



Приложение 8. Схематическое изображение принципа ПЦР сайта рестрикции (на основе G. Sarkar и соавт., [11]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; RS01–RS04 — олигонуклеотиды, условно соответствующие сайтам рестрикции BamHI, EcoRI, Sau3A и TaqI, расположены случайным образом; SP1–SP3 — специфические праймеры, созданные на основе известной части интересующего сегмента. Первая ПЦР проводится с внешними специфическими праймерами SP3 и RSO на геномной ДНК. Затем небольшую aliquоту продукта первой ПЦР используют в качестве матрицы для вложенной ПЦР с праймером SP2 и теми же RSO. Небольшую aliquоту амплифицированной ДНК после вложенной ПЦР транскрибируют соответствующей РНК-полимеразой и прямо секвенируют с помощью GAWTS с использованием специфического праймера SP1 с концевой меткой. Никакая очистка не используется ни на одном из этапов данного метода

Appendix. 8. Schematic representation of the PCR principle with a restriction site (based on G. Sarkar et al., [11]). Solid line: known DNA sequence; dashed line: unknown DNA region; arrow: primer binding site; RS01–RS04: oligonucleotides corresponding to the restriction sites BamHI, EcoRI, Sau3A, and TaqI, arranged randomly; SP1–SP3: specific primers created based on the known part of the segment of interest. The first PCR is carried out with the outer specific primers SP3 and RSO on genomic DNA. Then a small aliquot of the first PCR product is used as a template for nested PCR with primer SP2 and the same RSOs. A small aliquot of the amplified DNA after nested PCR is transcribed by the corresponding RNA polymerase and directly sequenced using GAWTS with the specific primer SP1 with an end label. No purification is used at any stage of this method