



# Получение и характеристика химерных Bst-подобных полимераз и их применение в изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК на примере вируса эпидемического паротита

Замотаева Т.Л.<sup>✉</sup>, Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

## Аннотация

**Введение.** Bst-полимераза играет ключевую роль в экспресс-диагностике инфекционных заболеваний благодаря своим уникальным биохимическим свойствам и возможности применения в петлевой изотермической амплификации (LAMP). В литературе описано несколько аналогов Bst-полимеразы, однако данные ферменты не получили широкого применения в молекулярной диагностике.

**Цель работы** — получение рекомбинантных Bst- и Btlv-полимераз с Sso7d-доменом и тестирование новых возможностей для их применения.

**Материалы и методы.** Экспрессионные конструкции, несущие ген полимеразы, получали стандартными методами генетической инженерии. Целевой фермент был наработан в клетках *Escherichia coli*. Очистку проводили методами металл-аффинной хроматографии с последующим диализом и концентрированием. РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) и ДНК-полимеразную активности ферментов определяли с помощью нерадиоактивных методик с флуоресцентной детекцией. Функциональные свойства ферментов оценивали в наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» и в методике, предназначенной для определения в биологическом материале РНК вируса эпидемического паротита в формате LAMP, совмещённой с обратной транскрипцией.

**Результаты.** В системе экспрессии на основе клеток *E. coli* получены рекомбинантные химерные ферменты с вытесняющей активностью: Bst\_Sso7d, Bst\_Sso7d\_mut4 и Btlv\_Sso7d. Разработанные протоколы культивирования и очистки позволяют получать ферменты в растворимой форме с выходом до 25% от собранной клеточной массы. Функциональное тестирование показало, что в LAMP химерные полимеразы демонстрировали сходную активность с Bst-полимеразой без Sso7d-домена. Вместе с тем полимеразы Btlv\_Sso7d имели повышенную ревертазную активность и устойчивость к ингибиторам.

**Заключение.** Полученная химерная полимеразы Btlv\_Sso7d, благодаря своим улучшенным свойствам, может быть использована в наборах реагентов для диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP при использовании методов экспресс-экстракции нуклеиновых кислот.

**Ключевые слова:** Bst-полимераза, вытесняющая активность, изотермическая амплификация, устойчивость к ингибиторам

**Источник финансирования.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета (федеральный проект «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)»).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Замотаева Т.Л., Дедяева Е.А., Михеева О.О., Пика М.И., Черкашин Е.А., Черкашина А.С., Акимкин В.Г. Получение и характеристика химерных Bst-подобных полимераз и их применение в изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК на примере вируса эпидемического паротита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(4):online-first.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-604>

EDN: <https://www.elibrary.ru/TRVYOB>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-604>

# Production and characterization of chimeric Bst-like polymerases and their application in isothermal amplification combined with rapid RNA extraction methods using the example of the mumps virus

Tatyana L. Zamotaeva<sup>✉</sup>, Ekaterina A. Dedyeva, Olga O. Mikheeva, Maria I. Pika, Evgeny A. Cherkashin, Anna S. Cherkashina, Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

## Abstract

**Introduction.** Bst polymerase plays a key role in the rapid diagnosis of infectious diseases due to its unique biochemical properties and potential application in loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Several analogs of Bst polymerase have been described in the literature; however, these enzymes have not been widely used in molecular diagnostics.

**The aim** of the study is to obtain recombinant Bst and Btlv polymerases with the Sso7d domain and to test new possibilities for their application.

**Materials and methods.** Expression constructs carrying the polymerase gene were obtained using standard genetic engineering methods. The target enzyme was produced in *Escherichia coli* cells. Purification was carried out using metal-affinity chromatography methods followed by dialysis and concentration. RNA-dependent DNA polymerase (reverse transcriptase) and DNA polymerase activities of the enzymes were determined using non-radioactive methods with fluorescent detection. The functional properties of the enzymes were assessed using the Amplisens SARS-CoV-2-IT reagent kit and a method designed for the detection of mumps virus RNA in biological material using the LAMP format combined with reverse transcription.

**Results.** In the *E. coli*-based expression system, the following recombinant chimeric enzymes with displacing activity have been obtained: Bst\_Sso7d, Bst\_Sso7d\_mut4 and Btlv\_Sso7d. The developed cultivation and purification protocols allow for the production of enzymes in soluble form with a yield of up to 25% of the collected cell mass. Functional testing showed that in LAMP, the chimeric polymerases demonstrated similar activity to Bst polymerase without the Sso7d domain. At the same time, the Btlv\_Sso7d polymerase exhibited increased reverse transcriptase activity and resistance to inhibitors.

**Conclusion.** The obtained chimeric polymerase Btlv\_Sso7d, due to its improved properties, can be used in reagent kits for the diagnosis of infectious diseases by the LAMP method when using nucleic acid extraction methods.

**Keywords:** Bst polymerase, displacing activity, isothermal amplification, inhibitor resistance

**Funding source.** The research was funded by the state budget (Federal project "Sanitary shield of the country — safety for health (prevention, detection, response)").

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Zamotaeva T.L., Dedyeva E.A., Mikheeva O.O., Pika M.I., Cherkashin E.A., Cherkashina A.S., Akimkin V.G. Production and characterization of chimeric Bst-like polymerases and their application in isothermal amplification combined with rapid RNA extraction methods using the example of the mumps virus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(4):online-first.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-604>

EDN: <https://www.elibrary.ru/TRVYOB>

## Введение

Сокращение времени исследования за счёт применения быстрых тестов является одной из ключевых тенденций в лабораторной диагностике. Этот подход особенно актуален для повышения пропускной способности лаборатории в условиях проведения массовых скринингов и позволяет медицинскому персоналу или эпидемиологам осуществлять диагностику в условиях ограниченности ресурсов,

что способствует оказанию своевременной помощи пациентам, быстрому выявлению инфицированных лиц, оперативному расследованию инфекционных вспышек и принятию адекватных эпидемиологических мер, а также предотвращает избыточное назначение профилактических и терапевтических средств. Такие быстрые тесты должны соответствовать определённым требованиям — высокой точности и скорости, простоте и доступности, а также

обладать высокой стабильностью при хранении и транспортировке [1, 2].

Пандемия коронавируса дала толчок развитию изотермических методов амплификации. Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) [3–5] обладает высокой чувствительностью и специфичностью, важным преимуществом является то, что реакция амплификации проходит при постоянной температуре (без термоциклирования). Это позволяет проводить исследования как в оборудованных клинико-диагностических лабораториях, так и в полевых условиях, где отсутствует специальное лабораторное оборудование. Ключевая роль в дальнейшем развитии наборов реагентов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP принадлежит Bst-полимеразе [6, 7] и её модификациям. Bst-полимераза является большим фрагментом ДНК-полимеразы I (Bst-LF), выделенной из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus* (ранее *Bacillus stearothermophilus*) [8] и имеющей температурный оптимум 60–70°C. Фермент был выделен J. Stenesh и соавт. в 1972 г. [9], за 4 года до открытия Taq-полимеразы [10, 11]. В дальнейшем как для исследовательских целей, так и в производственных решениях, как правило, стали использоваться рекомбинантные ферменты, в частности Bst-полимеразы, клонированная и экспрессированная в клетках бактерий *Escherichia coli*. Бактериальная система на основе клеток *E. coli* отличается простотой и невысокой стоимостью культивирования, высокой скоростью роста микроорганизмов, для неё разработан широкий спектр различных векторов для экспрессии рекомбинантных белков. Для Bst-полимеразы и аналогичных полимераз с вытесняющей активностью из других организмов описаны подходы к клонированию и получению рекомбинантных ферментов в бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* [12–14]. Поскольку на удельную каталитическую активность фермента влияют в том числе особенности нуклеотидной последовательности гена, условия экспрессии, протокол выделения и очистки, все эти этапы требуют оптимизации при получении любого фермента.

Основными подходами к изменению физико-химических характеристик фермента в соответствии с практическими задачами пользователя являются направленный мутагенез и добавление белковых доменов с заданными свойствами [15, 16]. Подобные модификации позволяют повысить выход растворимого фермента при экспрессии в клетках *E. coli*, упростить процесс очистки, а также получить ферменты с улучшенными свойствами: повышенной активностью и термостабильностью, устойчивостью к солям и ингибиторам. Немодифицированная Bst-полимераза обладает недостаточно высокой процессивностью, поскольку в нативном организме

участвует в основном в репарации ДНК [17]. Модифицированный фермент обладает гораздо большей процессивностью, которая обусловлена наличием в клетках вспомогательных белков, повышающих стабильность комплекса полимеразы–ДНК. Белок Sso7d относится к семейству ДНК-связывающих белков, выделенных из археи рода *Sulfolobus*, стабилен в широком диапазоне температуры и pH. Ряд авторов описывают стратегию слияния полимераз с белком Sso7d или подобными белками (Sto7d, SSB, TBD, DBD) для получения химерных ферментов, обладающих повышенной процессивностью, вытесняющей активностью, термостабильностью и толерантностью к ингибиторам, включая мочевины, цельную кровь и NaCl [18–22].

Термофильные бактерии родственных видов могут вырабатывать разные стратегии выживания, что обуславливается в том числе отличиями в свойствах их ферментов. В этой связи потенциально интересными направлениями становятся клонирование и получение рекомбинантных ДНК-полимераз из новых источников, например, из родственного организма и ближайшего гомолога — термофильной бактерии *Geobacillus thermoleovorans* (ранее *Bacillus thermoleovorans*) [23, 24].

Целью настоящей работы было получение химерных Bst-подобных полимераз из *G. stearothermophilus*, а также их сравнение с гомологом — Btlv-полимеразой из *G. thermoleovorans* для оценки возможности их применения в реакции изотермической амплификации в сочетании с экспресс-методами выделения РНК.

## Материалы и методы

### Получение генов

#### *Bst\_Sso7d, Bst\_Sso7d\_mut4, Btlv\_Sso7d*

Нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность Btlv-полимеразы из *G. thermoleovorans*, получали методом сборки из длинных перекрывающихся праймеров — «методом лесенки» [25]. На концах нуклеотидной последовательности были введены сайты рестрикции: NdeI — на 5'-конце и XhoI — на 3'-конце для последующего переклонирования в экспрессионный вектор pET16b+. В результате был получен экспрессионный вектор pET16-Btlv-Nhis. Правильность нуклеотидной последовательности клонированного гена подтверждали методом секвенирования.

В качестве источников генов *Bst* и *Bst\_mut4* использовали плазмиды, полученные ранее в лаборатории: pET16\_Bst и pET16\_Bst\_NHis\_m4 соответственно [7, 26]. Матрицей для амплификации гена *Sso7d* также служила ранее полученная конструкция pPSS, содержащая ген *Sso7d* дикого типа.

Для получения генов химерных ферментов проводили амплификацию гена целевого фермента

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, использованные для клонирования генов

| Матрица               | Имя   | Последовательность 5'-3'                         | ПЦР2 |
|-----------------------|-------|--------------------------------------------------|------|
| <b>Bst_Sso7d</b>      |       |                                                  |      |
| pET16_Bst             | BstF  | gaaaggaggaggagctctaacaatctcggaaggcgaaaaaccg      |      |
|                       | BstR  | agtctcgagttatttcgcatcataccagg                    | ✓    |
| pPSS                  | SsoF  | tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag              | ✓    |
|                       | SsoR  | agatgttagagctcctcctcttctctgtttttccag             |      |
| <b>Bst_Sso7d_mut4</b> |       |                                                  |      |
| pET16_Bst_NHis_m4     | BstF  | gaaaggaggaggagctctaacaatctcggaaggcgaaaaaccg      |      |
|                       | BstR  | agtctcgagttatttcgcatcataccagg                    | ✓    |
| pPSS                  | SsoF  | tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag              | ✓    |
|                       | SsoR  | agatgttagagctcctcctccttctctgtttttccag            |      |
| <b>Btlv_Sso7d</b>     |       |                                                  |      |
| pET16-Btlv-Nhis       | BtlvF | gaaaggaggaggagctctaacaatctcggtctctgaggaagaaaagcc |      |
|                       | BtlvR | aagtctcgagttatttcgcatcataccaagtagaacccgtagtg     | ✓    |
| pPSS                  | SsoF  | tcgtcatatggcgaccgtgaagttcaagtataaag              | ✓    |
|                       | SsoR  | agatgttagagctcctcctccttctctgtttttccag            |      |

и гена ДНК-связывающего домена *Sso7d*. Полученные ампликоны были выделены и очищены из геля и лигированы между собой с использованием фланкирующих праймеров (табл. 1).

Для получения выступающих А-концов очищенный ампликон инкубировали 30 мин при 72°C в присутствии Taq-полимеразы и смеси дезокси-нуклеотидов dNTPs. Целевой продукт затем был клонирован в вектор pGEM-T («Promega»). Наличие целевой последовательности и её корректность подтверждали с помощью секвенирования методом Сэнгера.

#### Получение экспрессионных плазмидных векторов, содержащих гены *Bst\_Sso7d*, *Bst\_Sso7d\_mut4*, *Btlv\_Sso7d*

Плазмидную ДНК, содержащую ген химерного фермента, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI и полученный продукт рестрикции клонировали в плазмидный вектор pET16b+, предварительно обработанный теми же эндонуклеазами рестрикции. В результате были получены экспрессионные векторы, содержащие гены, которые кодируют следующие гибридные белки: *Bst\_Sso7d* с молекулярной массой 75 кДа, *Bst\_Sso7d\_mut4* с молекулярной массой 75,2 кДа и *Btlv\_Sso7d* с молекулярной массой 75 кДа. Правильность нуклеотидной последовательности клонированных генов была подтверждена секвенированием.

#### Подбор штаммов *E. coli* для экспрессии генов *Bst\_Sso7d*, *Bst\_Sso7d\_mut4* и *Btlv\_Sso7d*

В качестве штаммов-носителей для созданных экспрессионных векторов pET16-Bst\_Sso7d, pET16-

Bst\_Sso7d\_mut4 и pET16-Btlv\_Sso7d использовали штаммы *E. coli* ER2566, BL21de3 pLys и Rosetta De3. Трансформированные клетки высевали на среду LB (1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) с агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина для клеток ER2566 и 20 мкг/мл хлорамфеникола для клеток BL21 (DE3) pLys и Rosetta (DE3), и выращивали в течение 16 ч при 37°C для получения отдельных колоний. Затем 7–8 колоний переносили в 100 мл среды LB с 100 мкг/мл ампициллина и выращивали 18 ч при 37°C на шейкере при перемешивании со скоростью 180 об/мин для получения ночной культуры. Полученные ночные культуры штаммов-продуцентов *E. coli* переносили в среду LB с 100 мкг/мл ампициллина в культуральных колбах Эрленмейера (процент засева составлял 2%) и выращивали при 37°C при перемешивании со скоростью 160 об/мин. При достижении оптической плотности культуры бактерий 0,8 опт. ед. вносили изопропил-β-D1-тиогалактопиранозид до концентрации 0,4 mM и выращивали при 23°C и 37°C в течение 4 и 24 ч. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 595 нм. Клеточную биомассу получали центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 4000 об/мин на центрифуге «Avanti JXN-30» («Beckman Coulter»).

#### Выделение *Bst\_Sso7d*, *Bst\_Sso7d\_mut4* и *Btlv\_Sso7d*

Клеточную биомассу (2 г) штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst\_Sso7d, BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst\_Sso7d\_mut4 и BL21 (DE3)pLys/pET16-Btlv\_Sso7d ресуспендировали в буферном растворе 50 mM Трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,5 с 1 mM PMSF в соотношении



1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора «Branson sonifier 250» («Branson Ultrasonics») в течение 20 мин при 4°C (цикл — 0,5 с, амплитуда — 50%). Затем центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге «Allegra X-30R» («Beckman Coulter»). После центрифугирования супернатант разбавляли в 2 раза буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl pH 8,5 и наносили на хроматографический сорбент IMAC FF, предварительно уравновешенный буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl pH 8,5 (буферный раствор А). Очистку от балластных белков проводили буферным раствором А. Целевой белок элюировали линейным градиентом буферного раствора А с 500 мМ имидазолом.

После металл-хелатной хроматографии фракции, содержащие целевой белок, диализовали против буферного раствора 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 0,5% Tween-20, 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,3. После проведения диализа к раствору белка добавляли глицерин до 50%.

#### Определение активности ферментов

РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) активность ферментов определяли с помощью нерадиоактивной методики с флуоресцентной детекцией, основанной на образовании дуплекса полиадениловой РНК и олигонуклеотидного праймера dT18, в который встраивался интеркалирующий краситель GelStar («Lonza»). ДНК-полимеразную активность ферментов определяли с помощью нерадиоактивной методики [27]. В качестве матрицы использовали олигонуклеотид, содержащий на 3'-конце шпильчатую структуру. В присутствии ионов  $Mg^{2+}$  полимеразы катализировали включение дезоксинуклеотидов, тем самым удлиняя матрицу. Описанные нерадиоактивные методики позволяют определять активности ферментов с помощью амплификаторов с оптическим модулем для детекции флуоресценции в режиме реального времени.

Устойчивость ферментов к температурному воздействию оценивали с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии в диапазоне 55–85°C по 1°C на шаг, продолжительность шага составляла 50 с, кривые плавления детектировались по каналу Fam на приборе «CFX 96» («Bio-Rad Laboratories»).

Оптимальные концентрации ионов в реакционной смеси подбирали аналогично анализу полимеразной активности с использованием концентраций KCl в диапазоне 50–500 мМ.

#### Аналитические методы

Концентрацию белка определяли с помощью набора «QuDye Protein» (ООО «Люмипроб РУС») на флуориметре «Qubit 4» («Thermo Scientific»), чистоту белка — с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях [28]. При проведении

ДСН-ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях использовали маркер длин белков — маркер молекулярных масс («ThermoScientific»).

#### Петлевая изотермическая амплификация, совмещённая с обратной транскрипцией

Для оценки потенциальной возможности использования полученных химерных ферментов в составе новых наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний, проводили тестирование на наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (ПУ № РЗН 2021/14599). В качестве образцов использовали генетическую конструкцию, представляющую собой бактериофаг MS2 со специфической вставкой гена *ORF1ab* коронавируса. Реакционные смеси содержали 0,8 мкл тестируемых ферментов в концентрации 0,288 ЕД/мкл или такое же количество Bst-полимеразы без Sso7d-домена, а также ревертазу (MMLv). Каждый образец амплифицировали в 3 повторях на приборе «Rotor-Gene Q» («Qiagen»).

Функциональные свойства ферментов также тестировали в лабораторной методике, предназначенной для определения в биологическом материале РНК вируса эпидемического паротита в формате LAMP с совмещённой обратной транскрипцией. Амплифицировали фрагмент гена фосфопротеина вируса эпидемического паротита (размер ампликона 225 пар оснований, GC-состав 54%). В качестве образцов использовали мочу и мазки со слизистой оболочки ротоглотки, содержание РНК вируса эпидемического паротита (*Mumps virus*) подтверждали секвенированием по методу Сэнгера с помощью набора «BigDye Terminator v. 1.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific») на секвенаторе «3500xL Genetic Analyzer» («Thermo Fisher Scientific»).

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с помощью экспресс-комплекта «ЭДЭМ» (ПУ № 2010/07828), а также лизирующего раствора, содержащего гуанидин гидрохлорид. В качестве контрольного метода экстракции использовали комплект реагентов «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147). Реакционные смеси содержали олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых мишеней, а также интеркалирующий краситель, что позволило регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»; а также смесь глицерина с тиоглицеролом, солями и поверхностно-активными веществами (все использованные дополнительные реагенты разработаны и производятся в ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). В качестве контрольного лота использовали немутированную форму Bst-полимеразы без Sso7d-домена в концентрации по белку, равной концентрации тестируемых ферментов. Реакцию проводили

по программе: 37°C — 5 мин, 65°C — 30 с, 40 циклов с детекцией по каналу FAM (общая продолжительность 25 мин).

### Оценка устойчивости ферментов к ингибиторам LAMP

Для оценки устойчивости ферментов к ингибиторам LAMP использовали муцин («Sigma-Aldrich»), а также предварительно охарактеризованные остаточные образцы биологического материала человека (моча, мазки со слизистой оболочки ротоглотки, плазма и цельная кровь). Мазки со слизистой оболочки ротоглотки содержались в транспортной среде для хранения и транспортировки респираторных мазков (ПУ № ФСР 2009/05011; ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Ингибиторы добавляли в реакционную смесь для LAMP. Реакцию проводили по программе: 37°C — 5 мин, 65°C — 30 с, 40 циклов с детекцией по каналу FAM (общая продолжительность 25 мин). Результаты оценивали по наличию/отсутствию флуоресцентного сигнала (обнаружено/не обнаружено) и величине значений пороговых циклов (Ct), что является достаточным для диагностических систем с качественным определением.

### Результаты

Семейство Sso7d включает в себя небольшие многочисленные неспецифические ДНК-связывающие белки, впервые обнаруженные в гипертермофильной бактерии *Archaea sulfobus*. Они имеют массу 7–10 кДа и обладают различными видами функциональной активности: стабилизация двойной спирали, отжиг ДНК при температуре выше температуры её плавления и предотвращение агрегирования белков. Кроме того, такие белки изменяют конформацию ДНК, вызывая расплетение двойной спирали ДНК [29].

Для получения рекомбинантной Bst-mut4- и Btlv-полимеразы были разработаны уникальные синтетические последовательности с учётом оптимизации частоты встречаемости кодонов для экспрессии в *E. coli*. Далее к генам Bst- и Btlv-полимеразы был присоединён ген *Sso7d*, и такие конструкторы были клонированы в экспрессионный вектор pET16b+ для прокариотической экспрессии в клетках *E. coli*. В ходе подбора штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst\_Sso7d*, *Bst\_Sso7d\_mut4* и *Btlv\_Sso7d* была исследована динамика накопления ферментов при разных температурах (23 и 37°C) и времени индукции белкового биосинтеза (4 и 24 ч). В результате было показано, что все ферменты эффективно нарабатывались в растворимой форме при 23°C в течение 24 ч в клетках *E. coli* BL21 (DE3)pLys (табл. 2–4).

Для очистки ферментов от клеточных белков использовали металл-аффинную хроматографию в линейном градиенте имидазола (рис. 1).

**Таблица 2.** Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst-Sso7d*

| Штамм-носитель <i>E. coli</i> | Условия культивирования | Содержание белка, % | Съём клеточной биомассы, г/л |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------|
| ER2566                        | 23°C, 4 ч               | 10                  | 2,1                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 15                  | 2,3                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 12                  | 2,3                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 12                  | 2,5                          |
| Rosetta De3                   | 23°C, 4 ч               | 23                  | 2,4                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 23                  | 2,6                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 21                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 24                  | 2,9                          |
| BL21 De3 pLys                 | 23°C, 4 ч               | 23                  | 2,7                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 25                  | 3,14                         |
|                               | 37°C, 4 ч               | 24                  | 2,9                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 21                  | 3,2                          |

Фракции с чистотой более 90% объединяли и проводили диализ против буферного раствора 20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 0,5% Твин-20, 0,1 мМ ЭДТА pH 8,3 с последующим концентрированием. По данным электрофоретического анализа чистота фермента составила не менее 90% (рис. 2) с концентрацией не менее 2 мг/мл.

Стоит отметить, что, несмотря на более высокий процент содержания белка от общей массы влажных клеток: в случае экспрессии Bst\_Sso7d — 25% против 23% для Bst\_Sso7d\_mut4 и Btlv\_Sso7d, после очистки более высокие выходы демонстрировали последние два фермента. Это связано с тем, что оптимизация состава кодонов кодирующей последовательности приводит к увеличению выхода белка в растворимой форме.

Тестирование полимеразной активности выделенных ферментов Bst\_Sso7d, Bst\_Sso7d\_mut4 и Btlv\_Sso7d проводили на образцах ПНК бактериофага MS2 со специфической вставкой, содержащей фрагмент генома SARS-CoV-2, методом LAMP с обратной транскрипцией с использованием реагентов, входящих в состав набора «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT». Концентрация матрицы составляла 10<sup>5</sup> копий в реакцию. Все новые ферменты проявляли полимеразную активность, однако средние значения пороговых циклов отличались от контрольного лота Bst-полимеразы без Sso7d-домена в сторону увеличения значений в среднем на 3,73 для Bst\_Sso7d, на 3,42 для Bst\_Sso7d\_mut4 и 2,88 для Btlv\_Sso7d (рис. 3), что может свидетельствовать о неоптимальных условиях реакции для новых ферментов.

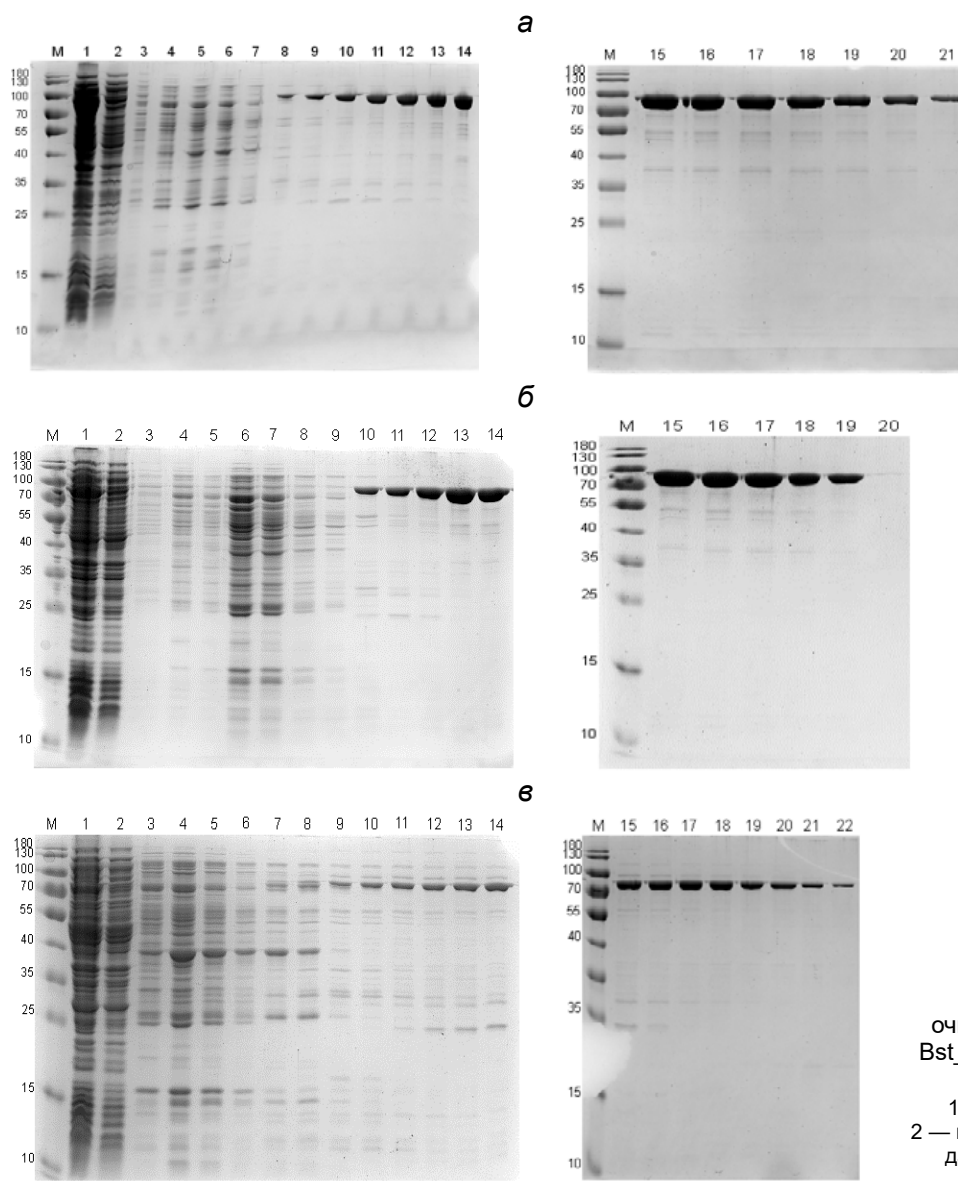
Все исследуемые ферменты показали сопоставимые результаты в экспериментах по оценке их устойчивости к температурному воздействию (рис. 4).

**Таблица 3.** Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов *Bst\_Sso7d\_mut4*

| Штамм-носитель <i>E. coli</i> | Условия культивирования | Содержание белка, % | Съём клеточной биомассы, г/л |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------|
| ER2566                        | 23°C, 4 ч               | 10                  | 2,1                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 11                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 14                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 16                  | 1,7                          |
| Rosetta De3                   | 23°C, 4 ч               | 19                  | 2,2                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 21                  | 2,4                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 21                  | 2,3                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 22                  | 2,5                          |
| BL21 De3 pLys                 | 23°C, 4 ч               | 21                  | 2,1                          |
|                               | <b>23°C, 24 ч</b>       | <b>23</b>           | <b>2,6</b>                   |
|                               | 37°C, 4 ч               | 21                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 20                  | 2,7                          |

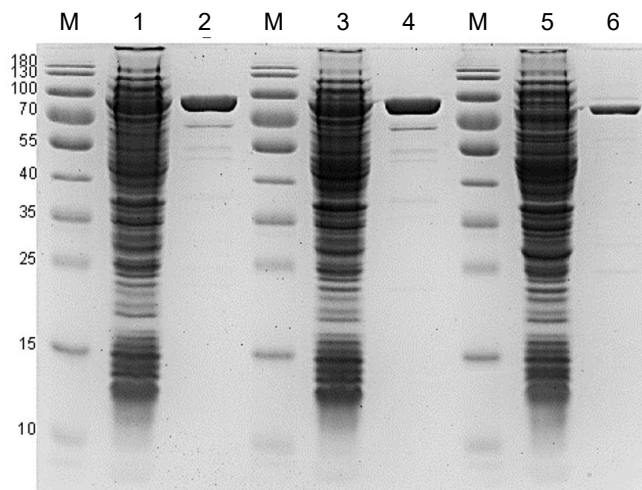
**Таблица 4.** Подбор штаммов-носителей для экспрессии генов *Btlv\_Sso7d*

| Штамм-носитель <i>E. coli</i> | Условия культивирования | Содержание белка, % | Съём клеточной биомассы, г/л |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------|
| ER2566                        | 23°C, 4 ч               | 18                  | 2,0                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 16                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 16                  | 2,4                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 14                  | 2,8                          |
| Rosetta De3                   | 23°C, 4 ч               | 18                  | 2,3                          |
|                               | 23°C, 24 ч              | 17                  | 2,4                          |
|                               | 37°C, 4 ч               | 19                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 19                  | 2,7                          |
| BL21 De3 pLys                 | 23°C, 4 ч               | 21                  | 2,4                          |
|                               | <b>23°C, 24 ч</b>       | <b>23</b>           | <b>2,5</b>                   |
|                               | 37°C, 4 ч               | 23                  | 2,5                          |
|                               | 37°C, 24 ч              | 21                  | 2,7                          |



**Рис. 1.** Электрофореграмма очистки ферментов *Bst\_Sso7d* (а), *Bst\_Sso7d\_mut4* (б) и *Btlv\_Sso7d* (в).

М — маркер молекулярных масс;  
1 — осветлённый клеточный лизат;  
2 — пропуск с металл-хелатного сорбента;  
далее — фракции после аффинной хроматографии.



**Рис. 2.** Электрофореграмма очистки ферментов Bst\_Sso7d\_mut4, Bst\_old\_Sso7d и Btlv\_Sso7d.

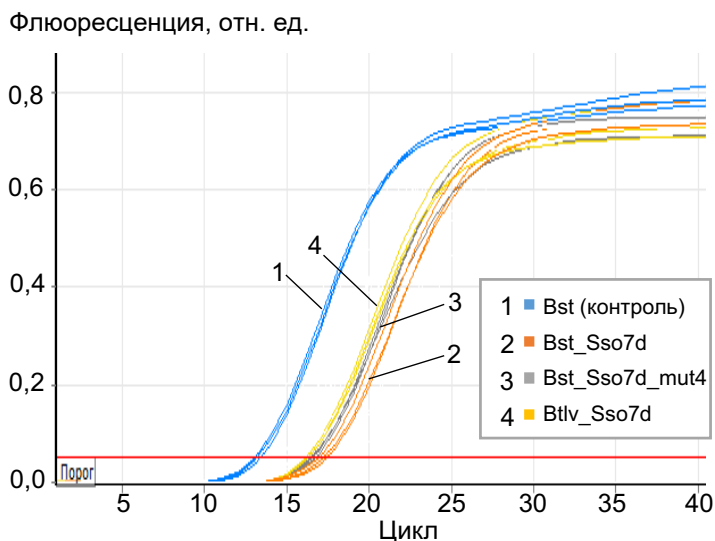
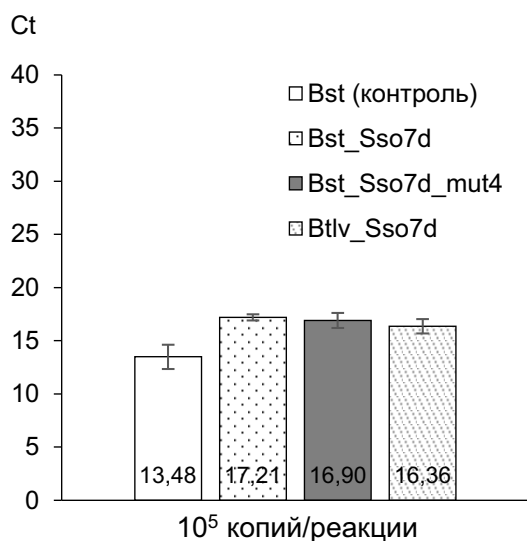
M — маркер молекулярных масс; 1, 3, 5 — осветлённый клеточный лизат Bst\_Sso7d\_mut4, Bst\_Sso7d и Btlv\_Sso7d соответственно; 2, 4, 6 — конечный очищенный препарат ферментов Bst\_Sso7d\_mut4, Bst\_Sso7d и Btlv\_Sso7d соответственно.

Выделенные ферменты Bst\_Sso7d, Bst\_mut4\_Sso7d и фермент сравнения проявляли слабую РНК-зависимую ДНК-полимеразную (ревертазную) активность как в методике [7], так и при тестировании в наборе «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» без использования фермента ревертазы. Вместе с тем Btlv\_Sso7d-полимераза проявляла ревертазную активность, сравнимую с активностью ревертазы (MMLv), но только в присутствии KCl и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , что позволяет использовать фермент не только для амплификации ДНК/кДНК, но и для обратной транскрипции РНК. Изменение состава реакционной смеси (главным образом, добавление KCl) позволило добиться увеличения полимеразной ак-

тивности всех химерных ферментов, оптимальная концентрация KCl в буфере для LAMP составила 200 mM (рис. 5).

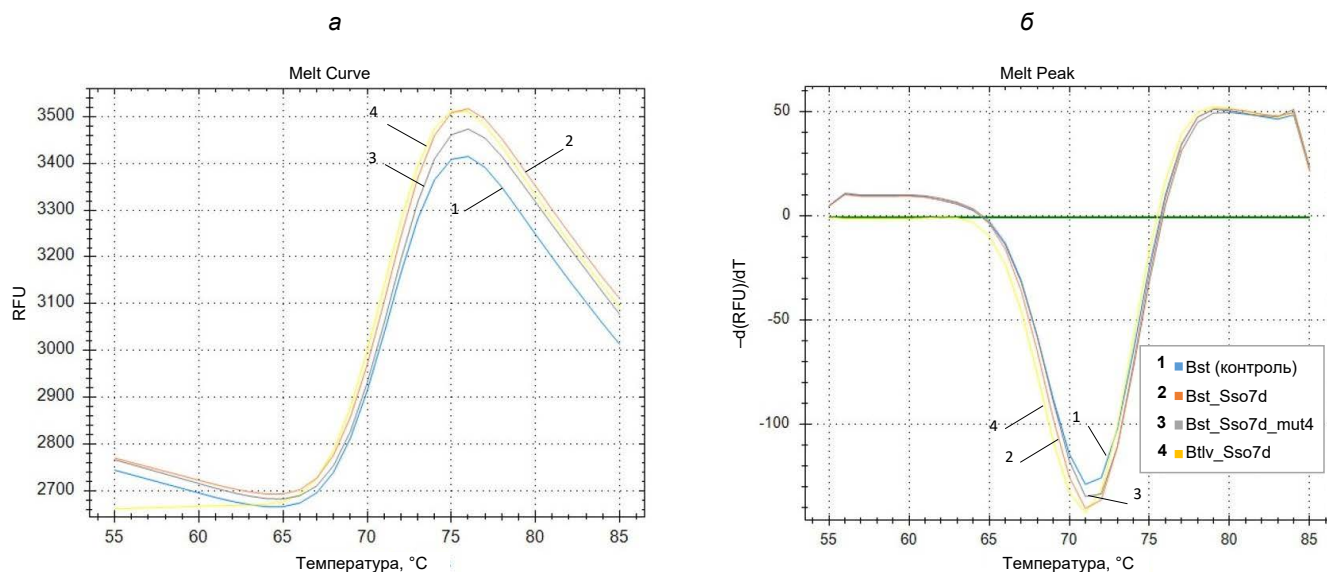
Наборы реагентов на основе LAMP позволяют сократить время амплификации с 1,5–2,5 ч (метод ПЦР) до 25–40 мин, при этом имеют высокую специфичность за счёт использования 4–6 олигонуклеотидов. Однако процесс экстракции нуклеиновых кислот из биологического материала по-прежнему является достаточно длительным. Исследуемые образцы обрабатываются лизирующим раствором, вследствие чего происходит разрушение клеточных стенок бактерий и вирусных оболочек с последующим высвобождением в раствор компонентов клетки и нуклеиновых кислот. Применение в протоколе экстракции последующих отмывок приводит к удалению из раствора веществ и компонентов клетки, которые ингибируют ПЦР. Экспресс-методы отличаются отсутствием этапа отмывки либо наличием всего одной отмывки: клинический материал, взятый в специальную транспортную среду (например, «ТС-ЭДЭМ»), подвергается термической обработке и центрифугированию, в результате чего нерастворимые компоненты осаждаются, а нуклеиновые кислоты, остающиеся в надосадочной жидкости, используются для проведения ПЦР. Однако после обеззараживания без экстракции или после экспресс-экстракции образцы РНК/ДНК содержат примеси, которые могут служить ингибиторами ПЦР, например, компоненты транспортных сред, лизирующего раствора, крови, мазков, мочи и других биоматериалов.

Функциональные свойства полученных в работе полимераз были проверены на устойчивость к наиболее часто встречающимся ингибиторам (компонентам цельной крови, плазмы крови, мочи, му-



**Рис. 3.** Оценка активности полученных полимераз в наборе реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (средние значения порогового цикла).





**Рис. 4.** Термостабильность химерных полимераз.

а — профили термической денатурации; б — производные величины флуоресценции от температуры.

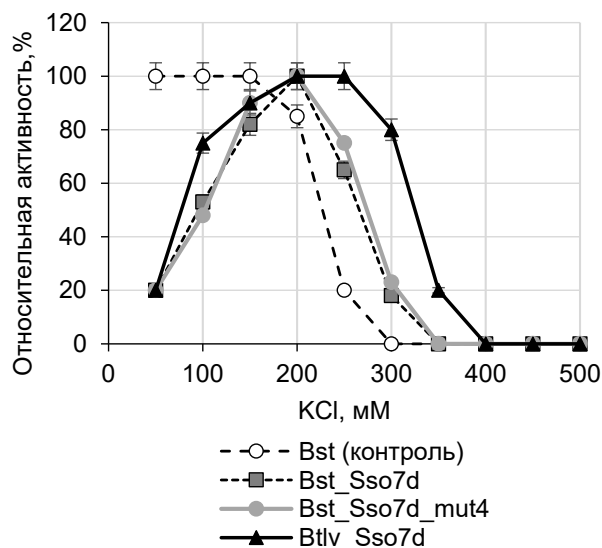
цину) в реакции LAMP в модельной системе с использованием положительных контрольных образцов. Ингибиторы добавляли в реакционную смесь, содержащую праймеры из набора реагентов «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» и выделенную РНК бактериофага MS2 со специфической вставкой, содержащей фрагмент генома SARS-CoV-2. Результаты оценивали по наличию/отсутствию флуоресцентного сигнала («обнаружено»/«не обнаружено»), что является достаточным для диагностических систем с качественным определением (табл. 5).

Модифицированные ферменты на основе Bst-полимеразы, содержащие ДНК-связывающий домен Sso7D: Bst\_Sso7d и Bst\_Sso7d\_mut4, продемонстрировали сниженную устойчивость к присутствию в реакционной смеси цельной крови и мочи по сравнению с контрольным ферментом. В то же время фермент Btlv\_Sso7d характеризуется более высокой устойчивостью к присутствию цельной крови (10 об. %), плазмы (1 об. %), мочи (10 об. %). Все ферменты сохраняют свою активность в присутствии муцина до 0,5 мг/мл.

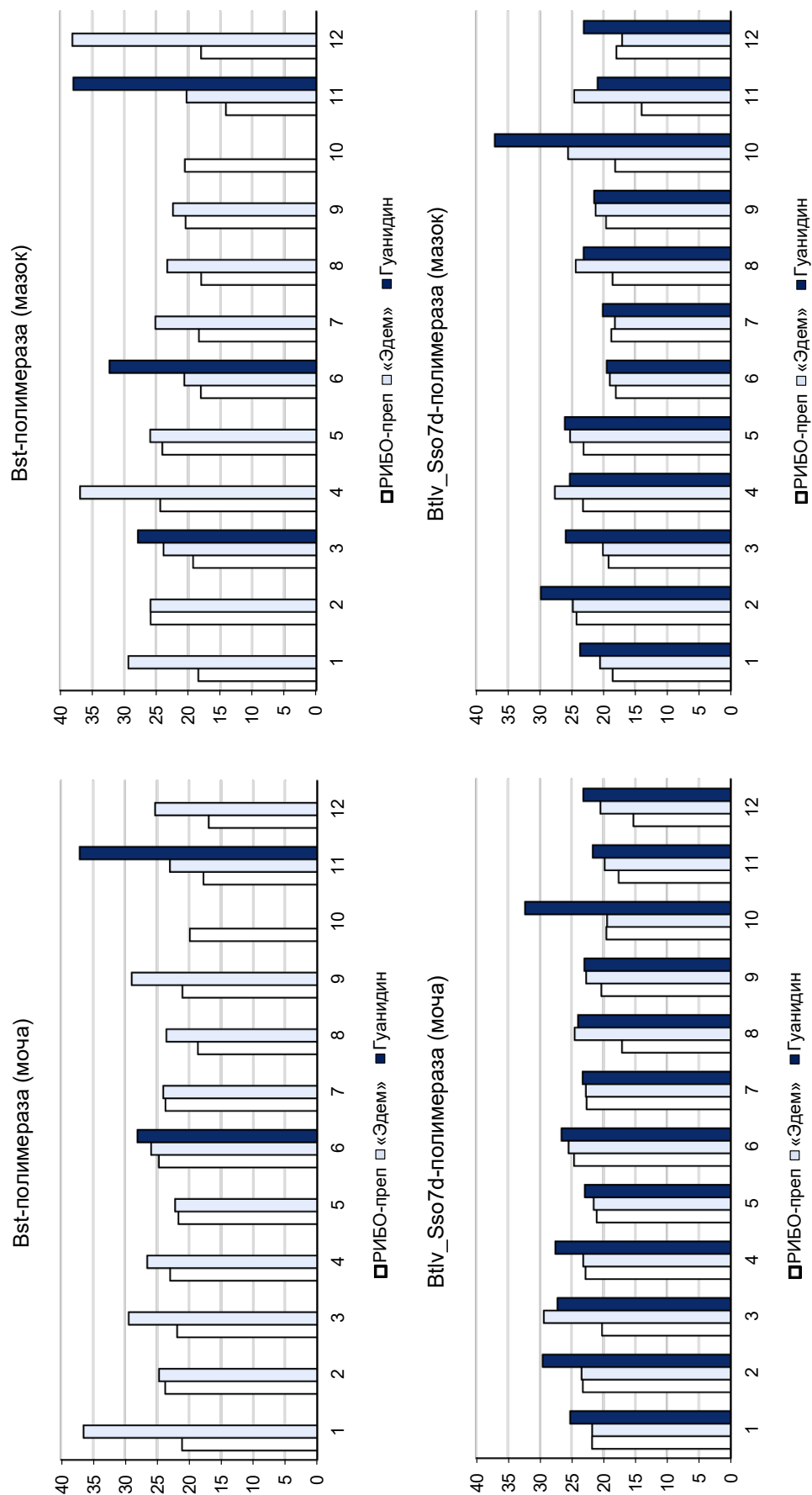
Дальнейшие эксперименты по определению влияния ингибиторов на эффективность реакции LAMP проводились только с использованием фермента Btlv\_Sso7d. Устойчивость полимеразы Btlv\_Sso7d к ингибиторам из биоматериала (слизь из ротоглоточных мазков, соли из мочи), компонентам транспортной среды (транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (ПУ № ФСП 2009/05011)) и лизирующего раствора (1М гуанидина гидрохлорида) была также протестирована на 12 клинических образцах мочи и 12 образцах мазков со слизистой оболочки ротоглотки, содержащих РНК вируса эпидемического паротита

в концентрации  $10^5$ – $10^8$  копий/мл, выделенных тремя различными методами: методом, основанным на преципитации с использованием набора «РИБО-преп»; экспресс-методом «ЭДЭМ»; обработкой раствором 1М гуанидина гидрохлорида (для обеззараживания биоматериала) без последующих отмывок. Далее все выделенные образцы сравнивали в методике LAMP без добавления ревертазы (MMLV) (рис. 6).

При использовании Btlv\_Sso7d-полимеразы, в отличие от контрольного фермента, реакция LAMP сохраняет свою эффективность во всех изученных условиях, а все биологические образцы, содержащие РНК вируса эпидемического паротита



**Рис. 5.** Оптимальная концентрация KCl для химерных полимераз.



**Рис. 6.** Выявление вируса эпидемического паротита в биологических образцах с помощью LAMP с использованием различных полимераз без добавления ревертазы.

**Таблица 5.** Сравнение влияния ингибиторов на обнаружение РНК вируса эпидемического паротита при использовании тестируемых ферментов

| Ингибиторы           |              | Обнаружение РНК вируса эпидемического паротита |           |                |            |
|----------------------|--------------|------------------------------------------------|-----------|----------------|------------|
| название             | концентрация | Bst-полимераза (контроль)                      | Bst_Sso7d | Bst_Sso7d_mut4 | Btlv_Sso7d |
| Цельная кровь, об. % | 0            | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 0,5          | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 1,0          | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 2,5          | +                                              | –         | –              | +          |
|                      | 5,0          | +                                              | –         | –              | +          |
|                      | 10,0         | –                                              | –         | –              | +          |
| Плазма крови, об. %  | 0            | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 1            | –                                              | –         | –              | +          |
| Муцин, мг/мл         | 0            | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 0,2          | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 0,5          | +                                              | +         | +              | +          |
| Моча, об. %          | 0            | +                                              | +         | +              | +          |
|                      | 5            | +                                              | –         | –              | +          |
|                      | 10           | –                                              | –         | –              | +          |

та использованные в работе, идентифицируются как положительные. Наблюдается также не такое значительное повышение значений Ct при анализе образцов после выделения нуклеиновых кислот экспресс-методом «ЭДЭМ», как в случае контрольного фермента. Всё это показывает, что полимеразы Btlv\_Sso7d обладает достаточной ревертазной активностью и повышенной толерантностью к ингибиторам для качественного обнаружения РНК вируса эпидемического паротита (рис. 6).

За счёт более высокой толерантности к ингибиторам применение новой Btlv\_Sso7d-полимеразы в реакциях изотермической амплификации на основе метода LAMP в сочетании с экспресс-методами экстракции нуклеиновых кислот, которые включают только этап лизиса, позволит вывести молекулярную диагностику на новый уровень скорости и сделать возможным применение тестов на основе LAMP в полевых условиях или «у постели больного».

### Обсуждение

Метод LAMP является перспективным направлением в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний. Основное достоинство метода — это более короткое время анализа: этап амплификации занимает всего 25–40 мин, а чувствительность и специфичность метода при этом сопоставимы с методом ПЦР [1, 2]. Изотермический режим проведения реакции позволяет использовать более простое оборудование для проведения реакции: термостат с модулем детекции флуоресценции вместо амплификатора.

Кроме этапа собственно амплификации, любой анализ чаще всего включает этап выделения нуклеиновых кислот.

Выделение нуклеиновых кислот проводится с целью избавления от основных ингибиторов амплификации, которые могут присутствовать в биологических образцах. В среднем, в зависимости от используемого метода, этап выделения может занимать от 1 до 3 ч. Сокращение этой стадии за счёт применения экспресс-методов выделения нуклеиновых кислот (10–30 мин) позволит существенно снизить общее время исследования. Для успешной реализации такой стратегии необходимы разработка и применение ферментов, устойчивых к основным ингибиторам амплификации.

Полученные в работе Bst-полимеразы, содержащие ДНК-связывающий домен Sso7D: Bst\_Sso7d и Bst\_Sso7d\_mut4 продемонстрировали сниженную устойчивость к присутствию в реакционной смеси цельной крови и мочи по сравнению с контрольным ферментом, не содержащим дополнительных доменов. В то же время фермент Btlv\_Sso7d характеризуется более высокой устойчивостью к присутствию цельной крови (10 об. %), плазмы (1 об. %), мочи (10 об. %). Все ферменты сохраняют свою активность в присутствии муцина до 0,5 мг/мл. Эти данные демонстрируют, что добавление ДНК-связывающего домена не привело к повышению устойчивости к ингибирующему эффекту мочи и цельной крови в случае Bst-полимеразы. В литературе опубликованы подобные работы, свидетельствующие об обратном эффекте при использовании различных Bst-подобных полимераз [17, 18, 30, 31]. Однако родственный химерный фермент Btlv\_Sso7d, полученный в данной работе, демонстрирует высокую устойчивость к ингибирующему эффекту компонентов цельной крови, плазмы и мо-

чи на реакцию LAMP. Такая разница результатов может объясняться особенностями генно-инженерных конструкций, наличием или отсутствием дополнительных спейсеров между ДНК-связывающим доменом и полимеразой, структурой этих спейсеров, условиями культивирования и очистки рекомбинантных белков. Полученные данные демонстрируют необходимость дальнейших детальных исследований в данной области для определения влияния ДНК-связывающих доменов на свойства химерных ферментов в каждом конкретном случае и определения взаимосвязей между структурой и функциями химерных ферментов.

### Заключение

В бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* получены рекомбинантные химерные ферменты с вытесняющей активностью: Bst\_Sso7d, Bst\_Sso7d\_mut4 и Btlv\_Sso7d. Разработанные протоколы получения и очистки позволяют получать ферменты в растворимой форме с выходом до 25% от всей собранной клеточной массы. В реакциях LAMP химерные полимеразы продемонстрировали сходную активность с Bst-полимеразой без Sso7d-домена. Вместе с тем Btlv\_Sso7d-полимераза характеризуется повышенной ревертазной активностью и устойчивостью к ингибиторам, что позволяет использовать её в наборах реагентов для диагностики инфекционных заболеваний методом LAMP в сочетании с экспресс-экстракцией нуклеиновых кислот путём термоинактивации или лизиса в присутствии гуанидина хлорида без последующих отмывок от компонентов биоматериала и лизирующего раствора. Это позволяет существенно сократить время проведения анализа.

По мере роста потребности в быстрой и точной диагностике инфекционных заболеваний использование методов LAMP, а следовательно, и аналогов Bst-полимеразы с улучшенными свойствами, будет только увеличиваться.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Рубель М.С., Дубровина И.А., Мясников В.А. и др. Сравнительная характеристика современных экспресс-методов диагностики инфекционных заболеваний, основанных на методе изотермической полимеразной цепной реакции. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2018;(1):160–3. Rubel M.S., Dubrovina I.A., Miasnikov V.A., et al. Comparative characteristics of modern express methods of diagnosing infectious diseases base on isothermal PCR technology. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018;(1):160–3. EDN: <https://elibrary.ru/emrzyi>
2. Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачев А.Л., Носков А.К. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):126–38. Chemisova O.S., Tsyurulina O.A., Trukhachev A.L., Noskov A.K. Comparative analysis of methods for isothermal amplification of nucleic acids. *Journal Of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(1):126–38. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176> EDN: <https://elibrary.ru/qbqrwj>
3. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
4. Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачёва А.В. и др. Быстрая диагностика генитального герпеса методом петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(6):40–6. Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., et al. Rapid diagnostics of genital herpes by loop-mediated isothermal amplification method with fluorescent detection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(6):40–6. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46> EDN: <https://elibrary.ru/yskkek>
5. Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В. и др. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6):417–24. Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitev K.V., et al. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology*. 2022;66(6): 417–24. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86> EDN: <https://elibrary.ru/bsgdlo>
6. Shirshikov F.V., Bespyatykh J.A. Loop-mediated isothermal amplification: from theory to practice. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022;48(6):1159–74. DOI: <https://doi.org/10.1134/S106816202206022X>
7. Пика М.И., Михеева О.О., Соловьёва Е.Д. и др. Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):210–8. Pika M.I., Mikheeva O.O., Solovyova E.D., et al. Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(3):210–8. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-364> EDN: <https://elibrary.ru/phcmoq>
8. Wada K., Suzuki H. Biotechnological platforms of the moderate thermophiles, *Geobacillus* species: notable properties and genetic tools. In: Salwan R., Sharma V., eds. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. Academic Press; 2020:195–218. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-03860-8>
9. 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*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1977;475(1):32–41. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(77\)90336-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(77)90336-7)
10. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 1976;127(3):1550–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976>
11. Ocorbin I., Filipenko M. Bst polymerase – a humble relative of Taq polymerase. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023;21:4519–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.09.008>
12. Li P., Amenov A., Kalendar R., et al. Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from *geobacillus stearothermophilus* and application in isothermal DNA amplification. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* 2017;(1):50–8. EDN: <https://elibrary.ru/zbenmt>
13. Ocorbin 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.



ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Mol. Biotechnol.* 2015;57(10):947–59.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>
14. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.* 2014;5:395.  
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00395>
15. Wang Y., Prosen D.E., Mei L., et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):1197–207.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
16. Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020;412(9):2009–23.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
17. Ocorbin I.P., Belousova E.A., Boyarskikh U.A., et al. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(16):9595–610.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx645>
18. Li J., Li Y., Li Y., et al. An enhanced activity and thermostability of chimeric Bst DNA polymerase for isothermal amplification applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2023;107(21):6527–40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12751-6>
19. Yu Z., Wang J. Strategies and procedures to generate chimeric DNA polymerases for improved applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2024;108(1):445.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13276-2>
20. Paik I., Bhadra S., Ellington A.D. Charge engineering improves the performance of Bst DNA polymerase fusions. *ACS Synth. Biol.* 2022;11(4):1488–96.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00559>
21. Ordóñez C.D., Lechuga A., Salas M., Redrejo-Rodríguez M. Engineered viral DNA polymerase with enhanced DNA amplification capacity: a proof-of-concept of isothermal amplification of damaged DNA. *Sci. Rep.* 2020;10(1):15046.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71773-6>
22. Coulther T.A., Stern H.R., Beuning P.J. Engineering polymerases for new functions. *Trends Biotechnol.* 2019;37(10):1091–103.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.011>
23. Lischer K., Tansil K.P., Ginting M.J., et al. Cloning of DNA Polymerase I *Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734 from a Batu Kuwung Hot Spring in *Escherichia coli*. *Int. J. Technol.* 2020;11(5):921–30.  
DOI: <https://doi.org/10.14716/ijtech.v11i5.4311>
24. Gaultier N.E., Junqueira A.C.M., Uchida A., et al. Genome sequence of *Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734, isolated from Singapore air. *Genome Announc.* 2018;6(27):e00636–18.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.00636-18>
25. Xiong A.S., Yao Q.H., Peng R.H., et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e98. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gnh094>
26. Черкашина А.С., Михеева О.О., Пика М.И. и др. Способ получения большого фрагмента Bst-полимеразы (варианты). Патент РФ № 2 809 366;2023. Cherkashina A.S., Mikheeva O.O., Pika M.I., et al. Method for obtaining a large fragment of Bst polymerase (variants). Patent RF № 2 809 366;2023.
27. Брагин А.Г., Глушков С.А., Иванов М.К. и др. Определение ДНК-полимеразной и нуклеазной активностей ДНК-зависимых полимераз с использованием флуоресцентной детекции в режиме реального времени. *Биохимия.* 2008;73(9):1252–64. EDN: <https://elibrary.ru/jubdgz> Bragin A.G., Glushkov S.A., Ivanov M.K., et al. Determination of DNA polymerase and nuclease activities of DNA-dependent polymerases using real-time fluorescent detection. *Biochemistry.* 2008;73(9):1007–17.  
DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297908090083>  
EDN: <https://elibrary.ru/liwvvl>
28. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
29. Napoli A., Zivanovic Y., Bocs C., et al. DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):2656–62. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkf377>
30. Xiang R., Liu G.Y., Hou Y., et al. Double domain fusion improves the reverse transcriptase activity and inhibitor tolerance of Bst DNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2024;274(Pt. 1):133243.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133243>
31. Hernández-Rollán C., Ehrmann A.K., Vlassis A., et al. Neq2X7: a multi-purpose and open-source fusion DNA polymerase for advanced DNA engineering and diagnostics PCR. *BMC Biotechnol.* 2024;24(1):17.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00844-7>

**Информация об авторах**

**Замотаева Татьяна Львовна**<sup>✉</sup> — н. с., Центр разработки, развития продукции и инноваций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [sazonova@pcr.ms](mailto:sazonova@pcr.ms), <https://orcid.org/0009-0003-9799-3749>

**Дедяева Екатерина Александровна** — старший технолог-разработчик, Центр разработки, развития продукции и инноваций, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [safronova.e@cmd.su](mailto:safronova.e@cmd.su), <https://orcid.org/0000-0002-2501-0956>

**Михеева Ольга Олеговна** — н. с., научная группа генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [olga.mikheeva.92@mail.ru](mailto:olga.mikheeva.92@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

**Пика Мария Игоревна** — м. н. с., научная группа генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [m.zotova@cmd.su](mailto:m.zotova@cmd.su), <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

**Черкашин Евгений Александрович** — канд. хим. наук, рук. Центра разработки, развития продукции и инноваций ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [e.cherkashin@pcr.ms](mailto:e.cherkashin@pcr.ms), <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

**Черкашина Анна Сергеевна** — канд. хим. наук, рук. научной группы генной инженерии и биотехнологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ Эпидемиологии

**Information about the authors**

**Tatyana L. Zamotaeva**<sup>✉</sup> — researcher, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [sazonova@pcr.ms](mailto:sazonova@pcr.ms), <https://orcid.org/0009-0003-9799-3749>

**Ekaterina A. Dedyeva** — technologist-developer, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [safronova.e@cmd.su](mailto:safronova.e@cmd.su), <https://orcid.org/0000-0002-2501-0956>

**Olga O. Mikheeva** — researcher, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [olga.mikheeva.92@mail.ru](mailto:olga.mikheeva.92@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

**Maria I. Pika** — researcher, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [m.zotova@cmd.su](mailto:m.zotova@cmd.su), <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

**Evgeny A. Cherkashin** — Cand. Sci. (Chem.), Head, Center for development, product development and innovation, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [e.cherkashin@pcr.ms](mailto:e.cherkashin@pcr.ms), <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

**Anna S. Cherkashina** — Cand. Sci. (Chem.), Head, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [cherkashina@pcr.ms](mailto:cherkashina@pcr.ms), <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

Роспотребнадзора, Москва, Россия, [cherkashina@pcr.ms](mailto:cherkashina@pcr.ms),  
<https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

*Акимкин Василий Геннадьевич* — д-р мед. наук, проф., академик РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия, [v.akimkin@cmd.su](mailto:v.akimkin@cmd.su),  
<https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

**Участие авторов:** *Замотаева Т.Л.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Дедяева Е.А., Пика М.И.* — проведение экспериментов; *Михеева О.О.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Черкашин Е.А., 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.

Статья поступила в редакцию 30.04.2025;  
принята к публикации 16.06.2025;  
опубликована online 10.08.2025

*Vasily G. Akimkin* — Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, [v.akimkin@cmd.su](mailto:v.akimkin@cmd.su),  
<https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

**Author contribution:** *Zamotaeva T.L.* — the study concept and design, conducting of the experiments, collecting, analyzing and interpreting of the data, preparing of the text; *Dedyeva E.A., Pika M.I.* — conducting of the experiments; *Mikheeva O.O.* — conducting experiments, collecting, analyzing and interpreting of the data, preparing of the text; *Cherkashin E.A., Cherkashina A.S.* — the study concept and design, preparing of the text; *Akimkin V.G.* — final approval of the article for publication. All authors made a final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.04.2025;  
accepted for publication 16.06.2025;  
published online 10.08.2025