

Whole genome amplification을 이용한 식중독 세균 신속 검출 기술 개발

성지영 · 고영준¹ · 명현군¹ · 오세욱*

국민대학교 자연과학대학 식품영양학과, ¹솔젠트(주) 연구기획팀

Development of a Rapid Foodborne-pathogen-detection Method Involving Whole-genome Amplification

Ji-yeong Seong, Young-Jun Ko¹, Hyeon-Koon Myeong¹, and Se-Wook Oh*

Department of Food and Nutrition, Kookmin University

¹R&D Management Team, SolGent Co., Ltd.

Abstract In this study, polyethylene glycol (PEG) was used to improve DNA amplification efficiency during whole genome amplification (WGA). Amplification efficiency was determined by adding PEG with different molecular weights to the WGA reaction. The greatest increase in amplification efficiency was obtained with PEG 4,000 used at 1.5% concentration. Foodborne pathogenic DNA was amplified by WGA and quantitatively analyzed by real-time polymerase chain reaction. DNA of *Salmonella* serotype Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus* was amplified 7,777.01, 9,981.22, and 1,239.03 fold, respectively, by WGA. On adding PEG in the WGA reaction (i.e., enhanced WGA [eWGA]), 18-40-fold more DNA amplification was achieved. Thus, these analyses showed that foodborne pathogens, which are usually present at very low concentration in foods, can be detected by real-time PCR and WGA.

Keywords: whole genome amplification, genomic DNA, pathogen, detection, real-time PCR

서 론

식중독 세균은 최근 식생활 패턴 변화, 지구 온난화 현상, 수명 연장에 의한 노인 인구와 같은 취약 인구 증가, 실내온도 상승 등 환경변화로 인하여 국내외 가공식품과 즉석식품에서 다양하게 검출되고 있으며 이에 따라 식중독 발생이 증가하고 있다(1). 2014년 우리나라에서 발생한 식중독 발생건은 349건, 식중독 환자 수는 7,466명으로 보고되고 있다(2). 미국의 경우, 미국 질병관리센터 자료에 의하면 *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*는 1996년부터 현재까지 꾸준히 식중독을 일으키고 있다고 알려져 있다. 10만 명 기준으로 2013년에 *Salmonella* spp.가 15.19%, *L. monocytogenes*가 0.26%, *V. parahaemolyticus*가 0.51%의 발생 비율을 나타내었다고 보고되고 있다(3).

식중독 세균을 검출하기 위해서는 비교적 오랜 시간이 요구된다. *Salmonella* spp.의 경우 증균배양, 분리배양을 거쳐 확인시험과 혈청시험 등의 과정이 필요하기 때문에 일주일 정도가 소요된다. 이러한 단점을 극복하고 식중독 세균을 신속하게 검출하기 위한 기술로 식중독 세균의 DNA 분석을 기반으로 하는 PCR 방법이 현재 보편적으로 사용되고 있다(4). PCR은 다른 방법에 비하여 검출한계가 낮아 식중독 세균 분석에 효과적이지만 대부분의 식품에 존재하는 식중독 세균은 검출한계 이하로 존재하기 때

문에 식품에서 바로 검출하기는 어려우며 농축배양(enrichment culture)이 반드시 필요하다(5).

DNA 분석을 하는데 있어서 DNA 양은 중요한 요소이다. 정확하고 높은 효율의 유전학적 분석을 위해서는 일정량의 DNA가 필요하다. 소량의 DNA를 증폭하는 기술로 최근 phi 29 중합효소(polymerase)를 이용하는 전체유전체 증폭(whole genome amplification, WGA)이 분자 증폭에 쓰이고 있다(5). WGA는 등온 증폭 방법 중 하나이며 phi 29 중합효소와 random primer를 이용하여 유전체(genome)를 등온에서 비특이적으로 수억 배로 증폭시킨다. Phi 29 중합효소를 사용하는 WGA는 높은 정확성과 proof-reading 기능을 가지기 때문에 *Taq* polymerase에 비해 오류가 적게 발생하는 장점이 있다(6,7).

지금까지의 WGA는 미량의 피와 같은 시료에서 DNA를 증폭하여 분석에 필요한 DNA를 확보하기 위한 분자 진단 분야에서 주로 활용되고 있다(8). 증폭된 DNA는 single nucleotide polymorphism genotyping(9), polymerase chain reaction-based mutation detection(10), DNA sequencing(11), restriction fragment length polymorphism(5), microsatellite analysis(12)에 쓰인다.

또한 DNA 증폭 효율을 높이기 위한 방법 중 하나로 molecular crowding agent를 첨가하는 방법이 이용되고 있다. Molecular crowding은 녹아있는 두 개의 분자가 동시에 같은 공간에 존재할 수 있도록 부피를 줄여주는 효과로 PCR 반응 등을 용이하게 한다. Molecular crowding에 주로 사용되는 물질로는 피콜(ficoll), 텍스트란(dextran), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol) 그리고 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol) 등이 있다(13).

식품에 존재하는 식중독 세균은 검출할 수 있을 정도로 낮은 수준으로 존재한다. 검출한계 이상으로 균수를 증가시키는 농축 배양 과정이 필요하며 보통 10시간 이상이 소요되기 때문에 신

*Corresponding author: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea
Tel: 82-2-910-5778

Fax: 82-2-910-5249.

E-mail: swoh@kookmin.ac.kr

Received February 4, 2016; revised March 10, 2016;

accepted March 30, 2016

Table 1. Target genes and oligonucleotide primers and probes used in this study

Species	Target gene	Type	Sequence (5'→3')
<i>S. Typhimurium</i>	<i>sdIA</i>	Forward primer	GCG TAA TCC GAA ACG CTG G
		Reverse primer	CGA TCG ATC CGG TAT TAA AGC
		probe	AAT TTC AGG CAG GGT CAT TTA CAT TGG GAT G
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	Forward primer	CAG TGA AGG GAA AAT GCA AGA AGA AG
		Reverse primer	CCA AGC GCT TGC AAC TGC TCT TTA G
		probe	TTT GCC GAA AAA TCT GGA AGG TCT TGT AGG T
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vpm</i>	Forward primer	TGG TGG AAA CAC GCC AAG G
		Reverse primer	ACT GCA TTA GGA GCG CCA C
		probe	ACC AAT GAC TGT TGC CAC TGT TCA AAC TCG

속 검출 기술 개발의 가장 큰 저해요인이 되고 있다. 따라서 식중독 세균에 존재하는 genome을 분리하여 이를 PCR과 같은 분자진단 방법의 검출한계 이상으로 증가시키는 분자농축 과정이 최근 주목을 받고 있다(14).

WGA로 DNA를 증폭하여 검출에 활용한 연구로는 오렌지주스에 존재하는 효모를 검출한 연구(15)가 보고되고 있으나 아직까지 식중독 세균 DNA를 증폭하여 검출한 연구는 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 식중독 세균의 신속 검출 기술 개발의 기초연구로서 WGA를 이용한 식중독 세균 DNA의 증폭 연구를 수행하였으며 이후 증폭된 DNA를 real-time PCR로 검출하여 분자농축 가능성을 타진하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 DNA 분리

본 실험에 사용한 human genomic DNA는 HEK 293T cell에서 분리하여 사용하였다. 미생물균주는 ATCC (Manassas, USA)에서 분양받은 *Salmonella* Typhimurium ATCC 19585, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27969를 사용하였다. *S. Typhimurium*, *L. monocytogene*는 tryptic soy broth (Difco, Franklin Lakes, USA)에 접종하고 *V. parahaemolyticus*는 NaCl (Sigma, St. Louis, USA)를 3% 첨가한 nutrient broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양시켜 사용하였다.

Human genomic DNA와 bacterial DNA는 SolgTM Genomic DNA Prep Kit For Blood (SolGent, Daejeon, Korea)와 SolgTM Genomic DNA Prep Kit For Bacterial cell (SolGent)를 사용하여 각각 추출하였다. DNA 추출 방법은 제조사에서 권장하는 방법에 따라 진행하였다.

Polyethylene glycol/폴리에틸렌글리콜 첨가

실험에 사용된 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)은 PEG 4,000, 8,000, 20,000, 35,000 (Sigma)로, WGA 반응에 시료 완충용액(sample buffer)을 첨가할 때 총 부피(volume)의 1.5%가 되도록 첨가하였다.

Whole genome amplification (WGA)

추출된 DNA는 SEQ-TempliGen WGA kit (SolGent)를 사용하여 증폭시켰으며 제조사에서 권장하는 방법에 따라 진행하였다. 1 µL DNA에 1 µL 1X 변성 완충용액(denaturation buffer)을 넣은 후 실온(room temperature)에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후, 2 µL 1X 중화 완충용액(neutralization buffer), 6 µL WGA 시료 완충용액(sample buffer), 9 µL WGA 반응 완충용액(reaction buffer) 그

리고 1 µL WGA 효소 혼합물(enzyme mixture)을 넣고 30°C에서 증폭(amplification) 반응시킨 뒤 70°C에서 5분간 불활성화 과정을 거쳤다.

최종산물은 반응액 5 µL를 1 µL loading star (SolGent)와 섞은 후 1% 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기이동하고 Gel Logic UV lamp (Carestream, Rochester, USA)로 확인하였다.

Multiplex PCR 반응

WGA로 증폭된 DNA 중 2 µL는 50 µL 반응용액(200 µM dNTP, 400 nM primer, 1.25 unit *Taq* polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% gelatin, 0.1% Tween 20)에서 증폭시켰다. 온도 조건은 94°C 4분 반응 후, 95°C 20초, 60°C 39초, 72°C 5분 반응을 35 cycle으로 진행하였다. PCR 산물은 반응액 5 µL를 1 µL loading star (SolGent)와 섞은 후 3% (w/v) agarose gel에서 전기이동 후 확인하였다. 산물의 크기는 1 kb plus DNA Ladder (SolGent)를 사용하여 측정하였다.

Real-time PCR 반응

WGA로 증폭된 DNA는 SolgTM 2X Real-time PCR Smart Mix (SolGent)를 사용하여 real-time PCR에 사용되었다. 2X Real-time PCR Smart mix 10 µL, 10 pmole/µL primers, 500 nM probe 그리고 2 µL template DNA를 혼합하였으며 증류수를 최종 20 µL가 되도록 첨가하였다. PCR에 사용된 프라이머(primer)는 Bioneer (Daejeon, Korea), probe는 Genotech (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 구매했으며, primer와 프로브(probe)에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다. 96-well microplate를 사용하여 CFX96 real-time PCR (BioRad, Hercules, USA)에서 real-time PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 95°C 15분간 가열한 후, 95°C 30초, 60°C 1분의 과정을 45회 반복하였다.

결과 및 고찰

PEG를 이용한 WGA 효율 향상

PEG 베테인(betaine), 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide) 같은 물질은 DNA 증폭 효율과 정확성을 높이는데 사용되고 있다. 이러한 물질들은 PCR 반응에서 주형(template) DNA의 이중가닥(double strand)이 50% 정도 단일가닥(single strand)으로 바뀌는 온도인 Tm값을 변화시킴으로써 PCR 반응의 특이성(specificity)을 증가시키며 반응용액 내의 핵산이나 단백질 같은 물질들의 반응 가능성을 높여준다고 알려져 있다(16,17). 이에 본 연구팀은 보편적으로 사용되는 PEG를 통한 증폭 반응인 WGA에 첨가하여 DNA 증폭 효율 증진의 가능성을 검증하고자 하였다.

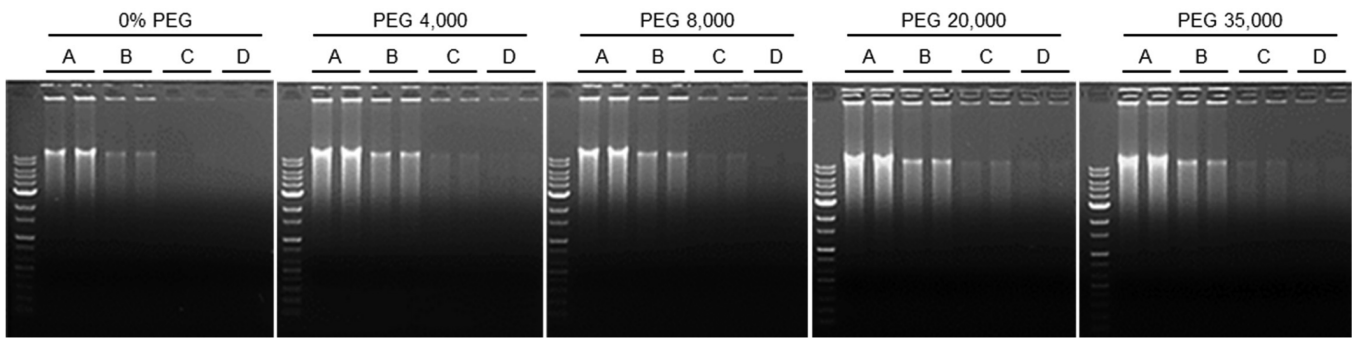


Fig. 1. Effect of various PEGs in WGA reaction in human genomic DNA. Lane A, 1 ng; lane B, 100 pg; lane C, 10 pg; lane D, 5 pg; lane 0, control (no additive).

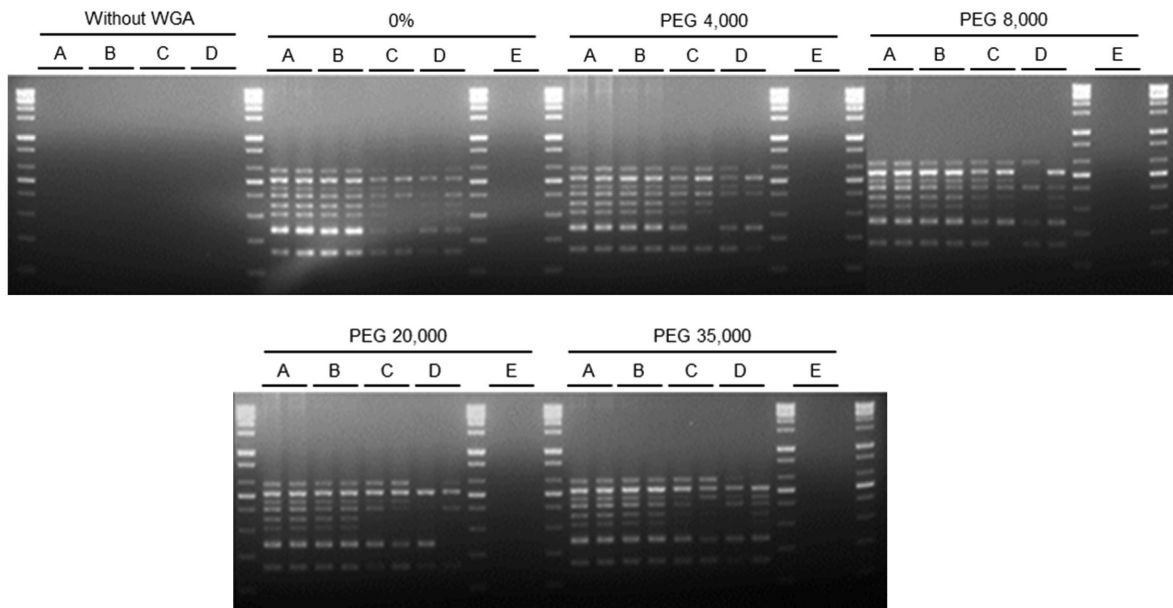


Fig. 2. Agarose gel analysis of multiplex PCR-amplified human genomic DNA after WGA with various PEGs. Lane A, 1 ng; lane B, 100 pg; lane C, 10 pg; lane D, 5 pg; lane E, control (no DNA).

4가지 다른 종류의 PEG (PEG 4,000, 8,000, 20,000, 35,000)를 WGA 반응에 첨가하여 미량 존재하는 human genomic DNA를 증폭시켰다. 그 결과, PEG를 첨가시켜 WGA를 진행한 처리구와 PEG를 첨가하지 않은 처리구를 비교해 보았을 때, 전기영동 상에서 PEG를 첨가하여 WGA를 한 처리구에서 더 선명한 DNA 띠(band)를 확인하였다. 따라서 WGA 반응에 PEG를 첨가한 것이 핵산 증폭에 효과가 있는 것으로 판단되었다(Fig. 1). 그러나 WGA 반응 산물은 핵산이 다중으로 증폭되어 큰 분자 크기의 형태로 나타나므로, 증폭 정도를 육안으로 판별하기 어렵기 때문에 WGA 반응 후 multiplex PCR 반응을 통해 증폭 정도를 확인하고자 하였다. WGA를 반응시킨 후에 multiplex PCR을 수행한 결과, WGA를 하지 않은 처리구에서는 DNA band가 전혀 검출되지 않았으며 실험에 사용된 DNA 양이 감소할수록 DNA band가 희미하게 나타났다. 또한 1.5% 농도의 PEG 4,000을 WGA 반응에 첨가하였을 때 다른 처리구보다 더 선명한 DNA band를 나타내어 PEG 4,000이 WGA에 의한 DNA 증폭 효과가 가장 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 2).

식중독 세균 DNA의 증폭 효율 분석

낮은 농도의 bacterial DNA를 WGA 후 real-time PCR을 통해

증폭 효율을 비교한 결과, 세가지 균 모두 PEG를 첨가하여 WGA를 했을 때 PCR 증폭 산물이 일정량 증폭되었을 때의 cycle 수인 Ct 값이 단축되는 양상을 나타내었다(Table 2). WGA를 실시하지 않고 real-time PCR을 수행했을 때 *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*는 Ct 값이 각각 28.41, 31.02, 27.92로 나타난 반면, WGA를 실시한 후 real-time PCR을 했을 때 Ct 값이 각각 19.65, 23.07, 22.79로 8.76, 7.95, 5.14 정도로 단축되는 것으로 나타났다. 또한, PEG를 첨가하여 WGA를 한 enhanced WGA (eWGA)를 실시하였을 때의 Ct 값과 DNA 추출 시료에서 얻은 Ct 값의 차이 또한 12.93, 13.29, 10.28로 확인한 단축 효과를 보였다. *S. Typhimurium*의 경우, eWGA를 했을 때 WGA를 하지 않은 시료보다 Ct 값이 12.93 정도 단축되는 결과가 나타났는데 이는 $2^{12.93}$ 배, 즉 7,777.01배 정도 핵산 증폭 양의 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. *L. monocytogenes*는 eWGA를 했을 때의 Ct 값을 WGA를 하지 않은 시료의 Ct와 비교해보았을 때 13.29 단축 효과가 있었으며 *V. parahaemolyticus*의 경우, 10.28로 각각 9,981.22, 1,239.03배 정도 핵산이 증폭된 양에서 차이가 있었다. PEG를 첨가하여 WGA를 수행한 시료를 PEG를 첨가하지 않고 WGA를 한 것과 비교해 보았을 때, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*의 Ct 값 차이가 각각 약

Table 2. Amplification efficiency of WGA with or without 1.5% PEG 4,000 against foodborne pathogens

Species	Ct values ¹⁾ (Mean±SD)			Difference ²⁾ /Degree of Amplification		
	No WGA	WGA	eWGA ³⁾	WGA-no WGA	eWGA-no WGA	eWGA-WGA
<i>S. Typhimurium</i>	28.41±0.22	19.65±0.23	15.48±0.01	8.76/432.03	12.93/7,777.01	4.17/18.00
<i>L. monocytogenes</i>	31.02±0.16	23.07±0.05	17.73±0.09	7.95/247.28	13.29/9,981.22	5.34/40.50
<i>V. parahaemolyticus</i>	27.92±0.08	22.79±0.05	17.65±0.04	5.14/35.14	10.28/1,239.03	5.14/35.26

¹⁾A number of cycles, where the PCR kinetic curve gets to a defined threshold of fluorescence

²⁾Subtraction of Ct values between WGA methods

³⁾Enhanced

4.17, 5.34, 5.14로 나타났다. 이는 각각 18.00, 40.50, 35.26배의 핵산이 더욱 더 증폭되는 효과가 있음을 알 수 있었다.

따라서 미량의 식중독 세균 DNA가 존재할 때 WGA를 통하여 35배에서 432배의 핵산 증폭 효과가 있었으며 또한 PEG를 첨가함으로써 1,239배에서 9,981배의 핵산 증폭 효과가 있음을 알 수 있었다. 균별로는 *V. parahaemolyticus*의 핵산이 상대적으로 적게 증폭되었으며 *L. monocytogenes*가 가장 많이 증폭이 되었다.

이러한 균 종류에 따른 핵산 증폭 효과의 차이는 균 자체의 특성에 기인한다기 보다는 미생물 균종이 가지고 있는 물리화학적 성질에 기인한다고 생각되었다. Musso 등(18)은 GC 함량이 높은 genomic DNA sequence를 증폭할 경우, 단일가닥으로 존재하는 DNA가 고리구조를 형성하여 *Taq* polymerase의 활성을 저해하여 상대적으로 짧은 PCR 산물이 만들어진다고 보고하였다. 또한 PEG를 첨가하면 GC의 비율이 높은 지역에서 생성되는 복잡한 이차구조를 풀어 PCR 증폭에 도움을 준다는 보고도 있다(19). 따라서 본 실험에서도 균종 간의 증폭 비율의 차이는 GC 비율 차이 등에 기인한다고 생각되었다.

요 약

PEG를 이용하여 WGA 수행 시 DNA 증폭 효율을 높이고 이를 식중독 세균의 DNA 증폭 및 검출에 적용하고자 하였다. 등은 증폭 반응인 WGA에 여러 종류의 PEG를 첨가하여 증폭한 결과, 1.5% 농도의 PEG 4,000을 첨가하는 것이 가장 효율이 높음을 알 수 있었다. 증폭 정도를 정량적으로 파악하기 위하여 3종의 식중독 세균 DNA를 이용하여 WGA를 수행하였으며 real-time PCR로 정량분석하였다. *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*의 경우에 WGA를 하지 않은 DNA에 비하여 각각 7,777.01배, 9,981.22배, 1,239.03배 정도로 DNA의 양이 증폭되는 것을 확인하였다. 또한 PEG를 첨가함으로써 18배에서 40배의 핵산 증폭 효과가 더 있음을 알 수 있었다. 따라서 식품에 미량의 농도로 존재하는 식중독 세균은 PEG가 첨가된 WGA 반응을 통하여 검출 가능성을 높일 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(다소비 횡감의 위생안전성 확보 및 소비촉진을 위한 식품 위해인자 검출기술 개발).

References

1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, van

- der Giessen J, Kruse H. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* 139: S3-S15 (2010)
2. Ministry of Food and Drug Safety. Food Safety Information. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthy-foodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02. Accessed Jan. 12, 2016.
3. Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, Cartter M, Tobin-D'Angelo M, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Zansky S, Cieslak PR, Dunn J, Holt KG, Lance S, Tauxe R, Henao OL. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 63: 328-32 (2014)
4. Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK, Renter DG. A real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in a wide variety of food and food-animal matrices. *J. Food Prot.* 70: 1080-1087 (2007)
5. Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG, Rutherford A. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: A new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 767-772 (2004)
6. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *Genome Res.* 1: 17-24 (1991)
7. Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Yamamoto Y, Yamada A. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 355-361 (2007)
8. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 5261-5266 (2002)
9. Barker DL, Hansen MST, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, Latterich M, Makarov V, Oliphant A, Pinter JH, Shen R, Sleptsova I, Ziehler W, Lai E. Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res.* 14: 901-907 (2004)
10. Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmüller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschhoff J. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification. *Am. J. Pathol.* 154: 83-95 (1999)
11. Lasken RS, Egholm M. Whole genome amplification: Abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends Biotechnol.* 21: 531-535 (2003)
12. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5847-5851 (1992)
13. Ellis RJ. Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 26: 597-604 (2001)
14. Maheux AF, Bissonnette L, Boissinot M, Bernier JLT, Huppé V, Picard FJ, Bérubé È, Bergeron MG. Rapid concentration and molecular enrichment approach for sensitive detection of *Escherichia coli* and *shigella* species in potable water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6199-6207 (2011)
15. Renard A, di Marco PG, Egea-Cortines M, Weiss J. Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of spoilage yeasts in orange juice. *Int. J.*

- Food Microbiol. 126: 195-201 (2008)
16. Bachmann B, Lüke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res.* 18: 1309 (1990)
17. Pomp D, Medrano JF. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10: 58-59 (1991)
18. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J. Mol. Diagn.* 8: 544-550 (2006)
19. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, TerMaat JR, Carvill G, Goliath R, Subramanian A, Viljoen HJ. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput. Biol. Chem.* 32: 452-457 (2008)