РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

ОСКОРБИН ИГОРЬ ПЕТРОВИЧ

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

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Филипенко Максим Леонидович

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление 2

Список принятых сокращений 5

1 Введение 7

2 Обзор литературы 10

2.1 История открытия и изучения ДНК-полимераз 10

2.2 Базовый механизм полимеризации ДНК и точность синтеза 12

2.3 Структура ДНК-полимераз 14

2.4 Классификация ДНК-полимераз 16

2.5 ДНК-полимеразы семейства А – функции *in vivo* 16

2.6 Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы 18

2.7 Использование и улучшение ДНК-полимераз 19

2.8 Bst-полимераза и её аналоги – особенности активности и структуры 22

2.9 Изотермическая амплификация 26

2.10 Изотермическая петлевая амплификация 33

2.11 Полногеномная амплификация 36

2.12 Заключение 37

3 Материалы и методы 39

3.1 Материалы 39

3.1.1 Олигонуклеотидные праймеры 39

3.1.2 Реактивы 40

3.1.1 Буферные растворы 40

3.1.2 Ферменты 42

3.1.3 Питательные среды 42

3.1.4 Маркеры молекулярного веса 42

3.2 Методы 42

3.2.1 Гель-электрофорез ДНК в агарозном геле 42

3.2.2 Денатурирующий гель-электрофорез белков по Лэммли 43

3.2.3 Приготовление линейного полиакриламида (ЛПАА) 43

3.2.4 Осаждение ДНК изопропанолом 44

3.2.5 Очистка нуклеиновых кислот фенол-хлорофомной экстракцией 44

3.2.6 Выделение геномной ДНК из бактерий 44

3.2.7 ПЦР для клонирования ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* и БФ *Gss*-полимеразы и его производных 44
3.2.8 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции 45
3.2.9 Лигирование фрагментов ДНК с липкими концами 46
3.2.10 Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидами 46
3.2.11 ПЦР-скрининг бактериальных колоний 46
3.2.12 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса 47
3.2.13 Индукция синтеза рекомбинантных белков в *E. coli* 47
3.2.14 Очистка вариантов ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi* 48
3.2.15 Очистка БФ Gss-полимеразы и её производных с 6×His при помощи металл-хелатной хроматографии 48
3.2.16 Очистка Gss при помощи аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе ... 49
3.2.17 Перевод БФ *Gss*-полимеразы в буфер для хранения гель-фильтрацией 50
3.2.18 Очистка белка при помощи ионообменной хроматографии 50
3.2.19 Диализ для перевода белков в буфер для хранения 50
3.2.20 Измерение концентрации белка по методу Брэдфорд 51
3.2.21 Количественное измерение полимеразной активности 51
3.2.22 Оценка термостабильности с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии 52
3.2.23 Выделение одноцепочечной ДНК фага M13mp8 52
3.2.24 Приготовление меченых субстратов для проведения гель-ретардации, анализа терминально-трансферазной активности и вытеснения цепи 52
3.2.25 Гель-ретардация в полиакриламидном геле 53
3.2.26 Анализ процессивности 54
3.2.27 Денатурирующий гель-электрофорез ДНК в полиакриламидном геле 54
3.2.28 Анализ терминально-трансферазной активности 55
3.2.29 Анализ вытеснения цепи 55
3.2.30 Анализ точности синтеза 55
3.2.31 Изотермическая петлевая амплификация в реальном времени (qLAMP) 55
3.2.32 Протяженная ПЦР 56
3.2.33 Полногеномная амплификация с множественным вытеснением цепи 56
3.2.34 Полимеразная цепная реакция с в режиме реального времени 57
3.2.35 Цифровая капельная ПЦР 57
4 Результаты и обсуждение 58

4.1 Клонирование и очистка ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы археи *Pyrococcus abyssi* ... 58

4.2 Связывание с ДНК DBD и его влияние на протяженную ПЦР ... 60

4.3 Определение филогенетического положения штамма 777 и секвенирование гена Gss-полимеразы ... 63

4.4 Клонирование большого фрагмента *Gss*-полимеразы и сравнение его свойств с коммерческими ферментами ... 66

4.5 Выбор оптимального красителя для проведения изотермической петлевой амплификации в реальном времени ... 76

4.6 Клонирование и очистка химерных ДНК-полимераз на основе БФ *Gss*-полимеразы 81

4.7 Биохимические свойства химерных ДНК-полимераз ... 82

4.7.1 Термостабильность ... 82

4.7.2 Удельная активность, оптимальные концентрация ионов, температура, термостабильность ... 84

4.7.3 Связывание с ДНК ... 86

4.7.4 Процессивность ... 88

4.7.5 Терминально-трансферазная активность ... 91

4.7.6 Вытеснение цепи ... 92

4.7.7 Селективность ... 94

4.8 Полногеномная амплификация с помощью химерных ДНК-полимераз ... 97

4.9 Изотермическая петлевая амплификация с помощью химерных ДНК-полимераз 101

5 Заключение ... 114

6 Выводы ... 115

7 Список литературы ... 116

Приложение 1. Праймеры и зонды, использованные для определения количества продуктов ПГА ... 131

Приложение 2. GC-coCTав, длина фрагмента и эффективность ПГА ... 133

Приложение 3 Структуры векторов для экспрессии ... 135

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЦ – активный центр,

БСА – бычий сывороточный альбумин,

БФ *Bsm*-полимеразы – большой фрагмент ДНК-полимеразы I бактерий рода *Bacillus smithii,*

БФ *Bst*-полимеразы – большой фрагмент ДНК-полимеразы I *Geobacillus stearothermophilus,*

БФ *Gss*-полимеразы, Gss – большой фрагмент ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp* 777,

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита;

ГМО – генно-модифицированный организм,

дНМФ – дезоксирибонуклеозид-5´- монофосфат,

дНТФ – дезоксирибонуклеозид-5´- трифосфат,

ДСН – додецилсульфат натрия,

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид,

КФ – фрагмент Кленова,

ЛПАА – линейный полиакриламид,

п.н. – пар нуклеотидов,

ПААГ – полиакриламидный гель,

ПЦР – полимеразная цепная реакция,

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

т.п.о. – тысяч пар оснований;

ФМСФ – фенилметилсулфонилфторид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота,

Bst-полимераза – ДНК-полимераза I рода *Geobacillus stearothermophilus,*

Cq – quantification cycle, циклы до пересечения кривой накопления продукта амплификации порогового значения,

DBD – ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi,*

DBD-Gss, Gss-DBD, Sto-Gss, Gss-Sto - большой фрагмент ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp* 777 с DBD или Sto7d на N- или C-конце соответственно,

FRET – fluorescence resonance energy transfer, Фёрстеровский резонансный перенос энергии, резонансный перенос энергии флуоресценции,

His-DBD, DBD-His - ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* с 6×His на N- или C-конце соответственно,

LAMP – loop-mediated isothermal amplification, изотермическая петлевая амплификация,

MDA – multiple displacement amplification, амплификация с множественным вытеснением,

MMR – mismatch repair, репарация некомплементарных пар оснований,

PCNA – proliferating cell nuclear antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток

RCA – rolling circle amplification, кольцевая амплификация,

RFU – relative fluorescence units, относительные единицы флуоресценции,

SDA – strand displacement amplification, амплификация с вытеснением цепи,

SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм,

Sso7d – белок 7 кДа *Sulfolobus solfataricus,*

Sto7d – белок 7 кДа *Sulfolobus tokodaii*,

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин,

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан,

Tt – time-to-threshold, время до пересечения кривой накопления продукта амплификации порогового значения,

WGA, ПГА – whole genome amplification, полногеномная амплификация

1 ВВЕДЕНИЕ

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 обходится 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. Эти и другие ограничения традиционной ПЦР послужили стимулом для разработки новых методов амплификации нуклеиновых кислот.

Реакция изотермической амплификации не требует циклического температурного режима и протекает при постоянной температуре. 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 процессивность 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*),

характеризация их биохимических свойств и использование в практических приложениях: изотермической петлевой амплификации и полногеномной амплификации.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Клонирование и характеризация 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 характеризация биохимических свойств ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi.*
4. Клонирование и характеризация 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 генной инженерии, очистки белков, методы характеризации 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 селективнсоти 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.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены на VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Москва, 2017), материалы которого индексируются в базах данных Web of Science и Scopus.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

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 EA., 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.

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 124 страницах, содержит 35 рисунков и 13 таблиц. Список процитированной литературы включает 209 источников.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

ДНК-полимеразы – семейство клеточных ферментов, катализирующих присоединение дезоксирибонуклеотидов к цепи ДНК. Эти белки жизненно необходимы для осуществления процессов клеточного метаболизма ДНК, таких как репликация и репарация. *In vitro* ДНК-полимеразы широко применяются для амплификации ДНК в биотехнологии и медицинской диагностике.

Первая ДНК-полимераза, впоследствии названная ДНК-полимеразой I, была открыта в 1956 г. группой Артура Корнберга в клеточных экстрактах *E. coli* [1]. Корнберг и соавт. установили, что при добавлении в экстракт клеток *E. coli* меченного C^{14} дТТФ происходит включение меченого нуклеотида в ДНК, после чего выделили фермент, катализирующий этот процесс. Спустя два года аналогичная полимеразная активность была обнаружена Боллумом и Ван Поттером в гомогенате регенерирующей печени крысы [2]. Много лет ДНК-полимераза I считалась единственным бактериальным ферментом, синтезирующим ДНК. Однако в 1969 г. Кернс и де Люсия выделили штамм *E. coli*, с активностью ДНК-полимеразы I менее 1-го процента от нормального уровня. Тем не менее, клетки найденного шатмма росли и делились с нормальной скоростью, однако обладали повышенной чувствительностью к ультрафиолетовому излучению [3]. Это открытие стимулировало поиски других прокариотических ДНК-полимераз, и в 1970 г. группа Томас Корнберг открыла сначала ДНК-полимеразу II, а затем ДНК-полимеразу III (позднее было показано, что именно последняя является основной репликативной ДНК-полимеразой в клетках *E. coli*) [4]. В 1999 г. список бактериальных ДНК-полимераз пополнился еще двумя ферментами: ДНК-полимеразой IV и ДНК-полимеразой V, участвующими в синтезе ДНК через повреждение [5,6].

Одновременно с исследованием ДНК-полимераз прокариот шел активный поиск аналогичных ферментов эукариот. В 1965 Ёнеда и Боллум выделили из тимуса теленка первую эукариотическую ДНК-полимеразу – ДНК-полимеразу α [7]. За последующие несколько лет аналогичная высокомолекулярная ДНК-полимераза была выделена из делящихся клеток различных таксонов эукариот [8–11]. Как и ДНК-полимераза I, ДНК-полимераза α долгое время считалась единственным ферментом эукариот, осуществляющим синтез ДНК. Однако в 1971 г. группа Вайсбаха обнаружил низкомолекулярную ДНК-полимеразу β в клетках HeLa [12], позднее его же группой была открыта ДНК-полимераза γ [13].

По порядку своего открытия ДНК-полимеразы обозначались римскими цифрами (ДНК-полимеразы прокариот) или греческими буквами (ДНК-полимеразы эукариот) [14]. К концу 90-х годов список ДНК-зависимых ДНК-полимераз включал в себя пять прокариотических

ферментов (I, II, III, IV и V) и шесть эукариотических (α, β, γ, δ, ε и ζ). За следующие 10 лет было открыто еще несколько ДНК-полимераз эукариот, принадлежащих к семействам X и Y и ответственных за репарацию и репликацию поврежденной ДНК. Принятая в настоящее время номенклатура ДНК-полимераз основана на гомологии аминокислотных последовательностей [15]; согласно ей выделяется семь семейств, некоторые представители которых перечислены в Таблице 1.

Таблица 1 - Классификация ДНК-полимераз [16]

Семейство	Вирусы	Бактерии	Археи	Эукариоты
A	T3 ДНК-полимераза T5 ДНК-полимераза T7 ДНК-полимераза	ДНК-полимераза I *E. coli* ДНК-полимераза I *T. aquaticus* ДНК-полимераза I *G. stearothermophilus*		ДНК-полимераза γ ДНК-полимераза θ ДНК-полимераза ν
B	T4 ДНК-полимераза T6 ДНК-полимераза RB69 ДНК-полимераза Адено ДНК-полимераза ВПГ-1 ДНК-полимераза BB ДНК-полимераза φ29 ДНК-полимераза	ДНК-полимераза II *E. coli*	ДНК-полимераза BI ДНК-полимераза BII ДНК-полимераза BIII	ДНК-полимераза α ДНК-полимераза δ ДНК-полимераза ε ДНК-полимераза ζ/ Rev 3
C		ДНК-полимераза III *E. coli* ДНК-полимераза I *B. subtilis* ДНК-полимераза III *T. aquaticus*		
D			ДНК-полимераза D *P. abyssi*	
X	ДНК-полимераза вируса африканской чумы свиней	ДНК-полимераза X *D. radiodurans* ДНК-полимераза X *B. subtilis* ДНК-полимераза X *L. monocytogenes* ДНК-полимераза X *S. saprolyticus* ДНК-полимераза X *S. aureus* ДНК-полимераза X *D. reducens* ДНК-полимераза X *A. aeolicus* ДНК-полимераза X *T. thermophiles* ДНК-полимераза X *T. denitrificans* ДНК-полимераза X *T. aquaticus*	ДНК-полимераза X *M. mazei* ДНК-полимераза X *M. thermautotrophicus* ДНК-полимераза X *T. volcanium* ДНК-полимераза X *F. acidarmanus*	ДНК-полимераза β ДНК-полимераза λ ДНК-полимераза μ ДНК-полимераза σ Терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза
Y		ДНК-полимераза IV *E. coli* ДНК-полимераза V *E. coli*	Dpo4 ДНК-полимераза Dbh ДНК-полимераза	ДНК-полимераза η ДНК-полимераза κ ДНК-полимераза ι Rev 1
RT	Обратная транскриптаза			Теломераза

Свойства ДНК-полимераз (термостабильность, точность, процессивность, требования к ионной силе раствора, набор ингибиторов и т.д.) как прокариот, так и эукариот варьируют в широких пределах. Несмотря на это, все ферменты, объединяемые в суперсемейство ДНК-полимераз, обладают рядом общих черт (в полной мере справедливо для прокариотических ДНК-полимераз I, II и III): необходимость для синтеза ДНК-матрицы и дНТФ (дезоксирибонуклеозид-5´-трифосфатов), 5´-3´ направление синтеза, наличие 3´-5´ экзонуклеазной активности. Кроме того, у ДНК-полимеразы I имеется 5´-3´ экзонуклеазная активность. Процесс репликации ДНК у эукариот организован значительно сложнее, чем у прокариот, и катализирующие его ДНК-полимеразы более специализированы. Так, ни одна эукариотическая ДНК-полимераза не обладает 5´-3´ экзонуклеазной активностью, а 3´-5´ экзонуклеазная активность присутствует только у ДНК-полимераз γ, δ и ε, участвующих в элонгации ДНК во время репликации [17].

2.2 БАЗОВЫЙ МЕХАНИЗМ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ДНК И ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА

Базовый механизм полимеризации универсален для всех ДНК-полимераз. Для работы они нуждаются в следующих компонентах (Рисунок 1):

- нуклеотиды в активированной форме (дезоксирибонуклеозид-5´-трифосфаты - дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ) в качестве субстрата;
- ДНК-матрица, определяющая последовательность включения нуклеотидов;
- гибридизованный с матрицей праймер (ДНК или РНК), содержащий 3´-ОН-группу (есть несколько исключений в виде белкового праймирования у фага Ф29 и аденовирусов);
- кофактор в виде двух двухвалентных катионов металлов Me^{2+}, чаще всего магния.

Сам механизм катализа включает в себя пять стадий:

1. образование Уотсон-Криковской пары между пришедшим дНТФ и нуклеотидом матрицы;
2. уход воды из активного центра (АЦ) фермента;
3. геометрическая селекция в активном центре;
4. изменение конформации АЦ из-за связывания дНТФ;
5. образование фосфодиэфирной связи между последним нуклеотидом праймера и новым нуклеотидом, высвобождение пирофосфата [16].

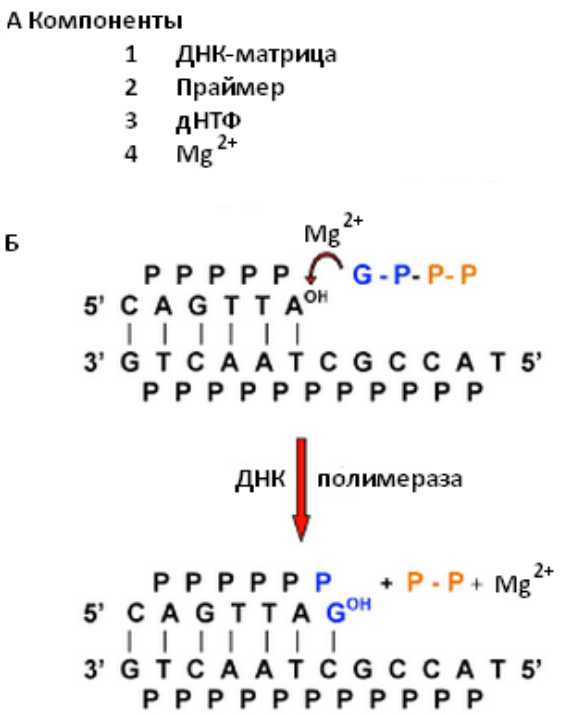

Рисунок 1. Компоненты и общая схема катализа синтеза ДНК с модификациями по Хюбшер с соавторами [16]. А – компоненты, необходимые для работы ДНК-полимераз, Б – принципиальная схема полимеразной реакции (пояснения в тексте).

В процессе катализа ДНК-полимеразы могут присоединять к растущей цепи ДНК некомплементарные нуклеотиды. Причина ошибок при синтезе ДНК – образование нестандартных (не Уотсон-Криковских) пар нуклеотидов либо попадание модифицированных нуклеотидов в активный центр фермента [18]. Точность синтеза (число некомплементарных нуклеотидов, отнесенное к общему количеству присоединенных нуклеотидов) ДНК-полимераз зависит от их роли в метаболизме ДНК. Эта величина колеблется в очень широких пределах от 10^{-1} [18] (частота спонтанного спаривания некомплементарного нуклеотида в отсутствие ДНК-полимеразы) до 10^{-6} [19]. Для уменьшения количества ошибок у ДНК-полимераз, отвечающих за синтез ДНК во время репликации, в структуре ферментов присутствует еще один активный центр с 3´-5´ экзонуклеазной (корректирующей) активностью. Корректирующая активность позволяет увеличить точность синтеза ДНК до 10^{-7} за счет удаления некомплементарных нуклеотидов из вновь синтезированной цепи [20]. Однако геномы эукариот, в том числе и человека, состоят из миллиардов пар оснований, и при точности репликации в одну ошибку на миллион пар оснований синтезированная ДНК будет содержать несколько тысяч ошибок. Такое их количество неприемлемо для поддержания сохранности генетической информации. Эта проблема решается с помощью вспомогательных белков, таких как PCNA (proliferating cell nuclear antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток), фактор репликации С и т.д., которые увеличивают процессивность и точность ДНК-полимераз до 10^{-9} [21]. Рост точности может достигаться за счет увеличения процессивности фермента, в результате чего ДНК-

полимераза менее склонна вносить делеции при амплификации повторов. Кроме того, существуют пост-репликативные механизмы репарации непомплементарных пар оснований (mismatch repair, MMR), различающие старые и вновь синтезированные цепи ДНК и удаляющие неправильно включенные нуклеотиды [22].

В некоторых случаях, напротив, требуется снижение избирательности включения нуклеотидов ДНК-полимеразами. В ходе репарации ДНК часто возникает потребность преодолевать арест репликации, вызванный наличием в матричной цепи модифицированных нуклеотидов. Репликативные ДНК-полимеразы мало приспособлены для преодоления повреждений ДНК, особенно объемных [23]. В таких случаях системы репарации привлекают к месту повреждения специализированные ДНК-полимеразы семейств X и Y [24]. Эти ферменты отличаются пониженной точностью синтеза, с низкой избирательностью включая нуклеотиды в растущую цепь ДНК [25,26]. После включения нескольких нуклеотидов ошибочные ДНК-полимеразы вновь заменяются на точные репликативные, и синтез ДНК продолжается. В результате клетка преодолевает арест репликации и избегает апоптоза. У позвоночных отвечающие за синтез через повреждение (TLS, translesion synthesis) ошибочные ДНК-полимеразы дополнительно участвуют в проведении направленного соматического гипермутагенеза [27]. При созревании клеток иммунной системы требуется повысить разнообразие генов иммуноглобулинов и клеточных рецепторов, участвующих в работе иммунной системы. Один из механизмов, который задействуется для этого – направленный соматический гипермутагенез – внесение замен в специфические участки генов, которое и осуществляется специализированными ДНК-полимеразами, такими как θ [28], η [29], ζ [30].

2.3 СТРУКТУРА ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

Пространственная структура ДНК-полимераз прокариот, эукариот и вирусов очень схожа [31]. Общая их архитектура напоминает правую руку человека и представляет собой комплекс трех доменов: «пальцы», «ладонь» и «большой палец» (Рисунок 2). «Пальцы» и «большой палец» состоят из α-спиралей, «ладонь» сформирована преимущественно β-складками. Наиболее консервативными являются аминокислотные остатки, экспонированные на поверхности молекулы фермента. Девять из них взаимодействуют с сахарофосфатным остовом ДНК при образовании комплекса фермент-ДНК. Замена еще десяти аминокислотных остатков влияет на эффективность образования этого комплекса. Аминокислотные остатки, расположенные внутри глобулы фермента, варьируют среди различных ДНК-полимераз [32].

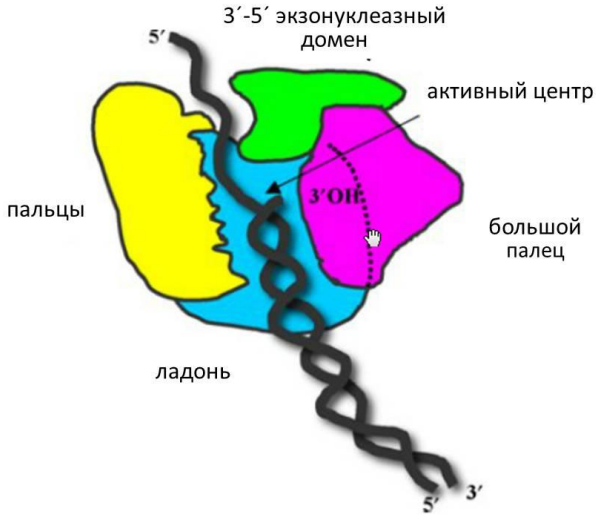

Рисунок 2. Схематическая структура ДНК-полимераз с модификациями по Хюбшер с соавторами [16]. Молекула ДНК-полимеразы представляют собой комплекс трех основных доменов: «пальцы», «ладонь» и «большой палец». Кроме того, в структуре ДНК-полимераз, обладающих корректирующей активностью, выделяют отдельный домен с 3´-5´ экзонуклеазной активностью.

При связывании ДНК-полимеразы с комплексом матрица-праймер и дНТФ происходят изменения конформации фермента и самой ДНК, приводящие к образованию открытого тройного комплекса. В результате этих конформационных перестроек ДНК-полимераза становится функционально-активной. Домен «пальцы» взаимодействует с поступающим дНТФ и комплементарным ему матричным основанием. «Большой палец» связывается с двуцепочечной ДНК. «Ладонь» содержит каталитические аминокислотные остатки, связывающие два иона магния, необходимые для трансферазной реакции (атаки дНТФ (дезоксирибонуклеозид трифосфата) 3´-ОН-группой растущей цепи ДНК и освобождения пирофосфата [33]). Поскольку в домене «ладонь» находятся основные аминокислотные остатки активного центра фермента, он является чрезвычайно консервативным у подавляющего большинства ДНК-полимераз. Исключениями являются ферменты семейства X, в частности ДНК-полимераза β, а также ДНК-полимеразы III *E. coli* и *Thermus aquaticus.* В отличие от высоко консервативного домена «ладонь», аминокислотная последовательность доменов «большой палец» и «пальцы» варьирует среди различных семейств ДНК-полимераз.

Как уже было отмечено выше, у некоторых ДНК-полимераз имеется 3´-5´ экзонуклеазная активность, за которую ответственен особый консервативный домен. У таких ДНК-полимераз существует механизм переключения между синтезом и расщеплением ДНК [34]. Он основан на выходе некомплементарного нуклеотида из полимеразного АЦ «ладони» и попадании высвободившегося одноцепочечного конца в экзонуклеазный активный центр. По всей видимости, когда ДНК-полимераза не катализирует синтез ДНК, экзонуклеазный домен находится в конформации, препятствующей его связыванию с одноцепочечной ДНК. Когда же

при встройке неправильного нуклеотида образуется одноцепочечный участок, он позволяет экзонуклеазному домену совершить переход к активной конформации.

2.4 КЛАССИФИКАЦИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

ДНК-полимеразы на основе гомологии аминокислотных последовательностей сгруппированы в семь семейств (A, B, C, D, X, Y и RT) (Таблица 1).

Ни один из трех доменов живых организмов не содержит ДНК-полимеразы всех семи семейств. Прокариоты содержат ДНК-полимеразы пяти семейств (A, B, C, X и Y), археи – четырех (B, D, X и Y) и эукариоты – пяти (A, B, X, Y и RT). ДНК-полимеразы вирусов принадлежат трем семействам: A, B и X. Разные семейства ДНК-полимераз адаптированы под разные стратегии выживания организма. Так, вирусы содержат ДНК-полимеразы одного-двух семейств, тогда как у бактерий и архей имеется по четыре-пять ДНК-полимераз из разных семейств; в эукариотических клетках разнообразие ДНК-полимераз еще больше. По всей видимости, большее по сравнению с прокариотами разнообразие ДНК-полимераз отражает более высокую сложность процессов репликации и репарации ДНК в ядерных организмах. ДНК-полимеразы эукариот и прокариот принадлежат одним и тем же семействам (за исключением специфичных для эукариот теломераз – семейство RT). Теломераза появилась для решения возникшей у эукариот проблемы недорепликации концов хромосом. Кроме того, эукариоты утратили семейства C и D, имеющиеся у бактерий и архей. Однако каждое из семейств ДНК-полимераз эукариот содержит по 3-5 ферментов в результате возросшей сложности метаболизма ДНК. Рассматриваемая в настоящей работе ДНК-полимераза I, выделенная из бактерий рода *Geobacillus* (*Bst*-полимераза), относится к семейству A.

2.5 ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ СЕМЕЙСТВА A – ФУНКЦИИ *IN VIVO*

Семейство A ДНК-полимераз представлено ДНК-полимеразами фагов T3, T5 и T7, ДНК-полимеразами I прокариот, в том числе *E. coli* (первый открытый фермент с полимеразной активностью), *T. aquaticus, G. stearothermophilus,* эукариотическими ДНК-полимеразами γ, θ и ν. Основная функция ДНК-полимераз семейства A – заполнение пробелов, возникающих в ходе репарации и репликации ДНК. Так, у штаммов *E. coli* и *G. stearothermophilus* с дефектной ДНК-полимеразой I повышается чувствительность к действию агентов, повреждающих ДНК [35].

Ген ДНК-полимеразы I (~3000 п.н.) кодирует полипептидную цепь протяженностью около 1000 аминокислотных остатков, молекулярной массой 100 кДа [36]. Гомология аминокислотной последовательности этого белка у различных организмов составляет порядка 50%. Установлено, что при переносе гена ДНК-полимеразы I между организмами, разделенными миллиардом лет эволюции, фермент сохраняет функциональную активность [37]. Любопытной особенностью генов некоторых ДНК-полимераз семейства A является наличие

кодирующих последовательностей интеинов – специфических белков, способных автокаталитически вырезаться из вновь синтезированной белковой молекулы-носителя [38]. Белок-носитель при этом полностью сохраняет свои функциональные свойства, а интеин представляет собой эндонуклеазу, узнающую специфические протяженные последовательности ДНК. В процессе, именуемом хоумингом (homing), интеин обеспечивает распространение своего гена по геному, вырезая собственную кодирующую последовательность и перенося её в подходящие участки ДНК (чаще всего гены белков, участвующих в метаболизме ДНК). Интеины обнаружены у вирусов, прокариот и одноклеточных эукариот, однако отсутствуют у многоклеточных эукариот, и даже среди близкородственных организмов встречаются крайне неравномерно. В биотехнологии интеины используются для экспрессии токсичных белков [39], очистки рекомбинантных белков [40], создания биосенсоров [41], направленной активации белков [42].

В общем случае ДНК-полимеразы семейства А обладают тремя ферментативными активностями: 5′-3′ полимеразной, 5′-3′ экзонуклеазной и 3′-5′ экзонуклеазной (редактирующей). У части ферментов этого семейства отмечена потеря редактирующей активности. Причиной может быть утрата домена с редактирующим АЦ (бактерии родов *Rickettsia* и *Thermus* [43]) или делеция нескольких каталитических аминокислотных остатков (*Geobacillus stearothermophilus* [44]). Считается, что современные ДНК-полимеразы семейства А представляют собой химерные белки, состоящие из двух компонентов – 5′-3′ экзонуклеазы и ДНК-полимеразы, гены которых были слиты воедино [45]. За счет наличия 5′-3′ экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы семейства А обладают уникальной для ДНК-полимераз способностью синтезировать ДНК, используя в качестве затравки одноцепочечный разрыв ДНК (ник-трансляция) [46].

Как упоминалось выше, *in vivo* ДНК-полимераза I и её гомологи участвуют в процессах репликации и репарации ДНК. Во время репликации ДНК-полимераза I заполняет пробелы между фрагментами Оказаки на отстающей цепи, возникающие на месте РНК-затравок, синтезированных праймазой. Кроме того, ДНК-полимераза I заполняет пробелы, образующиеся на месте повреждений ДНК при работе систем эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER). Особенности функционирования ДНК-полимеразы I объясняют её сравнительно низкую процессивность по сравнению с репликативными ДНК-полимеразами (десятки нуклеотидов у ДНК-полимеразы I против сотен/тысяч у репликативных ДНК-полимераз за один акт связывания с матрицей) [47].

ДНК-полимераза I *E. coli*, как первый открытый фермент с полимеразной активностью, активно исследовалась на протяжении десятилетий. Однако особый интерес представляет её часть, называемая фрагментом Кленова.

2.6 ФРАГМЕНТ КЛЕНОВА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

При мягком гидролизе субтилизином ДНК-полимеразы I *E. coli* образуется два фрагмента – N-концевой фрагмент с 5´-3´ экзонуклеазной активностью и С-концевой фрагмент с редактирующей и полимеразной активностями (фрагмент Кленова, КФ). Аналогичный последнему фрагмент ДНК-полимеразы I *Thermus aquaticus* (*Taq*-полимеразы) получил название фрагмента Штоффеля. Позднее было установлено, что структурно ДНК-полимеразы семейства А состоят из трех функциональных доменов: N-концевой домен с 5´-3´ экзонуклеазной активностью; центральный домен с 3´-5´ корректирующей активностью; С-концевой домен с полимеразной активностью [48].

Как и полноразмерная ДНК-полимераза I *E. coli*, фрагмент Кленова служил моделью при исследованиях механизма катализа и структуры ДНК-полимераз. В частности, именно КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* стал первой ДНК-полимеразой, у которой была определена трехмерная структура [49].

С практической точки зрения наибольшую значимость представляет цепь-вытесняющая активность фрагмента Кленова и некоторых его аналогов. Такой фермент может синтезировать новую цепь ДНК, вытесняя при этом уже существующую в 5´-3´ направлении. Кроме фрагмента Кленова цепь-вытесняющая активность обнаружена у его аналогов из бактерий родов *Bacillus* [50] и *Geobacillus* [51], ДНК-полимераз некоторых фагов (Ф29 [52], PyroPhage 3173 [53], Bam35 [54]). Однако у фрагмента Штоффеля *Taq*-полимеразы способность вытеснять цепь отсутствует.

Структурная основа вытеснения цепи ДНК-полимеразами семейства I была выявлена при сравнении 3D-моделей РНК-полимеразы фага T7 и КФ ДНК-полимеразы I *E. coli.* С-концевая часть T7 РНК-полимеразы имеет высокую структурную гомологию с КФ ДНК-полимеразы I *E. coli*, в том числе тех α-спиралей (домен «пальцы»), которые находятся между цепями двуцепочечной ДНК-матрицы в точке их разделения. Именно эти α-спирали денатурируют нити двуцепочечной ДНК при включении нового нуклеотида в растущую цепь. Дальнейшая судьба вытесненной цепи может быть различной. Так, при наличии активного 5´-3´ экзонуклеазного центра вытесненная цепь ДНК гидролизуется [55]. Если экзонуклеазный АЦ неактивен или отсутствует, вытесненная цепь ДНК остается интактной.

Способность некоторых ДНК-полимераз вытеснять цепь позволяет использовать их для методов амплификации ДНК, не требующих термической денатурации цепей. Таким образом, удается преодолевать некоторые ограничения наиболее распространенного метода амплификации ДНК - полимеразной цепной реакции (ПЦР). Подробнее о методах изотермической амплификации ДНК будет рассказано ниже.

2.7 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И УЛУЧШЕНИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

ДНК-полимеразы семейства А чрезвычайно широко используются в современной биотехнологии и медицинской диагностике. Не будет преувеличением сказать, что во многом именно использование ДНК-полимераз позволило совершить резкий скачок в развитии биологии и смежных отраслей, наблюдаемый в последние 25 лет. Первой используемой для генной инженерии полимеразой являлась ДНК полимераза I *E. coli*. Этот фермент применялся для мечения ДНК с помощью ник-трансляции, и в виде фрагмента Кленова – в ранних модификациях ПЦР. Последняя основана на использовании для разделения цепей ДНК периодического нагревания-охлаждения реакционной смеси. Однако прорыв произошел после внедрения в практику ПЦР *Taq*-полимеразы [56], которая в нстоящее время является наиболее часто используемой ДНК-полимеразой. В отличие от ДНК полимеразы I *E. coli* этот фермент термостабилен, вследствие чего исчезает необходимость добавлять новую порцию фермента во время каждого цикла ПЦР. В таком виде ПЦР используется на протяжении более 25 лет; было разработано множество модификаций ПЦР для решения специальных задач, начиная от клонирования ДНК и заканчивая выявлением соматических мутаций в единичных клетках.

ДНК-полимеразы семейства А также используются в альтернативных ПЦР методах амплификации ДНК, секвенировании ДНК, введения в ДНК флуоресцентно или радиоактивно меченых нуклеотидов и т.д.

С момента начала использования ДНК-полимераз предпринимались попытки их модификации для повышения эффективности работы ферментов в практических приложениях. Ряд ограничений *Taq*-полимеразы (сравнительно низкие процессивность, точность синтеза и устойчивость к ингибиторам) невозможно преодолеть изменениями условий пробоподготовки, реакции и т.п., поэтому требуется модификация непосредственно самой ДНК-полимеразы. В некоторых случаях полезным стало введение дополнительного фермента или вспомогательного белка, иногда – замена *Taq*-полимеразы на другой фермент. Так, использование обладающей корректирующей активностью *Pfu*-полимеразы (ДНК-полимеразы семейства В, выделенной из термофильной археи *Pyrococcus furiosus*) позволяет значительно снизить частоту ошибок при ПЦР [57]. Вместе с тем, поскольку *Pfu*-полимераза низкопроцессивна и эффективно ингибируется урацилом [58], её использование в индивидуальном состоянии для ПЦР затруднено. Поэтому чаще всего практикуется одновременное добавление *Pfu*- и *Taq*-полимераз, благодаря чему удается использовать преимущества обоих ферментов: более высокую процессивность *Taq*-полимеразы и повышенную точность *Pfu*-полимеразы. Другие ДНК-полимеразы семейства В, выделенные из гипертермофильных архей и предложенные в качестве замены *Taq*-полимеразы, имеют те же ограничения, что и *Pfu*-полимераза [59–61]. Выделяемые из термофильных бактерий ДНК-полимеразы семейства А также не обладают

радикально лучшими свойствами по сравнению с *Taq*-полимеразой [62,63]. Поэтому одновременно с поиском новых природных ДНК-полимераз, превосходящих *Taq*-полимеразу, проводится модификация уже существующих ферментов. Преимущественно модифицируется *Taq*-полимераза, как наиболее используемый и изученный фермент; прочие ДНК-полимеразы модифицируются значительно реже.

Модификация ферментов может производиться несколькими способами: направленный или случайный мутагенез отдельных аминокислотных остатков, отвечающих за какую-либо функцию; присоединение дополнительных белковых доменов или целых белков; замена целого АЦ на АЦ фермента-гомолога. Выбор конкретного метода модификации зависит от поставленной задачи. В качестве примеров успешных модификаций можно привести получение *Taq*-полимеразы, неактивной при температурах гибридизации праймеров (так называемый «горячий старт», позволяет повысить специфичность ПЦР, что особенно важно для генотипирования, мультиплексной ПЦР и обнаружения низкокопийной ДНК, в том числе за счёт избегания образования димеров праймеров) и создание термосеквеназы. Так, для получения *Taq*-полимеразы с «горячим стартом» использовались химические модификации фермента [64], антитела против полимеразного АЦ [65], мутагенез отдельных аминокислотных остатков [66]. Направленная эволюция *Taq*-полимеразы также позволила получить ферменты с повышенной термостабильностью, устойчивостью к ингибиторам, процессивностью и скоростью амплификации, в том числе коммерчески доступные высокопроцессивные KAPA- и KAPA2G-полимеразы. Для высокопроизводительного скрининга ферментов с полезными свойствами был разработан метод компартментализованной саморепликации (compartmentalized self-replication, CSR) [67]. Сущность метода заключается в последовательных циклах репликации генов полимераз в изолированных каплях ферментами, кодируемыми этими же генами. Библиотека для скрининга формируется посредством амплификации с помощью ошибочной ПЦР гена *Taq*-полимеразы. Полученный набор генов полимеразы клонируется в векторы для экспрессии, которые затем трансформируются в *E. coli*, и нарабатывается набор ферментов. Далее ферменты смешиваются с реакционной смесью и собственной кодирующей последовательностью в отдельных каплях, и проводится саморепликация. После репликации амплифицированные последовательности клонируются в экспрессирующие векторы для *E. coli*, экспрессируется набор Taq-полимераз, после чего проводится ещё один раунд саморепликации либо скрининг полученной библиотеки по какому-либо параметру (устойчивость к ингибиторам, термостабильность и т.д.). С помощью CSR были созданы ферменты, способные продолжать амплификацию, несмотря на наличие повреждений ДНК, в том числе гидантоинов, нескольких мисматчей подряд, утраченных азотистых

оснований и [68]. Такие полимеразы способны более эффективно амплифицировать «древнюю» ДНК, которая характеризуется большим количеством повреждений.

Первые попытки применения *Taq*-полимеразы для секвенирования ДНК по методу Сэнгера столкнулись с проблемой ухудшенного включения дидезоксинуклеозд трифосфатов (ддНТФ) *Taq*-полимеразой. Последняя, как и ДНК-полимераза I *E. coli* преимущественно включает в ДНК дНТФ; в результате требуется создавать 50-1000 кратный избыток ддНТФ для проведения секвенирования. Однако при анализе аминокислотной последовательности ДНК-полимеразы фага T7, одинаково эффективно использующей дНТФ и ддНТФ, удалось установить аминокислотный остаток, отвечающий за различение ддНТФ и дНТФ. Замена в *Taq*-полимеразе этого аминокислотного остатка (фенилаланина в 667-ом положении на тирозин) позволила создать эффективный и надежный фермент для секвенирования – термосеквеназу [69].

Важным параметром, характеризующим ДНК-полимеразы, является процессивность – число нуклеотидов, включающихся в растущую цепь за один акт связывания фермента с матрицей [70]. Процессивность определяет максимальную длину продукта, синтезируемого ферментом. В некоторых случаях (амплификация протяженных фрагментов ДНК и полногеномная амплификация) именно процессивность лимитирует применимость ДНК-полимеразы в конкретном приложении, поскольку далеко не всегда из исследуемого образца удается получить количество ДНК, необходимое или достаточное для анализа. Создание эффективных методов полногеномной амплификации чрезвычайно важно как для решения чисто фундаментальных задач, так и с точки зрения диагностики (подробнее о полногеномной амплификации будет рассказано в главе 2.11).

Как уже упоминалось выше (глава 2.5), ДНК-полимеразы семейства A уступают по процессивности репликативным ДНК-полимеразам. ДНК-полимеразы семейства B характеризуются ещё меньшей процессивностью и способны встраивать за один акт связывания с матрицей считанные нуклеотиды. В клетке высокая процессивность репликативных ферментов обеспечивается рядом вспомогательных белков, таких как PCNA эукариот и архей или белками скользящего зажима (sliding clamp) у бактерий. *In vitro* процессивность ферментов можно увеличить, повышая сродство ДНК-полимеразы к двуцепочечной ДНК за счет модификаций фермента, либо добавляя в реакционную смесь вспомогательные ДНК-связывающие белки [71]. Так, несмотря на многочисленные попытки повышения процессивности *Taq*-полимеразы [72–77], коммерчески успешным стал химерный белок на основе *Pfu*-полимеразы и ДНК-связывающего белка Sso7d термофильной археи *Sulfolobus solfataricus* [78]. Этот фермент, Phusion ДНК-полимераза, соединил в себе точность *Pfu*-полимеразы и высокую процессивность за счет повышения аффинности связывания с ДНК.

Белок Sso7d относится к семейству основных маленьких ДНК-связывающих белков, выделенных из архей порядка *Sulfolobales* [79]. Sso7d способствует плавлению [80] и отрицательной суперспирализации ДНК [81], обладает АТФазной [82] и РНКазной активностями [83]. Sso7d стабилен в широком диапазоне pH и температуры [84] и служит моделью для структурных исследований. Кроме того, на его основе созданы аналоги вариабельных фрагментов антител [85]. Как и Sso7d, повышать эффективность протяжённой ПЦР способны NADH-зависимые ДНК-лигазы, выделенные из термофильных бактерий *T. aquaticus* и *T. thermophilus* [86].

Кроме изменения термостабильности, процессивности и избирательности к нуклеотидам, модификации *Taq*-полимеразы были направлены на изменение точности синтеза ДНК [87,88], устойчивости к ингибиторам амплификации [89,90], придание способности вытеснять цепь ДНК [91]. Более того, создаются варианты *Taq*-полимеразы, способные с высокой эффективностью синтезировать ДНК по матрице РНК, распознавая при этом модификации нуклеотидов в РНК-матрице [92].

Суммируя вышесказанное, не существует универсальной ДНК-полимеразы, подходящей для всех практических приложений. Поэтому представляется разумным создание специализированных ферментов, приспособленных для выполнения определенных задач.

2.8 BST-ПОЛИМЕРАЗА И ЕЁ АНАЛОГИ – ОСОБЕННОСТИ АКТИВНОСТИ И СТРУКТУРЫ

ДНК-полимераза I *Geobacillus stearothermophilus* (*Bst*-полимераза) была выделена в 1972 г. [93], а спустя пять лет было установлено, что этот фермент отличается меньшей точностью по сравнению с ДНК-полимеразой I *E. coli* [94]. Отсутствие корректирующей активности у *Bst*-полимеразы было подтверждено в 1996 г [95].

Организм-продуцент *Bst*-полимеразы – *Geobacillus stearothermophilus* первоначально относили к роду *Bacillus*. В этот большой род, помимо *Geobacillus stearothermophilus,* входил широкий спектр других термофильных аэробных бактерий, который непрерывно пополнялся по мере открытия новых видов. Номенклатура рода *Bacillus* строилась по данным биохимических тестов, однако с развитием молекулярно-биологических методов их результаты начали использовать для коррекции существующей таксономической классификации. В 2001 г. номенклатура рода *Bacillus* была пересмотрена [96]. Основой для новой классификации стала гомология последовательности 16S рРНК, в результате чего единый род *Bacillus* был разделен. В частности, ряд термофильных бактерий, ранее относимых к роду *Bacillus* был объединен во вновь созданный род *Geobacillus*. В новый род был включен и вид *Bacillus stearothermophilus,* сменивший таким образом свое родовое название на *Geobacillus*. Однако устоявшееся к тому

времени сокращенное название ДНК-полимеразы I, выделенной из *Geobacillus stearothermophilus*, осталось неизменным – *Bst*-полимераза.

Bst-полимераза привлекла интерес в начале 1990-х в связи с разработкой новых методов секвенирования ДНК. Интерес был вызван рядом свойств этого фермента, в том числе температурным оптимумом в районе 60°С и большей процессивностью по сравнению с *Taq*-полимеразой, которые позволяли увеличить точность и удешевить процедуру секвенирования. В целях улучшения свойств фермента был получен большой фрагмент (large fragment, БФ) *Bst*-полимеразы длиной 592 а.о., аналогичный КФ ДНК-полимеразы I *E. coli,* и не имеющий 5´-3´-экзонуклеазной активности [95]. Как и КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* БФ *Bst*-полимеразы первоначально получали протеолитическим путем, расщепляя *Bst*-полимеразу субтилизином [97]. Позднее нуклеотидную последовательность, кодирующую большой фрагмент, клонировали в экспрессирующие векторы и более тщательно исследовали свойства БФ *Bst*-полимеразы (Таблица 2). Альтернативный путь удаления 5´-3´-экзонуклеазной активности с помощью введения аминокислотных замен был более трудоемок и не получил широкого распространения [98].

Таблица 2 - Сравнение специфической активности, процессивности и кинетических параметров БФ *Bst*-полимеразы, *Taq*-полимеразы и КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* [32]

Полимераза	Специфическая активность е.а./мг*		$k_{кат}$	K_m		Процессивность, н.
	ДНК из тимуса теленка	Праймированная ДНК фага М13		ДНК (нМ)	дНТФ (мкМ)	
БФ *Bst*-полимеразы	$1,5x10^5$	$4,9x10^5$	191,2 (39,3)	3,4 (1,6)	13,0 (5,5)	111,0
Taq-полимераза	$2,2x10^4$ $1,7x10^4$	$4,9x10^4$	46,6 (16,3)	3,5 (1,1) 1,4	24,0 (2,3) 16,0	10,0 42,0 (30,0)
КФ ДНК полимеразы I *E. coli*	$9,7x10^3$ $9,8x10^3$	$5,5x10^5$ $2,8x10^4$	5,2 2,8	1,8	2,3	7,0 7,7

* Специфическая активность указана в единицах активности (е.а.) на мг белка, где единица активности определена как количество фермента, необходимое для включения 10 нмоль дНТФ за 30 мин в кислотонерастворимую фракцию.

Оптимальная температура работы БФ *Bst*-полимеразы составляет 60°С, его процессивность на порядок выше по сравнению с КФ ДНК-полимеразы I *E. coli*. Более того, у БФ *Bst*-полимеразы каталитическая константа $k_{кат}$ для полимеразного центра (величина, показывающая эффективность превращения субстрата в активном центре фермента), в 40 раз больше, чем у КФ ДНК-полимеразы I *E. coli*. Аминокислотные последовательности С-концевых (полимеразных) доменов обоих ферментов совпадают на 48,4%, однако N-концевые (3´-5´-экзонуклеазные) домены гомологичны лишь на 19,8%.

Спустя некоторое время была определена 3D-структура БФ *Bst*-полимеразы (Рисунок 3) [32].

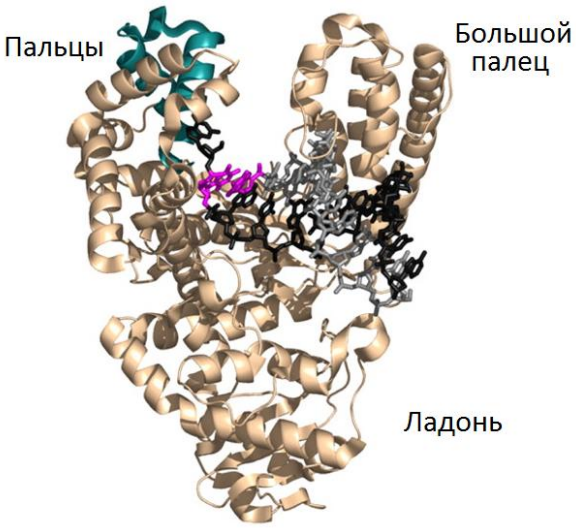

Рисунок 3. Структура комплекса БФ *Bst*-полимеразы и ДНК [99]. α-спиральный скелет БФ *Bst*-полимеразы обозначен *бежевым*, за исключением подвижного сегмента домена «пальцы», выделенного *бирюзовым*. Матричная цепь ДНК окрашена *темно-серым*, праймер – *светло-серым*.

Экзонуклеазный домен (на Рисунке 3 не показан, 469 а.о.) сохранил высокую структурную гомологию с ДНК-полимеразой I *E. coli*, однако утратил каталитическую активность. Отличие заключается в трех делециях в корректирующем АЦ *Bst*-полимеразы. Для 3´-5´ экзонуклеазной активности КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* необходимо наличие двух двухвалентных катионов Me^{2+}, участвующих в катализе. Они связываются четырьмя аминокислотными остатками, три из которых заменены в Bst-полимеразе, в результате чего её корректирующий АЦ не может связывать катионы Me^{2+}. Кроме того, заменены аминокислотные остатки, отвечающие в корректирующем АЦ за связывание нуклеозид монофосфата и ДНК. В совокупности это исключает всякую возможность связывания ДНК экзонуклеазным доменом. Функция 3´5´-экзонуклеазного домена до сих пор остается невыясненной, в интактном ферменте он является линкером между полимеразным и 5´-3´-экзонуклеазным доменом.

Полимеразный домен БФ *Bst*-полимеразы структурно сходен с соответствующими доменами других ДНК-полимераз семейства А и образован тремя субдоменами: «пальцы», «ладонь» и «большой палец» [32]. Ключевые аминокислотные остатки, участвующие в катализе, совпадают с соответствующими остатками в КФ ДНК-полимеразы I *E. coli*. Субдомены «пальцы» и «большой палец» участвуют в связывании ДНК, и структурные изменения в них напрямую влияют на процессивность ДНК-полимеразы. Перемычка между парой α-спиралей в «большом пальце» в БФ *Bst*-полимеразы составляет один а.о., в КФ ДНК

полимеразы I *E. coli* – три а.о. Вместе с тем, в этом же субдомене БФ *Bst*-полимеразы смещена одна из α-спиралей. Возможно, что именно эти различия обусловливают большую процессивность БФ *Bst*-полимеразы.

Существуют определенные структурные особенности, характерные для термостабильных белков, благодаря которым температурный оптимум БФ *Bst*-полимеразы выше, чем у ДНК-полимеразы I *E. coli*. К ним относятся:

- увеличение числа а.о. на поверхности фермента, участвующих во взаимодействии доменов фермента [76];
- уплотнение структуры, исчезновение петель, экспонированных на поверхности [32].

С практической точки зрения любопытным представляется сочетание у *Bst*-полимеразы цепь-вытесняющей активности и более высокой устойчивости к ингибиторам по сравнению с *Taq*-полимеразой [100]. Устойчивость к ингибиторам определяет пригодность фермента для использования в диагностике у постели больного, о которой будет рассказано ниже. В начале 2000-х *Bst*-полимераза привлекла к себе внимание в связи с развитием методов изотермической амплификации. Параллельно продолжалось описание аналогов *Bst*-полимеразы – мезофильных ДНК-полимераз, обладающих цепь-вытесняющей активностью.

Клонирование и описание биохимических свойств ДНК-полимераз из экстремофильных организмов – традиционный путь поиска ферментов с полезными для практических приложений свойствами. Также как и модификации известных ДНК-полимераз, описанные в разделе 2.7, клонирование позволяет получить ферменты, превосходящие известные аналоги, в особенности при изучении экстремофильных организмов. За период с 2000 по 2017 гг. было описано 3 новых ДНК-полимеразы семейства A – аналогов *Taq*-полимеразы [101–103] и 17 новых ДНК-полимераз семейства B – аналогов *Pfu*-полимеразы [61,62,104–116].

Bst-полимераза не стала исключением: было клонировано и описано несколько её аналогов из семейств ДНК-полимераз A и B [51,53,117–121] – 11 и 1, соответственно. Большинство этих ферментов (9) выделено из мезофильных бактерий родов *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Caldicellulosiruptor*. Однако за исключением двух ДНК-полимераз, выделенных из фагов, вновь клонированные ферменты не использовались для проведения изотермической амплификации; устойчивость аналогов *Bst*-полимеразы к ингибиторам не устанавливалась. Таким образом, оценка пригодности описанных ферментов для использования в диагностике затруднена. Из аналогов *Bst*-полимеразы следует особо выделить ДНК полимеразу 3173 из фагового метагенома, полученного в Йеллоустонском национальном парке [122]. Этот фермент, одновременно пригодный для проведения ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и LAMP, показывает, что поиск новых природных ДНК-полимераз сохраняет свою актуальность для биотехнологии.

2.9 ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ

Амплификация ДНК чрезвычайно широко используется в современной биотехнологии. Из всех способов амплификации ДНК наиболее распространена полимеразная цепная реакция. ПЦР проста в исполнении и достаточно надежна, однако у этого метода есть ряд ограничений. Так, для разделения комплементарных цепей ДНК в ПЦР используется нагревание, после чего реакционная смесь охлаждается для гибридизации праймеров. Такой циклический процесс требует наличия специальных приборов – амплификаторов. Еще один недостаток ПЦР – сложность амплификации протяженных участков ДНК. Максимальный размер амплифицируемого фрагмента зависит от многих параметров, главным из которых является процессивность ДНК-полимеразы. Используемые для ПЦР ДНК-полимеразы термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, *Thermococcus litoralis* (Vent-полимераза) сравнительно низкопроцессивны и потому малопригодны для амплификации фрагментов ДНК длиной в десятки и сотни тысяч пар нуклеотидов. Всё это стало ясно ещё в начале 90-х годов XX века и послужило причиной для разработки альтернативных ПЦР-методов амплификации нуклеиновых кислот [123].

Изотермичность достигается за счет использования нескольких специальных приемов. Это могут быть различные сочетания синтеза РНК, обратной транскрипции и деградации РНК в ДНК:РНК дуплексе [124,125]. В другом классе методов цепи ДНК разделяются с помощью термостабильных геликаз [126,127]. Третий класс основан на цепь-вытесняющей активности некоторых ДНК-полимераз – в том числе *Bst*-полимеразы и высокопроцессивной ДНК-полимеразы фага Ф29 [128–130]. Именно последний класс методов и будет более подробно описан далее.

Первым таким способом амплификации, разработанным в 1992 г. Уолкером с соавторами [131], была амплификация с вытеснением цепи (strand displacement amplification, SDA). В оригинале эта методика предполагала амплификацию ДНК с помощью КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* и четырех праймеров (Рисунок 4).

Введение в протокол обратной транскрипции позволяет детектировать с помощью этого метода РНК. Используется амплификация с вытеснением цепи для диагностики инфекционных заболеваний [133].

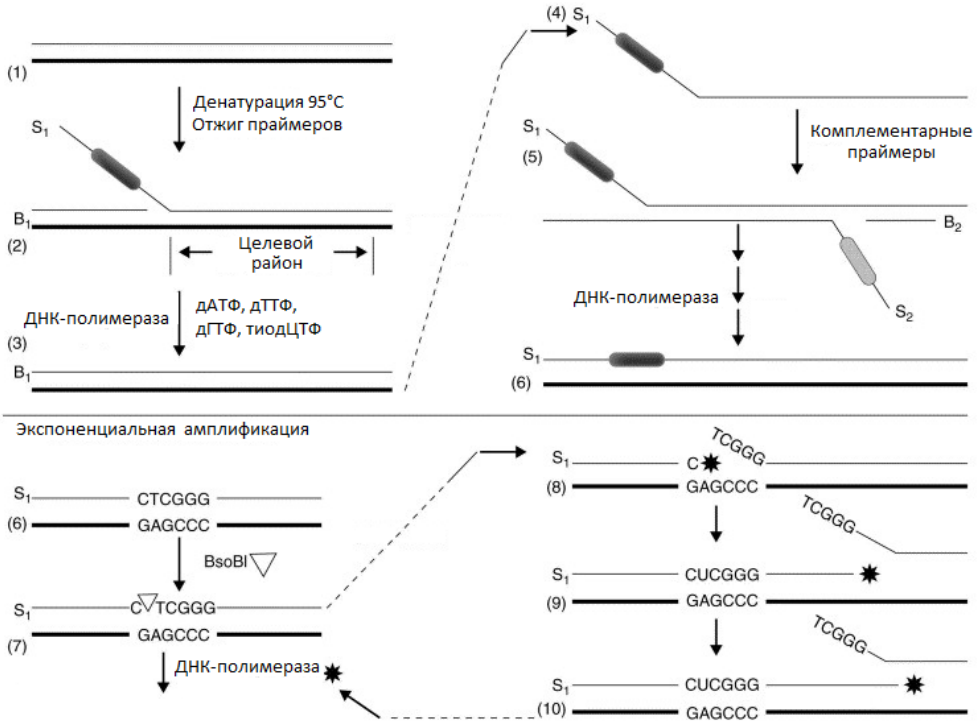

Рисунок 4. Схема амплификации с вытеснением цепи с модификациями по Швейцер с соавторами [132]. Район узнавания эндонуклеазы рестрикции выделен закрашенными прямоугольниками, эндонуклеаза рестрикции – белый треугольник, ДНК-полимераза – звездочкой. На первом этапе (1) с денатурированной ДНК-матрицей гибридизуется две пары праймеров, одна из которых несет на 5´-концах сайты для эндонуклеазы рестрикции (сайты образованы модифицированными нуклеотидами). После синтеза (2-4) второй цепи новообразованный дуплекс разделяется при амплификации со второй пары праймеров (5-6). Далее специально подобранная эндонуклеаза рестрикции вносит одноцепочечный разрыв (7) по сайту, введенному с первой парой праймеров (разрыв одноцепочечный, т.к. одна из цепей модифицирована). С разрыва начинается синтез новой цепи (8), существующая цепь при этом вытесняется (9-10) и служит матрицей для следующего цикла амплификации (7).

Конструктивные особенности амплификации с вытеснением цепи обусловили её недостатки. Так, температурный оптимум КФ ДНК-полимеразы I *E. coli* лежит в районе 37°C. Некоторые последовательности невозможно амплифицировать с помощью этого метода из-за использования эндонуклеаз [134]. Поэтому в дальнейшем метод был усовершенствован. Результатом стала разработка кольцевой амплификации (rolling circle amplification, RCA) и амплификации с множественным вытеснением (multiple displacement amplification, MDA).

Кольцевая амплификация представляет воспроизведенный *in vitro* механизм репликации ДНК некоторых бактериофагов [130] (Рисунок 5).

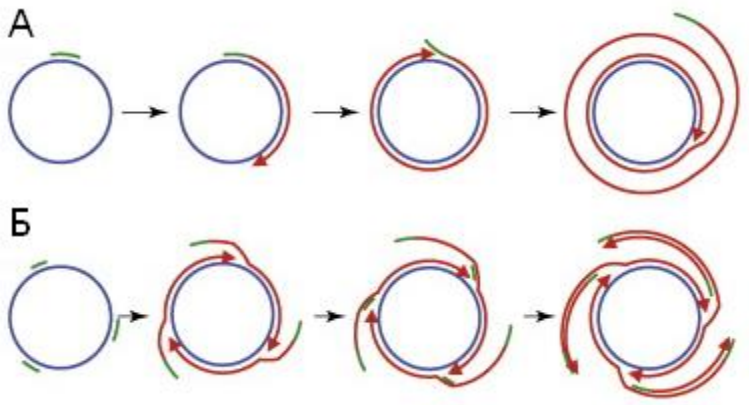

Рисунок 5. Схема кольцевой амплификации (А) – с одного праймера, (Б) – с нескольких праймеров. Одноцепочечная ДНК-матрица выделена *синим*, праймер – *зеленым*, вновь синтезированная цепь ДНК – *красным*. На первом этапе амплификации происходит гибридизация одного или нескольких праймеров на кольцевую матрицу и элонгация с этих праймеров. При этом ДНК-полимераза, полностью амплифицировав матрицу, начинает вытеснять *de novo* синтезированную цепь. Со вновь синтезированной цепью могут гибридизоваться праймеры, с которых идет элонгация и т.д.

В реакции используется кольцевая молекула ДНК-матрицы (может создаваться непосредственно в самой реакции с помощью специальных праймеров), один или несколько праймеров и ДНК-полимераза с цепь-вытесняющей активностью; чаще всего используют ДНК-полимеразу фага Ф29. Этот фермент обладает наибольшей процессивностью из всех известных ДНК-полимераз, но его температурный оптимум составляет около 30°С. Кольцевая амплификация широко используется для молекулярной диагностики различных инфекционных заболеваний либо для поиска однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) [135]. Еще одна сфера применения кольцевой амплификации – анализ экспрессии генов, амплификация целых геномов и приготовление матриц для секвенирования [136]. Однако для двух последних больше подходит амплификация с множественным вытеснением (Рисунок 6).

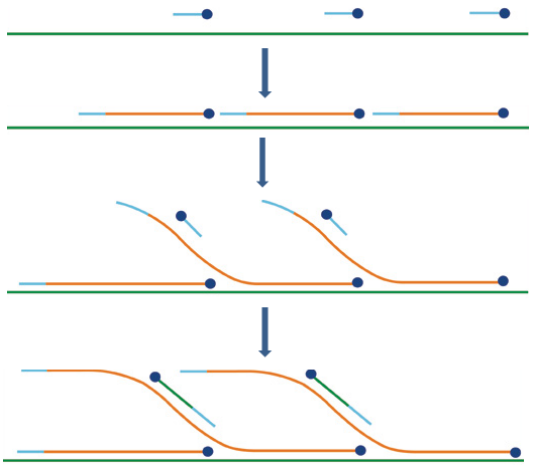

Рисунок 6. Схема амплификации с множественным вытеснением цепи. Матричная цепь ДНК обозначена *зеленым*, праймеры – *голубым*, ДНК-полимераза – *синим*, вновь синтезированная цепь ДНК – *оранжевым*. На первом этапе амплификации происходит гибридизация одного или нескольких праймеров с матричной цепью ДНК и элонгация этих праймеров. При этом ДНК-полимераза, дойдя до 5´-конца следующего праймера, начинает его вытеснять вместе с *de novo* синтезированной цепью. С вновь синтезированной цепью могут гибридизоваться праймеры, которые элонгируются и т.д.

Амплификация с множественным вытеснением (multiple displacement amplification, MDA) основана на использовании нескольких праймеров и ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью [129]. Существует два варианта этого метода, первый из которых применяется для амплификации специфического участка ДНК с помощью двух наборов праймеров, фланкирующих искомую последовательность ДНК. Во втором варианте амплификации с множественным вытеснением применяется набор статистических праймеров, которые случайным образом гибридизуются с ДНК-матрицей. Благодаря этому становится возможной амплификация целого генома, вплоть до амплификации генома единичной клетки [137].

Вариант MDA для амплификации специфических участков ДНК был разработан в 2009 г. и назван кросс-праймерной амплификацией (cross-priming amplification, CPA) [138]. Схема CPA представлена на Рисунок 7.

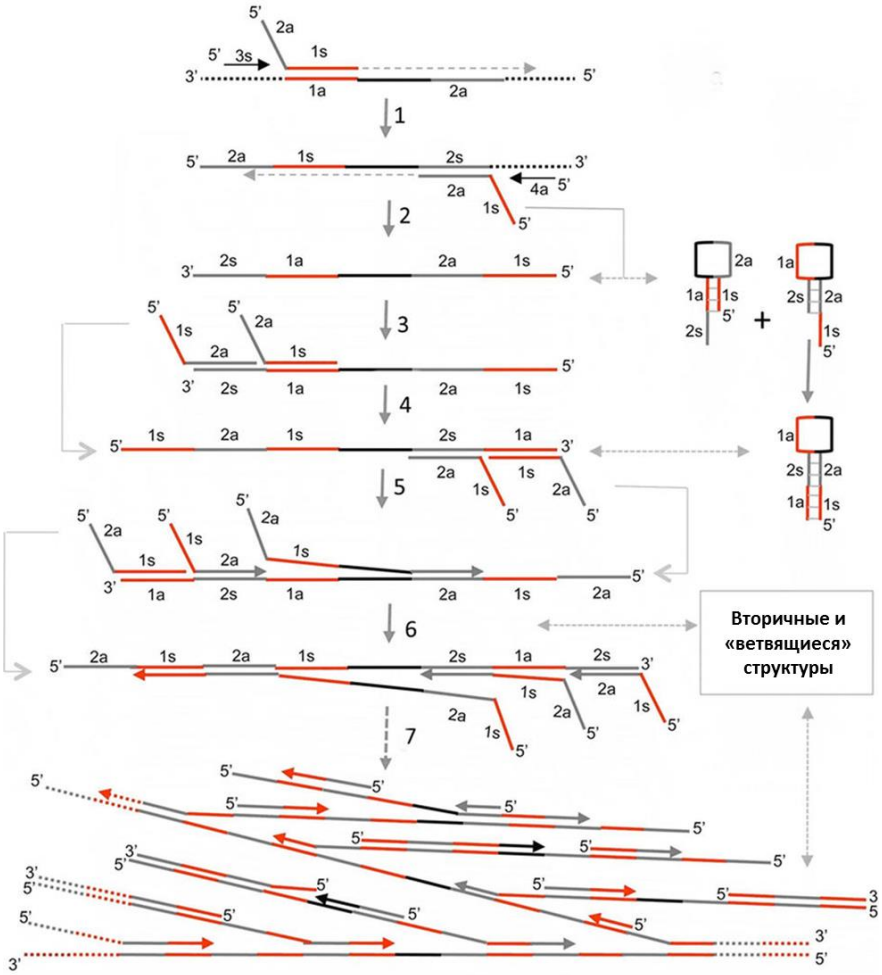

Рисунок 7. Схема кросс-праймерной амплификации с модификациями по Гаолянь с соавторами [139]. Амплификация стартует с гибридизации региона 1s прямого праймера с участком матричной ДНК 1a, гибридизованный праймер элонгируется и вытесняется ДНК-полимеразой с цепь-вытесняющей активностью при элонгации праймера 3s (1). С участком 2s вытесненного одноцепочечного фрагмента ДНК связывается регион 2a обратного праймера, обратный праймер элонгируется и вытесняется при элонгации праймера 4a (2). Полученный одноцепочечный фрагмент ДНК (3) гибридизуется с прямым (участок 1s) и обратным (участок 1a) праймерами, после чего запускается синтез разветвленных структур (5-7).

Первоначально продукт реакции детектировался при помощи гель-электрофореза, позднее была показана возможность детекции посредством гибридизационных устройств [140–142] и интеркалирующими красителями в режиме реального времени [143]. На основе СРА созданы тест-системы для детекции генно-модифицированных организмов (ГМО) [143], патогенов человека [138,141] и сельскохозяйственных животных [144,145].

Полимеразная спиральная реакция (polymerase spiral reaction, PSR), разработанная в 2015 г., полагается на ДНК-полимеразу с цепь-вытесняющей активностью и пару праймеров. Схема PSR представлена на Рисунок 8.

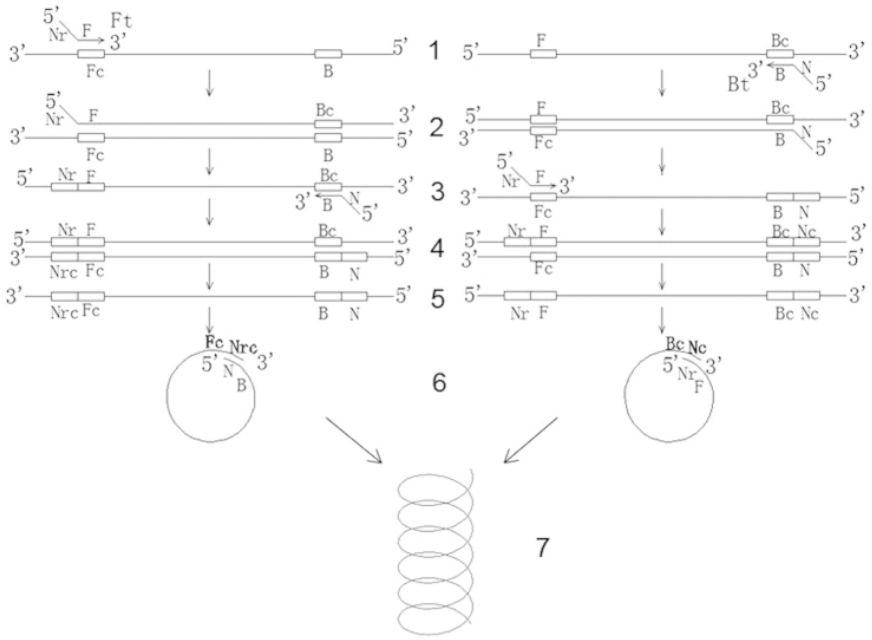

Рисунок 8. Схема полимеразной спиральной реакции по Лю с соавторами [146]. Сайты F и B прямого и обратного праймеров связываются с сайтами Fc и Bc на матричной ДНК, после чего происходит элонгация с помощью ДНК-полимеразы (1-2). С регионами Bc и Fc на вновь синтезированных цепях ДНК также гибридизуются сайты B и F обратного и прямого праймеров, элонгируемые ДНК-полимеразой (3-4). Синтезированные одноцепочечные фрагменты формируют кольца (6) за счет комплементарных регионов N/Nrc и Nc/Nr, которая служит матрицей для синтеза спирали (7).

Результаты PSR могут быть детектированы посредством гель-электрофореза или при помощи интеркалирующих красителей, в том числе в режиме реального времени. На основе PSR разработаны тест-системы для выявления патогенов человека и сельскохозяйственных животных: *Pseudomonas aeruginosa* [147], *Candida albicans* [148] и вируса африканской чумы свиней [149].

Ещё один метод изотермической амплификации, использующий цепь-вытесняющую активность ДНК-полимеразы – петлевая амплификация (hinge-initiated primer-dependent amplification, HIP). Метод основан на комбинации ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью и пары праймеров, образующих шпильки (Рисунок 9).

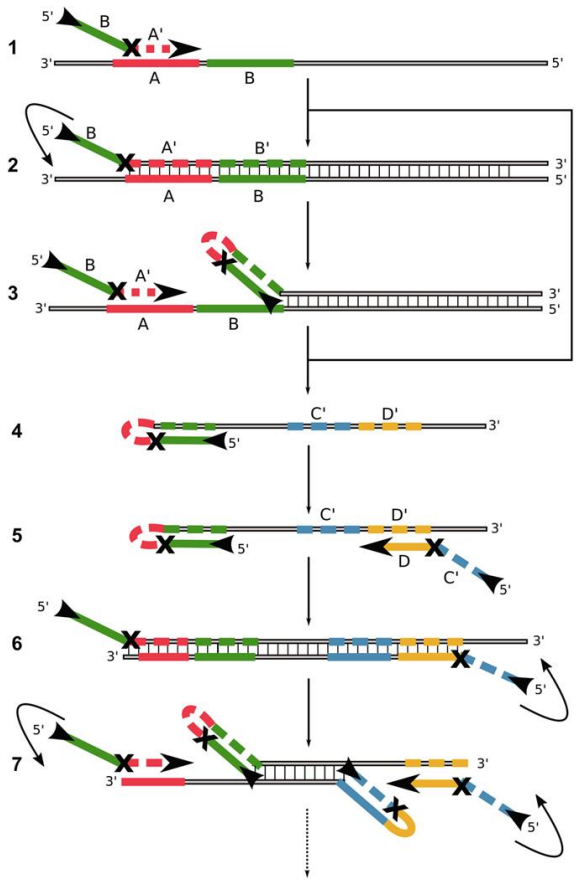

Рисунок 9. Схема петлевой амплификации по Фишбаху с соавторами [150]. Амплификация начинается со связывания сайта A′ праймера с сайтом A матричной ДНК (1). При элонгации с помощью ДНК-полимеразы (2) синтезируется регион B′, температура плавления дуплекса B-B′, больше, чем у дуплекса A-A′. В результате формирования шпильки B-B′ между сайтом B праймера и вновь синтезированным сайтом B′ происходит освобождение сайта связывания A на ДНК-матрице для следующего праймера (3), и цикл 1-3 может быть повторён. После вытеснения синтезированная шпилька (4) становится доступной для посадки обратного праймера (5), который функционирует схожим с прямым праймером образом. После элонгации (6) обратный праймер формирует шпильку (7). Впоследствии реакция циклического синтеза продолжается, и может быть детектирован накапливающийся специфический продукт. X отображает химическую модификацию, блокирующую ДНК-полимеразу (фуран или гексиленгликоль).

Накапливающийся специфичный продукт реакции может быть детектирован в режиме реального времени с помощью интеркалирующего красителя. К преимуществам HIP следует отнести простоту методики: реакция проводится одним ферментов и с одной парой праймеров. Однако в связи с новизной (HIP описана в 2017 г.), тест-системы на основе данной методики пока отсутствуют.

Совершенствование методов изотермической амплификации продолжается. Кроме разработки новых методов (PSR, HIP) в последние несколько лет появились системы цифровой изотермической амплификации [151–154]. Цифровая амплификация, основанная на многократном разведении ДНК-матрицы и ее амплификации с единичной молекулы ДНК в каждом реакционном объеме, позволила вывести молекулярную диагностику на новый уровень.

Благодаря им появилась возможность проводить неонатальный скрининг по ДНК плода в крови матери, напрямую подсчитывать количество резистентных клеток в опухоли и т.п. Однако цифровая амплификация на основе ПЦР выдвигает высокие требования к аппаратному обеспечению. Использование методов цифровой изотермической амплификации в перспективе даст возможность серьезно упростить и удешевить необходимые приборы.

2.10 ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕТЛЕВАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ

В 2000 г. Нотоми с соавторами была разработана технология изотермической петлевой амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Первоначально этот метод предполагал использование двух пар праймеров (внешней и внутренней) и ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью [128] (Рисунок 10). Позднее разработчиками была введена дополнительная пара праймеров для улучшения кинетики амплификации.

LAMP по чувствительности (предел чувствительности до нескольких молекул ДНК) и специфичности сравнима со ПЦР, а в некоторых случаях превосходит её. Отмечена также повышенная устойчивость LAMP к действию ингибиторов ПЦР [100].

Основная сфера применения LAMP – диагностика у постели больного или диагностика в поле (point-of-care, in-field diagnostics). И в том, и в другом случае анализ проводится непосредственно на месте забора образца либо максимально приближенно к нему, что позволяет увеличить скорость получения результатов и быстрее принимать решение о назначении соответствующей терапии. Важнейшим параметрами, определяющими пригодность метода для диагностики в поле, являются простота анализа и его устойчивость к действию ингибиторов, отсутствие потребности в дорогостоящей громоздкой аппаратуре. По сравнению с ПЦР методы изотермической амплификации более удобны для диагностики в поле, а среди них LAMP является одним из наиболее простых и надежных.

В силу вышесказанного, LAMP активно используется для диагностики инфекционных заболеваний [155–159] и генотипирования [160–162]. Как и в других методах амплификации ДНК, точность дискриминации целевой ДНК в анализе обеспечивается специфичными к этой последовательности праймерами. Так, при поиске ОНП 3´-конец внутренней пары праймеров комплементарен конкретному варианту однонуклеотидного полиморфизма.

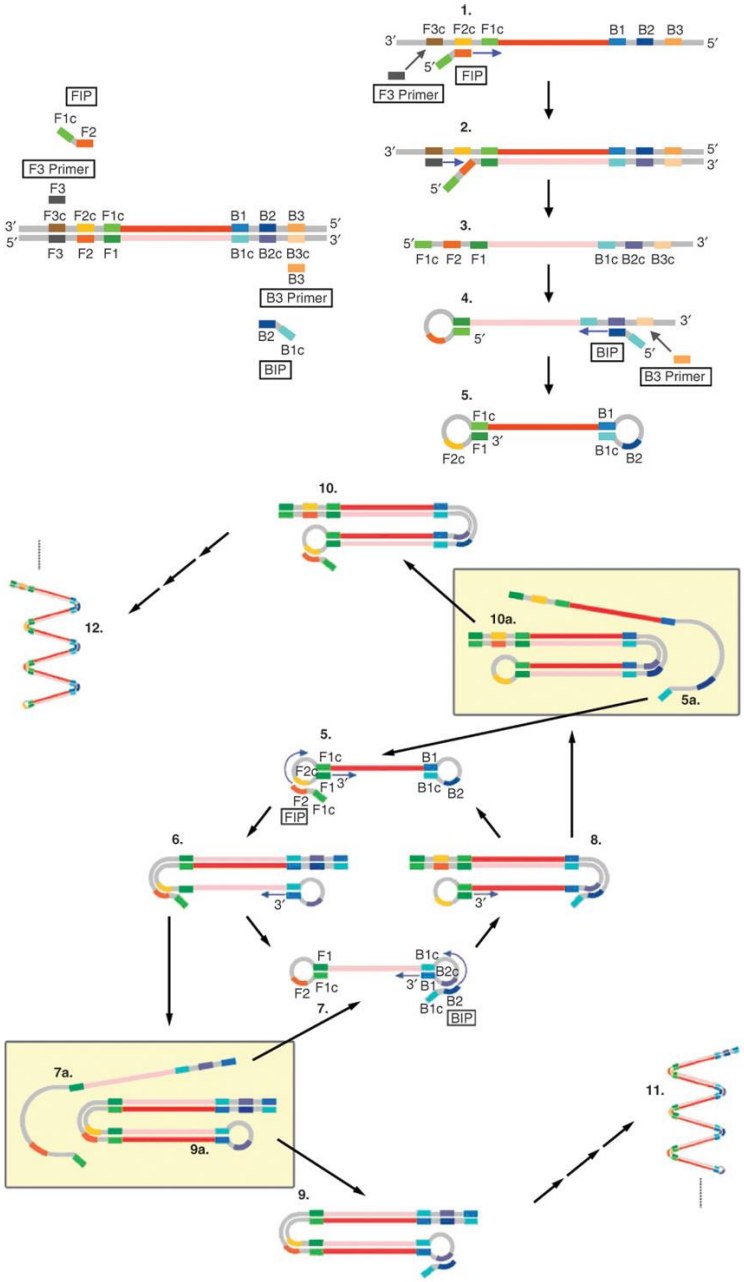

Рисунок 10. Схема изотермической петлевой амплификации по Томита с соавторами [163]. Амплифицируемый район ДНК обозначен *красным* и *розовым*, внешние праймеры – *черным* и *персиковым*, комплементарные им участки на матрице – *коричневым* и *бежевым,* соответственно. Внутренние праймеры: прямой – *оранжевым* и *салатовым*, обратный – *голубым* и *индиго*, комплементарные им районы матрицы – *желтым*, *изумрудным*, *синим* и *лазоревым,* соответственно. На первом этапе амплификации происходит гибридизация всех праймеров с ДНК-матрицей и элонгация с этих праймеров (1-3). При этом ДНК-полимераза, дойдя до 5´-конца следующего праймера, начинает его вытеснять вместе с *de novo* синтезированной цепью (4). С вновь синтезированной цепью также могут гибридизоваться праймеры, которые элонгируются с вытеснением цепи. В результате за счет специально подобранной структуры 5´-районов внутренних праймеров образуется «стволовая» шпилька (5). Она становится основой для дальнейшей амплификации, которая идет как с 3´-конца самой шпильки, так и с внутренних праймеров, которые с ней гибридизуются (10). Продуктом реакции является либо сама стволовая шпилька (5-7, 8), либо конкатемеры амплифицируемой последовательности (5–11, 5-12).

Мультиплексирование (проведение амплификации нескольких участков ДНК одновременно) уменьшает громоздкость тест-систем и делает их применение более гибким. В отличие от ПЦР, продуктом LAMP является совокупность конкатемеров разной длины. Таким образом, одновременная амплификация нескольких последовательностей с помощью LAMP требует дополнительных приемов для определения результата реакции. Один из самых простых – введение в праймеры (или использование уже имеющихся в мишени) сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции. После проведения LAMP ДНК-продукты подвергаются гидролизу соответствующими ферментами, в результате чего получается набор фрагментов ДНК строго определенной длины, заданной расстоянием между внешними праймерами LAMP. Этот набор может быть легко проанализирован с помощью гель-электрофореза [164,165]. Более сложный способ мультиплексирования LAMP – использование ДНК-зондов, меченых флуоресцентными красителями, и проведение реакции в режиме реального времени [166]. Этот вариант требует более дорогостоящего оборудования, но менее подвержен контаминации и позволяет оценивать кинетику амплификации разных мишеней.

Для детекции результатов LAMP могут использоваться подходы, основанные на разных принципах. В первую очередь, измерение оптической плотности [167], или флуоресценции [163] при введении специальных красителей, модификации праймеров [168] или введения флуоресцентно-меченных зондов [169], колориметрия [170]. Детекция по оптической плотности при 400 нм возможна за счет образования в ходе реакции большого количества пирофосфата магния, который увеличивает оптическую плотность реакционной смеси.

Несмотря на то, что первоначально LAMP предназначалась для проведения амплификации в полевых условиях, этот метод может быть модифицирован для проведения амплификации в режиме реального времени. Как уже упоминалось выше, проведение амплификации с одновременной детекцией результатов может быть полезным для оптимизации условий анализа. Как и в случае с детекцией результатов реакции *post factum*, накопление продукта в режиме реального времени может регистрироваться по изменению оптической плотности, флуоресценции [166,171,172] и электрохимичекими методами [173]. Для измерения оптической плотности или разности потенциалов требуются специальные приборы, в то время как детекция флуоресценции может осуществляться стандартными амплификаторами для проведения ПЦР в режиме реального времени. Однако флуоресцентные красители могут быть ингибиторами амплификации ДНК, причем степень ингибирования варьирует у разных красителей [174,175]. Поэтому при их использовании следует аккуратно подбирать как сам краситель, так и его концентрацию.

Общие тенденции в использовании LAMP: миниатюризация реакционного объема и перевод реакции в цифровой формат [176], разработка специальных устройств для полевой диагностики [177], мультиплексирование реакции [178].

2.11 ПОЛНОГЕНОМНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ

Большинство методов анализа геномной ДНК требуют определённого количества стартового материала. Однако в ряде случаев количество геномной ДНК, которое можно выделить из образца, исчисляется пикограммами (при анализе единичных клеток в пренатальной диагностике). Зачастую ограничено не только количество анализируемой ДНК, но и её качество оставляет желать лучшего, особенно в случае исследований «древней» ДНК или ДНК, выделяемой из гистологических блоков. В обоих вариантах выделяемая из образца ДНК крайне фрагментирована и содержит множество химических модификаций. Последнее особенно характерно для ДНК, выделяемой из гистологических блоков, поскольку самый распространённый агент для фиксации тканей – формалин, легко реагирует с основаниями ДНК. В связи с этим, существует большая потребность в методах амплификации полных геномов, ПГА (whole genome amplification, WGA), которые позволяли бы нарабатывать достаточные количества ДНК, пригодной для последующего исследования (в частности, полногеномного секвенирования и сравнительной геномной гибридизации).

Первые методы полногемной амплификации были основаны на использовании ПЦР – ПЦР с диспергированными повторяющимися последовательностями (interspersed repetitive sequence, IRS-PCR или Alu-ПЦР) [179], ПЦР с вырожденными праймерами (degenerate oligonucleotide primed, DOP-PCR) [180], ПЦР с преамплификацией (pre-amplification, PEP-PCR) [181], ПЦР с лигированием (ligation-mediated, LM-PCR) [182–184]. Эти методы предполагают использование праймеров, комплементарных повторяющимся последовательностям (Alu-ПЦР), искусственно введенным адаптерам (LM-ПЦР), полностью (PEP-ПЦР) либо частично (DOP-ПЦР) вырожденных праймеров. Все эти методы имеют ряд ограничений, обусловленных конструктивными особенностями. Так, Alu-ПЦР, основанная на использовании Alu-повторов, мало подходит для амплификации геномов, в которых эти повторы слабо представлены. Кроме того, продукт Alu-ПЦР обогащен последовательностями с часто встречающимися Alu-повторами [185]. Продукты DOP-ПЦР сравнительно коротки, характеризуются сильным смещением представленности индивидуальных локусов (размахом до трех порядков), и при малом количестве исходной ДНК-матрицы часто регистрируется утрата аллелей [186]. Поэтому, хотя DOP-ПЦР позволяет амплифицировать геномную ДНК из гистологических блоков, этот метод нашёл ограниченное применение для ПГА. Эффективность праймирования в PEP-ПЦР сильно варьирует, количество продукта мало по сравнению с другими методами ПГА

и в продуктах отмечается сильное смещение представленности аллелей [129]. Варианты LM-ПЦР превосходят прочие основанные на ПЦР методы ПГА по количеству и качеству продукта реакции [187], однако паттерн праймирования по-прежнему остается невоспроизводимым, что может сказываться на результатах последующих анализов.

Спустя некоторое время после появления ПЦР-методов для полногеномной амплификации было предложено использовать в этих же целях амплификацию с множественным вытеснением цепи, MDA (принцип описан в главе 2.9). Особенно выгодным является использование ДНК-полимеразы фага Ф29 из-за её чрезвычайно высокой процессивности (до 70 тысяч нуклеотидов за один акт связывания с матрицей). Фермент с такой высокой процессивностью позволяет нарабатывать большие количества высокомолекулярной ДНК, облегчая последующие исследования. Еще одно преимущество повышенной процессивности – уменьшение количества химерных фрагментов ДНК, которые возникают при спонтанной гибридизации 3´-конца растущей цепи с удаленным районом амплифицируемой ДНК.

Тем не менее, MDA также не лишена недостатков; в частности, отмечены перестройки в ДНК-продукте, значительная частота потери аллелей. ДНК-полимераза фага Ф29 также не способна амплифицировать деградировавшую ДНК из гистологических блоков; последнее затруднение можно преодолеть с помощью *Bst*-полимеразы.

Суммируя вышесказанное, не существует идеального метода полногеномной амплификации ДНК. Каждый из существующих подходов имеет свои преимущества и недостатки, поэтому выбор конкретного метода полногеномной амплификации определяется спецификой задачи. Поэтому продолжается разработка новых методов и улучшение уже существующих. Важным направлением в этом контексте является создание специализированных ДНК-полимераз для полногеномной амплификации, в особенности с повышенной процессивностью.

2.12 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНК-полимеразы – ферменты, катализирующие синтез ДНК и участвующие во всех клеточных процессах её метаболизма. *In vitro* ДНК-полимеразы широко используются в биотехнологии и медицинской диагностике.

По гомологии аминокислотной последовательности ДНК-полимеразы разделяются на семь семейств. Из них в прикладном аспекте наиболее часто используются ДНК-полимеразы семейств A и B. Самый известный молекулярно-биологический метод, использующий ДНК-полимеразы – ПЦР, а наиболее часто применяемая ДНК-полимераза – *Taq*-полимераза, ДНК-полимераза I термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Спектр возможных приложений ПЦР

чрезвычайно широк, начиная от клонирования ДНК и закачивая выявлением полиморфизма ДНК.

Несмотря на гибкость и надежность метода, у ПЦР существуют неустранимые ограничения. Для проведения ПЦР (за исключением, основанным на использовании конвекции в капилляре [188]) требуются специальные приборы – амплификаторы, что ограничивает её пригодность для диагностики в полевых условиях вне лабораторий. Другое значимое ограничение ПЦР – сложность амплификации целых геномов.

Альтернативные ПЦР-методы амплификации ДНК часто основаны на использовании цепь-вытесняющей активности некоторых ДНК-полимераз (ДНК-полимераза фага Ф29, *Bst*-полимераза - ДНК-полимераза I мезофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*). Такие полимеразы синтезируют новую цепь ДНК, вытесняя при этом уже существующую цепь в 5´-3´ направлении, в связи с чем исчезает необходимость в дополнительном этапе термической денатурации двуцепочечной молекулы ДНК. Подобные методы амплификации ДНК при постоянной температуре (изотермической амплификации ДНК) являются удобной альтернативой ПЦР для проведения полевой диагностики либо полногеномной амплификации.

Выделяемые из различных организмов ферменты, в том числе ДНК-полимеразы, нередко нуждаются в модификации для повышения эффективности применения в практических приложениях. Модификация ферментов может производиться с помощью случайного или направленного мутагенеза отдельных аминокислотных остатков или присоединения/удаления целых белковых доменов. Посредством последнего способа уже был успешно улучшены свойства ряда ДНК-полимераз (ДНК-полимераза фага Ф29, *Taq*-полимераза). Однако *Bst*-полимераза, один из основных ферментов, используемых для изотермической амплификации, до настоящего момента не был модифицирован.

Суммируя вышесказанное, представляется целесообразным применить технологию получения химерных белков для улучшения *Bst*-полимеразы и тем самым создать фермент, более подходящий для изотермической амплификации ДНК.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 МАТЕРИАЛЫ

3.1.1 Олигонуклеотидные праймеры

Использованные в настоящей работе олигонуклеотидные праймеры были синтезированы Биосан, Россия (Таблица 3). Последовательности праймеров были подобраны с использованием программы UGENE (УНИПРО, Россия) и базы данных NCBI Nucleotide. В последовательностях праймеров для клонирования подчёркиванием выделены сайты узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции, названия которых приведены в тех же графах

Таблица 3 - Олигонуклеотидные праймеры

Название	5′-последовательность-3′
pQE-F	CCTATAAAAATAGGCGTATC
pQE-R	GATGGAGTTCTGAGGTCATTACTG
pET-F	ATAGGGAGACCACAACGGTT
pET-R	CCGAAAGGAAGCTGAGTTG
DBD-cl-R1	CCTGTTGGGGTACCATGGGCTTTATTGG KpnI
DBD-cl-R2	CCTGTTGGGAATTCATGGGCTTTATTGG EcoRI
Gss-F1	TATACATATGGAATCGCCGTCATCAGAAG NdeI
Gss-R1	GAGTGCGGCCGCTTTCGCGTCATACCATGTC NotI
Gss-F2	GAAAATCCGCCAAGCGTT
Gss-R2	GAGTGCGGCCGCTTATTTCGCGTCATACCATGTC NotI
Gss-F3	GACAGGGATCCGAATCGCCGTCATCAGAAG BamHI
Gss-R3	AACGCTTGGCGGATTTTC
Gss-R4	ACTTCAGGTACCTTTCGCGTCATACCATGTC KpnI
Gss-R5	ACCGCCACCGCCGGTACCTTTCGCGTCATACCATGTC
DBD-F1	TCATGCATATGAGGTACATAGAGCTGGCCCA NdeI
DBD-R1	ATTCGGATCCCTTTATTGGCTTACCAATCTGAATT BamHI
DBD-F2	TCATGGGTACCATTCACATTGGTAAGCCAATAAAGAGGTACATAGAGCTGGCCCA KpnI
DBD-R2	GACATGCGGCCGCCTTTATTGGCTTACCAATCTGAATT NotI
Sto-F1	GTACCGGCGGTGGCGGTGTAACAGTAAAGTTCAAGTATAA
Sto-R1	ATGTCACTTCCAATTCTTCTCCCTT
Sto-F2	AAGGGAGAAGAATTGGAAGTAGACAT
Sto-R2	CTTTGCGGCCGCTTTCTTTCCAGATTTTTCTAACATTTG NotI
Sto-F3	GTCTCGCTAGCATGGTAACAGTAAAGTTCAAGTATAA NheI
Sto-R3	GCATGGATCCACCGCCACCGCCTTTCTTTCCAGATTTTTCTAACATTT BamHI
pET-R	CAACTCAGCTTCCTTTCGG
LB-F1	AGCTGCATCAGGATCATATCG
LB-R1	GCAATCAGTTCATCTTTCGTCAT
LB-F2	GACATGGATACCCCGTGAGTTAC
LB-R2	GACATGGATACCCCGTGAGTTAC
LB-300	GCGTAATACGCGGCAATTTC
ssOlig	AGTCGAGTAGATCTCCACCTTGGTGCCCTGGCCGAAGGTGTAGGGGTCCTCGTGGGACTGCTGGC
M13-HEX	HEX-CACGACGTTGTAAAACGAC
Lambda-F3	GAATGCCCGTTCTGCGAG
Lambda-B3	TTCAGTTCCTGTGCGTCG
Lambda-LF	GGCGGCAGAGTCATAAAGCA
Lambda-LB	GGCAGATCTCCAGCCAGGAACTA
Lambda-FIP	CAGCATCCCTTTCGGCATACCAGGTGGCAAGGGTAATGAGG
Lambda-BIP	GGAGGTTGAAGAACTGCGGCAGTCGATGGCGTTCGTACTC
Ecoli-F3	CTGCTGGGTGGTCAGGTA
Ecoli-B3	GGATTTTCGCTTCCCACTCT
Ecoli-LF	TGTCGATTTGTTCAGGAACA

Продолжение Таблицы 3

Название	5′-последовательность-3′
Ecoli-LB	CGACGACACTCCGATCGTT
Ecoli-FIP	AGCAGCTCTTCGTCATCAACCCAGGCGTTCCGTACATCATCG
Ecoli-BIP	TGTCTCAGTACGACTTCCCGGGCGCTTTCAGAGCAGAACCAC
TBEV-F3	ACCATAAATGCCGACTGTGA
TBEV-B3	TGCCACCACCATTGAGC
TBEV-LF	ACCTTGCCACTCTCTGTGG
TBEV-LB	ACGGGGACAGACTGTTGGTATGC
Rev-Cy3	Cy3-TGGCTGCTTCTAAGCCAACATCCT
Rev-G	CTAGTGAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
Rev-A	CTAGTAAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
Rev-T	CTAGTTAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
Rev-C	CTAGTCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
Rev-long	GCTAAGTGGGAAACGATGTGGAGTTGCCCAGACAACCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
Rev-stop	GCAACTCCACATCGTTTCCCACTTAGC
Rev-blunt	AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA
FIP	CAGCATCCCTTTCGGCATACCAGGTGGCAAGGGTAATGAGG
BIP	GGAGGTTGAAGAACTGCGGCAGTCGATGGCGTTCGTACTC
LF	GAATGCCCGTTCTGCGAG
LB	TTCAGTTCCTGTGCGTCG
F3	GGCGGCAGAGTCATAAAGCA
B3	GGCAGATCTCCAGCCAGGAACTA
N9	NNNNNNNNN

3.1.2 Реактивы

Ксиленцианол, бромфеноловый синий, агароза для электрофореза - «Chemapol»;

ДТТ, Coomassie Blue G-250, БСА, бромистый этидий – «Sigma»;

$(NH4)_2S_2O_8$, NaAc, KAc, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, KCl, K_2HPO_4, K_2SO_4, NH_4Cl, H_3PO_4, ЭДТА, HCl, этиловый спирт, изопропиловый спирт, глицин, AcOH – «Реахим»;

ампициллина натриевая соль - «Биохимик»;

бакто-пептон, бакто-дрожжевой экстракт, бакто-агар - ФГУН ГНЦ ПМБ Россия;

Изопропилтиогалактозид (ИПТГ) - «СибЭнзим»;

Triton X-100, Tween-20, акриламид, N,N-метилен-бис-акриламид, мочевина, фенол, хлороформ, ПЭГ, имидазол - «Panreac»;

Tris, ДСН, ТЕМЕД - «ICN»;

2-меркаптоэтанол - «Loba Feinchemie»;

SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen, SYPRO Orange – «Invitrogen»;

Profinity IMAC Ni-Charged Resin (Ni-NTA), Acrilex P-6, Affi-Gel heparin gel, – «Bio-Rad»

3.1.1 Буферные растворы

Буферы для электрофореза:

- 1× TAE: 40 мМ Tris-Ac pH 7,6, 1 мМ ЭДТА;
- 0,5× TBE: 45 мМ Tris-борат pH 8,3, 1 мМ ЭДТА;

- 10× буфер для нанесения ДНК на электрофорез: 0,5%-й бромфеноловый синий, 0,5%-й ксиленцианол FF, 50 %-й глицерин в воде;
- 2× денатурирующий буфер для электрофореза белков по Лэммли: 100 мМ Tris-HCl pH 6,8, 1,4 М 2-меркаптоэтанол, 4 %-й ДСН, 0,2 %-й бромфеноловый синий, 20 %-й глицерин;
- верхний электродный буфер для электрофореза белков по Лэммли: 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0,1% ДСН;
- нижний электродный буфер для электрофореза белков по Лэммли: 50 мМ Tris-HCl pH 8,9;
- фиксатор для электрофореза белков по Лэммли: 15 %-я уксусная кислота, 50 %-й этанол;
- красящий раствор для электрофореза белков по Лэммли: 10 %-й $(NH_4)_2SO_4$, 10 %-я фосфорная кислота, 1 0%-й этанол, 0,25 %-й Coomassie Blue G-250;
- отмывочный буфер для электрофореза белков по Лэммли: 7 %-я уксусная кислота, 10 %-й этанол;

1×TE: 10 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА;

1×лигазный буфер: 30 мМ Tris-HCl pH 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ ДТТ, 0,5 мМ АТФ;

буфер для промывки: 20 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,5 М NaCl.

Стандартные буферы для эндонуклеаз рестрикции СибЭнзим:

- SE-B (1×): 10 мМ Tris-HCl pH 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ДТТ;
- SE-G (1×): 10 мМ Tris-HCl pH 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl, 1мМ ДТТ;
- SE-Y (1×): 33 мМ Tris-Ac pH 7,9, 10 мМ MgAc, 66 мМ KAc, 1мМ ДТТ;
- SE-O (1×): 50 мМ Tris-HCl pH 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl, 1мМ ДТТ;
- SE-W (1×): 10 мМ Tris-HCl pH 8,5, 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl, 1мМ ДТТ

Буферы для ПЦР:

- S240 (10×): 650 мМ Tris-HCl pH 8,9, 240 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,5% Tween 20, 25 мМ $MgCl_2$;
- K25 (10×): 100 мМ Tris-HCl pH 8,9, 550 мМ KCl, 0,5% Tween 20, 25 мМ $MgCl_2$.

Буферы для Bst-полимеразы (10×):

- реакционный буфер: 200 мМ Tris-HCl pH 8,9, 100 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 100 мМ KCl, 0,5% Tween 20; 20 мМ $MgSO_4$, 4 мМ дНТФ.

Буферы для хроматографии и хранения Gss:

- A: 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,3 М NaCl;
- B: 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,3 М NaCl, 0,5 М имидазол;
- C: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 0,1 М NaCl;

- D: 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 1,5 М NaCl;
- E: 25 мМ K_2HPO_4 pH 8,0;
- F: 1 М K_2HPO_4 pH 8,0;
- буфер для хранения DBD: 50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 0,2 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 10 %-й глицерин;
- буфер для хранения Gss: 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,5 %-й Tween-20

Реактив Брэдфорд: 0,1 г/л Coomassie Blue G-250, 10% H_3PO_4, 5% этанол.

3.1.2 Ферменты

- ДНК лигаза фага T4, T4-полинуклеотид киназа – ИХБФМ СО РАН;
- *Taq*-полимераза, *Pfu*-полимераза – «Биосан»;
- Эндонуклеазы рестрикции: AsuNHI, BamHI, Bpu14I, Bsp19I, CciNI, EcoRI, FauNDI, KpnI, Ksp22I, SalI – ООО «СибЭнзим»;
- *Bst*-полимераза – «Lucigen», «NEB»;
- Лизоцим, ДНКаза I – «Sigma-Aldrich Corp., США».

3.1.3 Питательные среды

Среды стерилизуются автоклавированием.

- LB, на 100 мл: 1 г NaCl, 1 г бактериального пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта.
- LB-агар, на 100 мл: 1 г NaCl, 1,5г бактериального агара, 1г бактериального пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта.

3.1.4 Маркеры молекулярного веса

- p250 – длины фрагментов: 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н. Маркёр изготовлен в Лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН
- Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad): 250, 150, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 кДа.

3.2 МЕТОДЫ

3.2.1 Гель-электрофорез ДНК в агарозном геле

Для получения 1,5 %-го или 1 %-го агарозного геля растворяли соответственно 1,5 г и 1 г сухой агарозы в 100 мл буфера 1×TAE, прогревали в микроволновой печи до полного растворения. После остывания до 50-60℃ добавляли 3 мкл раствора бромистого этидия (10 мг/мл) и заполняли камеру с вертикально закреплённой гребёнкой, оставляли до застывания агарозы. Горизонтальный гель-электрофорез проводили в 1×TAE. Раствор анализируемой ДНК (2-10 мкл) смешивали с буфером для нанесения в соотношении 1:10 и вносили в карманы геля.

Разделение фрагментов проводили при помощи источника питания постоянного тока при напряженности электрического поля 6-10 В/см. Электрофореграмму документировали при помощи трансиллюминатора Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories, Inc).

3.2.2 Денатурирующий гель-электрофорез белков по Лэммли

Анализируемую клеточную суспензию (1 мл питательной среды, в которой выращивалась культура) центрифугировали при 4000×g в течение 3 мин и отбирали супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл 10 мМ Tris-HCl pH 8,0, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА.

Суспензию клеток или аликвоту анализируемого раствора объемом 25-50 мкл смешивали с равным объемом денатурирующего буфера и инкубировали в течение 3-5 мин при 95-100°С. Геномную ДНК в образцах разрушали, пропуская образец через тонкую иглу с помощью шприца объемом 2 мл. 15-20 мкл полученного белкового препарата наносили в карман геля.

Электрофорез белков проводили в следующих условиях:

- концентрирующий гель: 4% акриламид, 0,13 %-й бис-акриламид, 0,10 М Tris-HCl pH 6,7;

- разделяющий гель: 12,5% акриламид, 0,42 %-й бис-акриламид, 0,75 М Tris-HCl pH 8,9

Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 15-20 В/см в течение 1,5 ч.

После электрофореза гель помещали в фиксатор на 20-30 мин. Фиксатор отмывали в течение 5-10 мин в дистиллированной водой. Для окрашивания гель помещали в красящий раствор для белковых ПААГ и инкубировали в течение 1 часа при покачивании. Гель отмывали от красителя в отмывочном буфере в течение 2-3 ч. Электрофореграмму документировали при помощи сканера CanonScan LiDE 25 (Япония).

3.2.3 Приготовление линейного полиакриламида (ЛПАА)

К 10 мл 5 %-го акриламида, 40 мМ Tris-HCl, pH 7,8, 20 мМ NaAc, 1 мМ ЭДТА добавляли 100 мкл 10 %-го $(NH_4)_2S_2O_8$ и 10 мкл TEMED и оставляли смесь полимеризоваться в течение 30 мин. После полимеризации к смеси добавляли 25 мл этанола и осаждали ЛПАА центрифугированием в течение 10 минут при 14000×g. Супернатант декантировали и растворяли осадок ЛПАА в воде (до конечной концентрация ЛПАА 2,5 мг/мл). Хранили раствор ЛПАА при комнатной температуре.

3.2.4 Осаждение ДНК изопропанолом

Добавляли к исходному раствору ДНК 5 мкл 0,25 %-го ЛПАА, 1 объём изопропанола, 1/10 объема 3 М NaAc. Инкубировали смесь при –20°С в течение 15 мин. Осаждали ДНК центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g. Осажденную ДНК дважды промывали 200 мкл 75% этилового спирта, сушили в пробирке с открытой крышкой в термостате при 37°С до исчезновения запаха спирта (в течение 10-20 мин). Растворяли осадок ДНК в 30-50 мкл 1×ТЕ или воды. Концентрацию и качество ДНК проверяли электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле.

3.2.5 Очистка нуклеиновых кислот фенол-хлорофомной экстракцией

Объём раствора, содержащего ДНК, доводили до 200 мкл дистиллированной водой. Добавляли 200 мкл фенола, уравновешенного ТЕ, и 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали. Отделяли водную фазу центрифугированием в течение 5 минут при 14000×g. Водную фазу, содержащую ДНК, переносили в новую пробирку, не захватывая интерфазу, и, добавив 200 мкл хлороформа, перемешивали. Отделяли водную фазу центрифугированием в течение 5 минут при 14000×g, переносили ее в новую пробирку, после чего осаждали ДНК изопропанолом.

3.2.6 Выделение геномной ДНК из бактерий

100 мл питательной среды LB инокулировали колонией *E. coli* или *Geobacillus* sp 777, инкубировали при помешивании (200 об/мин) и 37°С (*E. coli*) или 65°С (*Geobacillus* sp 777) в течение 12-16 часов. Клетки осаждали центрифугированием при 4000×g. 1 г клеточной биомассы ресуспендировали в 4 мл 25 %-й сахарозы, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0. К полученной суспензии добавляли 2 мл 250 мМ ЭДТА pH 8,0, и 1,2 мл 10 мг/мл лизоцима в 250 мМ Tris-HCl pH 8,0. Клеточную суспензию инкубировали на льду в течение 1 часа и лизировали добавлением 4,8 мл 1 %-го Тритона X-100, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 62,5 мМ ЭДТА и 1 мл 10 %-го ДСН. К лизату добавляли 14 мл фенола, уравновешенного ТЕ, и 12 мл хлороформа, мягко перемешивали. Эмульсию разделяли центрифугированием в течение 15 мин при 13600×g и водную фазу, содержащую геномную ДНК, повторно очищали смесью фенол-хлороформа. После этого геномную ДНК из водной фазы осаждали изопропанолом. Растворяли осадок геномной ДНК в 1 мл 1×ТЕ, проверяли её концентрацию электрофорезом в 1,0 %-ом агарозном геле и спектрофотометром NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, страна).

3.2.7 ПЦР для клонирования ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* и БФ *Gss*-полимеразы и его производных

Реакционная смесь для ПЦР содержала 1× буфер для ПЦР S240, 0,2 мМ каждого дНТФ, 300 нМ праймеры (Таблицы 3, 4), 1 е.а. *Pfu*-полимеразы, 1 е.а. *Taq*-полимеразы и 1 нг ДНК-матрицы (Таблица 3). Объем реакционной смеси составлял 50 мкл.

Амплификация проводилась согласно следующей программе:

- денатурация при температуре 95°С в течение 3 мин;
- 35 циклов со следующими стадиями:
  - денатурация при температуре 95°С в течение 10 с;
  - отжиг при температуре 60°С в течение 10 с;
  - элонгация при 72°С в течение 60 с.

ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Результаты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза в 1,5 %-ом агарозном геле.

Таблица 4 - Олигонуклеотидные праймеры, матрицы и эндонуклеазы рестрикции для клонирования кодирующих фрагментов ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi*, большого фрагмента *Gss*-полимеразы и Sto7d

Рекомбинантный белок	Фрагмент	Матрица	Праймеры	Эндонуклеазы рестрикции	Вектор
His-DBD	DBD	pET-LIGP [189]	pET-F/DBD-cl-R1	BamHI/KpnI	pQE30
DBD-His			pET-F/DBD-cl-R2	FauNDI/EcoRI	pET23a
Gss-His	Gss	геномная ДНК *Geobacillus* sp 777	Gss-F1/Gss-R1	FauNDI/CciNI	pET-23a
His-Gss			Gss-F3/Gss-R4	BamHI/KpnI	pQE30
Gss			Gss-F2/Gss-R2	Bpu14I/CciNI	pET23a
DBD-Gss	Gss	pET23-Gss	Gss-F3/Gss-R3	DBD+Gss – BamHI FauNDI/SalI	
	DBD	pET-LIGP	DBD-F1/R1		
Gss-DBD	Gss	pET23-Gss	Gss-F2/Gss-R4	Gss+DBD – KpnI Bpu14I/CciNI	
	DBD	pET-LIGP	DBD-F2/R2		
Sto-Gss	Gss	pET23-Gss	Gss-F3/pET-R	Sto7d+Gss – BamHI AsuNHI/SalI	
	Sto7d	геномная ДНК *Sulfolobus tokodaii*	Sto-F3/Sto-R1		
			Sto-F2/Sto-R3		
Gss-Sto	Gss	pET23-Gss	Gss-F2/Gss-R2	Bpu14I/CciNI	
	Sto7d	геномная ДНК *Sulfolobus tokodaii*	Sto-F1/Sto-R1		
			Sto-F2/Sto-R2		

3.2.8 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили в буфере, оптимальном для выбранного фермента. Реакционная смесь объемом 30-50 мкл содержала оптимальный для работы эндонуклеазы буфер (SE-B для KpnI, SE-G для BamHI, Bpu14I, Ksp22I, SE-Y для AsuNHI, CciNI, FauNDI, SE-O для SalI, SE-W для Bsp19I, EcoRI), 20 ед. акт. фермента и 0,2-0,5 мкг ДНК. Ферменты, которыми гидролизовали фрагмент ДНК, указаны в Таблице 4. Реакционную смесь инкубировали в течение 1,5 часов при 37°С. По окончании инкубации гидролизованную ДНК очищали с помощью фенол-хлороформной экстракции и осаждали изопропанолом. Осадок гидролизованной ДНК растворяли в 30 мкл 1×ТЕ, проверяли концентрацию ДНК электрофорезом в 1,5 %-ом агарозном геле и спектрофотометром NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США).

3.2.9 Лигирование фрагментов ДНК с липкими концами

Реакционная смесь для лигирования объемом 20 мкл содержала: эквимолярное количество вектора и фрагмента, гидролизованных соответствующими эндонуклеазами рестрикции, 1 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 и 2 мкл 10× лигазного буфера. Инкубировали реакционную смесь при температуре 4°С в течение 3 часов. После окончания инкубации 10 мкл лигазной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli*.

3.2.10 Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидами

Компетентные клетки были приготовлены сотрудником Лаборатории Фармакогеномики А. В. Задорожным по методике с использованием $CaCl_2$ [190]. Замороженные при -70°С компетентные клетки *E. coli* размораживали во льду в течение 15 мин. К 100 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл лигазной смеси или 10-20 нг готовой плазмиды. Смесь инкубировали во льду 30 мин, затем прогревали в термостате при 37°С в течение 5 мин. Далее добавляли к клеточной суспензии 1 мл питательной среды LB, перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при 37°С. Осаждали клетки центрифугированием в течение 5 мин при 4000×g. Сливали супернатант, оставив 50 мкл, и ресуспендировали в нем клеточный осадок. Клеточную суспензию рассевали на чашку Петри с агаризованной средой LB и ампициллином (100 мкг/мл). Засеянную чашку Петри оставляли на 12-14 часов при температуре 37°С.

3.2.11 ПЦР-скрининг бактериальных колоний

Для скрининга каждую колонию переносили пластиковым наконечником в пробирку объемом 200 мкл с 50 мкл 1×ТЕ и ресуспендировали клеточный осадок. Полученную клеточную суспензию использовали в качестве матрицы для ПЦР, добавляя аликвоты по 2,5 мкл на одну реакционную смесь. Реакционная смесь для ПЦР содержала 2,5 мкл буфера для ПЦР S240 (10×), 300 нМ праймеры pQE-F/R для плазмид на основе pQE30 или pET-F/R для плазмид на основе pET23a (Таблица 3), 1 ед. акт. Taq-полимеразы. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл.

Амплификация проводилась согласно следующей программе:

- денатурация при температуре 95°С в течение 3 мин;
- 35 циклов со следующими стадиями:
  - денатурация при температуре 95°С в течение 10 с;
  - отжиг при температуре 60°С в течение 10 с;
  - элонгация при 72°С в течение 60 с.

ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Результаты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза в 1,5 %-ом агарозном геле.

3.2.12 Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Бактериальную колонию-трансформант вносили в пробирку с 4 мл питательной среды LB с ампициллином (100 мкг/мл), выращивали в течение 12-14 часов при температуре 37°С и постоянном помешивании со скоростью 180-220 об/мин. Переносили 1,5 мл культуры в пробирку объемом 1,5 мл, осаждали бактериальные клетки центрифугированием при 4000×g в течение 3 мин, декантировали супернатант. Далее клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора I (20 мМ Tris-HCl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 50 мкг/мл РНКазы А). Лизировали клетки добавлением 200 мкл раствора II (0,2 М NaOH, 1% ДСН) и осторожно перемешивали. После просветления раствора добавляли 200 мкл 3 М КАс pH 5,2 и перемешивали. Лизат инкубировали во льду в течение 1 часа, затем, добавив 30 мкл хлороформа, водную фазу, содержащую плазмидную ДНК, отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g. Плазмидную ДНК из водной фазы осаждали изопропанолом. Осадок ДНК растворяли в 50 мкл 1×ТЕ. Концентрацию выделенной плазмиды проверяли гель-электрофорезом в 1 %-ом агарозном геле и спектрофотометром NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific).

3.2.13 Индукция синтеза рекомбинантных белков в *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* трансформировали рекомбинантной плазмидой, несущей кодирующую последовательность рекомбинантного белка. Для работы использовали штаммы: XL10-Gold для плазмид на основе вектора pQE30 и BL21 (DE3) pLysS для плазмид на основе pET23a. Трансформированные клетки инкубировали при температуре 37°С в течение 12-14 часов на чашке Петри с агаризованной средой LB, ампициллином (100 мкг/мл) и 2 %-й глюкозой. После инкубации переносили одну-две колонии в колбы с 40 мл питательной среды LB, ампициллином (100 мкг/мл) и 2 %-й глюкозой. Выращивали дневные культуры при температуре 37°С и постоянном помешивании со скоростью 200-300 об/мин до достижения $ОП_{600}$ = 0,2-0,3 о.е. (UltroSpec 10, Amersham Biosciences, Великобритания). Выращенные культуры хранили ночь при температуре +4°С. На следующий день дневными культурами инокулировали в разведении 1:100 4 л питательной среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) в ферментере Li Flus GX (Biotron Inc., Южная Корея). Инокулированную среду инкубировали 3 часа при температуре 37°С (12-14 часов и 25°С для рекомбинантных вариантов DBD) и постоянном помешивании со скоростью 200-300 об/мин до достижения $ОП_{600}$ = 0,4-0,6 о.е. (UltroSpec 10, Amersham Biosciences, Великобритания). По достижении указанной оптической плотности индуцировали синтез рекомбинантного белка, добавив ИПТГ (индуктор lac-оперона) до концентрации в среде 1 мМ. После этого инкубировали культуру в течение 4 часов при температуре 37°С и постоянном помешивании со скоростью 200-300 об/мин. В случае подбора условий индукции температура инкубации составляла либо 30°С, либо 37°С.

До и после начала экспрессии отбирали по 1 мл клеточной суспензии для анализа суммарного клеточного белка с помощью SDS-PAGE по Лэммли. После окончания индукции осаждали клетки *E. coli* центрифугированием в течение 10 минут при 4000×g, клеточный осадок хранили при -80°C.

3.2.14 Очистка вариантов ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi*

Хроматографию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со скоростью 1 мл/мин. Колонку, заполненную 5 мл сорбента Profinity IMAC Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравновешивали 25 мл буфера А для хроматографии.

После уравновешивания колонки подготавливали белковый препарат для очистки. Биомассу после препаративной экспрессии рекомбинантного белка ресуспендировали в буфере А для хроматографии (в соотношении 10 мл буфера на 1 г биомассы) и лизировали клетки обработкой ультразвуком. Растворимую белковую фракцию отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g. После центрифугирования супернатант, содержащий растворимые белки, прогревали в течение 15 минут при 60°C и повторно отделяли растворимую белковую фракцию центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g.

Подготовленный к очистке белковый препарат наносили на колонку, после чего колонку промывали 25 мл буфера А для хроматографии. Рекомбинантные белки элюировали буфером В для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли.

Фракции, содержащие рекомбинантные белки, объединяли, добавляли 8 М $(NH_4)_2SO_4$ до конечной концентрации $(NH_4)_2SO_4$ 2 М и оставляли на 12-14 часов при +4°C для преципитации белков. Преципитировавшие белки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g и +4°C и растворяли в буфере для хранения DBD.

3.2.15 Очистка БФ Gss-полимеразы и её производных с 6×His при помощи металл-хелатной хроматографии

Хроматографию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со

скоростью 1 мл/мин. Колонку, заполненную 5 мл сорбента Profinity IMAC Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравновешивали 25 мл буфера А для хроматографии с добавлением 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ ФМСФ.

После уравновешивания колонки подготавливали белковый препарат для очистки. Биомассу после препаративной экспрессии рекомбинантного белка ресуспендировали в буфере А для хроматографии (в соотношении 10 мл буфера на 1 г биомассы) и лизировали клетки обработкой ультразвуком. Для гидролиза ДНК в лизат добавляли ДНКазу I до 1 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37°С. Растворимую белковую фракцию отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g. Супернатант после центрифугирования, содержащий растворимые белки, прогревали в течение 30 минут при 60°С и повторно отделяли растворимую белковую фракцию центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g.

Подготовленный к очистке белковый препарат наносили на колонку, после чего колонку промывали 25 мл буфера А для хроматографии. Рекомбинантные белки элюировали буфером В для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли.

3.2.16 Очистка Gss при помощи аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе

Хроматографию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со скоростью 1 мл/мин. Колонку, заполненную 5 мл сорбента Affi-Gel heparin gel (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравновешивали 25 мл буфера А для хроматографии.

После уравновешивания колонки подготавливали белковый препарат для очистки. Биомассу после препаративной экспрессии рекомбинантного белка ресуспендировали в буфере С для хроматографии (в соотношении 10 мл буфера на 1 г биомассы) и лизировали клетки обработкой ультразвуком. Для гидролиза ДНК в лизат добавляли ДНКазу I до 1 мкг/мл и инкубировали 30 мин при 37°С. Растворимую белковую фракцию отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g. Супернатант после центрифугирования, содержащий растворимые белки, прогревали в течение 30 минут при 60°С и повторно отделяли растворимую белковую фракцию центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g.

Подготовленный к очистке белковый препарат наносили на колонку, после чего колонку промывали 25 мл буфера D для хроматографии. Рекомбинантный Gss элюировали линейным градиентом (0-50%) буфера D для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли.

3.2.17 Перевод БФ *Gss*-полимеразы в буфер для хранения гель-фильтрацией

Гель-фильтрацию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со скоростью 1 мл/мин. Колонку, заполненную 10 мл сорбента Bio-Gel P6 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравновешивали 10 мл буфера для хранения Gss.

На подготовленную колонку наносили очищенный с помощью металл-хелатной хроматографии БФ Gss-полимеразы и элюировали белки буфером для хранения Gss. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли.

3.2.18 Очистка белка при помощи ионообменной хроматографии

Хроматографию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со скоростью 1 мл/мин. Колонку, заполненную 2 мл сорбента Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравновешивали 10 мл буфера E для хроматографии.

На подготовленную колонку наносили очищенные с помощью металл-хелатной хроматографии БФ *Gss*-полимеразы и её производные (или Gss, очищенный с помощью аффинной хроматографии) и промывали колонку 10 мл буфера E. Рекомбинантные белки элюировали буфером F для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли.

3.2.19 Диализ для перевода белков в буфер для хранения

Фракции, содержащие рекомбинантные белки, объединяли и переносили в диализный мешок (Sigma-Aldrich, США), после чего помещали в 1 литр буфера для хранения и оставляли на 12-14 часов при +4°C и постоянном помешивании. По окончании диализа препараты белков

из диализного мешка анализировали с помощью SDS-PAGE по Лэммли и оценивали их концентрацию по методу Брэдфорд. Далее препараты белков делили на аликвоты по 500 мкл каждая и хранили при -80°С.

3.2.20 Измерение концентрации белка по методу Брэдфорд

Для измерения концентрации рекомбинантного белка отбирали аликвоты (50, 25, 10 и 5 мкл) анализируемого раствора и доводили 1× буфером для хранения Gss их объем до 0,5 мл. Добавляли 0,5 мл реактива Брэдфорд, перемешивали и ждали установления стабильной окраски в течение 20 мин. После окрашивания измеряли $ОП_{595}$ в спектрофотометре UltroSpec 500 Pro (Amersham Biosciences, Великобритания). Концентрацию белка в пробе рассчитывали с помощью калибровочной кривой, построенной по БСА.

3.2.21 Количественное измерение полимеразной активности

Полимеразную активность рекомбинантных ДНК-полимераз определяли по включению меченного радиоактивным изотопом [α-^{32}P] дАТФ в ДНК. В качестве матрицы использовали активированную ультразвуком ДНК тимуса теленка (Sigma-Aldrich Corp., США).

Реакционная смесь (10 мкл) содержала 1 мкг активированной ДНК тимуса теленка, 0,2 мМ каждого дНТФ, 4 мкБк [α-^{32}P] дАТФ, 20 мМ Tris-HCl pH 9,0, 10 мМ KCl, 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 2 мМ $MgCl_2$, 1 мг/мл БСА. После добавления фермента реакционные смеси со льда переносили в предварительно прогретый до 60°С амплификатор «Терцик» и инкубировали в течение 30 минут, останавливая реакции добавлением 5 мкл 125 мМ ЭДТА. После остановки реакционные смеси переносили на DE81 бумагу (Sigma-Aldrich Corp., США), дважды промывали 0,5 М Na_2HPO_4. Количество включенного радионуклида определяли с помощью фосфоимиджера Pharos PX (Bio-Rad Laboratories, США), используя калибровочную кривую в виде серийных разведений реакционной смеси без фермента. За одну единицу фермента принималось количество фермента, необходимое для включения 10 нмоль всех дНТФ в кислотонерастворимый материал за 30 минут при 60 °С.

При анализе оптимального условий для полимеразной активности pH реакционного буфера варьировали в пределах 7,5-9,5, концентрации K_2SO_4, NH_4Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$ – 50-500 мМ, температуру реакции от 40 до80°С.

Термостабильность ферментов определяли, инкубируя аликвоты ферментов (0,2 е.а.) в реакционном буфере для полимеразной активности 0,5-5 часов при 50, 60 и 70°С, после чего измеряли полимеразную активность, как указано выше.

3.2.22 Оценка термостабильности с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии

Для оценки термостабильности использовали амплификатор CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США). Пробы объёмом 20 мкл, содержащие 1× буфер для хранения Gss, SYPRO Orange (Invitrogen, США), 1 мкМ белки, нагревали с 55 до 85℃ со скоростью 1 ℃/50 сек. Сигнал флуоресценции снимали в режиме FRET (fluorescence resonance energy transfer).

3.2.23 Выделение одноцепочечной ДНК фага M13mp8

Готовили стартовую культуру клеток *E. coli* штамма K12, инокулируя бактериальной колонией 5 мл питательной среды LB с последующей инкубацией в течение 6 часов при 37 ℃ и постоянном помешивании 200 об/мин до $ОП_{600}$ 0,8. Подготовленную стартовую культуру (200 мл) заражали стоком культуры фага M13mp8 и добавляли к 5 мл агаризованной среды LB (0,7 %-й агар) с 20 мкл 10 %-го X-Gal и 1 мМ ИПТГ, разогретой до 50℃. Среду разливали на чашку Петри с агаризованной средой LB (1,5 %-й агар) и инкубировали 12-14 часов при 37℃. Полученные бляшки фага синего цвета использовали для заражения препаративной культуры *E. coli* штамма K12 (готовили аналогично стартовой в 200 мл питательной среды LB), инокулируя сколотой бляшкой подготовленную препаративную культуру. Зараженную препаративную культуру выращивали в течение 12-14 часов при 37 ℃ и постоянном помешивании 200 об/мин.

Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 4000×g, далее осаждали клеточный дебрис центрифугированием в течение 10 минут при 14000×g. К подготовленному супернатанту добавляли 40 мл раствора ПЭГ (20% ПЭГ 8000, 2,5 М NaCl) и инкубировали ночь при +4℃. Преципитировавшие фаговые частицы осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 14000×g, осадок растворяли в 2 мл 1× TE и очищали оцДНК фенол-хлороформной экстракцией. Осадок оцДНК растворяли в 500 мкл 1× TE и использовали для приготовления матрицы для оценки процессивности.

3.2.24 Приготовление меченых субстратов для проведения гель-ретардации, анализа терминально-трансферазной активности и вытеснения цепи

Субстраты для анализа связывания DBD с ДНК метили [γ-^{32}P] АТФ. Кинирование проводили в 50 мкл раствора, содержащего 1× реакционный буфер (70 мМ Tris-HCl 7,5, 10 мМ MgCl2, 5 мМ ДТТ), 5 е.а. T4-полинуклеотид киназы, 200 пмоль LB-300 или ssOlig (Таблица 3), в течение 1 часа при 37℃. Кинированные олигонуклеотиды очищали фенол-хлороформной экстракцией и осаждали этанолом для удаления не включенного [γ-^{32}P] АТР. Двуцепочечный ДНК-субстрат готовили с помощью ПЦР. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 1× буфер для ПЦР S240, 0,3 мкМ праймеры LB-300/LB-F2 (Таблица 3), 0,2 мМ каждого дНТФ, 1

ед. акт. Taq-полимеразы, 1 нг ДНК фага лямбда. Амплификация проводилась согласно следующей программе:

- денатурация при температуре 95°С в течение 3 мин;
- 35 циклов со следующими стадиями:
    - денатурация при температуре 95°С в течение 10 с;
    - отжиг при температуре 60°С в течение 10 с;
    - элонгация при 72°С в течение 30 с.

ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Результаты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза в 1,5 %-ом агарозном геле.

Субстраты для анализа активностей Gss и его производных готовили, используя олигонуклеотиды, меченные флуоресцентными красителями:

- для гель-ретардации использовали олигонуклеотиды Rev-Cy3 (24-мер) и Rev-G (30-мер) (Таблица 3) в молярном соотношении 1:2;
- для оценки терминально-трансферазной активности – Rev-Cy3 (24-мер) и Rev-blunt (24-мер) (Таблица 3), в молярном соотношении 1:2;
- для оценки процессивности – M13-HEX (13-мер, Таблица 3) и оцДНК фага M13mp8 в молярном соотношении 1:2 (50/100 нМ);
- для оценки вытеснения цепи - Rev-Cy3, Rev-long (31-мер) и Rev-stop (24-мер) (Таблица 3) или Rev-Cy3 (24-мер), Rev-long (31-мер), в молярном соотношении 1:10:10 и 1:10 соответственно;
- для оценки точности - Rev-Cy3/Rev-G (30-мер), Rev-Cy3/Rev-A (30-мер), Rev-Cy3/Rev-T (30-мер), Rev-Cy3/Rev-C (30-мер) (Таблица 3) в молярном соотношении 1:2.

Олигонуклеотиды смешивали в указанном выше молярном соотношении в 1× буфере для *Bst*-полимеразы и гибридизовали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США), охлаждая раствор олигонуклеотидов с 95 до 37°С со скоростью 0,2 °С/сек.).

3.2.25 Гель-ретардация в полиакриламидном геле

Для заливки геля готовили раствор, содержащий 5 %-й акриламид, 0,17 %-й бис-акриламид, 0,5× буфер TBE. К приготовленному раствору добавляли 1:1000 объёма TEMED и 1:100 объёма $(NH_4)_2S_2O_8$, после чего раствор перемешивали и заливали в камеру для вертикального гель-электрофореза, помещая сверху гребенку. По окончании полимеризации промывали карманы водой и проводили преэлектрофорез в течение 20 мин при напряженности 10 В/см и температуре +4°С.

Связывание His-DBD и DBD-His с ДНК проводили в 20 мкл 1× буфера для ПЦР S240. Для связывания использовали 1 нг ампликона или 300 пг олигонуклеотида ssOlig,

приготовленных как описано в пункте 3.2.24 и 0,125-1 мкг рекомбинантного белка. Связывание проводили в течение 30 мин при температуре 70°С. При анализе оптимальной температуры для связывания последнюю варьировали в пределах 40-80 °С, при анализе термостабильности белки предварительно прогревали 2-10 мин при 95 °С. После окончания связывания пробы анализировали в нативном гель-электрофорезе как указано ниже.

Связывание Gss и его производных проводили в 10 мкл 1× буфере для *Bst*-полимеразы. Для связывания использовали 5 пмоль дуплекса Rev-Cy3/Rev-G (концентрация определена по Rev-Cy3), приготовленного как описано в пункте 3.2.24 или олигонуклеотида Rev-Cy3, и 2,5-25 пмоль белка. Связывание проводили в течение 15 мин при 55°С, после чего пробы анализировали в нативном гель-электрофорезе.

Анализируемые пробы смешивали с буфером для нанесения в соотношении 1:10 и вносили в карманы геля. Электрофорез проводили в течение 45-80 мин при напряженности 10 В/см и температуре +4°С. Гели (с радиоактивно-меченными субстратами гели предварительно высушивали) анализировали с помощью фосфоимиджера Pharos PX (Bio-Rad Laboratories, США).

3.2.26 Анализ процессивности

Для оценки процессивности использовали субстрат в виде одноцепочечной ДНК фага M13mp8/M13-HEX, приготовленный как описано в пункте 3.2.24. На льду смешивали 5 мкл субстрата с 5 мкл фермента в 1× буфере для *Bst*-полимеразы и 0,2 мМ каждого дНТФ. Реакционные смеси немедленно переносили в прогретый до 55°С термостат и инкубировали 10 мин. После инкубации реакции останавливали добавлением 10 мкл 0,125 М ЭДТА. Продукты реакции осаждали изопропанолом и анализировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН с использованием программы Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems, США). Процессивность определяли как описано в работе Риччетти [191]: $P = [[(1 \times I(1)]+[(2 \times (I(2)]+...+[(n) \times (I(n))])/[I(1)+I(2)+...+I(n)]]$, где P - процессивность, I – площадь под пиком, n – количество включённых нуклеотидов.

3.2.27 Денатурирующий гель-электрофорез ДНК в полиакриламидном геле

Для заливки геля готовили раствор, содержащий 15 %-й акриламид, 0,75 %-й бис-акриламид, 8 М мочевину, 0,5× буфер TBE. К приготовленному раствору добавляли 1:1000 объёма TEMED и 1:100 объёма $(NH_4)_2S_2O_8$, после чего раствор перемешивали и заливали в камеру для вертикального гель-электрофореза, помещая сверху гребенку. По окончании полимеризации промывали карманы водой и проводили преэлектрофорез в течение 20 мин при напряженности 10 В/см и температуре 50°С.

Анализируемые пробы смешивали с равным объемом формамида с 0,4 %-м бромфеноловым синим и денатурировали в течение 10 мин при 95°С, после чего подготовленные пробы наносили в карманы геля. Электрофорез проводили в течение 1,5 часов при 15 В/см и 50°С. Гели анализировали с помощью фосфоимиджера Pharos PX (Bio-Rad Laboratories, США).

3.2.28 Анализ терминально-трансферазной активности

Для оценки процессивности использовали субстрат в виде дуплекса олигонуклеотидов Rev-Cy3/Rev-blunt, приготовленный как описано в пункте 3.2.24. Реакционная смесь объёмом 5 мкл содержала 1× буфер для *Bst*-полимеразы, 2,5 пмоль субстрата (концентрация определена по Rev-Cy3), 0,4 мМ каждого дНТФ, 100 нМ фермент. После инкубации в течение 20 мин при 55°С реакции останавливали добавлением 5 мкл формамида с 0,4 %-м бромфеноловым синим и анализировали в денатурирующем ПААГ как описано в пункте 3.2.27.

3.2.29 Анализ вытеснения цепи

Для оценки процессивности использовали субстраты в виде дуплекса Rev-Cy3/Rev-long или триплекса Rev-Cy3/Rev-long/Rev-stop, приготовленные как описано в пункте 3.2.24. Реакционная смесь объёмом 5 мкл содержала 1× буфер для *Bst*-полимеразы, 2,5 пмоль субстрата (концентрация определена по Rev-Cy3), 0,2 мМ каждого дНТФ, 50 нМ фермент. После инкубации в течение 15-30 сек при 55°С реакции останавливали добавлением 5 мкл формамида с 0,4 %-м бромфеноловым синим и анализировали в денатурирующем ПААГ как описано в пункте 3.2.27.

3.2.30 Анализ точности синтеза

Для оценки точности синтеза использовали субстраты в виде дуплексов Rev-Cy3/Rev-G, Rev-Cy3/Rev-A, Rev-Cy3/Rev-T, Rev-Cy3/Rev-C, приготовленные как описано в пункте 3.2.24. Олигонуклеотиды Rev-G, Rev-A, Rev-T, Rev-C содержали соответственно нуклеотиды G, A, T, C в +1 позиции относительно праймера Rev-Cy3. Реакционная смесь объёмом 5 мкл содержала 1× буфер для *Bst*-полимеразы, 2,5 пмоль субстрата (концентрация определена по Rev-Cy3), 0,4 мМ каждого дНТФ, 100 нМ фермент. После инкубации в течение 1 мин при 55°С реакции останавливали добавлением 5 мкл формамида с 0,4 %-м бромфеноловым синим и анализировали в денатурирующем ПААГ как описано в пункте 3.2.27.

3.2.31 Изотермическая петлевая амплификация в реальном времени (qLAMP)

Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала реакционный буфер для *Bst*-полимеразы, по 0,2 мкМ внешних праймеров (Lambda-F3/B3), 0,4 мкМ петлевых праймеров (Lambda-LF/BF), 0,8 мкМ внутренних праймеров (Lambda-FIP/BIP), ДНК-матрицу (2 нг на одну реакционную

смесь), 1 ед. акт. фирменной БФ *Bst*-полимеразы или 0,44-12 е.а. БФ *Gss*-полимеразы и её производных. В случае проведения LAMP в режиме реального времени добавляли интеркалирующий краситель (SYBR Gold, SYBR Green I, SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, EvaGreen) до концентрации 0,5-8 мкМ. Реакцию проводили в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США). Программа включала в себя следующие стадии:

- отжиг праймеров и элонгацию при температуре 60°С в течение 100 мин со съемом сигнала флюоресценции раз в минуту на канале FAM (SYBR Gold, SYBR Green I, SYTO-9, SYTO-13, EvaGreen) или HEX (SYTO-82);
- съем температуры плавления продуктов амплификации в диапазоне 75 - 95°С после амплификации.

3.2.32 Протяженная ПЦР

Реакционная смесь для ПЦР содержала 1× буфер для ПЦР S240, 0,2 мМ каждого дНТФ, 300 нМ праймеры (Таблица 3) LB-F1/R1 – 4,2 т.п.о. продукт или LB-F2/R2 – 8,2 т.п.о. продукт, 1 е.а. *Taq*-полимеразы, 0,01-100 нг DBD-His и 1 нг ДНК фага лямбда. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

Амплификация проводилась согласно следующей программе:

- денатурация при температуре 95°С в течение 3 мин;
- 35 циклов со следующими стадиями:
  - денатурация при температуре 95°С в течение 10 с;
  - отжиг при температуре 60°С в течение 10 с;
  - элонгация при 72°С в течение 4 мин (4,2 т.п.о.) продукт или 8 мин (8,2 т.п.о. продукт).

ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Результаты ПЦР анализировали с помощью гель-электрофореза в 1,2 %-ом агарозном геле.

3.2.33 Полногеномная амплификация с множественным вытеснением цепи

Реакционная смесь для ПГА объемом 50 мкл содержала реакционный буфер для *Bst*-полимеразы, 0,4 мМ каждого дНТФ, 20 мкМ случайных праймеров N9 (Таблица 3), 2-5 нг геномной ДНК человека, фермент (8 ед. акт. фирменного фермента либо 100 нМ рекомбинантного БФ *Gss*-полимеразы или его производных). Пробы инкубировали при 50°С в течение 5 часов, инактивировали ферменты прогреванием в течение 3 мин при 95°С. Продукты ПГА очищали фенол-хлороформной экстракцией и анализировали гель-электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле.

3.2.34 Полимеразная цепная реакция с в режиме реального времени

ПЦР проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1× мкл буфер для ПЦР S240, 0,3 мкМ праймеры (Приложение 1), 1 ед. акт. Taq-полимеразы и ДНК-матрицу (количество ДНК варьировало в зависимости от задач).

Амплификация проводилась согласно следующей программе:

- денатурация при температуре 95°С в течение 3 мин;
- 45 циклов со следующими стадиями:
  - денатурация при температуре 95°С в течение 10 с;
  - отжиг и элонгация при температуре 56-60°С в течение 40 с, съём сигнала флуоресценции;

ПЦР проводили в амплификаторе «CFX 96» (Bio-Rad Laboratories, США). Точная температура отжига и элонгации, как и канал съёма флуоресценции (FAM, HEX, ROX), определялись конкретным набором праймеров и гидролизующейся пробы.

3.2.35 Цифровая капельная ПЦР

Цифровую ПЦР проводили на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (2,5 мкл), 1× ПЦР-смесь (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), 20 е.а. EcoRI, 900 нМ праймеры и 250 нМ гидролизуемые зонды (Приложение 1). Подготовленные реакционные смеси инкубировали на столе при комнатной температуре в течение получаса для гидролиза ДНК EcoRI. После гидролиза реакционные смеси и 70 мкл масла для генерации капелек помещали в картридж DG8 и переносили в генератор капель. 40 мкл полученных микрокапель переносили в 96-луночный планшет для ПЦР, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Амплификация проводилась согласно следующей программе (скорость нагрева планшета – 2°С/сек):

- денатурация при температуре 96°С в течение 10 мин;
- 45 циклов со следующими стадиями:
  - денатурация при температуре 96°С в течение 30 с;
  - отжиг и элонгация при температуре 57°С в течение 1 мин;
- инактивация фермента при температуре 98°С в течение 10 мин.

Планшеты после амплификации выдерживали при комнатной температуре 30 мин, после чего инкубировали при +4°С в течение 12-14 ч. Результат определяли посредством считывателя капель, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad Laboratories, Inc, США).

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 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 [86]. В последнем случае улучшение протяжённой ПЦР происходило и при отсутствии в реакционной смеси NADH, кофактора, необходимого для работы бактериальных лигаз. 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), близкого родственника *Pyrococcus furiosus.*

Трехмерная структура АТФ-зависимой ДНК-лигазы термофильной археи *P. abyssi* не разрешена. По этой причине для определения границ ДНК-связывающего домена (DBD) была использована 3D-модель ДНК-лигазы *P. furiosus* (идентификационный номер в базе данных Protein на сайте NCBI WP_011012782.1, в базе данных Structure 40298). По результатам выравнивания аминокислотных последовательностей ДНК-лигаз *P. abyssi* (идентификационный номер в базе данных Protein на сайте NCBI CAC20743.1) и *P. furiosus* (гомология составила 89,8%) и анализа 3D-модели (программа Cn3D, NLM, США) границы DBD были определены как 1-238 а.о. из 559 а.о., составляющих ДНК-лигазу.

Для клонирования DBD в вектор для экспрессии были подобраны две пары фланкирующих праймеров, в которые ввели сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции. С использованием этих праймеров кодирующую последовательность DBD амплифицировали, гидролизовали экзонуклеазами рестрикции и лигировали с соответствующими векторами для экспрессии – pQE30 и pET23a (Приложение 3). Выбор двух векторов был обусловлен наличием в их составе кодирующей последовательности гистидинового гексапептида (His-tag), необходимой для очистки рекомбинантного белка с помощью металл-хелатной хроматографии.

В результате клонирования гистидиновый гексапептид располагался на разных концах рекомбинантных белков: на N-конце в случае pQE30 и на C-конце для pET23a (варианты DBD: His-DBD и DBD-His, соответственно). Таким образом, было принято во внимание возможное влияние дополнительного гистидинового гексапептида и его линкера на функциональные свойства конечного белка.

Для наработки рекомбинантных белков использовались штаммы *E. coli* XL10-Gold (His-DBD, плазмида на основе pQE30) и BL21 (DE3) pLysS (DBD-His, плазмида на основе pET23a).

После индукции синтеза рекомбинантных белков биомассы были собраны и лизированы, полученные лизаты прогреты для удаления нетермостабильных белков. Непосредственная очистка рекомбинантных His-DBD и DBD-His проводилась с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA сорбенте. Далее рекомбинантные белки преципитировали сульфатом аммония, осадки растворяли в буфере для хранения. Таким образом, были получены препараты белков со степенью чистоты до 95% (

Рисунок **11**).

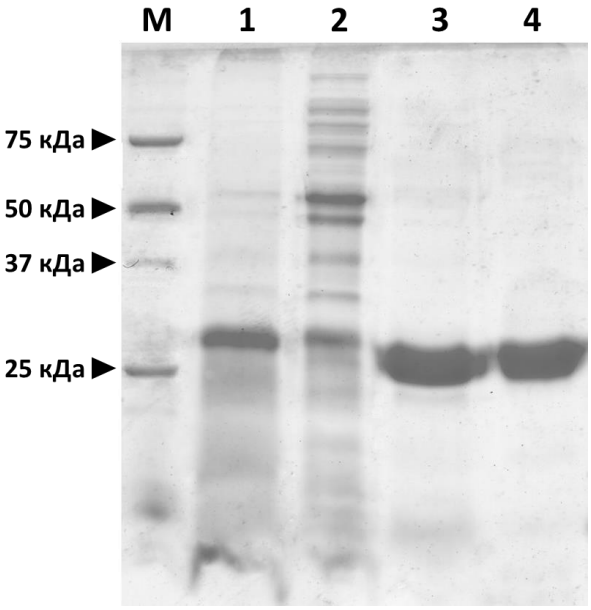

Рисунок 11. Анализ результатов очистки рекомбинантных вариантов ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* с помощью гель-электрофореза по Лэммли. M – маркер Precision Plus Protein Standards, 1 и 2 – лизаты биомассы после индукции His-DBD и DBD-His соответственно. 3 – очищенный DBD-His, 4 – очищенный His-DBD.

4.2 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. Результаты связывания с двуцепочечной ДНК представлены на Рисунок 12. 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.

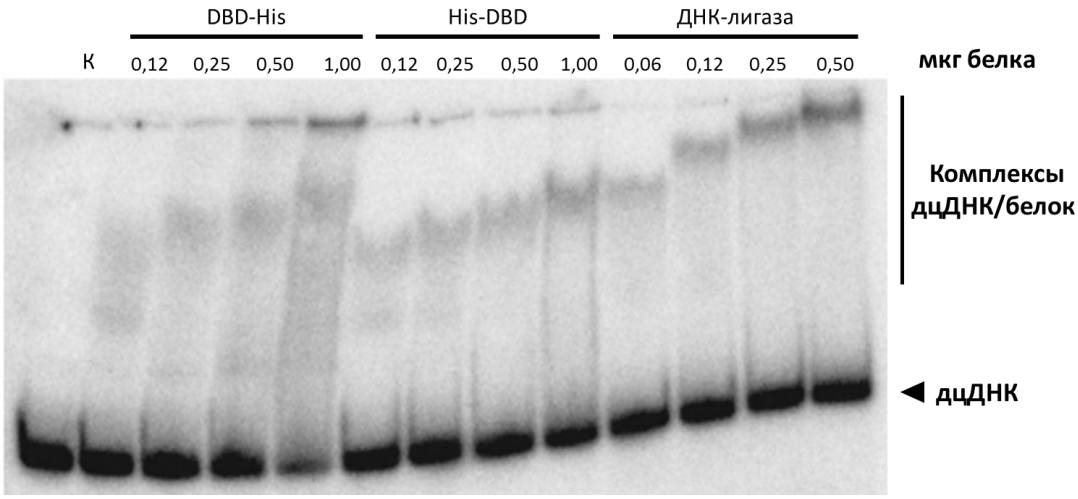

Рисунок 12. Электрофореграмма гель-ретардации вариантов DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi* с дцДНК. Связывание с дцДНК (1 нг на реакцию) проводилось при 70°С, после чего реакционные смеси анализировались с помощью гель-электрофореза в 5 %-м акриламидном геле.

Напротив, с одноцепочечной ДНК оба варианта DBD связывались с практически одинаковой эффективностью (Рисунок 13). Вместе с тем, нативная ДНК-лигаза *P. abyssi* по аффинности связывания с оцДНК превзошла как His-DBD, так и DBD-His.

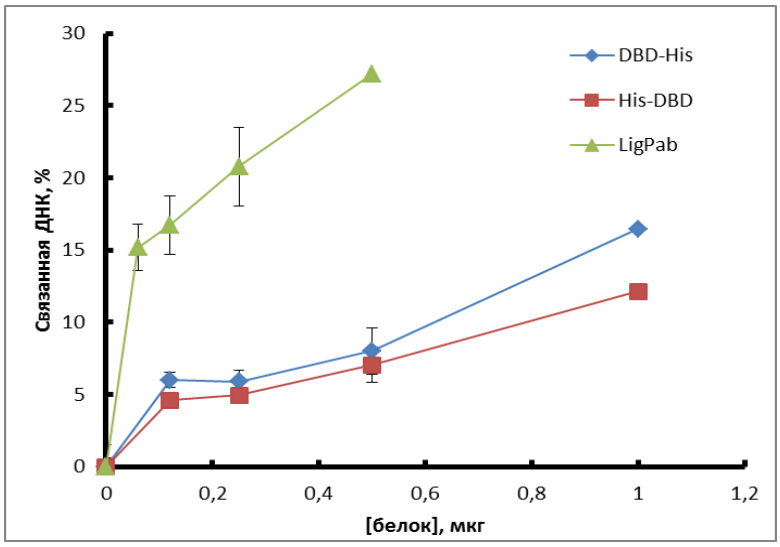

Рисунок 13. Эффективность связывания вариантов DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi* с оцДНК. Связывание с оцДНК (300 пг на реакцию) проводилось при 70°С, после чего реакционные смеси анализировались с помощью гель-электрофореза в 5 %-м акриламидном геле.

Для оценки влияния температуры на эффективность связывания температуру варьировали в пределах от 40 до 80°С с шагом в 10°С, после чего реакционные смеси анализировали с помощью метода задержки комплексов в геле. На Рисунок 14 приведены кривые, описывающие влияние температуры на связывание. Связывание всех изученных белков с ДНК становилось менее эффективным по мере роста температуры. Наиболее выраженным этот эффект был для His-DBD.

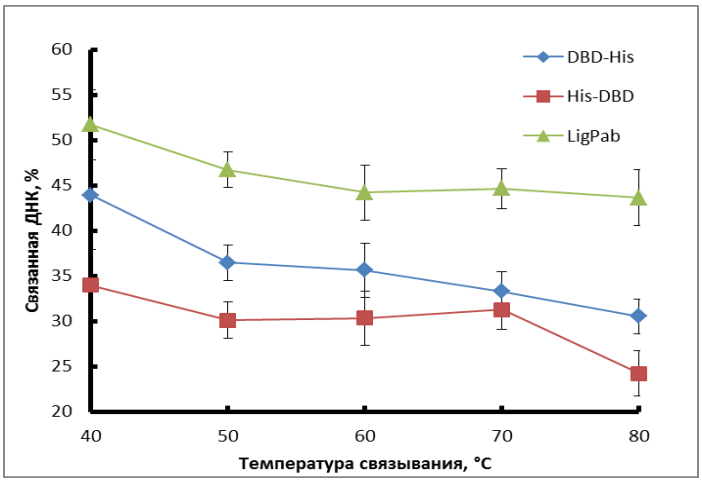

Рисунок 14. Влияние температуры на связывание вариантов DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi* с дцДНК. Связывание с оцДНК (300 пг на реакцию) проводилось при 70°С после чего реакционные смеси анализировались с помощью гель-электрофореза в 5%-м акриламидном геле.

Термостабильность вариантов DBD также оценивалась по их способности связывать ДНК после прогрева при 95°С (Рисунок 15). Способность DBD связывать ДНК снижалась после двух минут прогрева, в то время как нативная ДНК-лигаза сохраняла эту способность после десяти минут прогрева, демонстрируя более высокую термостабильность.

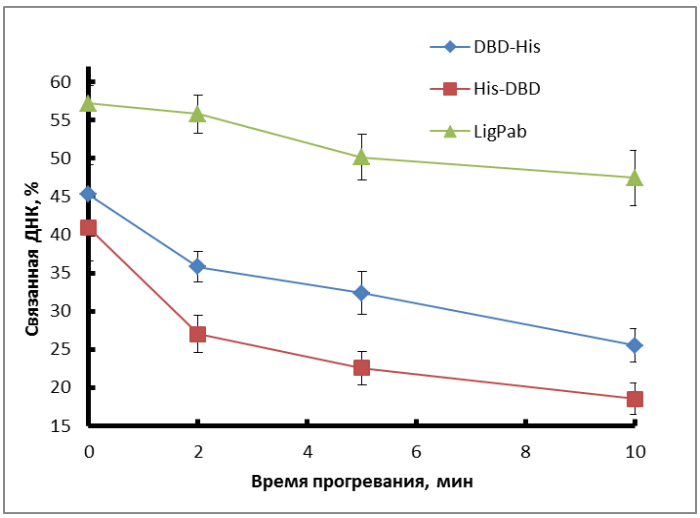

Рисунок 15. Термостабильность DBD и нативной ДНК-лигазы *P. abyssi*. Белки прогревались при 95°С, после чего анализировалась их способность связывать дцДНК.

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 вариант DBD с гистидиновым гексапептидом на С-конце, DBD-His, показавший более высокую степень связывания ДНК и термостабильность по сравнению с His-DBD. ПЦР проводили по матрице геномной ДНК фага λ (Рисунок 16). Добавление DBD значительно увеличивало эффективность ПЦР, в результате чего возрастало количество продукта реакции.

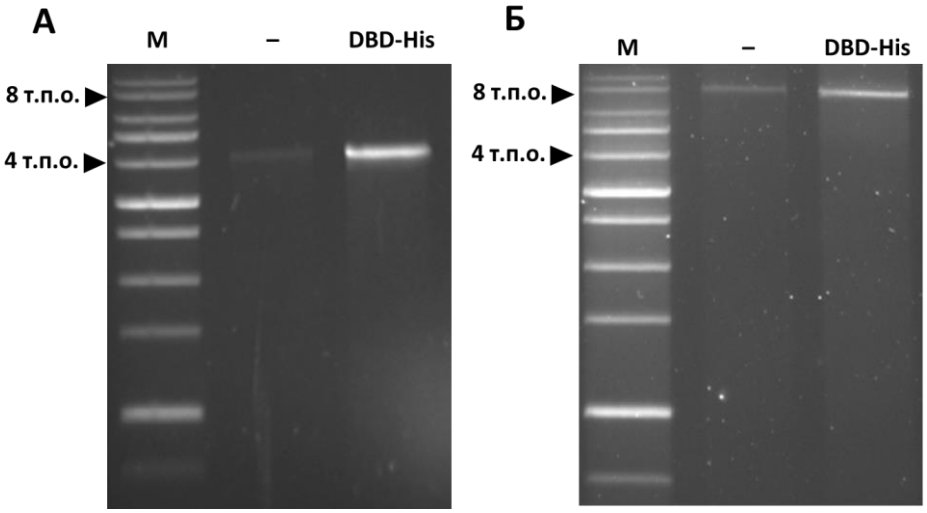

Рисунок 16. Электрофореграмма результатов протяженной ПЦР с и без добавления DBD-His (0,5 нг на реакцию). А – ампликон длиной 4 т.п.о., Б – ампликон длиной 8 т.п.о.

Неожиданный побочный эффект добавления DBD в реакционную смесь ПЦР – его способность нивелировать ингибирующий эффект гепарина (Таблица 5). Гепарин, являющийся полисахаридом, способен действовать как конкурентный ингибитор ПЦР, связываясь с ДНК-полимеразой. Гепарин – широко используемый антикоагулянт, однако являясь ингибитором ПЦР, он может препятствовать анализу ДНК, очищаясь вместе с последней. Добавление DBD в

реакционную смесь ПЦР в реальном времени приводило к ослаблению ингибирования, что выражалось в снижении Cq по сравнению с контрольными реакциями с гепарином и без DBD.

Таблица 5 - 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 ± 0,3	300 нг	42,6 ± 0,3
100 нг	Н/А*	100 нг	Н/А*
33,3 нг	Н/А	33,3 нг	Н/А
11,1 нг	Н/А	11,1 нг	Н/А
3,33 нг	Н/А	3,33 нг	Н/А
	Н/А		Н/А

* Н/А – нет амплификации.

Следует отметить, что полученные результаты противоречат ранее показанной низкой термостабильности DBD. Так, способность DBD связывать ДНК снижается после двух минут прогрева при 95℃, и вместе с тем он повышает эффективность протяжённой ПЦР. Известно, что АТФ-зависимые ДНК-лигазы, к которым относится и ДНК-лизаза *P. abyssi*, при формировании комплекса с ДНК опоясывают последнюю, и в этом взаимодействии участвует OB-домен фермента (олигонуклеотид-связывающий домен, oligonucleotide binding domain) [192]. 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, DBD доказал свою пригодность для улучшения протяженной ПЦР, подтвердив первоначальную гипотезу об улучшении протяженной ПЦР термостабильной ДНК-лигазой *P. abyssi*. Кроме того, была установлена способность DBD нивелировать ингибирование ПЦР гепарином.

4.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ ШТАММА 777 И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА GSS-ПОЛИМЕРАЗЫ

Несмотря на достигнутый за последние несколько десятилетий прогресс в поиске новых и улучшении свойств уже используемых ферментов, по-прежнему сохраняется потребность в ДНК-полимеразах, способных работать в субоптимальных условиях, в том числе в присутствии ингибиторов. Особую важность этим работам придаёт развитие методов диагностики у постели больного, при использовании которых анализируются образцы, не прошедшие многостадийной очистки в условиях стационарных лабораторий. Одним из методов, применяемых для диагностики у постели больного, является LAMP, 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°С. Предполагалось, что БФ *Gss*-полимеразы будет отличаться повышенной стабильностью и устойчивостью к ингибиторам по сравнению с БФ *Bst*-полимеразы.

Установление филогенетической принадлежности изолята 777 производилось с помощью молекулярных методов по гомологии нуклеотидных последовательностей консервативных генов. По гомологии последовательности участка гена 16S рРНК (идентификационный номер GenBank KM411354) полученный изолят близок к нескольким видам рода *Geobacillus* (Таблица 6).

Таблица 6 - Гомология последовательности участка гена 16S рРНК

Вид	Степень гомологии	Идентификационный номер GenBank
Geobacillus sp. GHH01	919/924 (99 %)	CP004008.1
Geobacillus sp. Y412MC52	919/924 (99 %)	CP002442.1
Geobacillus sp. C56-T3	919/924 (99 %)	CP002050.1

Для более точного определения филогенетического положения изолята 777 было проведено секвенирование двух генов: rpoB и spo0A. Эти гены являются умеренно консервативными, представлены в геномах в единственной копии и ранее уже использовались для типирования бактерий рода *Geobacillus* [193,194]. Продукт гена rpoB представляет собой β-субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий, обладающую полимеразной активностью. Точная функция продукта гена spo0A не установлена, однако известно, что он является главным регулятором процесса спорообразования и управляет экспрессией более чем пятисот генов. Участки этих генов были амплифицированы и секвенированы (идентификационные номера GenBank KM411355 и KM411356), результаты приведены в Таблица 7.

Таблица 7 - Гомология последовательности участков генов rpoB и spo0A

rpoB		
Вид	Степень гомологии	Идентификационный номер GenBank

Geobacillus sp. GHH01	450/458 (98 %)	CP004008.1
Geobacillus sp. Y412MC52	449/458 (98 %)	CP002442.1
Geobacillus sp. C56-T3	449/458 (98 %)	CP002050.1
spo0A		
Вид	Степень гомологии	Идентификационный номер GenBank
Geobacillus sp. Y412MC52	606/607 (99 %)	CP002442.1
Geobacillus sp. Y412MC61	606/607 (99 %)	CP001794.1
Geobacillus sp. C56-T3	605/607 (99 %)	CP002050.1

В Таблицах 6 и 7 приведены по три результата поиска с помощью алгоритма BLAST, показавшие наибольшую гомологию с изолятом 777. Гомология с описанными видами рода *Geobacillus* была ниже для всех трёх секвенированных последовательностей. Таким образом, 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 (следовательно, и аминокислотная) последовательность гена ДНК-полимеразы I *Geobacillus sp.* 777 (*Gss*-полимеразы) была неизвестна. Она была установлена с помощью секвенирования с использованием вырожденных праймеров, полученных при выравнивании генов ДНК-полимераз I бактерий рода *Geobacillus* с аннотированным геномом. Для этого из базы данных Nucleotide на сайте http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ были взяты гены polA трех штаммов бактерий рода *Geobacillus* (*Geobacillus sp.* GHH01, *Geobacillus sp.* Y412MC52, *Geobacillus sp.* C56-T3), наиболее близких к изоляту *Geobacillus sp*. 777 по результатам филогенетического анализа. Гомология этих нуклеотидных последовательностей составила 99,3%, на их основе была построена консенсусная нуклеотидная последовательность гена polA, которая и использовалась для подбора праймеров при секвенировании и клонировании БФ *Gss*-полимеразы.

После секвенирования кодирующей последовательности БФ *Gss*-полимеразы, полученная нуклеотидная последовательность была транслирована, и аминокислотная последовательность была сравнена с известными ДНК-полимеразами I бактерий рода *Geobacillus*. Гомология 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%.

4.4 КЛОНИРОВАНИЕ БОЛЬШОГО ФРАГМЕНТА *GSS*-ПОЛИМЕРАЗЫ И СРАВНЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ С КОММЕРЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Кодирующую последовательность БФ *Gss*-полимеразы клонировали в вектор для экспрессии pQE30 таким образом, что на N-конце рекомбинантного белка присутствовал гистидиновый гексапептид. Для этого была подобрана пара праймеров, фланкирующая кодирующую последовательность БФ *Gss*-полимеразы, и содержащая сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

После клонирования рекомбинантный БФ *Gss*-полимеразы был наработан в клетках *E. coli* штамма XL10-Gold. Наработанный белок был очищен с помощью металл-хелатной хроматографии и переведен в буфер для хранения посредством гель-фильтрации (Рисунок 17).

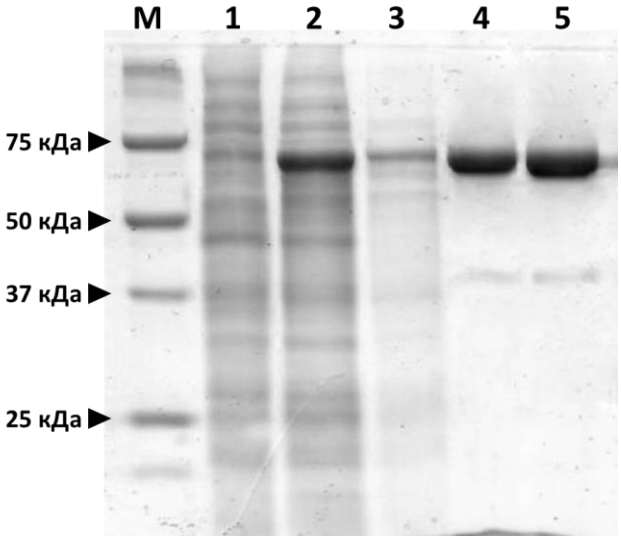

Рисунок 17. Гель-электрофорез по Лэммли очистки рекомбинантного БФ *Gss*-полимеразы. M – маркер Precision Plus Protein Standards, 1 и 2 – лизаты перед и после индукции БФ *Gss*-полимеразы, соответственно. 3 – прогретый лизат, 4 – БФ *Gss*-полимеразы после металл-хелатной хроматографии, 5 – БФ *Gss*-полимеразы после гель-фильтрации.

После очистки биохимические характеристики БФ *Gss*-полимеразы были сопоставлены с доступными коммерческими аналогами – большими фрагментами *Bst*-полимеразы (New England Biolabs) и *Bsm*-полимеразы (Lucigen). Для этого была оценена удельная активность ферментов (Таблица 8), их термостабильность, зависимость их активности от температуры и

концентрации моно- и дивалентных ионов

(

Рисунок **18**). Во всех случаях полимеразную активность оценивали по включению радиоактивного изотопа [α-^{32}P] дАТФ в активированную ДНК тимуса теленка.

Таблица 8 - Удельные активности ДНК-полимераз I бактерий родов *Geobacillus* и *Bacillus*

Штамм	Удельная активность, е.а./мг
Geobacillus stearothermophilus [18]	$1{,}5\times10^5$

Geobacillus stearothermophilus DSM 494 [14]	$0,8\times10^5$
Geobacillus caldoxylosilyticus TK4 [14]	$4,95\times10^5$
Bacillus caldovelox YT-F [14]	$0,625\times10^5$
Bacillus caldotenax YT-G [14]	$1,0\times10^5$
Geobacillus sp 777 (настоящая работа)	$1,04\pm0,05\times10^5$
Geobacillus stearothermophilus (Lucigen Corp.)	$0,56\pm0,02\times10^5$
Bacillus smithii (Thermo Fisher Scientific, Inc.)	$0,26\pm0,04\times10^5$

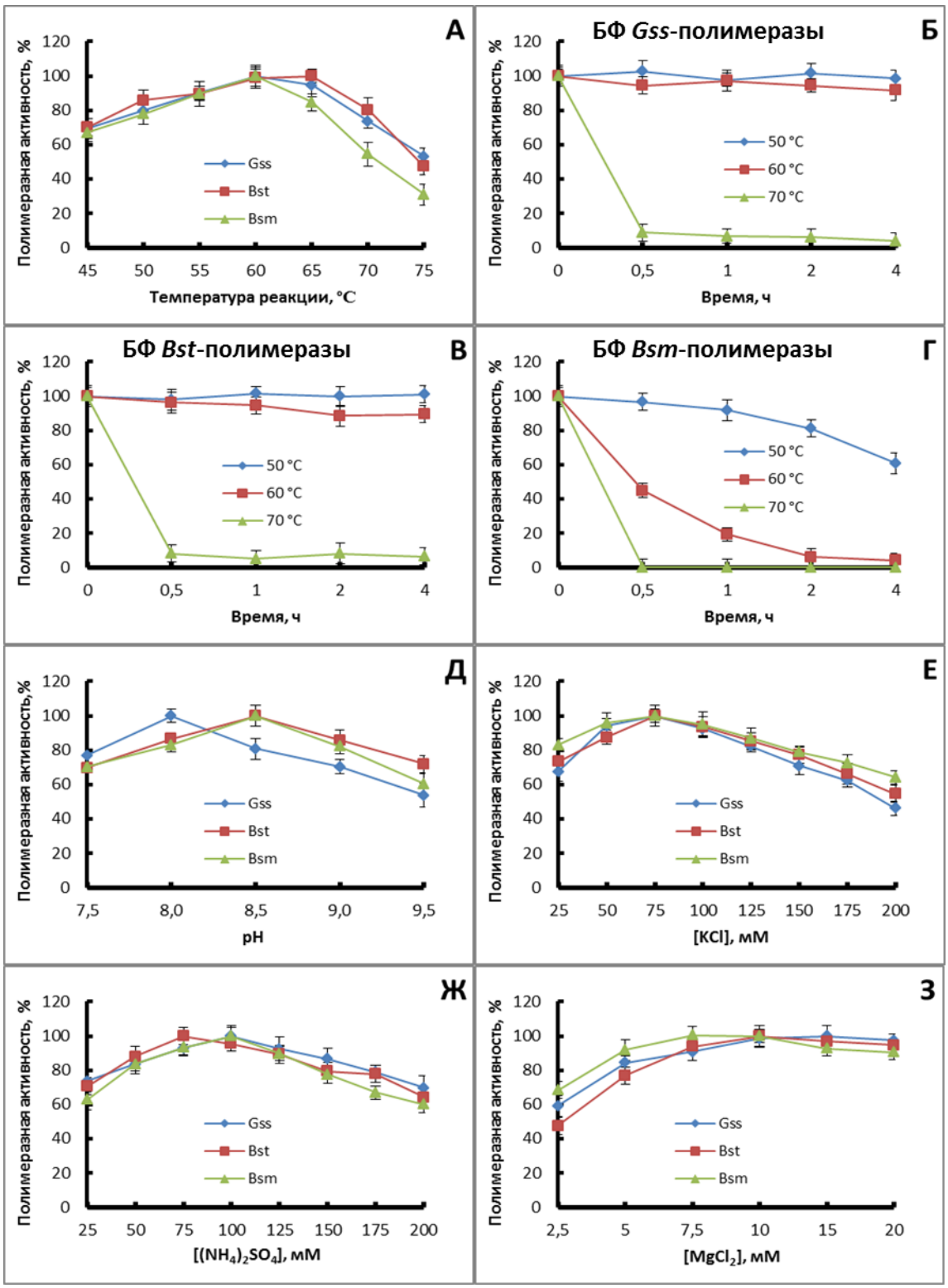

Рисунок 18. Сравнение биохимических характеристик больших фрагментов *Gss*-полимеразы, *Bst*-полимеразы и *Bsm*-полимеразы. Полимеразную активность рекомбинантных ДНК-полимераз определяли по включению меченого радиоактивным изотопом [α-^{32}P] дАТФ в ДНК. В качестве матрицы использовали активированную ультразвуком ДНК тимуса теленка. А – оптимальная температура полимеразной активности, Б, В, Г – термостабильность БФ *Gss*-полимеразы, *Bst*-полимеразы, *Bsm*-полимеразы соответственно, Д – pH, Е – концентрация KCl, Ж – концентрация $(NH_4)_2SO_4$, З – концентрация $MgCl_2$.

Удельная активность БФ *Gss*-полимеразы близка к таковой других ДНК-полимераз I бактерий родов *Bacillus* и *Geobacillus* (Таблица 8). Оптимум температуры всех трех изученных ферментов попал в диапазон 60-65℃, что хорошо согласуется с литературными данными (Рисунок 18 А). Кроме того, не было выявлено значимых различий по оптимальным концентрациям моно- и дивалентных ионов (Рисунок 18 Е-З). Такие отличия были отмечены для оптимального pH – 8,0 для БФ *Gss*-полимеразы и 8,5 для БФ *Bst*/*Bsm*-полимераз (Рисунок 18 Д), а также по термостабильности (Рисунок 18 Б-Г). 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 [96,195], *Bacillus smithii* – факультативный термофил [196].

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 ПГА и сравнили результаты с коммерческими ферментами.

На первом этапе сравнения эффективности ферментов в LAMP варьировали количество фермента в реакции (Рисунок 19). Эффективность работы ферментов оценивали по параметру Tt – time-to-threshold, время до пересечения кривой накопления продукта амплификации порогового значения; Tt 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 Tt для БФ *Bst*- и *Bsm*-полимераз были меньше таковых для БФ *Gss*-полимеразы. В дальнейшем для проведения LAMP использовалось по 4 е.а. БФ *Bst*- и *Gss* и 12 е.а. *Bsm*-полимераз.

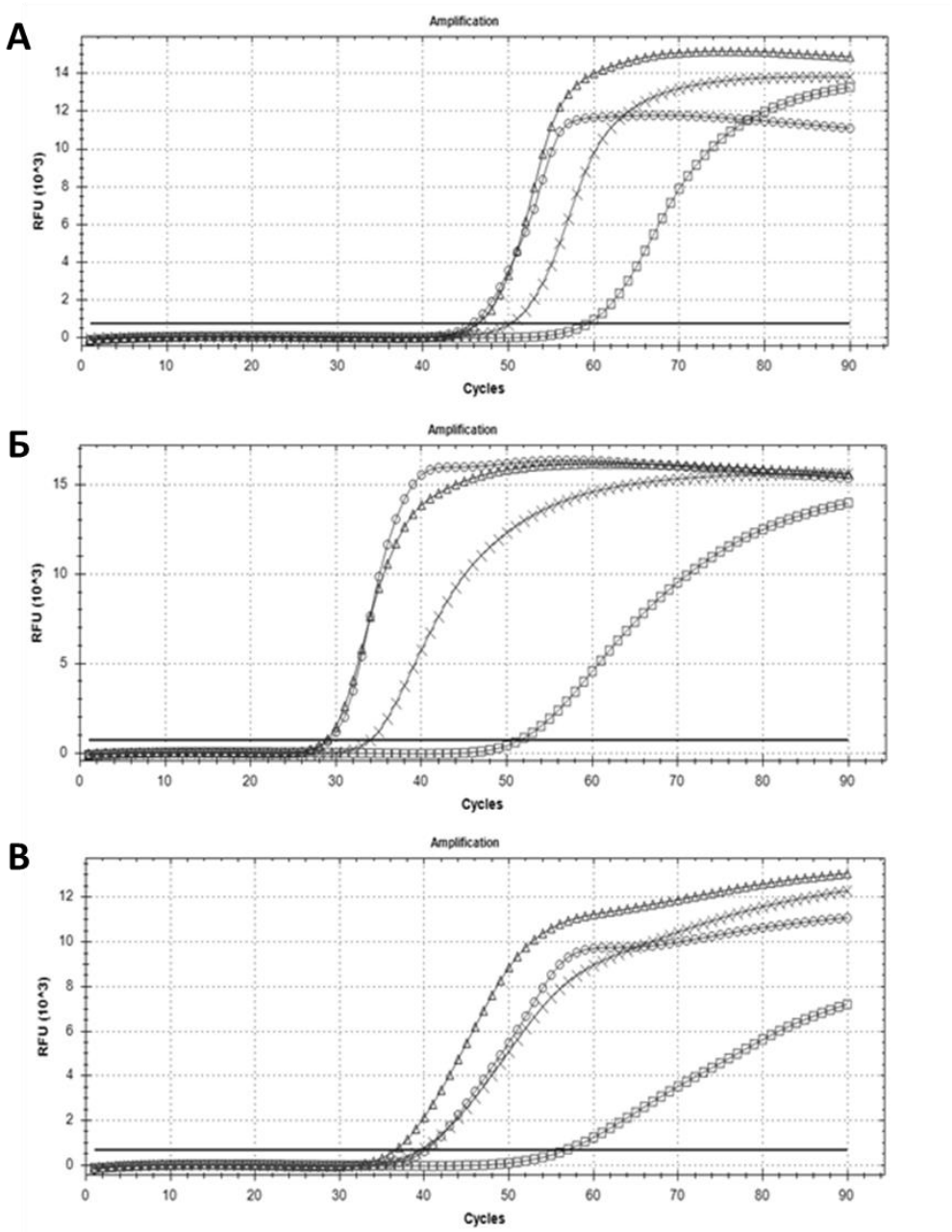

Рисунок 19. Кривые накопления продукта LAMP в режиме реального времени с использованием БФ *Gss*-(А), *Bst*- (Б), *Bsm*-(В) полимераз. 12 е.а. на реакцию – круг, 4 е.а. – треугольник, 1,3 – крест, 0,44 – квадрат. Номер цикла соответствует времени амплификации в минутах.

Чувствительность LAMP с разными ферментами была определена путём титрования матрицы (ДНК фага лямбды) в реакции LAMP (Рисунок 20). 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.

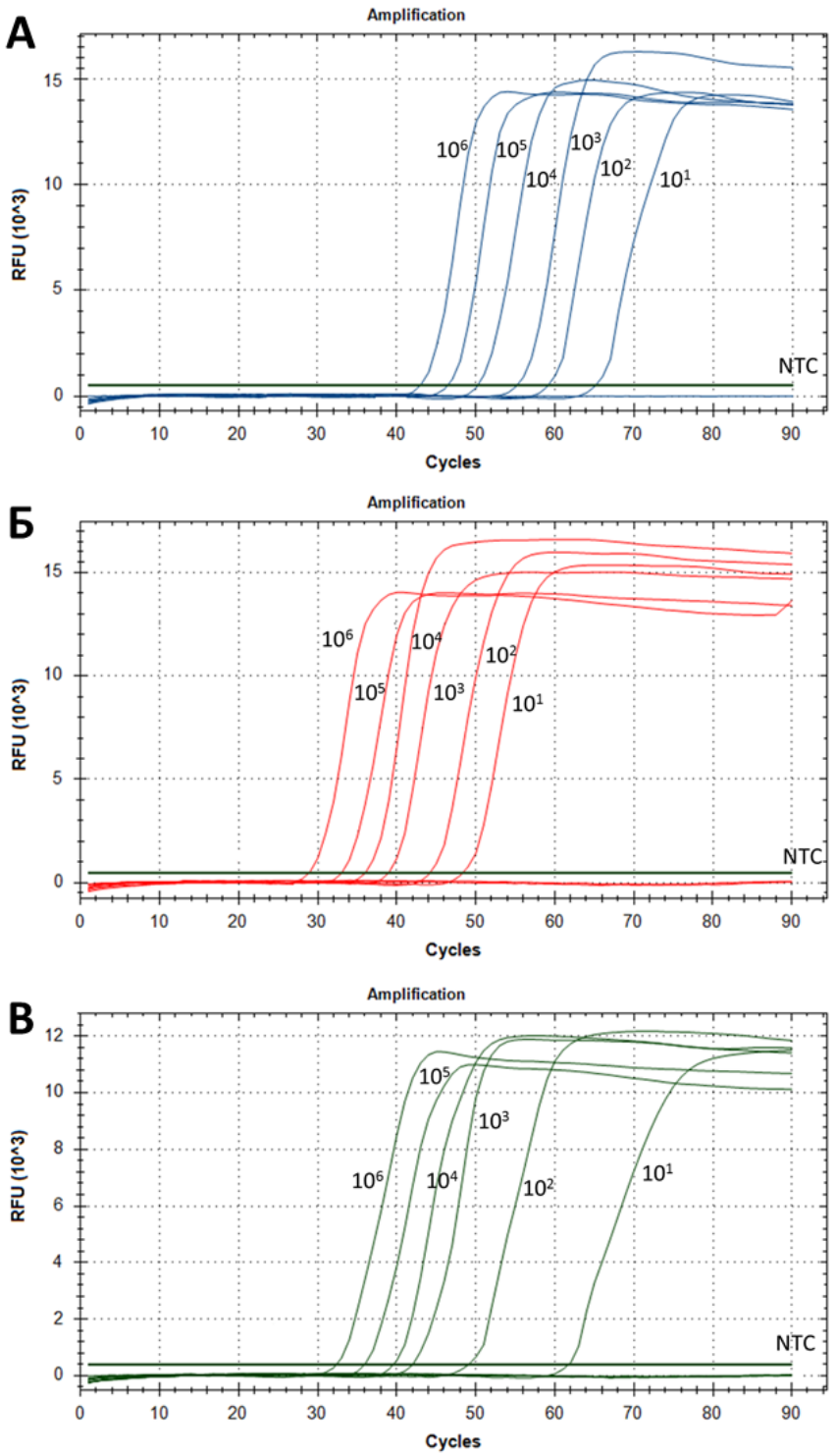

Рисунок 20. Титр матрицы (ДНК фага лямбда) в LAMP в реальном времени с БФ *Gss*-(А), *Bst*- (Б), *Bsm*-(В) полимераз. Количество матрицы указано в копиях на реакцию рядом с соответствующими кривыми накопления продукта. Номер цикла соответствует времени амплификации в минутах.

Дополнительно была оценена устойчивость ДНК-полимераз к действию ингибиторов LAMP (Таблица 9): SYBR Green I, гепарину, этанолу, плазме крови человека, цельной крови человека, мочевине, NaCl и ЭДТА. SYBR Green I, являясь распространённым интеркалирующим красителем, известен как ингибитор ПЦР [174]. Гепарин, как упоминалось

выше, может выступать как конкурентный ингибитор амплификации и используется как антикоагулянт. Компоненты цельной крови и плазмы крови, такие как гем, IgG, трансферрин, вещества, используемые при процедурах очистки нуклеиновых кислот – мочевина, этанол, ЭДТА, NaCl – также могут ингибировать работу ДНК-полимераз [100,197].

Все реакции LAMP с ингибиторами проводили в трёх повторах, в таблице указаны средние значения и стандартные отклонения от них. Цельную кровь и плазму забирали у пяти здоровых индивидов. 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, мочевины 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.

Таблица 9 - Устойчивость ДНК-полимераз к действию ингибиторов LAMP

Ингибитор	Tt, мин			RFU		
SYBR Green I	БФ *Gss*	БФ *Bst*	БФ *Bsm*	БФ *Gss*	БФ *Bst*	БФ *Bsm*
4 μM	56,0±1,8	40,0±0,6	Н/А[а]	1124±51	1306±40	Н/А
2 μM	48,3±1,4	29,4±0,2	35,7±1,2	748±42	967±27	921±38
1 μM	48,6±2,9	26,8±0,8	33,3±0,5	334±21	751±55	646±23
Гепарин [б]						
0,220 е.а.	65,1±0,8	77,2±0,8	Н/А	15,8±0,5*10^3	17,0±0,2*10^3	9,0±0,8*10^3
0,070 е.а.	44,8±0,7	46,4±0,5	62,3±0,5	14,7±1,1*10^3	16,1±0,5*10^3	12,7±0,4*10^3
0,020 е.а.	43,7±0,9	34,6±0,6	47,9±0,6	14,4±0,4*10^3	16,2±0,5*10^3	11,4±0,6*10^3
0,008 е.а.	42,7±0,5	31,1±1,0	44,8±0,9	14,2±0,5*10^3	13,7±1,3*10^3	12,0±0,3*10^3
0 е.а.	41,4±0,6	27,9±0,4	29,0±0,3	14,2±0,2*10^3	17,2±0,1*10^3	12,5±0,6*10^3
Этанол						
10,0%	50,4±0,2	Н/А	Н/А	9,6±0,1*10^3	Н/А	Н/А
5,0%	48,3±0,5	37,8±0,3	Н/А	12,8±0,2*10^3	11,1±0,2*10^3	Н/А
2,5%	46,3±0,8	33,6±0,6	Н/А	12,4±0,2*10^3	12,9±0,3*10^3	Н/А
1,0%	43,9±0,6	32,4±0,2	Н/А	12,5±0,7*10^3	13,3±1,6*10^3	Н/А
0%	43,7±0,3	31,2±0,9	33,6±0,7	12,4±0,6*10^3	12,4±0,2*10^3	11,0±0,4*10^3
Плазма крови						
1%	54,1±0,8	Н/А	Н/А	14,5±0,4*10^3	Н/А	Н/А
0%	43,4±0,5	32,2±0,7	36,1±0,3	14,1±0,6*10^3	15,9±0,1*10^3	12,6±0,3*10^3
Мочевина						
1,00 М	58,2±1,1	67,1±0,9	Н/А	8,4±0,8*10^3	6,7±0,6*10^3	Н/А
0,50 М	35,5±0,2	28,8±0,4	Н/А	9,7±0,2*10^3	12,1±0,6*10^3	Н/А
0,25 М	35,5±0,4	23,0±0,3	32,6±0,8	10,1±1,5*10^3	11,8±0,7*10^3	3,2±0,9*10^3
0 М	39,7±0,3	26,4±0,1	27,5±0,5	10,1±0,6*10^3	11,0±0,7*10^3	9,2±1,0*10^3
NaCl						
50,0 мМ	Н/А	58,5±1,3	54,3±0,9	Н/А	7,4±3,5*10^3	6,1±0,5*10^3
25,0 мМ	67,6±0,4	21,2±0,2	21,0±0,1	7,8±0,3*10^3	14,1±0,4*10^3	9,4±0,2*10^3
12,5 мМ	36,5±0,1	20,2±0,5	20,6±0,7	12,6±0,6*10^3	13,0±0,2*10^3	9,9±0,1*10^3
0 М	38,4±0,8	27,5±0,1	28,9±0,2	11,8±1,3*10^3	13,2±0,1*10^3	10,1±0,4*10^3

Продолжение Таблицы 9

Ингибитор	Tt, мин	RFU	Ингибитор	Tt, мин	RFU	Ингибитор
ЭДТА	БФ *Gss*	БФ *Bst*	SYBR	БФ *Gss*	БФ *Bst*	SYBR Green I
0,31 мМ	Н/А	47,3±0,8	41,4±1,2	Н/А	9,2±0,9*10^3	10,7±2,1*10^3
0,15 мМ	75,9±2,0	38,1±0,3	35,0±1,0	7,2±1,9*10^3	10,7±0,1*10^3	9,5±1,2*10^3
0,08 мМ	59,1±1,3	35,5±0,4	33,2±0,3	11,3±,4*10^3	12,7±1,0*10^3	10,9±0,1*10^3
0,04 мМ	51,5±0,9	31,6±0,5	30,8±0,8	11,9±1,3*10^3	11,5±0,9*10^3	9,1±1,1*10^3
0,02 мМ	48,4±1,6	30,5±0,6	30,4±0,2	11,2±0,6*10^3	11,6±1,3*10^3	10,8±0,5*10^3
0 мМ	39,2±0,1	28,3±0,1	29,5±0,3	11,5±1,8*10^3	12,1±0,5*10^3	10,1±0,2*10^3
Цельная кровь						
2,00%	66,2±1,8	56,5±3,5	58,4±2,3	2,0±0,2*10^3	2,2±0,1*10^3	1,9±0,1*10^3
0,67%	52,4±0,8	43,4±0,2	42,6±0,6	5,4±0,1*10^3	5,9±0,1*10^3	5,2±1,2*10^3
0,22%	40,0±0,9	35,4±0,1	32,5±0,5	8,4±0,7*10^3	9,3±0,4*10^3	7,9±0,8*10^3
0 %	38,3±0,2	27,6±0,3	27,5±0,2	11,2±2,5*10^3	12,6±0,9*10^3	10,3±0,5*10^3

а – Н/А – нет амплификации; б – одна единица гепарина (ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез», Россия) определялась как 0,0077 мг международного стандарта гепарина. Для консервации 1 литра цельной крови требуется 50 мг гепарина.

Кроме LAMP, БФ *Gss*-полимеразы вместе с коммерческими аналогами был использован для проведения ПГА (Рисунок 21). С каждым ферментом было проведено три независимых эксперимента, в качестве матрицы использовали геномную ДНК человека. Количество продуктов ПГА оценивали по 7 локусам, представленным в геноме человека в единственной копии (*ADIPOQ, ALB, BDNF, IL10, IL17RA, MET, PPARG1α*), с помощью ПЦР в реальном времени. Калибровочную кривую строили по неамплифицированной геномной ДНК человека (50, 25, 12,5, 6,25 3,12 и 1,56 нг на реакцию). 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 (*BDNF, IL10, IL17RA, PPARG1α*), БФ *Bst*- и *Bsm*-полимераз для двух локусов (*ADIPOQ, MET*), БФ *Gss*- и *Bst*-полимераз для одного локуса (*ALB*). 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.

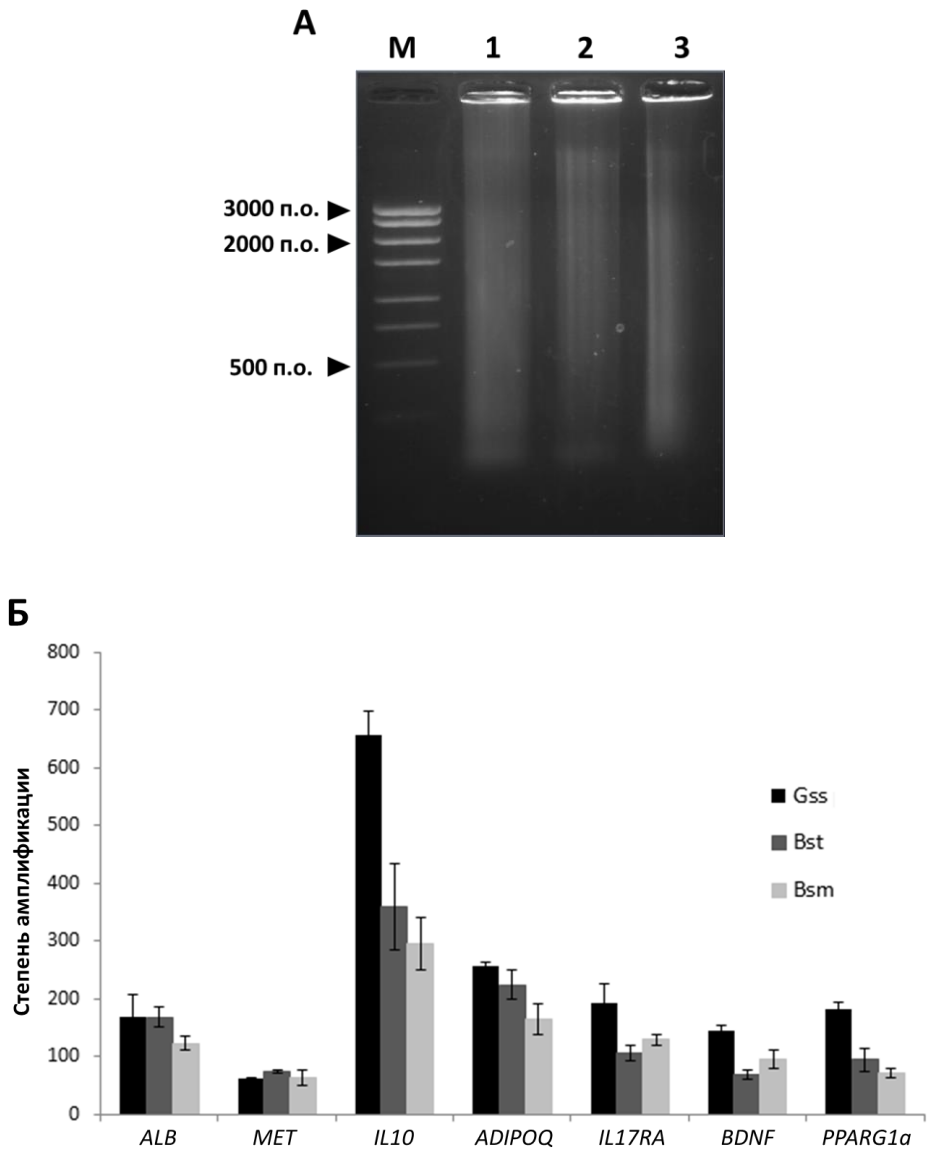

Рисунок 21. ПГА геномной ДНК человека с использованием БФ *Gss*-, *Bst*-, *Bsm*-полимераз. А. Гель-электрофорез продуктов ПГА в 1,5 %-м агарозном геле, 1/20 (2,5 мкл) объёма реакции: 1 - БФ *Gss*-, 2 - БФ *Bst*-, 3 - БФ *Bsm*-полимеразы. Б. Оценка количества продуктов ПГА ПЦР в реальном времени. Три повтора ПЦР были усреднены для каждого локуса и каждого эксперимента ПГА, на реакцию брали по 10 нг продукта ПГА. Планки погрешностей показывают одно стандартное отклонение от средних значений.

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, мочевине и плазме крови человека).

4.5 ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

При сравнении эффективности ДНК-полимераз в LAMP выяснилось, что наиболее распространенный интеркалирующий краситель для ПЦР в реальном времени, 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 Tt (time-to-threshold) и отношению сигнал/шум (ОСШ). Пороговое время Tt – момент времени, в который кривая накопления продукта амплификации пересекает пороговое значение, аналог Cq (Ct) ПЦР в реальном времени. Пороговое время напрямую зависит от эффективности амплификации и наличия ингибиторов. Отношение сигнал/шум определяется как отношение интенсивности сигнала к интенсивности шума; высокое соотношение означает высокую надежность сигнала и низкую вероятность ложноположительных результатов. В настоящей работе ОСШ рассчитывалось как отношение интенсивности флуоресценции в реакциях, содержащих матрицу, и контролях без матрицы после окончания амплификации.

В аспекте выбора флуоресцентного красителя ОСШ определяется концентрацией красителя и растет с увеличением его концентрации, параллельно происходит усиление ингибирования амплификации. Следует отметить, что в области низких концентраций красителя Tt также может увеличиваться в связи с крайне малым ростом флуоресценции при прохождении реакции. В результате при определении оптимального красителя для qLAMP следует учитывать оба параметра.

Оценку эффективности красителей в qLAMP проводили на трех модельных системах: фаг лямбда, вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), *E. coli* (Таблица 10). Для систем на фаг лямбда и *E. coli* в качестве матрицы использовали соответствующую геномную ДНК, для ВКЭ была приготовлена плазмида с амплифицируемым участком генома ВКЭ. При выборе модельных систем учитывалось влияние GC-состава и оптимальной температуры реакции на эффективность амплификации и связывание некоторых красителей (SYBR Green I).

Таблица 10 - Модельные системы для оценки флуоресцентных красителей

Модельная система	Дистанция между праймерами FIP и BIP, п.н.	GC-состав, %	Оптимальная температура, °C
Фаг лямбда	223	56,1	59
E. coli	208	53,8	60
ВКЭ	198	57,7	57

Для оценки степени ингибирования все красители титровали в пределах от 0,5 до 8 мкМ (за исключением EvaGreen, концентрация которого выражена в кратности за отсутствием возможности подсчитать молярную концентрацию). Результаты представлены на Рисунок 22.

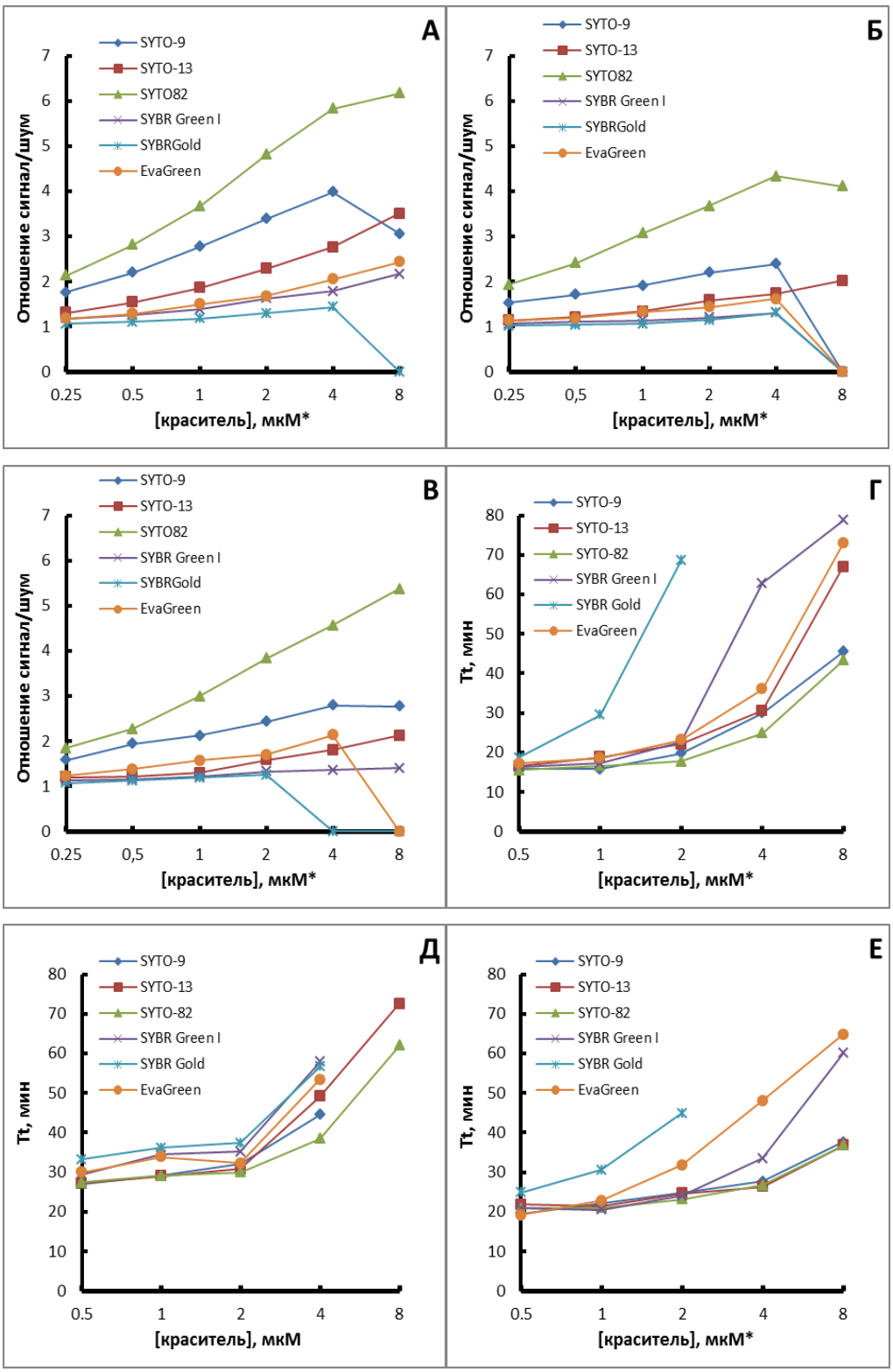

Рисунок 22. Титр флуоресцентных красителей в qLAMP. Шесть флуоресцентных красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold, EvaGreen) титровали в трёх модельных системах: фаг лямбда (А, Г), вирус клещевого энцефалита (Б, Д) и *E. coli* (В, Е). Стоковые растворы красителей были приготовлены в Milli-Q воде, в qLAMP концентрация красителей варьировала в пределах 0,5-8 мкМ. qLAMP реакции для каждого разведения проводили в трёх повторах. На диаграммах представлены графики зависимости ОСШ (А-В) Tt (Г-Е) от концентрации красителей. Концентрация EvaGreen выражена в степени разведения (кратности) за невозможностью рассчитать молярную концентрацию.

Эффективность qLAMP падала с ростом концентрации флуоресцентного красителя, что выражалось в увеличении Tt и свидетельствовало об усилении ингибирования. Незначительная разница в степени ингибирования между ВКЭ и двумя другими системами может быть объяснена более высоким GC-составом и меньшей оптимальной температурой для ВКЭ.

Линейный диапазон кривых на Рисунок 22 был использован для определения степени ингибирования флуоресцентным красителем. Тангенс наклона кривой напрямую связан со степенью ингибирования и позволяет оценить её количественно; полученные тангенсы наклона кривых приведены в Таблица 11.

Таблица 11 - Степень ингибирования qLAMP различными флуоресцентными красителями.

Флуоресцентный краситель	Модельная система		
	Фаг лямбда	*E. coli*	ВКЭ
SYTO-9	7,35	4,72	5,51
SYTO-13	11,28	3,48	6,75
SYTO-82	6,39	3,73	3,41
SYBR Green I	17,02	9,12	8,6
SYBR Gold	24,95	10,05	7,14
EvaGreen	12,88	11,64	6,87

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. Похожие результаты были получены по ОСШ (Рисунок 22, A-B), где SYTO-82 продемонстрировал лучшие результаты, 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. Исходные растворы красителей готовили в Milly-Q воде без ДМСО для минимизации влияния последнего на qLAMP. Однако в водном растворе SYTO-13 выпадал в осадок после нескольких циклов замораживания-размораживания.

Оптимальная комбинация малого Tt и высокого ОСШ достигалась при использовании 1 мкМ красителей (0,5× EvaGreen), эта концентрация использовалась в дальнейших экспериментах.

Степень ингибирования qLAMP красителями оценивали также по минимальному количеству фермента, необходимому для проведения qLAMP с каждым конкретным красителем. Титрование количества БФ *Bst*-полимеразы в qLAMP показало, что выбранные флуоресцентные красители пригодны для использования с малым количеством фермента

(Рисунок 23). 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.

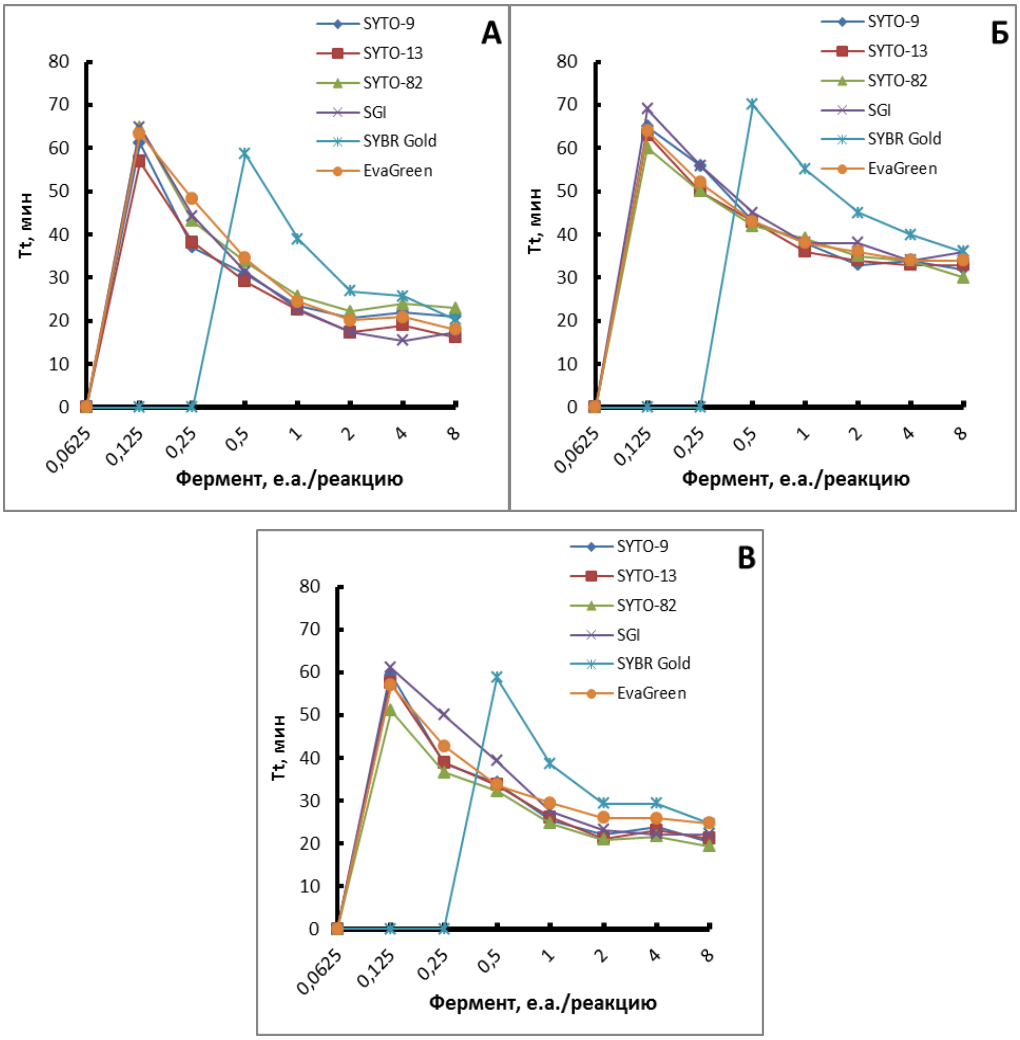

Рисунок 23. Титрование БФ *Bst*-полимеразы с флуоресцентными красителями: А – ДНК фага лямбда, Б – *E. coli*, В – ВКЭ. БФ *Bst*-полимеразы титровали в пределах 0,062-8 е.а. на реакцию. qLAMP реакции для каждого разведения проводили в трёх повторах. На диаграммах представлены графики зависимости Tt от количества фермента в реакции. Концентрация флуоресцентных красителей в qLAMP – 1 мкМ.

По мнению Гунадсона с соавторами [174] 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. При этом SYBR Green I и SYBR Gold показали более сильное ингибирование ПЦР в реальном времени, чем красители SYTO, а высокоаффинные красители TOTO полностью ингибировали ПЦР. Дополнительным подтверждением этой гипотезы служит продемонстрированные меньшая аффинность связывания с ДНК и меньшее ингибирование ПЦР EvaGreen по сравнению с SYBR Green I

[198]. 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 (Рисунок 24).

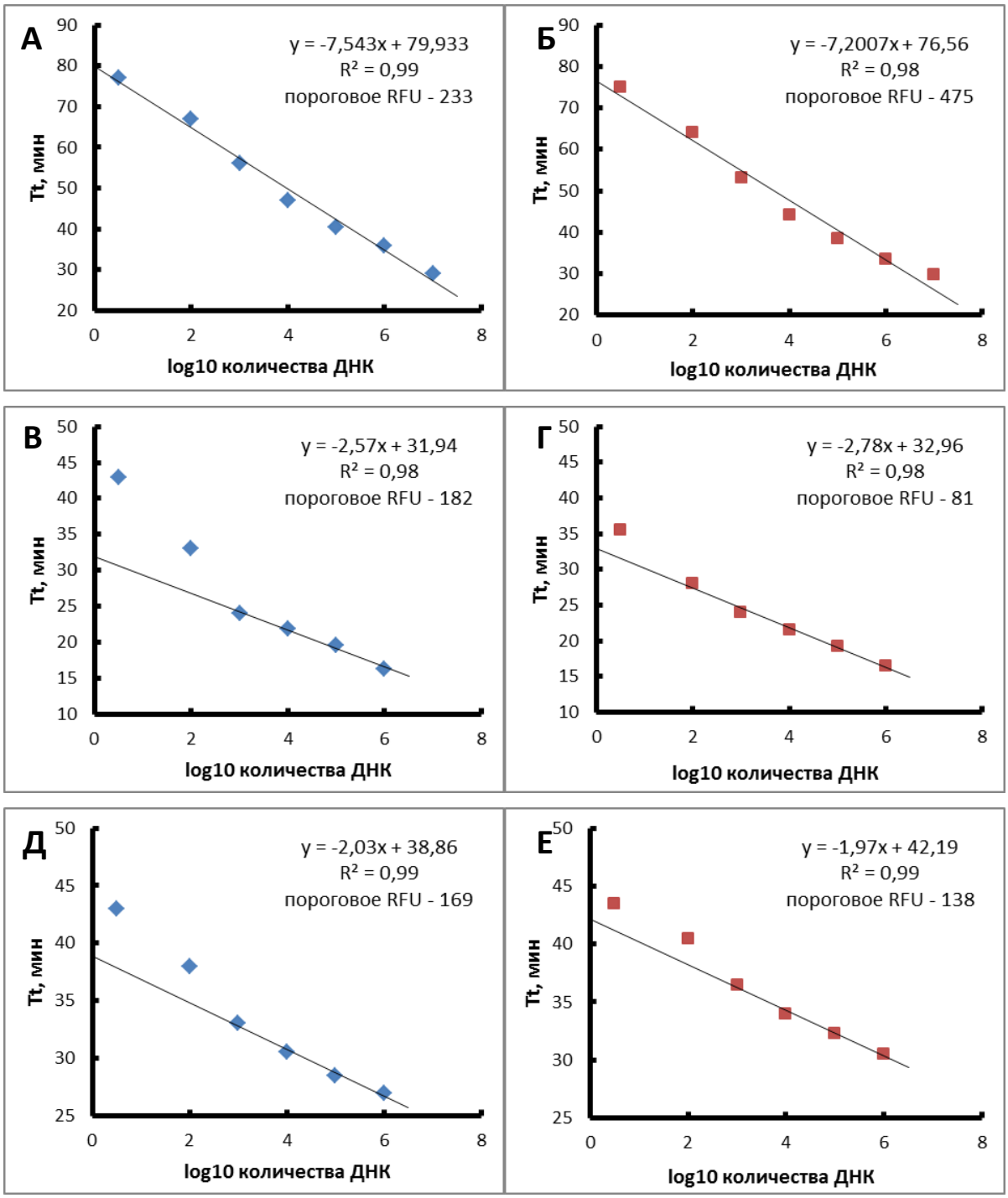

Рисунок 24. Титрование ДНК-матрицы с SYTO-9 (А, В, Д) и SYTO-82 (Б, Г, Е). ДНК фага лямбда (А, Б) титровали в пределах 10^7-5 копий на реакцию, геномную ДНК *E. coli* (В, Г) и ДНК ВКЭ (Д, Е) – 10^6-5 копий на реакцию. В качестве носителя при титровании использовали плазмиду pBluescript SK, qLAMP реакции для каждого разведения проводили в трёх повторах. На диаграммах представлены графики зависимости Tt от количества фермента в реакции. Концентрация флуоресцентных красителей в qLAMP – 1 мкМ.

Как SYTO-9, так и SYTO-82 позволяли обнаруживать с помощью qLAMP не менее 5 копий матрицы. 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 отношение сигнала к шуму.

4.6 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 [74,76,78]. 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* (DBD LigPab). Таким образом впервые созданы и охарактеризованы химерные ферменты на основе аналога *Bst*-полимеразы.

Для учёта влияния положения 6×His, DBD и Sto7d на структуру и активность БФ *Gss*-полимеразы эти дополнительные элементы размещались на N- или C-конце химерных белков (Рисунок 25, A). Всего было сконструировано 6 ферментов:

- Gss-His с 6×His на C-конце БФ *Gss*-полимеразы;
- Gss - БФ *Gss*-полимеразы без дополнительных доменов;
- DBD-Gss и Gss-DBD – DBD на N- или C-конце соответственно;
- Sto7d-Gss и Gss-Sto7d – Sto7d на N- или C-конце соответственно,

His-Gss был клонирован ранее в вектор pQE30, прочие ферменты клонировали в вектор pET23a. Кодирующие последовательности отдельных фрагментов амплифицировали, используя ранее полученные плазмиды с DBD или БФ *Gss*-полимеразы. Кодирующую последовательность Sto7d амплифицировали по матрице геномной ДНК *S. tokodaii*. Известно, что Sto7d обладает РНКазной активностью [83]. Поскольку БФ *Gss*-полимеразы может использоваться для детекции РНК-содержащих вирусов (в том числе с помощью RT-LAMP), наличие РНКазной активности может сделать невозможным применение в этих целях химерного фермента с Sto7d. Для сохранения у химерных ферментов, содержащих Sto7d, возможности работы с РНК в кодирующую последовательность Sto7d ввели две мутации: K12L и E35L, наличие которых приводит к полной потере РНКазной активности Sto7d [83].

Клонированные ферменты наработали в *E. coli* и очистили с помощью аффинной и ионообменной хроматографий. В случае белков с 6×His использовали металл-хелатную хроматографию на Ni-NTA сорбенте, для БФ *Gss*-полимеразы без 6×His использовали аффинную хроматографию на гепарин-сефарозе (Рисунок 25, Б).

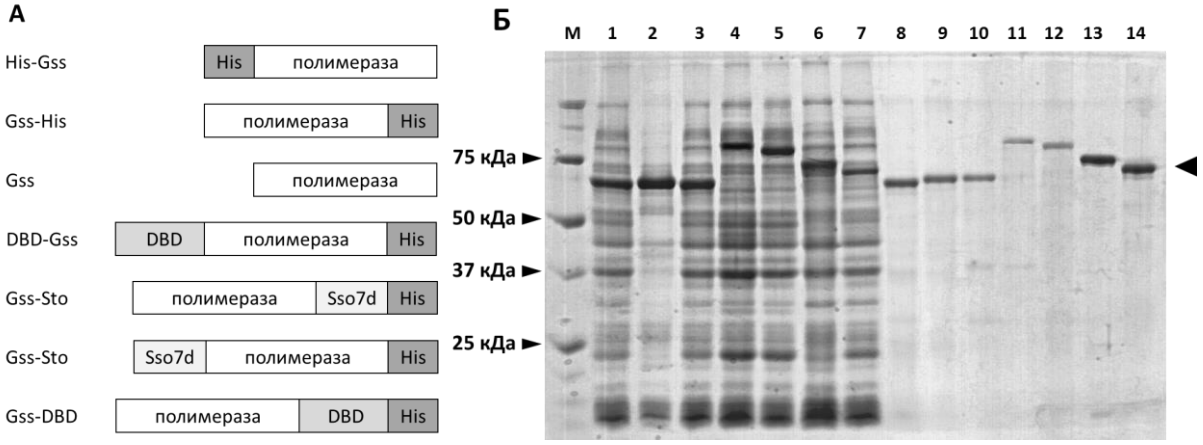

Рисунок 25. Схематичное представление структуры химерных вариантов БФ *Gss*-полимеразы (А) и их очистка (Б). Ферменты нарабатывали в штаммах *E. coli* XL10-Gold (His-Gss) или BL-21 (DE3) pLysS (Gss, Gss-His, DBD-Gss, Gss-DBD, Sto-Gss, Gss-Sto) и очищали посредством аффинной и ионообменной хроматографий. M – маркер Precision Plus Protein standards (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). 1 – Gss, 2 – His-Gss, 3 – Gss-His, 4 – DBD-Gss, 5 – Gss-DBD, 6 – Sto-Gss, 7 – Gss-Sto. Химерные ферменты указаны чёрной стрелкой.

В результате были получены препараты ферментов с чистотой не менее 95 %, которые были использованы для дальнейшей работы по характеризации биохимических свойств и применению в практических приложениях.

4.7 БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХИМЕРНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

4.7.1 Термостабильность

После клонирования и очистки были исследованы биохимические свойства химерных ДНК-полимераз. На первом этапе определяли термостабильность ферментов, так как известно, что присоединение дополнительных доменов может влиять на структуру и стабильность химерных белков [199]. Для оценки термостабильности использовали дифференциальную сканирующую флуориметрию. Этот метод основан на измерении флуоресценции в нагреваемом образце белка. В настоящей работе использовался флуоресцентный краситель SYPRO Orange, который связывается с гидрофобными участки молекул белков. При термической денатурации гидрофобные участки молекул белков экспонируются на поверхности, становясь доступными для связывания с SYPRO Orange, что выражается в росте флуоресценции; величина последней коррелирует со степенью изменения фолдинга белка. По мере дальнейшего роста температуры после полной денатурации белка флуоресценция может снова снижаться вследствие агрегации отдельных белковых молекул. Основным параметром является температура, при которой

наблюдается половина от максимальной достигнутой флуоресценции или температура плавления. Метод используется как скрининговый при изучении связывания отдельных белков с лигандами, что влияет на их термическую стабильность и, как следствие на температуру плавления. Результаты анализа термостабильности представлены на Рисунок 26.

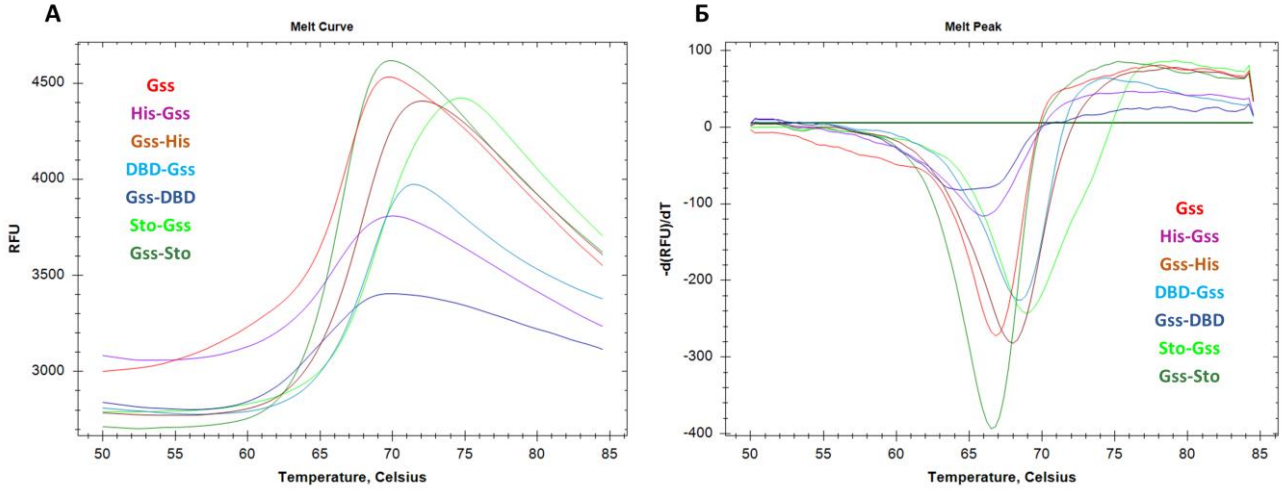

Рисунок 26. Анализ термостабильности химерных ДНК-полимераз. Анализ термостабильности химерных ферментов проводили с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии. Представлены профили термической денатурации (А) и производные величины флуоресценции от температуры (Б), каждый эксперимент проводился в трёх повторах, приведены типичные кривые. Соответствующие отдельным ферментам кривые выделены цветом.

Из полученных данных следует, что введение дополнительных доменов повлияло на термостабильность БФ *Gss*-полимеразы, противоположные результаты были получены для 6×His и DBD/Sto7d: так, 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 12**Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

Таблица 12 - Удельная активность, термостабильность и процессивность химерных ДНК-полимераз

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

Следует отметить, что базовый уровень флуоресценции Gss-DBD превышал таковой для остальных химерных ферментов, магнитуда роста флуоресценции была, напротив, меньше, что

свидетельствовало о нарушении фолдинга. Это наблюдение согласуется с полной потерей полимеразной активности Gss-DBD, описанной ниже.

4.7.2 Удельная активность, оптимальные концентрация ионов, температура, термостабильность

Важнейшей характеристикой ферментов, позволяющей проводить их сравнение, является удельная активность, отражающая количество молекул белка, способных производить катализ, на единицу массы. Удельную активность химерных ферментов измеряли по включения радиоактивно меченого субстрата в активированную ДНК из тимуса телёнка. За одну единицу активности брали количество фермента, необходимое для включения 10 нмоль всех дНТФ в кислотонерастворимый материал за 30 минут при 60 ℃ (Таблица 12**Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

Gss-DBD полностью утратил полимеразную активность и в дальнейшем не участвовал в анализе ферментативных характеристик химерных ДНК-полимераз. При этом присоединение DBD на N-конец и 6×His на C-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.

Помимо удельной активности важными ферментативными параметрами являются оптимальные концентрации моно- и дивалентных ионов, температура и термостабильность. Последняя была оценена повторно независимым методом для проверки результатов дифференциальной сканирующей флуориметрии.

Ионы в высокой концентрации могут затруднять взаимодействие белков с НК, экранируя заряженные поверхности. С этой точки зрения, введение дополнительных ДНК-связывающих доменов должно усилить способность фермента связываться с ДНК в растворах с высокими концентрациями солей. В настоящей работе проверяли работу химерных ферментов в присутствии Cl^- и SO_4^{2-}, различающихся по ионной активности.

Ферментативные параметры определяли по включению радиоактивно меченого субстрата в активированную ДНК из тимуса телёнка (**Ошибка! Источник ссылки не найден.Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

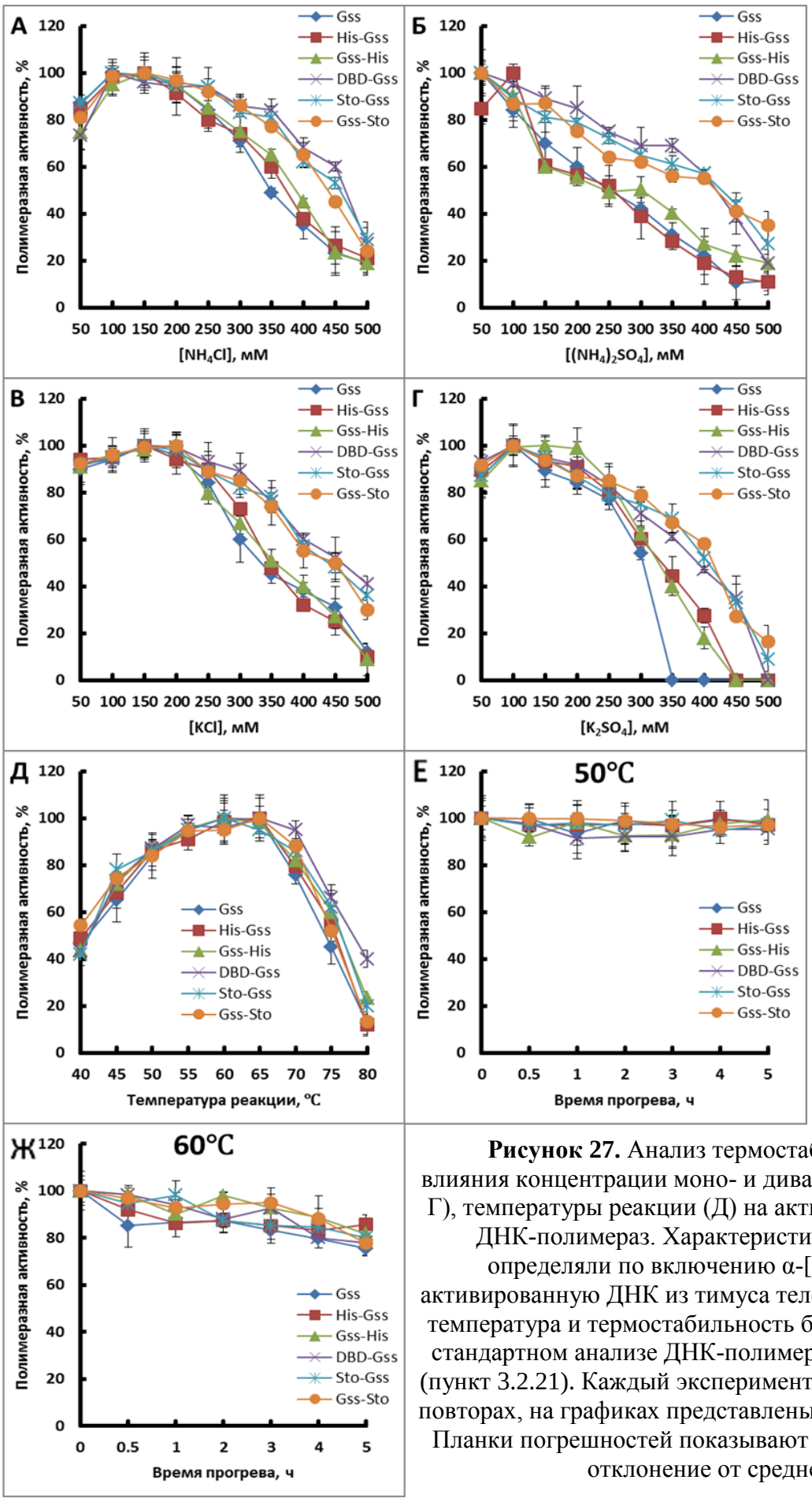

Рисунок 27. Анализ термостабильности (Е, Ж) и влияния концентрации моно- и дивалентных ионов (А-Г), температуры реакции (Д) на активность химерных ДНК-полимераз. Характеристики ферментов определяли по включению α-[^{32}P] дАМФ в активированную ДНК из тимуса телёнка. Оптимальная температура и термостабильность были определены в стандартном анализе ДНК-полимеразной активности (пункт 3.2.21). Каждый эксперимент проводился в трёх повторах, на графиках представлены средние значения. Планки погрешностей показывают одно стандартное отклонение от среднего.

Устойчивость химерных ферментов (DBD-Gss, Sto-Gss и Gss-Sto) к высоким концентрациям ионов возросла в соответствии с ожиданиями (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** А-Г). Все три активных химерных фермента сохраняли больший по сравнению с Gss процент полимеразной активности по мере увеличения концентрации солей в реакционной смеси. При этом термостабльность и температурный оптимум работы химерных ферментов не изменились по сравнению с исходным Gss (**Ошибка! Источник ссылки не найден.** Д-Ж). Все изученные ферменты показывали наивысшую активность при температуре 60-65℃ и сохраняли полимеразную активность после прогревания в течение 5 часов при 50-60℃. Прогревание при 70℃ в течение получаса приводило к полной потере полимеразной активности. Таким образом, подтвердилась первоначальная гипотеза об усилении у химерных ферментов способности сязываться с ДНК при высоких концентрациях солей.

4.7.3 Связывание с ДНК

После оценки термостабильности и удельной активности была изучена способность химерных ферментов связывать ДНК. Этот параметр является ключевым для протяженного синтеза ДНК, напрямую влияя на длину продукта синтеза, т.к. чем более прочный комплекс образовывает ДНК-полимераза с ДНК, тем более длинный продукт она способна синтезировать. Иными словами, высокая аффинность ДНК-полимеразы к ДНК означает высокую процессивность фермента. Способность химерных ферментов связывать ДНК исследовали с помощью метода задержки комплексов в геле (Рисунок 28). Для анализа связывания с дцДНК использовали дуплекс (с 5′-выступающим концом) двух олигонуклеотидов, один из которых нёс флуоресцентный краситель, для оцДНК – флуоресцентно меченый олигонуклеотид. ДНК-субстраты инкубировали с ферментами, выровненными по концентрации, в течение 15 мин при 55℃, после чего анализировали пробы в нативном гель-электрофорезе. При связывании фермента с ДНК подвижность образовавшегося комплекса уменьшалась по сравнению с несвязанным ДНК-субстратом, что выражалось в появлении на электрофореграмме дополнительной полосы связанной ДНК. Количественно связывание ферментов с ДНК оценивали по соотношению интенсивностей полос связанной и несвязанной ДНК.

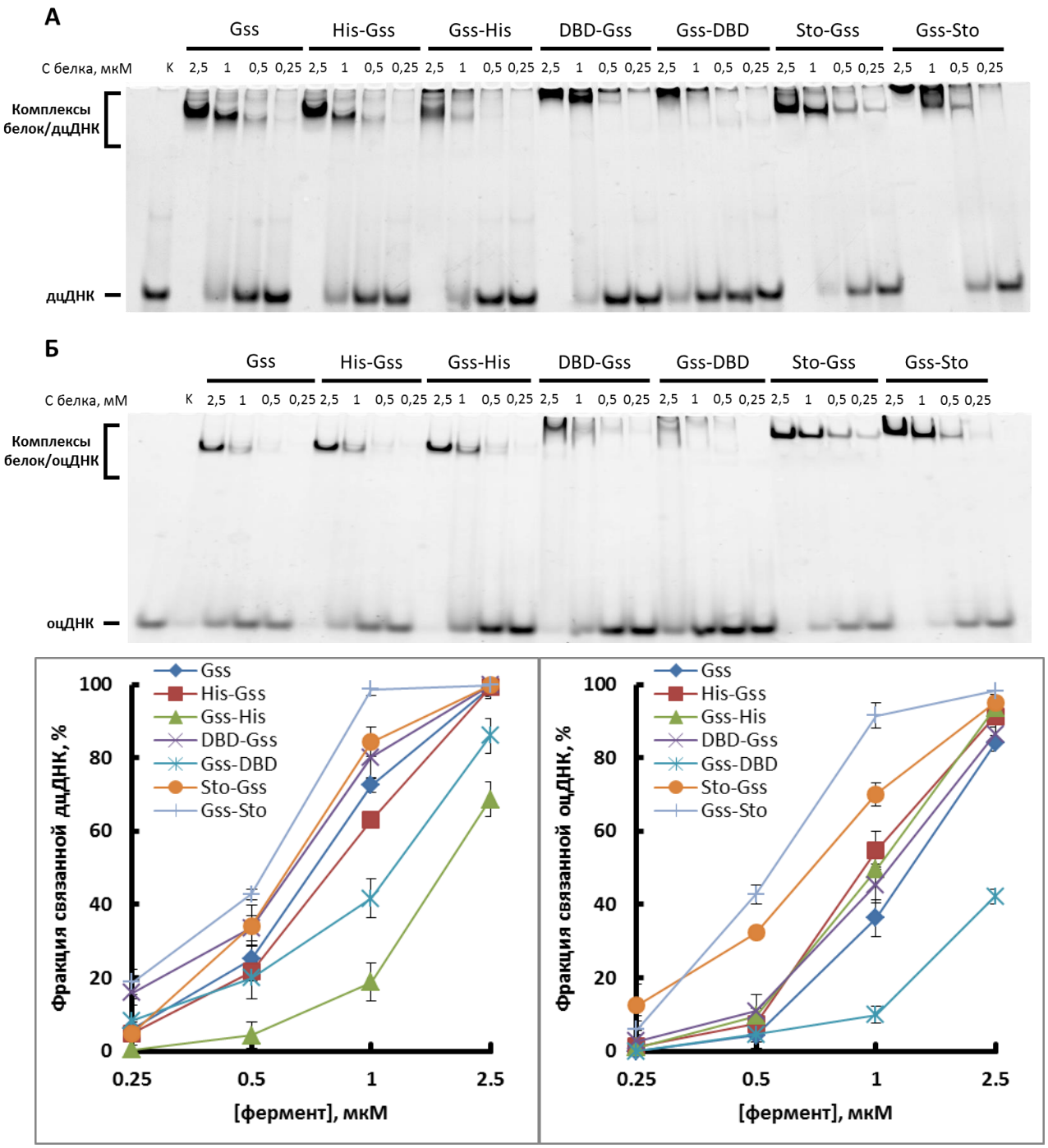

Рисунок 28. Связывание химерных ферментов с ДНК. Ферменты инкубировали с дцДНК-фрагментом с 3′-выступающим концом (А) или оцДНК (Б) при 55°С. Графики показывают количественный анализ степени связывания.

Положение 6×His влияло на взаимодействие Gss с ДНК. Gss связывал 65% дцДНК-субстрата, His-Gss – 60%, Gss-His – 15%; для оцДНК-субстрата разница в связывании была менее выражена: Gss – 35%, His-Gss – 55%, Gss-His – 50%.

Наибольшую аффинность связывания с оцДНК и дцДНК показал 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.

Наименьшую способность связывать оцДНК показал Gss-DBD (около 10% связанного субстрата при концентрации фермента 1 мкМ), к дцДНК – Gss-His (около 15% связанного субстрата при концентрации фермента 1 мкМ). В то же время, DBD-Gss (1 мкМ) связывал 80% дцДНК-субстрата и 45% оцДНК-субстрата. Следовательно, 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.

4.7.4 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. Кроме удобства анализа длинных фрагментов ДНК (в том числе с помощью массового параллельного секвенирования) существует ряд менее очевидных, но не менее важных преимуществ протяжённых продуктов ПГА. Так, при синтезе ДНК низкопроцессивными ферментами повышается количество инсерций и делеций, особенно в случае повторяющихся последовательностей.

При равных константах диссоциации комплекса фермент-ДНК фермент, включающий нуклеотиды с большей скоростью, будет обладать более высокой процессивностью; при равных скоростях синтеза медленнее диссоциирующий фермент также будет обладать более высокой процессивностью. Таким образом, процессивность тесно связана как с аффинностью связывания фермента с субстратом, так и со скоростью синтеза ДНК. *In vivo* высокая процессивность, необходимая для репликации целых геномов, обеспечивается вспомогательными белками, такими как скользящий зажим у бактерий и PCNA у эукариот. Эти белки опоясывают ДНК и находятся в комплексе с многосубъединичными репликативными ДНК-полимеразами, препятствуя их диссоциации от ДНК, однако подобные вспомогательные белки не влияют на скорость включения нуклеотидов как таковую. Репликативные ДНК-полимеразы (семейство С у бактерий, В и D у архей и эукариот) за счёт вспомогательных белков приобретают способность синтезировать ДНК со скоростью тысяча нуклеотидов в

секунду, обеспечивая своевременную репликацию геномов, в том числе насчитывающих миллиарды нуклеотидов. В свою очередь, ДНК-полимеразы, не являющиеся репликативными (ферменты семейств A, X, Y), не обладают высокой процессивностью и участвуют в основном в процессах репарации ДНК и созревании фрагментов Оказаки в ходе репликации.

Процессивность ДНК-полимераз определяется не только свойствами самой ДНК-полимеразы или вспомогательных белков, но также зависит от нуклеотидного контекста амплифицируемой последовательности. Повышенный GC-состав и стабильная вторичная структура ДНК могут замедлять работу ДНК-полимераз, увеличивая вероятность диссоциации комплекса ДНК-фермент [200,201]. Условия, в которых проводится амплификация, также влияют на процессивность. Так, повышенная концентрация солей будет препятствовать электростатическим взаимодействиям фермента и ДНК-матрицы, понижая процессивность [202].

По аналогии с природными ферментами процессивность, как было показано ранее, может быть увеличена за счёт введения дополнительных ДНК-связывающих доменов (Phusion полимераза – химерный фермент на основе *Pfu*-полимеразы и белка Sso7d). Одной из основных целей настоящей работы было повышение процессивности *Bst*-подобной полимеразы за счёт введения ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *P. abyssi* или белка Sto7d. В соответствии с ожиданиями устойчивость к высоким концентрациям солей и способность связывать ДНК у химерных ферментов возросли, поэтому на следующем этапе оценивалась непосредственно процессивность исследуемых ДНК-полимераз.

Процессивность химерных ДНК-полимераз с дополнительными ДНК-связывающими доменами оценивалась по степени элонгации флуоресцентно меченого праймера (Рисунок 29). Для этого использовался меченый олигонуклеотид, комплементарный оцДНК, выделенной из фага M13mp8. К олигонуклеотиду, гибридизованному с матрицей, добавляли ферменты в реакционном буфере, после чего пробы инкубировали 10 мин. Продукты реакции осаждали изопропанолом и анализировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН с использованием программы Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems, США). Процессивность определяли как описано в работе Риччетти с соавторами [191]: $P = [[(1 \times I(1)]+[(2 \times (I(2)]+...+[(n) \times (I(n))])/[I(1)+I(2)+...+I(n)]]$, где P - процессивность, I – площадь под пиком, n – число включённых нуклеотидов.

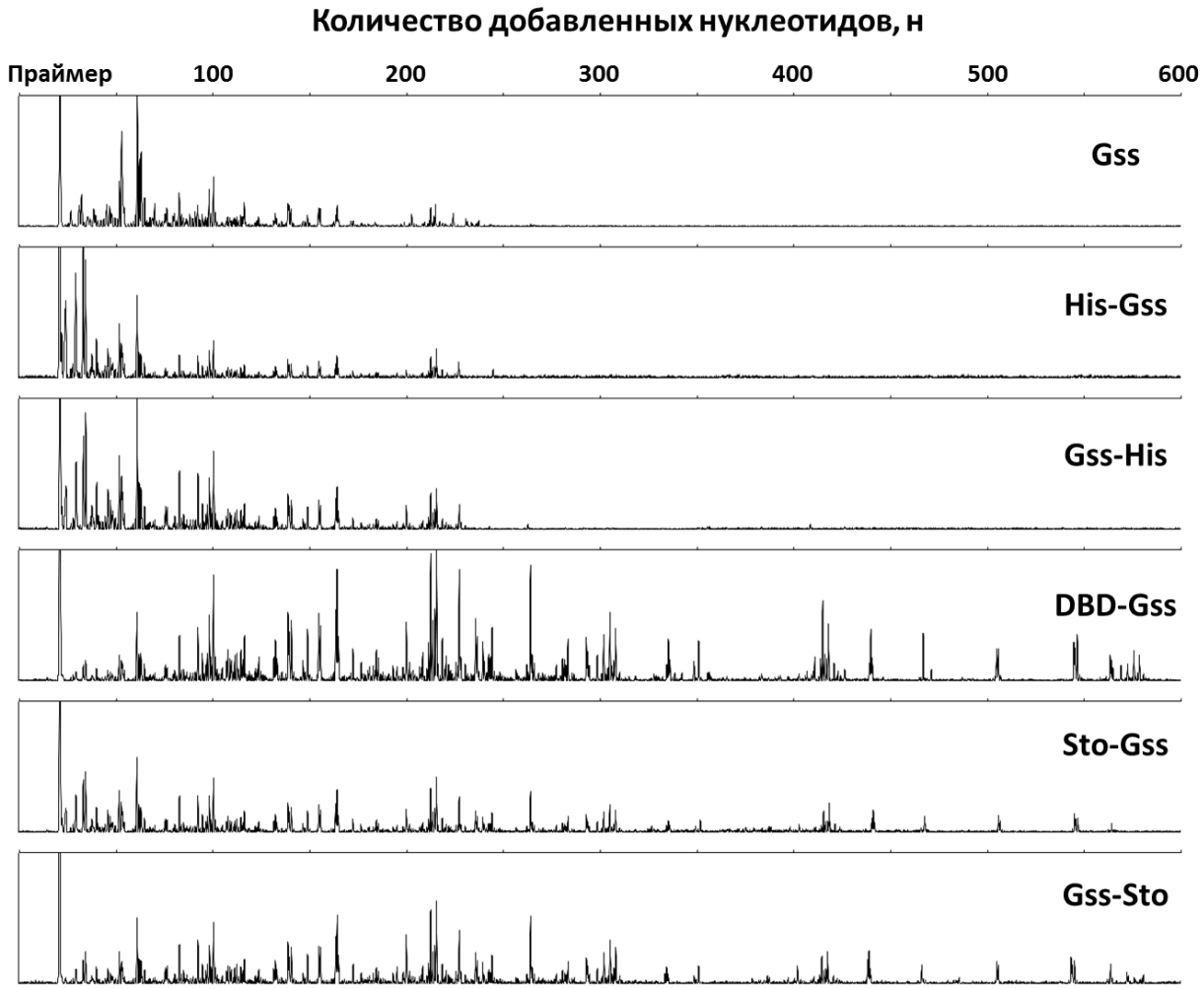

Рисунок 29. Результаты анализа процессивности химерных ферментов. Процессивность оценивали, элонгируя праймер, меченый флуорофором HEX. Каждая панель представляет результаты капиллярного гель-электрофореза, каждый пик – единичный продукт элонгации праймера. Реакция проводилась в течение 10 мин при 55°C. Ось абсцисс показывает длину продукта, определённую по маркёру на том же геле (не показан), ось ординат – интенсивность флуоресценции.

Разная высота пиков на хроматограммах является отражением влияния нуклеотидного контекста на эффективность элонгации праймера. Следует отметить, что количественная оценка в конкретных экспериментальных условиях может быть завышена в силу отсутствия ловушки в виде гепарина или немеченной ДНК, препятствующей повторному образованию комплекса праймированная матрица-фермент. Тем не менее, поскольку условия проведения реакции для всех ферментов были одинаковыми, сравнение полученных результатов представляется корректным, однако количественные данные будут обозначены как кажущаяся процессивность, и микроскопическая процессивность не будет вычислена.

Количественные результаты анализа процессивности приведены в Таблице 12. Наибольшую кажущуюся процессивность показал DBD-Gss (362 н.), на втором месте по этому показателю Gss-Sto (322 н.), на третьем – Sto-Gss (298 н.); кажущаяся процессивность Gss – 98 н., His-Gss – 105 н., Gss-His – 110 н. Присоединение дополнительных ДНК-связывающих

доменов в три раза повысило кажущуюся процессивность химерных ферментов **Ошибка! Источник ссылки не найден.**за исключением Gss-DBD, утратившего полимеразную активность. Gss-Sto показал более высокие результаты по сравнению с Sto-Gss, что может объясняться повышенной аффинностью к ДНК у Gss-Sto, что было показано выше (Раздел 4.7.3). Вместе с тем, большая процессивность DBD-Gss относительно Gss-Sto остаётся необъясненной, 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.

4.7.5 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. Наличие этой активности у химерных ДНК-полимераз и скорость добавления нуклеотидов были определены по присоединению нуклеотидов к флуоресцентно-меченому дцДНК-фрагменту (Рисунок 30). Для анализа использовали дуплекс без выступающих концов, образованный двумя олигонуклеотидами, один из которых нёс флуоресцентную метку на 5′-конце. ДНК-субстрат инкубировали с ферментами, и при наличии у фермента терминально-трансферазной активности происходила элонгация 3′-концов обоих нуклеотидов, которая могла быть детектирована по появлению дополнительной полосы элонгированного олигонуклеотида на электрофореграмме. Количественная оценка терминально-трансферазной активности проводилась по соотношению интенсивностей полос исходного и элонгированного олигонуклеотидов. Отдельно проанализировали скорость включения смеси всех дНТФ и включение индивидуальных дНТФ.

Наличие 6×His, DBD и Sto7d не влияло на способность Gss включать нуклеотиды на 3′ -конец безматричным образом. Все химерные ферменты сохранили терминально-трансферазную активность, о чём свидетельствовало появление полос элонгированных олигонуклеотидов (Рисунок 30 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 ($0{,}1*10^5$ 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. Это наблюдение может объясняться малым вкладом константы диссоциации комплекса фермент-субстрат в наблюдаемую скорость превращения субстрата по сравнению с каталитической константой этого процесса.

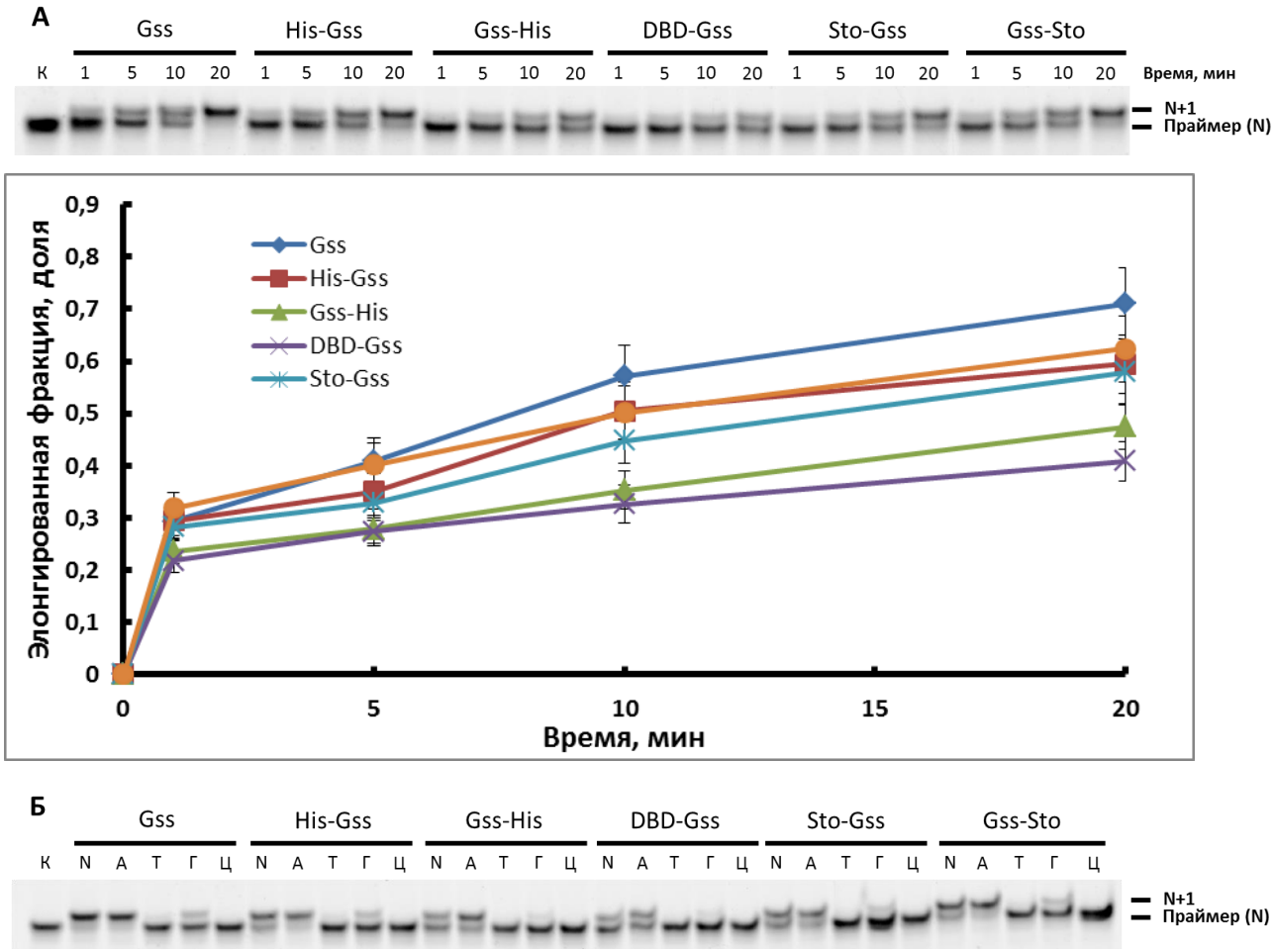

Рисунок 30. Анализ терминально-трансферазной активности (включения дНМФ в дцДНК-фрагмент без выступающих концов). А – кинетика терминально-трансферазной активности. Ферменты инкубировали с дцДНК-фрагментом и дНТФ при 55°С. Графики ниже показывают процент элонгированной ДНК. Б – включение в дцДНК индивидуальных дНМФ.

Среди отдельных нуклеозид монофосфатов наиболее активно происходило включение дАМФ, менее активно дГМФ, включения пиримидинов практически не происходило (Рисунок 30 Б). Это наблюдение хорошо согласуется с известным «А-правилом», согласно которому ДНК-полимеразы склонны связывать и инкорпорировать в растущую цепь дАМФ [203].

4.7.6 Вытеснение цепи

Способность вытеснять цепь ДНК при полимеризации является ключевой для использования *Bst*-подобных полимераз в практических приложениях; именно на цепь-вытесняющей активности основаны методы изотермической амплификации, такие как LAMP, MDA, PSR и др. Поэтому способность вытеснять цепь у химерных ферментов была проанализирована отдельно от прочих свойств. Для анализа цепь-вытесняющей активности использовали систему из трёх олигонуклеотидов: меченого флуоресцентным красителем праймера, матрицы и останавливающего олигонуклеотида-терминатора. ДНК-субстраты инкубировали с ферментами, выровненными по концентрации, в течение 15 или 30 секунд при

55°C, после чего реакцию останавливали добавлением формамида и анализировали продукты реакции денатурирующим гель-электрофорезом. В отсутствие терминатора фермент элонгирует праймер и синтезирует полноразмерный продукт, в противном случае терминатор препятствует элонгации, в результате чего синтез прекращается непосредственно перед ним (положение +10 относительно 3′-конца праймера). При наличии терминатора фермент способен продолжить синтез, только обладая способностью вытеснять цепь (Рисунок 31). Цепь-вытесняющую активность оценивали, сравнивая при наличии и отсутствии терминатора появление и интенсивность полос полноразмерного продукта и/или продуктов длиной больше, чем +10 нуклеотидов относительно длины праймера.

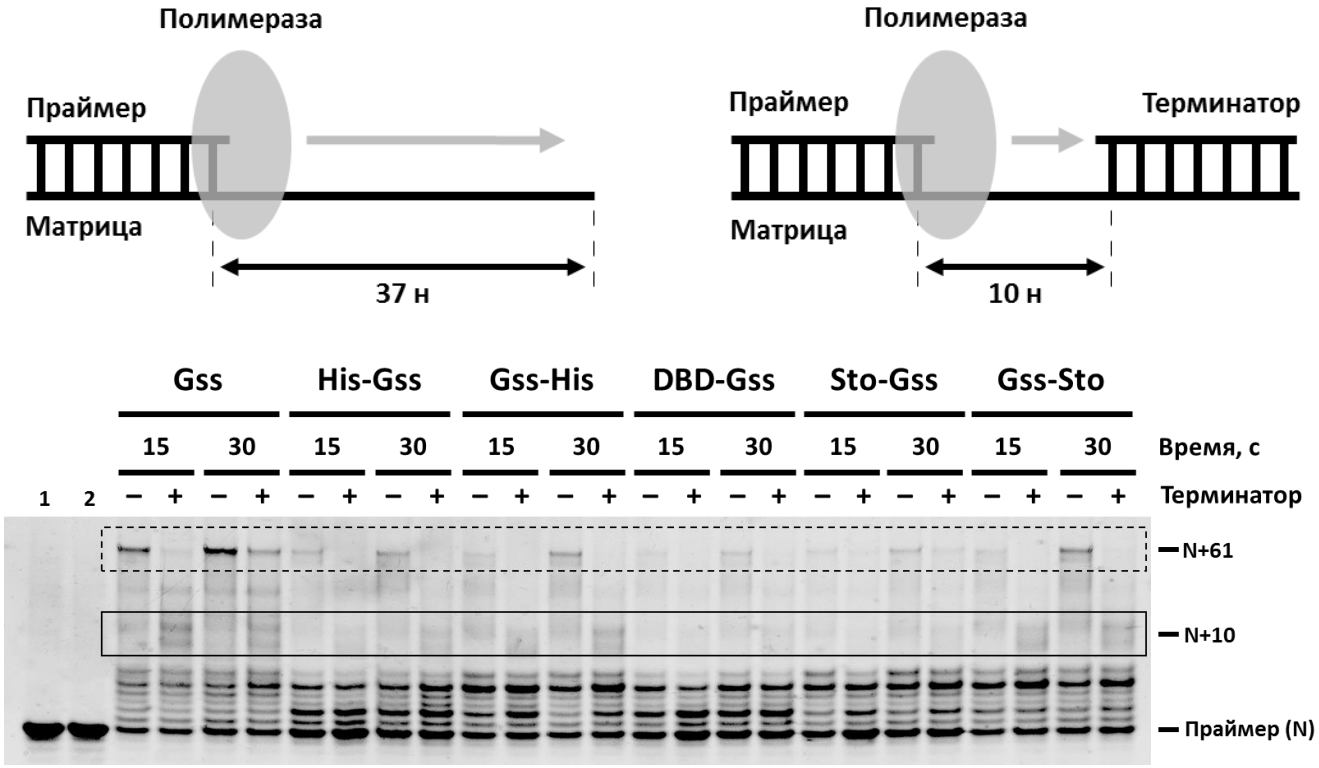

Рисунок 31. Вытеснение цепи химерными ферментами. Ферменты инкубировали с праймированной матрицей при наличии или отсутствии останавливающего олигонуклеотида при 55°C. Контроли: 1 – праймированная матрица, 2 – праймированная матрица с останавливающим нуклеотидом. Штрихованной рамкой выделен участок геля с полноразмерным продуктом (N+61), сплошной рамкой – участок геля с удлинённым на 10 нуклеотидов праймером.

При введении терминатора интенсивность полосы полноразмерного продукта для всех ферментов уменьшалась, либо соответствующая полоса исчезала полностью, что говорит о замедлении синтеза. Увеличение времени синтеза приводило к росту интенсивности полос полноразмерного продукта для Gss и Sto-Gss или полос элонгированного более чем на 10 нуклеотидов праймера (His-Gss, Gss-His, DBD-Gss, Gss-Sto). Несмотря на наличие терминатора, элонгация более чем на 10 нуклеотидов происходила при использовании всех ферментов, что говорит о наличии цепь-вытесняющей активности. Таким образом, 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, удлиненного более чем на 10 нуклеотидов при наличии терминатора (расстояние между праймером и останавливающим нуклеотидом) 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 [204].

4.7.7 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. Представленность соматических мутаций варьирует в широких пределах от десятков процентов до единичных копий в исходной ДНК-матрице, однако само их наличие может свидетельствовать о важных процессах, в том числе развитии резистентности опухолей к таргетной терапии. Артефакты амплификации в виде нуклеотидных замен могут ошибочно расцениваться в ходе молекулярной диагностики как соматические мутации, что по понятным причинам крайне нежелательно.

Точность синтеза ДНК-полимераз определяется их способностью различать нуклеотиды (селективностью) и наличием/отсутствием редактирующей активности. Кроме того, на общую точность синтеза ДНК влияют повреждение ДНК и нуклеотидов, эффективность работы систем репарации непомплементарных пар оснований. Среди факторов, определяемых особенностями конкретной ДНК-полимеразы, наибольший вклад в точность синтеза вносит именно селективность. Известно, что это свойство фермента в значительной степени определяется следующими параметрами: числом водородных связей между азотистыми основаниями матрицы и входящего дНТФ, удалением сольватной оболочки входящего нуклеотида, а также геометрией кармана, связывающего нуклеотиды [21].

Как и в случае процессивности, точность синтеза варьирует в зависимости от роли фермента в клетке. Репликативные ДНК-полимеразы, от которых требуется повышенная точность синтеза для поддержания постоянства генома, характеризуются повышенной селективностью нуклеотидов, обеспечивающей точность синтеза до 10^{-5} (число некомплементарных нуклеотидов, отнесенное к общему количеству присоединенных нуклеотидов). Напротив, ДНК-полимеразы, участвующие в репарации (семейства X и Y),

нередко отличаются пониженной селективностью, за счёт чего они могут синтезировать ДНК, несмотря на повреждения в матрице. Репликативные полимеразы обладают редактирующей активностью (второй активный центр с 3′-5′-экзонуклеазной активностью), дополнительно повышающей точность копирования генетической информации.

Особенно важным параметром точность синтеза становится в тех случаях, когда количество исходной матрицы невелико и/или она подверглась химической модификации (иллюстрацией может служить ДНК, выделяемая из парафиновых гистологических блоков, часто используемая для анализа соматических мутаций в опухолях [187]).

Селективность полимераз по отношению к нуклеотидам анализировали по элонгации меченого флуоресцентным красителем праймера в дуплексе матрица-праймер. В +1 положении матрицы относительно 3′-конца праймера располагался один из четырёх нуклеотидов, в реакционную смесь добавляли смесь всех четырех или индивидуальные дНТФ (концентрация смеси и индивидуальных дНТФ была одинакова). ДНК-субстраты инкубировали с ферментами, выровненными по концентрации, в течение 1 мин при 55℃, после чего реакцию останавливали добавлением формамида и анализировали продукты реакции в денатурирующем гель-электрофорезе. Появление полос элонгированного праймера в случае некомплементарных пар нуклеотида матрицы и дНТФ свидетельствовало о неточном синтезе. Степень селективности оценивали, сравнивая соотношение интенсивностей флуоресценции полос исходного праймера к элонгированному для разных ферментов; сравнение по каждой паре «нуклеотид матрицы-дНТФ» проводилось отдельно. Результаты анализа точности химерных ДНК-полимераз представлены на Рисунок 32.

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

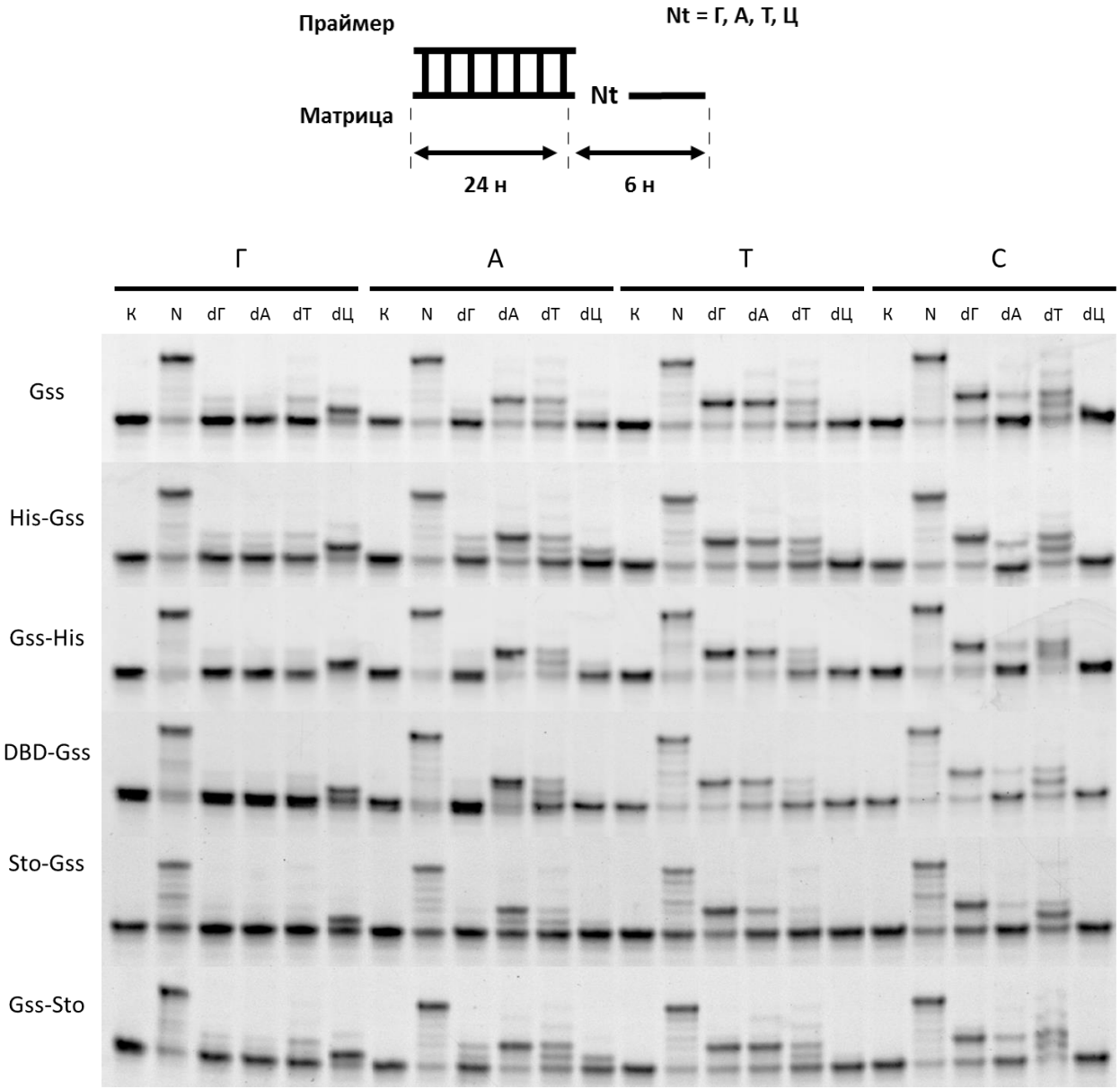

Рисунок 32. Электрофореграмма результатов анализа точности синтеза ДНК химерными ДНК-полимеразами. Матричные нуклеотиды содержали разные основания в +1-й позиции относительно 3′-конца праймера, в реакционной смеси присутствовали смесь или индивидуальные дНТФ. К – контроль, праймированная матрица.

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.

4.8 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. Известно, что наличие вторичных структур и GC-состав матрицы могут влиять на эффективность амплификации, меняя её в ту или иную сторону. Так, с помощью ПЦР хуже амплифицируются как GC-богатые [205], так и AT-богатые участки [206]. Напротив, при использовании MDA И Ф29-полимеразы происходит преимущественная амплификация GC-богатых районов [207]. Такое смещение может сказываться на результатах последующего анализа, приводя к ложной детекции инсерций/делеций. Особую важность минимальное смещение локусов приобретает при амплификации малых количеств материала (менее сотен копий матрицы на реакцию), когда в силу стохастических причин некоторые участки ДНК могут быть полностью потеряны при ПГА. С этой точки зрения оптимальный фермент для ПГА должен синтезировать большое количество протяженных фрагментов ДНК с минимальным смещением представленности локусов.

ПГА проводили по матрице геномной ДНК человека, выделенной из крови, праймерами служили олигонуклеотиды случайного состава длиной 9 звеньев. Для анализа продуктов ПГА было подобрано 20 локусов на геномной ДНК человека, представленных в геноме в одной копии (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**).

Таблица 13 - Характеристики локусов, использованных для оценки продуктов ПГА

Локус	Локализация	Длина ампликона, п.н.	GC-состав
MET	7q31	100	42
F II	11p11	110	42,7
BDNF	11p13	135	43,0
KRAS	12p12,1	95	43,2
IL10RA	11q23	83	43,4
PPARG C1A	4p15,1	167	43,7
ALB	4q13,3	94	45,7
CKMM	19q13,32	115	46,1
BCO1	16q23,2	196	46,4
APOA2	1q23,3	171	48,0
ADIPOQ	3q27	161	48,4
CYP1B1	2p22,2	199	48,7
NBPF3	1p36,12	147	49,6
EGFR	7p12	84	50,0
BHMT	5q14,1	149	51,7

Продолжение Таблицы 13

Локус	Локализация	Длина ампликона, п.н.	GC-состав
MTHFR	1p36,3	120	51,7
F XI	4q35	116	53,4
ALDH1L1	3q21,3	142	54,2
ERBB2	17q12	100	57,0
PER2	2q37,3	202	57,9

Количество продуктов ПГА оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, праймеры и зонды приведены в Приложении 1 (любезно предоставлены Боярских У.А., Ворониной Е.А., Шадриной А.С., Соколовой Е.А., Лаборатория фармакогеномики ИХБФМ СО РАН). Все использованные наборы праймеров и зондов соответствовали требованиям, предъявляемым к количественной ПЦР в реальной времени [208], эффективность амплификации колебалась в пределах 90-110 процентов, концентрации образцов попадали в линейный диапазон калибровочных кривых. Выбранные локусы различались по локализации на хромосомах, ампликоны различались по длине (83-202 п.н.) и GC-составу (42-58 %). С каждым ферментом проводили по три независимых постановки ПГА, матрицей служила геномная ДНК человека, выделенная из крови (Рисунок 33).

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 (Приложение 2, Рисунок 1). Вероятно, эффект GC-состава сказывается на ПГА в масштабе более длинных участков ДНК, чем использованные в анализе (83-202 п.н.), что может быть проверено массовым параллельным секвенированием продуктов ПГА. Также не было обнаружено связи между количеством продукта ПГА, определённым с помощью ПЦР в реальном времени, и длиной ампликона (Приложение 2, Рисунок 2). Последнее обстоятельство даёт основания утверждать, что в диапазоне длин 80-200 п.н. ПГА происходила с одинаковой эффективностью.

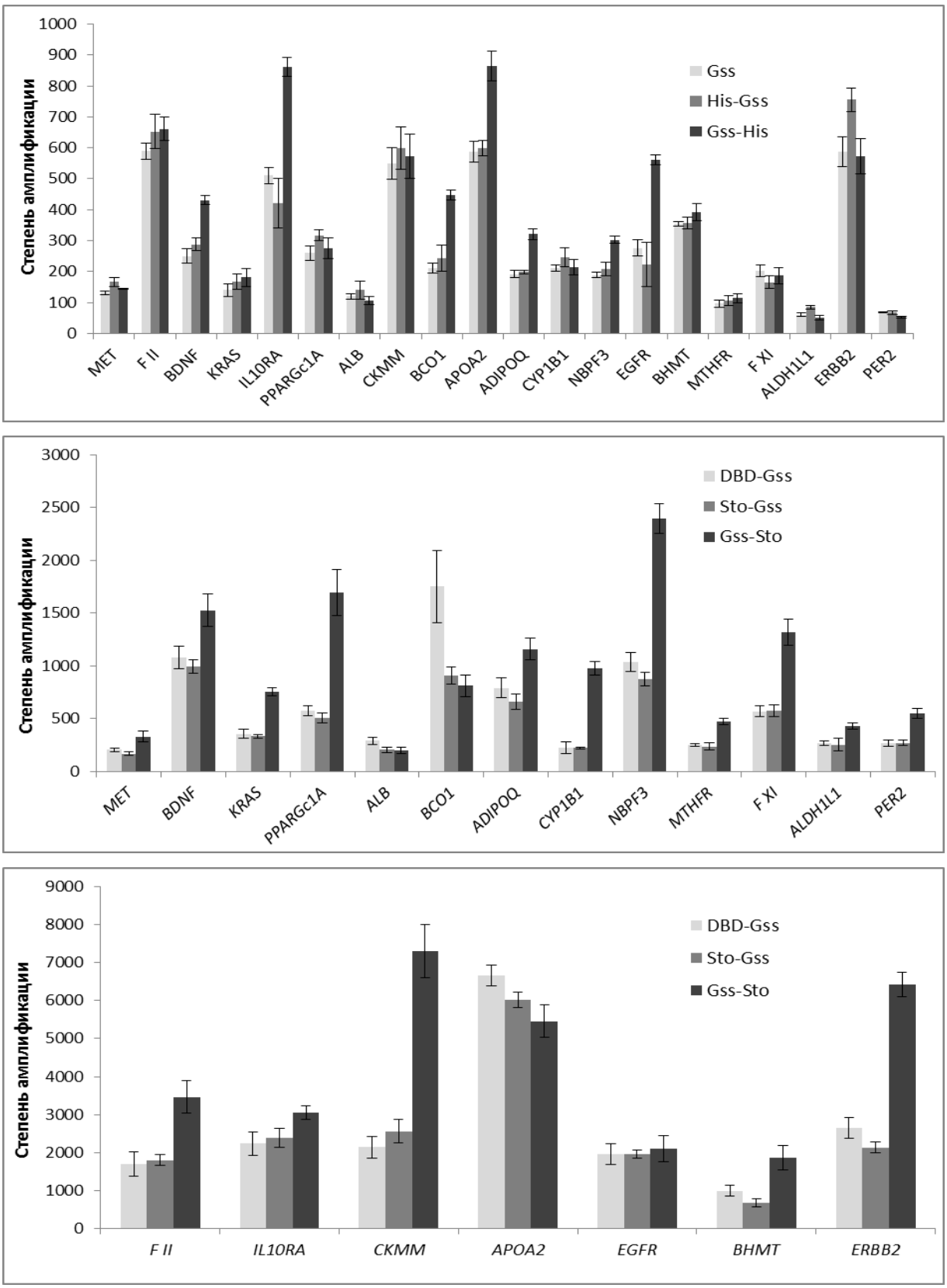

Рисунок 33. Степень амплификации продуктов ПГА химерными ферментами. Три повтора ПЦР были усреднены для каждого локуса и каждого эксперимента ПГА, на реакцию брали по 10 нг продукта ПГА. Количество ДНК определяли по сравнению со стандартной кривой, сгенерированной по неамплифицированной геномной ДНК человека (50, 25, 12,5, 6,25 3,12 и 1,56 нг на реакцию). Степень амплификации рассчитывалась для каждого локуса как отношение количества копий локуса после и до ПГА. Планки погрешностей показывают одно стандартное отклонение от средних значений.

Известно, что структура ДНК может влиять на эффективность её амплификации. В частности, суперспирализация ДНК может препятствовать оценке её количества с помощью ПЦР в реальном времени [209], приводя к занижению результатов. Продуктом ПГА по методу амплификации с множественным вытеснением цепи является древовидная структура частично комплементарных двуцепочечных фрагментов ДНК, которая теоретически может влиять на эффективность ПЦР в режиме реального времени. Для оценки влияния структуры продукта ПГА на его количественную оценку ПЦР в режиме реального времени, количество продукта ПГА определяли параллельно с помощью цифровой капельной ПЦР, предварительно гидролизовав продукт ПГА эндонуклеазой рестрикции EcoRI (Рисунок 34). Метод позволяет с точностью до отдельных копий определять количество матрицы и не нуждается в стандартах с независимо определённой концентрацией.

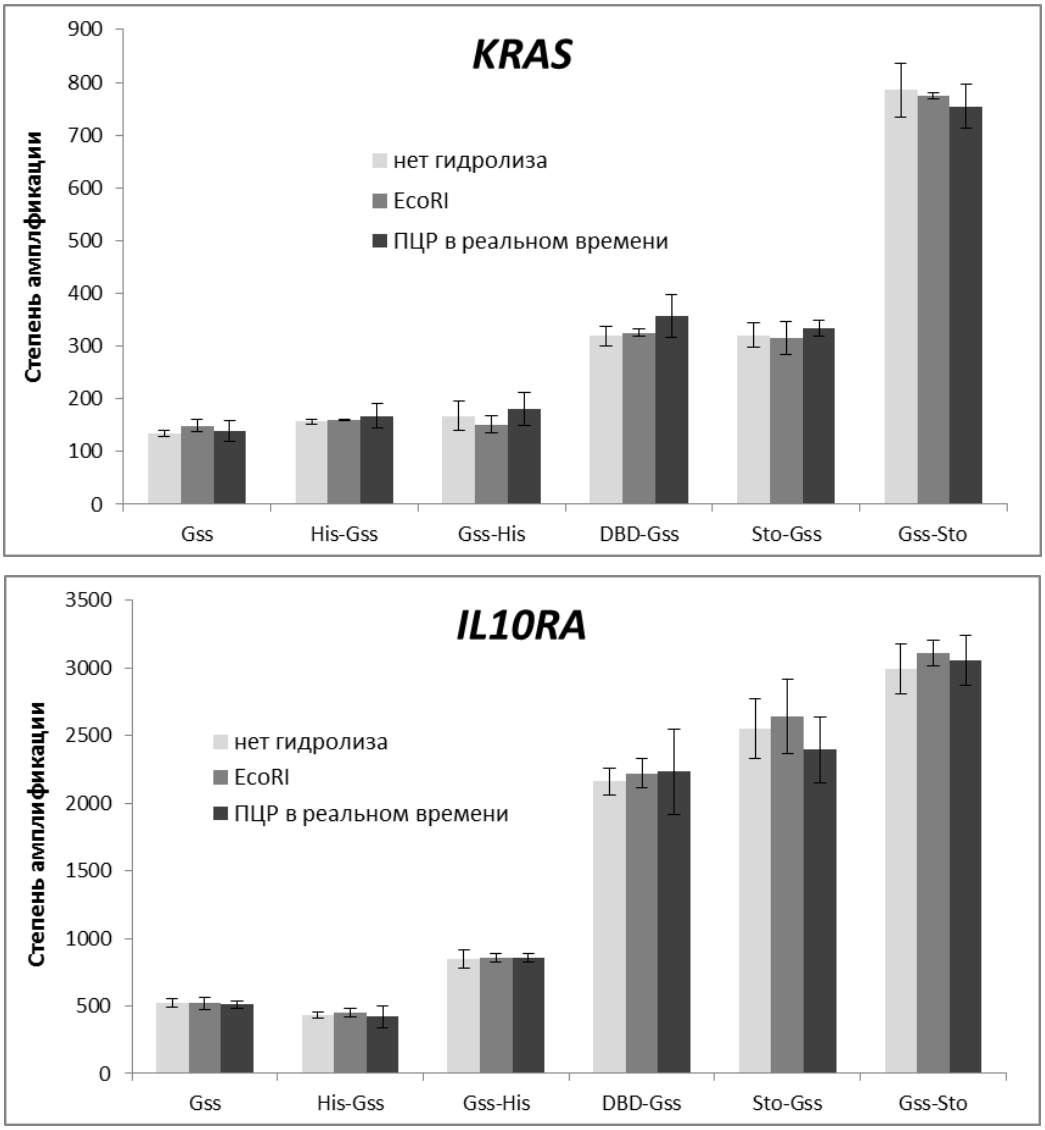

Рисунок 34. Количественный анализ продуктов ПГА с помощью цифровой капельной ПЦР. Три повтора ПЦР были усреднены для каждого локуса и каждого эксперимента ПГА, на реакцию брали по 10 нг продукта ПГА. Степень амплификации рассчитывалась для каждого локуса как отношение количества копий локуса после и до ПГА. Планки погрешностей показывают одно стандартное отклонение от средних значений.

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.

4.9 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. Анализируемые образцы нуклеиновых кислот в таких условиях зачастую содержат ингибиторы ферментативных реакций. Ингибиторами могут быть субстанции, сохранившиеся в образце после процедур очистки (компоненты крови, мочи, кала), реагенты, использовавшиеся для хранения образцов (гепарин, ЭДТА) или для очистки (мочевина, NaCl, этанол). Перечисленные субстанции могут ухудшать эффективность реакций или полностью их ингибировать, результатом чего может быть ложный результат тестирования. Отсюда происходят требования повышенной устойчивости к ингибиторам для ферментов, участвующих в LAMP или других методах лабораторной диагностики у постели больного. Химерные ДНК-полимеразы были проверены на устойчивость к ингибиторам LAMP с использованием набора праймеров для детекции ДНК

фага лямбда и интеркалирующего красителя SYTO-82

(

Рисунок **35**).

В случае гепарина, NaCl, мочевины и цельной крови химерные ферменты (DBD-Gss, Sto-Gss, Gss-Sto) показали повышенную устойчивость по сравнению с Gss и его вариантами с разным расположением 6×His. Так, устойчивость химерных ферментов к гепарину возросла в

пять раз (с 0,1 до 0,5 единиц на реакцию,

Рисунок **35** А). Причиной этого эффекта может являться рост эффективности связывания с ДНК у химерных ферментов, за счёт чего нивелируется действие гепарина как конкурентного ингибитора ДНК-полимераз, препятствующего связыванию ферментов с ДНК.

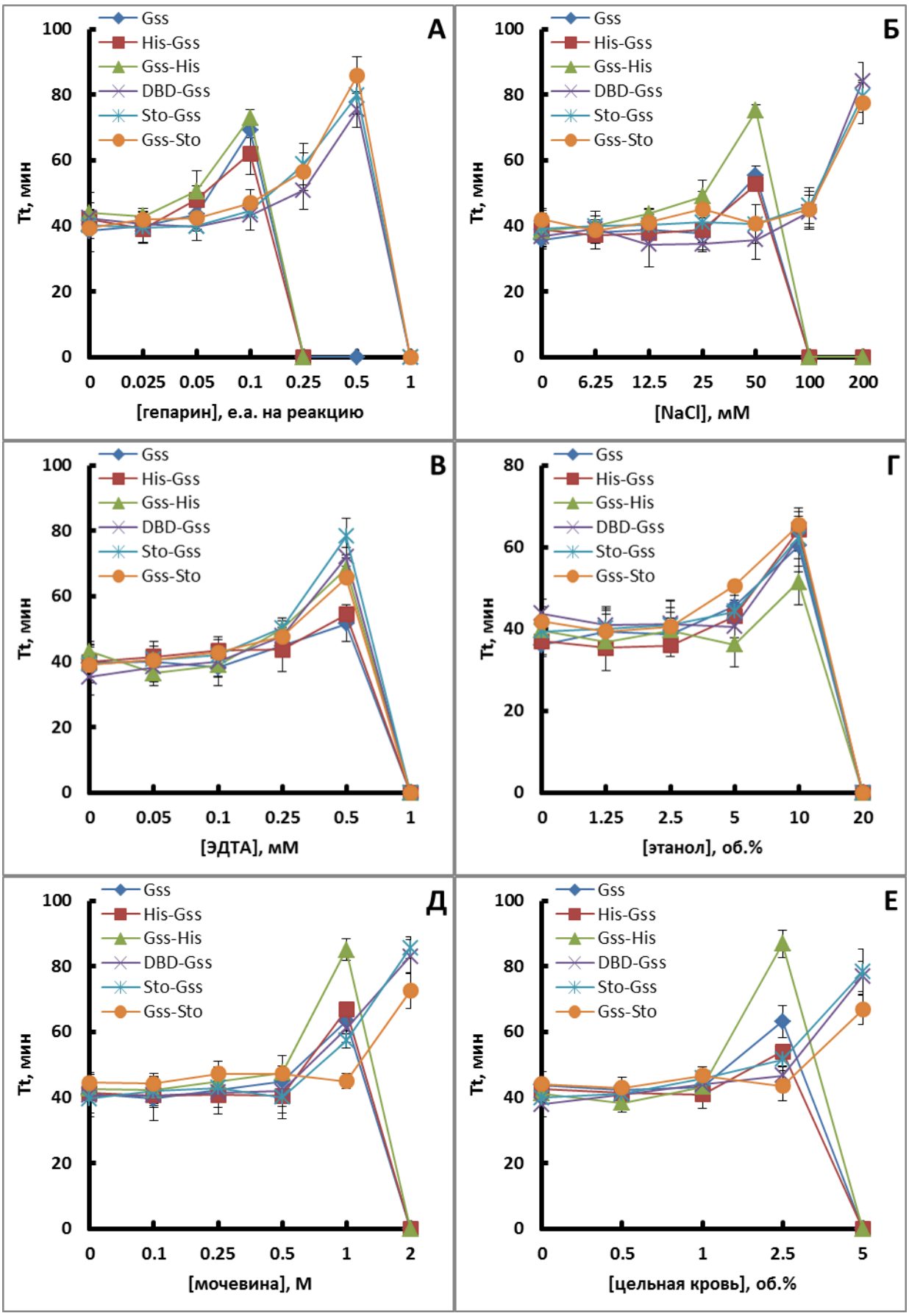

Рисунок 35. Влияние ингибиторов на LAMP с химерными ферментами. LAMP в реальном времени проводили по матрице ДНК фага лямбда и SYTO-82 в присутствии ингибиторов. На графиках представлены зависимости значений Tt от концентрации ингибиторов.

По аналогии с гепарином четырёхкратный рост устойчивости химерных ферментов к NaCl (с 50 мМ до 200 мМ,

Рисунок **35** Б) может объясняться более прочным связыванием химерных ферментов с ДНК, которое позволяет ферментам формировать комплекс с ДНК, несмотря на рост концентрации ионов в растворе, влекущий за собой усиление экранирующего эффекта на поверхности 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 (Раздел 4.7.2).

Повышение устойчивости химерных ферментов к мочевине (с 1 до 2 М,

Рисунок **35** Д) и цельной крови (с 2,5 до 5 об.%,

Рисунок **35** Е), по всей видимости, также объясняется более прочным связыванием ферментов с ДНК. Мочевина широко используется в биохимии как хаотропный агент,

нарушающий нековалентные меж- и внутримолекулярные взаимодействия, в том числе при исследовании комплексов ДНК-белок. Химерные ферменты с дополнительными ДНК-связывающими доменами образуют более стабильные комплексы с ДНК по сравнению с исходным Gss, что в том числе проявляется в повышенной устойчивости химерных ферментов к мочевине. 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. Точная природа этих ингибирующих субстанций остаётся неизвестной и требует дальнейших исследований.

В отличие от перечисленных выше ингибиторов устойчивость химерных ферментов к ЭДТА и этанолу

(

Рисунок **35** В, Г, соответственно) не изменилась. Такое различие может объясняться разными механизмами ингибирования, где NaCl, мочевина, гепарин и компоненты цельной крови влияют на связывание ферментов с ДНК. Ингибирование амплификации ЭДТА основано на связывании с последней ионов магния (или иных двухвалентных ионов металлов), которые являются необходимым кофактором ДНК-полимераз; в отсутствие двухвалентных ионов металлов эти ферменты теряют способность синтезировать ДНК. В свою очередь, этанол может денатурировать белки или вызывать их агрегацию. Таким образом, ингибирующий эффект ЭДТА и этанола не связан напрямую со способностью ферментов связываться с ДНК, которая выросла у химерных ферментов, и устойчивость последних к ЭДТА и этанолу не изменилась по сравнению с Gss.

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.

5 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, мочевине 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 позволят 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.

6 ВЫВОДЫ

1. Клонированный ДНК-связывающий домен ДНК-лигазы *Pyrococcus 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, мочевине 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 *Pyrococcus 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 С-конце.

7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg A., Kornberg S.R., Simms R.S. Metaphospate sinthesis by an enzyme from Escherichia coli // Biochimica et Biophysica Acta. 1956. Vol. 20. P. 215–227.
2. Bollum F.J., Potter V.R. Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from rat tissues // Journal of Biological Chemistry. 1958. Vol. 233. № 2. P. 478–482.
3. De Lucia P., Cairns J. Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase // Nature. 1969. Vol. 224. № 5225. P. 1164–1166.
4. Kornberg T., Gefter M.L. DNA synthesis in cell-free extracts of a DNA polymerase-defective mutant // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1970. Vol. 40. № 6. P. 1348–1355.
5. Wagner J. et al. The dinB gene encodes a novel E. coli DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis // Molecular Cell. 1999. Vol. 4. № 2. P. 281–286.
6. Tang M. et al. UmuD’(2)C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999. Vol. 96. № 16. P. 8919–8924.
7. Yoneda M., Bollum F.J. Deoxynucleotide-polymerizing calf thymus enzymes gland // Journal of Biological Chemistry. 1965. Vol. 240. № 8. P. 3385–3391.
8. McLennan A.G., Keir H.M. Deoxyribonucleic acid polymerases of Euglena gracilis. Purification and properties of two distinct deoxyribonucleic acid polymerases of high molecular weight // Biochemical Journal. 1975. Vol. 151. № 2. P. 227–238.
9. Crerar M., Pearlman R.E. Deoxyribonucleic acid polymerase from Tetrahymena pyriformis. Purification and properties of the major activity in exponentially growing cells // Journal of Biological Chemistry. 1974. Vol. 249. № 10. P. 3123–3131.
10. Wintersberger U., Wintersberger E. Studies on deoxyribonucleic acid polymerases from yeast. 2. Partial purification and characterization of mitochondrial DNA polymerase from wild type and respiration-deficient yeast cells // European Journal of Biochemistry. 1970. Vol. 13. № 1. P. 20–27.
11. Okita T.W., Volcani B.E. The deoxyribonucleic acid polymerases from the diatom Cylindrotheca fusiformis. Partial purification and characterization of four distinct activities // Biochemical Journal. 1977. Vol. 167. № 3. P. 601–610.
12. Weissbach A. et al. DNA polymerase from human cells // Nature. 1971. Vol. 231. P. 167–170.
13. Fry M., Weissbach A. A new deoxyribonucleic acid dependent deoxyribonucleic acid polymerase from HeLa cell mitochondria // Biochemistry. 1973. Vol. 12. № 19. P. 3602–3608.
14. Weissbach A. et al. Nomenclature of eukaryotic DNA polymerases // Science. 1975. Vol. 190. № 4212. P. 401–402.

15. Burgers P.M. et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature // Journal of Biological Chemistry. 2001. Vol. 276. № 47. P. 43487–43490.
16. Hübscher U. et al. DNA polymerases discovery, characterization and functions in cellular DNA transactions. New York: World Scientific Publishing, 2010. 61-63 p.
17. Reha-Krantz L.J. DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability // Biochimica et biophysica acta. 2010. Vol. 1804. № 5. P. 1049–1063.
18. Kunkel T.A. DNA replication fidelity // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279. № 17. P. 16895–16898.
19. Tindall K.R., Kunkel T.A. Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase // Biochemistry. 1988. Vol. 27. № 16. P. 6008–6013.
20. Agarwal S.S., Dube D.K., Loeb L.A. On the fidelity of DNA replication. Accuracy of Escherichia coli DNA polymerase I // Journal of Biological Chemistry. 1979. Vol. 254. № 1. P. 101–106.
21. McCulloch S.D., Kunkel T.A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases // Cell research. 2008. Vol. 18. № 1. P. 148–161.
22. Liu D., Keijzers G., Rasmussen L.J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2017. Vol. 773. P. 174–187.
23. Hedglin M., Benkovic S.J. Eukaryotic translesion DNA synthesis on the leading and lagging strands: unique detours around the same obstacle // Chemical Reviews. 2017. Vol. 117. № 12. P. 7857–7877.
24. McCulloch S.D. et al. Enzymatic switching for efficient and accurate translesion DNA replication // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32. № 15. P. 4665–4675.
25. Sale J.E., Lehmann A.R., Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2012. Vol. 13. № 3. P. 141–152.
26. Yamtich J., Sweasy J.B. DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles // Biochimica et Biophysica Acta. 2010. Vol. 1804. № 5. P. 1136–1150.
27. Casali P. et al. DNA repair in antibody somatic hypermutation // Trends in Immunology. 2006. Vol. 27. № 7. P. 313–321.
28. Zan H. et al. The translesion DNA polymerase theta plays a dominant role in immunoglobulin gene somatic hypermutation // EMBO Journal. 2005. Vol. 24. № 21. P. 3757–3769.
29. Zeng X. et al. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes // Nature Immunology. 2001. Vol. 2. № 6. P. 537–541.
30. Zan H. et al. The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation // Immunity. 2001. Vol. 14. № 5. P. 643–653.
31. Brautigam C.A., Steitz T.A. Structural and functional insights provided by crystal structures of

DNA polymerases and their substrate complexes // Current opinion in structural biology. 1998. Vol. 8. № 1. P. 54–63.

32. Kiefer J.R. et al. Crystal structure of a thermostable Bacillus DNA polymerase I large fragment at 2.1 A resolution // Structure. 1997. Vol. 5. № 1. P. 95–108.
33. Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. // Nature. 1996. Vol. 382. № 6588. P. 278–281.
34. Ibarra B. et al. Proofreading dynamics of a processive DNA polymerase // EMBO Journal. 2009. Vol. 28. № 18. P. 2794–2802.
35. Villani G. et al. Properties of a Bacillus subtilis strain lacking DNA polymerase I // Nucleic Acids Research. 1974. Vol. 1. № 3. P. 461–477.
36. Joyce C.M., Kelley W.S., Grindley N.D. Nucleotide sequence of the Escherichia coli polA gene and primary structure of DNA polymerase I // Journal of Biological Chemistry. 1982. Vol. 257. № 4. P. 1958–1964.
37. Gutman P.D., Fuchs P., Minton K.W. Restoration of the DNA damage resistance of Deinococcus radiodurans DNA polymerase mutants by Escherichia coli DNA polymerase I and Klenow fragment // Mutation Research. 1994. Vol. 314. № 1. P. 87–97.
38. Novikova O., Topilina N., Belfort M. Enigmatic distribution, evolution, and function of inteins // Journal of Biological Chemistry. 2014. Vol. 289. № 21. P. 14490–14497.
39. Saiki K. et al. Reconstitution and purification of cytolethal distending toxin of Actinobacillus actinomycetemcomitans // Microbiology and Immunology. 2001. Vol. 45. № 6. P. 497–506.
40. Chong S. et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element // Gene. 1997. Vol. 192. № 2. P. 271–281.
41. Liang R., Zhou J., Liu J. Construction of a bacterial assay for estrogen detection based on an estrogen-sensitive intein // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77. № 7. P. 2488–2495.
42. Skretas G., Wood D.W. Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins // Protein Science. 2005. Vol. 14. № 2. P. 523–532.
43. Huang Y.P., Downie J.A., Ito J. Primary structure of the DNA polymerase I gene of an alpha-proteobacterium, Rhizobium leguminosarum, and comparison with other family A DNA polymerases // Current Microbiology. 1999. Vol. 38. № 6. P. 355–359.
44. Sellmann E. et al. Purification and characterization of DNA polymerases from Bacillus species // Journal of Bacteriology. 1992. Vol. 174. № 13. P. 4350–4355.
45. Robins P. et al. Structural and functional homology between mammalian DNase IV and the 5’-nuclease domain of Escherichia coli DNA polymerase I // Journal of Biological Chemistry. 1994. Vol. 269. № 46. P. 28535–28538.
46. Rigby P.W. et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick

translation with DNA polymerase I // Journal of Molecular Biology. 1977. Vol. 113. № 1. P. 237–251.

47. Patel P.H. et al. Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection // Journal of Molecular Biology. 2001. Vol. 308. № 5. P. 823–837.
48. Franklin M.C., Wang J., Steitz T.A. Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase // Cell. 2001. Vol. 105. № 5. P. 657–667.
49. Beese L.S., Derbyshire V., Steitz T.A. Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA // Science. 1993. Vol. 260. № 5106. P. 352–355.
50. Milla M.A. et al. Use of the restriction enzyme AvaI and exo- Bst polymerase in strand displacement amplification // Biotechniques. 1998. Vol. 24. № 3. P. 392–396.
51. Sandalli C. et al. A new DNA polymerase I from Geobacillus caldoxylosilyticus TK4: cloning, characterization, and mutational analysis of two aromatic residues // Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. Vol. 84. № 1. P. 105–117.
52. Blanco L. et al. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication // Journal of Biological Chemistry. 1989. Vol. 264. № 15. P. 8935–8940.
53. Chander Y. et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Frontiers in Microbiology. 2014. Vol. 5. P. 395.
54. Berjón-Otero M. et al. DNA polymerase from temperate phage Bam35 is endowed with processive polymerization and abasic sites translesion synthesis capacity // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. Vol. 112. № 27. P. E3476-84.
55. Manosas M. et al. Mechanism of strand displacement synthesis by DNA replicative polymerases // Nucleic acids research. 2012. Vol. 40. № 13. P. 6174–6186.
56. Saiki R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. 1988. Vol. 239. № 4839. P. 487–491.
57. Lundberg K.S. et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus // Gene. 1991. Vol. 108. № 1. P. 1–6.
58. Sakaguchi A.Y. et al. Cautionary note on the use of dUMP-containing PCR primers with Pfu and VentR DNA polymerases // Biotechniques. 1996. Vol. 21. № 3. P. 368–370.
59. Takagi M. et al. Characterization of DNA polymerase from Pyrococcus sp. strain KOD1 and its application to PCR // Applied and Environmental Microbiology. 1997. Vol. 63. № 11. P. 4504–4510.
60. Ali S.F. et al. Family B DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum calidifontis: cloning, characterization and PCR application // Journal of Bioscience and

Bioengineering. 2011. Vol. 112. № 2. P. 118–123.

61. Kähler M., Antranikian G. Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon Pyrobaculum islandicum // Journal of Bacteriology. 2000. Vol. 182. № 3. P. 655–663.
62. Cambon-Bonavita M.A. et al. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea Thermococcus fumicolans // Extremophiles. 2000. Vol. 4. № 4. P. 215–225.
63. Kong H., Kucera R.B., Jack W.E. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea Thermococcus litoralis. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities // Journal of Biological Chemistry. 1993. Vol. 268. № 3. P. 1965–1975.
64. Louwrier A., Valk A. Thermally reversible inactivation of Taq polymerase in an organic solvent for application in hot start PCR // Enzyme and Microbial Technology. 2005. Vol. 36. № 7. P. 947–952.
65. Kellogg D.E. et al. TaqStart Antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase // Biotechniques. 1994. Vol. 16. № 6. P. 1134–1137.
66. Kermekchiev M.B., Tzekov A., Barnes W.M. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31. № 21. P. 6139–6147.
67. Ghadessy F.J., Ong J.L., Holliger P. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. Vol. 98. № 8. P. 4552–4557.
68. d’Abbadie M. et al. Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA // Nature Biotechnology. 2007. Vol. 25. № 8. P. 939–943.
69. Reeve M.A., Fuller C.W. A novel thermostable polymerase for DNA sequencing // Nature. 1995. Vol. 376. № 6543. P. 796–797.
70. Von Hippel P.H., Fairfield F.R., Dolejsi M.K. On the processivity of polymerases // Annals of the New York Academy of Sciences. 1994. Vol. 726. № 1. P. 118–131.
71. Inoue J., Shigemori Y., Mikawa T. Improvements of rolling circle amplification (RCA) efficiency and accuracy using Thermus thermophilus SSB mutant protein // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 34. № 9. P. e69.
72. Yamagami T. et al. A longer finger-subdomain of family A DNA polymerases found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities // Gene. 2016. Vol. 576. № 2 Pt 1. P. 690–695.
73. Villbrandt B. et al. Domain exchange: chimeras of Thermus aquaticus DNA polymerase, Escherichia coli DNA polymerase I and Thermotoga neapolitana DNA polymerase. // Protein

Engineering. 2000. Vol. 13. № 9. P. 645–654.

74. Pavlov A.R. et al. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. Vol. 99. № 21. P. 13510–13515.

75. Davidson J.F. et al. Insertion of the T3 DNA polymerase thioredoxin binding domain enhances the processivity and fidelity of Taq DNA polymerase // Nucleic Acids Research. 2003. Vol. 31. № 16. P. 4702–4709.

76. Pavlov A.R. et al. Cooperation between catalytic and DNA binding domains enhances thermostability and supports DNA synthesis at higher temperatures by thermostable DNA polymerases // Biochemistry. 2012. Vol. 51. № 10. P. 2032–2043.

77. Yamagami T. et al. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering // Frontiers in Microbiology. 2014. Vol. 5. P. 461.

78. Wang Y. et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32. № 3. P. 1197–1207.

79. Mai V.Q. et al. Small abundant DNA binding proteins from the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus shibatae constrain negative DNA supercoils // Journal of Bacteriology. 1998. Vol. 180. № 9. P. 2560–2563.

80. Guagliardi A. et al. Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein // Journal of Molecular Biology. 1997. Vol. 267. № 4. P. 841–848.

81. López-García P. et al. In vitro DNA binding of the archaeal protein Sso7d induces negative supercoiling at temperatures typical for thermophilic growth // Nucleic Acids Research. 1998. Vol. 26. № 10. P. 2322–2328.

82. Guagliardi A. et al. The chromosomal protein Sso7d of the Crenarchaeon Sulfolobus solfataricus rescues aggregated proteins in an ATP hydrolysis-dependent manner // Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275. № 41. P. 31813–31818.

83. Shehi E. et al. The Sso7d DNA-binding protein from Sulfolobus solfataricus has ribonuclease activity // FEBS Lett. 2001. Vol. 497. № 2–3. P. 131–136.

84. McCrary B.S., Edmondson S.P., Shriver J.W. Hyperthermophile protein folding thermodynamics: differential scanning calorimetry and chemical denaturation of Sac7d // Journal of Molecular Biology. 1996. Vol. 264. № 4. P. 784–805.

85. Gera N. et al. Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d Scaffold // Journal of Molecular Biology. 2011. Vol. 409. № 4. P. 601–616.

86. Ignatov K.B., Kramarov V.M. DNA ligases from thermophilic bacteria enhance PCR amplification of long DNA sequences // Biochemistry Biokhimiia. 2009. Vol. 74. № 5. P. 557–561.

87. Barnes W.M. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion // Gene. 1992. Vol. 112. № 1. P. 29–35.

88. Suzuki M. et al. Thermus aquaticus DNA polymerase I mutants with altered fidelity. Interacting mutations in the O-helix // Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275. № 42. P. 32728–32735.

89. Kermekchiev M.B. et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples // Nucleic Acids Research. 2009. Vol. 37. № 5. P. e40.

90. Drum M. et al. Variants of a Thermus aquaticus DNA polymerase with increased selectivity for applications in allele- and methylation-specific amplification // PLoS One. 2014. Vol. 9. № 5. P. e96640.

91. Ignatov K.B. et al. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification // Biotechniques. 2014. Vol. 57. № 2. P. 81–87.

92. Aschenbrenner J., Marx A. Direct and site-specific quantification of RNA 2’-O-methylation by PCR with an engineered DNA polymerase // Nucleic Acids Research. 2016. Vol. 44. № 8. P. 3495–3502.

93. Stenesh J., Roe B.A. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis. 1972. Vol. 272. № 2. P. 156–166.

94. Stenesh J., McGowan G.R. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. III. Lack of fidelity in the replication of synthetic polydeoxyribonucleotides by DNA polymerase from Bacillus licheniformis and Bacillus stearothermophilus // Biochimica et Biophysica Acta. 1977. Vol. 475. № 1. P. 32–41.

95. Aliotta J.M. et al. Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3’-->5’ proofreading exonuclease activity // Genet. Anal. 1996. Vol. 12. № 5–6. P. 185–195.

96. Nazina T.N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus th // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2001. Vol. 51. № Pt 2. P. 433–446.

97. Kasai H. et al. Efficient large-scale sequencing of the Escherichia coli genome: implementation of a transposon- and PCR-based strategy for the analysis of ordered lambda phage clones // Nucleic Acids Research. 1992. Vol. 20. № 24. P. 6509–6515.

98. Riggs M.G. et al. Construction of single amino acid substitution mutants of cloned // Biochimica et Biophysica Acta. 1996. Vol. 1307. P. 178–186.

99. Santoso Y. et al. Conformational transitions in DNA polymerase I revealed by single-molecule FRET // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010. Vol. 107. № 2. P. 715–720.

100. Francois P. et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications // FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2011. Vol. 62. № 1. P. 41–48.

101. Chang J.R. et al. Purification and properties of Aquifex aeolicus DNA polymerase expressed in Escherichia coli // FEMS Microbiology Letters. 2001. Vol. 201. № 1. P. 73–77.

102. Blöndal T. et al. Cloning, sequence analysis and functional characterization of DNA polymerase I from the thermophilic eubacterium Rhodothermus marinus // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2001. Vol. 34. № Pt 1. P. 37–45.

103. Kim D.J. et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from Thermoanaerobacter yonseiensis // Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2002. Vol. 35. № 3. P. 320–329.

104. Rodriguez A.C. et al. Crystal structure of a pol α family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus sp . 9°N-7 // Journal of Molecular Biology. 2000. Vol. 299. № 2. P. 447–462.

105. Zheng R. et al. The novel function of a short region K253xRxxxD259 conserved in the exonuclease domain of hyperthermostable DNA polymerase I from Pyrococcus horikoshii // Extremophiles. 2001. Vol. 5. № 2. P. 111–117.

106. Gueguen Y. et al. Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon Pyrococcus abyssi // European Journal of Biochemistry. 2001. Vol. 268. № 22. P. 5961–5969.

107. Chalov S.E. et al. Thermostable DNA-polymerase from the thermophilic archaeon microorganism Archaeoglobus fulgidus VC16 and its features // Biochemistry (Mosc). 2003. Vol. 68. № 3. P. 301–308.

108. Griffiths K. et al. New high fidelity polymerases from Thermococcus species // Protein Expression and Purification. 2007. Vol. 52. № 1. P. 19–30.

109. Kim Y.J. et al. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, Thermococcus sp. NA1 // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007. Vol. 17. № 7. P. 1090–1097.

110. Choi J.J. et al. Unique substrate spectrum and PCR application of Nanoarchaeum equitans family B DNA polymerase // Applied and Environmental Microbiology. 2008. Vol. 74. № 21. P. 6563–6569.

111. Marsic D., Flaman J.-M., Ng J.D. New DNA polymerase from the hyperthermophilic marine archaeon Thermococcus thioreducens // Extremophiles. 2008. Vol. 12. № 6. P. 775–788.

112. Bae H. et al. Characterization of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon

Thermococcus marinus and its application to PCR // Extremophiles. 2009. Vol. 13. № 4. P. 657–667.

113. Lee J. Il et al. Biochemical properties and PCR performance of a family B DNA polymerase from hyperthermophilic Euryarchaeon Thermococcus peptonophilus // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2010. Vol. 160, № 6. P. 1585–1599.
114. Kim K.P. et al. Cloning, expression, and PCR application of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon, Thermococcus celer // Biotechnology Letters. 2011. Vol. 33. № 2. P. 339–346.
115. Ali S.F. et al. Family B DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum calidifontis: cloning, characterization and PCR application // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2011. Vol. 112. № 2. P. 118–123.
116. Seo K.-J.J. et al. Characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon Ignicoccus hospitalis KIN4/I and its application to PCR // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014. Vol. 173. № 5. P. 1108–1120.
117. Griffiths K. et al. Thermophilic bacterial DNA polymerases with reverse-transcriptase activity // Extremophiles. 2004. Vol. 8. № 3. P. 243–251.
118. Bei H. et al. Preliminary characterization of a thermostable DNA polymerase I from a mesophilic Bacillus sphaericus strain C3-41 // Archives of Microbiology. 2006. Vol. 186. № 3. P. 203–209.
119. Çağlayan M., Bilgin N. Cloning and sequence analysis of novel DNA polymerases from thermophilic Geobacillus species isolated from hot springs in Turkey: characterization of a DNA polymerase I from Geobacillus kaue strain NB //Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011. Vol. 165. № 5–6. P. 1188–1200.
120. Çağlayan M., Bilgin N. Temperature dependence of accuracy of DNA polymerase I from Geobacillus anatolicus // Biochimie. 2012. Vol. 94. № 9. P. 1968–1973.
121. Berjón-Otero M. et al. DNA polymerase from temperate phage Bam35 is endowed with processive polymerization and abasic sites translesion synthesis capacity // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. Vol. 112. № 27. P. E3476-84.
122. Moser M.J. et al. Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme // PLoS One. 2012. Vol. 7. № 6. P. e38371.
123. Gill P., Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008. Vol. 27. № 3. P. 224–243.
124. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // Nature. 1991. Vol. 350. № 6313. P. 91–92.
125. Wharam S.D. et al. Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal

nucleic acid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure // Nucleic Acids Research. 2001. Vol. 29. № 11. P. E54-4.

126. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification // EMBO Reports. 2004. Vol. 5. № 8. P. 795–800.
127. Kurn N. et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications // Clinical chemistry. 2005. Vol. 51. № 10. P. 1973–1981.
128. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic Acids Research. 2000. Vol. 28. № 12. P. E63.
129. Dean F.B. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. Vol. 99. № 8. P. 5261–5266.
130. Fire A., Xu S.Q. Rolling replication of short DNA circles // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995. Vol. 92. № 10. P. 4641–4645.
131. Walker G.T. et al. Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique // Nucleic Acids Research. 1992. Vol. 20. № 7. P. 1691–1696.
132. Schweitzer B., Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection // Current Opinion in Biotechnology. 2001. Vol. 12. № 1. P. 21–27.
133. Schachter J. et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men // Sexually Transmitted Diseases. 2008. Vol. 35. № 7. P. 637–642.
134. Bachmann L.H. et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae oropharyngeal infections // Journal of Clinical Microbiology. 2009. Vol. 47. № 4. P. 902–907.
135. Wu L. et al. Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays // Molecules. 2010. Vol. 15. № 2. P. 619–626.
136. Maciejewska A., Jakubowska J., Pawłowski R. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes // International Journal of Legal Medicine. 2013. Vol. 127. № 2. P. 309–319.
137. Zong C. et al. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell // Science. 2012. Vol. 338. № 6114. P. 1622–1626.
138. Fang R. et al. Cross-priming amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens // Journal of Clinical Microbiology. 2009. Vol. 47. № 3. P. 845–847.
139. Xu G. et al. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification // Scientific Reports. 2012. Vol. 2. № 1. P. 246.
140. Zhang J. et al. Rapid on-site detection of Acidovorax citrulli by cross-priming amplification // Molecular and Cellular Probes. 2012. Vol. 26. № 4. P. 175–176.
141. Cui L. et al. Detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by reverse

transcription-cross-oriming amplification coupled with vertical flow visualization // Journal of Clinical Microbiology. 2012. Vol. 50. № 12. P. 3881–3885.

142. Yulong Z. et al. Rapid and sensitive detection of Enterobacter sakazakii by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis // Molecular and Cellular Probes. 2010. Vol. 24. № 6. P. 396–400.
143. Zhang F. et al. The detection of T-Nos, a genetic element present in GMOs, by cross-priming isothermal amplification with real-time fluorescence // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014. Vol. 406. № 13. P. 3069–3078.
144. Woźniakowski G. et al. The development and evaluation of cross-priming amplification for the detection of avian reovirus // Journal of Applied Microbiology. 2015. Vol. 118. № 2. P. 528–536.
145. Frączyk M. et al. Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus, in pig and wild boar blood and sera samples // Letters in Applied Microbiology. 2016. Vol. 62. № 5. P. 386–391.
146. Liu W. et al. Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. P. 12723.
147. Dong D. et al. Rapid detection of Pseudomonas aeruginosa targeting the toxA gene in intensive care unit patients from Beijing, China // Frontiers in Microbiology. 2015. Vol. 6. P. 1100.
148. Jiang X. et al. Rapid detection of Candida albicans by polymerase spiral reaction assay in clinical blood samples // Frontiers in Microbiology. 2016. Vol. 7. P. 916.
149. Woźniakowski G. et al. Polymerase cross-linking spiral reaction (PCLSR) for detection of African swine fever virus (ASFV) in pigs and wild boars // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 42903.
150. Fischbach J., Frohme M., Glökler J. Hinge-initiated Primer-dependent Amplification of nucleic acids (HIP) - a new versatile isothermal amplification method // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. № 1. P. 7683.
151. Zhu Q. et al. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care // Lab on a Chip. 2012. Vol. 12. № 22. P. 4755–4763.
152. Blainey P.C., Quake S.R. Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination // Nucleic Acids Research. 2011. Vol. 39. № 4. P. e19.
153. Khorosheva E.M. et al. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP // Nucleic Acids Research. 2016. Vol. 44. № 2. P. e10.
154. Sidore A.M. et al. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification // Nucleic Acids Research. 2015. Vol. 44. № 7. P. e66-.
155. Hara-Kudo Y. et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of

Salmonella // FEMS Microbiology Letters. 2005. Vol. 253. № 1. P. 155–161.

156. Tang Q. et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Aspergillus fumigatus // Journal of Clinical Microbiology. 2016. Vol. 54. № 4. P. 950–955.
157. Modak S.S. et al. Rapid point-of-care isothermal amplification assay for the detection of malaria without nucleic acid purification // Infection Diseases. 2016. Vol. 9. P. 1–9.
158. Chen H.-W. et al. Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Leptospira // International Journal of Bacteriology. 2015. Vol. 2015. P. 147173.
159. Cornelissen J.B.W.J. et al. Rapid detection of Streptococcus uberis in raw milk by loop-mediated isothermal amplification // Journal of dairy science. 2016. Vol 99. № 9. P. 4270-4281.
160. Aonuma H. et al. Detection of mutation by allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) // Methods in Molecular Biology. 2013. Vol. 1039. P. 121–127.
161. Fukuta S. et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based SNP markers for shelf-life in melon (Cucumis melo L.) // Journal of Applied Genetics 2006. Vol. 47. № 4. P. 303–308.
162. Itonaga M. et al. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification // PLoS One. 2016. Vol. 11. № 3. P. e0151654.
163. Tomita N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // Nature protocols. 2008. Vol. 3. № 5. P. 877–882.
164. Shao Y. et al. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect Salmonella spp. and Shigella spp. in milk // International Journal of Food Microbiology. 2011. Vol. 148. № 2. P. 75–79.
165. Iseki H. et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites // Journal of Microbiological Methods. 2007. Vol. 71. № 3. P. 281–287.
166. Aonuma H. et al. A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes // Experimental Parasitology. 2010. Vol. 125. № 2. P. 179–183.
167. Mori Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // Biochemical and biophysical research communications. 2001. Vol. 289. № 1. P. 150–154.
168. Kouguchi Y. et al. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic Escherichia coli isolates // Molecular and Cellular Probes. 2010. Vol. 24. № 4. P. 190–195.
169. Liu W. et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in

loop-mediated isothermal amplification assay // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 40125.

170. Goto M. et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue // Biotechniques. 2009. Vol. 46. № 3. P. 167–172.
171. Chou P.-H. et al. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes // Journal of Virological Methods. 2011. Vol. 173. № 1. P. 67–74.
172. Patel J.C. et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of Plasmodium vivax // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 1. P. e54986.
173. Veigas B. et al. Ion sensing (EIS) real-time quantitative monitorization of isothermal DNA amplification // Biosensors and Bioelectronics. 2014. Vol. 52. P. 50–55.
174. Gudnason H. et al. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. № 19. P. e127.
175. Eischeid A.C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR // BMC Research Notes. 2011. Vol. 4. P. 263.
176. Khorosheva E.M. et al. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP // Nucleic Acids Research. 2016. Vol. 44. № 2. P. e10.
177. Damhorst G.L. et al. Smartphone-imaged HIV-1 reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) on a chip from whole blood // Engineering. 2015. Vol. 1. № 3. P. 324–335.
178. Nyan D.-C., Swinson K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. P. 17925.
179. Nelson D.L. et al. Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989. Vol. 86. № 17. P. 6686–6690.
180. Telenius H. et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer // Genomics. 1992. Vol. 13. № 3. P. 718–725.
181. Zhang L. et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992. Vol. 89. № 13. P. 5847–5851.
182. Thorstenson Y.R. et al. An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased DNA shearing // Genome Research. 1998. Vol. 8. № 8. P. 848–855.
183. Gribble S. et al. Chromosome paints from single copies of chromosomes // Chromosome Research. 2004. Vol. 12. № 2. P. 143–151.
184. Langmore J.P. Rubicon Genomics, Inc. // Pharmacogenomics. 2002. Vol. 3. № 4. P. 557–560.

185. Wells D. et al. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation // Nucleic Acids Research. 1999. Vol. 27. № 4. P. 1214–1218.

186. Kittler R., Stoneking M., Kayser M. A whole genome amplification method to generate long fragments from low quantities of genomic DNA // Analytical Biochemistry. 2002. Vol. 300. № 2. P. 237–244.

187. Arneson N. et al. Comparison of whole genome amplification methods for analysis of DNA extracted from microdissected early breast lesions in formalin-fixed paraffin-embedded tissue // ISRN Oncology. 2012. Vol. 2012. P. 710692.

188. Chou W. et al. Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater // Biotechniques. 2011. Vol. 50, № 1. P. 52–57.

189. Zakabunin A.I. et al. Gene cloning, purification, and characterization of recombinant DNA ligases of the thermophilic archaea Pyrococcus abyssi and Methanobacterium thermoautotrophicum // Molecular Biology. 2011. Vol. 45. № 2. P. 229–236.

190. Cohen S.N., Chang A.C., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1972. Vol. 69. № 8. P. 2110–2114.

191. M. R., Buc H.E. coli DNA polymerase I as a reverse transcriptase // EMBO Journal. 1993. Vol. 12. № 2. P. 387–396.

192. Tanabe M. et al. Structure-based mutational study of an archaeal DNA ligase towards improvement of ligation activity // Chembiochem. 2012. Vol. 13. № 17. P. 2575–2582.

193. Meintanis C. et al. Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus Geobacillus // Letters in Applied Microbiology. 2008. Vol. 46. № 3. P. 395–401.

194. Kuisiene N., Raugalas J., Chitavichius D. Phylogenetic, inter, and intraspecific sequence analysis of spo0A gene of the genus Geobacillus // Current Microbiology. 2009. Vol. 58. № 6. P. 547–553.

195. Dinsdale A.E. et al. Emended descriptions of Geobacillus thermoleovorans and Geobacillus thermocatenulatus // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2011. Vol. 61. № 8. P. 1802–1810.

196. Nakamura L.K., Blumenstock I., Claus D. Taxonomic study of Bacillus coagulans Hammer 1915 with a proposal for Bacillus smithii sp. nov // International Journal of Systematic Bacteriology. 1988. Vol. 38. № 1. P. 63–73.

197. Khan G. et al. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA // Journal of Clinical Pathology. 1991. Vol. 44. № 5. P. 360–365.

198. Mao F., Leung W.-Y., Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its

physicochemical properties for qPCR applications // BMC Biotechnology. 2007. Vol. 7. P. 76.

199. Bedford E., Tabor S., Richardson C.C. The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on Escherichia coli DNA polymerase I // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997. Vol. 94. № 2. P. 479–484.
200. Varadaraj K., Skinner D.M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases // Gene. 1994. Vol. 140. № 1. P. 1–5.
201. Zhu X.-J. et al. Guanine-rich sequences inhibit proofreading DNA polymerases // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. № 1. P. 28769.
202. Bloom L.B., Goodman M.F. Polymerase processivity: measurement and mechanisms // Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
203. Strauss B.S. The “A” rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity // DNA Repair (Amst). 2002. Vol. 1. № 2. P. 125–135.
204. Singhal R.K., Wilson S.H. Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive // Journal of Biological Chemistry. 1993. Vol. 268. № 21. P. 15906–15911.
205. McDowell D.G., Burns N.A., Parkes H.C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR // Nucleic Acids Research. 1998. Vol. 26. № 14. P. 3340–3347.
206. Oyola S.O. et al. Optimizing Illumina next-generation sequencing library preparation for extremely AT-biased genomes // BMC Genomics. 2012. Vol. 13. P. 1.
207. Pugh T.J. et al. Impact of whole genome amplification on analysis of copy number variants // Nucleic Acids Research. 2008. Vol. 36. № 13. P. e80.
208. Bustin S.A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // Clinical Chemistry. 2009. Vol. 55. № 4. P. 611–622.
209. Dong L. et al. Accurate quantification of supercoiled DNA by digital PCR // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. № 1. P. 24230.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ПРОДУКТОВ ПГА

Локус	5′-последовательность-3′
ALB	GACTTGCCAAGACATATGAAACC
	TCCAACAATAAACCTACCACTTTG
	HEX-TGCTGTGCCGCTGCAGATCC-BHQ1
ALDH1L1	ACATGTTCATAGCCAAGGAGGA
	CTCCCAAAGCCCACATGAAG
	FAM- AGGAATCTGTCACACAGATGACC -BHQ1
IL10RA	TTCCATGTTACAGATGAGGAACTAA
	CAGCTCTGACTCTTATCAGCTTTG
	HEX-CCCTGACCAAATTACTTACCCTCTC-BHQ1
MET	CAAGATCGTCAACAAAAACAATG
	AAGTGGGGAACTGATGTGACTTA
	FAM-CGGACCCAATCATGAGCACTG-BHQ1
BCMO379	GAATGCAGAAGTGGGCACA
	CAGGAGGGAATTATTATGTAAAGAG
	HEX-CAAAAGTGGCATCTACA -BHQ1
	STBHQ1-CAGCCACGGCCCTGAA-P
BDNF	CAACTTAGACCATTATTTCCCAGA
	TACCGATGTGGCAGGAGAGA
	ROX-CTGTCTTTACTCACTGTTG-BHQ2
ADIPOQ	CATCAGAATGTGTGGCTTGC
	AAGCAGCCTGGAGAACTGGA
	HEX- CAGATCCTGCCCTTCAAAAAC -BHQ1
PPARGc1a	AACAAGCACTTCGGTCATC
	CTTTCATCTTCGCTGTCATCA
	ROX-ACAAGACCGGTGAACTGAGG-BHQ2
APOA2	CCAGAGAAATAACTTGGAATCCT
	AGAGGACAAGCACATGGAAGA
	HEX-CCTGTTGCACTCAAGTCCAAG -BHQ1
CKMM	TGCCAGTCCCTTACTTTCTC
	AGCCTCCAGCAAATGGTATG
	HEX-ACCTGCCCGTGGCTCCC -BHQ1
EGFR	GTCAAGATCACAGATTTTGGGCT
	CCTCCTTACTTTGCCTCCTTCTG
	FAM-CTGGGTGCGGAAGAGAAAGAATACC-BHQ1
ERBB2	CATCTTCCACAAGAACAACCAG
	GTCTGAGAGAAGAGGCAGCA
	FAM-AGACACCAACCGCTCTCGGGC -BHQ1
NBPF3	GTGGTTTTGGCAGCAATAG
	CATCTTCAGCGTTCCCAGT
	HEX-TGGGGTAATGTCCCCCAAA -BHQ1
F II	GAACCAATCCCGTGAAAG
	AGAGAGCTGCCCATGAATAG
	HEX-CATTGAGGCTCGCTGAGAG -BHQ1
F XI	GTGAGTTGGATGAGGAGTTAGC
	CTTGTTGTCGTGTATTTTCCTC
	HEX-TCTCTCTCTCGCCCTCTCATC -BHQ1
KRAS	GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA
	CATATTCGTCCACAAAATGATTCTG
	FAM-CTGTATCGTCAAGGCACTCTT -BHQ1
REP2	GTGTGCTTGTTAATGCGTG
	AGCAGTTTTCGTTGGTCTCAT
	HEX- CTTCGTTCCAGAGCCCA-BHQ1

Продолжение приложения 1

Локус	5′-последовательность-3′
BHMT	AGTCAGGAGTGTGGTAAGCCA
	ACTCACAGGAGCATCCATCA
	HEX- TTTCAGTCGGGCAGCC-BHQ1
CYP1B1	GCTACCACATTCCCAACG
	TTAGAAAGTTCTTCGCCAATG
	HEX-CATGACCCAGTGAAGTGGC-BHQ1
MTHFR	CTGAAGCACTTGAAGGAGAAG
	GCAAGTGATGCCCATGTC
	HEX-CTGCGGGAGCCGATTTC -BHQ1
IL17RA	TGTAGCCCTGGTCAGAGACTG
	CTTGATGCTCTCGCTCTTCG
	FAM-CTGCCGCTGCTCCTCCTCG-BHQ1

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. GC-СОСТАВ, ДЛИНА ФРАГМЕНТА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПГА

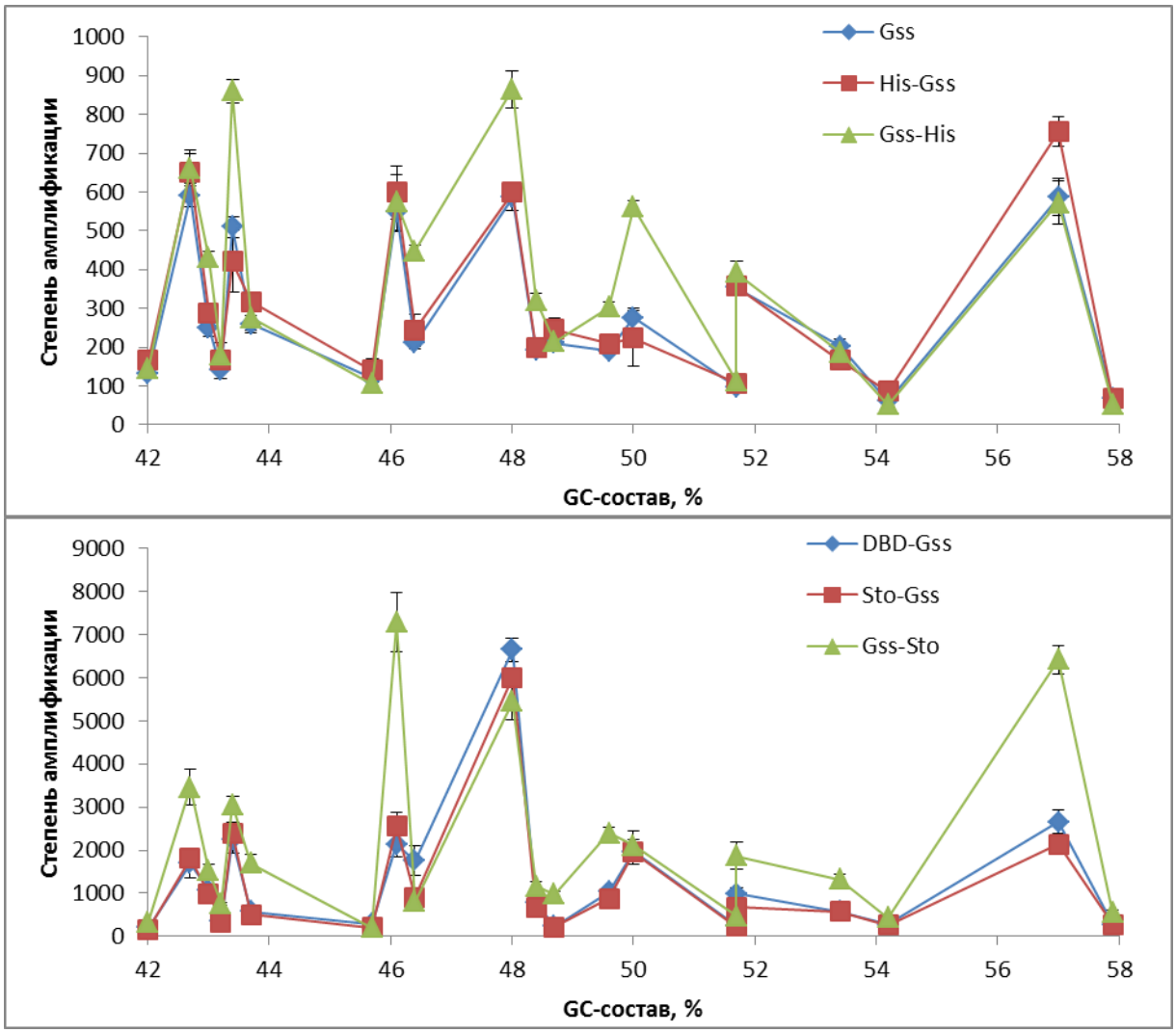

Рисунок 1. Эффективность ПГА и GC-состав ампликона ПЦР в реальном времени.

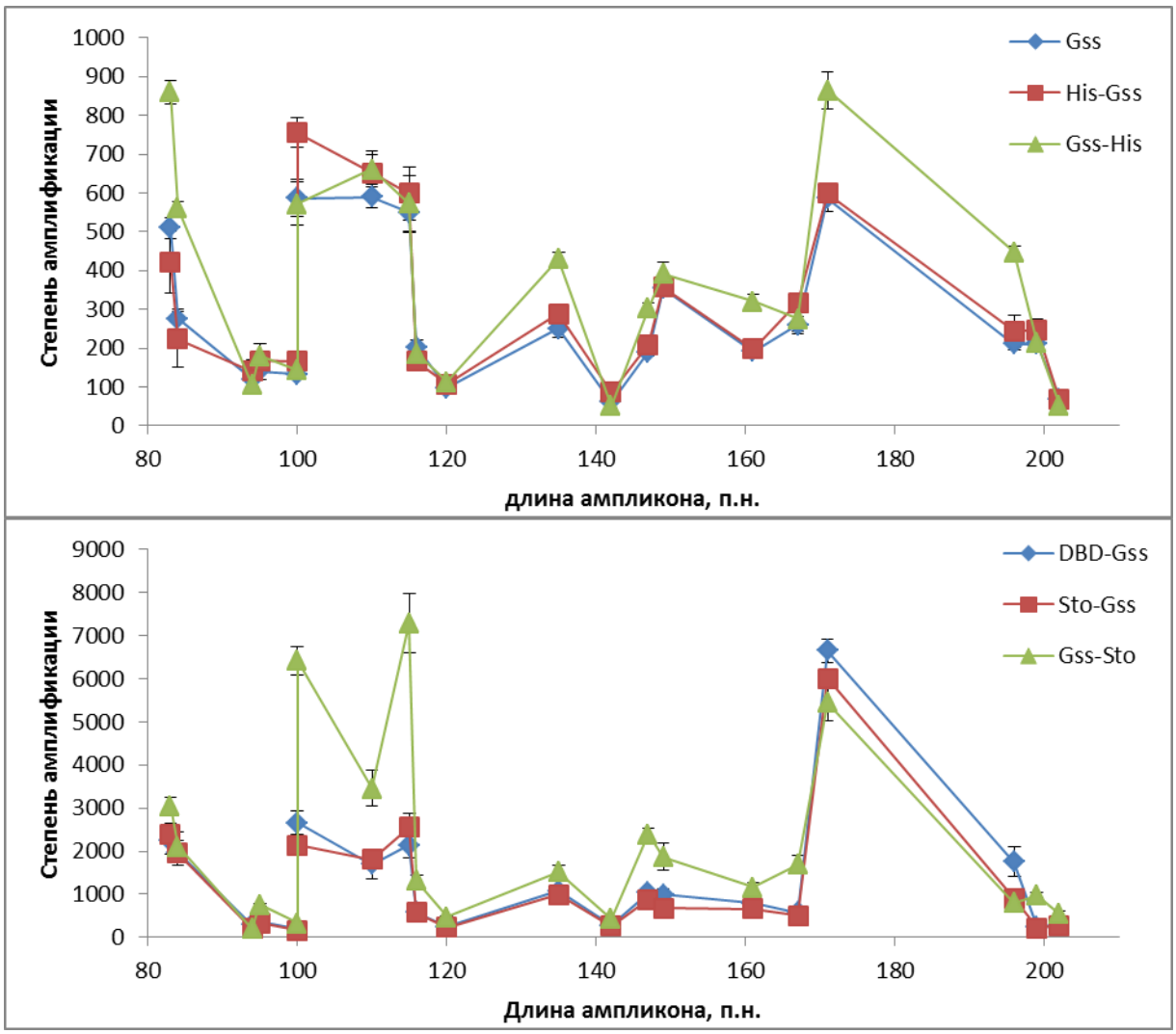

Рисунок 2. Эффективность ПГА и длина ампликона ПЦР в реальном времени.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 СТРУКТУРЫ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ

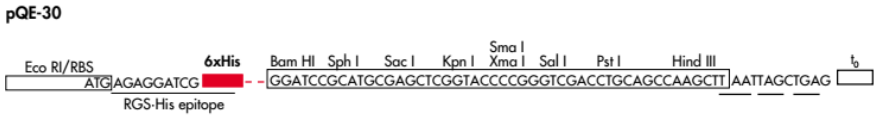

Рисунок 1. Карта векторов pQE30, pQE31, pQE32

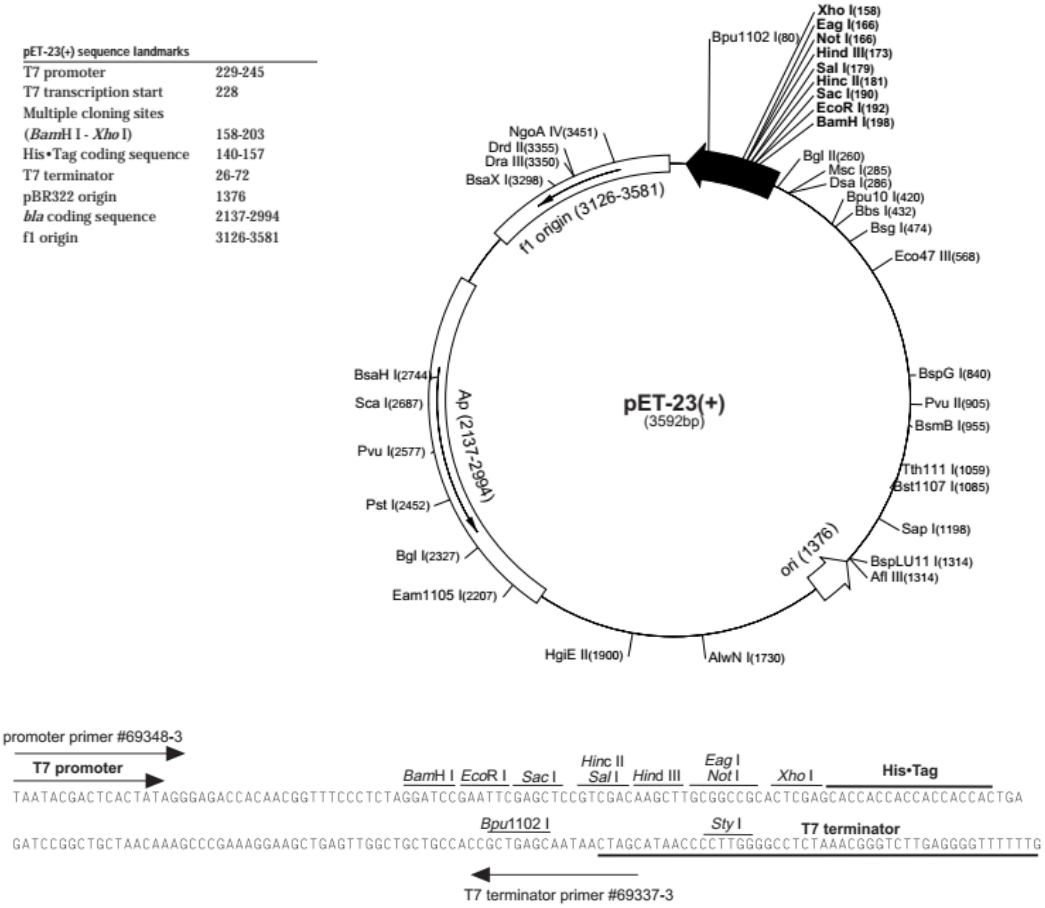

Рисунок 2. Карта векторов pET23a-d (+)