

# 几种 PCR 方法在克隆鸭肠炎病毒 未知基因中的应用

潘华奇<sup>1,2,3</sup> 曹瑞兵<sup>2</sup> 陈溥言<sup>2</sup> 刘磊<sup>3</sup> 王书锦<sup>1</sup> 潘光炎<sup>3</sup> 胡江春<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所 辽宁 沈阳 110016)

(2. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 江苏 南京 210095)

(3. 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 以 DEV 基因组 DNA 为模板, 用简并 PCR、改良 Targeted gene walking PCR、改良的热不对称交错 PCR 和 Long-PCR, 获得了 5350 bp、11083 bp 和 2905 bp 3 段 DEV 未知基因片段, DNA 序列分析发现包含 9 个开放阅读框, 将这些序列提交 GenBank 分别获得的登录号为: EF554396~EF554403。结果表明, 多种 PCR 方法联合使用可以高效的实现对鸭肠炎病毒未知基因的克隆。

**关键词:** 鸭肠炎病毒, 未知基因, 简并 PCR, Targeted gene walking PCR, 热不对称交错 PCR, Long-PCR

## Application of Several PCR Methods in Cloning Unknown Genes of Duck Enteritis Virus

PAN Hua-Qi<sup>1,2,3</sup> CAO Rui-Bing<sup>2</sup> CHEN Pu-Yan<sup>2</sup> LIU Lei<sup>3</sup>  
WANG Shu-Jin<sup>1</sup> PAN Guang-Yan<sup>3</sup> HU Jiang-Chun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)

(2. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

(3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Degenerate PCR, modified targeted gene walking PCR, modified thermal asymmetric interlaced PCR and Long-PCR were performed with genomic DNA of duck enteritis virus as a template and three fragments (5350 bp, 11083 bp, 2905 bp) of DEV genome were obtained. DNA sequence analysis revealed nine open reading frames encoding *UL3*, *UL4*, *UL5*, *UL25*, *UL26*, *UL27*, *UL28*, and *UL30* gene of DEV, respectively. These sequences have been submitted to GenBank with accession numbers from EF554396 to EF554402. Joint application of several PCR techniques is efficient in cloning unknown genes of duck enteritis virus.

**Keywords:** Duck enteritis virus, Unknown gene, Degenerate PCR, Thermal asymmetric interlaced PCR, Targeted gene walking PCR, Long-PCR

\* 通讯作者: Tel: 86-24-83970386; ✉: hujc@iae.ac.cn

收稿日期: 2009-05-26; 接受日期: 2009-07-27

鸭病毒性肠炎(Duck viral enteritis, DVE), 又名鸭瘟(Duck plague, DP), 是由鸭肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV)引起的鸭、鹅及多种雁形目禽类的一种急性、热性、败血性传染病。在我国, DEV对雏鸭和鹅的毒力不断增强, 而疫苗免疫失败则常有报道<sup>[1]</sup>。DEV是 $\alpha$ -疱疹病毒亚科成员之一, 其病毒基因组为大小约180 kb的线性双链DNA, 基因组结构与其它的 $\alpha$ -疱疹病毒相类似<sup>[2]</sup>。

随着分子生物学的兴起, 对DEV的研究也进入了分子时代, 首先需要解决的就是明确DEV的基因组信息。PCR技术和生物信息学的发展使PCR扩增未知基因变得越来越简单、高效。然而单一的PCR技术常常不能完全克服未知基因克隆中的困难。面对DEV大量的未知基因, 作者结合丰富的生物信息学数据库, 选择性的采用简并PCR(Degenerate PCR)、改良的Targeted gene walking PCR、改良的热不对称交错PCR(Thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)和基于EST标签的Long-PCR, 快速实现了一些DEV未知基因的钓取、基因组步移及基因拼接。相信随着生物信息学数据库的不断完善, 分析手段的不断改进, 针对不同基因的特点, 选择性的将几种PCR技术联合使用能更加简单高效的克隆未知基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DEV疫苗株(No. 020318)为浙江省农业科学院提供。9~11日龄鸭胚购自江苏省禽病研究所繁殖基地, 用于制备鸭胚成纤维原代细胞。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 为本实验室保存, 测序克隆载体pMDT-18为大连TaKaRa公司产品。限制性内切酶, Ex-Taq DNA聚合酶, LA-Taq DNA聚合酶, 核酸分子量标准DL2000与DL15000购自大连TaKaRa公司。MEM细胞培养基为Gibco BRL公司产品, 四季青小牛血清等试剂均购自南京生物工程有限公司, 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 鸭肠炎病毒增值和总DNA的提取:** 参照文献<sup>[1]</sup>进行。

**1.2.2 引物的设计策略:** 应用DNASar7.0和Blast比较分析了 $\alpha$ -疱疹病毒亚科的已知基因组序列, 根据UL27(或gB)蛋白的保守区设计一对简并引物

(Degenerate primer, DP) UL27DP1和UL27DP2, 用以钓取UL27中部较为保守的片段; 根据其他基因(UL2、UL3、UL5、UL28、UL29、UL30)的保守序列设计相应的DP; 根据GenBank已知的UL6和部分UL30基因设计特异性引物UL6SP1和UL30SP1, 分别配对UL5DP1和UL30DP1进行改良的Targeted gene walking PCR, 扩增片段被测序后用以设计下一个特异性引物, 再配对相应基因的DP进行PCR, 这样就实现了基因组的步移; 根据GenBank已知的UL24基因设计3个连续的特异性引物(UL24SP1、UL24SP2、UL24SP3), 设计8个随机简并(Arbitrary degenerate, AD)引物AD1、AD2、AD3、AD4、AD5、AD6、AD7和AD8, 采用TAIL-PCR进行UL25基因的扩增; 根据初步的基因图谱(图1), 通过对已扩增基因的生物信息学分析, 从已知的EST标签中设计一对特异性引物(UL26SP1和UL27SP4), 用Long-PCR实现对两引物间较大未知基因的扩增。其他引物设计参照以上思路设计, 所有引物见表1。引物均由上海Invitrogen公司合成。

**1.2.3 PCR反应:** PCR流程如图1所示, PCR反应体系参照文献<sup>[1,3]</sup>进行。简并PCR反应条件: 94°C 4 min; 94°C 40 s, 50°C 1 min, 72°C 90 s, 35个循环; 72°C 10 min。同时设有每条简并引物对照, 及阴性模板对照。改良Targeted gene walking PCR采用通用的降落PCR反应条件: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 58°C(每个循环降0.5°C) 1 min, 72°C 90 s, 20个循环; 94°C 40 s, 50°C 1 min, 72°C 90 s, 15个循环; 72°C 10 min。设阴性模板对照。改良TAIL-PCR反应条件见表2。Long PCR反应条件: 95°C 4 min; 94°C 40 s, 50°C 1 min, 72°C 5 min, 35个循环; 72°C 10 min。设阴性模板对照。

**1.2.4 PCR产物的克隆和测序:** 反应结束后取5  $\mu$ L PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。分析正确后, 其余PCR产物用琼脂糖凝胶试剂盒回收, 按说明书操作。回收产物连接pMDT-18后经蓝白斑筛选后送阳性菌株至Invitrogen公司测序。

**1.2.5 序列分析:** 将上述简并PCR, Targeted gene walking PCR, TAIL-PCR, Long-PCR反应产物测序后, 通过DNASar7.0和Blast比对分析后拼接, Genscan和DNASar预测分析其包括的ORF(Open reading frame), 并向GenBank提交DEV新基因序列。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 1 PCR 所使用的引物  
Table 1 The primers used in PCR

Expectant target gene	Primer	Sequence (5'- 3')
5'- <i>UL5</i> gene	<i>UL6SP1</i>	CCGATGTGTTGGCCTTCCG
	<i>UL5DP1</i>	GTYTGWGTAGGSGANCCNAC
Internal <i>UL5</i> gene	<i>UL5SP1</i>	GATGGTAAGGCTCCAGTCT
	<i>UL5DP2</i>	GTCATRGCNAGYTTNGANCT
3'- <i>UL5</i> gene, <i>UL4</i> gene and 5'- <i>UL3</i> gene	<i>UL5SP2</i>	ATATGGCCACTGTGGTAGA
	<i>UL3DP1</i>	AYAARAGCYTGCARATGTT
3'- <i>UL3</i> gene and 5'- <i>UL2</i> gene	<i>UL3SP1</i>	TCGGACTTATTGTCAGACAT
	<i>UL2DP1</i>	CTGGTNTTYATGYTNTGGGG
Internal <i>UL27</i> gene	<i>UL27DP1</i>	ACNTCNGTMAAYTYAT HGTNGA
	<i>UL27DP2</i>	AACAARNGGNCGGWTRTARCA
5'- <i>UL26</i> gene and 3'- <i>UL27</i> gene	<i>UL26SP1</i>	ATCTGCGGCTAGTGCGGAAA
	<i>UL27SP4</i>	CTTCCAGGAGGATCGTCATG
Internal <i>UL28</i> gene	<i>UL28SP1</i>	TCCTTCTTCTGGCTGCTGTTG
	<i>UL28DP1</i>	TTYTGARGARCTNTGYGTNAC
5'- <i>UL28</i> gene and 3'- <i>UL29</i> gene	<i>UL28SP2</i>	TATTTGCTTTGTTATATGGTCGC
	<i>UL29DP1</i>	CCTAATGCCCAGTGGTTCTGGA
3'- <i>UL30</i> gene	<i>UL30SP1</i>	GCAGTGGAATTACTTGGCCGTTTG
	<i>UL30DP1</i>	GACTGGCTNCGNATGMGNAA
Internal <i>UL30</i> gene	<i>UL30SP2</i>	AGTTGGAATCTTGGCTCGTAT
	<i>UL30DP2</i>	CCMGARTTYGTNACNGGNTA
5'- <i>UL30</i> gene	<i>UL30SP3</i>	GTCCATAAACAGTGGTCAAT
	<i>UL30DP3</i>	CACGTNTAYGACATNGTNGA
5'- <i>UL30</i> gene and 5'- <i>UL29</i> gene	<i>UL30SP4</i>	TGCCACTTCTTACCACATTCGCTTA
	<i>UL29SP1</i>	GCAGCGTACTCATCACTAAACCGTT
5'- <i>UL25</i> gene	<i>UL24SP1</i>	AGAATACGGTTATGATGGCAAGCA
	<i>UL24SP2</i>	TAGCGATACAGAGACACAAATAGG
	<i>UL24SP3</i>	TTCAGACCAACTAAACACT
3'- <i>UL25</i> gene	<i>UL25SP1</i>	TTAAATCGCGCGCGTCCAATGGC
	<i>UL25SP2</i>	GCCCAAACCATGAAAAGCGATAA
	<i>UL25SP3</i>	CTTTGCGAGCGTTATATGGC
5'- <i>UL27</i> gene	<i>UL27SP1</i>	ATGTTCTCTAGATTCGGTTGGTCC
	<i>UL27SP2</i>	GGAATGGAGACATA TTGACAACG
	<i>UL27SP3</i>	TATTGACAACGTCTCCATTC
	AD1	TACCANGTNCRAA
	AD2	GCNRCNARNCCNGGRAA
	AD3	AAATATNGCNGCNGC
	AD4	GCANARNGCNACRTG
	AD5	CACNARYTGRTRTA
AD6	TCAGSTWTSWGWWT	
AD7	CAGXAGWAXCAWAG	
AD8	GTACASTWTSWGWTT	

Note: B=G+C+T, K=G+T, M=G+T, N=A+G+C+T, R=A+G, S=G+C, W=A+T, Y=C+T.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

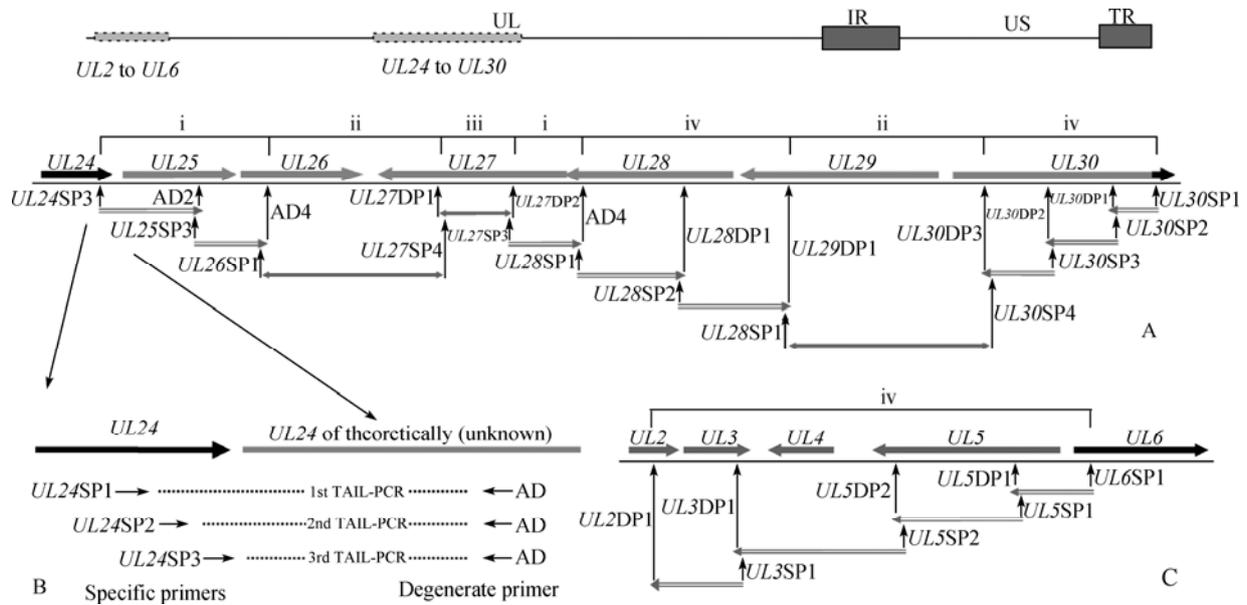


图 1 PCR 扩增 DEV 基因的策略

Fig. 1 The strategy for PCR amplification of DEV genes

注: DEV 基因组结果根据人疱疹病毒 1 型绘制, 箭头指示引物的位置. A: 克隆 UL25 到 UL30 的流程; B: TAIL-PCR 扩增流程; C: 克隆 UL2 到 UL5 的流程; i: 改良的 TAIL-PCR; ii: Long-PCR; iii: 简并 PCR; iv: 改良的 targeted gene walking PCR.

Note: The genomic structure scheme presented here is drawn according to the human herpesvirus type 1, primer positions and amplification directions are shown with arrow. A: Cloning UL25 to UL30 genes; B: Amplification of the downstream sequence by TAIL-PCR; C: Cloning UL2 to UL5 genes; i: Modified TAIL-PCR; ii: Long-PCR; iii: Degenerate PCR; iv: Modified targeted gene walking PCR.

表 2 TAIL-PCR 在 GeneAmp System 9600 循环控制程序  
Table 2 Cycling conditions used for TAIL-PCR on the GeneAmp System 9600

Reaction	File No.	Cycle No.	Thermal condition
Primary	1	1	98°C (40 s)
	2	5	98°C (15 s), 62°C (1 min), 72°C (2 min)
	3	1	98°C (15 s), 30 °C (3 min), ramping to 72°C over 3 min, 72°C (2 min)
	5	12	98°C (5 s), 62°C (1 min), 72°C (2 min)
			98°C (5 s), 62°C (1 min), 72°C (2 min)
	6	1	98°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
Secondary			72°C (5 min)
	7	12	98°C (5 s), 62°C (1 min), 72°C (2 min)
			98°C (5 s), 62°C (1 min), 72°C (2 min)
			98°C (5 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
Tertiary	6	1	72°C (5 min)
	8	30	98°C (10 s), 44°C (1 min), 72°C (2 min)
		1	72°C (5 min)

## 2 结果

1 个简并 PCR, 9 个改良 Targeted gene walking PCR, 3 个改良 TAIL-PCRs, 1 个 Long-PCR 均被成功执行, 而 1 个 Long-PCR 扩增失败。部分 PCR 产

物电泳结果见图 2。序列拼接分析显示, 获得 5350 bp、11083 bp 和 2905 bp 3 段 DEV 核苷酸片段, 包含的 ORF 有 UL3、UL4、UL5、UL25、UL26、UL26.5、UL27、UL28 和大部分 UL30 基因, 获得 GenBank 基因登录号: EF554396~EF554403。结果见表 3。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

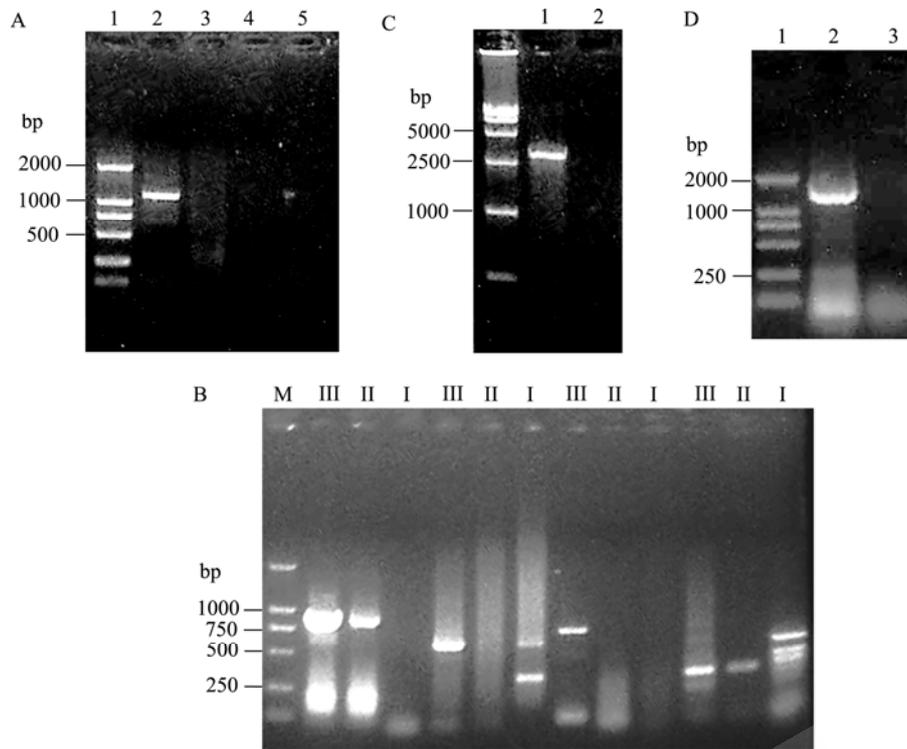


图 2 部分 PCR 扩增 DEV 基因的琼脂糖电泳鉴定结果

Fig. 2 Agarose gel analysis of partial PCR products for amplification of DEV genes

注: A: 简并 PCR 扩增 *UL27* 基因中部的琼脂糖电泳结果。1: DNA 分子量 Marker (DL2000); 2: 引物 *UL27DP1* 和 *UL27DP2* 扩增约 1200 bp 片段; 3: 引物 *UL27DP1* 对照; 4: 引物 *UL27DP2* 对照; 5: 阴性模板对照; B: 改良 TAIL-PCR 扩增 *UL27* 基因 5'-端的琼脂糖电泳结果。使用三个特异性巢式引物 *UL27SP1-UL27SP2-UL27SP3* 分别与随机简并引物 AD1, AD2, AD3, AD4 相匹配扩增的电泳鉴定; M: DNA 分子量 Marker (DL2000); I, II 和 III 分别表示 TAIL-PCR 的第一轮, 第二轮和第三轮反应; C: Long-PCR 扩增 *UL27* 基因 3'-端和 *UL26* 基因 3'-端的琼脂糖电泳结果。1: DNA 分子量 Marker (DL15000); 2: 引物 *UL26SP1* 和 *UL27SP4* 扩增约 3000 bp 片段; 3: 阴性模板对照; D: 改良的 targeted gene walking PCR 扩增 *UL5* 基因中部的琼脂糖电泳结果。1: DNA 分子量 Marker (DL2000); 2: 引物 *UL5SP1* 和 *UL5DP2* 扩增约 1500 bp 片段; 3: 阴性模板对照。

Note: A: Identification of the degenerate PCR product for internal *UL27* gene. 1: DNA molecular weight marker (DL2000); 2: The amplified 1200 bp fragment by *UL27DP1* and *UL27DP2*; 3: Control with primer *UL27DP1*; 4: Control with primer *UL27DP2*; 5: Control with negative template; B: Agarose gel analysis of modified TAIL-PCR products for amplification of the 5'-terminal of DEV *UL27* gene. Using primers *UL27SP1-UL27SP2-UL27SP3* and AD1, AD2, AD3, AD4 from right to left respectively; M: DL 2000 marker; I, II and III were primary, secondary and tertiary reaction of TAIL-PCR, respectively; C: Identification of the Long-PCR product. 1: DNA molecular weight marker (DL15000); 2: The amplified 3000 bp fragment by *UL26SP1* and *UL27SP4*; 3: Control with negative template; D: Identification of the modified targeted gene walking PCR product for internal *UL5* gene. 1: DNA molecular weight marker (DL2000); 2: The amplified 1500 bp fragment by *UL5SP1* and *UL5DP2*; 3: Control with negative template.

表 3 获得的部分 DEV 基因组中包含的 ORFs 及其 GenBank 登录号

Table 3 The ORF's and accession numbers of GenBank in the partial genome of DEV

Gene	Size (bp)	GC (%)	Accession No.
<i>UL3</i>	720	48.06	EF554396
<i>UL4</i>	714	43.98	EF554397
<i>UL5</i>	2568	42.41	EF554398
<i>UL25</i>	1797	44.46	EF554399
<i>UL26</i>	2124	48.31	EF554400
<i>UL26.5</i>	1074	49.53	EF554400
<i>UL27</i>	2796	44.64	EF554401
<i>UL28</i>	2412	45.32	EF554402
<i>UL30*</i>	3273	44.21	EF554403

Note: \*: Partial *UL30* gene sequence.

### 3 讨论

试验在生物信息学分析的基础上, 充分利用 DEV 已知的 EST, 采用多种 PCR 技术, 获得了 5350 bp、11083 bp 和 2905 bp 三段 DEV 未知核苷酸片段, 充分体现了 PCR 在克隆未知基因中的魅力。众所周知, 病毒不同于细菌、动物和植物, 它需要在宿主细胞中才能不断复制, 这样就造成了总病毒基因组中往往污染有大量宿主 DNA, 这使得鸟枪法、文库法应用受到限制, 而高纯度病毒粒子的获得需要高昂的仪器设备并花费大量的时间, 在普通实验室不易操作。由此可见 PCR 方法在克隆病毒未知基因中具有

独特的优势。

简并 PCR (Degenerate PCR) 是 20 世纪 90 年代初建立的用于细胞遗传学中特异扩增 DNA 的技术方法。Teleniu 等<sup>[4]</sup>人也称其为简并寡核苷酸引物 PCR (Degenerate oligonucleotide primed PCR, DOI-PCR)。作者根据疱疹病毒 gB 蛋白保守氨基酸基序, 设计了一对简并引物, 成功扩增得到 1200 bp 片段。利用具有非常保守的基因序列, 进行简并 PCR 可以非常直接快速的获得未知目的基因。分析疱疹病毒基因组, 除 UL27 外发现其 UL2、UL5、UL19、UL28、UL29、UL30、UL39、UL40、UL50、UL52 均可以通过设计简并引物进行简并 PCR 扩增获得, 这样就能获得覆盖整个 DEV 基因组具有一定跨度的 EST, 最终为用 PCR 获得整个 DEV 基因组全序列提供了必要的桥梁。由于时间的限制, 本实验选择了 DEV 基因组的一小部分作为研究对象, 利用 UL2、UL5、UL27、UL28、UL29、UL30 的保守序列设计了一系列简并引物并成功扩增。

Targeted gene walking PCR 是以已知序列为出发点, 采用特异性引物与非特异性 walking primer 相结合扩增已知序列相邻未知序列的方法, 可以通过设计多条特异性引物, 使下游引物对上游引物的 PCR 产物进行验证, 达到用巢式 PCR 筛选目标基因的目的<sup>[5]</sup>。我们通过 DNA 序列分析仅设计了一个特异性引物配对一个简并引物, 就可以高效的扩增相邻未知 DNA。另外所有的 Targeted gene walking PCR 反应可以用一个通用的降落 PCR 来实现, 非常简单高效。

TAIL-PCR 是 Liu 等<sup>[6, 7]</sup>设计的一种用于获得已知序列侧翼片段的方法。在研究中我们对 TAIL-PCR 的一些条件进行了修饰, 如使用 LA-Taq 保证了扩增的保真性, 使用 98°C 变性既有利于充分变性又可以节省时间。TAIL-PCR 成功的关键是选择合适的特异引物和简并引物, 一套合适的引物可以使反应表现很高的特异性, 而且能够得到长度在 1 kb~2 kb 左右的产物。有研究认为在 TAIL-PCR 中第 1 个反应最为重要, 它是特异性和非特异性扩增之间的控制步骤, 而且可以通过较高严谨度的循环有效降低非特异性扩增<sup>[8]</sup>。在本研究中发现前两个 TAIL-PCR 都很关键, 而且特异性引物的长度是成功的保证, 一般特异性引物需要 23 mer~30 mer, Tm>60°C 才能顺利扩增。另外, 我们还有目的地使用了随机简并引

物, 其中 AD2(FPGLA/V), AD3(AAAIF)是根据疱疹病毒 UL25 保守基序设计, AD4(HVALC) 是根据疱疹病毒 UL26 保守基序设计, 这样不仅大大增加了成功的几率, 而且得到了更长更可能正确的片段。

Long-PCR 是依赖于 LA-Taq DNA 聚合酶(Long and accurate Taq DNA polymerase)的 PCR 技术<sup>[9]</sup>, 使用 LA-Taq 不仅可以保证 PCR 反应的高保真性, 而且能获得长达 20 kb 以上的基因片段<sup>[10]</sup>, 这极大地增加了 PCR 克隆的容量。GC buffer 是 TaKaRa 公司开发的专门用于扩增复杂及高 G+C%含量的基因组模板。我们在准确分析 DEV 基因组结构的基础上试图扩增位于两个已知基因之间的未知片段, 但一直很难实现, 我们考虑到基因组的复杂性和不可预知性后改用 GC buffer, 并获得成功。在扩增中使用 LA-Taq 保证了扩增的准确性, 也获得了约 3000 bp 的较长片段。另外一个 Long-PCR 一直没有成功扩增, 分析主要原因可能是由于片段较长, 需要更高质量的模板。

从这次研究中, 可以归纳出一个用 PCR 克隆未知基因, 甚至基因组的通用策略: 分析同源的氨基酸和核苷酸信息, 设计简并引物进行简并 PCR, 对于高纯度的 DNA 模板, 可采用随机 PCR, 以获得宝贵的 EST 序列; 然后进行基因组步移, 如果邻近序列较为保守能设计简并引物, 则可用改良的 Targeted gene walking PCR, 否则用 TAIL-PCR 进行扩增; 最后, 当基因组步移到两个 EST 足可以用 Long-PCR 扩增时, 可尝试进行 Long-PCR, 如不成功可继续基因组步移, 然后再用 Long-PCR, 直至成功。

致谢: 特别感谢上海兽医研究所的邱亚峰博士、宁夏医学院的苏春霞博士、王秀清博士, 以及扬州大学的周海霞博士在实验设计和技术方面提供的帮助和讨论。

## 参 考 文 献

- [1] 潘华奇. 鸭肠炎病毒 gB 基因的克隆与表达及其产物的初步应用. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2007: 12-14.
- [2] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1073-1081.
- [3] Pan H, Cao R, Liu L, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the duck enteritis virus UL5 gene.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- Virus Research*, 2008, **136**(1/2): 152–156.
- [4] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, *et al.* Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate. *Genomics*, 1992, **13**(3): 718.
- [5] Parker JD, Rabinovitch PS, Burmer GC. Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**(11): 3055–3060.
- [6] Liu YG, Whittier RF. 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.
- [7] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, *et al.* Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, **8**: 457–463.
- [8] Liu YG, Huang N. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant Mol Biol Rept*, 1998, **16**: 75–181.
- [9] Mukai H, Nakagawa T. Long and accurate PCR(LA-PCR). *Nippon Rinsho*, 1996, **54**: 17–22.
- [10] Nakayama T, Soma M, Izumi Y, *et al.* Organization of the human prostacyclin synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 803–806.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年，是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：基础微生物学研究；农业微生物学研究；工业微生物学研究；医学微生物学研究；食品微生物学研究；环境微生物学研究；微生物功能基因组研究；微生物蛋白组学研究；微生物模式菌株研究；微生物工程与药物研究；微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖，2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版，由双月刊改为月刊，更换了彩色封面，纸张改用铜版纸，由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本（210×297），发表周期缩短，内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2010 年的每册定价为 48 元，全年 576 元，我们将按期免费邮寄。

另，本刊编辑部现存有少量过期期刊，如有需要者可直接与编辑部联系，款到即免费寄上。（请事先与编辑部联系，获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量）

邮购地址：（100101）北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel：（010）64807511；E-mail：tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; Http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号：2-817；国外发行代号：BM413

<http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>