Генноинженерная биотехнология

УДК 575.24.577.352.42

ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЕЛАТИРУЮЩИХ АГЕНТОВ. О РОЛИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В ИНДУКЦИИ КОМПЕТЕНТНОСТИ У ДРОЖЖЕЙ

Ю. И. Горлов, В. С. Кириллова, Л. Г. Жарова, Л. И. Лихачева, В. А. Кордюм

Введение. Широкое использование дрожжей в качестве объекта для генноинженерных исследований стало возможным благодаря разработке методов трансформации этих организмов плазмидной ДНК. С 1978 г. для трансформации дрожжей широко применяют метод с использованием сферопластов [1], обладающий рядом существенных недостатков, главным из которых является его большая трудоемкость. В 1983 г. разработан простой и удобный способ трансформации целых клеток дрожжей, включающий обработку их солями щелочных металлов [2]. В настоящее время данный метод внедряется в исследовательскую практику, однако известно, что он не во всех случаях обеспечивает удовлетворительные результаты [2]. Отсюда следует, что разработка новых эффективных приемов индукции компетентности к трансформации у дрожжей, исключающих получение сферопластов, остается актуальной.

Систему трансформации микроорганизмов с помощью ДНК применяют не только в практике генноинженерных исследований в качестве метода, но также используют как модель для изучения механизма проникновения экзогенной ДНК в клетку. Согласно общепринятой гипотезе Гринюса [3], объясняющей механизм транспорта ДНК через плазматическую мембрану бактерий, для протекания данного процесса необходимы наличие на мембране электрохимического потенциала, обусловленного энергозависимой генерацией градиента H^+, и структурные перестройки в ее липидном бислое. Установление природы физико-химических процессов, определяющих такие структурные изменения мембран, в результате которых клетки микроорганизмов становятся компетентными для проникновения ДНК при трансформации, представляет значительный интерес.

В результате многочисленных исследований на животных объектах установлено, что одним из механизмов модификации структурно-функционального состояния мембран являются процессы перекисного окисления липидов [4—7]. Роль перекисного окисления липидов в этом аспекте у микроорганизмов совершенно не изучена. В нашей лаборатории был разработан экспериментальный подход с использованием хелаторов металлов переменной валентности, который позволяет интенсифицировать окислительные процессы в липидах дрожжей *in vivo*. При этом исходили из следующих соображений. Известно, что ионы переходных металлов (Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}) способны выполнять роль катализаторов перекисного окисления липидов [5]. Кроме того, показано, что некоторые липофильные хелаторы (8-оксихинолин, 1,10-фенантролин) в значительной степени усиливают каталитические свой-

ства ионов железа и меди в системе окисления линоленовой кислоты [8]. В связи с этим мы применили данные агенты для интенсификации окислительных реакций липидов в целых клетках дрожжей.

Так как проникновение ДНК в клетку, как отмечалось, зависит от перестроек в липидной фазе мембран, нам представлялось интересным выяснить следующее: приводит ли интенсификация перекисного окисления липидов у дрожжей хелаторами к структурным изменениям мембран (в частности плазматической мембраны); влияет ли обработка дрожжей хелаторами на способность дрожжей к трансформации плазмидной ДНК и в какой мере это связано с интенсификацией перекисного окисления липидов. Исследованию поставленных вопросов посвящена данная работа.

Материалы и методы. В работе использовали следующие штаммы дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae LL-20 (leu 2-3 leu 2-112 his 3-11 his 3-15)*, получен из Ин-та биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР; *Saccharomyces cerevisiae 746 (110sA a his 3 ura 3-52 leu 2-3 leu 2-112 trp 1-289)*, штамм предоставлен д-ром Д. Ботстейн, Кэмбридж. Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали на среде YNP, которая содержала 0,67 % дрожжевой азотной основы YNB («Difco», США), 0,1 % пептона («Difco», США) и 2 % глюкозы. Для выращивания *S. cerevisiae 746* использовали полную питательную среду YPD, содержащую 0,67 % YNB («Difco», США), 2 % пептона («Difco», США), 1 % дрожжевого экстракта («Difco», США), 2 % глюкозы. Выращивание дрожжей проводили при 30 °С с аэрацией перемешиванием до плотности $1—2 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл (логарифмическая фаза роста). Для трансформации использовали химерные плазмиды *RB4* [9] и *pYF92* [10], несущие соответственно хромосомальные дрожжевые гены *LEU* и *HIS*, которые комплементировали соответствующие мутации у вышеуказанных штаммов дрожжей. Для выявления трансформантов у дрожжей *S. cerevisiae LL-20* использовали селективную по лейцину или гистидину агаризованную среду, содержащую 0,67 % дрожжевой азотной основы без аминокислот (YNB w/oAAc, «Difco», США), 2 % глюкозы, 2 % агара (в случае использования плазмиды *RB4* в данную среду добавляли гистидин до конечной концентрации 20 мкг/мл, в случае плазмиды *pYF92* — лейцин в той же концентрации). При трансформации дрожжей *S. cerevisiae 746* плазмидой *RB4* использовали аналогичную дефицитную по лейцину среду, содержащую остальные необходимые для роста этого штамма компоненты (гистидин — 20 мкг/мл, триптофан — 20 мкг/мл, урацил — 25 мкг/мл).

Эффективность трансформации выражали числом выросших трансформантов в расчете на 10 мкг плазмидной ДНК. Перекисное окисление липидов определяли по накоплению первичных продуктов этой реакции — диеновых конъюгатов, как описано в работе [11].

Измерение флюоресценции исследуемых клеток дрожжей с 1-анилино-нафтален-8-сульфонатом (АНС) проводили следующим образом. Обработанные хелаторами клетки дрожжей ($1 \cdot 10^7$ клеток) отмывали водой, ресуспендировали в 10 мМ трис-HCl буферном растворе (pH 7,0), содержащем 20 мкМ АНС («Serva», ФРГ) и через 5 мин осуществляли запись спектра флюоресценции на спектрофлюориметре MPF-2M («Hitachi», Япония) при длине волны возбуждения 370 нм. Значение максимума флюоресценции АНС выражали в относительных единицах (I_F).

Результаты и обсуждение. Обработка исследуемых дрожжей такими хелаторами, как 8-оксихинолин и 1,10-фенантролин, приводит к значительной стимуляции перекисного окисления липидов у этих организмов, о чем судили по накоплению первичных продуктов этой реакции — диеновых конъюгатов. Влияние указанных хелаторов на содержание диеновых конъюгатов у дрожжей *S. cerevisiae LL*-20 (нМ/г сухого веса дрожжей) при различных условиях эксперимента представлено следующими данными:

Контроль	34
1,10-фенантролин, 250 мкг/мл	113
8-оксихинолин, 250 мкг/мл	74
8-оксихинолин, 250 мкг/мл+ионол, 1 мкг/мл	45
8-оксихинолин, 250 мкг/мл+ионол, 10 мкг/мл	244

Длительность инкубации дрожжей с отмеченными агентами 1 ч. Инги-

битор окисления липидов — антиоксидант ионол — в низких дозах (1 мкг/мл) предотвращает стимуляцию перекисного окисления 8-оксихинолином, тогда как в более высокой концентрации (10 мкг/мл) он, наоборот, усиливает действие хелатора.

Использование техники флюоресцентных зондов позволяет отметить изменения в дрожжевых мембранах после обработки хелаторами,

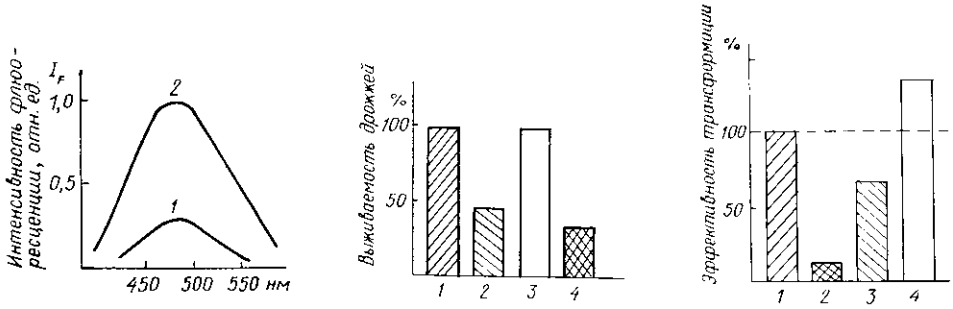

Рис. 1. Спектр флюоресценции АНС (20 мкМ) после окраски контрольных и обработанных 8-оксихинолином клеток дрожжей *S. cerevisiae LL-20* (возбуждение при 370 нм): *1* — контроль; *2* — 8-оксихинолин, 50 мкг/мл.

Fig. 1. Fluorescence spectrum ANS (20 μM) after staining of control and 8-hydroxyquinoline-treated yeast *S. cerevisiae LL-20* cells (excitation at 370 nm): *1* — control; *2* — 8-hydroxyquinoline (50 μg/ml).

Рис. 2. Влияние 8-оксихинолина и ионола на жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae LL-20* (за 100 % принята выживаемость контрольных клеток): *1* — контроль; *2* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл; *3* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл + ионол, 1 мкг/мл; *4* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл + ионол, 3 мкг/мл. Условия эксперимента те же, что при проведении трансформации, исключая инкубацию клеток с плазмидной ДНК. Клетки высевали на среду, содержащую необходимые для роста лейцин (20 мкг/мл) и гистидин (20 мкг/мл) — неселективная среда.

Fig. 2. Effect of 8-hydroxyquinoline and ionol on viability of yeast *S. cerevisiae LL-20* cells (100 % corresponds to viability of control cells): *1* — control; *2* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml); *3* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml) + ionol (1 μg/ml); *4* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml) + ionol (3 μg/ml).

Рис. 3. Влияние антиоксиданта (ионола) в момент обработки дрожжей *S. cerevisiae LL-20* 8-оксихинолином на выход трансформантов (трансформация плазмидой *RB4*). Эффективность трансформации в варианте без ионола принята за 100 %: *1* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл; *2* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл + ионол, 1 мкг/мл; *3* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл + ионол, 3 мкг/мл; *4* — 8-оксихинолин, 250 мкг/мл + ионол, 5 мкг/мл.

Fig. 3. Effect of antioxidant (ionol) on frequency of transformation of 8-hydroxyquinoline-treated yeast *S. cerevisiae LL-20* cells with plasmid *RB4* (100 % corresponds to transformation frequency in a variant without ionol). *1* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml); *2* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml) + ionol (1 μg/ml); *3* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml) + ionol (3 μg/ml); *4* — 8-hydroxyquinoline (250 μg/ml) + ionol (5 μg/ml).

которые проявляются в возникновении дополнительных сайтов связывания для отрицательно заряженного флюоресцентного зонда АНС (рис. 1).

Исходя из этих данных и предположения о возможной роли перекисного окисления липидов в возникновении компетентности у дрожжей, в дальнейших экспериментах было исследовано влияние хелатирующих агентов на способность дрожжевых клеток трансформироваться плазмидной ДНК. Клетки дрожжей *S. cerevisiae LL-20* и *S. cerevisiae 746*, в норме не способные к трансформации плазмидами, после обработки 8-оксихинолином и 1,10-фенантролином становятся компетентными для трансформации (табл. 1). Об эффективности трансформации дрожжей *S. cerevisiae LL-20* плазмидой *RB4* при использовании различных концентраций 8-оксихинолина (мкг/мл, обработка в течение 1 ч) судили по количеству трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК:

Концентрация 8-оксихинолина . .	0	50	250	500	750
Количество трансформантов . .	0	1490	2060	2030	890

Максимальный эффект данного хелатора проявляется в широком диапазоне концентраций от 50 до 500 мкг/мл. Зависимость трансформации

дрожжей *S. cerevisiae LL-20* плазмидой *RB4* от длительности инкубации с 8-оксихинолином (концентрация 250 мкг/мл) представлена на основании различий в количестве трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК:

Длительность обработки 8-оксихинолином, ч	0,5	1	2	3
Количество трансформантов	950	3220	1140	1160

Наибольший выход трансформантов наблюдали в случае инкубации клеток с комплексоном в течение 1 ч.

Для эффективной трансформации исследуемых дрожжей плазмидами необходима инкубация клеток с полиэтиленгликолем (ПЭГ, молекулярная масса 3000—4000) после обработки хелатирующими агентами и инкубации с плазмидной ДНК. Результаты изучения влияния полиэтиленгликоля и температурного прогрева на эффективность трансформации дрожжей *S. cerevisiae LL-20* (количество трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК) плазмидой *RB4* в различных условиях эксперимента приведены ниже:

Без ПЭГ, 42 °С, 5 мин	20
ПЭГ, без прогрева	1830
ПЭГ, 37 °С, 5 мин	1800
» 37 °С, 15 мин	2130
» 42 °С, 5 мин	2800
» 42 °С, 15 мин	3220
» 47 °С, 5 мин	350

Прогрев суспензии клеток после обработки ПЭГом при 42 °С приводит к заметному увеличению выхода трансформантов. Сведения, представленные выше, демонстрируют влияние различных условий на эффективность трансформации дрожжей в случае индукции компетентности 8-оксихинолином.

На основании результатов 26 независимых экспериментов предлагается следующая схема трансформации дрожжей плазмидной ДНК. Осадок дрожжевых клеток ($2 \cdot 10^7$) после отмывки дистиллированной водой суспендируют в 1 мл буферного раствора Т(10 мМ трис-HCl, pH 7,5) или в среде YNP без сахаров и добавляют 8-оксихинолин до конечной концентрации 100—250 мкг/мл. Суспензию инкубируют при 30 °С в течение 1 ч, затем центрифугируют (3000 g, 5 мин), осадок клеток ресуспендируют в 0,1 мл буфера Т. К полученной суспензии добавляют 8—10 мкг плазмидной ДНК и инкубируют при осторожном перемешивании в течение 30 мин при 30 °С. Затем к пробам прибавляют 1 мл 35—40 %-ного ПЭГ и продолжают инкубацию при тех же условиях в течение 1 ч. По окончании инкубации пробы переносят на 5 мин в водяную баню (42 °С), после чего клетки дважды отмывают дистиллированной водой, суспендируют в 1 мл дистиллированной воды и высевают по 0,2 мл в агаризованную селективную среду.

Таблица 1

Индукция компетентности к трансформации у дрожжей S. cerevisiae (штаммы LL-20 и 746) после обработки хелаторами (время обработки 1 ч)

Induction of Competence for Transformation in Yeast S. cerevisiae (Strains 746 and LL-20) after Treatment with Chelating Agents (Time of Treatment is 1 h)

Трансформируемые штаммы дрожжей и типы используемых плазмид	Хелатор, 250 мкг/мл	Выход трансформантов на 10 мкг плазмидной ДНК
Saccharomyces cerevisiae LL-20	8-оксихинолин	3220
Плазмида *RB4*	1,10-фенантролин	1340
Saccharomyces cerevisiae LL-20, плазмида *pYF92*	8-оксихинолин	685
Saccharomyces cerevisiae 746, плазмида *RB4*	8-оксихинолин	7310

Для сопоставления разработанного нами метода с описанными в литературе были проведены эксперименты по трансформации дрожжей *S. cerevisiae LL-20* плазмидой *RB4* с использованием методов сферопластов [1] и обработки клеток солями щелочных металлов [2]. Результаты этих опытов, суммированные в табл. 2, позволяют заключить, что предлагаемый метод обеспечивает трансформацию с эффективностью, не уступающей таковой при использовании других методов. Однако при трансформации той же плазмидой другого исследуемого штамма дрожжей *S. cerevisiae 746* оказалось, что метод с использованием

Таблица 2

Трансформация дрожжей S. cerevisiae LL-20 плазмидой RB4 с использованием различных способов индукции компетентности

Plasmid Transformation of Yeast Cells of S. cerevisiae LL-20 with the Use of Various Methods for Competence Induction

Способ трансформации	Распределение результатов по порядку величины выхода трансформантов на 10 мкг ДНК*		
	10^4	10^3	10^2
Сферопласты	21000 (2)	2772 (4)	—
Обработка LiCl	12247 (5)	5790 (6)	—
Обработка 8-оксихинолином	17760 (4)	4500 (11)	594 (4)

* — Приведены средние значения выхода трансформантов в опытах, количество которых указано в скобках.

хелаторов обеспечивает значительно более высокий выход трансформантов, чем метод обработки солями щелочных металлов (данные не приведены). Таким образом, наличие нескольких методов получения компетентных клеток дрожжей дает возможность исследователю в каждом конкретном случае подбирать адекватные условия трансформации этих организмов. Следует отметить, что компетентное состояние дрожжевых клеток достигается в результате использования относительно низких концентраций хелаторов —0,25—1,75 мМ, тогда как соли щелочных металлов, например LiCl, эффективны для этой цели в значительно более высокой концентрации —200—1000 мМ. Это позволяет говорить о более высокой специфичности действия хелаторов на процессы, определяющие формирование компетентности у дрожжей по сравнению с такими агентами, как соли щелочных металлов.

В связи с тем, что обработка хелаторами вызывает у дрожжей значительное повышение уровня перекисного окисления липидов и приводит к изменению структуры поверхности дрожжевых клеток, представлялось интересным установить степень взаимосвязи данных явлений с компетентным для трансформации состоянием дрожжевых организмов. С этой целью была предпринята попытка выяснить, как влияют антиоксиданты — ингибиторы перекисных реакций — на эффективность трансформации дрожжей и их жизнеспособность в условиях индукции компетентности хелатором. Использовали антиоксидант ионол, который в различной концентрации добавляли в суспензию дрожжей в момент инкубации их с 8-оксихинолином. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2, 3. Видно, что ионол в определенной концентрации способен предотвращать угнетающее действие хелаторов на жизнеспособность дрожжевых клеток, возвращая её к норме (рис. 2). Это согласуется с многочисленными данными, полученными на животных объектах и свидетельствующими о нормализующем действии различных антиоксидантов на протекание разнообразных патологических процессов, сопровождающихся интенсификацией перекисного окисления липидов [6, 7]. Как видно из данных, представленных на рис. 3, присутствие антиоксиданта в момент обработки дрожжей хелаторами приводит к значительному снижению частоты трансформации плазмидной ДНК. При

этом интересно отметить, что влияние ионола как на трансформацию, так и на жизнеспособность имеет четко выраженную концентрационную зависимость (рис. 2, 3). Данный антиоксидант эффективен только при низкой концентрации (1 мкг/мл). По мере увеличения дозы наблюдали обратный эффект, что проявлялось в возникновении у ионола способности усиливать токсическое действие хелатора на жизнеспособность дрожжей и не снижать, а наоборот, несколько увеличивать частоту трансформации. Эффект дозы для ионола и других антиоксидантов, вплоть до обращения действия, также неоднократно отмечен в литературе в отношении различных животных объектов [6, 7].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют в пользу сделанного предположения о том, что компетентность дрожжевых клеток к трансформации плазмидной ДНК в результате обработки хелаторами может прямо или опосредованно быть обусловлена процессами перекисного окисления липидов. По нашему мнению, интенсификация перекисных реакций хелатирующими агентами вызывает в плазматической мембране дрожжей (возможно, и в других мембранных структурах) такие конформационные изменения, которые делают возможным поглощение полимерной ДНК клетками. О наличии изменений поверхности дрожжевых клеток после воздействия хелаторов свидетельствуют данные, полученные при использовании флюоресцентной техники (рис. 1). Говоря о механизме индукции конформационных изменений в мембране путем интенсификации перекисного окисления липидов, следует отметить, что в литературе давно обсуждается вопрос о взаимосвязи этих процессов. Считается, что свободнорадикальное окисление, вызывающее появление полярных перекисных групп в полиеновых ацилах мембранных фосфолипидов, может приводить к существенным изменениям структуры мембраны вследствие «выталкивания» более гидрофильных ацилгидроперекисей из гидрофобного окружения в водную фазу [7]. Возможно, что образование подобных структурных дефектов в мембране и повышенная гидрофильность зоны дефектов может способствовать процессу адсорбции и поглощения экзогенной ДНК. Нельзя также исключить участие иных процессов в возникновении компетентности у дрожжей при стимуляции окислительных реакций в липидах хелаторами. Перекисное окисление липидов, химически модифицируя мембрану, приводит к изменению ее разнообразных свойств и физико-химических характеристик. В частности, имеются свидетельства, что изменение скорости окислительных реакций приводит к изменению липидного и фазового составов биомембран, липид-белковых взаимодействий, вязкости липидного компонента и условий для структурных переходов в мембранах; сдвигается температурный интервал жидкокристалличности мембранных липидов [4, 7]. Обнаружено, что изменение фазового состава липидов в результате действия продуктов перекисных реакций обусловливает модификацию ионной проницаемости мембран. В связи с этим обсуждается возможность участия линейных дефектов (искажения липидных слоев), возникающих в липидах биологических мембран при фазовых переходах в жидкокристаллическом состоянии или переходах гель — жидкий кристалл, в протекании различных транспортных процессов [12]. Имеются работы, в которых сделан вывод о важной роли фазовых переходов мембранных липидов, индуцируемых тепловым шоком в присутствии двухвалентных катионов в возникновении компетентности к поглощению ДНК у бактерий [13, 14].

В связи с вышеизложенным, представляется вероятной следующая схема взаимосвязанных процессов у дрожжей при индукции хелаторами компетентности в отношении поглощения ДНК: обработка хелаторами→интенсификация перекисного окисления липидов→химическая модификация мембран, изменение фазового состава липидного бислоя мембран (сдвиг температурного интервала жидкокристалличности мембран)→конформационные перестройки в мембранах (возникновение структурных дефектов, образование гидрофильных зон, нарушение липид-белковых взаимодействий)→компетентность к поглощению ДНК.

Таким образом, разработанный в данной работе способ индукции у дрожжей компетентности к трансформации плазмидной ДНК, основанный на применении липофильных хелаторов двухвалентных металлов, может служить моделью для изучения роли перекисного окисления липидов в структурной модификации мембран у дрожжевых организмов.

PLASMID DNA TRANSFORMATION OF YEAST CELLS TREATED WITH CHELATING AGENTS. THE ROLE OF LIPID PEROXIDATION IN INDUCING COMPETENCE IN YEAST

Yu. I. Gorlov, V. S. Kirillova, L. G. Zharova, L. I. Likhacheva, V. A. Kordyum

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

It is found that the pretreatment of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (strains *746* and *LL-20*) cells with the chelating agents of transition metals (8-hydroxyquinoline, 1,10-phenanthroline) causes the appearance of competence for plasmid DNA transformation. The factors affecting the efficiency of yeast cell transformation are studied using 8-hydroxyquinoline and double-replicon plasmid *RB4*. Transformant yield under application of such a method reached 4×10^3-2×10^4 transformations per 10 μg of plasmid DNA.

The chelating agents are shown to increase lipid peroxide formation in yeast. The addition of the lipid oxidation inhibitor (ionol, the synthetic antioxidant) during cell treatment with 8-hydroxyquinoline decreases the transformant yield. The data obtained indicate that the effect of chelators on the yeast competence for transformation may be due to their influence on the membrane lipid peroxidation.

1. *Beggs J. D.* Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid.— Nature, 1978, **275**, N 5679, p. 104-109.
2. *Transformation* of intact yeast cells treated with alkali cations / H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura.— J. Bacteriol., 1983, **153**, N 1, p. 163—168.
3. *Исследование* энергообеспечения передачи плазмиды *R100-1* при конъюгации клеток *Escherichia coli* / *Я. А. Бержинскене, Л. Ю. Зизайте, З. А. Баропайте, Л. Л. Гринюс.*— Биохимия, 1980, **45**, № 6, с. 1103—1113.
4. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М. : Наука, 1972.—252 с.
5. *Свободнорадикальное* окисление липидов в биологических мембранах / Ю. П. Козлов, В. С. Данилов, В. Е. Каган, М. В. Ситковский.— М. : Изд-во Моск. ун-та, 1972.—88 с.
6. *Бурлакова Е. Б., Алесенко А. В., Молочкина Е. М.* Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте.— М. : Наука, 1975.—214 с.
7. *Биохимия* липидов и их роль в обмене веществ / Под ред. С. Е. Северина.— М. : Наука, 1981.—168 с.
8. *Wills E. D.* Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids.— Biochim. et biophys. acta, 1965, **98**, N 2, p. 238-251.
9. *Sterile* host yeasts (shy): a neukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments / D. Botstein, S. C. Falco, S. E. Stewart et al.— Gene, 1979, **8**, N 1, p. 17-24.
10. *Chimeric* plasmids for cloning of deoxyribonucleic acids sequences in *Saccharomyces cerevisiae* / R. K. Storms, J. B. McNeil, P. S. Khandekar et al.— J. Bacteriol., 1979, **140**, N 1, p. 73-82.
11. *Стальная И. Д.* Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот.— В кн.: Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. М. : Медицина, 1977, с. 63—64.
12. *Минц Р. И., Кононенко Е. В.* Жидкие кристаллы в биологических системах.— М. : ВИНИТИ, 1982.—150 с. (Итоги науки и техники. Биофизика, т. 13).
13. *The influence* of phase transition of membrane lipids on uptake of plasmid DNA in *Escherichia coli* transformation / Van I. M. Die, van A. Österhout, H. E. N. Bergmans, W. P. M. Hoekstra.— FEMS Microbiol. Lett., 1983, **18**, N 1-2, p. 127-130.
14. *Van Die I. M., Bergmans H. E. N., Hoekstra W. P. M.* Studies on the role of the heat shock in induction of competence.— J. Gen. Microbiol., 1983, **129**, N 3, p. 663-670.

Ин-т молекулярной биологии и генетики
АН УССР, Киев

Получено 25.07.84