

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15229

半滑舌鳎 *Shh* 基因的克隆与表达及甲基化分析

齐茜^{1,2,3}, 董忠典^{1,2}, 张宁^{1,2}, 邵长伟², 贾晓东², 温海深¹, 陈松林²

1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
3. 中国水产科学研究院 鲟鱼繁育工程技术研究中心, 北京 100070

摘要: 通过 RACE 方法获得半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Hh* 基因家族的 *Shh* 基因, 该基因全长 1 922 bp, 其中 5'UTR 266 bp, 3'UTR 360 bp, ORF1 296 bp, 编码 431 个氨基酸, 经预测该多肽的相对分子质量为 47.28 kD, 理论等电点 6.95, 具有 *Hh* 基因家族特有的保守结构域。氨基酸序列分析表明, 半滑舌鳎 *Shh* 与牙鲆的同源性最高, 为 82%, 与其他鱼类同源性为 74%~81%, 与非洲爪蟾的同源性为 61%, 与人和鼠的同源性为 63%~64%。甲基化结果显示, *Shh* 基因在 1 龄卵巢中的甲基化程度普遍低于雄鱼与伪雄鱼精巢。基因表达分析显示, *Shh* 基因在胚胎期的囊胚期表达显著高于其它时期($P<0.05$), 在雌雄成鱼 8 个组织器官均表达, 在雌性性腺分化的关键期孵化后 50 d, 雌性性腺中表达量较前期升高, 且显著高于同时期雄性性腺中的表达($P<0.05$), 在雄性性腺分化的关键期 80~95 d, *Shh* 基因在雄性中的表达水平显著升高($P<0.05$), 在 8 月龄、1 龄及 2 龄雌鱼性腺中表达显著高于雄鱼与伪雄鱼。本研究表明, 半滑舌鳎 *Shh* 基因在进化中高度保守, 与胚胎分化、组织器官形成、雌雄性腺分化及性腺发育密切相关。

关键词: 半滑舌鳎; *Shh*; RACE; qRT-PCR; 性腺分化与发育; 甲基化

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0316-12

Hedgehog (*Hh*)是编码一系列分泌蛋白的基因家族, 它控制着细胞的生长、代谢, 参与各种无脊椎动物和脊椎动物的胚胎发育以及控制各种机体器官的发生发育, 在多细胞生物生命活动中扮演重要角色^[1]。Hedgehog 基因最早是从无脊椎动物果蝇(*Drosophila melanogaster*)中克隆得到, 通过研究发现 *Hh* 基因控制着果蝇的翅膀, 体节, 腿和眼睛等组织的发育^[2-5]。随后在水蛭(*Hirudo medicinalis*)、海胆(*Diadema antillarum*)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheffi*)、蟋蟀(*Gryllus bimaculatus*)等^[6-8]无脊椎动物中也发现了 *Hh* 基因。线虫作为无脊椎模式动物, 虽然没有在其体内发现 *Hh*

基因, 但仍有一些 *Hh* 受体 Patched (*Ptch*)的同源蛋白存在, 并且在线虫中发挥着类似于 *Hh* 基因的功能^[9]。随着脊椎动物基因组的复制, *Hh* 基因也发生了分化, 主要可以分为三类, 即 Desert Hedgehog (*Dhh*) 基因, Indian Hedgehog (*Ihh*)基因和 Sonic Hedgehog (*Shh*) 基因^[10-11]。*Dhh* 主要表达于性腺组织, 包括睾丸的支持细胞和卵巢的颗粒细胞中^[12-14], 该基因缺失的小鼠虽然绝大多数组织的表型没有发生明显变化, 但是雄性小鼠会因为缺乏没有成熟的精子而不育^[12]。*Ihh* 基因特异的表达与原始内胚层细胞, 肠道以及肥大软骨细胞有关^[15-18]。约有 50% *Ihh* 缺失的胎儿在胚胎

收稿日期: 2015-06-08; 修订日期: 2015-08-06.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31130057, 31472269); 国家 863 高技术研究发展计划(2012AA10A403-2); 山东泰山学者工程专项.

作者简介: 齐茜(1983-), 女, 博士生, 主要从事海水鱼类良种选育及基因发掘研究. E-mail: yufu_qiq@163.com

通信作者: 陈松林, 研究员. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

发育早期死于卵黄囊的发育不良, 而存活的胚胎个体则表现出皮质骨缺陷和长骨软骨组织异常^[18-19]。*Shh* 基因是在脊椎动物表达最广泛的一类 Hh 信号分子, 在脊椎动物早期胚胎发生过程中, *Shh* 基因表达于结节脊索和底板等部位, 调节胚胎左右和背腹的不对称^[20-22]。*Shh* 基因在四肢的发育过程中表达于胚胎极化活性区(ZPA), 对四肢起到极化的作用^[23-25]。在随后的生长发育及各种器官的形成过程中, *Shh* 基因主要表达于各种上皮组织中并在其中发挥重要的调节作用^[26-32]。*Shh* 基因在生殖系统也发挥一定作用, *Shh* 基因在胎儿前列腺的形成过程中发挥重要作用, *Shh* 基因发生突变的胎儿泌尿生殖系统发育异常, 并且无法形成前列腺芽^[33]。另外, *Shh* 基因还在一定程度上参与调控卵泡的发育^[33]。Hh 信号通路的组成主要包括 4 类蛋白: Hh 基因家族, Hh 信号受体 *Ptch* 1 和 2, *Smo*(Smoothed) 及 *Gli*1、*Gli*2、*Gli*3^[1]。Hh 信号通路是一个复杂的网状系统, 在不存在 Hh 效应蛋白的状态下, *Ptch* 与 *Smo* 形成复合体, *Smo* 的活性被 *Ptch* 抑制, 该信号通路被抑制。在存在 Hh 效应蛋白时, Hh 与其受体 *Ptch* 结合, *Ptch* 对 *Smo* 活性的抑制作用消失, *Smo* 进一步激活 *Gli*, *Gli* 调控相应靶基因的转录, 最终发挥该信号传导通路的效应^[34-36]。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是中国重要的海水养殖鱼类, 在自然条件下, 雌雄个体生长差异显著, 成熟雌鱼全长及体重是雄鱼的数倍, 且存在性逆转现象, 导致养殖群体中生理雄鱼比例高于雌鱼^[37]。以上因素严重制约了半滑舌鲷规模化养殖的发展进程, 因而研究半滑舌鲷性别相关基因及性别决定机制, 对于半滑舌鲷性别控制和全雌育种具有重要意义, 这也是目前国际上亟待解决的一大难题^[38]。目前, 未见有关半滑舌鲷 Hh 信号通路的研究报道。本研究主要研究 Hh 信号通路 *Shh* 基因在半滑舌鲷早期胚胎、雌、雄成鱼不同组织和不同发育时期性腺的表达, 以及成鱼性腺中的甲基化分析, 为半滑舌鲷性别相关基因研究以及全雌育种提供试验数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用半滑舌鲷样品均来自山东省海阳黄海水产公司。其中 1 龄雌雄成鱼样品各 3 尾, 分别取雌雄鱼的性腺、脾、肝、肾、心脏、脑、肠、皮共 8 种组织, 8 月龄 3 尾、1 龄 3 尾及 2 龄雌雄伪雄鱼各 3 尾, 分别取其性腺组织, 胚胎期样品采取连续取样法, 分别取受精后发育卵裂早期、囊胚期、神经胚期、心跳期、胚体扭动期、孵出期胚体, 以及孵化后 35 d、50 d、65 d、80 d、95 d、150 d 性腺样品, 每个时期 3 个平行, 其中一侧性腺和其他所有样品液氮速冻 10 min, -80°C 保存, 用于 RNA 提取, 另一侧性腺投入 10 倍性腺体积的戊二醛固定液中(2.5%)固定 24 h, 再转入乙醇(75%)中保存, 用于石蜡切片的制备。另外, 每条鱼取少量尾鳍鳍条放入已加 1 mL 无水乙醇的离心管中, 使用海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(天根)提取其性腺组织 DNA, 具体实验步骤按照说明书进行, 用于遗传性别鉴定。

1.2 生理性别与遗传性别鉴定

生理性别与遗传性别鉴定采用性别特异 CseF382 标记为引物(CseF382a、CseF382s), 方法参考文献[39]。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

总 RNA 提取及质量检测步骤参考胡乔木^[40]。检测合格后的 RNA 样品放入 -80°C 冰箱内保存。根据宝生物公司的 PrimeScript[®] RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录合成 cDNA 第一条链。cDNA 于 -20°C 冰箱内保存备用。

1.4 *Shh* 基因的克隆

根据半滑舌鲷全基因组的测序结果^[38], 我们得到了 *Shh* 基因的部分 cDNA 序列, 并进行准确性验证。并根据验证后的序列使用末端扩增试剂盒 SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit 进行 RACE 末端扩增。扩增验证及特异扩增所需的引物序列见表 1。

1.5 序列和进化分析

首先通过引物查找去除载体序列, 然后用

表 1 *Shh* 基因克隆使用的引物序列表

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers used in the experiment for *Shh* cloning

引物名称 primer	引物序列(5'–3') sequence(5'–3')	目的 amplification target
CseF382a	ATTCACTGACCCCTGAGAGC	性别鉴定
CseF382s	TGGCACCATCATTGTAAAACTA	for genetic sexidentification
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT	5'和 3'末端扩增 for 5' and 3' RACE
UPM-short NUP	GGTATCAACGCAGAGT	
	CTAATACGACTCACTATAGGG	
	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
β -actin-a	GCTGTGCTGTCCCTGTA	β -actin 的表达
β -actin-s	GAGTAGCCACGCTCTGTC	expression of β -actin
Shh-5'nest	AGATGAGAGCGACCGAGGCGAC	
Shh-5'race	AGGGTCAGAGTGGAGGATGCCG	5'和 3'末端扩增
Shh-3'nest	AGTCCATCCATCCACTGGGCAT	for 5' and 3' RACE
Shh-3'race	TTTACGCAGGAACACCAGGGC	
Shh-1a	ACGGAGTTCTCTGCTTTC	
Shh-1s	CCTCGGTCGCTCTCATCT	539 bp
Shh-2s	GTCCAAAGCCCACATCCA	
Shh-2a	ACCACCACGGTCCCCTCC	
r-Shh-s	CAGGAACACCAGGGCTCG	
r-Shh-a	CCAGCCGCAGTCTGAGGG	178 bp
msp-Shh-a	TGTTACGGTAGATAGTAGGATACGG	
msp-Shh-s	ACAAAAACAAACAAATAAAAAACGA	甲基化
msp-Shh-us	TGTTATGGTAGATAGTAGGATATGG	methylation
msp-Shh-ua	ACAAAAACAAACAAATAAAAAACAAC	

SeqMan 软件将已验证序列与 5'序列和 3'序列进行拼接, 最终获得 *Shh* 基因完整 cDNA 序列。再使用 DNASTAR 5.0 软件预测出 CDS 区并翻译成氨基酸序列, 用 SMART 对氨基酸序列进行结构功能域分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>), 用 Vector NTI 10 软件进行多序列比对, MEGA 5.0 软件构建系统进化树。在线预测(<http://www.expasy.org/proteomics>)蛋白的相对分子质量、等电点。

1.6 *Shh* 基因启动子区甲基化分析

通过片段扩增验证形式获得半滑舌鲷 *Shh* 基因起始密码子上游约 3000 bp 的片段。使用在线软件 MethPrimer 预测 *Shh* 基因的 DNA 启动子区域潜在的甲基化位点, 选出两对能覆盖多个甲基化位点的引物。引物序列见表 1。

性别鉴定后, 分别选取 1 龄雌、雄鱼及伪雄鱼 3 种类型的成鱼各 5 条, 提取其性腺组织 DNA, 实验步骤按照海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(天根)说明书进行。提取后, 使用 NanoVue™ Plus 分

光光度计进行 DNA 浓度测定, 将 5 条鱼 DNA 等摩尔量混匀, 调节其浓度使其介于 10~25 ng/μL。

使用 Zymo 公司的甲基化检测试剂盒 DNA Methylation-Gold Kit™分别处理雌鱼、雄鱼、伪雄鱼的性腺 DNA。每次制备的 DNA 的量为 200~500 ng, 具体处理步骤参照说明书进行。

以未处理的 DNA 为模版, 以 msp-Shh-a、msp-Shh-s 为模版进行 PCR 扩增, 以获得修饰后的 DNA 为模板, 以 msp-Shh-ua、msp-Shh-us 为上下游引物, 再次进行 PCR 扩增。获得 PCR 产物后, 将 PCR 产物电泳切胶、回收纯化, 再连接、转化, 随机选择 10 个雌鱼、雄鱼、伪雄鱼阳性克隆样本送往英潍捷基公司测序。用 BIQ Analyzer 软件分析测序结果并生成甲基化图谱。

1.7 实时定量 PCR

定量检测使用 Takara 定量试剂盒, 以 β -actin 为内参, 每个样本设置 3 个平行, 每个实验重复 3 次, 结果用 ABI 7500SDS software 进行分析, 所

得数据均表示为平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$), 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析并进行 Duncan 多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 用 Microsoft Office Excel 作图。基因特异性引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷 *Shh* 基因的克隆

通过基因序列验证和末端扩增, 我们得到 *Shh* 基因全长, cDNA 序列及氨基酸分析见图 1。该基因全长 1922 bp, 其中 5'UTR 266 bp, 3'UTR 360 bp, ORF 1296 bp, 编码 431 个氨基酸, 经预测该多肽的相对分子质量为 47.28 kD, 理论等电点为 6.95。

经 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线预测, 结果显示, *Shh* 蛋白有两个 HH 家族成员特有的保守结构域, 一个是 HintN 结构域(位于第 196~318 个氨基酸); 另一个是 HintC 结构域(位于第 321~365 个氨基酸)。经信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)为 1~23 个氨基酸位置。丝氨酸苏氨酸酪氨酸磷酸化位点预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)有多个位点。蛋白激酶位点预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>)PKC 位于 184 位点。N-连接糖基化位点(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测有 4 个。半胱氨酸位于 185 位, 具有保守位点 G/C, 能将序列切割呈切割成 N 端和 C 端两部分(图 1)。

2.2 半滑舌鲷 *Shh* 基因同源性分析

同源对比结果显示, 半滑舌鲷 *Shh* 蛋白与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的同源性最高, 为 82%, 其次是奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus* ♂ × *Oreochromis niloticus* ♀), 为 81%, 与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性分别为 79%、78%、74%、74%, 与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的同源性为 61%, 与人和鼠的同源性为 63%~64%, 由此可见, *Shh* 在进化上是保守的。

通过 NJ 法构建了 *Shh* 基因的系统发育树, 可靠性评估为重复 10000 次(图 2)。通过进化树结构可清楚看出, 整个进化树明显的分为三支, 一支

为 *Shh*, 一支为 *Dhh*, 另一支为 *Ihh*。半滑舌鲷 *Shh* 和各种鱼类关系比较密切, 聚为小分支。

2.3 成鱼性腺 *Shh* 基因启动子区甲基化特征

利用 BSP, 本研究分析了位于 *Shh* 基因启动子区域的 11 个 CpG 位点的甲基化情况, 结果显示, *Shh* 基因启动子区域在雌、雄及伪雄鱼性腺中甲基化水平差异很大。如图 3 所示, 在雌鱼卵巢中, 有 3 个 CG 位点甲基化为 0, 其余位在 1/9~5/9, 整体甲基化程度为 18% (18/99)(图 3A)。在雄鱼精巢中, 所有位点都有不同程度的甲基化, 其中 1 个位点 100%甲基化, 其余位点甲基化程度在 1/8~7/8, 整体甲基化程度为 67%(59/88)(图 3B)。在伪雄鱼精巢中, 其平均甲基化程度为 49.5% (49/99), 甲基化程度介于雌鱼和雄鱼之间(图 3C)。

2.4 组织表达分析结果

2.4.1 *Shh* 基因在半滑舌鲷早期胚胎中的转录水平 通过 RT-PCR 结果显示, 半滑舌鲷 *Shh* 基因在不同胚胎期发育时期的转录水平存在差异(图 4), 从卵裂早期到囊胚期、神经胚期、心跳期、胚体扭动期、孵出期, 囊胚期表达显著高于其他时期 ($P < 0.05$), 而卵裂早期、神经胚期、心跳期的低表达。

2.4.2 *Shh* 基因在成鱼不同组织中的转录水平 图 5 是 *Shh* 基因在雌雄成鱼 8 种不同组织中的 RT-PCR 结果。结果显示, *Shh* 基因在性成熟雌鱼和雄鱼的肝、脑中高表达, 皮肤、性腺次之, 而在肠、肾、脾中低表达。在雌性性腺表达显著高于雄性 ($P < 0.05$)。

2.4.3 *Shh* 基因在仔鱼性腺中的转录水平 *Shh* 基因在不同发育时期仔鱼性腺中的表达情况如图 6 所示。结果显示, 在卵巢中, *Shh* 基因在仔鱼出膜后 35~50 d 的表达量, 呈现上升趋势, 在出膜后 50~80 d 卵巢中的表达量呈下降趋势, 95 d 有所上升, 至 150 d 表达平稳。而在精巢中, *Shh* 基因在仔鱼出膜后 35~80 d 表达呈下降趋势, 95 d 大幅上升, 120 d 时下降, 且 120~150 d 时表达雌雄差异不大。

2.4.4 *Shh* 基因在成鱼性腺中的转录水平 研究发现, *Shh* 基因在 8 月龄、1 龄及 2 龄卵巢中的

```

1  aggcggctgcagctccactccactccagatcccggtggttttaattccctctactttttgaaccctccttcg
76  cgcccccccccacgcggtttctctgtcaggcggtccatttccgcacgtccacggtagacagcaggacacggag
151 cagcagcggaggagacaagagacattagtggaggcagacggcgaggagagaagacagcagcggagccgcttcacc
226 tcatcttacaggagcagagattcagccgaagactcggagATGGTTCTCTGGAGCACCGTCGCCTCGGTCGCTCT
1  M V L W S T V A S V A L
301 CATCTGCTGTCTGCTGCTCCTCGGGATGGGCTGTGGACGGGCAGGGGCTACGGCAGGAGGAAGCACCCGAA
13  I C L S L L S S G M G C G P G R G Y G R R K H P K
376 GAAGCTGACACCTCTGGGTACAAGCAGTTTATCCCAACGTGGCGGAGAAGACCCCTGGGGCCAGCGGCAGATA
38  K L T P L A Y K Q F I P N V A E K T L G A S G R Y
451 CGAAGCAAGATCACGAGAACTCGGAGCGATTAAAGGAGCTGACTCCCAACTACAACACTGACATCATCTCAA
63  E G K I T R N S E R F K E L T P N Y N T D I I F K
526 GGATGAGGAGAACCGGTGCCGACAGGCTCATGACTCAGAGATGCAAAGACAAGTGAATTCTCTGCCATCTC
88  D E E N T G A D R L M T Q R C K D K L N S L A I S
601 GGTGATGAACAGTGGCCCGGGTCAAGCTGCGGGTACCGAAGGTGGGACGAGGACGGACACCACTTCGAGGA
113 V M N Q W P G V K L R V T E G W D E D G H H F E E
676 GTCGCTGCACTACGAAGCGCGCGCTGGACATCACACGTCCGACAGGGACAAGCAAGTACGGCACTCTGTCT
138 S L H Y E G R A V D I T T D R D K S Y G T L S
751 CAGGCTGGCCGTGGAGGCTGGGTTTACTGGGCTACTACGAGTCCAAGCCACATCCACTGCTCGTGAAAGC
163 R L A V E A G F D W V Y Y E S K A H I H C S V K A
826 AGAGAACTCCGTGGCGGCAAGTCCGGCGGCTGTTCCCGGCATCTCCACTCTGACCCCTGGAGGACGGAACCCA
188 E N S V A A K S G G C F P A S S T L T L E D G T Q
901 GAGAGCGGTGCGGGAGCTGCGGCCCGGGACAGGGTTCTGGCGGCCGACCTGACGGACACCTGCTCTACCGGA
213 R A V G E L R P G D R V L A A D P D G H L L Y T D
976 CTTTCATCACCTTATCGACAGGACTCCACCACAGGAGGCTCTTCTACGTATCGAGACCGACTCGGGCCAGAG
238 F I T F I D Q D E T R R L F Y V I E T D S G Q R
1051 AATCACGCTGACCGCGCACACCTGCTCTTCTGGGCCACAACCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
263 I T L T A A H L L F V G H N S S S S S S S S S S
1126 TTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT
288 S S S S S S S S V V D R R M S A V F A S S V Q P G Q
1201 GAAGGTCTTCTGTTGACTCCGTGGGACAGCAGCTCCAGCCCGTACCGTCCGACGGATTTTACGCAGGAACA
313 K V F V L D S V G Q Q L Q P V T V R R I F T Q E H
1276 CCAGGGCTCGTTTGCCAGTACCGCGGAGGGACCGTGGTGGTGGACCGGGTCTGGCGTCTGTTACGAGT
338 Q G S F A P V T A E G T V V V D R V L A S C Y A V
1351 GATCGAAGACACCGGCTGGCACACTGGGCCCTGGCCCCGGTCAGGGCCGCGCACTGGGTCTCCACGCTGCTTTT
363 I E D H R L A H W A L A P V R A A H W V S T L L F
1426 CAGCCCTCAGACTGCGGCTGGGACCGGAGGAGGACGGGTCACCTGGTACTCCAAGGTCCTTTACGATTAGG
388 S P Q T A A G T R Q E D G V H W Y S K V L Y Q L G
1501 GACATGGCTGTTGGACAGTCAATCCATCCACTGGGATGTCGGTGTCCCGAGTTGAaggttcgactccgg
413 T W L L D S Q S I H P L G M S V S P S *
1576 aggaacagagtcggactcgaacgtagagacacgtgactattcagtagatataaaaaacaacaacaataaaat
1651 caaataaaaatcattattgtgaacaacagacaccaaccagacgaaggtccgagcgccgaggttggatattta
1726 ttggacagacttttcccgagctgtgtcccggtgtcagagaaacgagtgagcccttaaaaaaaagtttctctttg
1801 aataatttattctgtgaagagcctgagctctggactgtgtcttatctattttgtatatctcaaatgttaa
1876 aaaagacttaaaatgaaagaaaatgtgttaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 半滑舌鲷 *Shh* 的 cDNA 序列和氨基酸序列预测

poly A 用双下划线表示; 竖箭头表示信号肽切割位点; 黑色、红色和蓝色的下划线均为保守区域, 分别为 HH_signal (42~187 aa), Hint (/Intein) domain N-terminal region (199~305 aa)以及 Hint (Hedgehog/Intein) domain C-terminal region (307~351 aa); 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化位点分别用黄底、绿底和紫底方框表示; 1 个蛋白激酶位点(PKC)用透明橙色椭圆框表示; N-连接糖基化位点用透明绿色方框表示。

Fig. 1 Full length of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Shh* in *C. semilaevis*

The poly (A) is double underlined; vertical arrows indicate signal peptide cutting site; black, red and blue underline are conservative region, indicating HH_signal (42~187 aa), Hint (/Intein) domain N-terminal region (199~305 aa), and Hint (Hedgehog/Intein) domain C-terminal region (307~351 aa), respectively; serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites are indicated by yellow, green and purple bottom boxes, respectively; the transparent orange oval box indicates protein kinase site (PKC); transparent green box indicates N-connecting the glycosylation site.

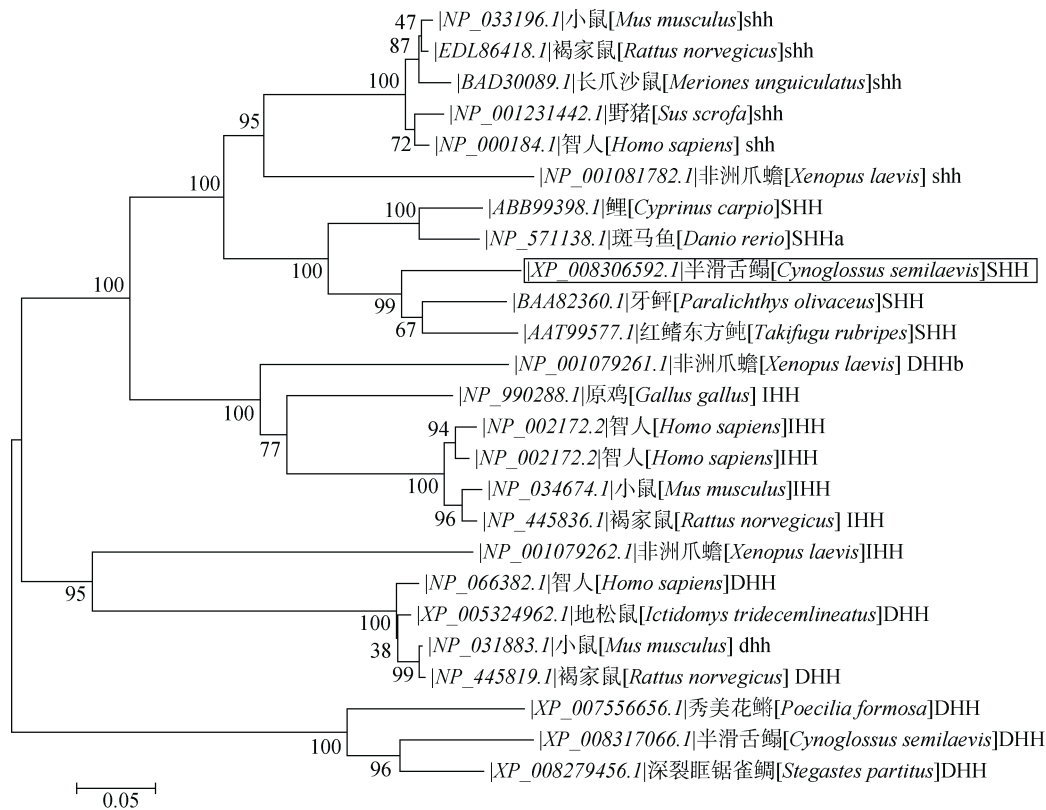


图 2 半滑舌鳎与其他脊椎动物 *Shh* 蛋白进化比对

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Shh* protein in *C. semilaеvis* and other vertebrates

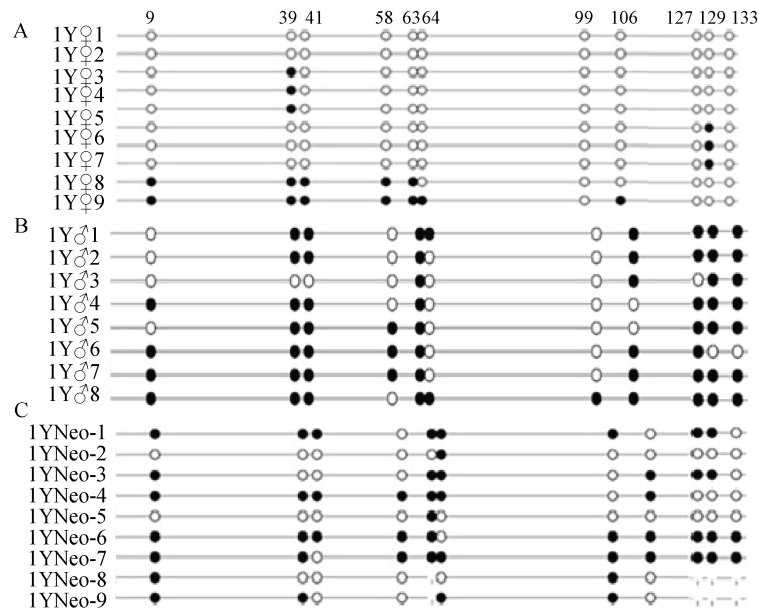


图 3 1 龄半滑舌鳎性腺 *Shh* 启动子区的甲基化差异

A: 1 龄雌性腺; B: 1 龄雄性腺; C: 1 龄伪雄性腺.

数字 9~133 代表潜在的启动区甲基化位点, ●代表甲基化位点, ○代表未甲基化位点.

Fig. 3 The methylation profiles of *Shh* in gonads of one-year old *C. semilaеvis*

A: one-year female; B: one-year male; C: one-year neo-male.

Numbers 9–133 correspond to potential CpG methylation sites. Filled (black) circles correspond to methylated Cs, and unfilled (white) circles correspond to unmethylated Cs.

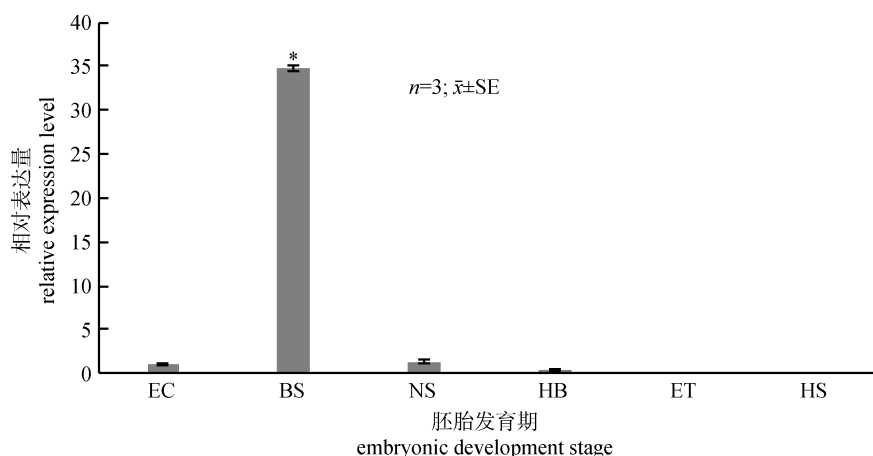


图 4 *Shh* 基因在半滑舌鲷早期胚胎发育的表达量

BS: 囊胚期, EC: 卵裂早期; ET: 胚体扭动期; HB: 心跳期; HS: 孵出期; NS: 神经胚期. *表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Expression of *Shh* gene in different embryonic developmental stages of *C. semilaevis*

BS: blastula stage; EC: early cleavage; ET: embryo twist; HB: heart-beating; HS: hatching stage; NS: neural stage. * donates significant difference ($P<0.05$).

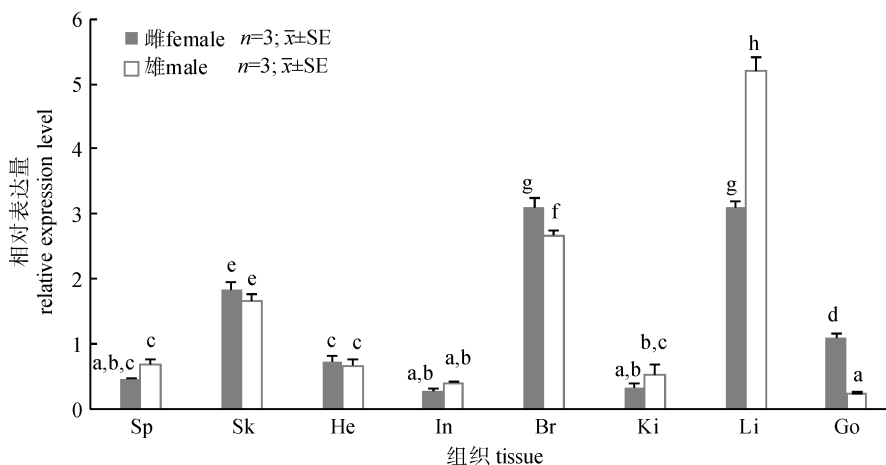


图 5 *Shh* 基因在性成熟雌鱼、雄鱼不同组织中的表达量

Br: 脑, Go: 性腺, He: 心脏, In: 肠, Ki: 肾, Li: 肝, Sk: 皮肤, Sp: 脾.

不同小写字母为差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 RT-qPCR analysis of *Shh* expression in various tissues of sexually mature male and female

Br: brain; Go: gonad; He: heart; In: intestine; Ki: kidney; Li: liver; Sk: skin; Sp: spleen.

Different letters donate significant difference between different groups ($P<0.05$).

转录水平显著高于同时期的雄鱼及伪雄鱼成熟精巢($P<0.05$), 且在 8 月龄时显著高于其他时期($P<0.05$)(图 7)。

3 讨论

3.1 半滑舌鲷 *Shh* 基因同源性及进化分析

本研究通过片段验证及 RACE 末端扩增得到半滑舌鲷 *Shh* 基因 cDNA 序列, 其全长 1922 bp, 编码 431 个氨基酸, 经预测该多肽的相对分子质

量为 47.28 kD, 具有 HH 家族成员特有的保守结构域 HintN 和 HintC, 以及切割位点具有保守位点 G/C, 能将序列切割呈切割成 N 端和 C 端两部分, 其中 N 端蛋白具有生物活性, C 结构域包括 Hint 模块和 SRR (sterol-recognition region, the cholesterol-binding site of HHC) 位点^[41-42], C 端借助 SRR 以一个十分独特的方式连接一个胆固醇分子到 HH-N 的羧基端, 这可能影响 HH 蛋白分子的极性分布和它与受体的结合, 影响临近分泌细胞较远靶细

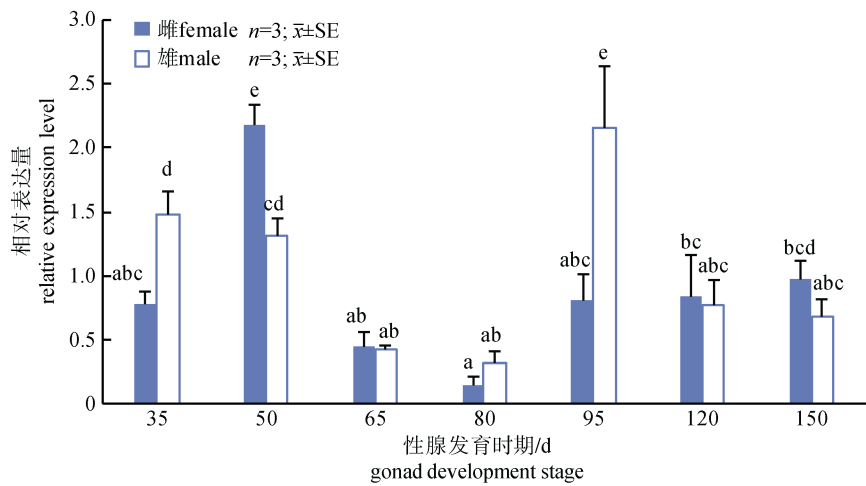


图 6 *Shh* 基因在仔鱼性腺中的表达量

35 d: 出膜后 35 d; 50 d: 出膜后 50 d; 65 d: 出膜后 65 d; 80 d: 出膜后 80 d; 95 d: 出膜后 95 d; 150 d: 出膜后 150 d. 不同字母表示组间差异显著($P>0.05$).

Fig. 6 The expression profile of *Shh* in gonads at different stages of development
35 d: 35 d age after hatching; 50 d: 50 d age after hatching; 65 d: 65 d age after hatching; 80 d: 80 d age after hatching; 95 d: 95 d age after hatching; 150 d: 150 d age after hatching. Values with different letters mean significant difference ($P>0.05$).

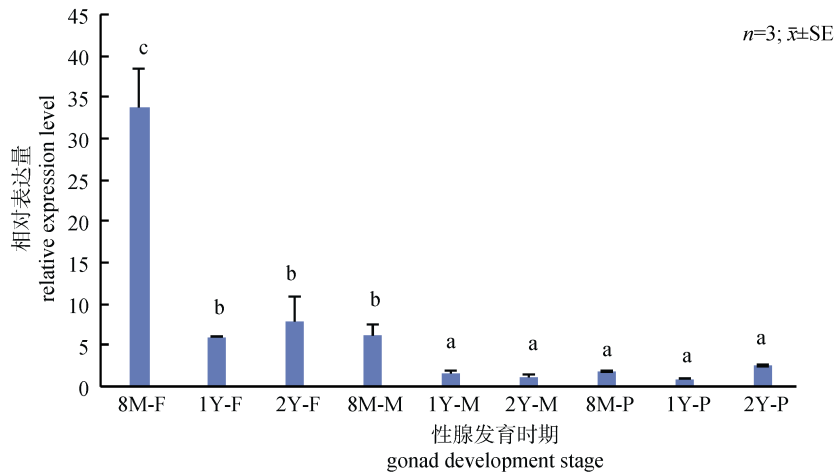


图 7 *Shh* 基因在成鱼性腺中的表达量

8M-F: 8 月龄雌鱼; 1Y-F: 1 龄雌鱼; 2Y-F: 2 龄雌鱼; 8M-M: 8 月龄雄鱼; 1Y-M: 1 龄雄鱼; 2Y-M: 2 龄雄鱼; 8M-P: 8 月龄伪雄鱼; 1Y-P: 1 龄伪雄鱼; 2Y-P: 2 龄伪雄鱼. 不同字母表示组间差异显著($P>0.05$).

Fig. 7 The relative expression of *Shh* in gonads among female, pseomale and male
8M-F: 8-month female; 1Y-F: 1-year female; 2Y-F: 2-year female; 8M-M: 8-month male; 1Y-M: 1-year male; 2Y-M: 2-year male; 8M-P: 8-month pseomale; 1Y-P: 1-year pseomale; 2Y-P: 2-year neomale. Values with different letters mean significant difference ($P>0.05$).

胞的基因表达, 可以进行短距离和长距离的信号传递^[35]。
通过多重序列比对, 发现从果蝇到人类, *Hh* 基因的功能结构域具有高度的保守性。半滑舌鳎 *Shh* 和 *Dhh* 与其他鱼类的 *Shh* 和 *Dhh* 分别聚为一个小分支, 半滑舌鳎 *Shh* 和其他鱼类 *Shh* 同源性在 74%~82%, 与哺乳类、两栖类的亲缘关系稍远, 但也达到

了 60%以上, 结合序列氨基酸预测结构分析, 进一步说明半滑舌鳎 *Shh* 基因在进化中保守的位置。
3.2 半滑舌鳎 *Shh* 基因的表达分析
Shh 基因在半滑舌鳎胚胎发育过程中的表达显示其在囊胚期的表达显著高于其他时期, 其次是神经胚期。*Shh* 基因在卵裂早期呈现的低水平表达可能是母系表达的结果^[41-45]。到囊胚期大量

升高, 囊胚期主要是细胞分化阶段, 说明 *Shh* 基因与细胞的分化密切相关, 这种表达和文昌鱼、斑马鱼及非洲爪蟾的模式类似^[46-48]。而更进一步理解 *Shh* 基因在胚胎发育中的影响, 可以采用胚胎组织原位杂交的方式, 通过定位进行深入的研究。

Shh 基因在不同性腺发育期的结果显示, 50~65 d 时, 雌性性腺中 *Shh* 基因的相对表达量高于雄性个体, 而在仔鱼发育 80~95 d 时, 雄性性腺中 *Shh* 基因的相对表达量高于雌性个体。马学坤等^[49]研究发现, 半滑舌鲷在 22℃ 养殖条件下, 出膜 62 d 以后, 雌鱼性腺发育开始, 体积略有增大, 而雄鱼的性腺此时还没有开始分化。邓思平等^[50]的研究证实, 半滑舌鲷出膜后 30 d, 雌雄性腺结构出现差异。张丽燕^[51]的研究发现半滑舌鲷雌鱼自出膜后 65 d 左右性腺分化, 且雄鱼晚于雌鱼的性腺分化。从出膜后 95 d 起, 其精巢体积明显增大, 精巢内细胞开始分化为不同形态, 在出膜后 120 d, 精巢已经初具精小叶结构, 之后精小叶逐渐完善, 精小叶内初级精母细胞已经被染成紫色。因此, 本研究中 50~65 d 时, 为雌性性腺分化的关键时期, 此时期为雌性性腺分化起始阶段, 雌性性腺中 *Shh* 基因的相对表达量高于雄性个体, 而在 80~95 d 时, 为雄性性腺分化的关键时期, 雄性性腺中 *Shh* 基因的相对表达量高于雌性个体, 因此, 我们推测 *Shh* 基因与半滑舌鲷的性腺分化密切相关。进一步分析 *Shh* 基因在 8 月龄、1 龄及 2 龄雌、雄及伪雄性腺中的表达, 发现各时期卵巢的表达显著高于雄鱼及伪雄鱼精巢中的表达, 由此推断半滑舌鲷 *Shh* 基因很可能参与了生理雌鱼的卵巢发育过程。另外, 我们检测到雌雄成鱼 8 种组织中 *Shh* 基因均有表达, 说明其对多种组织器官的发生产生重要作用, 尤其是雌性腺的发育。

3.3 半滑舌鲷 *Shh* 基因的甲基化分析

我们比较了 *Shh* 基因启动子区在雌鱼雄鱼以及伪雄鱼性腺中的甲基化程度。结果表明, 半滑舌鲷 *Shh* 基因在 1 龄卵巢中的甲基化程度普遍低于雄鱼与伪雄鱼精巢。这与邵长伟对全基因组的甲基化测序结果一致^[52]。结合 *Shh* 基因在精巢、

卵巢中的表达量特征, 不难得以下推论, *Shh* 基因在卵巢中的甲基化程度较低, 因而该基因在卵巢中的表达量较高; 而在精巢中, *Shh* 基因的甲基化程度较高, 高甲基化抑制了该基因在精巢中的表达。综上, 这 3 个基因和胡乔木^[40]对半滑舌鲷 *Dmrt1* 基因, 张丽燕^[51]对半滑舌鲷 *piwil2* 基因的研究结果一致, 即同一基因甲基化程度和该基因的表达量成负相关, 当甲基化密度高时抑制转录, 当甲基化密度低时转录就强^[53]。在鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*), *cyp19a* 基因启动子 DNA 甲基化调控芳香化酶基因的表达, 并且受温度影响, 高温增加雌鱼 *cyp19a* 启动子甲基化^[54]。已报道的半滑舌鲷 *Cyp19a* 与 *Gsdf* 基因在温度诱导的性逆转前后均具有显著的表达差异^[52]。而本研究中, 未进行不同温度下系统调控的影响, 可以进一步进行不同温度下的整体表达调控情况试验, 探索 *Shh* 基因的甲基化程度对该信号通路的影响。

本研究通过对半滑舌鲷 *Shh* 基因的克隆、表达分析及甲基化分析, 初步说明 *Shh* 基因在性腺分化中的作用, 为进一步研究半滑舌鲷 Hh 信号通路及半滑舌鲷性别决定提供理论基础。

参考文献:

- [1] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms[J]. Gen Dev, 2008, 22(18): 2454-2472.
- [2] Forbes A J, Nakano Y, Taylor A M, et al. Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila embryo*[J]. Development, 1992(Suppl): 115-124.
- [3] Lee J J, von Kessler D P, Parks S, et al. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog[J]. Cell, 1992, 71(1): 33-50.
- [4] Mohler J, Vani K. Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*[J]. Development, 1992, 115(4): 957-971.
- [5] Tabata T, Eaton S, Kornberg T B. The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation[J]. Gene Dev, 1992(6): 2635-2645.
- [6] Chang D T, Lopez A, von Kessler D P, et al. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene[J]. Development, 1994, 120(11): 3339-3353.

- [7] Shimeld S M. The evolution of the hedgehog gene family in chordates: insights from amphioxus hedgehog[J]. *Dev Gen Evol*, 1999, 209(1): 40–47.
- [8] Inoue Y, Niwa N, Mito T, et al. Expression patterns of *hedgehog*, *wingless*, and *decapentaplegic* during gut formation of *Gryllus bimaculatus* (cricket)[J]. *Mechan Dev*, 2002, 110(1): 245–248.
- [9] Kuwabara P E, Lee M H, Schedl T, et al. A *C. elegans* patched gene, *ptc-1*, functions in germ-line cytokinesis[J]. *Gen Dev*, 2000, 14(15): 1933–1944.
- [10] Echelard Y, Epstein D J, St-Jacques B, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity[J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1417–1430.
- [11] Wada H, Makabe K. Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest[J]. *Internat J Biol Sci*, 2006, 2(3): 133.
- [12] Bitgood M J, Shen L Y, McMahon A P. Sertoli cell signaling by desert hedgehog regulates the male germline[J]. *Curr Biol*, 1996, 6(3): 298–304.
- [13] Yao H H C, Whoriskey W, Capel B. Desert hedgehog/patched 1 signaling specifies fetal leydig cell fate in testis organogenesis[J]. *Gen Dev*, 2002, 16(11): 1433–1440.
- [14] Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge J W, et al. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(8): 3558–3566.
- [15] Dyer M A, Farrington S M, Mohn D, et al. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can re-specify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo[J]. *Development*, 2001, 128(10): 1717–1730.
- [16] Van den Brink G R. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1343–1375.
- [17] Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein[J]. *Science*, 1996, 273(5275): 613–622.
- [18] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation[J]. *Gen Dev*, 1999, 13(16): 2072–2086.
- [19] Colnot C, de la Fuente L, Huang S, et al. Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development[J]. *Development*, 2005, 132(5): 1057–1067.
- [20] Sampath K, Cheng A M, Frisch A, et al. Functional differences among *Xenopus* nodal-related genes in left-right axis determination[J]. *Development*, 1997, 124(17): 3293–3302.
- [21] Pagán-Westphal S M, Tabin C J. The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis[J]. *Cell*, 1998, 93(1): 25–35.
- [22] Roelink H. The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord[J]. *Dev Biol*, 2003, 257(2): 343–355.
- [23] Chang D T, Lopez A, von Kessler D P, et al. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene[J]. *Development*, 1994, 120(11): 3339–3353.
- [24] Johnson R L, Laufer E, Riddle R D, et al. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites[J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1165–1173.
- [25] Martí E, Takada R, Bumcrot D A, et al. Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo[J]. *Development*, 1995, 121(8): 2537–2547.
- [26] Ahn S, Joyner A L. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning[J]. *Cell*, 2004, 118(4): 505–516.
- [27] Jeong J, Mao J H, Tenzen T, et al. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia[J]. *Gen Dev*, 2004, 18(8): 937–951.
- [28] Goddeeris M M, Rho S, Petiet A, et al. Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart[J]. *Development*, 2008, 135(10): 1887–1895.
- [29] White A C, Lavine K J, Ornitz D M. FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network[J]. *Development*, 2007, 134: 3743–3752.
- [30] Miura H, Kusakabe Y, Sugiyama C, et al. *Shh* and *Ptc* are associated with taste bud maintenance in the adult mouse[J]. *Mechan Dev*, 2001, 106(1–2): 143–145.
- [31] Wijgerde M, Ooms M, Hoogerbrugge J W, et al. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(8): 3558–3566.
- [32] Pangas S A. Growth factors in ovarian development[J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(4): 225–234.
- [33] Berman D M, Desai N, Wang X, et al. Roles for hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2004, 267(2): 387–398.
- [34] Chen Y B, Jiang J. Decoding the phosphorylation code in hedgehog signal transduction[J]. *Cell Res*, 2013, 23(2): 186–200.

- [35] Li F X, Wang Y L. The functions of hedgehog signaling pathway in mammalian reproductive system[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2003, 25(4): 206–209. [李斐雪, 王雁玲. Hedgehog 信号通路在哺乳动物生殖系统中的功能[J]. 细胞生物学杂志, 2003, 25(4): 206–209.]
- [36] Chen M H, Wilson C W, Li Y J, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved[J]. Gen Dev, 2009, 23(16): 1910–1928.
- [37] Ji X S, Chen S L, Ma H Y, et al. Natural sex reversal of female *Cynoglossus semilaevis* in rearing populations[J]. Journal of fisheries of China, 2010, 34(2): 322–327. [季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鲷养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现[J]. 水产学报, 2010, 34 (2): 322–327.]
- [38] Chen S, Zhang G, Shao C, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. Nat Genet, 2014, 46(3): 253–260.
- [39] Liu Y, Chen S L, Gao F T, et al. SCAR-transformation of Sex-specific SSR marker and its application in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(6): 787–792. [刘洋, 陈松林, 高峰涛, 等. 半滑舌鲷性别特异微卫星标记的 SCAR 转化及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(6): 787–792.]
- [40] Hu Q M. Sex ratio analysis of half smooth tongue sole family, stock and researches of sex related gene[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 1–157. [胡乔木. 半滑舌鲷家系、群体性别比例与性别相关基因初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 1–157.]
- [41] Bürglin T R. The Hedgehog protein family[J]. Genome Biol, 2008, 9(11): 241.
- [42] Wang X C, Shi M X, Li H, et al. Hedgehog signaling pathway and adipogenesis[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33(8): 936–941. [王曦晨, 史铭欣, 李辉, 等. Hedgehog 信号通路脂肪形成[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(8): 936–941.]
- [43] Watson A J, Watson P H, Arcellana-Panlilio M, et al. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development[J]. Biol Reproduct, 1994, 50(4): 725–733.
- [44] De Sousa P A, Watson A J, Schultz G A. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review[J]. Mol Reproduct Dev, 1998, 51(1): 112–121.
- [45] De Sousa P A, Caveney A, Westhusin M E, et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors[J]. Theriogenology, 1998, 49(1): 115–128.
- [46] Koebernick K, Hollemann T, Pieler T. Molecular cloning and expression analysis of the hedgehog receptors XPTc1 and XSmo in *Xenopus laevis*[J]. Mechan Dev, 2001, 100(2): 303–308.
- [47] Lewis K E, Concordet J P, Ingham P W. Characterisation of a second patched gene in the zebrafish *Danio rerio* and the differential response of patched genes to hedgehog signaling[J]. Dev Biol, 1999, 208(1): 14–29.
- [48] Mao B Y, Zhang Y J, Zhang H W, et al. Cloning of Qingdao amphioxus hedgehog gene, a molecule involved in intercellular signaling of development[J]. Journal of Shandong University, 2001, 36(1): 95–100. [毛炳宇, 张燕君, 张红卫. 青岛文昌鱼发育信号传导相关基因 hedgehog 的克隆[J]. 山东大学学报: 自然科学版, 2001, 36(1): 95–100.]
- [49] Ma X K, Liu X Z, Wen H S. Histological observation on gonadal sex differentiation in *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27 (4): 55–61. [马学坤, 柳学周, 温海深. 半滑舌鲷性腺分化的组织学观察[J]. 海洋水产研究, 2006, 27 (4): 55–61.]
- [50] Deng S P, Chen S L, Tian Y S, et al. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(5): 714–719. [邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鲷的性腺分化和温度对性别决定的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 714–719.]
- [51] Zhang L Y. Molecular cloning and expression analysis of *piwil2* and *pik3r1* gene in the half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2014: 1–70. [张丽燕. 半滑舌鲷 *piwil2* 和 *pik3r1* 基因的克隆与表达分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014: 1–70.]
- [52] Shao C W. Genomic study of sex determination in half-smooth tongue (*Cynoglossus semilaevis*)[D]. Qingdao: China Ocean University, 2012: 1–135. [邵长伟. 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 性别决定的基因组学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 1–135.]
- [53] Bird A P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(7): 1499–1504.
- [54] Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, et al. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass[J]. PLoS Genet, 2011, 7(12): e1002447.

Cloning, expression and methylation analysis of the *Shh* gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

QI Qian^{1,2,3}, DONG Zhongdian^{1,2}, ZHANG Ning^{1,2}, SHAO Changwei², JIA Xiaodong², WEN Haishen¹, CHEN Songlin²

1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Technological and Engineering Center of Sturgeon's Reproduction, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100070, China

Abstract: The hedgehog (HH) signaling pathway plays an important role in embryonic development and adult tissue balance. To understand the function of the *Shh* (sonic hedgehog) gene in gonadal differentiation and development, we cloned *Shh* from the *Cynoglossus semilaevis*. The full-length *Shh* cDNA was 1922 bp, including a 1296-bp open reading frame (ORF), a 266-bp 5'-untranslated region (UTR) and a 360-bp 3'-UTR. The cDNA encoded a predicted protein of 431 amino acid residues. Phylogenetic analysis showed that the *Shh* putative protein belonged to the HH family, with typical HH-N and HH-C domains. Amino acid sequence analysis revealed that *C. semilaevis* *Shh* shared 74%–82% identity with *Shh* proteins in other fish and 60%–70% with *Shh* proteins from higher vertebrates. The CpG methylation levels of *Shh* were significantly lower in females than in males and neo-males. Real-time quantitative PCR showed that the relative expression of the *Shh* gene was significantly higher in the blastula stage than in other embryonic developmental stages ($P<0.05$). *Shh* was expressed in eight organs in males and females, and at the critical period of female gonad differentiation (50 d), the relative expression of the *Shh* gene sharply increased compared with earlier stages and was significantly higher than at the same period in the male gonads ($P<0.05$). In male gonads, during the critical period of differentiation (80 to 95 d), the relative expression of the *Shh* gene was significantly higher than in the female gonads. In 5-month, 8-month and 1-year-old gonads, the relative expression of the *Shh* gene was significantly higher in females than in males and pseudo males. These results suggest that the *Shh* gene is highly conserved in evolution and plays an important role in embryonic differentiation, tissue and organ formation, gonadal differentiation and the development of *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Shh*; RACE; qRT-PCR; gonadal differentiation and development; DNA methylation

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