



ISSN 2221-6197 <https://biomicsj.ru>

Термостабильные ДНК-полимеразы с ревертазной активностью

¹В.В. Зубов*, ²А.А. Воробьев, ³С.В. Жевора, ^{3,4}Я.И.Алексеев

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

²Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, Российская Федерация, Киров
³ООО «Синтол», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 42

⁴Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Российская Федерация, Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33

*E-mail: genseq@mail.ru

Резюме

Применение термостабильной Taq-ДНК-полимеразы из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus* в реакции полимеразной цепной реакции (ПЦР) превратило этот метод в один из наиболее востребованных инструментов молекулярной биологии. Среди его важных применений — оценка уровня транскрипционной активности отдельных генов и детекция РНК-содержащих вирусов. Для работы с РНК-матрицами требовался предварительный этап синтеза комплементарной ДНК (кДНК), который первоначально выполнялся исключительно с помощью вирусных обратных транскриптаз. Однако термолабильность этих ферментов создавала существенные ограничения: реакции обратной транскрипции, предшествующей ПЦР, приходилось проводить в неоптимальных температурных условиях. Кроме того, при относительно низких температурах молекулы РНК образовывали стабильные вторичные структуры, затрудняющие синтез кДНК. В связи с этим перспективным представлялось использование для получения кДНК термостабильной Taq-ДНК-полимеразы, что и было успешно реализовано. Позднее было установлено, что Tth-ДНК-полимераза из родственной бактерии *T. thermophilus* в присутствии ионов марганца проявляет значительно более высокую ревертазную (обратной транскриптазную) активность — примерно на два порядка выше, чем у Taq-полимеразы. Создание генно-инженерных вариантов термостабильных ДНК-полимераз на основе Taq-, Tth-полимераз и ряда других аналогичных ферментов позволило существенно улучшить этап обратной транскрипции. Особо важным достижением стало получение мутантных ферментов, сочетающих ревертазную активность с редактирующей 3'→5'-экзонуклеазной (корректирующей) активностью, что заметно снижает частоту ошибок при синтезе кДНК.

Ключевые слова: термостабильная ДНК-полимераза, Taq-полимераза, Tth-полимераза, обратная транскриптаза, ревертазная активность, ОТ-ПЦР, кДНК

Цитирование: Зубов В.В., Воробьев А.А., Жевора, С.В., Алексеев Я.И. Термостабильные ДНК-полимеразы с ревертазной активностью. *Biomics*. 2026. 18(2). С.168-177. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-13

© Авторы, В.В. Зубов, А.А. Воробьев, С.В. Жевора, Я.И.Алексеев, 2026

Thermostable DNA polymerases with reverse transcriptase activity

¹V.V. Zubov, ²A.A. Vorob'ev, ³S.V. Zhevora, ^{3,4}Ya.I. Alekseev

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS
3 Institut'skaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation
²Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute"
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation
³Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya Str., 127434, Moscow, Russian Federation
⁴Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,
198095, St. Petersburg, Russian Federation
E-mail: genseq@mail.ru

Resume

The introduction of thermostable Taq DNA polymerase from the thermophilic eubacterium *Thermus aquaticus* into PCR has transformed the method into a widely used tool for a variety of applications, including the assessment of transcriptional activity of individual genes and the detection of RNA viruses. These applications required a preliminary step of converting RNA molecules into complementary DNA (cDNA), which was initially performed exclusively using viral reverse transcriptases. However, the thermostability of these enzymes created significant limitations, as both reverse transcription and subsequent PCR had to be carried out under suboptimal conditions. In addition, at lower temperatures, RNA molecules tend to form stable secondary structures that hinder efficient cDNA synthesis. In this context, it was highly attractive to use thermostable Taq DNA polymerase directly for cDNA synthesis, and this approach proved successful. It was subsequently found that Tth DNA polymerase from the related bacterium *T. thermophilus*, in the presence of manganese ions, exhibits reverse transcriptase activity that is approximately two orders of magnitude higher than that of Taq polymerase. The subsequent development of genetically engineered thermostable DNA polymerases based on Taq, Tth polymerases, and several other similar enzymes has significantly improved the reverse transcription step. Importantly, some of these variants successfully combine reverse transcriptase activity with proofreading 3'→5' exonuclease activity, thereby reducing the error rate during cDNA synthesis.

Keywords: thermostable DNA polymerase, Taq polymerase, Tth polymerase, reverse transcriptase activity, RT-PCR, cDNA

Citation: Zubov V.V., Vorob'ev A.A., Zhevora S.V., Alekseev Ya.I. Thermostable DNA polymerases with reverse transcriptase activity. *Biomics*. 2026. 18(2). 168-177. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-13 (In Russian)

© The Authors, V.V. Zubov, A.A. Vorob'ev, S.V. Zhevora, Ya.I. Alekseev, 2026

Введение

Использование ПЦР для детекции молекул РНК весьма быстро стало высоко востребованным способом для оценки уровней транскрипционной активности отдельных генов, а также для выявления вирусов с РНК-геномом. Еще до внедрения в ПЦР термостабильной Taq-полимеразы вышла статья, в которой мРНК тяжелой цепи β-миозина человека детектировалась с использованием Кленовского фрагмента ДНК-полимеразы I *E. coli* после создания кДНК с помощью обратной транскриптазы вирусного происхождения [Harbarth, Vosberg, 1988]. При этом рукопись той статьи была получена редакцией 20 июля 1987 г., а 3 августа 1987 г. редакцией другого журнала была получена рукопись вышедшей даже раньше статьи [Powell et al., 1987]. В ней для детекции мРНК аполипопротеина из кишечника человека и кролика после этапа образования кДНК использовалась уже термостабильная ДНК-

полимераза фирмы New England Biolabs. При этом авторы ошибочно привели неверное родовое название бактерии, из которой выделялся данный фермент, как *Thermophyllus aquaticus* вместо *Thermus aquaticus*. Следующая работа, описывающая амплификацию РНК вируса иммунодефицита человека (наряду с его провирусной ДНК копией) с помощью обратной транскриптазы MMLV и на этапе ПЦР с помощью Taq-полимеразы, вышла весной 1988 г. [Wyrne et al., 1988]. После этого подобные работы стали носить массовый характер, сначала обычно на первом этапе получая кДНК с помощью вирусных обратных транскриптаз AMV или MMLV. Вскоре было предложено вести подобную амплификацию в одной пробирке с последовательной работой ферментов на разных этапах: например, AMV ревертазы и Taq-полимеразы [Goblet et al., 1989].

Хотя уже давно было известно, что ДНК-полимераза I *E. coli* характеризуется способностью

использовать в качестве матрицы РНК, но обладает ей лишь в незначительной степени [Karkas et al., 1972]. Можно было предположить, что и другим, в том числе термостабильным ДНК-полимеразам присуща такая активность, и это может оказаться полезным для детекции различных молекул РНК. Тем более, что использование обладающих ревертазной активностью термостабильных ДНК-полимераз при проведении обратного-транскрипционной ПЦР сулит определенные преимущества в виде применения при построении кДНК более высокой температуры, снижающей вероятность возникновения нежелательных вторичных структур, а также исключения необходимости открывания пробирок во время всего анализа при его проведении в режиме реального времени. Однако потребовалось еще некоторое время, чтобы попытаться обходиться без отдельного этапа получения кДНК с помощью вирусных РНК-зависимых ДНК-полимераз, а сразу по матрице РНК строить кДНК бактериальной термостабильной ДНК-полимеразой, обеспечивающей затем и протекание ПЦР.

Еще до появления ПЦР при выделении и исследовании ферментативных активностей некоторых термостабильных ДНК-полимераз в качестве субстратов использовались poly(rA)-последовательности, а также мРНК с праймерами к ним в виде коротких олиго(Т)-участков. Так, отечественными авторами при анализе Taq-полимеразы из *T. aquaticus* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1980], T₁₁-полимеразы из *T. flavus* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1981] и T₁₀-полимеразы из *T. ruber* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1982] были обнаружены слабые полимеризующие активности, проявляющиеся при 50°C на poly(rA) матрицах с праймером олиго(Т)₁₂¹, но не с мРНК из печени коровы с тем же праймером. Позже схожий результат был получен для T₁₁-полимеразы из *T. thermophilus* также по матрице из poly(rA) с праймером олиго(Т)₁₀, причем включение дНТФ шло лучше при 37 °C и в присутствии Mn²⁺ [Rüttimann et al., 1985].

В данном обзоре с соблюдением по возможности хронологической последовательности затронуты преимущественно оригинальные пионерные публикации, описывающее как нативные, так и модифицированные генно-инженерным путем и пригодные для проведения ПЦР термостабильные ДНК-полимеразы, обладающие способностью строить цепь ДНК по матрице РНК. При этом вирусные РНК-зависимые ДНК-полимеразы MMLV и AMV, которые с помощью мутагенеза удалось сделать более устойчивыми к повышенным температурам, здесь

рассматриваться не будут, поскольку им нужно посвятить отдельный обзор. Равно как и XNA² ревертазам, в том числе и обычным полимеразам, использующим в качестве субстратов неприродные нуклеотиды. При этом за пределами рассмотрения за небольшим исключением также окажутся мутантные формы термостабильных ДНК-полимераз, ставших фактически ДНК-зависимыми РНК-полимеразами.

Нативные термостабильные ДНК-полимеразы, проявляющие ревертазную активность

В 1989 г. вышла статья, в которой сообщалось об использовании Taq-полимеразы для амплификации мРНК глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы человека из клеток HeLa [Jones, Foulkes, 1989]. Причем праймеры были подобраны так, что происходила амплификация мРНК, в том числе после сплайсинга, свидетельствуя о построении цепи кДНК по матрице РНК именно Taq-полимеразой. В следующей подобной работе производилась амплификация фрагмента кДНК β-спектрина человека длиной 0,4 т.п.н. Этот участок гена содержал два интрона, и его размер с ними составлял уже 1,2 т.п.н., что позволяло идентифицировать их отдельно [Tse, Forget, 1990]. В качестве подтверждения копирования мРНК Taq-полимеразой этими авторами проводилась обработка выделенного препарата РНК РНКазой, которая приводила к исчезновению ампликона размером 0,4 т.п.н. Дополнительно использовалась блот-гибридизация с зондом в виде одного из интронов, и гибридационный сигнал для полосы ДНК размером 0,4 т.п.н. не возникало. Другие авторы на сплайсированном варианте мРНК интерлейкина-2 гиббона (с применением РНКазной обработки) убедительно показали, что синтез кДНК и последующая ПЦР осуществлялись единственным ферментом - Taq-полимеразой [Shaffer et al., 1990].

В следующем году вышла статья [Myers, Gelfand, 1991] с описанием экспериментов, в которых матрицей для ПЦР служил продукт транскрипции рекомбинантной плазмиды ферментом РНК-полимеразой фага T7 в системе *in vitro*. На этой матрице в ходе ПЦР с использованием Tth-полимеразы в присутствии MnCl₂ генерировался ампликон размером 308 п.н. Причем было показано, что Tth-полимераза в присутствии MnCl₂ проявляла ревертазную активность более чем в 100 раз превышающую таковую у Taq-полимеразы. Неудивительно, что после этой публикации подобные работы стали проводиться преимущественно с использованием Tth-полимеразы.

Например, была проведена обратная транскрипция мРНК интерлейкина-2 *in situ* в T-

¹ она была названа авторами как «рДНК-полимеразная активность»

² Xeno Nucleic Acid

лимфоцитах Jurkat клеток с использованием праймера, отжигающегося на экзон-интронной границе для исключения вклада геномной ДНК, в ходе которой Tth-полимераза включала в строящуюся цепь ДНК различные дНТФ. В том числе меченный флуоресцеином dUTP, позволяющий вести визуализацию продуктов транскрипции [Chang, 1994]. В одной из работ проводилось сравнение эффективности обратной транскрипционной ПЦР с использованием для построения кДНК MMLV-ревертазы и непосредственно Tth-полимеразы, с помощью которой и велась дальнейшая амплификация [Grazia et al., 1994]. При этом ПЦР с одной Tth-полимеразой оказалась менее чувствительной, чем двухэтапный процесс.

В работе японских авторов одним из двух праймеров при проведении ПЦР служили короткие продукты транскрипции *in vitro* рекомбинантных плазмид (т.е. фрагменты молекул РНК). Амплификация происходила благодаря тому, что использовалась Tth-полимераза, способная при копировании полностью достроить цепь ампликона по участку РНК в виде его праймерной последовательности и создать тем самым в следующем цикле сайт для отжига очередного рибопраймера [Shibata et al., 1995].

Было показано, что применение аналогов дНТФ (hydroxymethyl dUTP, dITP) в ходе обратной транскрипционной ПЦР с Tth-полимеразой на обеих стадиях (построения кДНК и самой ампликации) снижает температуру плавления продуктов и способствует улучшению детекции молекул РНК [Auer et al., 1995].

Впрочем, для целей обратной транскрипционной ПЦР не была оставлена без внимания и Taq-полимераза. В одной из работ мишенью служил вирус полиомиелита, не проходящего в своем жизненном цикле ДНК-стадию. Поэтому наработка ампликона размером 960 п.н. происходила в результате обратной транскрипции под действием как Tth-полимеразы, так и Taq-полимеразы в присутствии ионов Mg^{2+} [Grabko et al., 1996]. Несколько удивительным оказался результат, свидетельствующий, что Taq-полимераза обеспечила на два порядка более высокую чувствительность. Но здесь можно принять во внимание большую длину ампликона, с которой могла лучше справиться именно Taq-полимераза. Другими отечественными авторами при ампликации мРНК интерлейкина-2 в ходе обратной транскрипционной ПЦР при сравнении ферментов было показано, что Tth-полимераза эффективнее Taq-полимеразы [Гребенникова и др. (Grebennikova et al.), 1995].

После появления нового коронавируса SARS-CoV-2 для улучшения его выявления была проведена

работа по подбору оптимального состава буфера для Taq-полимеразы как единственного фермента, обеспечивающего обратную транскрипционную ПЦР [Bhadra et al., 2020]. Использовались различные концентрации Трис-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2$, $MgSO_4$, Triton X-100, а также варьировалась pH реакционной смеси. Это позволило подобрать условия для обнаружения таким путем до 2 копий вируса на 1 мкл экстракта.

В одной из работ исследовалось влияние на обратную транскрипционную ПЦР при детекции мРНК в реальном времени с применением Tth-полимеразы различных ингибиторов данного фермента, присутствующих в крови, моче, фекалиях и в других источниках, показавшее дозо-зависимый эффект [Cai et al., 2018], что, впрочем, неудивительно.

Модифицированные (мутантные) термостабильные ДНК-полимеразы, проявляющие ревертазную активность

Оптимизацией буфера и одной заменой ионов магния ионами марганца в плане улучшения ревертазной активности Taq-полимеразы многого не добьешься. К тому же в некоторых случаях марганец в реакционной смеси может быть неуместен, и в 2006 г. сразу несколько групп авторов обратились к генной инженерии. Так, с использованием фагового дисплея в результате шести селекционных циклов на основе фрагмента Стоффеля Taq-полимеразы удалось получить 116 ферментов с множеством мутаций, среди которых 28 обладали ревертазной активностью. Некоторые из них могли применяться в обратной транскрипционной ПЦР [Vichier-Guerre et al., 2006].

На основе термостабильной Tma-полимеразы из *Thermotoga maritima* был сконструирован химерный фермент CS5, несущий также 3'→5'-экзонуклеазный домен из штамма *Thermus* Z05. И него заменой двух аминокислот была получена CS6-полимераза, которая утратила экзонуклеазную активность, но приобрела ревертазную [Schönbrunner et al., 2006]. При этом ещё ряд мутаций в CS5-полимеразе позволяли ей проявлять обе эти активности. В результате впервые была получена обратная транскриптаза с редактирующей активностью, что опровергло принципиальную невозможность их совмещения. Для природных обратных транскриптаз это не характерно.

При помощи склонной к ошибкам ПЦР за два раунда было получено множество вариантов гена Taq-полимеразы, проявляющих ферментативную активность. Из них были отобраны два – M1 и M2 (несущие по отношению к исходному гену по 6 мутаций, а M2 ещё одну дополнительную), которые характеризовались повышенной ревертазной активностью по сравнению с ферментом дикого типа

[Sauter, Marx, 2006]. Впоследствии Taq M1-полимераза использовалась ими при детекции опасного хантавируса с трехсегментным РНК-геномом серотипа Dobrava [Kranaster et al., 2010]. В дальнейшем эти авторы с помощью ДНК-шаффлинга получили ряд новых вариантов, превосходящих по ревертазной активности созданные мутантные формы Taq-полимеразы M1 и M747K в 20 и 100 раз соответственно, изучив также их третичные организации рентгеноструктурным анализом [Blatter et al., 2013]. Позже ими был создан еще один мутант KlenTaq-полимеразы, пригодный для обратной-транскрипционной ПЦР [Raghunathan, Marx, 2019]. Работа над усовершенствованием ревертазной активности Taq-полимеразы была продолжена, и коллектив под руководством A.Marx недавно создал ряд ферментов - Taq pol V2, Taq pol V2 IL и Taq pol V3, отличающихся от Taq-полимеразы дикого типа всего 3–4 аминокислотными остатками, но при этом способных с помощью своих ревертазных активностей детектировать 100 копий (первые два мутанта) и всего 20 копий (polV3) коронавируса SARS-CoV-2 [Huber et al., 2025].

Другими авторами было обнаружено, что единичная замена аспарагиновой кислоты на аспарагин в 732 положении Taq-полимеразы приводит к возникновению у фермента ревертазной и цепь-вытесняющей активностей [Barnes et al., 2021].

В результате замены в Tgo-полимеразе из археи *Thermococcus gorgonarius* домена 'Finger' аналогичным участком из эукариотической ДНК-полимеразы ξ из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* была создана серия химерных ферментов, из которых наибольшую ревертазную активность показал вариант Z3-Tgo-Pol. Причем слияние с ДНК-связывающим белком Sso7d из археи *Sulfolobus solfataricus* увеличило его процессивность [Jozwiakowski, Connolly, 2011].

В K4PolII-полимеразе из эубактерии *Thermotoga petrophila* штамма K4, обладающей 3'→5'-экзонуклеазной редактирующей активностью, в кодирующем её домене были проведены замены девяти аминокислот (как по отдельности, так и парами), что привело к возникновению ревертазной активности у вариантов T326A, L329A и Q384A [Sano et al., 2012; Yasukawa et al., 2012]. При этом данная экзонуклеазная активность резко снизилась, сохранившись в большей степени у мутантной формы K4PolII_{L329A}.

Используя высокопроизводительный метод отбора мутантных форм был создан химерный фермент RTX (Reverse Transcriptase Xenopolymerase), имеющий обе эти активности [Ellefson et al., 2016]. В его основу положена KOD-полимераза из археи *Thermococcus kodakarensis*, которую с помощью

искусственной эволюции за 18 раундов превратили в фермент с 37 мутациями, способный по матрице РНК строить цепь ДНК длиной до 500 нуклеотидов, но потерявший при этом редактирующую активность (названный как RTX_{exo}-) и совершающий схожее с обратной транскриптазой MMLV число ошибок. Тем не менее, введение ряда дополнительных мутаций позволило совместить в RTX-полимеразе ревертазную и редактирующую активности, и повысить точность копирования в 3–10 раз. Впоследствии эти авторы смогли закристаллизовать RTX-полимеразу и установить её третичную структуру, что позволило связать введённые мутации с использованием данным ферментом молекул РНК в качестве матриц [Choi et al., 2020].

При исследовании вирусного метагенома из горячего (93 °C) источника в Йеллоустонском национальном парке была обнаружена термостабильная ДНК-полимераза, получившая обозначение 3173 Pol, имеющая время полужизни при 94 °C около 11 мин и обладающая редактирующей 3'→5'-экзонуклеазной активностью [Moser et al., 2012]. Проведенный мутагенез экзонуклеазного домена (D49A) привел к исчезновению этой активности и возникновению ревертазной активности, благодаря чему данный фермент вошел в состав специального набора PyroScript® RT-PCR (Lucigen, США) и был использован в той работе для детекции молекул РНК разного происхождения и размера. Впоследствии этими авторами был создан химерный фермент на основе 3173 PyroPhage-полимеразы и 5'→3'-экзонуклеазного домена Taq-полимеразы [Heller et al., 2019].

Гигантская работа по улучшению Taq-полимеразы в плане придания ей более эффективной ревертазной активности с применением искусственного интеллекта проделана сибирскими специалистами с привлечением их московских коллег [Tomilova et al., 2024]. Проведенный *in silico* анализ более 18 млн комбинаций потенциальных мутаций в гене Taq-полимеразы позволил для проведения лабораторных («мокрых») экспериментов остановиться на 16 топовых кандидатах. В итоге после проведенного сайт-направленного мутагенеза из 46 вариантов было отобрано для тестирования 18 вариантов фермента с ревертазной активностью и при этом не показывающих ухудшения других характеристик нативной Taq-полимеразы. Из них восемь имели увеличенную ревертазную активность, а шесть проявляли её в ещё большей степени. При этом данные мутанты Taq-полимеразы были способны включать в строящуюся цепь ДНК модифицированные LNA нуклеотиды, что имеет важное значение для целого ряда приложений.

Недавно другими московскими авторами проведен сравнительный анализ как по конечной точке, так и в реальном времени ревертазных активностей у генно-инженерных ферментов: ReverHotTaq-полимеразы (Bioron GmbH, Германия), RevTaq-полимеразы (myPOLS Biotec GmbH, Германия), OmniTaq2-полимеразы (DNA Polymerase Technology, Inc., США) в сравнении с набором OneTaq One-Step RT-PCR Kit (New England Biolabs, Inc., США) [Smirnova et al., 2025]. Мишенями служили участки мРНК микроглобулина человека размерами 105, 203 и 317 нуклеотидов. Было обнаружено, что наиболее крупный ампликон генно-инженерными полимеразами нарабатывался заметно хуже, чем специализированным набором с обратной транскриптазой MMLV. Было также показано, что все эти ДНК-полимеразы пригодны для детекции коронавируса SARS-CoV-2.

Хотя во Введении мы упомянули, что оставим практически без внимания мутантные формы ДНК-полимераз, способные использовать в качестве субстрата НТФ и ставшие, по сути, ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, но всё-таки их придётся здесь упомянуть. При помощи особой эмульсионной ПЦР Taq-полимераза, где это оказывалось возможным, амплифицировала свой собственный ген. В результате были получены два фермента, способные встраивать в строящуюся цепь как дНТФ, так и НТФ, и формировать в ходе ПЦР в одной цепи химерные ДНК/РНК последовательности [Ong et al., 2006]. Протекание подобной ПЦР означает, что эти ферменты в составе единой белковой молекулы обладают сразу несколькими разными активностями, являясь одновременно ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами, ДНК-зависимыми РНК-полимеразами и РНК-зависимыми ДНК-полимеразами.

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.

Заключение

Детекция молекул РНК с помощью ПЦР крайне важна во многих случаях. Это и определение транскрипционной активности различных генов, и обнаружение инфекционных агентов с РНК-геномом, включая новый коронавирус SARS-CoV2, справиться с пандемией которого в значительной степени помогла диагностика в виде обратной транскрипционной ПЦР. Однако считать, что все методические вопросы ОТ-ПЦР уже решены, будет неправильным. Так, нативные РНК-зависимые ДНК-

полимеразы вирусного происхождения, в целом удовлетворяя запросам экспериментаторов, характеризуются низким температурным оптимумом ферментативного действия, накладывающим определенные ограничения при получении ДНК-копий GC-богатых участков из-за возможного возникновения прочных вторичных структур, мешающих построению цепи ДНК. Использование вместо них нативных термостабильных ДНК-полимераз данную проблему решает, но они, будучи изначально ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами, используют молекулы РНК в качестве матриц не очень охотно. Мутантные формы термостабильных ДНК-полимераз до некоторой степени улучшают этап преобразования цепей РНК в кДНК, но предстоит дальнейшая работа по их совершенствованию. При этом параллельно проводятся генно-инженерные модификация вирусных обратных транскриптаз с целью повышения их термостабильности, но это тема другой статьи.

Литература

1. Гребенникова Т.В., Глухов А.И., Чистякова Л.Г. и др. Использование термостабильной ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus* КТП в совмещенной реакции обратной транскрипции и амплификации для детекции РНК интерлейкина 2а и определение экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости. *Молек. Биол.* 1995. 29(4). 930-931.
2. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* YТ1. *Биохимия.* 1980. 45(4). 644-651.
3. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus flavus*. *Биохимия.* 1981. 46(9). 1576-1581.
4. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus ruber*. *Биохимия.* 1982. 47(11). 1785-1791.
5. Auer T, Sninsky JJ, Gelfand DH et al. Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(24). 5021-5025. doi: 10.1093/nar/24.24.5021
6. Barnes WM, Zhang Z, Kermekchiev MB. A Single Amino Acid Change to Taq DNA Polymerase Enables Faster PCR, Reverse Transcription and Strand-Displacement. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. 8. 553474. doi: 10.3389/fbioe.2020.553474
7. Bellofatto V, Cross GA. Characterization of RNA transcripts from the alpha tubulin gene cluster of

- Leptomonas seymouri*. *Nucleic Acids Res.* 1988 Apr 25;16(8):3455-69. doi: 10.1093/nar/16.8.3455
8. Bhadra S, Maranhao AC, Paik I, Ellington AD. One-Enzyme Reverse Transcription qPCR Using Taq DNA Polymerase. *Biochemistry.* 2020. 59(49). 4638-4645. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00778
 9. Blatter N, Bergen K, Nolte O et al. Structure and function of an RNA-reading thermostable DNA polymerase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013. 52(45). 11935-11939. doi: 10.1002/anie.201306655
 10. Byrne BC, Li JJ, Sninsky J et al. Detection of HIV-1 RNA sequences by *in vitro* DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16(9). 4165. doi: 10.1093/nar/16.9.4165
 11. Cai D, Behrmann O, Hufert F et al. Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. *PLoS One.* 2018. 13(1). e0190041. doi: 10.1371/journal.pone.0190041
 12. Chang H. *In situ* transcription with Tth DNA polymerase and fluorescent nucleotides. *J Immunol Methods.* 1994. 176(2). 235-243. doi: 10.1016/0022-1759(94)90317-4
 13. Choi WS, He P, Pothukuchy A et al. How a B family DNA polymerase has been evolved to copy RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020. 117(35). 21274-21280. doi: 10.1073/pnas.2009415117
 14. Cozens C, Pinheiro VB, Vaisman A et al. A short adaptive path from DNA to RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012. 109(21). 8067-8072. doi: 10.1073/pnas.1120964109
 15. Cusi MG, Valassina M, Valensin PE. Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden. *Biotechniques.* 1994. 17(6). 1034-1036.
 16. Ellefson JW, Gollihar J, Shroff R et al. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science.* 2016. 352(6293). 1590-1593. doi: 10.1126/science.aaf5409
 17. Goblet C, Prost E, Whalen RG. One-step amplification of transcripts in total RNA using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17(5). 2144. doi: 10.1093/nar/17.5.2144
 18. Grabko VI, Chistyakova LG, Lyapustin VN et al. Reverse transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by Taq DNA polymerase. *FEBS Lett.* 1996. 387(2-3). 189-192. doi: 10.1016/0014-5793(96)00491-7
 19. Harbarth P, Vosberg HP. Enzymatic amplification of myosin heavy-chain mRNA sequences *in vitro*. *DNA.* 1988. 7(4). 297-306. doi: 10.1089/dna.1988.7.297
 20. Heller RC, Chung S, Crissy K et al. Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2019. 47(7). 3619-3630. doi: 10.1093/nar/gkz104
 21. Huber LB, Marchand V, Somtürk M et al. Engineering of novel DNA polymerase variants for single enzyme quantitative multiplex reverse transcription-PCR. *Sci Rep.* 2025. 15(1). 26147. doi: 10.1038/s41598-025-10211-x
 22. Jones MD, Foulkes NS. Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17(20). 8387-8388. doi: 10.1093/nar/17.20.8387
 23. Jozwiakowski SK, Connolly BA. A modified family-B archaeal DNA polymerase with reverse transcriptase activity. *Chembiochem.* 2011. 12(1). 35-37. doi: 10.1002/cbic.201000640
 24. 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
 25. Kranaster R, Drum M, Engel N et al. One-step RNA pathogen detection with reverse transcriptase activity of a mutated thermostable *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biotechnol J.* 2010. 5(2). 224-231. doi: 10.1002/biot.200900200
 26. Moser MJ, DiFrancesco RA, Gowda K et al. Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme. *PLoS One.* 2012. 7(6). e38371. doi: 10.1371/journal.pone.0038371
 27. 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
 28. Okano H, Baba M, Kawato K, Hidese R et al. High sensitive RNA detection by one-step RT-PCR using the genetically engineered variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity from hyperthermophilies. *J Biosci Bioeng.* 2018. 125(3). 275-281. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.004
 29. Okano H, Katano Y, Baba M et al. Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase. *Enzyme Microb Technol.* 2017. 96. 111-120. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.003
 30. Ong JL, Loakes D, Jaroslowski S et al. Directed evolution of DNA polymerase, RNA polymerase and reverse transcriptase activity in a single polypeptide. *J Mol Biol.* 2006. 361(3). 537-550. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.050
 31. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell.* 1987. 50(6). 831-840. doi: 10.1016/0092-8674(87)90510-1
 32. Raghunathan G, Marx A. Identification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase variants with increased mismatch discrimination and reverse

- transcriptase activity from a smart enzyme mutant library. *Sci Rep.* 2019. 9(1). 590. doi: 10.1038/s41598-018-37233-y
33. Rüttimann C, Cotorás M, Zaldivar J et al. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur J Biochem.* 1985. 149(1). 41-46. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08890.x
34. 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
35. Sauter KB, Marx A. Evolving thermostable reverse transcriptase activity in a DNA polymerase scaffold. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006. 45(45). 7633-7635. doi: 10.1002/anie.200602772
36. Schönbrunner NJ, Fiss EH, Budker O et al. Chimeric thermostable DNA polymerases with reverse transcriptase and attenuated 3'-5' exonuclease activity. *Biochemistry.* 2006. 45(42). 12786-12795. doi: 10.1021/bi0609117
37. Shaffer AL, Wojnar W, Nelson W. Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1990. 190(2). 292-296. doi: 10.1016/0003-2697(90)90196-g
38. Shibata H, Tahira T, Hayashi K. RNA-primed PCR. *Genome Res.* 1995. 5(4). 400-403. doi: 10.1101/gr.5.4.400
39. Smirnova EV, Blagodatskikh KA, Barsova EV et al. Comparison of Commercially Available Thermostable DNA Polymerases with Reverse Transcriptase Activity in Coupled Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Methods Protoc.* 2025. 8(1). 11. doi: 10.3390/mps8010011
40. Tomilova YE, Russkikh NE, Yi IM, Shaburova EV, Tomilov VN, Pyrinova GB, Brezhneva SO, Tikhonyuk OS, Gololobova NS, Popichenko DV, Arkhipov MO et al. Enhancing the reverse transcriptase function in Taq polymerase via AI-driven multiparametric rational design. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024. 12. 1495267. doi: 10.3389/fbioe.2024.1495267
41. Tse WT, Forget BG. Reverse transcription and direct amplification of cellular RNA transcripts by Taq polymerase. *Gene.* 1990 Apr 16;88(2):293-6. doi: 10.1016/0378-1119(90)90047-u
42. 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.
43. Vichier-Guerre S, Ferris S, Auberger N et al. A population of thermostable reverse transcriptases evolved from *Thermus aquaticus* DNA polymerase I by phage display. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006. 45(37). 6133-6137. doi: 10.1002/anie.200601217
44. 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

References

- Auer T, Sninsky JJ, Gelfand DH et al. Selective amplification of RNA utilizing the nucleotide analog dITP and *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(24). 5021-5025. doi: 10.1093/nar/24.24.5021
- Barnes WM, Zhang Z, Kermekchiev MB. A Single Amino Acid Change to Taq DNA Polymerase Enables Faster PCR, Reverse Transcription and Strand-Displacement. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. 8. 553474. doi: 10.3389/fbioe.2020.553474
- Bellofatto V, Cross GA. Characterization of RNA transcripts from the alpha tubulin gene cluster of *Leptomonas seymouri*. *Nucleic Acids Res.* 1988 Apr 25;16(8):3455-69. doi: 10.1093/nar/16.8.3455
- Bhadra S, Maranhao AC, Paik I, Ellington AD. One-Enzyme Reverse Transcription qPCR Using Taq DNA Polymerase. *Biochemistry.* 2020. 59(49). 4638-4645. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00778
- Blatter N, Bergen K, Nolte O et al. Structure and function of an RNA-reading thermostable DNA polymerase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013. 52(45). 11935-11939. doi: 10.1002/anie.201306655
- Byrne BC, Li JJ, Sninsky J et al. Detection of HIV-1 RNA sequences by *in vitro* DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988. 16(9). 4165. doi: 10.1093/nar/16.9.4165
- Cai D, Behrmann O, Hufert F et al. Capacity of rTth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. *PLoS One.* 2018. 13(1). e0190041. doi: 10.1371/journal.pone.0190041
- Chang H. *In situ* transcription with Tth DNA polymerase and fluorescent nucleotides. *J Immunol Methods.* 1994. 176(2). 235-243. doi: 10.1016/0022-1759(94)90317-4
- Choi WS, He P, Pothukuchy A et al. How a B family DNA polymerase has been evolved to copy RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020. 117(35). 21274-21280. doi: 10.1073/pnas.2009415117
- Cozens C, Pinheiro VB, Vaisman A et al. A short adaptive path from DNA to RNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012. 109(21). 8067-8072. doi: 10.1073/pnas.1120964109
- Cusi MG, Valassina M, Valensin PE. Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden. *Biotechniques.* 1994. 17(6). 1034-1036.

12. Ellefson JW, Gollihar J, Shroff R et al. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science*. 2016. 352(6293). 1590-1593. doi: 10.1126/science.aaf5409
13. Goblet C, Prost E, Whalen RG. One-step amplification of transcripts in total RNA using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1989. 17(5). 2144. doi: 10.1093/nar/17.5.2144
14. Grabko VI, Chistyakova LG, Lyapustin VN et al. Reverse transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by Taq DNA polymerase. *FEBS Lett*. 1996. 387(2-3). 189-192. doi: 10.1016/0014-5793(96)00491-7
15. Grebennikova TV, Glukhov AI, Chistiakova LG et al. Use of thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* KTP in a combined reverse transcription and amplification reaction of detecting interleukin 2 α RNA and determining expression of the multidrug resistance gene (MDR-1). *Mol Biol (Mosk)*. 1995. 29(4). 930-941.
16. Harbarth P, Vosberg HP. Enzymatic amplification of myosin heavy-chain mRNA sequences in vitro. *DNA*. 1988. 7(4). 297-306. doi: 10.1089/dna.1988.7.297
17. Heller RC, Chung S, Crissy K et al. Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2019. 47(7). 3619-3630. doi: 10.1093/nar/gkz104
18. Huber LB, Marchand V, Somtürk M et al. Engineering of novel DNA polymerase variants for single enzyme quantitative multiplex reverse transcription-PCR. *Sci Rep*. 2025. 15(1). 26147. doi: 10.1038/s41598-025-10211-x
19. Jones MD, Foulkes NS. Reverse transcription of mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1989. 17(20). 8387-8388. doi: 10.1093/nar/17.20.8387
20. Jozwiakowski SK, Connolly BA. A modified family-B archaeal DNA polymerase with reverse transcriptase activity. *ChemBiochem*. 2011. 12(1). 35-37. doi: 10.1002/cbic.201000640
21. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT1. *Biochemistry (Moscow)*. 1980. 45(4). 644-651.
22. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus flavus*. *Biochemistry (Moscow)*. 1981. 46(9). 1576-1581.
23. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA-polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus ruber*. *Biochemistry (Moscow)*. 1982. 47(11). 1785-1791.
24. 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
25. Kranaster R, Drum M, Engel N et al. One-step RNA pathogen detection with reverse transcriptase activity of a mutated thermostable *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biotechnol J*. 2010. 5(2). 224-231. doi: 10.1002/biot.200900200
26. Moser MJ, DiFrancesco RA, Gowda K et al. Thermostable DNA polymerase from a viral metagenome is a potent RT-PCR enzyme. *PLoS One*. 2012. 7(6). e38371. doi: 10.1371/journal.pone.0038371
27. 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
28. Okano H, Baba M, Kawato K, Hidese R et al. High sensitive RNA detection by one-step RT-PCR using the genetically engineered variant of DNA polymerase with reverse transcriptase activity from hyperthermophiles. *J Biosci Bioeng*. 2018. 125(3). 275-281. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.004
29. Okano H, Katano Y, Baba M et al. Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase. *Enzyme Microb Technol*. 2017. 96. 111-120. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.10.003
30. Ong JL, Loakes D, Jaroslowski S et al. Directed evolution of DNA polymerase, RNA polymerase and reverse transcriptase activity in a single polypeptide. *J Mol Biol*. 2006. 361(3). 537-550. doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.050
31. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*. 1987. 50(6). 831-840. doi: 10.1016/0092-8674(87)90510-1
32. Raghunathan G, Marx A. Identification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase variants with increased mismatch discrimination and reverse transcriptase activity from a smart enzyme mutant library. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 590. doi: 10.1038/s41598-018-37233-y
33. Rüttimann C, Cotorás M, Zaldívar J et al. DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *Eur J Biochem*. 1985. 149(1). 41-46. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08890.x
34. 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
35. Sauter KB, Marx A. Evolving thermostable reverse transcriptase activity in a DNA polymerase

- scaffold. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006. 45(45). 7633-7635. doi: 10.1002/anie.200602772
36. Schönbrunner NJ, Fiss EH, Budker O et al. Chimeric thermostable DNA polymerases with reverse transcriptase and attenuated 3'-5' exonuclease activity. *Biochemistry.* 2006. 45(42). 12786-12795. doi: 10.1021/bi0609117
37. Shaffer AL, Wojnar W, Nelson W. Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1990. 190(2). 292-296. doi: 10.1016/0003-2697(90)90196-g
38. Shibata H, Tahira T, Hayashi K. RNA-primed PCR. *Genome Res.* 1995. 5(4). 400-403. doi: 10.1101/gr.5.4.400
39. Smirnova EV, Blagodatskikh KA, Barsova EV et al. Comparison of Commercially Available Thermostable DNA Polymerases with Reverse Transcriptase Activity in Coupled Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *Methods Protoc.* 2025. 8(1). 11. doi: 10.3390/mps8010011
40. Tomilova YE, Russkikh NE, Yi IM, Shaburova EV, Tomilov VN, Pyrinova GB, Brezhneva SO, Tikhonyuk OS, Gololobova NS, Popichenko DV, Arkhipov MO et al. Enhancing the reverse transcriptase function in Taq polymerase via AI-driven multiparametric rational design. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024. 12. 1495267. doi: 10.3389/fbioe.2024.1495267
41. Tse WT, Forget BG. Reverse transcription and direct amplification of cellular RNA transcripts by Taq polymerase. *Gene.* 1990 Apr 16;88(2):293-6. doi: 10.1016/0378-1119(90)90047-u
42. 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.
43. Vichier-Guerre S, Ferris S, Auburger N et al. A population of thermostable reverse transcriptases evolved from *Thermus aquaticus* DNA polymerase I by phage display. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006. 45(37). 6133-6137. doi: 10.1002/anie.200601217
44. 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