



## Выделение, клонирование и секвенирование генов термостабильных ДНК-полимераз. II. Археи

<sup>1</sup>Д.А. Чемерис\*, <sup>2</sup>В.В. Зубов, <sup>1,3</sup>Я.И. Алексеев

<sup>1</sup>ООО «Синтол», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, д.3

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

\*E-mail: [dch@dch.ru.net](mailto:dch@dch.ru.net)

### Резюме

Вслед за термостабильными ДНК-полимеразами из термофильных зубактерий для проведения ПЦР было обращено внимание на микроорганизмы из другого домена Жизни – на термофильные и гипертермофильные археи, многие из которых способны расти при температурах около 100 °С и выше. С 1991 г. по настоящее время клонировано и секвенировано более трех десятков генов термостабильных ДНК-полимераз термофильных и гипертермофильных архей, представляющих 14 родов и около 30 видов. Наиболее широко представлены ДНК-полимеразы из рода *Thermococcus*. При этом наиболее часто используемой является *Pfu*-полимераза из гипертермофильной археи *Pyrococcus furiosus*. Подавляющее большинство этих ферментов относится к В-семейству ДНК-полимераз и кроме нуклеотидилтрансферазной (полимеразной) активности они имеют еще и редактирующую 3'→5'-экзонуклеазную активность, обеспечивающую увеличенную точность копирования в ПЦР. Большинство этих архейных ДНК-полимераз характеризуются продолжительным временем полужизни при 95 °С и даже при 100 °С, измеряемым для некоторых многими часами. Архейные ДНК-полимеразы нашли применение при амплификации трудных матриц, в том числе протяженных матриц с высоким GC-составом, где себя хорошо проявили смеси таких ферментов с *Taq*-полимеразой.

**Ключевые слова:** археи, гипертермофильные археи, термостабильная ДНК-полимераза, 3'→5'-экзонуклеазная редактирующая активность, ДНК, ПЦР

**Цитирование:** Чемерис Д.А., Зубов В.В., Алексеев Я.И. Выделение, клонирование и секвенирование генов термостабильных ДНК-полимераз. II. Археи. *Biomics*. 2026. 18(2). 151-167. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-12

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

## The isolation, cloning and gene sequencing of thermostable DNA polymerases. II. Archaea

<sup>1</sup>D.A. Chemeris\*, <sup>2</sup>V.V. Zubov, <sup>1,3</sup>Ya.I. Alekseev

<sup>1</sup>Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya str. 127434, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS

<sup>3</sup>Institutskaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,  
198095, St. Petersburg, Russian Federation

E-mail: [dch@dch.ru.net](mailto:dch@dch.ru.net)

### Resume

Following the thermostable DNA polymerases from thermophilic eubacteria, attention was paid to microorganisms from another domain of Life, thermophilic and hyperthermophilic archaea, many of which are capable of growing at temperatures around 100 °C and above. Since 1991, more than three dozen genes of thermostable DNA polymerases of thermophilic and hyperthermophilic archaea representing 14 genera and about 30 species have been cloned and sequenced. DNA polymerases from the genus *Thermococcus* are the most widely represented. *Pfu* polymerase from the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* is the most commonly used. The vast majority of these enzymes belong to the B-family of DNA polymerases, and in addition to nucleotidyltransferase (polymerase) activity, they also have editing 3'→5'-exonuclease activity, which provides increased copy accuracy in PCR. Most of these archaeal DNA polymerases are characterized by a long half-life at 95 °C and even at 100 °C, measured for some by many hours. Archaeal DNA polymerases have found application in the amplification of difficult matrices, including those with long and high GC compositions, where mixtures of such enzymes with Taq polymerase have performed well.

**Keywords:** archaea, hyperthermophilic archaea, DNA polymerase, thermostable DNA polymerase, 3'→5'-exonuclease editing activity, DNA, PCR

**Citation:** Chemeris D.A., Zubov V.V., Alekseev Ya.I. The isolation, cloning and sequencing of thermostable DNA polymerases. II. *Archea. Biomics*. 2026. 18(1). 151-167. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-12 (In Russian)

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

### Введение

Помимо эубактерий, для поиска и выделения термостабильных ДНК-полимераз в связи с расширением использования ПЦР и ростом требований к этой реакции, в том числе для амплификации так называемых трудных матриц с высоким GC-составом было обращено внимание и на археи, среди которых много различных экстремофилов. Так, есть виды архей, живущих благодаря увеличенному гидростатическому давлению на больших глубинах в морях и океанах при 100 °C и выше [Segerer et al., 1993]. Архея *Pyrolobus fumarii*, например, имеет оптимум роста при 106 °C с верхним пределом в 113 °C, выдерживая даже часовое автоклавирование при 121 °C, но при этом не растущая ниже 90 °C [Stetter, 2006]. Потенциально такие гипертермофильные археи могли бы быть носителями пригодных для высокоэффективной ПЦР термостабильных ДНК-полимераз и такие действительно у них найдены.

Термофильные и гипертермофильные археи характеризуются большим разнообразием ДНК-полимераз, относящихся к нескольким семействам этих ферментов [Sarmiento et al., 2014], и некоторые из них (в первую очередь из В-семейства полимераз) применяются в ПЦР весьма широко [Тегре, 2013]. Следует заметить, что архейные ДНК-полимеразы имеют довольно низкую гомологию с подобными ферментами эубактерий из А-семейства полимераз, сохраняя в целом общую топологию их доменной организации, при этом оказываясь даже ближе к отдельным эукариотическим ДНК-полимеразам, что свидетельствует об их некоторой общности с этими

организмами. Вопросам эволюции и предковым формам современных ДНК-полимераз уделено немало внимания [Makarova et al., 2014; Koonin et al., 2020] и в данном обзоре на этом останавливаться не будем.

В настоящем обзоре было принято решение для отражения полноты исследований в этой области довольно кратко коснуться как нашедших, так и не нашедших применение в ПЦР подобных ферментов, выделенных из термофильных архей. Но данная статья ни в коей мере не может претендовать на исчерпывающую полноту ввиду большого количества информации по этой теме. К тому же мутантным формам архейных ДНК-полимераз и их химерным вариантам с другими белками и ферментами будет посвящена отдельная статья и здесь затронуты только случаи с оптимизацией кодонов для экспрессии архейных генов в *E. coli*, не изменяющие аминокислотные последовательности этих ферментов. Другая статья требуется и для описания свойств архейных ДНК-полимераз в виде их процессивности, точности копирования и некоторых других характеристик, поэтому здесь этих моментов коснемся очень коротко. Основной акцент сделан на клонировании и секвенировании генов, кодирующих ДНК-полимераз, выделении и очистке этих ферментов, а также сопутствующей информации, которая по возможности преподносится в хронологическом порядке. В том числе с учетом родства этих микроорганизмов. При этом используются обозначения ДНК-полимераз, которые им давали авторы оригинальных статей, или эти ферменты будут называться по первым буквам

латинских родовых и видовых названий микроорганизмов – их хозяев, и приводиться курсивом. В некоторых случаях будут указываться страны, в которых те или иные исследования выполнялись, с целью показать широкую географию интереса к термостабильным ДНК-полимеразам архей.

#### ДНК-полимеразы архей родов *Sulfolobus* и *Thermoplasma*

В нашей предыдущей статье [Зубов, Алексеев (Zubov, Alekseev), 2026] уже упоминались ранние работы по ДНК-полимеразам из *Sulfolobus acidocaldarius* [Klimczak et al., 1985] и *S. solfataricus* [Rossi et al., 1986]. После разработки метода ПЦР с термостабильным ферментом (*Taq*-полимеразой) на эти микроорганизмы как потенциальный источник подходящих ДНК-полимераз было вновь обращено внимание. Так, французскими авторами в 1988 – 1990 гг. была опубликована серия статей [Elie et al., 1988; 1989; Forterre et al., 1989; Salhi et al., 1990], в которых они сообщали о выделении ДНК-полимеразы *S. acidocaldarius* и показали способность данного фермента амплифицировать ДНК длиной 127 и 211 п.н. Ими отмечалось, что очищенный в 5500 раз фермент при 100 °С обеспечивал построение цепи ДНК длиной 200 п.н. В одной из этих работ [Salhi et al., 1990] при помощи Р.С.Р.<sup>1</sup> проведен сайт направленный мутагенез гена аспартатпротеазы, что привело к замене А на С, вызвав тем самым на белковом уровне замену аспарагина на аланин. В те же годы этими авторами выделена ДНК-полимераза из другой термофильной археи - *Thermoplasma acidophilum* [Forterre et al., 1989; Hamal et al., 1990]. Было обнаружено, что очищенный в 2692 раза фермент имеет оптимум ферментативного действия при 65 °С и несет 3'→5'-экзонуклеазную редактирующую активность.

Отечественными авторами с участием немецких коллег [Datukishvili et al., 1996] клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из *S. acidocaldarius*, также относящейся к В-семейству полимераз. Этот ген кодировал фермент размером 875 аминокислотных остатков с вычисленной молекулярной массой около 100 кДа, что совпало с ранее определенными для этого фермента экспериментальным путем значениями [Klimczak et al., 1985; Прангшвили (Prangishvili), 1986]. Ранее клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы *S. solfataricus*, кодирующий белок с молекулярной массой 74 кДа [Prangishvili, Klenk, 1993].

Многолетние исследования ДНК-полимеразы *S. solfataricus*, начатые итальянскими авторами еще в

середине 1980-х гг., были ими продолжены. Так, в 1992 г. в фаговом векторе λEMBL3 клонирован ген ДНК-полимеразы из *S. solfataricus* и в результате проведенного секвенирования и анализа нуклеотидной последовательности оказалось, что он принадлежит к В-семейству полимераз и кодирует фермент размером 882 аминокислотных остатка с молекулярной массой около 100 кДа, по-видимому обладая также 3'→5'-экзонуклеазной активностью, что следовало из гомологии аминокислотных последовательностей с прочими подобными ДНК-полимеразами [Pisani et al., 1992] и затем получило экспериментальное подтверждение [Pisani, Rossi, 1994; Pisani et al., 1996]. В 1998 г. этими авторами сообщено о кристаллизации очищенного белка ДНК-полимеразы *S. solfataricus* для проведения рентгеноструктурного анализа [Nastopoulos et al., 1998]. Позже было подтверждено, что данная ДНК-полимераза имеет на N-конце типичную редактирующую 3'→5'-экзонуклеазную активность, а на С-конце находится полимеразный домен, характеризующийся необычным наличием двух дополнительных альфа-спиралей, взаимодействующих с аналогичными спиралью субдомена Finger, увеличивая его размер [Savino et al., 2004].

Обнаружено, что *S. islandicus* кодирует четыре ДНК-полимеразы, три из которых (Dpo1, Dpo2 и Dpo3) относятся к В-семейству, тогда как четвертая (Dpo4) - к Y-семейству полимераз [Feng et al., 2020]. Делеционными исследованиями определено, что основной ДНК-полимеразой для этого вида архей является Dpo1, а остальные вспомогательными. Предполагалось также, что ген Dpo2 может кодировать инактивированный фермент, на что ранее с помощью *in silico* анализа обратили внимание другие авторы [Rogozin et al., 2008].

#### ДНК-полимеразы архей рода *Pyrococcus*

Вероятно, вторым по популярности и масштабу использования применяемым ферментом в ПЦР после *Taq*-полимеразы является (или, по крайней мере, долгое время была) относящаяся к В-семейству полимераз *Pfu*-полимераза из археи *Pyrococcus furiosus*, которая впервые выделена в 1991 г. Показано, что этот фермент обладает сильной 5'→3'-экзонуклеазной редактирующей активностью, что обеспечивает намного более точное воспроизведение амплифицируемой ДНК при копировании [Lundberg et al., 1991]. Авторами разработан специальный тест для анализа возникающих мутаций, и было обнаружено, что *Pfu*-полимераза при амплификации фрагмента ДНК длиной 1 т.п.н. в течение 20 циклов ПЦР допускает всего 3,2% ошибок, тогда как в этих же условиях *Taq*-полимераза совершает их 40%. В том же году эти авторы в другой статье привели пару участков выведенной аминокислотной

<sup>1</sup> довольно редкая аббревиатура полимеразной цепной реакции

последовательности *Pfu*-полимеразы, показав консервативные места при сравнении с рядом других ДНК-полимераз [Mathur et al., 1991]. Некоторое уточнение данных той публикации по родству ДНК-полимераз из разных ветвей Жизни было сделано год спустя [Forterre, 1992].

В 1993 г. японские авторы сообщили о клонировании и секвенировании гена *Pfu*-полимеразы, установив, что данный ген кодирует фермент размером 775 аминокислотных остатков с молекулярной массой 90,109 кДа [Uemori et al., 1993]. При этом ген *Pfu*-полимеразы не кодирует интены, в отличие от секвенированного ранее гена другой ДНК-полимеразы из архей *Thermococcus litoralis* [Perler et al., 1992], о которой речь пойдет дальше. В 1995 г. этой же группой японских авторов у архей *P. furiosus* обнаружена другая ДНК-полимераза с молекулярным весом около 130000 кДа, характеризующаяся в системе *in vitro* меньшей процессивностью, при этом неся и 5'→3'-, и 3'→5'-экзонуклеазные активности [Imamura et al., 1995]. Продолжая изучать ДНК-полимеразы этой архей, они клонировали два гена, расположенные в геноме tandemно и кодирующие белки DP1 и DP2 с полимеразной активностью. После секвенирования этих генов выяснилось, что они кодируют ферменты размером 614 и 1263 аминокислотных остатка соответственно [Uemori et al., 1997; Ishino, Ishino, 2001]. При этом нуклеотидилтрансферазная активность проявлялась только когда эти белки работали вместе. Редактирующая экзонуклеазная активность, присущая этим ДНК-полимеразам, наблюдалась только когда они находились в комплексе. Сравнение нуклеотидных последовательностей этих ДНК-полимераз показало отсутствие какой-либо существенной гомологии с аналогичными ферментами. В другой своей работе, проведя анализ большого числа различных ДНК-полимераз из суперсемейства этих ферментов, было показано, что DP1 и DP2 обнаруживают некоторую гомологию с эукариотической ДНК-полимеразой  $\delta$ . Это подтверждает взаимосвязь архей с эукариотами [Cann et al., 1998]. Для рентгеноструктурного анализа был клонирован ген *Pfu*-полимеразы в векторе рЕТ6б с гистидиновым линкером на N-конце для упрощенной очистки данного фермента, что позволило вырастить палочковидные кристаллы этого белка [Goldman et al., 1998]. Подобные эксперименты по кристаллизации *Pfu*-полимеразы были повторены через несколько лет [Nishida et al., 2007; Kim et al., 2008]. Отдельное исследование свойств *Pfu*-полимеразы проведено японскими авторами в 2006 г. [Ishino, Ishino, 2006].

Довольно много публикаций посвящено способам выделения и очистки рекомбинантной *Pfu*-полимеразы, экспрессируемой в *E. coli* после

клонирования и в большей части случаев содержащей гистидиновый линкер для фракционирования на никелевой колонке [Lu, Erikson, 1997; Li et al., 1998; Sun, Cai, 2006; Hu et al., 2015; Zheng et al., 2016; Sankar et al., 2019; Ceylan, 2023; Hadi et al., 2023]. Польскими авторами клонированы гены не только *Pfu*-полимеразы, но и *Pwo*-полимеразы из *P. woesei*, помещенные в экспрессионный вектор с гистидиновой меткой [Dabrowski, Kur, 1998]. О выделении *Pwo*-полимеразы с гистидиновой меткой много позже сообщили иранские авторы [Ghasemi et al., 2011]. Корейские авторы попытались выделять *Pfu*-полимеразу (также с гистидиновым линкером) из периплазмы *E. coli* [Chae et al., 2002].

Иную аффинную хроматографию, основанную на иммобилизации лиганда из комбинаторной библиотеки, содержащей 26 дНТФ-миметических синтетических молекул на триазинном каркасе, для выделения и очистки в одну стадию *Pfu*-полимеразы использовали авторы из Греции [Melissis et al., 2006]. С целью увеличить выход фермента ген *Pfu*-полимеразы синтезирован заново с применением оптимизированных для *E. coli* кодонов [Nuryana et al., 2023]. Недавно сообщено о 30-кратном увеличении выхода *Pfu*-полимеразы после индуцированной экспрессии в *E. coli*, причем очистка завершалась за 20 мин путем лизиса бактериальных клеток кипячением [Khaerunnisa et al., 2025]. В одной из ранних работ экспрессия *Pfu*-полимеразы с высоким выходом осуществлялась в культуре клеток насекомых с использованием бакуловирусной системы [Mroczkowski et al., 1994].

Особняком стоит работа, в которой было предложено для проведения ПЦР диагностики, в том числе в полевых условиях, использовать лиофилизированный осветленный лизат двойной культуры *E. coli*, несущей плазмиды с комплементирующими ориджинами репликации и разной антибиотикоустойчивостью. В одной плазмиде находился ген дезоксинуклеотидкиназы, обеспечивающий появление в растворе дНТФ, а в другой - ген *Pfu*-полимеразы [Loan et al., 2019]. Показано, что из одного литра культуральной среды можно получить  $10^6$  высушенных аликвот, пригодных для проведения ПЦР без добавления извне дНТФ и ДНК-полимеразы.

Помимо ДНК-полимераз из *P. furiosus*, относящиеся к разным семействам этих ферментов ДНК-полимеразы находили, выделяли, а также клонировали и секвенировали их гены и из других видов микроорганизмов этого рода. Выше уже упоминалась *Pwo*-полимераза из *P. woesei*, поставлявшаяся немецкой фирмой Boehringer Mannheim. Исследовались ДНК-полимеразы и из других пироккокков. Так, после полногеномного секвенирования растущей при 100 °С

гипертермофильной археи *P. abyssi* в её геноме обнаружены два гена ДНК-полимераз из В-семейства (Pol I) и D-семейства (Pol II) этих ферментов [Guequen et al., 2001]. Ген Pol I кодирует белок размером в 771 аминокислотный остаток, тогда как Pol II представлена двумя субъединицами размерами 619 и 1270 аминокислотных остатков. В своей следующей работе [Dietrich et al., 2002] эти авторы продемонстрировали пригодность рекомбинантной *Pab*-полимеразы для проведения ПЦР, в ходе которой амплифицировался фрагмент ДНК размером 420 п.н. Данный фермент при сравнении со многими другими показал хорошие результаты. В той же статье сообщалось, что *Pab*-полимераза под торговой маркой Isis DNA Polymerase™ поставляется фирмой Qbiogene Molecular Biology.

В 1997 г. охарактеризована ДНК-полимераза из штамма KOD1 археи, определенной как *Pyrococcus sp.* [Takagi et al., 1997]. Спустя пару лет эти авторы уточнили данный вид как *P. kodakaraensis* [Hashimoto et al., 1999], но позже этот вид отнесли к роду *Thermococcus*. Поэтому ему будет уделено внимание в следующем разделе.

#### ДНК-полимеразы архей рода *Thermococcus*

Если у архей рода *Pyrococcus* ДНК-полимеразы выделены из небольшого числа видов, то из рода *Thermococcus* таковые изучены у полутора десятка видов. И еще у ряда штаммов, неохарактеризованных до вида. Так, практически одновременно с *Pfu*-полимеразой, из гипертермофильной археи *Thermococcus litoralis*, растущей при 98 °С, финскими авторами выделена и изучена *Tli*-полимераза (*Vent*<sup>TM</sup><sub>N</sub> DNA polymerase), также относящаяся к В-семейству этих ферментов [Mattila et al., 1991]. Показано, что благодаря редактирующей 5'→3'-экзонуклеазной активности этот фермент в условиях *in vitro* делает около  $30 \times 10^{-6}$  ошибок при копировании, что в 5 – 10 раз ниже, чем у ДНК-полимераз, лишенных данной активности. В рамках этой работы клонированы ген *Vent*<sup>TM</sup><sub>R</sub>-полимеразы и его укороченный вариант без экзонуклеазной активности *Vent*<sup>TM</sup><sub>REXo</sub>. Была отмечена их пригодность для ПЦР как альтернатива *Taq*-полимеразе, тем более что данный фермент имел время полужизни при 100 °С около 2 часов. В работе авторов из США также был клонирован ген *Vent*-полимеразы из *T. litoralis*. При этом обнаружено, что кодируемый этим геном белок содержит два прерывающих белковую последовательность интеина [Hodges et al., 1992; Perler et al., 1992]. Этими авторами было показано, что данный фермент высокотермостабилен и имеет время полужизни при 95 °С около 8 час, а при 100 °С – 2 час [Kong et al., 1993].

Отечественными авторами проверено наличие подходящих термостабильных ДНК-

полимераз у выделенных из разных географических мест 30 штаммов семи видов гипертермофильных архей родов *Thermococcus*, *Desulforococcus*, *Thermoproteus*, *Acidilobus*. Тестирование проводилось по включению радиоактивной метки в ДНК трансляцией [Слободкина и др. (Slobodkina et al.), 2005]. Из штамма Sh1AM *Thermococcus litoralis* выделена и охарактеризована *Tli*-полимераза, имеющая редактирующую экзонуклеазную активность и сохраняющая 50% ферментативной активности после инкубации при 95 °С в течение 120 мин. При этом отмечено, что выделенная ими *Tli*-полимераза уступает по данному показателю KOD1-полимеразе из *Thermococcus/Pyrococcus kodakaraensis*, превосходящей, впрочем, все другие подобные ферменты [Hashimoto et al., 2001].

Выше уже отмечалось, что в 1997 г. клонирована и секвенирована KOD-полимераза из археи *Pyrococcus (Thermococcus)* [Takagi et al., 1997]. Обнаружено, что последовательность фермента прерывается двумя интеинами, как и у *T. litoralis* [Hodges et al., 1992; Perler et al., 1992]. KOD-полимераза имела редактирующую 5'→3'-экзонуклеазную активность и совершала сопоставимое с *Pfu*-полимеразой число ошибок при копировании, но характеризовалась более высокой (в пять раз выше) скоростью полимеризации (100–130 нуклеотидов в сек) и увеличенной в 10–15 раз процессивностью (свыше 300 нуклеотидов), что обеспечивало более короткое время амплификации при проведении ПЦР. Спустя несколько лет данный вид археи был определен как *P. kodakaraensis* при создании кристаллов для X-ray анализа и его проведения с разрешением 3Å, показавшего ряд отличий в Thumb- и Finger-субдоменах по сравнению с другими архейными ДНК-полимеразы [Hashimoto et al., 1999; 2001]. В своей следующей статье эти же авторы [Kuroita et al., 2005] уже позиционировали данную архею как *Thermococcus kodakaraensis*, но поскольку в той работе речь шла о мутантных формах фермента, то здесь полученных ими сведений касаться не будем.

Предложена наработка рекомбинантной *Tkod*-полимеразы с помощью бакуловирусной экспрессии в личинках шелкопряда [Yamashita et al., 2017]. Для этого созданы конструкции, содержащие на N- или C-концах гистидиновые линкеры - rKOD-N и rKOD-C соответственно, и для первой выход фермента составил 1.1 мг/личинку, а для второй – 0.25 мг. При этом rKOD-C сохраняла около 70% своей первоначальной активности после 8 час инкубации при 95 °С, что даже выше показателей для этого фермента, экспрессируемого в *E. coli*.

Как уже говорилось, из архей рода *Thermococcus*, помимо описанных выше, выделено

немало и других ДНК-полимераз, в том числе реализуемых коммерчески. Так, в 1996 г. было сообщено о клонировании и секвенировании гена термостабильной ДНК-полимеразы из штамма *Thermococcus sp.* 9°N-7, характеризующегося 3'→5'-экзонуклеазной активностью и проявляемой в зависимости от температуры цепь-вытесняющей активностью [Southworth et al., 1996]. При этом ген данной ДНК-полимеразы не кодировал интеинов. В кратком сообщении, посвященном кристаллизации этого фермента (поставляемого фирмой New England Biolabs, Inc.) и предварительному рентгеноструктурному анализу с разрешением 2.2Å упомянуто, что он имеет время полужизни 6,7 час при температуре 368 градусов Кельвина (95 °C) [Zhou et al., 1998]. Позже [Rodriguez et al., 2000] дан подробный анализ трехмерной структуры 9°N-7 полимеразы, в том числе при сравнении с другими ставшими известными к тому моменту ДНК-полимеразами, включая *Tgo*-полимеразу из *T. gorgonarius* [Horfner et al., 1999]. В целом они имели типичную организацию. В первую очередь - для полимеразного домена. Что касается *Tgo*-полимеразы, то ген этого фермента был клонирован и секвенирован. Оказалось, что он кодирует белок размером 773 аминокислотных остатка, включающих 3'→5'-экзонуклеазный домен.

Немецкими авторами клонирована и охарактеризована ДНК-полимераза из штамма TУ *Thermococcus sp.* [Niehaus et al., 1997]. После секвенирования выяснилось, что белковая последовательность этой полимеразы прерывается тремя интеинами. Для экспрессии в *E. coli* создана конструкция без интеинов размером 2322 п.н. Также без интеинов французскими авторами [Cambon-Vonavita et al., 2000] сконструирован из трех экстензинов ген *Tfu*-полимеразы из архей *T. fumicollans*, растущей в Природе при 90 °C. *Tfu*-полимераза сохраняла 50% своей активности после выдерживания при 92 °C в течение 7 ч, при 95 °C – 3,3 ч, а при 100 °C – 2 ч. Очищенный из *E. coli* данный фермент позволил амплифицировать фрагмент ДНК размером 10 т.п.н., что привело к тому, что *Tfu*-полимераза была представлена на рынке фирмой Appligene-Онсог. В том же году другими французскими авторами была опубликована статья, в которой они сообщили о выделении *Tfu*-полимеразы из самого термококка [Raffin et al., 2000].

В 2007 г. также с удалением интеинов были сконструированы (из трех экстензинов каждый) два гена ДНК-полимераз из архей *T. zilligii* и *Thermococcus* штамма 'GT' [Griffiths et al., 2007]. Как *Tzi*-полимераза, так и 'GT'-полимераза имели 3'→5'-экзонуклеазный домен и обеспечивали при проведении ПЦР высокую точность копирования, сопоставимую с *Pfu*-полимеразой. Авторы провели

анализ последовательностей 16 ДНК-полимераз из архей *Thermococcales* на предмет наличия в них интеинов, из которого видно, что только пять из них не имеют интеинов, у большинства – по два интеина, два вида имеют по одному интеину, а у одного представителя этой группы – три интеина.

В том же году клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из *Thermococcus* штамма 'NA1' [Kim et al., 2007]. Он не был упомянут в их предыдущей работе [Griffiths et al., 2007], но также содержал один интеин. TNA1\_pol высокотермостабильна. Выдерживает 3,5 час при 100 °C и 12,5 час при 95 °C. Процессивность фермента составила около 150 нуклеотидов при скорости элонгации 60 нуклеотидов в сек, совершая при полимеризации одну ошибку на 4,45 т.п.н.

В ДНК-полимеразе из архей *T. thio还原ens*<sup>2</sup> один интеин длиной 537 аминокислотных остатка разделял N- и C-концевые части размерами 491 и 283 аминокислоты соответственно [Marsic et al., 2008]. Очищенная из *E. coli* *Thi*-полимераза, несмотря на наличие редактирующей экзонуклеазной активности, характеризовалась лишь ненамного более точным копированием, чем лишенная этой активности *Taq*-полимераза. Время полужизни фермента при 95 °C составило чуть более двух часов, но скорость элонгации была достаточно высокой – 97 нуклеотидов за сек.

В 2009 г. авторами из Южной Кореи был клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из гипертермофильной архей *T. marinus* [Bae et al., 2009]. Как и у ДНК-полимеразы *T. thio还原ens* в нем имелся один интеин длиной также 537 аминокислотных остатков, разделяющий N- и C-концевые части белка размерами 491 и 284 аминокислотных остатка соответственно. Сопоставление аминокислотных последовательностей зрелых белков (без интеинов) *Tma*-полимеразы с родственными видами показал высокий уровень гомологии по идентичным аминокислотам для большинства представителей рода *Thermococcus*, оказавшийся немногим выше 90% (в том числе 95,4% для *Thermococcus* 9°N-7), тогда как с представителями рода *Pyrococcus* подобная гомология составила около 80%. При этом наименьшие совпадения, как ни странно, обнаружались с *T. litoralis* (78%) и *T. aggregans* (77%). Время полужизни *Tma*-полимеразы составило 2 час при 94 °C и 45 мин при 95 °C. Благодаря наличию редактирующей экзонуклеазной активности *Tma*-полимераза имела сходную с *Pfu*-полимеразой точность копирования. Показано, что благодаря высокой скорости полимеризации *Tma*-полимераза способна амплифицировать фрагмент ДНК размером 2 т.п.н. за 5 с, тогда как *Pfu*-полимеразе и *Taq*-

<sup>2</sup> также не упомянутый в статье [Kim et al., 2007]

полимеразе в их экспериментах потребовалось на это по 40 сек. Однако нужно иметь в виду, что 5 сек и 40 сек составляют время элонгации, совмещенной в той работе с отжигом при 72 °С, но ферменты продолжали работать некоторое время при переходе ПЦР от этой стадии к стадии денатурации (94 °С), происходивший в используемом ими ДНК-термоциклере модели Palm-Cycler фирмы Corbett Life Science со скоростью 2 °С/сек. Тем не менее, нельзя не отметить, что *Tma*-полимераза работала гораздо быстрее своих «собратей».

В следующем году теми же авторами описано клонирование и секвенирование гена ДНК-полимеразы размером 774 аминокислотных остатка из гипертермофила *T. peptonophilus* [Lee et al., 2010a]. *Tpe*-полимераза имела небольшое время полужизни при 90 °С, составившее всего около 4 час. За счет наличия 3'→5'-экзонуклеазной активности ошибки репликации сопоставимы с таковыми для *Pfu*-полимеразы. Этими же авторами клонирован и экспрессирован в *E. coli* ген ДНК-полимеразы из археи *T. pacificus* [Lee et al., 2010]. *Tpa*-полимераза имела размер 774 аминокислотных остатка и несла 3'→5'-экзонуклеазный домен, несмотря на наличие которого она по скорости амплификации в ПЦР опережала *Taq*-полимеразу. Время полужизни *Tpa*-полимеразы составило 3 час при 99 °С.

В последующие годы эти авторы продолжили исследования термостабильных архейных ДНК-полимераз. Так, ими клонирован и секвенирован ген *Tce*-полимеразы из археи *T. celer*, кодирующий фермент размером 774 аминокислотных остатка и несущий 3'→5'-экзонуклеазный домен [Kim et al., 2011]. *Tce*-полимераза оказалась не очень термостабильной. Она имела время полужизни при 90 °С всего 1,8 час, тем не менее использовалась авторами при проведении ПЦР в ходе той работы. В 2012 г. ими же клонирован прерывающийся двумя интеинами ген высокоточной ДНК-полимеразы из археи *T. waiotapuensis* [Cho et al., 2012]. *Twa*-полимераза (без интеинов) имела размер 773 аминокислотных остатка и характеризовалась сильной редактирующей 3'→5'-экзонуклеазной активностью, обеспечивая даже более точное копирование, нежели *Pfu*-полимераза. При этом время полужизни *Twa*-полимеразы при 99 °С составляло около 4 час. Позже этими авторами клонирован из гипертермофильной археи *T. barophilus* прерываемый двумя интеинами ген ДНК-полимеразы, относящейся к В-семейству [Kwon et al., 2016]. *Tba5*-полимераза дикого типа обладает 3'→5'-экзонуклеазной активностью и имеет (без интеинов) размер 776 аминокислотных остатков. После выделения *Tba5*-полимеразы из *E. coli* фермент использовался в ПЦР, в том числе для амплификации протяженных матриц.

В 2020 г. из радиоустойчивой гипертермофильной археи *T. gammatolerans* клонирован ген ДНК-полимеразы из В-семейства этих ферментов [Zhang et al., 2020]. *Tga*-полимераза после прогрева при 95 °С сохраняла 93% своей активности в течение одного часа. Помимо полимеразной активности *Tga*-полимераза имела и 3'→5'-экзонуклеазную активность. Для облегчения очистки фермента после его экспрессии в *E. coli* проводилась аффинная хроматография, поскольку при клонировании использовался вектор с гистидиновым линкером. Авторы показали пригодность очищенной таким образом *Tga*-полимеразы для ПЦР.

Отечественными авторами клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из гипертермофильной археи *T. stetteri*, кодирующий белок размером 775 аминокислотных остатков, несущий экзонуклеазную редактирующую активность [Kuznetsova et al., 2024]. При сравнении аминокислотной последовательности *Tst*-полимеразы с родственными ферментами обнаружено почти 94% сходство с KOD1-полимеразой, немногим выше 92% и 88% с *Tgo*- и *Tfu*-полимеразами соответственно, и менее 80% с *Pfu*- и *Tli*-полимеразами. Для выделения и очистки *Tst*-полимеразы аффинной хроматографией использовали гистидиновый линкер и сайт расщепления тромбина на N-конце фермента. Время полужизни очищенного фермента в виде дикой формы *Tst*-полимеразы составило 9,1 час при 95 °С. С помощью *Tst*-полимеразы за короткое время успешно амплифицировался в ПЦР фрагмент ДНК размером 2 т.п.н. Помимо *Tst*-полимеразы дикого типа в данной работе созданы мутантная, а также химерная формы этого фермента, обладающие улучшенными характеристиками, но им будет уделено внимание в другой статье.

В литературе имеются сообщения и о других термостабильных ДНК-полимеразах из рода *Thermococcus*. Например, из *T. aggregans* [Böhlke et al., 2000], но этот фермент был подвергнут мутационным изменениям и будет рассмотрен в соответствующей статье.

#### ДНК-полимеразы из других родов архей

В 1994 г. клонирован и секвенирован ген *Mvo*-полимеразы из археи *Methanococcus voltae*, кодирующий белок размером 823 аминокислотных остатка [Konisky et al., 1994]. В следующем году одной из групп японских авторов из гипертермофильной археи *Pyrodicticum occultum* клонированы и секвенированы два гена термостабильных ДНК-полимераз [Uemori et al., 1995]. Один из них кодировал фермент размером 877 аминокислотных остатков, а другой – 803. При этом обе эти *Poc*-полимеразы имели как репарационную, так и редактирующую экзонуклеазные активности,

проявляя заметную гомологию с эукариотической ДНК-полимеразой дрожжей.

При анализе секвенированного генома термофильной архей *Methanococcus jannaschii* в нем обнаружен только один ген ДНК-полимеразы, имеющей редактирующую экзонуклеазную активность [Ishino et al., 1998]. Данный фермент схож с ДНК-полимеразами DP1 и DP2 *Pyrococcus furiosus* [Cann et al., 1998], свидетельствуя о наличии ещё одного D-семейства ДНК-полимераз у архей.

В 1999 г. с разрешением в 2.4 Å изучена структура ДНК-полимеразы термофильной архей штамма Tok *Desulfurococcus* (D. Tok Pol), имеющей размер 773 аминокислотных остатка. Она обладала 3'→5'-эксонуклеазным доменом и не теряла полимеризующую активность после инкубации в течение часа при 95 °C [Zhao et al., 1999].

В 2000 г. из гипертермофильной архей *Pyrobaculum islandicum* клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы, кодирующий *Pis*-полимеразу с 3'→5'-эксонуклеазным доменом [Kähler, Antranikian, 2000]. Рекомбинантный фермент, выделенный из *E. coli*, имел время полужизни более 5 час при температуре 90 °C и 35 мин при 100 °C. При помощи ПЦР с этим ферментом удалось амплифицировать фрагмент ДНК размером до 1500 п.н. Другими авторами из родственной архей *P. calidifontis* клонирован и секвенирован ген *Pca*-полимеразы размером 783 аминокислотных остатка, несущий 3'→5'-эксонуклеазный домен [Guo et al., 2017]. Время полужизни *Pca*-полимеразы при 95 °C составило 4,5 час. В этой же работе очищенный белок был кристаллизован и рентгеноструктурным анализом изучена его доменная организация.

В 2006 г. клонирован и секвенирован ген *Szi*-полимеразы из гипертермофильной архей *Sulphobococcus zilligii*, кодирующий фермент размером 797 аминокислотных остатков [Lee et al., 2006]. Данный фермент имел обе экзонуклеазные активности, и после выделения из *E. coli* характеризовался временем полужизни при 95 °C около 4,5 час. Используя *Szi*-полимеразу авторам удалось амплифицировать фрагмент ДНК размером 500 п.н., но участок размером 1000 п.н. наработать не удалось.

При анализе секвенированного генома гипертермофильной архей *Ignicoccus hospitalis* идентифицирован ген *Iho*-полимеразы размером 786 аминокислотных остатков, имеющий редактирующую экзонуклеазную активность, что обеспечивало точность копирования при ПЦР, сопоставимую с *Pfu*-полимеразой и *Vent*-полимеразой [Seo et al., 2014]. Выделенный из *E. coli* фермент, несущий аргининовую метку вместо гистидиновой, имел время полужизни при 94 °C около 2 час. Причем *Iho*-

полимераза проявила себя лучше при амплификации длинных матриц размером 6 и 8 т.п.н., чем те же *Pfu*-полимераза и *Vent*-полимераза.

Особого внимания заслуживает принадлежащая к В-семейству этих ферментов термостабильная ДНК-полимераза, выделенная из растущей в симбиозе или, возможно, паразитирующей на архее *I. hospitalis* наноархей *Nanoarchaeum equitans* [Choi et al., 2006]. Особенностью *Neq*-полимеразы является то, что она кодируется двумя отдельными генами: большим геном, кодирующим N-концевую часть (*Neq L*), и малым геном, кодирующим C-концевую часть (*Neq S*), которые разделены в геноме этой архей более чем 83 т.п.н.. Данные гены располагаются на разных цепях ДНК, но кодируемые ими белки объединяются после трансляции особым интееном, способствующим образованию зрелого белка. Оба эти гена (*Neq L* и *Neq S*) полимеразы клонированы и экспрессированы в *E. coli* по отдельности, а также составлен единый ген *Neq P*, имеющий размер 801 аминокислотный остаток. Интересно отметить, что белок *Neq L* характеризуется более низкой 3'→5'-эксонуклеазной активностью, тогда как *Neq C* и *Neq P* обладают как полимеразной, так и 3'→5'-эксонуклеазной активностями. Время полужизни очищенного фермента *Neq P* при 95 °C в присутствии стабилизирующего 0,01% BSA составило 183 мин, а при 100 °C – 62 мин. При этом без BSA *Neq*-полимераза быстро теряла свою активность при этих температурах. В своей следующей статье эти авторы [Choi et al., 2008] использовали *Neq*-полимеразу для проведения ПЦР, в ходе которой показали, что с помощью *Neq plus*-полимеразы в виде ее смеси с *Taq*-полимеразой удаётся наработать фрагмент фага лямбда длиной 20 т.п.н.

В 1999 г. японскими авторами клонированы и секвенированы два гена ДНК-полимераз из гипертермофильной архей *Aeropyrum pernix* [Cann et al., 1999]. Спустя два десятка лет они [Daimon et al., 2018] вернулись к тому исследованию и уточнили размер ДНК-полимеразы PolB3, оказавшийся длиннее на 19 аминокислот, поскольку ранее исходили из стартового кодона ATG, тогда как позже выяснилось, что для этого вида архей более типичен стартовый кодон TTG. Таким образом, этот фермент имеет размер 824 аминокислотных остатка и обладает большей термостабильностью, чем укороченная форма, нарабатываемая ими в *E. coli* ранее. При проведении ПЦР с данной *Aep*-полимеразой она показала увеличенную устойчивость к повышенной концентрации солей и гепарина, из чего авторы сделали вывод о ее пригодности для медицинской диагностики.

### Заключение

Из изложенного выше видно, что уже найдено и проанализировано множество ДНК-

полимераз из термофильных и гипертермофильных архей, часть из которых доведены до практического применения и реализуются коммерчески разными фирмами. Причем архейные ДНК-полимеразы оказываются востребованы в первую очередь при проведении ПЦР с трудными матрицами, в том числе при амплификации GC-богатых последовательностей, а также при недопустимости возникновения в ходе ПЦР большого числа мутаций, и даже полного их исключения при создании каких-либо важных генно-инженерных конструкций. Этого удастся избежать благодаря наличию редактирующей 3'→5'-экзонуклеазной активности, присущей этим полимеразам из В-семейства этих ферментов. Хорошо зарекомендовало себя использование смеси ДНК-полимераз из подходящей архейной ДНК-полимеразы

с редактирующей активностью и *Taq* полимеразы при амплификации протяженных матриц.

При этом далеко не все гипертермофильные археи еще изучены на предмет наличия в них еще более подходящих для молекулярно-биологических исследований ДНК-полимераз и, следовательно, есть определенный простор для дальнейших изысканий в этой области.

Следует заметить, что на основе многих из найденных архейных ДНК-полимераз созданы их мутантные и химерные формы, включающие в едином белке иные ферменты и прочие белки, что придает таким модифицированным ДНК-полимеразам улучшенные свойства для конкретных целей, но им внимание будет уделено в специальной статье.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 164.03.2026 г.

Доработана после рецензирования: 14.05.2026 г.

Принята к публикации: 15.05.2026 г.

#### Литература

1. Прангишвили Д.А. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы термоацидофильной археобактерии *Sulfolobus acidocaldarius*. *Молекул. Биология*. 1985. 19(2). 477-488.
2. Слободкина Г.Б., Черных Н.А., Лопатин С.А. и др. Выделение и характеристика термостабильной ДНК-полимеразы гипертермофильной археи *Thermococcus litoralis* Sh1AM. *Прикладн. Биохимия и микробиология*. 2005. 41(1). 40-47.
3. Bae H, Kim KP, Lee JI et al. Characterization of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus marinus* and its application to PCR. *Extremophiles*. 2009. 13(4). 657-667. doi: 10.1007/s00792-009-0248-0
4. Böhlke K, Pisani FM, Vorgias CE et al. PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon *Thermococcus aggregans* improved by mutations in the Y-GG/A motif. *Nucleic Acids Res*. 2000. 28(20). 3910-3917. doi: 10.1093/nar/28.20.3910
5. Cambon-Bonavita MA, Schmitt P, Zieger M et al. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles*. 2000. 4(4). 215-225. doi: 10.1007/pl00010714
6. Cann IK, Komori K, Toh H et al. A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95(24). 14250-14255. doi: 10.1073/pnas.95.24.14250
7. Ceylan HK. Enhanced Biomass Production of Recombinant Pfu DNA Polymerase Producer *Escherichia coli* BL21(DE3) by Optimization of Induction Variables Using Response Surface Methodology. *Protein J*. 2023. 42(4). 451-462. doi: 10.1007/s10930-023-10122-8
8. Chae YK, Jeon W, Cho KS. Rapid and simple method to prepare functional Pfu DNA polymerase expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002. 12(5). 841-843.
9. Cho SS, Kim KP, Lee KK et al. Characterization and PCR application of a new high-fidelity DNA polymerase from *Thermococcus waiotapuensis*. *Enzyme Microb Technol*. 2012. 51(6-7). 334-341. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.07.017
10. Choi JJ, Nam KH, Min B et al. Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite *Nanoarchaeum equitans*. *J Mol Biol*. 2006. 356(5). 1093-1106. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.036
11. Choi JJ, Song JG, Nam KH et al. Unique substrate spectrum and PCR application of *Nanoarchaeum equitans* family B DNA polymerase. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74(21). 6563-6569. doi: 10.1128/AEM.00624-08
12. Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein Expr Purif*. 1998. 14(1). 131-138. doi: 10.1006/prep.1998.0945
13. Daimon K, Ishino S, Imai N et al. Two Family B DNA Polymerases From *Aeropyrum pernix*, Based on Revised Translational Frames. *Front Mol Biosci*. 2018. 5. 37. doi: 10.3389/fmolb.2018.00037
14. Datukishvili N, Pokholok D, Lottspeich F et al. The DNA polymerase-encoding gene from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Gene*. 1996. 177(1-2). 271-273. doi: 10.1016/0378-1119(96)00298-3

15. De Felice M, Medagli B, Esposito L et al. Biochemical evidence of a physical interaction between *Sulfolobus solfataricus* B-family and Y-family DNA polymerases. *Extremophiles*. 2007. 11(2). 277-282. doi: 10.1007/s00792-006-0038-x
16. De Felice M, Sensen CW, Charlebois RL et al. Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol*. 1999. 291(1). 47-57. doi: 10.1006/jmbi.1999.2939
17. Dietrich J, Schmitt P, Zieger M et al. PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002. 217(1). 89-94. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11460.x
18. Elie C, De Recondo AM, Forterre P. Thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification, characterization and immunological properties. *Eur J Biochem*. 1989. 178(3). 619-626. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14490.x
19. Elie C, Salhi S, Rossignol JM et al. A DNA polymerase from a thermoacidophilic archaeobacterium: evolutionary and technological interests. *Biochim Biophys Acta*. 1988. 951(2-3). 261-267. doi: 10.1016/0167-4781(88)90095-4
20. Feng X, Liu X, Xu R et al. A Unique B-Family DNA Polymerase Facilitating Error-Prone DNA Damage Tolerance in Crenarchaeota. *Front Microbiol*. 2020. 11. 1585. doi: 10.3389/fmicb.2020.01585
21. Forterre P. The DNA polymerase from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* does not testify for a specific relationship between archaeobacteria and eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(7). 1811. doi: 10.1093/nar/20.7.1811
22. Forterre P, Elie C, Sioud M et al. Studies on DNA polymerases and topoisomerases in archaeobacteria. *Can J Microbiol*. 1989. 35(1). 228-233. doi: 10.1139/m89-035
23. Ghasemi A, Salmanian AH, Sadeghifard N et al. Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from *Pyrococcus woesei*. *Iran J Microbiol*. 2011. 3(3). 118-122.
24. Goldman S, Kim R, Hung LW et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1998. 54(5). 986-988. doi: 10.1107/s0907444998000353
25. Griffiths K, Nayak S, Park K et al. New high fidelity polymerases from *Thermococcus* species. *Protein Expr Purif*. 2007. 52(1). 19-30. doi: 10.1016/j.pep.2006.07.022
26. Gueguen Y, Rolland JL, Lecompte O et al. Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem*. 2001. 268(22). 5961-5969. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02550.x
27. Guo J, Zhang W, Coker AR et al. Structure of the family B DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2017. 73(5). 420-427. doi: 10.1107/S2059798317004090
28. Hadi MI, Laksmi FA, Helbert et al. An efficient approach for overproduction of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* using an optimized autoinduction system in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2024. 40(10). 324. doi: 10.1007/s11274-024-04127-3
29. Hamal A, Forterre P, Elie C. Purification and characterization of a DNA polymerase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur J Biochem*. 1990. 190(3). 517-521. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15604.x
30. Hashimoto H, Matsumoto T, Nishioka M et al. Crystallographic studies on a family B DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1. *J Biochem*. 1999. 125(6). 983-986. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022405
31. Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S et al. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J Mol Biol*. 2001. 306(3). 469-477. doi: 10.1006/jmbi.2000.4403
32. Hodges RA, Perler FB, Noren CJ et al. Protein splicing removes intervening sequences in an archaea DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(23). 6153-6157. doi: 10.1093/nar/20.23.6153
33. Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA et al. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96(7). 3600-3605. doi: 10.1073/pnas.96.7.3600
34. Hu JH, Wang F, Liu CZ. Development of an efficient process intensification strategy for enhancing Pfu DNA polymerase production in recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015. 38(4). 651-659. doi: 10.1007/s00449-014-1304-4
35. Imamura M, Uemori T, Kato I et al. A non-alpha-like DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biol Pharm Bull*. 1995. 18(12). 1647-1652. doi: 10.1248/bpb.18.1647
36. Ishino S, Ishino Y. Comprehensive search for DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006. 25(4-6). 681-691. doi: 10.1080/15257770600686485
37. Ishino Y, Ishino S. DNA polymerases from euryarchaeota. *Methods Enzymol*. 2001. 334. 249-260. doi: 10.1016/s0076-6879(01)34473-7
38. Ishino Y, Komori K, Cann IK et al. A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J Bacteriol*. 1998. 180(8). 2232-2236. doi: 10.1128/JB.180.8.2232-2236.1998

39. Kähler M, Antranikian G. Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*. *J Bacteriol.* 2000. 182(3). 655-663. doi: 10.1128/JB.182.3.655-663.2000
40. Khaerunnisa, Laksmi FA, Rahayuningsih M et al. One-step rapid production of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* system under optimized culture conditions. *Prep Biochem Biotechnol.* 2025. 55(8). 1066-1074. doi: 10.1080/10826068.2025.2483238
41. Kim KP, Bae H, Kim IH et al. Cloning, expression, and PCR application of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus celer*. *Biotechnol Lett.* 2011. 33(2). 339-346. doi: 10.1007/s10529-010-0434-2
42. Kim SW, Kim DU, Kim JK et al. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int J Biol Macromol.* 2008. 42(4). 356-361. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.01.010
43. Kim YJ, Lee HS, Bae SS et al. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. *J Microbiol Biotechnol.* 2007. 17(7). 1090-1097.
44. 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
45. Klimczak LJ, Grummt F, Burger KJ. Purification and characterization of DNA polymerase from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry.* 1986. 25(17). 4850-4855. doi: 10.1021/bi00365a019
46. Komori K, Ishino Y. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'→5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Protein Eng.* 2000. 13(1). 41-47. doi: 10.1093/protein/13.1.41
47. Kong H, Kucera RB, Jack WE. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. *J Biol Chem.* 1993. 268(3). 1965-1975. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53949-1
48. Konisky J, Paule SM, Carinato ME et al. The DNA polymerase gene from the methanogenic archaeon *Methanococcus voltae*. *J Bacteriol.* 1994. 176(20). 6402-6403. doi: 10.1128/jb.176.20.6402-6403.1994
49. Koonin EV, Krupovic M, Ishino S et al. The replication machinery of LUCA: common origin of DNA replication and transcription. *BMC Biol.* 2020. 18(1). 61. doi: 10.1186/s12915-020-00800-9
50. Kuroita T, Matsumura H, Yokota N et al. Structural mechanism for coordination of proofreading and polymerase activities in archaeal DNA polymerases. *J Mol Biol.* 2005. 351(2). 291-298. doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.015
51. Kuznetsova AA, Soloveva MA, Mikushina ES et al. Characterization and PCR Application of Family B DNA Polymerases from *Thermococcus stetteri*. *Life (Basel).* 2024. 14(12). 1544. doi: 10.3390/life14121544
52. Kwon KM, Kang SG, Sokolova TG et al. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus barophilus* Ch5 and its application for long and accurate PCR. *Enzyme Microb Technol.* 2016. 86. 117-126. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.02.004
53. Lee JI, Cho SS, Kil E-J et al. Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from *Thermococcus pacificus*. *Enzyme and Microbial Technology.* 2010. 47(4). 147-152. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.06.003
54. Lee JI, Kim YJ, Bae H et al. Biochemical properties and PCR performance of a family B DNA polymerase from hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus peptonophilus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010a. 160(6). 1585-1599. doi: 10.1007/s12010-009-8658-0
55. Lee Y-J, Choi JJ, Kwon S-T. Cloning, expression, and partial characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Enzyme and Microbial Technology.* 2006. 38(6). 821-830. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.010
56. Li B, Gu C, Zhao J. Molecular cloning and expression of Pfu polymerase gene and its application in long-distance PCR. *Chinese Science Bulletin.* 1998. 43(10). 863-867.
57. Loan TD, Easton CJ, Alissandratos A. DNA amplification with in situ nucleoside dNTP synthesis, using a single recombinant cell lysate of *E. coli*. *Sci Rep.* 2019. 9(1). 15621. doi: 10.1038/s41598-019-51917-z
58. Lu C, Erickson HP. Expression in *Escherichia coli* of the thermostable DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Expr Purif.* 1997. 11(2). 179-184. doi: 10.1006/prep.1997.0775
59. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* 1991. 108(1). 1-6. doi: 10.1016/0378-1119(91)90480-y
60. Makarova KS, Krupovic M, Koonin EV. Evolution of replicative DNA polymerases in archaea and their contributions to the eukaryotic replication machinery. *Front Microbiol.* 2014. 5. 354. doi: 10.3389/fmicb.2014.00354
61. Marsic D, Flaman JM, Ng JD. New DNA polymerase from the hyperthermophilic marine archaeon *Thermococcus thioreducens*. *Extremophiles.* 2008. 12(6). 775-788. doi: 10.1007/s00792-008-0181-7

62. Mathur EJ, Adams MW, Callen WN et al. The DNA polymerase gene from the hyperthermophilic marine archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, shows sequence homology with alpha-like DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19(24). 6952. doi: 10.1093/nar/19.24.6952
63. Mattila P, Korpela J, Tenkanen T et al. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19(18). 4967-4973. doi: 10.1093/nar/19.18.4967
64. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. Nucleotide-mimetic synthetic ligands for DNA-recognizing enzymes One-step purification of Pfu DNA polymerase. *J Chromatogr A.* 2006. 1122(1-2). 63-75. doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.044
65. Mroczkowski BS, Huvar A, Lernhardt W et al. Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector. *J Biol Chem.* 1994. 269(18). 13522-13528. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36862-X
66. Nastopoulos V, Pisani FM, Savino C et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of DNA polymerase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998. 54(5). 1002-1004. doi: 10.1107/s0907444998002443
67. Niehaus F, Frey B, Antranikian G. Cloning and characterisation of a thermostable alpha-DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. TY. *Gene.* 1997. 204(1-2). 153-158. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00536-2
68. Nishida H, Tanabe M, Ishino Y Crystallization and preliminary crystallographic study of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Pept Lett.* 2007. 14(4). 403-405. doi: 10.2174/092986607780363853
69. Nuryana I, Laksmi FA, Dewi KS, et al. Codon optimization of a gene encoding DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and its expression in *Escherichia coli*. *J Genet Eng Biotechnol.* 2023. 21(1). 129. doi: 10.1186/s43141-023-00605-7
70. Perler FB, Comb DG, Jack WE et al. Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89(12). 5577-5581. doi: 10.1073/pnas.89.12.5577
71. Pisani FM, De Martino C, Rossi M. A DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* shows sequence similarity to family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(11). 2711-2716. doi: 10.1093/nar/20.11.2711
72. Pisani FM, De Felice M, Rossi M. Amino acid residues involved in determining the processivity of the 3'-5' exonuclease activity in a family B DNA polymerase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry.* 1998. 37(42). 15005-15012. doi: 10.1021/bi981127s
73. Pisani FM, Manco G, Carratore V et al. Domain organization and DNA-induced conformational changes of an archaeal family B DNA polymerase. *Biochemistry.* 1996. 35(28). 9158-9166. doi: 10.1021/bi9604461
74. Pisani FM, Rossi M. Evidence that an archaeal alpha-like DNA polymerase has a modular organization of its associated catalytic activities. *J Biol Chem.* 1994. 269(11). 7887-7892. doi: 10.1016/S0021-9258(17)37134-X
75. Prangishvili D, Klenk HP. Nucleotide sequence of the gene for a 74 kDa DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(11). 2768. doi: 10.1093/nar/21.11.2768
76. Raffin JP, Henneke G, Dietrich J. Purification and characterization of a new DNA polymerase modulator from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus fumicolans*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2000. 127(3). 299-308. doi: 10.1016/s0305-0491(00)00263-7
77. Rella R, Raia CA, Pisani FM et al. Purification and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Ital J Biochem.* 1990. 39(2). 83-99.
78. Rogozin IB, Makarova KS, Pavlov YI et al. A highly conserved family of inactivated archaeal B family DNA polymerases. *Biol Direct.* 2008. 3. 32. doi: 10.1186/1745-6150-3-32
79. Rodriguez AC, Park HW, Mao C et al. Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J Mol Biol.* 2000. 299(2). 447-462. doi: 10.1006/jmbi.2000.3728
80. Rossi M, Rella R, Pensa M et al. Structure and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase isolated from *Sulfolobus solfataricus*. *System. Appl. Microbiol.* 1986. 7. 337-341. doi: 10.1016/S0723-2020(86)80029-7
81. Salhi S, Elie C, Forterre P et al. DNA polymerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. Replication at high temperature of long stretches of single-stranded DNA. *J Mol Biol.* 1989. 209(4). 635-644. doi: 10.1016/0022-2836(89)91000-0
82. Sankar PS, Citartan M, Siti AA et al. A simple method for in-house Pfu DNA polymerase purification for high-fidelity PCR amplification. *Iran J Microbiol.* 2019. 11(2). 181-186.
83. Sarmiento F, Long F, Cann I et al. Diversity of the DNA Replication System in the Archaea Domain. *Archaea.* 2014. 2014. 675946. doi: 10.1155/2014/675946
84. Savino C, Federici L, Johnson KA et al. Insights into DNA replication: the crystal structure of DNA polymerase B1 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Structure.* 2004. 12(11). 2001-2008. doi: 10.1016/j.str.2004.09.007

85. Seeger AH, Burggraf S, Fiala G et al. Life in hot springs and hydrothermal vents. *Orig Life Evol Biosph.* 1993. 23(1). 77-90. doi: 10.1007/BF01581992
86. Seo KJ, Cho SS, Ppyun HW et al. Characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis* KIN4/I and its application to PCR. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014. 173(5). 1108-1120. doi: 10.1007/s12010-014-0918-y
87. Stetter KO. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles.* 2006. 10(5). 357-362. doi: 10.1007/s00792-006-0012-7
88. Southworth MW, Kong H, Kucera RB et al. Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine Archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7 and mutations affecting 3'-5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93(11). 5281-5285. doi: 10.1073/pnas.93.11.5281
89. Sun Z, Cai J. Purification of recombinant Pfu DNA polymerase using a new JK110 resin. *Korean J. Chem. Eng.* 2006. 23. 607-609.
90. Takagi M, Nishioka M, Kakihara H et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1997. 63(11). 4504-4510. doi: 10.1128/aem.63.11.4504-4510.1997
91. Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. 97(24). 10243-10254. doi: 10.1007/s00253-013-5290-2
92. Uemori T, Ishino Y, Doi H et al. The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium occultum* has two alpha-like DNA polymerases. *J Bacteriol.* 1995. 177(8). 2164-2177. doi: 10.1128/jb.177.8.2164-2177.1995
93. Uemori T, Ishino Y, Toh H et al. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(2). 259-265. doi: 10.1093/nar/21.2.259
94. Uemori T, Sato Y, Kato I et al. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells.* 1997. 2(8). 499-512. doi: 10.1046/j.1365-2443.1997.1380336.x
95. Wang F, Li S, Zhao H et al. Expression and Characterization of the RKOD DNA Polymerase in *Pichia pastoris*. *PLoS One.* 2015. 10(7). e0131757. doi: 10.1371/journal.pone.0131757
96. Yamashita M, Xu J, Morokuma D et al. Characterization of Recombinant *Thermococcus kodakaraensis* (KOD) DNA Polymerases Produced Using SilkWorm-Baculovirus Expression Vector System. *Mol Biotechnol.* 2017. 59(6). 221-233. doi: 10.1007/s12033-017-0008-9
97. Zhang L, Jiang D, Shi H et al. Characterization and application of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic and radioresistant euryarchaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Int J Biol Macromol.* 2020. 156. 217-224. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.204
98. Zheng W, Wang Q, Bi Q. Construction, Expression, and Characterization of Recombinant Pfu DNA Polymerase in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2016. 35(2). 145-153. doi: 10.1007/s10930-016-9651-4
99. Zhao Y, Jeruzalmi D, Moarefi I et al. Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure.* 1999. 7(10). 1189-1199. doi: 10.1016/s0969-2126(00)80053-2
100. Zhou M, Mao C, Rodriguez AC et al. Crystallization and preliminary diffraction analysis of a hyperthermostable DNA polymerase from a *Thermococcus* archaeon. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998. 54(5). 994-995. doi: 10.1107/s0907444998001553

#### References

- Bae H, Kim KP, Lee JI et al. Characterization of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus marinus* and its application to PCR. *Extremophiles.* 2009. 13(4). 657-667. doi: 10.1007/s00792-009-0248-0
- Böhlke K, Pisani FM, Vorgias CE et al. PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon *Thermococcus aggregans* improved by mutations in the Y-GG/A motif. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(20). 3910-3917. doi: 10.1093/nar/28.20.3910
- Cambon-Bonavita MA, Schmitt P, Zieger M et al. Cloning, expression, and characterization of DNA polymerase I from the hyperthermophilic archaea *Thermococcus fumicolans*. *Extremophiles.* 2000. 4(4). 215-225. doi: 10.1007/pl00010714
- Cann IK, Komori K, Toh H et al. A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 95(24). 14250-14255. doi: 10.1073/pnas.95.24.14250
- Ceylan HK. Enhanced Biomass Production of Recombinant Pfu DNA Polymerase Producer *Escherichia coli* BL21(DE3) by Optimization of Induction Variables Using Response Surface Methodology. *Protein J.* 2023. 42(4). 451-462. doi: 10.1007/s10930-023-10122-8
- Chae YK, Jeon W, Cho KS. Rapid and simple method to prepare functional Pfu DNA polymerase expressed in *Escherichia coli* periplasm. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2002. 12(5). 841-843.
- Cho SS, Kim KP, Lee KK et al. Characterization and PCR application of a new high-fidelity DNA polymerase from *Thermococcus waiotapuensis*. *Enzyme Microb Technol.* 2012. 51(6-7). 334-341. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.07.017

8. Choi JJ, Nam KH, Min B et al. Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite *Nanoarchaeum equitans*. *J Mol Biol.* 2006. 356(5). 1093-1106. doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.036
9. Choi JJ, Song JG, Nam KH et al. Unique substrate spectrum and PCR application of *Nanoarchaeum equitans* family B DNA polymerase. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74(21). 6563-6569. doi: 10.1128/AEM.00624-08
10. Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein Expr Purif.* 1998. 14(1). 131-138. doi: 10.1006/prep.1998.0945
11. Daimon K, Ishino S, Imai N et al. Two Family B DNA Polymerases From *Aeropyrum pernix*, Based on Revised Translational Frames. *Front Mol Biosci.* 2018. 5. 37. doi: 10.3389/fmolb.2018.00037
12. Datukishvili N, Pokholok D, Lottspeich F et al. The DNA polymerase-encoding gene from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Gene.* 1996. 177(1-2). 271-273. doi: 10.1016/0378-1119(96)00298-3
13. De Felice M, Medagli B, Esposito L et al. Biochemical evidence of a physical interaction between *Sulfolobus solfataricus* B-family and Y-family DNA polymerases. *Extremophiles.* 2007. 11(2). 277-282. doi: 10.1007/s00792-006-0038-x
14. De Felice M, Sensen CW, Charlebois RL et al. Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol Biol.* 1999. 291(1). 47-57. doi: 10.1006/jmbi.1999.2939
15. Dietrich J, Schmitt P, Zieger M et al. PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002. 217(1). 89-94. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11460.x
16. Elie C, De Recondo AM, Forterre P. Thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Purification, characterization and immunological properties. *Eur J Biochem.* 1989. 178(3). 619-626. doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14490.x
17. Elie C, Salhi S, Rossignol JM et al. A DNA polymerase from a thermoacidophilic archaeobacterium: evolutionary and technological interests. *Biochim Biophys Acta.* 1988. 951(2-3). 261-267. doi: 10.1016/0167-4781(88)90095-4
18. Feng X, Liu X, Xu R et al. A Unique B-Family DNA Polymerase Facilitating Error-Prone DNA Damage Tolerance in Crenarchaeota. *Front Microbiol.* 2020. 11. 1585. doi: 10.3389/fmicb.2020.01585
19. Forterre P. The DNA polymerase from the archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* does not testify for a specific relationship between archaeobacteria and eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(7). 1811. doi: 10.1093/nar/20.7.1811
20. Forterre P, Elie C, Sioud M et al. Studies on DNA polymerases and topoisomerases in archaeobacteria. *Can J Microbiol.* 1989. 35(1). 228-233. doi: 10.1139/m89-035
21. Ghasemi A, Salmanian AH, Sadeghifard N et al. Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from *Pyrococcus woesei*. *Iran J Microbiol.* 2011. 3(3). 118-122.
22. Goldman S, Kim R, Hung LW et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998. 54(5). 986-988. doi: 10.1107/s0907444998000353
23. Griffiths K, Nayak S, Park K et al. New high fidelity polymerases from *Thermococcus* species. *Protein Expr Purif.* 2007. 52(1). 19-30. doi: 10.1016/j.pep.2006.07.022
24. Gueguen Y, Rolland JL, Lecompte O et al. Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur J Biochem.* 2001. 268(22). 5961-5969. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02550.x
25. Guo J, Zhang W, Coker AR et al. Structure of the family B DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 2017. 73(5). 420-427. doi: 10.1107/S2059798317004090
26. Hadi MI, Laksmi FA, Helbert et al. An efficient approach for overproduction of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* using an optimized autoinduction system in *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2024. 40(10). 324. doi: 10.1007/s11274-024-04127-3
27. Hamal A, Forterre P, Elie C. Purification and characterization of a DNA polymerase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur J Biochem.* 1990. 190(3). 517-521. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15604.x
28. Hashimoto H, Matsumoto T, Nishioka M et al. Crystallographic studies on a family B DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1. *J Biochem.* 1999. 125(6). 983-986. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022405
29. Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S et al. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J Mol Biol.* 2001. 306(3). 469-477. doi: 10.1006/jmbi.2000.4403
30. Hodges RA, Perler FB, Noren CJ et al. Protein splicing removes intervening sequences in an archaea DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(23). 6153-6157. doi: 10.1093/nar/20.23.6153
31. Hopfner KP, Eichinger A, Engh RA et al. Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from

- Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96(7). 3600-3605. doi: 10.1073/pnas.96.7.3600
32. Hu JH, Wang F, Liu CZ. Development of an efficient process intensification strategy for enhancing Pfu DNA polymerase production in recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015. 38(4). 651-659. doi: 10.1007/s00449-014-1304-4
33. Imamura M, Uemori T, Kato I et al. A non-alpha-like DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biol Pharm Bull*. 1995. 18(12). 1647-1652. doi: 10.1248/bpb.18.1647
34. Ishino S, Ishino Y. Comprehensive search for DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006. 25(4-6). 681-691. doi: 10.1080/15257770600686485
35. Ishino Y, Ishino S. DNA polymerases from euryarchaeota. *Methods Enzymol*. 2001. 334. 249-260. doi: 10.1016/s0076-6879(01)34473-7
36. Ishino Y, Komori K, Cann IK et al. A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J Bacteriol*. 1998. 180(8). 2232-2236. doi: 10.1128/JB.180.8.2232-2236.1998
37. Kähler M, Antranikian G. Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*. *J Bacteriol*. 2000. 182(3). 655-663. doi: 10.1128/JB.182.3.655-663.2000
38. Khaerunnisa, Laksmi FA, Rahayuningsih M et al. One-step rapid production of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* system under optimized culture conditions. *Prep Biochem Biotechnol*. 2025. 55(8). 1066-1074. doi: 10.1080/10826068.2025.2483238
39. Kim KP, Bae H, Kim IH et al. Cloning, expression, and PCR application of DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus celer*. *Biotechnol Lett*. 2011. 33(2). 339-346. doi: 10.1007/s10529-010-0434-2
40. Kim SW, Kim DU, Kim JK et al. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int J Biol Macromol*. 2008. 42(4). 356-361. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.01.010
41. Kim YJ, Lee HS, Bae SS et al. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. *J Microbiol Biotechnol*. 2007. 17(7). 1090-1097.
42. Klimeczak 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
43. Klimeczak LJ, Grummt F, Burger KJ. Purification and characterization of DNA polymerase from the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry*. 1986. 25(17). 4850-4855. doi: 10.1021/bi00365a019
44. Komori K, Ishino Y. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'→5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Protein Eng*. 2000. 13(1). 41-47. doi: 10.1093/protein/13.1.41
45. Kong H, Kucera RB, Jack WE. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. *J Biol Chem*. 1993. 268(3). 1965-1975. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53949-1
46. Konisky J, Paule SM, Carinato ME et al. The DNA polymerase gene from the methanogenic archaeon *Methanococcus voltae*. *J Bacteriol*. 1994. 176(20). 6402-6403. doi: 10.1128/jb.176.20.6402-6403.1994
47. Koonin EV, Krupovic M, Ishino S et al. The replication machinery of LUCA: common origin of DNA replication and transcription. *BMC Biol*. 2020. 18(1). 61. doi: 10.1186/s12915-020-00800-9
48. Kuroita T, Matsumura H, Yokota N et al. Structural mechanism for coordination of proofreading and polymerase activities in archaeal DNA polymerases. *J Mol Biol*. 2005. 351(2). 291-298. doi: 10.1016/j.jmb.2005.06.015
49. Kuznetsova AA, Soloveva MA, Mikushina ES et al. Characterization and PCR Application of Family B DNA Polymerases from *Thermococcus stetteri*. *Life (Basel)*. 2024. 14(12). 1544. doi: 10.3390/life14121544
50. Kwon KM, Kang SG, Sokolova TG et al. Characterization of a family B DNA polymerase from *Thermococcus barophilus* Ch5 and its application for long and accurate PCR. *Enzyme Microb Technol*. 2016. 86. 117-126. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.02.004
51. Lee JI, Cho SS, Kil E-J et al. Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from *Thermococcus pacificus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010. 47(4). 147-152. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.06.003
52. Lee JI, Kim YJ, Bae H et al. Biochemical properties and PCR performance of a family B DNA polymerase from hyperthermophilic Euryarchaeon *Thermococcus peptonophilus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010. 160(6). 1585-1599. doi: 10.1007/s12010-009-8658-0
53. Lee Y-J, Choi JJ, Kwon S-T. Cloning, expression, and partial characterization of a family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobococcus zilligii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. 38(6). 821-830. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.010

54. Li B, Gu C, Zhao J. Molecular cloning and expression of Pfu polymerase gene and its application in long-distance PCR. *Chinese Science Bulletin*. 1998. 43(10). 863-867.
55. Loan TD, Easton CJ, Alissandratos A. DNA amplification with in situ nucleoside to dNTP synthesis, using a single recombinant cell lysate of *E. coli*. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 15621. doi: 10.1038/s41598-019-51917-z
56. Lu C, Erickson HP. Expression in *Escherichia coli* of the thermostable DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Expr Purif*. 1997. 11(2). 179-184. doi: 10.1006/prep.1997.0775
57. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW et al. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 1991. 108(1). 1-6. doi: 10.1016/0378-1119(91)90480-y
58. Makarova KS, Krupovic M, Koonin EV. Evolution of replicative DNA polymerases in archaea and their contributions to the eukaryotic replication machinery. *Front Microbiol*. 2014. 5. 354. doi: 10.3389/fmicb.2014.00354
59. Marsic D, Flaman JM, Ng JD. New DNA polymerase from the hyperthermophilic marine archaeon *Thermococcus thioreducens*. *Extremophiles*. 2008. 12(6). 775-788. doi: 10.1007/s00792-008-0181-7
60. Mathur EJ, Adams MW, Callen WN et al. The DNA polymerase gene from the hyperthermophilic marine archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, shows sequence homology with alpha-like DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(24). 6952. doi: 10.1093/nar/19.24.6952
61. Mattila P, Korpela J, Tenkanen T et al. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase - an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(18). 4967-4973. doi: 10.1093/nar/19.18.4967
62. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. Nucleotide-mimetic synthetic ligands for DNA-recognizing enzymes One-step purification of Pfu DNA polymerase. *J Chromatogr A*. 2006. 1122(1-2). 63-75. doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.044
63. Mroczkowski BS, Huvar A, Lernhardt W et al. Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector. *J Biol Chem*. 1994. 269(18). 13522-13528. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36862-X
64. Nastopoulos V, Pisani FM, Savino C et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of DNA polymerase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1998. 54(5). 1002-1004. doi: 10.1107/s0907444998002443
65. Niehaus F, Frey B, Antranikian G. Cloning and characterisation of a thermostable alpha-DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. *Gene*. 1997. 204(1-2). 153-158. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00536-2
66. Nishida H, Tanabe M, Ishino Y. Crystallization and preliminary crystallographic study of DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Pept Lett*. 2007. 14(4). 403-405. doi: 10.2174/092986607780363853
67. Nuryana I, Laksmi FA, Dewi KS, et al. Codon optimization of a gene encoding DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and its expression in *Escherichia coli*. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023. 21(1). 129. doi: 10.1186/s43141-023-00605-7
68. Perler FB, Comb DG, Jack WE et al. Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89(12). 5577-5581. doi: 10.1073/pnas.89.12.5577
69. Pisani FM, De Martino C, Rossi M. A DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* shows sequence similarity to family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(11). 2711-2716. doi: 10.1093/nar/20.11.2711
70. Pisani FM, De Felice M, Rossi M. Amino acid residues involved in determining the processivity of the 3'-5' exonuclease activity in a family B DNA polymerase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry*. 1998. 37(42). 15005-15012. doi: 10.1021/bi981127s
71. Pisani FM, Manco G, Carratore V et al. Domain organization and DNA-induced conformational changes of an archaeal family B DNA polymerase. *Biochemistry*. 1996. 35(28). 9158-9166. doi: 10.1021/bi9604461
72. Pisani FM, Rossi M. Evidence that an archaeal alpha-like DNA polymerase has a modular organization of its associated catalytic activities. *J Biol Chem*. 1994. 269(11). 7887-7892. doi: 10.1016/S0021-9258(17)37134-X
73. Prangishvili DA. DNA-dependent DNA polymerases of thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molec. Biol. (Moscow)*. 1985. 19(2). 477-488. (In Russian)
74. Prangishvili D, Klenk HP. Nucleotide sequence of the gene for a 74 kDa DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(11). 2768. doi: 10.1093/nar/21.11.2768
75. Raffin JP, Henneke G, Dietrich J. Purification and characterization of a new DNA polymerase modulator from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus fumicolans*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2000. 127(3). 299-308. doi: 10.1016/s0305-0491(00)00263-7
76. Rella R, Raia CA, Pisani FM et al. Purification and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Ital J Biochem*. 1990. 39(2). 83-99.
77. Rogozin IB, Makarova KS, Pavlov YI et al. A highly conserved family of inactivated archaeal B family

- DNA polymerases. *Biol Direct.* 2008. 3. 32. doi: 10.1186/1745-6150-3-32
78. Rodriguez AC, Park HW, Mao C et al. Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J Mol Biol.* 2000. 299(2). 447-462. doi: 10.1006/jmbi.2000.3728
79. Rossi M, Rella R, Pensa M et al. Structure and properties of a thermophilic and thermostable DNA polymerase isolated from *Sulfolobus solfataricus*. *System. Appl. Microbiol.* 1986. 7. 337-341. doi: 10.1016/S0723-2020(86)80029-7
80. Salhi S, Elie C, Forterre P et al. DNA polymerase from *Sulfolobus acidocaldarius*. Replication at high temperature of long stretches of single-stranded DNA. *J Mol Biol.* 1989. 209(4). 635-644. doi: 10.1016/0022-2836(89)91000-0
81. Sankar PS, Citartan M, Siti AA et al. A simple method for in-house Pfu DNA polymerase purification for high-fidelity PCR amplification. *Iran J Microbiol.* 2019. 11(2). 181-186.
82. Sarmiento F, Long F, Cann I et al. Diversity of the DNA Replication System in the Archaea Domain. *Archaea.* 2014. 2014. 675946. doi: 10.1155/2014/675946
83. Savino C, Federici L, Johnson KA et al. Insights into DNA replication: the crystal structure of DNA polymerase B1 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Structure.* 2004. 12(11). 2001-2008. doi: 10.1016/j.str.2004.09.007
84. Segerer AH, Burggraf S, Fiala G et al. Life in hot springs and hydrothermal vents. *Orig Life Evol Biosph.* 1993. 23(1). 77-90. doi: 10.1007/BF01581992
85. Seo KJ, Cho SS, Ppyun HW et al. Characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis* KIN4/I and its application to PCR. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014. 173(5). 1108-1120. doi: 10.1007/s12010-014-0918-y
86. Slobodkina GB, Chernykh NA, Lopatin SA et al. Isolation and characterization of thermostable DNA polymerase of the hyperthermophilic archaeum *Thermococcus litoralis* Sh1AM. *Appl Biochem Microbiol.* 2005. 41. 34-41. doi: 10.1007/s10438-005-0007-7
87. Stetter KO. History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles.* 2006. 10(5). 357-362. doi: 10.1007/s00792-006-0012-7
88. Southworth MW, Kong H, Kucera RB et al. Cloning of thermostable DNA polymerases from hyperthermophilic marine Archaea with emphasis on *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7 and mutations affecting 3'-5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93(11). 5281-5285. doi: 10.1073/pnas.93.11.5281
89. Sun Z, Cai J. Purification of recombinant Pfu DNA polymerase using a new JK110 resin. *Korean J. Chem. Eng.* 2006. 23. 607-609.
90. Takagi M, Nishioka M, Kakihara H et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1997. 63(11). 4504-4510. doi: 10.1128/aem.63.11.4504-4510.1997
91. Terpe K. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. 97(24). 10243-10254. doi: 10.1007/s00253-013-5290-2
92. Uemori T, Ishino Y, Doi H et al. The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium occultum* has two alpha-like DNA polymerases. *J Bacteriol.* 1995. 177(8). 2164-2177. doi: 10.1128/jb.177.8.2164-2177.1995
93. Uemori T, Ishino Y, Toh H et al. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(2). 259-265. doi: 10.1093/nar/21.2.259
94. Uemori T, Sato Y, Kato I et al. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells.* 1997. 2(8). 499-512. doi: 10.1046/j.1365-2443.1997.1380336.x
95. Wang F, Li S, Zhao H et al. Expression and Characterization of the RKOD DNA Polymerase in *Pichia pastoris*. *PLoS One.* 2015. 10(7). e0131757. doi: 10.1371/journal.pone.0131757
96. Yamashita M, Xu J, Morokuma D et al. Characterization of Recombinant *Thermococcus kodakaraensis* (KOD) DNA Polymerases Produced Using Silkworm-Baculovirus Expression Vector System. *Mol Biotechnol.* 2017. 59(6). 221-233. doi: 10.1007/s12033-017-0008-9
97. Zhang L, Jiang D, Shi H et al. Characterization and application of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic and radioresistant euryarchaeon *Thermococcus gammatolerans*. *Int J Biol Macromol.* 2020. 156. 217-224. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.204
98. Zheng W, Wang Q, Bi Q. Construction, Expression, and Characterization of Recombinant Pfu DNA Polymerase in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2016. 35(2). 145-153. doi: 10.1007/s10930-016-9651-4
99. Zhao Y, Jeruzalmi D, Moarefi I et al. Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase. *Structure.* 1999. 7(10). 1189-1199. doi: 10.1016/s0969-2126(00)80053-2
100. Zhou M, Mao C, Rodriguez AC et al. Crystallization and preliminary diffraction analysis of a hyperthermostable DNA polymerase from a *Thermococcus* archaeon. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998. 54(5). 994-995. doi: 10.1107/s0907444998001553