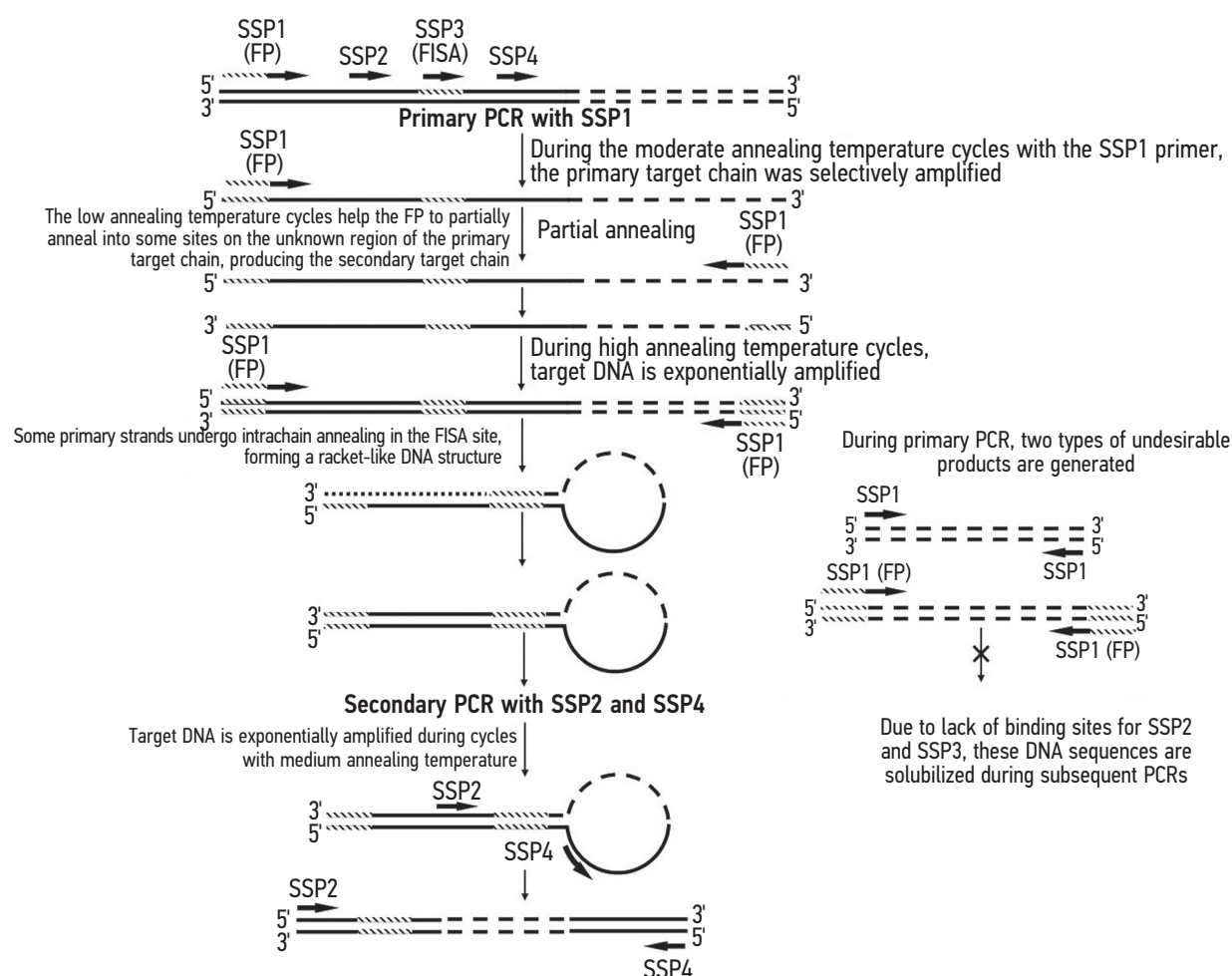




Consequently, the amount of target DNA becomes predominant

Appendix. 13. Schematic representation of the FPR-PCR method principle (based on J. Pei et al. [1]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA region; arrow, primer binding site. Four sequence-specific primers (SSP1, SSP2, SSP3, and SSP4) are sequentially selected to the known DNA (5'-3') for conducting FPR-PCR. SSP3 acts as a fragment providing intramolecular annealing (FISA). The FISA fragment is attached to the 5'-end of SSP1, forming a fused primer. FPR-PCR includes two rounds of amplification reactions. The primary FPR-PCR starts with synthesizing the target's first chain, then allows the primer to partially anneal somewhere on the unknown region of this chain, creating the target second chain. A new first chain is then synthesized using the second chain as a template. The 3'-end of this new first chain undergoes intramolecular annealing to the FISA site, subsequently forming a racket-shaped structure through loop elongation. This racket-like DNA is exponentially amplified in the secondary FPR-PCR, conducted using SSP2 and SSP4

Приложение 13. Схематическое изображение принципа метода FPR-PCR (на основе J. Pei и соавт. [1]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера. Четыре специфичных к последовательности праймера (SSP1, SSP2, SSP3 и SSP4) последовательно подбираются к известной ДНК (5'-3') для проведения FPR-PCR. SSP3 представляет собой фрагмент, который обеспечивает внутрицепочечный отжиг (FISA). Фрагмент FISA присоединен к 5'-концу SSP1, образуя слитый праймер. FPR-PCR включает два раунда реакций амплификации. Первичная FPR-PCR начинается с синтеза целевой первой цепи, затем позволяет праймеру частично отжигаться в каком-то месте (местах) на неизвестной области этой цепи, создавая целевую вторую цепь. После этого новая первая цепь синтезируется с использованием второй цепи в качестве матрицы. 3'-конец этой новой первой цепи подвергается внутривспечечному отжигу до сайта FISA с последующим образованием структуры в форме ракетки за счет петлевого удлинения. Эта ракеткоподобная ДНК экспоненциально амплифицируется во вторичной FPR-ПЦР, проводимой с использованием SSP2 и SSP4