

УДК 579.864.017:575.117.2

ВЕКТОР pLF22 ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЯХ

© 2004 г. Б. В. Тараканов^{*1}, А. А. Яковлева^{**}, Т. А. Николичева^{*},
Н. М. Комкова^{*}, А. И. Манухина^{*}, В. В. Алёшин^{***}

^{*}ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии,
биохимии и питания сельскохозяйственных животных РАСХН, г. Боровск

^{**}НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 22.04.03 г.

Сконструирован плазмидный вектор для экспрессии. Вектор содержит репликон криптической плазмиды pLF1311 из *Lactobacillus fermentum* и множественный сайт клонирования в составе *lacZ'*, интегрированный в *rep* оперон плазмиды, что обеспечивает обязательную конститутивную транскрипцию клонированных последовательностей, лишенных терминаторов транскрипции, во всех штаммах, поддерживающих репликацию вектора. Потенциальные штаммы-хозяева включают широкий круг грамположительных бактерий и грамотрицательные бактерии, в том числе пробиотические штаммы. Эффективность векторной системы была проверена на экспрессии β-галактозидазы в лабораторном штамме *Escherichia coli* и синтетического гена пептидного гормона – рилизинг фактора соматотропного гормона в пробиотических штаммах лактобацилл и энтерококков. Рекомбинантная культура с геном рилизинг фактора соматотропного гормона оказывала влияние на физиологические, гистолого-анатомические показатели и рост лабораторных животных, получавших пробиотический штамм с кормом.

Ключевые слова: оцДНК плазмиды, грамположительные бактерии, пробиотики, соматолиберин.

Молочнокислые бактерии (лактобациллы, лактококки, энтерококки) – обширная группа грамположительных бактерий, играющая важную роль в природе и, кроме того, важный объект биотехнологии. Уже разработано немало плазмидных векторных систем для клонирования и экспрессии генов в этих микроорганизмах [1–6], однако их технологичность уступает таковой векторов бацилл или кишечных палочек. Во многих случаях успешной гетерологичной экспрессии в клетках лактобацилл транскрипция чужеродных генов осуществлялась с их природных промоторов [5] или требовала специального клонирования и селекции промоторных последовательностей для клеток реципиентного штамма [4]. Ранее была показана возможность включения в состав репликативного оперона плазмид посторонних последовательностей без нарушения функции репликации [7, 8]. Целью настоящего исследования было конструирование вектора, гарантированно обеспечивающего транскрипцию клонированной последовательности в широком круге молочнокислых и других бактерий за счет активности промотора репликативных генов.

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: bifip@kaluga.ru).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Плазмиды и бактериальные штаммы. В работе использовали различные производные криптической плазмиды pLF1311 из *Lactobacillus fermentum* ВКМ 1311 [3], векторы pUK21 и pTZ19R, плазмиду pGRF1 [9], плазмиду pJEL24, несущую ген *lacZ* без инициаторного кодона (получена от А.С. Миронова, ГНИИгенетика) и плазмиду pUKTZ, которая представляет собой модифицированную pUK21, полученную заменой малого *PvuII* фрагмента на таковой плазмиды pTZ19R. Для создания селективных условий на агаризованных средах использовали хлорамфеникол (“Sigma”) в концентрации 15 мкг/мл. В жидкой среде клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, выращивали при концентрации хлорамфеникола не более 5 мкг/мл. ДНК выделяли из культуры в поздней стационарной фазе, после 18–24 ч роста. Более подробно условия культивирования описаны ранее [3]. В качестве грамположительных реципиентов использовали молочнокислые бактерии *Lactobacillus acidophilus* K3, *Lactobacillus* sp. 8PA3, *Enterococcus faecalis* OG1 из лабораторной коллекции и штамм *Enterococcus faecium* M74 – компонент пробиотика “Энтерацид П”. Все штаммы являются непатогенными обитателями кишечника.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для амплификации последовательности соматолиберина и соединения ее с сигналом инициации трансляции использовали олигонуклеотидные затравки MI – d(GAAGGATAAATTTATGTACGCTGACGCTATCT), включающую потенциальный SD участок, инициаторный триплет и разделяющий их AT-богатый спейсер, и MII – d(TCCATATTG-GTCGACATTTAA). Амплификацию осуществляли в следующем режиме: 93°C – 1 мин, 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин, всего 25 циклов. Продукт нужного размера очищали электрофорезом в 4%-ой легкоплавкой агарозе и после фосфорилирования клонировали по сайту *EcoRV* в вектор pBlue-scriptKS⁺ (“Stratagene”).

Клонирование ДНК. Молекулярное клонирование и анализ рекомбинантных клонов *E. coli* осуществляли по общеизвестным методикам. Эндонуклеазы рестрикции, ДНК лигаза фага T4 и другие ферменты нуклеинового обмена получены от “СибЭнзим” (Новосибирск) или “MBI Fermentas” (Литва).

Активность β-галактозидазы определяли колориметрически с *o*-нитрофенол-β-*D*-галактозидом (ОНФГ) в качестве субстрата [10].

Содержание лабораторных животных. Для проведения опыта из 1,5-месячных помесных кроликов пород калифорнийская × советская шиншилла было сформировано несколько групп, в каждой по 3 самца и 4 самки. Крольчата были размещены в сетчатых клетках по 1–2 головы. Первая группа получала основной рацион (ОР), животные остальных групп ежедневно в смеси с кормом дополнительно получали по 1 мл культур исходного или рекомбинантного штамма с титром около 4×10^9 КОЕ (колониеобразующих единиц). Группы, получающие культуры исходного штамма, служили контролем для групп, получавших соответствующий рекомбинантный штамм. Продолжительность опыта варьировала от 2 до 4 мес.

Гистологические и ультраструктурные исследования проводили по методике, более подробно описанной ранее [11]. Супраоптические ядра гипоталамуса исследовали на серийных срезах. Функциональное состояние нейроцитов оценивали по количеству гомориположительного вещества. Площадь ядер и тел нейронов измеряли с помощью окуляр-микрометра. Митотический коэффициент в аденогипофизе определяли как число митозов в 500 клетках. Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе ЭМ 100 К. Цифровой материал обрабатывали с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Введение *lacZα* в состав *repAB* оперона

Векторы на основе репликона pLF1311 [3] сохраняют организацию природной плазмиды, относящейся к семейству pE194-подобных плазмид. Их репликация зависит от экспрессии генов *rep*-оперона. Первый из генов оперона кодирует белок RepA – негативный регулятор транскрипции, а второй ген кодирует белок RepB, иницирующий репликацию по механизму катящегося кольца, начинающуюся с сайта плазмидной ДНК *ori*⁺ [12]. Транскрипция указанных генов осуществляется с единого промотора. Поскольку белок RepB строго необходим для репликации, указанный промотор функционирует во всех штаммах, в которых отмечена репликация плазмиды. Включение в состав оперона дополнительной последовательности обеспечит, таким образом, ее транскрипцию во всех потенциальных хозяевах, круг которых для репликона pLF1311 весьма широк [3].

В плазмиде pLF1311 гены *repA* и *repB* разделены спейсером 76 п.н., который содержит сайты для эндонуклеаз рестрикции *HindIII* и *HaeII*. Конструирование экспрессионного вектора включало несколько этапов, которые привели к получению плазмиды pLF22, в которой соответствующий спейсер замещен (после затупления липкого конца *HindIII*) на участок *BsrBI*–*HaeII* плазмиды pUKTZ, несущий беспромоторный *lacZα*, ориентированный в том же направлении, что и гены репликативного оперона. Поскольку сайт *BsrBI* находится внутри оператора *lac* оперона, клонированный фрагмент *lacZα* не подвержен действию *lac*-репрессора. Экспрессия *lacZα* обеспечивает комплементацию в штамме *E. coli* TG1 (pLF22), колонии которого окрашены в синий цвет на чашках с хлорамфениколом и Xgal независимо от присутствия в среде индуктора *lac* оперона ИПТГ.

2. Экспрессия клонированного в pLF22 гена в кишечных палочках

Окрашивание колоний кишечных палочек TG1(pLF22) на чашках с Xgal свидетельствует о присутствии транскрипции *repA* + *lacZα* + *repB* мРНК с промотора репликативных генов плазмиды и синтезе α-пептида. Для оценки эффективности репликативного промотора для экспрессии последовательностей в кишечных палочках мы клонировали беспромоторную последовательность β-галактозидазы, которая была извлечена из плазмиды pJEL24 в виде полноразмерной рамки *lacZ* без стартового кодона и лигирована с ДНК вектора pLF22, гидролизованной по сайтам *VamHI* и *Acc16I*. Полученная плаزمида pLF23 кодирует слитный белок β-галактозидазы (рис. 1а) и обеспечивает высокий уровень его экспрессии в

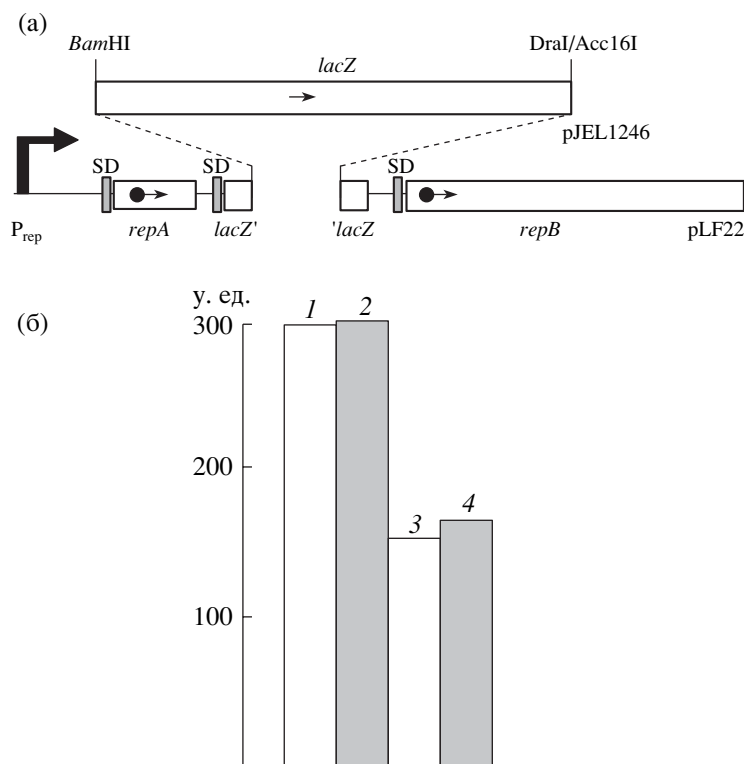


Рис. 1. Структура слитного гена *lacZ* и его экспрессия, обусловленная плазмидой pLF23: а – структура клонированного в pLF23 гена *lacZ*; б – активность β-галактозидазы по результатам ферментации в пробирках в зависимости от времени ферментации и присутствия индуктора *lac* оперона ИПТГ; условные единицы активности (у. ед.) вычислены по [10]: 1, 3 – рост в отсутствие ИПТГ, 2, 4 – в присутствии ИПТГ; 1, 2 – начало экспоненциального роста; 3, 4 – середина экспоненциального роста.

Lac⁻ штаммах, который был идентифицирован по активности фермента в отношении ОНФГ как субстрата и который не зависел от присутствия в среде индуктора *lac* оперона (рис. 1б). Отмеченная максимальная активность β-галактозидазы составляла примерно треть от наблюдаемой в *Lac*⁺ штаммах в условиях полной активации *lac* промотора [10]. Наиболее активно экспрессия происходила на стадии экспоненциального роста культуры, когда можно ожидать наибольшей активности работы репликативных генов плазмиды. В стационарной стадии, когда активной репликации плазмиды не происходит, наблюдалось падение активности β-галактозидазы (рис. 1б).

3. Экспрессия в молочнокислых реципиентах

Экспрессию клонированных последовательностей в грамположительных реципиентах проверяли на другой тест-системе. Для этого исследовали воздействие на лабораторных животных штаммов, несущих клонированную последовательность эукариотического гена соматолиберина. Соматолиберин (рилизинг фактор гормона роста) – это биологически активный пептид, состоящий из 44 аминокислотных остатков, который

синтезируется в гипоталамусе позвоночных животных и воздействует на клетки гипофиза, побуждая их к синтезу гормона роста (соматотропина), индуцируя таким образом соматотропный каскад [13].

Для экспрессии соматолиберина в клетках бактерий последовательность синтетического гена, полученную из плазмиды pGRF1 [9], внедряли в экспрессионный вектор. 3'-конец амплификационного праймера М1 был комплементарен матрице – структурной части гена соматолиберина в pGRF1, а 5'-конец праймера содержал SD последовательность, АТ-богатый спейсер и инициаторный кодон для трансляции мРНК в клетках бактерий. Продукт амплификации предварительно клонировали в кишечных палочках на векторе pVuescriptKS⁺, а затем фрагмент с нужной ориентацией рамки соматолиберина клонировали в векторе pLF. Результирующая плаزمида pLF-SL была введена в ряд пробиотических штаммов, после чего действие рекомбинантных штаммов на лабораторных животных сравнивали с действием исходных реципиентных штаммов. Реакция животных на введение экзогенного соматотропина или соматолиберина хорошо известна [14–16]. Эффект от перорального введения рекомбинант-

Влияние рекомбиантных штаммов, содержащих ген соматолиберина под промотором репликативных генов вектора, на показатели лабораторных животных

Показатель	Штамм, добавляемый к ОР			
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> K3 (pLF-SL)/реципиент ^а	<i>Lactobacillus</i> sp. 8PA3 (pLF-SL)/реципиент ^а	<i>Enterococcus faecium</i> M74 (pLF-SL)/реципиент ^б	<i>Enterococcus faecalis</i> OG1 (pLF-SL)/реципиент ^б
Живая масс крольчат в конце опыта (средняя), г	$\frac{2470 \pm 34}{2330 \pm 19}$	$\frac{2720 \pm 48}{2690 \pm 56}$	$\frac{3880 \pm 64}{3686 \pm 30}$	$\frac{3133 \pm 98}{3140 \pm 114}$
Валовый прирост относительно группы, получавшей ОР, %	$\frac{111^*}{101}$	$\frac{120}{119}$	$\frac{119}{114}$	$\frac{104}{105}$
Содержание жира в полутушке, %	$\frac{5.7^*}{7.7}$	$\frac{4.8^{*B}}{8.5^B}$	$\frac{2.4^*}{3.2}$	$\frac{5.8}{7.3}$
Диаметр адипоцитов подкожной жировой ткани, мкм	$\frac{70 \pm 4^*}{102 \pm 3}$	$\frac{71 \pm 4^*}{112 \pm 4}$	н/о	н/о
Митотический коэффициент клеток аденогипофиза	$\frac{3.2 \pm 0.3^{*B}}{0.8 \pm 0.1^B}$	$\frac{3.1 \pm 0.1^{*B}}{0.8 \pm 0.1^B}$	н/о	н/о

Примечание. н/о – не определяли.

* Различия достоверны (вероятность случайности различия $P < 0.05$).

^а Продолжительность опыта 3 мес.

^б Продолжительность опыта 4 мес.

^B После 2 мес. опыта.

ных штаммов можно было ожидать в связи со способностью пептидов преодолевать кишечный барьер молодняка животных в неизменном виде, как было неоднократно показано экспериментами на животных и изолированных тканях [17, 18]. Соответствующая реакция была получена при применении трех рекомбиантных культур из четырех проверенных в эксперименте (таблица). Различия опытных групп по сравнению с контрольными состояли в большей скорости роста животных опытных групп, больших их линейных размерах, в снижении содержания жира в тканях, снижении диаметра адипоцитов в подкожной жировой ткани, повышенных показателях митотической активности в некоторых тканях. Указанные отличия были статистически достоверными (таблица).

Мишенью действия гипоталамического гормона соматолиберина в организме являются клетки аденогипофиза. В соответствии с этим были проведены гистологические исследования гипоталамуса и гипофиза кроликов опытных и контрольных групп. В нейронах супраоптического ядра гипоталамуса кроликов, получавших рекомбиантные штаммы, обнаружено усиление функциональной активности: преобладали крупные “светлые” нейроны с пузырьковидным ядром и незначительное количество меклозернистых гранул, расположенных узкой полоской вокруг ядра (рис. 2а); площадь ядер на гистологических срезах превосходила на-

блюдаемую у контрольных животных. В гипофизе опытных групп было примерно на 5% больше соматотропоцитов, чем у контрольных животных. Пролиферативная активность клеток аденогипофиза, как известно, стимулируется пептидами супраоптического ядра [19, 20]. Учитывая, что аденогипофиз в норме характеризуется низким темпом пролиферации, в которой участвуют не все клетки, отмеченную разницу в митотическом коэффициенте следует считать существенной. Она статистически достоверна. Активизация клеток аденогипофиза проявлялась также в гипертрофии ядер и особенно ядрышек, которые приобретали разрыхленный вид за счет увеличения нитчатого компонента (рис. 2б). Синтез и секреция секреторных гранул в соматотропоцитах были несколько выше, чем в контроле (рис. 2в). Полученные данные свидетельствуют об усилении пролиферативной и секреторной активности аденогипофиза у кроликов, получавших рекомбиантные штаммы лактобацилл с экспрессирующим геном соматолиберина.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о реакции подопытных животных, идентичной таковой на экзогенно введенный в виде инъекций или имплантаций соматолиберин или соматотропин, что свидетельствует об экспрессии соматолиберина с промотора репликативных генов вектора в количествах, достаточных для индукции физиологического эффекта у лабора-

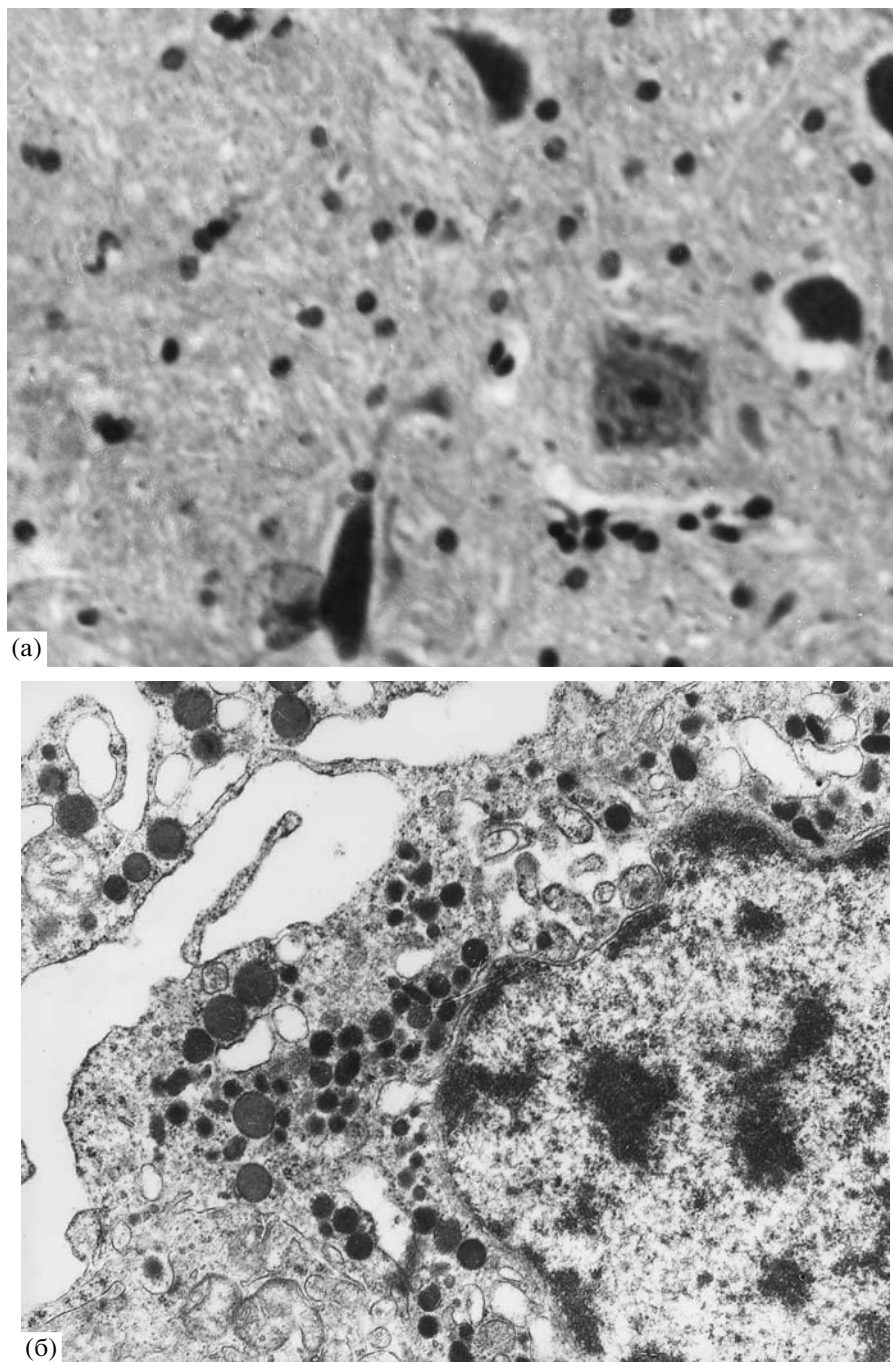


Рис. 2. Гипоталамус и ультраструктура аденогипофиза кролика из опытной группы, модифицированные экзогенным соматолиберином: а – гипоталамус (×400); крупные “светлые” нейроны содержат большое пузыревидное ядро и незначительное количество зернистых гранул. Окраска по Гомори. б – ультраструктура аденогипофиза (×20000); гипертрофия ядрышек, которые имеют разрыхленный вид за счет увеличения нитчатого компонента. в – ультраструктура аденогипофиза (×10000); активация синтеза и секреции в соматотропocyтaх.

торных животных. Менее выраженное проявление указанных эффектов в случае рекомбинантного штамма *Enterococcus faecalis* OG1 (pLF-SL) может быть связано с меньшей сегрегационной стабильностью плазмид семейства pLF в этом штамме (данные не представлены) или какими-то

другими особенностями этого штамма (меньшей эффективностью промотора pLF-SL или синтетической последовательности SD в клетках *E. faecalis* OG1, более активным внутриклеточным протеолизом чужеродного пептида, слабой адгезией клеток к кишечному эпителию или др.), исследо-

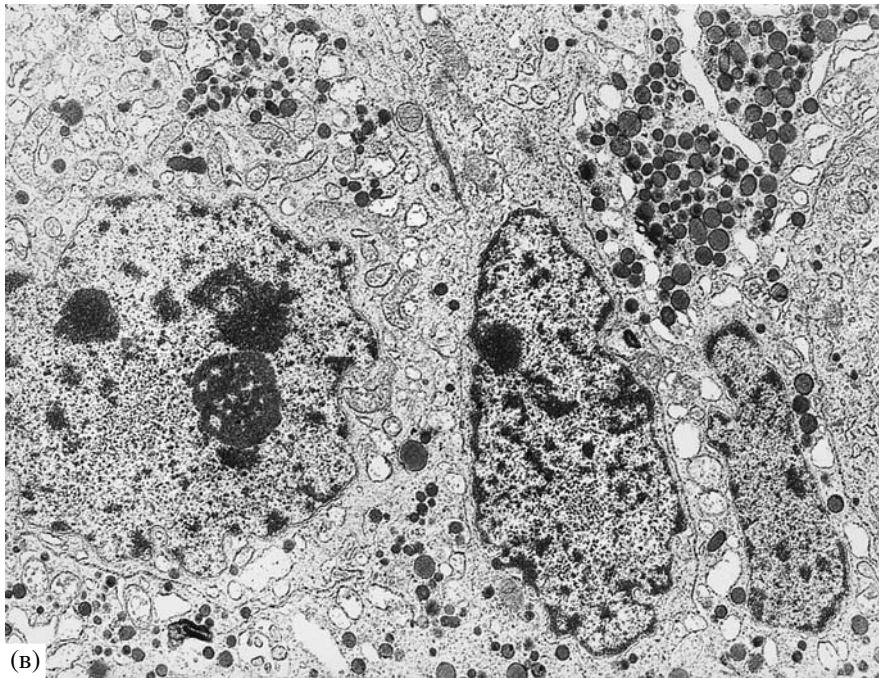


Рис. 2. Окончание.

вание которых не входило в задачу настоящей работы. В определенном смысле, отсутствие выраженной экспрессии соматолиберина в одном из штаммов можно рассматривать как результативность предлагаемой векторной системы, позволяющей проводить быстрый предварительный скрининг штаммов – потенциальных реципиентов, без трудоемких и длительных исследований условий экспрессии и ее оптимизации в каждом из них.

Таким образом, гетерологичная экспрессии с промотора репликативных генов вектора обнаружена в грамположительных и грамотрицательных бактериях, получена для прокариотического и эукариотического (синтетического) целевого гена и использована, в случае гена соматолиберина, для подбора оптимального реципиентного штамма.

Авторы благодарны В.А. Лившицу, предоставившему реципиентные штаммы и оказывавшему всестороннюю помощь на начальных этапах работы, С.Г. Карпушиной за проведение опытов по введению рекомбинантных плазмид в клетки грамположительных реципиентов и анонимному рецензенту за конструктивную критику начального варианта рукописи. Исследования получили финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Калужской области, гранты № 01-04-96027 и 02-04-96024, а также гранта Министерства промышленности, науки и технологий НШ–1712.2003.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pouwels P.H., Leer R.J., Boersma W.J.A.* The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens // *J. Biotechnol.* 1996. V. 44. P. 183–192.
2. *Djordjevic G.M., Klaenhammer T.R.* Positive selection, cloning vectors for gram-positive bacteria based on a restriction endonuclease cassette // *Plasmid.* 1996. V. 35. P. 37–45.
3. *Алëшин В.В., Семёнова Е.В., Тараканов Б.В., Лившиц В.А.* Семейство челночных векторов для молочнокислых и других грамположительных бактерий, основанных на репликоне плазмиды pLF1311 // *Микробиология.* 2000. Т. 69. С. 75–80.
4. *McCracken A., Turner M.S., Giffard P., Hafner L.M., Timms P.* Analysis of promoter sequences from *Lactobacillus* and *Lactococcus* and their activity in several *Lactobacillus* species // *Arch. Microbiol.* 2000. V. 173. P. 383–389.
5. *Luoma S., Peltoniemi K., Joutsjoki V., Rantanen T., Tamminen M., Heikkinen I., Palva A.* Expression of six peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 1232–1238.
6. *Pavlova S.I., Kilic A.O., Topisirovic L., Miladinov N., Hatzos C., Tao L.* Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus fermentum* KC5b and its use for constructing a stable *Lactobacillus* cloning vector // *Plasmid.* 2002. V. 47. P. 182–192.
7. *Алëшин В.В., Дорошенко В.Г., Тараканов Б.В.* 3'-конец гена *repB* лактобациллярной плазмиды pLF1311 удлинился вследствие утраты стоп-кодона гена-предшественника // *Мол. биология.* 1998. Т. 32. С. 416–419.

8. Яковлева А.А., Алёшин В.В., Тараканов Б.В. Структурная нестабильность некоторых искусственных плазмид и гетерологичная экспрессия с их промотора // Докл. Российской академии сельскохозяйственных наук. 2001. № 2. С. 33–36.
9. Brenig B., Brem G. Comparative-analysis of transgenic expression in mice // *Chimica OGGI – Chemistry Today*. 1993. V. 11 (1–2). P. 33–42.
10. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
11. Манухина А.И., Тараканов Б.В., Николочева Т.А., Брускова О.Б. Влияние некоторых пробиотиков на структурную организацию органов иммунной системы кроликов // Тр. ВНИИФБиП. 2001. Т. 40. С. 104–111.
12. Espinosa M., del Solar G., Rojo F., Alonso J.C. Plasmid rolling circle replication and its control // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 130. P. 111–120.
13. Sassolas G. Growth hormone-releasing hormone: past and present // *Horm. Res.* 2000. V. 53. Suppl. 3. P. 88–92.
14. Sainz R.D., Hosking B.J., Hart F.J., Schricker B.R. Exogenous growth hormone releasing factors and cottonseed meal improve growth performance and composition of gain in lambs fed lucerne chaff *ad libitum* // *Austral. J. Agric. Res.* 1994. V. 45. P. 1111–1123.
15. Рябых В.П., Кальницкий Б.Д., Эрнст Л.К. К вопросу об использовании генов соматотропного каскада для получения трансгенных свиней с заданным потенциалом продуктивности и качеством продукции // *Генно-инженерные с.-х. животные*. 1995. Вып. 1. С. 289–325.
16. Draghia-Akli R., Ellis K.M., Hill L.A., Malone P.B., Fiorotto M.L. High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs // *FASEB J.* 2003. V. 17. P. 526–528.
17. Ziv E., Bendayan M. Intestinal absorption of peptides through the enterocytes // *Microsc. Res. Tech.* 2000. V. 49. № 4. P. 346–352.
18. Philipps A.F., Kling P.J., Grille J.G., Dvorak B. Intestinal transport of insulin-like growth factor-I (igf-I) in the suckling rat // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002. V. 35. № 4. P. 539–544.
19. Schally A.V., Arimura A., Bowers C.Y., Kastin A.J., Sawano S., Reeding T.W. Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function // *Rec. Prog. Horm. Res.* 1968. V. 24. P. 497–588.
20. Garcia-Fernandez M.O., Schally A.V., Varga J.L., Groot K., Busto R. The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and its receptor splice variants in human breast cancer lines; the evaluation of signaling mechanisms in the stimulation of cell proliferation // *Breast Cancer Res. Treat.* 2003. V. 77. P. 15–26.

Expression Vector pLF22 for Lactic Acid Bacteria

B. V. Tarakanov*¹, A. A. Yakovleva, T. A. Nikolicheva*,
N. M. Komkova*, A. I. Manukhina*, and V. V. Aleshin*^{***}**

*All-Russia State Institute of the Physiology, Biochemistry, and Feed of Livestock,
Borovsk, Kaluga oblast, 249013 Russia

**Belozerskii Institute of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

¹ Corresponding author. E-mail: bifip@kaluga.ru

Abstract—The construction of the expression vector pLF22 for lactic acid bacteria is described. The vector contains a replicon of the cryptic plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* and a multiple cloning site of the *lacZ'* gene integrated with the plasmid *rep* operon. Such a construction of the vector provides for the constitutive transcription of the cloned sequences lacking the terminators of transcription in all the strains that maintain the replication of the vector. The vector is suitable for a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria, including probiotic strains. The efficiency of the vector was verified by expressing the β -galactosidase gene in a laboratory *Escherichia coli* strain and the synthetic gene of somatotropin releasing factor (SRF) in the probiotic strains of lactobacilli and enterococci. A recombinant strain with the SRF gene included in the diet of laboratory animals exerted an effect on their physiological and anthropometric parameters and on the histological characteristics of animal tissues.

Key words: plasmid DNA, gram-positive bacteria, probiotics, somatoliberin.