

СТАТЬЯ

УДК 577.217

**ОЧИСТКА ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ
СИНТЕТИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ РНК, ПОЛУЧЕННЫХ *IN VITRO***

Захарова М.В., Нагорных М.О.

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

Получение синтетических мРНК для исследовательских и терапевтических целей в последние годы стало рутинной методологической процедурой. Однако для проведения эффективной реакции транскрипции *in vitro*, а также получения функционально-активной мРНК требуется оптимизация каждого компонента этой многостадийной реакции. На рынке существует ряд коммерческих наборов для синтеза РНК *in vitro*, которые оптимизированы для получения искусственных молекул мРНК, обладающих биологической активностью в клетке. Ферменты для синтеза и модификации РНК *in vitro* являются ключевыми компонентами, и получение чистых препаратов таких ферментов критически важно для дальнейшего применения технологий, базирующихся на синтетических РНК при разработке РНК вакцин, способах геномного редактирования, перепрограммирования клеток, а также заместительной терапии. В качестве основных ферментов синтеза РНК *in vitro* обычно используются ДНК-зависимые РНК-полимеразы из бактериофагов. Такие ферменты для модификации синтетических молекул РНК как поли(А)-полимераза и кэпирующие ферменты вирусного происхождения имеют широкое распространение в лабораторной и производственной практике при синтезе мРНК. Результатом настоящей работы стала отработка схем наработки и очистки препаратов ферментов для модификации синтетических молекул мРНК, получаемых *in vitro*.

Ключевые слова: поли(А)-полимераза, кэпирующий фермент, синтетические РНК

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

**PURIFICATION OF ENZYMES FOR MODIFICATION
OF SYNTHETIC RNA MOLECULES OBTAINED *IN VITRO***

Zakharova M.V., Nagornykh M.O.

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

The production of synthetic mRNAs for research and therapeutic purposes has become a routine methodological procedure in recent years. However, to perform an efficient *in vitro* transcription reaction and to obtain functionally active mRNA, optimization of each component of this multistep reaction is required. There are a number of commercial *in vitro* RNA synthesis kits on the market that are optimized for the production of artificial mRNA molecules that have biological activity in the cell. Enzymes for the synthesis and modification of RNA *in vitro* are key components, and obtaining pure preparations of such enzymes is critical for the further use of technologies based on synthetic RNA in the development of RNA vaccines, genome editing, cell reprogramming, and replacement therapy methods. DNA-dependent RNA polymerases from bacteriophages are usually used as the main enzymes for RNA synthesis *in vitro*. Enzymes for modifying synthetic RNA molecules such as poly(A) polymerase and capping enzymes of viral origin are widely used in laboratory and industrial practice during the synthesis of mRNA. The result of this work was the development of schemes for the production and purification of enzyme preparations for modifying synthetic mRNA obtained *in vitro*.

Keywords: poly(A)-polymerase, capping enzyme, synthetic RNA

The work was supported by the program of the Ministry of Higher Education and Science of the Russian Federation (agreement No. 075-10-2021-113, unique project number RF----193021X0001).

Использование синтетических мРНК в исследовательской деятельности, а также производство таких молекул в промышленных масштабах при создании РНК-вакцин позволяют решать различные научные и терапевтические задачи, мРНК-вакцины оказались одним из наиболее эффективных инструментов в борьбе с недавней пандемией [1]. Производство этих препаратов зависит от получения высококачественной мРНК, синтезируемой посредством транскрипции *in vitro* [2]. Основным ферментом синте-

за РНК *in vitro* является ДНК-зависимая РНК полимераза из бактериофага T7 [3, 4]. Транскрипция РНК *in vitro* осуществляется со специально подготовленной ДНК матрицы, которая перед целевой последовательностью, содержащей открытую рамку считывания, а также 5' и 3' некодирующие области, имеет нуклеотидную последовательность T7 промотора. Для получения трансляционно-активной мРНК *in vitro*, в нее необходимо внести две основные модификации после транскрипции. Первой

модификацией является реакция синтеза 5'-концевого динуклеотида, называемой кэпированием, которая осуществляется в процессе транскрипции или после него [5, 6]. Вторая модификация, определяющая стабильность мРНК и степень ее трансляции в клетках, это достраивание поли(А) хвоста молекулы РНК с 3' конца [7, 8].

В природе мРНК, синтезируемая в ядре, подвергается различным модификациям, прежде чем она может транслироваться в белки цитоплазмы. Для того чтобы мРНК была функциональной, она требует модифицированных 5' и 3' концов, а также кодирующей области (то есть открытой рамки считывания (ORF), кодирующей интересующий белок), фланкированной нетранслируемыми областями (5' UTR и 3' UTR). Транскрибируемая мРНК (пре-мРНК) подвергается двум значительным модификациям в дополнение к сплайсингу. Во время синтеза структура 7-метилгуанилата, также известная как «кэп», добавляется к 5' концу пре-мРНК через 5' → 5' трифосфатную связь. Этот кэп защищает зрелую мРНК от деградации, а также играет роль в ядерном экспорте и эффективной трансляции [9, 10]. Вторая модификация происходит посттранскрипционно на 3' конце формирующейся молекулы РНК и характеризуется добавлением примерно 200 адениновых нуклеотидов – поли(А) хвоста. Эта модификация придает стабильность мРНК, способствует экспорту мРНК в цитозоль и участвует в образовании трансляционно-компетентного рибонуклеопротеина вместе со структурой 5' кэпа. Зрелая мРНК образует кольцевую структуру (замкнутую петлю), соединяя кэп с поли(А) хвостом через кэп-связывающий белок eIF4E (эукариотический фактор инициации 4E) и поли(А)-связывающий белок PABP, оба из которых взаимодействуют с eIF4G (фактор инициации эукариот 4G) [10, 11]. Таким образом, основные требования к функциональной мРНК – это наличие 7-метилгуанилатного кэпа на 5' конце и поли(А) хвоста на 3' конце. Поэтому эти структуры должны быть добавлены после реакции транскрипции *in vitro* для получения эффективной трансляции синтетических молекул мРНК в эукариотических клетках.

Стратегии синтеза мРНК *in vitro* варьируются в зависимости от желаемого масштаба синтеза. Синтетическая РНК может быть эффективно синтезирована *in vitro* в реакции транскрипции с помощью прокариотических фаговых полимераз. Кэп структура и поли(А) хвост, характерные для зрелой мРНК, могут быть добавлены либо во время синтеза РНК или уже после реакции транскрипции при помощи отдель-

ных ферментативных реакций с кэпирующими ферментами и поли(А)-полимеразой соответственно.

Реакции получения функциональных РНК *in vitro* хорошо масштабируются и могут осуществляться с использованием комплексного набора отдельных реагентов, в том числе ряда ферментов для синтеза и модификации РНК.

Целью настоящей работы являлась разработка технологии получения активных препаратов ферментов посттранскрипционной модификации молекул РНК, полученных *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Получение генетических конструкций

Нуклеотидные последовательности, кодирующие поли(А)-полимеразу из *E. coli*, а также кэпирующие белки из вируса осповакцины синтезировали *de novo* из олигонуклеотидов. Полученные фрагменты ДНК амплифицировали ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (NEB) и олигонуклеотидов (таблица), содержащих уникальные сайты рестрикции NcoI и NotI для последовательностей, кодирующих поли(А)-полимеразу из *E. coli* и 2-О-метилтрансферазу вируса осповакцины либо XbaI и XhoI для генов, кодирующих субъединицы D1 и D12 кэпирующего фермента из вируса осповакцины. Для аффинной очистки ферментов использовали полигистидиновую метку (6His), кодируемую на N-конце аминокислотных последовательностей. Фрагменты ДНК чистили при помощи агарозного геля набором для выделения из агарозы (Евроген). ДНК-фрагменты после очистки использовались в реакции рестрикции с соответствующими эндонуклеазами рестрикции (37°C, 1 ч). Плазмиды pET28a и pET-Duet использовали в реакции рестрикции теми же эндонуклеазами рестрикции: NdeI и NotI (для pET28a), а также XbaI и XhoI (для pET-Duet), а далее чистили резаный вектор через агарозу. Реакцию лигирования проводили при 22°C в течение 1 ч при помощи ДНК-лигазы T4, а потом инактивировали ДНК-лигазу прогревом при 65°C в течение 10 мин и трансформировали полученной смесью компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen). Полученную бактериальную культуру высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащими селективный антибиотик (ампициллин) и инкубировали в течение 12 ч при 37°C до появления единичных колоний. Из полученных колоний (по 8 шт. для каждой генетической конструкции) выделяли плазмидную ДНК и секвенировали.

Олигонуклеотиды для клонирования генов, кодирующих белки модификации РНК в экспрессионные векторы pET28a и pET-Duet

polyA_Nco_f	GATATACCATGGGAcatcatcaccacatcacTTTACCCGAGTCGCTAATTTTTTGC
polyA_Not_r	CTCGAGTGC GGCCGCtcaTGCGGTACCCTCACGACGTGGTG
2Ometh_Nco_f	GATATACCATGGGAGATGTTGTTTCTCTGGACAAACC
2Ometh_Not_r	CTCGAGTGC GGCCGCtcaGTGGTGATGATGGTGGTGTTCAGTG
D1D12_Xba_f	GATATATCTAGAAATAATTTTGATTAACTTTAAGAAG
D1D12_Xho_r	ctttaccagactcgagTTACAGCAGCAGTTTCACCAG

Наработка белков для модификации синтетических мРНК в клетках E. Coli

Плазмидами с корректными вставками, содержащими гены белков для модификации РНК, трансформировали один из экспрессионных штаммов *E. coli*, предназначенных для продукции рекомбинантных белков. Трансформационную смесь высевали на чашки Петри с агаризованной средой и селективным антибиотиком (ампициллин, 100 мкг/мл) и инкубировали ночь при 37°C до появления единичных колоний. Затем единичной колонией инокулировали 5 мл жидкой питательной среды LB, содержащей ампициллин, и растили ночь при 37°C на шейкере (Eppendorf Innova, 180 об/мин). Нарработка рекомбинантных белков проводилась в культуре бактерий *E. coli* на среде LB (10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л хлорид натрия). Ночной культурой инокулировали жидкую питательную среду LB в качалочных колбах (1/10 объема) и растили при 37°C до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6 единиц. Далее, для индукции экспрессии гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы T7 в среду добавляли ИПТГ (0,1 М) и инкубировали клеточную культуру при 37°C 2–3 ч. Биомассу собирали центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин при 4°C.

Хроматографическая очистка белков для модификации синтетических мРНК

Клеточный осадок ресуспендировали в буфере А (50 мМ Трис-НСl рН 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М 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. Надосадочную жидкость после ультразвукового разрушения биомассы и центрифугирования клеточного дебриса фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Полученный суперна-

тант наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA (Qiagen), предварительно промытую буфером (50 мМ калий-фосфатного буфера рН 7,6, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазола). Связавшийся с сорбентом белок элюировали хроматографическим буфером В (50 мМ Трис-НСl рН 7,5; 0,5 М имидазола). Фракции, содержащие максимальный уровень белка, объединяли и диализовали против буфера для хранения (40 мМ HEPES-КОН рН 7,6; 100 мМ KCl) 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 мМ Трис-НСl рН 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 М Трис-ОН и 1,8 М глицин) на приборе фирмы Bio-Rad (США).

Результаты исследования и их обсуждение

Эукариотические мРНК представляют собой сложные молекулы, состоящие из различных нуклеотидных участков, выполняющих свою функцию в процессе трансляции и стабильности РНК в клетках. Синтетические мРНК, которые получены *in vitro*, также должны подвергаться двум основным посттранскрипционным модификациям для трансляционной активности в клетках эукариот. Существует два варианта получения функционально-активных искусственных мРНК в реакции транскрипции *in vitro* в зависимости от выбранной стратегии кэ-

пирования: а) стандартный синтез с последующим кэпированием при помощи специальных ферментов после реакции транскрипции (посттранскрипционное кэпирование); б) включение аналога кэпа во время транскрипции (ко-транскрипционное кэпирование). Выбор метода будет зависеть от масштаба необходимого синтеза мРНК и количества транскрибируемых матриц ДНК. Если предполагается стратегия с посттранскрипционной модификацией, то для реакции кэпирования используются вирусные кэпирующие ферменты, например, из вируса осповакцины (*Vaccinia virus*). Кэпирование происходит в две последовательные ферментативные реакции, в ходе которых сначала образуется структура кэп-0, а потом кэп-1. Трансляционная активность РНК с кэп-1 выше, что предпочтительнее для конечного продукта. Второй модификацией синтетических мРНК является процесс полиаденилирования, что предполагает добавку поли(А) хвоста с 3' конца, который может быть либо закодирован в матрице ДНК с использованием праймера для ПЦР с соответствующей последовательностью, либо он может быть добавлен посттранскрипционно к уже синтезированной РНК на стадии ферментативной обработки поли(А)-полимеразой, например, из *E. coli*. При выборе такой стратегии длину добавленного хвоста можно регулировать титрованием количества поли(А)-полимеразы в реакции. Таким образом, для посттранскрипционной модификации искусственных мРНК, которая позволит им транслироваться в эукариотических клетках, необходимы белковые препараты кэпирующих ферментов и поли(А)-полимеразы.

Фрагменты ДНК, кодирующие гены, выбранных белков, были синтезированы *de novo* из олигонуклеотидов и клониро-

ваны в бактериальные экспрессионные векторы под контролем Т7 промотора с возможностью индукции экспрессии ИПТГ. Для генов, кодирующих поли(А)-полимеразу и 2-О-метилтрансферазу вируса осповакцины, был использован вектор рЕТ28а, куда по сайтам рестрикции NcoI и NotI были вставлены соответствующие фрагменты ДНК. Карты полученных генетических конструкций приведены на рис. 1.

Фрагменты ДНК, соответствующие генам субъединиц основного кэпирующего фермента вируса осповакцины D1 и D12, были клонированы по сайтам XbaI и XhoI в вектор рЕТ-Duet, который позволяет индуцируемо экспрессировать сразу два гена одновременно с отдельных промоторов Т7. Карта генетической конструкции, экспрессирующей оба гена кэпирующего фермента, приведена на рис. 2. После наработки в клетках обе субъединицы формируют двухсубъединичный фермент, который можно очистить при помощи аффинной хроматографии за полигистидиновый хвост (6His), который закодирован на N-конце большой субъединицы D1. Таким образом, количество наработанного кэпирующего фермента зависит от количества субъединицы D1, поскольку меньшая субъединица D12 нарабатывается с избытком по отношению к большой из-за различий в размере.

Общая схема получения штаммов-продуцентов была следующей. Полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3), созданного для продукции рекомбинантных белков. После получения единичных бактериальных колоний, содержащих соответствующие плазмиды, проводили засев ночных культур в микробиологических пробирках для получения стартовых культур перед культивацией в больших объемах.

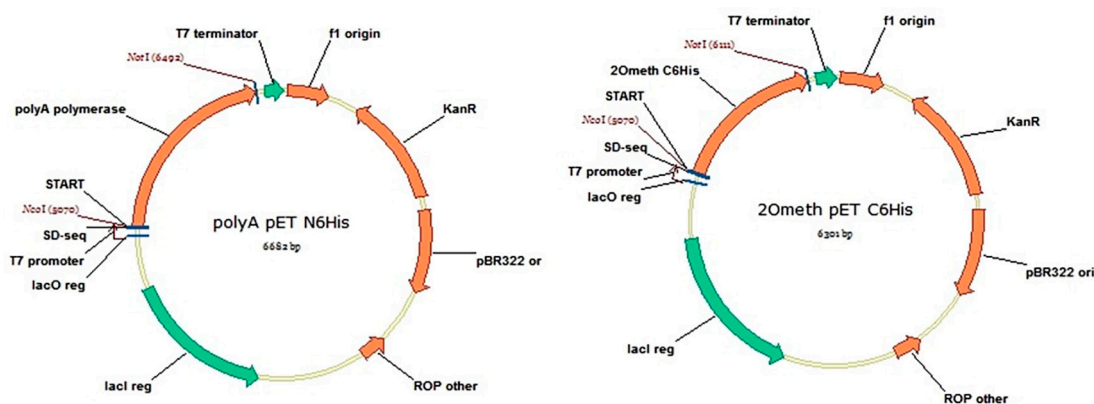


Рис. 1. Карта экспрессионных векторов для продукции фермента поли(А)-полимеразы из *E. coli* (левая панель) и фермента 2-О-метилтрансферазы вируса осповакцины под контролем промотора Т7 на основе коммерческого вектора рЕТ28а

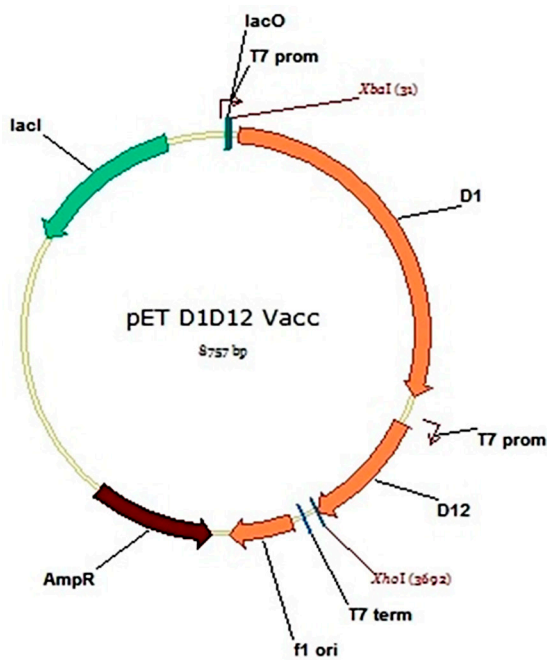


Рис. 2. Карта экспрессионного вектора для продукции основного кодирующего фермента вируса осповакцины, состоящего из двух субъединиц (большой D1 и малой D12) под контролем двух T7 промоторов для одновременной экспрессии обоих генов на базе вектора pET-Duet

Для получения подходящего количества белка при хроматографической очистке использовали объемы культур, выращенные в 100–200 мл жидкой среды LB с соответствующими антибиотиками (канамицин для вектора pET28a, ампициллин для вектора pET-Duet). После подроста бактериальных культур и индукции при помощи ИПТГ собирали биомассу и разрушали клетки,

как описано в разделе «Материалы и методы исследования». После осаждения клеточного дебриса отфильтрованный через фильтр 0,22 мкм надосадок наносили на хроматографическую колонку, содержащую метал-хелатный сорбент Ni-NTA (Qiagen).

Так, детальнее процесс получения фермента поли(А)-полимераза из *E. coli*, для очистки которого подбирали условия, выглядел следующим образом. Штамм *E. coli* BL21(DE3), содержащий плазмиду с клонированным геном, кодирующим поли(А)-полимеразу, культивировали в объеме жидкой культуры LB 100 мл. Культивирование производили при 37°C на шейкере при 150 об/мин. Оптическая плотность при внесении индуктора ИПТГ составляла OD = 0,6 единиц. Оптическая плотность при сборе биомассы была OD = 1,2 единиц (3 ч после индукции). Биомассу собирали центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин при 4°C. Далее ресуспендировали клетки в 5 мл буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола). Разрушение биомассы осуществляли при помощи ультразвукового дезинтегратора на льду до просветления лизата (20–30 мин с интервалами между озвучиванием, в режиме 30 с УЗ, 5 мин пауза). Осаждали клеточный дебрис центрифугированием при 10000 g в течение 40 мин при 4°C. Хроматографическую очистку осуществляли на аффинном сорбенте Ni-NTA, белок элюировали градиентом имидазола от 0 до 250 мМ. Анализировали экспрессию и очистку при помощи ПААГ электрофореза (рис. 3). После анализа объединяли фракции, содержащие целевой белок, и переводили в буфер для хранения при помощи диализа. Размер белка – 54кДа.

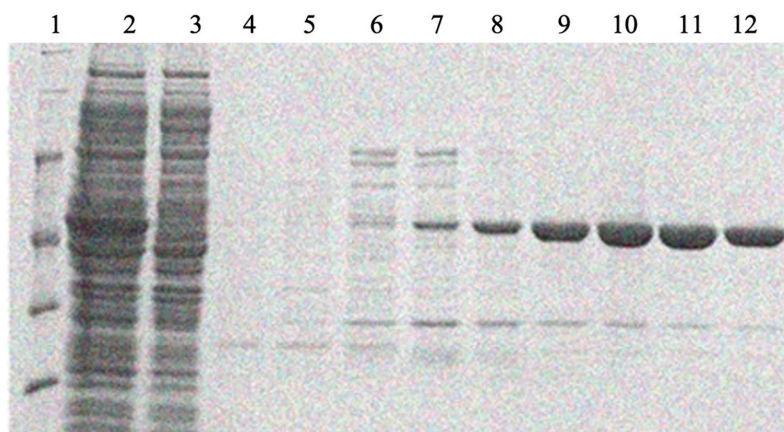


Рис. 3. Нарработка и очистка поли(А)-полимеразы *E. coli* в штамме *E. coli* BL21(DE3) (1 – маркер, 2 – супернатант после разрушения клеток, наносимый на колонку, 3 – тельца включения, осадок растворен в 8 М мочеvine, 4 и 5 – просок и промывка хроматографической колонки, 6–12 – фракции после градиента элюции имидазолом от 5 до 250 мМ)

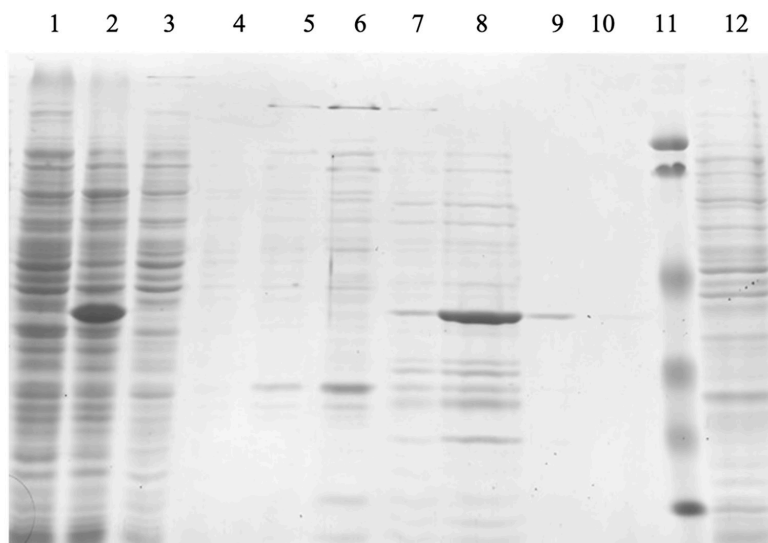


Рис. 4. Нарботка и очистка 2-О-метилтрансферазы вируса осповакцины в штамме *E. coli* KRX (1 – клетки до индукции рамнозой, 2 – супернатант после разрушения клеток, наносимый на колонку, 3 и 4 – пропуск и промывка хроматографической колонки, 5–10 – фракции после градиента элюции имидазолом от 10 до 250 мМ, 11 – маркер, 12 – тельца включения, осадок растворен в 8 М мочеvine)

Для получения чистого препарата 2-О-метилтрансферазы вируса осповакцины были подобраны следующие экспрессионный вектор и условия. Штамм KRX (Promega) трансформированный генетической конструкцией, которая несет в себе требуемый ген, культивировали в жидкой культуре LB в объеме 100 мл при температуре 37°C. Оптическая плотность при внесении индуктора рамнозы была OD = 0,4 единиц. Далее, продолжали инкубацию бактериальной культуры до оптической плотности OD = 1 единиц (3 ч после индукции). Собирали биомассу как описано выше и ресуспендировали в 4 мл буфера для разрушения (Трис, 8, 50 мМ, NaCl, 500 мМ). Разрушение биомассы и подготовку осветленного лизата для нанесения на хроматографическую колонку осуществляли аналогично описанному для поли(А)-полимеразы: разрушение при помощи УЗ на льду до просветления лизата (20–30 мин с интервалами между озвучиванием); осаждение клеточного дебриса: центрифугирование при 10000 g в течение 40 мин. Далее осуществляли хроматографическую очистку на металл-хелатном сорбенте NiNTA, а элюцию связавшегося белка проводили имидазолом с градиентом концентрации 0–250 мМ. Перевод в буфер для хранения: диализ. Размер белка – 40 кДа. Анализ наработки и очистки представлен на рис. 4.

Основной белок для кэпирования из вируса осповакцины состоит из двух субъеди-

ниц: большой D1 и малой D12. Для одновременной наработки обеих субъединиц был использован специальный экспрессионный вектор pET-Duet, позволяющий одновременную индукцию экспрессии обоих генов, кодирующих субъединицы фермента. При наработке обеих субъединиц они формируют единый ферментативный комплекс, аффинную очистку которого можно осуществить за полигистидиновый хвост, кодируемого на большой субъединице D1. Поскольку при наработке в штамме *E. coli* BL21 (DE3) практически весь целевой белок переходил в форму нефункциональных агрегатов, то в качестве подходящего штамма для наработки этого фермента был выбран штамм *E. coli* T7 ExpressLysY со стадией инкубации при пониженных температурах (16°C). Детально протокол наработки и очистки выглядел следующим образом. После трансформации штамма *E. coli* T7 ExpressLysY плазмидой, кодирующей обе субъединицы кэпирующего фермента, клеточную культуру растили до оптической плотности OD = 0,5 единиц. Затем бактериальную культуру охлаждали на льду не менее 5 мин и добавляли до 0,1 мМ IPTG, после чего следовала инкубация при интенсивном перемешивании на 16°C в течение 12 ч. Клеточную культуру после инкубации охлаждали на льду и осаждали клетки центрифугированием, как указано в разделе «Материалы и методы исследования».

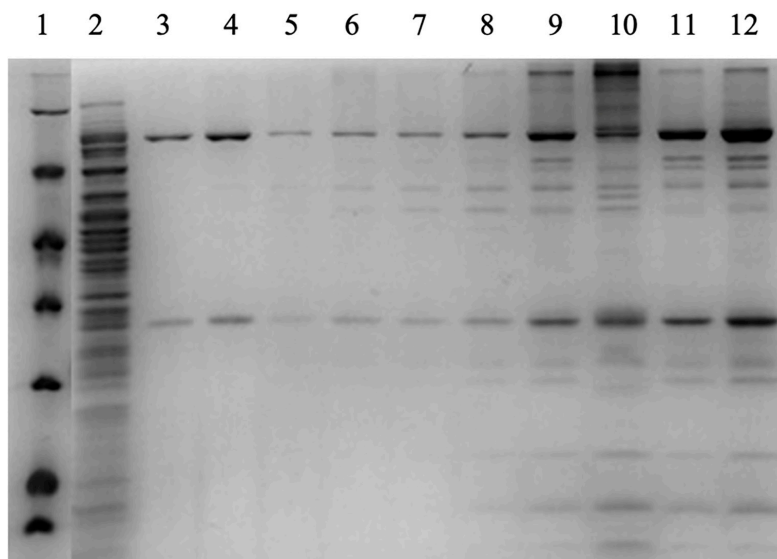


Рис. 5. Нарботка и очистка обеих субъединиц (большой D1 и малой D12) основного кэпирующего фермента вируса осповакцины в штамме *E. coli* T7 ExpressLysY (1 – маркер, 2 – супернатант после разрушения клеток, наносимый на колонку, 3–10 – фракции после градиента элюции имидазолом от 10 до 250 мМ, 11 и 12 – объединенные и сконцентрированные хроматографические фракции, содержащие целевой белковый продукт)

После осаждения клеток ресуспендировали осадки в 1/10 от объема клеточной культуры в буфере (50 mM TrisHCl pH8, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 5 mM DTT). Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора, а полученный препарат центрифугировали и фильтровали, как описано ранее.

Полученный клеточный лизат смешиваем с 0,5 мл IMAC, инкубация с качением в течение 1 ч. Промываем сорбент 50 mM TrisHCl pH8, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 0,1% Triton x-100, 5 mM DTT 10V колонки. Элюируем 50 mM TrisHCl pH8, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 10% глицерол, 5 mM DTT, снимаем 4 фракции по 1 мл. В белковые фракции после элюции добавляется Triton x-100 до 0,2%, далее проверяем с помощью э/фореза наличие целевого белка и проводим диализ (все фракции раздельно) против 40 mM TrisHCl pH8, 200 mM NaCl, 0,2 mM ЭДТА, 10% глицерол, 5 mM DTT (буфер дополнительно фильтровали в центриконах на 3 кДа), затем фракции фильтруем через 0,2 μm фильтр. После проверки на РНКазную активность фракцию 1 сконцентрировали и довели содержание глицерола до 50%. Анализ наработки и очистки представлен на рис. 5.

Таким образом, в ходе настоящей работы были получены штаммы-продуценты и подобраны условия для наработки трех рекомби-

нантных белков – ферментов, необходимых для посттранскрипционной модификации синтетических мРНК. Фермент поли(А)-полимераза необходим для модификации 3' конца молекулы РНК для достраивания поли(А) хвоста, а оба кэпирующих фермента из вируса осповакцины позволяют осуществить посттранскрипционное кэпирование РНК, что необходимо для формирования трансляционного комплекса и стабильности мРНК в клетке [12, 13].

Заключение

В данной работе были подобраны условия для получения ферментов модификации синтетических мРНК – поли(А) полимеразы из *E. coli*, а также двух кэпирующих ферментов из вируса осповакцины. В ходе экспериментов были найдены оптимальные условия для продукции и очистки этих ферментов. Полученные препараты могут быть использованы для посттранскрипционной модификации синтетических РНК *in vitro* и получения функционально-активных молекул мРНК для исследовательских и терапевтических целей.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Rohner E., Yang R., Foo K.S., Goedel A., Chien K.R. Unlocking the promise of mRNA therapeutics // *Nat. Biotechnol.* 2022. Vol. 40, Is. 11. P. 1586-1600.
2. To KKW, Cho WCS. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines // *Expert Opin Drug Discov.* 2021. Vol. 16, Is. 11. P. 1307-1317.
3. Dousis A. et al. An engineered T7 RNA polymerase that produces mRNA free of immunostimulatory byproducts // *Nat. Biotechnol.* 2023. Vol. 41, Is. 4. P. 560-568.
4. Захарова М.В., Нагорных М.О. Получение бактериального продуцента ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 для синтеза РНК *in vitro* // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2022. Вып. 12. С. 9-14.
5. Stepinski J. et al. Synthesis and Properties of mRNAs Containing the Novel "Anti-Reverse" Cap Analogues 7-methyl (3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA.* 2001. Vol. 7, Is. 10. P. 1486-1495.
6. Fuchs A.L. et al. A General Method for Rapid and Cost-Efficient Large-Scale Production of 5' Capped RNA // *RNA.* 2016. Vol. 22, Is. 9. P. 1454-1466.
7. Balbo P.B., Bohm A. Mechanism of poly(A) polymerase: structure of the enzyme-MgATP-RNA ternary complex and kinetic analysis. *Structure.* 2007. Vol. 15, Is. 9. P. 1117-1131.
8. Yehudai-Resheff S., Schuster G. Characterization of the *E. coli* poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, Is. 5. P. 1139-1144.
9. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. mRNA capping: biological functions and applications // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, Is. 16. P. 7511-7526.
10. Wu Q., Bazzini A.A. Translation and mRNA Stability Control // *Annu Rev Biochem.* 2023. Vol. 20, Is. 92. P. 227-245.
11. Dreyfus M., Régnier P. The poly(A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria // *Cell.* 2002. Vol. 111, Is. 5. P. 611-613.
12. Grier A.E. et al. pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences // *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016. Vol. 5, Is. 4. P. e306.
13. 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. Vol. 35, Is. 1. P. 68-79.