

酿酒酵母全基因组范围内筛选 MTM1 基因的抑制基因*

王娟** 张玟洁 曾雅雪 蔡颖 周兵

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 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酵母锰超氧化物歧化酶活性, 并损伤线粒体功能, 因此在非发酵培养基上不能生长. 利用 MTM1 基因缺失的突变体在非发酵培养基上的生长缺陷, 转入酵母基因组文库筛选 MTM1 抑制基因, 发现 MTM1 基因缺失造成的损伤一旦形成不可逆转, 重新引入 MTM1 基因也无法挽救, 直接筛选无法得到抑制基因. 为了避免 MTM1 缺失造成的不可逆损伤, 在野生型酵母中先转入带有 MTM1 基因的质粒, 再敲除染色体上的 MTM1 基因, 随后转入基因组文库, 再利用药物 5- 氟乳清酸(5-FOA)迫使细胞丢失表达 MTM1 基因的外源质粒, 再筛选能在非发酵培养基上生长的转化子, 通过这种方法筛选发现, POR2 等 5 个基因的过表达可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷, 为深入了解 MTM1 基因的功能提供了线索, 对筛选其他造成不可逆损伤的突变基因的抑制基因提供了一条可行的研究思路.

关键词 酵母, 筛选, MTM1, 抑制基因

学科分类号 Q75, Q36

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00320

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化代谢的重要细胞器, 是活性氧自由基产生的重要场所, SOD2 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 SOD2 活性非常重要, MTM1 基因的缺失会严重影响 SOD2 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等各种分子遗传手段, 是一个研究真核生物基因功能理想的模式生物^[6-10]. 本研究利用酿酒酵母基因组文库筛选 MTM1 基因的抑制基因, 在缺失 MTM1 基因的酵母突变体中转入基因组文库, 寻找哪些基因的过表达可以挽救 MTM1 基因缺陷表型.

1 材料和方法

1.1 菌株

本文所用的酿酒酵母菌株见表 1. 酵母

Saccharomyces cerevisiae 野生型菌株 BY4742; *mtm1Δ* 突变体购自 Invitrogen 酵母敲除文库; 外源 MTM1 基因菌株 YES2MTM1 为本研究室制备.

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

Strain	Genotype
BY4742	<i>MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<i>mtm1Δ</i>	<i>MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mtm1::kanMX</i>
YES2MTM1	<i>MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mtm1::kanMX, pADHYES2-MTM1</i>

1.2 培养基及培养条件

酿酒酵母在 30℃ 培养, 各培养基配方如下. 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. 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. SD 培养基: 0.67% 酵母氮基

* 国家自然科学基金资助项目(30871262).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62772253, E-mail: juan-wang03@mails.thu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-13, 接受日期: 2009-10-23

(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. SG 培养基: 0.67% 酵母氮基、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.

1.3 酿酒酵母基因组文库

酵母基因组文库(载体 YEp13, 筛选标记 LEU2)来自美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC). 此文库将 Sau3A 部分酶切的酿酒酵母基因组片段装入质粒 YEp13^[11], 可在大肠杆菌中扩增, 在酵母中以 LEU2 为选择性标记, 可用于筛选抑制基因及寻找表型相关基因^[12-13]. 筛选得到的质粒测序引物见表 2.

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Usage
MTM1-F	GGAAAGGAAACGAGGTGTTGA	Amplification of MTM1
MTM1-R	ATCTATATTTACAAGCCTTTA	Amplification of MTM1
MTM1-kanMX-F	CGAGGTGTTGATAATACGATATG CGTACGCTGCAG GTCGACGGAT	MTM1 knockout
MTM1-kanMX-R	TCTATATTTACAAGCCTTTATTCAA TCGATGAATTC GAGCTCGTTTTCG	MTM1 knockout
MTM1 up	TAAAGTATCGTAGGAAAGGAAAC GAGGTGTTGATAA TACGATATG	MTM1 knockout
MTM1 down	CTTCTTTTCGTTTACTATATATC TATATTTACAAGCCTT TATTCA	MTM1 knockout
MTM1-confirm-F	ACGCGCAACGTTATTTTCG	Confirmation of MTM1 knockout
MTM1-confirm-R	CGTGATTATTTTGCGCTCA	Confirmation of MTM1 knockout
YEp13-F	CCACTATCGACTACGCGA	Sequencing of DNA fragment in plasmid of yeast genomic library
YEp13-R	ATGTCGGCGATATCAGGCG	Sequencing of DNA fragment in plasmid of yeast genomic library

1.4 酿酒酵母转化

将过夜培养的菌 1 : 100 转接至 30 ml YPD 中, 30℃ 振荡培养 5~6 h, 达到一定菌体浓度 (A_{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℃ 保温 30 min 后, 42℃ 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℃ 恒温培养 3 天.

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, 3 000 g 离心 5 min, 加 50 μ l 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 μ l 玻璃珠和 200 μ l 酚/氯仿, 振荡 3 min,

加 200 μ l TE 混匀, 13 000 g 离心 5 min, 将上清加 1 ml 无水乙醇沉淀, 13 000 g 离心 10 min, 去上清, 沉淀加入 40 μ l TE (含 30 mg/L RNaseA), 37℃ 温育 5 min, 加 2 μ l 5 mol/L 醋酸铵、100 μ l 无水乙醇混匀后, -20℃ 放置 0.5 h, 13 000 g 离心 10 min, 去上清干燥, 用 20 μ l 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、中间为报告基因序列的片段, 转入酵母细胞, 利用同源重组敲除目的基因, 提取基因组 DNA, 利用敲除序列外部引物进行 PCR 验证是否敲除成功^[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 A_{600} 约为 1.0, 进行 10 倍梯度稀释, 依次取 5 μ l 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. 从文库中扩增 MTM1 基因采用 MTM1-F 和 MTM1-R 引物. 94°C 5 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 扩增 28 个循环; 72°C 延伸 10 min. MTM1 基因敲除片段的制备: 第一轮 PCR 采用 MTM1-kanMX-F 和 MTM1-kanMX-R 引物. 94°C 5 min; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 1 min, 扩增 5 个循环; 94°C 45 s, 59°C 45 s, 72°C 2 min, 扩增 25 个循环; 72°C 延伸 10 min. 第二轮 PCR 采用 MTM1 up 和 MTM1 down 引物. 94°C 5 min; 94°C 45 s, 54°C 45 s, 72°C 1 min, 扩增 5 个循环; 94°C 45 s, 59°C 45 s, 72°C 2 min, 扩增 25 个循环; 72°C 延伸 10 min. 验证 MTM1 基因是否敲除采用 MTM1-confirm-F 和 MTM1-confirm-R 引物. 94°C 5 min; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 3 min, 扩增 28 个循环; 72°C 延伸 10 min.

2 结 果

2.1 直接在 MTM1 基因缺失的突变体中转入基因组文库不能筛选得到抑制基因

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 *mtm1Δ* 在非发酵型培养基上不能生长. 筛选背景检测结果显示, 在非发酵型培养基 YPG 上涂布 20 万个 *mtm1Δ* 酵母细胞, 没有发现回复突变, 筛选背景很低.

为了得到 MTM1 基因的抑制基因, 我们在 *mtm1Δ* 中转入酿酒酵母基因组文库, 寻找能挽救 MTM1 基因缺陷表型的基因. 按照预期, 应该筛选得到含有 MTM1 基因本身和 MTM1 抑制基因的基因组片段. 但筛选结果显示, 引入基因组文库后没有任何基因组片段的过表达可以挽救 *mtm1Δ* 的生长缺陷. 出现这种结果的可能原因有: a. 基因组文库覆盖率不够, 其中没有包含 MTM1 基因, 或者其中包含的 MTM1 基因片段有突变, 而文库中含有的其他基因不能挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷; b. MTM1 基因缺失造成的损伤是不可逆的, 一旦出现这种损伤, 哪怕引入 MTM1 基因本身, 也不能挽救.

2.2 MTM1 基因缺失造成的损伤不可逆转

在寻找 MTM1 抑制基因的遗传筛选中发现, 引入基因组文库后没有任何基因组片段的过表达可以挽救 *mtm1Δ* 的生长缺陷, 为了确定引起这一现

象的原因, 我们首先检测了基因组文库中是否含有 MTM1 基因. 用基因组文库的质粒作为模板, 利用 MTM1 基因上下游特异性引物做 PCR, 结果如图 1 所示, 基因组文库中涵盖 MTM1 基因, PCR 产物测序结果显示基因组文库中的 MTM1 基因没有突变, 说明并不是由于基因组文库覆盖率不够或 MTM1 片段突变导致无法筛到基因组片段.

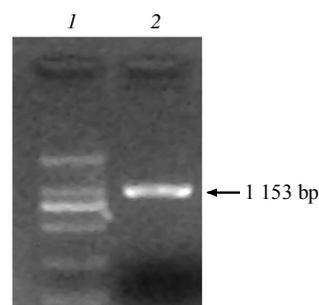


Fig. 1 There are genomic DNA fragments containing MTM1 gene in the yeast genomic library

1: Marker; 2: MTM1 gene. Primers: MTM1-F and MTM1-R; Predicted band: 153 bp.

另外, 构建了 MTM1 基因过表达的质粒(质粒测序验证插入片段 MTM1 基因无任何突变), 在 *mtm1Δ* 中过表达 MTM1 基因本身, 如图 2 所示, MTM1 基因的过表达也不能挽救 *mtm1Δ* 在非发酵培养基上的生长缺陷, 说明 MTM1 基因缺失造成的损伤是不可逆的.

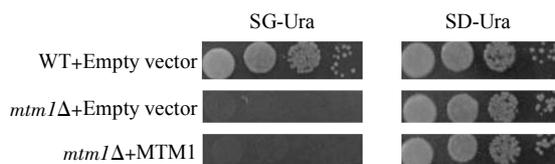


Fig. 2 The damage caused by MTM1 deletion is irreversible

Overexpression of MTM1 gene in *mtm1Δ* can not rescue the growth defect on nonfermentable carbon source.

2.3 MTM1 抑制基因的筛选

确定 MTM1 基因缺失造成的损伤不可逆转, 我们改变了筛选策略:

第一步, 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(外

源 MTM1 基因菌株).

第二步, 在外源 MTM1 基因菌株中转入酵母基因组文库, 用药物 5- 氟乳清酸 (5-fluoroorotic acid, 5-FOA) 迫使细胞丢掉 pADHYES2-MTM1 质粒^[15], 造成 MTM1 基因的缺失, 但在酵母菌缺失 MTM1 基因之前, 基因组文库已经被引入酵母细胞中, 如果基因组文库中含有某些基因可以挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷, 则敲除 MTM1 基因后, 可以筛选到缺失 MTM1 基因但能在非发酵培养基上生长的酵母细胞 (图 3).

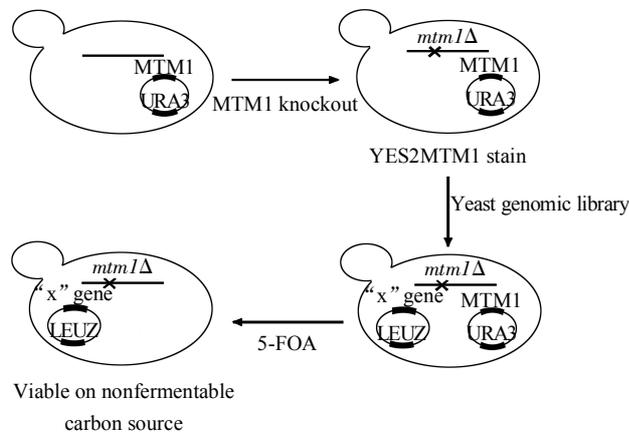


Fig. 3 Outline of the suppressor screen

A plasmid overexpressing MTM1 (URA3 as selectable marker) was transformed into the wild type strain before MTM1 on chromosome was deleted. The resulting strain, designated YES2MTM1, was transformed with a yeast genomic library (LEU2 as a selectable marker). Transformants lost the plasmid overexpressing MTM1 after 5-FOA treatment. If overexpression of "x" gene can rescue the growth defect caused by MTM1 deletion, the yeast strain with MTM1 deletion and "x" gene overexpression will be able to grow on nonfermentable carbon source.

按照上述筛选策略, 我们在野生型酵母中转入含有过表达 MTM1 基因的 pADHYES2-MTM1 质粒, 再通过 PCR 的方法得到两侧与基因组中 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 MTM1 基因, 在含有 G418 的培养基上筛选转化子, 并提取基因组 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. 如图 4 所示, 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)染色体上的 MTM1 基因已经被 KanMX 替换.

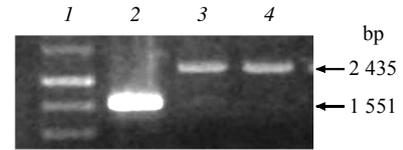


Fig. 4 Confirmation of MTM1 knockout by PCR

1: Marker; 2: Genomic DNA from WT; 3: Genomic DNA from *mtm1Δ*; 4: Genomic DNA from YES2MTM1 strain. Primers: MTM1-confirm-F and MTM1-confirm-R. Predicted band: 1 551 bp (WT strain), 2 435 bp (*mtm1* deletion strain).

敲除 MTM1 的突变体 *mtm1Δ* 在非发酵培养基上不能生长, YES2MTM1 代表的外源 MTM1 基因菌株(先转入带有 MTM1 基因的外源质粒, 再敲除染色体上的 MTM1 基因)在非发酵培养基上生长正常(图 5), 说明菌株构建成功, 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.

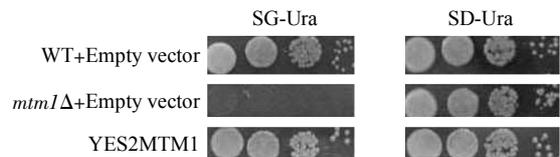


Fig. 5 YES2MTM1 strain (*mtm1Δ*, pADHYES2-MTM1) can grow normally on nonfermentable carbon source

将酵母基因组文库质粒转入外源 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, 还含有另一个带有酵母基因组片段的质粒. 将这些转化子用 5-FOA 处理, 5-FOA 可以迫使细胞丢掉 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 基因的质粒^[15], 此时细胞的外源 MTM1 基因丢失, 染色体上的 MTM1 已经敲除, MTM1 基因彻底缺失, 但在酵母菌缺失 MTM1 基因之前, 基因组文库已经被引入酵母细胞中, 如果基因组文库中含有某些基因可以挽救 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. 将转化子涂布在 SG-Leu 的培养基上, 筛选在非发酵型培养基上能够正常生长的转化子, 如图 6 所示, 某

些质粒的表达可以挽救 MTM1 基因缺失造成的生长缺陷. 为了验证筛选到的菌株中是否已经丢失 pADHYES2-MTM1 质粒, 抽提了筛选到的菌株质粒并用 MTM1 基因的引物进行 PCR 检测, 并测序验证其中是否含有 MTM1 基因, 如图 7 所示, 从 YES2MTM1 菌株(*mtm1Δ*, pADHYES2-MTM1) 中抽提的质粒作为模板可以扩增得到 MTM1 条带, 而经过 5-FOA 处理后筛选得到的 89# 菌株中并没有带含有 MTM1 基因的质粒.

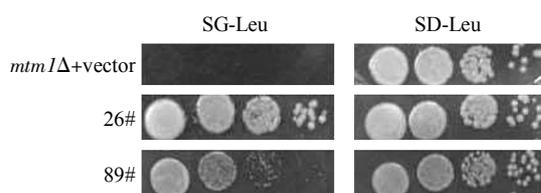


Fig. 6 Growth on nonfermentable carbon source of *mtm1Δ* mutant with and without overexpression of candidate suppressor genes

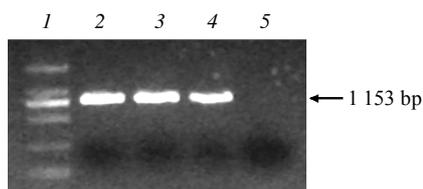


Fig. 7 Yeast strains treated with 5-FOA have lost the pADHYES2-MTM1 plasmid

1: Marker III ; 2: Yeast genomic DNA from wild type; 3: MTM1 overexpression plasmid; 4: Plasmid extracted from YES2MTM1 strain (*mtm1Δ*, pADHYES2-MTM1); 5: Plasmid extracted from strain 89#. Primers: MTM1-F and MTM1-R; Predicted band: 1 153 bp.

2.4 MTM1 抑制基因的复验和鉴定

复验是为了防止筛选到的酵母能在非发酵培养基上生长是由于随机突变而不是由于基因组文库质粒的过表达, 过程如下: 在筛选得到的转化子中抽提含有某基因组片段的质粒, 转入大肠杆菌扩增, 再转入外源 MTM1 基因菌株, 5-FOA 处理迫使细胞丢失外源 MTM1 基因, 得到带有某基因组片段但 MTM1 基因缺失的酵母菌株, 梯度稀释法检测这些酵母菌株在非发酵培养基上的生长, 如果生长缺陷有一定程度的挽救, 则进行进一步鉴定.

MTM1 抑制基因的鉴定: 基因组文库中含有 MTM1 基因的片段, 为了排除这些带有 MTM1 基因的质粒, 首先用筛选得到的质粒做模板, 用 MTM1 基因内部的引物做 PCR, 如果筛选得到的质粒内含有 MTM1 基因则不送往测序, 测序寻找不带有 MTM1 基因且能挽救生长缺陷的 DNA 片段. 得到 8 个含有不同基因组片段的质粒的过表达, 可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷, 并对可能的 MTM1 抑制基因进行了验证. 如果筛选得到的质粒只含有一个完整的基因片段, 则将其导入酵母体内再敲除基因组上的 MTM1 并观察非发酵培养基上的生长情况. 如果筛选得到的质粒含有多个完整的基因片段, 则制备亚克隆载体, 将亚克隆载体导入酵母体内再敲除基因组上的 MTM1 并观察非发酵培养基上的生长情况. 通过验证后发现 POR2 等 5 个基因的过表达可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷, 为 MTM1 基因的抑制基因(表 3).

Table 3 Suppressor genes of MTM1

ORF	Gene	Molecular function	Cellular component
YIL114C	POR2	Voltage-gated ion-selective channel activity	Mitochondrion
YDR391C	--	Unknown	Cytoplasm, nucleus
YEL002C	WBP1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycotransferase activity	Endoplasmic reticulum, nuclear envelope
YGR076C	MRPL25	Structural constituent of ribosome	Mitochondrion
YNL144C	--	Unknown	Mitochondrion

3 讨 论

MTM1 基因对于维持 SOD2 活性非常重要, MTM1 基因的缺失会严重影响 SOD2 活性, 并导致线粒体功能的损伤^[4], 本研究利用酿酒酵母基因

组文库筛选能挽救 MTM1 基因缺失导致的生长缺陷的候选基因.

研究发现, 直接在缺失 MTM1 基因的酵母突变体中转入基因组文库, 没有任何基因组片段的过表达可以挽救 *mtm1Δ* 在非发酵培养基上的生长缺

陷, 进一步的研究显示, 在 *mtm1Δ* 中过表达 MTM1 基因本身也不能挽救非发酵培养基上的生长缺陷, 说明 MTM1 基因缺失造成的损伤是不可逆的, 一旦出现这种损伤, 哪怕引入 MTM1 基因本身, 也不能挽救.

为了得到 MTM1 基因的抑制基因, 构建了外源 MTM1 基因菌株, 并利用基因组文库筛选. 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, 制备外源 MTM1 基因菌株, 转入酵母基因组文库后, 利用药物 5-FOA 迫使细胞丢掉 pADHYES2-MTM1 质粒, 造成 MTM1 基因的缺失. 在酵母菌缺失 MTM1 基因之前, 基因组文库已经被引入酵母细胞中, 如果基因组文库中含有某些基因可以挽救 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, 8 个含有不同基因组片段的质粒过表达可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷, 经亚克隆载体验证, 发现 *POR2* 等 5 个基因的过表达可以挽救 MTM1 基因缺失造成的非发酵培养基上的生长缺陷, 为 MTM1 基因的抑制基因. 本研究为深入了解 MTM1 基因的功能提供了线索, 也将为筛选其他造成不可逆损伤的突变基因的抑制基因提供借鉴作用.

参 考 文 献

- [1] Landis G N, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev*, 2005, **126**(3): 365-379
- [2] Martin F M, Bydlon G, Friedman J S. SOD2-deficiency sideroblastic anemia and red blood cell oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2006, **8**(7-8): 1217-1225
- [3] Melov S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(18): 10353-10357
- [5] Goffeau A, Barrell B G, Bussey H, *et al.* Life with 6000 genes. *Science*, 1996, **274**(5287): 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 Mol Biol*, 2007, **372**: 81-90
- [7] Kucharczyk R, Rytka J. *Saccharomyces cerevisiae*——a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochim Pol*, 2001, **48**(4): 1025-1042
- [8] Skoneczny M, Rytka J. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for studying function and biogenesis of peroxisomes. *Acta Microbiol Pol*, 1995, **44**(3-4): 209-218
- [9] Drubin D. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism for the cytoskeleton and cell biology. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1989, **14**(1): 42-49
- [10] Wolf D H. Cellular control in the eukaryotic cell through action of proteinases: the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. *Microbiol Sci*, 1986, **3**(4): 107-114
- [11] Nasmyth K A, Tatchell K. The structure of transposable yeast mating type loci. *Cell*, 1980, **19**(3): 753-764
- [12] Dekker J T, Keil P, Rassow J, *et al.* Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett*, 1993, **330**(1): 66-70
- [13] Loy C J, Lydall D, Surana U. NDD1, a high-dosage suppressor of *cdc28-1N*, is essential for expression of a subset of late-S-phase-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(5): 3312-3327
- [14] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, *et al.* A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21**(14): 3329-3330
- [15] Boeke J D, Trueheart J, Natsoulis G, *et al.* 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*, 1987, **154**: 164-175

A Genome-Wide Screening in *Saccharomyces cerevisiae* for Suppressor Genes of MTM1*

WANG Juan**, ZHANG Min-Jie, ZENG Ya-Xue, CAI Ying, ZHOU Bing

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

Abstract MTM1 gene is essential for SOD2 activity and normal mitochondrial function. MTM1 deletion results in decreased SOD2 activity, impaired mitochondrial function and growth defect on nonfermentable carbon source. A yeast genomic library was transformed into *mtm1* deletion mutant to screen for suppressor genes of MTM1. The damage caused by MTM1 deletion is irreversible and even overexpression of MTM1 can not rescue the growth defect of *mtm1* deletion mutant. Another screening strategy was adopted: a plasmid overexpressing MTM1 was transformed into wild type before the MTM1 gene on chromosome was deleted. The resulting strain, designated YES2MTM1, was transformed with a yeast genomic library. Transformants lost the plasmid overexpressing MTM1 after 5-FOA treatment. Yeast strains able to grow on nonfermentable carbon source with MTM1 deletion and overexpression of some DNA fragments were picked up and candidate suppressor genes were identified. Overexpression of five genes were identified to be able to rescue the growth defect on nonfermentable carbon source. The study will provide reference for MTM1 gene function and screening for suppressor of genes whose deletion result in irreversible damage.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, genetic screen, MTM1, suppressor gene

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00320

*This work was supported by a grant from The National Science Foundation of China (30871262).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62772253, E-mail: juan-wang03@mails.thu.edu.cn

Received: May 13, 2009 Accepted: October 23, 2009