

На правах рукописи

ОСКОРБИН ИГОРЬ ПЕТРОВИЧ

КЛОНИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ХИМЕРНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ НА ОСНОВЕ БОЛЬШОГО ФРАГМЕНТА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I *GEOVACILLUS* SP. 777 И ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ДНК-ЛИГАЗЫ *PYROCOCCLUS ABYSSI*, ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *SULFOLOBUS TOKODAI*

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: **Филипенко Максим Леонидович**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Горчаков Андрей Александрович**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, с.н.с.

Лунин Владимир Глебович, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, заведующий группой

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится «16» ноября 2018 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

 Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изотермическая амплификация ДНК (амплификация при постоянной температуре) является быстро развивающейся группой методов современной биотехнологии. Первые методы изотермической амплификации были разработаны в конце 80-х – начале 90-х гг. Предпосылкой для развития изотермической амплификации стала потребность в методах амплификации ДНК, позволяющих обходиться без специальных приборов. Это важно как для уменьшения стоимости амплификации, так и для создания миниатюрных диагностических экспресс-тестов. Кроме того, имеется ряд важных практических приложений, для осуществления которых традиционный метод амплификации ДНК – ПЦР, является малоэффективным. К таким задачам относятся детекция единичных молекул ДНК и полногеномная амплификация.

Изотермичность может достигаться за счет использования ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью. Такие полимеразы синтезируют новую цепь ДНК, вытесняя при этом уже существующую в 5'-3' направлении, в связи с чем исчезает необходимость в дополнительном этапе термической денатурации двуцепочечной молекулы ДНК. К числу наиболее широко используемых ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью относится большой фрагмент (БФ) ДНК-полимеразы I, выделенной из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* - БФ *Bst*-полимеразы. Однако для проведения изотермической амплификации (в особенности для диагностических целей) сохраняется потребность в более устойчивых ингибиторам и процессивных ДНК-полимеразах.

Ранее было показано, что химерные ферменты, состоящие из ДНК-полимеразного и ДНК-связывающего модулей, обладают повышенной процессивностью и устойчивостью к высоким концентрациям солей. Вместе с тем, подобные химерные ферменты на основе БФ *Bst*-полимеразы или его аналогов в литературе до настоящего момента описаны не были. Таким образом, присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов к БФ *Bst*-полимеразы или аналогичным белкам представляется перспективным с точки зрения получения ферментов с улучшенными свойствами.

Цель настоящей работы – получение набора химерных ферментов на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp.* 777 и ДНК-связывающих белков (ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d *Sulfolobus tokodaii*), характеристика их биохимических свойств и использование в практических приложениях: изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Клонирование и характеристика биохимических свойств большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp.* 777, его

- сравнение с коммерческими ферментами в изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.
2. Определение оптимального флуоресцентного красителя для детекции результатов изотермической петлевой амплификации в реальном времени.
 3. Клонирование и характеристика биохимических свойств ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi*.
 4. Клонирование и характеристика биохимических свойств химерных ферментов на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и ДНК-связывающих белков (ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* или Sto7d *Sulfolobus tokodaii*), их использование в изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Научная новизна работы. В рамках работы:

показано, что добавление ДНК-связывающих белков может нивелировать ингибирующий эффект гепарина на ПЦР; подобран оптимальный краситель для изотермической петлевой амплификации в реальном времени; создан химерный фермент на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и белка Sto7d *Sulfolobus tokodaii* с повышенной процессивностью. Впервые показана повышенная устойчивость химерной ДНК-полимеразы к ингибиторам амплификации.

Теоретическая и практическая значимость работы. Подобранный оптимальный флуоресцентный краситель для изотермической петлевой амплификации позволит повысить эффективность детекции результатов амплификации за счёт меньшего ингибирования реакции красителем. Химерный фермент на основе большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp. 777* и белка Sto7d *Sulfolobus tokodaii* позволяет повысить устойчивость изотермической петлевой амплификации к ингибиторам и эффективность полногеномной амплификации.

Методология и методы исследования. В работе применялись стандартные методы геной инженерии, очистки белков, методы характеристики биохимических свойств белков, ПЦР в реальном времени, полногеномная амплификация и изотермическая петлевая амплификация в реальном времени.

Положения, выносимые на защиту.

1. Показано, что химерные ДНК-полимеразы на основе БФ ДНК-полимеразы I бактерии *Geobacillus sp. 777* и ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы археи *Pyrococcus abyssi* или ДНК-связывающего белка археи *Sulfolobus tokodaii* не отличаются от исходной ДНК-полимеразы по термостабильности, сохраняют ДНК-полимеразную активность, терминально-трансферазную активность, способность к

вытеснению цепи и степень субстратной селективности при синтезе ДНК. Вместе с тем, химерные ДНК-полимеразы отличаются повышенной эффективностью связывания ДНК и процессивностью.

2. Показано, что химерные ферменты обладают повышенной эффективностью в реакции полногеномной амплификации ДНК и обладают большей устойчивостью к ингибиторам в реакции изотермической петлевой амплификации.

Публикации и апробация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные положения работы представлены на VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Москва, 2017), материалы которого индексируются в базах данных Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора. Все результаты, приведённые в настоящей работе, получены самим автором либо при его непосредственном участии.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка процитированной литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 35 рисунков и 13 таблиц. Список процитированной литературы включает 209 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.1 Клонирование и очистка ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы археи *Pyrococcus abyssi*

Ранее было показано, что ДНК-связывающие белки, в том числе ДНК-лигазы *Thermus aquaticus* и *Thermus thermophilus*, способны повышать эффективность протяженной ПЦР [Ignatov, Kramarov, 2009]. Для объяснения эффекта ДНК-лигаз на протяжённую ПЦР нами была выдвинута гипотеза, согласно которой значимым фактором является не наличие лигазной активности у фермента, а его способностью связывать ДНК. Для проверки этого предположения нами был клонирован и охарактеризован ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы термофильной археи *Pyrococcus abyssi* (именуемый в дальнейшем DBD).

Границы ДНК-связывающего домена (DBD) определяли, используя 3D-модель ДНК-лигазы *P. furiosus*, границы DBD были определены как 1-238 а.о. из 559 а.о., составляющих ДНК-лигазу. Для учёта возможного влияния 6×His на свойства DBD, последний клонировали рестриктазно-лигазным методом так, что гистидиновый гексапептид располагался на разных концах рекомбинантных белков: на N- или C-конце (варианты His-DBD и DBD-His). Рекомбинантные варианты DBD нарабатывали в штаммах *E. coli* XL10-Gold (His-DBD) и BL21 (DE3) pLysS (DBD-His) и очищали с помощью аффинной

металл-хелатной хроматографии до электрофоретической чистоты около 95%.

1.2 Связывание с ДНК DBD и его влияние на протяженную ПЦР

Способность вариантов DBD связываться с ДНК была изучена с помощью гель-ретардации комплексов белок-ДНК в акриламидном геле (Рисунок 1). Из представленных данных следует, что His-DBD связывает дцДНК менее эффективно, чем DBD-His. Кроме того, комплексы дцДНК-His-DBD были менее стабильны в условиях эксперимента, о чем свидетельствует размытость соответствующих полос. DBD-His и нативная ДНК-лигаза связывали дцДНК с одинаковой эффективностью.

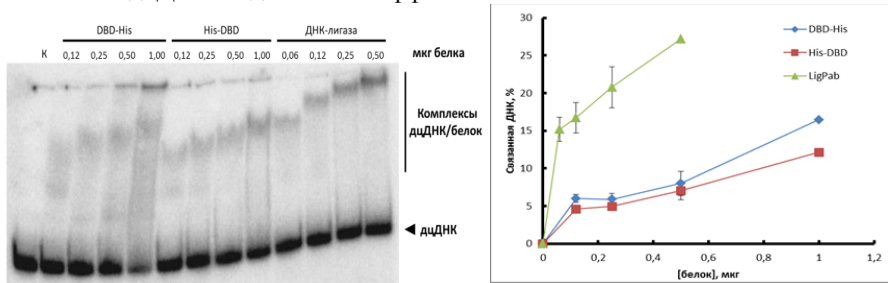


Рисунок 1. Электрофореграмма гель-ретардации вариантов DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi* с дцДНК. Связывание с дцДНК (1 нг на реакцию) проводилось при 70°C, после чего реакционные смеси анализировались с помощью гель-электрофореза в 5 %-м акриламидном геле. График отражает результаты анализа эффективности связывания DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi* с оцДНК. Связывание с оцДНК (300 пг на реакцию) проводилось при 70°C, после чего реакционные смеси анализировались с помощью гель-электрофореза в 5 %-м акриламидном геле.

Напротив, с одноцепочечной ДНК оба варианта DBD связывались с практически одинаковой эффективностью. Вместе с тем, нативная ДНК-лигаза *P. abyssi* по аффинности связывания с оцДНК превзошла как His-DBD, так и DBD-His.

Для оценки влияния температуры на эффективность связывания температуру варьировали в пределах от 40 до 80°C. Связывание всех изученных белков с ДНК становилось менее эффективным по мере роста температуры. Наиболее выраженным этот эффект был для His-DBD.

Термостабильность вариантов DBD оценивалась по их способности связывать ДНК после при 95°C. Способность DBD связывать ДНК снижалась после двух минут, в то время как нативная ДНК-лигаза сохраняла эту способность после десяти минут инкубации, демонстрируя более высокую термостабильность.

Известно, что ДНК-связывающие белки способны повышать эффективность протяженной ПЦР, хотя точный механизм этого явления остается неизвестным. Для проверки влияния DBD на ПЦР, был выбран DBD-His, показавший более высокую степень связывания ДНК и термостабильность по сравнению с His-DBD. ПЦР проводили по матрице геномной ДНК фага λ (

Рисунок 2). Добавление DBD значительно увеличивало эффективность ПЦР, в результате чего возрастало количество продукта реакции.

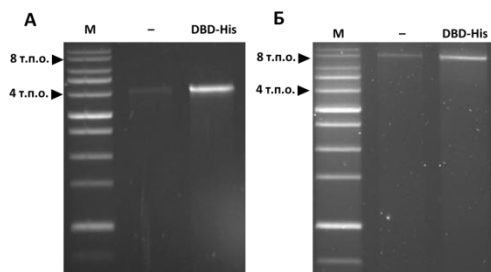


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов протяженной ПЦР с и без добавления DBD-His (0,5 нг на реакцию). А – ампликон длиной 4 т.п.о., Б – ампликон длиной 8 т.п.о.

Неожиданный побочный эффект добавления DBD в реакционную смесь ПЦР – его способность нивелировать ингибирующий эффект гепарина (Таблица 1). Гепарин, являющийся полисахаридом, способен действовать как конкурентный ингибитор ПЦР, связываясь с ДНК-полимеразой.

Таблица 1 - Влияние DBD-His на эффективность ПЦР в реальном времени с добавлением гепарина

DBD-His, нг/реакцию	Cq, циклы		
	Гепарин, е.а./реакцию		
	9×10^{-3} е.а.	3×10^{-3} е.а.	9×10^{-3} е.а.
300 нг	$42,6 \pm 0,3$	$24,2 \pm 0,1$	$24,2 \pm 0,1$
100 нг	Н/А*	$25,4 \pm 0,1$	$24,0 \pm 0,1$
33,3 нг	Н/А	$32,5 \pm 0,4$	$24,2 \pm 0,2$
11,1 нг	Н/А	$38,3 \pm 0,3$	$23,9 \pm 0,1$
3,33 нг	Н/А	$40,4 \pm 0,1$	$23,9 \pm 0,1$
0 нг	Н/А	$40,6 \pm 0,6$	$24,1 \pm 0,1$

* Н/А – нет амплификации.

Следует отметить, что полученные результаты противоречат ранее показанной низкой термостабильности DBD. Известно, что АТФ-зависимые ДНК-лигазы, к которым относится и ДНК-лигаза *P. abyssi*, при формировании комплекса с ДНК опоясывают последнюю, и в этом взаимодействии участвует олигонуклеотид-связывающий домен [Tanabe и др., 2012]. Основываясь на этих фактах и наших наблюдениях, можно

предположить, что индивидуальный DBD не является устойчивым к действию высоких температур и стабилизируется взаимодействием с ДНК и/или с другими доменами ДНК-лигазы.

Подводя итог, мы показали пригодность DBD для улучшения протяженной ПЦР, подтвердив тем самым первоначальную гипотезу об улучшении протяженной ПЦР термостабильной ДНК-лигазой *P. abyssi*. Кроме того, была установлена способность DBD нивелировать ингибирование ПЦР гепарином.

1.3 Определение филогенетического положения штамма 777 и секвенирование гена Gss-полимеразы

В связи с развитием методов диагностики у постели больного (анализ образцов, не прошедших многостадийной очистки в условиях стационарных лабораторий) сохраняется потребность в ДНК-полимеразах, способных работать в субоптимальных условиях, в том числе в присутствии ингибиторов. Одним из методов, применяемых для диагностики у постели больного, является LAMP (loop-mediated isothermal amplification, изотермическая петлевая амплификация). Для проведения LAMP требуется ДНК-полимераза с цепь-вытесняющей активностью, наиболее широко для LAMP используется БФ *Bst*-полимеразы.

Перспективным способом получения новых ферментов является их выделение из организмов, обитающих в агрессивной среде. В настоящей работе был клонирован и охарактеризован аналог БФ *Bst*-полимеразы из *Geobacillus* sp. 777, БФ Gss-полимеразы. Изолят мезофильных бактерий 777 был ранее получен в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» путем высевания на агаризованную среду смывов с осадка портвейна и культивации при 60°C. Установление филогенетической принадлежности изолята 777 производилось с помощью молекулярных методов по гомологии нуклеотидных последовательностей консервативных генов. По гомологии 16S рРНК полученный изолят близок к нескольким видам рода *Geobacillus* (*G. sp.* GHN01, *G. sp.* Y412MC52, *G. sp.* C56-T3); для *rpoB* и *spo0A* наибольшая гомология была показана с неохарактеризованными бактериями р. *Geobacillus* (*rpoB* – *G. sp.* GHN01, *G. sp.* Y412MC52, *G. sp.* C56-T3; *spo0A* – *G. sp.* Y412MC52, *G. sp.* Y412MC61, *G. sp.* C56-T3). Исходя из этих данных, можно заключить, что изолят 777 относится к мезофильным бактериям рода *Geobacillus* (отдел *Firmicutes*, класс *Bacillis*, порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*) и наиболее близок к неохарактеризованным изолятам этого рода. В последующем изолят 777 будет обозначаться как *Geobacillus* sp. 777.

Нуклеотидная (и аминокислотная) последовательность гена ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 (Gss-полимеразы) была неизвестна и установлена с помощью секвенирования. Гомология аминокислотной последовательности Gss-полимеразы с БФ *Bst*-полимеразы – 79 %, БФ *Bsm*-полимеразы – 94 %, ДНК-полимеразой I *G. thermoleovorans* – 100 %. С

неохарактеризованными представителями рода *Geobacillus* гомология составляла: *Geobacillus* sp. C56-T3 – 100%, *Geobacillus* sp. Y412MC61 – 99%.

1.4 Клонирование большого фрагмента Gss-полимеразы и сравнение его свойств с коммерческими ферментами

Кодирующую последовательность БФ Gss-полимеразы клонировали рестриктазно-лигазным методом в вектор для экспрессии pQE30 таким образом, что на N-конце рекомбинантного белка присутствовал гистидиновый гексапептид. Рекомбинантный БФ Gss-полимеразы был наработан в клетках *E. coli* штамма XL10-Gold и очищен с помощью металл-хелатной хроматографии. После очистки биохимические характеристики БФ Gss-полимеразы были сопоставлены с доступными коммерческими аналогами – большими фрагментами *Bst*-полимеразы (New England Biolabs, США) и *Bsm*-полимеразы (Lucigen, США). Для этого была оценена удельная активность ферментов, их термостабильность, зависимость их активности от температуры и концентрации моно- и дивалентных ионов. Во всех случаях полимеразную активность оценивали по включению радиоактивного изотопа [α - 32 P] дАТФ в активированную ДНК тимуса теленка.

Удельная активность БФ Gss-полимеразы близка к таковой других ДНК-полимераз I бактерий родов *Bacillus* и *Geobacillus*, составляя $1,04 \pm 0,05 \times 10^5$ е.а./мг белка. Оптимум температуры всех трех изученных ферментов находился в диапазоне 60-65°C, что хорошо согласуется с литературными данными. Кроме того, не было выявлено значимых различий по оптимальным концентрациям моно- и дивалентных ионов. Такие отличия были отмечены для оптимального pH – 8,0 для БФ Gss-полимеразы и 8,5 для БФ *Bst*/*Bsm*-полимераз, а также по термостабильности. По последнему параметру БФ Gss- и *Bst*-полимераз не отличались между собой, в то время как термостабильность БФ *Bsm*-полимеразы была значимо меньше. По всей видимости, это объясняется различной оптимальной температурой роста штаммов-хозяев: *G. stearothermophilus* и *G. sp* 777 – облигатные термофилы [Dinsdale и др., 2011], *Bacillus smithii* – факультативный термофил [Nakamura, Blumenstock, Claus, 1988].

После оценки биохимических свойств была проверена пригодность БФ Gss-полимеразы для практического применения. В частности, БФ Gss-полимеразы использовали для проведения LAMP в режиме реального времени (quantitative LAMP, qLAMP) и полногеномной амплификации (ПГА) и сравнили результаты с коммерческими ферментами.

На первом этапе сравнения эффективности ферментов в LAMP варьировали количество фермента в реакции. Эффективность работы ферментов оценивали по параметру T_t – time-to-threshold, время до пересечения кривой накопления продукта амплификации порогового значения; T_t и эффективность работы фермента находятся в обратной

зависимости. Наибольшую эффективность продемонстрировали 4 е.а. БФ *Bst*- и *Gss* и 12 е.а. *Bsm*-полимераз. При этом значения T_t для БФ *Bst*- и *Bsm*-полимераз были меньше таковых для БФ *Gss*-полимеразы.

Чувствительность LAMP с разными ферментами была определена путём титрования матрицы (ДНК фага лямбды) в реакции LAMP. БФ *Bst*- и *Gss*-полимераз продемонстрировали сходную способность детектировать присутствие матрицы, в то время как БФ *Bsm*-полимеразы менее эффективно катализировал LAMP в присутствии матрицы в количестве менее 10^3 копий на реакцию.

Дополнительно была оценена устойчивость ДНК-полимераз к действию ингибиторов LAMP: SYBR Green I, гепарину, этанолу, плазме крови человека, цельной крови человека, мочеvine, NaCl и ЭДТА. SYBR Green I, являясь распространённым интеркалирующим красителем, известен как ингибитор ПЦР [Gudnason и др., 2007]. Компоненты цельной крови и плазмы крови, такие как гем, IgG, трансферрин, вещества, используемые при процедурах очистки нуклеиновых кислот – мочеvine, этанол, ЭДТА, NaCl – могут ингибировать работу ДНК-полимераз [Francois и др., 2011].

БФ *Bst*- и *Gss* полимераз сохраняли активность в присутствии 4 мкМ SYBR Green I, в то время как БФ *Bsm*-полимеразы терял активность. БФ *Gss*-полимеразы показал наибольшую устойчивость к действию гепарина, этанола, мочеvine и плазме крови человека; БФ *Bsm*-полимеразы был наиболее восприимчив к ним. Напротив, БФ *Bsm*-полимеразы был наиболее устойчив к NaCl и ЭДТА; к действию цельной крови все ферменты продемонстрировали одинаковую устойчивость.

Кроме LAMP, БФ *Gss*-полимеразы вместе с коммерческими аналогами были использованы для проведения ПГА геномной ДНК человека. Количество продуктов ПГА оценивали по 7 локусам, представленным в геноме человека в единственной копии, с помощью ПЦР в реальном времени. Степень амплификации рассчитывалась для каждого локуса как отношение количества копий локуса после и до ПГА. БФ *Gss*-полимеразы показал наибольшую степень амплификации по четырём локусам, БФ *Bst*- и *Bsm*-полимераз для двух локусов, БФ *Gss*- и *Bst*-полимераз для одного локуса. Однако все ферменты продемонстрировали сравнительно высокое смещение после амплификации: БФ *Gss*-полимеразы – 6,9 (*IL10/MET*), БФ *Bst*-полимеразы – 5,3 (*IL10/BDNF*), БФ *Bsm*-полимеразы – 4,6 (*IL10/MET*). Наибольшее возмущение в полученные результаты по смещению после ПГА вносят данные по *IL10*, без них величина смещения уменьшается: БФ *Gss*-полимеразы – 4,0 (*ADIPOQ/MET*), БФ *Bst*-полимеразы – 3,1 (*ADIPOQ/BDNF*), БФ *Bsm*-полимеразы – 2,9 (*ADIPOQ/MET*). Причина этих различий остаётся невыясненной.

Таким образом, было установлено, что термостабильность, оптимальные концентрации ионов и pH БФ *Gss*-полимеразы не отличаются

от таковых для БФ *Bst*-полимеразы; БФ *Gss*-полимеразы пригоден для проведения полногеномной амплификации. Вместе с тем, БФ *Gss*-полимеразы показал более высокую устойчивость к ингибиторам амплификации (гепарину, этанолу, мочеvine и плазме крови человека).

1.5 Выбор оптимального красителя для проведения изотермической петлевой амплификации в реальном времени

При сравнении эффективности ДНК-полимераз в LAMP выяснилось, что интеркалирующий краситель SYBR Green I мало подходит для LAMP в силу малого разгорания и сильного ингибирования реакции. Поэтому было решено сравнить различные интеркалирующие красители и выбрать наиболее подходящий для изотермической петлевой амплификации.

Для работы были использованы интеркалирующие красители, ранее уже применявшиеся для LAMP в реальном времени: SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82. Красители сравнивали по двум показателям: пороговому времени T_t (time-to-threshold) и отношению сигнал/шум (ОСШ). В настоящей работе ОСШ рассчитывалось как отношение интенсивности флуоресценции в реакциях, содержащих матрицу, и контролях без матрицы после окончания амплификации. Оценку эффективности красителей в qLAMP проводили на трех модельных системах: фаг лямбда, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), *E. coli*.

Исследованные красители могут быть разделены на три группы по степени ингибирования: SYBR Gold как наиболее сильный ингибитор, SYBR Green I, EvaGreen и SYTO-13 как умеренные ингибиторы, SYTO-9, SYTO-82 как наиболее слабые ингибиторы. SYTO-82 продемонстрировал лучшие результаты по ОСШ, SYTO-9 находился на втором месте, SYTO-13 и EvaGreen показали промежуточные результаты, SYBR Green I и SYBR Gold – наименьшие ОСШ. Таким образом, среди использованных красителей наиболее подходящим для qLAMP был SYTO-82; SYTO-9 также оказывал минимальное ингибирующее действие, однако его ОСШ было значительно ниже. Следует отметить, что SYTO-13 в условиях эксперимента был нестабилен и выпадал в осадок после нескольких циклов замораживания-размораживания.

Степень ингибирования qLAMP красителями оценивали также по минимальному количеству фермента, необходимому для проведения qLAMP с каждым конкретным красителем. Титрование БФ *Bst*-полимеразы в qLAMP показало, что выбранные флуоресцентные красители пригодны для использования с малым количеством фермента (Рисунок 3). Единственным исключением был SYBR Gold, который полностью ингибировал qLAMP при содержании фермента менее 0,5 е.а. на реакцию. Остальные красители могут использоваться для qLAMP при содержании фермента до 0,125 е.а. на

реакцию.

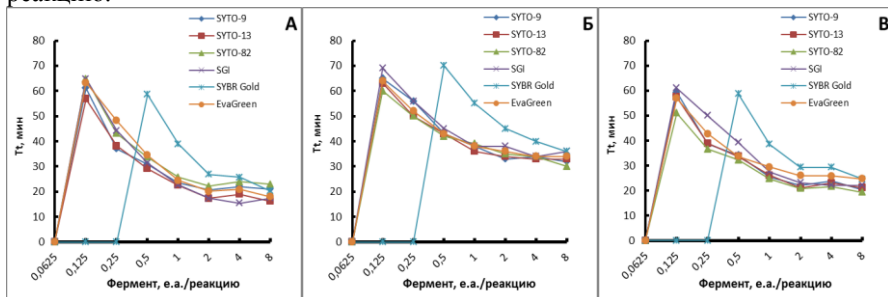


Рисунок 3. Титрование БФ *Bst*-полимеразы с флуоресцентными красителями: А – ДНК фага лямбда, Б – *E. coli*, В – ВКЭ. На диаграммах представлены графики зависимости Tt от количества фермента в реакции. Концентрация флуоресцентных красителей в qLAMP – 1 мкМ.

По мнению Гуднасона с соавторами [Gudnason и др., 2007] ингибирование амплификации флуоресцентными красителями напрямую связано с аффинностью последних к нуклеиновым кислотам. Так, SYBR Green I и SYBR Gold связываются с ДНК с высокой аффинностью, в то время как красители серии SYTO – со сравнительно низкой. Дополнительным подтверждением этой гипотезы служит продемонстрированное меньшая аффинность связывания с ДНК и меньшее ингибирование ПЦР EvaGreen по сравнению с SYBR Green I [Mao, Leung, Xin, 2007]. Установленное в настоящей работе меньшее ингибирование LAMP красителями SYTO также согласуется с этими данными.

На следующем этапе проводили титрование матрицы в qLAMP с двумя красителями, показавшими наилучшие результаты, SYTO-9 и SYTO-82. Оба красителя позволили выявлять не менее пяти копий матрицы. **Ошибка! Источник ссылки не найден..** Зависимость Tt от количества копий матрицы в реакции была линейной до 5 копий в случае ДНК фага лямбда и 10^3 копий – для геномной ДНК *E. coli* и ДНК ВКЭ. Таким образом, было установлено, что из шести красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen) оптимальными для проведения qLAMP являются SYTO-9 и SYTO-82, при этом последний показал большее ОСШ.

1.6 Клонирование и очистка химерных ДНК-полимераз на основе БФ *Gss*-полимеразы

Ранее было установлено, что присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов или белков может увеличивать у ДНК-полимераз процессивность и устойчивость к высоким концентрациям солей [Wang и др., 2004]. Однако подобные химерные ферменты не были описаны для БФ *Bst*-

полимеразы и его аналогов. В настоящей работе клонирован и охарактеризован набор химерных ДНК-полимераз на основе БФ Gss-полимеразы и белка Sto7d, аналога Sso7d из *S. tokodaii*, ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi*. Таким образом впервые созданы и охарактеризованы химерные ферменты на основе аналога Bst-полимеразы:

Gss-His с 6×His на С-конце БФ Gss-полимеразы;

Gss - БФ Gss-полимеразы без дополнительных доменов;

DBD-Gss и Gss-DBD – DBD на N- или С-конце;

Sto7d-Gss и Gss-Sto7d – Sto7d на N- или С-конце

Известно, что Sto7d обладает РНКазной активностью [Shehi и др., 2001]. Поскольку БФ Gss-полимеразы может использоваться для детекции РНК-содержащих вирусов (в том числе с помощью RT-LAMP), для сохранения у химерных ферментов возможности работы с РНК в кодирующую последовательность Sto7d ввели две мутации: K12L и E35L, приводящих к полной потере РНКазной активности [Shehi и др., 2001]. Клонированные ферменты наработали в *E. coli* и очистили с помощью аффинной и ионообменной хроматографий.

1.7 Биохимические свойства химерных ДНК-полимераз

1.7.1 Термостабильность

Для оценки термостабильности использовали дифференциальную сканирующую флуориметрию. Этот метод основан на измерении флуоресценции в нагреваемом образце белка. Введение дополнительных доменов повлияло на термостабильность БФ Gss-полимеразы, наличие 6×His на N-конце белка снижало его температуру плавления, в то время как наличие DBD или Sto7d в аналогичном положении этот показатель увеличивало (Таблица 2 **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Следует отметить, что базовый уровень флуоресценции Gss-DBD превышал таковой для остальных химерных ферментов, магнитуа роста флуоресценции была, напротив, меньше, что свидетельствовало о нарушении фолдинга. Это наблюдение согласуется с полной потерей полимеразной активности Gss-DBD, описанной ниже.

1.7.2 Удельная активность, оптимальные концентрация ионов, температура, термостабильность

Удельную активность химерных ферментов измеряли по включению радиоактивно меченого субстрата в активированную ДНК из тимуса телёнка (Таблица 2 **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Gss-DBD полностью утратил полимеразную активность; присоединение DBD на N-конец и 6×His на С-конец также привело к снижению удельной активности соответствующих химерных ферментов. Напротив, His-Gss, Sto-Gss, Gss-Sto сохранили удельную активность на уровне Gss без дополнительных доменов.

Таблица 2 - Удельная активность, термостабильность и процессивность химерных ДНК-полимераз

Фермент	Удельная активность, 10^5 е.а./мг	Температура плавления, °С	Наблюдаемая процессивность, н
Gss	0,87	$66,8 \pm 0,2$	98
His-Gss	1,04	$65,9 \pm 0,2$	105
Gss-His	0,32	$68,0 \pm 0,2$	110
DBD-Gss	0,10	$68,6 \pm 0,2$	362
Gss-DBD	Нет активности	$64,7 \pm 0,2$	-
Sto-Gss	0,89	$68,9 \pm 0,2$	298
Gss-Sto	0,94	$66,8 \pm 0,2$	322

Помимо удельной активности важными ферментативными параметрами являются оптимальные концентрации моно- и дивалентных ионов, температура и термостабильность. Ионы в высокой концентрации могут затруднять взаимодействие белков с нуклеиновыми кислотами, экранируя заряженные поверхности. Введение дополнительных ДНК-связывающих доменов должно усилить способность фермента связываться с ДНК в растворах с высокими концентрациями солей.

Устойчивость химерных ферментов (DBD-Gss, Sto-Gss и Gss-Sto) к высоким концентрациям ионов возросла в соответствии с ожиданиями. При этом термостабильность и температурный оптимум работы химерных ферментов не изменились по сравнению с исходным Gss. Наибольшая активность всех изученных ферментов наблюдалась при температуре 60-65°C; ферменты сохраняли полимеразную активность после инкубации в течение 5 часов при 50-60°C. Инкубация при 70°C в течение получаса приводила к полной потере полимеразной активности. Таким образом, подтвердилась первоначальная гипотеза об усилении у химерных ферментов способности связываться с ДНК при высоких концентрациях солей.

1.7.3 Связывание с ДНК

Способность химерных ферментов связывать ДНК является ключевой для протянутого синтеза ДНК, напрямую влияя на длину продукта синтеза. Высокая аффинность ДНК-полимеразы к ДНК означает высокую процессивность фермента. Способность химерных ферментов связывать ДНК исследовали с помощью метода задержки комплексов в геле (Рисунок 4).

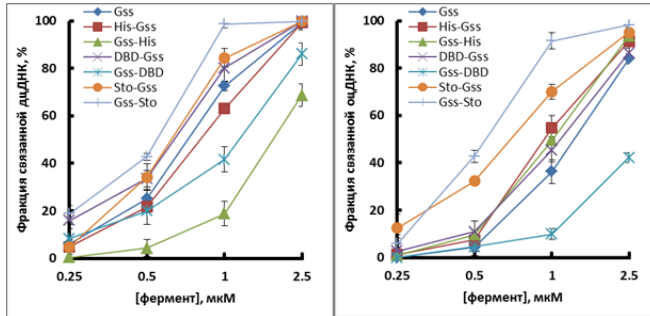


Рисунок 4. Связывание химерных ферментов с ДНК. Ферменты инкубировали с дцДНК-фрагментом с 3'-выступающим концом или оцДНК при 55°C. Графики показывают количественный анализ степени связывания.

Наибольшая аффинность связывания с оцДНК и дцДНК наблюдалась у Gss-Sto. Этот фермент связывал около 100% дцДНК-субстрата и 90% оцДНК-субстрата при концентрации 1 мкМ, в то время как прочие ферменты в этой концентрации связывали не более 80 и 70% субстрата соответственно. Способность Sto-Gss связывать ДНК выросла по сравнению с исходным Gss: 80% против 70% для дцДНК и 70% против 35% для оцДНК. Таким образом, присоединение Sto7d позволило достоверно повысить аффинность химерных ферментов к ДНК. Положение Sto7d в химерном белке было значимым фактором; способность связывать дцДНК и оцДНК была выше у Gss-Sto, в котором Sto7d находился на С-конце. Присоединение DBD к Gss сказалось на эффективности связывания ДНК по-разному: DBD на N-конце её не изменил, DBD на С-конце – уменьшил. Разница во влиянии наличия и положения DBD и Sto7d на связывание ферментов с ДНК может объясняться как их размерами (25 и 7 кДа соответственно), так и/или взаимодействием присоединённых доменов с ядром фермента. Однако влияние 6×His на аффинность Gss требует более подробного исследования.

1.7.4 Процессивность

Процессивность в случае ДНК-полимераз определяется как число нуклеотидмонофосфатов, включаемых в состав растущей цепи за один акт связывания фермента с ДНК-матрицей. Этот параметр отражает способность фермента синтезировать длинные (несколько т.п.о.) фрагменты ДНК, что является критически важным для полногеномной амплификации.

Процессивность химерных ДНК-полимераз с дополнительными ДНК-связывающими доменами оценивалась по степени элонгации флуоресцентно меченого праймера (Таблица 2). Присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов в три раза повысило наблюдаемую процессивность химерных ферментов. **Ошибка! Источник ссылки не найден..** Более высокие результаты Gss-Sto сравнению с Sto-Gss

могут объясняться повышенной аффинностью к ДНК у Gss-Sto. Вместе с тем, большая процессивность DBD-Gss относительно Gss-Sto остаётся необъяснённой, поскольку способность связывать ДНК у DBD-Gss ниже, чем у Gss-Sto. Несмотря на показанную выше разницу в связывании ДНК, наличие и положение 6×His на способность ферментов синтезировать длинные фрагменты ДНК практически не влияло: отличие между Gss и его вариантами с 6×His составляло не более 12 нуклеотидов.

1.7.5 Терминально-трансферазная активность

Некоторые практические приложения (приготовление библиотек ДНК для массового параллельного секвенирования) требуют наличия у ДНК-полимераз терминально-трансферазной активности, т.е. способности добавлять один или несколько нуклеотидов на 3'-конец фрагмента ДНК безматричным способом (Рисунок 5).

Все химерные ферменты сохранили терминально-трансферазную активность, о чём свидетельствовало появление полос элонгированных олигонуклеотидов (Рисунок А). По скорости синтеза значимо отличался от остальных ферментов только DBD-Gss (доля элонгированного олигонуклеотида 0,35), что может объясняться пониженной удельной активностью DBD-Gss ($0,1 \cdot 10^5$ е.а./мг); отставание Gss-His было менее выражено. Несмотря на наличие различий в эффективности связывания с ДНК, корреляции эффективности связывания с субстратом и скорости реакции не прослеживалось.

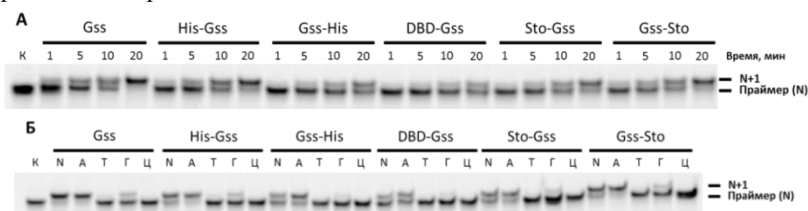


Рисунок 5. Анализ терминально-трансферазной активности (включения дНМФ в дцДНК-фрагмент без выступающих концов). А – кинетика терминально-трансферазной активности. Б – включение в дцДНК индивидуальных дНМФ.

Среди отдельных нуклеозид монофосфатов наиболее активно происходило включение дАМФ, менее активно дГМФ, включения пиримидинов практически не происходило (Рисунок Б). Это наблюдение хорошо согласуется с известным «А-правилом», согласно которому ДНК-полимеразы склонны связывать и инкорпорировать в растущую цепь дАМФ [Strauss, 2002].

1.7.6 Вытеснение цепи

Способность вытеснять цепь ДНК при полимеризации является

ключевой для использования *Bst*-подобных полимераз в практических приложениях. Поэтому способность вытеснять цепь у химерных ферментов была проанализирована отдельно от прочих свойств (Рисунок 6).

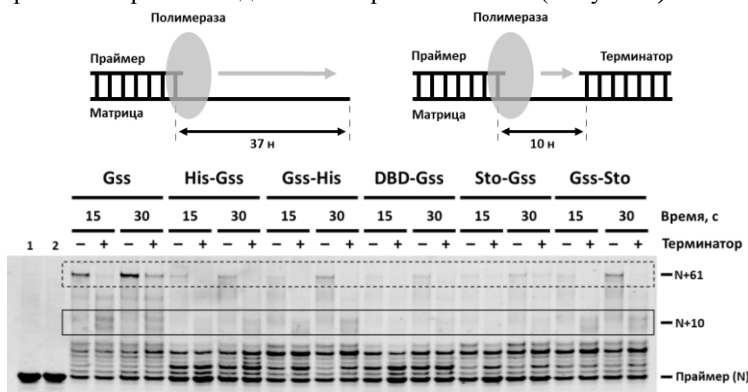


Рисунок 6. Вытеснение цепи химерными ферментами. Контроли: 1 – праймированная матрица, 2 – праймированная матрица с останавливающим нуклеотидом. Штрихованной рамкой выделен участок геля с полноразмерным продуктом (N+61), сплошной рамкой – участок геля с удлинённым на 10 нуклеотидов праймером.

Все химерные ферменты сохранили способность вытеснять цепь. Отличие в скорости накопления продукта, выражающееся в разной интенсивности полос полноразмерного продукта, по всей видимости, объясняется разной удельной активностью ферментов. Преимущественная элонгация праймера на 1-6 нуклеотидов может быть объяснено особенностями нуклеотидной последовательности матрицы, которые замедляют синтез до подхода ферментов к 3'-концу терминатора. Повышенное количество продукта, удлинённого более чем на 10 нуклеотидов при наличии терминатора по сравнению с более длинными продуктами (N+20 и далее), объясняется, по всей видимости, отсутствием на 5'-конце останавливающего олигонуклеотида фосфатной группы, играющей важную роль в распознавании ДНК ДНК-полимеразами [Singhal, Wilson, 1993].

1.7.7 Селективность

Точность синтеза ДНК, наряду с процессивностью, определяет пригодность ДНК-полимеразы для проведения ПГА. Нуклеотидные замены, возникающие при проведении ПГА, могут затруднять дальнейший анализ, что ярко проявляется при выявлении соматических мутаций. Точность синтеза ДНК-полимераз определяется их способностью различать нуклеотиды (селективностью) и наличием редактирующей активности.

Способность присоединять некомплементарный нуклеотид у химерных полимераз не изменилась по сравнению с исходным Gss (

Рисунок7). Соотношение интенсивностей полос исходных и элонгированных праймеров одинаково у всех ферментов, появления элонгированных на два и более нуклеотида продуктов, не синтезированных Gss, также не произошло. Таким образом, наличие дополнительных доменов не повлияло на селективность ДНК химерными ферментами. Следует отметить кажущуюся высокой ошибочность исследованных ДНК-полимераз, что выражалось в появлении полос элонгированных праймеров для пар «нуклеотид матрицы-дНТФ»: Г-дТ, А-дА, А-дЦ, Т-дГ, Т-дТ, Ц-дА, Ц-дТ. Этот результат может объясняться присутствием в реакционной смеси только одного дНТФ в большом избытке. Однако поскольку целью данного анализа было сравнение селективности химерных ДНК-полимераз с исходным ферментом, но не установление точных констант включения некомплементарных нуклеотидов, использованная методология позволяет получить достаточно надёжные данные.

По результатам анализа биохимических свойств химерных ДНК-полимераз можно сделать вывод, что наличие дополнительных доменов 6×His, DBD или Sto7d не влияет на термостабильность, терминально-трансферазную активность, способность вытеснять цепь ДНК и селективность ферментов. Вместе с тем, в присутствии DBD или Sto7d происходит увеличение устойчивости к ингибиторам и процессивности за счёт роста аффинности связывания с ДНК, за исключением Gss-DBD, полностью утратившего полимеразную активность.

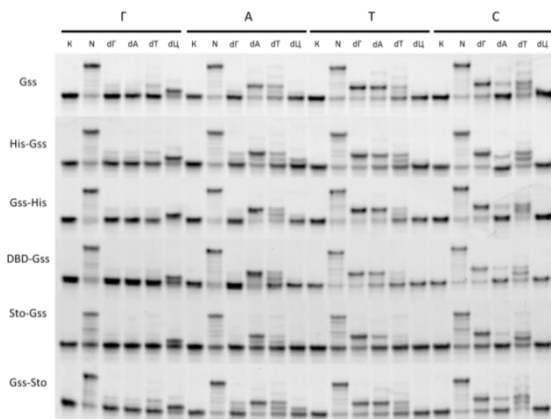


Рисунок 7. Электрофореграмма результатов анализа селективности химерных ДНК-полимераз.

Матричные нуклеотиды содержали разные основания в +1-й позиции относительно 3'-конца праймера, в реакционной смеси присутствовали смесь или индивидуальные дНТФ. К – контроль, праймированная матрица.

1.8 Полногеномная амплификация с помощью химерных ДНК-полимераз

Одной из целей настоящей работы было получение ферментов с улучшенными свойствами для полногеномной амплификации. Полногеномная амплификация в формате амплификации с множественным вытеснением цепи является одним из основных применений *Bst*-подобных ДНК-полимераз. Качество продукта ПГА кроме длины фрагментов описывается величиной смещения представленности отдельных локусов после амплификации. Такое смещение может сказываться на результатах последующего анализа, приводя к ложной детекции инсерций/делеций. ПГА проводили по матрице геномной ДНК человека. Для анализа продуктов ПГА было подобрано 20 локусов на геномной ДНК человека, представленных в геноме в одной копии.

Химерные ферменты с дополнительными ДНК-связывающими доменами: DBD-Gss, Sto-Gss и Gss-Sto превзошли исходный Gss по количеству продукта, сгенерированного в ПГА. Наибольшее количество продукта для 16 локусов из 20 было получено для Gss-Sto. Вопреки ожиданиям, не была обнаружена корреляция между количеством продукта ПГА и его GC-составом. Вероятно, эффект GC-состава сказывается на ПГА в масштабе более длинных участков ДНК, чем использованные в анализе (83-202 п.н.). Также не было обнаружено связи между количеством продукта ПГА, определённым с помощью ПЦР в реальном времени, и длиной ампликона. Последнее обстоятельство даёт основания утверждать, что в диапазоне длин 80-200 п.н. ПГА происходила с одинаковой эффективностью.

Известно, что структура ДНК может влиять на эффективность её амплификации [Dong и др., 2016], приводя к занижению результатов. Для оценки влияния структуры продукта ПГА на ПЦР в режиме реального времени, количество продукта ПГА определяли параллельно с помощью цифровой капельной ПЦР, предварительно гидролизовав продукт ПГА эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*. По результатам сравнения количества интактного и гидролизованного *EcoRI* продукта ПГА с данными ПЦР в реальном времени не было выявлено значимых отличий, что говорит об отсутствии влияния структуры продукта ПГА на эффективность его амплификации.

Таким образом, было установлено, что из созданного набора химерных ферментов DBD-Gss, Sto-Gss, Gss-Sto превзошли исходный Gss по количеству продукта ПГА, Gss-Sto наиболее эффективно катализирует полногеномную амплификацию. Не была обнаружена корреляция между количеством продукта ПГА и его GC-составом и длиной ампликона ПГА. Кроме того, структура продукта ПГА на влияла на его количественную оценку с помощью ПЦР в реальном времени.

1.9 Изотермическая петлевая амплификация с помощью химерных ДНК-полимераз

Основное предназначение методов изотермической амплификации ДНК (в том числе LAMP) – выявление ДНК или РНК инфекционных агентов в условиях, когда доступ к лабораторному оборудованию затруднен или отсутствует. Ингибиторами в таких условиях могут быть субстанции, сохранившиеся в образце после процедур очистки, реагенты, использовавшиеся для хранения образцов или для очистки. Химерные ДНК-полимеразы были проверены на устойчивость к ингибиторам LAMP с использованием набора праймеров для детекции ДНК фага лямбда и интеркалирующего красителя SYTO-82.

В случае гепарина, NaCl, мочевины и цельной крови химерные ферменты показали повышенную устойчивость по сравнению с Gss и его вариантами с 6×His. Так, устойчивость химерных ферментов к гепарину возросла в пять раз (с 0,1 до 0,5 единиц на реакцию). Причиной этого эффекта может являться рост эффективности связывания с ДНК у химерных ферментов, за счёт чего нивелируется действие гепарина как конкурентного ингибитора ДНК-полимераз.

По аналогии с гепарином четырёхкратный рост устойчивости химерных ферментов к NaCl (с 50 мМ до 200 мМ) может объясняться более прочным связыванием химерных ферментов с ДНК. Полученный рост устойчивости химерных ферментов к NaCl в LAMP хорошо согласуется с ростом их устойчивости к моно- и дивалентным ионам, отмеченным при изучении удельной активности. Повышение устойчивости химерных ферментов к мочедине (с 1 до 2 М) и цельной крови (с 2,5 до 5 об.%), по всей видимости, также объясняется более прочным связыванием ферментов с ДНК. Более широкий диапазон концентраций цельной крови, в котором химерные ферменты способны катализировать LAMP, свидетельствует о наличии в цельной крови субстанций, нарушающих ДНК-белковые взаимодействия, поскольку по прочим ферментативным параметрам (удельная активность, термостабильность, и т.д.) химерные ферменты не превосходили Gss и его производные с 6×His.

В отличие от перечисленных выше ингибиторов устойчивость химерных ферментов к ЭДТА и этанолу не изменилась. Такое различие может объясняться разными механизмами ингибирования, где NaCl, мочедине, гепарин и компоненты цельной крови влияют на связывание ферментов с ДНК, в то время как ингибирующий эффект ЭДТА и этанола не связан напрямую со способностью ферментов связываться с ДНК.

Подводя общий итог работе с химерными ферментами, добавление ДНК-связывающих доменов (как DBD, так и Sto7d) позволило увеличить процессивность и устойчивость химерных ДНК-полимераз к ингибиторам, сделав их более удобными для использования в изотермической

амплификации. Подобный эффект не был ранее описан в литературе и впервые зафиксирован в настоящей работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе нами были проведено клонирование и описание биохимических свойств ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* и большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp 777. Показано, что ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы *P. abyssi* повышает эффективность протяжённой ПЦР и нивелирует ингибирующий эффект гепарина на ПЦР. Было установлено, что термостабильность, оптимальные концентрации ионов и pH БФ Gss-полимеразы не отличаются от таковых для БФ Bst-полимеразы; БФ Gss-полимеразы пригоден для проведения полногеномной амплификации и более устойчив к ингибиторам амплификации (гепарину, этанолу, мочеvine и плазме крови человека), чем БФ Bst-полимеразы.

На основе охарактеризованных белков, а также ДНК-связывающего белка Sto7d *Sulfolobus tokodaii* были сконструированы, охарактеризованы и использованы в практических приложениях химерные ферменты. Термостабильность, терминально-трансферазная активность, субстратная селективность и способность вытеснять цепь ДНК у химерных ферментов сохранились на уровне исходного БФ Gss-полимеразы. Одновременно присоединение дополнительных ДНК-связывающих доменов повысило процессивность и устойчивость к ингибиторам у химерных ферментов. Продемонстрирована связь между положением и типом дополнительного домена и функциональной активностью химерного фермента.

Был подобран оптимальный интеркалирующий флуоресцентный краситель (SYTO-82) для проведения изотермической петлевой амплификации в реальном времени (qLAMP).

Полученные в работе результаты позволяют в будущем повысить эффективность LAMP в клинической диагностике. Создан химерный фермент, Gss-Sto, более устойчивый по сравнению с исходным БФ Gss-полимеразы к действию ингибиторов. При использовании Gss-Sto возрастёт надёжность LAMP, что критически важно в основной сфере её применения, диагностике у постели больного или полевой диагностике. Это позволит создавать простые и надёжные тесты для экспресс-анализа.

Присоединение дополнительных доменов к природным ферментам, в том числе дополнительных ДНК-связывающих доменов, зарекомендовало себя как эффективный способ получения ферментов с улучшенными свойствами. В настоящей работе было показано, что присоединение дополнительных доменов может придавать новые, непрогнозируемые свойства химерным белкам (повышение устойчивости к ингибиторам).

Подобная стратегия может быть применена и к другим ферментам, используемым для диагностики образцов с вероятным содержанием ингибиторов.

ВЫВОДЫ

1. Клонированный ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы *Rugosoccus abyssi* показал способность увеличивать эффективность протяжённой ПЦР и нивелировать ингибирующий эффект гепарина на ПЦР в реальном времени.
2. Биохимические свойства клонированного большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Geobacillus* sp. 777 (БФ Gss-полимеразы) сходны с большим фрагментом ДНК-полимеразы I *Geobacillus stearothermophilus* (БФ Bst-полимеразы). БФ Gss-полимеразы пригоден для использования в полногеномной амплификации и изотермической петлевой амплификации (LAMP), в том числе в режиме реального времени. БФ Gss-полимеразы продемонстрировал большую по сравнению с БФ Bst-полимеразы устойчивость к ингибиторам (гепарину, этанолу, мочеvine и плазме крови человека).
3. Среди интеркалирующих флуоресцентных красителей (SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82) SYTO-82 продемонстрировал наименьшее ингибирование qLAMP и наибольшее отношение сигнал/шум.
4. Клонированные на основе БФ Gss-полимеразы химерные ферменты DBD-Gss, Sto-Gss, Gss-Sto с дополнительными ДНК-связывающими доменами (ДНК-связывающим доменом ДНК-лигазы *Rugosoccus abyssi* или Sto7d) показали более высокие процессивность и устойчивость к ингибиторам по сравнению с исходным ферментом. На терминально-трансферазную активность и способность вытеснять цепь дополнительные домены не повлияли, за исключением Gss-DBD, который полностью утратил полимеразную активность. Наибольшую эффективность в полногеномной амплификации и устойчивость к ингибиторам амплификации показал Gss-Sto с Sto7d на C-конце.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Oscorbin I. P., Boyarskikh U. A., Zakabunin A. I., Khrapov E. A., Filipenko M. L. DNA-binding domain of DNA ligase from the thermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*: improving long-range PCR and neutralization of heparin's inhibitory effect // *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. – 2015. – V. 176. – № . 7. – P. 1859-1869.
2. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications // *Molecular Biotechnology*. – 2015. – V. 57. – №. 10. – P. 947-959.
3. Oscorbin I. P., Belousova E. A., Zakabunin A. I., Boyarskikh U. A., Filipenko M. L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) // *Biotechniques*. – 2016. – V. 61. – №. 1. – P. 20-25.
4. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., Zakabunin A.I., Khrapov E.A., Filipenko M.L. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – V. 45. - №. 13. – P. 9595-9610.

Подписано в печать

Формат бумаги 60x84, 1/16 печ.л.

Заказ №

Тираж 110 экз