



**РАЗНООБРАЗИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ
ПРОДУКТОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Никоноров Ю.М., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, chemeris@anrb.ru

Резюме

Описаны различные методы клонирования продуктов полимеразной цепной реакции, включая довольно экзотические. Проведен обзор большого числа экспериментальных работ методического плана, посвященных клонированию ампликонов в фаговых и плазмидных векторах. Все существующие методы клонирования ампликонов можно подразделить на несколько групп в виде клонирования по тупым и липким (выступающим) концам, А/Т-лигирования, рекомбинации. Причем каждый такой подход реализуется множеством способов, отличающихся использованием или неиспользованием ДНК-лигазы, направленным и ненаправленным расположением вставки, а также другими особенностями. Кратко рассмотрены преимущества и недостатки основных методов.

Ключевые слова: ПЦР, ампликон, ДНК-полимераза, клонирование, вектор, Т-вектор, ДНК-лигаза, топоизомераза, рекомбинация

Оглавление

| | Стр. |
|--|-------------|
| Введение | 168 |
| Ферментативные особенности некоторых ДНК-полимераз | 168 |
| Клонирование ампликонов по тупым концам | 169 |
| Клонирование ампликонов по липким (выступающим) концам | 171 |
| <i>Клонирование ампликонов с помощью рестрикционных эндонуклеаз</i> | 171 |
| <i>Клонирование ампликонов, амплифицированных с использованием практически одинаковых праймеров, но имеющих разную длину</i> | 173 |
| <i>Клонирование ампликонов, амплифицированных с использованием праймеров, несущих различные модификации</i> | 173 |
| <i>UDG-клонирование ампликонов</i> | 174 |
| <i>Клонирование ампликонов, подвергнувшихся после завершения ПЦР действию различных ферментов</i> | 174 |
| <i>Клонирование ампликонов мегапраймированием с использованием рестрикционной эндонуклеазы DpnI</i> | 176 |
| <i>Прочие способы клонирования ампликонов по липким концам</i> | 176 |
| А/Т-клонирование ампликонов | 177 |
| Топоизомеразное клонирование ампликонов | 179 |
| Клонирование ампликонов путем рекомбинации | 180 |
| Заключение | 181 |
| Литература | 181 |

Введение

Если до появления в середине 80-х годов метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Saiki et al., 1985] клонирование каких-либо генов или иных фрагментов ДНК представляло собой довольно продолжительный и весьма трудоемкий процесс в виде создания плазмидных или фаговых клонотек с дальнейшим выявлением в них искомым клонов путем молекулярной гибридизации с радиоактивно-меченным зондом, либо как-то иначе, то уже через несколько часов экспериментатор, благодаря специфичной амплификации фрагментов нуклеиновых кислот с помощью ПЦР после электрофоретического разделения продуктов реакции, мог воочию видеть именно тот фрагмент ДНК, который ему необходимо клонировать в подходящем векторе. Причем, представленный чуть ли не триллионом одинаковых молекул. Однако клонировать хотя бы единичную молекулу из этого триллиона оказалось не так просто как поначалу казалось. Причина этого стала ясна чуть позже, когда было обнаружено, что ставшая широко использоваться в ПЦР к тому времени [Saiki et al., 1988] термостабильная Taq полимераза обладает нематричной активностью и на 3'-концы достраиваемых цепей добавляет по дополнительному нуклеотиду [Clark, 1988; Mole et al., 1989]. Учитывая данное обстоятельство, для клонирования образующихся ампликонов было предложено большое количество методов, среди которых есть как весьма популярные, так и практически неиспользуемые. Данный обзор посвящен рассмотрению только одного из этапов молекулярного клонирования, а именно процесса помещения в подходящую векторную молекулу амплифицированного участка ДНК, называемого здесь «клонированием», практически не касаясь особенностей предварительного проведения самой ПЦР и последующего поиска рекомбинантных конструкций среди образующихся клонов, включая описание различных специальных векторов, нацеленных на позитивную селекцию рекомбинантов после этапа трансформации компетентных клеток *E.coli*, поскольку эти вопросы заслуживают отдельного внимания. Методические приемы по клонированию множественных вставок при конструировании синтетических генов также затронуты очень кратко.

Все существующие методы клонирования ампликонов можно подразделить на безлигазные и с использованием ДНК-лигазы, которые, в свою очередь, делятся на несколько групп в виде клонирования как по тупым, так и по липким концам, рекомбинацией. Причем для каждого такого подхода предложено немало разнообразных

вариантов, отличающихся направленным и ненаправленным расположением вставки, бесшовным клонированием и пр. В литературе встречается ряд аббревиатур, обозначающих различные варианты клонирования ампликонов – А/Т¹-клонирование, UDG²-клонирование, LIC³-клонирование, ТОРО⁴-клонирование и др., каждый из которых может быть реализован отличающимися способами.

Не желая вдаваться в различные технические детали процесса клонирования типа фенол-хлороформных депротенинизаций или им подобных процедур, все же напомним, что для образования фосфодиэфирных связей необходимо наличие на концах объединяемых фрагментов ДНК гидроксильной и фосфатной групп. При этом в ходе изложения данного материала для каждого конкретного случая упоминать об этом считаем излишним. Когда же наличие/создание данных функциональных групп определяют ход молекулярного клонирования, о них будет говориться особо. При этом фосфорилирование 5'-концов продуктов ПЦР может быть осуществлено разными способами в виде обработки полинуклеотидкиназой фага Т4 в присутствии АТФ или самих ампликонов или праймеров для их амплификации, которые могут быть также фосфорилированы во время химического синтеза. При написании данной статьи было проанализировано большое число экспериментальных и обзорных работ, однако при цитировании отдавалось предпочтение оригинальным пионерным материалам.

Ферментативные особенности некоторых ДНК-полимераз

При проведении ПЦР с целью последующего клонирования ампликонов важным моментом является тип используемой термостабильной ДНК-полимеразы. Как известно, большинство ДНК-полимераз являются матрице-зависимыми ферментами, то есть синтезирующими вторую комплементарную цепь ДНК по уже существующей, используя затравочную молекулу. При этом ДНК-полимеразы фактически являются ферментами двойного действия, поскольку наряду с полимеризующей активностью, выражающейся в последовательном присоединении нуклеотидов к растущей цепи ДНК в направлении 5'→3', они катализируют еще реакции деполимеризации. К

¹ А/Т – Adenine/Thymine

² UDG - Uracil DNA Glycosylase

³ LIC - Ligase Independent Cloning

⁴ ТОРО - Topoisomerase

такovým следует отнести пирофосфоролиз, а также проявление экзонуклеазной активности. 3'→5'-экзонуклеазная активность выражается в удалении присоединенных нуклеотидов и выполняет редактирующие функции. Некоторые ДНК-полимеразы обладают 5'→3'-экзонуклеазной активностью, призванной осуществлять в клетке репарирующие функции уже существующей цепи ДНК. Довольно многие ДНК-полимеразы имеют активность, смещающую одну цепь ДНК, заключающуюся в том, что, строя новую цепь ДНК и встретив на своем пути двухцепочечный участок, такие ферменты, продолжая строить начатую цепь по прежней матричной цепи, вытесняют комплементарную ей на дальнейшем протяжении в направлении 5'→3'. ДНК-полимеразы в структурном отношении в целом состоят из трех доменов, два из которых ответственны за экзонуклеазные активности, тогда как третий домен выполняет полимеразные функции, хотя эволюция распорядилась так, что у некоторых ферментов отсутствуют или тот или другой либо даже оба экзонуклеазных домена.

Примером матрице-независимой ДНК-полимеразы может служить терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (ТдТ), осуществляющая синтез одноцепочечной ДНК произвольной длины со случайной последовательностью путем последовательного присоединения нуклеотидов к тупому или выступающему 3'-концу. Однако подобная ограниченная нематричная активность показана и для ряда других ДНК-полимераз, присоединяющих по лишнему нуклеотиду к 3'-концу, причем из смеси всех четырех дНТФ в качестве нематричного нуклеотида такие ДНК-полимеразы оказывают значительное «предпочтение» дАТФ, благодаря большому родству к нему [Clark et al., 1987; Clark, 1988]. Оставив без внимания прочие ДНК-полимеразы, исследованные в цитированных работах, остановимся подробнее только на ферментах (Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E.coli*, Taq полимеразы), используемых, как в раннем варианте ПЦР [Saiki et al., 1985], так и в последовавших и в нынешних подходах к проведению ПЦР соответственно [Saiki et al., 1988]. Ранее у ДНК-полимеразы I *E.coil* с помощью частичного протеолиза субтилизином была убрана 5'→3'-экзонуклеазная активность [Klenow et al., 1971] и ее большой фрагмент, названный Кленовским потерял репарирующие функции, сохранив редактирующие. И хотя этот фермент часто используют для достройки 3'-утопленных концов до тупых, тем не менее ему все же присуща небольшая нематричная активность, которая усиливается для мутантной формы Кленовского

фрагмента ДНК-полимеразы I экзо⁻, лишенной и 5'→3'-экзонуклеазной активности [Clark et al., 1987]. У термостабильной Taq полимеразы изначально отсутствует 3'→5'-экзонуклеазный домен, вследствие чего данный фермент также характеризуется значительной нематричной активностью [Clark, 1988].

Фактически за общее правило можно принять то, что различные термостабильные ДНК-полимеразы, не обладающие редактирующей активностью, в ходе ПЦР будут приводить к наработке продуктов с наличием нематричного нуклеотида (преимущественно аденина) на 3'-концах, которые можно условно обозначить как А-ампликоны. Если быть точнее, то после завершения ПЦР в реакционной смеси может присутствовать смесь фрагментов ДНК, состоящая из ампликонов с обоими тупыми концами, с обоими концами с «навешенными» различными нематричными нуклеотидами, так и с промежуточным состоянием таких концов, когда на одном будет присутствовать нематричный нуклеотид, а на другом - нет. С учетом обеих комплементарных цепей ДНК таких вариантов ампликонов может быть 25. При этом, как показано в ряде работ [Hu, 1993; Smith et al., 1995; Brownstein et al., 1996; Magnuson et al., 1996], данный процесс носит неслучайный характер, поскольку прилегающие к 3'-концу несколько нуклеотидов оказывают заметное влияние на тип нематричного нуклеотида. Что касается некоторых других термостабильных ДНК-полимераз, используемых в ПЦР, то при наличии у них редактирующей экзонуклеазной активности (например, Pfu полимеразы, Pwo полимеразы и др.) образующиеся с помощью таких ферментов ампликоны тупоконечны, поскольку не имеют выступающих на 3'-концах нематричных нуклеотидов.

Таким образом, исходя из типа используемой в ПЦР термостабильной ДНК-полимеразы (или определенной смеси ферментов с разными свойствами), необходимо выбирать ту или иную стратегию клонирования ПЦР-продуктов. Другим важным моментом при выборе стратегии клонирования ампликонов являются задачи, стоящие перед исследователями в виде дальнейшего обращения с клонированными фрагментами ДНК, поскольку, например, может потребоваться направленная ориентация вставки в векторе, причем такие задачи часто предопределяют и тип используемых ДНК-полимераз.

Клонирование ампликонов по тупым концам

Одним из довольно простых способов клонирования ампликонов в выбранном векторе

является объединение вставки и вектора по тупым концам. При этом векторные молекулы предварительно расщепляются подходящими рестрикционными эндонуклеазами, чьи сайты узнавания расположены в так называемом полилинкере или участке множественного клонирования. Чаще всего таким ферментом служит *EcoRV* ($GAT^{\nabla}ATC$)⁵ или его изошизомер *Eco32I* [Koester, von Knebel Doeberitz, 2002]. Однако эффективность лигирования по тупым концам довольно низка и при этом существует преимущественная вероятность закольцовывания вектора без вставки. Увеличить выход лигированных продуктов можно за счет повышения концентрации ДНК-лигазы и продолжительности процесса лигирования, а также путем искусственного повышения концентрации реагирующих молекул, достигаемого добавлением в реакционную смесь 10% полиэтиленгликоля 6000. Чтобы снизить вероятность самолигирования рекомендуется дефосфорилировать 5'-концы линеаризованного вектора или в процессе лигирования добавлять рестрикционную эндонуклеазу, по сайту которой происходит встраивание ампликона для исключения образования целостного вектора [Liu, Schwartz, 1992; Bolchi et al., 2005]. Чтобы при этом свести к минимуму вероятность расщепления самой вставки в полилинкер вектора M13mtvh на основе фага M13 был добавлен сайт октануклеотидной рестрикционной эндонуклеазы *SrfI* ($GCCC^{\nabla}GGGC$) по которому предлагалось вести клонирование [Schlötterer, Wolff, 1996]. Вместо дефосфорилирования линеаризованного вектора щелочной фосфатазой предлагается нарабатывать вектор целиком с помощью ПЦР с нефосфорилированными праймерами [Lan et al., 2011]. Другой способ исключить самолигирование векторной молекулы заключается в удалении ОН-групп на 3'-концах, достигаемого замещением обычных дНМФ их дидезокси аналогами с помощью ДНК-полимеразы фага T4 [Ukai et al., 2002]. В одной из работ повысить выход рекомбинантных молекул из вектора с тупоконечными ампликонами предлагается за счет использования летального *ccdB* гена путем размещения в нем множественных сайтов клонирования, в которые если произойдет вставка, то токсичный для ДНК-гиразы белковый продукт нарабатываться не будет [Hu et al., 2010].

Разработанный тайваньскими авторами

способ клонирования ампликонов по тупым концам наоборот рассчитан на самолигирование, но уже вектора вместе со вставкой в виде единой линейной молекулы [Su, Hsu, 2004]. Его суть заключается в амплификации целевого продукта с помощью Pfu полимеразы и пары праймеров, один из которых несет участок, комплементарный вектору для клонирования, а добавление векторной молекулы во втором раунде ПЦР приводит к наработке единого ампликона, состоящего из вектора и вставки, самолигирование которого ведет к формированию рекомбинантных клонов.

Для образования тупых концов у ампликонов они должны или сразу амплифицироваться с использованием ДНК-полимераз с редактирующей активностью [Lohff, Cease, 1992] или готовиться различными способами уже после завершения ПЦР. Несмотря на то, что Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I обладает некоторой нематричной активностью, его все же используют для удаления нематричных нуклеотидов и затупления или «полирования» концов ампликонов [Hemsley et al., 1989; Lorens, 1991]. Другими используемыми для этой цели ферментами служат T4 ДНК-полимераза [Skryabin, Vassilacopoulou, 1993; Wang, 1997] или Pfu полимеразы [Costa et al., 1994; Costa, Weiner, 1994]. При этом в литературе имеются наблюдения, что если в ПЦР с Taq полимеразой не использовать заключительный этап длительной элонгации, используемый для максимальной достройки ампликонов, то тогда становится возможно непосредственно лигировать продукты ПЦР с вектором по тупым концам [Naqqi, 1992]. Несколько повысить эффективность клонирования ампликонов по тупым концам взялись канадские авторы [Parent et al., 1994]. Ими было предложено после этапа лигирования вектора со вставкой проводить второй раунд ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих вставку, с таким расчетом, чтобы увеличить количество пролигированных целевых ампликонов. Сообщается о пользе киназной обработки продуктов ПЦР, причем фосфорилирование рекомендуется проводить до этапа полировки концов [Kanungo, Pandey, 1993]. Еще одним недостатком тупоконечного лигирования ампликонов является для подавляющего большинства случаев невозможность вырезания клонированного ПЦР-фрагмента той же рестрикционной эндонуклеазой и применение соседних ферментов из полилинкера, добавляя тем самым к ампликону лишние нуклеотиды, что для ряда задач неприемлемо.

Хотя во многих обзорных статьях подчеркивается, что лигирование ампликонов по

⁵ Символ ∇ в сайтах узнавания рестрикционных эндонуклеаз здесь и далее означает место расщепления.

тупым концам исключает возможность направленного клонирования, на самом деле такое все же возможно. Так, предложен способ направленного клонирования при лигировании ампликона с вектором по тупым концам, заключающийся в использовании дефосфорилированного по одному из концов в результате двойного расщепления соответствующими рестрикционными эндонуклеазами линейизованного вектора и обычного олигонуклеотидного праймера, не несущего на 5'-конце фосфатной группы, тогда как другой праймер напротив фосфорилирован, что позволяет происходить только единственному варианту лигирования, приводящему к формированию двух ников на противоположных цепях ДНК, репарация которых происходит после трансформации уже в бактерии [Weiner, 1993]. Другой способ направленного лигирования ампликона с вектором по тупым концам рассчитан на наличие в 5'-области прямого и обратного праймеров сайтов узнавания рестрикционной эндонуклеазы *EcoRV*, расщепление ампликонов которой приводит к формированию тупых концов. Оригинальность данного подхода заключается еще и в том, что обычно в праймерах размещают сайты узнавания ферментов, генерирующих липкие концы, которые к тому же могут быть различны и позволяют вести направленное клонирование. В данном случае при наличии в одном из праймеров еще и сайта узнавания фермента *SmaI* (CCC[▼]GGG) в результате расщепления вектора обоими этими ферментами появляется возможность направленного клонирования, достигаемого путем расщепления лигазной смеси этими рестрикционными эндонуклеазами перед трансформацией, так как в одном из вариантов сайты восстановятся [Liu et al., 2000]. В другой работе наличие в одном из праймеров на 5'-конце только части (CGGG) сайта узнавания рестрикционной эндонуклеазы *SmaI* позволило авторам при лигировании ампликона специально восстановить только один из сайтов данного фермента, что дает возможность дальнейшего клонирования в это место новых фрагментов ДНК [Tachibana et al., 2007].

Целую линейку векторов для тупоконечного лигирования продуктов ПЦР предложили китайские авторы [Wu et al., 2010]. Особенностью этих векторных молекул служит то, что, помимо маркерных генов и некоторых других особенностей, для формирования тупых концов используется рестрикционная эндонуклеаза IIS-типа *SchI* (GAGTCNNNN[▼]), расщепляющая обе цепи ДНК в стороне от значащих нуклеотидов, что позволяет вести так называемое бесшовное

лигирование.

Клонирование ампликонов по липким (выступающим) концам

Эффективность лигирования липких концов ДНК с подходящей друг к другу комбинацией нуклеотидов значительно эффективнее объединения фрагментов ДНК с тупыми концами, что определяется формированием водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями, удерживающими концы молекул, еще до самого лигирования (образования фосфодиэфирных связей). Создание у вектора и ампликона более протяженных подходящих друг другу выступающих концов позволяет при клонировании обходиться без этапа лигирования, но в этих случаях часто требуется создание специализированных векторов, а также включение дополнительных последовательностей нуклеотидов на 5'-концы праймеров. Образование у ампликонов липких (выступающих) концов возможно не только за счет действия рестрикционных эндонуклеаз, но и иными способами. Так, разработана масса разнообразных вариантов генерирования пригодных для клонирования концов с выступающими комплементарными нуклеотидами, которые можно подразделить на несколько групп, в том числе по типу используемых ферментов.

Клонирование ампликонов с помощью рестрикционных эндонуклеаз

Одним из самых простых решений для клонирования ампликонов по липким концам является включение в 5'-область праймера сайта узнавания подходящей гексануклеотидной рестрикционной эндонуклеазы, генерирующей выступающие концы [Mullis et al., 1986; Scharf et al., 1986; Welsh et al., 1990]. Причем было показано, что обработка реакционной смеси протеиназой К перед рестриктазным расщеплением заметно повышает выход рекомбинантных клонов [Crowe et al., 1991]. Пролонгированное время расщепления и увеличенное количество фермента(ов) способствует эффективности расщепления ампликонов. Протокол клонирования ампликонов с помощью рестрикционных эндонуклеаз, содержится в статье, посвященной детальному описанию всего процесса [Delidow, 1997]. Расщепление сорбированного через стрептавидин/биотиновую систему на твердой фазе ампликона поочередно разными рестрикционными эндонуклеазами для формирования липких концов, сайты узнавания которых содержались в прямом и обратном праймерах, облегчило подготовку препарата к рестрикции и повысило эффективность данного процесса [Roeder, 2000]. Клонирование

ампликона по липким концам полилинкерных рестрикционных эндонуклеаз позволило резко повысить выход рекомбинантов, поскольку между сайтами клонирования в вектора находились еще как минимум два сайта узнавания других ферментов, примененных после стадии лигирования, практически полностью расщепивших холостой вектор [Zeng et al., 1997].

В ранних работах, когда синтез олигонуклеотидов был недешев, подчеркивалась несколько большая стоимость праймеров с сайтами рестрикционных эндонуклеаз из-за их увеличенной длины. В настоящее время это не столь неактуально. Однако наличие палиндромных последовательностей, принадлежащих сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз, в таких праймерах способствует возникновению нежелательных праймерных димеров, в определенной степени исключая их участие в виде затравочных молекул. Наконец, весьма существенным недостатком размещения сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз на краю праймеров является плохая эффективность расщепления цепей ДНК этими ферментами. Некоторым решением данной проблемы служит добавление большего числа нуклеотидов на 5'-конец праймера за сайтом рестрикционной эндонуклеазы, причем разные ферменты требуют разного количества таких «экстра»-нуклеотидов [Kaufman, Evans, 1990; Zimmermann et al., 1998]. Минимальное увеличение длины подобных праймеров достигается выявлением так называемых криптоических сайтов узнавания подходящих рестрикционных эндонуклеаз в амплифицируемых участках. Например, если в среднем сайт гексануклеотидной рестрикционной эндонуклеазы встречается через каждые 4096 пар нуклеотидов, то вероятность нахождения даже пяти конкретных нуклеотидов на любых местах такой шестерки азотистых оснований можно ожидать всего через 170 нуклеотидов. Таким образом, использование криптоических сайтов за счет образования на первой стадии отжига в праймере 1-2 неспаривающихся с исходной матрицей нуклеотидов позволяет без удлинения праймера получать возможность расщеплять итоговый ампликон такой рестриктазой. Однако эффективность отжига на первых этапах амплификации может быть несколько хуже и требовать снижения температуры. При этом у экспериментатора появляются те же проблемы в виде возможного образования праймерных димеров. Недостатком такого способа служит также и то, что сайт(ы) используемых ферментов, локализованные в праймерных последовательностях, должны отсутствовать в самом ампликоне, что бывает

известно экспериментатору не всегда. Облегчить задачи по дизайну сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз в праймерных последовательностях была призвана специальная компьютерная программа [Hou, 2002].

Другое решение повышения эффективности расщепления в праймерных последовательностях сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз заключается в превращении последних из концевых во внутренние за счет конкатемеризации по тупым концам (подготовленным одним из выше описанных способов) ампликонов [Jung et al., 1990; 1993]. Причем, возможно даже размещение на концах праймеров полусайтов узнавания подходящих рестрикционных эндонуклеаз с таким расчетом, что в процессе образования конкатемеров будут (могут) возникать полноценные сайты расщепления этих ферментов. Одновременно проводимые полировка концов, их фосфорилирование и лигирование с помощью Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы, полинуклеотидкиназы фага T4 и ДНК-лигазы фага T4 позволило сэкономить время на клонирование ампликонов [Lorens, 1991]. Использование рестрикционной эндонуклеазы *Eam1104I* с непалиндромным сайтом узнавания и расщепляющим цепи ДНК вне значимых последовательностей $CTCTC(N^{\nabla}/N^{\nabla}NNN^{\nabla})$ позволяет при клонировании ампликонов по липким концам вести бесшовное лигирование, что бывает важно при конструировании экспрессируемых клонов [Padgett, Sorge, 1996]. Для этого сайты узнавания данного фермента были помещены в праймеры для амплификации как целевого продукта, так и векторной последовательности. После завершения ПЦР пригодные для лигирования концы генерировались с помощью рестрикционной эндонуклеазы *Eam1104I*. Авторы отмечают, что во избежание непредсказуемого расщепления ампликона его наработка может вестись в присутствии метилированного дЦТФ вместо обычного дЦТФ. Некоторое время литовская фирма Fermentas (ныне входящая в состав международного концерна Thermo Scientific) выпускала набор для клонирования ПЦР-продуктов Dovetail PCR Product Cloning Kit, в котором липкие концы у ампликонов, пригодные для клонирования в стандартные полилинкерные сайты векторов, генерировались с помощью аналогичной рестрикционной эндонуклеазы IIS типа *Eco31I*, расщепляющей цепи ДНК вне значимых последовательностей $GGTCTC(N^{\nabla}/N^{\nabla}NNN^{\nabla})$, что позволяло при помещении в праймеры дистально по отношению к 5'-концу части сайтов гексануклеотидных рестрикционных эндонуклеаз (например *HindIII* и *BamHI*) и проксимально сайт *Eco31I* получать по

четверке выступающих нуклеотидов, комплементарных этим полилинкерным ферментам.

При клонировании продуктов ПЦР описано сочетание первичного тупоконечного лигирования, когда к ампликонам с затупленными концами присоединяли линкер, содержащий сайт узнавания рестрикционной эндонуклеазы *Bam*HI, и вторичного лигирования по липким концам с векторами, расщепленными этим же ферментом [Bhat et al., 1991; Kanungo, Pandey, 1993]. Использование адапторов позволяет вести направленное клонирование без расщепления ампликона рестрикционными эндонуклеазами [Lorens, 1991].

Клонирование ампликонов, амплифицированных с использованием практически одинаковых праймеров, но имеющих разную длину

Один из простых способов генерации выступающих концов при ПЦР заключается в параллельном проведении двух таких реакций с разными парами праймеров, отличающихся наличием на 5'-концах у прямого и у обратного праймеров дополнительных нуклеотидов. Т.е. в первой реакции удлиненным является прямой праймер, а во второй реакции удлинен уже обратный. Этот принцип эксплуатируется во множестве методических работ, отличающихся некоторыми деталями [Liu, 1996; Ailenberg, Silverman, 1996; Zeng, 1998; Tillett, Neilan, 1999; Walker et al., 2008; Tachibana et al., 2009; Yamabhai, 2009; Pan et al., 2010; Algire, 2013]. По завершению ПЦР продукты двух реакций смешиваются, денатурируются и между образовавшимися цепями проводится молекулярная гибридизация, приводящая к тому, что в смеси в приблизительно равной пропорции будут присутствовать 4 типа молекул в виде: полностью лишенных дополнительных нуклеотидов; несущих на обеих цепях дополнительные нуклеотиды; представляющих собой промежуточные варианты, когда ампликоны несут дополнительные нуклеотиды на той или иной цепи. Последние два типа как раз представляют собой продукты ПЦР с выступающими концами, которые могут быть как одинаковыми, так и разными, что предполагает возможность их направленного клонирования. Некоторое обогащение нужными цепями, несущими липкие концы для лигирования, было осуществлено путем параллельного проведения ассиметричной ПЦР, накапливающей преимущественно по одной цепи в каждой из реакций [Wang et al., 2009].

Что касается векторных молекул, используемых в таком варианте клонирования ампликонов, то они могут нести комплементарные участки или за счет лигированных адапторов [Liu,

1996] или быть расщеплены подходящей(ими) рестрикционной(ыми) эндонуклеазой(ами) [Ailenberg, Silverman, 1996; Zeng, 1998; Walker et al., 2008; Pan et al., 2010]. Другим способом подготовки вектора для лигирования с ним ампликона является аналогичная амплификация плазмидной последовательности, позволяющая исключить зависимость от сайтов рестрикции в полилинкере вектора [Tillett, Neilan, 1999].

Клонирование ампликонов, амплифицированных с использованием праймеров, несущих различные модификации

Получение ПЦР-продуктов с одноцепочечным участком на 5'-конце, пригодным для лигирования, возможно также благодаря использованию праймеров, содержащих «непроходимые» для ДНК-полимеразы участки. Так, в одной из работ в праймер был помещен названный авторами 2-дезоксинафтозином модифицированный нуклеотид, препятствующий дестраиванию цепи ДНК [Newton et al., 1993]. Другими авторами вместо азотистого основания в праймер включался 1,3-пропандиол, также оставляющий одноцепочечный участок в амплифицируемой ДНК [Gade et al., 2003], пригодный для безлигазного клонирования ампликонов [Kaluz, Flint, 1994]. Венгерскими авторами было предложено размещать в праймерах тетрагидрофуран, предотвращающий продвижение ДНК-полимеразы и тем самым генерирующий липкие концы, пригодные для клонирования по сайтам соответствующих рестрикционных эндонуклеаз [Gal et al., 1999; 2000]. Целый цикл работ японских авторов посвящен клонированию ампликонов путем формирования выступающих одноцепочечных участков в ПЦР с праймерами, несущими вблизи их 5'-конца светочувствительное производное тимина, останавливающего рост комплементарной цепи [Tanaka et al., 2008; 2008a; Kuzuza et al., 2009; 2009a; 2012]. После кратковременной обработки УФ-светом блокирующая группа удалялась и образовывался полноценный (для лигирования) 3'-конец с гидроксильной группой. Описан способ лигазо-независимого клонирования ампликонов путем образования одноцепочечных участков в векторе и вставке за счет использования праймеров, несущих на 5'-концах множественные фосфоротиоатные связи, которые после завершения ПЦР удаляются спиртовым раствором йода [Vlanusa et al., 2010].

Аналогом таких подходов стало проведение ПЦР с химерными праймерами, включающими по одному или по несколько рибонуклеотидных остатков. В случае использования ДНК-полимеразы,

не преодолевающей данный барьер, сразу в ходе ПЦР образуются ампликоны с выступающими 5'-концами [Coljee et al., 2000; Donahue et al., 2002]. Описан вариант образования выступающих концов, когда уже по завершению амплификации с ДНК-полимеразой, способной строить цепь ДНК по матрице РНК, проводится обработка ампликонов щелочью для удаления рибонуклеотидов [Coljee et al., 2000]. Для улучшения этого процесса при клонировании ПЦР-продуктов другие авторы предложили использовать РНКазу H, разрушающую цепь РНК в ДНК/РНК-гетеродуплексах [Li, Gao, 2007]. Для генерации выступающих концов, пригодных для лигирования предложено удаление единичных рибонуклеотидных остатков в ампликонах (в праймерных участках) с помощью обработки солями редкоземельных металлов лантана La^{3+} или лютеция Lu^{3+} [Chen et al., 2002]. Включение в праймерные последовательности остатков инозина, например, в третье положение с 5'-конца обеспечивает достройку растущих цепей ДНК, но по завершению амплификации с помощью фермента эндонуклеазы V возможно выщепление таких неприродных азотистых оснований и образование выступающих концов, пригодных для лигирования в расщепленном соответствующими рестрикционными эндонуклеазами векторе [Baumann et al., 2013].

UDG-клонирование ампликонов

Довольно значительное число работ посвящено разработке разнообразных вариантов клонирования ампликонов с использованием праймеров, содержащих остатки уридина, выщепляемых затем урацил ДНК-гликозилазой. Так, при использовании праймеров, несущих остатки дУМФ, удаляемых после амплификации с помощью урацил ДНК-гликозилазы, последующий разрыв цепи ДНК происходил под действием эндонуклеазы V [Watson, Bennett, 1997]. В литературе описан и более простой способ разрыва фосфодиэфирных связей после выщепления дУМФ из праймерной последовательности обработкой слабой щелочью [Smith et al., 1993]. Принцип формирования выступающих концов, благодаря присутствию в праймерах остатков дУМФ, разработанный в начале 90-х гг., лег в основу коммерческого набора USER (Uracil-Specific Excision Reagent) фирмы New England Biolabs, производимого с 2003 г. Он представляет собой комплекс ферментов из урацил ДНК-гликозилазы и гликозилазы-лиазы Endo VIII. Предложено немало усовершенствований данной технологии безлигазного клонирования ампликонов за счет генерации протяженных одноцепочечных участков

ДНК [Nour-Eldin et al., 2006; Bitinaite et al., 2007; Geu-Flores et al., 2007]. Вместо гликозилазы-лиазы Endo VIII в дополнении к урацил ДНК-гликозилазе при клонировании продуктов ПЦР предлагается также использовать фермент эндонуклеазу IV [Hou et al., 2008]. Учитывая популярность подхода и необходимость выбора в состав праймеров нуклеотидных последовательностей для лигирования, разработаны компьютерные программы по дизайну таких олигонуклеотидов [Olsen et al., 2011; Salomonsen et al., 2014].

Если в цитированных выше статьях в праймерные последовательности для клонирования ампликонов вводили по одному остатку дУМФ, то в целой серии работ другой группы авторов, разработавших и усовершенствовавших метод UDG-клонирования, таких остатков уридина было несколько [Nisson et al., 1991; Rashtchian et al., 1992; Booth et al., 1994; Rashtchian, 1995]. За счет этого после обработки ампликонов урацил ДНК-гликозилазой среди 10-11 концевых нуклеотидов возникло 3-4 безнуклеотидных места, что заметно ослабляло в этом участке двойную спираль. Подготовленный аналогичным образом с помощью амплификации вектор без участия ДНК-лигазы объединялся со вставкой и осуществлялась трансформация компетентных клеток. Такой подход позволил за счет разных последовательностей нуклеотидов на 5'-концах праймеров сразу осуществлять множественное сращивание ампликонов [Booth et al., 1994]. Желая несколько упростить процедуру UDG-клонирования ампликонов, было предложено не амплифицировать векторную молекулу целиком, а пришивать к ней готовые адапторы с пригодными для отжига на них праймерных участков ампликонов с ослабленной за счет безнуклеотидных мест двойной спиралью [Andersson et al., 1994].

Завершая рассмотрение способов клонирования ампликонов с использованием праймеров с дУМФ, необходимо заметить, что ДНК-полимеразы с редактирующими активностями не способны вести амплификацию таких матриц [Sakaguchi et al., 1996]. Однако не так давно сообщено о мутантной форме Pfu полимеразы, пригодной для проведения ПЦР с уридин-содержащими праймерами [Norholm, 2010].

Клонирование ампликонов, подвергнувшихся после завершения ПЦР действию различных ферментов

Формирование липких концов у ампликонов, пригодных для их лигирования с расщепленными подходящими рестрикционными эндонуклеазами векторами, может быть достигнуто за счет экзонуклеазной активности ДНК-

полимеразы фага T4 [Stoker, 1990; Yang et al., 1993], в присутствии определенных дНТФ удаляющей с 3'-конца прочие нуклеотиды и «останавливающейся» на имеющемся в смеси, поскольку полимеразная активность данного фермента многократно превышает редактирующую. Экзонуклеазное удаление нескольких нуклеотидов под действием T4 ДНК-полимеразы в присутствии одного дНТФ у ампликона и частичное заполнение 3'-утолщенных концов с помощью Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I в присутствии также одного (другого) дНТФ в расщепленном векторе позволило вести клонирование продуктов ПЦР по липким концам, исключая самолигирование вектора [Dietmaier et al., 1993].

Варианты безлигазного клонирования ампликонов требуют более протяженных выступающих комплементарных концов вектора и вставки, чем это может обеспечить рестриктазное расщепление. Проведенное специальное исследование, посвященное определению минимального количества спаривающихся нуклеотидов для трансформации такой конструкцией компетентных клеток *E.coli*, показало, что 8 нуклеотидов недостаточно, 10 нуклеотидов уже хватает, но при этом 12 отжигающихся друг на друге нуклеотидов обеспечивают четырехкратное увеличение выхода рекомбинантных клонов [Aslandis et al., 1994]. Еще целый ряд работ методического плана посвящены способам безлигазного клонирования ампликонов за счет использования экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы фага T4, причем длины генерируемых одноцепочечных участков для отжига варьировали от 10-12 до 20 и даже до 40 нуклеотидов [Aslanidis, de Jong, 1990; Haun et al., 1992; Kuijper et al., 1992; Li, Elledge, 2007; Thieme et al., 2011; Hill, Eaton-Rye, 2014; Schmid-Burgk et al., 2014; Thieme, Marillonnet, 2014]. При этом имеются указания, что добавление RecA-белка способствует улучшенному клонированию ампликонов, подвергнутых обработке T4 ДНК-полимеразой [Li, Elledge, 2007; Hill, Eaton-Rye, 2014].

Предложен интересный вариант двуступенчатого удлинения одноцепочечных участков у вектора и ампликона, достигаемого за счет смены присутствующих дНТФ в реакционной смеси [Tachibana et al., 2009]. Так, на первом этапе T4 ДНК-полимераза за счет своей экзонуклеазной активности удаляла несколько азотистых оснований до места, где появлялась возможность включения присутствующего в растворе дНТФ. Затем реакция останавливалась и находящийся в растворе дНТФ разрушался под действием термолabileй щелочной фосфатазы, после чего этот фермент

инактивировался высокотемпературной обработкой и добавлялась новая порция T4 ДНК-полимеразы вместе с другим дНТФ, расположенным дальше «вглубь» цепи ДНК. Результатом такого двухэтапного процесса становилось образование более протяженных комплементарных одноцепочечных участков, отжиг которых приводил к образованию устойчивой конструкции, без этапа лигирования пригодной для трансформации компетентных клеток.

Если экзонуклеазной активностью T4 ДНК-полимеразы можно управлять главным образом добавлением в реакционную смесь определенных дНТФ, то ферментативную активность экзонуклеазы III, деградирующей цепь ДНК в 3'→5'-направлении, можно контролировать только временем, при этом известно, что данный фермент работает почти «как часы», удаляя около 25 нуклеотидов за мин [Henikoff, 1987]. Для клонирования ампликонов с использованием экзонуклеазы III и рестрикционных эндонуклеаз с 5'-выступающими концами подходящий вектор расщеплялся такими ферментами, а ампликон, наработанный с помощью праймеров, несущих на самом 5'-конце остатки сайтов узнавания выбранных рестрикционных эндонуклеаз, подвергался кратковременному воздействию экзонуклеазы III, приводящему к образованию одноцепочечных участков, несущих сайты рестрикционных эндонуклеаз, пригодных для лигирования с остающимися небольшими брешами, репарируемыми уже в системе *in vivo* [Kaluz et al., 1992]. Сходное применение экзонуклеазы III для клонирования ампликонов описано в работах других авторов [Hsiao, 1993; Li, Evans, 1997]. Отличия заключались в конструировании специального вектора и соответствующем дизайне праймеров, приводящих под действием экзонуклеазы III к образованию более протяженных одноцепочечных участков, комплементарных друг другу, что позволяло, не прибегая к лигированию, трансформировать данными генетическими конструкциями компетентные клетки *E.coli*, в которых происходила репарация как брешей, так и вырезания торчащих нуклеотидов. Для образования выступающих концов для безлигазного клонирования ампликонов предлагалось использовать и другие ферменты, среди которых экзонуклеаза фага лямбда [Tseng, 1999] и экзонуклеаза шестого гена фага T7 [Zhou, Hatahet, 1995].

Использование рестрикционной эндонуклеазы и никизы для создания протяженных одноцепочечных участков описано китайскими авторами [Yang et al., 2010]. Ими был создан специальный вектор, несущий на разных цепях (по 2

на цепь) 4 сайта никазы *Nt.BbvCI* (CC[▼]TCAGC), расщепляющей только одну цепь ДНК, и сайт обычной рестрикционной эндонуклеазы между ними (в их работе это был фермент *VamHI*). В результате расщепления вектора этими ферментами и прогрева при 80°C происходило выщепление фрагментов ДНК с их диссоциацией, что приводило к формированию одноцепочечных участков. При амплификации в праймерные последовательности на 5'-концы добавлялись комплементарные последовательности, несущие сайты этой же никазы, что позволяло вести безлигазное клонирование ампликона. Другими авторами этот подход был несколько упрощен за счет расположения двух внутренних сайтов узнавания (расщепления) данной никазы на расстоянии двух нуклеотидов друг от друга в результате чего происходило расхождение цепей ДНК без использования дополнительной рестрикционной эндонуклеазы [Hansen et al., 2014].

Клонирование ампликонов мегапраймированием с использованием рестрикционной эндонуклеазы DpnI

Один из способов клонирования ампликонов без использования ДНК-лигазы был назван еще и безрестриктазным и описан с некоторыми вариациями во многих статьях [Chen et al., 2000; Geiser et al., 2001; van den Ent, Lowe, 2006; Li et al., 2011; Bond, Naus, 2012; Bryksin, Matsumura, 2013; Erijman et al., 2011; 2014; Ulrich et al., 2012; Peleg, Unger, 2014]. Но на самом деле именно применение рестрикционной эндонуклеазы *DpnI* является одним из ключевых моментов данного метода, который заключается в проведении двустадийной ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы, где на первой стадии вектор и ампликон амплифицируются по отдельности, причем праймер(ы) для амплификации вставки несут на 5'-концах участки гомологичные векторной последовательности. Затем на второй стадии происходит совместная амплификация кольцевого вектора и вставки, причем наработанный целевой ампликон служит в качестве затравочной молекулы в виде так называемого мегапраймера, что приводит амплификации единой последовательности вектора и вставки. Для уменьшения фона из нерекомбинантных клонов требуется расщепление продуктов второй стадии ПЦР ферментом *DpnI*, узнающим последовательность GA[▼]TC и расщепляющим таковую только в случае присутствия метилированного аденина, для чего исходный вектор должен наращиваться в специальных штаммах *E.coli dam*⁺. При этом имеется сообщение, что используя крайне малое

количество исходного вектора, при клонировании ампликонов этим методом можно обходиться и без использования рестрикционной эндонуклеазы *DpnI*, поскольку фон и так минимален [Spiliotis, 2012].

Прочие способы клонирования ампликонов по липким концам

Одним из первых был предложен метод клонирования ампликонов, основанный на использовании 4 праймеров, два из которых амплифицировали мишень (а и b), а два других (с и d) – вектор [Shuldiner et al., 1990; 1991]. Ключевым моментом было то, что праймеры а и b несли на своих 5'-концах участки, комплементарные 3'-концам линеризованного вектора. Таким образом, после первых циклов ПЦР, удаления праймеров, добавления расщепленного вектора содержимое пробирки делилось на две части и в одной ПЦР шла с праймерами а и с, а в другой – с праймерами b и d, благодаря чему нарабатывались комплементарные последовательности вектора и вставки. После объединения содержимого этих двух пробирок, денатурации и гетерологичного отжига формировались в том числе, несущие по одному отстоящему друг от друга на длину вставки нику на разных цепях, кольцевые молекулы вектора со вставкой, которыми проводилась трансформация компетентных клеток. В дальнейшем метод был несколько упрощен, поскольку оказалось достаточным использование всего трех праймеров [Temesgen, Eschrich, 1996].

Самый простой способ бесферментного клонирования ампликонов путем отжига их 5'-концов, представляющих собой экстрапраймерные последовательности, с комплементарными им участками векторной молекулы, получивший название PIPE (Polymerase Incomplete Primer Extension), заключается в простом непродолжительном объединении амплифицированных вектора и вставки перед трансформацией [Klock et al., 2007; Klock, Lesley, 2009; Stevenson et al., 2013]. Данный метод основан на раннем наблюдении, говорящем что «при ближайшем рассмотрении» ампликоны, даже формирующие одну полосу при их анализе геле-электрофорезом, на самом деле весьма гетерогенны, поскольку несут терминированные на разных расстояниях 3'-концы [Olsen, Eckstein, 1989]. Таким образом, и амплифицированный вектор и вставка среди сотен миллиардов копий (особенно если не проводить последний этап дотройки концов) неизбежно будут представлены вариантами с поразному недостроенными 3'-концами, пригодными для отжига друг с другом, а образующиеся бреши и ники репарируются уже *in vivo* после

трансформации. Ввиду своей простоты этот подход обеспечивает высокую производительность и массовость клонирования ампликонов.

Создание вектора, несущего в полилинкере два сайта узнавания рестрикционной эндонуклеазы *Sfi*I, узнающей прерванную палиндромную последовательность GGCCNNNN[▼]NGGCC, позволило разработать метод клонирования ампликонов, названный китайскими авторами как 3GC-клонирование [Zheng et al., 2008]. Его суть заключается в объединении данного вектора, несущего на обоих 3'-концах последовательности в виде GGG, образующихся, благодаря возможности помещения на места незначущих нуклеотидов в сайте узнавания (приведенных здесь как N) для одного сайта гуанинов, а для другого – цитозинов, с ампликонами, несущими на 3'-концах гомополимерные участки в виде нескольких цитозинов. Последние возникают за счет постаmplификационного действия терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы, способной к присоединению к свободному 3'-концу некоторого числа нематричных нуклеотидов. При этом лишние (начиная с четвертого цитозина) нуклеотиды гомополимерного хвоста удаляются репарационными ферментами самих бактерий после трансформации. Недавно предложен сходный метод объединения специально подготовленных ампликона и вектора, каждый из которых несет соответствующие гомополимерные концы [Lazinski, Camilli, 2013]. Можно заметить, что некоторое ограничение длины гомополимерных хвостов при их построении ТдТ в этой работе было достигнуто определенным соотношением (19:1) дЦТФ и ддЦТФ.

В одной работе также описано создание векторов, предназначенных для клонирования ампликонов и пригодных для лигирования как по тупым, по липким концам, так и путем А/Т-клонирования [Cease, Lohff, 1993].

А/Т-клонирование ампликонов

Некой разновидностью липких или выступающих концов можно считать присутствие на 3'-концах молекул ДНК нематричных нуклеотидов, которые или преимущественно представлены аденинами (у А-ампликонов) или могут быть целенаправленно «изготовлены» в виде остатков тимина (для Т-векторов), что позволяет вести так называемое А/Т-клонирование. Если в предыдущих разделах основное внимание уделялось преимущественно способам подготовки ампликонов к лигированию с готовыми векторами, несущими или тупые или липкие концы, которые относительно несложно создать, не принимая во внимание

безлигзные методы клонирования, то при А/Т-клонировании, напротив, наиболее важным становится подготовить вектор, несущий навешенные Т-нуклеотиды, а ампликоны в норме (в большинстве случаев) и так содержат нематричные аденины. При этом однородность таких концов у ампликонов весьма важна и об этом нужно помнить, поскольку, как уже отмечалось выше, прилегающие к 3'-концу несколько нуклеотидов оказывают заметное влияние на тип нематричного нуклеотида [Hu, 1993; Smith et al., 1995; Brownstein et al., 1996; Magnuson et al., 1996]. Детальное исследование клонирования ампликонов с Т-вектором в зависимости от первых двух нуклеотидов на 5'-конце праймеров показало, что от наличия того или иного терминального нуклеотида меняется его эффективность, зависимость которой приблизительно можно выразить так – А>>>>>>>>G>C>>>>Т [Peng et al., 2007], из чего можно сделать вывод, что «выбор» Таq полимеразой нематричного нуклеотида (в данном случае аденина, поскольку оценивалось клонированием в Т-вектор) нуклеотида-зависим. Как оказалось и проксимальный нуклеотид (при терминальном аденине) также влияет на процесс клонирования следующим образом – аG>aA>>aT>>>aC. Таким образом, при намерении клонировать ампликон с помощью А/Т-концов при подборе праймеров следует избегать наличия на их 5'-концах тимина(ов). Показано также, что более продолжительная финальная достройка ампликонов увеличивает эффективность клонирования продуктов ПЦР, амплифицированных с помощью ДНК-полимеразы без редактирующей активности, свидетельствующая об увеличении пула ампликонов с нематричными нуклеотидами и в частности А-ампликонов [Li, Guu, 1996].

Существует несколько подходов к созданию Т-векторов, заключающихся в расщеплении полилинкерных участков векторов с помощью особых эндонуклеаз рестрикции, генерирующих 3'-выступающие концы, или узнающих прерванные палиндромы, в использовании Т-адапторов, а также в «простом навешивании» остатков тимина на тупые концы расщепленного подходящим ферментом вектора находящегося в реакционной смеси только дТТФ с помощью Таq полимеразы.

Максимально простой способ клонирования А-ампликонов предложен тайваньскими авторами [Chuang et al., 1995]. Его суть заключается в использовании подходящих рестрикционных эндонуклеаз, генерирующих 3'-выступающие концы – *Sac*I (GAGCT[▼]C), *Pvu*I (CGAT[▼]CG), *Aat*II (GACGT[▼]C), *Pac*I (TTAATT[▼]AA), где жирным шрифтом выделены крайние нуклеотиды их липких

концов, являющиеся у этих ферментов тиминами. Важным моментом для данного способа клонирования является наличие фосфатных групп на 5'-концах ампликона. На этапе лигирования возникают конструкции, в которых происходит образование водородных связей (между комплементарными А/Т основаниями) и фосфодиэфирных связей между остатками тимина на 3'-концах вектора и нуклеотидами на 5'-концах ампликона. При этом на противоположных цепях образуются бреши в виде одного или трех нуклеотидов, которые после трансформации репарируются уже *in vivo*.

Наиболее часто используемым ферментом для создания вектора с Т-концами является рестрикционная эндонуклеаза *XcmI*, расщепляющая последовательность $CCANNNNN^{\nabla}NNNNTGG$ и генерирующая 3'-концы с одним выступающим нуклеотидом, который фактически может быть любым, так как место разреза приходится на незначительные нуклеотиды. Общий принцип, лежащий в основе всех таких векторов, заключается в размещении в полилинкере на некотором расстоянии друг от друга двух участков узнавания этого фермента, последовательности которых подобраны с таким расчетом, что в результате рестрикции образуются одинаковые 3'-концы с тиминами, исключающими лигирование расщепленного вектора без вставки на себя. Учитывая популярность такого подхода для клонирования ПЦР-продуктов, создано большое количество подобных векторов, отличающихся друг от друга расстоянием между двумя сайтами *XcmI*, фланкирующими сайтами других эндонуклеаз рестрикции и прочими особенностями [Kovalic et al., 1991; Mead et al., 1991; Mitchell et al., 1992; Cha et al., 1993; Harrison et al., 1994; Testori et al., 1994; Kwak, Kim, 1995; Borovkov, Rivkin, 1997; Sampath et al., 1997; Schutte et al., 1997; Testori, Sollitti, 1997, de Vries, 1998; Arashi-Heese et al., 1999; Jo C., Jo S.A., 2001]. Несмотря на то, что большинство Т-векторов на основе этой эндонуклеазы рестрикции созданы в 90-х гг. конструирование новых вариантов продолжается и поныне [Aranishi et al., 2004; Wang et al., 2007; Chen et al., 2009; Hong et al., 2009; Zhao et al., 2009; Jun et al., 2010; Gu, Ye, 2011; Janner et al., 2013]. Ряд таких Т-векторов в качестве маркерного гена несет ген зеленого флуоресцентного белка *gfp* [Kwon et al., 1998; Ito et al., 2000; Luo et al., 2008; Park, Zeng, 2007; 2008]. Гораздо меньшее число Т-векторов создано на основе других, также узнающих прерванные палиндромные последовательности рестрикционных эндонуклеаз *Eam1105I* ($GACNNN^{\nabla}NNGTC$) и ее изоизомеров [Ichihara, Kurosawa, 1993; Ido, Hayami, 1997; Jeung et

al., 2002; Xuejun et al., 2002; Reisinger et al., 2007; Wang et al., 2007; Dimov, 2012].

Другой подход к приготовлению Т-векторов заключается в расщеплении таковых рестрикционными эндонуклеазами, образующими тупоконечные фрагменты, и навешивании на их 3'-концы тимина с помощью *Taq* полимеразы [Marchuk et al., 1991; Trower, Elgar, 1994; Papp et al., 1995; Hadjeb, Berkowitz, 1996; Tsang et al., 1996]. Еще один способ получения Т-вектора, пригодного для лигирования с ампликонами, несущими преимущественно аденины на их 3'-концах, заключается в использовании нематричной активности терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы [Holton et al., 1991]. Однако ввиду того, что данный фермент способен присоединить несколько нуклеотидов, то для исключения такой возможности авторы применили дидезоксиТТФ, не позволяющий происходить дальнейшему росту цепи ДНК.

Описан вариант создания Т-векторов, где выступающий остаток тимина на 3'-концах принадлежит специальному адаптору, представляющему собой двухцепочную олигонуклеотидную структуру, пригодную для лигирования с образующимися липкими концами расщепленного подходящей рестрикционной эндонуклеазой вектора [Horton et al., 1996]. Для исключения самолигирования адаптора и образования димеров 5'-конец липкого конца такого адаптора не содержал фосфатной группы, тогда как 5'-конец комплементарной цепи напротив был фосфорилирован, чтобы облегчить лигирование с А-ампликоном.

Был также предложен совсем иной способ создания вектора с выступающими на 3'-концах тиминами [Zimmer, 1993]. Основой конструкции послужила одноцепочная ДНК фага М13, на которой был отождествлен первый олигонуклеотид, содержащий сайт узнавания рестрикционной эндонуклеазы *XbaI* ($T^{\nabla}CTAGA$), сформировавший таким образом двухцепочечный участок ДНК, пригодный для расщепления данным ферментом. В результате фаговая одноцепочечная ДНК становалась линейаризованной и несущей на 3'-конце остаток тимина, входящего в сайт узнавания *XbaI*, а два оставшихся после рестриктазного расщепления фрагмента первого олигонуклеотида, будучи короткими, диссоциировали с матрицы. После отжига на линейаризованной ДНК фага М13 двух новых олигонуклеотидов, подобранных с таким расчетом, что двухцепочечные участки полилинкера данного вектора оба стали нести по одному выступающему на 3'-концах нуклеотиду (а именно, по тимину, отмеченному в сайте узнавания жирным

шрифтом), благодаря которым можно было вести А/Т-лигирование ампликонов. При этом образуется одно/двухцепочечная конструкция, где вектор представлен по большей части в одноцепочечном виде, а вставка – в двухцепочечном. Еще более сложный способ образования Т-концов у вектора для клонирования ампликонов, основанный на использовании специально сконструированных довольно протяженных Т-кассет, был предложен другими авторами [Iwahana et al., 1994; 1994a].

Как и при клонировании ампликонов по тупым концам с помощью особым образом фосфорилированных и дефосфорилированных концов вектора и вставки можно добиться направленного клонирования [Zhou, Gomes-Sanchez, 2000]. В этом случае один из праймеров изначально содержал на 5'-конце фосфатную группу, а вектор был расщеплен первой рестрикционной эндонуклеазой, дефосфорилирован и затем второй фермент удалил дефосфорилированный участок линейного вектора после чего было произведено навешивание Т-концов Таq полимеразой.

В завершении данного раздела по Т-векторам следует уделить внимание работе, где А/Т-клонирование ампликонов проводилось после амплификации с использованием Pfu полимеразы, обладающей редактирующей активностью и образующей тупые концы [Zhou et al., 1995]. Учитывая низкую эффективность тупоконечного лигирования, авторы прибегли к постаплификационной доработке А-концов с помощью Таq полимеразы, однако при этом требовался дополнительный этап для удаления остаточной активности Pfu полимеразы. Обойтись без него смогли японские ученые, которые вместе с Таq полимеразой для навешивания аденинов на 3'-концы ампликонов в реакционную смесь добавляли антитела, блокирующие работу ДНК-полимеразы с редактирующей активностью [Kitabayashi et al., 2003].

Топоизомеразное клонирование ампликонов

При топоизомеразном клонировании ампликонов возможно объединение вектора со вставкой по тупым концам, А/Т-клонированием, а также путем направленного клонирования вставки [D'Агра, 2009]. Несмотря на то, что разнообразные варианты этих способов уже описаны в предыдущих разделах, ввиду серьезных отличий предложенного метода ТОРО-клонирования ампликонов с помощью Vaccinia virus топоизомеразы I [Shuman, 1994; Cheng, Shuman, 2000] логично остановится на нем отдельно.

Топоизомераза I вируса осповакцины является ферментом двойного действия - она узнает

пентапиримидиновый мотив (С/Т)ССТТ[▼], расщепляя как никака лишь одну цепь, а также способна лигировать такие участки. Участок расщепленной цепи в случае его близости к краю молекулы ДНК и соответственно небольшого размера, например из 6 нуклеотидов, диссоциирует. При этом данный фермент через тирозин в 274 положении белковой молекулы образует комплекс с ДНК, несущей на 3'-конце последовательность С/ТССТТ [Shuman et al., 1989]. Благодаря реакции трансэтерификации фосфатная группа остается связанной с 3'-концом цепи ДНК. Наличие на противоположных цепях векторной ДНК двух сайтов узнавания ТОРО I С/ТССТТ, расположенных вплотную или вблизи друг от друга, приводит к формированию линейной формы вектора с двумя ковалентно-связанными молекулами топоизомеразы на концах. Такие комплексы весьма устойчивы и выдерживают 4-х дневное пребывание при 37°C, а при низкой температуре могут храниться неограниченно долго. Это обстоятельство крайне удобно для выпуска соответствующих готовых наборов для клонирования различных фрагментов ДНК. Активированный топоизомеразой осповакцины вектор способен объединяться с ампликоном при условии, что 5'-концы последнего не фосфорилированы, что обычно и бывает при использовании при ПЦР стандартных праймеров.

К основным преимуществам ТОРО-клонирования следует отнести быстроту процесса (5 мин при комнатной температуре), высокий выход рекомбинантов (до 95%). Некоторым недостатком ТОРО-клонирования можно считать необходимость исключения в праймерах последовательностей YССТТ или ААGGR. В литературе также содержится предостережение использования LNA-праймеров, поскольку топоизомераза осповакцины ингибируется нестандартными азотистыми основаниями [Liu et al., 2012], а также наличием мест с отсутствием нуклеотидов [Tian et al., 2004].

Целую линейку ТОРО-векторов из нескольких семейств, имеющих различное предназначение, производит американская фирма Invitrogen [Heuman et al., 1999]. Так, в ее ассортименте имеются группы векторов общего назначения для клонирования обычных и протяженных фрагментов ДНК, для клонирования с последующей транскрипцией *in vitro*, секвенирования, экспрессии в про- и эукариотических клетках, а также для дальнейшего переноса вставок в вектора системы Gateway. Ряд векторов сконструирован для Т/А-клонирования вставок, тупоконечного клонирования, направленного клонирования. Причем имеется

работа, где показано, что одни и те же вектора, изначально рассчитанные на клонирование того или иного типа вставок (с тупыми или липкими концами, А-ампликонов), хотя и с различной эффективностью, но пригодны для клонирования всех вышеперечисленных типов продуктов ПЦР [Geng et al., 2006]. Подобное возможно потому, что топоизомераза I осповакцины способна вытеснять ненужные (мешающие лигированию) одноцепочечные участки ДНК с последующей репарацией таких мест *in vivo* [Xiao et al., 2007; D'Arpa, 2009].

Клонирование ампликонов путем рекомбинации

Объединение вставки с вектором может происходить также за счет рекомбинации их гомологичных участков в системах как *in vitro*, так и *in vivo*, достигаемой благодаря тому, что на 5'-концах праймеров размещаются дополнительные последовательности, совпадающие с определенными местами векторной молекулы. Такое рекомбинационное клонирование ампликонов осуществляется с помощью разных ферментных систем, нуждающихся в разной протяженности гомологичных участков. При этом все методы рекомбинационного клонирования отличаются быстротой процесса, обеспечивая в большинстве случаев бесшовное объединение вставки и вектора в отличие, например, от методов клонирования ампликонов с помощью рестрикционных эндонуклеаз или А/Т-клонирования, где в местах лигирования могут оказаться нежелательные лишние нуклеотиды, что крайне важно при создании экспрессионных конструкций.

Одним из наиболее распространенных методов является клонирование в поставляемых фирмой Invitrogen Gateway векторах, основанных на сайт-специфичной рекомбинационной системе бактериофага лямбда. Протекающие реакции контролируются различными комбинациями ферментов, белков и рекомбинационных сайтов [Hartley et al., 2000; D'Arpa, 2009]. В результате амплификации на противоположных концах ампликона формируются изначально включенные в праймеры дополнительные последовательности *attB1* и *attB2* протяженностью 25 пар нуклеотидов, позволяющие с помощью так называемой BP Clonase в виде комплекса ферментов (интегразы Int и хозяйского интеграционного фактора IHF) замещать в векторе-доноре pDONR по гомологичным им участкам *attP* селективный упомянутый выше летальный ген *ccdB* на ампликон с образованием фланкирующих участков *attL1* и *attL2*, приводя к созданию на основе плазмид из группы pENTR промежуточной генно-инженерной

конструкции в виде «вводного клона». Далее вставка из такого вводного клона с помощью специального вектора «доставки», первоначально несущего последовательность *attR1-ccdB-attR2*, может быть под действием второго ферментного комплекса LR Clonase (Int, IHF и эксционазы Xis) легко перемещена в подходящий вектор, в том числе для экспрессии клонированного гена и наработки целевого продукта. Желая иметь некоммерческую альтернативу Gateway векторам фирмы Invitrogen китайские авторы создали свой «вводный» Т-вектор, получаемый путем расщепления полилинкера рестрикционной эндонуклеазой *AhdI* (изоизомер *Eam1105I*) и рассчитанный на клонирование А-ампликонов [Chen et al., 2007]. Было также предложено сократить двухстадийное клонирование в Gateway векторах до одной стадии за счет использования укороченных *attL* сайтов, позволяющих обходиться без донорного вектора [Fu et al., 2008].

Если в ТОРО-клонировании задействована топоизомераза I вируса осповакцины, то в поставляемой фирмой Clontech системе для рекомбинационного клонирования In-Fusion, используется ДНК-полимераза данного вируса Vaccinia virus вкупе с его же белком I3, специфически связывающимся с одноцепочечной ДНК. Для этого достаточно на 5'-концы праймеров добавить по 15 нуклеотидов, гомологичных выбранному участку любого вектора, чтобы с линейризованным вектором под действием Vv полимеразы (присутствие I3 белка увеличивает эффективность клонирования ампликонов на треть [Irwin et al., 2012]) за 30 мин происходило объединение вставки и вектора, по одноцепочечным гомологичным участкам, которые образуются за счет 3'→5'-экзонуклеазной активности данной ДНК-полимеразы [Benoit et al., 2006; Berrow et al., 2007; Zhu et al., 2007]. Репарация возможных брешей будет происходить *in vivo* уже после трансформации клеток *E.coli*. Эффективность бесшовного направленного In-Fusion-клонирования фрагментов ДНК протяженностью от 0,5 до 15 т.п.н. достигает 95%. Оно может с успехом использоваться и для одновременного множественного клонирования ампликонов, генерируя протяженные участки в заданной последовательности [Sleight et al., 2010].

Еще одним способом рекомбинационного клонирования ампликонов служит *Cre/lox*-рекомбинационная система бактериофага P1 [Liu et al., 1998; Buchholz, Bishop, 2001; Khalil et al., 2007]. Описан способ клонирования ампликонов по тупым концам, предполагающий использование несущего *lox*-участок специального вектора, после

расщепления которого подходящей рестрикционной эндонуклеазой на первой стадии лигирования с ампликоном происходит образование тримеров, состоящих из вектора::вставки::вектора. При этом половина конструкций будет содержать векторные последовательности с *lox*-участком в виде прямых повторов, другая половина – в виде инвертированных. На второй стадии добавляется *Cre*-белок, циркулизирующий рекомбинантные молекулы, становящиеся пригодными для трансформации компетентных клеток [Boyd, 1993]. Среди других используемых для клонирования ампликонов рекомбинационных систем можно отметить RecE/RecT-рекомбинацию [Zhang et al., 2000], Flp-рекомбинацию [Sadowski, 2003], требующих специально сконструированные векторы.

В нескольких статьях описываются способы клонирования ампликонов путем гомологичной рекомбинации *in vivo* после котрансформации компетентных клеток линейризованным вектором и вставкой, несущей на 3'- и 5'-концах протяженные участки, совпадающие с векторными последовательностями [Bubeck et al., 1993; Oliner et al., 1993; Zhang et al., 2000]. Причем проведенное исследование достаточной длины таких участков показало, что всего 10 нуклеотидов (при 42 нуклеотидах на другом конце) обеспечивают появление рекомбинантных клонов [Bubeck et al., 1993]. Неким продолжением этих работ можно считать технологию клонирования ампликонов путем рекомбинации в системе *in vitro*, содержащей экстракт лизата клеток какого-либо RecA⁻ штамма *E. coli*, когда после часовой инкубации линейризованного вектора с ампликоном при 37°C следовала трансформация компетентных клеток [Zhang et al., 2012; 2014].

Довольно простой и весьма быстрый способ клонирования ампликонов, получивший обозначение Xi-cloning, предлагает фирма Genlantis [www.genlantis.com]. Он заключается в совместной трансформации компетентных клеток (входящих в набор для клонирования) рекомбиназа-позитивного штамма *E. coli* (SmartCells) двумя молекулами ДНК в виде специального линейризованного вектора и ампликона, амплифицированного с помощью специфичных праймеров, несущих дополнительно по 28-32 экстрануклеотида на их 5'-концах, гомологичных концам вектора [D'Агра, 2009]. После трансформации происходит рекомбинация *in vivo*, в результате которой свыше 85% колоний несут вставку в нужной ориентации.

Заключение

На основании вышеизложенного можно сделать вывод об огромном разнообразии методов клонирования продуктов ПЦР, которое мы попытались уложить в несколько основных типов и видов, насчитывающих несколько десятков вариантов и вариаций. При этом в последние годы довольно отчетливо прослеживается тенденция разработки новых способов безлигазного бесшовного клонирования ампликонов, пригодных для широкомасштабного конструирования синтетических генов и геномов, что должно являться предметом рассмотрения самостоятельной обзорной статьи.

Литература

1. Ailenberg, M., & Silverman, M. (1996). Description of a one step staggered reannealing method for directional cloning of PCR-generated DNA using sticky-end ligation without employing restriction enzymes. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 39, 771–779. doi:10.1080/15216549600201861
2. Algire, M. A. (2013). Restrictionless cloning. *Methods in Enzymology*, 529, 125–134. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00009-4
3. Andersson, B., Povinelli, C. M., Wentland, M. A., Shen, Y., Muzny, D. M., & Gibbs, R. A. (1994). Adaptor-based uracil DNA glycosylase cloning simplifies shotgun library construction for large-scale sequencing. *Analytical Biochemistry*, 218, 300–308. doi:S0003269784711821 [pii]
4. Aranishi, F., & Okimoto, T. (2004). Engineered XcmI cassette-containing vector for PCR-based phylogenetic analyses. *Journal of Genetics*, 83(1), 33–34.
5. Arashi-Heese, N., Miwa, M., & Shibata, H. (1999). XcmI site-containing vector for direct cloning and *in vitro* transcription of PCR product. *Molecular Biotechnology*, 12, 281–283. doi:10.1385/MB:12:3:281
6. Aslanidis, C., & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18, 6069–6074. doi:10.1093/nar/18.20.6069
7. Aslanidis, C., de Jong, P. J., & Schmitz, G. (1994). Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods and Applications*, 4, 172–177. doi:10.1101/gr.4.3.172
8. Baker, M. (2012). De novo genome assembly: what every biologist should know. *Nature Methods*, 9(4), 333–337.
9. Baumann, T., Arndt, K. M., & Müller, K. M. (2013). Directional cloning of DNA fragments using deoxyinosine-containing oligonucleotides and

- endonuclease V. *BMC Biotechnology*, 13, 81. doi:10.1186/1472-6750-13-81
10. Benoit, R. M., Wilhelm, R. N., Scherer-Becker, D., & Ostermeier, C. (2006). An improved method for fast, robust, and seamless integration of DNA fragments into multiple plasmids. *Protein Expression and Purification*, 45, 66–71. doi:10.1016/j.pep.2005.09.022
 11. Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D., Owens, R. J. (2007). A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Research*, 35, e45. doi:10.1093/nar/gkm047
 12. Bhat, G. J., Lodes, M. J., Myler, P. J., & Stuart, K. D. (1991). A simple method for cloning blunt ended DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 19(2), 398.
 13. Bitinaite, J., Rubino, M., Varma, K. H., Schildkraut, I., Vaisvila, R., & Vaiskunaite, R. (2007). USER friendly DNA engineering and cloning method by uracil excision. *Nucleic Acids Research*, 35, 1992–2002. doi:10.1093/nar/gkm041
 14. Blanus, M., Schenk, A., Sadeghi, H., Marienhagen, J., & Schwaneberg, U. (2010). Phosphorothioate-based ligase-independent gene cloning (PLICing): An enzyme-free and sequence-independent cloning method. *Analytical Biochemistry*, 406, 141–146. doi:10.1016/j.ab.2010.07.011
 15. Bolchi, A., Ottonello, S., & Petrucco, S. (2005). A general one-step method for the cloning of PCR products. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42, 205–209. doi:10.1042/BA20050050
 16. Bond, S. R., & Naus, C. C. (2012). RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects. *Nucleic Acids Research*, 40, W209–13. doi:10.1093/nar/gks396
 17. Booth, P. M., Buchman, G. W., & Rashtchian, A. (1994). Assembly and cloning of coding sequences for neurotrophic factors directly from genomic DNA using polymerase chain reaction and uracil DNA glycosylase. *Gene*, 146, 303–308. doi:10.1016/0378-1119(94)90310-7
 18. Borovkov, A. Y., & Rivkin, M. I. (1997). XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *BioTechniques*, 22(5), 812–814.
 19. Boyd, A. C. (1993). Turbo cloning: a fast, efficient method for cloning PCR products and other blunt-ended DNA fragments into plasmids. *Nucleic Acids Research*, 21, 817–821. doi:10.1093/nar/21.4.817
 20. Brown, S. D., Utturkar, S. M., Klingeman, D. M., Johnson, C. M., Martin, S. L., Land, M. L., ... Pelletier, D. a. (2012). Twenty-one genome sequences from *Pseudomonas* species and 19 genome sequences from diverse bacteria isolated from the rhizosphere and endosphere of *Populus deltoides*. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 5991–3. doi:10.1128/JB.01243-12
 21. Brownstein, M. J., Carpten, J. D., & Smith, J. R. (1996). Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* (Vol. 20, pp. 1004–1006, 1008–1010).
 22. Bryksin, A., & Matsumura, I. (2013). Overlap Extension PCR Cloning. In *Synthetic Biology* (Vol. 1073, pp. 31–42). doi:10.1007/978-1-62703-625-2
 23. Bubeck, P., Winkler, M., & Bautsch, W. (1993). Rapid cloning by homologous recombination in vivo. *Nucleic Acids Research*, 21, 3601–3602. doi:10.1093/nar/21.15.3601
 24. Buchholz, F., & Bishop, M. (2001). LoxP-directed cloning: use of Cre recombinase as a universal restriction enzyme. *BioTechniques*, 31, 906–908, 910, 912, 914, 916, 918.
 25. Cease KB, Lohff CJ. A vector for facile PCR product cloning and modification generating any desired 4-base 5' overhang: pRPM // *Biotechniques*. 1993. V.14. P.250-255.
 26. Cha, J., Bishai, W., & Chandrasegaran, S. (1993). New vectors for direct cloning of PCR products. *Gene*, 136(1-2), 369–370.
 27. Chen, G. J., Qiu, N., Karrer, C., Caspers, P., & Page, M. G. (2000). Restriction site-free insertion of PCR products directionally into vectors. *BioTechniques*, 28, 498–500, 504–505. doi:10.1385/1-59259-177-9:133
 28. Chen, G. J., Qiu, N., & Page, M. P. G. (2002). Universal restriction site-free cloning method using chimeric primers. *BioTechniques* (Vol. 32, pp. 516, 518–520).
 29. Chen, Q. J., Zhou, H. M., Chen, J., & Wang, X. C. (2006). Using a modified TA cloning method to create entry clones. *Analytical Biochemistry*, 358, 120–125. doi:10.1016/j.ab.2006.08.015
 30. Cheng, C., & Shuman, S. (2000). DNA strand transfer catalyzed by vaccinia topoisomerase: ligation of DNAs containing a 3' mononucleotide overhang. *Nucleic Acids Research*, 28, 1893–1898. doi:gkd323 [pii]
 31. Chuang, S. E., Wang, K. C., & Cheng, A. L. (1995). Single-step direct cloning of PCR products. *Trends in Genetics: TIG*, 11(1), 7–8.
 32. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases // *Nucleic Acids Res.* 1988. V.16. P.9677-9686.
 33. Coljee, V. W., Murray, H. L., Donahue, W. F., & Jarrell, K. A. (2000). Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning. *Nature Biotechnology*, 18, 789–791. doi:10.1038/77363
 34. Costa, G. L., Grafsky, A., & Weiner, M. P. (1994). Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments. *PCR Methods and Applications*, 3, 338–345. doi:10.1101/gr.3.6.338

35. Costa, G. L., & Weiner, M. P. (1994). Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments. *Nucleic Acids Research*, 22, 2423. doi:10.1093/nar/22.12.2423
36. Crowe, J. S., Cooper, H. J., Smith, M. A., Sims, M. J., Parker, D., & Gewert, D. (1991). Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nucleic Acids Research*, 19(1), 184.
37. D'Arpa, P. (2009). Strategies for cloning PCR products. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, pdb.ip68. doi:10.1101/pdb.ip68
38. De Vries, E. (1998). pUCPCR1. A vector for direct cloning of PCR products in a double XcmI restriction site offering compatible single 3'-overhanging T residues. *Molecular Biotechnology*, 10, 273–274.
39. Delidow, B. C. (1993). Molecular cloning of polymerase chain reaction fragments with cohesive ends. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 15, 217–228. doi:10.1385/0-89603-244-2:217
40. Dietmaier, W., Fabry, S., & Schmitt, R. (1993). DISEC-TRISEC: di- and trinucleotide-sticky-end cloning of PCR-amplified DNA. *Nucleic Acids Research*, 21(15), 3603–3604.
41. Dimov, S. G. (2012). pSDTV vector: a modification of the pBluescript SK+ plasmid in order to perform PCR-fragments TA-cloning using Eam1105I restriction endonuclease. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 6133–6139. doi:10.1007/s11033-011-1429-3
42. Donahue, W. F., Turczyk, B. M., & Jarrell, K. A. (2002). Rapid gene cloning using terminator primers and modular vectors. *Nucleic Acids Research*, 30, e95. doi:10.1093/nar/gnf094
43. Eng, W. K., Pandit, S. D., & Sternglanz, R. (1989). Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 13373–13376.
44. Erijman, A., Dantes, A., Bernheim, R., Shifman, J. M., & Peleg, Y. (2011). Transfer-PCR (TPCR): A highway for DNA cloning and protein engineering. *Journal of Structural Biology*, 175, 171–177. doi:10.1016/j.jsb.2011.04.005
45. Erijman, A., Shifman, J. M., & Peleg, Y. (2014). A Single-Tube Assembly of DNA Using the Transfer-PCR (TPCR) Platform. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 89–101. doi:10.1007/978-1-62703-764-8
46. Fu, C., Wehr, D. R., Edwards, J., & Hauge, B. (2008). Rapid one-step recombinational cloning. *Nucleic Acids Research*, 36, e54. doi:10.1093/nar/gkn167
47. Gade R, Kaplan BE, Swiderski PM, Wallace RB. Incorporation of nonbase residues into synthetic oligonucleotides and their use in the PCR // *Genet. Anal. Tech. Appl.* 1993. V.10. P.61-65.
48. Gál, J., Schnell, R., & Kálmán, M. (2000). Polymerase Dependence of Autosticky Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 156–158. doi:10.1006/abio.2000.4593
49. Gál, J., Schnell, R., Szekeres, S., & Kálmán, M. (1999). Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (autosticky PCR). *Molecular & General Genetics : MGG*, 260, 569–573.
50. Geiser, M., Cèbe, R., Drewello, D., & Schmitz, R. (2001). Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *BioTechniques* (Vol. 31, pp. 88–90, 92).
51. Geng, L., Xin, W., Huang, D.-W., & Feng, G. (2006). A universal cloning vector using vaccinia topoisomerase I. *Molecular Biotechnology*, 33, 23–28. doi:MB:33:1:23 [pii]
52. Gershon, D. (1995). Technologies in DNA diagnostics on the horizon. *Nature Medicine*, 1(2), 103. doi:10.1038/nm0295-103
53. Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H. H., Nielsen, M. T., & Halkier, B. A. (2007). USER fusion: a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Research*, 35, e55. doi:10.1093/nar/gkm106
54. Hadjeb, N., & Berkowitz, G. A. (1996). Preparation of T-over-hang vectors with high PCR product cloning efficiency. *BioTechniques*, 20(1), 20–22.
55. Hansen, N. B., Lubeck, M., & Lubeck, P. S. (2014). Advancing USER cloning into simpleUSER and nicking cloning. *Journal of Microbiological Methods*, 96, 42–49. doi:10.1016/j.mimet.2013.10.018
56. Haqqi TM. Direct ligation of PCR products for cloning and sequencing // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20. P.6427.
57. Harrison J, Molloy PL, Clark SJ. Direct cloning of polymerase chain reaction products in an XcmI T-vector // *Analytical Biochemistry.* 1994. V.216. P.235-236.
58. Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10, 1788–1795. doi:10.1101/gr.143000
59. Haun, R. S., Serventi, I. M., & Moss, J. (1992). Rapid, reliable ligation-independent cloning of PCR products using modified plasmid vectors. *BioTechniques*, 13(4), 515–518.
60. Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., & Galas, D. J. (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17, 6545–6551. doi:10.1093/nar/17.16.6545
61. Heyman, J. A., Cornthwaite, J., Foncerrada, L., Gilmore, J. R., Gontang, E., Hartman, K. J., ...

- Hoeffler, J. P. (1999). Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation. *Genome Research*, 9, 383–392. doi:10.1101/gr.9.4.383
62. Hill, R. E., & Eaton-Rye, J. J. (2014). Plasmid construction by SLIC or sequence and ligation-independent cloning. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 25–36. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_2
63. Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors // *Nucleic Acids Res.* 1991. V.19. P.1156.
64. Hong, S. G., Choi, J. Y., Pryor, B. M., & Lee, H. K. (2009). An efficient method to prepare PCR cloning vectors. *Mycobiology*, 37, 240–2. doi:10.4489/MYCO.2009.37.3.240
65. Horton, R. M., Raju, R., & Conti-Fine, B. M. (1997). A T-Linker Strategy for Modification and Directional Cloning of PCR Products. In B. A. White (Ed.), *PCR Cloning Protocols* (pp. 101–110). Humana Press.
66. Horton, R. M., Raju, R., & Conti-Fine, B. M. (2003). A T-Linker Strategy for Modification and Directional Cloning of PCR Products. In J. M. S. Bartlett & D. Stirling (Eds.), *PCR Protocols* (pp. 475–483). Humana Press.
67. Hou, J. (2002). Bioinformatics applications note. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(12), 1690–1691.
68. Hou, J., Liu, X., Zheng, Y., & Liu, J. (2008). An efficient cloning of DNA fragments by a method based on uracil-DNA glycosylase and endonuclease IV. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), 1196–1198. doi:10.1016/j.jbbm.2007.07.006
69. Hsiao, K. (1993). Exonuclease III induced ligase-free directional subcloning of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 21(23), 5528–5529.
70. Huang, W., Li, L., Myers, J. R., & Marth, G. T. (2012). ART: a next-generation sequencing read simulator. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(4), 593–4. doi:10.1093/bioinformatics/btr708
71. Ichihara Y, Kurosawa Y. Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products // *Gene.* 1993. V.130. P.153-154.
72. Ido, E., & Hayami, M. (1997). Construction of T-tailed vectors derived from a pUC plasmid: a rapid system for direct cloning of unmodified PCR products. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1766–1767. doi:10.1271/bbb.61.1766
73. Irwin, C. R., Farmer, A., Willer, D. O., & Evans, D. H. (2012). In-fusion® cloning with vaccinia virus DNA polymerase. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 890, pp. 23–35). doi:10.1007/978-1-61779-876-4_2
74. Ito Y, Suzuki M, Husimi Y. A T-extended vector using a green fluorescent protein as an indicator // *Gene.* 2000. V.245. P.59-63.
75. Iwahana, H., Tsujisawa, T., Katashima, R., Yoshimoto, K., & Itakura, M. (1994). PCR with end trimming and cassette ligation: a rapid method to clone exon-intron boundaries and a 5'-upstream sequence of genomic DNA based on a cDNA sequence. *PCR Methods and Applications*, 4, 19–25. doi:10.1101/gr.4.1.19
76. Iwahana, H., Yoshimoto, K., Tsujisawa, T., & Itakura, M. (1994). T-cassette ligation: a method for direct sequencing and cloning of PCR-amplified DNA fragments. *PCR Methods and Applications*, 3, 219–224. doi:10.1101/gr.3.4.219
77. Jeung, J. U., Cho, S. K., Shim, K. S., Ok, S. H., Lim, D. S., & Shin, J. S. (2002). Construction of two pGEM-7Zf(+) phagemid T-tail vectors using AhdI-restriction endonuclease sites for direct cloning of PCR products. *Plasmid*, 48, 160–163. doi:10.1016/S0147-619X(02)00122-1
78. Jo, C., & Jo, S. A. (2001). A simple method to construct T-vectors using XcmI cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid*, 45, 37–40. doi:10.1006/plas.2000.1500
79. Jung, V., Pestka, S. B., & Pestka, S. (1990). Efficient cloning of PCR generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6156.
80. Jung, V., Pestka, S. B., & Pestka, S. (1993). Cloning of polymerase chain reaction-generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. *Methods in Enzymology*, 218(1986), 357–362.
81. Kaluz, S., & Flint, A. P. (1994). Ligation-independent cloning of PCR products with primers containing nonbase residues. *Nucleic Acids Research*, 22, 4845.
82. Kaluz, S., Kolble, K., & Reid, K. B. (1992). Directional cloning of PCR products using exonuclease III. *Nucleic Acids Research*, 20(16), 4369–4370.
83. Kanungo, J., & Pandey, K. N. (1993). Kinasing PCR products for efficient blunt-end cloning and linker addition. *BioTechniques*, 14(6), 912–913.
84. Kaufman, D. L., & Evans, G. A. (1990). Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques*, 9(3), 304,306.
85. Khalil, A.-M., Julius, J. A., & Bachant, J. (2007). One step construction of PCR mutagenized libraries for genetic analysis by recombination cloning. *Nucleic Acids Research*, 35, e104. doi:10.1093/nar/gkm583
86. Kitabayashi, M., Nishiya, Y., & Esaka, M. (2003). A simple and efficient method for high fidelity PCR cloning using antibody-neutralizing technology. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 2034–

2037. doi:10.1271/bbb.67.2034

87. Klock, H. E., Koesema, E. J., Knuth, M. W., & Lesley, S. A. (2008). Combining the polymerase incomplete primer extension method for cloning and mutagenesis with microscreening to accelerate structural genomics efforts. *Proteins*, *71*, 982–994. doi:10.1002/prot.21786
88. Klock, H. E., & Lesley, S. A. (2009). The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *498*, 91–103. doi:10.1007/978-1-59745-196-3_6
89. Koesters, R., & Magnus von Knebel Doeberitz. (2002). Improved Blunt-End Cloning by Replacing. *BioTechniques*, *32*(6), 1244–1246.
90. Kovalic D1, Kwak JH, Weisblum B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction // *Nucleic Acids Res.* 1991. V.19. P.4560.
91. Kuijper, J. L., Wiren, K. M., Mathies, L. D., Gray, C. L., & Hagen, F. S. (1992). Functional cloning vectors for use in directional cDNA cloning using cohesive ends produced with T4 DNA polymerase. *Gene*, *112*, 147–155. doi:10.1016/0378-1119(92)90370-5
92. Kuzuya, A., Okada, F., & Komiyama, M. (2009). Precise site-selective termination of DNA replication by caging the 3-position of thymidine and its application to polymerase chain reaction. *Bioconjugate Chemistry*, *20*, 1924–1929. doi:10.1021/bc900254e
93. Kuzuya, A., Tanaka, K., Katada, H., & Komiyama, M. (2009). Restriction enzyme treatment/ligation independent cloning using caged primers for PCR. *Nucleic Acids Symposium Series (2004)*, *75–76*. doi:10.1093/nass/nrp038
94. Kuzuya, A., Tanaka, K., Katada, H., & Komiyama, M. (2011). Enzyme Treatment-Free and Ligation-Independent Cloning Using Caged Primers in Polymerase Chain Reactions. *Molecules*. doi:10.3390/molecules17010328
95. Kwak, J. H., & Kim, M. Y. (1995). Construction of T-vector for direct cloning and expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, *228*(1), 178–180. doi:10.1006/abio.1995.1335
96. Lan, D., Yan, H., Yang, B., & Wang, Y. (2011). Blunt-end vectors generated by polymerase chain reaction (PCR) for direct cloning of blunt-end DNA fragments. *African Journal of Biotechnology*, *10*(54), 11149–11151. doi:10.5897/AJB10.1369
97. Lazinski, D. W., & Camilli, A. (2013). Homopolymer tail-mediated ligation PCR: a streamlined and highly efficient method for DNA cloning and library construction. *BioTechniques*, *54*, 25–34. doi:10.2144/000113981
98. Li, C., & Evans, R. M. (1997). Ligation independent cloning irrespective of restriction site compatibility. *Nucleic Acids Research*, *25*, 4165–4166. doi:gka645 [pii]
99. Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y., & Chang, Y. (2011). FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnology*. doi:10.1186/1472-6750-11-92
100. Li, M. Z., & Elledge, S. J. (2007). Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods*, *4*, 251–256. doi:10.1038/nmeth1010
101. Li, Q. B., & Guy, C. L. (1996). Prolonged final extension time increases cloning efficiency of PCR products. *BioTechniques*, *21*(2), 192,196.
102. Li, W., & Gao, F. (2007). Creation of DNA overhangs by using modified DNA overhang cloning method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*, 703–709. doi:10.1007/s00253-007-0852-9
103. Liu, Q., Li, M. Z., Leibham, D., Cortez, D., & Elledge, S. J. (1998). The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Current Biology: CB*, *8*, 1300–1309. doi:10.1016/S0960-9822(07)00560-X
104. Liu, V. W., Nagley, P., & Ngan, H. Y. (2000). One-step directional cloning of blunt-ended polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry*, *287*(2), 349–52. doi:10.1006/abio.2000.4878
105. Liu, Y., Doring, J., & Hurek, T. (2012). Bias in topoisomerase (TOPO)-cloning of multitemplate PCR products using locked nucleic acid (LNA)-substituted primers. *Journal of Microbiological Methods*, pp. 483–486. doi:10.1016/j.mimet.2012.10.002
106. Liu, Z. (1996). Hetero-stagger cloning: efficient and rapid cloning of PCR products. *Nucleic Acids Research*, *24*(12), 2458–2459.
107. Liu, Z. G., & Schwartz, L. M. (1992). An efficient method for blunt-end ligation of PCR products. *BioTechniques*, *12*, 28, 30.
108. Lohff CJ, Cease KB. PCR using a thermostable polymerase with 3' to 5' exonuclease activity generates blunt products suitable for direct cloning // *Nucleic Acids Res.* 1992. V.20. P.144.
109. Lorens, J. B. (1991). Rapid and reliable cloning of PCR products. *Genome Research*, *1*(2), 140–141. doi:10.1101/gr.1.2.140
110. Luo, K., Harding, S. A., & Tsai, C.-J. (2008). A modified T-vector for simplified assembly of hairpin RNAi constructs. *Biotechnology Letters*, *30*, 1271–1274. doi:10.1007/s10529-008-9673-x
111. Magnuson, V. L., Ally, D. S., Nylund, S. J., Karanjawala, Z. E., Rayman, J. B., Knapp, J. I., ... Collins, F. S. (1996). Substrate nucleotide-determined

- non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. *BioTechniques*, 21, 700–709.
112. Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products // *Nucleic Acids Res.* 1991. V.19. P.1154.
113. Mcelroy, K. (2012). GemSIM User manual, (July), 1–10.
114. Mead, D. A., Pey, N. K., Herrnstadt, C., Marcil, R. A., & Smith, L. M. (1991). A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9, 657–663. doi:10.1038/nbt0791-657
115. Mitchell, D. B., Ruggli, N., & Tratschin, J. D. (1992). An improved method for cloning PCR fragments. *Genome Research*, 2(1), 81–82. doi:10.1101/gr.2.1.81
116. Mole, S. E., Iggo, R. D., & Lane, D. P. (1989). Using the polymerase chain reaction to modify expression plasmids for epitope mapping. *Nucleic Acids Research*, 17(8), 3319.
117. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263–273. doi:10.1101/SQB.1986.051.01.032
118. Newton, C. R., Holland, D., Heptinstall, L. E., Hodgson, I., Edge, M. D., Markham, A. F., & McLean, M. J. (1993). The production of PCR products with 5' single-stranded tails using primers that incorporate novel phosphoramidite intermediates. *Nucleic Acids Research*, 21(5), 1155–1162.
119. Nisson, P. E., Rashtchian, A., & Watkins, P. C. (1991). Rapid and efficient cloning of Alu-PCR products using uracil DNA glycosylase. *PCR Methods and Applications*, 1, 120–123. doi:10.1101/gr.1.2.120
120. Nørholm, M. H. H. (2010). A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnology*, 10, 21. doi:10.1186/1472-6750-10-21
121. Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Nørholm, M. H. H., Jensen, J. K., & Halkier, B. A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research*, 34, e122. doi:10.1093/nar/gkl635
122. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 21, 5192–5197.
123. Olsen, D. B., & Eckstein, F. (1989). Incomplete primer extension during in vitro DNA amplification catalyzed by Taq polymerase; exploitation for DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 17, 9613–9620.
124. Olsen, L. R., Hansen, N. B., Bonde, M. T., Genee, H. J., Holm, D. K., Carlsen, S., ... Wernersson, R. (2011). PHUSER (Primer Help for USER): a novel tool for USER fusion primer design. *Nucleic Acids Research*, 39, W61–W67. doi:10.1093/nar/gkr394
125. Padgett, K. A., & Sorge, J. A. (1996). Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene*, 168, 31–35. doi:10.1016/0378-1119(95)00731-8
126. Pan, J.-S., Zhang, Z.-P., Cai, J.-Y., Dong, J., Ren, J.-L., & Wang, X.-Z. (2010). Competitive priming PCR: a versatile method to generate cohesive terminus. *Molecular Biology Reports*, 37, 1421–1425. doi:10.1007/s11033-009-9527-1
127. Papp, T., Kirchner, S., Diener, U., Jafari, M., Golka, A., & Schiffman, D. (1995). Cloning of PCR fragments with a modified M13mp18 T-vector. *Trends in Genetics: TIG*, 11(5), 169.
128. Parent, J. L., Le Gouill, C., Rola-Pleszczynski, M., & Stanková, J. (1994). A highly efficient technique for cloning of refractory DNA fragments and polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry*, 220(2), 426–428.
129. Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Liu, J., Xu, F., Bin, C., Zhu, H., & Yao, Q.-H. (2007). Adenosine added on the primer 5' end improved TA cloning efficiency of polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry*, 363(1), 163–165. doi:10.1016/j.ab.2007.01.014
130. Pratas, D., Pinho, A. J., & Rodrigues, J. M. O. S. (2014). XS: a FASTQ read simulator. *BMC Research Notes*, 7, 40. doi:10.1186/1756-0500-7-40
131. Rabbani, H., Hammarstrom, L., Yu, S., Wen, S., Zhao, Y., & Liu, Z. (2009). Construction of a High Efficiency PCR Products Cloning T Vector Using pGEM-5zf (+). *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 1, 37–9.
132. Rashtchian, A. (1995). Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/0958-1669(95)80006-9
133. Rashtchian, A., Buchman, G. W., Schuster, D. M., & Berninger, M. S. (1992). Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of polymerase chain reaction- amplified DNA: Application to genomic and cDNA cloning. *Analytical Biochemistry*, 206, 91–97. doi:10.1016/S0003-2697(05)80015-6
134. Reisinger, C., Kern, A., Fesko, K., & Schwab, H. (2007). An efficient plasmid vector for expression cloning of large numbers of PCR fragments in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 241–244. doi:10.1007/s00253-007-1151-1
135. Roeder, T. (2000). Simple and Efficient Cloning of Small Polymerase Chain Reaction-

- Generated DNA Products. *Analytical Biochemistry*, 285(2), 278–280. doi:10.1006/abio.2000.4762
136. Sadowski, P. D. (2003). The Flp double cross system a simple efficient procedure for cloning DNA fragments. *BMC Biotechnology*, 3, 9. doi:10.1186/1472-6750-3-9
137. Sakaguchi, A. Y., Sedlak, M., Harris, J. M., & Sarosdy, M. F. (1996). Cautionary note on the use of dUMP-containing PCR primers with Pfu and VentR DNA polymerases. *BioTechniques*, 21(3), 368–370.
138. Salomonsen, B., Mortensen, U. H., & Halkier, B. A. (2014). USER-derived cloning methods and their primer design. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 59–72. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_5
139. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences // Science. 1986: V.233. P.1076-1078
140. Schatz, M. C. (2012). Computational thinking in the era of big data biology. *Genome Biology*, 13(11), 177. doi:10.1186/gb-2012-13-11-177
141. Schmid-Burgk, J. L., Xie, Z., & Benenson, Y. (2014). Hierarchical ligation-independent assembly of PCR fragments. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 49–58. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_4
142. Schutte, B. C., Ranade, K., Pruessner, J., & Dracopoli, N. (1997). Optimized conditions for cloning PCR products into an XcmI T-vector. *BioTechniques*, 22(1), 40–42,44.
143. Shuldiner, A. R., Scott, L. A., & Roth, J. (1990). PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products. *Nucleic Acids Research*, 18(7), 1920.
144. Shuldiner, A. R., Tanner, K., Scott, L. A., Moore, C. A., & Roth, J. (1991). Ligase-free subcloning: a versatile method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products in a single day. *Analytical Biochemistry*, 194, 9–15. doi:10.1016/0003-2697(91)90144-I
145. Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 32678–32684.
146. Silva, G. G., Dutilh, B. E., Matthews, T. D., Elkins, K., Schmieder, R., Dinsdale, E. a, & Edwards, R. a. (2013). Combining de novo and reference-guided assembly with scaffold_builder. *Source Code for Biology and Medicine*, 8(1), 23.
147. Skryabin, B., & Vassilacopoulou, D. (1993). A simple and fast method for cloning and analyzing polymerase chain reaction products. *Genetic Analysis, Techniques and Applications*, 10(5), 113–115.
148. Sleight, S. C., Bartley, B. A., Lieviant, J. A., & Sauro, H. M. (2010). In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Research*, 38, 2624–2636. doi:10.1093/nar/gkq179
149. Smith, C., Day, P. J., & Walker, M. R. (1993). Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. *PCR Methods and Applications*, 2, 328–332. doi:10.1101/gr.2.4.328
150. Smith, J. R., Carpten, J. D., Brownstein, M. J., Ghosh, S., Magnuson, V. L., Gilbert, D. A., ... Collins, F. S. (1995). Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Research*, 5, 312–317. doi:10.1101/gr.5.3.312
151. Spiliotis, M. (2012). Inverse fusion PCR cloning. *PLoS ONE*, 7. doi:10.1371/journal.pone.0035407
152. Stevenson, J., Krycer, J. R., Phan, L., & Brown, A. J. (2013). A practical comparison of ligation-independent cloning techniques. *PLoS ONE*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0083888
153. Stoker, A. W. (1990). Cloning of PCR products after defined cohesive termini are created with T4 DNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 18(14), 4290.
154. Su, V., & Hsu, B.-D. (2004). A simple and highly efficient cloning method that employs PCR to directly create a fusion between insert and vector. *Biochemical Genetics*, 42, 401–409.
155. Tachibana, A., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2007). SmaI cloning with regeneration of the SmaI site for sequential PCR product cloning. *Analytical Biochemistry*, 361(1), 143–5. doi:10.1016/j.ab.2006.10.044
156. Tachibana, A., Tohiguchi, K., Ueno, T., Setogawa, Y., Harada, A., & Tanabe, T. (2009). Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: Sequential T4 DNA polymerase treatments. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 668–669. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.01.019
157. Tanaka, K., Katada, H., Shigi, N., Kuzuya, A., & Komiyama, M. (2008a). Direct preparation of sticky-ended duplexes within PCR by using caged primers. *Nucleic Acids Symposium Series (2004)*, 467–468. doi:10.1093/nass/nrn237
158. Tanaka, K., Katada, H., Shigi, N., Kuzuya, A., & Komiyama, M. (2008b). Site-selective blocking of PCR by a caged nucleotide leading to direct creation of desired sticky ends in the products. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 9, 2120–2126. doi:10.1002/cbic.200800285
159. Temesgen, B., & Eschrich, K. (1996). Simplified method for ligase-free cloning of PCR products. *BioTechniques*, 21(5), 828, 830, 832.
160. Testori A, Sollitti P. Cloning unmodified PCR products using engineered XcmI restriction sites in a portable cassette // Methods Mol Biol. 1997. V.67. P.89-100.

161. Testori A, Listowsky I, Sollitti P. Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site // *Gene*. 1994. V.143. P.151-152.
162. Thieme, F., Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2011). Quick and clean cloning: A ligation-independent cloning strategy for selective cloning of specific PCR products from non-specific mixes. *PLoS ONE*, 6. doi:10.1371/journal.pone.0020556
163. Thieme, F., & Marillonnet, S. (2014). Quick and clean cloning. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 37–48. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_3
164. Tian, L., Sayer, J. M., Jerina, D. M., & Shuman, S. (2004). Individual nucleotide bases, not base pairs, are critical for triggering site-specific DNA cleavage by vaccinia topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 39718–39726. doi:10.1074/jbc.M407376200
165. Tillett, D., & Neilan, B. A. (1999). Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites. *Nucleic Acids Research*, 27, e26. doi:10.1093/nar/27.19.e26
166. Trower, M. K., & Elgar, G. S. (1994). PCR cloning using T-vectors. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 31, 19–33. doi:10.1385/0-89603-258-2:19
167. Tsang, T. C., Harris, D. T., Akporiaye, E. T., Schluter, S. F., Bowden, G. T., & Hersh, E. M. (1996). Simple method for adapting DNA fragments and PCR products to all of the commonly used restriction sites. *BioTechniques*, 20(1), 51–52.
168. Tseng, H. (1999). DNA cloning without restriction enzyme and ligase. *BioTechniques*, 27, 1240–1244.
169. Ulrich A, Andersen KR, Schwartz TU. Exponential megaprimer PCR (EMP) cloning--seamless DNA insertion into any target plasmid without sequence constraints // *PLoS One*. 2012. V.7. e53360.
170. Ukai, H., Ukai-Tadenuma, M., Ogiu, T., & Tsuji, H. (2002). A new technique to prevent self-ligation of DNA. *Journal of Biotechnology*, 97, 233–242. doi:10.1016/S0168-1656(02)00107-4
171. Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., & Peleg, Y. (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology*, 172, 34–44. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.016
172. Van Den Ent, F., & L??we, J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67, 67–74. doi:10.1016/j.jbbm.2005.12.008
173. Walker, A., Taylor, J., Rowe, D., & Summers, D. (2008). A method for generating sticky-end PCR products which facilitates unidirectional cloning and the one-step assembly of complex DNA constructs. *Plasmid*, 59, 155–162. doi:10.1016/j.plasmid.2008.02.002
174. Wang K. Using T4 DNA polymerase to generate clonable PCR products // *Methods Mol. Biol.* 2003. V.226. P.469-474.
175. Wang K. Using T4 DNA polymerase to generate clonable PCR products // *Methods Mol Biol.* 2002. V.192. P.121-124.
176. Wang K. Using T4 DNA polymerase to generate clonable PCR products // *Methods Mol Biol.* 1997. V.67. P.63-68.
177. Wang, B., Liang, H., Liu, R., Li, X., Sun, B., Zhang, R., ... Dai, C. (2007). Construction of a restriction-endonuclease-Eam1105I-generated T-vector for high-throughput cloning and expression. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 48(Pt 1), 29–33. doi:10.1042/BA20070033
178. Watson, D. E., & Bennett, G. N. (1997). Cloning and assembly of PCR products using modified primers and DNA repair enzymes. *BioTechniques* (Vol. 23, pp. 858–862, 864).
179. Weiner, M. P. (1993). Directional cloning of blunt-ended PCR products. *BioTechniques*, 15(3), 502–505.
180. Welsh, J., Liu, J. P., & Efstratiadis, A. (1990). Cloning of PCR-amplified total cDNA: construction of a mouse oocyte cDNA library. *Genetic Analysis, Techniques and Applications*, 7, 5–17. doi:10.1016/0735-0651(90)90038-H
181. Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J., & Wallace, R. B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA and Cell Biology*, 10(3), 233–8.
182. Wu, Q., Zhong, X., Zhai, C., Yang, J., Chen, X., Chen, L., ... Ma, L. (2010). A series of novel directional cloning and expression vectors for blunt-end ligation of PCR products. *Biotechnology Letters*, 32, 439–443. doi:10.1007/s10529-009-0166-3
183. Xiao, J.-H., Xin, W., Liu, Y.-J., Murphy, R. W., & Huang, D.-W. (2007). Generation of linear expression constructs by one-step PCR with vaccinia DNA topoisomerase I. *Molecular Biotechnology*, 35, 15–22. doi:10.1385/MB:35:1:15
184. Xuejun, H., Zhichao, Z., Yongming, B., Qing, Y., & Lijia, A. (2002). An expeditious method for constructing T-vectors using Eam 1105 I cassettes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(2), 189. doi:10.1007/BF02799435
185. Yamabhai, M. (2009). Sticky PCR: A PCR-based protocol for targeted protein engineering. *Biotechnology Journal*, 4, 544–553.

doi:10.1002/biot.200800198

186. Yang, J., Zhang, Z., Zhang, X. A., & Luo, Q. (2010). A ligation-independent cloning method using nicking DNA endonuclease. *BioTechniques*, 49, 817–821. doi:10.2144/000113520

187. Yang YS, Watson WJ, Tucker PW, Capra JD. Construction of recombinant DNA by exonuclease recession // *Nucleic Acids Res.* 1993. V.21. P.1889–1893.

188. Zeng, G. (1998). Sticky-end PCR: new method for subcloning. *BioTechniques*, 25(2), 206–208.

189. Zeng, Q., Eidsness, M. K., & Summers, A. O. (1997). Near-zero background cloning of PCR products. *BioTechniques*, 23(3), 412–414,416,418.

190. Zhang, Y., Muylers, J. P., Testa, G., & Stewart, A. F. (2000). DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 18, 1314–1317. doi:10.1038/82449

191. Zhang, Y., Werling, U., & Edelman, W. (2012). SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Research*, 40, e55. doi:10.1093/nar/gkr1288

192. Zhang, Y., Werling, U., & Edelman, W. (2014). Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) cloning method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1116, 235–244. doi:10.1007/978-1-62703-764-8_16

193. Zheng, D., Liu, X., & Zhou, Y. (2008). 3GC cloning: PCR products cloning mediated by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Analytical Biochemistry*, 378, 108–110. doi:10.1016/j.ab.2008.03.053

194. Zhou, M., & Hatahet, Z. (1995). An improved ligase-free method for directional subcloning of PCR amplified DNA. *Nucleic Acids Research*, 23(6), 1089–1090.

195. Zhou, M. Y., Clark, S. E., & Gomez-Sanchez, C. E. (1995). Universal cloning method by TA strategy. *BioTechniques*, 19(1), 34–35.

196. Zhou, M. Y., & Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. *Current Issues in Molecular Biology*, 2, 1–7.

197. Zhu, B., Cai, G., Hall, E. O., & Freeman, G. J. (2007). In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques*, 43, 354–359. doi:10.2144/000112536

198. Zimmer, W. (1993). Efficient cloning of fragments of the polymerase chain reaction directly into the single stranded bacteriophage M13mp18. *Nucleic Acids Research*, 21(3), 773–774.

199. Zimmermann, K., Schögl, D., & Mannhalter, J. W. (1998). Digestion of terminal restriction endonuclease recognition sites on PCR products. *BioTechniques*, 24(4), 582–4.

DIVERSITY OF THE METHODS FOR PCR PRODUCTS MOLECULAR CLONING

Chemeris A.V., Chemeris D.A., Nikonorov Yu.M., Gimalov F.R., Vakhitov V.A.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa

Resume

Various methods of PCR products cloning are described, including the quite exotic. Review is carried out for a large number of the methodical experimental works devoted to amplicon cloning in phage and plasmid vectors. All existing methods of the amplicon cloning can be subdivided into several groups, differs by blunt or sticky ends cloning, A/T-ligation and recombination. Each such approach is realized by multiple ways, differing by DNA ligase using, directed and non-directed inserts, etc. Advantages and shortcomings of the main methods are briefly considered.

Keywords: PCR, amplicon, DNA polymerase, cloning, vector, T-vector, DNA ligase, topoisomerase, recombination