

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.003

基于新的 CRISPR/Cas9 技术实现斑马鱼 LHX9 基因的快速编辑 及对 F0 突变体性腺发育的初筛 *

王楠¹ 朱惠¹ 朱文娇¹ 张昌润² 沈也雷³ 董梅² 宋怀东² 乔洁^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属第九人民医院内分泌科 上海 200011;

2 上海交通大学医学院附属第九人民医院中心实验室 上海 200011; 3 上海市南洋模范中学 上海 200030)

摘要 目的: CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼的反向遗传学中的得到了广泛应用,但突变基因的表型观察往往需要在突变鱼系的 F1 中进行,费时较长。LHX9 作为 LIM 家族的一种转录因子,在胚胎早期的泌尿生殖嵴中有广泛分布;且 LHX9 基因敲除的小鼠存在性腺发育不良。本研究拟通过一种新的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,采用四条 sgRNA 对 LHX9 基因进行 VASA 转基因斑马鱼的基因敲除,以观察该基因缺陷对斑马鱼性腺发育的影响。**方法:** 利用新的 CRISPR/Cas9 技术,设计四条针对斑马鱼 LHX9 基因 3 号外显子的 20bp 的 sgRNA,通过非克隆体外转录得到靶位点的四条 sgRNA。将以上靶位点的四条 sgRNA 与 Cas9 核酸酶蛋白同时注射入单细胞期的斑马鱼胚胎内,利用 PCR 鉴定突变类型和突变比例。通过对 LHX9 基因突变体的 VASA 转基因斑马鱼进行荧光观察,发现 LHX9 基因缺陷的斑马鱼性腺发育的情况。**结果:** 靶向 Exon 3 的四条 sgRNA 可成功编辑 斑马鱼 LHX9 基因,敲除效率高达 82%,Sanger 测序发现产生 10 种不同的移码突变类型。通过该方法对 VASA 转基因斑马鱼的 LHX9 基因进行编辑,发现 LHX9 基因突变导致 dph6 的的斑马鱼原始生殖细胞增殖和迁移受到影响。**结论:** 基于 4 条 sgRNA 注射的 CRISPR/Cas9 技术,可以快速地产生具有突变表型的 G0 斑马鱼,具有应用潜力。LHX9 基因敲除导致原始生殖细胞的发育和迁移受到影响,提示该基因参与了斑马鱼早期性腺的发育。

关键词: CRISPR/Cas9; LHX9; 斑马鱼; 基因编辑**中图分类号:** R-33; Q75; Q132.7; Q959.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)01-14-05

Using A newly Rapid CRISPR/Cas9 System to Perform Genome Editing of Zebrafish LHX9 Gene and Preliminary Screening Gonad Development in F0 Mutant*

WANG Nan¹, ZHU Hu¹, ZHU Wen-jiao¹, ZHANG Chang-run², SHEN Ye-lei³, DONG Mei², SONG Huai-dong², QIAO Jie^{1Δ}

(1 Department of Endocrinology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200011, China;

2 Central Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China;

3 Shanghai Nanyang Model High School, Shanghai, 200030, China)

ABSTRACT Objective: CRISPR/Cas9 system has been widely used in reverse genetics of zebrafish, but it often takes longer time to observe and screen phenotype of mutant genes in F1 of mutant fish lines. LHX9, the LIM homeobox gene, is widely expressed in urogenital ridges in early embryonic stage. In LHX9 knockout mice, somatic cells of the genital ridge fail to proliferate, leading to disturbance of gonads formation. In this study, four sgRNAs were designed to target the LHX9 gene in VASA transgenic zebrafish by a new CRISPR/Cas9 gene editing technique to rapidly observe the effect of LHX9 knockout in the gonad development of zebrafish. **Methods:** Four 20bp sgRNAs targeting exon 3 of zebrafish LHX9 gene were designed. These sgRNAs were obtained by non-cloning in vitro transcription. The mixture of four sgRNAs were injected into VASA transgenic zebrafish embryos at single cell stage together with Cas9 nuclease. The mutation types and mutation proportions were identified by PCR and sequencing. The development of gonads in zebrafish with LHX9 gene defect was observed by fluorescence microscopy in VASA transgenic zebrafish. **Results:** Four sgRNAs targeting Exon 3 could successfully edit the LHX9 gene of zebrafish. The knockout efficiency was as high as 82%, and Sanger sequencing revealed 10 different types of shifting mutations. In a VASA transgenic zebrafish, it was found that the proliferation and migration of primordial germ cells were affected if LHX9 gene was disturbed. **Conclusions:** CRISPR/Cas9 technology based on four sgRNA injections can rapidly produce F0 zebrafish with mutant phenotype and has potential application. The knockout of LHX9 gene affect the proliferation and migration of primordial germ cells, suggesting its role in the early development of gonads in zebrafish.

Key words: CRISPR/Cas9; LHX9; Zebrafish; Gene edit

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81570753, 81873652)

作者简介: 王楠, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 性发育异常疾病, E-mail: wangnan921016@163.com

Δ 通讯作者: 乔洁, 女, 博士生导师, 主任医师, 主要研究方向: 性发育异常疾病, E-mail: qiao2001@126.com

(收稿日期: 2019-04-21 接受日期: 2019-05-18)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q75; Q132.7; Q959.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2020)01-14-05

前言

CRISPR/Cas9 系统 (clustered regularly interspaced palindromic repeat CRISPR/Cas9) 可以方便地用于斑马鱼胚胎的基因编辑,在斑马鱼的反向遗传学研究中的到了广泛的应用,也使线虫、果蝇和小鼠等其他动物模型中的基因功能、生理过程、发育和疾病表型的研究得到了快速发展。然而,目前所通用的 Cas9/CRISPR 基因敲除技术主要是通过设计一条与靶位点互补的 sgRNA 来对目标位点进行定向基因敲除,此方法所获得的 F0 代由于胚胎嵌合现象,通常无法观察到明显的敲除表型,需要经过多代筛选至 F2 代获得纯合的基因敲除个体后才能观察到相应表型,此过程所需时间长,需要 6-9 个月,过程繁琐,在应用于对未知功能的基因进行初步筛选的过程中并不十分适合。2018 年,Roland^[1]等发现了一种新的 Cas9/CRISPR 基因敲除技术,同时对斑马鱼胚胎进行靶位点的四条不同的 sgRNA 注射,以彻底破坏靶基因的功能,此技术可以仅在 F0 代就观察到与目的基因纯合敲除相似的表型,提高了对未知功能的基因进行初步筛选的效率。

在哺乳动物的胚胎分化过程中,原始生殖细胞的迁移开始于泌尿生殖嵴。而有研究发现,在小鼠胚胎的早期发育中,LIM 同源盒基因 9(LHX9)在泌尿生殖嵴处有明显的表达^[2]。LHX9 属于 LIM 同源家族的转录因子^[3],并且在各种神经系统结构,比如脊髓中神经元^[4]、间脑神经元^[4]、下丘脑神经元^[5]、小脑神经元^[6]中表达,以及发育中的四肢^[6],泌尿生殖器等组织中也有分布。近年来,关于 LHX9 在神经系统中的功能作用已有众多学者进行了深入研究,2000 年,Birk^[7]等学者观察到 LHX9 在性腺发育过程中具有关键作用。在敲除 LHX9 的小鼠体内,性腺体细胞出现增殖障碍,导致性腺的发育受到影响,并出现雌性化表型。由于 LHX9 与 LIM 同源家族许多基因功能上的重复性,跟其他与性腺发育有关的基因(比如类固醇生成因子 SF1, wilms 肿瘤抑制因子 WT1 等)不同,LHX9 基因敲除的小鼠并

没有表现出除了性腺发育异常之外的其他系统的畸形^[7]。我们研究小组在对 46,XY 性发育异常患者(46,XY DSD)进行二代测序,发现部分患者携带 LHX9 的基因突变^[8]。然而,当前国内外学者对于 LHX9 在性腺方面的研究还不是很深入,且没有在斑马鱼中进行 LHX9 的功能研究。本研究正是利用新的 Cas9/CRISPR 基因敲除技术在 VASA 转基因的斑马鱼中对 LHX9 基因进行敲除,VASA 基因作为不同物种原始生殖细胞 (PGC)的标记基因^[9-11],通过 GFP 荧光蛋白标识,可以观察生殖细胞的定位、迁移和性腺的发育。并且在 F0 代观察到了 LHX9 基因敲除的斑马鱼在性腺发育方面的异常表型。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 本项研究在上海市第九人民医院中心实验室斑马鱼饲养中心培育斑马鱼,采用 VASA 转基因斑马鱼为研究对象,28.5℃恒温饲养,光照黑暗交替循环。VASA 转基因斑马鱼为澳门大学葛伟教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 普通 PCR 试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司),DNA 割胶回收试剂盒(北京天根生化科技公司),T-easy 载体连接系统(Promega 公司),MAXIscript® Kit (Ambion),mirVana® miRNA Isolation Kit (Ambion),EnGen® Cas9 核酸酶 NLS, S. pyogenes(NEB)。

1.2 实验方法

1.2.1 设计四条 LHX9 基因敲除靶点的 sgRNA 序列 主要利用以下原则设计靶点:靶点包含 20 个碱基,其中 5' 端应为 GG;紧邻靶点 3' 端的 3 个碱基构成 PAM 区,要求序列为 NGG (N 为任意碱基)。正义链或反义链上均可选择靶位点。靶位点尽量选择在基因 CDS 区的前 2/3 区域并且在 ATG 之后,但是不要在最后一个外显子上。

本实验将靶位点设计在 LHX9 基因的第三号外显子上,具体位置如图 -1。

```
aatttcacgtgcacccgctttttatatgttaaacgtatttgtaaagacataactaaatgttttcatcaa  
tctatgttttgattgtaaatggtgtgtgtgtgtgtccagAAGGTTCTCCGTGCAGAGATGTGCCCGCTGCCA  
CCTCGGCATATCCGCTTCGGAATGGTGATGCGCGCCAAGGACTCCGTGTACCATCTGAGCTGCTTCAC  
CTGCACCAATGCAACAAAACACTGACACGGGTGACCAATTCGGCATGAAAGACAACTGGTTTACTG  
CCGGGTTCACTTGTAGACCCCTTATTCAGGGAGAGTATCACCTCAATTAACTACGCTGAATTAGCGGC  
CAAAGCGGAGGGCTTGCGCTGCCTTACTTCAATGGCACCGGCACGGTGACAGAAAGGAAGGCCACGAAA  
GAGGAAGAGTCCGGCGATGGGGATTGACATCGGCTCTTACAGCTCAGgtgagatgtcaatttacagctg  
ctcagtgccgttgctcaccatttttttgggtttttctgagtggttcgtgttcgtttttagcgga
```

图 1 四条 sgRNA 靶位点位置图。

Fig.1 Locations of four sgRNA target sites

Note: The yellow part is the target sequence, the blue part is the PAM region, and the grey part is the primer sequence verified by PCR.

The upper case is the exon region, and the lower case is the intron region.

根据设计的靶位点合成四条特异的 oligo 序列以及一条反向互补的 Rev sgRNA scaffold 序列,序列如表 1。

1.2.2 sgRNA 的体外转录和回收 根据 2015 年,Varshney^[12]等设计的新方法,通过普通 PCR 反应,采用非克隆的方式合成

含有四条线性体外转录模板的混合物。对 PCR 产物进行回收。利用 Ambion 公司的 MAXIscript® Kit 试剂盒进行体外转录,转录产物利用同公司的 mirVana® miRNA Isolation Kit 试剂盒进行回收,获得含有四条 sgRNA 的混合物。

表 1 四条 oligo 引物序列以及 Rev sgRNA scaffold 序列
Table 1 Four oligo sequences and Rev sgRNA scaffold sequences

Oligo	Sequence
Oligo1	TAATACGACTCACTATAGGAAATGGTATGCGCGCCAGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Oligo2	TAATACGACTCACTATAGGTCAGTGTGTTTGTGCATGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Oligo3	TAATACGACTCACTATAGGTGATACTCTCCCTGAATAGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Oligo4	TAATACGACTCACTATAGGCACCGGCACGGTGCAGAAAGTTTATAGAGCTAGAAATAGC
Rev	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTC
sgRNA	TAGCTCTAAAAC

Note: The underlined part is T7 promoter sequence, the thickened part is target site sequence, and the remaining part is complementary sequence with Rev sgRNA scaffold. Rev sgRNA stands for the Rev sgRNA scaffold sequence.

1.2.3 体外显微注射获得 F0 代斑马鱼 将 cas9 核酸酶蛋白与 4 条 sgRNA 混合物共同注射到 VASA 转基因斑马鱼的单细胞胚胎中,具体注射剂量为:每个胚胎 sgRNA 混合物 100 pg, cas9 核酸酶 30 nM。取注射过 sgRNA 的 48hdf 的 22 个胚胎提取 DNA, 利用引物 5'-AATTTACGTGCACCCGCTT-3', 5'-TCCGCTAACAAACGAACACG-3' 进行 PCR 测序验证,并将 PCR 产物连入 pGEM-T-easy 载体进行 TA 克隆验证。

1.2.4 F0 代 LHX9 基因敲除斑马鱼的表型观察 为了观察 LHX9 基因敲除对早期斑马鱼性腺发育的影响,取发育至 6dpf 已注射 sgRNA 的斑马鱼在荧光显微镜下观察表型,未注射 sgRNA 的 VASA 转基因斑马鱼为对照。

2 结果

2.1 成功构建 LHX9 基因片段敲除的 F0 代斑马鱼

取已注射的 48hpf 的胚胎提取 DNA 进行 PCR 反应,对 PCR 产物进行测序,测序结果如图 -2 所示,22 条注射过 LHX9 基因 sgRNA 的胚胎中,有 18 条在靶位点处出现明显的测序双峰,所占比例为 82%,说明 F0 代胚胎在注射 sgRNA 之后出现嵌合现象。

将上述 PCR 产物连入 pGEM-T-easy 载体进行 TA 克隆,以确定具体突变类型。克隆测序结果如图 -3 所示,共形成了 11 种突变类型,10 种突变体,且这些突变类型全部为片段的插入缺失突变,导致不同程度的阅读框架移码。其中,第一条 sgRNA(Oligo 1)产生了 5 中突变型,第三条 sgRNA(Oligo 3)产生 6 种突变型,可见第三条 sgRNA 的的敲除效率较高。

2.2 LHX9 基因功能的缺陷对 VASA 转基因斑马鱼性腺发育影响的观察

取注射过 LHX9 基因 sgRNA 的 6dpf 的斑马鱼在荧光显微镜下进行观察,发现与对照组原始生殖细胞的位置相比,实验组斑马鱼原始生殖细胞的位置明显异常,迁移出现障碍,如图 -4 所示,由于早期胚胎发育的生殖细胞的迁移是从泌尿生殖嵴开始的,而且先前研究者发现 LHX9 基因在小鼠胚胎早期的泌尿生殖嵴处广泛分布,因此,该结果提示 LHX9 基因在早期斑马鱼胚胎早期生殖细胞的迁移和性腺发育中发挥了重要的作用。

3 讨论

本项研究利用新的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,通过对斑

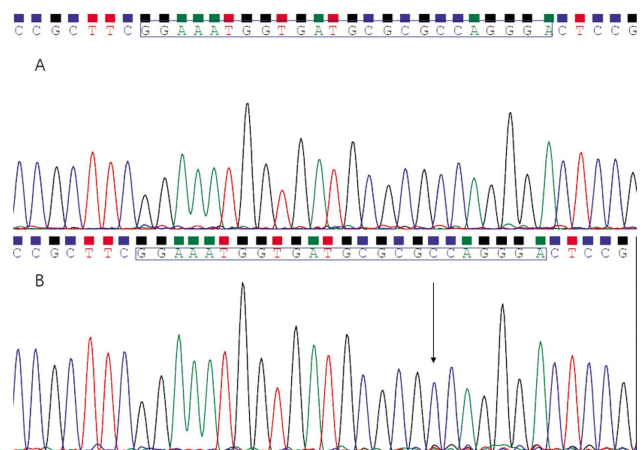


图 2 F0 代 48hpf 斑马鱼胚胎 PCR 测序图

Fig.2 PCR Sequencing Map of 48hpf Zebrafish Embryos in F0 Generation
Note: Figure A is the control group without sgRNA injection, and figure B is the sequencing map of the experimental group with sgRNA injection of LHX9 gene. The arrow shows the bimodal position. The box is marked as the designed target area.

马鱼胚胎同时注射四条针对某一靶基因的 sgRNA,足以产生基因敲除效应,实现在 F0 代获得与纯合 F2 代变异体相似的临床表型。根据相关研究报道,这项新的 CRISPR/Cas9 基因打靶技术,基因敲除效率可达 90%以上,产生几乎完全外显的表型,且毒性作用不明显(胚胎畸形率 <17%)^[1]。不同基因的 gRNA 往往由于染色体结构不同、未注释的 SNP、改变的起始位点或剪切位点等因素产生不同的靶向效率。有时,即便能够靶向到特定的基因,非同源修复也会导致出现部分功能的等位基因而影响敲除效率^[13]。与传统的设计一条 sgRNA 进行打靶相比,这种方法使 F0 的敲除表型(null phenotype)接近纯合 F2 代。此项技术可以在短期内获得与 F2 纯合表型接近的变异体,在对未知功能基因进行筛选中有及其广泛的应用前景。本项研究就是利用该技术,对 VASA 转基因斑马鱼进行了 LHX9 的基因敲除,以探究 LHX9 基因缺陷对斑马鱼性腺发育的影响。

哺乳动物的性腺发育开始于早期具有双向分化潜能的性腺原基,在睾丸决定因子 SRY 基因的调控下,性腺原基发育成睾丸,分泌雄激素与抗缪勒氏管激素,促使胚胎的雄性化发育,相反的,缺乏 SRY 基因的个体,胚胎发育则会向雌性化方向进行^[14,15]。这个过程中参与的基因目前已知的主要有 SRY, SF1,

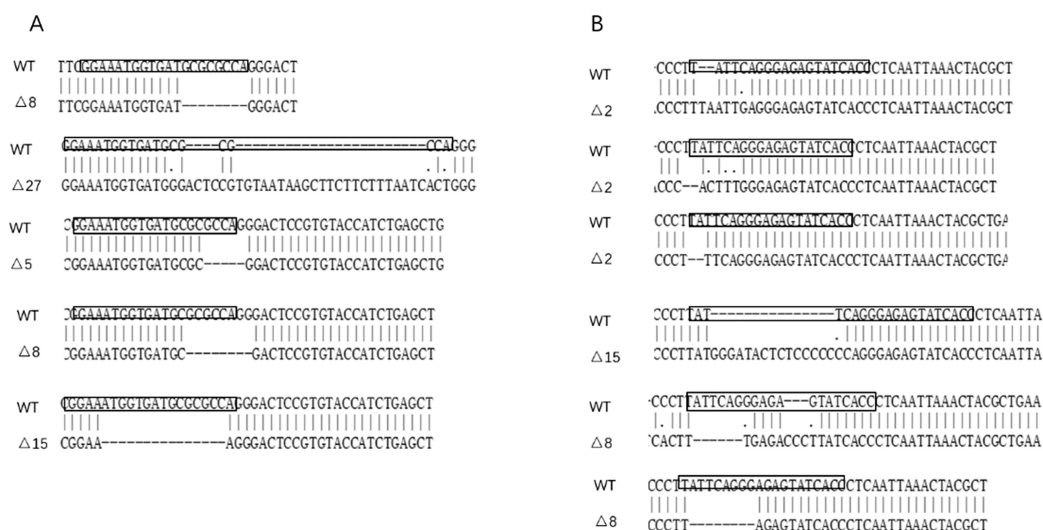


图3 F0代嵌合体的TA克隆测序结果

Fig.3 TA cloning and sequencing of F0

Note: A is the mutation type at oligo1 target site and B is the mutation type at oligo3 target site. WT indicated that in the control group without sgRNA injection of LHX9 gene, Δ was the base number changed compared with the control group, and the box marked the target site.

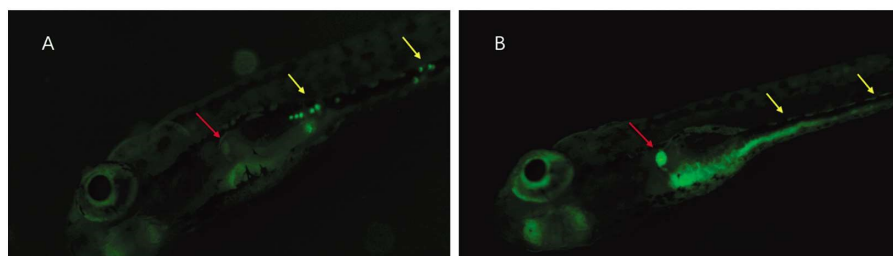


图4 胚胎发育 6d 的 VASA 转基因斑马鱼荧光成像。

Fig.4 Fluorescence Imaging of Zebrafish at 6dpf

Note: A was fluorescence imaging of VASA transgenic zebrafish in control group, and yellow arrow indicated the location of PGCs in control group.

B is the fluorescence imaging results of VASA transgenic zebrafish in the experimental group. It was found that the location of germ cells changed significantly compared with the control group.

SOX9^[16]等。而 LHX9 作为 LIM 同源家族的转录因子,目前所广为人知的功能主要是参与了神经系统的发育,其在性腺发育过程中的研究并没有被深入。有趣的是,2000 年,birk^[2]等在小鼠胚胎发育早期的泌尿生殖嵴中发现了 LHX9 基因的广泛分布,而原始生殖细胞正是在泌尿生殖嵴处形成。进一步观察发现,LHX9 可调控类固醇生成因子(SF-1)的表达;在敲除 LHX9 的小鼠体内,性腺体细胞出现增殖障碍,雄性小鼠出现外生殖器的雌性化改变,提示该基因在性腺发育中起重要作用。

脊椎动物的原始生殖细胞(PGC)是在胚胎发育早期未分化的生殖干细胞,其在原始性腺处生成,随后逐渐迁移到生殖嵴,并最终分化为相应的精原细胞和卵原细胞^[17-19]。首先在 3hpf 的斑马鱼胚胎中,PGC 为静止的圆形细胞;4.7hpf 时由于细胞中 RGS14a 表达和高水平 E- 的钙黏蛋白,使细胞伸出伪足,7hpf 的 PGC 发生极化并逐渐形成丝状伪足后,获得迁移能力^[20,21],并由此在多种调节因素的作用下开始迁移至靶组织^[22,23]。研究表明,斑马鱼的生殖细胞迁移过程主要受到 Cxcl12a/Cxcr4b 信号通路的调控,基质细胞衍生因子 1 (CXCL12)及其受体 CXCR4(在斑马鱼中分别为 Cxcl12a, Cxcr4b)在调控原始生殖细胞的迁移过程发挥重要作用^[24]。在胚胎早期,极化的原始生殖细胞受趋化因子 Cxcl12a 浓度梯度

的影响,向 Cxcl12a 浓度较高的位置迁移,而趋化因子 Cxcl12a 的浓度又受到其另一个受体 Cxcr7b 的调控,趋化因子 Cxcr7b 是一种 G 蛋白偶联受体,表达于性腺体细胞表面^[25],可以调节趋化因子 Cxcl12a 的浓度,从而使 Cxcl12a 保持合适的浓度梯度,使原始生殖细胞顺利迁移。2012 年,Mahabaleshwar^[26]等研究发现,通过下调 β - 抑制素的表达,可使 Cxcr7b 功能抑制,将会使原始生殖细胞异常迁移至体节的中胚层,提示 Cxcr7b 的功能需要通过 β - 抑制蛋白实现,性腺体细胞 Cxcr7b 的功能障碍将导致原始生殖细胞迁移。结合既往 birk^[2]等在小鼠体内对 LHX9 基因敲除的实验结果进行对比,虽然该研究小组在 LHX9 基因敲除的小鼠体内并没有观察到原始生殖细胞迁移的异常,但他们发现 LHX9 基因敲除的小鼠出现性腺体细胞增殖障碍,由此我们可以推测,如果 LHX9 基因敲除的斑马鱼性腺体细胞增殖异常,并由此导致体细胞表面的 Cxcr7b 受体减少,则会出现原始生殖细胞异常迁移的现象。此外,原始生殖细胞的数量也与斑马鱼性别决定以及早期卵子发生和精子形成有关^[27]。

斑马鱼的性别决定与性别分化非常复杂,目前还不是十分清楚,与哺乳动物不同,斑马鱼在胚胎发育早期,无论其遗传学上是雄性还是雌性,其所有个体均会先形成一个卵巢样组织,

在受精后的 23-35 天,部分个体通过卵巢样组织的细胞凋亡发生性别转换,并由此形成精巢^[28,29]。这个过程除了受基因的调控外,一些环境因子,如温度、光照、食物水平等也起一定作用。2015 年, Tzung^[30]等研究发现,原始生殖细胞的减少将会促使斑马鱼性别向雄性方向转化。VASA 是一种 DEAD-BOX 的螺旋酶,为生殖细胞的分子标记物;从体节期早期开始,EGFP 标记阳性的 PGC 细胞位于轴旁中胚层的侧面^[31]。而我们在本研究中发现,通过对斑马鱼的 LHX9 基因进行敲除,发现在受精后 6 天左右,与对照组相比,突变型的斑马鱼出现了明显的 PGC 增殖和迁移障碍,提示 LHX9 基因对斑马鱼早期生殖细胞的正常迁移有一定的影响,并由此可能影响其性腺发育和性别的分化过程。本项研究利用新的 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼 LHX9 基因进行编辑,证实了这项新的 CRISPR/Cas9 打靶技术可以快速地在 F0 代获得靶基因敲除的相关表型。此外,本研究首次发现 LHX9 基因对斑马鱼原始生殖细胞迁移的作用,并可能影响斑马鱼的性别分化,其具体调节机制可能涉及多种趋化因子,还有待进一步深入研究,但肯定了 LHX9 基因在斑马鱼性腺发育方面的作用,对日后关于该基因对性腺发育的影响提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Wu R S, Lam I I, Clay H, et al. A Rapid Method for Directed Gene Knockout for Screening in G0 Zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(1): 112-125
- [2] Birk O S, Casiano D E, Wassif C A, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation [J]. *Nature*, 2000, 403 (6772): 909-913
- [3] Hobert O, Westphal H. Functions of LIM-homeobox genes [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(2): 75-83
- [4] Wilson S I, Shafer B, Lee K J, et al. A molecular program for contralateral trajectory: *Rig-1* control by LIM homeodomain transcription factors[J]. *Neuron*, 2008, 59(3): 413-424
- [5] Lakhina V, Subramanian L, Huilgol D, et al. Seizure evoked regulation of LIM-HD genes and co-factors in the postnatal and adult hippocampus[J]. *F1000Res*, 2013, 2: 205
- [6] Bertuzzi S, Porter F D, Pitts A, et al. Characterization of *Lhx9*, a novel LIM/homeobox gene expressed by the pioneer neurons in the mouse cerebral cortex[J]. *Mech Dev*, 1999, 81(1-2): 193-198
- [7] Kreidberg J A, Sariola H, Loring J M, et al. *WT-1* is required for early kidney development[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 679-691
- [8] Wang H, Zhang L, Wang N, et al. Next-generation sequencing reveals genetic landscape in 46, XY disorders of sexual development patients with variable phenotypes[J]. *Hum Genet*, 2018, 137(3): 265-277
- [9] Schupbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo [J]. *Roux Arch Dev Biol*, 1986, 195(5): 302-317
- [10] Menke D B, Koubova J, Page D C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave[J]. *Dev Biol*, 2003, 262(2): 303-312
- [11] Lasko P F, Ashburner M. Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development[J]. *Genes Dev*, 1990, 4(6): 905-921
- [12] Varshney G K, Pei W, LaFave M C, et al. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9 [J]. *Genome Res*, 2015, 25(7): 1030-1042
- [13] Moreno-Mateos M A, Vejnár C E, Beaudoin J D, et al. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 982-988
- [14] Parker K L, Schedl A, Schimmer B P. Gene interactions in gonadal development[J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 417-433
- [15] Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(7): 755-767
- [16] Koopman P. *Sry* and *Sox9*: mammalian testis-determining genes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(6-7): 839-856
- [17] Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, et al. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target[J]. *Development*, 2002, 129(1): 25-36
- [18] Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, et al. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells[J]. *Development*, 1999, 126(23): 5295-5307
- [19] Paksa A, Raz E. Zebrafish germ cells: motility and guided migration [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 36: 80-85
- [20] Van Doren M, Williamson A L, Lehmann R. Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(4): 243-246
- [21] Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, et al. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 17): 4027-4038
- [22] Raz E. Guidance of primordial germ cell migration[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2): 169-173
- [23] Richardson B E, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 37-49
- [24] Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine *SDF-1* [J]. *Cell*, 2002, 111(5): 647-659
- [25] Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 463-473
- [26] Mahabaleswar H, Tarbashevich K, Nowak M, et al. β -arrestin control of late endosomal sorting facilitates decoy receptor function and chemokine gradient formation [J]. *Development*, 2012, 139(16): 2897-2902
- [27] Nikolic A, Volarevic V, Armstrong L, et al. Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 1741072
- [28] Orban L, Sreenivasan R, Olsson P E. Long and winding roads: testis differentiation in zebrafish [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 312(1-2): 35-41
- [29] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, et al. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish[J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(Pt 6): 711-718
- [30] Tzung K W, Goto R, Saju J M, et al. Early Depletion of Primordial Germ Cells in Zebrafish Promotes Testis Formation [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(1): 156
- [31] Krovel A V, Olsen L C. Expression of a *vas*: EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish [J]. *Mech Dev*, 2002, 116(1-2): 141-150