

斑马鱼胸苷酸合成酶与自身 mRNA 的相互作用 *

宋春霞^{1,2)} 牛荣丽³⁾ 杜长青⁴⁾ 杨少丽³⁾ 林秀坤^{3)**}

¹⁾山东大学生命科学院, 济南 250100; ²⁾山东大学威海分校海洋学院, 威海 264209;

³⁾中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 青岛 266071; ⁴⁾山东潍坊医学院, 潍坊 261042)

摘要 斑马鱼(zebrafish, *Danio rerio*)是生物学领域中公认的研究脊椎类生物的模式生物. 胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)是 DNA 从头合成的限速酶, 多年来一直作为肿瘤化疗的重要靶酶. 前期的研究表明, 人和大肠杆菌中 TS 能与自身的 mRNA 结合, 在翻译水平上具有反馈抑制自调控现象. 斑马鱼作为药物模型的研究已成为热点研究领域, 为了探讨斑马鱼的胸苷酸合成酶的调控规律, 以及与人 TS 的相关性, 利用原核表达, 纯化获得高均一性斑马鱼 TS 蛋白, 采用凝胶迁移研究了 TS 和其 mRNA 的体外结合, 采用免疫共沉淀: RT-PCR 技术研究了它们在体内的相互作用, 实验结果表明, 斑马鱼的 TS 在体内外均与自身的 mRNA 存在特异性的相互作用. 研究说明, 斑马鱼和人的 TS 具有高度生物学过程相关性, 为构建斑马鱼抗肿瘤药理模型提供了理论基础.

关键词 斑马鱼, 胸苷酸合成酶, 凝胶迁移(EMSA), 蛋白质和 RNA 相互作用, 免疫共沉淀: RT-PCR

学科分类号 Q7

斑马鱼具有胚胎透明, 操作简单, 生长同步和繁殖速度快等特点, 现已成为生物学领域中公认的研究脊椎类生物的最佳模式生物, 适用于遗传学、胚胎学、免疫学、发育生物学和细胞生物学的研究. 近年来, 其在疾病模型方面的研究已获得突破性进展, 利用斑马鱼作为药物研究模型已成为新的研究亮点^[1]. 作为一种新型的药物研究模型, 需要对重要的抗肿瘤药物靶点分子进行深入研究, 进一步明确斑马鱼相应生物学过程与人的相关性.

胸苷酸合成酶(E.C.2.1.1.45, TS)广泛存在于各种生物体内, 目前为止, 已从几十种生物中克隆了 TS 的基因并对其进行了深入研究. TS 基因具有高度的进化保守性, 多数生物体内的 TS 都是以单独的蛋白质分子存在, 但在植物与原生动物体内, TS 多与二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)结合, 构成双功能酶^[2]. 在动物和动物 DNA 病毒中, 该酶有 2 个相同的亚基构成, 亚基大小 30~35 ku^[3]. TS 是一种叶酸依赖性生物酶, 是生物体内核苷酸代谢和叶酸代谢中的关键酶, 在生物体内催化 dUMP 甲基化形成 dTMP, 后者进一步代谢产生 dTTP, dTTP 直接参与 DNA 的分子合成, 因此 TS 是 DNA 从头合成的关键酶, 调节细胞生长的调控因子, 更是肿瘤化学治疗的重要靶酶. TS 除催

化功能外, 还有与 RNA 结合的功能, 不仅能与自身的 mRNA 结合, 而且能与其他 RNA, 包括 c-myc、bcl-2 和 p53 等的 RNA 相互作用, 在细胞周期、DNA 修复、基因转录和细胞凋亡中起重要的调控作用^[4,5].

我们前期工作表明, 人和大肠杆菌的 TS 基因表达调控是多水平控制的, 尤其在翻译水平上具有负反馈抑制现象, 也正是以 TS 为药物作用靶点的氟尿嘧啶类抗肿瘤药物, 如 5-FU 等使细胞产生耐药性的原因之一^[6]. 我们已经从斑马鱼中克隆到 TS 基因, 原核表达并纯化出活性蛋白, 与人和大肠杆菌有较高的相似性^[7], 然而我们对胸苷酸合成酶在斑马鱼中的表达调控机制却知之甚少. 在本研究中, 我们利用纯化斑马鱼 TS, 采用凝胶迁移和紫外交联、免疫共沉淀结合 RT-PCR 技术研究了 TS 与自身 mRNA 之间的相互作用, 研究结果显示, 斑马鱼的 TS 能与自身 mRNA 结合, 初步揭示斑马鱼中胸苷酸合成酶的翻译调控机制, 可能在翻译水平上也

* 国家自然科学基金资助项目(40506031, 30472043) 和山东省自然科学基金资助项目(Q2005C06).

** 通讯联系人. Tel: 0532-82898916, E-mail: linxiukun@yahoo.com

收稿日期: 2007-05-22, 接受日期: 2007-08-19

具有自调控现象, 与人的TS基因表达调控具有相同的方式, 进一步为斑马鱼作为肿瘤药物筛选模型提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

斑马鱼由武汉水生研究所提供; 质粒pET28a-ZF/TS由杜长青博士构建, 质粒图谱见文献[8]; 含pET28a-ZF/TS的大肠杆菌BL21(DE3)由中国科学院海洋所林秀坤研究员实验室保存; Ni-NTA Spin columns购自Qiagen公司; BCA™ Protein Assay Kit购自Pierce公司; 反转录酶M-MuLV Reverse Transcriptase和体外转录试剂盒Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems购自Promega公司; BrightStar™ BioDect™ Nonisotopic Detection Kit、酵母tRNA和glycoblue购自Ambion公司; Dig-11-UTP和Anti-Digoxigenin-AP购自Roche公司; Trizol和Protein A-agarose购自Invitrogen公司; 引物的合成和测序由上海生工生物技术公司完成; 其他试剂均为国产试剂, 分析纯.

1.2 斑马鱼TS重组蛋白的表达纯化

参见Qiagen公司的Ni-NTA Spin Kit操作手册, 在活性条件下纯化蛋白质的程序, 简述如下: 培养含TS表达质粒的BL21, 加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导3 h, 离心收集菌体, 按照50:1的体积比加入裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 用溶菌酶和超声波处理后离心上清加至镍离子柱, 用清洗缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)冲洗3次, 后用洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)从柱子上洗脱带有His-tag标签的斑马鱼TS蛋白. 用BCA法蛋白质定量, SDS-PAGE纯度分析.

1.3 体外转录合成地高辛标记TS mRNA

设计含T7启动子序列的引物, PCR得到包含T7启动子的TS全长序列. TS980 (正义), d(taatac gactc actat agggagac atgccc gacacggcagtg), TS980 (反义), d(ctaaacagccatttgcatt), 斜体表示T7启动子序列. 纯化PCR产物作为体外转录的DNA模板; 部分DIG-11-UTP取代UTP作为转录的反应底物; 参照Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems实验程序, 合成地高辛标记的TS mRNA, 酚-氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 得到的RNA分装, -80℃保存.

1.4 凝胶迁移 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

取地高辛标记的斑马鱼全长TS mRNA, 加入适量的蛋白和4 μl的5×样品结合缓冲液(10 mmol/L Hepes pH 7.5, 40 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 0.01% NP40, 0.25 g/L 酵母tRNA, 5%甘油), 反应体积为20 μl, 室温共育15 min. 加入3 μl上样缓冲液 (Ambion), 点样. 6%非变性的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:二甲叉丙烯酰胺=60:1)电泳, 在0.5×TBE中, 电压200 V, 在4℃条件下电泳1 h, 电泳前预电泳15 min. 电泳后, 取下一块玻璃板, 直接接触法转至带正电荷的尼龙膜, 转膜时间为30 min, 120℃固定20 min. 检测参照 BrightStar™ BioDect™ Nonisotopic Detection Kit, 先在封闭液中处理40 min, 然后在加入1 μl Anti-Digoxigenin-AP的封闭液中共育30 min, 后用封闭液和清洗缓冲液冲洗3~4次, 用1×测定缓冲液处理后加入适量的CDP-Star™, 5~8 min后去除多余的化学荧光试剂, 曝光自显影.

1.5 RNA-蛋白质复合物UV交联

在含结合缓冲液的20 μl反应体系中, 地高辛标记的斑马鱼TS mRNA和适量的斑马鱼TS蛋白室温共育20 min, 然后反应复合物直接经紫外线交联(波长254 nm, 时间15 min). 加入终浓度为1 g/L的RNaseA, 30℃共育30 min. 再加入15 μl 2×SDS-PAGE上样缓冲液, 煮沸3~5 min, 点样, 12% SDS-PAGE (丙烯酰胺:二甲叉丙烯酰胺=29:1), 电压120 V, 电泳至溴酚蓝到达胶的底部. 转移至带正电的尼龙膜, 直接接触法转膜, 检测方法同1.4. 参考文献[9,10], 并有所改进.

1.6 免疫共沉淀

取斑马鱼胚胎50 mg, 4%甲醛室温交联固定15 min, 加入终浓度为0.25 mol/L的甘氨酸, 室温5 min终止反应. 加入1 ml裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 10 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 1 μmol/L Pepstatin A, 0.1 mmol/L Leupeptin, 5 mg/L Apoptinins, 1 mmol/L PMSF), 组织匀浆, 离心上清作为免疫沉淀的抗原. 每200 μl加入20 μl Protein A-agarose, 再加入鼠抗人单克隆抗体TS106, 酵母tRNA, RNAase抑制剂共育, 后分别用高盐缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 500 mmol/L NaCl, 0.1% NP-40), 低盐缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.1% NP-40)清洗Protein

A-agaose和TS蛋白-RNA复合物^[1]. 直接加入蛋白质上样缓冲液, 煮沸3~5 min, 12% SDS-PAGE. 电泳后转移至硝酸纤维素膜, 使用鼠抗人单克隆抗体TS106进行蛋白质印迹分析.

1.7 RT-PCR

RNP复合物70℃温育45 min, 解交联后用Trizol 300 μl重悬上述免疫沉淀复合物, 后加入80 μl氯仿, 室温10 min, 12 000 r/min离心10 min, 取上层加异丙醇沉淀, 同时加1 μl glycoblue, 12 000 r/min离心20 min收集沉淀, 70%乙醇洗涤沉淀, 空气干燥后用10 μl去RNAase水溶解沉淀, -80℃保存或立即进行RT-PCR. 采用两步法RT-PCR, 用M-MuLV反转录酶进行第一链cDNA合成, 取产物体积的1/10作为PCR反应的模板, 引物序列: TS740 (正义), d(cggagaaagcaagaagaa), TS740 (反义), d(gggcgtaacctaattgtatg), 反应条件: 95℃变性1min, 60℃退火1 min, 72℃延伸 90 s, 最后72℃延伸5 min, 30个循环. 取5 μl反应产物, 1.2%琼脂糖凝胶电泳, EB染色观测结果.

2 结 果

2.1 斑马鱼TS重组蛋白的获取

培养含TS表达质粒pET28a-ZF/TS的BL21(DE3), 加入终浓度为1 mmol/L的IPTG进行诱导表达, 诱导3 h后, 外源重组蛋白在大肠杆菌的表达量达到总蛋白质量的30%左右. 因为TS蛋白N端有一个组氨酸序列标签, 可用镍离子柱进行TS蛋白的纯化, SDS-PAGE后, 见图1, 说明纯化效果比较好, 得到了纯度较高的TS蛋白.

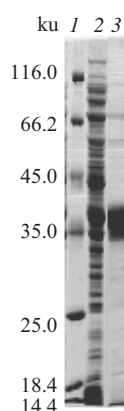


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified zebrafish TS protein pET28a-ZF/TS transformed into BL21(DE3). After culturing with IPTG for 3h, the crude extract of homogenized BL21 cells and purified TS protein were detected with SDS-PAGE and stained with coomassie blue. 1: Marker. 2: The crude extract (30 μg). 3: The purified zebrafish TS protein (15 μg).

2.2 TS与自身mRNA的体外结合实验

TS与自身mRNA的体外结合是通过凝胶迁移和紫外交联实验来分析的. EMSA实验结果表明(图2), 经6%非变性聚丙烯酰胺电泳, 转膜, 荧光曝光显示, 除了游离的标记斑马鱼全长TS mRNA外, 还有明显滞后条带(箭头所示), 说明斑马鱼的TS和其自身的mRNA有结合. 结合条带的位置靠近点样孔, 说明RNA结合蛋白质后, 电泳速率明显降低. 如在反应体系中, 同时加入斑马鱼的TS重组蛋白和牛血清白蛋白(BSA), 有滞后条带, 说明斑马鱼的TS蛋白能与斑马鱼的TS mRNA结合, 不能被其他蛋白质竞争抑制. 我们用非地高辛标记的TS mRNA进行竞争抑制试验, 则没有滞后带, 说明斑马鱼的TS和其自身的mRNA结合可以被过量抑制, 如用牛血清白蛋白(BSA)取代TS蛋白, 没有结合现象. 由以上的实验证据, 说明TS蛋白与TS mRNA在体外能相互作用.

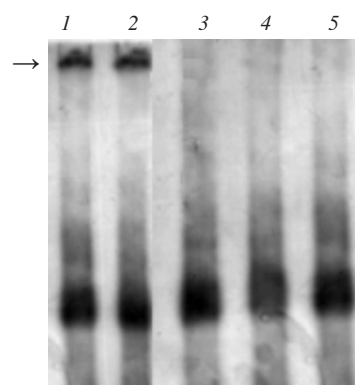


Fig. 2 Interaction between zebrafish His-tag TS protein and zebrafish TS mRNA

Gel mobility-shift assays were performed with digoxigenin labeled full-length zebrafish TS mRNA as probe. Samples were cultured 15min under room temperature and then resolved in a nondenaturing 6% acrylamide gel as described in **Materials and methods**. The specific complex is indicated (arrow). 1: 1.0 μg of recombinant zebrafish TS; 2: 1.0 μg of recombinant zebrafishTS and 1.0 μg of bovine serum albumin; 3: 100-fold molar excess competitor TS RNAs; 4: 1.0 μg of bovine serum albumin; 5: 200 ng of Dig-labeled zebrafish RNA.

为了进一步确定斑马鱼TS蛋白和斑马鱼TS mRNA在体外的相互作用, 我们将地高辛标记的TS mRNA和纯化的TS蛋白在紫外线下交联, 形成稳定的复合物, 然后经SDS-PAGE, 检测结果显示, 复合物的分子质量大小约为80 ku (图3). 另外, 同凝胶迁移试验相似, 我们用BSA蛋白取代TS, 就没有特异条带, 在加入TS RNA前, 先加入鼠抗人单克隆抗体TS106, 则使斑马鱼的TS蛋白丧失了与

mRNA结合的能力, 在80 ku处没有条带。

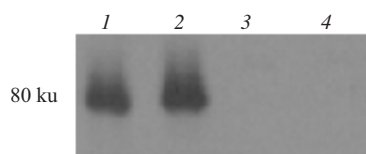


Fig. 3 UV crosslinking of TS RNAs with recombinant zebrafish TS protein

UV crosslinking was as described in **Materials and methods**. 1: 500 ng of recombinant zebrafish TS; 2: 500 ng of recombinant human TS; 3: 500 ng bovine serum albumin; 4: 500 ng of recombinant zebrafish TS protein was preincubated with 500 ng of TS106 antibody.

2.3 TS与自身mRNA的体内结合试验

TS与自身mRNA的体内结合是通过免疫共沉淀结合RT-PCR实验来分析的。利用鼠抗人单克隆抗体TS106免疫共沉淀, 得到的TS-RNP复合物直接加蛋白质上样缓冲液, 12% SDS-PAGE分离, 转膜, 蛋白质印迹, 实验结果显示, 鼠抗人单克隆抗体TS106能特异地免疫沉淀斑马鱼的TS蛋白(图4a)。纯化出的RNA进一步RT-PCR, 结果显示, 只有一条大小约为740 bp的条带, 如图4b所示。我们进一步对产物进行了测序分析, 结果见图5。PCR扩增产物是斑马鱼的TS编码区134~870区间的核

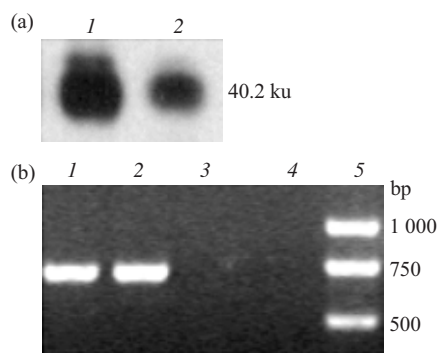


Fig. 4 Zebrafish TS protein associates with TS mRNA *in vivo*

(a) Western blot of total 24hpf zebrafish embryos lysate prior to immunoprecipitation (lane 1) and the fraction immunoprecipitation (lane 2) detected with human TS106 antibody. The position of the 40.2 ku molecular mass standard is shown. (b) Ethidium bromide stained 1.2% agarose gel showing RT-PCR products from PCR reaction using zebrafish TS740 primers. Immunoprecipitated nucleic acid treated with (lane 1, 2 and 4) or without (lane 3) reverse transcriptase and PCR amplified; whole embryos extracts were immunoprecipitated with TS106 monoclonal antibody (lane 1 to 3) or without antibody (lane 4). Lane 2, immunoprecipitated nucleic acid treated with DNase prior to reverse transcription. Lane 5 contains a DL2000 ladder size standard.

昔酸序列, 是我们的目的条带。而在免疫沉淀处理中不加抗体的处理和没有RT反应过程的, PCR结果中没有该条带。我们还对免疫沉淀后的复合物进行了DNase处理, 处理后RT-PCR的结果没有改变, 说明免疫沉淀得到的核酸是斑马鱼TS的mRNA, 而不是DNA。同时说明了在体内条件下, 斑马鱼TS蛋白与TS mRNA的结合。

```

1  cggagaaagc aagaaagaaa caaacggagg gaaaaaggag ttttctctct tttgcagca
61  acgcgggtat ttgagctcgg tggagtttat ttgcagaat ggagtaaaga aagcgcacag
121  gacaggcaca ggagtgatct ctgtgttcgg gacacaagcc agatacagtc tcagagatca
181  gtttcggttg ctgacgacca aaagagtitt ctggaaagcg atattggagg agctgctgtg
241  gttcatcaag ggttcaacaa acgccaaga tetgtcggag aagggtgtga ggatttggga
301  tgctaacggc tccagagagt ttctggataa gaacggattc accgatcggg aggaaggaga
361  tctgggtcca gtttatggat ttcagtggag gcatttttga gccgaataca aagatatgca
421  tactgattat tctggagaag gactcgatca gttacagaaa gttattgaca ccatcaagtc
481  aaaccagagc gaccgaagga tcatcatgtg tgcctggaat cctaaagatc tcctctgat
541  ggcgctgcgc cctgtcatg cgttgtgtca gttttacgtg tcgaacgggt agttgtactg
601  tcagctgtac cagcgatcgg gagacatcgg tctcgggtgc ccattcaaca tcgccagcta
661  cgccctgctg acctacatga tcgccacat cactggactc aagcctgggg atggcggttca
721  tacattaggt gacgccc

```

Fig. 5 Nucleotide sequence of RT-PCR product

3 讨 论

在本研究中, 我们用凝胶迁移和免疫共沉淀结合RT-PCR实验技术分析了斑马鱼TS蛋白与TS mRNA的结合情况。结果显示, 在体内外条件下, 斑马鱼TS蛋白能与自身mRNA结合。这是首次在斑马鱼中揭示这一代谢现象, 因为斑马鱼是生物学领域中公认的研究脊椎类生物的模式生物, 是研究抗肿瘤药物筛选的理想整体动物模型, 胸苷酸合成酶又是重要的抗肿瘤药物作用靶点, 所以我们的研究对揭示胸苷酸合成酶的调控现象非常有意义。在实验中我们还发现, 紫外交联后, 结果显示复合物的分子质量大小约为80 ku, 这与以前报道人TS的情况相似^[9]。另外, 鼠抗人单克隆TS106能与斑马鱼的TS蛋白很好地结合, 免疫共沉淀TS和RNA复合物, 这也说明了人与斑马鱼的TS蛋白, 在基因序列和蛋白质结构上都有很高的同源性, 两者都能与TS mRNA结合。

我们前期工作证实, 人和大肠杆菌TS基因的表达调控是多水平控制的, 尤其在翻译水平上具有负反馈抑制现象, 即在正常生理条件下, TS蛋白可与自身的mRNA结合, 形成TS-mRNA复合物, 使TS mRNA的翻译受到抑制^[12]。现在我们发现, 斑马鱼TS蛋白也可与自身的mRNA结合, 成

TS-mRNA复合物, 这些证据表明在斑马鱼中, 斑马鱼的胸苷酸合成酶基因在翻译水平上极可能具有与人和大肠杆菌同样的自调控现象. 在人的TS mRNA分子上具有2个与TS结合的位点, 一个是mRNA分子5'端包含起始密码子AUG的30个核苷酸序列构成的茎环结构, 另一个是TS编码区480~550区间的70个核苷酸序列^[13, 14]. 虽然我们发现斑马鱼胸苷酸合成酶的基因结构和氨基酸序列与人具有高度的相似性, 嘧啶结合域的同源性为100%^[8], 但在斑马鱼的TS mRNA中没有发现与人相应的TS蛋白结合位点核苷酸序列, 可能在斑马鱼TS mRNA上结合TS蛋白的核苷酸序列与人的不同, 我们将进行下一步的工作, 确定两者结合方式和结合区结构特点.

前期研究表明, TS易受以TS为靶酶抗肿瘤药物的诱导而表达水平提高, 继而产生对药物的抗性^[15]. 临床上常用的抗肿瘤药物5-FU、ZD1694等产生的抗药性与胸苷酸合成酶(TS)的翻译调控具有密切关系^[6, 16]. 5-FU在体内代谢, 最终转变为活性代谢产物5-FdUMP, 能与TS结合, 影响dUMP与TS的结合. 在肿瘤细胞中, 5-FU可使TS蛋白的表达量提高2~5倍, 在动物模型中, 用5-FU处理小鼠, 7天后可使TS蛋白的表达量提高2~3倍^[17]. 关于5-FU、ZD1694等对斑马鱼TS蛋白表达以及TS mRNA的影响, 我们实验室正在进行这方面的研究, 以期全面揭示斑马鱼中TS的翻译水平上的调控方式和药物对其影响, 为获取新型抗肿瘤药物打下基础.

我们对TS翻译调控机制进行了研究, 进一步明确了斑马鱼相应生物学过程与人的相关性, 为发展斑马鱼作为抗肿瘤药物研究模型提供理论基础, 为人肿瘤治疗研究提供高效简便可靠的动物模型. 在整体动物水平上阐明肿瘤细胞产生抗药性的机制, 为肿瘤治疗提供新的思路, 为发现新的抗肿瘤药物提供高效、方便、可靠的研究手段.

致谢 感谢美国耶鲁大学医学院的Edward Chu教授赠送鼠抗人单克隆抗体TS106; 感谢山东大学生命科学学院张举仁教授对本文的修改.

参考文献

- 1 牛荣丽, 阎松, 杜长青, 等. 抗肿瘤新药的新型模式生物斑马鱼. 新药研究杂志, 2006, **15** (7): 496~500
Niu R L, Yan S, Du C Q, *et al.* Chinese Journal of New Drugs, 2006, **15** (7): 496~500
- 2 Cox K, Robertson D, Fites R. Mapping and expression of a bifunctional thymidylate synthase, dihydrofolate reductase gene from maize. Plant Molecular Biology, 1999, **41** (6): 733~739
- 3 Carreras C W, Santi D V. The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. Annu Rev Biochem, 1995, **64**: 721~762
- 4 Chu E, Allegra C J. The role of thymidylate synthase as an RNA binding protein. Bioessays, 1996, **18** (3): 191~198
- 5 Costi M P, Ferrari S, Venturelli A, *et al.* Thymidylate synthase structure, function and implication in drug discovery. Current Medicinal Chemistry, 2005, **12** (19): 2241~2258
- 6 Liu J, Lin X K, Chu E, *et al.* Thymidylate synthase as a translational regulator of cellular gene expression. Biochim Biophys Acta, 2002, **1587** (2~3): 174~182
- 7 杜长青, 牛荣丽, 张培军, 等. 斑马鱼胸腺苷酸合成酶基因的克隆与表达. 高技术通讯, 2006, **16** (4): 420~424
Du C Q, Niu R L, Zhang P J, *et al.* Chinese High Technology Letters, 2006, **16** (4): 420~424
- 8 Du C Q, Niu R L, Zhang P J, *et al.* Sequence analysis and functional study of thymidylate synthase from zebrafish. J Biochem, 2006, **139** (5): 913~920
- 9 Chu E, Vonna V, Koeller D M, *et al.* Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (2): 517~521
- 10 Francoise R M, Tina G, Yaacov B D, *et al.* Heterogeneous nuclear rionucleoprotein A1 and regulation of the xenobiotic-inducible gene cyp2a5. Molecular Pharmacology, 2002, **61** (4): 795~799
- 11 Niranjankumari S, Lasda E, Brazas R, *et al.* Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions *in vivo*. Methods, 2002, **26** (1): 182~190
- 12 Chu E, Cogliati T, Copur S M, *et al.* Identification of *in vivo* target RNA sequences bound by thymidylate synthase. Nucleic Acids Res, 1996, **24** (16): 3222~3228
- 13 Lin X K, Parsel L A, Voeller D M, *et al.* Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein coding region of thymidylate synthase mRNA. Nucleic Acids Res, 2000, **28** (6): 1381~1389
- 14 Lin X K, Liu J, Chu E, *et al.* Role of cysteine amino acid residues on the RNA binding activity of human thymidylate synthase. Nucleic Acid Res, 2003, **31** (16): 4882~4891
- 15 Oguri T, Achiwa H, Bessho Y, *et al.* The role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in resistance to 5-fluorouracil in human lung cancer cells. Lung Cancer, 2005, **49** (3): 345~351
- 16 Schmitz J C, Yu D, Agrawal S, *et al.* Effect of 2'-O-methyl antisense ORNs on expression of thymidylate synthase in human colon cancer RKO cells. Nucleic Acids Res, 2001, **29** (2): 415~422
- 17 Peters G J, Backus H H, Freemantle S, *et al.* Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. Biochim Biophys Acta, 2002, **1587** (2~3): 194~205

Zebrafish Thymidylate Synthase Binds to Its Own mRNA *in vitro* and *in vivo**

SONG Chun-Xia^{1,2)}, NIU Rong-Li³⁾, DU Chang-Qing⁴⁾, YANG Shao-Li³⁾, LIN Xiu-Kun^{3)**}

¹⁾College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China; ²⁾ Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China;

³⁾Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

⁴⁾Weifang Medical University, Weifang 261042, China)

Abstract Thymidylate synthase (TS), an essential enzyme for DNA *de novo* synthesis, is a critical therapeutic target in cancer therapy. Previous study has shown that TS was able to bind to its own mRNA in human and *E.coli*, resulting in translational repression. Zebrafish is the best animal model for vertebrate study. In order to study the regulatory mechanism of zebrafish TS, the enzyme were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and it was purified to homogeneity. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was used to detect the interaction of zebrafish TS protein and its own TS transcript *in vitro* and the results showed that zebrafish TS could bound with its own mRNA specifically. Further study revealed that zebrafish TS was able to interact with its own mRNA *in vivo* using immunoprecipitation : RT-PCR technique. The results provide evidence that zebrafish may be developed as an useful model for studying the anti-metabolism agents.

Key words zebrafish, thymidylate synthase, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), protein-RNA interaction, immunoprecipitation : RT-PCR

*This work was supported by grant from The National Natural Science Foundation of China (40506031, 30472043) and Natural Science Foundation of Shandong Province (Q2005C06).

**Corresponding author. Tel: 86-532-82898893, E-mail: linxiukun@yahoo.com

Received: May 22, 2007 Accepted: August 19, 2007