

利用酿酒酵母转座子文库筛选线粒体 镁代谢相关基因*

王娟** 范强旺 周兵
 (清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 镁离子对于维持细胞正常功能十分重要, 糖尿病、高血压、慢性呼吸道疾病、骨质疏松、心律失常等多种疾病都与镁代谢失衡有关。MRS2 基因编码线粒体镁离子转运蛋白, MRS2 缺失会导致酵母线粒体镁离子浓度下降、线粒体内 II 型内含子剪接缺陷和非发酵碳源培养基上的生长缺陷。为了增进对线粒体镁离子代谢调控基因的了解, 利用酿酒酵母 mTn-lacZ/LEU2 转座子文库筛选 MRS2 的抑制基因, 发现线粒体载体家族成员 YMR166C 基因的缺失可以挽救 MRS2 基因缺失突变体的生长缺陷、II 型内含子剪接缺陷, 并可以调节线粒体镁离子浓度, 首次发现 YMR166C 是线粒体镁代谢相关基因。

关键词 酵母, 筛选, 镁, 线粒体

学科分类号 Q75, Q36

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00284

镁是人体细胞内的主要阳离子, 作为多种酶的激活剂, 参与 300 多种酶促反应, 参与能量代谢、蛋白质和核酸合成、细胞周期调控以及离子代谢等诸多生理活动, 因此镁对维持组织细胞的正常功能十分重要。现已发现镁代谢失衡会导致糖尿病、高血压、慢性呼吸道疾病、肾脏钙质沉积、骨质疏松、心律失常等多种疾病^[1-2]。但是, 目前对细胞维持镁离子代谢平衡的机制、镁离子在各细胞器内的分布和调控机理等方面的了解还很少^[3-4]。

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, 遗传学手段丰富, 操作简单易行, 是研究基因功能理想的模式生物。在酵母中已经发现 MRS2 基因编码线粒体镁离子转运蛋白, 且 MRS2 基因的敲除会导致酵母线粒体镁离子浓度降低、在非发酵型培养基上的生长缺陷、线粒体内 II 型内含子剪接缺陷^[5-8]。本研究利用 MRS2 基因缺失的突变体 *mrs2Δ* 在非发酵型培养基上生长有缺陷的表型, 在敲除 MRS2 基因的酵母突变体 *mrs2Δ* 中转入 mTn3 转座子文库, 筛选能挽救 *mrs2Δ* 突变体生长缺陷的转座子插入位点, 利用这种遗传筛选得到 MRS2 的抑制基因(suppressor gene), 以期找到其他调节线粒体镁离子代谢的基因, 增进对细胞内镁离子代谢调控的了解。

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。mrs2Δ 突变体和 ymr166cΔ 突变体购自 Invitrogen 公司酵母敲除文库。mrs2Δ ymr166cΔ 双突变体为本实验室制备。

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

Strain	Genotype
BY4742	MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ 0
<i>mrs2Δ</i>	MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>mrs2::kanMX</i>
<i>ymr166cΔ</i>	MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>ymr166c::kanMX</i>
<i>mrs2Δ ymr166cΔ</i>	MA Tα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 <i>mrs2::LEU2 ymr166c::kanMX</i>

* 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: 2009-05-03, 接受日期: 2009-11-16

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(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(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.

1.3 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. 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^[9].

1.4 酿酒酵母转化

将过夜培养的菌按 1:100 转接至 30 ml YPD 中, 30℃ 振荡培养 5~6 h (A_{600} 约 1.0) 后, 离心收集菌体, 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), 混匀并分成 50 μ l 小份, 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, 42℃ 水浴热激 15 min, 离心除去上清, TE 溶液重悬细胞, 涂布相应的选择平板, 30℃ 恒温培养 3 天.

1.5 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 *Bam*H I 酶切拯救质粒 pRSQ2-URA3 得到线性片段, 这一线性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 *Eoc*R I 限制性内切酶处理, 切断转座子内部的 *Eoc*R I 位点和转座子周围的酵母基因组 DNA 上的 *Eoc*R I 位点, 自连成环成一环形 DNA 分子, 内含氨苄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^[9-10].

具体操作如下: *Bam*H I 酶切拯救质粒 pRSQ2-URA3 得到的线性片段转化含 mTn 转座子标签的插入突变体, SD-leu-ura 培养基筛选转化子; 提取基因组 DNA, 用 *Eoc*R I 限制性内切酶处理; 酶切片段自连成环; 将环化 DNA 分子在大肠杆菌中扩增, 利用设计在拯救质粒上已知序列片段测定转座子插入点的邻近序列^[9-10]. 拯救质粒测序引物 M13-47 序列见表 2.

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Usage
M13-47	CGCCA GGGTT TTCCC AGTCA CGAC	Identification of the genomic site of transposon insertion
b1	AGTGAATAGTTATATTATTGATTCACC	
b1l	ATTACTAATAATGCATGTCTAATTAGG	Defect in Group II RNA splicing
b2	ATAACTAGTGCACCTCAATGTGAC	
mrs2-LEU2-F	GATTTTCAATCAAGCATCTCATG	MRS2 knockout
	ATTTCTCCTTACGCATCTGTGC	
mrs2-LEU2-R	GTTTATCATGATAATCGCCTTTCA	
	GCTTAACTATGCGGCATCAGAGC	
mrs2 up 46	GTATACGCAATCGTAGTGAAAGT	
	GATTTTCAATCAAGCATCTCATG	
mrs2 down 48	GGTTTATGCTAATAATATTGTATAG	
	TTTATCATGATAATCGCCTTTCA	

1.6 酵母基因组 DNA 的提取

取酵母过夜培养物 3 ml, 离心收集菌体, 无菌水洗涤, 3 000 *g* 离心 5 min 去上清, 加入 50 μ l 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, 再加入 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, 取上清, 加入 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 $^{\circ}$ C 温育 5 min, 加入 2 μ l 5 mol/L 的醋酸铵、100 μ l 无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 13 000 *g* 离心 10 min, 去上清干燥, TE 溶解所得基因组 DNA.

1.7 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, 并通过不同引物的 PCR 产物片段的大小检测是否敲除成功^[1].

1.8 梯度稀释法检测酵母的生长

接种酵母于培养基中, 30 $^{\circ}$ C 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 1.0, 进行 10 倍梯度稀释, 依次取 5 μ l 滴于测试平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 天, 观察菌落生长情况.

1.9 线粒体内 II 型内含子剪接缺陷检测

酿酒酵母 RNA 抽提: 酵母菌在 YPD 培养基中培养至对数生长期, 离心得到菌体, 无菌水洗涤重悬, 加入 400 μ l 的 TES 液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 高压灭菌)和 400 μ l 的水饱和酚, 剧烈振荡混匀, 于 60~65 $^{\circ}$ C 的水浴中加热 1 h, 其间每隔 10 min 剧烈振荡一次. 冰浴 5 min, 在 4 $^{\circ}$ C 下 14 600 *g* 离心 5 min, 水相转移至新离心管中, 水饱和酚和氯仿各抽提一次, 4 $^{\circ}$ C 14 600 *g* 离心 5 min, 水相转移至一新离心管中, 加入 1/10 体积的 DEPC 水配制的醋酸钠(3 mol/L, pH 5.2)及 2.5 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min, 4 $^{\circ}$ C 下 14 600 *g* 离心 10 min, 70% 乙醇洗涤沉淀, 风干后加入 DEPC 水溶解, 测定 260 nm 和 280 nm 的吸收值, 溶解后的 RNA 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱或直接用于逆转录实验.

逆转录按照 Invitrogen 公司试剂盒说明书进行, 检测线粒体内 II 型内含子剪接缺陷方法参照 Bui 和 Gegan 等方法^[6-7].

1.10 原子吸收光谱测定线粒体内镁离子浓度

酿酒酵母线粒体抽提: 将酵母接种于 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 摇床, 175 r/min 培养 12 h, 加入两倍体积的 YPG 培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 175 r/min 培养 6 h, 离心收集酵母, 蒸馏水洗涤, β - 巯基乙醇溶液 (0.5 mol/L β - 巯基乙醇, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.3) 30 $^{\circ}$ C 处理 10 min, Tris-HCl-KCl 缓冲液 (0.5 mol/L KCl, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.0) 洗涤沉淀 2 次, 加入蜗牛酶溶液(10 g/L 蜗牛酶, 0.01 mol/L 柠檬酸, 1.35 mol/L 山梨糖醇, 0.01 mol/L KH_2PO_4 , 1.0 mmol/L EGTA, pH 5.8) 混匀, 30 $^{\circ}$ C 50 min, 用溶液 1 (1.0 mol/L 山梨糖醇, 0.5 mmol/L EGTA, 1.7 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 6.8) 洗涤沉淀, 900 *g* 离心 10 min, 去上清, 用溶液 4 (0.01 mol/L Tris, 0.01 mol/L 马来酸, 0.75 mol/L 山梨糖醇, 0.4 mol/L 甘露糖醇, 2.0 mmol/L EGTA, pH 6.8) 洗涤沉淀, 900 *g* 离心 10 min, 去上清. 加入线粒体分离缓冲液(5.0 mmol/L HEPES, 70 mmol/L 蔗糖, 0.22 mol/L 甘露糖醇, pH 7.2), 匀浆上下各 5 次, 900 *g* 离心 10 min, 保留上清, 沉淀再加入分离缓冲液, 匀浆, 900 *g* 离心 10 min, 将 2 次离心得到的上清混合, 10 000 *g* 离心 10 min, 沉淀加入分离缓冲液重悬, 并将各酵母菌株的线粒体调成等蛋白质浓度.

原子吸收光谱测定: 将样品转移至干净的烧杯中, 加入重蒸硝酸, 盖上表面皿, 电热板 160 $^{\circ}$ C 消解, 待样品消解澄清后, 定容于 10 ml, 摇匀, 原子吸收光谱用等离子体质谱(ICP-MS)测定(Thermo ICP-MS XII).

1.11 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 *mrs2* Δ 突变转座子文库的 Δ 建和筛选

Not I 酶切 mTn3 转化子文库, 将线性片段转化受体菌 *mrs2* Δ 突变体, 以 SD-Leu 平板筛选得到 *mrs2* Δ 的转座子文库, 每个转座子突变体内含 *MRS2* 基因缺失和一个转座子插入位点, 共得到约 40 000 个 *mrs2* Δ 转座子突变体.

将 *mrs2* Δ 转座子突变体涂布在 SG-Leu 培养基上, 挑选长势最好的菌落, 从涂布的 280 000 个细

胞中挑选得到 112 个克隆. 梯度稀释法检测这 112 个克隆在非发酵型碳源(甘油)培养基上的生长, 其中 90 个克隆在甘油做碳源的培养基上长势良好, 挑选长势最好的 42 个克隆鉴定转座子插入位置. 图 1 示部分 *mrs2Δ* 转座子突变体在非发酵碳源(甘油)培养基上的生长.

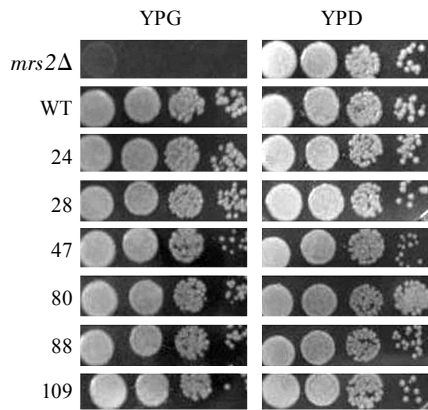


Fig. 1 Growth on nonfermentable medium of *mrs2Δ*, wild type and transformant strains carrying transposons

2.2 转座子插入位置鉴定得到 *YMR166C* 基因

*Bam*H I 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, *Eco*R I 酶切后进行自身连接, 连接液转化大肠杆菌 DH5 α . 根据拯救质粒的设计原理, 筛选得到的突变体内若含有 mTn3 转座标签, 则这些质粒经 *Bam*H I 与 *Eco*R I 双酶切后应得到 2.9 kb 左右的酶切片段^[9].

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 2), 而且不同突变体相对应的质粒酶切图谱有些是一致的, 提示在这些突变体中转座子插入的位点可能是相同的. 另用

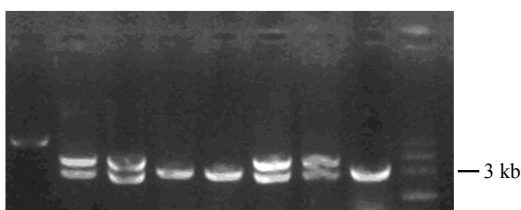


Fig. 2 Rescued plasmids were analyzed by double-digestion with *Bam*H I and *Eco*R I

Desired plasmids are supposed to display a 2.9 kb band containing part of mTn3 transposon and pRSQ2-URA3 sequences.

*Hind*III 与 *Eco*R V 双酶切所得质粒, 若酶切图谱依旧相同则认为是相同质粒, 只选一个测序.

根据拯救质粒全序列设计并合成引物对验证过的质粒测序, 将测序结果与酵母基因组全序列数据库进行 Blast 分析, 确定了各转座标签的插入点. 结果发现, 虽然这些克隆的拯救质粒酶切图谱不同, 但插入的基因却高度集中, *YMR166C* 基因在不同位置有多个插入, 80%以上的克隆都插入 *YMR166C* 基因.

2.3 *YMR166C* 基因缺失对 *mrs2Δ* 突变体生长的影响

为了进一步确定 *YMR166C* 基因是 *MRS2* 的抑制基因, 本研究利用同源重组制备了 *mrs2Δ ymr166cΔ* 双突变, 并检测各个突变体在非发酵型碳源(甘油)培养基上的生长.

如图 3 所示, *ymr166cΔ* 突变本身在非发酵型碳源培养基上的生长不受影响, 但 *YMR166C* 基因的缺失可以有效挽救 *mrs2Δ* 突变体的生长缺陷, *mrs2Δ ymr166cΔ* 双突变株在非发酵型碳源(甘油)培养基上生长几乎完全正常, 验证了转座子文库筛选所得到的结果.

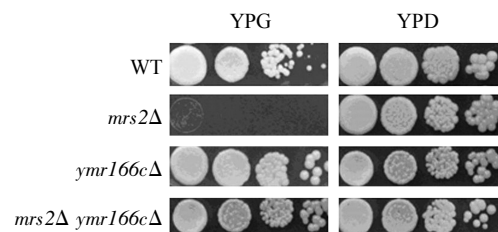


Fig. 3 *YMR166C* deletion can rescue the growth defect of *mrs2Δ* on nonfermentable carbon source

YPG: Nonfermentable medium with glycerol as carbon source. YPD: Fermentable medium with glucose as carbon source.

2.4 *YMR166C* 基因缺失对 *mrs2Δ* 突变体内线粒体镁离子浓度的影响

为了确定 *YMR166C* 基因缺失对 *mrs2Δ* 突变体内线粒体镁离子浓度的影响, 进一步分离了野生型、*mrs2Δ*、*ymr166cΔ*、*mrs2Δ ymr166cΔ* 突变体的线粒体, 利用原子吸收光谱测定各菌株线粒体内的镁离子含量, 发现 *mrs2Δ* 突变体线粒体内镁离子浓度较低, 而 *mrs2Δ ymr166cΔ* 线粒体镁离子浓度明显高于 *mrs2Δ*, 验证了 *YMR166C* 基因在线粒体镁离子代谢平衡中的作用(图 4).

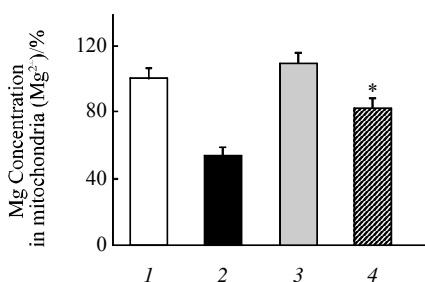


Fig. 4 Magnesium concentration in mitochondria isolated from different strains

Magnesium concentration in mitochondria isolated from wild type was normalized to 100%. Data were reported as $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs *mrs2*Δ. 1: WT; 2: *mrs2*Δ; 3: *ymr166c*Δ; 4: *mrs2*Δ *ymr166c*Δ.

2.5 YMR166C 基因缺失对 *mrs2*Δ 突变体内 II 型内含子剪接的影响

镁离子对于线粒体内 II 类内含子的剪接非常重要, *mrs2*Δ 突变体线粒体内镁离子含量下降, II 类内含子的剪接受到影响, 导致细胞色素 b II 型内含子剪接受阻, 无法得到成熟的 RNA^[6,7]. 利用细胞色素 b 基因内含子和外显子上的 3 条引物做 RT-PCR, 可以得知前体与成熟 RNA 的含量, 判断线粒体内 II 类内含子剪接是否受到影响^[6,7]. 如图 5 所示, *mrs2*Δ 突变体线粒体中未发现成熟 RNA, 与已有报道相符, 但 *mrs2*Δ*ymr166c*Δ 双突变株线粒体内则有成熟 RNA 出现, 说明 *YMR166C* 的敲除可以部分挽救 *mrs2*Δ 突变线粒体内 II 类内含子的剪接缺陷.

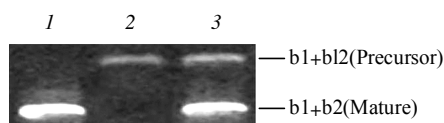


Fig. 5 YMR166C deletion can partially rescue the Group II RNA splicing defect of *mrs2*Δ mutant

1: WT; 2: *mrs2*Δ; 3: *mrs2*Δ *ymr166c*Δ.

3 讨 论

MRS2 基因编码线粒体镁离子转运蛋白, *MRS2* 缺失会导致酵母线粒体镁离子浓度下降、线粒体内 II 型内含子剪接缺陷和非发酵碳源培养基上的生长缺陷, 本研究利用敲除 *MRS2* 基因的酵母突变体在非发酵型碳源培养基上生长有缺陷的表型, 在 *mrs2*Δ 中转入 mTn3 转座子文库, 筛选能挽救

*mrs2*Δ 突变体生长缺陷的转座子插入位点, 利用这种遗传筛选发现转座子插入 *YMR166C* 基因可以有效挽救 *mrs2*Δ 突变体在非发酵型碳源培养基上的生长缺陷.

为了进一步确定 *YMR166C* 基因的缺失可以挽救 *mrs2*Δ 突变体的缺陷, 利用同源重组得到了 *mrs2*Δ *ymr166c*Δ 双突变株, 发现 *YMR166C* 基因的敲除可以挽救 *mrs2*Δ 突变体在非发酵型碳源培养基上的生长缺陷, 验证了转座子文库所得到的结果. 并进一步分离了野生型、*mrs2*Δ、*ymr166c*Δ、*mrs2*Δ*ymr166c*Δ 突变体的线粒体, 利用原子吸收光谱测定各菌株线粒体内的镁离子含量, 发现, *mrs2*Δ 突变体线粒体内镁离子浓度较低, 而 *mrs2*Δ*ymr166c*Δ 线粒体镁离子浓度明显高于 *mrs2*Δ, 验证了 *YMR166C* 基因在线粒体镁离子代谢平衡中的作用. 除此之外, *YMR166C* 基因的敲除还可以挽救 *mrs2*Δ 突变体内因镁离子浓度降低而导致的 II 型内含子剪接缺陷.

目前 *YMR166C* 基因功能未知, 序列分析发现, *YMR166C* 编码蛋白含有线粒体定位信号, 预测其编码的蛋白质定位于线粒体, 且属于线粒体载体家族(mitochondria carrier family), 参与线粒体内代谢物质的转运, 但具体参与什么物质转运尚不明确^[2]. 线粒体载体家族承担着向线粒体内外转移代谢物的功能, 其成员包括线粒体磷酸、ATP、ADP、苹果酸盐、柠檬酸盐、铁离子等多种物质的转运蛋白^[3].

综合上述信息, 我们猜测 *YMR166C* 编码蛋白作为线粒体载体家族成员, 参与线粒体内镁离子相关代谢物质的转运, 调节线粒体内的镁离子浓度, 但具体机制是直接向线粒体外转运镁离子还是间接调节镁离子浓度还有待进一步探索. 本研究首次发现 *YMR166C* 基因的缺失可以挽救 *mrs2*Δ 突变体的生长缺陷、II 型内含子剪接缺陷和调节线粒体内镁离子浓度, 为了解 *YMR166C* 基因功能和细胞镁离子代谢平衡机制提供了线索.

参 考 文 献

[1] Musso C G. Magnesium metabolism in health and disease. *Int Urol Nephrol*, 2009, **41**(2): 357-362
 [2] Champagne C M. Magnesium in hypertension, cardiovascular disease, metabolic syndrome, and other conditions: a review. *Nutr Clin Pract*, 2008, **23**(2): 142-151
 [3] Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys*, 1992, **298**(1): 1-12

- [4] Gardner R C. Genes for magnesium transport. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**(3): 263–267
- [5] Wiesenberger G, Waldherr M, Schweyen R J. The nuclear gene *MRS2* is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts *in vivo*. *J Biol Chem*, 1992, **267** (10): 6963–6969
- [6] Bui D M, Gregan J, Jarosch E, *et al.* The bacterial Mg^{2+} transporter *CorA* can functionally substitute for its putative homologue *Mrs2p* in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 1999, **274**(29): 20438–20443
- [7] Gregan J, Kolisek M, Schweyen R J. Mitochondrial Mg^{2+} homeostasis is critical for group II intron splicing *in vivo*. *Genes Dev*, 2001, **15**(17): 2229–2237
- [8] Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, *et al.* *Mrs2p* is an essential component of the major electrophoretic Mg^{2+} influx system in mitochondria. *EMBO J*, 2003, **22**(6): 1235–1244
- [9] Ross-Macdonald P, Coelho P S, Roemer T, *et al.* Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*, 1999, **402**(6760): 413–418
- [10] Burns N, Grimwade B, Ross-Macdonald P B, *et al.* Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 1994, **8** (9): 1087–1105
- [11] 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
- [12] Moulalij B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J, *et al.* Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, **13**(6): 573–581
- [13] Palmieri, HAgrimi G H, HBlanco E H, *et al.* Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1757**(9–10): 1249–1262

A Transposon-Based Genetic Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Role of *YMR166C* in Mitochondrial Magnesium Homeostasis*

WANG Juan**, FAN Qiang-Wang, ZHOU Bing

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

Abstract Magnesium homeostasis is very important to normal functions of cell and plays a role in a number of diseases such as diabetes, hypertension, chronic respiratory disorder, osteoporosis and arrhythmia. *MRS2* encode a magnesium transporter protein in *Saccharomyces cerevisiae* and deletion of *MRS2* gene results in decrease in mitochondrial magnesium concentration, group II RNA splicing defect and growth defect on nonfermentable carbon source. To obtain more information of magnesium homeostasis in mitochondria, mTn-*lacZ*/LEU2 transposon library was transformed into *mrs2* deletion mutant to screen for suppressor genes of *MRS2*. *YMR166C*, a member of mitochondrial carrier family, was identified as a suppressor gene of *MRS2*. Deletion of *YMR166C* gene can rescue the defects of *mrs2* deletion mutant such as the decrease in mitochondrial magnesium concentration, group II RNA splicing defect and growth defect on nonfermentable carbon source. For the first time it was demonstrated that *YMR166C* is involved in mitochondrial magnesium homeostasis.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, genetic screen, magnesium, mitochondria

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00284

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

**Corresponding author.

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

Received: May 3, 2009 Accepted: November 16, 2009