

文章编号: 1000-0615(2018)05-0646-07

DOI: 10.11964/jfc.20170110689

日本沼虾N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶基因克隆 及KK-42对其表达的影响

吕艳杰, 关建义, 杜娟, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为进一步探究KK-42缩短蜕皮周期的分子机制, 本研究以日本沼虾幼虾为材料, 通过RACE技术克隆了几丁质降解途径中的限速酶基因NAGase cDNA全长序列, 定量测定了KK-42处理不同时间对头胸甲表皮组织中NAGase mRNA相对表达量和对应酶活力的影响。序列分析结果显示, NAGase cDNA全长2 536 bp, 编码617个氨基酸。同源性分析显示, NAGase基因保守性较低, 与凡纳滨对虾的相似度最高, 仅为68%。系统进化分析显示, 日本沼虾、三疣梭子蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾聚为一个大类, 凡纳滨对虾和中国明对虾亲缘关系更为接近, 日本沼虾单列一个分支。Real-time PCR分析表明, NAGase相对表达量在蜕皮前D₀期达到峰值; KK-42处理后3 h, D₄期的相对表达量是对照组的253%, 处理后6 h, C期和D₀期较对照组分别提高了226%和187%。NAGase酶活力从C期到D₄期逐渐提高, KK-42处理能明显提高C和D₀期NAGase酶活力, 尤其对C期的影响最为显著, 在处理3、6和12 h分别提高了11.26、5.99、7.15倍。结果提示, KK-42对日本沼虾表皮NAGase的诱导效应可能是其缩短蜕皮周期的分子机制之一。

关键词: 日本沼虾; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 克隆; KK-42

中图分类号: Q 459; S 917.4

文献标志码: A

几丁质(chitin)是甲壳动物表皮的主要成分, 后者在发挥支撑和防御作用的同时也制约了动物的生长, 因此, 伴随着几丁质降解和合成导致的新旧表皮更替(蜕皮过程)成为甲壳动物生长的关键环节。旧表皮中的几丁质在几丁质酶系的作用下形成寡聚片段和几丁质二糖, 再由N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAGase)分解成N-乙酰葡萄糖胺^[1], 参与新表皮的形成^[2]。NAGase作为几丁质降解途径中的限速酶, 在蜕皮周期形成中的重要性一直是相关领域研究的热点问题之一。

目前研究表明, 甲壳动物表皮NAGase受蜕皮激素的调控, 其酶活性的变化与蜕皮周期密切相关。在大型蚤(*Daphnia magna*)、锯齿长臂虾

(*Palaemon serratus*)、招潮蟹(*Uca ugilator*)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等甲壳动物中, NAGase酶活力峰值均出现在蜕皮前期, 且与蜕皮激素的含量呈正相关^[3-6]。对河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)的研究还发现, 摘除眼柄解除蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone)对蜕皮过程的抑制后, 表皮中的NAGase酶活力持续升高^[7]。为了进一步揭示NAGase酶的分子特征及酶促动力学性质, 多位学者采用分离纯化方法获得了纯酶制剂, 研究了该酶的分子量、等电点、氨基酸组成及酶促反应动力学等^[8-13], 但涉及基因水平的报道较少, 在GenBank中仅收录了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus* KF914 668.1)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus* KP968 829.1)^[14]、中国

收稿日期: 2017-01-13 修回日期: 2017-05-10

资助项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A240003); 河南师范大学青年科学基金(2015QK15); 天津市动植物抗性重点实验室开放基金(5201049160124)

通信作者: 宁黔冀, E-mail: nqjqj1964@163.com

明对虾(*Fenneropenaeus chinensis* DQ280 379.1)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* FJ888 482.1), 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的NAGase基因序列尚未见报道。

本实验室前期研究发现, 咪唑类物质KK-42可以显著缩短日本沼虾幼虾蜕皮周期的时间^[15], 推测NAGase可能是KK-42调控的靶目标。据此, 本文以日本沼虾幼虾为研究对象, 在获得表皮组织转录组测序数据的基础上, 利用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆到了NAGase cDNA全长序列, 并定量测定了KK-42处理前后表皮组织中NAGase mRNA相对表达量和对应酶活力的变化, 为阐明KK-42缩短蜕皮周期的机制积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取500尾健康日本沼虾(河南师范大学水产基地自行繁育)幼虾 [体长(2.0±0.5) cm], 饲养于水族箱中, 随机平均分为处理组和对照组。处理组经 1.95×10^{-4} mol/L的咪唑类物质KK-42(烟台大学应用化学系提供, 纯度≥95%)溶液浸泡1 min取出, 静置数秒控干水分后投入水族箱中, 常规饲养^[16]; 对照组用含0.01%(v/v, 体积比)乙醇的水溶液处理, 方法同上。分别于处理后0、3、6、12、24和48 h取处于不同蜕皮周期的幼虾头胸甲表皮用于实验测定, 蜕皮周期的鉴定参考已有文献^[17], 并稍加改进。实验均设置3个重复。

1.2 总RNA提取及cDNA第一链合成

采用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit试剂盒分别提取处理组和对照组蜕皮间期(C期)、蜕皮前期的早期(D₀期)、蜕皮前期的晚期(D₄期)日本沼虾头胸甲表皮RNA, 每3尾实验虾的头胸甲混合在一起为一个样品, 重复3次。按照RT MasterMix (Abm)试剂盒操作说明合成cDNA第一链。

1.3 日本沼虾NAGase cDNA全长克隆及序列鉴定

根据转录组测序提供的NAGase核心序列信息设计RACE引物NAGase-F1, NAGase-R1(表1), 采用SMARTer® RACE 5'/3'Kit (clontech) 试剂盒按照使用说明操作。

表1 实验中使用的引物

Tab. 1 Primers used in experiment

引物名称 primer name	引物序列(5'→3') sequence (5'→3')
NAGase-F1	GATTACGCCAAGCTTGCCCTGGGCTATTAGTTT
NAGase-R1	GATTACGCCAAGCTTAATGAGTGAGAATCCGTGA
NAGase-F	TTGACTGTGGGTTTGGTG
NAGase-R	GGTAAGATTTGTGGCTATTT
18S rRNA-F	TGTTACGGGTGACGGAGAA
18S rRNA-R	CATTCCAATTACGCAGACTCGG

1.4 生物信息学分析

将所获得的序列利用ORF finder分析软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框及蛋白翻译情况, 使用NCBI Blast P进行氨基酸序列同源性比对, 使用ProtParam软件(<http://au.expasy.org/tools/protparam>)预测蛋白理化性质, CD Search预测保守结构域, Singal P 4.1程序分析信号肽, Clustal W软件进行多序列比对分析, 将不同物种的氨基酸序列利用MEGA 6.0软件构建系统进化树。

1.5 日本沼虾NAGase mRNA相对表达量分析

根据获得的cDNA全长序列和18S rRNA cDNA (内参基因)序列设计Real-time PCR引物NAGase-F, NAGase-R, 18S rRNA-F, 18S rRNA-R(表1), 使用LightCycler 96(Roche) PCR仪, SYBR Green Master Mix试剂盒(Vazyme)按照使用说明进行。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析, 实验所得数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计分析($P < 0.05$)。

1.6 日本沼虾NAGase酶活力分析

酶活力的测定参照文献^[13]的方法并稍加改进。取幼虾头胸甲表皮组织, 每3尾虾混合为一个样品, 浸泡在预冷的0.1 mol/L磷酸缓冲液中, 冰浴匀浆20 s, 离心(4 °C、12 000 r/min)10 min, 取上清液用于酶活力分析, 每组设3个重复。

2 结果

2.1 日本沼虾NAGase cDNA全长克隆及分析

NAGase cDNA全长2 536 bp, 开放阅读框(ORF)长度为1 854 bp, 5'非翻译区(UTR)为382 bp, 3'UTR为300 bp, 该序列提交GenBank的注册号为KU522 433.1。

该基因编码的蛋白质由617个氨基酸残基组成,起始密码子(ATG)位于383 bp处,终止密码子(TAG)位于2 236 bp处,催化结构域特征保守位点分别为:R241、D384、E385、W442、W466、Y493、D495、W548和E550。经ExPASy网站预测,日本沼虾NAGase蛋白的理论分子量为69 ku,等电点为5.43。利用SignalP 4.1 server分析,显示该序列具有含23个氨基酸的信号肽,表明该蛋白可能属于分泌型蛋白。

2.2 同源性比对及系统进化树构建

经Blast P序列比对,结果显示,该序列与凡纳滨对虾的相似度最高为68%,其次是中国明对

虾,相似度为67%。保守结构域分析,发现日本沼虾NAGase氨基酸序列(220~597位氨基酸)含有糖苷水解酶20家族(GH20-HexA-HexB-like)保守域。将该段保守域氨基酸序列与凡纳滨对虾和中国明对虾的保守序列进行比对发现,相似度高达90.4%,且具有催化结构域特征保守位点。将日本沼虾NAGase氨基酸序列与GenBank中已上传的节肢动物(主要选取昆虫和甲壳动物)NAGase氨基酸序列,采用Clustal W和MAGA 6.0进行系统进化分析发现,日本沼虾、三疣梭子蟹、凡纳滨对虾、中国明对虾聚为一个大类,凡纳滨对虾和中国明对虾亲缘关系更为接近,日本沼虾单列一个分支(图1)。

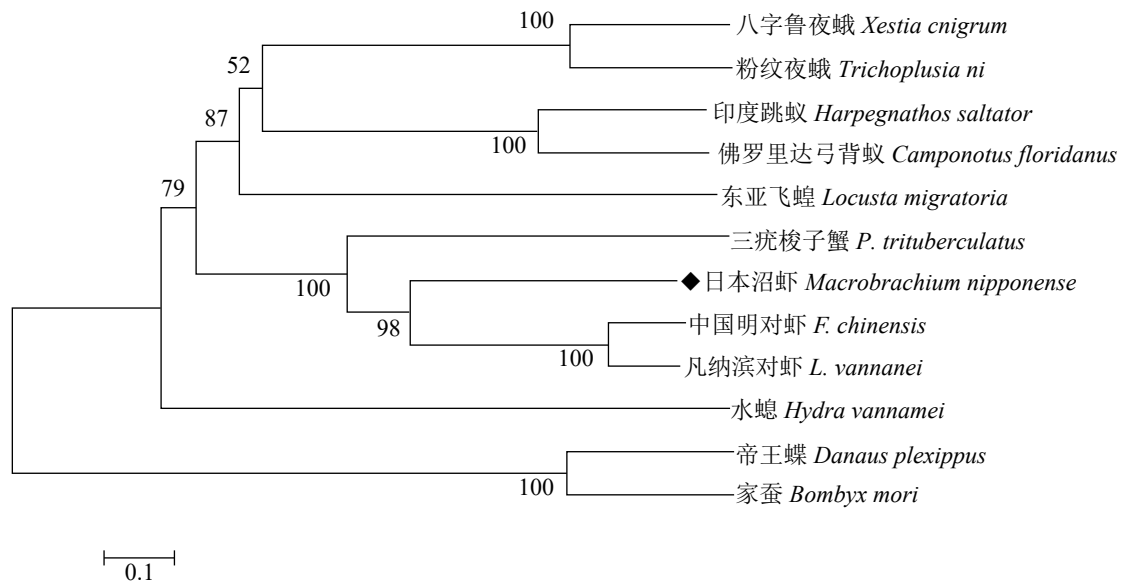


图1 基于NAGase氨基酸构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on NAGase amino acid sequences

2.3 KK-42对日本沼虾NAGase表达的影响

Real-time PCR结果显示, NAGase相对表达量在D₀期达到峰值, D₄期有所下降但高于C期(图2)。在所观察的3个蜕皮周期阶段, KK-42均可显著上调该基因的表达, 在处理3 h, D₄期的相对表达量是对照组的253%($P < 0.01$)(图3-c), 处理后6 h, C期和D₀期较对照组分别提高了226%和187%($P < 0.01$)(图3-a, b)。

2.4 KK-42对日本沼虾NAGase酶活力的影响

实验观察期间, 对照组NAGase酶活力从C期到D₀期再到D₄期逐渐升高, 但在同一蜕皮周期, 酶活力虽有一定的波动但无统计学差异

(图4, 5)。KK-42处理能明显提高C和D₀期NAGase酶活力(图5-a, b), 尤其对C期的影响最为显著, 处理组酶活力均高于对照组, 在3、6和12 h分别提高11.26、5.99和7.15倍($P < 0.01$)(图5-a)。

3 讨论

本研究首次从日本沼虾幼虾头胸甲表皮组织中克隆到了NAGase cDNA全长序列, 所编码的氨基酸序列中含有糖苷水解酶20家族(GH20-HexA-HexB-like)保守域和催化结构域特征保守位点, 并含有一段由23个氨基酸组成的信号肽, 推测该蛋白是一种属于几丁质酶系的分泌型蛋

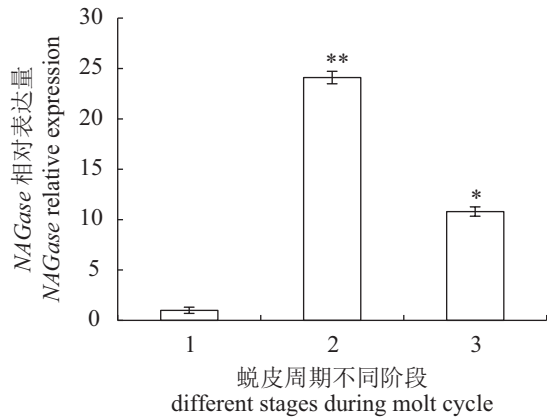


图2 不同蜕皮周期NAGase基因表达变化

1. C期(蜕皮间期), 2. D₀期(蜕皮前期的早期), 3. D₄期(蜕皮前期的晚期); *表示与C期相比, P < 0.05, 显著差异, **表示与C期相比, P < 0.01, 极显著差异; 下同

Fig. 2 Change of NAGase expression during different molt cycles

1. C stage (intermolt), 2. D₀ stage (early premolt), 3. D₄ stage (late premolt); * represents significant difference, P < 0.05, ** represents very significant difference, P < 0.01, vs. C stage; the same below

白。氨基酸序列同源性分析显示, 该序列与凡纳滨对虾的相似度最高, 相似度为68%, 其次是中国明对虾, 相似度达67%。日本沼虾与这两种虾尽管分类地位非常接近, 但其序列的相似性并不高, 只是在保守结构域的序列相似度可以达到90%以上, 表明该酶基因变异程度比较大, 这可能也是限制该酶基因通过传统设计兼并引物进行克隆的原因所在, 因此, 以往对于甲壳动物NAGase的研究大多集中在酶的分、纯化、活力的影响因素等, 而关于cDNA序列相对较少。本次实验为在分子水平开展该酶相关功能的研究及其调控机制奠定了基础。

Real-time PCR实验结果发现, 在不同的蜕皮周期中NAGase mRNA相对表达量呈波动性变化, D₀期最高, D₄期有所降低但高于C期; NAGase酶活力呈相似的变化趋势, 峰值出现在D₄期, 稍滞后于mRNA的表达峰值期, 这符合基因先转录后翻译的特征, 与招潮蟹和中华绒螯蟹的报道基本一致^[4, 6]。同时, 蜕皮前期也是各种生理机能以及表皮结构显著变化的时期, 作为几丁质降解的关键酶类, NAGase蛋白在此时期的高表达和高活力也可保证高效降解旧的外骨骼。

KK-42处理能显著诱导头胸甲表皮NAGase

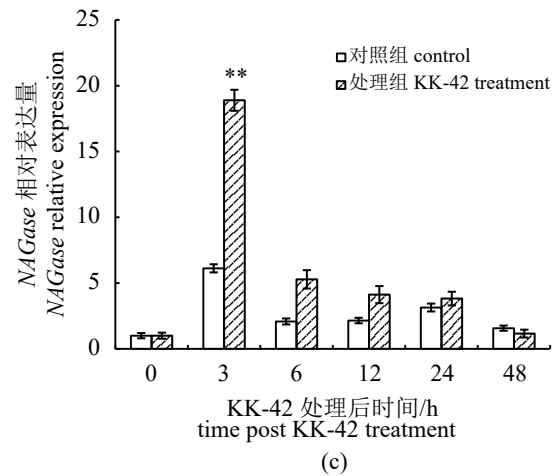
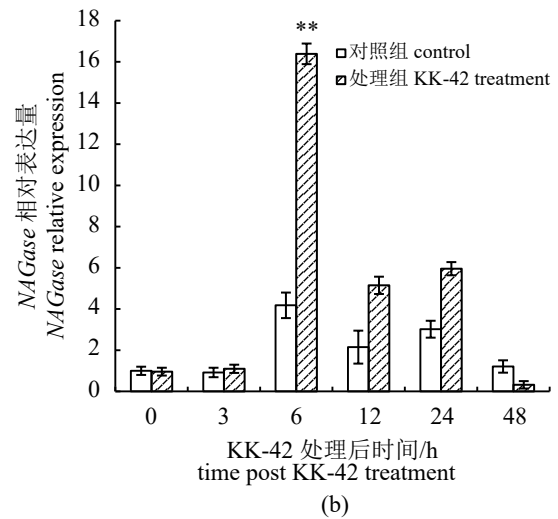
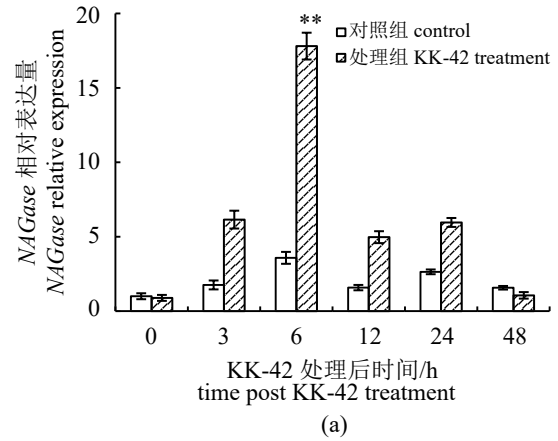


图3 KK-42处理对C、D₀及D₄期日本沼虾幼虾表皮NAGase表达的影响

n=9/组/时间点; (a) C期, (b) D₀期, (c) D₄期; *表示与相应对照组比有显著差异, P < 0.05, **表示极显著差异, P < 0.01; 下同

Fig. 3 Effects of KK-42 on cuticular NAGase expression in juvenile *M. nipponense* at C, D₀ or D₄ stage

n=9/each group/each time point; (a) C stage, (b) D₀ stage, (c) D₄ stage; * represents significant difference, P < 0.05, ** represents very significant difference, P < 0.01, vs. control group at the same time; the same below

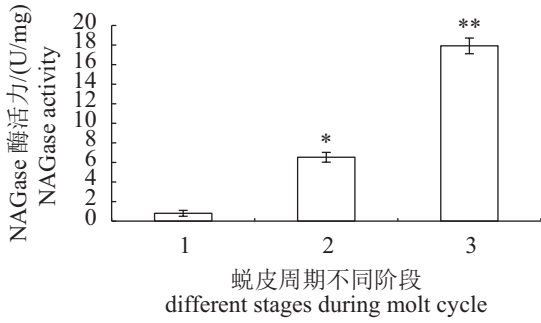
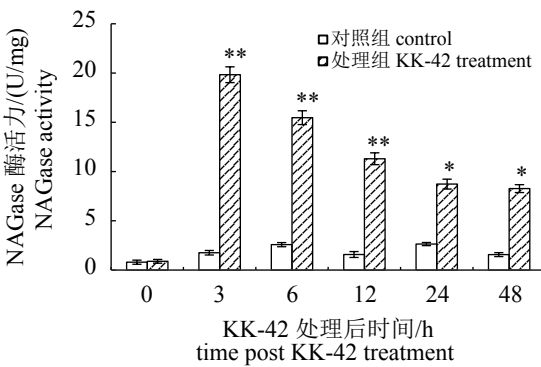
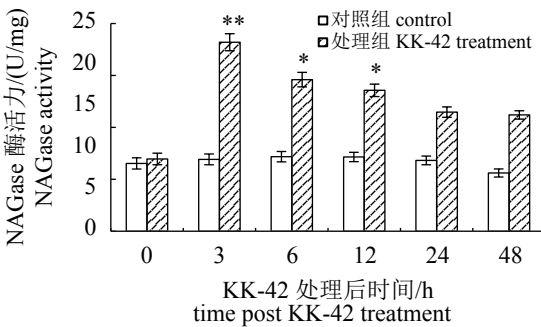


图4 不同蜕皮周期NAGase酶活力变化

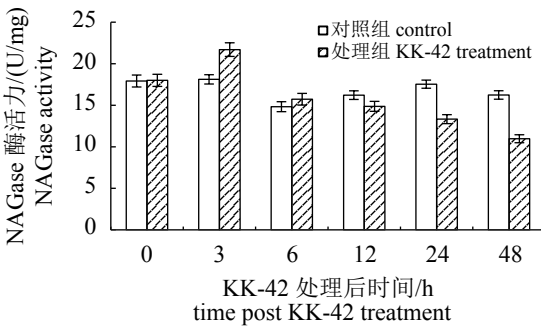
Fig. 4 Change of NAGase activity during different molt cycles



(a)



(b)



(c)

图5 KK-42对C、D₀及D₄期日本沼虾幼虾表皮NAGase酶活力的影响

Fig. 5 Effects of KK-42 on cuticular NAGase activity in juvenile *M. nipponense* at C, D₀ or D₄ stage

的表达, 在所观察的3个蜕皮周期阶段, KK-42均可显著上调该基因的表达, 与我们前期对凡纳滨对虾的研究结果一致^[18]。KK-42对酶活力的诱导效应主要表现在C期和D₀期, 与肝胰腺中获得的结果类似^[19]; 与对照组相比, KK-42对D₄期酶活性影响不大, 提示KK-42处理导致了酶活力的“峰值”提前出现, 进而加快了旧表皮的降解, 致使蜕皮周期缩短。由于NAGase等几丁质酶的降解会引起旧表皮结构的紊乱和疏松, 所以旧表皮的厚度也会发生相应的变化, 这与“KK-42处理能显著增加D₃期日本沼虾表皮厚度”的结果相符^[19]。我们前期研究表明, KK-42处理能提高日本沼虾幼虾血淋巴20E滴度^[20], 由此推测KK-42对NAGase的上调效应可能是通过蜕皮激素间接实现的。

参考文献:

[1] Zou E M, Bonvillain R. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an *in vivo* screen for molt-interfering xenobiotics[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2004, 139(4): 225-230.

[2] Lehane M J. Peritrophic matrix structure and function[J]. Annual Review of Entomology, 1997, 42(42): 525-550.

[3] Espie P J, Roff J C. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux[J]. Physiological Zoology, 1995, 68(5): 727-748.

[4] Zou E M. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption[J]. Integrative and Comparative Biology, 2005, 45(1): 33-38.

[5] Spindler-Barth M, Wormhoudt A V, Spindler K D. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle[J]. Marine Biology, 1990, 106(1): 49-52.

[6] Li X G, Xu Z Q, Zhou G, et al. Molecular characterization and expression analysis of five chitinases associated with molting in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 187: 110-120.

[7] 裴思慧, 落继先, 邹恩民, 等. 摘除眼柄对河南华溪蟹蜕皮激素与几丁质酶含量和β-NAGase活性的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(5): 677-683.

Pei S H, Luo J X, Zou E M, et al. Effects of eyestalk ab-

- lation on the ecdysone and chitinase levels and N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity of the freshwater crab (*Sinopotamon henanense*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(5): 677-683(in Chinese).
- [8] 田志环, 焦传珍, 康现江. 中华绒螯蟹蜕皮过程中鳃组织主要成分及N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶活性变化[J]. 淡水渔业, 2013, 43(3): 81-84.
- Tian Z H, Jiao C Z, Kang X J. Major constituents and N-acetyl-β-glucosaminidase activity changes in gills during the molt cycle of *Eriocheir sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(3): 81-84(in Chinese).
- [9] Zhang J P, Chen Q X, Wang Q, *et al.* Purification and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*)[J]. Biochemistry (Moscow), 2006, 71(S1): S55-S59.
- [10] 林建成, 林大河, 林秀春. 中国明对虾体壁N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及酶学性质[J]. 海洋科学, 2014, 38(8): 52-58.
- Lin J C, Lin D H, Lin X C. Isolation, purification and characterization of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from the integument of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Marine Sciences, 2014, 38(8): 52-58(in Chinese).
- [11] 陈欣颖. 克氏原螯虾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的性质及活力调控[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- Chen X Y. Some properties and activity regulation of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Procambarus clarkii*[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010(in Chinese).
- [12] Xie X L, Du J, Huang Q S, *et al.* Inhibitory kinetics of bromacetic acid on beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 41(3): 308-313.
- [13] 黄小红, 王寿昆, 黄一帆, 等. 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶初步纯化及部分性质[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 804-808.
- Huang X H, Wang S K, Huang Y F, *et al.* Preliminary purification and some properties of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from *Macrobrachium nipponense*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(6): 804-808(in Chinese).
- [14] Glazer L, Roth Z, Weil S, *et al.* Proteomic analysis of the crayfish gastrolith chitinous extracellular matrix reveals putative protein complexes and a central role for GAP 65[J]. Journal of Proteomics, 2015, 128(1): 333-343.
- [15] 关建义, 吕艳杰, 张宇, 等. KK-42对日本沼虾幼虾蜕皮周期的影响及其可能机制[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 867-872.
- Guan J Y, Lü Y J, Zhang Y, *et al.* Effect of KK-42 on the molt cycle of juvenile *Macrobrachium nipponense* and its possible mechanism[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(6): 867-872(in Chinese).
- [16] Ning Q J, Fu S G, Xu X J, *et al.* A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *Penaeus schmitti*[J]. Aquaculture, 2007, 270(1-4): 422-426.
- [17] Promwikorn W, Kirirat P, Thaweethamseewee P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2004, 26(5): 765-772.
- [18] 夏西超, 杨洪, 宁黔冀, 等. KK-42对凡纳滨对虾物质储备相关酶类基因表达的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 388-392.
- Xia X C, Yang H, Ning Q J, *et al.* The effect of KK-42 on the expression of nutritional storage-associated enzymes in the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 388-392(in Chinese).
- [19] 吕艳杰, 陈香丽, 郭爱莲, 等. KK-42对日本沼虾D₃期头胸甲表皮结构的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 1964-1969.
- Lü Y J, Chen X L, Guo A L, *et al.* Effect of KK-42 on the carapace structure in *Macrobrachium nipponense* during premolt D₃ stage[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 1964-1969(in Chinese).
- [20] 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.
- Liu F, Chen X L, Guo A L, *et al.* Effect of KK-42 on ecdysone and ecdysteroid receptor mRNA in *Macrobrachium nipponense*[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2013, 41(4): 124-127(in Chinese).

Molecular cloning of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (*NAGase*) gene and the effect of KK-42 on *NAGase* gene in *Macrobrachium nipponense*

LÜ Yanjie, GUAN Jianyi, DU Juan, NING Qianji*

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

Abstract: In order to further explore the molecular mechanism that KK-42 shortens the molt cycle of the juvenile prawn *Macrobrachium nipponense*, the full-length cDNA sequence of *NAGase*, the rate-limiting enzyme in chitin catabolism, was cloned from carapace by RACE technique. The relative expression of *NAGase* mRNA and its activity in cuticular tissue were determined before and after KK-42 treatment. Sequence analysis showed that the full length *NAGase* cDNA was 2 536 bp, encoding 617 amino acids. Homology analysis indicated that *NAGase* was less conserved and had the highest similarity of 68% to that from *Litopenaeus vannamei*. Phylogenetic analysis showed that the amino acid sequence of *NAGase* from *M. nipponense* was clustered into one major group with that from *Portunus trituberculatus*, *L. vannamei*, and *Fenneropenaeus chinensis*. The *NAGase* sequence from *L. vannamei* and *F. chinensis* shared more similarities with each other, *M. nipponense* belonged to a separate branch. The mRNA concentration of cuticular *NAGase* in control group peaked at premolt D₀ stage. Once treated by KK-42, the mRNA content increased significantly, with a 253% rise in D₄ phase at 3 h, as well as a 226% or 187% rise in C or D₀ phase at 6 h. The activity of *NAGase* rose gradually from C to D₄. KK-42 treatment could cause significant increase of *NAGase* activity in C and D₀ stages, especially in C stage, during which the activity increased by 11.26, 5.99 and 7.15 folds, respectively, at 3, 6 and 12 h. The results above suggest that the induction effect of KK-42 on the cuticular *NAGase* of *M. nipponense* may be one of the molecular mechanisms to shorten the molt cycle.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; N-acetyl- β -D-glucosaminidase; clone; KK-42

Corresponding author: NING Qianji. E-mail: nqjnqj1964@163.com

Funding projects: Basic Key Project of Science and Technology Research of Henan Province Educational Commission(14A240003); Youth Science Foundation of Henan Normal University(2015QK15); Open Fund of Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance (5201049160124)