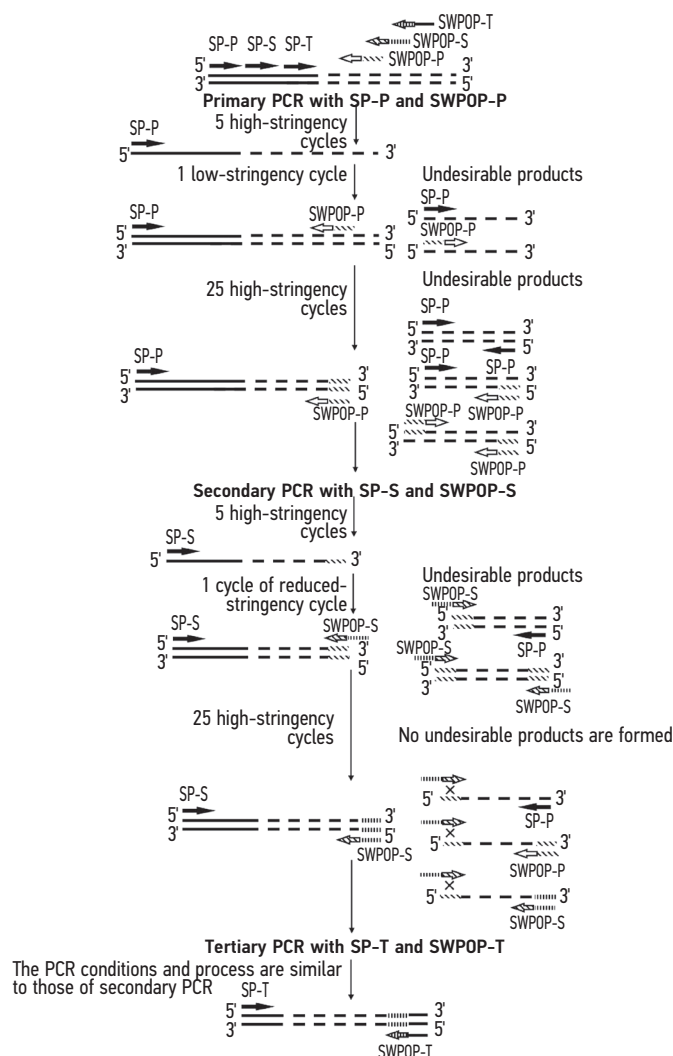




Appendix. 10. Schematic representation of the SWPOP-PCR method principle (based on K. Chang et al. [4]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA region; arrow, primer binding site. Partially overlapping primers are used in the amplification process: SWPOP-P for primary PCR, SWPOP-S for secondary PCR, SWPOP-T for tertiary PCR. Each 3'-end (10 nucleotides) of the subsequent SWPOP primer is identical to the 5'-end of the previous one, therefore, annealing between the SWPOP primer and its partially complementary site (previous SWPOP site) occurs only at relatively low temperatures. SP-P, SP-S, SP-T: gene-specific nested primers are used in combination with the corresponding SWPOP primer in each PCR round. A total of three PCR rounds (primary, secondary, tertiary) are conducted. In each subsequent round, products from the previous one are used as templates. In the initial five high-temperature cycles, the SP primer (specific primer) anneals with its complementary site on the known sequence and elongates towards the unknown region, thereby increasing the number of copies of single-stranded DNA of various lengths. The subsequent lower-temperature cycle allows the SWPOP primer to create the annealing site(s) for the 3'-end of the next SWPOP primer. This creates a pool of single-stranded DNA containing both non-target and target fragments with complementary sequences for the SP primers. In this case, non-target single-stranded DNA cannot be converted into double-stranded DNA, explained by the absence of annealing sites for the primers. Therefore, only the target molecule containing the boundary sequence between the known and unknown DNA regions is exponentially amplified

Приложение 10. Схематическое изображение принципа метода SWPOP-PCR (на основе K. Chang и соавт. [4]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера. В процессе амплификации используются частично перекрывающиеся праймеры: SWPOP-P для первичной ПЦР, SWPOP-S для вторичной ПЦР, SWPOP-T для третичной ПЦР. Каждый 3'-конец (10 п.н.) последующего праймера SWPOP идентичен 5'-концу предыдущего, следовательно, отжиг между праймером SWPOP и его частично комплементарным сайтом (предыдущий сайт SWPOP) возникает только при относительно низкой температуре. SP-P, SP-S, SP-P — генспецифические вложенные праймеры применяются в сочетании с соответствующим праймером SWPOP в каждом раунде ПЦР. Всего проводится три раунда ПЦР (первичная, вторичная, третичная). В каждом следующем раунде в качестве матрицы используются продукты предыдущей. В начальных пяти циклах с высокой температурой праймер SP (специфический праймер) отжигается с комплементарным ему участком на известной последовательности и элонгируется в сторону неизвестного участка, таким образом увеличивая количество копий, представляющих интерес одноцепочечных ДНК разной длины. Последующий цикл с более низкой температурой позволяет праймеру SWPOP создать сайт(ы) отжига связывания 3'-конца для следующего SWPOP-праймера. Таким образом создается пул одноцепочечных ДНК, содержащий как нецелевые, так и целевые фрагменты с комплементарной последовательностью для праймеров SP. В таком случае нецелевая одноцепочечная ДНК не может быть преобразована в двухцепочечную, что объясняется отсутствием сайтов отжига праймеров. Следовательно, экспоненциально амплифицируется только молекула-мишень, содержащая пограничную последовательность между известным и неизвестным участком ДНК