



УДК 577(214.625+217.52):577.113.6

ДУПЛИКАЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ЛЕЙКОЦИТАРНОГО
ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В СОСТАВЕ
ПОЛИЦИСТРОННЫХ мРНК С СОПРЯЖЕННОЙ СИСТЕМОЙ
ТРАНСЛЯЦИИ

**Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В.,
Куличков В. А., Добрынин В. Н.*, Филиппов С. А.*,
Чувпило С. А.*, Коробко В. Г.***

Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии,
пос. Кольцово Новосибирской обл.;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР,
Москва

С помощью химически синтезированного адаптера осуществлена дупликация структурной части синтетического гена интерферона (*ifn- α 2*). Структура адаптера выбрана таким образом, чтобы терминатор трансляции первого гена (ГАА) входил в состав последовательности сайта SD (TAAGCA) второго гена и находился на расстоянии 11 п. о. от нового старта трансляции. В другом случае терминатор первого гена был расположен на расстоянии 69 п. о. от района инициации трансляции второго гена, имеющего тот же участок SD. Исследована экспрессия таких бицистронов в составе полицистроновых мРНК, иницируемых с промоторов $P_{lac}(P_{trp})_2$ и P_{VII} бактериофага M13. Найдено, что в клетках *E. coli* бицистроны гена *ifn- α 2* под контролем $(P_{trp})_2$ и P_{VII} в полицистроновых *trp L-ifn-ifn* и IX-VIII-*ifn-ifn*, имеющих сопряженную систему трансляции всех генов, обеспечивают высокий уровень синтеза интерферона $\alpha 2$ в отличие от бицистронов под контролем P_{lac} , в котором сопряжение есть только между генами *ifn- α 2*.

Одним из способов оптимизации экспрессии генов является изменение дозы гена. Эффект дозы гена заключается в том, что увеличение в клетке количества копий определенного гена вызывает повышение уровня синтеза его продукта [1]. Этот принцип применяют при создании продуцентов биологически активных веществ, клонируя соответствующие гены в многокопийных векторах на основе плазмид или бактериофагов λ и M13. Известны также примеры клонирования tandemных дубликаций фрагментов и полных генов в многокопийных векторах с целью увеличения выхода продукта клонированного гена [2, 3]. В случае клонирования двух, трех и четырех копий гена *ifn- α 8*, отстоящих друг от друга в таких гомополицистроновых на расстоянии ~ 600 п.о., наблюдали пропорциональное увеличение синтеза продукта по сравнению с моноцистроновым вариантом [3]. В приведенном выше примере tandemных дубликаций гена *ifn- α 8* входят в состав одной полицистроновой матрицы. В то же время их трансляция происходит, по-видимому, независимо, поскольку известно [4], что при расстоянии между генами уже в 176 п.о. эффект сопряжения значительно ослаблен.

С другой стороны, недавно было показано [5, 6], что в экспрессионных системах полицистронового типа, имеющих сцепленную или сопряженную систему трансляции, удается значительно увеличить уровень синтеза клонированного гена по сравнению с другими генами такого искусственного полицистронов [5]. В связи с этим представляло интерес исследовать возможности применения полицистроновой системы со сцепленной трансляцией в сочетании с клонированием повторяющихся генов.

Для изучения экспрессии полицистронов, имеющих сцепленную систему трансляции, в настоящей работе в качестве модели выбран синтетиче-

Сокращения: SD — участок связывания рибосомы, п.о.— пара оснований, IFN — интерферон, *ifn* — ген интерферона.

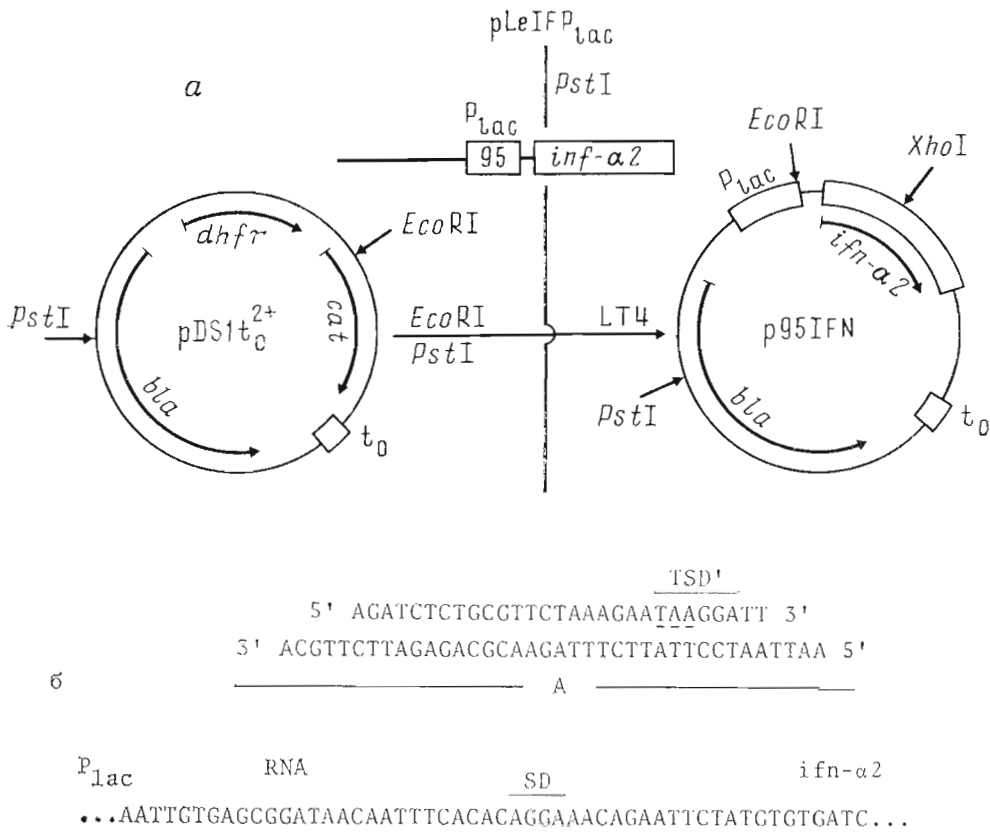


Рис. 1. Плазмиды p95IFN. *a* — схема получения плазмиды p95IFN. *Pst*I, *Eco*RI, *Xho*I — расщепление соответствующей рестриктазой; LT4 — сшивка ДНК-лигазой фага T4 и трансформация клеток *E. coli*; *P*_{lac} — промотор гена β-галактозидазы *E. coli*, содержащий мутацию UV5 в составе фрагмента ДНК длиной 95 п.о.; А — химически синтезированный адаптер. Физическая карта плазмиды pLeIF(*P*_{lac}) описана в работе [7]. Нуклеотидные последовательности верхней цепи адаптера А, соответствующие терминатору транскрипции гена *inf-α2* и участку SD, подчеркнуты прерывистой и сплошной линиями соответственно и обозначены TSD'. Другие обозначения даны по работе [8]. Указаны только те рестриктные сайты, которые использовались при клонировании и анализе структуры. *б* — частичная нуклеотидная последовательность верхней цепи ДНК p95IFN в окрестности стыка промотора *P*_{lac} (подчеркнута снизу) с началом синтетического гена *inf-α2*. Участок SD подчеркнут сверху. Стрелками отмечены старты транскрипции и трансляции искусственного оперона

ский ген лейкоцитарного интерферона человека (*inf-α2*). В начале этого гена перед кодоном ATG расположен сайт расщепления рестриктазы *Eco*RI, а в структурной части на расстоянии 26 п.о. от терминирующего кодона имеется сайт *Pst*I [5, 7]. Это обстоятельство было использовано для получения искусственного тандема генов *inf-α2*. С этой целью был химически синтезирован *Pst*/*Eco*RI-адаптер, с помощью которого сначала была сконструирована плазмиды p95IFN, как показано на рис. 1. Структуру рекомбинантной плазмиды p95IFN подтверждали с помощью рестрикционного анализа и прямым секвенированием района ДНК, расположенного по обе стороны от места расщепления рестриктазой *Xho*I. Найдено, что структура ДНК p95IFN в окрестности синтетического гена *inf-α2* полностью совпадает со структурой соответствующего района ДНК p381IFN [6], за исключением участка в области начала гена *inf-α2* (см. рис. 1б).

Для получения тандема искусственных генов *inf-α2* использовали *Pst*/*Eco*RI-векторные части ДНК p95IFN (см. рис. 1) и p381IFN [6], в которые в присутствии синтетического *Pst*/*Eco*RI-адаптера (структура адаптера показана на рис. 1а) встраивали *inf-α2*-содержащие *Pst*I-фрагменты ДНК. pIF6/8 [5] и pLeIF(*P*_{lac}) [7] получали по схеме, аналогичной

конструированию плазмиды p95IFN (см. рис. 1 и «Экспериментальную часть»). Рестрикционные и генетические карты полученных таким способом плазмид p95/2IFN, p381/2IFN и p381/2IFN' приведены на рис. 2. Структуры этих рекомбинантных плазмид подтверждали рестрикционным анализом с помощью эндонуклеаз

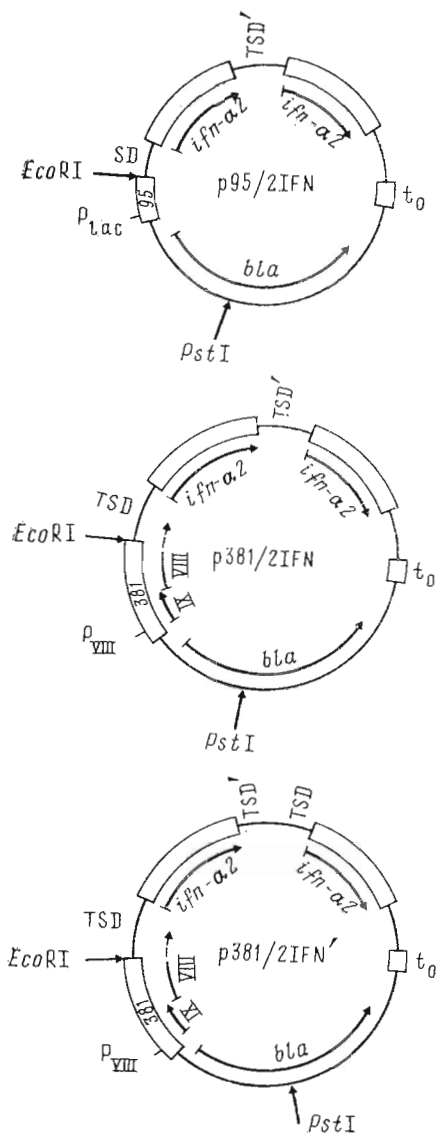


Рис. 2. Схемы плазмид p95/2IFN, p381/2IFN и p381/2IFN' (способ их конструирования см. в «Экспер. части»). TSD — участок терминации трансляции предшествующего гену *ifn-α2* цистрона VIII и сайт SD. Структура TSD идентична аналогичному району в окрестности начала синтетического гена интерферона у ДНК pIF6/8 [5] и p381IFN [6]. Остальные обозначения см. в работе [6] и в подписях к рис. 1

BspI, *EcoRI*, *XhoI* и *PstI*, а также путем секвенирования ДНК в области встройки искусственных генов *ifn-α2*. Результаты этих анализов суммированы на рис. 3. Можно видеть (см. рис. 2 и 3), что все три плазмиды содержат тандем искусственного гена *ifn-α2*, причем структуры межгенных районов у ДНК p95/2IFN и p381/2IFN идентичны, а области в начале гомобицистронов различаются. Эти различия заключаются в том, что тандем генов *ifn-α2* в плазмиде p381/2IFN входит в состав искусственного полицистрона из последовательно расположенных генов IX-VIII-*ifn-ifn*, находящихся под контролем промотора P_{VIII} бактериофага M13, а в плазмиде p95/2IFN гены *ifn-α2* организованы в бицистрон, транскрипция которого инициируется с промотора P_{Iac} (см. рис. 3). Плазмиды p381/2IFN и p381/2IFN' полностью идентичны, за исключением области стыка двух генов *ifn-α2* (см. рис. 3).

Как было показано в предыдущей работе [6], замена регуляторного фрагмента *TaqI*-381 с промотором P_{VIII} (плазмида p381IFN) на промоторный фрагмент с (P_{trp})₂ приводит к трехкратному увеличению продукции интерферона в клетках *E. coli*, содержащих плазмиду p280IFN [6]. Поэтому для достижения более высокого уровня синтеза интерферона представляло интерес использовать укороченную часть лидерного пептида триптофанового оперона *E. coli* (фрагмент (Hha-140)₂ [6]) в качестве первого гена в искусственном полицистроне, содержащем дубликацию синтетического цистрона *ifn-α2*. С этой целью *PstI*/*EcoRI*-фрагмент плазмид p381/2IFN и p381/2IFN' был заменен на соответствующий фрагмент, выделенный из ДНК pDS280 [6]. Схемы сконструированных таким способом рекомбинантных плазмид p280/2IFN и p280/2IFN' приведены на рис. 4.

Экспрессия интерферона, направляемая этими плазмидами, происходит, по-видимому, с полицистронных матриц, структурная организация которых показана на рис. 3.

Таким образом, нами получена серия рекомбинантных плазмид, содержащих дубликацию искусственного гена *ifn-α2* (см. рис. 2–4). Транс-

p95/2IFN

SD
—AGGA—11—ATG—i fn—TAAAGGA—8—ATG—i fn—

p381/2IFN

IX—ATGA—VIII—TAAAGGA—8—ATG—i fn—TAAAGGA—8—ATG—i fn—
TSD' TSD'

p381/2IFN'

IX—ATGA—VIII—TAAAGGA—8—ATG—i fn—TAAAGGA—10—ATG—orf13—TAAAGGA—8—ATG—i fn—
TSD' TSD'

p280/2IFN

trpL—TAAAGGA—8—ATG—i fn—TAAAGGA—8—ATG—i fn—
TSD' TSD'

p280/2IFN'

trpL—TAAAGGA—8—ATG—i fn—TAAAGGA—10—ATG—orf13—TAAAGGA—8—ATG—i fn—
TSD' TSD'

Рис. 3. Структурно-функциональная организация сигналов транскрипции дуплицированного гена *ifn-α2* в составе би- и полицистронных оперонов, содержащихся в рекомбинантных плазмидах. Трансляционные терминаторы и участок SD подчеркнуты снизу и сверху соответственно и обозначены TSD и TSD' (см. подпись к рис. 1 и 2). Цифрами указано расстояние в нуклеотидных остатках между соответствующими трансляционными сигналами. *orf* — нуклеотидная последовательность с открытой рамкой считывания при трансляции; IX и VIII — гены IX и VIII бактериофага M13 [6, 9]; L — часть гена лидерного петлегида триптофанового оперона *E. coli* [6, 10]

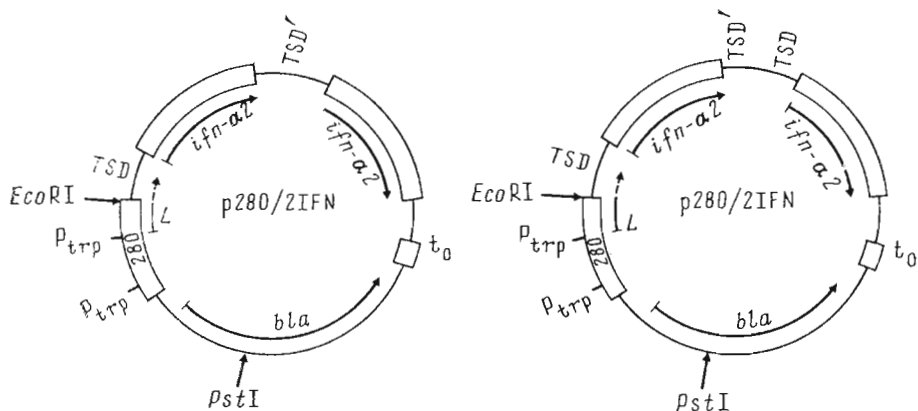


Рис. 4. Схемы плазмид p280/2IFN и p280/2IFN'. P_{trp} и L — промотор и часть гена лидерного пептида триптофанового оперона *E. coli* соответственно [6, 10]. Остальные обозначения см. в подписях к рис. 2

Экспрессия tandemных генов интерферона в этих плазмидах контролируется промоторами P_{lac} (плазмида p95/2IFN), P_{VIII} (плазмиды p381/2IFN и p381/2IFN') и P_{trp} (плазмиды p280/2IFN и p381/2IFN'). На основании наших данных [6] и результатов работы [11] эти промоторы по убывающей силе можно расположить в следующий ряд: P_{trp}, P_{lac} и P_{VIII}. Поэтому можно было ожидать аналогичную картину для уровней синтеза интерферона в соответствующих плазмидосодержащих клетках *E. coli*. Однако, как видно из результатов электрофоретического анализа суммарных белков в лизатах плазмидосодержащих клеток, плазмида p95/2IFN (промотор P_{lac}) практически не обеспечивает синтеза интерферона, по крайней мере его количество значительно меньше, чем в моновариантах гена *ifn-α2* (ср. на рис. 5а дорожки 1–4 и 9, 10). Низкий уровень синтеза интерферона в p95/2IFN-содержащих клетках свидетельствует о том, что сигнал инициации трансляции, расположенный между двумя генами *ifn-α2* (см. рис. 3), функционирует только при условии эффективной трансляции предыдущего цистрона. Аналогичные эффекты наблюдались также в природных полицистрогах, в частности в триптофановом [12] и рибосомальных [13, 14] оперонах.

В противоположность p95/2IFN-содержащим клеткам плазмиды серий 381 и 280 обеспечивают в клетках *E. coli* очень высокий уровень синтеза интерферона (см. рис. 5а и б). Путем денситометрирования соответствующих дорожек гелей было установлено, что уровень синтеза интерферона в клетках *E. coli* с плазмидами p381/2IFN и p381/2IFN' составляет ~30% суммы клеточных белков, а в случае плазмид p280/2IFN и p280/2IFN' этот уровень увеличивается до 70%. Необходимо отметить, что количество интерферона, синтезируемого в клетках *E. coli* с плазмидами p381/2IFN и p381/2IFN', в 3–4 раза выше, чем в клетках, несущих плазмиды p381IFN и pIF6/8 с одной копией синтетического гена *ifn-α2* (см. таблицу, «Экспериментальную часть» и [6]). Плазмиды p280/2IFN и p280/2IFN' (обе содержат бицистрон *ifn-α2*, см. рис. 3, 4) по сравнению с моноцистронным вариантом искусственного гена *ifn-α2* (плазмида p280IFN [6]), который обеспечивает синтез интерферона на уровне ~30% от суммарного клеточного белка [6], также дают более чем двукратное увеличение выхода интерферона (см. таблицу, «Экспериментальную часть» и [6]). Наблюдаемый в клетках *E. coli* уровень экспрессии искусственного гена *ifn-α2*, детерминированный плазмидами p381/2IFN, p381/2IFN', p280/2IFN и p280/2IFN' (см. рис. 5), значительно превышает все известные примеры экспрессии природных и синтетических генов лейкоцитарного [3, 5, 6, 15, 16], фибробластного [17] и иммунного [18] интерферонов человека.

Итак, из совокупности представленных в работе данных следует, что предложенный нами ранее способ экспрессии генов в составе полицистро-

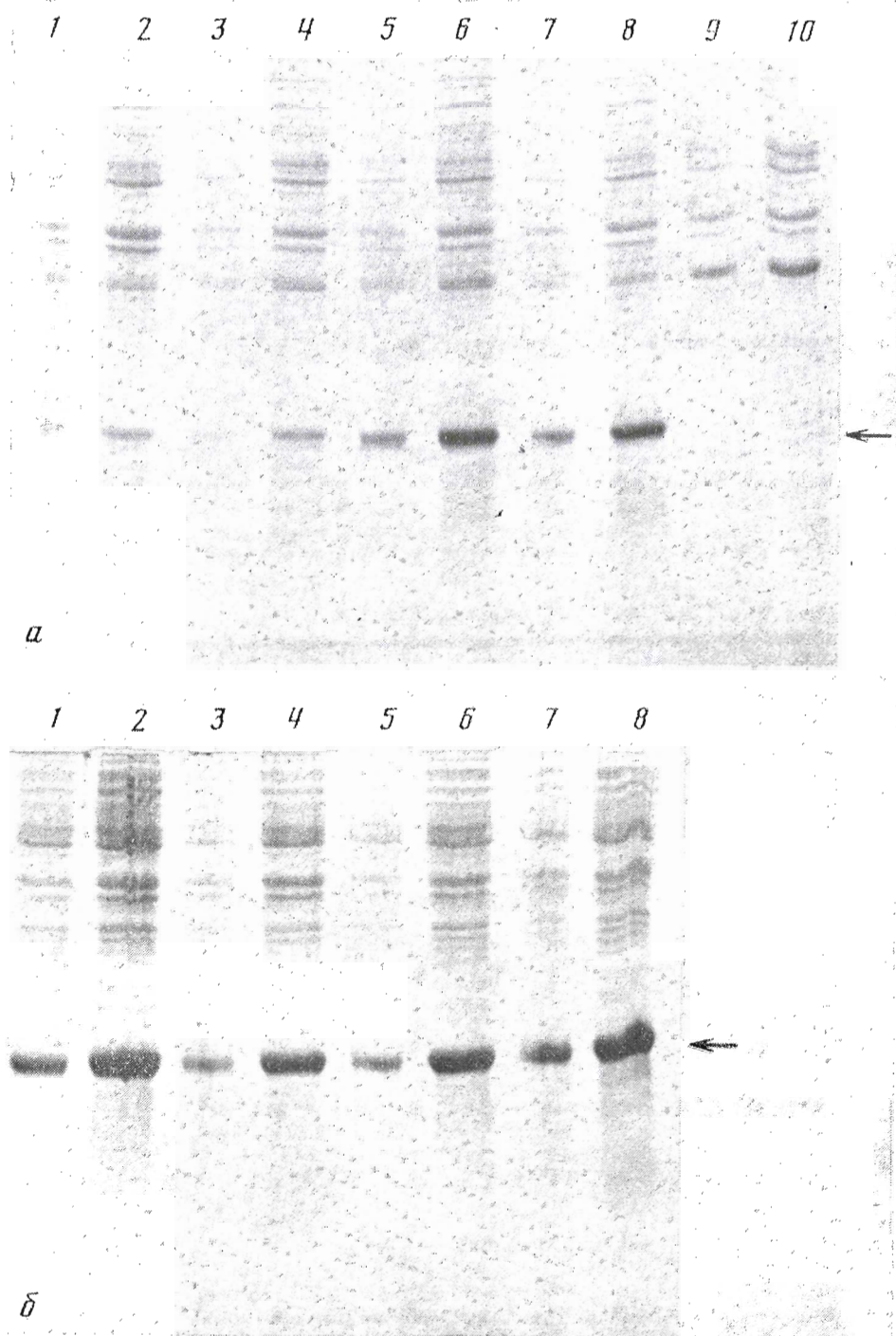


Рис. 5. Результаты электрофоретического разделения плазмидосодержащих клеточных лизатов в 12,5% ПААГ. *а* — лизаты клеток, несущих плазмиды pIF6/8 (1 и 2), p381IFN (3 и 4), p381/2IFN (5 и 6), p381/2IFN' (7 и 8) и p95/2IFN (9 и 10). *б* — лизаты клеток, несущих плазмиды p280/2IFN (1–4) и p280/2IFN' (5–8). Пробы 1, 2, 5 и 6 приготовлены из плазмидосодержащих клеток, выращенных в стандартных условиях, но в присутствии β -индолилукриловой кислоты (20 мкг/мл). Электрофорузу подвергли 2 мкл (нечетные дорожки) и 5 мкл (четные дорожки) клеточных лизатов, приготовленных как указано в «Экспер. части». Положение белковых полос на геле выявляли с помощью красителя кумасси ярко-синего R-250

Относительные уровни синтеза интерферона в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды с одной и двумя копиями гена *ifn-α2*

Плаزمида	Промотор	Количество копий гена <i>ifn-α2</i>	Относительное содержание интерферона *
pIF6/8	P _{VIII}	1	1
p381IFN	P _{VIII}	1	1
p280IFN	(P _{Trp}) ₂	1	3,1
p381/2IFN	P _{VIII}	2	3
p381/2IFN'	P _{VIII}	2	3,2
p280/2IFN	(P _{Trp}) ₂	2	6,8
p280/2IFN'	(P _{Trp}) ₂	2	7,2

* Количество интерферона, синтезируемого в клетках *E. coli* SG20050 с плазмидой pIF6/8 [5,6], принято за единицу.

нов [5, 6] в сочетании с конструированием гомополицистронов, имеющих сопряженную систему трансляции всех генов в таком искусственном опероне, позволяет уже при дупликации клонированного гена более чем в 2 раза увеличить выход его продукта. Следует отметить, что такого эффекта усиления не наблюдается при использовании метода клонирования тандемных дупликаций гена в составе единой гомополицистроной мРНК в отсутствие сопряжения трансляции цистронов [3].

В заключение следует указать на то, что предлагаемый способ экспрессии генов открывает возможности для создания высокоэффективных продуцентов различных генов, организованных в единый полицистрон, имеющий сопряженную систему трансляции между цистронами. В таких генных «фабриках» для гарантированной экспрессии целевых генов можно использовать в качестве первого цистрона, определяющего эффективность трансляции последующих генов, регуляторные сигналы трансляции, входящие в описанные нами ранее векторы pDSpv1 [5], pDS381 и pDS280 [6]. Кроме того, такими векторами могут быть плазмиды pIF6/8 [5], p381IFN и p280IFN [6], клонирование в которых можно производить по сайтам рестрикции, имеющимся в структурной части синтетического гена *ifn-α2* (например, *Pst*I или *Xho*I).

Экспериментальная часть

Экспериментальные подробности, касающиеся использованных в работе штаммов *E. coli*, плазмид, ферментов, антибиотиков и других реактивов, а также условия конструирования рекомбинантных плазмид, выделения плазмидных ДНК, электрофоретического разделения фрагментов ДНК в ПААГ и выделения их из геля, трансформации клеток *E. coli*, выращивания плазмидсодержащих клеток и анализа нуклеотидной последовательности ДНК, изложены в предыдущих сообщениях [6, 19].

Следующие фрагменты и векторные части были использованы при конструировании плазмид: p95IFN – *Pst*I-фрагмент ДНК pLcIF(Plac) [7], содержащий начало гена *bla*, промотор P_{lac} и 5'-концевую часть синтетического гена *ifn-α2*, *Pst*I/*Eco*RI-адаптер (структура адаптера приведена на рис. 1) в виде двух комплементарных олигонуклеотидов длиной 30 и 38 нуклеотидных остатков (далее в тексте используется обозначение адаптер А) и *Pst*I/*Eco*RI-векторная часть плазмиды pDS1₀² [8]. p95/2IFN – фрагмент и адаптер А были те же, что и при получении плазмиды p95IFN, а в качестве вектора использовали большой *Pst*I/*Eco*RI-фрагмент ДНК p95IFN. p381/2IFN – *Pst*I-фрагмент ДНК pIF6/8 [5], содержащий начало гена *bla*, промотор P_{VIII} с укороченной частью гена VIII и 5'-концевую часть гена *ifn-α2* вместе с синтетическим участком TSD, адаптер А и *Pst*I/*Eco*RI-векторную часть ДНК p95IFN. p381/2IFN'-фрагмент и адаптер А были те же, что и при конструировании плазмиды p381/2IFN, а в качестве вектора использовали большой *Pst*I/*Eco*RI-фрагмент ДНК p381IFN [6]. p280/2IFN и p280/2IFN' – *Pst*I/*Eco*RI-фрагмент ДНК pDS280 [6], содержащий начало гена *bla*, тандем промоторов P_{Trp} и часть гена лидерного пептида L триптофанового оперона *E. coli*, встраивали в *Pst*I/*Eco*RI-векторные части ДНК p381/2IFN и p381/2IFN' соответственно.

Для определения уровня синтеза интерферона в плазмидсодержащих клетках *E. coli* отдельные колонии выращивали в среде LB в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) до плотности ~10⁹ клеток на 1 мл клеточной суспензии. Биомассу из 0,5 мл клеточной суспензии собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 4° С, 2 мин), водсушивали и ресуспендировали в 100 мкл буфера для нанесения (5% глицерин, 3% додецилсульфат натрия, 2% 2-меркаптоэтанол, 0,02% бромфеноловый синий). Пробу выдерживали 10 мин при 100° С и по 2 или 5 мкл наносили на 12,5%

ПААГ (отношение метилгембисакриламида к акриlamиду 1:30). Электрофорез и окраску геля проводили как указано в работе [19]. Процентное содержание интерферона в лизатах определяли путем сканирования соответствующих дорожек геля на лазерном денситометре Ultrosan XL (ЛКВ, Швеция). Установлено, что в клетках *E. coli* плазмиды обеспечивали следующие уровни интерферона, %: рIF6/8 — 9,5; р381/1FN — 10,2; р381/21FN — 30,7; р381/21FN' — 32; р280/21FN — 68,8; р280/21FN' — 72.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лобашев М. Е. Генетика. Л.: Изд-во ЛГУ, 1967. С. 168—176.
2. Schoner B. E., Hsiung H. M., Belagaje R. M., Mayne N. G., Schoner R. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 17. P. 5403—5407.
3. Lee N., Cozzitor J., Wainwright N., Testa D. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 17. P. 6797—6812.
4. Schümperli D., McKenney K., Sobieski D. A., Rosenberg M. // Cell. 1982. V. 30. № 3. P. 865—871.
5. Гулева И. П., Мизенко Г. А., Серпинский О. И., Алмосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734—737.
6. Кравченко В. В., Гулева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1176—1185.
7. Колосов М. Н., Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Чувпило С. А., Быстров Н. С., Берлин Ю. А., Каюшин А. Л., Буткус В. В., Полякова И. А., Болдырева Е. Ф., Сандахчиев Л. С., Попов С. Г., Шубина Т. Н., Кравченко В. В., Серпинский О. И., Ямщиков В. С., Беликов С. И., Силыков А. Н., Сиволобова Г. Ф. Способ получения искусственного гена интерферона $\alpha 2$ человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом. А. с. 1092176 СССР // В. И. 1984. № 18.
8. Stueber D., Bujard H. // EMBO J. 1982. V. 1. № 11. P. 1399—1404.
9. Wezenbeck P., Hulsebos T., Schoenmakers J. // Gene. 1980. V. 11. № 1—2. P. 129—148.
10. Yanofsky C., Platt T., Crawford I. P., Nichols B. P., Christie G. E., Horowitz H., Vancleemput M. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 24. P. 6647—6668.
11. De Boer H. A., Comstock L. J., Yansura D. G., Heyneker H. L. // Promoters (structure and function)/Eds Rodrigues R. L., Chamberlin M. J. Praeger, 1983. P. 462—481.
12. Oppenheim D. S., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 4. P. 785—795.
13. Vaughn G., Nomura M. // Cell. 1983. V. 34. № 3. P. 979—988.
14. Спирихин А. С. // Структура рибосом и биосинтез белка. Пушино, 1984. С. 279—307.
15. Valenzuela D., Weber H., Weissmann C. // Nature. 1985. V. 313. № 6004. P. 698—700.
16. Машко С. В., Лалидус А. Л., Лебедева М. И., Подковырова С. М., Плотникова Т. Г., Козлов Ю. И., Ребенгитш Б. А., Костров С. В., Рыжавская А. С., Стронгин А. Я., Свердлов Е. Д., Дебабов В. Г. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 6. С. 1491—1496.
17. Remaut E., Stanssens P., Fiers W. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 14. P. 4677—4688.
18. Simons G., Remaut E., Allet B., Devas R., Fiers W. // Gene. 1984. V. 28. № 1. P. 55—64.
19. Кравченко В. В., Ямщиков В. Ф., Плетнев А. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 523—533.

Поступила в редакцию
31.XII.1986

CONSTRUCTION OF A TANDEM OF ARTIFICIAL GENES ENCODING HUMAN LEUKOCYTE INTERFERON AND ITS EXPRESSION AS A PART OF POLYCYSTRONIC TEMPLATE WITH COUPLED TRANSLATION

KRAVCHENKO V. V., GULEVA I. P., SHAMIN V. V., KULICHKOV V. A., DOBRYNIN V. N., FILIPPOV S. A., CHUVPILLO S. A., KOROBKO V. G.*

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

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

Using a chemically synthesised adapter, the coding part of an artificial gene for human leukocyte $\alpha 2$ interferon (*ifn- $\alpha 2$*) has been duplicated. The adapter contained a termination signal of the first gene (TAA) within the Shine — Dalgarno sequence of the second gene (TAAGGA), distance between the terminating codon and starting codon of the second gene being 11 nucleotides. In another case this distance was 69 nucleotides, with the same SD sequence. The expression of the tandems as a part of polycistrons has been studied under control of promoters P_{lac} , $(P_{trp})_2$ of *E. coli*, and P_{VII} of M13 phage. It was found that tandems of *ifn- $\alpha 2$* genes in polycistronic structures *trp L-ifn-ifn* and IX—VIII-*ifn-ifn* under control of promoters $(P_{trp})_2$ and P_{VII} , respectively, provided high level of the interferon biosynthesis, thus differing from the tandem under P_{lac} promoter control, which had only *ifn-ifn* translation coupling.