

# PCR longue : progrès récents et application à l'étude des délétions de l'ADN mitochondrial

Pascal Reynier, Yves Malthièry

*L'optimisation des performances des ADN polymérasés et l'utilisation judicieuse des caractéristiques propres à chacune permet, aujourd'hui, la synthèse de fragments d'ADN de plusieurs dizaines de milliers de paires*

*de bases. De nouveaux champs d'application dans la pratique médicale s'ouvrent pour cette technique. L'étude de la structure des gènes, l'étude des génomes viraux ou des ADN mitochondriaux devraient*

*s'en trouver facilités. Par exemple, la PCR longue permet d'aborder les réarrangements de l'ADN mitochondrial sous un angle nouveau, tant qualitatif que quantitatif.*

**D**epuis 1985 [1], la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) s'est largement imposée, tout particulièrement grâce à l'apparition d'une ADN polymérase thermorésistante en 1988 [2, 3]. Cette technique permet la sélection et l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN cible à partir d'un mélange complexe. Elle a largement supplanté les techniques de clonage, beaucoup plus lourdes, au prix de contraintes réelles mais mineures. Il est nécessaire de connaître la séquence nucléotidique des bornes du fragment à amplifier et de synthétiser les oligonucléotides correspondants, de travailler en conditions draconiennes évitant toute contamination, et de toujours s'assurer de la spécificité de l'ADN synthétisé par un contrôle interne.

Cette réaction, extrêmement sensible, a rapidement trouvé de nombreuses applications. Couplée à la transcription inverse, elle permet la détection et même la quantification des ARN messagers. Elle a donc été facilement adaptée à l'étude de l'expression gé-

nique [4]. Sa souplesse d'utilisation et son extrême efficacité l'ont imposée comme incontournable dans la détection et la quantification des génomes d'agents infectieux. Sa standardisation et son automatisation permettent, aujourd'hui, certains diagnostics « en routine ». Et le champ d'application, en diagnostic comme en recherche, reste largement ouvert.

Jusqu'à une période récente, en dépit de ses performances et de ses nombreuses applications, la PCR trouvait sa limite dans la taille des fragments amplifiés. Quelques tentatives rapportaient l'amplification *in vitro* de séquences de 5 à 15 kilobases (kb), mais les réactions étaient peu efficaces et peu reproductibles [5-7]. Dans les conditions classiques, les séquences amplifiées sont limitées à quelques kilobases.

En 1994, une étape importante fut franchie avec l'adaptation de cette technique à l'amplification d'ADN de grandes tailles. L'utilisation différente des polymérasés et de leurs cinétiques d'action permet la synthèse efficace et reproductible d'ADN de

plusieurs dizaines de kilobases, 35 kb par Barnes (Saint-Louis, MO, USA) dans la publication princeps [8] et jusqu'à 42 kb dans une publication plus récente [9].

## Principe

Les ADN polymérasés présentent des caractéristiques variables, notamment sur le nombre de nucléotides incorporés dans la molécule d'ADN en cours de synthèse par chaque molécule d'enzyme avant que celle-ci ne quitte le complexe de polymérisation (*processivity*). La *processivity* caractérise la spécificité de l'activité polymérasique 5' → 3' des enzymes : le nombre de nucléotides du brin synthétisé par une seule molécule d'enzyme varie de 7-10 résidus pour l'enzyme de Klenow à plusieurs milliers pour l'ADN polymérase III, enzyme assurant la réplication des génomes procaryotes. *In vitro*, lors de l'étape d'élongation d'amorce de la PCR, chaque molécule d'ADN polymérase catalyse ainsi l'addition d'un nombre variable de résidus désoxyribonucléo-

sidiques à l'extrémité 3' du brin d'ADN nouvellement synthétisé, reflet de la *processivity* de la polymérase utilisée. La synthèse totale d'un amplicon est assurée par la formation successive de complexes entre amplicon en cours de synthèse et autant de molécules enzymatiques qu'il est nécessaire. La *processivity* moyenne des ADN polymérases habituellement utilisées dans la PCR est faible, de l'ordre de 20 à 40 nucléotides.

La vitesse d'extension de l'ADN polymérase correspond au nombre de nucléotides incorporés par unité de temps. *In vitro*, dans les conditions optimales, elle est de 60 nucléotides/seconde pour la *Taq* ADN polymérase, l'enzyme la plus couramment utilisée. Cette vitesse dépend, entre autres facteurs, de la présence d'une activité exonucléasique 5' → 3' (exo+) de relecture et de correction du dernier nucléotide incorporé (*proofreading*). Cette activité d'auto-correction améliore la fidélité de l'amplification mais affecte la vitesse d'extension et la *processivity* en ralentissant la vitesse de synthèse. À l'inverse, l'absence de cette activité d'auto-correction permet une extension d'amorce rapide au prix d'une fidélité réduite. Ces enzymes déficientes en activité exonucléasique 5' → 3' (exo-) sont actuellement largement utilisées pour la PCR.

Pour amplifier de longs fragments d'ADN il est nécessaire d'utiliser des ADN polymérases «exo-» à capacité d'extension élevée. Certaines enzymes «exo-» à thermorésistance accrue permettent, en effet, l'amplification de fragments allant jusqu'à 15 kb. Mais, au-delà de 10 kb, la réaction d'amplification perd beaucoup de son efficacité. Cette limite à la PCR est due aux erreurs d'incorporations qui se produisent une fois toutes les 10 à 50 kb selon les enzymes utilisées. Lorsque l'ADN polymérase libère le complexe de polymérisation en laissant une extrémité 3' mésappariée, aucune autre molécule de polymérase ne pourra reprendre l'extension. Ainsi, à chaque cycle d'une longue PCR, un nombre croissant de brins d'ADN synthétisés présentent une amplification avortée rendant la réaction inopérante.

L'adjonction d'une petite proportion d'ADN polymérase «exo+» à une

ADN polymérase «exo-» compense les inconvénients de cette dernière. La vitesse d'extension élevée de la polymérase «exo-» est conservée et la polymérase «exo+» apporte une capacité de correction des mésappariements en 3'. Un bon équilibre entre les deux polymérases permet d'optimiser une extension rapide tout en conservant une activité de correction. Dans les mélanges enzymatiques testés cette optimisation est obtenue pour un mélange ADN polymérase «exo-» ADN polymérase «exo+» de l'ordre de 15:1, selon les polymérases utilisées. Dans le premier modèle d'amplification qui utilisait l'ADN du bactériophage lambda et un jeu d'amorces permettant des amplifications de tailles croissantes, Barnes montrait que l'ajout de l'activité «exo+» à une polymérase «exo-» produisait effectivement une augmentation de la quantité de synthèse des fragments les plus longs, et que cette capacité de synthèse était directement dépendante et spécifique du mélange des ADN polymérases utilisées. Sur cette matrice d'ADN homogène et purifiée, il est alors possible d'obtenir une synthèse de fragments allant jusqu'à 42 kilobases [8, 9].

Cette amélioration du système enzymatique n'est pas suffisante à elle seule pour amplifier de longues séquences d'ADN. En effet, à forte température, l'ADN est susceptible d'être altéré et de subir des cassures en raison du haut niveau énergétique et de la structure simple brin qu'il adopte. Le pH du milieu réactionnel diminue au cours des étapes de dénaturation à 95 °C et cette acidification est responsable de la dépurination des matrices. Le pH d'un milieu réactionnel de 8,55 °C à 25 °C peut diminuer à environ 6,45 °C à 95 °C, entraînant une vitesse de dépurination de 1/20-30 kb/minute [8, 9]. Ces altérations compromettent sérieusement la qualité de la PCR. Pour limiter, autant que possible ces effets du pH et de la température, le pH du milieu de la réaction est augmenté à 9,1 permettant une neutralité à haute température. En outre, la durée des étapes de dénaturation est réduite à quelques secondes (15 à 20 secondes) grâce à l'utilisation d'agents diminuant la

température de fusion de l'ADN tels que glycérol et DMSO. Une bonne spécificité de la PCR est conditionnée par l'utilisation d'amorces longues, 25 à 33-mers, permettant une température d'hybridation voisine de la température d'élongation. Les cycles d'amplification comportent préférentiellement deux paliers thermiques (94 °C et 72 °C). Il semble que les variations fréquentes de température soient plus néfastes que le maintien à une température plus constante, même élevée.

Au total, les conditions de réalisation et d'optimisation de la PCR longue sont assez contraignantes et strictes. Il est nécessaire de protéger la qualité des matrices, d'utiliser un mélange enzymatique adapté à la situation et de mettre en œuvre un ensemble de mesures dont les principales sont rapportées dans le *Tableau I* [10, 11]. Si l'ensemble de ces mesures doivent être respectées, deux facteurs nous semblent déterminants, à savoir la qualité de la préparation de l'ADN matrice et le type de thermocycleur utilisé. En effet, une cinétique rapide des températures conditionne largement la qualité du résultat.

## Résultats

La PCR longue est d'autant plus efficace que la séquence cible est pure (séquence clonée) ou naturellement surreprésentée (séquences virales ou mitochondriales). La technique a été mise au point sur de l'ADN du bactériophage lambda (48,5 kb) en solution pure. Jusqu'à 42 kb ont pu être amplifiés avec une bonne efficacité [8, 9]. L'amplification du génome mitochondrial humain est réalisable à 98 % [12] et même 100 % [13]. Cette méthode de préparation de l'ADN mitochondrial permet la recherche d'un polymorphisme en associant la PCR longue et l'étude des fragments de restriction et doit rapidement détrôner l'incontournable *Southern blot*, technique efficace mais limitée par ses besoins en ADN. L'amplification d'une séquence unique à partir d'un ADN génomique est moins performante. Cependant, des amplifications de l'ordre de 22 kb sont rapportées (sur le gène de la  $\beta$ -globine) [9].

La PCR longue trouve des applications évidentes dans la détermination

Tableau I			
CONDITIONS TECHNIQUES UTILISÉES DANS LES PCR CLASSIQUES ET LES PCR LONGUES			
	PCR Classique < 5kb	PCR Longue > 5kb	But recherché
<b>ADN polymérase</b>	une seule enzyme exo- (ou exo+)	ADN pol exo- : 2 à 2,5U ADN pol exo+ : 0,015 à 0,15U	optimisation du rapport : taux extension/ auto-corrrection
<b>pH</b>	8,3 (à 25 °C )	9,2 (à 25 °C )	protection de la matrice d'ADN
<b>dénaturation</b>	60 secondes à 95 °C	5 à 10 secondes à 92-94 °C	
<b>agent dénaturant</b>	non	± DMSO : 1 à 3 % (v/v) ± glycérol : 8 % (v/v) ± tween 20 : 0,1 % (v/v)	
<b>tampon</b>	50 mM KCl 20 mM Tris 1 à 2 mM MgCl <sub>2</sub> dNTP : 200 µM	16 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 mM Tris HCl 1,75 à 3,5 mM MgCl <sub>2</sub> (selon la taille) dNTP : 350 à 500 µM (selon la taille)	maintien de la spécificité  de la réaction  dans les conditions préconisées
<b>début de la réaction à chaud (hot-start)</b>	facultatif	indispensable	
<b>longueur des amorces</b>	20-25 nucléotides	30-33 nucléotides (T <sub>m</sub> =68 °C )	
<b>cycles</b>	3 étapes : 95 °C – 1 mn, 60 °C – 30 à 60 s. 72 °C – 30 à 60 s/kb.	2 étapes : 94 °C – 20 s 68 °C – 30 s/kb avec augmentation progressive du temps d'élongation	
<b>performances du thermocycleur</b>	±	+++	optimisation
<b>tubes à paroi fine</b>	±	+	des transferts de chaleur pour faciliter
<b>volume de réaction</b>	50-100 µl	30-50 µl	la dénaturation
<b>extraction de l'ADN selon les protocoles « long fragments »</b>	±	++++	extraction « douce », congélation/décongélation de l'ADN à éviter

de la structure introns/exons de gènes nouvellement identifiés et dans la recherche d'association entre des altérations géniques spécifiques et maladies ou prédispositions pathologiques [9]. La détection et l'analyse des génomes bactériens et viraux doit

s'en trouver grandement bénéficier. L'amplification de 8,3 kb du génome proviral de VIH-1 avec 40 cycles de PCR montre que 10 à 100 copies est un seuil de sensibilité accessible à cette technique de PCR longue [9]. En outre, le couplage à

une étape de transcription inverse constitue une RT-PCR adaptée à l'étude directe des génomes viraux et des ARNm. Le génome total d'un picornavirus (7 kb) a été récemment amplifié selon cette technique [14]. La synthèse d'un ADNc de 13,5 kb de

la dystrophine humaine a aussi été rapportée [15].

La fidélité de la copie pourrait être le prix à payer à la longueur et la rapidité de synthèse. Cette fidélité de synthèse a été testée dans un système biologique consistant à amplifier le gène *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) dans les conditions de PCR longue, à cloner les ADN obtenus dans un vecteur procaryote d'expression et à dénombrer les colonies mutantes. Une analyse statistique permet d'évaluer le taux d'erreurs [8]. Le mélange enzymatique « *Taq* ADN polymérase (exo-)/*Pfu* ADN polymérase (exo+) » dans le rapport 15:1 se traduit par un taux d'erreurs de  $1,05/10^5$  paires de bases (pb), comparable à celui de la *Pfu* ADN polymérase ( $1,9/10^5$  pb), ADN polymérase actuel-

lement reconnue comme la plus fidèle. D'autres couples d'ADN polymérases testées donnent des taux d'erreurs du même ordre. Dans ce système, la *Taq* ADN polymérase (exo-) présente un taux d'erreur de  $13,4/10^5$  pb.

### Application à l'étude du génome mitochondrial

Le génome mitochondrial humain est un ADN circulaire double brin de 16 569 pb qui code pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiques et 13 protéines qui font toutes partie des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale [16]. Au cours du vieillissement, il existe un déclin progressif de la fonction mitochondriale. Parallèlement, les mitochon-

dries accumulent des génomes porteurs de mutations ponctuelles, de duplications et de délétions. Ces génomes mutés s'accumulent préférentiellement dans les cellules à taux de renouvellement faible ou nul (système nerveux, muscles squelettiques et cardiaques) [17]. Les délétions multiples sont particulièrement difficiles à mettre en évidence, à cause de leur très faible fréquence individuelle. Le phénomène de délétion a été le plus souvent exploré par l'analyse quantitative d'une délétion dite « commune » de 5 kb. Une étude par PCR (la sensibilité relative de la méthode de *Southern* étant insuffisante) révélait et analysait un fragment d'ADN de quelques centaines de paires de bases intégrant la délétion, la fraction non délétée n'étant en général pas détectée [18-20]. La proportion des génomes présentant cette délétion dans les cellules musculaires ou nerveuses du sujet âgé est de l'ordre de un pour mille [17], et on comprend mal comment cette anomalie si faiblement représentée peut retentir sur la fonction mitochondriale et expliquer le déclin de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est prouvé aujourd'hui que cette délétion « commune », supposée être un reflet des multiples délétions présentes sur les ADN mitochondriaux (ADNmt), est en réalité un mauvais témoin de l'importance des délétions des génomes mitochondriaux. L'importance des nombreuses délétions n'est, en effet, pas corrélée à la présence de cette délétion de 5 kb. Une détection plus globale, et si possible exhaustive, des délétions multiples est plus adaptée à l'étude de ce phénomène. La somme des nombreuses molécules mutées peut atteindre une valeur importante, définissant une hétéroplasmie globale, suffisante pour expliquer le retentissement phénotypique observé, et ce, d'autant plus que les diverses mutations de l'ADNmt semblent pouvoir potentialiser leurs effets respectifs [21, 22].

L'amplification d'une région de 12 kb fréquemment affectée par les délétions est réalisée en présence d'une polymérase «exo-» fortement thermorésistante [23]. Cette réaction de PCR longue permet de mettre en évi-

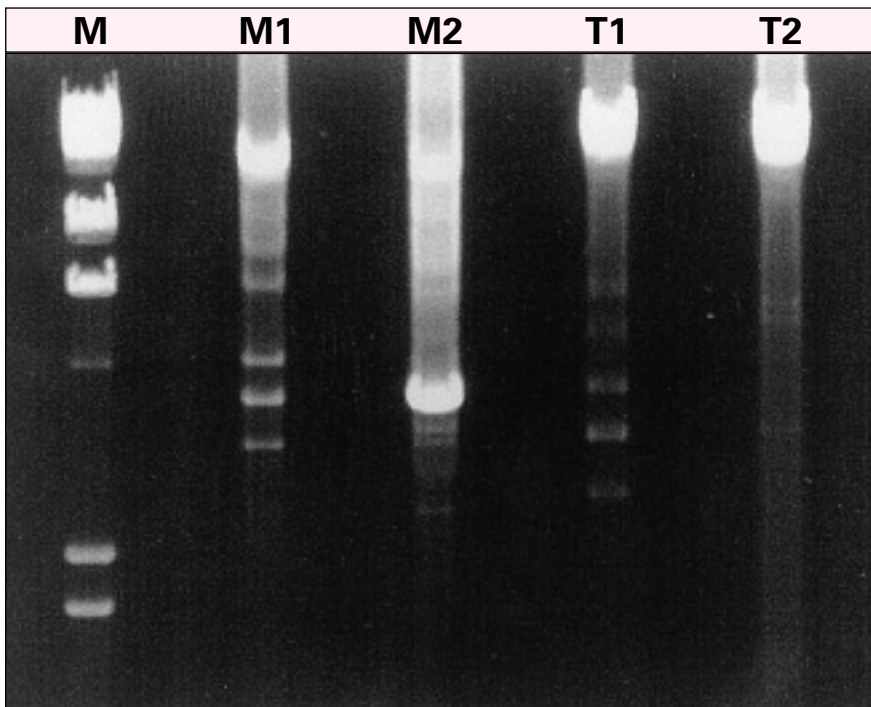


Figure 1. Amplification de la totalité de l'ADN mitochondrial (16,5 kb) par PCR longue à l'aide d'un mélange de deux ADN polymérases (*Taq* ADN polymérase «exo-»/*Pwo* ADN polymérase «exo+» dans un rapport 15:1) sur deux préparations d'ADN pathologiques (M1 = myocarde de myocardiopathie dilatée, sujet de 41 ans et M2 = muscle squelettique de myopathie mitochondriale, 60 ans) et deux ADN de sujets sans pathologie mitochondriale clinique (T1 = muscle squelettique d'un individu âgé, 89 ans et T2 = muscle squelettique d'un individu jeune, 33 ans). Au cours du vieillissement apparaissent et s'accumulent diverses délétions des génomes mitochondriaux, à des taux variables selon les individus, pouvant atteindre ou non un seuil d'apparition d'une maladie mitochondriale clinique. Chez le sujet T1 le pourcentage encore élevé d'ADNmt intacts explique l'absence de symptomatologie clinique. M: marqueur de poids moléculaire.

dence simultanément de nombreuses délétions (jusqu'à 20 dénombrées) dans une préparation d'ADNmt de muscle squelettique de sujets âgés [13]. Au-delà de 12 kb les amplifications perdent beaucoup de leur efficacité et deviennent très aléatoires. Avec ce protocole de PCR utilisant une seule ADN polymérase «exo-» à performances optimisées, utilisant les conditions «standard» de PCR, une amplification préférentielle des formes moléculaires les plus courtes est observée. Le taux d'échecs par erreur d'incorporation est proportionnel à la taille du produit amplifié, ce qui explique l'arrêt prématuré d'espèces moléculaires longues et l'amplification préférentielle des séquences courtes. Ce biais d'amplification interdit toute approche quantitative au cours de ce type de PCR.

L'utilisation d'un mélange de deux ADN polymérases permet l'amplification de la totalité du génome mitochondrial, soit 16,5 kb. Elle permet également la détection des délétions multiples de l'ADNmt. Mais le biais d'amplification en faveur des molécules les plus courtes est beaucoup moins marqué et les proportions des différentes formes moléculaires présentes au stade initial semblent respectées après une réaction de 30 et même 40 cycles d'amplification. Cela confirme l'impact fondamental sur l'extension de l'activité «exo+» ajoutée au milieu réactionnel. Les cinétiques d'amplifications de séquences de tailles très différentes étant similaires, la quantification des différentes formes moléculaires, et tout particulièrement la forme intacte non délétée, peut être raisonnablement envisagée [13]. Il est possible de définir un taux d'hétéroplasmie globale des ADNmt délétés, représentant le rapport de l'ensemble des ADNmt présentant une quelconque délétion à l'ensemble des génomes mitochondriaux (délétés et non délétés).

La PCR longue permet donc une approche à la fois qualitative (figure 1) et quantitative (figure 2) du phénomène multidélétionnel des génomes mitochondriaux. L'abord qualitatif montre que la délétion «commune» de 5 kb n'est pas toujours présente et qu'elle n'est jamais prédominante. Sa

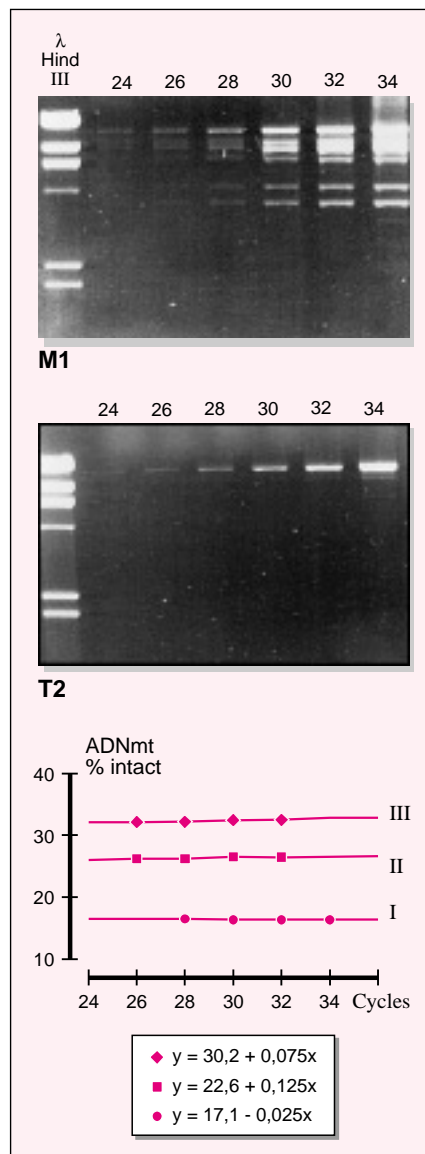


Figure 2. La PCR longue permet une approche quantitative, avec les aléas connus de toute PCR quantitative [4]. La mesure quantitative des molécules d'ADNmt non délétées dans une préparation mitochondriale issue d'un myocarde pathologique (M1 de la figure 1) est obtenue par mesure densitométrique après migration en gel d'agarose et coloration par le bromure d'éthidium [17 % des ADNmt totaux (I)]. Une mesure menée à l'identique sur des mélanges d'une quantité fixe de cette préparation initiale (M1) avec des quantités connues d'une préparation d'ADNmt intact (T2) montre des valeurs de 23 % (II) et 30 % (III) du rapport ADNmt intact/ADNmt total (soit des augmentations de 6 % et 13 % de ce rapport I/T) pour des apports de préparation d'ADNmt intact de 12,5 % et 25 % respectivement. L'augmentation du rapport final mesuré I/T est proportionnel à l'augmentation du rapport initial des mélanges. Cette augmentation proportionnelle se vérifie à différentes étapes de la cinétique de réaction (hors la phase de plateau), ce qui est confirmé par le graphe rapportant des rapports I/T constants.

quantification est insuffisante pour estimer la proportion de molécules délétées. L'étude de cette délétion n'est en rien un reflet informatif des délétions survenant sur les ADNmt. Les profils de délétions sont propres à chaque sujet, même si certaines délétions sont plus fréquemment observées que d'autres. Cette approche qualitative permet de mieux comprendre l'altération de la fonction mitochondriale puisque chaque délétion présente en très faible proportion additionne son effet délétère à celui de nombreuses autres délétions. Si l'on admet que mutations ponctuelles et duplications s'accumu-

lent elles aussi avec le temps, il est raisonnable de penser que l'ensemble des génomes mutés atteint une proportion importante, suffisante pour atteindre le seuil pathogène chez les personnes âgées ne présentant pas, à proprement parlé, de cytopathie mitochondriale. Cette considération est compliquée par la présence de complémentations entre génomes mutés différemment. Dans ces conditions, le déclin de la fonction mitochondriale avec l'âge pourrait être directement relié à l'accumulation des diverses mutations dans le temps. Un abord quantitatif permet de quantifier les génomes sans délétion (de

16,5 kb) par rapport à l'ensemble des génomes mitochondriaux. Nos études sur des préparations mitochondriales de tissus musculaires (squelettiques ou cardiaques) montrent que ce pourcentage est faible, de l'ordre de 15 %. Ce niveau d'hétéroplasmie est du même ordre que celui retrouvé dans les cytopathies mitochondriales dues à des mutations uniques hétéroplasmiques [16]. Un autre travail utilisant plus de 180 réactions de PCR rapporte l'étude exhaustive de plus de 235 délétions de l'ADNmt d'un même malade. Le taux d'hétéroplasmie obtenu dans cette étude est similaire à celui obtenu dans notre étude [24]. Cette évaluation quantitative des génomes intacts doit faciliter l'analyse des réarrangements de l'ADNmt et permettre d'expliquer le retentissement pathologique des délétions de l'ADNmt. Grâce à cette méthode d'amplification des biopsies précieuses, de petit volume, telles les biopsies myocardiques, permettent la préparation d'une quantité suffisante d'ADNmt qui pourra être analysée après amplification. Les deux amorces utilisées ont leurs extrémités 5' chevauchant le site *Eag I* unique du génome, ce qui permet une restitution intégrale des génomes mitochondriaux linéarisés. Après amplification, une coupure par *Eag I* restitue un ADNmt linéarisé à extrémités compatibles, qui pourrait être, le cas échéant, recircularisé. Ces génomes linéarisés sont analysés pour la recherche de polymorphismes de restriction ou sont, éventuellement, séquencés.

## Perspectives

Après la PCR, la RT-PCR et la PCR quantitative, la PCR longue constitue une indéniable évolution technique. Ses applications seront nombreuses et l'on devrait rapidement assister à une inflation des travaux utilisant cette technique. Cette mise au point méthodologique a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réaction de PCR, cinétique enzymatique, reproductibilité et fidélité. Outre les avantages évidents sur la taille des ADN synthétisés, une amplification utilisant un couple d'ADN polymérases présente des avantages au niveau de

la fidélité de la synthèse. Une PCR longue est 13 fois plus fidèle que la PCR classique utilisant la *Taq* polymérase. En outre, cette technique permet la comparaison quantitative de séquences amplifiées de tailles très différentes et cela constitue, en soi, un réel progrès par rapport à la PCR classique ■

**Pascal Reynier**  
**Yves Malthiery**

*Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, CHRU, 49033 Angers Cedex 01, France.*

## TIRÉS À PART

P. Reynier.

## RÉFÉRENCES

- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985 ; 230 : 1350-4.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 ; 239 : 487-91.
- Kahn A. L'amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR (*polymerase chain reaction*) : un tournant en génétique. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 515-8.
- Peccoud J. La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 1378-85.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 10953-71.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 640-9.
- Kainz P, Schmiedlechner A, Strack HB. *In vitro* amplification of DNA fragments >10 kb. *Anal Biochem* 1992 ; 202 : 46-9.
- Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2216-20.
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 5695-9.
- Barnes WM. Tips and tricks for long and accurate PCR. *Trends Biochem Sci* 1994 ; 19 : 342.
- Cheng S, Chang SY, Gravitt P, Respass R. Long PCR. *Nature* 1994 369 : 684-5.
- Cheng S, Higuchi R, Stoneking M. Complete mitochondrial genome amplification. *Nature Genet* 1994 : 350-1.
- Reynier P, Malthiery Y. Accumulation of deletions in MtDNA during tissue aging : analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 217 : 59-67.
- Leister D, Thompson R. Production of full-length cDNA from a picornaviral genome by RT-PCR. *Trends Genet* 1996 ; 12 : 11.
- Kübler G, Meurer B, Frey B. Expand reverse transcriptase. *Biochemica* 1996 ; 1 : 48-51.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992 ; 61 : 1175-212.
- Wallace DC. Mitochondrial genetics : a paradigm for aging and degenerative diseases. *Science* 1992 ; 256 : 628-32.
- Ozawa T, Tanaka M, Ikebe S, Ohno K, Kondon T, Mizuno Y. Quantitative determination of deleted mitochondrial DNA relative to normal DNA in parkinsonian striatum by a kinetic PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 172 : 483-9.
- Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linna AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS Lett* 1992 ; 297 : 34-8.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain : regional variability and increase with advanced age. *Nature Genet* 1992 ; 2 : 324-8.
- Reynier P, Figarella-Branger D, Serratrice G, Charvet B, Malthiery Y. Association of deletion and homoplasmic point mutation of the mitochondrial DNA in an ocular myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 202 : 1606-11.
- Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 8739-46.
- Reynier P, Pellissier JF, Harle JR, Malthiery Y. Multiple deletions of the mitochondrial DNA in polymyalgia rheumatica. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 205 : 375-80.
- Ozawa T, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Sugiyama S, Tanaka T, Itoyama S, Nunoda SI, Sekiguchi M. Genotype and phenotype of severe mitochondrial cardiomyopathy : a recipient of heart transplantation and the genetic control. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 ; 207 : 613-20.