

Присвячується пам'яті професора
Г. М. Шавловського

Ідентифікація ARS-послідовності флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii*

А. Я. Вороновський, Ю. Р. Борецький

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Драгоманова, 14—16, Львів, 79005, Україна

Виявлено, що фрагмент хромосомної ДНК *Pichia guilliermondii*, котрий містить структурний ген GTP-циклогідролази II (*RIB1*), у складі рекомбінантних плазмід обумовлює високу частоту трансформації клітин цього виду дріжджів (10^4 — 10^5 трансформантів на 1 мкг ДНК). Показано, що висока частота трансформації і автономна реплікація плазмід у клітинах *P. guilliermondii* забезпечуються послідовністю (названою PgARS), розміщеною в 3'-області гена *RIB1*. Сконструйовано низку рекомбінантних плазмід, котрі є човниковими для бактерій *Escherichia coli* і *P. guilliermondii*.

Вступ. Флавіногенні дріжджі *P. guilliermondii* є цікавим об'єктом дослідження як з наукової, так і з практичної точки зору. Однією з причин, що зумовлюють інтерес до цього виду, є проблема дослідження регуляції біосинтезу рибофлавіну (вітаміну B₂). На сьогодні відомо, що до регуляції флавіногенезу залучені іони заліза, а також негативні (*Rib80p*, *Rib81p*) і позитивні (*Rib83p*, *Rib84p*) регуляторні фактори [1]. Ще однією причиною інтересу до *P. guilliermondii* є те, що цей вид неконвенційних дріжджів розглядається як потенційний суперпродуцент вітаміну B₂. Для подальшого успішного вивчення молекулярних механізмів регуляції біосинтезу рибофлавіну у *P. guilliermondii* і можливості конструювання промислових суперпродуцентів вітаміну B₂ необхідним є застосування методів роботи з рекомбінантною ДНК. Обов'язковою складовою таких методів є створення ефективної трансформаційної системи для клонування та експресії генетичного матеріалу. Система генетичної трансформації (або трансформаційна система вектор—господар) передбачає наявність «господаря» — реципієнтного штама мікроорганізму і «вектора» — засобу введення та експресії певного спадкового матеріалу. До складу плазмідного вектора, зокрема, входять маркерний ген, що дає

зможу проводити селекцію, і реплікатор (ARS — Autonomously Replicating Sequence), який забезпечує автономну реплікацію плазміди і високу частоту трансформації [2].

На сьогоднішній день ефективні трансформаційні системи описані для низки видів неконвенційних дріжджів, зокрема, для *Kluyveromyces lactis* [3], *K. fragilis* [4], *Pichia pastoris* [5, 6], *Hansenula polymorpha* [7], *Candida maltosa* [8], *C. albicans* [9], *Yamadazyma (Pichia) ohmeri* [10], *Pichia methanolica* [11].

Незважаючи на значний прогрес у впровадженні методології рекомбінантної ДНК стосовно багатьох видів неконвенційних дріжджів, для *P. guilliermondii* ефективної системи вектор—господар на сьогодні не розроблено. Для трансформації цього виду використовували лише вектори *Saccharomyces cerevisiae* [12].

Раніше нами було клоновано два структурних гени флавіногенезу дріжджів *P. guilliermondii* — *RIB1* (кодує GTP-циклогідролазу II) і *RIB7* (кодує рибофлавінсинтазу) [13, 14]. Ген *RIB1* було просеквеновано [15].

У цій статті описується виявлення та локалізація ARS-послідовності *P. guilliermondii* (названої PgARS), а також конструювання низки рекомбінантних плазмід, котрі є човниковими для бактерій *Escherichia coli* і дріжджів *P. guilliermondii*.

Матеріали і методи. *Штами, середовища, умови культивування.* Для трансформації як реципієнтні штами було використано рибофлавінзалежні мутанти *P. guilliermondii* *rib1-21* (з пошкодженою GTP-циклогідролазою II) та *rib7-162* (з блокованою рибофлавінсинтазою) [16]. Для селекції та ампліфікації плазмід, що несуть гени *RIB1* або *RIB7* *P. guilliermondii*, здійснювали трансформацію рибофлавінзалежних бактерійних штамів *E. coli* *ribA802-81* (з блокованою GTP-циклогідролазою II) і *ribB802-45* (з пошкодженою рибофлавінсинтазою) [17]. Для нарощування бактерійних та дріжджових клітин використовували стандартні середовища LB і YPD (1 %-й дріжджовий екстракт, 2 %-й бактопептон і 2 %-ва декстроза) відповідно [18]. Трансформовані штами *E. coli* підтримували на середовищі, що містило ампіцилін (100 мг/л). Рибофлавінзалежні штами бактерій і дріжджів вирощувалися на середовищі, котре містило рибофлавін (50 мг/л для бактерій та 200 мг/л для дріжджів). Клітини *P. guilliermondii* культивували при температурі 29 °С. Трансформовані штами дріжджів та бактерій підтримували на середовищі без рибофлавіну.

Трансформація, маніпуляції з ДНК, плазмідні конструкції. Клітини *E. coli* трансформували методом Когена (Cohen) [19]. Розщеплення ДНК ендонуклеазами, лігування, приготування плазмідних векторів, їхню ампліфікацію, електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі виконували за загальноприйнятими методиками [19]. Трансформацію *P. guilliermondii* здійснювали «літєвим» методом [20] або модифікованим методом генерації сферопластів, описаним для *P. pastoris* [5]. Під час трансформації сферопластів *P. guilliermondii* у всіх буферних розчинах (SED, SCE, CaS) та для відмивання клітин 1 М сорбіт було замінено на 1 М сахарозу. Суспензії протрансформованих сферопластів розводили 1 М сахарозою і висівали безпосередньо на поверхню агаризованого середовища YPD (2 % агар), що містило 1 М сахарозу. Колонії виростали протягом 4—7 діб.

Плазмідні конструкції, що використовувалися в даній роботі, зображені на рис. 1, а, б. Плазміда *p19R1* містить *SalI*-фрагмент хромосомної ДНК *P. guilliermondii* (розміром 2,1 тис. п. н.), що несе ген *RIB1* (кодує GTP-циклогідролазу II), клонований у відповідний сайт *pUC19* [21]. *p19R1Xh* містить *SalI-XhoI*-фрагмент ДНК *P. guilliermondii* (розміром 1,68 тис. п. н.), що несе ген *RIB1*. Плазміда *p19R7* має *HindIII-EcoRI*-фрагмент геному (розміром 1,4 тис. п. н.), що містить ген *RIB7* *P. guilliermondii* (кодує рибофлавінсинтазу), вбудований у *pUC19*. Плазміди *p19R7R1-1* і *p19R7R1-5*

є похідними *p19R7*. Вони містять хромосомний фрагмент *P. guilliermondii* (розміром 2,1 тис. п. н.) з геном *RIB1*, клонований в *EcoRI*-сайт *p19R7* у протилежних орієнтаціях (рис. 1, а). Плазміди *p19R7-34* і *p19R7-38* несуть *HincII*-фрагмент 5'-області гена *RIB1* *P. guilliermondii* (розміром 0,76 тис. п. н.), вбудований в *EcoRI*-сайт *p19R7* у протилежних орієнтаціях. Плазміди *p19R7-51* і *p19R7-55* містять *PstI*-фрагмент гена *RIB1* розміром 1,33 тис. п. н., теж вбудований в *EcoRI*-сайт *p19R7* у протилежних орієнтаціях (рис. 1, б). Плазміди *p19R7-3* і *p19R7-7* містять *HincII*-фрагмент 3'-області гена *RIB1* *P. guilliermondii* (розміром 0,82 тис. п. н.), клонований в *EcoRI*-сайт *p19R7* у протилежних орієнтаціях (рис. 1, б).

Плазмідну ДНК з трансформантів *P. guilliermondii* виділяли «десятихвилинним методом» [22]. Стабільність трансформантів *P. guilliermondii* аналізували так, як було описано раніше [5].

Результати і обговорення. Показано, що при трансформації «літєвим» методом мутанта *rib1* *P. guilliermondii* плазмідною *p19R1* (несе ген *RIB1*) частота трансформації майже в 150 разів перевищує таку мутанта *rib7* плазмідною *p19R7*, котра несе ген *RIB7* (табл. 1). При застосуванні сферопластування результати трансформації були такими: для мутанта *rib1* (плазміда *p19R1*) — $1,5 \cdot 10^4$ трансформантів на 1 мкг ДНК, для мутанта *rib7* (плазміда *p19R7*) — лише 50 на 1 мкг. Обидві плазміди базуються на бактерійному векторі *pUC19* [21].

Таблиця 1
Частота трансформації *P. guilliermondii* плазмідами, що містять гомологічні гени *RIB1*, *RIB7* або *RIB1* та *RIB7* одночасно

Штам	Плазміда	Частота трансформації, трансформантів на 1 мкг ДНК	
		Метод сферопластування	«Літєвий» метод
<i>rib1-21</i>	<i>p19R1</i>	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$
<i>rib1-21</i>	<i>p19R7R1-1</i>	$5 \cdot 10^4$	—
<i>rib1-21</i>	<i>p19R7</i>	0	0
<i>rib1-162</i>	<i>p19R7</i>	$5 \cdot 10^1$	1,2
<i>rib1-162</i>	<i>p19R7R1-1</i>	$4,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^2$
<i>rib1-162</i>	<i>p19R7R1-5</i>	$7,5 \cdot 10^4$	—
<i>rib1-162</i>	<i>p19R1</i>	0	0

«—» — Не визначали.

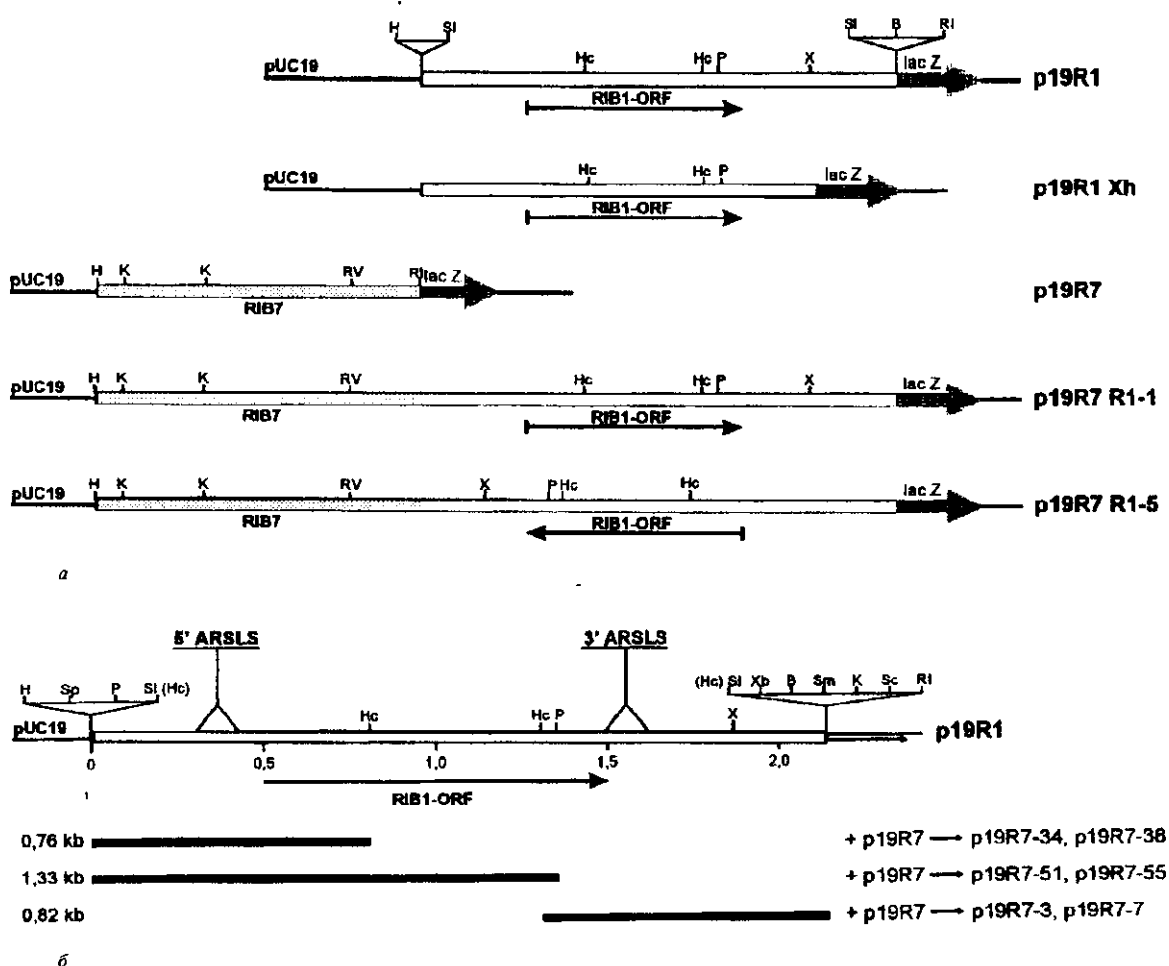


Рис. 1. Плазмідні конструкції, застосовані в даній роботі: *a* — плазміда *p19R1* несе генотипний фрагмент *P. guilliermondii* розміром 2,1 тис. п. н., що містить ген *RIB1*, плазміда *p19R1Xh* — фрагмент розміром 1,68 тис. п. н. з цим же геном, плазміда *p19R7* містить ген *RIB7* у складі генотипного фрагмента *P. guilliermondii* розміром 1,4 тис. п. н., плазміді *p19R7R1-1* і *p19R7R1-5* одержані в результаті субклонування *RIB1*-інсертів *p19R1* у сайт *EcoRI* плазміді *p19R7* у протилежних орієнтаціях; *b* — фрагменти гена *RIB1*, субклонувані у сайт *EcoRI* плазміді *p19R7* (тонкою лінією позначено послідовність бактерійного вектора (pUC19), товстими лініями зображені генотипні дріжджові фрагменти). Скорочення сайтів рестрикції: *H* — *HindIII*; *Sp* — *SphI*; *P* — *PstI*; *SI* — *Sall*; *Hc* — *HincI*; *X* — *XhoI*; *Xb* — *XbaI*; *B* — *BamHI*; *Sm* — *SmaI*; *K* — *KpnI*; *Sc* — *SacI*; *RI* — *EcoRI*; *RV* — *EcoRV*

Для дослідження вищеприписаного явища було сконструйовано низку плазмід (рис. 1, *a*, *б*). Результати трансформації з використанням як «літєвого» методу, так і сферопластування представлені у табл. 1. Плазміда *p19R1Xh*, що несе фрагмент ДНК розміром 1,68 тис. п. н. з геном *RIB1*, забезпечує частоту трансформації на тому ж рівні, що й *p19R1*. Введення фрагмента ДНК *P. guilliermondii* з геном *RIB1* у плазміду *p19R7* (плазміді *p19R7R1-1* і *p19R7R1-5*) призводить до підвищення

частоти трансформації мутанта *rib7* у 950—1500 разів (табл. 1). Одержані результати свідчать на користь того, що фрагмент ДНК *P. guilliermondii*, який несе ген *RIB1*, містить у собі ARS, оскільки відомо, що наявність такої послідовності на плазміді підвищує частоту трансформації дріжджів у 10^2 — 10^5 разів [2].

Аналіз нуклеотидної послідовності фрагмента хромосомної ДНК *P. guilliermondii*, що несе ген *RIB1*, виявив дві послідовності — 5'ARSLS і

3'ARSLs (ARS-Like Sequence, рис. 2), котрі фланкують структурну частину цього гена і мають риси, притаманні ARS. Дані послідовності характеризуються високим вмістом АТ пар — 71—73 % протягом 140—160 тис. п. н. Це значно вище від середнього вмісту АТ пар (55—65 %), описаного для хромосомної ДНК видів *Pichia* [23]. У межах 5'ARSLs і 3'ARSLs знайдено послідовності, гомологічні до ACS (ARS Consensus Sequence) *S. cerevisiae* [24]. Окрім цього, обидві виявлені «ARS-подібні» послідовності містять інвертовані повтори (див. рис. 2), що теж є характерним для ARS [5].

Для з'ясування того, чи насправді яка-небудь з двох «ARS-подібних» послідовностей функціонує як плазмідний реплікатор, було створено низку конструкцій, котрі містять 5'ARSLs або 3'ARSLs, вбудовані в *p19R7* (рис. 1, б). Результати трансформації мутанта *rib7 P. guilliermondii* показали, що значне підвищення частоти трансформації — більше, ніж у 1000 разів — забезпечується плазмідами *p19R7-3* і *p19R7-7*, котрі несуть 3'ARSLs. Плазмід ж, що містять 5'-«ARS-подібну» послідовність (*p19R7-34*, *p19R7-38*, *p19R7-51* і *p19R7-55*), трансформують вищезазначений мутант на рівні *p19R7* (табл. 2). Отже, саме послідовність 3'ARSLs (але не 5'ARSLs) забезпечує високу частоту трансформації дріжджів *P. guilliermondii*, що, як відомо, є ознакою ARS-елементів [2].

Було перевірено мітотичну стабільність дріжджових трансформантів. Для цього їх вирощували протягом приблизно 10 генерацій в неселективних умовах — у присутності рибофлавіну (200 мг/л). Виявилось, що трансформанти, одержані за допомогою плазмід, котрі містять 5'ARSLs, були стабільними. Вони зберігали Rib⁺-фенотип у неселективних умовах, що може свідчити про інтеграцію плазмід в хромосомну ДНК. На відміну від цього трансформанти, одержані за допомогою плазмід, котрі містять 3'-ARSLs, були нестабільними — від 70 до 90 % клітин втрачали Rib⁺-фенотип. Мітотична нестабільність фенотипічної ознаки, котра визначається маркерним геном, є свідченням автономного (екстрахромосомного) статусу плазмід [2—10]. Наявність 10—30 % стабільних трансформантів можна пояснити або інтеграцією плазмід в хромосомну ДНК (при наявності гомологічних послідовностей таке є цілком можливим) або ж мультимеризацією плазмід (останнє, як відомо, забезпечує стабільне успадкування фенотипової ознаки, детермінованої маркерним геном [7]).

Плазмід *p19R1*, *p19R7-3*, *p19R7-7*, *p19R7R1-1* і *p19R7R1-5* (рис. 1, а, б) було виділено з трансформантів *P. guilliermondii* у кількостях, достатніх для ретрансформації *E. coli*. З трансформантів *E.*

Таблиця 2

Трансформація *P. guilliermondii* плазмідами, що містять 5'- або 3'-«ARS-подібні» послідовності

Штам	Плазмід	ARSLs	Частота трансформації, трансформантів на 1 мкг ДНК (метод сферопланування)	Втрата Rib ⁺ -фенотипу після 10 генерацій на неселективному середовищі, %
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7</i>	Відсутній	$5,5 \cdot 10^1$	0
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-34</i>	5'-ARSLs	$4,4 \cdot 10^1$	0
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-38</i>	5'-ARSLs	$9,7 \cdot 10^1$	0
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-51</i>	5'-ARSLs	$8,8 \cdot 10^1$	0
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-55</i>	5'-ARSLs	$5,9 \cdot 10^1$	0
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-3</i>	3'-ARSLs	$7,5 \cdot 10^4$	88
<i>rib7-162</i>	<i>p19R7-7</i>	3'-ARSLs	$9,5 \cdot 10^4$	70

coli виділено плазмід, ідентичні до тих, якими трансформували відповідний дріжджовий мутант. Таким чином, вищеперелічені рекомбінантні плазмід автономно реплікуються в клітинах *P. guilliermondii*. Спроба виділити плазмід з трансформантів *P. guilliermondii rib7/p19R7*, *rib7/p19R7-34*, *rib7/p19R7-38*, *rib7/p19R7-51*, *rib7/p19R7-55* успіху не мала.

ARS-послідовності (ARS-елементи), як відомо, забезпечують автономний статус плазмід і високу частоту трансформації [2, 25]. Як правило, ARS-послідовності є видоспецифічними і не функціонують у клітинах інших видів дріжджів. Зокрема, ARS1 *S. cerevisiae* не проявляє активності у *Schizosaccharomyces pombe* [26], *K. lactis* [3], *K. fragilis* [4], *P. pastoris* [5, 6], *C. maltosa* [8]. Ori-послідовність 2 мкм плазмід *S. cerevisiae* неефективно функціонує в *K. lactis* [3] і *P. pastoris* [5, 6] і не функціонує в *K. fragilis* [4] і *C. maltosa* [8]. Водночас ARS-елементи різних видів можуть мати спільні особливості (підвищений вміст АТ пар, наявність інвертованих повторів) і гомологічні послідовності [5, 24].

Ідентифікована нами ARS-послідовність *P. guilliermondii* — PgARS — знаходиться в 3'-області гена *RIB1*. Вона має особливості, характерні для ARS-елементів інших видів дріжджів, а саме — підвищений вміст АТ пар (71 % протягом 160 п. н.), інвертовані повтори, дві послідовності, гомо-

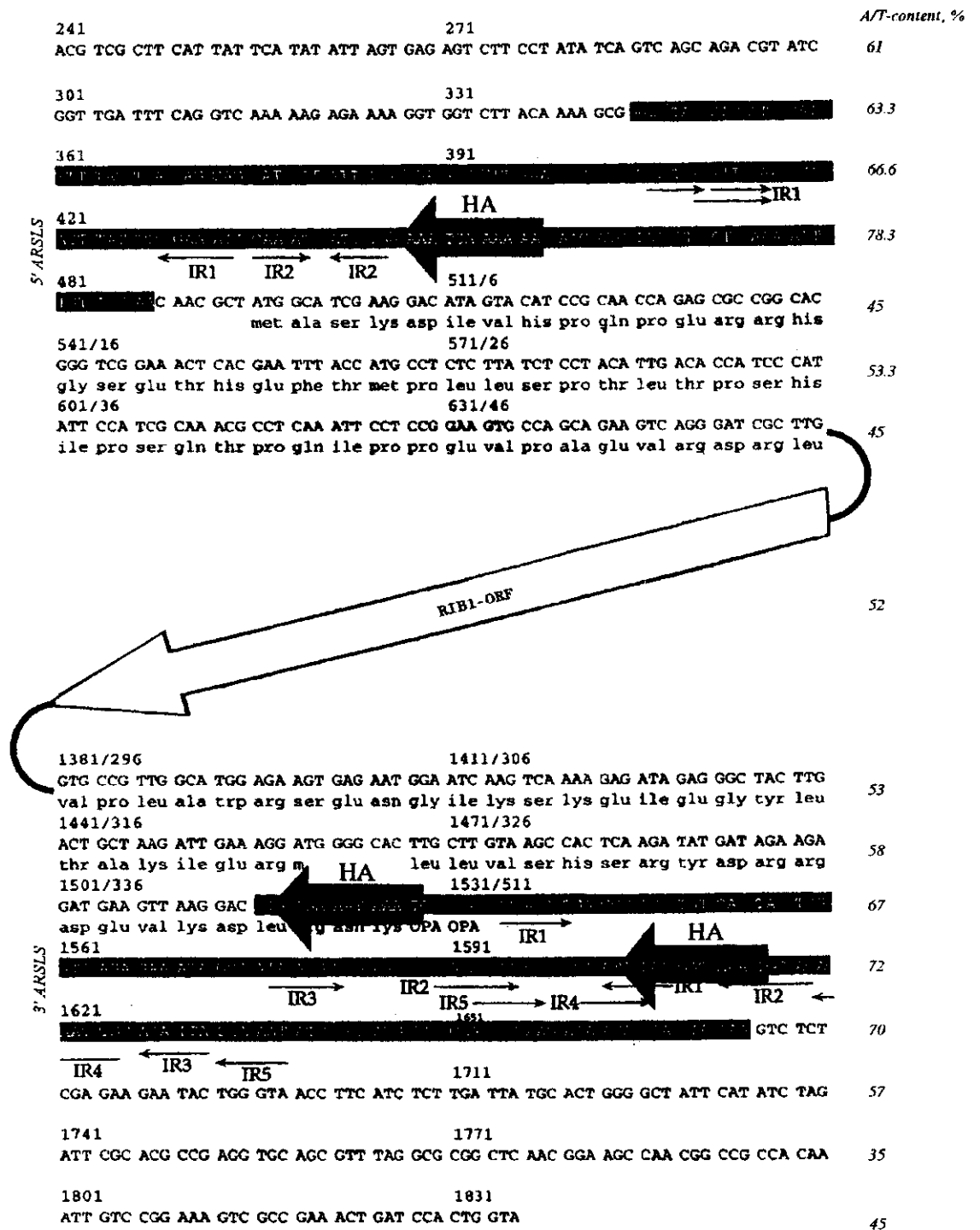


Рис. 2. Послідовність ДНК і амінокислотна послідовність 5'- та 3'-областей гена *RIB1* *P. guilliermondii*. (Повну нуклеотидну послідовність геномного фрагмента *P. guilliermondii*, що несе ген *RIB1*, див. у статті [15].) 5'- і 3'-«ARS-подібні» послідовності — 5'ARSLS та 3'ARSLS (ARSLS — ARS-Like Sequence) — виділено чорною рамкою. Послідовності, гомологчні до ACS (ARS Consensus Sequence) *S. cerevisiae* — HA (Homology to ACS) — зображено товстими темними стрілками. Інвертовані повтори (IR) показано тонкими стрілками з відповідними номерами

логічні до ACS *S. cerevisiae* [5, 23, 24]. Друга «ARS-подібна» послідовність, котра знаходиться в 5'-області гена *RIB1* (5'ARSL), не функціонує як плазмідний реплікатор у *P. guilliermondii*, хоча теж має характеристики, притаманні ARS-елементам. Можливо, 5'ARSL не містить якихось важливих (поки що неідентифікованих) послідовностей, котрі є обов'язковими для функціонування ARS у *P. guilliermondii*.

Наявність PgARS у складі рекомбінантних плазмід забезпечує автономну реплікацію і високу частоту трансформації *P. guilliermondii*. PgARS було використано для конструювання низки реплікативних плазмід, човникових для *E. coli* і *P. guilliermondii*. Таким чином, ми розробили систему генетичної трансформації (вектор—господар) для *P. guilliermondii*, котра базується на реципієнтних штаммах *rib1* або *rib7* і плазмідних векторах, що містять гени *RIB1* або *RIB7* як селективні маркери. Така система є важливою умовою застосування методології рекомбінантної ДНК для флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii*.

А. Я. Вороновський, Ю. Р. Борецький

Идентификация ARS-последовательности флавиногенных дрожжей *Pichia guilliermondii*

Резюме

Обнаружено, что фрагмент хромосомной ДНК *Pichia guilliermondii*, несущий структурный ген ГТФ-циклогидролазы II (*RIB1*), в составе рекомбинантных плазмид обеспечивает высокую частоту трансформации клеток данного вида дрожжей (10^5 — 10^7 трансформантов на 1 мкг ДНК). Показано, что высокая частота трансформации и автономная репликация плазмид в клетках *P. guilliermondii* обеспечивается последовательностью (названной PgARS), расположенной в 3'-области гена *RIB1*. Сконструирован ряд челночных для *Escherichia coli* и *P. guilliermondii* рекомбинантных плазмид.

Andriy Voronovsky, Yuriy Boretsky

Identification of an autonomously replicating sequence of the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*

Summary

An autonomously replicating sequence adjacent to the *RIB1* gene encoding GTP cyclohydrolase II of the yeast *Pichia guilliermondii* was identified by transformation experiments. Detailed sequence analysis unveiled two potential ARS elements located 5' and 3' of the *RIB1* open reading frame. The chromosomal fragment containing the ARS-like sequence 3' to the *RIB1* structural gene, called PgARS, conferred autonomous replication to hybrid plasmids and high transformation frequencies (10^5 — 10^7 transformants/ μ g DNA) in *Pichia guilliermondii*. Based on the PgARS element a series of *E. coli*—*P. guilliermondii* shuttle vectors was developed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sibirny A. A. *Pichia guilliermondii* // Nonconventional yeast in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 255—275.

2. Cregg J. M., Madden K. R. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption // Biological research on industrial yeasts / Eds G. G. Stewart, I. Russel, R. D. Klein, R. R. Hiedsch.—Boca Raton: CRC press, 1987.—P. 1—18.
3. Wesolowski-Louvel M., Breunig K. D., Fukuhara H. *Kluyveromyces lactis* // Nonconventional yeast in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 139—201.
4. Das S., Kellerman E., Hollenberg C. P. Transformation of *Kluyveromyces fragilis* // J. Bacteriol.—1984.—158.—P. 1165—1167.
5. Cregg J. M., Barringer K. J., Hessler A. Y., Madden K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations // Mol. Cell. Biol.—1985.—5.—P. 3376—3385.
6. Sreerishna K., Kropp K. E. *Pichia pastoris* // Nonconventional yeasts in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 203—253.
7. Hansen H., Hollenberg C. P. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) // Nonconventional yeasts in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 293—311.
8. Mauersberger S., Ohkuma M., Schunck W.-H., Takagi M. *Candida maltosa* // Nonconventional yeasts in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 411—580.
9. Kurtz M. B., Cortelyou M. W., Miller S. M., Lai M., Kirsch D. R. Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans* // Mol. Cell. Biol.—1987.—7.—P. 209—217.
10. Piredda S., Gaillardin C. Development of a transformation system for the yeast *Yamadazyma* (*Pichia ohmeri*) // Yeast.—1994.—10.—P. 1601—1612.
11. Raymond C. K., Bukowski T., Holderman S. D., Ching A. F. T., Vanaja E., Stamm M. R. Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase // Yeast.—1998.—14.—P. 11—23.
12. Kunze G., Petzoldt C., Bode R., Samsonova I., Hecker M., Birnbaum D. Transformation of *Candida maltosa* and *Pichia guilliermondii* by plasmid containing *Saccharomyces cerevisiae* ARG4 DNA // Curr. Genet.—1985.—9.—P. 205—209.
13. Зокальський А. Е., Злочевський М. Л., Стасюк Ю. З., Логвиненко Е. М., Бебуров М. Ю., Шавловський Г. М. Клонирование гена *RIB1*, кодирующего фермент первого этапа флавиногенеза у дрожжей *Pichia guilliermondii* — ГТФ-циклогидролазу, в клетках *Escherichia coli* // Генетика.—1990.—26, № 4.—С. 614—620.
14. Логвиненко Е. М., Стасюк Ю. З., Злочевський М. Л., Вороновський А. Я., Бебуров М. Ю., Шавловський Г. М. Клонирование гена *RIB7*, кодирующего рибофлавинсинтазу дрожжей *Pichia guilliermondii* // Генетика.—1993.—29, № 6.—С. 922—927.
15. Liauta-Teglivets O., Hasslacher M., Boretsky Y., Kohlwein S. D., Shavlovsky G. M. Molecular cloning of the GTP cyclohydrolase structural gene *RIB1* of *Pichia guilliermondii* involved in riboflavin biosynthesis // Yeast.—1995.—11.—P. 945—952.
16. Шавловський Г. М., Сибирний А. А., Киановская Б. В., Колтун Л. В., Логвиненко Е. М. Генетическая классификация рибофлавінзависимых мутантов *Pichia guilliermondii* // Генетика.—1979.—15.—С. 1561—1568.
17. Тесляр Г. Е., Шавловський Г. М. Локалізація генів, кодирующих ГТФ-циклогидролазу II и рибофлавінсинтазу на хромосоме *Escherichia coli* K-12 // Цитология и генетика.—1983.—17.—С. 54—56.
18. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Current Protocols in

- Molecular Biology.—New York: Greene Publ. Assoc. at Wiley-Interscience, 1990.—Vol. 1, 2.
19. Маніатис Т., Фріч Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—479 с.
 20. Gleeson M. A., Ortori G. S., Sudbery P. E. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // J. Gen. Microbiol.—1986.—132.—P. 3459—3465.
 21. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene.—1985.—33.—P. 103—119.
 22. Hoffman C. S., Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* // Gene (Amst.).—1987.—57.—P. 267—272.
 23. Storck R., Alexopoulos C. J. Deoxyribonucleic acid of fungi // Bacteriol. Rev.—1970.—34.—P. 126—154.
 24. Rowley A., Dowell S. J., Diffley J. F. X. Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges // Biochim. et biophys. acta.—1994.—1217.—P. 239—256.
 25. Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W. High-frequency transformations of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 1035—1039.
 26. Beach D., Nurse P. High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // Nature.—1981.—290.—P. 140—142.

УДК 577.21:582.282.23
Надійшла до редакції 16.08.99