

一种改进后的重叠延伸 PCR 法对被孢霉重组载体的构建

孟祥亮¹ 王宁新¹ 牛丽华¹ 李培光¹ 李洋¹ 黄大卫^{1,2}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018 ; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 为了提高 DNA 大片段的拼接效率, 通过引入逐次退火的 PCR 的方法, 改良了传统的重叠延伸 PCR 方法。逐次退火 PCR 法, 一方面延长了重叠区的 PCR 引物长度; 另一方面把原来在 1 个循环中 1 个退火温度改成若干个, 逐次降低退火温度, 适用于 T_m 值相差比较大的引物 相邻的退火温度之间相差 3-6。结果显示 通过此种方法成功拼接了 ω3(2) 和 HCT 两个大片段; PCR 产物电泳条带单一, 克隆测序证实序列完全正确, 可以直接应用于后续试验。这种改进后的方法可以有效减少非特异性扩增, 提高灵敏度, 把这种方法称之为逐次退火重叠延伸 PCR。

关键词: 逐次退火 重叠区域 PCR 突变 拼接

DNA Molecule Construction by a Modified Overlap Extension PCR

Meng Xiangliang¹ Wang Ningxin¹ Niu Lihua¹ Li Peiguang¹ Li Yang¹ Hung Dawei^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018 ; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: In order to assemble large fragments of DNA sequence efficiently, the study modified a advanced method, successive anneal overlap extension PCR, base on the traditional overlap extension PCR. The method of successive anneal overlap extension PCR lengthens the primer sequences corresponding to overlapping region between two fragments and uses successive annealing ranging from 3 to 6 in each single PCR cycles of the second PCR process. In this study, we assembled two large DNA fragments, ω3(2) and HCT, using this advanced method. A single band was obtained with the PCR product and the sequence was proved to be right after sequencing repectively, which would contribute to next experiments. This modified method has higher specificity and sensitivity, and is called successive anneal overlap extension PCR.

Key words: Successive anneal Overlap extension PCR Mutagenesis Splice

重叠延伸 PCR (overlap extension PCR or OEP-PCR)^[1] 是通过 PCR 的方法进行 DNA 片段改造的技术, 它可以进行基因拼接^[2] 或者基因定点突变^[3]。重叠延伸 PCR 一般包括两轮 PCR 反应, 第一轮 PCR 形成具有重叠区域的 DNA 片段; 在第二轮 PCR 中, 具有重叠区域的位置互补结合, 由两侧的引物共同引导目的 DNA 片段的合成。基因拼接是把不同的 DNA 片段连接在一起, 通过此种方法可以研究基因或者启动子的功能^[4]; 而基因定点突变是在基因特定的位置发生碱基替代、插入或者缺失, 可以研究基因或者蛋白特定区域的功能。除上述作用外, 重叠延伸 PCR 还能够基于 PCR 方法精确合成

长 DNA 片段, 获得高水平表达的全新基因, 使得基因功能的研究摆脱了材料的限制^[5]。

重叠延伸 PCR 快速、简单, 不需要限制性内切酶即可以进行片段连接^[2], 这大大地缩短了构建载体的时间。为适应不同的应用需求, 重叠延伸 PCR 已有多种变化。其中, 长引物 (megaprimer)^[6] 扩增方法在进行定点突变时, 不需要对第一轮 PCR 产物进行纯化, 只需补充引物和酶类即可完成。此方法的关键是两轮 PCR 反应采用 T_m 值相差比较大的引物。

重叠延伸 PCR 功能强大, 但是在实际操作过程中, 如果基因片段比较长或者是序列有特殊结构,

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NSFC 31101634)

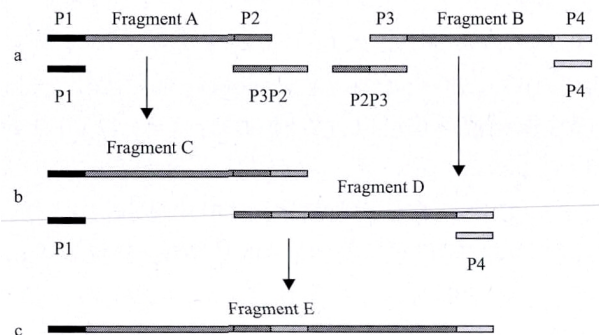
作者简介: 孟祥亮, 男, 硕士, 研究方向: 真菌改造; E-mail: mengxiangliangoo@126.com

通讯作者: 黄大卫, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 协同进化与分子系统发育; E-mail: huangdw@ioz.ac.cn

容易出现非特异性扩增、弥散等情况,也容易发生碱基突变、插入和缺失等问题,就会大大增加片段融合的难度,影响此种方法的使用效率。降落重叠延伸 PCR^[7]是把降落 PCR 和重叠延伸 PCR 相结合,提高了引物结合的特异性。但是此种方法增加了循环数,一共使用了 48 个循环,这大大地增加了碱基突变的概率。

基于上述问题,我们在重叠延伸 PCR 的过程中加入逐次退火的方法,并将这种方法融合片段与传统的重叠延伸 PCR 方法进行比较,摸索出一种改良方法来进行 DNA 片段的拼接。这种改良后的方法不会增加 PCR 的循环数,但有利于 DNA 片段的拼接。在重叠区域引物设计时增加重叠区域的长度,由原来的 18-24 个碱基增加到 30-45 个;而两侧的引物与模板互补碱基相对较少。在本试验中,重叠区域长度为两个引物的长度,引物设计如图 1 所示。

在退火温度方面,主要设计是通过把退火温度由一个变成若干个,在第二轮 PCR 过程中的每个单一循环采用逐次降低退火温度的方法,当退火温度由高温向低温变化时,使得引物依次结合到模板上。在图 1 中,P1、P3 引物的 T_m 值比较高,两侧的引物 P1、P4 T_m 值较小。以高 T_m 值(T_m 值计算由铂尚生物提供)为高的退火温度,以 P1、P4 的 T_m 值为低的退火温度。如果这两个 T_m 值相差特别大,可以在两个退火温度之间再加入几个退火温度,一般每两个退火温度相差 3-6。每个退火温度时间的设置也是不同的,前几个退火温度停留 1 s,最后一个退火温度是正常的时间(30 s)。



引物 P1 与 P2、P3 与 P4 分别用来形成片段 A 和 B,形成的片段 C 和 D 作为模板合成片段 E。引物 P2P3 与 P3P2 代表使用比较长的重叠区域

图 1 改进后的重叠延伸 PCR 图示

在本研究中,所采用的材料来自于高山被孢霉,其中 $\omega 3$ 基因是 *M.alpina* 中编码一种去饱和酶的基因,这种去饱和酶能够催化脂肪酸去饱和,使得 n-6 途径的不饱和脂肪酸生成 n-3 途径的不饱和脂肪酸^[8],敲除这个基因能够抑制 n-3 途径的产物生成。而 *sdhB* 基因是 *M.alpina* 中编码琥珀酸脱氢酶上的铁硫亚基的基因,其 cDNA (819 bp) 上 728 位碱基由 A 变成 C 后,可以对萎秀灵产生抗性^[9],称之为 CBXB 基因,可以用来作为抗性筛选基因。H4.1 的启动子和终止子来源于质粒 pD4。

1 材料与方法

1.1 材料

高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 购自中国农业微生物菌种保藏中心,质粒 pD4 由英国诺维奇科研公园 Donald 教授提供,Transtart FastPfu DNA 聚合酶等试剂由北京全式金生物技术有限公司无偿提供。

1.2 方法

1.2.1 选用的融合片段和引物 $\omega 3a$ (1.6 kb) 为 $\omega 3$ 基因的上游侧翼序列,由引物 $\omega 3aF$ 和引物 $\omega 3aR$ 扩增;引入重叠区域和限制酶切位点使用的引物是 $\omega 3aF$ (1)、 $\omega 3aR$ (1) 和 $\omega 3aR$ (2)、 $\omega 3b$ (1.4 kb) 为 $\omega 3$ 基因下游的侧翼序列,由引物 $\omega 3bF$ 和 $\omega 3bR$ 扩增;引入侧翼序列使用的引物是 $\omega 3bF$ (1)、 $\omega 3bF$ (2) 和 $\omega 3bR$ (1)。使用引物 $\omega 3aF$ (1) 和 $\omega 3aR$ (1) 扩增的片段 $\omega 3a$ (1),与引物 $\omega 3bF$ (1) 和 $\omega 3bR$ (1) 扩增的片段 $\omega 3b$ (1) 进行融合形成全长片段 $\omega 3$ (1) (3 kb);使用引物 $\omega 3aF$ 、 $\omega 3aR$ (2) 扩增的片段 $\omega 3a$ (2),和引物 $\omega 3bF$ (2)、 $\omega 3bR$ 扩增的片段 $\omega 3b$ (2) 融合形成全长片段 $\omega 3$ (2) (3 kb)。

sdhB 基因由引物 *sdhBF* 和引物 *sdhBR* 扩增,由引物 CBXBF 和 CBXBR 引入重叠区域。H4.1 启动子和终止子 TrpC 基因从质粒 pD4 扩增得到。启动子 H4.1 由引物 H4.1F 和 H4.1R 扩增^[10],由引物 HP1F 和 HP1R 引入重叠区域和酶切位点。终止子由引物 TTF 和 TTR 扩增出来。引入酶切位点和重叠区域之后使用的引物:TT1F 和 TT1R。由引物 H4.1F 和 HP-1R 扩增的片段 HP1 (1 kb)、CBXBF 和 CBXBR 扩增的片段 CBXB (0.8 kb),与 TT1F 和 TTR 扩增的片段 TT1 (0.7 kb) 融合形成全长片段 HCT (2.5 kb)。

表1 用来扩增 $\omega 3$ 片段所需的引物

引物	引物序列 (5'-3')	Tm ()
$\omega 3aF$	ATCGACTATCGAGTTTGGAG	53.4
$\omega 3aR$	GTGATCCACGCAGGAAGTCT	57.4
$\omega 3aF(1)$	CCGGAATTCATCGACTATCGAGTTTGGAG	63.7
$\omega 3aR(1)$	AGCGACGGTCGGATCCGTGATCCACGC-AGGAAGTCT	71.1
$\omega 3aR(2)$	TCATACAGAGGAGCGACGGTCAATTC-GTGATCCACGCAGGAAGTCT	71.1
$\omega 3bF$	GACCGTCGCTCCTCTGTATGA	59.5
$\omega 3bR$	GTAATACGACTACTATAGGGC	55.8
$\omega 3bF(1)$	CGTGGATCACGGATCCGACCGTCTGCTCC-TCTGTATGA	70.8
$\omega 3bF(2)$	AGAGTTCTCGTGGATCACGAATTCGA-CCGTCGCTCCTCTGTATGA	71.1
$\omega 3bR(1)$	GCTCTAGAGCGTAATACGACTACTATA-GGGC	64.8

引物的 Tm 值由上海铂尚生物技术有限公司提供

表2 用来扩增 HCT 片段所需的引物

引物	引物序列 (5'-3')	Tm ()
sdhBF	ATGTCCCTCTCTATTGCCAAGC	57.7
sdhBR	TACTCCAAAGCCATGGTCTTC	55.8
CBXBF	CACCCAACACTCTCTCAACAATCATGTCC-CTCTCTATTGCCAAGC	68.8
CBXBR	GCTGTTTGATGATTTCCAGGATTTACTCC-AAAGCCATGGTCTTC	65.4
H4.1F	AAGCGAAAGAGAGATATGAAACA	52.4
H4.1R	TCTAGAAAGAAGGATTACCTC	51.7
HP1F	CGGAATTCGAAGCGAAAGAGAGATATGA-AACA	59.6
HP1R	GCTTGGCAATAGAGAGGGACATGATTG-TTGGAGAGAGTGTGGGTG	68.8
TTF	GATCCACTTAACGTTACTGAA	51.7
TTR	TCTAGAAAGAAGGATTACCTC	51.7
TT1F	GAAGACCATGGCTTTGGAGTAAGATCC-ACTTAACGTTACTGAA	65.4
TT1R	CGGAATTCGATCTCTAGAAAGAAGG-ATTACCTC	64.4

1.2.2 融合 PCR 反应 对于 $\omega 3$ 基因侧翼序列的融合采用了常规的融合方法和逐次退火重叠延伸 PCR 扩增两种方法, 两种引物设计; 而对于 HCT 融合只采用一种方法。使用引物 $\omega 3aF(1)$ 和 $\omega 3aR(1)$ 扩增的片段 $\omega 3a(1)$, 与 $\omega 3bF(1)$ 和 $\omega 3bR(1)$ 扩增的片段 $\omega 3b(1)$ 进行融合形成全长片段 $\omega 3(1)$, 使用引物 $\omega 3aF$ 和 $\omega 3aR(2)$ 扩增的片段 $\omega 3a(2)$, 和引物 $\omega 3bF(2)$ 和 $\omega 3bR$ 扩增的片段 $\omega 3b(2)$ 融合形成全长片段 $\omega 3(2)$ 。

其中 $\omega 3(1)$ 片段采用的引物 Tm 值与重叠区相近, 而对于 $\omega 3(2)$ 和 HCT 片段的融合采用的引物 Tm 值与重叠区是不相同的。中间引物设计具有比较长的重叠区域, 在本试验中重叠区域具有两个相邻片段引物长度。引物 Tm 值与重叠区不同的 PCR 反应采用逐次退火方法。

第一轮 PCR 即引入重叠区或者限制性酶切位点的体系是: 模板 4 μL , Buffer 8 μL , dNTPs (2.5 mmol/ μL) 5 μL , 引物 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) 各 1 μL , Transtart FastPfu (2.5 U/ μL) 1 μL , ddH₂O 30 μL 。扩增模板之后纯化备用。在融合 PCR 体系中, 每个模板一般添加 100 ng 左右, 加入的体积根据模板的浓度进行变化, 最后由 ddH₂O 补充至 50 μL 。

第一轮 PCR 反应引入重叠区域, 通过常规 PCR 条件即可得到。对于使用 Tm 值相似的引物扩增的模板 $\omega 3$ 进行融合形成的全长 $\omega 3(1)$, 程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 退火温度为梯度 (59-67 $^{\circ}\text{C}$), 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min 10 s; 最后延伸 5 min。

采用 $\omega 3aF$ 、 $\omega 3aR(2)$ 、 $\omega 3bF(2)$ 和 $\omega 3bR$ 扩增的模板进行融合形成的全长 $\omega 3(2)$ 。退火温度是从高 Tm 值向低 Tm 值逐次降低, 高 Tm 值降低 5 $^{\circ}\text{C}$, 低 Tm 值不变。PCR 程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 退火采用逐次降低的方法: 66 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 61 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 57 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min 10 s, 最后延伸 5 min。逐次退火温度也可以设置成 61 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 57 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。

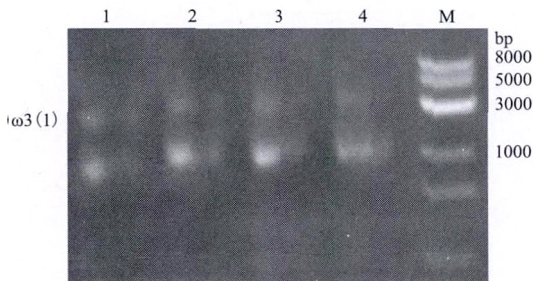
对于 HCT 片段的扩增, 采用引物 H4.1F 和 HP1R, CBXBF 和 CBXBR, TT1F 和 TTR 扩增的片段进行融合 PCR。PCR 程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 变性 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s; 退火 65 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 56 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 50 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 最后延伸 5 min。逐次退火温度也可以设置成 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 57 $^{\circ}\text{C}$, 1 s; 53 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。

1.2.3 PCR 产物分析及测序 对于片段 $\omega 3(1)$ DNA 片段, 割胶纯化之后获得的 DNA 量少, 转化不成功。而对于扩增的 $\omega 3(2)$ 和 HCT DNA 片段纯化之后克隆到载体 pEASY-Blunt Zero 克隆载体 (北京全式金生物技术有限公司) 之后, 在上海铂尚生物技术有限公司进行测序 (ABI 3730 测序仪)。

2 结果

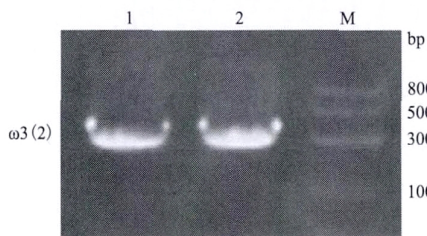
2.1 PCR结果分析

利用 T_m 值相近的引物扩增片段 $\omega 3(1)$ 通过调整条件能够扩增出目的片段(图2), 而利用重叠区域比较长的引物进行扩增, 同时使用逐次退火的 PCR 条件, 形成的条带单一, 稳定, 重复性好的 PCR 产物(图3)。即使是两侧的引物 5' 端添加酶切位点, 也会得到相同的效果。扩增 HCT 融合片段, 采用逐次退火温度也能够形成很单一的目的片段(图4)。



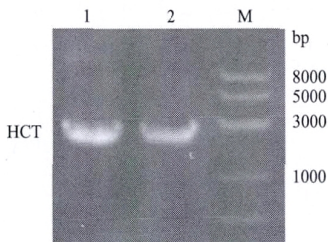
1-4 退火温度分别是 59, 59.5, 60.5 和 61.9 °C; M: DNA marker (Trans 8 k DNA marker)

图2 $\omega 3(1)$ DNA 片段的琼脂凝胶成像分析



1, 2 : $\omega 3(2)$ DNA fragments ; M : DNA marker (Trans 8 k DNA marker)

图3 $\omega 3(2)$ DNA 片段的琼脂糖凝胶成像分析



1, 2 : HCT DNA 片段 ; M : DNA marker (Trans 8 k DNA marker)

图4 HCT DNA 片段的凝胶成像分析

2.2 融合片段序列分析

对 HCT 和 $\omega 3(2)$ 片段进行测序, 其序列一致性达到 99.92%。随机挑选 3 个样本测序(图5), 均

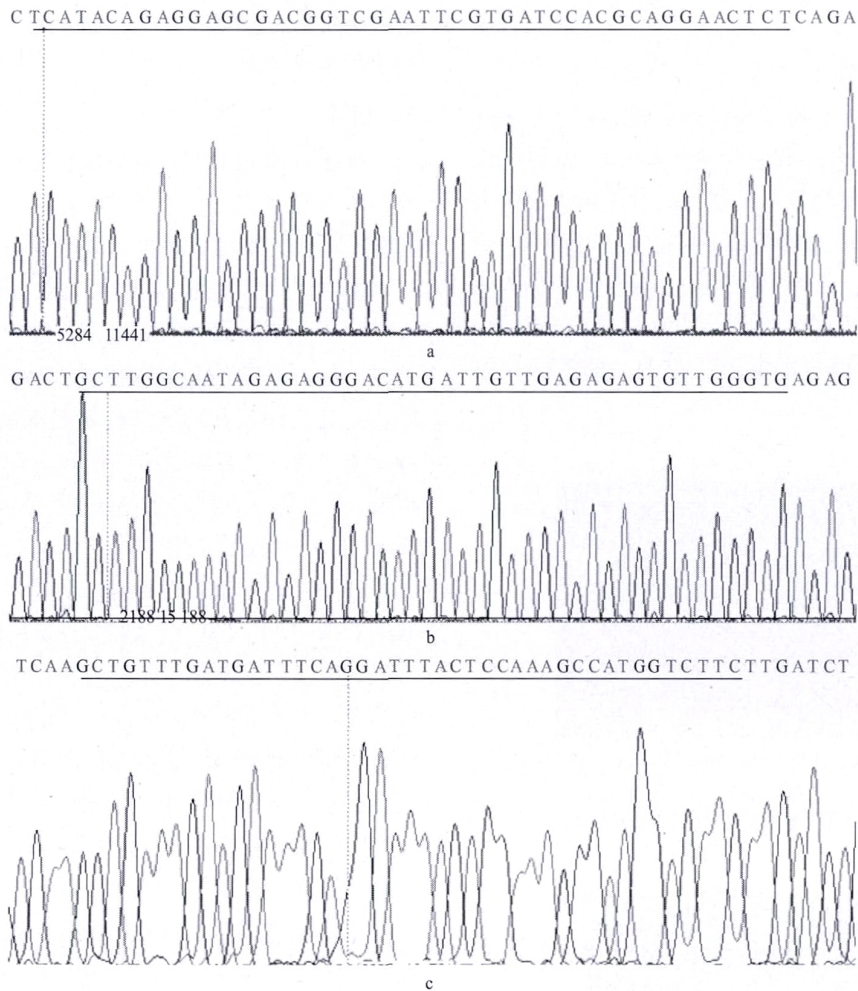
能够获得完全正确的序列, 正确 DNA 片段可以用来构建表达载体。

3 讨论

重叠延伸 PCR 是一种基因拼接和定点突变的技术, 这项技术已经发展了 20 多年^[11], 用途广泛, 简单易操作, 使用普通的 PCR 仪即可完成。这种方法要求设计的引物具有相同 T_m 值, 或者 T_m 相差不大^[3]。但是有时候在实际操作过程中产生非特异性扩增、目的条带弥散或者是目的 DNA 扩增量少的现象。尤其当序列有特殊结构如局部高 GC 含量、含有重复序列, 更容易是第二轮 PCR 时产生非特异性扩增, 甚至得不到目的 DNA 片段, 影响了后续试验。如 $\omega 3(1)$ 片段的扩增, 调节 PCR 条件也能够获得 PCR 产物, 但是重复性不好, 杂带多, 极易形成弥散的 PCR 产物, 尤其在扩增的 DNA 片段放置(-20 °C)一段时间之后, 基本上不能够扩增出目的片段, 这可能是由于此条序列含有 poly T 结构或者局部高 GC 含量。而用割胶纯化得到的 DNA 片段, 易造成碱基突变, 这主要是在模板在 EB 结合的过程中或者是长时间曝露于紫外线的照射下发生的^[12], 这就增加了后期筛选目的 DNA 片段的工作。

本研究使用逐次退火重叠延伸 PCR 的方法, 不仅能够利用起初扩增片段的引物, 而且可以使用 T_m 相差比较大的引物, 这增加了获得特异性引物的机会。如扩增 $\omega 3a$ DNA 片段的引物 $\omega 3aF$ 和引物 $\omega 3aR$, 以及扩增 $\omega 3b$ DNA 片段的 $\omega 3bF$ 和 $\omega 3bR$ 引物之间相差就很大, 但是这些引物均具有较好的特异性, 不需要对引物长度进行调整即可进行目的片段扩增。而在传统重叠延伸 PCR 中, 对原来扩增 DNA 片段的引物长度进行调整可能会降低引物特异性, 产生非特异性扩增。

长重叠区域有利于长片段之间的融合, 在本试验中, 对于重叠区引物设计采用了较长的重叠区域, 如引物 $\omega 3aR(2)$ 、CBXBF 和 CBXBR。但是长引物也增加了非特异性结合的机会。本研究增加了重叠区域的长度, 而两侧引物长度较短, 这样既增加了 DNA 片段碱基互补配对的机会, 又降低了引物非特异性结合的机会, 如扩增的 $\omega 3(2)$ DNA 片段和 HCT DNA 片段。均获得了单一的目的条带。由于



下划线区域为片段的重叠区域；a：ω3aR；b：HPIR；c：CBXBR

图5 逐次退火延伸 PCR 的测序结果

引物的筛选不受其它引物 T_m 值的限制，使得扩增不同来源 DNA 片段时可以根据需要选择特异性的引物。但对于此种方法能否应用于更多片段或者更长片段的融合还有待试验进一步验证。

表达载体构建需要确保序列的保真性。引入逐次退火 PCR 条件，仅仅是 PCR 扩增时间稍微增加，不会增加 PCR 循环次数，有利于维持高保真性 DNA 聚合酶的活性，而扩增片段的长度和保真性效果往往取决于所选用的保真性酶的活性，所以保证了序列保真性。本试验选用 Transtart FastPfu DNA 聚合酶扩增的 DNA 片段突变率很低，随机挑选 3 个样本测序，均能够获得完全正确的序列，可以直接用于后续试验操作。

逐次退火还可以在常规 PCR 中发挥作用。常规

PCR 时，可能会遇到引物的 T_m 值相差特别大的情况，这时也可以采用逐次退火的方法进行 PCR。对于 T_m 相差较大的情况，选取高低两个 T_m 值，中间可以插入若干个退火温度。例如，两个引物的 T_m 值分别是 61.5 和 51，可以采用的退火温度是 61 (1 s)、56 (1 s) 和 51 (30 s)，能够较有效地抑制非特异性扩增，提高灵敏度。

4 结论

逐次退火重叠延伸 PCR 通过对传统重叠延伸 PCR 进行改良，把退火温度改成若干个，逐次降低温度，可以适用 T_m 值不同或者相差较大的引物。使用此种方法成功拼接了 ω3 (2) 和 HCT 两个大片段；PCR 产物电泳条带单一，克隆测序证实序列

完全正确,可以直接应用于后续试验。将逐次退火 PCR 条件应用于常规 PCR 中,也能够有效抑制非特异性扩增。

参考文献

- [1] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension [J] . Nat Protoc, 2007, 2 (4) :924-932.
- [2] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes :gene splicing by overlap extension [J] . Gene, 1989, 77 (1) :61-68.
- [3] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J] . Gene, 1989, 77 (1) :51-59.
- [4] Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, et al. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans* [J] . Nat Protoc, 2006, 1 (6) : 3111-3120.
- [5] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences [J] . Nat Protoc, 2006, 1 (2) :791-797.
- [6] Ke SH, Madison EL. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube ' megaprimer ' PCR method [J] . Nucleic Acids Res, 1997, 25 (16) :3371-3372.
- [7] 柴冉, 孙强, 邱立友. 降落 - 重叠 PCR 法四重融合构建平菇同源重组片段 [J] . 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28 (4) : 375-379.
- [8] Sakuradani E. Advances in the production of various polyunsaturated Fatty Acids through oleaginous fungus *Mortierella alpina* breeding [J] . Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74 (5) :908-917.
- [9] Ando A, Sakuradani E, Horinaka K, et al. Transformation of an oleaginous zygomycete *Mortierella alpina* 1S-4 with the carboxin resistance gene conferred by mutation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase [J] . Curr Genet, 2009, 55 (3) :349-356.
- [10] Mackenzie DA, Wongwathanarat P, Carter AT, et al. Isolation and use of a homologous histone H4 promoter and a ribosomal DNA region in a transformation vector for the oil-producing fungus *Mortierella alpina* [J] . Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (11) : 4655-4661.
- [11] Yolov AA, Shabarova ZA. Constructing DNA by polymerase recombination [J] . Nucleic Acids Res, 1990, 18 (13) :3983-3986.
- [12] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR based fusion of several fragments simultaneously [J] . Nucleic Acids Res, 2004, 32 (2) : e19.

(责任编辑 李楠)