



Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации

Пика М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Черкашин Е.А., Петров В.В., Красовитов К.В., Черкашина А.С.[✉], Акимкин В.Г.

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus* GIM1.543 (ДНК-полимераза Bst) обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, 5'-3'-вытесняющей активностью и высокой процессивностью. Благодаря этим свойствам ДНК-полимераза Bst используется в петлевой изотермической амплификации (LAMP), которая обеспечивает амплификацию целевой последовательности с высокой специфичностью и применяется для быстрого обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Цель работы — получение рекомбинантного фермента Bst-полимеразы в бактериальной системе экспрессии и оценка его свойств в условиях LAMP для диагностики инфекционных заболеваний.

Материалы и методы. Методами генетической инженерии получали экспрессионные конструкции, несущие ген Bst-полимеразы. Экспрессию белка проводили в различных штаммах клеток *Escherichia coli*. Для получения очищенных препаратов белка использовали методы металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографии. Оценку каталитических свойств фермента проводили в реакциях петлевой изотермической амплификации в диагностических системах «АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT», «АмплиСенс® IAV-IT» и «АмплиСенс® IBV-IT», предназначенных для качественного определения РНК SARS-CoV-2, вируса гриппа А (IAV) и вируса гриппа В (IBV) соответственно.

Результаты. Разработанный протокол наработки, выделения и очистки рекомбинантной Bst-полимеразы позволяет получать фермент в бактериальной системе экспрессии на основе клеток *E. coli* в растворимой форме с выходом до 20% от собранной клеточной массы. В реакциях LAMP полученный фермент демонстрирует активность, сопоставимую с коммерческим ферментом Bst 2.0 («NEB»).

Заключение. Полученная рекомбинантная Bst-полимераза, учитывая быстрый способ очистки и получения фермента, пригодна для применения в диагностических наборах на основе LAMP.

Ключевые слова: полимеразы, изотермическая амплификация, рекомбинантный фермент

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: Пика М.И., Михеева О.О., Соловьева Е.Д., Валдохина А.В., Буланенко В.П., Черкашин Е.А., Петров В.В., Красовитов К.В., Черкашина А.С., Акимкин В.Г. Получение Bst-полимеразы для диагностики различных инфекций методом петлевой изотермической амплификации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2023;100(3):210–218.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-364>

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

Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification

Maria I. Pika, Olga O. Mikheeva, Elena D. Solovyova, Anna V. Valdokhina, Victoria P. Bulanenko, Evgeny A. Cherkashin, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitev, Anna S. Cherkashina[✉], Vasily G. Akimkin

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* GIM1.543 (Bst DNA polymerase) possesses 5'-3' DNA polymerase activity, 5'-3' displacement activity and high processivity. These properties make it possible to use Bst DNA polymerase in loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which provides highly specific amplification of the target sequence and is used for rapid detection of agents causing human infectious diseases.

The **purpose** of the study was to produce a recombinant Bst polymerase enzyme in the bacterial expression system and to assess its properties for LAMP-based diagnostics of infectious diseases.

Materials and methods. Expression constructs carrying the Bst polymerase gene were obtained using genetic engineering techniques. Different *Escherichia coli* strains were used for protein expression. Metal-chelate and gel filtration chromatography techniques were used for protein purification. Catalytic characteristics of the enzyme were assessed in loop-mediated isothermal amplification reactions using AmpliSens[®] SARS-CoV-2-IT, AmpliSens[®] IAV-IT and AmpliSens[®] IBV-IT diagnostic systems designed for high-quality detection of SARS-CoV-2, influenza A virus (IAV) and influenza B virus (IBV) RNA, respectively.

Results. The offered protocol for production, extraction and purification of recombinant Bst polymerase makes it possible to produce the enzyme in the bacterial expression system using *E. coli* cells in a soluble form and reaching the yield up to 20% of the total cell mass. In LAMP reactions, the obtained enzyme demonstrates activity comparable with that of the commercial enzyme Bst 2.0 (NEB).

Conclusion. Considering the fast purification and production of the enzyme, the obtained recombinant Bst polymerase can be used in LAMP-based diagnostic kits.

Keywords: polymerase, isothermal amplification, recombinant enzyme

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: Pika M.I., Mikheeva O.O., Solovyova E.D., Valdokhina A.V., Bulanenko V.P., Cherkashin E.A., Petrov V.V., Krasovitev K.V., Cherkashina A.S., Akimkin V.G. Production of Bst polymerase for diagnosis of different infections using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(3): 210–218. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-364> EDN: <https://www.elibrary.ru/phcmoq>

Введение

Методы амплификации нуклеиновых кислот широко используются в диагностике инфекционных заболеваний, определении однонуклеотидных замен в генотипировании и других клинических применениях. Однако традиционная процедура полимеразной цепной реакции (ПЦР) занимает много времени и требует дорогостоящего специального оборудования. Сравнительно недавно Т. Notomi и соавт. разработали метод быстрого обнаружения оснований нуклеиновых кислот — петлевую изотермическую амплификацию (LAMP), с помощью которой с высокой чувствительностью и специфичностью проводится амплификация целевой последовательности

ДНК при постоянной температуре в любом термостатирующем устройстве, пренебрегая обычными температурными циклами, что позволяет ускорить процесс [1–4]. Метод LAMP широко используется для выявления возбудителей инфекционных заболеваний вирусной природы, таких как коронавирус SARS-CoV-2 [5, 6], вирусы гриппа и респираторно-синцициальный вирус [7], вирус гепатита С [8], вирус денге (DENV) [9], вирус иммунодефицита человека (HIV) [10] и вирус Эбола (EVD) [11].

Bst-полимераза нашла широкое применение в изотермической амплификации и сыграла ключевую роль в развитии клинической экспресс-диагностики вирусных инфекций. ДНК-полимераза I из

Geobacillus stearothermophilus [12] была впервые выделена в 1972 г. [13], а очищена в 1982 г. [14]. После получения трехмерной структуры фермента был сделан вывод о том, что ДНК-полимераза I состоит из 3 независимых доменов [15]. Домен I отвечает за 5'-3'-экзонуклеазную активность, домен II — за 5'-3'-ДНК-полимеразную активность, домен III подобен доменам, отвечающим за 3'-5'-экзонуклеазную активность у других полимераз [15]. Домены II и III расположены на С-конце ДНК-полимеразы I и обозначаются как большой фрагмент (БФ) [16]. Полноразмерный ген ДНК-полимеразы I из *G. stearothermophilus* состоит из 2628 пар оснований и кодирует белок, состоящий из 876 а.к. массой 98 кДа. Укороченный ген БФ Bst-полимеразы, лишённый 5'-конца из 930 пар оснований, кодирует белок из 587 а.к. массой 64 кДа и может быть клонирован с С-концевым полигистидиновым тэгом с расчётной массой 65 кДа. В данном случае из-за наличия метки из 6 гистидинов на С-конце гена Bst-полимеразы лишена 5'-3'-экзонуклеазной активности и оказалась эффективна в полимеризации dNTP в ПЦР [17, 18]. Существуют, однако, данные, в которых говорится о клонировании гена БФ Bst-полимеразы без фьюжн-метки во избежание неправильного фолдинга рекомбинантного белка [19].

Поскольку ДНК-полимераза Bst характеризуется высокой процессивностью, обладает высокой полимеразной активностью и вытесняющей активностью, способна сохранять активность при температуре 65°C [18] в течение длительного времени и широко применяется в методике изотермической амплификации для экспресс-детекции инфекционных заболеваний, **цель** данного исследования — предложить быстрый способ получения и очистки Bst-полимеразы, пригодной для применения в диагностических целях в методе LAMP.

Материалы и методы

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции NdeI и XhoI («Thermo Scientific»), pET16b+ («Merck Millipore»), бактериальные штаммы *Escherichia coli* XL2, ER2566, BL21 (DE3) pLys, Rosetta (DE3) («Merck Millipore»); при культивировании — бакто-триптон, бакто-агар и дрожжевой экстракт («Хеликон»), при выделении белка — Трис(гидроксиметил)-аминометан гидрохлорид (Трис-HCl), NaCl, имидазол, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), глицерин («Panreac»); PageRuler Prestained Protein Ladder, 10–250 кДа («Thermo Scientific»).

Получение экспрессионного плазмидного вектора, содержащего ген Bst-полимеразы

Для амплификации гена, кодирующего Bst-полимеразу, были использованы олигонуклеотидные праймеры:

Bst-for 5'-GGTGGTCATATGCCCGTCTTCTGAGG AAGAAAAGCCGCTG-3';
Bst-rev 5'-GGTGGTTAACTCGAGTTTCGCTCATA CCAAGTAGAACCGTAGT-3',
содержащие сайты узнавания рестриктаз NdeI и XhoI соответственно (подчёркнуты).

Полученные ампликоны были обработаны эндонуклеазами рестрикции NdeI и XhoI и клонированы в плазмидный вектор pET16b+, предварительно обработанный теми же эндонуклеазами рестрикции. В результате был получен экспрессионный вектор pET16-Bst-NHm4. Правильность нуклеотидной последовательности клонированного гена была подтверждена секвенированием.

Подбор штаммов *E. coli* для экспрессии гена Bst-NHm4

В качестве штаммов-носителей для созданного вектора pET16-Bst-NHm4 использовали штаммы *E. coli* ER2566, BL21 (DE3) pLys, 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 14 ч при 37°C для получения отдельных колоний. Затем несколько колоний переносили в 100 мл среды LB с 100 мкг/мл ампициллина и выращивали 16 ч при 37°C на шейкере при перемешивании со скоростью 180 об/мин для получения ночной культуры. Полученной ночной культурой штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4, ER2566/pET16-Bst-NHm4 и Rosetta (DE3)/pET16-Bst-NHm4 засеивали 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 о.е. вносили изопропил-β-D1-тиогаляктопиранозид до концентрации 0,4 мМ 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-NHm4

Клеточную биомассу (2 г) штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4 ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl, pH 8,5 с 1 мМ 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, рН 8,5 (буферный раствор А) и наносили на хроматографический сорбент IMAC FF, предварительно уравновешенный тем же буферным раствором. Очистку от балластных белков проводили буферным раствором А. Целевой белок элюировали линейным градиентом буферного раствора А с 500 мМ имидазолом.

После металл-хелатной хроматографии элюат наносили на колонку HiTrap, содержащую 5 мл сорбента G-25 в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 20% глицерин, рН 8,5.

Определение активности Bst-NHm4

Для проверки активности полученной Bst-полимеразы в LAMP использовали реагенты набора «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (РУ № РЗН 2021/14599), а в качестве образцов — плазмидную ДНК, содержащую целевой фрагмент генома коронавируса SARS-CoV-2. Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 5 мкл IT-mix SARS-CoV-2, 4,2 мкл смеси глицерина, тиоглицерина и флуоресцентного интеркалирующего красителя и 0,8 мкл тестируемой Bst-полимеразы. В качестве фермента сравнения использовали фермент Bst 2.0 DNA Polymerase («NEB»; далее Bst 2.0), реакционная смесь содержала 5 мкл IT-mix SARS-CoV-2, 4 мкл смеси глицерина, тиоглицерина и флуоресцентного интеркалирующего красителя и 1 мкл полимеразы Bst 2.0. К полученным реакционным смесям добавляли по 10 мкл плазмидной ДНК (в концентрации 10^4 и 10^6 копий/мл). Каждый образец был поставлен в 2 повторения. Реакцию проводили в амплификаторе «CFX 96» («Bio-Rad Laboratories»). Программа амплификации состояла из 50 циклов по 30 с при 65°C в течение 25 мин с детекцией сигнала на канале FAM.

Аналитические методы

Концентрацию белка определяли с помощью «Qubit» («Thermo Scientific»), чистоту белка — с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях [20].

Петлевая изотермическая амплификация, совмещённая с обратной транскрипцией

Для оценки возможности использования полученной Bst-полимеразы в составе диагностических тест-систем проводили LAMP в реальном времени, совмещённую с обратной транскрипцией, на реагентах из наборов «АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT», «АмплиСенс® IAV-IT» и «АмплиСенс® IBV-IT», предназначенных для качественного определения РНК SARS-CoV-2, вирусов гриппа А (IAV) и В (IBV) соответственно. В качестве образцов использовали разведения препаратов выделенной РНК вирусов из образцов биологического материала (мазки со сли-

зистой оболочки носо- и ротоглотки) с концентрацией 10^4 – 10^7 копий/мл.

Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 5 мкл соответствующего определяемому возбудителю реагента IT-mix, 4,2 мкл смеси глицерина, тиоглицерина и флуоресцентного интеркалирующего красителя и 0,8 мкл Bst-полимеразы. В качестве фермента сравнения использовали полимеразу Bst 2.0, разведённую до той же рабочей концентрации, что и тестируемый фермент, — 320 ЕД/мл (1 ед. фермента катализирует включение 25 нмоль дНТФ в состав продукта за 30 мин реакции при 65°C). К полученным реакционным смесям добавляли по 10 мкл препарата РНК. Реакцию проводили в амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология»). Программа амплификации включала предварительную инкубацию в течение 5 мин при 37°C и изотермическую амплификацию в течение 25 мин (50 циклов) при 65°C с детекцией флуоресцентного сигнала каждые 30 с на канале FAM.

В качестве референтного метода анализа образцов РНК использовали зарегистрированные наборы реагентов, основанные на ПЦР, — «АмплиСенс® COVID-19-FL» (РУ № РЗН 2021/14599) и «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (РУ № ФСР 2009/05010) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты

Для получения рекомбинантной полимеразы Bst была разработана уникальная синтетическая последовательность гена *Bst-pol*. Для этого на первом этапе была проведена обратная трансляция фрагмента аминокислотной последовательности ДНК-полимеразы I из *G. stearothermophilus* (AAB52611) с 290 по 876 а.к. Затем был оптимизирован нуклеотидный состав последовательности с учётом частоты встречаемости кодонов для бактериальной системы экспрессии на основе клеток *E. coli*. Итоговая последовательность гена была получена методом сборки из длинных перекрывающихся праймеров [21]. Ген, кодирующий Bst-pol, был клонирован в плазмидный вектор pET16b+ для прокариотической экспрессии в *E. coli*. В ходе подбора штаммов-носителей для экспрессии гена *Bst-NHm4* была исследована динамика накопления фермента Bst-NHm4 при разных температурах (23°C и 37°C) и времени индукции белкового биосинтеза (4 и 24 ч). В целом белок эффективно нарабатывался в штаммах-носителях *E. coli* BL21 (De3) pLys и Rosetta (De3) в растворимой форме, но не нарабатывался в штамме-носителе ER2566. Несколько большее содержание и съём биомассы достигались при культивировании штамма-продуцента BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4 при 23°C в течение 4 ч (табл. 1).

Таблица 1. Содержание фермента Bst-NHm4 в штаммах-продуцентах относительно общего белка клетки**Table 1.** Content of the Bst-NHm4 enzyme in producer strains compared to total cell protein

Штамм-носитель <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> carrier strain	Условия культивирования Culture conditions	Содержание белка, % Protein content, %	Съём клеточной биомассы, г/л Cell biomass yield, g/L
ER2566	23°C, 4 ч h	Фермент Bst-NHm4 не нарабатывается Bst-NHm4 enzyme is not accumulated	
	23°C, 24 ч h		
	37°C, 4 ч h		
	37°C, 24 ч h		
BL21 (De3) pLys	23°C, 4 ч h	20,2	4,8
	23°C, 24 ч h	19,8	4,5
	37°C, 4 ч h	19,7	4,2
	37°C, 24 ч h	18,9	4,9
Rosetta (De3)	23°C, 4 ч h	19,5	5,1
	23°C, 24 ч h	19,3	4,9
	37°C, 4 ч h	18,8	4,5
	37°C, 24 ч h	18,7	4,7

Примечание. Данные получены при использовании программы «Image Lab v. 5.2.1» («Bio-Rad»).

Note. The data were obtained using the Image Lab v. 5.2.1 software (Bio-Rad).

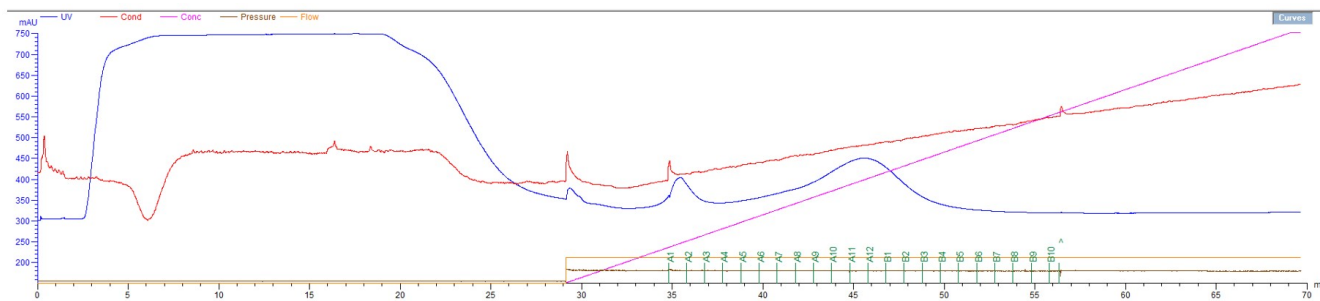
Для очистки фермента от клеточных белков на первом этапе использовали металл-хелатную аффинную хроматографию в градиенте имидазола (**рис. 1**). Фракции с чистотой более 90% (**рис. 2**) объединяли и проводили гель-фильтрационную хроматографию. Полученный фермент Bst-NHm4 охарактеризован с использованием электрофореза ДСН-ПААГ. По данным электрофоретического анализа чистота фермента составила не менее 95% (**рис. 3**) с концентрацией 0,85 мг/мл.

Для подтверждения активности выделенного фермента Bst-NHm4 проводили LAMP в реальном времени на образцах плазмидной ДНК, содержащей фрагмент генома SARS-CoV-2.

В реакции использовали ферменты с концентрацией 320 ЕД/мл. В эксперименте также использовались две концентрации ДНК-матрицы: 10^2 и 10^4 копий в реакции (**табл. 2**). На **рис. 4** хорошо видно, что полученная полимеразы Bst-NHm4 показывает

более высокую активность (меньшие значения пороговых циклов Ct) в реакции LAMP на образцах ДНК, чем фермент сравнения Bst 2.0.

Для подтверждения активности фермента Bst-NHm4 был проведён анализ проб РНК вирусов SARS-CoV-2, IAV и IBV, выделенных из образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), методом LAMP с обратной транскрипцией с использованием реагентов, входящих в состав наборов «АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT», «АмплиСенс® IAV-IT» и «АмплиСенс® IBV-IT» в сравнении с ферментом Bst 2.0. В качестве контроля образцы РНК анализировали методом ПЦР с обратной транскрипцией с помощью набора реагентов «АмплиСенс® COVID-19-FL» или методом ПЦР с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», предварительно получив кДНК с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА-L».

**Рис. 1.** Хроматографический профиль очистки рекомбинантного фермента Bst-NHm4 на сорбенте IMAC FF.**Fig. 1.** Chromatographic profile of purification of the recombinant Bst-NHm4 enzyme using IMAC FF sorbent.

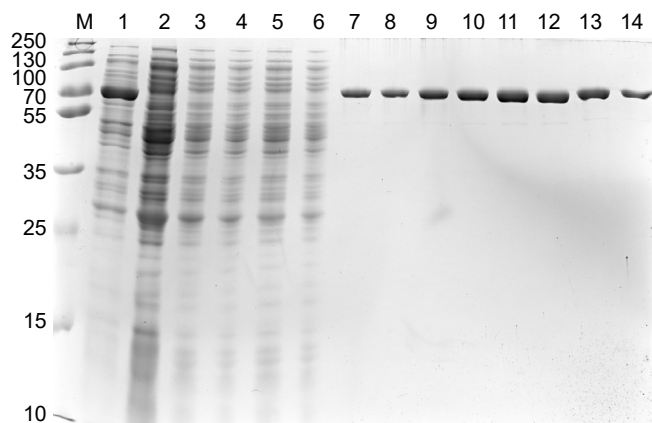


Рис. 2. Хроматографическая очистка Bst-pol на сорбенте IMAC FF.

M — маркер молекулярных масс; 1 — осветлённый клеточный лизат штамма-производителя BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4; 2 — балластные белки; 3–14 — фракции Bst-NHm4.

Fig. 2. Chromatographic purification of Bst-pol using IMAC FF sorbent.

M — molecular weight marker; 1 — clarified cell lysate of the producer strain BL21 (DE3)pLys/pET16-Bst-NHm4; 2 — ballast proteins; 3–14 — Bst-NHm4 fractions.

Полимераза Bst-NHm4 демонстрирует сопоставимую активность с полимеразой Bst 2.0 в реакции LAMP на образцах РНК SARS-CoV-2, но меньшую активность (большие значения порогового цикла Ct) на образцах РНК IAV и IBV с использованием соответствующих наборов реагентов (**рис. 5**). Несмотря на более позднее прохождение образцов РНК IBV в реакции с полимеразой Bst-NHm4 в сравнении с Bst 2.0, исследованные образцы РНК были определены как «положительные», что является достаточным для диагностических систем с качественным определением.

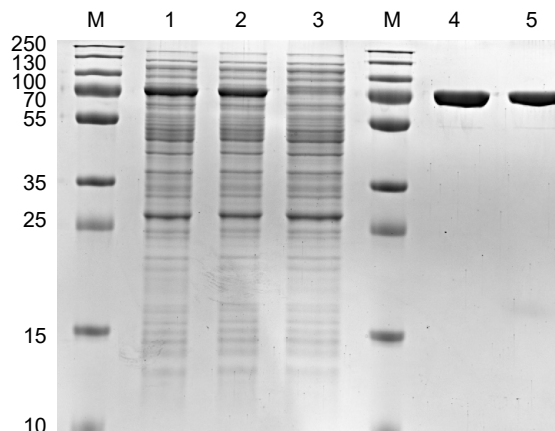


Рис. 3. Получение и очистка Bst-NHm4.

M — маркер молекулярных масс; 1 — тотальный клеточный лизат; 2 — осветлённый клеточный лизат; 3 — клеточный осадок; 4 — тотальная фракция Bst-NHm4 после металл-хелатной аффинной хроматографии; 5 — тотальная фракция Bst-NHm4 после гель-фильтрационной хроматографии.

Fig. 3. Production and purification of Bst-NHm4.

M — molecular weight marker; 1 — total cell lysate; 2 — clarified cell lysate; 3 — cell sediment; 4 — total fraction of Bst-NHm4 after metal-chelate affinity chromatography; 5 — total fraction of Bst-NHm4 after gel-filtration chromatography.

Согласно инструкциям к наборам реагентов «АмплиСенс® SARS-CoV-2-IT», «АмплиСенс® IAV-IT» и «АмплиСенс® IBV-IT», они имеют предел обнаружения не более 10^4 копий/мл при экстракции РНК из биологического материала с использованием реагентов комплекта «РИБО-преп» и высокую специфичность, обусловленную использованием 4–6 диагностических праймеров, комплементарных 6–8 участкам ДНК мишени.

Полученные нами результаты подтверждают высокую диагностическую специфичность наборов реагентов на основе LAMP (100%) в сравнении

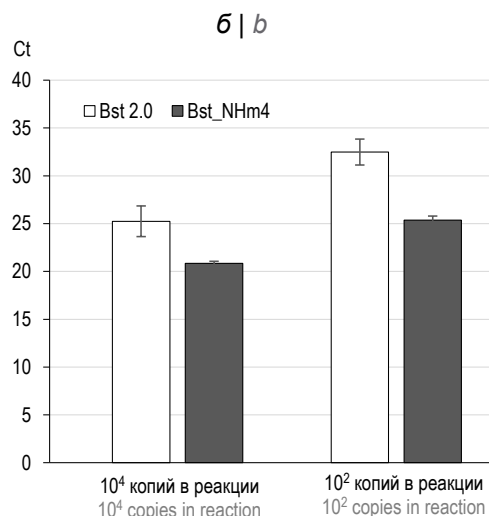
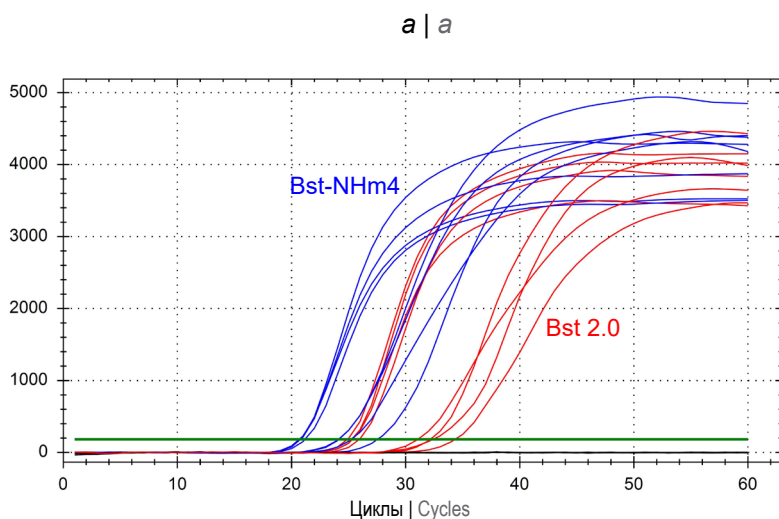


Рис. 4. Оценка активности полимеразы Bst-NHm4 в модельной системе.

a — кривые накопления продукта реакции; б — среднее значение порогового цикла.

Fig. 4. Assessment of Bst-NHm4 polymerase activity in the model system.

a — product accumulation curves; b — mean cycle threshold value.

Таблица 2. Значения пороговых циклов при использовании Bst-NHm4 в реакции LAMP**Table 2.** Cycle threshold values using Bst-NHm4 in the LAMP reaction

№ пробы Sample No.	Тип пробы Sample type	Bst-полимераза Bst polymerase	Значения Ct (FAM) Ct values (FAM)
1	Контроль Control	Bst 2.0	–
2	Контроль Control	Bst-NHm4	–
Число копий Number of copies			
3	10 ²	Bst 2.0	30,1
4	10 ²	Bst 2.0	32,3
5	10 ²	Bst 2.0	31,0
6	10 ²	Bst 2.0	33,4
7	10 ²	Bst-NHm4	22,0
8	10 ²	Bst-NHm4	22,4
9	10 ²	Bst-NHm4	24,1
10	10 ²	Bst-NHm4	24,9
11	10 ⁴	Bst 2.0	22,2
12	10 ⁴	Bst 2.0	22,8
13	10 ⁴	Bst 2.0	24,0
14	10 ⁴	Bst 2.0	24,3
15	10 ⁴	Bst-NHm4	20,2
16	10 ⁴	Bst-NHm4	19,8
17	10 ⁴	Bst-NHm4	20,9
18	10 ⁴	Bst-NHm4	22,1

с ПЦР-тест-системами при анализе образцов РНК с концентрацией не ниже 10⁴ копий/мл. Основным преимуществом использования наборов реагентов на основе LAMP является значительное сокращение времени анализа (31 мин) по сравнению с ПЦР с наборами реагентов «АмплиСенс® COVID-19-FL» (103 мин) «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL» (150 мин) за счёт сокращения продолжительности программы амплификации.

Полученные данные показывают перспективность созданной конструкции и разработанного

протокола выделения и очистки фермента Bst-полимеразы Bst-NHm4 для дальнейшего изучения и внедрения в разрабатываемые и существующие наборы реагентов для диагностики различных инфекций методом LAMP.

Заключение

Разработанный протокол выделения и очистки фермента позволяет получать рекомбинантную Bst-полимеразу в растворимой форме с выходом до 19–20% белка от всей клеточной массы. Таким обра-

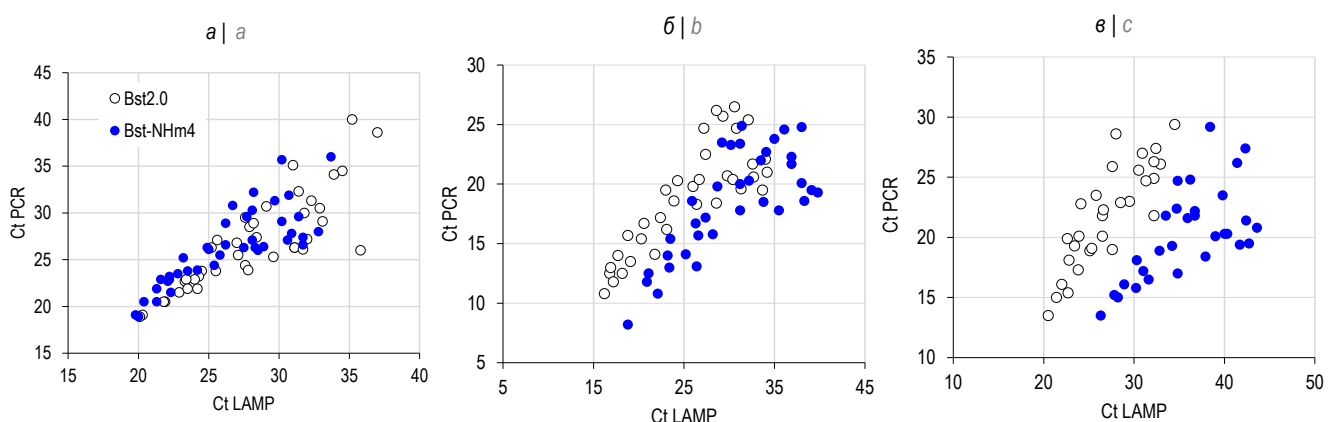


Рис. 5. Анализ проб РНК вирусов SARS-CoV-2 (а), IAV (б) и IBV (в), выделенных из образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки), методом LAMP с обратной транскрипцией.

Fig. 5. Analysis of SARS-CoV-2 (a), IAV (b), and IBV (c) RNA samples isolated from biological material (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) using reverse transcription LAMP.

зом, Bst-NHm4, учитывая быстрый и эффективный способ очистки и получения фермента, пригодна в дальнейшем для применения в диагностических целях в методе LAMP.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. 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>
2. Oscorbin I.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: cloning and comparison with DNA polymerases I in practical applications. *Mol. Biotechnol.* 2015;57(10):947–59. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>
3. Becherer L., Borst N., Bakheit M., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods.* 2020;12(6):717–46. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
4. Soroka M., Wasowicz B., Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR? *Cells.* 2021;10(8):1931. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
5. Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., et al. Loop-mediated isothermal amplification detection of SARS-CoV-2 and myriad other applications. *J. Biomol. Tech.* 2021;32(3):228–75. DOI: <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-017>
6. 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):417–424. Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitov K.V., et al. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology.* 2021;66(6):417–424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>
7. Takayama I., Nakauchi M., Takahashi H., et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods.* 2019;267:53–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.02.010>
8. Wang Q.Q., Zhang J., Hu J.S., et al. Rapid detection of hepatitis C virus RNA by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011;63(1):144–7. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00828.x>
9. Parida M., Horioka K., Ishida H., et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6):2895–903. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2895-2903.2005>
10. Curtis K.A., Rudolph D.L., Owen S.M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods.* 2008;151(2):264–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.011>
11. Kurosaki Y., Takada A., Ebihara H., et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2007;141(1):78–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.031>
12. 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>
13. Stenesh J., Roe B.A. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria: I. Purification and properties of DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972;272:156–66. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(72\)90240-7](https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90240-7)
14. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Akhmedov A.T., Bekker M.L. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 1981;145(1):21–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.145.1.21-26.1981>
15. Steitz T.A. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1999;274(25):17395–8. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17395>
16. Phang S.M., Teo C.Y., Lo E., Wong V.W. Cloning and complete sequence of the DNA polymerase-encoding gene (Bstpoll) and characterisation of the Klenow-like fragment from *Bacillus stearothermophilus*. *Gene.* 1995;163(1):65–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00387-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00387-1)
17. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993;2(4):275–87. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
18. Li P., Amenov A., Kalendar R., et al. Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* and its application in isothermal DNA amplification. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2017;(1):50–8. DOI: <https://doi.org/10.11134/btp.1.2017.6>. EDN: <https://www.elibrary.ru/zbenmt>
19. Kordyukova M.Y., Antipova V.N., Rogachevsky V.V., Zyrina N.V. An acid precipitation technique: A strip assay for the large-scale DNA polymerase activity screening. *Anal. Biochem.* 2016;513:39–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.08.022>
20. 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>
21. Черкашина А.С., Пика М.И., Михеева О.О. и др. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Способ получения большого фрагмента Bst-полимеразы. Заявка на патент RU 2022135005. Заявл. 28.12.2022. Cherkashina A.S., Pika M.I., Mikheeva O.O., et al. CRIE. Method for obtaining a large fragment of Bst-polymerase. Patent application RU 2022135005; 28.12.2022.

Информация об авторах

Пика Мария Игоревна — м.н.с., научная группа генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

Михеева Ольга Олеговна — н.с., научная группа генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

Соловьева Елена Дмитриевна — м.н.с., научная группа генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-0762-0347>

Валдохина Анна Владимировна — н.с., научная группа генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Буланенко Виктория Петровна — н.с., научная группа генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Черкашин Евгений Александрович — канд. хим. наук, рук. центра разработки, развития продукции и инноваций — ВРИО заведующего научно-производственной лаборатории, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

Петров Вадим Викторович — рук. научной группы разработки новых молекулярно-биологических технологий, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Красовитов Кирилл Владимирович — технолог-разработчик, научная группа разработки новых молекулярно-биологических технологий, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

Черкашина Анна Сергеевна[✉] — к.хим.н., рук. научной группы генной инженерии и биотехнологии, отдел молекулярной диагностики и эпидемиологии, ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, cherkashina@pcr.ms, <https://orcid.org/0000-0001-7970-7495>

Акимкин Василий Геннадиевич — д.м.н., проф., академик РАН, член-корреспондент РАН, директор ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов. *Пика М.И.* — концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Михеева О.О.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; *Соловьева Е.Д.* — проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; *Валдохина А.В.*, *Буланенко В.П.* — проведение экспериментов; *Черкашин Е.А.*, *Петров В.В.* — сбор, анализ и интерпретация данных; *Красовитов К.В.* — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных; *Черкашина А.С.* — концепция и дизайн исследования, подготовка текста; *Акимкин В.Г.* — концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации. Все авторы одобрили финальную версию статьи до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.01.2023;
принята к публикации 20.03.2023;
опубликована 28.06.2023

Information about the authors

Maria I. Pika — junior researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3279-6811>

Olga O. Mikheeva — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1721-5134>

Elena D. Solovyova — junior researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0762-0347>

Anna V. Valdokhina — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4592-4755>

Victoria P. Bulanenko — researcher, Research group of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7055-1762>

Evgeny A. Cherkashin — Cand. Sci. (Chem.), Head, Center for development, product development and innovation — Deputy head, Production department, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3627-6047>

Vadim V. Petrov — Head, Research group of development of new molecular biological technologies, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Kirill V. Krasovitev — technologist-developer, Research group of development of new molecular biological technologies, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

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

Vasily G. Akimkin — D. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Author contribution. *Pika M.I.* — the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; *Mikheeva O.O.* — conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; *Solovyova E.D.* — conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data; *Valdokhina A.V.*, *Bulanenko V.P.* — conducting of the experiments; *Cherkashin E.A.*, *Petrov V.V.* — collection, analysis and interpretation of the data; *Krasovitev K.V.* — the study concept and design, collection, analysis and interpretation of the data; *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 22.01.2023;
accepted for publication 20.03.2023;
published 28.06.2023