



УДК 577.213.7

ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ  
ФРАГМЕНТОВ ГЕНА  $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ  
*ESCHERICHIA COLI*

Чахламчева О. Г., Мурских О. В., Чьонг Нам Хай.,  
Ефимов В. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

С использованием синтетических олигонуклеотидов сконструированы новые плазмидные векторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии в бактериальных клетках коротких белков и пептидов в составе гибридных белков различной длины. Источником лидерной последовательности для этих гибридов послужил фермент  $\beta$ -галактозидаза *E. coli*. С помощью полученных векторов осуществлена экспрессия гена функционально важного фрагмента бактериоопсина. Выходы гибридов составили 5–30% от общего количества белка в клетке.

Одним из многочисленных применений синтетических фрагментов ДНК в современной молекулярной биологии и биотехнологии является создание новых векторных систем. С помощью синтетических олиго- и полинуклеотидов уже получен целый ряд плазмидных и фаговых векторов, удобных для клонирования, секвенирования и экспрессии генов. Так, в настоящее время известно целое семейство векторов на основе ДНК бактериофага M13 [1], содержащих синтетические последовательности с рядом сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции. Кроме того, была создана серия плазмидных векторов pUC, в состав которых также входят полилинкерные синтетические участки ДНК [2]. В литературе описаны плазмиды типа pBBV, предназначенные для быстрого клонирования синтетических полинуклеотидов [3], и оригинальные фаговые векторы M13mp18amIV и M13mp19amIV, сконструированные специально для проведения олигонуклеотиднаправленного мутагенеза [4]. Ранее с применением синтетических фрагментов ДНК нами была получена серия векторов pHS и pPLE [5, 6], представляющих собой удобные для клонирования, проведения мутагенеза и конструирования искусственных генов молекулы, которые содержат уникальные сайты узнавания ряда эндонуклеаз рестрикции на относительно коротком участке ДНК. В продолжение этих исследований нами был сконструирован ряд экспрессирующих плазмидных векторов. Настоящее сообщение посвящено описанию способа получения некоторых из этих плазмид, в основу которых были положены фрагменты гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli*, и изучению эффективности их функционирования на примере экспрессии гена функционально важного фрагмента бактериоопсина [6].

При попытках осуществления в бактериальных клетках прямой экспрессии небольших гетерологичных пептидов или белков часто возникают проблемы, связанные с крайней нестабильностью последних. Одним из возможных путей их преодоления является получение этих соединений в составе более крупных и более стабильных гибридов, использование которых позволило в ряде случаев решить задачу синтеза в бактериях таких быстро разрушающихся под действием внутриклеточных протеиназ гормонов, как инсулин [7], соматостатин [8], брадикинин [9]. В качестве

Условные обозначения: X-gal – 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактозид; PMSF – фенолметилсульфонилфторид; IPTG – изопропил- $\beta$ -D-тиогаалактозид; a.o. – аминокислотный остаток; SDS – додецилсульфат натрия; BSA – бычий сывороточный альбумин.

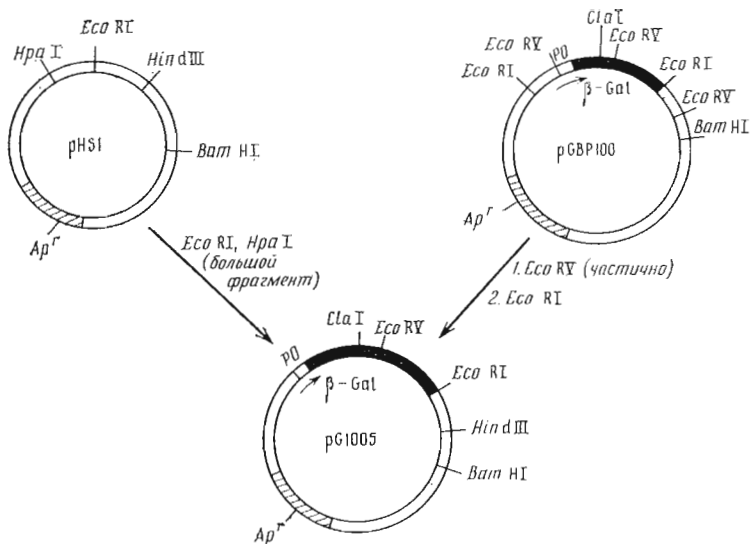


Рис. 1. Схема конструирования плазмидного вектора pG1005

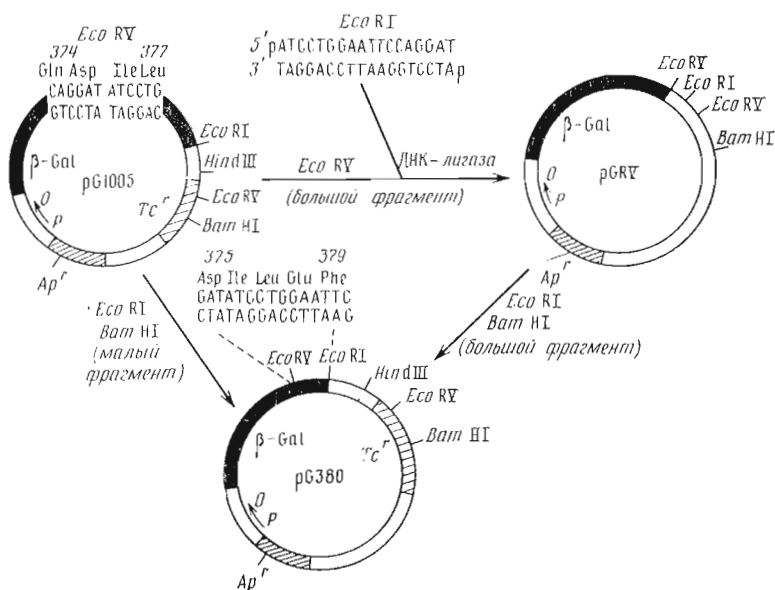


Рис. 2. Схема конструирования плазмидного вектора pG380

белков-носителей в этих случаях чаще всего используются некоторые бактериальные белки или их фрагменты. Одним из таких белков является β-галактозидаза *E. coli*. Ранее было показано, что фрагменты этого фермента, в которых отсутствует С-концевая часть, и их гибриды с некоторыми пептидами и белками образуют в цитоплазме клеток *E. coli* нерастворимые агрегаты, что позволяет предотвратить разрушение входящего в их состав целевого белка протеиназами [7]. Исходя из гена β-галактозидазы [10] можно сконструировать целый ряд векторов, предусматривающих длину лидерной последовательности кодируемого ими гибридного белка в интервале от нескольких а.о. до тысячи а.о. Однако только небольшая часть этих возможных векторных систем была реализована для обеспечения микробиологического синтеза небольших белков [11]. Было показано, что наиболее надежны с точки зрения устойчивости химерные белки с длинным лидером. Но их применение не позволяет достичь максимальных выходов целевого пептида, поскольку доля последнего в молекуляр-

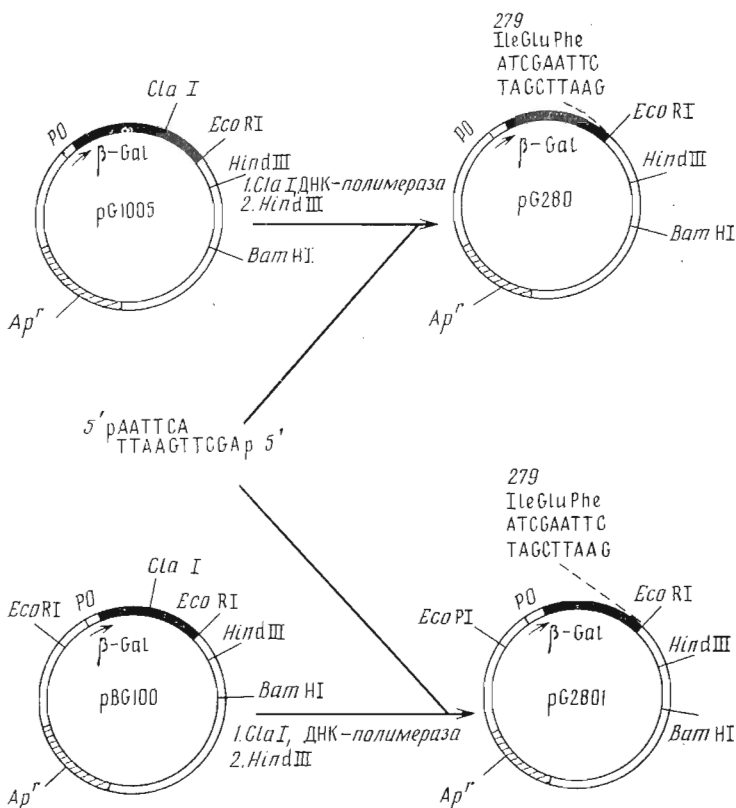


Рис. 3. Получение плазмид pG280 и pG2801

ной массе химерного белка невысока. Выход может быть повышен за счет использования коротких лидеров, хотя при значительном их уменьшении может опять возникнуть проблема нестабильности химерного белка в протоплазме бактериальных клеток.

Для получения векторов, обеспечивающих экспрессию пептидов в составе гибридов с фрагментами  $\beta$ -галактозидазы различной длины, в качестве исходной нами была взята плазида pBG100 [8], содержащая фрагмент фага  $\lambda$ rIas $\delta$ , несущий промотор и большую часть гена  $\beta$ -галактозидазы.

Первой плазмидой в этой серии явилась pG1005. Для ее получения (рис. 1) плазмиду pGP100 подвергали частичному гидролизу эндонуклеазой рестрикции *Eco*RV, а затем после обработки рестриктазой *Eco*RI выделяли фрагмент, содержащий около 3000 а.о., и вводили его между *Eco*RI- и *Hpa*I-сайтами плазмиды pHS1, полученной нами ранее [5]. Синтезированные рекомбинантные ДНК трансформировались в клетки *E. coli* HB101. Селекция полученных при этом рекомбинантных клонов проводилась при расеве на чашки в присутствии ампициллина и X-gal. Отбирались колонии, обладающие ярко-голубой окраской. Из отображенных колоний выделялась плазмидная ДНК, и ее структура подтверждалась рестриктивным анализом.

При конструировании второго из этой серии векторов в качестве исходной была взята плазида pG1005 (рис. 2). В результате ее обработки эндонуклеазой *Eco*RV образовывался фрагмент гена  $\beta$ -галактозидазы, кодирующий 380 а.о. с N-конца цепи. Прибавлением к этому фрагменту синтетического линкера, содержащего внутри своей последовательности *Eco*RI-сайт, была получена плазида pGRV, замена *Eco*RI-*Bam*III-фрагмента которой на соответствующий фрагмент pBR322 в свою очередь привела к вектору pG380, удобному для экспрессии пептидов и белков под контролем промоторно-операторной системы *lac*-оперона в составе гибридного белка.

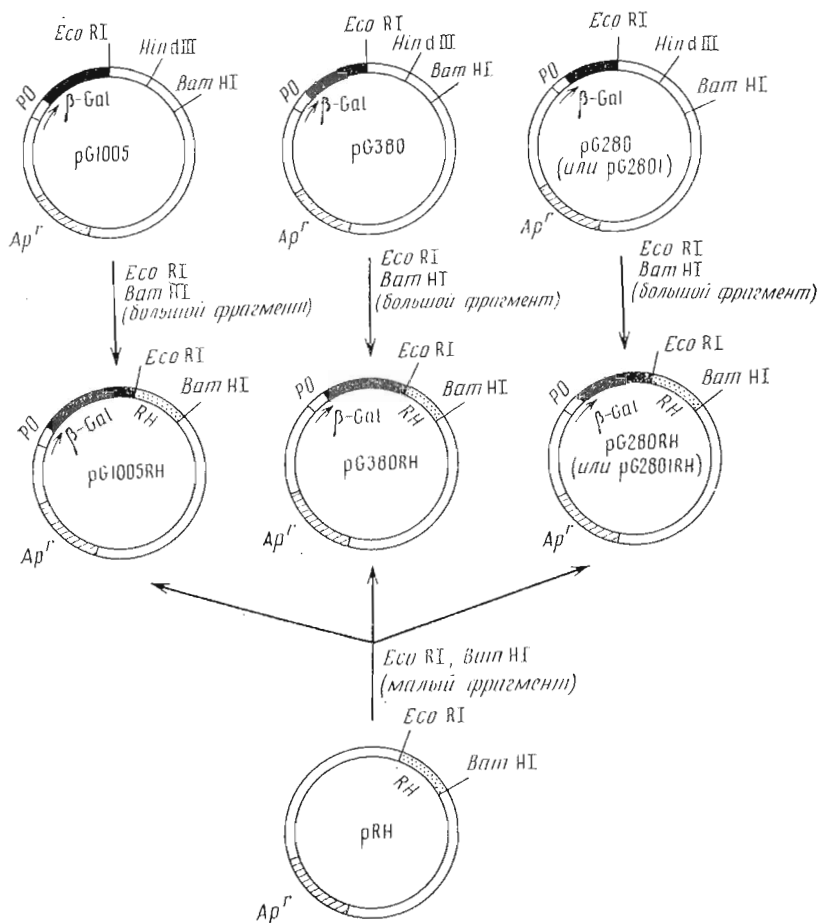


Рис. 4. Конструирование экспрессирующих плазмидных векторов, кодирующих синтез фрагмента бактериоопсина 198–231 в составе гибридных белков с фрагментами β-галактозидазы различной длины (RH – фрагмент гена бактериоопсина, β-Gal – фрагменты гена β-галактозидазы)

Подобным образом были сконструированы векторы pG280 и pG2801, кодирующие лидерную последовательность длиной 280 а.о. (рис. 3). С целью получения плазмиды pG280 ДНК pG1005 последовательно обрабатывали эндонуклеазой *Clal*, ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) в присутствии нуклеозиддезокситрифосфатов и *Hind*III. Полученный при этом большой фрагмент лигировали с синтетическим дуплексом, содержащим на одном конце последовательность, соответствующую половинному *Hind*III-сайту, а на другом – ренарированный *Eco*RI-сайт. После трансформации и скрининга колоний была выделена плаزمида pG280. Второй вектор, pG2801, конструировался аналогично, исходя из плазмиды pBGP100 (см. рис. 3).

Для осуществления экспрессии функционально важного фрагмента бактериоопсина из трех вышеописанных векторов вырезался короткий сегмент *Eco*RI – *Bam*HI и вместо него вводился клонированный фрагмент гена бактериоопсина, соответствующий пептиду 198–231 [6]. Структура этого синтетического полинуклеотида была выведена нами ранее на основе первичной структуры соответствующего белка [12] и генетического кода с учетом частоты использования различных кодонов в ДНК *E. coli* [13]. Помимо кодирующей части в этом полинуклеотиде содержались также иницирующий и терминирующий кодоны, а на его концах были предусмотрены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Eco*RI и *Bam*HI. Кроме того, для удобства проведения экспрессии в составе гибридных белков и последующего выделения целевого пептида кодон, соответствующий остатку Met<sup>209</sup>,

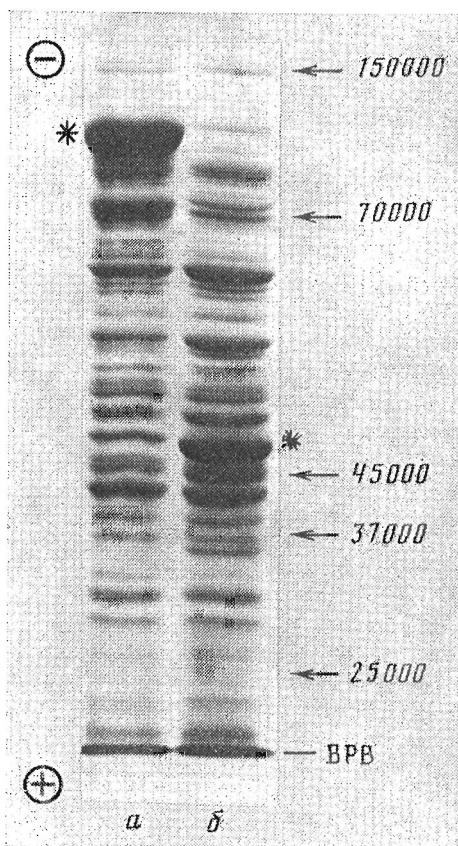


Рис. 5. Гель-электрофорез суммарных белков, выделенных из клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pG1005RH (а) и pG380RH (б). Стрелками показаны положения белков-маркеров и их молекулярные массы. Звездочками отмечено положение на геле гибридных белков. ВРВ — бромфеноловый синий

идентифицировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS с последующей визуализацией белковых зон окрашиванием геля кумаси (рис. 5), а также иммуноблоттингом [14, 15] (данные не приведены). Относительное содержание гибридных белков в бактериях определялось с помощью денситометрирования белковых зон на электрофореграмме (рис. 6), а их абсолютное количество в расчете на 1 г биомассы — после выделения экстракцией 7 М гуанидингидрохлоридом с последующим осаждением водой. Типичные денситометрические картины, полученные при электрофоретическом разделении клеточных белков, приведены на рис. 6.

Показано, что в штаммах на основе *E. coli* HB101 в случае длинного гибрида с галактозидазой уровень экспрессии последнего был достаточно высок и составлял до 30% от общего количества клеточного белка (таблица). В то же время более короткий гибрид давал худший результат. Переход к другому штамму-реципиенту — VL902 приводил в случае гибрида, имеющего предшественник длиной 380 а.о., к значительному повышению выхода целевого белка, что может быть отнесено за счет свойств самого штамма-реципиента, являющегося *lon*-мутантом, т. е. штаммом, дефектным по синтезу ряда внутриклеточных протеиназ. В случае же самого короткого из сконструированных гибридов ни один из реципиентов не позволил получить удовлетворительных результатов вследствие нестабильности штаммов VL902/pG280RH и VL902/pG2801RH. Через несколько циклов ферментации реципиент практически полностью терял трансформированные в него

был заменен на кодон изолейцина. Схема выщепления синтетического гена из несущей его плазмиды pRH [6] и получения плазмид, кодирующих синтез соответствующего ему пептида, показана на рис. 4.

Полученные при этом рекомбинантные ДНК трансформировались в клетки *E. coli* K12 HB101 или VL902, и трансформанты высевались на агаризованную LB-среду, содержащую ампициллин и X-gal. Отбирались ярко-голубые колонии, которые скринировались на присутствие гена бактериоопсина гибридизацией с одним из входящих в его состав олигонуклеотидов после введения в последний [<sup>32</sup>P] метки. Из отобранных колоний выделяли плазмидные ДНК, и их строение подтверждали рестриктивным анализом. Таким образом были получены плазмиды pG1005RH, pG380RH и pG280RH, кодирующие синтез гибридных белков, состоящих из фрагментов β-галактозидазы и бактериоопсина. Условия транскрипции и трансляции генов химерных белков в этих плазмидах были созданы за счет регуляторной области *lac*-оперона.

Для определения уровня экспрессии гибридов соответствующие штаммы бактерий выращивали на LB-среде в присутствии ампициллина с добавлением индуктора — изопропил - β - D - тиогалактозида (IPTG). Гибридные белки иденти-

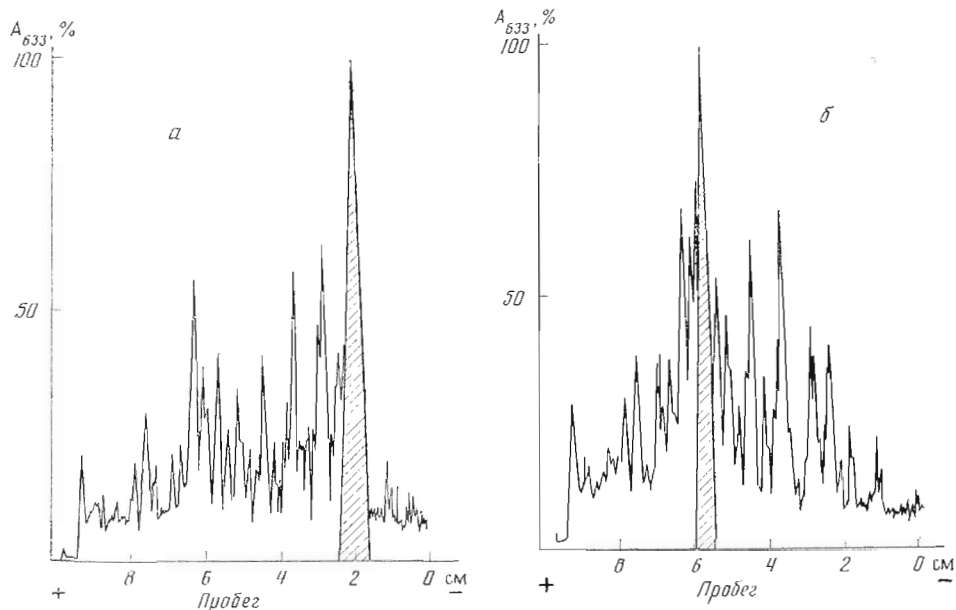


Рис. 6. Результаты денситометрирования акриламидных гелей (показанных на рис. 5), полученных при разделении белков, выделенных из клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pG1005RH (а) и pG380RH (б). Пики гибридных белков заштрихованы

плазмиды. Последнее, по-видимому, вследствие свойств бактериородопсина как мембранного белка [12]. Значительный вклад фрагмента бактериородопсина в коротком гибриде, вероятно, уже способен резко изменить свойства последнего, что несомненно должно сказаться на устойчивости рекомбинантных штаммов. Как показали параллельные эксперименты с другими пептидами, в частности с проинсулином, подобные векторы в штамме VL902 обеспечивали очень высокий уровень экспрессии гибридных белков и полученные на их основе штаммы *E. coli* были совершенно стабильны.

Как отмечалось выше, одним из свойств химерных белков, образующихся при экспрессии гибридных генов галактозидазы и некоторых пептидов, является плохая растворимость в воде. Вследствие этого они образуют в цитоплазме клеток нерастворимые агрегаты, накапливающиеся на внутренней стороне мембраны и препятствующие протеиназной деградации белкового продукта. Причем количество химерного белка возрастает в бактериальной культуре по мере увеличения плотности растущих клеток и продолжает увеличиваться даже после прекращения их деления [16]. При уменьшении длины гибрида стабильность его несколько падает, однако, как только образуются агрегаты, гибридный белок становится уже недоступным для протеиназ. *lon*-Мутанты *E. coli*, видимо, и обеспечивают стабильность коротких гибридов во время их синтеза и непосредственно после его окончания до образования подобных конгломератов.

Свойство гибридов плохо растворяться в воде и водных солевых растворах позволяет выделить их из клеточных экстрактов практически количественно с применением простых процедур, включающих осаждение и центрифугирование. В случае же хорошей растворимости гибрида он может быть выделен за одну стадию с помощью аффинной хроматографии [17].

Следует также отметить, что длина лидерной последовательности гибридного белка оказывает существенное влияние на уровень экспрессии целевого пептида. Чем короче лидер, тем выше должен быть выход целевого пептида на 1 г биомассы. Это объясняется прежде всего меньшими размерами гибридного белка. Очевидно, что при одинаковом количестве гибрида, накапливающегося в бактериальной клетке за время ферментации, относительное содержание целевого пептида будет больше в том штамме, где меньше молекулярная масса гибридного белка. Кроме того, наличие короткого предшественника облегчает очистку целевого соединения после его

**Уровень синтеза различных гибридных белков, состоящих  
из фрагментов бактериородопсина и  $\beta$ -галактозидазы,  
в штаммах *E. coli***

| Плазмида | Штамм-реципиент<br><i>E. coli</i> | Количество гибридного белка |                                     |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
|          |                                   | мг/г биомассы               | % от суммарного<br>клеточного белка |
| pC1005RH | HB101                             | 280                         | 28                                  |
| pC380RH  | HB101                             | 60                          | 5-6                                 |
| pC380RH  | VL902                             | 240                         | 24                                  |
| pC280RH  | HB101                             | 15                          | 1,5                                 |
| pC280RH  | VL902 *                           |                             |                                     |
| pG2801RH | HB101                             | 16                          | 1,6                                 |
| pC2801RH | VL902 *                           |                             |                                     |

\* Штамм нестабилен при повторной ферментации.

отделения от лидера (чаще всего обработкой бромцианом). Так, в случае предшественника длиной 1005 а.о. при расщеплении BrCN образуется 24 пептида, а в случае укороченной до 380 и 280 а.о. лидерной последовательности — 9 и 4 соответственно. Однако оптимальная длина предшественника, по-видимому, должна подбираться индивидуально для сочетания каждого экспрессируемого пептида и системы, в которой он экспрессируется. При этом очень важно обеспечить сохранение основного свойства, дающего подобному подходу преимущество перед прямой экспрессией — способность давать в цитоплазме клетки нерастворимые, устойчивые в данном штамме агрегаты.

### Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции (Boehringer, ФРГ), Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы P-L Biochemicals (США).

Химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов осуществляли фосфоритриэфирным методом с применением О-нуклеофильных катализаторов [18]. Синтетические олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали препаративным гелем-электрофорезом и обращенно-фазовой хроматографией, а их структуры подтверждали методом Максама — Гилберта [19]. 5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ (3000 Ки/ммоль, Amersham, Англия) [19]. Денситометрирование проводилось при 633 нм на приборе Ultrascan (ЛКВ, Швеция).

*Репаративный синтез* проводили в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСI (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дитиотреит, или в рестрикционном буфере (см. ниже). Во всех случаях использовали 100 мкМ растворы dNTP и 2—4 ед. акт. ДНК-полимеразы *E. coli* на 100 мкл реакционной смеси. Реакцию проводили в течение 30 мин при 20°С и останавливали фенольной экстракцией белка и осаждением ДНК спиртом.

*Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции* осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСI (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ NaCl и 2 мМ дитиотреит, в течение 1 ч при 37°С с использованием 0,5—1 ед. акт. фермента на 1—2 мкг ДНК.

*Лигирование* синтетических олигонуклеотидов и фрагментов плазмидных ДНК проводили как описано ранее [6].

*Конструирование рекомбинантных плазмид* и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами осуществляли согласно работе [21]. Бактерии выращивали на LB-среде [22] с добавлением 25—30 мкг/мл ампициллина, а при тестировании уровня экспрессии гибридных белков прибавляли IPTG до 2 мМ.

*Гибридные белки* выделяли аналогично тому, как это описано для А- и В-цепей инсулина [7]. Электрофорез белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле, содержащем SDS, по методу Лэммли [23].

Обнаружение белков с помощью иммуноблоттинга осуществляли в основном так, как описано в работах [14–16]. Клетки выращивали в 10 мл LB-бульона, содержащего 50 мкг/мл ампициллина, до оптического поглощения 0,6, затем в среду добавляли IPTG до 2 мМ и выращивание продолжали еще 12 ч. Затем клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин (10 мин) и осаживали в 1,5 мл буфера, содержащего 0,06 М трис-НСl, рН 6,8, и 5 мкг/мл PMSF, при 38 кГц 3 раза по 1 мин. Аликвоты из этих суспензий после прогревания с буфером Лэммли [23] использовали для нанесения на полиакриламидный гель. После окончания электрофореза белки перенесли с геля на нитроцеллюлозный фильтр при 80 В и 0,3 А в течение 2 ч в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин (рН 8,3), 20% метанола и 0,02% SDS, с помощью аппарата Trans-Blot-System (Bio-Rad, США). После окончания переноса половину фильтра прокрашивали амидочерным и оставляли в качестве контрольной, а вторую половину отмывали от SDS буфером, содержащим 20 мМ трис-НСl, рН 7,5 и 105 мМ NaCl, и инкубировали в том же буфере с 3% BSA при 4°С в течение ночи и 1,5 ч при 20°С. Затем фильтр выдерживали в растворе антисыворотки к бактериородопсину в присутствии 0,05% твин-20 и 1% BSA в течение 2 ч при перемешивании при 20°С и отмывали (3×15 мин) в том же буфере, содержащем твин-20. После инкубации в растворе конъюгата в течение 2 ч при 20°С фильтр отмывали при перемешивании буфером с твин-20 (4×15 мин). Для выявления связанных с антителами белковых зон фильтр вымачивали в 0,1 М трис-НСl, рН 7,5, содержащем 2,5 мг диаминобензидина и 3,3 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 10 мл раствора, в течение 10 мин в темноте, а затем отмывали водой.

Авторы глубоко признательны Н. Г. Абдулаеву и В. А. Коваленко за предоставление антител к бактериородопсину и конъюганта с пероксидазой.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Messing J. *Meth. Enzymol.*, 1983, v. 101, p. 20–31.
2. Messing J., Vieira J. *Gene*, 1982, v. 19, № 3, p. 259–268.
3. Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Шингарова Л. Н., Быстров Н. С., Филиппов С. А., Болдырева Е. Ф., Колосов М. П., Матвиевко Н. И., Крамаров В. М. Докл. АН СССР, 1984, т. 278, № 4, с. 1002–1005.
4. Carter P., Bedouelle H., Winter G. *Nucl. Acids Res.*, 1985, v. 13, № 12, p. 4431–4443.
5. Ефимов В. А., Мирских О. В., Чухмажчева О. Г., Овчинников Ю. А. *Биоорганич. химия*, 1985, т. 11, № 5, с. 621–627.
6. Чухмажчева О. Г., Буярякова А. А., Мирских О. В., Ревердатто С. В., Ефимов В. А., Овчинников Ю. А. *Биоорганич. химия*, 1985, т. 11, № 11, с. 1533–1546.
7. Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 1, p. 106–110.
8. Heyneker H. L., Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Bolivar F., Boyer H. W. *Science*, 1977, v. 198, № 4321, p. 1056–1063.
9. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Северцова И. В., Чернов Б. Н., Колосов М. Н., Городецкий С. И., Слюсаренко А. Г., Капелюнская Т. В., Лисенков А. Ф., Дубинин Н. П. *Биоорганич. химия*, 1979, т. 5, № 12, с. 1802–1815.
10. Kalnins A., Otto K., Ruter U., Müller-Hill B. *EMBO J.*, 1983, v. 2, № 4, p. 593–597.
11. Guo L.-H., Stepien P., Yun Tso J., Brousseau R., Narang S., Thomas D. Y., Wu R. *Gene*, 1984, v. 29, № 1–2, p. 251–254.
12. Ovchinnikov Yu. A., Abdulaev N. G., Feigina M. Yu., Kiselev A. V., Lobanov N. A. *FFBS Lett.*, 1979, v. 100, № 2, p. 219–224.
13. Robinson M., Lilley R., Little S., Ematage J. S., Yarranton G., Sterhens P., Milligan A., Eaton M., Humphreys G. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 17, p. 6663–6671.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 9, p. 4350–4354.
15. Nielsen P. J., Manchester K. L., Towlin H., Gordon J., Thomas G. J. *Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 20, p. 12316–12321.
16. Williams D., Richard M. *Science*, 1982, v. 215, № 4533, p. 687–689.
17. Uhlen M. Abstracts of protein engineering symposium. Groningen, the Netherlands. 4–7 may 1986, p. 22.
18. Efimov V. A., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. *Nucl. Acids Res.*, 1985, v. 13, № 10, p. 3651–3666.
19. Maxam A. M., Gilbert W. *Meth. Enzymol.*, 1980, v. 65, p. 499–560.
20. Ovchinnikov Yu. A., Efimov V. A., Ivanova I. N., Reverdatto S. V., Skiba N. P., Chakhmakhcheva O. G. *Gene*, 1984, v. 31, № 1–3, p. 65–78.



21. Ефимов В. А., Чахмахчиева О. Г. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 8, с. 2084—2093.
22. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976, с. 395.
23. Luetjli U. K. Nature, 1970, v. 227, № 5259, p. 680—685.

Поступила в редакцию  
24.VI.1986

## LASMID EXPRESSION VECTORS ON THE BASIS OF *ESCHERICHIA COLI* $\beta$ -GALACTOSIDASE GENE

СНАКНМАКНЧЕВА О. Г., МИРСКИХ О. В., ЧИОНГ НАМ ХАУ, ЕФИМОВ В. А.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

With the use of synthetic DNA fragments, a set of new plasmid vectors has been obtained. The vectors provided high level expression of peptides and small proteins in *E. coli* as fusions with fragments of  $\beta$ -galactosidase of various length. These vectors were used to achieve expression of a synthetic gene for a functionally active fragment of bacteriorhodopsin. The yields of hybrid proteins consisting of  $\beta$ -galactosidase and bacterioopsin fragments were in the range of 5–30% from the total amount of cellular protein.