

## НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.123

### БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ Bst-ПОЛИМЕРАЗЫ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Анна Сергеевна Черкашина<sup>1</sup>, Ольга Олеговна Михеева<sup>1</sup>, Василий  
Геннадьевич Акимкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора

**Автор, ответственный за переписку:** Анна Сергеевна Черкашина,  
cherkashina@pcr.ms

**Аннотация.** Обзор посвящен белковой инженерии Bst-полимеразы различными методами. Для модификации фермента использовали следующие подходы: получение химерных белков, направленная эволюция, направленный и неупорядоченный мутагенез. Описаны примеры успешного изменения таких свойств фермента, как каталитическая активность, процессивность, термостабильность, устойчивость к ингибиторам.

**Ключевые слова:** Bst-полимераза, большой фрагмент, вытесняющая активность, изотермическая амплификация, мутагенез

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-113-120

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания.

**Для цитирования:** Черкашина А.С., Михеева О.О., Акимкин В.Г. Белковая инженерия Bst-полимеразы для целей изотермической амплификации // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 2. С. 113–120.

## SCIENTIFIC REVIEW

### PROTEIN ENGINEERING OF Bst POLYMERASE FOR ISOTHERMAL AMPLIFICATION PURPOSES

Anna S. Cherkashina<sup>1</sup>, Olga O. Mikheeva<sup>1</sup>, Vasily G. Akimkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor

**Corresponding author:** Anna S. Cherkashina, cherkashina@pcr.ms

**Abstract.** The review is devoted to protein engineering of Bst polymerase using various methods. To modify the enzyme, approaches such as the production of chimeric proteins, directed evolution, directed and random mutagenesis have been used. Examples of successful changes in enzyme properties such as catalytic activity, processivity, thermal stability, and resistance to inhibitors are described.

**Keywords:** Bst-polymerase, big fragment, strand displacement activity, isothermal amplification, mutagenesis

**Financial Support.** The work was carried out within the framework of the state task.

**For citation:** Cherkashina A.S., Mikheeva O.O., Akimkin V.G. Protein engineering of Bst polymerase for isothermal amplification purposes // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 2. S. 113–120.

Большой фрагмент Bst-полимеразы из *Geobacillus stearothermophilus* обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной и цепь-вытесняющей активностью, а также достаточно высокой процессивностью [1]. В последние годы он активно используется для разработок диагностических наборов реагентов на основе метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) [2]. Методы изотермической амплификации дают возможность проведения реакции при одном значении температуры без использования циклов нагревания-охлаждения смеси. Разработаны варианты детекции продуктов как с использованием флуоресцентного сигнала [3], так и с помощью колориметрии за счет изменения окраски реакционной смеси [4] или турбодиметрически по образованию нерастворимого осадка [5]. Изотермический подход сокращает время проведения анализа, позволяет использовать более простое оборудование, а методы визуальной детекции дают возможность применения тестов в полевых условиях или у постели больного.

### Характеристика Bst-полимеразы

Bst-полимераза – большой фрагмент ДНК-полимеразы I из термофильных бактерий *Geobacillus stearothermophilus* (ранее классифицировалась как *Bacillus stearothermophilus*). Она имеет температурный оптимум работы в интервале от 60 до 70 °С [1]. Bst-полимераза обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью и 5'-3'-экзонуклеазной активностью, но у нее отсутствует 3'-5'-корректирующая активность. Ген, кодирующий ДНК-полимеразу I (897 а.о.) состоит из 2691 п.н. Удаление N-концевого домена (310 а.о.) лишает фермент 5'-3'-экзонуклеазной активности и приводит к образованию большого фрагмента Bst-полимеразы (БФ-Bst, 587 а.о.). БФ-Bst демонстрирует более высокие показатели реакционной способности и стабильности и большую устойчивость к ингибиторам из клинического материала, такого как кровь и фекалии [6].

За счет высокой вытесняющей активности БФ-Bst способен разделять комплементарные цепи ДНК и одновременно удлинять дочернюю цепь [7], что делает возможным проведение реакции без использования циклов нагревания-охлаждения, что снижает время проведения реакции с 1,5 ч до 20–30 мин. В основе метода LAMP лежит использование системы из 4–6 праймеров в тандеме с полимеразой, обладающей вытесняющей активностью. Дизайн системы праймеров сделан так, что в результате амплификации

образуются множественные конкатемеры инвертированных повторов целевого фрагмента, а накопление продукта реакции происходит лавинообразно. Достоинства метода: высокая эффективность, специфичность, скорость реакции и возможность использования различных методов детекции [2].

### Полимеразы с вытесняющей активностью из различных источников

Кроме Bst вытесняющей активностью обладает целый ряд полимераз из других источников. Для разработки систем с использованием LAMP исследователи отдают предпочтение ферментам с температурным оптимумом работы выше 60 °С. Такими характеристиками обладают полимеразы из бактерий родов *Bacillus* и *Geobacillus* и других термофильных организмов [8] (таблица).

В работе [9] авторы сравнивали свойства больших фрагментов полимераз из *G. stearothermophilus* (БФ-Bst), *Geobacillus* sp. 777 (БФ-Gss) и *Bacillus smithii* (БФ-Bsm) в применении к методу LAMP с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Первые два вида *G. stearothermophilus* и *Geobacillus* sp. 777 являются облигатными термофилами, а *B. smithii* – факультативным термофилом [13]. Как и следовало ожидать, полимеразы БФ-Bsm обладают более низким температурным оптимумом работы (60 °С против 60–65 °С у БФ-Bst и БФ-Gss), а также более низкой термостабильностью: БФ-Bsm теряет 50% активности при инкубировании при 60 °С уже через 30 мин, в то время как БФ-Bst и БФ-Gss сохраняют более 90% активности при 60 °С даже после 4 ч инкубирования. Нагревание до 70 °С приводит к практически полной потере активности всеми ферментами уже через 30 мин.

В условиях LAMP использование БФ-Bst позволило получить самые низкие значения пороговых циклов Ct при анализе одной и той же мишени (лямбда-фаг). А наиболее высокие значения Ct были получены с использованием фермента БФ-Gss. Авторы [13] анализировали также устойчивость ферментов к частым ингибиторам амплификации, таким как этанол, человеческая плазма, интеркалирующий краситель SYBR Green I, мочевины, ЭДТА, NaCl и цельная кровь. Оказалось, что наиболее устойчивым ферментом является БФ-Gss. Он в отличие от конкурентов сохраняет активность в условиях LAMP в присутствии 10%-го этанола и 1%-й человеческой плазмы, менее чувствителен к гепарину и SYBR Green I. Более высокая толерантность к

ингибиторам делает БФ-Gss ценным инструментом для диагностических тестов на основе LAMP в ситуациях, когда надежность анализа более важна, чем скорость амплификации. Однако при использовании этого фермента полностью теряется временное преимущество LAMP по сравнению с ПЦР.

Еще одним интересным представителем полимераз с вытесняющей активностью является термостабильный вирусный фермент – полимеразы из РугоPhage 3173. Исходный фермент обладает корректирующей экзонуклеазной активностью, которая была удалена с помощью направленного мутагенеза. На основе этого фермента создан коммерчески доступный препарат «OmniAmp polymerase» («Lucigen Corporation», Middleton, WI) [14]. Уникальной особенностью этого фермента является сочетание полимеразной и вытесняющей активности с активностью обратной транскриптазы, что позволяет детектировать РНК-мишени в формате LAMP. OmniAmp-полимеразы характеризуются также более высокой термостабильностью. Температурный оптимум OmniAmp-полимеразы составляет 70 °С, а Bst-полимеразы – 65 °С. OmniAmp-полимеразы выдерживают кратковременное нагревание до 92 °С и характеризуются более высокой устойчивостью к ингибированию компонентами цельной крови [14].

### Модификация ферментов и химерные белки

Эффективной стратегией изменения свойств фермента является получение химерных белков, включающих белковые домены с выбранными свойствами. Этот метод используется при дизайне как термостабильных полимераз для ПЦР, так и для полимераз с вытесняющей активностью. Цель таких модификаций – введение аффинных меток для упрощения очистки фермента, повышение его растворимости при экспрессии, повышение ферментативной активности и устойчивости к ингибиторам. Следует отметить, что даже добавление небольшого полигистидинового тэга и его положение (на С- или N-конце) может повлиять и на эффективность экспрессии белка, и на его ферментативную активность [15].

Добавление в структуру белка, обладающего высокой растворимостью при экспрессии в клетках *E. coli*, как правило, повышает растворимость химерного фермента. В работе [15] продемонстрировано увеличение выхода химерного белка в растворимой форме при экспрессии в клетках

*E. coli* БФ-Bst, содержащего на N-конце флуоресцентный белок mCherry (mCh-FL-BSTLF). Добавление в структуру пептида R5, обладающего аффинностью к кремнезему (R52-mCh-FL-BSTLF) позволяет выделять фермент на частицах диоксида кремния. Такой подход упрощает и ускоряет очистку фермента. Несмотря на наличие примесных белков *E. coli* в препарате фермента, авторы [15] сообщают о том, что полученный химерный белок Si-R52-mCh-FL-BSTLF позволяет обнаруживать до 200 коп/образец плазмодия методом LAMP. Эффективность реакции LAMP сильно зависит от типа детектируемого плазмодия и используемой системы праймеров.

Другим примером служит повышение растворимости химерного белка за счет добавления небольшого F-актин-связывающего белка – виллина [16]. Свойство сверхбыстрого фолдинга субдомена головы виллина HP35 сделало его моделью для исследования динамики сворачиваемости белков [17]. Авторы [16] сообщают, что добавление такого увеличенного на 12 а.к. (введение дополнительной альфа-спирали) домена HP47 на N-конец большого фрагмента Bst-полимеразы приводит к увеличению выхода фермента Br512 в растворимой форме. Еще одно преимущество домена HP47 – наличие кластера положительно заряженных аминокислот, что может обеспечить лучшее взаимодействие с матрицами нуклеиновых кислот. Результаты работы [16] показывают, что присутствие домена виллина H47 в химерном белке Br512 улучшает скорость амплификации по сравнению с Bst-БФ, достигая уровня скорости амплификации коммерческого модифицированного фермента ДНК-полимеразы Bst 2.0 фирмы NEB.

Кроме того, Br512 демонстрирует активность обратной транскриптазы в анализах на матрице РНК. Ранее сообщалось, что ДНК-полимераза Bst обладает активностью обратной транскриптазы (ОТ) [10, 11]. В работе [16] показана возможность использования химерного фермента Br512 для детекции РНК-мишеней на примере выявления РНК SARS-CoV-2 с тремя разными наборами праймеров. Следует отметить, что авторы [16] использовали детекцию с анализом по конечной точке, учитывая результаты реакции по наличию флуоресценции через 60 мин после амплификации при 65 °С. Чувствительность систем колебалась от 300 до 3000 коп/реакц. Для разработки «быстрых» методов время анализа не должно превышать 30 мин.

Добавление ДНК-связывающих доменов часто используют для модификации свойств различных

## Свойства различных полимераз с вытесняющей активностью

| Источник фермента                             | 3'→5'<br>Exo | 5'→3'<br>Exo | OT* | Вытеснение<br>цепи | T <sub>опт.</sub> , °C | Ссылки |
|---|--------------|--------------|-----|--------------------|------------------------|--------|
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> polI (Bst) | –            | +            | –   | +                  | 65                     | [1]    |
| Bst_БФ  | –            | –            | +/- | +                  | 65                     | [9–11] |
| <i>E. coli</i> pol I                          | +            | +            | +   | +                  | 37                     | [12]   |
| Klenow  | +            | –            | –   | +                  | 37                     | [12]   |
| <i>Bacillus smithii</i> polI (Bsm)            | –            | +            | –   | +                  | 60                     | [13]   |
| <i>Geobacillus</i> sp. 777                    | –            | +            | –   | +                  | 65                     | [13]   |
| <i>Thermococcus litoralis</i> – Tli (Vent)    | –            | +            | +   | +                  | 72                     | [12]   |
| Tli (Vent) exo-                               | –            | –            | +   | +                  | 72                     | [12]   |
| OmniAmp (PyroPhage 3173 exo-)                 | –            | –            | +   | +                  | 70                     | [14]   |

\*OT – обратная транскрипция.

полимераз, в том числе и Bst-полимеразы (Bst 3.0 фирмы «NEB») и аналогов. Например, в работе [18] был получен большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus* sp. 777 (Gss), слитый с ДНК-связывающим доменом ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* (DBD-Gss) [19] и с белком Sto7d – аналогом Sso7d из *Sulfolobus tokodaii* (Sto-Gss).

Полимеразная активность химерных ферментов, которая была оценена по способности ферментов включать нуклеотиды с радиоактивной меткой в ДНК, была нарушена дополнительными доменами. Присоединение ДНК-связывающего домена ДНК-лигазы *Pyrococcus abyssi* к N-концу Gss вызывало десятикратное снижение активности DBD-Gss по сравнению с нативным Gss, тогда как присоединение DBD к C-концу Gss приводило к полной потере способности амплифицировать ДНК. Несмотря на столь резкое снижение активности полимеразы, ферменты, слитые с ДНК-связывающими доменами, показали чрезвычайно высокую процессивность.

Замечено, что ДНК-связывающий домен не только увеличивает процессивность фермента, но и обеспечивает толерантность к таким ингибиторам, как гепарин, мочеви́на и хлорид натрия в концентрации до 200 мМ. Авторами [18] показана возможность проведения анализа методом ЛАМР с использованием химерных ферментов при наличии в пробе до 5% цельной крови. Повы-

шенная устойчивость химерных ДНК-полимераз к распространенным ингибиторам открывает новые возможности для разработки тестов в формате «у постели больного».

Интересный пример разработки метода изотермической амплификации с использованием химерной FEN1-Bst-полимеразы – метод с использованием флэп-зондов [20]. Авторы работы [20] сконструировали химерный фермент, состоящий из Bst-полимеразы и белка эндонуклеазы I (FEN1), который удаляет короткие сегменты одноцепочечной ДНК с 5'-конца. Химерный фермент FEN1-Bst обладает полимеразной, вытесняющей и эндонуклеазной активностью.

Примечательно, что для получения химерного белка разработчики использовали метод ковалентной сшивки белков с помощью системы Spy Tag/Catcher [21], а не инструменты генной инженерии. ДНК-полимераза Bst (большой фрагмент), содержащая SpyTag, ковалентно связывалась с FEN1, содержащим SpyCatcher, с образованием рекомбинантной ДНК-полимеразы FEN1-Bst.

В основе метода лежит расщепление последовательности зонда, содержащего в своей структуре флуорофор и тушитель флуоресценции, в условиях успешной амплификации фрагмента. Расщепление структуры зонда приводит к росту сигнала флуоресценции. Сочетание полимеразной, вытесняющей и эндонуклеазной активности в одном ферменте дает возможность проведения

реакции в изотермических условиях. К достоинствам системы можно отнести простую систему праймера и зонда. Результат реакции можно оценивать как в режиме реального времени, так и по конечной точке. Авторы показали возможность успешного применения этого метода для обнаружения таких мишеней, как SARS-CoV-2, возбудитель ротавирусной инфекции и *C. trachomatis*.

### Направленный мутагенез

Изменение свойств ферментов с помощью направленного мутагенеза требует рационального дизайна мутаций на основе данных анализа последовательностей гомологичных ферментов, анализа трехмерной структуры белка, в некоторых случаях используют моделирование структуры белка с учетом введенных замен. Цель таких модификаций может заключаться как в повышении выхода фермента в растворимой форме в процессе экспрессии, так и в направленном изменении свойств фермента (повышение активности, термостабильности, устойчивости к ингибиторам, изменение рН-оптимума, субстратной специфичности и т.д.).

Одна из первых работ по мутагенезу Bst-полимеразы связана с отключением 5'-3'-экзонуклеазной активности полноразмерного фермента [22]. В качестве мишени для мутагенеза был выбран аминокислотный остаток Tyr73, который является одним из консервативных остатков 5'-3'-экзонуклеазного домена различных полимераз, таких как Bst-полимераза, полимеразы из *B. caldotenax* (Bca), *S. pneumoniae* (Spn), *E. coli* (Eco) и Taq-полимераза из *T. aquaticus*. Введение замен Tyr73Ala или Tyr73Phe приводит к полному выключению 5'-3'-экзонуклеазной активности мутантов полноразмерной Bst-полимеразы [22]. И хотя использование БФ-Bst более широко распространено, в том числе в коммерческих решениях, этот фермент может тоже найти свое применение в методах изотермической амплификации.

В работе [23] авторы вводили замены в области активного сайта Bst-БФ в целях изменения полимеразной активности фермента. Мишенями для мутагенеза стали четыре консервативных остатка в активном сайте полимеразы, которые важны для связывания конца праймера ДНК и dNTP, а также для катализа полимеразной реакции: Gly310, Arg412, Lys416 и Asp540. Всего в работе были получены 10 различных мутантов Bst-БФ: G310A, G310L, D540A, D540E, R412A, R412E, K416A, K416D и двойные мутанты G310A-D540E и G310L-D540E. Значения  $k_{\text{кат}}$  для мутантов G310L

и G310A были соответственно на 42,2 и 20,8% выше, чем у коммерческой ДНК-полимеразы Bst 2.0 (NEB), а в случае мутанта D540E значение  $k_{\text{кат}}$  оказалось таким же, как и у ДНК-полимеразы Bst 2.0 (NEB). Все остальные введенные мутации, в том числе и двойные мутанты, приводили к полной потере полимеразной активности.

Три активных мутанта Bst-БФ G310L, G310A и D540E были также протестированы в реакции изотермической амплификации по методу IMSA [24] для детекции фрагмента VP1 гена энтеровируса 71 (EV71). Из всех вариантов модифицированная БФ-Bst с мутацией G310L продемонстрировала более высокую эффективность амплификации ДНК, чем фермент дикого типа и коммерческий фермент Bst 2.0 (NEB).

Авторы работы [4] применили методы машинного обучения для поиска мутаций, повышающих термостабильность Bst-БФ. В качестве матрицы для введения мутаций авторы использовали описанный выше химерный белок Br512, содержащий быстро сворачивающийся довесок виллина HP47 на N-конце [16]. Из десяти спрогнозированных замен пять привели к существенному снижению активности фермента в реакции LAMP (N528E, T510F, I304V, Y303H, V572A), а остальные пять (V191L, T493N, A522G, R562V, S371D) оказались более удачными: они сохранили активность без изменений и привели к увеличению термостабильности ферментов по сравнению с Br512. Показано также, что комбинация предсказанных мутаций приводит к синергетическому росту термостабильности фермента. Анализ двойных и тройных мутантов позволил установить, что наиболее удачными вариантами являются T493N/A552G и S371D/T493N/A552G.

Наибольшей активностью обладал тройной мутант S371D/T493N/A552G, а его повышенная термостабильность позволяла проводить реакцию изотермической амплификации LAMP при 73 °C, а также осуществлять предварительный прогрев реакционной смеси до 75 °C в течение 3 мин, а до 80 °C – в течение 30 с без ущерба для активности фермента.

В целом, комбинация химерного белка и направленного мутагенеза позволила получить фермент с более высоким выходом, высокой активностью в LAMP на уровне Bst 2.0 (NEB) и повышенной термостабильностью. За счет повышения температуры реакции LAMP возможно как повышение эффективности реакции, особенно в случае GC-богатых матриц, так и сокращение

общего времени проведения реакции и более быстрое получение результатов.

В работе [25] сообщается о вариантах Bst-полимеразы со сверхзаряженным дополнительным доменом виллина HP47. На поверхности виллина введены дополнительные положительные и отрицательные заряды с помощью мутагенеза. Все четыре отдельные положительные замены аддитивно повышают термостабильность фермента, тогда как отрицательные мутации не влияют на активность. Показано, что мутанты A20K/N31R/E43K/N39K и N31R/E43K/N39K выполняют LAMP быстрее, чем родительский фермент после предварительного нагрева. Авторы [25] сконструировали также комбинированные мутанты: Br512 g3.1: S371D/T493N/A552G/A20K/N31R/E43K/N39K и Br512 g3.2: S371D/T493N/A552G/N31R/E43K/N39K. Без предварительного нагрева эти ферменты работали на 5 мин быстрее, чем фермент Br512 (HP47wt-Bst-БФ) в LAMP.

Мутации поверхности виллина также привели к повышению полимеразной активности по сравнению с Br512. Что касается устойчивости к ингибиторам, то Br512 g3.1 и Br512 g3.2 были активны в присутствии до 2 М мочевины, тогда как Br512 оказался неактивным в этих условиях. EMSA [26] продемонстрировал более высокую ДНК-связывающую способность мутантов по сравнению с Br512. Однако Br512 g3.1 и Br512 g3.2 утратили активность обратной транскриптазы, а Br512 и мутант S371D/T493N/A552G сохранили ее. Введение замены K9D восстанавливает активность обратной транскриптазы, не влияя на улучшение термостабильности и устойчивости к ингибиторам полученных мутантов.

### Неупорядоченный мутагенез

Неупорядоченный мутагенез позволяет изменять свойства ферментов, не углубляясь в анализ и моделирование структуры. Наличие сравнительно простой системы отбора мутантных форм фермента с нужными свойствами дает возможность отбора оптимальных вариантов путем скрининга сотен и тысяч клонов. В работе [27] с помощью такого подхода удалось найти одну аминокислотную замену Asp422Ala, которая приво-

дит к увеличению в 2,5 раза вытесняющей активности большого фрагмента ДНК-полимеразы I из психрофильной бактерии *Psychrobacillus* sp. Этот фермент проявляет оптимальную полимеразную активность при pH 8–9 и 25–110 мМ NaCl/KCl, а также синтезирует ДНК с замещением цепи при температуре окружающей среды (25–37 °C).

Авторы [27] протестировали влияние аналогичной замены консервативного остатка Asp в термофильных гомологах из *Ureibacillus thermosphaericus* и *Geobacillus stearothermophilus*. Эксперименты показали, что замена Asp на Ala в положении 422 приводит к значительному увеличению активности смещения цепи и в этом случае. В структуре полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus* этот остаток находится в положении 720.

В работе [28] авторы проверили влияние разрушения солевого мостика между остатками D720 и R433 на вытесняющую активность Bst-BF. Для этого были получены три одиночных мутанта: D720A, R433A и R433P. Фермент получали в виде большого фрагмента с полигистидиновым тэгом, но нумерация мутаций указана для полно-размерной версии. Полученные мутанты были протестированы в реакции LAMP в сравнении с коммерческим ферментом Warm Start LAMP Kit master mix (NEB, product number E1700L). Оказалось, что все три мутанта более эффективны в реакции LAMP, чем коммерческий продукт и немодифицированный фермент.

### Заключение

В обзоре рассмотрены различные работы по модификации свойств БФ-Bst и гомологичных ферментов из термофильных организмов. Исследователям удалось повысить активность ферментов, увеличить их процессивность или термостабильность. В некоторых случаях удалось получить ферменты, обладающие активностью обратной транскриптазы, что дает возможность детектировать РНК-содержащие мишени без введения в систему дополнительного фермента. Однако задача получения оптимального фермента для метода LAMP, объединяющего все эти улучшенные свойства, все еще остается актуальной.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aliotta J. Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3' → 5' proofreading exonuclease activity // Genet. Anal. Biomol. Eng. 1996. Vol. 12. N 5–6. P. 185.
2. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // Nucleic Acids Res. England, 2000. Vol. 28. N 12. P. E63.
3. Li P. et al. Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearother-*

- mophilus and its application in isothermal DNA amplification // *Biotechnol. Theory Pract.* 2017. March.
4. Paik I. et al. Improved Bst DNA Polymerase Variants Derived via a Machine Learning Approach // *Biochemistry.* 2023. Vol. 62. N 2. P. 410.
  5. Mori Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. Vol. 289. N 1. P. 150.
  6. Mikita K. et al. The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis // *Parasitol. Int.* Elsevier Ireland Ltd, 2014. Vol. 63. N 6. P. 785.
  7. Perler F.B., Kumar S., Kong H. Thermostable DNA polymerases // *Adv. Protein Chem. United States,* 1996. Vol. 48. P. 377.
  8. Sellmann E. et al. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. N 13. P. 4350.
  9. 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.* Springer US. 2015. Vol. 57. N 10. P. 947.
  10. Jackson L.N. et al. Crystal structures of a natural DNA polymerase that functions as an XNA reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press. 2019. Vol. 47. N 13. P. 6973.
  11. Shi C. et al. Innate Reverse Transcriptase Activity of DNA Polymerase for Isothermal RNA Direct Detection. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. N 43. P. 13804.
  12. Hamilton S.C., Farchaus J.W., Davis M.C. DNA polymerases as engines for biotechnology // *Biotechniques.* 2001. Vol. 31. N 2. P. 370.
  13. Pavlov A.R. et al. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99. N 21. P. 135105.
  14. Chander Y. et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5. N AUG.
  15. Seevaratnam D. et al. Analysis and validation of silica-immobilised BST polymerase in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis // *Anal. Bioanal. Chem.* Springer Berlin Heidelberg, 2022. Vol. 414. N 21. P. 6309.
  16. Maranhao A. et al. An improved and readily available version of Bst DNA Polymerase for LAMP, and applications to COVID-19 diagnostics // *medRxiv.* 2020. N 8. P. 2020.10.02.20203356.
  17. McKnight C.J. et al. A thermostable 35-residue subdomain within villin headpiece. // *J. Mol. Biol. Netherlands.* 1996. Vol. 260. N 2. P. 126.
  18. Oscorbin I.P. et al. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2017. Vol. 45. N 16. P. 9595.
  19. Oscorbin I.P. et al. DNA-Binding Domain of DNA Ligase from the Thermophilic Archaeon *Pyrococcus abyssi*: Improving Long-Range PCR and Neutralization of Heparin's Inhibitory Effect // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2015. Vol. 176. N 7. P. 1859.
  20. Ye X. et al. A high-specificity flap probe-based isothermal nucleic acid amplification method based on recombinant FEN1-Bst DNA polymerase // *Biosens. Bioelectron.* Elsevier B.V., 2021. Vol. 192. June. P. 113503.
  21. Wang X.-W., Zhang W.-B. SpyTag-SpyCatcher Chemistry for Protein Bioconjugation In Vitro and Protein Topology Engineering *In Vivo* // *Bioconjugation: Methods and Protocols* / ed. Massa S., Devoogdt N. New York, NY: Springer New York, 2019. P. 287.
  22. Riggs M.G. et al. Construction of single amino acid substitution mutants of cloned *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase I which lack 5'→3' exonuclease activity. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1307. N 2. P. 178.
  23. Ma Y. et al. Enhancement of Polymerase Activity of the Large Fragment in DNA Polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* by Site-Directed Mutagenesis at the Active Site // *Biomed Res. Int.* 2016. Vol. 2016.
  24. Ding X. et al. Improved detection limit in rapid detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by a novel reverse transcription-isothermal multiple-self-matching-initiated amplification assay // *J. Clin. Microbiol.* 2014. Vol. 52. N 6. P. 1862.
  25. Paik I., Bhadra S., Ellington A.D. Charge Engineering Improves the Performance of Bst DNA Polymerase Fusions // *ACS Synth. Biol.* 2022. Vol. 11. N 4. P. 1488.
  26. Fried L.M.H. and M.G. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions // *Nat Protoc.* 207AD. Vol. 2. N 8. P. 1849.
  27. Piotrowski Y., Gurung M.K., Larsen A.N. Characterization and engineering of a DNA polymerase reveals a single amino-acid substitution in the fingers subdomain to increase strand-displacement activity of A-family prokaryotic DNA polymerases // *BMC Mol. Cell Biol.* BMC Molecular and Cell Biology, 2019. Vol. 20. N 1. P. 1–11.
  28. Sherrill-Mix S. et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons // *Genome Biol.* BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 22. N 1. P. 169.

**Информация об авторах**

Анна Сергеевна Черкашина – руководитель научной группы генной инженерии и биотехнологии Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, канд. хим. наук (cherkashina@pcr.ms);

Ольга Олеговна Михеева – мл. науч. сотр. научной группы генной инженерии и биотехнологии Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора (miheeva@cmd.su);

Василий Геннадьевич Акимкин – профессор, академик РАН, директор научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, докт. мед. наук (akimkin@pcr.mu).

**Соблюдение этических стандартов**

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

**Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 15.11.2023;  
одобрена после рецензирования 18.11.2023;  
принята к публикации 20.11.2023.