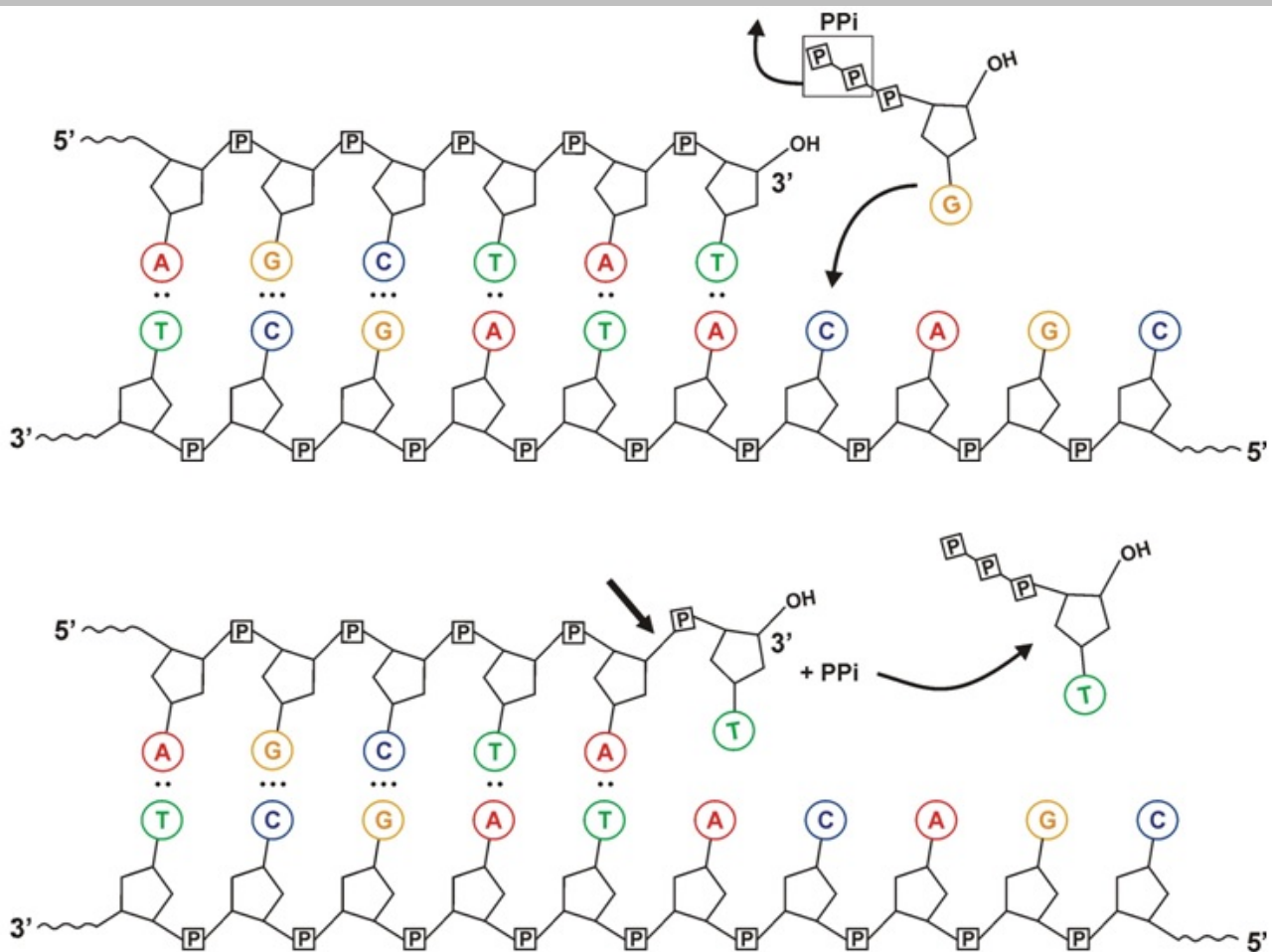


Электронный сетевой рецензируемый журнал Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук



**Самый главный фермент нуклеинового обмена:**

**Стр. 115 – 119; 120 – 129; 130 – 135; 136 – 150; 151 – 167; 168 – 177.**

**The most important enzyme of nucleic metabolism:**

**Pages 115 – 119; 120 – 129; 130 – 135; 136 – 150; 151 – 167; 168 – 177.**

Институт биохимии и генетики  
Уфимского федерального  
исследовательского центра  
Российской академии наук

ISSN 2221-6197  
DOI: 10/31301.2221-6197.bmcs

ЭЛЕКТРОННЫЙ  
НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в 2011 г.  
Выходит 4 раза в год

**Редакция**  
Хуснутдинова Э.К.  
*главный редактор*

Вершинина З.Р.  
*Ответственный секретарь*

Матниязов Р.Т.  
*технический редактор*

Адрес издателя и редакции:  
Россия, 450054, Уфа,  
пр. Октября, д. 71

Учредитель: Федеральное  
государственное бюджетное  
научное учреждение  
Уфимский федеральный  
исследовательский центр  
Российской академии наук

© УФИЦ РАН, 2025  
© Редколлегия, 2025  
© Авторы, 2025

**e-mail:**  
[biomicsufa@gmail.com](mailto:biomicsufa@gmail.com)

**www:**  
<https://biomicsj.ru>

### Главный редактор

Хуснутдинова Э.К. доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАО,  
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская  
Федерация

### Редакционная коллегия

Кудоярова Г.Р. зам. главного редактора, доктор биологических наук, профессор,  
Уфимский институт биологии УФИЦ РАН, Уфа, Российская  
Федерация

Чемерис А.В. зам. главного редактора, доктор биологических наук, профессор,  
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская  
Федерация

Вершинина З.Р. ответственный секретарь, кандидат биологических наук,  
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская  
Федерация

Баймиев Ал.Х. доктор биологических наук, доцент, Институт биохимии и  
генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Баймиев Ан.Х. доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики  
УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Белимов А.А. доктор биологических наук, Всероссийский научно-  
исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Боронникова С.В. доктор биологических наук, профессор, Пермский  
государственный национально-исследовательский университет,  
Пермь, Российская Федерация

Гарафутдинов Р.Р. доктор химических наук, кандидат биологических наук, Институт  
биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Глотов А.С. доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отга,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация

Гоголев Ю.В. доктор биологических наук, профессор, Федеральный  
исследовательский центр «Казанский научный центр Российской  
академии наук», Казань, Российская Федерация

Гусев О.А. PhD, Juntendo University, Япония

Карунас А.С. Кандидат медицинских наук, доктор биологических наук,  
профессор РАО, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,  
Уфа, Российская Федерация

Корытина Г.Ф. доктор биологических наук, доцент, Институт биохимии и  
генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Кулуев Б.Р. доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики  
УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Ласточкина О.В. кандидат биологических наук, Институт биохимии и генетики  
УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Макеев В.Ю. доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН,  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва,  
Российская Федерация

Максимов И.В. доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии и  
генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Салтыкова Е.С. доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики  
УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Топунов А.Ф. доктор биологических наук, профессор, Федеральный  
исследовательский центр "Фундаментальные основы  
биотехнологии" РАН, Москва, Российская Федерация

Янковский Н.К. доктор биологических наук, академик РАН, Институт общей  
генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Российская Федерация

Яруллина Л.Г. доктор биологических наук, профессор, Институт биохимии и  
генетики УФИЦ РАН, Уфа, Российская Федерация

Мирза Хасануззаман Профессор, Сельскохозяйственный университет Шер-э-Бангла,  
Дакка, Бангладеш

Institute of Biochemistry and Genetics,  
Ufa Federal Research Center,  
Russian Academy of Sciences

ISSN 2221-6197  
DOI: 10/31301.2221-6197.bmcs

ELECTRONIC  
SCIENTIFIC JOURNAL

First published in 2011  
Published 4 times a year

**Editorial Board**  
**Khusnutdinova E.K.**  
*Editor-in-chief*

Vershinina Z.R.  
*Executive secretary*

Matniyazov R.T.  
*Technical editor*

Publisher and editorial  
office address:  
450054, Ufa, Oktyabrya  
Prospect, 71

Founder: Ufa Federal Research  
Centre of the Russian  
Academy of Sciences

© UFRC of RAS, 2025  
© Editorial board, 2025  
© The Authors, 2025

**e-mail:**  
[biomicsufa@gmail.com](mailto:biomicsufa@gmail.com)

**www:**  
<https://biomicsj.ru>

## Editor-in-chief

E.K. Khusnutdinova Sci. D. (Biology), Professor, Corresponding Member of RAE, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

## Editorial Board

Kudoyarova G.R. *deputy editor-in-chief*, Sci. D. (Biology), Professor, Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Chemeris A.V. *deputy editor-in-chief*, Sci. D. (Biology), Professor, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Vershinina Z.R. *Executive secretary*, PhD (Biology), Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Baymiev Al.Kh. Sci. D. (Biology), Docent, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Baymiev An.Kh. Sci. D. (Biology), Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Belimov A.A. Sci. D. (Biology), All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology, St.-Petersburg, Russian Federation

Boronnikova S.V. Sci. D. (Biology), Professor, Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

Garafutdinov R.R. Sci. D. (Chemistry), PhD (Biology), Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Glotov A.S. Sci. D. (Biology), D.O.Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St.-Petersburg, Russian Federation

Gogolev Yu.V. Sci. D. (Biology), Professor, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Kazan, Russian Federation

Gusev O.A. PhD, Juntendo University, Япония

Karunas A.S. PhD (Medicine), Sci. D. (Biology), Professor of RAE, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Korytina G.F. Sci. D. (Biology), Docent, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Kuluev B.R. Sci. D. (Biology), Docent, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Lastochkina O.V. PhD (Biology), Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Makeev V.J. Sci. D. (Physics & Mathematics), Corresponding Member of RAS, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Maksimov I.V. Sci. D. (Biology), Professor, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Saltykova E.S. Sci. D. (Biology), Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Topunov A.F. Sci. D. (Biology), Professor, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Yankovsky N.K. Sci. D. (Biology), Academician of RAS, Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Yarullina L.G. Sci. D. (Biology), Professor, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Mirza Hasanuzzaman Professor, Sher-e-Bangla Agricultural University, Dacca, Bangladesh





## Самый главный фермент нуклеинового обмена (редакторская статья)

Э.К. Хуснутдинова

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, 450054, Уфа, пр. Октября, 71  
E-mail: [elzakh@mail.ru](mailto:elzakh@mail.ru)

### Резюме

Если считать ДНК самой главной молекулой среди биополимеров, то ДНК полимеразы, вне всякого сомнения, является самым главным ферментом нуклеинового обмена. Причем не только в живой Природе, обеспечивая продолжение Жизни, но и в экспериментальных исследованиях в системах *in vitro* в области физико-химической биологии и в смежных дисциплинах, в которых, так или иначе, оказываются задействованы молекулы ДНК, включая амплификацию их специфичных участков, что находит широкое применение в различной диагностике. При этом для этих целей требуются термостабильные ферменты, выдерживающие длительный нагрев при 95°C. Подобных ферментов из термофильных эубактерий и архей выделено немало. Первым обнаруженным в *E.coli* ферментом 70 лет назад стала ДНК полимеразы I. Спустя 20 лет (50 лет назад) был выделен фермент Таq полимеразы из термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*. 35 лет назад была выделена более термостабильная Pfu полимеразы из археи *Pfycoccus furiosus*. В данном номере электронного журнала Biomics, выходящем в юбилейный для него пятнадцатый год, содержатся несколько статей, посвященных ДНК полимеразам, что делает данный номер журнала по сути тематическим. Также не обойден вниманием химический синтез олигонуклеотидов, без которого проведение ПЦР просто невозможно.

**Ключевые слова:** ДНК, ДНК полимеразы, термостабильная ДНК полимеразы, ПЦР, химический синтез олигонуклеотидов

**Цитирование:** Хуснутдинова Э.К. Самый главный фермент нуклеинового обмена. (Редакторская статья). *Biomics*. 2026. 18(2). 115-119. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-8

© Автор, Э.К. Хуснутдинова, 2026

## The most important enzyme of nucleic metabolism (Editorial)

E.K. Khusnutdinova

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation  
E-mail: [elzakh@mail.ru](mailto:elzakh@mail.ru)

### Resume

If DNA is considered the most important molecule among biopolymers, then DNA polymerase is undoubtedly the most important enzyme of nucleic metabolism. Moreover, not only in wildlife, ensuring the continuation of Life, but also in experimental studies in the *in vitro* system in the field of molecular biology and in related disciplines, in which, one

way or another, DNA molecules are involved, including amplification of their specific sites, which is widely used in various diagnostics. At the same time, for these purposes, thermostable enzymes are required that can withstand prolonged heating at 95°C. Many similar enzymes have been isolated from thermophilic eubacteria and archaea. The first enzyme discovered in *E.coli* 70 years ago was DNA polymerase I. 20 years later (50 years ago), the enzyme Taq polymerase was isolated from the thermophilic eubacterium *Thermus aquaticus*. 35 years ago, a more thermostable Pfu polymerase was isolated from the archaea *Pyrococcus furiosus*. This issue of the electronic journal *Biomics*, published for him in the fifteenth anniversary year, contains several articles on DNA polymerases, which makes this issue of the journal essentially thematic. Also, the chemical synthesis of oligonucleotides is not ignored, without which PCR is simply impossible.

**Keywords:** DNA, DNA polymerase, thermostable DNA polymerase, PCR, chemical synthesis of oligonucleotides

**Citation:** Khusnutdinova E.K. The most important enzyme of nucleic metabolism. (Editorial). *Biomics*. 2026. 18(2). 115-119. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-8 (In Russian)

© The Author, E.K. Khusnutdinova, 2026

На 2026 г. приходится много юбилейных дат, связанных с физико-химической биологией, пройти мимо части которых мы не смогли. Начнем издавала. Поначалу мир на нашей Планете был РНКовым и не существовало никаких ферментов в нынешнем понимании, что это должны быть белковые молекулы, поскольку тогда были так называемые рибозимы, выполняющие над цепочками РНК не самые сложные каталитические операции и, как ни странно, сохранившиеся до сего дня<sup>1</sup>. Постепенно древняя примитивная Жизнь «налаживалась», и мир через какое-то время, сохранив такой важный тип молекул как РНК, в массе своей стал ДНКовым, имея в виду способ наследования и передачи генетической информации. Наряду с прочими биополимерами появились белки, перенявшие у рибозимов некоторые каталитические функции и развившие свои собственные, среди которых оказались такие ферменты как ДНК полимеразы, способные строить новые цепи, комплементарные исходным, обеспечивая их копирование. Можно смело утверждать, что сейчас ДНК полимеразы – это самые главные ферменты нуклеинового обмена. Точно также среди биополимеров самой главной молекулой можно считать ДНК. В целом, различный синтез нуклеиновых кислот, а также деструкцию этих биополимеров ведет (если учитывать их целевые предназначения) пара десятков типов разных ферментов. Что касается непосредственно ДНК полимераз, то их существует два вида – ДНК-зависимые ДНК полимеразы и РНК-зависимые ДНК полимеразы. Первые типичны для всего Живого, тогда как вторые присущи некоторым вирусам с РНК-геномами, в своем жизненном цикле

встраивающимися в геном хозяина в виде их ДНК-копии. К РНК-зависимым ДНК полимеразам относятся различные ретротранспозоны, а также теломеразы эукариотических организмов, но последние выполняют особую функцию, многократно копируя короткие мотивы теломерных концов хромосом, приводя в итоге к весьма большой длине этих участков, имеющих, впрочем, свойство укорачиваться при репликации в силу специфики работы ДНК полимераз, строящих цепи ДНК в 5'→3'-направлении. Причем ДНК полимеразы являются многофункциональными ферментами, и кроме полимеризующей активности некоторые несут разнонаправленные экзонуклеазные активности: 5'→3'-репарирующую активность и 3'→5'-редактирующую активность. Есть еще ДНК-зависимые РНК полимеразы и РНК-зависимые РНК полимеразы. Последние копируют РНК-вирусы, невстраивающиеся в ДНК хозяев, а первые опять-таки имеются у всего Живого и передают информацию от ДНК к РНК, что в том числе ведет к биосинтезу белков, включая ферменты и среди них те же самые разнообразные ДНК и РНК полимеразы.

ДНК полимеразы, копируя себе подобные молекулы, обеспечивают размножение различных организмов всех уровней генетической сложности, поддерживая тем самым современную Жизнь на нашей Планете. При этом ДНК полимеразы оказались по существу самыми главными ферментами также и при различных исследованиях нуклеиновых кислот в системах *in vitro*, проделывая с ними при копировании и амплификации разнообразные действия. Для этих целей основное применение нашли бактериальные и архейные ДНК полимеразы из А и В семейств этих ферментов, выделяемые как нативные ферменты из мезофильных, термофильных, гипертермофильных и даже психрофильных микроорганизмов, так и их рекомбинантные формы,

<sup>1</sup> причем в настоящее время с помощью генной инженерии превратившиеся даже в ряде случаев в дезоксирибозимы

создаваемые в результате генно-инженерных манипуляций. В данном номере журнала различным бактериальным и архейным ДНК полимеразам посвящена целая серия статей, что фактически делает этот выпуск журнала почти полностью тематическим. При этом в редакционном «портфеле» журнала *Biomics* находятся еще несколько статей по термостабильным ДНК полимеразам, проходящие в данный момент этап рецензирования, и с высокой вероятностью они будут опубликованы в очередных номерах.

Но все началось с открытия 70 лет назад весной 1956 г. фермента ДНК полимеразы I из мезофильной бактерии кишечной палочки *Escherichia coli*, называемой иногда ферментом Корнберга [Kornberg et al., 1956]. Спустя три года за это открытие А.Корнберг получил Нобелевскую премию, которую разделил с С.Очоа, получившим ее за открытие в 1955 г. фермента полинуклеотидфосфорилазы, которому вместе с открытым в 1960 г. F.Bollum терминальной нуклеотидилтрансферазой, или иначе ферментом Боллума, наш журнал посвятил отдельную статью в декабрьском номере 2025 г. [Гарафутдинов и др., 2025].

С момента обнаружения Корнбергом первой ДНК полимеразы на протяжении многих лет продолжались активные исследования этого фермента, но его структурно-функциональная организация была выяснена только через четверть века после молекулярного клонирования гена данной ДНК полимеразы в той же *E.coli* и его секвенирования [Joyce et al., 1982]. Чуть позже удалось создать генно-инженерную конструкцию для продукции данной ДНК полимеразы, но при этом несколько укороченной и названной Кленовским фрагментом ДНК полимеразы I, лишенной 5'→3'-экзонуклеазной активности [Joyce, Grindley, 1983]. Именно Кленовский фрагмент нашел применение в первых громоздких вариантах ПЦР [Saiki et al., 1985], требовавших добавления новых порций фермента в каждом цикле из-за невыдерживания им высокой температуры на этапе денатурации исходных цепей ДНК, а также нарабатываемых ампликонов. При этом удивительным можно считать то, что прошло несколько лет, прежде чем в ПЦР стала использоваться термостабильная ДНК полимеразы, выделяемая из термофильной зубактерии *Thermus aquaticus* [Kogan et al., 1987; Saiki et al., 1988]. Получается, что молекулярные биологи не знали, что такой фермент уже давно был известен микробиологам, но те в свою очередь не знали, что можно с ним делать. Так, 50 лет назад в 1976 г. была выделена и очищена термостабильная Taq полимеразы [Chien et al., 1976], но тогда дельного применения ей

не нашлось. Потребовалось более 10 лет, прежде чем Taq полимеразы заняла более чем достойное место в арсенале молекулярных биологов, а затем и экспериментаторов многих других смежных специальностей. Причем в этот десятилетний промежуток отечественными авторами в 1980-1982 гг. были опубликованы три статьи, описывающие выделение таких ДНК полимераз из той же *T.aquaticus* и родственных ей видов *T.flavus* и *T.ruber* [Каледин и др., 1980; 1981; 1982]. Однако термостабильность Taq полимеразы для некоторых задач недостаточна, и пришлось обратить внимание на гипертермофильные археи, живущие при 100°C и выше. В 1986 г. (40 лет назад) впервые была выделена ДНК полимеразы из термофильной археи *Methanobacterium thermoautotrophicum* [Klimczak et al., 1986], но термостабильность того фермента оказалась также невысокой, и применения в ПЦР он не нашел. Спустя пять лет (35 лет назад), в 1991 г. из другой археи *Pyrococcus furiosus* выделена Pfu полимеразы, обладающая сильной 5'→3'-экзонуклеазной редактирующей активностью, что обеспечивает намного более точное воспроизведение амплифицируемой ДНК в ПЦР, к тому же характеризующейся большей термостабильностью [Lundberg et al., 1991]. Поэтому данный фермент стал весьма популярен, все же заметно уступая по масштабу применения Taq полимеразе. После этого термостабильные ДНК полимеразы выделены из многих архей и зубактерий, часть которых находит применение в ПЦР.

Проведение ПЦР, помимо обязательного наличия в реакционной смеси анализируемых молекул нуклеиновых кислот, невозможно без требующей ионы магния термостабильной ДНК полимеразы, субстратом для которой служат дНТФ. Еще одним важным компонентом для ПЦР являются короткие олигонуклеотидные праймеры, синтезируемые сейчас химическим путем, которые, отжигаясь на целевых местах исследуемых матриц, обеспечивают специфичность амплификации. Химический синтез олигонуклеотидов (динуклеотидов) впервые был осуществлен в 1955 г. [Michelson, Todd, 1955]. С того момента прошло уже более 70 лет, и за это время проделан огромный путь, благодаря чему из очень длительной трудоемкой работы по синтезу олигонуклеотидов, которая была под силу только высококлассным химикам-синтетикам, теперь это превратилось в довольно рядовую<sup>2</sup> и относительно быструю процедуру автоматического синтеза олигонуклеотидов амидофосфитным методом, выполняемого на заказ

<sup>2</sup> здесь имеются ввиду обычные олигонуклеотиды, не несущие какие-либо модификации

многими фирмами, включая ООО «Синтол», сотрудники которого вместе с коллегами из Института биохимии и генетики УФИЦ РАН подготовили для данного номера журнала большую обзорную статью, затрагивающую как историю вопроса, так и перспективы развития химического синтеза олигонуклеотидов не только на твердой фазе, но и в растворе, а также его масштабированию, которое, вполне ожидаемо, потребуется уже в скором будущем.

Наконец, на 2026 г. приходится 15-летие издания электронного сетевого журнала *Biomics*, в более чем полусотне номеров которого за эти годы опубликованы около 450 обзорных и экспериментальных статей преимущественно в области физико-химической биологии, авторами которых стали свыше 500 специалистов как России, так ближнего и дальнего зарубежья. При этом в 47 статьях содержится слово «полимераза», и это не считая данного номера журнала, что также подтверждает важность этих ферментов, и непреходящий интерес к ним.

#### Литература

1. Гарифутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р. и др. Ферментативный синтез олигонуклеотидов. *Biomics*. 2025. 17(4). 337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
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. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*. 1976. 127(3). 1550-1557. doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
6. 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
7. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830

8. Joyce CM, Kelley WS, Grindley ND. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* polA gene and primary structure of DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 1982. 257(4). 1958-1964. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68132-9
9. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
10. Kornberg A, Lehman IR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Federation Proc*. 1956. 15(1). 291-292.
11. 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
12. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc*. 1955. (0). 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
14. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980

#### References

1. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol*. 1976. 127(3). 1550-1557. doi: 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976
2. Garafutdinov R.R., Nikonorov Yu.M., Sakhabutdinova A.R. et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Biomics*. 2025. 17(4). doi: P.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30 (In Russian)
3. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830
4. Joyce CM, Kelley WS, Grindley ND. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* polA gene and primary structure of DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 1982. 257(4). 1958-1964. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68132-9
5. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YТ1. *Biochemistry (Moscow)*. 1980. 45(4). 644-651. (In Russian)
6. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA polymerase from

- extremal thermophilic bacteria *Thermus flavus*. *Biochemistry (Moscow)*. 1981. 46(9). 1576-1581. (In Russian)
7. Kaledin AS, Slyusarenko AG, Gorodetskyj SI. Isolation and properties of DNA-polymerase from extremal thermophilic bacteria *Thermus ruber*. *Biochemistry (Moscow)*. 1982. 47(11). 1785-1791. (In Russian)
8. 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
9. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med.* 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
10. Kornberg A, Lehman IR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Federation Proc.* 1956. 15(1). 291-292.
11. 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
12. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* 1955. (0). 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
13. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
14. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980



## ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

<sup>1</sup>Р.Р. Гарафутдинов\*, <sup>1</sup>Ан.Х. Баймиев, <sup>1</sup>А.Р. Сахабутдинова,  
<sup>1</sup>Р.Т. Матниязов, <sup>1</sup>Б.Р. Кулуев, <sup>1</sup>Ал.Х. Баймиев, <sup>2</sup>В.В. Зубов

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, 450054, Уфа, пр. Октября, 71

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

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

### Резюме

ДНК-зависимые ДНК-полимеразы являются многофункциональными ферментами. Помимо своего основного предназначения – строить цепь ДНК, комплементарную матричной, они выступают как экзонуклеазы, разрушающие одну из цепей ДНК, характеризуясь разнонаправленными 3'→5'- и 5'→3'-активностями, за которые отвечают соответствующие домены этих крупных белков. При этом домены, отвечающие за экзонуклеазные активности, располагаются на N-конце белка, тогда как нуклеотидилтрансферазный домен расположен на С-конце. Подобная топология их организации практически одинакова для всех ферментов этой группы. Кроме того, некоторые ДНК-полимеразы вместо репарирующей активности обладают цепь-вытесняющей активностью, вытесняя встречающуюся им старую цепь ДНК. Показано также, что ДНК-полимеразы способны катализировать пирофосфоролиз. Обнаруженные у разных организмов ДНК-полимеразы формируют семь семейств, из которых в ПЦР находят применение термостабильные ферменты зубактерий из А-семейства и архейные из В-семейства. Архейные ДНК-полимеразы обладают редактирующей активностью, обеспечивая более высокую точность копирования при амплификации, тогда как некоторые генно-инженерные ДНК-полимеразы лишены обеих экзонуклеазных активностей.

**Ключевые слова:** ДНК-полимераза, семейства ДНК-полимераз, полимеразный домен, 5'→3'-экзонуклеазный домен, 3'→5'-экзонуклеазный домен, репарирующая активность, редактирующая активность, пирофосфоролиз

**Цитирование:** Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Сахабутдинова А.Р., Матниязов Р.Т., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Зубов В.В. ДНК-зависимые ДНК-полимеразы. *Biomics*. 2026. 18(1). 120-129. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-9

© **Авторы,** Р.Р. Гарафутдинов, Ан.Х. Баймиев, А.Р. Сахабутдинова, Р.Т. Матниязов, Б.Р. Кулуев, Ал.Х. Баймиев, В.В. Зубов, 2026

## DNA-dependent DNA polymerases

<sup>1</sup>R.R. Garafutdinov\*, <sup>1</sup>An.Kh. Baymiev, <sup>1</sup>A.R. Sakhabutdinova,  
<sup>1</sup>R.T. Matniyazov, <sup>1</sup>B.R. Kuluev, <sup>1</sup>Al.Kh. Baymiev, <sup>2</sup>V.V. Zubov

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS  
3 Institutskaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

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

### Resume

DNA-dependent DNA polymerases are multifunctional enzymes. In addition to their main purpose of building a new DNA chain complementary to the template, they act as exonucleases, characterized by multidirectional 3'→5'-editing and 5'→3'-repairing activities, for which the corresponding domains of this large protein are responsible. The domains responsible for exonuclease activities are located at the N-terminus of the protein, whereas the nucleotidyltransferase domain is located at the C-terminus and this topology of their organization is practically the same for all these enzymes. In addition, some DNA polymerases have strand-displacement activity instead of repairing activity. DNA polymerases are also capable to catalyze pyrophosphorolysis. The DNA polymerases found in different organisms form seven families, of which the thermostable enzymes of Eubacteria from the A family and archaeal enzymes from the B family are used in PCR. Archaeal DNA polymerases carry editing activity, providing higher fidelity during amplification. Some genetically engineered DNA polymerases lack exonuclease activities.

**Keywords:** DNA polymerase, family of DNA polymerases, polymerase domain, 5'→3'-exonuclease domain, 3'→5'-exonuclease domain, repairing activity, editing activity, pyrophosphorolysis

**Citation:** Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Sakhabutdinova A.R., Matniyazov R.T., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Zubov V.V. DNA-dependent DNA polymerases. *Biomiscs.* 2026. 18(1). 120-129. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-9 (In Russian)

© **The Authors**, R.R. Garafutdinov, An.Kh. Baymiev, A.R. Sakhabutdinova, R.T. Matniyazov, B.R. Kuluev, Al.Kh. Baymiev, V.V. Zubov, 2026

### Введение

Весной 2026 г. исполняется 70 лет с момента обнаружения во всех смыслах очень важного фермента – ДНК-полимеразы, представляющей собой сложную биологическую машину, выполняющую как химические, так и механические функции. Спустя всего несколько лет после открытия Дж.Уотсоном и Ф.Криком в 1953 г. структуры ДНК в виде двойной спирали в 1956 г. из мезофильной бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* был выделен называемый иногда полимеразой Корнберга фермент, отвечающий за синтез данного биополимера, что было опубликовано в виде тезисов в Federation Proceedings [Kornberg et al., 1956]. Вскоре автор той и соавтор нескольких других публикаций по этой теме [Bessman et al., 1956; 1958; Lehman et al., 1958] А.Корнберг получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1959 г. «за открытие механизмов биологического синтеза рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот». Неудивительно, что за этим последовало активное изучение данного фермента, но при этом потребовалось немало лет, чтобы стали ясны его структурно-функциональные особенности, что оказалось возможным только после молекулярного клонирования гена данной ДНК-полимеразы I *E. coli* в фаговом векторе в той же *E. coli* и его секвенирования [Joyce et al., 1982]. При этом нельзя не упомянуть об укороченном варианте этого фермента, который путем ограниченного энзиматического расщепления субтилизинном цельного фермента был получен еще в 1970 г. и назван по фамилии одного из авторов Кленовским фрагментом ДНК-полимеразы I *E. coli* [Klenow,

Overgaard-Hansen, 1970]. Но только в 1983 г. удалось создать генно-инженерную конструкцию для продукции этого укороченного фермента ДНК-полимеразы I в *E. coli* [Joyce, Grindley, 1983]. Позже рентгеновской дифракцией была установлена структура кодируемого им белка в комплексе с дезоксирибонуклеотидтрифосфатом [Ollis et al., 1985].

Акцентируем внимание на всех этих работах не случайно, поскольку они явились пионерными для последующих исследований различных ДНК-полимераз, но наибольший интерес для нас представляют бактериальные и архейные термостабильные ферменты, находящие применение в ПЦР. Но при этом нельзя обойти вниманием современную классификацию подразделяемых на семь семейств ДНК-полимераз, включая полимеразы эукариотических организмов и органелл.

Что касается РНК-зависимых ДНК-полимераз, формирующих отдельное семейство, то они заслуживают отдельной статьи. Здесь они упоминаются только вскользь, как и некоторые другие ферменты нуклеинового обмена, ведущие тот или иной синтез полинуклеотидных цепей.

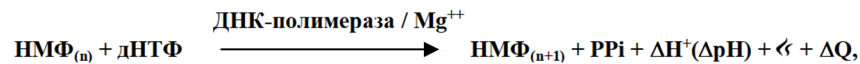
### Ферментативные активности ДНК-полимераз

ДНК-полимеразы разных организмов осуществляют матричный синтез (за единственным исключением<sup>1</sup>) в направлении 5'→3' по отношению к синтезируемой цепи. При этом, помимо основного продукта в виде растущей цепи ДНК, образуются побочные продукты, а также выделяется тепловая

<sup>1</sup> которого ниже коснемся специально

энергия. И в системе *in vitro* за счет увеличения количества отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты в составе данного биополимера изменяется импеданс реакционной смеси, что позволяет регистрировать эти меняющиеся значения

при по-нуклеотидном (пошаговом) построении цепи ДНК, например при секвенировании посредством синтеза с помощью разных технологий, что в виде некоей формулы приведено ниже.



где **PPi** обозначает пирофосфат;  $\Delta\text{H}^+(\Delta\text{pH})$  отражает изменение концентрации протонов в реакционной смеси, приводящее к сдвигу pH; символ  $\llcorner$  указывает на выделяющееся тепло при разрыве макроэргических связей в молекулах дНТФ;  $\Delta\text{Q}$  обозначает изменение импеданса сенсорной ячейки при удлинении цепи ДНК.

Однако эта формула справедлива только для нуклеотидилтрансферазной (полимеразной) активности ДНК-полимераз, схематично изображенной на рис. 1.

При этом данные ферменты обладают и другими активностями, показанными на рис. 2 - 6.

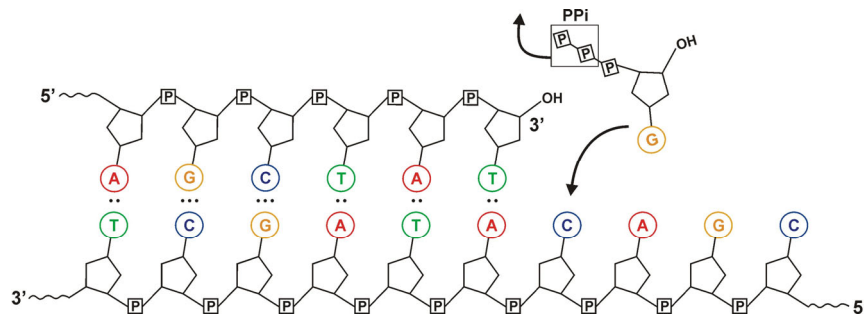


Рис. 1. Нуклеотидилтрансферазная (полимеразная) 5'→3'-активность ДНК-зависимых ДНК-полимераз.  
Fig. 1. Enzymatic activity of DNA-dependent DNA polymerases. Nucleotidyltransferase (polymerase) activity.

ДНК-полимеразы с разной степенью эффективности катализируют также обратную реакцию пирофосфоролитического отщепления уже встроенного дНМФ с образованием дНТФ, что изображено на рис. 2. При высокой концентрации пирофосфата в реакционной смеси эта реакция становится более заметной.

Описываемые ниже экзонуклеазные активности не являются полноценно реверсивными по отношению к нуклеотидилтрансферазной, поскольку при полимеризации в реакцию вовлекается дНТФ и происходит выделение PPi, а в результате экзонуклеазного расщепления выделяется дНМФ.

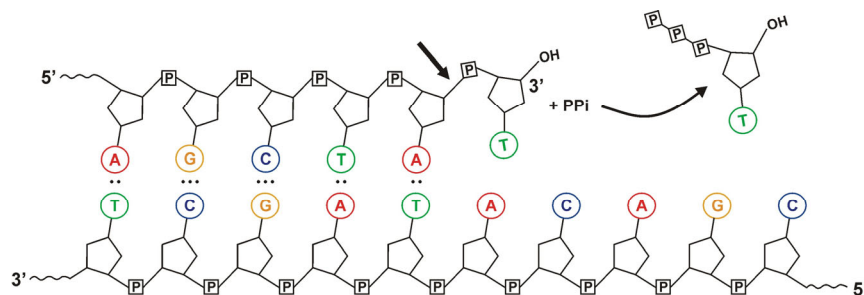


Рис. 2. Пирофосфоролитическая реакция, катализируемая ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами.  
Fig. 2. Pyrophosphorolysis catalyzed by DNA-dependent DNA polymerases.

## ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

ДНК-полимеразы, помимо своей основной активности (и реверсного пирофосфоролита) обладают еще различными экзонуклеазными активностями, разрушающими цепи ДНК. Так,  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазная активность разрушает цепь ДНК в данном направлении, но полимеризующая активность у этих ферментов в направлении  $5' \rightarrow 3'$  намного выше, поэтому при наличии в реакционной смеси дНТФ её проявление практически незаметно. Но если будут отсутствовать, например, все дНТФ кроме ТТФ, то фермент за счет данной экзонуклеазной активности будет удалять азотистые основания с  $3'$ -конца пока не дойдет до того места, против которого нужно

встраивать именно ТМФ, что как раз показано на рис. 3А. Причем такое действие ДНК-полимеразы часто используют для того, чтобы укоротить одну из цепей ДНК на нужное количество нуклеотидов. Эту  $3' \rightarrow 5'$  экзонуклеазную активность называют еще редактирующей, поскольку она отвечает за точность встраивания очередного нуклеотида. И если он оказывается некомплементарным, то будет удален, что видно из рис. 3В. Но каким образом ДНК-полимераза узнает в этом случае имеющее место неспаривание - отдельный вопрос, и здесь его касаться не будем.

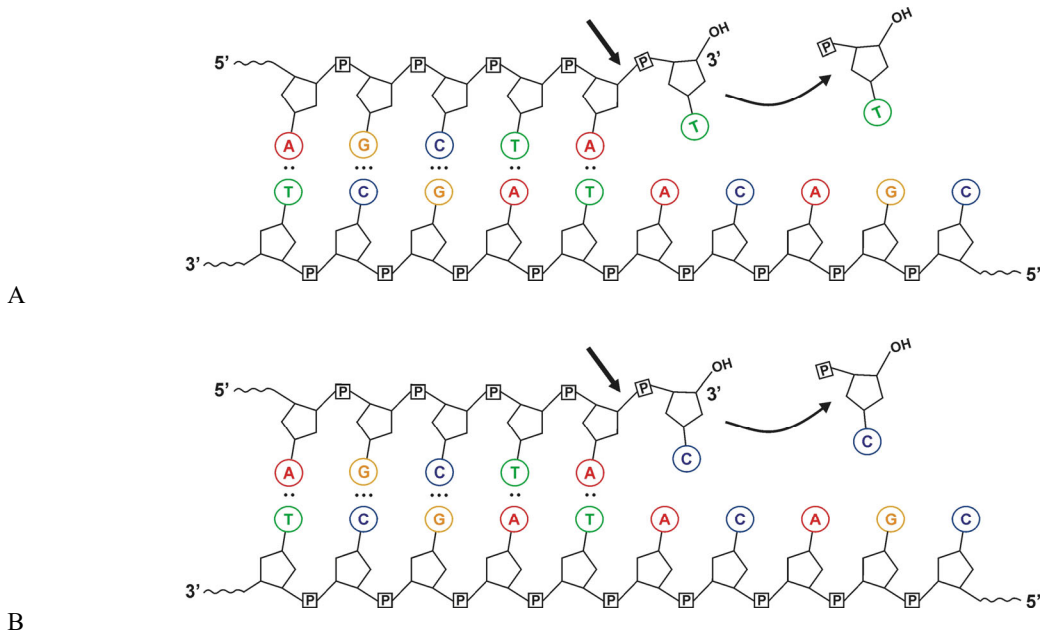


Рис. 3. А.  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность ДНК-зависимых ДНК-полимераз.  
 В. Редактирующая  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность  
 Fig. 3. A.  $3' \rightarrow 5'$ -exonuclease activity. B. Editing  $3' \rightarrow 5'$ -exonuclease activity

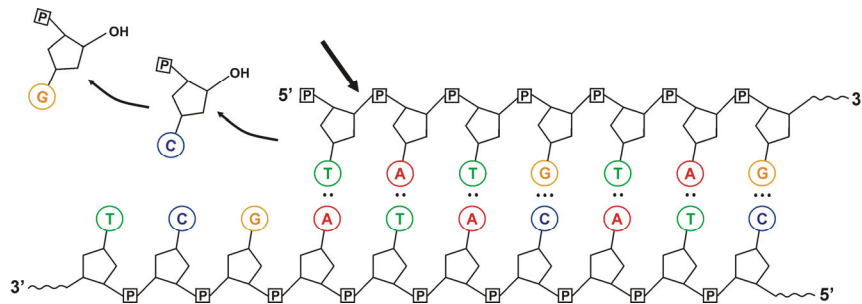


Рис. 4.  $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активность ДНК-зависимых ДНК-полимераз.  
 Fig. 4.  $5' \rightarrow 3'$ -exonuclease activity of DNA-dependent DNA polymerases.

## ДНК-зависимые ДНК-полимеразы

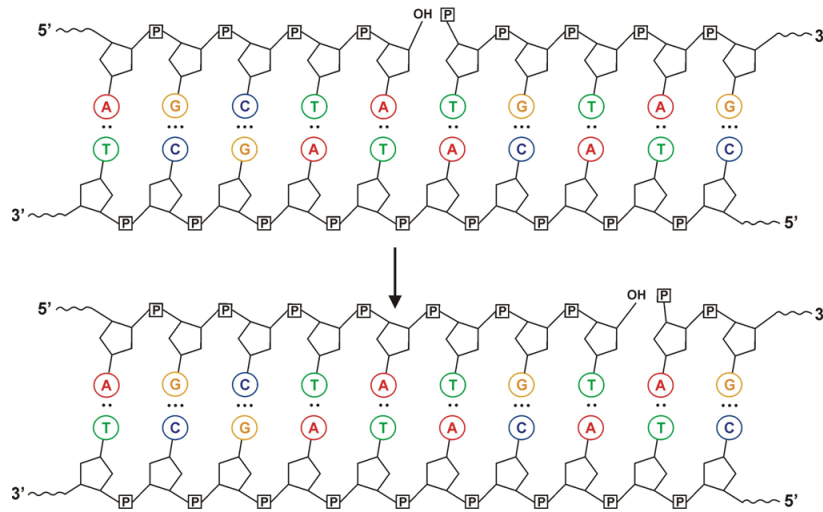


Рис. 5. Репарирующая 5'→3'-экзонуклеазная активность ДНК-зависимых ДНК-полимераз.  
Fig. 5. Repairing 5'→3'-exonuclease activity of DNA-dependent DNA polymerases.

У некоторых ДНК-полимераз имеется еще 5'→3'-экзонуклеазная активность, удаляющая дНМФ с 5'-конца дуплексной ДНК, что показано на рис. 4. При этом происходит некоторое смещение разрушаемой цепи ДНК и об этой способности ДНК-полимераз речь пойдет дальше. Изображенную на рис. 5 5'→3'-экзонуклеазную активность ДНК-полимераз также называют репарирующей. Она стартует с образованного тем или иным способом

(или возникшему по какой-то причине) «ника» в виде разрыва одной из цепей ДНК, приводя в результате построения новой цепи к смещению этого «ника», что изображено на рис. 4. Чтобы остановить такое движение ДНК-полимеразы требуется лигирование цепи ДНК ферментом ДНК-лигазой. Эта 5'→3'-экзонуклеазная репарирующая реакция идет также с выделением дНМФ.

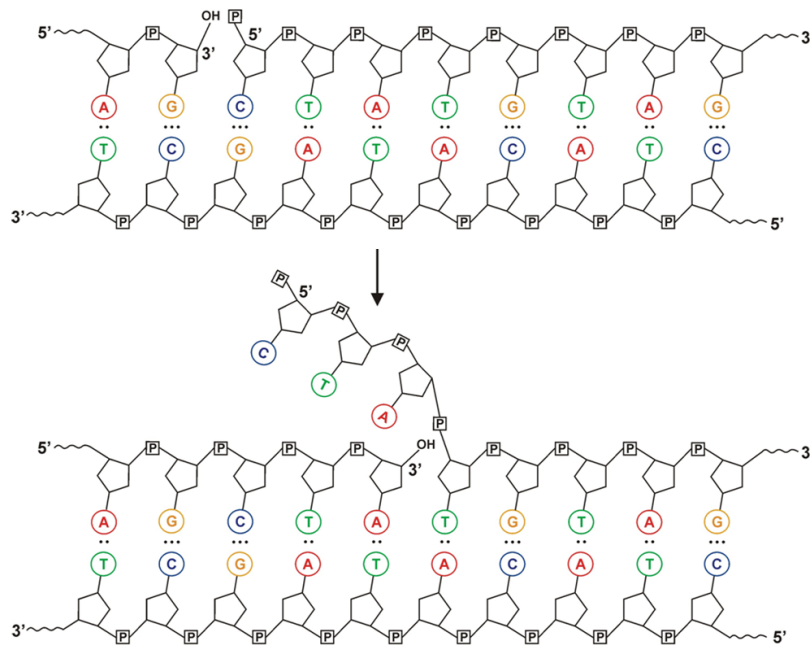


Рис. 6. Цепь-вытесняющая активность ДНК-зависимых ДНК-полимераз.  
Fig. 6. Enzymatic activity of DNA-dependent DNA polymerases. Strand-displacement activity.

Некоторые ДНК-полимеразы обладают цепь-вытесняющей активностью (рис. 6). Они при полимеризации вытесняют встречающуюся им на пути комплементарную матрицу цепь ДНК. Фактически эту способность ДНК-полимераз можно считать неким видоизменением репарирующей экзонуклеазной активности, когда происходит не деградация старой цепи ДНК, а ее вытеснение без каких-либо нарушений нуклеотидной последовательности.

**Классификация ДНК-полимераз**

По мере обнаружения новых ДНК-полимераз и секвенирования их генов на основе выведенных для данных ферментов аминокислотных последовательностей

создавались их различные классификации, которые потом дополнялись и совершенствовались [Delarue et al., 1990; Ito, Braithwaite, 1991; Braithwaite, Ito, 1993]. В настоящее время принято считать, что существует семь семейств ДНК-полимераз, происходящих из всех ветвей Жизни – прокариот, архей, эукариот, а также от различных вирусов и органелл [Case, Hingorani, 2017]. Весьма детально различные ДНК-полимеразы из всех семейств рассмотрены в недавней работе отечественных авторов [Kuznetsova et al., 2022], тогда как наше внимание будет уделено всего двум семействам – А и В, и в первую очередь - термостабильным ферментам, используемым в ПЦР.

Таблица 1

Семейства ДНК-полимераз разных групп организмов, включая вирусы  
Table 1. Families of DNA polymerases from different groups of organisms, including viruses

Домены Жизни Domains of Life	С е м е й с т в а / F a m i l i e s						
	A	B	C	D	X	Y	RT
Bacteria	I	II	III			IV V	
Archaea		B1 B3		D		Y	
Eukarya	γ θ	α δ ε ξ			Β σ λ μ TdT	η ι κ REV1	TERT
Virus*	T7	T4 phi29			ASFV		AMV MuMLV

\* - неклеточная форма Жизни

Цветом выделены группы бактериальных и архейных ДНК-полимераз двух семейств, отдельные представители из которых являются основными ферментами в ПЦР.

С учетом значимости для всего Живого процесса репликации генетического материала и связанных с этим неких дополнительных, в том числе репарационных, рекомбинационных и прочих функций, Природа позаботилась о широком разнообразии ДНК-полимераз. В одной кишечной палочке насчитывают пять таких ферментов, принадлежащих к четырем семействам. В эукариотических организмах, включая человека, найдено уже 15 различных ДНК-полимераз с отличающимися функциями и относящихся также к четырем семействам [Burgers et al., 2001; Jain et al., 2018]. Однако в молекулярно-биологических экспериментах, и в ПЦР в частности, почти исключительно используется лишь ДНК-полимеразы из двух семейств, а именно бактериальные (из семейства А) и архейные (из семейства В).

Из семейства RT при проведении обратнотранскрипционной ПЦР оказываются задействованы вирусные РНК-зависимые ДНК-полимеразы (обратные транскриптазы), но им, как уже говорилось выше, должна быть посвящена самостоятельная статья. К тому же эти ферменты носят для ПЦР вспомогательный характер в отличии, например, от нативной Tth-полимеразы, в определенных условиях способной вовлекать в ПЦР молекулы РНК без использования вирусных ферментов AMV или MMLV.

Находит некоторое применение в ПЦР и в ряде других молекулярно-биологических экспериментов

называемая иногда ферментом Боллума и выделенная изначально из тимуса телят терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) из X-семейства ДНК-полимераз, которой мы недавно посвятили обзорную статью [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025] в связи с 65-летием обнаружения этого фермента [Bollum, 1960], а также некоторого ренессанса TdT, нашедшей применение в ферментативном синтезе олигонуклеотидов, способном конкурировать (или дополнять) их химический синтез. Особенно перспективным такой подход может оказаться при синтезе протяженных олигонуклеотидов. При этом TdT является единственной ДНК-полимеразой, строящей новую цепь ДНК без использования матричной последовательности, отталкиваясь лишь от небольшой затравки, что делает ее абсолютно уникальным ферментом. Несколько удивительно, что Нобелевский комитет оставил без внимания открытие этого фермента, присудив Премии за открытие Корнбергом ДНК-полимеразы и С.Очоа полинуклеотидфосфорилазы, хотя нужно признать, что значимость TdT для живых эукариотических организмов тогда была абсолютно непонятной и оставалась таковой больше десятилетия. При этом сейчас у этого фермента намечается огромное будущее при его использовании в синтетической биологии.

Еще более уникальными следует считать РНК-полимеразы из суперсемейства Thg1/TLP, катализирующие рост цепи РНК в «обратном» направлении ( $3' \rightarrow 5'$ ), отличаясь тем самым от всех остальных ДНК/РНК полимераз. Недавно продемонстрирована полимеризация в системе *in vitro* с помощью двух таких ферментов из разных источников по матрице РНК, встраивающих до 19 нуклеотидов, что, как отмечено авторами, потенциально может иметь применение в молекулярной биологии [Jayasinghe et al., 2024]. При этом можно предполагать, что какие-либо произведенные в будущем мутации этого фермента придадут ему новые возможности. Вспомнили здесь про эти РНК-зависимые РНК-полимеразы с необычным  $3' \rightarrow 5'$  направлением синтеза с целью продемонстрировать общность происхождения практически всех ДНК/РНК полимераз, ведущих синтез в обоих направлениях, произошедших от некоей прото-полимеразы, о чем свидетельствует рассматриваемая ниже схожесть топологии этих ферментов.

#### Структурно-функциональная организация ДНК-полимераз

У всех подобных ферментов, ведущих полимеризацию полинуклеотидных цепей, нуклеотидилтрансферазный домен состоит из трех субдоменов: непосредственно «ладони» - Palm (P), четырех «пальцев» - Fingers (F) и «большого пальца» - Thumb (T). Каталитический центр фермента располагается на ладонной части P, а «пальцы» F и T,

сжимаясь, образуют некую полость (щель), через которую происходит транслокация молекулы ДНК во время синтеза. При этом Thg1/TLP РНК-полимеразы имеют такое же, но при этом зеркальное строение этой части своей белковой молекулы [Nakamura et al., 2013]. Это значит, что когда-то, в ходе еще додарвиновской химической эволюции биополимеров, произошла трансверсия участка ДНК, кодирующего каталитический домен данного фермента, и он оказался способен принимать субстрат и матрицу с затравкой с противоположной стороны. Хотя с учетом того, что поначалу мир на Планете был РНКовым, можно допустить, что полимеризация в «обратном» направлении ( $3' \rightarrow 5'$ ) является более архаичной, а её реверс произошёл позднее.

Эти знания структурно-функциональной организации ДНК-полимераз стали известными благодаря клонированию и секвенированию кодирующих их генов, а также благодаря рентгеноструктурному анализу закристаллизованных белков, в том числе с молекулами ДНК и различными субстратами. Но это требует отдельного рассмотрения, тогда как здесь ограничимся лишь изображением некоей условной ДНК-полимеразы в виде линейной последовательности, из которой будет видно расположение в данном белке ферментативных активностей. Необходимо отметить, что общая длина большинства ДНК полимераз с обеими экзонуклеазными активностями составляет немногим более 800 аминокислотных остатков.

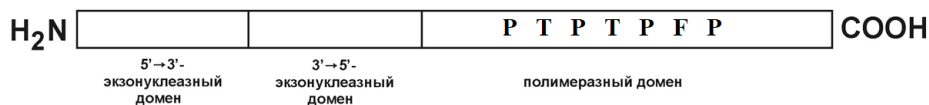


Рис. 7. Принципиальная схема локализации полимеразного и экзонуклеазных доменов в ДНК-зависимых ДНК-полимеразах. Масштаб приблизительный.

Fig. 7. Schematic diagram of localization of polymerase and exonuclease domains in DNA-dependent DNA polymerases. The scale is approximate.







Как можно видеть из рис. 7, у ДНК-полимераз экзонуклеазные активности располагаются на N-конце белка (с редкими исключениями порядка их локализации в белковой молекуле), а полимеразная активность расположена на C-конце белка, что, возможно, имеет определенный эволюционный смысл.

На рис. 1 - 6 изображены ферментативные активности, присущие различным ДНК-полимеразам, но без указания их принадлежности к тем или иным ферментам. Как уже говорилось выше, некоторые ДНК-полимеразы, помимо основного домена с нуклеотидилтрансферазной активностью, обладают одним или двумя экзонуклеазными функциональными доменами. А генно-инженерные ферменты бывают лишены обеих экзонуклеазных активностей, что

можно видеть из рис. 8, где они схематично изображены с использованием соответствующих символов. Там же приведены типовые для них ДНК-полимеразы из разных семейств этих ферментов, включая созданные искусственно.

Из рис. 8 видно, что ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, включая генно-инженерные, характеризуются большим разнообразием своих ферментативных действий<sup>2</sup>, и это находит применение при проведении различных молекулярно-биологических экспериментов.

<sup>2</sup> пирофосфоролиз здесь оставляем без внимания, хотя его можно даже рассматривать как некую альтернативу  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной редактирующей активности у ферментов, которые её лишены

ДНК-полимераза с 5'→3'- и 3'→5'-эксонуклеазными активностями		ДНК-полимераза I <i>E.coli</i> (A)
ДНК-полимераза с 3'→5'-эксонуклеазной активностью		KF (A), Pfu (B)
ДНК-полимераза с 5'→3'-эксонуклеазной активностью		Taq (A), Tth (A)
ДНК-полимераза без эксонуклеазных активностей		KF exo <sup>-</sup> (A), KlenTaq (A)
ДНК-полимераза с цепь-сдвигающей активностью		Bst 2.0 (A), Vent exo <sup>-</sup> (B)
ДНК-полимераза с цепь-сдвигающей активностью и 5'→3'-эксонуклеазной активностью		Bst (A), Vent (B), Phi29 (B)

KF – Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I *E.coli*

Pfu – ДНК-полимераза термофильной археи *Pyrococcus furiosus*

Taq – ДНК-полимераза термофильной эубактерии *Thermus aquaticus*

Tth – ДНК-полимераза термофильной эубактерии *T. thermophilus*

KlenTaq – генно-инженерная ДНК-полимераза *T.aquaticus*, лишённая 5'→3'-эксонуклеазной активности

Bst – ДНК-полимераза *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus*

Vent – ДНК-полимераза термофильной археи *Thermococcus litoralis*

Phi29 – ДНК-полимераза бактериофага φ29 *Bacillus subtilis*

Рис. 8. Типы различных ДНК-зависимых ДНК-полимераз, ведущих полимеризацию цепи ДНК в направлении 5'→3' и некоторые соответствующие им типовые ферменты. В скобках приведены семейства этих ДНК-полимераз. «Выемки» в «шаре-полимеразе» символизируют разные эксонуклеазные активности, а «выступ» - цепь-вытесняющую активность.

Fig. 8. Types of various DNA-dependent DNA polymerases extending of the DNA chain in the 5'→3' direction and some typical enzymes corresponding to them. The families of these DNA polymerases are shown in parentheses. The “recesses” in the polymerase “ball” symbolize different exonuclease activities, and the “protrusion” is a strand-displacement activity.

В разных вариантах ПЦР используются термостабильные ДНК-полимеразы с 5'→3'-эксонуклеазной активностью (в частности, для детекции наработки ампликонов в реальном времени с помощью системы TaqMan), с 3'→5'-эксонуклеазной редактирующей активностью (для повышения точности копирования, например для создания генно-инженерных конструкций), а также с отсутствием обеих эксонуклеазных активностей. Подобные ферменты могут использоваться и в обычной ПЦР, когда нет каких-то особых требований к нарабатываемым ампликонам и особенностям их детекции.

Что касается особенностей проявления нуклеотидилтрансферазной активности у разных ДНК-полимераз при проведении ПЦР, то они довольно сильно различаются. И это можно видеть даже для одного и того же фермента в разных публикациях, что вполне объяснимо используемыми авторами неодинаковыми составами буферов, неодинаковой амплифицируемой ДНК, ее отличающимся GC-составом, включая возможное наличие в ней примесей в виде ингибиторов полимеризации, используемых праймеров, от которых многое зависит, а также степенью очистки ферментов. Поэтому при необходимости следует по этим

моментам обращаться к оригинальным статьям, а также к рекомендациям производителей конкретных ферментов.

Все же в целом можно сказать, что точность копирования цепей ДНК при их синтезе у разных ферментов далеко неодинакова, даже безотносительно наличия или отсутствия редактирующей эксонуклеазной активности. Такой показатель полимеризующей активности термостабильных ДНК-полимераз как их процессивность, в целом отражающая важные свойства того или иного фермента, может меняться в широких пределах, что зависит от условий реакции и чистоты выделенной ДНК. К тому же некоторые в норме ДНК-зависимые ДНК-полимеразы из термофильных микроорганизмов в определенных условиях способны проявляют иную матричную активность, становясь в частности РНК-зависимыми ДНК-полимеразами. Несмотря на то что используемые в ПЦР ДНК-полимеразы называются термостабильными, по этому показателю они довольно сильно отличаются друг от друга, и для особых случаев амплификации (например, длинных и GC-богатых матриц) это надо учитывать. При этом археи обычно обладают более термостабильными ДНК-полимеразами, поскольку растут некоторые при 100°C и даже выше. Однако все эти моменты

являются предметами отдельных статей, часть из которых выйдет в данном номере журнала.

### Заключение

Как показано выше, ДНК-зависимые ДНК-полимеразы являются многофункциональными белками, и помимо полимеризующей активности выступают как экзонуклеазы, имея 3'→5'-редактирующую и 5'→3'-репарирующую активности, за которые отвечают соответствующие домены этих белков. В ПЦР находят применение ДНК-полимеразы из двух семейств этих ферментов - бактериальные (из семейства А) и архейные (из семейства В), причем последние обычно несут 3'→5'-редактирующую экзонуклеазную активность, обеспечивая при этом увеличенную точность репликации с меньшим числом ошибок. Измененные генно-инженерным

путем как эубактериальные, так и архейные термостабильные ДНК-полимеразы, а также их химерные формы, обладают разными улучшенными характеристиками при проведении молекулярно-биологических экспериментов, включая амплификацию целей ДНК, в том числе по матрице из молекул РНК, но всем им должны быть посвящены отдельные публикации.

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

*Поступила в редакцию: 16.03.2026 г.*

*Доработана после рецензирования: 20.04.2026 г.*

*Принята к публикации: 23.04.2026 г.*

### Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р. и др. Ферментативный синтез олигонуклеотидов. *Biotics*. 2025. 17(4). 337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
2. Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES et al. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J Biol Chem*. 1958. 233(1). 171-177. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68049-X
3. Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(4). 787-802. doi: 10.1093/nar/21.4.787
4. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. *J Biol Chem*. 1960. 235(8). 2399-2403. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64634-4
5. Burgers PM, Koonin EV, Bruford E et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*. 2001. 276(47). 43487-43490. doi: 10.1074/jbc.R100056200
6. Case BC, Hingorani MM. Polymerase. In: Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.06928-4
7. Delarue M, Poch O, Tordo N et al. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng*. 1990. 3(6). 461-467. doi: 10.1093/protein/3.6.461
8. Ito J, Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res*. 1991. 19(15). 4045-4057. doi: 10.1093/nar/19.15.4045
9. Jain R, Aggarwal AK, Rechkoblit O. Eukaryotic DNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol*. 2018. 53. 77-87. doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003
10. Jayasinghe MI, Patel KJ, Jackman JE. Thg1 family 3'-5' RNA polymerases as tools for targeted RNA synthesis. *RNA*. 2024. 30(10). 1315-1327. doi: 10.1261/rna.080156.124
11. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830
12. Joyce CM, Kelley WS, Grindley ND. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli polA* gene and primary structure of DNA polymerase I. *J Biol Chem*. 1982. 257(4). 1958-1964. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68132-9
13. Klenow H, Overgaard-Hansen K. Proteolytic cleavage of DNA polymerase from *Escherichia coli* B into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS Lett*. 1970. 6(1). 25-27. doi: 10.1016/0014-5793(70)80032-1
14. Kornberg A, Lehman LR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzymes from *Escherichia coli*. *Federation Proceedings*. 1956. 15(1). 291-292.
15. Kuznetsova AA, Fedorova OS, Kuznetsov NA. Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(12). 6373. doi: 10.3390/ijms23126373
16. Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES et al. A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1958. 233(1). 163-170. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68048-8
17. Nakamura A, Nemoto T, Heinemann IU et al. Structural basis of reverse nucleotide polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013. 110(52). 20970-20975. doi: 10.1073/pnas.1321312111
18. Ollis DL, Brick P, Hamlin R et al. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*. 1985. 313(6005). 762-726. doi: 10.1038/313762a0

### References

1. Bessman MJ, Lehman IR, Simms ES et al. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. *J Biol Chem.* 1958. 233(1). 171-177. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68049-X
2. Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(4). 787-802. doi: 10.1093/nar/21.4.787
3. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235(8). 2399-2403. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64634-4
4. Burgers PM, Koonin EV, Bruford E et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem.* 2001. 276(47). 43487-43490. doi: 10.1074/jbc.R100056200
5. Case BC, Hingorani MM. Polymerase. In: Reference Module in Life Sciences, Elsevier, 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.06928-4
6. Delarue M, Poch O, Tordo N et al. An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 1990. 3(6). 461-467. doi: 10.1093/protein/3.6.461
7. Garafutdinov RR, Nikonov YuM, Sakhabutdinova AR et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Biomics.* 2025. 17(4). 337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30 (In Russian)
8. Ito J, Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19(15). 4045-4057. doi: 10.1093/nar/19.15.4045
9. Jain R, Aggarwal AK, Rechkoblit O. Eukaryotic DNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol.* 2018. 53. 77-87. doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003
10. Jayasinghe MI, Patel KJ, Jackman JE. Thg1 family 3'-5' RNA polymerases as tools for targeted RNA synthesis. *RNA.* 2024. 30(10). 1315-1327. doi: 10.1261/rna.080156.124
11. Joyce CM, Grindley ND. Construction of a plasmid that overproduces the large proteolytic fragment (Klenow fragment) of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983. 80(7). 1830-1834. doi: 10.1073/pnas.80.7.1830
12. Joyce CM, Kelley WS, Grindley ND. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli polA* gene and primary structure of DNA polymerase I. *J Biol Chem.* 1982. 257(4). 1958-1964. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68132-9
13. Klenow H, Overgaard-Hansen K. Proteolytic cleavage of DNA polymerase from *Escherichia coli* B into an exonuclease unit and a polymerase unit. *FEBS Lett.* 1970. 6(1). 25-27. doi: 10.1016/0014-5793(70)80032-1
14. Kornberg A, Lehman LR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzymes from *Escherichia coli*. *Federation Proceedings.* 1956. 15(1). 291-292.
15. Kuznetsova AA, Fedorova OS, Kuznetsov NA. Structural and Molecular Kinetic Features of Activities of DNA Polymerases. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(12). 6373. doi: 10.3390/ijms23126373
16. Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES et al. A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1958. 233(1). 163-170. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68048-8
17. Nakamura A, Nemoto T, Heinemann IU et al. Structural basis of reverse nucleotide polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013. 110(52). 20970-20975. doi: 10.1073/pnas.1321312111
18. Ollis DL, Brick P, Hamlin R et al. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature.* 1985. 313(6005). 762-726. doi: 10.1038/313762a0



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

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

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

<sup>2</sup>ООО «Синтол», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

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

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

### Резюме

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

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

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

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

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

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

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

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

### Resume

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

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

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

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

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

### Введение

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

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

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

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

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

### Ранние годы изучения термостабильных ДНК-полимераз

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

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

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

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

В начале 1985 г.<sup>1</sup> была опубликована статья, описывающая выделение трёх ДНК-полимераз из родственной им бактерии *T. thermophilus* штамма НВ-8, полученного чилийскими авторами из депозитария АТСС [Rüttimann et al., 1985]. Были проведены в целом стандартные определения их ферментативной активности в различных буферных растворах. Оценивалась термостабильность ферментов, причем в этот раз проводилась прединкубация при 90 °С продолжительностью до одного часа. Установлено, что ни одна из этих Tth-полимераз не обладает нематричной активностью по типу дезоксирибонуклеотидилтрансферазной<sup>2</sup>.

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

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

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

#### Полимеразная цепная реакция

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

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

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

<sup>3</sup> до первой публикации по ПЦР в декабре 1985 г.

Stenesh, McGowan, 1977], хотя для стандартной ПЦР она не применима<sup>4</sup>.

Первой статьей, в которой говорилось о проведении ПЦР с помощью Таq-полимеразы, стала опубликованная в октябре 1987 г. работа [Kogan et al., 1987], в которой авторы сообщили, что этот фермент им был предоставлен фирмой New England Biolabs, Inc. Что касается публикации с участием разработчика этой реакции К.Мюллера, то в их статье, вышедшей в январе 1988 г. [Saiki et al., 1988], о происхождении данного фермента ничего не говорится. Но в поданных фирмой Cetus Corporation чуть ранее заявках на получение патентов США (обе от 17 июня 1987 г.) с авторами изобретения в составе для первой<sup>5</sup> D.H.Gelfand<sup>6</sup>, F.C.Lawyer и R.K.Saiki, и для второй<sup>7</sup> - К.В.Муллис, Н.А.Эрлич, Д.Н.Гелфанд, Г.Норн и Р.К.Саики, упоминается фермент Таq-полимераза, который выделялся ими из предоставляемой депозитарием АТСС культуры *Thermus aquaticus* УТ-1.

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

#### Заключение

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

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

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

<sup>6</sup> предложившего использовать в ПЦР термостабильную ДНК полимеразу

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

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

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

Поступила в редакцию: 04.03.2026 г.

Доработана после рецензирования: 14.04.2026 г.

Принята к публикации: 16.04.2026 г.

#### Литература

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

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

## References

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

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



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

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

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

<sup>2</sup>ООО «Синтол», 127434, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

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

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

### Резюме

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

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

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

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

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

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

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS

3 Institutskaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation

<sup>2</sup>Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya Str., 127434, Moscow, Russian Federation

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

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

### Resume

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

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

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

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

### Введение

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

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

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

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

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

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

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

В мае 1990 г. та же группа авторов, опубликовавшая вышеупомянутую статью [Lawyer et al., 1989], подала заявку на свой очередной патент США, в котором правовая охрана должна была распространяться на укороченные с N-конца варианты Taq-полимеразы [Gelfand et al., 1992]. Один из них короче всего на три аминокислотных остатка и получил потом коммерческое название AmpliTaq, а другой укорочен на 289<sup>1</sup> аминокислот и получил обозначение по фамилии одного из соавторов “Stoffel fragment”. В следующем году вышла соответствующая статья [Lawyer et al., 1993], где сообщалось, что поместив Стоффельский фрагмент Taq-полимеразы под сильный промотор бактериофага лямбда P<sub>L</sub> удалось достичь выхода фермента в 3% от тотального белка. При этом такой укороченный вариант Taq полимеразы имел время полужизни при 97,5 °C равное 21 мин, тогда как для полноразмерной Taq-полимеразы оно заметно короче – 9 мин.

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

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

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

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

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

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

На основе тестовой плазмиды pWB305 с геном Taq-полимеразы, изготовленной для проверки точности результатов ПЦР-анализа (GenBank Accession No. M86847), создан укороченный на 235 аминокислот с N-конца ген данной ДНК-полимеразы, получивший название KlenTaq<sup>2</sup> [Barnes, 1992]. В результате образовалась ДНК полимеразы, лишенная экзонуклеазной активности, и при этом характеризующаяся уменьшенным в два раза числом ошибок при копировании по сравнению с полноразмерным ферментом. Этим же автором в 1995 г. получен патент США #5,436,149 [Barnes, 1995], в котором правовая охрана распространялась на укороченные с N-конца на 280 и на 279 аминокислот Taq- и Tfl-полимеразы соответственно.

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

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

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

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

К уже имеющимся нескольким укороченным вариантам Taq-полимеразы в 1998 г. прибавился еще один, который стал короче Стоффельского фрагмента на 4 аминокислоты (если судить по нуклеотидной последовательности), но при этом нес на N-конце дополнительно 21 аминокислоту, среди которых были шесть идущих подряд гистидинов, что позволило очищать такой белок аффинной хроматографией на никелевой колонке в одну стадию [Dabrowski, Kur, 1998a]. Ранее отечественными авторами [Смирнов и др. (Smirnov et al.), 1995] был клонирован ген Taq-полимеразы (собиравшийся из трех ПЦР-фрагментов), при этом содержащий на N-конце 11 дополнительных аминокислот из которых подряд идущие шесть принадлежали гистидину, что дало возможность проводить одностадийную очистку фермента аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA-агарозой. Эта His<sub>6</sub>-Taq-полимераза сохраняла 50% активности после часовой инкубации при 95 °С.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В 1992 г. был клонирован и секвенирован ген ДНК-полимеразы из микроорганизма *T. flavus*, обнаруженного на Камчатке [Akhmetzjanov, Vakhitov, 1992]. Его размер оказался равным 2496 п.н. и кодировал он Tfl-полимеразу длиной 831 аминокислоту. Позже американские авторы выделили нативную Tfl-полимеразу из дикого штамма ATCC 33923<sup>4</sup> и обнаружили, что их фермент сохранял активность при 94 °С в течение 60 мин, а Taq-полимераза при этих условиях - только 30 мин [Harrell 2nd, Hart, 1994]. ДНК-полимераза из *T. flavus* некоторое время поставлялась как Hot Tub-полимераза английской фирмой Amersham.

В 1993 г. была выделена ДНК-полимераза из бактерии *T. caldophilus* [Park et al., 1993]. После прогрева очищенного фермента при 95 °С в течение 70 мин он сохранял около 50% активности. При этом отмечалось, что Tca-полимераза способна амплифицировать более длинные матрицы по сравнению с Taq-полимеразой при схожем уровне ошибок. В присутствии MnCl<sub>2</sub> Tca-полимераза проявляла слабую ревертазную активность, сравнимую с таковой у Taq-полимеразы. Позже ими был клонирован и секвенирован ген этой Tca-полимеразы, кодирующий 834 аминокислотных остатка, совпадающих на 86% с Taq-полимеразой [Kwon et al., 1997]. Помещение гена Tca-полимеразы под контроль *tac*-промотора увеличило выход фермента в 26 раз по сравнению с диким штаммом. В том же году из бактерии *T. filiformis* был клонирован ген ДНК-полимеразы, кодирующий Tfi-полимеразу длиной 833 аминокислотных остатка, совпадающих на 78,5% с Taq-полимеразой, и на 78,4% - с Tca-полимеразой [Jung et al., 1997]. В своей следующей работе [Choi et al., 1999] эти авторы сообщили о создании штамма *E. coli*, несущего ген Tfi-полимеразы под контролем *tac*-промотора. Очищенный фермент сохранял около 50% своей активности после выдерживания при 94 °С в течение 40 мин.

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

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

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

Не так давно была клонирована и экспрессирована в *E. coli* с 10 гистидинами на С-конце термостабильная ДНК-полимераза TsK1 из *T. scotoductus* [Saghatel'yan et al., 2021]. Фермент стабилен 1 час при 80 °С и имеет время полужизни при 88 °С и 95 °С 30 и 15 мин соответственно.

#### ДНК полимеразы прочих термофильных эубактерий

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

Пользуясь результатами секвенирования полного генома гипертермофильного микроорганизма

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

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

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

### Заключение

Как можно видеть из изложенного выше, Тау-полимераза по масштабу применения и уделяемому ей внимания значительно «опережает» прочие ДНК-полимеразы, выделяемые из микроорганизмов рода *Thermus* и других эубактерий. При этом главным недостатком их всех<sup>5</sup> (за исключением Аае-полимеразы и K4PloI-полимеразы) является отсутствие редактирующей экзонуклеазной активности, следствием чего становятся ошибки при амплификации, достигающие довольно значительных величин. Тем не менее, сейчас очень многими фирмами производится Тау-полимераза, тогда как прочие ДНК полимеразы эубактерий, находящие применение в ПЦР, поставляются ограниченным количеством компаний или никогда коммерчески не производились. Причинами такой популярности Тау-полимеразы служит как исторический момент, поскольку она была первой, так и то, что в большинстве случаев при амплификации каких-либо участков ДНК сверхвысокая точность воспроизведения исходной последовательности не требуется. Исключениями являются эксперименты, ставящие

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

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

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

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

Поступила в редакцию: 04.03.2026 г.

Доработана после рецензирования: 14.04.2026 г.

Принята к публикации: 16.04.2026 г.

<sup>5</sup> имеется в виду изученных

## Литература

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

26. Ferralli P, Egan JD, Erickson FL. Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *BIOS*. 2007. 78(2). 69-74. doi: 10.1893/0005-3155(2007)78[69:MTDPIT]2.0.CO;2
27. Gelfand DH, Stoffel S, Lawyer FC et al. Purified thermostable enzyme. US Patent #5,079,352, Dated Jan. 7, 1992
28. Gibbs MD, Reeves RA, Mandelman D et al. Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. *Extremophiles*. 2009. 13(5). 817-826. doi: 10.1007/s00792-009-0269-8
29. Grimm E., Arbutnot P. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(21). 4518-4519. doi: 10.1093/nar/23.21.4518
30. Gräslund T, Nilsson J, Lindberg AM et al. Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expr Purif*. 1997. 9(1). 125-132. doi: 10.1006/prep.1996.0674
31. Guyer RL, Koshland DE Jr. The Molecule of the Year. *Science*. 1989. 246(4937). 1543-1546. doi: 10.1126/science.2688087
32. Hadi MI, Laksmi FA, Violando WA et al. Efficient expression of truncated Taq DNA polymerase in *Escherichia coli* and its application in mitochondrial cytochrome b-targeted PCR for halal authentication. *World J Microbiol Biotechnol*. 2026. 42(2). 88. doi: 10.1007/s11274-026-04834-z
33. Harrell RA 2nd, Hart RP. Rapid preparation of *Thermus flavus* DNA polymerase. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). 372-375. doi: 10.1101/gr.3.6.372
34. Ishino Y, Ueno T, Miyagi M et al. Overproduction of *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its structural analysis by ion-spray mass spectrometry. *J. Biochem*. 1994. 116(5). 1019- 1024. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124622
35. Jin C, Liu H, Yang S et al. Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*. 1995. 11(3). 185-191.
36. Jung SE, Choi JJ, Kim HK et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Mol Cells*. 1997. 7(6). 769-776.
37. Karkas JD, Stavrianopoulos JG, Chargaff E. Action of DNA polymerase I of *Escherichia coli* with DNA-RNA hybrids as templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972. 69(2). 398-402. doi: 10.1073/pnas.69.2.398
38. Kim DJ, Jang HJ, Pyun YR et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *J Biochem Mol Biol*. 2002. 35(3). 320- 329. doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.3.320
39. Kim JS, Koh S, Kim JJ et al. Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB27: gene cloning, sequence determination, and physicochemical properties. *Mol Cells*. 1998. 8(2). 157- 161.
40. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
41. Kwon ST, Kim JS, Park JH et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus caldophilus* GK24. *Mol Cells*. 1997. 7(2). 264-271.
42. Laksmi FA, Dewi KS, Nuryana I et al. High-level expression of codon-optimized Taq DNA polymerase under the control of rhaBAD promoter. *Anal Biochem*. 2024. 692. 115581. doi: 10.1016/j.ab.2024.115581
43. Laksmi FA, Lischer K, Nugraha Y et al. A robust strategy for overexpression of DNA polymerase from *Thermus aquaticus* using an IPTG-independent autoinduction system in a benchtop bioreactor. *Sci Rep*. 2025. 15(1). 5891. doi: 10.1038/s41598-025-89902-4
44. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989. 264(11). 6427- 6437. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83367-1
45. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 1993. 2(4). 275-287. doi: 10.1101/gr.2.4.275
46. Leelayuwat C, Srisuk T, Paechaiyaphum R et al. Production and evaluation of Taq DNA polymerase. *J Med Assoc Thai*. 1997. 80(1). 129-137.
47. Leonart R, Campos M, Suárez A et al. Molecular cloning of the gene, expression in *E. coli* and purification of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Acta Biotechnologica*. 2004. 12. 155-159. doi: 10.1002/abio.370120215
48. Louwrier A. Nucleic acid removal from Taq polymerase preparations using an aqueous/organic biphasic system. *Biotechniques*. 1999. 27(3). 444-445. doi: 10.2144/99273bm09
49. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*. 2007. 2(1). 121-132. doi: 10.1002/biot.200600191
50. Merkens LS, Bryan SK, Moses RE. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1264(2). 243-248. doi: 10.1016/0167-4781(95)00153-8
51. Mishra M, Mohanraj J, Nisshanthini D et al. High-level Expression and Purification of DNA and

- DNase Free Taq DNA Polymerase. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2018. 2(4). 1-10. doi: 10.9734/ajrb/2018/v2i4607
52. Moazen F, Rastegari A, Hoseini SM et al. Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res*. 2012. 1. 82. doi: 10.4103/2277-9175.103004
53. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991. 30(31). 7661-7666. doi: 10.1021/bi00245a001
54. Niimi H, Mori M, Tabata H et al. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination. *J. Clin Microbiol*. 2011. 49(9). 3316-3320. doi: 10.1128/JCM.00584-11
55. Oktem HA, Bayramoglu G, Ozalp VC et al. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. *Biotechnol Prog*. 2007. 23(1). 146-154. doi: 10.1021/bp0602505
56. Park JH, Kim JS, Kwon ST et al. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur J Biochem*. 1993. 214(1). 135-140. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17905.x
57. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(20). 4850-4851. doi: 10.1093/nar/21.20.4850
58. Pormehr LA, Vishkaei MN, Mozafarzadeh Z et al. Isolation, characterization of novel fragment of a gene *Klentaq1* which encodes *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its thermostability studies in *Escherichia coli*. *Science International (Lahore)*. 2013. 25(4). 833-836.
59. Protzko RJ, Erickson FL. A scaled-down and simplified protocol for purifying recombinant Taq DNA polymerase. *BIOS*. 2012. 83(1). 8-11. doi: 10.1893/0005-3155-83.1.8
60. Raghu N, Deepak J. Rapid simplified protocol for purification of Taq polymerase fragment expressed in *Escherichia coli*. *Intern. J. Advanced Res*. 2016. 4(6). 13-17.
61. Roayaei M, Galehdari H. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2008. 1(1). 1-5.
62. Sadeghi HMM, Rabbani MJ, Moazen F. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* strain YT-1. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2007. 1(1). 49-52.
63. Saghatelian A, Panosyan H, Trchounian A et al. Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *Microbiologyopen*. 2021. 10(1). e1149. doi: 10.1002/mbo3.1149
64. Sagner G, Ruger R, Kessler C. Rapid filter assay for the detection of DNA polymerase activity: direct identification of the gene for the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *Gene*. 1991. 97(1). 119-123. doi: 10.1016/0378-1119(91)90018-7
65. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
66. Samman N, Al-Muhalhil K, Nehdi A. A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography. *Journal of King Saud University - Science*. 2023. 35. 102565. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102565
67. Sano S, Yamada Y, Shinkawa T et al. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. *J Biosci Bioeng*. 2012. 113(3). 315-321. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.001
68. Sellmann E, Schroder KL, Knoblich IM et al. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species. *J Bacteriol*. 1992. 174(13). 4350-4355. doi: 10.1128/jb.174.13.4350-4355.1992
69. Shima Y, Hasegawa A, Arakawa T et al. Construction and characterization of N-terminally truncated DNA polymerase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996. 81(6). 504-510. doi: 10.1016/0922-338X(96)81470-X
70. Simpson HD, Coolbear T, Daniel RM. Purification of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Ann N Y Acad Sci*. 1990. 613. 426-428. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18192.x
71. Simpson HD, Coolbear T, Vermue M et al. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Biochem Cell Biol*. 1990a. 68(11). 1292-1296. doi: 10.1139/o90-192
72. Slater MR, Hartnett JR, Bolchakova E et al. Thermophilic DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana*. US Patent #6,077,664. Dated Jun. 20, 2000
73. Teng XC, Ang SY, Citartan M et al. Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 2023. 31(1). 45-52. doi: 10.35118/apjmbb.2023.031.1.05
74. Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1988. 27(16). 6008-6013. doi: 10.1021/bi00416a027
75. Vainshtein I, Atrazhev A, Eom SH et al. Peptide rescue of an N-terminal truncation of the Stoffel fragment of Taq DNA polymerase. *Protein Sci*. 1996. 5(9). 1785-1792. doi: 10.1002/pro.5560050904
76. Villbrandt B, Sagner G, Schomburg D. Investigations on the thermostability and function of truncated *Thermus aquaticus* DNA polymerase fragments.

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

22. Ferralli P, Egan JD, Erickson FL. Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *BIOS*. 2007. 78(2). 69-74. doi: 10.1893/0005-3155(2007)78[69:MTDPIT]2.0.CO;2
23. Gelfand DH, Stoffel S, Lawyer FC et al. Purified thermostable enzyme. US Patent #5,079,352, Dated Jan. 7, 1992
24. Gibbs MD, Reeves RA, Mandelman D et al. Molecular diversity and catalytic activity of *Thermus* DNA polymerases. *Extremophiles*. 2009. 13(5). 817-826. doi: 10.1007/s00792-009-0269-8
25. Grimm E., Arbutnot P. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(21). 4518-4519. doi: 10.1093/nar/23.21.4518
26. Gräslund T, Nilsson J, Lindberg AM et al. Production of a thermostable DNA polymerase by site-specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Expr Purif*. 1997. 9(1). 125-132. doi: 10.1006/prep.1996.0674
27. Guyer RL, Koshland DE Jr. The Molecule of the Year. *Science*. 1989. 246(4937). 1543-1546. doi: 10.1126/science.2688087
28. Hadi MI, Laksmi FA, Violando WA et al. Efficient expression of truncated Taq DNA polymerase in *Escherichia coli* and its application in mitochondrial cytochrome b-targeted PCR for halal authentication. *World J Microbiol Biotechnol*. 2026. 42(2). 88. doi: 10.1007/s11274-026-04834-z
29. Harrell RA 2nd, Hart RP. Rapid preparation of *Thermus flavus* DNA polymerase. *PCR Methods Appl*. 1994. 3(6). 372-375. doi: 10.1101/gr.3.6.372
30. Ishino Y, Ueno T, Miyagi M et al. Overproduction of *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its structural analysis by ion-spray mass spectrometry. *J. Biochem*. 1994. 116(5). 1019- 1024. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124622
31. Jin C, Liu H, Yang S et al. Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*. 1995. 11(3). 185-191.
32. Jung SE, Choi JJ, Kim HK et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus filiformis*. *Mol Cells*. 1997. 7(6). 769-776.
33. Karkas JD, Stavrianopoulos JG, Chargaff E. Action of DNA polymerase I of *Escherichia coli* with DNA-RNA hybrids as templates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972. 69(2). 398-402. doi: 10.1073/pnas.69.2.398
34. Kim DJ, Jang HJ, Pyun YR et al. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from *Thermoanaerobacter yonseiensis*. *J Biochem Mol Biol*. 2002. 35(3). 320- 329. doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.3.320
35. Kim JS, Koh S, Kim JJ et al. Top DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB27: gene cloning, sequence determination, and physicochemical properties. *Mol Cells*. 1998. 8(2). 157- 161.
36. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl. J. Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
37. Kwon ST, Kim JS, Park JH et al. Cloning and analysis of the DNA polymerase-encoding gene from *Thermus caldophilus* GK24. *Mol Cells*. 1997. 7(2). 264-271.
38. Laksmi FA, Dewi KS, Nuryana I et al. High-level expression of codon-optimized Taq DNA polymerase under the control of rhaBAD promoter. *Anal Biochem*. 2024. 692. 115581. doi: 10.1016/j.ab.2024.115581
39. Laksmi FA, Lischer K, Nugraha Y et al. A robust strategy for overexpression of DNA polymerase from *Thermus aquaticus* using an IPTG-independent autoinduction system in a benchtop bioreactor. *Sci Rep*. 2025. 15(1). 5891. doi: 10.1038/s41598-025-89902-4
40. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*. 1989. 264(11). 6427- 6437. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83367-1
41. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl*. 1993. 2(4). 275-287. doi: 10.1101/gr.2.4.275
42. Leelayuwat C, Srisuk T, Paechaiyaphum R et al. Production and evaluation of Taq DNA polymerase. *J Med Assoc Thai*. 1997. 80(1). 129-137.
43. Leonart R, Campos M, Suárez A et al. Molecular cloning of the gene, expression in *E. coli* and purification of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase I. *Acta Biotechnologica*. 2004. 12. 155-159. doi: 10.1002/abio.370120215
44. Louwrier A. Nucleic acid removal from Taq polymerase preparations using an aqueous/organic biphasic system. *Biotechniques*. 1999. 27(3). 444-445. doi: 10.2144/99273bm09
45. Melissis S, Labrou NE, Clonis YD. One-step purification of Taq DNA polymerase using nucleotide-mimetic affinity chromatography. *Biotechnol J*. 2007. 2(1). 121-132. doi: 10.1002/biot.200600191
46. Merkens LS, Bryan SK, Moses RE. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta*. 1995. 1264(2). 243-248. doi: 10.1016/0167-4781(95)00153-8
47. Mishra M, Mohanraj J, Nisshanthini D et al. High-level Expression and Purification of DNA and

- DNase Free Taq DNA Polymerase. *Asian Journal of Research in Biochemistry*. 2018. 2(4). 1-10. doi: 10.9734/ajrb/2018/v2i4607
48. Moazen F, Rastegari A, Hoseini SM et al. Optimization of Taq DNA polymerase enzyme expression in *Escherichia coli*. *Adv Biomed Res*. 2012. 1. 82. doi: 10.4103/2277-9175.103004
49. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991. 30(31). 7661-7666. doi: 10.1021/bi00245a001
50. Niimi H, Mori M, Tabata H et al. A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase which is free from bacterial DNA contamination. *J. Clin Microbiol*. 2011. 49(9). 3316-3320. doi: 10.1128/JCM.00584-11
51. Oktem HA, Bayramoglu G, Ozalp VC et al. Single-step purification of recombinant *Thermus aquaticus* DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. *Biotechnol Prog*. 2007. 23(1). 146-154. doi: 10.1021/bp0602505
52. Park JH, Kim JS, Kwon ST et al. Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur J Biochem*. 1993. 214(1). 135-140. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17905.x
53. Patrushev LI, Valiaev AG, Golovchenko PA et al. Cloning of the gene for thermostable *Thermus aquaticus* YT1 DNA polymerase and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biol (Mosk)*. 1993. 27(5). 1100-1112. (In Russian).
54. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(20). 4850-4851. doi: 10.1093/nar/21.20.4850
55. Pormehr LA, Vishkaei MN, Mozafarzadeh Z et al. Isolation, characterization of novel fragment of a gene Klentaq1 which encodes *Thermus aquaticus* DNA polymerase and its thermostability studies in *Escherichia coli*. *Science International (Lahore)*. 2013. 25(4). 833-836.
56. Protzko RJ, Erickson FL. A scaled-down and simplified protocol for purifying recombinant Taq DNA polymerase. *BIOS*. 2012. 83(1). 8-11. doi: 10.1893/0005-3155-83.1.8
57. Raghu N, Deepak J. Rapid simplified protocol for purification of Taq polymerase fragment expressed in *Escherichia coli*. *Intern. J. Advanced Res*. 2016. 4(6). 13-17.
58. Rechkunova NI, Akishev AG, Lebedeva NA et al. Thermostable DNA-polymerase from *Thermus thermophilus* B35: isolation and characterization of some properties. *Biochemistry (Mosc)*. 1998. 63(11). 1266-1270. (In Russian)
59. Roayaei M, Galehdari H. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2008. 1(1). 1-5.
60. Sadeghi HMM, Rabbani MJ, Moazen F. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* strain YT-1. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2007. 1(1). 49-52.
61. Saghatelian A, Panosyan H, Trchounian A et al. Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *Microbiologyopen*. 2021. 10(1). e1149. doi: 10.1002/mbo3.1149
62. Sagner G, Rüger R, Kessler C. Rapid filter assay for the detection of DNA polymerase activity: direct identification of the gene for the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. *Gene*. 1991. 97(1). 119-123. doi: 10.1016/0378-1119(91)90018-7
63. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
64. Samman N, Al-Muhalhil K, Nehdi A. A simple and efficient method for Taq DNA polymerase purification based on heat denaturation and affinity chromatography. *Journal of King Saud University - Science*. 2023. 35. 102565. doi: 10.1016/j.jksus.2023.102565
65. Sano S, Yamada Y, Shinkawa T et al. Mutations to create thermostable reverse transcriptase with bacterial family A DNA polymerase from *Thermotoga petrophila* K4. *J Biosci Bioeng*. 2012. 113(3). 315-321. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.001
66. Sellmann E, Schröder KL, Knoblich IM et al. Purification and characterization of DNA polymerases from *Bacillus* species. *J Bacteriol*. 1992. 174(13). 4350-4355. doi: 10.1128/jb.174.13.4350-4355.1992
67. Shima Y, Hasegawa A, Arakawa T et al. Construction and characterization of N-terminally truncated DNA polymerase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996. 81(6). 504-510. doi: 10.1016/0922-338X(96)81470-X
68. Simpson HD, Coolbear T, Daniel RM. Purification of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Ann N Y Acad Sci*. 1990. 613. 426-428. doi: 10.1111/j.1749-6632.1990.tb18192.x
69. Simpson HD, Coolbear T, Vermue M et al. Purification and some properties of a thermostable DNA polymerase from a *Thermotoga* species. *Biochem Cell Biol*. 1990a. 68(11). 1292-1296. doi: 10.1139/o90-192
70. Slater MR, Hartnett JR, Bolchakova E et al. Thermophilic DNA polymerases from *Thermotoga neapolitana*. US Patent #6,077,664. Dated Jun. 20, 2000
71. Smirnov IuV, Chakhmakhcheva OG, Efimov VA. Recombinant *Thermus thermophilus* His6-DNA polymerase with reverse transcriptase activity. *Bioorg Khim*. 1997. 23(4). 257-261. (In Russian)
72. Smirnov IuV, Fradkov AF, Chakhmakhcheva OG et al. Synthesis of a highly active recombinant

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



## 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<sup>TM</sup> 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 30×10<sup>-6</sup> 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 интрона [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 интронами, 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* [Hopfner 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. thioreducens*<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. thioreducens* 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 интеином, 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. Seegerer 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 *Sulfophobococcus 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



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

## Термостабильные ДНК-полимеразы с ревертазной активностью

<sup>1</sup>В.В. Зубов\*, <sup>2</sup>А.А. Воробьев, <sup>3</sup>С.В. Жевора, <sup>3,4</sup>Я.И.Алексеев

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

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

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

\*E-mail: [genseq@mail.ru](mailto: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 термоллабильность 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

<sup>1</sup>V.V. Zubov, <sup>2</sup>A.A. Vorob'ev, <sup>3</sup>S.V. Zhevora, <sup>3,4</sup>Ya.I. Alekseev

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS  
3 Institut'skaja str., 142290, Pushchino, Moscow region, Russian Federation  
<sup>2</sup>Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute"  
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation  
<sup>3</sup>Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya Str., 127434, Moscow, Russian Federation  
<sup>4</sup>Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,  
198095, St. Petersburg, Russian Federation  
E-mail: [genseq@mail.ru](mailto: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. [Wugne 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], T<sub>11</sub>-полимеразы из *T. flavus* [Каледин и др. (Kaledin et al.), 1981] и T<sub>10</sub>-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)<sub>12</sub><sup>1</sup>, но не с мРНК из печени коровы с тем же праймером. Позже схожий результат был получен для Tth-полимеразы из *T. thermophilus* также по матрице из poly(rA) с праймером олиго(Т)<sub>10</sub>, причем включение дНТФ шло лучше при 37 °C и в присутствии Mn<sup>2+</sup> [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 XNA<sup>2</sup> 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 MnCl<sub>2</sub> генерировался ампликон размером 308 п.н. Причем было показано, что Tth-полимераза в присутствии MnCl<sub>2</sub> 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-

<sup>1</sup> она была названа авторами как «рДНК-полимеразная активность»

<sup>2</sup> 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  $\xi$  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<sub>L329A</sub>.

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<sub>exo</sub>-) 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 полимеразми 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-полимеразми, 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-полимеразми, ДНК-зависимыми РНК-полимеразми и РНК-зависимыми ДНК-полимеразми.

**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-полимеразми, 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* УТ1. *Биохимия.* 1980. 45(4). 644-651.
3. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus flavus*. *Биохимия.* 1981. 46(9). 1576-1581.
4. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus ruber*. *Биохимия.* 1982. 47(11). 1785-1791.
5. 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 $\alpha$  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, 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



## Химический синтез олигонуклеотидов: этапы 70-летнего пути

<sup>1,2</sup>Я.И. Алексеев\*, <sup>3</sup>Р.Р. Гарафутдинов, <sup>1</sup>Д.А. Чемерис, <sup>1</sup>Б.Т. Шарипов,  
<sup>4</sup>А.А. Воробьев, <sup>1</sup>С.В. Жевора, <sup>1</sup>А.В. Кузубов, <sup>3</sup>А.В. Чемерис

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

<sup>2</sup>Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,  
Российская Федерация, Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, 450054, Уфа, пр. Октября, 71

<sup>4</sup>Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт»  
Министерства обороны Российской Федерации, Российская Федерация, Киров

\*E-mail: [jalex@syntol.ru](mailto:jalex@syntol.ru)

### Резюме

Более 70 лет назад, в августе 1955 г., вышла статья, в которой описан первый синтез динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью. За прошедшие годы химический синтез олигонуклеотидов претерпел серьезную эволюцию, пройдя различные этапы: от фосфотриэфирного, через фосфонатный, фосфодиэфирный, фосфиттриэфирный, преобразованный затем в амидофосфитный. Последний является в настоящее время основным методом синтеза олигонуклеотидов с помощью автоматических ДНК-синтезаторов. В целом, амидофосфитный способ обеспечивает решение текущих задач науки и практики, за исключением получения протяженных олигонуклеотидов и крупномасштабного синтеза. Однако потребность в олигонуклеотидах будет неизбежно расти, в том числе их модифицированных форм, как в плане разнообразия, так и в количественном отношении. При этом должны будут интенсивно развиваться как твердофазный колоночный и микрочиповый синтезы, так и синтез в жидкой фазе, способный обеспечить производство килограммовых количеств терапевтических олигонуклеотидов. Можно прогнозировать, что потребность в относительно коротких олигонуклеотидах для сельского хозяйства через некоторое время будет измеряться тоннами.

**Ключевые слова:** олигонуклеотид, химический синтез олигонуклеотидов, амидофосфитный метод, ДНК-синтезатор, твердофазный колоночный синтез, микрочиповый синтез, синтез олигонуклеотидов в жидкой фазе

**Цитирование:** Алексеев Я.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Шарипов Б.Т., Воробьев А.А., Жевора С.В., Кузубов А.В., Чемерис А.В. Химический синтез олигонуклеотидов: этапы 70-летнего пути. *Biomics*. 2026. 18(1). С/ 178-214. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-14

© **Авторы**, 2026, Я.И. Алексеев, Р.Р. Гарафутдинов, Д.А. Чемерис, Б.Т. Шарипов, А.А. Воробьев, С.В. Жевора, А.В. Кузубов, А.В. Чемерис

## Chemical synthesis of oligonucleotides: stages of a 70-year journey

<sup>1,2</sup>Ya.I. Alekseev\*, <sup>3</sup>R.R. Garafutdinov, <sup>1</sup>D.A. Chemeris, <sup>1</sup>B.T. Sharipov,  
<sup>4</sup>A.A. Vorob'ev, <sup>1</sup>S.V. Zhevora, <sup>1</sup>A.V. Kuzubov, <sup>3</sup>A.V. Chemeris

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

<sup>2</sup>Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,  
198095, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation

<sup>4</sup>Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute"  
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

\*E-mail: [jalex@syntol.ru](mailto:jalex@syntol.ru)

### Resume

More than 70 years ago, in August 1955, an article was published describing the first synthesis of dinucleotides with a natural phosphodiester bond. Over the years, the chemical synthesis of oligonucleotides has undergone a serious evolution, going through various stages from phosphotriester, through phosphonate, phosphodiester, phosphite triester, and then transformed into phosphoramidite. The latter approach is currently the main method of synthesis of oligonucleotides using automatic DNA synthesizers. In general, the phosphoramidite method provides solutions to current scientific and practical problems, with the exception of the production of extended oligonucleotides and large-scale synthesis. However, the demand for oligonucleotides will inevitably grow, including in their modified forms, both in terms of diversity and quantity. At the same time, both solid-phase column and microarray syntheses, as well as synthesis in the liquid phase, capable of producing kilogram amounts of therapeutic oligonucleotides, will have to be intensively developed. It can be predicted that the demand for relatively short oligonucleotides for agriculture will be measured in tons after a while.

**Keywords:** oligonucleotide, chemical synthesis of oligonucleotides, amidophosphite method, DNA synthesizer, solid-phase column synthesis, microarray synthesis, synthesis of oligonucleotides in the liquid phase

**Citation:** Alekseev Ya.I., Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sharipov B.T., Vorob`ev A.A., Zhevora S.V., Kuzubov A.V., Chemeris A.V. Chemical synthesis of oligonucleotides: stages of a 70-year journey. *Biomcs.* 2026. 18(1). 178-214. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-14 (In Russian)

© **The Authors**, 2026, Ya.I. Alekseev, R.R. Garafutdinov, D.A. Chemeris, B.T. Sharipov, A.A. Vorob`ev, S.V. Zhevora, A.V. Kuzubov, A.V. Chemeris

Содержание	Стр.
Введение	180
Первое десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов	181
Второе десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов	182
Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов	183
Четвертое и последующие десятилетия химического синтеза олигонуклеотидов	186
Носители для твердофазного колоночного синтеза олигонуклеотидов	190
Растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов	191
Автоматические синтезаторы ДНК	192
Крупномасштабный синтез олигонуклеотидов в растворе	195
Заключение	196
Литература	197
References	206

Content	Pages
Introduction	180
The first decade of chemical synthesis of oligonucleotides	181
The second decade of chemical synthesis of oligonucleotides	182
The third decade of chemical synthesis of oligonucleotides	183
The fourth and subsequent decades of chemical synthesis of oligonucleotides	186
Supports for solid-phase column synthesis of oligonucleotides	190
Soluble supports for the synthesis of oligonucleotides	191
Automatic DNA Synthesizers	192
Large-scale synthesis of oligonucleotides in solution	195
Conclusion	196
References (in Russian)	197
References	206

### Введение

В настоящее время молекулярную биологию и целый ряд смежных дисциплин абсолютно невозможно представить без использования синтетических олигонуклеотидов разной длины, которые применяются в широком спектре современных методов и технологий. Олигонуклеотиды используются также в молекулярной диагностике в качестве праймеров при амплификации, в медицинских исследованиях и в фармацевтике, в том числе в виде аптамеров и терапевтических нуклеиновых кислот, что так или иначе связано с биологией и фундаментальной наукой. И даже такое, казалось бы, далекое, но при этом довольно активно развивающееся направление как долговременное хранение небиологической информации в молекулах ДНК, получившее стойкое обозначение как DNA Data Storage<sup>1</sup>, в будущем немислимо без крупномасштабного синтеза олигонуклеотидов. Однако последнему применению посвящено немало обзорных статей [Jo et al., 2024; Yu et al., 2024], поэтому коснемся его здесь очень кратко.

Основное внимание в данном обзоре будет сосредоточено на рассмотрении эволюции химического синтеза олигонуклеотидов, проделавшего большой 70-летний путь от момента получения первых динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью [Michelson, Todd, 1955]. Этот путь можно подразделить на целый ряд этапов, в основе которых лежат те или иные химические реакции и превращения. При этом несмотря на то, что уже больше четырех десятилетий назад вполне оправданный выбор был сделан в пользу амидофосфитного метода синтеза на твердой фазе, который сейчас является основным, тем не менее, не все методологические вопросы решены. Так, в уже устоявшихся направлениях научной и практической деятельности постоянно растет масштаб применения как обычных, так и модифицированных тем или иным способом олигонуклеотидов, причем разнообразие последних становится все шире. Помимо этого, расширяется спектр применения олигонуклеотидов в связи с возникающими новыми приложениями их использования, о чем говорилось выше. И необходимо отвечать на эти вызовы времени.

В последнее десятилетие некую конкуренцию химическому синтезу олигонуклеотидов пытается составить ферментативный синтез оных с помощью терминальной нуклеотидилтрансферазы<sup>2</sup>, но у этих

подходов все же разные ниши, поскольку ферментативным способом можно синтезировать гораздо более протяженные олигонуклеотиды<sup>3</sup>, востребованные в первую очередь в синтетической биологии, которая весьма бурно развивается, но она, впрочем, также нуждается и в коротких олигонуклеотидах. Однако ферментативным методом невозможно синтезировать широчайший спектр необходимых для других задач модифицированных олигонуклеотидов, в которых могут быть изменены кроме самих азотистых оснований как углеводный компонент, так и остаток фосфорной кислоты. Это придает таким олигонуклеотидам новые свойства, резко отличающие их от природных, поэтому уже довольно давно возникла новая аббревиатура XNA (Xeno Nucleic Acid), и в этой статье некоторым из них уделим определенное внимание. При этом за пределами рассмотрения останутся такие направления как синтез олиго**рибон**уклеотидов (за редким исключением), химерных олигонуклеотидов, состоящих из участков ДНК/РНК, а также синтез конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами, заслуживающими отдельного рассмотрения каждое.

Несмотря на то, что химическому синтезу олигонуклеотидов, в том числе с рассмотрением исторических аспектов, посвящено значительное количество обзорных публикаций [Женодарова, Хабарова (Zhenodarova, Khabarova), 1966; Khorana, 1969; Zhdanov, Zhenodarova, 1975; Amarnath, Broom, 1977; Caruthers et al., 1983; Caruthers, 1991; Beaucage, Iyer, 1992; Brown, 1993; Pon, 2002; Reese, 2005; Abramova, 2013; Hogrefe et al., 2013], рассчитываем, что нам удастся затронуть вопросы, оставшиеся без внимания в большинстве других обзоров. Отметим вклад отечественных ученых в методологию олигонуклеотидного синтеза, включая его автоматизацию, среди которых нужно особо выделить (приведа по алфавиту) Т.В.Абрамову, Ю.А.Берлина, А.Г. Веньяминову, В.В. Власова, В.В.Горна, С.М.Грязнова, В.А.Ефимова, С.М.Женодарову, В.Ф.Зарытову, Д.Г.Кнорре, М.С. Купрюшкина, В.К.Потапова, М.А.Прокофьева, Д.В. Пышного, А.Н.Синякова, Ю.Г.Средина, З.А.Шабарову<sup>4</sup>.

Однако наш обзор близко не может претендовать на исчерпывающую полноту, поскольку объять необъятное невозможно, а именно это и имеет место в связи с вопросами относительно разнообразия подходов к синтезу олигонуклеотидов и их

<sup>1</sup> На Всемирном экономическом форуме в 2019 г. в Давосе технология 'DNA Data Storage' была включена в Перечень десяти прорывных технологий, которые кардинально изменят жизнь человечества в будущем.

<sup>2</sup> чему мы недавно посвятили отдельную статью [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025]

<sup>3</sup> если химический синтез позволяет синтезировать с приемлемым выходом олигонуклеотиды длиной до 100 звеньев, то ферментативный позволяет синтезировать до 1000 звеньев и даже более

<sup>4</sup> заранее приносим свои извинения, если вдруг кто-то оказался нами забыт

многопланового использования. В качестве подтверждения этих слов достаточно обратиться к раннему обзору американских авторов [Amarnath, Broom, 1977], в котором уже на тот момент<sup>5</sup> список цитированной литературы составил 565 наименований, причем на долю отечественных ученых пришлось 64 публикации 1964-1975 гг.

Таким образом, здесь нами изложена лишь совсем малая толика из гигантского объема информации по олигонуклеотидному синтезу с тем расчетом, чтобы в целом, насколько это возможно, отразить ландшафт исследований в этой гигантской области человеческих знаний, и смеем надеяться, что наиболее важные моменты не были упущены. При этом, не имея возможности бесконечно увеличивать список цитируемой литературы, вынуждены ограничиться по большей части только пионерными работами и некоторыми наиболее значимыми результатами, полученными на разных этапах во многом благодаря олигонуклеотидному синтезу, а также отдельными публикациями отечественных авторов.

Разбив семь десятилетий химического синтеза олигонуклеотидов на ряд этапов (десятилетий), хотим заметить, что они довольно условны, поскольку в ходе одного этапа зарождались подходы, в полной мере проявившиеся в следующем десятилетии или даже позже. Тем не менее, подобное деление в виде этапов большого пути, на наш взгляд, имеет право быть. При этом нельзя исключать того, что предложенные некоторое время назад те или иные подходы к химическому синтезу олигонуклеотидов, включая технологические решения и пока остающиеся почти незамеченными, проявят себя в будущем.

#### Первое десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Как уже говорилось выше, более 70 лет назад в августе 1955 г. была опубликована эпохальная статья, в которой сообщалось о химическом синтезе тиминовых динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью 3' : 5'<sup>6</sup> [Michelson, Todd, 1955]. Отдавая должное важности этого события<sup>7</sup>, Нобелевский комитет вскоре присудил Лорду А.Тодду Нобелевскую премию по химии 1957 г. за исследования нуклеотидов и нуклеотидных коферментов.

При химическом синтезе первых двух динуклеотидов d(TrT) и d(pTrT) с фосфодиэфирной связью, произведенном в лаборатории Тодда, использован метод синтеза, позже названный фосфотриэфирным, однако он затем фактически оказался забытым на целое десятилетие. Природный характер образовавшейся межнуклеотидной связи был подтвержден ферментативным разрушением созданного динуклеотида. Чуть позже под руководством Тодда синтезирован динуклеотид аденозил-уридинфосфат, что было сделано уже другим методом [Hall et al., 1957]. Разработанный тогда ими новый способ синтез также оказался забыт, и только через три десятилетия он обрел новое рождение в виде *H*-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов, которого ниже коснемся.

Как ни странно, но Тодд вскоре потерял интерес к синтезу олигонуклеотидов, а его коллега А.М.Мичелсон в конце 1950-х гг покинул Кембридж, но при этом в 1963 г. опубликовал фундаментальный труд в виде книги 'The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides'. Незадолго до этого Michelson с коллегами подготовили несколько статей, в одной из которых он сообщил о синтезе олигонуклеотидных аналогов с измененной углеводной частью и включением серы в остаток фосфорной кислоты [Michelson, 1962].

Одной из причин забвения в конце 1950-х гг. разработанных в лаборатории Тодда двух разных методов синтеза олигонуклеотидов стало появление в те же годы (третьего) фосфодиэфирного метода синтеза [Gilham, Khorana, 1958], разработанного под руководством Х.Г.Кораны<sup>8</sup>, ставшего спустя 10 лет Нобелевским лауреатом по физиологии и медицине 1968 г. за вклад в расшифровку генетического кода и изучение механизмов синтеза белков», разделив премию с М.Ниренбергом и Р.Холли.

Фосфодиэфирный метод синтеза, в котором происходит конденсация нуклеозидного компонента с незащищенной 3'-ОН-группой с нуклеотидным компонентом, несущим свободную 5'-фосфомоноэфирную группу, надолго стал основным методом, с помощью которого велся синтез олигонуклеотидов. Однако одним из главных его недостатков была крайне низкая скорость конденсации. Причем, такой синтез был «под силу» только высококлассным химикам.

<sup>5</sup> рукопись этой статьи получена редакцией 9 января 1976 г.

<sup>6</sup> так в то время было принято указывать направление цепи ДНК

<sup>7</sup> вполне возможно, что тогда Нобелевский комитет проявил огромную прозорливость, не до конца понимая всю важность олигонуклеотидного синтеза

<sup>8</sup> стоит заметить, что у Нобелевских лауреатов 1957 и 1968 гг. А.Тодда и Х.Г.Кораны имеется совместная публикация 1953 г. (за их совместным авторством и без иных соавторов), ставшая результатом работы второго в лаборатории первого, в которой они описали новый метод получения пиррофосфатов [Khorana, Todd, 1953].

На протяжении многих лет под руководством Кораны продолжалось совершенствование фосфодиэфирного метода синтеза олигонуклеотидов. Важным прорывом явилось применение для конденсации дидеоксигексилкарбодимида при синтезе 'dideoxynucleotides'<sup>9</sup> [Khorana et al., 1957]. Однако позже выяснилось, что арилсульфохлориды для этого предпочтительнее. При этом Кораной с коллегами были предложены защитные соединения для реакционных групп нуклеотидов и нуклеозидов [Schaller et al., 1963], часть которых до сих пор используются при синтезе олигонуклеотидов уже другими методами. Но при этом Кораной защита фосфатных групп не производилась, что на самом деле вело к появлению побочных продуктов.

Синтез олигонуклеотидов в те годы осуществлялся двояко: в ступенчатом варианте очередной нуклеотид присоединялся шаг за шагом, тогда как в блочном варианте присоединение происходило изначально синтезированными блоками по два-три-четыре нуклеотида<sup>10</sup> с тем расчетом, чтобы при синтезе основного более протяженного олигонуклеотида уменьшить число этапов конденсации ввиду требующегося для них продолжительного времени [Weimann, Khorana, 1962].

#### Второе десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Несмотря на то, что фосфодиэфирный метод синтеза олигонуклеотидов продолжал активно использоваться до конца 1970-х гг., тем не менее, мы решили отсчет второго этапа (десятилетия) химического синтеза олигонуклеотидов начать с 1965 г., когда был предложен способ синтеза на твердой фазе, которой послужили гранулы сополимера стирола и дивинилбензола [Letsinger, Mahadevan, 1965]. С учетом того, что твердофазный синтез решает сразу много проблем с удалением ставших ненужными реагентов и очисткой промежуточного продукта при переходе от одного этапа к другому без трудоемкого хроматографического разделения продуктов реакционной смеси, неудивительно, что на выбор носителя для синтеза олигонуклеотидов

оказалось обращено пристальное внимание. При этом предложено таких немало, но их коснемся в специальном разделе дальше.

Во второй половине 1960-х гг. внимание исследователей оказалось вновь обращено на первоначальный фосфотриэфирный метод, и были предложены его серьезные усовершенствования [Eckstein, Rizk, 1967; Letsinger et al., 1967; Reese, Saffhill, 1968; Letsinger, Ogilvie, 1969]. Следующие улучшения этого метода, резко увеличившие его производительность, сделаны в 1973 г. [Catlin, Cramer, 1973; Itakura et al., 1973], что позволило назвать его модифицированным фосфотриэфирным методом. Используя предложенные подходы стало возможным синтезировать 20-ти звенные олигонуклеотиды за несколько месяцев, тогда как ранее на это уходил целый год или даже больше.

Возвращаясь в середину 1960-х гг., надо сказать, что интересным решением стало применение для синтеза олигонуклеотидов растворимых носителей (осаждаемых затем другим растворителем), что облегчило переход от одного этапа к другому при синтезе в растворе, обеспечивающим почти количественный выход благодаря тому, что все реакции идут в однородной среде [Cramer et al., 1966; Hayatsu, Khorana, 1966; 1967]. Толчком к такому варианту синтеза олигонуклеотидов послужила работа отечественных ученых по пептидному синтезу, в которой ими предложена эта красивая идея [Shemyakin et al., 1965]. Причем в конце своей статьи они упомянули, что, помимо пептидного синтеза, такой подход также может быть применен для синтеза олигонуклеотидов и полисахаридов. Но на данных вопросах остановимся отдельно ниже.

Применение растворимых носителей для синтеза олигонуклеотидов заставило авторов твердофазного синтеза в своей новой публикации [Letsinger, Mahadevan, 1966], дабы сразу разграничить используемую ими методику синтеза, вывести в заголовок слова об использовании нерастворимого полимерного носителя, коими в той их работе послужили несколько иные сополимеры стирола с *n*-винилбензойной кислотой, с 2,3-диметилбутадиеном и с 0,2% *n*-дивинилбензолом в качестве сшивающего агента.

В то (второе) десятилетие была завершена расшифровка генетического кода, что без синтеза большого количества олигонуклеотидов фосфодиэфирным методом сделать тогда было проблематично или даже невозможно и Кораной вместе с сотрудниками внесен большой вклад в то глобальное исследование, что отмечено Нобелевской премией, о чем говорилось выше. Также под руководством Кораны проведен синтез фосфодиэфирным методом полноразмерного гена для аланиновой тРНК дрожжей и это стало тогда

<sup>9</sup> нужно заметить, что тогда под 'dideoxynucleotides' понимали обычные динуклеотиды, объединенные фосфодиэфирной связью, а не современный «дидезоксирибонуклеотид», лишенный второй гидроксильной группы в углеводном компоненте, который нашел применение в ферментативном секвенировании ДНК по Сэнгеру с дидезокситерминаторами

<sup>10</sup> к блочному синтезу олигонуклеотидов мы еще вернемся

грандиозным достижением, о чем было сообщено в 1970 г. [Agarwal et al., 1970].

### Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов началось с того, что в 1975 г. вышла статья [Letsinger et al., 1975], в которой было обращено внимание, что трехвалентный фосфор гораздо реакционноспособнее, нежели пентавалентный. Это привело к разработке нового метода синтеза олигонуклеотидов, названного фосфиттриэфирным [Letsinger, Lunsford, 1976] и получившего дальнейшее развитие, в том числе в твердофазном варианте [Matteucci, Caruthers, 1980], что явилось важным шагом на пути к автоматизации всего процесса. В своей следующей статье [Matteucci, Caruthers, 1981] эти авторы привели схему аппарата для «машинного» синтеза олигонуклеотидов, на которой изобразили реакционную колонку, сосуды с реагентами, насос, инжектор, спектрофотометр для контроля качества процесса синтеза. Наибольшего прорыва удалось достичь после того, как оказался разработан новый вариант фосфиттриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов, названный амидофосфитным, в котором в качестве синтонов стали применяться амидофосфиты дезоксиинуклеозидов [Besaue, Caruthers, 1981]. После того, как в качестве активатора стал использоваться 1*H*-тетразол этот метод получил дополнительное серьезное преимущество [McBride,

Caruthers, 1983]. Применение для защиты фосфитной группы β-цианоэтильной группы заметно упростило депротекцию и выделение конечного продукта [Sinha et al., 1984].

При этом в те годы продолжалось совершенствование и фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов [Narang et al., 1979; 1980; Efimov et al., 1982]. Целый ряд дальнейших улучшений амидофосфитного метода привел к тому, что в настоящее время он стал основным методом синтеза олигонуклеотидов и на нем стоит остановиться подробнее.

В амидофосфитном методе для синтеза олигонуклеотидов в качестве синтонов используются амидофосфиты, представляющие собой по сути обычные азотистые основания, в которых все реакционноспособные группы (амино-, гидроксильные, фосфатные) защищены соответствующими блокаторами нежелательных реакций. Так, для остатков аденозина и цитидина применяются 6-*N*-бензоил (Bz), а для гуанозина используется 2-*N*-изобутирил (iBu), тогда как тимидин не требует подобной защиты ввиду отсутствия у него экзоциклических аминогрупп. Фосфитная группа защищается β-цианоэтильной группой (CE), а также диизопропиламинной группой (iPr<sub>2</sub>N), тогда как 5'-ОН группа защищается диметокситритилом (DMT). Структурные формулы ставших классическими амидофосфитов приведены на рис. 1.

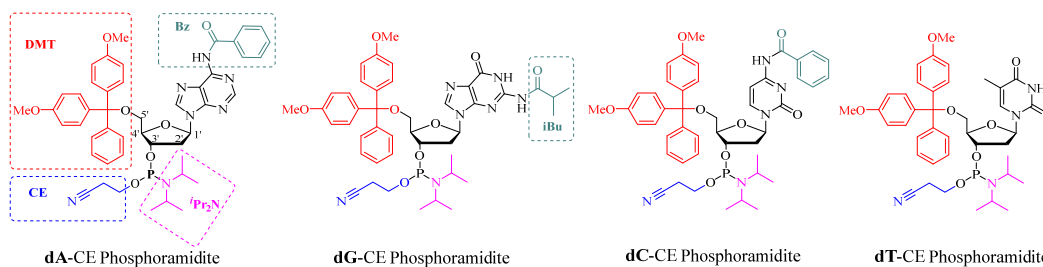


Рис. 1. Структурные формулы четырех основных амидофосфитов, где защитные группы выделены цветом и заключены в рамки  
 Fig. 1. Structural formulas of the four main phosphoramidites, where the protective groups are highlighted in color and enclosed in frames

Помимо перечисленных защитных групп предложено также немало иных, в том числе обеспечивающих более мягкие условия финальной депротекции, но при этом страдающие другими недостатками. Большинство таких защитных групп удаляются по завершению всего синтеза, за исключением 4,4'-диметокситритильной группы, которая удаляется в начале каждого цикла, так как к данному месту присоединяется очередной нуклеотид.

Кроме амидофосфитов в виде стандартных нуклеозидов, могут использоваться и другие синтоны с модифицированными азотистыми основаниями, а также синтоны, служащие для дальнейшего введения различных реакционных групп, используемых обычно постсинтетически для мечения олигонуклеотидов флуоресцентными красителями, биотином, либо для введения прочих модификаций.



одного цикла, однако большинство из них излишне схематичны и не дают полного представления о входящих субстратах и удаляемых защитных группах. Мы попытались изобразить наиболее полное прохождение этих процессов, акцентируя внимание, что циклами синтеза правильнее считать добавление третьего и последующего фосфорамидитов, поскольку первый этап депротекции следует считать лишь вхождением в циклический процесс.

Представленная на рис. 2 схема синтеза начинается с азотистого основания, обозначенного как  $V_1$ . По ходу синтеза к нему присоединяется азотистое основание  $V_2$  и затем очередные азотистые основания обозначенные как  $V_n$  и они могут быть лобными, как несущими защитные группы (Bz, iBu), так и без оных для T. Во время конденсации при добавлении очередного нуклеотида удаляется также диизопропиламинная группа, на место которой на стадии окисления или сульфуризации встает кислород (O) или сера (S) и соответственно возникает природная фосфодиэфирная связь либо тиофосфатная, устойчивая к действию нуклеаз. Но перед этим проводится этап экпирования, служащий для блокирования непрореагировавших субстратов и вывода их из дальнейшего синтеза, в противном случае в следующем цикле к ним может присоединиться следующий нуклеотид, создав тем самым пропуск нуклеотида. Для продолжения синтеза и перехода к следующему циклу производится удаление DMT. Оно также производится по завершению синтеза и снятия готового олигонуклеотида с твердой фазы и финальной депротекции.

В результате удаления слабой кислотой защитной диметокситритильной группы у закрепленного на твердой фазе стартового нуклеотида (или у последнего нуклеотида при продолжающемся синтезе) появляется свободная 5'-гидроксильная группа, к которой на следующей стадии конденсации будет присоединен очередной нуклеотид, доставляемый в реакцию в виде активированного каким-либо азолом (например, 1*H*-тетразолом) соответствующего фосфорамидита, согласно прописи синтезируемой нуклеотидной последовательности. Сейчас такая конденсация протекает за считанные секунды (около 20 сек) и в результате олигонуклеотид удлиняется на одно звено. Несмотря на добавление активированного фосфорамидита в большом избытке, не исключается вероятность того, что не все свободные 5'-ОН группы с ним прореагируют и тогда в реакционной смеси могут остаться олигонуклеотиды из предыдущего цикла, готовые к реакции со следующим фосфорамидитом, следствием чего станет ошибка синтеза в виде пропущенного нуклеотида. Чтобы это исключить требуется стадия экпирования,

в ходе которой происходит выведение из дальнейшего процесса синтеза непрореагировавшей во время конденсации части 5'-гидроксильных групп путем их ацетилирования, устойчивого к действию слабых кислот в следующих циклах при удалении новых диметокситритильных групп. В результате конденсации между соседними нуклеотидами формируется неприродная трехкоординированная фосфитная связь, которую необходимо окислить и образовать через фосфотриэфирную фосфодиэфирную связь. Либо создать тиофосфатную путем сульфуризации. Так, в 1984 г. было сообщено о синтезе амидофосфитным методом модифицированного олигонуклеотида с тиофосфатной связью, в котором вместо одного из кислородов фосфатной группы находится сера [Stec et al., 1984]. При этом нужно заметить, что подобные модификации с присутствием серы в межнуклеотидной связи осуществлялись и раньше с помощью фосфотриэфирного метода [Cook et al., 1969]. В итоге на твердой фазе будет находиться синтезируемый тот или иной олигонуклеотид с защищенной 5'-гидроксильной группой, которую для начала нового цикла требуется удалить, как описано выше.

По завершению синтеза производится снятие всех защитных групп и самого синтезированного олигонуклеотида с твердофазного носителя аммонолизом, что приводит к появлению функциональной одноцепочечной ДНК с гидроксильными группами на 3'- и 5'-концах (в случае синтеза обычного немодифицированного олигонуклеотида) после чего готовый олигонуклеотид осаждают этанолом и в отдельных случаях его уже можно использовать. Дальнейшая очистка синтезированного олигонуклеотида в зависимости от его состава (модификаций) и стоящих задач проводится или с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, или высокоэффективной жидкостной хроматографией.

При эффективности олигонуклеотидного синтеза амидофосфитным методом, превышающей обычно 99,5%, выход целевого продукта в виде 20-звенного олигонуклеотида составляет более 90% и из них менее 1% может быть представлено олигонуклеотидом из 19 звеньев (N-1), причем недоставать будет только концевой нуклеотида на 5'-конце, малозначимого для проведения ПЦР и некоторых других задач. Однако при необходимости клонирования образующегося ампликона в некоторых случаях бывает важен нуклеотид на 5'-конце праймера (олигонуклеотида). Синтез олигонуклеотидов обычно ведется в направлении 3'→5' и на их 5'-конце будет отсутствовать присущая природной ДНК фосфатная группа, и для ее введения во время синтеза необходимо использовать специальный синтон или проводить постсинтетическую модификацию с

помощью АТФ и полинуклеотидкиназы фага Т4 в тех случаях, когда предстоит этап клонирования ампликонов, хотя иногда можно обойтись и без этого, предоставив такому фосфорилированию произойти *in vivo*.

В настоящее время синтез, например, 20-звенного олигонуклеотида занимает менее трех часов в отличие от многих месяцев, требовавшихся на такой синтез использовавшимися ранее методами олигонуклеотидов даже меньшей длины, не говоря уже о крайне низком прежде выходе конечного продукта.

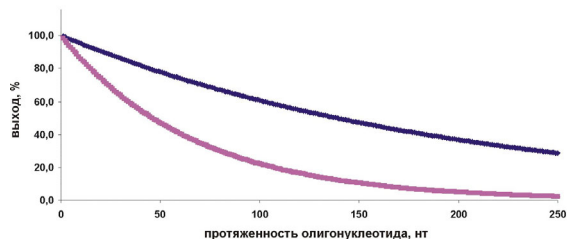


Рис. 3. Теоретический выход олигонуклеотидов в зависимости от их длины и разной эффективности синтеза. Синяя кривая – 99,5%, фиолетовая – 99% усредненных эффективностей синтеза в каждом цикле.

Fig. 3. Theoretical yield of oligonucleotides depending on their length and different synthesis efficiency. The blue curve is 99.5%, the purple one is 99% of the average synthesis efficiencies in each cycle.

Эффективность присоединения очередных нуклеотидов в первых и последних циклах для протяженных олигонуклеотидов будет заметно различаться, но поскольку это трудно оценить, то обычно приводят единые значения для всех циклов (рис. 3). При этом многие фирмы принимают заказы на синтез олигонуклеотидов до 100 звеньев длиной, что в целом гарантирует и выполнение заказа и точность синтеза.

В описываемое десятилетие благодаря химическому синтезу олигонуклеотидов получены важные результаты. Так, в 1975 и в 1977 гг. фосфотриэфирным методом разными группами авторов синтезирован лактозный оператор *E.coli* в виде 31 п.н. дуплекса [Itakura et al., 1975; Goeddel et al., 1977]. Поскольку аминокислоты кодируются тремя нуклеотидами, то в 1978 г. также фосфотриэфирным методом синтезированы все 64 возможных тринуклеотидных синтона [Hirose et al., 1978], после чего 32 из них использованы для синтеза генов А и В цепей инсулина человека [Crea et al., 1978]. В 1979 г. сообщено о завершении многолетней работы по синтезу фосфодиэфирным методом функционально-активного гена для тирозинового супрессора тРНК *E.coli* общей длиной 207 п.н.

[Khorana, 1979]. В 1981 г. вышла статья, описывающая синтез гена интерферона человека размером 514 п.н., для чего потребовался синтез с помощью твердофазного фосфотриэфирного метода 66 олигонуклеотидов разного размера [Edge et al., 1981].

Однако во всех этих работах использовались довольно короткие олигонуклеотиды, в большинстве своем не превышающие в длину 20 звеньев, но благодаря амидофосфитному методу в 1983 г. удалось синтезировать два олигонуклеотида длиной 51 звено каждый, что сделало их на тот момент самыми длинными, полученными химическим синтезом без каких-либо ферментативных этапов лигирования [Adams et al., 1983].

Но самый важный результат того десятилетия, непосредственно связанный с олигонуклеотидами, это разработка К.Мюлисом в 1983-1985 гг. полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Saiki et al., 1985], за что ему в 1993 г. присуждена Нобелевская премия. Причем Мюллис в то время работал химиком-синтетиком в американской фирме Cetus и сам синтезировал олигонуклеотиды, что сыграло немаловажную роль в этом его изобретении. Хотя, справедливости ради, следует сказать, что еще в конце 1960-х гг. в лаборатории Кораны был поставлен эксперимент с использованием некоей матрицы длиной 30 нуклеотидов и двух направленных навстречу друг другу праймеров длиной 9 и 10 нуклеотидов, результат которого доложен К.Клеппе на Gordon Conference on Nucleic Acids в 1969 г., идейно очень близкий к тому, что позже сделал Мюллис [Templeton, 1992].

В рассматриваемое десятилетие, помимо разработки ПЦР, в 1978 г. предложен другой очень важный метод в виде сайт-направленного мутагенеза, в котором олигонуклеотиды играют решающую роль, за что также была присуждена Нобелевская премия по химии М.Смиту вместе с Мюллисом.

Появление ПЦР с термостабильной Taq полимеразой [Kogan et al., 1987; Saiki et al., 1988] очень сильно изменило не только молекулярную биологию, но и многие смежные дисциплины, вызвав массовый синтез коротких олигонуклеотидов для их использования в ПЦР в качестве праймеров, но это уже произошло в следующее десятилетие.

#### Четвертое и последующие десятилетия химического синтеза олигонуклеотидов

Поскольку в предыдущие три десятилетия в плане совершенствования химического синтеза олигонуклеотидов как фосфодиэфирным, фосфотриэфирным, фосфитным и амидофосфитным методами были достигнуты серьезные успехи, то в дальнейшем грандиозных прорывов казалось бы ждать не приходилось. Тем не менее, в 1986 г. опубликованы две статьи [Froehler et al., 1986; Garegg

et al., 1986], в которых *H*-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотидов после его первоначальной разработки в конце 1950-х гг. под руководством Тодда [Hall et al., 1957] после тридцатилетнего забвения можно сказать возродился и до сих пор используется, но в небольших масштабах. При этом *H*-фосфонатная химия больше подходит для синтеза олигонуклеотидов с различными модификациями фосфатной группы [Kraszewski, Stawinski, 2007]. Некоторое время продолжалось совершенствование и фосфотриэфириного метода синтеза олигонуклеотидов [Efimov et al., 1986].

А в 1991 г. родилось новое направление в твердофазном синтезе в виде микрочипового способа синтеза олигонуклеотидов *in situ*, в котором на подходящей подложке из стекла, кремния, карбида кремния либо полиэтилентерефталата одновременно синтезируются множество олигонуклеотидов с отличающимися последовательностями. При этом они или остаются на своих местах после завершения синтеза и завершающего деблокирования, становясь в этом случае ДНК-чипами и служа для проведения молекулярной гибридизации с исследуемыми образцами ДНК или РНК, либо происходит удаление всех олигонуклеотидов в виде их пула в единый раствор для последующих операций с ними для синтеза генов [Tian et al., 2004], или для организации долговременного хранения небиологических данных в молекулах ДНК [Rebimbas et al., 2026].

Так, в статье, посвященной управляемому светом<sup>11</sup> синтезу 1024 пептидов на твердой подложке, которой служило микроскопное предметное стекло, заодно было сообщено о синтезе подобным образом и динуклеотида [Fodor et al., 1991]. Спустя несколько лет этими авторами была выполнена работа [Pease et al., 1994], в которой создан прообраз специального ДНК-чипа для секвенирования путем гибридизации, содержащий в тот момент на аналогичной стеклянной подложке 256 октануклеотидов, синтезированных *in situ* с помощью фотолитографии для чего предварительно синтезированы соответствующие амидофосфиты с фотолabileйной N-ацильной группой. Также было подсчитано, что для ДНК-чипов с подобной плотностью с учетом дифракции света 65536 октануклеотидов могут разместиться на площади 0,64 кв.см, а 1048576 додекануклеотидов разместятся на 2,56 кв.см.

Однако вышеописанный способ микрочипового синтеза с использованием масок требует заранее изготовленного большого их количества. Так, для

синтеза 25-ти звенного олигонуклеотида таких масок необходимо 100 (4×N). Причем смены таких масок занимают немало времени и это сильно увеличивает продолжительность синтеза. Применение технологии DMD (Digital Micromirror Device) или иначе цифрового микрозеркального устройства, используемого в DLP-проекторах, позволило вести безмасочный синтез олигонуклеотидов *in situ* [Singh-Gasson et al., 1999], что нашло затем широкое применение. Важным преимуществом безмасочного синтеза является упрощенная возможность коммерческого изготовления ДНК-чипов с любыми нуклеотидными последовательностями заказчика.

Другой подход к синтезу олигонуклеотидов *in situ* на подходящей поверхности заключается в использовании специального струйного принтера, доставляющего необходимые реагенты в нужное место [Blanchard et al., 1996]. Позднее было сообщено, что, используя эту технологию, удалось добиться *in situ* синтеза олигонуклеотидов длиной до 150 звеньев [LeProust et al., 2010]. При синтезе ДНК-чипов описано также применение полупроводниковых фоторезистов [McGall et al., 1996].

Еще одним способом синтеза олигонуклеотидов *in situ* на подложках из стекла и прочих материалов служит электрохимическое управление этим процессом [Egeland et al., 2002; 2005]. Не так давно сообщено об изготовлении ДНК-чипов с 25 млн. точек (т.е. разных олигонуклеотидов) на 1 кв. см, что достигнуто с помощью электрохимически направленного синтеза ДНК в виде избирательного приложения напряжения к реакционным точкам, вызывающего окислительно-восстановительное превращение гидрохинона/бензохинона в органическом растворителе, ведущее к локальному образованию протонов, удаляющих диметокситриглицеридную защитную группу у растущих олигонуклеотидов и обеспечивающих присоединение очередного нуклеотида [Nguyen et al., 2021].

Предложенные подходы к изготовлению ДНК-чипов<sup>12</sup> путем синтеза олигонуклеотидов *in situ* коммерциализованы различными фирмами и имеют устойчивый спрос. Олигонуклеотидному синтезу *in situ* посвящено немало обзоров разных лет [Gao et al., 2004; Ma et al., 2024], в которых имеется большое количество ссылок на оригинальные работы, с которыми при необходимости можно ознакомиться и поэтому на этих вопросах больше останавливаться не будем.

<sup>11</sup> в местах, где должен присоединяться очередной пептид (нуклеотид), свет, направляемый через специальную маску, снимал защитную фотолabileйную группу

<sup>12</sup> Изготовление ДНК-чипов посредством нанесения предсинтезированных олигонуклеотидов на твердую подложку с помощью специального струйного принтера или каким иным способом здесь нами не рассматривается.

Выше уже отмечалось, что химический синтез олигонуклеотидов амидофосфитным методом ведется в направлении 3'→5', однако разработан и обратный вариант в виде 5'→3' колоночного синтеза [Wagner, Pfeiderer, 2000], но он значительно дороже ввиду гораздо меньшего масштаба использования и применяется для особых целей. Что касается синтеза *in situ* с целью изготовления ДНК-чипов, то синтез в направлении 5'→3' имеет определенное значение так как позволяет получать олигонуклеотиды, фиксированные на подложке по 5'-концу и со свободными 3'-концами, пригодными для их удлинения с помощью подходящей ДНК полимеразы, например при детекции однонуклеотидного полиморфизма и посему такой подход в ряде случаев используется [Beier, Hoheisel, 2002; Albert et al., 2003; Hölz et al., 2018].

Как уже говорилось выше, в предыдущем десятилетии для синтеза генов были заготовлены синтоны всех возможных 64 триплетов<sup>13</sup> [Hirose et al., 1978], но в 1990-х гг. к этому вернулись и подобные синтоны оказались представлены триплетными амидофосфитами с целью некоего упрощения синтеза генов, кодирующих белки. На протяжении ряда лет такие работы проводились несколькими группами ученых, включая россиян [Sondek, Shortle, 1992; Virnekäs et al., 1994; Ono et al., 1995; Kayushin et al., 1996]. Впрочем, это можно считать не повторением 1970-х гг., а вариантом предложенного еще Кораной в начале 1960-х гг. блочного синтеза олигонуклеотидов. Однако широкого распространения такой подход не получил.

Тем не менее, недавно предложено использовать синтоны из динуклеотидов, которых достаточно иметь всего 16 разных [Shi et al., 2024]. Как ни странно, но в будущем, возможно, это будет востребовано в большей степени, чем триплетные синтоны, поскольку появляется возможность для хранения цифровой информации в молекулах ДНК обходиться еще меньшим количеством динуклеотидных синтонов, потенциально увеличивая (теоретически в два раза) длины синтезируемых олигонуклеотидов, доведя их до 500 звеньев вместо пока максимальных 250<sup>14</sup>, что также весьма важно. Так, для бинарных чисел «0» и «1» в их двухразрядной кодировке комбинаций может быть

<sup>13</sup> Здесь, пожалуй, стоит вспомнить, что еще в 1966 г. Корана с сотрудниками синтезировали все 64 варианта триплетов в виде риботринуклеотидов [Lohrmann et al., 1966], что способствовало выяснению генетического кода.

<sup>14</sup> Что касается максимально возможной длины синтезируемых олигонуклеотидов химическим путем, то к этому вопросу обратимся ниже.

только четыре: «00», «01», «10», «11» и, используя при этом принцип пиримидин-пуринового кодирования соответственно «нулей» и «единиц», достаточно будет всего четырех синтонов из динуклеотидов - 'PyPy', 'PyPu', 'PuPy', 'PuPu'. Однако для исключения появления нежелательных вторичных структур в реально синтезируемой нуклеотидной последовательности, состоящей в итоге из тех же А, С, G и Т, нужно озаботиться о некоторой вырожденности уже «компьютерно-нуклеинового кода» для чего следует заготовить восемь динуклеотидных синтонов (например, с учетом 50% GC состава в них - вот этих: 'CT' и 'TC', 'CA' и 'AC', 'GT' и 'TG', 'AG' и 'GA') и это вполне может быть приемлемо для подобного синтеза.

Помимо обычных линейных олигонуклеотидов описан синтез их разветвленных форм в виде дендримеров за счет использования специальных синтонов, что позволяет применять их как в качестве праймеров, так и гибридизационных проб с увеличенным числом меток на 5'-концах [Shchepinov et al., 1997], а также для создания различных объемных наноконструкций [Shchepinov et al., 1999]. Другими авторами предложены аналогичные разветвленные олигонуклеотидные конструкции под названием bDNA (branched), имеющие схожее предназначение [Horn et al., 1997]. Описано также разветвление синтезируемых олигонуклеотидов через остатки фосфорной кислоты [Heinonen, Lönnberg, 2004].

Тем же Caruthers с соавторами предложено амидофосфитный олигонуклеотидный синтез, состоящий из четырех этапов, сократить до двух этапов за счет использования перокси аниона, обеспечивающего депротекцию (удаление карбоновой защиты вместо тритильной) и окисление, а также обходиться без стадии кэпирования [Sierzchala et al., 2003; Dellinger et al., 2005].

Во Введении мы упомянули про модифицированные олигонуклеотиды с измененными азотистыми основаниями, углеводной частью и остатками фосфорной кислоты, что со временем привело к необходимости использования для них специальной аббревиатуры в виде XNA. Неприродных нуклеиновых кислот, устойчивых в частности к действию нуклеаз, синтезировано уже немало, и про тиофосфатные речь уже шла и пойдет еще. Здесь же в хронологическом порядке осуществления синтеза таких соединений приведем некоторые из них, преимущественно с иным углеводным компонентом, в ряде случаев заметно увеличивая стабильность образуемых с ними гетеродуплексов.

Итак, аббревиатура XNA объединяет такие модификации как РМО (Phosphorodiamidate

Morpholino Oligonucleotide) [Stirchak et al., 1989], PNA (Peptide) [Nielsen et al., 1991], ANA (Arabinose) [Giannaris et al., 1994], HNA (Hexitol) [Van Aerschot et al., 1995], UNA (Unlocked) [Nielsen et al., 1995], XyloNA (Xylose) [Aleksseev et al., 1996], BNA (Bridged) [Obika et al., 1997; 1997a], LNA (Locked) [Singh et al., 1998], tc-DNA (tricyclo) [Steffens et al., 1999], CeNA (Cyclohexene) [Wang et al., 2000], TNA (Threose) [Schöning et al., 2000], GNA (Glycol) [Zhang et al., 2004], ONA (Oxepane) [Sabatino et al., 2007], SNA (Serinol) [Kashida et al., 2011], BuNa (acyclic (S)-butyl) [Kumar et al., 2013], PGO (Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides) [Купрюшкин и др. (Kupryushkin et al.), 2014]. Справедливости ради следует заметить, что впервые углевод в нуклеозиде заменил Michelson [1962].

Недавно японскими авторами вместо XNA предложено другое обозначение модифицированных нуклеиновых кислот –  $\Omega$ NA (Omega) [Hamada et al., 2026]. Ими было показано, что практически все буквы латинского алфавита уже задействованы при обозначении неприродных химически синтезируемых нуклеиновых кислот. Но, они в частности, не отметили форму ДНК в виде L-DNA [Urata et al., 1992], являющейся стереоизомером природной и ее особенность заключается в том, что две цепи L-DNA с комплементарными нуклеотидами двойную спираль меж собой не формируют, что бывает востребовано в молекулярной биологии в отдельных случаях. Что касается PNA, то в отличие от присущего истинным молекулам ДНК, а также другим модификациям сахарофосфатного остова, как в виде вариаций его углеводного компонента, так и несколько видоизмененной фосфорной кислоты (тиофосфат, метилфосфонат, фторфосфат, амидофосфат, боранофосфат), соединяющих соседние азотистые основания фосфодиэфирной связью, в остове пептидно-нуклеиновой кислоты нет ни того, ни другого компонента или их аналогов, а состоит тот остов из N-(2-аминоэтил)глициновых остатков, связанных пептидной связью. Однако для некоторых задач в молекулярной биологии не столь важно, каким образом соединены соседние азотистые основания, поскольку главное, чтобы они находились друг от друга на расстоянии, обеспечивающем образование водородных связей с себе комплементарными в антипараллельной цепи (ДНК). В связи с PNA можно еще добавить, что с помощью безмасочной фотолитографии изготовлен ДНК-чип из 256 PNA олигонуклеотидов, размещенных на стеклянной подложке размером 210×210 мкм [Liu et al., 2007]. Также нельзя не отметить, что помимо PNA, электронейтральный остов имеют РМО и РГО, что способствует их проникновению в клетку, тогда

как прочие XNA несут большой суммарный отрицательный заряд.

Получение модифицированных олигонуклеотидов и концепция комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот, впервые сформулированная отечественными авторами, получившая международное признание и заложившая основу нового направления в терапии – антисмысловой (antisense) технологии [Belikova et al., 1967], открыли широкие возможности по созданию терапевтических нуклеиновых кислот [Talap et al., 2021].

В 2016 г. в медицинскую практику для лечения спинальной мышечной атрофии внедрен препарат «Спинраза», представляющий собой 18-ти звенный олигонуклеотид с тиофосфатными связями, придающими ему устойчивость к воздействию нуклеаз. После этого еще несколько препаратов на этом принципе стали использоваться в качестве лекарственных средств, и еще около сотни ожидают разрешения. Однако при обычном синтезе получается снижающая действие таких препаратов рацемическая смесь из гигантского количества стереоизомеров O-P-S/S-P-O связей, подчиняющему формуле  $2^n$ , где n соответствует числу нуклеотидов. Ранее было показано, что тиофосфатные Sp-олигонуклеотиды оказались более устойчивы к действию нуклеаз, нежели тиофосфатные Rp-олигонуклеотиды или их рацемическая смесь [Koziołkiewicz et al., 1997]. Другими авторами обнаружено, что использование 28-звенного тиофосфатного Sp-олигонуклеотида было более эффективно при антисенс-терапии [Inagawa et al., 2002]. Уже давно уделялось значительное внимание методам стереоконтролируемого синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Lu, 2006].

В последние годы приложены значительные усилия к получению чистых энантиомеров подобных олигонуклеотидов и для этого пришлось при синтезе «вернуться» к более подходящему для этой цели пятивалентному фосфору P(V) [Knouse et al., 2018; Huang et al., 2021; Nassir et al., 2025].

Поскольку мы в предыдущих разделах приводили наиболее важные результаты, полученные с использованием олигонуклеотидного синтеза, то и здесь продолжим это делать. Так, в области синтетической биологии выполнены эпохальные работы, в ходе которых под руководством К.Вентера были созданы (воспроизведены, исходя из известных геномных данных) первые полностью синтетические микроорганизмы – бактерии *Mycoplasma genitalium* с размером генома 582970 п.н. [Gibson et al., 2008] и *M. mycoides* с размером генома 1077947 п.н. [Gibson et al., 2010]. При этом для их многоэтапного конструирования синтезировано огромное количество олигонуклеотидов разной протяженности. Причем их авторы внедрили в эти геномы в межгенные участки

несколько коротких «водяных ДНК-знаков», свидетельствующих, что это искусственные микроорганизмы. Так, в частности, в геноме *M. mycoides* в четырех таких водяных знаках оказались закодированы фамилии авторов, их электронные адреса, а также три цитаты - “TO LIVE, TO ERR, TO FALL, TO TRIUMPH, TO RECREATE LIFE OUT OF LIFE.”- JAMES JOYCE; “SEE THINGS NOT AS THEY ARE, BUT AS THEY MIGHT BE.” – из книги “AMERICAN PROMETHEUS”; “WHAT I CANNOT BUILD, I CANNOT UNDERSTAND.” – RICHARD FEYNMAN. Собственно в использовании водяных ДНК-знаков эти авторы были не оригинальны и не одиноки, поскольку это делалось и до них при создании, например, трансгенных растений, о чем упоминается в одной из наших статей [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2021].

В еще одной работе уже из области DNA Data Storage в молекулах ДНК (олигонуклеотидах) было сохранено 35 различных файлов (размерами от 29 Кб до 44 Мб), представленных большим разнообразием их типов – txt, pdf, MP3, MP4, jpg, а также ряд архивированных общим объемом более 200 Мб [Organick et al., 2018]. Среди наиболее крупных и примечательных файлов следует отметить «Декларацию прав человека» на более чем 100 языках, видеоклип музыкальной рок-группы OK Go с песней «This Too Shall Pass», базу данных семян, хранящихся в Глобальном хранилище семян на Шпицбергене. Для этого потребовался синтез 13448372 олигонуклеотидов размерами 190 и 194 звена.

В описываемый в этом разделе период, занявший около четырех десятилетий из всего 70-ти летнего развития химического синтеза олигонуклеотидов, были совершены и иные достижения, но они будут приведены в последующих разделах, поскольку нам показалось, что так будет к месту и в целом логичнее.

#### **Носители для твердофазного колонного синтеза олигонуклеотидов**

Поначалу химический синтез олигонуклеотидов велся в растворе, но после разработки в 1965 г. синтеза на твердой фазе со временем появилась возможность его автоматизации, что было спустя полтора десятилетия осуществлено и к чему далее перейдем. При этом еще до этого в качестве носителя синтезируемых олигонуклеотидов после предложенного первым сополимера так называемого «попкорнового» типа из стирола с дивинилбензолом [Letsinger, Mahadevan, 1965] стали испытываться и другие макроскопических размеров носители, которых ниже кратко коснемся, не затрагивая при этом различных модификаций их поверхности, включая соединения для ковалентной пришивки к ним первых

(затравочных) нуклеотидов, к которым затем происходит присоединение последующих звеньев.

Так, отечественными авторами в 1971 г. был осуществлен синтез олигонуклеотидов на несколько измененных «попкорновых» носителях в виде изотактического полистирола и высокосшитого сополимера стирола и дивинилбензола, содержащего до 40% последнего [Потапов и др. (Potapov et al.), 1971; Зарытова и др. (Zarytova et al.), 1971]. Описано изготовление сополимерных носителей из стирола, дивинилбензола и *n*-метокси-*n*-винилтрифенилкарбинола [Потапов и др. (Potapov et al.), 1973]. Спустя несколько лет этой группой авторов был предложен иной носитель для твердофазного синтеза, представляющий собой привитый на тефлоновые гранулы полистирол [Потапов и др. (Potapov et al.), 1978; Potapov et al., 1979]. Другие отечественные авторы использовали для твердофазного синтеза макропористый силикагель, в том числе выпускаемый под торговой маркой «Силохром» [Добрынин и др. (Dobrynin et al.), 1983; Ломакин, Попов (Lomakin, Popov), 1985].

В 1972 г. в одном номере журнала Tetrahedron Letters вышла (следом друг за другом) целая серия статей немецких авторов, в которых ими предложены для твердофазного синтеза олигонуклеотидов разные носители, среди которых были шарики из непористого стекла (0,02 – 0,05 мм), а также силикагель [Köster, 1972]. Помимо них в той работе вскользь упоминались пористые кремнезем и стекло, причем применение последнего носителя получило развитие в их дальнейшей работе [Köster et al., 1983]. В 1977 г. другими авторами предложено использовать носитель из полидиметилакриламида [Gait, Sheppard, 1977], а также сшитый полиакрилморфолид [Narang et al., 1977], в 1980 г. применили в качестве носителя целлюлозные фильтры Whatman CC31 [Crea, Horn, 1980], в 1982 г. – сшитую полиакриламидную смолу [Gait et al., 1982] и носитель из кизельгура с полиамидом [Gait et al., 1982]. В 1984 г. опять вспомнили бумажные фильтры Whatman 3MM [Ott, Eckstein, 1984].

И это далеко не все испытывавшиеся носители для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, часть которых рассмотрена в специализированном обзоре [Pon, 1993].

Наиболее широко используемыми носителями для твердофазного синтеза олигонуклеотидов сейчас являются слегка набухающие в некоторых растворителях при синтезе полистирольные гранулы (PS), а также стойкое к различным реагентам пористое стекло с контролируемым размером пор, обозначаемое как `CPG` (Controlled Pore Glass), имеющее обычно диаметр шариков около 100 мкм, но отличающаяся размерами пор. Так, было проведено

исследование эффективности синтеза олигонуклеотида длиной 75 звеньев и обнаружено, что лучшие результаты достигались с СРГ с размером пор 1400Å [Kozlov et al., 2005]. В целом считается, что короткие олигонуклеотиды (до 20 звеньев) могут синтезироваться с использованием СРГ с порами 500Å, олигонуклеотиды средней длины (от 20 до 80 звеньев) требуют СРГ с порами 1000Å. Для более длинных олигонуклеотидов вплоть до 250 звеньев рекомендуется использовать СРГ с порами в 2000Å и 3000Å. При этом необходимо иметь ввиду, что общая площадь поверхности СРГ с увеличенным размером пор становится меньше. Однако с ростом олигонуклеотидных цепей при синтезе в порах СРГ они (цепи) будут препятствовать проникновению новых порций реагентов к реакционным группам.

При этом для многих случаев крайне важна точность синтеза, которая в целом неизбежно снижается с ростом длины синтезируемых олигонуклеотидов. И этому вопросу недавно было уделено значительное внимание отечественными авторами [Синяков, Костина (Sinyakov, Kostina), 2025; Yakovleva et al., 2026].

Некоторое время назад вышла статья [Yin et al., 2024], а затем и подробный протокол [Fang et al., 2024], в которых сообщалось о синтезе амидофосфитным методом в автоматическом ДНК-синтезаторе двух олигонуклеотидов длиной 399 и 401 звено, где в качестве носителя использован СРГ с порами в 2000Å. Для очистки синтезированных олигонуклеотидов авторы применили ранее разработанный ими подход [Fang, Fueangfung, 2010] с финальной полимеризацией целевого продукта фактически с полиакриламидным гелем за счет того, что последний синтон с нуклеотидом нес также специальные группировки в виде метакриламида и силильную группу, чтобы после удаления простой отмывкой загрязняющих реагентов, разрушить последнюю (силильную группу) и элюировать из геля готовый олигонуклеотид, ограниченный на 5'- и 3'-концах стандартными ОН-группами. Но на этом авторы тех работ не ограничились и позже опубликовали статью, в которой речь шла о синтезе олигонуклеотидов длиной 800 и 1728 звеньев [Yin et al., 2024]. В этом случае основной синтез (помимо контроля с использованием СРГ) велся в течение нескольких суток на твердой фазе из стеклянных волокон и стеклянных шариков с гладкой поверхностью, что исключало негативный вклад пор СРГ в рост цепей олигонуклеотидов. Диаметр таких волокон составлял около 8 мкм, а их длина могла достигать 1 см. Шарик имел диаметр 58 мкм. Выход 800-мерного олионуклеотида составил итоговые 0,38% на волокнах и 0,13% на шариках. 1728-мерный олигонуклеотид показал выход на

стеклянных шариках в 0,16%. Для их очистки применялся тот же описанный выше подход с приполимеризацией к полиакриламиду. При этом авторы оценили качество синтеза путем клонирования синтезированных продуктов и секвенирования по Сэнгеру в общей сложности более 100 колоний, показавшее от 85 до 96% точности для 800-звенного олигонуклеотида, но только 44% правильных последовательностей для 1728-звенного олигонуклеотида. Однако в любом случае это в настоящее время является рекордом длины синтеза олигонуклеотидов химическим путем. При этом выход таких длинных олигонуклеотидов весьма низок и с этим трудно что-либо кардинально поделать при использовании химического синтеза, разве что переходить к жидкофазному синтезу, где все реакции идут в однородной среде с практически количественным выходом.

Важное значение для повышения эффективности синтеза олигонуклеотидов приобретают пришиваемые к носителям активаторные молекулы [Miyazaki et al., 2022]. Недавно значительное внимание уделено использованию для синтеза олигонуклеотидов всевозможных гибридных носителей с использованием СРГ [Trzciński et al., 2024].

Помимо упомянутых выше различных носителей для синтеза олигонуклеотидов, предлагались и иные. Так, в 2013 г. вышла статья [Jensen et al., 2013], в которой описан синтез олигонуклеотидов в коммерческом ДНК синтезаторе с использованием стандартного протокола для амидофосфитного метода, где вместо СРГ или PS в качестве носителя в реакционной колонке использовались парамагнитные шарики размером 1 мкм, удерживаемые в ней с помощью находящегося внутри другого шарика, представляющего собой постоянный магнит, или, используя магнитную пластину снаружи, поскольку используемые фильтры в таких колонках имеют отверстия гораздо крупнее и не способны задерживать такие мелкие частицы. При этом авторы отметили, что синтез олигонуклеотидов на такой платформе позволяет синтезировать, помимо обычных олигонуклеотидов также и РНК и пептидно-нуклеиновую кислоту. Здесь нужно заметить, что еще в 1987 г. был выдан патент США за номером 4,638,032, в котором описывалось использование магнитных частиц в качестве носителей для синтеза на них различных полимерных соединений, включая ДНК, РНК и полипептиды [Benner, 1987].

#### **Растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов**

В середине 1960-х гг. в качестве растворимого носителя для синтеза олигонуклеотидов предложены растворимые в пиридине производные полистирола в

виде его производных с *p*-метокситритилхлоридом [Hayatsu, Khorana, 1966; 1967] и с *p*-метоксифенилфенилметилхлоридом [Cramer et al., 1966]. В 1973 г. для этой цели предлагалось использовать растворимый в смеси пиридина и гексаметилфосфоротриамида поливиниловый спирт [Schott, 1973].

Также рассматривалась возможность применения в качестве носителя для синтеза олигонуклеотидов полиэтиленгликоля (PEG) с молекулярным весом 20000, который растворим в воде, диоксане и в том же пиридине, что позволяет в одной фазе вести контроль за процессом конденсации [Köster, 1972a]. Спустя почти два десятка лет такой подход с PEG лег в основу растворимых носителей для олигонуклеотидного синтеза, и данная технология получила название 'HELP' (High Efficiency Liquid Phase), фактически объединив преимущества твердофазного синтеза и синтеза олигонуклеотидов в растворе фосфотриэфирным методом, переходя от стадии к стадии через осаждение диэтиловым эфиром и кристаллизацию без длительного хроматографического разделения продуктов для их очистки от непрорегировавших соединений [Bonoga et al., 1990]. Затем эти авторы применили свой подход для аналогичного синтеза, но уже с помощью амидофосфитного метода, назвав его HELP Plus [Bonoga et al., 1993]. Позже этот подход использовался ими для *H*-фосфонатного метода [Zaramella, Bonoga, 1995], а затем для синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Bonoga et al., 2000]. В дальнейшем при подобном способе синтеза с растворимой твердой фазой в качестве таковой выступали различные ионные жидкости [Donga et al., 2006; 2007; Huo, Chan, 2010]. В 2012 г. растворимым носителем для олигонуклеотидного синтеза было предложено использовать модифицированный  $\beta$ -циклодекстрин [Molina et al., 2012].

Предлагались и другие растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов в растворе, но о них и в целом о данном способе синтеза будет говориться в соответствующем разделе данной статьи. К тому же нами завершается написание отдельного обзора по жидкофазному синтезу олигонуклеотидов, а также готовится подача заявки на патенты на оригинальный способ синтеза олигонуклеотидов в растворе и на так называемую полезную модель.

#### Автоматические синтезаторы ДНК

Разработка синтеза олигонуклеотидов на твердой фазе и подбор подходящих носителей для синтезируемых цепей ДНК вкупе с появлением удобного амидофосфитного метода вылились в долгожданную автоматизацию процесса синтеза и вызвали к жизни соответствующие специализированные приборы. Но и

до этого автоматический синтез олигонуклеотидов уже производился.

Так, первый автоматический твердофазный синтез нескольких олигонуклеотидов длиной 8 и 9 звеньев еще фосфодиэфирным методом с помощью подвергнутого модернизации пептидного синтезатора модели 990 фирмы Beckman был осуществлен в 1977 г. [Gait, Sheppard, 1977]. Спустя несколько лет этими авторами синтезированы более протяженные олигонуклеотиды (до 12 звеньев длиной) с помощью уже фосфотриэфирного метода и было отмечено, что эта технология более быстрая и обеспечивает больший выход целевых продуктов [Gait et al., 1980]. Причем синтез проводился с использованием все того же модернизированного пептидного синтезатора фирмы Beckman и авторы указали, что по запросу могут прислать детальное описание произведенных конструктивных изменений этого пептидного синтезатора, чтобы он стал олигонуклеотидным.

Первая попытка вывести на рынок автоматический ДНК-синтезатор была предпринята в декабре 1980 г. американской фирмой Vega Biotechnologies, переделавшей свой пептидный синтезатор в модель Coder Model 280, но с 1984 она, не выдержав конкуренции, перестала выпускаться [Kaplan, 1985].

В 1981 г. канадскими авторами опубликована статья, в которой они описали синтез тетрадекамерного олигонуклеотида на управляемом компьютером приборе собственной конструкции, приведя схематическое расположение его узлов [Alvarado-Urbina et al., 1981]. Продолжительность цикла у них составила 30 мин, используя фосфитную химию. В 1984 г. вышли статьи двух групп американских авторов, в которых шла речь о конструировании автоматических ДНК-синтезаторов, рассчитанных на амидофосфитную химию. Одна из них [Hunkapiller et al., 1984] посвящена конструированию под руководством L.Hood целого ряда приборов в Калифорнийском технологическом институте, среди которых упоминался автоматический ДНК синтезатор, рассчитанный на использование разработанной одним из авторов той публикации (М.С.<sup>15</sup>) самой фосфитной технологии с эффективностью конденсации выше 96% и временем цикла около 10 мин. Авторы сообщили, что на их приборе можно синтезировать олигонуклеотиды длиной более 50 звеньев.

В другой статье [Warner et al., 1984] приведена схематика их прибора и сообщалось, что на нем синтезировано более 600 олигонуклеотидов размерами до 122 звеньев со временем цикла,

<sup>15</sup> Marvin Caruthers

занимающим 15 мин, и эффективностью конденсации 98,5% в каждом цикле.

Отечественными авторами еще в конце 1970-х гг. стали вестись разработки автоматических синтезаторов олигонуклеотидов [Потапов и др. (Potapov et al.), 1982]. Сначала была создана полуавтоматическая установка «Виктория-1», опытный образец которой изготавливался в Специальном конструкторско-технологическом бюро специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР. В той статье была приведена гидравлическая схема данной установки и сообщено об успешном синтезе фосфотриэфирным методом нонануклеотида (T-G-T-G-T-G-G-A-C)<sup>16</sup> с использованием упоминавшегося выше носителя из тефлоновых гранул с привитым полистиролом. Спустя пару лет появился более совершенный полностью автоматический ДНК-синтезатор модели «Виктория-4М», рассчитанный на фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов [Грязнов и др. (Gryaznov et al.), 1986].

Стоит обратиться к словам основоположника современного твердофазного синтеза олигонуклеотидов М.Н. Caruthers, приведенным им в статье с символическим названием “The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science” [Caruthers, 2013], где автор вспомнил намерения его самого и коллег создать метод, который был бы пригоден для машинного синтеза олигонуклеотидов и что самое главное, чтобы им могли оперировать не только химики. Собственно разработать такой метод [Matteucci, Caruthers, 1980; Beaucage, Caruthers, 1981] им действительно удалось. Продолжая в той же статье [Caruthers, 2013] свое повествование М.Н. Caruthers привел фото первого амидофосфитного коммерческого ДНК-синтезатора модели 380А американской фирмы Applied Biosystems, который появился у него в лаборатории в декабре 1982 г., а в 1983 г. был выведен на рынок.

Однако с учетом того, что автоматические ДНК синтезаторы доступны были далеко не всем и с учетом высокой стоимости этих приборов и отсутствия навыков работы на них, другой основоположник в этот раз всего твердофазного синтеза олигонуклеотидов R.L. Letsinger опубликовал статью, в которой описан ручной способ пошагового синтеза олигонуклеотидов амидофосфитным методом с использованием подходящего шприца с смонтированным на выходе специальным фильтром,

удерживающим силикагелевые частицы, используемые в качестве твердой фазы [Tanaka, Letsinger, 1982]. О подобном ручном синтезе олигонуклеотидов в пробирках упоминал и тот же Caruthers [deHaseth et al., 1983; Caruthers, 1985].

Предлагавшийся оригинальный способ параллельного ручного синтеза фосфотриэфирным методом сразу нескольких олигонуклеотидов на твердой фазе, в качестве которой служили целлюлозные диски из фильтровальной бумаги Whatman 3ММ, заключался в том, что когда растущие цепи разных олигонуклеотидов должны удлиняться одним и тем же синтоном, то такие олигонуклеотиды собираются в одном и том же реакционном сосуде, а после завершения процесса они разделяются и заново объединяются в соответствии со следующими одинаковыми нуклеотидами [Frank et al., 1983]. Другие авторы сообщили, что за две недели им удалось синтезировать таким образом 254 олигонуклеотида с размерами от 8 до 22 звеньев, используя некие реакционные колонки, помечаемые как А, С, G и Т, за счет помещения/перемещения таких дисков в конкретные колонки в зависимости от очередного присоединяемого нуклеотида [Matthes et al., 1984]. Данный подход получил название как «сегментный твердофазный синтез», но полностью его автоматизировать не удалось. Однако отечественными авторами он был использован для автоматического синтеза пяти олигонуклеотидов длиной 13-18 звеньев на установке «Виктория-2», в реактор которой помещались целлюлозные диски диаметром 10 мм (причем их могло помещаться там несколько десятков), что позволило в общей сложности обойтись 19 стадиями конденсации вместо стандартных 71 [Ломакин, Попов (Lomakin, Popov), 1985]. При этом реактор все же приходилось открывать и изменять комбинацию дисков.

В условиях некоторой нехватки и малой доступности ДНК синтезаторов такой подход с ручным синтезом олигонуклеотидов экспериментирующими молекулярными биологами стал использоваться и соответствующие готовые комплекты для его проведения поставлялись рядом фирм. При этом даже в конце 1980-х гг. когда уже автоматические ДНК-синтезаторы, помимо отечественной «Виктории-6М», выпускались целым рядом зарубежных фирм (Applied Biosystems, Biosearch, Systec, Cruachem, Pharmacia, Millipore и др.) публиковались подробные протоколы по ручному синтезу олигонуклеотидов как более передовым амидофосфитным методом [White, 1988], так и к тому времени несколько устаревшим фосфотриэфирным [O'Callaghan, Donnelly, 1988].

В качестве некоего подтверждения имевшего место в те годы определенного дефицита олигонуклеотидов может служить письмо редактору

<sup>16</sup> как в те годы было принято писать последовательности синтезируемых олигонуклеотидов, иногда добавляя еще перед скобками букву d(.-.-), для уточнения, что это дезоксирибоолигонуклеотид

журнала Nature, опубликованное в номере за 5 января 1989 г. [Willems, 1989], в котором его автор отмечал огромный потенциал появившегося варианта ПЦР с термостабильной ДНК полимеразой и одновременно сетовал на ограниченную доступность для значительной части экспериментаторов олигонуклеотидных праймеров отчасти из-за их дороговизны и даже предлагал за счет небольших взносов заинтересованных лабораторий при одной из биологических коллекций создать некий депозитарий таких молекул ДНК, которые могли бы рассылаться по запросам.

Однако этого не потребовалось, поскольку появившиеся к тому времени коммерческие автоматические ДНК-синтезаторы «сделали свое дело» и заказной синтез олигонуклеотидов стал быстро «набирать обороты». Так, уже начиная с февральских номеров 1989 г., в том же журнале Nature (да и в других профильных журналах), целый ряд специализирующихся на этом бизнесе фирм стали размещать рекламные объявления о заказном синтезе олигонуклеотидов по цене 7,5 – 10 долларов за звено. Причем благодаря сильной конкуренции такой заказной синтез начал очень быстро и при этом резко дешеветь, став «нормой» для молекулярных биологов и прочно оставив ручной синтез в прошлом.

В России в настоящее время имеется несколько фирм, предоставляющих услуги в виде синтеза олигонуклеотидов «под заказ» и среди них одним из первых возникло ООО «Синтол», производящее, наряду с обычными олигонуклеотидами, синтезируемыми в широком количественном диапазоне (от 0,02 до 5 мкмоль), еще и множество их модификаций, что можно видеть из web-сайта фирмы <https://www.syntol.ru>.

Что касается самих автоматических ДНК-синтезаторов, то в настоящее время в разных странах, включая Россию, производятся для колоночного синтеза различные модели этих инструментов, отличающихся масштабами синтеза и количеством одновременно синтезируемых олигонуклеотидов, но на этом останавливаться не будем, упомянув лишь некие вехи и оригинальные решения. Так, в 1995 г. появился ДНК-синтезатор, синтез олигонуклеотидов в котором шел в стандартном 96-луночном полипропиленовом планшете [Lashkari et al., 1995]. В 2002 г. было сообщено о конструировании ДНК-синтезатора с 1536 реакционными емкостями [Cheng et al., 2002]. В 2014 г. вышла публикация, в которой авторы предложили свою конструкцию подобного ДНК-синтезатора с 1536 реакционными емкостями, но с возможностью увеличения их количества до 3456 лунок [Jensen et al., 2014].

В 1988 году был разработан, в 1989 году выпущен в серию первый одноклоночный автоматический синтезатор ДНК/РНК серии ASM-102U, в котором

дозирование реагентов осуществлялось не по времени, как у синтезаторов серии «Виктория», а по объему, что в итоге оказалось более эффективным и позволило приборам ASM успешно выйти на отечественный и зарубежный рынки. Разработкой прибора руководил Ю.Г.Средин. Через 10 лет под его руководством компанией Биоссет [www.biosset.com](http://www.biosset.com) был начат серийный выпуск сначала 7-, а потом и 8-колоночных синтезаторов ДНК серии ASM-700/800, а еще через 10 лет были выпущены еще более производительные приборы серии ASM-1000/2000 для синтеза олигонуклеотидов в формате 96-луночного планшета.

В 2015 году стартовало серийное производство препаративных синтезаторов ДНК/РНК ASM-10, а в 2024 году компания Биоссет начала серийно производить синтезаторы ASM-32. В настоящее время в России при участии компании Биоссет стартует опытно-конструкторская работа по разработке синтезатора в плашке на 384 лунки. Это один из немногих примеров в отрасли, когда отечественные разработчики и производители высокотехнологических решений на равных конкурируют с ведущими мировыми компаниями. Несомненно, такие практики надо всячески поддерживать и пропагандировать в качестве прекрасного примера для подражания молодым начинающим компаниям.

Помимо стандартных конструкций, автоматический синтез олигонуклеотидов предлагалось вести в стеклянных капиллярах длиной 10.8 см с внутренним диаметром 0.8 мм, служившей твердой фазой, а другой особенностью было управление светом, позволяющее осуществлять присоединение очередного нуклеотида в местах капилляра, где происходило снятие фотолабильной защиты [Blair et al., 2006]. Авторы сообщили, что им удалось одновременный синтез в одном таком капилляре в разных его местах нескольких олигонуклеотидов длиной от 25 до 70 звеньев, постсинтетически смываемых из капилляра вместе в одном растворе.

Описаны струйные ДНК-синтезаторы нового поколения, часть конструктивных элементов которых изготавливали с помощью 3D печати, а синтез велся как на CPG носителях, так и микрочиповым способом [Li et al., 2019; Kim et al., 2024; 2025].

Завершая краткое рассмотрение автоматических ДНК-синтезаторов, пожалуй, стоит также вспомнить довольно старое предложение вести крупномасштабный синтез олигонуклеотидов на твердой фазе амидофосфитным методом с использованием центрифуги, в том числе проточной с зональным ротором, с проработанными схемами таких конструкций [Anderson et al., 1995].

### Крупномасштабный синтез олигонуклеотидов в растворе

Около десятилетия назад сокращения в виде LPOS, а заодно и SPOS, в которых ранее под буквой 'O' скрывалось слово 'Organic' получили новое значение и под ними стали также подразумеваться 'Liquid-Phase Oligo Synthesis' и 'Solid-Phase Oligo Synthesis' соответственно [Gaffney et al., 2015], призванные четче разграничивать синтез олигонуклеотидов в растворе и на твердой фазе, имеющие свои особенности. Пока эти аббревиатуры не очень широко используются, но можно предполагать, что, по крайней мере, LPOS будет набирать популярность в силу необходимости в будущем синтеза олигонуклеотидов в гораздо больших чем сейчас количествах. Причем в LPOS сейчас используется больше фосфотриэфирный метод синтеза, хотя также наряду с фосфорамидитным применяется и *H*-фосфонатный.

Как отмечено выше, синтез олигонуклеотидов на растворимых носителях берет начало в середине 1960-х гг. и был предложен как некая альтернатива только набирающему тогда популярность твердофазному синтезу. Важен вклад отечественных ученых [Shemyakin et al., 1965], которыми такой подход был реализован для пептидного синтеза, а затем переял Кораной [Hayatsu, Khorana, 1966], а также немецкими учеными [Cramer et al., 1966], опубликовавшими краткие сообщения, причем работа последних вышла чуть раньше – 1 июля, а Кораны – 5 июля, да и их рукописи получены редакциями с еще большим разрывом - соответственно 9 мая и 31 мая 1966 г. Но в 1967 г. Корана опубликовал уже обстоятельную статью на этот счет [Hayatsu, Khorana, 1967].

Твердофазный синтез, хотя и сильно облегчает удаление использованных реагентов, обеспечивая легкую смену этапов, он далеко не идеален в силу ряда причин, тогда как растворимые носители в момент взаимодействия реакционных групп с реагентами находятся с ними в однородном растворе, облегчающим течение процесса, то и синтез идет, по сути, количественно. Причем достаточным оказывается лишь незначительного избытка добавляемых реагентов, притом, что в SPOS требуется их огромный 20 - 50-ти кратный избыток. Так, подсчитано, что чтобы синтезировать 1 кг тиофосфатных олигонуклеотидов твердофазным методом необходимо истратить 4 тонны реагентов, растворителей, носителей [Tedebark et al., 2011], что с учетом набирающей силу «зеленой химии», в том числе в области олигонуклеотидного синтеза приветствоваться не может [Andrews et al., 2021].

В LPOS после добавления соответствующего растворителя до той поры растворимые носители

перестают быть таковыми, переходя в твердую фазу и утягивая вместе с собой из раствора пришитые к ним олигонуклеотиды. Это позволяет без трудоемкой хроматографии отделять их из раствора осаждением в центрифуге. Другой подход основан на различной растворимости носителей с олигонуклеотидами и реагентов в используемых растворителях, что позволяет вести экстракцию в делительной воронке. Еще проще избавляться от отработавших свое реагентов с помощью мембранной технологии, обрезаяющей прохождение через поры в специальной стойкой к агрессивным жидкостям мембране веществ большего размера, коими являются как раз носители с пришитыми к ним олигонуклеотидами.

В отличие от SPOS вариантов LPOS подход позволяет его гораздо легче масштабировать, что очень важно, когда необходимо синтезировать килограммовые количества терапевтических олигонуклеотидов. А с учетом роста подобных способов лечения различных болезней и расширения спектра таковых, в том числе протекающих в тяжелой форме и не имеющих других средств излечения, потребность в еще большем количестве подобных олигонуклеотидов будет только расти и следовательно объемы их синтеза должны не отставать. В этой связи неудивителен рост числа исследований в этой области. Только за последние годы опубликованы довольно подробные обзоры, включающие описание различных растворимых носителей для синтеза олигонуклеотидов, а также содержащие детальное рассмотрение происходящих процессов при LPOS [Lönnberg, 2017; Katayama, Hirai, 2018; Molina, Sanghvi, 2019; Virta, 2025]. При этом имеются целиком посвященные синтезу олигонуклеотидов в растворе с использованием растворимых носителей обзоры и прежних лет [Gravert, Janda, 1997]. Поэтому здесь коротко коснемся только некоторых работ в дополнение к тем, что уже упоминали в других разделах.

Так, среди новых носителей для LPOS следует выделить тетраподальные, у которых их коровая часть, разветвляясь, позволяет вести синтез олигонуклеотидов сразу в четырех направлениях и среди них тетракис-(*p*-гидроксифенил)адамantan [Singh et al., 2012], пентаэритритил [Kungurtsev et al., 2013], а также квадруплексный гидрогель на основе модифицированного PEG [Tanaka et al., 2018]. Не так давно предложен способ стереоконтролируемого LPOS синтеза на основе неких производных хиральных молекул лимонена для синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Rosenqvist et al., 2023]. Совсем недавно вышла статья, в которой сообщается, что впервые удалось провести LPOS от начала до конца в едином растворителе и все время синтеза все реагенты находились в однородной среде

в растворенном виде вплоть до конечной стадии лиофилизации целевых олигонуклеотидов [Gaffney et al., 2026]. При этом синтез происходил в специальном реакторе Nanostar-10, оборудованном мембранной диафильтрацией. Ранее этими авторами уже сообщалось о таком подходе к смене реагентов в реакционном сосуде путем нанофильтрации при синтезе олигорибонуклеотидов [Gaffney et al., 2015].

Подытоживая данный раздел, можно сказать, что в плане крупномасштабного синтеза олигонуклеотидов LPOS будет несомненно активно развиваться.

### Заключение

Практически вся современная биологическая и медицинская науки, а также сопряженные с ней дисциплины, включая биотехнологию, а также ДНК-криминалистику [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2024], уже довольно давно не в состоянии обходиться без синтетических олигонуклеотидов, характеризующихся как весьма разной длиной, так и всевозможными модификациями их структуры, включая все

составляющие нуклеотидов: сами азотистые основания, углеводные компоненты, остатки фосфорной кислоты. Для этого, как можно видеть из вышеизложенного, химическому синтезу олигонуклеотидов за прошедшие семь десятилетий пришлось проделать гигантский путь, претерпев целый ряд эволюционных и даже революционных преобразований, в том числе даже возвращаясь к истокам, что нельзя считать регрессией (с точки зрения биологической эволюции), поскольку это обеспечивало более мощное развитие. При этом фосфодиэфирный метод все же остался в прошлом, *N*-фосфонатный имеет относительно небольшой масштаб применения, фосфотриэфирный для отдельных приложений по-прежнему используется, включая крупномасштабный синтез в растворе, но наиболее распространенным является амидофосфитный.

Основные вехи химического синтеза олигонуклеотидов, если расположить их по десятилетиям, могут выглядеть так:

- 1955 г. – синтез первых динуклеотидов фосфотриэфирным методом
- 1957 г. – синтез динуклеотидов фосфонатным методом
- 1958 г. – фосфодиэфирный метод
- 1965 г. – твердофазный метод синтеза
- 1966 г. – жидкофазный метод синтеза на растворимых носителях
- 1967 г. – ренессанс фосфотриэфирного метода
- 1975 г. – фосфиттриэфирный метод
- 1977 г. – автоматический синтезатор ДНК для фосфодиэфирного метода
- 1980 г. – автоматический синтезатор ДНК для фосфотриэфирного метода
- 1981 г. – амидофосфитный метод
- 1983 г. – автоматический синтезатор ДНК для амидофосфитного метода
- 1986 г. – ренессанс *N*-фосфонатного метода
- 1991 г. – микрочиповый синтез олигонуклеотидов
- 2015 г. – мембранная технология жидкофазного синтеза олигонуклеотидов на растворимых носителях
- 2018 г. – стереоселективный синтез тиофосфатных олигонуклеотидов на основе ренессанса P(V) химии.

При этом нужно заметить, что добавить можно еще столько же других вех (хотя и менее весомых), но это не даст абсолютно полной картины того, что за 70 прошедших лет удалось сделать по химическому синтезу олигонуклеотидов. Хотим напомнить, что, как уже говорилось во Введении, главной задачей данной публикации было отразить разноплановые исследования в этой необъятной области.

В настоящее время все существующие способы химического синтеза олигонуклеотидов технологически можно подразделить на несколько следующих групп: твердофазный колоночный синтез, (твердофазный же) микрочиповый синтез и синтез олигонуклеотидов в растворе, имеющий каждый свои предназначения. Так, колоночный синтез позволяет в зависимости от

выбираемого масштаба синтеза синтезировать обычно<sup>17</sup> микрограммовые и миллиграммовые количества олигонуклеотидов, которых в разных моделях ДНК-синтезаторов может одновременно синтезироваться свыше полутора тысяч разных, что в принципе вполне хватает для ведения научных исследований и для проведения ДНК-диагностики в ограниченных масштабах. Микрочиповая технология рассчитана на одновременный синтез десятков и сотен тысяч и даже миллионов разных

<sup>17</sup> Справедливости ради следует сказать, что имеются коммерческие ДНК-синтезаторы на твердой фазе, обеспечивающие килограммовый выход олигонуклеотидов.

олигонуклеотидов, представленных каждый в пикограммовых и нанограммовых количествах, находящих применение, как в научных, так и в диагностических исследованиях. На микрочиповый синтез олигонуклеотидов по причине массового параллелизма процесса возлагаются определенные надежды для обеспечения долговременного хранения небиологической информации в молекулах ДНК. Впрочем, и колоночный синтез для этих целей (для некоторых решений) также подходит, если с его помощью формировать, например, специальные олиготеки, в том числе в виде модифицированных олигонуклеотидов [Garafutdinov et al., 2022]. Синтез олигонуклеотидов в растворе потенциально дает возможность синтезировать граммовые и даже многограммовые количества олигонуклеотидов, которые требуются для терапевтических целей и спрос на такие объемы будет расти с учетом внедрения в лечебную практику все большего числа разрешенных к применению подобных препаратов на основе тиофосфатных или морфолино модифицированных олигонуклеотидов [Mohammed et al., 2024]. К тому же прекращаются сроки действия патентов на ряд бессмысленных олигонуклеотидов и будет развиваться рынок дженериков.

При этом возможно даже еще больший рынок для модифицированных олигонуклеотидов откроется для их использования на практике в сельском хозяйстве в области растениеводства для борьбы с вредителями и патогенами растений и животных [Krasnodębski et al., 2023; Delavari et al., 2026]. Отечественными учеными уже на протяжении многих лет разрабатывается новый тип инсектицидов – ДНК-инсектицидов в виде, в том числе коротких олигонуклеотидов [Oberemok et al., 2016; Oberemok et al., 2022]. Для таких сельскохозяйственных целей количества требуемых олигонуклеотидов будут измеряться, по крайней мере, уже центнерами<sup>18</sup>, а возможно даже и тоннами.

Таким образом, можно смело констатировать, что спрос на количества олигонуклеотидов как в плане их разнообразия, так и в весовом измерении будет неизбежно расти и конкуренция среди производителей таковых станет увеличиваться, что будет вести к снижению цен, которая должна опираться, в том числе на уменьшение себестоимости подобных синтезов, а для этого требуются новые научные изыскания, включая перспективные технологические решения.

В качестве подтверждения вышесказанного можно обратиться к многочисленным прогнозам мирового рынка олигонуклеотидов, подготовленных разными фирмами, специализирующихся в этих

областях. Однако их оценки показывают большой разброс, причиной чему является то, какие аспекты и направления они брали в анализ, поэтому здесь будет дана некая компиляция имеющихся сведений. Причем все сходится во мнении, что мировой рынок синтеза олигонуклеотидов будет устойчиво расти со среднегодовым темпом роста (CAGR) в пределах от 10% до 19%, но при этом стартовые и конечные величины отличаются у этих обозревателей более чем в два раза. Так, если принять во внимание весь диапазон, то получим следующие оценочные данные: с примерено 4,9 – 10,8 млрд долларов США в 2025 г. мировой рынок олигонуклеотидного синтеза достигнет 20 – 50 млрд к 2030 – 2035 гг. При этом, учитывая и разнообразный научно-исследовательский сектор и различную молекулярную диагностику, и терапевтические олигонуклеотиды, а также некоторые другие направления, никто не принимал в внимание сельскохозяйственное производство, в котором рост применения олигонуклеотидов, начинаясь фактически с нуля, может быть гигантским. А может и не быть вовсе. И тут все зависит от результатов текущих и будущих исследований.

Что касается рынка техники в виде производства олигонуклеотидных синтезаторов, то для него также прогнозируется заметный рост с CAGR от 10 до 14%, стартуя в 2025 г. в среднем с 2,3 млрд. долларов США до 5 млрд. к 2034 г. При этом сейчас в таких прогнозах учитываются лишь инструменты, основанные на твердофазном синтезе, что легко объяснимо полным отсутствием в настоящее время коммерчески производимых LPOS олигонуклеотидных синтезаторов, поскольку они еще не перешагнули уровень лабораторных разработок. Однако есть полная уверенность, что это случится в ближайшие год-два-три и потребуются внесение заметных корректировок в нынешние прогнозы.

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

*Поступила в редакцию: 26.03.2026 г.*

*Доработана после рецензирования: 22.05.2026 г.*

*Принята к публикации: 27.05.2026 г.*

#### Литература

1. Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Быстров Н.С. и др. Катализируемый метилимидазолом быстрый синтез олигодезоксинуклеотидов фосфотриэфирным путем на силикагельном носителе в дихлорэтаноле. *Биоорг. химия*. 1983. 9(5). 706-710.
2. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р. и др. Ферментативный синтез

<sup>18</sup> привычными измерениями для аграриев

- олигонуклеотидов. *Biomcs*. 2025. 17(4). С.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
3. Грязнов С.М., Потапов В.К., Горн В.В. и др. Полный автоматический синтез фосфотриэфирным методом олигодезоксинуклеотидов на синтезаторе «Виктория-4М». *Биополимеры и клетка*. 1986. 2(6). 311–316.
  4. Женодарова С.М., Хабарова М.И. Химические методы синтеза полинуклеотидов. *Успехи химии*. 1966. 35(7). 1265-1276.
  5. Зарытова В.Ф., Потапов В.К., Шабарова З.А. и др. Синтез олигуклеотидов на полимерных носителях. Синтез олигодезоксинуклеотидов, содержащих дезоксигуаниловую кислоту. *Доклады Академии наук СССР*. 1971. 199(5). 1072 -1074.
  6. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот. *Acta Naturae*. 2014. 6(4). 123-125.
  7. Ломакин А.И., Попов С.Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. II. Использование сегментных носителей на основе целлюлозы. *Биоорганическая химия*. 1985. 11(7). 927-933.
  8. Ломакин А.И., Ястребов С.И., Попов С.Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. I. Исследование носителей на основе силикагеля марки «Силохром». *Биоорганическая химия*. 1985. 11(7). 920-926.
  9. Оберемок В.В., Лайкова Е.В., Зайцев А.С. и др. Создание ДНК-инсектицидов – новое направление в защите растений. *Защита и карантин растений*. 2026. (11). 14-16.
  10. Потапов В.К., Звездина В.В., Кочеткова М.Н. и др. Препаративный синтез олигонуклеотидных блоков на высокосшитом полимерном носителе. *Доклады Академии наук СССР*. 1973. 209(2). 364–366.
  11. Потапов В.К., Потемкин В.К., Горн В.В. и др. Полуавтоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов. *Доклады Академии наук СССР*. 1982. 263(6). 1386–1389.
  12. Потапов В.К., Туркин С.И., Вейко В.П. и др. Использование нового типа полимерного носителя в синтезе олигонуклеотидов. *Доклады Академии наук СССР. Химия*. 1978. 241(6). 1352 – 1354.
  13. Потапов В.К., Чехмачева О.Г., Шабарова З.А. и др. Синтез олигонуклеотидов на полимерных носителях. Синтез дезокси-[тимидили-(3'→5')-аденилил-(3'→5')-аденилил-(3'→5')-аденозина. *Доклады Академии наук СССР*. 1971. 196(2). 360–363.
  14. Сахабутдинова А.Р., Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р. и др. «Водяные ДНК-знаки» в виде встроенных в геномы различных организмов чужеродных последовательностей ДНК и не только встроенных. *Biomcs*. 2021. 13(4). 368-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-26
  15. Сняжков А.Н., Костина Е.В. Методы очистки синтетических олигонуклеотидов и исправления ошибок в синтетической ДНК. *Молекулярная Биология*. 2025. 59(4). 544–556. doi: 10.31857/S0026898425040021
  16. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р. и др. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
  17. Abramova T. Frontiers and approaches to chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Molecules*. 2013. 18(1). 1063-75. doi: 10.3390/molecules18011063
  18. Adams SP, Kavka KS, Wykes EJ et al. Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers. *J. Am. Chem. Soc.* 1983. 105(3). 661-663. doi: 10.1021/ja00341a078
  19. Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH et al. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970. 227(5253). 27-34. doi: 10.1038/227027a0
  20. Albert TJ, Norton J, Ott M et al. Light-directed 5'→3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res.* 2003. 31(7). e35. doi: 10.1093/nar/gng035
  21. Alekseev YI, Krynetskaya NF, Tashlytsky VN et al. Interaction of *Escherichia coli* ribonuclease H with hybrid duplexes containing 2'-deoxyxylothyridine, 2'-deoxy-2' fluorouridine or alpha-thymidine. *Nucleosides and Nucleotides*. 1996. 15(9). 1545-1558. doi: 10.1080/07328319608002453
  22. Alvarado-Urbina G, Sathe GM, Liu WC et al. Automated synthesis of gene fragments. *Science*. 1981. 214(4518). 270-274. doi: 10.1126/science.6169150
  23. Amarnath V, Broom AD. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chemical Reviews*. 1977. 77(2). 183–217. doi:10.1021/cr60306a002
  24. Anderson NG, Anderson NL, Taylor J et al. Large-scale oligonucleotide synthesizers. I. Basic principles and system design. *Appl Biochem Biotechnol*. 1995. 54(1-3). 19-42. doi: 10.1007/BF02787909
  25. Andrews BI, Antia FD, Brueggemeier SB et al. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.* 2021. 86(1). 49-61. doi: 10.1021/acs.joc.0c02291
  26. Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1981. 22(20). 1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7
  27. Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. 1982. 48(12). 2223-2311. doi: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4
  28. Beier M, Hoheisel JD. Analysis of DNA-microarrays produced by inverse in situ oligonucleotide

- synthesis. *J Biotechnol.* 2002. 94(1). 15-22. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00416-3
29. Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967. 37. 3557-3562. doi: 10.1016/s0040-4039(01)89794-x.
30. Benner SA. Magnetic particles as supports for organic synthesis. US Patent No 4,638,032. Jan. 20, 1987.
31. Blair S, Richmond K, Rodesch M et al. A scalable method for multiplex LED-controlled synthesis of DNA in capillaries. *Nucleic Acids Res.* 2006. 34(16). e110. doi: 10.1093/nar/gkl641
32. Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics.* 1996. 11(6-7). 687-690. doi: 10.1016/0956-5663(96)83302-1
33. Bonora GM, Biancotto G, Maffini M et al. Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(5). 1213-1217. doi: 10.1093/nar/21.5.1213
34. Bonora GM, Rossin R, Zaramella S et al. A Liquid-Phase Process Suitable for Large-Scale Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Org. Process Res. Dev.* 2000. 4(3). 225 – 231. doi: 10.1021/op9900961
35. Bonora GM, Scremin CL, Colonna FP et al. HELP (high efficiency liquid phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(11). 3155-3159. doi: 10.1093/nar/18.11.3155
36. Brown D.M. A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol.* 1993. 20. 1-17. doi: 10.1385/0-89603-281-7:1
37. Brzezinska J, Trzeciński S, Strzelec J et al. From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media. *Bioorg Chem.* 2023. 140. 106806. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106806
38. Caruthers MH. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science.* 1985. 230(4723). 281-285. doi: 10.1126/science.3863253
39. Caruthers MH. Chemical synthesis of DNA and DNA analogs. *Acc. Chem. Res.* 1991. 24(9). 278-284. doi: 10.1021/ar00009a005
40. Caruthers MH. The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science. *J Biol Chem.* 2013. 288(2). 1420-1427. doi: 10.1074/jbc.X112.442855
41. Caruthers MH, Beaucauge SL, Becker C et al. Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal.* 1983. 3. 1-26.
42. Catlin JC, Cramer F. Deoxy oligonucleotide synthesis via the triester method. *J. Org. Chem.* 1973. 38(2). 245–250. doi: 10.1021/jo00942a011
43. Cheng JY, Chen HH, Kao YS et al. High throughput parallel synthesis of oligonucleotides with 1536 channel synthesizer. *Nucleic Acids Res.* 2002. 30(18). e93. doi: 10.1093/nar/gnf092
44. Cook AF, Holman MJ, Nussbaum AL. Nucleoside S-alkyl phosphorothioates. III. Application to oligonucleotide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1969. 91(23). 6479–6484. doi: 10.1021/ja01051a052
45. Cramer F, Helbig R, Hettler H et al. Oligonucleotide Synthesis with a Soluble Polymer as Carrier. *Angew. Chem. Int. Edit.* 1966. 5(6). 601.
46. Crea R, Horn T. Synthesis of oligonucleotides on cellulose by a phosphotriester method. *Nucleic Acids Res.* 1980. 8(10). 2331-2348. doi: 10.1093/nar/8.10.2331
47. Crea R, Kraszewski A, Hirose T et al. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978. 75(12). 5765-5769. doi: 10.1073/pnas.75.12.5765
48. deHaseth PL, Goldman RA, Cech CL et al. Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda PR promoter. *Nucleic Acids Res.* 1983. 11(3). 773-787. doi: 10.1093/nar/11.3.773
49. Delavari A, Keykhasaber M, Miri MA et al. Control of *Phytophthora capsici*, which causes root and stem rot, using encapsulated oligonucleotide DNA. *Sci Rep.* 2026. 16(1). 4215. doi: 10.1038/s41598-025-34330-7
50. Dellinger DJ, Betley JR, Wyrzykiewicz TK et al. Synthesis of DNA using a new two-step cycle. *Methods Mol Biol.* 2005. 288. 1-16. doi: 10.1385/1-59259-823-4:001
51. Donga RA, Hassler M, Chan TH et al. Oligonucleotide synthesis using ionic liquids as soluble supports. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. 26(10-12). 1287-1293. doi: 10.1080/15257770701530533
52. Donga RA, Khaliq-Uz-Zaman SM, Chan TH et al. A novel approach to oligonucleotide synthesis using an imidazolium ion tag as a soluble support. *J Org Chem.* 2006. 71(20). 7907-7910. doi: 10.1021/jo061279q
53. Eckstein F, Rizk I. Synthesis of oligonucleotides by use of phosphoric triesters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1967. 6(8). 695-697. doi: 10.1002/anie.196706951
54. Edge MD, Green AR, Heathcliffe GR et al. Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature.* 1981. 292(5825). 756-762. doi: 10.1038/292756a0
55. Efimov VA, Buryakova AA, Dubey IY et al. Application of new catalytic phosphate protecting groups for the highly efficient phosphotriester oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(16). 6525-6540. doi: 10.1093/nar/14.16.6525
56. Efimov VA, Reverdatto SV, Chakhmakhcheva OG. New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1982. 10(21). 6675-6694. doi: 10.1093/nar/10.21.6675
57. Egeland RD, Marken F, Southern EM. An Electrochemical Redox Couple Activated by

- Microelectrodes for Confined Chemical Patterning of Surfaces. *Analytical Chemistry*. 2002. 74(7). 1590-1596. doi: 10.1021/ac010953v
58. Egeland RD, Southern EM. Electrochemically directed synthesis of oligonucleotides for DNA microarray fabrication. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33(14). e125. doi: 10.1093/nar/gni117
59. Fang S, Arneson R, Yin Y et al. De Novo Synthesis of Error-Free Long Oligos. *Curr Protoc.* 2024. 4(10). e70028. doi: 10.1002/cpz1.70028
60. Fang S, Fueangfung S. Scalable synthetic oligodeoxynucleotide purification with use of a catching by polymerization, washing, and releasing approach. *Org Lett.* 2010. 12(16). 3720-3723. doi: 10.1021/ol101316g
61. Fiers W, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XXII. Enzymic degradation. An exonuclease from lactobacillus acidophilus R26. A. Purification, properties, and substrate specificity. *J Biol Chem.* 1963. 238(8). 2780-2788. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67897-4
62. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 1991. 251(4995). 767-773. doi: 10.1126/science.1990438
63. Frank R, Heikens W, Heisterberg-Moutsis G et al. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: segmental solid supports. *Nucleic Acids Res.* 1983. 11(13). 4365-4377. doi: 10.1093/nar/11.13.4365
64. Froehler BC, Ng PG, Matteucci MD. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(13). 5399-5407. doi: 10.1093/nar/14.13.5399
65. Gaffney PRJ, Jarrett-Wilkins C, Yeo J et al. Fully Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Organic Process Research & Development.* 2026. 30(1). 98-120. doi: 10.1021/acs.oprd.5c00346
66. Gaffney PR, Kim JF, Valtcheva IB et al. Liquid-Phase Synthesis of 2'-Methyl-RNA on a Homostar Support through Organic-Solvent Nanofiltration. *Chemistry.* 2015. 21(26). 9535-9543. doi: 10.1002/chem.201501001
67. Gait MJ, Matthes HW, Singh M et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. VII. Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by a continuous flow phosphotriester method on a kieselguhr-polyamide support. *Nucleic Acids Res.* 1982. 10(20). 6243-6254. doi: 10.1093/nar/10.20.6243
68. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides: a new solid-phase method. *Nucleic Acids Res.* 1977. 4(4). 1135-1158. doi: 10.1093/nar/4.4.1135
69. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Machine-aided solid-phase syntheses of two nonanucleotides and an octanucleotide. *Nucleic Acids Res.* 1977. 4(12). 4391-4410. doi: 10.1093/nar/4.12.4391
70. Gait MJ, Singh M, Sheppard RC et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1980. 8(5). 1081-1096. doi: 10.1093/nar/8.5.1081
71. Gao X, Gulari E, Zhou X. *In situ* synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers.* 2004. 73(5). 579-596. doi: 10.1002/bip.20005
72. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems.* 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
73. Garegg PJ, Lindh I, Regberg T et al. Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Letters.* 1986. 27. 4051-4054. doi: 10.1016/S0040-4039(00)84908-4
74. Giannaris PA, Damha MJ. Hybridization properties of oligoarabinonucleotides. *Can. J. Chem.* 1994. 72(3). 909-918. doi: 10.1139/v94-118
75. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science.* 2008. 319(5867). 1215-20. doi: 10.1126/science.1151721
76. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science.* 2010. 329(5987). 52-56. doi: 10.1126/science.1190719
77. Gilham PT, Khorana HG. Studies on polynucleotides. I. A new and general method for the chemical synthesis of the C5"-C3" Internucleotidic linkage. syntheses of deoxyribo-dinucleotides<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* 1958. 80(23). 6212-6222. doi: 10.1021/ja01556a016
78. Goeddel DV, Yansura DG, Caruthers MH. Studies on gene control regions. 1. Chemical synthesis of lactose operator deoxyribonucleic acid segments. *Biochemistry.* 1977. 16(9). 1765-1772. doi: 10.1021/bi00628a001
79. Gravert DJ, Janda KD. Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies. *Chem. Rev.* 1997. 97(2). 489-510. doi: 10.1021/cr960064i
80. Hall RH, Todd A, Webb RF. Nucleotides. Part XXI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc.* 1957. 3291-3296. doi: 10.1039/JR9570003291
81. Hamada S, Murayama K, Takezawa Y et al. Omega Nucleic Acids ( $\Omega$ NA), Ultimate Nucleic Acids for Future Technology. *Molecules.* 2026. 31(3). 523. doi: 10.3390/molecules31030523

82. Hayatsu H, Khorana HG. Deoxyribooligonucleotide Synthesis on a Polymeric Support. *J. Am. Chem. Soc.* 1966. 88(13). 3182–3183. doi: 10.1021/ja00965a086
83. Hayatsu H, Khorana HG. Studies on polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc.* 1967. 89(15). 3880-3887. doi: 10.1021/ja00991a035
84. Heinonen P, Lönnberg H. Synthesis of phosphate-branched oligonucleotides. *Bioconj Chem.* 2004 Nov-Dec;15(6):1158-60. doi: 10.1021/bc049845g
85. Hirose T, Crea R, Itakura K. Rapid synthesis of trideoxyribonucleotide blocks. *Tetrahedron Letters.* 1978. 19(28). 2449-2452. doi: 10.1016/S0040-4039(01)94797-5
86. Hogrefe RI, Midthune B, Lebedev A. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *Isr. J. Chem.* 2013. 53(6-7). 326-349. doi: 10.1002/ijch.201300032
87. Hölz K, Hoi JK, Schaudy E et al. High-Efficiency Reverse (5'→3') Synthesis of Complex DNA Microarrays. *Sci Rep.* 2018. 8(1). 15099. doi: 10.1038/s41598-018-33311-3
88. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(23). 4842-4849. doi: 10.1093/nar/25.23.4842
89. Huang Y, Knouse KW, Qiu S et al. A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science.* 2021. 373(6560). 1265-1270. doi: 10.1126/science.abi9727
90. Hunkapiller M, Kent S, Caruthers M et al. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins. *Nature.* 1984. 310(5973). 105-111. doi: 10.1038/310105a0
91. Huo C, Chan TH. A novel liquid-phase strategy for organic synthesis using organic ions as soluble supports. *Chem Soc Rev.* 2010. 39(8). 2977-3006. doi: 10.1039/b914497h
92. Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS Lett.* 2002. 528(1-3). 48-52. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03235-0
93. Itakura K, Bahl CP, Katagiri N et al. A Modified Triester Method for the Synthesis of Deoxyribopolynucleotides. *Can. J. Chem.* 1973. 51. 3649–3651. doi:10.1139/v73-543
94. Itakura K, Katagiri N, Narang SA et al. Chemical synthesis and sequence studies of deoxyribooligonucleotides which constitute the duplex sequence of the lactose operator of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1975. 250(12). 4592-4600. doi: 10.1016/S0021-9258(19)41343-4
95. Jensen M, Roberts L, Johnson A et al. Next generation 1536-well oligonucleotide synthesizer with on-the-fly dispense. *J. Biotechnol.* 2014. 171. 76-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.027
96. Jensen MA, Akhras MS, Fukushima M et al. Direct oligonucleotide synthesis onto super-paramagnetic beads. *J Biotechnol.* 2013. 167(4). 448-453. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.006
97. Jensen TB, Langkjaer N, Wengel J. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2008. (52). 133-134. doi: 10.1093/nass/nrn068
98. Jo S, Shin H, Joe SY et al. Recent progress in DNA data storage based on high-throughput DNA synthesis. *Biomed Eng Lett.* 2024. 14(5). 993-1009. doi: 10.1007/s13534-024-00386-z
99. Kamaike K, Hasegawa Y, Ishido Y. Efficient syntheses of an oligonucleotide on a cellulose acetate derivative as a novel polymer-support using phosphotriester approach. *Tetrahedron Letters.* 1988. 29(6). 647–650. doi: 10.1016/S0040-4039(00)80172-0
100. Kaplan BE. The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Trends in Biotechnology.* 1985. 3(10). 253-256. doi: 10.1016/0167-7799(85)90024-1
101. Kashida H, Murayama K, Toda T et al. Control of the chirality and helicity of oligomers of serinol nucleic acid (SNA) by sequence design. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011. 50(6). 1285-1288. doi: 10.1002/anie.201006498
102. Katayama S, Hirai K. Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. In: Obika S, Sekine M. (eds) *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides.* Springer, Singapore. 2018. 83-95. doi: 10.1007/978-981-13-1912-9\_5
103. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
104. Khorana HG. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl. Chem.* 1968. 17. 349-381. doi: 10.1351/pac196817030349
105. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science.* 1979. 203(4381). 614-625. doi: 10.1126/science.366749
106. Khorana HG, Razzell WE, Gilham PT et al. Syntheses of dideoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 1957. 79(4). 1002-1003. doi: 10.1021/ja01561a065
107. Khorana HG, Todd AR. Studies on phosphorylation. Part XI. The reaction between carbodiimides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates. *Journal of the Chemical Society.* 1953. 2257-2260. doi: 10.1039/jr9530002257

108. Kim J, Kim H, Bang D. OpenIDS2: A low-cost, 3D-printed, open-source platform for reproducible construction of DNA microarray synthesizers. *PLoS One*. 2025. 20(12). e0338478. doi: 10.1371/journal.pone.0338478
109. Kim J, Kim H, Bang D. An open-source, 3D printed inkjet DNA synthesizer. *Sci Rep*. 2024. 14(1). 3773. doi: 10.1038/s41598-024-53944-x
110. Knouse KW, deGruyter JN, Schmidt MA et al. Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science*. 2018. 361(6408). 1234-1238. doi: 10.1126/science.aau3369
111. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl J Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
112. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VI use of inorganic carriers. *Tetrahedron Letters*. 1972. 13(16). 1527-1530. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84677-3
113. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VIII use of polyethylenglycol. *Tetrahedron Letters*. 1972a. 13(16). 1534-1538. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84679-7
114. Köster H, Stumpe A, Wolter A. Polymer support oligonucleotide synthesis 13: Rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach. *Tetrahedron Letters*. 1983. 24(8). 747-750. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81515-4
115. Koziołkiewicz M, Wójcik M, Kobylańska A et al. Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997. 7(1). 43-48. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.43
116. Kozlov IA, Dang M, Sikes K et al. Significant improvement of quality for long oligonucleotides by using controlled pore glass with large pores. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005. 24(5-7). 1037-1041. doi: 10.1081/ncn-200059761
117. Krasnodębski C, Sawuła A, Kaźmierczak U et al. Oligo-Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci*. 2023. 24(5). 4466. doi: 10.3390/ijms24054466
118. Kraszewski A, Stawiński J. H-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds. *Pure and Applied Chemistry*. 2007. 79(12). 2217 – 2227. doi: 10.1351/pac200779122217
119. Kumar V, Gore KR, Pradeepkumar PI et al. Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA). *Org Biomol Chem*. 2013. 11(35). 5853-5865. doi: 10.1039/c3ob41244j
120. Kungurtsev V, Laakkonen J, Molina AG et al. Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2'-deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support. *Eur. J. Org. Chem*. 2013. 6687-6693. doi: 10.1002/ejoc.201300864
121. Lashkari DA, Hunicke-Smith SP, Norgren RM et al. An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92(17). 7912-7915. doi: 10.1073/pnas.92.17.7912
122. LeProust EM, Peck BJ, Spirin K et al. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38(8). 2522-2540. doi: 10.1093/nar/gkq163
123. Letsinger RL, Caruthers MH, Miller PS et al. Oligonucleotide syntheses utilizing beta-benzoylpropionyl, a blocking group with a trigger for selective cleavage. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(26). 7146-7147. doi: 10.1021/ja01002a074
124. Letsinger RL, Finnan JL, Heavner GA et al. Letter: Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links. *J Am Chem Soc*. 1975. 97(11). 3278-3279. doi: 10.1021/ja00844a090
125. Letsinger RL, Lunsford WB. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J Am Chem Soc*. 1976. 98(12). 3655-3661. doi: 10.1021/ja00428a045
126. Letsinger RL, Mahadevan V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc*. 1965. 87(15). 3526–3527. doi: 10.1021/ja01093a058
127. Letsinger RL, Mahadevan V. Stepwise synthesis of oligodeoxyribonucleotides on an insoluble polymer support. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(22). 5319-5324. doi: 10.1021/ja00974a053
128. Letsinger RL, Ogilvie KK. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *J. Am. Chem. Soc*. 1969. 91(12). 3350–3355. doi: 10.1021/ja01040a042
129. Li H, Huang Y, Wei Z et al. An oligonucleotide synthesizer based on a microreactor chip and an inkjet printer. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 5058. doi: 10.1038/s41598-019-41519-0
130. Liu ZC, Shin DS, Shokouhimehr M et al. Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens Bioelectron*. 2007. 22(12). 2891-2897. doi: 10.1016/j.bios.2006.12.005
131. Lohrmann R, Söll D, Hayatsu H et al. Studies on polynucleotides. LI. Syntheses of the 64 possible ribotrinucleotides derived from the four major ribomononucleotides. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(4). 819-829. doi: 10.1021/ja00956a039
132. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J Org Chem*. 2017. 13. 1368-1387. doi: 10.3762/bjoc.13.134

133. Lu Y. Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates. *Mini Rev Med Chem.* 2006. 6(3). 319-330. doi: 10.2174/138955706776073439
134. Ma Y, Zhang Z, Jia B et al. Automated high-throughput DNA synthesis and assembly. *Heliyon.* 2024. 10(6). e26967. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26967
135. Marshall WS, Caruthers MH. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science.* 1993. 259(5101). 1564-1570. doi: 10.1126/science.7681216
136. Matteucci MD, Caruthers MH. The synthesis of oligodeoxyrimidines on a polymer support. *Tetrahedron Letters.* 1980. 21(8). 719-722. doi: 10.1016/S0040-4039(00)71455-9
137. Matteucci MD, Caruthers MH. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 1981. 103(11). 3185-3191. doi: 10.1021/ja00401a041
138. Matthes HW, Zenke WM, Grundström T et al. Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J.* 1984. 3(4). 801-805. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01888.x
139. McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters.* 1983. 24. 245-248. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
140. McGall G, Labadie J, Brock P et al. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93(24). 13555-13560. doi: 10.1073/pnas.93.24.13555
141. Michelson AM. Polynucleotides. Part IV. Synthesis of oligonucleotide analogous substituted in the sugar portion. *Journal of the Chemical Society.* 1962. 979-982. doi: 10.1039/JR9620000979
142. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3':5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* 1955. 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
143. Miyazaki Y, Yoshida A, Okaniwa T et al. Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators. *Org Lett.* 2022. 24(21). 3807-3811. doi: 10.1021/acs.orglett.2c01348
144. Mohammed AA, AlShaer D, Al Musaimi O. Oligonucleotides: evolution and innovation. *Medicinal Chemistry Research.* 2024. 33. 2204-2220. doi: 10.1007/s00044-024-03352-7
145. Molina AG, Kungurtsev V, Virta P et al. Acetylated and methylated  $\beta$ -cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2'-oligodeoxyribo-nucleotides in solution. *Molecules.* 2012. 17(10). 12102-20. doi: 10.3390/molecules171012102
146. Molina AG, Sanghvi YS. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2019. 77(1). e82. doi: 10.1002/cpnc.82
147. Narang CK, Brunfeldt K, Norris KE. Oligonucleotide synthesis on a crosslinked polyacrylmorpholide support. *Tetrahedron Letters.* 1977. 18(21). 1819-1822. doi: 10.1016/S0040-4039(01)83614-5
148. Narang SA, Brousseau R, Hsiung HM et al. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method. *Methods Enzymol.* 1980. 65(1). 610-620. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65063-0
149. Narang SA, Hsiung HM, Brousseau R. Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments. *Methods Enzymol.* 1979. 68. 90-98. doi: 10.1016/0076-6879(79)68008-4
150. Nassir M, Gherardi L, Redman RL et al. An Improved P(V) Thio-Oligonucleotide Synthesis Platform. *Org Lett.* 2025. 27(1). 97-102. doi: 10.1021/acs.orglett.4c03980
151. Nguyen BH, Takahashi CN, Gupta G et al. Scaling DNA data storage with nanoscale electrode wells. *Sci Adv.* 2021. 7(48). eabi6714. doi: 10.1126/sciadv.abi6714
152. Nielsen P, Dreijøe LH, Wengel J. Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary. *Bioorg Med Chem.* 1995. 3(1). 19-28. doi: 10.1016/0968-0896(94)00143-q
153. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 1991. 254(5037). 1497-500. doi: 10.1126/science.1962210
154. Oberemok VV, Useinov RZ, Skorokhod OA et al. Oligonucleotide Insecticides for Green Agriculture: Regulatory Role of Contact DNA in Plant-Insect Interactions. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(24). 15681. doi: 10.3390/ijms232415681
155. Obika S, Morio K, Nanbu D et al. Synthesis and conformation of 3'-O,4'-C-methylenribonucleosides, novel bicyclic nucleoside analogues for 2',5'-linked oligonucleotide modification. *Chem. Commun.* 1997. (17). 1643-1644. doi: 10.1039/A704376G
156. O'Callaghan DM, Donnelly WJ. Oligonucleotide synthesis using the manual phosphotriester method. *Methods Mol Biol.* 1988. 4. 165-192. doi: 10.1385/0-89603-127-6:165
157. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(22). 4677-4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
158. Organick L, Ang SD, Chen YJ et al. Random access in large-scale DNA data storage. *Nat. Biotechnol.* 2018. 36(3). 242-248. doi: 10.1038/nbt.4079
159. Ott J, Eckstein F. Filter disc supported oligonucleotide synthesis by the phosphite method.

- Nucleic Acids Res.* 1984. 12(23). 9137-9142. doi: 10.1093/nar/12.23.9137
160. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. 91(11). 5022-5026. doi: 10.1073/pnas.91.11.5022
161. Pon RT. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol.* 1993. 20. 465-496. doi: 10.1385/0-89603-281-7:465
162. Pon RT. Chemical Synthesis of Oligonucleotides: From Dream to Automation. In book: *Artificial DNA. Methods and Applications.* Eds Khudyakov YuE, Fields HA. 2002. CRC Press. 1-80.
163. Potapov VK, Veiko VP, Koroleva ON et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted polymer support. *Nucleic Acids Res.* 1979. 6(6). 2041-2056. doi: 10.1093/nar/6.6.2041
164. Rebimbas R, Glória I, Chegão J et al. DNA as a data storage medium. *J Biotechnol.* 2026. 414. 19-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2026.03.003
165. Reese CB. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org Biomol Chem.* 2005. 3(21). 3851-3868. doi: 10.1039/B510458K
166. Reese CB, Saffhill R. Oligonucleotide synthesis via phosphotriester intermediates: the phenyl-protecting group. *Chemical Comm. (London).* 1968. (13). 767-768. doi: 10.1039/C1968000076
167. Rosenqvist P, Saari V, Pajuniemi E et al. Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem.* 2023. 88(14). 10156–10163. doi: 10.1021/acs.joc.3c01006
168. Sabatino D, Damha MJ. Oxepane nucleic acids: synthesis, characterization, and properties of oligonucleotides bearing a seven-membered carbohydrate ring. *J Am Chem Soc.* 2007. 129(26). 8259-8270. doi: 10.1021/ja071336c
169. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
170. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
171. Schaller H, Weimann G, Lerch B et al. Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3'' Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 1963. 85(23). 3821–3827. doi: 10.1021/ja00906a021
172. Schönig K, Scholz P, Guntha S et al. Chemical etiology of nucleic acid structure: the alpha-thiofuranosyl-(3'→2') oligonucleotide system. *Science.* 2000. 290(5495). 1347-1351. doi: 10.1126/science.290.5495.1347
173. Schott H. Polyvinyl Alcohol Substituted by Nucleotides as Carrier for Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1973. 12. 246-246. doi: 10.1002/anie.197302461
174. Shemyakin MM, Ovchinnikov YuA, Kinyushkin AA et al. Synthesis of peptides in solution on a polymeric support I. Synthesis of glycylglycyl-L-leucylglycine. *Tetrahedron Letters.* 1965. 6(27). 2323-2327. doi: 10.1016/S0040-4039(00)70379-0
175. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.* 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
176. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
177. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters.* 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
178. Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR et al. Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: a two-step cycle using peroxy anion deprotection. *J Am Chem Soc.* 2003. 125(44). 13427-13441. doi: 10.1021/ja030376n
179. Singh A, Tolev M, Schilling CI et al. Solution-Phase Synthesis of Branched DNA Hybrids via H-Phosphonate Dimers. *J. Org. Chem.* 2012. 77(6). 2718–2728. doi: 10.1021/jo202508n
180. Singh SK, Koshkin AA, Wengel J et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* 1998. (4). 455 - 456. doi: 10.1039/a708608c
181. Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y et al. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol.* 1999. 17(10). 974-978. doi: 10.1038/13664
182. Sinha ND, Biernat J, McManus J et al. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* 1984. 12(11). 4539-4557. doi: 10.1093/nar/12.11.4539
183. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
184. Stec WJ, Zon G, Egan W. Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides.

- J. Am. Chem. Soc.* 1984. 106. 6077 – 6079. doi: 10.1021/ja00332a054
185. Steffens R, Leumann CJ. Synthesis and thermodynamic and biophysical properties of Tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. 121(14). 3249 – 3255. doi: 10.1021/ja983570w
186. Stirchak EP, Summerton JE, Weller DD. Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages. *Nucleic Acids Res.* 1989 Aug 11;17(15):6129-41. doi: 10.1093/nar/17.15.6129
187. Talap J, Zhao J, Shen M et al. Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. 206. 114368. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114368.
188. Tanaka T., Letsinger R.L. Syringe method for stepwise chemical synthesis of oligonucleotides. *Nucleic Acids Research.* 1982. V. 10(10). P. 3249–3260. doi: 10.1093/nar/10.10.3249
189. Tanaka S, Yukami S, Fukushima K et al. Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis. *ACS Macro Lett.* 2018. 7(3). 295-299. doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00063
190. Tedebark U, Scozzari A, Werbitzky O et al. Industrial-scale manufacturing of a possible oligonucleotide cargo CPP-based drug. *Methods Mol Biol.* 2011. 683. 505-524. doi: 10.1007/978-1-60761-919-2\_36
191. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol.* 1992. 1(1). 58-72. doi: 10.1097/00019606-199203000-00008
192. Tian J, Gong H, Sheng N et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature.* 2004. 432(7020). 1050-1054. doi: 10.1038/nature03151
193. Trzeciński S, Brzezinska J, Waligórski K et al. Hybrid Supports for Oligonucleotide Synthesis: Controlled Pore Glass Derivatives with Branched Amine-Ended Polyether or Polyimine. *Chemistry.* 2024. 30(69). e202403086. doi: 10.1002/chem.202403086
194. Urata H, Ogura E, Shinohara K et al. Synthesis and properties of mirror-image DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(13). 3325-3332. doi: 10.1093/nar/20.13.3325
195. Van Aerschot A, Verheggen I, Hendrix C et al. 1,5-Anhydrohexitol nucleic acids, a new promising antisense construct. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995. 34. 1338-1339. doi: 10.1002/anie.199513381
196. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
197. Virta P. From liquid-phase synthesis to chemical ligation: preparation of oligonucleotides and their backbone analogs in solution. *Nucleic Acids Res.* 2025. 53(20). gkaf1084. doi: 10.1093/nar/gkaf1084
198. Wagner T, Pflleiderer W. Synthesis of 2'-deoxyribonucleoside 5'-phosphoramidites: New building blocks for the inverse (5'-3')-oligonucleotide approach. *Helvetica Chimica Acta.* 2000. 83(8). 2023-2035. doi: 10.1002/1522-2675(20000809)83:8<2023::AID-HLCA2023>3.0.CO;2-P
199. Wang J, Verbeure B, Luyten I et al. Cyclohexene Nucleic Acids (CeNA): Serum Stable Oligonucleotides that Activate RNase H and Increase Duplex Stability with Complementary RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2000.122(36). 8595–8602. doi: 10.1021/ja000018+
200. Warner BD, Warner ME, Karns GA et al. Construction and evaluation of an instrument for the automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *DNA.* 1984. 3(5). 401-411. doi: 10.1089/dna.1984.3.401
201. Weimann G, Khorana HG. Studies on Polynucleotides. XIII.1 Stepwise Synthesis of Deoxyribo-oligonucleotides. An Alternative General Approach and the Synthesis of Thymidine Di-, Tri- and Tetranucleotides Bearing 3"-Phosphomonoester End Groups<sup>2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* 1962. 84(3). 419-430. doi: 10.1021/ja00862a022
202. White H.A. Manual oligonucleotide synthesis using the phosphoramidite method. *New Nucleic Acid Techniques* 1988. 4. 193-213. doi: 10.1385/0-89603-127-6:193
203. Willems PJ. Primer availability. *Nature.* 1989. 337. 10. DOI: 10.1038/337010b0
204. Yakovleva KI, Pereverzev IM, Kechin AA et al. The Influence of the Capping Step During Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligonucleotides on Synthetic Errors in Oligonucleotides. *Molecules.* 2025. 31(1). 94. doi: 10.3390/molecules31010094
205. Yin Y, Arneson R, Apostle A et al. Long oligodeoxynucleotides: chemical synthesis, isolation via catching-by-polymerization, verification via sequencing, and gene expression demonstration. *Beilstein J Org Chem.* 2023. 19. 1957-1965. doi: 10.3762/bjoc.19.146
206. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci.* 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
207. Yu M, Tang X, Li Z et al. High-throughput DNA synthesis for data storage. *Chem Soc Rev.* 2024. 53(9). 4463-4489. doi: 10.1039/d3cs00469d
208. Zaramella S, Bonora GM. The Application of H-Phosphonate Chemistry in the HELP Synthesis of Oligonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides.* 1995. 14(3-5). 809-812. doi: 10.1080/15257779508012477
209. Zhang L, Peritz A, Meggers E. A simple glycol nucleic acid. *J Am Chem Soc.* 2005. 127(12). 4174-4175. doi: 10.1021/ja042564z

210. Zhdanov RI, Zhenodarova SM. Chemical Methods of Oligonucleotide Synthesis. Synthesis. 1975. 4. 222-245. doi: 10.1055/s-1975-23714

### References

- Abramova T. Frontiers and approaches to chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Molecules*. 2013. 18(1). 1063-75. doi: 10.3390/molecules18011063
- Adams SP, Kavka KS, Wykes EJ et al. Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers. *J. Am. Chem. Soc.* 1983. 105(3). 661-663. doi: 10.1021/ja00341a078
- Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH et al. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970. 227(5253). 27-34. doi: 10.1038/227027a0
- Albert TJ, Norton J, Ott M et al. Light-directed 5'→3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res.* 2003. 31(7). e35. doi: 10.1093/nar/gng035
- Alekseev YI, Krynetskaya NF, Tashlytsky VN et al. Interaction of *Escherichia coli* ribonuclease H with hybrid duplexes containing 2'-deoxyxylothyridine, 2'-deoxy-2' fluorouridine or alpha-thymidine. *Nucleosides and Nucleotides*. 1996. 15(9). 1545-1558. doi: 10.1080/07328319608002453
- Alvarado-Urbina G, Sathe GM, Liu WC et al. Automated synthesis of gene fragments. *Science*. 1981. 214(4518). 270-274. doi: 10.1126/science.6169150
- Amarnath V, Broom AD. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chemical Reviews*. 1977. 77(2). 183-217. doi:10.1021/cr60306a002
- Anderson NG, Anderson NL, Taylor J et al. Large-scale oligonucleotide synthesizers. I. Basic principles and system design. *Appl Biochem Biotechnol*. 1995. 54(1-3). 19-42. doi: 10.1007/BF02787909
- Andrews BI, Antia FD, Brueggemeier SB et al. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.* 2021. 86(1). 49-61. doi: 10.1021/acs.joc.0c02291
- Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1981. 22(20). 1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7
- Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. 1982. 48(12). 2223-2311. doi: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4
- Beier M, Hoheisel JD. Analysis of DNA-microarrays produced by inverse in situ oligonucleotide synthesis. *J. Biotechnol.* 2002. 94(1). 15-22. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00416-3
- Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967. 37. 3557-3562. doi: 10.1016/s0040-4039(01)89794-x.
- Benner SA. Magnetic particles as supports for organic synthesis. US Patent No 4,638,032. Jan. 20, 1987.
- Blair S, Richmond K, Rodesch M et al. A scalable method for multiplex LED-controlled synthesis of DNA in capillaries. *Nucleic Acids Res.* 2006. 34(16). e110. doi: 10.1093/nar/gkl641
- Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996. 11(6-7). 687-690. doi: 10.1016/0956-5663(96)83302-1
- Bonora GM, Biancotto G, Maffini M et al. Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21(5). 1213-1217. doi: 10.1093/nar/21.5.1213
- Bonora GM, Rossin R, Zaramella S et al. A Liquid-Phase Process Suitable for Large-Scale Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Org. Process Res. Dev.* 2000. 4(3). 225 - 231. doi: 10.1021/op990096l
- Bonora GM, Scremin CL, Colonna FP et al. HELP (high efficiency liquid phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(11). 3155-3159. doi: 10.1093/nar/18.11.3155
- Brown D.M. A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol.* 1993. 20. 1-17. doi: 10.1385/0-89603-281-7:1
- Brzezinska J, Trzciński S, Strzelec J et al. From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media. *Bioorg Chem.* 2023. 140. 106806. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106806
- Caruthers MH. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*. 1985. 230(4723). 281-285. doi: 10.1126/science.3863253
- Caruthers MH. Chemical synthesis of DNA and DNA analogs. *Acc. Chem. Res.* 1991. 24(9). 278-284. doi: 10.1021/ar00009a005
- Caruthers MH. The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science. *J Biol Chem.* 2013. 288(2). 1420-1427. doi: 10.1074/jbc.X112.442855
- Caruthers MH, Beaucage SL, Becker C et al. Deoxypolynucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal.* 1983. 3. 1-26.
- Catlin JC, Cramer F. Deoxy oligonucleotide synthesis via the triester method. *J. Org. Chem.* 1973. 38(2). 245-250. doi: 10.1021/jo00942a011
- Chemers AV, Aminev FG, Garafutdinov RR et al. DNA criminalistics. M.: Nauka. 2024. 466 S. (In Russian)
- Cheng JY, Chen HH, Kao YS et al. High throughput parallel synthesis of oligonucleotides with

- 1536 channel synthesizer. *Nucleic Acids Res.* 2002. 30(18). e93. doi: 10.1093/nar/gnf092
29. Cook AF, Holman MJ, Nussbaum AL. Nucleoside S-alkyl phosphorothioates. III. Application to oligonucleotide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1969. 91(23). 6479–6484. doi: 10.1021/ja01051a052
30. Cramer F, Helbig R, Hettler H et al. Oligonucleotide Synthesis with a Soluble Polymer as Carrier. *Angew. Chem. Int. Edit.* 1966. 5(6). 601.
31. Crea R, Horn T. Synthesis of oligonucleotides on cellulose by a phosphotriester method. *Nucleic Acids Res.* 1980. 8(10). 2331-2348. doi: 10.1093/nar/8.10.2331
32. Crea R, Kraszewski A, Hirose T et al. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978. 75(12). 5765-5769. doi: 10.1073/pnas.75.12.5765
33. deHaseth PL, Goldman RA, Cech CL et al. Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda PR promoter. *Nucleic Acids Res.* 1983. 11(3). 773-787. doi: 10.1093/nar/11.3.773
34. Delavari A, Keykhasaber M, Miri MA et al. Control of *Phytophthora capsici*, which causes root and stem rot, using encapsulated oligonucleotide DNA. *Sci Rep.* 2026. 16(1). 4215. doi: 10.1038/s41598-025-34330-7
35. Dellinger DJ, Betley JR, Wyrzykiewicz TK et al. Synthesis of DNA using a new two-step cycle. *Methods Mol Biol.* 2005. 288. 1-16. doi: 10.1385/1-59259-823-4:001
36. Dobrynin VN, Filippov SA, Bystrov NS et al. Methylimidazole-catalyzed rapid synthesis of oligodeoxynucleotides by the phosphotriester pathway on a silica gel carrier in dichloroethane. *Bioorg. Chemistry (Moscow).* 1983. 9(5). 706-710.
37. Donga RA, Hassler M, Chan TH et al. Oligonucleotide synthesis using ionic liquids as soluble supports. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2007. 26(10-12). 1287-1293. doi: 10.1080/15257770701530533
38. Donga RA, Khaliq-Uz-Zaman SM, Chan TH et al. A novel approach to oligonucleotide synthesis using an imidazolium ion tag as a soluble support. *J Org Chem.* 2006. 71(20). 7907-7910. doi: 10.1021/jo061279q
39. Eckstein F, Rizk I. Synthesis of oligonucleotides by use of phosphoric triesters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1967. 6(8). 695-697. doi: 10.1002/anie.196706951
40. Edge MD, Green AR, Heathcliffe GR et al. Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature.* 1981. 292(5825). 756-762. doi: 10.1038/292756a0
41. Efimov VA, Buryakova AA, Dubey IY et al. Application of new catalytic phosphate protecting groups for the highly efficient phosphotriester oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(16). 6525-6540. doi: 10.1093/nar/14.16.6525
42. Efimov VA, Reverdatto SV, Chakhmakhcheva OG. New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1982. 10(21). 6675-6694. doi: 10.1093/nar/10.21.6675
43. Egeland RD, Marken F, Southern EM. An Electrochemical Redox Couple Activated by Microelectrodes for Confined Chemical Patterning of Surfaces. *Analytical Chemistry.* 2002. 74(7). 1590-1596. doi: 10.1021/ac010953v
44. Egeland RD, Southern EM. Electrochemically directed synthesis of oligonucleotides for DNA microarray fabrication. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33(14). e125. doi: 10.1093/nar/gni117
45. Fang S, Arneson R, Yin Y et al. De Novo Synthesis of Error-Free Long Oligos. *Curr Protoc.* 2024. 4(10). e70028. doi: 10.1002/cpz1.70028
46. Fang S, Fueangfung S. Scalable synthetic oligodeoxynucleotide purification with use of a catching by polymerization, washing, and releasing approach. *Org Lett.* 2010. 12(16). 3720-3723. doi: 10.1021/ol101316g
47. Fiers W, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XXII. Enzymic degradation. An exonuclease from lactobacillus acidophilus R26. A. Purification, properties, and substrate specificity. *J Biol Chem.* 1963. 238(8). 2780-2788. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67897-4
48. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.* 1991. 251(4995). 767-773. doi: 10.1126/science.1990438
49. Frank R, Heikens W, Heisterberg-Moutsis G et al. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: segmental solid supports. *Nucleic Acids Res.* 1983. 11(13). 4365-4377. doi: 10.1093/nar/11.13.4365
50. Froehler BC, Ng PG, Matteucci MD. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(13). 5399–5407. doi: 10.1093/nar/14.13.5399
51. Gaffney PRJ, Jarrett-Wilkins C, Yeo J et al. Fully Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Organic Process Research & Development.* 2026. 30(1). 98-120. doi: 10.1021/acs.oprd.5c00346
52. Gaffney PR, Kim JF, Valtcheva IB et al. Liquid-Phase Synthesis of 2'-Methyl-RNA on a Homostar Support through Organic-Solvent Nanofiltration. *Chemistry.* 2015. 21(26). 9535-9543. doi: 10.1002/chem.201501001
53. Gait MJ, Matthes HW, Singh M et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. VII. Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by a continuous flow phosphotriester method on a kieselguhr-polyamide support. *Nucleic Acids Res.* 1982. 10(20). 6243-6254. doi: 10.1093/nar/10.20.6243
54. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides: a new solid-phase method.

- Nucleic Acids Res.* 1977. 4(4). 1135-1158. doi: 10.1093/nar/4.4.1135
55. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Machine-aided solid-phase syntheses of two nonanucleotides and an octanucleotide. *Nucleic Acids Res.* 1977. 4(12). 4391-4410. doi: 10.1093/nar/4.12.4391
56. Gait MJ, Singh M, Sheppard RC et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res.* 1980. 8(5). 1081-1096. doi: 10.1093/nar/8.5.1081
57. Gao X, Gulari E, Zhou X. *In situ* synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers.* 2004. 73(5). 579-596. doi: 10.1002/bip.20005
58. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems.* 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
59. Garafutdinov RR, Nikonov YuM, Sakhabutdinova AR et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Biomics.* 2025. 17(4). P.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30 (In Russian)
60. Garegg PJ, Lindh I, Regberg T et al. Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Letters.* 1986. 27. 4051-4054. doi: 10.1016/S0040-4039(00)84908-4
61. Giannaris PA, Damha MJ. Hybridization properties of oligoarabinonucleotides. *Can. J. Chem.* 1994. 72(3). 909-918. doi: 10.1139/v94-118
62. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science.* 2008. 319(5867). 1215-20. doi: 10.1126/science.1151721
63. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science.* 2010. 329(5987). 52-56. doi: 10.1126/science.1190719
64. Gilham PT, Khorana HG. Studies on polynucleotides. I. A new and general method for the chemical synthesis of the C5"-C3" Internucleotidic linkage. syntheses of deoxyribo-dinucleotides<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* 1958. 80(23). 6212-6222. doi: 10.1021/ja01556a016
65. Goeddel DV, Yansura DG, Caruthers MH. Studies on gene control regions. I. Chemical synthesis of lactose operator deoxyribonucleic acid segments. *Biochemistry.* 1977. 16(9). 1765-1772. doi: 10.1021/bi00628a001
66. Gravert DJ, Janda KD. Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies. *Chem. Rev.* 1997. 97(2). 489-510. doi: 10.1021/cr960064l
67. Gryaznov SM, Potapov VK, Gorn VV et al. The all-machine synthesis of oligodeoxyribonucleotides by phosphotriester approach using automatic synthesizer «Victory-4M». *Biopolymers and Cell.* 1986. 2(6). 311-316. doi: 10.7124/BC.0001C9
68. Hall RH, Todd A, Webb RF. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc.* 1957. 3291-3296. doi: 10.1039/JR9570003291
69. Hamada S, Murayama K, Takezawa Y et al. Omega Nucleic Acids (ΩNA), Ultimate Nucleic Acids for Future Technology. *Molecules.* 2026. 31(3). 523. doi: 10.3390/molecules31030523
70. Hayatsu H, Khorana HG. Deoxyribooligonucleotide Synthesis on a Polymeric Support. *J. Am. Chem. Soc.* 1966. 88(13). 3182-3183. doi: 10.1021/ja00965a086
71. Hayatsu H, Khorana HG. Studies on polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc.* 1967. 89(15). 3880-3887. doi: 10.1021/ja00991a035
72. Heinonen P, Lönnberg H. Synthesis of phosphate-branched oligonucleotides. *Bioconj Chem.* 2004 Nov-Dec;15(6):1158-60. doi: 10.1021/bc049845g
73. Hirose T, Crea R, Itakura K. Rapid synthesis of trioxoribonucleotide blocks. *Tetrahedron Letters.* 1978. 19(28). 2449-2452. doi: 10.1016/S0040-4039(01)94797-5
74. Hogrefe RI, Midthune B, Lebedev A. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *Isr. J. Chem.* 2013. 53(6-7). 326-349. doi: 10.1002/ijch.201300032
75. Hölz K, Hoi JK, Schaudy E et al. High-Efficiency Reverse (5'→3') Synthesis of Complex DNA Microarrays. *Sci Rep.* 2018. 8(1). 15099. doi: 10.1038/s41598-018-33311-3
76. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(23). 4842-4849. doi: 10.1093/nar/25.23.4842
77. Huang Y, Knouse KW, Qiu S et al. A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science.* 2021. 373(6560). 1265-1270. doi: 10.1126/science.abi9727
78. Hunkapiller M, Kent S, Caruthers M et al. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins. *Nature.* 1984. 310(5973). 105-111. doi: 10.1038/310105a0
79. Huo C, Chan TH. A novel liquid-phase strategy for organic synthesis using organic ions as soluble supports. *Chem Soc Rev.* 2010. 39(8). 2977-3006. doi: 10.1039/b914497h
80. Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS*

- Lett.* 2002. 528(1-3). 48-52. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03235-0
81. Itakura K, Bahl CP, Katagiri N et al. A Modified Triester Method for the Synthesis of Deoxyribopolynucleotides. *Can. J. Chem.* 1973. 51. 3649–3651. doi:10.1139/v73-543
82. Itakura K, Katagiri N, Narang SA et al. Chemical synthesis and sequence studies of deoxyribooligonucleotides which constitute the duplex sequence of the lactose operator of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1975. 250(12). 4592-4600. doi: 10.1016/S0021-9258(19)41343-4
83. Jensen M, Roberts L, Johnson A et al. Next generation 1536-well oligonucleotide synthesizer with on-the-fly dispense. *J. Biotechnol.* 2014. 171. 76-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.027
84. Jensen MA, Akhras MS, Fukushima M et al. Direct oligonucleotide synthesis onto super-paramagnetic beads. *J Biotechnol.* 2013. 167(4). 448-453. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.006
85. Jensen TB, Langkjaer N, Wengel J. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2008. (52). 133-134. doi: 10.1093/nass/nrn068
86. Jo S, Shin H, Joe SY et al. Recent progress in DNA data storage based on high-throughput DNA synthesis. *Biomed Eng Lett.* 2024. 14(5). 993-1009. doi: 10.1007/s13534-024-00386-z
87. Kamaike K, Hasegawa Y, Ishido Y. Efficient syntheses of an oligonucleotide on a cellulose acetate derivative as a novel polymer-support using phosphotriester approach. *Tetrahedron Letters.* 1988. 29(6). 647–650. doi: 10.1016/S0040-4039(00)80172-0
88. Kaplan BE. The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Trends in Biotechnology.* 1985. 3(10). 253-256. doi: 10.1016/0167-7799(85)90024-1
89. Kashida H, Murayama K, Toda T et al. Control of the chirality and helicity of oligomers of serinol nucleic acid (SNA) by sequence design. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011. 50(6). 1285-1288. doi: 10.1002/anie.201006498
90. Katayama S, Hirai K. Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. In: Obika S, Sekine M. (eds) *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*. Springer, Singapore. 2018. 83-95. doi: 10.1007/978-981-13-1912-9\_5
91. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
92. Khorana HG. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl. Chem.* 1968. 17. 349-381. doi: 10.1351/pac196817030349
93. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science.* 1979. 203(4381). 614-625. doi: 10.1126/science.366749
94. Khorana HG, Razzell WE, Gilham PT et al. Syntheses of dideoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 1957. 79(4). 1002-1003. doi: 10.1021/ja01561a065
95. Khorana HG, Todd AR. Studies on phosphorylation. Part XI. The reaction between carbodiimides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates. *Journal of the Chemical Society.* 1953. 2257-2260. doi: 10.1039/jr9530002257
96. Kim J, Kim H, Bang D. OpenIDS2: A low-cost, 3D-printed, open-source platform for reproducible construction of DNA microarray synthesizers. *PLoS One.* 2025. 20(12). e0338478. doi: 10.1371/journal.pone.0338478
97. Kim J, Kim H, Bang D. An open-source, 3D printed inkjet DNA synthesizer. *Sci Rep.* 2024. 14(1). 3773. doi: 10.1038/s41598-024-53944-x
98. Knouse KW, deGruyter JN, Schmidt MA et al. Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science.* 2018. 361(6408). 1234-1238. doi: 10.1126/science.aau3369
99. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl J Med.* 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
100. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VI use of inorganic carriers. *Tetrahedron Letters.* 1972. 13(16). 1527-1530. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84677-3
101. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VIII use of polyethylenglycol. *Tetrahedron Letters.* 1972a. 13(16). 1534-1538. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84679-7
102. Köster H, Stumpe A, Wolter A. Polymer support oligonucleotide synthesis 13: Rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach. *Tetrahedron Letters.* 1983. 24(8). 747-750. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81515-4
103. Koziółkiewicz M, Wójcik M, Kobylańska A et al. Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1997. 7(1). 43-48. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.43
104. Kozlov IA, Dang M, Sikes K et al. Significant improvement of quality for long oligonucleotides by using controlled pore glass with large pores. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2005. 24(5-7). 1037-1041. doi: 10.1081/ncn-200059761
105. Krasnodębski C, Sawuła A, Kaźmierczak U et al. Oligo-Not Only for Silencing: Overlooked Potential for

- Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci.* 2023. 24(5). 4466. doi: 10.3390/ijms24054466
106. Kraszewski A, Stawiński J. H-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds. *Pure and Applied Chemistry.* 2007. 79(12). 2217 – 2227. doi:10.1351/pac200779122217
107. Kumar V, Gore KR, Pradeepkumar PI et al. Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA). *Org Biomol Chem.* 2013. 11(35). 5853-5865. doi: 10.1039/c3ob41244j
108. Kungurtsev V, Laakkonen J, Molina AG et al. Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2'-deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support. *Eur. J. Org. Chem.* 2013. 6687-6693. doi: 10.1002/ejoc.201300864
109. Kupryushkin MS, Pyshnyi DV, Stetsenko DA. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. *Acta Naturae.* 2014 Oct;6(4):116-8.
110. Lashkari DA, Hunnicke-Smith SP, Norgren RM et al. An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995. 92(17). 7912-7915. doi: 10.1073/pnas.92.17.7912
111. LeProust EM, Peck BJ, Spirin K et al. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Res.* 2010. 38(8). 2522-2540. doi: 10.1093/nar/gkq163
112. Letsinger RL, Caruthers MH, Miller PS et al. Oligonucleotide syntheses utilizing beta-benzoylpropionyl, a blocking group with a trigger for selective cleavage. *J Am Chem Soc.* 1967. 89(26). 7146-7147. doi: 10.1021/ja01002a074
113. Letsinger RL, Finnan JL, Heavner GA et al. Letter: Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links. *J Am Chem Soc.* 1975. 97(11). 3278-3279. doi: 10.1021/ja00844a090
114. Letsinger RL, Lunsford WB. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J Am Chem Soc.* 1976. 98(12). 3655-3661. doi: 10.1021/ja00428a045
115. Letsinger RL, Mahadevan V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* 1965. 87(15). 3526–3527. doi: 10.1021/ja01093a058
116. Letsinger RL, Mahadevan V. Stepwise synthesis of oligodeoxyribonucleotides on an insoluble polymer support. *J Am Chem Soc.* 1966. 88(22). 5319-5324. doi: 10.1021/ja00974a053
117. Letsinger RL, Ogilvie KK. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 1969. 91(12). 3350–3355. doi: 10.1021/ja01040a042
118. Li H, Huang Y, Wei Z et al. An oligonucleotide synthesizer based on a microreactor chip and an inkjet printer. *Sci Rep.* 2019. 9(1). 5058. doi: 10.1038/s41598-019-41519-0
119. Liu ZC, Shin DS, Shokouhimehr M et al. Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens Bioelectron.* 2007. 22(12). 2891-2897. doi: 10.1016/j.bios.2006.12.005
120. Lohrmann R, Söll D, Hayatsu H et al. Studies on polynucleotides. LI. Syntheses of the 64 possible ribotrinnucleotides derived from the four major ribomononucleotides. *J Am Chem Soc.* 1966. 88(4). 819-829. doi: 10.1021/ja00956a039
121. Lomakin AI, Popov SG. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Use of segmental solid supports based on a cellulose. *Bioorg. Chem. (Moscow).* 1985. 11(7). 927-933.
122. Lomakin AI, Yastrebov SI, Popov SG. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. I. A study of solid supports based on silica gel "Silochrom". *Bioorg. Chem. (Moscow).* 1985. 11(7). 920-926.
123. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J Org Chem.* 2017. 13. 1368-1387. doi: 10.3762/bjoc.13.134
124. Lu Y. Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates. *Mini Rev Med Chem.* 2006. 6(3). 319-330. doi: 10.2174/138955706776073439
125. Ma Y, Zhang Z, Jia B et al. Automated high-throughput DNA synthesis and assembly. *Heliyon.* 2024. 10(6). e26967. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26967
126. Marshall WS, Caruthers MH. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science.* 1993. 259(5101). 1564-1570. doi: 10.1126/science.7681216
127. Matteucci MD, Caruthers MH. The synthesis of oligodeoxyrimidines on a polymer support. *Tetrahedron Letters.* 1980. 21(8). 719-722. doi: 10.1016/S0040-4039(00)71455-9
128. Matteucci MD, Caruthers MH. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 1981. 103(11). 3185-3191. doi: 10.1021/ja00401a041
129. Matthes HW, Zenke WM, Grundström T et al. Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J.* 1984. 3(4). 801-805. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01888.x
130. McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters.* 1983. 24. 245-248. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
131. McGall G, Labadie J, Brock P et al. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93(24). 13555-13560. doi: 10.1073/pnas.93.24.13555

132. Michelson AM. Polynucleotides. Part IV. Synthesis of oligonucleotide analogous substituted in the sugar portion. *Journal of the Chemical Society*. 1962. 979–982. doi: 10.1039/JR9620000979
133. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3':5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* 1955. 2632–2638. doi: 10.1039/JR9550002632
134. Miyazaki Y, Yoshida A, Okaniwa T et al. Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators. *Org Lett*. 2022. 24(21). 3807–3811. doi: 10.1021/acs.orglett.2c01348
135. Mohammed AA, AlShaer D, Al Musaimi O. Oligonucleotides: evolution and innovation. *Medicinal Chemistry Research*. 2024. 33. 2204–2220. doi: 10.1007/s00044-024-03352-7
136. Molina AG, Kungurtsev V, Virta P et al. Acetylated and methylated  $\beta$ -cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2'-oligodeoxyribo-nucleotides in solution. *Molecules*. 2012. 17(10). 12102–20. doi: 10.3390/molecules171012102
137. Molina AG, Sanghvi YS. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2019. 77(1). e82. doi: 10.1002/cpnc.82
138. Narang CK, Brunfeldt K, Norris KE. Oligonucleotide synthesis on a crosslinked polyacrylmorpholide support. *Tetrahedron Letters*. 1977. 18(21). 1819–1822. doi: 10.1016/S0040-4039(01)83614-5
139. Narang SA, Brousseau R, Hsiung HM et al. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method. *Methods Enzymol*. 1980. 65(1). 610–620. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65063-0
140. Narang SA, Hsiung HM, Brousseau R. Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments. *Methods Enzymol*. 1979. 68. 90–98. doi: 10.1016/0076-6879(79)68008-4
141. Nassir M, Gherardi L, Redman RL et al. An Improved P(V) Thio-Oligonucleotide Synthesis Platform. *Org Lett*. 2025. 27(1). 97–102. doi: 10.1021/acs.orglett.4c03980
142. Nguyen BH, Takahashi CN, Gupta G et al. Scaling DNA data storage with nanoscale electrode wells. *Sci Adv*. 2021. 7(48). eabi6714. doi: 10.1126/sciadv.abi6714
143. Nielsen P, Dreier LH, Wengel J. Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary. *Bioorg Med Chem*. 1995. 3(1). 19–28. doi: 10.1016/0968-0896(94)00143-q
144. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991. 254(5037). 1497–500. doi: 10.1126/science.1962210
145. Oberemok VV, Laikova EV, Zaitsev AS et al. The creation of DNA insecticides is a new direction in plant protection. *Protection and quarantine of plants*. 2026. (11). 14–16.
146. Oberemok VV, Useinov RZ, Skorokhod OA et al. Oligonucleotide Insecticides for Green Agriculture: Regulatory Role of Contact DNA in Plant-Insect Interactions. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(24). 15681. doi: 10.3390/ijms232415681
147. Obika S, Morio K, Nanbu D et al. Synthesis and conformation of 3'-O,4'-C-methyleneribonucleosides, novel bicyclic nucleoside analogues for 2',5'-linked oligonucleotide modification. *Chem. Commun*. 1997. (17). 1643–1644. doi: 10.1039/A704376G
148. O'Callaghan DM, Donnelly WJ. Oligonucleotide synthesis using the manual phosphotriester method. *Methods Mol Biol*. 1988. 4. 165–192. doi: 10.1385/0-89603-127-6:165
149. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(22). 4677–4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
150. Organick L, Ang SD, Chen YJ et al. Random access in large-scale DNA data storage. *Nat. Biotechnol*. 2018. 36(3). 242–248. doi: 10.1038/nbt.4079
151. Ott J, Eckstein F. Filter disc supported oligonucleotide synthesis by the phosphite method. *Nucleic Acids Res*. 1984. 12(23). 9137–9142. doi: 10.1093/nar/12.23.9137
152. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(11). 5022–5026. doi: 10.1073/pnas.91.11.5022
153. Pon RT. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol*. 1993. 20. 465–496. doi: 10.1385/0-89603-281-7:465
154. Pon RT. Chemical Synthesis of Oligonucleotides: From Dream to Automation. In book: *Artificial DNA. Methods and Applications*. Eds Khudyakov YuE, Fields HA. 2002. CRC Press. 1–80.
155. Potapov VK, Chekhmacheva OG, Shabarova ZA et al. Synthesis of oligonucleotides on polymer carriers. Synthesis of deoxy-[thymidyl-(3'→5')-adenyl-(3'→5')-adenyl-(3'→5')-adenosine. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971. 196(2). 360–363. (In Russian)
156. Potapov VK, Potemkin VK, Gorn VV et al. Semi-automatic solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1982. 263(6). 1386–1389.
157. Potapov VK, Turkin SI, Veiko VP et al. The use of a new type of polymer carrier in the synthesis of oligonucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1978. 241(6). 1352–1354. (In Russian)
158. Potapov VK, Veiko VP, Koroleva ON et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted

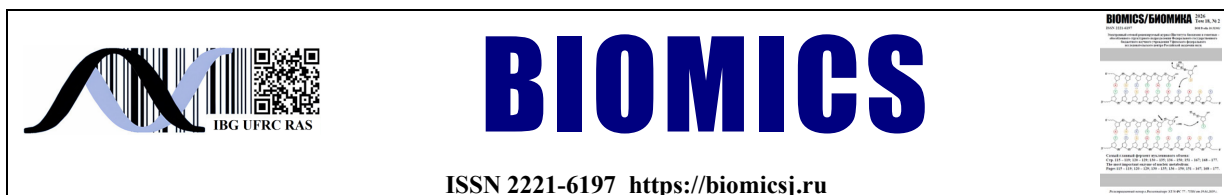
- polymer support. *Nucleic Acids Res.* 1979. 6(6). 2041-2056. doi: 10.1093/nar/6.6.2041
159. Potapov VK, Zvezdina VV, Kochetkova MN et al. Preparative synthesis of oligonucleotide blocks on highly cross-linked polymeric carriers. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1973. 209(2). 364-366. (In Russian)
160. Rebinbas R, Glória I, Chegão J et al. DNA as a data storage medium. *J Biotechnol.* 2026. 414. 19-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2026.03.003
161. Reese CB. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org Biomol Chem.* 2005. 3(21). 3851-3868. doi: 10.1039/B510458K
162. Reese CB, Saffhill R. Oligonucleotide synthesis via phosphotriester intermediates: the phenyl-protecting group. *Chemical Comm. (London).* 1968. (13). 767-768. doi: 10.1039/C1968000076
163. Rosenqvist P, Saari V, Pajuniemi E et al. Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem.* 2023. 88(14). 10156–10163. doi: 10.1021/acs.joc.3c01006
164. Sabatino D, Damha MJ. Oxepane nucleic acids: synthesis, characterization, and properties of oligonucleotides bearing a seven-membered carbohydrate ring. *J Am Chem Soc.* 2007. 129(26). 8259-8270. doi: 10.1021/ja071336c
165. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
166. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
167. Sakhabutdinova AR, Mikhailenko KI, Garafutdinov RR et al. "DNA Watermarks" in the form of alien DNA sequences inserted in the genomes of various organisms and not only inserted ones. *Biomics.* 2021. 13(4). 368-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-26 (In Russian)
168. Schaller H, Weimann G, Lerch B et al. Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3" Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 1963. 85(23). 3821–3827. doi: 10.1021/ja00906a021
169. Schöning K, Scholz P, Guntha S et al. Chemical etiology of nucleic acid structure: the alpha-thiofuranosyl-(3'→2') oligonucleotide system. *Science.* 2000. 290(5495). 1347-1351. doi: 10.1126/science.290.5495.1347
170. Schott H. Polyvinyl Alcohol Substituted by Nucleotides as Carrier for Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1973. 12. 246-246. doi: 10.1002/anie.197302461
171. Shemyakin MM, Ovchinnikov YuA, Kinyushkin AA et al. Synthesis of peptides in solution on a polymeric support I. Synthesis of glycyglycyl-L-leucylglycine. *Tetrahedron Letters.* 1965. 6(27). 2323-2327. doi: 10.1016/S0040-4039(00)70379-0
172. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.* 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
173. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
174. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters.* 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
175. Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR et al. Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: a two-step cycle using peroxy anion deprotection. *J Am Chem Soc.* 2003. 125(44). 13427-13441. doi: 10.1021/ja030376n
176. Singh A, Tolev M, Schilling CI et al. Solution-Phase Synthesis of Branched DNA Hybrids via H-Phosphonate Dimers. *J. Org. Chem.* 2012. 77(6). 2718–2728. doi: 10.1021/jo202508n
177. Singh SK, Koshkin AA, Wengel J et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* 1998. (4). 455 - 456. doi: 10.1039/a708608c
178. Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y et al. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol.* 1999. 17(10). 974-978. doi: 10.1038/13664
179. Sinha ND, Biernat J, McManus J et al. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* 1984. 12(11). 4539-4557. doi: 10.1093/nar/12.11.4539
180. Sinyakov AN, Kostina EV. Error Correction Techniques in Synthetic Oligonucleotides and Synthetic DNA. *Mol Biol (Mosk).* 2025. 59(4). 544-556. doi: 10.31857/S0026898425040021 (In Russian)
181. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
182. Stec WJ, Zon G, Egan W. Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides.

- J. Am. Chem. Soc.* 1984. 106. 6077 – 6079. doi: 10.1021/ja00332a054
183. Steffens R, Leumann CJ. Synthesis and thermodynamic and biophysical properties of Tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. 121(14). 3249 – 3255. doi: 10.1021/ja983570w
184. Talap J, Zhao J, Shen M et al. Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. 206. 114368. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114368.
185. Tanaka T., Letsinger R.L. Syringe method for stepwise chemical synthesis of oligonucleotides. *Nucleic Acids Research.* 1982. V. 10(10). P. 3249–3260. doi: 10.1093/nar/10.10.3249
186. Tanaka S, Yukami S, Fukushima K et al. Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis. *ACS Macro Lett.* 2018. 7(3). 295-299. doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00063
187. Tedebark U, Scozzari A, Werbitzky O et al. Industrial-scale manufacturing of a possible oligonucleotide cargo CPP-based drug. *Methods Mol Biol.* 2011. 683. 505-524. doi: 10.1007/978-1-60761-919-2\_36
188. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol.* 1992. 1(1). 58-72. doi: 10.1097/00019606-199203000-00008
189. Tian J, Gong H, Sheng N et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature.* 2004. 432(7020). 1050-1054. doi: 10.1038/nature03151
190. Trzeciński S, Brzezinska J, Waligórski K et al. Hybrid Supports for Oligonucleotide Synthesis: Controlled Pore Glass Derivatives with Branched Amine-Ended Polyether or Polyimine. *Chemistry.* 2024. 30(69). e202403086. doi: 10.1002/chem.202403086
191. Urata H, Ogura E, Shinohara K et al. Synthesis and properties of mirror-image DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992. 20(13). 3325-3332. doi: 10.1093/nar/20.13.3325
192. Van Aerschot A, Verheggen I, Hendrix C et al. 1,5-Anhydrohexitol nucleic acids, a new promising antisense construct. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995. 34. 1338-1339. doi: 10.1002/anie.199513381
193. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
194. Virta P. From liquid-phase synthesis to chemical ligation: preparation of oligonucleotides and their backbone analogs in solution. *Nucleic Acids Res.* 2025. 53(20). gkaf1084. doi: 10.1093/nar/gkaf1084
195. Wagner T, Pfeleiderer W. Synthesis of 2'-deoxyribonucleoside 5'-phosphoramidites: New building blocks for the inverse (5'-3')-oligonucleotide approach. *Helvetica Chimica Acta.* 2000. 83(8). 2023-2035. doi: 10.1002/1522-2675(20000809)83:8<2023::AID-HLCA2023>3.0.CO;2-P
196. Wang J, Verbeure B, Luyten I et al. Cyclohexene Nucleic Acids (CeNA): Serum Stable Oligonucleotides that Activate RNase H and Increase Duplex Stability with Complementary RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2000.122(36). 8595–8602. doi: 10.1021/ja000018+
197. Warner BD, Warner ME, Karns GA et al. Construction and evaluation of an instrument for the automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *DNA.* 1984. 3(5). 401-411. doi: 10.1089/dna.1984.3.401
198. Weimann G, Khorana HG. Studies on Polynucleotides. XIII.1 Stepwise Synthesis of Deoxyribo-oligonucleotides. An Alternative General Approach and the Synthesis of Thymidine Di-, Tri- and Tetranucleotides Bearing 3"-Phosphomonoester End Groups<sup>2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* 1962. 84(3). 419-430. doi: 10.1021/ja00862a022
199. White H.A. Manual oligonucleotide synthesis using the phosphoramidite method. *New Nucleic Acid Techniques* 1988. 4. 193-213. doi: 10.1385/0-89603-127-6:193
200. Willems PJ. Primer availability. *Nature.* 1989. 337. 10. DOI: 10.1038/337010b0
201. Yakovleva KI, Pereverzev IM, Kechin AA et al. The Influence of the Capping Step During Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligonucleotides on Synthetic Errors in Oligonucleotides. *Molecules.* 2025. 31(1). 94. doi: 10.3390/molecules31010094
202. Yin Y, Arneson R, Apostle A et al. Long oligodeoxynucleotides: chemical synthesis, isolation via catching-by-polymerization, verification via sequencing, and gene expression demonstration. *Beilstein J Org Chem.* 2023. 19. 1957-1965. doi: 10.3762/bjoc.19.146
203. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci.* 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
204. Yu M, Tang X, Li Z et al. High-throughput DNA synthesis for data storage. *Chem Soc Rev.* 2024. 53(9). 4463-4489. doi: 10.1039/d3cs00469d
205. Zaramella S, Bonora GM. The Application of H-Phosphonate Chemistry in the HELP Synthesis of Oligonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides.* 1995. 14(3-5). 809–812. doi: 10.1080/15257779508012477
206. Zarytova VF, Potapov VK, Shabarova ZA, Knorre DG. Synthesis of oligonucleotides on polymer carriers. Synthesis of oligodeoxynucleotides containing deoxyguanylic acid. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1971. 199(5). 1072-1074. (In Russian)
207. Zhang L, Peritz A, Meggers E. A simple glycol nucleic acid. *J Am Chem Soc.* 2005. 127(12). 4174-4175. doi: 10.1021/ja042564z

208. Zhang N, Tan C, Cai P et al. Synthesis and properties of morpholino chimeric oligonucleotides. *Tetrahedron Letters*. 2008. 49(22). 3570-3573. doi: 10.1016/j.tetlet.2008.04.035

209. Zhdanov RI, Zhenodarova SM. Chemical Methods of Oligonucleotide Synthesis. *Synthesis*. 1975. 4. 222-245. doi: 10.1055/s-1975-23714

210. Zhenodarova SM, Khabarova MI. Chemical methods of synthesis of polynucleotides. *Russian Chemical Reviews*. 1966. 35(7). 531-537.



## Феназины бактерий: биосинтез, функции и прикладное значение

\*З.Р. Вершинина<sup>1,2</sup>, О.В. Чубукова<sup>1,2</sup>, Л.Р. Хакимова<sup>1,2</sup>, А.М. Лавина<sup>1</sup>, Р.М. Садыкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября 71, лит. 1Е.

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», Россия, 450064, Уфа, ул. Космонавтов, 1.  
\*E-mail: [zilyaver@mail.ru](mailto:zilyaver@mail.ru)

### Резюме

Феназины — гетероциклические азотсодержащие вторичные метаболиты, широко распространённые у бактерий и обладающие разнообразными биологическими функциями: от антимикробного действия до участия в обмене электронов. Химическое ядро феназинов базируется на бициклической системе, в которой два бензольных кольца соединены через два атома азота. На сегодняшний день известно более 150 природных феназинов и более 6000 их синтетических производных с широким спектром биоактивностей, включая противомикробную, противоопухолевую, гипотензивную, нейропротекторную, противопаразитарную и ряд других. Эти вторичные метаболиты являются ценным природным ресурсом для разработки новых лекарств, благодаря возможности модификации положения и типов функциональных групп в молекуле, которые в итоге диктуют химические, физические и биологические свойства новых феназинов. Хотя ферменты, участвующие в метилировании, гидроксильровании, гликозилировании и изопрениляции феназинового ядра исследованы, все еще остается много вопросов с такими реакциями, как димеризация, галогенирование и биосинтез сафеновой кислоты, для которых до сих пор не найдены ключевые ферменты. В обзоре суммируются сведения о биосинтезе феназинов и его генетической основе, роли этих вторичных метаболитов в растительно-микробных сообществах и патогенезе, методах обнаружения, а также применение в биотехнологии и фармакологии; обсуждаются существующие проблемы получения новых производных феназинов и перспективные направления для будущих исследований.

**Ключевые слова:** биосинтез феназинов, вторичные метаболиты бактерий, антимикробная активность, противоопухолевая активность, обмен электронов, феназин, пиоцианин, *phz*-оперон.

**Цитирование:** Вершинина З.Р., Чубукова О.В., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Садыкова Р.М. Феназины бактерий: биосинтез, функции и прикладное значение. *Biomics*. 2026. 18(2). 215-242. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-15

© Авторы, З.Р. Вершинина, О.В. Чубукова, Л.Р. Хакимова, А.М. Лавина, Р.М. Садыкова, 2026

## Bacterial phenazines: biosynthesis, functions and applications

\*Z.R. Verшинina<sup>1,2</sup>, O.V. Chubukova<sup>1,2</sup>, L.R. Khakimova<sup>1,2</sup>, A.M. Lavina<sup>1</sup>, R.M. Sadykova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, lit. 1E

<sup>2</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ufa State Petroleum Technological University" (USPTU), Department of molecular technologies, Russia, 450064, Ufa, Kosmonavtov st. 1

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

### Resume

Phenazines are heterocyclic nitrogen containing secondary metabolites widely distributed among bacteria and exhibiting diverse biological functions — from antimicrobial activity to involvement in electron transfer. The chemical core of phenazines is based on a bicyclic system in which two benzene rings are linked via two nitrogen atoms. To date, more than 150 natural phenazines and over 6,000 synthetic derivatives are known, each with a wide range of bioactivities, including antimicrobial, antitumor, hypotensive, neuroprotective, antiparasitic, and other activities. Phenazines represent a valuable natural resource for drug discovery, owing to the possibility of modifying the position and types of functional groups in the molecule — features that ultimately determine the chemical, physical, and biological properties of novel phenazines. Although enzymes involved in methylation, hydroxylation, glycosylation, and isoprenylation of the phenazine core have been studied, many questions remain regarding reactions such as dimerization, halogenation, and the biosynthesis of safenic acid — for which key enzymes have yet to be identified. This review summarizes current knowledge on: the biosynthesis of phenazines and its genetic basis; the role of these secondary metabolites in plant microbial communities and pathogenesis; methods for their detection; applications in biotechnology and pharmacology. In addition, the existing problems of obtaining new phenazine derivatives and promising directions for future research are discussed.

**Keywords:** phenazine biosynthesis, secondary bacterial metabolites, antimicrobial activity, antitumor activity, electron exchange, phenazine, pyocyanin, phz operon.

**Citation:** Vershinina Z.R., Chubukova O.V., Khakimova L.R., Lavina A.M., Sadykova R.M. Bacterial phenazines: biosynthesis, functions and applications. *Biomics*. 2026. 18(2). 215-242. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-15 (In Russian)

© **The Authors**, Z.R. Vershinina, O.V. Chubukova, L.R. Khakimova, A.M. Lavina, R.M. Sadykova, 2026

### Введение

Феназины представляют собой большую группу азотсодержащих гетероциклических соединений, обладающих биологической активностью и представляющих потенциальный интерес для сельскохозяйственного, промышленного и фармацевтического производства [Hernandez et al., 2004; Price-Whelan et al., 2006; Arseneault et al., 2013; Morohoshi, et al., 2013].

Данные соединения обнаруживаются в архебактериях рода *Methanosarcina* [Arseneault et al., 2013], грамположительных (роды *Streptomyces*, *Microbiospora*, *Amycolata* и *Brevibacterium*) [Mentel et al., 2009] и грамотрицательных бактериях (роды *Pantoea*, *Vibrio*, *Pelagibacter*, *Xanthomonas*, *Lysobacter*, *Burkholderia* и *Pseudomonas*) [Price-Whelan et al., 2006; Веремеенко и др., 2009; Pierson III et al., 2010; Liaudanskaya et al., 2025]. Образование феназинов происходит в рамках шикиматного метаболического пути, который является основным для получения таких соединений, как ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан), сидерофоры (белки, транспортирующие железо) и хиноны [Pierson III et al., 2010; Mavrodi et al., 2010; Левданская и др., 2021]. Отличительной чертой феназинов является их интенсивная окраска, проявляющаяся в разнообразных оттенках. Их спектры поглощения включают несколько полос в ультрафиолетовой

области и одну основную полосу в видимом диапазоне (400–600 нм), отвечающую за цвет [Turner, Messenger, 1986; Mavrodi et al., 2010].

Положение и тип функциональных групп в молекулах феназинов диктуют их химические, физические и биологические свойства [Serafim et al., 2023]. С момента открытия первого феназина было зарегистрировано более 150 природных и более 6000 синтетических производных с широким спектром биоактивностей [Schmitz, Rosenbaum, 2020; Yan et al., 2021]. Феназины эффективно ингибируют рост ряда грибов и бактерий, играют важную роль в транспорте электронов и обладают высоким окислительно-восстановительным потенциалом благодаря своему средству к флавиновым кофакторам [Феклистова, Максимова, 2005; Pierson III et al., 2010; Chincholkar, Thomashow, 2013; Guttenberger et al., 2017; Aversch, Krömer, 2018; Wang et al., 2022; Liaudanskaya et al., 2025]. Также они участвуют в ряде физиологических процессов, а именно в формировании биопленок и в восстановлении железа [Chincholkar, Thomashow, 2013; Wang et al., 2021]. Существует гипотеза, что феназины способны стимулировать рост растений путем преобразования почвенных минералов в биодоступные формы, улучшающие питание растений [Hernandez et al., 2004; Liaudanskaya et al., 2025].

Антимикробная активность феназинов в микробных биопленках защищает корни растений от

вредного воздействия почвенных фитопатогенов [Chincholkar, Thomashow, 2013]. Принимая электроны, феназины трансформируются в относительно стабильные анионы. Это нарушает нормальный транспорт электронов, подавляет клеточное дыхание и приводит к накоплению в клетках супероксид-радикалов и перекиси водорода. В конечном итоге это вызывает гибель чувствительных к феназинам микроорганизмов [Веремеенко и др., 2009]. Разнообразие химической структуры и физических свойств феназинов проявляется не только в антибиотической активности этих соединений, но и в противоопухолевой, гипотензивной и нейропротекторной активностях [Shapira et al., 2021]. Эти соединения могут использоваться в медицине для лечения малярии, гельминтозов и даже рака [Sawhney, Boykin, 1979; Cimmino et al., 2012; Liaudanskaya et al, 2025]. Также феназины могут быть задействованы в разработке медиаторов биосенсоров, способствующих переносу электронов от окислительно-восстановительных ферментов к электродам [Pauliukaite et al., 2010].

За последнее десятилетие количество исследовательских работ, посвященных феназинам, постоянно растет. Целью данного обзора является объединение информации, включая краткую историю открытия феназинов, общую химическую структуру этих соединений и распространенность в природе, ключевые моменты их биосинтеза, а также описание их разнообразных биологических активностей и экологических функций. Кроме того, в обзоре обсуждаются последние достижения биотехнологов, связанные с феназинами и вносящие свой вклад в сельское хозяйство, промышленность и фармацевтическое производство.

### Краткая история открытия феназинов

Открытие феназинов началось со случайного обнаружения в 1859 году сине-зеленого пигмента, ответственного за окраску «голубого гноя», связанного с тяжелыми ранами в результате хирургических процедур. Этот пигмент был назван пиоцианином, а 65 лет спустя он был идентифицирован как производное феназина [Wrede, Strack, 1924; Diggle, Whiteley, 2020; Gonçalves, Vasconcelos, 2021].

Позже были выявлены более 100 производных, включая 1-гидроксифеназин, впервые выделенный в начале двадцатого века из почвенных псевдомонад. Структурно молекула отличается гидроксильной группой в положении С1, которая изменяет его физико-химическое поведение, повышая окислительно-восстановительный потенциал и растворимость, тем самым усиливая антимикробную активность [Huang et al., 2024]. После Первой мировой войны удалось успешно кристаллизовать пиоцианин и идентифицировать ядро феназина - азотсодержащую

трициклическую ароматическую систему. Это выделило феназины в отдельный класс гетероароматических соединений, отличных от красителей и алкалоидов, известных в то время [Blankenfeldt, Parsons, 2014]. В 1938 структура пиоцианина была окончательно идентифицирована как 5-метил-1-гидроксифеназин. Это открытие подчеркнуло важность гидроксильного замещения в модуляции окислительно-восстановительной активности и силе антимикробных свойств. Идея о том, что химические модификации (метилирование, гидроксильное замещение и т.д.) изменяют биологическую функцию, стала центральной для более поздних исследований разнообразия феназинов [Stepien et al., 2017; Huang et al., 2024].

Постепенно феназины начали восприниматься научным сообществом не только как микробные пигменты и антибиотики, но и как патогенные факторы, особенно для *Pseudomonas aeruginosa*. В конце 1960-х и начале 1970-х годов появились данные, что пиоцианин способствует сохранению инфекции, нарушая иммунную защиту хозяина и усиливая защиту микроорганизма, в том числе способствуя образованию биопленок [Si et al, 2024]. В то же время в почвах присутствие феназина позволяло бактериям подавлять конкурентов и доминировать в экологической нише [Zboralski et al, 2022]. Таким образом, феназины оказались «многофункциональными метаболитами», изучением которых занимались не только микробиологи, но и химики, экологи и медицинские работники. В 1960-1970-х годах, благодаря продвинутым методам спектроскопии (УФ, ИК, ЯМР) и развитию генетики, началась идентификация биосинтетических путей конкретных феназинов [Guttenberger et al., 2017; Huang et al., 2024].

Детальное понимание биосинтеза феназинов стало возможным с приходом эры молекулярной генетики в 1980-1990-х годах, благодаря секвенированию генов, кодирующих белки, участвующие в этом процессе у бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и *Pseudomonas fluorescens*. Это исследование выявило оперон *phzABCDEFGHI*, состоящий из семи генов, который отвечает за производство ключевого феназинового предшественника - феназин-1-карбоксилата. Дальнейшие модификации этого соединения приводят к образованию всего многообразия известных феназинов. Примечательно, что у обоих видов бактерий этот *phz*-оперон присутствовал в двух активных копиях. Последующие исследования показали, что *phz*-опероны широко распространены среди бактерий рода *Pseudomonas*, а также у представителей родов *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Burkholderia* и других [Левданская и др., 2021; Huang et al., 2024].

### Химическая структура феназинов и их распространённость среди бактерий

Феназины являются вторичными метаболитами почвенных и глубоководных морских микроорганизмов, относящихся к родам *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Actinomycetes*, *Vibrio* и ряду других [Pierson, Pierson, 2010; Blankenfeldt, Parsons, 2014; Shapira et al., 2021; Yan et al., 2021; Serafim et al., 2023]. Ранее было установлено, что у архей рода *Methanosarcina* присутствует производное феназина, связанное с мембраной и функционирующее в качестве переносчика электронов в процессе метаногенеза [Mavrodi et al., 2006]. В научных и промышленных целях феназины обычно получают из грамположительных бактерий рода *Streptomyces* и грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas*. Представители этих родов характеризуются самым высоким природным уровнем синтеза упомянутых метаболитов и разнообразием производных, что повышает их перспективность в качестве промышленных штаммов [Zhyzneyskaya et al., 2023].

Полный механизм синтеза феназиновых соединений до сих пор имеет много пробелов. Наиболее хорошо исследованы начальные стадии у бактерий рода *Pseudomonas*, тогда как пути синтеза иодина, 2-оксифеназина и ряда других соединений остаются невыясненными [Mavrodi et al., 2006; Peng et al., 2018].

Химическая структура феназинов базируется на бициклической системе (добензопиразин, 9,10-диазаантрацен), где два бензольных кольца соединены через два атома азота (Рис. 1А). Возможность присоединения различных химических групп к основному ядру приводит к образованию множества феназиновых производных, каждое из которых обладает уникальными физическими, химическими и биологическими свойствами [Guttenberger et al., 2017; Serafim et al., 2023; Thalhammer, Newman, 2023; Zhyzneyskaya et al., 2023].

На сегодняшний день, практически одна треть всех существующих феназинов обнаруживаются в метаболитах псевдомонад. При этом все эти соединения являются производными двух основных предшественников - феназин-1-карбоновой кислоты (РСА) и феназин-1, 6-дикарбоновой кислоты (PDC) (Рис. 1Б, 1В) [Mavrodi et al., 2006; Chincholkar, Thomashow, 2013; Wan et al., 2022].

Известно более 50 различных типов феназиновых соединений, синтезируемых различными видами рода *Pseudomonas*. Примеры включают феназин-1-карбоновую кислоту (производимый *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas aureofaciens*), 4,9-диоксифеназин (*Pseudomonas cepacia*), феназин-1-карбоксамид (*Pseudomonas chlororaphis*), иодинин

(*Pseudomonas iodina* и *Pseudomonas phenazinium*), азругинозин (*Pseudomonas aeruginosa*), а также 2-оксифеназин-1-карбоновую кислоту и 2-оксифеназин (*Pseudomonas aureofaciens*). Часто бактерии одного и того же штамма способны продуцировать несколько видов феназиновых пигментов. Например, *Pseudomonas aeruginosa* синтезирует пиоцианин, феназин-1-карбоновую кислоту, феназин-1-карбоксамид и 1-оксифеназин. В то же время, для *Pseudomonas chlororaphis* характерно производство феназин-1-карбоксамид, хлорорафина и феназин-1-карбоновой кислоты [Феклистова, Максимова, 2005; Serafim et al., 2023].

Наиболее распространенными типами модификации природных феназинов являются гидроксиметилирование и гидроксиметилирование: например, 1-гидроксифеназин, 2-гидроксифеназин, 1,2-дигидроксифеназин, 1,6-дигидроксифеназин, 1-карбоксил-6-формил-4,7,9-тригидроксифеназин.

Данные феназины в основном обнаруживаются в *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp., *Sphingomonas wittichii*, *Lysobacter antibioticus* и *Xenorhabdus szentirmaii* [Deng et al., 2021]. Два O-метилированных феназиновых соединения, 1,6-диметоксифеназин и 1-гидрокси-6-метоксифеназин, были выделены из *Lysobacter antibioticus* [Zhao et al., 2016]. Кроме того, 1-метоксифеназин и метил-6-метоксифеназин-1-карбоновая кислота были обнаружены в *Streptomyces luteireticuli* [Jesmina et al., 2023]. Стрептофеназин А, содержащий гидроксильные, карбоксильные и метоксильные группы, также был обнаружен в культуральной среде штамма стрептомицетов [Chen et al., 2019; Huang et al., 2024].

N-оксидная группа, которая повышает растворимость и мембранную проницаемость многих молекул, также часто встречается в феназинах [Viktorsson et al., 2017; Huigens et al., 2022]. Это в том числе иодинин (Рис. 1 Г, 1,6-дигидроксифеназин-5,10-диоксид), который был обнаружен в *Streptosporangium* sp. и *Lysobacter antibioticus*, который является N 5, N 10-диоксидом 1,6-дигидроксифеназина [Muhren et al., 2013; Sletta et al., 2014]. Существуют также другие N-оксиды феназина, вырабатываемые *Lysobacter antibioticus*, в том числе 1,6-дигидроксифеназин-N 5-оксид, 1,6-диметоксифеназин-N 5-оксид, 1-гидрокси-6-метоксифеназин-N 5-оксид и 1,6-диметоксифеназин-N 5, N 10-диоксид [Zhao et al., 2016]. Изумифеназин D (Рис. 1Д), обнаруженный в *Streptomyces* sp., является единственным природным феназином, содержащим хинолиновую группу совместно с N-оксидом [Abdelfattah et al., 2011]. Недавно два новых феназина, содержащие N-оксидные группы, были искусственно биосинтезированы в *Pseudomonas chlororaphis*: 1-гидроксифеназина-N 10-оксид и 1-метоксифеназина-N

10-оксид [Guo et al., 2020; Wan et al., 2022; Huang et al., 2024].

Существует два N-метилированных природных феназина, в том числе исторически знаменитый пиоцианин (Рис. 1Е) и его биосинтетический предшественник 5-метилфеназин-1-карбоновая кислота, выделенные из *Pseudomonas aeruginosa* [Gonçalves, Vasconcelos, 2021].

Карбоксамидная группа также характерна для природных феназинов, в частности феназин-1-карбоксамид обнаруживается в *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Nigrospora oryzae* и *Pantoea agglomerans* [Gorantla et al., 2014, George et al., 2015; Zhou et al., 2016], 6-гидроксифеназин-1-карбоксамид, метил-6-карбамилфеназин-1-карбоксилат, хромофеназин С и хромофеназин F являются четырьмя новыми производными феназина с карбоксамидными группами, синтезируемыми *Streptomyces* spp. [Zendah et al., 2012; Hu et al., 2019].

Феназины, содержащие терпеноидные группы, представляют собой большой класс природных соединений, обнаруживаемых в *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces* spp. и *Kitasatospora* sp., в том числе это такие вещества, как JBIR-46, JBIR-47, JBIR-48, эндофеназин А, эндофеназин В и эндофеназин Е

[Izumikawa et al., 2010; Khan et al., 2010; Saleh et al., 2012; Dutta et al., 2014; Wu et al., 2015; Huang et al., 2024].

Гликозилирование является распространенной модификацией природных феназинов, в том числе тех, которые были описаны выше [Jansen et al., 2014; Wu et al., 2015a; Wu et al., 2015b; Pratiwi et al., 2020]. Галогенированные феназины встречаются в природе достаточно редко. Ранее сообщалось о 2-бром-1-гидроксифеназине, обнаруженном в *Streptomyces* sp. [Conda-Sheridan et al., 2010]. Шесть бромированных феназинов, мариноцианов А-F, были получены из *Streptomyces* sp. [Asolkar et al., 2017]. До сих пор нет информации о природных феназинах, содержащих фтор или йод, однако встречаются содержащие серу, в том числе в виде N-ацетилцистеинового фрагмента [Wagner et al., 2014; Abdelfattah et al., 2011].

В последние годы в микроорганизмах все больше обнаруживаются соединения со сложной структурой, где феназиновое ядро является лишь малой частью молекулы, в том числе сафенамицины, эсмеральдины, изумифеназины, барафеназины, феназинолины, дермакозины и многие другие [Huang et al., 2024].

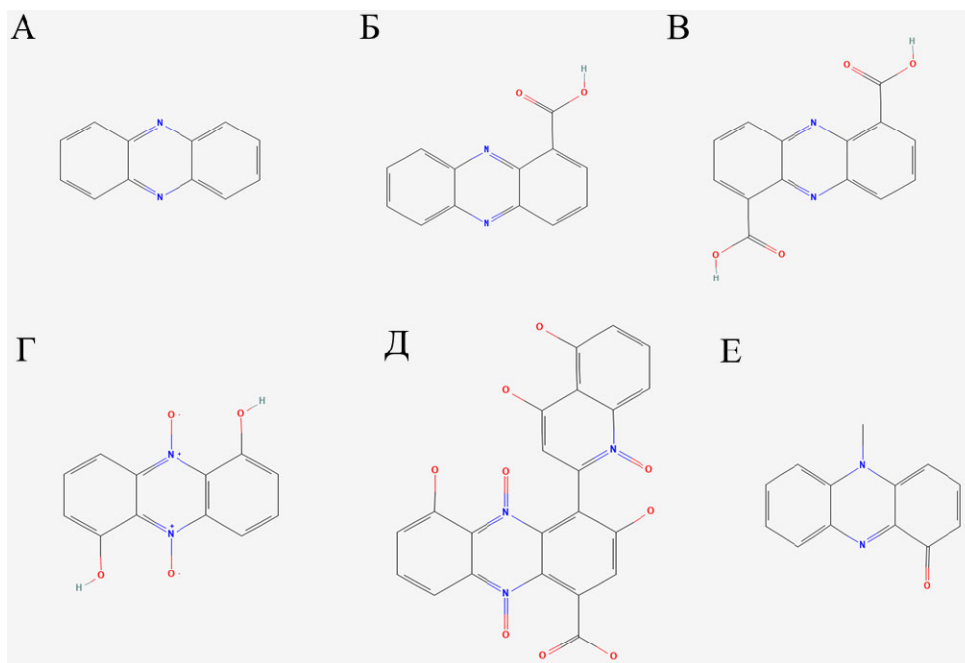


Рисунок 1. Химические формулы построены на основе платформы PubChem: А. Дибензопиразин, 9,10-диазаантрацен (ядро феназинов); Б. Феназин-1-карбоновая кислота (РСА); В. Феназин-1, 6-дикарбоновая кислота (PDC); Г. Иодинин, 1,6-дигидроксифеназин-5,10-диоксид; Д. Изумифеназин D; Е. Пиоцианин.

Figure 1. Chemical formulas are based on the PubChem platform: А. Dibenzo-pyrazine, 9,10-diazaanthracene (the core of phenazines); В. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA); В. Phenazine-1,6-dicarboxylic acid (PDC); Г. Iodinine, 1,6-dihydroxyphenazine-5,10-dioxide; Д. Biphenazine D; Е. Pyocyanin.

**Биосинтез феназинов и его генетическая основа**

Детальная расшифровка биосинтетического пути производства феназинов стала возможна, когда были секвенированы гены, кодирующие белки, участвующие в этом процессе у бактерий штаммов *Pseudomonas aureofaciens* и *Pseudomonas fluorescens*. Это позволило обнаружить оперон с семью генами, *phzABCDEFG*, ответственный за образование основных феназиновых соединений в рамках функционирования шикиматного метаболического пути — феназин-1-карбоновой кислоты и феназин-1,6-дикарбоновой кислоты [McDonald et al., 2001; Culbertson, Toney, 2013; Huang et al., 2024]. Последующие модификации данных молекул дают все разнообразие известных на сегодняшний день феназиновых соединений [Serafim et al., 2023].

Обычно в микроорганизмах феназиновый оперон присутствует в двух копиях, каждая из которых активна. Функциональные исследования показали, что эта генетическая избыточность обеспечивает устойчивость микроорганизмов к стрессовым воздействиям, обеспечивая устойчивый выход метаболитов при изменениях условий окружающей среды. Важно отметить, опероны отличаются регулированием: один из них контролируется сигналами «чувства кворума», в то время как второй активируется в условиях стресса [Higgins et al., 2018; Wan et al., 2021; Huang et al., 2024a]. Более поздние эксперименты продемонстрировали присутствие феназиновых оперонов как у многих бактерий рода *Pseudomonas*, так и в штаммах *Brevibacterium* sp., *Erwinia* sp., *Burkholderia* sp., *Streptomyces* sp. и др. [Левданская и др., 2021]. Предполагается, что горизонтальный перенос генов сыграл ключевую роль в распространении генов биосинтеза феназинов среди разнообразных родов бактерий, благодаря двойственности свойств самих феназинов: как факторов вирулентности патогенных бактерий, так и метаболитов, обеспечивающих биоконтроль и конкурентное преимущество [Serafim et al., 2023].

Шесть основных генов (*phzA*, *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* и *phzG*) необходимы для синтеза общего ядра для всех феназинов — дибензопиразина. Гены, ответственные за модификацию основной структуры феназинов (например, *phzO* у *Pseudomonas chlororaphis*), обычно расположены вне оперона, но образуют с ним общий регулон [Mavrodi et al., 2006; Mavrodi et al., 2010; Pierson III et al., 2010; Mavrodi et al., 2013; Левданская и др., 2019; Liaudanskaya et al., 2025]. Феназиновый оперон также включает дополнительные гены, участвующие в регуляции на транскрипционном уровне — *phzI* и *phzR*.

Промежуточный продукт шикиматного метаболического пути - хоризмовая кислота - является предшественником природных феназинов [Huang et al., 2024b]. Хоризмовая кислота превращается в 2-амино-4-дезоксихоризмовую кислоту с помощью гена *phzE*. Он кодирует аналог антранилатсинтазы, который ингибирует лиазную активность белка TrpE, отщепляющую пируват от 2-амино-4-дезоксихоризмовой кислоты во время синтеза триптофана. 2-Амино-4-дезоксихоризмовая кислота далее превращается в 2,3-дигидро-3-гидроксиантралиловую кислоту ферментом, кодируемым геном *phzD*. Этот белок структурно похож на  $\alpha/\beta$ -гидролазы. Данный фермент катализирует реакцию гидролиза 2-амино-2-дезоксиизохоризмовой кислоты, который в результате превращается в пируват и транс-2,3-дигидро-3-гидроксиантралиловую кислоту [Serafim et al., 2023]. Последующие этапы метаболического пути представляют собой окисление полученного соединения до кетона с помощью продукта гена *phzF* [Blankenfeldt et al., 2004; Wang et al., 2022]. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что 2,3-дигидро-3-гидроксиантралиловая кислота подвергается ряду транс-превращений в енол, который затем таутомеризуется в кетон. Известно, что кетон превращается в феназин-1-карбоновую кислоту через промежуточные стадии. Димерная структура белка PhzF подразумевает возможность взаимодействия двух молекул кетона в активном центре фермента. Достаточно низкое количество феназин-1-карбоновой кислоты в клетках указывает на то, что промежуточные соединения (кетон и двойное основание Шиффа), ведущие к конечному продукту, нестабильны [Serafim et al., 2023]. Они могут подвергаться различным реакциям дегградации, включая неферментативное окисление или гидролиз. Вероятно, остальные гены *phz*-оперона (*phzA*, *phzB* и *phzG*) служат для предотвращения распада этих промежуточных соединений [Parsons et al., 2004; Ahuja et al., 2008; Guo et al., 2017]. Гены *phzA* и *phzB* образовались в результате дупликации (сходство последовательностей составляет около 80%) и появления мутаций в области, кодирующей активный сайт фермента. Была зарегистрирована обратная зависимость между уровнями экспрессии генов *phzA* и *phzB*: если экспрессия одного из этих генов увеличивается, то экспрессия второго уменьшается [Левданская и др. (Liaudanskaya et al.) 2021]. Ранее, было высказано предположение, что общее количество образующейся феназин-1-карбоновой кислоты зависит от гена *phzA*, продукт которого участвует в синтезе веществ с кислотно-основной каталитической активностью. Флаavin-моноклеотид-зависимая

оксидаза, кодируемая геном *phzG*, имеет достаточно большой субстратный сайт, позволяющий присоединяться к трициклическим феназиноподобным молекулам. Эта способность предполагает участие данного фермента в окислении после димеризации кетона с образованием 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновой кислоты, которая спонтанно окисляется до феназин-1-карбоновой кислоты [McDonald et al., 2001; Parsons et al., 2004; Ahuja et al., 2008; Pierson III et al., 2010; Guo et al., 2017; Guo et al., 2020; Serafim et al., 2023]

Ферменты PhzA и PhzG, возможно, сыграли роль в расхождении синтетического пути феназин-1-карбоновой кислоты от феназин-1,6-дикарбоновой кислоты. Между тем, было обнаружено, что вторая молекула может образовываться спонтанно без участия PhzG, что повышает вероятность того, что феназин-1,6-дикарбоновой кислоте присущ неферментативный путь синтеза. Некоторые исследователи предполагают, что заключительными этапами биосинтеза феназин-1,6-дикарбоновой кислоты является последовательное окисление гексагидрофеназин-1,6-дикарбоновой кислоты с помощью PhzG, тогда как для феназин-1-карбоновой кислоты требуется также реакция декарбоксилирования [Xu et al., 2013]. Однако механизм превращения гексагидрофеназин-1,6-дикарбоновой кислоты в ключевые молекулы, от которых происходят все остальные феназины, до сих пор до конца не изучен. Тем не менее, показано, что высокая экспрессия *phzG* повышает уровень биосинтеза феназин-1-карбоновой кислоты [Guo et al., 2020; Huang et al., 2024b].

Ген *phzC* кодирует 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат синтазу II типа (ДАГФ-синтаза II типа), которая является ключевым ферментом шикиматного пути и обеспечивает взаимодействие фосфоенолпирувата и D-эритрозо-4-фосфата с образованием 3-дезоксид-арабино-гепт-2-улозонат-7-фосфата и неорганического фосфата [McDonald et al., 2001; Wang et al., 2022]. Известно, что в бактериях ДАГФ-синтазы II типа кодируются генами *aroF*, *aroG* и *aroH*. В *Pseudomonas chlororaphis* именно *phzC* играет критическую роль в производстве феназин-1-карбоксамидов [Pierson III et al., 2010; Mavrodi et al., 2013; Wang et al., 2022]. Инактивация *phzC* приводит к снижению производства феназин-1-карбоксамидов более чем на 90%, в то время как отсутствие активности генов *aroF*, *aroG* и *aroH* снижало выход данного продукта менее чем на 15%, при этом уровень синтеза был восстановлен после внесения дополнительной копии гена *phzC*. Стоит отметить, что уровень экспрессии гена *phzC* не ингибируется продуктом из-за отсутствия петлевой

области, необходимой для связывания, в отличие от генов *aroF*, *aroG* и *aroH* [Wang et al., 2022].

Производство специфичных для штамма феназинов осуществляется ферментами, кодируемыми такими генами, как *phzH*, *phzM*, *phzO* и *phzS* [Delaney et al., 2001; Mavrodi et al., 2001]. Считается, что модификации вносятся не в молекулу феназин-1-карбоновой кислоты, а в 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновую кислоту из-за ее более высокой реакционной способности [Guo et al., 2020]. Фермент PhzM является феназин-специфичной метилтрансферазой и катализирует образование 5-метилфеназина-1-карбоновой кислоты, которая затем преобразуется в пиоцианин ферментом PhzS, флавиносодержащей монооксигеназой [Delaney et al., 2001; Jin et al., 2015]. Так как эти два фермента критичны для получения пиоцианина, гены, которые их кодируют, присутствуют в *Pseudomonas aeruginosa* [Jin et al., 2015]. PhzH, аспарагинсинтаза, представляет собой фермент, участвующий в преобразовании 5,10-дигидрофеназин-1-карбоновой кислоты в феназин-1-карбоксамид [Xu et al., 2013; Chen et al., 2015; Jin et al., 2015; Huang et al., 2020]. Этот фермент находится в штаммах *Pseudomonas chlororaphis* и *Pseudomonas aeruginosa* [Chin-A-Woeng et al., 2001; Peng et al., 2015]. Производство 2-гидроксифеназин-1-карбоновой кислоты опосредовано ферментом PhzO, феназин-гидроксилазой, продукт реакции впоследствии может подвергаться спонтанному декарбоксилированию с образованием 2-гидроксифеназина в штаммах *Pseudomonas chlororaphis* [Delaney et al., 2001; Huang et al., 2010; Xu et al., 2013; Chen et al., 2014].

Сообщается, что в *Pseudomonas* spp. встречаются в основном производные феназин-1-карбоновой кислоты, в то время как феназин-1,6-дикарбоновая кислота больше характерна для *Streptomyces* spp. [Patil et al., 2017; Dasgupta et al., 2015]. Исключением является ряд штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, которые могут производить феназин-1,6-дикарбоновую кислоту при выращивании на сырой нефти в качестве единственного источника углерода [Dasgupta et al., 2015; Serafim et al., 2023].

У бактерий рода *Pseudomonas* экспрессия генов синтеза феназинов контролируется двухкомпонентной системой, а именно механизмом «чувства кворума» и системой малых некодирующих РНК (sRNAs) [Pierson III, 1998; Naas, Défago et al., 2005; Bourret, Silversmith, 2010; De Maeyer et al., 2011].

Важнейшим из факторов, влияющих на продукцию феназинов, является плотность клеточной популяции, регулируемая сигналами «чувства кворума». Самыми известными такими молекулярными сигналами у бактерий являются ацилгомосеринлактоны, которые также важны для экспрессии феназинов. Анализ количества

соединений, связанных с «чувством кворума», показал, что они появляются при достижении минимальной концентрации клеток. Таким образом, эти молекулы позволяют бактериям определять размер своей популяции и задерживать или стимулировать экспрессию определенных генов до достижения необходимой плотности клеток [Pierson III, 1998; De Maeyer et al., 2011; Bauer et al., 2016]. Было показано, что система «чувства кворума» PhzI/PhzR играет важную роль в производстве феназинов у большинства псевдомонад [Morohoshi et al., 2022].

Помимо сигналов «чувства кворума» сильное воздействие на синтез феназинов оказывают компоненты питательной среды, например, кислород, ионы железа и углеводы. Однако на данный момент неизвестно, обусловлено ли это влиянием функционированием системы «чувства кворума», либо является независимыми от нее. Вместе с тем, установлена ключевая роль двухкомпонентной GacA/GacS системы в регуляции синтеза феназинов. Белок GacS представляет собой киназу, расположенную в клеточной мембране, тогда как GacA является регулятором транскрипции. Под воздействием сигнальных молекул происходит фосфорилирование GacA, который в свою очередь регулирует синтез феназинов [Haas, Défago et al., 2005; Chen et al., 2007; Bourret, Silversmith, 2010]. GacA способствует экспрессии малых некодирующих РНК (например, RsmZ). Эти РНК связываются с трансляционными репрессорами, предотвращая снижение экспрессии основных биосинтетических генов *phz* у бактерий, например у *Pseudomonas chlororaphis* [Heeb, Haas, 2001; Wang et al., 2012]. RpeA/RpeB - еще одна двухкомпонентная регуляторная система, обнаруженная в *Pseudomonas chlororaphis*, в которой RpeA отрицательно регулирует экспрессию *phzR*, а RpeB - положительно [Wang et al., 2012].

#### Участие феназинов во внеклеточном переносе электронов и формировании биопленок

Известно, что феназины могут функционировать как молекулы, участвующие в переносе электронов, что может способствовать выживанию бактерий в сложных условиях, или, наоборот — приводить к нарушениям клеточных процессов.

С одной стороны, феназины облегчают перенос электронов от восстановителей, таких как НАД(Ф)Н, к окислителям, таким как трехвалентное железо и кислород [Wang, Newman, 2008; Glasser et al., 2014]. Этот процесс способствует выработке аденозинтрифосфата (АТФ) благодаря протон-движущей силе, позволяя клеткам выживать в условиях низких концентраций кислорода [Wang and

Newman, 2008; Dietrich et al., 2013; Ciemniecki, Newman, 2020]. Терминальные оксидазы CcoI и Cco2 у *Pseudomonas aeruginosa* — это ключевые компоненты дыхательной цепи, участвующие в восстановлении феназинов [Jo et al., 2017; Ren et al., 2025]

С другой стороны, феназины, благодаря окислительно-восстановительному потенциалу, могут способствовать лизису клеток [Kang et al. 2022]. Так, 1-гидроксифеназин многократно перемещает электроны между внутриклеточными донорами (например, НАДН-зависимыми дегидрогеназами, компонентами дыхательной цепи) и терминальными акцепторами (часто O<sub>2</sub>), переключаясь между окисленными и восстановленными состояниями. Этот цикл непрерывно генерирует активные формы кислорода, в том числе супероксид-, гидроксид-радикалы и перекись водорода. Эти молекулы повреждают липидные бислои, ухудшают компоненты цепи переноса электронов, окисляют богатые цистеином и металлами белки и вносят изменения в ДНК. В биопленках активные формы кислорода ослабляют архитектуру экзополисахаридного матрикса и нарушают «чувство кворума». Экологически, 1-гидроксифеназин, например у *Pseudomonas chlororaphis*, действует «как оружие», подавляя конкурирующие микроорганизмы в ограниченных ресурсами средах, таких как почва, ризосфера и ткани растений [Wan et al. 2021; Camilios-Neto et al. 2024; Abuelhaded et al., 2025].

Недавние исследования показали, что феназины могут влиять на формирование биопленок несколькими способами. Например, пиоцианин, вырабатываемый *Pseudomonas aeruginosa*, способствует высвобождению внеклеточной ДНК путем увеличения генерации перекиси водорода в планктонных клетках [Allesen-Holm et al., 2006; Das, Manefield, 2012]. В дальнейшем феназин может связываться с данной ДНК, усиливая перенос электронов и увеличивая вязкость биопленки. Это взаимодействие имеет решающее значение для развития биопленки у *Pseudomonas aeruginosa* [Das et al., 2013; Das et al., 2015]. Показано, что феназины повышают устойчивость биопленок к антибиотикам, таким как ципрофлоксацин [Schiessl et al., 2019]. Ранее сообщалось, что 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота также способствует высвобождению внеклеточной ДНК в штаммах *Pseudomonas chlororaphis*, участвуя в поддержании массы и структуры матрицы биопленки, в том числе на корнях растений, а усиление синтеза данного феназина способствует адгезии клеток и изменяет трехмерную структуру биопленок по сравнению с диким типом [Wang et al., 2016; Zboralski et al., 2022]. Феназины и активные формы кислорода напрямую влияют на

морфогенез биопленки через регуляторный белок RmcA, который модулирует компоненты матрикса, ответственные за образование складок [Dietrich et al., 2008; Okegbe et al., 2017]. Колонии, продуцирующие феназины, как правило, растут гладко, тогда как штаммы с дефицитом феназинов демонстрируют более шероховатые, сильно морщинистые биопленки, которые максимизируют контакт с кислородом [Kempes et al., 2014]. Образование складок служит адаптивным механизмом для оптимизации доступности кислорода и поддержания метаболического гомеостаза [Ren et al., 2025].

### Биотехнология производства феназинов

С начала XX века проводились попытки химического синтеза феназинов. Так, феназин-1-карбоновая кислота может быть синтезирована с использованием 1-метил-2,3-циклогександиона и о-фенилендиамин в качестве субстратов путем циклизации и окисления. Однако необходимость дорогостоящих реагентов, низкая эффективность очистки, жесткие условия реакции и образование токсичных побочных продуктов, которые вредны для здоровья человека и окружающей среды, практически свели на нет попытки химического синтеза феназинов [Aktar et al., 2009; China Raju et al., 2014]. В качестве альтернативы был предложен биосинтез феназинов с помощью микробной ферментации, который легко масштабируется, отличается экологичностью, и, при необходимости, возможна дальнейшая химическая модификация полученных продуктов [Huang et al., 2024b].

Стоит отметить, что уровень продукции феназинов в диких штаммах бактерий является достаточно низким для применения в промышленном производстве. Традиционно для получения штаммов с повышенной продуктивностью использовали мутагенез, тем не менее, этот метод имел ряд недостатков, в том числе высокую трудоемкость и накопление нежелательных мутаций. В настоящее время для производства феназинов применяются эффективные методы биотехнологии и геной инженерии, в том числе оптимизация состава питательных сред, pH и температуры для усиления активности ферментов, удаление генов, отвечающих за конкурирующие метаболические пути, модификация регуляторных сетей, улучшение устойчивости продуцента к конечному продукту и перенос генных кластеров в эффективные производственные штаммы [Guttenberger et al., 2018].

Существует целый ряд работ по использованию периодического культивирования с контролем температуры и значения pH для производства феназин-1-карбоновой кислоты бактериями рода *Pseudomonas* spp. [Chen et al., 2014; Li et al., 2010].

Также, сообщалось, что производство пиоцианина является чувствительным к составу питательной среды, изменениям pH, температуры и аэрации. Так, в штамме *Pseudomonas aeruginosa* DN9 удалось значительно увеличить синтез данного феназина при использовании культуральной среды, содержащей маннитол, пептон, NaCl и FeSO<sub>4</sub> [Gahlout et al., 2021]. Аналогично, производство пиоцианина достигало высоких значений у *Pseudomonas aeruginosa* R1 и *Pseudomonas aeruginosa* U3 на питательной среде с добавлением глюкозы [El-Fouly et al., 2015]. В штамме *Pseudomonas aeruginosa* LV производство феназин-1-карбоновой кислоты увеличилось в 38 раз в результате оптимизации состава питательной среды, включающей глюкозу, соевый белок, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, этанол и другие компоненты [Bedoya et al., 2019]. Была разработана экономически оптимальная минимальная среда для эффективного синтеза феназинов с использованием глицерина в качестве единственного источника углерода. Используя данную среду удалось достичь в 1,3 раза большего выхода феназинов в *Pseudomonas chlororaphis*, чем при использовании сложной среды [Li et al., 2023]. Кроме того, сообщалось об использовании дитиотреитола для стимулирования производства феназин-1-карбоновой кислоты в *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN [Yue et al., 2020]. Сравнительный метаболомный и транскриптомный анализы показали, что дитиотреитол влиял на экспрессию генов, связанных с биосинтезом феназина, и приводил к изменению количества метаболитов, участвующих в обмене углерода, шикиматном пути и других [Li et al., 2022].

В качестве биотехнологической платформы для производства феназинов чаще всего используются штаммы *Pseudomonas chlororaphis*, так как эти бактерии не патогенны, в отличие от *Pseudomonas aeruginosa*, и могут производить феназин-1-карбоновую кислоту в достаточно высоких количествах [Dietrich et al. 2006]. Сообщается об отключении гена *phzO* и добавлении *phzS*, чтобы сместить синтез феназинов в *Pseudomonas chlororaphis* в сторону получения 1-гидроксифеназина. Увеличение числа копий гена *gacA* также позволило значительно повысить титры данного соединения [Wan et al. 2021; Abuelhaded et al., 2025]. Сверхэкспрессия генов *glpF* и *glpK* позволила эффективнее утилизировать глицерин, при этом производство феназин-1-карбоновой кислоты в *Pseudomonas chlororaphis* GP72 достигало 1493,3 мг/л [Song et al., 2020]. Было показано, что в рекомбинантных штаммах *Pseudomonas aurantiaca* с дополнительными копиями генов *phzI* и *phzR*, увеличивается уровень синтеза N-гексаноил-гомосерин лактона, что приводит к значительному увеличению производства феназинов. Дополнительное

повышение выхода феназинов было достигнуто путем добавления в питательную среду антиоксидантов, преимущественно растительного происхождения [Веремеенко, Максимова, 2010].

Для усиления синтеза феназинов также используется подход, в котором отключают гены, негативно регулирующие производство феназинов. Известно несколько таких негативных регуляторов, в том числе продукты генов *psrA* и *rpeA* у бактерий *Pseudomonas aureofaciens*, а также продукт гена *mvaT*, подавляющий синтез пиоцианина у *Pseudomonas aeruginosa* [Веремеенко и др., 2009]. Двойная инактивация генов-супрессоров биосинтеза феназин-1-карбоксиамида (*psrA/rpeA*) повысила производство этого соединения в 4,24 раза по сравнению с диким штаммом *Pseudomonas chlororaphis* [Peng et al., 2018]. Кроме того, нокаут регуляторных генов - *lon*, *parS* и *prxA* - в *Pseudomonas chlororaphis* HT66 позволил повысить производство феназин-1-карбоксиамида на глицерине [Yao et al., 2018]. В *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN производство 2-гидроксифеназина было увеличено до 170 мг/л путем инактивации гена *rpeA* [Huang et al., 2011]. Недавно был создан новый изолированный штамм *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* LX24, способный производить 677,1 мг/л 2-гидроксифеназина путем выключения генов *rpeA* и *rsmE* и оптимизации условий ферментации, что является самым высоким показателем, зарегистрированным на сегодняшний день [Liu et al., 2021].

В последние годы активно начались исследования в области белковой инженерии для усиления активности ферментов, в том числе PhzS [Jablonska et al., 2023]. Так, сообщалось об изменении аминокислотной последовательности PhzS, которое улучшило эффективность гидроксирования феназин-1-карбоновой кислоты на 70% по сравнению с ферментом дикого типа *in vivo* [Wan et al., 2021; Liu et al., 2023]. Использование сильных промоторов также является многообещающей стратегией для повышения производства феназинов. Например, в штамме *Pseudomonas* PA1201 был идентифицирован сильный промотор PrhII, регулируемый температурой и «чувством кворума», который в перспективе можно использовать для увеличения производства феназин-1-карбоксиамида [Jin et al., 2020].

#### Феназины как биопестициды

Феназины представляют собой ценную альтернативу традиционным пестицидам благодаря своему расширенному спектру действия. Они эффективны против фитопатогенных грибов и ряда фитопатогенных бактерий, включая *Acidovorax avenae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* и

*Xanthomonas campestris* [Turner, Messenger, 1986]. Наиболее перспективными в качестве биопестицидов феназинами являются феназин-1-карбоновая кислота, феназин-1-карбоксамид, 1-гидроксифеназин, 2-гидроксифеназин, 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота, 1-метоксифеназин и 1-метоксифеназин-N 10-оксид [Park et al., 2012; Gorantla et al., 2014; Tupe et al., 2015; Wang et al., 2021].

Ранее сообщалось об активности псевдомонад, синтезирующих феназин-1-карбоновую кислоту, против различных фитопатогенных грибов, в том числе *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani* [Gorantla et al., 2014, Park, 2014; Harman, 2024]. *Pseudomonas piscium* и *Pseudomonas aeruginosa*, продуцирующие феназин, обладали активностью против таких грибов, как *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Exserohilum turcicum* [George et al., 2015; Chen et al., 2018; Liu et al., 2020]. Было показано, что штаммы *Pseudomonas chlororaphis* и *Pseudomonas fluorescens*, производящие 1-гидроксифеназин и его производные, подавляют рост *Fusarium* spp. и *Rhizoctonia solani*, тем самым защищая такие культуры, как пшеница и ячмень, от фитопатогенов. Биосинтез феназина способствовал не только прямой фунгицидной и бактерицидной активности, но и устойчивости состава ризосферы, способствуя колонизации корней полезными псевдомонадами [Zboralski et al., 2022; Huang et al., 2024a]. Сообщалось об ингибирующем воздействии 2-гидроксифеназина, продуцируемого *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10, на гриб *Rhizoctonia solani* [Park, 2014]. Была показана противогрибковая активность феназин-1-карбоксамид, выделенного из флуоресцентных штаммов псевдомонад [Karmegham et al., 2020]. Штамм *Pseudomonas chlororaphis* HT66 был трансформирован для повышенного производства феназина-1-карбоксамид, что привело к усилению его противогрибковой активности [Peng et al., 2018 год]. Предыдущие исследования показали, что бактерии *Pseudomonas aurantiaca* B-162 обладают способностью подавлять рост различных патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания растений. К ним относятся возбудители корневых и стеблевых гнилей злаковых культур, хлорозов, плодовой гнили, а также такие заболевания гороха, как бледный и темный аскохитоз. Среди поражаемых патогенов были идентифицированы представители родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, а также *Erwinia herbicola*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* и *Pseudomonas syringae* [Феклистова, Максимова, 2005]. *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) 30–84 может применяться при

поражениях пшеницы, возбудителем *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [Wang et al., 2016].

Несмотря на широкий ряд феназинов с противогрибковой активностью, феназин-1-карбоновая кислота является единственным коммерциализированным фунгицидом с торговым названием Shenqinmucin, отмеченным за его высокую эффективность, низкую токсичность для людей и животных, а также повышение урожайности сельскохозяйственных культур [Kim, 2012; Martini et al., 2015; Xiong et al., 2017]. В настоящее время в Китае он широко используется в качестве ключевого фунгицида для профилактики фитофтороза риса, перца, ложной мучнистой росы, пятнистости листьев, фузариозного поражения колоса и других болезней растений [Guo et al., 2022]. Shenqinmucin показывает активность против широкого спектра фитопатогенов, таких как *Phytophthora capsica*, *Gibberella zeae*, *Verticillium dahlia*, *Phaeoacremonium minimum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Neofusicoccum parvum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phyricularia grisea*, *Streptomyces scabies*, and *Rhizoctonia solani* [Liu et al., 2007; Shah et al., 2014; Pagmadulam et al., 2020; Padaria et al., 2016; Patel et al., 2020; Cimmino et al., 2021; Hane et al., 2021; Radhakrishnan et al., 2023; Huang et al., 2024a].

Несмотря на то, что феназины достаточно редко представлены на рынке в составе пестицидов, биопрепараты на основе псевдомонад, вырабатывающих феназины, встречаются часто [Huang et al., 2024b]. Так, *Pseudomonas chlororaphis* и *Pseudomonas fluorescens* были коммерциализированы компаниями из Европы (Cedomon BioAgri AB) и США (AtEze, Turf Science Laboratories) [Castaldi et al., 2021; Raio, Puorolo, 2021]. Эти биопрепараты были активны против таких грибов, как *F. oxysporum*, *Aspergillus niger* и *Botrytis cinerea* [Castaldi et al., 2021; Serafim et al., 2023].

В заключение необходимо подчеркнуть, что наиболее эффективным подходом к защите растений является комплексная система, объединяющая различные методы. Для обеспечения здоровья человека и охраны окружающей среды необходимо рациональное и обоснованное применение химических пестицидов, и дополнительное использование биопрепаратов на основе бактерий, вырабатывающих феназины, является перспективным направлением в современных агротехнологиях.

#### Фармакологические свойства феназинов

За последние годы проводились многочисленные исследования природных и синтетических феназинов, свидетельствующие об их значительном терапевтическом потенциале в контексте профилактики и лечения заболеваний

человека. Эти соединения характеризуются широким спектром биологической активности, включая антибактериальную, цитотоксическую, противогрибковую, противовирусную и противопаразитарную, опосредованную различными молекулярными механизмами, что делает феназины перспективными кандидатами для дальнейшей разработки лекарственных препаратов.

Эффективность феназинов против грибов чаще рассматривается, когда речь идет о защите растений. Однако, существуют исследования о потенциале применения феназинов против дерматофита *Trichophyton rubrum*, который вызывает микозы стоп и ногтей у человека [Gorantla et al., 2014; Yan et al., 2021]. Феназины также были протестированы против грибов из рода *Candida*, в частности, было показано, что 5-метилфеназин-1-карбоновая кислота (5МРСА), продуцируемая *Pseudomonas aeruginosa*, ингибирует рост *Candida albicans* [Morales et al., 2010]. Наблюдался синергетический эффект от совместного применения феназинов, выделенных из *Pseudomonas aeruginosa*, и азолов против нескольких видов *Candida* spp. [Gorantla et al., 2014; Serafim et al., 2023].

Феназины демонстрируют выраженную противобактериальную активность за счёт индуцирования окислительного стресса и разрушения биоплёнок, что делает их перспективными кандидатами для терапии бактериальных инфекций при условии минимизации токсичности, например, с помощью химической модификации [Saosoong et al., 2009; Huigens et al., 2019].

В частности, феназиномицин, выделенный из *Streptomyces* sp. WK-2057, проявлял антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* [Huang et al., 2024a]. Д-аланилглизеололотеиновая кислота, продуцируемая *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087, обладала широким спектром антимикробной активности, в том числе против клинических изолятов *Streptococcus pneumoniae* [Giddens, Bean, 2007]. Галогенированные феназины, например 2-бром-1-гидроксифеназин и другие, способны эффективно разрушать бактериальные биопленки [Yang et al., 2021]. Сложное производное феназина, полученное еще в середине XX века - клофазимин - используется для лечения проказы и туберкулеза. Это лекарство включено в список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения [Gopal et al., 2013; Serafini et al., 2020]. Экспериментально было подтверждено, что клофазимин подавляет репликацию коронавирусов, в том числе SARS-CoV-2 [Yuan et al., 2021].

Ряд феназинов помимо антимикробной активности проявляют выраженный цитостатический эффект против различных линий опухолевых клеток

[Huang et al., 2024a]. Так, производное арилфеназина NC-190 показало противоопухолевую эффективность против лейкемии человека, сравнимую с эпопозидом [Samata et al., 2002]. Феназиномицин и лавандоцианин, выделенные из *Streptomyces* sp., обладали сильной цитотоксичностью против устойчивых к андромидину лейкозных клеток и других опухолей грызунов [Zhyzneyskaya et al., 2023]. Феназиномицин проявлял также цитотоксическую активность против HeLa S3 [Omura et al., 1989]. Иодинин продемонстрировал потенциал для воздействия на злокачественные клетки в костном мозге пациентов [Viktorsson et al., 2017]. Феназин-1-карбоновая кислота и феназин-1,6-дикарбоновая кислота проявляли цитотоксичность в отношении различных клеточных линий рака, включая карциному шейки матки, молочной железы, простаты и толстого кишечника. Феназин-1-карбоновая кислота и другие феназины также ингибировали рост клеток меланомы. Пиоцианин показал значительную цитотоксичность в отношении клеток глиомы [Zhyzneyskaya et al., 2023].

Механизмы действия феназинов, проявляющих противоопухолевую активность, чаще всего обусловлены образованием активных форм кислорода. Данный эффект наиболее выражен в отношении метаболически активных и интенсивно пролиферирующих клеточных популяций, что является характерной чертой большинства опухолевых клеток. Кроме того, идентифицированы производные феназина, способные ингибировать активность топоизомераз I и II, которых достаточно много в активно пролиферирующих клетках [Serafim et al., 2023; Zhyzneyskaya et al., 2023]. Такое негативное воздействие на топоизомеразы не было описано ни для одного из встречающихся в природе феназинов, но интенсивно изучалось на синтетических аналогах, например, на производных арилфеназина XR11576, XR5944, NC-182 и NC-190 [Samata et al., 2002; Vicker et al., 2002; de Jonge et al., 2004; Verborg et al., 2007; Liu et al., 2020]. XR11576 является ингибитором топоизомеразы I и II, а XR5944 является новым цитотоксическим агентом, который интеркалирует в ДНК и ингибирует транскрипцию [de Jonge et al., 2004; Verborg et al., 2007]. Эти два соединения проходят I фазы клинических испытаний. NC-182 представляет собой новое противоопухолевое соединение, также интеркалирующее в ДНК и со сходной с даунорубицином способностью связывания, однако способ этого взаимодействия с ДНК зависит от концентрации препарата, где интеркалирующие и электростатические связи преобладают при низких и высоких концентрациях препарата, соответственно [Tarui et al., 1994]. Было показано, что NC-190 вызывает опосредованное топоизомеразой II

расщепление и дальнейшую фрагментацию ДНК [Samata et al., 2002; Huang et al., 2024a].

Совокупность представленных данных свидетельствует о высокой перспективности исследований феназиновых соединений бактериального происхождения в качестве потенциальных веществ для разработки инновационных противоопухолевых препаратов.

#### Методы экстракции и анализа феназинов

Открытие новых производных феназина осложняется отсутствием универсальных методов экстракции и очистки. Разнообразные функциональные группы, которые связаны с дибензопиразиновым ядром, вызывают различия в химико-физических свойствах феназинов. Все это делает процедуру очистки сложной и дорогой.

Стандартным методом выделения феназинов является экстракция с помощью органических растворителей, таких как этилацетат, хлороформ, дихлорметан, толуол, диэтиловый эфир и других при предварительном подкислении культуральной жидкости [Serafim et al., 2023]. Однако этот метод имеет ряд существенных ограничений. Одним из них является необходимость оптимизации протокола для каждого феназина. Зачастую требуется целая комбинация органических и неорганических растворителей, которые все равно не гарантируют полную экстракцию всех феназинов из-за различий в их химических структурах и физических свойствах. Использование органических растворителей также приводит к извлечению феназиновых антибиотиков вместе с липидами и другими липофильными агентами, что еще больше осложняет последующую очистку [Shapira et al., 2021]. После этапа экстракции некоторые исследователи включают предварительный этап колоночной хроматографии на силикагеле для дополнительной очистки. Затем органическую фазу, в которой растворены феназины, выпаривают, а остаток растворяют в ацетонитриле или метаноле [Rane et al., 2007].

Дальнейшее разделение феназиновых соединений осуществляется в основном методами тонкослойной хроматографии и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии [Chen et al., 2007; Bilal, et al., 2018; Meel, Saharan, 2026]. Однако сообщается и о других методах, таких как капиллярный электрофорез, электрофорез в свободном потоке и использование микропористых адсорбционных смол [Thacharodi et al., 2021]. В последние годы большое внимание уделяется разработке экспресс-методов идентификации феназинов с учетом их свойств, а именно флуоресценции, окислительно-восстановительных свойств и коэффициента молярной экстинкции

[Serafim et al., 2023]. После экстракции, разделения и очистки структурная характеристика и идентификация феназинов проводятся обычно с использованием масс-спектрологии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса и ИК-Фурье спектроскопии [Rane et al., 2007; Jasim et al., 2013; Gorantla et al., 2014; Patil et al., 2026].

### Заключение

Феназины составляют большую группу азотсодержащих гетероциклических соединений, которые синтезируются только бактериями, в первую очередь представителями родов *Pseudomonas* и *Streptomyces*. Эти метаболиты отличаются своими химическими и физическими свойствами в зависимости от типа и положения функциональных групп, присутствующих на трехкольцевой структуре. Природные феназины проявляют широкий спектр биоактивностей том числе противогрибковые и противоопухолевые свойства. Однако, несмотря на это, существует только один коммерциализированный препарат феназина, который используется в качестве биофунгицида. Такое ограничение связано с низкими концентрациями феназинов, синтезируемых большинством бактериальных штаммов. Следовательно, необходимы дополнительные исследования для увеличения производства феназинов, в том числе создание высокоэффективных штаммов-продуцентов. Биосинтез природных феназинов изучается достаточно давно, и расшифровка биосинтетических путей открыла путь для биоинженерии производных феназинов, в том числе интегрировав генную, метаболическую инженерию и омиксные технологии. Помимо природных феназинов активно разрабатывается синтез новых производных молекул с уникальными свойствами, тем самым расширяя терапевтический диапазон этих соединений. Несомненно, будущие исследования должны быть сосредоточены на расширении процесса производства феназинов с учетом всех проблем, с которыми может столкнуться масштабирование процесса, в том числе необходима оптимизация методов экстракции и очистки без ущерба для окружающей среды.

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

Поступила в редакцию: 27.03.2026 г.

Доработана после рецензирования: 22.05.2026 г.

Принята к публикации: 25.05.2026 г.

### Литература

1. Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П. Повышение продукции феназиновых антибиотиков у бактерий

*Pseudomonas aurantiaca* путем клонирования *phzIR* генов и внесения в ростовую среду антиоксидантных добавок. Published online 2010. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/16291>

2. Веремеенко Е.Г., Федорович М.Н., Феклистова И.Н. и др. Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca* - продуцентов антибиотиков феназинового ряда. Published online 2009. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/5491>

3. Левданская А.И., Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П. Анализ генома бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162. Сборник научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты»/ Белорусская наука-Минск. 2019. 11. 102. [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_41498933\\_41763894.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_41498933_41763894.pdf)

4. Левданская А.И., Светлова А.С., Максимова Н.П. и др. Экспрессия феназинового оперона у штаммов *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* В-162, способных к сверхсинтезу феназиновых соединений. Молекулярная и прикладная генетика. 2021. 31. 93-101. doi: 10.47612/1999-9127-2021-31-93-101

5. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162. Published online 2005. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/109812>

6. Abdelfattah MS, Toume K, Ishibashi M. Isolation and structure elucidation of izuminosides A-C: A rare phenazine glycosides from *Streptomyces* sp. IFM 11260. *J Antibiot.* 2011. 64. 271-275. doi: 10.1038/ja.2010.172

7. Abdelfattah MS, Toume K, Ishibashi M. Izumiphenazine D, a new phenazoquinoline N-oxide from *Streptomyces* sp. IFM 11204. *Chem Pharm Bull.* 2011. 59. 508-510. doi: 10.1248/cpb.59.508

8. Abuelhaded K, Mohamed HH, Faraag AH. *Pseudomonas* spp. and antimicrobial resistance: unlocking new horizons with 1-hydroxyphenazine. *Folia Microbiol.* 2025. 70. 1173-1199. doi:10.1007/s12223-025-01355-4

9. Ahuja EG, Janning P, Mentel M et al. PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *J Am Chem Soc.* 2008. 130. 17053-17061. doi: 10.1021/ja806325k

10. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol.* 2009. 2. 1-12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7

11. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006. 59. 1114-1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x

12. Arseneault T, Goyer C, Filion M. Phenazine production by *Pseudomonas* sp. LBUM223 contributes to the biocontrol of potato common scab. *Phytopathology*. 2013. 1. 1-24.
13. Asolkar RN, Singh A, Jensen PR et al. Marinocyanins, cytotoxic bromo-phenazinone meroterpenoids from a marine bacterium from the Streptomycete clade MAR4. *Tetrahedron*. 2017. 73. 2234-2241. doi: 10.1016/j.tet.2017.03.003
14. Aversch NJH., Krömer JO. Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds-Present and Future Strain Construction Strategies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018. 6(32). doi: 10.3389/fbioe.2018.00032
15. Bauer JS, Hauck N, Christof L et al. The systematic investigation of the Quorum Sensing system of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* PB-ST2 unveils ari to be a biosynthetic origin for 3-oxo-homoserine lactones. *PLoS ONE*. 2016. 11:e0167002. doi: 10.1371/journal.pone.0167002
16. Bedoya JC, Dealis ML, Silva CS et al. Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatal Agr Biotechnol*. 2019. 17. 545-556. doi: 10.1016/j.bcab.2018.12.024
17. Bilal M, Yue SJ, Hu HB et al. Adsorption/desorption characteristics, separation and purification of phenazine-1-carboxylic acid from fermentation extract by macroporous adsorbing resins. *J Cheml Technol Biotechnol*. 2018. 93. 3176-3184.
18. Blankenfeldt W, Kuzin AP, Skarina T. et al. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101. 16431-16436. doi: 10.1073/pnas.0407371101
19. Blankenfeldt W, Parsons JF. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 2014. 29. 26-33. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.013
20. Bourret RB, Silversmith RE. Two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol*. 2010. 13. 113-115. doi: 10.1016/j.mib.2010.02.003
21. Camilios-Neto D, RRd N, Ratko J et al. *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterial platform for biopharmaceutical production. *Future Pharmacol*. 2024. 4. 892-918. doi: 10.3390/futurepharmacol4040047
22. Castaldi S, Masi M, Sautua F. et al. *Pseudomonas fluorescens* showing antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, a severe pathogenic fungus of soybean, produces phenazine as the main active metabolite. *Biomolecules*. 2021. 11. 1728. doi: 10.3390/biom11111728
23. Chen K, Hu H, Wang W et al. Metabolic degradation of phenazine-1-carboxylic acid by the strain *Sphingomonas* sp. DP58: The identification of two metabolites. *Biodegradation*. 2007. 19. 659-667. doi: 10.1007/s10532-007-9171-1
24. Chen M, Cao H, Peng H et al. Reaction kinetics for the biocatalytic conversion of phenazine-1-carboxylic acid to 2-hydroxyphenazine. *PLoS ONE*. 2014. 9. e98537. doi: 10.1371/journal.pone.0098537
25. Chen X, Hu LF, Huang XS et al. Isolation and characterization of new phenazine metabolites with antifungal activity against root-rot pathogens of panax notoginseng from *Streptomyces*. *J Agric Food Chem*. 2019. 67. 11403-11407. doi: 10.1021/acs.jafc.9b04191
26. Chen Y, Norrman A, Ponomarenko SA et al. Coherence lattices in surface plasmon Polariton Fields. *Opt Lett*. 2018. 43(3429). doi: [10.1364/OL.43.003429](https://doi.org/10.1364/OL.43.003429)
27. Chen Y., Shen X., Peng H. et al. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting Rhizobacterium. *Genom Data*. 2015. 4. 33-42. doi: 10.1016/j.gdata.2015.01.006
28. Chin A, Woeng TF, Thomas-Oates JE et al. Introduction of the phzH gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol Plant Microbe Interact*. 2001. 14. 1006-1015. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.8.1006
29. China Raju B, Veera Prasad K, Saidachary G et al. A novel approach for C-C, C-N, and C-O bond formation reactions: a facile synthesis of benzophenazine, quinoxaline, and phenoxazine derivatives via ring opening of benzoxepines. *Org Lett*. 2014. 16. 420-423. doi: 10.1021/ol4033122
30. Chincholkar S, Patil S, Sarode P et al. Fermentative Production of Bacterial Phenazines. In: Chincholkar S, Thomashow L, eds. *Microbial Phenazines*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. 89-100. doi: 10.1007/978-3-642-40573-0\_5
31. Ciemniecki JA, Newman DK. The Potential for Redox-Active Metabolites To Enhance or Unlock Anaerobic Survival Metabolisms in Aerobes. *J Bacteriol*. 2020. 202(11). e00797-19. doi: 10.1128/JB.00797-19
32. Cimmino A, Bahmani Z, Castaldi S et al. Phenazine-1-carboxylic Acid (PCA), produced for the first time as an antifungal metabolite by *Truncatella angustata*, a causal agent of grapevine trunk diseases (GTDs) in Iran. *J Agric Food Chem*. 2021. 69. 12143-12147. doi: 10.1021/acs.jafc.1c03877
33. Cimmino A, Evidente A, Mathieu V et al. Phenazines and cancer. *Natural product reports*. 2012. 29(4). 487-501.
34. Conda-Sheridan M., Marler L., Park E-J et al. Potential chemopreventive agents based on the structure of the lead compound 2-bromo-1-hydroxyphenazine, isolated from *Streptomyces* species, strain CNS284. *J Med Chem*. 2010. 53. 8688-8699. doi: 10.1021/jm1011066

35. Culbertson JE, Toney MD. Expression and characterization of PhzE from *P. aeruginosa* PAO1: aminodeoxyisochorismate synthase involved in pyocyanin and phenazine-1-carboxylate production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013. 1834(1). 240-246. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.010
36. Das T, Kutty SK, Kumar N et al. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One*. 2013. 8. 58299. doi: 10.1371/journal.pone.0058299
37. Das T, Kutty SK, Tavallaie R et al. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports*. 2015. 5. 8398. doi: 10.1038/srep08398
38. Das T, Manefield M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2012. 7. 46718. doi: 10.1371/journal.pone.0046718
39. Dasgupta D, Kumar A, Mukhopadhyay B et al. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. *App Microbiol Biotechnol*. 2015. 99. 8653-8665. doi: 10.1007/s00253-015-6707-x
40. Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, et al. PhzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J Bacteriol*. 2001. 183. 318-327. doi: 10.1128/JB.183.1.318-327.2001
41. Deng RX, Zhang Z, Li HL et al. Identification of a novel bioactive phenazine derivative and regulation of phoP on its production in *Streptomyces lomondensis* S015. *J Agric Food Chem*. 2021. 69. 974-981. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06498
42. Dietrich LEP, Okegbe C, Price-Whelan A et al. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. *J. Bacteriol*. 2013. 195. 1371-1380. doi:10.1128/JB.02273-12.
43. Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2006. 61. 1308-1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x
44. Dietrich LEP, Teal TK, Price-Whelan A et al. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science*. 2008. 321(5893). 1203-1206. doi: 10.1126/science.1160619
45. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiol*. 2020. 166. 30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860
46. Dutta S, Morang P, Nishanth Kumar S et al. Fusarial wilt control and growth promotion of pigeon pea through bioactive metabolites produced by two plant growth promoting rhizobacteria. *World J Microb Biotechnol*. 2014. 30. 1111-1121. doi: 10.1007/s11274-013-1532-9
47. El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM et al. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sc*. 2015. 8. 36-48. doi: 10.1016/j.jrras.2014.10.007
48. Gahlout M, Chauhan PB, Prajapati H et al. Characterization, application and statistical optimization approach for enhanced production of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa* DN9. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2021. 1. 459-470.
49. George E, Kumar SN, Jacob J. et al. Characterization of the bioactive metabolites from a plant growth-promoting rhizobacteria and their exploitation as antimicrobial and plant growth-promoting agents. *App Biochem Biotechnol*. 2015. 176. 529-546. doi: 10.1007/s12010-015-1593-3
50. Giddens SR, Bean DC. Investigations into the in vitro antimicrobial activity and mode of action of the phenazine antibiotic D-alanylgriseoluteic acid. *Int J Antimicrob Agents*. 2007. 29. 93-97. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.08.028
51. Glasser NR, Kern SE, Newman DK. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. *Mol. Microbiol*. 2014. 92. 399-412. doi: 10.1111/mmi.12566
52. Gonçalves T, Vasconcelos U. Colour me blue: The history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules*. 2021. 26(927). doi: 10.3390/molecules26040927
53. Gopal M, Padayatchi N, Metcalfe JZ et al. Systematic review of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis [Review article]. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013. 17. 1001-1007. doi: 10.5588/ijtld.12.0144
54. Gorantla JN, Nishanth Kumar S, Nisha GV et al. Purification and characterization of antifungal phenazines from a fluorescent *Pseudomonas* strain FPO4 against medically important fungi. *J Mycol Med*. 2014. 24. 185-192. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.02.003
55. Guo S, Hu H, Wang W et al. Production of antibacterial questiomycin A in metabolically engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *J Agric Food Chem*. 2022. 70. 7742-7750. doi: 10.1021/acs.jafc.2c03216
56. Guo S, Liu R, Wang W et al. Designing an artificial pathway for the biosynthesis of a novel phenazine N-oxide in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synth Biol*. 2020. 9. 883-892. doi: 10.1021/acssynbio.9b00515
57. Guo S, Wang Y, Bilal M et al. Microbial synthesis of antibacterial phenazine-1,6-dicarboxylic acid and the role of PhzG in *Pseudomonas chlororaphis*

- GP72AN. *J Agric Food Chem.* 2020. 68. 2373-2380. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07657
58. Guo S, Wang Y, Dai B. et al. PhzA, the shunt switch of phenazine-1,6-dicarboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *App Microb Biotechnol.* 2017. 101. 7165-7175. doi: 10.1007/s00253-017-8474-3
59. Guttenberger N, Blankenfeldt W, Breinbauer R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorg Med Chem.* 2017. 25. 6149-6166. doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.002
60. Guttenberger N, Schlatter T, Leypold M, Tassoti S, Breinbauer R. Synthesis of novel ligands targeting phenazine biosynthesis proteins as a strategy for antibiotic intervention. *Monatsh Chem.* 2018. 149. 847-856. doi: 10.1007/s00706-017-2100-z
61. Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 2005. 3. 307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129
62. Hane M, Wijaya HC, Nyon YA et al. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) produced by *Paraburkholderia phenazinium* CK-PC1 aids postgermination growth of *Xyris complanata* seedlings with germination induced by *Penicillium rolfisii* Y-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2021. 85. 77-84. doi: [10.1093/bbb/zbaa060](https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa060)
63. Harman GE. Integrated benefits to agriculture with trichoderma and other endophytic or root-associated microbes. *Microorganisms.* 2024. 12(1409). doi: 10.3390/microorganisms12071409
64. Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001. 14. 1351-1363. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1351
65. Hernandez ME, Kappler A, Newman DK. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70(2). 921-928. doi: 10.1128/AEM.70.2.921-928.2004
66. Higgins S, Heeb S, Rampioni G et al. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018. 8. 252. doi: 10.3389/fcimb.2018.00252
67. Hu L, Chen X, Han L et al. Two new phenazine metabolites with antimicrobial activities from soil-derived *Streptomyces* species. *J Antibiot.* 2019. 72. 574-577. doi: 10.1038/s41429-019-0163-2
68. Huang L, Chen MM, Wang W. et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72. *App Microbiol Biotechnol.* 2010. 89. 169-177. doi: 10.1007/s00253-010-2863-1
69. Huang L, Huang Y, Lou Y. et al. Pyocyanin-modifying genes *phzM* and *phzS* regulated the extracellular electron transfer in microbiologically-influenced corrosion of X80 carbon steel by *Pseudomonas aeruginosa*. *Corros Sci.* 2020. 164. 108355. doi: 10.1016/j.corsci.2019.108355
70. Huang W, Wan Y, Su H et al. Recent advances in phenazine natural products: biosynthesis and metabolic engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2024. 72(39). 21364-21379. doi: 10.1021/acs.jafc.4c05294
71. Huang W, Wan Y, Zhang S et al. Recent Advances in Phenazine Natural Products: Chemical Structures and Biological Activities. *Molecules.* 2024. 29(19). 4771. doi: 10.3390/molecules29194771
72. Huigens RW, Abouelhassan Y, Yang H. Phenazine antibiotic-inspired discovery of bacterial biofilm-eradicating agents. *Chem Bio Chem.* 2019. 20. 2885-2902. doi: 10.1002/cbic.201900116
73. Huigens RW, Brummel BR, Tenneti S et al. Pyrazine and Phenazine Heterocycles: Platforms for Total Synthesis and Drug Discovery. *Molecules.* 2022. 27. 1112. doi: 10.3390/molecules27031112
74. Izumikawa M, Khan ST, Takagi M et al. Sponge-derived *Streptomyces* producing isoprenoids via the mevalonate pathway. *J Nat Prod.* 2010. 73. 208-212. doi: 10.1021/np900747t
75. Jabłońska J, Augustyniak A, Dubrowska K et al. The two faces of pyocyanin-why and how to steer its production? *World J Microbiol Biotechnol.* 2023. 39(103). doi: 10.1007/s11274-023-03548-w
76. Jansen R, Sood S, Huch V et al. Pyrronazols, metabolites from the Myxobacteria *Nannocystis pusilla* and *N. exedens*, are unusual chlorinated pyrone-oxazole-pyrroles. *J Nat Prod.* 2014. 77. 320-326. doi: 10.1021/np400877r
77. Jasim B, Anisha C, Rohini S et al. Phenazine carboxylic acid production and rhizome protective effect of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from *Zingiber officinale*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013. 30. 1649-1654.
78. Jesmina ARS., Induja DK., Drissya T. et al. In vitro antibacterial effects of combination of ciprofloxacin with compounds isolated from *Streptomyces luteireticuli* NIIST-D75. *J Antibiot.* 2023. 76. 198-210. doi: 10.1038/s41429-023-00600-7
79. Jin K, Zhou L, Jiang H et al. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng.* 2015. 32. 30-38. doi: 10.1016/j.ymben.2015.09.003
80. Jin ZJ, Zhou L, Sun S et al. Identification of a strong quorum sensing- and thermo-regulated promoter for the biosynthesis of a new metabolite pesticide phenazine-1-carboxamide in *Pseudomonas* strain PA1201. *ACS Synth Biol.* 2020. 9. 1802-. doi: 10.1021/acssynbio.0c00161

81. Jo J, Cortez KL, Cornell WC et al. An orphan cbb3-type cytochrome oxidase subunit supports *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth and virulence. *Elife*. 2017. 6. e30205. doi: 10.7554/eLife.30205
82. Jonge MJA., Kaye S, Verweij J et al. Phase I and pharmacokinetic study of XR11576, an oral topoisomerase I and II inhibitor, administered on days 1–5 of a 3-weekly cycle in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2004. 91. 1459-1465. doi: 10.1038/sj.bjc.6602178
83. Kang J, Cho YH, Lee Y. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine promote anaerobic killing of *Pseudomonas aeruginosa* via single-electron transfer with ferrous iron. *Microbiol Spectr*. 2022. 10. e02312-02322. doi: 10.1128/spectrum.02312-22
84. Karmegham N, Vellasamy S, Natesan B et al. Characterization of antifungal metabolite phenazine from rice rhizosphere fluorescent pseudomonads (FPS) and their effect on sheath blight of rice. *Saudi J Biol Sci*. 2020. 27. 3313-3326. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.007
85. Kempes CP, Okegbe C, Mears-Clarke Z et al. Morphological optimization for access to dual oxidants in biofilms. *Proc Natl Acad Sci*. 2014. U.S.A. 111(1). 208-213. doi: 10.1073/pnas.1315521110
86. Khan ST, Izumikawa M, Motohashi K et al. Distribution of the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and isoprenoid production in marine-derived Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2010. 304. 89-96. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01886.x
87. Kim SD, Weller DM, Thomashow LS. Colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* 2112, among collections of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* spp. in pea rhizosphere. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2012. 22(6). 763-770.
88. Li S, Yue SJ, Huang P et al. Comparative metabolomics and transcriptomics analyses provide insights into the high-yield mechanism of phenazines biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* GP72. *J Appl Microbiol*. 2022. 133. 2790-2801. doi: 10.1111/jam.15727
89. Li Y, Jiang H, Du X et al. Enhancement of phenazine-1-carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of gacA inactivated *Pseudomonas* sp. *M18G Biosour Technol*. 2010. 101. 3649-3656. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.120
90. Li YX, Yue SJ, Zheng YF et al. Economical production of phenazine-1-carboxylic acid from glycerol by *Pseudomonas chlororaphis* using cost-effective minimal medium. *Biology*. 2023. 12. doi: 10.3390/biology12101292
91. Liaudanskaya AI, Shapira MA, Verameyenka KG et al. Comparative Phz proteins analysis of the mutant strains *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* with enhanced phenazine synthesis. *Molecular & Applied Genetics: Proceedings. Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus*; ed: A. V. Kilchevsky (editor-in-chief) [et al.]. Minsk, 2025. 38. 99–110.
92. Liu H, He Y, Jiang H et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Curr Microbiol*. 2007. 54. 302-306. doi: 10.1007/s00284-006-0444-4
93. Liu K, Li Z, Liang X et al. Biosynthesis and genetic engineering of phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas chlororaphis* Lzh-T5. *Front Microbiol*. 2023. 14. 1186052. doi: 10.3389/fmicb.2023.1186052
94. Liu TT, Ye FC., Pang CP. et al. Isolation and identification of bioactive substance 1-hydroxyphenazine from *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial activity. *Lett App Microbiol*. 2020. 71. 303-310. doi: 10.1111/lam.13332
95. Liu WH, Yue SJ, Feng TT et al. Characterization and engineering of *Pseudomonas chlororaphis* LX24 with high production of 2-hydroxyphenazine. *J Agric Food Chem*. 2021. 69. 4778-4784. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00434
96. Liu XW, Liu NY, Deng YQ et al. Anticancer activity, topoisomerase I inhibition, DNA ‘light switch’ behavior and molecular docking of two ruthenium complexes containing phenazine ring. *J Biomol Struct Dyn*. 2020. 39. 5953-5962. doi: 10.1080/07391102.2020.1796806
97. Maeyer K, Daes J, Hua GK et al. N-acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas isolates* from the red cocoyam rhizosphere. *Microbiology*. 2011. 157. 459-472. doi: 10.1099/mic.0.043125-0
98. Martini M, Moruzzi S, Ermacora P et al. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of Fluorescent Pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends Food Sci Technol*. 2015. 46. 277-285. doi: [10.1016/j.tifs.2015.10.017](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.017)
99. Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biosynthesis and regulation Annu Rev Phytopathol*. 2006. 44. 417-445. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710
100. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 2001. 183. 6454-6465. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001
101. Mavrodi DV, Parejko JA, Mavrodi OV et al. Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*. 2013. 15(3). 675-686. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02846.x

102. Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76(3). 866-879. doi: 10.1128/AEM.02009-09
103. McDonald M, Mavrodi DV, Thomashow LS, Floss HG. Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. *J Am Chem Soc.* 2001. 123(38). 9459-9460. doi: 10.1021/ja011243+
104. Meel S, Saharan BS. Characterization and analytical validation of phenazine producing rhizobacteria for sustainable control of soil borne pathogens in wheat using TLC and HPLC based approaches. *Discov Plants.* 2026. 3. 17. doi: 10.1007/s44372-026-00479-2
105. Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, Breinbauer R, Thomashow LS, Blankenfeldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem.* 2009. 10(14). 2295-2304.
106. Morales DK, Jacobs NJ, Rajamani S et al. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol.* 2010. 78. 1379-1392. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07414.x
107. Morohoshi T, Wang WZ, Suto T et al. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508. *Journal of bioscience and bioengineering.* 2013. 116(5). 580-584.
108. Morohoshi T, Yabe N, Yaguchi N et al. Regulation of phenazine-1-carboxamide production by quorum sensing in type strains of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* *J Biosci Bioeng.* 2022. 133. 541-546. doi: 10.1016/j.jbiosc.2022.03.004
109. Myhren LE, Nygaard G, Gausdal G et al. Iodinin (1,6-dihydroxyphenazine 5,10-dioxide) from *Streptosporangium* sp. induces apoptosis selectively in myeloid leukemia cell lines and patient cells. *Mar Drugs.* 2013. 11:332-349. doi: 10.3390/md11020332
110. Okegbe C, Fields BL, Beierschmitt C et al. Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. *Proc Natl Acad Sci.* 2017. U.S.A.114. 5236-5245. doi: 10.1073/pnas.1700264114
111. Omura S, Eda S, Funayama S et al. Studies on a novel antitumor antibiotic, phenazinomycin: Taxonomy, fermentation, isolation, and physicochemical and biological characteristics. *J Antibiot.* 1989. 42. 1037-1042. doi: 10.7164/antibiotics.42.1037
112. Padaria JC, Tarafdar A, Raipuria R et al. Identification of phenazine-1-carboxylic acid gene (phc CD) from *Bacillus pumilus* MTCC7615 and its role in antagonism against *Rhizoctonia solani*. *J Basic Microbiol.* 2016. 56. 999-1008. doi: 10.1002/jobm.201500574
113. Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T et al. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. *Parasitol Int.* 2020. 74. 101961. doi: 10.1016/j.parint.2019.101961
114. Park GK. Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. *J Microbiol Biotechnol.* 2014. 22. 326-330. doi: 10.4014/jmb.1106.06042
115. Parsons JF, Song F, Parsons L et al. Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Biochemistry.* 2004. 43. 12427-12435. doi: 10.1021/bi049059z
116. Patel NP, Raju M, Haldar S et al. Characterization of phenazine-1-carboxylic acid by *Klebsiella* sp. NP-C49 from the coral environment in Gulf of Kutch. *India Arch Microbiol.* 2020. 202. 351-359. doi: 10.1007/s00203-019-01742-9
117. Patil S, Nikam M, Patil H et al. Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Proc Biochem.* 2017. 58. 298-305. doi: 10.1016/j.procbio.2017.05.003
118. Pauliukaite R, Ghica ME, Barsan MM et al. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters.* 2010. 43(10-11). 1588-1608. doi: 10.1080/00032711003653791
119. Peng H, Ouyang Y, Bilal M. et al. Identification, synthesis and regulatory function of the N-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact.* 2018. 17. 1-11. doi: 10.1186/s12934-017-0854-y
120. Peng H, Zhang P, Bilal M et al. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact.* 2018. 17(1). 117. doi: 10.1186/s12934-018-0962-3
121. Pierson III LS. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behaviour of bacteria in the environment and Biotechnological Processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. 86. 1659-1670. doi: 10.1007/s00253-010-2509-3
122. Pierson III LS., Wood DW, Pierson EA. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 1998. 36. 207-225. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.207
123. Pratiwi RH, Hidayat I, Hanafi M et al. Isolation and structure elucidation of phenazine derivative from *Streptomyces* sp. strain UICC B-92 isolated from *Neesia altissima* (Malvaceae). *Iran J Microbiol.* 2020. 12. 127-137.
124. Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology.* 2006. 2(2). 71-78.

125. Radhakrishnan NA, Ravi A, Joseph BJ et al. Phenazine 1-carboxylic acid producing seed harbored endophytic bacteria from cultivated rice variety of Kerala and its broad range antagonism to diverse plant pathogens. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2023. 15. 516-523. doi: [10.1007/s12602-021-09844-x](https://doi.org/10.1007/s12602-021-09844-x)
126. Raio A, Puopolo G. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World J Microb Biot*. 2021. 37. 1-8.
127. Rane MR, Sarode PD, Chaudhari BL et al. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Sci Ind Res*. 2007. 66. 627-631.
128. Ren L, Yuan Y, Farea K et al. The adaptability of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in oxygen-limited environments. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025. 15. 1655335. doi: [10.3389/fcimb.2025.1655335](https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1655335)
129. Saleh O, Flinspach K, Westrich L et al. Mutational analysis of a phenazine biosynthetic gene cluster in *Streptomyces anulatus* 9663. *Beilstein J Org Chem*. 2012. 8. 501-513. doi: [10.3762/bjoc.8.57](https://doi.org/10.3762/bjoc.8.57)
130. Samata K, Yamagishi T, Ichihara T et al. Establishment and characterization of a mouse FM3A cell mutant resistant to topoisomerase II-inhibitor NC-190. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002. 50. 367-372. doi: [10.1007/s00280-002-0508-5](https://doi.org/10.1007/s00280-002-0508-5)
131. Saosong K, Wongphathanakul W, Poasiri C et al. Isolation and analysis of antibacterial substance produced from *P. aeruginosa* TISTR 781. *KKU Sci J*. 2009. 37. 163-172.
132. Sawhney SN, Boykin DW. Phenazines with two cationic side chains as potential antimalarials. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1979. 68(4). 524-526.
133. Schiessl KT, Hu F, Jo J et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Commun*. 2019. 10(1). 762. doi: [10.1038/s41467-019-08733-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08733-w)
134. Schmitz S, Rosenbaum MA. Controlling the production of *Pseudomonas phenazines* by modulating the genetic repertoire. *ACS Chem Biol*. 2020. 15. 3244-3252. doi: [10.1021/acscchembio.0c00805](https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00805)
135. Serafim B, Bernardino AR, Freitas F et al. Recent Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of *Pseudomonas* spp. *Phenazines Molecules*. 2023. 28(3). 1368. doi: [10.3390/molecules28031368](https://doi.org/10.3390/molecules28031368)
136. Serafini M, Cargnin S, Massarotti A et al. Essential Medicinal Chemistry of Essential Medicines. *J Med Chem*. 2020. 63. 10170-10187. doi: [10.1021/acs.jmedchem.0c00415](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00415)
137. Shah SG, Shier WT, Jamaluddin TN et al. *Penicillium verruculosum* SG: A source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines. *Arch Microb*. 2014. 196. 267-278. doi: [10.1007/s00203-013-0945-z](https://doi.org/10.1007/s00203-013-0945-z)
138. Shapira MA, Verameyenka KG, Liavonchyk KV et al. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium. *Process Biochemistry*. 2021. 111. 325-331.
139. Si T, Wang A, Yan H et al. Progress in the study of natural antimicrobial active substances in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2024. 29. 4400. doi: [10.3390/molecules29184400](https://doi.org/10.3390/molecules29184400)
140. Sletta H, Degnes KF, Herfindal L et al. Antimicrobial and cytotoxic 1,6-dihydroxyphenazine-5,10-dioxide (iodinin) produced by *Streptosporangium* sp. DSM 45942 isolated from the fjord sediment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. 98. 603-610. doi: [10.1007/s00253-013-5320-0](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5320-0)
141. Song C, Yue SJ, Liu WH et al. Engineering of glycerol utilization in *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for enhancing phenazine-1-carboxylic acid production. *World J Microb Biot*. 2020. 36. 1-8. doi: [10.1007/s11274-020-02824-3](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02824-3)
142. Stepien M, Gonka E, Żyła M et al. Heterocyclic nanographenes and other polycyclic heteroaromatic compounds: synthetic routes, properties, and applications. *Chem Rev*. 2017. 117. 3479-3716. doi: [10.1021/acs.chemrev.6b00076](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00076)
143. Tarui M, Doi M, Ishida T et al. DNA-binding characterization of a novel anti-tumour benzo[a]phenazine derivative NC-182: Spectroscopic and viscometric studies. *Biochem J*. 1994. 304. 271-279. doi: [10.1042/bj3040271](https://doi.org/10.1042/bj3040271)
144. Thacharodi A, Priyadarshini R, Karthikeyan G et al. Extraction, purification and characterization of phenazine from *Pseudomonas aeruginosa* isolate of wastewater sources: A panacea towards clinical pathogens. *App Nanosci*. *Appl Nanosci*. 2023. 13. 2365-2378. doi: [10.1007/s13204-021-01944-y](https://doi.org/10.1007/s13204-021-01944-y)
145. Thhammer KO, Newman DK. A phenazine-inspired framework for identifying biological functions of microbial redox-active metabolites. *Curr Opin Chem Biol*. 2023. 75. 102320. doi: [10.1016/j.cbpa.2023.102320](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102320)
146. Tupe SG, Kulkarni RR, Shirazi F et al. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2015. 118. 39-48. doi: [10.1111/jam.12675](https://doi.org/10.1111/jam.12675)
147. Turner JM, Messenger AJ. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in microbial physiology*. 1986. 27. 211-275.
148. Verborg W, Thomas H, Bissett D. et al. First-in-to-man phase I and pharmacokinetic study of XR5944.14, a novel agent with a unique mechanism of action. *Br J Cancer*. 2007. 97. 844-850. doi: [10.1038/sj.bjc.6603953](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603953)
149. Vicker N, Burgess L, Dodd R et al. Novel angular benzophenazines: dual Topoisomerase I and

- Topoisomerase II inhibitors as potential anticancer agents. *J Med Chem.* 2002. 45. 721-739. doi:[10.1021/jm010329a](https://doi.org/10.1021/jm010329a).
150. Viktorsson EÖ, Melling GB., Aesoy R et al. Total synthesis and antileukemic evaluations of the phenazine 5,10-dioxide natural products iodinin, myxin and their derivatives. *Bioorgani Med Chem.* 2017. 25. 2285-2293. doi: [10.1016/j.bmc.2017.02.058](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.058)
151. Wagner M, Abdel-Mageed WM, Ebel R et al. Dermacozines H-J isolated from a deep-sea strain of *Dermacoccus abyssi* from Mariana Trench sediments. *J Nat Prod.* 2014. 77. 416-420. doi: [10.1021/np400952d](https://doi.org/10.1021/np400952d)
152. Wan Y, Liu H, Xian M et al. Biosynthesis and metabolic engineering of 1-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* H18. *Microb Cell Fact.* 2021. 20. 235. doi: [10.1186/s12934-021-01731-y](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01731-y)
153. Wan Y, Liu H, Xian M et al. Biosynthetic Pathway Construction and Production Enhancement of 1-Hydroxyphenazine Derivatives in *Pseudomonas chlororaphis* H18. *J Agric Food Chem.* 2022. 70. 1223-1231. doi: [10.1021/acs.jafc.1c07760](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07760)
154. Wang D, Yu J, Dorosky R et al. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30–84. *PLoS One.* 2016. 11(1). e0148003. doi: [10.1371/journal.pone.0148003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148003)
155. Wang D, Yu JM, Pierson LS et al. Differential regulation of phenazine biosynthesis by RPEA and RpeB in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Microbiology.* 2012. 158. 1745-1757. doi: [10.1099/mic.0.059352-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.059352-0)
156. Wang S, Liu D, Bilal M et al. Uncovering the role of phzC as DAHP synthase in shikimate pathway of *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Biology.* 2022. 11(86). doi: [10.3390/biology11010086](https://doi.org/10.3390/biology11010086)
157. Wang S, Liu D, Bilal M et al. Uncovering the Role of PhzC as DAHP Synthase in Shikimate Pathway of *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Biology.* 2022. 11(1). doi: [10.3390/biology11010086](https://doi.org/10.3390/biology11010086)
158. Wang SY, Shi XC, Chen X et al. Biocontrol ability of phenazine-producing strains for the management of Fungal Plant Pathogens: A Review. *Biol Control.* 2021. 155. 104548. doi: [10.1016/j.biocontrol.2021.104548](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104548)
159. Wang Y, Newman DK. Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and Molecular Oxygen. *Environ Sci Technol.* 2008. 42(7). 2380-2386. doi: [10.1021/es702290a](https://doi.org/10.1021/es702290a)
160. Wrede F, Strack E Über das pyocyanin, Den blauen Farbstoff des *Bacillus pyocyaneus*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* 1924. 140. 1-15. doi: [10.1515/bchm2.1924.140.1-2.1](https://doi.org/10.1515/bchm2.1924.140.1-2.1)
161. Wu C, Medema MH, Läkamp RM et al. Leucanicidin and Endophenazines Result from Methyl-Rhamnosylation by the Same Tailoring Enzymes in *Kitasatospora* sp. MBT66. *ACS Chem Biol.* 2016. 11(2). 478-490. doi: [10.1021/acscchembio.5b00801](https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00801)
162. Wu C, Wezel GP., Hae CY Identification of novel endophenazine antibiotics produced by *Kitasatospora* sp. MBT66. *J Antibiot.* 68. 445-452. doi: [10.1038/ja.2015.14](https://doi.org/10.1038/ja.2015.14)
163. Xiong Z, Niu J, Liu H et al. Synthesis and bioactivities of phenazine-1-carboxylic acid derivatives based on the modification of PCA Carboxyl Group. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017. 27. 2010-2013. doi: [10.1016/j.bmcl.2017.03.011](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.011)
164. Xu N, Ahuja EK, Janning P, et al. Trapped intermediates in crystals of the FMN-dependent oxidase PhzG provide insight into the final steps of phenazine biosynthesis. *Acta Crystallog D Biol Crystallogr.* 2013. 69. 1403-1413. doi: [10.1107/S0907444913008354](https://doi.org/10.1107/S0907444913008354)
165. Yan J, Liu W, Cai J. et al. Advances in phenazines over the past decade: Review of their pharmacological activities, mechanisms of action, biosynthetic pathways and synthetic strategies. *Mar Drugs.* 2021. 19. 610. doi: [10.3390/md19110610](https://doi.org/10.3390/md19110610)
166. Yang H, Kundra S, Chojnacki M et al. A Modular Synthetic Route Involving N-Aryl-2-nitrosoaniline Intermediates Leads to a New Series of 3-Substituted Halogenated Phenazine Antibacterial Agents. *J Med Chem.* 2021. 64. 7275-7295. doi: [10.1021/acs.jmedchem.1c00168](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00168)
167. Yao R, Pan K, Peng H et al. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source. *Biotechnol Biofuels.* 2018. 11. 130. doi: [10.1186/s13068-018-1123-y](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1123-y)
168. Yuan S, Yin X, Meng X et al. Clofazimine broadly inhibits coronaviruses including SARS-CoV-2. *Nature.* 2021. 593(7859). 418-423. doi: [10.1038/s41586-021-03431-4](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03431-4)
169. Yue SJ, Huang P, Li S et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine from glycerol by a two-stage fermentation strategy in *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN. *J Agric Food Chem.* 2020. 68. 561-566. doi: [10.1021/acs.jafc.9b05033](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05033)
170. Zboralski A, Saadia H, Novinscak A et al. Interplay between *Arabidopsis thaliana* genotype, plant growth and rhizosphere colonization by phyto-beneficial phenazine-producing *Pseudomonas chlororaphis*. *Microorganisms.* 2022. 10. 660. doi: [10.3390/microorganisms10030660](https://doi.org/10.3390/microorganisms10030660)
171. Zendah I, Riaz N, Nasr H et al. Chromophenazines from the terrestrial *Streptomyces* sp. Ank 315. *J Nat Prod.* 2012. 75. 2-8. doi: [10.1021/np100818d](https://doi.org/10.1021/np100818d)
172. Zhao Y, Qian G, Ye Y et al. Heterocyclic aromatic N-oxidation in the biosynthesis of phenazine antibiotics from *Lysobacter antibioticus*. *Org Lett.* 2016. 18. 2495-2498. doi: [10.1021/acs.orglett.6b01089](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01089)
173. Zhyzneyskaya AA, Lukashovich AA, Maksimova NP et al. The cytotoxic activity of Phenazine compounds from *Pseudomonas chlororaphis* subsp. aurantiaca against

the HeLa cell line. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2023. 38(4). 215-221. doi: [10.3103/s0891416823040079](https://doi.org/10.3103/s0891416823040079)

174. Zhou L, Jiang HX, Sun S et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016. 32(50). doi: 10.1007/s11274-015-1987-y

### References

- Abdelfattah MS, Toume K, Ishibashi M. Isolation and structure elucidation of izuminosides A-C: A rare phenazine glycosides from *Streptomyces* sp. IFM 11260. *J Antibiot*. 2011. 64. 271-275. doi: [10.1038/ja.2010.172](https://doi.org/10.1038/ja.2010.172)
- Abdelfattah MS, Toume K, Ishibashi M. Izumiphenazine D, a new phenazoquinoline N-oxide from *Streptomyces* sp. IFM 11204. *Chem Pharm Bull*. 2011. 59. 508-510. doi: 10.1248/cpb.59.508
- Abuelhaded K, Mohamed HH, Faraag AHI. *Pseudomonas* spp. and antimicrobial resistance: unlocking new horizons with 1-hydroxyphenazine. *Folia Microbiol*. 2025. 70. 1173-1199. doi: 10.1007/s12223-025-01355-4
- Ahuja EG, Janning P, Mentel M et al. PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *J Am Chem Soc*. 2008. 130. 17053-17061. doi: 10.1021/ja806325k
- Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol*. 2009. 2. 1-12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006. 59. 1114-1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Arseneault T, Goyer C, Filion M. Phenazine production by *Pseudomonas* sp. LBUM223 contributes to the biocontrol of potato common scab. *Phytopathology*. 2013. 1. 1-24.
- Asolkar RN, Singh A, Jensen PR et al. Marinocyanins, cytotoxic bromo-phenazinone meroterpenoids from a marine bacterium from the Streptomycete clade MAR4. *Tetrahedron*. 2017. 73. 2234-2241. doi: 10.1016/j.tet.2017.03.003
- Aversch NJH., Krömer JO. Metabolic Engineering of the Shikimate Pathway for Production of Aromatics and Derived Compounds-Present and Future Strain Construction Strategies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018. 6(32). doi: 10.3389/fbioe.2018.00032
- Bauer JS, Hauck N, Christof L et al. The systematic investigation of the Quorum Sensing system of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* PB-ST2 unveils ari to be a biosynthetic origin for 3-oxo-homoserine lactones. *PLoS ONE*. 2016. 11. e0167002. doi: 10.1371/journal.pone.0167002
- Bedoya JC, Dealis ML, Silva CS et al. Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatal Agr Biotechnol*. 2019. 17. 545-556. doi: 10.1016/j.bcab.2018.12.024
- Bilal M, Yue SJ, Hu HB et al. Adsorption/desorption characteristics, separation and purification of phenazine-1-carboxylic acid from fermentation extract by macroporous adsorbing resins. *J Cheml Technol Biotechnol*. 2018. 93. 3176-3184.
- Blankenfeldt W, Kuzin AP, Skarina T. et al. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004. 101. 16431-16436. doi: 10.1073/pnas.0407371101
- Blankenfeldt W, Parsons JF. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 2014. 29. 26-33. doi: 10.1016/j.sbi.2014.08.013
- Bourret RB, Silversmith RE. Two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol*. 2010. 13. 113-115. doi: 10.1016/j.mib.2010.02.003
- Camiliós-Neto D, RRd N, Ratko J et al. *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterial platform for biopharmaceutical production. *Future Pharmacol*. 2024. 4. 892-918. doi:10.3390/futurepharmacol4040047.
- Castaldi S, Masi M, Sautua F. et al. *Pseudomonas fluorescens* showing antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, a severe pathogenic fungus of soybean, produces phenazine as the main active metabolite. *Biomolecules*. 2021. 11. 1728. doi: 10.3390/biom11111728
- Chen K, Hu H, Wang W et al. Metabolic degradation of phenazine-1-carboxylic acid by the strain *Sphingomonas* sp. DP58: The identification of two metabolites. *Biodegradation*. 2007. 19. 659-667. doi: 10.1007/s10532-007-9171-1
- Chen M, Cao H, Peng H et al. Reaction kinetics for the biocatalytic conversion of phenazine-1-carboxylic acid to 2-hydroxyphenazine. *PLoS ONE*. 2014. 9. e98537. doi: 10.1371/journal.pone.0098537
- Chen X, Hu LF, Huang XS et al. Isolation and characterization of new phenazine metabolites with antifungal activity against root-rot pathogens of panax notoginseng from *Streptomyces*. *J Agric Food Chem*. 2019. 67. 11403-11407. doi: 10.1021/acs.jafc.9b04191
- Chen Y, Norrman A, Ponomarenko SA et al. Coherence lattices in surface plasmon Polariton Fields. *Opt Lett*. 2018. 43(3429). doi: [10.1364/OL.43.003429](https://doi.org/10.1364/OL.43.003429)
- Chen Y., Shen X., Peng H. et al. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting Rhizobacterium. *Genom Data*. 2015. 4. 33-42. doi: 10.1016/j.gdata.2015.01.006
- Chin A, Woeng TF, Thomas-Oates JE et al. Introduction of the phzH gene of *Pseudomonas*

- chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001. 14. 1006-1015. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.8.1006
24. China Raju B, Veera Prasad K, Saidachary G et al. A novel approach for C-C, C-N, and C-O bond formation reactions: a facile synthesis of benzophenazine, quinoxaline, and phenoxazine derivatives via ring opening of benzoxepines. *Org Lett.* 2014. 16. 420-423. doi: 10.1021/ol4033122
25. Chincholkar S, Patil S, Sarode P et al. Fermentative Production of Bacterial Phenazines. In: Chincholkar S, Thomashow L, eds. *Microbial Phenazines*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. 89-100. doi: 10.1007/978-3-642-40573-0\_5
26. Ciemniecki JA, Newman DK. The Potential for Redox-Active Metabolites To Enhance or Unlock Anaerobic Survival Metabolisms in Aerobes. *J Bacteriol.* 2020. 202(11) e00797-19. doi: 10.1128/JB.00797-19
27. Cimmino A, Bahmani Z, Castaldi S et al. Phenazine-1-carboxylic Acid (PCA), produced for the first time as an antifungal metabolite by *Truncatella angustata*, a causal agent of grapevine trunk diseases (GTDs) in Iran. *J Agric Food Chem.* 2021. 69. 12143-12147. doi: 10.1021/acs.jafc.1c03877
28. Cimmino A, Evidente A, Mathieu V et al. Phenazines and cancer. *Natural product reports.* 2012. 29(4). 487-501.
29. Conda-Sheridan M., Marler L., Park E-J et al. Potential chemopreventive agents based on the structure of the lead compound 2-bromo-1-hydroxyphenazine, isolated from *Streptomyces* species, strain CNS284. *J Med Chem.* 2010. 53. 8688-8699. doi: 10.1021/jm1011066
30. Culbertson JE, Toney MD. Expression and characterization of PhzE from *P. aeruginosa* PAO1: aminodeoxyisochorismate synthase involved in pyocyanin and phenazine-1-carboxylate production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 2013. 1834(1). 240-246. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.010
31. Das T, Kutty SK, Kumar N et al. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One.* 2013. 8. 58299. doi: 10.1371/journal.pone.0058299
32. Das T, Kutty SK, Tavallaie R et al. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports.* 2015. 5. 8398. doi: 10.1038/srep08398
33. Das T, Manefield M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2012. 7. 46718. doi: 10.1371/journal.pone.0046718
34. Dasgupta D, Kumar A, Mukhopadhyay B et al. Isolation of phenazine 1,6-di-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain HRW.1-S3 and its role in biofilm-mediated crude oil degradation and cytotoxicity against bacterial and cancer cells. *App Microbiol Biotechnol.* 2015. 99. 8653-8665. doi: 10.1007/s00253-015-6707-x
35. Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, et al. PhzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *J Bacteriol.* 2001. 183. 318-327. doi: 10.1128/JB.183.1.318-327.2001
36. Deng RX, Zhang Z, Li HL et al. Identification of a novel bioactive phenazine derivative and regulation of phoP on its production in *Streptomyces lomondensis* S015. *J Agric Food Chem.* 2021. 69. 974-981. doi: 10.1021/acs.jafc.0c06498
37. Dietrich LEP, Okegbe C, Price-Whelan A et al. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. *J. Bacteriol.* 2013. 195. 1371-1380. doi: 10.1128/JB.02273-12
38. Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006. 61. 1308-1321. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x
39. Dietrich LEP, Teal TK, Price-Whelan A et al. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science.* 2008. 321(5893). 1203-1206. doi: 10.1126/science.1160619
40. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiol.* 2020. 166. 30-33. doi: 10.1099/mic.0.000860
41. Dutta S, Morang P, Nishanth Kumar S et al. Fusarial wilt control and growth promotion of pigeon pea through bioactive metabolites produced by two plant growth promoting rhizobacteria. *World J Microb Biotechnol.* 2014. 30. 1111-1121. doi: 10.1007/s11274-013-1532-9
42. El-Fouly MZ, Sharaf AM, Shahin AAM et al. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Radiat Res Appl Sc.* 2015. 8. 36-48. doi: 10.1016/j.jrras.2014.10.007
43. Feklistova IN, Maksimova NP. [Synthesis of phenazine compounds by *Pseudomonas aurantiaca* B-162]. *Published online.* 2005. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/109812>. (In Russian)
44. Gahlout M, Chauhan PB, Prajapati H et al. Characterization, application and statistical optimization approach for enhanced production of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa* DN9. *Systems Microbiology and Biomanufacturing.* 2021. 1. 459-470.
45. George E, Kumar SN, Jacob J. et al. Characterization of the bioactive metabolites from a plant growth-promoting rhizobacteria and their exploitation as antimicrobial and plant growth-promoting agents. *App*

- Biochem Biotechnol.* 2015. 176. 529-546. doi: 10.1007/s12010-015-1593-3
46. Giddens SR, Bean DC. Investigations into the in vitro antimicrobial activity and mode of action of the phenazine antibiotic D-alanylgriseoliteic acid. *Int J Antimicrob Agents.* 2007. 29. 93-97. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2006.08.028
47. Glasser NR, Kern SE, Newman DK. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. *Mol. Microbiol.* 2014. 92. 399-412. doi: 10.1111/mmi.12566
48. Gonçalves T, Vasconcelos U. Colour me blue: The history and the biotechnological potential of pyocyanin. *Molecules.* 2021. 26. 927. doi: 10.3390/molecules26040927
49. Gopal M, Padayatchi N, Metcalfe JZ et al. Systematic review of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis [Review article. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013. 17. 1001-1007. doi: 10.5588/ijtld.12.0144
50. Gorantla JN, Nishanth Kumar S, Nisha GV et al. Purification and characterization of antifungal phenazines from a fluorescent *Pseudomonas* strain FPO4 against medically important fungi. *J Mycol Med.* 2014. 24. 185-192. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.02.003
51. Guo S, Hu H, Wang W et al. Production of antibacterial questiomycin A in metabolically engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *J Agric Food Chem.* 2022. 70. 7742-7750. doi: 10.1021/acs.jafc.2c03216
52. Guo S, Liu R, Wang W et al. Designing an artificial pathway for the biosynthesis of a novel phenazine N-oxide in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *ACS Synth Biol.* 2020. 9. 883-892. doi: 10.1021/acssynbio.9b00515
53. Guo S, Wang Y, Bilal M et al. Microbial synthesis of antibacterial phenazine-1,6-dicarboxylic acid and the role of PhzG in *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN. *J Agric Food Chem.* 2020. 68. 2373-2380. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07657
54. Guo S, Wang Y, Dai B. et al. PhzA, the shunt switch of phenazine-1,6-dicarboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *App Microb Biotechnol.* 2017. 101. 7165-7175. doi: 10.1007/s00253-017-8474-3
55. Guttenberger N, Blankenfeldt W, Breinbauer R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorg Med Chem.* 2017. 25. 6149-6166. doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.002
56. Guttenberger N, Schlatter T, Leypold M, Tassoti S, Breinbauer R. Synthesis of novel ligands targeting phenazine biosynthesis proteins as a strategy for antibiotic intervention. *Monatsh Chem.* 2018. 149. 847-856. doi: 10.1007/s00706-017-2100-z
57. Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 2005. 3. 307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129
58. Hane M, Wijaya HC, Nyon YA et al. Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) produced by *Paraburkholderia phenazinium* CK-PC1 aids postgermination growth of *Xyris complanata* seedlings with germination induced by *Penicillium rolfsii* Y-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2021. 85. 77-84. doi: [10.1093/bbb/zbaa060](https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa060)
59. Harman GE. Integrated benefits to agriculture with trichoderma and other endophytic or root-associated microbes. *Microorganisms.* 2024. 12. 1409. doi: 10.3390/microorganisms12071409
60. Heeb S, Haas D. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001. 14. 1351-1363. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.12.1351
61. Hernandez ME, Kappler A, Newman DK. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70(2). 921-928. doi: 10.1128/AEM.70.2.921-928.2004
62. Higgins S, Heeb S, Rampioni G et al. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018. 8. 252. doi: 10.3389/fcimb.2018.00252
63. Hu L, Chen X, Han L et al. Two new phenazine metabolites with antimicrobial activities from soil-derived *Streptomyces* species. *J Antibiot.* 2019. 72. 574-577. doi: 10.1038/s41429-019-0163-2
64. Huang L, Chen MM, Wang W. et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* GP72. *App Microbiol Biotechnol.* 2010. 89. 169-177. doi: 10.1007/s00253-010-2863-1
65. Huang L, Huang Y, Lou Y. et al. Pyocyanin-modifying genes *phzM* and *phzS* regulated the extracellular electron transfer in microbiologically-influenced corrosion of X80 carbon steel by *Pseudomonas aeruginosa*. *Corros Sci.* 2020. 164. 108355. doi: 10.1016/j.corsci.2019.108355
66. Huang W, Wan Y, Su H et al. Recent advances in phenazine natural products: biosynthesis and metabolic engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2024. 72(39). 21364-21379. doi: 10.1021/acs.jafc.4c05294
67. Huang W, Wan Y, Zhang S et al. Recent Advances in Phenazine Natural Products: Chemical Structures and Biological Activities. *Molecules.* 2024. 29(19). 4771. doi: 10.3390/molecules29194771
68. Huigens RW, Abouelhassan Y, Yang H. Phenazine antibiotic-inspired discovery of bacterial biofilm-eradicating agents. *Chem Bio Chem.* 2019. 20. 2885-2902. doi: 10.1002/cbic.201900116

69. Huigens RW, Brummel BR, Tenneti S et al. Pyrazine and Phenazine Heterocycles: Platforms for Total Synthesis and Drug Discovery. *Molecules*. 2022. 27. 1112. doi: 10.3390/molecules27031112
70. Izumikawa M, Khan ST, Takagi M et al. Sponge-derived *Streptomyces* producing isoprenoids via the mevalonate pathway. *J Nat Prod*. 2010. 73. 208-212. doi: 10.1021/np900747t
71. Jabłońska J, Augustyniak A, Dubrowska K et al. The two faces of pyocyanin-why and how to steer its production? *World J Microbiol Biotechnol*. 2023. 39(103). doi: 10.1007/s11274-023-03548-w
72. Jansen R, Sood S, Huch V et al. Pyrroazols, metabolites from the Myxobacteria *Nannocystis pusilla* and *N. exedens*, are unusual chlorinated pyrone-oxazole-pyrroles. *J Nat Prod*. 2014. 77. 320-326. doi: 10.1021/np400877r
73. Jasim B, Anisha C, Rohini S et al. Phenazine carboxylic acid production and rhizome protective effect of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from *Zingiber officinale*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013. 30. 1649-1654.
74. Jesmina ARS., Induja DK., Drissya T. et al. In vitro antibacterial effects of combination of ciprofloxacin with compounds isolated from *Streptomyces luteireticuli* NIIST-D75. *J Antibiot*. 2023. 76. 198-210. doi: 10.1038/s41429-023-00600-7
75. Jin K, Zhou L, Jiang H et al. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production. *Metab Eng*. 2015. 32. 30-38. doi: 10.1016/j.ymben.2015.09.003
76. Jin ZJ, Zhou L, Sun S et al. Identification of a strong quorum sensing- and thermo-regulated promoter for the biosynthesis of a new metabolite pesticide phenazine-1-carboxamide in *Pseudomonas strain* PA1201. *ACS Synth Biol*. 2020. 9. 1802-. doi: 10.1021/acssynbio.0c00161
77. Jo J, Cortez KL, Cornell WC et al. An orphan cbb3-type cytochrome oxidase subunit supports *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth and virulence. *Elife*. 2017. 6. e30205. doi: 10.7554/eLife.30205
78. Jonge MJA., Kaye S, Verweij J et al. Phase I and pharmacokinetic study of XR11576, an oral topoisomerase I and II inhibitor, administered on days 1–5 of a 3-weekly cycle in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2004. 91. 1459-1465. doi: 10.1038/sj.bjc.6602178
79. Kang J, Cho YH, Lee Y. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine promote anaerobic killing of *Pseudomonas aeruginosa* via single-electron transfer with ferrous iron. *Microbiol Spectr*. 2022. 10. e02312-02322. doi: 10.1128/spectrum.02312-22
80. Karmegham N, Vellasamy S, Natesan B et al. Characterization of antifungal metabolite phenazine from rice rhizosphere fluorescent pseudomonads (FPS) and their effect on sheath blight of rice. *Saudi J Biol Sci*. 2020. 27. 3313-3326. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.10.007
81. Kempes CP, Okegbe C, Mears-Clarke Z et al. Morphological optimization for access to dual oxidants in biofilms. *Proc Natl Acad Sci*. 2014. U.S.A. 111(1). 208-213. doi: 10.1073/pnas.1315521110
82. Khan ST, Izumikawa M, Motohashi K et al. Distribution of the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and isoprenoid production in marine-derived Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2010. 304. 89-96. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01886.x
83. Kim SD, Weller DM, Thomashow LS. Colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* 2112, among collections of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* spp. in pea rhizosphere. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2012. 22(6). 763-770.
84. Li S, Yue SJ, Huang P et al. Comparative metabolomics and transcriptomics analyses provide insights into the high-yield mechanism of phenazines biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* GP72. *J Appl Microbiol*. 2022. 133. 2790-2801. doi: 10.1111/jam.15727
85. Li Y, Jiang H, Du X et al. Enhancement of phenazine-1-carboxylic acid production using batch and fed-batch culture of *gacA* inactivated *Pseudomonas* sp. *M18G Bioresour Technol*. 2010. 101. 3649-3656. doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.120
86. Li YX, Yue SJ, Zheng YF et al. Economical production of phenazine-1-carboxylic acid from glycerol by *Pseudomonas chlororaphis* using cost-effective minimal medium. *Biology*. 2023. 12. doi: 10.3390/biology12101292
87. Liaudanskaya AI, Svetlova AS, Maksimova NP et al. [Expression of the phenazine operon in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 strains capable of overproduction of phenazine compounds]. *Molecular & Applied Genetics: Proceedings. Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus; ed: A. V. Kilchevsky (editor-in-chief) [et al.]*. Minsk, 2021. 31. 93-101. doi: 10.47612/1999-9127-2021-31-93-101 (In Russian)
88. Liaudanskaya AI, Verameyenka EG, Maksimova NP. [Analysis of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 bacterial genome]. *Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: collection of research papers. Minsk: Belarusian Science*. 2019. 11. 102. [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_41498933\\_41763894.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_41498933_41763894.pdf). (In Russian)
89. Liaudanskaya AI., Shapira MA, Verameyenka KG et al. Comparative Phz proteins analysis of the mutant strains *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* with enhanced phenazine synthesis. *Molecular & Applied Genetics: Proceedings. Institute of Genetics and Cytology,*

- NAS of Belarus; ed: A. V. Kilchevsky (editor-in-chief) [et al.]. Minsk, 2025. 38. 99–110.
90. Liu H, He Y, Jiang H et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. *Curr Microbiol.* 2007. 54. 302-306. doi: 10.1007/s00284-006-0444-4
91. Liu K, Li Z, Liang X et al. Biosynthesis and genetic engineering of phenazine-1-carboxylic acid in *Pseudomonas chlororaphis* Lzh-T5. *Front Microbiol.* 2023. 14(1186052). doi:10.3389/fmicb.2023.1186052.
92. Liu TT, Ye FC., Pang CP. et al. Isolation and identification of bioactive substance 1-hydroxyphenazine from *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial activity. *Lett App Microbiol.* 2020. 71. 303-310. doi: 10.1111/lam.13332
93. Liu WH, Yue SJ, Feng TT et al. Characterization and engineering of *Pseudomonas chlororaphis* LX24 with high production of 2-hydroxyphenazine. *J Agric Food Chem.* 2021. 69. 4778-4784. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00434
94. Liu XW, Liu NY, Deng YQ et al. Anticancer activity, topoisomerase I inhibition, DNA ‘light switch’ behavior and molecular docking of two ruthenium complexes containing phenazine ring. *J Biomol Struct Dyn.* 2020. 39. 5953-5962. doi: 10.1080/07391102.2020.1796806
95. Maeyer K, Daes J, Hua GK et al. N-acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. *Microbiology.* 2011. 157. 459-472. doi: 10.1099/mic.0.043125-0
96. Martini M, Moruzzi S, Ermacora P et al. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of Fluorescent *Pseudomonads* used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. *Trends Food Sci Technol.* 2015. 46. 277-285. doi: [10.1016/j.tifs.2015.10.017](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.017)
97. Mavrodi DV, Blankenfeldt W, Thomashow LS Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biosynthesis and regulation Annu Rev Phytopathol.* 2006. 44. 417-445. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710
98. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM et al. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2001. 183. 6454-6465. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001
99. Mavrodi DV, Parejko JA, Mavrodi OV et al. Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology.* 2013. 15(3). 675-686. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02846.x
100. Mavrodi DV, Peever TL, Mavrodi OV et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76(3). 866-879. doi: 10.1128/AEM.02009-09
101. McDonald M, Mavrodi DV, Thomashow LS, Floss HG. Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. *J Am Chem Soc.* 2001. 123(38). 9459-9460. doi: 10.1021/ja011243+
102. Meel S, Saharan BS. Characterization and analytical validation of phenazine producing rhizobacteria for sustainable control of soil borne pathogens in wheat using TLC and HPLC based approaches. *Discov Plants.* 2026. 3. 17. doi: 10.1007/s44372-026-00479-2
103. Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, Breinbauer R, Thomashow LS, Blankenfeldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem.* 2009. 10(14). 2295-2304.
104. Morales DK, Jacobs NJ, Rajamani S et al. Antifungal mechanisms by which a novel *Pseudomonas aeruginosa* phenazine toxin kills *Candida albicans* in biofilms. *Mol Microbiol.* 2010. 78. 1379-1392. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07414.x
105. Morohoshi T, Wang WZ, Suto T et al. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508. *Journal of bioscience and bioengineering.* 2013. 116(5). 580-584.
106. Morohoshi T, Yabe N, Yaguchi N et al. Regulation of phenazine-1-carboxamide production by quorum sensing in type strains of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* and *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* *J Biosci Bioeng.* 2022. 133. 541-546. doi: 10.1016/j.jbiosc.2022.03.004
107. Myhren LE, Nygaard G, Gausdal G et al. Iodinin (1,6-dihydroxyphenazine 5,10-dioxide) from *Streptosporangium* sp. induces apoptosis selectively in myeloid leukemia cell lines and patient cells. *Mar Drugs.* 2013. 11. 332-349. doi: [10.3390/md11020332](https://doi.org/10.3390/md11020332)
108. Okegbe C, Fields BL, Beierschmitt C et al. Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. *Proc Natl Acad Sci.* 2017. U.S.A. 114. 5236-5245. doi: [10.1073/pnas.1700264114](https://doi.org/10.1073/pnas.1700264114)
109. Omura S, Eda S, Funayama S et al. Studies on a novel antitumor antibiotic, phenazinomycin: Taxonomy, fermentation, isolation, and physicochemical and biological characteristics. *J Antibiot.* 1989. 42. 1037-1042. doi: [10.7164/antibiotics.42.1037](https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.1037)
110. Padaria JC, Tarafdar A, Raipuria R et al. Identification of phenazine-1-carboxylic acid gene (phc CD) from *Bacillus pumilus* MTCC7615 and its role in antagonism against *Rhizoctonia solani*. *J Basic Microbiol.* 2016. 56. 999-1008. doi: [10.1002/jobm.201500574](https://doi.org/10.1002/jobm.201500574)
111. Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T et al. Isolation and characterization of antiprotozoal

- compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. *Parasitol Int.* 2020. 74. 101961. doi: [10.1016/j.parint.2019.101961](https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101961)
112. Park GK Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. *J Microbiol Biotechnol.* 2014. 22. 326-330. doi: [10.4014/jmb.1106.06042](https://doi.org/10.4014/jmb.1106.06042)
113. Parsons JF, Song F, Parsons L et al. Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Biochemistry.* 2004. 43. 12427-12435. doi: [10.1021/bi049059z](https://doi.org/10.1021/bi049059z)
114. Patel NP, Raju M, Haldar S et al. Characterization of phenazine-1-carboxylic acid by *Klebsiella* sp. NP-C49 from the coral environment in Gulf of Kutch. *India Arch Microbiol.* 2020. 202. 351-359. doi: [10.1007/s00203-019-01742-9](https://doi.org/10.1007/s00203-019-01742-9)
115. Patil S, Nikam M, Patil H et al. Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp. MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Proc Biochem.* 2017. 58. 298-305. doi: [10.1016/j.procbio.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.003)
116. Pauliukaite R, Ghica ME, Barsan MM et al. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters.* 2010. 43(10-11). 1588-1608. doi: [10.1080/00032711003653791](https://doi.org/10.1080/00032711003653791)
117. Peng H, Ouyang Y, Bilal M. et al. Identification, synthesis and regulatory function of the N-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact.* 2018. 17. 1-11. doi: [10.1186/s12934-017-0854-y](https://doi.org/10.1186/s12934-017-0854-y)
118. Peng H, Zhang P, Bilal M et al. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microb Cell Fact.* 2018. 17(1). 117. doi: [10.1186/s12934-018-0962-3](https://doi.org/10.1186/s12934-018-0962-3)
119. Pierson III LS. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behaviour of bacteria in the environment and Biotechnological Processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. 86. 1659-1670. doi: [10.1007/s00253-010-2509-3](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3)
120. Pierson III LS., Wood DW, Pierson EA. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 1998. 36. 207-225. doi: [10.1146/annurev.phyto.36.1.207](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.207)
121. Pratiwi RH, Hidayat I, Hanafi M et al. Isolation and structure elucidation of phenazine derivative from *Streptomyces* sp. strain UICC B-92 isolated from *Neesia altissima* (Malvaceae). *Iran J Microbiol.* 2020. 12. 127-137.
122. Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology.* 2006. 2(2). 71-78.
123. Radhakrishnan NA, Ravi A, Joseph BJ et al. Phenazine 1-carboxylic acid producing seed harbored endophytic bacteria from cultivated rice variety of Kerala and its broad range antagonism to diverse plant pathogens. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2023. 15. 516-523. doi: [10.1007/s12602-021-09844-x](https://doi.org/10.1007/s12602-021-09844-x)
124. Raio A, Puopolo G. *Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield. *World J Microb Biot.* 2021. 37. 1-8.
125. Rane MR, Sarode PD, Chaudhari BL et al. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Sci Ind Res.* 2007. 66. 627-631.
126. Ren L, Yuan Y, Farea K et al. The adaptability of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in oxygen-limited environments. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025. 15. 1655335. doi: [10.3389/fcimb.2025.1655335](https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1655335)
127. Saleh O, Flinspach K, Westrich L et al. Mutational analysis of a phenazine biosynthetic gene cluster in *Streptomyces anulatus* 9663. *Beilstein J Org Chem.* 2012. 8. 501-513. doi: [10.3762/bjoc.8.57](https://doi.org/10.3762/bjoc.8.57)
128. Samata K, Yamagishi T, Ichihara T et al. Establishment and characterization of a mouse FM3A cell mutant resistant to topoisomerase II-inhibitor NC-190. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002. 50. 367-372. doi: [10.1007/s00280-002-0508-5](https://doi.org/10.1007/s00280-002-0508-5)
129. Saosoong K, Wongphathanakul W, Poasiri C et al. Isolation and analysis of antibacterial substance produced from *P. aeruginosa* TISTR 781. *KKU Sci J.* 2009. 37. 163-172.
130. Sawhney SN, Boykin DW. Phenazines with two cationic side chains as potential antimalarials. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1979. 68(4). 524-526.
131. Schiessl KT, Hu F, Jo J et al. Phenazine production promotes antibiotic tolerance and metabolic heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat Commun.* 2019. 10(1). 762. doi: [10.1038/s41467-019-08733-w](https://doi.org/10.1038/s41467-019-08733-w)
132. Schmitz S, Rosenbaum MA. Controlling the production of *Pseudomonas phenazines* by modulating the genetic repertoire. *ACS Chem Biol.* 2020. 15. 3244-3252. doi: [10.1021/acscchembio.0c00805](https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00805)
133. Serafim B, Bernardino AR, Freitas F et al. Recent Developments in the Biological Activities, Bioproduction, and Applications of *Pseudomonas* spp. *Phenazines Molecules.* 2023. 28(3). 1368. doi: [10.3390/molecules28031368](https://doi.org/10.3390/molecules28031368)
134. Serafini M, Cargnin S, Massarotti A et al. Essential Medicinal Chemistry of Essential Medicines. *J Med Chem.* 2020. 63. 10170-10187. doi: [10.1021/acs.jmedchem.0c00415](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00415)
135. Shah SG, Shier WT, Jamaluddin TN et al. *Penicillium verruculosum* SG: A source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines. *Arch Microb.* 2014. 196. 267-278. doi: [10.1007/s00203-013-0945-z](https://doi.org/10.1007/s00203-013-0945-z)

136. Shapira MA, Verameyenka KG, Liavonchyk KV et al. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium. *Process Biochemistry*. 2021. 111. 325-331.
137. Si T, Wang A, Yan H et al. Progress in the study of natural antimicrobial active substances in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2024. 29(4400). doi: [10.3390/molecules29184400](https://doi.org/10.3390/molecules29184400)
138. Sletta H, Degnes KF, Herfindal L et al. Antimicrobial and cytotoxic 1,6-dihydroxyphenazine-5,10-dioxide (iodinin) produced by *Streptosporangium* sp. DSM 45942 isolated from the fjord sediment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014. 98. 603-610. doi: [10.1007/s00253-013-5320-0](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5320-0)
139. Song C, Yue SJ, Liu WH et al. Engineering of glycerol utilization in *Pseudomonas chlororaphis* GP72 for enhancing phenazine-1-carboxylic acid production. *World J Microb Biot*. 2020. 36. 1-8. doi: [10.1007/s11274-020-02824-3](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02824-3)
140. Stepien M, Gonka E, Żyła M et al. Heterocyclic nanographenes and other polycyclic heteroaromatic compounds: synthetic routes, properties, and applications. *Chem Rev*. 2017. 117. 3479-3716. doi: [10.1021/acs.chemrev.6b00076](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00076)
141. Tarui M, Doi M, Ishida T et al. DNA-binding characterization of a novel anti-tumour benzo[a]phenazine derivative NC-182: Spectroscopic and viscometric studies. *Biochem J*. 1994. 304. 271-279. doi: [10.1042/bj3040271](https://doi.org/10.1042/bj3040271)
142. Thacharodi A, Priyadarshini R, Karthikeyan G et al. Extraction, purification and characterization of phenazine from *Pseudomonas aeruginosa* isolate of wastewater sources: A panacea towards clinical pathogens. *App Nanosci*. 2023. 13. 2365–2378. doi: [10.1007/s13204-021-01944-y](https://doi.org/10.1007/s13204-021-01944-y)
143. Thalhammer KO, Newman DK. A phenazine-inspired framework for identifying biological functions of microbial redox-active metabolites. *Curr Opin Chem Biol*. 2023. 75. 102320. doi: [10.1016/j.cbpa.2023.102320](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102320)
144. Tupe SG, Kulkarni RR, Shirazi F et al. Possible mechanism of antifungal phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas* sp. against dimorphic fungi *Benjaminiella poitrasii* and human pathogen *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2015. 118. 39-48. doi: [10.1111/jam.12675](https://doi.org/10.1111/jam.12675)
145. Turner JM, Messenger AJ. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in microbial physiology*. 1986. 27. 211-275.
146. Verameyenka EG, Fedorovich MN, Feklistova IN et al. [Obtaining and characterizing mutants of *Pseudomonas aurantiaca* - producers of phenazine antibiotics]. *Published online*. 2009. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/5491>. (In Russian)
147. Verameyenka EG, Maksimova NP. [Increscent of phenazine antibiotics production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning *phzIR* genes and entering the antioxidants additives at cultural medium]. *Published online*. 2010. Accessed March 5, 2026. <https://elib.bsu.by/handle/123456789/16291>. (In Russian)
148. Verborg W, Thomas H, Bissett D. et al. First-intoman phase I and pharmacokinetic study of XR5944.14, a novel agent with a unique mechanism of action. *Br J Cancer*. 2007. 97. 844-850. doi: [10.1038/sj.bjc.6603953](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603953)
149. Vicker N, Burgess L, Dodd R et al. Novel angular benzophenazines: dual Topoisomerase I and Topoisomerase II inhibitors as potential anticancer agents. *J Med Chem*. 2002. 45. 721-739. doi: [10.1021/jm010329a](https://doi.org/10.1021/jm010329a)
150. Viktorsson EÖ, Melling GB., Aesoy R et al. Total synthesis and antileukemic evaluations of the phenazine 5,10-dioxide natural products iodinin, myxin and their derivatives. *Bioorgani Med Chem*. 2017. 25. 2285-2293. doi: [10.1016/j.bmc.2017.02.058](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.058)
151. Wagner M, Abdel-Mageed WM, Ebel R et al. Dermacozines H-J isolated from a deep-sea strain of *Dermacoccus abyssi* from Mariana Trench sediments. *J Nat Prod*. 2014. 77. 416-420. doi: [10.1021/np400952d](https://doi.org/10.1021/np400952d)
152. Wan Y, Liu H, Xian M et al. Biosynthesis and metabolic engineering of 1-hydroxyphenazine in *Pseudomonas chlororaphis* H18. *Microb Cell Fact*. 2021. 20(235). doi: [10.1186/s12934-021-01731-y](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01731-y)
153. Wan Y, Liu H, Xian M et al. Biosynthetic Pathway Construction and Production Enhancement of 1-Hydroxyphenazine Derivatives in *Pseudomonas chlororaphis* H18. *J Agric Food Chem*. 2022. 70. 1223-1231. doi: [10.1021/acs.jafc.1c07760](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07760)
154. Wang D, Yu J, Dorosky R et al. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30–84. *PLoS One*. 2016. 11(1). e0148003. doi: [10.1371/journal.pone.0148003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148003)
155. Wang D, Yu JM, Pierson LS et al. Differential regulation of phenazine biosynthesis by RPEA and RpeB in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. *Microbiology*. 2012. 158. 1745-1757. doi: [10.1099/mic.0.059352-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.059352-0)
156. Wang S, Liu D, Bilal M et al. Uncovering the Role of PhzC as DAHP Synthase in Shikimate Pathway of *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Biology*. 2022. 11(1). doi: [10.3390/biology11010086](https://doi.org/10.3390/biology11010086)
157. Wang S, Liu D, Bilal M et al. Uncovering the role of phzc as DAHP synthase in shikimate pathway of *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Biology*. 2022. 11(86). doi: [10.3390/biology11010086](https://doi.org/10.3390/biology11010086)
158. Wang SY, Shi XC, Chen X et al. Biocontrol ability of phenazine-producing strains for the management of Fungal Plant Pathogens: A Review. *Biol Control*. 2021. 155(104548). doi: [10.1016/j.biocontrol.2021.104548](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104548)
159. Wang Y, Newman DK. Redox Reactions of Phenazine Antibiotics with Ferric (Hydr)oxides and

- Molecular Oxygen. *Environ Sci Technol.* 2008. 42(7). 2380-2386. doi: [10.1021/es702290a](https://doi.org/10.1021/es702290a)
160. Wrede F, Strack E Über das pyocyanin, Den blauen Farbstoff des *Bacillus pyocyaneus*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* 1924. 140. 1-15. doi: [10.1515/bchm2.1924.140.1-2.1](https://doi.org/10.1515/bchm2.1924.140.1-2.1)
161. Wu C, Medema MH, Läkamp RM et al. Leucanicidin and Endophenazines Result from Methyl-Rhamnosylation by the Same Tailoring Enzymes in *Kitasatospora* sp. MBT66. *ACS Chem Biol.* 2016. 11(2). 478-490. doi: [10.1021/acscchembio.5b00801](https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00801)
162. Wu C, Wezel GP., Hae CY Identification of novel endophenazine antibiotics produced by *Kitasatospora* sp. *MBT66 J Antibiot.* 68. 445-452. doi: [10.1038/ja.2015.14](https://doi.org/10.1038/ja.2015.14)
163. Xiong Z, Niu J, Liu H et al. Synthesis and bioactivities of phenazine-1-carboxylic acid derivatives based on the modification of PCA Carboxyl Group. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017. 27. 2010-2013. doi: [10.1016/j.bmcl.2017.03.011](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.011)
164. Xu N, Ahuja EK, Janning P, et al. Trapped intermediates in crystals of the FMN-dependent oxidase PhzG provide insight into the final steps of phenazine biosynthesis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013. 69. 1403-1413. doi: [10.1107/S0907444913008354](https://doi.org/10.1107/S0907444913008354)
165. Yan J, Liu W, Cai J. et al. Advances in phenazines over the past decade: Review of their pharmacological activities, mechanisms of action, biosynthetic pathways and synthetic strategies. *Mar Drugs.* 2021. 19. 610. doi: [10.3390/md19110610](https://doi.org/10.3390/md19110610)
166. Yang H, Kundra S, Chojnacki M et al. A Modular Synthetic Route Involving N-Aryl-2-nitrosoaniline Intermediates Leads to a New Series of 3-Substituted Halogenated Phenazine Antibacterial Agents. *J Med Chem.* 2021. 64. 7275-7295. doi: [10.1021/acs.jmedchem.1c00168](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00168)
167. Yao R, Pan K, Peng H et al. Engineering and systems-level analysis of *Pseudomonas chlororaphis* for production of phenazine-1-carboxamide using glycerol as the cost-effective carbon source. *Biotechnol Biofuels.* 2018. 11. 130.
168. Yuan S, Yin X, Meng X et al. Clofazimine broadly inhibits coronaviruses including SARS-CoV-2. *Nature.* 2021. 593(7859). 418-423.
169. Yue SJ, Huang P, Li S et al. Enhanced production of 2-hydroxyphenazine from glycerol by a two-stage fermentation strategy in *Pseudomonas chlororaphis* GP72AN. *J Agric Food Chem.* 2020. 68. 561-566. doi: [10.1021/acs.jafc.9b05033](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05033)
170. Zboralski A, Saadia H, Novinscak A et al. Interplay between *Arabidopsis thaliana* genotype, plant growth and rhizosphere colonization by phyto-beneficial phenazine-producing *Pseudomonas chlororaphis*. *Microorganisms.* 2022. 10. 660. doi: [10.3390/microorganisms10030660](https://doi.org/10.3390/microorganisms10030660)
171. Zendah I, Riaz N, Nasr H et al. Chromophenazines from the terrestrial *Streptomyces* sp. Ank 315. *J Nat Prod.* 2012. 75. 2-8. doi: [10.1021/np100818d](https://doi.org/10.1021/np100818d)
172. Zhao Y, Qian G, Ye Y et al. Heterocyclic aromatic N-oxidation in the biosynthesis of phenazine antibiotics from *Lysobacter antibioticus*. *Org Lett.* 2016. 18. 2495-2498. doi: [10.1021/acs.orglett.6b01089](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b01089)
173. Zhou L, Jiang HX, Sun S et al. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016. 32(50). doi: [10.1007/s11274-015-1987-y](https://doi.org/10.1007/s11274-015-1987-y)
174. Zhyzneyskaya AA, Lukashevich AA, Maksimova NP et al. The cytotoxic activity of Phenazine compounds from *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* against the HeLa cell line. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2023. 38(4). 215-221. doi: [10.3103/s0891416823040079](https://doi.org/10.3103/s0891416823040079)