



Выделение, клонирование и секвенирование термостабильных ДНК-полимераз. I. Эубактерии

¹В.В. Зубов*, ²Д.А. Чемерис, ^{2,3}Я.И. Алексеев

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Московская обл., г. Пущино, 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

После разработки ПЦР с использованием термостабильной Таq-полимеразы из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus* интерес к таким ферментам резко возрос, и было найдено немало ДНК-полимераз из нескольких видов этого рода микроорганизмов, а также некоторых других термофильных эубактерий. Для многих из них были предложены методы выделения и очистки этих ферментов, проведено клонирование и секвенирование кодирующих их генов, сопровождающееся созданием штаммов *E. coli* - продуцентов соответствующих ДНК-полимераз, в том числе их укороченных вариантов, лишенных 5'→3'-экзонуклеазной активности. При этом редактирующей 3'→5'-активности у данных ферментов за редким исключением не имеется. Наиболее широко используемым ферментом в ПЦР до сих пор остается Таq-полимераза в силу исторических причин, а также благодаря удовлетворения ею основных требований, предъявляемых при проведении классического варианта данной реакции.

Ключевые слова: ДНК-полимераза, термостабильная ДНК-полимераза, Таq-полимераза, ДНК, ПЦР, *Thermus aquaticus*

Цитирование: Зубов В.В., Чемерис Д.А., Алексеев Я.И. Выделение, клонирование и секвенирование термостабильных ДНК-полимераз. I. Эубактерии. *Biomics*. 2026. 18(2). 136-150. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-11

© Авторы, В.В. Зубов, Д.А. Чемерис, Я.И. Алексеев, 2026

The isolation, cloning and sequencing of thermostable DNA polymerases. I. Eubacteria

¹V.V. Zubov*, ²D.A. Chemeris, ^{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

After the elaboration of PCR using a thermostable Taq polymerase from the thermophilic eubacterium *Thermus aquaticus*, interest in such enzymes increased dramatically, and many DNA polymerases from several species of this genus of microorganisms, as well as from some other thermophilic eubacteria, were found. For many of them, methods have been proposed for isolating and purifying these enzymes, cloning and sequencing the genes encoding them, accompanied by the creation of *E.coli* strains producing the corresponding DNA polymerases, including their truncated variants devoid of 5'→3'-exonuclease activity. At the same time, with rare exceptions, these enzymes do not have editing 3'→5'-exonuclease activity. Taq polymerase is still the most widely used enzyme in PCR due to historical reasons, as well as thank to its satisfaction of the basic requirements imposed during the classical version of this reaction.

Keywords: DNA polymerase, thermostable DNA polymerase, Taq polymerase, DNA, PCR, *Thermus aquaticus*

Citation: Zubov V.V., Chemeris D.A., Alekseev Ya.I. The isolation, cloning and sequencing of thermostable DNA polymerases. I. Eubacteria. *Biomics*. 2026. 18(2). 136-150. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-11 (In Russian)

© The Authors, V.V. Zubov, D.A. Chemeris, Ya.I. Alekseev, 2026

Введение

Применение в ПЦР термостабильной ДНК-полимеразы в корне изменило подход к этой реакции и из малопродуктивного метода очень быстро ПЦР превратилась, по сути, в метод №1 в системе биологических наук, проникнув и в некоторые смежные дисциплины. После этого начался настоящий бум по поиску и выделению термостабильных нативных ДНК-полимераз из термофильных микроорганизмов, в первую очередь из эубактерий, а также по клонированию и секвенированию кодирующих их генов, чему как раз и посвящена данная статья, тогда как сопровождающая статья [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2026] посвящена ровно тем же вопросам, но только в ней рассматриваются ДНК-полимеразы из архей. Ввиду того, что имеется огромное количество публикаций по данной теме, то собрать всю имеющуюся информацию абсолютно нереально и вполне допускаем, что что-то (но, надеемся, не самое важное) могло быть нами упущено.

Поскольку использование термостабильных ДНК-полимераз в ПЦР имеет коммерческую составляющую, то, помимо журнальных публикаций, упомянуты некоторые ключевые патенты на этот счет, а также приводится информация из рекламных буклетов. При этом материал преподносится с соблюдением по возможности хронологического порядка сведений о ДНК-полимеразах из микроорганизмов рода *Thermus*, а также из других эубактерий. Не все упомянутые в статье ДНК-полимеразы нашли свое применение в ПЦР, но мы сочли необходимым обратить на них внимание, в том числе с целью не прилагать дальнейших усилий по их изучению в связи с непригодностью для ПЦР. При рассмотрении свойств разных ДНК-полимераз

главное внимание уделено степени очистки, термостабильности и экзонуклеазным активностям, поскольку описание их прочих свойств (процессивность, скорость полимеризации, разная требовательность к используемым модифицированным дНТФ и некоторые другие характеристики) требует отдельной статьи.

ДНК-полимеразы микроорганизмов рода *Thermus* *Taq-полимераза*

В 1989 г. была опубликована статья, в которой сообщалось об идентификации несущего ген термостабильной Taq-полимеразы фрагмента ДНК в созданной клонотеке *E. coli* на основе λ gt11 с помощью антител к одному из эпитопов фермента. После секвенирования размер этого гена оказался равным 2499 п.н., кодируя белок из 832 аминокислотных остатков с молекулярным весом около 94 кДа [Lawyer et al., 1989]. Ген Taq-полимеразы затем был субклонирован в плазмидный вектор под контролем *lac*-промотора. Для выделения рекомбинантного фермента из клеток *E. coli* проводился их лизис при помощи ультразвука с последующим прогревом полученного лизата при 75 °С в течение 20 мин для инактивации обычных белков кишечной палочки, после чего лизат выдерживали при 0 °С в течение 15 мин. В результате центрифугирования для осаждения денатурированных белков Taq-полимераза из супернатанта подвергалась различным испытаниям. Сравнение аминокислотных последовательностей Taq-полимеразы с аналогичным термолабильным ферментом из *E. coli* показало для них 38% идентичных аминокислот. Установлено, что N-регион Taq-полимеразы отвечает за 5'→3'-экзонуклеазную активность, а С-регион за 5'→3'-полимеразную активность. При этом еще за год до

этого при исследовании нативной Taq-полимеразы было показано, что она не имеет редактирующей 3'→5'-экзонуклеазной активности [Tindall, Kunkel, 1988].

Совершенно неудивительно, что после публикации той статьи, описывающей клонирование и секвенирование гена Taq-полимеразы [Lawyer et al., 1989], а также растущей популярности «новой» ПЦР [Kogan et al., 1987; Saiki et al., 1988] термостабильную ДНК-полимеразу выбрали в качестве «Молекулы года», о чем было сообщено журналом Science в номере от 22 декабря 1989 г. [Guyer, Koshland Jr., 1989], поскольку именно применение в ПЦР Taq-полимеразы превратило этот метод в революционизировавший практически всю биологическую науку.

В мае 1990 г. та же группа авторов, опубликовавшая вышеупомянутую статью [Lawyer et al., 1989], подала заявку на свой очередной патент США, в котором правовая охрана должна была распространяться на укороченные с N-конца варианты Taq-полимеразы [Gelfand et al., 1992]. Один из них короче всего на три аминокислотных остатка и получил потом коммерческое название AmpliTaq, а другой укорочен на 289¹ аминокислот и получил обозначение по фамилии одного из соавторов “Stoffel fragment”. В следующем году вышла соответствующая статья [Lawyer et al., 1993], где сообщалось, что поместив Стоффельский фрагмент Taq-полимеразы под сильный промотор бактериофага лямбда P_L удалось достичь выхода фермента в 3% от тотального белка. При этом такой укороченный вариант Taq полимеразы имел время полужизни при 97,5 °C равное 21 мин, тогда как для полноразмерной Taq-полимеразы оно заметно короче – 9 мин.

В 1990 г. вышла статья [Engelke et al., 1990], в которой описывалось клонирование из того же штамма YT-1 *T. aquaticus* в плазмидном экспрессионном векторе гена Taq-полимеразы, для чего авторы использовали амплификацию нужного участка (благодаря ставшей известной его нуклеотидной последовательности из цитированной выше работы [Lawyer et al., 1989]) с помощью ПЦР с Taq-полимеразой, используя на 5'-концах прямого и обратного праймеров экстрапоследовательности, несущие сайты рестрикционных эндонуклеаз EcoRI и BglII для направленного клонирования. Для крупномасштабного выделения Taq-полимеразы из штамма-суперпродуцента, где данный ген находился под *tac*-промотором, после культивирования в объеме 12 л использовался предложенный ранее [Lawyer et al., 1989] подход с получением грубого экстракта с

помощью ультразвука и прогрева образовавшегося лизата при 75 °C для денатурации белков *E. coli*, последующего охлаждения и осаждения Taq-полимеразы из осветленного скоростным центрифугированием лизата 10% полиэтиленгликолем (ПЭИ). Окончательная очистка, в том числе и от ПЭИ, проводилась путем ионообменной хроматографии. Спустя несколько лет описан несколько измененный способ выделения Taq-полимеразы из данного штамма, заключающийся в осаждении белка не ПЭИ, а сульфатом аммония. После диализа без этапа хроматографии фермент содержал лишь незначительные примеси и мог использоваться для проведения ПЦР [Pluthero, 1993]. Не так давно малазийские авторы сообщили о выделении тем же способом рекомбинантной Taq-полимеразы из трех разных штаммов *E. coli* [Teng et al., 2023]. Еще более простой способ выделения рекомбинантной Taq-полимеразы применен другими авторами. Он основан на использовании двух циклов замораживания-оттаивания бактериальной суспензии при -70 °C и 75 °C соответственно с последующим удалением дебриса скоростным центрифугированием [Grimm, Arbuthnot, 1995].

В 1991 г. был предложен быстрый способ идентификации клонов, содержащих Taq полимеразу в экспрессионных векторах – с помощью радиоавтографии нитроцеллюлозных фильтров с перенесенными на них бактериальными колониями после высокотемпературного прогрева, инактивирующего ДНК-полимеразу самой *E. coli*. Остающаяся работоспособной клонированная Taq-полимераза в образующиеся из тотальной бактериальной ДНК некие матрицы включала меченый ³²P ТМФ из присутствующего в реакционной смеси радиоактивного ТТФ. При этом детектируемые сигналы указывали на рекомбинантные клоны [Sagner et al., 1991]. Для этого ДНК *T. aquaticus* расщеплялась в условиях недорестрикции рестрикционной эндонуклеазой с тетра nukлеотидным сайтом узнавания (Sau3AI), после чего из агарозного геля вырезалась зона, соответствующая приблизительно размеру 2,5 т.п.н., и элюированную из нее ДНК лигировали с вектором, расщепленным гексануклеотидной рестриктазой BamHI с теми же «липкими» концами. Затем данной лигазной смесью проводилась трансформация компетентных клеток *E. coli*. с последующим поиском нужных клонов как описано выше.

Иной способ клонирования гена Taq полимеразы избрали кубинские авторы [Lleonart et al., 1992]. Около 2000 плазмидных клонов с HindIII-вставками они скринировали путем гибридизации с двумя олигонуклеотидными зондами длиной 27

¹ с учетом добавления нового стартового метионинового кодона белок в итоге стал короче на 288 аминокислот

звеньев каждый, комплементарных зонам N- и C-концов гена Taq-полимеразы, создав в итоге полноразмерный ген и расположив его под *lac*-промотором. При выделении фермента использовали вышеописанный подход с прогревом и охлаждением грубого экстракта с последующим этапами хроматографии на DEAE-52 целлюлозе и P-11 фосфоцеллюлозе, что позволило им достичь 283-кратной очистки фермента.

На основе тестовой плазмиды pWB305 с геном Taq-полимеразы, изготовленной для проверки точности результатов ПЦР-анализа (GenBank Accession No. M86847), создан укороченный на 235 аминокислот с N-конца ген данной ДНК-полимеразы, получивший название KlenTaq² [Barnes, 1992]. В результате образовалась ДНК полимеразы, лишенная экзонуклеазной активности, и при этом характеризующаяся уменьшенным в два раза числом ошибок при копировании по сравнению с полноразмерным ферментом. Этим же автором в 1995 г. получен патент США #5,436,149 [Barnes, 1995], в котором правовая охрана распространялась на укороченные с N-конца на 280 и на 279 аминокислот Taq- и Tfl-полимеразы соответственно.

Отечественными авторами в векторе pUC19 клонирован ген Taq-полимеразы, используя BglII-фрагменты ДНК штамма YT-1 *T. aquaticus* [Патрушев и др. (Patrushev et al.), 1993]. После переклонирования данного гена в экспрессионный вектор под контролем PR промотора фага лямбда выход Taq-полимеразы составлял 1-2% тотального белка. Время полужизни очищенного фермента составило 60 мин при 95 °С.

Японскими авторами также с помощью амплификации участка ДНК *T. aquaticus* штамма YT-1, несущего ген Taq полимеразы, с использованием самой Taq-полимеразы создана плазмидная конструкция с *lac*-промотором, но при этом сайт-направленным мутагенезом были изменены шесть кодонов на типичные для *E. coli* [Ishino et al., 1994]. В последующие годы выполнено несколько схожих работ, в которых производилась амплификация гена Taq-полимеразы и его клонирование в плазмидных векторах [Desai, Pfaffe, 1995; Jin et al., 1995; Leelayuwat et al., 1997]. Сообщалось также об элиминации 5'→3'-экзонуклеазной активности у Taq-полимеразы путем сайт-направленного мутагенеза³ с

заменой ряда аминокислот. Такие ферменты показали даже чуть лучшие показатели термостабильности, чем AmpliTaq-полимераза [Merkens et al., 1995]. Была создана серия укороченных вариантов Стоффельского фрагмента Taq-полимеразы в виде StofΔ12, StofΔ45 и StofΔ47, при этом последний фермент характеризовался сниженной термостабильностью и эффективностью полимеризации [Vainshtein et al., 1996]. Другими авторами практически полностью удален экзонуклеазный домен, создав два варианта Taq-полимеразы - Δ288 (аналогичный Стоффельскому фрагменту) и Δ413. При этом последний обладал все же несколько худшей термостабильностью [Villbrandt et al., 1997].

Отдельного внимания заслуживает работа, в которой для очистки ΔTaq-полимеразы ее сначала сшивали с сывороточным альбумином, полученным при помощи стрептококкового белка G, а после аффинной хроматографии чистый фермент ДНК-полимеразы получали с помощью сайт-специфического расщепления аффинной метки рекомбинантной протеазой 3С вируса Коксаки [Gräslund et al., 1997]. Здесь стоит отметить, что ген укороченной ΔTaq-полимеразы, совпадающий по размеру с вышеупомянутой KlenTaq-полимеразой, получали путем амплификации с помощью Taq-полимеразы его двух частей с последующими сшивкой и клонированием.

К уже имеющимся нескольким укороченным вариантам Taq-полимеразы в 1998 г. прибавился еще один, который стал короче Стоффельского фрагмента на 4 аминокислоты (если судить по нуклеотидной последовательности), но при этом нес на N-конце дополнительно 21 аминокислоту, среди которых были шесть идущих подряд гистидинов, что позволило очищать такой белок аффинной хроматографией на никелевой колонке в одну стадию [Dabrowski, Kur, 1998a]. Ранее отечественными авторами [Смирнов и др. (Smirnov et al.), 1995] был клонирован ген Taq-полимеразы (собравшийся из трех ПЦР-фрагментов), при этом содержащий на N-конце 11 дополнительных аминокислот из которых подряд идущие шесть принадлежали гистидину, что дало возможность проводить одностадийную очистку фермента аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA-агарозой. Эта His₆-Taq-полимераза сохраняла 50% активности после часовой инкубации при 95 °С.

Не так давно авторами из Саудовской Аравии и Туниса описано клонирование гена Taq-полимеразы в экспрессионном векторе pET28a(+) с гистидиновой меткой на C-конце белка для аффинной очистки фермента [Samman et al., 2023]. Индонезийскими авторами показана высокоэффективная экспрессия под контролем T7-промотора в *E. coli* укороченного

² По аналогии с Кленовским фрагментом ДНК полимеразы I *E. coli*, в котором убран 5'→3'-экзонуклеазный домен [Klenow et al., 1971].

³ Хотя выше говорилось, что сайт-направленный мутагенез ДНК-полимераз - это тема другой статьи, но там имелось ввиду изменение непосредственно полимеризующей активности, а не удаление экзонуклеазной или оптимизация кодонов.

варианта Taq-полимеразы размером 63 КДа [Hadi et al., 2026].

В одной из работ предложено доочищать выделенную Taq-полимеразу, используя двухфазную водно-органическую систему, компонентами которой служили соответственно 10% K_2HPO_4 и этанол, в который после короткого центрифугирования переходила Taq-полимераза [Louwrier, 1999]. Позже другими авторами этот подход был применен для очистки Стоффельского фрагмента Taq-полимеразы [Yang et al., 2008]. Иную водную фазу в виде 8% сульфата натрия в подобной двухфазной системе использовали индийские авторы для аналогичной очистки Taq-полимеразы [Das et al., 2010].

Отличающиеся принципы аффинной хроматографии для выделения Taq-полимеразы предложены в работах 2007 г. Так, очистка в одну стадию основана на использовании иммобилизованного лиганда из комбинаторной библиотеки, содержащей 26 дНТФ-миметических синтетических молекул [Melissis et al., 2007]. Наиболее эффективным среди них оказался лиганд mABSGu, несущий 9-аминоэтилгуанин и анилин-2-сульфоновою кислоту на триазиновом каркасе, обеспечивающий выделение высокоочищенного фермента с отсутствием загрязняющей ДНК и неспецифических нуклеазных активностей. В другой работе в качестве лиганда служил аптамер в виде олигонуклеотида длиной 56 звеньев, иммобилизованного на магнитных частицах, что обеспечило при выделении из подвергнутого воздействию ультразвука клеточного лизата 93% чистоту Taq-полимеразы также за одну стадию [Oktem et al., 2007].

В наступившем столетии опубликован целый ряд схожих работ, выполненных в разных странах, в которых описывается клонирование гена Taq-полимеразы, сопровождающееся или полным выделением и очисткой фермента, или проведением только некоторых этапов его очистки [Sadeghi et al., 2007; Roayaei, Galehdari, 2008; Protzko, Erickson, 2012; Farazmandfar et al., 2013; Moazen et al., 2012; Pormehr et al., 2013; Fang et al., 2016; Raghu, Deepak, 2016; Mishra et al., 2018; Zhou et al., 2018]. Отдельного внимания заслуживает статья, в которой из осветленного грубого лизата, полученного замораживанием/оттаиванием, Taq-полимераза осаждалась этанолом и после растворения в подходящем буфере с глицерином могла как сразу использоваться в ПЦР, так и успешно храниться [Chen et al., 2015]. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании для осаждения этанола с конечной концентрацией 55%. При этом выделенный фермент не уступал по качеству как полимеразе, полученной при помощи осаждения

сульфатом аммония, так и Taq-полимеразе из коммерческого источника.

Пакистанскими авторами описано переклонирование в экспрессионном векторе полученного в составе плазмидного вектора из депозитария Addgene гена Taq-полимеразы [Din et al., 2020]. Экспрессионный вектор pGEX-4T-1 нес под контролем *tac*-промотора GST-участок глутатион-S-трансферазы, способствующий выделению фермента аффинной хроматографией, после чего GST-tag удалялся с помощью тромбина. Индонезийские авторы ген KlenTaq-полимеразы поместили в экспрессионный вектор с участком 6×His под контролем *rhaBAD*-промотора, индуцируемого L-рамнозой [Laksmi et al., 2024]. Попутно ими проведена оптимизация кодонов для экспрессии в *E. coli*. В своей следующей работе эти авторы сообщили о наработке Taq-полимеразы с полноразмерного гена с оптимизированными кодонами, находящегося под контролем T7-промотора в настольном 5-литровом ферментере [Laksmi et al., 2025].

Стоит отметить, что клонирование гена Taq-полимеразы, выделение рекомбинантного фермента и его всесторонний анализ предлагаются в качестве студенческих проектов в ряде университетов США [Ferralli et al., 2007; Bellin et al., 2010].

При амплификации неких бактериальных генов определенную проблему создает загрязняющая ДНК, принадлежащая *E. coli* для рекомбинантных белков, или ДНК *T. aquaticus*, если фермент выделялся из дикого штамма. Такая ДНК потенциально способна привести в ряде случаев к ложно-положительной ПЦР. Для исключения этого в одной из работ предложено выделять рекомбинантную Taq-полимеразу из эукариотических клеток, которыми служили дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а также культура клеток табака *Nicotiana tabacum*, что потребовало произвести оптимизацию кодонов под этих хозяев [Niimi et al., 2011]. Перед началом данной работы эти авторы провели анализ Taq-полимераз восьми производителей, используя ПЦР со стандартными (универсальными) праймерами для бактерий и обнаружили у всех остаточные количества загрязняющей ДНК, тогда как при проведении ПЦР в этих же условиях Taq-полимеразы, выделенные из дрожжей и растений, показали полное отсутствие сигналов амплификации даже после очень большого числа циклов. В целом нужно заметить, что загрязнение ДНК полимераз, как и прочих ингредиентов ПЦР какой-либо посторонней ДНК (для конкретного исследования) представляет собой в ряде случаев определенную проблему, в том числе в виде ложно-положительных результатов.

***Tth*-полимераза, *Tte*-полимераза, *Tfi*-полимераза, *Tsa*-полимераза, *Tfi*-полимераза и др.**

Хотя *Taq*-полимераза была и до сих пор остается наиболее широко применяемым ферментом в ПЦР, тем не менее интерес вызывают и подобные ДНК полимеразы из других микроорганизмов, включая виды все того же рода *Thermus*. Поскольку американские авторы в первые годы развития и распространения ПЦР фактически «монополизировали» *Taq*-полимеразу, то исследователи других стран обратили внимание на другие виды бактерий. Среди них больше остальных внимание привлекала выделенная одной из первых еще в 1985 г. *Tth*-полимераза из *T. thermophilus*. Так, в 1990 г. кубинские авторы сообщили о повторном выделении ДНК-полимеразы из того же штамма *T. thermophilus* HB8 [Carballeira et al., 1990]. После получения грубого экстракта с помощью французского пресса и двух этапов хроматографии на DEAE-сефадексе и фосфоцеллюлозе им удалось очистить фермент в 800 раз.

Впрочем, в следующем году вышла статья тех же авторов из США [Myers, Gelfand, 1991], в которой показано, что *Tth*-полимераза, характеризуясь 5'→3'-экзонуклеазной активностью, в присутствии $MnCl_2$ проявляла еще и заметную ревертазную активность, более чем в 100 раз превышающую таковую у *Taq*-полимеразы. Было отмечено, что причина столь большой разницы между этими ферментами неясна, хотя *Tth*-полимераза имеет с *Taq* полимеразой на аминокислотном уровне 93% подобия и 88% идентичности, и при этом длиннее последней на две аминокислоты (834 аминокислотных остатка против 832). Здесь нужно заметить, что и ДНК-полимераза I *E. coli* характеризуется способностью использовать в качестве матрицы РНК, но обладает ей лишь в незначительной степени, что было известно уже давно [Karkas et al., 1972]. В 1992 г. опубликована статья, посвященная выделению и характеристике ДНК-полимераз из нескольких видов термофильных бацилл, при этом в ней также изучена *Tth*-полимераза, которую удалось очистить в 820 раз, но авторы акцентировали внимание на использовании этих ферментов в обычном секвенировании (не ПЦР-секвенировании), отметив, что *Tth*-полимераза быстро теряет активность при 95 °C [Sellmann et al., 1992].

Японскими авторами в 1993 г. был клонирован ген *Tth*-полимеразы в плазмидном векторе с использованием *Hind*III-расщепления тотальной ДНК того же штамма *T. thermophilus* HB8, и проведено секвенирование этого гена [Asakura et al., 1993]. Его размер оказался равным 2505 п.н., и он кодировал белок из 834 аминокислотных остатка. Об этом сообщалось и раньше [Myers, Gelfand, 1991], но без приведения самой последовательности. При этом

уровень гомологии с *Taq*-полимеразой на нуклеотидном уровне составил 85%, а на аминокислотном – 87%. Спустя несколько лет этими авторами был создан укороченный приблизительно на 300 аминокислот вариант *Tth*-полимеразы, в котором отсутствовал экзонуклеазный домен. При этом термостабильность этого фермента оказалась несколько ниже, чем у нативной *Tth*-полимеразы [Shima et al., 1996]. Было отмечено, что оба эти фермента проявляют нематричную активность, добавляя один нуклеотид на 3'-конец синтезируемой цепи.

В конце 1990-х гг. отечественными авторами был клонирован ряд генов *Tth*-полимеразы из штаммов HB8 и Tt-111 [Смирнов и др. (Smirnov et al.), 1997]. На их основе создано несколько рекомбинантных ферментов (*His*₆-*Tth*-полимераз), несущих на N-конце 12 дополнительных аминокислот. Шесть из них были гистидинами, что облегчало очистку ферментов на никелевой колонке. При этом фермент из штамма Tt-111 характеризовался несколько меньшей полимеразной и ревертазной активностями. Схожую работу позже выполнили польские авторы, создав подобную рекомбинантную *Tth*-полимеразу с тем отличием, что шесть гистидинов у них находились в составе 43 дополнительных аминокислот [Dabrowski, Kur, 1998].

Из другого штамма *T. thermophilus* (HB27) корейские авторы клонировали ген ДНК-полимеразы, кодирующей белок также размером 834 аминокислотных остатка и с молекулярным весом 93,81 кДа, назвав его *Tor*-полимеразой [Kim et al., 1998]. Было отмечено, что при хранении этот фермент, подвергаясь гидролитическому воздействию, сам «разваливался» на две части – приблизительно 60 и 35 кДа, отвечающих соответственно за полимеразную и экзонуклеазную активности.

Также в конце 1990-х гг. другими отечественными авторами была выделена ДНК-полимераза из штамма *T. thermophilus* B35, что позволило авторам назвать этот фермент *Tte*-полимеразой [Речкунова и др. (Rechkunova et al.), 1998]. Авторы указали на предпочтительность использования данного штамма ввиду более высокой термостабильности ДНК-полимеразы из него, а также по причине отсутствия в нём рестрикционных эндонуклеаз, способных помешать проведению некоторых реакций. В результате четырех этапов хроматографии на DEAE-сефарозе, оксиапатите, гексилгагарозе и гепаринсефарозе, *Tte*-полимераза приобрела степень очистки в 13750 раз. В своей следующей работе эти авторы клонировали и секвенировали ген *Tte*-полимеразы [Акишев и др. (Akishev et al.), 1999]. Сравнение нуклеотидных и

аминокислотных последовательностей Tte-полимеразы с Tth-полимеразой показало различие между ними в заменах 22 нуклеотидов и только 7 аминокислот.

В 1992 г. был клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из микроорганизма *T. flavus*, обнаруженного на Камчатке [Akhmetzjanov, Vakhitov, 1992]. Его размер оказался равным 2496 п.н. и кодировал он Tfl-полимеразу длиной 831 аминокислоту. Позже американские авторы выделили нативную Tfl-полимеразу из дикого штамма ATCC 33923⁴ и обнаружили, что их фермент сохранял активность при 94 °С в течение 60 мин, а Taq-полимераза при этих условиях - только 30 мин [Harrell 2nd, Hart, 1994]. ДНК-полимераза из *T. flavus* некоторое время поставлялась как Hot Tub-полимераза английской фирмой Amersham.

В 1993 г. была выделена ДНК-полимераза из бактерии *T. caldophilus* [Park et al., 1993]. После прогрева очищенного фермента при 95 °С в течение 70 мин он сохранял около 50% активности. При этом отмечалось, что Tca-полимераза способна амплифицировать более длинные матрицы по сравнению с Taq-полимеразой при схожем уровне ошибок. В присутствии MnCl₂ Tca-полимераза проявляла слабую ревертазную активность, сравнимую с таковой у Taq-полимеразы. Позже ими был клонирован и секвенирован ген этой Tca-полимеразы, кодирующий 834 аминокислотных остатка, совпадающих на 86% с Taq-полимеразой [Kwon et al., 1997]. Помещение гена Tca-полимеразы под контроль *tac*-промотора увеличило выход фермента в 26 раз по сравнению с диким штаммом. В том же году из бактерии *T. filiformis* был клонирован ген ДНК-полимеразы, кодирующий Tfi-полимеразу длиной 833 аминокислотных остатка, совпадающих на 78,5% с Taq-полимеразой, и на 78,4% - с Tca-полимеразой [Jung et al., 1997]. В своей следующей работе [Choi et al., 1999] эти авторы сообщили о создании штамма *E. coli*, несущего ген Tfi-полимеразы под контролем *tac*-промотора. Очищенный фермент сохранял около 50% своей активности после выдерживания при 94 °С в течение 40 мин.

Здесь еще нужно вспомнить ДНК полимеразу из бактерии *T. Brockianus* (Tbr-полимераза), поставляющуюся финской фирмой Finnzymes Oy под торговой маркой DyNAzyme и DyNAzyme II, при этом последняя обеспечивала в ПЦР «горячий старт».

В одной из работ выполнено масштабное исследование многих ДНК-полимераз из разных видов рода *Thermus* путем их клонирования в

экспрессионных векторах с гистиридиновыми метками для облегчения очистки ферментов, а также проведен анализ родства анализируемых штаммов на основе нуклеотидных последовательностей ДНК-полимераз и генов 16S рРНК [Gibbs et al., 2009]. Полученные результаты позволили построить схожие филогенетические древа на основе двух этих генетических локусов и выделить шесть ДНК-полимераз из штаммов, относящихся к *T. filiformis*, *T. oshimai*, *T. Thermophilus* и *T. antranikianus*. При исследовании свойств этих ферментов обнаружено их короткое время полужизни при 95 °С, находящееся в диапазоне от 2,5 до 6 мин, сильно уступающее Taq-полимеразе с её 20 мин в этих же условиях.

Не так давно была клонирована и экспрессирована в *E. coli* с 10 гистидинами на С-конце термостабильная ДНК-полимераза TsK1 из *T. scotoductus* [Saghatelyan et al., 2021]. Фермент стабилен 1 час при 80 °С и имеет время полужизни при 88 °С и 95 °С 30 и 15 мин соответственно.

ДНК полимеразы прочих термофильных эубактерий

Кроме термостабильных ДНК-полимераз, выделяемых из микроорганизмов рода *Thermus*, исследователи обращали внимание и на другие термофильные эубактерии. Так, новозеландские авторы из растущей при 80 °С анаэробной эубактерии из рода *Thermotoga* штамма FjSS3-B.1 выделили ДНК-полимеразу, и после ряда этапов хроматографии получили очищенный в 54 раза фермент [Simpson et al., 1990; 1990a]. Однако данная полимеразы из этой бактерии имела время полужизни всего 3 мин при 95 °С, хотя использование некоторых добавок увеличивало его до 7 мин. Позднее были получены ДНК-полимеразы из того же рода микроорганизмов *Thermotoga*, относящихся к видам *T. maritima* [Chatterjee, 1999] и *T. neapolitana* [Slater et al., 2000; Chatterjee, 2002]. ДНК-полимераза из первого вида под названием UTMa использовалась в ПЦР и была доступна из коммерческого источника, представленного тогда американской фирмой Perkin-Elmer. Что касается Tpe-полимеразы, то ее ген был клонирован, но фермент имел короткое время полужизни при 95 °С, измеряемое 3 мин. Также был клонирован ген K4PolI полимеразы из *T. petrophila* штамма K4, которая обладала помимо полимеразной ещё репарирующей и редактирующей активностями, и состояла из 893 аминокислотных остатков [Sano et al., 2012; Yasukawa et al., 2012]. Но поскольку этот фермент был использован для конструирования на его основе обратной транскриптазы, то ему будет уделено внимание в другой статье.

Пользуясь результатами секвенирования полного генома гипертермофильного микроорганизма

⁴ как отметили сами авторы, что этот штамм также известен в коллекции ATCC как *T. aquaticus* AT62

Aquifex aeolicus, способного расти в диапазоне от 55 до 95 °С, в нем был идентифицирован ген Аае-полимеразы размером 1754 п.н., кодирующий фермент из 574 аминокислотных остатков. Это позволило авторам из Южной Кореи, подобрав праймеры, клонировать данный ген в плазмидном векторе [Chang et al., 2001]. Аае-полимераза была очищена, и после изучения её свойств было показано, что этот фермент отличается на удивление коротким временем полужизни при температурах выше 90 °С. У Аае-полимеразы была выявлена редактирующая 3'→5'-экзонуклеазная активность, что подтверждалось и сравнительным анализом аминокислотной последовательности этого белка с остальными ДНК-полимеразами.

В следующем году из растущей при 85 °С анаэробной бактерии *Thermoanaerobacter yonseiensis* другими корейскими авторами [Kim et al., 2002] был клонирован ген ДНК-полимеразы, получившей обозначение Тау-полимераза и имевшей размер 872 аминокислотных остатка с молекулярным весом 97 кДа. К С-концу гена Тау-полимеразы был пришит полигистидиновый участок для очистки на никелевой колонке. Проведенный анализ выделенного фермента показал не самую высокую его термостабильность, поскольку время полужизни при 90 °С Тау-полимеразы составляло всего 10 мин. Также было обнаружено, что Тау-полимераза не имеет 3'→5'-экзонуклеазной активности.

Заключение

Как можно видеть из изложенного выше, Таq-полимераза по масштабу применения и уделяемому ей внимания значительно «опережает» прочие ДНК-полимеразы, выделяемые из микроорганизмов рода *Thermus* и других эубактерий. При этом главным недостатком их всех⁵ (за исключением Аае-полимеразы и K4PloI-полимеразы) является отсутствие редактирующей экзонуклеазной активности, следствием чего становятся ошибки при амплификации, достигающие довольно значительных величин. Тем не менее, сейчас очень многими фирмами производится Таq-полимераза, тогда как прочие ДНК полимеразы эубактерий, находящие применение в ПЦР, поставляются ограниченным количеством компаний или никогда коммерчески не производились. Причинами такой популярности Таq-полимеразы служит как исторический момент, поскольку она была первой, так и то, что в большинстве случаев при амплификации каких-либо участков ДНК сверхвысокая точность воспроизведения исходной последовательности не требуется. Исключениями являются эксперименты, ставящие

целями клонирование генов и/или создание новых генно-инженерных конструкций, в которых необходимо использовать ДНК-полимеразы архейных микроорганизмов, обладающие редактирующей активностью. Но им будет посвящена следующая статья этого номера журнала [Чемерис и др. (Chemeris et al., 2026)].

Практически параллельно с поиском и изучением природных термостабильных ДНК полимераз из эубактерий стала вестись работа по их улучшению с помощью как направленного, так и случайного мутагенеза, а также путем создания химерных и гибридных форм, в том числе с другими термостабильными белками. И на этих направлениях достигнуты серьезные успехи, но здесь им внимания уделено не будет, поскольку это требует отдельных публикаций, равно как и выяснение с помощью рентгеноструктурного анализа пространственных особенностей различных ДНК полимераз, включая детальное изучение их доменной и субдоменной организации, а также тонкостей работы каталитического центра.

Как показано выше, Таq-полимераза является наиболее широко используемым ферментом для проведения ПЦР среди термостабильных ДНК полимераз, относящихся к А семейству этих ферментов эубактерий. За ней с большим отрывом следует полимеразы из близкородственного микроорганизма *T. thermophilus*. ДНК полимеразы остальных представителей этого рода, а также ряда других термофильных эубактерий, используются в ПЦР крайне ограниченно, и даже не используются вовсе в силу разных причин, главной из которых служит их сравнительно низкая термостабильность при высоких (95 °С и выше) температурах. Тем не менее, мы сочли, что здесь будет все же правильным привести информацию о них. Хотя надо заметить, что различные мутации некоторых ДНК полимераз приводят к изменению их свойств, включая термостабильность, но этим вопросам должна быть посвящена отдельная статья. Также нельзя не отметить, что после того как было обращено внимание на гипертермофильные археи с целью выделения из них термостабильных ДНК полимераз для применения в ПЦР, то и термостабильность Таq-полимеразы уже кажется невысокой, но этим ферментам посвящена самостоятельная статья.

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.

⁵ имеется в виду изученных

Литература

1. Акишев А.Г., Речкунова Н.И., Лебедева Н.А. и др. Термостабильная ДНК-полимераза из *Thermus thermophilus* В35: клонирование, определение первичной структуры и экспрессия гена. *Биохимия*. 1999. 64(11). 1536–1543.
2. Патрушев Л.И., Валяев А.Г., Головченко П.А. и др. Клонирование гена термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* YТ1 и его экспрессия в клетках *Escherichia coli*. *Молекул. Биология*. 1993. 27(5). 1100-1112.
3. Речкунова Н.И., Акишев А.Г., Лебедева Н.А. и др. Термостабильная ДНК полимераза из *Thermus thermophilus* В35: выделение и изучение свойств. *Биохимия*. 1998. 63(11). 1490–1495.
4. Смирнов Ю.В., Фрадков А.В., Чахмачева О.Г. и др. Синтез в клетках *Escherichia coli* и быстрый метод очистки высокоэффективной рекомбинантной His₆-ДНК полимеразы *Thermus aquaticus*. *Биоорганическая химия*. 1995. 21(5). 396–398.
5. Смирнов Ю.В., Чахмачева О.Г., Ефимов В.А. Рекомбинантная His₆-ДНК полимераза *Thermus thermophilus* с активностью обратной транскриптазы. *Биоорганическая химия*. 1997. 23(4). 257–261.
6. Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И. Выделение, клонирование, секвенирование термостабильных ДНК-полимераз. II. Археи. *Biomcs*. 2026. 18(2). 151-167. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-12
7. Akhmetzjanov AA, Vakhitov VA. Molecular cloning and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from *Thermus flavus*. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(21). 5839. doi: 10.1093/nar/20.21.5839
8. Asakura K, Komatsubara H, Soga S et al. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of DNA Polymerase Gene (poL4) from *Thermus thermophilus* HI38. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 1993. 76(4). 265-269. doi: 10.1016/0922-338X(93)90191-A
9. Barnes WM. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene*. 1992. 112(1). 29-35. doi: 10.1016/0378-1119(92)90299-5
10. Barnes WM. Thermostable DNA polymerase with enhanced thermostability and enhanced length and efficiency primer extension. US Patent # 5,436,149. Dated Jul. 25, 1995
11. Bellin RM, Bruno MK, Farrow MA. Purification and characterization of Taq polymerase: A 9-week biochemistry laboratory project for undergraduate students. *Biochem Mol Biol Educ*. 2010. 38(1). 11-16. doi: 10.1002/bmb.20352
12. Carballeira N, Nazabal M, Brito J et al. Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1990. 9(3). 276- 281.
13. Chang JR, Choi JJ, Kim HK et al. Purification and properties of *Aquifex aeolicus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001. 201(1). 73-77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10735.x
14. Chatterjee DK. Cloned DNA polymerase from *Thermotoga maritima* and mutants thereof. US Patent #5,948,614. Dated Sep. 7, 1999
15. Chatterjee DK, Hughes J, Jr. Cloned DNA polymerase from *Thermotoga maritima*. US Patent #6,444,424. Dated Sep. 3, 2002
16. Chen ST, Zheng X, Cao H et al. A simple and efficient method for extraction of Taq DNA polymerase. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2015. 18. 355–358. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.08.001
17. Choi JJ, Jung SE, Kim HK et al. Purification and properties of *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 1999. 30(1). 19-25.
18. Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. I. Cloning, purification and partial characterization of *Thermus thermophilus* recombinant DNA polymerase. *Acta Biochim Pol*. 1998. 45(3). 653-660.
19. Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). *Acta Biochim Pol*. 1998a. 45(3). 661-667.
20. Das KMP, Sampali B, Padmanabhan S. An alternate method for purification of recombinant Taq DNA polymerase using aqueous two phase system. *Industrial Biotechnology*. 2010. 6(5). 295-301. doi: 10.1089/ind.2010.6.295
21. Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*// *Biotechniques*. 1995. 19(5). 780- 782, 784.
22. Din RU, Khan MI, Jan A et al A novel approach for high-level expression and purification of GST-fused highly thermostable Taq DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. 2020. 202(6). 1449-1458. doi: 10.1007/s00203-020-01860-9
23. Engelke DR, Krikos A, Bruck ME et al. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem*. 1990. 191(2). 396-400. doi: 10.1016/0003-2697(90)90238-5
24. Fang N, Zhong N, Yang Y et al. Data of expression and purification of recombinant Taq DNA polymerase. *Data Brief*. 2016. 9. 81-84. doi: 10.1016/j.dib.2016.08.032
25. Farazmandfar T, Rafiei A, Hashemi SMB et al. A Simplified Protocol for Producing Taq DNA Polymerase in Biology Laboratory. *Res Mol Med*. 2013. 1(2). 23-26.

26. Ferralli P, Egan JD, Erickson FL. Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *BIOS*. 2007. 78(2). 69-74. doi: 10.1893/0005-3155(2007)78[69:MTDPIT]2.0.CO;2
27. Gelfand DH, Stoffel S, Lawyer FC et al. Purified thermostable enzyme. US Patent #5,079,352, Dated Jan. 7, 1992
28. Gibbs MD, Reeves RA, Mandelman D et al. Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. *Extremophiles*. 2009. 13(5). 817-826. doi: 10.1007/s00792-009-0269-8
29. Grimm E., Arbutnot P. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(21). 4518-4519. doi: 10.1093/nar/23.21.4518
30. Gräslund T, Nilsson J, Lindberg AM et al. Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expr Purif*. 1997. 9(1). 125-132. doi: 10.1006/prep.1996.0674
31. Guyer RL, Koshland DE Jr. The Molecule of the Year. *Science*. 1989. 246(4937). 1543-1546. doi: 10.1126/science.2688087
32. Hadi MI, Laksmi FA, Violando WA et al. Efficient expression of truncated Taq DNA polymerase in *Escherichia coli* and its application in mitochondrial cytochrome b-targeted PCR for halal authentication. *World J Microbiol Biotechnol*. 2026. 42(2). 88. doi: 10.1007/s11274-026-04834-z
33. Harrell RA 2nd, Hart RP. Rapid preparation of *Thermus flavus* DNA polymerase. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). 372-375. doi: 10.1101/gr.3.6.372
34. Ishino Y, Ueno T, Miyagi M et al. Overproduction of *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its structural analysis by ion-spray mass spectrometry. *J. Biochem*. 1994. 116(5). 1019- 1024. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124622
35. Jin C, Liu H, Yang S et al. Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*. 1995. 11(3). 185-191.
36. Jung SE, Choi JJ, Kim HK et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Mol Cells*. 1997. 7(6). 769-776.
37. Karkas JD, Stavrianopoulos JG, Chargaff E. Action of DNA polymerase I of *Escherichia coli* with DNA-RNA hybrids as templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972. 69(2). 398-402. doi: 10.1073/pnas.69.2.398
38. Kim DJ, Jang HJ, Pyun YR et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *J Biochem Mol Biol*. 2002. 35(3). 320- 329. doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.3.320
39. Kim JS, Koh S, Kim JJ et al. Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB27: gene cloning, sequence determination, and physicochemical properties. *Mol Cells*. 1998. 8(2). 157- 161.
40. 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
41. Kwon ST, Kim JS, Park JH et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus caldophilus* GK24. *Mol Cells*. 1997. 7(2). 264-271.
42. Laksmi FA, Dewi KS, Nuryana I et al. High-level expression of codon-optimized Taq DNA polymerase under the control of rhaBAD promoter. *Anal Biochem*. 2024. 692. 115581. doi: 10.1016/j.ab.2024.115581
43. Laksmi FA, Lischer K, Nugraha Y et al. A robust strategy for overexpression of DNA polymerase from *Thermus aquaticus* using an IPTG-independent autoinduction system in a benchtop bioreactor. *Sci Rep*. 2025. 15(1). 5891. doi: 10.1038/s41598-025-89902-4
44. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989. 264(11). 6427- 6437. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83367-1
45. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 1993. 2(4). 275-287. doi: 10.1101/gr.2.4.275
46. Leelayuwat C, Srisuk T, Paechaiyaphum R et al. Production and evaluation of Taq DNA polymerase. *J Med Assoc Thai*. 1997. 80(1). 129-137.
47. Leonart R, Campos M, Suárez A et al. Molecular cloning of the gene, expression in *E. coli* and purification of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Acta Biotechnologica*. 2004. 12. 155-159. doi: 10.1002/abio.370120215
48. Louwrier A. Nucleic acid removal from Taq polymerase preparations using an aqueous/organic biphasic system. *Biotechniques*. 1999. 27(3). 444-445. doi: 10.2144/99273bm09
49. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*. 2007. 2(1). 121-132. doi: 10.1002/biot.200600191
50. Merkens LS, Bryan SK, Moses RE. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1264(2). 243-248. doi: 10.1016/0167-4781(95)00153-8
51. Mishra M, Mohanraj J, Nisshanthini D et al. High-level Expression and Purification of DNA and

- DNase Free Taq DNA Polymerase. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2018. 2(4). 1-10. doi: 10.9734/ajrb/2018/v2i4607
52. Moazen F, Rastegari A, Hoseini SM et al. Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res*. 2012. 1. 82. doi: 10.4103/2277-9175.103004
53. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991. 30(31). 7661-7666. doi: 10.1021/bi00245a001
54. Niimi H, Mori M, Tabata H et al. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination. *J. Clin Microbiol*. 2011. 49(9). 3316-3320. doi: 10.1128/JCM.00584-11
55. Oktem HA, Bayramoglu G, Ozalp VC et al. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. *Biotechnol Prog*. 2007. 23(1). 146-154. doi: 10.1021/bp0602505
56. Park JH, Kim JS, Kwon ST et al. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur J Biochem*. 1993. 214(1). 135-140. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17905.x
57. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(20). 4850-4851. doi: 10.1093/nar/21.20.4850
58. Pormehr LA, Vishkaei MN, Mozafarzadeh Z et al. Isolation, characterization of novel fragment of a gene *Klentaq1* which encodes *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its thermostability studies in *Escherichia coli*. *Science International (Lahore)*. 2013. 25(4). 833-836.
59. Protzko RJ, Erickson FL. A scaled-down and simplified protocol for purifying recombinant Taq DNA polymerase. *BIOS*. 2012. 83(1). 8-11. doi: 10.1893/0005-3155-83.1.8
60. Raghu N, Deepak J. Rapid simplified protocol for purification of Taq polymerase fragment expressed in *Escherichia coli*. *Intern. J. Advanced Res*. 2016. 4(6). 13-17.
61. Roayaei M, Galehdari H. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2008. 1(1). 1-5.
62. Sadeghi HMM, Rabbani MJ, Moazen F. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* strain YT-1. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2007. 1(1). 49-52.
63. Saghatelian A, Panosyan H, Trchounian A et al. Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *Microbiologyopen*. 2021. 10(1). e1149. doi: 10.1002/mbo3.1149
64. Sagner G, Ruger R, Kessler C. Rapid filter assay for the detection of DNA polymerase activity: direct identification of the gene for the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *Gene*. 1991. 97(1). 119-123. doi: 10.1016/0378-1119(91)90018-7
65. 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
66. Samman N, Al-Muhalhil K, Nehdi A. A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography. *Journal of King Saud University - Science*. 2023. 35. 102565. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102565
67. Sano S, Yamada Y, Shinkawa T et al. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. *J Biosci Bioeng*. 2012. 113(3). 315-321. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.001
68. Sellmann E, Schroder KL, Knoblich IM et al. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species. *J Bacteriol*. 1992. 174(13). 4350-4355. doi: 10.1128/jb.174.13.4350-4355.1992
69. Shima Y, Hasegawa A, Arakawa T et al. Construction and characterization of N-terminally truncated DNA polymerase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996. 81(6). 504-510. doi: 10.1016/0922-338X(96)81470-X
70. Simpson HD, Coolbear T, Daniel RM. Purification of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Ann N Y Acad Sci*. 1990. 613. 426-428. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18192.x
71. Simpson HD, Coolbear T, Vermue M et al. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Biochem Cell Biol*. 1990a. 68(11). 1292-1296. doi: 10.1139/o90-192
72. Slater MR, Hartnett JR, Bolchakova E et al. Thermophilic DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana*. US Patent #6,077,664. Dated Jun. 20, 2000
73. Teng XC, Ang SY, Citartan M et al. Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 2023. 31(1). 45-52. doi: 10.35118/apjmbb.2023.031.1.05
74. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1988. 27(16). 6008-6013. doi: 10.1021/bi00416a027
75. Vainshtein I, Atrazhev A, Eom SH et al. Peptide rescue of an N-terminal truncation of the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase. *Protein Sci*. 1996. 5(9). 1785-1792. doi: 10.1002/pro.5560050904
76. Villbrandt B, Sagner G, Schomburg D. Investigations on the thermostability and function of truncated *Thermus aquaticus* DNA polymerase fragments.

- Protein Eng.* 1997. 10(11). 1281-1288. doi: 10.1093/protein/10.11.1281
77. Yang Z, Ding Y, Zhang Y et al. Rapid purification of truncated Taq DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008. 50(2). 71-75. doi: 10.1042/BA20070114
78. Yasukawa K, Konishi A, Shinomura M et al. Kinetic analysis of reverse transcriptase activity of bacterial family A DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. 427(3). 654-658. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.116
79. Zhou H, Zhang Y, Hu Z et al. High-Efficiency Separation and Purification of Taq DNA Polymerase. 2018. In: Liu H, Song C, Ram A. (eds) *Advances in Applied Biotechnology*. ICAB 2016. Lecture Notes in Electrical Engineering, Vol 444. Springer, Singapore. 663-672. doi: 10.1007/978-981-10-4801-2_68
- ### References
- Akhmetzjanov AA, Vakhitov VA. Molecular cloning and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from *Thermus flavus*. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(21). 5839. doi: 10.1093/nar/20.21.5839
 - Akishev AG, Rechkunova NI, Lebedeva NA et al. Thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* B35: cloning, sequence analysis, and gene expression. *Biochemistry (Mosc).* 1999. 64(11). 1298-1304.
 - Asakura K, Komatsubara H, Soga S et al. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of DNA Polymerase Gene (poL4) from *Thermus thermophilus* HI38. *Journal of Fermentation Bioengineering.* 1993. 76(4). 265-269. doi: 10.1016/0922-338X(93)90191-A
 - Barnes WM. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene.* 1992. 112(1). 29-35. doi: 10.1016/0378-1119(92)90299-5
 - Barnes WM. Thermostable DNA polymerase with enhanced thermostability and enhanced length and efficiency primer extension. US Patent # 5,436,149. Dated Jul. 25, 1995
 - Bellin RM, Bruno MK, Farrow MA. Purification and characterization of Taq polymerase: A 9-week biochemistry laboratory project for undergraduate students. *Biochem Mol Biol Educ.* 2010. 38(1). 11-16. doi: 10.1002/bmb.20352
 - Carballeira N, Nazabal M, Brito J et al. Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* 1990. 9(3). 276- 281.
 - Chang JR, Choi JJ, Kim HK et al. Purification and properties of *Aquifex aeolicus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001. 201(1). 73-77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10735.x
 - Chatterjee DK. Cloned DNA polymerase from *Thermotoga maritima* and mutants thereof. US Patent #5,948,614. Dated Sep. 7, 1999
 - Chatterjee DK, Hughes J, Jr. Cloned DNA polymerase from *Thermotoga maritima*. US Patent #6,444,424. Dated Sep. 3, 2002
 - Chemeris D.A., Zubov V.V., Alksv Ya.I. The isolation, cloning, sequencing of thermostable DNA polymerases. II. *Archea. Biomics.* 2026. 18(1). 151-167. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-12 (In Russian)
 - Chen ST, Zheng X, Cao H et al. A simple and efficient method for extraction of Taq DNA polymerase. *Electronic Journal of Biotechnology.* 2015. 18. 355-358. doi: 10.1016/j.ejbt.2015.08.001
 - Choi JJ, Jung SE, Kim HK et al. Purification and properties of *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem.* 1999. 30(1). 19-25.
 - Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. I. Cloning, purification and partial characterization of *Thermus thermophilus* recombinant DNA polymerase. *Acta Biochim Pol.* 1998. 45(3). 653-660.
 - Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of *Thermus aquaticus* recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). *Acta Biochim Pol.* 1998a. 45(3). 661-667.
 - Das KMP, Sampali B, Padmanabhan S. An alternate method for purification of recombinant Taq DNA polymerase using aqueous two phase system. *Industrial Biotechnology.* 2010. 6(5). 295-301. doi: 10.1089/ind.2010.6.295
 - Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*// *Biotechniques.* 1995. 19(5). 780- 782, 784.
 - Din RU, Khan MI, Jan A et al A novel approach for high-level expression and purification of GST-fused highly thermostable Taq DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 2020. 202(6). 1449-1458. doi: 10.1007/s00203-020-01860-9
 - Engelke DR, Krikos A, Bruck ME et al. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem.* 1990. 191(2). 396-400. doi: 10.1016/0003-2697(90)90238-5
 - Fang N, Zhong N, Yang Y et al. Data of expression and purification of recombinant Taq DNA polymerase. *Data Brief.* 2016. 9. 81-84. doi: 10.1016/j.dib.2016.08.032
 - Farazmandfar T, Rafiei A, Hashemi SMB et al. A Simplified Protocol for Producing Taq DNA Polymerase in Biology Laboratory. *Res Mol Med.* 2013. 1(2). 23-26.

22. Ferralli P, Egan JD, Erickson FL. Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *BIOS*. 2007. 78(2). 69-74. doi: 10.1893/0005-3155(2007)78[69:MTDPIT]2.0.CO;2
23. Gelfand DH, Stoffel S, Lawyer FC et al. Purified thermostable enzyme. US Patent #5,079,352, Dated Jan. 7, 1992
24. Gibbs MD, Reeves RA, Mandelman D et al. Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. *Extremophiles*. 2009. 13(5). 817-826. doi: 10.1007/s00792-009-0269-8
25. Grimm E., Arbutnot P. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(21). 4518-4519. doi: 10.1093/nar/23.21.4518
26. Gräslund T, Nilsson J, Lindberg AM et al. Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expr Purif*. 1997. 9(1). 125-132. doi: 10.1006/prep.1996.0674
27. Guyer RL, Koshland DE Jr. The Molecule of the Year. *Science*. 1989. 246(4937). 1543-1546. doi: 10.1126/science.2688087
28. Hadi MI, Laksmi FA, Violando WA et al. Efficient expression of truncated Taq DNA polymerase in *Escherichia coli* and its application in mitochondrial cytochrome b-targeted PCR for halal authentication. *World J Microbiol Biotechnol*. 2026. 42(2). 88. doi: 10.1007/s11274-026-04834-z
29. Harrell RA 2nd, Hart RP. Rapid preparation of *Thermus flavus* DNA polymerase. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). 372-375. doi: 10.1101/gr.3.6.372
30. Ishino Y, Ueno T, Miyagi M et al. Overproduction of *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its structural analysis by ion-spray mass spectrometry. *J. Biochem*. 1994. 116(5). 1019- 1024. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124622
31. Jin C, Liu H, Yang S et al. Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*. 1995. 11(3). 185-191.
32. Jung SE, Choi JJ, Kim HK et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Mol Cells*. 1997. 7(6). 769-776.
33. Karkas JD, Stavrianopoulos JG, Chargaff E. Action of DNA polymerase I of *Escherichia coli* with DNA-RNA hybrids as templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972. 69(2). 398-402. doi: 10.1073/pnas.69.2.398
34. Kim DJ, Jang HJ, Pyun YR et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *J Biochem Mol Biol*. 2002. 35(3). 320- 329. doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.3.320
35. Kim JS, Koh S, Kim JJ et al. Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB27: gene cloning, sequence determination, and physicochemical properties. *Mol Cells*. 1998. 8(2). 157- 161.
36. 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
37. Kwon ST, Kim JS, Park JH et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus caldophilus* GK24. *Mol Cells*. 1997. 7(2). 264-271.
38. Laksmi FA, Dewi KS, Nuryana I et al. High-level expression of codon-optimized Taq DNA polymerase under the control of rhaBAD promoter. *Anal Biochem*. 2024. 692. 115581. doi: 10.1016/j.ab.2024.115581
39. Laksmi FA, Lischer K, Nugraha Y et al. A robust strategy for overexpression of DNA polymerase from *Thermus aquaticus* using an IPTG-independent autoinduction system in a benchtop bioreactor. *Sci Rep*. 2025. 15(1). 5891. doi: 10.1038/s41598-025-89902-4
40. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989. 264(11). 6427- 6437. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83367-1
41. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 1993. 2(4). 275-287. doi: 10.1101/gr.2.4.275
42. Leelayuwat C, Srisuk T, Paechaiyaphum R et al. Production and evaluation of Taq DNA polymerase. *J Med Assoc Thai*. 1997. 80(1). 129-137.
43. Leonart R, Campos M, Suárez A et al. Molecular cloning of the gene, expression in *E. coli* and purification of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Acta Biotechnologica*. 2004. 12. 155-159. doi: 10.1002/abio.370120215
44. Louwrier A. Nucleic acid removal from Taq polymerase preparations using an aqueous/organic biphasic system. *Biotechniques*. 1999. 27(3). 444-445. doi: 10.2144/99273bm09
45. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*. 2007. 2(1). 121-132. doi: 10.1002/biot.200600191
46. Merkens LS, Bryan SK, Moses RE. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1264(2). 243-248. doi: 10.1016/0167-4781(95)00153-8
47. Mishra M, Mohanraj J, Nisshanthini D et al. High-level Expression and Purification of DNA and

- DNase Free Taq DNA Polymerase. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2018. 2(4). 1-10. doi: 10.9734/ajrb/2018/v2i4607
48. Moazen F, Rastegari A, Hoseini SM et al. Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res*. 2012. 1. 82. doi: 10.4103/2277-9175.103004
49. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991. 30(31). 7661-7666. doi: 10.1021/bi00245a001
50. Niimi H, Mori M, Tabata H et al. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination. *J. Clin Microbiol*. 2011. 49(9). 3316-3320. doi: 10.1128/JCM.00584-11
51. Oktem HA, Bayramoglu G, Ozalp VC et al. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. *Biotechnol Prog*. 2007. 23(1). 146-154. doi: 10.1021/bp0602505
52. Park JH, Kim JS, Kwon ST et al. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur J Biochem*. 1993. 214(1). 135-140. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17905.x
53. Patrushev LI, Valiaev AG, Golovchenko PA et al. Cloning of the gene for thermostable *Thermus aquaticus* YT1 DNA polymerase and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biol (Mosk)*. 1993. 27(5). 1100-1112. (In Russian).
54. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(20). 4850-4851. doi: 10.1093/nar/21.20.4850
55. Pormehr LA, Vishkaei MN, Mozafarzadeh Z et al. Isolation, characterization of novel fragment of a gene Klentaq1 which encodes *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its thermostability studies in *Escherichia coli*. *Science International (Lahore)*. 2013. 25(4). 833-836.
56. Protzko RJ, Erickson FL. A scaled-down and simplified protocol for purifying recombinant Taq DNA polymerase. *BIOS*. 2012. 83(1). 8-11. doi: 10.1893/0005-3155-83.1.8
57. Raghu N, Deepak J. Rapid simplified protocol for purification of Taq polymerase fragment expressed in *Escherichia coli*. *Intern. J. Advanced Res*. 2016. 4(6). 13-17.
58. Rechkunova NI, Akishev AG, Lebedeva NA et al. Thermostable DNA-polymerase from *Thermus thermophilus* B35: isolation and characterization of some properties. *Biochemistry (Mosc)*. 1998. 63(11). 1266-1270. (In Russian)
59. Roayaei M, Galehdari H. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2008. 1(1). 1-5.
60. Sadeghi HMM, Rabbani MJ, Moazen F. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* strain YT-1. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2007. 1(1). 49-52.
61. Saghatelian A, Panosyan H, Trchounian A et al. Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *Microbiologyopen*. 2021. 10(1). e1149. doi: 10.1002/mbo3.1149
62. Sagner G, Rüger R, Kessler C. Rapid filter assay for the detection of DNA polymerase activity: direct identification of the gene for the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *Gene*. 1991. 97(1). 119-123. doi: 10.1016/0378-1119(91)90018-7
63. 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
64. Samman N, Al-Muhalhil K, Nehdi A. A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography. *Journal of King Saud University - Science*. 2023. 35. 102565. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102565
65. Sano S, Yamada Y, Shinkawa T et al. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. *J Biosci Bioeng*. 2012. 113(3). 315-321. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.001
66. Sellmann E, Schröder KL, Knoblich IM et al. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species. *J Bacteriol*. 1992. 174(13). 4350-4355. doi: 10.1128/jb.174.13.4350-4355.1992
67. Shima Y, Hasegawa A, Arakawa T et al. Construction and characterization of N-terminally truncated DNA polymerase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996. 81(6). 504-510. doi: 10.1016/0922-338X(96)81470-X
68. Simpson HD, Coolbear T, Daniel RM. Purification of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Ann N Y Acad Sci*. 1990. 613. 426-428. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18192.x
69. Simpson HD, Coolbear T, Vermue M et al. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Biochem Cell Biol*. 1990a. 68(11). 1292-1296. doi: 10.1139/o90-192
70. Slater MR, Hartnett JR, Bolchakova E et al. Thermophilic DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana*. US Patent #6,077,664. Dated Jun. 20, 2000
71. Smirnov IuV, Chakhmakhcheva OG, Efimov VA. Recombinant *Thermus thermophilus* His6-DNA polymerase with reverse transcriptase activity. *Bioorg Khim*. 1997. 23(4). 257-261. (In Russian)
72. Smirnov IuV, Fradkov AF, Chakhmakhcheva OG et al. Synthesis of a highly active recombinant

- Thermus aquaticus* His6-DNA-polymerase in *Escherichia coli* cells and a rapid method of purifying it. *Bioorg Khim.* 1995. 21(5). 396-398. (In Russian).
73. Teng XC, Ang SY, Citartan M et al. Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology.* 2023. 31(1). 45-52. 10.35118/apjmbb.2023.031.1.05
74. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 1988. 27(16). 6008-6013. doi: 10.1021/bi00416a027
75. Vainshtein I, Atrazhev A, Eom SH et al. Peptide rescue of an N-terminal truncation of the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase. *Protein Sci.* 1996. 5(9). 1785-1792. doi: 10.1002/pro.5560050904
76. Villbrandt B, Sagner G, Schomburg D. Investigations on the thermostability and function of truncated *Thermus aquaticus* DNA polymerase fragments. *Protein Eng.* 1997. 10(11). 1281-1288. doi: 10.1093/protein/10.11.1281
77. Yang Z, Ding Y, Zhang Y et al. Rapid purification of truncated Taq DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures. *Biotechnol Appl Biochem.* 2008. 50(2). 71-75. doi: 10.1042/BA20070114
78. Yasukawa K, Konishi A, Shinomura M et al. Kinetic analysis of reverse transcriptase activity of bacterial family A DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. 427(3). 654-658. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.116
79. Zhou H, Zhang Y, Hu Z et al. High-Efficiency Separation and Purification of Taq DNA Polymerase. 2018. In: Liu H, Song C, Ram A. (eds) *Advances in Applied Biotechnology. ICAB 2016. Lecture Notes in Electrical Engineering, Vol 444.* Springer, Singapore. 663-672. doi: 10.1007/978-981-10-4801-2_68