

DOI: 10.12264/JFSC2024-0254

草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因的克隆与表达特征分析

黄玲, 叶欢, 岳华梅, 侯彦岭, 屈紫玲, 阮瑞, 李创举

中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223

摘要: 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的经济鱼类。为了加快草鱼育种进程, 笔者建立了草鱼生殖干细胞移植方法, 利用赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)借腹生殖产生草鱼配子。为建立移植后鉴定草鱼和赤眼鳟生殖细胞的方法, 本研究克隆得到了草鱼和赤眼鳟生殖相关基因 *nanos2* 的全长 cDNA 序列, 对其进行序列分析, 通过荧光定量 PCR (qPCR)研究其在不同组织的表达水平, 最终设计特异性引物区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞。克隆的草鱼和赤眼鳟 *nanos2* cDNA 序列长度分别为 649 bp 和 636 bp, 分别编码 145 和 144 个氨基酸; 比对发现草鱼和赤眼鳟 *Nanos2* 氨基酸序列同源性高达 91.67%, 与斑马鱼(*Danio rerio*)具有 65.49%同源性; 系统发育进化树显示草鱼和赤眼鳟的亲缘关系最近; 荧光定量 PCR 分析表明, *nanos2* 基因主要在草鱼和赤眼鳟性腺表达, 且精巢的表达水平显著高于卵巢; 通过比对草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因序列, 设计获得草鱼和赤眼鳟特异性与通用引物, PCR 结果显示, 草鱼 *nanos2* 特异性引物只在草鱼性腺扩增出 179 bp 的目的条带, 赤眼鳟 *nanos2* 特异性引物只在赤眼鳟性腺扩增出 265 bp 的目的条带, *nanos2* 通用引物在草鱼和赤眼鳟性腺都能扩增出 251 bp 的目的条带, 结果表明利用特异性引物可以高效区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞。本研究为进一步探讨 *nanos2* 在草鱼和赤眼鳟性腺发育的作用机制奠定基础, 也为后续监测草鱼生殖细胞在赤眼鳟性腺的嵌合及发育情况提供了一种有效方法。

关键词: 草鱼; 赤眼鳟; *nanos2*; 组织分布; 物种特异性引物

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)12-1411-11

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国淡水养殖重要的品种之一, 因其肉质鲜美、营养丰富、适应力强、生长快、规格大等优点, 被广泛养殖^[1-2]。近年来, 随着养殖密度和规模的扩大, 草鱼养殖出现病害频发和生长性状退化等问题, 造成巨大的经济损失^[3-5]。因此, 改良品系对草鱼健康养殖十分重要^[6]。草鱼初次性成熟需要 4—5 年^[7], 传统育种方法周期长, 需要运用新技术加快草鱼的育种进程^[8]。

生殖干细胞移植技术在缩短鱼类性成熟周期、种质资源保存、濒危物种保护等方面具有巨大的应用价值^[9-10]。鱼类生殖干细胞移植技术是将供体鱼的生殖干细胞移植到受体鱼腹腔, 供体

鱼生殖干细胞迁移至受体鱼生殖嵴并嵌合, 经过增殖分化, 待受体鱼性成熟时产生供体鱼的功能性配子^[11-12]。鱼类生殖细胞移植技术最先在斑马鱼(*Danio rerio*)中建立^[13], 经过不断发展, 在其他鱼类也取得突破性进展, 如大西洋鲑(*Salmo salar*)^[14]和金鱼(*Carassius auratus*)^[15]。为了加快草鱼新品种创制, 笔者建立了草鱼精原干细胞移植技术, 草鱼和赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)的亲缘关系较近, 赤眼鳟初次性成熟只需要 2 年^[16], 以草鱼作为供体提供精原干细胞, 以赤眼鳟作为受体代孕产生草鱼配子。供体与受体生殖细胞的鉴定是生殖干细胞移植的重要环节, 然而, 目前缺乏移植后鉴定草鱼和赤眼鳟生殖细胞的方法。

收稿日期: 2024-08-15; 修订日期: 2024-09-18.

基金项目: 农业生物育种重大专项(2023ZD4054). 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2022YJ08, 2022XT03, 2023TD23).

作者简介: 黄玲(1996–), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向为水生动物遗传育种与分子生物学. E-mail: huangling@yfi.ac.cn

通信作者: 李创举, 研究员, 研究方向为鱼类分子遗传学. E-mail: lcj@yfi.ac.cn

鱼类中,常见的生殖细胞标记基因有 *vasa*^[17-18]、*dnd*^[19-20]、*nanos*^[21-26]、*dazl*^[27-28]等。研究表明,*Nanos* 蛋白与生殖细胞发育相关^[29-30]。*nanos2* 基因是脊椎动物 *nanos* 基因家族的一员^[22-23],其在生殖细胞的表达特征已在多种鱼类中展开研究。斑马鱼和点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) *nanos2* 基因被鉴定为生殖干细胞(germline stem cells, GSCs)的特异性基因^[22,31];青鳉(*Oryzias latipes*) *nanos2* 基因在卵原细胞和精原细胞中表达^[25];在虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)中, *nanos2* 的表达仅限于未分化的精原细胞亚群^[23];而银鲫(*Carassius gibelio*) *nanos2* 基因除了在生殖干细胞表达外,还在精原细胞和初级精母细胞表达^[32]。这些研究表明 *nanos2* 是一种可靠的生殖细胞标记基因。

本研究克隆鉴定了草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因的全长 cDNA 序列,研究了它们在不同组织的表达特征;通过 *nanos2* 基因的序列比对,开发并验证了区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞的 PCR 方法。本研究为进一步研究 *nanos2* 在草鱼和赤眼鳟性腺发育的分子机制提供了有价值的信息,也为后续监测供体草鱼生殖细胞在受体赤眼鳟性腺的嵌合及发育情况提供了依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究使用的草鱼和赤眼鳟分别从武汉市宏新渔业有限公司和梁子湖试验场获得。选择 3 尾雄性草鱼[(49.5±0.5) cm, (1.39±0.06) kg]、3 尾雌性草鱼[(48.5±0.5) cm, (1.37±0.1) kg]、3 尾雄性赤眼鳟[(37.83±0.29) cm, (0.43±0.05) kg]、3 尾雌性赤眼鳟[(41.67±1.53) cm, (0.62±0.06) kg]作为实验鱼。放血后 20 min 内,分别采集鳃、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、脑、精巢和卵巢保存于 RNA 保存液(Vivacell, 中国),用于 RNA 提取,取部分精巢和卵巢置于 Bouin's 固定液(Scientific Phygene, 中国)用于石蜡切片。所有实验程序均按照中国水产科学研究院长江水产研究所制定的《实验动物养护和使用指导原则》实施。

1.2 RNA 提取和反转录

利用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation

Kit V2 (Vazyme, 中国)提取总 RNA,使用微量分光光度计(Thermo Scientific, 美国, NanoDrop One)测浓度,通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,将高质量总 RNA 保存在-80 °C 备用。使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本)将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA,4 倍稀释后分装保存于-20 °C 备用。

1.3 草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因全长 cDNA 的克隆

采用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因全长 cDNA 序列。根据 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中与草鱼和赤眼鳟亲缘关系较近的武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*) *nanos2* 基因(XM_048189299.1)的核苷酸序列设计得到两对引物,分别为 *Ci_nanos2* F1 和 *Ci_nanos2* R1、*Sc_nanos2* F1 和 *Sc_nanos2* R1(表 1),经过 PCR 和测序得到草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因部分 cDNA 序列。根据草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因部分序列,设计得到用于 RACE 实验的特异性引物(Gene-Specific Primers, GSPs),分别应用于草鱼 3'RACE (*Ci_nanos2* 3' F1 和 *Ci_nanos2* 3' F2)、草鱼 5'RACE (*Ci_nanos2* 5' R1 和 *Ci_nanos2* 5' R2)、赤眼鳟 3'RACE (*Sc_nanos2* 3' F1 和 *Sc_nanos2* 3' F2)、赤眼鳟 5'RACE (*Sc_nanos2* 5' R1 和 *Sc_nanos2* 5' R2)(表 1)。选择 A260/A280 比值在 1.8~2.0,电泳条带 28S : 18S rRNA 亮度比值约为 2 的 RNA 样品用于 RACE 实验,利用 SMARTer® RACE 5'/3' Kit (TaKaRa, 日本)试剂盒合成第一链 cDNA,使用 SeqAmpTM DNA Polymerase (TaKaRa, 日本)进行 3'RACE 和 5'RACE 的 PCR 扩增,利用 PMD-19T 载体(TaKaRa, 日本)克隆纯化后的 PCR 产物,经过测序拼接得到草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因的全长 cDNA 序列。草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因全长 cDNA 已上传至 BankIt,登录号分别为 PP790588 和 PP790592。

1.4 生物信息学分析

通过 Vector NTI 11.5.1 比对分析核苷酸序列;通过 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框(ORF);通过 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)预

表 1 本研究所使用引物
Tab. 1 Primers used in this study

物种 species	引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Ci_nanos2</i> F1	ATGATGCAGCCCTCCTCTCC	cloning
	<i>Ci_nanos2</i> R1	CGGTTTACATTCTGCTGGTC	
	<i>Ci_nanos2</i> 3' F1	GTTATGTCTGTCCTTTCTGCTCTGCGA	3' RACE
	<i>Ci_nanos2</i> 3' F2	CCTCGGAGAGCATCGAAGACCAGCAG	
	<i>Ci_nanos2</i> 5' R1	CGCAGAGCAGAAAGGACAGACATA	5' RACE
	<i>Ci_nanos2</i> 5' R2	AGGAAGTCGTCAGCTGCGGGGATCG	
	<i>Ci_nanos2</i> qPCR F1	GCAGCTGACGACTTCCTCAT	qPCR
	<i>Ci_nanos2</i> qPCR R1	GCTGGAAGAGTCGGTTCTCT	
	<i>Ci_β actin</i> F1	GCACGGTATTGTCACTCAACT	internal reference
	<i>Ci_β actin</i> R1	GGTGTGAAGGTCTCGAACA	
赤眼鳟 <i>Squaliobarbus curriculus</i>	<i>Sc_nanos2</i> F1	CCGATCTTCGCAAGACGATC	cloning
	<i>Sc_nanos2</i> R1	CGGTTTACATTCTGCTGGTC	
	<i>Sc_nanos2</i> 3' F1	CGCGACGAAAGGCAAGCCGTAAGTGC	3' RACE
	<i>Sc_nanos2</i> 3' F2	GCAGAATGGAGAGAGTGTGGAGGTC	
	<i>Sc_nanos2</i> 5' R1	TGCAGACAGAATCCGCAGGTGTCA	5' RACE
	<i>Sc_nanos2</i> 5' R2	GCGGTGGTCCCGGCTGGAGGAAGAG	
	<i>Sc_nanos2</i> qPCR F1	CGAAAGGCAAGCCGTAAC	qPCR
	<i>Sc_nanos2</i> qPCR R1	GTCGCAGAGCAGAAAGGACA	
	<i>Sc_EF 1α</i> F1	CGCCATTGTTGAGATGATCCCT	internal reference
草鱼 <i>C. idella</i>	<i>nanos2</i> F1	ATCCTCTGCCCGATCCTACGA	specific expression of <i>C. idella</i>
	<i>nanos2</i> R1	TACTTCGAAGTTCGAACACAG	
赤眼鳟 <i>S. curriculus</i>	<i>nanos2</i> F2	GCGATTCATCACGAGAACCG	specific expression of <i>S. Curriculus</i>
	<i>nanos2</i> R2	GTTGGTCTTCGTTACTCTCT	
草鱼和赤眼鳟 <i>C. idella</i> and <i>S. curriculus</i>	<i>nanos2</i> F3	GACGAAAGGCAAGCCGTAA	positive control
	<i>nanos2</i> R3	GTCGCAGAGCAGAAAGGAC	

测蛋白磷酸化位点; 通过 SignalP-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽; 通过 SMART (https://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)预测蛋白质的结构域; 通过 Expasy- ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质理化性质, 包括分子量和等电点; 利用 NCBI 数据库工具[Protein BLAST: Align two or more sequences using BLAST (nih.gov)]计算物种间 Nanos2 蛋白序列的一致性百分比; 通过 MEGA 11 软件的 Clustal W 算法比对氨基酸序列, 采用最大似然法构建系统发育进化树, 每组分析设置 1000 个重复; 通过 MEGA11 软件和 ESPript 3.0 (<https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)^[33]进行氨基酸序列多重比对和绘图(表 2)。

表 2 不同物种 Nanos2 蛋白及登录号
Tab. 2 Accession number of different species for Nanos2 protein

物种 species	简称 abbreviation	登录号 accession number
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>C. idella</i>	PP790588
<i>Squaliobarbus curriculus</i>	<i>S. curriculus</i>	PP790592
<i>Danio rerio</i>	<i>D. rerio</i>	DAA64468
<i>Electrophorus electricus</i>	<i>E. electricus</i>	XP_026860045.2
<i>Salmo salar</i>	<i>S. salar</i>	XP_045565480.1
<i>Oryzias latipes</i>	<i>O. latipes</i>	NP_001153919.1
<i>Thunnus orientalis</i>	<i>T. orientalis</i>	BB128322.1
<i>Mauremys mutica</i>	<i>M. mutica</i>	XP_044845049.1
<i>Homo sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	NP_001025032.1
<i>Mus musculus</i>	<i>M. musculus</i>	NP_918953.2
<i>Salvelinus alpinus</i>	<i>S. alpinus</i>	XP_023991317.1
<i>Scomber japonicus</i>	<i>S. japonicus</i>	XP_053198577.1
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>O. mykiss</i>	BAM84264.1
<i>Larimichthys crocea</i>	<i>L. crocea</i>	AHN52225.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>D. labrax</i>	CBN81978.1

1.5 石蜡切片和 HE 染色

将部分性腺固定在 Bouin's 固定液中, 根据组织块大小固定 1~4 h 后, 使用 70%、80%、90%、95%、100%乙醇梯度脱水, 二甲苯透明、石蜡浸渍、包埋。利用切片机(徕卡, 德国, RM2245)对性腺石蜡样品连续切片, 切片厚度固定为 5 μm , 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后进行苏木精-伊红(HE)染色(Biosharp, 中国), 中性树脂(Biosharp, 中国)封片。在显微镜(徕卡, 德国, DM5000 B)下观察和拍照, 分析性腺的组织学特征。

1.6 *nanos2* 基因表达特征分析

利用荧光定量 PCR (qPCR)技术分析 *nanos2* 基因在草鱼和赤眼鳟不同组织的表达特征, 包括鳃、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、脑、精巢和卵巢。利用 Primer Premier 5 软件设计得到用于 qPCR 的引物, 如表 1 所示, 分别为草鱼 *nanos2* (*Ci_nanos2* qPCR F1 和 *Ci_nanos2* qPCR R1)、草鱼 β *actin* (*Ci_β actin* F1 和 *Ci_β actin* R1)、赤眼鳟 *nanos2* (*Sc_nanos2* qPCR F1 和 *Sc_nanos2* qPCR R1)和赤眼鳟 *EF 1α* (*Sc_EF 1α* F1 和 *Sc_EF 1α* R1), 扩增效率分别为 100%、96%、101%和 97%。使用荧光定量染料 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, 美国)在 ABI QuantStudio™ 6 Flex PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)上检测基因 mRNA 水平。qPCR 反应体系: 10 μL PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix、8.4 μL ddH₂O、1 μL cDNA、0.35 μL 上游引物和 0.35 μL 下游引物。qPCR 反应程序: 预变性包括 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 三步法扩增 40 个循环, 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。熔解曲线: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。每种样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。 β -*actin* 和 *EF 1α* 作为内参基因, 结果用 $2^{-\Delta C_t}$ 表示。统计分析采用 *t* 检验, 最终数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。当 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 时, 表示差异显著。统计数据用 GraphPad Prism 8.0 绘制。

1.7 利用物种特异性引物区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞

利用 Vector NTI 11.5.1 对草鱼和赤眼鳟的 *nanos2* 基因核苷酸序列进行比较, 根据其序列的

差异部分设计相应的物种特异性引物(表 1), 分别为草鱼特异性引物(*nanos2* F1 和 *nanos2* R1)、赤眼鳟特异性引物(*nanos2* F2 和 *nanos2* R2)和共同表达引物(*nanos2* F3 和 *nanos2* R3), 用于 PCR 和 1.5%琼脂糖凝胶电泳分析, 以区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞。PCR 体系为 5 μL 2 $\times$ Taq master mix, 3.5 μL ddH₂O, 1 μL cDNA, 0.4 μL 上游引物和 0.4 μL 下游引物。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后, 进入 35 个扩增循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 *nanos2* 基因序列分析

利用 PCR 技术从草鱼精巢克隆得到 442 bp 的 *nanos2* 基因部分 cDNA 序列, 通过 RACE 技术获得 *nanos2* 基因 649 bp 的全长 cDNA 序列, ORF 为 438 bp, 5'UTR 为 26 bp, 3'UTR 为 185 bp。ORF 编码 145 个氨基酸, 具有锌指结构域, 包含 23 个磷酸化位点, 无信号肽(图 1a)。预测的氨基酸序列理论等电点为 8.96, 相对分子质量为 16735.78。

利用 PCR 技术从赤眼鳟精巢中克隆得到 420 bp 的 *nanos2* 基因部分 cDNA 序列, 通过 RACE 技术获得 *nanos2* 基因 636 bp 的全长 cDNA 序列, ORF 为 435 bp, 5'UTR 为 25 bp, 3'UTR 为 176 bp。ORF 编码 144 个氨基酸, 具有锌指结构域, 包含 25 个磷酸化位点, 无信号肽(图 1b)。预测的氨基酸序列理论等电点为 8.86, 相对分子质量为 16387.32。

2.2 *Nanos2* 氨基酸同源性和系统进化关系分析

草鱼与其他脊椎动物的氨基酸序列比对结果显示(图 2), 草鱼与赤眼鳟 *Nanos2* 蛋白的同源性最高(91.67%), 与斑马鱼(65.49%)、电鳗(50%)和太平洋蓝旗金枪鱼(47.69%)具有较高同源性, 与黄喉拟水龟(44.53%)、青鳉(41.32%)、人类(40.98%)、小鼠(40.98%)和大西洋鲑(40%)的同源性较低。*Nanos2* 系统发育进化树(图 3)显示该树主要分为两大分支, 一个分支由硬骨鱼类组成, 草鱼和赤眼鳟聚在一起, 其遗传距离最近; 另一分支由四足类组成。

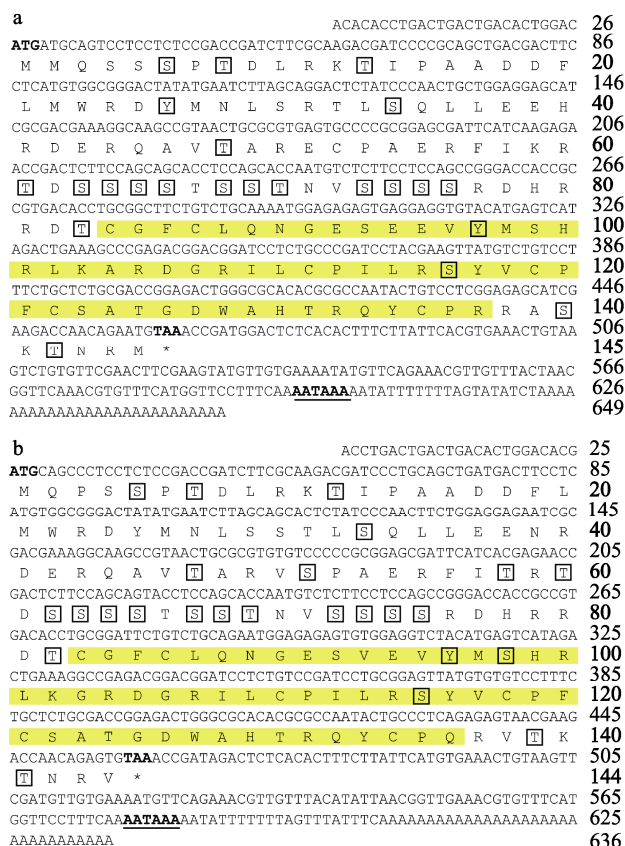


图 1 草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因 cDNA 序列和
 推导的氨基酸序列

a. 草鱼 *nanos2* 基因; b. 赤眼鳟 *nanos2* 基因。起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)标记为粗体, 加尾信号(AATAAA)标记为粗体和下划线; 锌指结构域用黄色突出显示; 预测的丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和酪氨酸(Y)残基上的磷酸化位点用黑色方框显示。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequences of *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus nanos2*
 a. *C. idella nanos2*; b. *S. curriculus nanos2*. The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are in bold; the polyadenylation signal (AATAAA) is marked using bold underlined; Zinc Finger is shaded by bright yellow; the predicted phosphorylation sites of serine (S), threonine (T) and tyrosine (Y) residues are shown in black boxes.

2.3 *nanos2* 在不同组织的表达特征分析

利用石蜡切片及 HE 染色分析了草鱼和赤眼鳟性腺的组织学特征, 发现草鱼精巢只含有大量的精原细胞(图 4a), 而赤眼鳟精巢含有少量的精原细胞和大量的初级精母细胞(图 4d); 草鱼和赤眼鳟卵巢均以初级卵母细胞为主(图 4b, 4e)。

利用 qPCR 研究了 *nanos2* 基因在不同组织的表达水平。草鱼中, *nanos2* 基因主要在卵巢和精巢表达, 且精巢的表达水平显著高于卵巢($P < 0.001$), 在肝脏有少量表达, 其他组织不表达(图 4c); 赤

眼鳟 *nanos2* 基因主要表达于卵巢和精巢, 且精巢的转录水平显著高于卵巢($P < 0.01$), 心脏有少量表达, 其他组织不表达(图 4f)。

2.4 物种特异性引物区分草鱼和赤眼鳟生殖细胞

通过比对分析草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 核苷酸序列, 分别设计了草鱼 *nanos2* 特异性引物(*nanos2* F1 和 *nanos2* R1)、赤眼鳟 *nanos2* 特异性引物(*nanos2* F2 和 *nanos2* R2)和两个物种的通用引物(*nanos2* F3 和 *nanos2* R3)(表 1)。通过 PCR 技术研究发现, 草鱼 *nanos2* 特异性引物只在草鱼性腺扩增得到 179 bp 的目的条带, 而赤眼鳟 *nanos2* 特异性引物只在赤眼鳟性腺扩增得到 265 bp 的目的条带, 两个物种的 *nanos2* 通用引物在草鱼和赤眼鳟性腺都能扩增得到 251 bp 的目的条带(图 5b)。由于目前鱼类中的研究表明 *nanos2* 为生殖细胞特异表达基因, 因此本研究通过物种特异 *nanos2* 引物的 PCR 可以有效鉴定供体和受体生殖细胞。

3 讨论

本研究克隆鉴定了草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因, 并进行了序列分析。对于许多物种来说, *nanos2* 编码氨基酸的个数在 100~200 之间, 如草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 分别编码 145 和 144 个氨基酸(图 1a、1b); 银鲫、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *nanos2* 分别编码 141、175 和 187 个氨基酸^[32,34-35]; 奶山羊和水牛(*Bubalus bubalis*) *nanos2* 分别编码 138 和 155 个氨基酸^[36-37]; 然而, 海胆(*Mesocentrotus nudus*) *nanos2* 编码 230 个氨基酸^[38]。这些研究表明, *nanos2* 编码氨基酸数目具有物种差异性。Nanos 蛋白具有 2 个进化保守的 Cys-Cys-His-Cys 锌指基序(zf-nanos), 它们是潜在的锌结合位点^[39-40]。在草鱼和赤眼鳟 Nanos2 氨基酸序列的 C 末端发现了典型的 zf-nanos 结构域(图 1a, 1b), 这与在其他鱼类的研究一致^[25,35-36]。对不同物种 Nanos2 氨基酸同源性分析(图 2), zf-nanos 结构域外的同源性相对较低, zf-nanos 结构域高度保守, 说明其对 *nanos2* 功能至关重要。已有研究表明, 3'UTR 在 *nanos2* 基因功能的发挥也起着至关重要的作用。*nanos* 3'UTR 中的保守基序通过与 Pumilio 相互作用发挥功能^[41-42]。

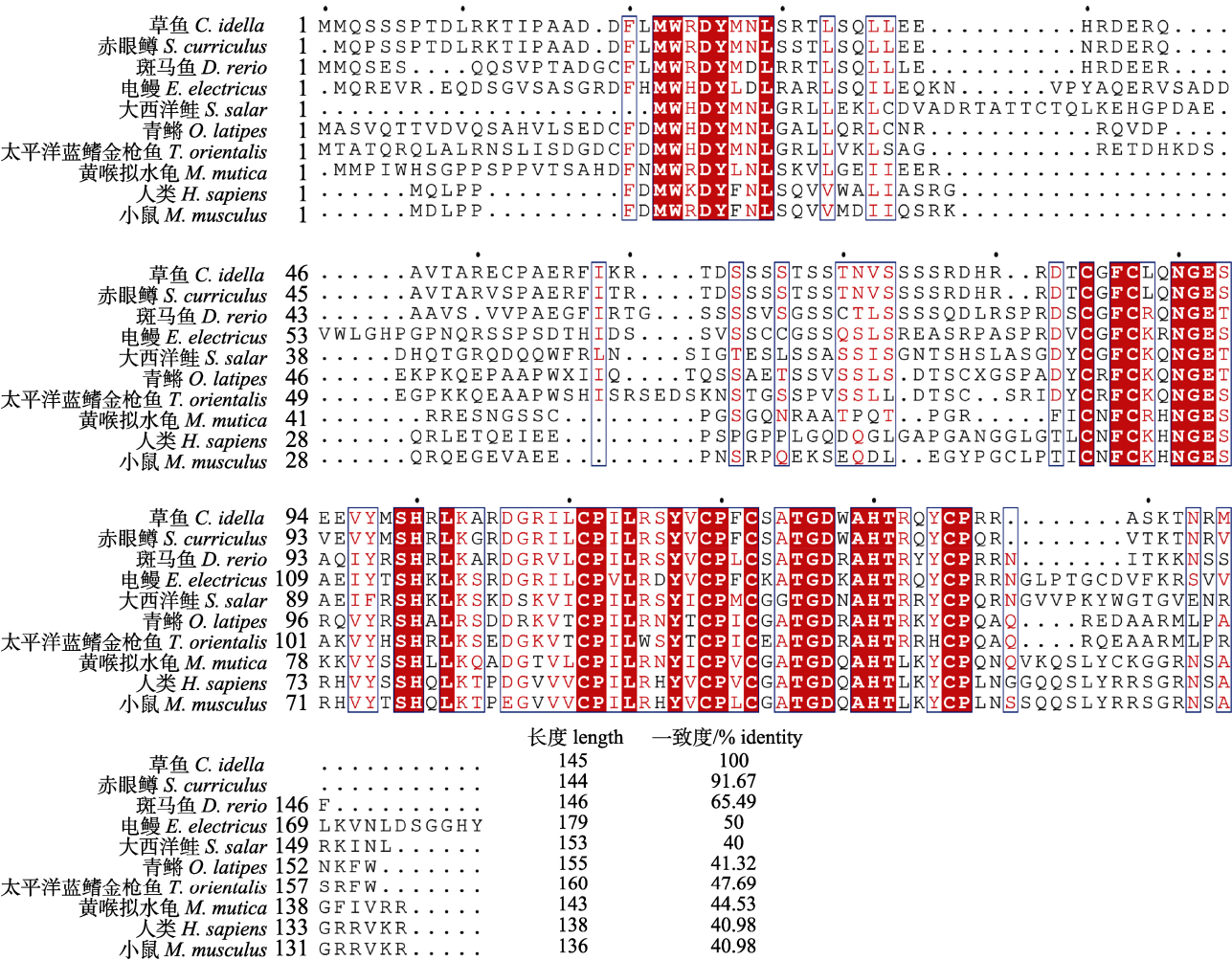


图 2 草鱼与赤眼鲮及其他脊椎动物 Nanos2 蛋白序列多重比对

若某一列的相似性大于 70%，则认为残基高度相似，用红色字母和蓝框显示；若 100% 相同，则用白色字母和红色背景标出。
Fig. 2 Multiple amino acid sequence alignments of Nanos2 of *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus* and other vertebrates
If the similarity score assigned to a column is greater than 70%, residues are considered as highly similar and are colored in red and framed in blue, and they are highlighted in white letters with red background in case of 100% identity.

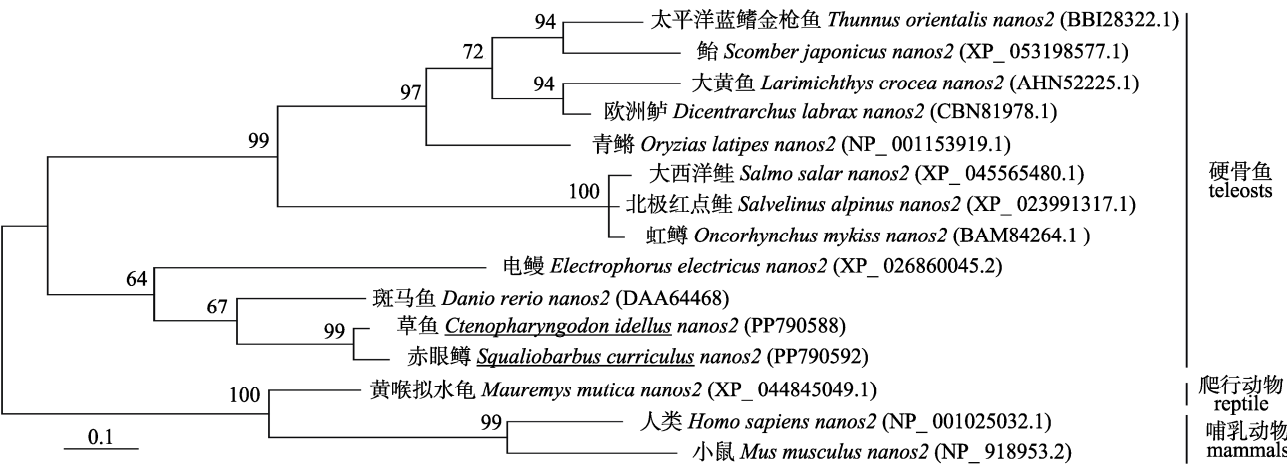


图 3 草鱼与赤眼鲮及其他脊椎动物 Nanos2 系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of Nanos2 of *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus* and other vertebrates

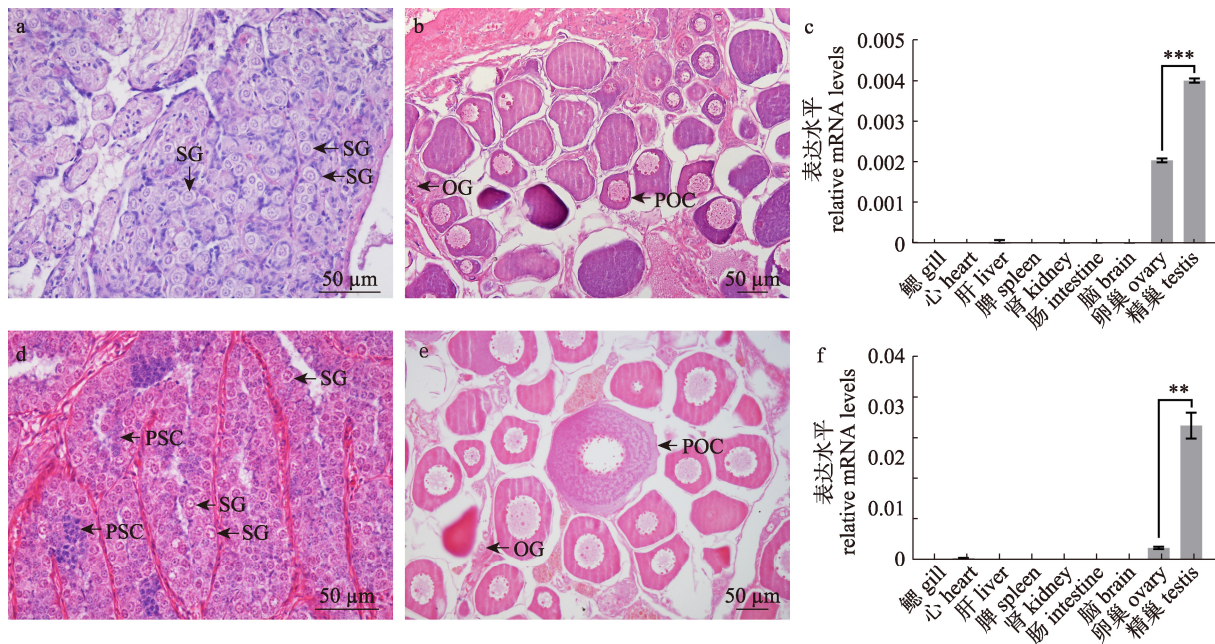


图 4 草鱼与赤眼鳟 *nanos2* 在不同组织的表达水平分析

a. 草鱼精巢; b. 草鱼卵巢; c. *nanos2* 在草鱼不同组织的 mRNA 水平分析; d. 赤眼鳟精巢; e. 赤眼鳟卵巢; f. *nanos2* 在赤眼鳟不同组织的 mRNA 水平分析. SG: 精原细胞; PSC: 初级精母细胞; OG: 卵原细胞; POC: 初级卵母细胞. 比例尺: 50 μ m.

Fig. 4 Expression levels of *nanos2* gene in different tissues of *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus*. a. testis of *C. idella*; b. ovary of *C. idella*; c. mRNA levels of *nanos2* were detected in gonad and other tissues in *C. idella*; d. testis of *S. curriculus*; e. ovary of *S. curriculus*; f. mRNA levels of *nanos2* were detected in gonad and other tissues in *S. curriculus*. SG: spermatogonia; PSC: primary spermatocytes; OG: oogonia; POC: primary oocyte. Scale bar: 50 μ m.

在小鼠 *nanos2* 3'UTR 突变体中, 发现 *nanos2* 3'UTR 通过调节 Nanos2 蛋白水平从而调控精子发生^[43]。海胆中, *nanos2* 3'UTR 对生殖细胞的发育具有关键作用^[44]。草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因 3'UTR 在生殖细胞的功能值得进一步研究。

利用 qPCR 研究了 *nanos2* 在草鱼和赤眼鳟性腺及其他组织的表达特征, 结合性腺组织切片结果, 表明 *nanos2* 在草鱼和赤眼鳟性腺发育时期高表达, 在精巢的表达水平显著高于卵巢(图 4), 这与半滑舌鲷、虹鳟、银鲫和海胆的研究结果一致^[23,32,35,38]。在大黄鱼、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)和尼罗罗非鱼(Nile tilapia *Oreochromis niloticus*)性腺中, 检测到 *nanos2* 在精巢特异性表达, 卵巢不表达^[34,45-46]。这些研究结果表明 *nanos2* 在不同物种的表达模式具有一定的物种特异性。Nanos 是一种 RNA 结合蛋白, 它在动物生殖系的形成、发育和维持等方面起重要作用^[47-50]。在小鼠和罗非鱼中, 敲除 *nanos2* 导致性腺生殖细胞缺失^[26,51], 结果表明 *nanos2* 基因在草鱼和赤眼

鳟性腺发育过程中发挥重要作用。

草鱼和赤眼鳟 Nanos2 蛋白相似性高达 91.67% (图 2), 表明 *nanos2* 在这两种鱼中高度保守, 该基因在两种鱼生殖细胞发育过程中的功能可能十分相似。建立生殖干细胞移植技术需考虑供体与受体的亲缘性, 亲缘关系越近, 越易获得供体的配子, 目前报道了许多鱼类生殖细胞移植成功的案例, 如鱼类属间移植, 鱼类属内移植、鱼类种内移植等^[8]。草鱼和赤眼鳟同属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科, 分属草鱼属和赤眼鳟属, 亲缘关系很近^[52], 系统发育树显示草鱼和赤眼鳟 Nanos2 聚为一支(图 3), 其遗传距离最近, 提示了在草鱼和赤眼鳟之间开展生殖干细胞移植的可行性。受体性腺中供体生殖细胞的鉴定是鱼类生殖干细胞移植的重要环节。Saito 等^[15]在 *vasa* 3'UTR 设计物种特异性引物, 在受体斑马鱼中检测到供体闪电斑马鱼(*Danio albolineatus*)的生殖细胞; 类似的, 通过 *vasa* 物种特异性引物证实了在受体黄条鰻(*Seriola lalandi*)中存在来源于供体南方蓝鳍金枪

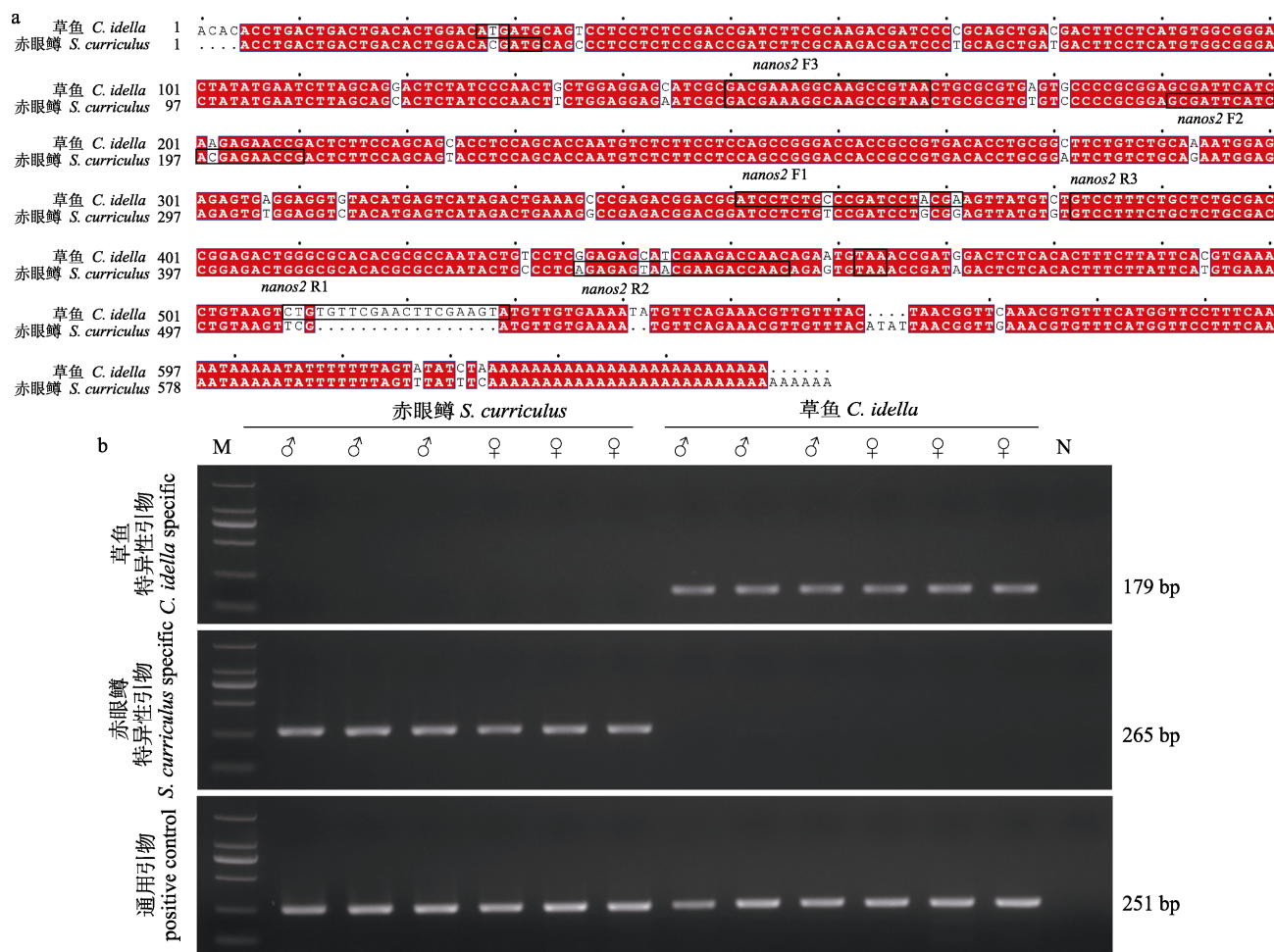


图 5 草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因特异引物的设计和 PCR 验证

a. 草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因序列比对和引物位置; b. *nanos2* 基因的物种特异性 PCR 扩增。

相同的碱基由白色字母和红色背景显示; 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用黑框标出; *nanos2* F1 和 *nanos2* R1 为草鱼特异扩增引物, *nanos2* F2 和 *nanos2* R2 为赤眼鳟特异扩增引物, *nanos2* F3 和 *nanos2* R3 为草鱼和赤眼鳟通用引物;

M 代表 DL2000 分子标记; N 表示阴性对照。

Fig. 5 Specific primers design and PCR validation of *nanos2* gene in *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus*. a. Sequences alignment and primers of *nanos2* of *C. idella* and *S. curriculus*; b. the species-specific PCR amplification of *nanos2*.

Identical bases are shown with white letters and red background; the start codon (ATG) and stop codon (TAA) are in black boxes; *nanos2* F1 and *nanos2* R1 belong to *C. idella*-specific PCR amplification primers, *nanos2* F2 and *nanos2* R2 belong to *S. curriculus*-specific PCR amplification primers, *nanos2* F3 and *nanos2* R3 is the universal primers;

M represents DL2000 molecular markers; N represents negative control.

鱼(*Thunnus maccoyii*)的生殖细胞^[53]; 根据 *amh* 基因第一个内含子序列设计特异性引物, 成功的检测出供体来源的精子^[54]; 利用 *vasa*、*dnd* 和 *nanos2* 物种特异性引物能准确区分供体大黄鱼和受体黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的生殖细胞^[55]。本研究通过分析草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因核苷酸的差异性, 设计得到草鱼和赤眼鳟物种特异性引物, 通过 PCR 快速有效地区分了它们的生殖细胞(图 5a、5b), 为鉴定草鱼和赤眼鳟生殖干细胞移植成功与

否提供了关键技术支撑。

4 结论

本研究克隆鉴定了草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 基因全长的 cDNA 序列, 草鱼和赤眼鳟 *nanos2* 氨基酸序列同源性高达 91.67%, 系统发育进化树显示草鱼和赤眼鳟的亲缘关系很近; 荧光定量分析显示, *nanos2* 基因主要在草鱼和赤眼鳟性腺表达, 且精巢的表达量显著高于卵巢; 根据草鱼和赤眼鳟

nanos2 基因序列的差异, 设计并验证了获得物种特异性引物, 建立了有效鉴定草鱼和赤眼鳟生殖细胞的方法。本研究为进一步探究 *nanos2* 在草鱼和赤眼鳟性腺发育机制提供参考, 也为后续草鱼生殖干细胞移植技术的建立奠定基础。

参考文献:

- [1] Lu X, Chen H M, Qian X Q, et al. Transcriptome analysis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) between fast-and slow-growing fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics & Proteomics, 2020, 35: 100688.
- [2] Wu C S, Ma Z Y, Zheng G D, et al. Chromosome-level genome assembly of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides insights into its genome evolution[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): Article No.271.
- [3] Song X H, Hu X L, Sun B Y, et al. A transcriptome analysis focusing on inflammation-related genes of grass carp intestines following infection with *Aeromonas hydrophila*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 40777.
- [4] Zhao H H, Chong J, Tang R, et al. Metabolomics investigation of dietary effects on flesh quality in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. GigaScience, 2018, 7(10): giy111.
- [5] Zhan F B, Li Y N, Shi F, et al. Characterization analysis of TLR5a and TLR5b immune response after different bacterial infection in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2023, 136: 108716.
- [6] Chen S L, Xu W T, Lu S, et al. Development strategy for aquatic breeding biotechnology[J]. Strategic Study of CAE, 2023, 25(4): 214-226. [陈松林, 徐文腾, 卢昇, 等. 水产育种生物技术发展战略研究[J]. 中国工程科学, 2023, 25(4): 214-226.]
- [7] Qi B, Li S J, Du J X, et al. Gonadal histology and expression analysis of sex characteristic genes in grass carp at different ages[J]. Progress in Fishery Sciences, 2024, 45: 1-11. [祁博, 李胜杰, 杜金星, 等. 草鱼不同月龄性腺组织学观察及性别特征基因 *cyp19a1a* 和 *amh* 的表达分析[J]. 渔业科学进展, 2024, 45: 1-11.]
- [8] Ye H, Wei Q W, Xu D D, et al. Progress and application prospect of germ cell transplantation technique in fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 321-337. [叶欢, 危起伟, 徐冬冬, 等. 鱼类生殖细胞移植的研究进展及应用前景[J]. 水产学报, 2020, 44(2): 321-337.]
- [9] Xu D D, Yoshino T, Konishi J, et al. Germ cell-less hybrid fish: Ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm[J]. Biology of Reproduction, 2019, 101(2): 492-500.
- [10] Tao B B, Hu W. Research progress on primordial germ cell development and reproductive manipulation techniques of fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(1): 94-106. [陶彬彬, 胡炜. 鱼类原始生殖细胞发育与生殖操作技术研究进展[J]. 水产学报, 2023, 47(1): 94-106.]
- [11] Yoshizaki G, Lee S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation[J]. Stem Cell Research, 2018, 29: 103-110.
- [12] de Siqueira-Silva D H, Saito T, dos Santos-Silva A P, et al. Biotechnology applied to fish reproduction: Tools for conservation[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(6): 1469-1485.
- [13] Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, et al. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(23): 14919-14924.
- [14] Hattori R S, Yoshinaga T T, Katayama N, et al. Surrogate production of *Salmo salar* oocytes and sperm in triploid *Oncorhynchus mykiss* by germ cell transplantation technology[J]. Aquaculture, 2019, 506: 238-245.
- [15] Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation[J]. Biology of Reproduction, 2008, 78(1): 159-166.
- [16] Long G H, Lin G, Hu D S, et al. The reproductive biology of barbel chub[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(5): 28-36. [龙光华, 林岗, 胡大胜, 等. 赤眼鳟的繁殖生物学[J]. 动物学杂志, 2005, 40(5): 28-36.]
- [17] Duangkaew R, Jangprai A, Ichida K, et al. Characterization and expression of a *vasa* homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)[J]. Theriogenology, 2019, 131: 61-71.
- [18] Zhou L, Wang X Y, Du S R, et al. Germline specific expression of a *vasa* homologue gene in the viviparous fish black rockfish (*Sebastes schlegelii*) and functional analysis of the *vasa* 3' untranslated region[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 575788.
- [19] Wang X Y, Liu Q H, Xiao Y S, et al. The *dnd* RNA identifies germ cell origin and migration in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 428591.
- [20] Sun Z H, Zhou L, Li Z, et al. Sexual dimorphic expression of *dnd* in germ cells during sex reversal and its requirement for primordial germ cell survival in protogynous hermaphroditic grouper[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2017, 208-209: 47-57.
- [21] Gribouval L, Sourdain P, Lareyre J J, et al. The *nanos1* gene was duplicated in early Vertebrates and the two paralogs show different gonadal expression profiles in a shark[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): Article No.6942.
- [22] Draper B W. Identification of germ-line stem cells in zebrafish[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1463: 103-113.
- [23] Bellaiche J, Lareyre J J, Cauty C, et al. Spermatogonial stem

- cell quest: *nanos2*, marker of a subpopulation of undifferentiated a spermatogonia in trout testis[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(4): Article No.79.
- [24] Liu L J, Liu T, Wu S X, et al. Discovery of *nanos1* and *nanos2/3* as germ cell markers during scallop gonadal development[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(2): 408-416.
- [25] Aoki Y, Nakamura S, Ishikawa Y, et al. Expression and syntenic analyses of four *nanos* genes in medaka[J]. *Zoological Science*, 2009, 26(2): 112-118.
- [26] Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, et al. Conserved role of *nanos* proteins in germ cell development[J]. *Science*, 2003, 301(5637): 1239-1241.
- [27] Qu L, Wu X, Liu M F, et al. Identification and characterization of germ cell genes *vasa* and *dazl* in a protogynous hermaphrodite fish, orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Gene Expression Patterns*, 2020, 35: 119095.
- [28] Wang W X, Liang S S, Zou Y X, et al. Expression of *scp3* and *dazl* reveals the meiotic characteristics of the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Biology of Reproduction*, 2023, 108(2): 218-228.
- [29] Oulhen N, Wessel G M. Every which way—*nanos* gene regulation in echinoderms[J]. *Genesis*, 2014, 52(3): 279-286.
- [30] Saga Y. Function of *Nanos2* in the male germ cell lineage in mice[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67(22): 3815-3822.
- [31] Sun Z H, Wang Y, Lu W J, et al. Divergent expression patterns and function implications of four *nanos* genes in a hermaphroditic fish, *Epinephelus coioides*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 685.
- [32] Zhang Q Q, Zhou L, Li Z, et al. Allelic diversification, syntenic alignment and expression patterns of *nanos2* in polyploid gibel carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(5): 1087-1096. [张琴琴, 周莉, 李志, 等. 多倍体银鲫 *nanos2* 等位多态性、共线性和表达模式分析[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(5): 1087-1096.]
- [33] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [34] Han K H, Chen S H, Cai M Y, et al. *Nanos3* not *nanos1* and *nanos2* is a germ cell marker gene in large yellow croaker during embryogenesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2018, 218: 13-22.
- [35] Huang J Q, Li Y J, Shao C W, et al. Identification, characterization and functional analysis of regulatory region of *nanos* gene from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Gene*, 2017, 617: 8-16.
- [36] Yao X, Tang F, Yu M, et al. Expression profile of *Nanos2* gene in dairy goat and its inhibitory effect on *Stra8* during meiosis[J]. *Cell Proliferation*, 2014, 47(5): 396-405.
- [37] Li M Q, Luo A L, Zhao P W, et al. *Nanos2* is a molecular marker of inchoate buffalo spermatogonia[J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 186: 44-51.
- [38] Zhang J, Han X, Wang J, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression analysis of *nanos2* in the sea urchin, *Mesocentrotus nudus*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2705.
- [39] 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.
- [40] Zhu L, Wang H P, Zhu Z Y, et al. Molecular cloning and identification of *nanos3* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(3): 457-464. [朱林, 王厚鹏, 朱作言, 等. 团头鲂 *nanos3* 基因的克隆鉴定[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(3): 457-464.]
- [41] Sonoda J, Wharton R P. Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio[J]. *Genes & Development*, 1999, 13(20): 2704-2712.
- [42] Gerber A P, Luschnig S, Krasnow M A, et al. Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(12): 4487-4492.
- [43] Tsuda M, Kiso M, Saga Y. Implication of *nanos2-3'* UTR in the expression and function of *nanos2*[J]. *Mechanisms of Development*, 2006, 123(6): 440-449.
- [44] Oulhen N, Yoshida T, Yajima M, et al. The 3'UTR of *nanos2* directs enrichment in the germ cell lineage of the sea urchin[J]. *Developmental Biology*, 2013, 377(1): 275-283.
- [45] Li H, Zhu Q H, Chen R Y, et al. Identification and characterization of dimorphic expression of sex-related genes in rock bream, a fish with multiple sex chromosomes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 791179.
- [46] Jin Y H, Davie A, Migaud H. Expression pattern of *nanos*, *piwil*, *dnd*, *vasa* and *pum* genes during ontogenic development in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Gene*, 2019, 688: 62-70.
- [47] Xu W H, Niu C M, Xia M M, et al. The function of RNA binding protein in spermatogenesis[J]. *Chinese Journal of Andrology*, 2020, 34(6): 75-79. [徐文华, 牛长敏, 夏蒙蒙, 等. RNA 结合蛋白在精子发生过程中的作用[J]. *中国男科学杂志*, 2020, 34(6): 75-79.]
- [48] Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. Functional redundancy among *nanos* proteins and a distinct role of *nanos2* during male germ cell development[J]. *Development*, 2007, 134(1): 77-83.
- [49] Hayashi Y, Hayashi M, Kobayashi S. *Nanos* suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(28): 10338-10342.
- [50] Wang Z, Lin H F. *Nanos* maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2016-2019.

- [51] Li M H, Yang H H, Zhao J E, et al. Efficient and heritable gene targeting in Tilapia by CRISPR/Cas9[J]. *Genetics*, 2014, 197(2): 591-599.
- [52] Qiao Q, Liu Q L, Xiao T Y, et al. The study of ploidy and fertility of the hybrid F1 of *Ctenopharyngodon idella*♀×*Squaliobarbus curriculus*♂[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 313-322. [乔庆, 刘巧林, 肖调义, 等. 草鱼(♀)×赤眼鳟(♂)杂交 F1 倍性分析和性腺发育特点[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 313-322.]
- [53] Bar I, Smith A, Bubner E, et al. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation[J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2016, 28(12): 2051-2064.
- [54] Majhi S K, Hattori R S, Yokota M, et al. Germ cell transplantation using sexually competent fish: An approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6132.
- [55] Yu Y J, Yang Y, Ye H, et al. Identification of germ cells in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and yellow drum (*Nibea albiflora*) using RT-PCR and in situ hybridization analyses[J]. *Gene*, 2023, 863: 147280.

Cloning and expression characterization analysis of *nanos2* gene in *Ctenopharyngodon idella* and *Squaliobarbus curriculus*

HUANG Ling, YE Huan, YUE Huamei, HOU Yanling, QU Ziling, RUAN Rui, LI Chuangju

Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: The grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) represents an economically important fish species in freshwater aquaculture within China. However, the urgency to develop superior varieties has become paramount due to significant germplasm degeneration in grass carp. Germline stem cell transplantation emerges as a promising and potent technique for reducing the sexual maturity cycle in fish. Consequently, our objective was to shorten the generation interval for obtain functional gametes of grass carp by employing barbel chub (*Squaliobarbus curriculus*) as a surrogate host. The accurate identification of germ cells between donor and recipient species is a critical step in the successful establishment of germline stem cell transplantation. However, the method of identification of germ cells in grass carp and barbel chub is not clear. In the present study, the full-length cDNA of reproduction-related gene *nanos2* were cloned from grass carp and barbel chub, which are 649 and 636 base pairs, encoding 145 and 144 amino acids, respectively. Sequence analysis revealed that the grass carp Nanos 2 (CiNanos2) amino acid sequence exhibits a high degree of sequence identity to that of barbel chub (91.67%), and to that of zebrafish (*Danio rerio*) (65.49%). Phylogenetic tree analysis showed that grass carp is clustered together with barbel chub, indicating the closest genetic relationship between them. The expression of *nanos2* transcripts in grass carp and barbel chub was predominantly observed in the gonads, with significantly higher levels detected in the testis compared to the ovary, suggesting that *nanos2* might plays a crucial role in the development of gonad. Species-specific and common primers were designed based on the alignment of *nanos2* sequences between grass carp and barbel chub for PCR analysis. The results demonstrated that the grass carp-specific primers had exclusively target product (179 bp) in the gonad of grass carp, while the barbel chub-specific primers had only expected product (265 bp) in the gonad of barbel chub gonads. Additionally, the common primers were able to amplify indiscriminately in the gonads of both grass carp and barbel chub, producing a target product of 251 bp, implying that the germ cells of grass carp and barbel chub could be efficiently distinguished via species-specific primers by PCR. Our study laid the foundation for further investigating the mechanism of the *nanos2* gene in gonad development of grass carp and barbel chub. Meanwhile, it provided an effective method for monitoring the chimerism and development of grass carp germ cells in the gonads of barbel chub.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Squaliobarbus curriculus*; *nanos2*; tissue distribution; species-specific primers

Corresponding author: LI Chuangju. E-mail: lcj@yfi.ac.cn