

Artículo Original/ Original Article

<http://dx.doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2022.020.02.13>

## Optimización de una técnica de PCR convencional para la amplificación de la región LCR y el gen E6 del virus del papiloma humano tipo 16

Natalia Jazmín Díaz-Ferreira<sup>1</sup> , Mabel Rocío Miranda-Echagüe<sup>1</sup> , María Alexandra Mercado-Amarilla<sup>1</sup> , Iara Magaly Martínez-Pereira<sup>2</sup> , Adriana Beatriz Valenzuela-Cáceres<sup>1</sup> , Laura Patricia Mendoza-Torres<sup>1</sup> , \*Pamela Esther Mongelós-Dacunte<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Salud Pública. San Lorenzo, Paraguay.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. San Lorenzo, Paraguay.

Cómo referenciar este artículo/  
How to reference this article:

Díaz-Ferreira NJ, Miranda-Echagüe MR, Mercado-Amarilla MA, Martínez-Pereira IM, Valenzuela-Cáceres AB, Mendoza-Torres LP, Mongelós-Dacunte PE. Optimización de una técnica de PCR convencional para la amplificación de la región LCR y el gen E6 del virus del papiloma humano tipo 16. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2022; 20(2): 13-19.

### RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más frecuente en mujeres en el mundo y a nivel mundial, el VPH 16 se encuentra presente en aproximadamente el 60% de los casos. A la fecha, las variantes de VPH 16 se clasifican en 4 linajes y 16 sublinajes asociándose algunas variantes con severidad de lesión. La secuenciación de la región LCR y del gen E6 es utilizada para la clasificación de variantes. Por ello, el objetivo fue optimizar 2 PCRs convencionales para detectar la región LCR y una PCR para el gen E6. Para ello, se utilizaron muestras positivas para VPH 16, cebadores específicos para la región LCR y el gen E6. Se probaron las reacciones a diferentes temperaturas de anillamientos. La concentración de MgCl<sub>2</sub>, dNTP y cebadores fueron determinadas siguiendo las recomendaciones del fabricante de la enzima ADN polimerasa utilizada. Para la amplificación de la región LCR y el gen E6 del VPH 16, se observaron mejores resultados a una temperatura de anillamiento de 57°C y 50°C, respectivamente. La concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizada en ambas reacciones fue de 1,5mM, la de dNTP 0,2mM y la de cebadores 0,2uM. La optimización de la reacción de PCR permitirá obtener amplicones aptos para secuenciación, a fin de determinar las variantes génicas y posteriormente evaluar funcionalidad y actividad transcripcional que puedan estar relacionadas con la patogénesis cervical.

**Palabras clave:** VPH16, PCR, LCR/E6.

## Optimization of a conventional PCR technique for the amplification of the LCR region and the E6 gene of human papillomavirus type 16.

### ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women in the world and worldwide HPV 16 is present in approximately 60% of cases. To date, HPV 16 variants are classified into 4 lineages and 16 sublineages, with some variants being associated

Fecha de recepción: junio 2022. Fecha de aceptación: julio 2022

\*Autor correspondiente: Pamela Mongelós. Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Salud Pública. San Lorenzo Paraguay.

Email: [pamemongelos@hotmail.com](mailto:pamemongelos@hotmail.com)



with lesion severity. Sequencing of the LCR region and the E6 gene is used for variant classification. Therefore, the objective was to optimize two conventional PCRs to detect the LCR region and one PCR for the E6 gene. For this purpose, HPV 16 positive samples, specific primers for the LCR region and the E6 gene were used. The reactions were tested at different alignment temperatures. The concentration of MgCl<sub>2</sub>, dNTP, and primers was determined following the recommendations of the manufacturer of the DNA polymerase enzyme used. For amplification of the LCR region and the HPV 16 E6 gene, the best results were observed at an annealing temperature of 57°C and 50°C, respectively. The concentration of MgCl<sub>2</sub> used in both reactions was 1.5mM, dNTP 0.2mM and primers 0.2uM. The present optimization will be used to sequence the amplified products to determine the variants and subsequently evaluate the functionality and transcriptional activity in order to relate it to cervical pathogenesis.

**Keywords:** HPV16, PCR, LCR/E6.

## INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH), es un virus no envuelto, su genoma está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de doble hebra, cuyo tamaño es 8000 nucleótidos aproximadamente<sup>(1)</sup>.

El genoma del VPH está formado por 3 regiones: LCR (*Long control región*), región no codificadora que posee secuencias que controlan la transcripción y replicación viral. Región temprana: contiene 6 marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frame-ORFs*) que contienen las secuencias codificantes de las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, involucradas en múltiples funciones incluyendo la activación de la transcripción, transformación, replicación y la adaptación viral a diferentes ambientes celulares. Región tardía: contempla a los ORFs que contienen la secuencia codificante de las proteínas L1 y L2 de la cápside viral, las mismas forman la estructura del virión y facilitan el empaquetamiento del ADN<sup>(1)</sup>.

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae* y se clasifica según la identidad de la secuencia de nucleótidos del gen L1, en género, especie, tipo, subtipo y variantes. La identificación de los tipos virales de VPH se basa en el marco de lectura abierto de L1 debido a que es la región más conservada en el genoma viral. Un tipo es considerado nuevo si el genoma completo es clonado y la secuencia completa de nucleótidos del gen L1 difiere en más de 10% del tipo viral conocido más cercano. Una diferencia entre 2 y 10% define un subtipo, y una diferencia menor a 2% define a una variante<sup>(2)</sup>.

El VPH está asociado a diferentes patologías, desde lesiones benignas a tumores invasivos. Los VPH mucosos del género alfa-papillomavirus, son VPH oncogénicos, responsables de la mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino. Por otro lado, también son los responsables de otros tipos de cánceres como el anal, vulvar, de pene, vaginal y orales, pero en menor proporción<sup>(3)</sup>.

El VPH 16 pertenece al género alfa-papillomavirus<sup>(4)</sup>. El mismo es el tipo viral más frecuente en mujeres con citología normal, lesión de alto grado y con cáncer de cuello uterino invasivo a nivel mundial<sup>(5-7)</sup>. Es el responsable de aproximadamente el 60% de los casos de cáncer de cuello uterino a nivel mundial<sup>(7)</sup>. En nuestro país el VPH 16 es el más frecuente tanto en mujeres con cáncer de cuello uterino, así como también en mujeres con y sin lesión de cuello uterino<sup>(8-11)</sup>.

Las variantes de VPH 16, a la fecha se clasifican en 4 linajes y 16 sublinajes: linaje A, incluye los sublinajes A1, A2, A3 (anteriormente conocidas como europeas) y A4 (asiática), linaje B, sublinajes B1, B2, B3 y B4 (africana-1), linaje C, sublinajes C1, C2, C3 y C4 (africana-2), linaje D, sublinajes D1 (norteamericana, NA), D2 y D3 (asiático-americana, AA) y D4<sup>(12)</sup>.

Una variante de un tipo viral conocido se considera cuando el aislado viral difiere en menos del 2% de la secuencia de nucleótidos del gen L1. La secuenciación de la región LCR se utiliza con frecuencia para clasificar la diversidad intra-típica y los linajes de las variantes, debido a que esta región es la menos conservada y es la que presenta mayor variabilidad entre los diferentes genomas de VPH. Además, la misma controla la transcripción y replicación viral mediante la unión de factores de transcripción a la misma. Las diferentes variantes de VPH 16 presentan diferencias en

esta región, implicando diferencias en la unión de factores de transcripción, determinando así la funcionalidad<sup>(1,13)</sup>.

La secuenciación completa del gen E6 junto con la región LCR es utilizada a fin de que las mismas sean comparables con la clasificación de las variantes en base a la secuenciación completa del genoma del VPH 16<sup>(14)</sup>.

Con respecto a las variantes de VPH 16 y la patogénesis cervical, existe evidencia suficiente que demuestran que la persistencia, progresión a lesiones precancerosas, desarrollo de cáncer, así como también el tipo de cáncer cervical se encuentran relacionados a la misma<sup>(15)</sup>.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue optimizar dos reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) que abarcan a la región no codificante LCR y al gen E6 cuyos productos podrán ser sometidos a secuenciación por el método de Sanger. El análisis de la secuencia nucleotídica de estas regiones del genoma servirá para determinar las variantes de VPH 16. Por otra parte, las secuencias obtenidas se utilizarán para construir plásmidos, pudiendo posteriormente evaluar la actividad transcripcional de la región no codificante LCR de las diferentes variantes de VPH16 a través de la medición indirecta de la actividad de la luciferasa de vagalume en ensayos de transfección, con el fin de relacionarlas con la patogénesis cervical.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la optimización de las PCR se utilizaron muestras de VPH 16, previamente tipificadas (Proyecto código 14-inv-036), provenientes del biobanco del Departamento de Salud Pública.

### Extracción de ADN viral

Para la extracción del ADN viral se utilizó el kit comercial GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EEUU) y se siguió el protocolo proveído por el fabricante. El ADN extraído fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento.

### Optimización de las PCR

Para la optimización en la amplificación de la región LCR y del gen E6 se utilizaron los cebadores descritos por Xi et al 2017 y Cornet et al 2012, respectivamente<sup>(13,14)</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para las reacciones de PCR.

Cebador	Secuencia 5´ -----3´	Posición	Tamaño prod. amplificado
LCR 1F	ACCCACCACCTCATCTACCTCTACAA	7101-7126	460pba
LCR 1R	ATTTGGCACGCATGGCAAGCAGGAA	7560-7536	
LCR2F	CATGCTTTTTGGCACAAAATGTGTTTT	7465-7491	621pba
LCR2R	ATATCATGTATAGTTGTTTGCAGCTCT	180-154	
E6F	CGAAACCG GTTAGTATAA	52-69	524pba
E6R	GTATCTCCATGCATGATT	558-575	

Se probaron tres PCR. Cada una utiliza un par de cebadores que amplifican la región 5´ de LCR (cebadores LCR1), la región 3´ de LCR hasta la región 5´ de E6 (cebadores LCR2) y por último cebadores para las regiones 5´ y 3´ de E6 (cebadores E6) (Tabla 1). Cada amplicón posee un extremo que se superpone con el subsiguiente, por lo que con el empalme de los tres productos se obtiene una secuencia consenso desde la posición 7101 (LCR) a 575 (E6) del genoma circular de VPH 16. Todas las PCRs fueron probadas siguiendo las recomendaciones del fabricante de la enzima ADN polimerasa utilizada de alta fidelidad, (iProof High-Fidelity DNA Polimerase, Bio-Rad), considerando que los productos de amplificación serán secuenciados.

Cada reacción se realizó en un volumen final de 50uL con concentraciones finales 1X de *buffer*, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 200uM de dNTP, 0,2uM de cada cebador y 0,02U/uL de iProof DNA polimerasa.

Teniendo en cuenta la *temperatura de melting* (Tm) de cada par de cebadores, cada PCR se probó a diferentes temperaturas de anillamiento. Además, se probaron los diferentes *buffers* proveídos con la enzima. Para la PCR con los cebadores LCR1 y LCR2 se probaron las temperaturas de 54 °C, 57 °C y 60°C. Para los cebadores E6 se probaron las temperaturas de 48°C, 50 °C y 52°C. En la tabla II se describe el programa de termociclado utilizado según las recomendaciones del fabricante de enzima ADN polimerasa utilizada.

**Tabla 2.** Programa de termociclado.

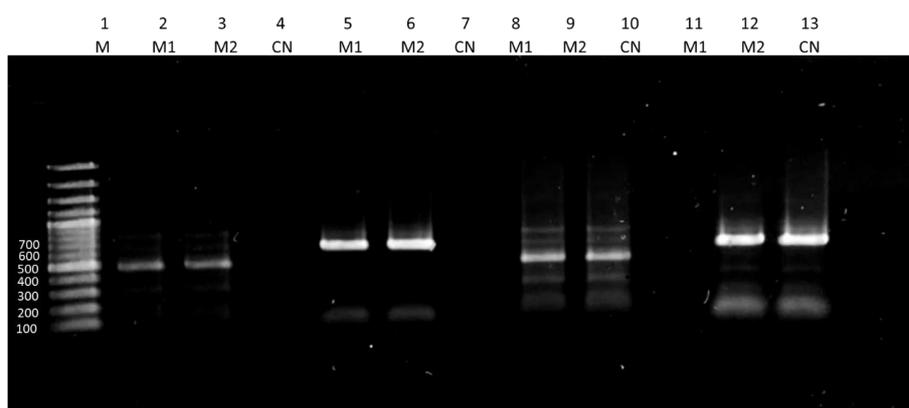
Temperatura °C	Tiempo	Pasos	
98	3min	1	
98	10s	2	35 ciclos del paso 2 al 4
T° anillamiento	30s	3	
72	30s	4	
72	10 min	5	
4	15 min	6	
15	inf	7	

Los productos de amplificación fueron sometidos a corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1%. Los productos amplificados fueron visualizados mediante tinción y revelado. Para la tinción se utilizó el colorante Diamond™ (Promega, EEUU).

## RESULTADOS

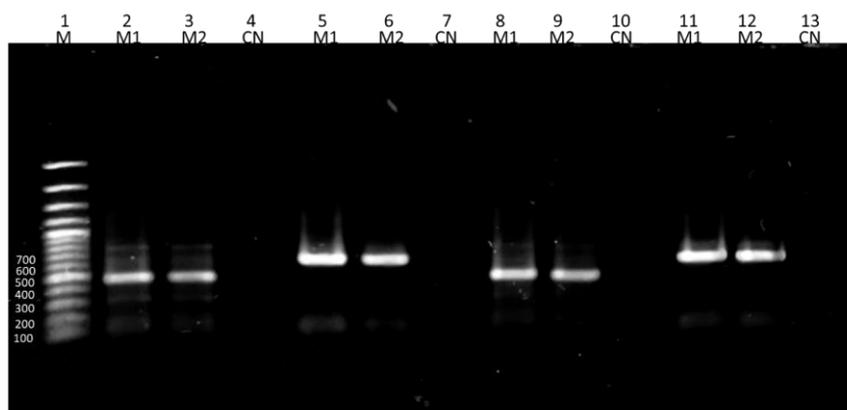
### Optimización de la PCR LCR1 y LCR2

Con respecto a la temperatura de anillamiento, se observó producto de amplificación en las 3 temperaturas probadas, sin embargo, se observó una mayor intensidad al realizar la PCR a 57°C utilizando el *buffer* GC, que incrementa la efectividad para secuencias con alto contenido de bases G-C. En las Figuras 1-3 se observan las corridas electroforéticas de productos amplificados obtenidos en las diferentes PCRs utilizando diferentes temperaturas de anillamiento y *buffers* de reacción.



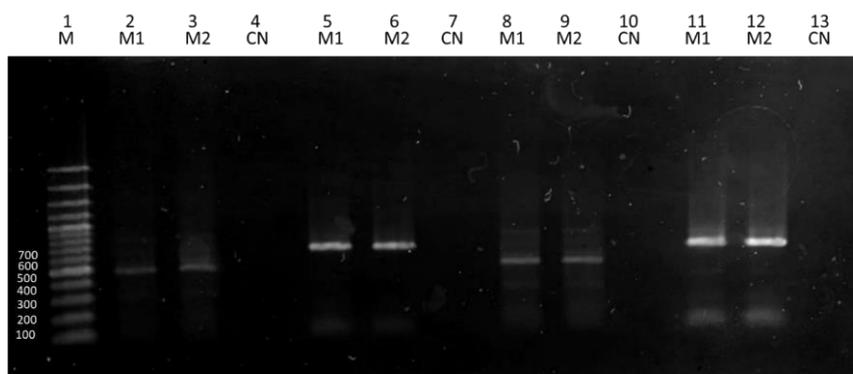
M1: muestra1 de VPH16 tipificada previamente M2: muestra2 de VPH16 tipificada previamente CN: control negativo

**Figura 1.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de productos amplificados de VPH 16 con cebadores LCR1 y LCR2 utilizando una temperatura de anillamiento de 54°C. Carril 1: Marcador de pares de base. Carriles 2-7 se utilizó *buffer* HF y del 8-13 *buffer* GC. En los carriles 2, 3, 8 y 9 se sembraron productos amplificados de 460 pb, obtenidos mediante cebadores LCR1. En los carriles 5, 6, 11 y 12 se sembraron productos amplificados de 621 pb obtenidos mediante cebadores LCR2.



M1: muestra1 de VPH16 tipificada previamente M2: muestra2 de VPH16 tipificada previamente CN: control negativo

**Figura 2.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de productos amplificados de VPH 16 con cebadores LCR1 y LCR2 utilizando una temperatura de anillamiento de 57°C. Carril 1: Marcador de pares de base. Carriles 2-7 se utilizó *buffer* HF y del 8-13 *buffer* GC. En los carriles 2, 3, 8 y 9 se sembraron productos amplificados de 460 pb, obtenidos mediante cebadores LCR1. En los carriles 5, 6, 11 y 12 se sembraron productos amplificados de 621 pb obtenidos mediante cebadores LCR2.

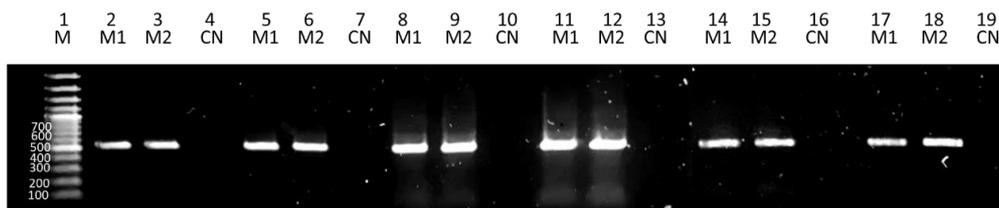


M1: muestra1 de VPH16 tipificada previamente M2: muestra2 de VPH16 tipificada previamente CN: control negativo

**Figura 3.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de productos amplificados de VPH 16 con cebadores LCR1 y LCR2 utilizando una temperatura de anillamiento de 60°C. Carril 1: Marcador de pares de base. Carriles 2-7 se utilizó *buffer* HF y del 8-13 *buffer* GC. En los carriles 2, 3, 8 y 9 se sembraron productos amplificados de 460 pb, obtenidos mediante cebadores LCR1. En los carriles 5, 6, 11 y 12 se sembraron productos.

### Optimización de la PCR E6

Para la PCR E6, se observó una mejor amplificación utilizando una temperatura de anillamiento de 50°C con el *buffer* GC. En la Figura 4 se observa la corrida electroforética de los productos amplificados con los cebadores E6, a diferentes temperaturas de anillamiento y con diferentes *buffers* de reacción.



M1: muestra1 de VPH16 tipificada previamente M2: muestra2 de VPH16 tipificada previamente CN: control negativo

**Figura 4.** Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de productos amplificados de VPH 16 con cebadores E6, con un producto de amplificación de 524pb. En los carriles del 2-7 se sembraron los productos de amplificación obtenidos utilizando una temperatura de anillamiento de 48°C, del 8 al 13 de 50°C y del 14-19 de 52°C. En los carriles 2, 3, 4, 8, 9, 10, 14, 15 y 16 se sembraron productos obtenidos con la utilización del *buffer* HF y en los carriles 5, 6, 7, 11, 12, 13, 17, 18 y 19 *buffer* GC.

Por tanto, para la amplificación de la región LCR utilizando los cebadores LCR1 y LCR2 se observaron mejores resultados a una temperatura de anillamiento de 57°C y para la amplificación del gen E6 50°C. La concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizada en ambas reacciones fue de 1,5mM, la de dNTP 0,2mM y la de cebadores 0,2uM.

## DISCUSIÓN

Para ambas reacciones de PCR se optó por utilizar el *buffer* GC, ya que se obtuvieron bandas más nítidas para LCR y para E6. Estos resultados se correlacionan con las indicaciones establecidas por el fabricante de la enzima ADN polimerasa utilizada, iProof High-Fidelity DNA Polymerase de la marca Bio-Rad, donde se recomienda la utilización del *buffer* GC para la amplificación de templados ricos en bases G-C y para secuencias complejas o de mayor longitud<sup>(16)</sup>.

Las temperaturas de anillamiento testadas para la amplificación de la región LCR y el gen E6 fueron seleccionadas teniendo en cuenta la *temperatura de melting* (T<sub>m</sub>) de cada par de cebadores, así como también las indicaciones proveídas por el fabricante de la enzima utilizada, el cual sugiere la elección de una temperatura de anillamiento que se encuentre 3°C por encima de la T<sub>m</sub> más baja del par de cebadores utilizados<sup>(16)</sup>. Las temperaturas de anillamiento seleccionadas para cada reacción de PCR permitieron la obtención de bandas nítidas del tamaño esperado para cada producto de amplificación, además de minimizar la amplificación de fragmentos inespecíficos. Sin embargo, cabe mencionar que en algunos casos se observaron productos inespecíficos, los cuales fueron muy tenues en comparación al producto deseado, lo cual permitirá realizar una purificación en gel a fin de secuenciar el producto específico.

Para los ensayos de amplificación de la región LCR se optó por la temperatura de anillamiento de 57°C, lo cual permitió realizar las reacciones de amplificación de los segmentos LCR 1 y LCR 2 bajo las mismas condiciones de ciclado, con T<sub>m</sub> respectivos de 59°C y 53°C<sup>(17)</sup>. Esta temperatura seleccionada es similar a la utilizada en los experimentos de Xi *et al.*<sup>(13)</sup>.

Para la amplificación del segmento E6 se optó por la temperatura de anillamiento de 50°C, lo cual se concuerda con una T<sub>m</sub> calculada de 53°C<sup>(17)</sup>, similar a lo reportado en los ensayos realizados por Cornet *et al.*<sup>(14)</sup>.

En conclusión, se logró optimizar las reacciones para la amplificación de la región LCR y del gen E6 del genoma de VPH16, obteniéndose amplicones con concentraciones de ADN necesarias para ser sometidos a secuenciación por el método de Sanger, según inspección visual de los productos obtenidos en geles, mediante la comparación con las bandas del marcador de peso molecular, cuya concentración es conocida. La presente optimización servirá para determinar las variantes de VPH 16 mediante el análisis de las secuencias de ambas regiones. Además, los amplicones podrán ser clonados y utilizados en ensayos in vitro de funcionalidad y actividad transcripcional de la región no codificante LCR, considerando que han sido reportadas diferencias en la capacidad de patogénesis cervical de los diferentes linajes de VPH 16.

**Financiamiento:** Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), PINV18-896.

**Conflicto de interés:** No posee conflicto de intereses.

**Contribución de autores:** Natalia Jazmín Díaz Ferreira: Preparación del manuscrito, realización de las PCRs y corridas electroforéticas.

Mabel Rocío Miranda Echagüe: Realización de las PCRs y corridas electroforéticas.

María Alexandra Mercado Amarilla: Realización de las PCRs y corridas electroforéticas.

Iara Magaly Martínez Pereira: Análisis de resultados y revisión de la versión final.

Adriana Beatriz Valenzuela Cáceres: Análisis de resultados y revisión de la versión final.

Laura Patricia Mendoza Torres: Análisis de resultados y revisión de la versión final.

Pamela Esther Mongelós Dacunte: Concepción/diseño del trabajo, preparación del manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: Genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009; 12(5-6):281-90.
2. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17-27.
3. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015; 476.
4. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology [Internet]*. 2010; 401(1):70-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
5. Sanjosé S, Díaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical HPV in women with normal cytology. *Lancet Infect [Internet]*. 2007; 7(7): 453-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597569>
6. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121(3): 621-32.
7. de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*. 2010; 11(11): 1048-56.
8. Rolón P, Smith JS, Muñoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J Cancer*. 2000; 85(4):486-91.
9. Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, et al. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol [Internet]*. 2012 Oct [cited 2018 Mar 14];84(10):1628-35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23373>
10. Mendoza LP, Arbiza J, Paez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *J Med Virol [Internet]*. 2011 Aug 1 [cited 2018 Mar 14]; 83(8): 1351-7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.22112>
11. Mongelos P, Mendoza LP, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, et al. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from Paraguayan indigenous. *Int J Infect Dis*. 2015; 39: 44-9.
12. Mirabello L, Clarke M, Nelson C, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses [Internet]*. 2018;10(2):80. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/2/80>
13. Xi J, Chen J, Xu M, Yang H, Luo J, Pan Y, et al. Genetic variability and functional implication of the long control region in HPV-16 variants in Southwest China. *PLoS One*. 2017; 12(8):1-11.
14. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, et al. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *J Virol [Internet]*. 2012;86(12):6855-61. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00483-12>
15. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology [Internet]*. 2013; 445(1-2):232-43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>
16. BioRad. iProof™ High-Fidelity PCR Kit. *Bio\_Rad*. 2016. p. 2-3.
17. Kibbe WA. "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic Acids Res*. 2007.