

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

Yi Liang<sup>1</sup>, Juan Bai<sup>2</sup>, Hui Sun<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou

<sup>3</sup>The 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<sup>1</sup>, 白娟<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>河南中医学院, 郑州

<sup>3</sup>武汉大学生命科学学院, 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<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。

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>, 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<sup>[7]</sup>。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 pGEFP-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。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: acgcgtcgacctaatgagggacatgaag, 将 SUMO 基因克隆到真核表达载体 pGEFP-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。

### 2.4. 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)。

### 2.5. 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。

## 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 *Coprinopsis*

```

1 gggggacaccgacacctccaacatcgccctcgctctcccccataatccgcttcataactcaatttagcggttctaaaaa
1 M S D T E
76 gctagtcgtccctttttctctctgaaatcaaggttttccccaccgcgcacccgtggacaacgATGTCTGACACCG
6 Q N Q S H V E P K A E D A N A T I N I K V V S S T
151 AGCAAAACAGAGGCCATGTTGAGCAAAGGCTGAGGAGCAGCCAATGCCACCATTAAACATCAAGGTGGTGAGCTCAA
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 CTGGCGATGAAGTTTCTCAAAATCAAGAGAAGTACGAAGCTAGCAAGCTGCAGGGCGTACCGAGCAAAG
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 TAGGGAAGGACGTTGGAGCATTGCGATTTGTACGATGGGACACGGATAAGCGACGATGACACCCCACAATCGC
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 TCGACATGGACGACAACGATACTATTGATGTCATGGTAGAACAGGTTGGAGGCCATCTCATGTCCTCATTAAGg
451 tactggtagcccgtagaatccctcaatccaaattgcctcaactgcaatggccagtgtctgtacatttcttgct
526 gctttgttatatctttgtctatgataatcgctttgacccataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
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

Agrocybe aegerita SUMO	MSDTEQNQSHVEPKAEDANATINIKVVSSTGDEVFFKIKRSTKLSKLQGAYASKVGKDVG	60
Coprinopsis cinerea SUMO	MSDEEQNNATQEVKTEDANAPINVKVVVASGEEVFFFKIKRSTKLSKLQGAYASKVGKDVN	60
Bigelowiella natans SUMO	-----MEETKDQKPNEHNLKVKSQDGNEVFFFVKKKTPFKRLMEAYCQKVGAEKS	51
Paracoccidioides brasiliensis SUMO	MDTTPQ---ENTSAAQPPSEHLNIKVTDDN-NEVFFKIKRSTQLKKLMEAFQCQRQGKDMT	56
	: . : * : ** . : * : * : * : * : * : * : * :	
Agrocybe aegerita SUMO	SIRFLYDGTRISDDDTPQSLMDNDTIDVMVEQVGGHLHVPH	103
Coprinopsis cinerea SUMO	SIRFLYDGSRIQEDDTPASLDMEDNDTIDVMVEQVGGARP---	100
Bigelowiella natans SUMO	SVRFLFDGDRISGDQTPADLDMQDEDEIDAMVQQTGGSW----	90
Paracoccidioides brasiliensis SUMO	QVRFLFDGTRVRQDDTPDTLDMADGDTLEVHQEQIGG-----	93
	: : *** : * * : * : * : * : * : * : * : *	

Figure 2. The amino acid sequence comparison of SUMO. “\*” meant identical residues, “:” meant conserved substitutions, “.” meant semi-conserved substitutions

图 2. 几种 SUMO 氨基酸序列比对结果。“\*”表示完全相同的氨基酸残基，“:”表示保守替换，“.”表示非保守替换

*cinerea* SUMO(登录号 BAF64517.1)、*Bigelowiella natans* SUMO(登录号 AAP34642.1)和 *Paracoccidioides brasiliensis* SUMO(登录号 XP\_002794493.1)的相似性分别为 76.7%、43.7% 和 45.6%。

### 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 SUMO 基因，扩增结果如图 3(a)，将基因克隆到 pEGFP-C1 载体上，酶切鉴定结果如图 3(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 3(c)表明转染效率可达 80% 以上。

### 3.3. PI 染色及流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡

使用碘化丙啶染色以及流式细胞仪分析发现，SUMO 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 4(a)所示。转染空质粒对照凋亡峰只有  $2.47\% \pm 0.13\%$ ，而 SUMO 基因的表达诱导细胞出现  $23.76\% \pm 0.96\%$  的亚二倍体峰，说明 SUMO 可显著诱导细胞出现凋亡。

### 3.4. 衰老相关 $\beta$ -galactosidase 活性实验

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，如图 5(a)所示。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 5(b)所示，转染 SUMO 基因( $4.06\% \pm 1.5\%$ )与对照组( $3.86\% \pm 0.32\%$ )相比没有显著性差异。

## 4. 讨论

SUMO 蛋白是一类蛋白质修饰物家族，在调节蛋白稳定及功能方面其关键作用。本文克隆了药用真菌杨树菇 SUMO 基因，发现 SUMO 表达在真核 HeLa 细胞中可引起细胞的凋亡(图 4)，对细胞衰老没有显著性影响(图 5)。从杨树菇的近源种 *Agrocybe cylindracea* 中分离出类泛素短肽具有刺激巨噬细胞，抑制细胞增殖和核糖核酸酶活性<sup>[8]</sup>；平菇中分离出的 N 端序列与

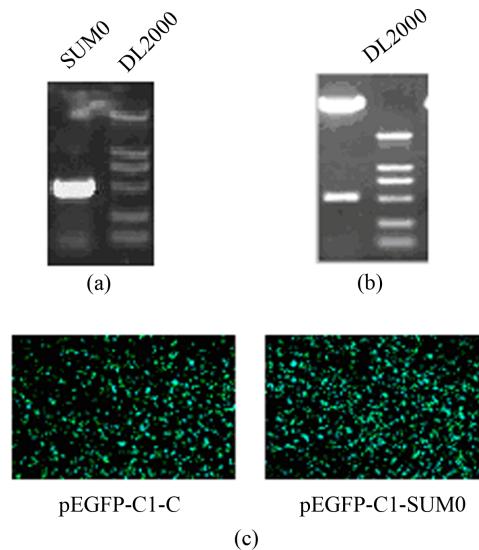
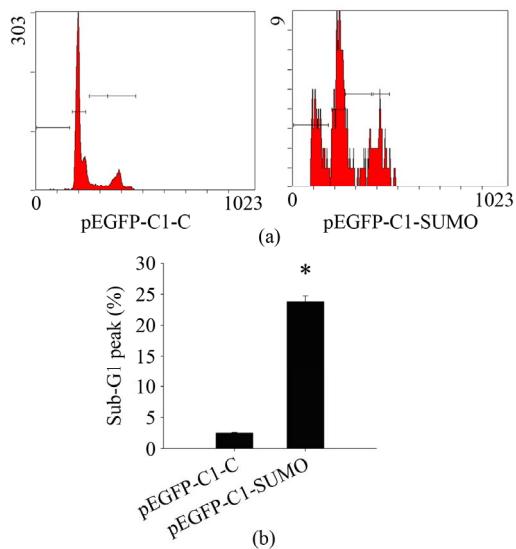


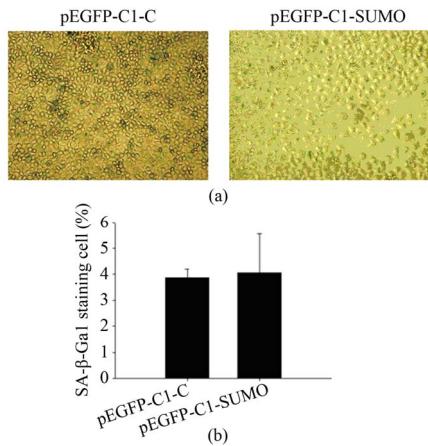
Figure 3. The construction and the transformation of the plasmid pEGFP-C1-SUMO. (a) The PCR result of SUMO; (b) The result of enzyme digestion of the plasmid pEGFP-C1-SUMO; (c) The transformation of the plasmid pEGFP-C1-SUMO. The plasmid with GFP-tag was transformed into HeLa cells, and after 48 h the result was observed and pictured by fluorescence microscope (pEGFP-C1-C was the control)

图 3. pEGFP-C1-SUMO 真核质粒构建及转染。(a) SUMO 基因扩增；(b) pEGFP-C1-SUMO 质粒酶切鉴定结果；(c) pEGFP-C1-SUMO 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 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- $\beta$ -Gal staining.** (a) The plasmids were transformed into HeLa cells, and the cells were stained for 16 h by the senescence associated  $\beta$ -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- $\beta$ -Gal 染色检测衰老细胞。(a) 转染后, 使用衰老相关  $\beta$ -galactosidase 检测试剂盒染色 16 小时, 光学显微镜 200 $\times$ , 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<sup>[9]</sup>; 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<sup>[10]</sup>。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 antimitogenic activities in a peptide from puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289(3): 744-749.