



在体条件下 miR-305-5p 对日本沼虾 *MnCHT3A* 的靶向调控作用

岳凯迪, 陈柯, 杜鹃, 吕艳杰, 杨洪, 宁黔冀*

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为了探索 miRNA 对日本沼虾几丁质酶 3A(*Macrobrachium nipponense* chitinase 3A, *MnCHT3A*) 基因的调控作用, 实验采用生物信息学方法预测并筛选与 *MnCHT3A* 靶向结合的 miRNA——miR-305-5p; 利用 qRT-PCR、生物化学以及组织学方法, 研究了在体条件下, miR-305-5p 对靶基因的调控作用。结果显示, 一个蜕皮周期中 miR-305-5p 与 *MnCHT3A* 的表达量呈负相关, 前者 C 期最高、A 期最低; 而 *MnCHT3A* 的表达趋势则相反。注射 miR-305-5p mimics 和 miR-305-5p inhibitor 后, 与对照组相比, *MnCHT3A* 转录水平分别降低 60% 和升高 166%; *MnCHT* 酶活性分别降低 39.53% 和升高 133%。组织学观察发现, C 期的头胸甲表皮为 3 层结构, 由外向内依次为上表皮、外表皮和内表皮 (H.E 染色); 几丁质荧光染色结果显示, 几丁质分布在内、外表皮; 扫描电镜结果清晰显示了内、外表皮的板层结构。与对照组相比, miR-305-5p mimics 组内表皮的板层厚度增加, 呈蓝色荧光的几丁质条带有增厚趋势; 而 miR-305-5p inhibitor 组表皮结构紊乱, 几丁质荧光分布不均且部分区域明显减弱。研究表明, miR-305-5p 的靶基因为 *MnCHT3A*, 在体条件下, miR-305-5p 能够靶向抑制 *MnCHT3A* 的转录。

关键词: 日本沼虾; miRNA; 几丁质酶 3A; 调控

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

甲壳动物体表覆盖的坚硬表皮, 又称“外骨骼”, 限制其生长, 必须通过周期性蜕皮完成生长发育, 蜕皮周期的调控机制一直是相关领域的研究热点。几丁质是构成表皮的主要成分之一, 在蜕皮过程中, 几丁质酶通过水解 β -1, 4 糖苷键将几丁质聚合物或者寡聚物降解成几丁质单体^[1], 是参与旧表皮降解的关键酶, 其基因表达的变化与蜕皮周期密切相关^[2-3]。目前, 已经从三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)^[4]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[5] 和中华绒螯蟹

(*Eriocheir sinensis*)^[6] 等甲壳动物中克隆出多种几丁质酶 cDNA 全长序列, 根据基因的碱基序列以及结构等方面的差异, 将几丁质酶基因分为 6 类 (Group I~VI), 每一类又分为多个亚类, 分别用 A、B 等表示^[7-8]。日本沼虾几丁质酶 3A (*Macrobrachium nipponense* chitinase 3A, *MnCHT3A*) 基因属于 Group3, 初步研究显示, 该基因可能参与动物的胚后发育^[7]。

microRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物, 长度约为 20~24 个核苷酸的内源性非编

收稿日期: 2020-09-30 修回日期: 2021-03-19

资助项目: 河南省自然科学基金 (182300410033)

第一作者: 岳凯迪 (照片), 从事甲壳动物生长发育调控的研究, E-mail: yuekaidi@163.com

通信作者: 宁黔冀, E-mail: nqjnqj1964@163.com



码 RNA, 在转录后水平上具有多重的调控作用。在节肢动物中, 涉及 miRNA 参与调控生长发育的研究报道以昆虫为多, 甲壳动物相对较少。miR-263 直接抑制飞蝗 (*Locusta migratoria*) 几丁质酶 10 基因, 蝗虫的蜕皮呈缺陷表型, 影响其正常的蜕皮发育^[9]。在棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 中, miR-24 过表达可降低几丁质酶表达, 阻碍幼虫的蜕皮^[10]。在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 中, miR-4924 通过下调几丁质酶 1 的表达影响其幼虫的蜕皮发育行为^[11]。黄金米虾 (*Neocaridina heteropoda*) 注射 miR-26 agomirs, 可导致磷酸果糖激酶基因表达降低, 动物的蜕皮周期延长及个体变小^[12]。

本实验以日本沼虾为材料, 首先采用生物信息学方法, 预测筛选出了靶基因 *MnCHT3A* 对应的 miRNA(miR-305-5p); 在分子及组织学水平研究了注射 miR-305-5p mimics 和 miR-305-5p inhibitor 后, 头胸甲表皮组织 *MnCHT3A* 转录水平、酶活性、表皮结构的变化, 旨在揭示 miR-305-5p 对其靶基因 *MnCHT3A* 的调控作用, 为阐明甲壳动物蜕皮周期的调控机制积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取体长 (3.0±0.5) cm 的健康日本沼虾幼虾 (捕捞于河南省卫辉市) 饲养在实验室玻璃水族箱, 水温 (25±1) °C, 早晚各投喂 1 次, 1 周后用于实验。蜕皮周期的鉴定参照 Kirirat 等^[13]。

1.2 靶向 miRNA 的预测和筛选

在获得 *MnCHT3A* 全长和 Small RNA 测序 (miRNA-Seq) 的基础上, 筛选头胸甲表皮组织中特异表达的 miRNA。使用 NCBI GEO 中 miRNA 测序数据库对 miRNA 分析, 得到的 miRNA 作为靶向 miRNA; 使用 miRanda 和 RNAhybrid 对 *MnCHT3A* 的 3'UTR 靶向预测 miRNA, 根据 mRNA 和 miRNA 的序列匹配程度和形成复合结构的自由能, 筛选二者相同结果的 miRNA。

1.3 RNA 的提取

选取处于 C 期、D₀₋₂ 期、D₃₋₄ 期和 A 期的虾各 3 只, 分别取头胸甲表皮, 利用 Mini BEST Universal RNA Extraction Kit (TaKaRa) 试剂盒提取

总 RNA, 琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 完整, Nano Drop ONE(赛默飞世尔科技公司) 超微量紫外-分光光度计检测 RNA 纯度。

1.4 cDNA 和 miRNA 第一链的合成及定量分析

使用 HiScript QRT Super Mix for qPCR (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 反转录试剂盒, 总 RNA 反转录合成 cDNA。每一蜕皮周期与内参分别设置 3 个重复。再以 cDNA 为模板, 正向引物: 5'-GTCATTGCTTGACCTTCTACC-3', 反向引物: 5'-GACCTTGATCGC ATAATCAGCA-3', 使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 试剂盒实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *MnCHT3A* 的表达量。

使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 合成 miRNA 的 cDNA 第一链。再以产物为模板, 正向引物: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCAAATCGTGAAGCG-3', 反向引物: 5'-CTCAACTGGTGTCTGTG-GAGTCGGCAA-3'。每一蜕皮周期的不同阶段设置 3 个重复, 用 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 检测 miRNA 的表达量。

1.5 miR-305-5p 对在体 MnCHT3A 的靶向调控

根据 miRNA 的序列或者互补序列, 合成 miR-305-5p 模拟物 (mimics) 和抑制物 (inhibitor) (武汉金开瑞生物有限公司)。

选取 C 期的日本沼虾, 微量进样器从围心腔分别注射 DEPE 水 (对照组)、4 μg/g miR-305-5p mimics (miR-305-5p mimics 组) 和 4 μg/g miR-305-5p inhibitor (miR-305-5p inhibitor 组)。48 h 后, 对照组、miR-305-5p mimics 组再注射相同剂量, miR-305-5p inhibitor 组剂量加倍。168 h 后, 取头胸甲表皮组织, 分别用于 *MnCHT3A* 的 mRNA 水平测定、几丁质酶活性分析 (南京建成科技有限公司) 以及显微、亚显微结构观察。

1.6 表皮组织学观察

取头胸甲表皮 (3 只/组), 常规石蜡包埋及切片, 分别进行苏木精-伊红 (H.E) 染色、几丁质荧光染色 (FB28、碘化丙啶试剂) 观察表皮的显微结构, 扫描电镜 (JSM-7800F, JROL) 观察亚显微结构。

1.7 数据分析

实验所得数据用 SPSS 13.0 软件数据分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 显著、极显著差异分别用 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示。所有的数据结果均以平均值±标准差 (mean±SE) 表示。

2 结果

2.1 靶基因的预测与筛选

通过 miRanda 和 RNAhybrid 软件对 miRNA 测序数据库与 *MnCHT3A* 的 3'UTR 的分析, miR-305-5p 的 5'端 2~8 位种子区碱基互补配对 (图 1), 结合自由能较小 (-32.9 kcal/mol), 判定 miR-305-5p 的潜在靶基因为 *MnCHT3A*。

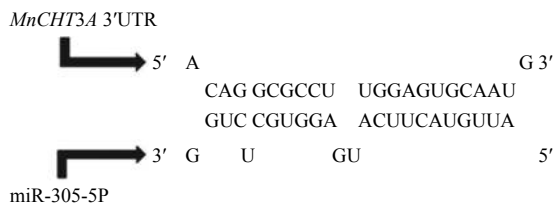
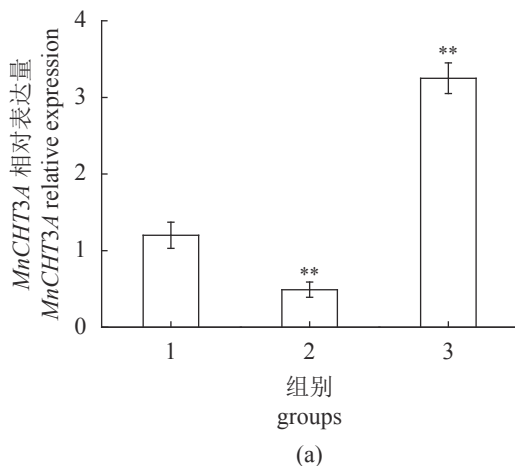


图 1 miR-305-5p 在 *MnCHT3A*-3'UTR 上的结合位点预测

Fig. 1 Predicted binding site of miR-305-5p in 3'UTR of *MnCHT3A*

2.2 miR-305-5p 和 *MnCHT3A* 在蜕皮周期中的表达趋势

MnCHT3A 表达量最低为 C 期, 至 A 期达到最



高; 而 miR-305-5p 的表达量变化则与之相反 (图 2)。

2.3 在体条件下, miR-305-5p 对 *MnCHT3A* 的靶向调控效应

靶基因转录水平的变化 qRT-PCR 结果显示, 与对照组相比, miR-305-5p mimic 组 *MnCHT3A* 表达量降低 60% ($P<0.01$), 而 miR-305-5p inhibitor 组 *MnCHT3A* 的表达量增加了 166% ($P<0.01$) (图 3-a)。结果表明, miR-305-5p 对其靶基因的转录具有抑制效应。

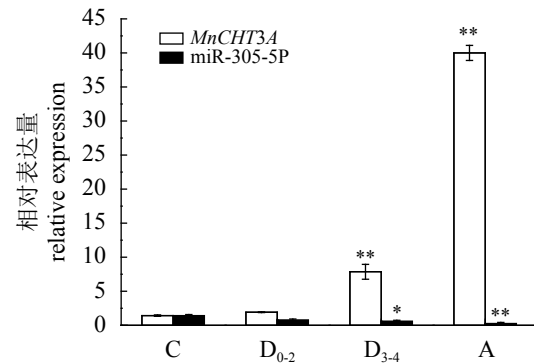


图 2 miR-305-5p 与 *MnCHT3A* 在蜕皮周期中的表达变化

C. 蜕皮间期, D₀₋₂. 蜕皮前早期, D₃₋₄. 蜕皮前晚期, A. 蜕皮后早期; n=9/蜕皮周期; *和**分别表示与 C 期相比, $P<0.05$ 和 $P<0.01$

Fig. 2 Expression analysis of miR-305-5p and *MnCHT3A* in different molting stages of *M. nipponense*

C. intermolt stage, D₀₋₂. early proecdysis, D₃₋₄. later proecdysis, A. early postmolt; n=9 / each cycle; *. $P<0.05$, **. $P<0.01$ vs. C stage

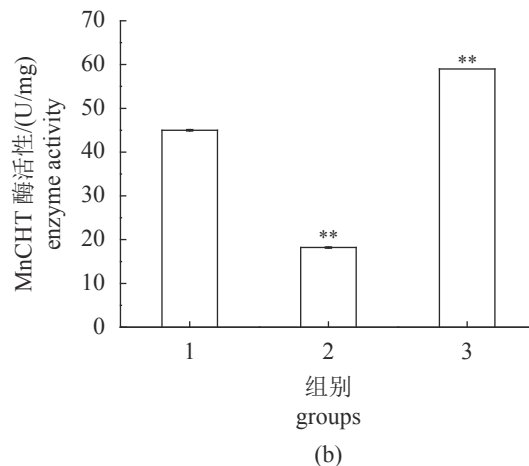


图 3 miR-305-5p mimic 和 miR-305-5p inhibitor 对 *MnCHT3A* 表达 (a) 和 MnCHT 酶活性 (b) 的影响

1. 对照组, 2. miR-305-5p mimic 组, 3. miR-305-5p inhibitor 组

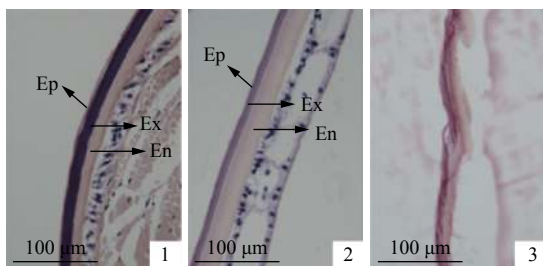
Fig. 3 Effects of miR-305-5p mimic and miR-305-5p inhibitor on *MnCHT3A* expression (a) and MnCHT enzyme activity (b)

1. control group, 2. miR-305-5p mimic group, 3. miR-305-5p inhibitor group

MnCHT 酶活性的变化 miR-305-5p mimic 组 MnCHT 酶活性极显著降低, 仅为对照组的 39.53% ($P < 0.01$); 而 miR-305-5p inhibitor 组酶活性显著升高, 为对照组的 133% ($P < 0.01$)(图 3-b)。

2.4 表皮的组织学观察

H.E 染色结果显示, C 期表皮分为 3 层, 由外向内依次为上表皮 (Ep)、外表皮 (Ex) 和内表皮 (En)(图版 I -1)。miR-305-5p mimic 组表皮结构正常且内表皮厚度增加 (图版 I -2), miR-305-5p inhibitor 组表皮结构紊乱 (图版 I -3)。



图版 I 注射 miR-305-5p mimic 和 miR-305-5p inhibitor 后表皮 H.E 染色结果

1. 对照组, 2. miR-305-5p mimic 组, 3. miR-305-5p inhibitor 组; Ep. 上表皮, Ex. 外表皮, En. 内表皮, 下同

Plate I H.E staining cuticle after miR-305-5p mimic or miR-305-5p inhibitor administration

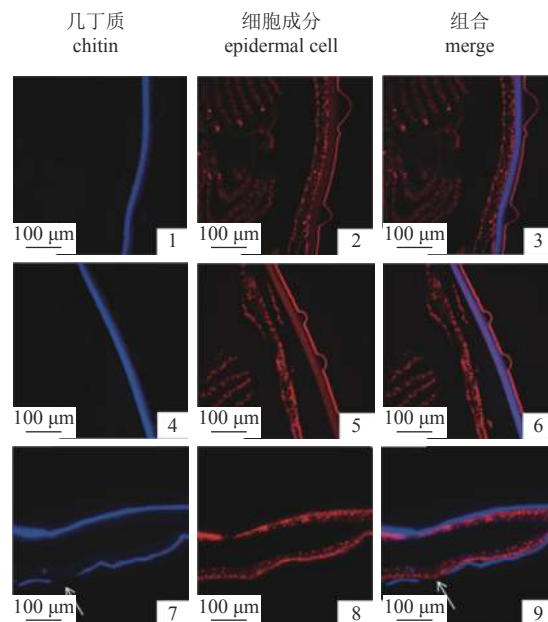
1. control group, 2. miR-305-5p mimic group, 3. miR-305-5p inhibitor group; Ep. epicuticle, Ex. exocuticle, En. endocuticle, the same below

通过 FB28 和 PI 两种染色剂染色表皮, 在荧光显微镜下含有几丁质成分的组织成蓝色阳性, 表皮的其他细胞成分被 PI 染成红色 (图版 II -2, 3)。位于外表皮和内表皮的几丁质成分被 FB28 染成了蓝色且分布较为均匀 (图版 II -1, 3)。相较于对照组, miR-305-5p mimic 组有几丁质分布的表皮层蓝色荧光增厚现象 (图版 II -4, 6), 而 miR-305-5p inhibitor 组几丁质荧光信号分布不均且部分区域减弱 (图版 II -7, 9)。

扫描电镜可以清晰看到表皮各层的结构 (图版 III -1), miR-305-5p mimic 组内表皮较对照组出现增厚现象 (图版 III -2), 与图版 I -2 结果一致; 而 miR-305-5p inhibitor 组表皮结构紊乱 (图版 III -3)。

3 讨论

miRNA 具有高度组织特异性、保守性和时序性^[14-16], 与靶基因结合引起的调控效应与二者的匹配程度有关^[17-18], 研究表明, 如果 miRNA

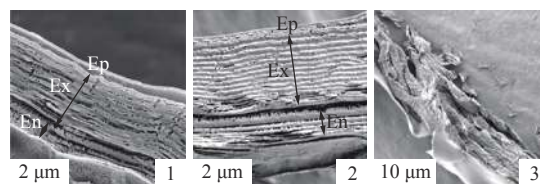


图版 II 注射 miR-305-5p mimic 和 miR-305-5p inhibitor 后表皮几丁质荧光染色结果

1~3. 对照组, 4~6. miR-305-5p mimic 组, 7~9. miR-305-5p inhibitor 组; 箭头指示荧光减弱区域

Plate II Fluorescence staining of epidermal chitin after injection of miR-305-5p mimic or miR-305-5p inhibitor

1-3. control group, 4-6. miR-305-5p mimic group, 7-9. miR-305-5p inhibitor group; arrows in 7 and 9 indicate fluorescence attenuation area



图版 III 注射 miR-305-5p mimic 和 miR-305-5p inhibitor 后表皮扫描电镜结果

1. 对照组, 2. miR-305-5p mimic 组, 3. miR-305-5p inhibitor 组

Plate III Epidermal scanning electron microscopic results after injection of miR-305-5p mimic and miR-305-5p inhibitor

1. control group, 2. injection of miR-305-5p mimic group, 3. injection of miR-305-5p inhibitor group

与 mRNA 的序列不完全匹配, 但只要位于 3'UTR 的种子序列与 mRNA 匹配, 也能实现对靶基因的调控^[19]。根据匹配程度和形成复合结构自由能的大小, 本实验筛选出了能靶向结合 *MnCHT3A* 的 miR-305-5p。 *MnCHT3A* 与 miR-305-5p 在蜕皮周期中的表达趋势呈负相关 (图 2), 初步印证了 miR-305-5p 对靶基因表达的抑制效应, 作用机理可能是 miRNA 与靶基因结合后直接抑制 mRNA

的翻译导致转录水平下降^[20], 也可能是通过影响 mRNA 的稳定性导致其降解^[21], 有待进一步研究。关于 *MnCHT3A* 的功能目前尚无确切的结论, 有学者认为该基因可能在降解围食膜等方面发挥作用^[2,7], 而本实验结果显示, *MnCHT3A* 在蜕皮周期中呈波动性变化, D₃₋₄ 期表达量较 C 期显著升高(图 2), 推测该基因参与旧表皮的降解。

理论上, 处于 C 期的甲壳动物表皮结构相对稳定, 几丁质酶水平变化相对较小^[2], 所以, 本实验选择 C 期的日本沼虾用于研究在体条件下 miR-305-5p 对靶基因的调控。注射 miR-305-5p mimic 后, *MnCHT3A* 的转录水平显著下降(图 3-a), MnCHT 酶活性相应地降低(图 3-b), 进一步验证了上述推测。组织学观察结果也支持上述推断, MnCHT 酶活性的降低可减慢表皮, 尤其是内表皮中几丁质降解的速率, 所以内表皮厚度相应增加(图版 I-2, 图版 III-2), 这与飞蝗表皮中几丁质酶 10 受到干扰时的结果一致^[9]。为了进一步说明 *MnCHT3A* 和 miR-305-5p 的靶向调控关系, 合成了 miR-305-5p inhibitor, 得到了与 miR-305-5p mimic 组相反的结果, 由于 miR-305-5p inhibitor 抑制了与靶基因的结合, 故 *MnCHT3A* 转录水平及 MnCHT 酶活性升高(图 3), 加快了表皮中几丁质的降解速率, 表皮结构出现紊乱(图版 I-3、图版 II-9、图版 III-3)。以上结果表明, *MnCHT3A* 是 miR-305-5p 的靶基因, 在体条件下 miR-305-5p 对 *MnCHT3A* 的表达具有抑制效应。

参考文献 (References):

- [1] 叶成凯, 卢志杰, Sarath B V, 等. 罗氏沼虾几丁质酶 3B 基因的克隆及其在蜕皮周期中的表达[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 751-762.
- Ye C K, Lu Z J, Sarath B V, *et al.* Cloning and expression analysis of chitinase-3B from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) during molting cycle[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 751-762 (in Chinese).
- [2] Guan J Y, Lv Y J, 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.
- [3] Zhang S Y, Jiang S F, Xiong Y W, *et al.* Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 30-40.
- [4] 张凤, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)几丁质酶 PtCht3 基因克隆鉴定及表达分析[J]. *渔业科学进展*, 2017, 38(2): 167-176.
- Zhang F, Lü J J, Liu P, *et al.* Cloning and expression analysis of the cDNA of *PtCht3* in *Portunus trituberculatus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 167-176 (in Chinese).
- [5] Huang Q S, Yan J H, Tang J Y, *et al.* Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 75-81.
- [6] 姚琴琴, 杨志刚, 王瑶, 等. 中华绒螯蟹几丁质酶基因 *HXchit* 全长 cDNA 克隆及其在蜕皮过程中的表达分析[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(2): 185-195.
- Yao Q Q, Yang Z G, Wang Y, *et al.* Full length cDNA cloning of the chitinase gene (*HXchit*) and analysis of expression during the molting cycle of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(2): 185-195 (in Chinese).
- [7] 张世勇. 青虾几丁质酶基因全长 cDNA 序列的克隆及时空表达分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- Zhang S Y. Six chitinases cDNA cloning and expression analysis during post-embryonic development and moulting cycle in *Macrobrachium nipponense*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [8] Zhu Q S, Arakane Y, Banerjee D, *et al.* Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(4): 452-466.
- [9] Yang M L, Wang Y L, Jiang F, *et al.* miR-71 and miR-263 jointly regulate target genes *Chitin synthase* and *Chitinase* to control locust molting[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(8): e1006257.
- [10] Agrawal N, Sachdev B, Rodrigues J, *et al.* Development associated profiling of chitinase and microRNA of

- Helicoverpa armigera* identified chitinase repressive microRNA[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2292.
- [11] Zhang Y L, Huang Q X, Yin G H, *et al.* Identification of microRNAs by small RNA deep sequencing for synthetic microRNA mimics to control *Spodoptera exigua*[J]. *Gene*, 2015, 557(2): 215-221.
- [12] Li R, Weng J Y, Ren L Q, *et al.* A novel microRNA and its *pfk* target control growth length in the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2020, 223(13): 223529.
- [13] Kirirat P, Promwikorn W, Thaweethamsewee P. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, 26(5): 765-772.
- [14] 范文涛, 钟杨生, 陈芳艳, 等. miRNA在动物胚胎形成、发育中的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(2): 91-94.
Fan W T, Zhong Y S, Chen Y F, *et al.* Research progress of miRNA regulation in animal embryo formation and development[J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(2): 91-94 (in Chinese).
- [15] Flynt A S, Lai E C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(11): 831-842.
- [16] 马圣运, 白玉, 韩凝, 等. miRNA*生物合成及其功能研究的新发现[J]. *遗传*, 2012, 34(4): 383-388.
Ma S Y, Bai Y, Han N, *et al.* Recent research progress of biogenesis and functions of miRNA*[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(4): 383-388 (in Chinese).
- [17] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F A, *et al.* Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(3): 331-341.
- [18] 朱文奇, 陈宽维, 李慧芳, 等. 动物miRNA的最新研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(11): 66-69.
Zhu W Q, Chen K W, Li H F, *et al.* The latest research progress of animal miRNA[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 36(11): 66-69 (in Chinese).
- [19] 李都悦, 黄伊子, 刘伟, 等. miRNA分析研究进展[J]. *湖南农业科学*, 2014(16): 14-17.
Li D Y, Hang Y Z, Liu W, *et al.* Progress in miRNA research[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2014(16): 14-17 (in Chinese).
- [20] Wang Y L, Yang M L, Jiang F, *et al.* MicroRNA-dependent development revealed by RNA interference-mediated gene silencing of *LmDicer1* in the migratory locust[J]. *Insect Science*, 2013, 20(1): 53-60.
- [21] Wienholds E, Plasterk R H A. MicroRNA function in animal development[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(26): 5911-5922.

Targeted regulation of miR-305-5p on *Macrobrachium nipponense* *MnCHT3A* gene *in vivo*

YUE Kaidi, CHEN Ke, DU Juan, LÜ Yanjie, YANG Hong, NING Qianji *

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

Abstract: In order to explore the regulatory effect of microRNA (miRNA) on *Macrobrachium nipponense* chitinase 3A(MnCHT3A) gene, bioinformatics approach was firstly used to predict and screen the miRNA--miR-305-5p bound specifically to *MnCHT3A*. Using qRT-PCR, biochemical and histological methods, the regulation of miR-305-5p on target gene *MnCHT3A* was studied *in vivo*. The results showed that the expression change of miR-305-5p was negatively correlated with *MnCHT3A* during the molting cycle of *M. nipponense*. The level of miR-305-5p peaked at stage C and was the lowest at stage A, while the expression trend of *MnCHT3A* mRNA was opposite. After injection of miR-305-5p mimics or miR-305-5p inhibitor, the transcription level of *MnCHT3A* was decreased by 60% or increased by 166%, and the activity of MnCHT enzyme, meanwhile, was decreased by 39.53% or increased by 133%, respectively compared with the control group. Histological results showed that a three-layer cuticle structure of carapace in stage C was observed by means of H-E staining, namely, epicuticle, exocuticle and endocuticle from outside to inside. The images of chitin fluorescence staining showed the presence of chitin in the exocuticle and endocuticle. Results from scanning electron microscopy clearly showed the lamellar structure of the exocuticle and endocuticle. Compared with the control group, a thickening trend in the endocuticle with the lamellae as well as the blue fluorescence chitin stripe was observed in miR-305-5p mimics group. But in miR-305-5p inhibitor group, the cuticular structure was disordered. Correspondingly, the blue fluorescence chitin stripe was not uniform and weakened in some areas. The results obtained above indicate that the target gene of miR-305-5p is *MnCHT3A*, and miR-305-5p can specifically inhibit the transcription of *MnCHT3A in vivo*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; miRNA; chitinase 3A; regulation

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

Funding project: Natural Science Foundation Project of Henan Province (182300410033)