

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ

ՍԱՂԱԹԵԼՅԱՆ ԱՆԻ ՌՈԲԵՐՏԻ

THERMUS SCOTODUCTUS K1 ՇՏԱՄԻ ԶԵՐՄԱԿԱՅՈՒՆ ԴՆԹ ՊՈԼԻՄԵՐԱԶ Ի-Ի
ՀԵՏԵՐՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ
ԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՆԵՐՈՒԺԸ

Գ.00.07 - «Միկրոբիոլոգիա. կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2023

SPC «ARMBIOTECHNOLOGY» NAS RA

SAGHATELYAN ANI ROBERT

HETEROLOGUS EXPRESSION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL
POTENTIAL OF THERMOSTABLE DNA POLYMERASE I OF *THERMUS*
SCOTODUCTUS K1 STRAIN

SYNOPSIS

of dissertation for conferring of scientific degree of
Candidate of Biological Science (PhD)
in the specialty 03.00.07 – «Microbiology. biotechnology»

YEREVAN – 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.դ., դոցենտ Հովիկ Հարությունի Փանոսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., պրոֆեսոր
Հրաչյա Գարեգինի Հովհաննիսյան
Կ.գ.թ. Արթուր Ալբերտի Համբարձումյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023թ. դեկտեմբերի 15-ին
ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի
Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան 14, հեռ./ֆաքս՝ (+374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2023թ. նոյեմբերի 15 -ին:

018 մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, Կ.գ.թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

The theme of dissertation has been approved at Yerevan State University.

Scientific supervisor: Dr. of Biological Sciences, Assoc. Prof. Hovik Panosyan

Offical opponents: Dr. of Biological Sciences, Prof. Hrachya Hovhannisyan
PhD of Biological Sciences Arthur Hambardzumyan

Leading organization: Institute of Molecular Biology NAS RA

The defense of the dissertation will be held on 15th of December, 2023, at 15⁰⁰ at
the session of 018 Specialized Council on Biotechnology of SCC of RA at SPC
"Armbiotechnolog" NAS RA.

Address: 0056, RA, Yerevan, 14 Gyurjyan str., tel./fax (+374 10) 65 41 80.

The dissertation is available at the library of SPC «Armbiotechnolog» NAS RA.
The synopsis has been sent on 15th of November, 2023.

Scientific Secretary of 018 Specialized Council, PhD

G.E. Avetisova

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

Ատենախոսության թեմայի արդիականությունը: Թերմոֆիլ (ջերմասեր) մանրէների կենսաբազմազանության ուսումնասիրությունը կարևոր է ոչ միայն բարձր ջերմաստիճանային պայմաններում մանրէների հարմարվողականության մեխանիզմների վերծանման, կյանքի ծագման և կյանքի ջերմաստիճանային սահմանների վերաբերյալ մեր պատկերացումների ընդլայնման, այլև՝ մենահատուկ առանձնահատկություններով օժտված կենսատեխնոլոգիական կիրառման հեռանկար ունեցող մանրէների և դրանց հիմքով նոր արդյունավետ տեխնոլոգիաների մշակման տեսակետից [Straub et al., 2018, Arbab et al., 2022, Vavitsas et al., 2022]: Թերմոֆիլ մանրէների բնական կենսամիջավայրերից են երկրաջերմային, այդ թվում՝ վերերկրյա տաք հանքային աղբյուրները [Ulucay et al., 2022], որոնցով հարուստ է նաև Հայկական լեռնաշխարհը: Ներկայումս երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացվել և նույնականացվել են բազմաթիվ թերմոֆիլ և հիպերթերմոֆիլ մանրէներ, որոնք կիրառվում են կենսատեխնոլոգիական արտադրություններում որպես ջերմակայուն հիդրոլազների, ԴՆԹ-պոլիմերազների և այլ ֆերմենտների ակտիվ արտադրիչներ [Killelea et al., 2014, Aschenbrenner and Marx, 2017, Abdollahi et al., 2021, Ulucay et al., 2022]:

Աերոբ ասպորոգեն քենոօրգանոտրոֆ բակտերիաները, մասնավորապես *Thermus* ցեղի ներկայացուցիչները, հայտնաբերվում են երկրաջերմային հանքային աղբյուրներում [Albuquerque et al., 2018]: Դրանք օժտված են ջերմային սթրեսին դիմակայելու ճկուն մեխանիզմներով և հայտնի են որպես կենսատեխնոլոգիական կիրառություն գտած բազմաթիվ ֆերմենտների, այդ թվում՝ ջերմակայուն պոլիմերազների ակտիվ արտադրիչներ [Cava et al., 2009, Syssoev et al., 2021]: Բացի ռեպլիկացիայից և ռեպարացիայի գործընթացում գենոմի ամբողջականության պահպանման կարևոր կենսական դերից, ԴՆԹ-պոլիմերազները *in vitro* կիրառվում են ԴՆԹ-ի կլոնավորման, սեքվենավորման, նշադրման, և այլ տեխնոլոգիաներում [Gibbs et al., 2009, Killelea et al., 2014, Coulther et al., 2019]: Առաջին ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազը *Taq* պոլիմերազն է՝ անջատված *Thermus aquaticus* ջերմակայուն բակտերիայից: Մինչ օրս նկարագրված ջերմակայուն ԴՆԹ-պոլիմերազները տարբերվում են իրենց ջերմակայունությամբ, պրոցեսիվությամբ, ԴՆԹ-ի սինթեզի ճշգրտությամբ, մենահատկությամբ, կոնտամինացնող նյութերի և արգելակիչների նկատմամբ կայունությամբ և այլն [Aschenbrenner and Marx, 2017, Coulther et al., 2019]: Ներկայումս նկարագրված պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (ՊՇՌ) հիմքով բազմաթիվ մեթոդներում կիրառվում են ինչպես *Thermus*, այնպես էլ թերմոֆիլ ու հիպերթերմոֆիլ մանրէների այլ ցեղերի տեսակներից անջատված ԴՆԹ պոլիմերազները [Zhang et al., 2015, Aschenbrenner and Marx, 2017]: Մենահատուկ հատկանիշներ ունեցող ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազների կիրառումը կարևոր են նաև ախտորոշիչ մեթոդների մշակման և բարելավման տեսակետից [Aschenbrenner and Marx, 2017, Coulther et al., 2019]: Հետևաբար, նոր մենահատուկ առանձնահատկություններով օժտված ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազների հայտնաբերումը ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի արդի հիմնախնդիրներից է: Լեռնային Ղարաբաղի տարածքում հայտնաբերված Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից *T. scotoductus* տեսակին պատկանող շտամի մեկուսացմանն ու դրանից ծագող մենահատուկ

առանձնահատկություններով օժտված ԴՆԹ պոլիմերագ Լ-ի՝ կենսատեխնոլոգիայում կիրառման հեռանկարների բացահայտմանն է նվիրված այս աշխատանքը:

Աշխատանքի նպատակը և խնդիրները: Աշխատանքի նպատակն է եղել Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի միկրոբիոտայի կազմի ուսումնասիրումը, այդ աղբյուրից մեկուսացված *T. scotoductus* K1 ջերմասեր բակտերիայի Լ-տիպի ԴՆԹ-պոլիմերագի ռեկոմբինանտ ֆերմենտի ստացումը, բնութագրումը և կիրառական ներուժի բացահայտումը:

Աշխատանքն իրականացնելու համար առաջադրվել են հետևյալ խնդիրները.

- աճեցման և աճեցումից անկախ (մոլեկուլային) մեթոդների կիրառմամբ ուսումնասիրել երկրաջերմային աղբյուրների միկրոբիոտայի տաքսոնոմիական բազմազանությունը, մեկուսացնել և ֆենոտիպական, գենոտիպական ու ֆիլոգենետիկական հատկանիշների հիման վրա նույնականացնել *Thermus* ցեղին պատկանող բակտերիաներ:
- Մեկուսացված *T. scotoductus* K1 շտամի գենոմի վերլուծությամբ վերծանված Լ-տիպի ԴՆԹ պոլիմերագ կողավորող գենը կլոնավորել մեզոֆիլ տեր-օրգանիզմում՝ ինդուկցիոն մեխանիզմով առավելագույն քանակով թիրախային սպիտակուց ստանալու համար:
- Ուսումնասիրել մաքրված սպիտակուցի հիմնական ֆիզիկաքիմիական (օպտիմալ ջերմաստիճան, միջավայրի pH, իոնների ազդեցություն, ջերմակայունություն) և գործառույթային (ՊՇՌ իրականացնելու կարողություն, ճշգրտություն) հատկանիշները:
- Մաքրված սպիտակուցի՝ ՊՇՌ ամպլիֆիկացման ռեակցիաներում կիրառման համար բարելավել ռեակցիոն խառնուրդի բաղադրիչների և ռեակցիայի իրականացման պայմանները:
- Անջատված պոլիմերագի հիմքով մշակել ՊՇՌ տեխնոլոգիայի փորձարարական մոդել:

Աշխատանքի գիտական նորույթը: Առաջին անգամ Փոքր Կովկասյան տարածաշրջանի երկրաջերմային աղբյուրներից մեկուսացվել է ասպորոգեն թերմոֆիլ մանրէային կուլտուրա և պոլիֆազային մոտեցմամբ նույնականացվել է որպես *T. scotoductus* տեսակին պատկանող մանրէ: Առաջին անգամ այդ շտամից ստացվել և ուսումնասիրվել է ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերագ Լ սպիտակուց՝ մոլեկուլային կենսաբանական տարբեր մեթոդներում կիրառման նշանակությամբ: Իրականացվել է սպիտակուցի հետերոլոգ էքսպրեսիա՝ Լ-տիպի ԴՆԹ պոլիմերագի բարձր քանակի ստացման նպատակով: Հետերոլոգիական էքսպրեսիայի արդյունքում անջատված և մաքրված պոլիմերագի հիմքով մշակվել է ՊՇՌ տեխնոլոգիայի փորձարարական մոդել՝ տարաբնույթ ԴՆԹ կադապարների կիրառմամբ:

Աշխատանքի գործնական նշանակությունը: Աշխատանքի ընթացքում մեկուսացված թերմոֆիլ *Thermus scotoductus* K1 շտամն ավանդադրվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ի «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ MDC 11681 համարի և շիֆրի ներքո: Նշված շտամը համարել է ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում ստեղծված էքսպրեսիոն ֆիլ մանրէների կուլտուրաների հավաքածուն և կարող է ծառայել որպես օբյեկտ տարատեսակ հետազոտություններում՝ ներառյալ թերմոֆիլիայի

մեխանիզմների վերծանման, նյութափոխանակային առանձնահատկությունների ուսումնասիրման և կենսատեխնոլոգիայում տարատեսակ կենսամոլեկուլների ստացման համար: Մանրէն ներառվել է նաև ԵՊՀ Կենսաբանության ֆակուլտետի Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում դասավանդվող «Մանրէաբանություն և վիրուսաբանություն» դասընթացի լաբորատոր աշխատանքներում՝ որպես թերմոֆիլ մանրէի մոդել: Թերմոֆիլ շտամի ԴՆԹ պոլիմերազի գենն ունի կիրառական ներուժ գենետիկական կոնավորման ճանապարհով ԴՆԹ պոլիմերազի արտադրության համար: Զերմակայուն Tsk1 ԴՆԹ պոլիմերազի կիրառումը հատկապես հեռանկարային կարող է լինել, այստորոշիչ թեստերի մշակման գործընթացում՝ ֆերմենտի մի շարք առանձնահատկությունների, մասնավորապես՝ բարձր ճշգրտության, դասական և մուլտիպլեքս ՊՇՌ-ի արդյունավետ իրականացման շնորհիվ:

Պաշտպանությանը ներկայացվող հիմնական դրույթները.

- Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրից մեկուսացված *T. scotoductus* K1 շտամը ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի հեռանկարային աղբյուր է:
- Սպիտակուցային հաջորդականության պահպանմամբ ԴՆԹ պոլիմերազ I-ի գենի կոդոնային բարելավմամբ բարձր մաքրությամբ ռեկոմբինանտ ֆերմենտային N- և C-ծայրային հիստիդինային նիշով սպիտակուցների ելքը համապատասխանաբար 151.6 մգ և 161.5 մգ է՝ բջջային կենսազանգվածի մեկ գրամից:
- Ռեկոմբինանտ սպիտակուցը առնվազն մեկ ժամ կայուն է ընդհուպ մինչև 80°C ջերմաստիճանում, հարաբերական կայունություն է պահպանում 88°C-ում, իսկ 95°C-ում 15 րոպե ինկուբացման դեպքում պահպանում է ակտիվության կեսը:
- Tsk1 ԴՆԹ պոլիմերազը բարձր արդյունավետությամբ ամպլիֆիկացնում է առնվազն 2.5 հ.ն.գ. չափով պրոդուկտներ ինչպես 68°C, այնպես էլ 72°C-ում շղթայի երկարացման դեպքում:
- Tsk1 ԴՆԹ-պոլիմերազը երկու անգամ ավելի ճշգրիտ է աշխատում, քան *Taq* պոլիմերազը, Tsk1 ԴՆԹ-պոլիմերազի կիրառմամբ արդյունավետ ՊՇՌ իրականացման համար մշակված օպտիմալ աշխատանքային բուֆերի կազմը հետևյալն է՝ 10 մՄ Tris-HCl, pH 9.0, 50 մՄ KCl, 0.1% Triton X, Mg²⁺ իոնի լրացուցիչ 3 մՄ և 10% գլիցերոլի ավելացմամբ:

Ատենախոսական աշխատանքի կապը գիտական թեմաների հետ: Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ՀՀ ԳԿ-ի 15T-1F399, 18T-1F261 ծածկագրերով պայմանագրային թեմատիկ ֆինանսավորման ծրագրերի, Հայկական կրթության և գիտության ազգային հիմնադրամի (ANSEF) NS-microbio 4676, Բարձրագույն կրթության ոլորտում միջազգային համագործակցության նորվեգական կենտրոնի (SIU, DIKU, HK-dir) CPEA-2011/10081, CPEA-LT-2016/10095, CPEA-LT-2017/10061 դրամաշնորհային ծրագրերի շրջանակներում:

Աշխատանքի իրականացման վայրը: Ատենախոսական աշխատանքն իրականացվել է ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնում, Բերգենի (Նորվեգիա) համալսարանի Կենսաբանության ամբիոնում:

Ատենախոսական աշխատանքի ապրոբացիան: Հետազոտության արդյունքները զեկուցվել են ԵՊՀ Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի և Բերգենի համալսարանի Կենսաբանության ամբիոնի սեմինարներում,

«Մանրէաբանության և մանրէների կենսատեխնոլոգիայի նվաճումները» խորագրով միջազգային գիտաժողովում (Երևան, Հայաստան, 2014), Էքստրեմոֆիլների 10-րդ (Սանկտ-Պետերբուրգ, Ռուսաստան, 2014) միջազգային կոնգրեսում, Եվրոպական մանրէաբանների FEEMS 6-րդ (Մաստրիխտ, Նիդերլանդներ, 2015) կոնգրեսում, Մանրէների էկոլոգիայի ISME 15-րդ (Սեուլ, Հարավային Կորեա, 2014), «Մանրէները և դրանց վիրուսները. էկոլոգիա, բազմազանություն և կիրառություն» խորագրով (Թբիլիսի, Վրաստան, 2019) միջազգային գիտաժողովում:

Հրատարակված աշխատությունները: Ատենախոսության հիմնադրույթներն ու արդյունքներն ամփոփված են 17 գիտական աշխատություններում՝ 6 հոդվածներում, որոնցից 1-ը՝ առանց համահեղինակների, 3 գրքի գլուխներում և միջազգային գիտաժողովների 8 թեզիսներում:

Աշխատանքի կառուցվածքը և ծավալը: Ատենախոսական աշխատանքը շարադրված է 143 էջի վրա, ներառում է 54 նկար և 10 աղյուսակ: Ատենախոսությունը կազմված է «Հապավումների և միավորների ցանկ», «Ներածություն», «Գրականության ակնարկ», «Փորձարարական մաս», «Արդյունքներ և դրանց քննարկումը», «Ամփոփում», «Եզրակացություններ», «Օգտագործված գրականության ցանկ», «Հավելված» բաժիններից:

ԳԼՈՒԽ 1. ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

Գլուխ 1-ում ներկայացված է *Thermus* ցեղին պատկանող թերմոֆիլ մանրէների տարածվածությունը, կարգաբանությունը և ֆիլոգենեզը, մորֆո-ֆիզիոլոգիական, նյութափոխանակային և կենսաքիմիական առանձնահատկությունները, էկոլոգիական դերը և բազմազանությունը, գենոմի կառուցվածքը, ինչպես նաև՝ դրանց կենսատեխնոլոգիական ներուժը: Նկարագրված են ԴՆԹ պոլիմերազների կառուցվածքը և առանձնահատկությունները, դրանց կիրառական նշանակությունը, ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազների առավելությունները և կենսատեխնոլոգիական ներուժը: Բերված են շուկայում հայտնի ջերմակայուն ԴՆԹ պոլիմերազների օրինակներ:

ԳԼՈՒԽ 2. ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐ

Հետազոտության օբյեկտները: Ուսումնասիրության նյութ են ծառայել Քարվաճառի աղբյուրի ջրատղմային նմուշները, մեկուսացված *Thermus scotoductus* K1 աերոբ թերմոֆիլ ասպորոգեն մանրէական շտամը և այդ մանրէի ԴՆԹ պոլիմերազ I սպիտակուցը:

ԴՆԹ-ի անջատումը և գեների ՊՇՌ ամպլիֆիկացումները: Ջրատղմային նմուշներից հանրագումարային ԴՆԹ-ն անջատվել է ֆերմենտային [Marmur, 1961] և ՆԴՍ-ով քայքայման եղանակներով [Dempster et al., 1999]: Գենոմային ԴՆԹ-ի անջատումն իրականացվել է GenElute™ Bacterial Genomic Kit (Sigma) առևտրային հավաքածուի միջոցով:

Մեկուսացված կուլտուրայի գենոմային ԴՆԹ-ից 16S ռԴՆԹ-ի ամպլիֆիկացումն իրականացվել է ՊՇՌ մեթոդով՝ 16SF և 16SR համընդհանուր բակտերիական փրայմերների զույգով [Rainey et al., 1992]:

Սեքվենավորումը և տվյալների կենսահինֆորմատիկական վերլուծությունը: Հանրագումարային ԴՆԹ-ի մետագենոմային հետազոտությունն իրականացվել է Գերմանական GATC Biotech սեքվենավորման կենտրոնում Genome Sequencer

Illumina HiSeq տեխնոլոգիայով: Մեկուսացված կուլտուրայի 16S ռԴՆԹ-ի սեքվենավորումն իրականացվել է ABI (PRISM կամ 3730x1) մագանթային սեքվենատորում՝ Սանգերի (Sanger, Functional Biosciences (Madison, WI)) մեթոդով՝ համաձայն ABI Prism BigDye Terminator kit (Perkin Elmer) առևտրային հավաքածուի ընթացակարգի: K1 շտամի գենոմի սեքվենավորումն իրականացվել է PacBio RS տեխնոլոգիայով, իսկ հավաքագրումն իրականացվել է Celera Assembler-ի միջոցով GATC Biotech ընկերության (Գերմանիա) կողմից (<http://www.gatc-biotech.com>): K1 շտամի գենոմի համահավասարեցումը մոտ ազգակցի գենոմի հետ իրականացվել է Mauve 2.3.1 ծրագրի միջոցով [Darling et al., 2004]: Անտոացումն իրականացվել է ինչպես NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ծրագրով [Seemann, 2014], այնպես էլ՝ RAST ծրագրով (<http://rast.nmpdr.org/>) [Aziz et al., 2008, Overbeek et al., 2014]: Միջին նուկլեոտիդային նմանության (ՄՆՆ) վերլուծությունն իրականացվել է առցանց ANI calculator հաշվարկիչով (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>): ԴՆԹ:ԴՆԹ հիբրիդիզացման վերլուծությունն իրականացվել է Genome-to-Genome Distance Calculator-ով (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) [Meier-Kolthoff et al., 2013]: Մետաբոլիկ վերակառուցումներն իրականացվել են SEED մետաբոլիկ ուղիների կառուցման ծրագրով [Devoid et al., 2013]:

Թերմոֆիլ աերոբ էնդոսպոր չառաջացնող մանրէի մեկուսացումը և ֆենոտիպական հատկանիշների ուսումնասիրությունը: Աերոբ էնդոսպոր չառաջացնող մանրէն մեկուսացվել է Բրոկի և Ֆրիզի կողմից [Brock and Freeze, 1969] առաջարկած սննդամիջավայրի կիրառմամբ [Brock and Freeze, 1961]:

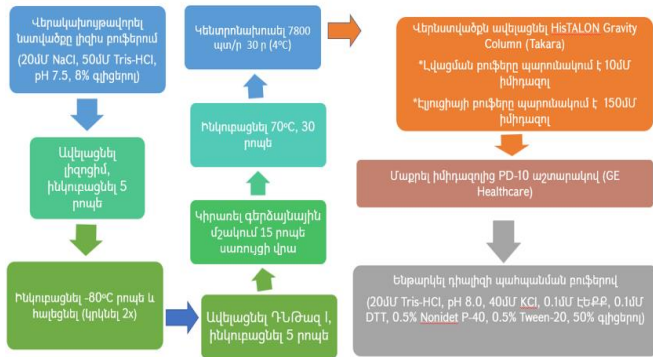
Մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմիական հատկանիշների ուսումնասիրությունն իրականացվել է ըստ ընդունված մեթոդների [Degryse et al., 1978 Manaiia and da Costa, 1991]: Բջջիների ձևաբանական հատկանիշներն ուսումնասիրվել են լուսային (Motic 10) և սքանավորող էլեկտրոնային մանրադիտարկմամբ ըստ [Kalab et al., 2008]: Բջջային ճարպաթթուների կազմը որոշվել է Լեյբնիցի ինստիտուտի Միկրոօրգանիզմների և բջջային կուլտուրաների հավաքածուում [Miller, 1982]: Փորձերն իրականացվել են եռակի կրկնությամբ, իսկ տվյալները ներկայացված են երեք կրկնությունների միջինով:

Ֆիլոգենետիկ ծառերի կառուցումը: MEGAX [Kumar et al., 2018] ծրագիրն օգտագործվել է 16S ռԴՆԹ-ի նուկլեոտիդային, ինչպես նաև՝ պոլիմերազների սպիտակուցային հաջորդականությունների միջև էվոլյուցիոն հեռավորությունը բացահայտող ֆիլոգենետիկ ծառերի կառուցման համար: Սպիտակուցի եռաչափ մոդելի կառուցվածքի կանխատեսումն իրականացվել է Swiss-model առցանց գործիքի օգնությամբ [Bertoni et al., 2017, Bienert et al., 2017]:

ԴՆԹ-պոլիմերազ I-ի գենի կլոնավորումը և էքսպրեսիան: Սինթեզվել է կոդոն-բարելավված գեն, GenScript կենտրոնում (<https://www.genscript.com/>): Կլոնավորումն իրականացվել է FX (fragment exchange) կլոնավորման համակարգով [Geertsma and Dutzler, 2011]: Որպես էքսպրեսիոն վեկտոր փորձարկվել են p7xC3H (Addgene # 47065) և p7xNH3 (Addgene # 47064) պլազմիդները [Geertsma and Dutzler, 2011]:

ԴՆԹ-պոլիմերազ I-ի էքսպրեսիան և մաքրումը: Ռեկոմբինանտ էքսպրեսիոն պլազմիդներ կրող համապատասխան *E. coli* BL21 (DE3) կլոնների կուլտուրաներում սպիտակուցի գերարտադրությունը մակաձվել ԻՊԹԳ-ի ավելացմամբ: Հաջորդիվ, կուլտուրաները կենտրոնախուսվել են, որից հետո սպիտակուցի մաքրումն

իրականացվել է ըստ նկար 1-ում ներկայացված սխեմայի: Սպիտակուցի վերջնական կոնցենտրացիաները չափվել են Qubit Assay kit-ով (Life Technologies):



Նկար 1. *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի քայլերի հաջորդականությունը

Ռեկոմբինանտ ԴՆԹ պոլիմերազի հատկանիշների ուսումնասիրությունը:

Պոլիմերազի ակտիվությունը որոշվել է նադիիոլգոտոպային

մեթոդով [Choi et al., 2006] Tri-Carb 2900 TR Liquid Scintillation Analyser (PerkinElmer) սարքով: Օպտիմալ pH-ի հայտնաբերման համար վերոնշյալ փորձում կիրառվել են տարբեր բուֆերային համակարգեր՝ MOPS-NaOH (pH 6.0-8.0, 25°C), Tris-HCl (pH 8.0-9.5, 25°C), և գլիցին-NaOH (pH 9.0-10.0, 25°C): Ֆերմենտի օպտիմալ ջերմաստիճանը, K^+ իոնների, երկվալենտ կատիոնների (Mg^{2+} , Mn^{2+}) ազդեցությունը, ջերմակայունությունը որոշվել է ստանդարտ համընդհանուր ընդունված մեթոդներով [Choi et al., 2006]:

Անջատված ԴՆԹ պոլիմերազի ՊՇՌ պայմանների բարելավումը: ՊՇՌ պայմանների բարելավման համար որպես կաղապար ծառայել է pUC19 պլազմիդը (NEB), որից ամպլիֆիկացվել է lacZ գենի 265 ն.գ. երկարությամբ հատված: Փորձարկվել են ռեակցիոն խառնուրդում Mg^{2+} -ի, կաղապարի և կայունացուցիչների տարբեր քանակություններ:

Անջատված ԴՆԹ պոլիմերազի՝ ՊՇՌ իրականացնելու ունակությունը: Տարբեր չափերի ամպլիկոնների ստացման նպատակով կիրառվել են տարաբնույթ կոմբերցիոն հասանելի, ինչպես նաև՝ նախագծված (Primer3 առցանց գործիքով (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)) փրայմերների զույգեր: Որպես կաղապար օգտագործվել են ինչպես գենոմային, այնպես էլ՝ պլազմիդային ԴՆԹ-ներ:

Ռեկոմբինանտ պոլիմերազի մոլտիպլեքս ՊՇՌ իրականացվել է որպես կաղապար մարդու գենոմային ԴՆԹ-ի կիրառմամբ՝ դիստորֆիների գենի 3, 47, 50 և 52 էկզոնների ամպլիֆիկացման համար:

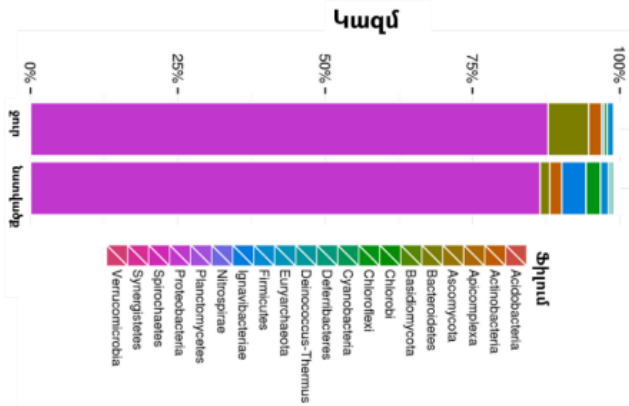
Պոլիմերազի ճշգրտության (Fidelity) որոշումը: Պոլիմերազի ճշգրտության որոշման համար կիրառվել է կապույտ-սպիտակ (blue-white) սկրինինգի մեթոդը, որոշակի փոփոխություններով [Lee et al., 2009]: Որպես կաղապար ծառայել է pUC19 պլազմիդը, որից ամպլիֆիկացվել է 265 ն.գ. չափով հատված: Կրկնակի ռեստրիկցիան իրականացվել է NdeI և HindIII ռեստրիկտազներով:

ԳԼՈՒԽ 3. ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԴՐԱՆՑ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի միկրոբիոտայի մետագենոմային ուսումնասիրությունը:

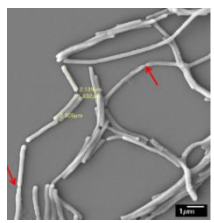
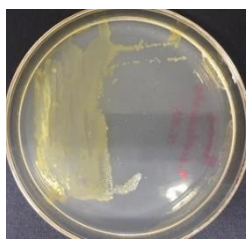
Illumina HiSeq պլատֆորմի կիրառմամբ Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի ջրային և նստվածքային նմուշներից անջատված հանրագումարային ԴՆԹ-ի մետագենոմային վերլուծության արդյունքում ստացվել են ավելի քան 11 միլիոն բարձր որակի հաջորդականությունների կտորներ (read), որոնցից բակտերիական պատկանելիություն ունեն 94.2%-ը և 83.8%-ը՝ արքեական ծագում՝ 0.04% և 0.07%-ը, համապատասխանաբար ջրային և նստվածքային նմուշներում: Երկրաջերմային ջրում գերակշռող էին Proteobacteria ֆիլումի ներկայացուցիչները (ընդհանուր հաջորդականությունների կտորների 85%-ից ավելին), որոնց հաջորդում են Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Ignavibacteriae, և Deinococcota (նախկինում՝ Deinococcus-Thermus) ֆիլումների ներկայացուցիչները (նկար 2):

Թերմոֆիլ աերոբ ասպորոգեն մանրէի մեկուսացումը: Ջրաղմային նմուշից մեկուսացնել է գրամ-բացասական, աերոբ ասպորոգեն, ձողաձև բակտերիաների կուլտուրա, որն անվանակոչվել է K1: Այն առաջացնում է դեղին գունավորված, կլոր, հարթ եզրերով, փոքր-ինչ ուռուցիկ գաղութներ (նկար 3.Ա), բջիջները ձողաձև են, ունեն 0.2-0.25 մկմ լայնություն և 2.15-2.90 մկմ երկարություն և առաջացնում են ֆիլամենտներ (նկար 3.Բ):



Նկար 2. Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի ջրային և նստվածքային նմուշներում հայտնաբերված մանրէների բաշխվածությունը ֆիլումային մակարդակով

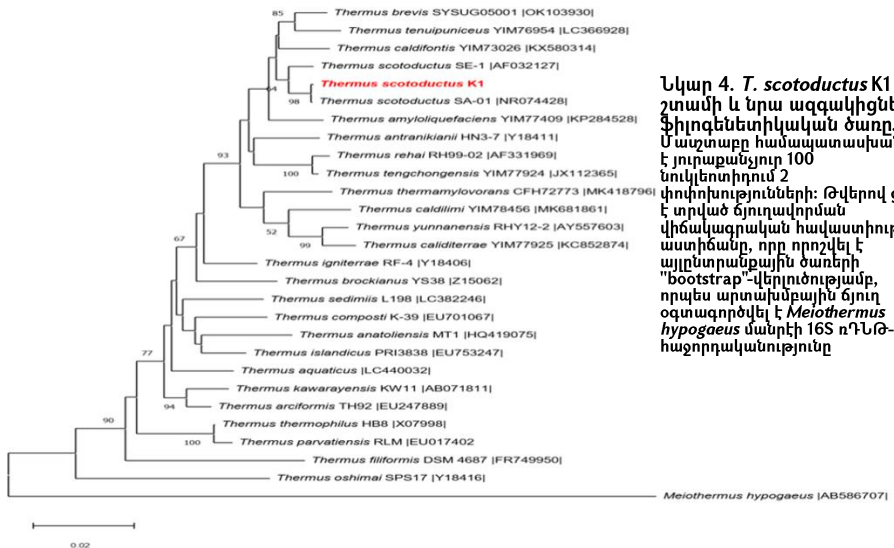
Նկար 3.Ա. K1 շտամի աճը Բրոկի սննդամիջավայրում
Բ.K1 շտամի էլեկտրոնամանրադիտակային պատկերը (x6500 խոշորացմամբ)
Կարմիր սլաքներով նշված են ֆիլամենտային կառուցվածքները



K1 շտամի նույնականացումը և ֆիլոգենետիկական: K1 շտամի ֆիլոգենետիկական նույնականացումն իրականացվել է ըստ 16S ռԻՆԹ գենի վերլուծության: Գենոմային ԴՆԹ-ից ամպլիֆիկացված, ապա՝ սեքվենավորված համապատասխան

գենային հաջորդականության համեմատությունը GenBank-ի տվյալների բազայում ավանդադրված հաջորդականությունների հետ ցույց է տվել, որ այն 99% նմանություն ունի Հարավային Աֆրիկայի սուկու հանքի հոսքաջերից (60°C) մեկուսացված *Thermus scotoductus* SA-01 շտամի հետ [Kieft et al., 1999]: Ըստ 16S ռԻՆՌ-ի գենի հաջորդականությունների վերլուծության կոլտուրան նույնականացվել է որպես *Thermus scotoductus* K1 և համալրել է Երևանի պետական համալսարանի Կենսաքիմիայի, մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի ամբիոնի էքստրեմոֆիլ մանրէների կոլտուրաների հավաքածուն: Շտամը դեպոնացվել է «Մանրէների ավանդադրման կենտրոն» հիմնարկում՝ MDC 11681 համարի ներքո:

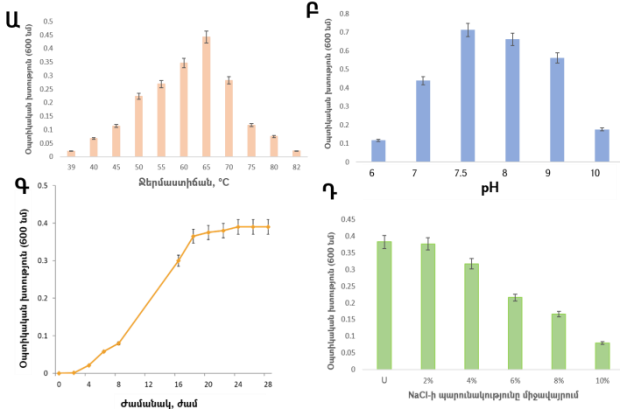
Thermus scotoductus K1 շտամի և ցեղի այլ ներկայացուցիչների միջև ազգակցությունն արտահայտող ֆիլոգենետիկական ծառը կառուցվել է շտամի և ցեղի այլ ներկայացուցիչների 16S ռԻՆՌ-ի գենի հաջորդականություններով (նկար 4):



Նկար 4. *T. scotoductus* K1 շտամի և նրա ազգակիցների ֆիլոգենետիկական ծառը. Մաշտաբը համապատասխանում է յուրաքանչյուր 100 նուկլեոտիդում 2 փոփոխությունների: Թվերով ցույց է տրված ճյուղավորման վիճակագրական հավաստիության աստիճանը, որը որոշվել է այլընտրանքային ծանրերի "bootstrap"-վերլուծությամբ, որպես արտախմբային ճյուղ օգտագործվել է *Meiothermus hypogaeus* մանրէի 16S ռԻՆՌ-ի հաջորդականությունը

K1 շտամի ֆենոտիպական հատկանիշների ուսումնասիրությունը: Կոլտուրան աճ է ցուցաբերում 40-80°C ջերմաստիճանային միջակայքում, իսկ աճի ջերմաստիճանային օպտիմումը 65°C է (նկար 5.Ա), ունակ է աճել pH 6.0-10.0 պայմաններում, ընդ որում՝ pH օպտիմումը կազմում է 7.5-8.0 (նկար 5.Բ): Օպտիմալ pH-ի և ջերմաստիճանի պայմաններում պարբերական աճեցման դեպքում կոլտուրայի աճի էքսպոնենցիալ փուլը սկսվում է մոտավորապես 6-7-րդ ժամում, իսկ ստացիոնար փուլին կոլտուրան հասնում է աճեցման 22-րդ ժամում (նկար 5.Գ): Ցույց է տրվել, որ NaCl-ի 2-4% կոնցենտրացիայի դեպքում կոլտուրայի աճի տեմպը գրեթե չի զիջում, կամ քիչ է զիջում աղ չպարունակող սննդամիջավայրում կոլտուրայի աճի արագությամբ (նկար 5.Դ): Շտամն ունակ է աճել որպես ածխածնի միակ աղբյուր տվին 80 պարունակող սննդամիջավայրում, ունի նաև շատ թույլ արտահայտված ամիլոլիտիկ և կազեինոլիտիկ հատկություններ, սակայն չի

հիդրոլիզում ժելատինը, կատալազ և օքսիդազ դրական է: Թաղանթային ճարպաթթուների վերլուծությամբ ցույց է տրվել, որ K1 շտամը սինթեզում է գլխավորապես իզո- և անտեիզո-ճյուղավորված հագեցած ճարպաթթուներ: K1 շտամի ՃԹՄԷ պրոֆիլները ցույց են տալիս, որ թաղանթում գերակշռող ճարպաթթուներն են C 15:0 իզո (41.79%), C17:0 իզո (28.52%) և C 15:0 անտեիզո (11.41%) ճարպաթթուները:

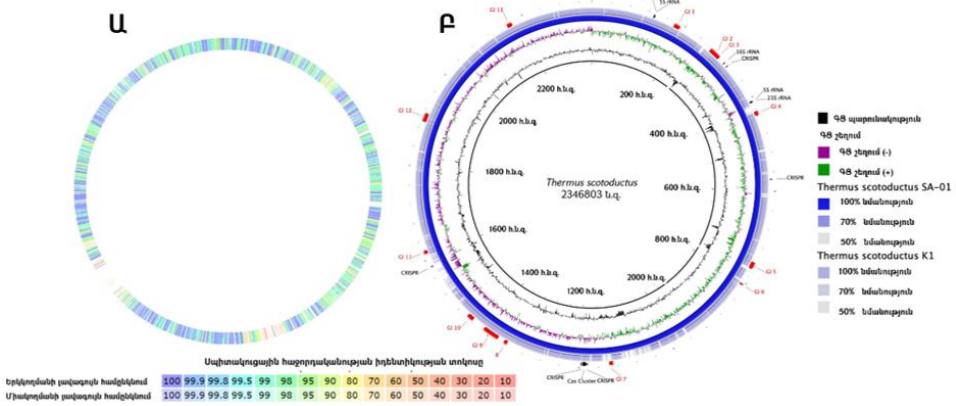


Նկար 5. Ա. K1 շտամի աճը տարբեր ջերմաստիճաններում
 Բ. K1 շտամի աճը միջավայրի pH-ի տարբեր արժեքների դեպքում (65°C-ի պայմանում)
 Գ. K1 շտամի աճի կորը պարբերական կուլտուրայում
 Դ. K1 կուլտուրայի աճը NaCl-ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում (Մ – ստուգիչ, որում բացակայում է աղը):
 Յուրաքանչյուր կետը ներկայացնում է 3 չափումների արժեքների միջին թվաբանականը, սխալանքի գծերը ներկայացնում են այդ երեք արժեքների միջև միջին քառակուսային շեղումը

K1 շտամի գենոմի ուսումնասիրությունը: K1 շտամի գենոմի սեքվենավորման և խմբագրման արդյունքների վերլուծությամբ ստացվել են ընդհանուր 110,643 հաջորդականությունների կտորներ, սեքվենավորված հիմքերի 303,436 հ.ն.գ. չափով, որոնք հավաքագրվել են 55 քոնթիգներում՝ ներառելով ընդհանուր 2,379,636 ն.գ.: K1 շտամի գենոմի ԳՑ պարունակությունը կազմում է 65.2%: K1 և SA-01 շտամների գենոմների միջին նուկլեոտիդային նմանությունը կազմում է 97.48% (միջին քառակուսային շեղումը = 3.82%): Երկկողմանի ՄՆՆ-ը կազմում է 97.55%, իսկ ընդհանուր գենոմային հոմոլոգիան՝ 80.70%: K1 շտամի գենոմի հաջորդականությունը ավանդադրվել է DDBJ/EMBL/GenBank-ում՝ [LJJR000000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/LJJR000000000) հաշվառման համարով: K1 և SA-01 շտամների գենոմների համահավասարեցումը ցույց է տվել գրեթե լիարժեք համընկում՝ աննշան բացթողումներով, որոնք ներկայացնում են հոմոլոգներ չունեցող հատվածները:

K1 շտամի գենոմի վերծանումը: NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ծրագրով գեների կանխատեսմամբ հայտնաբերել են 2529 գեներ, ներառյալ՝ 2104 կոդավորող ԴՆԹ հաջորդականություններ, ոՌՆԹ-ի գեների հավաքակազմ (set), 48 փՌՆԹ-ի գեներ և 2 ոչ կոդավորող ՌՆԹ-ի գեներ: ոՌՆԹ-ի գեները կասակցված չեն, և տեղակայված են առանձին՝ 16S և 23/5S ոՌՆԹ գեներում/օպերոններում: Ըստ RAST ծրագրով իրականացված վերծանման և SEED viewer-ի միջոցով վերլուծման, հնարավոր հատկանիշների քանակը կազմում է 2711, իսկ հնարավոր բացակայող գեների քանակը՝ 21: Հնարավոր քոնտիգների քանակը կազմում է 54, ենթահամակարգերի քանակը՝ 358, որից սպիտակուց կոդավորող հաջորդականությունների քանակը կազմում է 2653, իսկ ՌՆԹ կոդավորողների քանակը՝ 58: Սպիտակուց կոդավորող հաջորդականությունների 46%-ը

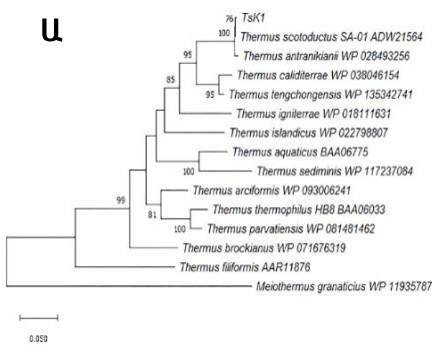
ներկայացված է ենթահամակարգերում, իսկ 54%-ը՝ դրանից դուրս: KEEG վերլուծությունը ցույց է տվել, որ շտամն ունի ամբողջական եռկարբոնաթթվային ցիկլ, գլիքսիլատային ցիկլ, պենտոզոֆոսֆատային ցիկլ, գլիկոլիզի և գլյուկոնեոգենեզի ուղիներ: Ավելին, հայտնաբերվել են գեներ, որոնք առցանցված են վիրուլենտության, ախտածնության, պաշտպանության, դորմանտության և սպորառաջացման հետ, չնայած որ այս բակտերիան պատկանում է սպոր չառաջացնող խմբի: Ինչպես և ակնկալվում էր, երկու գենոմները (K1 և SA-01) միանման են առանցքային մետաբոլիկ ուղիներով (եռկարբոնաթթվային ցիկլ, նիտրատային, սուլֆատային մետաբոլիզմ, և այլն): Գենոմային սակավ տարբերություններ հայտնաբերվել են հիմնականում հիպոթետիկ սպիտակուցների շրջանում, չնայած որ K1 շտամի գենոմում հայտնաբերվել են ֆագերի, տրանսպոզազների հետ կապված գեներ, որոնք բացակայում են SA-01-ի գենոմում: Բացի դա, հայտնաբերվել են որոշ գեներ, որոնք կոդավորում են ցիտոքրոմ P450 (թույների դետոքսիկացիայի մեջ մասնակցող) և RuBisCo գենի երկար և կարճ շղթաները, որոնք նույնպես բացակայում են SA-01 գենոմում: Ուսումնասիրվող շտամի սպիտակուցային հաջորդականությունների համեմատությունը SA-01-ի հետ (նկար 6.Ա-ում) ցույց է տվել, որ սպիտակուցների մեծ մասը առնվազն 99% հաջորդականության նմանություն ունի SA-01 շտամի հետ: *Thermus* ցեղին պատկանող բակտերիաների գենոմների համահավասարեցումը BLAST Ring Generator (BRIG) v0.95-ի միջոցով [Alikhan et al., 2011] ևս ցույց է տալիս երկու գենոմների միջև նմանությունը, չնայած ոչ հոմոլոգ հատվածները ևս ակներև են (նկար 6.Բ): Այսպես, ներքին օղակը ներկայացնում է K1 շտամի գենոմը, հաջորդիվ ներկայացված են ԳՑ շեղումը և պարունակությունը: Արտաքին օղակը պատկանում է SA-01 շտամին: Որքան ինտենսիվ է գունավորումը յուրաքանչյուր շղթայում, այնքան բարձր է նմանության աստիճանը ուսումնասիրվող գենոմում:



Նկար 6.Ա. *T. scotoductus* K1 և SA-01 շտամների միջև սպիտակուցային հաջորդականությունների տոկոսային նմանությունն արտահայտող գծապատկեր՝ քսո RAST վերլուծության, Բ. K1 շտամի գենոմի օղակաձև ներկայացվածությունը՝ որպես ռեֆերենս *T. scotoductus* SA-01 գենոմի կիրառմամբ. Օղակները ձևավորվել են Blast Ring Image Generator (BRIG) առցանց հարթակի միջոցով: Կարմիրով ներկայացված են գենոմային կղզյակները (GI)

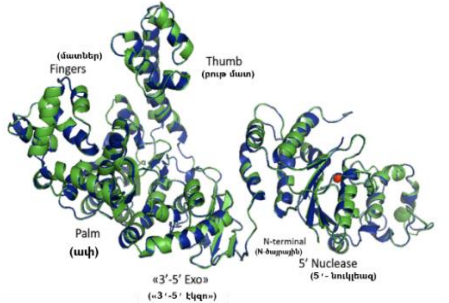
K1 շտամի I տիպի ԴՆԹ-պոլիմերազի գենի և համապատասխան սպիտակուցի հաջորդականության *in silico* ուսումնասիրությունը: Օրիգինալ ԴՆԹ-պոլիմերազի

գենը ներառում է 2493 ն.գ., որը կողպվորում է 830 ամինաթթվից բաղկացած 93613.61 Դա մոլեկուլային զանգվածով սպիտակուց, որը պայմանականորեն անվանակոչել էնք *TsK1*: Իրականացված ամինաթթվային հաջորդականությունների ֆիլոգենետիկ վերլուծությունը (նկար 7.Ա), ցույց է տվել, որ *TsK1* ԴԼԹ-պոլիմերազի հաջորդականությունը բարձր հոմոլոգիա ունի *T. scotoductus* SA-01-ի և *T. antranikianii*-ի ԴԼԹ-պոլիմերազների հետ, և բավական տարբերվում է *T. aquaticus*-ի և *T. thermophilus*-ի I տիպի ԴԼԹ-պոլիմերազներից, ընդ որում, այն 85.75% հաջորդականության նմանություն ունի նաև *Taq* պոլիմերազի հետ: *T. aquaticus*-ից ծագող *Taq* պոլիմերազի և ուսումնասիրվող պոլիմերազի որոշ դոմենների ամինաթթվային հաջորդականությունների համահավասարեցումը (նկար 7.Բ) ցույց է տալիս, որ ԴԼԹ-ի և ddCTP-ի հետ փոխազդող բոլոր ամինաթթուները և կատալիտիկ ամինաթթվային եռյակը (նշված Klenow հատվածի հետ համեմատությամբ, ըստ [Li et al., 1998]) բավական կոնսերվատիվ են: Նկարում դրանք նշված են համապատասխանաբար դեղին և կարմիր գույներով:



Նկար 7.Ա. K1 շտամի ԴԼԹ-պոլիմերազի (*TsK1*) և *Thermus* ցեղի այլ պոլիմերազների միջև էվոլյուցիոն կապն արտահայտող ֆիլոգենետիկական ծառը կառուցված առավելագույն նմանության վերլուծության հիման վրա: Ցուցադրված է առավելագույն նմանության (7699.30) ծառը: Ցուրաբանյուր ճյուղի կողքին ներկայացված է bootstrap արժեքը (1000 կրկնություն) յուրաքանչյուր կետի համար: Մասշտաբը ներկայացնում է 0.05 փոխարկումներ (substitution) յուրաքանչյուր ամինաթթվային դիրքի համար: Բ. *Taq* պոլիմերազի և *TsK1* պոլիմերազի որոշ դոմենների ամինաթթվային հաջորդականությունների համահավասարեցումը: ԴԼԹ-ի և ddCTP հետ փոխազդող բոլոր ամինաթթուները, այնպես էլ կատալիտիկ ամինաթթվային եռյակը նշված են համապատասխանաբար դեղին և կարմիր գույներով: Նշված Klenow հատվածի հետ համեմատությամբ, ըստ [Li et al., 1998]

TsK1 պոլիմերազի երրորդային կառուցվածքի մասին պատկերացում կազմելու համար իրականացվել է դրա և *Taq* պոլիմերազի վերահամադրումը (superimposition), որը վիզուալիզացվել է PyMOL ծրագրով: Արդյունքները ներկայացված է նկար 8-ում: Տարբեր դոմենների նշագրումն իրականացվել է ըստ համապատասխան նկարագրության [Kim et al., 1995]:

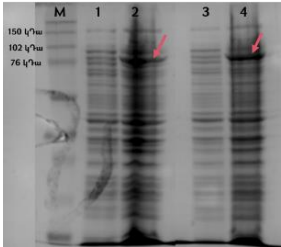


Նկար 8. ԴԼԹ Պոլիմերազի երրորդային կառուցվածքի մոդելը. վիզուալիզացիան իրականացվել է PyMol ծրագրով

7sK1 ԴՆԹ-պոլիմերազի կլոնավորումը էքսպրեսիոն վեկտորներում:

Իրականացվել է պոլիմերազի գենի հաջվադեպ կոդոնների բարելավում՝ սպիտակուցային հաջորդականության պահպանմամբ: Արդյունքում հաջողվել է նախագծել և ապա ստանալ pC57-Mini պլազմիդում ներկառուցված սինթետիկ գեն, որն էլ օգտագործվել է հետագա աշխատանքներում: Պոլիմերազի բարելավված գենի և p7xNH3, p7xC3H էքսպրեսիոն պլազմիդների SapI ռեստրիկտազով մշակման, հաջորդիվ կցակարման և *E.coli* TOP10 տեր-բջիջներում հաջող տրանսֆորմացման արդյունքում յուրաքանչյուր վեկտորի համար ընտրված ճիշտ ներդիրով պլազմիդ պարունակող մեկական կլոններ օգտագործվել են հաջորդիվ արդեն էքսպրեսիոն տեր բջջում տրանսֆորմացման և սպիտակուցի գերարտադրության մակաձման համար:

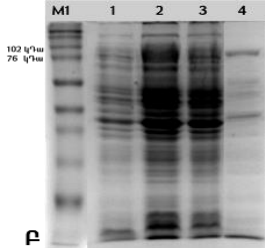
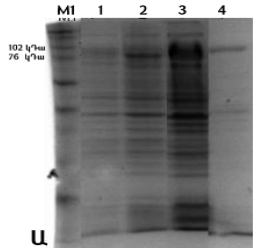
ԴՆԹ-պոլիմերազի էքսպրեսիան և մաքրումը: Սպիտակուցի գերարտադրության մակաձման համար համապատասխան գենը կրող յուրաքանչյուր պլազմիդ տրանսֆորմացվել է *E.coli* BL21 (DE3) բջիջներում: Ստացված տրանսֆորմանտներն աճեցվել են կանամիցին պարունակող 2xYT հեղուկ սննդամիջավայրում: Սպիտակուցի գերարտադրությունը խթանվել է ԻՊԹԳ-ի ավելացմամբ: Երկու պլազմիդների դեպքում էլ հաջողվել է իրականացնել մեզոֆիլ տեր-օրգանիզմում թիրախային սպիտակուցի գերարտադրություն (Նկար 9):



Նկար 9. Ընտրված պլազմիդներից պոլիմերազի էքսպրեսիան արտահայտող ԵԴԱ-ՊԱԱԺ էլեկտրաֆորեզը.
 1- p7xNH3 (մինչև ԻՊԹԳ-ով խթանումը), 2- p7xNH3 (ԻՊԹԳ-ով խթանումից հետո), 3 - p7xC3H (մինչև ԻՊԹԳ-ով խթանումը), 4- p7xC3H (ԻՊԹԳ-ով խթանումից հետո), M - Full Range rainbow սպիտակուցային չափասանողը (BioRad)

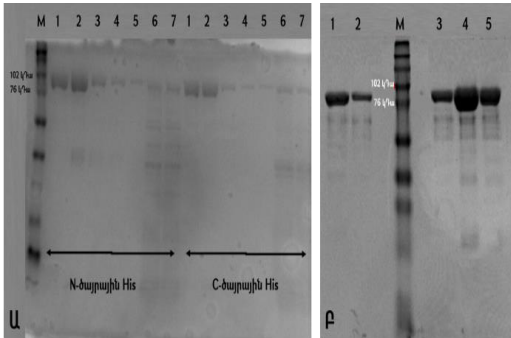
Ինչպես երևում է Նկարից, ի տարբերություն ինդուկցիայի չենթարկված բջիջների (Նկար 9, գծեր 1 և 3), ինդուկցված կուլտուրաներում (Նկար 9, գծեր 2 և 4) տեսանելի է մոտավորապես 94 կԴա չափի անհամեմատ ինտենսիվ բիծ, ինչը հաստատում է ռեկոմբինանտ սպիտակուցի բարեհաջող գերարտադրությունը: Ուլտրաձայնային քայքայման արդյունքում ստացված էքստրակտում զգալի քանակությամբ 94 կԴա զանգվածով սպիտակուցի առկայությունը վկայում է այն մասին, որ թիրախային C-ձայրային (Նկար 10.Ա, գիծ 3) և N-ձայրային (Նկար 10.Բ, գիծ 3) հիստիդինային նիշ կրող սպիտակուցները լուծելի են, հետևաբար՝ ենթակա են հետագա ուսումնասիրության:

Ջերմային մշակումից հետո բծերի քաջցումը վկայում է տեր-օրգանիզմի կոնտամինացնող սպիտակուցների քայքայման մասին (Նկար 10.Ա,Բ, գիծ 4): Չնայած ջերմային մշակումը և հաջորդիվ կենտրոնախուսումը հնարավորություն տվեցին ազատվել տեր-բջջի սպիտակուցների մեծ մասից, այնուամենայնիվ, որոշ անցանկալի սպիտակուցներ դեռևս առկա էին թիրախային ֆերմենտը պարունակող վերնստվածքում:



Նկար 10. C-ձայրային (Ա) և N-ձայրային (Բ) հիստիդինային նիշ կրող էքսպրեսված սպիտակուցի մաքրման նախնական փուլի ԵԴԱ-ՊԱԱԺ էլեկտրաֆորեզը.
 M1- Full Range rainbow սպիտակուցային չափասանողը (BioRad), 1- չիղուկցված կուլտուրա, 2-ինդուկցված կուլտուրա, 3-տեր-բջիջների ուլտրաձայնային մշակումից ստացված էքստրակտ, 4- ջերմային մշակումից և կենտրոնախուսումից հետո ստացված վերնստվածքը

Սպիտակուցների մաքրման համար կիրառվել են HisTalon ձգողական աշտարակներ (Takara): Արդյունքում ստացվել է գրեթե մաքուր սպիտակուց, ինչի մասին վկայում է էյուոցիոն ֆրակցիաների բարձր հոմոգենության աստիճանը աֆինային քրոմատոգրաֆիայից հետո: Թիրախային սպիտակուցի առավելագույն քանակ պարունակող էյուոցիոն ֆրակցիաները (նկար 11.Ա, գիծ 1, նկար 11.Բ, գիծ 1՝ N-ձայրային, նկար 11.Ա, գիծ 1-2, նկար 11.Բ 3-4՝ C-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցների համար) միավորվել և ենթարկվել են ժել-ֆիլտրացիայի PD-10 աշտարակներով՝ իմիդազոլից մաքրման նպատակով (նկար 11.Բ, գծեր 2 և 5՝ համապատասխանաբար N- և C-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցի համար):



Նկար 11. *TsK1* պոլիմերազի մաքրման ընթացքի որոշ ֆրակցիաների ՆԴԱ-ՊԱԱԺ էլեկտրաֆորեզամբ:

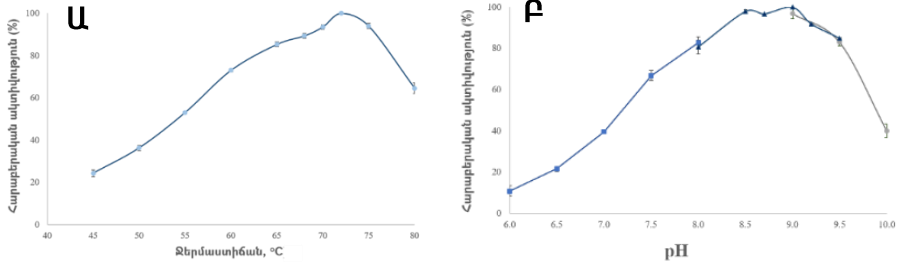
Ա. 1-5-էյուոցիայի փուլի առաջին հինգ ֆրակցիաները, 6-ջերմային մշակումից հետո ստացված ֆիլտրված վերնատվածքի՝ աշտարակին ավելացված վերջին ֆրակցիան, 7-վազման փուլի առաջին ֆրակցիան:

Բ. 1-N-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցի էյուոցիայի առաջին ֆրակցիան, 2-N-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցը՝ PD-10 աշտարակով ժել-ֆիլտրացիայից հետո, 3,4-C-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցի էյուոցիայի առաջին և երկրորդ ֆրակցիաները, 5-C-ձայրային հիստիդինային նշագրմամբ սպիտակուցը՝ PD-10 աշտարակով ժել-ֆիլտրացիայից հետո, M- Full Range rainbow սպիտակուցային չափասանդուրը (BioRad)

***TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի որոշ հատկանիշների ուսումնասիրությունը:** Տույց է տրվել, որ *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության օպտիմալ ջերմաստիճանային տիրույթը 68-75°C է, ընդ որում, ամենաբարձր ակտիվությունը գրանցվել է 72°C-ի պայմանում (նկար 12.Ա): *TsK1* պոլիմերազի ակտիվության օպտիմալ ջերմաստիճանը (72°C) համեմատելի է այլ *Taq*-տիպի պոլիմերազների հետ [Lawyer et al., 1993, Park et al., 1993], իսկ նվազագույն պոլիմերազային ակտիվությունը 80°C-ի պայմաններում կարելի է բացատրել օգտագործված կաղապարի (հորթի թիմուսային ակտիվացված ԴՆԹ) բարձր ջերմաստիճաններում դենատուրացմամբ, քանի որ *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազը կայուն է 80°C-ի պայմաններում: Ֆերմենտը առավելագույն ակտիվություն է ցուցաբերում pH-ի 8.5 - 9.2 տիրույթում Tris-HCl բուֆերի դեպքում, ընդ որում առավելագույն ակտիվությունը դրսևերվել է pH 9.0-ի դեպքում (նկար 12.Բ), ի տարբերություն *Taq* պոլիմերազի, որը նախընտրում է ավելի քիչ հիմնային pH [Chein et al., 1976, Lawyer et al., 1993]: Հետաքրքիր է, որ *T. caldophilus* GK24 շտամի I տիպի ԴՆԹ-պոլիմերազի աշխատանքի օպտիմալ pH-ը ևս թույլ հիմնային է, և կազմում է 8.7 [Park et al., 1993]:

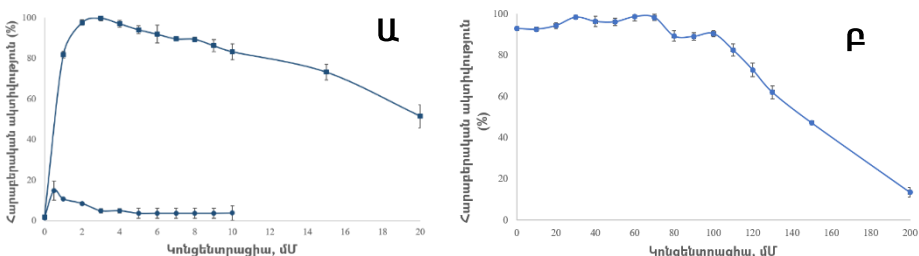
Տույց է տրվել, որ *TsK1* ֆերմենտը բարձր կախվածություն ունի Mg^{2+} իոններից: Ֆերմենտի ակտիվության համար օպտիմալ է Mg^{2+} իոնի 3-5 մՄ կոնցենտրացիան, իսկ 8 մՄ և բարձր կոնցենտրացիաները ճնշում են նրա ակտիվությունը: Mn^{2+} իոնների առկայությունը գրեթե ազդեցություն չունի պոլիմերազի ակտիվության վրա (նկար 13.Ա): Ստացված արդյունքները համահունչ են գրականության տվյալներին, որոնք վկայում են, որ Mg^{2+} իոնները որոշիչ բաղադրիչներ են ԴՆԹ պոլիմերազների համար [Choi et al., 2006]: Ի տարբերություն *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի, որի

առավելագույն ակտիվության համար Mg^{2+} -ի օպտիմալ քանակությունը կազմում է 3-5 մՄ, *Taq*, ռեկոմբինանտ *Taq* և *Tca* պոլիմերազների առավելագույն ակտիվության համար օպտիմալ են այս կատիոնի՝ համապատասխանաբար 10, 2-4 և 12 մՄ կոնցենտրացիաները [Chein et al., 1976, Lawyer et al., 1993, Park et al., 1993]:



Նկար 12. Ա. Ջերմաստիճանի ազդեցությունը *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության վրա
Բ. pH-ի ազդեցությունը *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության վրա.
 MOPS-NaOH (■), Tris-HCl (▲), և գլիցին-NaOH (●) բուֆերային համակարգերում: Յուրաքանչյուր կետը ներկայացնում է 3 չափումների արժեքների միջին թվաբանականը, սխալանքի գծերը ներկայացնում են այդ երեք արժեքների միջև միջին քառակուսային շեղումը

Ցույց է տրվել, որ *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազն ակտիվ է մինչև 70 մՄ KCl-ի առկայության պայմաններում, իսկ կալիում իոնի ավելի բարձր կոնցենտրացիաները ճնշում են ֆերմենտի ակտիվությունը (նկար 13.Բ): *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվությունը, կարելի է ասել, անկախ է KCl-ից, ցածր կոնցենտրացիաների պարագայում: Ինչպես ցույց է տրվել նախկինում, KCl-ի՝ 100 մՄ-ից բարձր կոնցենտրացիաները արգելակում են նաև *Taq* պոլիմերազին [Chein et al., 1976]:

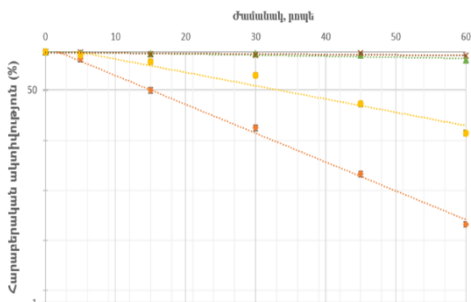


Նկար 13. Ա. *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության վրա երկվալենտ կատիոնների ազդեցությունը.
Բ. *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի ակտիվության կախվածությունը KCl-ի կոնցենտրացիայից.

■ - Mg^{2+} , ● - Mn^{2+}
 Յուրաքանչյուր կետը ներկայացնում է 3 չափումների արժեքների միջին թվաբանականը, սխալանքի գծերը ներկայացնում են այդ երեք արժեքների միջև միջին քառակուսային շեղումը

Մաքուր *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի սպեցիֆիկ ակտիվությունը հաշվարկվել է 27.03 միավոր/մկգ: Ցույց է տրվել, որ *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազը առնվազն մեկ ժամվա ընթացքում կայուն է 75 և 80°C ջերմաստիճաններում և հարաբերական կայունություն է պահպանում 88°C-ում: Ֆերմենտը կորցնում է ակտիվության կետը 15 րոպե 95°C-ում ինկուբացնելուց հետո (նկար 14): Չնայած *TsK1* պոլիմերազի կիսաքայքայման ժամանակը (առանց լրացուցիչ կայունացուցիչների ավելացման)

95°C-ում (15 րոպե) ավելի քիչ է քան *Taq* պոլիմերազի պարագայում (40 րոպե, կայունացուցիչների ավելացմամբ) [Lawyer et al., 1993], սակայն շատ մոտ է առևտրային այլ պոլիմերազների, օրինակ՝ *rTaq* պոլիմերազին (20 րոպե) [Gibbs et al., 2009], ինչը վկայում է, որ այն կիրառելի է ՊՇՌ-ում: Ընդ որում, *Thermus* ցեղի որոշ շտամներից անջատված պոլիմերազների ջերմակայունությունը զգալիորեն գիջում է *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազին: Դրանց շարքին են պատկանում *Wai28A.1*, *NMX2A.1*, *Fiji3A.1*, և *OHA.2* պոլիմերազները, որոնց կիսաքայքայման ժամանակը կազմում է համապատասխանաբար 4, 3.5, 6, և 2.5 րոպե 95°C-ի պայմանում [Gibbs et al., 2009]: Ընդ որում, այս ֆերմենտները նաև ավելի ցածր ՊՇՌ-ամպլիֆիկացման արդյունավետություն ունեն *Taq* պոլիմերազի հետ համեմատած: Ի հակադրություն սրան, *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազը ամպլիֆիկացման բարձր արդյունավետություն է ցուցաբերել անգամ տարաբնույթ ԴՆԹ կաղապարների կիրառմամբ:

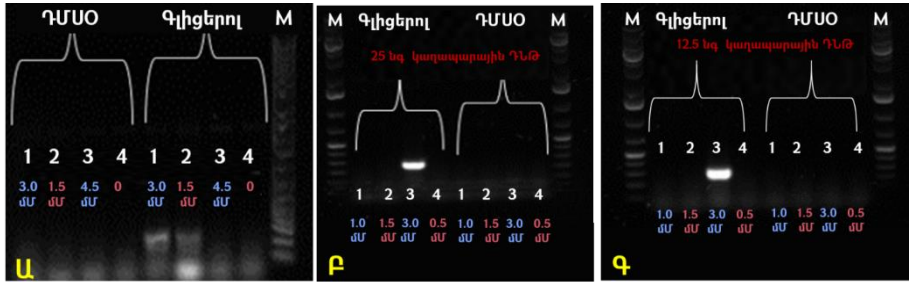


Նկար 14. *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի ջերմակայունությունը.
 x - ներկայացնում է 75 °C
 ▲ - ներկայացնում է 80 °C
 ● - ներկայացնում է 88 °C
 ◆ - ներկայացնում է 95 °C
 Տվյալները ներկայացված են լոգարիթմական մասշտաբով: Յուրաքանչյուր կետը ներկայացնում է 3 չափումների արժեքների միջին թվաբանականը, սխալների գծերը ներկայացնում են այդ երեք արժեքների միջև միջին քառակուսային շեղումը

***TsK1* պոլիմերազով իրականացվող ՊՇՌ- ամպլիֆիկացման**

պայմանների բարելավումը: Հաշվի առնելով, որ ուսումնասիրվող սպիտակուցը *Taq* պոլիմերազին նման ֆերմենտ է, *TsK1* պոլիմերազով ՊՇՌ ամպլիֆիկացման իրականացման պայմանների բարելավման նախնական փորձերն իրականացվել են կոմբեցիոն OneTaq Standard ռեակցիոն բուֆերում (NEB)՝ միակցման և երկարացման տարբեր ջերմաստիճանային ռեժիմներում [Kramer and Coen, 2001]: Սակայն, նշված պայմաններում *TsK1* պոլիմերազով իրականացված փորձերի արդյունքում կամ չի ստացվել, կամ ստացվել են ոչ սպեցիֆիկ ամպլիկոններ, ինչը վկայում է այն մասին, որ յուրաքանչյուր պոլիմերազի համար չկա համընդհանուր օգտագործման բուֆեր, և կա անհրաժեշտություն ռեակցիայի բաղադրիչների օպտիմալ քանակությունների հայտնաբերման և համապատասխան աշխատանքային բուֆերի բաղադրության մշակման: Այս խնդիրը լուծելու նպատակով մշակվել է կայունացուցիչներ պարունակող OPT բուֆեր (10 մՄ Tris-HCl, pH 9.0, 50 մՄ KCl, 0.1% Triton X, pH 9.0) և օգտագործվել որպես հիմնական ռեակցիոն բուֆեր հետագա փորձերում: MgCl₂ -ի տարբեր կոնցենտրացիաներ (0, 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 4.5 մՄ) են փորձարկվել՝ 10% գլիցերոլի կամ 5% ԴՄՍՕ-ի հետ համակցված: Ամպլիֆիկացման ելքը գնահատվել է ըստ ՊՇՌ արգասիքների ազարոզային ժել-էլեկտրաֆորեզի պատկերում բծերի ինտենսիվության (նկար 15): Ինչպես երևում է նկարից, ՊՇՌ ռեակցիոն խառնուրդին որպես կայունացուցիչ գլիցերոլի ավելացումը, համադրված 3 մՄ MgCl₂ -ի հետ, զգալիորեն բարելավում է ՊՇՌ ելքը: Ընդ որում, ամպլիկոնների բծերի ինտենսիվությունը ավելի մեծ է

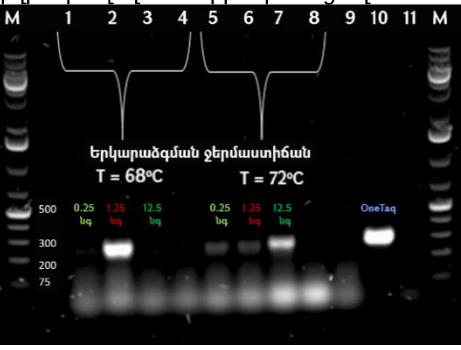
կաղապարային ԴՆԹ-ի ավելի փոքր քանակի կիրառության ժամանակ (նկար 15. Գ գիծ 3): Ի հակադրումն սրա, գլիցերոլի փոխարեն որպես կայունացուցիչ ԴՄՍՕ-ի ավելացման դեպքում ամպլիֆիկացում չի ընթացել (նկար 15. Ա, Բ, Գ): Որոշվել է նաև *TsK1* պոլիմերազի ամպլիֆիկացիայի արդյունավետությունը կախված օգտագործվող ԴՆԹ-կաղապարի քանակից և երկարձաման ջերմաստիճանից:



Նկար 15. 265 ն.գ. չափով ԴՆԹ հատվածի ամպլիֆիկացիայի արդյունքը *TsK1* պոլիմերազով՝ որպես կայունացուցիչներ ԴՄՍՕ-ի կամ գլիցերոլի կիրառմամբ՝ համադրված $MgCl_2$ -ի տարբեր կոնցենտրացիաներով:

Ա. 1-4՝ ռեակցիոն խառնուրդում $MgCl_2$ -ի համապատասխանաբար 3.0 մՄ, 1.5 մՄ, 4.5 մՄ, 0 կոնցենտրացիա, Բ և Գ. *TsK1* պոլիմերազով իրականացված ՊՇՌ արգասիքների՝ կաղապարային ԴՆԹ-ի համապատասխանաբար 25 նգ և 12.5 նգ քանակի դեպքում՝ որպես կայունացուցիչներ ԴՄՍՕ-ի կամ գլիցերոլի կիրառմամբ՝ համադրված $MgCl_2$ -ի տարբեր կոնցենտրացիաներով: 1-4՝ ռեակցիոն խառնուրդում $MgCl_2$ -ի համապատասխանաբար 1.0 մՄ, 1.5 մՄ, 3.0 մՄ, 0.5 մՄ կոնցենտրացիա

Ցույց է տրվել, որ *TsK1* պոլիմերազն ունակ է իրականացնել ամպլիֆիկացիա ինչպես 68, այնպես էլ 72°C երկարաձգման ջերմաստիճանի դեպքում: Ցույց է տրվել, որ 12.5 նգ պլազմիդային ԴՆԹ-ի քանակն է օպտիմալ արդյունավետ ամպլիֆիկացիայի համար 68°C-ում էրոնգացիայի դեպքում (նկար 16, գիծ 2), իսկ 72°C-ում էրոնգացիայի դեպքում ամպլիկոնների բծերի ինտենսիվությունը մեծանում է օգտագործված կաղապարի քանակի մեծացմանը զուգընթաց (նկար 16, գիծ 5-7): Ընդ որում, գլիցերոլից զուրկ ռեակցիոն խառնուրդում ամպլիֆիկացիա տեղի չի ունեցել (նկար 16, գիծ 9), ինչը վկայում է այս բաղադրիչի կարևորության մասին *TsK1* պոլիմերազով ՊՇՌ իրականացնելու համար:

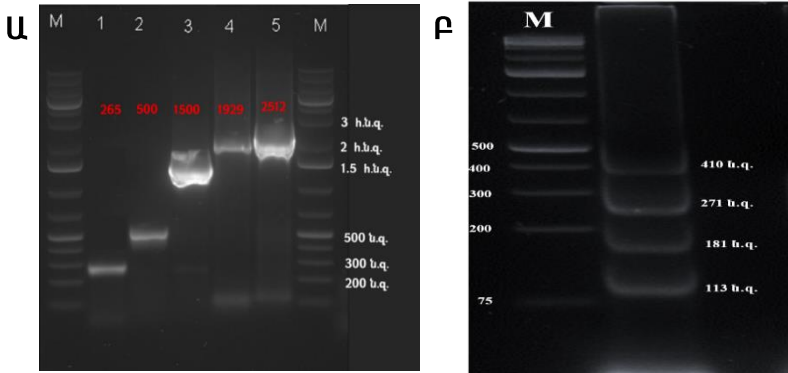


Նկար 16. 68°C և 72°C երկարաձգման ջերմաստիճանի պայմաններում *TsK1* պոլիմերազով իրականացված ՊՇՌ արգասիքների էլեկտրաֆորեզամը՝ որպես կայունացուցիչ գլիցերոլի առկայությամբ, 3 մՄ $MgCl_2$ -ի և տարբեր քանակությամբ կաղապարային ԴՆԹ-ի օգտագործմամբ: 1 և 5 - 0.25 նգ կաղապար, 2 և 6 - 1.25 նգ կաղապար, 3 և 7 - 12.5 նգ կաղապար, 4 և 8-բացասական ստուգիչներ, 9 - գլիցերոլ չի ավելացվել, 10 - դրական ստուգիչ՝ OneTag պոլիմերազով իրականացված ՊՇՌ, 11 - OneTag պոլիմերազով իրականացված ռեակցիայի բացասական ստուգիչ, M - GeneRuler 1 kb Plus ԴՆԹ չափասանուղղը (NEB)

***TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազով իրականացվող ՊՇՌ**

ամպլիֆիկացումները: Աշխատանքային բուֆերի և ռեակցիայի պայմանների օպտիմալացման արդյունքում հաջողվել է ստանալ տարբեր կաղապարներից տարբեր չափերի ամպլիկոններ՝ *TsK1* պոլիմերազով ամպլիֆիկացիա

իրականացնելով: ՊՇՌ պրոդուկտների էլեկտրոֆորեզամում (նկար 17.Ա) ամպլիկոնների բծերի ինտենսիվությունը հաստատում է, որ *TsK1* պոլիմերազը կարող է բարձր արդյունավետությամբ ամպլիֆիկացնել առնվազն մինչև 2.5 հ.ն.գ. չափով պրոդուկտներ: Փորձարկվել է նաև *TsK1* պոլիմերազի՝ մուլտիպլեքս ՊՇՌ իրականացնելու կարողությունը: Այդ նպատակով մարդու գենոմային ԴՆԹ-ն օգտագործվել է որպես կաղապար՝ ամպլիֆիկացնելու համար մարդու դիստրոֆինի գենի որոշ էկզոններ: Մի շարք էկզոնների դելեցիաները մարդու դիստրոֆինի գենում ասոցացված են Դյուշենի և Բեկերի մկանային դիստրոֆիաների հետ (ԴՄԴ, ԲՄԴ): Նախկինում նկարագրվել են մուլտիպլեքս ՊՇՌ-ի հիման վրա մշակված տարբեր մեթոդներ, որոնք թույլ են տալիս հայտնաբերել այդ գենի տարբեր էկզոններ մեկ ռեակցիայում [Beggs, 1996] և ներկայումս կիրառվում են լաբորատոր ախտորոշման մեջ: Այսպիսով, պատահականության սկզբունքով ընտրված փրայմերների չորս զույգեր են օգտագործվել էկվիմոլյար քանակությամբ մեկ ռեակցիայում՝ մարդու դիստրոֆինի գենի որոշ էկզոններ ամպլիֆիկացնելու համար՝ 3 մՄ MgCl₂ պարունակող բարելավված հիմնական ռեակցիոն խառնուրդում: Նկար 17.Բ-ում ներկայացված ամպլիկոնները հաստատում են *TsK1* պոլիմերազի ունակությունը իրականացնելու մուլտիպլեքս ՊՇՌ:



Նկար 17. Ա. *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի կիրառմամբ իրականացված ՊՇՌ արգասիքները
 Բ. *TsK1* պոլիմերազի կիրառմամբ իրականացված մարդու դիստրոֆինի գենի որոշ էկզոնների մուլտիպլեքս ՊՇՌ ամպլիֆիկացման արգասիքները

M - GeneRuler 1kb Plus ԴՆԹ չափասանող (NEB), 2 (500 ն.գ.) և 3 (1.5 հ.ն.գ.) գծերը ներկայացնում են բակտերիական գենոմային ԴՆԹ-ից, իսկ 1 (265 ն.գ.), 4 (1920 ն.գ.) և 5 (2.5 հ.ն.գ.) գծերը՝ պլազմիդային կաղապարներից ամպլիֆիկացված պրոդուկտներ

***TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազի ճշգրտությունը:** Այսպես, puC19 պլազմիդից բոլոր չորս պոլիմերազների (*TsK1*, *OneTaq*, *Taq*, *Fusion*) կիրառմամբ ամպլիֆիկացված *lacZ* գենի (265 ն.գ.) և puC19 պլազմիդի 2421 ն.գ. չափով հատվածի կցակարման արգասիքների՝ *E. coli* TOP10 քիմիայես կոմպետենտ բջիջներում տրանսֆորմացումից հետո ստացված գաղութների հաշվարկը կատարվել է հետևյալ կերպ՝ ավելի քան 33000 գաղութներ են ուսումնասիրվել *TsK1* կցակարման խառնուրդում և մոտավորապես 5000-ական գաղութներ՝ ուսումնասիրված մյուս պոլիմերազների համար: Մուտանտ գաղութների մասնաբաժինները կազմել են համապատասխանաբար 1.26%, 2.40%, 2.39%, և 0.7792%՝ *TsK1*, *Taq*, *OneTaq*, և *Fusion* պոլիմերազների համար: Չնայած մեթոդի որոշ սահմանփակումներին,

կարելի է փաստել, որ *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազը առնվազն երկու անգամ ավելի ճշգրիտ է աշխատում *Taq* պոլիմերազի համեմատությամբ:

ԵՋՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Մետազենոմային հետազոտություններով ցույց է տրվել Քարվաճառի երկրաջերմային աղբյուրի միկրոօրիտայում *Deinococcus-Thermus* բակտերիական ֆիլումին պատկանող ֆիլոտիպերի առկայությունը:
2. Մեկուսացվել է *Thermus* ցեղին պատկանող K1 անվանակոչված մանրէային կուլտուրա, որը պոլիֆազային մոտեցմամբ, այդ թվում՝ գենոմի սեքվենավորմամբ, նույնականացվել է որպես *Thermus scotoductus* տեսակի շտամ:
3. Ցույց է տրվել, որ *T. scotoductus* K1-ի պոլիմերազի գենի կոդոնային բարելավմամբ ստացված բարձր մաքրությամբ ռեկոմբինանտ ֆերմենտային N- և C-ձայրային հիստիդինային նիշով սպիտակուցների ելքը կազմել է համապատասխանաբար 151.6 մգ և 161.5 մգ՝ բջջային կենսազանգվածի մեկ գրամից (թաց քաշ):
4. Ցույց տրվել, որ ֆերմենտի աշխատանքի օպտիմալ ջերմաստիճանային և pH տիրույթները համապատասխանաբար 68-75°C և 8.5-9.2 արժեքների սահմանում են: Ֆերմենտը կայուն է ընդհուպ 80°C ջերմաստիճանում, հարաբերական կայունություն է պահպանում 88°C-ում առնվազն մեկ ժամ, և կորցնում իր ակտիվության կեսը 95°C-ում 15 րոպե ինկուբացնելուց հետո: *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի սպեցիֆիկ ակտիվությունը ռեակցիայի օպտիմալ պայմաններում 27.03 միավոր/մկգ է:
5. *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազի կիրառմամբ արդյունավետ ՊՇՌ- իրականացման համար օպտիմալ աշխատանքային բուֆերի (OPT) կազմը հետևյալն է՝ 10 մՄ Tris-HCl, pH 9.0, 50 մՄ KCl, 0.1% Triton X՝ 3 մՄ MgCl₂-ի և 10% գլիցերոլի համադրությամբ:
6. Ցույց է տրվել, որ *TsK1* ԴՆԹ պոլիմերազը բարձր արդյունավետությամբ ամպլիֆիկացնում է առնվազն 2.5 հ.ն.զ. չափով ԴՆԹ-ի հատվածներ ինչպես 68°C, այնպես էլ 72°C-ում շղթայի երկարացման դեպքում: Ֆերմենտն ունակ է իրականացնելու նաև մուլտիպլեքս ՊՇՌ:
7. Հաստատվել է, որ *TsK1* ԴՆԹ-պոլիմերազը երկու անգամ ավելի ճշգրիտ է աշխատում, քան *Taq* պոլիմերազը:

ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅԱՆ ԹԵՄԱՅՈՎ ՀՐԱՏԱՐԱԿՎԱԾ ԱՇԽԱՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

1. Сагатемян А.Р., Маргарян А.А., Паносян О.А., Трчунян А.А. (2014). *Thermus scotoductus*, изолированный из горячего источника Карвачар. Сборник тезисов “Биология наука XXI века” 18 международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых, Пушино, 223-224.
2. Сагатемян А.Р., Маргарян А.А., Паносян О.А., Трчунян А.А. (2014). Выделение и изучение *Thermus scotoductus* Karvachar-1 из горячего

- источника Карвачар, Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук, 6 (1):89-92.
3. **Saghatelyan A.R.**, Nils-Kåre Birkeland, Panosyan H.H. (2014). Microbial diversity of a geothermal spring in Nagorno-Karabakh and characterization of a novel *Thermus scotoductus* strain. Abstract Book, 15th International Symposium on Microbial Ecology ISME15, Seoul, South Korea, 61-62.
 4. **Saghatelyan A.**, Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K. (2014). Investigation of microbial diversity of geothermal springs in Nagorno-Karabakh based on metagenomic and culture-based approaches. International Scientific Workshop on “Trends in Microbiology and Microbial Biotechnology” Book of Abstracts, Yerevan, Armenia, 38.
 5. **Saghatelyan A.**, Birkeland N.K., Panosyan H. (2014). Physiology and genomics of a novel *Thermus scotoductus* strain isolated from a geothermal spring in Nagorno-Karabakh. Book of Abstracts 10th International Congress on Extremophiles, Extremophiles 2014, Saint Petersburg, Russia, 193.
 6. **Saghatelyan A.**, Panosyan H. (2015). Study of bacterial diversity of Karvachar geothermal spring using culture-independent methods. In: Collection of scientific articles of YSU SSS: materials of the scientific session dedicated to the 95th anniversary of YSU. Yerevan State University, Yerevan, 1.1()pp 13–18.
 7. Panosyan H., **Saghatelyan A.**, Margaryan A., Birkeland N.-K., Trchounian A. (2015). Diversity of thermophiles in Armenian geothermal springs. 13th International Meeting Thermophiles 2015, Santiago, Chile, 149.
 8. **Saghatelyan A.**, Panosyan H., Trchounian A. Birkeland N.-K. (2015). Bacterial diversity of geothermal springs in Nagorno-Karabakh. The FEMS 2015, 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, The Netherlands, 296.
 9. **Saghatelyan A.**, Poghosyan L., Panosyan H., Birkeland N.K. (2015). Draft Genome Sequence of *Thermus scotoductus* Strain K1, Isolated from a Geothermal Spring in Karvachar, Nagorno Karabakh. ASM Journals Genome Announc. 3(6):e01346-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01346-15>.
(Scopus)
 10. **Saghatelyan A.**, Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K. (2016). Amplification and cloning of DNA polymerase 1 (polI) of *Thermus scotoductus* K1 isolated from an Armenian geothermal spring. FEBS Journal 283 (Suppl 1), Abstracts of the 41st FEBS Congress, 165-166.
 11. Panosyan H., Margaryan A., Poghosyan L., **Saghatelyan A.**, Gabashvili E., Jaiani E., Birkeland N.-K. (2018). Microbial Diversity of Terrestrial Geothermal Springs in Lesser Caucasus. In: Egamberdieva D., Birkeland NK., Panosyan H., Li WJ. (eds) Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications. Microorganisms for Sustainability, Springer, Singapore, 8:81-117. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0329-6>.
(գրքի գրուխ)
 12. **Saghatelyan A.**, Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K. (2019). Purification and characterization of recombinant DNA polymerase I form *Thermus scotoductus* K1 strain. Abstract Book of “Microbes and their viruses: Ecology, diversity, applications”, Tbilisi, Georgia, 43.

13. **Saghatelyan, A.R. (2020).** Optimization of PCR conditions by recombinant DNA polymerase I originating from *Thermus scotoductus* K1 strain. *Biological Journal of Armenia*. Volume 72, Issue 1-2, pp. 72-77.
14. **Saghatelyan A., Panosyan H., Trchounian A., Birkeland N.K. (2021).** Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1 *MicrobiologyOpen*, 10e1149, 1-8. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1149>. (IF 3.904, Scopus)
15. **Saghatelyan A., Margaryan A., Panosyan H., Birkeland N.K. (2021).** Microbial Diversity of Terrestrial Geothermal Springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: A Review. *Microorganisms*, 9(7):1473, 1-20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071473>. (IF 4.78, Scopus)
16. **Saghatelyan A., Panosyan H., Birkeland N.K. (2021).** The Genus *Thermus*: A Brief History of Cosmopolitan Extreme Thermophiles: Diversity, Distribution, Biotechnological Potential and Applications. In: Egamberdieva D., Birkeland N.K., Li WJ., Panosyan H. (eds) *Microbial Communities and their Interactions in the Extreme Environment. Microorganisms for Sustainability*, 32, Springer, Singapore, 141-175. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3731-5_8. (գրքի գլուխ)
17. Tadevosyan M., Yeghiazaryan S., Ghevondyan D., **Saghatelyan A., Margaryan A., Panosyan H. (2022).** Microbial thermostable hydrolases (amylases, lipases, and keratinases) and polymerases: biology and applications. In: Naveen Kumar Arora, Shekhar Agnihotri, Jitendra Mishra (eds) *Extremozymes and Their Industrial Applications*. Academic Press (pp. 177-204). ISBN 9780323902748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90274-8.00007-1>. (գրքի գլուխ)

САГАТЕЛЯН АНИ РОБЕРТОВНА

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ И ШТАММА *THERMUS SCOTODUCTUS* K1 РЕЗЮМЕ

Ключевые слова: геотермальные источники, метагеномные исследования, *Thermus scotoductus*, ДНК-полимераза, гетерологическая экспрессия.

Изучено биоразнообразие микробиоты геотермального источника Карвачар (Нагорный Карабах) методом секвенирования ILLUMINA. В микробиоте источника обнаружены представители Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Ignavibacteriae, Cyanobacteria, Nitrospirae, Synergistetes, Acidobacteria, Planctomycetes, Deferribacteriae, Spirochaetes, Chlorobi, Verrcomicrobia и других филумов. Показано также присутствие представителей филума Deinococcota (ранее Deinococcus-Thermus) в микробиоте источника. Большинство идентифицированных бактериальных филотипов имеют 83–98% (в основном <94%) сходство с

известными видами или родами, что указывает на уникальный состав исходной микробиоты, включая новые и еще не открытые виды микроорганизмов.

Выделен новый термофильный бактериальный штамм K1, который полифазными методами идентифицирован как *Thermus scotoductus* K1. Проведены секвенирование и детальный анализ генома штамма K1, а также изучение и сравнение генома с близкородными видами.

Расшифрованы нуклеотидная и белковая последовательности гена, кодирующего ДНК-полимеразу I штамма K1. Выявлено, что исходный ген ДНК-полимеразы включает 2493 н.п., который кодирует белок с молекулярной массой 93613,61 из 830 аминокислот (названный *TsK1*). Филогенетический анализ показал, что белковая последовательность ДНК-полимеразы *TsK1* имеет высокую гомологию с ДНК-полимеразами *T. scotoductus* SA-01 и *T. antranikianii* и существенно отличается от *T. aquaticus* и *T. thermophilus*. Сходство аминокислотной последовательности *TsK1* с нативной *Taq* полимеразой составляет 85.75%.

Проведена оптимизация гена ДНК-полимеразы с целью элиминации редких кодонов (с сохранением аминокислотной последовательности белка). Синтетический ген клонирован с помощью системы клонирования FX (fragment exchange). После успешного клонирования и трансформации была проведена индукция сверхэкспрессии белка в мезофильном хозяине *E.coli* BL21 (DE3). Индукция экспрессии была стимулирована добавлением ИПТГ. Улучшение триплетов кодонов сделало возможной правильную экспрессию термофильного фермента в мезофильном хозяине-организме, что привело к получению значительного количества белка (151.6 и 161.5 мг/грамм клеточной массы соответственно для белков с N- и C-концевой гистиридиновыми метками).

Показано, что оптимальный температурный диапазон активности фермента составляет 68-75°C, при этом наибольшая активность регистрируется при 72°C, что сравнимо с другими *Taq*-полимеразами. Фермент проявляет высокую активность в диапазоне pH 8.5-9.2 в Tris-HCl-буфере с максимальной активностью при pH 9.0 в отличие от *Taq*-полимеразы, которая предпочитает менее щелочной pH. Показано, что активность фермента сильно зависит от ионов Mg^{2+} . Концентрация иона Mg^{2+} 3-5 мМ оптимальна для ферментативной активности, в отличие от *Taq*, *rTaq*- и *Tca*-полимераз, для которых оптимальные концентрации этого катиона составляют 10, 2-4 и 12 мМ соответственно. Концентрации 8 мМ и выше подавляют активность полимеразы *TsK1*. Присутствие ионов Mn^{2+} практически не влияет на активность полимеразы. Показано, что активность *TsK1* ДНК-полимеразы практически не зависит от KCl при низких концентрациях, хотя более высокие концентрации этой соли подавляют активность фермента.

Специфичная активность очищенной *TsK1* ДНК-полимеразы составляет 27,03 ед/мкг.

Показано, что фермент *TsK1* стабилен при 75 и 80°C и относительно стабилен при 88°C по меньшей мере в течении одного часа. Фермент теряет половину своей активности через 15 минут инкубации при 95°C. Хотя время полураспада *TsK1* полимеразы (без добавления дополнительных стабилизаторов) меньше, чем у *Taq* (40 мин, с добавлением стабилизаторов), оно очень близко к другим коммерчески

доступным полимеразам, таким как *rTaq* (20 мин), что указывает на то, что *TsK1* может быть применима в методах на основе ПЦР.

Было показано, что добавление глицерина в качестве стабилизатора к реакционной смеси для ПЦР в сочетании с 3 mM MgCl₂ значительно повышает выход ПЦР с использованием *TsK1*. Напротив, при добавлении ДМСО в качестве стабилизатора вместо глицерина амплификация не происходит. Показано, что *TsK1* способна амплифицировать ДНК как при температуре элонгации 68, так и при 72°C.

Показано, что *TsK1* полимеразы может эффективно амплифицировать как минимум продукты длиной до 2.5 т.п.н.. Также была продемонстрирована способность *TsK1* полимеразы проводить мультиплексную ПЦР.

Показано, что аккуратность амплификации *TsK1* ДНК-полимеразы примерно в два раза больше *Taq*.

SAGHATELYAN ANI ROBERT

HETEROLOGUS EXPRESSION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL
POTENTIAL OF THERMOSTABLE DNA POLYMERASE I OF *THERMUS*
SCOTODUCTUS K1 STRAIN
SUMMARY

Keywords: geothermal spring, metagenome, *Thermus scotoductus*, DNA polymerase, heterologous expression.

The biodiversity of the microbiota of the Karvachar geothermal spring (Nagorno-Karabakh) has been studied using the ILLUMINA sequencing method. Representatives of Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Ignavibacteriae, Cyanobacteria, Nitrospirae, Synergistetes, Acidobacteria, Planctomycetes, Deferribacteria, Spirochaetes, Chlorobi, Verrcomicrobia and other phyla have been found in microbial community of the spring. The presence of representatives of the phylum Deinococcota (formerly Deinococcus-Thermus) in the microbiota of the spring was also detected. Most of the identified bacterial phylotypes share only 83–98% (mostly <94%) similarities with known species or genera, indicating a unique composition of the original microbiota.

A new thermophilic bacterial strain K1 was isolated, which was identified by polyphasic approche as *Thermus scotoductus* K1. Sequencing and detailed analysis of the genome of the K1 strain, as well as its investigation and comparison with closely related species' genomes has been performed.

The nucleotide and protein sequences of the gene encoding DNA polymerase I of strain K1 were deciphered. The original DNA polymerase gene consists of 2493 bp, which encodes a protein (named *TsK1*) with a molecular weight of 93613.61 of 830 amino acids. Phylogenetic analysis revealed, that the protein sequence of *TsK1* polymerase shares a high homology with DNA polymerases of *T. scotoductus* SA-01 and *T.*

antranikianii and significantly differs from *T. aquaticus* and *T. thermophilus*. The similarity of amino acid sequence of *Tsk1* with native *Taq* polymerase is 85.75%.

The optimization of the DNA polymerase gene was carried out in order to eliminate rare codons (with the preservation of the amino acid sequence of the protein). The synthetic gene was cloned using the FX (fragment exchange) cloning system. After successful cloning and transformation, protein overexpression was induced in the mesophilic host *E. coli* BL21 (DE3) by the addition of IPTG. The improvement of codon triplets led to the correct expression of the thermophilic enzyme in the mesophilic host, resulting in a significant yield of the protein (151.6 and 161.5 mg/g of cell mass, for proteins with N- and C-terminal His-tags, respectively).

The optimal temperature range of enzyme activity is 68–75°C, with the highest activity being recorded at 72°C, which is comparable with other *Taq* polymerases. The enzyme is highly active at the pH range of 8.5–9.2 in Tris-HCl buffer, with maximum activity at pH 9.0, in contrast to *Taq* polymerase, which prefers a less alkaline pH. It was shown that the enzyme strongly depends on Mg²⁺ ions. 3–5 mM Mg²⁺ is optimal for enzymatic activity, in contrast to *Taq*, recombinant *Taq* and *Tca* polymerases, for which the optimal concentrations of this cation are 10, 2–4, and 12 mM, respectively. 8 mM and higher concentrations of magnesium inhibit the activity of *Tsk1* polymerase. The presence of Mn²⁺ ions has almost no effect on polymerase activity. It has been shown that the activity of *Tsk1* DNA polymerase is practically independent of KCl at low concentrations, although higher concentrations of this salt inhibit the activity of the enzyme.

The specific activity of the purified *Tsk1* DNA polymerase is 27.03 units/μg.

The *Tsk1* enzyme was shown to be stable at 75 and 80°C and relatively stable at 88°C for at least one hour. The enzyme loses half of its activity after 15 minutes of incubation at 95°C. Although the half-life of *Tsk1* polymerase (without adding additional stabilizers) is shorter than that of *Taq* (40 min, with added stabilizers), it is very close to other commercially available polymerases such as *rTaq* (20 min), indicating that *Tsk1* can be applicable in PCR-based methods.

It was shown that addition of glycerol as a stabilizer to the PCR reaction mixture in combination with 3 mM MgCl₂ significantly increased the yield of PCR using *Tsk1*. In contrast, when DMSO is added as a stabilizer instead of glycerol, no amplification occurs. It was shown that *Tsk1* is able to amplify DNA both at elongation temperature of 68 and at 72°C.

It was shown that *Tsk1* polymerase can efficiently amplify at least up to 2.5 kb products. The ability of *Tsk1* polymerase perform multiplex PCR has also been demonstrated.

It was shown that the amplification accuracy of *Tsk1* DNA polymerase is approximately twice higher than that of *Taq*.