

周延清,张 喻,李静云,等. 地黄纤维素合酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):21-24.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.006

# 地黄纤维素合酶基因的克隆与生物信息学分析

周延清<sup>1,2</sup>, 张 喻<sup>1</sup>, 李静云<sup>1</sup>, 陈娟娟<sup>1</sup>, 王婉坤<sup>1</sup>, 苑璐璐<sup>3</sup>, 魏 俊<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007; 2. 资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室培养基地/河南师范大学,河南新乡 453007; 3. 河南省周口市科学技术局,河南周口 466000)

**摘要:**根据以前克隆的地黄 *RghBNG* 基因碱基序列,利用 Primer Premier 5.0 设计特异引物,采用 hiTAIL-PCR 技术从怀地黄基因组 DNA 中扩增出 578 bp DNA 片段。经生物信息学分析发现,它与根瘤土壤杆菌、土壤杆菌的纤维素合酶基因的同源性达 81%~91%;它所含的 453 bp 的开放阅读框(ORF)编码蛋白质的氨基酸序列与根瘤土壤杆菌、土壤杆菌、菜豆根瘤菌、豌豆根瘤菌纤维素合酶基因编码蛋白质氨基酸序列的同源性高达 83%~99%,说明蛋白质可能具有纤维素合酶的结构域。用 hiTAIL-PCR 技术克隆怀地黄纤维素合酶基因,为进一步研究其分子作用机制和在地黄分子育种中的应用奠定了基础。

**关键词:**怀地黄;纤维素合酶;hiTAIL-PCR 技术;生物信息学分析

**中图分类号:**S567.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0021-03

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)是玄参科(Scrophulariaceae)地黄属(*Rehmannia*)多年生草本植物,共有 6 个种,广泛分布于中国、韩国和日本等地<sup>[1]</sup>。地黄在河南、山东、山西、陕西等省广泛分布,为我国大宗常用中药材之一,传统认为怀地黄[称为怀地黄(*R. glutinosa* f. *hueichingensis*)]质量优良<sup>[2]</sup>。地黄块根入药,富含梓醇、糖类和苷类物质、维生素、多种氨基酸、多种微量元素,具有防癌、抗癌、增强免疫力、延缓衰老、增强造血能力、降低血糖、防治糖尿病并发症等功能<sup>[3]</sup>和重要的经济价值<sup>[4]</sup>。在方剂中,地黄的使用量占了很大的比重,例如六味地黄丸、知柏地黄丸和杞菊地黄丸等。在保健使用方面,已经开发出一些含有地黄成分的产品,如地黄精、地黄茶和地黄醋等<sup>[5]</sup>。国内外关于地黄基因克隆、功能分析和表达模式研究已有报道。例如,用 RT-PCR 方法扩增的地黄肌动蛋白基因片段,可用作内参基因<sup>[6]</sup>;通过 RT-qPCR 分析地黄中 11 个内参基因的 mRNA 表达差异情况<sup>[7]</sup>;用 SSH 方法克隆地黄块根中 *RgPR-10* 基因,研究其在地黄根和茎以及原核表达情况<sup>[3,8]</sup>;利用 Solexa 测序技术、生物信息学和荧光定量 PCR 分析从正茬地黄和重茬地黄中鉴定出 89 个 miRNAs,预测其中 7 个新型 miRNAs 的 15 个靶基因,在正茬地黄和重茬地黄之间构建 miRNAs 差异表达谱<sup>[4,9]</sup>;进行地黄赤霉素、脱落酸和部分寡糖合成代谢关键酶基因以及扩展蛋白基因 *RgExpAI* 的克隆与表达分析<sup>[10-11]</sup>;用 PCR 技术克隆怀地黄转座酶基因<sup>[12]</sup>;此外,还进行了怀地黄 *RgVP* 和 *RgKAT* 基因的克隆和时空表达分析<sup>[13]</sup>及怀地黄 3-酮酯酰

CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析<sup>[14]</sup>。但尚未见克隆地黄纤维素合酶基因的报道,纤维素合成酶是将纤维素水解成纤维二糖和葡萄糖的一组复杂酶系的总称<sup>[15-16]</sup>。迄今为止,已有从毛竹<sup>[17]</sup>和苧麻<sup>[18]</sup>等植物中克隆纤维素合酶基因的报道。本研究根据以前克隆的地黄 *RghBNG* 基因碱基序列<sup>[19]</sup>,利用 Primer Premier 5.0 设计特异引物,采用 hiTAIL-PCR 技术<sup>[20]</sup>克隆怀地黄纤维素合酶基因序列,用生物信息学方法对其进行分析,为进一步研究其分子作用机制和在地黄分子育种中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

怀地黄 85-5 种植于河南师范大学生命科学学院试验田,取其新鲜块根用于提取 DNA。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株由笔者所在实验室保存,DNA 凝胶回收试剂盒(上海生工服务有限公司)、Taq DNA 聚合酶和 DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司)及克隆载体 pMD19-T(TaKaRa 公司),引物合成和基因测序分别由北京华大基因有限公司和上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 怀地黄基因组 DNA 的提取** 用 CTAB 法提取怀地黄基因组 DNA,用紫外分析法和琼脂糖凝胶电泳方法检测基因组 DNA 的浓度、大小和纯度。

**1.2.2 引物设计与合成** 根据笔者所在实验室前期研究克隆的地黄 *RghBNG* 基因碱基序列(登录号为 JX290370),利用 Primer Premier 5.0 设计 3 条下游特异引物,上游非特异性引物序列参见文献[20](表 1)。

**1.2.3 hiTAIL-PCR 反应及检测** 根据 Liu 等的 hiTAIL-PCR 程序<sup>[20]</sup>略作改进。以怀地黄基因组 DNA 为模板,RH1 分别与 LAD1~LAD4 配对,进行第 1 轮 PCR 反应,其反应液组分见表 2,程序如下:93℃热启动 2 min;95℃预变性 1 min;94℃变性 30 s,60℃退火 1 min,72℃延伸 3 min,10 个

收稿日期:2014-03-27

基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划(编号:092300410009);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14B180028);国家大学生创新创业训练计划(编号:201310476102);河南省高校科技创新团队支持计划(编号:13IRTSTHN009)。

作者简介:周延清(1963—),男,河南邓州人,博士,教授,主要从事遗传学教学与研究。E-mail: yqzhou@htu.cn.

表1 所用引物名称及其序列

引物名称	引物序列(5'→3')
RH1	GGTGAAGAAGCTATTAAGGGACGGCATG
RH2	GCAAAGTCATCCAACACACCAGCAGC
RH3	CACCAACGGCAGCGAACAAGGATACA
LAD1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNBNNGGAA
LAD2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNGGTT
LAD3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNCCAA
LAD4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNCGGT
AC	ACGATGGACTCCAGAG

注:RH1、RH2、RH3为下游特异引物,LAD2、LAD3、LAD4、AC为上游非特异性引物。

循环;94℃变性30s,25℃退火2min,以0.5℃/s的速度升温至72℃,延伸3min;94℃变性20s,58℃退火1min,72℃延伸3min,25个循环;72℃延伸5min。将第1轮PCR反应产物稀释10倍,用作模板,标记为L1、L2、L3、L4,引物RH2与AC1配对,进行第2轮PCR反应,其反应液组分见表2,程序如下:94℃变性20s,65℃退火1min,72℃延伸3min,2个循环;94℃变性20s,68℃退火1min,72℃延伸3min,94℃变性20s,50℃退火1min,72℃延伸3min,13个循环;72℃延伸5min。将第2轮PCR反应产物稀释10倍,用作模板,标记为R1、R2、R3、R4,引物RH3与AC1配对,进行第3轮PCR反应,其反应液组分见表2,程序如下:94℃变性20s,68℃退火1min,72℃延伸3min,94℃变性20s,68℃退火1min,72℃延伸3min,94℃变性20s,50℃退火1min,72℃延伸3min,共7个循环;72℃延伸10min。取第3轮PCR反应产物8μL,用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表2 hiTAIL-PCR反应组分及用量

反应成分	用量(μL)		
	第1轮	第2轮	第3轮
模板	1.0	1.0	1.0
dNTP 预混物(各2.5mmol/L)	4.0	4.0	2.0
10×LA PCR缓冲液(加入Mg <sup>2+</sup> )	2.0	2.5	2.5
TaKaRa公司的5U/μL LA Taq	0.5	0.6	0.5
100pmol/μL上游引物	1.0	0.3	0.6
10pmol/μL下游引物	0.3	0.3	0.6
水	11.2	16.3	17.8

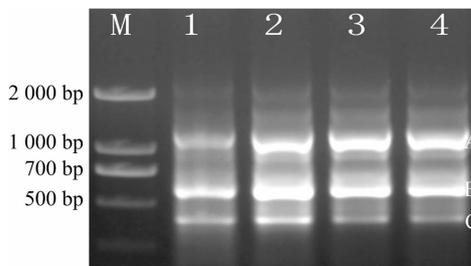
1.2.4 基因片段的克隆、测序 按照TaKaRa公司的载体pMD19-T说明书,将回收的目的片段进行连接反应,连接液为5μL,载体为0.5μL,回收DNA的量为4.5μL,共10μL,16℃连接过夜。取10μL连接产物转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,取细胞悬浮液涂布于含氨苄青霉素Amp的LB平板上,37℃倒置培养过夜,挑取菌落,进行PCR检测。将检测为阳性的克隆送上海生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 基因片段的生物信息学分析 在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上运用BLAST软件进行目的基因的同源性搜索,并进行同源性比较。用MEGA5的Neighbor-Joining法构建系统进化树<sup>[15]</sup>。通过NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测氨基酸的保守域<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 地黄基因组DNA片段的扩增与电泳

用CTAB法提取怀地黄基因组DNA,经紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳方法分析符合后续试验要求后,用作模板,进行hiTAIL-PCR,共扩增出3个条带(图1)。



M—2 000 DNA marker; 1—4—R1、R2、R3、R4的第3轮PCR扩增产物; A—100 bp; B—600 bp; C—400 bp

图1 hiTAIL-PCR产物的电泳结果

### 2.2 地黄基因组DNA片段的回收、克隆与测序

用试剂盒回收图1中B片段,克隆至载体pMD19-T,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,筛选阳性克隆测序,测序结果显示B片段长578bp(图1)。

### 2.3 地黄类纤维素合酶基因的ORF及其编码蛋白质氨基酸序列分析

利用ORF Finder分析B片段测序结果,发现其含有453bp开放阅读框,编码151个氨基酸(图2)。预测其编码蛋白质分子量约为18ku,等电点为9.00,摩尔消光系数为34045,不稳定系数为49.51,为略碱性的不稳定蛋白质。

```

1  ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCGGTAGGGAACAGCATCTATGTC
47  GACAAGCCGCTGATCGCCGGCCTGCAACCCGCCACCTTCGCAAGCT
93  TCATCGGCCAGCGCAGCCGCTGGGCGCAGGGCATGATGCAGATTCTG
1  M Q I L
140 ATCTTCCGTCAGCCGCTGTTCCGCGCGGCTCTCTCGTTTACGCAG
6  I F R Q P L F R R R G L S F T Q
185 CGTCTCTGTACATGTCATCGACGCTGTTCTGGCTTTTCCGTTTCCG
21  R L C Y M S S T L F W L F P R F
233 CGCACGATCTTCTGTTCCGCGCCGCTGTTCTACCTGTTCTCGACCTG
37  P T I F L F A P L F L F L F F D L
281 CAGATTTTCTGGCCCTCCGCGCGGAGTTCCTGGCCTATACGGCG
53  Q I F V A S G G E F L A Y T A
326 GCCTATATGCTCGTGAACCTGATGATGCAGAACTATCTATGGC
68  A Y M L V N L M M Q N Y L Y G
371 AGTTCGCGCTGGCCATGGATTTCTGAGCTTTACGAATATGTGCAG
83  S F R W P W I S E L Y E Y V Q
416 ACG GTTACCTTCTGCCCGCGTGGTTTCGGTGATCTTCAACCCC
98  T V H L L P A V V S V I F N P
461 GGCAAGCCCACTTCAAGGTGACGGCGAAGGATGAATCCATTGCC
113 G K P T F K V T A K D E S I A
506 GAGGCGCGGCTTTCGAAATCAGCCGGCGTTCCTTCGTCATCTTC
128 E A R L S E I S R P F F V I F
551 G C G C T G C T G G T G T T G G A T G A C T T T G C
143 A L L V C W M T L

```

左侧数字代表碱基数或氨基酸数; 正体字母代表核苷酸序列, 斜体字母代表氨基酸序列; 起始密码子用方框标出

图2 地黄类纤维素合酶基因的核苷酸及其编码的氨基酸序列

### 2.4 多序列比对与系统进化树分析

将测序所得的氨基酸序列在NCBI上进行BLAST比对分析,发现与已知10个物种的纤维素合酶基因及其编码的氨基酸序列高度同源(表3)。用软件MEGA5构建的系统进化树(图3)表明,其与根瘤土壤杆菌和土壤杆菌的亲缘关系最近。

### 2.5 氨基酸保守域的预测

在NCBI网站预测该氨基酸的保守域,发现其含有纤维

表 3 地黄与其他物种纤维素合酶的同源性比较

物种	GenBank 登录号	氨基酸同源性 (%)	核苷酸同源性 (%)
根瘤土壤杆菌 ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )	WP_003506371.1	99	91
土壤杆菌 ( <i>Agrobacterium</i> sp.)	WP_020011862.1	99	91
菜豆根瘤菌 ( <i>Rhizobium phaseoli</i> )	WP_016734164.1	88	—
豌豆根瘤菌 ( <i>R. leguminosarum</i> )	WP_003578482.1	88	—
三叶草根瘤菌 ( <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> )	YP_002975124.1	87	—
费氏中华根瘤菌 ( <i>Sinorhizobium fredii</i> )	YP_005192181.1	86	—
苜蓿中华根瘤菌 ( <i>S. meliloti</i> )	YP_007193525.1	85	—
中华根瘤菌 ( <i>S. medicae</i> )	WP_018010495.1	84	—

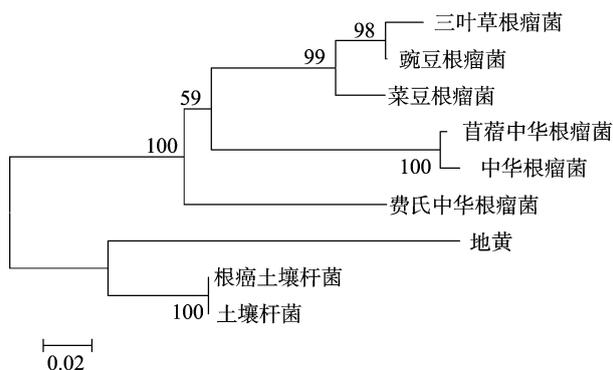
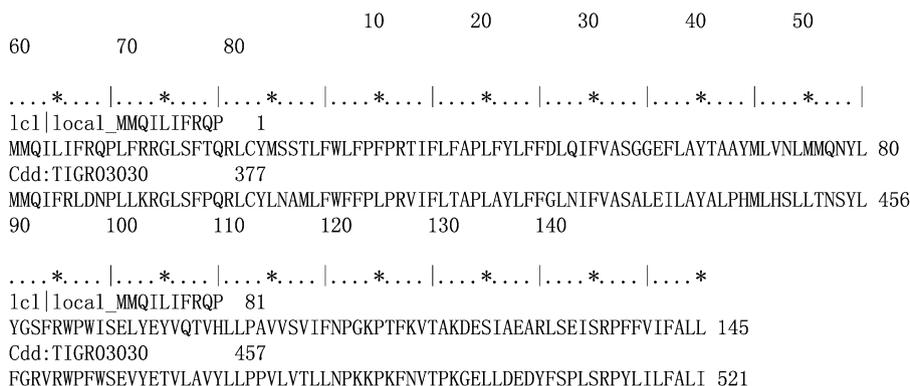


图 3 地黄和其他物种纤维素合酶氨基酸序列的系统进化树

素合酶催化亚单位 (UDP-forming) 的保守域 (图 4)。

### 3 结论与讨论

本研究根据以前克隆的地黄 *RghBNG* 基因碱基序列<sup>[19]</sup>, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异引物, 采用 hiTAIL-PCR 技术从怀地黄基因组 DNA 中扩增出 A、B、C 等 3 条带, 分别对其进行回收、克隆、测序和生物信息学分析。结果发现, B 带大小为 578 bp, 含有 453 bp 的开放阅读框, 编码 151 个氨基酸残基组成的蛋白质 (另外 2 条带 A 和 C 的分析结果在此未呈现)。它与根瘤土壤杆菌、土壤杆菌的纤维素合酶基因的同源性达 81% ~ 91%, 其编码的氨基酸序列与根瘤土壤杆菌、土壤杆菌、菜豆根瘤菌、豌豆根瘤菌等纤维素合酶基因编



Cdd:TIGR03030—纤维素合酶催化亚单位的保守域

图 4 地黄纤维素合酶保守域预测

码蛋白质的氨基酸序列同源性达 83% ~ 99%, 而且其编码的蛋白质具有纤维素合成酶的结构域。本研究首次从怀地黄中分离克隆了纤维素合酶基因, 为研究其在地黄生长发育过程中的作用和地黄基因工程育种奠定了基础。该怀地黄 DNA 片段与其他植物纤维素合酶基因不同源, 但与根瘤菌纤维素合成酶基因同源, 可能是因为地黄生长发育过程中地黄块根与其根际根瘤菌共生而发生后者基因组 DNA 片段转移并整合到地黄基因组 DNA 中。但是, 其具体形成原因有待进一步深入研究。

### 参考文献:

[1] Kim Y S, Ryuk J A, Ko B S. Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker [J]. Journal of the Korean

Society for Applied Biological Chemistry, 2012, 55(1): 1-6.  
 [2] Zhou Y Q, Gu F P, Zhou C N, et al. Genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* cultivars based on sequence-related amplified polymorphism markers [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125: 789-794.  
 [3] Peng S, Guo Y H, Qi J J, et al. Isolation and expression analysis of tuberous root development related genes in *Rehmannia glutinosa* [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37(2): 1069-1079.  
 [4] Yang Y H, Chen X J, Chen J Y, et al. Differential miRNA expression in *Rehmannia glutinosa* plants subjected to continuous cropping [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11: 53-56.  
 [5] 张中朋. 地黄国际市场前景看好——中国地黄及其制品国内外市场简介 [J]. 中药研究与信息, 2005, 7(4): 43-44.  
 [6] 孙 鹏, 郭玉海, 祁建军, 等. 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析 [J]. 农业科学与技术, 2008, 9(2): 42-44, 66.

代艳艳,廖秋萍,贾桂珍,等. 新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因克隆及鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):24-26.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.007

# 新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因克隆及鉴定

代艳艳,廖秋萍,贾桂珍,周桐,罗福江,周玉琴,王帅,赵丽,刘永宏

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

**摘要:**为了克隆及鉴定新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因,参照 GenBank 登录的微小牛蜱 *Bm86* 基因序列,设计了可以扩增 *Bm86* 基因完整阅读框架的引物,对微小牛蜱进行总 RNA 提取、RT-PCR、克隆、测序、序列分析。结果表明,获得的 *Bm86* 基因长 1 953 bp,与 GenBank 中登录号为 M29321、HQ014398 的微小牛蜱 *Bm86* 基因核苷酸同源性分别为 99%、97%,且为一个完整的开放阅读框架。本研究获得的微小牛蜱 *Bm86* 基因,为获得基因工程疫苗的候选抗原及中国抗微小牛蜱疫苗制备奠定了基础。

**关键词:**南疆;微小牛蜱;*Bm86* 基因;克隆

**中图分类号:** S852.74\*6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0024-03

微小牛蜱为典型的一宿主蜱,是我国分布最广的一个种<sup>[1]</sup>,属于蜱类最常见、危害最大的硬蜱科扇头蜱亚科扇头蜱属<sup>[2]</sup>。该蜱主要生活于农区,在新疆喀什及周边地区多见。该蜱主要寄生于牛,也常寄生于其他家畜和野生动物,也侵袭人类。可引起动物贫血、消瘦、发育不良、产乳量下降或肢体麻痹,更重要的是感染动物免疫抑制,使蜱更易于存活或传播疾病。在我国,微小牛蜱是其他许多寄生虫的传播媒介和传播者,也能自然感染一些人畜共患病等<sup>[3]</sup>。因此做好微

小牛蜱及其蜱传病的防治工作,对新疆乃至全国畜牧业健康发展意义重大。

微小牛蜱 *Bm86* 是 Willadsen 等<sup>[4-5]</sup> 从半饱血微小牛蜱雌蜱肠道分离的一种膜结合糖蛋白,是一种较好的保护性抗原。Penichet 等证实,*Bm86* 抗原在不同株的微小牛蜱肠道细胞膜上均存在,重组 *Bm86* 表达产物对抗药性微小牛蜱也有免疫抵抗作用<sup>[6]</sup>。García - García 等研究发现,在大肠杆菌中 *Bm86* 基因表达的产物为融合蛋白包涵体,用该包涵体免疫的牛对微小牛蜱具有明显的抵抗力<sup>[7]</sup>。李文卉等将 *Bm86* 基因进行真核表达获得了其重组蛋白<sup>[8]</sup>;樊瑞泉等<sup>[9]</sup>、马米玲等<sup>[10]</sup> 将 *Bm86* 基因克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1,转化大肠杆菌后得到能被兔抗微小牛蜱全蜱阳性血清所识别的包涵体。

蜱的防治已成为国内外畜牧业发展迫切须要解决的课题,传统蜱防治方法造成的环境污染、食品安全、药物残留、抗药性等问题日趋严重。免疫防治可使宿主增强免疫力,针对

收稿日期:2014-02-21

基金项目:新疆生产建设兵团博士资金(编号:2012BB023);塔里木大学大学生创新创业训练计划(编号:2013107570030)。

作者简介:代艳艳(1994—),女,河南鹿邑人,研究方向为动物传染病与免疫病理学。E-mail:2275781936@qq.com。

通信作者:赵丽,博士,副教授,主要从事动物疫病研究。E-mail:zhaolidky@126.com。

[7]侯维海,孙鹏,陈全家,等. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 中国农学通报,2011,27(17):76-82.

[8]孙鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄 *RgPR-10* 基因的克隆与表达[J]. 西北农业学报,2009,18(1):300-304.

[9]Yang Y H, Chen X J, Chen J Y, et al. Identification of novel and conserved microRNAs in *Rehmannia glutinosa* L. by solexa sequencing [J]. Plant Molecular Biology Reporter,2011,29(4):986-996.

[10]侯维海. 地黄 ABA、GA 和部分寡糖合成代谢关键酶基因克隆与表达分析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2011.

[11]臧亚超,孙鹏,杨太新,等. 地黄扩展蛋白基因 *RgExpA1* 的克隆与表达分析[J]. 生物技术通报,2012(4):69-73.

[12]周延清,姚换灵,段红英,等. 怀地黄基因片段及其中转座酶基因的克隆与序列分析[J]. 河南农业科学,2012,41(1):106-109.

[13]周延清,张永华,陈艳梅,等. 怀地黄液泡质子泵焦磷酸水解酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 河南农业科学,2013,42(3):107-111,114.

[14]周延清,张永华,张喻,等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析[J]. 中草药,2013,44(1):

76-84.

[15]Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731-2739.

[16]Manning K, Wood D A. Production and regulation of extracellular endocellulase by *Agaricus bisporus* [J]. Microbiol,1983,129(6):1839-1847.

[17]张智俊,杨洋,何沙娥,等. 毛竹纤维素合成酶基因 *PeCesA* 的克隆及组织表达谱分析[J]. 园艺学报,2010,37(9):1485-1492.

[18]田志坚,易蓉,陈建荣,等. 苧麻纤维素合成酶基因 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 作物学报,2008,34(1):76-83.

[19]张永华. 地黄基因 *RgVP*、*RgIKAT* 与 *RghBNG* 的克隆和表达[D]. 新乡:河南师范大学,2013.

[20]Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. BioTechniques,2007,43(5):649-650,652,654.