

СТАТЬИ

УДК 577.217

**ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА
ДНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T7
ДЛЯ СИНТЕЗА РНК *IN VITRO***

¹Захарова М.В., ^{1,2}Нагорных М.О.

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пушchino;
²АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, e-mail: derbanner@gmail.com

Развитие технологий получения и доставки искусственных молекул РНК в течение трех последних десятилетий привело к активному биомедицинскому использованию мРНК, в том числе в качестве вакцин. Успешное применение РНК-вакцин против инфекционных заболеваний требует соответствующих объемов синтеза РНК *in vitro* при переходе от лабораторных к промышленным масштабам. Для синтеза РНК *in vitro* необходим ряд химических компонентов реакционной смеси, а также ферменты, обеспечивающие искусственный синтез, кеппирование и полиаденилирование РНК. Одним из ключевых ферментов при получении мРНК *in vitro* является ДНК-зависимая РНК-полимераза, поскольку обладает высокой каталитической активностью и продуктивностью синтеза РНК. Наибольшее распространение в лабораторной практике получили ДНК-зависимые РНК-полимеразы бактериофагов, в частности ДНК-зависимая РНК-полимераза фага T7. Большие объемы синтеза РНК *in vitro* требуют значительных количеств этого фермента. Наилучшие результаты продукции ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 можно достичь при использовании бактериального продуцента. Для синтеза РНК *in vitro* так же важно получать препараты фермента удовлетворительного качества с минимальными стадиями очистки. Именно поэтому препаративное получение ДНК-зависимой РНК-полимеразы, а также оптимизация этого фермента являются важной задачей при масштабировании синтеза РНК *in vitro* для биотехнологических и терапевтических целей.

Ключевые слова: РНК, ДНК-зависимая РНК-полимераза, транскрипция *in vitro*

**RECOMBINANT EXPRESSION OF T7 RNA POLYMERASE
IN *E. COLI* STRAIN FOR RNA SYNTHESIS *IN VITRO***

¹Zakharova M.V., ^{1,2}Nagornykh M.O.

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Puschino;
²Sirius University of Science and Technology, Sochi, e-mail: derbanner@gmail.com

The development of technologies for the production and delivery of artificial RNA molecules over the past three decades has led to an active biomedical use of mRNA. Successful use of RNA vaccines against infectious diseases requires appropriate volumes of *in vitro* RNA synthesis when moving from laboratory to industrial scales. Synthesis of RNA *in vitro* requires a number of chemical components of the reaction mixture, as well as enzymes that ensure the synthesis, capping, and polyadenylation of RNA. One of the key enzymes in the production of mRNA *in vitro* is DNA-dependent RNA polymerase. The most widely used in laboratory practice are DNA-dependent RNA polymerases of bacteriophages, because it has a high catalytic activity and productivity of RNA synthesis, in particular DNA-dependent RNA polymerase of T7 phage. Large volumes of *in vitro* RNA synthesis require significant amounts of this enzyme. The best results in the production of T7 DNA-dependent RNA polymerase can be achieved using a bacterial producer. For *in vitro* RNA synthesis, it is also important to obtain enzyme preparations of satisfactory quality with minimal purification steps. The preparative production of these enzymes, as well as their optimization, is an important task when scaling up *in vitro* RNA synthesis for biotechnological and therapeutic purposes.

Keywords: RNA, DNA-dependent RNA polymerase, *in vitro* transcription

Синтез одноцепочечных молекул РНК *in vitro* – широко используемая лабораторная процедура, которая активно используется как для научных задач по исследованию РНК, так и для получения терапевтических препаратов на основе РНК. Этот метод позволяет вносить модификации в РНК, а также адаптировать синтез РНК под разные задачи. Так, этот способ применим для биохимического и молекулярного анализа РНК, а также структурного анализа комплексов между РНК и белками. Кроме того, использование синтезированной *in vitro* РНК сыграло важную роль в разработке мРНК-вакцин, инструментов редактирования генома CRISPR/Cas9 и создании плюрипотентных стволовых клеток [1–5].

Основными ферментами для синтеза РНК *in vitro* являются ДНК-зависимые РНК-полимеразы вирусов бактерий (T7, T3, SP6), среди которых фермент из T7 бактериофага (T7РНКП) является самым распространенным в практическом применении. Эти ферменты позволяют синтезировать РНК как в лабораторных условиях, так и на производстве. В качестве матриц для синтеза могут быть использованы либо фрагменты ДНК, полученные в ходе ПЦР, либо линейаризованные плазмиды, содержащие целевую последовательность под контролем T7-промотора. Использование T7РНКП для синтеза РНК позволяет кеппировать ее искусственными кепп-аналогами в процессе ко-транскрипционного кеппирования [6]. Од-

нако для масштабирования синтеза РНК *in vitro* и воспроизведения технологий, лежащих в основе производства мРНК-вакцин, необходимо получить штамм-продуцент Т7РНКП для получения работоспособных препаратов этого фермента. Ранее были предложены схемы продукции Т7РНКП на основе коммерческих векторов, где индукция осуществляется с помощью ИПТГ, что экономически невыгодно при переходе к большим объемам на ферментерах [7–9]. Поэтому для масштабного получения этого фермента необходим бактериальный штамм-продуцент с подходящим селекционным маркером и недорогим индуктором. В качестве экспериментальной попытки улучшить процессивность Т7РНКП мы модифицировали фермент, получив химерный белок, состоящий из Т7РНКП и белка Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*.

В данной работе мы получили штамм-продуцент *E. coli*, несущий экспрессионный вектор для высокой продукции Т7РНКП, а также подобрали оптимальные условия экспрессии и очистки этого фермента для дальнейшего использования в отработке технологии производства терапевтических препаратов на основе мРНК. Также мы создали химерный белок, состоящий из белка Sso7d, повышающего процессивность ДНК-связывающих белков, и Т7РНКП, чтобы далее исследовать влияние на продуктивность синтеза РНК *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Получение генетических конструкций

Нуклеотидные последовательности, кодирующие Т7РНКП и белок Sso7d, синтезировали *de novo* из олигонуклеотидов. Далее фрагменты ДНК, соответствующие Т7РНКП и белку Sso7d, амплифицировали ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB) и олигонуклеотидов, содержащих уникальные сайты рестрикции NdeI и NotI (NEB). Также во время работы ДНК-фрагмента ПЦР добавляли нуклеотидную последовательность, кодирующую шесть гистидинов (6His) на С-конце Т7РНКП для дальнейшей аффинной очистки фермента. После этого фрагменты были очищены через агарозный гель набором для экстракции из агарозы (Евроген). Очищенные препараты ДНК-фрагментов были использованы в реакции рестрикции обеими эндонуклеазами рестрикции (37°C, 1 ч), после чего следовала стадия переосаждения ДНК (3М ацетат натрия, 96% этанол) центрифугированием на максимальных оборотах настольной миницентрифуги (Eppendorf Minispin). Экспрессионный вектор pSOL (Lucigen) также гидролизировали

двумя эндонуклеазами рестрикции NdeI и NotI (NEB) в течение 3 ч, а далее очищали через агарозу. Реакцию лигирования проводили при 22°C в течение 1 ч при помощи ДНК-лигазы T4, а затем лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen). Чашки Петри с агаризованной средой LB и канамицином инкубировали в течение 12 ч при 37°C до появления единичных колоний. На следующий день проводили ПЦР анализ отдельных колоний на содержание вставки, из положительных колоний выделяли плазмидную ДНК и секвенировали. Плазмиды с корректными вставками нарабатывали, выделяли и трансформировали экспрессионные штаммы *E. coli*, предназначенные для продукции рекомбинантных белков.

Экспрессия Т7РНКП в клетках *E. coli*

Для проведения экспериментов по экспрессии рекомбинантной Т7РНКП использовали две микробиологические среды: LB (10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л хлорид натрия) и 2YT (16 г/л триптон, 10 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л хлорид натрия). Для проверки экспрессии использовались следующие штаммы: KRX (Promega); Rosetta gami 2 (Novagen); BL21 DE3 (Invitrogen); *E. coli* 10G (Lucigen). Ниже приведены генотипы этих штаммов.

***E. coli* 10G:** *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara, leu)7697galU galK rpsL nupG λ- tonA (StrR)*

BL21(DE3): *F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)*

Rosetta gami 2: *Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuIIphoRaraD139ahpCgalEgalKrpSL (DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (CamR, StrR, TetR)*

KRX: *[F', traD36, ΔompP, proA+B+, lacIq, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nalr), thi-1, hsdR17 (rk-, mk+), e14- (McrA-), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase.*

Реципиентные штаммы *E. coli*, предназначенные для продукции рекомбинантных белков трансформировали полученными генетическими конструкциями. Трансформационную смесь высевали на чашки Петри с агаризованной средой и селективным антибиотиком и инкубировали ночь при 37°C до появления единичных колоний. Далее единичной колонией инокулировали 5 мл жидкой питательной среды с антибиотиком (канамицин, 30 мкг/мл) и растили ночь при 37°C на шейкере (Eppendorf Innova, 180 об/мин). На следующий день ночной культурой заражали жидкую питательную среду в качалочных колбах (1/10 объема) и подращивали при 37°C до оптической

плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$ единиц. Далее в колбы добавляли рамнозу (0,05–0,2%) в качестве индуктора экспрессии и инкубировали клеточную культуру при разных температурах (от 28°C до 37°C) до оптической плотности $OD_{600} = 1-1,2$. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин при 4°C.

Выделение и очистка Т7РНКП

Биомассу ресуспендировали в буфере для нанесения 50 mM калий-фосфатного буфера pH 7,6, 300 mM NaCl, 5mM имидазола на льду. Далее бактериальные клетки разрушали ультразвуком во льду до просветления суспензии. Полученный лизат центрифугировали (10000 g, 40 мин при 4°C) до осаждения клеточного дебриса и визуального просветления супернатанта. Супернатант осторожно отбирали и хранили на льду до нанесения на хроматографическую колонку. Аликвоту супернатанта и клеточного дебриса отбирали для дальнейшего электрофоретического анализа. Полученный супернатант наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA, предварительно промытую буфером (50 mM калий-фосфатного буфера pH 7,6, 300 mM NaCl, 5 mM имидазола). Связавшийся с сорбентом белок элюировали градиентом концентрации имидазола (25–500 mM) в том же буфере. Фракции, содержащие максимальный уровень белка, объединяли и диализовали против буфера для хранения (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl) с глицерином на -20°C. Для избежания деградации РНК рибонуклеазами все растворы готовились на воде, обработанной DEPC. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по стандартной методике Лэммли. Для белкового электрофореза в денатурирующих условиях использовался 8–12% ПААГ. К белковому препарату добавлялся двукратный объем буфера для нанесения (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 2% меркаптоэтанол, 16% глицерин, 0,05% бромфеноловый синий), раствор тщательно перемешивали и выдерживали в кипящей водяной бане в течение 5 мин. Окраску геля проводили с использованием Кумасси бриллиантового синего R-250. Для электрофореза использовали в трис-глициновый буфер (10x 1% SDS 0,25 M Tris-OH и 1,8 M глицин) на приборе фирмы Bio-Rad (США).

Постановка реакции транскрипции *in vitro*

ДНК-матрицу, содержащую последовательность Т7-промотора (ДНК-фрагмент после ПЦР или линейаризованная плазмида), перед постановкой реакции очищали через агарозный гель набором для экстракции из агарозы (Евроген). Реакционная смесь

объемом 20 мкл содержала следующие компоненты: 50 нг/мкл ДНК, 2 mM rNTPs, 1x транскрипционный буфер (40 mM TrisHCl pH 8,6 mM MgCl₂, 5 mM DTT), 0,2 мкг/мкл Т7РНКП. Реакцию транскрипции *in vitro* проводили при 37°C в течение 1 ч. Продукты ферментативной реакции анализировали при помощи агарозного электрофореза в денатурирующих условиях.

Результаты исследования и их обсуждение

Использование искусственных мРНК в терапевтических целях имеет огромный потенциал, что показало недавнее широкое применение мРНК вакцин [1, 2]. Синтез РНК *in vitro* в лабораторных и промышленных условиях осуществляется ДНК-зависимыми РНК-полимеразами бактериофагов, в частности бактериофага Т7. Фермент Т7РНКП является односубъединичным глобулярным белком с молекулярной массой около 100 кДа. Этот фермент специфично связывается с последовательностью ДНК Т7-промотора (23 нуклеотида), что обеспечивает дальнейший синтез РНК с ДНК-матрицы *in vitro*. Таким способом могут быть синтезированы молекулы РНК длиной от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов. Продуктивность таких реакций транскрипции *in vitro* может достигать миллиграммовых количеств. Оптимизация реакции транскрипции *in vitro* является важной задачей как с точки зрения повышения качества итоговой РНК, так и продуктивности самой реакции [10]. Ранее было показано, что белок Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*, ковалентно сшитый с ДНК-полимеразами, увеличивает их процессивность *in vitro* [11]. Авторы утверждают, что подобная стратегия по увеличению сродства к ДНК может быть применима к любому ДНК-связывающему ферменту, поэтому мы решили получить химерный белок, в котором Sso7d и Т7РНКП связаны гибким линкером, для дальнейшего исследования влияния Sso7d на процессивность Т7РНКП и продуктивность синтеза РНК *in vitro*.

Для создания штамма-продуцента Т7РНКП и химерного белка Sso7d-Т7РНКП была использована коммерческая экспрессионная система, контроль над продукцией рекомбинантных белков в которой происходит за счет рамнозного промотора (pSOL, Lucigen). Благодаря этому промотору можно проводить тонкую настройку экспрессии рекомбинантного белка с помощью титрования рамнозой. Также использование этой экспрессионной системы позволяет снизить количество белковых молекул с неправильной укладкой, которые в итоге формируют

нерастворимые агрегированные частицы (тельца включения). Это свойство экспрессионного вектора pSOL дает преимущество при продукции сложных белковых молекул, склонных к агрегации, например, таких как химерные белки из разных полипептидных цепей, соединенных ковалентно. Одновременно с этим вектор pSOL имеет малый размер и подходящий для крупных наработок фермента селекционный маркер (канамицин). Дополнительные терминаторы транскрипции предотвращают сквозную транскрипцию в плазмиде, что дополнительно стабилизирует вставку.

На первом этапе работы мы синтезировали ДНК-последовательности, кодирующие T7PHKP и белок Sso7d *de novo* из олигонуклеотидов. Далее при помощи ПЦР мы синтезировали последовательность ДНК, кодирующую химерный белок Sso7d-T7PHKP, где две полипептидные цепи были соединены через гибкий аминокислотный мостик (GGGSGGGSGGG). Итоговый расчетный размер химерного белка составляет 108 кДа. После этого полученные фрагменты ДНК были клонированы в экспрессионный вектор pSOL по уникальным сайтам, как описано выше. В результате были получены генетические конструкции, кодирующие T7PHKP (рис. 1, а) и химерный белок Sso7d-T7PHKP (рис. 1, б) под контролем рамнозного промотора.

Далее мы провели сравнительный анализ продукции обоих белков в четырех разных экспрессионных штаммах *E. coli*, оптимизированных для получения рекомбинантных белков: KRX (Promega); Rosetta gami 2 (Novagen); BL21 DE3 (Invitrogen); *E. coli* 10G (Lucigen). По результатам пробных наработок ферментов лучший результат был в штамме BL21 DE3 (рис. 2).

Остальные штаммы показали значительно более низкую продукцию белков,

поэтому дальнейшая отработка условий наработки ферментов проводилась на штамме BL21 DE3. Итоговые условия для лучшей продукции обоих функционально-активных ферментов включают такие факторы, как: а) среда для культивирования 2YT; б) температура культивирования до индукции 37°C, температура культивирования после индукции 37°C; в) оптическая плотность культуры до индукции 0,5–0,6 ОЕ, а концентрация рамнозы в качестве индуктора – 0,2%; г) экспрессионный штамм BL21 DE3. Типовой результат оптимальной продукции этих белков показан на рис. 3.

Очистка T7PHKP осуществлялась с помощью аффинного сорбента Ni-NTA (Qiagen). Бактериальные клетки после осаждения из культуральной жидкости ресуспендировали в буфере для нанесения на хроматографическую колонку и разрушали с помощью ультразвука, а полученную суспензию осветляли центрифугированием. После этого супернатант наносили на хроматографическую колонку с сорбентом и элюировали связанный белок градиентом концентрации имидазола. Все процедуры детально описаны в разделе «Материалы и методы исследования». Точно так же выделяли химерный белок Sso7d-T7PHKP. В условиях эксперимента химерный белок практически весь находился в растворимой фракции, что может указывать на корректный фолдинг как белка Sso7d, так и T7PHKP в составе одной полипептидной цепи. Таким образом, можно предполагать, что выбранный гибкий линкер позволяет двум белкам соседствовать в пространстве. После электрофоретического анализа собранных фракций часть из них объединялась и переводилась в буфер для хранения диализом. Полученные препараты имели чистоту от 90 до 95% и итоговый выход продуктов от 35 мг/л до 40 мг/л (рис. 3, а и б).

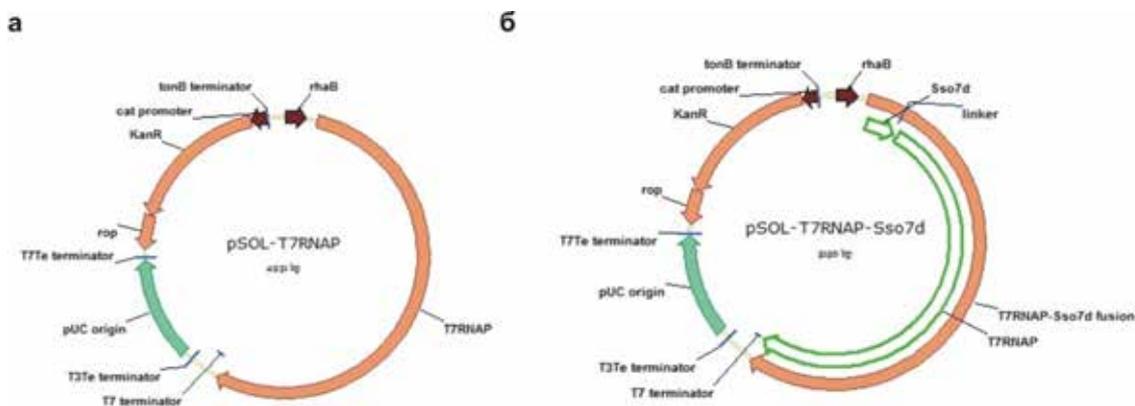


Рис. 1. а) Карта экспрессионного вектора для продукции T7PHKP под контролем рамнозного промотора; б) Карта экспрессионного вектора для продукции химерного белка Sso7d-T7PHKP под контролем рамнозного промотора



Рис. 2. Сравнительный анализ наработки белков T7RNKII (100 кДа) и Sso7d-T7RNKII (108 кДа) в четырех штаммах *E. coli*. Результат электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях, 5 мкл бактериальной культуры + 10 мкл буфера для нанесения (1–2 – T7RNKII и Sso7d-T7RNKII в штамме KRX; 3–4 – T7RNKII и Sso7d-T7RNKII в штамме Rosetta gami 2; 5–6 – T7RNKII и Sso7d-T7RNKII в штамме *E. coli* 10G; 7–8 – T7RNKII и Sso7d-T7RNKII в штамме BL21 DE3)

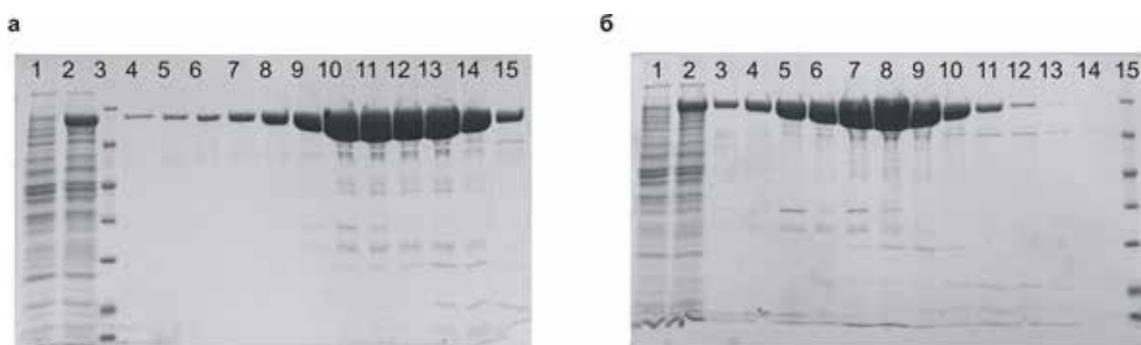


Рис. 3. а) Нарботка и очистка T7RNKII (1 – просок после нанесения на колонку, 2 – наносимый образец, 3 – маркер, 4–15 элюция градиентом имидазола). б) Нарботка и очистка химерного белка Sso7d-T7RNKII (1 – просок после нанесения на колонку, 2 – наносимый образец, 3–14 элюция градиентом имидазола, 15 – маркер)



Рис. 4. Электрофоретический анализ в агарозном геле продуктов реакции транскрипции *in vitro* с использованием коммерческого фермента T7RNKII Thermo Scientific (1), выделенного препарата T7RNKII (2–0,1 мкг/мкл фермента; 3–0,2 мкг/мкл фермента) и препарата химерного белка Sso7d-T7RNKII (4–0,1 мкг/мкл фермента; 5–0,2 мкг/мкл фермента)

Следующим этапом была проведена проверка активности полученных ферментов. Для этого при помощи ПЦР была получена ДНК-матрица, содержащая T7-промотор. После очистки фрагментов ДНК с использованием электрофореза в агарозном геле их использовали в реакции транскрипции *in vitro*, как описано в разделе «Материалы и методы исследования». Выделенная T7RNKII показала схожую активность в сравнении с коммерческим препаратом T7RNKII от компании Thermo Scientific. Химерный белок Sso7d-T7RNKII также продемонстрировал активный синтез РНК *in vitro*, однако каких-то существен-

ных преимуществ относительно T7RNKII не дал, по крайней мере в условиях предварительного эксперимента (рис. 4).

Ранее было показано, что для химер Sso7d и ДНК-полимераз наибольший преимущественный эффект наблюдался при синтезе ампликонов длиной до 10000 нуклеотидов [11–14], в нашем же случае использовались относительно короткие ДНК-матрицы (от 500 до 2000 нуклеотидов), что могло нивелировать разницу между процессивностью T7RNKII дикого типа и гибридного белка Sso7d-T7RNKII. Также возможно, что для демонстрации потенциального преимущества химерного белка необходима

оптимизация самой реакции синтеза РНК (концентрация ионов магния, концентрация нуклеотидов, время инкубации), что может быть предметом следующего исследования.

Заклучение

В данной работе был получен бактериальный продуцент Т7РНКП на основе штамма *E. coli* и экспрессионного вектора, подходящих для масштабных наработок этого фермента. В ходе экспериментов подобрали оптимальные условия для продукции и очистки Т7РНКП. Полученный препарат фермента по активности не уступает коммерческому и может быть использован в реакции синтеза РНК *in vitro* как для исследовательских задач в лабораторной практике, так и для терапевтического применения при изготовлении мРНК-вакцин. Также мы модифицировали фермент Т7РНКП в целях повышения синтеза РНК *in vitro* при помощи создания химерного белка с Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*, однако подбор оптимальных условий реакции для этого гибридного белка требует дальнейших экспериментов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF-193021X0001).

Список литературы

1. Qin S., Tang X., Chen Y. et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Sig Transduct Target Ther* 7. 2022. № 166. DOI: 10.1038/S41392-022-01007-W.
2. To K.K.W., Cho W.C.S. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. *Expert Opin Drug Discov*. 2021 Nov. No. 16 (11). P. 1307–1317. DOI: 10.1080/17460441.2021.1935859.
3. Hu Q., Zhao Y., Shaabani N., Lyu X., Powers C., Sun H., Cruz V., Stegman K., Xu J., Fossier A., Huang Y., Ho G., Kao Y., Wang Z., Wang Z., Hu Y., Zheng Y., Kyaw L., Zuluaga C., Wang H., Pei H., Allen R., Xie H., Ji H., Chen R. Chimeric mRNA-based COVID-19 vaccine induces protective immunity against Omicron and Delta variants. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 Dec 13. No. 30. P. 465–476. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.10.021.
4. Rohner E., Yang R., Foo K.S., Goedel A., Chien K.R. Unlocking the promise of mRNA therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2022 Nov. No. 40 (11). P. 1586–1600. DOI: 10.1038/s41587-022-01491-z.
5. Steinle H., Behring A., Schlensak C., Wendel H.P., Avci-Adali M. Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges. *Stem Cells*. 2017 Jan. No. 35 (1). P. 68–79. DOI: 10.1002/stem.2402.
6. Muttach F., Muthmann N., Rentmeister A. Synthetic mRNA capping. *Beilstein J Org Chem*. 2017 Dec 20. No. 13. P. 2819–2832. DOI: 10.3762/bjoc.13.274.
7. Rio D.C. Expression and purification of active recombinant T7 RNA polymerase from *E. coli*. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013. Nov 1. 2013. № 11. pdb.prot078527. DOI: 10.1101/pdb.prot078527.
8. Li Y., Wang E., Wang Y. A modified procedure for fast purification of T7 RNA polymerase. *Protein Expr Purif*. 1999 Jul. No. 16 (2). P. 355–8. DOI: 10.1006/prep.1999.1083.
9. Ellinger T., Ehrlich R. Single-step purification of T7 RNA polymerase with a 6-histidine tag. *Biotechniques*. 1998 May. No. 24 (5). P. 718–720. DOI: 10.2144/98245bm03. Erratum in: *Biotechniques* 1998 Oct. No. 25 (4). 640 p.
10. Beckert B., Masquida B. Synthesis of RNA by in vitro transcription. *Methods Mol Biol*. 2011. No. 703. P. 29–41. DOI: 10.1007/978-1-59745-248-9_3.
11. 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 Res*. 2004 Feb 18. No. 32 (3). P. 1197–1207. DOI: 10.1093/nar/gkh271.
12. Wu J., de Paz A., Zamft B.M., Marblestone A.H., Boyden E.S., Kording K.P., Tyo K.E.J. DNA binding strength increases the processivity and activity of a Y-Family DNA polymerase. *Sci Rep*. 2017 Jul 6. No. 7 (1). P. 4756. DOI: 10.1038/s41598-017-02578-3.
13. Oscorbin I.P., Wong P.F., Boyarskikh U.A., Khrapov E.A., Filipenko M.L. The attachment of a DNA-binding Sso7d-like protein improves processivity and resistance to inhibitors of M-MuLV reverse transcriptase. *FEBS Lett*. 2020 Dec. No. 594 (24). P. 4338–4356. DOI: 10.1002/1873-3468.13934.
14. Coulther T.A., Stern H.R., Beuning P.J. Engineering Polymerases for New Functions. *Trends Biotechnol*. 2019 Oct. No. 37 (10). P. 1091–1103. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.011.