

黄河鲤 *nanog* 基因克隆及其表达特征研究

于淼, 刚会会, 王方圆, 李木子, 王园, 江红霞, 王磊, 张猛, 乔志刚

(河南师范大学 水产学院; 水产动物疾病控制河南省工程实验室;
河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 转录因子 *Nanog* 在干细胞多能性维持、胚胎早期发育等方面具有重要作用。利用 PCR 技术克隆黄河鲤 *nanog* 基因(*Ccnanog*), 通过实时荧光定量 PCR 或半定量 PCR 分别对其在黄河鲤不同胚胎发育时期以及雌、雄成体不同组织中的表达特征进行了分析, 并利用荧光原位杂交和免疫组织化学方法进一步检测了该基因在黄河鲤卵巢和精巢中的亚细胞定位。结果显示, 黄河鲤 *nanog* 基因 ORF 为 1 158 bp, 编码 385 个氨基酸残基; *Nanog* 蛋白包含保守的 HOX 结构域, 与斑马鱼的序列相似性最高。在胚胎中, *Ccnanog* 在未受精卵、早期胚胎的 I 细胞期至原肠胚期高表达, 在神经胚期表达量显著降低, 之后在眼囊期至出膜期基本检测不出; 在组织中, *Ccnanog* 短片段在以性腺为首的多个组织中均有不同程度的表达, *Ccnanog* 长片段仅在雌鱼卵巢和皮肤中表达, 其中在雌鱼卵巢中的表达量最高, 其组织表达具有一定的性别二态性; 在性腺中进一步检测到, *Ccnanog* 主要分布在卵巢的卵原细胞、I 期、II 期和 III 期初级卵母细胞的细胞质中, 以及精巢的精原细胞、精母细胞和精子细胞中, 且随着生殖细胞的发育其表达量逐渐下降。以上结果表明 *Ccnanog* 可能参与了黄河鲤早期胚胎发育过程与生殖细胞的发育, 为后续功能研究提供了参考。

关键词: 黄河鲤; *nanog*; 基因表达; 性腺

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1000-2367(2024)04-0063-08

Nanog 基因最早是从小鼠 (*Mus musculus*) 中被鉴定出来的一种转录因子, 它包含同源异型盒 (homeobox, HOX) 结构域, 属于同源异型类触角足基因 (antennapedia, Antp) 超家族中的 NK-2 家族, 在维持胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESCs) 多能性、胚胎早期发育、细胞周期调控、细胞重编程以及原始生殖细胞增殖和迁移等方面起重要作用, 是 ESCs 多能性调控网络中的关键转录因子之一^[1-3]。该基因在哺乳动物 ESCs、胚胎发育早期以及原始生殖细胞中表达^[4-6], 在已分化的 ESCs 中不表达^[7]。在鱼类中, *nanog* 在青鳉 (*Oryzias latipes*) 胚胎发育早期和成体性腺中表达, 并在未受精卵中有母源性表达^[8]; 其他鱼类如金鱼 (*Carassius auratus*)^[9]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[10] 和青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)^[11] 中也陆续发现了类似的表达模式。然而最新的研究表明, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中并未出现这种母源性表达, 其 *nanog* 基因在 1 细胞期受精卵中不表达, 在囊胚期才开始表达并持续到囊胚晚期, 之后在原肠胚期下调; 在卵巢中也仅在体细胞而非生殖细胞中表达^[12-13]。这表明 *nanog* 基因在鱼类中的表达并不是保守的, 该基因在不同鱼类中的多能性及其早期胚胎发育基因调控网络等可能存在着差异^[14]。因此, 鱼类中 *nanog* 基因的表达与功能值得进一步探索。

收稿日期: 2023-03-29; **修回日期:** 2023-05-05.

基金项目: 国家自然科学基金 (32102776); 河南省高等学校重点科研项目 (23A240002); 河南省科技攻关项目 (192102110083); 河南师范大学博士科研启动基金项目 (QD18095).

作者简介 (通信作者): 于淼 (1981-), 女, 安徽砀山人, 河南师范大学副教授, 博士, 研究方向为水产动物遗传育种, E-mail: miaoyu@htu.edu.cn.

引用本文: 于淼, 刚会会, 王方圆, 等. 黄河鲤 *nanog* 基因克隆及其表达特征研究 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2024, 52(4): 63-70. (Yu Miao, Gang Huihui, Wang Fangyuan, et al. Cloning and expression characteristics of *nanog* gene in the Yellow River carp [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2024, 52(4): 63-70. DOI: 10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.29.0003.)

黄河鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)属鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),鲤属(*Cyprinus*),具有外形优美、营养丰富、肉质鲜嫩等特点,是我国黄河流域重要的经济鱼类,科研价值较高^[15].目前有关黄河鲤的研究涉及遗传与育种、营养与饲料、毒理学、疾病与免疫等多个方面^[16-17],但关于 *nanog* 表达与功能等相关研究尚未见报道.鉴于该因子的重要作用,本研究通过基因克隆获得了黄河鲤 *nanog* 基因的 ORF 序列,并对该序列进行了生物信息学分析;同时对该基因在黄河鲤胚胎不同发育时期和成体不同组织中的表达模式及其在性腺中的亚细胞定位进行了检测,以期为进一步解析黄河鲤 *nanog* 基因的功能、探究 *nanog* 同源基因的进化保守性提供基础资料.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

试验用鱼:黄河鲤成鱼由河南省水产科学研究院赵道全老师惠赠,暂养于河南师范大学水产学院水产养殖基地,养殖水温 20~26 °C,每天早晚各投喂商品饲料 1 次,每周换水 3 次.

胚胎样品采集:在黄河鲤繁殖季节挑选健康亲鱼,雌鱼和雄鱼各 3 尾.雌鱼注射促黄体素释放激素 A2 (luteinizing hormone-releasing hormone A2, LRH-A2) 2 μg/kg 和地欧酮(domperidone, DOM) 1 mg/kg,雄鱼减半.待效应期后,将亲鱼捞出,分别把精子和卵子挤入盆中,添加适量质量分数 0.65% 生理盐水,顺时针搅拌使卵子充分受精;将受精卵置于培养皿中孵化,温度控制在(21±2) °C,定期在显微镜下观察受精卵各发育时期并拍照.采样时期包括未受精卵、1 细胞期(0.5 hpf)、4 细胞期(1.5 hpf)、囊胚期(5 hpf)、原肠胚期(8 hpf)、神经胚期(10 hpf)、眼囊期(14 hpf)、肌肉效应期(28 hpf)、心跳期(36 hpf)和出膜期(58 hpf),其中 hpf 为受精后小时数(hour-post-fertilization, hpf).采集的各期样品经质量分数 0.65% 生理盐水清洗后分别转移至 1.5 mL 离心管(RNase-free),在各管中加入 5~10 倍体积 sample protector for RNA/DNA,之后放入 -80 °C 超低温冰箱中备用.

组织样品采集:取健康雌、雄成鱼各 3 尾,经 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(tricaine methanesulfonate, MS-222)麻醉后解剖,分别取出脑、肌肉、鳃、皮肤、心脏、肾脏、鳔、肝脏、脾脏、肠、卵巢和精巢组织,迅速放入液氮中,速冻后转移至 -80 °C 冰箱保存,用于提取各组织 RNA 并进行后续试验.

主要试剂:TRIzol 试剂、Taq PCR mix、DL2000 DNA marker、感受态大肠杆菌 DH5α、胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒(康维,中国);反转录试剂盒 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本);T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(NEB, 美国);DIG RNA Labeling Mix 试剂盒(Roche, 瑞士);其他试剂均为国产分析纯;引物合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成,序列测定由河南尚亚生物技术有限公司完成.

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计

根据美国国家生物技术信息中心数据库(national center for biotechnology information, NCBI) 鲤(*Cyprinus carpio*) 基因组序列信息,使用 Oligo 7 软件在已报道的鲤科鱼类 *nanog* 基因保守区域设计引物 Nanog-F1 和 Nanog-R1,用于 *Cc-nanog* 基因 ORF 序列扩增.根据克隆得到的基因片段设计组织表达检测引物 Nanog-F2 和 Nanog-R2 以及实时荧光定量 PCR 引物 qNanog-F 和 qNanog-R,各引物序列见表 1.

表 1 实验所用引物序列

Tab. 1 Primers used in the present study

引物名称	引物序列(5'-3')	目的
Nanog-F1	AAAGAATCTGCTCTGCGTTTATCTGACGA	基因克隆、组织表达检测
Nanog-R1	TGCTCTAGAACTTACTGCAACGTCATTCCT	
Nanog-F2	GACCTATTACCCCGCTCAAAC	组织表达检测
Nanog-R2	CTGTTTCATAGTCCCGATCTCC	
qNanog-F	CGGGACTAACATACAAACAGGT	胚胎/组织表达检测
qNanog-R	ACATATCTCTCCGTCATCCAG	
qActin-F	TCGTGATGGACTCTGGTGATGG	内参基因
qActin-R	TCTCGGCTGTGGTGGTGAAG	

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 TRIzol 法提取黄河鲤不同发育时期胚胎和不同组织的 RNA,使用 Nanodrop 2000 核酸蛋白测定仪(Thermo,美国)检测 RNA 的浓度与纯度,1%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性.以所提取的 RNA 为模板,根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明书要求进行反转录,制备的 cDNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存.

1.2.3 黄河鲤 *nanog* 基因的克隆

为获得黄河鲤 *nanog* 基因编码序列,以卵巢 cDNA 作为模板,使用引物 Nanog-F1 和 Nanog-R1 进行 PCR 扩增.PCR 反应体系共 $40\text{ }\mu\text{L}$,PCR 反应条件如下: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 70 s,循环 35 次; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止程序.反应结束后,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并对目的条带切胶回收,与 pMD19-T 载体(TaKaRa,日本)连接、转化后,挑选阳性克隆进行测序.

1.2.4 黄河鲤 *nanog* 基因的序列比对分析

根据测序所得结果,结合从 NCBI 数据库获得的其他物种 Nanog 蛋白序列信息,使用 DNAMAN 软件进行黄河鲤 Nanog 蛋白序列多重比对分析,使用 Clustal X 和 MEGA 6.0 软件以邻位相连法构建其系统发育树.

1.2.5 荧光定量 PCR

以反转录的各发育时期胚胎 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 技术对 *nanog* 基因在黄河鲤各个发育时期的相对表达量进行测定, β -actin 基因作为内参基因.以 SYBR Green I 荧光染料(TaKaRa,日本)为原料,BIO-RAD CFX96 定量 PCR 仪为试验仪器,反应体系为 $15\text{ }\mu\text{L}$: $2\times$ SuperReal PreMix Plus $7.5\text{ }\mu\text{L}$,上下游引物 $1.5\text{ }\mu\text{L}$,模板 cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$,RNase Free H_2O $4\text{ }\mu\text{L}$;反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s,40 个循环.每个处理设置 3 个平行.采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *nanog* 基因的相对表达水平,结果用平均值 \pm 标准误差表示;使用 Graphpad prism 6.0 软件对数据进行单因素方差分析和 Duncan's 多重检验,显著性水平设为 0.05.

1.2.6 荧光原位杂交

分别用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Xba I* 对 pMD19T-*Ccnanog* 质粒和 pCS2+载体进行双酶切,构建 pCS2+*Ccnanog* 表达载体;再根据载体图谱分别选用 *BamHI* 和 *Xba I* 酶切 pCS2+*Ccnanog*,使其线性化;接着使用 DIG RNA Labeling Mix 试剂盒,按照说明书要求进行体外转录,分别获得反义和正义 *Ccnanog* mRNA 探针.取黄河鲤成体卵巢和精巢组织切片,参照文献中的方法^[10,18]进行荧光原位杂交实验,其中 *Ccnanog* 探针的使用质量浓度为 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$,同时以其正义探针作阴性对照,检测 *Ccnanog* 基因在黄河鲤性腺中的表达与亚细胞定位.

1.2.7 免疫组织化学

Nanog 蛋白在黄河鲤卵巢和精巢中的表达与定位通过免疫组化实验进行检测,所用抗体为市售 Nanog 多克隆抗体(碧云天,AF1912),阴性对照为 PBS 溶液,实验由武汉赛维尔生物科技有限公司开展,实验结果经扫描后使用 CaseViewer 软件分析作图.

2 实验结果

2.1 黄河鲤 *nanog* 基因克隆与生物信息学分析

Ccnanog 基因开放阅读框长度为 1 158 bp,编码 385 个氨基酸残基,在分类上属于 Antp 超家族的 NK-2 家族,包含一个由 62 个氨基酸残基构成的 HOX 结构域,位置在第 196~258 个氨基酸之间(附录图 S1).

经氨基酸多重序列比对分析发现,Nanog 蛋白均含有相对保守的 HOX 结构域;黄河鲤 Nanog 蛋白的氨基酸序列与其他硬骨鱼类的相似度高,其中与斑马鱼(*Danio rerio*)的全长氨基酸序列相似度为 79%,HOX 结构域氨基酸相似度为 92%;与四足类的相似度较低,与小鼠的全长氨基酸序列相似度仅为 10%,HOX 结构域氨基酸相似度为 49%(附录图 S2).这表明 *nanog* 基因在由鱼类向四足类进化的过程中,HOX 结构域外部的序列发生了差异较显著的变化.

采用邻位相连法构建 Nanog 蛋白系统进化树,选取同为 NK 蛋白家族的 NK-1 和 NK-3 亚族蛋白作为

外类群(各物种蛋白登录号见附录表 S1)。从系统进化树中可以看出,属于 NK-2 亚族的 Nanog 蛋白与 NK-1、NK-3 亚族的蛋白具有明显的差异,拥有不同的分支,在进化的过程中各自保守;黄河鲤 Nanog 蛋白先与其他硬骨鱼类的 Nanog 蛋白聚为一小枝,其中与斑马鱼 Nanog 蛋白相似度最高,然后再与其他物种的 Nanog 蛋白逐渐聚类(图 1)。

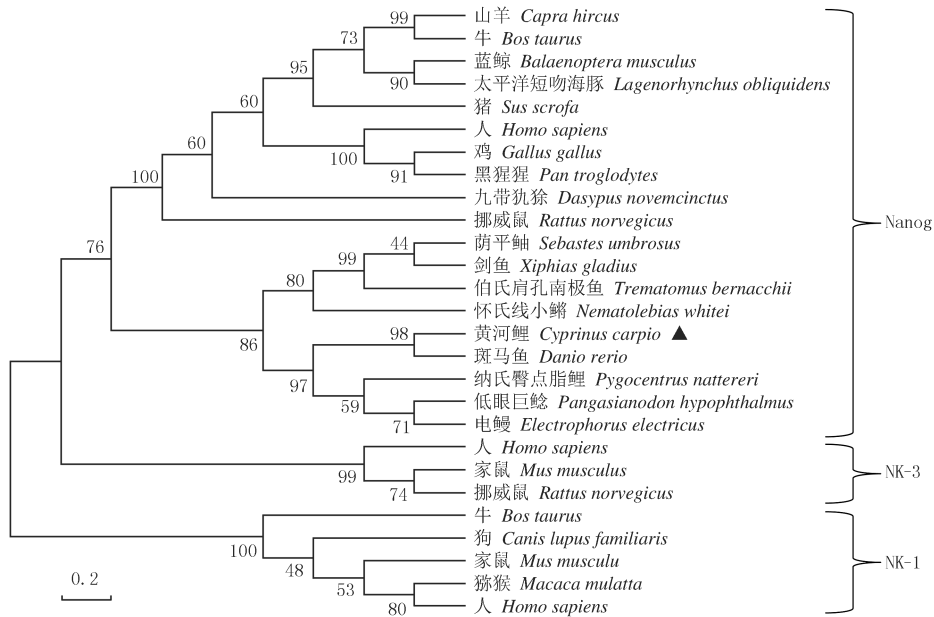


图1 Nanog蛋白系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of Nanog protein

2.2 黄河鲤 *nanog* 基因在不同发育时期胚胎中的表达

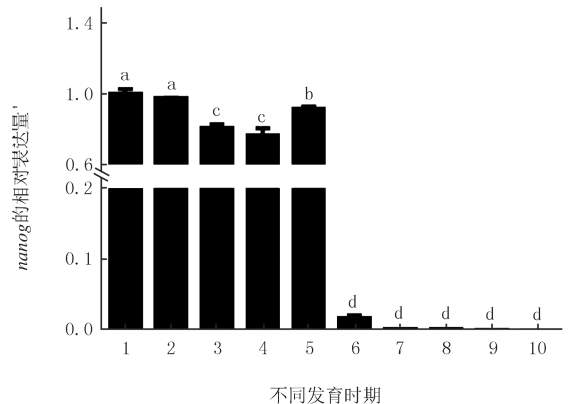
黄河鲤 *nanog* 基因在不同发育时期胚胎中的表达模式见图 2。结果显示,黄河鲤 *nanog* 基因主要在未受精卵以及黄河鲤胚胎发育早期的 1 细胞期至原肠胚期表达,在神经胚期表达量显著下降,其后至出膜期几乎检测不到该基因的表达。黄河鲤 *nanog* 基因呈现出明显的胚胎发育早期高表达特征。

2.3 黄河鲤 *nanog* 基因在不同组织中的表达

由图 3 可见,*Ccnanog* 基因短片段(100 bp)在雌、雄鱼不同组织中都有不同程度的表达;*Ccnanog* 基因中片段(290 bp)在雌鱼中主要在卵巢和皮肤中高表达,在雄鱼中也几乎都有不同程度的表达;*Ccnanog* 基因长片段(1 197 bp)则仅高表达于雌鱼卵巢和皮肤中,其中卵巢是表达量最多的组织且不同长度的 *nanog* 片段都有表达。图 3 表明 *Ccnanog* 基因在性腺中的表达具有一定的二态性。

2.4 *nanog* mRNA 在黄河鲤性腺中的亚细胞定位

采用组织切片荧光原位杂交技术进一步研究了 *Ccnanog* 基因在黄河鲤卵巢和精巢中的亚细胞定位(图 4)。结果显示,在卵巢组织中,*Ccnanog* 的 mRNA 信号主要分布在卵原细胞和 I-III 期的初级卵母细胞中(图 4(a)),与其在卵子中存在的母源性表达结果一致;在精巢组织中,*Ccnanog* 阳性信号主要分布在精原细

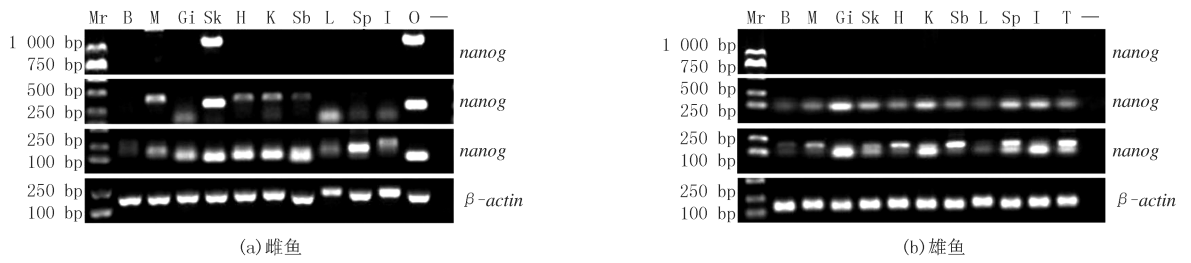


1. 未受精卵;2. 1细胞期;3. 4细胞期;4. 囊胚期;5. 原肠胚期;6. 神经胚期;7. 眼囊期;8. 肌肉效应期;9. 心跳期;10. 出膜期。图中不同字母表示各发育时期之间*nanog*相对表达量有显著性差异($P < 0.05$)。

图2 黄河鲤*nanog*基因在不同胚胎发育时期的表达

Fig.2 Expression of *nanog* gene in different developmental stages of the Yellow River carp

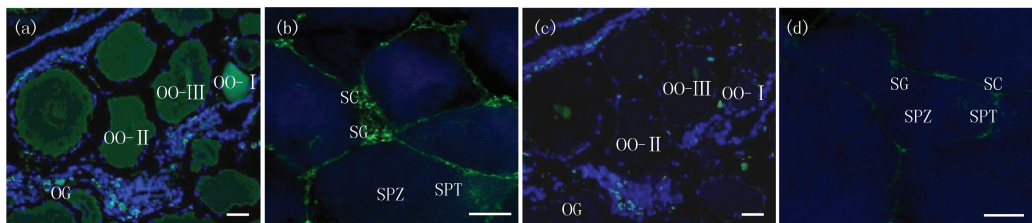
胞、精母细胞以及精子细胞(图 4(b));且随着生殖细胞的发育,其荧光信号强度均逐渐减弱.正义探针均未检测到明显的荧光信号(图 4(c),4(d)).



Mr. DL2000 DNA标记;B. 脑;M. 肌肉;Gi. 鳃;Sk. 皮肤;H. 心脏;K. 肾脏;Sb. 脾;L. 肝脏;Sp. 脾脏;I. 肠;O. 卵巢;T. 精巢;—. 空白对照.

图3 黄河鲤 *nanog* 基因在不同组织中的表达

Fig.3 Expression of *nanog* gene in different tissues of the Yellow River carp



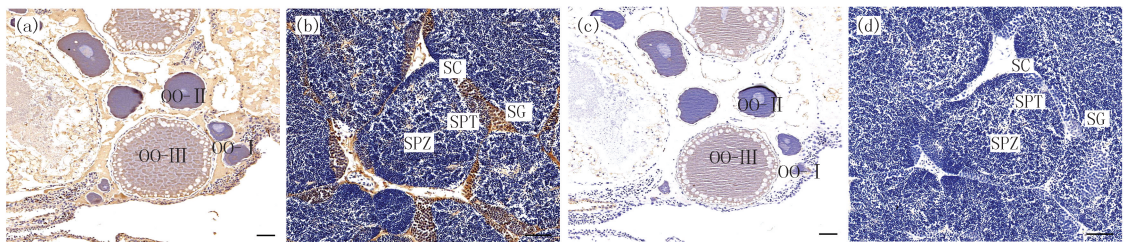
(a) *nanog* 反义探针(卵巢);(b) *nanog* 反义探针(精巢);(c) *nanog* 正义探针(卵巢);(d) *nanog* 正义探针(精巢). OG. 卵原细胞;OO- I. I 期初级卵母细胞;OO- II. II 期初级卵母细胞;OO-III. III 期初级卵母细胞;SG. 精原细胞;SC. 精母细胞;SPT. 精细胞;SPZ. 精子;标尺=50 μ m.

图4 黄河鲤卵巢和精巢 *nanog* 基因荧光原位杂交实验结果

Fig.4 Results of fluorescence *in situ* hybridization of *nanog* gene in ovary and testis of the Yellow River carp

2.5 Nanog 蛋白在黄河鲤性腺中的亚细胞定位

采用免疫组化技术研究了 Nanog 蛋白在黄河鲤卵巢和精巢中的表达与定位(图 5).如图 5 所示,在卵巢组织中,Nanog 蛋白的棕色阳性信号主要出现在 I 期、II 期和 III 期的初级卵母细胞中,且随着卵母细胞的发育,其阳性信号逐渐减弱,Nanog 蛋白的表达呈逐渐下降趋势(图 5(a)),与荧光原位杂交实验结果基本一致;在精巢组织中,Nanog 蛋白阳性信号则主要出现在精原细胞、精母细胞以及精子细胞(图 5(b)),该结果也与荧光原位杂交结果一致.对照组亦均未检测到阳性信号(图 5(c,d)).



(a) Nanog(卵巢);(b) Nanog(精巢);(c) 对照(卵巢);(d) 对照(精巢). OG. 卵原细胞;OO- I. I 期初级卵母细胞;OO- II. II 期初级卵母细胞;OO-III. III 期初级卵母细胞;SG. 精原细胞;SC. 精母细胞;SPT. 精细胞;SPZ. 精子;标尺=50 μ m.

图5 黄河鲤卵巢和精巢 Nanog 蛋白免疫组化实验结果

Fig.5 Immunohistochemical results of Nanog protein in ovary and testis of the Yellow River carp

3 讨论

3.1 黄河鲤 *nanog* 基因结构特征及其进化关系分析

Nanog 是 ESCs 多能性调控网络中的关键转录因子之一,近些年来,继小鼠中 *nanog* 基因被首次报道后,其他物种中 *nanog* 同源基因的研究工作陆续开展,并在人 (*Homo sapiens*)^[19]、牛 (*Bos taurus*)^[20]、青鳉^[8]、牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)^[21]、红鲫 (*Carassius auratus*)^[22] 等物种中证明了该因子在干细胞多能

性维持和胚胎早期谱系发生等方面具有重要作用。笔者克隆得到的黄河鲤 *nanog* 基因序列编码 385 个氨基酸残基, *Nanog* 蛋白与斑马鱼、纳氏臀点脂鲤 (*Pygocentrus nattereri*)、剑鱼 (*Xiphias gladius*) 等其他鱼类的结构域相似性在 49%~92%, 全长相似性在 28%~79%, 而与鸡 (*Gallus gallus*)、小鼠、黑猩猩 (*Pan troglodytes*) 等鸟类和哺乳类的结构域相似性在 46%~59%, 全长相似性仅在 10%~19%, 且鸟类和哺乳类比鱼类的 *Nanog* 蛋白 N 端明显缺少一段序列, 这表明在由鱼类向哺乳类进化的过程中, 其 HOX 结构域保持了相对稳定的状态, 但其同源结构域外部的序列发生了差异较显著的变化, 与 *Nanog* 在脊椎动物中经历了快速进化的假设一致^[9]。另外, 从系统发育树来看, 黄河鲤与斑马鱼的亲缘关系最近, 与同属于 NK-2 亚族的哺乳类亲缘关系较远, 而与属于 NK-1 和 NK-3 亚族的哺乳类亲缘关系最远, 说明笔者克隆的 *Ccnanog* 基因是其他物种 *Nanog* 的同源基因, 为进一步分析 *Nanog* 基因的进化特征提供了参考。

3.2 黄河鲤 *nanog* 基因表达模式分析

本研究中, *Ccnanog* 主要在未受精卵、胚胎的 1 细胞期至原肠胚期高表达, 表明该基因在黄河鲤中是母系遗传的且主要在胚胎早期发育阶段表达, 与斑马鱼胚胎中 *nanog* 的表达模式一致^[23-24], 且这种母源性表达在青鳉、金鱼、团头鲂和青鱼中同样存在。*Ccnanog* 短片段在组织中主要表达于以性腺为首的不同组织中, 其中卵巢是表达量最多的组织且不同长度的 *nanog* 片段都有表达, 与露斯塔野鲮 (*Labeo rohita*) 中 *nanog* 在卵巢中高表达且表达信号强度是精巢的 12.5 倍^[25] 的趋势一致, 也与其他鱼类如青鳉^[8]、金鱼^[9] 等 *nanog* 基因在生殖腺中表达的情况一致。而 *Nanog* 这种在生殖细胞表达的特性可能是由于生殖细胞为避免原肠胚期的甲基化转移到了胚外, 而在增殖的生殖细胞中表达^[26]。进一步的检测结果显示, *Ccnanog* 主要分布在卵巢的卵原细胞、I 期、II 期和 III 期初级卵母细胞的细胞质中, 以及精巢的精原细胞、精母细胞和精子细胞中, 与在团头鲂中检测到的 *nanog* 亚细胞定位结果一致^[10]。以上结果表明黄河鲤 *nanog* 的时空表达模式与某些鱼类具有一定相似性, 推测其可能在胚胎早期发育及生殖细胞发育方面具有某些保守的功能。

然而也有研究表明鱼类中 *nanog* 的表达存在着一定的差异。在尼罗罗非鱼中, *nanog* 的这种母源性表达并没有出现, 其在囊胚期才开始表达并在原肠胚期下调; 且 *nanog* 在未成熟的精巢中不表达, 在成熟的精巢生殖系细胞中高表达, 而在卵巢生殖系细胞中并不表达^[12]。LI^[27] 的研究表明, 在斑马鱼卵巢中, *nanog* 主要在 I-III 期卵母细胞的细胞质中表达; 而在精巢中, 阳性信号只在生精小管周围的精原细胞中检测到。WANG 等^[28] 发现 *nanog* 在青鳉卵原细胞中高表达, 在小卵母细胞中表达较弱; 在成体精巢中, *nanog* 的表达仅见于精原细胞。在牙鲆中, *nanog* 的表达定位于卵原细胞和卵母细胞的细胞质和精原细胞中^[21]。这表明 *nanog* 在鱼类中的时空表达模式并不是完全一致的, 而是随着鱼类物种的不同而有所不同。这可能与 *nanog* 基因存在异构体等遗传复杂性或在进化过程中发生了一定的功能分化有关。

另外, 鱼类 *nanog* 基因一般在卵巢和精巢中都有表达, 在其他成体组织中的表达则因物种而异。本研究检测到 *Ccnanog* 基因短片段在雌、雄鱼不同组织中都有不同程度的表达, 中片段主要在雌鱼的卵巢和皮肤中高表达, 在雄鱼各组织中也几乎都有不同程度的表达, 而长片段仅高表达于雌鱼卵巢和皮肤中。在团头鲂中, *nanog* 短片段在所有组织中也均有不同程度的表达, *nanog* 中片段和长片段主要在性腺中表达, 在肝脏中也有一定表达^[10]; 在红鲫中, *nanog* 主要集中于成体性腺表达, 但在肾脏、肠道和脑组织中有微量的表达^[22]; 在尼罗罗非鱼中, *nanog* 则是在卵巢的体细胞而非生殖细胞中表达^[12]。因此, *nanog* 的表达是否限定于特定的组织区域这一问题仍值得我们进一步探索。同时, *Ccnanog* 基因长片段在雌鱼皮肤中高表达而在雄鱼皮肤中不表达, 这一结果本团队已在小范围内进行了验证, 后续有望开发出黄河鲤雌雄鉴别的微创分子标记, 助力黄河鲤育种研究。

4 结 论

本研究克隆获得了黄河鲤 *nanog* 基因, 通过氨基酸序列分析发现 *Nanog* 蛋白含有 HOX 结构域, 与斑马鱼等硬骨鱼类的同源性较高。*Ccnanog* 基因主要在黄河鲤的未受精卵和胚胎发育早期阶段高表达; 在组织中, *Ccnanog* 短片段在以性腺为首的不同组织中均有不同程度的表达, 而 *Ccnanog* 长片段仅在雌鱼卵巢和皮肤中高表达, 其中在卵巢中的表达量最高, 且该片段有望用于黄河鲤雌雄微创鉴别; 在卵巢中, *Ccnanog* 主

要表达于卵原细胞、I 期、II 期和 III 期初级卵母细胞的细胞质中;在精巢中,*Ccnanog* 主要定位于精原细胞、精母细胞以及精子细胞,且随着生殖细胞的发育其表达量逐渐下降,以上结果表明 *Ccnanog* 可能主要参与黄河鲤早期胚胎发育过程以及生殖细胞的发育。

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.03.29.0003)。

参 考 文 献

- [1] MITSUI K, TOKUZAW Y, LTOH H, et al. The home protein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 631-642.
- [2] CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, et al. Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 643-655.
- [3] HE M D, JIAO S B, ZHANG R, et al. Translational control by maternal Nanog promotes oogenesis and early embryonic development[J]. *Development*, 2022, 149(24): 201213.
- [4] WANG S H, TSAI M S, CHIANG M F, et al. A novel NK-type homeobox gene, ENK(early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells[J]. *Gene Expression Patterns*, 2003, 3(1): 99-103.
- [5] YAMAGUCHI S, KIMURA H, TADA M, et al. Nanog expression in mouse germ cell development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 639-646.
- [6] YASUDA S Y, TSUNEYOSHI N, SUMI T, et al. NANOG maintains self-renewal of primate ES cells in the absence of a feeder layer[J]. *Genes to Cells*, 2006, 11(9): 1115-1123.
- [7] HYSLOP L, STOJKOVIC M, ARMSTRONG L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8): 1035-1043.
- [8] CAMP E, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ A V, GARCÍA-ESPAÑA A, et al. Nanog regulates proliferation during early fish development[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2081-2091.
- [9] MARANDEL L, LABBE C, BOBE J, et al. Nanog 5'-upstream sequence, DNA methylation, and expression in gametes and early embryo reveal striking differences between teleosts and mammals[J]. *Gene*, 2012, 492(1): 130-137.
- [10] YU M, XUE T, CHEN T S, et al. Maternal inheritance of Nanog ortholog in blunt-snout bream[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(8): 749-759.
- [11] 邓羽. 青鱼 *nanog* 和 *oct4* 基因的鉴定及青鲢肌肉细胞系的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
DENG Y. Identification of *nanog* and *oct4* gene in *Mylopharyngodon piceus* and establishment of a muscle cell line from *Oryzias latipes* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018.
- [12] BAI X M, ZHAO C L, QU X M, et al. Characterization of nanog in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its spatiotemporal expression patterns during embryonic and gonadal development[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2022, 259: 110718.
- [13] BAI X M, LI J N, ZHANG Z M, et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Nanog co-expression with Pou5f3, transcriptional regulation and biological activity in embryonic development and embryonic cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2023, 264: 110812.
- [14] 柴壮, 刘忠华. NANOG 在哺乳动物早期胚胎发育与干细胞中的功能研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(1): 19-24.
CHAI Z, LIU Z H. Advances in the functions of NANOG in mammalian early embryonic development and stem cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2021, 43(1): 19-24.
- [15] 邵如玉. 黄河鲤体型和生长性状的全基因组关联研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
TAI R Y. Genome-wide association studies of body shape and growth traits of Yellow River carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [16] CHEN L, XU J, SUN X W, et al. Research advances and future perspectives of genomics and genetic improvement in allotetraploid common carp[J]. *Review in aquaculture*, 2022, 14(2): 957-978.
- [17] 张岚, 姜淑泓, 陈玉函, 等. 基于 SCoT 分子标记的黄河鲤抗嗜水气单胞菌不同群体遗传多样性分析[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(10): 2748-2755.
ZHANG L, JIANG S H, CHEN Y H, et al. Genetic diversity analysis of different populations of *Cyprinus carpio* resistant to *Aeromonas hydrophila* based on SCoT molecular markers[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, 53(10): 2748-2755.
- [18] 唐舟凯, 张飘逸, 储张杰, 等. 中华鳖 *dazl* 基因克隆及在生殖细胞中的表达[J]. *水产学报*, 2019, 43(2): 400-409.
TANG Z K, ZHANG P Y, CHU Z J, et al. The cloning and expression analysis of *dazl* in germ cells in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(2): 400-409.

- [19] 柳霞,龙梅,蒋晖,等.人 *Nanog* 基因的克隆及其在 COS-7L 细胞中的表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(4):495-498.
LIU X, LONG M, JIANG H, et al. Cloning of human *Nanog* gene and its expression in COS-7L cells[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2004, 20(4): 495-498.
- [20] 云彦,郑喜邦,刘文强,等.牛 *Nanog* 基因真核表达载体构建及有效干扰序列筛选[J].中国农业科学,2008,41(12):4180-4186.
YUN Y, ZHENG X B, LIU W Q, et al. Construction of eukaryotic expression vector of bovine *nanog* gene and screening for effective siRNA[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(12): 4180-4186.
- [21] GAO J N, WANG J, JIANG J J, et al. Identification and characterization of a nanog homolog in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Gene, 2013, 531(2): 411-421.
- [22] 李华金.鱼类多能性相关基因的筛选和鉴定[D].长沙:湖南师范大学,2019.
LI H J. Screening and identification of genes related to fish pluripotency[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2019.
- [23] TIAN J, CHENG S C, ONG J X, et al. Cloning and functional study of Nanog in zebrafish[J]. Developmental Biology, 2011, 356(1): 234.
- [24] SCHUFF M, SIEGEL D, PHILIPP M, et al. Characterization of *Danio rerio* Nanog and functional comparison to *Xenopus laevis* Vents[J]. Stem Cells and Development, 2012, 21(8): 1225-1238.
- [25] PATRA S K, VEMULAWADA C, SOREN M M, et al. Molecular characterization and expression patterns of Nanog gene validating its involvement in the embryonic development and maintenance of spermatogonial stem cells of farmed carp, *Labeo rohita* [J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2018, 9(1): 45.
- [26] ZHANG W, SUI Y, NI J, et al. Insights into the Nanog gene: a propeller for stemness in primitive stem cells[J]. International Journal of Biological Sciences, 2016, 12(11): 1372-1381.
- [27] LI Z D. Nanog in the twin fish models medaka and zebrafish: Functional divergence or pleiotropy of vertebrate pluripotency gene[D]. Singapore: National University of Singapore, 2009.
- [28] WANG D K, MANALI D, WANG T S, et al. Identification of pluripotency genes in the fish medaka[J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(4): 440-451.

Cloning and expression characteristics of *nanog* gene in the Yellow River carp

Yu Miao, Gang Huihui, Wang Fangyuan, Li Muzi, Wang Yuan, Jiang Hongxia, Wang Lei,
Zhang Meng, Qiao Zhigang

(College of Fisheries; Engineering Laboratory of Henan Province for Aquatic Animal Disease Control; Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The transcription factor *Nanog* plays an important role in maintenance of pluripotency of stem cells and early embryonic development. In this study, the *nanog* gene of the Yellow River carp (*Ccnanog*) was cloned by PCR technology. The expression characteristics of *Ccnanog* gene in different embryonic development stages and in different tissues of female and male adults of the Yellow River carp were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR or semi-quantitative PCR. The subcellular localization of *Ccnanog* gene in ovary and testis of the Yellow River carp were further detected by fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The results showed that the ORF of the *nanog* gene of the Yellow River carp was 1158 bp, encoding 385 amino acid residues. Nanog protein contains a conserved HOX domain, which has the highest sequence similarity with zebrafish. In the embryo, *Ccnanog* was highly expressed in the unfertilized eggs, from the 1-cell stage to the gastrula stage, and the expression level significantly decreased in the neurula stage, then was basically undetectable from the optic capsule stage to the hatching stage. In tissues, short segments of *Ccnanog* are expressed to varying degrees in multiple tissues headed by the gonads, while long segments of *Ccnanog* are only expressed in the ovary and skin of female fish, with the highest expression level in the ovary, and their tissue expression has a certain gender dimorphism. It was further detected in the gonads that *Ccnanog* was mainly distributed in the oogonia, cytoplasm of the phase I, II and III primary oocytes of the ovary, as well as in the spermatogonia, spermatocytes and sperm cells of the testis, and their expression gradually decreased with the development of the oocytes or spermatocytes. The above results suggest that *Ccnanog* may participate in the early embryos and germ cells development of the Yellow River carp, providing a reference for the follow-up study of its function.

Keywords: Yellow River carp; *nanog*; gene expression; gonad

附 录

1 **ATGGCGGATTGGAAGATGCCAGTGAGTTACAACCTCAACCCATCTTATCATGCATATGCATACGGTCTCATGTACCCGCAAGTGGCTGAA**
 1 M A D W K M P V S Y N F N P S Y H A Y A Y G L M Y P Q V A E
 91 CACGGCCACCCGAATCTGAGCTGGCCCGAGGCCGCTACACTACTCCGGCGGGGTCACCGCGACCTATTACCCCGCTCAAACCGCACAG
 31 H G H P N L S W P E A A Y T H S G G V T A T Y Y P A Q T A Q
 181 CAGTCGCCAACCTGGAGCCCGGAGAACGGCAGTGCCAGCAACTACGGCCAGTATCCGAGCCACGCGCAGAACGGACGGCTTCTCTCTCT
 61 Q S P T W S P E N G S A S N Y G Q Y P S H A Q N G R L F L S
 271 TATAAGACTGAGCCCGATCCGAAAGCAAAGATGTAGAGCAGGCCGGCAGCGATACACCCAGTGACTCAGAGGCCCATACCCAGATTCC
 91 Y K T E P D P K A K D V E Q A G S D T P S D S E A H T P D S
 361 TGGAGCTCAGGCAGCAGTCGTGAGGGGGCCGCTCTGACCAACCTCAATCTTCTCTCTTGGGGAGATCGGGACTATGAAACAGACAGCGGC
 121 W S S G S S R E G A A L T N L N L L S W G D R D Y E T D S G
 451 AGTCTGACAGTGGAGAACAGATCCCATCTCCATCTCTGCAGCGAGAGAGGCCAGTGAGTCTGAATCTGGGGGTGGAAGCCTTGCCCT
 151 S P D S G E Q I P S S I S A A R E E P V S L N L G V E A L P
 541 CCCCTGCTGCTTTGACCACATCTCCAGCCGACCTCCAACCCAGACCCGCAAGACCCGGGCTGCCTTTTCTGATGAGCAGATGAATGCT
 181 P L P A L T T S P A R P P T Q **T R K T R A A F S D E Q M N A**
 631 CTCATCCACCGGTTTAATATCCAGAGATATCTCAGCCTGCAGAGATGAAGACGCTTGCCTGGAGCGACGGGACTAACATACAAACAGGTG
 211 **L I H R F N I Q R Y L T P A E M K T L A G A T G L T Y K Q V**
 721 AAAACATGGTTTCAAACCGTAGGATGAAACTCAAGAGGCATCAAAGAGATAGTAGCTGGATGACGGAGAGATATGTCGTCAGTGCCGTA
 241 **K T W F Q N R R M K L K R H Q R D S** S W M T E R Y V V S A V
 811 CCCAGCACACCAGCTCCTCACTCTCAGTTTCAGACTGAAACCCCTCGAGCAACCCCAAGACCCCTACAGTAACCCCTCAGGTGAGAGAGTCT
 271 P S T P A P H S Q F Q T E T P R A T Q D P Y S N P Q V R E S
 901 GCGTTCAAGAGGAGTCTCCACAAACGCCCTTCTACCCAGTACCCACAGCCAGCTCTCTCTACCCAGCCCAGCACAAAGACCCCGGGA
 301 A F K R S P P Q T P F Y P S Y P Q P R S P T Q P S T R P P G
 991 AACTGGCCTCTGCCCCAGCTGTGACGCACTACGAGTTCCCAACACTGTAGCTACATGCAGGCCGCTGATGGCAGCGATGCAGCGAAC
 331 N W P L P P A V T H Y E F P N T A S Y M Q A R D G S D A A N
 1081 AAAGCGGCGACCCCTTCTCAAATGCCATCTATGCTTGGTGACGCCAGTGGACAACGAAAGGAATGACGTTGCGAGTAA
 361 K G G S P S Q M P S M L G D A Q W T T K G M T L Q

加粗首尾字母为起始密码子与终止密码子;连续无间隔字母为开放阅读框;有间隔字母表示蛋白;黑框表示Nanog蛋白HOX结构域.

图S1 黄河鲤*nanog*基因的核苷酸与氨基酸序列

Fig.S1 Nucleotide and amino acid sequence of *nanog* gene of the Yellow River carp

表 S1 Nanog 蛋白系统进化树所用登录号

Tab. S1 Login number used in the Nanog protein phylogenetic tree

蛋白名称	物种名称	登录号	蛋白名称	物种名称	登录号
Nanog	山羊	NP 001301200.1		怀氏线小鳉	XP 037549831.1
	牛	NP 001020515.1		斑马鱼	NP 001091862.1
	蓝鲸	XP 036721974.1		纳氏臀点脂鲤	XP 017571494.1
	太平洋短吻海豚	XP 026948997.1		低眼巨鲶	XP 026782433.1
	猪	NP 001123443.1		电鳗	XP 035387036.1
	人	NP 001284627.1	NK-3	人	NP 001243268.1
	鸡	NP 001139614.1		家鼠	NP 035051.1
	黑猩猩	NP 001065295.1		挪威鼠	NP 001029316.1
	九带犰狳	XP 023443652.1	NK-1	牛	XP 002691234.1
	挪威鼠	NP 001094251.1		狗	NP 001012637.1
	荫平鲉	XP 037613401.1		家鼠	NP 033339.2
	剑鱼	XP 039983244.1		猕猴	NP 001032950.1
	伯氏肩孔南极鱼	XP 033988142.1		人	NP 001049.1