



УДК 577.213(32+7)

© 1992 г.

Ю. А. Берлин, Е. Н. Лебеденко, К. Р. Бирих,
О. В. Плуталов

ИСКУССТВЕННЫЙ СПЛАЙСИНГ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАПРАВЛЕННОГО ЛИГИРОВАНИЯ*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Предложен метод генетической рекомбинации *in vitro* — искусственный сплайсинг ДНК с помощью направленного лигирования, позволяющий соединять между собой заданные сегменты ДНК с образованием сплайсированных последовательностей. Метод основан на амплификации с помощью полимеразной цепной реакции выбранных участков ДНК с использованием праймеров, несущих участки узнавания эндонуклеаз рестрикции класса IIS, которые расщепляют ДНК за пределами этих сайтов с образованием уникальных выступающих концов. Структура концов соединяемых друг с другом участков подбирается таким образом, чтобы эти концы были взаимно комплементарными. Лигирование смеси полученных фрагментов протекает направленно и приводит к целевой последовательности. Предложенный метод использован для синтеза полностью процессированного (безынтронного) гена зрелого интрейкина-1 α человека.

Получение искусственных генов, способных продуцировать функционально активные белки и их аналоги, вносит существенный вклад в исследования по молекулярной биологии. На протяжении многих лет для этой цели использовались почти исключительно полный химико-ферментативный синтез и обратная транскрипция мРНК [3–5]. Появление эффективного и разностороннего метода полимеразной цепной реакции (ПЦР; амплификация ДНК *in vitro*) [6–8] затронуло — среди многих других — проблему синтеза генов. Так, был разработан элегантный метод сплайсинга генов путем элонгации перекрывающихся участков (SOE) [9, 10]. В настоящей работе описывается альтернативный подход к сплайсингу ДНК, также основанный на ПЦР, — искусственный сплайсинг с помощью направленного лигирования (СНЛ).

Наиболее существенные характеристики предложенного метода СНЛ состоят в следующем. С помощью серии ПЦР на геномной ДНК в качестве матрицы с использованием синтетических праймеров со свисающим (т. е. не комплементарным матрице и, следовательно, не участвующим в локальной дуплексной структуре праймер-матрица) 5'-концом получают набор подлежащих сплайсингу сегментов, которые фланкированы участками узнавания эндонуклеаз рестрикции класса IIS в нужной ориентации (эти участки содержатся в свисающей части каждого из праймеров). Такие рестриктазы расщепляют обе цепи молекулы ДНК за пределами участка узнавания, но в строго определенном месте каждой из цепей относительно этого участка. В настоящей работе мы использовали эндонуклеазу рестрикции *Eco31I* [11], которая узнает в составе

* Краткие сообщения по настоящей работе были опубликованы ранее [1, 2].
Сокращения: СНЛ — сплайсинг ДНК с помощью направленного лигирования, ПЦР — полимеразная цепная реакция, DTT — дитиотреит, BSA — бычий сывороточный альбумин, IL-1 α — интерлейкин 1 α , X-gal — 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид. Префикс «d» в обозначении дезоксирибонуклеотидов опущен.

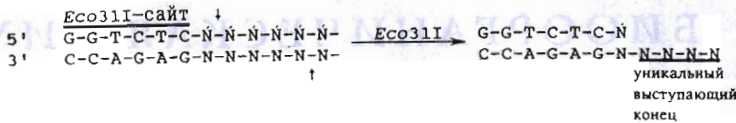


Рис. 1. Создание уникальных выступающих концов в составе фрагментов ДНК с помощью эндонуклеазы рестрикции *Eco31I*. N и N отвечают комплементарным нуклеотидным звеньям

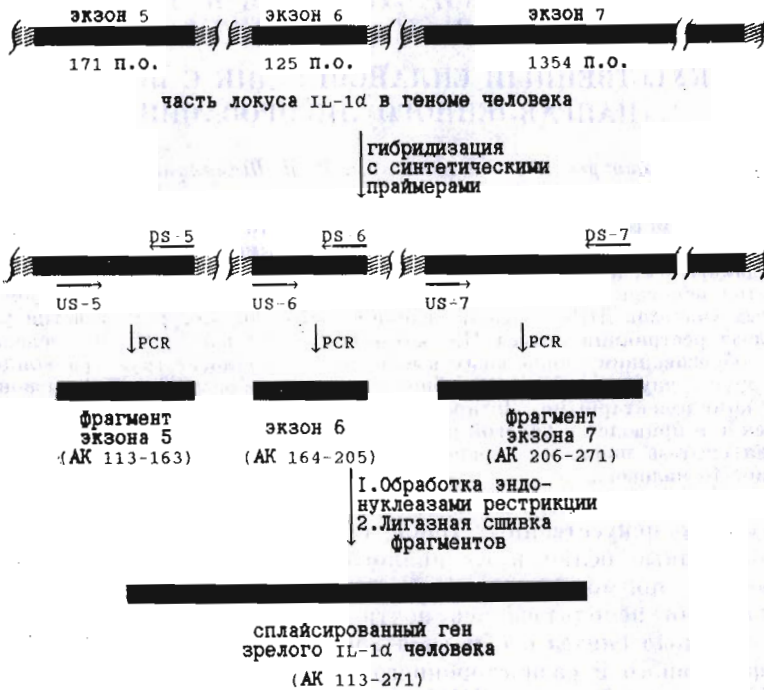


Рис. 2. Конструирование гена зрелого IL-1α человека методом СНЛ. US — прямой (upstream) праймер, DS — обратный (downstream) праймер. Зачерненные участки отвечают экзонам и их фрагментам, заштрихованные — другим сегментам геномной ДНК, в том числе интронам. В скобках указаны номера аминокислотных остатков, кодируемых соответствующими экзональными сегментами

ДНК шестизвенные непалиндромные участки и расщепляет ДНК на расстоянии одного и пяти звеньев от каждого из участков с образованием 5'-выступающих четырехзвенных концов (рис. 1). Именно эти концы предназначены для стыковки различных сегментов ДНК. (Следует отметить, что ранее были описаны синтетические адаптеры, которые содержат участки узнавания некоторых эндонуклеаз рестрикции класса IIS (*MboII*, *HphI*, *HgaI*, *BbvII*, *FokI*) и использовались для встраивания синтетических олигонуклеотидов в клонирующие векторы и их выщепления [12–15], а также для специфического расщепления одноцепочечных ДНК [16].)

Каждое из мест расщепления *Eco31I* (в дальнейшем оно же служит местом стыковки полученных фрагментов) конструируется таким образом, чтобы образующиеся *Eco31I*-концы стыкуемых сегментов были взаимно комплементарны. В отличие от обычных липких (самокомплементарных) концов, готовых отжаться и затем сшиться с любым себе подобным, каждый из выступающих концов, образующихся при действии

Eco31I и сходных с ней эндонуклеаз, обладает специфической первичной структурой, определяемой последовательностью ДНК, которая примыкает к участку узнавания. Общее число различных концов такого рода достаточно велико (при четырехзвенных выступающих концах оно составляет $4^4=256$), чтобы каждый из них можно было рассматривать как уникальный: даже если отбросить 16 четырехзвенных палиндромов, т. е. нежестких липких концов, повторение остающихся вариантов в пределах одной собираемой структуры маловероятно. Лигирование совокупности таких фрагментов должно протекать направленно и с высоким выходом, приводить к искусственно сплайсированной целевой последовательности.

С использованием этого метода (СНЛ) мы синтезировали ген, кодирующий зрелый интерлейкин-1 α (IL-1 α) человека, один из наиболее полифункциональных цитокинов, функционирующий в клетке в виде 159-звенного полипептида. Этот полипептид, образующийся из С-терминальной части 271-звенного предшественника (аминокислотные остатки 113–271) в результате его посттрансляционного процессинга, кодируется экзонами 5 (частично), 6 (полностью) и 7 (частично) гена IL-1 α [17] (общая схема конструирования гена приведена на рис. 2). В соответствии с этим мы сконструировали три пары праймеров для амплификации *in vitro* трех сегментов гена, отвечающих экзонам 5–7, — праймеры US-5 и DS-5, US-6 и DS-6, US-7 и DS-7 (рис. 3).

Каждый из этих праймеров состоит из двух частей: его 3'-концевая часть комплементарна 3'-концу одной из цепей данного сегмента, тогда как другая часть представляет собой свисающий 5'-конец, о котором шла речь выше. В случае каждого из внутренних праймеров (DS-5, US-6, DS-6 и US-7), т. е. праймеров, создающих структурные предпосылки для последующей стыковки фрагментов, этот 5'-конец содержит соответствующим образом ориентированный *Eco31I*-сайт, определяющий возникновение уникального четырехзвенного выступающего конца при действии этой рестриктазы на продукт амплификации. Следует отметить, что во всех праймерах, содержащих *Eco31I*-сайт, он представлен одной и той же цепью непалиндромного дуплекса (GGTCTC), так что ориентация этих свойств в составе каждой пары — как в продуктах амплификации экзона, так и в местах будущих экзон-экзонных сочленений — оказывается противоположной.

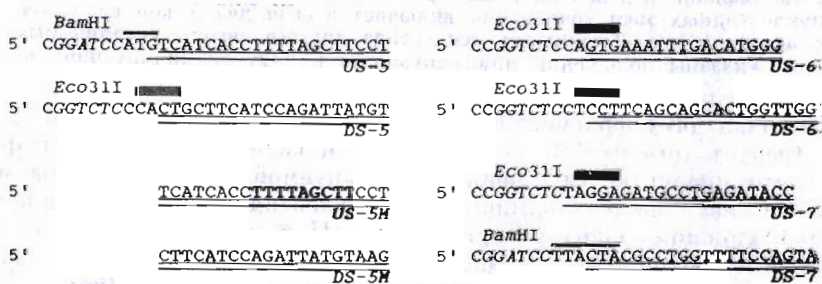


Рис. 3. Праймеры для амплификации *in vitro* 5, 6 и 7-го экзона гена IL-1 α человека. Подчеркнуты последовательности экзона (верхняя черта) и геномной ДНК (нижняя черта) в составе праймеров. Иницирующий кодон в праймере US-5 и терминирующие кодоны в праймере DS-7 (некодирующая цепь) подчеркнуты сверху. Курсивом изображены рестриктивные сайты. Зачерненные прямоугольники отвечают будущим уникальным выступающим концам, образующимся при действии эндонуклеазы рестрикции *Eco31I*. В каждом из четырех внутренних праймеров (DS-5, US-6, DS-6 и US-7) *Eco31I*-сайт и будущий выступающий конец в соответствии с характером действия эндонуклеазы разделены одним произвольным нуклеотидным звеном. Приведены также модифицированные (не содержащие выступающих концов) праймеры US-5H и DS-5H для первого этапа амплификации 5-го экзона (см. текст).

ГЕНОМНАЯ ДНК

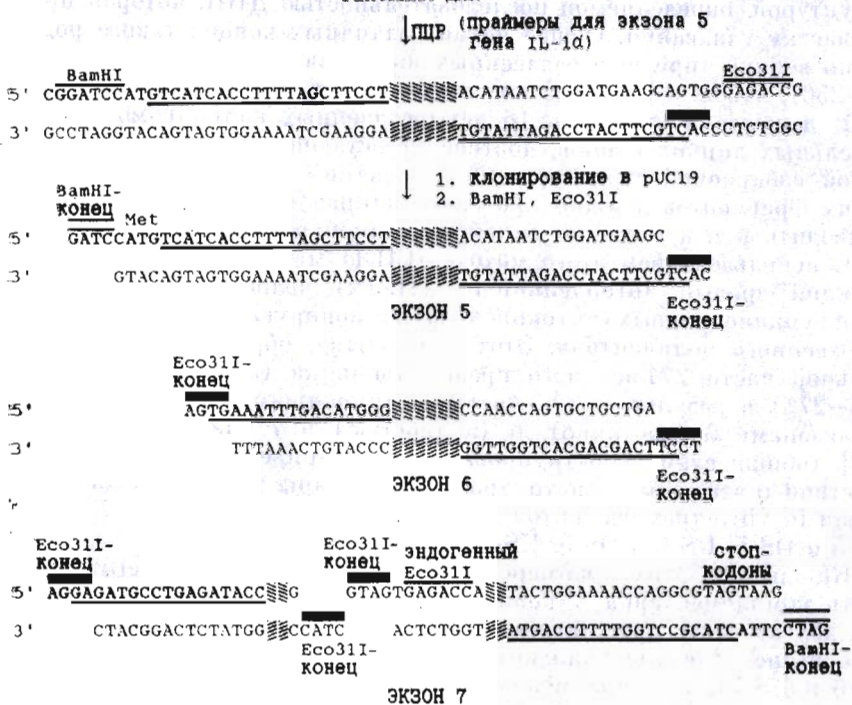
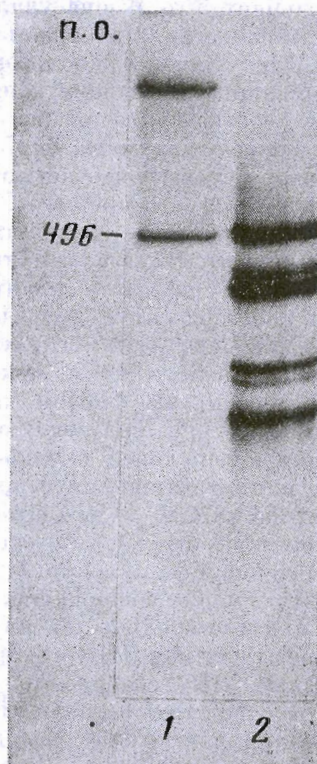


Рис. 4. Получение фрагментов 5, 6 и 7-го экзонов исходя из геномной ДНК человека с помощью ПЦР и последующей обработки рестриктазами *Eco31I* и *VamHI* (в случае 6-го и 7-го экзонов на схеме изображены только конечные продукты) для последующего сочленения с образованием гена зрелого IL-1α, фланкированного *VamHI*-концами. Последовательности праймеров для ПЦР выделены жирным шрифтом; заштрихованные прямоугольники отвечают внутриэкзонным участкам; подчеркнуты участки праймеров, комплементарные матрице (геномной ДНК). Экзон 7, содержащий внутренний *Eco31I*-сайт, образует после рестриктазной обработки два фрагмента. Тетрануклеотидные сегменты, отмеченные зачерненными прямоугольниками, соответствуют уникальным выступающим концам, возникающим при действии *Eco31I* на продукты амплификации и используемым для лигазной сшивки экзонов. Каждое из этих тетрануклеотидных мест сочленения включает в себя два 5'-концевых нуклеотида одного экзона и два 3'-концевых нуклеотида другого экзона, соединяемых друг с другом. Указаны положения иницирующего и двух терминирующих кодонов

Стыковка двух фрагментов по выступающим *Eco31I*-концам, разумеется, требует того чтобы эти концы были взаимно комплементарными. Для этого продукты амплификации стыкуемой пары сегментов вблизи места стыковки на расстоянии одной нуклеотидной пары от каждого из противоположно ориентированных *Eco31I*-сайтов должны содержать одинаковые четырехзвенные двуцепочечные участки, которые в дальнейшем как раз и служат источником взаимно комплементарных *Eco31I*-концов.

Положение этих одинаковых участков относительно границ стыкуемых экзонов задается структурами двух соответствующих праймеров (обратного праймера для одного сегмента и прямого праймера для другого) и в принципе может варьировать в пределах совокупности обоих экзонных сегментов. При этом, чем дальше от экзон-экзонной границы располагаются участки будущей стыковки, тем длиннее должен быть свисающий конец одного из праймеров. Это не только увеличивает объем химического синтеза, но и приводит к тому, что продукты амплификации, точнее, стыкуемые фрагменты (после обработки *Eco31I*), оказываются

Рис. 5. Сборка гена зрелого IL-1 α человека путем направленного лигирования экзонных фрагментов. 1 — ген IL-1 α , полученный через кДНК [18] (496 п. о. после достройки 3'-концов; контроль), 2 — продукты лигазной шпикки 5, 6 и 7-го экзонов гена IL-1 α после обработки *Bam*HI и полимеразной достройки 3'-концов (электрофорез в 10% ПААГ)



отличными по длине от соответствующих экзонов. В то же время фрагменты геномной ДНК, в точности соответствующие экзонам, представляют самостоятельный интерес как полинуклеотиды, кодирующие возможные функциональные домены целевого белка.

Поэтому среди возможных вариантов стыковки в каждом случае мы использовали тот, который приводит к наиболее точному исключению интересующих нас экзонных фрагментов из геномной ДНК: свисающие 5'-концы внутренних праймеров были сконструированы таким образом, чтобы одинаковые участки в составе продуктов амплификации и, следовательно, будущие выступающие *Eco*311-концы содержали каждый два 5'-терминальных нуклеотида своего сегмента и два 3'-терминальных нуклеотида другого сегмента, подлежащего присоединению (два 3'-терминальных нуклеотида содержались в свисающей части соответствующего праймера).

Что касается двух наружных праймеров (US-5 и DS-7), то они имеют отношение не к самой стыковке сегментов, а к введению в целевую сплайсированную последовательность дополнительных функциональных элементов (сигналов инициации и терминации трансляции) и ее встраиванию в клонирующий вектор по *Bam*HI-сайту.

Синтезированные праймеры были использованы в трех отдельных ПЦР с геномной ДНК человека в качестве матрицы. Оказалось, что, в то время как вторая (US-6 и DS-6) и третья пара праймеров (US-7 и DS-7) функционировали нормально, приводя к образованию 6-го экзона и соответствующего фрагмента 7-го экзона, первая пара (US-5 и DS-5) вообще не давала продуктов амплификации — по-видимому, из-за неких особенностей взаимодействия праймера DS-5 с матрицей (в системе US-5+DS-7 с кДНК в качестве матрицы амплификация проходила нормально [18]).

Нужный фрагмент 5-го экзона удалось получить лишь с помощью двух-этапной амплификации. На первом этапе — с геномной ДНК — в качестве праймеров была успешно использована пара 20-звенных олигонуклеотидов, не содержащих свисающих концов, т. е. полностью комплементарных 3'-концевым участкам 5-го экзона (см. рис. 3): US-5M, совпадающий с 3'-концевой частью праймера US-5, и DS-5M, сдвинутый по сравнению с комплементарной матрице частью праймера DS-5 на три нуклеотидных звена в сторону прямого праймера. После этого ПЦР с участием праймеров US-5 и DS-5, ранее не дававших результата, и аликвоты реакционной смеси после первого этапа в качестве источника матрицы прошла успешно, с образованием соответствующего фрагмента 5-го экзона.

Высокая специфичность проведенных ПЦР в принципе делала возможным прямой переход к последующему этапу — обработке эндонуклеазами рестрикции и лигазной сшивке. Однако нельзя было не считаться с таким хорошо известным фактом, как довольно высокая частота ошибок в копировании ДНК при ПЦР из-за отсутствия у термостабильной ДНК-полимеразы корректирующей активности [19]. Поэтому мы провели промежуточное клонирование синтезированных экзонных фрагментов в плазмидном векторе pUC19, с тем чтобы иметь возможность проанализировать их первичную структуру и отобрать для последующих манипуляций клоны, не содержащие мутаций. Следует отметить, что в составе проанализированных клонов, содержащих плазмиды со вставками экзонов 5—7, мутантных последовательностей не оказалось, т. е. амплификация *in vitro* этих участков геномной ДНК протекает без заметных погрешностей.

Плазмидные ДНК, содержащие копии трех экзонных сегментов, были обработаны соответствующими рестриктазами (рис. 4), целевые фрагменты (из-за наличия в экзоне 7 эндогенного *Eco*31I-сайта этому экзону отвечает два фрагмента) очищены электрофорезом в ПААГ и лигированы в одной реакционной смеси. Полученная смесь была обработана рестриктазой *Bam*HI, чтобы расщепить продукты нежелательного лигирования по этому сайту, синтетический ген был выделен электрофорезом (рис. 5) и встроен в плазмидный вектор pDR540 по *Bam*HI-сайту. Рекомбинанты отбирали методом гибридизации колоний, после чего клоны с нужной ориентацией вставки идентифицировали рестриктным анализом по величине *Eco*RI-фрагмента (450 п. о. в случае правильной и 804 п. о. в случае обратной ориентации вставки). Секвенирование показало, что полученная структура, включая места стыков, в точности отвечает нативной нуклеотидной последовательности гена.

Таким образом, предложен метод искусственного сплайсинга, позволяющий сочленять любые сегменты геномной ДНК при наличии данных о первичной структуре коротких фланкирующих последовательностей.

Экспериментальная часть

В работе использовали штамм *E. coli* TG1 ([20], с. А. 12) и плазмидные векторы pUC19 [21] и pDR540 (Pharmacia). Использовались эндонуклеазы рестрикции *Eco*31I, *Bam*HI, *Sma*I, *Eco*RI, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, полинуклеотидкиназа и ДНК-лигаза фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), термостабильная ДНК-полимераза *Thermus thermophilus* (ЛИЯФ, Гатчина), щелочная фосфатаза из желудка теленка (СР; Boehringer), [γ -³²P]АТФ и [α -³²P]dАТФ (ВНИИ «Изотоп», Ташкент). Ферментативные реакции проводили в буферах, рекомендуемых фирмой-изготовителем. Обработку эндонуклеазой *Eco*31I проводили в буфере 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 25 мМ NaCl, 5 мМ DTT. При необходимости обработки образца рестриктазами *Eco*31I и *Bam*HI реакцию проводили в присутствии обоих ферментов в аналогичном буфере с 60 мМ NaCl и 1 мМ DTT.

Синтез праймеров. Праймеры для амплификации и секвенирования синтезировали твердофазным фосфамидитным методом [22, 23] с помощью автоматического ДНК-синтезатора System 1 Plus (Beckman). После отщепления от носителя и полного деблокирования олигонуклеотиды очищали электрофорезом в 15% денатурирующем ПААГ.

Амплификация *in vitro* (ПЦР) сегментов экзонов гена IL-1 α проводилась по модифицированной методике [24] в 100 мкл инкубационной смеси, содержащей 1 мкг ДНК из лейкоцитов человека (выделена как описано в работе [25]), 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 6,7 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, четыре dNTP (1 мМ каждый), 17 мкг BSA и по 20 пмоль прямого и обратного праймеров, предварительно 5'-фосфорилированных по методике ([20], с. 11.31–11.33) с помощью полинуклеотидкиназы и нерадиоактивного АТФ. Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирки насаивали силиконовое масло. После предварительной денатурации (5 мин при 95°С) добавляли под масло 2 ед. акт. ДНК-полимеразы *T. thermophilus*. Реакционную смесь инкубировали в амплификаторе (DNA Thermal Cycler, Perkin – Elmer Cetus) в следующем режиме: денатурация 1 мин при 94°С, отжиг 2 мин при 55°С, элонгация 3 мин при 72°С (всего 30 циклов). Далее в реакционную смесь добавляли 1 ед. акт. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и NaCl до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали 10 мин при 20°С, чтобы затупить концы продуктов амплификации. В случае двухэтапной амплификации при получении 5-го экзона реакционную смесь, полученную в описанных выше условиях с праймерами US-5 и DS-5M, разбавляли буфером в 5000 раз, добавляли праймеры US-5 и DS-5, смесь dNTP и ДНК-полимеразу *T. thermophilus* и снова проводили 30 циклов амплификации. Продукты амплификации выделяли электрофорезом в 10% ПААГ с последующей электроэлюцией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

Клонирование продуктов амплификации. Продукты ПЦР клонировали по тупым концам в векторе pUC19, расщепленном по единственному SmaI-сайту и дефосфорилированном с помощью щелочной фосфатазы по стандартной методике ([20], с. 1.60–1.61, 5.72). Лигирование и трансформацию компетентных клеток *E. coli* TG1 проводили по описанным методикам ([20], с. 1.62, 1.70, 1.82–1.84), клоны отбирали на селективной среде с X-gal ([20], с. 1.85–1.86).

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса ([20], с. 1.25–1.28) и дополнительно очищали путем осаждения 7,5% раствором полиэтиленгликоля 6000 ([20], с. 1.40–1.41).

Сборка гена IL-1 α из экзонных фрагментов. По 25 мкг рекомбинантных плазмид pUC19, содержащих продукты амплификации 5, 6 и 7-го экзонов гена IL-1 α , по отдельности обрабатывали рестриктазами, выщепляющими эти фрагменты гена (*Eco311*+*Bam*HI в случае экзонов 5 и 7 и *Eco311* в случае экзона 6). Реакционные смеси разделили электрофорезом в 10% ПААГ, нужные полосы после прокрашивания бромистым этидием вырезали из геля, объединили и провели электроэлюцию. После гель-фильтрации на сефадексе G-50 получили 2,6 мкг смеси экзонных фрагментов.

Половину препарата (1,3 мкг) лиофилизовали и обрабатывали T4-ДНК-лигазой в 40 мкл стандартного буфера (12 ч при 4°С), затем фермент инактивировали нагреванием (2 мин при 100°С) и, доведя концентрацию NaCl до 100 мМ, обрабатывали рестриктазой *Bam*HI. Аликвоту реакционной смеси, меченную с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и [α -³²P]dNTP, анализировали гель-электрофорезом в 10% ПААГ (рис. 5). Продукт сшивки выделили электрофорезом основной части реакционной смеси в тех же условиях. После электроэлюции и гель-фильтрации на сефадексе G-50 получили 0,7 мкг целевого полинуклеоти-

да (ген зрелого IL-1 α), который встроили в вектор pDR540 по BamHI-сайту при 15-кратном молярном избытке фрагмента (0,7 мкг ДНК-фрагмента и 0,4 мкг плазмидной ДНК, расщепленной BamHI и дефосфорилированной). Полученной рекомбинантной плазмидой (Ap^R) трансформировали клетки *E. coli* TG1.

Гибридизация колоний. Рекомбинантные клоны на основе pDR540 анализировали гибридизацией бактериальных колоний на нитроцеллюлозных мембранах фирмы Schleicher and Schuell по описанной методике ([20], с. 1.90–1.104). В качестве зондов использовали по отдельности праймеры US-5 и DS-7, меченные по 5'-концу с помощью [γ -³²P]ATP ([20], с. 11.31–11.33).

Секвенирование двуцепных ДНК методом дидезокситерминаторов Сенгера [26] проводили с помощью модифицированной ДНК-полимеразы фага T7 в составе «Набора для определения нуклеотидных последовательностей» (НПО «Фермент», Вильнюс) и ряда специально синтезированных праймеров. Для секвенирования вставок в pDR540 использовали 18-звенный праймер 5'ACAATTAATCATCGGCTC, гомологичный смысловой цепи плазмиды в области *tac*-промотора. Для секвенирования рекомбинантных pUC19 использовали 20-звенные праймеры, один из которых (5'GTTGTA AACGACGGCCAGT) гомологичен смысловой цепи плазмиды в области, примыкающей к полилинкеру со стороны *EcoRI*-сайта, а другой (5'GSTATGACCATGATTACGCC) комплементарен той же цепи в области *HindIII*-сайта. Источником метки при секвенировании служили [α -³²P]dATP в составе смеси для элонгации или же 5'-³²P-меченный праймер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lebedenko E. N., Plutalov O. V., Berlin Yu. A. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. Special Issue 1. P. 269–272.
2. Lebedenko E. N., Plutalov O. V., Berlin Yu. A. // Nucleosides and Nucleotides. 1991. V. 10. № 1. P. 631–632.
3. Kimmel A. R., Berger S. L. (eds.) Meth. Enzymol. 1987. V. 152. P. 307–755.
4. Wu R., Grossman L. (eds.) Meth. Enzymol. 1987. V. 154. P. 221–326.
5. Khorana H. G. // Science. 1988. V. 203. № 4381. P. 614–625.
6. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification/Ed. Ehrlich H. A. New York: Stockton Press, 1989.
7. Ehrlich H. A., Gibbs R., Kazazian H. H. Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
8. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications/Eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. San Diego: Acad. Press, 1990.
9. Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., Pease L. R. // Gene. 1989. V. 77. № 1. P. 61–68.
10. Horton R. M., Cai Z., Ho S. N., Pease L. R. // Biotechniques. 1990. V. 8. № 5. P. 528–535.
11. Butkus V., Bitinaite J., Kersulyte D., Janulaitis A. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 826. № 13. P. 208–212.
12. Narang S. A., Brousseau R., Hsing H. M. // Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 1980. № 7. P. 377–385.
13. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 830–839.
14. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69–81.
15. Сивяков А. Н., Серпинский О. И., Данилюк Н. К., Чижиков В. Е., Дегтярев С. X. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 5. С. 638–647.
16. Kim S. C., Podhajski A. J., Szybalski W. // Science. 1988. V. 240. № 4851. P. 504–506.
17. Furutani Y., Notake M., Fukui T., Ohue M., Nomura H., Yamada M., Nakamura S. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 8. P. 3167–3179.
18. Лебедево Е. Н., Плуталов О. В., Берлин Ю. А. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1570–1573.
19. Tindall K. R., Kunkel T. A. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 16. P. 6008–6013.
20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

21. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // *Gene*. 1985. V. 33. № 1. P. 103-119.
22. Beaucage S. L., Caruthers M. H. // *Tetrahedron Lett.* 1981. V. 22. № 20. P. 1859-1862.
23. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 11. P. 4539-4557.
24. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Ehrlich H. A. // *Science*. 1988. V. 239. № 4839. P. 487-491.
25. Old J. M. // *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*/Ed. Davies K. E. Oxford, Washington: IRL Press, 1987. P. 5.
26. Murphy G., Ward E. S. // *Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach*/Eds Howe C. G., Ward E. S. Oxford, New York, Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1989. P. 99-115.

Поступила в редакцию
3.IX.1991

Yu. A. BERLIN, E. N. LEBEDENKO, K. R. BIRIKH, O. V. PLUTALOV

ARTIFICIAL DNA SPLICING BY DIRECTED LIGATION (SDL)

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow*

An approach to the directed genetic recombination *in vitro* has been devised, which allows for joining, in a predetermined chemical-enzymatic way, a series of DNA segments to give a precisely spliced polynucleotide sequence (DNA Splicing by Directed Ligation, SDL). The approach makes use of amplification, by several polymerase chain reactions (PCR), of the chosen DNA segments. The corresponding primers contain recognition sites of the class IIS restriction endonucleases, yielding protruding ends of unique primary structures. The protruding ends of the segments to be joined together are structurally predetermined to make them mutually complementary. Ligation of the mixture of the segments so synthesized gives the desired sequence in an unambiguous way. The suggested approach has been exemplified by the synthesis of a totally processed (intronless) gene encoding human mature interleukin-1 α .