



(51) МПК
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/70 (2021.08); *C12N 9/14* (2021.08); *C07K 14/195* (2021.08); *B01D 15/36* (2021.08); *B01D 15/08* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2020143359, 28.12.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2020
 Дата регистрации:
 17.12.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2020

(45) Опубликовано: 17.12.2021 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева,
 8, Пестряков Павел Ефимович

(72) Автор(ы):

 Оскорбин Игорь Петрович (RU),
 Храпов Евгений Александрович (RU),
 Филипенко Максим Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

 Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Институт химической
 биологии и фундаментальной медицины
 Сибирского отделения Российской академии
 наук (ИХБФМ СО РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: SCHONBRUNNE N.J. et al., Chimeric
 Thermostable DNA Polymerases with Reverse
 Transcriptase and Attenuated 3'-5' Exonuclease
 Activity, *Biochemistry*, 2006, Vol.45, N42,
 pp.12786-12795. STAMOS J.L. et al., Structure of
 a Thermostable Group II Intron Reverse
 Transcriptase with Template-Primer and Its
 Functional and Evolutionary Implications, *Mol
 Cell*, (см. прод.)

(54) Рекомбинантная химерная обратная транскриптаза, обладающая повышенной процессивностью и устойчивостью к ингибиторам амплификации, и способ ее получения

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области генетической инженерии, конкретно к биотехнологии. В изобретении раскрыта рекомбинантная химерная обратная транскриптаза, обладающая повышенной

процессивностью и устойчивостью к ингибиторам амплификации. Также раскрыт способ получения данной химерной обратной транскриптазы. 2 н.п. ф-лы, 3 ил., 1 табл., 5 пр.

(56) (продолжение):

2017, Vol.68, N5, pp.926-939. ZHAO C. et al., An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron, *RNA*, 2018, Vol.24, N2, 183-195. MOHR S. et al., Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing, *RNA*, 2013, Vol.19, N7, pp.958-70. ЛУКЪЯНОВ К.А. и др., Метод получения нормализованных библиотек кДНК, основанный на эффекте супрессии полимеразной цепной реакции, *БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ*, 1996, т.22, н.9, стр.686-690. ARMENTANO D. et al., Effect of internal viral sequences on the utility of retroviral vectors, *Journal of Virology*, 1987, Vol.61, N5, pp.1647-1650.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)

2 762 291 (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/70 (2021.08); *C12N 9/14* (2021.08); *C07K 14/195* (2021.08); *B01D 15/36* (2021.08); *B01D 15/08* (2021.08)

(21)(22) Application: **2020143359, 28.12.2020**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2020

Registration date:
17.12.2021

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2020**

(45) Date of publication: **17.12.2021 Bull. № 35**

Mail address:

**630090, g. Novosibirsk, pr. Ak. Lavrenteva, 8,
Pestryakov Pavel Efimovich**

(72) Inventor(s):

**Oskorbin Igor Petrovich (RU),
Khrapov Evgenii Aleksandrovich (RU),
Filipenko Maksim Leonidovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe
uchrezhdenie nauki Institut khimicheskoi
biologii i fundamentalnoi meditsiny Sibirskogo
otdeleniia Rossiiskoi akademii nauk (IKhBFM
SO RAN) (RU)**

(54) **RECOMBINANT CHIMERIC REVERSE TRANSCRIPTASE EXHIBITING INCREASED PROCESSIVITY AND RESISTANCE TO AMPLIFICATION INHIBITORS, AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to the field of genetic engineering, specifically, to biotechnology. Disclosed in the invention is a recombinant chimeric reverse transcriptase exhibiting increased processivity and resistance to amplification

inhibitors. Also disclosed is a method for producing the chimeric reverse transcriptase.

EFFECT: production of a recombinant chimeric reverse transcriptase with increased processivity.

2 cl, 3 dwg, 1 tbl, 5 ex

RU 2 762 291 C1

RU 2 762 291 C1

Группа изобретений относится к области генетической инженерии, конкретно к биотехнологии, и может быть использована для выявления РНК-содержащих вирусов.

Методы ферментативного анализа нуклеиновых кислот являются неотъемлемой частью современных фундаментальных исследований и прикладных дисциплин, включая медицинскую и ветеринарную диагностику. Среди них важное место занимает ферментативный синтез РНК по матрице ДНК, т.е. обратная транскрипция, позволяющая анализировать тотальный набор РНК или отдельные молекулы РНК в разных клеточных образцах. С точки зрения фундаментальных исследований обратная транскрипция даёт возможность перевести РНК в более удобную для анализа и более стабильную форму нуклеиновой кислоты - комплементарную ДНК, кДНК [1]. Анализ кДНК предоставляет информацию о внутриклеточных процессах на уровне транскрипции отдельных генов или генома в целом, а также позволяет детектировать присутствие отдельных молекул РНК. Последнее обстоятельство послужило причиной широкого использования обратной транскрипции в сочетании с различными методами детекции и анализа молекул ДНК, например, ПЦР и секвенирования, в диагностических целях для выявления патогенов, в первую очередь, РНК-содержащих вирусов, по наличию специфических молекул РНК [2,3].

Ключевым компонентом обратной транскрипции являются ферменты, а именно РНК-зависимые ДНК-полимеразы или обратные транскриптазы, способные по матрице РНК синтезировать ДНК. В контексте практического использования обратных транскриптаз большое значение приобретает ряд их ферментативных характеристик, таких как термостабильность, специфический оптимум рабочей температуры, точность, процессивность и устойчивость к ингибиторам. Улучшение этих свойств повышает количество и качество синтезируемой комплементарной ДНК, что облегчает, в свою очередь, последующий анализ кДНК. Так, термостабильность в сочетании с высокой рабочей температурой позволяет проводить обратную транскрипцию в условиях, когда денатурирована вторичная структура РНК, в результате чего увеличивается эффективность обратной транскрипции [4]. Таким образом, удаётся преодолеть проблему анализа РНК со сложной вторичной структурой (в аспекте медицинской диагностики – геномной РНК вирусов), которая с трудом поддаётся конвертации в комплементарную ДНК. Высокие процессивность и точность позволяют получать протяжённые фрагменты кДНК с нуклеотидной последовательностью, максимально приближенной к нуклеотидной последовательности анализируемой РНК [5]. Последнее обстоятельство особенно важно в контексте поиска соматических мутаций, в том числе перестроек, затрагивающих протоонкогены, такие как *ALK*, *ROS1* [6,7]. Анализируемые препараты РНК могут содержать ингибирующие примеси, представляющие собой компоненты биоматериала, из которого препарат РНК был выделен, либо реагенты, использовавшиеся при очистке. Устойчивость к ингибиторам позволит повысить надёжность диагностических тестов с использованием обратной транскриптазы за счёт уменьшения вероятности ложноотрицательных результатов, спровоцированных наличием ингибиторов [8].

В настоящее время наиболее часто используются обратные транскриптазы вируса лейкемии птиц (AMV) и вируса лейкемии мышей Молони (M-MuLV). Однако оба эти фермента не полностью отвечают требованиям, выдвигаемым практическими приложениями, а именно высокой термостабильностью, оптимальной рабочей температурой, устойчивостью к ингибиторам, точностью синтеза ДНК, процессивностью [9,10].

Позднее Yasukawa К. с соавторами [11–13] были обнаружены другие аминокислотные

замены, которые также приводили к увеличению оптимальной рабочей температуры и термостабильности M-MuI V и AMV. Однако и в этом случае эффект также зависел от наличия в реакционной смеси праймированной РНК-матрицы. Аналогичные результаты были получены и с другим набором мутаций в работе Baranauskas A. с соавторами в 2012 г [14]. Основываясь на этих наблюдениях, можно предположить, что одним из основных факторов, влияющих на термостабильность обратной транскриптазы M-MuI V, является аффинность фермента к праймированной РНК-матрице.

Увеличение аффинности ферментов к нуклеиновым кислотам можно достичь присоединением дополнительных ДНК- или РНК-связывающих белковых доменов. Ранее этот подход был успешно применён для получения процессивных химерных ДНК-полимераз на основе Pfu-полимеразы, Taq-полимеразы, Bst-полимеразы [15,16]. Кроме того, присоединение дополнительных белковых доменов увеличивает диапазон концентраций моно- и дивалентных катионов, необходимых для реализации ДНК-полимеразной активности [15], и увеличивает устойчивость ДНК-полимераз к действию ингибиторов [16].

Альтернативный подход к созданию обратных транскриптаз с повышенными процессивностью и термостабильностью заключается в использовании мутантных форм термостабильных ДНК-полимераз, способных использовать РНК в качестве матрицы при синтезе ДНК.

Известно, что некоторые природные ДНК-полимеразы, в частности, ДНК-полимераза I из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза), способны синтезировать ДНК по матрице РНК в присутствии ионов марганца [17]. Однако в качестве обратной транскриптазы Tth-полимераза синтезирует сравнительно короткие фрагменты ДНК и поэтому не может быть использована для получения протяженной комплементарной ДНК. С помощью сайт-ненаправленного введения аминокислотных замен на основе ДНК-полимеразы семейства A термофильной бактерии *Thermotoga petrophila* K4 (K4polL329A, [18]) и ДНК-полимеразы семейства B термофильной археи *Thermococcus kodakaraensis* (RTX, [19]) были созданы ферменты, способные синтезировать достаточно длинную ДНК по матрице РНК при проведении ОТ-ПЦР (обратной транскрипции с последующей ПЦР) без использования дополнительных ферментов. Тем не менее, нет данных об устойчивости созданных мутантных ферментов к ингибиторам, точности их синтеза. Кроме того, сравнения биохимических характеристик обратных транскриптаз K4polL329A и RTX с наиболее часто используемыми M-MuI V и AMV не проводилось.

В настоящее время продолжается поиск новых ферментов, в том числе и из ранее неисследованных в этом отношении таксонов. Так, за последние несколько лет был изучен целый ряд обратных транскриптаз из метагеномов и интронов группы II [20,21]. Вновь открытые ферменты проявляют большую термостабильность, процессивность и точность по сравнению с M-MuI V и AMV [20,21]. В частности, обратные транскриптазы, описанные в работах Mohr C. с соавторами и Zhao C. с соавторами, сохраняют ферментативную активность до 81° [20] или 50-60° [21], обладают высокой точностью и пригодны для анализа микроРНК и приготовления библиотек для секвенирования РНК. Тем не менее, устойчивость этих ферментов к ингибиторам остается неизвестной, равно как и другие их ферментативные характеристики, в том числе наличие терминалтрансферазной активности. Следует отметить, что проведение обратной транскрипции при температуре выше 60-65° представляется нецелесообразным, поскольку выигрыш в эффективности синтеза ДНК за счёт

разрушения вторичной структуры РНК-матрицы будет нивелирован деградацией РНК-матрицы под действием высокой температуры.

Наиболее близкой к заявляемой группе изобретений – прототипом, является рекомбинантная обратная транскриптаза (РОТ) М-MuLV с пятью аминокислотными заменами, отличающаяся повышенной термостабильностью, и способ её получения, включающий следующие стадии. С помощью ПЦР нарабатывали нуклеотидную последовательность, кодирующую обратную транскриптазу М-MuLV без РНКазного домена с аминокислотной заменой D542N, после чего вносили в неё случайные нуклеотидные замены с помощью набора GeneMorph® Random Mutagenesis Kit. Полученную библиотеку нуклеотидных последовательностей клонировали в плазмиду для наработки белков в клетках *E. coli* и нарабатывали мутантные обратные транскриптазы, которые скринировали на наличие специфической активности при 55°C. Варианты мутантных обратных транскриптаз, показавших наибольшую термостабильность, секвенировали и вносили в них нуклеотидные замены по специфическим позициям. Полученную библиотеку нуклеотидных последовательностей клонировали в плазмиду для наработки белков в клетках *E. coli*, нарабатывали мутантные обратные транскриптазы, которые скринировали на наличие специфической активности при 55°C. Варианты мутантных обратных транскриптаз, показавших наибольшую термостабильность, секвенировали. Аминокислотные замены, обеспечивавшие наибольшую термостабильность, объединяли в одной последовательности, используя QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit [22]. Полученная РОТ М-MuLV с аминокислотными заменами E69K, E302R, W313F, L435G, N454K обладала повышенной аффинностью к РНК-матрице, оптимумом рабочей температуры и устойчивостью к ингибиторам.

Недостатками известной мутантной обратной транскриптазы М-MuLV являются недостаточная процессивность и устойчивость к ингибиторам амплификации. Кроме этого, увеличение термостабильности последней было отмечено только в присутствии праймированной РНК-матрицы.

Недостатками способа получения М-MuLV являются трудоемкость и длительность стадий, связанных с необходимостью скрининга множества аминокислотных замен в М-MuLV на предмет их влияния на эффективность обратной транскрипции и устойчивость фермента к ингибиторам.

Задачей изобретения является разработка нового способа получения химерной обратной транскриптазы, обладающей повышенной процессивностью и устойчивостью к ингибиторам амплификации.

Технический результат: повышение процессивности и устойчивости химерной обратной транскриптазы к ингибиторам амплификации, а также уменьшение трудоемкости и длительности способа ее получения.

Поставленная задача достигается заявляемой химерной обратной транскриптазой, имеющей молекулярную массу 66,1 кДа, содержащей кодирующую последовательность ДНК-связывающего белка Sto7d термофильной археи *Sulfolobus tokodaii*, аминокислотную замену K12L в Sto7d.

Поставленная задача достигается также предлагаемым способом получения химерной обратной транскриптазы путём присоединения к С-концу обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони ДНК-связывающего белка Sto7d из археи *Sulfolobus tokodaii*, заключающегося в следующем.

С помощью ПЦР в кодирующую последовательность ДНК-связывающего белка Sto7d термофильной археи *Sulfolobus tokodaii* вводят мутацию AA>TT для замены остатка

лизина-12 на лейцин, в результате чего в белке Sto7d инактивируется РНКазная активность. К 3'-концу кодирующей последовательности обратной транскриптазы M-MuLV присоединяют посредством перекрывающейся ПЦР кодирующую последовательность белка Sto7d. Между кодирующими последовательностями белков помещают нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO: 1), кодирующую гибкий пептидный линкер Гли-Тре-Гли-Гли-Гли-Гли.

Полученный посредством ПЦР сборный фрагмент ДНК, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, кодирующую химерную обратную транскриптазу, далее именуемую химерная RT-Sto, клонируют рестриктазно-лигазным методом в вектор для экспрессии в *E. coli* pET23b с использованием рестриктаз NdeI, NotI. Соответствие клонированной нуклеотидной последовательности плазмиды pET23b-RT-Sto теоретически ожидаемой было подтверждено секвенированием по Сэнгеру. Карта генетической конструкции pET23b-RT-Sto представлена на фиг.1, где:

T7 – промотор РНК-полимеразы фага T7

RT-Sto – нуклеотидная последовательность, кодирующая белок RT-Sto

Linker - нуклеотидная последовательность, кодирующая гибкий пептидный линкер Гли-Тре-Гли-Гли-Гли-Гли

Sto7d - нуклеотидная последовательность, кодирующая белок Sto7d

AA -> TT Lys ->Leu – нуклеотидная замена, приводящая к аминокислотной замене

Lys на Leu

His tag – нуклеотидная последовательность, кодирующая гистидиновый гексапептид

T7 terminator - терминатор РНК-полимеразы фага T7

f1 origin – ориджин фага F1

bla (Ap) sequence - ген бета-лактамазы

ColE1 pBR322 origin – ориджин плазмиды pBR322

Химерную обратную транскриптазу RT-Sto нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS. Синтез рекомбинантного белка индуцировали с помощью изопропил-β-D-тиогалактозида, наработку рекомбинантного белка проводили в течение 4 часов при 37°C. Рекомбинантную химерную RT-Sto очищали с помощью последовательных хроматографий: металл-хелатной на Ni-NTA-сорбенте и ионообменной на сорбенте HighQ, после чего химерную RT-Sto переводили в буфер для хранения с помощью диализа.

Химерная обратная транскриптаза RT-Sto имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, кодирующая последовательность SEQ ID NO: 2 которой находится в плазмиде pET23b-RT-Sto, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, представленную в перечне последовательностей.

Для лучшего понимания сущности предлагаемых изобретений, они иллюстрируются следующими примерами осуществления.

Пример 1

Конструирование плазмиды pET23b-RT-Sto.

С помощью ПЦР синтезировали кодирующую последовательность обратной транскриптазы M-MuLV без РНКазного домена, используя праймеры (RT-F 5'-TATGGCTAGCCTAAATATAGAAGATGAGCATCGGC-3' и RT-R 5'-ACCGCCACCGCCGGTACCATCAAGGCAGTTGTGTTGC-3') и комплементарную ДНК вируса M-MuLV в качестве матрицы. Далее с помощью ПЦР синтезировали кодирующую последовательность белка Sto7d с нуклеотидными заменами AA>TT (Sto-F 5'-GGTACCGGCGGTGGCGGTGTAACAGTAAAGTTCAAGTATAA -3' и Sto-R 5'-GATGATGCGGCCGCTTTTCTAACATTTGTAGTAATTCTT-3'). В качестве матрицы

для наработки мутантной кодирующей последовательности Sto7d использовали ранее полученную плазмиду pET-Sto-Gss [16]. Нароботанные кодирующие фрагменты ДНК были соединены с помощью ПЦР с праймерами RT-F, Sto-R. Объединённый фрагмент и вектор pET23b (Novagen, США) гидролизировали эндонуклеазами рестрикции FauNDI и CciNI (Сибэнзим, Россия). Гидролизованные фрагмент и вектор лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 (Биосан, Россия), трансформировали реакционной смесью после лигирования компетентные клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS и распределяли клетки по чашке Петри со средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Колонии-трансформанты скринировали на предмет наличия вставки с помощью праймеров RT-F, Sto-R, соответствие нуклеотидной последовательности вставки теоретически ожидаемой оценивали с помощью секвенирования по Сенгеру (ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН). Плазмиду со вставкой, соответствующей теоретически ожидаемой (pET23b-RT-Sto), очищали с помощью щелочного лизиса и хранили при -20 °С до момента использования. Физическая карта плазмиды pET23b-RT-Sto, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 4, приведена на фиг. 1.

Пример 2

Получение штамма *E. coli* - продуцента рекомбинантной химерной обратной транскриптазы RT-Sto.

Рекомбинантную химерную обратную транскриптазу RT-Sto нарабатывали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS. Для этого трансформировали плазмидой pET23b-RT-Sto компетентные клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS и распределяли клетки по чашке Петри со средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (34,5 мкг/мл). Инкубировали чашки Петри при 37°С в течение ночи. На следующий день готовили стартовую культуру. Для этого инокулировали одной колонией пробирку с 2 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (34,5 мкг/мл), инкубировали пробирку в течение 5 часов при 37°С и помешивании со скоростью 200 об/мин до достижения оптической плотности при 600 нМ 1,0. Переносили стартовую культуру в колбу на 1 л с 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (34,5 мкг/мл), инкубировали колбу в течение 4 часов при 37°С и помешивании со скоростью 200 об/мин до достижения оптической плотности при 600 нМ 1,0. По достижению указанной оптической плотности индуцировали синтез RT-Sto с помощью изопропил-β-D-тиогалактозида, добавляя к 200 мл культуры 2 мл 1 М изопропил-β-D-тиогалактозида. После добавления изопропил-β-D-тиогалактозида продолжали инкубацию в течение 4 часов в тех же условиях. По завершению времени инкубации собирали клетки центрифугированием при 4°С и 6000×g в течение 15 мин, клеточный осадок хранили при -70 °С до момента выделения RT-Sto.

Пример 3

Выделение и очистка рекомбинантной химерной обратной транскриптазы RT-Sto из клеток-продуцентов *E. coli*.

Рекомбинантную химерную RT-Sto очищали с помощью последовательных хроматографий: металл-хелатной на Ni-NTA-сорбенте и ионообменной на сорбенте HighQ, после чего химерную RT-Sto переводили в буфер для хранения с помощью диализа. Хроматографию проводили на хроматографе BioLogic LP (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), снабженном оптической и кондуктометрической ячейками. Оптическую плотность и электропроводность в элюате визуализировали при помощи программы BioLogic™ LP Data View™ Software (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Все растворы подавали на колонку со скоростью 1 мл/мин.

Аффинную хроматографию проводили на колонке, заполненной 5 мл сорбента

Profinity IMAC Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), которую перед использованием уравнивали 25 мл буфера А (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl). После уравнивания колонки подготавливали белковый препарат для очистки. Биомассу после препаративной экспрессии рекомбинантного белка ресуспендировали в буфере А для хроматографии (в соотношении 10 мл буфера на 1 г биомассы) и лизировали клетки обработкой ультразвуком. Растворимую белковую фракцию отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 14000×g.

Подготовленный к очистке белковый препарат наносили на колонку, после чего колонку промывали 25 мл буфера А для хроматографии. Рекомбинантные белки элюировали буфером В (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl, 0,5 М имидазол) для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции – 1 мин, объем фракции – 1 мл. Все фракции, полученные в ходе очистки, анализировали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли.

Ионообменную хроматографию проводили на колонке, заполненной 5 мл сорбента 2 мл сорбента HighQ (Bio-Rad Laboratories, Inc, США), перед использованием уравнивали 50 мл буфера Е для хроматографии.

На подготовленную колонку наносили препарат химерной RT-Sto, очищенный с помощью аффинной хроматографии, и промывали колонку 20 мл буфера С (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl). Рекомбинантные белки элюировали буфером D (50 мМ Tris-HCl pH 7,5, 1 М NaCl) для хроматографии. Элюат собирали фракциями, время сбора фракции - 1 мин, объем фракции - 1 мл. Все фракции анализировали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли.

Фракции, содержавшие химерную RT-Sto, объединяли и переносили в диализный мешок (Sigma-Aldrich, США), после чего помещали в 1 литр буфера для хранения (100 мМ Tris-HCl pH 7,5, 300 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 55% глицерин) и оставляли на 12-14 часов при +4° и постоянном помешивании. По окончании диализа препараты белков из диализного мешка анализировали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях по Лэммли и оценивали их концентрацию по методу Брэдфорд. Далее препараты белков делили на аликвоты по 500 мкл каждая и хранили при -20°.

Пример 4

Оценка специфической активности и процессивности химерной обратной транскриптазы RT-Sto.

Специфическую активность препарата химерной RT-Sto оценивали по включению дезокситимидин трифосфата, меченного ³²P, в полирибоаденозин монофосфат. За одну единицу специфической активности принимали количество ферменте, необходимое для включения 1 наномоля дезокситимидин трифосфата в кислотонерастворимый материал за 10 минут при 37°С. Активность очищенной химерной RT-Sto составила 1,18*10⁴ е.а. на мг белка.

Процессивность химерной RT-Sto оценивали по элонгации праймера, меченного на 5'-конце флуорофором. Праймер был комплементарен геномной ДНК фага лямбда, в качестве матрицы использовали геномную ДНК фага лямбда либо искусственно наработанную РНК, идентичную по последовательности соответствующей цепи ДНК фага лямбда. Длину продуктов элонгации оценивали с помощью капиллярного гель-элетрофореза. Процессивность определяли согласно формуле: $P = \frac{[(1 \times I(1)) + (2 \times I(2)) + \dots + (n \times I(n))]}{[I(1) + I(2) + \dots + I(n)]}$, где P - процессивность, I – площадь под пиком, n – количество включённых в праймер нуклеотидов. Процессивность обратной транскриптазы M-MuLV RT (прототип) и химерной RT-Sto представлена в таблице 1.

Таблица 1

Фермент	Процессивность, нт	
	РНК-матрица	ДНК-матрица
M-MuLV RT	78±2	17±3
RT-Sto mut	677±6	287±6

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что заявляемая химерная RT-Sto обладает повышенной в 8 раз процессивностью по матрице РНК, и в 17 раз - по матрице ДНК, по сравнению с исходным ферментом.

Пример 5

Оценка устойчивости к ингибиторам амплификации рекомбинантной обратной транскриптазы M-MuLV RT (прототип) и химерной обратной транскриптазы RT-Sto.

Устойчивость ферментов к ингибиторам синтеза ДНК оценивали по способности проводить обратную транскрипцию в присутствии различных субстанций: цельной крови и плазмы крови человека, NaCl, формамида, фенола, гуанидина изотиоцианата и гуанидина хлорида. Для этого проводили обратную транскрипцию по матрице тотальной РНК из ядерных клеток крови человека, полученной от 5 здоровых доноров. В реакционную смесь обратной транскрипции добавляли разное количество ингибитора, после чего проводили реакцию и оценивали количество наработанной кДНК с помощью ПЦР в режим реального времени. В качестве меры степени ингибирования использовали показатель IC50 (концентрацию полумаксимального ингибирования), который рассчитывался как количество ингибитора, необходимое для снижения количества продукта наполовину от уровня пробы без ингибитора.

Результаты проведения обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы M-MuLV и химерной RT-Sto в присутствии ингибиторов амплификации представлены на фиг. 2. На фиг. 2 приведены показатели IC50 разных ингибиторов синтеза РНК, полученные при добавлении ингибиторов в реакционные смеси обратной транскрипции с исходной обратной транскриптазой M-MuLV и химерной RT-Sto. На фиг. 2 приведены показатели IC50 ингибиторов амплификации в обратной транскрипции с обратными транскриптазами M-MuLV и RT-Sto, выраженные в объемных процентах, а на фиг. 3 – показатели IC50 ингибиторов амплификации в обратной транскрипции с обратными транскриптазами M-MuLV и RT-Sto, выраженные в мМ.

Из данных, представленных на фиг. 2 и фиг. 3 следует, что устойчивость химерной RT-Sto возросла ко всем ингибиторам: цельной крови и плазмы крови человека, NaCl, формамида, фенола, гуанидина изотиоцианата и гуанидина хлорида.

Таким образом, предлагаемая химерная обратная транскриптаза RT-Sto, полученная путём присоединения ДНК-связывающего белка Sto7d из археи *Sulfolobus tokodaii* обладает повышенной процессивностью и устойчивостью к ингибиторам амплификации и может с успехом использоваться в медицинских диагностических тестах, основанных на использовании обратных транскриптаз.

Источники информации

1. Bayega A. et al. Current and future methods for mRNA analysis: A drive toward single molecule sequencing // *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., 2018. Vol. 1783. P. 209–241.

2. Zhou B. et al. Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous surveillance of influenza A and B viruses // *J. Clin. Microbiol. American Society for Microbiology*, 2017. Vol. 55, № 12. P. 3492–3501.

3. Burchard P.R. et al. A rapid RT-PCR assay for the detection of HIV-1 in human plasma specimens // *Exp. Mol. Pathol. Academic Press Inc.*, 2014. Vol. 97, № 1. P. 111–115.

4. Malboeuf C.M. et al. Thermal Effects on Reverse Transcription: Improvement of Accuracy and Processivity in cDNA Synthesis // *Biotechniques*. 2001. Vol. 30, № 5. P. 1074–1084.
5. Zhao C., Liu F., Pyle A.M. An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron // *RNA*. 2018. Vol. 24, № 2. P. 183–195.
6. Davies K.D., Doebele R.C. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer // *Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research Inc.*, 2013. Vol. 19, № 15. P. 4040–4045.
7. Kozuma Y., Toyokawa G., Seto T. ALK testing methods: is there a winner or loser? // *Expert Review of Anticancer Therapy*. Taylor and Francis Ltd, 2019. Vol. 19, № 3. P. 237–244.
8. Arezi B., McCarthy M., Hogrefe H. Mutant of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase exhibits higher resistance to common RT-qPCR inhibitors // *Anal. Biochem*. 2010. Vol. 400, № 2. P. 301–303.
9. Gerard G.F. et al. The role of template-primer in protection of reverse transcriptase from thermal inactivation // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2002. Vol. 30, № 14. P. 3118.
10. Harrison G.P. et al. Pausing of reverse transcriptase on retroviral RNA templates is influenced by secondary structures both 5' and 3' of the catalytic site // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26, № 14. P. 3433–3442.
11. Yasukawa K. et al. Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis // *J. Biotechnol.* 2010. Vol. 150, № 3. P. 299–306.
12. Konishi A., Yasukawa K., Inouye K. Improving the thermal stability of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase α -subunit by site-directed mutagenesis // *Biotechnol. Lett.* 2012. Vol. 34, № 7. P. 1209–1215.
13. Okano H. et al. High sensitive RNA detection by one-step RT-PCR using the genetically engineered variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity from hyperthermophiles // *J. Biosci. Bioeng.* 2018. Vol. 125, № 3. P. 275–281.
14. Baranauskas A. et al. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants // *Protein Eng. Des. Sel.* 2012. Vol. 25, № 10. P. 657–668.
15. Wang Y. et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 3. P. 1197–1207.
16. Ostorbin I.P. et al. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 16.
17. Katcher H.L., Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol // *Biotechniques*. 1994. Vol. 16, № 1. P. 84–92.
18. Sano S. et al. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4 // *J. Biosci. Bioeng.* 2012. Vol. 113, № 3. P. 315–321.
19. Ellefson J.W. et al. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase // *Science* (80-.). 2016. Vol. 352, № 6293.
20. Mohr S. et al. Thermostable group II intron reverse transcriptase fusion proteins and their use in cDNA synthesis and next-generation RNA sequencing // *RNA*. 2013. Vol. 19, № 7. P. 958–970.
21. Zhao C., Liu F., Pyle A.M. An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron // *RNA*. 2018. Vol. 24, № 2. P. 183–195.
22. Arezi B., Hogrefe H. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37, № 2. P. 473–481.

(57) Формула изобретения

1. Рекомбинантная химерная обратная транскриптаза, обладающая повышенной процессивностью и устойчивостью к ингибиторам амплификации, имеющая молекулярную массу 66,1 кДа, содержащая кодирующую последовательность ДНК-связывающего белка Sto7d термофильной археи *Sulfolobus tokodaii*, аминокислотную замену K12L в Sto7d, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2, представленные в перечне последовательностей.

2. Способ получения рекомбинантной химерной обратной транскриптазы по п.1, включающий направленный мутагенез с помощью ПЦР, клонирование с помощью рестриктазно-лигазного метода, наработку рекомбинантного белка в клетках *E. coli* с последующей очисткой рекомбинантного белка с помощью хроматографических методов, отличающийся тем, что в кодирующую последовательность белка Sto7d вводят нуклеотидную замену AA>TT, присоединяют кодирующую последовательность белка Sto7d к 3'-концу кодирующей последовательности обратной транскриптазы вируса M-MuLV, затем между кодирующими последовательностями белков помещают нуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 1, кодирующую гибкий пептидный линкер Гли-Тре-Гли-Гли-Гли-Гли, полученный сборный фрагмент ДНК, представленный в SEQ ID NO: 2, клонируют в вектор для экспрессии pET23b, сконструированной плазмидой pET23b-RT-Sto, представленной в SEQ ID NO: 4, трансформируют клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS, наработанную рекомбинантную химерную обратную транскриптазу очищают сначала с помощью металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-сорбенте, а затем с помощью ионообменной хроматографии на сорбенте HighQ, после чего целевой фермент переводят в буфер для хранения с помощью диализа.

25

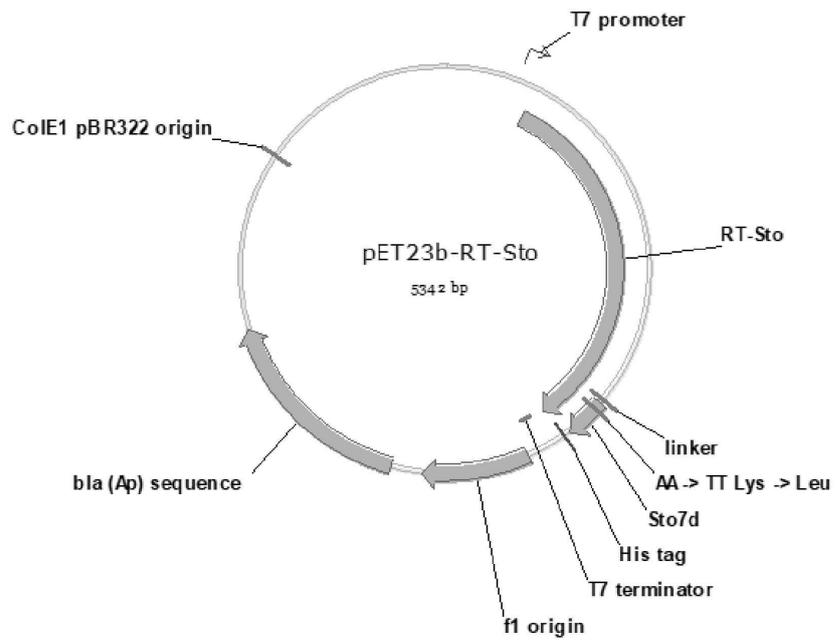
30

35

40

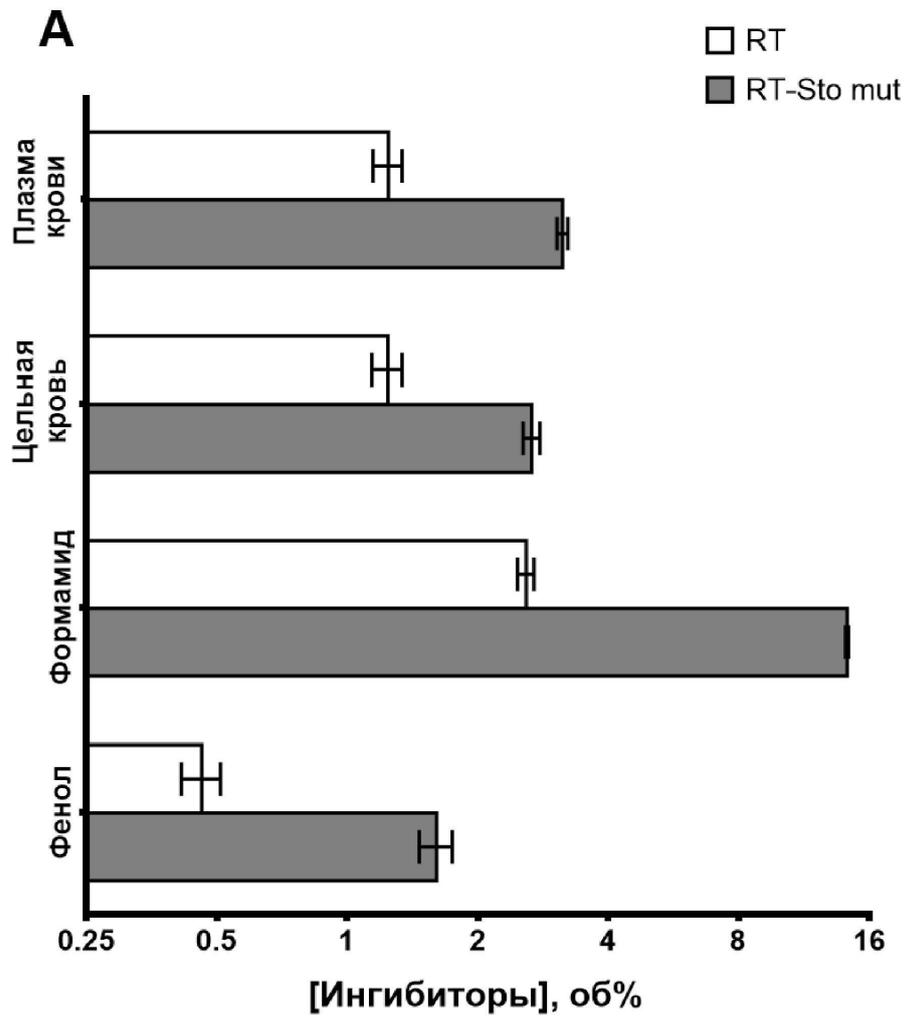
45

1

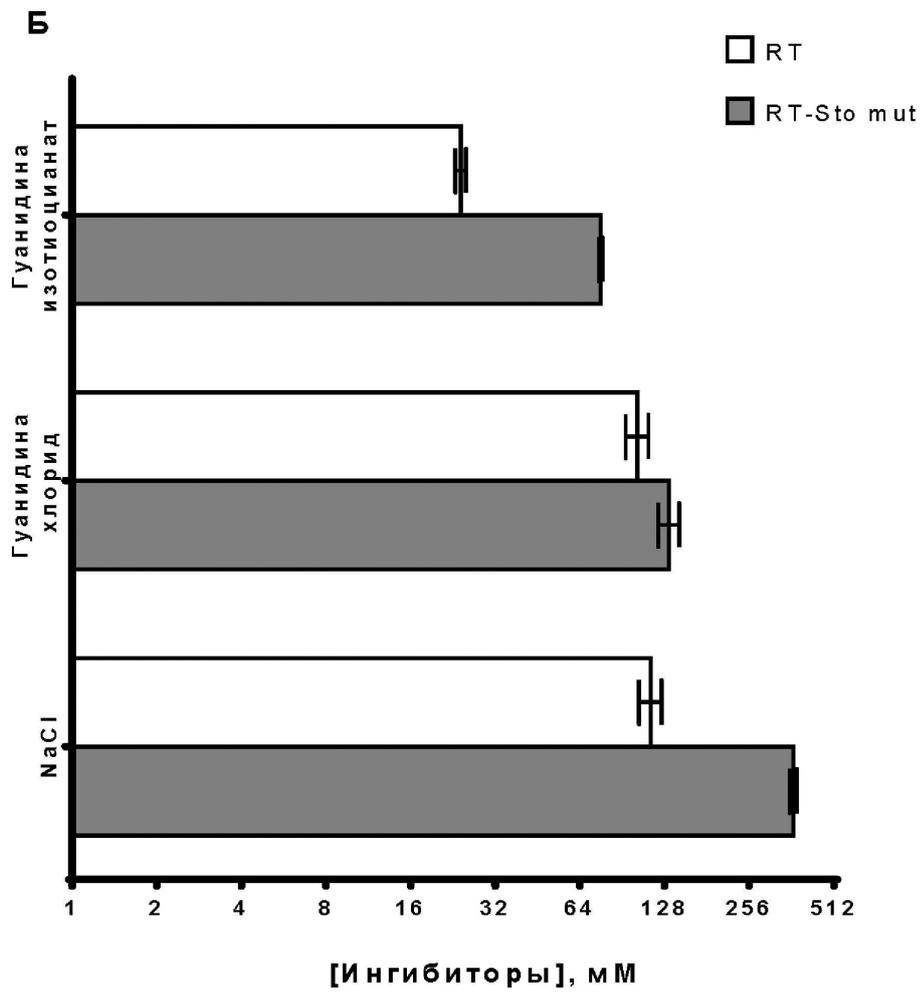


Фиг. 1

2



Фиг. 2



Фиг. 3