



# *Kcmf1* 基因在家蚕和斜纹夜蛾精巢中的表达及功能初探

朱芷莹\*, 林志凯\*, 陈思博\*, 王淳静, 肖妍虹, 余小强, 胡启豪\*\*

(华南师范大学生命科学学院, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室, 广州 510631)

**摘要:** *Kcmf1* 基因属于 E3 泛素化酶家族, 在哺乳动物器官发育及癌症发生过程中发挥作用, 但在哺乳动物及昆虫生殖系统中的功能仍不清楚。本研究通过 PCR 实验获得了家蚕 *Bombyx mori* *BmKcmf1* (1 110 bp) 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* *SlKcmf1* (966 bp) 两个基因的 ORF。生物信息学分析结果显示, *BmKCMF1* 和 *SlKCMF1* 蛋白均包含保守的锌结合域与 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构域。qRT-PCR 结果显示, *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 在不同发育阶段的家蚕和斜纹夜蛾精巢中均有表达, 且它们的表达随着发育时期而变化, 提示 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 的功能与精巢发育有关。在家蚕 BmN 和斜纹夜蛾 SI221 细胞株中分别过表达 *BmKCMF1* 和 *SlKCMF1* 蛋白, 结果发现 *Vasa*、*Hop*、*Dpp* 等精子发生关键基因的表达发生显著变化。由此, 本研究推测 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因参与家蚕和斜纹夜蛾精巢发育及精子发生等过程。

**关键词:** *Kcmf1*; 精巢; 精子发生; 家蚕; 斜纹夜蛾

中图分类号: Q963

文献标识码: A

## Expression and functional analysis of *Kcmf1* gene in the testis of *Bombyx mori* and *Spodoptera litura*

ZHU Zhi-Ying\*, LIN Zhi-Kai\*, CHEN Si-Bo\*, WANG Chun-Jing, XIAO Yan-Hong, YU Xiang-Qiang, HU Qi-Hao\*\* (Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金-区域联合基金项目 (2022A1515111055); 国家自然科学基金青年项目 (32300389)

\*共同第一作者简介: 朱芷莹, 女, 研究方向为昆虫发育, E-mail: 2574131540@qq.com; 林志凯, 男, 研究方向为昆虫发育, E-mail: 2671106328@qq.com; 陈思博, 男, 研究方向为昆虫发育, E-mail: 1328724186@qq.com

\*\*通讯作者 Author for correspondence: 胡启豪, 博士, 助理研究员, 主要研究昆虫发育与免疫, E-mail: huqihx@163.com

收稿日期 Received: 2024-10-12; 修回日期 Revision received: 2024-11-04; 接受日期 Accepted: 2024-11-05

**Abstract:** The *Kcmfl* gene belongs to the E3 ubiquitin ligase family and is related to the organ development and oncogenesis in mammals. However, the function of *Kcmfl* in the reproductive systems of mammals and insects remains unclear. In this paper, we obtained the ORFs of *Bombyx mori* *BmKcmfl* (1 110 bp) and *Spodoptera litura* *SlKcmfl* (966 bp) through PCR method. Bioinformatics analysis showed that both BmKCMF1 and SlKCMF1 proteins contain conserved zinc-binding domains and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> type zinc finger domains. Moreover, we found that *BmKcmfl* and *SlKcmfl* were expressed in the testis of *B. mori* and *S. litura* at different developmental stages by real-time quantitative PCR (qRT-PCR), suggesting that *BmKcmfl* and *SlKcmfl* may be related to testis development. Furthermore, when BmKCMF1 and SlKCMF1 were overexpressed in the BmN cells and Sl221 cells, respectively, the mRNA levels of genes related to spermatogenesis such as *Vasa*, *Hop* and *Dpp* changed significantly. In conclusion, our results suggest that *BmKcmfl* and *SlKcmfl* genes might participate in the spermatogenesis of *B. mori* and *S. litura*.

**Key words:** *Kcmfl*; testis; spermatogenesis; *Bombyx mori*; *Spodoptera litura*

精子作为雄性昆虫的配子，其质量和数量对于后代的数量至关重要。另外，昆虫的生命活动也影响着农业生产的正常进行。因此，精子发生的分子调节机制是当前昆虫学的研究热点，对于农业生产也有重要意义。

不同昆虫的精子发生过程相对保守，目前关于昆虫精子发生的研究主要集中于模式生物黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*。在 JAK-STAT (Janus kinase signal transducer and activator of transcription)、BMP (Bone Morphogenetic Protein) 等多条信号通路的协同参与下，果蝇生殖干细胞 (Germ stem cell, GSCs) 通过不对称分裂产生性原细胞 (Gonblast, GB)。性原细胞经历细胞分裂、核延伸与变型、精子个体化等过程，最终发育成成熟精子 (Fabian and Brill, 2012; Greenspan *et al.*, 2015)。近年来，*Ant2* (Adenine nucleotide translocase 2)、*α4GT1* ( $\alpha$ 1, 4-galactosyltransferase) 等新基因被揭示可以参与精子发生过程，例如 *α4GT1* 功能缺失会引起精子个体化异常，及精子束的过度凋亡 (He *et al.*, 2023; Xiao *et al.*, 2024)。此外，脂滴、柠檬酸盐等化合物也被证明是精子发生所必须的 (François *et al.*, 2023; Chao *et al.*, 2024)。以上研究说明，精子发生是一个复杂的过程，仍需进一步探索。

不同于黑腹果蝇，家蚕 *Bombyx mori* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等鳞翅目昆虫可产生有核精子和无核精子两种精子。其中，有核精子参与形成受精卵；无核精子可协助有核精子与卵细胞的结合 (Whittington *et al.*, 2019)。尽管有研究显示 *BmHen*、*SIDsx* (Doublesex) 等基因的功能与家蚕和斜纹夜蛾精子发生有关 (Du *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2022)，但相

关研究大多停留在表型层面，其中的具体机制仍存在大量空白。

本研究前期发现，果蝇 E3 泛素化蛋白酶 *CG3526* 是精子发生的关键调节因子(Hu *et al.*, 2024)，但 *CG3526* 在其它昆虫精子发生中的功能仍不明确。通过序列比对，本研究在家蚕和斜纹夜蛾中鉴定到 *CG3526* 的同源蛋白 BmKCMF1(Potassium Channel Modulatory Factor 1) 和 SIKCMF1。但是，BmKCMF1 和 SIKCMF1 是否参与精子发生尚不清楚。

本研究通过 qRT-PCR 检测了 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因在不同发育阶段家蚕和斜纹夜蛾精巢中的表达情况，发现 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因在精巢中都有一定水平的表达。通过在家蚕 BmN 和斜纹夜蛾 SI221 细胞中分别过表达 BmKCMF1 和 SIKCMF1，发现 BmKCMF1 和 SIKCMF1 可以调节 *Vasa* 等精子发生相关基因的表达。本研究的结果初步说明 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因参与了家蚕和斜纹夜蛾精子发生的过程。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试昆虫及主要实验材料

供试家蚕为大造品系，由广东省蚕业技术推广中心提供，斜纹夜蛾为本实验室保存品系。家蚕和斜纹夜蛾饲养条件参考前期报道（文靓等，2019；胡启豪等，2024）。家蚕 BmN 细胞、斜纹夜蛾 SI221 细胞、过表达载体 pIEx4 等为本实验室保存材料。

总 RNA 提取试剂 RNAex Pro reagent 购自湖南艾科瑞生物公司；反转录试剂盒购自江苏康为世纪生物技术有限公司；qRT-PCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；细胞转染购自德国 Qiagen 公司；Taq 酶等分子克隆所需试剂购自日本 Takara 公司；引物和基因测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成；实验所用其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 生物信息学分析

通过果蝇基因组数据库 Flybase (<https://flybase.org/>) 获得 *CG3526* 蛋白序列，利用美国国家生物技术信息中心 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 数据库获得 BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白和 cDNA 序列。蛋白质理化性质预测通过 ExPASy (<http://www.expasy.org>) 进行，磷酸化位点及糖基化位点利用 DTU Health Tech 网站 (<https://services.healthtech.dtu.d>) 进行分析，蛋白结构域及三维结构分别利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行分析。基因启动子顺式结合元件分析利用 JASPAR 网站 (<https://jaspar2022.genereg.net>) 进行。

### 1.3 不同发育阶段家蚕和斜纹夜蛾精巢 cDNA 制备

收集不同发育阶段的家蚕和斜纹夜蛾，在蜡盘上解剖并取出精巢，并在 DEPC 处理的

PBS 缓冲液中漂洗干净。总 RNA 提取方法如下：将上述不同样品置于 1 mL RNAex 中，于组织研磨仪中充分研磨。加入 200  $\mu$ L 的氯仿/异戊醇溶液（体积比为 24 : 1），剧烈震荡 15 s 后，冰上静置 20 min。随后，在 4°C 条件下 12 000 g 离心 20 min。将上层水相移至新的离心管，加入等体积异丙醇后充分混匀，于 -20°C 下放置 1 h，以沉淀 RNA。在 4°C 条件下 12 000 g 离心 15 min，弃上清，往沉淀中加入 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀。在 4°C 条件下 7 500 g 离心 5 min，弃上清，往沉淀中加入 200  $\mu$ L 无水乙醇再次洗涤 RNA 沉淀。在 4°C 条件下 7 500 g 离心 5 min，弃上清，并在洁净的环境下干燥 RNA。根据 RNA 沉淀体积加入适量 DEPC 处理水溶解 RNA。

逆转录反应参考康为世纪 HiFiScript gDNA removal RT Master Mix 说明书并稍作修改，步骤如下：将 1  $\mu$ g 总 RNA 与 gDNA Eraser 混合，于 42°C 下孵育 2 min，以去除样品中的基因组 DNA。往样品中加入 HiFiScript 逆转录酶和 Primer Mix，于 42°C 孵育 30 min，后于 85°C 孵育 5 min，反应结束后即得到 cDNA。随后，将 cDNA 保存于 -20°C 中。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR

*BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 在精巢中的表达，及精子发生相关基因在细胞中的表达采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行。具体方法如下：将上述 cDNA 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释适当倍数作为模板，分别以家蚕和斜纹夜蛾 *Rp49* 作为内参基因。qRT-PCR 循环条件如下：95°C 30 s；95°C 10 s，60°C 30 s，40 个循环。利用 GraphPad Prism 8.0 对实验结果进行可视化处理。本研究所用引物序列如下：

表 1 实验所用引物的序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')	用途
Primer name	Forward Primer sequences (5' - 3')	Reverse Primer sequences (5' - 3')	Purpose
<i>BmKcmf1</i> -clone	ATGAATCGCCATGAAGGAGT	TCAGTGGGCATCCGCGGCGG	cDNA 克隆 cDNA cloning
<i>SlKcmf1</i> -clone	ATGAATCGCCATGAAGGAG	TTACGGCGCCGACGCCCCA	cDNA 克隆 cDNA cloning
<i>BmKcmf1</i> -qRT	GCTGATTGGCTGAAGTTGCACAT	TTCTACGAAGCCAGCCCCATT	定量 PCR Quantitative reverse transcription PCR

			定量 PCR
<i>BmVasa</i> -qRT	ACTGGTCGCGTAGGAAACAG	AATGTAGCAGTGCCACCTCC	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmHop</i> -qRT	TTCGTTTCAAGGTGCCAAGGT	TCTGTGATCCCCAGTCCGAG	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmDome</i> -qRT	GTGTTGTGTGTGAGTAATCCCTTGT	ATAGTTAGTCGTTGCTAGGCTTTCA	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmStat92e</i> -qRT	GAGGACCAGCAGCGTTCGTT	GGCGAGACAACGCCTCATGT	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmDpp</i> -qRT	GCTCTGTAATCGTTCGCGGT	ATCGGAGAGGCTTTGGCTGG	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmGbb</i> -qRT	GAGCTGCGGTTGCCATTGAT	TGGAATTTGAACGACGGACTAAGC	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmTkv</i> -qRT	GCGCTCCGTCACTTCATTCG	CAACGCACGGATTTCTCGGG	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmPunt</i> -qRT	CTACCCACGCGGACGACT	CCGACTGAATAGCCACCTTGG	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmCyclinA</i> -qRT	GGTCAACCCGCAATGTGCAA	CCGCGGCTCTACTTGAGACA	Quantitative reverse transcription PCR
			定量 PCR
<i>BmCyclinB</i> -qRT	ACAGTACGTGGGGCGTTAGG	ACTACGCCACGGTTTAGGGT	Quantitative reverse

			transcription PCR 定量 PCR
<i>BmAnt2</i> -qRT	TGGCCGGTATTGCGTCGTAT	AAAGAAAGCACCGGCTCCCT	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>Bma4GT1</i> -qRT	GCGAGGGAGAGCGATGAGAT	ACGGAACATCCGTAAAAACCACTG	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>BmRp49</i> -qRT	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC	TACGGAATCCATTGGGAGCAT	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlKcmf1</i> -qRT	CCTTGGAACAACCGCAAGCA	ACTGGACACACCACAGCCAA	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlVasa</i> -qRT	CGATAGACGGGATCGTGGGG	TTCTCTGTGGGTTCAGGCGG	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlHop</i> -qRT	TGGTGC GCCTATACGGAGTG	TGGACTATACCCGCCTCCGA	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlDome</i> -qRT	GATGCCGGAAGACGCACAAG	CGGATTCACTGGCTGTGGC	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlStat92e</i> -qRT	CTCACTCACCCGACTCGCAT	TGTCGAAATTTAGTTCGTCTTCCG	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlDpp</i> -qRT	CAACACTTCAGCCCCGCAC	GTTCACGACCGAACCGATGG	Quantitative reverse transcription PCR
<i>SlGbb</i> -qRT	CGACACGTCTGGTTCGAGGT	TGACCCTGTGTGCAACGACT	定量 PCR

			Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlTkv</i> -qRT	ATCGCTCAGTGTTGTCCGCC	CCCGCGTCCGTGCTATCATT	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlPunt</i> -qRT	GATTCGGAGCCGTGTGGAGA	GCCCTTCTTGCTACGCCGA	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlCyclinA</i> -qRT	CACTCTCACGCCTCGCTACA	GAGGCTGGTACTTGGGCACT	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlCyclinB</i> -qRT	AGACGGAGTTGAGCAAGCGT	CTGGATCTGAGCCGTTCCGGT	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlAnt2</i> -qRT	AAAGGCACACACCTACCCCC	GGGTCGAGGTGGAATCTGGG	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>Sl<math>\alpha</math>4GT1</i> -qRT	ACGGCTCCTACCAAACGTACA	ATCTGAGGCGTGCTCTACGG	Quantitative reverse transcription PCR 定量 PCR
<i>SlRp49</i> -qRT	CGTGAGCTGGAGATCCTGATGAT	CTCTACAATGGTCTTGCGCTTCT	Quantitative reverse transcription PCR

## 1.5 细胞转染

将 BmN 细胞重悬，分装至 12 孔板中培养，待细胞密度达到 80% 以上时进行转染。转染步骤参考 Qiagen 转染试剂说明书进行，将 2  $\mu$ g BmKCMF1-pIEx4 和 pIEx4 质粒分别与 EC Buffer 和 Enhancer 试剂混匀，于室温放置 5 min；加入 Effective Transfection Reagent 试剂后于室温放置 10 min；往反应液中加入适量细胞培养基，混匀后加入细胞中，以转染 BmN 细胞。于转染 48 h 后，去除细胞培养基，用 DEPC 处理的 PBS 清洗细胞，参考上述步骤提取 RNA。按照相似的方法，将 SIKCMF1-pIEx4 和 pIEx4 质粒分别转染 SI221 细胞，并提取 RNA。

## 2 结果与分析

### 2.1 BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白的结构及理化性质分析

为分析 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因的功能，首先克隆了 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 的 ORF 序列，并进行测序，结果显示与 NCBI 中的数据一致。进一步分析显示，*BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因 ORF 分别为 1 110 bp 和 966 bp（图 1），分别编码 369 和 321 个氨基酸，蛋白分子量分别为 39.2 kDa 和 34.3 kDa，等电点分别为 8.52 和 6.31。另外，生物信息学预测分析显示 BmKCMF1 蛋白可能有 39 个磷酸化位点和 27 个 O-糖基化位点，SIKCMF1 可能有 35 个磷酸化位点和 19 个 O-糖基化位点（表 2）。以上结果说明 BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白的理化性质存在差异，它们的功能可能受到磷酸化等翻译后修饰的调节。

利用 SMART 网站对果蝇 CG3526、BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白的结构进行预测，结果显示它们都含有 1 个锌结合结构域（Zinc-binding domain）。另外，CG3526 含有 2 个锌指结构域（Zinc finger-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>），而 BmKCMF1 和 SIKCMF1 均含 1 个锌指结构域。预测结果还显示，BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白的 C 端均含低复杂区域（Low complex region），但 CG3526 蛋白并不含有低复杂区域（图 2-A）。通过 Swiss model 网站对 CG3526、BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白的三维结构进行预测，发现它们都可能形成 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构，并能形成相似的三维结构（图 2-B）。这些结果说明，CG3526、BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白可能具有相似的功能。

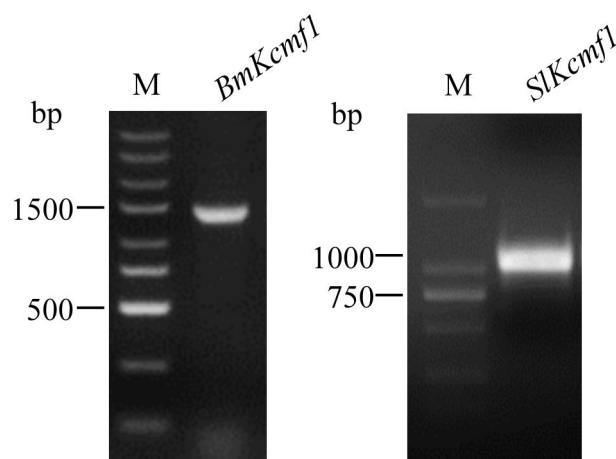


图 1 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因 ORF 克隆

Fig. 1 Cloning of *BmKcmf1* and *SIKcmf1* ORFs



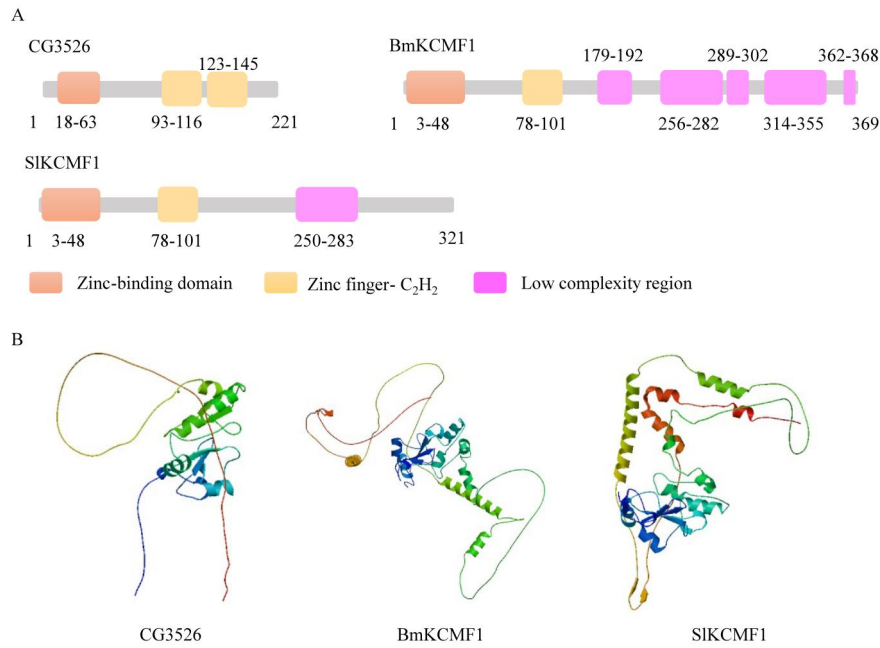


图2 CG3526、BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白结构域 (A) 及三维结构预测 (B)

Fig. 2 Analysis of functional domains (A) and 3-dimensional model structures of CG3526, BmKCMF1 and SIKCMF1 (B)

表2 BmKCMF1 和 SIKCMF1 蛋白理化性质分析

Table 2 Physical and chemical characteristics of BmKCMF1 and SIKCMF1

蛋白名称 Protein name	NCBI 数据库编号 Protein ID	氨基酸数 Size (aa)	蛋白质		磷酸化位点 Phosphorylation site	O-糖基化位点 O-Glycosylation site
			分子量 Protein mol. mass (kDa)	等电点 <i>pI</i>		
BmKCMF1	XP_037867972.1	369	39.2	8.52	39	27
SIKCMF1	XP_022835202.1	321	34.3	6.31	35	19

## 2.2 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 在精巢中的表达分析

为分析 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因在精巢发育和精子发生中的功能, 首先检测了它们在家蚕和斜纹夜蛾不同发育阶段精巢中的表达水平。结果显示, *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 在不同发育阶段精巢中均有表达。其中, *BmKcmf1* 在 5 龄幼虫至蛹期中的表达相对平稳, 在蛹后期 (P3-P5) 的表达水平显著上升, 但在羽化后降低 (图 3-A); 而 *SIKcmf1* 的表达在 6 龄幼虫初期 (L6D0-L6D2) 逐渐上升, 但随后逐渐下降 (图 3-B)。这些结果说明, *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因可能参与家蚕和斜纹夜蛾精巢发育或精子发生的过程。

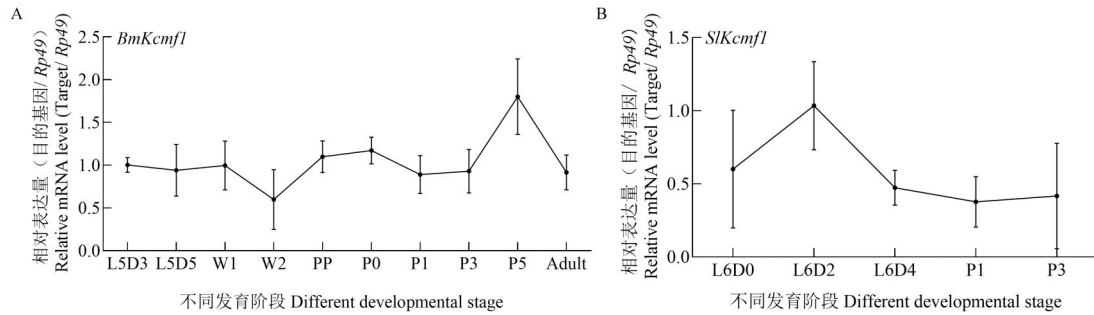


图3 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因在不同发育阶段家蚕 (A) 和斜纹夜蛾 (B) 精巢中的表达

Fig. 3 Expression of *BmKcmf1* and *SlKcmf1* in the testis of *Bombyx mori* (A) and *Spodoptera litura* (B) at different developmental stages

注: L5D3, 5龄第3天; L5D5, 5龄第5天; L6D0, 6龄第0天; L6D2, 6龄第2天; L6D4, 6龄第4天; W1, 游走期第1天; W2, 游走期第2天; PP, 预蛹期; P0, 蛹期第0天; P1, 蛹期第1天; P3, 蛹期第3天; P5, 蛹期第5天; Adult, 成虫。  
 Note: L5D3, Day 3 of the 5<sup>th</sup> instar; L5D5, Day 5 of the 5<sup>th</sup> instar; L6D0, Day 0 of the 6<sup>th</sup> instar; L6D2, Day 2 of the 6<sup>th</sup> instar; L6D4, Day 4 of the 6<sup>th</sup> instar; W1, Day 1 of wandering stage; W2, Day 2 of wandering stage; PP, Prepupa; P0, Day 0 after pupation; P1, Day 1 after pupation; P3, Day 3 after pupation; P5, Day 5 after pupation.

### 2.3 BmKCMF1 和 SlKCMF1 在精巢中的功能分析

昆虫精巢发育和精子发生受到多个基因的协同调控, 为分析 *BmKcmf1* 和 *SlKcmf1* 基因在其中的功能, 构建了 BmKCMF1 和 SlKCMF1 细胞超表达载体, 将它们分别转染家蚕 BmN 和斜纹夜蛾 SI221 细胞, 并通过 qRT-PCR 实验检测 *Vasa*、*Stat92e* 等精子发生相关基因的表达变化。

结果显示, 过表达 BmKCMF1 后, *BmVasa* 基因的表达显著上调; *BmDome*、*BmStat92e*、*BmDpp*、*BmGbb* 等 JAK-STAT 和 BMP 信号通路关键基因的表达显著下调 (图 4)。不同于 BmKCMF1, 过表达 SlKCMF1 后, *SlVasa* 的表达显著下调; 而在 JAK-STAT 和 BMP 信号通路相关的基因中, *SlHop*、*SlDome* 和 *SlGbb* 的表达显著下调, 但 *SlDpp*、*SlTkv* 和 *SlPunt* 的表达显著上升 (图 5)。

除了以上信号通路相关基因外, 本研究还检测了 *CyclinA* 等与精子发生相关的效应基因的表达变化。结果显示, 过表达 BmKCMF1 或 SlKCMF1 后, *CyclinB* 和  *$\alpha$ 4GT1* 的表达水平均显著上调。另外, 过表达 BmKCMF1 不能显著改变 *BmCyclinA* 的表达, 但可以显著下调 *BmAnt2* 的表达; 而过表达 SlKCMF1 可显著上调 *SlCyclinA* 的表达, 但对 *SlAnt2* 的表达影响不显著 (图 4, 图 5)。

以上结果表明, 过表达 BmKCMF1 和 SlKCMF1 可调节 *Vasa* 等精子发生相关基因的表达

达，但 BmKCMF1 和 SIKCMF1 对它们的表达调节机制存在差异。

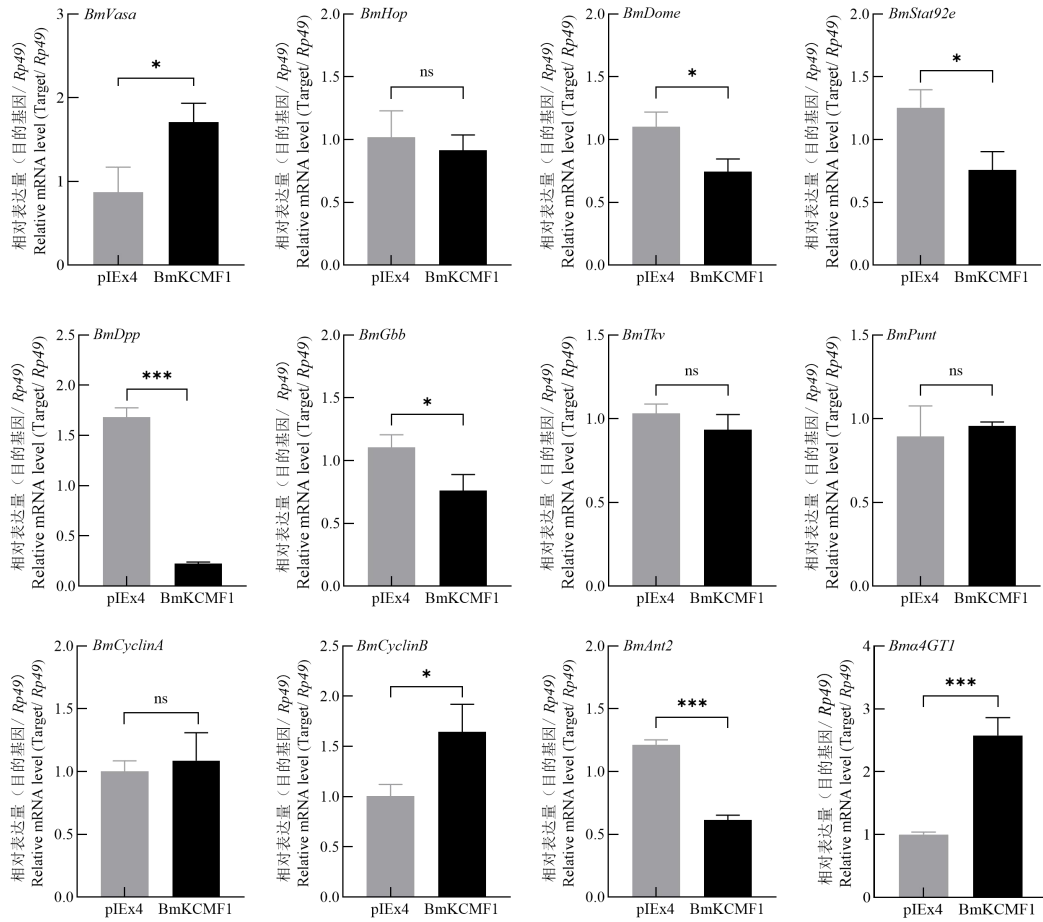


图 4 过表达 BmKCMF1 对精子发生相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of BmKCMF1 overexpression on the expression of genes related to spermatogenesis

柱：上标有星号表示该处理组与对照组差异显著；ns 表示该处理组与对照组差异不显著 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ; t-检验)，下图同。Note: The asterisks above the column indicated significant difference between the two groups, “ns” indicated non-significant between two groups (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns,  $P > 0.05$ ; t-test), the same below.

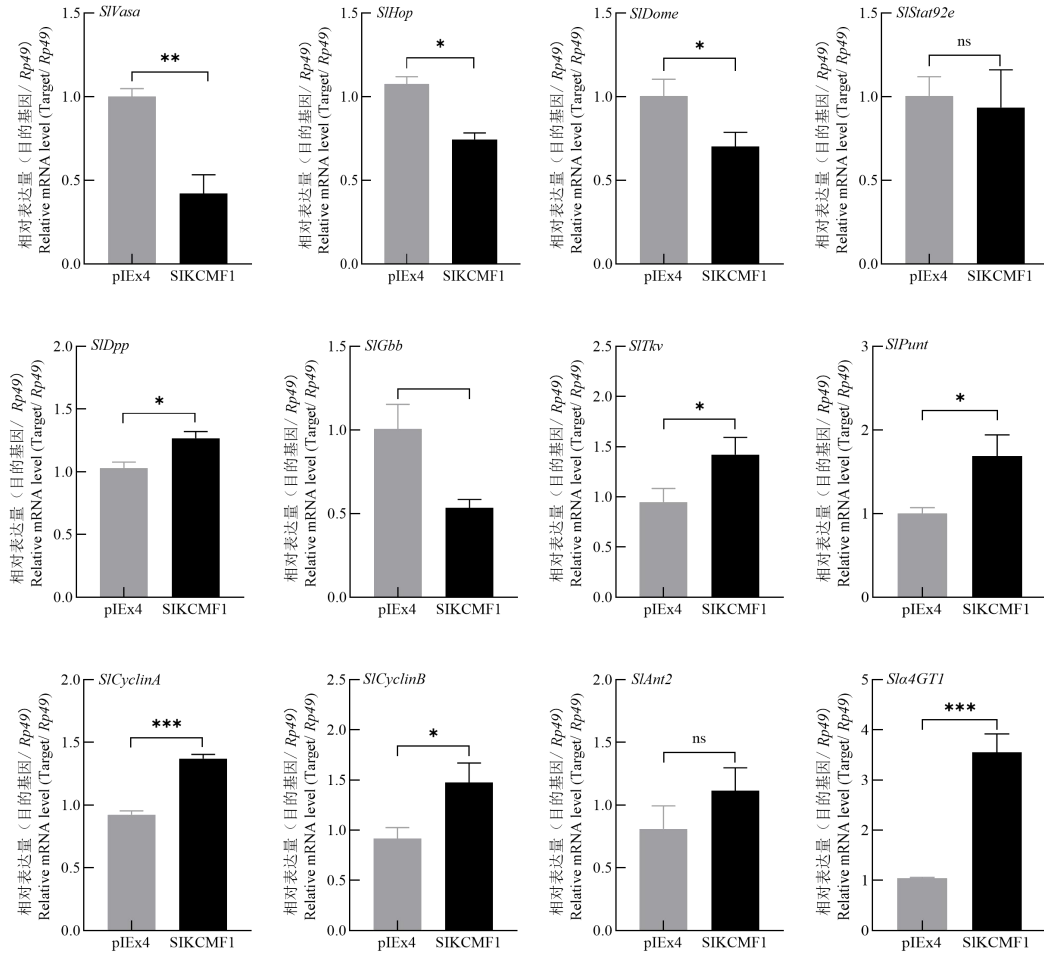


图 5 过表达 SIKCMF1 对精子发生相关基因表达的影响

Fig. 5 Effect of SIKCMF1 overexpression on the expression of genes related to spermatogenesis

#### 2.4 BmKCMF1 和 SIKCMF1 下游基因启动子结合位点分析

BmKCMF1 和 SIKCMF1 都包含典型的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构域, 该结构域具有 DNA 结合活性。因此, 挑选过表达 BmKCMF1 或 SIKCMF1 后表达变化最显著的 *CyclinA*、*Ant2* 和 *a4GT1* 作为候选基因, 通过 NCBI 数据库获得这些基因转录起始位点上游 2 000 bp 序列作为启动子序列, 利用 JASPAR 数据库对其上潜在的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结构结合位点进行预测。

结果显示, *BmCyclnA* 和 *SICyclinA* 分别具有 12 和 14 个潜在的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结合位点; *BmAnt2* 和 *SlAnt2* 分别具有 7 和 10 个潜在的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结合位点; *Bma4GT1* 和 *Sla4GT1* 分别具有 6 和 21 个潜在的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结合位点。

该结果说明, BmKCMF1 和 SIKCMF1 可能通过与靶基因启动子上相应的顺式作用元件结合, 从而调节它们的表达。

### 3 结论与讨论

*BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 是果蝇 *CG3526* 在家蚕和斜纹夜蛾中的一个同源基因, 本研究通过 qRT-PCR、细胞过表达等实验, 发现 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 基因在家蚕和斜纹夜蛾精巢中有一定水平的表达, 且 *BmKCMF1* 和 *SIKCMF1* 可调节 *Vasa* 等精子发生相关基因的表达, 提示它们可以参与精巢发育和精子发生等过程。

家蚕和斜纹夜蛾幼虫精巢均呈肾型, 成对存在。不同的是, 家蚕精巢在发育过程中体积逐渐变大, 但形态不会出现显著变化; 而斜纹夜蛾精巢在变态过程中, 两个精巢会出现融合现象 (文靓等, 2019)。qRT-PCR 实验结果显示, *BmKcmf1* 的表达在家蚕变态前期 (W2) 出现下调的趋势, 家蚕精巢体积在该阶段逐渐增大; 而 *SIKcmf1* 在精巢融合阶段 (L6D4-P1) 的表达水平逐渐下调, 但在蛹期第一天后逐渐上升, 这与精巢融合的时期相吻合。这些结果提示, *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 的功能与家蚕和斜纹夜蛾精巢发育过程相关, 其中 *SIKcmf1* 可能参与斜纹夜蛾精巢融合过程。

精巢是昆虫精子发生的场所。研究发现, 家蚕和斜纹夜蛾等鳞翅目昆虫可以产生有核精子和无核精子两种精子。其中, 有核精子主要负责传递遗传物质; 而无核精子在协助有核精子与卵细胞结合的过程中发挥重要作用。近期研究发现, *BmVasa* 功能缺失可阻碍家蚕两种精子的生成 (Yang *et al.*, 2023)。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等其他鳞翅目昆虫中发现 JAK-STAT 等信号通路的功能可能与精子发生有关 (Elliott and Zeidler, 2008; Li *et al.*, 2021)。Zhang 等研究也发现 *BmStat* 基因在家蚕精巢中有高水平表达 (Zhang *et al.*, 2016)。以上研究说明, JAK-STAT 等信号通路在家蚕等鳞翅目昆虫精子发生中起关键作用。在本研究中, 通过细胞转染等实验发现在家蚕 *BmN* 和斜纹夜蛾 *SI221* 细胞中过表达相应的 *KCMF1* 蛋白, 均能显著下调 *Dome* 和 *Gbb* 基因的表达, 但 *Vasa*、*Dpp* 等其他精子发生关键基因在过表达 *BmKCMF1* 和 *SIKCMF1* 细胞中的表达变化不同。该结果提示, *BmKCMF1* 和 *SIKCMF1* 可能通过 JAK-STAT 等信号通路参与家蚕和斜纹夜蛾精子发生过程, 但其中的分子调节机制存在差异。

研究显示, *KCMF1* 属于 E3 泛素化酶家族成员, 可通过促进蛋白质泛素化过程的发生, 参与调节哺乳动物器官发育和肿瘤生长等生物学过程, 但其在生殖系统中的功能仍不明确 (Hong *et al.*, 2015)。在黑腹果蝇中, 蛋白质的泛素化和去泛素化修饰已被证明是精子发生过程的关键步骤。例如, 多聚泛素化基因 *Ubi-p63E* 的功能缺失会阻碍精母细胞减数分裂的进行 (Lu *et al.*, 2013)。结合本团队研究结果, 推测 *KCMF1* 也可以通过泛素化修饰调节家蚕和斜纹夜蛾精巢发育和精子发生过程。此外, 通过蛋白结构域的预测, 本研究在 *BmKCMF1* 和 *SIKCMF1* 蛋白上均鉴定到 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-锌指结构域, 该结构域被认为具备 DNA 结合活性

(Bonchuk and Georgiev, 2024)。通过对 *Ant2* 等基因的启动子区域进行分析, 本团队也鉴定到其上存在若干潜在的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指结合位点。因此, 本研究推测 BmKCMF1 和 SIKCMF1 可能直接与 *Ant2* 等基因的启动子 DNA 结合, 从转录水平上调节相关基因的表达。

综上, 本研究结果说明 *BmKcmf1* 和 *SIKcmf1* 的功能与家蚕和斜纹夜蛾精巢发育和精子发生有关。以上结果完善了鳞翅目昆虫雄性生殖系统发育的分子机制, 为进一步探究昆虫精子发生的分子调控网络提供参考。

### 参考文献 (References)

- Bonchuk AN, Georgiev PG. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> proteins: Evolutionary aspects of domain architecture and diversification [J]. *Bioessays*, 2024, 46 (8): e2400052.
- Bunt SM, Monk AC, Siddall NA, *et al.* GAL4 enhancer traps that can be used to drive gene expression in developing *Drosophila* spermatocytes [J]. *Genesis*, 2012, 50 (12): 914-920.
- Chao CF, Pesch YY, Yu H, *et al.* An important role for triglyceride in regulating spermatogenesis [J]. *Elife*, 2024, 12: RP87523.
- Coutelis JB, Petzoldt AG, Speder P, *et al.* Left-right asymmetry in *Drosophila* [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2008, 19: 252-262.
- Du Q, Wen L, Zheng SC, *et al.* Identification and functional characterization of doublesex gene in the testis of *Spodoptera litura* [J]. *Insect Science*, 2019, 26 (6): 1000-1010.
- Elliott GC, Zeidler MP. MsSOCS expression indicates a potential role for JAK/STAT signalling in the early stages of *Manduca sexta* spermatogenesis [J]. *Insect Molecular Biology*, 2008, 17 (5): 475-483.
- Fabian L, Brill JA. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages [J]. *Spermatogenesis*, 2012, 2 (3): 197-212.
- Findlay GD, Yi X, Maccoss MJ, *et al.* Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating [J]. *PLoS Biology*, 2008, 6 (7): e178.
- François CM, Pihl T, Dunoyer de Segonzac M, *et al.* Metabolic regulation of proteome stability via N-terminal acetylation controls male germline stem cell differentiation and reproduction [J]. *Nature Communications*, 2023, 14 (1): 6737.
- Greenspan LJ, de Cuevas M, Matunis E. Genetics of gonadal stem cell renewal [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2015, 31: 291-315.
- Hasan S, Hétie P, Matunis EL. Niche signaling promotes stem cell survival in the *Drosophila* testis via the JAK-STAT target DIAP1 [J]. *Developmental Biology*, 2015, 404 (1): 27-39.
- He Z, Fang Y, Zhang FC, *et al.* Adenine nucleotide translocase 2 (*Ant2*) is required for individualization of spermatogenesis of *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Science*, 2023, 31 (4): 1055-1072.

- He Z, Li DC, Wu F. From fruit fly to silkworm: An overview on insect spermatogenesis [J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2020, 32 (12): 1322-1330. [贺真, 李德臣, 吴凡. 从果蝇到家蚕: 精子发生过程及调控机制概述 [J]. *生命科学*, 2020, 32 (12): 1322-1330]
- Herrera SC, Bach EA. The Emerging Roles of JNK Signaling in *Drosophila* Stem Cell Homeostasis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22 (11): 5519.
- Hong JH, Kaustov L, Coyaud E, et al. KCMF1 (potassium channel modulatory factor 1) links RAD6 to UBR4 (ubiquitin N-recognition domain-containing E3 ligase 4) and lysosome-mediated degradation [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14 (3): 674-685.
- Hu QH, Xiao YH, Wei RN, et al. Identification and functional analysis of CG3526 in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Science*, 2024, 31 (1):79-90.
- Lesch BJ, Page DC. Genetics of germ cell development [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13 (11): 781-794.
- Li LY, Wang S, Huang KY, et al. Identification and characterization of microRNAs in gonads of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Insects*, 2021, 12 (8): 749.
- Lu CG, Kim JM, Fuller MT. The polyubiquitin gene Ubi-p63E is essential for male meiotic cell cycle progression and germ cell differentiation in *Drosophila* [J]. *Development*, 2013, 140 (17): 3522-3531.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1839 (3): 155-168.
- Sheng XR, Posenau T, Gumulak-Smith JJ, et al. Jak-STAT regulation of male germline stem cell establishment during *Drosophila* embryogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2009, 334 (2): 335-344.
- Siddall NA, Hime GR. A *Drosophila* toolkit for defining gene function in spermatogenesis [J]. *Reproduction*, 2017, 153 (4): R121-R132.
- Sitaram P, Hainline SG, Lee LA. Cytological analysis of spermatogenesis: Live and fixed preparations of *Drosophila* testes [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2014, 83: e51058.
- Wen L, Chen F, Chen YQ, et al. The testis development and spermatogenesis in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 51 (4): 47- 56. [文靓, 陈丰, 陈亚青, 等. 斜纹夜蛾精巢的发育和精子的发生 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 51 (4): 47-56]
- Whittington E, Karr TL, Mongue AJ, et al. Evolutionary proteomics reveals distinct patterns of complexity and divergence between Lepidopteran sperm morphs [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2019, 11: 1838-1846.
- Xiao YH, Huang B, Chen SB, et al. Dual roles of  $\alpha 1$ , 4-galactosyltransferase 1 in spermatogenesis of *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Science*, 2024, 10.1111/1744-7917.13369.
- Xiao YH, Pei MY, He ZY, et al. Molecular mechanism of 20E regulating BmFoxL2-2 in *Bombyx mori* and expression analysis of SIFoxL2-2 in the testis of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2024, 67 (5): 603-610. [肖妍虹,

裴梦圆, 贺智颖, 等. 20E 调控家蚕 BmFoxL2-2 的分子机制及斜纹夜蛾 SIFoxL2-2 在精巢中的表达分析 [J]. 昆虫学报, 2024, 67 (5): 603-610]

Yang X, Chen DB, Zheng SR, *et al.* BmHen1 is essential for eupyrene sperm development in *Bombyx mori* but PIWI proteins are not [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2022, 151: 103874.

Yang X, Chen DB, Zheng SR, *et al.* The Prmt5-Vasa module is essential for spermatogenesis in *Bombyx mori* [J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19 (1): e1010600.

Zhang XL, Guo R, Kumar D, *et al.* Identification, gene expression and immune function of the novel Bm-STAT gene in virus-infected *Bombyx mori* [J]. *Gene*, 2016, 577 (1): 82-88.

Zhao T, Xiao Y, Huang B, *et al.* A dual role of lola in *Drosophila* ovary development: Regulating stem cell niche establishment and repressing apoptosis [J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13 (9): 756.