

长 PCR 技术及其在动物学研究中的应用*

叶维萍 黄原**

(陕西师范大学生命科学学院 西安 710061)

摘要:长 PCR(long PCR)技术自 1994 年发明以来,在生命科学发展中发挥了巨大的作用。长 PCR 技术与常规 PCR 有较大的区别。本文从长 PCR 技术的由来、长 PCR 技术对模板、引物和聚合酶的特殊要求及长 PCR 技术反应条件等方面进行了较全面的介绍。最后介绍了近期发展的 LR-IPCR(long range-inverse PCR,长反向 PCR)、内切酶介导性长 PCR(endonuclease-mediated long PCR)、long RT-PCR 以及 LDD-PCR。目前此技术在动物学研究中的应用主要在基因组测序和线粒体基因组研究、病理诊断、基因差异表达、病原微生物的研究、遗传多态性分析等领域。

关键词:长 PCR(long PCR);双聚合酶系统;辅助溶剂;基因组测序;动物学

中图分类号:Q7 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)03-105-05

Long PCR Technique and its Applications in Zoological Study

YE Wei-Ping HUANG Yuan

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract:The advent of long PCR has proven to be a major advance in PCR technology. This article reviews the origins, special requirements with respect to templates, primers, DNA polymerases, and reaction conditions, of long PCR. Recent developments in long PCR, including long range-inverse PCR (LR-IPCR), endonuclease-mediated long PCR, long RT-PCR and LDD-PCR, are introduced. Finally, applications of long PCR in zoological study are summarized with respect to genome sequencing and mitochondrial genome research, pathogenetic diagnosis, differential gene expression, pathogenetic virus research and analysis of genetic polymorphism.

Key words:Long PCR; Two-polymerase system; Cosolvents; Genome sequencing; Zoology

PCR 技术自 1983 发明以来,给生命科学带来了历史性的变化,现已成为分子遗传学、基因组测序和作图、法医学、系统动物学等各领域内不可缺少的工具^[1-8]。目前,科学家又发展了一种新 PCR 技术——长 PCR(long PCR)^[4](有不同名称,如 long and accurate PCR^[1], long-distance PCR^[9], extra-long PCR^[10], long template PCR^[11]),用于扩增大于 5 kb 的 DNA 片段。长 PCR 技术已成功地用于扩增人类 β 球蛋白基因簇 22 kb 的 DNA 片段、噬菌体基因组 42 kb 的片段和人类线粒体基因组 16.3 kb 的片段^[3]。

1 长 PCR 技术由来

“Long PCR”这个名词和技术最早由美国华盛顿大

学医学院的 Barnes W M 提出^[4]。其设想来自于他 1992 年一次实验错误。最初他想用常规 PCR 方法扩增来自 *Bacillus thuringiensis* (Bt, 苏云金杆菌)的一种 2 kb 的蛋白质基因^[12]。在实验过程中使用的引物末端出现了差错,模板链上是 A 的位点,其对应的引物位点也是 A,这一位点不匹配导致了 PCR 扩增反应终止,未得到预期产物。Barnes 用的聚合酶是 KlenTaq1,是 *Taq* DNA 聚合

* 国家自然科学基金项目(No. NSFC30070114),陕西师范大学 2002 年研究生培养创新基金资助;

** 通讯联系人, E-mail: yuanh@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 叶维萍,女,23 岁,硕士研究生;研究方向:分子进化和分子系统学; E-mail: helenyecn@eyou.com.

收稿日期:2002-08-10,修回日期:2003-03-14

酶 N 端缺失突变体,无外切酶和内切酶活性。为解决模板-引物不匹配问题,他试着用另一种聚合酶 *Pfu* 来代替 *Klentaq1*,此酶具 3→5 外切酶功能,但结果还是没有得到预期产物。Barnes 设想 *Pfu* 可能过多地切掉了引物末端的核苷酸,就将 *Klentaq1* 和少量的 *Pfu* 结合使用,竟然成功了^[4]。Barnes 解释其原因是“*Pfu* 需要切除不匹配的核苷酸,使 *Klentaq1* 继续扩增”。Barnes 进一步设想,如果引物与模板不匹配能导致 PCR 终止,那么聚合酶延伸过程中产生的不匹配是否也会对扩增反应产生同样的终止作用呢?如果是的话,那么这就是限制 PCR 产物长度的主要因素。正是基于这种思路,Barnes 确立了用双聚合酶系统来扩增长目标序列,即无外切酶功能的 DNA 聚合酶(主导酶, major polymerase)和具 3→5 校对功能的 DNA 聚合酶(校对酶, minor polymerase)的组合,最后得到了长达 28 kb 的产物^[4]。

与此同时, Roche Molecular Systems (California, Alameda) 由 Suzanne Cheng 领导的研究小组,也通过改变反应条件得到了较长的 PCR 产物。他们认为限制 PCR 产物长度的主要因素是 PCR 过程本身对 DNA 模板造成损伤,因此通过优化 PCR 反应过程,加入了辅助溶剂(如甘油),不断进行改进和尝试,成功地扩增了 λ 噬菌体 26 kb 的 DNA 片段,甚至复杂的人类基因组 12 kb 的 DNA 片段^[4]。1993 年, Roche 研究小组与 Barnes 开始联合研究。将两者的研究成果结合后, Barnes 成功地扩增了 35 kb 的 λ 噬菌体^[13]。Roche 小组采用双酶系统后,声称其扩增 λ 噬菌体长度达到 42 kb,对人类 β 球蛋白基因簇的扩增也达到了 22 kb^[14]。

另外, Perkin-Elmer 公司的 Elise Rose 也建立了扩增长片段 DNA 的 PCR 方法,称为“Long-distance PCR”^[9]。她认为限制扩增长度的主要因素是聚合酶在模板链上起作用的时间。扩增长片段 DNA 的关键是找到能停留在模板链上时间较长或复制速度较快或两者兼具的聚合酶。Rose 声称使用 *Tth* 和 *Vent* 等聚合酶,能得到 20~25 kb 的人类 DNA^[4]。

从历史上来看,不同学者从不同角度分别扩展了 PCR 技术对模板的扩增长度。一般认为长 PCR 最关键的是反应的进行性(processivity),即聚合酶在链上反应的时间。Rose 就是从这个角度出发来优化 PCR 反应的。但 Barnes 认为事实并非如此, *Klentaq1* 的反应进行性不如全长 *Taq* DNA 酶,但其在长 PCR 中效果更好,可能是因为 *Taq* DNA 酶的 5→3 外切酶活性会对长 PCR 造成负面影响。*Klentaq1* 较弱的反应进行性才使得酶混合物中其它成分得以接近延伸链,修复碱基错配^[13]。Rose 在选用聚合酶时,也比较了带有 3→5 或 5→3 端外

切酶活性的酶的各种组合,认为聚合酶组合的使用对扩增更长的模板可能有好处^[15]。Barnes 的双酶系统支持了这种方法。从 Roche 研究小组与 Barnes 的联合后长 PCR 效果更显著来看,反应中的聚合酶和反应条件需要协调改进,才能达到长 PCR 的目的。所以现在可能较为大家所接受的就是采用适当的双酶组合(比例需优化)以及优化 PCR 反应体系来扩增长片段模板。

2 长 PCR 技术方法和指导原则

从以上对 PCR 技术起源的介绍可以看出,长 PCR 技术并没有一个标准的模式,需要针对不同的情况采用不同的扩增方法。但也不是没有规律可循,以下是一些基本指导原则。

2.1 高质量完整的模板 各种来源的、降解的、有缺刻的和未纯化的 DNA 都在常规 PCR 中成功的应用过,但扩增高分子量 PCR 产物不像获得小片段 DNA 那么有效^[9]。较长的模板 DNA 中有更多位点容易在变性步骤中发生脱嘌呤和脱氨,所以长 PCR 中使用的要求是完整的 DNA 模板^[13,16]。Rose 研究发现在“脉冲电场电泳”级低熔点琼脂糖凝胶中制备的全染色体 DNA,其长度和完整性比在溶液中制备的 DNA 能产生高产量的大片段 PCR 产物^[17]。Cheng 等建议使用甘油和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等辅助溶剂来降低变性温度和时间、提高反应液 pH 值,这样可以尽量减少模板在 PCR 过程中的损伤^[14]。

2.2 引物 标准 PCR 的引物设计原则也适用于长 PCR 技术,如尽量避免引物二级结构或引物二聚物的形成、引物 3' 末端的稳定性等^[3]。长 PCR 的引物一般较长,增加引物长度能够提高其与模板结合的稳定性,引物每增加一个核苷酸能使反应提高大约 4 倍的特异性^[13]。典型的长 PCR 引物一般为 21~34 个核苷酸,熔解温度(T_m)为 65~70℃,这样的引物允许较高的退火温度来增强反应特异性^[3]。这一点对长 PCR 很重要,因为目标 DNA 越大,其反应非特异性增加。

2.3 聚合酶 对于长 PCR,现在基本认同 Barnes 的双聚合酶系统(two-polymerase system)来增强链延伸反应。主导酶(major polymerase)无 3→5 核酸外切酶功能,负责链的延伸;校对酶(minor polymerase)具 3→5 外切酶功能,负责修复链延伸过程中产生的错配,保证链延伸长度^[4,13]。Rose 在提出“long distance PCR”时尽管没有提出这样一个双酶系统,但也是在改进聚合酶的反应持续时间,并提出聚合酶组合的设想^[15]。Barnes 摸索出的最好的双酶组合是 *klentaqLA*,即 *Klentaq1* 和 *Deep Vent*。他认为 *Klentaq1* 比全长 *Taq* 酶效果更好,可能是

因为去除了 5→3 外切酶活性^[13]。Cheng 等对各种聚合酶组合的测试表明, *rTth* 聚合酶(来自 *Thermus thermophilus* 的重组 DNA 聚合酶,具 5→3 外切酶活性,未检测到 3→5 外切酶活性)作为主导酶最好^[14],这一点与 Rose 等的结果一致^[15]。Klentaq1、*rTaq*、*Pfu*(*exo*⁻)也是较好的主导酶。校对酶一般选用 *Pfu*、Vent、Deep Vent、*rTma*^[14]。在 Cheng 等的实验中,分别检测了 *rTth* 和以上四种辅酶的组合效果,发现 *rTth* 和 Vent 组合是最佳的。*rTth* 和 deep vent、*rTma* 或 *rTaq* 和 *Pfu* 组合也能应用于长 PCR,但在扩增超出 30~34 kb 范围的片段时不是那么有效^[14]。至于两种酶的比例,目前还未形成一个优化的标准,不同酶的组合需确定不同的最佳相对浓度。Barnes 在扩增 λ 噬菌体时采用的比例是 Klentaq1:*Pfu* = 160:1(v/v), Klentaq:deep vent = 500:1(v/v)^[13]。

2.4 PCR 条件

2.4.1 较高的 pH 值

Barnes 在扩增 35 kb 的 λ 噬菌体时,在 Cheng 的建议下采用较高的 pH 值才得到预期产物。对 pH 8.8~9.2 范围内进行测试,发现其最适 pH 值为 9.1^[13]。Lindahl 和 Nyberg 研究显示在 pH 7.4, 70℃ 条件下,单链 DNA 脱嘌呤速度是双链 DNA 的 4 倍; 100℃, pH 7.0 条件下,100 kb 的 DNA 每分钟将有 1 个位点脱嘌呤^[18,19]。PCR 使用的缓冲液 Tris 的酸解离常数(pKa)对温度敏感,平均每升高 1℃, pKa 降低 0.03。25℃, pH 8.55 的反应液在 95℃ 时为 pH 6.45,其低 pH 值将使脱嘌呤速度加快,达到每分钟 20~30 kb 内一个位点脱嘌呤^[13]。所以长 PCR 要求 pH > 8.3(常规 PCR 采用的 pH 8.3)。Cheng 等建议采用 pH 8.7,一可以减少污染,二可以减少热循环中模板链的损伤^[14]。

2.4.2 辅助溶剂

长 PCR 技术需要对反应进行优化,其中对辅助溶剂进行优化最早是由 Cheng 等展开研究的,建议加入 DMSO 和甘油^[14]。甘油对反应的作用表现在:一是增强聚合酶的热稳定性,二是有效的降低溶解温度(每 10% 甘油降低 2.5~3℃),以保持模板完整性,增强退火的特异性。尽管 DMSO 可能降低 *rTaq* 聚合酶的稳定性,但其能大大降低变性温度(每 10% DMSO 降低 5.5~6℃),因而一般也被采用。DMSO 与甘油结合使用效果更佳^[14]。

Ohler 和 Rose 发现采用 *rTth* 聚合酶的长距离 PCR,加入 5% 甘油和 0.01% 明胶有利于扩增长模板链 DNA^[15]。由于 Tris 缓冲液的 pKa 对温度依赖性较强, Ponce 和 Micol 建议选用对温度不敏感的 Tricine 缓冲

液,以提高反应液 pH 值稳定性^[20]。

Cheng 等认为长 PCR 中 K⁺ 浓度应减少到标准水平(*rTaq*, 50 mmol/L KCl; *rTth*, 100 mmol/L KCl)的 10%~40%。降低 K⁺ 浓度能增强酶的反应能力和反应进行性,但也可降低反应特异性,用 KOAc 代替 KCl 能提高反应特异性^[14]。

2.4.3 热循环模式

长 PCR 热循环基本采用双温度循环(two-temperature thermal cycling profile)——变性和退火延伸,然后再对其中的参数进行一些优化,一般遵循以下原则。

1) 尽量降低加热变性温度和时间: Barnes 认为在反应液中, DNA 模板是热不稳定因素^[13]。加热到 95℃ 以上,对酶的损伤不是很大,关键是损伤模板,如脱嘌呤,从而阻止聚合酶反应得到较长的扩增产物。Barnes 在扩增 35 kb 的 λ 噬菌体时,采用的变性温度是 93℃ 或 94℃,时间 2~20 s,这样才得到了大于 8.4 kb 产物。Cheng 等在扩增克隆插入序列和人类基因组 DNA 时,也得出了相同的结论,认为采用短时、中等变性温度可以减少模板链的损伤^[14]。

2) 较高的退火温度:长 PCR 中退火温度和延伸温度可以一样,采用相对较高的退火温度(一般为 68℃,普通 PCR 为 50~60℃),提高反应特异性,减少引物与模板的错配率^[13]。

3) 增加链延伸时间: Cheng 等认为,长 PCR 要保证链延伸足够长,必须要保证足够的链延伸时间和校对酶活性^[14]。建议扩增长于 20 kb 的 DNA 时,退火和延伸时间至少为 10 min,但不能超过 22 min。每次循环增加 15~20 s,比每次循环用恒定的延伸时间特异性高。退火和延伸时间的粗略估计公式为: $n = 1 \text{ min} + (2.5 \text{ s} / 100 \text{ bases})^*$ 。Barnes 在扩增 35 kb λ 噬菌体时采用的链延伸时间 20 min,效果较好^[13]。

4) 加快循环: Barnes 建议使用薄壁 PCR 小管,以便快速传导热量,加速反应^[13]。在选择热循环仪时,要注意其温度的转换速度,即从变性高温要迅速转换到延伸温度,温度的迅速转换也和产物密切相关。

5) 热启动: Cheng 等在扩增克隆插入序列和人类基因组 DNA 时采用的热启动是先不加 MgCl₂ 或 Mg(OAc)₂, 在 75~80℃ 加热 90 s 后加入 Mg²⁺, 这样引物之间作用最小,减少较短的非特异性产物^[14]。Pete Estep 采用另一种热启动。将反应液分成两部分: 3/4 或 4/5 的模板与引物的混合物和 1/4 或 1/5 的聚合酶部分。首先将模板与引物混合物置于反应管中,在 PCR 仪中

* 参见 <http://twod.med.harvard.edu/labgc/estep/longPCR-protocol.html>

94℃加热 10 s。在第一次退火延伸时加入聚合酶部分或者在变性后,用 80℃来加入聚合酶部分^[20]。

以上只是各实验室对长 PCR 方法的一些改进的总体概括。在 Barnes 的“Tips and tricks for long and accurate PCR”一文中比较了三种长 PCR 方法与标准 PCR 的区别^[21],也未能达成一定的共识。其具体应用还需要将这些条件优化组合,根据具体情况,进行预实验,达到扩增的最佳效果。

3 长 PCR 技术的发展及其在动物学研究中的应用

长 PCR 技术自 1994 年发展以来,其技术方法已日趋成熟。目前的方向已经从开发方法本身转移到应用长 PCR 回答生命科学中一系列的基本问题。现在已有很多公司提供长 PCR 的试剂盒。如 Master Amp™ Extra-Long PCR Kit (EPICENTRE, USA), Extensor Long PCR System (WESTBURG company, Belgium, The Netherlands), GENAXIS™ Extra Long PCR Kit(Genaxis Biotechnology Company, USA)等。

近年来,长 PCR 技术得到了较快的发展。Benkel 和 Fong 发展了 LR-IPCR(long range-inverse PCR,长反向 PCR),用于扩增小鸡内生性原病毒侧翼未知 DNA 序列^[22]。Her 和 Weinshilbom 发展了内切酶介导性长 PCR(endonuclease-mediated long PCR),即在长 PCR 之前用限制性酶进行消化,这样可以选择性地抑制相似的非目标 DNA,提高反应的特异性^[23]。Fromenty 等提出,在 Long PCR 混合液中加入 *E. coli* 外切酶 III 能用于扩增损伤的模板,这无疑为长 PCR 技术的一大进步^[24]。相应的 long RT-PCR 也被广泛用于扩增许多病毒 RNA 基因^[25, 26]。Fang 等的研究显示选用正确的 PCR 条件, long RT-PCR 过程中重组发生频率可能减少^[27]。长 PCR 技术也用于基因的差异表达研究,如长距离 DD-PCR(long distance differential display PCR, LDD-PCR)^[28],扩展了 mRNA 差异显示的长度。Osamu Ishibashi 利用长 PCR 技术合成竞争性 RNA 用于竞争性 RT-PCR,定量分析 mRNA^[29]。目前,长 PCR 技术在动物学研究中的应用主要在以下几个方面。

(1) 基因组测序和线粒体基因组研究:由于长 PCR 技术拓展了 PCR 技术的扩增长度,使目标扩增长度空前提高,所以长 PCR 技术被广泛应用于动物核基因组的长片段 DNA 扩增,包括人类基因组的扩增^[1, 10, 14]。动物全线粒体基因组一般为 17~23 kb,长 PCR 技术完全可用于全长测序^[30-32]。Kopsidas 等研究发现在长 PCR 反应体系中,在常规 PCR 中出现的对模板混合物

中较短 DNA 的扩增优势减少^[33],即有利于全线粒体基因组的测序。线粒体基因是研究物种多态性和系统发育分析常用的分子标记。利用长 PCR 进行全线粒体测序,开创了在整个基因组水平上的多态性和系统发育分析的简便方法,提供大量的遗传信息,必将推动系统动物学的长远发展。

(2) 病理诊断:长 PCR 在动物学病理诊断方面独具优势,通过特异性扩增与病理有关的基因,判断有无缺失、重排等突变存在,可以检测疾病^[34]。与线粒体有关的疾病(如 Kearns-Sayre syndrome, Pearson syndrome),由于长 PCR 的发展,其检测缺失片段变得相对容易^[35-39]。

(3) 基因差异表达:前面所提及的 long RT-PCR 和 LDD-PCR 都可用于 mRNA 的定量分析,研究不同基因在不同组织及不同发育阶段的差异表达^[28, 29]。

(4) 遗传多态性分析:长 PCR 技术拓展了遗传多态性研究的范围,突破了以往 5 kb 以内序列的多态性分析^[2, 40, 41]。

(5) 病原微生物的研究:long RT-PCR 技术的发展,使得那些以 RNA 为遗传物质的病原微生物(包括 HIV)的研究达到基因组水平,减少了克隆带来的复杂性^[25-27]。

参 考 文 献

- [1] Mukai H, Nakagawa T. Long and accurate PCR (LA-PCR). *Nippon Rinsho*, 1996, 54: 17~22.
- [2] Richie K L, Goldsborough M D, Darfler M M, et al. Long PCR for VNTR analysis. *J Forensic Sci*, 1999, 44: 1 176~1 185.
- [3] Cheng S, Chang S Y, Gravitt P, et al. Long PCR. *Nature*, 1994, 369: 684~685.
- [4] Cohen J. 'Long PCR' leaps into larger DNA sequences. *Science*, 1994, 263: 1 564~1 565.
- [5] 王亚明,周开亚. PCR 介导的 DNA 序列系统分析在系统动物学中的应用. *动物学杂志*, 1996, 31(3): 54~59.
- [6] 常重杰,周荣家,余其兴. PCR 扩增泥鳅和大鳞副泥鳅 SRY 盒基因. *动物学杂志*, 1998, 33(1): 12~15.
- [7] 郭金虎,余多慰,赵清良等. 应用显微操作和 PCR 技术进行基因的染色体定位. *动物学杂志*, 2000, 35(4): 25~28.
- [8] 张锁链,布赫,仓明等. 牛冷冻试管胚胎性别鉴定的应用. *动物学杂志*, 2002, 37(2): 42~45.
- [9] Foord O, Rose E A. Long-distance PCR. *PCR Methods Appl*, 1994, 3: S149~S161.
- [10] Cheng S, Kolomodina L A. XL PCR amplification of long target from genomic DNA. *Methods Mol Biol*, 1997, 67: 17~29.
- [11] Tayebi N, Cushner S, Sidransky E. Differentiation of the glu-

- cocerebrosidase gene from pseudogene by long-template PCR: implications for Gaucher disease. *Am J Hum Genet*, 1996, **59** (3): 740 ~ 741.
- [12] Hoffman M P, Zalom F G, Wilson L T, et al. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 1992, **85**: 2 516 ~ 2 522.
- [13] Barnes W M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 2 216 ~ 2 220.
- [14] Cheng S, Fockler C, Barnes W M, et al. Effective amplification of long target from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 5 695 ~ 5 699.
- [15] Ohler L, Rose E A. Optimization of long distance PCR using a transposon-based model system. *PCR Methods Appl*, 1992, **2**: 51 ~ 59.
- [16] Cheng S, Chen Y, Monforte J A, et al. Template integrity is essential for PCR amplification of 20-to 30-kb sequences from genomic DNA. *PCR Methods Appl*, 1995, **4**: 294 ~ 298.
- [17] Rose E A, Glaser T, Jones C, et al. Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell*, 1990, **60**: 495 ~ 508.
- [18] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, **362**(6 422): 709 ~ 715.
- [19] Lindahl T, Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 1972, **11**(19): 3 610 ~ 3 618.
- [20] Ponce M R, Micol J L. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(3): 623.
- [21] Barnes W M. Tips and tricks for long and accurate PCR. *Trends Biochem Sci*, 1994, **19**: 342.
- [22] Benkel B F, Fong Y. Long range-inverse PCR (LR-IPCR): extending the useful range of inverse PCR. *Genet Anal*, 1996, **13**: 123 ~ 127.
- [23] Her C, Weinsilboun R M. Endonuclease-mediated long PCR and its application to restriction mapping. *Curr Issues Mol Biol*, 1999, **1**: 77 ~ 87.
- [24] Fromenty B, Demeilliers C, Mansouri A, et al. *Escherichia coli* exonuclease III enhances long PCR amplification of damaged DNA templates. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28**: E50.
- [25] Zhang F Q, Huang Q S, Ma W Y, et al. Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector. *J Virol Methods*, 2001, **96**: 171 ~ 182.
- [26] Akin A, Wu Ch Ch, Lin T L. Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR. *J Virol Methods*, 1999, **82**: 55 ~ 61.
- [27] Fang G W, Zhu G, Burger H, et al. Minimizing DNA recombination during long RT-PCR. *J Virol Methods*, 1998, **76**: 139 ~ 148.
- [28] Jurecic R, Belmont J W. Long-distance DD-PCR and cDNA microarray. *Curr Opin Microbiol*, 2000, **3**: 316 ~ 321.
- [29] Ishibashi O. A new method to synthesize competitive RNAs for accurate analyses by competitive RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*, 1997, **35**: 203 ~ 207.
- [30] Cheng S, Higuchi R, Stoneking M. Complete mitochondrial genome amplification. *Nature Genet*, 1994, **7**: 350 ~ 351.
- [31] Nelson W S, Prodöhl P A, Avise J C. Development and application of long-PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. *Mol Ecol*, 1996, **5**: 807 ~ 810.
- [32] Ui Wook Hwang, Chan Jong Park, Tai Soon Yong, et al. One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, **19**(3): 345 ~ 352.
- [33] Kopsidas G, Kovalenko S A, Islam M M, et al. Preferential amplification is minimized in long-PCR systems. *Mutant Res*, 2000, **456**: 83 ~ 88.
- [34] Steen V M, Andreassen O A, Daly A K, et al. Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics*, 1995, **5**: 215 ~ 223.
- [35] Kleinle S, Wiesmann U, Superti-Furga A, et al. Detection and characterization of mitochondrial DNA rearrangements in Pearson and Kearns-Sayre syndromes by long PCR. *Hum Genet*, 1997, **100**: 643 ~ 650.
- [36] Yamamoto M, Hamada K, Shimokawa M, et al. Simple and rapid detection of large mitochondrial DNA deletions in mitochondrial encephalomyopathy by long PCR. *Muscle Nerve*, 1996, **19**: 928 ~ 929.
- [37] Reynier P, Malthiery Y. Accumulation of deletions in mtDNA during tissue aging: analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **217**: 59 ~ 67.
- [38] Marion B C, Derek A A, Jennifer R T, et al. A protocol for detection of mitochondrial DNA deletion: characterization of a novel deletion. *Clin Biochem*, 1998, **31**(8): 627 ~ 632.
- [39] Jessie B C, Sun C Q, Irons H R, et al. Accumulation of mitochondrial DNA deletion in the malignant prostate of patients of different age. *Exp Gerontol*, 2001, **37**: 169 ~ 174.
- [40] Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves Wolbachia DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 2000, **9**: 393 ~ 405.
- [41] Watanabe G, Sgimizu K. DNA sequence analysis of long PCR amplified products at the D1S80 locus. *Legal Medicine*, 2002, **4**: 37 ~ 39.