



УДК 577.213.7 : 577.214.622/625

© 1990 г.

С. А. Зозуля, Т. А. Обухова, Е. П. Ширкова,
П. Р. Бадалов

ПЛАЗМИДНЫЕ ЭКСПРЕССИОННЫЕ ВЕКТОРЫ С ЭЛЕМЕНТАМИ ГЕНА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ *E. COLI*

Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Пушино Московской обл.

Описано конструирование семейства экспрессионных плазмидных векторов, содержащих элементы гена щелочной фосфатазы *Escherichia coli* (*phoA*) и предназначенных для термоиндуцибельной суперпродукции под контролем промотора P_R фага λ гибридов гетерологичных белков с щелочной фосфатазой *E. coli*. Структура векторов позволяет легко получать гены гибридных белков с присоединением гетерологичного полипептида к N- или C-концу щелочной фосфатазы, а также с подстройкой к чужеродной последовательности лидерного пептида фосфатазы. Показана возможность эффективной экспрессии и секреции в периплазматическое пространство получаемых гибридов с сохранением в некоторых случаях энзиматической активности фосфатазы.

Конструирование и экспрессия гибридных генов исследуемого белка и белка-маркера (или носителя) являются генно-инженерным подходом, часто применяемым при изучении регуляции генов или функций белков, а также для упрощения выделения рекомбинантного белка из клеток организма-хозяина. Хорошо известный пример — использование разнообразных векторов на основе маркерного гена *lacZ* *E. coli*, кодирующего фермент β -галактозидазу, для получения подобных гибридов [1—3]. Перспективный кандидат на роль ферментативного маркера при получении гибридных белков — щелочная фосфатаза *E. coli* (продукт гена *phoA*), обладающая рядом удобных свойств и отличий от β -галактозидазы. В данной работе мы описываем конструкцию новых плазмидных векторов, предназначенных для упрощенного конструирования и эффективной экспрессии в клетках *E. coli* различных типов белковых гибридов с щелочной фосфатазой *E. coli*.

Щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) представляет собой периплазматический димерный белок, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой 47 кДа. Подобно большинству секретируемых белков фосфатаза синтезируется в виде предшественника, содержащего 21-звенный лидерный пептид. Транслокация фосфатазы в периплазматическое пространство с отщеплением лидерной последовательности и димеризацией — необходимое условие для появления у белка ферментативной активности [4]. В связи с простотой колориметрической детекции фосфатазной активности этот фермент удобен как маркер в генно-инженерных исследованиях, так же как и традиционная β -галактозидаза. Однако периплазматическая локализация, высокая термостабильность и сравнительно небольшая молекулярная масса делают применение фосфатазы в генно-инженерных конструкциях в ряде случаев предпочтительным. В литературе описан ряд векторов и транспозонов разного назначения, в которых используются маркерные свойства гена *phoA* *E. coli* [5—9]. Однако эти векторы не обеспечивают достаточной широты и удобства генно-инженерных манипуляций с геном *phoA* при получении гибридных генов.

Клонирование гена *phoA* из разных штаммов *E. coli* K12 было описано ранее несколькими группами исследователей [10—13]; известна полная нуклеотидная последовательность этого гена и прилегающих областей [14]. В качестве первого этапа работы в плазмидный вектор pUC18 нами

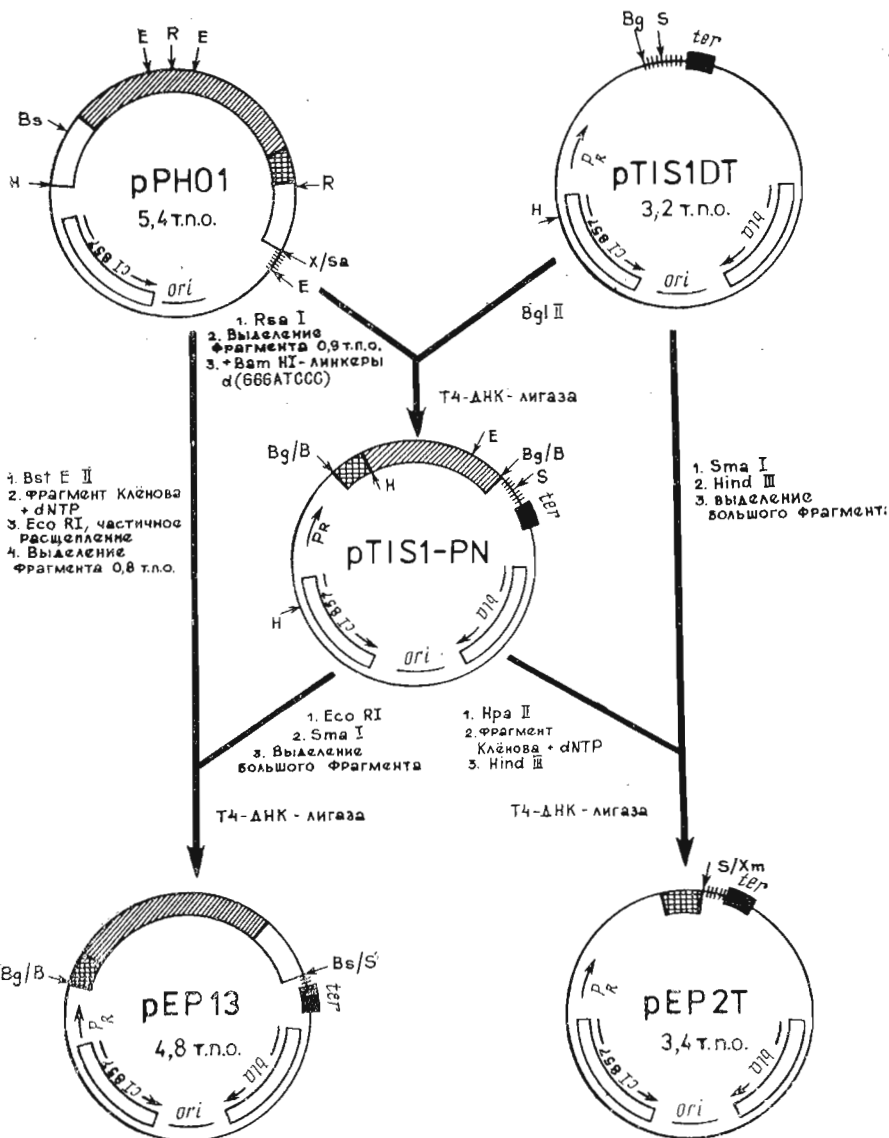


Рис. 1. Схема конструирования плазмидных векторов pEP13 и pEP2T. Кодировущая последовательность гена щелочной фосфатазы заштрихована, двусторонней штриховкой выделена область лидерного пептида. Условные обозначения: *bla* — ген ампициллин-резистентности, *ter* — терминатор транскрипции, *trp*, *a*, *ori* — ориджины репликации плазмиды. Обозначения сайтов узнавания рестриктаз: B — *Bam*HI, Bg — *Bgl*II, Bs — *Bst*EII, E — *Eco*RI, H — *Hind*III, Hp — *Hpa*I, R — *Rsa*I, S — *Sma*I, Sa — *Sa*II, X — *Xho*I, Xm — *Xma*I

был клонирован рестриктный фрагмент *Hind*III/*Xho*I (2,7 т. п. о.) из генома штамма *E. coli* K12 HB 101, содержащий интактный ген щелочной фосфатазы и его регуляторные области. Рестрикционный анализ этого фрагмента и определение нуклеотидной последовательности концевых областей гена *phoA* свидетельствуют об идентичности его структуры структуре, опубликованной ранее [14]. Полученная таким образом плаزمида pPH01 была использована как источник гена *phoA* при конструировании описанных ниже экспрессионных векторов.

В качестве другого исходного компонента для конструирования был взят плазмидный вектор pTIS1DT, описанный нами ранее [15] и представляющий собой «ATC-вектор» для экспрессии эукариотических генов. Этот вектор сконструирован на основе мультикопийного репликаона плазмид серии pUC [3] с делетированной *lac*-областью и содержит *Bgl*III/*Pst*I-фрагмент ДНК фага λ с геном термочувствительного репрессора *cI857* и сильным

а

```

... ATG GAA CAA CGC ATA ACC CTG AAA GAT TAT GCA ATG CGC TTT
      |
      |----- cro -----
GGG CAA ACC AAG ACA GCT AAA GAT CGC ACA TGG AGA AAA TAA A GTG
      |                                     |
      |----- cro ----- S.D.pho A
AAA CAA AGC ACT ATT GCA CTG GCA CTC TTA CCG TTA CTG TTT ACC
      |----- лидерный пептид pho A -----
CCT CTG ACA AAA GCC CGGGGATCCTCTAGACTCGACCTGCAGAGCCCGCСТААТ
      |                                     |
      |----- SmaI BamHI XbaI SalI PstI терминатор ----->
GAGCGGGCTTTTTCATGCAAGСТААТTC...
      |
      |----- транскрипции (HindIII/EcoRI) -----<

```

б

```

Sph I Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe
5'- CC GCC AAT GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC
3'-GTA CGG CGG TTA CAA CAA CCT GAC TGG CTG GTC TGG CTA GAG AAG

Tyr Thr Met Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys Lys Ile TER Xba I
TAC ACC ATG AAA GCC GCT CTG GGG CTG AAA AAG ATC TAA T 3'
ATG TGG TAC TTT CGG CGA GAC CCC GAC TTT TTC TAG ATT AGATC 5'
      |
      |----- Bgl II -----

```

в

```

лидерный пептид | зрелая фосфатаза
-2 -1 1 2 3
.. Lys Ala Arg Gly Ile Arg Thr Pro..
.. AAA GCC CGG GGG ATC CGG ACA CCA..
.. TTT CGG GCC CCC TAG GCC TGT GGT..
      |
      |----- Sma I Bam HI Bsp MII -----

```

Рис. 2. Фрагменты нуклеотидных последовательностей векторов рЕР2Т, рЕР15 и рЕР17: а — участок экспрессионного вектора рЕР2Т, находящийся под контролем λ -промотора P_R , включающий в себя минцистрон *cro*, область лидерного пептида гена *phoA*, полилинкер и терминатор транскрипции. Выделены инициирующий и терминирующий кодоны минцистрона *cro*, инициирующий кодон (GTG) гена *phoA* и кодон последнего аминокислотного остатка лидерного пептида фосфатазы; отмечен (S. D.) участок Шайн — Дальгарно гена *phoA*; б — синтетический дуплекс, кодирующий измененный С-концевой участок фосфатазы (вектор рЕР15). Кодоны, дополнительные к природной структуре, заключены в рамку; в — измененный участок стыка областей лидерного пептида и зрелого белка гена *phoA* в векторе рЕР17. Кодоны, дополнительные к природной структуре, заключены в рамку

анним промотором P_R [16]. Для повышения уровня экспрессии клонированных генов и стабилизации вектора в дистальную по отношению к промотору P_R часть полилинкера клонирован химически синтезированный сильный терминатор транскрипции *trp a* [17].

При конструировании секреторного экспрессионного вектора рЕР2Т фрагмент плазмиды рTIS1DT, содержащий обобщенный участок инициации трансляции для клонируемых гетерологичных генов, был заменен на фрагмент гена *phoA* размером 80 п. о., включающий полную область лидерного пептида и участок Шайн — Дальгарно (рис. 1). Для упрощения сборки целевой структуры на первом этапе была получена промежуточная плазмида рTIS1-PN путем клонирования *RsaI*-фрагмента (0,9 т. п. о.)

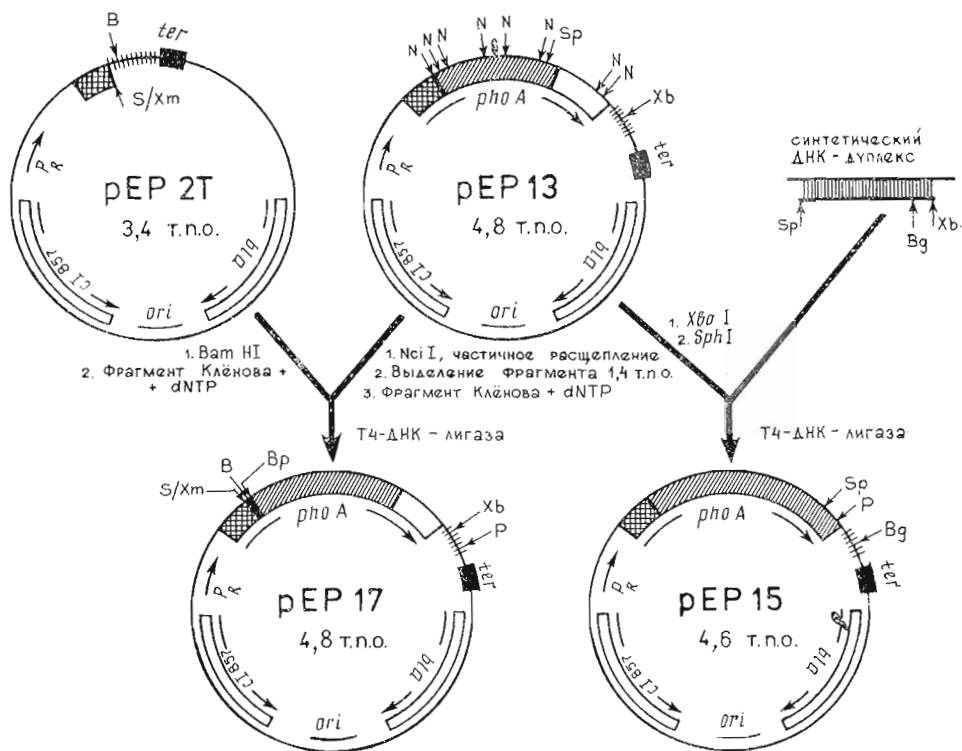


Рис. 3. Схема конструирования плазмидных векторов рЕР15 и рЕР17. Обозначения сайтов узнавания рестриктаз: Bp — *BspMII*, N — *NciI*, Sp — *SphI*, Xb — *XbaI*, P — *PstI*. Прочие условные обозначения указаны в подписи к рис. 1

с проксимальной частью гена *phoA* в сайт *BglIII* вектора рТIS1DT с помощью синтетических *BamHI*-линкеров.

При конструировании вектора рЕР2Т (как и нижеописанных родственных векторов рЕР13, рЕР15 и рЕР17) с целью обеспечения эффективной трансляции экспрессируемых гибридных генов был реализован принцип трансляционного сопряжения [18—20] гена *phoA* с геном *cro* фага λ . Для этого участок сочленения между соответствующими фрагментами ДНК конструировали таким образом, чтобы терминирующий кодон эффективно транслируемого миницистрона *cro*, содержащего проксимальную область природного гена *cro*, находился в непосредственной близости перед инициирующим кодоном гена *phoA* (рис. 2а). Для удобства прецизионной подстройки чужеродного гена к кодирующей последовательности лидерного пептида *phoA* в месте стыка последовательности *phoA* с полилинкерной областью введены уникальные сайты рестриктаз *SmaI* и *AvaI*. Использование при клонировании одного из этих сайтов в комбинации с процедурами достройки/отщепления 5'-выступающих концов ДНК (в случае *AvaI*) позволяет легко осуществить точную подстройку в любой рамке считывания чужеродной кодирующей последовательности к последовательности лидерного пептида *phoA*. Нуклеотидную последовательность, приведенную на рис. 2а, подтверждали секвенированием после субклонирования соответствующего *HindIII*-субфрагмента плазмиды рЕР2Т в фаговый вектор M13mp18,

Вектор рЕР13, сконструированный путем клонирования недостающей дистальной области гена *phoA* в промежуточную плазмиду рТIS1-PN, содержит поставленную под контроль промотора *P_R* полную последовательность гена *phoA* дикого типа, за которой следуют природный терминатор транскрипции *phoA* и терминатор *trp a* (рис. 1). Вектор рЕР13 был использован как основа для конструкции векторов рЕР15 и рЕР17, предназначенных для получения соответственно С- и N-концевых гибридов чужеродных белков с щелочной фосфатазой.

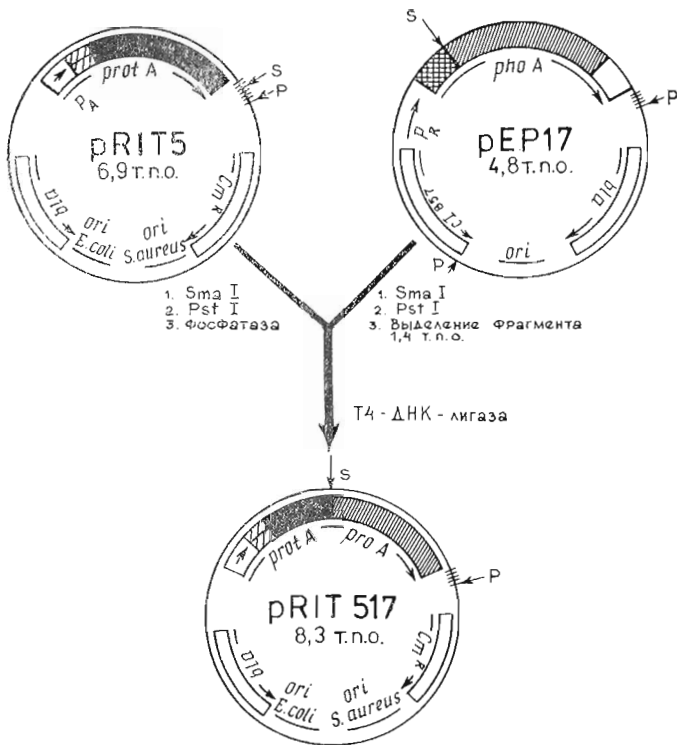


Рис. 4. Схема конструирования плазмиды pRIT517. Ген белка А *S. aureus* зачернен, штриховкой (редкой) выделена область лидерного пептида. Прочие условные обозначения указаны в подписи к рис. 1

При конструировании pEP15 небольшой 3'-концевой фрагмент гена *phoA* был заменен на химически синтезированный олигонуклеотидный дуплекс, кодирующий измененную С-концевую часть фосфатазы (рис. 2б). Отличие синтетической С-концевой части от природной заключается во введении сайта рестриктазы *BglII* непосредственно перед стоп-кодоном гена. Это приводит к появлению в последовательности мутантной фосфатазы, синтез которой кодируется плазмидой pEP15, двух дополнительных С-концевых аминокислотных остатков (рис. 2б). Полную нуклеотидную последовательность клонированного синтетического фрагмента подтверждали секвенированием. Наличие уникального *BglII*-сайта в гене *phoA* позволяет конструировать гибридные гены с подстройкой гетерологичной последовательности с С-конца к полной последовательности фосфатазы.

Вектор pEP17 был получен путем встройки части гена *phoA*, кодирующей зрелую фосфатазу, в вектор pEP2T (рис. 3). Полученный при этом мутантный ген *phoA* отличается от гена дикого типа наличием трех дополнительных кодонов, не меняющих рамку трансляции гена, у границы раздела кодирующих последовательностей лидерного пептида и зрелой фосфатазы. Как видно из рис. 2в, эта модификация гена приводит к возникновению уникальных рестрикционных сайтов *SmaI*, *BamHI* и *BspMII*, позволяющих вводить гетерологичную кодирующую последовательность в участок между кодирующими последовательностями лидерного пептида и зрелой фосфатазы. С целью проверки пригодности этого варианта гена *phoA* для создания энзиматически активных гибридов была сконструирована плазмида pRIT517 (рис. 4). Эта плазмида содержит ген гибридного белка, состоящего из N-концевой области иммуноглобулинсвязывающего белка А *Staphylococcus aureus*, включая лидерный пептид белка А, и последовательности зрелой щелочной фосфатазы.

Для оценки эффективности функционирования описанных векторов ими трансформировали клетки стандартных лабораторных штаммов *E. coli* HB101 или K802 и измеряли ферментативную активность фосфатазы при различных условиях выращивания. Свойства векторов, в частности

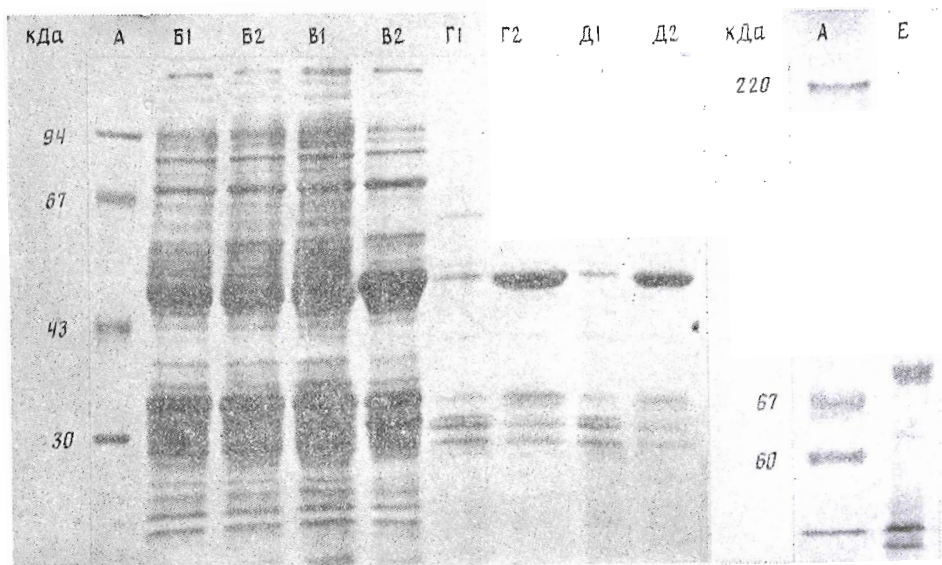


Рис. 5. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ препаратов белка, образуемых при термоиндукции (указана температура) клеток *E. coli* HB101, содержащих плазмиды: А — маркеры молекулярной массы; В — тотальный белок *E. coli*/rEP2Г при 30 (1) и 37°С (2); В — тотальный белок *E. coli*/rEP13 при 30 (1) и 37°С (2); Г — периплазматический белок *E. coli*/rEP15 при 30 (1) и 37°С (2); Д — периплазматический белок *E. coli*/rEP17 при 30 (1) 37°С (2); Е — периплазматический белок *E. coli*/rRIT517 при 37°С

присутствие на плазмиде гена термочувствительного репрессора *cI* и независимость экспрессии плазмидных вариантов гена *phoA*, в отличие от природного, от концентрации фосфата в среде, не накладывает специальных ограничений на выбор штамма *E. coli*-хозяина. Термоиндукцию синтеза фосфатазы клетками *E. coli*, трансформированными векторами rEP13, rEP15 и rEP17, осуществляли при 37°С, т. е. в условиях частичной дерепрессии λ -промотора P_R . Попытки индукции синтеза фосфатазы при 40—42°С приводили к лизису клеток или к невоспроизводимости результатов при выделении фракции периплазматических белков. Объяснением этого феномена может быть токсический эффект суперпродукции секретлируемого белка на клетки *E. coli* при полной дерепрессии мощного промотора или (и) дестабилизация периплазматического пространства при экстремальных температурах роста клеток. Аналогичные наблюдения при термоиндуцируемом синтезе секретлируемых белков описаны в литературе [21].

Электрофоретический анализ клеточных белков (рис. 5) говорит о высокой эффективности термоиндуцибельной экспрессии плазмидных генов фосфатазы. Уровень экспрессии практически одинаков для rEP13, rEP15 и rEP17 и, по данным денситометрии электрофореграмм, составляет не менее 70% от тотального периплазматического белка. Как видно из рис. 5 (колонка Е), основной белковый компонент периплазматической фракции клеток *E. coli*, содержащих плазмиду rRIT517, имеет молекулярную массу ~75 кДа, что соответствует расчетной массе гибрида белок-А-фосфатаза, кодируемого плазмидой rRIT517.

Уровень фосфатазной активности в клетках *E. coli*, содержащих плазмиды rEP13, 15 или 17, составляет после термоиндукции 800—1000 ед. акт. в расчете на 1 л бактериальной культуры с $A_{600} = 1,5$ (до термоиндукции ~50 ед. акт.). Фосфатазная активность в клетках, содержащих плазмиду rRIT517, составляла 700 ед./л. Эти значения уровня фосфатазной активности в клетках коррелируют с денситометрическими данными и указывают также на отсутствие существенных различий между удельными активностями фосфатазы дикого типа, кодируемой rEP13, и мутантных фосфатаз, кодируемых rEP15 и rEP17.

Детальная характеристика свойств штаммов *E. coli*, содержащих описанные векторы, а также проверка возможностей их применения для экспрессии различных гибридных белков будут объектами дальнейших исследований. Возможность использования вектора pEP2T для суперпродукции и экспорта в периплазматическое пространство гетерологичных белков была показана на примере экспрессии гена γ -субъединицы зрительной фосфодиэстеразы из сетчатки быка [22].

Экспериментальная часть

В работе использовали рестриктазы, *RsaI*, *HpaII*, *NciI*, *BglII* (Boehringer Mannheim), *SallI*, *XhoI*, *HindIII*, *PstI*, *EcoRI*, ДНК-лигазу фага T4 (НПО «Фермент», Вильнюс), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I, полинуклеотидкиназу фага T4 (Amersham), щелочную фосфатазу *E. coli* (Boehringer Mannheim). Ферментативные реакции проводили в условиях, рекомендованных фирмами-изготовителями.

В работе использовали штаммы *E. coli* K12 HB101, K802 [23] и JM 105 [3] и плазмидные векторы pRIT5 (Pharmacia), pUC18, pUC19 [3].

Молекулярное клонирование, выделение и анализ рекомбинантных плазмид проводили в соответствии со стандартными методиками [23, 24]. Нуклеотидные последовательности фрагментов векторов определяли модифицированным методом Сенгера [25] после субклонирования в бактериофаги M13mp18 и M13mp19. В качестве праймеров для секвенирования использовали универсальный 17-звенный праймер M13 и олигонуклеотиды структуры 5' d(TTTACCCCTGTGACAAAAGCCC) и 5' d(AAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTCTGCA), комплементарные соответственно областям лидерного пептида *PhoA* и терминатора транскрипции *trp a*. Олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезировали твердофазным фосфитамидным методом с применением автоматического ДНК-синтезатора System 1 Plus (Beckman) по методикам, рекомендованным фирмой-изготовителем. После полного деблокирования олигонуклеотиды очищали электрофорезом в денатурирующем 15—20% полиакриламидном геле.

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли ПЭВМ IBM-PC-AT с использованием пакета программ «Microgenie» (Beckman).

Электрофорез белковых образцов в SDS-полиакриламидном геле проводили методом Лэммли [26] с использованием 12,5% разделяющего и 6% концентрирующего гелей; в качестве маркеров молекулярной массы применяли готовые смеси белковых стандартов (Pharmacia). Гели окрашивали кумасси G250. Денситометрию гелей проводили на лазерном денситометре Ultrosan (LKB).

Клонирование гена щелочной фосфатазы (phoA). Тотальную геномную ДНК штамма *E. coli* HB101, выделенную как описано [27], подвергали полному совместному гидролизу рестриктазами *XhoI* и *HindIII*. Полученный гидролизат (100 мкг) фракционировали в 0,8% агарозном геле; зону, соответствующую 2,7 т. п. о., вырезали и элюировали; элюированную ДНК клонировали в вектор pUC18, расщепленный рестриктазами *SallI* и *HindIII* и дефосфорилированный. Целевую плазмиду pPHO1 отбирали из полученных рекомбинантов гибридизацией с колониями радиоактивно меченного олигонуклеотидного зонда 5' d(TTTACCCCTGTGACAAAAGCCC), комплементарного области лидерного пептида гена *phoA* [14], соответствие ее структуры ожидаемой подтверждали рестриктным анализом.

Индукция и фракционирование биомассы клеток E. coli. Клетки *E. coli* HB101 или K802, содержащие экспрессионные плазмиды pEP2T, pEP13, pEP15 или pEP17, выращивали с интенсивным перемешиванием при 30° С в среде LB с 50 мкг/мл ампициллина до плотности 0,8—1 A_{600} , затем при 37° С еще 2—3 ч. Клетки, содержащие плазмиду pRIT517, выращивали при 37° С до плотности 1,3—1,8 A_{600} . Осажденные центрифугированием (8000 g, 10 мин, 4° С) клетки (3—4 г) ресуспендировали в 50 мл холодного

буфера, содержащего 0,5 М сахарозу, 30 мМ трис-НСl (рН 8,0), 0,5 мМ EDTA, и инкубировали на льду 10 мин. Суспензию центрифугировали (8000 g, 10 мин, 4° С) и осадок быстро ресуспендировали в 50 мл холодной дистиллированной воды. После инкубации на льду в течение 10 мин суспензию центрифугировали в тех же условиях. Полученный супернатант рассматривали как фракцию периплазматических белков, а осадок — как фракцию сферопластов.

Определение фосфатазной активности. Для качественного определения синтеза активной фосфатазы отдельными бактериальными колониями чашку Петри с выросшими при 30° С колониями инкубировали 1—2 ч при 42° С. Затем чашку перемещали на светлую подложку и заливали поверхность агара тонким слоем раствора, содержащего 1 мМ *n*-нитрофенилфосфат, 1 М трис-НСl (рН 8,0). Через 1—10 мин инкубации вокруг колоний с фосфатазной активностью развивается интенсивное желтое окрашивание. В альтернативном методе колонии выращивали на чашках, содержащих 40 мкг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата. Для развития синей окраски вокруг колоний с фосфатазной активностью чашки инкубировали несколько часов при 37 или 42° С.

Количественное определение ферментативной активности щелочной фосфатазы осуществляли в соответствии с описанной методикой [28]. Для проведения ферментативной реакции 10—100 мкл образца добавляли к 1 мл 1 мМ *n*-нитрофенилфосфата в 0,1 М трис-НСl (рН 8,0) и инкубировали 5—10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 0,5 М фосфата натрия, рН 8,0, и измеряли A_{410} . За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата в 1 мин (молярный коэффициент поглощения *n*-нитрофенола считали равным $1,62 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [28]). При измерении фосфатазной активности в клетках *E. coli* аликвоту бактериальной культуры предварительно встряхивали 1—2 мин с несколькими каплями хлороформа для увеличения проницаемости клеток.

Количество белка определяли по модифицированному методу Брэдфорд [29, 30], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Casadaban M. J., Martinez-Arias A., Shapira S. K., Chou J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 293—308.
2. Silhavy T. S., Berman M. L., Enquist L. W. // Experiments in gene fusions. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1984.
3. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
4. Michaelis S., Inouye H., Oliver D., Beckwith J. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. № 1. P. 366—374.
5. Hoffman C. S., Wright A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 14. P. 5107—5111.
6. Schneider K., Beck C. F. // Gene. 1986. V. 42. № 1. P. 37—48.
7. Mateucci M., Lipetsky H. // Biotechnology. 1986. V. 4. № 1. P. 51—55.
8. Manoil C., Beckwith J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 23. P. 8129—8133.
9. Strom M. S., Lory S. // J. Bacteriol. 1987. V. 169. № 7. P. 3181—3188.
10. Yoda K., Kikuchi Y., Yamasaki M., Tamura G. // Agric. Biol. Chem. 1980. V. 44. № 5. P. 1213—1214.
11. Berg P. E. // J. Bacteriol. 1981. V. 146. № 2. P. 660—667.
12. Inouye H., Michaelis S., Wright A., Beckwith J. // J. Bacteriol. 1981. V. 146. № 2. P. 668—675.
13. Boidol W., Simonis M., Topert M., Siewert G. // Mol. Gen. Genet. 1982. V. 185. № 3. P. 510—512.
14. Chang C. N., Kuang W.-J., Chen E. Y. // Gene. 1986. V. 44. № 1. P. 121—125.
15. Скиба Н. П., Удовиченко И. П., Бондаренко В. А., Наточин М. Ю., Юровская А. А., Зогуля С. А., Широкова Е. П., Липкин В. М. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 3. С. 230—242.
16. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. // J. Mol. Biol. 1982. V. 162. № 4. P. 729—773.
17. Wu A. M., Platt T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 11. P. 5442—5446.
18. Schoner B. E., Belagaje R. M., Schoner R. G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 22. P. 8506—8510.
19. Машко С. В., Лебедева М. И., Подковыров С. М., Липидус А. Л., Трухан М. Э., Мочальский А. В., Еремашвили М. Р., Ребенгитш Б. А., Козлов Ю. И. // Антибиотики и медицинская биотехнология. 1987. Т. 32. № 4. С. 248—254.

20. Кравченко В. В., Шамин В. В., Гилева И. П., Лихошвай В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1372—1386.
21. Oka T., Sumi S., Fujiwara T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T. // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 4. P. 1099—1104.
22. Skiba N. P., Udovichenko I. P., Bondarenko V. A., Shirokova E. P., Zozulya S. A., Lipkin V. M. // J. Cell. Biochem. 1989. Suppl. 13A. P. 100.
23. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
24. Клонирование ДНК. Методы / Ред. Гловер Д. М.: Мир, 1988. С. 1401—173.
25. McGrow R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.
26. Laemmli U. K., Favre M. // J. Mol. Biol. 1973. V. 80. № 4. P. 575—599.
27. Marmur J. // J. Mol. Biol. 1961. V. 3. № 2. P. 208—215.
28. Dunn B. E., Edberg S. C., Torres A. R. // Anal. Biochem. 1988. V. 168. № 1. P. 25—30.
29. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1. P. 248—254.
30. Spector T. // Anal. Biochem. 1978. V. 86. № 1. P. 142—144.

Поступила в редакцию
25.XII.1989.

S. A. ZOZULYA, T. A. OBUKHOVA, E. P. SHIROKOVA, P. R. BADALOV

PLASMID EXPRESSION VECTORS UTILIZING FRAGMENTS
OF THE *E. COLI* ALKALINE PHOSPHATASE GENE

Branch of M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of
the USSR, Pushchino, Moscow Region

A family of plasmid expression vectors, containing fragments of the *E. coli* alkaline phosphatase gene (*phoA*), has been constructed for the λP_R promoter-directed thermoinducible superproduction of fusions of heterologous polypeptides to the N- or C-terminus of *E. coli* alkaline phosphatase and its leader peptide. Effective expression and export to periplasm of resulting fusion proteins, which may retain enzymatic activity of the phosphatase, has been shown.