Journal of the Korean Society of
Tobacco Science Vol. 37, No. 1, 25~33(2015)
Printed in Republic of Korea

C-G 링커 어댑터 PCR을 이용한 지놈워킹

서효석 · 이영기 · 전은영 · 이정헌※
KT&G
(2015년 11월 12일 접수 ; 2015년 12월 11일 수정 ; 2015년 12월 21일 승인)

C-G Linker Adaptor PCR Method for Genome Walking

Hyo-seok Seo, Yung-gi Lee, Eun-young Jeon, Jeong-heon Lee
KT&G Research Institute, Daejeon 34128, Korea
(Received Nov 12, 2015 ; Revised Dec 11, 2015 ; Accepted Dec 21, 2015)

ABSTRACT : Genome walking is a particular application for identifying sequences of unknown genomic regions adjacent to a known region. Many genome walking methods based on polymerase chain reaction (PCR) are available. Even if earlier techniques suffer from low reproducibility, inefficiency, and non-specificity, improved strategies have been developed. In this study, we present an alternative strategy: the genomic DNA is digested with restriction enzymes. After cytosine overhangs at 5' ends, the fragments are ligated to linker adaptors had guanine overhang at 3' ends. Then nested PCR is performed. The improvements in this strategy focus on two points. The first is the C tailing method using *Pfu* polymerase instead of the A tailing method based on non-template-dependent terminal transferase activity of *Taq* polymerase. Therefore unintended modification of target DNA can be prevented without A tailing error. The second point is the use of C/G-specific ligation had advantage in the ligation efficiency compared with A/T-specific ligation. Therefore, the C-G linker PCR method increases ligation efficiency between digested genomic DNA and adaptor DNA. As a result, the quantity of target DNA to amplify by PCR is enriched. We successfully used G-C linker PCR to retrieve flanking regions bordering the phophinothricin resistance gene in genetically modified tobacco (GMO).

Key words **: genome walking, ligation mediated PCR, unknown DNA sequence**

지놈워킹 (Genome walking)이란 염기서열을 알고 있는 유전자 부위에서 인접한 부위의 염기서열을 밝혀내기 위해 이용되는 응용 기술로 주로 두 가지 목적으로 활용된다 (Guo and Xiong, 2006). 유전자의 염기서열이 일부만 밝혀져 있을 때, 인접한 상류 (upstream) 부분이나 하류 (downstream) 부분의 염기서열을 추가로 확인하여 유전자의 기능을 완전히 밝히고자 하는 목적이 첫 번째이며, 유전자 변형 생물체 (GMO)의 외부 유래 도입 유전자를 확인하는 것이 두 번째 목적이다 (Yuanxin *et al.*, 2003; Wahl *et al.*, 1987; Berriman *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2008; Terauchi and Kahl, 2000).

*연락저자 : 34118, 대전광역시 유성구 가정로 30, KT&G연구원
*Corresponding author : *30, KT&G Research Institute, 30 Gajeong-ro Yuseong-gu, Daejeon 34118, Korea*
(phone: 82-42-866-5538; fax: 82-42-866-5544; e-mail: leej-heon@ktng.com)

유전자 증폭 기술 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 기반으로 여러 가지 지놈워킹 방법이 개발되었는데 크게 세 가지 방법으로 분류할 수 있다. 첫 번째 방법은 degenerated primer를 이용한 TAIL-PCR 방법이다 (Liu *et al.*, 1995; Levano-Garcia *et al.*, 2005). 미지의 염기서열 부위에 무작위적으로 primer를 결합시켜 증폭 시킨 후, nested specific primer를 이용하여 다시 증폭하는 방법으로 대량 동시 실험에 적합하다는 장점이 있는 반면, 비특이적인 증폭물이 생성될 가능성이 높다는 단점이 있다. 두 번째 방법은 inverse PCR (iPCR)이다. 제한효소로 지노믹 DNA를 절단한 후, ligation 시켜 원형의 (circular) DNA를 만들고 기지의 염기서열 부위에 결합하는 서로 반대방향의 primer를 이용하여 미지의 DNA 부위를 증폭할 수 있다 (Dai *et al.*, 2000; Collins and Weissman, 1984; Ochman *et al.*, 1988; Triglia *et al.*, 1988; Silver and Keerikatte, 1989; Rich and Willis, 1990). Nested primer를 포함한 네 개의 primer를 디자인 할 수 있을 만큼 기지의 염기서열이 길어야 한다는 것과 절단된 지노믹 DNA 단편들의 비특이적인 ligation을 막을 수 없다는 것이 한계점으로 지적되고 있다. 마지막으로 제한효소로 지노믹 DNA를 절단한 후, 인공적으로 제작한 링커 어댑터 DNA를 ligation하여 증폭하는 LM-PCR 방법이 있다 (Pfeifer *et al.*, 1989; Mueller and Wold, 1989; Riley *et al.*, 1990; Rosenthal and Jones, 1990; Arnold and Hodgson, 1991; Garrity and Wold, 1992; Jones and Winistorfer, 1992; Warshawsky and Miller, 1994; Hui *et al.*, 1998; Spertini *et al.*, 1999). 초기 개발된 LM-PCR 방법들은 비특이적인 ligation 문제와 어댑터 primer에 의한 비특이적인 증폭의 문제점들이 있었으나 최근 이러한 문제를 보완한 새로운 방법들이 제시되고 있다 (Trinh *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Bae and Sohn, 2010).

본 연구에서는 LM-PCR의 문제점을 해결하고 효율성을 향상 시킬 수 있는 C-G 링커 어댑터 PCR 방법을 고안하였다. 이 방법은 제한효소에 의해 잘린 지노믹 DNA의 5′ 말단에 cytosine overhang을 남긴 후, C-G 링커 어댑터와 ligation 시키고, nest-PCR을 통해 증폭하는 방법으로서 기존의 방법들에 비해 두 가지 측면에서 차별화되었다. 첫째, 기존의 *Taq* polymerase를 이용한 A-tailing 기법 대신 *Pfu* polymerase를 이용한 C-tailing 기법을 이용하여 nondependent terminal transferase 활성의 오류 요인을 제거하였다. 둘째, A-T 링커 어댑터를 이용한 ligation 보다 효율이 높은 C-G 링커 어댑터를 이용하였다. 또한 C-G 링커 어댑터 PCR 기법을 이용하여 유전자 변형 담배의 지노믹 DNA에 도입된 외부 유전자를 구명하였다.

재료 및 방법

DNA 추출 및 정제

CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터가 도입된 유전자 변형 담배 (KT35)의 생엽 100 ㎎에 액체질소를 첨가하여 냉각시킨 후, 막자와 사발을 이용하여 분쇄하였다. NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, 독일)를 이용하여 지노믹 DNA를 추출하였으며, 260/280 ㎚ 파장의 흡광도를 측정하여 농도와 정제도를 확인하였다.

지노믹 DNA 단편화

정제된 지노믹 DNA를 6 종의 제한효소, *Nco*I, *Pvu*II, *Spe*I, *Xba*I, *Hind*III, *Sca*I (NEB, 미국)으로 절단하였다. 제한효소 반응액의 조성은 지노믹 DNA 1 ㎍, 제한효소 10 units, 1 X 반응버퍼이며, 최종 부피 50 ㎕ 용액을 37 ℃에서 16 시간 배양시켰다. 반응이 끝난 용액은 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL, 독일)을 이용하여 정제하였다.

DNA 단편의 말단 변형

C-tailing 말단 변형은 *Nco*I, *Pvu*II, *Spe*I, *Xba*I 제한효소로 절단한 지노믹 DNA를 이용하였고, A-tailing 말단 변형은 *Hind*III, *Nco*I, *Sca*I, *Spe*I 제한효소로 절단된 지노믹 DNA를 이용하였다. C-tailing은 정제된 단편화 DNA 1 ㎍, 10 X 반응버퍼 5 ㎕, 2.5 mM deoxyadenosine triphosphate (dATP), deoxythymidine triphosphate (dTTP),

deoxyguanosine triphosphate (dGTP) 각각 1 μL, *Pfu* polymerase 1 unit (ELPIS-BIOTECH, 한국)을 첨가하여 최종 50 μL 부피의 반응액을 72 ℃에서 10 분 동안 반응시키는 방법으로 수행하였다. A-tailing을 위해서는 정제된 DNA 단편 1 μg, 10 X 반응버퍼 5 μL, 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) 4 μL, *Taq* polymerase 1 unit (Sun genetics, 한국)이 포함된 50 μL 반응액을 72 ℃에서 30 분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후에는 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up을 이용하여 정제하였다.

링커 어댑터 디자인 및 변형

링커 어댑터 및 프라이머에 사용한 모든 DNA 올리고머 (oligomer)는 바이오니아 (대전, 한국)에 의뢰하여 제작하였다 (Table 1). A-T 링커 어댑터와 C-G 링커 어댑터는 모두 12~3 bp 길이의 짧은 DNA 사슬과 45~46 bp 길이의 긴 DNA 사슬 부분이 부분적으로 결합을 이루어 이중 가닥 (double strand) 형태이며, tailing을 위한 말단 염기서열을 제외하면 같은 염기서열을 공유하도록 디자인하였다. 짧은 DNA 사슬의 5′ 말단은 DNA 단편과의 연결 (ligation) 효율을 높이기 위하여 인산화 반응을 시켰으며, 짧은 DNA 사슬의 유전자 증폭을 방지하기 위하여 3′ 말단의 아미노 C6 위치에 NH_2 그룹을 결합시켰다. Adaptor primer는 긴 DNA 사슬의 염기서열을 토대로 제작되었다.

지노믹 DNA 단편과 어댑터 DNA 연결 (Ligation)

C-tailing 된 DNA에는 C-G 링커 어댑터를 연결 (ligation) 시키고, A-tailing 된 DNA에는 A-T 링커 어댑터를 연결시켰다. Tailing 된 DNA 500 ng과 10 μM 링커 어댑터 1 μL, Blunt/TA Ligase Master Mix (NEB, 미국) 5 μL를 첨가하여 총 10 μL 부피의 반응액을 만든 후, 25 ℃에서 15 분 동안 배양시켰다. 반응이 끝난 용액은 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up을 이용하여 정제하였다.

유전자 증폭 반응 (PCR)

지노믹 DNA 단편과 링커 어댑터가 연결된 DNA를 1차 PCR의 주형 (template) DNA로 사용하였다. 50 μL 부피의 PCR 반응 용액에는 주형 DNA 5 μL, 1 x PCR buffer, 25 mM $MgSO_4$

Table 1. Oligonucleotides used in the experiments.

Name	Sequence (5'-> 3')	Use
ADL_CG	GACTGATAGCGTTCGGTCGTTCCCACTGGAGTTGAGAGTTGGCGC	C-G linker adaptor
ADS_CG	PO_4-GGCGCCAACTCTC-amino C_6	C-G linker adaptor
ADL_AT	GACTGATAGCGTTCGGTCGTTCCCACTGGAGTTGAGAGTTGGCGCT	A-T linker adaptor
ADS_AT	PO_4-GCGCCAACTCTC-amino C_6	A-T linker adaptor
Ap_1st	GACTGATAGCGTTCGGTCGTTCCCA	1^{st} PCR (adaptor primer)
Ap_2nd	CGTTCGGTCGTTCCCACTGGAGTTG	2^{nd} PCR (adaptor primer)
35S_1st	TGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC	1^{st} PCR (p35S primer)
35S_2nd	GCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGAC	2^{nd} PCR (p35S primer)

3 μL, 2 mM dNTPs 3 μL, 10 pmol/μL Ap_1st 프라이머 1 μL, 10 pmol/μL 35S_1st 프라이머 1 μL, KOD-Plus-Neo polymerase (Toyobo, 일본) 1 unit을 포함하도록 제조하였다. 주형 DNA와 프라이머를 제외한 나머지 시약은 2차 PCR에서도 동일한 양과 비율을 사용하였다. 2차 PCR에서는 반응이 끝난 1차 PCR 반응액에 3차 증류수를 첨가하여 1/100 배율로 희석한 용액 5 μL를 주형 DNA로 사용하였으며, Ap_1st 프라이머 대신 Ap_2nd 프라이머, 35S_1st 프라이머 대신 35S_2nd 프라이머를 사용하였다. 1차 및 2차 PCR의 반응 온도 및 시간 조건은 같으며 2 step PCR 기법과 step-down PCR 기법을 이용하였다(Table 2).

Table 2. Cycling parameters for PCR.

Cycle number	Thermal condition	Note
1	94 ℃, 2 min	Initial denaturation
5	98 ℃, 10 s	Touchdown and two-step PCR
	74 ℃, 3 min	
5	98 ℃, 10 s	
	72 ℃, 3 min	
5	98 ℃, 10 s	
	70 ℃, 3 min	
25	98 ℃, 10 s	
	68 ℃, 3 min	

전기영동 및 염기서열 분석

PCR이 끝난 용액 10 μL는 1 % agarose gel에서 전기영동 (electrophoresis)한 후, UV를 조영하여 증폭물의 크기 및 양상을 확인하였다. 나머지 40 μL는 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up을 이용하여 정제한 후, 염기서열을 확인하였다.

결과 및 고찰

C-G 링커 어댑터 PCR의 원리

지놈워킹을 하기 위해 현재 널리 쓰이는 LM-PCR (Ligation mediated-PCR)의 공통적인 네 가지 단계는, 첫째, 길이가 긴 지노믹 DNA를 물리적, 혹은 효소반응을 통해 적당한 길이로 자르는 단계, 둘째, 잘려진 DNA의 양 끝 부분을 이어 붙이기 쉬운 형태로 변형 시켜주는 단계, 셋째, 미리 디자인 해 놓은 인공 염기서열의 어댑터를 잘려진 DNA에 이어 붙이는 단계, 넷째, 유전자 특이 프라이머와 어댑터 프라이머로 유전자 증폭을 하는 단계이다. LM-PCR의 한계점으로 꼽히는 낮은 목표 DNA 연결 효율 (ligation efficiency)과 직접적인 관련이 있는 단계는 두 번째 단계와 세 번째 단계이다.

A-T 링커 어댑터 PCR 기법은 *Taq* polymerase, 혹은 Klenow exo (3′ to 5′ exo minus)의 주형에 의존적이지 않은 말단 변형 활성 (terminal deoxynucleotidyl transferase activity, 이하 TdT 활성)을 이용하여 DNA 말단에 adenosine 하나를 추가(A-tailing)한 후, 이에 상보적인 thymine이 추가된 어댑터를 연결시키는 방법으로 T linker PCR 기법과 LM-PCR이 접목된 형태이다 (Siebert *et al.*, 1995; Yuanxin *et al.*, 2003; Yin and Largaespada, 2007). A-T 링커 어댑터 PCR 기법은 지노믹 DNA 단편들끼리의 비특이적인 연결(ligation)을 방지하고, 지노믹 DNA와 어댑터 DNA의 특이적인 연결 효율성이 높으며 제한효소의 선택 범위가 넓다는 장점을 가진다 (Trinh *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). 반면, TdT 활성의 오류를 감수해야 하는 단점이 있다. 일반적으로 TdT 활성에 의해서 3′ 말단에 adenosine이 주로 추가된다고 알려져 있으나, 이를 반박하는 연구 결과들이 제시된 바 있다 (Hu, 1993; Denney and Weismann, 1990; Magnuson *et al.*, 1996; Hite *et al.*, 1996; Brownstein *et al.*, 1996). 연구 결과에 따르면 A-tailing의 효율은 3′ 말단 염기서열의 종류와 72 ℃에서의 반응 시간에 따라 4~75 %까지 다양하게 나타났다. 이러한 비특이적이고 낮은 TdT 활성은 검출 가능한 목표 유전자의 비율을 떨어뜨리는 결과를 가져오게 된다.

C-G 링커 어댑터 PCR은 중합 (polymerization) 활성 외에 염기서열 교정 (proof-reading) 기능을

추가로 가진 *Pfu* polymerase, 혹은 T4 DNA polymerase를 이용하여 DNA의 5′ 말단에 cytosine을 남겨놓은 방법 (C-tailing)을 이용한다. 제한효소 종류에 따라 두 가지 방법을 이용할 수 있다.

*Pvu*II와 같이 절단 후, 말단이 blunt end를 형성하거나, 3′ overhang을 형성하는 경우에는 dGTP를 제외한 dATP, dTTP, dCTP를 첨가하여 *Pfu* polymerase의 3′ to 5′ exonuclease 활성을 이용하여 5′ 말단의 Cytosine을 남겨 놓을 수 있다 (Fig. 1 (A)). 만약 *Nco*I, *Spe*I, *Xba*I과 같이 절단 후, 5′ overhang의 DNA가 생성되는 제한효소를 이용하는 경우에는 dGTP가 결여된 상태에서 중합 (polymerization) 반응을 함으로써 5′ 말단에 C-tailing을 할 수 있다 (Fig. 1 (B)). 이러한 C-tailing 기법은 DNA 이중가닥 중 상보적인 염기서열에 근거해서 이루어지므로 A-tailing 기법의 TdT 오류 가능성을 원천적으로 해결한 방법이라고 할 수 있다. 또한 A-T 이중 결합에 의한 결합력 보다 C-G 삼중결합에 의한 결합력이 강하므로 연결 (ligation) 효율 또한 높을 것으로 기대할 수 있다.

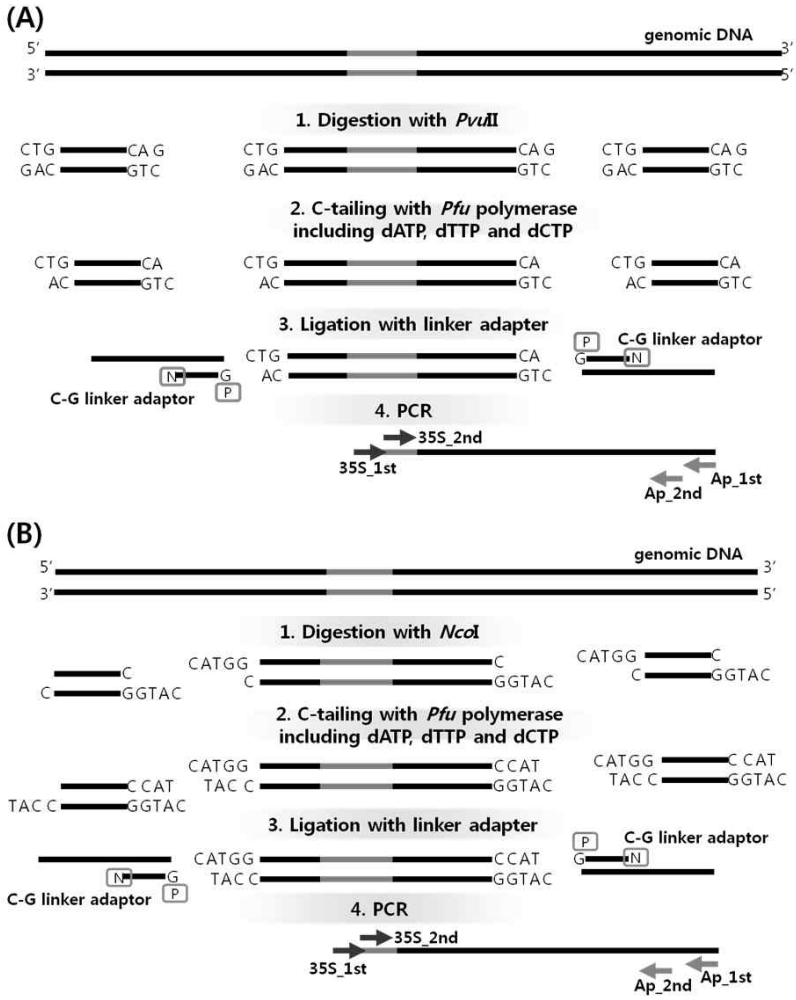

Fig. 1. General schemes for C-G linker adaptor PCR using blunt end or 3′ overhang producing restriction enzymes (e.g. *Pvu*II) (A) and 5′ overhang producing restriction enzymes (e.g. *Nco*I) (B).

A-T 링커 어댑터 PCR과 C-G 링커 어댑터 PCR 결과 비교

유전자 변형 담배를 대상으로 각각 A-T 링커 어댑터 PCR 기법과 C-G 링커 어댑터 PCR 기법을 이용하여 도입된 외래 유전자를 증폭하여 비교하였다. 유전자 변형 담배 제작에 널리 쓰이는 CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터에 이어지는 외래 유전자를 증폭할 수 있도록 35S 프로모터 특이 정방향 프라이머를 사용하였다.

*Sca*I, *Spe*I, *Nco*I, *Hind*III 네 가지 제한효소로 각각 처리된 샘플을 대상으로 1차 PCR과 2차 PCR을 실시한 후, 증폭물을 전기영동한 결과, *Sca*I, *Hind*III 제한효소 처리 샘플의 경우 원활한 증폭 밴드를 확인할 수 있었다. 반면, *Spe*I, *Nco*I으로 처리한 샘플의 경우 뚜렷한 증폭 밴드를 확인할 수 없었다 (Fig. 2).

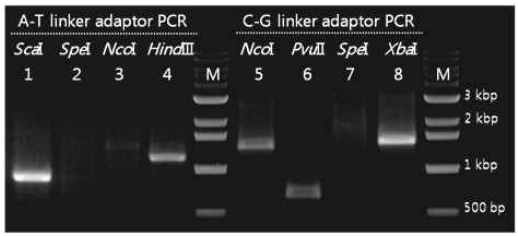

Fig. 2. Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis.

증폭이 원활히 이루어지지 않은 이유에 대해 두 가지 예상을 할 수 있다. 첫째, 특정 제한효소가 인식하는 염기서열의 위치가 35S 프로모터로부터 너무 멀리 있기 때문이다. 1차 PCR과 2차 PCR 조건의 extension 시간은 3분으로 이는 KOD-Plus-Neo polymerase가 6 kb를 증폭할 수 있는 조건이다. *Spe*I, *Nco*I 제한효소가 인식하는 염기서열이 35S 프로모터로부터 6 kb 보다 더 멀리 떨어진 곳에 위치한다면 PCR 증폭 범위 밖이라고 생각할 수 있다. 둘째, 3′ 말단 변형, 연결 (ligation) 단계의 반응 효율이 낮았다고 생각할 수 있다. A-tailing의 효율은 3′ 말단의 염기서열 종류에 따라 다르므로 제한효소 처리 후 남은 over-hang의 염기서열에 따라 전체 반응의 효율에 영향을 줄 수 있다.

C-G 링커 어댑터 실험에는 *Nco*I, *Pvu*II, *Spe*I, *Xba*I 네 가지 제한효소로 처리한 샘플을 사용하였다. 네 가지 제한효소 중 *Nco*I, *Spe*I은 A-T 링커 어댑터 PCR과 C-G 링커 어댑터 PCR 기법에 공통적으로 사용한 제한효소이다. 2차 PCR이 끝난 반응액을 전기영동하여 증폭 양상을 확인하였다. *Spe*I을 처리한 샘플을 제외한 나머지 세 개의 실험군에서 증폭 밴드를 확인할 수 있었다. *Nco*I 처리 군의 경우, A-T 어댑터 PCR로는 증폭되지 않았으나, C-G 링커 어댑터 PCR에서는 원활히 증폭이 되었다. 반복된 실험에서도 A-T 링커 PCR 대비 C-G 링커 어댑터 PCR의 결과가 증폭률이 우수함을 확인할 수 있었다. *Spe*I 제한효소 처리 샘플의 경우, 두 가지 방법 모두에서 증폭 밴드가 확인되지 않았다. 이는 앞서 예상한 이유 중 첫 번째 이유에 해당할 것으로 예상된다.

유전자 변형 담배의 외래 도입 유전자 확인

A-T 링커 어댑터 PCR과 C-G 링커 어댑터 PCR로 증폭된 산물에 대해 염기서열 분석을 수행하였다. 각 증폭 밴드들의 염기서열 분석 결과, 공통적으로 35S 프로모터에 이어 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자 (phosphinothricin resistance gene), 35S 터미네이터, left boarder로 이어지는 외래 유전자가 도입되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Left boarder 이후 염기서열은 담배 식물 지노믹 DNA 부분으로 세 가지 종류로 분류할 수 있었다. 이는 외래 유전자가 지노믹 DNA의 서로 다른 세 위치에 도입되었다는 것을 보여준다.

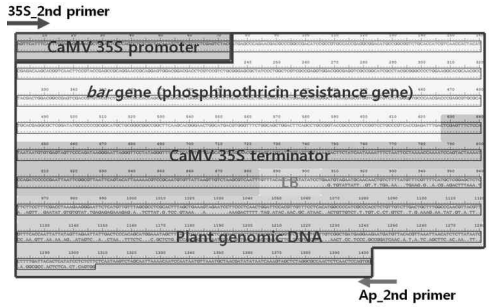

Fig. 3. The region of inserted foreign DNA revealed by the C-G linker adaptor PCR method.

결 론

본 연구에서는 기존의 LM-PCR의 한계점으로 지적되었던 낮은 목표 DNA 연결 (ligation) 효율을 보완한 C-G 링커 PCR 기법을 새로 제시하였다. 실험 결과, A-T 링커 어댑터 PCR 대비 높은 증폭률을 확인할 수 있었으며, 유전자 변형 담배의 제초제 저항성 유전자 도입 위치를 성공적으로 밝혀낼 수 있었다.

참 고 문 헌

Acevedo, J. P., Reyes, F., Parra, L. P., Salazar, O., Andrews, B. A. and Asenjo, J. A. (2008) Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. *J. Biotechnol.* 133(3): 277-286.

Arnold, C. and Hodgson, I. J. (1991) Vectorette PCR: a novel approach to genomic walking. *PCR Methods Appl.* 1: 39-42.

Bae, J. H. and Sohn, J. H. (2010) Template-blocking PCR: an advanced PCR technique for genome walking. *Anal. Biochem.* 398(1): 112-116.

Berriman, M. *et al.* (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309(5733): 416-422.

Brownstein, M. J., Carpten, J. D. and Smith, J. R. (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004-1010.

Collins, F. S. and Weissman, S. M. (1984) Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6812-6816.

Dai, S. M., Chen, H. H., Chang, C., Riggs, A. D. and Flanagan, S. D. (2000) Ligation-mediated PCR for quantitative in vivo footprinting. *Nat. Biotechnol.* 18: 1108-1111.

Denney, D. and Weismann, I. (1990) DNA generated by polymerase chain reaction using *Taq* polymerase has non-template nucleotide additions: implications for cloning PCR products. *Amplification* 4: 25.

Garrity, P. A. and Wold, B. J. (1992) Effects of different DNA polymerase in ligation-mediated PCR: enhanced genomic sequencing and in vivo footprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1021-1025.

Guo, H. and Xiong, J. (2006) A specific and versatile genome walking technique. *Gene* 381: 18-23.

Hite, J. M., Eckert, K. A. and Cheng, K. C. (1996) Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of $d(C-A)_n \cdot d(G-T)_n$ microsatellite repeats. *Nucleic Acid Res.* 24: 2429-2434.

Hu, G. (1993) DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3′ of a DNA fragment. *DNA Cell Biol.* 12(8): 763-770.

Hui, E. K., Wang, P. C. and Lo, S. J. (1998) Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1403-1411.

Jones, D. H. and Winistorfer, S. C. (1992) Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 595-600.

Levano-Garcia, J., Verjovski-Almeida, S. and da Silva, A. C. (2005) Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers. *Biotechniques* 38: 225-229.

Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and

Whittier, R. F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8: 457-463.

Magnuson, V. L., Ally, D. S., Nylund, S. J., Karanjawala, Z. E., Rayman, J. B., Knapp, J. I., Lowe, A. L., Ghosh, S. and Collins, F. S. (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by *Taq* DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *Biotechniques* 21: 700-709.

Mueller, P. R. and Wold, B. (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation-mediated PCR. *Science* 246: 780-786.

Ochman, H., Gerber, A. S. and Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.

Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B. and Riggs, A. D. (1989) Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 246: 810-813.

Rich, J. J. and Willis, D. K. (1990) A single oligonucleotide can be used to rapidly isolate DNA sequences flanking a transposon Tn5 insertion by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18: 6673-6676.

Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J. C. and Markham, A. F. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequence from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.* 19: 5395-5490.

Rosenthal, A. and Jones, D. S. C. (1990) Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 18: 3095-3096.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. and Lukyanov, S. A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23: 1087-1088.

Silver, J. and Keerikatte, V. (1989) Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* 63: 1924-1928.

Spertini, D., Beliveau, C. and Bellemare, G. (1999) Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA. *Biotechniques* 27: 308-314.

Terauchi, R. and Kahl, G. (2000) Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 59-flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (Dioscorea). *Mol. Gen. Genet.* 263(3): 554-560.

Triglia, T., Peterson, M. G. and Kemp, D. J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.

Trinh, Q., Xu, W., Shi, H., Luo, Y. and Huang, K. (2012) An A-T linker adapter polymerase chain reaction method for chromosome walking without restriction site cloning bias. *Anal. Biochem.* 425(1): 62-67.

Wahl, G. M., Lewis, K. A., Ruiz, J. C., Rothenberg, B., Zhao, J. and Evans, G. A. (1987) Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(8): 2160-2164.

Warshawsky, D. and Miller, L. (1994) A rapid genomic walking technique based on ligation-mediated PCR and magnetic separation technology. *Biotechniques* 16: 792-798.

Xu, W., Shang, Y., Zhu, P., Zhai, Z., He, J., Huang, K. and Luo, Y. (2013) Randomly broken fragment PCR with 5′ end-directed adaptor for genome walking. *Sci. Rep.* 3: 3465.

Yin, B. and Largaespada, D. A. (2007) PCR-based procedures to isolate insertion sites of DNA elements. *Biotechniques* 43: 79-84.

Yuanxin, Y., Chengcai, A., Li, L., Jiayu, G., Guihong, T. and Zhangliang, C. (2003) 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.* 31(12): e68.