

# 山茶花翻译控制肿瘤蛋白 *CjTCTP* 基因的电子克隆及生物信息学分析

丁岳炼,赵鸿杰,柯 欢,陈 杰

(佛山市林业科学研究所,广东 佛山 528222)

**摘要:**采用电子克隆方法从山茶花的 EST 数据库中获得了一条 TCTP 基因,并命名为 *CjTCTP*,使用生物信息学方法对该基因编码蛋白从氨基酸组成、理化性质、跨膜结构域、疏水性/亲水性、信号肽、亚细胞定位、高级结构及功能域和进化树等方面进行了预测和分析。结果表明:山茶花 *CjTCTP* 基因全长 706 bp,包含 507 bp 的完整开放阅读框,编码 168 个氨基酸;编码蛋白含有 TCTP1 及 TCTP2 保守域,是 TCTP superfamily 家族;从信号肽的预测可知,该蛋白不存在信号肽,可能为可溶性蛋白;亚细胞定位显示其可能位于细胞质中;同源性分析表明,该蛋白序列与拟南芥、橡胶树、玉米等物种 TCTP 蛋白序列的相似度达 80% 以上。

**关键词:**山茶花;TCTP;电子克隆;生物信息学分析

**中图分类号:**S685.14

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)08-0018-05

翻译控制肿瘤蛋白(The translationally controlled tumor protein, TCTP)是一类高度保守、广泛表达的真核蛋白家族。该蛋白最初在小鼠肉瘤细胞(sarcoma ascites cells)和红白血病细胞(erythroleukemia cells)中发现,并定义为生长相关蛋白,随后又发现其 mRNA 以非活性 mRNP-messenger ribonucleo protein)的形式存在<sup>[1]</sup>。被正式命名为“翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)”,是因其 mRNA 在肿瘤细胞中的表达量高于正常细胞,并在翻译水平上受到高度的调控<sup>[2]</sup>。随着研究的不断深入,发现 TCTP 不仅存在于肿瘤细胞中,还广泛存在于菌类、酵母、昆虫、植物和除肾细胞外的哺乳动物组织正常细胞中<sup>[3]</sup>,并且不同物种的 TCTP 均表现为高度的同源性和保守性,这暗示其可能在细胞生长活动中扮演着重要的角色<sup>[4]</sup>。近年来的研究证实,TCTP 是一种多功能细胞因子,参与细胞周期调控,使细胞内环境稳定,还是一种热稳定蛋白,具有钙结合和使微管稳定的结构域,并且具有促进组胺释放、抗凋亡、抗氧化活性和热激蛋白活性等功能<sup>[5-8]</sup>。

首个植物 TCTP 是 1992 年 Pay<sup>[9]</sup>等在紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中发现的;迄今已从

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AF215897.1)、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*, DQ323740.1)、麻疯树(*Jatropha curcas*, EF091818.1)、草莓(*Fragaria × ananassa*, Z86091)、荔枝(*Litchi chinensis*, HQ667568.1)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*, EU182720.1)及木薯(*Manihot esculenta*, JX855122.1)等植物中分离得到 TCTP 基因。而有关 TCTP 功能的研究主要集中在人和动物中,在植物中的研究较少。Woo<sup>[10]</sup>等最初发现豌豆(*Pisum sativum*)TCTP 与根冠细胞的分裂有关;梁小莲<sup>[11]</sup>等发现乙烯利处理可诱导巴西橡胶树 *HbTCTP* 基因的表达,而割胶可抑制其表达,表明 *HbTCTP* 可能参与伤信号或乙烯信号传导;另外有研究表明其可能参与植物不同的胁迫反应,如水分、盐碱、光、寒、重金属铝等,甚至与植物病原体感染反应有关<sup>[12-14]</sup>。山茶花(*Camellia japonica* L.)为山茶科山茶属植物,是我国传统十大名花之一,也是优良的木本观赏花卉,具有重要的经济价值<sup>[15]</sup>。目前,有关山茶花 TCTP 基因的克隆还尚未见文献报道,因此该研究通过电子克隆手段,从山茶花 EST 序列中分离了 TCTP 基因,为进一步深入研究该基因在山茶花逆境反应中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

山茶花 EST 数据(在 NCBI 中搜索获得)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 山茶花 TCTP 基因的电子克隆 以拟南

收稿日期:2014-03-13

基金项目:佛山市现代种业振兴计划资助项目(20130106)

第一作者简介:丁岳炼(1985-),男,广东省潮州市人,硕士,助理工程师,从事山茶花遗传育种及分子生物学研究。E-mail:dyuel21@163.com。

芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *TCTP* 基因(GenBank:AY079333.1)作为探针,利用 NCBI 数据库中的 Blast 工具搜索山茶花 EST 数据库,对得到的同源性山茶花 EST 序列进行聚类、拼接、延伸,并以新获得的重叠群再一次进行 EST 搜索,直到没有新的山茶花 EST 可供拼接为止。将拼接完成的新基因序列在非冗余数据库中进行比对搜索,确认为新基因序列。

1.2.2 山茶花 *TCTP* 基因的核酸及蛋白质序列的特征分析 采用 Vector NTI 及 DNASTart 对序列进行比对与拼接;将所测定的序列结果通过 BlastN 和 BlastP 搜索 NCBI 的核苷酸和蛋白质数据库,进行序列相似性分析;用 NCBI 的 ORF Finder 软件及 Bioedit 预测开放阅读区并翻译核苷酸序列;用 ScanProsite 程序预测该氨基酸序列的理化性质;采用 CDD 数据库对其保守序列进行分析;ProtScale、SignalP 4.1 Server、TargetP 1.1、TMHMM Server v. 2.0 分别预测其亲水疏水性、信号肽及跨膜区域;采用 PSORT WWW Server 预测其亚细胞定位;采用 SOPMA 和 SWISS-MODE 预测其二级结构和三级结构;采用 MEAG 6.06 对其蛋白分子进行系统发育树构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 山茶花 *TCTP* 基因全长 cDNA 的获得

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *TCTP* 基因(GenBank:AY079333.1)作为探针,搜索与之同源性较高的山茶花 EST 序列。利用 Vector NTI 及 DNASTart 对序列进行比对与拼接,并将 contig 进一步进行 EST 搜索,直到没有与之重叠的序列为止,最终获得了一个长约 706 bp 的 cDNA 序列。将获得的序列在 NCBI 中进行 Blastn 比对,其结果表明该核苷酸序列与橡胶树(*Hevea brasiliensis*) *TCTP* 基因(Accession NO. HQ640232.1)、荔枝(*Litchi chinensis*) *TCTP* 基因(Accession NO. HQ667568.1)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*) *TCTP* 基因(Accession NO. EU182720.1)和山鸡椒(*Litsea cubeba*) *TCTP* 基因(Accession NO. KF706380.1)的同

源性分别达 85%、83%、82% 和 80%。因此初步表明该序列为山茶花 *TCTP* 基因,并命名为 *CjTCTP*。经 NCBI ORF Finder 软件分析表明,该 cDNA 序列含有一个长度为 507 bp 的开放阅读框,编码 168 个氨基酸,另外 5'-UTR 和 3'-UTR 长度分别为 52 bp 和 147 bp(见图 1)。

```

1                               cctacact
8  ctctctccatctctatcctaacgatccgagagctagctctgcaatc
53  atgttggtctaccaggacttgcttacggggatgagctctctctcg
   M L V Y Q D L L T G D E L L S
98  gattcgtttccatcacaggaaatccataatggagtggttgaggaa
   D S F P Y K E I H N G V L W E
143 gttgagggaagtgggtgttcaggagcagtcgatgtagacatt
   V E G K W V V Q G A V D V D I
188 ggtgctaacccttctgccgaagggtgtgtgaagatgagggtgtt
   G A N P S A E G G G E D E G V
233 gatgatcaaacgtcaagtgttgatattgttgacacattcagg
   D D Q T V K V V D I V D T F R
278 ctccaggagcaacctcttttcgataagaagctgttcgttcatat
   L Q E Q P P F D K K L F V A Y
323 ataaagaagtacatcaagttgttgacacccaagctggaggagac
   I K K Y I K L L T P K L E G D
368 aagcaagaggaaatttaagaagaacatcgaggagcaactaagtc
   K Q E E F K K N I E G A T K F
413 ttgctctcgaaagctaaagtacatccaattttttgtcgtgagagc
   L L S K L S D L Q F F V G E S
458 atgcatgatgacagtaccatagttgttcatactacaaggatggt
   M H D D S T I V F A Y Y K D G
503 gtaactgacccaacattttgtacttcggtcatggtttgaggaa
   A T D P T F L Y F G H G L R E
548 gtcaagtggtgaggatggaatattaatagccaggtttggtt
   V K C *
593 ggagccattgtcttagtttatgtttttatcgtccagttttgtt
638 ggattttgtactatgcaacttagaattttgtcagttactgtttt
683 atgctaccttggattgtaacatg
  
```

图 1 山茶花 *CjTCTP* 基因全长 cDNA 序列及氨基酸序列预测

\* 表示终止密码子;方框标记分别为 *TCTP* 保守序列 TCTP1 和 TCTP2

Fig. 1 The full-length of cDNA sequence and amino acid sequence of *CjTCTP*

\* shows the termination codon; TCTP1 and TCTP2 are highly conserved regions which are indicated in the frame

### 2.2 山茶花 *CjTCTP* 氨基酸保守序列的预测

使用 NCBI 中的 CDD 数据库对 *CjTCTP* 氨基酸保守序列进行分析,结果表明山茶花 *CjTCTP* 有 *TCTP* 特有的保守序列,属于 *TCTP*

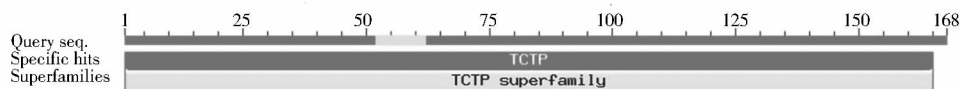


图 2 山茶花 *CjTCTP* 氨基酸保守结构域分析

Fig. 2 The analysis of conserved domain prediction of *Camellia japonica* L. *CjTCTP*

Superfamily 家族,进一步证明所克隆的基因为一条完整的基因(见图 2)。另通过 ScanProsite 软件在线分析可知,该 cDNA 序列推导的氨基酸序列具有 TCTP 保守的完整功能域,即微管结合区域和  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域等和该家族的两个特征结构区 TCTP1 及 TCTP2,即 IGANPSAEGGG 和 LSDLQFFVGESMHDDSTIVFAYY(见图 1)。

### 2.3 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白的理化性质

由表 1 可知,基因编码的氨基酸分子量为 18 951.4 Da,等电点为 4.57。预测的 *CjTCTP* 蛋白含 31 个带负电荷的氨基酸残基和 18 个带正电荷的氨基酸残基,该分子元素组成为  $\text{C}_{866}\text{H}_{1322}\text{N}_{208}\text{O}_{263}\text{S}_3$ ,不稳定系数为 31.28,说明该蛋白可以稳定存在。

表 1 *CjTCTP* 基因编码蛋白的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of gene encoding protein of *CjTCTP*

编码蛋白理化性质 Physical and chemical properties	预测结果 Predicting outcomes
分子量(MW)/Da	18951.4
等电点(pI)	4.57
负电荷残(Asp+Glu)	31
正电荷残(Arg+Lys)	18
分子式 molecular formula	$\text{C}_{866}\text{H}_{1322}\text{N}_{208}\text{O}_{263}\text{S}_3$
不稳定系数(II)	31.28
脂肪系数(AD)	87.50
平均疏水性(GRAVY)	-0.293

### 2.4 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白疏水性/亲水性预测和分析

ProtScale 软件预测结果如图 3 所示,该编码蛋白多肽链第 39 位 Gly 具有最高的分值 1.144 和最高的疏水性,第 109 位 Glu 具有最低的分值 -2.933 和最高的亲水性。由于该蛋白的平均疏水性为 -0.293(见表 1),因此整个多肽链表现为亲水性。

### 2.5 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白导肽和信号肽的预测与分析

采用 TargetP 1.1 Server 和 SignalP 4.1 Server 对该基因编码蛋白的导肽和信号肽进行分

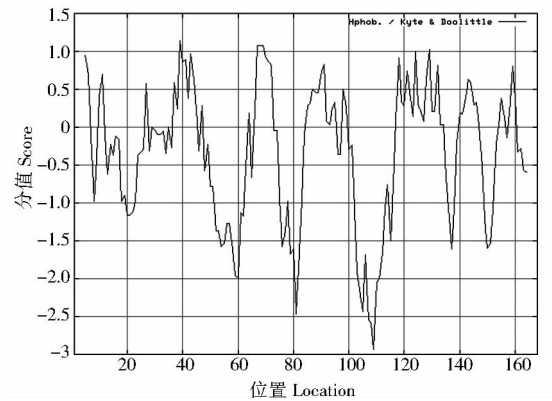


图 3 *CjTCTP* 基因编码蛋白的疏水性/亲水性预测

Fig. 3 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity of gene encoding protein of *CjTCTP*

析,结果表明,该蛋白含有叶绿体转运肽(cTP)、线粒体靶向肽(mTP)和信号肽(SP)的分值分别为 0.122、0.117 和 0.227,分值都显示较低,并且无氨基酸残基剪切位点,预测可靠性为 3 级。另其预测的 max. C、max. Y 和 max. S 分值及结果也表明该蛋白不存在信号肽,因此可推测该蛋白为可溶性蛋白。

### 2.6 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白跨膜结构的预测

利用 TMHMM Server v. 2.0 预测 *CjTCTP* 基因编码蛋白跨膜区(见图 4),由此看出,整条肽链均位于膜外,即该蛋白不是膜蛋白,不存在跨膜结构域。

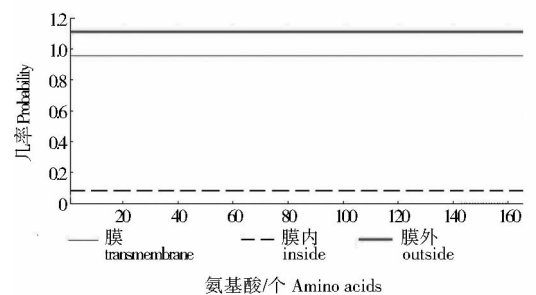


图 4 山茶花 *CjTCTP* 蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 4 Predicted transmembrane domain of *CjTCTP* protein

### 2.7 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白的亚细胞定位

应用 PSORT WWW Server 对山茶花 *CjTCTP* 进行亚细胞定位预测(见表 2)。由表中数据可推断,该蛋白位于细胞质溶液中的可能性最大,位于叶绿体的可能性最小。

表 2 山茶花 *CjTCTP* 蛋白的亚细胞定位  
Table 2 Subcellular location of *CjTCTP* protein

亚细胞定位 Subcellular location	概率 Probability
细胞质 Cytoplasm	10.0
细胞外 Extracellular	2.0
叶绿体 Chloroplast	1.0

2.8 山茶花 *CjTCTP* 基因编码蛋白二级结构及三级结构的预测

采用 SOPMA 在线软件对 *CjTCTP* 蛋白的二级结构进行预测(见表 3)。从表可看出山茶花 *CjTCTP* 蛋白的二级结构中  $\alpha$  螺旋的比例最高、达 42.26%,无规则卷曲次之,为 30.36%,延伸链及  $\beta$  折叠所占的比例分别为 19.05%及 8.33%。据此结果可推断, $\alpha$  螺旋和无规则卷曲是该蛋白的主要二级结构元件,延伸链及  $\beta$  折叠也散布在整个蛋白质中。

表 3 山茶花 *CjTCTP* 蛋白的二级结构分析  
Table 3 The analysis of secondary structure prediction of *CjTCTP* protein

二级结构类型 Models of secondary structure	氨基酸残基个数 Amino acid residue	所占百分比/% Proportion
$\alpha$ 螺旋 Alpha helix	71	42.26
延伸链 Extended strand	32	19.05
$\beta$ 折叠 Beta turn	14	8.33
无规则卷曲 Random coil	51	30.36

采用 SWISS-MODEL 对 *CjTCTP* 氨基酸序列进行蛋白三维结构同源性建模(见图 5),*CjTCTP* 的结构域在空间布局上呈勺子状, $\alpha$  螺旋和延伸链构成了勺子的底部,而勺子的柄部主要由不规则卷曲构成。

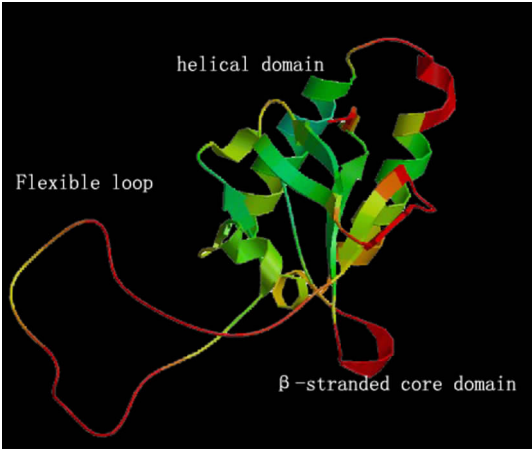


图 5 山茶花 *CjTCTP* 蛋白的三级结构预测  
Fig. 5 Predicted 3D structure of *CjTCTP* protein

2.9 山茶花 *CjTCTP* 蛋白质与其它物种的同源性比较及系统进化树分析

使用 Vector NTI AlignX 对山茶花 *CjTCTP* 基因编码的氨基酸序列与玉米、拟南芥、麻疯树、橡胶树等物种的 TCTP 氨基酸序列进行同源性分析,结果表明,该序列与玉米、拟南芥、麻疯树和橡胶树等物种的相似性分别达 82.1%、82.1%、85.7%和 86.3%。进一步采用 Clustal X 将山茶花 *CjTCTP* 蛋白质序列与拟南芥等 10 个物种 TCTP 蛋白质序列进行比对,并采用 MEGA 6.06

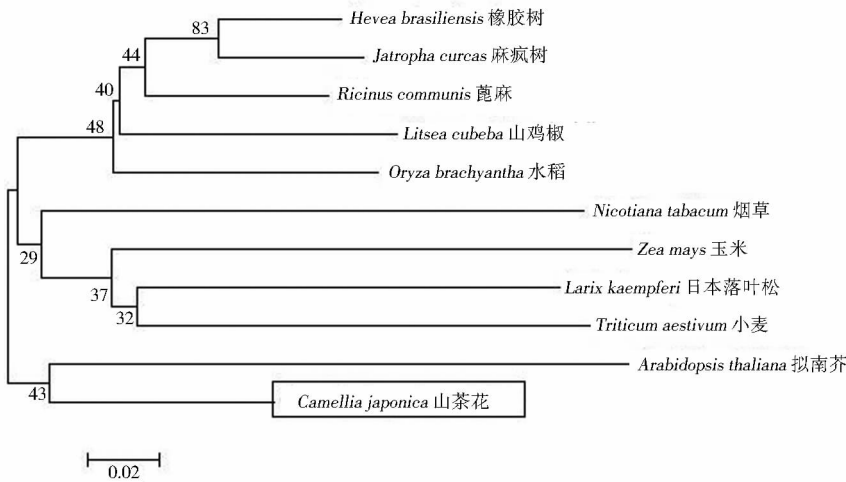


图 6 几种植物 TCTP 蛋白序列的系统进化树  
Fig. 6 The phylogenetic tree of TCTP protein of several plants

软件构建进化树。采用的是 N-J 法,并用 bootstrap 重复 1 000 次进行计算分析。从图 6 看出,该进化树共有 3 个分支,其中山茶花与拟南芥同为一个分支,说明其在进化上具有较近的亲缘关系。

### 3 结论与讨论

基于表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)的电子克隆(in silico cloning)方法,已在基因的克隆中发挥着越来越重要的角色。电子克隆方法与传统的克隆方法相比,具有速度快、设备简单和针对性强等优点,但容易受 EST 数量和质量的限制。由于动物基因组的发展较快,EST 数据较多,目前已通过该技术在动物中克隆了大量的基因。而在植物中,大部分物种的 EST 数据较为缺乏,制约着该技术在植物基因克隆中的运用。

目前对山茶花物种相关基因克隆的信息较为匮乏,只报道了山茶花 *CjAGL*、*CjAPL1*、*B-function* 等<sup>[16-18]</sup>少量基因,而对茶花 *TCTP* 基因的克隆还尚未见文献报道。因此,该研究采用 EST 电子克隆方法,从山茶花 EST 序列中克隆了一条新基因 *CjTCTP*,该基因全长 706 bp,其 ORF 长度为 507 bp,与已报道植物中其它物种的翻译控制肿瘤蛋白基因长度基本一致,共编码 168 个氨基酸,并且含有该家族的两个特征结构区,即 TCTP1 及 TCTP2,同时具有微管结合区域和  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域。另外,对该基因编码蛋白进一步的亲水性分析、跨膜结构域预测及高级结构预测等生物信息学分析,与已报道的拟南芥、橡胶树和丹参等的分析结果基本一致。说明 *TCTP* 基因具有高度的同源性和保守性,暗示其可能参与某些重要的生物学功能。Vincent D 等<sup>[12-14]</sup>也提及 *TCTP* 基因可能参与植物不同的胁迫反应,如水分、盐碱、光、寒、重金属铝等,而新克隆的山茶花 *CjTCTP* 基因是否也参与生长过程中的胁迫反应,还需进一步的探究。

#### 参考文献:

- [1] Yenofsky R, Cereghini S, Krowczyńska A, et al. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide[J]. Mol. Cell Biol., 1983(3):1197-1203.
- [2] MacDonald S M, Rafnar T, Langdon J, et al. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor[J]. Science, 1995(269):688-690.
- [3] Bommer U A, Thiele B J. The translationally controlled tumour protein (TCTP) [J]. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004,36(3):379-85.
- [4] Lopez A P, Franco A R. Cloning and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein from strawberry fruits [J]. Biologia Plantarum, 2006, 50 (3): 447-449.
- [5] 吕素芳, 广君, 永萍. 翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)研究进展[J]. 科学技术与工程, 2006, 6(4): 424-428.
- [6] Gnanasekar M, Ramaswamy K. Translationally controlled tumor protein of *Brugia malayi* functions as an antioxidant protein[J]. Parasitol Res, 2007, 101(6): 1533-1540.
- [7] Mak C H, Poon M W, Lun H M, et al. Heat-inducible translationally controlled tumor protein of *Trichinella pseudospiralis*: cloning and regulation of gene expression [J]. Parasitol Res, 2007(100):1105-1111.
- [8] Gnanasekar M, Dakshinamoorthy G, Ramaswamy K. Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009(386):333-337.
- [9] Pay A, Heberle-Bors E, Hirt H. An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein [J]. Plant Mol Biol, 1992, 19(3): 501-503.
- [10] Woo H H, Hawes M C. Cloning of genes whose expression is correlated with mitosis and localized in dividing cells in root caps of *Pisum sativum* L [J]. Plant Mol. Biol., 1997(35):1045-1051.
- [11] 梁小莲, 李辉亮, 彭世清. 巴西橡胶树 *HbTCTP* 基因的克隆及表达 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 188-193.
- [12] Vincent D, Ergul A, Bohlman M C, et al. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity [J]. J. Exp. Bot., 2007(58):1873-1892.
- [13] Sage-Ono K, Ono M, Harada H, et al. Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Pharbitis* [J]. Plant Cell Physiol, 1998(39):357-360.
- [14] Hoepflinger M C, Reitsamer J, Geretschlaeger A M, et al. The effect of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) on programmed cell death in plants [J]. BMC Plant Biology, 2013(13):135.
- [15] 江运仁, 胡羨聪, 赵鸿杰. 试论广东山茶种质资源库建设 [J]. 防护林科技, 2011, 3(102): 53-56.
- [16] 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福, 等. 托桂型茶花金盘荔枝中花器官发育基因 *GJAGL* 的克隆与功能分析 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(9):1963-1698.
- [17] 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福. 茶花 *CjAPL1* 基因干扰表达载体的构建与遗传转化 [J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2013, 30(2):114-117.
- [18] 朱高浦, 李纪元, 范正琪, 等. 重瓣茶花“红十八学士”MADS-box 家族 *B-function* 基因序列分析与原核表达 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(6):1077-1083.