doi: 10.7541/2019.056

团头鲂*nanos*3基因的克隆鉴定

朱 林[1,2] 王厚鹏[1] 朱作言[1] 孙永华[1] 叶 鼎[1]

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室，武汉 430072;
2. 中国科学院大学现代农业科学学院，武汉 430072)

摘要: 为了标记团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs), 首次克隆并鉴定了团头鲂*nanos*3基因(*mananos*3)。*mananos*3全长1027 bp, 包括48 bp 5′UTR (5′untranslated Region), 490 bp 3′UTR和489 bp开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。该基因编码162个氨基酸。通过序列比对发现Mananos3蛋白和其他物种Nanos蛋白一样, 存在一个保守的RNA结合功能域, 该功能域包含一个锌指基序(Motif)。系统发育树结果显示, Mananos3与鲤(*Cyprinus carpio*)的Nanos3最为相近。半定量和定量PCR结果表明, *mananos*3具有较高的母源表达, 并在胚胎发育早期高量表达, 而在1000细胞期之后表达量逐渐降低。在成体组织中, *mananos*3仅在卵巢中检测到表达。*mananos*3和斑马鱼(*Danio rerio*) *nanos*3 (*zfnanos*3)的3′UTR均可以介导绿色荧光蛋白特异标记团头鲂和斑马鱼胚胎发育早期的PGCs, 但是*mananos*3的3′UTR能够更特异地标记团头鲂的PGCs。通过比对*mananos*3和*zfnanos*3的3′UTR发现, *mananos*3 的3′UTR中有一个非经典的miR430识别位点(GCACTA)。通过对该位点的突变研究证实其有利于*nanos*3在非PGCs组织中的降解。综上所述, 团头鲂*mananos*3的3′UTR序列中的非经典miR430识别位点(GCACTA)可能与介导报告基因在PGCs中特异表达相关。

关键词: *Nanos*3; 团头鲂; 原始生殖细胞; 斑马鱼

中图分类号: Q344^{+}.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2019)03-0457-08

*Nanos*通常被认为对生殖细胞的存活和全能性的维持起重要作用。动物中一般存在1—4个*nanos*基因[1]。该基因编码高度保守的RNA结合蛋白。该蛋白C端拥有2个连续的半胱氨酸-半胱氨酸-组氨酸-半胱氨酸(Cys-Cys-His-Cys, CCHC)锌指基序[2, 3]。

*Nanos*基因在非脊椎动物和脊椎动物中均得到了鉴定和研究。果蝇(*Drosophila melanogaster*)中只有1个*nanos*基因, 该基因在介导腹部形成、原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)特化和迁移以及生殖干细胞的维持等方面发挥重要作用[4, 5]。在小鼠(*Mus musculus*)中, *nanos*2和*nanos*3在PGCs和未分化的精原细胞中表达, *nanos*2突变导致雄性精原细胞的缺失, 而nanos3突变导致精巢和卵巢中的生殖细胞均缺失[6]。在硬骨鱼类中, 斑马鱼(*Danio rerio*)*nanos*有3个基因: *nanos*1、*nanos*2、*nanos*3。*Nanos*1在成熟卵巢的早期卵母细胞中有表达; *nanos*2在成鱼精卵巢的生殖干细胞中表达, 对于维持生殖干细胞必不可少[7, 8]; *nanos*3在生殖质和PGCs中特异性表达[9], 对PGCs的形成和迁移以及卵母细胞的产生及维持至关重要[7, 9]。

在鱼类中, *nanos*3的3′UTR常被用于介导荧光蛋白在PGCs中特异性表达, 用于PGCs的活体标记[10]。利用胚胎注射EGFP-*nanos*3′UTR mRNA的方法, 在斑马鱼[10]、鲤(*Cyprinus carpio*)[11]、青鳉(*Oryzias latipe*)[12]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)[13]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)[14]中实现了PGCs的可视化标记。

收稿日期: 2018-05-16; **修订日期:** 2018-11-17

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(A)(XDA08010106); 国家自然科学基金(31671501)资助 [Supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA08010106); the National Natural Science Foundation of China (31671501)]

作者简介: 朱林(1990—), 男, 山东潍坊人; 硕士研究生; 主要从事鱼类发育和生物技术研究。E-mail: zhulin2009ouc@163.com

通信作者: 叶鼎, 副研究员; E-mail: yeding@ihb.ac.cn

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)属鲤形目, 鲤科, 鲂属, 又名武昌鱼。其具有养殖成本低、生长迅速、食性广、养殖成活率高、肉质鲜美等特点, 是我国重要的经济鱼类之一[15]。为了开展团头鲂原始生殖细胞操作相关的研究, 我们克隆和分析了团头鲂的*nanos*3基因, 并利用该基因的3′UTR序列进行特异性标记PGCs实验。我们发现, 和斑马鱼*nanos*3的3′UTR相比, 利用团头鲂自身的*nanos*3-3′UTR能够更加特异地标记团头鲂的PGCs。这项研究工作为将来开展基于团头鲂PGCs的遗传操作提供便利。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用雌、雄团头鲂均养殖于中国科学院水生生物研究所官桥水产养殖基地, 在繁殖季节采用人工授精的方法获取团头鲂的胚胎, 置于(22±1)℃的环境发育。成体组织取自2龄的团头鲂。AB品系的斑马鱼均来自于国家斑马鱼资源中心(武汉, http://zfish.cn)。斑马鱼饲养于14h∶10h光暗周期及28.5℃恒温条件下。用于显微注射的胚胎由雌、雄斑马鱼自然产卵而得。

1.2 方法

总RNA的提取 获取团头鲂不同发育时期胚胎及幼鱼和成体不同组织, 采用Trizol (Invitrogen)法提取胚胎、幼鱼及成鱼各组织的总RNA, 用超微量分光光度计(Thermo, NanoDrop 2000)和1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度及纯度, 将RNA溶于无核酸酶水中, 置于–80℃冰箱中保存备用。

团头鲂*nanos*3基因全长cDNA的克隆 根据斑马鱼和鲤鱼*nanos*3基因的序列比对, 在保守功能域设计引物*nanos*-F和*nanos*-R (表 1)。以团头鲂卵巢组织总RNA为模板, 根据Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific)说明书反转录获得cDNA。以此cDNA为模板进行PCR扩增, 获得团头鲂*nanos*3基因的中间片段。根据获得的中间片段, 设计RACE(Rapid-amplification of cDNA ends)扩增引物(表 1)。3′RACE和5′RACE利用System for Rapid Amplification of cDNA Ends试剂盒(Thermo Fisher Scientific)并按照说明书进行。

扩增的PCR产物经DNA纯化试剂盒(Thermo Fisher Scientific)纯化回收DNA后连接至pMD18-T (TaKaRa), 经转化、挑克隆和测序(武汉天一辉远生物科技有限公司), 获得相应片段的阳性克隆。所获得的片段序列经Lasergene软件拼接分析获得团头鲂*nanos*3基因全长cDNA序列。

表 1 团头鲂*nanos*3基因cDNA全长的克隆及表达所用到的引物

Tab. 1 Primers used for *nanos*3 full length cDNA cloning and expression

引物名称Primer name	序列Sequence (5′—3′)	用途Usage
nanos-F	CCTTGGAAGGACTACATGGG	同源片段扩增
nanos-R	CAAACTTGTACACAAGCCAG	
nanos-3gsp1	GAGACCAAGCAGAAAAGAAGCC	3′RACE扩增
nanos-3gsp2	CAAACATAATGGTGAGGCTGAGG	
nanos-3gsp3	CCTACAGCTCCGTGTACGCC	
nanos-5RT	CTTTCTGTAAAAACTGTCC	5′RACE扩增
nanos-5gsp1	GGTTGGTTCCCTCTTGTCATCTC	
nanos-5gsp2	GGCTTCTTTTCTGCTTGGTCTC	
nanos-5gsp3	CATTGCGGTCTTTGAGGTAGTG	
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	3′和5′RACE扩增
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
nanos-real time-F	ACACTATCTCAAAGACCGCAATG	定量PCR
nanos-real time-R	GCGGGCAGAACCTTTTAGTG	
β-actin-F	GATGATGAAATTGCCGCACTG	内参引物
β-actin-R	ACCAACCATGACACCCTGATGT	
Xho Ⅰ-*mananos*3UTR-S	CCGCTCGAGACGGGACATTTCTGACCCAC	表达载体构建
Xba Ⅰ-*mananos*3UTR-A	GCTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATATG	
mananos-mut1-F	GTTTGATTTTGCACTTCTTCT	构建突变载体引物
mananos-mut2-F	GTTTGATTTTCTACTACTTCT	
mananos-mut-R	CGTGAAAGCACACATGCATAC	

***nanos*3基因氨基酸序列比对及系统进化分析**　使用Lasergene软件预测团头鲂*nanos*3基因编码的氨基酸序列, 采用BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)和Clustal W (https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw)将预测的氨基酸序列与NCBI的其他物种Nanos3进行蛋白质序列比对。同时, 基于各个物种Nanos3蛋白序列, 使用MEGA5.1软件构建NJ (Neighbor-joining方法)系统发育树[16]。所用到各物种的氨基酸序列GenBank登录号如下: 团头鲂(*M. amblycephala*): MH215557; 金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*): XP_016139847; 鲤(*C. carpio*): XP_018955255; 银鲫(*Carassius gibelio*): AKP99418; 斑马鱼(*D. rerio*): NP_571953; 大西洋鲑(*Salmo salar*); XP_013985774; 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*): NP_001268351; 青鳉(*O. latipes*): NP_001116380; 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*): XP_005467279; 人(*Homo sapiens*): NP_001092092; 小鼠(*Mus musculus*): NP_918948; 果蝇(*Drosophila melanogaster*): NP_476658; 爪蟾(*Xenopus laevis*): XP_018107247。

团头鲂*nanos*3 mRNA在不同发育时期和成体组织中的表达分析　根据已获得的团头鲂*nanos*3基因序列, 设计半定量及定量引物(表 1)。以*β-actin*作为内参, 采用半定量(定量)方法检测团头鲂*nanos*3基因mRNA在不同发育时期及成鱼不同组织中的表达情况。

pCS2-SP6∶EGFP-*mananos*3-3′UTR 质粒的构建、mRNA合成及显微注射实验　以团头鲂卵巢cDNA为模板, 以*Xho* Ⅰ-*mananos*3UTR-S和*Xba* Ⅰ-*mananos*3UTR-A为引物(表 1)进行PCR扩增。其产物经双酶切后插入到pCS2+的载体上得到pCS2-SP6∶EGFP-*mananos*3-3′UTR质粒。质粒pCS2-SP6∶EGFP-*zfnanos*3-3′UTR和pCS2-SP6∶EGFP-*mananos*3-3′UTR, 分别使用*Not* Ⅰ和*Xba* Ⅰ线性化后, 通过mMessage mMachine sp6 UltraKit (Thermo Fisher Scientific)体外转录试剂盒合成和纯化mRNA。合成的mRNA用超微量分光光度计测浓度和纯度, 用琼脂糖凝胶电泳检测mRNA的质量。将合成的mRNA分别注射进入1细胞期团头鲂和斑马鱼的胚胎中, 在斑马鱼发育至1 dpf和团头鲂发育至2 dpf时, 于荧光显微镜下观察各自PGCs被标记效率并作统计。

***mananos*3-3′UTR 点突变质粒的构建及显微注射实验**　利用BioEdit7.0和Clustal W将团头鲂和斑马鱼的3′UTR进行序列比对, 比对后分别设计突变引物mananos-mut1-F/mananos-mut2-F与mananos-mut-R, 并利用反向PCR构建pCS2-SP6∶EGFP-*mananos*3-3′UTR_mut1和pCS2-SP6∶EGFP-*mananos*3-3′UTR_mut2突变质粒。质粒经*Xba* Ⅰ线性化后用mMessage mMachine sp6 UltraKit (Thermo Fisher Scientific)体外转录试剂盒合成然后纯化mRNA, 注射1细胞期的斑马鱼胚胎, 在斑马鱼发育至1 dpf时, 观察胚胎荧光情况并作统计。

2　结果

2.1　团头鲂*nanos*3基因全长cDNA的克隆及序列分析

本研究利用RT-PCR和RACE方法成功获得团头鲂的*nanos*3基因全长 cDNA序列(GenBank登录号MH215557), 其全长为1027 bp, 包括48 bp的 5′非编码区(5′UTR), 490 bp的3′非编码区(3′UTR)和489 bp的开放阅读框(ORF)。该基因编码162个氨基酸。氨基酸序列比对结果显示, 团头鲂Nanos3蛋白同其他物种的Nanos3蛋白具有较高的相似性, 与鲤科鱼类中的金线鲃(*S. grahami*)、鲤(*C. carpio*)、银鲫(*C. gibelio*)和斑马鱼(*D. rerio*)相似性较高, 依次为77.2%、77.1%、75.9%和69.2%; 同鲑科鱼类[大西洋鲑鱼(*S. salar*)和虹鳟(*O. mykiss*)]和哺乳类[人类(*H. sapiens*)和小鼠(*M. musculus*)]的相似性较低, 在34%—48.1%(图 1A)。但是, 它们均拥有1个保守的RNA结合功能域。在该功能域里面包含一个锌指基序“CCHC CCHC”。基于蛋白质序列, 利用MEGA5.1软件构建NJ系统发育树(图 1B), 结果显示团头鲂的Nanos3蛋白同鲤鱼和斑马鱼的Nanos3聚为一支。这表明团头鲂的Nanos3与鲤鱼和斑马鱼的Nanos3最为相近。

2.2　团头鲂*nanos*3 mRNA在不同发育时期和成体组织中的表达分析

我们利用半定量和荧光定量PCR方法检测了团头鲂不同发育时期胚胎以及成鱼不同组织中*nanos*3 mRNA表达水平。我们发现团头鲂的*nanos*3具有母源表达, 在胚胎发育早期(shield时期以前)均具有较高的表达。在bud时期之后, *nanos*3 mRNA的表达量逐渐减少。从受精后3—15d, 在幼鱼中很难检测到*nanos*3的表达 (图 2A)。*nanos*3在团头鲂胚胎发育各时期的表达特征同该基因在其他鱼类胚胎发育中的表达特征相似[17—19], 这暗示了*nanos*3在鱼类中可能具有相对保守的表达调控机制。在成鱼各组织中, *nanos*3 mRNA在卵巢中高表达, 在肝、肾、肌肉、心脏、腮、脑、肠、脾和精巢等组织中不表达(图 2B)。以上结果表明, 团头鲂*nanos*3不仅是一个母源基因, 还是一个卵巢特异高

量表达基因。

2.3 团头鲂*nanos*3-3′UTR能够稳定EGFP在PGCs中的表达

接下来, 我们分别在团头鲂和模式动物斑马鱼中研究了*mananos*3-3′UTR介导绿色荧光蛋白(EGFP)特异性标记PGCs的功能。我们将EGFP-*mananos*3-3′UTR mRNA或者EGFP-*zfnanos*3-3′UTR mRNA分别注射进入斑马鱼和团头鲂1细胞期受精卵, 并统计了非PGCs组织具有较强荧光(High background)和较弱荧光(Low background)的胚胎数。我们发现所有注射有以上任意一种mRNA的胚胎均能够标记PGCs, 其区别主要在于背景荧光强度上, 即*nanos*3-3′UTR介导mRNA在非PGCs组织中的降解效率(图3C、3D)。在注射有EGFP-*zfnanos*3-3′UTR mRNA

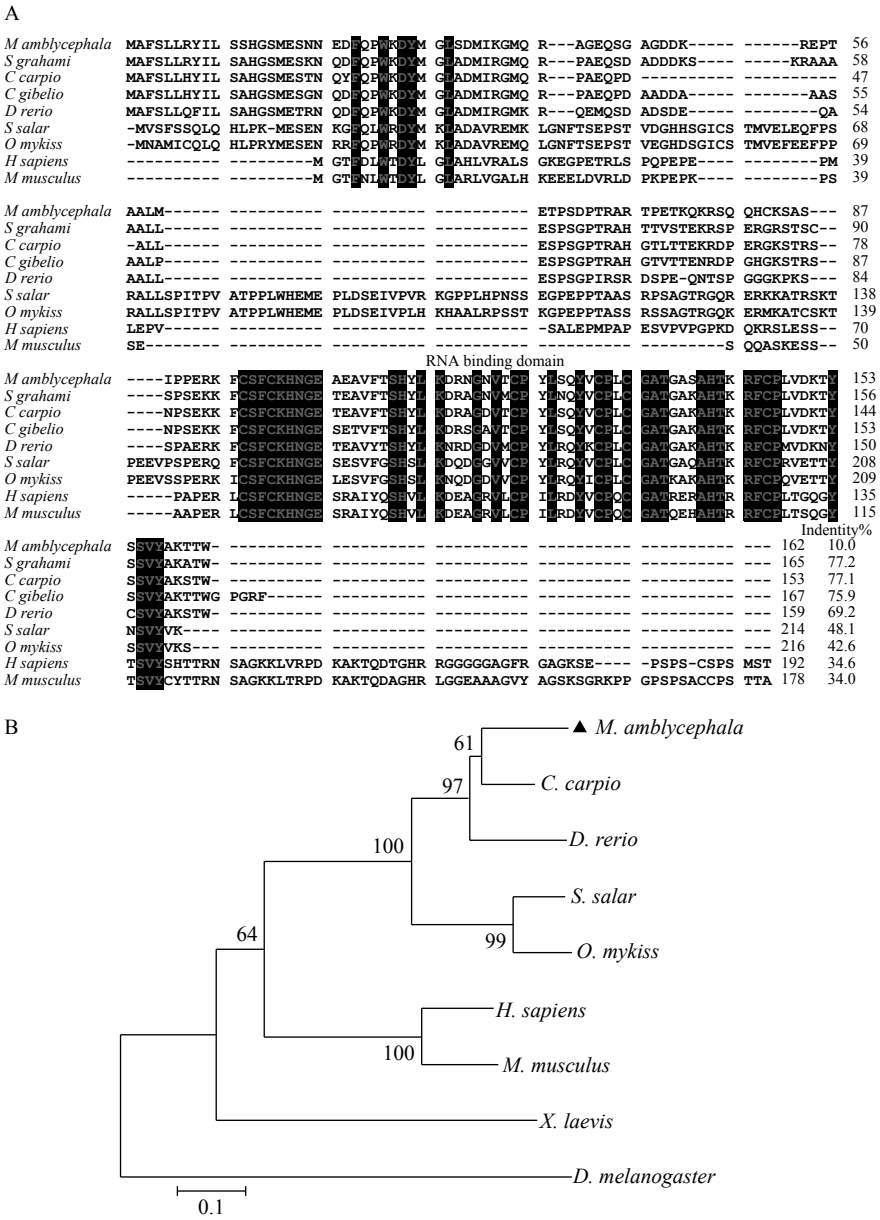

图 1 团头鲂Nanos3氨基酸序列比对及系统进化分析

Fig. 1 The Alignment of predicted amino acid sequence of *Megalobrama amblycephala* Nanos3 with its homologs in selected vertebrates (A) and Neighbor-Joining phylogenetic tree (NJ tree) of Nanos3 homologs of selected vertebrates (B)

A. 团头鲂与所选物种*nanos*3基因的氨基酸序列比对及结构分析;在全部所选物种中均保守的氨基酸残基用黑色标记; 方框标示RNA结合结构域; “▲”标示锌指基序; B. 团头鲂*nanos*3基因基于氨基酸序列构建的NJ系统进化树; 团头鲂在进化树中的位置被“▲”标记。所选物种中文及英文名称请见材料方法

A. Conserved amino acid residues among all selected vertebrates are marked black; the RNA binding domain is marked with box; the zinc finger motif is indicated by“▲”; B. *Megalobrama amblycephala* in NJ tree is marked with “▲”. Please refer to the section of materials and methods for selected vertebrates

的斑马鱼胚胎中, 绝大多数胚胎(98%, *n*=100)具有较弱的荧光背景; 而同样的mRNA注射进入团头鲂胚胎中, 大多数胚胎(96.4%, *n*=83)的荧光背景较强(图 3C、3E)。在注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR mRNA的团头鲂胚胎中, 有86.7%的胚胎(*n*=60)具有较弱的荧光背景, 而同样的mRNA注射进入斑马鱼胚胎中, 83.3%的胚胎(*n*=90)却具有较强的荧光背景(图 3D、3F)。这些数据表明, 物种本身的*nanos*3-3′UTR能够更加特异地标记自身的PGCs。总之, *mananos*3-3′UTR具有同其他硬骨鱼类*nanos*3-3′UTR相似的功能, 除可以有效标记团头鲂的PGCs外, 也可以标记斑马鱼的PGCs。

2.4　团头鲂*nanos*3-3′UTR表达调控区域的鉴定

在斑马鱼中, miR430通过结合*nanos*3-3′UTR序列介导mRNA在体壁细胞中的降解[20, 21]。经典的miR430识别位点为GCACUU[22]。通过比对团头鲂和斑马鱼*nanos*3-3′UTR序列, 我们发现在团头鲂*nanos*3-3′UTR的173—178 nt位置具有一个潜在的miR430识别位点GCACUA (WT, “_”标识出了与经典miR430识别位点不同的碱基)(图 4A、4B)。我

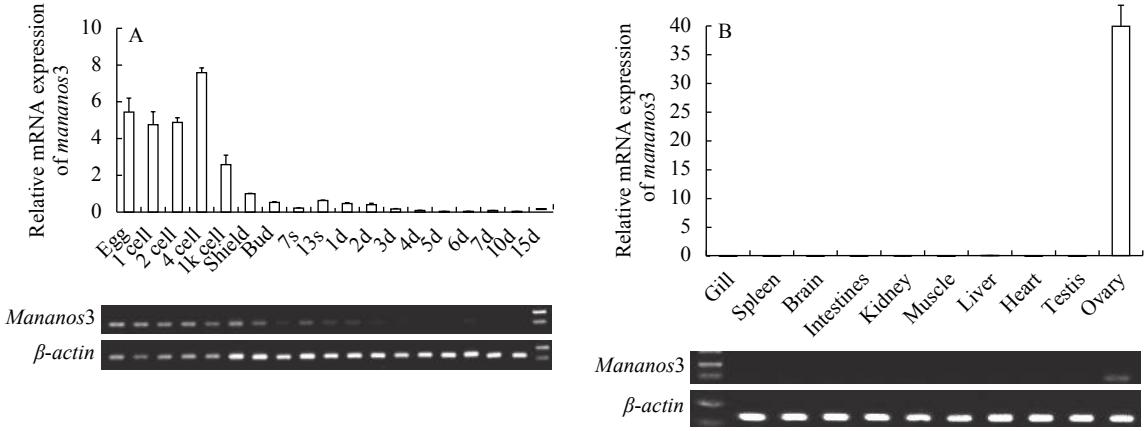

图 2　团头鲂*nanos*3在胚胎发育不同时期和成体不同组织表达谱

Fig. 2　The expression level of *mananos*3 during embryogenesis and among different adult tissues

A. 团头鲂*nanos*3在早期胚胎发育及幼鱼阶段15 dpf之前的表达水平; B. 团头鲂*nanos*3在成鱼不同组织中的表达水平。在荧光定量PCR中, 所有时期胚胎样本或组织样本的*mananos*3 表达量均相对于团头鲂*β-actin*计算获得

A. The expression level of *mananos*3 during embryonic stages and larva stages before 15 dpf; B. The expression level of *mananos*3 among different adult tissues. For RT-qPCR, the *manons*3 level was normalized to *β-actin*

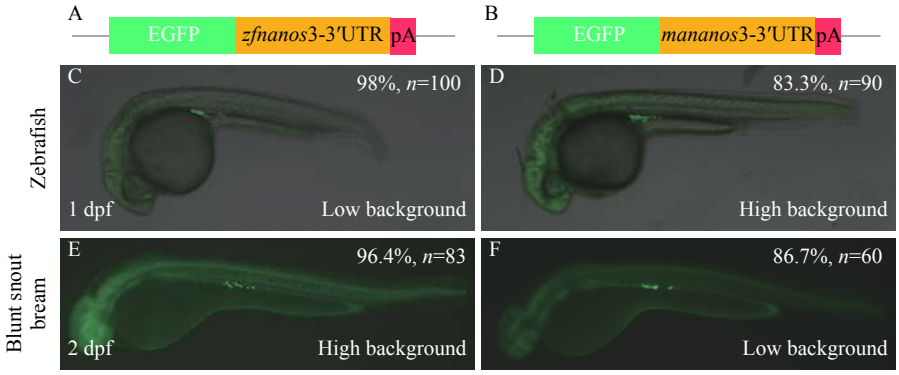

图 3　团头鲂和斑马鱼的原始生殖细胞均能被EGFP-*mananos*3-3′UTR和EGFP-*zfnanos*3-3′UTR标记

Fig. 3　Primordial germ cells (PGCs) of zebrafish and blunt snout bream were labeled by both EGFP-*mananos*3-3′UTR and EGFP-*zfnanos*3-3′UTR

A、B. EGFP-*zfnanos*3-3′UTR和EGFP-*mananos*3-3′UTR的示意图; C. 注射有EGFP-*zfnanos*3-3′UTR的1 dpf斑马鱼胚胎; D. 注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR的1 dpf斑马鱼胚胎; E. 注射有EGFP-*zfnanos*3-3′UTR的2 dpf团头鲂胚胎; F. 注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR的2 dpf团头鲂胚胎。图片右上角统计了代表照片胚胎的数量占观察总数的百分比, *n*值为总胚胎数

A, B. Diagram of the EGFP-*zfnanos*3-3′UTR and the EGFP-*mananos*3-3′UTR; C. 1 dpf zebrafish embryo injected with *EGFP-zfnanos3UTR*; D. 1 dpf zebrafish embryo injected with EGFP-*zfnanos*3-3′UTR; E. 2 dpf bunt snout bream embryo injected with EGFP-*zfnanos*3-3′UTR; F. 2dpf bunt snout bream embryo injected with EGFP-*mananos*3-3′UTR. The number at the right-up corner indicates the percentage of representative embryos. “*n*” is the total number of observed embryos

们通过设计引物(表 1), 将*mananos*3-3′UTR的该位点分别突变为miR430经典的识别位点GCACUU (mut1)和不能识别的位点CUACUA (mut2, “_”指出了与经典miR430识别位点不同的碱基)(图 4B), 并以斑马鱼为模式动物进一步探究该位点是否有利于EGFP在非PGCs细胞中有效降解从而使PGCs能够被EGFP更特异的标记。通过观察1dpf的胚胎, 我们发现在注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR WT的群体中, 具有高背景的胚胎占比73%(n=100); 在注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR mut1 (突变位点理论上能够被miR430更好地识别)的群体中, 具有高背景的胚胎得到明显减少(40%, n=90); 而在注射有EGFP-*mananos*3-3′UTR mut2 (突变位点理论上不能被miR430识别)的群体中, 具有高背景的胚胎进一步增多(87%, n=120)(图 4C)。该数据表明团头鲂*nanos*3-3′UTR中的序列“GCACUA”可能是miR430识别的位点。

3 讨论

本研究首次克隆了团头鲂的*nanos*3 全长cDNA (*mananos*3, GenBank: MH215557)。序列分析发现预测的Mananos3氨基酸序列与鲤科鱼类相似性较

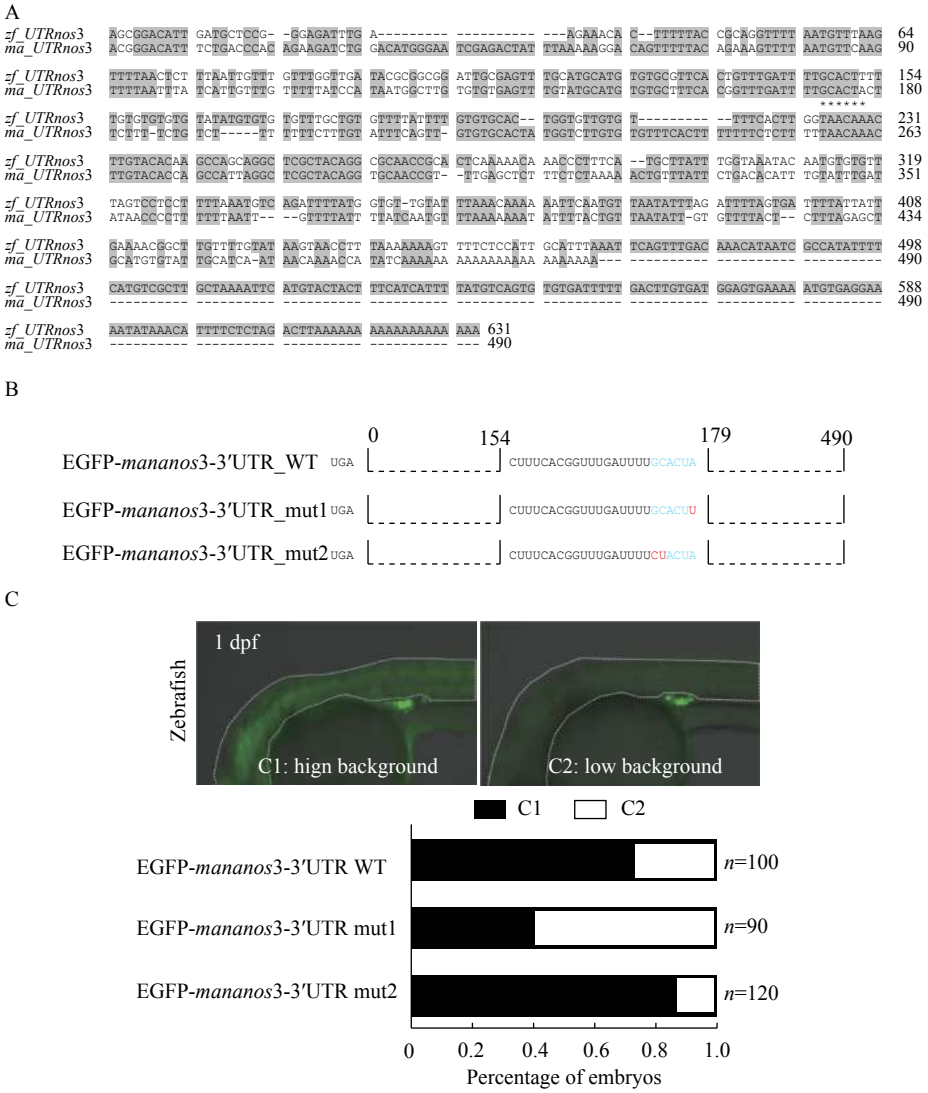

图 4 团头鲂*nanos*3-3′UTR miR430结合位点的鉴定

Fig. 4 Identification of miR430 binding motif in *mananos*3-3′UTR

A. 团头鲂和斑马鱼*nanos*3-3′UTR的序列比对; B. miR-430结合位点碱基替换示意图; C. 在注射了EGFP融合的突变型*mananos*3-3′UTR的胚胎中, 对非PGCs组织中的EGFP表达情况进行统计分析。“*”标记了潜在的miR-430结合基序; “n”代表统计的胚胎总数

A. Sequences alignment of 3′UTR of *nanos*3 homologs between zebrafish and blunt snout bream; B. diagram of base substitution in putative miR-430 binding motif; C. statistics analysis of EGFP repression in tissue of non-PGCs after injection of EGFP-fused mutated *mananos*3-3′UTR. “*” marks the putative miR-430 binding motif; “n” is the total number of observed embryos

高, 同鲑科鱼类、哺乳类、非脊椎动物和两栖类的相似性较低。在进化树上, 其与鲤和斑马鱼被聚到同一分支上。虽然*nanos*3在不同物种间的序列差异较大, 但是其RNA结合功能域的氨基酸序列高度保守。定量和半定量PCR结果显示, *Mananos*3具有母源表达, 并在胚胎发育早期高量表达, 而在PGCs特化完成后表达量逐渐减少。这种表达模式与斑马鱼[19]、家蚕(*Bombyx mori*)[17]、文昌鱼(*Branchiostoma*)[18]非常相似。综上, *nanos*3基因蛋白序列及其mRNA表达模式的保守性暗示*nanos*3在不同物种中可能具有相似的生物学功能。

早在2006年, Saito等[10]就使用斑马鱼*nanos*3基因的3′UTR序列插入到EGFP开放阅读框下游, 介导EGFP在青鳉(*Oryzias latipes*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)、金鱼(*Carassius auratus*)等8种鱼类的PGCs中特异稳定的表达。在本研究中, 我们同样发现*mananos*3-3′UTR和*zfnanos*3-3′UTR均可以标记团头鲂和斑马鱼的PGCs。通过比较发现, 利用*mananos*3-3′UTR标记团头鲂本身的PGCs能使其他组织中的荧光(背景噪声信号)更弱。因此, *mananos*3-3′UTR比*zfnanos*3-3′UTR更加适合团头鲂PGCs的特异性标记, 这为将来开展基于团头鲂PGCs的遗传操作提供便利。

*EGFP-nanos*3-3′UTR之所以能够特异性标记PGCs, 主要是由于两个方面的分子机制共同作用。一方面, 在体细胞中, miR430能够识别并结合到*nanos*3-3′UTR上的特殊位点从而介导mRNA的降解[20]。另一方面, 在PGCs中, 生殖细胞特异的RNA结合蛋白Dnd1能够结合到*nanos*3-3′UTR上富含尿嘧啶区域从而保护mRNA免受miR430介导的RNA降解[21]。在本研究中, 我们在团头鲂*nanos*3-3′UTR中发现了一个非经典的*nanos*3 miR430结合位点GCACUA, 对其进行点突变后, 发现该序列的改变可以影响*Mananos*3-3′UTR对斑马鱼PGCs的标记效率。所以我们推测, *mananos*3同样存在通过miR430介导的mRNA降解及在生殖细胞中收到Dnd1蛋白保护的转录后调控机制, 并且*mananos*3-3′UTR与miR430结合位点可能包含GCACUA。

参考文献:

[1] De Keuckelaere E, Hulpiau P, Saeys Y, *et al*. Nanos genes and their role in development and beyond [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, **75**(11): 1929—1946

[2] Wang C, Lehmann R. Nanos is the localized posterior determinant in Drosophila [J]. *Cell*, 1991, **66**(4): 637—647

[3] Curtis D, Treiber D K, Tao F, *et al*. A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation [J]. *The EMBO Journal*, 1997, **16**(4): 834—843

[4] Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, *et al*. Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in Drosophila [J]. *Nature*, 1996, **380**(6576): 708—711

[5] Wang Z, Lin H. Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation [J]. *Science*, 2004, **303**(5666): 2016—2019

[6] Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, *et al*. Conserved role of nanos proteins in germ cell development [J]. *Science*, 2003, **301**(5637): 1239—1241

[7] Draper B W, McCallum C M, Moens C B. nanos1 is required to maintain oocyte production in adult zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2007, **305**(2): 589—598

[8] Beer R L, Draper B W. nanos3 maintains germline stem cells and expression of the conserved germline stem cell gene nanos2 in the zebrafish ovary [J]. *Developmental Biology*, 2013, **374**(2): 308—318

[9] Doerks T, Copley R R, Schultz J, *et al*. Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions [J]. *Genome Research*, 2002, **12**(1): 47—56

[10] Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, *et al*. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos13'UTR mRNA [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2006, **50**(8): 691—699

[11] Kawakami Y, Saito T, Fujimoto T, *et al*. Visualization and motility of primordial germ cells using green fluorescent protein fused to 3'UTR of common carp nanos-related gene [J]. *Aquaculture*, 2011, **317**(1—4): 245—250

[12] Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, *et al*. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka Oryzias latipes [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, **48**(3): 209—221

[13] Saito T, Goto-Kazeto R, Kawakami Y, *et al*. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(9)

[14] Li M, Tan X, Jiao S, *et al*. A new pattern of primordial germ cell migration in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) identified using nanos3 [J]. *Developmental Dynamics*, 2015, **225**(4): 195—206

[15] Gao Z X, Wang W M, Jiang E M, *et al*. Research advances on germplasm resources and genetic improvemnet of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, **33**(3): 138—144 [高泽霞, 王卫民, 蒋恩明, 等. 团头鲂种质资源及遗传改良研究进展. 华中农业大学学报, 2014, **33**(3): 138—144]

[16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al*. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum

likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2731—2739

[17] Zhao G, Chen K, Yao Q, *et al*. The nanos gene of *Bombyx mori* and its expression patterns in developmental embryos and larvae tissues [J]. *Gene Expression Patterns*, 2008, **8**(4): 254—260

[18] Wu H R, Chen Y T, Su Y H, *et al*. Asymmetric localization of germline markers Vasa and Nanos during early development in the amphioxus *Branchiostoma floridae* [J]. *Developmental Biology*, 2011, **353**(1): 147—159

[19] Dosch R. Next generation mothers: Maternal control of germline development in zebrafish [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, **50**(1): 54—68

[20] Mishima Y, Giraldez A J, Takeda Y, *et al*. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430 [J]. *Current Biology*, 2006, **16**(21): 2135—2142

[21] Kedde M, Strasser M J, Boldajipour B, *et al*. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA [J]. *Cell*, 2007, **131**(7): 1273—1286

[22] Mickoleit M, Banisch T U, Raz E. Regulation of hub mRNA stability and translation by miR430 and the dead end protein promotes preferential expression in zebrafish primordial germ cells [J]. *Developmental Dynamics*, 2011, **240**(3): 695—703

MOLECULAR CLONING AND IDENTIFICATION OF *NANOS*3 IN BLUNT SNOUT BREAM (*MEGALOBRAMA AMBLYCEPHALA*)

ZHU Lin[1, 2], WANG Hou-Peng[1], ZHU Zuo-Yan[1], SUN Yong-Hua[1] and YE Ding[1]

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology*, *Institute of Hydrobiology*, *Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*; 2. *School of Advanced Agricultural Sciences*, *University of Chinese Academy of Sciences*, *Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Nanos3 is one of the components of germ plasm which is generally considered to be the determinant of primordial germ cells (PGCs) in most of the ovipara. The miR430 bind to the 3′untranslated region (UTR) of *nanos*3 to mediate the degradation of its mRNA in somatic cells, while in PGCs, the Dnd1 binds to the 3′UTR region of *nanos*3 to protect it from degradation through miR430. Therefore, the 3′UTR of nanos3 was generally used to mediate the specific expression of fluorescent protein in PGCs. In this study, we cloned and characterized the cDNA of the *nanos*3 homolog in *Megalobrama amblycephala* (*mananos*3). *Mananos*3 is of 1027 bp length including 48 bp 5′UTR, 490 bp 3′UTR and 489 bp opening reading frame. It encodes a peptide with 162aa. By peptide alignment, there was a conserved RNA binding domain with one zinc finger motif. Phylogenetic analysis revealed that Mananos3 has the highest similarity with its homolog in common carp. Semi-quantitative and Real-time qPCR showed that *nananos*3 was highly maternally expressed. During early embryonic stage, it was high expressed before 1k-cell stage and then gradually decreased. *Mananos*3 was specifically expressed in ovary among different selected tissues. Both 3′UTR of *mananos*3 and zebrafish *nanos*3 (*zfnanos*3) can mediate the specific expression of green fluorescent protein (EGFP) in PGCs while it appeared that 3′UTR of *mananos*3 has higher efficiency and specificity. Finally, the alignment of the 3′UTR of *mananos*3 and *zfnanos*3 revealed a potential non-classical recognition site (GCACTA) for miR430 that promotes the degradation of mRNA in non-PGCs tissues.

Key words: *Nanos*3; Blunt snout bream; Primordial germ cells; Zebrafish