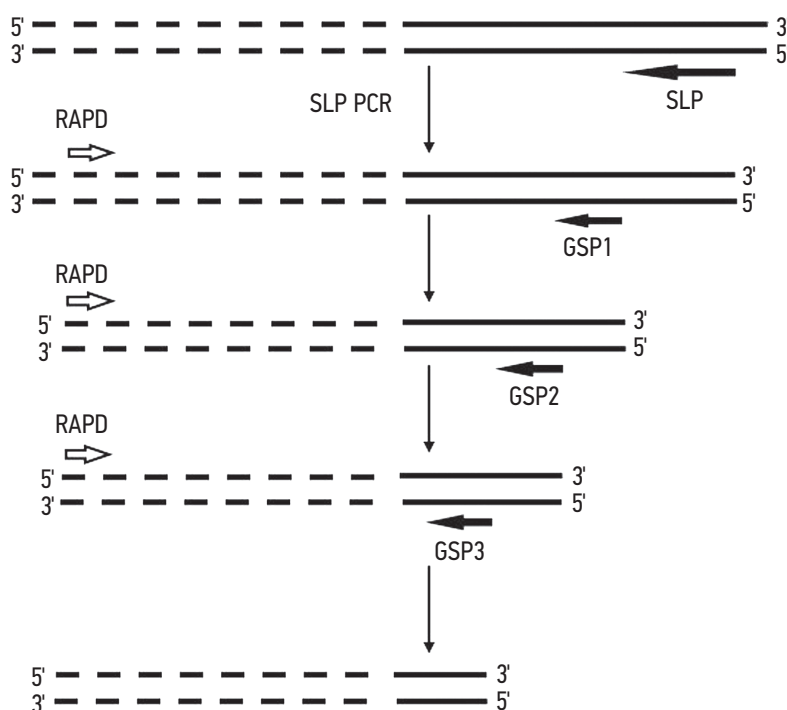




Appendix. 12. Schematic representation of the SLRA-PCR method principle (based on F. Li et al. [29]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA region; arrow, primer binding site; SLP, single long primer; GSP (1–3), gene-specific primers; RAPD, primer for random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Each arrow indicates a specific hybridization of the primer with the nucleotide sequence. SLRA-PCR consists of two stages. The first stage is carried out with a single long primer (SLP PCR). SLP must meet the following requirements: length 30–35 nucleotides, GC content 40–60%, annealing and elongation temperature 68°C. The last six positions at the 3'-end of the primer should have no more than three G and C letters. The second stage is a three-step nested PCR. Each GSP should be 26–28 nucleotides long to ensure high annealing and elongation temperatures. The GC content in the GSP is the same as in the SLP. RAPD primers are chosen at random. Considering the characteristics of the RAPD primer (10 nucleotides), a low annealing temperature of 40°C is applied. The annealing and elongation temperature of 68°C is used for the effective binding of GSP primers

Приложение 12. Схематическое изображение принципа метода SLRA-PCR (на основе F. Li и соавт. [29]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера; SLP — одиночный длинный праймер; GSP (1–3) — генспецифические праймеры; RAPD — праймер со случайной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD). Каждая стрелка обозначает конкретную гибридизацию праймера с нуклеотидной последовательностью. SLRA-ПЦР состоит из двух этапов. На первом этапе проводится ПЦР с одиночным длинным праймером (SLP PCR). SLP должен соответствовать следующим требованиям: длина 30–35 нуклеотидов, содержание GC 40–60 %, температура отжига и элонгации 68 °С. В последних шести позициях на 3'-конце праймера должно быть не более трех букв G и C. Второй этап представляет собой трехэтапную вложенную ПЦР. Каждый GSP должен иметь длину 26–28 нуклеотидов для обеспечения высокой температуры отжига и элонгации. Содержание GC в GSP такое же, как и в SLP. Праймеры RAPD подбираются случайным образом. Учитывая характеристики праймера RAPD (10 п. о.), применяется низкая температура отжига 40 °С. Температура отжига и элонгации 68 °С используется для посадки и эффективного связывания праймеров GSP