

# The Molecular Cloning and Bioactivity Characterization of Unknown Gene 1C10 from Medicinal Fungus *Agrocybe aegerita*

Yi Liang<sup>1\*</sup>, Lianxian Guo<sup>2\*</sup>, Hui Sun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan

<sup>2</sup>Department of Occupational and Environmental Health, Guangdong Medical College, Dongguan

<sup>3</sup>The College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan

Email: liangyi@gdmc.edu.cn

Received: Feb. 29th, 2012; revised: Mar. 9th, 2012; accepted: Mar. 10th, 2012

**Abstract: Objective:** The antitumor-associated gene of *Agrocybe aegerita* was cloned to identify the bioactivity. **Method:** cDNA library was constructed and the gene 1C10 was obtained by random sequencing. The differential expression of the gene was analyzed by high-throughout sequencing. The eukaryotic expression vector was constructed to detect cell apoptosis and senescence activity. **Result:** The gene of 1C10 was cloned with 728 bp and 107 amino acid residues. The high-throughout sequencing analyse showed that 1C10 was highly expressed in the fruiting body. The expression in HeLa cells could induce the cell apoptosis instead of senescence. **Conclusion:** 1C10 was identified to have antitumor activity by cDNA library and sequencing, which was fundation for further study.

**Keywords:** Medicinal Fungus; Antitumor Activity; cDNA Sequence

## 药用真菌杨树菇未知基因 1C10 克隆及其抗肿瘤活性初步鉴定

梁一<sup>1\*</sup>, 郭莲仙<sup>2\*</sup>, 孙慧<sup>3</sup>

<sup>1</sup>广东医学院检验学院临床免疫教研室, 东莞

<sup>2</sup>广东医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生教研室, 东莞

<sup>3</sup>武汉大学生命科学院, 武汉

Email: liangyi@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2012 年 2 月 29 日; 修回日期: 2012 年 3 月 9 日; 录用日期: 2012 年 3 月 10 日

**摘要: 目的:** 克隆杨树菇抗肿瘤相关蛋白基因, 初步鉴定其活性。 **方法:** 构建 cDNA 文库, 随机测序得到杨树菇基因 1C10。高通量测序分析其在菌丝体和子实体的差异表达。构建真核表达质粒检测其在 HeLa 细胞中表达引起的细胞凋亡及衰老的变化, 初步鉴定其抗肿瘤活性。 **结果:** 得到全长为 728 bp 的杨树菇基因 1C10, 编码 107 个氨基酸, 高通量测序分析发现其在子实体中为高表达。在真核细胞中表达会引起肿瘤细胞的凋亡而非衰老。 **结论:** 通过构建 cDNA 文库及测序初步鉴定出具抗肿瘤活性的杨树菇未知基因 1C10, 为进一步研究其活性及机理奠定基础。

**关键词:** 药用真菌; 抗肿瘤活性; cDNA 序列

### 1. 引言

药用真菌因其独特的药理活性被越来越多的研

究者关注<sup>[1-3]</sup>。其中蛋白质组分占子实体干重约 10%~40%<sup>[4]</sup>, 但长期以来, 仅有上百种蛋白/多肽被分离, 且多集中在对其氨基酸组成、活性分析等初步研究。

\*equal author contribution.

已有十多种药用真菌蛋白被报道具很强的抗肿瘤活性(nM 级)<sup>[5,6]</sup>, 包括凝集素、核糖体失活蛋白、核糖核酸酶、泛素类蛋白、抗真菌蛋白等, 提示蛋白质是药用真菌中另一类重要的抗肿瘤活性组分<sup>[7]</sup>。

相对于多糖, 药用真菌的抗肿瘤活性蛋白研究不足的原因, 可能是由于药用真菌基因组信息缺乏, 不易克隆蛋白基因序列的缘故。目前随着高通量测序技术的成熟, 国内外学者也都致力于对药用真菌基因组的测序工作。2006 年, 来自 19 个大学的研究人员组成的团队开始首次对食用菌平菇 *Pleurotus ostreatus* 基因组测序, 2007 年开始对双胞蘑菇 *Agaricus bisporus* 的基因组测序, 目前这些项目均已完成<sup>[8]</sup>, 极大地推动了药用真菌活性蛋白的研究工作。药用真菌杨树菇活性蛋白在体内和体外试验中均表现出显著的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>, 本文通过构建 cDNA 文库测序的方法, 克隆药用真菌杨树菇 *Agrocybe aegerita* 具抗肿瘤活性的未知基因, 并对其进行初步活性鉴定。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

杨树菇(*Agrocybe aegerita*)子实体由华中农业大学食用菌研究所培育, 品种为杨树菇 3 号, 采集之后迅速冷冻于液氮罐中保存。RNA 提取试剂盒是 Qiagen 公司的 RNeasy Plant Mini Kit, SMART cDNA Library Construction Kit 购于 Clontech 公司。真核表达载体 pGFP-C1 系本实验室保存, HeLa 细胞购于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 转染试剂为 invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000。衰老相关  $\beta$ -galactosidase 检测试剂盒购自上海杰美生物公司, 碘化丙啶 PI 购于武汉大风生物技术有限公司。

### 2.2. cDNA 文库及基因测序

使用 RNeasy Plant Mini Kit 提取杨树菇子实体总 RNA, 按照 SMART cDNA Library Construction Kit 说明书构建 cDNA 文库。即在合成 cDNA 的反应中事先加入的 3'末端带 Oligo (dG)的 SMART 引物, 由于逆转录酶以 mRNA 为模板合成 cDNA, 在到达 mRNA 的 5'末端时碰到真核 mRNA 特有的“帽子结构”, 即甲基化的 G 时会连续在合成的 cDNA 末端加上几个 (dC), SMART 引物的 Oligo (dG)与合成 cDNA 末端突

出的几个 C 配对后形成 cDNA 的延伸模板, 逆转录酶会自动转换模板, 以 SMART 引物作为延伸模板继续延伸 cDNA 单链直到引物的末端, 这样得到的所有 cDNA 单链的一端有含 Oligo (dT)的起始引物序列, 另一端有已知的 SMART 引物序列, 合成第二链后可以利用通用引物进行扩增。由于有 5'帽子结构的 mRNA 才能利用这个反应得到能扩增的 cDNA, 因此扩增得到的 cDNA 就是全长 cDNA。

对文库进行随机测序, 得到的序列用 CodonCode Aligner 软件去掉低质量序列、载体序列、重复序列等, 用 Phrap 拼接同源 EST, 并与 NCBI 非冗余蛋白库比对(BLASTX)。

### 2.3. 转录组测序

提取样品总 RNA 后, 用带有 Oligo (dT)的磁珠富集 mRNA。加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(random hexamers)合成第一条 cDNA 链, 然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链, 在经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly(A)并连接测序接头, 然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增, 建好的测序文库用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。测序得到的原始图像数据经 base calling 转化为序列数据, 结果以 fastq 文件格式存储, 包括 reads 的序列以及 reads 的测序质量。

### 2.4. 真核表达质粒构建及转染

通过引物 Forward: ccgaattccatggcagttctctgctg, reverse: cggggtacctcatgcatccatgggtg, 将 1C10 基因克隆到真核表达载体 pGFP-C1 上。HeLa 细胞按每孔约  $3 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔细胞培养板, 37℃ 培养过夜, 待细胞密度为 80%~90% 使用 Lipofectamine 2000 转染真核表达质粒。

### 2.5. PI 染色及流式细胞仪分析

按照上述方法转染待质粒, 继续培养 48 hr。使用荧光显微镜检测转染效率。细胞用 PBS 重悬洗涤 1 次, 75% 乙醇重悬后, 加 RNase A (终浓度 0.25 mg/ml) 37℃ 孵育 1 hr, 终浓度 50 mg/ml 的碘化丙啶 4℃ 避光

染色 30 min, 流式细胞计数仪检测荧光强度分布(激发波长 488 nm)。

## 2.6. 衰老相关 $\beta$ -galactosidase 检测

按照上述方法转染质粒, 使用  $\beta$ -galactosidase 衰老相关试剂盒里对细胞进行染色, 细胞呈现蓝色部位为衰老细胞特异性酶( $\beta$ -半乳糖苷酶)活性位点。

## 2.7. 统计学方法

应用统计软件 SPSS13.0 进行数据分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验,  $p < 0.05$  有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 1C10 基因序列及数据分析

杨树菇 cDNA 文库构建成功, 随机测序获得杨树菇 *Agrocybe aegerita* 1C10 序列(如图 1 所示), 长 728bp。用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析其开放阅读框, 5'-非翻译区为 28 bp, 3'-非翻译区 376 bp, 其中末尾有 18 bp 的 poly-A。含有长 324 bp 的开放阅读框(包括一个终止密码子), 编码 107 个氨基酸。使用 BLASTP 搜索数据库, 未找到相似度较高的氨基酸序列这一结果表明 1C10 序列是杨树菇中全新基因。

### 3.2. 1C10 基因在杨树菇菌丝体和子实体的差异表达

分别提取杨树菇菌丝体和子实体的总 RNA, 在华东基因研发中心使用 Illumina HiSeq 2000 进行测序。原始测序结果进行去除杂质和组装处理, 得到尽可能长的非冗余 Unigene。将 1C10 基因与 Unigene 进行比对, 分别得到其在菌丝体和子实体中的 reads 数分别为 5 和 342, 如表 1 所示。为消除基因长度和测序量差异对计算基因表达的影响<sup>[9]</sup>, 使用 RPKM 法对 Unigene 的表达量进行统计, 在菌丝体和子实体中分

别为 0.7471 和 50.8093。这说明 1C10 基因在菌丝体和子实体中均有表达, 但在子实体中为高表达。

## 3.3. 真核表达质粒构建及转染

PCR 扩增连在 cDNA 文库构建质粒载体 pDNR-lib 上的 1C10 基因, 扩增结果如图 2(a), 将基因克隆到 pEGFP-C1 载体上, 酶切鉴定结果如图 2(b)。真核表达载体构建完成后, 用 pEGFP-C1 空载体作为对照, 以相同的量转染入 6 孔板的 HeLa 细胞, 48 小时后通过标签 GFP 在荧光显微镜下检测转染效率, 图 2(c)表明转染效率可达 80% 以上。

### 3.4. 1C10 表达对 HeLa 细胞的影响

使用碘化丙啶染色以及流式细胞仪分析发现, 1C10 基因的表达可引起 HeLa 细胞亚二倍体峰细胞群也就是凋亡细胞数目的增多, 如图 3(a)所示。转染空质粒对照凋亡峰只有 2.24%, 而 1C10 基因的表达诱导细胞出现 24.6% 的亚二倍体峰, 说明 1C10 的表达可显著诱导细胞出现凋亡。

转染质粒 48 小时后, 使用衰老相关  $\beta$ -galactosidase 检测试剂盒对细胞进行染色, 光学显微镜观察, 每个样品随机选取 4 个视野, 计算 SA- $\beta$ -Gal 呈阳性反应的细胞比例, 统计结果如图 3(b)所示, 转染 1C10 基因与对照组相比没有显著性差异。

## 4. 讨论

药用真菌中蛋白组分的研究十分不足, 重要原因之一在于其基因信息的缺乏。由于其繁殖特点(有性或无性繁殖, 菌丝的异宗结合, 不同遗传背景的菌丝纽结成子实体等特点), 使得基因克隆非常困难, 因此, 构建 cDNA 文库结合表达序列标签分析将有助于获得大量基因信息, 从而推动对药用真菌抗肿瘤蛋白的研究。

1C10 基因在数据库中未检索到相似度较高的基因, 属杨树菇新基因。通过高通量测序的 Unigene 表

Table 1. The differential expression of 1C10 in mycelium and fruiting body of *Agrocybe aegerita*  
表 1. 1C10 基因在杨树菇菌丝体(M)和子实体(F)中的差异表达分析

Identity (%)	E-value	Unigene length	M rawreads	F rawreads	M_ RPKM	F_ RPKM	Log2 (F_ RPKM/ M_ RPKM)
95.61	0	808	5	342	0.7471	50.8093	6.08

M: mycelium, F: fruiting body.

```

1           M V S S V V A V D P A R P K P G
1 ggggactgctcaaaaccaaacacgaccATGGTCAGTTCGTGCTGCTGTTGACCCCGCCGCGGAAGCCAGG
17 Y P R T N A G N Q R M S A T M E E T D T I N V H L
76 ATATCTCGCACAACCGCTGGAAACCAACGCATGTCGGCCACCATGGAAGAACTGACACAATCAATGTCACCT
42 L A L L Q L L S P V D P H Y T A W Q F P C E R Y K
151 GTTGGCTTCTTCCAACCTTTGTCGCCCGTGGATCCCACTATACGGCGTGGCAGTTCCCTGCGAGAGGTACAA
67 N C S T K S A H S K A T S P N C S P C S T T Y N W
226 GAACTGCAGCAGAAATCAGCGCACTCGAAGGCGACCTCACCGAATGCTCCCATGCTCGACCACTACAACCTG
92 W M T S E F S R E S W T P W I A *
301 GTGGATGACGTGCGAATTTCAAGAGAATCGTGGACACCATGGATCGCATGAgggatagaatctatgagcagcgc
376 accaagatatccgagatagaggacgttgttcgcgctctttgcaccacaacacagggcgcccgatgcaaacctct
451 acttagccatcgctccgccaaaagaacgtagctggaccatgatcccttatgcccgctctagaccgaagaa
526 gaattttttcgggggttgtttcggaagtacgtccatataagtagagggccacaaaagcctcgtttctctcttc
601 ttccctgacatccgctttctggggttgattctcataattcatgttaaagtcttgtaattactctagagctctt
676 cgcaactcaagatcgcttcatccacaaaagaaaaaaagaaatcatgt
    
```

Figure 1. The gene from *Agrocybe aegerita* and the deduced amino acid sequence  
图 1. 杨树菇 *Agrocybe aegerita* 1C10 基因序列及氨基酸序列

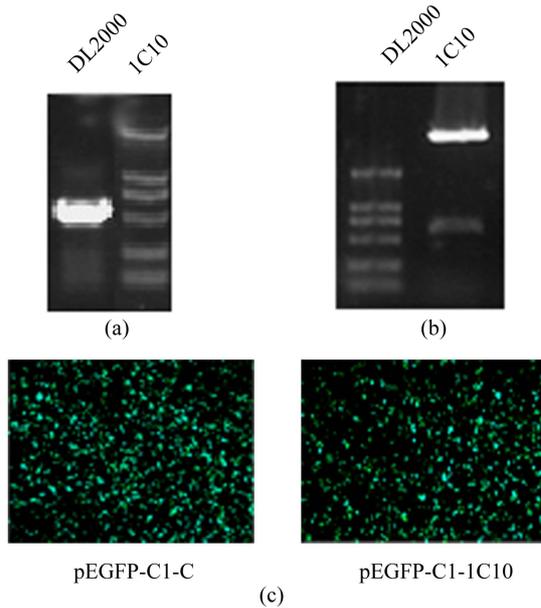


Figure 2. The construction and the transformation of the plasmid pEGFP-C1-1C10. (a) The PCR result of 1C10; (b) The result of enzyme digestion of the plasmid pEGFP-C1-1C10; (c) The transformation of the plasmid pEGFP-C1-1C10. The plasmid with GFP-tag was transformed into HeLa cells, and after 48 h the result was observed and pictured by fluorescence microscope (pEGFP-C1-C was the control)

图 2. pEGFP-C1-1C10 真核质粒构建及转染。(a) 1C10 基因扩增; (b) pEGFP-C1-1C10 质粒酶切鉴定结果; (c) pEGFP-C1-1C10 质粒转染, 带有 GFP 标签的质粒转染 HeLa 细胞, 48 小时后荧光显微镜观察并照相(pEGFP-C1-C)为空载体对照

达差异分析发现, 1C10 基因在子实体中有高表达, 菌丝体中表达量较低。在真核细胞中 1C10 表达可以引起 HeLa 细胞的凋亡, 该分子的活性及作用机制值得进一步研究。

cDNA 文库构建的质量很大程度上反应在重组 cDNA 片段的序列完整性, 要从文库中分离获得目的基因完整的序列和功能信息, 要求文库中的重组 cDNA 片段足够长以便尽可能地反应出天然基因

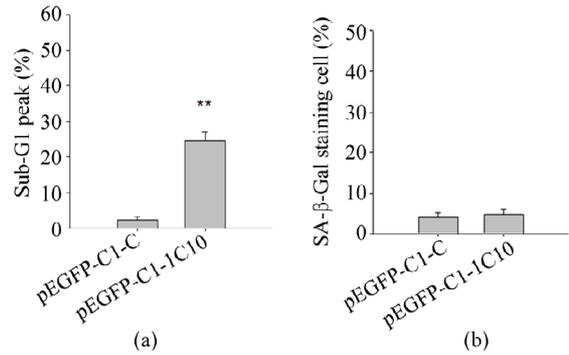


Figure 3. The effect of the expression of 1C10 on HeLa cells. (a) The plasmids were transformed into HeLa cells, and after 48 h, the cells were detected by PI staining and flow cytometry. pEGFP-C1-C was used as blank control, and the statistical data was collected by three experiments performed. \*\* indicated that  $p$  value < 0.01; (b) The cells was stained for 16 h by the senescence associated  $\beta$ -galactosidase detection kit, and the percentage of positive cells was statistically collected in the four microscopic fields random selected

图 3. 检测 1C10 基因表达对 HeLa 细胞的影响。(a) 转染质粒 48 小时后, PI 染色结合流式细胞仪检测细胞。pEGFP-C1-C 为转入空质粒对照, 三次流式试验的统计学数据, \*\*表示  $p < 0.01$ ; (b) 使用衰老相关  $\beta$ -galactosidase 检测试剂盒染色 16 小时, 随机挑选 4 个视野计数阳性反应即衰老细胞比例的统计数据

的结构。本文使用基于 SMART 技术构建文库的方法, 根据其原理应该是全长的 cDNA。由测序结果也看到本实验中构建的 cDNA 文库比较成功, 测序得到的 246 条 EST 序列, 大部分(>70%都可以找到 ORF, 以及 5' 上游的终止密码子以及 3' 的 polyA 序列, 说明 SMART 技术是比较成熟的适用于构建全长 cDNA 文库的方法。

本文通过 cDNA 文库构建及测序, 快速对杨树菇大量基因信息进行分析, 并进一步通过构建真核表达质粒, 转染入 HeLa 细胞中, 初步筛选到多个具有抗肿瘤活性的基因, 包括泛素蛋白酶系统相关分子, 及本文的 1C10 等分子, 说明该方法对快速大量地研究

未知基因种群的活性蛋白具有优势，值得重视。

## 5. 致谢

感谢国家自然科学基金(No. 81102850)，广东省医学科研基金(A2011434)，东莞市高等院校科研项目基金(No. 2011108102049)及广东医学院博士启动基金项目(XB1106)给予本研究的支持。

## 参考文献 (References)

- [1] A. T. Borchers, C. L. Keen and M. E. Gershwin. Mushrooms, tumors, and immunity: An update. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(5): 393-406.
- [2] A. T. Borchers, J. S. Stern, R. M. Hackman, et al. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999, 221(4): 281-293.
- [3] B. Z. Zaidman, M. Yassin, J. Mahajna, et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(4): 453-468.
- [4] W. Breene. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 1990, 53(10): 883-894.
- [5] T. B. Ng. Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 2004, 25(6): 1055-1073.
- [6] N. T. Wang, V. E. C. Ool. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 1998, 102(8): 897-906.
- [7] C.Y. Liang, H. H. Liu, R. Luan, T. Che, S. Jiang, D. Y. Xie and H. Sun. The tumor rejection effect of protein components from medicinal fungus. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2011, 1(4): 245-254.
- [8] <http://www.jgi.doe.gov/>
- [9] A. Mortazavi, B. A. Williams, K. McCue, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621-628.