

Познавательный журнал для хороших людей

# НАУКА

12+

из первых рук [www.scfh.ru](http://www.scfh.ru)

2

2<sup>(104)</sup> • 2025

НАУКА ИЗ ПЕРВЫХ РУК

№ 2 (104) 2025

ОРЗ: КТО ВИНОВАТ  
И ЧТО ДЕЛАТЬ

ТРАВЕРТИНЫ –  
КАМЕННАЯ ЛЕТОПИСЬ  
ЗЕМЛЕТРЯСЕНИЙ  
ГОРНОГО АЛТАЯ

ПАЗЫРЫКСКИЙ  
ПАЦИЕНТ

«САД МЕЧТЫ»  
АВГУСТА ТОМСОНА

## Молекулярные «Инструменты» для Генетических Технологий

Горный Алтай, плоскогорье Укок. Фото М. Зейферта



[www.scfh.ru](http://www.scfh.ru)





www.scfh.ru



*В рамках масштабного всероссийского проекта по поиску и изучению почвенных микроорганизмов с полезными свойствами школьники под руководством наставников собрали тысячи проб почвы из самых разных местобитаний со всей территории РФ – от Калининграда до Владивостока. На основе этой уникальной коллекции микроорганизмов удалось создать высокоточные термостабильные ферменты для ДНК-технологий и разработать «микробные удобрения», которые защищают сельскохозяйственные культуры от стресса и повышают их урожайность*

*А. А. Кузнецова, А. А. Булыгин, Н. А. Кузнецов*

Плоды гражданской науки – молекулярные «инструменты» для генетических технологий

на стр. 6

*Е. Н. Воронина*

Невидимые фермеры и агрономы

Как почвенные бактерии меняют будущее сельского хозяйства

на стр. 24

*На первой странице обложки:*

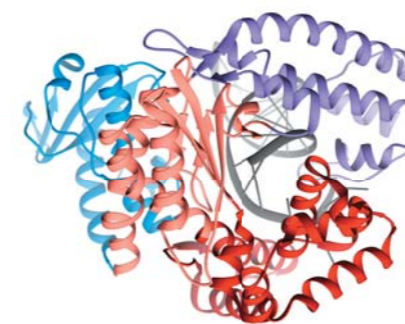
*Часть фермента ДНК-полимеразы TdT, которая присоединяет звенья-нуклеотиды в ходе синтеза новой цепи ДНК*

**2.** 2025  
научно-популярный журнал



# НАУКА

из первых рук



## В НОМЕРЕ:

Уникальная коллекция микроорганизмов из образцов почв, собранных волонтерами-школьниками, послужила основой для создания новых эффективных ферментов для ДНК-технологий, не уступающих мировым образцам

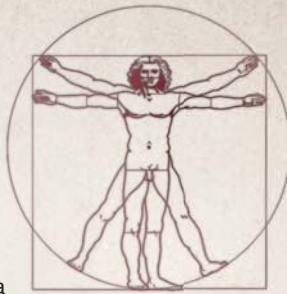
Полезные бактерии и минеральные удобрения при совместном внесении в почву усиливают действие друг друга, работая через разные физиологические механизмы растений

Травертины осаждаются в местах активных разломов, где на земную поверхность поступают обогащенные углекислотой подземные воды, служа индикатором палеотектонических событий

Отличить бактериальную респираторную инфекцию от вирусной можно с помощью простого и быстрого теста на содержание в крови одного биомаркера – белка прокальцитонина

Около 2,5 тыс. лет назад врач с плато Укок вернул своей пациентке способность жевать, заменив разорванную связку височно-нижнечелюстного сустава предположительно сухожилием либо конским волосом

Познавательный журнал  
для хороших людей



#### Редакционная коллегия

главный редактор  
акад. В.Н. Пармон  
заместитель главного редактора  
акад. В.В. Власов  
заместитель главного редактора  
акад. Г.Н. Кулипанов  
заместитель главного редактора  
акад. Д.М. Маркович  
заместитель главного редактора  
акад. Н.А. Колчанов  
заместитель главного редактора  
Л.М. Панфилова  
заместитель главного редактора  
И.А. Травина  
акад. И.В. Бычков  
акад. А.П. Деревянко  
акад. А.В. Латышев  
д.ф.-м.н. Г.В. Майер  
акад. Н.П. Похиленко  
акад. М.П. Федорук  
акад. М.И. Эпов

#### Редакционный совет

чл.-кор. А.И. Кривошапкин  
акад. М.И. Кузьмин  
чл.-кор. И.Ю. Кулаков  
акад. В.И. Молодин  
д.б.н. М.П. Мошкин  
акад. С.В. Нетесов  
д.ф.-м.н. А.Р. Оганов  
И.О. Орлов  
чл.-кор. Н.В. Полосьмак  
акад. В.К. Шумный

#### Над номером работали

к.б.н. Л. Овчинникова  
Л. Панфилова  
к.б.н. М. Перепечаева  
А. Харкевич  
А. Мистрюков  
Д. Ковалева



Основатель и первый  
главный редактор  
(с 2003 по 2020 г.)  
журнала «НАУКА  
из первых рук»/  
SCIENCE First  
Hand академик  
Николай Леонтьевич  
Добрецов

«Естественное желание хороших  
людей – добывать знание»

Леонардо да Винчи

#### Периодический научно-популярный журнал

Издается с января 2004 года

Периодичность: 6 номеров в год

Учредители:

Сибирское отделение Российской  
академии наук (СО РАН)

Институт физики полупроводников  
им. А.В. Ржанова СО РАН

Институт археологии и этнографии  
СО РАН

Лимнологический институт СО РАН

Институт геологии и минералогии  
им. В.С. Соболева СО РАН

Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

Институт нефтегазовой геологии  
и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН

ООО «ИНФОЛИО»

Издатель: ООО «ИНФОЛИО»

Адрес редакции и издателя:  
630090, Новосибирск,  
ул. Золотодолинская, 11  
Тел.: +7 (383) 238-37-20, 238-37-25  
e-mail: lidia@infolio-press.ru  
e-mail: zakaz@infolio-press.ru

www.scfh.ru

Журнал зарегистрирован  
в Федеральной службе по надзору  
в сфере связи, информационных  
технологий и массовых коммуникаций  
(Роскомнадзор)

Свидетельство ПИ № ФС77-37577  
от 25 сентября 2009 г.

ISSN 2310-2500 (электронная версия)

Дата выхода в свет 24.12.2025

Свободная цена

Перепечатка материалов только  
с письменного разрешения редакции

© Сибирское отделение РАН, 2025

© ООО «ИНФОЛИО», 2025

© Институт физики полупроводников  
им. А.В. Ржанова СО РАН, 2025

© Институт археологии и этнографии  
СО РАН, 2025

© Лимнологический институт СО РАН,  
2025

© Институт геологии и минералогии  
им. В.С. Соболева СО РАН, 2025

© Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины  
СО РАН, 2025

© Институт нефтегазовой геологии  
и геофизики им. А.А. Трофимука  
СО РАН, 2025

#### Дорогие друзья!

В наши дни наукой профессионально занимаются более 0,1% мирового населения, а с недавних пор внести свой вклад в научное исследование может при желании практически любой человек. Сейчас во многих развитых странах так называемая гражданская наука (citizen science) переживает расцвет: за последние два десятилетия в различных научных проектах приняли участие десятки миллионов добровольцев-непрофессионалов.

В первую очередь речь идет о масштабном сборе данных, включая опросы населения, получение биологических образцов и т.п. Даже неподготовленные люди, в том числе школьники и студенты, могут выполнять эту нужную и трудоемкую работу, если специалисты предоставят им необходимые материалы и инструкции.

Успешные примеры такого подхода есть и в нашей стране. В фокусе нового выпуска журнала – результаты масштабного проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами», инициированного учеными Института химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск). Его участниками стали более 8,5 тыс. «гражданских ученых» – школьников и их наставников-учителей из различных регионов России. Изучение колоссального микробного материала, выделенного из собранных ими десятков тысяч почвенных проб, уже принесло свои плоды.

Одним из самых значимых результатов стало создание новых высокоточных термостабильных ферментов ДНК-полимераз – важнейших инструментов современных генетических технологий, необходимых для синтеза протяженных фрагментов ДНК. Новые гибридные ДНК-полимеразы, полученные на основе ферментов экстремофильных бактерий, по скорости работы, точности воспроизведения и максимальной длине синтезируемой молекулы не уступают коммерческим ферментам, а по некоторым параметрам даже превосходят их.


Новосибирским ученым удалось добиться успеха и в создании ферментов для прямого пошагового ферментативного синтеза ДНК – новой перспективной генетической технологии, которая в РФ еще не используется. Такие разработки способствуют развитию методов создания ДНК de novo.

Еще один пул результатов, полученных с помощью гражданской науки, относится к сельскому хозяйству. Речь идет о выявлении природных и создании искусственных микробных сообществ («микробного удобрения»), стимулирующих рост и развитие растений, и снижающих их потребность в химических удобрениях. Ученым удалось обнаружить бактериальные штаммы, способные защищать сельскохозяйственные культуры от засухи, засоления и других средовых стрессов, в том числе путем активации собственных адапционных систем растений. При этом геномный анализ и натурные испытания показали, что лучше всего эти бактерии работают в ансамбле, подобно тому как это происходит в здоровой почве.

Также в номере:

- изучение травертинов – карбонатных отложений на месте выхода богатых углекислотой вод – позволяет продлить сейсмическую летопись Горного Алтая на десятки и сотни тысяч лет назад;
- с помощью компьютерной томографии на черепе женщины из пазырыкского погребения на горно-алтайском плато Укок обнаружены следы челюстно-лицевой операции, выполненной 2,5 тыс. лет назад;
- взгляд эксперта на ситуацию с острыми респираторными заболеваниями человека вирусной и бактериальной природы и меры их контроля и профилактики;
- история первого плодового сада в Восточной Сибири и его создателя, садовода-опытника Августа Томсона.

Редакционная коллегия и редакция  
журнала «НАУКА из первых рук»



Одна из созданных **НОВОСИБИРСКИМИ УЧЕНЫМИ** термостабильных **ДНК-ПОЛИМЕРАЗ** делает при **СИНТЕЗЕ ДНК** лишь **ОДНУ ОШИБКУ** на более чем 2,5 млн присоединенных звеньев. **С. 06**

Внесение в почву искусственного **МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА** активирует в **ПРИКОРНЕВОЙ ЗОНЕ** процессы фиксации **АЗОТА** и мобилизации **ФОСФОРА**, увеличивая урожайность сельскохозяйственных культур. **С. 24**

**ТРАВЕРТИНОВЫЕ** тела используют как инструмент для **ДАТИРОВАНИЯ** древних **ЗЕМЛЕТРЯСЕНИЙ** – они более **УСТОЙЧИВЫ** к выветриванию, чем поверхностные разрывы землетрясений, «сглаживающиеся» в течение нескольких тысячелетий. **С. 36**

**ТРАВЕРТИНЫ** Горного Алтая возрастом около 123 тыс. лет образовались в период **МЕЖЛЕДНИКОВЬЯ** на местах активации **ТЕКТОНИЧЕСКИХ РАЗЛОМОВ**, вызванной уменьшением ледового покрова и **ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕМ МАСС** в земных недрах. **С. 36**

.01

#### ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЖИЗНИ

- 06 **А. А. Кузнецова, А. А. Булыгин, Н. А. Кузнецов**  
Плоды гражданской науки – молекулярные «инструменты» для генетических технологий
- 24 **Е. Н. Воронина**  
Невидимые фермеры и агрономы  
Как почвенные бактерии меняют будущее сельского хозяйства

.02

#### ГИПОТЕЗЫ И ФАКТЫ

- 36 **Е. В. Деев, С. Н. Кох, Э. В. Сокол**  
Травертины – каменная летопись землетрясений Горного Алтая



**ВИРУСЫ** служат причиной только 20–40 % **ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**, остальные инфекции вызывают **БАКТЕРИИ** или **ГРИБЫ**, при этом часть имеет смешанную вирусно-бактериальную природу. **С. 50**

В обязательное **МЕДИЦИНСКОЕ СТРАХОВАНИЕ** в РФ не входит лабораторная диагностика **ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**, исключая госпитализированных больных, – большинство **ДИАГНОЗОВ** ставят на основе клинических симптомов. **С. 50**

С помощью **КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ** на **ЧЕРЕПЕ** женщины из древнего **ПАЗЫРЫКСКОГО ПОГРЕБЕНИЯ** на Горном Алтае обнаружили следы успешно проведенной **ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОПЕРАЦИИ**, направленной на восстановление посттравматических нарушений. **С. 62**

Август **ТОМСОН** (1950): «С тяжелым чувством, как в изгнание, ехал я в **СИБИРЬ**. Я знал, что в Сибири **САДОВ НЕТ**, и думал, что разводить их здесь невозможно. Значит, прощай, любимое дело, прощай надолго». **С. 76**

.03

#### ЧЕЛОВЕК

- 50 **С. В. Нетесов**  
ОРЗ: кто виноват и что делать

.04

#### ОТКРЫТИЕ СИБИРИ

- 62 **Н. В. Полосьмак, А. Ю. Летягин, В. В. Каныгин**  
Пазырыкский пациент  
«Замерзшее» погребение на плато Укок – свидетельство мастерства древних хирургов
- 76 **В. Я. Кузеванов, А. В. Попов**  
Иркутский Мичурин, или «Сад мечты» Августа Томсона





## Плоды гражданской науки – МОЛЕКУЛЯРНЫЕ «ИНСТРУМЕНТЫ» для ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ



КУЗНЕЦОВА Александра Александровна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник и заведующая лабораторией исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 71 научных работ и 6 патентов



БУЛЫГИН Анатолий Алексеевич – младший научный сотрудник лаборатории генетических технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 9 научных работ и 2 патентов



КУЗНЕЦОВ Никита Александрович – член-корреспондент РАН, доктор химических наук, заведующий лабораторией генетических технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор свыше 150 научных работ, включая 3 монографии, и 9 патентов

© А. А. Кузнецова, А. А. Булыгин, Н. А. Кузнецов, 2025

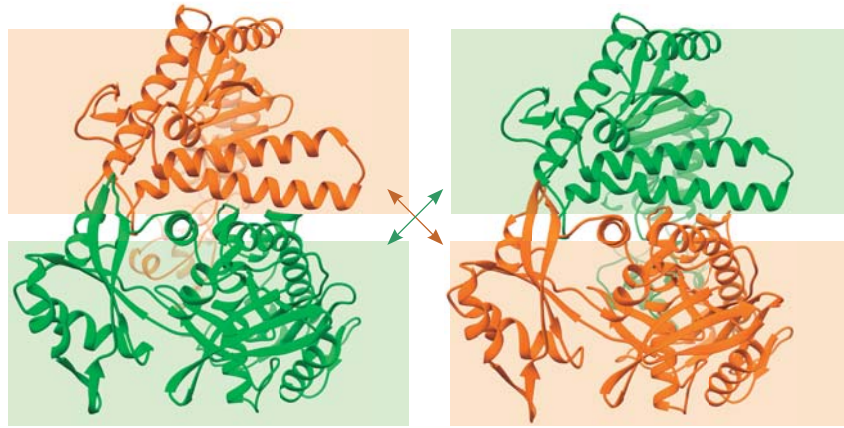
**Ключевые слова:** генетические технологии, нуклеиновые кислоты, ферменты, ДНК-полимераза, гражданская наука, почвенные микроорганизмы.

**Key words:** genetic technologies, nucleic acids, enzymes, DNA polymerase, citizen science, soil microorganisms

Слева – часть фермента ДНК-полимеразы TdT, которая присоединяет звенья-нуклеотиды в ходе синтеза новой цепи ДНК

*В наши дни биологическая наука из описательной дисциплины все больше становится производительной силой. Активно развиваются биотехнологии, в том числе генетические, которые используют для изменения уже существующих в природе или конструирования совершенно новых биологических систем. Это открывает огромные возможности в получении принципиально новых объектов на всех уровнях организации живого (от макромолекул до клеток и целых организмов), которые будут обладать полезными для человека свойствами.*

*Ключевую роль в биотехнологических процессах играют ферменты – катализаторы, ускоряющие химические реакции в живых системах. Настоящей кладовой этих биомолекул служат микроорганизмы, обитающие в почве в самых разных условиях, в том числе экстремальных, но вести их поиск – задача, непосильная для обычного научного коллектива. Исследователям из новосибирского Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН пришли на помощь волонтеры, работавшие в рамках всероссийского проекта по поиску и изучению почвенных микроорганизмов как потенциальных продуцентов биологически активных молекул. На основе собранной уникальной микробной коллекции ученым удалось создать ферменты для ДНК-технологий, не уступающие мировым образцам*



Химерные ферменты получают заменой целых участков (доменов) белка, взятых из ферментов других организмов. Так как эффективность работы ферментов во многом зависит от структуры отдельных доменов, можно значительно улучшить характеристики целевого фермента относительно обоих «родительских» вариантов, правильно комбинируя фрагменты разных белков

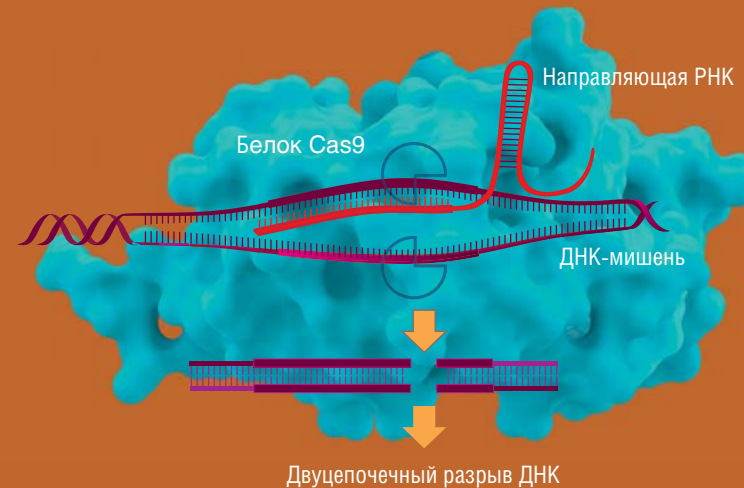
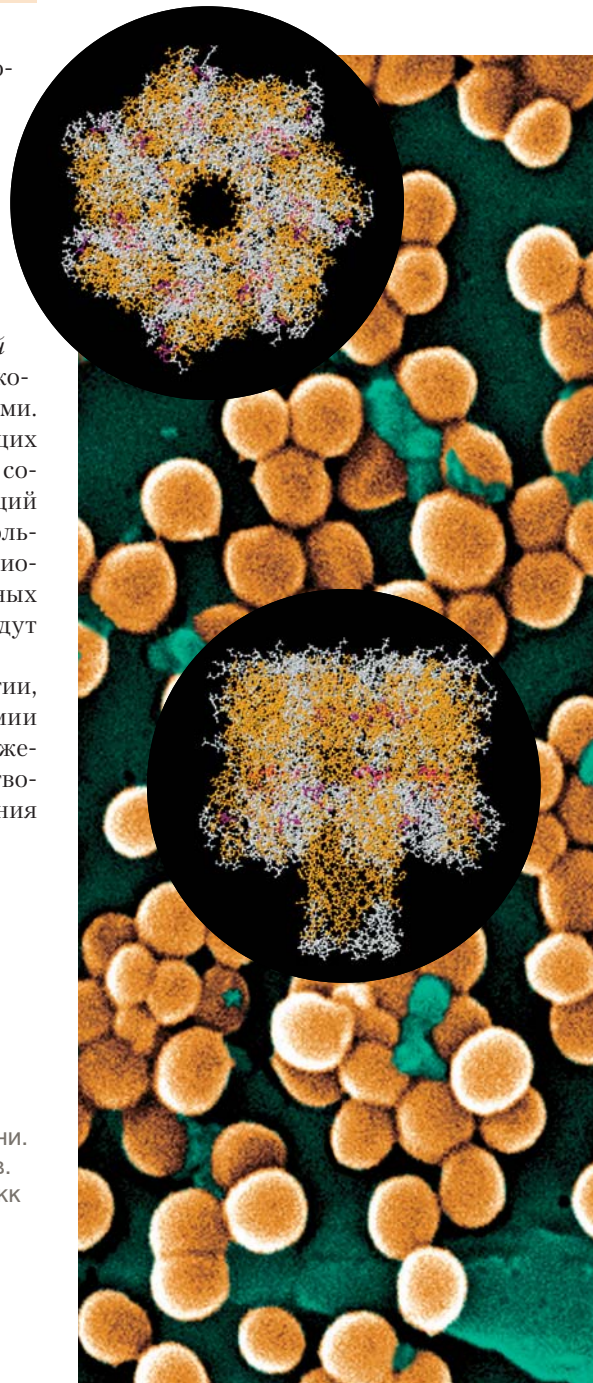
Один из ярких примеров использования современных биотехнологий – создание новых ферментов (биомолекул, ускоряющих реакции в живых системах) с целевыми свойствами. И это не просто поиск природных белков-катализаторов, а затем получение их в рекомбинантном виде, т.е. с помощью генно-модифицированных организмов (бактерий, грибов, клеточных культур и т.д.). Такие биотехнологии давно известны и широко применяются для медицинских целей (к примеру, для получения вакцин и лекарств), в промышленном производстве и научных исследованиях. Задачи, стоящие перед современными учеными, относятся к так называемой синтетической биологии – быстро развивающейся отрасли молекулярной биологии, которая не ограничивается манипуляциями с реальными генами и геномами.

Речь идет о создании химерных белковых конструкций, содержащих участки (домены) разных ферментов из организмов разных видов. В совокупности они дают не существующий в природе фермент, обладающий нужными свойствами. Такие новые каталитические белки можно использовать для создания ферментативных каскадов при синтезе ценных биологически активных веществ или для получения генетически измененных или даже полностью синтетических микроорганизмов, которые будут их производить.

Для решения подобных задач используются генетические технологии, основывающиеся на применении тонких методов органической химии и ферментативного катализа. Ферменты нужны для множества приложений, и ниже мы подробнее остановимся на тех из них, которые задействованы в современных технологиях, касающихся работы и манипулирования молекулами ДНК.

Нанопоровый метод секвенирования основан на изменении силы ионного тока, протекающего через отверстие наноразмера по направлению действия приложенного электрического поля. При прохождении через нанопору одноцепочечной молекулы ДНК или РНК ее пропускная способность по отношению к ионам уменьшается, и сила тока падает. Изменения силы тока уникальны для каждого типа нуклеотида, что позволяет считывать последовательность нуклеиновой кислоты в режиме реального времени. Справа – структура альфа-гемолизина, одного из нанопоровых белков. Этот токсичный белок вырабатывает бактерия золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*).

© CC BY-SA 3.0/DandBD и Public Domain/Janice Haney Carr, CDC



В основу технологии редактирования генома CRISPR/Cas легла система «приобретенного иммунитета» бактерий, позволяющая им противостоять вирусам-бактериофагам. Современная система CRISPR/Cas состоит из некодирующей направляющей молекулы РНК и ферментов-нуклеаз Cas. Направляющая РНК находит целевой участок гена и присоединяется к нему с помощью Cas-белка. В месте посадки Cas разрезает цепь ДНК – в получившийся разрыв можно встроить любую донорную молекулу ДНК

## Читаем, редактируем и пишем... ДНК

Важнейший и самый первый составной блок ДНК-технологий – это технологии секвенирования, которые дают информацию о последовательности нуклеотидов, составляющих цепочку нуклеиновой кислоты. На основе этих данных можно выявить связь между последовательностью ДНК и свойствами самого организма.

Одна из самых продвинутых технологий секвенирования, позволяющая проводить прямой анализ длинных фрагментов ДНК/РНК в режиме реального времени, основана на использовании нанопоры, через которую «пропускается» одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты. И в роли нанопоры может выступать фермент. Закрепленный в мембране, он позволяет считывать десятки тысяч «букв»-нуклеотидов за один запуск секвенатора.

По мере накопления данных о природных нуклеотидных последовательностях ДНК стало понятно, что ее редактирование, которое в общем виде подразумевает возможность «выключить», удалить, откорректировать или встроить ген в живой организм, открывает новые перспективы как для исследования биологических процессов, так и для практического применения.

Сегодня мы уже не только можем «читать» ДНК, но и обладаем инструментами для исправления прочитанного. Для редактирования ДНК используется особый класс ферментов – так называемые *сиквенс-специфические ДНК-эндонуклеазы*, которые находят в молекуле ДНК определенные последовательности и расщепляют ее в этом месте.

По мере эволюции систем редактирования генома за последние два с лишним десятилетия в них применялись разные эндонуклеазы. Самая передовая на сегодня и широко используемая система, CRISPR/Cas, основана на одном-единственном ферменте.

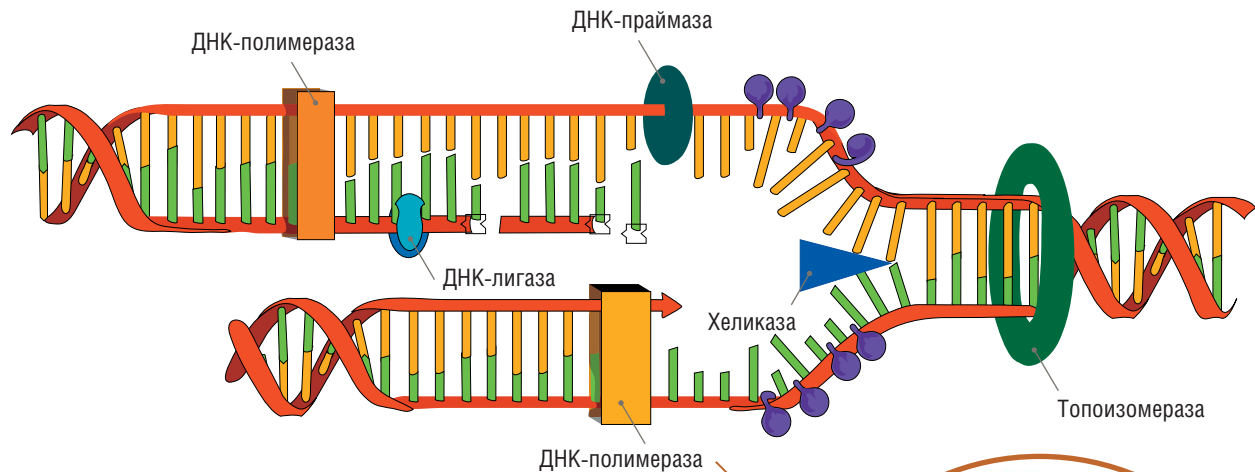
Есть немалый прогресс и в наших возможностях «написания» нужной нуклеотидной последовательности. За десятилетия работы в этом направлении удалось разработать технологии поэтапного синтеза фрагментов нуклеиновых кислот заданного состава.

В первую очередь нужно рассмотреть химический метод твердофазного *фосфитамидного (фосфоамидитного)* синтеза, при котором растущая цепь синтетического олигонуклеотида «пришита» к твердому носителю. Присоединение каждого нового мономера происходит с помощью активирующего агента – кислотного катализатора (органического гетероциклического соединения *тетразола* или его производных).

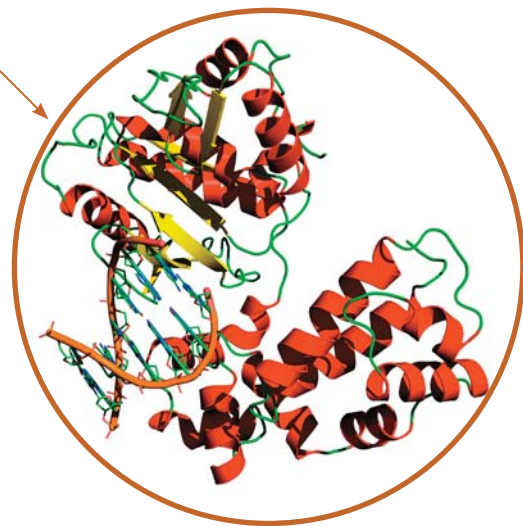
Этот метод и по сей день считается надежным источником синтеза коротких олигонуклеотидов длиной до 300 звеньев. Количество звеньев во многом зависит от самого «текста» нуклеотидной последовательности и возможности формирования различных структур и в среднем составляет 100–200 нуклеотидов.

Одна из проблем синтеза олигонуклеотидов на твердом носителе – снижение выхода целевого продукта по мере увеличения длины цепи. Поскольку процесс синтеза ДНК требует повторения циклов с добавлением новых реагентов, то чем больше будет длина последовательности, тем выше вероятность образования нежелательных побочных продуктов. В целом предел длины обусловлен как минимум двумя факторами: возможными неудачами при присоединении каждого последующего нуклеотида и *депуринизацией* – высвобождением из нуклеотидов в результате спонтанного гидролиза азотистых оснований *аденина* или *гуанина*, что в конечном итоге приводит к снижению эффективности синтеза.

Но уже на рубеже 2000-х гг. были предприняты первые попытки разработки новых, ферментативных



В ходе репликации (копирования) двуцепочечной молекулы ДНК задействован целый ряд ферментов. ДНК-полимераза осуществляет полимеризацию новой цепи нуклеотидов на основе информации, считываемой с противоположной, матричной цепи. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с нуклеотидом цепи, с которой ведется считывание. *Вверху* – репликация ДНК. © CC BY-SA 3.0/DonRumata, с изменениями. *Справа* – трехмерная структура ДНК-связывающих участков в человеческой бета-ДНК-полимеразе. © CC BY-SA 3.0/ Yikrazuul



**Ферменты ДНК-полимеразы играют ключевую роль в сохранении стабильности генома, процессах репликации и репарации («ремонта») ДНК. Эти ферменты катализируют полимеризацию мономеров ДНК вдоль «материнской» цепи, которую фермент «читает» и использует в качестве матрицы. При этом каждый новый нуклеотид будет комплементарен соответствующему нуклеотиду матрицы, с которой ведется считывание. Таким образом, вновь синтезируемая молекула будет идентична одной из цепей двойной спирали ДНК. ДНК-полимеразы применяют в различных приложениях молекулярной биологии и биотехнологии, в том числе в методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) – быстром и чувствительном методе «размножения» нуклеотидных последовательностей, широко используемом в научных исследованиях и клинической практике. Для ПЦР необходимы термостабильные ДНК-полимеразы, так как для разделения цепей спирали ДНК требуется высокая температура. Эти ферменты также должны обладать, в зависимости от задачи, набором дополнительных свойств, таких как высокая точность и скорость работы. Для получения ферментов с улучшенными каталитическими свойствами природные варианты полимераз модифицируют с помощью технологий белковой инженерии**

и гибридных, подходов к созданию более длинных молекул ДНК. Как видно из названия, эти технологии основаны на применении в качестве активирующего агента ферментов, в первую очередь *ДНК-полимераз*.

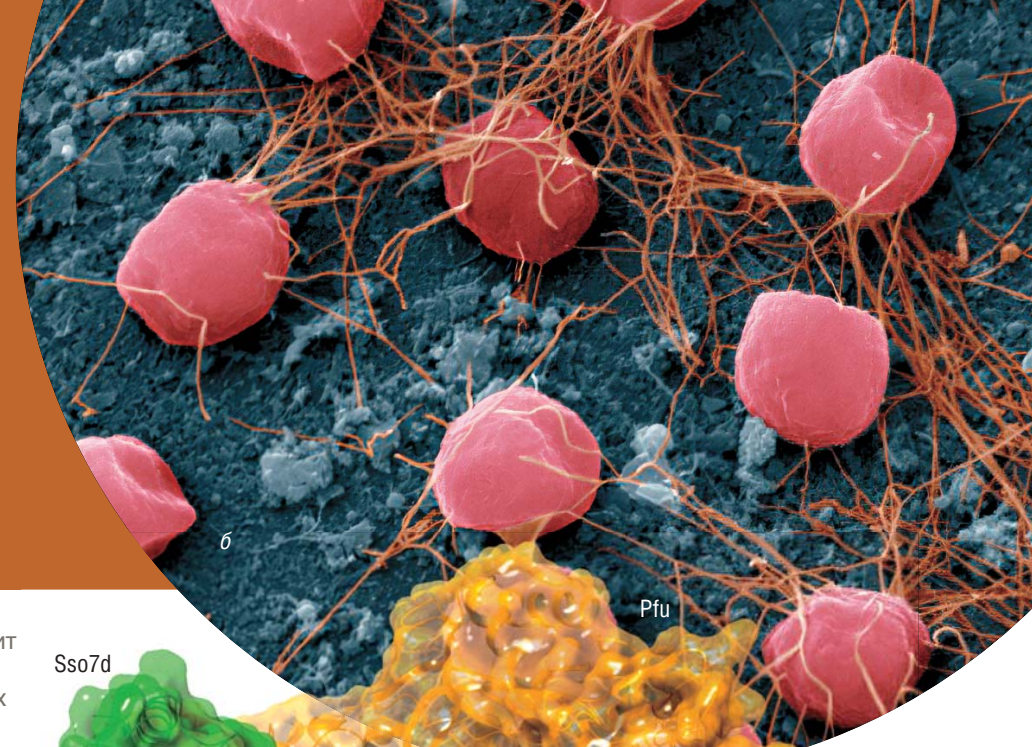
### «Сшиваем» ДНК

Работы по созданию длинных молекул нуклеиновых кислот ведутся по двум направлениям. Первое – это разработка методов сборки длинных последовательностей из более коротких. И здесь сразу возникает как минимум два вопроса: какого максимального размера можно получить *ампликон* (синтезируемый по матрице фрагмент нуклеотидной последовательности) и с какой точностью нам нужно его воспроизвести?

В качестве примера можно сравнить точность некоторых ДНК-полимераз из мирового арсенала геномной инженерии. Так, термостабильная Таq-полимераза из семейства ДНК-полимераз А, выделенная в 1976 г. из термофильной бактерии *Thermus aquaticus* (температурный оптимум 70 °С), способна эффективно наращивать ампликон длиной 5 тыс. пар нуклеотидов, делая

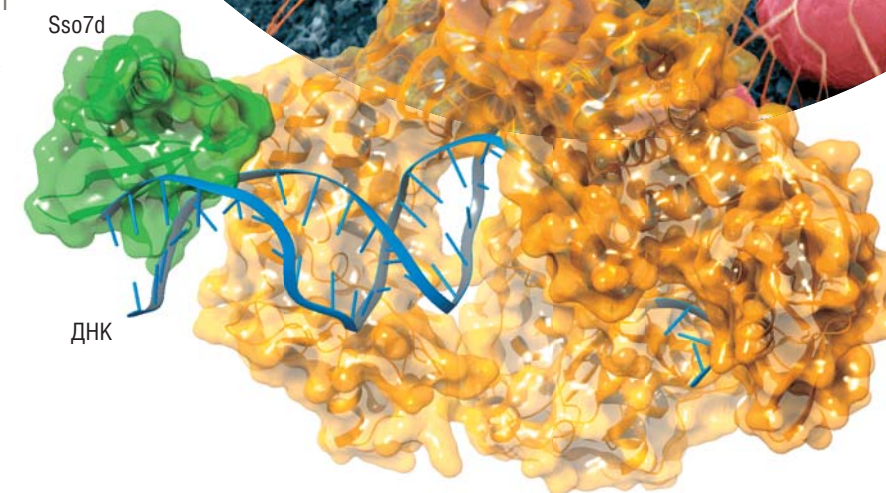


a



b

ДНК-полимераза Phusion состоит из двух частей, полученных из модельных экстремофильных архей. К полимеразе Pfu из *Pyrococcus furiosus* «пришит» небольшой белок Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*, связывающийся с ДНК, который не дает распасться полимеразному комплексу. *S. solfataricus* (a) была впервые выделена из вулкана Сольфатара, а *P. furiosus* (б) – из геотермальных отложений на пляжах о. Вулкано в Италии. © CC BY 4.0/ S. Niazi, A.K. Sadaghiani, G. Gharib и CC BY 4.0/ Servé Kengen



одну-две ошибки. Тогда как точность ДНК-полимераз из семейства В (например, Pfu из архей *Pyrococcus furiosus*, температурный оптимум 100 °С) в 30 раз выше!

Но для получения ампликона длиной до 10 тыс. нуклеотидов уже нужны другие подходы, основанные на создании гибридных белковых конструкций. Таких, к примеру, как полимеразы Phusion от компании *Thermo Fisher Scientific* (США). Она представляет собой химерный белок, состоящий из Pfu-полимеразы и неспецифического ДНК-связывающего фрагмента Sso7d из археобактерии *Sulfolobus solfataricus*, который стабилизирует комплекс фермента с ДНК-матрицей. А поскольку такие полимеразы в природе блокируются характерным для РНК нуклеотидом *уридином*, активный центр фермента нужно также дополнительно модифицировать, чтобы он мог работать и на уридин-содержащей матрице.

С помощью белковой инженерии точность синтеза конкретного фермента относительно Pfu можно увеличить еще почти на порядок. Так, высокоточная ДНК-полимераза Q5 HF от компании *New England Biolabs* (Великобритания) делает примерно одну ошибку

на 2 млн присоединенных нуклеотидов, при этом она способна синтезировать матрицу длиной до 20 тыс. нуклеотидов. Если же нужен ампликон еще большего размера, то его можно получить только с использованием смесей ДНК-полимераз, при этом точность синтеза будет невысокой.

Следующий этап в развитии ДНК-технологий связан с возможностью синтезировать нуклеотидные последовательности, несуществующие в природе, т. е. при отсутствии какой бы то ни было матрицы.

### Марафон полимераз

Создание эффективных методов синтеза протяженных фрагментов искусственной ДНК с заданной последовательностью – очень актуальная область. Успехи в ней связаны с одной уникальной ДНК-полимеразой – *терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой* (TdT). В отличие от большинства других полимераз, TdT не требуется матрица: в природе она катализирует хаотичное неспецифическое присоединение нуклеотидов к одному из концов молекулы ДНК.

Показано, что TdT может быть катализатором в синтезе олигонуклеотидов *de novo* с помощью модифицированных *нуклеозидтрифосфатов* – предшественников нуклеотидов. Фермент может создавать синтетическую ДНК с заданной последовательностью в повторяющемся цикле, добавляя по одному нуклеотиду за цикл.

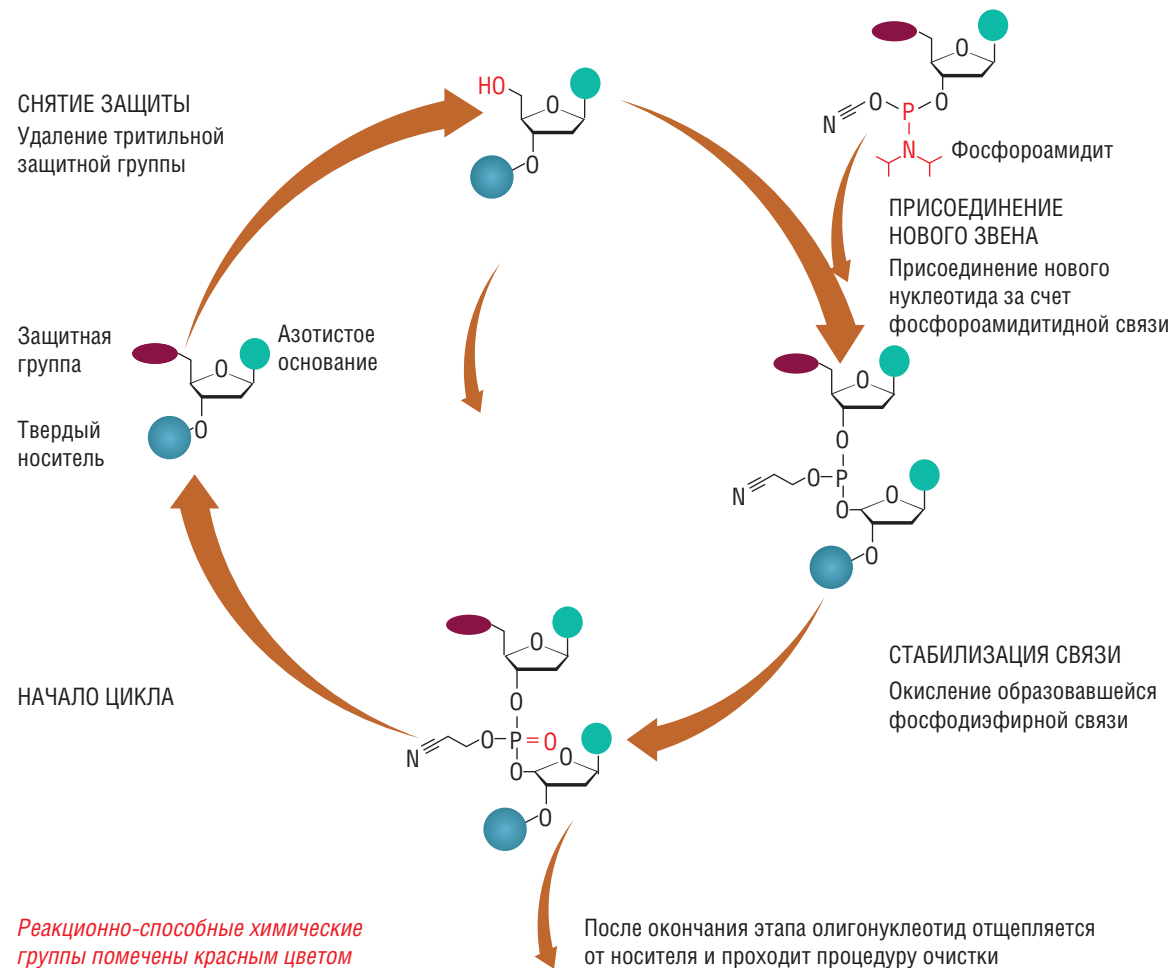
Эта технология позволяет синтезировать одноцепочечную ДНК с эффективностью до 99,9% в каждом звене, тогда как при стандартном химическом синтезе – в среднем 99,6%. На первый взгляд разница в 0,4% кажется незначительной, но это не так: она будет расти с каждым шагом синтеза! Так, при химическом синтезе олигонуклеотида длиной всего лишь 100 звеньев конечный продукт будет содержать около 40% цепей с «ошибками» ( $0,4\% \times 100$ ). Тогда как при ферментативном синтезе этот показатель будет составлять около 10%, т.е. в четыре раза меньше. Поэтому технологию ферментативного синтеза можно использовать для получения гораздо более длинных нуклеотидных последовательностей, вплоть до целых генов.

В последние годы индустрия синтеза протяженных фрагментов ДНК быстро развивается благодаря

активному внедрению новых технологических решений. Некоторые зарубежные компании уже предлагают синтезировать последовательности длиной до 10 тыс. нуклеотидов.

На конец 2023 г. лучшим достижением в этом направлении стало получение живых, делящихся *эукариотических* (ядерных) организмов – *хлебопекарных*

Синтез олигонуклеотидов с помощью фосфоамидитных мономеров осуществляется в повторяющемся цикле. Каждый повтор состоит из трех этапов, при этом присоединение нового нуклеотида происходит на втором этапе. Отличие направленного ферментативного синтеза в том, что на втором шаге используется фермент дезоксирибонуклеотидилтрансфераза, которая присоединяет к растущей цепи другой мономер – нуклеозидтрифосфат. Этот нуклеотид также содержит на конце химическую группу, блокирующую присоединение следующего звена. После окончания этапа проводят промывку и химическое деблокирование защитной группы для дальнейшего синтеза



*дрожжей*, геном которых более чем на 50% состоял из искусственно синтезированных последовательностей (Zhao, Coelho, Hughes *et al.*, 2023). А к началу 2025 г. исследователям удалось полностью собрать все 16 хромосом первого синтетического генома дрожжей, которые могут успешно расти и размножаться на глицерине как единственном источнике углерода (Goold, Kroukamp, Erpf *et al.*, 2025).

## Волонтеры науки

Как мы видим, практически все перечисленные выше биотехнологии основаны на использовании ферментов. Более того, очень часто новый метод или технология как раз и появлялись в связи с открытием или применением нового каталитического белка. Обширный репертуар ферментов совершенно необходим не только для развития существующих технологий, но и для создания новых на их основе.

Получение ферментов с особыми свойствами – высокоспецифичных, каталитически эффективных, быстрых, точных и стабильных – нетривиальная задача сама по себе. Однако российские биотехнологи в настоящее время находятся в особенно сложной ситуации: в этих условиях она становится настоящим вызовом.

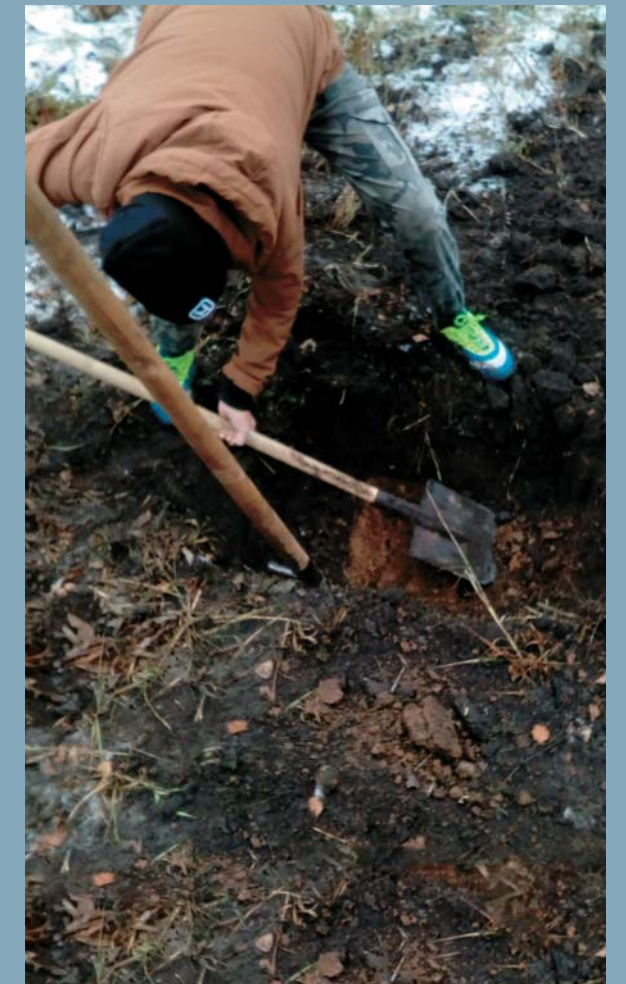
В РФ еще в 2019 г. была запущена Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий, направленная в том числе на создание инструментов манипулирования генами и биотехнологических продуктов для здравоохранения, сельского хозяйства и промышленности. Через два года был объявлен конкурс на проведение исследований в области генетических технологий с применением методов так называемой *гражданской науки*. В рамках этого подхода к научным исследованиям привлекают широкий круг активных граждан.

В нашем проекте «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами», который начал реализовываться в 2021 г., объектом исследования выступили почвенные микроорганизмы.

Масштабные задачи проекта были условно разделены на три блока. Первый – поиск новых ферментов для генетических технологий (направление «синтетическая биология и ДНК-технологии»); второй – обнаружение новых продуцентов антибиотиков и бактериофагов («медицина»); третье – выявление микробных сообществ, стимулирующих рост и развитие растений («сельское хозяйство»). Таким образом предполагалось максимально извлечь пользу из собранного материала.

Школьники из с. Кыштовка (НСО) проводят отбор образцов почвы. 2019 г.

Подход гражданской науки заключается в привлечении к научным исследованиям широкого круга активных граждан, добровольцев (это могут быть пенсионеры, школьники, студенты), которых называют научными волонтерами или гражданскими учеными. В области биологии, где ученым приходится изучать огромное количество объектов, рассеянных на больших территориях, такое массовое привлечение научных волонтеров, распределенных по всей стране, выглядит крайне привлекательно. В мировой практике задачи, которые решаются с помощью подхода гражданской науки, самые разнообразные: от описательных аспектов, например анализа путей миграции перелетных птиц, изучения животных или растений в различных регионах обитания, и до практических, когда проводится сбор образцов почвы либо какого-то иного субстрата в различных местах (в лесу, около дома, на свалках, в полях). Далее эти образцы отправляются в научную организацию специалистам для детальных исследований





Непосредственными исполнителями – гражданскими учеными – стали более 8,5 тыс. школьников. Это были, как правило, группы учащихся младших и средних классов, работавшие под руководством наставников, в роли которых обычно выступали учителя по биологии. Участники получали подробные инструкции по методике сбора образцов и описанию характеристик мест сбора.

В результате за четыре года работы проекта в Новосибирск поступили образцы почвы со всей территории страны: от Калининграда до Владивостока. Образцы были собраны в самых разных, в том числе труднодоступных, местообитаниях: на сельскохозяйственных угодьях, техногенных промышленных отвалах и свалках, заповедных территориях, а также из гейзеров и горячих источников, соленых озер и болот.

Команда из с. Кыштовка (НСО) проводит предварительный посев бактерий из образцов почвы. МБОУ КСОШ № 2. 2020 г.

Внизу – аспирант лаборатории исследования модификации биополимеров ИХБФМ СО РАН А. А. Мирошников отбирает перспективные бактериальные штаммы

Количество образцов почвы, собранных и протестированных в рамках проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов...» гражданскими учеными с помощью специально разработанных наборов, составило свыше 15 тыс. Основная их часть хранится в новосибирском Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Полученные почвенные образцы были использованы для выделения микроорганизмов и дальнейшего изучения их свойств в научных организациях консорциума, созданного для реализации проекта. Общая численность исследованных образцов, включая отдельные почвенные микроорганизмы и их консорциумы, превысила 48 тыс.



Для реализации проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» был создан консорциум из семи организаций. Головной организацией выступил Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), соисполнителями, отвечающими за научные блоки проекта, – Сколковский институт науки и технологий (Москва), Институт почвоведения и агрохимии СО РАН (Новосибирск), Пущинский научный центр биологических исследований РАН, а также Новосибирский национальный исследовательский государственный университет и Научно-технологический университет «Сириус». Фонд «Поддержка проектов в области образования» стал координатором исследовательских и общеобразовательных учреждений, принявших участие в проекте



Поступившие образцы исследовались в специализированных микробиологических лабораториях. Специалисты культивировали почвенные микроорганизмы, получали отдельные микробные изоляты и проводили их видовую идентификацию. На следующем этапе свойства выделенных микробов детально анализировались.

При реализации проекта, помимо научных задач, пришлось решать сложные организационные вопросы, чтобы несколько тысяч людей из разных уголков страны смогли собрать и отправить в Новосибирск уникальный материал. А для фиксации результатов проведения этого массового исследования была разработана специальная интерактивная база данных.

Так с помощью гражданской науки удалось в сжатые сроки собрать колоссальный микробиологический материал, на базе которого можно решать задачи синтетической биологии по поиску новых ферментов и созданию на их основе химерных вариантов для пополнения инструментария генетических технологий.

### Ферменты из экстремофилов

Одна из главных задач проекта – получение ферментов с уникальными свойствами, таких как высокоточные термостабильные ДНК-полимеразы, важнейшие инструменты для генетических технологий.

С самого начала работы микробиологи непрерывно высевали микроорганизмы из поступающих образцов почвы, выделяя бактериальные изоляты – отдельные колонии бактерий, растущие на питательной среде. Специалисты лаборатории генетических технологий и лаборатории исследования модификаций биополимеров ИХБФМ СО РАН разработали тест-систему флуоресцентного скрининга полимеразной активности



## ГРАЖДАНСКАЯ НАУКА – ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И МЕДИЦИНЫ

Благодаря огромному материалу, собранному при реализации проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами 2021–2024 гг.», исследователи получили целый ряд результатов по другим направлениям, в первую очередь медицинскому и сельскохозяйственному. Часть из них уже удалось воплотить в практически значимые разработки, к которым проявили интерес реальные производственные партнеры.

Так, был открыт и депонирован во Всероссийской коллекции промышленных организмов новый штамм почвенной бактерии *Bacillus pumilus*, которая продуцирует несколько разных ферментов-протеаз (разрушающих белки), способных работать в широком диапазоне температур и кислотности. Эти ферменты можно использовать в производстве моющих средств, а также в фармацевтической, пищевой и кормовой промышленности.

Рост растений во многом определяется почвенным сообществом микроорганизмов. Поиск бактериальных генов, отвечающих за метаболические пути, связанные с метаболизмом растений (фиксация азота, транспорт тяжелых металлов и др.), привел к созданию тест-системы, с помощью которой можно в конкретном образце почвы оценить наличие бактерий, «полезных для плодородия».

Анализ влияния различных бактериальных штаммов на рост сельскохозяйственных культур в стрессовых условиях (засуха, засоление почвы) показал, что в этих случаях хороший эффект может дать использование «микробных» удобрений, которые активируют адаптационные механизмы растений. А на основе изучения почвенных сообществ микроорганизмов, формирующих условия в области корневой системы, был разработан синтетический консорциум бактерий для увеличения урожайности сахарной свеклы, который уже был протестирован гражданскими учеными.

В почвенных пробах, собранных в рамках проекта, были обнаружены не только различные бактерии, но и большое число их естественных врагов – вирусов-бактериофагов. На основе изучения этих микроорганизмов была создана диагностическая панель, в которую вошли бактериофаги, активные против патогенных штаммов кишечной палочки и сальмонелл. Ее можно использовать для анализа путей заражения патогенами и подбора профилактических и терапевтических бактериофагов в сельском хозяйстве. Панель успешно прошла клинические испытания в условиях птицефабрики. На основе бактериофагов был также создан «лечебный коктейль» против основных патогенных видов бактерий азромонад – обитателей пресных и соленых водоемов. Эти микроорганизмы, устойчивые к низким температурам и большинству антибиотиков, являются основными патогенами рыб, а также могут заражать человека. Новую технологию планируется использовать в прудовых хозяйствах.

Фаготерапия уже давно применяется в медицине и ветеринарии, однако для терапии можно задействовать не только сами вирусы, но и их биологически активные вещества. Так, в рамках проекта на основе фагового эндонуклеазы – фермента, разрушающего стенки бактерий, – создано лекарственное средство для терапии инфекционных маститов у крупного рогатого скота. Эффективность препарата подтверждена в доклинических исследованиях, а также при лечении коров с подтвержденным диагнозом



К. б. н. В. Н. АФОНЮШКИН, заведующий сектором молекулярной биологии Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН, сотрудник лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

### БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПТИЦЕФАБРИКИ

Как ни парадоксально, но наименьшее воздействие на окружающую среду при производстве животного белка оказывают самые высокотехнологичные на сегодня отрасли сельского хозяйства, такие как промышленное птицеводство и рыбоводство. Ведь на получение 1 кг рыбной продукции тратится всего 1,2 кг корма, а на 1 кг курятины – 1,4 кг (для сравнения: на 1 кг говядины – не менее 3 кг!).

При этом условная курица выходит в лидеры. Дело в том, что выращивание рыбы зачастую сопровождается значительным загрязнением водоемов и их последующей эвтрофикацией – чрезмерным накоплением биогенных элементов (азота и фосфора). Это может вызывать бурное развитие цианобактерий («цветение» воды) и падение содержания кислорода («заморы»).

В куроводстве отходы в основном представлены птичьим пометом, который совместно с растительными отходами (к примеру, подстилочной

смесью, состоящей из измельченной соломы, лузги подсолнечника и гречихи, опилок и др.) может служить хорошим субстратом для выращивания популярных пластинчатых грибов – шампиньонов. С помощью технологий переработки отходов птицеводства и растениеводства можно получить с 1 т такого компостированного пометно-подстилочного субстрата до 300 кг плодовых тел грибов. Все это делает комплекс «птицеводство + грибоводство» самым экологически чистым способом производства продуктов питания, позволяющим минимизировать урон, который наносит полям и лесам рост площадей сельскохозяйственных угодий.

Для развития этого многообещающего направления сельского хозяйства проводится поиск микроорганизмов, повышающих эффективность утилизации растительного сырья в грибном субстрате. Такая задача решалась и в рамках проекта «Всероссийский атлас почвенных микроорганизмов как основа для поиска новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами» (2021–2024 г.), выполнявшегося с привлечением волонтеров.

В лабораториях молекулярной микробиологии и фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) были проведены исследования, направленные на повышение продуктивности при выращивании шампиньонов на компосте из подстилочной смеси с птицефабрик. Требовалось найти микроорганизмы, эффективно разрушающие целлюлозу – структурный углевод, составляющий основу клеточной стенки

Выращивание шампиньонов на подстилочном субстрате с птицефабрики, компостированном с добавлением некоторых штаммов почвенных бактерий родов *Aeribacillus* и *Brevibacillus*, обеспечивает более быстрый рост грибного мицелия и вдвое увеличивает продуктивность (вверху) по сравнению с контролем (внизу)



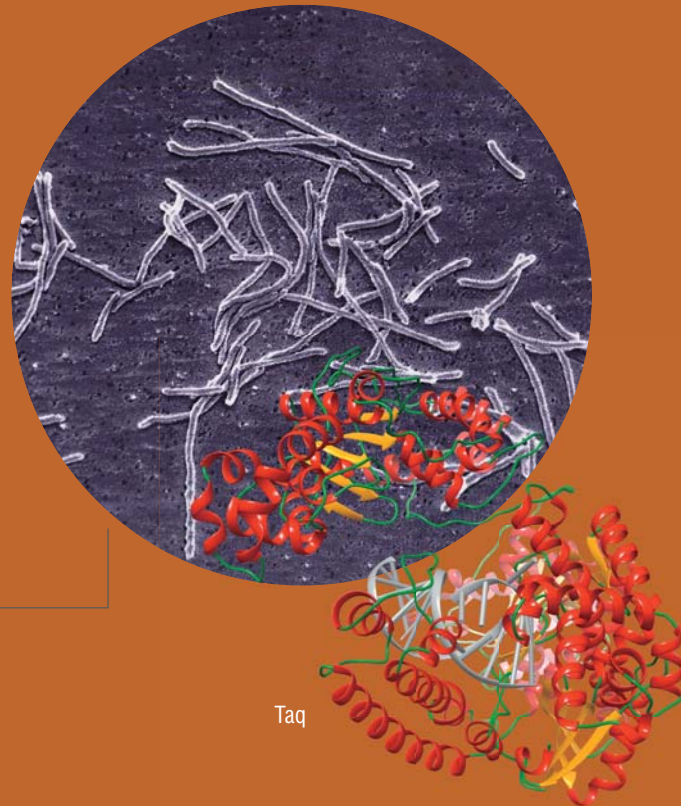
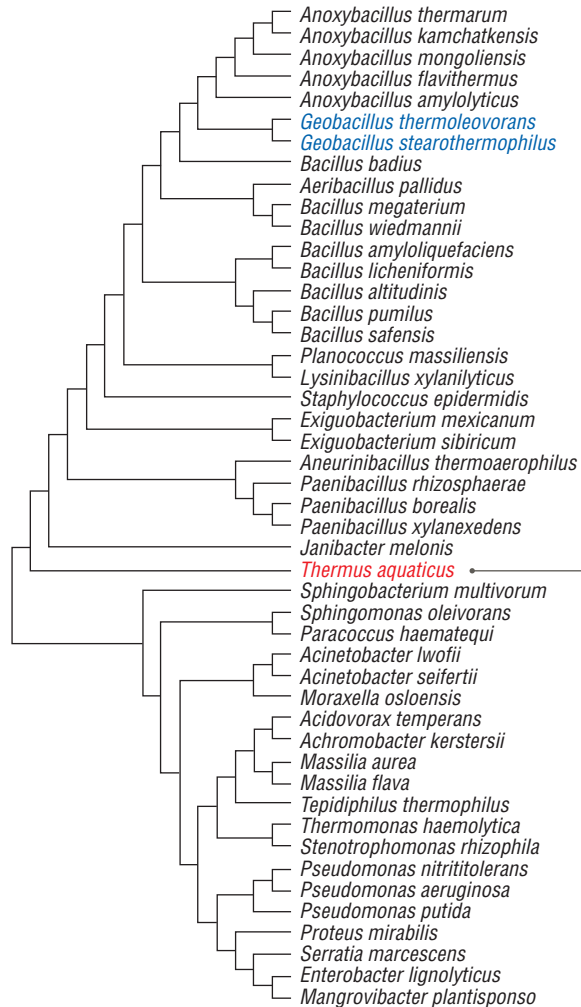
растений и снижающий доступность их питательных веществ.

В результате удалось выделить два непатогенных термофильных штамма почвенных бактерий, обладающих такой активностью. Показано, что субстрат, полученный при компостировании подстилки с птицефабрики с добавлением одного из этих штаммов, обеспечивает более быстрый рост грибного мицелия, а средний вес плодовых тел грибов увеличивается вдвое по сравнению с контролем.

Еще одна проблема, которой уже давно занимаются в ИХБФМ СО РАН, – обеспечение биобезопасности самих птичников. Как известно, большая часть микроорганизмов, встречающихся в птицеводческих помещениях, находится в подстилке, причем среди них могут быть и патогенные бактерии, выделяемые птицами вместе с фекалиями. До недавнего времени не существовало технологий, позволяющих подавлять такие бактерии прямо в подстилочной смеси, вместо этого ветеринары вводили антибиотики непосредственно птицам. И после завершения курса антибиотикотерапии птицы могли повторно заразиться.

В институте еще в 2019 г. было разработано и впоследствии внедрено средство для дезинфекции подстилки на основе органических кислот и соли серной кислоты. Сегодня все большую популярность в сельском хозяйстве приобретают биотехнологические решения.

На основе коллекции микроорганизмов, собранных в рамках проекта, был создан консорциум бактерий рода *Bacillus* (из 6 штаммов 4 видов), обладающих антагонистическими свойствами в отношении условно-патогенной микрофлоры, встречающейся в подстилке сельскохозяйственных птиц. Эффективность действия этого бактериального сообщества была успешно проверена на образцах подстилки с одной из птицефабрик

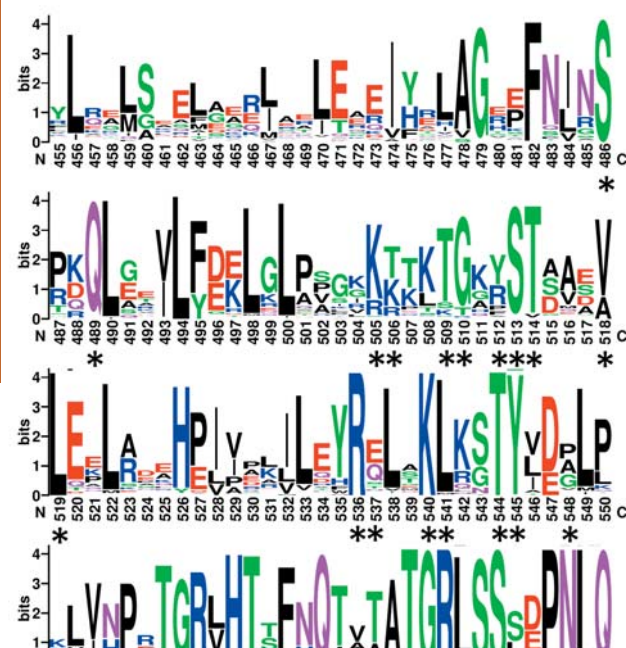


Экстремально термофильная палочковидная бактерия *Thermus aquaticus* была впервые выделена из горячих источников Йеллоустонского национального парка (США). *Public Domain*

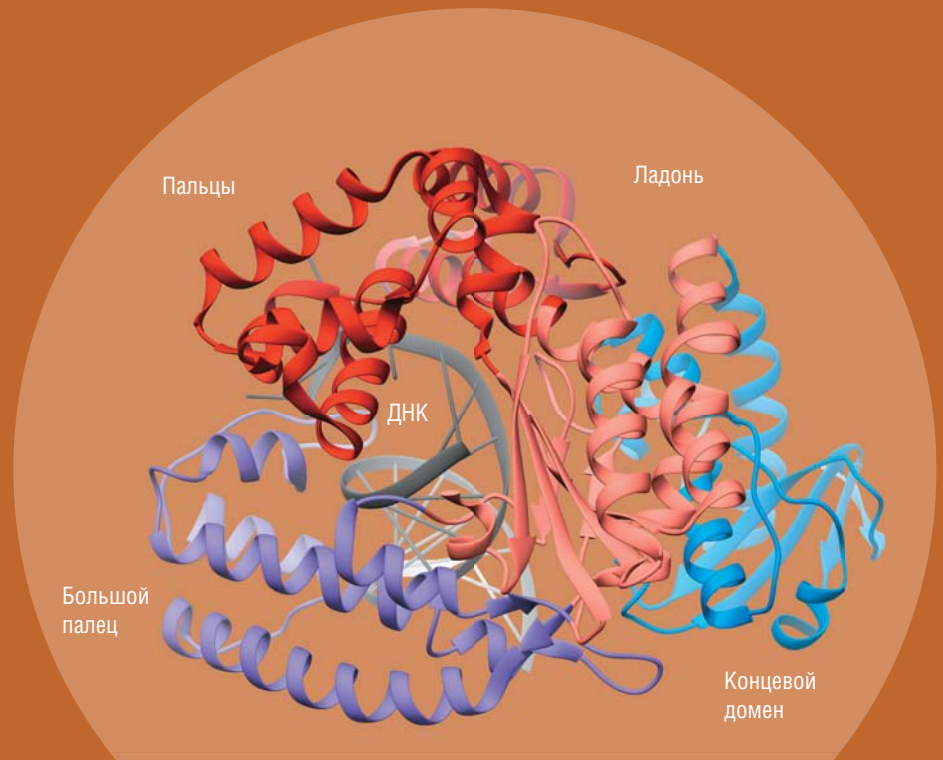
ДНК-полимераза Таq была выделена из этого микроорганизма в 1976 г.  
© CC BY-SA 3.0/Adenosine

Филогенетическое дерево ДНК-полимераз семейства А, полученных из экспонатов Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Все эти белки имеют характерные домены – общая гомология между ними составляет не менее 30 %. Цветом отмечены ДНК-полимеразы с известными каталитическим свойством, применяемые на практике: из представителей рода *Thermus* (красным, Таq-полимераза) и *Geobacillus* (синим).

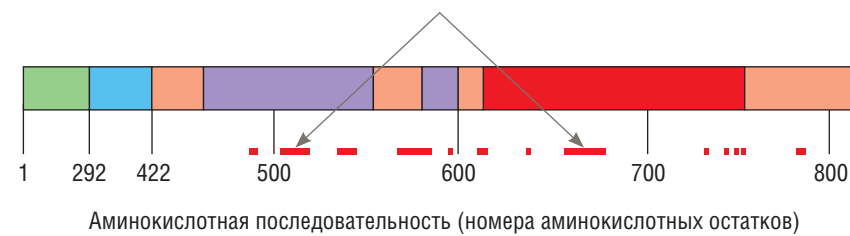
Справа – пример графического представления частот встречаемости (по оси Y) остатков аминокислот в последовательностях этих полимераз. Нумерация остатков (по оси X) соответствует ферменту Таq, звездочками отмечены остатки, взаимодействующие с субстратами и ионами металла.  
По: (Булыгин, Кузнецова, Федорова и др., 2023)



Общая структура большинства полимераз напоминает правую руку человека. Домены «большой палец» связываются с двуцепочечной ДНК, «пальцы» взаимодействуют с поступающим нуклеотидом и комплементарным ему матричным основанием, «ладонь» связывает ионы магния, необходимые для переноса реакционно-активных групп. Справа – структура комплекса ДНК с так называемым фрагментом Кленова (Klen) Таq-полимеразы. Klen представляет собой большую часть фермента, который используется в молекулярных технологиях.  
Структура из базы данных PDB, ID: 3RTV



Области нахождения 62 субстрат- и кофактор-связывающих остатков



в экстракте бактериальных клеток, полученных из одной колонии. Если такой экстракт предварительно выдержать при высокой температуре, то можно выявить изоляты, бактерии из которых обладают термостабильной ДНК-полимеразой.

Помимо выделенных из почвы бактерий, были также проанализированы образцы из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН, а также из Всероссийской коллекции микроорганизмов Пущинского научного центра.

При поиске новых ДНК-полимераз с использованием коллекций уже охарактеризованных микроорганизмов был применен другой, *биоинформационный подход*, заключающийся в анализе генов, кодирующих эти ферменты. Но как среди многочисленных вариантов ферментов найти тот, который будет, к примеру, быстрее или точнее синтезировать ДНК, чем уже известный?

Для предварительной селекции был использован анализ частот встречаемости функционально важных аминокислотных остатков в активном центре полимераз. В результате был получен некий идеальный аминокислотный «слепок» активного центра, который обеспечивает как хорошее связывание с субстратом, так и эффективный катализ.

Затем было проведено моделирование кристаллических структур ДНК-полимераз, чтобы понять, как замена каждой из этих аминокислот

Схема расположения доменов в аминокислотной последовательности ДНК-полимеразы на примере Таq. По: (Булыгин, Кузнецова, Федорова и др., 2023)

может повлиять на связывание фермента с ДНК-субстратом и на эффективность каталитической реакции.

Следующим этапом стало создание конструкций, позволяющих наработать *рекомбинантный* (генно-инженерный) фермент. Порядок действий был таков: сначала получали геномную ДНК отобранного из коллекции микроорганизма, «размножили» ген его ДНК-полимеразы, который затем клонировали в *плазмиду* – генетический элемент, обычно в виде кольцевой

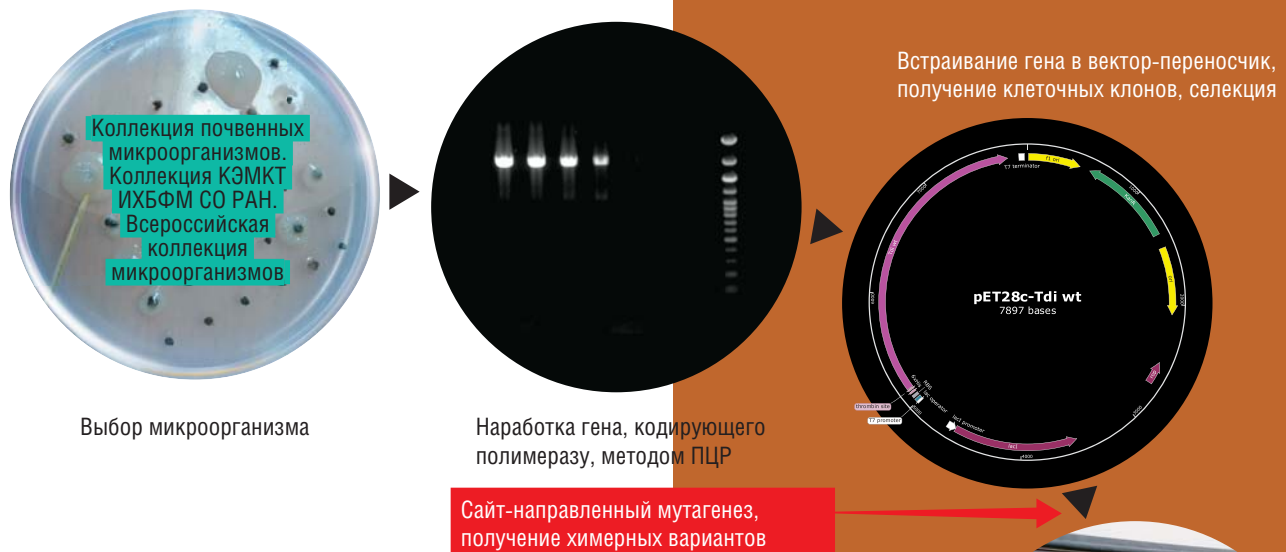
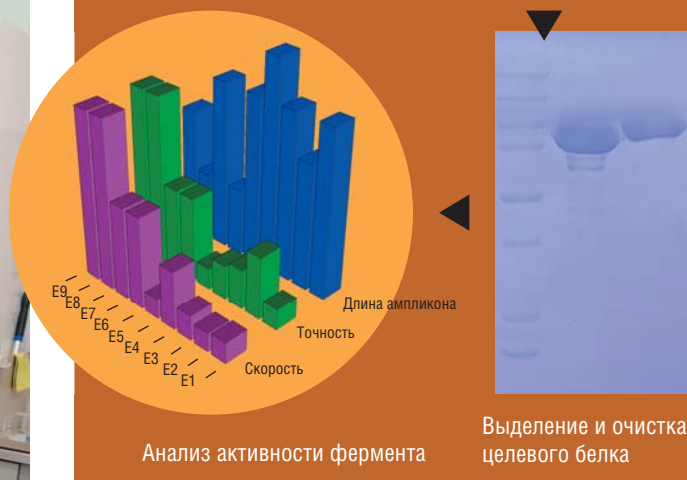


Схема получения рекомбинантных препаратов высокоточных термостабильных ДНК-полимераз

Внизу – аспирантка лаборатории исследования модификации биополимеров ИХБФМ СО РАН А. М. Яковлева



Наработка клеточной биомассы



молекулы ДНК, который может сам воспроизводиться. Нужный ген в составе такого вектора вводили в клетки бактерии *кишечной палочки*. Сам вектор обычно конструируется таким образом, чтобы он мог заставить клетку-хозяина производить кодируемый трансеном белок (в нашем случае – фермент ДНК-полимеразу). Далее шли рутинные процедуры, такие как отбор клонов клеток бактерии, содержащих целевую векторную последовательность, наработка биомассы и очистка белкового препарата.

Описанным способом можно получить рекомбинантный фермент в *нативном виде*, т.е. дикого типа. В работе по проекту этот путь модифицировали: был добавлен этап *сайт-направленного мутагенеза*, на котором один участок белка заменялся аналогичным из другого организма, в результате чего получался химерный белок. Так была создана коллекция различных вариантов генов, кодирующих ДНК-полимеразы, а также самих мутантных и химерных белков.

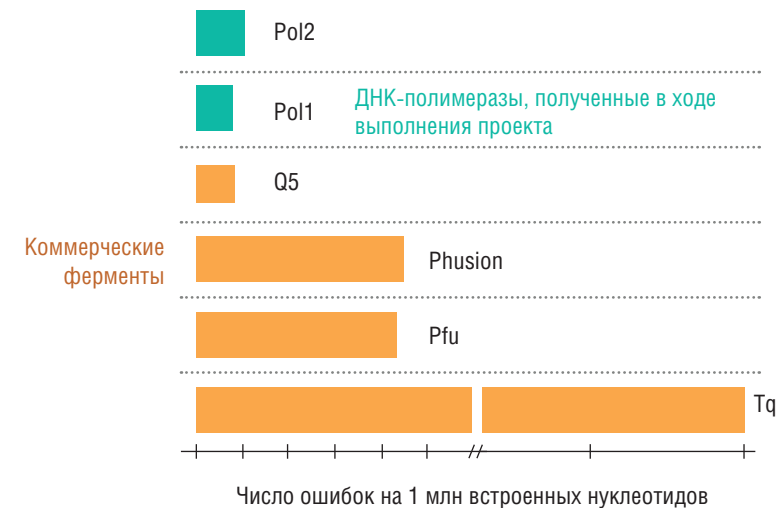
На заключительном этапе проводилась оценка ферментативных свойств полученных вариантов ферментов. Как уже упоминалось, среди характеристик ДНК-полимераз одни из самых важных – это максимальная длина молекулы ДНК, наработанной «в пробирке», скорость синтеза и точность воспроизведения.

При сравнении характеристик полученных в институте ДНК-полимераз с доступным и широко используемым в РФ коммерческим ферментом Pfu выяснилось, что по длине получаемого продукта они близки, но по скорости, а главное по точности синтеза, значительно его превосходят.

Путем секвенирования продуктов синтеза молекул ДНК одного размера созданными полимеразами удалось посчитать число ошибочных нуклеотидов, которые может присоединить фермент, т.е. установить абсолютную точность их работы. В качестве эталона использовали два фермента от британской компании *New England Biolabs*, включая полимеразу Q5 High-Fidelity, считающуюся на сегодня самой точной в мире.

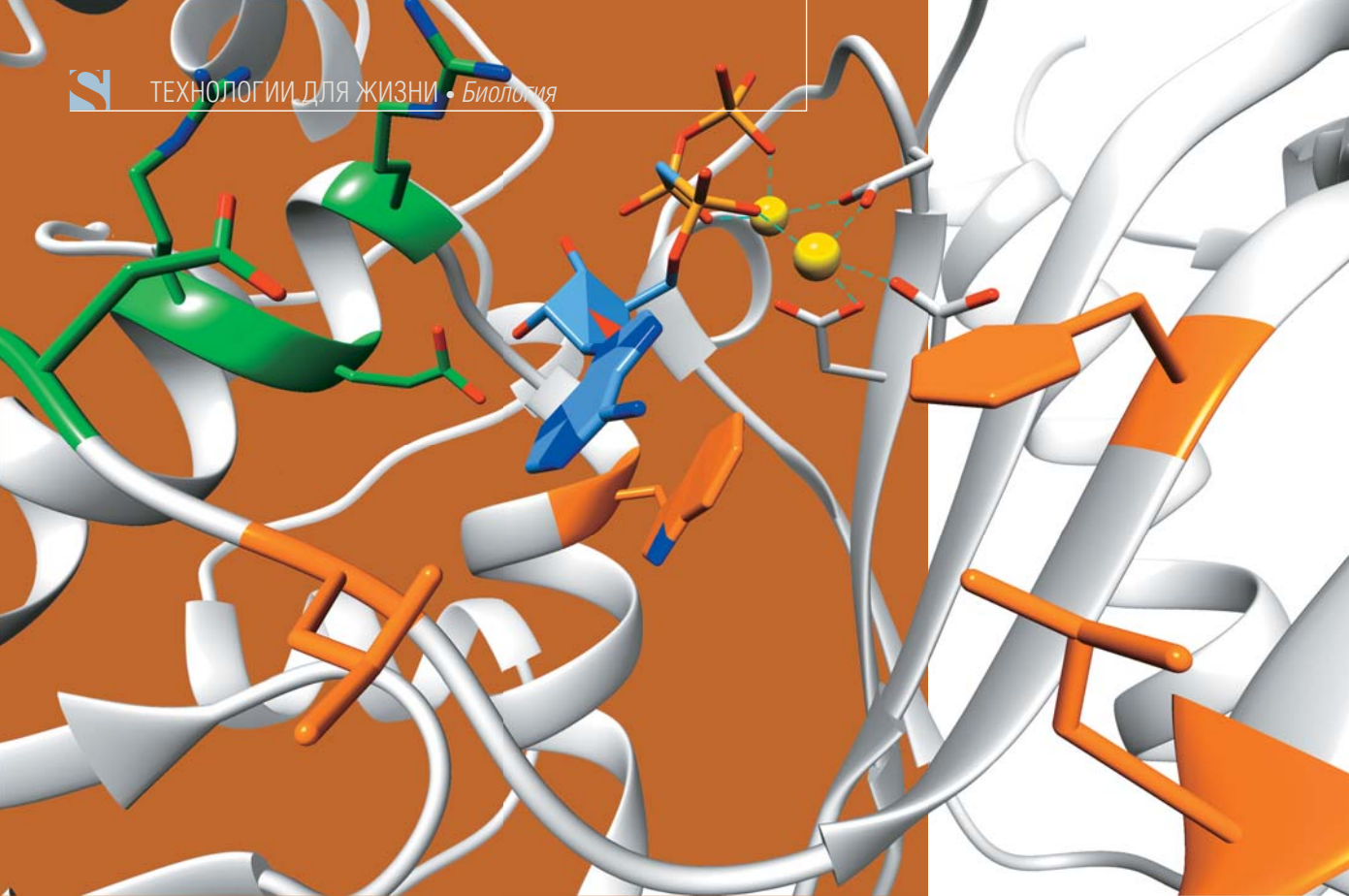
Оказалось, что одна из полученных в Новосибирске ДНК-полимераз, гибридная Pol1, делает одну ошибку на более чем 2,5 млн присоединенных нуклеотидов, тогда как Q5 – на более чем 2,3 млн. Еще один новый фермент – Pol2 – также оказался достаточно точным: одна ошибка на 1,9 млн нуклеотидов, при этом скорость синтеза в 100 раз больше, чем у контрольной Pfu.

Таким образом, в результате реализации проекта была получена



Точность работы термостабильных ДНК-полимераз, полученных авторами в ходе выполнения проекта, оказалась выше коммерческих ферментов, включая гибридные ДНК-полимеразы Q5 и Phusion





На рисунке показана архитектура нуклеозидтрифосфат-связывающего кармана фермента дезоксинуклеотидилтрансферазы TdT, которая присоединяет новые звенья-мономеры к растущей цепи ДНК. Присоединяемый нуклеотид (отмечен голубым цветом) образует сеть связей с двумя ионами металла (желтым цветом). Его окружает набор гидрофильных (зеленым цветом) и гидрофобных (оранжевым цветом) аминокислотных остатков, входящих в состав фермента, которые стабилизируют комплекс и обеспечивают субстратную специфичность. Структура из базы данных PDB, ID 4I2D

очередные звенья к растущей цепи ДНК, способен узнавать значительно отличающиеся по своей природе и структуре нуклеозидтрифосфаты, т. е. он обладает молекулярной пластичностью.

Анализ механизма действия рекомбинантного человеческого фермента TdT, используемого в качестве модели, показал, что его работа зависит от природы азотистого основания и иона металла, служащего кофактором («молекулой-помощником» фермента).

Моделируя комплексы фермента с ДНК и трифосфатами, удалось установить ключевые аминокислотные остатки TdT, отвечающие за пространственную координацию нуклеотидов внутри активного центра фермента. На основе этих данных были предложены замены для некоторых из участков фермента, которые потенциально могли бы повлиять на такие его характеристики, как специфичность, термостабильность и др. В результате был получен рекомбинантный препарат TdT, который в 15 раз эффективнее

включает в цепь новые нуклеотиды по сравнению с ферментом дикого типа.

По аналогии с термостабильными ДНК-полимеразами был проведен биоинформатический анализ и поиск перспективных нуклеотидилтрансфераз среди бактерий и низших грибов из коллекции почвенных микроорганизмов, собранных в рамках проекта. В результате была создана коллекция генов, кодирующих эти ферменты, ведется анализ ферментативных свойств рекомбинантных препаратов.

Отдельная часть работы – создание ферментативного цикла по синтезу модифицированных нуклеозидтрифосфатов, так как эти необходимые компоненты не всегда можно получить химическим синтезом.

Для такого ферментативного катализа требуются три фермента, которые последовательно фосфорилируют модифицированный нуклеозид. На основе собранной микробной коллекции были сначала получены гены, а затем и представители этого ферментного каскада. Источниками этих ферментов стали разные микроорганизмы, включая термофильные бактерии и бактериофаги (вирусы, поражающие бактерии). Сейчас идет работа по описанию природных вариантов этих ферментов и оценка их субстратной специфичности.

Реализация масштабного всероссийского проекта по поиску новых противомикробных продуцентов и ферментов с уникальными свойствами, в рамках которого к научным исследованиям было привлечено большое число волонтеров, в первую очередь школьников, подтвердила эффективность использования такого подхода в биологических исследованиях.

С помощью уникальной коллекции микроорганизмов, собранных гражданскими учеными, и результатов фундаментальных исследований механизмов каталитического действия ферментов удалось в сжатые сроки создать новые, высокоточные отечественные термостабильные ДНК-полимеразы. А разработка ферментов с улучшенными характеристиками, которые можно использовать в ферментативном синтезе протяженных фрагментов ДНК, будет способствовать развитию технологий создания ДНК *de novo*.

В долгосрочной перспективе развитие генетических технологий в области синтетической биологии позволит решить проблему ограниченного доступа к природному разнообразию источников нужных биомолекул за счет создания искусственных организмов, производящих ферменты с целевыми свойствами.

#### Литература

- Бульгин А.А., Кузнецова А.А., Федорова А.С., Кузнецов Н.А. Сравнительный анализ ДНК-полимераз семейства A как инструмент поиска ферментов с новыми свойствами // Молекулярная биология. 2023. Т. 57, № 2. С. 185–196.
- Власов В.В. Гражданская наука: приглашаются все! // НАУКА из первых рук. 2020. № 5/6 (90). С. 146–151.
- Кузнецова А.А., Алексеева И.В., Бакман А.С., Кузнецов Н.А. Ферменты для ДНК: скальпели, ножницы и швейные иголки // НАУКА из первых рук. 2021. № 5/6 (93). С. 24–33.
- Седых С.Е., Воронина Е.Н., Галямова М.Р., Данилова А.И., Смирнова Н.В., Власов В.В. Наука в руках школьника: сибирские «охотники за микробами» // НАУКА из первых рук. 2020. № 5/6 (90). С. 152–161.
- Aschenbrenner J., Marx A. DNA polymerases and biotechnological applications // Curr. Opin. Biotechnol. 2017. V. 48. P. 187–195.
- Tamura R., Toda M. Historic overview of genetic engineering technologies for human gene therapy // Neurol Med. Chir. 2020. V. 60 (10). P. 483–491.
- Wang F., Li P., Chu H. C. et al. Nucleic acids and their analogues for biomedical applications // Biosensors. 2022. V. 12 (2). P. 93.

высокоточная термостабильная полимеразы, которую можно использовать для практически безошибочного синтеза ДНК, а также для соответствующих прикладных приложений.

## ДНК *de novo*

Удалось добиться успеха и в другом направлении – создании ферментов, которые можно использовать в прямом пошаговом ферментативном синтезе ДНК, о котором говорилось выше. Эти работы были поддержаны Российским научным фондом в рамках проекта «Модификация нуклеиновых кислот и репарация ДНК как источник новых инструментов управления геномами».

На сегодняшний день за рубежом уже зарегистрировано несколько стратегий ферментативного синтеза, тогда как в России эта перспективная технология пока не используется. И одной из задач проекта стал подбор пары «эффективный катализатор присоединения – модифицированный нуклеозидтрифосфат».

Согласно опубликованным данным, активный центр вышеупомянутого фермента дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT), который присоединяет



В публикации использованы фото из архивов авторов