

Traduzione in italiano:

Canale telegram: <https://t.me/katesugakufficiale>

Sito web: <https://www.ekaterinasugak.com/homepage>

Articolo originale in inglese:

<https://criticalcheck.wordpress.com/2022/05/08/pcr-and-real-time-rt-pcr-under-critical-review/>



PCR IN TEMPO REALE E RT-PCR - UNA REVISIONE CRITICA.

8 MAGGIO 2022 | TAM

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è descritta come un metodo per "amplificare" (copiare) ripetutamente specifiche sequenze di DNA utilizzando l'enzima PCR e nucleotidi artificiali. Inizialmente è stato sviluppato per creare frammenti di DNA sufficienti a fini di ricerca, ma in seguito è diventato uno strumento per la medicina legale, il sequenziamento del DNA e la diagnosi di malattie genetiche.

La maggior parte di noi ha sentito parlare della PCR durante la pandemia di Covid-19, quando la reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa in tempo reale (RT-PCR) è diventata il gold standard per individuare il virus Sars-Cov-2, il virus collegato alla malattia di Covid-19.

Alcune brevi sequenze del virus sono state selezionate per l'individuazione della Sars-Cov-2. Quando si esegue la RT-PCR in tempo reale, viene rilasciato un segnale di colorante fluorescente; se queste sequenze sono presenti nel campione, questi segnali vengono registrati [da un "sistema di PCR in tempo reale"](#).

Ci sono molti articoli che criticano la PCR come "strumento inappropriato per la diagnosi di infezioni virali", ma in realtà la PCR stessa non è mai stata criticata. In questo articolo esamineremo la PCR, la RT-PCR in tempo reale, gli ingredienti e le attrezzature utilizzate per eseguirle.

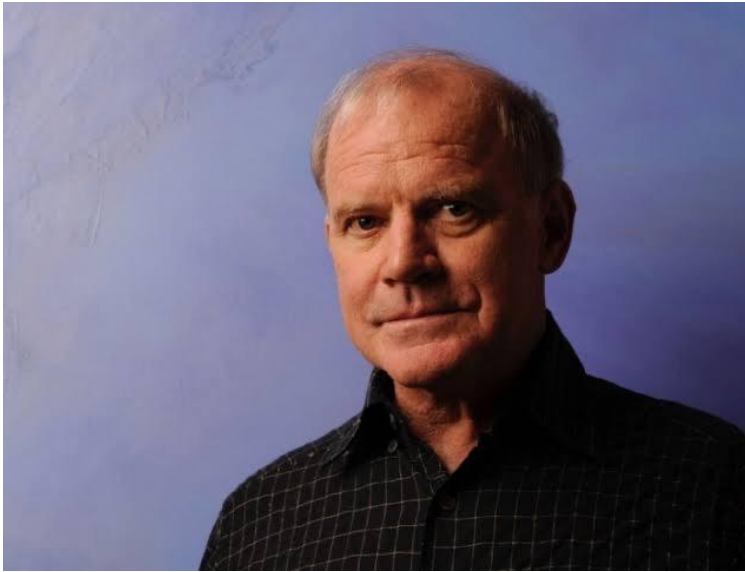
TERMINOLOGIA

Cercherò di limitare l'uso di termini scientifici, ma utilizzerò alcuni dei termini riportati di seguito per evitare frasi lunghe e complicate.

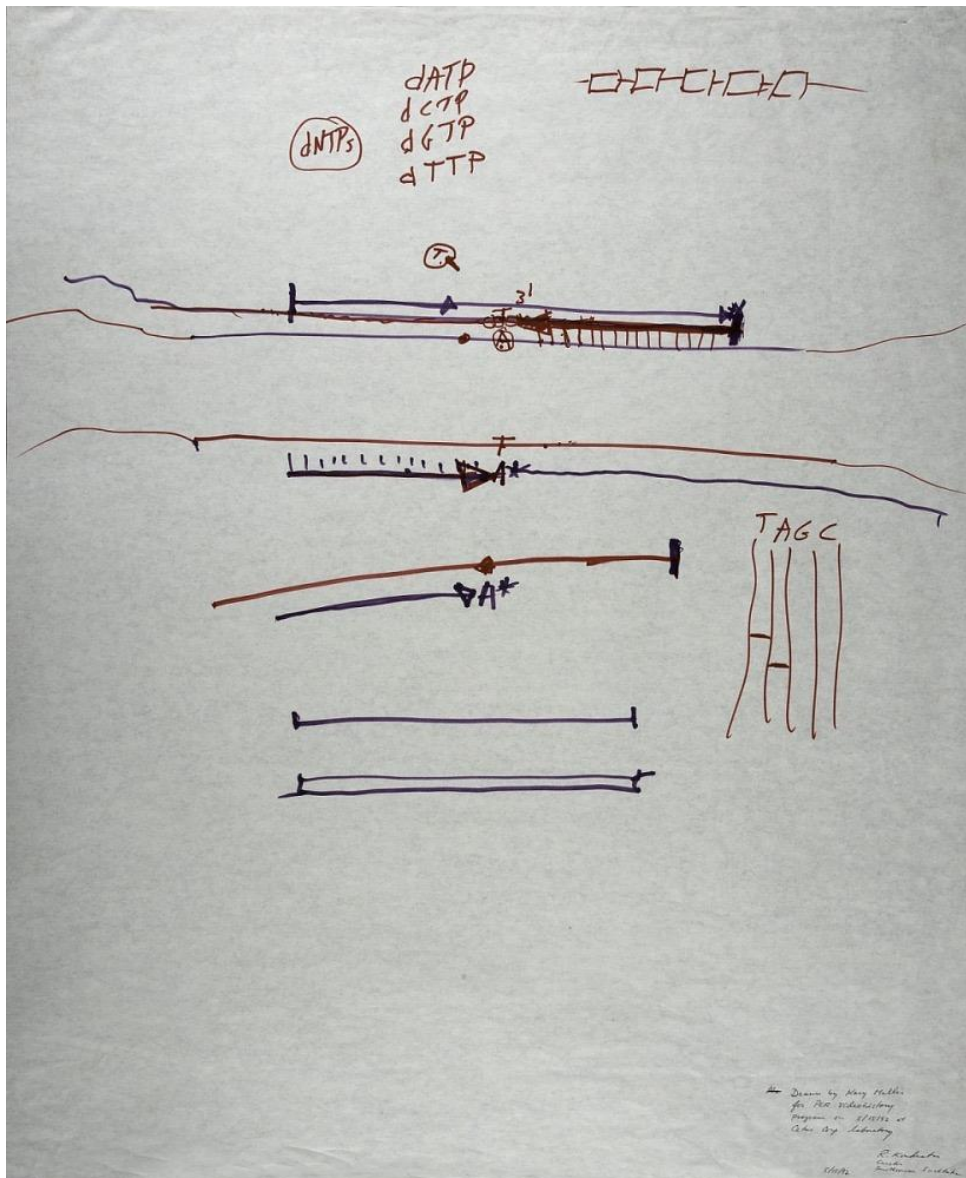
- Amplificazione del DNA: amplificazione artificiale di uno specifico frammento/sequenza di DNA.
- PCR: Reazione a catena della polimerasi, una tecnica ampiamente utilizzata per amplificare (copiare/moltiplicare) uno specifico tratto/sequenza di DNA.
- RT-PCR: PCR a trascrizione inversa (RT), una tecnica utilizzata quando il campione è costituito da RNA. La RT è una procedura che trasforma l'RNA in DNA producendo un filamento complementare (cDNA) che corrisponde al filamento di RNA.
- Ciclo di PCR: un ciclo di PCR consiste in tre fasi: denaturazione, annealing e allungamento. Durante queste fasi il DNA viene scisso e copiato.
- Nucleobasi: componente della coppia di basi, adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C).
- [Nucleotide](#): l'unità strutturale del DNA/RNA, cioè una nucleobase e la sua base.
- Oligonucleotidi: corti filamenti di nucleotidi sintetici
- dNTP (trifosfati nucleosidici deossiribosio): nucleotidi sintetici
- Polimerasi: enzima utilizzato per sintetizzare artificialmente il DNA.
- Primer del DNA: brevi filamenti di nucleotidi sintetici che vengono utilizzati dalla polimerasi per avviare l'amplificazione del DNA.
- Sonde: oligonucleotidi colorati con coloranti fluorescenti
- Template di DNA/RNA: un filamento di DNA o RNA.
- Precipitato/granuli: solido in provetta
- Surnatante: sostanza liquida contenuta in una provetta.
- Espettorato: saliva, catarro e/o muco provenienti dalle vie respiratorie superiori.
- BALF: liquido di lavaggio broncoalveolare raccolto dai polmoni.
- Termociclatore (anche detto termociclatore, macchina per PCR, amplificatore di DNA): macchina utilizzata per la PCR.
- Centrifugazione: rotazione vigorosa effettuata da una macchina centrifuga.

REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

Breve storia della PCR



[A Cary Mullis](#) si deve l'invenzione della PCR, per la quale ha ricevuto [il Premio Nobel](#) per la Chimica nel 1993. Secondo Mullis, l'idea della PCR gli venne mentre era alla guida di un'auto e usò droghe ricreative, in particolare LSD, per concettualizzare la procedura PCR. C. Mullis, [H. Ehrlich](#), R. K. Saiki e il loro team della Cetus Corporation hanno sviluppato la procedura PCR. La procedura PCR è stata brevettata e il brevetto è stato successivamente venduto alla Abbott Pharmaceuticals. Ci sono diverse controversie legali sulla PCR e sull'enzima Taq polimerasi, che hanno portato al mancato rinnovo di questi brevetti.

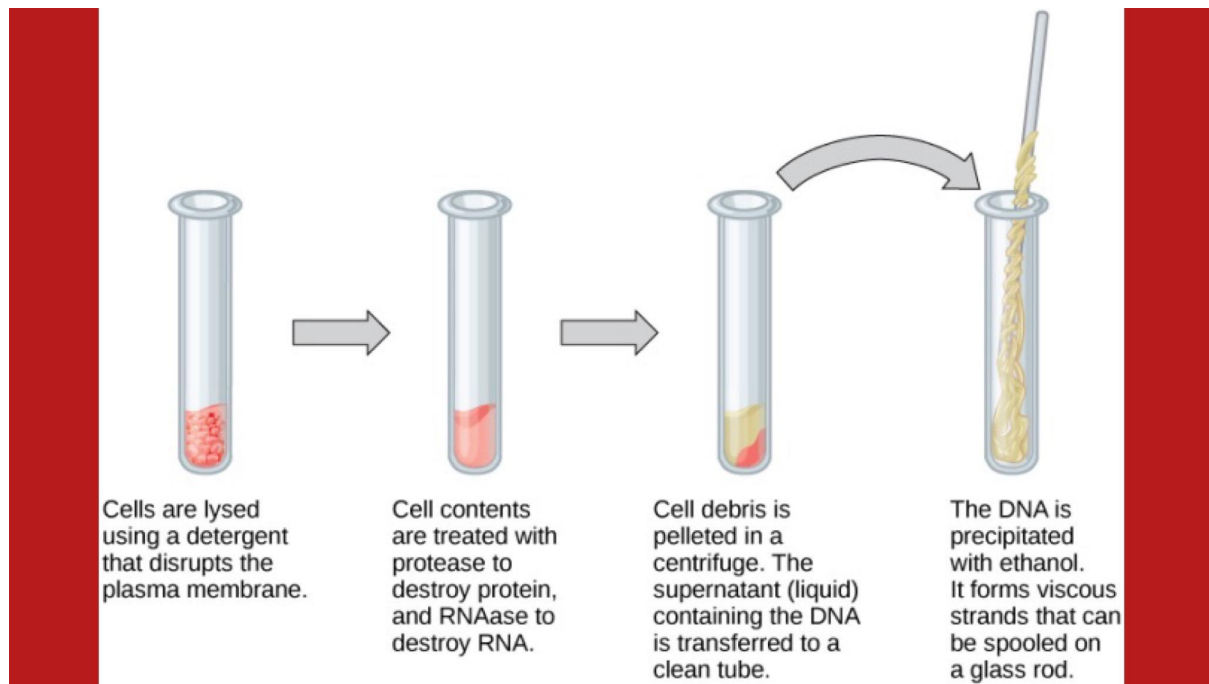


Disegno PCR di Cary Mullis.

Come funziona la PCR

La moderna procedura di PCR è piuttosto semplice, non è nemmeno necessario essere un biologo molecolare o un chimico per eseguirla. Tutto ciò che serve è un campione che contiene il DNA, una serie di reagenti chimici, componenti di DNA sintetico e un termociclatore, tutti venduti esclusivamente da aziende di biotecnologia come Thermo Fisher e Agilent Technologies. Tutto ciò che dovete fare è isolare il DNA secondo le istruzioni del kit di estrazione del DNA, mescolarlo con le sostanze chimiche per la PCR, metterlo nel termociclatore, impostare il programma (temperatura e numero di cicli da ripetere) e voilà, in un'ora o due avrete più DNA da studiare e lavorare.

Estrazione del DNA



Isolamento/estrazione del DNA

Prima di effettuare la PCR, il DNA deve essere estratto dal resto della sostanza. Da quando [Friedrich Miescher](#) isolò per la prima volta il DNA, poco è cambiato nella metodologia di isolamento, a parte l'avvento di attrezzature speciali, del calore e di tonnellate di kit per l'estrazione del DNA presenti sul mercato. Ogni kit e attrezzatura offre i propri protocolli d'uso.

[L'estrazione del DNA](#) (nota anche come estrazione del DNA, purificazione del DNA) consiste in quattro fasi:

Lisi cellulare (cioè distruzione delle cellule): una sostanza contenente DNA viene mescolata con enzimi sintetici come RNasi e proteasi e un cocktail di sostanze chimiche alcalinizzanti e acide chiamato "tamponi". La soluzione deve essere agitata con un vortex e poi incubata a temperatura tiepida o elevata. La soluzione viene quindi centrifugata (ruotata energicamente) per separare la sostanza in un "surnatante" (la parte liquida) e in un "pellet" (il solido che rimarrà sul fondo della provetta). A seconda del protocollo del kit, il DNA si troverà nel surnatante o nel pellet, le sostanze indesiderate verranno scartate e le sostanze trattenute possono essere mescolate con tamponi e centrifugate più volte; il DNA finale si troverà nel surnatante.

"Precipitazione" (DNA dalla soluzione): alla sostanza ottenuta nella fase precedente viene aggiunto dell'alcol sintetico, la nuova soluzione viene incubata e centrifugata. Questa volta il DNA finirà in un vassoio, il surnatante verrà scartato e il DNA rimasto nella provetta verrà lasciato asciugare all'aria.

"Lavaggio" (DNA): si aggiunge (nuovamente) alcool chimico per rimuovere eventuali cellule residue, si centrifuga nuovamente la soluzione, si scarta il surnatante e la vaschetta risultante viene considerata come DNA separato.

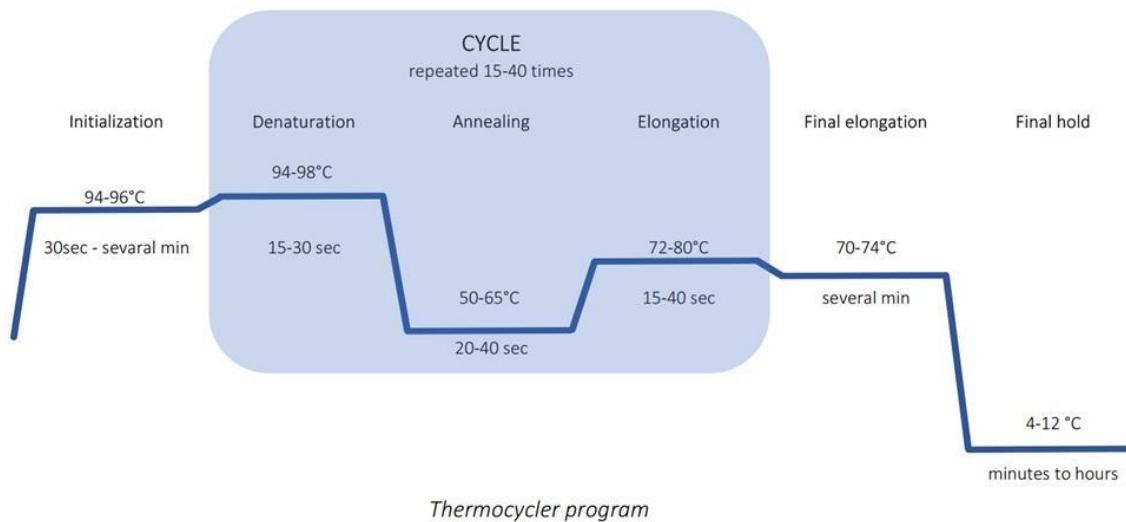
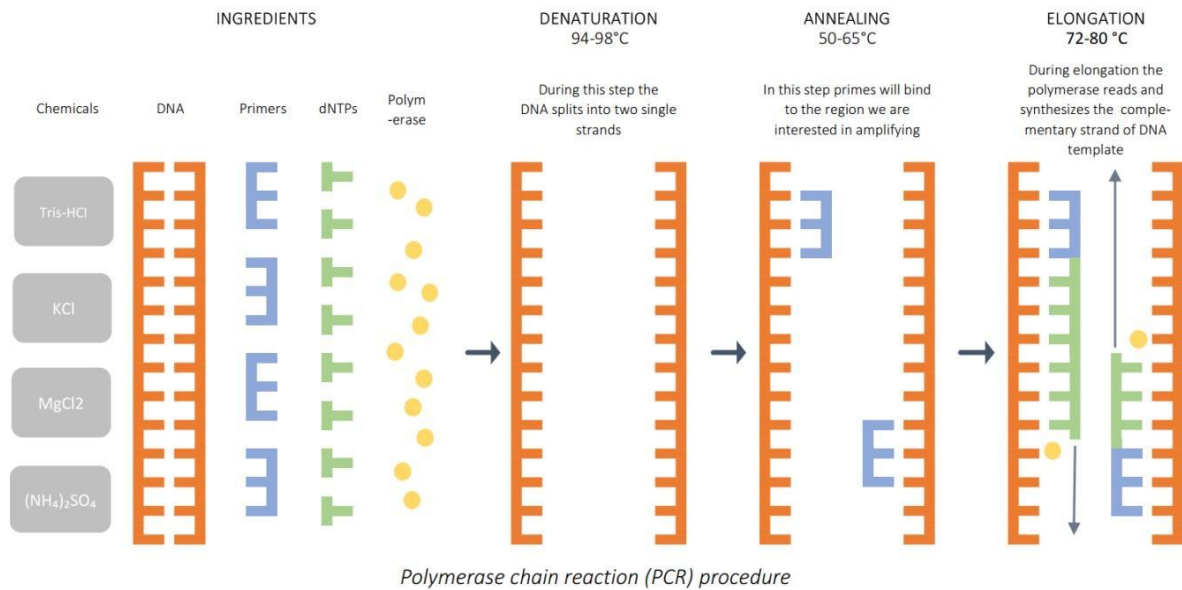
Risospensione (DNA): il DNA estratto viene mescolato con tampone o acqua di grado molecolare, cioè il DNA estratto viene sospeso in una soluzione chimica, in un tampone o in acqua ultrapura, a seconda della durata di conservazione del DNA. Il tampone stabilizza il DNA e ne impedisce la degradazione.

Ingredienti della PCR

- **DNA isolato:** nella maggior parte dei casi, viene isolato da un fluido corporeo (sangue, espettorato o BALF).
- **Acqua**
- **Soluzione tampone per la PCR:** un tampone tipico contiene Tris-HCl (Tris(idrossimetil)aminometano cloridrato) e KCl (cloruro di potassio). Queste sostanze chimiche sono utilizzate per mantenere costante il valore del pH del cocktail PCR (tra 8,3-9pH), che fornisce un ambiente stabile per l'attività della DNA polimerasi.
- **DNA polimerasi:** enzima che sintetizza i filamenti di DNA. La più nota e più utilizzata è la Taq polimerasi
- **MgCl₂** (cloruro di magnesio): aumenta l'attività della polimerasi e quindi l'amplificazione del DNA.
- **(NH₄)₂SO₄** (solfato di ammonio): svolge lo stesso ruolo di MgCl₂.
- **Primer del DNA:** i [primer](#) sono brevi sequenze di DNA artificiale a singolo filamento che si attaccano a una sezione specifica di un singolo filamento di DNA. Indicano alla polimerasi il punto di partenza della sequenza che gli scienziati sono interessati a copiare. Gli scienziati possono acquistare primer predefiniti o ordinare singole sequenze, entrambi acquistabili solo da aziende di biotecnologia.
- **dNTP:** nucleotidi artificiali utilizzati dalla polimerasi come mattoni per l'amplificazione del DNA. Anche i dNTP sono commercializzati esclusivamente da società di biotecnologia.

Gli ingredienti specificati vengono mescolati e inseriti in un termociclatore. Il termociclatore applica temperature specifiche per un periodo di tempo più volte ("cicli") per amplificare il DNA.

Fasi della PCR



La procedura di PCR consiste nelle seguenti fasi:

- **Inizializzazione:** la miscela viene riscaldata a 94-96°C per 30 secondi o alcuni minuti. Questa fase attiva la DNA polimerasi e viene eseguita una sola volta, all'inizio del processo di PCR.
- **Denaturazione:** la miscela viene riscaldata a 94-98°C per 15-30 secondi. Questa fase "denatura", cioè divide il DNA in due filamenti separati.
- **Ricottura:** durante la fase di ricottura, la temperatura viene ridotta a 50-65°C per 20-40 secondi. Questa temperatura consente ai primer e alla polimerasi di legarsi alla regione di amplificazione di interesse. Di solito la temperatura ideale è di qualche grado inferiore al "[punto di fusione](#)" degli inneschi.
- **Allungamento/estensione:** in questa fase la temperatura viene portata a 72-80°C per 20-40 secondi. A questa temperatura, la polimerasi si attiva e inizia a collegare i dNTP liberi a un filamento di DNA. Di conseguenza, si formano due nuovi pezzi di DNA a doppio filamento. La durata di questa fase dipende dalla lunghezza della

copia del DNA. In genere, la DNA polimerasi può copiare 1.000 coppie di basi al minuto.

- **Allungamento finale:** fase facoltativa ma consigliata in cui la temperatura viene mantenuta a 70-74°C per alcuni minuti (di solito la stessa temperatura della fase di allungamento). Questa fase consente alla polimerasi di terminare la copiatura del filamento su cui sta lavorando.
- **Ammollo finale:** una volta completato il programma impostato, il termociclatore mantiene il risultato finale a una temperatura che impedisce la degradazione, 4-12°C.

Le fasi da 2 a 4 rappresentano un ciclo di PCR che viene ripetuto 15-40 volte. Più cicli vengono eseguiti, più copie di DNA si formano, ma dopo un certo numero di cicli, cioè più di 40, i primer e i nucleotidi possono esaurirsi, causando problemi con il DNA finale nella provetta; inoltre, un numero elevato di cicli riduce l'efficienza della PCR a causa dell'accumulo di sottoprodotti.

Ricerca critica sulla PCR

- **DNA:** ho già parlato del concetto di DNA nel mio precedente [articolo](#), che consiglio vivamente di leggere perché aiuta a capire cosa sia o meno il DNA. Per chi volesse continuare questo articolo ed esplorare il DNA in una fase successiva, ecco un breve riassunto delle mie principali scoperte:
 - Nel processo di estrazione/isolamento del DNA, la sostanza di interesse viene mescolata con sostanze chimiche e centrifugata più volte; alla fine nella provetta si trova un precipitato, che **presumibilmente è il DNA. Personalmente descrivo questa procedura come "lavaggio chimico dei tessuti morti" piuttosto che isolamento o estrazione, perché l'isolamento o l'estrazione vera e propria avviene quando si separa la materia di interesse dal resto della materia senza ricorrere a sostanze chimiche, alla centrifugazione o al trattamento termico.**
 - Il DNA isolato viene raramente, quasi mai, osservato al microscopio.
 - Componenti della coppia di basi, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T): invisibili, ma sono questi componenti invisibili che presumibilmente distinguono gli esseri umani dalle piante, dagli alberi, dalle rane, ecc.
- Le loro quantità, posizioni e coppie sono state postulate sulla base della "regola di Chargaff". Nel suo lavoro scientifico, Erwin Chargaff ha identificato i componenti delle coppie di basi e ha concluso che la quantità A è simile a T e la quantità C è simile a G. Chargaff non ha mai proposto un meccanismo di accoppiamento basato su queste quantità.
- La forma della doppia elica viene dedotta applicando modelli matematici alle immagini a raggi X del DNA. La matematica è una forma di linguaggio, la sua forma quantitativa, la matematica non esiste in natura; inoltre, l'applicazione di formule matematiche a diverse fotografie di un oggetto quasi invisibile, può dire molto poco sulla reale forma e struttura di quell'oggetto. Per determinare matematicamente la struttura e la forma del DNA, sono state utilizzate solo due immagini a raggi X di un particolare DNA (il "sale di DNA" di un timo di vitello, noto come NaDNA); da allora, disponiamo solo di alcune immagini di DNA provenienti da fonti sconosciute e di una tecnica di estrazione sconosciuta. La forma del DNA era in gran parte basata su un'ipotetica struttura molecolare del DNA e l'ipotetica struttura molecolare era basata su un'ipotetica forma.

- È stato ipotizzato il noto ruolo del DNA, ma non abbiamo prove reali e documentate che il DNA venga copiato, trascritto in RNA e poi in proteine. Tutte le ipotesi si basano sull'esame quantitativo del campione prima e dopo determinate procedure (lavaggi chimici, centrifugazione, riscaldamento e bollitura). Il microscopio viene utilizzato raramente.
 - La DNA polimerasi è stata descritta come un enzima in grado di tollerare e lavorare ad alte temperature. Ecco un brevissimo riassunto del lavoro scientifico di Mullis et al. in cui hanno sperimentato con [E. coli](#) e [Taq polimerasi](#)
1. L'E. coli o la Taq "isolata" (cioè trattata chimicamente) viene mescolata con ingredienti provenienti da aziende biotecnologiche (dNTP, tamponi, ecc.). In un articolo che studiava l'E. coli, sono stati utilizzati addirittura sale di bario, resina Dowex 50 e fluoruro.
 2. Dopo la centrifugazione, il riscaldamento e il raffreddamento, la quantità di precipitato ottenuto viene misurata con vari metodi di precipitazione frazionata (documento di ricerca su E. coli) e di elettroforesi su gel (documento di ricerca su Taq) per determinare la "dimensione/peso molecolare" del "DNA".
 3. **Non c'è un'effettiva osservazione dell'attività enzimatica e della conversione di una certa quantità di DNA in una quantità maggiore di DNA.** La documentazione di determinate quantità di sottoprodotti dopo la miscelazione di sostanze chimiche con tessuti o batteri morti non prova che esista un enzima (polimerasi) che si attacca ai primer e al DNA a singolo filamento (ssDNA) e in qualche modo fonde magicamente i dNTP liberi a ssDNA a 72-80°C.
 4. Gli enzimi sono noti per digerire e decomporre la materia piuttosto che sintetizzarla.
 5. **Non sono stati effettuati esperimenti di controllo senza polimerasi, né esperimenti senza dNTP o altre sostanze chimiche per stabilire l'effetto di ciascun componente del cocktail chimico.**
 - Non sappiamo come vengano sintetizzati i nucleotidi artificiali (dNTP), **gli ingredienti esatti e la metodologia non vengono resi noti e sono considerati un segreto commerciale.** L'unico modo per ottenerli è acquistarli dalle aziende biotecnologiche e credere di aver ottenuto ciò che si è pagato, poiché non c'è modo di verificare o confermare il contenuto risultante. L'aspetto molto interessante è che all'acquisto c'è sempre un'avvertenza: ["Solo per uso di ricerca". Non per l'uso in procedure diagnostiche](#)", vale a dire che se vengono utilizzati per la diagnostica, nessuno può intraprendere azioni legali contro le aziende biotecnologiche in caso di problemi con il prodotto. Questa clausola si applica praticamente a tutti gli ingredienti e agli strumenti utilizzati per la PCR da tutte le aziende biotecnologiche.
 - Anche i primer possono essere acquistati solo nelle aziende biotecnologiche. Lo sviluppo dei primer si basa sul ["ciclo di sintesi" degli oligonucleotidi](#); questa procedura prevede diverse fasi e sostanze chimiche come acetonitrile, acido tricloroacetico al 3% in diclorometano, argon, N-metil imidazolo, piridina e iodio. È piuttosto scomodo che siano necessari così tanti passaggi, sostanze chimiche e solventi per sintetizzare primer/oligonucleotidi, il tutto senza osservazione al microscopio o esperimenti di controllo. Poiché i primer sono invisibili, otteniamo [un flacone vuoto e un foglio di garanzia della qualità](#) e, come per i dNTP, non possiamo verificare o confermare che il flacone risultante contenga i primer e, se il flacone contiene i primer, si tratta delle sequenze che abbiamo ordinato.

- Perché i primer si attaccano da soli e i dNTP richiedono un enzima? I primer contengono qualche tipo di ingrediente "collante"? Se così fosse, perché non aggiungere questa "colla" ai dNTP (?), eliminando così la necessità della polimerasi.
- Durante la denaturazione, il cocktail di PCR viene riscaldato a 95°C. Il calore è molto dannoso per i tessuti, le cellule e il loro contenuto. Mentre le radiazioni, una forma di calore, sono scientificamente riconosciute come causa di apoptosi e danni al DNA, nel caso della PCR si presume che 95°C dividano il DNA in due. Perché i 95°C dividono il DNA in due filamenti e non in frammenti diversi, ad esempio frammenti singoli o doppi? Poiché la biologia molecolare non utilizza il microscopio e il DNA viene studiato molto raramente al microscopio, quali prove abbiamo che il DNA si divide in due filamenti a questa temperatura? Alcuni potrebbero obiettare che è per questo che si usano gli stabilizzatori (sostanze chimiche), ma come possono esattamente le sostanze chimiche alcaline/acide stabilizzare qualcosa alla devastante temperatura di 95°C? Le sostanze chimiche riscaldate possono infatti danneggiare maggiormente la sostanza in esame.
- Nella fase di annealing, i primer sintetici "senza cervello o coscienza" si attaccano a singoli filamenti di DNA a 60 °C. Questo passaggio non ha senso se mescoliamo un tessuto morto con la sua controparte sintetica (nucleotidi artificiali), che possono combaciare, e non significa che si "attacchino", soprattutto in una miscela in cui le sostanze chimiche costituiscono la maggior parte del contenuto. Ad esempio, se si mettono un pezzo grande e uno piccolo della stessa stoffa e alcuni acidi in una casseruola e la si scalda a 60°C, i pezzi non si legheranno e non torneranno a essere un tutt'uno, così come un pollo tagliato a pezzi non si riunirà quando la zuppa sarà bollita. So che i paragoni sembrano piuttosto divertenti, forse addirittura idioti, ma non ci sono prove effettive che i primer si attacchino al DNA a 60°C, o che i primer facciano qualcosa. Se la temperatura di annealing è la temperatura di attacco, perché i filamenti di DNA scissi non si attaccano l'uno all'altro, visto che sono perfettamente accoppiati? Brevi filamenti sintetici di DNA si attaccano, ma i filamenti di DNA originali no?
- La temperatura di annealing deve essere di 5-7°C inferiore alla "temperatura di fusione" dei primer. La temperatura di fusione è definita come "la temperatura alla quale il 50% del DNA a doppio filamento (dsDNA) si scinde in DNA a singolo filamento (ssDNA)". Esistono diversi metodi per calcolare la temperatura di ricottura, ognuno dei quali propone una temperatura diversa. Questa temperatura si basa principalmente sulla nucleobase, cioè sull'ipotetica struttura molecolare e sulla temperatura "assegnata" a ciascuna nucleobase. L'articolo "[Phenomenological model for predicting the melting temperature of DNA sequences](#)" ([Modello fenomenologico per la previsione della temperatura di fusione delle sequenze di DNA](#)) contiene informazioni su molte delle ipotesi fatte quando si cerca di calcolare la temperatura di fusione dei primer. Se la temperatura non è adeguata, si suppone che gli inneschi non si attacchino. Ora sorge una domanda importante: qual è la relazione tra questi due dati? (1) I primer si attaccano alla temperatura alla quale (2) il 50% del dsDNA si converte in ssDNA? I primer sono già a singolo filamento e il dsDNA è già scisso nella fase di denaturazione.
- A circa 75°C, la polimerasi diventa attiva e "amplifica" il DNA. Secondo la descrizione della PCR, la polimerasi riconosce un'estremità del primer e la successiva coppia di basi mancanti del DNA e in qualche modo raccoglie magicamente i dNTP sintetici che si trovano in giro e li posiziona secondo la "regola di Chargaff della spaziatura

delle basi". L'unico modo in cui riesco a immaginare questo passaggio è quello di immaginare una polimerasi con tre mani: una che tiene il DNA a singolo filamento, l'altra che tiene il primer e la terza che raccoglie i nucleotidi sintetici liberi, e non solo quelli che si trovano nelle vicinanze, ma esattamente quelli che si adattano alla [regola di Chargaff dell'accoppiamento delle basi](#). La polimerasi conosce la direzione della replicazione del DNA (da 3' a 5'), quindi si attacca all'estremità destra del primer; sa anche dove deve iniziare la replicazione perché esiste una regola di copiatura del DNA - da 3' a 5' (un'altra ipotesi non specificata). Non si muove all'indietro, cioè da 5' a 3', né si attacca all'altra estremità del primer, sa, agisce sulla base di regole stabilite dalla biologia molecolare (che non sono mai state osservate al microscopio e non sono state confermate). La realtà è che non abbiamo alcuna prova che ciò accada. I documenti di ricerca originali che evidenziano e descrivono il ruolo e l'azione della polimerasi si basano sul trattamento chimico della sostanza, sul riscaldamento, sul confronto dei volumi dei diversi prodotti prima e dopo, e tutte le conclusioni si basavano sull'analisi statistica dei sottoprodotti ottenuti dopo queste fasi, come l'aumento della radioattività o della fluorescenza nel risultato finale, significa che la polimerasi ha sintetizzato più DNA.

- Che dire dello scenario in cui i primer non sono attaccati e la polimerasi non copia? Copia solo se i primer sono attaccati? È così intelligente? Cosa succede se la PCR viene eseguita senza primer? Hanno fatto un esperimento del genere? E se sì, qual è il risultato finale?
- [Il Tris-HCl](#) si forma mescolando sostanze chimiche, in particolare alcool sintetico, polioossimetilene (plastica a base di formaldeide), nitrometano (formato dalla combinazione di propano e acido nitrico in fase gassosa a 350-450°C), ecc. Questa miscela dovrebbe mantenere costante il pH del cocktail PCR. Non mi risulta che qualcosa di vivente (ad esempio il DNA, l'enzima polimerasi) sia mantenuto in vita quando viene estratto da una fonte di nutrimento e posto in una soluzione chimica. A giudicare dagli ingredienti, il Tris-HCl sembra più una soluzione conservante che uno stabilizzatore; se è così, come fa esattamente la polimerasi (un enzima derivato dai batteri *E. coli* o *Thermus aquaticus*) a lavorare in una soluzione acida (riscaldata) come questa?
- MgCl₂ (cloruro di magnesio) è un sale inorganico che aumenta l'acidità della miscela. Nulla di vivente, come una polimerasi, può "vivere" o "lavorare" in un ambiente chimico di questo tipo, soprattutto se riscaldato.
- Il solfato di ammonio è "[potenzialmente pericoloso per l'uomo e per l'ambiente](#)", ma per l'amplificazione del DNA è abbastanza adatto.
- Vediamo la costruzione del termociclatore e il suo funzionamento. La temperatura tra una fase e l'altra di un termociclatore cambia rapidamente, ogni fase del ciclo dura meno di un minuto; come fa esattamente un cocktail chimico a raffreddarsi da 95°C a 60°C e poi a risalire rapidamente a 72°C-80°C in meno di un minuto? Un termociclatore funziona con l'elettricità, come un forno elettrico, utilizzando piastre metalliche per condurre il calore. Anche se il termociclatore riesce a regolare la temperatura abbastanza rapidamente, il contenuto delle provette avrà bisogno di più tempo per adattarsi e scendere o salire alla temperatura richiesta per ogni singolo passaggio. Dato che stiamo parlando di secondi, personalmente dubito che il contenuto delle provette abbia il tempo di affondare per la fase di ricottura e poi di risalire per la fase di allungamento. Inoltre, con quale velocità un forno elettrico o una piastra di calore metallica può davvero cambiare la sua temperatura (?), soprattutto

abbassandola in pochi secondi? Utilizza qualche tipo di meccanismo di raffreddamento? È qualcosa di simile a un forno e a un congelatore in uno? È possibile avere questi due elementi in uno (?) in un dispositivo così piccolo? Esaminiamo il [QIAamplifier 96](#), che promette un "protocollo di ciclaggio rapido, fino a 45 minuti per 30 cicli", e usiamo il ciclo più breve possibile:

- 45 minuti = 2.700 secondi
- 30 cicli brevi = 1.500 secondi = (15sec + 20sec + 15sec) x 30
- Restano 1.200 secondi per la regolazione delle temperature, 1.200/30 cicli = 40sec per ogni ciclo
- Ogni ciclo ha 3 fasi, il che significa 13,3 secondi per ogni transizione, per ogni cambiamento di temperatura.
- Dubito seriamente che la temperatura necessaria possa essere raggiunta, in particolare abbassata entro 13,3 secondi dal termociclatore e dal contenuto delle provette o da qualsiasi apparecchiatura che operi con il calore.
- In origine, le fasi del ciclo di PCR venivano eseguite manualmente e gli ingredienti di ciascuna fase venivano aggiunti prima di ogni fase del ciclo. Ora tutti gli ingredienti vengono aggiunti in anticipo e passano più volte attraverso tutte le temperature del ciclo. Solo un pensiero critico: riscaldare questo cocktail di PCR non avrà un effetto dannoso su alcuni, se non su tutti, gli ingredienti? Per esempio, seriamente, otteniamo ogni volta due DNA perfetti a singolo filamento durante la denaturazione? Possiamo aspettarci che si formi qualcosa di nuovo in questa calda zuppa chimica?
- Non è assolutamente previsto un esame al microscopio del DNA isolato prima e dopo il trattamento chimico, dopo ogni cambio di temperatura e dopo ogni ciclo di PCR. Si suppone che sia fatto correttamente perché se gli scienziati eseguono l'elettroforesi su gel (di cui parleremo in un altro articolo) e appare un'intensa fluorescenza, allora hanno isolato una grande quantità e qualità di DNA/RNA, indipendentemente dal fatto che non sanno cosa sia finito nella provetta, perché (è stato detto molte, molte volte in precedenza) i biologi molecolari non usano il microscopio. Qualcuno potrebbe dirmi che gli scienziati possono sequenziare il risultato finale per confermarlo e studiarlo, ma le macchine e gli ingredienti per il sequenziamento sono piuttosto costosi, non molti laboratori possono permetterseli, inoltre gli ingredienti e la tecnica di sequenziamento sono discutibili quanto l'estrazione del DNA e il processo di PCR.
- Quando qualcuno cerca informazioni sulla PCR, riceve immagini e video animati di ciò che accade nelle provette, ma la realtà è che non c'è assolutamente alcuna prova visiva e affidabile che ogni fase avvenga come mostrato nell'animazione, ad esempio a 95°C il DNA viene scisso, a 60°C vengono attaccati i primer e a 75°C il DNA viene "copiato". Non sappiamo se il DNA si scinde a 95°C, non sappiamo se i primer si attaccano e non sappiamo se la dNTPs polimerasi si attacca ai filamenti di DNA. Non c'è assolutamente alcuna prova che un qualsiasi passo avvenga effettivamente come descritto.
- Infine, la quantità di sostanze chimiche utilizzate per l'estrazione del DNA e nella procedura di PCR è incomprensibile, soprattutto se si considera che anche i primer e i dNTP sono sostanze chimiche, in quanto progettati artificialmente con sostanze chimiche. La quantità di tessuto (morto) che ci interessa è inferiore all'1% della soluzione, forse addirittura inferiore allo 0,1%. In qualche modo mi sembra che un semplice esame del tessuto al microscopio, senza alcun trattamento chimico o riscaldamento, possa dirci molto di più di tutto ciò che è stato detto sopra.

PCP IN TEMPO REALE

Come si usa la PCR per diagnosticare la Sars-Cov-2

[Una versione modificata della PCR, la PCR a trascrizione inversa in tempo reale \(real-time reverse transcription PCR\)](#), viene utilizzata per rilevare il virus della Sars-Cov-2. Questo metodo di rilevamento del virus è stato originariamente sviluppato [da Victor M Korman, Christian Drosten et al.](#) e prevede alcuni ingredienti, attrezzature e fasi aggiuntive.

Ulteriori fasi della RT-PCR in tempo reale sono:

La Sars-Cov-2 è dichiarata un virus a RNA (a singolo filamento), poiché il metodo PCR è stato sviluppato sulla base e per il DNA (a doppio filamento), l'RNA deve essere trasformato in DNA prima di effettuare la PCR. Questa fase, che trasforma l'RNA in DNA (sintetizzando un filamento complementare di RNA), è chiamata trascrizione inversa (RT).

Il "tempo reale" viene eseguito da un sistema PCR contenente un fluorimetro. Quando gli scienziati vogliono determinare se una particolare sequenza è presente in un campione, aggiungono al campione stesso oligonucleotidi (detti anche sonde) colorati in fluorescenza. Se queste sonde si attaccano al DNA/RNA template, durante la fase di allungamento verrà emesso un segnale fluorescente. Questo segnale viene rilevato dalla telecamera e registrato dal software PCR. Per rilevare la Sars-Cov-2, sono stati utilizzati primer e sonde appositamente progettati, basati sulle brevi sequenze del genoma della Sars-Cov-2 presenti in [Genbank](#) e [Gisaid](#).

Ingredienti e attrezzature per la RT-PCR in tempo reale:

- **RNA** isolato
- **Tampone e sostanze chimiche** (come per la PCR convenzionale): Tris-HCl, KCl, MgCl₂ e (NH₄)₂SO₄.
- **Trascrittasi inversa** (o DNA polimerasi diretta dall'RNA): enzima che converte l'RNA in DNA. Sintetizza un filamento complementare di RNA (cDNA).
- **Primer esamerici casuali**: questi primer sono utilizzati per la sintesi del cDNA.

Primers Sars-Cov-2: oligonucleotidi basati sul genoma Sars-Cov-2

- **Sonde a DNA** (alias TaqMan) per la Sars-Cov-2: oligonucleotidi basati sul genoma della Sars-Cov-2 contenenti un colorante fluorescente.
- **DNA polimerasi**
- **dNTP** (nucleotidi artificiali).
- **Sistema di PCR in tempo reale**: un sistema che combina un termociclatore, un fluorimetro e un software appositamente sviluppato. Il sistema di PCR in tempo reale non solo copia il DNA, ma registra anche il rilascio di segnali fluorescenti quando le sonde colorate con un colorante fluorescente vengono attivate.

Isolamento dell'RNA

Come nel caso della PCR convenzionale, in cui è necessario isolare il DNA, anche l'RNA deve essere isolato prima della RT-PCR. I passaggi per l'[isolamento dell'RNA Sars-Cov-2](#)

sono esattamente gli stessi dell'isolamento del DNA. Uno striscio di espettorato raccolto viene posto in una soluzione reagente e l'RNA viene isolato come segue:

- **Lisi cellulare:** il tampone di lisi, come il reagente [Trisol](#) e il [cloroformio](#), viene mescolato con una soluzione contenente RNA. La miscela viene agitata o agitata al vortex e centrifugata. Lo strato superiore (strato acquoso) della soluzione contenente RNA viene trasferito in una nuova provetta.
- **Precipitazione:** alla soluzione di RNA viene aggiunto alcol sintetico (etanolo, isopropanolo o alcol isopropilico), la miscela viene centrifugata e il surnatante (la parte liquida della soluzione) viene scartato. L'RNA sarà in pellet e questo passaggio viene ripetuto una o due volte.
- **Risospensione/eluizione:** l'RNA ottenuto viene risospeso in acqua, alcol sintetico o tampone.

Fasi della RT-PCR in tempo reale

- L'RNA isolato viene **mescolato con un enzima di trascrittasi inversa (RT)** e nucleotidi artificiali. Questo enzima sintetizza un filamento complementare di DNA (cDNA) che corrisponderà al filamento di RNA.
- La fase di **denaturazione è la stessa della** PCR convenzionale: il riscaldamento della miscela a 95°C.
- Durante la fase di **annealing**, i primer e le sonde sars-cov-2 si attaccano al DNA a singolo filamento (ssDNA); i primer e le sonde sars-cov-2 si attaccano solo se l'RNA/cDNA contiene tali sequenze corte.
- Durante la fase di **espansione**, quando la polimerasi sta sintetizzando nuovi filamenti, se la polimerasi raggiunge la sonda collegata, questa emette un segnale fluorescente (luce), che viene rilevato dalla telecamera e registrato dal software.
- Il software registrerà i segnali della sonda e il loro aumento ad ogni ciclo.

Analisi critica in tempo reale RT-PCR

Tutti i punti critici sollevati durante l'esame della PCR sono rilevanti per la RT-PCR in tempo reale. Ma la RT-PCR in tempo reale solleva alcune domande aggiuntive:

- Mentre abbiamo alcune foto del DNA scattate al microscopio elettronico (che non sono altro che un filamento attorcigliato di origine sconosciuta), non abbiamo nessuna foto e nessuna prova dell'RNA, della sua forma, struttura molecolare e funzione.
- La soluzione reagente utilizzata per raccogliere un campione contenente RNA, come la [sodio azide](#), è una [sostanza chimica altamente tossica](#).
- Perché per sintetizzare il filamento complementare di RNA si usa la trascrittasi inversa e non la Taq polimerasi? Qual è la differenza esatta tra questi due enzimi?
- Per l'RNA si utilizza la RT-PCR. Nella RT-PCR, l'RNA viene "trascritto in senso inverso" in DNA (cDNA) utilizzando l'enzima trascrittasi inversa. Si basa sulla teoria secondo cui il DNA viene trascritto in RNA e l'RNA viene tradotto in proteine. Non abbiamo prove concrete di questa teoria, cioè che questi processi avvengano effettivamente nelle nostre cellule o che artificialmente, raramente osservati al microscopio, il DNA tenero produca in qualche modo (con l'aiuto di un enzima) DNA

a singolo filamento (RNA) e che questo DNA a singolo filamento dia "istruzioni" ai "ribosomi" su come sintetizzare le proteine.

- Per qualche ragione sconosciuta, i laboratori che eseguono i test Sars-Cov-2 RT-PCR in tempo reale non rivelano il numero di cicli eseguiti; l'unica cosa che otteniamo è un risultato positivo o negativo, oltre ai primer e alle sonde utilizzati per determinare la presenza/assenza del virus. Il numero di cicli è molto importante perché maggiore è il numero di cicli, maggiore è la probabilità di un risultato positivo o non conclusivo. Non capisco perché non vengano divulgate informazioni così importanti che influenzano il risultato, soprattutto perché paghiamo questo test (direttamente o attraverso le nostre tasse). Non è forse nostro diritto sapere, essere informati su tutti gli aspetti di come vengono condotti questi test?
- Il test Sars-Cov-2 RT-PCR sviluppato [da Victor M Korman, Christian Drosten e altri](#) presenta una serie di problemi, tra cui i principali sono:
 - I primer e le sonde sono stati sviluppati sulla base di "sequenze di virus correlati alla SARS disponibili in GenBank al 1° gennaio 2020", poiché non è ancora stato rilasciato ufficialmente il genoma della Sars-Cov-2. Infatti, la RT-PCR è stata sviluppata sulla base del genoma generato al computer.
 - Il documento di ricerca è stato presentato il 21 gennaio 2020, è stato sottoposto a peer review e pubblicato in meno di 24 ore (non era mai successo prima); la revisione non è stata pubblicata.
 - Drosten è il [direttore](#) della rivista in cui è stato pubblicato il loro articolo (Eurosurveillance).
 - TIB Molbiol, un'azienda tedesca di biotecnologie, ha sviluppato un kit RT-PCR per la Sars-Cov-2 basato sui protocolli di Corman-Drosten e ha iniziato a distribuirlo già il [10 gennaio 2020](#), cioè prima dell'annuncio ufficiale del virus e del [rilascio ufficiale della sequenza da parte dell'OMS](#).
 - [Inoltre, diverse sequenze di genomi sono state pubblicate da scienziati cinesi in GISAID, GENBANK e Virological.org tra il 10 e l'11 gennaio](#), ma poco si sa su come sono stati ottenuti questi genomi, cioè sulla metodologia di isolamento e sequenziamento del materiale e sulle attrezzature utilizzate.
 - I due autori dei documenti di ricerca sulla RT-PCR sono Olfert Landt, fondatore di TIB Molbiol, e Marco Kaiser, consulente scientifico di Tib-Molbiol.
 - La quantità di sostanze chimiche e di procedure della RT-PCR è quasi doppia rispetto a quella della PCR, il che porta a chiedersi cosa finisca esattamente nella provetta, se non un minuscolo frammento di fluido corporeo sospeso in una zuppa chimica bollente.

RIFLESSIONI FINALI E CONCLUSIONI

Come per l'isolamento e la funzione del DNA, non sono convinta che ciò che viene affermato avvenga effettivamente durante la PCR. Non si usa il microscopio, non ci sono esperimenti di controllo, attrezzature e sostanze chimiche discutibili, tonnellate di passaggi e temperature elevate.

Personalmente, vedo l'affermazione non documentata e non provata che una piccola quantità di materia morta o degenerata (qualsiasi cosa estratta da una fonte di nutrimento è morta o in decomposizione), se mescolata con molte sostanze chimiche ossidanti e

"ingredienti" commerciali segreti e riscaldata per un periodo di tempo significativo, creerà molte copie di "DNA".

Come fa un enzima batterico isolato da sorgenti termali a sintetizzare la materia? I batteri digeriscono, fermentano e degradano la materia; sono riciclatori naturali. Questo enzima batterico (Taq o polimerasi di E.coli) è stato isolato utilizzando tonnellate di sostanze chimiche e calore; come funziona esattamente l'enzima batterico senza il batterio che lo produce? E come ha fatto a collegare nucleotidi sintetici a cDNA sintetici?

La realtà sembra piuttosto semplice se ci lasciamo guidare dal buon senso, quando usiamo tonnellate di sostanze chimiche, calore e centrifugazione, l'unica cosa che otteniamo è una zuppa tossica contenente lo 0,0000001% di materia morta (se crediamo che la PCR moltiplichi qualcosa, allora può creare 1.073.741.824 copie con un solo DNA in 30 cicli). Se dovessi paragonare le procedure di PCR o RT-PCR in tempo reale a qualcosa, sarebbe il riscaldamento del cibo in un forno a microonde o in un forno. Immaginate di mettere in forno per mezz'ora una piccola quantità di carne con molte sostanze chimiche e qualche materia sintetica pubblicizzata come carne sintetica. Questo processo creerà più carne (?) che potrà essere mangiata? Oppure ci ritroveremo con una miscela altamente tossica e inutilizzabile, forse addirittura pericolosa per il forno e l'ambiente.

Un'altra analogia potrebbe essere quella di mescolare pezzi di lego con un cocktail chimico, mettere il composto in forno e aspettarsi che il lego si assembli dopo un'ora a 95°C. Non si disintegreranno? Non si disintegrano o si sciolgono? Tutto ciò che viene sottoposto all'alta temperatura della PCR non dovrebbe decomporsi?

In realtà, alle alte temperature non si forma nulla di nuovo, né per ebollizione, né per riscaldamento, ecc. La materia si ossida e gli ingredienti si degradano. L'affermazione che la DNA polimerasi sintetizzi qualcosa potrebbe in realtà essere un sottoprodotto dell'ossidazione e della degradazione degli ingredienti durante il trattamento termico.

Credo che non sia necessario approfondire la storia della PCR. Chiunque legga questi documenti e, usando la logica di base, si renderà conto che non c'è assolutamente alcuna prova che la DNA polimerasi si attacchi a qualcosa o sintetizzi qualcosa, perché le sostanze chimiche utilizzate, la metodologia di estrazione e le conclusioni ottenute si basano sui volumi di liquido prima e dopo il trattamento chimico, il riscaldamento e la centrifugazione. Ancora una volta, non c'è assolutamente bisogno di un microscopio.

Se tutti i prodotti biochimici e le più recenti attrezzature biotecnologiche venissero rimossi, i biologi molecolari sarebbero in grado di condurre i loro esperimenti? Ovviamente, i biologi molecolari si affidano pesantemente alle aziende biotecnologiche, non sono in grado di generare materiali/materie prime proprie e non possono testare l'accuratezza dei prodotti e l'efficacia delle apparecchiature. Questi fatti mi fanno dubitare del potere e del controllo che le aziende biotecnologiche hanno acquisito negli ultimi decenni nel campo della scienza.

Come per l'estrazione del DNA, la PCR non è altro che un cocktail di sostanze chimiche riscaldate per un periodo di tempo considerevole.

Ci viene chiesto di non mettere in discussione le scoperte e i processi della scienza o della biologia molecolare, che sono "consolidati", premiati con il Nobel; ci viene detto di fidarci semplicemente delle immagini e dei video animati che ci vengono forniti per spiegare cosa succede in una provetta con un campione. La chiamano scienza; personalmente la chiamerei setta. Un culto che ha sviluppato tonnellate di termini e procedure inutili che rendono la loro "scienza" irraggiungibile per la persona media, facendo sì che la gente diventi più suscettibile a "fidarsi e seguire" gli scienziati. Se si elimina la barriera terminologica e si osservano gli ingredienti e le procedure così come sono, ci si rende conto che la biochimica o la biologia molecolare non sono altro che una misurazione dei sottoprodotti prodotti dalle reazioni chimiche e dal calore, sottoprodotti che hanno poco da dire sulla vita e soprattutto sulla salute.

Ci si potrebbe chiedere: cosa rende la RT-PCR sars-cov-2 "positiva"? Devo confessare che non lo so. Tutto ciò che so è che il Covid-19 (una malattia che si suppone collegata al "virus" Sars-Cov-2) non contiene alcun sintomo nuovo o insolito per essere etichettato come una nuova malattia. Covid-19 contiene tutti i sintomi noti di quasi tutte le malattie più comuni; dai sintomi del comune raffreddore e dell'influenza alla polmonite e alla gastroenterite, più recentemente sono stati aggiunti alla lunghissima lista dei sintomi di Covid-19 la coagulazione del sangue, il mal di testa e persino la depressione. I soggetti positivi saranno trattati con i protocolli Covid-19, che includono una miscela sperimentale di farmaci e persino un ventilatore. I soggetti che presentano sintomi ma che risultano negativi al test saranno trattati alla vecchia maniera, cioè con un trattamento e/o una terapia farmacologica a seconda dei sintomi. Inoltre, la RT-PCR in tempo reale ci ha fatto conoscere un nuovo concetto: quello di portatore asintomatico di un virus che può portare alla morte di un'altra persona. Si tratta di un concetto interessante: essere portatori di un virus mortale che non provoca sintomi nell'ospite, ma che se trasmesso può uccidere un'altra persona. Immaginate se un concetto del genere fosse presentato per l'influenza comune, nessuna persona comune ci crederebbe e forse inizierebbe a mettere in discussione la scienza medica/molecolare. Come si trasmette esattamente questo virus? Come si fa a dimostrare che anche se qualcosa viene trasmesso, provoca dei sintomi? Provoca sintomi in una persona ma non in un'altra? Se il virus si trova in una persona sana e in una malata, allora forse non è la causa della malattia? Come mai i [postulati di Koch](#) sono stati soddisfatti per il Sars-Cov-2 (?) e per qualsiasi altro virus? L'isolamento del virus è un processo innaturale e ridicolo come l'isolamento del DNA e dell'RNA, che contiene molte sostanze chimiche e passaggi (l'isolamento del virus e gli effetti citopatici saranno discussi in un articolo successivo).

Ciò che mi sorprende è che gli scienziati abbiano raggiunto la fase [di amplificazione del DNA sintetico](#). Cosa otterranno esattamente copiando e studiando il DNA o l'RNA sintetico? Anche se queste sequenze sono basate su un genoma umano o virale (generato al computer), cosa possono dirci esattamente le sequenze sintetiche su persone, animali, malattie, batteri, virus, vita in generale? Immaginate se gli scienziati e l'industria medica arrivassero ad annunciare scoperte e a creare test diagnostici, strumenti e apparecchiature basati su queste "sequenze" artificiali e completamente irrealistiche.

La cosa sorprendente è che gli scienziati stanno persino cercando di creare cellule e organismi sintetici basati su [sequenze] di DNA utilizzando la PCR e, sebbene non ci riescano quasi mai, giustificano il loro fallimento con i limiti della tecnologia, in particolare

con i limiti del processo e delle attrezzature della PCR. L'equivoco scientifico ha raggiunto uno stadio tale da proporre di fare della PCR un "metodo di replicazione cellulare", che hanno chiamato "reazione del ciclo di replicazione (RCR)", dove "...si prevede che questo metodo sia una piattaforma per la creazione di cellule artificiali con la capacità di replicare più DNA". Poiché RCR è un sistema di replicazione del genoma ricostituito da E. coli, il sistema sarà applicabile per chiarire il meccanismo della replicazione del genoma e della divisione microbica. Tuttavia, permangono diversi problemi tecnici...". Se credono nella possibilità di creare vita sintetica, allora devono credere che non siamo altro che un pezzo di carne vivo e funzionante attraverso reazioni chimiche. I miei pensieri, le mie osservazioni e i miei sentimenti sono prodotti di reazioni chimiche? Non è forse coinvolta qui qualche forma di coscienza? Che dire di tutte queste testimonianze di esperienze extracorporee e di esperienze di pre-morte? Sono solo gli illusioni? La sensazione di essere molto più di un corpo fisico è un'illusione?

Al giorno d'oggi, con tutta la scienza "consolidata" che influenza le nostre vite ogni giorno, soprattutto negli ultimi due anni, "pensare con la propria testa" è lo strumento migliore e più importante che abbiamo per affrontare le misure governative Covid-19, il mainstream della scienza, della medicina, dell'istruzione e della salute.

Cordiali saluti,

Lì.

PS: Sono rimasto colpito non solo dalla quantità di sostanze chimiche utilizzate, ma anche dalla quantità di plastica monouso, ad esempio provette, puntali per pipette, guanti, alcol sintetico, ecc. Sembra una scienza piuttosto inquinante, sia a livello chimico che plastico.

Una ricerca di Cary Mullis e altri, che ha utilizzato il metodo PCR:

ULTERIORI INFORMAZIONI

- 1967, [Sintesi enzimatica del DNA, XXIV. Sintesi del DNA di un fago infettivo \$\phi\$ X174](#)
- 1971, Studi sui polinucleotidi. XCVI. Riparazione della replicazione di DNA sintetico corto catalizzata dalle DNA polimerasi DOI: [10.1016/0022-2836\(71\)90469-4](#)
- 1976 Polimerasi dell'acido desossiribonucleico del termofilo estremo *Thermus aquaticus* [PMC232952](#)

Documento di ricerca di Cary Mullis et al. che stabilisce il metodo PCR:

- 1982, Winkler ME, Mullis K, Barnett J, Stroynowski I, Yanofsky C. La terminazione della trascrizione nell'operone attenuatore del triptofano è ridotta in vitro da un oligomero complementare al segmento trascrittivo leader <https://www.pnas.org/content/79/7/2181>.
- 1985, Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Amplificazione enzimatica di sequenze genomiche di beta-globina e analisi dei siti di restrizione per la diagnosi di anemia falciforme. *Science* (New York, N.Y.). 230: 1350-4. PMID [2999980](#) DOI: [10.1126/Science.2999980](#).
- 1986, Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Amplificazione enzimatica specifica del DNA in vitro: la reazione a catena della polimerasi. Simposi

di biologia quantitativa di Cold Spring Harbor. 51: 263-73. PMID [3472723](#) DOI: [10.1101/Sqb.1986.051.01.032](#).

- 1986, Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analisi del DNA amplificato enzimaticamente di beta-globina e HLA-DQ alfa mediante sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. *Natura*. 324: 163-6. PMID [3785382](#) DOI: [10.1038/324163A0](#)
- 1987, Mullis KB, Faloona FA. [21] Sintesi specifica di DNA in vitro mediante reazione a catena della polimerasi catalizzata *Methods in Enzymology*. 155: 335-350. DOI: [10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](#)

Articoli:

- [Storia della PCR](#)
- [Valutazione delle prestazioni dei termociclatori per PCR in condizioni di ciclaggio veloce](#)
- [PCR - analisi critica](#)
- [Parametri del ciclo di PCR - sei considerazioni chiave per il successo](#)
- [Che cos'è la PCR? - Una guida per i principianti](#)
- [RAPPORTO DI REVISIONE SUL METODO KORMAN-DROSTEN DA PARTE DEL CONSORZIO INTERNAZIONALE DEGLI SCIENZIATI DELLA VITA \(ICSLS\)](#)
- [Scandali multipli sui test PCR: parte 1](#)
- [Scandali di test PCR multipli: parte 2](#)

Video:

- [Che cos'è la PCR? Reazione a catena della polimerasi | miniPCR bio™](#)
- [Test del coronavirus: RT-PCR in tempo reale - video animato](#)
- [RT-PCR per la diagnosi di COVID-19 \(ex 2019-nCoV\)](#)