

大菱鲆T淋巴细胞酪氨酸激酶(LCK)基因全长cDNA的克隆及表达分析

王贤丽^{1,2}, 张玉喜², 孟亮², 陈松林²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 本研究采用cDNA末端快速扩增技术(RACE)从大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)脾脏 cDNA 文库中克隆得到T淋巴细胞酪氨酸激酶(LCK)全长cDNA序列。该序列包含193 bp的5'末端非编码区(5' UTR), 1 506 bp的开放阅读框(ORF)和300 bp 3' UTR, 整个开放阅读框编码502个氨基酸。系统发生分析表明, 大菱鲆LCK基因与红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)和黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)的亲缘关系最近。在大菱鲆正常组织、胚胎细胞(TEC)和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染的免疫器官组织中对LCK基因进行了RT-PCR表达分析。结果表明, 大菱鲆LCK基因只在正常脾脏组织中表达; 在用鳃弧菌感染12 h后, 大菱鲆胚胎细胞LCK基因表达增强; 在鳃弧菌感染的大菱鲆免疫组织中, 只在脾脏中检测到LCK基因表达, 鳃弧菌感染48 h后, LCK基因在脾脏中表达最强。这些结果表明, LCK基因在大菱鲆脾脏免疫应答中起着重要作用。[中国水产科学, 2009, 16(5): 660-667]

关键词: 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); T淋巴细胞酪氨酸激酶; cDNA; RT-PCR

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0660-08

T淋巴细胞酪氨酸激酶(Lymphocyte cell kinase, LCK)是蛋白酪氨酸激酶Src家族成员之一。当鱼类受到外源病原菌或病毒侵袭时, 抗原通过主要组织相容性复合体(MHC)与T淋巴细胞受体(TCR)结合, 激活包括LCK在内的各种激酶参与信号转递过程。LCK基因能够结合T淋巴细胞表面的糖蛋白CD4和CD8, 激活蛋白酶C和MAP-激酶信号传导途径; 也能够结合白细胞介素2受体(IL-2R), 参与T淋巴细胞抗原-受体信号传递过程^[1], 对T淋巴细胞的发育和活化起重要作用^[2-6]。LCK基因在鱼类中发现的较少, 目前只在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)中有相关报道^[7-9]。现有研究表明, LCK在脊椎动物例如斑马鱼^[8]、河鲀^[9]、鸡(*Gallus gallus*)^[10]中高度保守, 在富含T淋巴细胞的组织例如胸腺和脾脏中高度表达^[7]。Langenau

等^[8]在研究斑马鱼T淋巴细胞的发育和定位时发现, 斑马鱼胸腺长期淋巴细胞(Long-term thymic cells)再生部位位于肾脏, 而不是在胸腺中。

随着大菱鲆养殖业特别是集约化养殖在中国的发展, 疾病日益严重, 造成了巨大的经济损失, 因此提高大菱鲆自身的免疫防御能力成为亟待解决的问题。哺乳动物T淋巴细胞的活化是免疫学研究领域中较活跃的分支, 但是鱼类T淋巴细胞的相关研究比较少^[11]。本研究从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中克隆、鉴定出1个LCK基因, 同时构建了系统发生树, 对大菱鲆LCK基因同其他鱼类已知LCK基因进行了聚类分析。另外利用RT-PCR技术进行了该基因在大菱鲆正常组织、鳃弧菌感染的大菱鲆胚胎细胞(Turbot embryonic cell, TEC)和鳃弧菌感染的大菱鲆免疫器官组织中的表达分析, 以便为利用分子生物学技术

收稿日期: 2009-02-27; 修订日期: 2009-04-21.

基金项目: 国家973计划项目(2004B117403); 国家自然科学基金项目(40376047).

作者简介: 王贤丽(1980-), 女, 博士研究生, 从事细胞生物学研究. E-mail: taraey77@126.com

通讯作者: 陈松林. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

提高养殖鱼类抗病力的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大菱鲆

大菱鲆购自中国水产科学院黄海水产研究所海阳养殖基地,体质量200~500 g,暂养于1 000 L的水箱中,水温保持在17℃。

1.2 cDNA文库的构建

大菱鲆脾脏cDNA文库的构建参照Chen等^[12]的方法。大菱鲆脾脏RNA从4尾健康大菱鲆个体的脾脏中使用TRIzol试剂(Qiagen)提取,使用oligo dT引物合成cDNA,然后使用pBlueScript II (SK+) cDNA library kit (Stratagene)按照说明构建文库。构建的大菱鲆脾脏cDNA文库超过了 2.2×10^6 个克隆,经过40个随机克隆的PCR检测发现片段的平均插入长度为700~2 000 bp。

1.3 SMART-RACE扩增

使用TRIzol试剂(Qiagen)提取大菱鲆组织总RNA。使用OligotexTM mRNA midi kit (Qiagen)分离得到Poly(A)+RNAs,然后使用随机引物合成cDNA^[13]。参照已知的大菱鲆LCK基因部分cDNA序列,设计2条特异引物(GSP5和GSP3)用来扩增cDNA未知序列;RACE通用引物使用BD公司的Long primer和Short primer(表1)。使用Smart RACE cDNA amplification kit (BD)进行5'-RACE和3'-RACE。Touchdown PCR反应如下:94℃ 2 min;94℃ 5 s,72℃ 3 min,5个循环;94℃ 5 s,70℃ 10 s,72℃ 3 min,10个循环;94℃ 5 s,64℃ 10 s,72℃ 3 min,20个循环;72℃ 10 min。扩增得到的片段使用Qiaex II gel extraction kit (Qiagen)进行分离纯化,然后克隆到pMD18-T载体(Takara)中,在大肠杆菌(DH5 α)中扩增繁殖,然后进行测序。

表1 大菱鲆LCK基因序列的克隆及组织表达检测所用引物
Tab. 1 Primers used for cloning and tissue expression of LCK gene

引物 Primer	序列 Sequence
Long primer	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
Short primer	5'-CTAATACGACTCACT ATAGGGC-3'
GSP5	5'-CCACCTGAGATGCCATGTCTATCAGAG-3'
GSP3	5'-GAAGCTATCAACTACGGCACCTTCTCC-3'
1485N	5'-GGCCAACATGATGAAGAACCTGCA-3'
1485C	5'-ACATCCCAGGGTAAGGTATGCGTC-3'
TactinN	5'-AGGTGATGAAGCCCAGAGCA-3'
TactinC	5'-GCACTGGTGGTGAAGGACTAG-3'

1.4 组织及细胞材料的制备

取出健康大菱鲆组织(肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤),于-80℃下保存备用。鳃弧菌(*V. anguillarum*)培养和注射方法参照文献[14]进行。鳃弧菌于2216E液体培养基(0.5%蛋白胨,0.1%酵母提取物,0.01% FePO₄·4H₂O,1 000 mL海水,pH 7.6)中培养至对数生长期。然后离心收集沉淀,将沉淀用生理盐水悬浮。采用腹腔注射

的方式,将稀释至 7.6×10^8 /mL的0.5 mL菌液注入健康大菱鲆体内,将未注射大菱鲆作为空白对照。分别于注射后5 h、12 h、24 h、48 h、72 h和96 h取出大菱鲆肝脏、脾脏和头肾,迅速冻存于液氮中,于-80℃保存备用。

感染用大菱鲆胚胎细胞系(TEC)的建立和培养按照Chen等^[15]的方法进行。大菱鲆胚胎细胞培养于25 cm²的培养瓶中,24 h后更换新培养基,然后加

入鳗弧菌至终浓度 2.9×10^8 CFU/mL。在感染后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 96 h 收集大菱鲆胚胎细胞并保存于 -80°C 下备用。

1.5 半定量RT-PCR分析

组织和细胞总RNA的提取使用TRIzol试剂,按照Chen等^[12]的方法进行。cDNA的合成使用Promega公司的M-MLV反转录酶,按照操作说明进行。设计1对特异引物1485N和1485C用来进行该基因的RT-PCR表达分析,扩增片段大小为446 bp。利用大菱鲆肌动蛋白基因(β -actin)已知片段设计特异引物TactinN和TactinC(表1),用来扩增大菱鲆 β -actin基因片段作为内参,片段大小为221 bp。PCR反应程序如下: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 ~ 35个循环; 72°C 10 min。

1.6 序列分析

登录NCBI用BLAST对测序结果进行同源性检索。实验分析所用到的DNA序列和蛋白序列使用DNASTAR 5.0^[16]编辑和分析;多序列比较用CLUSTALW进行^[17];系统发生树用MEGA3.0^[18]构建,计算方法为Neighbour-joining,该NJ树的可靠性用自展内部分支法评定,重复1 000次。

2 结果与分析

2.1 大菱鲆LCK基因的克隆

利用cDNA文库扩增得到的553 bp的cDNA片段,通过5'和3' RACE分别扩增得到了未知的5'和3'端序列,从而得到cDNA全长。基因在GenBank数据库中接收号为DQ848967。该基因的完整cDNA序列全长为1 999 bp:其中包含193 bp的5'末端非编码区(UTR)、1 506 bp开放阅读框(ORF)和300 bp的3' UTR区。ORF共编码502个氨基酸残基,理论蛋白分子量为57.3 kD,等电点为5.026。3' UTR具有典型的加尾信号(AATAAA)和PolyA尾巴。

2.2 大菱鲆LCK基因编码氨基酸序列的分析

通过将根据大菱鲆LCK基因推断的氨基酸序列与已知其他物种LCK氨基酸序列比较分析,发现LCK在进化上比较保守。大菱鲆同红鳍东方鲀(*Fugu*

rubripes, AAL89664)、虹鳟LCK2 (*Oncorhynchus mykiss*, AAY41440)、大西洋鲑(*Salmo salar*, ACI33121)、虹鳟LCK1 (*Oncorhynchus mykiss*, AAY41439)、黑青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*, CAG09909)、鲫(*Carassius auratus langsdorffii*, BAF56885)、斑马鱼(*Danio rerio*, AAR26383.1)、鸡(*Gallus gallus*, P42683)、非洲爪蛙(*Xenopus laevis*, NP_001091190)、人(*Homo Sapiens*, P06239)和鼠(*Mus musculus*, P06240)的同源性分别为84%、81%、81%、80%、78%、77%、76%、71%、69%、68%和68%。参照根据人类LCK基因推断的蛋白结构,将根据大菱鲆LCK基因推断的蛋白结构分为SH1、SH2、SH3、SH4和C末端5个结构域。N末端具有与CD4和CD8结合的CXXC框以及与肉豆蔻酰和棕榈醇结合的GCXCS框。大菱鲆LCK基因在C末端具有与人类LCK基因中的Tyr³⁹⁴和Tyr⁵⁰⁵一致的保守酪氨酸位点(图1)。基于MEGA3的邻位相联法构建的分子进化树表明,大菱鲆同红鳍东方鲀和黑青斑河鲀具有最近的亲缘关系,其次为虹鳟、大西洋鲑、鲫和斑马鱼;和非洲爪蛙、鸡、人类和鼠亲缘关系较远(图2)。

2.3 LCK基因在正常大菱鲆组织中的表达

为了检测LCK基因在大菱鲆组织中的表达情况,本研究对大菱鲆肝脏、脾脏、肠、头肾、肾、鳃、性腺、肌肉、心脏、脑和皮肤11个正常组织中的LCK基因进行RT-PCR分析,其结果如图3所示。LCK基因只在大菱鲆脾脏中表达,在其他组织中没有检测出。

2.4 LCK基因在TEC细胞中的表达

以鳗弧菌感染大菱鲆TEC细胞为材料,以反转录合成的cDNA第一链为模板,应用RT-PCR方法对LCK基因的组织表达进行了分析,结果如图4所示。鳗弧菌感染大菱鲆TEC细胞后,LCK基因呈现出明显的被诱导表达的趋势。LCK基因在未感染TEC细胞中微弱表达,在感染后6 h该基因转录增强,并且在感染后12 h表达最强;随后表达减弱。

2.5 LCK基因在鳗弧菌感染大菱鲆组织中的表达

以鳗弧菌感染大菱鲆的肝脏、脾脏和头肾为材料,以反转录合成的cDNA第一链为模板,应用RT-PCR方法对LCK基因的组织表达进行了分析。RT-

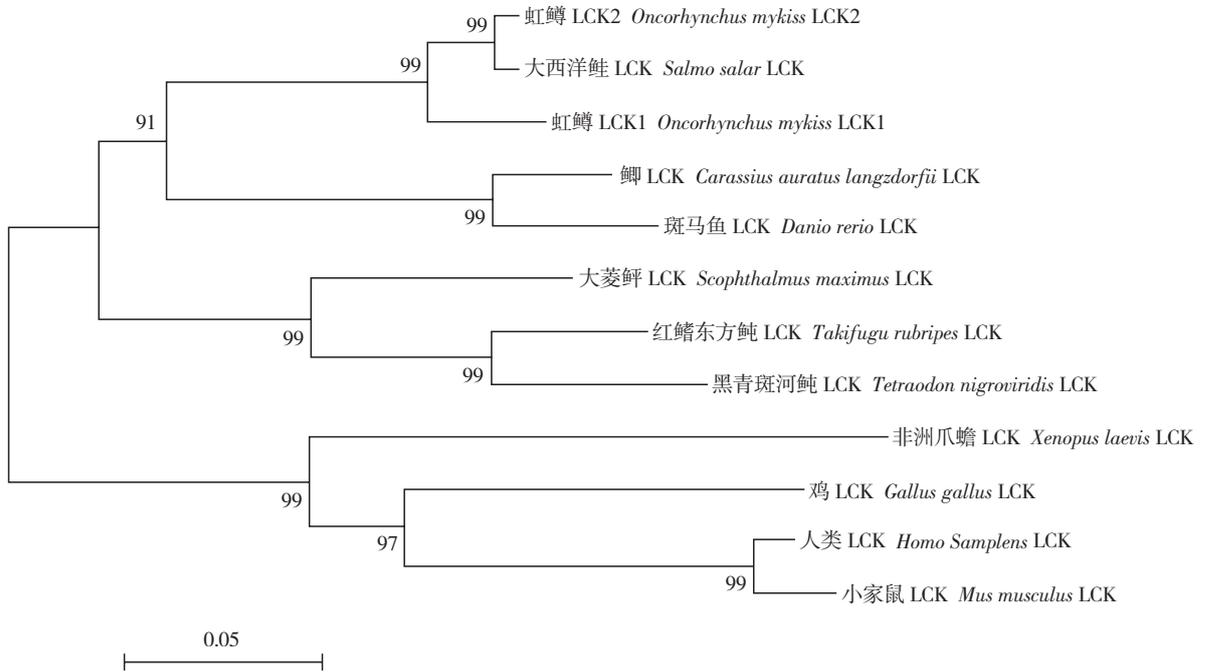


图2 基于大菱鲂和其他物种的LCK氨基酸序列构建的系统发育树
分支数字为1 000次自举检验各分支的置信度。

Fig. 2 Phylogenetic tree of LCK in *Scophthalmus maximus* and other species based on NJ method
Figures on the nodes represent bootstrap values based on 1 000 re-sampling replicates.

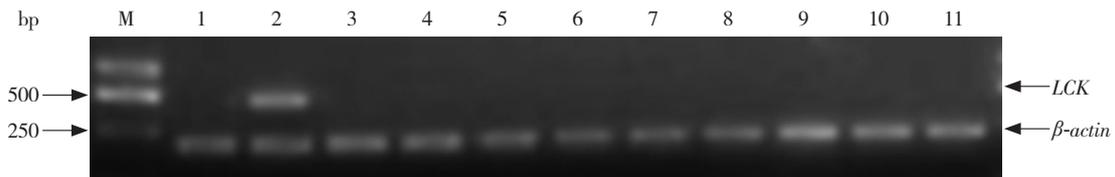


图3 LCK基因在大菱鲂正常组织中的表达

M: 分子量标准; 1: 肝脏; 2: 脾脏; 3: 肠; 4: 头肾; 5: 肾; 6: 鳃; 7: 性腺; 8: 肌肉; 9: 心脏; 10: 脑; 11: 皮肤。

Fig. 3 Expression of LCK gene in various tissues of healthy *S. maximus*

M: molecular weight standard; 1: liver; 2: spleen; 3: intestine; 4: head kidney; 5: kidney; 6: gill; 7: gonad; 8: muscle; 9: heart; 10: brain; 11: skin.

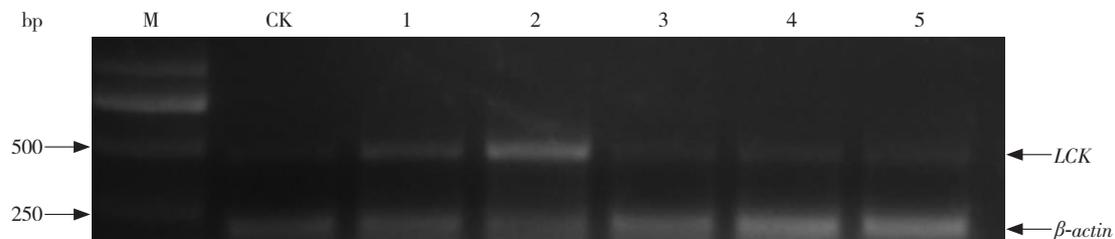


图4 LCK基因在鳃弧菌感染的大菱鲂胚胎细胞中的表达

M: 分子量标准; CK: 未感染组; 1-5 分别表示鳃弧菌感染后 6 h、12 h、24 h、48 h、96 h

Fig. 4 Expression of turbot LCK gene in infected turbot embryonic cell line

M: molecular weight standard; CK: uninfected group; 1-5: 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h after challenge with *V. anguillarum*

PCR结果分析表明, *LCK* 基因只在鳃弧菌感染的大菱鲆的脾脏中表达, 肝脏和头肾中均未检测出表达(结果未列出)。在鳃弧菌感染大菱鲆初期, *LCK* 基因

在脾脏中微弱表达, 但是在感染 48 h 后, *LCK* 基因表达增强; 72 h 后表达开始减弱(图 5)。

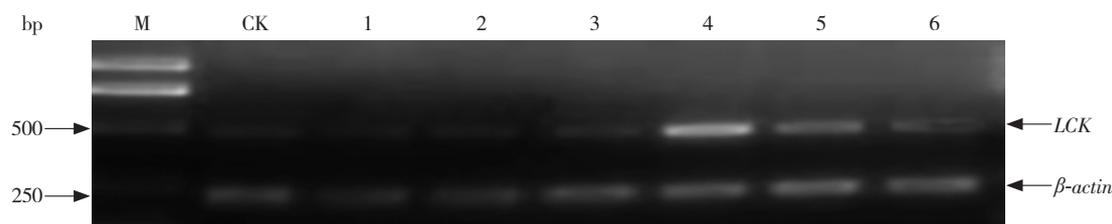


图 5 *LCK* 基因在鳃弧菌感染的大菱鲆脾脏组织中的表达

M: 分子量标准; CK: 未感染组; 1-6: 鳃弧菌感染 5 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h

Fig. 5 Expression of *LCK* gene in spleen of infected turbot

M: molecular weight standard; CK: uninfected group; 1-6: 5 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h after challenge with *V. anguillarum*

3 讨论

本研究从大菱鲆脾脏 cDNA 文库中筛选出了大菱鲆 T 淋巴细胞酪氨酸激酶 (*LCK*) 的基因片段, 克隆出了它的全长 cDNA, 其 ORF 共编码 502 个氨基酸残基。LCK 包含 5 个结构域: SH4 (N 端)、SH2、SH3、SH1 和 1 个 C 末端尾。N 端是 LCK 区别于 Src 家族其他成员的重要区域^[19]。N 末端的 4 个半胱氨酸残基 (CXXC) 能够与 CD4、CD8 的尾部结合, 诱导 *LCK* 基因与 TCR 结合。N 末端的 3 个氨基酸 Gly²、Cys³、Ser⁶ 能够将 LCK 定位在细胞膜上^[20]; SH1 具酪氨酸激酶活性; SH2 能够识别并结合含磷酸化酪氨酸的短序列, 通过蛋白的酪氨酸磷酸化/去磷酸化结合或解离信号转导分子; C 末端为 1 短片段, 对 LCK 的活性调节起作用。LCK 激酶的活性调节主要依赖于 2 个关键酪氨酸磷酸化位点。在哺乳动物中, Trp³⁹⁴ 为活化位点, 位于 SH1 结构域, 其磷酸化可增强激酶的活性。Trp⁵⁰⁵ 为抑制位点, 位于 C 末端尾, 其磷酸化后与 SH2 结构域结合, 抑制激酶活性^[21]; Trp⁵⁰⁵ 去磷酸化后与 SH2 解离, 激活 LCK 激酶活性^[9-10]。将大菱鲆 LCK 的氨基酸序列同其他脊椎动物 LCK 的氨基酸序列进行比较, 结果表明大菱鲆 LCK 比较保守, 其氨基酸序列包含有 5 个结构域: N 端 (SH4)、SH2、SH3、SH1 和 C 末端, 并且在其 N 端发现 GCXCS 框和 CXXC 框,

CXXC 框为 Src 家族成员 LCK 所独有的。这表明本研究所克隆基因为 Src 家族中 *LCK* 基因。大菱鲆 LCK 蛋白在 C 末端有 2 个保守的酪氨酸位点, 这与人类 LCK 蛋白中具有保守的 Tyr³⁹⁴ 和 Tyr⁵⁰⁵ 一致。在哺乳动物中这 2 个酪氨酸与 LCK 激酶的激活有关^[21-22], 大菱鲆的这 2 个酪氨酸位点可能也与大菱鲆 LCK 激酶的激活有关。结果同时还表明大菱鲆 LCK 高度保守, 且具有同哺乳动物相似的基因结构。通过 CLUSTAL W 比对分析发现, 大菱鲆 LCK 同红鳍东方鲀、虹鳟和大西洋鲑 LCK 的氨基酸序列相似性较高, 均高于 80%。系统发育树表明, 大菱鲆 LCK 同红鳍东方鲀和黑青斑河鲀 LCK 具有最近的亲缘关系; 其次是虹鳟、大西洋鲑、鲫和斑马鱼。

本研究分析了大菱鲆 *LCK* 基因在转录水平上的表达。在正常大菱鲆体内, *LCK* 基因只在脾脏中表达, 其他组织中不表达。这与在河鲀和虹鳟中的研究结果不同, 虹鳟 *LCK* 基因在胸腺中表达最强, 在脾脏、肾脏中微弱表达^[7]; 而河鲀 *LCK* 基因在肠、脾脏、鳍、心脏、肝脏、肌肉、卵巢中均有表达^[13]。但是大菱鲆 *LCK* 基因的表达与哺乳动物和鸡的 *LCK* 基因表达相似, 均在含有 T 淋巴细胞的组织中表达^[10, 23]。在鳃弧菌感染的大菱鲆胚胎细胞系细胞中, *LCK* 基因对病原菌的感染表现出了迅速应答, 在感染 6 h 后表达

即增强,由此推测LCK基因可能在胚胎发育的囊胚期就开始发挥重要作用。在鳗弧菌感染大菱鲂后,LCK基因在肝脏、头肾中未检测出表达,只在脾脏中检测到表达。在感染大菱鲂的脾脏组织中,LCK基因在48 h后表达增强,这表明LCK基因在T细胞免疫应答过程中起着作用,但具体的调节机制需要进一步研究。

综上所述,本研究首次对大菱鲂淋巴细胞酪氨酸激酶基因的克隆、特征及功能进行了分析,大菱鲂LCK和其他脊椎动物的LCK蛋白有着相似的结构特征。转录水平表达分析表明,LCK基因的表达与组织的T淋巴细胞有关;受到病原菌感染后表达增强,这表明LCK基因在大菱鲂的免疫系统调节中起作用。将进一步对其功能进行分析,深入研究其作用机制,期望能为大菱鲂病害防治提供理论基础。

参考文献:

- [1] Robinson D R, Wu Y M, Lin S F. The protein tyrosine kinase family of the human genome [J]. *Oncogene*,2000,19: 5 548-5 557.
- [2] Trevillyan J M, Chiou X G, Ballaron S J, et al. Inhibition of p56 (LCK) tyrosine kinase by isothiazolones [J]. *Arch Biochem Biophys*,1999,364 (1): 19-29.
- [3] Watts J D, Welham M J, Kalt L, et al. IL-2 stimulation of T lymphocytes induces sequential activation of mitogen-activated protein kinases and phosphorylation of p56LCK at serine-59 [J]. *J Immunol*,1993,151 (12): 6 862-6 871.
- [4] Sommers C L, Samelson L E, Love P E. LAT: a T-lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways [J]. *Bioessays*,2004,26: 61-67.
- [5] Hanke J H, Gander J L, Dow R L, et al. Discovery of a novel, potent, and src family selective tyrosine kinase inhibitor: study of LCK⁻ and fyn⁻ T-dependent T cell activation [J]. *J Biol Chem*,1996,271 (2): 695-700.
- [6] Williams J C, Wierenga R K, Saraste M. Insights into Src kin functions: structural comparisons [J]. *Trends Biochem Sci*,1998,23: 179-184.
- [7] Laing K J, Dutton S, Hansen J D. Molecular and biochemical analysis of rainbow trout LCK suggests a conserved mechanism for T-cell signaling in gnathostomes [J]. *Mol Immunol*,2007,44: 2 737-2 748.
- [8] Langenau D M, Ferrando A A, Traver D, et al. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2004,101: 7 369-7 374.
- [9] Brenner S, Venkatesh B, Yap W H, et al. Conserved regulation of the lymphocyte-specific expression of LCK in the fugu and mammals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99: 2 936-2 941.
- [10] Chow L M L, Ratcliffe M J H, Veillette A. Tkl is the avian homolog of the mammalian LCK tyrosine protein-kinase gene [J]. *Mol Cell Biol*,1992,12: 1 226-1 233.
- [11] Nikolaus S T, Leonard I Z. Development of T-cells during fish embryogenesis [J]. *Dev Comp Immunol*,1998,22: 253-263.
- [12] Chen S L, Xu M Y, Hu S N, et al. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen [J]. *Aquaculture*,2004,240: 115-130.
- [13] Chen S L, Hong Y, Scherer S, et al. Lack of ultraviolet-light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 [J]. *Gene*,2001,264: 197-203.
- [14] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*,2007,22 (3): 172-181.
- [15] Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*,2005,249: 63-68.
- [16] Dayhoff M O, Schwartz R M, Orcutt B C. A model of evolutionary change [M]//Dayhoff M O. Atlas of protein sequence and structure, vol.5. suppl.3. Washington, D C: National Biomedical Research Foundation,1978: 345-358.
- [17] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*,1994,22: 4 673-4 680.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M, et al. MEGA3. 0: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*,2004,5: 150-163.
- [19] Marth J D, Peet R, Krebs E G, et al. A lymphocyte specific protein-tyrosine kinase gene is rearranged and over expressed in the murine T-cell lymphoma LSTRA [J]. *Cell*,1985,43: 393-404.
- [20] Yasuda K, Kosugi A, Hayashi F, et al. Serine 6 of LCK tyrosine kinase: a critical site for LCK myristoylation, membrane localization, and function in T lymphocytes [J]. *J Immunol*,2000,165: 3 226-3 231.
- [21] Holdorf A D, Lee K H, Burack W R, et al. Regulation of LCK activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse [J]. *Nat Immunol*,2002,3: 259-264.

- [22] Giannini A, Bijlmakers M J. Regulation of the Src family kinase LCK by hsp90 and ubiquitination [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 5 667–5 676. of the human LCK gene differential accumulation of 2 classes of LCK transcripts in T-cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 2 173–2 180.
- [23] Takadera T, Leung S, Gernone A, et al. Structure of the 2 promoters

Cloning, characterization and expression analysis of a *LCK* gene from turbot (*Scophthalmus maximus*)

WANG Xian-li^{1,2}, ZHANG Yu-xi², MENG Liang², CHEN Song-lin²

(1 College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2 Key Lab of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;)

Abstract: The lymphocyte cell kinase (LCK) is a member of the Src family kinases of protein tyrosine kinase. Turbot (*Scophthalmus maximus*) is one of the most commercially important marine fish in China. To detect whether *LCK* gene is specifically expressed in the turbot immunity organs is very important for further investigation on the functions of *LCK* in turbot immunity response. In the present research, a novel turbot *LCK* gene was cloned from a turbot spleen cDNA library using RACE method. After splicing and assembling analysis with DNASTAR SeqMan software, a full-length *LCK* cDNA fragment of 1 999 bp was obtained, which included 193 bp 5' terminal untranslated region (UTR), 1 506 bp encoding region and 300 bp 3' terminal UTR containing one typical tailing signal (AATAAA) followed by the poly (A) tail. Amino acid sequence of turbot LCK was deduced from the nucleotide sequence of *LCK* cDNA. The open reading frame (ORF) of 1 506 bp was found to code for a protein of 502 amino acid residues. Phylogenetic analysis showed that the deduced LCK clustered with *fugu rubripes* and spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*). RT-PCR was conducted to detect the expression of *LCK* gene in various tissues of healthy turbot, the infected turbot embryonic cells (TEC) and immunity tissues of turbot infected with *Vibrio anguillarum*. RT-PCR result showed that turbot *LCK* gene was only expressed in spleen of uninfected turbot and no expression was found in intestine, gill, muscle, kidney, gonad, heart, brain and skin. In TECs the expression of *LCK* dramatically increased after 12 h of challenge with *V. anguillarum*. The expression of the turbot *LCK* cDNA was analyzed in liver, spleen and head kidney after challenge with *V. anguillarum*. In liver and head kidney, no expression of *LCK* was found. Furthermore, the turbot LCK was highly induced in spleen after 48 h of challenge with *V. anguillarum*. These results indicate that LCK plays an important role in turbot immune response. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 660–667]

Key words: *Scophthalmus maximus*; lymphocyte cell kinase (LCK); cDNA; RT-PCR

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri. ac. cn