

日本沼虾表皮几丁质结合蛋白基因的克隆以及 KK-42 对其表达的影响

张宇, 王佩, 吕艳杰, 宁黔冀

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为探讨 KK-42 缩短日本沼虾蜕皮周期的可能机制,首次从日本沼虾步足表皮组织克隆了编码几丁质结合蛋白的一个新基因——*MnCBP-1* 部分 cDNA 序列,对其序列进行生物信息学分析,qRT-PCR 技术检测 *MnCBP-1* 基因的表达水平以及 KK-42 的影响.结果表明,*MnCBP-1* 基因部分 cDNA 序列为 1396 bp,含有特征性的几丁质结合结构域(chitin-bind-4),经 BLAST 比对,*MnCBP-1* 与蚤状溞相似性为 44%.qRT-PCR 结果显示,步足表皮组织内 *MnCBP-1* 基因表达量随着蜕皮前期(D₀₋₂)的开始逐渐增多.KK-42 处理后,蜕皮间期(C)幼虾内 *MnCBP-1* 基因表达水平分别在 6、12、24 和 48 h 比对照组显著升高,而在 D₀₋₂ 期和 D₃₋₄ 期 *MnCBP-1* 基因转录物仅在个别时间点有所增多.研究表明,*MnCBP-1* 基因表达与蜕皮周期有关, KK-42 处理可显著诱导 *MnCBP-1* 基因表达,且表达的高峰提前至 C 期,这可能是 KK-42 缩短蜕皮周期的机制之一.

关键词:日本沼虾;几丁质结合蛋白;KK-42;克隆;基因表达

中图分类号:Q174

文献标志码:A

甲壳动物的特征之一就是拥有坚硬的外表皮,一方面,能够保护机体,另一方面,也限制了生长,但可通过周期性地褪去旧表皮、形成新表皮来克服这一弊端.甲壳动物的表皮主要由碳酸钙、几丁质和表皮蛋白这三大类物质组成,大部分从甲壳动物表皮内分离鉴定出的表皮蛋白都能够结合几丁质,被称为几丁质结合蛋白(chitin-binding proteins, CBPs),大量的研究发现,CBPs 与几丁质所形成的有机支架,对新表皮的形成具有重要作用^[1].

甲壳动物 CBPs 主要有两种几丁质结合域-R&R 保守基序和 cys-CBD(cysteine-rich chitin-binding domain)^[1],其中,R&R 保守基序是迄今为止 CBPs 中最易于识别、分布最广泛的基序,已从斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[2]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[3]和红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)^[4]等多个物种内发现了含有 R&R 保守基序的 CBPs.初步的研究显示,CBPs 基因的表达与蜕皮周期有关,利用 RNAi 技术沉默蓝蟹(*Callinectes sapidus*)^[5]和红螯螯虾^[6]的 CBPs,蜕皮过程受阻或周期延长,提示 CBPs 在蜕皮过程中起到重要的作用.目前,有关日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)CBPs 的研究尚未见报道.

我们实验室首次发现,咪唑类物质 KK-42 能明显缩短日本沼虾幼虾蜕皮周期的时程^[7].为探讨其可能的机制,本研究以获得的日本沼虾表皮组织转录组数据资料为基础,首次从日本沼虾步足表皮组织克隆出一个编码 CBPs 序列的部分 cDNA 片段,经相关的生物信息学分析,命名为 *MnCBP-1* (NCBI 登录号: KU316937);并采用 qRT-PCR 方法分析步足表皮组织内 *MnCBP-1* 基因表达的时序性特征以及 KK-42 对其表达的影响.

收稿日期:2016-04-23;修回日期:2016-07-10.

基金项目:河南省基础与前沿技术研究(142300410021)

第1作者简介:张宇(1988-),男,河南新乡人,河南师范大学在读硕士研究生,研究方向为甲壳动物生长发育的体液调控.

通信作者:宁黔冀,教授,博士生导师,E-mail: nqjnqj1964@163.com.

1 材料方法

1.1 实验材料

日本沼虾捕捞于新乡原阳黄寺渔场,放置于实验室水族箱(规格:1096 mm×470 mm×670 mm)内喂养,控制水温(20±2)℃,每天喂食两次,隔天换水并用增氧泵进行增氧,每天对水族箱底部的排泄物、死虾和蜕去的虾壳进行及时清理,保证水体不受污染。经1周左右的适应性暂养后,将400尾体长(3.0±0.5)cm的健康幼虾随机分为实验组和对照组,其中,实验组用含浓度为1.95 mmol/L的KK-42溶液浸泡处理1 min,将其迅速捞出并投入原水族箱内,按原方式进行喂养;对照组用不含KK-42的溶液进行相同处理^[8]。

1.2 RNA提取及cDNA第一链的合成

KK-42处理后0、3、6、12、24和48 h的实验组和对照组中,分别选取处于C、D₀₋₂和D₃₋₄期的幼虾,用MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(TaKaRa)试剂盒提取步足表皮组织的RNA,分别用凝胶电泳和A₂₆₀对RNA的完整性和纯度进行检测,并对其浓度进行定量。按照Applied Biological Materials(ABM)公司反转录试剂盒5×All-In-One RT Master Mix说明书,以RNA为模板反转录得到cDNA。按照Cesar等^[9]的方法对实验中日本沼虾蜕皮周期进行鉴定。

1.3 MnCBP-1基因的克隆及序列分析

实验室前期与美吉生物合作完成了日本沼虾表皮组织转录组测序,根据测序结果,选取一条预测为几丁质结合蛋白基因的序列,并设计引物MnCBP-1-F1和MnCBP-1-R1(表1)进行PCR扩增,其中,50 μL的PCR反应体系如下:

50 μL反应体系如下:2×Tap Master Mix 25 μL;模板DNA 0.1~1 μg;上游引物(10 μM)2 μL;下游引物(10 μM)2 μL;ddH₂O up to 50 μL。

扩增条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,进行30个循环,72℃ 5 min。反应结束后,获得中间片段。经检测,PCR扩增产物特异性强,纯度高,可直接送至生工测序。根据测序得到的cDNA序列信息,使用NCBI Blastx进行氨基酸序列同源性比对,DNAMAN软件进行多序列比对分析。

1.4 MnCBP-1基因表达的定量分析

根据MnCBP-1的测序结果,用软件Prime primer 5.0设计目的基因特异性引物MnCBP-1-F2和MnCBP-1-R2(表1),并合成内参基因18S rRNA的内参引物18S-F和18S-R(表1)。实验所用引物均由金唯智生物公司合成。qRT-PCR使用Roche Light Cycler 96 qPCR仪完成,操作步骤按照Vazyme AceQ™ qPCR SYBR® Green Master Mix试剂盒说明书进行。按以下各成分的顺序加入到无RNase的八联管,20 μL反应体系如下: AceQ™ qPCR SYBR® Green Master Mix 10 μL;上游引物(10 μM)0.4 μL;下游引物(10 μM)0.4 μL;模板cDNA;2 μL;灭菌ddH₂O up to 20 μL。

按照两步法进行qRT-PCR循环。循环条件:95℃ 5 min,1个循环;95℃ 10 s,60℃ 30 s,进行40个循环。实验结果通过2^{-ΔΔct}法进行处理,使用SPSS统计软件中单因素方差(ANOVA)和Duncan检验法对数据进行分析,其中P≤0.05表示存在显著性差异,P≤0.01表示存在极显著差异。

表1 日本沼虾MnCBP-1基因克隆和qRT-PCR所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')	用途
MnCBP-1-F1	CATACCATCCACCACCGCC	RT-PCR
MnCBP-1-R1	GGAACACTTTGTAAGATCCCCGACAC	RT-PCR
MnCBP-1-F2	GGAGCTCCGTGTCGGGATCT	qRT-PCR
MnCBP-1-R2	TGCCTCGCCCTCGTAAGTG	qRT-PCR
18S-F	TGTTACGGGTGACGGAGAA	qRT-PCR
18S-R	CATTCCAATTACGCAGACTCGG	qRT-PCR

2 结果

2.1 MnCBP-1部分序列

MnCBP-1测序为1396 bp,NCBI保守域搜索显示,含有几丁质结合结构域(chitin-bind-4)(图1),经

BLAST 比对, *MnCBP-1* 与蚤状溞 (*Daphnia pulex*, EFX71650.1) 相似性为 44% (图 2), 该序列提交 GenBank 的注册号为 KU316937.

```

1      CTGCTGCCAT TAAGGAGAGC CAGAGACTGA GCAGAGAGCC AGAGATTGAG CAAGGATAACC
61     GCTGCCCCGT TACCGTCATG AGCGCCAAGC TAATATTCGT GGGACTGACC ATTGGCATAG
121    CCAGAGCATT ACCGCATGCC CTTCCCGACT CACCACCTAT CTACGGCGTC TCTGAATATG
181    AACCACAGCC ATACCATCCA CCACCGCCTC CACCATCCTA CCATGAAGTT GAAGATGAAC
241    CCAAGAAACC CTACGCTTTC GACTACGGCG TGAAGGACGA CTACTCCGGG GCCAACTTCA
301    ACCACGCCGA GAACTCAGAC GGGAGCTCCG TGTCGGGATC TTACAAAGTG TTCCTTCCCG
361    ACGGTCGGGT ACAAACCGTC AATTACGTTG CTGACCATTA CAACGGGTAC CATGCACAGG
421    TCACCTACGA GGGCGAGGCA CAATACCCAG AAGCAAAGCC TTACGTTTCCT CCCCAACCAT
481    CTTACCCAGC GCCCCCTCAA TACCCCGTTG AACCACCACC ACCACAGTAC CCTGTGGAGC
541    TACCACCACC ACCACCACAG TACCCAGTGG AGCTCCCACC GCCACCACCA TCATACCCCG
601    AAGAGGCGAT TCCAATTTAT AGCAACTAAA CTTATCTCGA AAACGGACGA CTTGCAAGGA
661    CTCCCGAAGA TGCACCTCTG GTCAAGAGTG AAGGAAATGT CGCTTCCGCT TTGCCACTTA
721    GCTAAAGCAA TTGATCCCAG TGTTTCAGGA GACGACTGAA ACCGAACTTC CTTCAAACCG
781    AGATCTTTTC TTCTACGGAG TGTGTTAGA TATTTGGAGT CTACATGTGT GAACATTCGC
841    CTCTCCTGT  TGTTAGCCAT CTCATCATCC ATTTAGTGAA GCTCGCCGGG CGAGCTCAGA
901    CTAGTCATCC ATACATCGTG CCATTTAAGC ACGCAGTGCT TGTCATCAA ATATACACAA
961    TAATACCGTT AGCATCTCAT TTCATTTTCA TTCGTTGTTA AAATGTACAA AAATACCAGG
1021   ACTGAACCAA AGGAAGAGAA ATTAAAAATA AGGCGGGTCA GTCGATTGTA AAAAGGGTGT
1081   TTAGGTACTT CTTAATAAAT ACATGCATAG TTGAAAATAT CTTTAAAATA TTTTAAAATA
1141   TCTAGTAAA  ATGGTGTAAG AGAGAACAAC AGCAAAAGAA TCACACTTAT ACAGAATCAT
1201   ATACCATGTC AAAATATTAA TTTACGTGAC TTACATGCAG TCATCCCGAA TTTAATTCTC
1261   AAAAATCTG  CAAGTAATGA AACACGATGA TCATCATTA ATCGAATCTG CTGTCATGAA
1321   TTCCCTTAAC TTTTTCATGA GAAAACACCC CTTGGAGGTA ATTTGGACTT GTAATGTGTA
1381   CTCTTGATT  CTTGCC

```

黑色: chitin_bind_4结构域位置.

图1 日本沼虾 *MnCBP-1* cDNA 部分序列

2.2 步足 *MnCBP-1* 基因在蜕皮周期不同阶段的表达

以 C 期为参照, 步足表皮组织内 *MnCBP-1* 基因随着蜕皮前期的开始, 表达量持续增加 (图 3), D_{3-4} 期比 D_{0-2} 期增高 8 倍以上.

2.3 KK-42 对步足 *MnCBP-1* 基因表达的影响

KK-42 对步足 *MnCBP-1* 表达有显著的诱导效应, 尤其是在 C 期. 与对照组 C 期较低且相对稳定的表达特点明显不同, KK-42 处理后 6~48 h, *MnCBP-1* mRNA 含量比对照组高 2 倍以上 (图 4). KK-42 对 D 期的诱导效应较弱, 在 D_{0-2} 期和 D_{3-4} 期, *MnCBP-1* 表达水平仅在处理后 6 h (图 5) 和 6、24 h (图 6) 显著升高.

3 讨论

本文首次从日本沼虾步足表皮组织克隆到 1 个长度为 1396 bp 的 *MnCBP-1* 部分 cDNA 序列, 含有特征性的几丁质结合结构域 (chitin-bind-4) (图 1), 属于 CBPs. 为了初步分析 *MnCBP-1* 在蜕皮周期中的作用, 采用 qRT-PCR 技术研究了步足内 *MnCBP-1* 基因表达的时序性特征, 结果表明, 随着蜕皮前期的开始, *MnCBP-1* 基因表达量持续增加 (图 3), 与蓝蟹中发现的 CBPs-CsCP8.5 和 CsCP8.2 的表达变化相似^[10]. 本实验室前期研究显示, 日本沼虾新上表皮出现在 D_3 期, 新外表皮和内表皮分别出现在 D_4 期和蜕皮后期 (B 期)^[8], 也就是说, 蜕皮前期是新的上表皮和外表皮开始形成的时期, 据此推测 *MnCBP-1* 可能参与新外表皮的形成.

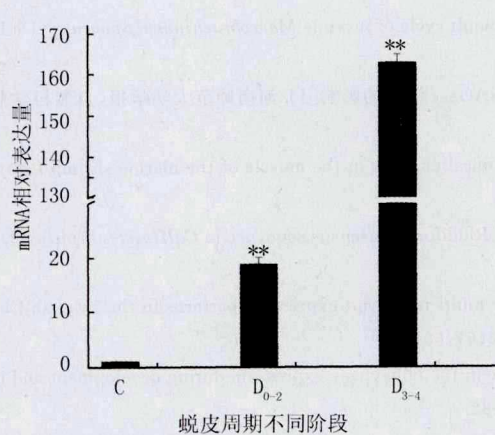
分泌 CBPs 的表皮上皮细胞层是蜕皮激素作用的靶组织^[11], 已有研究表明, CBPs 与蜕皮激素之间有着密切的联系^[12-13]. 血淋巴中蜕皮激素浓度在蜕皮前不断升高, 临近蜕皮时达到最大值, 然后迅速降低, 当蜕

皮发生时,蜕皮激素浓度处于较低状态,步足表皮 *MnCBP-1* 的表达模式与蜕皮激素的变化趋势一致,提示:该基因的转录受蜕皮激素的调节,与孙汝江等^[14]从中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)中分离得到的 CBPs—*AccCPR2* 表达结果类似。

日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KU316937)	..EP...KKEYAEDYGRKQYSGANFNHA	102
蛙疮痂鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , ADD24410.1)	..EP...AKFYAEQYGAADYSGSNFSAE	73
蛙疮痂鱼虱 (<i>L. salmonis</i> , ACO12414.1)	..ES...PQFYAEKYGASDYSGAQFTAE	66
蚤状蚤 (<i>D. pulex</i> , EFX71650.1)	..YA...AMEYSEAWAKKQYTYNDYAHQ	63
山松甲虫 (<i>Dendroctonus ponderosae</i> , ENN71422.1)	..HGGYEEPQSYEEGYRQKQYSGSSFHQK	72
温带臭虫 (<i>Cimex lectularius</i> , XP_014249800.1)	HHEP...GMEFDENYAKQYTYGTDYSHN	235
卤虫 (<i>Artemia franciscana</i> , ABS19965.1)	..HP...PMEYDEAWAKKQYTYNDYNHQ	82
中华按蚊 (<i>Anopheles sinensis</i> , KFB45925.1)	HHEP...GMEFDQYNNETQNDYSHK	130
大型蚤 (<i>Daphnia magna</i> , BAH23312.1)	..DA...PMEYSEAWAKKQYTYNDYGHK	59
一致序列 (consensus)	f v d	
日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KU316937)	ENSDGSS.VSSESKVLEFDGGRVCTINQVAD	131
蛙疮痂鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , ADD24410.1)	ENADGKI.TSSEYKVALFDGGRICITSSITVD	102
蛙疮痂鱼虱 (<i>L. salmonis</i> , ACO12414.1)	ENADGKI.TSSEYQVALFDGGRICITITITVD	95
蚤状蚤 (<i>D. pulex</i> , EFX71650.1)	ETACDKGYVSESYRTLEFDGGRICITITIKAD	93
山松甲虫 (<i>Dendroctonus ponderosae</i> , ENN71422.1)	ESSDGNQ.VRGEYRVALFDGGRITRITQVWA	100
温带臭虫 (<i>Cimex lectularius</i> , XP_014249800.1)	AVSDGLV.VRGEYKVALFDGGRICITSSVAD	264
卤虫 (<i>Artemia franciscana</i> , ABS19965.1)	ETSDENGYVRESYQTLFDGGRVCTINQVAD	112
中华按蚊 (<i>Anopheles sinensis</i> , KFB45925.1)	AVSDGLV.TRGEYRVALFDGGRICITVRYTAD	159
大型蚤 (<i>Daphnia magna</i> , BAH23312.1)	ETSDEKV.VTESYRVALFDGGRICITIKKA	87
一致序列 (consensus)	d g y lpdqr q v y	
日本沼虾 (<i>M. nipponense</i> , KU316937)	HYN.EYVADQSEEAQYEE.....AKP	153
蛙疮痂鱼虱 (<i>Lepeophtheirus salmonis</i> , ADD24410.1)	AYN.EFVADQSEETPVYEK.....YEP	124
蛙疮痂鱼虱 (<i>L. salmonis</i> , ACO12414.1)	GYN.EFVADQSEETPSYEK.....YEP	117
蚤状蚤 (<i>D. pulex</i> , EFX71650.1)	DYS.EYVADQSEEAQYEEYKPSGYKPAE	122
山松甲虫 (<i>Dendroctonus ponderosae</i> , ENN71422.1)	DWKTEFHDQSEECQATYEDNKKYIFPPG	130
温带臭虫 (<i>Cimex lectularius</i> , XP_014249800.1)	WKN.EYVADQSEEAQYEE.....YEP	284
卤虫 (<i>Artemia franciscana</i> , ABS19965.1)	DYT.EYVADQSEEAQYEE.....YKPAY	135
中华按蚊 (<i>Anopheles sinensis</i> , KFB45925.1)	WKN.EYVADQSEEAQYEE.....YEP	179
大型蚤 (<i>Daphnia magna</i> , BAH23312.1)	DEN.EYVADQSEEAQYEE.....YEP	106
一致序列 (consensus)	g a v y g Y	

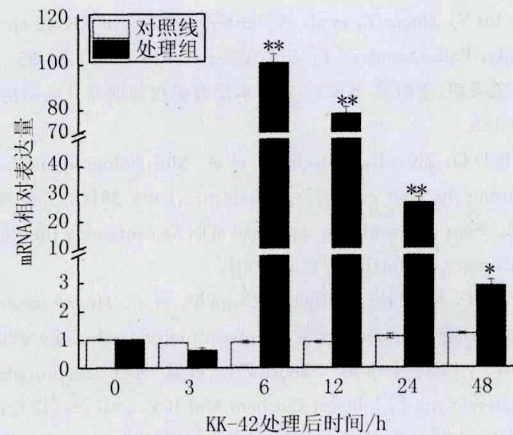
黑色: 相同水平为100%, 灰色: 相同水平≥50%.

图2 *MnCBP-1* 与其它物种的保守区域氨基酸序列比对结果



n=5/组织/蜕皮阶段. C: 蜕皮间期; D₀₋₂: 蜕皮前早期; D₃₋₄: 蜕皮前晚期. “**”表示与对照组C期相比, 有极显著差异(P<0.01).

图 3 日本沼虾 *MnCBP-1* 基因表达随蜕皮周期的变化



n=9/组/时间点; “*” “**” 分别表示与相应对照组比有显著或极显著差异(P<0.05, P<0.01); 下同.

图 4 KK-42对C期日本沼虾步足 *MnCBP-1* 基因表达的影响

KK-42 对步足内 *MnCBP-1* 基因表达的调节效应可能与蜕皮激素有关. 我们前期研究发现, KK-42 处理能够提高日本沼虾血淋巴中 20E 浓度^[15], 这可能导致蜕皮激素浓度的峰值提前出现, 与幼虾步足 *MnCBP-1* 在 C 期的高表达结果一致(图 4~6), *MnCBP-1* 转录水平的升高可能加快了新表皮的形成速度, 缩短了蜕皮

周期的时程,具体的分子机制还需进一步的研究.

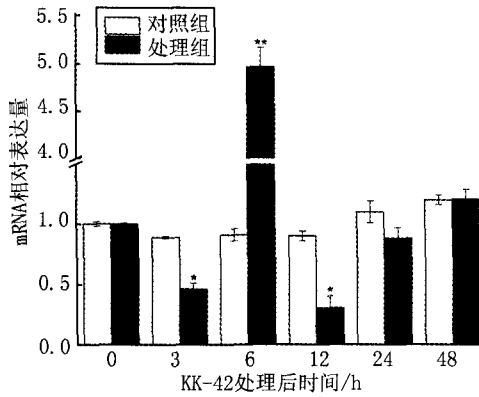


图5 KK-42对D0-2期日本沼虾步足MnCBP-1基因表达的影响

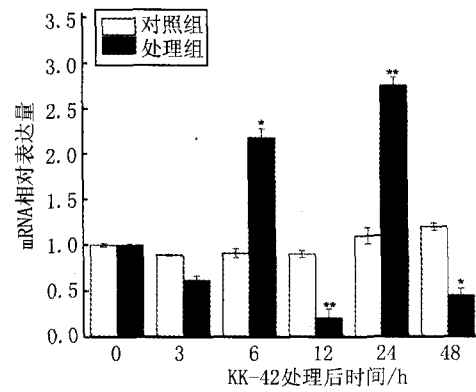


图6 KK-42处理对D3-4期日本沼虾步足内MnCBP-1基因的表达影响

参 考 文 献

- [1] Roer R, Abehsera S, Sagi A. Exoskeletons across the Pancrustacea: comparative morphology, physiology, biochemistry and Genetics [J]. Integrative and comparative biology, 2015, 55(5): 771-791.
- [2] Sritunyalucksana K, Utairungsee T, Sirikharin R, et al. Virus-binding proteins and their roles in shrimp innate immunity[J]. Fish & shellfish immunology, 2012, 33(6): 1269-1275.
- [3] Yudkovski Y, Glazer L, Shechter A, et al. Multi-transcript expression patterns in the gastrolith disk and the hypodermis of the crayfish *Cherax quadricarinatus* at premolt[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2010, 5(2): 171-177.
- [4] Shechter A, Glazer L, Cheled S, et al. A gastrolith protein serving a dual role in the formation of an amorphous mineral containing extracellular matrix[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(20): 7129-7134.
- [5] Jenkins J. Investigating the roles of cuticular proteins of the blue crab, *Callinectes Sapidus* using RNA interference[D]. Wilmington: University of North Carolina, 2010.
- [6] Tynyakov J, Bentov S, Abehsera S, et al. A novel chitin binding crayfish molar tooth protein with elasticity properties[J]. PloS one, 2016, 10(5): 11-10.
- [7] Guan J, Lü Y, Zhang Y, et al. A shortening effect of KK-42 on the moult cycle of juvenile *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (Decapoda, Palaemonidae)[J]. Crustaceana, 2016, 89(1): 85-95.
- [8] 吕艳杰, 陈香丽, 宁黔冀. KK-42 对日本沼虾蜕皮前期外骨骼结构及 NAGase 活力的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 130-133.
- [9] Cesar J R D O, Zhao B, Malecha S, et al. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 688-694.
- [10] Wynn A. Four differentially expressed cDNAs containing the Rebers-Riddiford consensus sequence in *Callinectes sapidus*[D]. Wilmington: University of North Carolina, 2004.
- [11] Yudkovski Y, Shechter A, Chalifa-Caspi V, et al. Hepatopancreatic multi-transcript expression patterns in the crayfish *Cherax quadricarinatus* during the moult cycle[J]. Insect molecular biology, 2007, 16(6): 661-674.
- [12] Soares M P, Elias-Neto M, Simoes Z L, et al. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(12): 1272-82.
- [13] Alizadeh C, Mitra T. Embryonic ecdysone-induced gene expression and progression of organ morphogenesis[M]. Sweden University of Gothenbury, 2011.
- [14] 孙汝江. 中华蜜蜂表皮蛋白基因的克隆与功能分析[D]. 济南: 山东农业大学, 2014.
- [15] 刘方, 陈香丽, 郭爱莲, 等. KK-42 对日本沼虾蜕皮激素及其受体表达的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2013, 41(4): 124-127.

Cloning and the Effect of KK-42 on Chitin-Binding Proteins Genes from the Cuticle of *Macrobrachium Nipponense*

ZHANG Yu, WANG Pei, LYU Yanjie, NING Qianji

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In order to investigate the possible molecular mechanism of KK-42 treatment shortening the duration of molting cycle of the juvenile prawn *Macrobrachium nipponense*, the part sequence of a chitin-binding protein gene-*MnCBP-1* was firstly cloned from pereopod cuticular tissue of *M. nipponense* and the bioinformatics analysis of the sequence was done. The expression level of the *MnCBP-1* as well as the effect of KK-42 on the gene expression were investigated using qRT-PCR. Results showed that the part sequence of the *MnCBP-1* contained 1396 bp in which the characteristic chitin-binding domain (chitin-bind-4) was included. The similarity of the deduced amino acid sequence for *MnCBP-1* was 44 % to *Daphnia pulex*. In pereopod cuticular tissue, qRT-PCR analysis revealed that the expression level of *MnCBP-1* increased continuously from stage D_{0-2} to stage D_{3-4} . The *MnCBP-1* mRNA transcripts in stage C significantly rose at 6~48 h after KK-42 treatment, but that in premolt increased only at some time points following KK-42 administration. In conclusion, our present results display that the change of the *MnCBP-1* expression is related to the molting cycle. The gene expression not only can be significantly up-regulated but also peak stage C in advance after KK-42 treatment, which may be one of the molecular mechanisms of KK-42 shortening the duration of molting cycle of the juvenile prawn *M. nipponense*.

Keywords: *Macrobrachium nipponense*; chitin-binding proteins; KK-42; clone; gene expression