

# 应用于染色体步移的 PCR 扩增技术的研究进展

刘 博<sup>1,2</sup>, 苏 乔<sup>1</sup>, 汤敏谦<sup>2</sup>, 袁晓东<sup>2</sup>, 安利佳<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学环境与生命科学院, 大连 116023; 2. 宝生物工程(大连)有限公司, 大连 116600)

**摘要:** 各种建立在 PCR 基础上染色体步移的方法能够根据已知的基因序列得到侧翼的基因序列。染色体步移技术主要应用于克隆启动子、步查获得新物种中基因的非保守区域、鉴定 T-DNA 或转座子的插入位点、染色体测序工作中的空隙填补, 从而获得完整的基因组序列等方面。其方法主要有 3 种: 反向 PCR 的方法, 连接法介导的 PCR 的方法以及特异引物 PCR 的方法。文章就各种方法进行举例说明并加以分析比较。

**关键词:** 染色体步移; 反向 PCR; 连接法 PCR; 特异引物 PCR

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)05-0587-09

## Progress of the PCR Amplification Techniques for Chromosome Walking

LIU Bo<sup>1,2</sup>, SU Qiao<sup>1</sup>, TANG Min-Qian<sup>2</sup>, YUAN Xiao-Dong<sup>2</sup>, AN Li-Jia<sup>1</sup>

(1. School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China; 2. TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd. Dalian 116600, China)

**Abstract:** Various PCR-based methods are available for chromosome walking from a known sequence to an unknown region. It is promising in genome-related research for the following experiments: promoter cloning, obtaining non-conservative parts of genes in new species, identification of T-DNA or transposon insertion sites and filling in gaps or unknown chromosome regions in genome sequencing. These methods consisted of three types: inverse PCR, ligation-mediated PCR and specific primer PCR. In this review, we illustrated and compared the current techniques.

**Key words:** chromosome walking; inverse PCR; ligation-mediated PCR; specific primer PCR

获得与已知序列相邻的未知序列的染色体步移技术是一项重要的分子生物学研究技术。染色体步移技术主要有以下几方面的应用: (1) 根据已知的基因或分子标记连续步移获取人、动物和植物的重要调控基因, 用于研究结构基因的表达调控, 如: 分离克隆启动子并对其功能的研究; (2) 步查获得新物种中基因的非保守区域, 从而获得完整的基因序列; (3) 鉴定 T-DNA 或转座子的插入位点, 以及鉴定基因枪转基因法等转基因技术所导致的外源基因的插入位点; (4) 用于染色体测序工作中的空隙填补, 从而获得完整的基因组序列; (5) 用于人工染色体 PAC、YAC 和 BAC 的片段搭接。对于基因组测序已

经完成的少数物种(如人、小鼠、线虫、水稻、拟南芥等)来说, 可以轻松地从数据库中找到已知序列的侧翼序列。但是这毕竟只是研究少数模式生物时的情况, 对于自然界中种类繁多的其他生物而言, 在不知道它们的基因组 DNA 序列以前, 想要知道一个已知区域两侧的 DNA 序列, 只能采用染色体步移技术。因而, 染色体步移技术在现代分子生物学研究中占有举足轻重的地位, 是结构基因组研究以及功能基因组研究的基础。

自从 PCR 技术发明以来, 人们就在 PCR 技术的基础上设计了多种扩增未知序列的染色体步移的方法, 这些方法依其原理可分为 3 类: 反向 PCR 的

收稿日期: 2005-09-07; 修回日期: 2005-11-09

作者简介: 刘 博(1979—), 男, 黑龙江人, 硕士生, 专业方向: 植物基因工程。Tel: 0411-87509077; E-mail: ppic9k@msn.com

通讯作者: 安利佳(1955—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物基因工程及基因工程药物。Tel: 0411-84706365; E-mail: bioeng@dlut.edu.cn

方法,连接 PCR 的方法,以及特殊引物 PCR 的方法。本文就各种方法进行举例说明并加以分析比较,并结合目前的技术,探讨未来发展的趋势走向。

## 1 反向 PCR

反向 PCR(I-PCR)是 TRIGLIA 等<sup>[1]</sup> 1988 年设计的一种方法,原理见图 1。选择一个已知序列中没有的限制酶对基因组 DNA 进行酶切,基因组 DNA 经限制酶酶切后自连成环状分子,根据已知序列设计引物,进行反向 PCR 扩增。I-PCR 被用于从酵母基因组 DNA 中分离 YAC 克隆末端,从植物基因组 DNA 中分离转座子侧翼的特异区域<sup>[2]</sup> 也被成功地应用于探测乙肝病毒(HBV 和 T 淋巴病毒(HTLV)的结合部位<sup>[3~7]</sup>。PI-PCR (partial I-PCR)是 PANG 等<sup>[8]</sup>对 I-PCR 进行的一种改进的方法,他们用 *Sau3A I* 部分酶切基因组 DNA, *Sau3A I* 的识别位点只有 4 个碱基,因而在许多基因中都存在,所以可以不知道目的基因侧翼序列的限制性图谱。然而 I-PCR 也存在着若干问题,比如环化反应难以控制,存在分子间的连接而形成大量的线状串联体,这导致非特异扩增,如果酶切片段太长,也会使扩增效率下降<sup>[9]</sup>。

## 2 连接法介导的 PCR

这类方法的第一步都是酶切基因组 DNA,连接载体或接头,载体可以是质粒也可以是噬菌体,只要有合适的酶切位点。接头可以是双链也可以是单链,所连接的载体或接头不同,后继实验程序也有很大的不同。

### 2.1 连接载体的 PCR

Shyamala 等<sup>[10]</sup>利用单特异引物 PCR (single specific primer PCR, SSP-PCR)以小鼠伤寒杆菌组氨酸转运操纵子为起点进行连续步行。他们以 M13mp18RF DNA 为载体,用 *Pst I* + *Ara I* 酶切基因组 DNA, *Pst I* + *Xma I* 酶切载体 DNA,然后连接基因组片段和载体片段,用根据基因组 DNA 序列设计的特异引物和载体的通用引物进行扩增。由于非特异片段没有单特异引物的结合位点,即使有载体连接到非特异片段,它也不能得到大量扩增,而使特异片段得到有效扩增。Mizobuchi 等<sup>[11]</sup>也用 SSP-PCR,以 pBluescript KS 质粒为载体,扩增了小鼠下丘脑和胎盘的释放激素基因 5' 侧翼。在这种

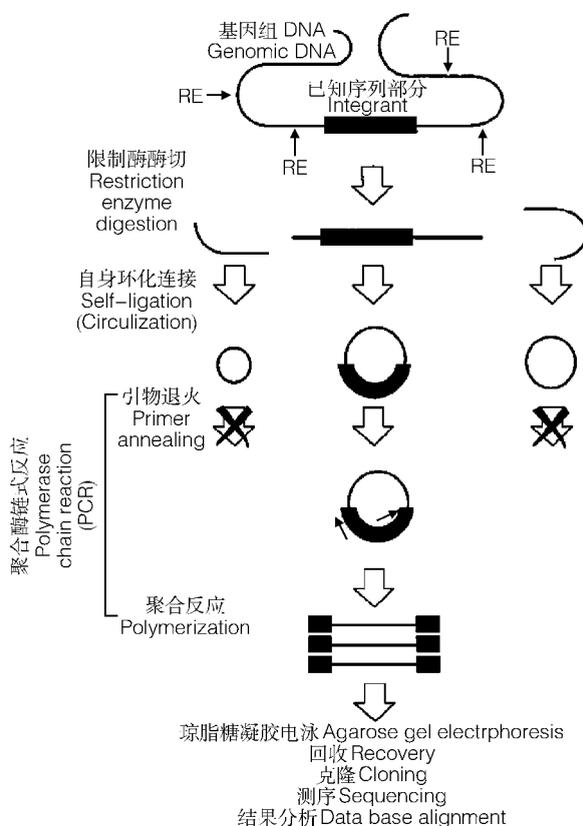


图 1 I-PCR 原理图

Fig.1 The principle of I-PCR

方法中,如果用合适的接头代替载体效果也会一样。这种方法原理简单,实验设计简便,但操作较为繁琐,特异性较低,产物仍需杂交进一步确定。

### 2.2 连接接头的 PCR

这类方法是在酶切的基因组 DNA 片段上连接双链、单链或部分双链的接头,用序列特异引物和接头引物引发 PCR 扩增,PCR 产物的特异性依赖于接头结构的特异性和基因组 DNA 的复杂性,但在研究复杂基因组时,这种方法有时也是不可靠的,原因之一就是副反应的发生,诸如:PCR 反应中单链或部分单链的接头的凹入末端被补平,或接头的单链部分被 PCR 反应中的酶降解等,这些副反应就导致非特异扩增,而且难以鉴别特异产物。为降低副反应的发生和提高产物的特异性,在 Rosenthal 等<sup>[9]</sup>设计的 CPCR (Capture PCR) 中介导 PCR 反应的是双链接头,并且在特异引物上增加了便于选择产物的生物素标记,原理见图 2。在第一次 PCR 反应中,用带有生物素标记的特异引物进行单引物 PCR,合成含有目的序列和接头序列的产物,然后用

链霉亲和素包被的磁珠捕捉分离带有生物素标记的单链产物,以回收的产物为模板,用无标记的嵌套特异引物和接头引物进行第二次 PCR 扩增。由于在特异引物上增加了有利于选择特异产物的生物素标记,这种技术的特异性比较高。Rosenthal 等用这种技术实现了对 YAC 中线虫 *unc31* 基因的步行和人类 DMD 基因的步行。Bloomquist 等<sup>[12]</sup>在分离大鼠编码 PAM 基因 3 个内含子时所用的方法与这种方法类似,他们只是在外显子末端连接了 poly(dA) 代替接头并且第一次 PCR 扩增是用无标记的特异引物 1 和接头引物引发,其产物以嵌套的放射性标记末端的特异引物 2 为探针筛选,把筛选到的产物进行第二次 PCR 扩增,用生物素标记的嵌套引物 3 和接头引物引发,用磁珠捕捉分离带有生物素标记的单链产物,然后再进行一次嵌套 PCR 扩增。这种方法进行两次筛选特异产物,进一步提高了 PCR 产物的特异性,降低了背景。

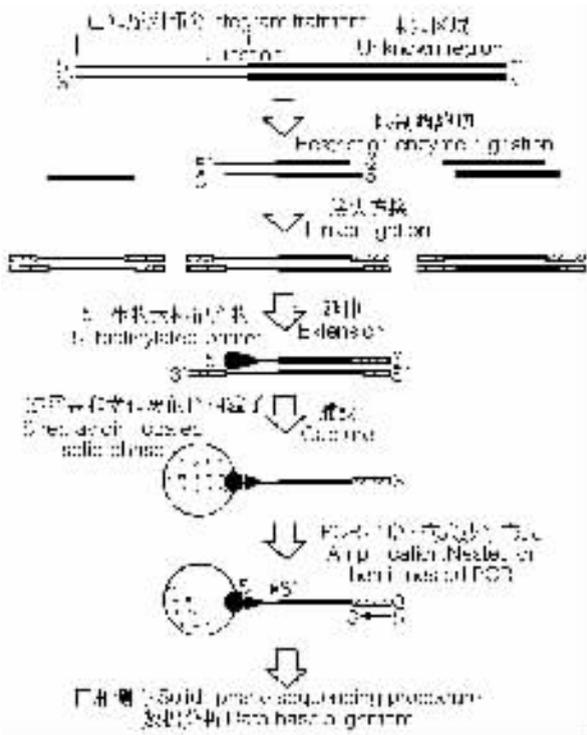


图 2 Capture PCR 原理图

Fig.2 The principle of capture PCR

Riley J 等利用 Vectorette-PCR 分离了酵母人工染色体(YAC)的末端序列<sup>[13]</sup>。这种方法使 PCR 反应有很高的特异性,避免了其他副产物的产生,其原理见图 3。先选择一种限制酶对基因组 DNA 进

行酶切,得到 5'突出末端的 DNA 片段,再在其两端连接上一种特殊构造的接头。这种接头中间由于有一段序列不配对而形成了泡泡型,所以这种 PCR 也称泡泡 PCR。接下来侧翼序列可以使用一条已知序列上的特异引物和接头上泡泡处的一条特异引物扩增得到。由于只有与特异引物引导合成了接头的互补序列后,接头引物才能退火参与扩增,所以可以很大程度的避免了接头引物的单引物扩增。方卫国、肖月华等<sup>[14]</sup>设计了 YADE 法(Y-shaped adaptor dependent extension)用于棉花基因组的 PCR 步行。这种方法与 Vectorette-PCR 相似,其采用“Y”形接头,以减少接头引物的单引物扩增。其原理在于:接头引物处于“Y”接头的两个分叉单链上,序列与接头一样,只有与特异引物引导合成了与接头末端互补的序列后,接头引物才能退火参与扩增。

TaKaRa<sup>[15]</sup>和 Clontech<sup>[16]</sup>公司都利用对接头进行氨基修饰的方法来抑制单引物的扩增,具体原理见图 4。因为在设计上,Cassette 的 5'末端没有磷酸基,所以 Target DNA 的 3'末端和 Cassette 的 5'末端的连接部位形成缺口。在第一次 PCR 反应的第一个循环时,从 Primer C1 开始的延伸反应在连接部位终止,限制了 Primer C1 和 Primer C1 同一引物之间的扩增,从而控制了非特异性 PCR 扩增。只有从 Primer S1 开始延伸合成的 DNA 链,才能成为 Primer C1 的模板,进行 DNA 的特异性扩增反应。再用内侧 Primer (Primer C2,Primer S2)进一步进行第二次 PCR 反应,可以高效特异地扩增目的 DNA。

Yan Yuanxin 等<sup>[17]</sup>设计了 T-linker PCR 的方法来进行染色体步移,原理见图 5。先将基因组 DNA 通过末端转移酶加 Poly d(T)尾,以消除基因组 DNA 中的 3'凹端和平端,形成末端全部为 3'突出端的 DNA,再用 3'突出端的限制酶进行酶切,产生全部为 3'突出端的 DNA 片段。用 *Taq* 酶和一个特异引物,在特异温度下合成目标 DNA 分子,产生具有 3'-A 尾的目标 DNA 分子,而其他 3'突出端的 DNA 片段(非特异分子)保持不变。用 T4 DNA 连接酶选择性连接具有 3'-A 尾的目标 DNA 分子和 3'-T 尾的接头(T-linker)。再经过两轮巢式 PCR 的扩增得到目的产物。T-linker PCR 的方法实现了接头和目标 DNA 分子的特异性连接,由于这种特异性连接极大地提高了步移 PCR 的特异性和有效率,并且由于不需低温退火,一次性扩增得到的片段可以很长。

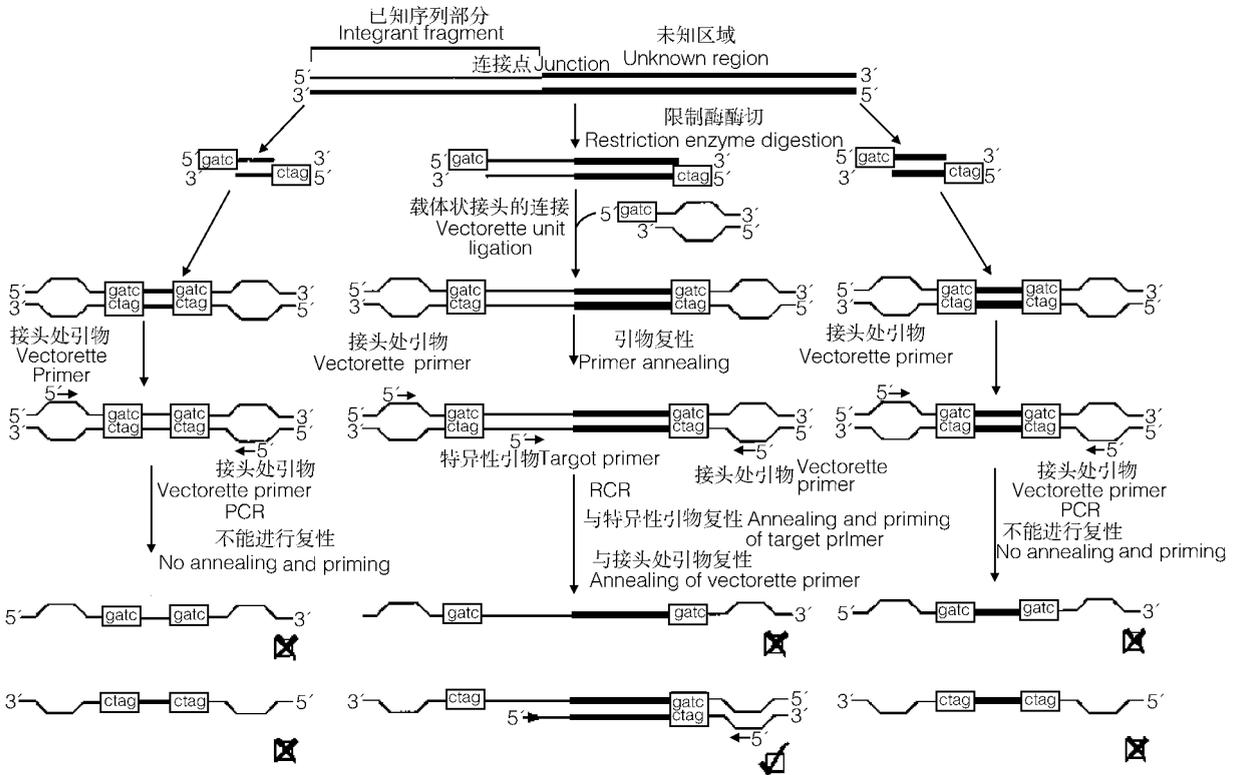


图 3 Vectorette-PCR 原理图  
Fig.3 The principle of Vectorette-PCR

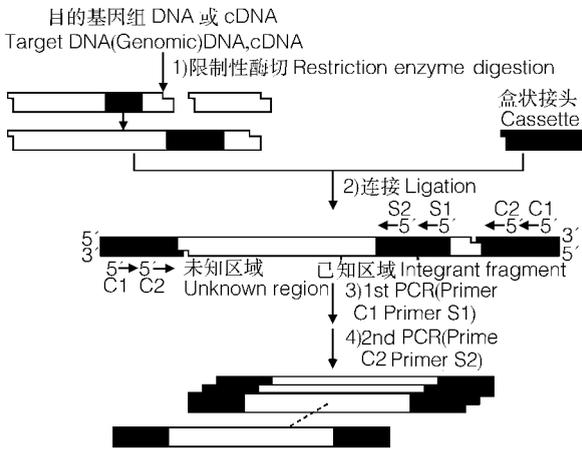


图 4 Cassette PCR 原理图  
Fig.4 The principle of cassette PCR

2.3 Panhandle PCR

Panhandle PCR (P-PCR) 与 I-PCR 相比, P-PCR 是利用末端反向重复序列与已知序列互补配对形成锅把状单链模板<sup>[18]</sup>, 原理见图 6。P-PCR 中需要 3 个根据已知序列设计的引物, 3 个引物在已知序列内呈线形排列, 其中第 3 个引物可作为接头使用, 可

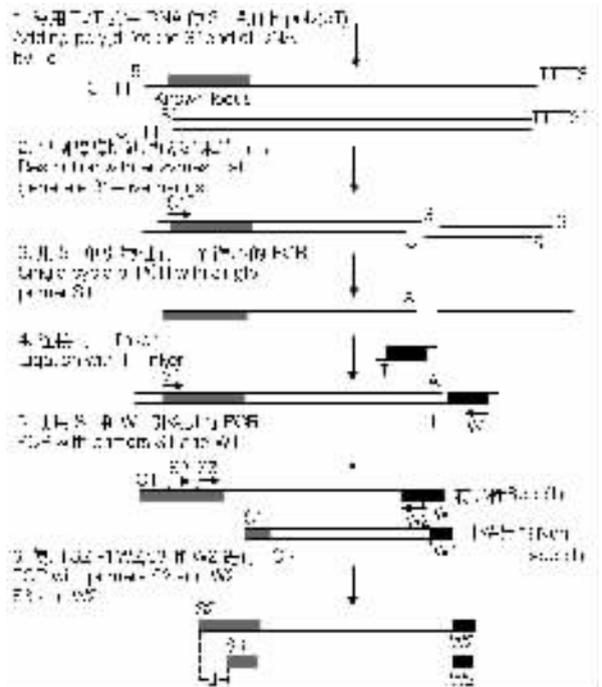


图 5 T-linker PCR 原理图  
Fig.5 The principle of T-linker PCR

与已知序列互补配对形成单链模板。其过程为,首先酶切基因组 DNA,产生 5'或 3'粘末端,然后连接上合适的接头,连接好后最好用核酸外切酶除去多余的接头,之后分别用 3 个单引物进行 3 次 PCR 扩增,能有效扩增 2~9 kb 的大片段未知序列。Jones 等<sup>[19]</sup>利用改进的 P-PCR,在形成 panhandle 结构之前 3'末端连上了 ddCTP,使引物错配的机率减少,特异性增加。他们从人类基因组 DNA 已知位点侧翼扩增了 4~9 kb 的大片段未知序列。

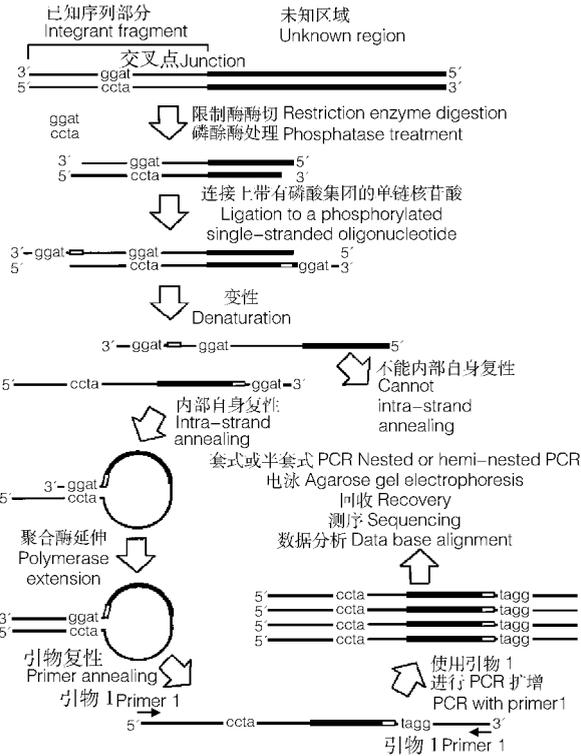


图 6 Panhandle PCR 原理图

Fig.6 The principle of Panhandle PCR

### 3 特异引物 PCR

很早就有人设计特异引物来对已知序列翼侧的 DNA 进行 PCR 扩增,但由于无法有效地控制由随机引物引发的非特异性产物的产生,所以一直没被广泛应用。近年来,研究者们发明了几种方法解决了这个问题。

#### 3.1 Alu-PCR

Alu-PCR 最早被应用于以非人类基因组为背景的人类基因组的扩增<sup>[20~22]</sup>。这种方法是基于在人类基因组上每隔大约 4 kb 就有一段 Alu 重复序

列<sup>[23,24]</sup>。根据已知序列和 Alu 重复序列设计引物,可以扩增出一段所需的侧翼序列,其原理见图 7。Alu-PCR 需要设计两条特殊的引物:一条与已知序列复性,另一条与 Alu 重复序列退火。为了避免产生由 Alu 重复序列引物单引物扩增出的非特异性产物,需要满足两个要求<sup>[25]</sup>:首先,Alu 重复序列引物合成时需要用 dUTP 进行修饰。这种引物在扩增 10 个循环以后被尿嘧啶脱氧核酸糖基酶(UDG)破坏,这样可以阻止 Alu 重复序列引物的单引物扩增。其次,在 UDG 处理前,引物的比例是不对称的。已知序列的引物的浓度是 Alu 重复序列引物的 10 倍,这样也可以一定程度上控制单引物的扩增。而且,在引物设计时,可以在引物的两端加上一段 Taq 序列,进而可以进行巢氏 PCR 来增加特异性产物的量。这种方法所需的 DNA 模板量少,并且可以较好地控制非特异性产物的产生。使用这种方法扩增得到侧翼序列的报道很多<sup>[26~28]</sup>。有报道称,根据其他重复序列设计引物也可以使用与之类似的方法,扩增出侧翼序列<sup>[29,30]</sup>。

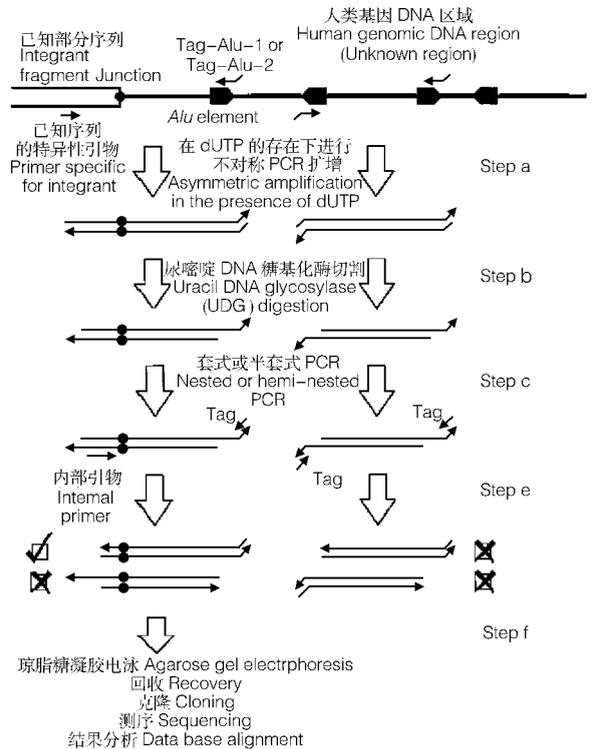


图 7 Alu-PCR 原理图

Fig.7 The principle of Alu-PCR

#### 3.2 TAIL-PCR

由 LIU 等<sup>[31~33]</sup>设计的 TAIL-PCR (Thermal

Asymmetric Interlaced PCR) 有效地抑制了非特异产物的扩增。这种方法利用 3 个嵌套的特异引物和 1 个较短的随机简并引物 (AD Primer) 引发 PCR 扩增。原理见图 8。这种 PCR 反应一般有 3 种产物生成: 由特异引物和随机简并引物共同延伸产生的 I 型产物, 由特异引物单独延伸产生的 II 型产物, 和由随机简并引物延伸产生的 III 型产物。其中 II 型和 I 型产物中的非特异产物可以用嵌套 PCR 除去, III 型产物则不能, 因而是 PCR 中主要的背景。TAIL-PCR 用特殊的 TAIL 循环程序使 PCR 反应有利于 I 型产物的扩增, 而抑制 III 型非特异性产物。这种策略的关键是 TAIL-PCR 中使用的长的高退火温度的嵌套特异引物和短的低退火温度随机简并引物, 由于两种引物的退火温度有明显的差别, 这样就可以通过控制 PCR 循环中的退火温度决定在 PCR 反应中何种引物起作用, 从而控制不同类型产物的产生。与其他 PCR 方法相比, TAIL-PCR 有以下优点: (1) 简便性。TAIL-PCR 既不需要 PCR 前进行任何 DNA 操作, 也不需要 PCR 后进行筛选工作, 而且只需要很少的 DNA 模板就能满足 TAIL-PCR 扩增的要求。(2) 高度特异性。反应过程中有效地抑制了各种来源的非特异性产物的扩增。(3) 高效率。大多数反应应用任意的 AD 引物都可产生特异性产物。(4) 迅速。7~8 个小时之内就能得到实验结果。(5) 高度灵敏。很低拷贝数的基因都能得到有效地扩增。这些优点使 TAIL-PCR 在分子生物学研究的各个领域有广泛的应用。但 TAIL-PCR 反应需要较多的引物组合, 而且由于 AD 引物存在有限的结合位点, 对于个别的侧翼序列, 即使使用不同的简并引物也难以扩增到阳性结果。此外, 整个 TAIL-PCR 需要一系列连续的反应, 反应条件的设置要求比较精细, 对 PCR 反应仪的要求也较高。TAIL-PCR 技术能够分离获得克隆载体上的 DNA 序列, 也能够用于基因组小的物种, 如: 拟南芥<sup>[33,34]</sup>、水稻<sup>[35,36]</sup> 和基因组大的物种, 如小麦<sup>[31]</sup> 以及哺乳动物<sup>[37]</sup> 的已知序列两侧翼的 DNA 序列的分离。此外, 经过改良的 TAIL-PCR 技术已被用于快速克隆 *Pal* 及 *Pgi* 基因的启动子序列和野油菜的黄单胞菌群体感应信号基因<sup>[38,39]</sup>。TAIL-PCR 技术已成为分子生物学研究中的一种强大工具。

### 3.3 DW-ACP PCR

Seegene 开发了 DNA Walking SpeedUp™ Kit

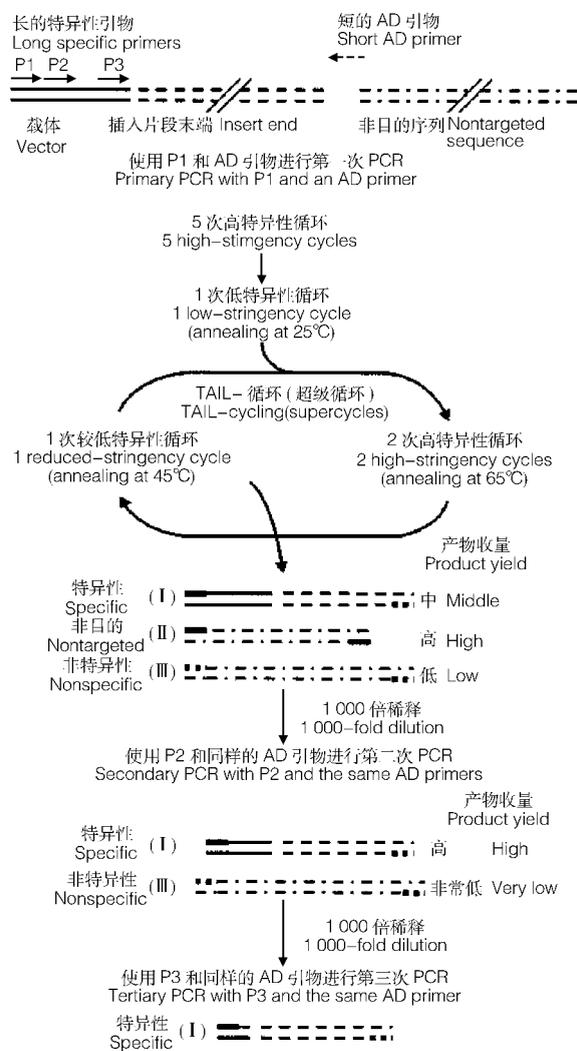


图 8 TAIL-PCR 原理图

Fig. 8 The principle of TAIL-PCR

试剂盒, 其利用 ACP 引物 (Annealing control primer) 有效地控制了引物的非特异性结合, 具体原理见图 9。因为设计的 DW-ACP 引物的 5' 端为某种通用引物, 3' 端为 5 个碱基, 中间加入 5 个次黄嘌呤核苷酸所构成, 在第一轮 PCR 扩增时, 采用较高的退火温度, 该引物的 3' 端的 5 个碱基可与未知序列部分退火, 而中间的 5 个次黄嘌呤由于其退火温度较低, 不会与模板退火, 而是形成了一个泡状结构, 使得 5' 端的引物也不能和模板形成非特异性退火, 因而阻碍了非特异性产物的扩增。随后由于特异性引物 1 的延伸, 构成了完整的 DW-ACP 引物的模板, DW-ACP 引物可以完全退火进行扩增。然后使用 DW-ACP 引物 5' 端的通用引物及特异性引物 2 进行巢

式 PCR, 就可以得到大量的特异性产物, 且有效地抑制了非特异性产物的产生<sup>[40,41]</sup>。

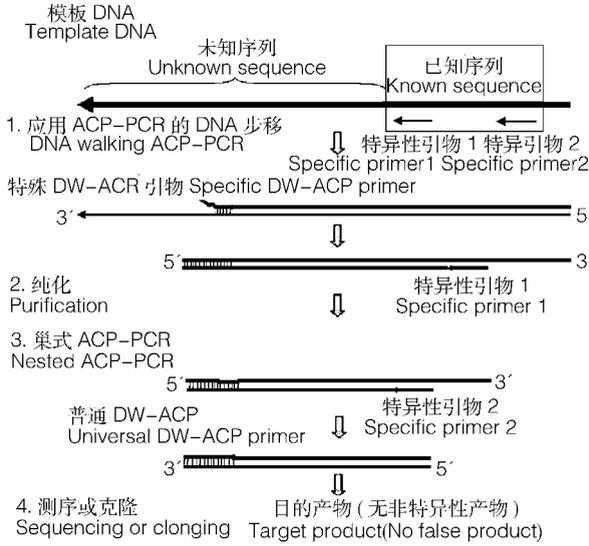


图 9 DW-ACP PCR 原理图

Fig.9 The principle of DW-ACP PCR

## 4 讨论

以 PCR 为基础的染色体步移要解决的问题主要是如何在预先不了解未知区域序列信息的情况下, 设计两个特异性引物来扩增未知区域。本文综述的这几种方法基本上概括了现有的以 PCR 技术为基础的染色体步行方法, 它们不尽完善, 有一定的适用时期和适用范围。关于几种方法的比较见表 1。

反向 PCR 是最早应用于染色体步移的一种方法, 但近些年很少有这方面的应用, 主要是由于往往找不到合适的酶切位点, 而且受到连接效率的影响。利用接头或载体的 PCR 技术的应用比较多, 尤其在 T-DNA 定位方面, 但是扩增长度往往比较短 (< 1 kb), 若想获得更长的片段只能通过几次步移后才能得到。一种理想的染色体步行方法应该步骤简单, 自动化操作, 步行距离长, 而且扩增的特异性高。T-linker PCR、Alu-PCR、TAIL-PCR 以及 DW-ACP PCR 都基本符合这样的要求, 但也有许多不尽人意

表 1 PCR 为基础的染色体步移方法比较

Table 1 The comparison of PCR-based methods for chromosome walking

方法 Method	DNA 切割 DNA digestion	连接 Ligation	DNA 用量 Amount of DNA used	使最优化的步骤 Steps to optimize	非特异性产物 Nonspecific products	灵敏度 Sensitivity
Inverse PCR (IPCR)	需要 Yes	自连 Self-ligation (circulation)	2~5 μg	1. 需要大量 DNA Requires large amount of DNA 2. 自身连接的 DNA 浓度 DNA concentration of self-ligation	来自不完整或未连接的 DNA From free non-integrated DNA or non-ligated DNA	低 Low
Capture PCR (CPCR)	需要 Yes	连接 Linker ligation	100 ng	连接效率 Ligation efficiency	来自生物素标记的单引物扩增 From single biotinylated primer	中等 Medium
Vectoret te-PCR	需要 Yes	矢量单元连接 Vectorette unit ligation	1~2 μg	1. 连接条件 Ligation condition 2. 费时费力 Laborious and time-consuming	来自末端修补的引物 From end-repair primer	中等 Medium
Adaptor- ligated PCR	需要 Yes	连接接头 Adaptor ligation	2~5 μg	1. 接头连接效率 Adaptor ligation efficiency 2. 合适的酶切位点 Favorable restriction	来自单个接头引物的扩增 From single adaptor primer amplification	中等 Medium
T-linker PCR	需要 Yes	连接接头 Adaptor ligation	2~5 μg	1. 接头连接效率 Adaptor ligation efficiency 2. 合适的酶切位点 Favorable restriction	来自特异性的单引物的扩增 From single target primer amplification	中等 Medium
Panhandle PCR	需要 Yes	单链 DNA 连接 Single-strande d oligo ligation	2~5 μg	1. 连接效率 Ligation efficiency 2. 形成环状的条件 Looping condition	来自特异性的单引物的扩增 From single target primer amplification	中等 Medium

续表 1 Table 1 continued

方法 Method	DNA 切割 DNA digestion	连接 Ligation	DNA 用量 Amount of DNA used	使最优化的步骤 Steps to optimize	非特异性产物 Nonspecific products	灵敏度 Sensitivity
Alu-PCR	不需要 No	不需要 No	20~200 ng	1. Alu 方向性的考虑 Alu orientation consideration 2. 特殊的重复序列 Species-specific repetitive sequence	来自 Alu-Alu 扩增 From Alu-Alu amplification	高 High
Tail PCR	不需要 No	不需要 No	20~200 ng	1. 复性温度 Annealing temperature 2. Tail 随机引物的设计 Arbitrary tail primer design	来自 tail 随机引物的单引物扩增 From single arbitrary tail primer	高 High
DW ACP-PCR	不需要 No	不需要 No	20~200 ng	1. 引物的设计 Primer set design 2. 需要 4 种 ACP 引物 4 kinds of ACP primer	来自 ACP 引物的单引物扩增 From single ACP primer	高 High

的地方,比如 T-linker PCR 在已知序列部分如果没有合适的 3' 突出端的限制酶识别位点,这种方法将无能为力; Alu-PCR 扩增的区域包含有较短的 Alu 重复序列时,往往得不到目的产物; TAIL-PCR 很可能扩增的是高度重复序列,这样无法进行步行; DW-ACP PCR 也很可能造成单引物扩增。我们期待着一种更为理想方法的出现。

## 参考文献 (References):

- [1] Triglia T, Peterson M G, Kemp D J. A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, 1998, 16(16):8186.
- [2] Rosenthal A, Winistorfer S C. PCR amplification techniques for chromosome walking. *Trends Biotechnol*, 1992, 10(1):44~48.
- [3] Tsuei D J, Chen P J, Lai M Y, Chen D S, Yang C S, Chen J Y, Hsu T Y. Inverse polymerase chain reaction for cloning cellular sequences adjacent to integrated hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinomas. *J Virol Methods*, 1994, 49(3):269~284.
- [4] Takemoto S, Matsuoka M, Yamaguchi K, Takatsuki K. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood*, 1994, 84(9):3080~3085.
- [5] Cavois M, Wain-Hobson S, Wattel E. Stochastic events in the amplification of HTLV-I integration sites by linker-mediated PCR. *Res Virol*, 1995, 146(3):179~184.
- [6] Ohshima K, Suzumiya J, Kato A, Tashiro K, Kikuchi M. Clonal HTLV-I-infected CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes and non-clonal non-HTLV-I-infected giant cells in incipient ATLL with Hodgkin-like histologic features. *Intl J Cancer*, 1997, 72(4):592~598.
- [7] Ohshima K, Mukai Y, Shiraki H, Suzumiya J, Tashiro K, Kikuchi M. Clonal integration and expression of human T-cell lymphotropic virus type I in carriers detected by polymerase chain reaction and inverse PCR. *Am J Hematol*, 1997, 54(4):306~312.
- [8] Pang K M, Knecht D A. Partial inverse PCR: A technique for cloning flanking sequences. *Biotechniques*, 1997, 23(6):1046~1048.
- [9] Rosenthal A, Jones D S. Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(10):3095~3096.
- [10] Shyamala V, Ames G F. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction; SSP-PCR. *Gene*, 1989, 84(1):1~8.
- [11] Mizobuchi M, Frehman L A. Rapid amplification of genomic DNA ends. *Biotechniques*, 1993, 15(2):214~216.
- [12] Bloomquist B T, Johnson R C, Mains R E. Rapid isolation of flanking genomic DNA using biotin-RAGE: a variation of single-sided polymerase chain reaction. *DNA Cells Biology*, 1992, 11(10):791~797.
- [13] Riley J, Butler R, Ogilvie D, Finniear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith J C, Markham A F. A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(10):2887~2890.
- [14] XIAO Yue-Hua, LUO Ming, FANG Wei-Guo, LUO Ke-Ming, HOU Lei, LUO Xiao-Ying, PEI Yan. PCR walking in cotton genome using YADE method. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(1):62~66.  
肖月华, 罗明, 方卫国, 罗克明, 侯磊, 罗小英, 裴炎. 利用 YADE 法进行棉花基因组 PCR 步行. *遗传学报*, 2002, 29(1):62~66.
- [15] TaKaRa LA PCR™ *in vitro* Cloning Kit. Code No. DRR015. *TaKaRa Bio Catalog*, 2004-2005, E34~36.
- [16] Universal GenomeWalker™ Kit User Manual. Clontech Catalog #: K1807-1.
- [17] Yuanxin Y, Chengcai A, Li L, Jiayu G, Guihong T, Zhangliang C. T-linker-specific ligation PCR (T-linker PCR): an advanced

- PCR technique for chromosome walking or for isolation of tagged DNA ends. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(12):68.
- [18] Jones D H, Winistorfer S C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(3):595~600.
- [19] Jones D H, Winistorfer S C. Amplification of 4-9 kb human genomic DNA flanking a known site using a panhandle PCR variant. *Biotechniques*, 1997, 23(1):132~138.
- [20] Nelson D L, Ledbetter S A, Corbo L, Victoria M F, Ramirez-Solis R, Webster T D, Ledbetter D H, Caskey C T. Alu polymerase chain reaction; a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(17):6686~6690.
- [21] Ledbetter S A, Nelson D L, Warren S T, Ledbetter D H. Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics*, 1990, 6(3):475~481.
- [22] Nelson D L, Ballabio A, Victoria M F, Pieretti M, Bies R D, Gibbs R A, Maley J A, Chinault A C, Webster T D, Caskey C T. Alu-primed polymerase chain reaction for regional assignment of 110 yeast artificial chromosome clones from the human X chromosome: identification of clones associated with a disease locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(14):6157~6161.
- [23] Jelinek W R, Schmid C W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Ann Rev Biochem*, 1982, 51(7):813~844.
- [24] Kariya Y, Kato K, Hayashizaki Y, Himeno S, Tarui S and Matsubara K. Revision of consensus sequence of human Alu repeats—a review. *Gene*, 1987, 53(1):1~10.
- [25] Puskas L G, Fartmann B, Bottka S. Restricted PCR: amplification of an individual sequence flanked by a highly repetitive element from total human DNA. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(20):3251~3252.
- [26] Minami M, Poussin K, Brechot C, Paterlini P. A novel PCR technique using Alu-specific primers to identify unknown flanking sequences from the human genome. *Genomics*, 1995, 29(2):403~408.
- [27] Courcoul M, Patience C, Rey F, Blanc D, Harmache A, Sire J, Vigne R, Spire B. Peripheral blood mononuclear cells produce normal amounts of defective Vif- human immunodeficiency virus type 1 particles which are restricted for the prerotranscription steps. *J Virol*, 1995, 69(4):2068~2074.
- [28] Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol*, 1996, 70(6):3863~3869.
- [29] Schmid C W. Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1996, 53(6):283~319.
- [30] Carmody M W, Jones M, Tarraza H, Vary C P. Use of the polymerase chain reaction to specifically amplify integrated HPV-16 DNA by virtue of its linkage to interspersed repetitive DNA. *Mol Cell Probes*, 1996, 10(2):107~116.
- [31] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 1995, 25(3):674~681.
- [32] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier R F. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, 8(3):457~463.
- [33] Liu Y G, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16(2):175~181.
- [34] Grossniklaus U, Vielle-Calzada J P, Hoepfner M A, Gagliano W B. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science*, 1998, 280(5362):446~450.
- [35] Chin H G, Choe M S, Lee S H, Park S H, Koo J C, Kim N Y, Lee J J, Oh B G, Yi G H, Kim S C, Choi H C, Cho M J, Han C D. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J*, 1999, 9(5):615~623.
- [36] FANG Jin, ZHAI Wen-Xue, WANG Wen-Ming, LI Su-Wen, ZHU LI-Huang. Amplification and analysis of T-DNA flanking sequences in transgenic rice. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(4):345~351.
- 方 进,翟文学,王文明,李素文,朱立煌.转基因水稻 T-DNA 侧翼序列的扩增与分析. *遗传学报*, 2001, 28(4):345~351.
- [37] Hahn S A, Schutte M, Hoque A T, Moskaluk C A, da Costa L T, Rozenblum E, Weinstein C L, Fischer A, Yeo C J, Hruban R H, Kern S E. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 1996, 271(5247):350~353.
- [38] Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (*Dioscorea*). *Mol Gen Genet*, 2000, 263(3):554~560.
- [39] YING Ge, WU Wei, HE Chao-Zu. Cloning of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pathogenicity related gene sequences by TAIL-PCR. *Chinese J Biotechnol*, 2002, 18(2):182~186.
- 应 革,武 威,何朝族. TAIL-PCR 方法快速分离 XCC 致病相关基因序列. *生物工程学报*, 2002, 18(2):182~186.
- [40] Hwang I T, Kim Y J, Kim S H, Kwak C I, Gu Y Y, Chun J Y. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques*, 2003, 35(6):1180~1184.
- [41] Kim Y J, Kwak C I, Gu Y Y, Hwang I T, Chun J Y. Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *Biotechniques*, 2004, 36(3):424~430.