

The Molecular Cloning and Antitumor Activity Characterization of SUMO from Medicinal Fungus *Agrocybe aegerita*

Yi Liang¹, Juan Bai², Hui Sun³

¹Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan

²Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou

³The College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan

Email: liangyi@gdmc.edu.cn

Received: May 18th, 2012; revised: May 25th, 2012; accepted: Jun. 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 SUMO was obtained by random sequencing. The eukaryotic expression vector was constructed to detect cell apoptosis and senescence activity. **Result:** The gene of SUMO was cloned with 606 bp and 103 amino acid residues. The expression in HeLa cells could induce the cell apoptosis instead of senescence. **Conclusion:** SUMO from medicinal fungus worth to be investigated for the discovery of new antitumor medicine.

Keywords: Medicinal Fungus; SUMO; Antitumor Activity; Apoptosis

药用真菌杨树菇 SUMO 基因及抗肿瘤活性初步鉴定

梁一¹, 白娟², 孙慧³

¹广东医学院检验学院, 临床免疫教研室, 东莞

²河南中医学院, 郑州

³武汉大学生命科学院, 武汉

Email: dianerliu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012 年 5 月 18 日; 修回日期: 2012 年 5 月 25 日; 录用日期: 2012 年 6 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 SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) 基因, 通过构建真核表达质粒, 并检测其在 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 606 bp 的 SUMO cDNA 序列, 编码 103 个氨基酸, 将表达 SUMO 的真核表达质粒转染入 HeLa 细胞中, 发现可引起肿瘤细胞的凋亡, 但对细胞衰老无影响。**结论:** 药用真菌中 SUMO 等小泛素类蛋白酶系统值得进一步研究, 有助于新型抗肿瘤药物前体的开发。

关键词: 药用真菌; SUMO; 抗肿瘤; 凋亡

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^[1-3]。其中蛋白质组分占子实体干重约 10%~40%^[4], 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。

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)^[5,6], 提示除多糖外, 蛋白质是药用真菌中另一类重要的抗肿瘤活性组分^[7]。本文通过构建 cDNA 文库测序的方法, 克隆到药用真菌杨树菇 *Agrocybe aegerita* 小泛素样修饰物(Small Ubiquitin-

like Modifier, SUMO)基因, 通过检测其表达在真核细胞中引起的细胞凋亡和衰老的变化, 初步鉴定其抗肿瘤活性。

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 β -galactosidase 检测试剂盒购自上海杰美生物公司, 碘化丙锭 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。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. 真核表达质粒构建及转染

通过引物 Forward: ccgaattccatgtctgacaccgagc, reverse: acgcgtcgacctaatgaggacatgaag, 将 SUMO 基因克隆到真核表达载体 pGFP-C1 上。HeLa 细胞按每孔约

3×10^4 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。

2.4. 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 的碘化丙锭 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)。

2.5. 衰老相关 β -galactosidase 检测

按照上述方法转染质粒, 使用 β -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(β -半乳糖苷酶)活性位点。

3. 结果

3.1. SUMO 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* SUMO 序列(如图 1 所示), 长 606 bp。用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析其开放阅读框, 5'-非翻译区为 137 bp, 3'-非翻译区 157 bp, 其中末尾有 30 bp 的 poly-A。含有长 312 bp 的开放阅读框(包括一个终止密码子), 编码 103 个氨基酸, 氨基酸序列分析显示其含有 SUMO 的特征序列。

杨树菇 SUMO 氨基酸序列用 BLASTP 搜索找出其相似度较高的氨基酸序列, 然后用 Clustal W2 比对序列, 如图 2 所示。*Agrocybe aegerita* SUMO 与 *Coprinos*

```

1  gggggacacgcaccccaacatcgctctctccctaaatccgcttcacactcaatttagcggttctataaa
1                                     M S D T E
76  gctagtctgcctctctctctctctctgaaatcaagttttcccccacgcgaccttggacaacgATGCTGACACCG
6  Q N Q S H V E P K A E D A N A T T I N I K V V S S T
151 AGCAAAACGAGCCATGTTGAGCCAAAGGCTGAGGACGCCAATGCCACCATTAAACATCAAGGTGGTGAGCTCAA
31  G D E V F F K I K R S T K L S K L Q G A Y A S K V
226 CTGGCGATGAAGTTTCTTCAAAATCAAGAGAAGTACGAAGCTCAGCAAGCTGCAGGGGGCGTACGCGAGCAAAG
56  G K D V G S I R F L Y D G T R I S D D D T P Q S L
301 TAGGGAAGGACGTTGGGAGCATTTCGATTTTGTACGATGGGACACGGATAAGCGACGATGACACCCACAATCGC
81  D M D D N D T I D V M V E Q V G G H L H V P H *
376 TCGACATGGACGACAACGATACTATTGATGTCATGGTAGAACAGGTTGGAGGCCATCTTCATGTCCTCATTAGG
451 tactggtaacccgtagaateccctcaatccaaattgcctcaactgcaatgggcccagtgctgtgtacattttcttgc
526 gctttgtattatcttttgtctatgataatcgctttttgaccttacaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
601 acatgt

```

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

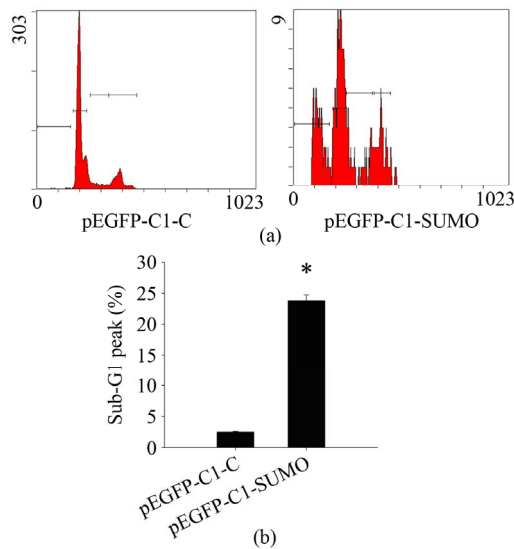


Figure 4. The pro-apoptotic effect of the expression of SUMO on HeLa cells. (a) The plasmids were transformed into HeLa cells, and after 48 h, the cells were detected by PI staining and flow cytometry. pEGFP-C1-C was used as blank control, and the left line indicated the sub-G1 peak; **(b)** The statistical data was collected by three experiments performed. * indicated that P value < 0.01

图 4. 流式细胞仪检测 SUMO 基因引起的 HeLa 细胞凋亡。(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, 图中左侧横线表示亚二倍体峰; **(b)** 三次试验的统计学数据, *表示 $P < 0.01$

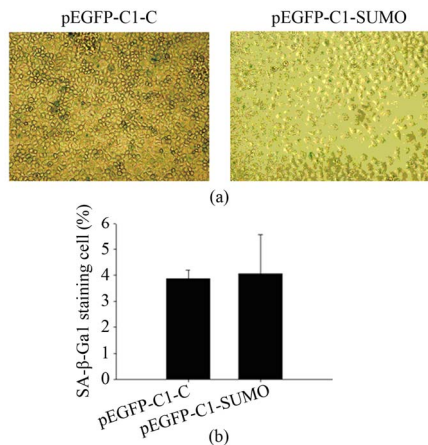


Figure 5. The senescence-induced effect of the expression of SUMO on HeLa cells detected by SA-β-Gal staining. (a) The plasmids were transformed into HeLa cells, and the cells were stained for 16 h by the senescence associated β-galactosidase detection kit. Blue cells indicated the positive signals which were senescence cells; **(b)** The percentage of positive cells was statistically collected in the four microscopic fields random selected, and $P > 0.05$

图 5. SA-β-Gal 染色检测衰老细胞。(a) 转染后, 使用衰老相关 β-galactosidase 检测试剂盒染色 16 小时, 光学显微镜 200×, 其中蓝色为阳性反应, 即出现衰老的细胞; **(b)** 每个样品随机挑选 4 个视野计数的统计数据。 $P > 0.05$

泛素高相似性的糖蛋白具有抑制 HIV, 抑制蛋白翻译和核糖核酸酶活性^[9]; 马勃菌中分离的 N 端序列与泛素高相似性的蛋白短肽具有抑制增殖, 及有丝分裂的活性^[10]。说明药用真菌中的泛素类蛋白酶系统中的分子十分值得进一步研究, 尤其是肿瘤细胞会产生更多的癌蛋白以及非正常蛋白质分子, 比正常细胞对泛素类蛋白酶系统的药物反应更灵敏, 因此研究此类蛋白更有助于我们开发靶向型的抗肿瘤药物。

5. 致谢

感谢国家自然科学基金(No. 81102850), 广东省教育厅育苗工程项目(No. LYM11070), 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* (Maywood), 2004, 229(5): 393-406.
- [2] A. T. Borchers, J. S. Stern, R. M. Hackman, C. L. Keen and M. E. Gershwin. 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 and S. P. Wasser. 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] H. X. Wang, N. B. Ng and V. E. C. Ool. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*. 1998, 102(8): 897-906.
- [7] Y. Liang, Y. C. Chen, 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] P. H. Ngai, H. X. Wang and T. B. Ng. Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides*, 2003, 24(5): 639-645.
- [9] H. X. Wang, T. B. Ng. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 276(2): 587-593.
- [10] Y. W. Lam, T. B. Ng and H. X. Wang. Antiproliferative and antimetastatic activities in a peptide from puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(3): 744-749.