



Appendix. 5. Schematic representation of the PCR principle with restriction site elongation (based on J. Ji et al., [17]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA region; arrow, primer binding site; black rectangles, adapter. DNA sample is cleaved separately by four different endonucleases. During the initial RSE-PCR in the first cycle (5 sec.), there is a short elongation of the 3'-end of DNA fragments. This is done using an adapter primer that has a complementary 3'-end to the DNA, sized 5 nucleotides. Such a short period does not allow full chain elongation, but the restriction site is "expanded" due to the adapter primer sequence. This is followed by specific exponential target amplification through a combination of various PCR programs using a reverse primer complementary to the known sequence. Secondary PCR is performed with nested primers: one primer anneals at the site of restriction site elongation, the other above the previous one, complementary to the known sequence

Приложение 5. Схематическое изображение принципа ПЦР с удлинением сайта рестрикции (на основе J. Ji и соавт. [17]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; черные прямоугольники — адаптер. Образец ДНК расщепляется отдельно четырьмя различными эндонуклеазами. Во время первичной RSE-PCR на первом цикле (5 с) производится короткое удлинение 3'-конца фрагментов ДНК. Это происходит с помощью адаптерного праймера, имеющего комплементарный 3'-концу ДНК участок, размером 5 п. н. За такой короткий период не происходит полноценного удлинения цепи, но сайт рестрикции «расширяется» за счет последовательности адаптерного праймера. Далее идет специфическая экспоненциальная амплификация мишени за счет комбинации различных программ ПЦР с использованием обратного праймера, комплементарного известной последовательности. Вторичная ПЦР проводится с вложенными праймерами: один праймер отжигается на области с удлинением сайта рестрикции, другой — выше предыдущего, комплементарного известной последовательности