



Appendix. 2. Schematic representation of the “Panhandle”-PCR method principle (based on D.H. Jones et al. [13]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA segment; arrow, primer annealing site. The first step involves restriction of genomic DNA with formation of sticky ends. Next, a single-stranded oligonucleotide is ligated. Under specific conditions, denaturation of double-stranded DNA fragments and subsequent intra-strand annealing of the oligonucleotide to the DNA region containing a complementary region occur. A loop structure is formed with elongation (“panhandle”), with the unknown segment within the loop. During PCR, elongation of ligated oligonucleotide along the second strand occurs. Subsequently, PCR is conducted with primers 1 and 2, thus amplifying the unknown DNA fragment. For increased amplification accuracy, PCR is performed with nested primers 3 and 4. The final product is sequenced

Приложение 2. Схематическое изображение принципа «Panhandle»-PCR (на основе D.H. Jones и соавт. [13]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера. На первом этапе происходит рестрикция геномной ДНК с образованием липких концов. Далее лигируется одноцепочечный олигонуклеотид. В специальных условиях проводится денатурация двухцепочечных фрагментов ДНК и последующий внутрицепочечный отжиг олигонуклеотида на участок ДНК, содержащий комплементарную область. Образуется кольцевая структура с удлинением («сковорода с ручкой»), в кольце оказывается неизвестный участок. В процессе ПЦР происходит удлинение лигированного олигонуклеотида вдоль второй цепи. Далее проводится ПЦР с праймерами 1 и 2, таким образом амплифицируется неизвестный фрагмент ДНК. Для увеличения точности амплификации проводится ПЦР с вложенными праймерами 3 и 4. Конечный продукт секвенируется