

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 616.98:579.852.11

ХИМЕРНАЯ ПОЛИМЕРАЗА KFQ: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2025 г. Е. Д. Соловьева¹, О. О. Михеева¹, Е. А. Черкашин¹, А. С. Черкашина¹*, В. Г. Акимкин¹

¹ФБУН “Центральный научно-исследовательский институт
эпидемиологии” Роспотребнадзора, Москва, 111123 Россия

*e-mail: cherkashina@pcr.ms

Поступила в редакцию 19.11.2024 г.

После доработки 05.12.2024 г.

Принята к публикации 20.01.2025 г.

Разработан протокол получения, выделения и очистки рекомбинантной химерной ДНК-полимеразы KFQ, содержащей домены высокоточных полимераз из термофильных организмов *Pyrococcus furiosus* и *Thermococcus kodakarensis* и ДНК-связывающий белок Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*. Проанализированы свойства полученного фермента и проведено их сравнение с широким спектром коммерческих ДНК-полимераз. Продемонстрировано, что показатели скорости элонгации и термостабильности полимеразы KFQ сравнимы с коммерческими ферментами, а эффективность амплификации протяженных фрагментов нуклеотидной цепи, размером до 8 т.п.н., и устойчивость к основным ингибиторам превосходят все исследованные ферменты.

Ключевые слова: полимеразы, химерный фермент, ДНК-связывающий белок, Sso7d, ПЦР

DOI: 10.56304/S0234275825010119

ДНК-зависимые ДНК-полимеразы (КФ 2.7.7.7) широко используют в разных молекулярно-биологических методах, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), синтез генов *de novo*, секвенирование ДНК и генотипирование.

Известные на сегодняшний момент ДНК-полимеразы можно разделить на четыре основные группы: ДНК-полимераза I (семейство А), ДНК-полимераза II (семейство В), ДНК-полимераза III (семейство С) и другие (семейство Х) [1]. Первоначально для ПЦР использовали ДНК-полимеразы семейства А, выделенные из термофильных бактерий (Taq ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* и Tth ДНК-полимераза из *Thermus thermophilus*) [2]. В последующем широкое распространение получили архейные ДНК-полимеразы семейства В: Pfu из *Pyrococcus furiosus* и KOD из *Thermococcus kodakarensis*, – благодаря их термостабильности и высокой точности репликации длинных фрагментов, наряду с интегрированной 3'→5' экзонуклеазной активностью [3–5], которая не присуща Taq-полимеразе. При сходной высокой точности (частота мутаций – около 0.4%) термостабильность KOD-полимеразы ниже, чем Pfu [5, 6]. М. Такаги и др. [5] показали, что в условиях ПЦР эти полимеразы различаются по следующим параметрам: у полимеразы KOD скорость удлинения цепи в пять раз (106–138 н./с), а процессивность (число нуклеотидов, присоединяемых полимеразой за одно событие связывания) на порядок выше, чем у Pfu. Позднее А. Elshawad-

фу и др. [6] подтвердили высокую производительность KOD в классическом варианте ПЦР и в формате реального времени.

Полимеразы семейства В имеют схожую структуру и состоят из 3 основных доменов: N-концевого (1–130, 327–368 а.о.), экзонуклеазного (131–326 а.о.) и ДНК-полимеразного [7]. Роль N-концевого домена до конца не изучена, хотя показано, что он важен для распознавания урацила в архейных, но не в эукариотических ферментах этого семейства. Экзонуклеазный домен обладает 3'→5' корректирующей активностью. Полимеразный домен по форме напоминает кисть правой руки и подразделяется на 3 домена: “ладонь” (369–450 и 501–588 а.о.), “пальцы” (451–500 а.о.) и “большой палец” (589–775 а.о.). Связывание ДНК происходит в области на стыке этих доменов. Каталитический центр фермента включает консервативные аминокислотные остатки домена “ладонь”. “Пальцы” связывают матрицу и dNTP в активном центре, а “большой палец” – ДНК [8].

Для улучшения свойств различных полимераз используют следующие методы: 1) оптимизацию кодонов для увеличения выхода рекомбинантного фермента в растворимой форме и повышения его удельной активности; 2) мутагенез с целью изменения свойств фермента [9–13]; 3) создание химерных ферментов, включающих фрагменты и полноразмерные последовательности разных ДНК-полимераз [6], и 4) создание ферментов слияния с моти-

вом связывания ДНК, таким как Sso7d или спираль-шпилька-спираль (HhH) [14–16].

Примером химерных ДНК-полимераз является фермент Kofu. Он получен путем обмена доменами между ДНК-полимеразами KOD и Pfu. В ДНК-полимеразе Kofu N-концевой экзонуклеазный домен и С-конец взяты из KOD, а центральная область – из Pfu. Химерная ДНК-полимераза Kofu характеризуется близкой к KOD скоростью удлинения праймеров, процессивностью и термостабильностью и аналогичной Pfu точностью репликации [17].

Так, белок Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*, связывающий двухцепочечную ДНК (дцДНК), значительно усиливал процессивность полимераз [15, 18]. F. Wang и др. [19] показали, что гибридный фермент, содержащий Sso7d-домен, слитый с полимеразой KOD, характеризуется значительно более высокой процессивностью. Также эта модификация увеличивала термостабильность и устойчивость полимеразы к действию ингибиторов [18].

Нами сконструирована химерная ДНК-полимераза KFQ, состоящая из фрагментов последовательностей полимераз KOD (PDB: 1WNS_A) и Pfu (GenBank: AAL80336.1). С-конец KFQ фланкирован последовательностью Sso7d, содержащей мутации K12L и E35L, – они “удаляют” РНКазную активность белка, не влияя на его термическую стабильность [20, 21]. Все введенные модификации направлены на получение высокоточной и высокопроизводительной ДНК-полимеразы для использования в ПЦР. Разработана методика получения и очистки фермента KFQ, а также изучены его свойства и проведено сравнение с коммерческими ДНК-полимеразами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Сборка целевого гена

Последовательность, кодирующую полимеразу KFQ, получали путем сборки ПЦР-фрагментов из олигонуклеотидных праймеров методом “слива” [22] с последующей их ПЦР-сшивкой. Концевые праймеры: F (прямой) 5'-CATATGGC-GAGTGСТАТТСТGGACACCG-3' и R (обратный) 5'-CTCGAGTTTCTTCTGTTTTTCCAACATTTG-CAGCAATTCSTTAGG-3' – содержали сайты узнавания рестриктаз *NdeI* и *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, США) соответственно (выделены подчеркиванием). Полученный ампликон обрабатывали *NdeI* и *XhoI* и клонировали в плазмидный вектор pET24a+, предварительно обработанный теми же рестриктазами. В результате была получена экспрессионная плаزمида pET24KFQ, содержащая последовательность, кодирующую целевой ген полимеразы KFQ, к С-концу которой присоединен домен Sso7d и 6-гистидиновый тэг (6×His). Правильность нуклеотидной последовательности

клонированного гена была подтверждена секвенированием.

Экспрессия и очистка полимеразы

Для экспрессии полимеразы штамм *Escherichia coli* Rosetta (De3) (Merck Millipore, США), содержащий экспрессионную плазмиду pET24KFQ, растили в среде LB (“Helicon”, Россия), содержащей 2% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, при 37°C в течение ночи. Затем 3% ночной культуры штамма-продуцента инокулировали в 300 мл обогащенной питательной среды LB со 100 мкг/мл канамицина и 0.2% глюкозы и растили при 37°C и перемешивании со скоростью 190 об/мин. По достижении оптической плотности 0.8 при длине волны 595 нм (OD₅₉₅) к клеткам добавляли изопропил-β-D1-тиогалактопиранозид (IPTG) до концентрации 0.4 мМ и растили при 37°C в течение 23 ч. Клеточную биомассу получали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 4 000 об/мин на центрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США). Выход влажных клеток составила 3.6 г/л культуральной среды.

Влажные клетки *E. coli* Rosetta (De3)/pET24KFQ (1.5 г) гомогенизировали в ультразвуковом дезинтеграторе Branson sonifier 250 (Branson Ultrasonics, США) в 15 мл буферного раствора 50 мМ Трис-НСl, рН 9.1 (раствор А) в течение 5 мин с циклом 0.5 с и амплитудой 30%. После центрифугирования при 9000 об./мин 30 мин при 4°C супернатант разбавляли в 2 раза раствором А и наносили на сорбент Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, Швеция), уравновешенную этим же буфером. Элюцию проводили линейным градиентом: раствор В – раствор А с 500 мМ имидазолом. По результатам электрофореза в денатурирующих условиях объединяли фракции, содержащие целевой белок. Суммарный объем составил 16 мл, концентрация – 0.05 мг/мл.

Диализ объединенных фракций, содержащих белок KFQ, проводили против буфера следующего состава: 20 мМ Трис-НСl, 100 мМ КCl, 0.1 М ЭДТА (рН 9.1) – в диализном мешке MWCO 12000–14000, RC (Serva, Германия). После диализа концентрация белка составила 0.2 мг/мл, электрофоретическая чистота – не менее 95%. К раствору белка добавляли дитиотреитол (ДТТ) до концентрации 1 мМ, БСА до 200 мкг/мл и глицерин до 50%. Полученные фракции хранили при температуре –80°C.

Условия ПЦР

ПЦР, если не указано иное, проводили по следующей схеме: денатурация ДНК при 98°C 2 мин; 25 циклов (денатурация при 98°C 10 с, отжиг праймеров 15 с при 52°C и амплификация 15 с/1000 п.н. при 72°C); элонгация при 72°C 2 мин. При ис-

пользовании Taq-полимеразы (“AmpliSens”, Россия) денатурацию проводили при 95°C. Для коммерческих полимераз состав реакционной смеси соответствовал рекомендованной производителем. ПЦР с полимеразой KFQ проводили в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 60 мМ КСl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCl₂, 0.02% БСА.

Объем реакционной смеси во всех случаях составлял 25 мкл. Для каждой ПЦР использовали 20 нг плазмидной ДНК.

Электрофорез в агарозном геле

Результаты ПЦР оценивали посредством электрофореза в 1.3%-ном агарозном геле, если не указано иное (агароза RA; VWR International LLC, США). Электрофорез проводили в Трис-ацетатном буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, рН 8.5) при напряженности электрического поля 2–3 В/см. Для визуализации ДНК в агарозный гель добавляли раствор бромистого этидия (“AmpliSens”) до конечной концентрации 1.6 мкг/мл и проводили облучение геля на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм. На гель наносили по 5 мкл каждого образца и маркера молекулярных масс ДНК, если не указано иное.

Сравнительный анализ свойств KFQ и коммерческих полимераз

Термостабильность. В этом анализе 3 мкл каждой ДНК-полимеразы: KFQ, Q5 (New England Biolabs (NEB), США), Phusion (NEB) или Phusion (Thermo Fisher Scientific; далее: TFS) – или 10 мкл Taq-полимеразы (“AmpliSens”) нагревали при 95°C и 99°C в течение 10, 30, 60, 90 и 120 мин, охлаждали в штативе-охладителе, после чего проводили ПЦР. В качестве матрицы использовали плазмиду на основе Т-вектора, содержащую вставку размером 500 п.н. Контролем служили ПЦР с теми же ферментами, не подвергавшимися нагреванию.

Определение оптимальных параметров элонгации и денатурации в ПЦР. Элонгацию проводили в диапазоне температур 40–80°C с шагом 5°C и при 72°C в качестве контроля. Для каждой из температур элонгации варьировали температуру денатурации: 95 и 98°C.

Для определения оптимального времени элонгации в ПЦР с полимеразми KFQ, Q5, Phusion (NEB), Phusion (TFS) процесс проводили в течение 5, 15, 30, 45 и 60 с/1000 п.н. В качестве матрицы использовали плазмиды на основе Т-вектора, содержащие вставки 1000 и 2000 п.н.

Определение максимальной длины амплифицируемого фрагмента. Для определения способности полимераз к амплификации протяженных фрагментов проводили ПЦР с KFQ, Q5, Phusion (NEB), Phusion (TFS) и Taq при времени элонгации 5, 15,

30, 45, и 60 с/1000 п.н. В качестве матрицы использовали плазмиды на основе Т-вектора, содержащие вставки 2000, 3500, 4850 и 8000 п.н.

Определение устойчивости к действию ингибиторов. Определяли устойчивость полимераз KFQ, Q5, Phusion (NEB), Phusion (TFS) и Taq к присутствию в реакционной смеси различных концентраций ингибиторов ПЦР. Для этого к ПЦР-смеси добавляли следующие ингибиторы (указаны конечные концентрации):

- КСl – 10, 60, 80, 100, 120, 140 мМ;
- (NH₄)₂SO₄ – 10, 40, 60, 80, 100, 120 мМ;
- MgCl₂ – 1, 5, 10, 15, 20, 30 мМ;
- Моча – 0.3, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 и 30.0% v/v;
- Мочевина – 10, 40, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование, экспрессия и очистка ДНК-полимеразы KFQ

Для получения рекомбинантной ДНК-полимеразы KFQ была разработана конструкция на основе последовательности ДНК-полимеразы KOD (PDB: 1WNS_A), в которой участок 340–570 а.о. (домены “ладони” и “пальцев”) был заменен соответствующей аминокислотной последовательностью ДНК-полимеразы Pfu (GenBank: AAL80336.1). На 3'-конец сконструированного гена была добавлена последовательность гена, кодирующего белок Sso7d (GenBank: AAK42679.1) с мутациями K12L и E35L. Последовательность гена ДНК-полимеразы KFQ была оптимизирована с учетом частоты встречаемости кодонов для бактериальной системы экспрессии на основе клеток *E. coli*. Итоговую последовательность получали методом сборки из длинных перекрывающихся праймеров [22]. Ген, кодирующий KFQ, клонировали в плазмидный вектор pET24a+ по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Полученной в результате этих манипуляций экспрессионной плазмидой pET24KFQ трансформировали клетки *E. coli* Rosetta (De3) и получали ДНК-полимеразу KFQ в виде растворимого белка.

Очистку фермента проводили на металл-хелатном сорбенте за счет 6-гистидинового тэга на С-конце полипептидной цепи (рис. 1а). Фракции, содержащие не менее 90% целевого белка, объединяли и концентрировали. Как видно из электрофореграммы, представленной на рис. 1б, чистота продукта составляла не менее 95%.

Термостабильность ДНК-полимеразы KFQ

В ходе ПЦР каждый цикл амплификации включает этап денатурации (при 95–98°C) ДНК-матрицы – для подготовки ее к новому раунду. В связи

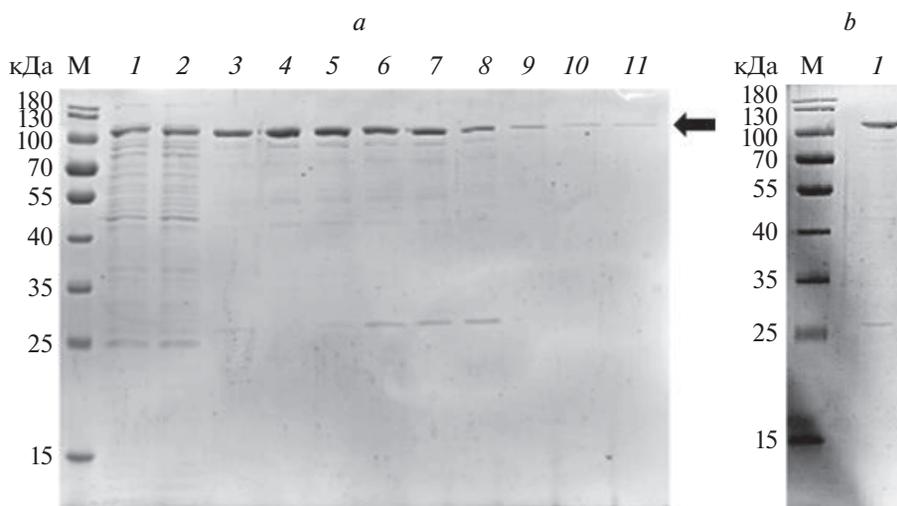


Рис. 1. Электрофоретический анализ целевого белка, KFQ, во фракциях элюата аффинной хроматографии (a) и в концентрате объединенных фракций (b). М – маркер молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). a – На дорожки нанесены: осветленный клеточный лизат (1), фракция проскока (2), фракции элюата (3–11). Стрелкой указан целевой белок. b – На дорожку 1 нанесена объединенная фракция KFQ-содержащих элюатов аффинной хроматографии.

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the target protein, KFQ, in the affinity chromatography eluate fractions (a) and in the pooled fraction concentrate (b). M, protein molecular mass marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). a – The following fractions were applied to the gel tracks: total cell lysate (1), precipitate (2), eluate fractions (3–11). The arrow indicates the target protein. b – The pooled fraction of KFQ-containing affinity chromatography eluates was applied to track (1).

с этим термостабильность ДНК-полимеразы имеет важное значение для амплификации. Термостабильность рекомбинантной ДНК-полимеразы KFQ была проанализирована в ПЦР после предварительной инкубации фермента при 95 и 98°C в интервале от 10 мин до 2 ч. Параллельно этот же эксперимент проводили для коммерческих полимераз (рис. 2).

Как и ожидалось, термостабильность фермента KFQ была сопоставима с коммерческими ДНК-полимеразами. Все изученные ферменты сохраняли свою активность после нагревания при 95°C и 98°C даже в течении 2 ч. В случае полимераз KFQ (рис. 2a) и Q5 (рис. 2b) наблюдалось небольшое снижение выхода продукта, хотя полученного количества достаточно не только для качественного определения присутствия целевого гена в смеси, но и для любых дальнейших молекулярно-биологических манипуляций (клонирование, секвенирование и т.д.).

Анализ температуры элонгации и денатурации

Большинство реакций ПЦР начинаются с этапа денатурации, который идет при 94–98°C в течение 1–9 мин. Этот этап гарантирует, что вся матрица перейдет в одноцепочечную форму. При использовании буферных растворов с высоким содержанием солей (что необходимо для некоторых ДНК-полимераз) температура денатурации превышает 98°C, т. к. GC-богатые матрицы могут

сохранять двухцепочечные участки при 95°C. Что касается температуры элонгации, как правило для ПЦР используют температуру 72°C, так как она оптимальна для активности ДНК-полимераз. Тем не менее, температура элонгации не относится к критическим параметрам [23] и ее можно варьировать в зависимости от целей эксперимента. Например, при амплификации АТ-богатых последовательностей температуру элонгации снижают [24, 25].

Определение оптимальной температуры денатурации и диапазона температуры элонгации проводили только для полимеразы KFQ (рис. 3).

Как видно из представленных результатов, при 98°C, когда денатурация ДНК происходит в большем объеме, чем при 95°C, выход продукта амплификации выше (рис. 3b). В то же время изменение температуры элонгации не влияет на выход продукта реакции – фермент в равной степени эффективен в широком диапазоне температур: от 45 до 80°C.

Определение оптимального времени элонгации

Длительность этапа элонгации ПЦР зависит от скорости синтеза ДНК-полимеразы и длины целевой ДНК. Типичное время элонгации для ДНК-полимеразы Taq составляет 1 мин/т.п.н. [26], тогда как для ДНК-полимеразы Pfu – 2 мин/т.п.н. [3]. Понятно, что для сопоставимой эффективности амплификации “медленным” ферментам потребу-

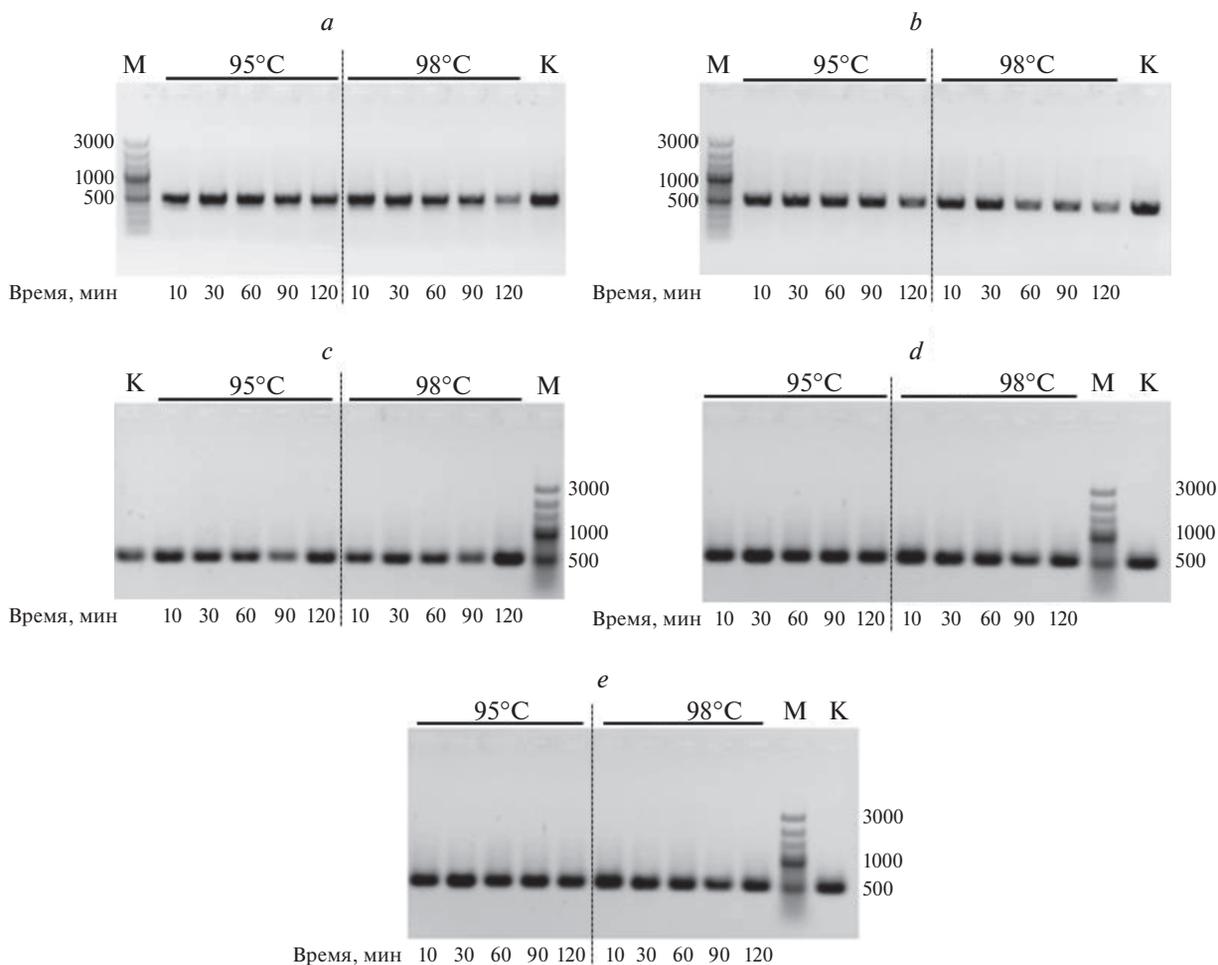


Рис. 2. Определение температурной стабильности полимераз KFQ (a), Q5 (b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) и Taq (e). М – маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific), К – контрольная ПЦР.

Fig. 2. Thermal stability of KFQ (a), Q5 (b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) и Taq (e) polymerases. M, DNA ladder GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific); K, quality control PCR.

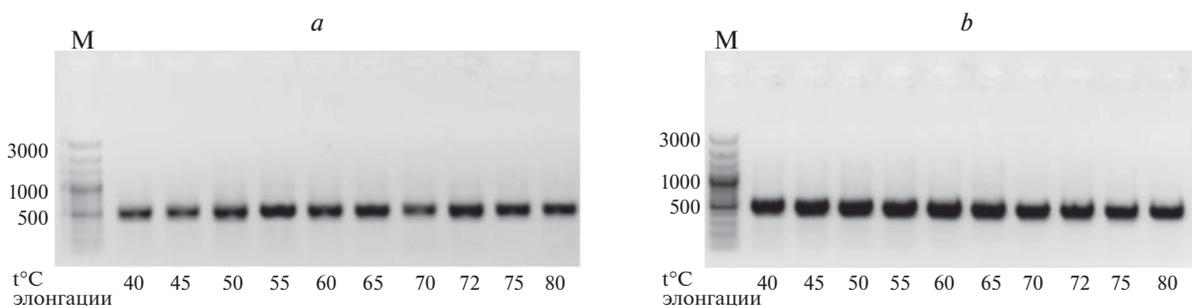


Рис. 3. Определение оптимальной температуры элонгации при температуре денатурации 95°C (a) и 98°C (b). М – маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 3. Optimal elongation temperature at the denaturation temperature of 95°C (a) and 98°C (b). M, DNA ladder GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

ется больше времени, чем “быстрым”. Следовательно, амплификация протяженных участков ДНК полимеразми с низкой скоростью элонгации потребует гораздо больше времени. Именно по-

этому одна из целей модификаций ДНК-полимераз – это увеличение их скорости синтеза для сокращения длительности этапа элонгации и суммарного времени проведения ПЦР.

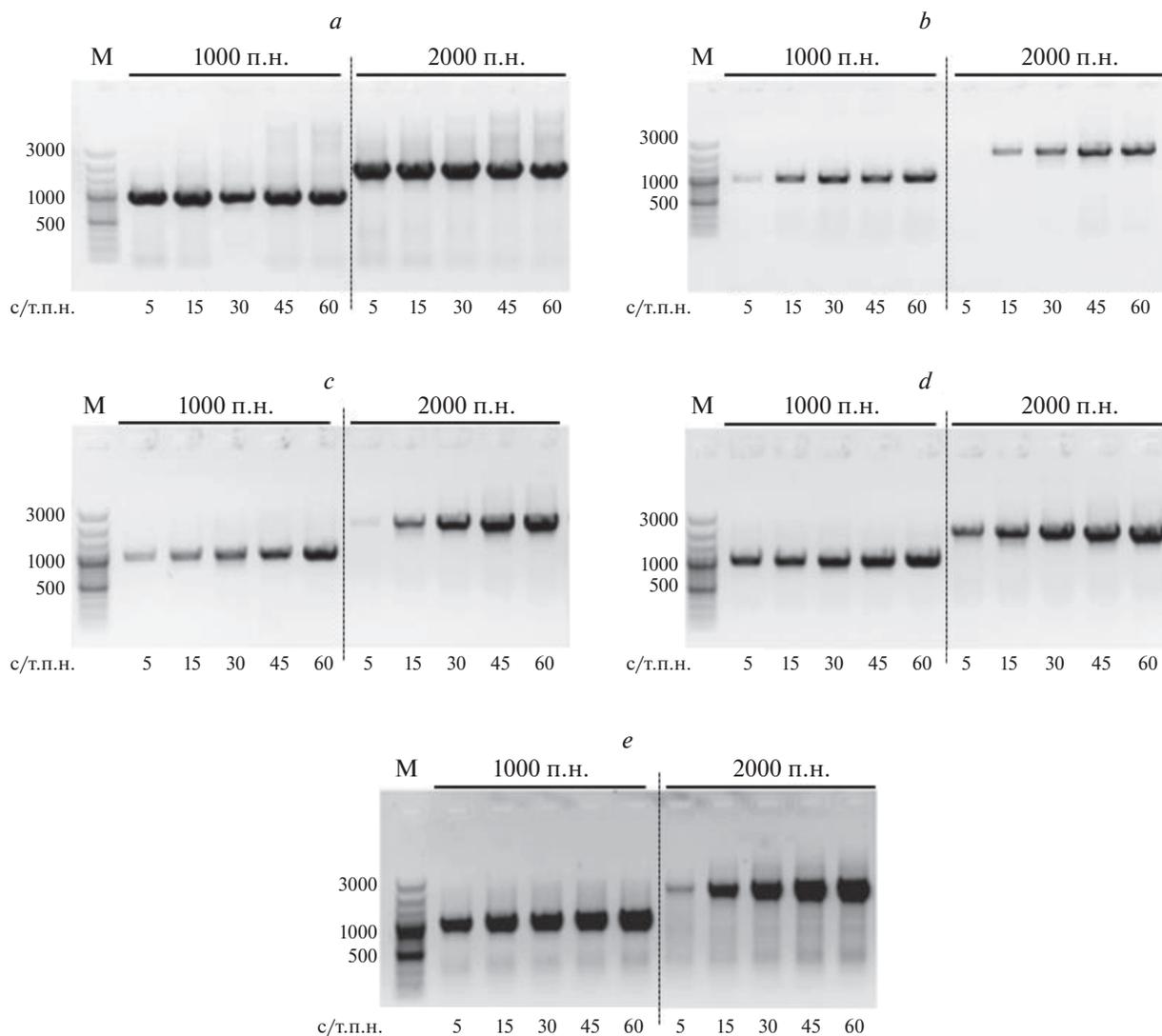


Рис. 4. Определение оптимального времени элонгации полимераз KFQ (a), Q5 (b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) и Taq (e). M – маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 4. Determination of the optimal elongation time for KFQ (a), Q5 (b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) and Taq (e) polymerases. M, DNA ladder GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

Эксперимент по определению оптимального времени элонгации при амплификации фрагментов ДНК длиной 1000 и 2000 п.н. для всех исследуемых полимераз проводили, варьируя время элонгации в интервале 5–60 с/т.п.н. (рис. 4).

Для большинства коммерческих полимераз рекомендуемое производителем время элонгации составляет 15–30 с/т.п.н. Как видно из рис. 4, эффективность амплификации ДНК-полимераз Q5 (рис. 4b) и Phusion (NEB) (рис. 4c) снижается с уменьшением времени элонгации, тогда как KFQ (рис. 4a) и Phusion (TFS) (рис. 4d) остается высокой даже при минимальном времени элонгации. Неожиданно полимеразы Taq (рис. 4e) эффективно работала в этом временном интервале, хотя рекомендованное производителем время элонга-

ции составляет 60 с/т.п.н. Однако амплификация Taq-полимеразой сопровождается образованием большого количества побочных продуктов. При использовании полимеразы KFQ также образовались побочные продукты, что может быть связано с недостаточной степенью очистки фермента.

Определение максимальной длины амплифицируемого фрагмента

Ампликоны размером более 4–5 т.п.н. обычно называют длинными. Амплификация таких последовательностей не входит в число рутинных приложений ПЦР, но может потребоваться для решения различных научных задач, связанных с синтезом генов *de novo*, молекулярным клониро-

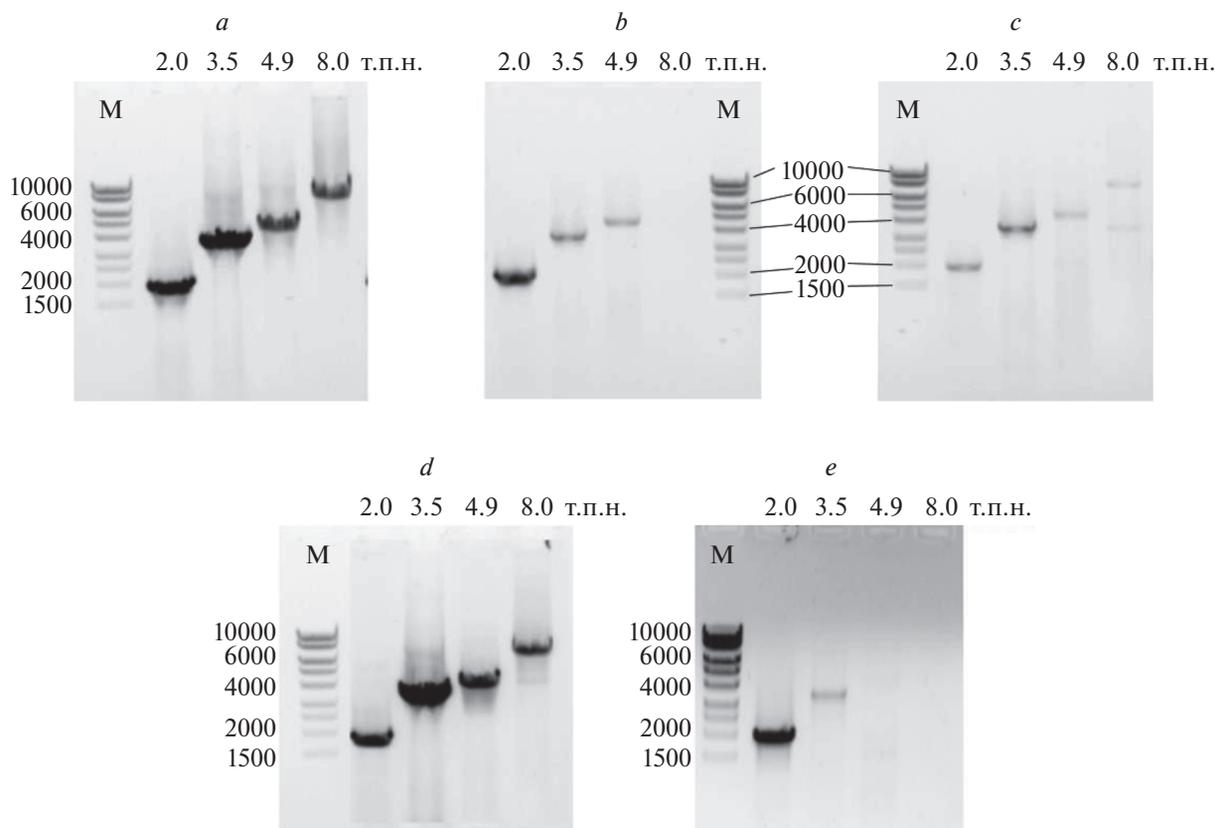


Рис. 5. Амплификация протяженных ДНК-фрагментов полимеразми KFQ (a), Q5(b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) и Taq (e) при скорости элонгации 1000 п.н./15 с. М – маркер длин ДНК MassRuler HR (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 5. Amplification of extended DNA fragments by KFQ (a), Q5(b), Phusion (NEB) (c), Phusion (TFS) (d) and Taq (e) polymerases at an elongation rate of 1000 bp/15 s. M, DNA ladder MassRuler HR (Thermo Fisher Scientific).

ванием или генетическим анализом. Амплификация таких длинных фрагментов обычно осложняется неспецифическим отжигом праймеров и образованием вторичных структур в матрице ДНК. Для успешной амплификации длинных последовательностей ДНК часто необходима оптимизация условий реакции. Для этого варьируют такие параметры реакции, как температура и длительность различных этапов ПЦР, проводят оптимизацию концентрации праймеров и dNTP, а также применяют специальные добавки, предназначенные для повышения эффективности и специфичности реакции. В связи с этим для характеристики свойств полимераз важно определить максимальную длину амплифицируемого фрагмента при стандартных условиях ПЦР.

Для этого с использованием полимераз KFQ, Q5, Phusion (NEB), Phusion (TFS) и Taq амплифицировали фрагменты ДНК длиной 2, 3.5, 4.85 и 8 т.п.н. с временем элонгации 15 с/т.п.н. Из-за большого размера фрагментов для лучшего разделения электрофорез проводили в геле низкой плотности (0.8%). Известно, что гели с низкой концентрацией агарозы очень чувствительны к

перегрузу по ДНК, поэтому ПЦР-продукты полимеразы KFQ наносили в объеме 2.5 мкл, а для остальных полимераз – 5 мкл (рис. 5).

Полимеразы KFQ (рис. 5a) и Phusion (TFS) (рис. 5d) эффективно амплифицировали все фрагменты. В случае полимеразы Phusion (NEB) (рис. 5c) также зарегистрировали все продукты амплификации, но их концентрация была существенно ниже, что свидетельствует о низкой эффективности. При использовании полимеразы Q5 (рис. 5b) были получены продукты размером 2, 3.5 и 4.85 т.п.н., однако с достаточно высокой эффективностью прошла амплификация только фрагмента длиной 2 т.п.н. ПЦР-продукты полимеразы Taq (рис. 5e) были длиной 2 и 3.5 т.п.н. и, как в случае полимеразы Q5, эффективно был амплифицирован только фрагмент 2 т.п.н.

Таким образом, показано, что использование полимеразы KFQ позволяет эффективно амплифицировать фрагменты размером до 8000 п.н. со скоростью 15 с/т.п.н. без какой-либо дополнительной оптимизации реакции, тогда как для коммерческих полимераз время элонгации протяженных

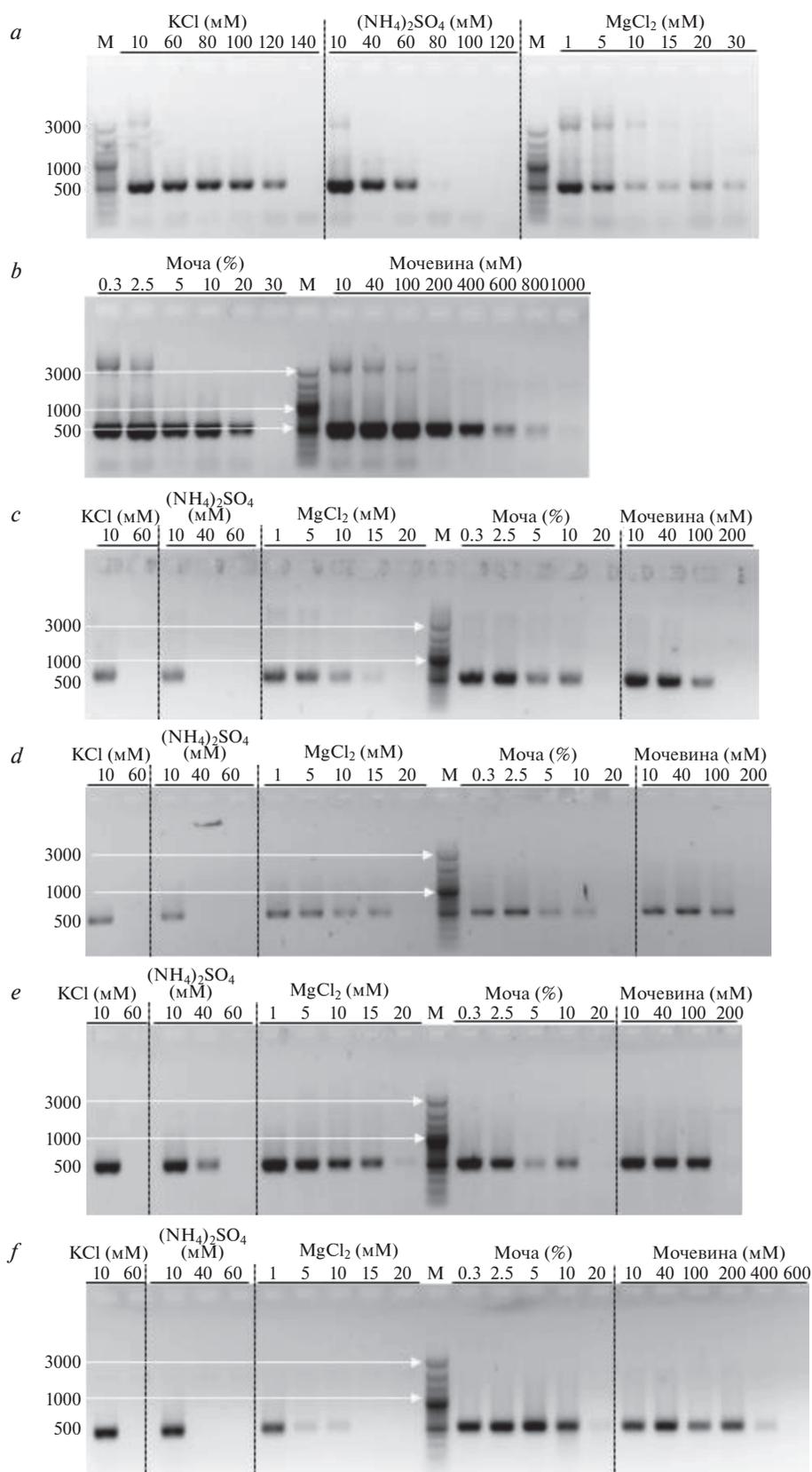


Рис. 6. Определение устойчивости полимераз KFQ (*a, b*), Q5 (*c*), Phusion (NEB) (*d*), Phusion (TFS) (*e*) и Taq (*f*) к ингибиторам. М – маркер длин ДНК GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

Fig. 6. Analysis of resistance of KFQ (*a, b*), Q5 (*c*), Phusion (NEB) (*d*), Phusion (TFS) (*e*) and Taq (*f*) polymerases to inhibitors. M, DNA ladder GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific).

фрагментов ДНК рекомендовано увеличить до 40 с/т.п.н. Также следует отметить, что количество полученного ПЦР-продукта значительно выше, чем для коммерческих полимераз.

Определение устойчивости полимераз к действию ингибиторов

Ингибиторы ПЦР обычно напрямую взаимодействуют с ДНК, препятствуя связыванию полимеразы с матрицей ДНК, или взаимодействуют с ДНК-полимеразой, блокируя активность фермента. ДНК-полимеразы также чувствительны к наличию в реакционной смеси кофакторов, которые могут быть мишенью ингибирования. Например, присутствие ионов магния – важнейшее условие для работы ДНК-полимераз, а соединения, которые снижают доступность Mg^{2+} или мешают связыванию Mg^{2+} с ферментом, могут ингибировать ПЦР.

К наиболее распространенным ингибиторам ПЦР относятся биологические жидкости (кровь, моча, слюна и т.д.), а также компоненты различных растворов, используемых для обработки биологических образцов: соли, спирты и т.д. Мы проанализировали устойчивость ДНК-полимераз KFQ, Q5, Phusion (NEB), Phusion (TFS) и Taq к таким ингибиторам как моча, мочевины, соли калия, магния и аммония (рис. 6). Оказалось, что порог устойчивости к каждому из ингибиторов для полимеразы KFQ заметно выше, чем у коммерческих полимераз.

По сравнению с другими протестированными полимеразми KFQ (рис. 6a) оказалась почти на порядок устойчивее к присутствию в реакции повышенных концентраций KCl. Также KFQ сохраняет активность в присутствии 60 мМ сульфата аммония, тогда как полимеразы Phusion (TFS) (рис. 6b) активна только до 40 мМ, а другие теряют активность уже при 10 мМ.

Ферментативная активность KFQ сохраняется в диапазоне концентраций $MgCl_2$ 1–30 мМ, хотя в концентрациях выше 5 мМ снижается. Полимераза Phusion (TFS) сохраняет высокую активность до 15 мМ $MgCl_2$, но эффективность резко падает при повышении концентрации до 20 мМ. Диапазон концентраций хлорида магния, при которых уровень активности ферментов оставался оптимальным в этом эксперименте, составляет 1–5 мМ.

Полимераза KFQ (рис. 6b) примерно в 2 раза устойчивее к присутствию в реакционной смеси мочи (до 20% для KFQ против 10% для других полимераз) и в 2–4 раза к присутствию мочевины. Повышенная устойчивость полимеразы KFQ к солям, мочеvine и моче позволяет считать этот фермент перспективным для включения в протоколы ПЦР, в том числе ПЦР-диагностики.

Таким образом, в проведенном нами исследовании получен рекомбинантный штамм *E. coli*, экспрессирующий химерную ДНК-полимеразу KFQ. В результате анализа свойств ДНК-полимеразы KFQ выявлено, что показатели скорости элонгации, термостабильности не уступают коммерческим полимеразам. ДНК-полимераза KFQ характеризуется высокой эффективностью в случае амплификации протяженных фрагментов, размером до 8 т.п.н., и повышенной устойчивостью к ингибиторам по сравнению с другими полимеразми, исследованными в работе. На основании этих данных ДНК-полимераза KFQ можно рассматривать как перспективный инструмент ПЦР-амплификации в разных молекулярно-биологических приложениях. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение корректирующей способности фермента и его точности при амплификации протяженных фрагментов и в реакциях сборки генов *de novo*, а также на оценку возможности его применения в ПЦР-диагностике.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет государственного бюджета: федеральный проект “Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Участие авторов: Соловьева Е.Д. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Михеева О.О. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Черкашин Е.А. – подготовка текста, Черкашина А.С. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста; Акимкин В.Г. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации. Все авторы одобрили финальную версию статьи для публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ito J., Braithwaite D.K. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(15), 4045–4057. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4045>
2. Nishioka M., Mizuguchi H., Fujiwara S., Komatsubara S., Kitabayashi M., Uemura H., Takagi M., Imanaka T. Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *J. Biotechnol.*, 2001, 88(2), 141–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00275-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00275-9)
3. Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., Mathur E.J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Py-*

- rococcus furiosus*. *Gene*, 1991, 108(1), 1–6.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-y](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-y)
4. Cline J., Braman J.C., Hogrefe H.H. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24(18), 3546–3551.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3546>
 5. Takagi M., Nishioka M., Kakihara H., Kitabayashi M., Inoue H., Kawakami B., Oka M., Imanaka T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(11), 4504–4510.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4504-4510.1997>
 6. Elshawadfy A.M., Keith B.J., Ee Ooi H., Kinsman T., Heslop P., Connolly B.A. DNA polymerase hybrids derived from the family-B enzymes of *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis*: improving performance in the polymerase chain reaction. *Front. Microbiol.*, 2014, 5, 224.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00224>
 7. Kazlauskas D., Krupovic M., Guglielmini J., Forterre P., Venclovas Č. Diversity and evolution of B-family DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, 2020, 48(18), 10142–10156.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa760>
 8. Joyce C.M., Steitz T.A. Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, 63, 777–822.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004021>
 9. Ishino Y., Iwasaki H., Kato I., Shinagawa H. Amino-acid-sequence motifs essential to 3'–5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 14655–14660.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36675-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36675-9)
 10. Biles B.D., Connolly B.A. Low-fidelity *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase mutants useful in error-prone PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(22), e176.
<https://doi.org/10.1093/nar/gnh174>
 11. Nørholm M.H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. *BMC Biotechnol.*, 2010, 10, 21.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-21>
 12. Yamagami T., Ishino S., Kawarabayasi Y., Ishino Y. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front. Microbiol.*, 2014, 5, 461.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00461>
 13. Ppyun H., Kim S.H., Youn M.H., Cho S.S., Kwon K.M., Kweon D.H., Kwon S.T. Improved PCR performance and fidelity of double mutant Neq A523R/N540R DNA polymerase. *Enzyme Microb. Technol.*, 2016, 82, 197–204.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.10.010>
 14. Kitabayashi M., Nishiya Y., Esaka M., Itakura M., Imanaka T. Gene cloning and polymerase chain reaction with proliferating cell nuclear antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66(10), 2194–2200.
<https://doi.org/10.1271/bbb.66.2194>
 15. Wang Y., Prosen D.E., Mei L., Sullivan J.C., Finney M., Vander Horn P.B. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(3), 1197–207.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
 16. Pavlov A.R., Belova G.I., Kozyavkin S.A., Slesarev A.I. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(21), 13510–13515.
<https://doi.org/10.1073/pnas.202127199>
 17. Faurholm B., McEwan P., Bourn W., Rush G. Chimeric dna polymerases. *Patent US20120115188A1*, publ. 10.05.2012.
 18. Sundarrajan S., Parambath S., Suresh S., Rao S., Padmanabhan S. Novel properties of recombinant Sso7d-Taq DNA polymerase purified using aqueous two-phase extraction: utilities of the enzyme in viral diagnosis. *Biotechnol. Rep. (Amst.)*, 2018, 19, e00270.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00270>
 19. Wang F., Li S., Zhao H., Bian L., Chen L., Zhang Z., Zhong X., Ma L., Yu X. Expression and characterization of the RKOD DNA polymerase in *Pichia pastoris*. *PLoS One*, 2015, 10(7), e0131757.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131757>
 20. Shehi E., Serina S., Fumagalli G., Vanoni M., Consonni R., Zetta L., Dehò G., Tortora P., Fusi P. The Sso7d DNA-binding protein from *Sulfolobus solfataricus* has ribonuclease activity. *FEBS Lett.*, 2001, 497(2–3), 131–136.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02455-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02455-3)
 21. Gera N., Hussain M., Wright R.C., Rao B.M. Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *J. Mol. Biol.*, 2011, 409(4), 601–616.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.020>
 22. Heckman K.L., Pease L.R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.*, 2007, 2(4), 924–932.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
 23. Linz U., Delling U., Rübsamen-Waigmann H. Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1990, 28(1), 5–13.
 24. López-Barragán M.J., Quiñones M., Cui K., Lemieux J., Zhao K., Su X.Z. Effect of PCR extension temperature on high-throughput sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2011, 176(1), 64–67.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.013>
 25. Su X.Z., Wu Y., Sifri C.D., Wellems T.E. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A + T-rich DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24(8), 1574–1575.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.8.1574>
 26. Godbey W.T. Chapter 11 – The polymerase chain reaction. In: *An Introduction to Biotechnology*. Academic Press, 2015, 207–236.
<https://doi.org/10.1016/C2013-0-18161-5>

Chimeric KFQ Ppolymerase: Production and Properties

E. D. Solovieva^a, O. O. Mikheeva^a, E. A. Cherkashin^a, A. S. Cherkashina^{a, #}, and V. G. Akimkin^a

^aCentral Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Moscow, 111123 Russia

[#]e-mail: cherkashina@pcr.ms

Abstract—Here, a protocol for obtaining, isolating and purifying recombinant chimeric KFQ DNA-polymerase containing domains of high-fidelity polymerases from thermophilic organisms *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis* and DNA-binding protein Sso7d from *Sulfolobus solfataricus* was developed. The properties of obtained enzyme were analyzed and compared with a wide range of commercial DNA-polymerases. It was shown that elongation rate and thermal stability of KFQ polymerase were comparable with commercial enzymes, and the efficiency of amplification of extended fragments of the nucleotide chain, up to 8 kb, and resistance to the main inhibitors were superior to all the studied enzymes.

Keywords: DNA-polymerase, chimeric enzyme, DNA-binding protein, Sso7d, PCR