

## 原生动物单细胞 PCR 应用初探——以天蓝喇叭虫为例\*

刘志新<sup>1,2</sup>, 余育和<sup>1\*\*</sup>

(1: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘 要:** 以天蓝喇叭虫(*Stentor coeruleus*)为研究对象, 探索了单细胞单基因 PCR 扩增及单细胞全基因组 PCR 扩增技术在原生动物中的应用. 经过不断探索和优化条件后, 试验取得了理想的结果. 在 40 例单细胞单基因(SSU rDNA 基因全序列)PCR 的一次性扩增中, 新鲜细胞和经过中性红染色的细胞都获得了 100%的成功率, 室温下酒精(95%)保存一周的细胞获得了 82.5%的成功率. 在单细胞全基因组 PCR 扩增中, 采用高效高保真的 *phi*29 DNA 聚合酶结合随机引物(Random Primer)进行扩增, 获得了丰富且质量较高的 PCR 产物. 以全基因组扩增产物(稀释 10 倍)对四个常用的基因位点(TEF1、SSU rRNA、18S-ITS1-5.8S、 $\alpha$ -tubulin)进行扩增, 均成功获得相应的基因片段.

**关键词:** 单细胞 PCR; 单细胞全基因组扩增; 原生动物; 天蓝喇叭虫

## A preliminary study of single cell PCR in protozoa: take *Stentor coeruleus* for an instance

LIU Zhixin<sup>1,2</sup> & YU Yuhe<sup>1</sup>

(1: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P.R.China)

(2: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China)

**Abstract:** Taking *Stentor coeruleus* for an instance, we have tested single cell PCR for single gene and whole genome. After optimization, we got perfect results. In the single cell PCR for single gene reaction, 40 fresh cells and 40 neutral red stained cells all got 100% success and rich products, and 40 cells kept in the alcohol (95%) for one week got 82.5% success. In the single cell PCR for whole genome reaction, we employed *phi* 29 DNA Polymerase and random primer for our PCR amplification and got rich products. Using whole genome amplification (10 times diluted) 4 gene loci were amplified, and all of them got objective gene section successfully.

**Keywords:** Single cell PCR; whole genome amplification; Protozoa; *Stentor coeruleus*

PCR 技术自产生以来已经发展成为现代分子生物学最重要的技术之一, 并衍生出众多与此相关的技术. 其中, 单细胞 PCR 的产生及应用, 使得研究者在单细胞水平上对研究对象的基因组进行精确研究成为可能. 但是对于很多只具有常规分子生物学实验设备的实验室而言, 还存在着诸多条件限制, 制约了单细胞 PCR 技术的实际应用.

原生动物(protozoa) 作为一类特殊单细胞(unicellular)动物, 不同的种类大小差别很大. 由于原生动物在生态系统中占据重要地位, 在种群生态、环境保护、生物地理等领域都极具研究价值. 而在以往的研究中, 大多数研究者在对原生动物进行分子生物学研究时都是以群体基因组(常规方法提取总 DNA)作为研究对象, 鲜见以个体基因组作为研究对象而加以探讨的. 这主要是因为单细胞原生动物个体基因组的获取及扩增还存在着一定程度的困难. 随着现代生物学技术的发展, 单细胞 PCR 技术为这种困境找到了出路. 但是, 原生动物个体微小, 很多种类无体色(透明), 而且在远距离野外样本的采集过程中, 往往没有条件对获得的新鲜细胞样本及时进行 DNA 提取、PCR 扩增等分子生物学常规操作. 因此, 对于一

---

\* 国家自然科学基金项目(30490232)资助. 2007-07-27 收稿; 2008-01-05 收修改稿. 刘志新, 男, 硕士研究生; E-mail: lzx20022456@126.com.

\*\* 通讯作者; E-mail: yhyu@ihb.ac.cn.

般的分子实验室而言在单细胞的获取和细胞样本的保存(在野外条件下保证细胞的基因组在一定时间内不被降解)等方面存在不少困难.

针对上述难点, 本试验以原生动物天蓝喇叭虫为实验材料, 利用一般分子生物学实验室所具备的最基本的试验设备对进行过不同方式处理(中性红染色、室温下 95%酒精保存细胞样本)的原生动物细胞进行了单细胞 PCR 试验, 以期能够为其他研究者提供可借鉴的思路和技术.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料的准备

1.1.1 天蓝喇叭虫细胞的准备 天蓝喇叭虫分离自武昌东湖水样, 使用玻璃微吸管纯化, 双蒸水中饥饿一周. 然后将天蓝喇叭虫用双蒸水漂洗 3 次, 用微吸管小心的收集到一个经过灭菌处理的载玻片上, 置于倒置显微镜下观察, 确保没有其它细胞混入. 用玻璃微吸管将清洗后的材料分为三组, 每组 40 个单细胞样本, 分别经过如下处理: (1) 新鲜细胞样本: 用双蒸水漂洗, 直接收集单个细胞进行 PCR. (2) 0.1%中性红染色样本: 用 0.1%中性红染色 5min, 双蒸水漂洗一遍, 收集染色过的单个细胞进行 PCR. (3) 95%酒精浸泡样本: 用玻璃微吸管小心收集天蓝喇叭虫细胞, 置于 1.5ml EP 管中, 尽量去除多余水分, 然后加入 95%的酒精, 室温下放置一周后小心取出天蓝喇叭虫细胞, 玻璃培养皿中用双蒸水浸泡 6h, 其间换水一次, 并不时轻轻吹动. 然后收集经过酒精处理的单个细胞进行 PCR.

1.1.2 单个细胞的收集 取量程为 2.5 $\mu$ l 的移液器, 调到 1 $\mu$ l, 在倒置显微镜(或解剖镜)40 $\times$ 镜下小心的吸取单个虫体, 置于含裂解液的 0.5ml PCR 管中. 轻轻反复吹打移液器, 确保虫体进入裂解液中. 此过程一定要小心, 必要时将 PCR 管置于倒置显微镜(或解剖镜)下观察虫体是否已经成功的落在裂解液中.

1.1.3 细胞裂解液的配制(5 $\mu$ l 体系)<sup>[1]</sup> 配制裂解液母液. 最终保证每个 0.5ml PCR 管中含有 0.5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq DNA Polymerase buffer; 0.5 $\mu$ l 1% Tween20; 0.5 $\mu$ l 1% Triton $\times$ 100; 0.05 $\mu$ l 蛋白酶 K(20mg/ml); 2.5 $\mu$ l dsH<sub>2</sub>O; 1.0 $\mu$ l(直接来自于上一步骤)的单个天蓝喇叭虫细胞. 注: 每组设一管空白对照.

### 1.2 单细胞 PCR 扩增

#### 1.2.1 单细胞单基因 PCR 扩增

(1) 细胞裂解: 在每管裂解液中加入 10 $\mu$ l 矿物油, 置于离心机中 4000r/min 离心 1min, 在 PCR 仪中 45 $^{\circ}$ C 温浴 15min, 然后在 96 $^{\circ}$ C 热变性 20min.

(2) 扩增体系(50 $\mu$ l 体系): 扩增目的序列为核糖体小亚基 rRNA(SSU rRNA)基因全序列. 使用的引物为纤毛虫通用的 SSU rRNA 基因全序列扩增引物<sup>[2]</sup>. 引物序列分别为: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCC AGT-3'和 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'.

向每个管加入如下 PCR 反应液: 4.5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq DNA Polymerase buffer; 4.0 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(2.5mM); 3 $\mu$ l dNTP(2.0mM); 0.5 $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l)(MBI); 2 $\mu$ l 正向引物(10mM); 2 $\mu$ l 反向引物(10mM); 29 $\mu$ l dsH<sub>2</sub>O; 5.0 $\mu$ l(直接来自于上一步骤) 经过裂解的单细胞扩增模板, 最后置于离心机中 4000r/min 离心 1min.

(3) 反应条件: ①94 $^{\circ}$ C 预变性 2min, 45 $^{\circ}$ C 退火 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8min; ②开始循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 循环 35 次; ③72 $^{\circ}$ C 延伸 15min.

#### 1.2.2 单细胞全基因组 PCR 扩增

(1) 细胞裂解液的配制(5 $\mu$ l 体系): 配制裂解液母液, 最终保证每个 0.5ml PCR 管中含有如下成分: 0.5 $\mu$ l 10 $\times$ *phi*29 Polymerase buffer; 2.5 $\mu$ l 随机引物(100mM) (NEB); 0.05 $\mu$ l 蛋白酶 K(20mg/ml); 1 $\mu$ l dsH<sub>2</sub>O; 1.0 $\mu$ l 单个天蓝喇叭虫细胞(1.1.2). 注: 设一管空白对照.

(2) 细胞裂解: 在每管裂解液中加入 10 $\mu$ l 矿物油, 置于离心机中 4000r/min 离心 1min. 在 PCR 仪中 45 $^{\circ}$ C 温浴 15min, 然后在 96 $^{\circ}$ C 热变性 20min, 最后迅速降到 0 $^{\circ}$ C 保持 15min.

(3) 扩增体系(10 $\mu$ l 体系): 向每个管加入如下 PCR 反应液: 0.5 $\mu$ l 10 $\times$ *phi*29 Polymerase buffer; 2.5 $\mu$ l dNTP(2.0mM); 0.5 $\mu$ l *phi*29 Polymerase(10U/ $\mu$ l) (NEB); 0.1 $\mu$ l 100 $\times$ BSA; 1.4 $\mu$ l dsH<sub>2</sub>O; 5.0 $\mu$ l(直接来自于上一步骤)经过裂解的单细胞扩增模板. 每管反应液中加入 10 $\mu$ l 矿物油, 置于离心机中 4000r/min 离心 1min.

(4) 反应条件: 30 $^{\circ}$ C 过夜; 然后, 65 $^{\circ}$ C 10min, 使酶变性.

## (5) 全基因组PCR扩增效果检测:

① 将单细胞全基因组扩增产物(包括空白对照)稀释10倍, 作为下列基因序列PCR扩增的DNA模板:  
(a) TEF1 (Translation Elongation Factor 1-Alpha) 基因部分序列: 天蓝喇叭虫翻译延长因子基因的部分序列 (GENBANK 号: AF056106). 从 GENBANK 上下载序列, 利用在线引物设计软件 Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))设计引物. 两条引物序列分别为: 5'-CCCAGGC CACAGAGACTT TA-3'和5'-AGAACATCAAAAGCGGCATC-3'.

(b) a-tubulin 基因部分序列: 天蓝喇叭虫 alpha-tubulin 微管蛋白基因部分序列(GENBANK 号: Z49853). 从 GENBANK 上下载序列, 利用在线引物设计软件 Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))设计引物, 两条引物序列分别为: 5'-AGACGACGCCTTCAACACTT-3'和 5'-GCTGATCATGCAGACAGCTC-3'.

(c) SSU rRNA基因全序列: 核糖体小亚基rRNA基因全序列. 基因扩增使用的引物为纤毛虫通用的 SSU rRNA 基因全序列扩增引物<sup>[2]</sup>. 两条引物序列分别为: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'和 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'.

(d) 18S-ITS1-5.8S基因序列: 基因扩增两条引物分别对应的是纤毛虫18S rDNA的5'端和5.8S rDNA的3'端<sup>[3]</sup>. 两条引物序列分别为: 5'-CGCATTTCGCTGCGTTCTTC-3'和5'-GTT CCCCTTGAACGAGGAATTC-3'.

② 扩增体系(25 $\mu$ l 体系): 向每个管加入如下 PCR 反应液: 2.5 $\mu$ l 10 $\times$ Taq DNA Polymerase buffer; 2.0 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>(2.5mM); 1.5 $\mu$ l dNTP(2.0mM); 0.5 $\mu$ l Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l) (MBI); 1 $\mu$ l 正向引物(10mM); 1 $\mu$ l 反向引物(10mM); 15.5 $\mu$ l dsH<sub>2</sub>O; 1 $\mu$ l 模板 DNA(单细胞全基因组扩增产物稀释 10 倍).

③ 反应条件: (a) TEF1基因部分序列: I、94 $^{\circ}$ C预变性2min; II、开始循环, 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 55 $^{\circ}$ C退火 1min, 72 $^{\circ}$ C延伸2min, 循环35次; III、72 $^{\circ}$ C延伸15min.

(b) SSU rRNA 基因全序列: I、94 $^{\circ}$ C预变性 2min; II、94 $^{\circ}$ C变性 1min, 56 $^{\circ}$ C退火 1min, 72 $^{\circ}$ C延伸 2min, 循环 5 次; III、94 $^{\circ}$ C变性 1min, 62 $^{\circ}$ C退火 1min, 72 $^{\circ}$ C延伸 2min, 循环 35 次; IV、72 $^{\circ}$ C延伸 15min.

(c) 18S-ITS1-5.8S 基因序列: I、94 $^{\circ}$ C预变性 2min; II、94 $^{\circ}$ C变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C退火 1min, 72 $^{\circ}$ C延伸 2min, 循环 35 次; III、72 $^{\circ}$ C延伸 15min.

(d) a-tubulin 基因部分序列: I、94 $^{\circ}$ C预变性 2min; II、94 $^{\circ}$ C变性 1min, 57 $^{\circ}$ C退火 1min, 72 $^{\circ}$ C延伸 2min, 循环 35 次; III、72 $^{\circ}$ C延伸 15min.

### 1.3 PCR 扩增产物的检测

上述所有的PCR扩增产物均用含有EB(0.5 $\mu$ l/ml)的1.0%琼脂糖凝胶电泳分离, 电泳液为1 $\times$ TAE, 取PCR扩增产物8 $\mu$ l(单细胞全基因组扩增产物取量为4 $\mu$ l)加2 $\mu$ l溴酚蓝染色, 混匀后点入胶孔. 75V恒压电泳 1h, Image UVP凝胶处理系统观察并一次性成像.

## 2 试验结果

### 2.1 单细胞单基因 PCR 扩增

3 组经过不同方式处理的单细胞单基因 PCR 扩增产物电泳图见图 1. 40 例新鲜和经过中性红染色的细胞在一次性单细胞单基因 PCR 扩增均获得了 100%的成功率, 绝大部分样本扩增产物丰富( $\geq 100$ ng/ $\mu$ l). 经过酒精处理的 40 例单细胞样本在一次性单细胞单基因 PCR 扩增中成功率为 82.5%(有 7 例在琼脂糖凝胶电泳中没有检测到可见产物), 大部分样本扩增产物丰富( $\geq 100$ ng/ $\mu$ l). 三组样本的空白对照组在琼脂糖凝胶电泳中均没有检测到可见产物.

### 2.2 单细胞全基因组 PCR 扩增

单细胞全基因组 PCR 扩增及用于全基因组扩增效果检测的四个基因位点 PCR 扩增产物电泳图如图 2. 单细胞全基因扩增产物(点样 4 $\mu$ l)绝大部分 $>2500$ bp, 样本扩增产物丰富( $\geq 100$ ng/ $\mu$ l), 产物呈一定程度的弥散(因为扩增产物大小不一所致). 空白对照组在琼脂糖凝胶电泳中没有检测到可见产物. 将单细胞全基因组的 PCR 扩增产物稀释 10 倍, 作为天蓝喇叭虫四个常用基因位点(TEF1、SSU rRNA、18S-ITS1-5.8S、a-tubulin)PCR 扩增的 DNA 模板, 在琼脂糖凝胶电泳中均检测到可见的目标产物, 与以常

规方法提取的 DNA 为模板(多细胞提取总 DNA)的扩增产物保持一致. 将单细胞全基因组 PCR 扩增的空白对照产物稀释 10 倍, 作为天蓝喇叭虫 4 个常用基因位点(TEF1、SSU rRNA、18S-ITS1-5.8S、a-tubulin)PCR 扩增的 DNA 模板进行扩增, 在琼脂糖凝胶电泳中未检测可见的扩增产物.

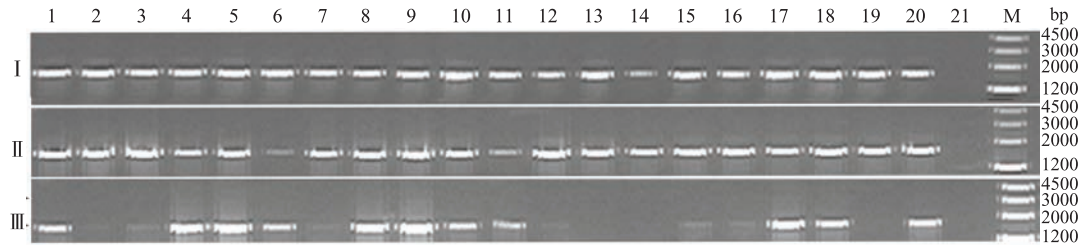


图 1 I, II, III 分别为新鲜细胞、中性红染色的细胞和酒精浸泡一周的细胞的单细胞 SSU rDNA 基因的扩增产物图谱(泳道 1–20 为 20 例细胞的一次性扩增产物; 21 为空白对照; M 为 DNA Ladder)

Fig.1 I, II, III is the single cell PCR for single gene (SSU rDNA gene) amplification products of fresh cells, neutral red stained cells and cells kept in the alcohol (95%) for one week respectively (Lane 1–20 are 20 PCR amplification products; lane 21 is blank control; M is the DNA Ladder)

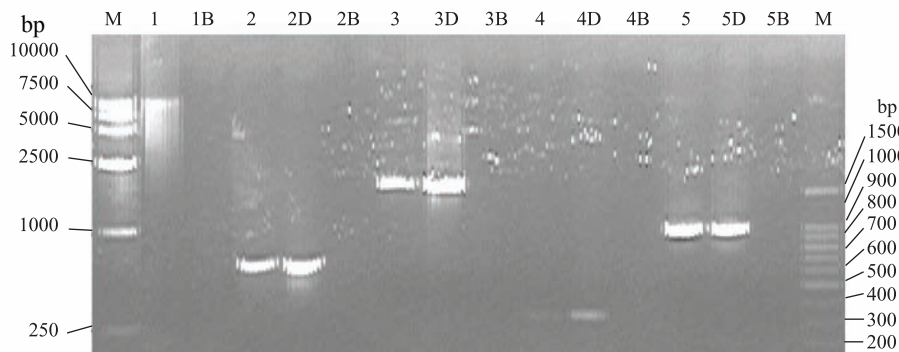


图 2 泳道 1 为天蓝喇叭虫单细胞全基因组扩增产物(1B 为 1 的空白对照; 泳道 2–5 分别为以单细胞全基因组扩增产物(稀释 10 倍)为模板对四个基因位点(TEF1、a-tubulin、SSU rRNA、18S-ITS1-5.8S)进行 PCR 扩增所获得的产物; 2D–5D 分别为以常规方法提取的 DNA(多细胞提取总 DNA)为模板对四个基因位点进行 PCR 扩增所获得的产物; 2B–5B 分别为以单细胞全基因组扩增的空白对照产物(稀释 10 倍)为模板对四个基因位点进行 PCR 扩增所获得的产物; M 为 DNA Ladder)

Fig.2 Lane 1 is the product of single cell PCR for whole genome(1B is the blank control of 1; Lane 2–5 amplification products of 4 gene loci (TEF1, a-tubulin, SSU rRNA, 18S-ITS1-5.8S), using whole genome amplification products (10 times diluted) as amplifying template respectively; Lane 2B–5B amplification products of 4 gene loci, using the DNA which distilled by general method as amplifying template respectively; Lane 2D–5D is the amplification products of 4 gene loci; using the blank control of single cell PCR for whole genome amplification (10 times diluted) as amplifying template respectively; M is the DNA Ladder)

### 3 讨论

20 世纪 80 年代后期 Jeffreys 等<sup>[4]</sup>率先把单细胞 PCR 应用于分子生物学研究领域. 此后经过不断完善, 单细胞 PCR 衍生出了许多方法, 并开始在分子生物学的众多研究领域展现出其独特的魅力. 近年来, 随着人们在单细胞水平上分析的需求, 单细胞 PCR 开始向更多的生物学领域渗透, 为在单细胞水平上进行产前诊断、基因表达、DNA 测序及个体生态学等研究提供了简便而快速的技术支持.

单细胞 PCR 的模板只有目的细胞所具有的唯一一套基因组, 因此要求反应体系十分灵敏和高效, 与普通的 PCR 反应相比有一定的特殊性. 在实验中发现, 在原生动物采样及后续的分子实验操作过程中常常遇到以下三种困难: I、细胞样本透明或颜色太浅影响样本的观察、分辨和采集; II、远距离采样过程中细胞样本的保存困难(很难保证在常温条件下目标细胞的基因组 DNA 在一定时间内不降解); III、细胞样本数量太少影响后续试验. 针对这些困难, 分别对采取了不同的处理措施的天蓝喇叭虫细胞进行单细胞 PCR 扩增: I、使用 1% 中性红对细胞进行染色(虽然本实验研究对象天蓝喇叭虫体呈天蓝色, 但是可以为其他无体色的原生动物提供可借鉴的方法). 可以解决显微视野下单细胞样本观察、分辨困难, 并可以有效检测及预防其他非目标细胞的混入, 确保目标细胞的准确捕获; II、室温下 95% 酒精保存样本一周. 解决野外样本采集过程中细胞样本的保存问题, 确保目的细胞的基因组在常温下一定的时间内不被降解; III、单细胞全基因组 PCR 扩增. 解决细胞样本数量太少, 不能为后续的分子生物学实验提供足量 DNA 模板的问题.

经过不断尝试和优化条件, 取得了理想的效果: 在分别对 40 例新鲜、中性红染色和酒精保存的 3 种单细胞样本进行单细胞单基因(SSU rDNA 基因全序列)PCR 扩增中, 新鲜和中性红染色的细胞样本在一次性 PCR 扩增中都取得了 100% 的成功率, 酒精室温保存一周的样本在一次性 PCR 扩增中也取得了 82.8% 的成功率, 绝大多数产物浓度都大于 100ng/μl(通过对照 Maker 亮度大致估算, 见图 1 和图 2).

虽然原生动物单细胞单基因 PCR 扩增取得了良好的结果, 但是该技术的一个局限之处是单个细胞仅能利用一次. 在实际工作中, 若需要对一个单细胞个体的多个基因进行分析, 仅靠一次 PCR 对单细胞的多个基因作出判断是不可能的. 基于此种考虑, 此次试验也对原生动物单细胞全基因组扩增做了尝试性的探索, 并取得了良好的效果. 根据以往的研究, 单细胞全基因组扩增, 能够使得到单个二倍体细胞基因组 78% 序列增加 30 倍以上<sup>[5]</sup>. 但是以往的单细胞全基因扩增多通过引物延伸预扩增(primer extension preamplification)<sup>[6]</sup>和退化寡核苷酸起始 PCR(degenerate oligonucleotide-primed PCR)的方法<sup>[7]</sup>, 扩增得到的 DNA 分子量相对较低, 这些低分子量 DNA 产物并不能有效代表整个基因组, 而且产物通常错误率较高并且不能完全保留杂合性信息和短重复序列元件的正确拷贝. 本实验所使用的 DNA 聚合酶为从 *Bacillus subtilis* 噬菌体 phi29 中克隆出的嗜温 DNA 聚合酶<sup>[8]</sup>, 具有 3'-5' 核酸外切酶高保真纠错功能(报道的错误率仅为  $5 \times 10^{-6}$ , 大约比 Taq DNA 聚合酶低 100 倍)<sup>[9]</sup>, 使扩增的 DNA 保持了原始单核苷酸多态性(SNP)信息, 可给后续试验分析提供有力的支撑. 此外, Phi 29 DNA 聚合酶还具有特殊的链置换和连续合成特性<sup>[10]</sup>, 因此从理论上讲合成效率应大上述 78%. Phi 29 DNA 聚合酶支持等温扩增技术, 在 30℃ 即可保持良好的活性, 因此不需要使用热循环器(PCR 仪)也可进行有效扩增, 为实验提供了巨大的便利. 为了检测全基因组扩增的效果, 我们以全基因组扩增产物为模板对四个长度不同的基因位点进行扩增, 均成功获得相应的扩增产物.

上述工作不仅为原生动物野外样本采集的后续处理工作提供了技术支持, 还使得在个体水平上对单细胞原生动物进行研究成为可能, 具有一定的实用价值.

#### 4 参考文献

- [1] Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T *et al.* Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Mol Cell Endocrin*, 2001, **183**: 65-68.
- [2] Medlin L, Elwood HJ, Stickel S *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 1988, **71**: 491-499.
- [3] Benjamin KD, Robert DA. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. *J Euk Microbiol*, 1997, **44**: 25-32.
- [4] Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R *et al.* Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**(23): 10953-10971.
- [5] Zhang L, Cui XF, Schmitt K *et al.* Whole genome from a single cell: implication for genetic analysis. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 5847-5851.

- [6] Nam DK, Lee S, Zhou GL *et al.* Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNA through internal poly(A) priming during reverse trascription. *Pro Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 6152-6156.
- [7] Aubele M, Smida J. (2003) Degenerate oligonucleotide-primed PCR *Methods Mol Biol*, **226**: 315-318.
- [8] Blanco L, Salas M. Characterization and purification of a phage *phi29*-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 5325-5329.
- [9] Blanco L, Bernad A, Lazaro JM *et al.* Highly efficient DNA synthesis by the phage *phi29* DNA polymerase Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*, 1989, **264**(15): 8935-8940.
- [10] Garmendia C, Bernad A *et al.* The bacteriophage *phi29* DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 2594-2599.