

ПОЛУЧЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ПРИМЕРЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПЛАЦЕНТАРНОГО ИНГИБИТОРА РИБОНУКЛЕАЗ

С.А.Хаустов¹, Н.И.Матвиенко², Л.А.Железная¹

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино
142290, г. Пущино Московской обл. ул. Институтская, 3. Тел. (495) 632-78-69.*

²*Институт белка РАН, Пущино
142290 Московская область, г. Пущино ул. Институтская, 4; Тел.: +7 (495) 632-78-71*

ВВЕДЕНИЕ

Плацентарный ингибитор рибонуклеаз (ИР) является ключевым ферментом обмена РНК в тканях человека. Динамичный баланс соотношения ИР и цитоплазматических рибонуклеаз определяет количество клеточных РНК, уровень экспрессии генов, активность малых регуляторных РНК, влияет на рост и дифференцировку клеток, защиту клеток от патогенов, индукцию апоптоза. Значительный интерес представляет способность ИР связывать ангиогенин (фактор роста кровеносных сосудов) и эозинофил-зависимые рибонуклеазы, повышенная активность которых проявляется при различных патологиях: псориаз, ревматоидный артрит, диабетическая ретинопатия, аллергические болезни, канцерогенез [Nacamura and Matsumoto, 2005]. Такие заболевания как астма, аллергические риниты и атипические дерматиты, а так же паразитарные инфекции, приводят к образованию в крови и тканях повышенного содержания эозинофильных гранул, которые выделяют токсичные белки: нейротоксин (РНКаза 2) и катионный белок (РНКаза 4). Рибонуклеазная активность обоих белков провоцирует развитие аллергической реакции организма [Rosenberg, 1998]. Способность ИР ингибировать эозинофил-зависимые рибонуклеазы позволяет рассматривать его как потенциальный противоаллергический препарат.

Возможность применения ИР для терапии онкологических заболеваний основана на его способности связывать индуктор неоваскуляризации - ангиогенин (РНКаза 5), который индуцирует образование новых кровеносных сосудов для снабжения раковой опухоли кислородом и питательными веществами. Терапевтический эффект ИР достигается при использовании ДНК-вакцинации, в результате чего рост опухоли останавливается [Fu et al., 2005].

Широко распространено применение ИР для защиты РНК в таких реакциях *in vitro*, как прямая и обратная транскрипция, трансляция, РНК-ДНК гибридизация, выделение и изучение РНК-белковых комплексов [Blackburn and Jaikhani, 1979].

При традиционном способе экспрессии нативного гена в *E.coli* выход ИР оказался чрезвычайно низким [Lee and Vallee, 1989]. Одной из причин низкой эффективности экспрессии может быть отличие кодового состава продуцента, в данном случае, *E.coli* и гена ИР. Оптимизация кодового состава, как правило, приводит к увеличению продукции целевого белка [Gustafsson and Govindarajan, 2004]. Мы использовали наиболее эффективный способ оптимизации кодового состава - получение искусственного гена.

Предложенные на сегодняшний день методы очистки ИР основаны на аффинной хроматографии с использованием иммобилизованной рибонуклеазы А [Blackburn, 1979], что приводит к неизбежному присутствию рибонуклеазной активности в препарате белка. Для того чтобы избежать присутствия нежелательных примесей, нами была разработана схема хроматографической очистки ИР без использования рибонуклеазы. В результате удалось получить гомогенный препарат ИР, не обладающий остаточной рибонуклеазной активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химико-ферментативный синтез ДНК

Модификацию нуклеотидной последовательности кДНК гена человеческого рибонуклеазного ингибитора (NCBI *GeneID*: 6050), поиск и замену редких кодонов, замену сайтов эндонуклеаз рестрикции, конструирование олигонуклеотидов осуществляли с использованием программы GeneRunner 3.00 (Hastings Software Inc., США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) в тонкостенных пробирках. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА), 250 мкМ дезоксинуклеозидтрифосфаты (каждый), 0,5 мкМ олигонуклетиды (Metabion International AG, Германия), 1 ед. ДНК-полимеразы *Pfu* (в реакциях синтеза ДНК) или 2,5 ед. ДНК-полимеразы *Taq* (для анализа клонов). ДНК-полимеразы получены в нашей лаборатории. Для проведения ПЦР использовали следующие программы:

- 1) Объединение ДНК: 94°C, 30 с; 20 циклов (94°C, 20 с; 30°C, 40 с; 72°C, 30 с).
- 2) Нарботка одноцепочечной ДНК: 94°C, 1 мин; 15 циклов (94°C, 20 с; 65°C, 40 с; 72°C, 30 с).
- 3) Анализ клонов: 94°C, 3 мин; 20 циклов (94°C, 20 с; 55°C, 30 с; 72°C, 90 с).

ДНК гена ИР получали, используя синтетические олигонуклеотиды, с помощью

многостадийной реакции, основанной на чередовании стадий амплификации и объединения ДНК (рис. 1). Продукт, полученный на каждой стадии (1 мкл) использовали в качестве матрицы ДНК на последующей стадии. Анализ продуктов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с использованием маркеров молекулярного веса ДНК HyperLadder IV (Bioline, Германия). Клонирование синтетических ДНК и получение полноразмерного гена ИР осуществляли как было описано ранее [Хаустов и др., 2008]. Клоны анализировали на наличие рекомбинантой плазмиды с помощью ПЦР; плазмиды секвенировали с помощью ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Получение и очистка ИР

Индукцию экспрессии генов осуществляли добавлением к культуре клеток изопропил- β -D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Перед добавлением ИПТГ клетки выращивали на среде LB (1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, pH 7,0) в присутствии канамицина (50 мкг/мл) с постоянной аэрацией при 37°C до величины поглощения (A_{600}) 0,6. После индукции клетки инкубировали в течение 4 ч в тех же условиях, а затем собирали центрифугированием (30 мин, 4000 g, 4°C). Осадок суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 10 мМ ДТТ, 5 мМ ЭДТА-Na, 0,5% Tween 80, 0,5% Triton X-100), добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали 30 мин на льду. После инкубации клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-А (Россия) в течение 2 мин (10 с озвучивание, 10 с пауза) на льду. Лизат центрифугировали (30 мин, 10000 g, 4°C).

Очистку ИР проводили следующим образом. К супернатанту добавляли NaCl до конечной концентрации 200 мМ и полиэтиленимин до 0,25%, инкубировали 30 мин при 4°C и снова центрифугировали в тех же условиях для удаления ДНК. Полученный осветленный лизат клеток наносили на колонку со 100 мл Q Big Beads (GE Healthcare, США). После нанесения лизата колонку промывали 300 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА-Na, 5 мМ ДТТ, 0,1% Tween 80, 5% глицерин). Связанные белки элюировали 200 мл буфера В (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 400 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА-Na, 5 мМ ДТТ, 0,1% Tween 80, 5% глицерин). К полученному препарату добавляли сульфат аммония до 30% насыщения, инкубировали 30 мин на льду, после чего центрифугировали (20 мин, 6000 g, 4°C). Осадок отбрасывали, к супернатанту добавляли сульфат аммония до 60% насыщения, инкубировали 30 мин на льду, центрифугировали в тех же условиях. Осадок разводили в 50 мл буфера С (50 мМ Tris-HCl, (pH 7,5), 500 мМ

NaCl, 5 mM K₂HPO₄, 5 mM ДТТ, 0,1% Tween 80, 5% глицерин), наносили на колонку с 50 мл Hydroxyl Apatite (Bioline, Германия), промывали 150 мл буфера С и элюировали 100 мл буфера D (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM ДТТ, 0,1% Tween 80, 5% глицерин, 150 mM K₂HPO₄). Элюат наносили на колонку с 50 мл Q Масропреп (Bio-Rad, США), промывали 100 мл буфера E (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM ДТТ, 0,1% Tween 80, 5% глицерин), содержащим 150 mM NaCl и элюировали 1 л линейного градиента NaCl от 50 до 500 mM в буфере E. По ходу элюции собирали фракции по 12 мл, аликвоты из которых анализировали на наличие в них активности ИР. Активные фракции объединяли и наносили на колонку с 20 мл ANX Fast Flow (GE Healthcare, США), промывали 50 мл буфера E и элюировали 400 мл линейного градиента NaCl от 50 до 500 mM в буфере E. Активные фракции объединяли и диализовали против буфера для хранения (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА-Na, 5 mM ДТТ).

Электрофорез белков проводили по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. В качестве маркеров молекулярных масс белков использовали Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega, США).

Определение активности

Функциональную активность ИР по отношению к рибонуклеазе А измеряли модифицированным нами методом [Blackburn, 1979]. В реакционную смесь вносили 20 мкл 10x буфера (1 M Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM ЭДТА-Na, 1 мг/мл БСА, 100 mM ДТТ), 5 нг рибонуклеазы А и препарат ИР в различных разведениях. Смесь доводили водой до 100 мкл, затем в раствор добавляли 100 мкл тотальной РНК *E.coli* (0,5 мг/мл), предварительно нагретой до 37°C. Смесь инкубировали 5 мин при температуре 37°C, реакцию останавливали добавлением 2 мл 5% HClO₄. Пробирки охлаждали на льду в течение 10 мин и центрифугировали (5 мин, 12000 g, 4°C). Супернатант переносили в кварцевые кюветы и измеряли поглощение при длине волны 260 нм на спектрофотометре Hitachi 220 А (Япония).

Расчет активности ингибитора осуществляли по формуле:

$$A = \text{Abs}_1 * D * 100\% / \text{Abs}_0 * V * 50\%, \text{ где}$$

A – активность, ед/мкл

Abs₁ – поглощение, эксперимент

Abs₀ – поглощение, контроль без добавления ИР

D – разведение препарата ИР

V – объем препарата, добавляемого в реакцию, мкл

50% – коэффициент пересчета

Согласно принятой номенклатуре, 1 единице ферментативной активности ИР соответствует количество ИР, которое на 50% ингибирует гидролизующее действие 5 нг РНКазы А [Blackburn, 1979].

Для определения остаточной рибонуклеазной активности в препарате ИР, его инактивировали 20 мин при температуре 80°C, , вносили в реакционную смесь без добавления рибонуклеазы А и осуществляли измерение, как было описано ранее. Отсутствие поглощения при длине волны 260 нм говорит об отсутствии рибонуклеазной активности в препарате.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Химико-ферментативный синтез ДНК

Искусственный ген ИР был получен из синтетических олигонуклеотидов путем их объединения в ПЦР с помощью разработанной нами схемы (рис. 1).

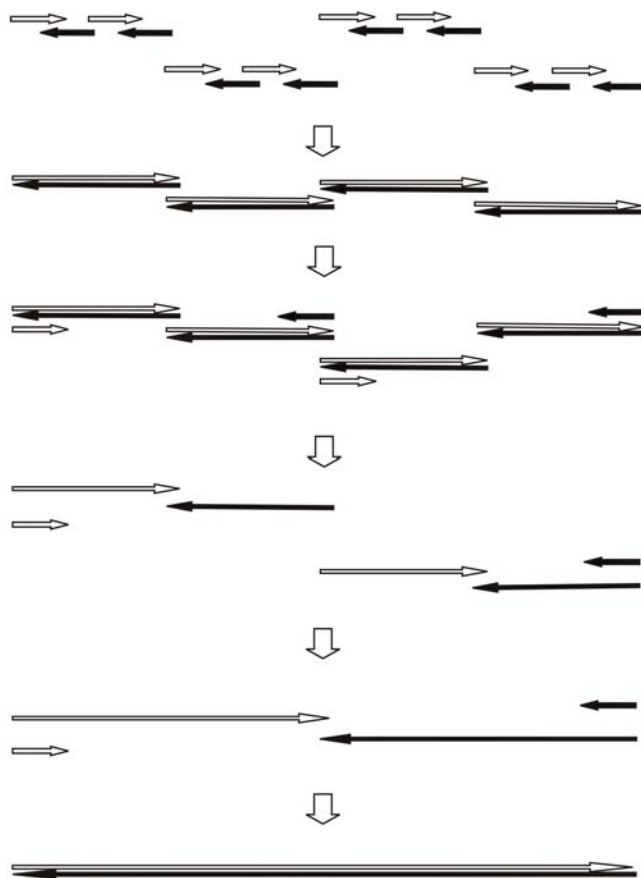


Рис. 1. Схема стратегии химико-ферментативного синтеза гена ИР. Одноцепочечные олигонуклеотиды объединяли по 4 в каждой отдельной реакции.

Полученные продукты использовали в качестве матрицы и добавляли один из концевых олигонуклеотидов для наработки одноцепочечной ДНК. Полученные ДНК объединяли попарно, полученные продукты снова использовали для наработки одноцепочечной ДНК. Стадии повторяли до получения продукта ДНК нужного размера.

Метод химико-ферментативного синтеза ДНК основан на следующем принципе: короткие одноцепочечные олигонуклеотиды способны гибридизоваться взаимодополнительными концами и объединятся с помощью ДНК-лигазы [Au et al., 1998] или ДНК-полимеразы [Dillon and Rosen, 1990]. Согласно литературным данным в одной реакции возможно объединить от 2 до нескольких десятков олигонуклеотидов [Xiong et al., 2004]. Нами была предпринята попытка получить 4 сегмента гена ИР объединением от 8 до 24 олигонуклеотидов. Однако в большинстве случаев оказалось невозможным объединить более 4 олигонуклеотидов в одной реакции (рис. 2).

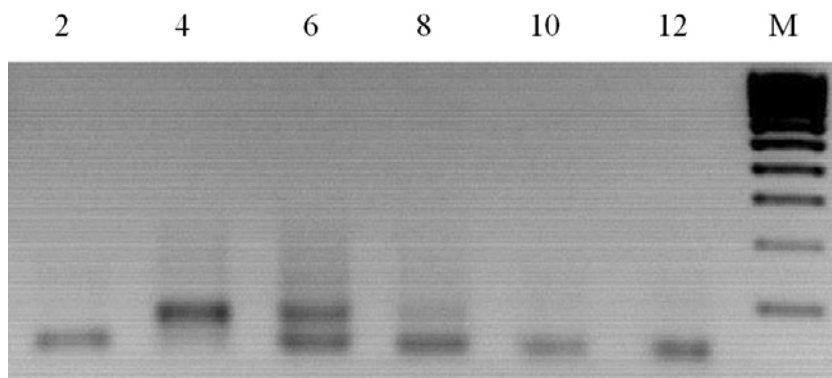


Рис. 2. Объединения разного количества олигонуклеотидов. Цифрами указано число олигонуклеотидов в одной реакции, М – маркер молекулярного веса ДНК.

На рисунке видно, что при объединении 2 и 4 олигонуклеотидов образуются продукты ДНК нужного размера (50 п.н. и 90 п.н., соответственно). При попытке объединить 6 олигонуклеотидов образуются промежуточные продукты, а ДНК нужного размера практически не детектируется. При объединении 8 и более олигонуклеотидов образуются преимущественно промежуточные продукты объединения 2 олигонуклеотидов. Возможной причиной возникновения сложностей может быть крайне регулярная структура гена ИР, что приводит к неспецифической гибридизации олигонуклеотидов и образованию побочных продуктов ПЦР.

Дуплексы, полученные из 4 олигонуклеотидов, также содержат взаимодополнительные концы, а значит могут быть объединены между собой в реакции

«слияния ДНК», основанной на ПЦР [Prodromou and Pearl, 1992]. Однако использование стандартной технологии оказалось низкоэффективным (рис. 3, дорожка №6), вероятно по причине образования большого количества побочных продуктов из-за регулярной структуры гена, что обсуждалось выше.

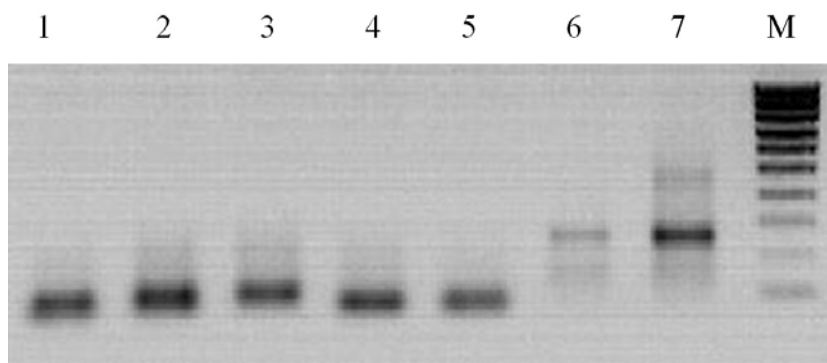


Рис. 3. Объединение олигонуклеотидов с образованием продуктов ДНК. 1-5 – объединение различных групп из 4 олигонуклеотидов; 6 – объединение полученных ДНК стандартным методом «слияния ДНК»; 7 – объединение с помощью разработанной нами схемы.

Для преодоления сложностей, связанных с неспецифической гибридизацией ДНК, мы разработали стратегию, позволяющую минимизировать образование побочных продуктов (рис. 1). Специфичность реакции увеличивали за счет объединения одноцепочечных ДНК и использования не более двух различных продуктов ДНК, объединяющихся в каждой реакции. Продукты каждой стадии объединения без предварительной очистки использовали в качестве матрицы для получения одноцепочечной ДНК в присутствии только одного концевых олигонуклеотида. Полученные одноцепочечные ДНК снова объединяли. Стадии получения одноцепочечной ДНК и ее объединения повторяли до получения ДНК нужного размера. Так при использовании олигонуклеотидов длиной 30 н.о. (длина области перекрытия 10 н.о.) для получения ДНК размером 180 п.н. необходимо провести объединение двух групп по 4 олигонуклеотида, поработать с полученной матрицы одноцепочечные ДНК и объединить их. Эффективность использования разработанной нами схемы оказалась выше, чем «слияние ДНК» (рис. 3, дорожка №7). Фрагменты ДНК, не содержащие мутаций, использовали для получения полноразмерного гена ИР, как было описано ранее [Хаустов и др., 2008].

Анализ мутаций

На современном этапе развития синтетической биологии ее ключевым вопросом является решение проблемы ошибок синтеза. Различные модификации методов синтеза ДНК направлены на уменьшение числа мутаций, однако даже их использование не позволяет полностью избежать появления ошибок [Binkowski et al., 2005; Fuhrmann et al., 2004]. Мы были вынуждены проанализировать большое количество рекомбинантных плазмид (около 40) в поисках клонов, не содержащих мутации в составе синтезированных фрагментов.

Специфическая структура гена привела к возникновению чрезвычайно высокого числа мутаций. Было секвенировано порядка 10000 п.н. и обнаружено 116 случайных мутаций в соотношении: делеция/вставка/трансверсия/транзиция = 32/3/58/23. Все они располагаются относительно равномерно по всей последовательности гена (рис. 4).

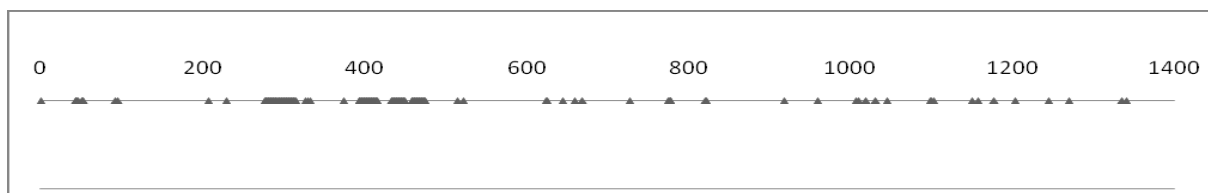


Рис. 4. Локализация мутаций в последовательности синтетического гена ИР. Отмечены нуклеотидные позиции, в которых обнаружили мутации в проанализированных клонках, содержащих сегменты гена ИР.

В ПЦР использовали ДНК-полимеразу *Pfu*, которая обладает корректирующей активностью и относительно низким числом ошибок синтеза - не более трех на 1000 п.н. [Cline et al., 1996]. Однако при синтезе гена ИР число ошибок оказалось значительно выше – 12 на 1000 п.н. Доля различных типов мутаций также несколько отличается от ранее полученных данных [Carr et al., 2004] (рис. 5). Анализ локализации, типов и частоты мутаций позволил предположить вероятные причины их возникновения.

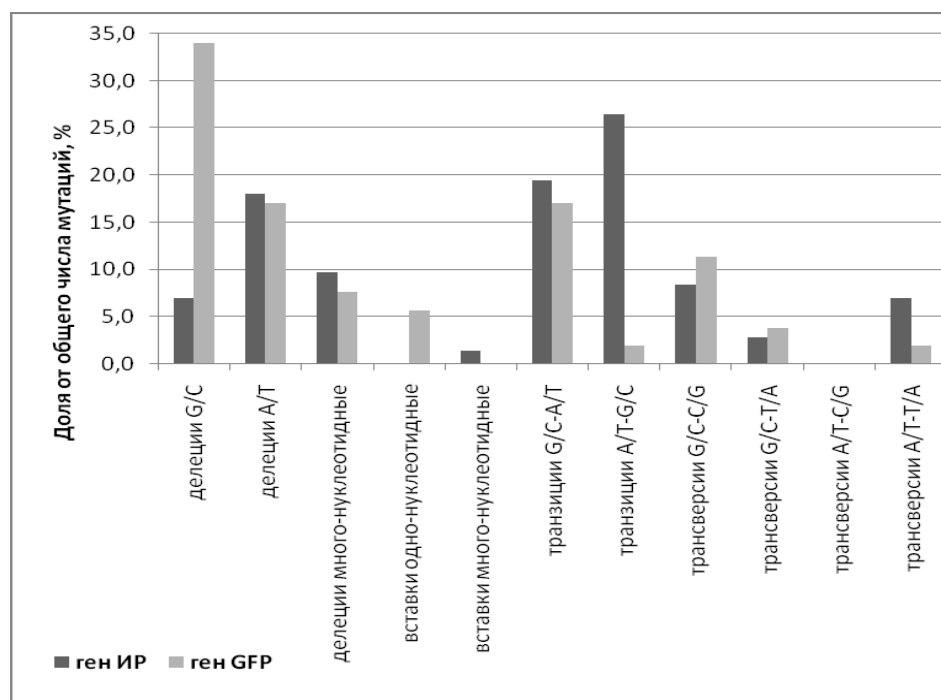


Рис. 5. Доля каждого типа мутаций, полученных при синтезе гена ИП в сравнении с ранее полученными данными при синтезе гена GFP.

Примерно половина обнаруженных мутаций представляют собой транзиции (замены одного пуринового или пиримидинового основания на другое). Возможной причиной этого типа мутаций может быть термическое дезаминирование дезоксицитозина в процессе ПЦР с образованием дезоксиуридина, которому на стадии полимеризации комплиментарен дезоксиаденин. В результате происходит замена C→T или G→A [Smith et al., 2004]. Поскольку для получения ДНК гена использовали многостадийную ПЦР, нуклеотиды подвергались длительному воздействию повышенной температуры, что могло привести к увеличению вероятности данной модификации. Поскольку вклад термической модификации оказался достаточно ощутимым, можно сделать вывод, что предложенное ранее использование режимов ПЦР с минимальным высокотемпературным воздействием [Mamedova et al., 2007] может значительно уменьшить вероятность возникновения мутаций. Сравнивая долю транзиций при синтезе генов ИП и GFP можно заметить, что в последнем случае их доля примерно в 2 раза меньше. Этот факт может быть связан с использованием ДНК-полимеразы PfuTurbo (Stratagene, США), содержащей ферменты, разрушающие образовавшиеся модифицированные нуклеотиды [Hogrefe, et al., 2002]. Авторы работы не акцентировали внимание на выборе данной полимеразы, однако на основании сравнения полученных данных следует заметить, что ее использование может быть вполне оправдано для минимизации ошибок в синтезированной ДНК.

Примерно треть мутаций представляют собой одно-нуклеотидные делеции, что

можно объяснить преимущественно ошибками химического синтеза олигонуклеотидов. Их наличие наиболее вероятно, поскольку в работе были использованы обессоленные олигонуклеотиды, которые не подвергались дополнительной очистке.

Многонуклеотидные вставки, которые относительно редко встречаются при получении искусственных генов, составляют в нашем случае около 3%. Их возникновение может быть связано с неспецифической гибридизацией высокомолекулярных повторов в ПЦР.

Трансверсии (замены пуринового основания на пиримидиновое и наоборот) составляют менее четверти всех мутаций, не имеют однозначной причины возникновения и, что наиболее вероятно, являются случайными ошибками полимеразы.

На основании анализа различных типов возникших мутаций можно сделать вывод, что если уменьшить вероятность возникновения делеций благодаря дополнительной очистке олигонуклеотидов и снизить эффекты термической модификации, приводящей к возникновению трансверсий, то частота мутаций может составить менее 3 на 1000 п.н., что соответствует средним значениям при синтезе искусственных генов.

Выделение ИР

Полученный ген ИР экспрессировали в *E.coli* BL21(DE3) (Stratagene, США). Доля ИР составила примерно 20% от тотального клеточного белка. Основная часть ИР после лизиса клеток обнаруживалась в нерастворимых телах включения, из которых не удалось выделить активный белок. Очистка белка проводилась из растворимой фракции, в которой ИР не детектируется электрофоретически. Однако при использовании разработанной схемы очистки оказалось возможным получить гомогенный препарат ИР.

Для очистки ИР проводили четыре стадии колоночной хроматографии, осаждение нуклеиновых кислот полиэтиленмином, двойное осаждение сульфатом аммония и диализ (рис.6).

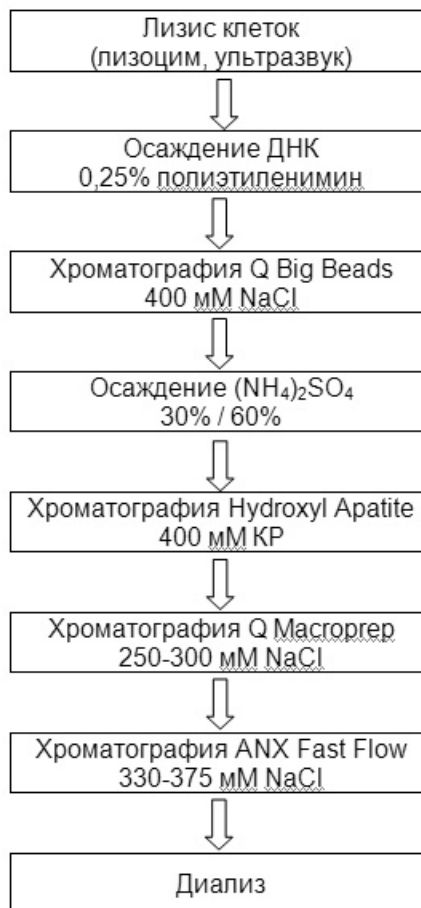


Рис. 6. Схема очистки ИР.

Согласно данным определения активности ИР после очистки, выход активного белка составил 100000 ед/л культуры клеток, что в 4 раза выше, чем при экспрессии нативного гена ИР [Lee et al., 1989]. Увеличение выхода активного белка, вероятно, связано с оптимизацией кодонового состава для экспрессии в *E.coli*. Возможность оптимизации кодонового состава является важным преимуществом метода синтеза искусственных генов и позволяет увеличить уровень экспрессии рекомбинантного белка.

Несмотря на кажущуюся сложность и многостадийность схемы очистки, препарат ИР был получен в течение трех рабочих дней. Возможность анализировать фракции с помощью определения активности без использования электрофореза ускорила процесс выделения и позволила получить гомогенный препарат ИР (рис. 7).

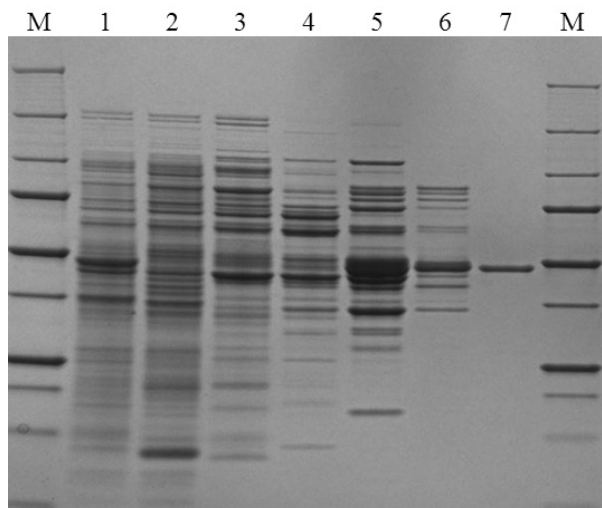


Рис. 7. Анализ образцов различных стадий очистки ИР. М - маркер молекулярных масс белков, 1 - лизат клеток *E.coli* после индукции, 2 - экстракт белков *E.coli*, 3 - элюат Q Big Beads, 4 - преципитат после осаждения 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 - элюат Hydroxyl Apatite, 6 - элюат Q MacroPrep, 7 - элюат ANX Fast Flow.

ВЫВОДЫ

Химико-ферментативный синтез ДНК является универсальным способом, позволяющим получить любой ген с известной последовательностью. Однако существуют гены, получение которых осложнено особенностями их структуры. Человеческий плацентарный ингибитор рибонуклеаз – цитоплазматический белок с молекулярной массой 50 кДа, отличается крайне высоким содержанием остатков лейцина (18%) и цистеина (6%) в своем составе. Особенностью белка является его крайне регулярная структура: белок состоит из 14 лейцин богатых повторов состава XLXXLXLXXN, где L, N, X – это остатки лейцина, аспарагина и любой аминокислоты, соответственно [Haigis et al., 2002]. Гомология между повторами составляет около 40%. Получение ДНК, содержащей высокогомологичные повторы, как оказалось, осложняется высоким уровнем образования неспецифических продуктов гибридизации в ПЦР и большой вероятностью возникновения ошибок. Только использование сложной многостадийной стратегии объединения олигонуклеотидов и трудоемкой стадии скрининга клонов, позволило получить искусственный ген ИР.

После оптимизации нуклеотидной последовательности, синтеза и экспрессии искусственного гена ИР в *E.coli* было получено 100000 ед. ИР из 1 л биомассы, что примерно в 4 раза больше, чем при экспрессии нативного гена [Lee and Vallee, 1989]. Разработанная нами схема очистки белка эффективна и позволяет получить электрофоретически чистый ИР, без использования иммобилизованной рибонуклеазы А

[Blackburn, 1979], что исключает вероятность присутствия примесей рибонуклеазной активности в препарате. Функциональная активность по отношению к рибонуклеазе А была определена с помощью разработанного нами метода. Отказ от предложенного ранее использования радиоактивно меченной РНК и нестабильных рибонуклеазных субстратов [Blackburn P, Jaikhani BL, 1979] значительно упрощает процедуру определения активности ИР.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №№ 06-08-01076, 05-04-48901.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Хаустов С.А., Железная Л.А., Матвиенко Н.И. 2008. Синтез гена человеческого плацентарного ингибитора рибонуклеаз и его экспрессия в *E.coli*. *Технологии живых систем*, №3 (в печати).

Au L.C., Yang F.Y., Yang W.J., Lo S.H., Kao C. F. 1998. Gene synthesis by a LCR-based approach: high-level production of leptin-L54 using synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 200-203.

Binkowski B.F., Richmond K.E., Kaysen J., Sussman M.R., Belshaw P.J. 2005. Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling. *Nucleic Acids Res.*, **33**(6), e55.

Blackburn P. 1979. Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay. *J. Biol. Chem.*, **254**(24), 12484-12487.

Blackburn P., Jaikhani B.L. 1979. Ribonuclease inhibitor from human placenta: interaction with derivatives of ribonuclease A. *J Biol Chem.*, **254**(24), 12488-93.

Carr P.A., Park J.S., Lee Y.J., Yu T., Zhang S., Jacobson J.M. 2004. Protein-mediated error correction for de novo DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **32**(20), e162.

Cline J, Braman J C., Hogrefe H H. 1996. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, **24**(18), 3546–3551.

Dillon P. J., Rosen C. A. 1990. A rapid method for the construction of synthetic genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, **9**, 298-300.

Fu P., Chen J., Tian Y., Watkins T., Cui X., Zhao B. 2005. Anti-tumor effect of hematopoietic cells carrying the gene of ribonuclease inhibitor. *Cancer Gene Ther.*, **12**(3), 268-75.

Fuhrmann M., Oertel W., Berthold P., Hegemann P. 2005. Removal of mismatched bases from synthetic genes by enzymatic mismatch cleavage. *Nucleic Acids Res.*, **33**(6), e58.

Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.*, **22**, 346-53.

Haigis M. C., Haag E. S., Raines R. T. 2002. Evolution of ribonuclease inhibitor by exon duplication. *Mol. Biol. Evol.*, **16** (6), 959-963.

Hogrefe H.H., Hansen C.J., Scott B.R., Nielson K.B. 2002. Archaeal dUTPase enhances PCR amplifications with archaeal DNA polymerases by preventing dUTP incorporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(2), 596-601.

Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.*, **96**, 23-28.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lee F. S., Vallee B. L. 1989. Expression of human placental ribonuclease inhibitor in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**(1), 115-120.

Mamedov T G., Padhye N. V., Viljoen H., Subramanian A. 2007. Rational de novo gene synthesis by rapid polymerase chain assembly (PCA) and expression of endothelial protein-C and thrombin receptor genes. *J Biotechnol.*, **131**(4), 379-87.

Nacamura T., Riordan I.F. 1997. Organogenesis and angiogenin. *Cell Mol. Life Sci.*, **53**, 803-815.

Prodromou C., Pearl L. H. 1992. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.*, **5**, 827-829.

Rosenberg H.F. 1998. The eosinophil ribonucleases. *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 795-803.

Scheele G, Blackburn P. 1979. Role of mammalian RNase inhibitor in cell-free protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**(10), 1898-902.

Smith H. O., Hutchison C. A., III, Pfannkoch C., Venter J. C. 2003. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**(26), 15440-15445.

Xiong A.S., Yao Q.H., Peng H.H, Li X., Fan H.Q., Cheng Z.M., Li Y. 2004. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res.*, **32**(12) e9.