



cbx2 在青鳉胚胎发育和性腺中的表达谱与定位

晁青何¹, 申峰峰¹, 蔡振西¹, 张俊玲^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: CBX2(Chromobox homolog 2) 作为 PcG(Polycomb Group) 蛋白家族成员之一, 在性腺发育中具有重要作用。缺乏 *cbx2* 的小鼠, 雌雄性腺均发育不良, 并且部分小鼠出现雄性转变为雌性的性反转现象。实验选择模式生物青鳉作为对象, 通过荧光定量 PCR 和免疫组化技术检测了 *cbx2* 在青鳉胚胎发育过程和性腺中的表达。定量结果显示, 在胚胎发育时期, *cbx2* 在原肠胚期、神经胚期和器官形成期均具有高的表达; 在两性性腺中, *cbx2* 在精巢中的表达量较高。免疫组化结果表明, 在精巢中, CBX2 主要在精原细胞和精母细胞中表达; 在卵巢中, CBX2 主要在 I、II、III 时相卵母细胞中表达。为进一步研究 *cbx2* 的功能, 实验利用显微注射技术对 *cbx2* 进行 RNA 干扰, 结果显示, 注射 siRNA 后, 随着 *cbx2* 表达量降低, 雄性性别相关基因 *sox9*(SRY-related HMG box 9) 的表达也相应下调, 雌性性别相关基因 *foxl2*(Forkhead transcriptional factor 2) 的表达则上调。研究表明, *cbx2* 不仅参与了青鳉胚胎发育过程, 而且在青鳉性腺分化以及雌雄配子发生中也起重要作用。

关键词: 青鳉; 胚胎发育; 性腺发育; *cbx2*

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

性腺发育对于行有性生殖的生物来说, 是基础的生物学问题之一, 也是一个复杂而必不可少的过程。尽管已经对性腺发育的理解有了长足的进展, 相关的新基因也在不断地被发现和鉴定, 但仍未完全阐明性腺发育的机制。鱼类的性腺发育及成熟过程一直是鱼类学研究的重点, 不仅对水产养殖行业有重要的指导意义, 而且能为鱼类发育及性别调控的研究提供依据。

CBX2(Chromobox homolog 2) 是多梳蛋白家族(Polycomb Group, PcG)的关键成员之一^[1], 在哺乳动物的性腺发育中发挥着重要作用。PcG 蛋

白家族是一类保守的蛋白家族, 主要针对一系列与细胞分化和发育相关的基因, 在染色质水平上进行表观遗传修饰, 从而使基因沉默^[2]。*M33/cbx2* 缺失的小鼠表现为雌雄性腺均发育不良, 甚至出现性反转^[3]。在人类中, *cbx2* 突变也导致类似的性反转现象发生^[4]。功能分析发现, 突变的 *cbx2* 不能正确结合并且不能充分调节性腺发育必需的靶基因的表达^[5], 表明 *cbx2* 可能通过调节性腺发育相关基因的表达而发挥作用。但迄今为止, 关于 *cbx2* 在性别发育方面的研究主要集中在人和小鼠等哺乳动物中, 在鱼类中的研

收稿日期: 2020-01-09 修回日期: 2020-06-08

资助项目: 国家自然科学基金(31972772); 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题(ZZ-A11)

第一作者: 晁青何(照片), 从事鱼类遗传与发育研究, E-mail: 19821252732@163.com

通信作者: 张俊玲, E-mail: jlzhang@shou.edu.cn



究鲜有报道。

青鳉(*Oryzias latipes*)是最早被确定性别决定基因的鱼类^[6],因其具有胚胎透明,性成熟周期短以及性别可塑等特点,一直被视作研究脊椎动物性腺发育和性别调控的模式动物^[7]。鉴于 *cbx2* 在性腺发育中的重要作用,实验以青鳉为对象,采用荧光定量 PCR 和免疫组化技术建立了 *cbx2* 在青鳉胚胎发育和性腺中的表达谱,并采用 RNA 干扰技术抑制 *cbx2* 的表达,分析 *cbx2* 抑制后性别调控相关基因 *sox9* (SRY-related HMG box 9) 和 *foxl2* (forkhead transcriptional factor 2) 的表达变化,进而探讨 *cbx2* 的功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用青鳉来自上海海洋大学青鳉养殖中心,光暗周期比例为 14 h : 10 h,养殖水温为 26 °C,每日按时孵化、喂食丰年虫。从青鳉身上摘取鱼卵,分离后养在胚胎培养液中,置于显微镜下连续观察胚胎发育过程,对各时期的胚胎进行拍照记录,胚胎发育参考 Iwamatsu^[8] 的方法进行阶段分类。

收集不同时期的青鳉卵,经 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理水冲洗干净,置于装有 TRizol (Invitrogen, 美国)的离心管中匀浆,用于总 RNA 提取。同时解剖青鳉成鱼,取其精巢和卵巢用于总 RNA 提取。

1.2 Real-time PCR 检测 *cbx2* 在胚胎发育和性腺中的表达

首先采用 TRizol 法提取性腺和胚胎中的总 RNA,然后使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)(TaKaRa, 日本)进行反转录,合成 cDNA 的第一条链。通过搜索 NCBI 数据库,获得了青鳉 *cbx2* 的预测序列 (No. EF537027.1),经克隆测序确认序列的正确性后,使用 Primer 5.0 软件设计青鳉 *cbx2* 和内参基因 18S 的定量引物 (表 1) 用于荧光定量实验。

Real-time PCR 反应在 CFX96 Touch Real Time(Bio-Rad, 美国)上进行,总体积为 20 μL: cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL, TB Green Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本)10 μL 及 7 μL 灭菌水。PCR 扩增程序: 95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s; 进行 39 个循环,并制作熔解曲线。定量数据采

表 1 Real-time PCR 引物

Tab. 1 Primers used for Real-time PCR

引物 primer	序列(5'→3') sequence (5'→3')
<i>cbx2</i> -F	GCCCAAGTCCAGCACCTCA
<i>cbx2</i> -R	GCTCCTTCGCCTCACCTCT
<i>sox9</i> -F	AAACTGGCCGACCAATAC
<i>sox9</i> -R	CTCAGCCTCTCCACAAA
<i>foxl2</i> -F	TCCTACACGTCCTGCCAGAT
<i>foxl2</i> -R	CCCATGCCGTTGTAAAGAGTT
18S-F	CTGAGAAACGGCTACCACAG
18S-R	CAGCAACTTTAAGATACGC

用平均值±标准差 (mean±SD) 表示,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算,并采用 SPSS 24.0 软件对计算结果进行显著性分析,获取 *cbx2* 在青鳉胚胎发育和性腺中的表达情况。

1.3 免疫组化分析 CBX2 在性腺中的表达

解剖成鱼,获取精巢和卵巢组织,用 PBS 洗涤后,立即在 4% 的多聚甲醛中固定 24 h,然后使用 70%、80%、90%、100% I 和 100% II 酒精进行梯度脱水,再经过 1/2 二甲苯+1/2 无水乙醇、二甲苯 I 和二甲苯 II 逐级进行透明,最后用石蜡进行透蜡、包埋,制作石蜡切片。为了验证切片的时期和完整性,实验对切片进行 H.E 染色,并将验证好的切片保存起来,用于后续的免疫组化实验。

用上述验证过的精巢和卵巢切片做免疫组化实验,抗体为兔源的多克隆抗体 Anti-CBX2 (Abcam, 美国),用 SABC 显色试剂盒进行化学显色 (武汉博士德生物公司),实验方法按照试剂盒流程进行。使用正置光学显微镜 (尼康, 日本) 对结果进行拍照并记录。

1.4 RNA 干扰

将 *cbx2* 的序列号 (EF537027.1) 发送至上海吉玛生物公司,合成 siRNA 序列 (表 2)。参照说明书,对合成的 siRNA 干粉进行稀释、混匀,在胚胎 1 细胞期的动物极进行显微注射,注射液浓度为 20 μmol/L,每个胚胎注射 3 nL,同步注射阴性对照组,并设置空白组。注射后,将其放置在胚胎培养液中正常培养,在器官形成期取样,进行 *cbx2* 及性别相关基因 *sox9*、*foxl2* 的定量表达分析。

表 2 siRNA 靶位点和合成序列
Tab. 2 siRNA target site and sequence

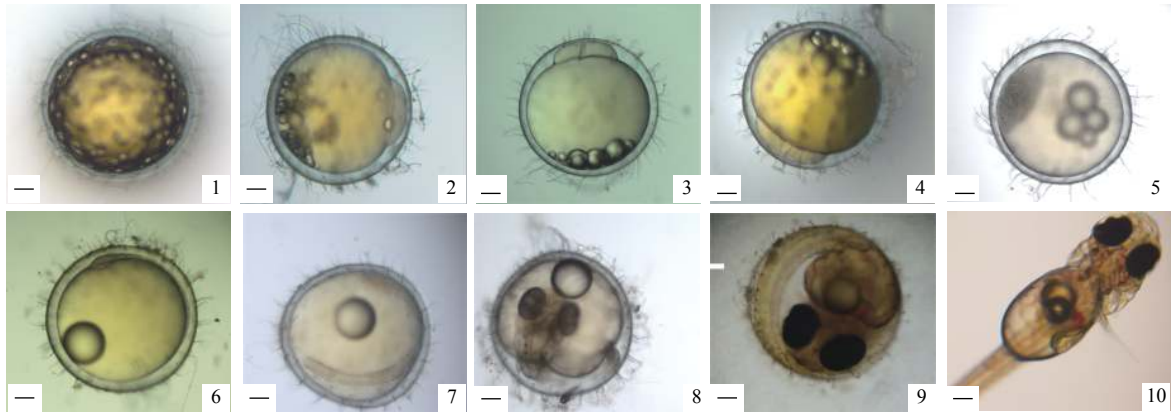
基因 gene	方向 direction	序列 sequence
<i>cbx2</i> -siRNA-1 (251)	sense (5'-3')	CCGACUCUGACCGCACUAATT
	anti-sense (3'-5')	UUAGUGCGGUCAGAGUCGGTT
<i>cbx2</i> -siRNA-2 (853)	sense (5'-3')	GCGCUGCACCUGAACCCUUTT
	anti-sense (3'-5')	AAGGGUUCAGGUGCAGCGCTT
<i>cbx2</i> -siRNA-3 (1337)	sense (5'-3')	GCCUCAUCGAGCACGUGUUTT
	anti-sense (3'-5')	AACACGUGCUCGAUGAGGCTT

2 结果

2.1 *cbx2* 在青鳉胚胎发育中的表达

使用正置光学显微镜对胚胎发育过程进行连续观察，并利用徕卡成像系统记录胚胎发育过程。青鳉胚胎发育 (从未受精到出膜) 可大致

可分为未受精期、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、器官形成期和出膜期。其中，每个阶段又可细分为多个小阶段，不同的胚胎发育阶段各有其特点，本实验主要选取以上 10 个具有代表性的发育时期收集样品，进行定量检测，各时期胚胎的形态学特征如图版 I 所示。



图版 I 青鳉胚胎不同发育时期

1. 未受精期；2. 1 细胞期 (胚盘期)；3. 2 细胞期；4. 8 细胞期；5. 囊胚期；6. 原肠胚期；7. 神经胚期；8. 器官形成期；9. 出膜前期；10. 出膜后，图 1 同。比例尺为 100 μ m

Plate I Different developmental stages of *O. latipes* embryos

1. unfertilized stage; 2. 1 cell stage (blastodisc stage); 3. 2 cell stage; 4. 8 cell stage; 5. blastula stage; 6. gastrula stage; 7. neurula stage; 8. organogenesis stage; 9. hatching stage; 10. fry stage, the same as Fig.1. Scale bars. 100 μ m

从未受精时 *cbx2* mRNA 就有微量表达，卵裂期时它的表达量保持较低水平，囊胚期时表达量开始上升，原肠胚期时其表达量显著上升，达到峰值 (图 1)。 *cbx2* 在神经胚期和器官形成期也一直持续高表达，出膜前期和出膜后表达量则明显降低 ($P<0.05$)。

2.2 *cbx2* 在青鳉性腺中的表达

荧光定量 PCR 结果显示， *cbx2* mRNA 在精巢中的表达量高于卵巢，约为卵巢中表达量的 3 倍

(图 2， $P<0.05$)。

为了进一步检测 CBX2 蛋白在性腺中的定位表达，本实验进行了 H.E 染色和免疫组化分析。青鳉的整个卵巢发育过程共分为 I~VI 期 6 个阶段。在青鳉卵巢中，同一时期卵巢中的卵母细胞发育不同步，既可见 V 期的成熟卵母细胞，同时也存在少量 I 期卵母细胞。免疫组化显示，CBX2 几乎在整个卵子发生过程中都有表达，在 I、II 和 III 期初级卵母细胞中高表达，而在 IV 和 V

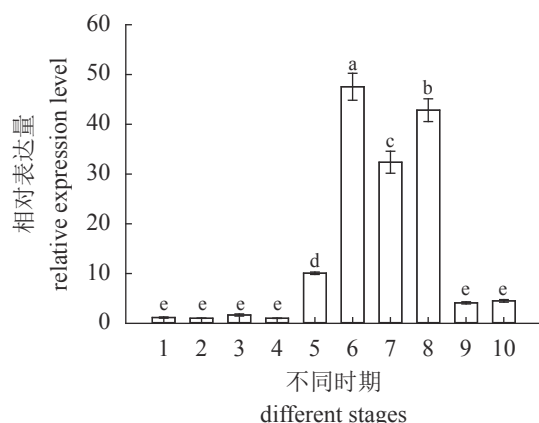


图1 *cbx2* 在青鲮胚胎发育中的定量表达分析

不同字母代表结果具有显著性差异 ($P<0.05$)

Fig. 1 Real-time PCR analysis of *cbx2* mRNA in different developmental stages of *O. latipes* embryos

Different letters indicate significant differences ($P<0.05$)

期次级卵母细胞中表达较弱, VI期基本不表达(图版 II)。

青鲮精巢体积较小, 精巢中的生殖上皮随着结缔组织向内部延伸, 形成隔膜, 进而把精巢划分成多个形状不规则的精小叶, 同一个精小叶中生殖细胞发育不同步。从精小叶结构上

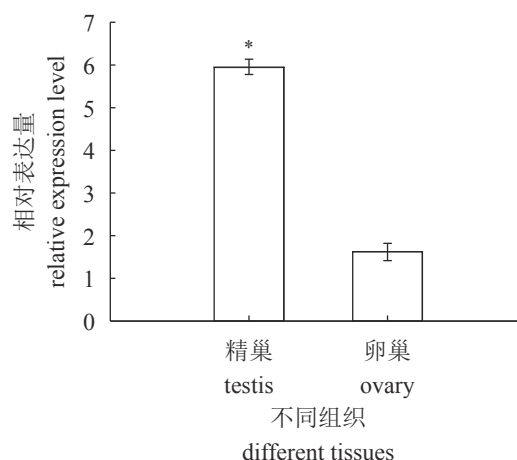


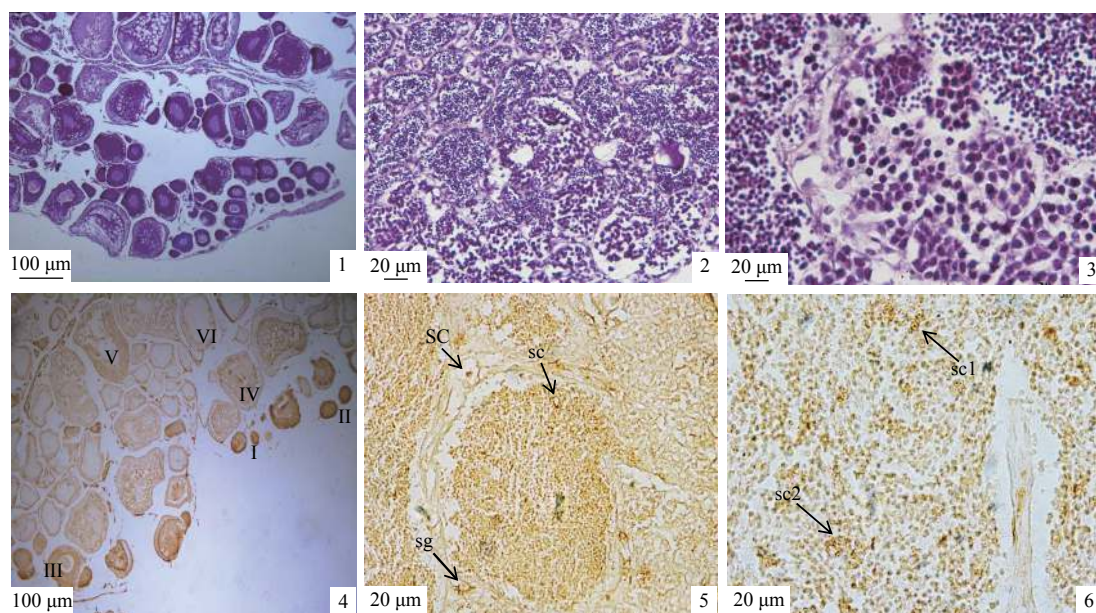
图2 青鲮 *cbx2* 在性腺中的定量表达

*号表示具有显著性差异 ($P<0.05$), 图3 同

Fig. 2 Real-time PCR of *cbx2* mRNA in *O. latipes* gonads

"" indicates significant differences ($P<0.05$), the same as Fig.3

看, 在精子发生过程中生殖细胞由外向内大体可分为精原细胞、精母细胞、精细胞和精子。免疫组化表明, CBX2 主要在精原细胞和精母细胞中表达, 在精细胞和精子中没有明显的信号(图版 II)。



图版 II 青鲮精巢和卵巢免疫组化 (IHC) 分析

I~VI, 卵母细胞阶段; sg. 精原细胞; sc. 精母细胞; sc1. 初级精母细胞; sc2. 次级精母细胞; SC. 支持细胞。序号 1~3 为 H.E 染色, 4~6 为免疫组化, 其中, 1、4 为卵巢, 2、3、5、6 为精巢

Plate II Immunohistochemistry (IHC) analysis in ovary and testis of *O. latipes*

I~VI, oocyte stage; sg. spermatogonia; sc. spermatocytes; sc1. primary spermatocyte; sc2. secondary spermatocyte; SC. sertoli cell. 1-3 were performed H.E staining, 4-6 were performed immunohistochemistry analysis, 1 and 4 were ovaries, and others were testes

2.3 *cbx2*、*sox9* 和 *foxl2* 在 RNA 干扰后的表达变化

干扰结果显示, 显微注射 siRNA 后, *cbx2* 的表达明显被抑制 ($P < 0.05$), 相应的, 雄性性别相关基因 *sox9* 的表达量随之降低, 雌性性别相关基因 *foxl2* 的表达量则升高 (图 3)。

3 讨论

本研究首先分析了 *cbx2* 在青鳞胚胎发育中的表达情况, 结果显示 *cbx2* 在胚胎发育初期表达量相对较低, 而在原肠胚期、神经胚期和器官形成期的表达量显著升高。在胚胎经过卵裂期, 形成囊胚后, 会经过一段被称为原肠胚形成的形态发生过程。而原肠胚形成是外、中、内 3 种胚层的组合, 是器官形成的先决条件^[9-12]。有研究表明, 在硬骨鱼中, 原始生殖细胞 (PGC) 最早被发现于原肠胚期^[13]。*cbx2* 在囊胚期表达量开始升高, 在原肠胚期表达量达到最高值, 在神经胚期和器官形成期也一直保持较高的表达, 这表明 *cbx2* 可能参与了鱼类器官的形成与发育, 或许还与原始生殖细胞的生成有关。

荧光定量结果表明 *cbx2* 在青鳞精巢中的表达量高于卵巢。NCBI 显示 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84733>), 在人类正常组织中, *cbx2* 在精巢中的表达量最高, 卵巢次之, 其在精巢中的表达量约为卵巢中表达量的 5 倍。王新艳等^[14]研究发现, *cbx2* 在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 精巢和卵巢中均较高表达, 在精巢中的表达量同样高于卵巢, 与本结果类似。综上所述, *cbx2* 在脊椎动物中具有广泛的物种表达分布, 但在两性性腺中均具有较高的表达, 表明该基因在脊椎动物性腺发育中具有重要作用。*cbx2* 在精巢中均具有更高的表达, 暗示了 *cbx2* 在精巢的发生和功能维持上可能发挥着更为重要的作用。

免疫组化结果表明, 在精巢中, CBX2 主要在精原细胞和精母细胞中表达, 而在精细胞和精子中没有明显的信号。在卵巢中, CBX2 主要在初级卵母细胞中高表达, 而在次级卵母细胞中表达较弱。精巢和卵巢的发育即配子发生过程, 主要以有丝分裂和减数分裂为主。Eid 等^[15]在细胞中对 *cbx2* 进行 RNA 干扰, 发现随着 *cbx2* 被抑制, 减数分裂必不可少的基因 *exol* 的表达量也随之降低。先前也有研究表明 *cbx2* 在哺乳

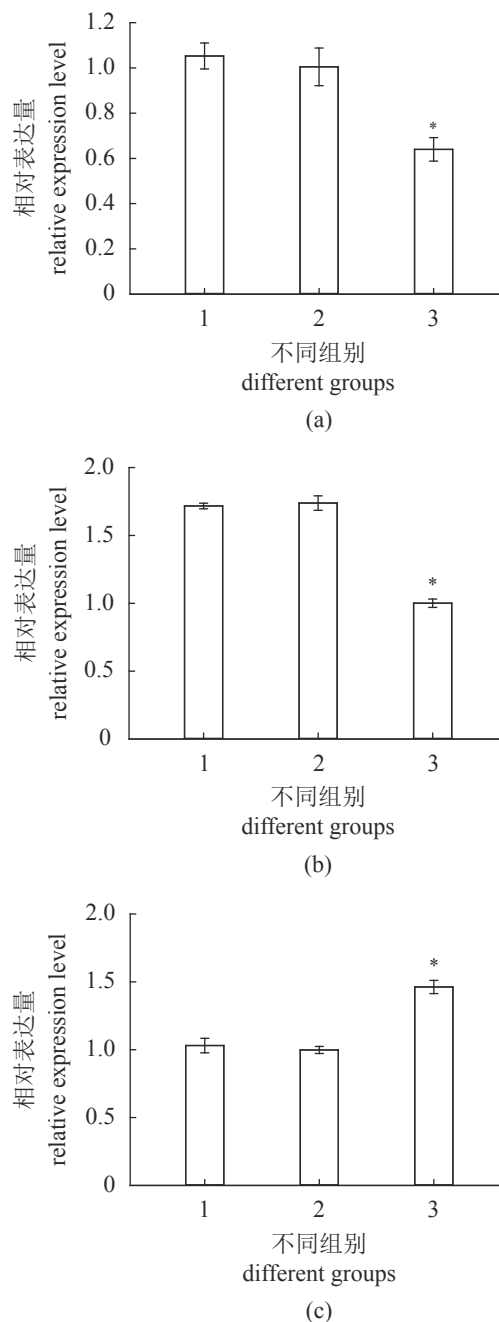


图 3 RNA 干扰后 *cbx2*(a)、*sox9*(b) 和 *foxl2*(c) 的表达变化

1. 空白组, 2. 阴性对照组, 3. 实验组

Fig. 3 Expression changes of *cbx2*(a), *sox9*(b) and *foxl2*(c) after RNA interference

1. blank group, 2. negative control group, 3. experimental group

动物的细胞周期变化^[16-17]、生殖细胞增殖分化、减数分裂和同源染色体的联会中发挥着重要作用^[18]。因此, 本研究结果进一步表明 *cbx2* 可能通过参与生殖细胞的增殖与分化, 进而在青鳞精子发生和卵子发生过程中起作用。

为了进一步探讨 *cbx2* 的功能, 本研究在青鳞胚胎中通过注射 siRNA 以抑制 *cbx2* 的表达, 结果发现 *cbx2* 与 *sox9* 的表达量下调, *foxl2* 的表达量却相应上调。*foxl2* 是 Forkhead/HNF-3 相关转录因子家族中的一员, 它通过调节 *cyp19a1* 的表达, 参与卵巢分化、发育与功能维持^[19-20]。*sox9* 被认为是受 *sry* 直接调控的性别基因^[21-22], 影响生殖细胞与体细胞的分化^[23], 研究表明 *sox9* 影响性腺的发育^[24], 是精巢形成所必需的。在人类细胞中, 当 *cbx2* 被抑制后, 雄性性别相关基因 *sry* 和 *sox9* 的表达量也相应降低, 而雌性相关基因表达量反而升高^[15]。CBX2 作为 PcG 蛋白家族的组成成分, 在表观遗传中主要起抑制作用, 但也有研究表明, *cbx2* 还可作为基因转录的激活因子发挥作用^[25]。人类的全基因组测序结果表明, *cbx2* 一方面为雄性特异基因, 通过刺激雄性特异基因 *sox9* 的表达而在精巢中起作用; 另一方面还通过调控 *foxl2* 信号通路进而抑制雌性相关基因的表达^[15]。这与本研究结果类似, 表明 *cbx2* 可能通过调节性别相关基因如 *sox9* 和 *foxl2* 的表达, 进而影响鱼类的性腺分化。

4 结论

本研究通过荧光定量 PCR 和免疫组化技术, 分析了 *cbx2* 在青鳞胚胎发育和性腺中的表达模式, 结果显示, 在胚胎发育过程中, *cbx2* 在原肠胚期、神经胚期和器官形成期均具有高的表达; 在性腺中, 该基因在精巢中的表达水平高于卵巢; 在精巢中, CBX2 蛋白主要在精原细胞和精母细胞中表达, 在卵巢中, CBX2 蛋白主要在 I、II 和 III 期时相的卵母细胞中表达。RNA 干扰实验表明, *cbx2* 能影响性别相关基因 (*sox9* 和 *foxl2*) 的表达, 为后续深入探讨其在鱼类性腺发育中的作用奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Alkema M J, Bronk M, Verhoeven E, *et al.* Identification of bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex[J]. *Genes & Development*, 1997, 11(2): 226-240.
- [2] Bulzyhenkov V E, Ginter E K, Ivanov V I. Interaction of the homeotic mutations aristapedia and polycomb during ontogenesis of *Drosophila melanogaster*[J]. *Ontogenez*, 1974, 5(6): 634-641.
- [3] Katoh-Fukui Y, Miyabayashi K, Komatsu T, *et al.* *Cbx2*, a polycomb group gene, is required for *Sry* gene expression in mice[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(2): 913-924.
- [4] Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, *et al.* Ovaries and female phenotype in a girl with 46, XY karyotype and mutations in the *CBX2* gene[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 2009, 84(5): 658-663.
- [5] Sproll P, Eid W, Biason-Lauber A. CBX2-dependent transcriptional landscape: implications for human sex development and its defects[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 16552.
- [6] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish[J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 559-563.
- [7] 亢逸, 关桂君, 洪云汉. 用模式生物青鳞概硬骨鱼性别决定及性分化研究进展[J]. *遗传*, 2017, 39(6): 441-454.
- [8] Kang Y, Guan G J, Hong Y H. Insights of sex determination and differentiation from medaka as a teleost model[J]. *Hereditas*, 2017, 39(6): 441-454(in Chinese).
- [9] Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*[J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(7-8): 605-618.
- [10] Arnold S J, Robertson E J. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(2): 91-103.
- [11] Viotti M, Nowotschin S, Hadjantonakis A K. SOX17 links gut endoderm morphogenesis and germ layer segregation[J]. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(12): 1146-1156.
- [12] Stower M J, Bertocchini F. The evolution of amniote gastrulation: the blastopore-primitive streak transition[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2017, 6(2): e262.
- [13] Zhou X L, Sasaki H, Lowe L, *et al.* *Nodal* is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation[J]. *Nature*, 1993, 361(6412): 543-547.
- [14] 殷海成, 吕海英. 黑尾近红鲌胚胎发育和原始生殖细胞的迁移研究[J]. *水产科学*, 2010, 29(5): 265-269.
- [15] Yin H C, Lü H Y. Embryonic development and primor-

- dial germ cell migration in culter *Ancherythroculter nigrocauda*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(5): 265-269(in Chinese).
- [14] 王新艳, 张俊玲, 施志仪. 牙鲆*cbx2*基因的分子特征与组织表达[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(4): 69-75.
Wang X Y, Zhang J L, Shi Z Y. Molecular characterization and tissue expression of *cbx2* gene in *Paralichthys olivaceus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(4): 69-75(in Chinese).
- [15] Eid W, Opitz L, Bignon-Laubert A. Genome-wide identification of CBX2 targets: insights in the human sex development network[J]. *Molecular Endocrinology*, 2015, 29(2): 247-257.
- [16] Noguchi K, Shiurba R, Higashinakagawa T. Nuclear translocation of mouse polycomb M33 protein in regenerating liver[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291(3): 508-515.
- [17] Hirose S, Komoike Y, Higashinakagawa T. Identification of a nuclear localization signal in mouse polycomb protein, M33[J]. *Zoological Science*, 2006, 23(9): 785-791.
- [18] Baumann C, De La Fuente R. Role of polycomb group protein Cbx2/M33 in meiosis onset and maintenance of chromosome stability in the mammalian germline[J]. *Genes*, 2011, 2(1): 59-80.
- [19] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, *et al.* Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1[J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(3): 712-725.
- [20] Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. From sex determination to initial folliculogenesis in mammalian ovaries: morphogenetic waves along the anteroposterior and dorsoventral axes[J]. *Sexual Development*, 2015, 9(4): 190-204.
- [21] Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer[J]. *Nature*, 2008, 453(7197): 930-934.
- [22] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, *et al.* *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination[J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(6): e187.
- [23] Chiang E FL, Pai C I, Wyatt M, *et al.* Two *Sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites[J]. *Developmental Biology*, 2001, 231(1): 149-163.
- [24] 张梦, 朱阳阳, 李完波, 等. 大黄鱼*sox9a/b*基因的克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2019, 43(8): 1691-1705.
Zhang M, Zhu Y Y, Li W B, *et al.* Cloning and expression of *sox9a/b* gene in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(8): 1691-1705(in Chinese).
- [25] Katoh-Fukui Y, Owaki A, Toyama Y, *et al.* Mouse polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating *Ad4BP/SF1* expression[J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1612-1620.

Expression pattern and localization analysis of *cbx2* during embryonic and gonadal development in the medaka (*Oryzias latipes*)

CHAO Qinghe¹, SHEN Fengfeng¹, CAI Zhenxi¹, ZHANG Junling^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: CBX2 (Chromobox homolog2), as a key member of the Polycomb Group protein (PcG) family, plays an important role in gonadal development. Mice lacking *cbx2* showed defects in gonads (both ovary and testis) development, and some mice have exhibited male-to-female sex reversal. But little is known about the function of *cbx2* in gonadal development of fish. In this study, we used *Oryzias latipes*, a model organism, to investigate the expression of *cbx2* during embryonic and gonadal development by real-time PCR and immunohistochemistry. Real-time PCR results showed that *cbx2* was highly expressed in embryos at gastrula, neurula and organogenesis stages. In bisexual gonads, *cbx2* had a relatively high expression in testis. Immunohistochemistry results revealed that *cbx2* mRNA was mainly localized in spermatogonia and spermatocytes in testis. And *cbx2* was also predominately observed in oocytes at stages I, II and III in ovary. In order to further study the function of *cbx2*, we used microinjection technology to knock out *cbx2*. The results showed that the expression of *cbx2* was significantly decreased after injecting siRNA, and thus the expression of *sox9* (SRY-related HMG box 9) was down-regulated, whereas the expression of *foxl2* (Forkhead transcriptional factor 2) increased. This indicated that *cbx2* was not only involved in embryonic development but also played a role in gonadal differentiation and gametogenesis in *O. latipes*.

Key words: *Oryzias latipes*; embryonic development; gonadal development; *cbx2*

Corresponding author: ZHANG Junling. E-mail: jlzhang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972772); Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, China (ZZ-A11)