of variation/CV (%)	
	RNase-free water	TE buff-er pH 7,8	RNase-free water	TE buffer pH 7,8
0.915	13.46	14.71	0.84	0.08
0.098	13.5	15.59	0.91	1.06
0.049	14.08	17.09	0.77	0.44
0.024	15.18	17.73	1.27	0.43
0.012	16.16	18.76	1.70	1.36
0.0061	17.24	20.05	0.45	0.22
0.0030	18.18	20.96	0.15	1.03
0.0015	19.21	21.8	0.92	1.08
0.0008	20.14	22.55	0.28	0.69



Gambar 3 Kurva standar pGEM-T *whn*. Biru untuk RNase-free water; merah untuk TE buffer pH 7,8.

tertarget trastuzumab (Goddard dkk., 2012). Penilaian status HER-2 yang akurat tidak luput dari metoda skoring yang digunakan. Metoda skoring HER-2 dengan qPCR merupakan skoring yang dapat terkuantifikasi.

Efisiensi qPCR dengan validitas yang tinggi akan dapat meningkatkan tingkat kepercayaan terhadap hasil analisis skoring. Penilaian yang akurat dan terapi yang tepat sasaran, membuat pasien mendapatkan manfaat



Gambar 4 Kurva melt peak dan visualisasi hasil elektroforesis gel pGEM-T
whn. (A) H₂O pH 5,2; (B) TE buffer pH 7,8.

sekaligus keuntungan dari terapi ini (Baselga dkk., 2006).

Preparasi kurva standar dapat digunakan sebagai sarana untuk mengukur efisiensi dan validitas scoring HER-2 yang mengindikasikan seberapa baik reaksi PCR yang dijalankan, sekaligus sebagai kontrol pekerjaan skoring itu sendiri. Hal ini dapat dilihat dari integritas data yang didapatkan, harus memenuhi teori yang telah ditetapkan. Pada penelitian ini, kurva standar dibuat dengan menggunakan DNA plasmid. Template ini dipilih dikarenakan proses perbanyakannya dan penyimpanannya yang mudah. Untuk mengevaluasi efisiensi reaksi qPCR, kurva standar dievaluasi dengan memperhatikan beberapa parameter yaitu nilai koefisien determinasi (R^2), CV dan efisiensi qPCR (Dorak 2006). Pada penelitian ini nilai R^2 untuk kedua standar sesuai dengan ketentuan yaitu $>0,980$, namun nilai efisiensi yang diperoleh

dari kurva standar yang dipreparasi dengan TE buffer pH 7,8 menghasilkan efisiensi terbaik, mendekati 100% sedangkan dengan H₂O pH 5,2 menunjukkan efisiensi 115%. Berdasarkan konsistensi nilai Ct yang terbentuk, R^2 dan efisiensi amplifikasi qPCR pada penggunaan TE buffer pH 7,8 memperbaiki efisiensi dan performa qPCR dibandingkan menggunakan H₂O pH 5,2 sebagai pelarut. Dhanasekaran dkk. (2010) melaporkan bahwa perbedaan nilai efisiensi merupakan efek langsung dari pergeseran nilai Ct yang dihasilkan. Variasi nilai Ct ini akan berpengaruh langsung mengubah efisiensi standar qPCR secara signifikan, tetapi tidak pada koefisien korelasi. Tingginya nilai efisiensi qPCR secara teori dilaporkan mengindikasikan bahwa telah terjadi kesalahan pada proses pipetting. Berbeda dengan penelitian ini, nilai CV yang merupakan indikator reproduibilitas, diperoleh berada dibawah 10% sesuai

dengan teori yang telah ditetapkan. Sehingga penyebab tingginya nilai efisiensi qPCR pada pelarut H₂O pH 5,2 bukan dikarenakan kesalahan pada proses pipetting. Teori lainnya menyatakan bahwa tingginya nilai efisiensi qPCR dapat disebabkan oleh amplifikasi non spesifik. Keberadaan amplifikasi non target akan menyebabkan penundaan munculnya nilai Ct (Dorak, 2006). Pada penelitian ini, berdasarkan hasil analisa melt peak menunjukkan pita tunggal menggunakan kedua pelarut. Hal ini diperkuat dengan hasil elektroforesis pada 1% menunjukkan pita tunggal pada ukuran yang ditargetkan, 93bp. Pita non spesifik dan primer dimer tidak ditemukan pada hasil elektroforesis agarose 1%. Hal ini mengindikasikan bahwa primer bekerja secara spesifik pada targetnya. Ditinjau dari nilai NTC yang diperoleh, nilai NTC menunjukkan nilai pada kisaran 8 siklus. Dengan perbedaan lebih kurang 8 siklus, kecil kemungkinan tingginya nilai efisiensi qPCR disebabkan oleh kontaminasi. Dorak (2006) menyatakan, nilai Ct yang dapat diterima adalah nilai Ct ≥ 5 siklus dengan NTC.

Tingginya nilai efisiensi qPCR pada pelarut menggunakan H₂O pH 5,2 kemungkinan dikarenakan rendahnya pH pada pelarut ini. pH normal cenderung basa akan menjaga konsistensi reaksi PCR, sedangkan pH asam akan menyebabkan depurinasi DNA templat. Menurut An dkk., (2014), semakin rendah pH maka akan semakin meningkatkan proses depurinasi DNA, kecepatan proses depurinasi pada suhu 37°C pH 5,1 adalah $2,4 \times 10^{-8}$ k,s⁻¹ untuk guanin dan

$1,9 \times 10^{-8}$ k,s⁻¹ untuk adenin. Selanjutnya, keberadaan EDTA sebagai salah satu penyusun buffer TE pH 7,8 akan semakin meningkatkan performa pelarut ini dalam menjaga integritas plasmid dari kerusakan disebabkan oleh nuclease yang bisa jadi berada didalam campuran reaksi PCR ataupun pada pengenceran plasmid (Glover dkk., 1988).

SIMPULAN DAN SARAN

pH berpengaruh terhadap efisiensi qPCR. Pelarut TE buffer pH 7,8 merupakan pelarut yang lebih baik dan ideal dibandingkan pelarut H₂O pH 5,2. Nilai R₂, efisiensi qPCR dan CV untuk TE buffer pH 7,8 adalah 0,99; 99% dan CV dibawah 10%. Hasil konfirmasi dengan elektroforesis gel dan analisis melt peak menunjukkan satu pita tunggal dengan ukuran yang ditargetkan (93 bp) dan peak tunggal dengan T_m $\pm 81^\circ\text{C}$.

Ucapan terima kasih kepada RISTEK SINAS DIKTI, PI. Dr. Eng. Desriani, Laboratorium Biologi Molekular Kesehatan dan Diagnostik, PUSLIT Bioteknologi, LIPI Cibirong.

DAFTAR PUSTAKA

- An, R., Jia, Y., Wan, B., Zhang, Y., Dong, P., Li, J., Liang, X. (2014). Non-enzymatic depurinations of nucleic acids: factors and mechanisms. *Plos One*: 1-17.
- Baselga, J., Perez, E.A., Pienkowski, T., Bell, R. (2006). Adjuvant trastuzumab: a mile-

- stone in treatment if HER2-positif early breast cancer. *The Oncologist*, 11(suppl 1), 4-12.
- Blake, R. (1995). Denaturation of DNA dalam Molecular Biology and Biotechnology. Willey.
- Clifford, A., Hudis, M.D. (2007). Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *New England journal of medicine* 357: 39-51.
- Chen, J., Kadlubar, F.F., Chen, J.Z. (2007). DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to quantification of mitochondrial DNA damage and repair. *Nucleic Acids Res.*, 35, 1377-1388.
- Ellis, I.O., Bartlett, J., Dowsett, M., Humphreys, S., Jasani, B., Miller, K., Pinder, S. E., Rhodes, A., Walker, R. (2004). Updated recommendation for HER2 testing in the UK. *Journal Clinical Pathology* 57(176): 233 – 237.
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J., (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*, 354, 34-39.
- Dorak, M.T. (2006). Real-time PCR. Taylor & Francis Group. New York.
- Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.*, 30, 503-512.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386.
- Glover, J.N.M., Haniford, D.B., Puleyblank, D.E. (1988). Intermediate range effects in DNA I: low pH/stress induced conformational changes in the vicinity of an extruded d(AT)n.d(AT)n cruciform. *Nucleic Acid Research*, 16(12), 5473-5490.
- Goddard, K.A.B., Bowles, E.J.A., Feigelson, H.S., Habel, L.A., Alford, S.H., McCarty, C.A., Nekhlyudov, L., Onitilo, A.A., Rahm, A.K., Webster, J.A. (2012). Utilization of HER2 genetic testing in a multi-institutional observational study. *Am. J. Manag. Care*, 18(11), 704-712.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene. *PLoS ONE*, 5: e9545.
- Lin, C-H., Chen, Y-C., Pan, T-M. (2011). Quantification bias caused by plasmid DNA conformation in quantitative real-time PCR assay. *PLoS*

- ONE*, 6(12): e29101
- Mendoza, G., Portillo, A., Olmos-Soto, J. (2013). Accurate breast cancer diagnosis through real-time PCR *her-2* gene quantification using immunohistochemically-identified biopsies. *Oncology Letters*, 5, 295-298.
- Nogva, H.K. and Rudi, K. (2004). Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *Biotechniques*, 37, 246-253.
- Ross J. S., Fletcher J. A., Bloom, K. J., Linette G. P., Stec, J., Symmans, W. F., Pusztai, L., Hortobagyi, N. (2004). Targeted Therapy in Breast Cancer. molecular and Cellular *Proteomics* 379-398
- Wollfs, P., Grage, H., Hagberg, O., Radstrom, P. (2004). Impact of DNA Polymerases and their Buffer Systems on Quantitative Realtime PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(1): 408-411.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 75-85.