

ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ РНК ЗАВИСИМОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ

Мусахметов А^{1,2}, Акишев Ж^{1,2}, Хасенов Б^{1,2}

¹ТОО «Национальный центр биотехнологии», Коргалжынское шоссе, 13/5, Казахстан, Астана, 010000.

²ТОО «GenLab», ул. М.Габдуллина, 19/1. Казахстан, Астана, 010000.

*khasenov@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека является РНК зависимой ДНК-полимеразой, позволяющая получить комплементарную ДНК на РНК матрице. Исходная аминокислотная последовательность обратной транскриптазы была модифицирована путем внесения 18 замен и кодоноптоптимизирована для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Методом **безрестрикционного клонирования получен плазмидный вектор, в котором ген модифицированной обратной транскриптазы ВИЧ встроен под контроль индуцируемого промотора**. Трансформацией данным вектором компетентных клеток *E. coli* получен штамм, продуцирующий рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу ВИЧ с молекулярной массой 62,5 кДа. Рекомбинантный фермент был хроматографически очищен двухступенчатой элюцией на ионах Ni^{2+} и гепарине, выход составил 420 мг с 1 литра индуцированной культуры. РНК зависимая ДНК-полимеразная активность очищенного фермента подтверждена на образцах РНК, выделенных из *Secale cereale* и крови человека путем амплификации фрагментов генов 18S рРНК и актина Б, соответственно. Рекомбинантная модифицированная обратная транскриптаза демонстрирует полимеразную активность в диапазоне температур 50-70°C, что свидетельствует о её термостабильности. Биохимические показатели показывают перспективность применения фермента в качестве ревертазы в научных исследованиях и диагностической практике.

Ключевые слова: РНК, ДНК, РНК зависимая ДНК-полимераза, ВИЧ, *E.coli*, хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Обратная транскриптаза (ЕС 2.7.7.49) является РНК зависимой ДНК-полимеразой, без которой не происходит процесс обратной транскрипции – образование комплементарной ДНК (кДНК) на РНК матрице. Обратные транскриптазы (ОТ), их еще называют ревертазы, были открыты в 1970-ом году [1]. В 1975 году Д. Балтимор и Х. Темин за открытие обратной транскриптазы были награждены Нобелевской премией. Первоначально считалось, что обратная транскрипция имеется только у ретровирусов [2], однако позже установили, что данных механизм присутствует в эукариотических (человека, животных, растений) [3] и прокариотических клетках [4-10]. У эукариот обратная транскрипция встречается в контексте ретротранспозонов – мобильных генетических элементов, способных самостоятельно транспортироваться из одного участка генома в другой. В клетках человека обратную транскрипцию осуществляет еще и теломераза, достраивая теломерные участки на хромосомах [3].

Наиболее изученной является ревертаза ретровируса птиц, вызывающего миелобластоз (avian myeloblastosis virus, AMV) [11]. Ревертаза выполняет синтез молекулы ДНК на РНК матрице и расщепляет молекулу РНК в комплексе РНК-ДНК. Фермент ОТ имеет первостепенное значение в жизненном цикле многих вирусов, в первую очередь ретровирусов, таких как вирус иммунодефицита человека (human immunodeficiency virus, HIV) [2], так как с помощью механизма обратной транскрипции происходит встраивание РНК вириона в геном пораженной клетки и появление большого количества его копий внутри нее.

В научных исследованиях ОТ используют для чтения последовательности белков эукариотических организмов. Полученную с помощью ОТ кДНК используют в полиме-

разной цепной реакции, чтобы искусственно увеличить число копий полученной кДНК. Данный метод используется также и в диагностических целях – для идентификации РНК вирусов.

Известными ОТ являются ревертазы полученные из вирусов, вызывающих лейкемию мышей (murine leukemia viruses, M-MuLV) [12, 13] кошек [14], вызывающих лейкоз крупного рогатого скота (bovine leukemia virus, BLV) [15, 16], миелобластоз птиц AMV [11], обезьяньего пеностого вируса [17], вируса иммунодефицита человека HIV 1 и 2 типов [18-20].

Целью работы являлось получить рекомбинантную обратную транскриптазу в клетках *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Векторы, штаммы, ферменты, реактивы

В работе использовали плазмиду pET-28c(+) (Novagen, США). Ген модифицированной обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека был синтезирован в компании Macrogen (Южная Корея). Для клонирования и получения рекомбинантного белка использовали штаммы *Escherichia coli* DH5a (Promega, США) и BL21(DE3) (Novagen, США), соответственно. Использовались высокоточная полимераза Phusion и эндонуклеаза DpnI производства (Thermo Fisher, США). Химические реактивы, использованные в этом исследовании, были производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) и AppliChem (Дармштадт, Германия). Векторы и фермент хранились при -20°C, штаммы хранились при -80°C, а реактивы хранились в соответствии с рекомендациями производителя. Для культивирования штаммов использовали среда Миллера (0,5% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 0,5% NaCl, pH 7.5) и SOC (2 % триптона, 0,5

% дрожжевого экстракта, 0,05 % NaCl (0.5 g), 0.0186 % KCl, 0.0952 % MgCl₂, 0,2465 % MgSO₄, 0,3603 % глюкозы, pH 7,0).

Клонирование гена обратной транскриптазы

Клонирование гена проводили по протоколу безрестрикционного лигирования [21]. Для проведения безрестрикционного клонирования проводили ПЦР с 50 нг амплифицированного гена обратной транскриптазы, 30 нг вектора pET-28c(+) и высокоточной Phusion ДНК полимеразы в буфере HF Phusion buffer. Условия реакции были следующие: 98°C в течение 3 мин; 25 циклов (98°C в течение 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 3 мин); 1 цикл - 72°C в течение 10 минут. Для деградации исходной (метилованной) плазмидной ДНК амплифицированный продукт обрабатывали эндонуклеазой DpnI в буфере Tango X при 37°C в течение 2 часов. Очистку проводили с использованием смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт с последующим осаждением ДНК в этаноле. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре. Полученной смесью обрабатывали компетентные клетки *E. coli* DH5α по протоколу температурного шока. T7 регион в результирующей конструкции pET28c/RT-HIV секвенировали по Сенгеру [22] с использованием BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fischer Scientific, США). Разделение фрагментов ДНК проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3730xl (Applied Biosystem, США). Плазмидный вектор нарабатывали в клетках *E. coli* DH5α и выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

Трансформация клеток *E. coli*, индукция и хроматографическая очистка белка

Компетентные клетки штамма *E. coli* BL-21(DE3) были трансформированы вектором pET28c/RT-HIV. Трансформацию проводили методом электропорации на электропораторе MicroPulser (Bio-Rad, США) при следующих режимах: кювета 2,0 мм; напряжение 2,5 кВ; время переноса 4,7 мс. Клоны трансформанты отбирали на ЛБ-агаре с канамицином (50 мкг/мл) и культивировали на ЛБ-бульоне с канамицином до достижения OD₆₀₀=0,6, после чего добавляли изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) в концентрации 0,5 мМ и проводили индукцию белка в течение 20 часов при 18°C.

Клетки собирали центрифугированием при 6000×g в течение 6 минут и лизировали ультразвуком на соникаторе Sonicators (Qsonica, США). Водорастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 40000×g, в течение 1 часа при 4°C и наносили на колонку с Ni-NTA (Invitrogen, Германия), предварительно уравновешенную буфером: 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 500 мМ NaCl, 20 мМ Имидазол. Рекомбинантный белок элюировали ступенчатым градиентом по имидазолу: 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ и 250 мМ в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 500 мМ NaCl. Положительные фракции объединяли, концентрировали на колонке Piers (Thermo Scientific, США) с заменой буфера на 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 20 мМ NaCl и наносили на предупакованную колонку HiTrap Heparin 1 mL (General Electric, США), предварительно уравновешенную буфером: 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 20 мМ NaCl. Рекомбинантный белок элюировали ступенчатым градиентом по NaCl: 100 мМ, 200 мМ, 300 мМ, 500 мМ, 800 мМ,

1 М и 2М по 1 мл в 20 мМ Tris-HCl (pH 8.0). В элюатах измеряли концентрацию белка по методу Бредфорда [23] и с помощью разведения вносили в буфер хранения: 20 мМ Tris-HCl (pH 7.4) 100 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0,1% NP-40 с 50% глицерином и использовали в реакциях обратной транскрипции.

Реакция обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили на образцах РНК выделенных из *Secale cereale* и крови человека. РНК из *Secale cereale* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit 50 (QIAGEN) по протоколу производителя. При выделении РНК из *Secale cereale* присутствие ДНК в образце не было установлено, что было подтверждено электрофорезом в агарозном геле. Реакционная смесь для получения кДНК фрагмента 18S рРНК *Secale cereale* протяженностью 357 п.о. состояла из следующих компонентов; 2 мкл РНК (700 нг/мкл), 4,5 мкл 10 мМ dNTP, по 4,5 мкл 10 мМ праймеров 18SpPHK5337 (5'-TG CATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTC-3') и 18SpPHK5339 (5'-CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTC CAATAGCGT-3'), 119 мкл деионизированной воды. Прогревали при 70°C в течение 1 минуты и при 65°C в течение 5 минут. Добавляли 15 мкл 10X ОТ буфера (200 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 500 мМ KCl, 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 1% Tween-20) и 2,5 мМ MgCl₂, разделили по 15 мкл и инкубировали каждый образец при температуре: 50, 51, 54, 58, 62, 66, 68 или 70°C. Далее, на полученных образцах ставили ПЦР. Полимеразную цепную реакцию на кДНК полученную в результате реакции обратной транскрипции проводили с использованием термоциклера-амплификатора Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Германия) при следующих условиях: 1 мкл кДНК, 10 мкл 5x OneTaq Standard Reaction Buffer, 1 мкл 10 мМ dNTP, 1,5 мкл 10 мМ праймеров 18SpPHK5337 и 18SpPHK5339, 0,5 мкл 5 Ед/мкл OneTaq DNA Polymerase (New England Biolabs, США). Программа амплификации: 95°C - 1 минута; 25 циклов (95°C - 15 секунд, 60°C - 30 секунд, 72°C - 10 секунд); 72°C - 10 секунд.

Аналогичным образом с использованием праймеров 18SpPHK5337 и 18SpPHK5338 (5'-CAGCAGCCGCGGT AATTCCAGCTCCAATAGCGT-3') получали кДНК с последующей ПЦР фрагмента 18S рРНК *Secale cereale* протяженностью 1062 п.о. Программа амплификации состояла из следующих циклов: 95°C - 1 минута; 25 циклов (95°C - 15 секунд, 60°C - 30 секунд, 72°C - 30 секунд); 72°C - 10 секунд.

РНК выделяли из крови человека. Из 10 мл крови путем удаления эритроцитов получали лейкоцитарную массу. Для этого кровь обрабатывали 17 мл 0,5% уксусной кислотой и таким же количеством 1,8% NaCl с центрифугированием при 500×g в течение 10 минут. Лейкоциты лизировали добавлением 500 мкл лизирующего буфера RLT (79216, Qiagen) и инкубацией в течение 5 минут. Добавляли 100 мкл хлороформа, инкубировали 5 минут, центрифугировали 10000×g в течение 10 минут при 4°C. Надосадочную жидкость обрабатывали изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 при 0°C. Центрифугировали 12000×g в течение 20 минут при 4°C. РНК осаждали 70% этанолом и растворяли в стерильной безнуклеазной воде.

Реакционная смесь для получения кДНК гена ак-

тина Б протяженностью 1128 п.о. состояла из следующих компонентов; 2 мкл РНК (876 нг/мкл), 2 мкл 10 mM dNTP, по 1 мкл 10 мкМ праймеров ActBfw (5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGCT-3') и ActBrv (5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGA-3'), 11 мкл деионизированной воды. Прогревали при 70°C в течение 5 минут. Добавляли 2 мкл 10X ОТ буфера с 2,5 mM MgCl₂ и модифицированную обратную транскриптазу в объеме 1 мкл и инкубировали при температуре 50°C в течение 30 минут. Далее, на полученных образцах ставили ПЦР. Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: 2 мкл кДНК, 5 мкл 5x Phusion HF Buffer, 2 мкл 10 mM dNTP, 1 мкл 10 мкМ праймеров ActBfw и ActBrv, 0,5 мкл 2 Ед/мкл Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (Thermo Scientific, США). Программа амплификации: 98°C - 1 минута; 25 циклов (98°C - 15 секунд, 55°C - 30 секунд, 72°C - 30 секунд); 72°C - 10 минут.

Для проверки результатов проводили электрофорез в агарозном геле с этидиум бромидом в трис-ацетатном буфере с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете.

ПААГ-ДСН электрофорез

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия для электрофоретического разделения белков проводили в 12% полиакриламидном геле по методу Лэммли [24] в ячейке MiniProtean-IV (Bio-Rad Laboratories Inc). Условия электрофореза были следующими: 120 В в течение 90 минут. Гель окрашивали 2% Кумасси бриллиантовым синим R250 (AppliChem, Германия) в 10% уксусной кислотой в 50% этаноле и отмывали 7,5% уксусной кислотой в 25% этаноле. Использовали лабораторный маркер молекулярной массы белков на 14 кДа, 30 кДа, 42 кДа, 66 кДа и 100 кДа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборка экспрессионной генно-инженерной конструкции с геном обратной транскриптазы

Синтезированный ген модифицированной и кодо-

ноптимизированной обратной транскриптазы представлен в составе высококопийного плазмидного вектора pTOP_Blunt_V2. Плазмидную ДНК нарабатывали путем трансформации данным вектором компетентных клеток *Escherichia coli* штамма DH5α по протоколу температурного шока. В качестве селективного маркера pTOP_Blunt_V2 содержит ген устойчивости к антибиотику ампициллину. В настоящем исследовании было выбрано 18 мутаций, которые потенциально увеличат термостабильность фермента, процессивность и устойчивость к высоким концентрациям KCl. На рисунке 1 представлен сравнительный анализ двух последовательностей: нативной обратной транскриптазы из ВИЧ и модифицированной ОТ с введенными мутациями.

Последовательность модифицированной обратной транскриптазы содержит аминокислотные замены в следующих положениях: V36T, E123K, D178E, Q208E, R212K, L215F, V246Q, R278K, T287A, E292D, E294V, R357K, G360S, A372V, T377A, K391R, K432T, N461D. Замены D178E и E292D консервативные и направлены на **оптимизацию структуры** белка для повышения устойчивости при температурах 60–70 °C [25]. Замены Ala/Val/Thr (T287A, E294V, A372V, T377A, K391R) могут снижать энтропию денатурации белка, способствуя его стабилизации [26]. Мутации R212K, E123K, L215F, V246Q, R278K, R357K направлены на повышение поверхностного положительного заряда способствуя снижению степени инактивации при высоких концентрациях KCl и уменьшению агрегирования [27–29]. Мутации V36T, Q208E, G360S в области были выбраны с целью повышения аффинности ревертазы к матрице и праймерам, а также для ускорения скорости полимеризации при RT-PCR [26, 27]. Последние две замены K432T и N461D в участках связывания трифосфатов, произведены с целью возможного эффекта снижения сродства к dTTP и увеличению эффективности работы с dUTP [26].

Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили по протоколу Miniprep с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, США). В качестве

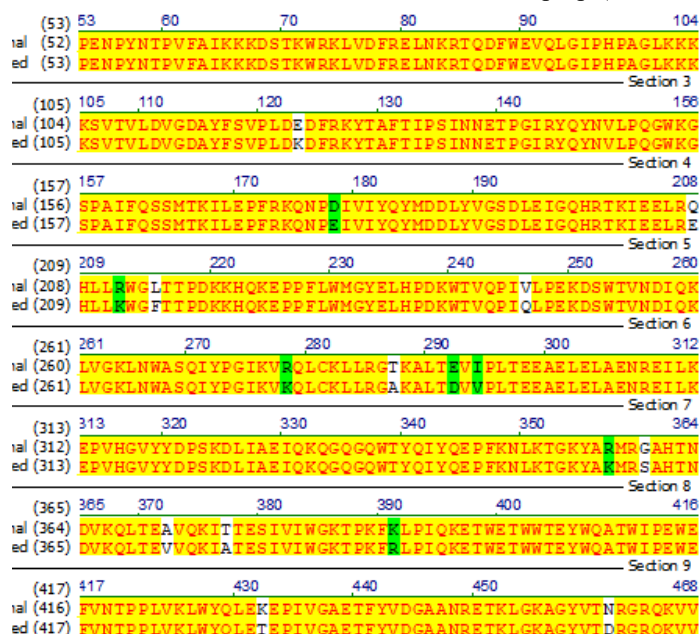


Рисунок 1 – Мутации в гене обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека

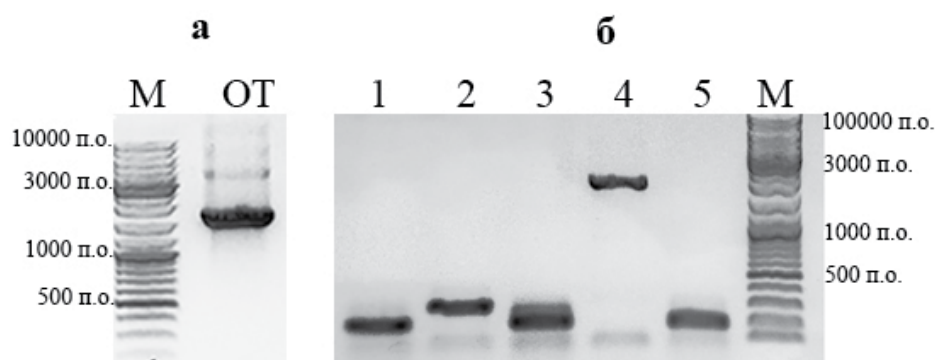


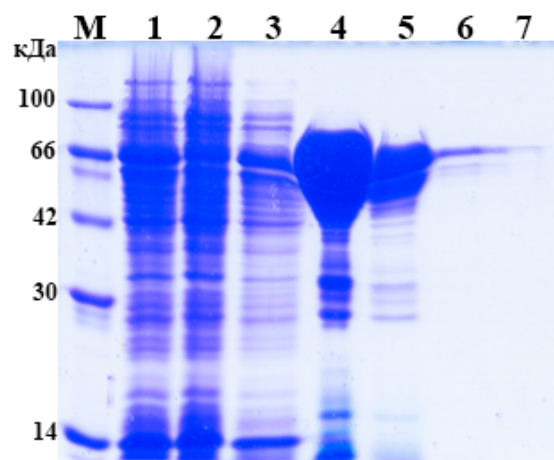
Рисунок 2 – Результаты ПЦР амплификации гена модифицированной обратной транскриптазы ВИЧ (а) и ПЦР-скрининга клонов-трансформантов на наличие встроенного гена обратной транскриптазы (б), где ОТ – обратная транскриптаза, 1-4 клоны, М – ДНК маркер

бактериального экспрессионного вектора был выбран вектор рЕТ-28с(+) (Novagen, США), который содержит индуцибельный промотор бактериофага Т7 и селективный маркер в виде гена устойчивости к канамицину. Для сборки генно-инженерной конструкции с геном обратной транскриптазы был выбран протокол безрестрикционного клонирования. Основываясь на последовательности гена, были подобраны и синтезированы олигонуклеотиды RT1-Hisfw (5'-TGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCCATTA GTCTATTGAAA-3') и RT1rv (5'-GGGCTTTGTTAGCA GCCGGATCTCACAGTACTTTCTGATTCCA-3'). Ген обратной транскриптазы был амплифицирован с использованием олигонуклеотидов RT1-Hisfw и RT1rv. На рисунке 2а представлены результаты амплификации гена обратной транскриптазы.

В результате безрестрикционного клонирования получены клоны-трансформанты, которые проверяли на наличие целевой конструкции при помощи ПЦР-скрининга по Т7 региону. Результаты ПЦР-скрининга приведены на рисунке 2б. Как следует из рисунка, из пяти клонов клон №4 содержал ген с ожидаемой протяженностью 1686 п.о. в Т7 регионе. Клон культивировали в 5 мл ЛБ бульона, из клеток выделяли плазмидную ДНК, которую секвенировали на проверку наличия/отсутствия мутаций. Анализ хроматограмм показал, что в результирующей конструкции отсутствуют какие-либо мутации и она полностью совпадает с заданным вектором. В составе данного вектора модифицированный ген обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека встроен под контроль РНК полимеразы бактериофага Т7. В открытой рамке считывания последовательность белка насчитывает 562 а.о. С N-конца обратная транскриптаза содержит гексагистидиновую метку. Расчетная масса рекомбинантного белка составляет 62,46 кДа.

Экспрессия гена и хроматографическая очистка рекомбинантной обратной транскриптазы

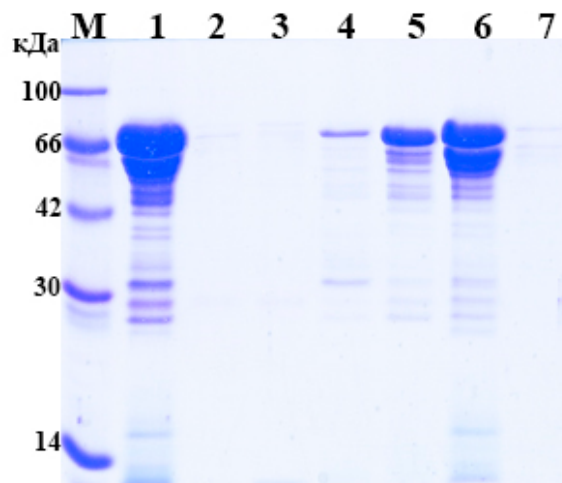
Трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* BL-21(DE3) полученным вектором позволило получить рекомбинантный штамм, который при добавлении ИПТГ обеспечивал внутриклеточное накопление белка с молекулярной массой 62,5 кДа. Хроматографическая очистка с использованием имидазола в качестве элюирующего буфера позволила выделить рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу из бактериального лизата используя встроенную гексагистидиновую метку белка (рисунок 3).



1- фракция до колонки с Ni-NTA, 2 - фракция после колонки с Ni-NTA, 3-8 элюаты с имидазолом, где 3 – 20 мМ, 4 - 100 мМ, 5 - 150 мМ, 6 – 200 мМ, 7 – 250 мМ, М-белковый маркер

Рисунок 3. ПААГ-ДСН после хроматографической очистки рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы ВИЧ на Ni-NTA

Дополнительная хроматография с использованием гепарина в качестве ДНК-имитирующего агента позволила



1- фракция до колонки HiTrap Heparin 1ml, 2 - фракция после колонки HiTrap Heparin 1ml, 3-8 элюаты с NaCl, где 3 – 100 мМ, 4 – 200 мМ, 5 – 300 мМ, 6 – 500 мМ, 7 – 800 мМ, М - белковый маркер

Рисунок 4. ПААГ-ДСН после хроматографической очистки рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы ВИЧ на HiTrap Heparin 1ml

доочистить рекомбинантный белок (рисунок 4), который был использован в экспериментах по получению комплиментарной ДНК на основе РНК, выделенной из различных источников.

Проверка ревертазной активности рекомбинантной обратной транскриптазы

Проверка ревертазной активности полученной рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы на РНК, выделенной из образцов *Secale cereale* показала, что фермент обладает требуемой ревертазной активностью в диапазоне температур 50-58°C для фрагментов кДНК протяженностью ~1000 п.о. и в диапазоне 50-70°C для более коротких фрагментов ~350 п.о. (рисунок 5).

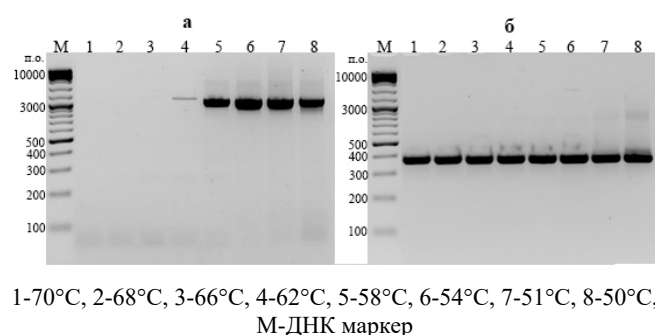
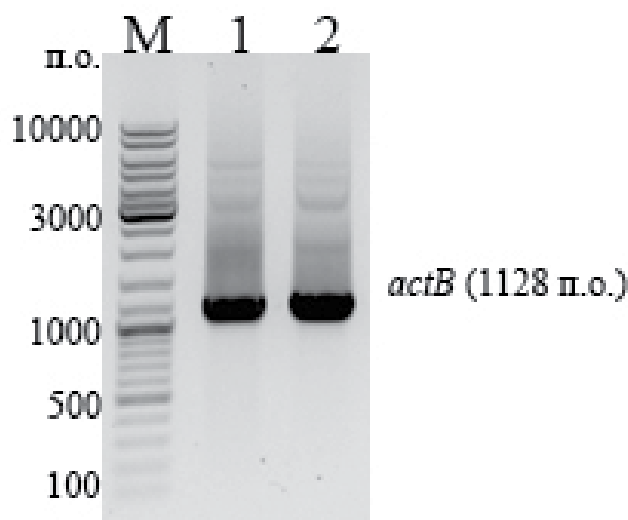


Рисунок 5. Результаты ПЦР амплификации фрагментов 18S рРНК *Secale cereale* на 1062 п.о. (а) и 357 п.о. (б), проведенной на кДНК, полученной с помощью рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы

Проверка ревертазной активности на РНК, выделенной из крови человека с использованием праймеров специфичных к гену актина Б (*actB*) также показала, что рекомбинантная модифицированная обратная транскриптаза из вируса иммунодефицита человека обладает РНК зависимой ДНК полимеразной активностью и может быть использована при получении кДНК генов человека (рисунок 6).



1,2-ПЦР продукт, М-ДНК маркер

Рисунок 6. Результаты ПЦР амплификации гена актина Б человека, проведенной на кДНК полученной с помощью рекомбинантной модифицированной обратной транскриптазы

ОБСУЖДЕНИЕ

Обратные транскриптазы востребованы в научных исследованиях и диагностических тест-системах. На практике обычно используют ОТ полученные из AMV и M-MuLV, которые применяют в различных приложениях, однако по прежнему актуальны исследования по получению улучшенных вариантов ревертаз и поиску обратных транскриптаз альтернативного происхождения [30-33]. Природные ревертазы из AMV и M-MuLV характеризуются невысокой термостабильностью, в тоже время желательно чтобы рабочий диапазон ОТ составлял не менее 50°C. Максимально допустимой температурой для ОТ дикого типа из M-MuLV является 45°C. Введение трёх мутаций в последовательность домена, ответственного за связывание ОТ с РНК матрицей (E286R, E302K, L435R) позволяют повысить термостабильность фермента до 60°C [31]. Последующие эксперименты с заменой аминокислот, участвующих в стабилизации гидрофобного ядра ОТ из M-MuLV позволили подобрать еще дополнительные три мутации (A32V, L72R, W388R), которые несколько улучшили термостабильность фермента [33]. В работе [31] авторы с использованием методики эволюции компартиментализованного рибосомного дисплея смогли установить, что совместные мутации в ОТ M-MuLV в положении D200N, L603W, T330P, L139P и E607K ведут к увеличению максимальной температуры ОТ до 62°C. Аналогичные работы по мутагенезу ОТ из M-MLV с использованием внеклеточных систем экспрессии позволяют находить другие точечные мутации повышающие температурные показатели фермента [32, 34].

Перспективным объектом для получения термостабильной обратной транскриптазы является ревертаза из вируса иммунодефицита человека, так как ОТ из ВИЧ сама по себе является термостабильным ферментом, но обладающего, к сожалению, невысокой точностью полимеризации из-за плохой дискриминирующей способности в отношении вставляемых нуклеотидов. Особенностью ревертазы из HIV1 группы О является то, что точность ОТ зависит от температуры. Эксперименты показали, что при температуре 55°C точность фермента в реакции обратной транскрипции увеличивается в 2-3 раза в сравнении с температурой 37°C [35]. Если ретровирусные ревертазы эволюционно настроены на невысокую точность, которая им необходима для лучшей выживаемости, то для практического применения требуются ревертазы с повышенной точностью амплификации [36-39].

Не менее важным является снижение рибонуклеазной Н (РНК-азной Н) активности ревертаз, для предотвращения деградации РНК и гибридных молекул РНК/ДНК. Исследования показали, что у ОТ из M-MLV участки ответственные за полимеразную и РНК-ую Н активности находятся в разных доменах, что позволяет снизить РНК-ую Н активность без снижения ревертазной активности [40].

Анализ показал, что последовательность ревертазы из ВИЧ1 группы М входит в состав гена *gag-pol* полипротеина, который состоит из 2 доменов, кодирующего структурные белки *gag*- домена и полимеразного *pol*-домена. Из анализа аминокислотной последовательности белка следует, что введение ряда мутаций может потенциально ска-

жется на увеличении эффективности фермента.

Еще одной модификацией являлась полная замена нуклеотидной последовательности без изменения заданной аминокислотной последовательности. Известно, что частота встречаемости кодонов, кодирующих белки вирусов человека и *E. coli* для одних и тех же аминокислот различна, поэтому была проведена процедура кодоноптоимизации, в ходе которой, триплеты были заменены на другие с использованием ресурса IDT Codon Optimization Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>). Данная процедура позволяет значительно увеличить уровень экспрессии вирусов в бактериальной экспрессионной системе. Полученный в результате применения технологии рекомбинантных ДНК плазмидный вектор, несущий ген модифицированной ОТ из ВИЧ1, был использован для внутриклеточного накопления рекомбинантного фермента. Дальнейшие работы по выделению и хроматографической очистке позволили получить рекомбинантную модифицированную обратную транскриптазу с выходом 420 мг из 1 литра индуцированной культуры. Проведенные эксперименты по тестированию ревертазной активности данного рекомбинантного фермента на образцах РНК из показали, что полученный фермент обладает РНК связывающей ДНК полимеразной активностью. Инкубация фермента с образцами РНК не выявила значительной рибонуклеазной Н активности.

Таким образом, на основе последовательности *gag-pol* вируса иммунодефицита человека путем замены 18 аминокислотных остатков (рисунок 7), кодоноптоимизации и плазмидной экспрессией в клетках *Escherichia coli* получена рекомбинантная термостабильная обратная транскриптаза, которая демонстрирует РНК зависимую ДНК полимеразную активность в диапазоне температур 50-70°C и может быть использована в научных исследованиях и диагностической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологии рекомбинантных ДНК в клетках *Escherichia coli* получена рекомбинантная модифицированная обратная транскриптаза, которая содержит последовательность *gag-pol* вируса иммунодефицита человека с 18 аминокислотными заменами относительно исходной последовательности. Очистку рекомбинантного фермента проводили металлоаффинной хроматографией на ионах Ni^{2+} и аффинной хроматографией на гепарине. Выход очищенного фермента составил 420 мг с 1 литра индуцированной культуры. Проверка ферментативной активности на образцах РНК выделенных из *Secale cereale* и крови человека, показало, что полученная рекомбинантная обратная транскриптаза обладает РНК зависимой ДНК-полимеразной активностью, в тоже время у фермента не обнаружена выраженная рибонуклеазная Н активность, ведущая к деградации РНК. Полученный фермент имеет перспективу применения в качестве ревертазы в научных исследованиях и диагностической практике для получения комплиментарной ДНК. Дальнейшие исследования предполагают изучение влияния различных факторов на ревертазную активность, таких как: температура, ионы солей, кофакторы, рН, ингибиторы. Планируется введение дополнительных мутаций в последовательность обратной транскриптазы для увеличения процессивности и скорости полимеризации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования были профинансированы Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (ПЦФ BR24992881).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

От имени всех авторов, отвечающий автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

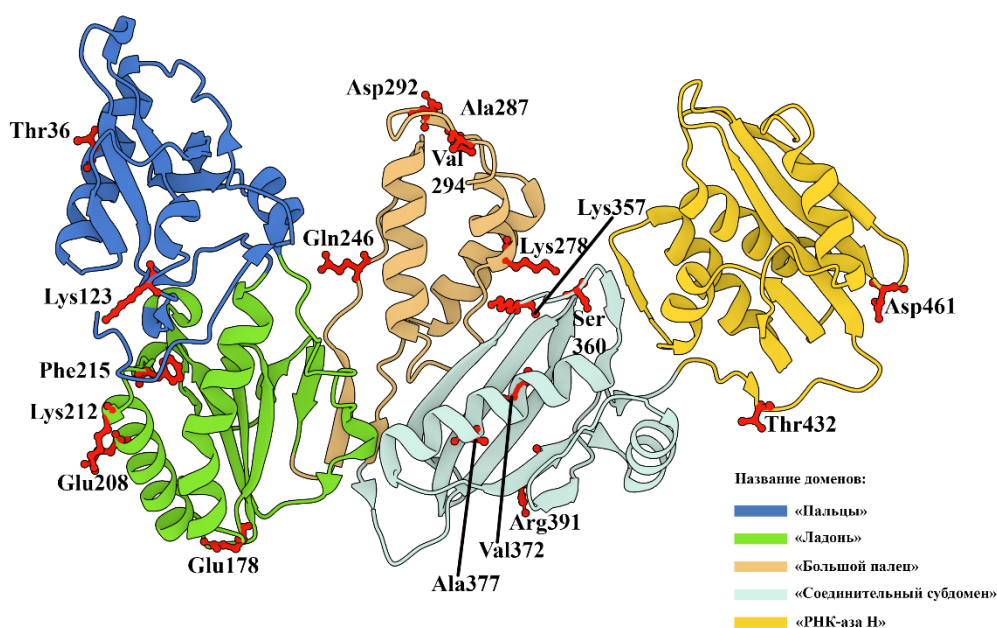


Рисунок 7. Предположительная 3D структура обратной транскриптазы полученной ревертазы при помощи AlphaFold3 [41]. Цветами показаны различные структурные домены, с указанием мест произведенных замен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baltimore D. Discovery of the reverse transcriptase // *Faseb j.* – 1995. – V. 9, No 15. – P. 1660-3.
2. Goff S. P. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function // *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988). – 1990. – V. 3, No 8. – P. 817-31.
3. Autexier C., Lue N. F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase // *Annual Review of Biochemistry.* – 2006. – V. 75, No 1. – P. 493-517.
4. Bahrami F., Jestin J. L. Streptococcus agalactiae DNA polymerase I is an efficient reverse transcriptase // *Biochimie.* – 2008. – V. 90, No 11-12. – P. 1796-9.
5. Zimmerly S., Wu L. An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria // *Microbiol Spectr.* – 2015. – V. 3, No 2. – P. 0058-2014.
6. Lim D., Maas W. K. Reverse transcriptase in bacteria // *Mol Microbiol.* – 1989. – V. 3, No 8. – P. 1141-4.
7. Lampson B. C., Sun J., Hsu M. Y., Vallejo-Ramirez J., Inouye S., Inouye M. Reverse transcriptase in a clinical strain of Escherichia coli: production of branched RNA-linked msDNA // *Science.* – 1989. – V. 243, No 4894 Pt 1. – P. 1033-8.
8. Jackson L. N., Chim N., Shi C., Chaput J. C. Crystal structures of a natural DNA polymerase that functions as an XNA reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47, No 13. – P. 6973-6983.
9. Silas S., Mohr G., Sidote D. J., Markham L. M., Sanchez-Amat A., Bhaya D., Lambowitz A. M., Fire A. Z. Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein // *Science.* – 2016. – V. 351, No 6276. – P. aad4234.
10. Sontheimer E. J., Marraffini L. A. RNA. CRISPR goes retro // *Science.* – 2016. – V. 351, No 6276. – P. 920-1.
11. Houts G. E., Miyagi M., Ellis C., Beard D., Beard J. W. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus // *J Virol.* – 1979. – V. 29, No 2. – P. 517-22.
12. Moelling K. Characterization of reverse transcriptase and RNase H from friend-murine leukemia virus // *Virology.* – 1974. – V. 62, No 1. – P. 46-59.
13. Malik O., Khamis H., Rudnizky S., Kaplan A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, No 22. – P. 12954-12962.
14. North T. W., Cronn R. C., Remington K. M., Tandberg R. T., Judd R. C. Characterization of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus // *J Biol Chem.* – 1990. – V. 265, No 9. – P. 5121-8.
15. Perach M., Hizi A. Catalytic features of the recombinant reverse transcriptase of bovine leukemia virus expressed in bacteria // *Virology.* – 1999. – V. 259, No 1. – P. 176-89.
16. Avidan O., Meer M. E., Oz I., Hizi A. The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus // *Eur J Biochem.* – 2002. – V. 269, No 3. – P. 859-67.
17. Benzair A. B., Rhodes-Feuillette A., Emanoïl-Ravicovitch R., Peries J. Reverse transcriptase from simian foamy virus serotype 1: purification and characterization // *J Virol.* – 1982. – V. 44, No 2. – P. 720-4.
18. Muñoz J. L., Parks W. P., Wolinsky S. M., Korber B. T., Hutto C. HIV-1 reverse transcriptase. A diversity generator and quasispecies regulator // *Ann N Y Acad Sci.* – 1993. – V. 693. – P. 65-70.
19. Tarrago-Litvak L., Andréola M. L., Nevinsky G. A., Sarih-Cottin L., Litvak S. The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention // *Faseb j.* – 1994. – V. 8, No 8. – P. 497-503.
20. Bird L. E., Chamberlain P. P., Stewart-Jones G. B., Ren J., Stuart D. I., Stammers D. K. Cloning, expression, purification, and crystallisation of HIV-2 reverse transcriptase // *Protein Expr Purif.* – 2003. – V. 27, No 1. – P. 12-8.
21. van den Ent F., Löwe J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids // *J Biochem Biophys Methods.* – 2006. – V. 67, No 1. – P. 67-74.
22. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1977. – V. 74, No 12. – P. 5463-7.
23. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-54.
24. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680-5.
25. Jacobo-Molina A., Arnold E. HIV reverse transcriptase structure-function relationships // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30, No 26. – P. 6351-6.
26. Sarafianos S. G., Marchand B., Das K., Himmel D. M., Parniak M. A., Hughes S. H., Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition // *J Mol Biol.* – 2009. – V. 385, No 3. – P. 693-713.
27. Kim B., Hathaway T. R., Loeb L. A. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Functional mutants obtained by random mutagenesis coupled with genetic selection in Escherichia coli // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271, No 9. – P. 4872-8.
28. Patel P. H., Jacobo-Molina A., Ding J., Tantillo C., Clark A. D., Jr., Raag R., Nanni R. G., Hughes S. H., Arnold E. Insights into DNA Polymerization Mechanisms from Structure and Function Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34, No 16. – P. 5351-5363.
29. Wrobel J. A., Conrad M. J., Bloedon E., Swanstrom R., Hutchison C. A., 3rd. Analysis of HIV type 1 reverse transcriptase: comparing sequences of viral isolates with mutational data // *AIDS Res Hum Retroviruses.* – 2000. – V. 16, No 18. – P. 2049-54.
30. 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. – V. 37, No 2. – P. 473-81.
31. Yasukawa K., Mizuno M., Konishi A., Inouye K. Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis // *J Biotechnol.* – 2010. – V. 150, No 3. – P. 299-306.

32. Katano Y., Hisayoshi T., Kuze I., Okano H., Ito M., Nishigaki K., Takita T., Yasukawa K. Expression of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a cell-free protein expression system // *Biotechnol Lett.* – 2016. – V. 38, No 7. – P. 1203-11.
33. Baba M., Kakue R., Leucht C., Rasor P., Walch H., Ladiges D., Bell C., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination // *Protein Eng Des Sel.* – 2017. – V. 30, No 8. – P. 551-557.
34. Katano Y., Li T., Baba M., Nakamura M., Ito M., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2017. – V. 81, No 12. – P. 2339-2345.
35. Álvarez M., Menéndez-Arias L. Temperature effects on the fidelity of a thermostable HIV-1 reverse transcriptase // *Febs j.* – 2014. – V. 281, No 1. – P. 342-51.
36. Zhang W. H., Svarovskaia E. S., Barr R., Pathak V. K. Y586F mutation in murine leukemia virus reverse transcriptase decreases fidelity of DNA synthesis in regions associated with adenine-thymine tracts // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – V. 99, No 15. – P. 10090-5.
37. Svarovskaia E. S., Cheslock S. R., Zhang W. H., Hu W. S., Pathak V. K. Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity // *Front Biosci.* – 2003. – V. 8. – P. d117-34.
38. Mbisa J. L., Nikolenko G. N., Pathak V. K. Mutations in the RNase H primer grip domain of murine leukemia virus reverse transcriptase decrease efficiency and accuracy of plus-strand DNA transfer // *J Virol.* – 2005. – V. 79, No 1. – P. 419-27.
39. Menéndez-Arias L. Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 2002. – V. 71. – P. 91-147.
40. Kotewicz M. L., Sampson C. M., D'Alessio J. M., Gerard G. F. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16, No 1. – P. 265-77.
41. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A. J., Bambrick J., Bodenstein S. W., Evans D. A., Hung C.-C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A. I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F. B., Gladman H., Jain R., Khan Y. A., Low C. M. R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E. D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J. M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature.* – 2024. – V. 630, No 8016. – P. 493-500.
1. Baltimore D. Discovery of the reverse transcriptase // *Faseb j.* – 1995. – V. 9, No 15. – P. 1660-3.
2. Goff S. P. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function // *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988). – 1990. – V. 3, No 8. – P. 817-31.
3. Autexier C., Lue N. F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase // *Annual Review of Biochemistry.* – 2006. – V. 75, No 1. – P. 493-517.
4. Bahrami F., Jestin J. L. Streptococcus agalactiae DNA polymerase I is an efficient reverse transcriptase // *Biochimie.* – 2008. – V. 90, No 11-12. – P. 1796-9.
5. Zimmerly S., Wu L. An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria // *Microbiol Spectr.* – 2015. – V. 3, No 2. – P. 0058-2014.
6. Lim D., Maas W. K. Reverse transcriptase in bacteria // *Mol Microbiol.* – 1989. – V. 3, No 8. – P. 1141-4.
7. Lampson B. C., Sun J., Hsu M. Y., Vallejo-Ramirez J., Inouye S., Inouye M. Reverse transcriptase in a clinical strain of Escherichia coli: production of branched RNA-linked msDNA // *Science.* – 1989. – V. 243, No 4894 Pt 1. – P. 1033-8.
8. Jackson L. N., Chim N., Shi C., Chaput J. C. Crystal structures of a natural DNA polymerase that functions as an XNA reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47, No 13. – P. 6973-6983.
9. Silas S., Mohr G., Sidote D. J., Markham L. M., Sanchez-Amat A., Bhaya D., Lambowitz A. M., Fire A. Z. Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein // *Science.* – 2016. – V. 351, No 6276. – P. aad4234.
10. Sontheimer E. J., Marraffini L. A. RNA. CRISPR goes retro // *Science.* – 2016. – V. 351, No 6276. – P. 920-1.
11. Houts G. E., Miyagi M., Ellis C., Beard D., Beard J. W. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus // *J Virol.* – 1979. – V. 29, No 2. – P. 517-22.
12. Moelling K. Characterization of reverse transcriptase and RNase H from friend-murine leukemia virus // *Virology.* – 1974. – V. 62, No 1. – P. 46-59.
13. Malik O., Khamis H., Rudnizky S., Kaplan A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45, No 22. – P. 12954-12962.
14. North T. W., Cronn R. C., Remington K. M., Tandberg R. T., Judd R. C. Characterization of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus // *J Biol Chem.* – 1990. – V. 265, No 9. – P. 5121-8.
15. Perach M., Hizi A. Catalytic features of the recombinant reverse transcriptase of bovine leukemia virus expressed in bacteria // *Virology.* – 1999. – V. 259, No 1. – P. 176-89.
16. Avidan O., Meer M. E., Oz I., Hizi A. The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus // *Eur J Biochem.* – 2002. – V. 269, No 3. – P. 859-67.
17. Benzair A. B., Rhodes-Feuillette A., Emanoïl-Ravicovitch R., Peries J. Reverse transcriptase from simian foamy virus serotype 1: purification and characterization // *J Virol.* – 1982. – V. 44, No 2. – P. 720-4.
18. Muñoz J. L., Parks W. P., Wolinsky S. M., Korber B.

REFERENCES

- T., Hutto C. HIV-1 reverse transcriptase. A diversity generator and quasispecies regulator // *Ann N Y Acad Sci.* – 1993. – V. 693. – P. 65-70.
19. Tarrago-Litvak L., Andréola M. L., Nevinsky G. A., Sarih-Cottin L., Litvak S. The reverse transcriptase of HIV-1: from enzymology to therapeutic intervention // *Faseb j.* – 1994. – V. 8, No 8. – P. 497-503.
20. Bird L. E., Chamberlain P. P., Stewart-Jones G. B., Ren J., Stuart D. I., Stammers D. K. Cloning, expression, purification, and crystallisation of HIV-2 reverse transcriptase // *Protein Expr Purif.* – 2003. – V. 27, No 1. – P. 12-8.
21. van den Ent F., Löwe J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids // *J Biochem Biophys Methods.* – 2006. – V. 67, No 1. – P. 67-74.
22. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1977. – V. 74, No 12. – P. 5463-7.
23. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-54.
24. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680-5.
25. Jacobo-Molina A., Arnold E. HIV reverse transcriptase structure-function relationships // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30, No 26. – P. 6351-6.
26. Sarafianos S. G., Marchand B., Das K., Himmel D. M., Parniak M. A., Hughes S. H., Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition // *J Mol Biol.* – 2009. – V. 385, No 3. – P. 693-713.
27. Kim B., Hathaway T. R., Loeb L. A. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Functional mutants obtained by random mutagenesis coupled with genetic selection in *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271, No 9. – P. 4872-8.
28. Patel P. H., Jacobo-Molina A., Ding J., Tantillo C., Clark A. D., Jr., Raag R., Nanni R. G., Hughes S. H., Arnold E. Insights into DNA Polymerization Mechanisms from Structure and Function Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34, No 16. – P. 5351-5363.
29. Wrobel J. A., Conrad M. J., Bloedon E., Swanson R., Hutchison C. A., 3rd. Analysis of HIV type 1 reverse transcriptase: comparing sequences of viral isolates with mutational data // *AIDS Res Hum Retroviruses.* – 2000. – V. 16, No 18. – P. 2049-54.
30. 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. – V. 37, No 2. – P. 473-81.
31. Yasukawa K., Mizuno M., Konishi A., Inouye K. Increase in thermal stability of Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis // *J Biotechnol.* – 2010. – V. 150, No 3. – P. 299-306.
32. Katano Y., Hisayoshi T., Kuze I., Okano H., Ito M., Nishigaki K., Takita T., Yasukawa K. Expression of moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in a cell-free protein expression system // *Biotechnol Lett.* – 2016. – V. 38, No 7. – P. 1203-11.
33. Baba M., Kakue R., Leucht C., Rasor P., Walch H., Ladiges D., Bell C., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Further increase in thermostability of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by mutational combination // *Protein Eng Des Sel.* – 2017. – V. 30, No 8. – P. 551-557.
34. Katano Y., Li T., Baba M., Nakamura M., Ito M., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Generation of thermostable Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase variants using site saturation mutagenesis library and cell-free protein expression system // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2017. – V. 81, No 12. – P. 2339-2345.
35. Álvarez M., Menéndez-Arias L. Temperature effects on the fidelity of a thermostable HIV-1 reverse transcriptase // *Febs j.* – 2014. – V. 281, No 1. – P. 342-51.
36. Zhang W. H., Svarovskaia E. S., Barr R., Pathak V. K. Y586F mutation in murine leukemia virus reverse transcriptase decreases fidelity of DNA synthesis in regions associated with adenine-thymine tracts // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – V. 99, No 15. – P. 10090-5.
37. Svarovskaia E. S., Cheslock S. R., Zhang W. H., Hu W. S., Pathak V. K. Retroviral mutation rates and reverse transcriptase fidelity // *Front Biosci.* – 2003. – V. 8. – P. d117-34.
38. Mbisa J. L., Nikolenko G. N., Pathak V. K. Mutations in the RNase H primer grip domain of murine leukemia virus reverse transcriptase decrease efficiency and accuracy of plus-strand DNA transfer // *J Virol.* – 2005. – V. 79, No 1. – P. 419-27.
39. Menéndez-Arias L. Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 2002. – V. 71. – P. 91-147.
40. Kotewicz M. L., Sampson C. M., D'Alessio J. M., Gerard G. F. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – V. 16, No 1. – P. 265-77.
41. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A. J., Bambrick J., Bodenstein S. W., Evans D. A., Hung C.-C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A. I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F. B., Gladman H., Jain R., Khan Y. A., Low C. M. R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E. D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J. M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature.* – 2024. – V. 630, No 8016. – P. 493-500.

ӘОЖ 577.215.3

КЕРІ ТРАНСКРИПТАЗА РЕТІНДЕ ПАЙДАЛАНУҒА АРНАЛҒАН АДАМНЫҢ ИММУН ТАПШЫЛЫҒЫ ВИРУСЫНЫҢ МОДИФИКАЦИЯЛАНҒАН РНҚ-ТӘУЕЛДІ ДНҚ ПОЛИМЕРАЗАСЫН АЛУ**Мұсахметов А^{1,2}., Акишев Ж^{1,2}., Хасенов Б^{1,2}.**¹Ұлттық биотехнология орталығы ЖШС, Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана қ., 010000.² «GenLab» ЖШС, М.Габдуллина к., 19/1. Казахстан, Астана, 010000.

*khassenov@biocenter.kz

ТҮЙІН

Адамның иммун тапшылығы вирусының кері транскриптазасы РНҚ матрицасы негізінде комплементарлы ДНҚ алуға мүмкіндік беретін РНҚ-тәуелді ДНҚ-полимераза болып табылады. Кері транскриптазаның бастапқы амин қышқыл тізбегі, 18 алмастыруды енгізу арқылы, өзгертіліп, ішек таяқшасы жасушаларында экспрессия үшін кодон оңтайландырылды. Рестрикциясыз клондау әдісін қолдана отырып, индукцияланатын промотордың бақылауымен модификацияланған АИТВ кері транскриптазасының гені клондалған плазмидтік векторы алынды. Компетентті *E. coli* жасушаларының осы вектормен трансформациясы негізінде молекулалық салмағы 62,5 кДа болатын рекомбинантты модификацияланған АИТВ кері транскриптазасын өндіретін штамм алынды. Рекомбинантты фермент Ni²⁺ иондары мен гепарин негізінде екі сатылы элюциясы арқылы хроматографиялық тазартылды, 1 литр индукцияланған дақылынан шығысы 420 мг құрады. Тазартылған ферменттің РНҚ-тәуелді ДНҚ-полимераза белсенділігі *Secale cereale* және адам қанынан бөлініп алынған РНҚ үлгісінен сәйкесінше 18S рРНҚ және актин В гендерінің фрагменттерін амплификациялау арқылы расталды. Рекомбинантты модификацияланған кері транскриптаза 50-70°C температура аралығында полимеразалық белсендігін көрсетті, осы жағдай оның термотұрақтылығын көрсетеді. Биохимиялық көрсеткіштер ферменттің ғылыми зерттеулер мен диагностикалық тәжірибелерде кері транскриптаза ретінде пайдалану мүмкіндігін көрсетеді.

Кілтті сөздер: РНҚ, ДНҚ, РНҚ-тәуелді ДНҚ-полимераза, АИТВ, *E. coli*, хроматография.

UDC 577.215.3

PRODUCTION OF MODIFIED RNA-DEPENDENT DNA POLYMERASE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS FOR USE AS REVERSE TRANSCRIPTASE**Mussakhmetov A^{1,2}., Akishev Zh^{1,2}., Khassenov B^{1,2}.**¹National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhyn Road, Astana, 010000.²«GenLab» LLP, 19/1 M. Gabdullin Street, Astana 010000, Kazakhstan.

*khassenov@biocenter.kz

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus reverse transcriptase is an RNA-dependent DNA polymerase that allows the production of complementary DNA on an RNA matrix. The original amino acid sequence of the reverse transcriptase was modified by making 18 substitutions and codon optimized for expression in *Escherichia coli* cells. A plasmid vector in which the modified HIV reverse transcriptase gene was integrated under the control of the inducible promoter was obtained by restriction-free cloning. Transformation of competent *E. coli* cells with this vector yielded a strain producing recombinant modified HIV reverse transcriptase with a molecular mass of 62.5 kDa. The recombinant enzyme was chromatographically purified by two-step elution on Ni²⁺ ions and heparin, yielding 420 mg from 1 liter of induced culture. The RNA-dependent DNA polymerase activity of the purified enzyme was confirmed on RNA samples isolated from *Secale cereale* and human blood by amplification of 18S rRNA and actin B gene fragments, respectively. The recombinant modified reverse transcriptase exhibits polymerase activity in the temperature range of 50-70°C, indicating its thermostability. Biochemical parameters show the promising application of the enzyme as a reverse transcriptase in scientific research and diagnostic practice.

Keywords: RNA, DNA, RNA-dependent DNA polymerase, HIV, *E. coli*, chromatography.