

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(1):126-131; 4 January 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

利用酿酒酵母转座子文库筛选 MTM1 基因缺失表型相关基因

王娟*, 张玟洁, 曾雅雪, 蔡颖, 孙驰程, 周兵

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要:【目的】MTM1 基因对于维持锰超氧化物歧化酶的活性和线粒体正常功能十分重要, MTM1 基因的缺失会严重影响锰超氧化物歧化酶活性, 并损伤线粒体功能, 使酵母在非发酵培养基上不能生长。为加深对 MTM1 基因功能及其相关基因的研究, 尝试利用转座子文库筛选 MTM1 基因缺失表型相关基因, 寻找哪些位置的转座子插入能挽救 MTM1 基因缺失导致的生长缺陷。【方法】因 MTM1 基因的缺失造成的损伤不可逆, 直接转入文库无法筛选得到 MTM1 基因缺失表型相关基因, 本研究利用外源 MTM1 基因菌株和 mTn-lacZ/LEU2 酿酒酵母转座子文库进行筛选, 寻找能挽救 *mtm1* 突变体生长缺陷的转座子插入位点。【结果】发现转座子插入 HSL1 和 TPS2 基因能挽救 *mtm1* 突变体的生长缺陷。【结论】我们的结果为深入了解 MTM1 基因的功能提供了线索。

关键词: 酵母; 转座子文库; MTM1

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0126-06

锰超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 2, SOD2) 是一种广泛存在于动物、植物和微生物中的金属酶, 定位于线粒体^[1]。线粒体是能量产生和氧代谢的重要细胞器, 是活性氧自由基产生的重要场所, 锰超氧化物歧化酶对于清除线粒体内活性氧自由基、维持线粒体正常功能起着重要作用^[2-3]。

MTM1 基因对于维持锰超氧化物歧化酶活性非常重要, MTM1 基因的缺失会严重影响锰超氧化物歧化酶活性, 并导致线粒体功能的损伤^[4], 但 MTM1 基因的具体功能尚不清晰。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为最简单的真核生物, 已完成全基因组测序^[5], 并建立了基因组文库、转座子文库等, 可进行遗传操作, 是一个研究真核生物基因功能理想的模式生物^[6-10]。本研究利用 MTM1 基因缺失的突变体 *mtm1*Δ 在非发酵型培养基上生长有缺陷的表型, 借助 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库, 寻找能挽救 MTM1 基因缺陷表型的转座子插入位点。

MTM1 基因缺失会导致线粒体功能严重受损, 在非发酵型培养基上, 酵母需要线粒体提供能量, MTM1 基因缺失的突变体 *mtm1*Δ 在非发酵型培养基上不能生长。且 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷是不可逆的, 即使在 *mtm1*Δ 中重新转入带有 MTM1 基因的质粒也不能挽救, 因此直接在 *mtm1*Δ 中转入文库无法筛选得到 MTM1 基因缺失表型相关基因。为了得到 MTM1 基因缺失表型相关基因, 我们制备了外源 MTM1 基因菌株 (菌株仍然带有 MTM1 基因, 但不是在染色体上, 而是在外源质粒上): 在野生型菌株中先转入过表达 MTM1 基因的 pADHYES2-MTM1 质粒, 然后将染色体上的 MTM1 基因敲除, 这个过程酵母细胞并没有缺少 MTM1 基因, 只是 MTM1 基因的位置不是存在于染色体而是存在于 pADHYES2-MTM1 质粒上。将 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库转入外源 MTM1 基因菌株, 利用药物 5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA) 可以

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871262)

作者简介: 王娟 (1982-), 女, 山东人, 博士研究生, 研究方向为遗传学。E-mail: juan_wang03@mails.thu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-09; 修回日期: 2009-11-05

迫使细胞丢掉 pADHYES2-MTM1 质粒^[11], 造成 MTM1 基因的缺失, 但在酵母菌缺失 MTM1 基因之前, mTn-lacZ/LEU2 转座子文库已经被引入酵母细胞中, 如果某些位点的转座子插入可以挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷, 则敲除 MTM1 基因后, 可以得到缺失 MTM1 基因但能在非发酵培养基上生长的酵母细胞。我们希望利用外源 MTM1 基因菌株和 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库筛选获得 MTM1 基因缺失表型相关基因以增进对 MTM1 基因功能的了解。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 本论文所用的酿酒酵母菌株见表 1。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 野生型菌株 BY4742。mtm1 Δ 突变体购自 Invitrogen 酵母敲除文库。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype
BY4742	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
mtm1 Δ	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 mtm1::kanMX
YES2MTM1	MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 mtm1::kanMX, pADHYES2-MTM1

1.1.2 培养基及培养条件: 酿酒酵母在 30 $^{\circ}$ C 培养, 各培养基配方如下: ① YPD 培养基: 1% 酵母浸粉, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖, 固体培养基添加 2% 琼脂粉。② YPG 培养基: 1% 酵母浸粉, 2% 蛋白胨, 2% 甘油, 固体培养基添加 2% 琼脂粉。③ SD 培养基: 0.67% 酵母氮基 (yeast nitrogen base)、0.5% 硫酸铵、2% 葡萄糖, 同时根据质粒的选择标记添加相应的氨基酸混合物造成选择压力, 用于筛选转化子及保持转入细胞中的质粒, 固体培养基添加 2% 琼脂粉。④ SG 培养基: 0.67% 酵母氮基 (yeast nitrogen base)、0.5% 硫酸铵、2% 甘油, 同时根据质粒的选择标记添加相应的氨基酸混合物造成选择压力, 用于筛选转化子及保持转入细胞中的质粒, 固体培养基添加 2% 琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器: 5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA)、醋酸锂 (Lithium acetate, LiAc)、Tris-HCl、EDTA、PEG4000、TriotnX-100、鲑鱼精 DNA、玻璃珠购自 Sigma, 限制性内切酶 BamHI 和 EocRI 购自宝生物, 其余试剂均为国产分析物。PCR 仪为美国应用生物系统公司产品 (ABI 9700), 酵母培养箱

为上海一恒隔水式恒温培养箱。

1.2 酿酒酵母转座子文库

酿酒酵母 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库为耶鲁大学 Mike Snyder 教授馈赠。文库以 mTn3 转座子对构建于载体上的酿酒酵母染色体文库进行随机插入而得, 构建方法如下: 构建完整的酵母基因组文库, 转入大肠杆菌, 在大肠杆菌中引入转座子, 并使其随机插入酵母基因组文库中, 将含有插入转座子的酵母基因组文库质粒抽提混合就得到酵母的转座子文库质粒。将转座子文库质粒上带有的酵母基因组片段 (其中插入带有筛选标记的转座子) 用限制性内切酶切下, 转化酵母受体菌株, 利用同源重组, 用插入转座子的酵母基因组片段取代染色体上的片段, 利用转座子上带有的筛选标记进行选择, 可以得到在不同位置插入转座子的酵母转座子插入文库。利用酵母转座子插入文库筛选与某种性状相关的插入突变体, 利用拯救质粒法 (plasmid rescue) 和小载体 PCR 法 (Vectorette PCR) 等方法可以鉴定转座子插入位点, 从而可以得知哪些位点的转座子插入可以引起所需的性状^[12]。

1.3 酿酒酵母转化

将过夜培养的菌 1:100 转接至 30 mL YPD 中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 5-6 h, 达到一定菌体浓度 (OD_{600} 约 1.0) 后, 离心收集菌体, 用无菌水洗涤, 重悬细胞于 TE/LiAc 溶液 (100 mmol/L LiAc, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L EDTA, pH 7.5), 混匀。分成 50 μ L 小份离心后, 依次加入 TE/LiAc/PEG4000 溶液 (40% PEG4000, 100 mmol/L LiAc, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L EDTA, pH 7.5)、50 μ L 单链鲑鱼精 DNA、待转化的质粒 DNA (或线性 DNA 片段) 混匀。30 $^{\circ}$ C 保温 30 min 后, 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 15 min。离心除去上清, 重悬细胞于 TE 溶液中, 涂布相应的选择平板, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 3 d。

1.4 转座子插入位置的鉴定

使用拯救质粒法 (plasmid rescue) 鉴定 mTn3 转座子插入位点。用 BamHI 酶切拯救质粒 pRSQ2-URA3 得到线性片段, 这一线形片段上含有筛选标记 URA3、氨苄青霉素抗性基因、质粒复制起始子, 两端为 LacZ 基因序列, 与转座子内的 LacZ 序列同源, 转入酵母后, 与插在基因组上的转座子内的 LacZ 序列发生同源重组, 插入转座子内部。抽提基因组 DNA, 用 EocRI 限制性内切酶处理, 转座子内部的 EocRI 位点被切断, 转座子周围的酵母基因组

DNA 上的 EocRI 位点也被切断,自连成环成一环形 DNA 分子,内含氨基青霉素抗性基因和质粒复制起始子(来自拯救质粒)、LacZ 基因序列(来自转座子和拯救质粒)以及转座子插入位点周围的酵母基因组 DNA 序列,将这种环形 DNA 分子转入大肠杆菌扩增,利用设计在拯救质粒上已知序列片段测定转座子插入位点周围的酵母基因组 DNA 序列,就可以

得知转座子插入的位置^[12-13]。拯救质粒测序引物 M13-47 序列见表 2。

根据拯救质粒的序列和设计原理,含有部分转座子、拯救质粒、酵母染色体的环形 DNA 分子在大肠杆菌中扩增所得到的质粒,经 *Bam*HI 与 *Eco*RI 双酶切后应得到 2.9 kb 左右的片段,这一现象可以用于验证筛选得到的菌株内是否含有 mTn3 转座标签^[12]。

表 2 研究中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Usage
MTM1-kanMX-F	CGAGTGTTGATAATACGATATG CGTACGCTGCAG GTCGACGGAT	MTM1 knockout
MTM1-kanMX-R	TCTATATTTACAAGCCTTTATTCAA TCGATGAATTC GAGCTCGTTTTTCG	MTM1 knockout
MTM1 up	TAAAGTATCCTAGGAAAGGAAAC GAGGTGTTGATAA TACGATATG	MTM1 knockout
MTM1 down	CTTCTTTTCGTTTACTATATATC TATATTTACAAGCCTT TATTCA	MTM1 knockout
MTM1-confirm-F	ACGCGCAACGTTATTTTTTCG	Confirmation of MTM1 knockout
MTM1-confirm-R	CGTGATTATTTTGCGCTCA	Confirmation of MTM1 knockout
M13-47	CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC	Characterization of transposon-insertion site

1.5 酵母基因组 DNA 的提取

取 3 mL 的酵母过夜培养物,离心收集菌体,用无菌水洗涤重悬,3000 × g 离心 5 min,加 50 μL 的裂解缓冲液(2% TritonX-100,1% SDS,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA)悬浮细胞,再加 50 μL 的玻璃珠和 200 μL 的酚/氯仿,振荡 3 min,加 200 μL TE 混匀,13000 × g 离心 5 min,将上清加 1 mL 无水乙醇沉淀,13000 × g 离心 10 min,去上清,沉淀加入 40 μL TE (含 30 μg/mL RNaseA),37℃ 温育 5 min,加 2 μL 5 mol/L 的醋酸铵、100 μL 无水乙醇混匀后,-20℃ 放置 30 min,13000 × g 离心 10 min,去上清干燥,用 20 μL 的 TE 溶解。

1.6 基因敲除

利用 PCR 得到两侧与目标基因两端侧翼序列同源、中间为报告基因的片段,转入酵母细胞,利用同源重组敲除目的基因,提取基因组 DNA,并通过不同的 PCR 产物片段的大小检测是否敲除成功^[14]。

1.7 梯度稀释法检测酵母的生长

接种酵母于培养基中,30℃ 培养至对数生长期,离心收集菌体,调节菌液浓度使菌悬液 *OD*₆₀₀ 约 1.0,进行 10 倍梯度稀释,依次取 5 μL 点滴于测试平板,30℃ 培养 3 天,观察菌落生长情况。

1.8 分子生物学操作

常规分子生物学操作根据各公司手册进行。PCR 引物(表 2)合成及 DNA 序列测定均由北京奥科生物工程公司完成。

2 结果

2.1 外源 MTM1 基因菌株的性质鉴定

外源 MTM1 基因菌株构建策略如下:在野生型酵母中转入含有过表达 MTM1 基因的 pADHYES2-MTM1 质粒,再利用 PCR 得到两侧与 MTM1 两端侧翼序列同源、中间为报告基因 KanMX 的片段,转入带有 pADHYES2-MTM1 质粒的酵母,通过同源重组,用 G418 抗性 KanMX 基因替换染色体上的 MTM1 基因,在含有 G418 的培养基上筛选转化子。

鉴定外源 MTM1 基因菌株的指标包括:

首先,提取基因组 DNA,用 MTM1 基因外围的引物做 PCR,利用 MTM1 和 KanMX 基因的不同大小判断是否替换成功。

其次,用 5-氟乳清酸(5-Fluoroorotic acid, 5-FOA)处理,迫使细胞丢掉 pADHYES2-MTM1 质粒,pADHYES2-MTM1 质粒上带有一个 URA3 基因,其产物与 5-FOA 同时存在时会对细胞产生毒性,因此在 5-FOA 存在时,细胞会丢失含有 URA3 基因的 pADHYES2-MTM1 质粒^[11],鉴定丢失质粒后的酵

母菌能否在非发酵培养基上生长。外源 MTM1 基因菌株如果丢失质粒上的 MTM1 基因,会导致细胞内没有 MTM1 基因的存在,在非发酵培养基上有生长缺陷。

如图 1 所示,5#候选菌株染色体上的 MTM1 已经被 KanMX 替换,可以用作外源 MTM1 基因菌株(染色体上的 MTM1 基因敲除,外源质粒上带有 MTM1 基因)。图 2 显示 5#候选菌株在非发酵培养基上生长正常,而经过 5-FOA 处理后在非发酵培养基上不能生长,提示 5#候选菌株带有的质粒上的 MTM1 基因可以有效行使功能,染色体上的 MTM1 基因的敲除并未造成不可逆损伤,而一旦丢失带有 MTM1 基因的质粒,则成为 MTM1 基因缺失菌株。

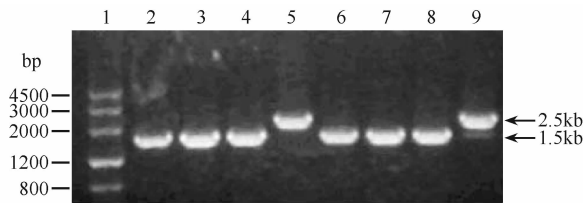


图 1 PCR 方法鉴定 MTM1 基因敲除

Fig. 1 Confirmation of MTM1 knockout by PCR. 1: marker; 2: genomic DNA from WT; 3-8: genomic DNA from candidate YES2MTM1 strains; 9: genomic DNA from *mtm1Δ*.

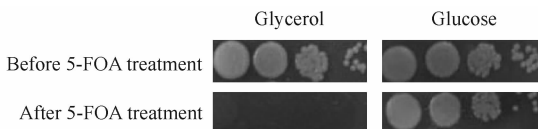


图 2 YES2MTM1 菌株在 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) 处理前后在不同碳源上的生长状况

Fig. 2 Growth of candidate YES2MTM1 strain (*mtm1Δ*, pADHYES2-MTM1) on nonfermentable (glycerol) carbon source and fermentable carbon source (glucose) before and after 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) treatment.

2.2 利用转座子文库筛选 MTM1 基因缺失表型相关基因

将酵母 mTn-*lacZ*/LEU2 转座子文库转入外源 MTM1 基因菌株,得到转化子,这些转化子染色体上的 MTM1 已经敲除,pADHYES2-MTM1 质粒带有 MTM1 基因,此外在基因组某处带有转座子插入。将这些转化子用 5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA) 处理,迫使细胞丢失带有 pADHYES2-MTM1 质粒,而染色体上的 MTM1 已经敲除,因此 MTM1 基因彻底缺失。但在酵母菌缺失 MTM1 基因之前,mTn-*lacZ*/LEU2 转座子文库被引入酵母细胞中,如果某些位点的转座子插入可以挽救 MTM1 基

因缺失造成的生长缺陷,则敲除 MTM1 基因后,可以得到缺失 MTM1 基因但能在非发酵培养基上生长的酵母细胞。

将 mTn-*lacZ*/LEU2 转座子文库外源 MTM1 基因菌株,得到约 10^5 个转化子,5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA) 处理迫使细胞丢失 pADHYES2-MTM1 质粒,然后涂布在含有非发酵碳源甘油的 SG-Leu 培养基上,筛选得到约 200 个在非发酵型培养基上能够生长的转化子。在 SD-Leu-Ura 固体培养基上检测这些转化子是否还带有 pADHYES2-MTM1 质粒(上面带有的 URA3 基因使酵母可以在缺少 uracil 的培养基上生存),结果显示所有转化子都不能在缺少 uracil 的 SD-Leu-Ura 培养基上生长,提示 5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA) 有效清除了 pADHYES2-MTM1 质粒。然后在 SG-Leu 固体培养基上进行复验,挑选 SG-Leu 平板上长势良好的转化子进入基因鉴定(如图 3 中 E521)。

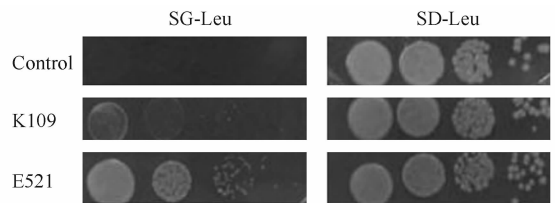


图 3 带有转座子插入的 *mtm1* 基因缺失菌株在非发酵型培养基上的生长

Fig. 3 Growth on nonfermentable carbon source of *mtm1* mutants with transposon-insertion in candidate suppressor genes.

2.3 转座子插入位点鉴定

使用拯救质粒法 (plasmid rescue) 鉴定 mTn3 转座子插入位点。具体操作如下: BamHI 酶切线性化拯救质粒 pRSQ2-URA3, 分别转化所得到的突变体,以 SD-Leu-Ura 平板筛选转化子。抽提拯救转化子的染色体 DNA, EcoRI 酶切后进行自身连接,连接液转化大肠杆菌 DH5 α 。根据拯救质粒的序列和设计原理,含有部分转座子、拯救质粒、酵母染色体的环形 DNA 分子在大肠杆菌中扩增所得到的质粒,经 BamHI 与 EcoRI 双酶切后应得到 2.9 kb 左右的片段,这一现象可以用于确定筛选得到的突变体内是否含有 mTn3 转座标签^[12]。实验结果表明,绝大部分突变体对应的质粒酶切图谱均含有 2.9 kb 片段(图 4)。并利用限制性内切酶酶切图谱初步判定各质粒之间是否有重复,如 3 种酶切图谱都一致,则认为

测序。

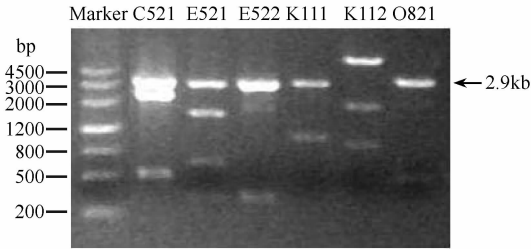


图4 BamHI 和 EcoRI 双酶切鉴定挽救质粒

Fig.4 Rescued plasmids were analyzed by double-digestion with BamHI and EcoRI. Desired plasmids are supposed to display a 2.9-kb band containing part of mTn3 transposon and pRSQ2-URA3 sequences.

根据转座子文库设计原理和拯救质粒全序列合成 M13-47 引物对质粒测序,将测序结果与酵母基因组全序列数据库进行 blast 分析,确定了各转座子标签的插入点。结果发现转座子插入位点为 HSL1 和 TPS2 基因,基因详细信息如表 3 所示。我们的结果提示 HSL1 和 TPS2 基因的转座子插入可以挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷,但二者与 MTM1 基因的相互关系还有待于进一步的机制研究。

表 3 候选 MTM1 基因缺失表型相关基因

Table 3 Candidate transposon insertion sites able to rescue phenotype of MTM1 deletion mutant

ORF	Gene	Molecular Function	Cellular Component
YKL101W	HSL1	protein kinase that regulates the morphogenesis and septin checkpoints	cellular bud neck septin ring
YDR074W	TPS2	Phosphatase subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex, which synthesizes the storage carbohydrate trehalose	mitochondria

3 讨论

MTM1 基因对于维持锰超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 2, SOD2) 的活性和线粒体正常功能十分重要^[4],本研究利用酿酒酵母转座子文库筛选 MTM1 基因缺失表型相关基因,寻找能挽救 MTM1 基因缺失导致的生长缺陷的转座子插入位点。由于 MTM1 基因缺失造成的损伤是不可逆的,直接转入转座子文库无法得到 MTM1 基因缺失表型相关基因,我们利用了外源 MTM1 基因菌株,使 MTM1 基因从染色体上转移到了 pADHYES2-MTM1 质粒上,将转座子文库转入外源 MTM1 基因

菌株中,再利用药物 5-氟乳清酸 (5-Fluoroorotic acid, 5-FOA) 迫使细胞丢掉 pADHYES2-MTM1 质粒,造成 MTM1 基因的缺失,但在酵母菌缺失 MTM1 基因之前,转座子文库已经被引入酵母细胞中,如果某些位点的转座子插入可以挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷,则敲除 MTM1 基因后,可以得到缺失 MTM1 基因但能在非发酵培养基上生长的酵母细胞。

通过这种方法筛选发现 HSL1 和 TPS2 基因的转座子插入可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷,本研究为深入了解 MTM1 基因的功能提供了线索,也为利用 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库筛选其他造成不可逆损伤的基因的缺失表型相关基因提供了借鉴。

参考文献

- [1] Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, 126(3): 365-379.
- [2] Martin FM, Bydlon G, Friedman JS. SOD2-deficiency sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, 8:1217-1225.
- [3] Melov S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 908:219-225.
- [4] Luk E, Carroll M, Baker M, et al. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(18): 10353-10357.
- [5] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, et al. Life with 6000 genes. *Science*, 1996, 274:563-567.
- [6] Altmann K, Dürr M, Westermann B. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Methods in Molecular Biology*, 2007, 372:81-90.
- [7] Kucharczyk R, Rytka J. *Saccharomyces cerevisiae*—a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48:1025-1042.
- [8] Skoneczny M, Rytka J. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for studying function and biogenesis of peroxisomes. *Acta Biochimica Polonica*, 1995, 44:209-218.

- [9] Drubin D. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for the cytoskeleton and cell biology. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1989, 14:42-49.
- [10] Wolf DH. Cellular control in the eukaryotic cell through action of proteinases: the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *Microbiological Sciences*, 1986, 3: 107-114.
- [11] Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, et al. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology*, 1987, 154: 164-175.
- [12] Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, et al. HLarge-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *H Nature*, 1999, 25: 413-418.
- [13] Burns N, Grimwade B, Ross-Macdonald PB, et al. Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 1994, 8(9): 1087-1105.
- [14] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3329-3330.

Screen in *Saccharomyces cerevisiae* for transposon insertion sites able to rescue phenotype of MTM1 deletion mutant using mTn-*lacZ*/LEU2 transposon library

Juan Wang^{*}, Minjie Zhang, Yaxue Zeng, Ying Cai, Chicheng Sun, Bing Zhou

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: [**Objective**] MTM1 gene is essential for superoxide dismutase 2 activity and normal mitochondrial functions. MTM1 deletion results in decreased superoxide dismutase 2 activity, impaired mitochondrial functions and growth defect on nonfermentable carbon source. To promote understanding of MTM1 gene, we started a genetic screen for transposon insertions which are able to rescue the growth defect resulting from MTM1 deletion. [**Methods**] Routine screening strategy didn't work because of the irreversible damage caused by MTM1 deletion. So we adopted the following screening strategy: we transformed a plasmid overexpressing MTM1 into wild type before deleting MTM1 in chromosome and got the resulting strain, designated YES2MTM1. Then we transformed mTn-*lacZ*/LEU2 transposon library into the YES2MTM1 strain. Transformants lost the plasmid overexpressing MTM1 after 5-Fluoroorotic acid treatment. We picked up the yeast strains able to grow on nonfermentable carbon source with MTM1 deletion and some transposon insertion and identified the insertion sites. [**Results**] We found transposon insertions in two genes were able to rescue the growth defect resulting from MTM1 deletion on nonfermentable carbon source. [**Conclusion**] Our study will provide reference for thorough understanding of MTM1 gene function.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; mTn-*lacZ*/LEU2 transposon library; MTM1

(本文责编: 张晓丽)