

# 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)MHC A 基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析\*

张玉喜<sup>1,2</sup> 陈松林<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 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 青岛 266071)

**提要** 采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)方法,得到 1131bp 的大菱鲂 MHC A 全长 cDNA 片段。该序列包括 720bp 的开放阅读框(ORF), 75bp 的 5' 末端非编码区(UTR)以及 336bp 的 3' 末端非编码区。利用 CLASTAL W1.8 软件进行 MHC A 基因的氨基酸序列比对和同源性比较,结果表明,大菱鲂 MHC A 与牙鲆 MHC A 的相似性最高,为 69.8%,与真鲷、鲈鱼和丽鱼的相似性次之,分别为 65.5%、69.6%和 61.4%,与人、鼠和鲨鱼 MHC A 的相似性仅为 19.8%、31.6%和 26.9%。应用 RT-PCR 分析其组织表达发现 MHC A 基因在正常大菱鲂组织中均表达,但表达量在各个组织中不同,其中在鳃、脾、头肾、心脏、小肠和皮肤中有较强的转录本,中等程度表达于肝和血,在性腺和肌肉中表达最弱。

**关键词** 大菱鲂, MHC, 克隆, 组织特异性表达

**中图分类号** Q78

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)属于鲽形目、鲆科、菱鲆属,俗称欧洲比目鱼,原产于英国、法国等欧洲国家,栖息于大西洋北部海域,是欧洲水产品市场广受欢迎的一种名贵鱼类,经济价值极高。自 1992 年引入我国以来,近几年大菱鲂养殖业在我国北方沿海迅速兴起,其育苗和养殖技术已逐渐成熟且进入了产业化阶段。随着养殖规模的快速增长,高密度集约化养殖也带来了多种负面影响,疾病的流行也随之而来,其病害种类、发病频率及危害性逐年增加(薛淑霞等, 2006)。其中细菌性疾病危害最大,其流行性的暴发给整个大菱鲂养殖业造成了巨大的经济损失。

主要组织相容性复合体(Major Histocompatibility Complex, MHC),是由紧密连锁的高度多态的基因位点所组成的染色体上的一个遗传区域。MHC 基因编码细胞表面糖蛋白,能结合和呈递内源抗原和外源抗原给 T 细胞受体。MHC 广泛的参与免疫应答的调节和控制,激发机体

特异性免疫反应,在动物机体的免疫系统中发挥着极其重要的作用,并与许多疾病的抗性、易感性以及生产性能有密切的关系,对抗某些疾病起着重要的作用,从而成为疾病抗性和易感性的候选标记基因。自 Hashimoto 等(1990)报道了鱼类 MHC 基因序列以来,目前已对 30 多种鱼类的 MHC 基因进行了克隆,如牙鲆(张玉喜等, 2004)、真鲷(Chen *et al*, 2004, 2006)、鲈鱼(Hardee *et al*, 1995)和斑马鱼(Sültmann *et al*, 1993)等,在大菱鲂上尚未见报道。本文作者采用同源克隆和 RACE-PCR 技术克隆了大菱鲂的 MHC A 完整的 cDNA 序列,并对 cDNA 序列和由此推测的氨基酸序列进行了分析,同时比较了它与其他鱼类、鼠和人的 MHC A 的氨基酸序列,并分析了大菱鲂 MHC A 基因的组织特异性表达,为进一步研究 MHC 类分子的作用机理以及 MHC 基因多态性与鱼体抗病力的关系奠定基础。

\* 国家重点基础研究发展规划(973)项目,2004B117403 号;青岛市科技将才计划项目资助,2005—2008。张玉喜,博士, E-mail: zhang-yuxi@163.com

通讯作者:陈松林,研究员,博士生导师, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期:2005-11-04, 收修改稿日期:2006-03-30

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)购自山东海阳市海珍品养殖场。于青岛麦岛养殖基地暂养一周后,将大菱鲂组织取出,迅速放入液氮中冻存,然后转移到-80℃冰箱保存备用。

### 1.2 引物

根据其他鱼类(张玉喜等,2004; Hardee *et al.*, 1995; Sülmann *et al.*, 1993)的MHC A cDNA保守序列合成一对兼并引物:TMHC AN1(5'-CC-CTSATCTGTCATGTGACTGGT-3')和TMHC AC1(5'-CTCGTTCCYTTTGATGAGGAAGAA-3'),根据上面一对兼并引物得到的序列合成两条特异引物:GSP5 primer(5'-ATGTGACTGGTTTCTA-CCCTGCTCCTGT-3')和GSP3 primer(5'-ACAG-GAGCAGGGTAGAAACCAGTCACAT-3')分别被用来扩增大菱鲂MHC A cDNA序列5'和3'末端。

### 1.3 mRNA的提取和cDNA的合成

分别称取0.2g大菱鲂的肝、脾脏、鳃、肠、头肾、心脏、血、皮肤、性腺和肌肉10种组织,利用Trizol(Gibco BRL, Japan)一步法提取总RNA。cDNA利用M-MLV反转录酶(Promega)合成;RACE-Ready-cDNA利用BD Smart™ RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)合成,于-20℃冰箱保存备用。

### 1.4 RACE扩增和RT-PCR扩增

RACE-PCR扩增按照SMART RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech)的说明书进行。RACE PCR反应条件:94℃ 5min、94℃ 1min、70℃ 50s、72℃ 1min,共5个循环,每个循环退火温度降低1℃,接下来94℃ 30s、65℃ 30s、72℃ 3min,共30个循环,72℃延伸10min。

RT-PCR反应条件:94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 50s、30个循环,最后72℃延伸10min。

### 1.5 RACE产物的纯化、克隆及测序

50μl的RACE产物,经1%的琼脂糖凝胶电

泳,切下目的片段,用QIAEX Gel Extraction Kit(QIAGEN)回收试剂盒,按说明书提供的方法进行纯化。将回收产物按摩尔比(回收产物的浓度/分子量与T载体的浓度/分子量的比值)3:1的比例与pMD18-T(Takara)载体进行连接反应。连接产物5μl用于转化*E. coli* DH5 $\alpha$ ,根据蓝白斑原理,筛选白色菌斑,提取质粒,经*EcoR* I和*Hind* III酶切鉴定含插入片段的质粒。在上海博亚生物工程用ABI 3730测序仪进行测序。

### 1.6 序列分析

登录NCBI用BLAST对测序结果进行同源性检索。用DNAMAN(version 5.1)分析所得大菱鲂MHC A cDNA序列以及开放阅读框。信号肽序列用SignalP分析。蛋白质二级结构用PHDsec program软件进行预测分析。用CLUSTAL W1.8软件进行多种蛋白氨基酸序列的排列比较,用MEGA3.0软件中的邻位相联法(neighbor-joining, NJ)方法构建进化树。

## 2 结果

### 2.1 MHC A cDNA末端的快速扩增

根据其他鱼的MHC A cDNA的同源序列设计的兼并引物,扩增得到338bp的cDNA片段,根据BLAST分析结果(表1),所得的序列为MHC A基因。根据所得的片段设计基因特异引物进行RACE PCR。根据3'RACE的操作流程,得到822bp的特异带(图1);根据5'RACE的操作流程,得到约413bp的特异带(图1)。扩增产物克隆、测序后,经DNAMAN分析去除重叠序列(104bp)和接头序列后得到1131bp的全长cDNA序列(Genbank accession NO.: DQ094170)(图2)。由图2可见,大菱鲂MHC A cDNA由720bp编码区,75bp的5'UTR区和336bp的3'UTR区组成。3'UTR区含有脊椎动物典型的加尾信号AATAAA和26bp的PolyA尾巴。另外,在大菱鲂MHC A的3'UTR区发现了一个AU(ATTTA)序列,此序列与mRNA的稳定性直接相关(Bakheet *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 1986)。

表1 序列的BLAST分析结果  
Tab.1 The BLAST results of the sequence

Blast结果中与查询序列相似性较高的序列	匹配序列分值(Bits)	E值
<a href="#">gi 62901633 gb AA18782.1 </a> MHC class A antigen [ <i>Paralichthys olivaceus</i> ]	324	1e-87
<a href="#">gi 522315 gb AAB67867.1 </a> MHC class alpha [ <i>Morone saxatilis</i> ]	336	5e-91
<a href="#">gi 522311 gb AAA49381.1 </a> MHC class alpha [ <i>Morone saxatilis</i> ]	334	2e-90
<a href="#">gi 522319 gb AAB67859.1 </a> MHC class alpha [ <i>Morone saxatilis</i> ]	327	2e-88

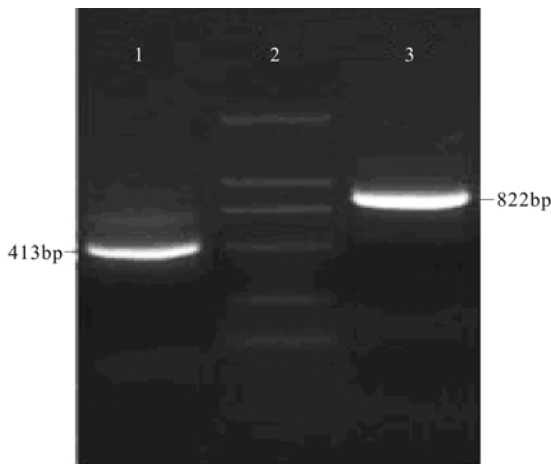


图 1 MHC A RACE 的扩增结果

Fig.1 The result of MHC A RACE amplification

1: 5' RACE 扩增产物; 2: DL2000 marker; 3: 3' RACE 扩增产物

### 2.2 MHC A 氨基酸序列分析

大菱鲂 MHC A cDNA 的开放阅读框编码 239 个氨基酸, 蛋白质预测的分子量约为 26.69kD, 等电点为 4.59。其二级结构经 PHDsec program 软件进行预测, 结果表明, 分别在 alpha2 上的第 148 位上含有 1 个 N-糖基化位点(N-X-S/T); 在 alpha2 的第 165 和 169 位上分别含有一个蛋白激酶 C-磷酸化位点(S/T-X-R/K); 在 alpha1 的第 35、64、70、100 位上和 alpha2 的第 170 位上共存在 5 个酪蛋白激酶 磷酸化

位点(S/T-X-X-D/E); 在 alpha1 的第 31 位、alpha2 的 152 位和跨膜区的 210 和 224 位上共含有 4 个 N-豆蔻酰化位点(G-E/D/R/K/H/P/F/Y/W-X-X- S/T/A/G/C/N-G/T); 另外, 在 alpha2 的 182 位上含有免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号(F/Y-X-C-X-V/A-X-H)。经 SignalP neural networks (NN)分析大菱鲂 MHC A 蛋白质的信号肽序列, 结果表明, 信号肽与 alpha1 区的分界点在第 16 和 17 位之间(VSA-EG)。用 MEGA3.0 构建系统进化树(图 3), 结果发现鲨鱼(Ohta *et al*, 2000)、鼠(Lankar *et al*, 2002)和人(AB062112)形成一个独立的分支, 大菱鲂与其他鱼类形成另一个独立分支。用 CLUSTAL W 比较该氨基酸序列与其他鱼类、鼠和人的 MHC A 氨基酸序列(表 2), 其中大菱鲂和牙鲆相似性最高, 为 69.8%, 与鲈鱼(Hardee *et al*, 1995)、真鲷(AY698064)与丽鱼(AAF65681)的相似性次之, 分别为 69.6%、65.5% 和 61.4%, 与虹鳟(CAB96452)、大西洋鲑(AAL40122)、鲤鱼(van Erp *et al*, 1996)和斑马鱼(Sültmann *et al*, 1993)的相似性分别为 47.6%、46.3%、44.4%和 43.6%, 与人(Morel *et al*, 2003)、鼠(Lankar *et al*, 2002)和鲨鱼(Ohta *et al*, 2000)的 MHC A 的相似性最低, 分别为 19.8%、31.6%和 26.9%。

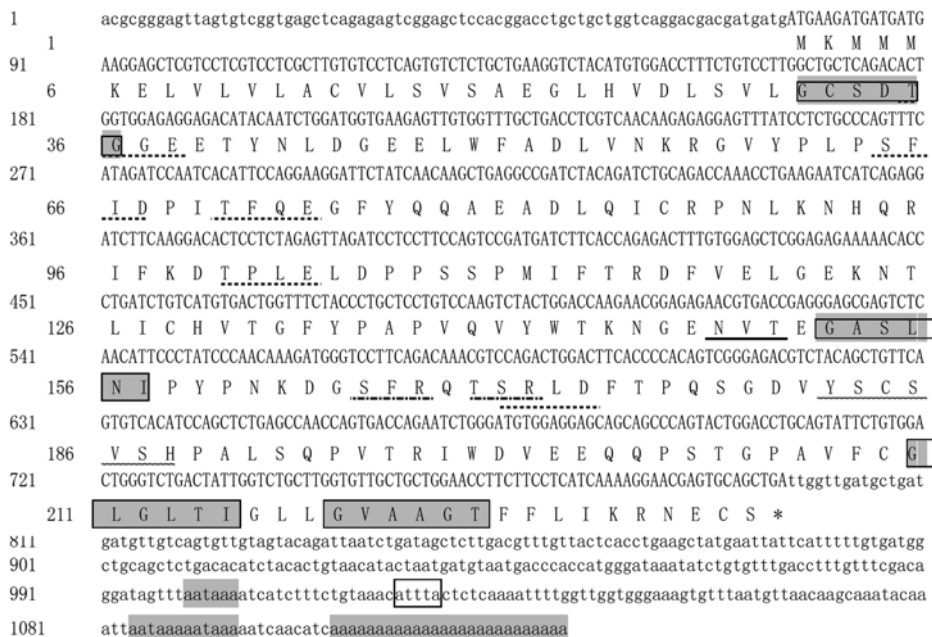


图 2 大菱鲂 MHC A cDNA 全长序列以及由此推测的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and putative amino acid sequence of turbot Class A gene

星号示终止密码子; 阴影示末端的加尾信号和 PolyA 尾巴, 小写字母示 5' 和 3' UTR, 方框内示 AU(ATTTA)序列; N V T 示 N 连接的糖基化位点; 下划点虚线示蛋白激酶 C-磷酸化位点; 下划点线示酪蛋白激酶 磷酸化位点; 带阴影的方框示 N-豆蔻酰化位点; 免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号用 Y S C S V S H 表示

表2 推测的大菱鲆 MHC A 氨基酸序列与其他鱼类、鼠和人的氨基酸同源性和遗传距离分析

Tab.2 Identity and genetic distance of turbot MHC Class A amino acid sequence with those of other vertebrates

MHC A	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
大菱鲆(1)	*	0.698	0.655	0.696	0.444	0.614	0.476	0.463	0.436	0.269	0.316	0.198
牙鲆(2)	0.302	*	0.607	0.674	0.464	0.604	0.473	0.491	0.442	0.255	0.291	0.193
真鲷(3)	0.345	0.393	*	0.722	0.462	0.639	0.493	0.485	0.467	0.294	0.296	0.208
鲈鱼(4)	0.304	0.326	0.278	*	0.453	0.665	0.493	0.502	0.485	0.308	0.302	0.187
鲤鱼(5)	0.556	0.536	0.538	0.547	*	0.491	0.558	0.562	0.709	0.255	0.293	0.234
丽鱼(6)	0.386	0.396	0.361	0.335	0.509	*	0.491	0.509	0.483	0.244	0.286	0.187
虹鳟(7)	0.524	0.527	0.507	0.507	0.442	0.509	*	0.847	0.545	0.277	0.308	0.246
大西洋鲑(8)	0.537	0.509	0.515	0.498	0.438	0.491	0.153	*	0.536	0.252	0.290	0.228
斑马鱼(9)	0.564	0.558	0.533	0.515	0.291	0.517	0.455	0.464	*	0.248	0.281	0.228
鲨鱼(10)	0.731	0.745	0.706	0.692	0.745	0.756	0.723	0.748	0.752	*	0.405	0.276
鼠(11)	0.684	0.709	0.704	0.698	0.707	0.714	0.692	0.710	0.719	0.595	*	0.298
人(12)	0.802	0.807	0.792	0.813	0.766	0.813	0.754	0.772	0.772	0.724	0.702	*

注: 对角线上方为不同 MHC A 蛋白之间全长氨基酸序列的同源性, 下方为遗传距离

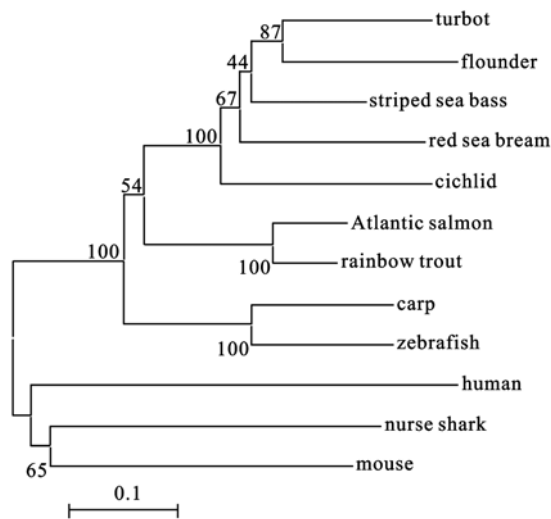


图3 基于 MEGA3.0 中的 NJ 方法的大菱鲆 MHC A 基因和其他物种的分子进化树聚类分析

Fig.3 Phylogenetic tree of the MHC Class A from turbot and other vertebrates in MEGA 3.0 Program based the on genetic distance by using NJ method

注: 系统树中结点处数值代表 1000 次评估的自举检验置信度

### 2.3 MHC A 在不同组织中的表达分析

应用 RT-PCR 半定量检测方法, 以反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 分析了 MHC A 基因在正常的大菱鲆组织中的表达(图 4)。用引物肌动蛋白-F(actin-F: 5'-TGGCATCACCTTCTACA-A-3')和肌动蛋白-R(actin-R: 5'-CTGCATCTCC-TGCTCAAAGTC-3')扩增的 $\beta$ 肌动蛋白( $\beta$ -actin)为阳性对照, 平衡不同模板的 cDNA 浓度。结果表明, 在正常大菱鲆组织中 MHC A 基因均扩增

出约 330bp 的片段, 其中较强的表达于鳃、脾、头肾、心脏、小肠和皮肤中, 中等程度表达于肝和血, 在性腺和肌肉中表达最弱。

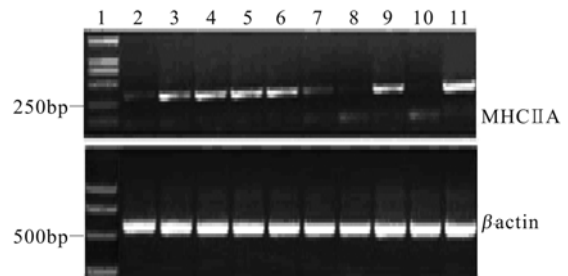


图4 大菱鲆 MHC A 的组织表达特异性 RT-PCR 分析

Fig.4 Reverse transcription-PCR analysis of Class A gene expression in various tissues from normal turbot

1: DL2000 DNA marker; 2: 肝; 3: 心脏; 4: 头肾; 5: 脾脏; 6: 皮肤; 7: 血; 8: 性腺; 9: 小肠; 10: 肌肉; 11: 鳃

### 3 讨论

主要组织相容性复合体(MHC)是脊椎动物免疫系统中的重要成员, 它编码抗原识别蛋白激发机体特异性免疫反应。本文作者克隆到大菱鲆完整的 MHC A cDNA 序列并对其在不同组织中的表达情况做了研究。在大菱鲆的 1131bp 的 MHC A cDNA 序列中, alpha1 和 alpha2 含有保守的 4 个半胱氨酸, 并且 alpha2 的 148—150 位上存在 N-X-S/T 糖基化位点, 在牙鲆、真鲷、鲈鱼、虹鳟和大西洋鲑的 alpha2 上相同的位点也存在; 当然, 在已知的其他哺乳动物和硬骨鱼中也存在 N-X-S/T 糖基化位点, 只是不是在相同的位点上。Alpha 链与 beta 链上的 N-X-S/T 糖基化位点提供

指导 MHC 分子 $\alpha\beta$ 二聚体形成的分子伴侣一个靶位点。另外,在 alpha2 区的 182—188 位上含有 MHC A 基因的极保守的免疫球蛋白和主要组织相容性复合体蛋白信号(F/Y-X-C-X-V/A-X-H)。推测的大菱鲂的连接肽和跨膜区与其他的硬骨鱼的相应序列相比较是相对保守的;在跨膜区大菱鲂和其他鱼类及哺乳类均含有 GXXGXXXGXX-XXXXG 框(X 指疏水氨基酸残基),Cosson 等(1992)推测此框与其和 MHC B 基因形成异二聚体有关。这与 Rene(1996)的鱼类的 MHC 基因的分子结构形式与哺乳动物的 MHC 类分子相似,只是鱼类的跨膜区极度保守的结论相一致。如果以人类的 MHC A 氨基酸顺序号(NP\_006111)和功能性氨基酸位置作为参照,比较大菱鲂 MHC A 推测的氨基酸与鱼类、鼠和人的 MHC A 氨基酸序列,在 18 个与抗原多肽结合的关键性氨基酸中,其中 84 位苯丙氨酸(F)和 112 位亮氨酸(L)在鱼类中极保守。基于 MEGA3.0 中的 NJ 方法的推测的大菱鲂 MHC A 基因的氨基酸分子进化树聚类分析表明,推测的大菱鲂 MHC A 基因的氨基酸和其他物种的 MHC A 的相似性在 19.8%—69.8%之间,此同源性与鱼类本身的分类地位和亲缘关系有关。大菱鲂和牙鲆相似性为 69.8%,因为大菱鲂和牙鲆同属鲽形目、鲽亚目、鲆科,亲缘关系最近;真鲷、鲈鱼和丽鱼同属鲈形目,亲缘关系次之,与虹鳟、大西洋鲑、鲤鱼和斑马鱼的亲缘关系较远。

MHC 类分子是由 链和 链组成的异二聚体,双链是平衡表达的,而且鱼类的 MHC 分子结构形式与哺乳动物的 MHC 类分子相似,主要在免疫系统的细胞类型上表达,如 B 细胞、巨噬细胞和其他抗原递呈细胞。Liu 等(2002)在光滑爪蟾上,利用 Northern blot 方法研究了 MHC A 基因在不同组织中的相对表达水平,发现在脾、胸腺和肠中的杂交信号较强,表明 MHC A 基因在这三种组织中有较高的转录水平。Stmann 等(1993)在研究斑马鱼的 MHC A 基因的多态性、表达和功能中发现 MHC A 基因在脾脏、肝胰腺、小肠和肾脏中高度表达。Murray 等(2000)在丽鱼的肝胰腺和脾中检测到 MHC A 基因的转录本。本实验发现在正常大菱鲂组织中,MHC A 基因较强的表达于鳃、脾、头肾、心脏、小肠和皮肤中,中等程度表达于肝和血,在性腺和肌肉中表达最弱。MHC A 基因较强的转录表达组织与前人的研究结果基本相符。

以上结果表明,MHC 基因的表达同组织所含有的淋巴/骨髓细胞有关,从而表明免疫器官有较强水平的基因表达。

### 参 考 文 献

- 张玉喜,陈松林,2004. 牙鲆 MHC B 基因 cDNA 克隆及其组织表达特异性分析. 高技术通讯,增刊: 309—315
- 薛淑霞,冯守明,孙金生,2006. 海水工厂化养殖大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)和褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)腹水病原菌的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 37(6): 548—554
- Bakheet T, Frevel M, Williams BRG *et al*, 2001. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res*, 29(1): 246—254
- Chen S L, Xu M Y, Hu S N *et al*, 2004. Analysis of immune-relevant genes expressed in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen. *Aquaculture*, 240: 115—130
- Chen S L, Zhang Y X, Xu M Y *et al*, 2006. Molecular polymorphism and expression analysis of MHC B gene from red sea bream (*Chrysophrys major*). *Dev Comp Immunol*, 30(4): 407—418
- Cosson P, Bonifacino J S, 1992. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class MHC molecules. *Science*, 258: 659—662
- Hardee J J, Godwin U, Benedetto R *et al*, 1995. Major histocompatibility complex class II A gene polymorphism in the striped bass. *Immunogenetics*, 41(4): 229—238
- Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y, 1990. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 817: 6863—6867
- Lankar D, Vincent-Schneider H, Briken V *et al*, 2002. Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. *J Exp Med*, 195(4): 461—472
- Liu Y, Kasaharab M, Lynn L *et al*, 2002. *Xenopus* class II A genes: studies of genetics, polymorphism, and expression. *Dev Comp Immunol*, 26: 735—750
- Morel J, Simoes C S, Avinens O *et al*, 2003. Polymorphism of HLA-DMA and DMB alleles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 30(7): 1485—1490
- Murray B W, Shintani S, Stmann H *et al*, 2000. Major histocompatibility complex class A genes in cichlid fishes: Identification, expression, linkage relationships, and haplotype variation. *Immunogenetics*, 51: 576—586
- Ohta Y, Okamura K, McKinney E C *et al*, 2000. Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(9): 4712—4717
- Rene J M 1996. Inference of structure and function of fish major histocompatibility complex (MHC), molecules

- from expressed genes. *Fish & Shellfish Immunology*, 6: 305—318
- Sültmann H, Mayer W E, Figueroa F *et al*, 1993. Zebrafish Mhc class II alpha chain-encoding genes: polymorphism, expression, and function. *Immunogenetics*, 38(6): 408—420
- Shaw G, Kamen R, 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46: 659—667
- van Erp S H, Egberts E, Stet R J, 1996. Characterization of class II A and B genes in a gynogenetic carp clone. *Immunogenetics*, 44(3): 192—202

## FULL LENGTH cDNA CLONING AND TISSUE EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (MHC) A FROM TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

ZHANG Yu-Xi<sup>1, 2</sup>, CHEN Song-Lin<sup>2</sup>

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

**Abstract** The full-length cDNA encoding turbot MHC class A was cloned from turbot using homology cloning and RACE PCR approach. The MHC class A was 1131bp in length, including 75bp 5' terminal UTR, 720bp encoding region and 336bp 3' terminal UTR with a AU motif (ATTTA) that associated with mRNA instability and three canonical polyadenylation signals (AATAAA), followed by an additional 26bp poly (A) tail. The 720bp ORF was found to code a protein with 239 amino acid residues, and its secondary structure was analyzed using PHDsec Program. One N-glycosylation site (N-X-S/T) was observed in alpha 1 domain region. Two protein kinase C phosphorylation sites (S/T-X-R/K) were identified in alpha 2 domain region and five casein kinase phosphorylation sites (S/T-X-X-D/E) were identified in alpha 1 and alpha 2. Four N-myristoylation sites (G-E/D/R/K/H/P/F/Y/W-X-X-S/T/A/G/C/N-G/I/T) were found in alpha 1, alpha 2 and transmembrane region. In addition, signature (F/Y-X-C-X-V/A-X-H) of immunoglobulins and MHC proteins occurred in alpha 2 domain region (residues 182–188). Alignment of deduced amino acid sequences of the MHC class A and those of other vertebrates demonstrated that they shared many protein features common in those of other fish and mammals. Phylogenetic analysis using CLASTAL W software showed that the putative MHC A and that of Japanese flounder were close to each other in the first sister group in similarity of 69.8%. For other animals, the similarity was 65.5%, 69.6%, 44.4%, 61.4%, 47.6%, 46.3%, 43.6%, 19.8%, 31.6% and 26.9% from red sea bream, striped sea bass, carp, cichlid, rainbow trout, Atlantic salmon, zebrafish, human, mouse and nurse shark, respectively. Semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that MHC class A was ubiquitously expressed in tissues, but the expression level was locally unique. The MHC A transcript was detected at a high level in head kidney, spleen, intestine, gill and heart, moderate in liver and blood, and low in gonad and muscle.

**Key words** Turbot *Scophthalmus maximus*, Major histocompatibility complex (MHC), Cloning, mRNA expression