



УДК 577.213.7

© 1991 г.

*Н. К. Данилюк, С. В. Серегин, А. Н. Синяков,
О. И. Серпинский, Н. Н. Бабкина, М. А. Урманова,
В. А. Рабинин, С. Г. Поздняков*

ЭФФЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО АНАЛОГА; ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *E. COLI* ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2

*Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
НПО «Вектор» Минмедпрома СССР, пос. Кольцово Новосибирской обл.*

Сконструированы двухцепочечные ДНК-фрагменты, кодирующие последовательности гена интерлейкина-2 человека (IL-2) и его аналога (с делецией 14 аминокислотных кодонов с 3'-конца). Искусственные гены получены из частично комплементарных синтетических полинуклеотидов путем достройки их ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова), клонирования полученных ДНК-дуплексов в специально сконструированных плазмидных векторах рFN-типа, позволяющих выделять клонированные фрагменты с произвольными «лишними» концами, с последующей одно- или двустадийной сборкой целевой последовательности. Биологическую активность продукта экспрессии искусственного гена IL-2 выявляли тестированием T-пролиферативной активности лизатов клеток *E. coli*, содержащих экспрессирующую IL-2 плазмиду рEXIL2.

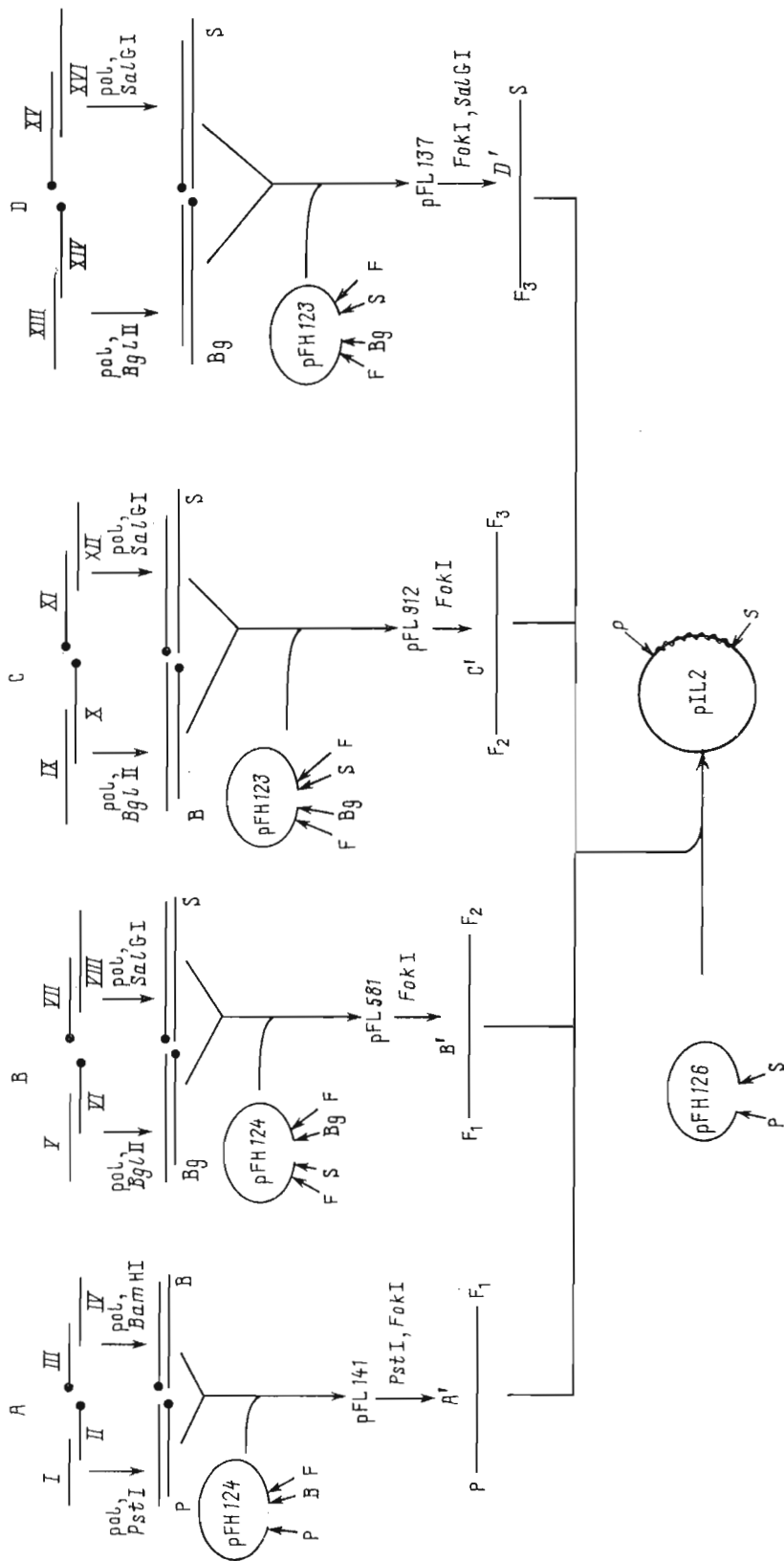
IL-2 — один из ключевых медиаторов иммунной системы [1]. Структурно-функциональная организация этого белка интенсивно изучается [2—4], что обусловлено помимо теоретического интереса поиском более устойчивых к окислению и изомеризации аналогов и возможных его антагонистов [5]. Один из важных районов, отвечающих за проявление биологической активности, — С-концевой участок молекулы IL-2 (120—133-я аминокислоты). Делеция как всего этого участка, так и отдельных аминокислот, входящих в его состав, приводит к появлению биологически неактивных белков-аналогов IL-2 [2, 5, 6], лигандные свойства которых пока мало исследованы. С целью изучения способности к взаимодействию с рецепторами IL-2 наряду с синтезом полноразмерного гена IL-2 нами осуществлен синтез гена-аналога IL-2.

Для синтеза искусственных фрагментов ДНК широко используется метод Г. Кораны [7, 8]. Возможность получения протяженного фрагмента ДНК по этому методу связана с необходимостью разработки оптимального способа сборки целевой нуклеотидной последовательности из отдельных олигомерных сегментов. Реализация этого метода выявила ряд экспериментальных трудностей. Так, с увеличением длины целевого фрагмента ДНК резко возрастает количество необходимых олигомеров, что с неизбежностью приводит к сборке фрагмента по сложным многоступенчатым схемам. Часто отмечающиеся низкие выходы в реакциях лигирования, образование непредсказуемых побочных продуктов в многокомпонентных реакционных смесях ставят под сомнение возможность стабильного получения этим методом протяженных нуклеотидных последовательностей [9, 10].

Появление работы Росси с сотр. [11], в которой были продемонстрированы элементы нового подхода к стратегии получения ДНК-дуплексов, побудило нас продолжить работу по улучшению схемы конструирования протяженных нуклеотидных последовательностей. Сохранив в нашей

Сокращения: IL-2 — интерлейкин-2, префикс «d» перед дезоксирибоолигонуклеотидами для простоты опущен.

Схема 1



Общая схема сборки искусственного гена ингерлейкина-2.

Показаны места расщепления рестриктазами. В — *Bam*HI, P — *Pst*I, *Bg* — *Bgl*II, S — *Sal*GI; F — *Fok*I; F₁, F₂, F₃ — выступающие несимметричные 5'-концы фрагментов, образованные после гидролиза ДНК рестриктазой *Fok*I; pol — ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова). A, B, C, D — группы полинуклеотидов, образующие соответствующий фрагмент ДНК; A', B', C', D' — фрагменты A, B, C, D после 1-го клонирования, выделенные из рекомбинантных плазмид путем их гидролиза указанными рестриктазами; линии с точкой — 5'-фосфорилированные олигонуклеотиды

<i>Pst</i> I	A	P	T	S	S	S	T	K	K	T	Q	L	Q	L	14
<i>CTGCA</i>	GGG	CCT	ACT	TCA	AGC	TCT	ACA	AAG	AAA	ACA	CAG	CTG	CAA	CTG	28
	E	H	L	L	L	D	L	Q	M	I	L	N	G	I	42
	GAG	CAT	TTA	CTG	CTG	GAT	TTA	CAG	ATG	ATT	TTG	AAT	GGA	ATT	56
	N	N	Y	K	N	P	A	L	T	R	M	L	T	P	70
	AAT	AAT	TAC	AAG	AAT	CCC	AAA	CTC	ACC	AGA	ATG	CTC	ACA	TTT	84
	K	F	Y	M	P	K	K	A	T	E	L	K	H	L	98
	AAG	TTT	TAC	ATG	CCC	AAG	AAG	GCC	ACA	GAA	CTG	AAA	CAT	CTT	112
	Q	C	L	E	E	E	L	K	P	L	E	E	V	L	126
	CAG	TGT	TTA	GAA	GAA	GAA	CTC	AAA	CCT	CTG	GAA	GAA	GTG	CTG	140
	N	L	A	Q	S	K	N	F	H	L	R	P	R	D	154
	AAT	TTA	GCA	CAA	AGC	AAA	AAT	TTT	CAC	TTA	CGT	CCC	CGT	GAC	168
	L	I	S	N	I	N	V	I	V	L	E	L	K	G	182
	TTA	ATC	TCC	AAT	ATC	AAC	GTA	ATT	GTA	CTG	GAA	CTG	AAG	GGT	196
	S	E	T	T	F	M	C	E	Y	A	D	E	T	A	210
	TCT	CAA	ACA	ACA	TTC	ATG	TGT	GAA	TAT	GCT	GAT	GAG	ACA	GCA	224
	T	I	V	E	E	I	N	R	W	I	T	F	C	Q	238
	ACC	ATT	GTA	GAA	TTT	CTG	AAC	CGT	TGG	ATT	ACC	TTT	TGT	CAA	252
	S	I	I	S	T	L	T	stop	stop	<i>SalGI</i>					266
	AGC	ATT	ATT	TCA	ACA	CTG	ACT	TAA	TGA	CTCGAC					280

Рис. 1. Нуклеотидная (нижняя строка) и аминокислотная (верхняя строка) последовательности искусственного гена IL-2: 5'-концевая часть гена ограничена сайтом рестрикции *Pst*I, 3'-концевая — стоп-кодонами Ochre, Opal и сайтом рестрикции *Sal*GI; вертикальной штриховой линией показаны места расчленения последовательности на произвольные 4 субфрагмента (A — D)

схеме стадию получения промежуточных субфрагментов из частично комплементарных полинуклеотидов, предложенную в работе [11], мы попытались усовершенствовать процедуру клонирования субфрагментов-интермедиагов и сборки из них целевой протяженной нуклеотидной последовательности.

Для этого нами сконструированы две серии новых плазмидных векторов (pMB и pFH), содержащих сайты эндонуклеаз рестрикции *Fok*I и *Hga*I и позволяющих после клонирования в них выщеплять фрагменты ДНК с любыми произвольно запланированными «липкими» концами.

В целом предложенная нами схема состоит из следующих этапов (схема 1):

а) из двух частично комплементарных полинуклеотидов путем репаративной достройки с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) образуют ДНК-дуплексы. В нуклеотидной последовательности дуплексов на одном из их концов сформирован участок узнавания для одной из указанных рестриктаз (схема 1), действием которых образуются «липкие» концы для удобства клонирования;

б) по два таких дуплекса, составляющих один из субфрагментов, клонируют в специальных векторах серии pFH [12, 13], позволяющих с помощью рестриктаз *Hga*I или *Fok*I выделять из состава рекомбинантных плазмид целевые субфрагменты с уникальными запланированными «липкими» 5'-концами;

Таблица 1

Первичная структура синтетических олигодезоксирибонуклеотидов

Суб-фрагмент	Номер полинуклеотида	Структура полинуклеотида
A	I	5' CCCTGCAGCGCCTACTTCAAGCTCTACAAAGAAA
	II	TAAATGCTCCAGTTGCAGCTGTGTTTTCTTTGTA
	III	CTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAAT
	IV	CCGGATCCTTGTAATTATTAATTCCATTCAAA
	V	CCGTCGACAAAGAATCCCAAACCTCACCAGAAT
B	VI	ATGTA AAAACTTAAATGTGAGCATCTCTGGTGA
	VII	GCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCT
	VIII	CCCAGATCTCTAAACACTGAAGATGTTTCA
C	IX	CCCAGATCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAAGAAGTG
	X	GAAAAATTTTGGCTTTGTGCTAAATTCAGCACTTCTTCCAG
	XI	ACTTACGTCCCCGTGACTTAATCTCCAATATCAACGTAAT
	XII	CCTGTCGACCCCTCAGTTCAGTACAATTACGTTGATA
	XIII	CCTGATCAGGGTTCTGAAACAACATTCATGTGTGAATAAG
D	XIV	TTCTACAATGGTTGCTGTCTCATCAGCATATTCACACAT
	XV	TTTCTGAACCGTTGGATTACCTTTTGTCAAAGCATTATT
	XVI	CCTGTCGACTCATTAAGTCAGTGTGAAATAATGCTTTG

в) полученные субфрагменты одностадийно собирают в целевую структуру, клонируя в подходящем векторе.

Предложенная схема успешно апробирована на примере синтеза гена IL-2 человека (413 п.о.) и его делеционного варианта (без 14 аминокислотных кодонов с 3'-конца).

Целевая последовательность гена IL-2 была произвольно разделена на четыре фрагмента длиной 90—120 п.о; 5'-концевая часть гена ограничена сайтом *Pst*I, а 3'-концевая — двумя кодонами терминации трансляции и сайтом *Sal*GI (рис. 1). В структуру искусственного гена по сравнению с природным [14] нами были введены некоторые нуклеотидные замены, не искажающие аминокислотной последовательности белка. Это было сделано для введения кодонов, более предпочтительных для экспрессии в клетках *E. coli*, и для формирования либо разрушения в последовательности гена сайтов узнавания некоторых рестриктаз.

При конструировании гена IL-2 были использованы 16 полинуклеотидов, синтезированных модифицированным твердофазным фосфоритриэфирным методом, как описано в работе [15]. Первичная структура этих полимеров представлена в табл. 1. Для создания делеционного варианта использованы те же полинуклеотиды, за исключением двух последних (XV и XVI), которые были заменены на два олигонуклеотида, формирующих дуплекс

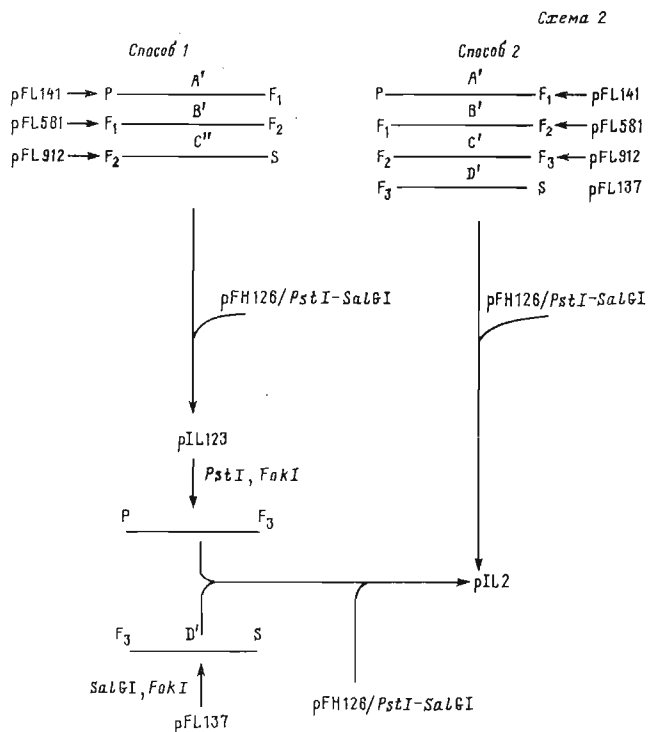


Для синтеза четырех субфрагментов (А — D) все полинуклеотиды разделялись на четыре группы по четыре полинуклеотида в каждой (схема 1). В каждой группе пара полинуклеотидов составляла частично комплементарный комплекс за счет 10—12 взаимно комплементарных нуклеотидных оснований на их 3'-концах. С помощью достройки ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) были получены полные ДНК-дуплексы (выход продуктов составил 50—70% в случае субфрагментов А, В, С и 30% для D).

Для упрощения схемы синтеза и удлинения клонируемого фрагмента в состав плазмидной ДНК одновременно вводили два дуплекса, предварительно обработав каждый из них соответствующей рестриктазой, сайт узнавания которой заранее был заложен на одном из концов дуплекса (схема 1). Клонирование проводили, исходя из удобства фенотипического отбора в специально сконструированных плазмидных векторах серии рFH, содержащих набор уникальных сайтов рестрикции между двумя противоположной полярности парами участков узнавания рестриктаз *HgaI* и *FokI*, которые были сформированы на строго рассчитанном расстоянии от сайтов *SalGI* и *BamHI*, используемых при клонировании. Поэтому встроенные синтетические фрагменты вщеплялись с помощью рестриктазы *FokI* из состава рекомбинантных плазмид в виде фрагментов с выступающими уникальными 5'-концами из четырех нуклеотидных звеньев [12, 13, 16]. Сайты промежуточного клонирования при этом из фрагментов удалялись.

С целью проверки эффективности сборки различного числа субфрагментов, а также для упрощения получения делеционного гена-аналога IL-2 синтез полного гена IL-2 осуществляли двумя способами.

При реализации первого способа сначала получали ДНК-фрагмент неполного гена IL-2, состоящий из субфрагментов А', В', С'', к которому затем присоединяли субфрагмент D' (схема 2, обозначения те же, что на схеме 1). Для этого из ДНК промежуточных плазмид рFL141, рFL581, рFL912 выделяли субфрагменты А' (*PstI-FokI*-фрагмент), В' (*FokI-FokI*-фрагмент) и С'' (*FokI-SalGI*-фрагмент) соответственно. Затем смесь этих субфрагментов и векторного *PstI-SalGI*-фрагмента плазмиды рFH126



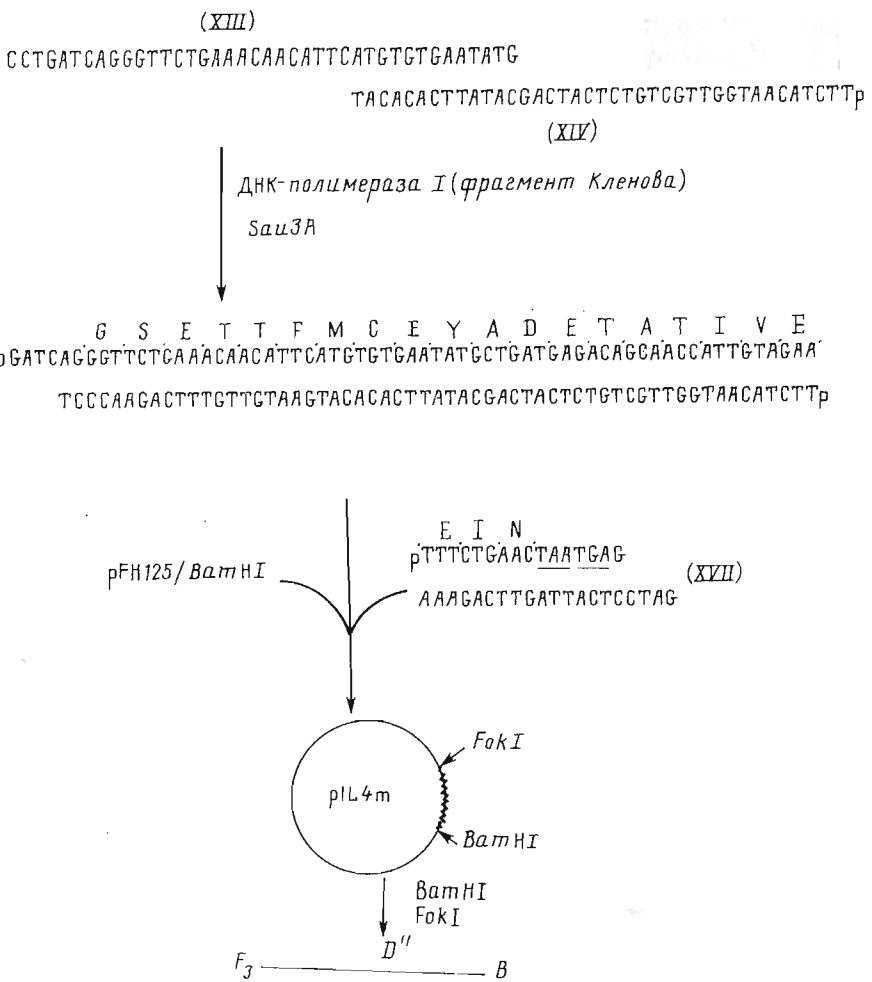


Рис. 2. Схема получения плазмиды рIL4m и нуклеотидная последовательность составляющих субфрагмент D'' олигомеров. Подчеркнуты терминирующие кодоны

лигировали в стандартных условиях [17]. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* JM103. Отбор рекомбинантных клонов проводили при помощи гибридизации с мечеными олигонуклеотидами из субфрагментов А и С. 10% бактериального банка (62 клона) составили клоны, гибридизующиеся с обоими зондами. Проведенный рестрикционный анализ выделенной рекомбинантной ДНК с помощью эндонуклеаз *Bsp*RI, *Eco*RI + *Pst*I, *Pvu*II, а также секвенирование встроенного фрагмента ДНК подтвердили соответствие его структуры планируемой.

Для получения полного гена IL-2, *Pst*I-*Fok*I-фрагмент плазмиды рIL123, содержащий 5'-концевую часть гена, клонировали вместе с субфрагментом D' (*Fok*I-*Sal*GI-фрагмент) в векторе рFH126/*Pst*I-*Sal*GI. Рекомбинантные клоны выявляли гибридизацией 280 полученных клонов с мечеными полинуклеотидами из В- и D-фрагментов. Всего было обнаружено 60 гибридных клонов. Анализ ДНК таких клонов с использованием рестриктаз *Bsp*RI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II указывал на получение целевой плазмиды рIL2.

Параллельно мы осуществили одностадийную сборку субфрагментов А', В', С' и D' в том же векторе (схемы 1, 2) — второй способ сборки. Скрининг клонов вели аналогично. Выявлено 12% гибридизующихся клонов от числа анализированных (110 клонов).

Сборку делеционного гена-аналога IL-2 проводили первым способом, показанным на рис. 2 для гена IL-2, для чего использовали уже полученный *Pst*I-*Fok*I-фрагмент плазмиды рIL123 и субфрагмент D'' из плазмиды рIL4m (*Fok*I-*Bam*HI-фрагмент) вместо субфрагмента D.

Включение [³H]тимидина в культуре клеток спленоцитов мыши

Индуктор	имп/мин	Относительное включение
Конканавалин А	730 ± 120	1
Лизат <i>E. coli</i> (pFH126), 10 мкл *	2 560 ± 880	3,0
Лизат <i>E. coli</i> (pEXIL2), 10 мкл *	22 100 ± 4 500	30
Интерлейкин-2 (Sigma), 10 ед. акт.	76 200 ± 13 100	100

* Приготовление лизатов см. в «Экспер. части».

Плазмида pIL4m была получена клонированием дстроенного и гидролизованного *Sau3A*-дуплекса из олигонуклеотидов (XIII) и (XIV) (табл. 1) в векторе pFH125/*Bam*HI совместно с олигонуклеотидным дуплексом (XVII) (рис. 2). Условия лигазной реакции и скрининг рекомбинантов аналогичны вышеописанным. Схема получения гена, кодирующего укороченный IL-2, и условия эксперимента также аналогичны описанным для гена IL-2. По результатам гибридизации 75 клонов из 375 полученных отобрали 9, из них 3 охарактеризовали рестрикционным анализом с использованием большого набора рестриктаз. Два клона имели ожидаемую рестриктную карту. Нуклеотидная последовательность искусственных фрагментов ДНК в составе рекомбинантных плазмид подтверждена методом Максама — Гилберта [18, 19].

Ранее было показано, что присутствие произвольных 2—9 аминокислот на N-конце IL-2 существенно не изменяет биологическую активность белка [20]. Строение полученной нами рекомбинантной плазмиды pIL2 позволяло легко реконструировать ее для совмещения кодонов гена IL-2 с рамкой считывания α -пептида β -галактозидазы. Для этого ДНК плазмиды pIL2 расщепляли эндонуклеазой рестрикции *Pst*I и последовательно обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и ДНК-лигазой. В результате была получена плазмида pEXIL2, обеспечивающая под контролем *lac*-промотора синтез IL-2, содержащего на N-конце шесть дополнительных аминокислот (первые аминокислоты α -пептида β -галактозидазы).

Для экспрессии гена IL-2 использовали штамм *E. coli* JM83, трансформированный плазмидой pEXIL2. Биологическое тестирование синтезированного в клетках белка IL-2 проводили методом Гиллиса [21] на Т-клеточной культуре, полученной из селезенки мышей линии СВА. Проведенные опыты достоверно показывают наличие в лизатах *E. coli* JM83 (pEXIL2) биологической активности IL-2 (табл. 2), а следовательно, и полноценность синтезированного нами гена.

Так, пролиферативная активность бактериального лизата продуцента, разведенного в 10 раз, превышала активность введенного конканавалина А в 30 раз. Некоторой пролиферативной активностью обладал и контрольный клеточный лизат *E. coli* JM83 (pFH126), что, по-видимому, можно связать с митогенным действием липополисахаридов, входящих в состав клеточной стенки бактерий и содержащихся в неочищенных клеточных лизатах *E. coli*. Позднее полученные искусственные гены были использованы для создания высокоэффективных штаммов-продуцентов IL-2 и его аналога.

Реализованная нами стратегия получения искусственных протяженных фрагментов ДНК имеет несомненные преимущества перед традиционными методами. Применение на стадии получения синтетических дуплексов частично комплементарных полинуклеотидов позволило значительно сократить работу по химическому синтезу, выделению и анализу нуклеотидного материала. В работе [22] для получения гена IL-2 было синтезировано 56 олигонуклеотидов общей длиной свыше 800 нуклеотидных звеньев. Нами использовано 16 полинуклеотидов общей протяженностью 560 нуклеотидных звеньев. Разбивка последовательности гена на фраг-

менты позволила раздельно клонировать их в специально сконструированных плазмидных векторах серии рРН, наработать в достаточном количестве, после гидролиза эндонуклеазой рестрикции *FokI* выделить в виде субфрагментов с уникальными расчетными взаимно комплементарными 5'-концами и однозначно собрать за одну стадию в целевую последовательность. Это позволило избежать трудоемкого и ненадежного многостадийного лигирования коротких олигомеров в полный двухцепочечный дуплекс, сократить количество промежуточных фрагментов с семи или восьми, как это было осуществлено в работах [22, 23] для этого же гена, до четырех. Представленные два способа сборки искусственного фрагмента ДНК эффективны в плане получения целевых рекомбинантных плазмид и демонстрируют широкие возможности стратегии в образовании различных вариантов синтезируемой последовательности.

Экспериментальная часть

В работе использовали рестриктазы *PstI*, *EcoRI*, *PvuII*, *BamHI*, *SalGI*, *HaeII*, *BspRI* (КФ 3.1.23.х; НПО «Фермент», Вильнюс), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 6.5.1.1; НИКТИ БАВ, Бердск); рестриктазу *FokI*, а также ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова), полученные от С. Х. Дегтярева (НИКТИ БАВ, Бердск); dNTP (Sigma, США), [γ - 32 P]АТР и [α - 32 P]dNTP (1000—4000 Ки/ммоль, отечественное производство), [3 H]тимидин (50 Ки/ммоль, отечественное производство), питательную среду Хенкса для культур клеток (производство ВНИИ МБ, Кольцово Новосибирской обл.), фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм, человеческий интерлейкин-2 (10 000 ед. акт./мл), конканавалин А (все фирмы Sigma, США). Приготовление сред, ферментативные реакции, электрофорез в ПААГ, трансформацию клеток *E. coli* проводили согласно [17]. Чистоту и подвижность полученных полинуклеотидов анализировали электрофорезом в 10—15% ПААГ с 7 М мочевиной, нуклеотидную последовательность подтверждали модифицированным методом Максама — Гилберта [19]. В работе были использованы рабочие буферные растворы — буфер 1: 20 мМ трис-НСl (рН 7,8), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 100 мМ NaCl; буфер 2: тот же состав, но 50 мМ NaCl; буфер 3: тот же состав, но без NaCl.

Получение ДНК субфрагмента А, кодирующего 1—31-й аминокислотный сегмент человеческого IL-2. Дуплексы для клонирования фрагмента А получали из олигонуклеотидов I—IV (табл. 1). Для этого реакционную смесь, содержащую по 100 пмоль меченого олигонуклеотида (I) и фосфорилированного олигонуклеотида (II) в 100 мкл буфера 3, нагревали 10 мин при 50° С, охлаждали до 20° С, добавляли все четыре dNTP до концентрации 250 мкМ и 10 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 20° С. ДНК-дуплекс осаждали согласно [16] и расщепляли рестриктазой *PstI* (50 ед. акт.) в 200 мкл буфера 2 в течение 3 ч при 37° С. Аналогично получали дуплекс из полинуклеотидов (III) и (IV), который расщепляли рестриктазой *BamHI* (60 ед. акт.) в 20 мкл буфера 1 в течение 12 ч при 37° С. Оба фрагмента выделяли с помощью электрофореза в 8% ПААГ. Выход дуплексов составил 50—70%.

Реакционную смесь, содержащую по 2 пмоль приготовленных дуплексов и 0,25 пмоль векторной ДНК, полученной расщеплением плазмиды рРН124 рестриктазами *BamHI* и *PstI*, обрабатывали ДНК-лигазой (8 ед. акт.) в течение 16 ч при 10° С. Реакционную смесь использовали для трансформации клеток *E. coli* JM103 [17]. Гибридизацию клонов проводили соответственно [17]. Плазмидную ДНК выделяли методом, предложенным в работе [24], и анализировали с помощью рестриктаз *BspRI*, *EcoRI* и *PstI*. Структуру клонированного фрагмента в составе рекомбинантной плазмиды рFL141 подтверждали модифицированным методом Максама — Гилберта [19].

Для получения целевого субфрагмента А с запланированными «липкими» концами 60 мкг ДНК плазмиды в 300 мкл буфера 2 обрабатывали

1 ч при 37° С рестриктазой *PstI* (30 ед. акт.), а затем 12 ч при 37° С рестриктазой *FokI* (30 ед. акт.). Целевой фрагмент длиной 100 п.о. выделяли с помощью электрофореза в 5% ПААГ.

Получение ДНК других субфрагментов, кодирующих аминокислотную последовательность человеческого IL-2, было выполнено как описано выше и как изложено в работе [16].

Получение ДНК субфрагмента D', кодирующего 98—119-й аминокислотный сегмент человеческого IL-2. 5'-Концевой дуплекс был получен из полинуклеотидов (XIII) и (XIV) аналогично вышеописанному; 3'-концевой дуплекс сразу формировали из пары олигонуклеотидов, указанных в тексте и на рис. 2. Для клонирования субфрагмента D', скрининга гибридных клонов и подтверждения его структуры в составе гибридной плазмиды pIL4m использовали методики, описанные нами ранее [25].

Получение рекомбинантной плазмиды pIL2, содержащей ген IL-2 человека. 5 мкг плазмиды pFH126 гидролизовали последовательно рестриктазой *SalGI* в 50 мкл буфера 1 в течение 1 ч при 37° С, затем рестриктазой *PstI* в 50 мкл буфера 2 в тех же условиях. Смесь из 0,5 пмоль векторной ДНК и по 5 пмоль субфрагментов A', B', C', D' обрабатывали 15 ед. акт. ДНК-лигазы в стандартных условиях [17]. 10 мкл смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* JM103. Из колоний, гибридизующихся с ³²P-мечеными олигонуклеотидами из B- и D-фрагментов, выделяли ДНК и анализировали ее с помощью рестриктаз *BspRI*, *PvuII*, *PstI* и *EcoRI*. Рекомбинантную плазмиду pIL23 получали аналогично с использованием субфрагментов A', B' и C''.

Получение рекомбинантной плазмиды pIL2m, содержащей аналог гена IL-2 человека. Для конструирования плазмиды pIL2m выделяли *PstI*-*FokI*-фрагмент плазмиды pIL123 (~300 п.о.) и *BamHI*-*FokI*-фрагмент плазмиды pIL4m (~70 п.о.) и клонировали их в векторе pFH125/*BamHI*-*PstI*, используя методики, приведенные выше и изложенные в работе [25].

Получение экспрессирующей плазмиды pEXIL2. 1 мкг ДНК плазмиды pIL2 гидролизовали рестриктазой *PstI* в описанных выше условиях. ДНК осаждали, осадок растворяли в 30 мкл буфера 3, добавляли 5 ед. акт. ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и выдерживали 15 мин при 20° С. Реакционную смесь прогревали 2 мин при 70° С, добавляли АТР до концентрации 100 мкМ, 5 ед. акт. ДНК-лигазы и инкубировали 12 ч при 5° С. 2 мкл реакционной смеси использовали для трансформации клеток *E. coli* JM83. Скрининг клонов вели аналогично вышеописанному.

Определение биологической активности рекомбинантного IL-2. Активность рекомбинантного белка была оценена по количеству включенного [³H]тимидина в ДНК первичной культуры клеток мышинных спленоцитов в соответствии с известным методом Гиллиса [24]. Клетки *E. coli* JM83, содержащие плазмиду pEXIL2, выращивали в 5 мл LB-среды при 37° С до 1,5 ОЕ (600 нм), собирали центрифугированием, затем ресуспендировали в 5 мл среды Хенкса, содержащей 1 мг/мл лизоцима, и выдерживали 30 мин при 5° С. Смесь трижды замораживали — оттаивали, затем озвучивали и центрифугировали. Супернатант фильтровали через фильтр (0,22 мкм) и разбавляли в 10 раз. 100 мкл полученного супернатанта добавляли к 100 мкл клеточной культуры (посевная доза (1—5)·10⁵ клеток) и термостатировали 24 ч при 37° С в атмосфере 5% CO₂. 0,25 мкКи [³H]тимидина вводили в реакционную смесь и выдерживали еще 16 ч в тех же условиях. Клетки собирали на фильтре (0,45 мкм), промывали 0,01 М K₂HPO₄, pH 7,5, содержащим 0,1 М NaCl. Количество включенного [³H]-тимидина на фильтрах измеряли, используя счетчик Mark III. Ошибка измерения счета составила 20%. В табл. 2 приведены средние значения трех независимых экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith K. A. // Science. 1988. V. 240. № 4856. P. 1169—1176.
2. Kuo L.-M., Robb R. J. // J. Immunol. 1986. V. 137. № 5. P. 1538—1543.

3. Altman A., Gardenas J. N., Houghten R. A., Dixon F. J., Theofilopoulos A. N. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 2176—2180.
4. Wang A., Lu S.-D., Mark D. F. // Science. 1984. V. 224. № 4656. P. 1431—1433.
5. Liang S.-M., Thatcher D. R., Liang C.-M., Allet B. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 1. P. 334—337.
6. Cohen F. E., Kosen P. A., Kuntz J. D., Epstein L. B., Ciardelli T. L., Smith K. A. // Science. 1986. V. 234. № 4774. P. 349—352.
7. Khorana H. G. // Science, 1979. V. 203. № 4381. P. 614—652.
8. Khorana H. G., Terrefy L., Karnik S. S. // Proc Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 3. P. 599—603.
9. Theriault N., Tomich C., Wierenda W. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 6. № 1. P. 15—32.
10. Edge M. D., Green A. R., Heathdiffe G. R., Moore V. E., Faulkner N. J., Cambi R., Petter N. N., Trueman P., Sehuch W., Hennam J., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 18. P. 6419—6435.
11. Rossi J. J., Kiezek R., Huang T., Itakura K. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 16. P. 9226—9229.
12. Синаков А. Н., Данилюк Н. К., Серпинский О. И. Вектор рFH123 для получения фрагментов ДНК с произвольными липкими концами и способ его конструирования: А. с. № 1563240 СССР. Приоритет от 3.03.88.
13. Синаков А. Н., Данилюк Н. К., Серпинский О. И. Вектор рFH124 для получения фрагментов ДНК с произвольными липкими концами и способ его конструирования: А. с. № 1552643 СССР. Приоритет от 3.03.88.
14. Devos R. O., Plaetinck G., Cheroutre H., Simons G., Degraeve W., Tavernier J., Remaut E., Fiers W. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 13. P. 4307—4323.
15. Синаков А. Н., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1129—1131.
16. Синаков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. X. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 5. С. 637—648.
17. Маниацис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
18. Mazam A. M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
19. Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П., Попов С. Г. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1185—1188.
20. Crowl R., Seaman C., Lomedico P., McAndrew S. // Gene. 1985. V. 38. № 1. P. 31—38.
21. Gillis S., Ferm M. M., Ou W., Smith K. A. // J. Immunol. 1978. V. 120. № 6. P. 2027—2032.
22. Takehiro O., Tanaka S., Tsujimoto M. Patent (EPB). 1985. № 171000.
23. Williams D. P., Regier D., Akiyoshi D., Genbauffe F., Murphy J. R. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 16. № 22. P. 10453—10469.
24. Birnboim H. C., Doli J. A. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1523.
25. Серегин С. В., Рябинин В. А., Синаков А. Н., Данилюк Н. К., Поздняков С. Г. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 759—764.

Поступила в редакцию
11.I.1990

После доработки
10.IX.1990

N. K. DANILYUK, S. V. SERYOGIN, A. N. SINYAKOV, O. I. SERPINSKI,
I. N. BAVKINA, M. A. URMANOVA, V. A. RYABININ, S. G. POZDNYAKOV

EFFECTIVE SYNTHESIS AND CLONING OF THE HUMAN INTERLEUKIN-2
GENE AND ITS ANALOGUE; EXPRESSION OF INTERLEUKIN-2
IN *E. COLI*

All-Union Research Institute of Molecular Biology, Koltsovo, Novosibirsk Region

Artificial DNA fragments encoding human interleukin-2 (133 a.a.) and its analogue (deletion of 14 C-terminal a.a.) were prepared by means of the DNA polymerase I mediated extension of synthetic polynucleotides having short overlapping sequences at their 3'-ends. The fragments were cloned in specially designed pFH-type plasmids and then excised by the FokI and other restriction endonucleases to yield the sub-fragments with the structurally predetermined 5'-unique cohesive ends. The complete synthetic gene was constructed by one or two-step ligation. The expressed IL-2 was tested by analysing the T-cell proliferation activity of *E. coli* crude lysates containing the pEXIL2 expression plasmid.