

DEDALUS - Acervo - FZEA



1 1 4 0 0 0 2 7 2 9 7

Introdução às **técnicas** de **PCR** convencional, em tempo real e digital

Tiago Campos Pereira
(organizador)

Volume 5

SBG

Sociedade
Brasileira de
Genética

Ribeirão Preto, 2018

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
FZEA/USP

© 2018

Todos os direitos desta edição são reservados à Sociedade Brasileira de Genética.

Comissão Editorial Sociedade Brasileira de Genética

Editor

Tiago Campos Pereira
Universidade de São Paulo

Comissão Editorial

Carlos Frederico Martins Menck
Universidade de São Paulo

Louis Bernard Klaczko
Universidade Estadual de Campinas

Marcio de Castro Silva-Filho
Universidade de São Paulo

Maria Cátira Bortolini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Marcelo dos Santos Guerra Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Pedro Manoel Galetti Junior
Universidade Federal de São Carlos

Class.	QH430
	P436i
	2028
folha	19.251

Introdução às técnicas de PCR convencional, em tempo real e digital / Tiago Campos Pereira (organizador). – Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2018.

232 p.

ISBN 978-85-89265-29-4

1. Genética. 2. Biologia Molecular. 3. Clonagem. 4. Engenharia Genética. 5. Diagnóstico. 6. Medicina. I. Pereira, Tiago Campos, org.

Capa, projeto gráfico e diagramação

editora  **cubo**
soluções para o universo acadêmico



Sociedade
Brasileira de
Genética

Rua Cap. Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 - Ribeirão Preto - SP
16 3621-8540 | 16 3621-3552

Aplicações gerais da PCR convencional

Capítulo 3

Greice Lubini^{1,2,a}, Thiago da Silva Depintor^{3,4,a}, Karina Bezerra Salomão^{5,a}, Mariana de Lara Campos Arcuri^{6,a}, Rômulo Pedro Macêdo Lima^{6,a} e Ivan de Godoy Maia⁶

¹ *Depto. de Biologia, FFCLRP, USP, SP – Brasil*

² *Centro de Cana, IAC, SP – Brasil*

³ *Depto. de Genética, FMRP, USP, SP – Brasil*

⁴ *PPG em Genética, FMRP, USP, SP – Brasil*

⁵ *Depto. de Pediatria, FMRP, USP, SP – Brasil*

⁶ *Depto. de Genética, IB, UNESP, SP – Brasil*

^a *Igualmente primeiros autores*

Estruturação do Capítulo

3.1 Introdução

3.2 Diagnóstico

3.3 Identificação de colônias transformadas

3.4 Identificação de transgenes

3.5 Identificação de espécies

3.6 Sequenciamento genético

3.7 Análises forenses e estudos de DNA antigo

3.8 Inserção de *tags* (promotores e sítios de restrição)

3.9 Clonagem

3.10 Mutagênese sítio-dirigida

3.1 Introdução

Neste capítulo, veremos algumas aplicações mais comuns da PCR nas pesquisas básica e aplicada. Contudo, o leitor deve ter em mente que existem inúmeras outras possibilidades além destas aqui apresentadas.

3.2 Diagnóstico

A PCR evoluiu muito desde a sua criação, tornando-se uma ferramenta universalmente empregada no diagnóstico molecular dos mais variados patógenos virais, bacterianos, fúngicos e parasitas multicelulares. Esta abordagem é muito mais confiável, rápida e específica do que técnicas imunológicas rotineiras. Adicionalmente, uma vez que muitas doenças compartilham sintomas entre si, como as enfermidades causadas pelos vírus da dengue, chikungunya e zika, o diagnóstico preciso e rápido por meio da PCR pode ser decisivo. A partir da coleta de fluidos corporais, é realizada extração de RNA, seguida de uma reação de transcrição reversa gerando cDNA. Este último é então amplificado utilizando *primers* específicos por PCR convencional (ou PCR em tempo real, sendo a segunda ainda mais específica, sensível e mais comum atualmente [1]). O diagnóstico é simples: caso o paciente esteja infectado, uma região do genoma do vírus será amplificada; caso contrário, não.

Adicionalmente, também é possível a identificação de DNA tumoral circulante (ctDNA - do inglês, *circulating tumoral DNA*) em fluidos corporais por meio da PCR. Um teste bem estabelecido e talvez um dos mais conhecidos é a identificação de mutações no gene *EGFR* em câncer de pulmão de células não pequenas [2]. O câncer de bexiga também pode ser diagnosticado precocemente por meio de PCR de amostras de urina (*i.e.*, identificação de mutação de nucleotídeo único - PIK3CA p.E545K, um indicador do câncer de bexiga [3]).

Do mesmo modo, os ácidos nucleicos fetais também podem ser identificados por PCR durante o período pré-natal. Essa análise é possível devido à presença de DNA livre de células fetais no plasma materno. Isso pode ser extremamente importante para a detecção precoce de doenças como a β -talassemia [4] ou mesmo para caracterizações simples, como o sistema Rh de grupos sanguíneos e a verificação do sexo do feto (amplificação da região SRY). Por fim, o diagnóstico de inúmeras doenças genéticas, em fetos ou adultos, também pode ser feito por meio da amplificação e do sequenciamento do(s) gene(s) associado(s).

3.3 Identificação de colônias transformadas

Experimentos de clonagem molecular possuem um ponto passível de checagem via PCR. Isto é, após a ligação (vetor-inserto) e transformação de bactérias com este plasmídeo recombinante, pode-se fazer a seleção de colônias positivas. Para cada colônia que tenha crescido em meio com antibiótico, conduz-se uma PCR contendo *primers* que flanqueiam o sítio de clonagem do vetor. Portanto, há dois cenários possíveis: i) colônias que terão apenas um pequeno fragmento amplificado e ii) colônias que terão um fragmento maior amplificado. A primeira situação corresponde àquelas que possuem o vetor sem o inserto de interesse integrado (amplificando-se apenas a região entre os *primers*). No segundo caso, o fragmento maior corresponde à sequência de interesse clonada no vetor.

3.4 Identificação de transgenes

De maneira complementar, a PCR também é utilizada na identificação de transgenes em organismos geneticamente modificados, seja para diagnóstico ou para pesquisa. Por exemplo, uma das características mais comuns em plantas transgênicas no Brasil é a resistência ao herbicida glifosato. As plantas selvagens são sensíveis e morrem ao serem tratadas com o herbicida. O glifosato inibe o gene *EPSPS*, ocasionando a interrupção da via de produção de três aminoácidos essenciais. Por sua vez, o transgene *EPSPS* vindo de uma bactéria (*Agrobacterium*) apresenta algumas alterações em relação ao gene endógeno *EPSPS*. Devido a essas diferenças, a proteína heteróloga substitui a endógena na via de produção dos aminoácidos, tornando a planta resistente ao glifosato.

Entretanto, como o gene endógeno e o transgene são muito similares em nível de sequência de DNA, para identificar se determinada planta em questão é transgênica ou não, deve-se analisar a região do promotor *CaMV 35S*, que dirige a expressão do transgene *EPSPS* (Figura 3.1). Assim, se a amostra testada for transgênica, ela apresentará amplificação positiva para o *CaMV 35S*, resultado que pode ser visualizado em uma eletroforese em gel de agarose. Nos casos em que o transgene não é similar a nenhum gene endógeno da planta, a

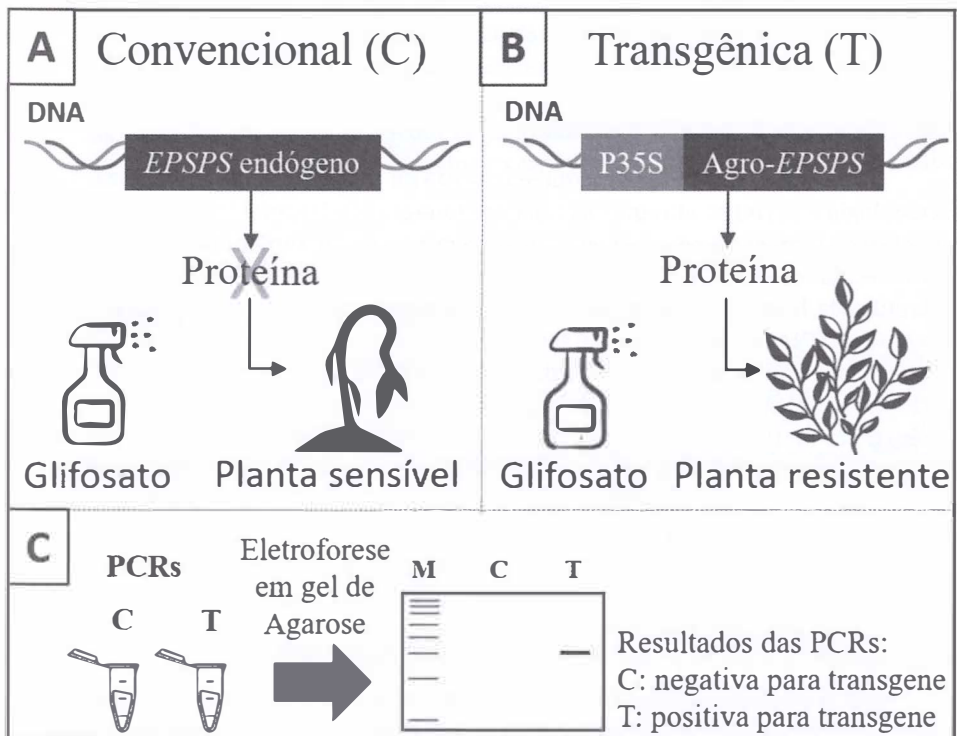


Figura 3.1. Demonstração de amplificação de DNA de plantas convencionais versus transgênicas para resistência ao herbicida glifosato. A) Planta convencional produz uma proteína sensível ao herbicida. B) Planta transgênica produz uma proteína resistente ao herbicida. C) Após PCRs com *primers* específicos para a região promotora *CaMV 35S* (na figura, referida como *P35S*), verifica-se que somente a planta transgênica (T) possui a região amplificada. Imagem: Greice Lubini, com uso de elementos da *Noun Project* - Maria Zamchy (planta resistente), Anthony Ledoux (tubo de ensaio), Gemma Evans (planta sensível) e Symbolon (borrifador).

sua própria amplificação poderá ser realizada para confirmar a transgenia. Algumas vezes, também são amplificados os genes que conferem resistência a antibióticos utilizados nas fases de micropropagação *in vitro*.

3.5 Identificação de espécies

A PCR também pode ser uma poderosa ferramenta quando associada a técnicas de sequenciamento. Por exemplo, a amplificação de uma região do gene codificador da Subunidade I da Citocromo C Oxidase (COI) presente no DNA mitocondrial é um ótimo marcador para identificação de espécies animais. O DNA é extraído, amplificado por PCR e a região correspondente a COI é sequenciada para posterior identificação, por meio de comparações com um banco de dados específico (BOLD Systems). Essa abordagem pode ter diferentes finalidades, como mostram os autores Frantine-Silva et al. [5] e Zeale et al. [6]. O primeiro trabalho buscou amplificar a COI com a finalidade de se identificar espécies presentes em tributários do Rio Paranapanema, via coleta de ictioplâncton (estágio no qual a identificação por morfologia é inviável), aplicando à conservação e ao manejo de espécies de peixes [5]. Já o segundo trabalho mostrou que a amplificação e o sequenciamento da COI são úteis para a determinação da dieta de morcegos insetívoros, por meio da extração de DNA de suas fezes [6].

3.6 Sequenciamento genético

O acoplamento da PCR ao sequenciamento do DNA possibilitou a otimização dessa metodologia e permitiu eliminar a etapa de clonagem de fragmentos em um hospedeiro microbiano. O sequenciamento genético consiste em determinar a ordem das bases nucleotídicas nas moléculas de DNA [7]. A terminação dideoxi ou sequenciamento de Sanger, abordagem mais utilizada, baseia-se em incorporação de 2,3-dideoxynucleotídeos “terminadores” na cadeia nascente de DNA [8]. As técnicas de sequenciamento genômico baseadas em PCR incluem a geração de sequências de sítios-alvos (STS) para construção de mapas físicos, a análise de clones de cDNA para formação de *tags* de sequências expressas (ESTs) e o mapeamento genético por amplificação de sequências curtas repetidas em *tandem* [9]. O princípio da PCR também é aplicado em sequenciamento de nova geração. Durante a construção de bibliotecas, *primers* com adaptadores são utilizados em ciclos iniciais de PCR para inserção de *barcodes* identificadores de amostras [10].

3.7 Análises forenses e estudos de DNA antigo

A PCR também possibilita a amplificação de materiais genômicos degradados ou escassos, como as que estão disponíveis em investigações forenses, amostras biológicas conservadas em parafinas [11], e em estudos que utilizam material antigo, como DNAs remanescentes de humanos, outros animais e plantas, que possuem entre dezenas a milhares de anos, denominados de ‘DNA antigo’ (*ancient DNA*) [12]. Investigações forenses são fundamentadas em DNA *fingerprinting*, definido como a identificação de indivíduos baseada no perfil genético. Essa técnica permite o estudo do parentesco entre as amostras e compara

os padrões de DNA. Esse princípio também pode ser aplicado em testes de paternidade, na agricultura (caracterização de novas culturas) e na indústria alimentícia (averiguar a segurança e autenticidade dos alimentos) [13].

O DNA *fingerprinting* analisa sequências de DNA altamente polimórficas entre os indivíduos, o que permite a distinção entre dois ou mais organismos de uma mesma espécie. Os exemplos mais comuns são os minissatélites, os microssatélites e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) [13,14]. Uma otimização da quantidade de amostras pode ser alcançada com a coamplificação de múltiplos microssatélites via PCR *multiplex* [15]. Recentemente, a amplificação por PCR direta também tem sido aplicada, evitando perda de material genético durante as etapas de extração e quantificação de DNA. Para tanto, são utilizados tampões que evitam a interferência de inibidores de PCR e polimerases especiais [16,17].

Adaptações no protocolo da PCR também foram necessárias para permitir o estudo de DNA antigo. Dentre essas adaptações, estão: i) a seleção de fragmentos pequenos como alvos; ii) a análise de DNA presente em múltiplas cópias (*e.g.*, DNA mitocondrial); iii) o uso de vários controles negativos; iv) a realização de amplificações em réplicas; v) o impedimento da atuação de inibidores de PCR (amplamente presentes nessas amostras); vi) a aplicação de *Taq* DNA polimerases especiais (*High Fidelity*, *AmpliTaq Gold*), e vii) os cuidados na manipulação para evitar contaminação com DNA moderno [18,19]. Materiais genômicos antigos são importantes para estudos arqueológicos (investigação de populações antigas), filogenéticos e paleontológicos, e dentro da biologia e genética da conservação [20]. Exemplos notáveis desta área de estudo incluem análises de restos mortais atribuídos a figuras históricas importantes [21] e na confirmação da identidade dos patógenos causadores de importantes epidemias, como a peste negra no século 14 [22]. Análises de DNA de amostras de milhões de anos (*e.g.*, dinossauros, plantas e insetos de outras eras) estão presentes na literatura, mas não são amplamente aceitas.

3.8 Inserção de *tags* (promotores e sítios de restrição)

Dentre o vasto rol de aplicações da PCR, destaca-se a sua utilização como ferramenta para inserção de *tags* (*i.e.*, pequenas sequências) em fragmentos de DNA de interesse (Figura 3.2). Dentre os *tags* mais comuns, estão os *sítios de restrição*, inseridos nas extremidades 5' e/ou 3' de um fragmento de interesse por meio de sua amplificação, empregando oligonucleotídeos iniciadores específicos dotados de sítios de restrição terminais [23].

Esse artifício permite a posterior digestão do produto de PCR com as respectivas enzimas de restrição, cujos sítios não estavam presentes no fragmento original, obtendo-se, assim, um fragmento com extremidades coesivas e/ou abruptas, que estará apto para clonagem direcional em vetor específico ou para outras aplicações. Essa abordagem, no entanto, traz consigo algumas dificuldades técnicas, como, por exemplo, a redução da eficiência de clivagem das enzimas de restrição em regiões terminais da molécula de DNA. Em função disso, sugere-se que sejam adicionadas sequências de nucleotídeos extras nas porções terminais dos iniciadores, de maneira a transformar os sítios de restrição terminais em sítios internos [24].

Na metodologia chamada de Expression-PCR (E-PCR) [25,26], um *tag* correspondente a uma região promotora é incorporado a um fragmento de DNA de interesse, empregando PCR. O objetivo, neste caso, é viabilizar a transcrição e, eventualmente, também, a tradução

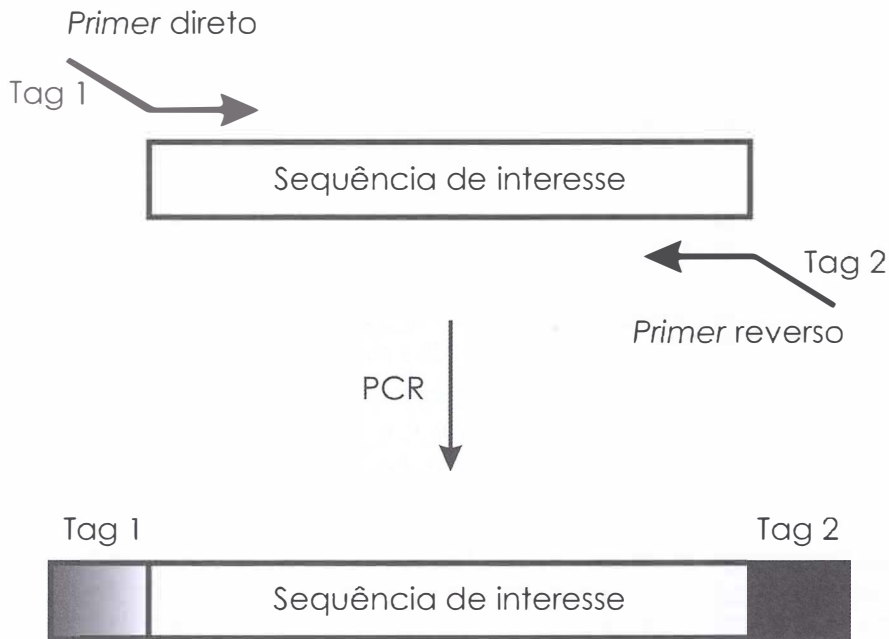


Figura 3.2. Inserção de *tags* via PCR. Reações contendo *primers* quiméricos, constituídos de uma parte que se anela ao alvo e outra parte adicional (o *tag* em si), permitem gerar de amplicons portando sequências extras em suas extremidades. Imagem: Pereira, TC.

in vitro do produto de PCR, dispensando a necessidade de clonagem em vetores de expressão. Nesta abordagem, uma sequência (denominada promotor universal) contendo o promotor do bacteriófago T7 (~17 nucleotídeos) e a região líder não traduzida do *alfafa mosaic virus* é fusionada a uma sequência de interesse em duas reações de amplificação de sobreposição. Na primeira reação, faz-se uso de um iniciador senso que corresponde à sequência do promotor “universal” adicionada de nove nucleotídeos complementares ao fragmento de DNA de interesse. Na segunda reação, após purificação do produto de amplificação da primeira etapa, um segundo iniciador complementar à porção 5' do promotor “universal” será empregado juntamente com um iniciador antissenso complementar à porção 3' da sequência de interesse. O produto final terá incorporado o promotor T7 que será reconhecido pela RNA polimerase de T7 em reação de transcrição *in vitro*. Adicionalmente, tais fusões podem ser obtidas via PCR, empregando iniciadores quiméricos longos contendo o promotor T7 e sequências complementares ao DNA de interesse (~20 nucleotídeos).

3.9 Clonagem

A clonagem por PCR é um método rápido que permite amplificar fragmentos de DNA de interesse, mesmo que em pequenas concentrações, para posterior inserção em vetores de clonagem. O método clássico de clonagem requer o uso de endonucleases de restrição para digestão do vetor e do fragmento de DNA a ser clonado, com posterior ligação empregando a enzima DNA ligase. Todavia, quando não se dispõe de sítios de restrição compatíveis para

a clonagem, a inserção de tais sítios no fragmento de DNA de interesse empregando PCR (conforme descrito anteriormente) representa uma opção interessante [27].

Uma alternativa à clonagem clássica que dispensa o uso de enzimas de restrição refere-se à inserção direta de um fragmento de DNA de interesse oriundo de amplificação por PCR em vetores plasmidiais pré-linearizados contendo uma desoxitimidina (T) em cada extremidade 3' [28]. Essa metodologia, denominada clonagem T-A, baseia-se na capacidade das DNA polimerases termoestáveis sem atividade *proofreading*, como a *Taq* polimerase, de adicionar um resíduo de desoxiadenosina (A) nas extremidades 3' dos seus produtos de amplificação, independente do molde. Desta maneira, os produtos monoadenilados resultantes da amplificação são passíveis de inserção direta, porém não direcional, no vetor pré-linearizado, utilizando o pareamento A/T e a enzima DNA ligase.

A clonagem T-A não se aplica, entretanto, para os casos em que o uso de DNA polimerases de alta fidelidade se faz necessário, uma vez que os produtos de amplificação gerados por estas não são adenilados, apresentando assim extremidades abruptas. Uma opção para a clonagem de tais produtos, além da metodologia convencional de inserção em vetores digeridos por enzimas de restrição de corte cego, é o uso de vetores comerciais pré-linearizados cujas extremidades 3' estão covalentemente ligadas à enzima topoisomerase I de *Vaccinia virus* [29]. Esta enzima reúne as atividades de endonuclease e ligase, o que irá viabilizar a inserção não direcional do fragmento de interesse no vetor. Cabe ressaltar que diferentes versões comerciais de tais vetores se encontram disponíveis e algumas destas permitem a clonagem direcional de fragmentos de PCR longos ou curtos.

Um sistema alternativo que também viabiliza a clonagem direcional de produtos de PCR – independentemente do emprego de enzimas de restrição – baseia-se no uso da recombinação sítio-específica [30]. Esta tecnologia, fundamentada no mecanismo de integração e excisão do bacteriófago lambda, permite que fragmentos de DNA flanqueados por sítios de recombinação específicos (sítios *att*) sejam transferidos para vetores contendo sítios de recombinação compatíveis. Para tal, o fragmento de interesse deverá ser amplificado por PCR, utilizando iniciadores dotados das sequências de recombinação *att* (nove nucleotídeos), o que viabiliza a sua inserção em um vetor de entrada empregando enzimas que reconheçam os sítios de recombinação. O referido vetor de entrada é, em seguida, utilizado para transferir, em uma segunda reação de recombinação, o fragmento de interesse para outros vetores de destino com sítios de recombinação compatíveis. Uma adaptação desta técnica permite que três fragmentos de PCR diferentes sejam transferidos de maneira simultânea, em ordem e orientação definidas, para um vetor de destino específico [31]. Esta metodologia favorece a obtenção de cassetes de expressão contendo versões de escolha do promotor, fragmento de interesse e terminador. Estes serão amplificados em reações de PCR independentes, inseridos em vetores de entrada, e então reunidos na transferência final para o vetor de destino.

Uma estratégia geralmente adotada para garantir a eficiência da clonagem de produtos de PCR é a utilização de vetores “suicidas”, ou seja, dotados de um gene letal. Como exemplo, é possível citar o gene *ccdB*, cujo produto é tóxico à vasta maioria das cepas de *E. coli* [32]. Este gene funciona como um marcador positivo de seleção, uma vez que somente clones contendo o plasmídeo com a inserção do produto de PCR no gene letal – inativando-o – serão viáveis.

Técnicas menos usuais de clonagem de produtos de PCR, como, por exemplo, a clonagem UDG [33], que emprega a enzima Uracila DNA-glicosilase (UDG), também são descritas na literatura. Nesta metodologia, o DNA de interesse é amplificado usando iniciadores dotados

de uma sequência 5'-terminal extra que contém desoxiuridinas, as quais serão reconhecidas e removidas pela UDG, gerando extremidades coesivas nos produtos de amplificação.

3.10 Mutagênese sítio-dirigida

Dentre as diversas aplicações da PCR no campo da engenharia genética, está a mutagênese sítio-dirigida (*site-directed mutagenesis*; SDM). Esta técnica consiste na introdução de mutações específicas e precisas em uma molécula de DNA clonada, empregando oligonucleotídeos “mutagênicos” (Figura 3.3) [34].

Como procedimento padrão, a técnica de SDM inclui a realização de uma PCR cuja etapa de extensão enzimática é mediada por dois oligonucleotídeos iniciadores, que irão especificar a mutação a ser introduzida no alvo (substituições pontuais de nucleotídeos ou pequenas inserções ou deleções). No protocolo mais usual [35], esses iniciadores, sobrepostos e complementares a cada uma das fitas moldes do DNA-alvo, o qual, em geral, está inserido em um vetor plasmidial, são estendidos por uma DNA polimerase de alta fidelidade (12-18 ciclos), permitindo assim a incorporação da mutação nas fitas recém-sintetizadas. Contudo, torna-se necessária a posterior seleção das moléculas de DNA contendo a mutação desejada a partir de uma mistura de plasmídeos “originais” e mutados. Neste caso, como o DNA sintetizado *in vitro* não é metilado, faz-se uso de uma enzima de restrição capaz de clivar

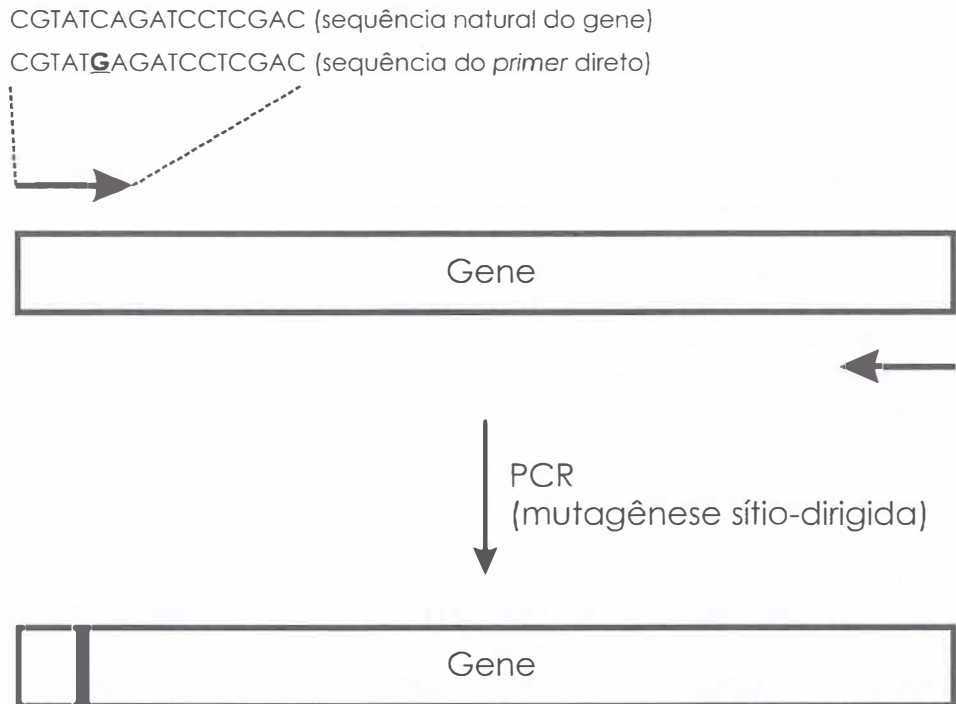


Figura 3.3. Mutagênese sítio-dirigida. Reações contendo *primers* com *mismatches* (um ou poucos nucleotídeos diferentes do gene-alvo) permitem gerar de amplicons portando mutações específicas. Neste exemplo, o *primer* direto contém um “G” em vez de “C”, levando a uma alteração pontual (representada pela barra preta vertical). Imagem: Pereira, TC.

somente o DNA parental metilado, digerindo assim os plasmídeos originais não mutados e selecionando o DNA plasmidial recém-amplificado, que contém a mutação desejada. Nessa etapa, que antecede a transformação em *E. coli*, o DNA plasmidial é digerido seletivamente pela enzima de restrição *Dpn I*, que cliva apenas as moléculas de DNA metiladas.

Embora utilizando o mesmo princípio, protocolos alternativos que fazem uso de oligonucleotídeos não sobrepostos e empregam outras estratégias de seleção das moléculas de DNA contendo a mutação desejada, também são encontrados na literatura. Dentre estes, o *Single-Primer Reactions in Parallel* (SPRINP) [36], que preconiza o uso de iniciadores únicos (senso e antissenso, respectivamente) em reações de PCR independentes, a fim de evitar a formação de dímeros de iniciadores e aumentar a eficiência de obtenção de mutantes. As reações são então combinadas e as moléculas amplificadas carregando a mutação desejada, após uma etapa de desnaturação e renaturação, são selecionadas usando a enzima *Dpn I*, como descrito anteriormente.

Entre outras aplicações, a SDM pode ser utilizada em estudos de relação estrutura-função de proteínas e ácidos nucleicos, bem como na engenharia de proteínas. As funções de muitas proteínas podem ser exploradas empregando SDM. Como exemplo, pode-se ressaltar o fator VIII da cascata de coagulação sanguínea, cuja atividade pode ser potencializada por meio de uma única mudança na sua sequência primária de aminoácidos, mais especificamente na posição 113, localizada junto ao sítio de ligação de cálcio [36]. Empregando uma adaptação da SDM denominada mutagênese por saturação, os pesquisadores testaram e avaliaram 19 substituições possíveis na posição 113, e verificaram que a substituição de um ácido glutâmico por uma alanina resultou em aumento de atividade específica [37].

Referências

- [1] Singh RK et al. *Front Microbiol* 2017. 8:2677.
- [2] Stewart CM et al. *Cancer Genet* 2018.
- [3] Todenhöfer T et al. *Bladder Cancer* 2018. 4(1):19-29.
- [4] Allen S et al. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017. 29(2):73-9.
- [5] Frantine-Silva W et al. *Genet Mol Res* 2015. 14(4):18637-49.
- [6] Zeale MR et al. *Mol Ecol Resour* 2011. 11(2):236-44.
- [7] Innis MA et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988. 85(24):9436-40.
- [8] Sanger F et al. *J Mol Biol* 1976. (94):441-8.
- [9] Harris E, *A low-cost approach to PCR*. (1998).
- [10] Kinde I et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011. (108):9530-5.
- [11] Volkenant et al., *PCR protocols: current methods and applications*. White. (1993). p. 81-8.
- [12] Rohland N et al. *Biotechniques* 2007. (42):343-52.
- [13] Heras J et al. *Brief Bioinform* 2015. 17(6):903-11.
- [14] Romeika JM et al. *J Forensic Res* 2013. s12.
- [15] Krüger et al. In: White S et al., *Genotyping: methods in molecular biology*. Humana Press. (2017). 1492 p.
- [16] Cavanaugh B et al. *Forensic Sci Int Genet* 2018. 32:40-9.
- [17] Hedman J et al. *Anal Biochem* 2010. 405(2):192-200.
- [18] Malainey, *A consumer's guide to archaeological science*. (2011).
- [19] Shapiro H, *Ancient DNA: methods and protocols*. Humana Press. (2012).
- [20] Hummel S. In: *Ancient DNA typing*. Springer. (2003). p. 57-63.
- [21] Vernesi C et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001. 98(23):13460-3.
- [22] Raoult D et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000. 97(23):12800-3.
- [23] Scharf SJ et al. *Science* 1986. 223(4768):1076-8.
- [24] Kaufman et al. *Biotechniques* 1990. 9:304-6.
- [25] Kain et al. *Biotechniques* 1991. 10:366-74.
- [26] Kain et al. *Genome Res* 1994. 4:S92-6.
- [27] Jung V et al. *Nucleic Acids Res* 1990. 18(20):6156.
- [28] Mead DA et al. *Biotechnology* 1991. 9(7):657-63.
- [29] Shuman. *J Biol Chem* 1994. 269:32678-84.
- [30] Hartley JL et al. *Genome Res* 2000. 10(11):1788-95.
- [31] Cheo DL et al. *Genome Res* 2004. 14(10b, 10B):2111-20.
- [32] Bernard P et al. *Gene* 1994. 148(1):71-4.
- [33] Rashtchian A et al. *Anal Biochem* 1992. 286(1):91-7.
- [34] Hemsley A et al. *Nucleic Acids Res* 1989. 17(16):6545-51.
- [35] Braman J et al. *Methods Mol Biol* 1996. 57:31-44.
- [36] Edelheit O et al. *BMC Biotechnol* 2009. 9(1):61.
- [37] Wakabayashi H et al. *Biochemistry* 2005. 44(30):10298-304.