

The Molecular Cloning and Bioactivity Characterization of Calmodulin from Medicinal Fungus *Agrocybe aegerita*

Yi Liang¹, Hui Sun²

¹Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan

²The College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan

Email: liangyi@gdmc.edu.cn

Received: Mar. 29th, 2012; revised: Apr. 9th, 2012; accepted: Apr. 24th, 2012

Abstract: Objective: The antitumor-associated gene of *Agrocybe aegerita* was cloned to identify the bioactivity. **Method:** cDNA library was constructed and the gene calmodulin was obtained by random sequencing. The eukaryotic expression vector was constructed to detect cell apoptosis and senescence activity. **Result:** The calmodulin gene was cloned with 588 bps code for 150 amino acid residues, and the amino acid sequence was very conserved in calmodulin family. The expression of cloned gene in HeLa cells did not induce the cell apoptosis or senescence. **Conclusion:** The sequence of calmodulin contained conserved motif and belonged to calmodulin family.

Keywords: Medicinal Fungus; CaM; cDNA Sequence

药用真菌杨树菇钙调素基因及活性初步鉴定

梁一¹, 孙慧²

¹广东医学院检验学院, 临床免疫教研室, 东莞

²武汉大学生命科学院, 武汉

Email: liangyi@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2012年3月29日; 修回日期: 2012年4月9日; 录用日期: 2012年4月24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钙调素(calmodulin, CaM)基因, 并对其进行生物信息学分析, 通过检测其在 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 588 bp 的杨树菇钙调素 cDNA 序列, 编码 150 个氨基酸, 其氨基酸序列在整个钙调素家族中十分保守。钙调素基因在真核细胞中表达没有引起肿瘤细胞的凋亡和衰老。**结论:** 杨树菇钙调素序列具有 CaM 保守序列模式, 是 CaM 家族的成员。

关键词: 药用真菌; CaM; 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^[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]。

然而由于药用真菌基因组信息缺乏, 不易克隆蛋白基因序列, 药用真菌的抗肿瘤活性蛋白研究十分不足。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, 极大地推动了药用真菌活性蛋白的研究。在之前的研究中, 杨树菇 *Agrocybe aegerita* 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^[7], 本文通过构建 cDNA 文库测序的方法, 克隆药用真菌杨树菇抗肿瘤活性相关基因并对其活性做初步筛选, 为研究抗肿瘤蛋白提供理论基础。

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. 真核表达质粒构建及转染

通过引物 Forward: cccaagcttgatggctgaccaactg, reverse: cggggtaccttactttgacaacatcatc, 将 CaM 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°C 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 h。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°C 孵育 1 h, 终浓度 50 mg/mL 的碘化丙啶 4°C 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。

2.6. 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. 钙调素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* 钙调素序列(如图 1 所示), 长 588 bp。用 NCBI 的 ORF Finder 程序分析其开放阅读框, 5'-非翻译区为 52 bp, 3'-非翻译区 86 bp, 其中末尾有 31 bp 的 poly-A。含有长 450 bp 的开放阅读框(包括一个终止密码子), 编码 150 个氨基酸。

杨树菇钙调素氨基酸序列用 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* CaM 与 *Schizophyllum commune* CaM(登录号 XP_003025993)、*Ganoderma lucidum* CaM(登录号 ADV17372)、*Postia placenta* CaM(登录号 XP_002473838)和 *Homo sapiens*

3.2. 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 CaM 基因, 扩增结果如图 4(a), 将基因克隆到 pEGFP-C1 载体上, 酶切鉴定结果如图 4(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 4(c) 表明转染效率可达 80% 以上。

3.3. 钙调素表达对 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, CaM 基因表达后, HeLa 细胞亚二倍体峰细胞群也就是凋亡细胞数目并没有增多, 如图 5(a)所示。转染空质粒凋亡峰为 $3.86\% \pm 0.32\%$, CaM 基因表达诱导细胞出现 $5.8\% \pm 1.9\%$ 的亚二倍体峰, 与对照组相比没

有显著性差异(图 5(b))。

转染质粒 48 小时后, 使用衰老相关 β -galactosidase 检测试剂盒对细胞进行染色, 每个样品随机选取 4 个视野, 计算 SA- β -Gal 呈阳性反应的细胞比例, 统计结果如图 5(c)所示, 转染 CaM 基因与对照组相比没有显著性差异。

4. 讨论

钙调素是细胞中重要的功能分子, 参与介导许多生理活动, 包括炎症反应、代谢、细胞凋亡、神经发育、免疫反应等^[9]。本研究得到杨树菇 *Agrocybe aegerita* 钙调素基因, 不仅与真菌钙调素同源性高, 与人类钙调素序列比对同源性也很高, 这说明钙调素分子序列在整个钙调素家族中都十分保守, 也间接说明该分子在细胞功能的重要性。

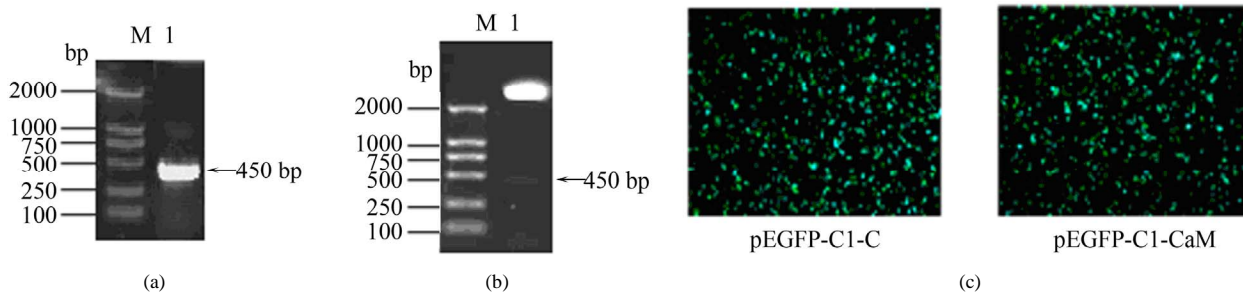


Figure 4. The construction and the transformation of the plasmid pEGFP-C1-CaM. (a) The PCR result of calmodulin, M: DL2000 Marker, 1: Amplification of calmodulin's ORF; (b) M: DL2000 Marker, 1: the result of enzyme digestion of the plasmid pEGFP-C1-calmodulin; (c) The transformation of the plasmid pEGFP-C1-calmodulin. The plasmid with GFP-tag was transformed into HeLa cells, and after 48h the result was observed and pictured by fluorescence microscope (pEGFP-C1-C was the control)

图 4. pEGFP-C1-CaM 真核质粒构建及转染: (a) 钙调素基因扩增, M: DL2000 Marker, 1 为钙调素 ORF 扩增结果; (b) M: DL2000 Marker, 1 为 pEGFP-C1-calmodulin 质粒酶切鉴定结果; (c) pEGFP-C1-CaM 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)

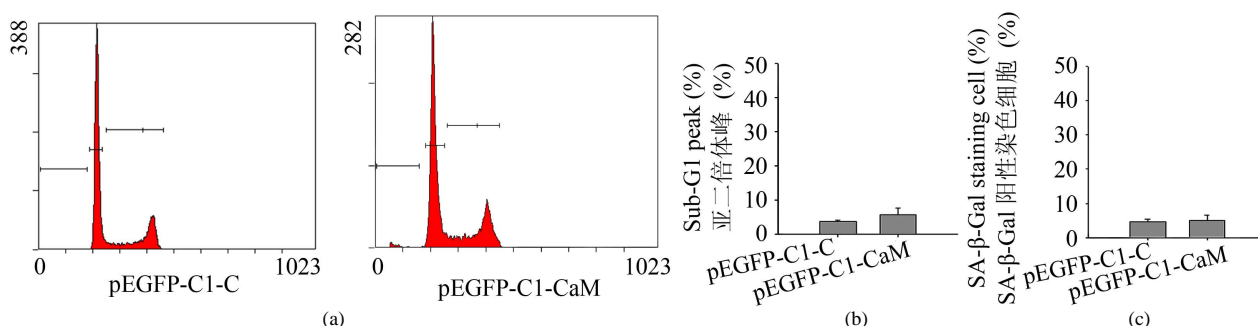


Figure 5. The effect of the expression of calmodulin on HeLa cells. (a) The plasmids were transformed into HeLa cells, and after 48 h, the cells were detected by PI staining and flow cytometry. pEGFP-C1-C was used as blank control, and the line on the left indicated sub-G1 peak; (b) The statistical data of three experiments performed in A; (c) The cells was stained for 16 h by the senescence associated β -galactosidase detection kit, and the percentage of positive cells was statistically collected in the four microscopic fields random selected

图 5. 检测钙调素基因表达对 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, 图中左侧横线表示亚二倍体峰; (b) 三次流式试验的统计学数据; (c) 使用衰老相关 β -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

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。本研究通过该方法结合构建真核表达质粒, 转染入HeLa细胞, 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, 及部分未知基因。真菌钙调素功能及作用机制各有不同, 例如病原真菌的钙调素分子可能参与帮助病原体存活^[10]。药用真菌的钙调素分子研究不多, 基于药用真菌独特的抗肿瘤作用, 本文检测了真核表达杨树菇钙调素的活性, 发现并没有引起肿瘤细胞的凋亡或衰老, 该结果可能与钙调素基因在整个家族中高度同源有关, 至于杨树菇钙调素的其他生物学功能需要在进一步的研究中做一阐明。

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

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, A. Krishnamurthy, C. L. Keen, et al. The immunobiology of mushrooms. *Experimental Biology and Medicine*, 2008, 233(3): 259-276.
- [3] 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.
- [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, H. X. Ool. V.E.C. 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] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, et al. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [9] M. J. de Carvalho, R. S. A. Jesuino, B. S. Daher, et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics Biology*, 2003, 39(3): 204-210.
- [10] P. R. Kraus, J. Heitman. Coping with stress: Calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(4): 1151-1157.