

Trabajo Práctico
Reacción en Cadena de la Polimerasa
B101

Objetivos.

Que el alumno...

- comprenda el fundamento teórico que permitió el desarrollo de la técnica de PCR. relacione las etapas de la técnica con su correlato en la programación del equipo.
- interprete los resultados obtenidos en relación al objetivo del experimento planteado.
- comprenda la importancia de la técnica en el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante.
- conozca las aplicaciones y usos de la técnica.

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de secuencias específicas del ADN. Aplicándola se dispone, en forma rápida y eficaz, de grandes cantidades de una determinada secuencia para su posterior estudio molecular: diagnóstico de patologías genéticas o adquiridas, aplicación a la medicina forense y legal, detección de patógenos responsables de enfermedades infecciosas, etc. La PCR fue desarrollada por el grupo de Kary Mullis de Cetus-Perkin- Elmer en 1985. Los primeros experimentos fueron planeados con el objetivo de diagnosticar en menos de 24 h la detección prenatal de la anemia falciforme ("*sickle cell anemia*"). En el experimento amplificaron un fragmento de 110 pb (pb= pares de bases) portador o no de la mutación que luego trataron con **enzimas de restricción**¹.

Fundamento

La PCR, mediante el uso de una polimerasa de ADN, permite la amplificación de regiones específicas de ADN, donde cada hebra actúa como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Estos moldes se obtienen cuando una molécula de ADN doble cadena se calienta para ser desnaturalizada (*melting temperature*² = *Tm*), produciendo la separación de las cadenas de ADN. Para la iniciación de la síntesis de las cadenas complementarias se requiere además de la presencia de un par de cebadores (en la jerga se los conoce por su término en inglés *primers* (/ 'pri-mər/), que son secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos), que

¹ La anemia falciforme presenta una cadena β de la globina con una mutación llamada β^S donde una T (timina) sustituye a una A en el alelo salvaje (forma β^A). Si el fragmento amplificado contiene el sitio diana de la enzima de restricción que incluye la T de la mutación, se corta y genera dos fragmentos. Si no contiene la mutación, no se corta y genera un fragmento. El individuo heterocigota contendría tres fragmentos.

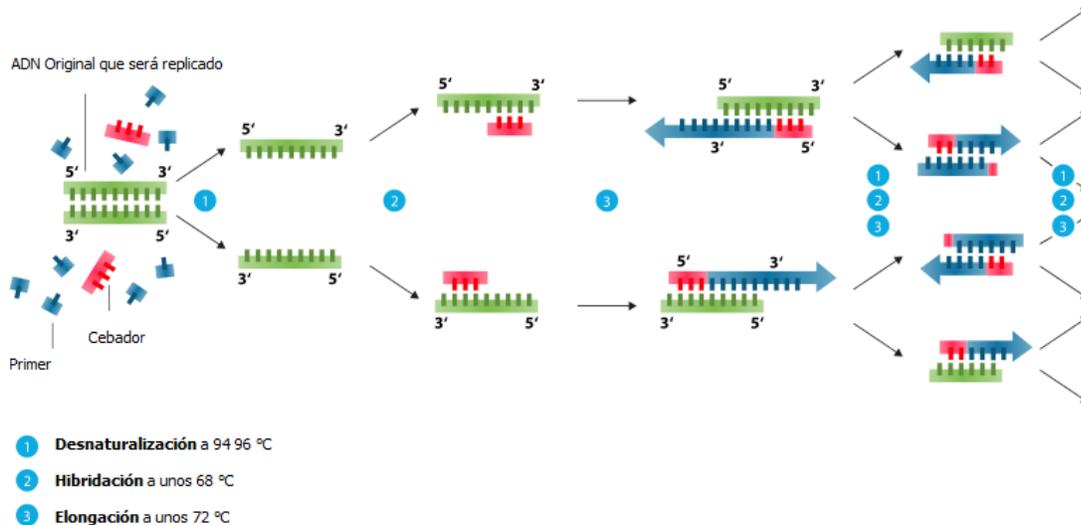
² El punto medio del rango de temperatura a la cual se separan las cadenas de ADN se denomina la temperatura de disociación (*melting temperature*, *Tm*). Depende de la proporción de pares GC. Debido a que los pares G-C tienen tres puentes de hidrógeno, son más estables que los pares A-T, los cuales tienen sólo dos puentes de hidrógeno.

hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de ADN. Los cebadores se diseñan de tal manera que hibridan en los extremos opuestos de cada hebra de la región de interés. Así las nuevas cadenas de ADN sintetizadas que comienzan en cada cebador se extienden hacia la posición del cebador que se encuentra en la hebra opuesta. De esta forma se generan en cada cadena de ADN nueva, nuevos sitios de unión a los cebadores. La mezcla de reacción se calienta nuevamente para separar la cadena original de la recientemente sintetizada, las cuales quedan disponibles para nuevos ciclos de hibridación del cebador, síntesis de ADN, separación de las cadenas, y así sucesivamente. Es decir que la amplificación de la secuencia de interés se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en:

- Desnaturalización del ADN molde (94°C).
- Hibridación de los cebadores con el molde (entre 40 y 68° C).
- Síntesis del ADN complementario mediante la acción de una polimerasa termoestable, denominada polimerasa de ADN (72°C).

El resultado de una reacción de PCR es que al final de n ciclos, la reacción contiene un máximo teórico de 2^n moléculas de ADN de doble cadena. Estas son copias de la secuencia de ADN comprendida entre los cebadores específicos. Si se realizan 20-30 ciclos del proceso de PCR señalado anteriormente, se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de interés, flanqueada por los cebadores utilizados en la amplificación.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



Componentes de la Reacción de PCR³

- Muestra de ADN que contiene la secuencia a amplificar.
- Enzima ADN polimerasa.

³ Esta es una guía que toma en general los componentes de una reacción. Sin embargo cada laboratorio genera un protocolo propio.

- Cebadores.
- Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)
- Mg Cl₂
- Buffer de reacción.
- Aceite mineral.

Muestra de ADN o templado.

La muestra de ADN puede consistir en 100 ng⁴ de ADN genómico (aproximadamente 100.000 copias del ADN molde a amplificar); o ADN obtenido de una única célula, es decir solo una a dos copias del ADN (aproximadamente 0,005 ng de ADN).

ADN polimerasa.

Existen varios tipos de enzimas ADN polimerasa. En un principio se utilizó ADN polimerasa procedente de *Escherichia coli*. Sin embargo, la actividad de esta enzima desciende por encima de los 37° C, y la exposición a las altas temperaturas de desnaturalización, necesarias para separar las dos cadenas de ADN, inactiva la enzima tras cada ciclo de amplificación. Por tal razón, en la reacción de PCR se utilizan ADN polimerasas termoestables; éstas se han aislado a partir de microorganismos que viven a temperaturas elevadas. La ADN polimerasa del microorganismo *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa) permite la síntesis del ADN por encima de los 70° C, resistiendo temperaturas de hasta 94° C. Otras enzimas termoestables son las Tfl ADN polimerasa obtenida de *Thermus flavus*, la Pfu ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus*, etc.

Cebadores.

Los cebadores son secuencias cortas de ADN de 20 a 30 bases que se obtienen por síntesis química. La secuencia de los mismos se diseña de acuerdo al fragmento de ADN que se desea amplificar. En el diseño de los cebadores es necesario tener en cuenta algunas consideraciones: deben ser específicos, especialmente en el extremo 3'. Las bases que lo componen deben tener una distribución homogénea a lo largo de la secuencia, evitando regiones ricas en polipurinas, polipirimidinas u otras secuencias poco comunes. Se debe tratar en lo posible que el contenido de CG sea similar al del fragmento a amplificar. Diseñar "cebadores" con el Tm más alto posible, 55° a 80° C y similares entre los cebadores. Los cebadores no deben estar distanciados por más de 3 kpb (o *kbp*: kilo pares de bases= 1000 bases).

⁴ 100 ng= cien nanogramos. 1x10⁻⁹ g

dNTPs.

Son necesarios para la formación del nuevo ADN amplificado. 0.2 mM c/u (0,8 mM en total), corresponden a aproximadamente a 10^{16} moléculas de dNTPs. Cuando se amplifican productos largos se aumenta también la concentración de dNTPs.

Mg²⁺.

Es un co-factor de la ADN polimerasa modulando su actividad. Usualmente se usan concentraciones entre 0.5 y 5.0 mM.

Buffer de reacción.

Medio óptimo para el funcionamiento de la reacción: 50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl (pH 8.3).

Aceite mineral

Hay equipos de PCR con tapas térmicas. En éstos, los diferentes ciclos no producen evaporación de la mezcla. En otro termocicladores, se evita la evaporación colocando una gota de aceite mineral sobre la mezcla de los reactivos antes de ejecutar el programa.

Diseño de una reacción de PCR.

En una reacción de PCR hay tres aspectos que se deben optimizar: especificidad, rendimiento y fidelidad. La *especificidad* se refiere a la capacidad de obtener un producto de PCR único y deseado. La *fidelidad* busca por su parte que el producto de amplificación sea tan fiel a la secuencia original como sea posible, y el *rendimiento* implica la obtención de una gran cantidad de producto final después de toda la reacción. Debido a la amplia variedad de aplicaciones en las que se está utilizando la PCR, no existen condiciones estándares que garanticen el éxito en todas las situaciones. Sin embargo, algunos parámetros pueden ser tenidos en cuenta como referencia para el diseño de una reacción de PCR. Una reacción de PCR se realiza habitualmente en un volumen de 25 a 50 μl^5 , en un aparato automático programado (termociclador) para conseguir las temperaturas y los ciclos deseados. Un ciclo típico consiste en realizar la desnaturalización a 94° C durante 20 seg., la hibridación de los cebadores con el ADN molde a 55° C durante 20 seg., y la síntesis a 72° C durante 30 seg. El total del proceso de amplificación puede ser de menos de 3 horas. En la mezcla de reacción, la concentración del ión Mg^{2+} puede tener un gran efecto sobre la especificidad y el rendimiento en una amplificación. Generalmente una concentración de 1,5 mM de MgCl_2 es óptima cuando se trabaja con concentraciones de 200 μM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), pero en algunas circunstancias pueden ser requeridas diferentes cantidades de Mg^{2+} . Los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) se utilizan normalmente en concentraciones equimolares y comprendidas

⁵ 50 μL . La milésima parte de un mililitro. 1×10^{-6} L

entre 50 a 200 mM cada uno de ellos. Concentraciones más elevadas pueden dar lugar a incorporaciones erróneas por la ADN polimerasa (es decir, disminuye la fidelidad de la copia); a las concentraciones mencionadas hay suficiente cantidad de precursor para sintetizar aproximadamente 6,5 y 25 mg de ADN respectivamente. A concentraciones menores disminuye el rendimiento de la reacción, es decir, la cantidad de producto amplificado que se obtiene. La Taq polimerasa se utiliza en una concentración de 2,5 unidades por 100 μ l.

Aplicaciones de la PCR.

- Diagnóstico preciso de una patología hereditaria, tanto los procesos en los que el defecto molecular es conocido en detalle, como aquellos para los que sólo ha sido posible la localización cromosómica del defecto en cuestión.
- En enfermedades genéticas adquiridas, como el cáncer y los procesos autoinmunes, la PCR permite detectar con precisión los defectos moleculares que han sido definidos, y facilita la exploración de su patología básica.
- La detección de patógenos infecciosos se ha visto también revolucionada con la utilización de la tecnología del ADN recombinante, no sólo en el ser humano, sino también en otros animales, plantas, etc.
- La PCR en el campo de las enfermedades monogénicas⁶ tiene dos aplicaciones principales: i) el análisis indirecto de los procesos hereditarios mediante el estudio de polimorfismos asociados a los genes responsables de los distintos procesos; y ii) la detección directa de mutaciones, mediante hibridación, digestión con enzimas de restricción, secuenciación directa del ADN o simple visualización de fragmentos. En el campo agronómico también hay importantes aplicaciones, como la detección de enfermedades o el análisis de genes ligados a variables deseadas (resistencia, productividad, etc.).

⁶ Monogénicas: Causadas por un solo gen, como las recesivas Fibrosis quística o Anemia falciforme, o las dominantes como la enfermedad de Huntington.

Ejemplo:

Detección de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc) en *Brassica* spp. (ISTA 2014)

La Xcc es una bacteria que causa serios daños en las brásicas (repollo, coliflor, etc.) y se transmite por semillas. Para identificarla se remojan las semillas, y se cultiva el exudado del remojado en medios específicos. Las colonias de color amarillo cremoso, son confirmadas por PCR como Xcc. Para ello se usan tres juegos de cebadores:

Juego 1 (Berg *et al.*, 2005):

- DLH120: 5' CCg.TAg.CAC.TTA.gTg.CAA.Tg 3'
- DLH125: 5' gCA.TTT.CCA.TCg.gTC.ACg.ATT.g 3'

La amplificación con estos cebadores generará un fragmento de *Xanthomonas campestris* no específico para Xcc de 619 pb

Juego 2 (Rijlaarsdam *et al.*, 2004):

- Zup2309: 5' AAA.TCA.ggg.ggA.TgC.ggT.gg 3'
- Zup2310: 5' TCC.ggC.CAg.ggT.CgA.TAC.AgT.g 3'

Este fragmento será específico de Xcc y presenta una extensión de 370 pb

Juego 3 (adaptado de Eden *et al.*, 1991):

- 1052F: 5' gCA.Tgg.TTg.TCg.TCA.gCT.CgT. 3'⁷
- BacR: 5' TAC.ggC.TAC.CTT.gTT.ACg.ACT.T 3'

Este par de cebadores es Universal para Bacterias. Indica que amplifica bacterias y genera un fragmento no específico de 441 pb

Visualización de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. Fundamentos.

El método electroforético aprovecha la propiedad de las partículas cargadas de migrar en un campo eléctrico, en donde la velocidad de migración depende del tamaño y la carga de dichas partículas. Este método se puede usar tanto para proteínas como para ácidos nucleicos. En el caso del ADN, éste se carga negativamente cuando se encuentra en un buffer alcalino, debido a sus extremos fosfatos y de esta manera puede migrar al ánodo (polo positivo) en un campo eléctrico.

Forma de llevar a cabo una electroforesis.

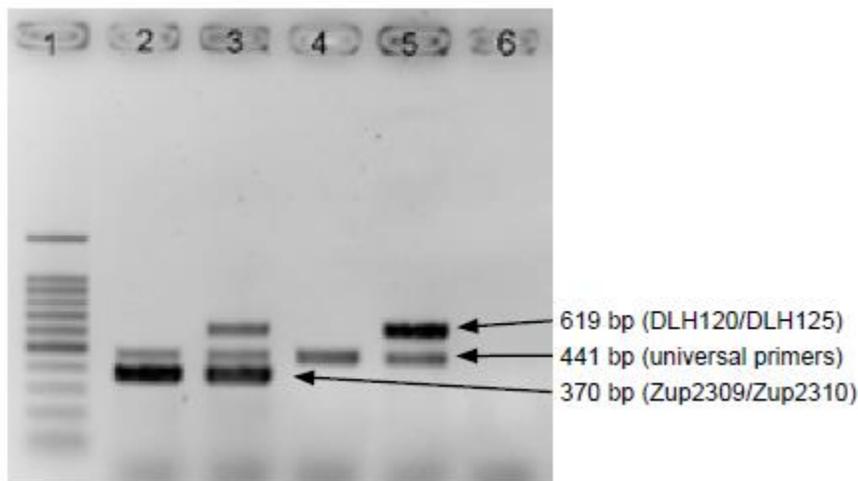
Entre los soportes más comunes está la agarosa en forma de gel. Este tipo de medio participa activamente en la separación de las moléculas ya que ejercen un efecto de filtración molecular. Este efecto de tamiz es función de la dimensión de los poros del gel, lo que depende de la concentración del gel. Los soportes más comunes para la electroforesis en gel son los de agarosa y poliacrilamida. Los primeros dan un tamaño de poros más grande y su utilización permite la separación de grandes moléculas mientras que con geles de poliacrilamida se logran poros de pequeño tamaño, haciendo posible la separación de pequeñas macromoléculas.

⁷ F significa Forward -hacia adelante- y R Reverse - hacia atrás- según ajuste en la cadena '5-3 o '3-5.

Electroforesis en geles de agarosa.

Es un método estándar usado para analizar moléculas de ADN de más de 200 pb. El método más común para la electroforesis del ADN es el método submarino en el cual el buffer cubre el gel. Se utilizan buffers neutros o alcalinos. Ej: TAE⁸. Éste contiene EDTA que es un agente quelante de cationes divalentes, que son requeridos por las DNAsas y así se previene la degradación de la muestra de gel. La agarosa actúa como tamiz molecular, por lo tanto la conformación del ADN afecta su migración y separación durante la electroforesis.

Visualización de la corrida electroforética con DNA amplificado a partir de bacterias encontradas en semillas de brásicas



Gel de Agarosa mostrando productos de amplificación de *Xanthomonas campestris* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* usando las combinaciones de cebadores DLH120 y DLH125; Zup2309 y Zup2310; 1052F y BacR.

Pocillo 1: Marcador de peso molecular cada 100 pb; 2: Dos bandas (370 bp/441 bp): Resultado de PCR indeterminado; 3: Tres bandas (441 bp/619 bp/370 bp): muestra positiva para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). 4: Una banda (441 bp): muestra negativa para *Xanthomonas campestris* (Xc). 5: Dos bandas (441 bp/619 bp): muestra positiva para *Xanthomonas campestris* pero no el patovar *campestris* (Se sospecha la presencia de otras *Xanthomonas*). 6: Agua (Control negativo): sin reacción.

⁸ TAE: Buffer Tris-Ácido acético-EDTA. Más información en https://en.wikipedia.org/wiki/TAE_buffer

Desarrollo del Trabajo de Laboratorio

Propósitos

- Amplificar ADN utilizando un termociclador y cebadores específicos.
- Aprender como cargar y correr una electroforesis en gel
- Observar el bandeo de ADN producido a través de la electroforesis y comparar las muestras de PCR provistas con el marcador de peso molecular.

Materiales

Termociclador	Muestra de ADN	Loading dye
Equipo para electroforesis	Marcador de peso molecular	Cajas para tubos
Transiluminador UV	SYBR green (colorante de ADN)	Precipitados de 10 y 100 mL
Micropipetas y puntas (tips)	Agarosa	Bolsas ziploc
Mix de reacción	Buffer TAE	Papel toalla
Guantes	Gafas	Bolsas de descarte

Amplificación de ADN

Los protocolos utilizados por los distintos laboratorios surgen de la consulta de artículos científicos de investigadores que trabajan en temáticas similares y pusieron a punto un método. Luego se modifican según las posibilidades de cada laboratorio.

Lo primero que se debe preparar es la Mezcla de Reacción.

En este caso se prepara la master mix para 10 reacciones (por errores de pipeteo siempre se preparan las mezclas para al menos dos reacciones que no se harán. Es decir en este caso se amplificarán 8 muestras de ADN, se prepara cantidad suficiente para 10 muestras)

La columna **1X** indica cuál es la cantidad total de reactivo en que se realizará la amplificación. La columna “**Cc final**” indica la concentración final de la reacción.

¿De dónde surgen estos números? Analizaremos el caso del $MgCl_2$. La solución stock presenta una concentración de 50 mM y la concentración final (columna verde) es de 1.5 mM. El volumen final de la reacción será de 13 μL (se amplificarán 10 μL extraídos de la master mix más 3 μL de ADN que se agregan y diluyen la solución).

Se aplica la fórmula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Por pasaje de términos y reemplazos: $V_i = 1.5 \times 13/50 \Rightarrow V_i = 0.39$.

El volumen inicial por reacción es de 0.39 μL extraídos de la solución stock. Se redondea a 0.4 μL . Como se preparan 10 reacciones, se toman 4 μL de la solución stock para preparar la Master Mix. (son los 4 μL que figuran en la columna Master Mix). Lo último en ajustarse (y en agregarse) es el agua.

Normalmente los laboratorios tienen una planilla de cálculo donde colocan el número de reacciones que realizarán (considerando los dos blancos) y se hacen los cálculos automáticamente. Se imprime la hoja y se pega en el cuaderno de trabajo. Cada vez que se agrega un componente a la Master Mix se tilda la columna de control.

Reactivo	Stock	Unidad	Cc. final	1X	Máster mix	Chequeo
H ₂ O	---	---	---	4,6	46,0	
Buffer	10	X	1	1,3	13,0	
ClMg ₂	50	mM	1,5	0,4	4,0	
dNTPs	2500	μM	250	1,3	13,0	
Primer F	3	μM	0,25	1,1	11,0	
Primer R	3	μM	0,25	1,1	11,0	
Taq. Pol	5	U/μL	0,08	0,2	2,0	
DNA Molde	---	---	---	3,0		
Vol. final				13,0	100	
Nº reacciones					10	

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1ra. Parte: montaje de una reacción de PCR.

1. Etiqueta un microtubo de 0.2 mL, con las iniciales de tu grupo y colócalos en hielo.
2. Mezcla los reactivos de la Master Mix suavemente invirtiendo el microtubo con la mano.
3. Practica la técnica de pipeteo con agua y papel toalla. Descarta una punta y toma una nueva. Ajusta la micropipeta a 10 μL y mide el tamaño de la gota. (Las micropipetas tienen dos stops. Debes estar seguro que oprimes hasta el primer stop para pipetear la medida justa de la mezcla).
4. Prepara otra micropipeta a 3 μL. Usa puntas nuevas en cada pipeteada. Pipetea dentro del tubo que etiquetaste:
 - a. 10 μL de la master mix (incluye buffer, dNTPs, enzyme, agua, MgCl₂, cebadores, etc.)
 - b. 3 μL del templado de ADN (registra la etiqueta del ADN que te corresponde)
5. Deja el tubo en hielo hasta iniciar el programa del termociclador.
6. Colocar los tubos dentro del termociclador. Un tubo debe ser cargado con 10 μL de mezcla de reacción y 3 μL del agua utilizada para preparar la master mix. Es el control negativo de la reacción de PCR. Registra los datos del programa del termociclador que se usará en la siguiente Tabla

Condiciones de amplificación del Termociclador.

Fecha: ____/____/____

Modelo de Termociclador: _____

Nombre del grupo _____

PASO	ETAPAS					
	Desnaturalización		Hibridación		Extensión	
	t	T°	t	T°	t	T°
Hold Inicial						
Ciclo iterativo					a	72 °C
Hold Final					b	72 °C

a: 1 min por cada kb

b: depende de la longitud del fragmento buscado, entre 3 y 15 minutos

2da. Parte: visualización del fragmento de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se visualizará el fragmento de amplificación de la PCR corriendo 5 µl de muestra en pocillos dentro de un gel de agarosa 0.8% en una cuba de electroforesis usando como buffer de electroforesis TAE 1X y como marcador de peso molecular, 1 Kb. Antes de sembrar la muestra se le agrega un volumen determinado de colorante (1 µl) de frente (azul de bromofenol) para visualizar la corrida. La electroforesis se lleva a cabo a 10 V cm⁻¹ durante 1 h a temperatura ambiente; los geles luego se tiñen con SYBR Green, colorante que se intercalan entre las bases del ADN y fluorescen cuando se iluminan con luz ultravioleta.

Los reactivos específicos para esta parte son:

- 1X TAE buffer (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0)
- 0,8 % agarosa en 1X TAE buffer.
- SYBR Green.
- Marcador de peso molecular: 1kb.
- Buffer de corrida.

Preparación del Gel de Agarosa

Preparar la cuba de electroforesis con el peine correspondiente. Realizar el cálculo necesario para preparar un gel de agarosa 0,8 % (25 ml). Pesar la agarosa. Diluir con TAE 1x hasta 25 ml y calentar hasta disolución. Dejar enfriar 10 minutos y verter solución de agarosa. Dejar solidificar y cubrir el gel con TAE 1x.

En el siguiente video se pueden observar parte de estos pasos.

<https://www.youtube.com/watch?v=EZjNuqSEPbY>

Electroforesis

Toma un gel preparado. Prepara la cuba. Carga el buffer de corrida.

Tomar Parafilm y colocarlo sobre una superficie lisa. Normalmente usamos microtiter plates en desuso. Limpiar la superficie

Ordenar en hielo los microtubos resultantes de la PCR.

Colocar 1 μ L del loading por cada muestra a someter a electroforesis incluyendo el blanco (se puede usar el mismo tip)

Tomar 2 μ L del marcador de peso molecular y colocarlos en el primer punto del loading. Descartar tip.

Tomar 3 μ L del primer tubo resultado de la PCR. y colocarlos en el segundo punto del loading. Descartar tip.

Continuar hasta terminar todas las muestras. En cada punto hay ahora 4 μ L del producto de la PCR más el loading. Sembrar dentro de los pocillos en el gel cada uno de los puntos. Aquí se puede usar la misma punta, pero enjuagando en el buffer.

Ensamblar los cables del Ánodo (rojo) y Cátodo (negro). Las cubas para electroforesis están preparadas para no confundir el sitio de carga del ADN, que migrará hasta el ánodo (electrodo rojo) Ajustar Voltaje a 90V. El tiempo de corrida será de unos 105', más 45' luego de tinción.

En el siguiente blog puedes encontrar imágenes que facilitarán la comprensión del texto:

<http://farmacologiabasica.blogspot.com.ar/2008/08/electroforesis-en-gel.html>

En este video se indica cómo se prepara y corre un gel.

<https://www.youtube.com/watch?v=vq759wKCCUQ>

Preguntas para reflexionar sobre la práctica

1. Hay tres cambios de temperatura claves en la reacción de PCR ¿Cuáles son esas temperaturas? ¿Qué está ocurriendo en cada una de esas temperaturas?
2. El termociclador hace 25-30 veces los ciclos a través de las tres temperaturas ¿por qué?
3. Las reacciones de PCR se realizan con Taq ADN polimerasa. ¿Cuál es el rasgo clave que hace a esta enzima diferente a la mayoría de las otras enzimas?
4. ¿Cuál es el rol de los cebadores de ADN en la reacción de PCR?
5. En el texto de esta GTP se indica: “Se debe tratar en lo posible que el contenido de CG sea similar al del fragmento a amplificar.” Indica el porqué
5. En la electroforesis en gel, hacia qué polo migra el ADN ¿por qué?
6. ¿Cuál es la función del gel?
7. Investiga y describe dos aplicaciones prácticas del uso de la PCR no presentes en esta GTP

Fuentes consultadas

- Cátedra Genética Molecular (2015). FCEQyN. Univ. Nac. de Misiones. Trabajo Práctico Nro 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa. <http://docplayer.es/19536708-Universidad-nacional-de-misiones-facultad-de-ciencias-exactas-quimicas-y-naturales-trabajo-practico-no-4-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr.html>
- ISTA 2014. Protocolo 7-019b: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica Seeds. <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019b-2014.pdf>
- Nikota C., Wheable (sd). PCR Experiment. GA Wheable Secondary School, London, Ontario. https://www.schulich.uwo.ca/biochem/about_us/outreach/docs/pcr_experiment.pdf. Visitada 18/02/2018
- Polti, Marta A.; Cuozzo, Sergio A. 2014. Trabajo Práctico N 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Cátedra Biología Molecular. Facultad de Ciencias Naturales e IML.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* (New York, N.Y.), 230(4732), 1350–1354.