

УДК 577.15

## ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 2023 г. Т. Л. Замотаева<sup>1</sup> \*, А. Ф. Шеметова<sup>1</sup>,  
А. С. Черкашина<sup>1</sup>, Е. А. Черкашин<sup>1</sup>, В. Г. Акимкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 111123 Россия

\*e-mail: zamotaevata1@gmail.com

Поступила в редакцию 16.09.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принята к публикации 02.10.2023 г.

Полимераза и обратная транскриптаза (ревертаза) являются ключевыми компонентами полимеразной цепной реакции. На стабильность этих ферментов и, как следствие, на работоспособность наборов реагентов для полимеразной цепной реакции влияет множество внешних факторов, главный из которых – температурный режим хранения ферментов. Как правило, производители наборов рекомендуют длительное хранение ферментов при температуре – 20°C. В данной работе исследовано влияние лиофилизации на изменение активности ферментов для полимеразной цепной реакции, хранившихся при комнатной температуре. При сравнительном изучении криопротекторов – декстрана, сахарозы и трегалозы установлено, что последняя помогает сохранить активность обоих ферментов в процессе лиофилизации. Подобрана оптимальная концентрация трегалозы и оценено влияние декстрана на активность ферментов. Полимеразную и ревертазную активности ферментов определяли с помощью нерадиоактивных методик, основанных на применении флуоресцентных красителей. Этот способ позволяет быстрее и объективнее охарактеризовать фермент, чем тестирование методом полимеразной цепной реакции. По сравнению с полимеразной цепной реакцией чувствительность методик измерения ферментативной активности выше, поскольку с их помощью можно увидеть ее снижение на 10–20%. Лيوфилизованные полимеразу и обратную транскриптазу можно транспортировать без “холодовой цепи” при комнатной температуре и после получения хранить при температуре 2–8°C. Это упрощает процедуру доставки наборов реагентов и снижает затраты на их транспортировку.

*Ключевые слова:* лиофилизация, обратная транскриптаза, полимеразы, ПЦР, ферментативная активность

DOI: 10.56304/S0234275823040105

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была изобретена биохимиком Кэри Муллисом в 1983 г. как универсальная методика увеличения числа копий (амплификации) определенной ДНК последовательности, открывающая окно возможностей для лабораторных исследований в области молекулярной биологии [1]. ПЦР в реальном времени (real-time PCR), также известная как количественная ПЦР (qPCR), была предложена в 1993 г. Higuchi с соавт. Они модифицировали метод ПЦР путем добавления флуоресцентных красителей, тем самым достигнув высокой чувствительности метода и снизив время получения результатов, так как ПЦР в реальном времени не требует дополнительного проведения электрофореза [2].

Срок годности реагентов для ПЦР является важной характеристикой наборов, поскольку в течение данного периода времени все компонен-

ты должны полностью сохранять свои функциональные характеристики. Ключевыми составляющими наборов для ПЦР, которые влияют на срок годности, являются ферменты: ДНК-зависимая ДНК-полимераза (КФ 2.7.7.7) и РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза или ревертаза) (КФ 2.7.7.49). Как и многие биологические молекулы, ферменты, используемые в ПЦР, очень чувствительны к изменению физических свойств окружающей среды и не могут длительное время храниться при комнатной температуре, поскольку они инактивируются, и их ферментативная активность снижается. Хранение ферментов для ПЦР при температуре около –20°C гарантирует сохранение функциональной активности длительное время [3].

В настоящее время наборы реагентов для ПЦР перевозятся в условиях строго контролируемой

“холодовой цепи” т.е. при поддержании постоянной отрицательной температуры, что накладывает ограничения на транспортировку и создает проблемы при внештатных ситуациях (разморозка, увеличение времени доставки и т.п.), а также приводит к существенному удорожанию логистического процесса.

Лиофилизация является лучшим способом обезвоживания биологических веществ путем сублимации и позволяет избежать преждевременной потери функциональных свойств, достигая при этом более длительного срока хранения реагентов, а также упрощая процедуру их доставки, которая может осуществляться при комнатной температуре. Под лиофильной (сублимационной) сушкой подразумевают технологию высушивания, которая позволяет льду испаряться, минуя жидкую фазу.

Процесс лиофилизации подчинен общим законам испарения и зависит от температуры, времени и давления, но индивидуален для каждого продукта. Биохимические процессы протекают, преимущественно, в воде, а в веществах, подвергшихся лиофилизации, данные процессы затормаживаются. Таким образом, биологический препарат долгое время может сохранять свои первоначальные свойства и структурную целостность, проявляя при этом дополнительную устойчивость к факторам внешнего воздействия. При контакте с водой он моментально переводится в исходную нативную форму [4, 5].

Для защиты раствора фермента при низкотемпературном хранении обычно используют глицерин. Однако он не подходит для приготовления лиофилизованных реагентов, поскольку при температурах, близких к комнатной, является жидкостью. В качестве криопротекторов при лиофилизации обычно используют полиолы, сахара, полимеры и аминокислоты [6], которые имеют кристаллическую структуру при комнатной температуре.

В связи с этим, целью нашей работы был подбор криопротектора и определение его оптимальной концентрации для лиофилизации Taq-полимеразы и ревертазы (MMLV).

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Фракции ферментов Taq-полимеразы (“TaqF-полимеразы”, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) и ревертазы (“TM-ревертаза (MMLV)”, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) получали согласно стандартным протоколам культивирования и очистки, используемым в Научно-производственной лаборатории Института, после чего ферменты консервировали с использованием глицерина (контроль) или разных концентраций сахаров – сахарозы и трегалозы (MP Biomedicals, США).

Полученные партии ферментов анализировали методом обращенно-фазной хроматографии

среднего давления (FPLC) на жидкостном хроматографе Милихром А-02 с использованием хроматографической колонки с рабочим объемом  $2 \times 75$  мм, сорбент Prontosil 120-5, C18, 5 мкм (ЭкоНова, Россия). Градиент при хроматографии создавался смешением следующих растворов: элюент А (20% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота) и элюент В (80% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота). Элюция проводилась по программе: 30% В – 0 мкл, 30% В – 200 мкл, 70% В – 3000 мкл, 100% В – 3000 мкл, 100% В – 3200 мкл. Скорость потока 100 мкл/мин. Детекция: 230, 280, 260 нм. Исследуемые пробы сравнивали с контрольным лотом по времени удерживания пика фермента. Концентрацию фермента по белку определяли хроматографически в сравнении с контрольным лотом фермента. На основе этих данных полученные партии ферментов разводили до рабочих концентраций, соответствующих концентрациям ферментов в стандартной ПЦР (лот фермента). Для разведения ферментов использовали стандартные буферные растворы на основе Трис-НСI (рН 8.0), в которых глицерин был заменен на сахарозу или трегалозу.

ДНК-полимеразную активность Taq-полимеразы определяли с помощью нерадиоактивной методики, описанной Брагиным и соавт. [7]. Данный метод позволяет определять ДНК-полимеразную активность ферментов с помощью амплификаторов с оптическим модулем для детекции флуоресценции в режиме реального времени. В качестве матрицы используется олигонуклеотид, содержащий на 3'-конце шпилечную структуру. В присутствии ионов  $Mg^{2+}$  Taq-полимеразы катализирует включение дезоксинуклеотидов, тем самым удлиняя матрицу. Детекция осуществляется по изменению флуоресценции интеркалирующего красителя. Поскольку на начальных участках графиков зависимости флуоресценции от времени прирост флуоресценции имеет линейный характер, строили линейное приближение к этим участкам и определяли тангенс угла наклона. Активность экспериментальных лотов Taq-полимеразы нормировали относительно коммерческого препарата Taq DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., США), охарактеризованного по активности стандартным радиоактивным методом, где за 1 единицу активности (U) принималось количество фермента, необходимое для включения 15 нМоль дНТФ в кислотонерастворимую фракцию в течение 30 мин при температуре 75°C.

РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) активность обратной транскриптазы определяли с помощью нерадиоактивной методики, разработанной в лаборатории ранее [8] и основанной на измерении флуоресценции интеркалирующего красителя GelStar (Lonza, Швейцария). Матрицей служила полиадениловая РНК (полиА), в качестве затравки выступал олигонуклеотидный

праймер dT18 (5'-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-3'). Запуск ферментативной реакции осуществляли в термостате при 37°C путем добавления дТТФ. В ходе реакции происходило образование дуплекса ДНК: РНК (полиА: dT18), в который встраивался интеркалирующий краситель. С увеличением количества дуплекса прямо пропорционально возрастал уровень флуоресценции. В качестве термостатируемого флуориметра использовали Real-time амплификатор CFX 96 (Bio Rad, США). Активность экспериментальных лотов ревертазы (MMLV) нормировали относительно коммерческого препарата M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, США), охарактеризованного по активности стандартным радиоактивным методом, где за 1 единицу активности (U) принималось количество фермента, необходимое для включения 1 нМоль дТТФ в кислотонерастворимую фракцию в объеме 50 мкл в течение 10 мин при температуре 37°C.

При подборе криопротектора для лиофилизации ферментов кроме сахаров мы оценивали влияние декстрана. Для этого к половине экспериментальных лотов Taq-полимеразы и ревертазы (MMLV) был добавлен Dextran 70 BioChemica (AppliChem Panreac, Испания).

Экспериментальные лоты Taq-полимеразы и ревертазы (MMLV), приготовленные без добавления глицерина, аликвотировали по 60 мкл в пробирки с завинчивающимися крышками и лиофильно высушивали с использованием установки VirTis Ultra 35L (VirTis, США). Лيوфилизацию проводили при следующих параметрах: *замораживание* – 1 ч при минус 40°C; *первичная сушка* – 10 ч при минус 20°C, давление 50 мТорр; *вторичная сушка* – 6 ч при 5°C, давление 50 мТорр и 2 ч при 20°C, давление 50 мТорр. После окончания процесса камеру лиофильной установки заполняли аргоном. Закрытые пробирки с готовыми лиофилизированными ферментами запаивали под вакуумом в цефленовые пакеты с силикагелевым осушителем (5 г). Часть пакетов вскрывали, чтобы отобрать пробирки для контрольной проверки активности ферментов, после чего вскрытые пакеты закрывали на застежку zip-lock для дальнейшего хранения. Запаянные и закрытые на zip-lock цефленовые пакеты с лиофилизированными ферментами хранили при температурах 2–8°C (холодильник) и 18–24°C (комнатная температура, имитация транспортировки). Для дальнейшей работы экспериментальные высушенные лоты ферментов восстанавливали с помощью глицерина и после восстановления хранили в морозильной камере при температуре минус 20°C.

Стабильность при хранении экспериментальных лотов Taq-полимеразы и ревертазы (MMLV) проверяли как по активности ферментов, так и по их эффективности в ПЦР. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл плазмы крови

человека с помощью набора реагентов “Амплисенс Рибо-преп” (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Образцы плазмы представляли собой стандартные панели вируса гепатита С (HCV) и вируса гепатита В (HBV), аттестованные относительно стандарта The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, США).

Для амплификации ДНК (ПЦР в реальном времени) использовали набор реагентов “Амплисенс HBV-FL” (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). С помощью данного набора реагентов проверяли стабильность Taq-полимеразы, хранившейся при комнатной температуре.

Для проведения обратной транскрипции РНК с последующей амплификацией кДНК (ОТ-ПЦР в реальном времени) использовали набор реагентов “Амплисенс HCV-FL” (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). С помощью этого набора реагентов проверяли стабильность ревертазы (MMLV), хранившейся при комнатной температуре. Эксперимент проводили с использованием стандартной полимеразы из набора и новых лиофилизированных лотов ревертазы (MMLV).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе лиофилизации для недопущения изменения структуры белков и потери ферментативной активности обычно используют стабилизаторы и криопротекторы. В качестве таких добавок чаще всего выступают полиолы (маннитол), полимеры (декстран, ПЭГ), сахара (сахароза, трегалоза, лактоза) и аминокислоты (глицин). Выбор того или иного криопротектора зависит, в первую очередь, от структуры веществ, подвергающихся лиофилизации.

Нами были приготовлены экспериментальные лоты Taq-полимеразы и ревертазы (MMLV) с добавлением в качестве криопротекторов сахарозы или трегалозы. Конечная концентрация сахарозы в растворе с ферментом составляла 20 и 10%. Трегалозу использовали в таких же концентрациях. Все лоты ферментов готовились в двух вариантах – с добавлением и без добавления декстрана (конечная его концентрация 2%).

До лиофилизации была измерена ферментативная активность всех лотов. В качестве контроля использовали Taq-полимеразу и ревертазу (MMLV), приготовленные с добавлением глицерина. Функциональная активность экспериментальных ферментов совпала с активностью контролей. После подтверждения наличия специфической активности, ферменты были лиофилизированы и вновь охарактеризованы по активности. Таблетки ферментов (и Taq-полимеразы, и ревертазы (MMLV)), приготовленных на 20%-ной сахарозе как с добавлением декстрана, так и без него, имели неоднородную рыхлую стекловидную структуру и мед-



Рис. 1. Внешний вид таблеток после лиофилизации.  
Fig. 1. Appearance of tablets after lyophilization.

ленно восстанавливались глицерином (рис. 1а). Таблетки остальных лотов после лиофилизации имели плотную однородную структуру, их внешний вид соответствовал общепринятым нормам (рис. 1б). Согласно проведенным экспериментам активность ферментов, лиофилизованных без добавления глицерина, не отличается от активности не лиофилизованных ферментов, приготовленных как с добавлением глицерина, так и без него.

Для имитации транспортировки пробирки с лиофилизованными ферментами хранили при температуре 2–8°C (холодильник) и 18–24°C (комнатная температура). Спустя 1 мес хранения была измерена активность Таq-полимераз и ревертаз (MMLV), а также проведено тестирование ферментов методом ПЦР.

Для всех лотов ферментов, хранившихся при температуре 2–8°C, были получены удовлетворительные результаты.

У лота Таq-полимеразы, приготовленного на 20%-ной сахарозе с добавлением декстрана и хранившегося при комнатной температуре функциональная активность была снижена на 50–90%, а при его тестировании в ПЦР для точек с концентрацией ДНК вируса НВV 200 МЕ/мл кинетические кривые выходили на 2–5 циклов позже. Результаты тестирования остальных лотов Таq-полимеразы, хранившихся при комнатной температуре, были удовлетворительные.

Среди лотов ревертазы (MMLV), хранившихся при комнатной температуре, как по активности, так и при тестировании в ПЦР для вариантов ферментов, приготовленных на 20%-ной трегалозе как с добавлением декстрана, так и без него были получены удовлетворительные результаты. Для остальных лотов ревертазы (MMLV) результаты были неудовлетворительные, как по активности (снижение на 50–90%), так и в ПЦР (от отставания по пороговому циклу (Ct) до полного

отсутствия положительного сигнала у образцов с концентрацией РНК вируса HCV 100 МЕ/мл).

Поскольку перед нами стояла задача подобрать единый вариант криопротектора, который подходил бы для лиофилизации как Таq-полимеразы, так и ревертазы (MMLV), варианты с сахарозой, а также с 10%-ной трегалозой из дальнейших экспериментов мы исключили ввиду того, что они оказались неподходящими для лиофилизации ревертазы (MMLV). Таким образом, в качестве оптимального криопротектора для лиофилизации обоих ферментов нами был выбран раствор трегалозы (с конечной концентрацией 20%).

Ферменты, приготовленные на 20%-ной трегалозе с декстраном и без него были также протестированы спустя два месяца хранения. Результаты тестирования полимераз и ревертаз (MMLV), хранившихся как при комнатной температуре, так и при температуре 2–8°C, в ПЦР были удовлетворительные. Однако, активность ферментов, приготовленных с декстраном, была на 20% ниже активности ферментов, приготовленных без декстрана.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов при сравнении наиболее известных криопротекторов – сахарозы, трегалозы и декстрана было установлено, что трегалоза является подходящим криопротектором для лиофилизации как Таq-полимеразы, так и ревертазы (MMLV).

Полимеразную и ревертазную активности ферментов определяли с помощью нерадиоактивных методик, основанных на применении флуоресцентных красителей. Измерение функциональной активности ферментов таким способом позволяет быстрее, удобнее и точнее охарактеризовать фермент, по сравнению с тестированием методом ПЦР. Методики измерения ферментативной активности являются также более чувствительными в сравнении с ПЦР, поскольку с их помощью можно увидеть снижение ферментативной активности на 10–20%. Таким образом, с помощью методик измерения активности можно контролировать все этапы получения лиофилизованных ферментов

С помощью лиофилизации ферменты, хранившиеся при комнатной температуре сохраняют активность для использования в ПЦР. Это упрощает процедуру доставки наборов реагентов и снижает затраты на их транспортировку. Лиофилизованный формат ферментов для ПЦР позволяет доставлять их конечному пользователю без соблюдения “холодовой цепи”, что делает возможным транспортировку наборов реагентов даже в самые отдаленные регионы и работу в полевых условиях. Развитие данного направления очень важно в период пандемий, а также для проведения поисковых работ по выявлению природных очагов особо опасных заболеваний в странах Африки, Юго-Восточной Азии и Латинской Америки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239, 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
2. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nat. Biotechnol.*, 1993, 11, 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
3. Lopata A., Jójárt B., Surányi D., Takács D., Bezúr D., Leveles D., Bendes D., Viskolcz D., Vértessy D., Tóth D. Beyond Chelation: EDTA Tightly Binds Taq DNA Polymerase, MufT and dUTPase and Directly Inhibits dNTPase Activity. *Biomolecules*, 2019, 9, 621. <https://doi.org/10.3390/biom9100621>
4. Thirion L., Dubot-Peres A., Pezzi L., Corcostegui I., Touinssi M., De Lamballerie X., Charrel R. Lyophilized Matrix Containing Ready-to-Use Primers and Probe Solution for Standardization of Real-Time PCR and RT-qPCR Diagnostics in Virology. *Viruses*, 2020, 12, 159. <https://doi.org/10.3390/v12020159>
5. Yang S., Wen W. Lyophilized Ready-to-Use Mix for the Real-Time Polymerase Chain Reaction Diagnosis. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2021, 4, 4354–4360. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00131>
6. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов. *Российский биотерапевтический журнал*, 2017, 16(1), 6–11. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11>
7. Брагин А.Г., Глушков С.А., Иванов М.К., Краснов А.А., Дымищ Г.М. Определение ДНК-полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-зависимых полимераз с использованием флуоресцентной детекции в режиме реального времени. *Биохимия*. 2008, 73(9), 1252–1264
8. Черкашин Е.А., Сазонова Т.Л. Универсальный, нерadioактивный метод измерения ферментативной активности обратных транскриптаз. Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика – 2014” (Москва, 18–20 марта 2014 г). Москва: Издательство МБА, 2014, 2, 539–540.

## Lyophilization of enzymes for polymerase chain reaction

T. L. Zamotaeva<sup>a, #</sup>, A. F. Shemetova<sup>a</sup>, A. S. Cherkashina<sup>a</sup>, E. A. Cherekashin<sup>a</sup>, and V. G. Akimkin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Scientific Research Institute for Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, 111123, Russia

<sup>#</sup>e-mail: zamotaevatat@gmail.com

**Abstract**—Polymerase and reverse transcriptase (revertase) are key components of the polymerase chain reaction. Many external factors affect the stability of these enzymes and, as a result, the performance of polymerase chain reaction reagent kits. The main factor is the temperature regime of enzyme storage. As a rule, kit manufacturers recommend long-term storage of enzymes at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ . In this work, the effect of lyophilization on changes in the activity of polymerase chain reaction enzymes stored at room temperature was investigated. In a comparative study of cryoprotectors – dextran, sucrose and trehalose, it was found that the latter helps maintain the activity of both enzymes during the lyophilization process. The optimal concentration of trehalose was selected and the effect of dextran on enzyme activity was assessed. Polymerase and reverse enzyme activities were determined using non-radioactive methods based on the use of fluorescent dyes. This method allows for faster and more objective characterization of the enzyme than polymerase chain reaction testing. Compared to the polymerase chain reaction, the sensitivity of methods for measuring enzymatic activity is higher, since they can be used to see a decrease in activity by 10–20%. Lyophilized polymerase and reverse transcriptase can be transported without cold chain at room temperature and once received stored at  $2-8^{\circ}\text{C}$ . This simplifies the delivery of reagent kits and reduces the cost of their transportation.

**Keywords:** lyophilization, reverse transcriptase, polymerase, PCR, enzyme activity