



Appendix. 14. Schematic representation of the wristwatch PCR method principle (based on L. Wang et al. [30]). Solid line, known DNA sequence; dashed line, unknown DNA region; arrow, primer binding site. WWP 1–3: wristwatch primers, have 5'- and 3'-overlapping regions (15 and 3 nucleotides, respectively) and a heterologous interval (10 nt); GSP 1–3: nested gene-specific primers for primary, secondary, and tertiary PCR respectively. WWP randomly anneals somewhere in the genome during the low-stringency cycle of primary PCR or is directed to the previous WWP binding site in one cycle with reduced stringency in secondary and tertiary PCR, creating a pool of single-stranded DNA (ssDNA). The ssDNA target includes a gene-specific primer (GSP), complementary at the 3'-end, and WWP at the 5'-end and thus can be exponentially amplified in the subsequent high-stringency cycles. However, non-target single-stranded DNA cannot be amplified since it lacks a perfect binding site for any primers.

Приложение 14. Схематическое изображение принципа метода wristwatch PCR (на основе L. Wang и соавт. [30]). Сплошная линия — известная последовательность ДНК; штриховая линия — неизвестный участок ДНК; стрелка — сайт посадки праймера. WWP 1–3 — праймеры wristwatch, имеют 5'- и 3'-перекрывающиеся участки (15 и 3 п. о. соответственно) и гетерологичный интервал (10 и. о.); GSP 1–3 — вложенные генспецифические праймеры для первичной, вторичной и третичной ПЦР соответственно. WWP произвольно отжигается где-то в геноме во время цикла с низкой строгостью первичной ПЦР или направленно на предыдущем сайте посадки WWP в одном цикле с пониженной строгостью вторичной третичной ПЦР, создавая пул одноцепочечных ДНК (оцДНК). ОцДНК-мишень включает генспецифический праймер (GSP), комплементарный на 3'-конце и WWP на 5'-конце и, таким образом, может экспоненциально амплифицироваться в следующих циклах высокой строгости. Тем не менее нецелевая одноцепочечная ДНК не может быть амплифицирована, поскольку у нее отсутствует идеальный сайт связывания для каких-либо праймеров.