

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.112
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-3-225-233>

Поступила в редакцию 11.05.2023
Received 11.05.2023

А. Б. Саченко, М. Травкина, В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО
ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *Sso7d***

Аннотация. Белок *Sso7d* обладает исключительной стабильностью структуры, а также способностью высоко-специфично связываться с ДНК, что делает белок перспективным модулем для создания химерных белков и тест-систем. *Sso7d* является компонентом химерных высокоточных ДНК-полимераз, способных осуществлять полимеразную цепную реакцию даже в присутствии ингибиторов ПЦР. Применение более быстрого, простого и высокопроизводительного метода получения белка позволит существенно сократить расходы на создание биосенсоров и на проведение анализов. Описан новый эффективный способ получения рекомбинантного белка *Sso7d* с высокой степенью чистоты без использования аффинной хроматографии.

Ключевые слова: *Sso7d*, ДНК-связывающий белок, гетерологическая экспрессия, выделение белка, ультрафильтрация, рекомбинантный белок

Для цитирования. Экспрессия и очистка рекомбинантного термостабильного ДНК-связывающего белка *Sso7d* / А. Б. Саченко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2023. – Т. 59, № 3. – С. 225–233. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-3-225-233>

A. B. Sachanka, M. Trawkina, V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT THERMOSTABLE DNA-BINDING
PROTEIN *Sso7d***

Abstract. The *Sso7d* protein has exceptional structural stability and the ability to bind highly specifically to DNA, which makes the protein a promising module for creating fusion proteins and test systems. *Sso7d* is a part of fusion high-fidelity DNA polymerases capable of carrying out the polymerase chain reaction even in the presence of PCR inhibitors. Application of faster, simpler, and more efficient method for protein production will significantly reduce the cost of creating biosensors and conducting analyzes. This paper describes a new efficient method for obtaining recombinant *Sso7d* protein with a high degree of purity without using affinity chromatography.

Keywords: *Sso7d*, heterologous expression, DNA-binding proteins, protein isolation, ultrafiltration, recombinant protein

For citation. Sachanka A. B., Trawkina M., Shchur V. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. Expression and purification of recombinant thermostable DNA-binding protein *Sso7d*. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2023, vol. 59, no. 3, pp. 225–233 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-3-225-233>

Введение. *Sulfolobus solfataricus* (*S. solfataricus*) – вид экстремофильных микроорганизмов, обитающих в вулканических горячих источниках [1]. Данные бактерии экспрессируют большое количество ДНК-связывающих белков, которые играют важную роль в защите ДНК от термической денатурации [2]. *Sso7d* – один из наиболее стабильных среди известных ДНК-связывающих белков. Даже при денатурирующих условиях он все еще некоторое время сохраняет свою структуру, а его температура денатурации близка к температуре кипения воды (99 °C) [3]. Белок практически не теряет свою термостабильность при снижении pH до 4 и повышении до 9, существенное изменение (денатурация при 80 °C) происходит только при pH 3,0 [4]. *Sso7d* очень устойчив

к денатурирующему действию гуанидин хлорида, белок начинает терять третичную структуру при концентрации в 3 М, а полная денатурация наступает при 5 М GuHCl. При этом *Sso7d* более устойчив к воздействию мочевиной, при которой полная денатурация белка не наступает даже при концентрации в 9 М [5].

Sso7d неспецифично связывается с РНК и ДНК любого размера и состава нуклеотидов [6]. Кроме того, *Sso7d* – первый белок с обнаруженной ренатурирующей активностью по отношению к ДНК у гипертермофилов, что способствует ренатурации цепей комплементарной ДНК при высоких температурах и стабилизации дуплексов ДНК [7]. По этой причине белок *Sso7d* часто используют при создании новых более эффективных полимераз путем создания химерных ферментов. Химерные полимеразы, состоящие из ДНК-полимеразы и ДНК-связывающего домена *Sso7d*, обладают повышенной устойчивостью к высоким концентрациям солей и процессивностью [8].

Sso7d является привлекательным белком для разработки аффинных лигандов и биосенсоров из-за его небольшого размера (7,4 кДа), высокой термостабильности и отсутствия остатков цистеина [9]. Все это – желаемые свойства для биосенсорного зонда, поскольку идеальный биосенсор должен быть стабильным, функционировать в среде с восстановителем и обладать малыми размерами для *in vivo* приложений [10]. *Sso7d* связывается с ДНК относительно небольшим сайтом (24 основания белка взаимодействуют с шестью аминокислотами ДНК), что потенциально увеличивает чувствительность биосенсора за счет повышения стехиометрического отношения в комплексе ДНК-белок [11]. Благодаря этим уникальным свойствам *Sso7d* созданы биосенсоры для обнаружения иммуноглобулина G [12], мальтозы, лизоцима, бетацеллюлина и зеленого флуоресцирующего белка [13, 14]. Перспективным направлением является иммобилизация *Sso7d* на поверхностях (бумаги, сорбента или мембраны) для создания устройств, способных обнаруживать различные аналиты. Подобная индикаторная бумага разработана для определения стрептавидина, при этом она обладает более высокой термостойкостью, чем обычные полоски с поликлональными антителами [15].

Цель данной работы – создание экспрессионных конструкций для гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* и разработка эффективного метода получения высокоочищенного рекомбинантного белка *Sso7d* как компонента потенциальных биосенсоров.

Материалы и методы исследования. Молекулярное клонирование и создание плазмид. Праймеры для ПЦР синтезировали фосфоамидитным методом на синтезаторе H32 (K&A, Германия), снимая с подложки 32%-ным водным аммиаком и очищая твердофазной экстракцией, используя сорбент на основе пористых силикагельных частиц с порами около 70 Å, модифицированных октадецилсилильными группами.

Оптимизированный для экспрессии в клетках *E. coli* ген *Sso7d* синтезирован *de novo* из шести олигонуклеотидов (таблица) с использованием полимеразной цепной сборки [16].

Олигонуклеотиды используемые в синтезе гена *Sso7d* и для ПЦР

Oligonucleotides used in the synthesis of the *Sso7d* gene and for PCR

Название	Последовательность
1	ATGGCCACTGTAAAATTCAAGTATAAGGGCGAGGAAAAAGAAGTGGA
2	CCACACGCCAGACCTTTTTGATTTTGCTTATATCCACTTCTTTTCCTCGCCCTTATACTTGAAT
3	TATAAGCAAAATCAAAAAGGTCTGGCGTGTGGGGAAGATGATTTCTTTCACCTACGATGAAGGGG
4	TTTCGCTCACCGCGCCACGGCCGGTTTTACCACCCCTTCATCGTAGGTGAAAGAAATCATCTTC
5	CCGTGGCGCGGTGAGCGAAAAGGACGCGCCGAAAGAAGCTGCTGCAGATGCTGGAAAAACAGAAAA
6	TTTTTCTGTTTTTCCAGCATCTGCAGCAGT
6His_Sso7d	atcgtgtgttctcatcatcaccatcaccacATGGCCACTGTAAAATTCAAGTATAAGGGCGAGG
SSO7d_Stop	TTATTTTTTCTGTTTTTCCAGCATCTGCAGCAGTTCTTTTCG
SSO7d_F	ccatcgatgctaggaggtcatatgCGTGGTTCTCATCATCACCATC
SSO7d_R	ACAGCTTATCAGCTAaagcttttatttttctgtttttccagcatctgcagcagttc

После синтеза ген амплифицирован праймерами 6His_SSO7d и SSO7d_Stop для добавления N-концевой последовательности с гистидиновой меткой, которая не взаимодействовала с Ni-NTA. Полученный продукт амплифицировали, используя праймеры SSO7d_F и SSO7d_R для добавления сайтов рестрикции HindIII и NdeI на 3' и 5' концы соответственно (сайты выделены курсивом в праймере в таблице).

Полученный продукт амплификации очищали электрофорезом в агарозном геле и лигировали с использованием T4 лигазы (NEB, Великобритания) в промежуточный вектор pJET1.2 (NEB, Великобритания) по тупым концам. Продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5 α (NEB, Великобритания), трансформанты отбирали на агаризованной среде, содержащей ампициллин. Из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК, используя коммерческий набор для выделения Invitrogen PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США), и проверяли рестрикционным картированием на наличие гена *Sso7d*. Плазмиды с геном *Sso7d* обрабатывали рестриктазами NdeI и HindIII, вставку очищали электрофорезом в агарозном геле и лигировали в экспрессионную плазмиду pCWori по соответствующим сайтам. Плазмиды трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5 α , из которых выделяли плазмиду pCWori_SSO7d тем же набором. Синтезированную рекомбинантную плазмиду pCWori_SSO7d проверяли рестрикционным картированием и секвенированием, а экспрессию белков контролировали протеомным анализом.

Экспрессия рекомбинантного белка Sso7d. Плазмиду pCWori_SSO7d трансформировали в компетентные клетки *E. coli* штамма BL21 (NEB, Великобритания). Колонии бактерий пересеивали в среду LB, содержащую ампициллин (100 мг/мл), и культивировали при 37 °С в течение 16 ч. После чего ночную культуру переносили в один литр среды ТБ, которая содержала ампициллин (100 мг/мл) и микроэлементы (0,25 мкМ FeCl₃; 0,25 мкМ ZnCl₂; 0,02 мкМ CoCl₂; 0,02 мкМ Na₂MoO₄; 0,02 мкМ CaCl₂; 0,02 мкМ CuCl₂; 0,01 мкМ H₃BO₃), и культивировали при 37 °С до оптической плотности в 0,6. Затем температуру снизили до 26 °С и внесли изопропил β -D-1-тио-галактопиранозид (ИПТГ) до концентрации в 1 мМ для индукции синтеза белка. Клетки культивировали в течение суток при 26 °С и осаждали центрифугированием (3500 g, 20 мин). Осадок клеток ресуспендировали в трехкратном по массе лизирующем буфере (20 мМ Трис, pH 7,0, 500 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,5 мМ PMSF, 0,1% Тритон X-100).

Очистка рекомбинантного белка Sso7d. Клетки разрушали гомогенизатором Emulsiflex C5 (Avestine, Канада). После чего в лизат клеток добавляли 1 мкл бензоназы (1305 ед. акт/мкл) и перемешивали в течение 30 мин при 4 °С. Осадок клеток и супернатант разделяли центрифугированием в течение 30 мин при 30 000 g и 4 °С. Затем супернатант нагревали на водяной бане при 65 °С в течение 30 мин и центрифугированием в течение 45 мин при 30 000 g и 4 °С отделяли денатурированные белки (рис. 1).

Осветленный супернатант поместили в камеру для ультрафильтрации на 300 мл с мембранами на 10 000 и 30 000 кДа из восстановленной целлюлозы. Ультрафильтрацию проводили при 4 °С под внешним давлением в 1 бар сжатым воздухом. Мембрану промывали 50 мл буфера А (50 мМ Трис, 10 мМ NaCl, pH 7,1). Ретентат анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в 18%-ном полиакриламидном геле, протеомного анализа и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Ретентат дополнительно очищали ионообменной хроматографией, разбавили в 26 раз буфером А и наносили на предварительно уравновешенную буфером А колонку (20 \times 2,5 см) с сорбентом Sephadex C-25 (Pharmacia fine chemicals, Швеция). Колонку промывали 200 мл буфера А и элюировали белок буфером Б (50 мМ Трис, 1 М NaCl, pH 7,1). Фракции, содержащие рекомбинантный белок, объединяли и подвергали диализу в течение ночи при 4 °С в буфере для хранения (50 мМ Трис, pH 7,4, 0,2 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 50 % глицерин и 0,1 % Тритон X-100). Элюированные фракции (0,5 мл) собирали и анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в 18%-ном полиакриламидном геле, протеомного анализа и масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Протеомный анализ. Образцы белка очищали метанол/хлороформной экстракцией, осаждали метанолом и растворяли в 100 мкл 0,1 М буфере бикарбоната аммония с pH 8,0. Затем белок смешивали с 50 мкл 50 мМ дитиотреитола в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буфере и нагревали



Рис. 1. Схема очистки рекомбинантного белка *Sso7d*
 Fig. 1. Purification scheme for the recombinant *Sso7d* protein

до 50 °С в течение 30 мин, к раствору добавляли 50 мкл 150 мМ йодацетамида и инкубировали при комнатной температуре в течение часа в темноте. После чего реакционную смесь разбавляли до 600 мкл 0,1 М аммоний-бикарбонатным буфером, pH 8,0. Затем добавляли 5 мкл раствора трипсина (1,0 мг/мл в 50 мМ уксусной кислоте) и инкубировали в течение 16 ч при 37 °С. Далее к раствору добавляли 100 мкл муравьиной кислоты и центрифугировали 10 мин при 19 000 g. Супернатант отфильтровывали через Chromafil Xtra PTFE 0,45 мкм и переносили в хроматографические флаконы.

Пептиды фракционировали на колонке Thermo Fisher Scientific Hypersil GOLD (2,1 × 50 мм, 1,9 мкм). Подвижная фаза А состояла из 0,2%-ного раствора муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза Б состояла из 0,2%-ного раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле. Объем вносимого образца составлял 5 мкл, а градиент элюирования был следующий: от 3 до 25 % фазы Б в течение 35 мин, от 25 до 40 % – за 10 мин, от 40 до 90 % – за 10 мин и 90 % – в течение 15 мин. Скорость потока подвижной фазы – 200 мкл/мин, а температура колонки – 40 °С. Используемый для детектирования ква-

друпольный времяпролетный масс-анализатор Q-TOF 6550 (Agilent, США) оснащен источником ионизации электрораспылением (APESI) со следующими параметрами: температура газа-носителя – 400 °С, скорость потока газа-носителя – 9 л/мин, напряжение капилляра – 2 кВ, напряжение фрагментатора – 360 В. Масс-анализатор использовался в режиме Auto-MS/MS со следующими параметрами: диапазон m/z (MS, MS/MS режимы) 275–1700 m/z и энергии фрагментации (3,1(m/z)/100 + 1,0)В для $z = 2$ и (3,6(m/z)/100 – 4,8)В для $z \geq 3$. Анализ результатов проводили в программе Peaks studio (Bioinformatics Solutions, Канада) по базе данных Swiss-Prot и UniProt.

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Образцы белка осаждали спиртом, а полученный осадок промывали 70%-ным этанолом и перерастворяли в 20 мкл 70%-ной муравьиной кислоты. Растворенный белок (0,75 мкл) смешивали с 0,75 мкл матрицы HCCA (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) или синапиновой кислоты (Bruker, Германия) для MALDI на металлической пластине для записи спектра. Запись масс-спектров осуществляли на MALDI-TOF MicroFlex (Bruker, Германия) при интенсивности лазера 50 %.

Динамическое светорассеяние. Образцы белка разбавляли до концентрации в 1 мг/мл буфером (50 мМ Трис, 300 мМ NaCl, pH 7,4), центрифугировали 5 мин при 5000 g и 10 мкл верхней фракции супернатанта перенесли в кювету для ДЛС. Определение производили при помощи DynaPro Nanostar instrument (WYATT Technology, США) в диапазоне температур от 20 до 80 °С при скорости нагревания в 1 град/мин, проводя как минимум 10 измерений для одной температуры при интегрировании сигнала в 5 с. Анализ данных проводили в программе DYNAMICS 7.8 (WYATT Technology, США).

Исследование ДНК-связывающей способности белка методом электрофореза. Взаимодействие с ДНК подтверждали путем изменения хроматографической подвижности плазмидной ДНК в присутствии *Sso7d*. Чистый белок *Sso7d* смешивали с плазмидной ДНК в равном молярном объеме, а к ПЦР смеси добавляли 100 мкг белка. Затем образцы выдерживали в шейкере при 4 °С и 100 об/мин в течение 30 мин. После чего образцы смешивали с загрузочным буфером Gel Loading Dye, Purple (6X) с SDS (NEB, Великобритания) и разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при напряжении в 150 В. Результаты электрофореза фиксировали с помощью системы визуальной фиксации геля Azure c300 (Azure Biosystems, США).

Результаты и их обсуждение. Высокая термостабильность белка *Sso7d* позволяет избавиться от большинства белков бактерии *E. coli* путем их денатурации при нагревании. Экспериментально установлено, что оптимальная температура для данного процесса – 65 °С при времени обработки в 30 мин. При повышении температуры или времени обработки существенно растет риск протеолиза и агрегирования с другими белками. Добавление в лизат бензоназы позволяет

расщепить мешающую ДНК, с которой белок взаимодействует и оседает при центрифугировании, что повышает количество выделяемого белка *Sso7d* практически в два раза. Дальнейшая ультрафильтрация через мембрану в 30 кДа позволяет очистить препарат от примесных белков вплоть до 13 кДа и незначительного количества белков с более высокой массой (21,1 кДа осмотически индуцируемый белок Y, 11,8 кДа Тиоредоксин 1, 12,3 кДа 50S рибосомный белок L7/L12, 14,0 кДа 30S рибосомный белок S8, 9,0 кДа белок-фосфоноситель HPr, 5,0 кДа основной белок холодового шока) исходя из результатов масс-спектра, протеомного анализа и электрофореза (рис. 2). При использовании мембраны в 10 кДа наблюдалось незначительное количество примесных белков (11,8 кДа Тиоредоксин 1, 9,0 кДа белок-фосфоноситель HPr, 5,0 кДа основной белок холодового шока), что позволило достичь чистоты в 90 % целевого белка по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ, рис. 2). Примесные белки, устойчивые к температурной денатурации и небольшого размера, не обладают ярко выраженной активностью к ДНК или другим белкам.

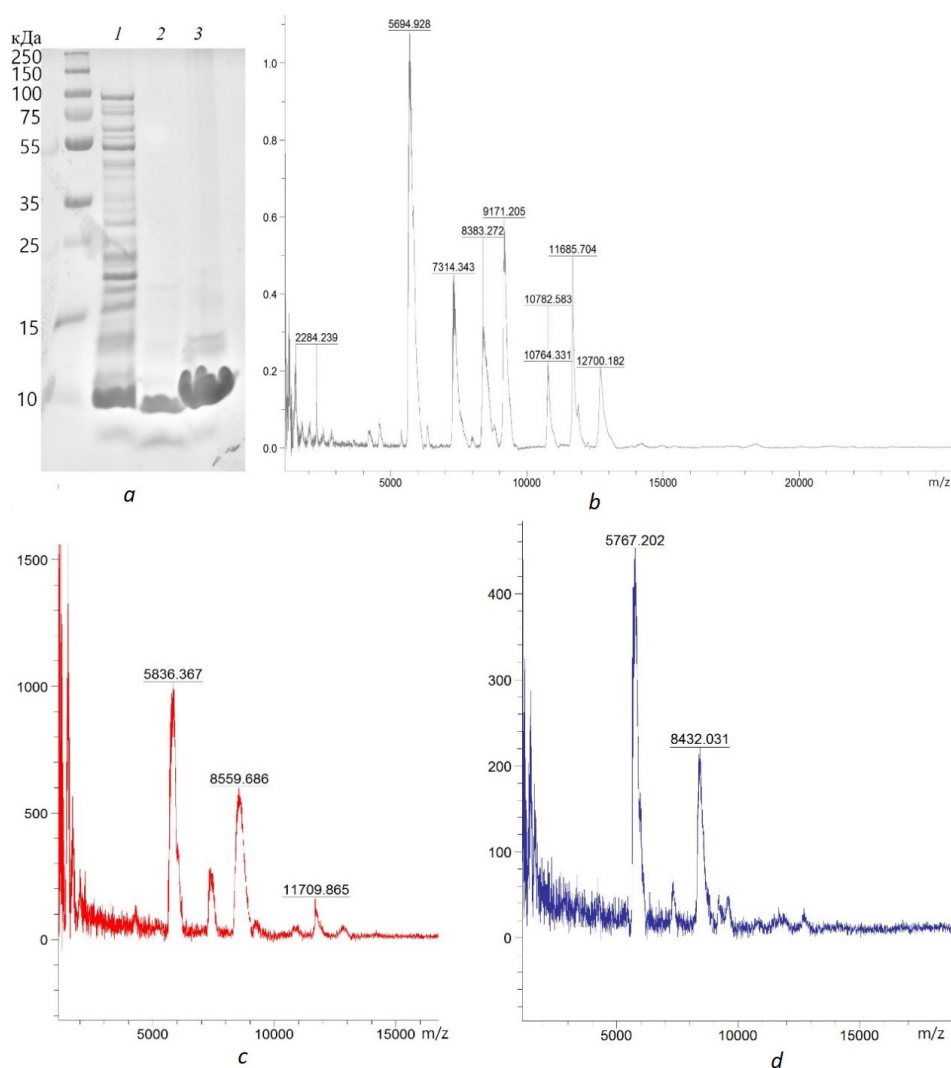


Рис. 2. Результаты электрофореза в 18%-ном полиакриламидном геле (a): 1 – лизат после тепловой обработки; 2 – пермеат после ультрафильтрации через мембрану в 10 кДа; 3 – фракция, содержащая белок после катионообменной хроматографии; MALDI-TOF масс-спектры после ультрафильтрации через мембрану в 30 (b) и 10 кДа (c) и после катионообменной хроматографии (d). Молекулярная масса 8,4 кДа соответствует целевому белку *Sso7d*

Fig. 2. Results of electrophoresis in 18 % polyacrylamide gel (a): 1 – lysate after heat treatment; 2 – permeate after ultrafiltration through a 10 kDa membrane; 3 – fraction containing protein after cation exchange chromatography; MALDI-TOF mass spectra after ultrafiltration through a 30 (b) and 10 kDa (c) membrane and after cation exchange chromatography (d). The molecular weight of 8.4 kDa corresponds to the target protein *Sso7d*

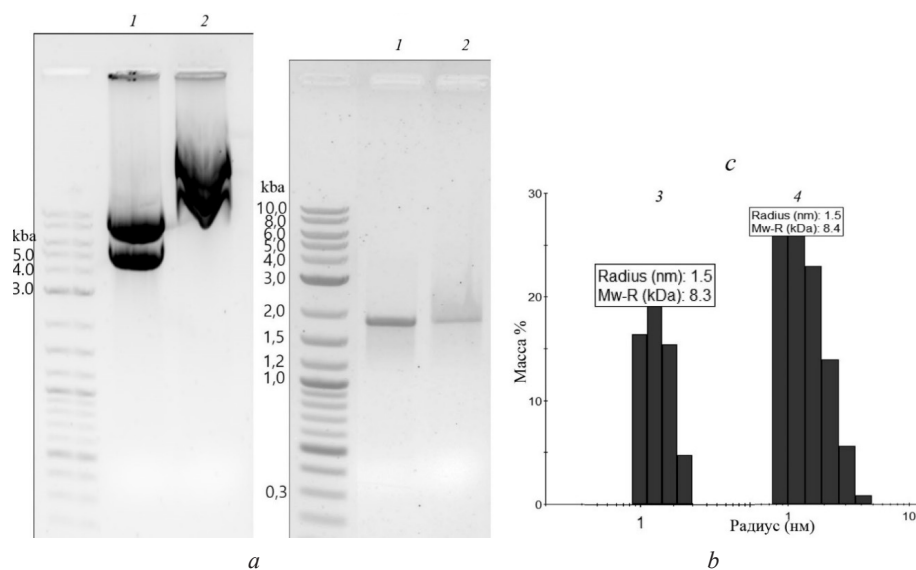


Рис. 3. Результаты электрофореза в агарозном геле при взаимодействии белка *Sso7d* с плазмидной ДНК 5000 п. о. (а) и ПЦР продуктом 1800 п. о. (b): 1 – без белка, 2 – в присутствии белка; и ДЛС анализ (c): 3 – до нагревания, 4 – после выдерживании белка при 80 °С в течение 60 мин

Fig. 3. Results of electrophoresis in agarose gel during the interaction of *Sso7d* protein with plasmid DNA 5000 bp (a) and PCR mixture 1800 bp (b): 1 – without protein, 2 – in the presence of protein; with DLS analysis (c): 3 – before heating, 4 – after threatening the protein at 80 °C for 60 min

Исходя из результатов анализа пермеатов на содержание примесных белков была выбрана мембрана в 10 кДа для масштабирования процесса выделения белка, а также подобраны оптимальные условия для катионообменной хроматографии.

Проведение катионообменной хроматографии в свою очередь позволяет получить высокоочищенный рекомбинантный белок с чистотой более чем в 95 % (по электрофорезу в ПААГ) и выходом не менее 70 мг (определяли спектрофотометрическим методом, используя коэффициент молярной экстинкции в $8480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, рассчитанный методом Гилла–фона Хиппеля [17]) с одного литра среды ТБ или 3,5 мг белка с одного грамма клеточной массы. Протеомный анализ очищаемых и очищенных белков подтвердил идентичность белка *Sso7d* по анализу пептидов, покрывающих последовательности на 47 % (после хроматографии других белков в препарате не обнаружено), а также по результатам электрофореза и масс-спектра, соответствующих расчетной массе (8,4 кДа) на основании аминокислотной последовательности белка.

Описанные в литературе методы экспрессии и выделения белка *Sso7d* позволяют получить до 50 мг белка с одного литра среды. При этом они требуют проведения хроматографической очистки, как правило, аффинной, с использованием гистидиновой метки, что требует дополнительных затрат времени на хроматографию и модификации структуры белка. Использование данного метода позволило выделить на 30 % больше белка, чем в описанных ранее методах, и существенно ускорить процесс очистки [18–20]. Предложенный нами метод очистки без катионообменной хроматографии позволяет в течение нескольких часов выделить белок с чистотой не менее 90 %, который может быть использован для создания тест-систем и аффинных сорбентов [21].

Полученный белок *Sso7d* функционально активен, что проявляется в его связывании с дцДНК как в виде суперскрученной формы плазмидной ДНК, так и с линейной ДНК (рис. 3). Физико-химические свойства белка также соответствуют литературным данным, белок устойчив к высоким температурам и к продолжительному нагреванию, признаков денатурации белка (помутнение образца, выпадение белка) после нагревания не обнаружено (рис. 3) [4].

Заключение. В работе синтезирован ген *Sso7d*, сконструирован экспрессионный вектор и описан новый эффективный метод экспрессии и выделения рекомбинантного белка *Sso7d*, который перспективен для конструирования биосенсоров и аффинных сорбентов на основе *Sso7d*.

Ключевыми стадиями очистки являются ферментативное расщепление ДНК и ультрафильтрация. Идентифицированы примесные белки клеток-хозяина, не влияющие на свойства *Sso7d*, отличающиеся высокой стабильностью и при необходимости могут быть удалены хроматографическими методами. Предложенная схема является простой и недорогой для дальнейшего масштабирования.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Национальной академии наук Беларуси (грант № 2022-27-009).

Acknowledgements. The study was financially supported by the National Academy of Sciences of Belarus (grant no. 2022-27-009).

Список использованных источников

1. Solution structure and DNA-binding properties of a thermostable protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* / H. Baumann [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 1994. – Vol. 1, № 11. – P. 808–819. <https://doi.org/10.1038/nsb1194-808>
2. An overview of the structures of protein-DNA complexes / N. M. Luscombe [et al.] // *Genome Biol.* – 2000. – Vol. 1, № 1. – Reviews001. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-1-reviews001>
3. A single-point mutation in the extreme heat- and pressure-resistant *sso7d* protein from *Sulfolobus solfataricus* leads to a major rearrangement of the hydrophobic core / R. Consonni [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, № 39. – P. 12709–12717. <https://doi.org/10.1021/bi9911280>
4. Investigations of *Sso7d* catalytic residues by NMR titration shifts and electrostatic calculations / R. Consonni [et al.] // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42, № 6. – P. 1421–1429. <https://doi.org/10.1021/bi0265168>
5. Guanidine-induced unfolding of the *Sso7d* protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* / V. Granata [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2004. – Vol. 34, № 3. – P. 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.04.002>
6. The *Sso7d* DNA-binding protein from *Sulfolobus solfataricus* has ribonuclease activity / E. Shehi [et al.] // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 497, № 2–3. – P. 131–136. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02455-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02455-3)
7. Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein / A. Guagliardi [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 267, № 4. – P. 841–848. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0873>
8. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering / H. L. Zhao [et al.] // *Protein Expr Purif.* – 2008. – Vol. 61, № 1. – P. 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.013>
9. Thermal unfolding of small proteins with SH3 domain folding pattern / S. Knapp [et al.] // *Proteins.* – 1998. – Vol. 31, № 3. – P. 309–319. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(19980515\)31:3](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(19980515)31:3)
10. A 45-Amino-Acid Scaffold Mined from the PDB for High-Affinity Ligand Engineering / M. A. Kruziki [et al.] // *Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 22, № 7. – P. 946–956. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.012>
11. DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein *Sso7d* of *Sulfolobus solfataricus* / A. Napoli [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30, № 12. – P. 2656–2662. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf377>
12. Design of pH sensitive binding proteins from the hyperthermophilic *Sso7d* scaffold / N. Gera [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048928>
13. Loving, G. S. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores / G. S. Loving, M. Sainlos, B. Imperiali // *Trends Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.002>
14. Design Principles for SuCESsFul Biosensors: Specific Fluorophore/Analyte Binding and Minimization of Fluorophore/Scaffold Interactions / S. de Picciotto [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 428, № 20. – P. 4228–4241. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.004>
15. Activity-based assessment of an engineered hyperthermophilic protein as a capture agent in paper-based diagnostic tests / E. A. Miller [et al.] // *Mol. Syst. Des. Eng.* – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. 377–381. <https://doi.org/10.1039/c6me00032k>
16. 5'-DMT-protected double-stranded DNA: Synthesis and competence to enzymatic reactions / V. V. Shchur [et al.] // *Analytical Biochemistry.* – 2021. – Vol. 617. – P. 114–115. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114115>
17. Gill, S. C. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data / S. C. Gill, P. H. von Hippel // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 182, № 2. – P. 319–326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
18. Edmondson, S. P. DNA binding proteins *Sac7d* and *Sso7d* from *Sulfolobus* / S. P. Edmondson, J. W. Shriver // *Methods Enzymol.* – 2001. – Vol. 334. – P. 129–145. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)34463-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)34463-4)
19. Thermal stability and DNA binding activity of a variant form of the *Sso7d* protein from the archeon *Sulfolobus solfataricus* truncated at leucine 54 / E. Shehi [et al.] // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42, № 27. – P. 8362–8368. <https://doi.org/10.1021/bi034520t>
20. Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic *Sso7d* scaffold / N. Gera [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 409, № 4. – P. 601–616. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.020>
21. Hyperthermostable binding molecules on phage: Assay components for point-of-care diagnostics for active tuberculosis infection / N. Zhao [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2017. – Vol. 521. – P. 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.021>

References

1. Baumann H., Knapp S., Lundbäck T., Ladenstein R., Härd T. Solution structure and DNA-binding properties of a thermostable protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nature Structure Biology*, 1994, vol. 1, no. 11, pp. 808–819. <https://doi.org/10.1038/nsb1194-808>
2. Luscombe N. M., Austin S. E., Berman H. M., Thornton J. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biology*, 2000, vol. 1, no. 1. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-1-reviews001>
3. Consonni R., Santomo L., Fusi P., Tortora P., Zetta L. A single-point mutation in the extreme heat- and pressure-resistant sso7d protein from *Sulfolobus solfataricus* leads to a major rearrangement of the hydrophobic core. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 39, pp. 12709–12717. <https://doi.org/10.1021/bi9911280>
4. Consonni R., Arosio I., Belloni B., Fogolari F., Fusi P., Shehi E., Zetta L. Investigations of Sso7d catalytic residues by NMR titration shifts and electrostatic calculations. *Biochemistry*, 2003, vol. 42, no. 6, pp. 1421–1429. <https://doi.org/10.1021/bi0265168>
5. Granata V., Vecchio P. D., Barone G., Shehi E., Fusi P., Tortora P., Graziano G. Guanidine-induced unfolding of the Sso7d protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004, vol. 34, no. 3, pp. 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.04.002>
6. Shehi E., Serina S., Fumagalli G., Vanoni M., Consonni R., Zetta L., Dehò G., Tortora P., Fusi P. The Sso7d DNA-binding protein from *Sulfolobus solfataricus* has ribonuclease activity. *FEBS Letters*, 2001, vol. 497, no. 2–3, pp. 131–136. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02455-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02455-3)
7. Guagliardi A., Napoli A., Rossi M., Ciaramella M. Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein. *Journal of Molecular Biology*, 1997, vol. 267, no. 4, pp. 841–848. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0873>
8. Zhao H. L., Yao X. Q., Xue C., Wang Y., Xiong X. H., Liu Z. M. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expression and Purification*, 2008, vol. 61, no. 1, pp. 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.013>
9. Knapp S., Mattson P. T., Christova P., Berndt K. D., Karshikoff A., Vihinen M., Smith C. I., Ladenstein R. Thermal unfolding of small proteins with SH3 domain folding pattern. *Proteins*, 1998, vol. 31, no. 3, pp. 309–319. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(19980515\)31:3](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(19980515)31:3)
10. Kruziki M. A., Bhatnagar S., Woldring D. R., Duong V. T., Hackel B. J. A 45-Amino-Acid Scaffold Mined from the PDB for High-Affinity Ligand Engineering. *Chemical Biology*, 2015, vol. 22, no. 7, pp. 946–956. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.012>
11. Napoli A., Zivanovic Y., Bocs C., Buhler C., Rossi M., Forterre P., Ciaramella M. DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, no. 12, pp. 2656–2662. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf377>
12. Gera N., Hill A. B., White D. P., Carbonell R. G., Rao B. M. Design of pH sensitive binding proteins from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048928>
13. Loving G. S., Sainlos M., Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends of Biotechnology*, 2010, vol. 28, no. 2, pp. 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.11.002>
14. de Picciotto S., Dickson P. M., Traxlmayr M. W., Marques B. S., Socher E., Zhao S. [et al.]. Design Principles for SuCESsFul Biosensors: Specific Fluorophore Analyte Binding and Minimization of Fluorophore Scaffold Interactions. *Journal of Molecular Biology*, 2016, vol. 428, no. 20, pp. 4228–4241. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.004>
15. Miller E. A., Traxlmayr M. W., Shen J., Sikes H. D. Activity-based assessment of an engineered hyperthermophilic protein as a capture agent in paper-based diagnostic tests. *Molecular Systems Design and Engineering*, 2016, vol. 1, no. 4, pp. 377–381. <https://doi.org/10.1039/c6me00032k>
16. Shchur V. V., Burankova Y. P., Zhauniarovich A. I., Dzichenka Y. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. 5'-DMT-protected double-stranded DNA: Synthesis and competence to enzymatic reactions. *Analytical Biochemistry*, 2021, vol. 617, pp. 114–115.
17. Gill S. C., Hippel P. H. von. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 182, no. 2, pp. 319–326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90602-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90602-7)
18. Edmondson S. P., Shriver J. W. DNA binding proteins Sac7d and Sso7d from *Sulfolobus*. *Methods in Enzymology*, 2001, vol. 334, pp. 129–145. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)34463-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)34463-4)
19. Shehi E., Granata V., Del Vecchio P., Barone G., Fusi P., Tortora P., Graziano G. Thermal stability and DNA binding activity of a variant form of the Sso7d protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* truncated at leucine 54. *Biochemistry*, 2003, vol. 42, no. 27, pp. 8362–8368. <https://doi.org/10.1021/bi034520t>
20. Gera N., Hussain M., Wright R. C., Rao B. M. Highly stable binding proteins derived from the hyperthermophilic Sso7d scaffold. *Journal of Molecular Biology*, 2011, vol. 409, no. 4, pp. 601–616. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.020>
21. Zhao N., Spencer J., Schmitt M. A., Fisk J. D. Hyperthermostable binding molecules on phage: Assay components for point-of-care diagnostics for active tuberculosis infection. *Analytical Biochemistry*, 2017, vol. 521, pp. 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.021>

Информация об авторах

Саченко Антон Борисович – мл. науч. сотрудник, аспирант. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antosuk@yandex.ru

Травкина Мария – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mtrawkina@gmail.com

Щур Вероника Владимировна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shchur931@gmail.com

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by

Янцевич Алексей Викторович – канд. хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al.yantsevich@gmail.com

Information about the authors

Sachanka Antos B. – Junior Researcher, Postgraduate Student. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antosuk@yandex.ru

Trawkina Maria – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mtrawkina@gmail.com

Shchur Veronika V. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shchur931@gmail.com

Usanov Sergei A. – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by

Yantsevich Aliaksei V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al.yantsevich@gmail.com