

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 579.66:577.15+579.842.11
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-601-607>

Поступило в редакцию 18.08.2018
Received 18.08.2018

И. С. Казловский, член-корреспондент А. И. Зинченко

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ХИМЕРНОГО БЕЛКА, СОСТОЯЩЕГО ИЗ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ДНК-АФФИННОГО ДОМЕНА

Аннотация. Одним из новых перспективных направлений молекулярной биотехнологии является бесклеточный синтез белка. Процедура бесклеточного синтеза белка основана на реконструкции *in vitro* всех этапов биосинтеза белка в клетке, включая транскрипцию, аминоацилирование тРНК и трансляцию мРНК рибосомами. Для воспроизведения этапа транскрипции требуется участие специфических РНК-полимераз, которые иницируют процесс синтеза мРНК с определенных сайтов узнавания. Часто для этого применяется ДНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Т7 (Т7-РНК-полимераза). Для улучшения качественных характеристик Т7-РНК-полимеразы в настоящей работе создан новый штамм *Escherichia coli*, продуцирующий этот фермент, слитый с ДНК-аффинным доменом Sso7d термофильной бактерии *Sulfolobus solfataricus*. Продуцирующая способность полученного рекомбинантного штамма в отношении синтезируемого химерного белка достигает 625 ед/л культуральной жидкости, а удельная активность препарата очищенного фермента составила 80 ед/мкг белка. Полученный фермент предназначен для использования в качестве инструментария при синтезе белков в бесклеточной системе.

Ключевые слова: химерный белок, РНК-полимераза бактериофага Т7, ДНК-аффинный домен *Sulfolobus solfataricus*, *Escherichia coli*

Для цитирования: Казловский, И. С. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из РНК-полимеразы и ДНК-аффинного домена / И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 601–607. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-601-607>

Ilya S. Kazlovskiy, Corresponding Member Anatoliy I. Zinchenko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

CONSTRUCTION OF A STRAIN-PRODUCER OF THE CHIMERIC PROTEIN CONSISTING OF RNA POLYMERASE AND A DNA-AFFINITY DOMAIN

Abstract. One of the recent perspective trends of molecular biotechnology is cell-free synthesis of protein. The procedure of cell-free synthesis of protein is based on *in vitro* reconstruction of all stages of a biosynthesis of protein in a whole cell, including a transcription, an aminoacylation of tRNA and translation of mRNA by ribosomes. Procreation of the transcription stage requires participation of specific RNA polymerase which initiates process of mRNA synthesis from the particular sites of recognition. Often the DNA-dependent RNA polymerase of a bacteriophage of T7 (T7 RNA polymerase) is for this purpose applied. For improvement of qualitative characteristics of the T7 RNA polymerase in the real work the new strain of *Escherichia coli* producing this enzyme fused with the DNA-affine Sso7d domain of a thermophilic bacterium *Sulfolobus solfataricus* is created. The producing ability of the received recombinant strain concerning synthesized chimera protein reaches 625 un/l of cultural liquid, and the specific activity of the purified enzyme preparation was 80 un/μg of protein. The received enzyme is intended for use as tools at synthesis of proteins in cell-free system.

Keywords: fusion protein, T7 bacteriophage RNA polymerase, DNA-affinity domain of *Sulfolobus solfataricus*, *Escherichia coli*

For citation: Kazlovskiy I. S., Zinchenko A. I. Construction of a strain-producer of the chimeric protein consisting of RNA polymerase and a DNA-affinity domain. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 5, pp. 601–607 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-601-607>

Введение. В настоящее время для получения лекарственных препаратов пептидной или белковой природы (интерферонов, антигенов, антител, гормонов) широко применяется биотехнология на основе генетической инженерии (выделение и клонирование генов, получение кДНК, введение генов в чужеродные про- или эукариотические клетки, экспрессия гетерологичных белков). Несмотря на значительные достижения, этот подход имеет существенные ограничения: не все гены экспрессируются в «чужом окружении» из-за несоответствия элементов регуляции

реципиентных клеток и донорских генов; пока не удалось достичь экспрессии полицистронных мРНК; не происходит посттрансляционная модификация и формирование нативной структуры протеинов высших эукариот в бактериальных клетках.

В качестве альтернативы канонической генно-инженерной технологии получения хозяйственно важных белков ряд исследовательских групп начали использовать для протеинового синтеза бесклеточные системы [1; 2]. Реакционная смесь для бесклеточного синтеза белка – открытая система без физических барьеров, таких как клеточная мембрана. Выход конечного продукта зависит от концентрации каждого компонента, которую можно варьировать в широких пределах, в отличие от ситуации *in vivo*, т. е. варианта с использованием целых клеток. При этом конечная концентрация белка достигает более 2 мг/мл [3].

Система бесклеточного синтеза белка предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы, функционально важные белки и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенная генетическая информация (ДНК и мРНК) при этом удаляется. По сравнению с системами, основанными на целых клетках, бесклеточные системы обладают рядом преимуществ. Среди них можно выделить:

продукцию исключительно целевого белка, что кардинально облегчает процедуру его выделения и очистки;

возможность синтеза токсичных для клеток белков;

возможность решать проблему агрегации целевого белка путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе.

Процедура бесклеточного синтеза белка включает в себя все основные стадии, типичные для синтеза белка в целых клетках, такие как транскрипция и трансляция. Для осуществления транскрипции *in vitro* чаще применяется метод с использованием РНК-полимераз *Escherichia coli*. Данные РНК-полимеразы являются сайт-неспецифическими и начинают синтез РНК на ДНК с общих прокариотических промоторов [4].

Транскрипция эукариотических генов происходит только при участии эукариотических РНК-полимераз, которые начинают транскрипцию с эукариотических промоторов. Однако указанные РНК-полимеразы не подходят для использования в бесклеточных системах из-за неспецифического синтеза РНК [5]. При необходимости получения значительного количества специфической мРНК, желательно использовать транскрипционную систему, способную инициировать процесс транскрипции и прекращать его в определенных сайтах на матричной ДНК.

Ряд исследователей используют в таких случаях специфические РНК-полимеразы бактериофагов, например, РНК-полимеразу бактериофага Т7 (далее Т7-РНК-полимераза). Она эффективно начинает транскрипцию ДНК с Т7-промотора и заканчивает ее на Т7-терминаторе [6].

Т7-РНК-полимераза относится к односубъединичным ДНК-зависимым РНК-полимеразам. Она характеризуется более высокой скоростью синтеза мРНК и более низкой частотой ошибок, по сравнению с мультиферментными комплексами прокариотических и эукариотических РНК-полимераз. Несмотря на относительно маленький размер (около 99 кДа), этот фермент способен транскрибировать полный геном без каких-либо дополнительных белковых факторов [7; 8]. Относительная простота, общедоступность и высокая специфичность сделали Т7-РНК-полимеразу подходящей моделью для изучения молекулярных механизмов транскрипции и применение ее в постановке реакций бесклеточного синтеза белка.

Ранее в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси был получен рекомбинантный штамм *E. coli*, продуцирующий Т7-РНК-полимеразу [9]. Однако данный фермент, как и многие полимеразы, может вносить мутации в продукт своего синтеза, и для оптимальной работы системы бесклеточного синтеза требуется внесение большого количества фермента. В связи с этим для уменьшения частоты ошибок при транскрипции и количества добавляемого фермента, нами было решено пришить к Т7-РНК-полимеразе ДНК-аффинный домен Sso7d термофильной бактерии *Sulfolobus solfataricus*, который повышает специфичность присоединения РНК-полимераз к ДНК и, тем самым, способствует снижению частоты вводимых ошибок при синтезе мРНК [10].

Домен Sso7d представляет собой небольшой белок (7 кД), способный прочно связываться с двухцепочечной ДНК без каких-либо предпочтений в отношении ее первичной структуры. Создание химерного белка, включающего аффинный домен Sso7d и ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus*, показало, что ДНК-полимераза приобрела свойство плавного скольжения по матрице. Связывание аффинного домена с этой ДНК-полимеразой не изменило ее структуру и каталитические свойства фермента [10].

Нам представляется, что вышеуказанные полезные свойства ДНК-аффинного домена Sso7d можно использовать и для улучшения качественных характеристик не изученной ранее в этом отношении Т7-РНК-полимеразы. В частности, можно предполагать, что модифицированная аналогичным образом Т7-РНК-полимераза будет характеризоваться более высокой производительностью, что, в свою очередь, может привести к сокращению времени синтеза соответствующих продуктов и затрат фермента.

Настоящая работа посвящена созданию штамма *E. coli*, продуцирующего новый химерный белок, представляющий собой Т7-РНК-полимеразу, дополненную ДНК-аффинным доменом Sso7d *S. solfataricus*, а также получение высокоочищенного препарата фермента с использованием металло-аффинной хроматографии.

Материалы и методы исследования. Источником гена Т7-РНК-полимеразы (*t7p07*; GenBank ID: M38308.1) служила ДНК бактериофага Т7, выделенная из вирусной биомассы с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе последовательностей гена Т7-РНК-полимеразы: прямой *t7p07-F* (5'-gtggtggtccacaacatgaacacgattaacatcg-3') и обратный – *t7p07-R* (5'-ggtgatggtgatgctccgcgaacgcaag-3'). На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде рЕТ42а+ (Novagen, США). Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 55 °С; 30 с при 72 °С) – финальная элонгация 75 с при 72 °С. На втором этапе линейаризовали плазмиду рЕТ42а+ методом ПЦР с использованием Diamant-ДНК-полимеразы (Институт микробиологии НАН Беларуси) и двух праймеров: прямой рЕТ42а-F (5'-catatg-tatatctctctctaaagttaaacaaaattattctagag-3') и обратный рЕТ42а-R (5'-gagcatcaccatcaccaccaccacta-attg-3'). Амплификацию вектора осуществляли по программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 30 циклов амплификации (10 с при 98 °С, 15 с при 55 °С, 3 мин при 72 °С) – финальная элонгация 3 мин и 25 с при 72 °С. На третьем этапе проводили клонирование нуклеотидной последовательности, кодирующей ДНК-аффинный домен *SSO_RS12375* (Gene ID: 1454006) из плазмиды, полученной ранее в лаборатории молекулярной биотехнологии [11]. На четвертом этапе собирали линейаризованный вектор и целевые гены методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [12; 13] по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °С) – 16 циклов амплификации (10 с при 98 °С; 15 с при 50 °С; 4 мин при 72 °С) – финальная элонгация 5 мин при 72 °С. На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы фрагменты, полученные на первых трех этапах, в эквимольных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL(DE3) (Novagen, США) с последующим высевом на плотную селективную питательную среду LB с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки ДНК», часть одиночной колонии отбирали при помощи стерильного наконечника и вносили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgCb, 0,02 % Твин-20, смесь четырех канонических дНТФ (каждого в концентрации 0,2 мМ) и 1 ед Diamant-ДНК-полимеразы [11]. В качестве ДНК-затравки использовали праймеры (по 10 пмоль) к последовательности Т7-промотора (прямой Т7р-F 5'-taatacgaactcactataggg-3') и к последовательности, кодирующей Т7-РНК-полимеразу (обратный *t7p07-R*). ПЦР проводили по следующей программе: этап начальной денатурации 2 мин при 94 °С – 25 циклов амплификации (30 с при 94 °С; 15 с при 55 °С; 1 мин при 72 °С) – финальная элонгация 2 мин при 72 °С.

Клетки-трансформанты выращивали в LB-среде с добавлением канамицина с конечной концентрацией 80 мкг/мл до оптической плотности 0,6 ($\lambda = 600$ нм), затем проводили индукцию синтеза белка 0,5 мМ изопропил- β -тиогалактопиранозидом и продолжали культивирование в течение 3 ч. Анализ процентного содержания целевого белка проводили в программе ImageLab (BioRad, США). По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и 20 мМ имидазол. Ультразвуковую дезинтеграцию клеток проводили в приборе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4 °С; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат осветляли центрифугированием при 60 000 g в течение 30 мин. Супернатант клеточного лизата наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni-NTA (Qiagen, США). Белок элюировали 50 мМ фосфатным буфером (pH 8,0), содержащим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазол. Полученные в результате аффинной хроматографии образцы анализировали с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок (названный нами «Sso7d-T7-РНК-полимераза»), объединяли и диализовали против 100-кратного объема 50 мМ Трис-НСl-буфера (pH 8,0), содержащего 100 мМ NaCl, 20 мМ β -меркаптоэтанол, 0,1 % Тритон X-100 и 50 % глицерин.

РНК-полимеразную активность химерного белка определяли в реакционной смеси, содержащей 20 мМ Трис-НСl-буфер (pH 8,0), 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ дитиотреитол, каждый из четырех природных нуклеозидтрифосфатов в концентрации 0,5 мМ. Ход реакции контролировали с помощью агарозного гель-электрофореза. За единицу активности фермента принимали такое количество, которое обеспечивало образование 1 нмоль продукта за 1 мин в соответствующих условиях реакции.

Результаты и их обсуждение. Основным компонентом реакционной смеси для осуществления бесклеточного синтеза белка является ДНК-зависимая РНК-полимераза. Ранее нами была получена рекомбинантная Т7-РНК-полимераза, слитая с октагистидиновым олигопептидом, позволяющим упростить процедуру выделения фермента из клеточного лизата [9]. Для повышения специфичности связывания с ДНК, а тем самым и повышения активности Т7-РНК-полимеразы,

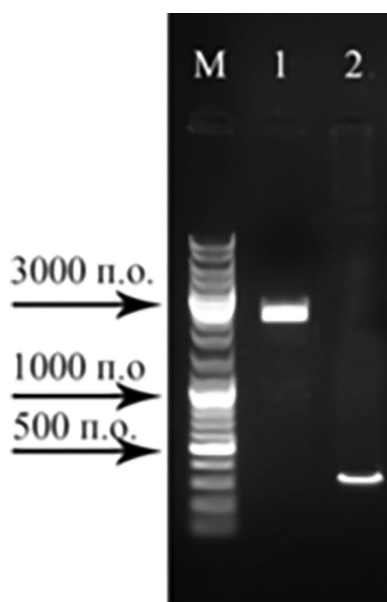


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации генов *t7p07* (1) и *SSO_RS12375* (2). М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 1. Electrophoregram of amplified fragments of genes *t7p07* (1) and *SSO_RS12375* (2). М – DNA molecular size markers

было решено удлинить молекулу этого фермента на ДНК-аффинный Sso7d-домен *S. solfataricus*. Клонирование генов проводили с помощью ПЦР. Продукты амплификации генов анализировали при помощи электрофоретического разделения в 1 %-ном агарозном геле. Как следует из рис. 1, размеры полученных фрагментов соответствовали теоретически рассчитанным.

Затем проводили постановку ПП-ПЦР, которая, в отличие от стандартной ПЦР, требует наличия в векторе и вставке перекрывающихся комплементарных участков, добавляемых на стадии клонирования целевых генов.

Как известно, при проведении ПП-ПЦР [12; 13] вставка с вектором образуют смесь линейных конкатемеров, содержащих различное количество повторов «вставка-вектор». Данной смесью высокомолекулярных линейных молекул трансформируются клетки-реципиенты, в которых происходит формирование нескольких кольцевых молекул – плазмид, несущих в себе целевой ген.

Таким образом, ген *SSO_RS12375*, кодирующий Sso7d-домен, и ген *t7p07*, кодирующий Т7-РНК-полимеразу, были встроены в плазмиду рЕТ42a+ под контролем сильного Т7-промотора. К гену *t7p07* с 3'-конца кодирующей цепи была добавлена дополнительная нуклеотидная последовательность, кодирующая октагистидиновый олигопептид, выполняющий роль домена, аффинного к Ni-NTA-смоле. Полученной конструкцией транс-

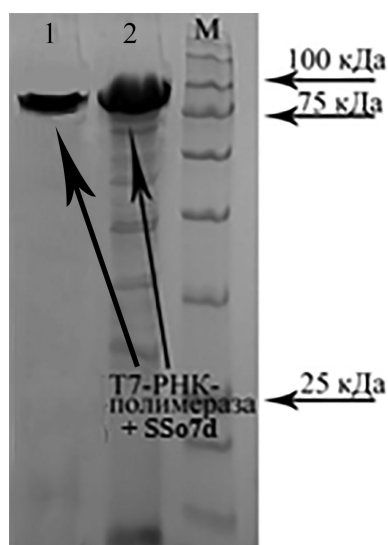


Рис. 2. Электрофореграмма в ДСН-полиакриламидном геле химерного белка после (1) и до (2) выделения из клеток *E. coli* pet42-T7S. М – маркерные белки с известной молекулярной массой

Fig. 2. SDS-PAGE image of chimera protein after (1) and before (2) isolation from *E. coli* pet42-T7S cell lysate. M – protein molecular weight markers

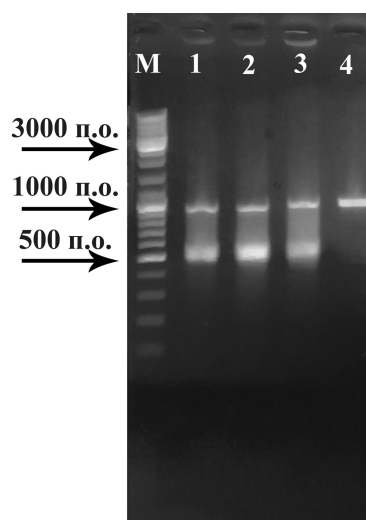


Рис. 3. Электрофореграмма транскриптов, полученных под действием: 1 – коммерческой Т7-РНК-полимеразы; 2 – Т7-РНК-полимеразы, полученной ранее авторами; 3 – Sso7d-Т7-РНК-полимеразы; 4 – реакционная смесь без внесения фермента. М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 3. Electropherogram of transcripts received under the influence of enzymes: 1 – commercial T7 RNA polymerase; 2 – T7 RNA polymerase, received earlier by authors; 3 – Sso7d T7 RNA polymerase; 4 – negative control; M – DNA molecular size markers

формировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3), в результате чего был создан новый штамм, названный *E. coli* pet42-T7S. Клетки этого штамма продуцируют химерный белок, состоящий из ДНК-аффинного домена Sso7d *S. solfataricus* и Т7-РНК-полимеразы, и содержащий при этом на С-конце дополнительный октагистидиновый олигопептид.

На рис. 2 представлены результаты ДСН-полиакриламидного геле-электрофореза белков в лизате клеток *E. coli* pet42-T7S. Видно, что клетки анализируемого штамма способны после соответствующей индукции нарабатывать белок с молекулярной массой около 99 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной величине.

На следующем этапе работы проводили очистку химерного белка методом аффинной хроматографии на смоле Ni-NTA. При этом следует подчеркнуть, что добавление к рамке считывания гена *t7p07* дополнительной нуклеотидной последовательности, кодирующей октагистидиновый олигопептид, позволило получить высокоочищенный препарат белка с выходом 60 %. При этом чистота ферментного препарата составила более 95 % (рис. 2). В результате из 1 л культуральной жидкости было получено 50 мг очищенного фермента с активностью 80 ед/мкг белка.

В результате экспериментов было установлено, что белок способен синтезировать матричную РНК *in vitro* (рис. 3).

В плане обсуждения результатов, следует отметить, что полученный в настоящем исследовании штамм-продуцент Т7-РНК-полимеразы превосходит лучший из известных продуцентов этого фермента [14] по продуктивности (625 ед/л против 190 ед/л культуральной жидкости), но не по удельной активности изолированного фермента (80 ед/мкг белка против 210 ед/мг белка).

Заключение. Впервые сконструирована генетическая конструкция, включающая в себя ген бактериофага Т7, ответственный за экспрессию РНК-полимеразы, и нуклеотидную последовательность, кодирующую ДНК-аффинный домен Sso7d термофильной бактерии *S. solfataricus*, выделенные методом ПЦР и встроенные в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* BL21 (DE3), что привело к созданию нового рекомбинантного штамма *E. coli* pet42-T7S – продуцента химерной Sso7d-Т7-РНК-полимеразы, содержащей окта-

гистициновый олигопептид на С-конце молекулы. Такая первичная структура фермента позволяет выделять его из клеточного лизата в одну стадию с использованием металло-аффинной хроматографии на смоле Ni-NTA.

Штамм продуцент Sso7d-T7-РНК-полимеразы был охарактеризован по продуцирующей способности в отношении синтезируемого фермента, составляющей 625 ед/л культуральной жидкости, а также рассчитана удельная активность выделенного фермента, которая составила 80 ед/мкг белка. Полученный фермент предназначен для использования в качестве инструментария при синтезе белков в бесклеточной системе.

Список использованных источников

1. Bundy, B. C. *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles / B. C. Bundy, M. J. Franciszkowicz, J. R. Swartz // *Biotechnol. Bioeng.* – 2008. – Vol. 100, N 1. – P. 28–37. <https://doi.org/10.1002/bit.21716>
2. Bundy, B. C. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles / B. C. Bundy, J. R. Swartz // *J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 154, N 4. – P. 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.011>
3. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis / M. T. Smith [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2012. – Vol. 28, N 2. – P. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>
4. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes / N. T. Hovijitra [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol. 104, N 1. – P. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
5. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode / V. Georgi [et al.] // *Lab. Chip.* – 2016. – Vol. 16, N 2. – P. 269–281. <https://doi.org/10.1039/c5lc00700c>
6. Caschera, F. Preparation of amino acid mixtures for cell-free expression systems / F. Caschera, V. Noireaux // *Biotechniq.* – 2015. – Vol. 58. – P. 40–43. <https://doi.org/10.2144/000114249>
7. Roberts, J. W. Termination factor for RNA synthesis / J. W. Roberts // *Nature.* – 1969. – Vol. 224, N 5225. – P. 1168–1174. <https://doi.org/10.1038/2241168a0>
8. Studier, F. W. T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli* / F. W. Studier // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 124, N 1. – e63. <https://doi.org/10.1002/cpmb.63>
9. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента РНК-полимеразы бактериофага Т7 / И. С. Казловский [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты.* – Минск: Беларуская навука, 2016. – Т. 8. – С. 72–81.
10. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro* / Y. Wang [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, N 3. – P. 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
11. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction / A. S. Korovashkina [et al.] // *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / eds. S. D. Varfolomeev, G. E. Zaikov, L. P. Krylova. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2012. – P. 1–5.
12. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, N 7. – e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
13. You, C. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* / C. You, X. Z. Zhang, Y. H. P. Zhang // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78, N 5. – P. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/aem.07105-11>
14. Construction and expression of a modular gene encoding bacteriophage T7 RNA polymerase / N. Arnaud [et al.] // *Gene.* – 1997. – Vol. 199, N 1–2. – P. 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00362-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00362-4)

References

1. Bundy B. C., Franciszkowicz M. J., Swartz J. R. *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, vol. 100, no. 1, pp. 28–37. <https://doi.org/10.1002/bit.21716>
2. Bundy B. C., Swartz J. R. Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *Journal of Biotechnology*, 2011, vol. 154, no. 4, pp. 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.011>
3. Smith M. T., Varner C. T., Bush D. B., Bundy B. C. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress*, 2012. vol. 28, no. 2, pp. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>
4. Hovijitra N. T., Wu J. J., Peaker B., Swartz J. R. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, vol. 104, no. 1, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
5. Georgi V., Georgi L., Blechert M., Bergmeister M., Zwanzig M., Wüstenhagen D. A., Bier F. F., Jung E., Kubick S. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16, no. 2, pp. 269–281. <https://doi.org/10.1039/c5lc00700c>
6. Caschera F., Noireaux V. Preparation of amino acid mixtures for cell-free expression systems. *Biotechniques*, 2015, vol. 58, no. 1, pp. 40–43. <https://doi.org/10.2144/000114249>
7. Roberts J. W. Termination factor for RNA synthesis. *Nature*, 1969, vol. 224, no. 5225, pp. 1168–1174. <https://doi.org/10.1038/2241168a0>

8. Studier F. W. T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2018, vol. 124, no. 1, e63. <https://doi.org/10.1002/cpmb.63>
9. Kazlovskii I. S., Pymko A. N., Kvach S. V., Zinchenko A. I. Construction of *Escherichia coli* strain, producing bacteriophage T7 RNA polymerase. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty* [*Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects*]. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2016, vol. 8, pp. 72–81 (in Russian).
10. Wang Y., Prosen D. E., Mei L., Sullivan J. C., Finney M., Vander Horn P. B. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, no. 3, pp. 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
11. Korovashkina A. S., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction. Varfolomeev S. D., Zaikov G. E., Krylova L. P. (eds.). *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development*. New York, Nova Science Publishers, Inc., 2012, pp. 1–5.
12. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
13. You C., Zhang X. Z., Zhang Y. H. P. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, no. 5, pp. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/aem.07105-11>
14. Arnaud N., Cheynet V., Oriol G., Mandrand B., Mallet F. Construction and expression of a modular gene encoding bacteriophage T7 RNA polymerase. *Gene*, 1997, vol. 199, no. 1–2, pp. 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00362-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00362-4)

Информация об авторах

Казловский Илья Сергеевич – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonardo_139@mail.ru.

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.

Information about the authors

Kazlovskiy Il'ya Sergeevich – Master of Biology, Junior researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonardo_139@mail.ru.

Zinchenko Anatoliy Ivanovich – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.