



Термостабильные ДНК-полимеразы в до-ПЦРную эпоху и в самом её начале

¹В.В. Зубов*, ^{2,3}Я.И. Алексеев

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д.3

²ООО «Синтол», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

³Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Российская Федерация, Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33

*E-mail: genseq@mail.ru

Резюме

Впервые термостабильная ДНК полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* выделена в 1976 г., но её применение в ПЦР началось только спустя более десяти лет при том, что сама ПЦР была разработана за несколько лет до этого. К моменту начала применения в ПЦР этого фермента вместо Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* уже были известны, помимо Taq-полимеразы, ДНК-полимеразы из родственных эубактерий *T. thermophilus*, *T. flavus*, *T. ruber*, а также ДНК-полимеразы из термофильных архей *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfataricus* и *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Однако прошло немало лет, прежде чем некоторые из них стали использоваться в ПЦР.

Ключевые слова: ДНК-полимераза, Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E.coli*, термостабильная ДНК-полимераза, ДНК, ПЦР, *Thermus aquaticus*

Цитирование: Зубов В.В., Алексеев Я.И. Термостабильные ДНК-полимеразы в до-ПЦРную эпоху и в самом её начале. *Biomics*. 2026. 18(2). 130-135. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-10

© Авторы, В.В. Зубов, Я.И. Алексеев, 2026

Thermostable DNA polymerases in the pre-PCR era and at its very beginning

¹V.V. Zubov*, ^{2,3}Ya.I. Alekseev

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS
3 Institutskaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation
²Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya str., 127434, Moscow, Russian Federation
³Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,
198095, St. Petersburg, Russian Federation

*E-mail: genseq@mail.ru

Resume

For the first time, a thermostable DNA polymerase from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* was isolated in 1976, but its use in PCR began only more than ten years later, despite the fact that PCR itself had been developed a couple of years earlier. By the time this enzyme began to be used in PCR instead of the Klenow fragment of *E.coli* DNA polymerase I, DNA polymerases from related eubacteria *T. thermophilus*, *T. flavus*, and *T. ruber*, as well as DNA polymerases from thermophilic archaea *Sulfolobus*

acidocaldarius, *S. solfataricus*, and *Methanobacterium thermoautotrophicum*, were already known, in addition to Taq-polymerase. However, many years passed before some of them were used in PCR.

Keywords: DNA polymerase, Klenow fragment of DNA polymerase I *E. coli*, thermostable DNA polymerase, DNA, PCR, *Thermus aquaticus*

Citation: Zubov V.V., Alekseev Ya.I. Thermostable DNA polymerases in the pre-PCR era and at its very beginning. *Biomics*. 2026. 18(2). 130-135. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-10 (In Russian)

© The Authors, V.V. Zubov, Ya.I. Alekseev, 2026

Введение

Описание ДНК-полимераз целесообразно начать с напоминания о температурных границах роста микроорганизмов. Известны психрофильные, мезофильные, термофильные и гипертермофильные микроорганизмы. Психрофилы в большинстве своем растут в диапазоне от 15 до 20 °С, мезофилы – от 25 до 40 °С, термофилами считаются те, что растут при температурах выше 50 °С, хотя для некоторых из них больше подходят температуры 65–75 °С, а гипертермофилы способны расти и при температурах выше 100 °С в условиях повышенного давления на дне морей и океанов.

ДНК-полимераза - по сути самый главный фермент нуклеинового обмена - впервые выделена из кишечной палочки *Escherichia coli* в 1956 г. [Kornberg et al., 1956]. Вслед за этим началось активное изучение структурно-функциональных особенностей данного фермента, обнаруженного тогда у мезофильного микроорганизма с оптимумом температурного роста 37 °С. При этом прошло два десятка лет, прежде чем подобный фермент был выделен из термофильного микроорганизма *Thermus aquaticus*, растущего при температурах свыше 70 °С [Chien et al., 1976]. И после этого прошло еще больше десятилетия до того, как Taq-полимераза нашла себе грандиозное применение.

Появление метода ПЦР с термостабильной ДНК-полимеразой в 1987–1988 гг. [Kogan et al., 1987; Saiki et al., 1988] кардинально изменило практически весь ландшафт биологических исследований, а также некоторых смежных дисциплин. Причем ПЦР была известна до этого уже несколько лет (с декабря 1985 г.), но её популярность была довольно низкой ввиду использования термолабильной ДНК-полимеразы в виде Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli*, требовавшей добавления новых порций данного фермента в каждом новом цикле, что создавало серьезные неудобства.

Как уже говорилось выше, ДНК-полимеразы из термофильных микроорганизмов были известны задолго до появления ПЦР, но потребовалось время, чтобы о них вспомнили применительно к этому

методу. После этого начался настоящий бум по поиску и выделению термостабильных нативных ДНК-полимераз, как из зубактерий, так и из архей, а также по клонированию и секвенированию кодирующих их генов. Настоящая статья призвана показать сложившуюся ситуацию с изучением термостабильных ДНК-полимераз к середине 1980-х гг.

Ранние годы изучения термостабильных ДНК-полимераз

Впервые термофильная бактерия, названная *Thermus aquaticus*, была изолирована из горячего источника в Йеллоустонском национальном парке в США [Brock, Freeze, 1969]. Среди депонированных штаммов в American Type Culture Collection (ATCC) был и YТ-1, оказавшийся позже востребованным для выделения из него ДНК-полимеразы для проведения ПЦР. Спустя много лет Т.Д.Брок [1997] описал свои исследования тех лет по поиску термофильных микроорганизмов, начатые осенью 1966 г., и вспомнил, как появилось окончательное родовое и видовое обозначение этой бактерии, изначально называемой им *Caldobacter trichogenes*.

Спустя несколько лет из этого вида бактерий (штамм YТ-1) была выделена термостабильная ДНК-полимераза [Chien et al., 1976]. Стоит обратить внимание на масштаб того эксперимента. Культура *T. aquaticus* выращивалась в полностью заполненной 16-литровой бутылки с узким горлом, но вместо встряхивания проводилась аэрация стерильным воздухом при 75 °С. Через 20 ч бактериальные клетки собирали в проточной центрифуге, обрабатывали ультразвуком и осветляли лизат в обычной скоростной центрифуге. Полученный грубый экстракт объемом 176 мл подвергался очистке с помощью хроматографии на разных носителях. В результате была достигнута 55-кратная очистка фермента, с которым далее проводились анализы по определению температурного оптимума его работы, влияния разных катионов на полимеризующую активность и некоторые другие характеристики.

Следующих подобных работ пришлось ждать еще несколько лет. Выполнены они были в СССР: с

разницей в год были выделены ДНК полимеразы из *T. aquaticus* (из того же штамма УТ-1) [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1980], *T. flavus* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1981] и *T. ruber* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1982]. Авторы использовали 5–6-стадийные процедуры очистки, и если Таq-полимеразу удалось очистить лишь в 140 раз, то для Tfl-полимеразы и Tgu-полимеразы эти показатели составили соответственно около 1000 и 1200 раз. При анализе активности данных ферментов оценивались многие параметры, включая выявление возможной нематричной активности по типу терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, которой в итоге не оказалось. В частности, было определено, что Tgu-полимераза сохраняла до 90% ферментативной активности после 2-часовой инкубации при 70 °С. Tfl-полимераза сохраняла в этих условиях до 50% своей активности. Тогда ПЦР еще известна не была, и более важный тест на предмет выдерживания ферментом 95 °С не проводился за ненадобностью.

В начале 1985 г.¹ была опубликована статья, описывающая выделение трёх ДНК-полимераз из родственной им бактерии *T. thermophilus* штамма НВ-8, полученного чилийскими авторами из депозитария АТСС [Rüttimann et al., 1985]. Были проведены в целом стандартные определения их ферментативной активности в различных буферных растворах. Оценивалась термостабильность ферментов, причем в этот раз проводилась прединкубация при 90 °С продолжительностью до одного часа. Установлено, что ни одна из этих Tth-полимераз не обладает нематричной активностью по типу дезоксирибонуклеотидилтрансферазной².

В те годы выделяли и изучали термостабильные ДНК полимеразы не только из микроорганизмов рода *Thermus*. Так, в июне 1985 г. была опубликована статья, в которой сообщалось об очистке в 25536 раз термостабильной ДНК-полимеразы из археи *Sulfolobus acidocaldarius*, характеризующейся температурным оптимумом ферментативного действия около 65 °С, но быстро теряющей активность при инкубации между 70 и 80 °С [Klimczak et al., 1985]. С учетом крайне высокой степени очистки данного фермента стоит перечислить процедуры, в ходе которых достигалась такая степень очистки. После первоначального получения грубого

экстракта с помощью французского пресса проводилась хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе; хроматография на фосфоцеллюлозе; хроматография на гидроксипатите; хроматография на голубой сефарозе; хроматография на фенил-сефарозе, и завершающим было ультрацентрифугирование в градиенте глицерина. Год спустя эти авторы выделили ДНК полимеразу из термофильной археи *Methanobacterium thermoautotrophicum* [Klimczak et al., 1986]. Этот фермент был очищен в 16857 раз и, помимо полимеризующей активности, имел 5'→3', а также 3'→5'-экзонуклеазные активности с оптимумом при 65 °С, но при прогреве при 100 °С в течение 10 минут полностью инактивировался. В том же году в СССР была выделена ДНК полимеразы из археи *S. acidocaldarius* [Прангишвили и др. (Prangishvili et al.), 1985]. В мае все того же 1985 г. вышла статья, описывающая выделение, очистку и свойства термостабильной ДНК-полимеразы из другой бактерии того же рода - *S. solfataricus*, изолированной из горячего источника в Италии. И в этом случае культивирование велось в 90-литровом ферментере [Rossi et al., 1986]. Причем та статья была опубликована по материалам прошедшего в июне 1985 г.³ в Германии Международного рабочего совещания по биологии и биохимии археобактерий. Было сообщено, что очищенный приблизительно в тысячу раз фермент имеет оптимум ферментативной активности при 75 °С. При этом время его полужизни составляет около 35 минут при 85 °С и 6 минут при 90 °С.

Однако в те годы еще не было понимания важности применения термостабильных ДНК-полимераз в молекулярной биологии, а также в прочих дисциплинах, и фактически шло накопление информации об этих ферментах.

Полимеразная цепная реакция

Несколько удивительно, что ранние варианты ПЦР, впервые описанной в декабре 1985 г. [Saiki et al., 1985], проводились с использованием не термостабильного, но при этом хорошо изученного фермента Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* [Joyce, Grindley, 1983]. Прошло почти два года, прежде чем ситуация резко поменялась. Хотя термостабильная Таq-полимераза и подобные ей ферменты, как можно видеть из предыдущих абзацев, были уже известны на протяжении более десятка лет. И это если не считать обнаруженную в 1972 г. Bst-полимеразу из бактерии *Bacillus stearothermophilus* с оптимумом температурного действия 65 °С. Этой полимеразе было посвящено несколько публикаций одной группы авторов [Stenesh, Roe, 1972; 1972a;

¹ Рукопись была получена редакцией 11 октября 1984 г. – более чем за год до выхода первой статьи по ПЦР ещё с термолабильным Кленовским фрагментом ДНК-полимеразы I *E. coli*

² почему-то во всех вышеописанных работах такой тест проводился, что делалось скорее по аналогии, а не в попытке найти дезоксирибонуклеотидилтрансферазную активность

³ до первой публикации по ПЦР в декабре 1985 г.

Stenesch, McGowan, 1977], хотя для стандартной ПЦР она не применима⁴.

Первой статьей, в которой говорилось о проведении ПЦР с помощью Таq-полимеразы, стала опубликованная в октябре 1987 г. работа [Kogan et al., 1987], в которой авторы сообщили, что этот фермент им был предоставлен фирмой New England Biolabs, Inc. Что касается публикации с участием разработчика этой реакции К.Мюллера, то в их статье, вышедшей в январе 1988 г. [Saiki et al., 1988], о происхождении данного фермента ничего не говорится. Но в поданных фирмой Cetus Corporation чуть ранее заявках на получение патентов США (обе от 17 июня 1987 г.) с авторами изобретения в составе для первой⁵ D.H.Gelfand⁶, F.C.Lawyer и R.K.Saiki, и для второй⁷ - К.В.Мюллер, Н.А.Эрлих, Д.Н.Гелфанд, Г.Норн и Р.К.Саики, упоминается фермент Таq-полимераза, который выделялся ими из предоставляемой депозитарием АТСС культуры *Thermus aquaticus* УТ-1.

После первых успешных применений термостабильной ДНК-полимеразы в ПЦР появилась возможность легко «размножать» практически любую ДНК in vitro. Это привело к быстрому проникновению метода в различные биологические дисциплины и к резкому росту спроса на Таq-полимеразу и другие термостабильные ферменты.

Заключение

Таким образом, к моменту появления метода ПЦР, в котором поначалу использовался Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E. coli*, о термостабильных ДНК-полимеразах уже было известно части микробиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Однако потребовалось несколько лет, прежде чем эти ферменты оказались востребованы в новой ПЦР. После чего интерес к термостабильным ДНК-полимеразам резко возрос и начался их поиск как у эубактерий, так и у архей. При этом структурно-функциональная организация этих ферментов на примере ДНК-полимеразы I *E. coli* уже была известна, что облегчило дальнейшую работу и позволило создать их первоначальную

⁴ имеется патент США, описывающий проведение ПЦР с подобным ферментом из микроорганизма *Bacillus caldolyticus* [Fuller, 1995]

⁵ с названием “Purified thermostable enzyme”, ставшей патентом США # 4,889,818 от 26 декабря 1989 г.

⁶ предложившего использовать в ПЦР термостабильную ДНК полимеразу

⁷ с названием “Process for amplifying, detecting and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme”, ставшей патентом США # 4,965,188 от 23 октября 1990 г.

классификацию [Ito, Braithwaite, 1991], которая потом уточнялась [Braithwaite, Ito, 1993]. Этим вопросам посвящена отдельная статья в данном номере журнала [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2026].

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 04.03.2026 г.

Доработана после рецензирования: 14.04.2026 г.

Принята к публикации: 16.04.2026 г.

Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Сахабутдинова А.Р. и др. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. *Biomics*. 2026. 18(1). 120-129. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-9
2. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* УТ1. *Биохимия*. 1980. 45(4). 644-651.
3. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus flavus*. *Биохимия*. 1981. 46(9). 1576-1581.
4. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus ruber*. *Биохимия*. 1982. 47(11). 1785-1791.
5. Прангишвили Д.А. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы термоацидофильной археобактерии *Sulfolobus acidocaldarius*. *Молекул. Биология*. 1985. 19(2). 477-488.
6. Bessman MJ, Kornberg A, Lehman IR et al. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*. 1956. 21(1). 197-198. doi: 10.1016/0006-3002(56)90127-5
7. Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(4). 787-802. doi: 10.1093/nar/21.4.787
8. Brock TD. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics*. 1997. 146(4). 1207-1210. doi: 10.1093/genetics/146.4.1207
9. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol*. 1969. 98(1). 289-297. doi: 10.1128/jb.98.1.289-297.1969
10. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*. 1976. 127(3). 1550-1557. doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
11. Freeze H, Brock TD. Thermostable aldolase from *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*. 1970. 101(2). 541-550. doi: 10.1128/jb.101.2.541-550.1970

12. Fuller CW. Cycle sequencing with non-thermostable DNA polymerase. US Patent 5,432,065, Jul. 11, 1995
13. Ito J, Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19(15). 4045-4057. doi: 10.1093/nar/19.15.4045
14. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830
15. Klimczak LJ, Grummt F, Burger KJ. Purification and characterization of DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* 1985. 13(14). 5269-5282. doi: 10.1093/nar/13.14.5269
16. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med.* 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
17. Rüttimann C, Cotorás M, Zaldivar J et al. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur J Biochem.* 1985. 149(1). 41-46. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08890.x
18. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
19. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
20. Stenesh J, McGowan GR. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. III. Lack of fidelity in the replication of synthetic polydeoxyribonucleotides by DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta.* 1977. 475(1). 32-41. doi: 10.1016/0005-2787(77)90336-7
21. Stenesh J, Roe BA. 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(2). 156-166. doi: 10.1016/0005-2787(72)90240-7
22. Stenesh J, Roe BA. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria: II. Temperature dependence of nearest neighbor frequencies of the product from the DNA polymerase reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. 272(2). 167-178. doi: 10.1016/0005-2787(72)90241-9

References

1. Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(4). 787-802. doi: 10.1093/nar/21.4.787
2. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235. 2399-2403. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64634-4
3. Brock TD. The value of basic research: discovery of *Thermus aquaticus* and other extreme thermophiles. *Genetics.* 1997. 146(4). 1207-1210. doi: 10.1093/genetics/146.4.1207
4. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol.* 1969. 98(1). 289-297. doi: 10.1128/jb.98.1.289-297.1969
5. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976. 127(3). 1550-1557. doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
6. Freeze H, Brock TD. Thermostable aldolase from *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1970. 101(2). 541-550. doi: 10.1128/jb.101.2.541-550.1970
7. Fuller CW. Cycle sequencing with non-thermostable DNA polymerase. US Patent 5,432,065, Jul. 11, 1995
8. Garafutdinov RR, Baymiev AnK., Sahabutdinova AR et al. DNA-dependent DNA polymerases. *Biomics.* 2026. 18(1). 120-129. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-9 (In Russian)
9. Ito J, Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19(15). 4045-4057. doi: 10.1093/nar/19.15.4045
10. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830
11. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT1. *Biochemistry (Moscow).* 1980. 45(4). 644-651. (In Russian)
12. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus flavus*. *Biochemistry (Moscow).* 1981. 46(9). 1576-1581. (In Russian)
13. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA-polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus ruber*. *Biochemistry (Moscow).* 1982. 47(11). 1785-1791. (In Russian)

14. Klimczak LJ, Grummt F, Burger KJ. Purification and characterization of DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Nucleic Acids Res.* 1985. 13(14). 5269-5282. doi: 10.1093/nar/13.14.5269
15. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med.* 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
16. Prangishvili DA. DNA-dependent DNA polymerases of thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molec. Biol. (Moscow)*. 1985. 19(2). 477-488. (In Russian)
17. Rüttimann C, Cotorás M, Zaldívar J et al. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur J Biochem.* 1985. 149(1). 41-46. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08890.x
18. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
19. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
20. Stenesh J, McGowan GR. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. III. Lack of fidelity in the replication of synthetic polydeoxyribonucleotides by DNA polymerase from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim Biophys Acta.* 1977. 475(1). 32-41. doi: 10.1016/0005-2787(77)90336-7
21. Stenesh J, Roe BA. 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(2). 156-166. doi: 10.1016/0005-2787(72)90240-7
22. Stenesh J, Roe BA. DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria: II. Temperature dependence of nearest neighbor frequencies of the product from the DNA polymerase reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. 272(2). 167-178. doi: 10.1016/0005-2787(72)90241-9