

# 胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因新型真核表达载体的构建及其在盐藻中的表达<sup>\*</sup>

徐文琦 柴晓杰<sup>\*\*</sup> 张 婷 代靖宇 张晓琳

(大连海洋大学 海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室 大连 116023)

**摘要** 应用 PCR 技术扩增 *Nos* 基因、*CaMV35S* 启动子片段和氯霉素抗性基因 *Cat*, 并与胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因连接, 构建真核表达载体 pMDCKN-Cat。DNA 序列分析结果表明: 表达载体中的胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因、启动子 *CaMV35S*、终止子 *Nos* 和氯霉素抗性基因 *Cat* 与已知序列完全一致。采用 LiAc/PEG 介导法将质粒 pMDCKN-Cat 转化至盐藻细胞中, 通过氯霉素抗性基因筛选和 PCR 鉴定获得转基因盐藻细胞。经 Western blotting 检测, 在硝酸纤维素膜上出现清晰的条带, 分子量为 20.1 kDa, 证明胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因在盐藻中得到成功表达。

**关键词** 胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因 盐藻 LiAc/PEG 介导法 真核表达载体

**中图分类号** Q786

胰蛋白酶抑制剂 (trypsin inhibitor, TI) 是指具有抑制胰蛋白酶活性作用的多肽或蛋白质, 是一种重要的生化药物和生化试剂。在临床上, TI 对急性胰腺炎、肺气肿、休克、脑水肿和脑缺血等都有很好的临床治疗效果<sup>[1]</sup>。近年来还发现大豆胰蛋白酶抑制剂具有明显的抗病毒、抗肿瘤的作用<sup>[2-4]</sup>, 同时它也是一种天然抗虫物质, 在植物体内发挥着自我防御的作用, 研究表明: Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂 (Kunitz soybean trypsin inhibitor, KSTI) 可抑制昆虫蛋白酶活性, 阻碍昆虫消化蛋白质, 尤其对鳞翅目昆虫有较强的抑制作用<sup>[5-7]</sup>。因而, 作为新型生物药物显示出广阔的应用前景。目前, 胰蛋白酶抑制剂的主要来源是从人尿、大豆和南瓜中提取, 但成本较高、有化学试剂残留, 尤其是从人尿中提取易受到病原微生物 (如病毒等) 的污染, 分子量较大, 可引起过敏反应等<sup>[8]</sup>。如果能开发一种安全、高效的新型生物反应器, 利用基因工程技术高效表达 TI, 将为胰蛋白酶抑制剂的获得提供一条新途径。

盐藻 (*Dunaliella salina*), 是一种无细胞壁的单细胞真核绿藻, 为天然的原生质体, 能在高盐条件下生长不易污染其它微生物, 同时盐藻培养条件简单, 营养价

值高, 尤其是含有丰富的  $\beta$ -胡萝卜素, 而且盐藻能对真核蛋白进行准确的翻译后加工, 能够产生具有天然活性的重组蛋白。因而, 盐藻作为新型的生物反应器较之常规的微生物发酵、哺乳动物细胞、转基因动物和高等植物等生产体系, 具有独特的优越性, 其开发潜力巨大<sup>[9-11]</sup>。为此, 本研究采用基因工程技术构建胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 基因的真核表达载体, 利用 LiAc/PEG 介导法将其导入盐藻细胞, 使其在盐藻生物反应器内高效表达, 从而为生物药物的开发提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 藻种和实验动物 盐藻藻种 *Dunaliella salina* 由大连海洋大学水生生物学实验室提供, 新西兰大白兔购自大连医科大学实验动物中心。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 DH5 $\alpha$ , 质粒 pBI121、pCambia2201、pMDKSTI3<sup>[12]</sup> (由柴晓杰构建) 均由本室保存, pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶、Taq 酶、溶菌酶、T4DNA 连接酶、DNA Marker DL-2000 分子量标准购自 TaKaRa 公司, 孔径 0.2  $\mu$ m 的硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, LiAc、PEG、胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3*、牛

收稿日期: 2011-02-03 修回日期: 2011-05-30

<sup>\*</sup> 辽宁省教育厅资助项目 (2008T023)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者, 电子信箱: cxj63@126.com.cn

血清白蛋白、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司,BCIP、NBT 购自 Amersco 公司,其他试剂均为国产分析纯。盐藻培养液为康威试液。

1.1.4 引物设计与合成 利用 Primer Premier5.0 软件设计特异性引物,由 TaKaRa 公司合成(表1)。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

Gene	Sequences(5' ~ 3')	Length of PCR products(bp)
Nos	P1:CTCGACGATCGTTCAAACATTTGG	256
	P2:CTGCAGCCCGATCTAGTAACATAG	
CaMV35S	P1:GGCGGTACCAGATTAGCCTTTTCAAT	835
	P2:TTAGGATCCCGTGTCTCTCCAAATG	
Cat	P1:CTGCAGATGGAGAAAAAATCACTGGAT	660
	P2:GCATGCTTACGCCCGCCCT	

## 1.2 方法

1.2.1 Nos 基因的克隆与中间载体 pMDNos 的构建 根据已发表的序列设计引物(含有 Sal I 和 Pst I 酶切位点)(表1),以 pBI121 为模板扩增 Nos 基因。以 pBI121 为模板,进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系为:MgCl<sub>2</sub> 4.0μl,10× Buffer 5.0μl,dNTP 4.0μl,引物各 1μl(50pmol/L),模板 DNA 0.1μg,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50μl。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30s,55℃复性 30s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物回收后,与 pMD18-T 载体连接。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,在含有 100μg/L 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上进行选择培养。挑取阳性克隆用碱裂解法提取质粒,经 PCR 检测和酶切鉴定,得到重组克隆 pMDNos。

1.2.2 中间载体 pMDKN 的构建 用 BamH I 与 Xba I 酶切质粒 pMDKSTI3(KSTI3 基因两端含有 BamH I 与 Xba I 酶切位点)和 pMDNos,回收 KSTI3 片段和载体大片段。用 T4 连接酶连接,构建中间载体 pMDKN。转化 E. coli DH5α,挑取阳性克隆用碱裂解法提取质粒 DNA,酶切鉴定。

1.2.3 CaMV35S 启动子基因的克隆与中间载体 pMDCKN 的构建 设计引物序列(含有 KpnI 和 BamHI 酶切位点)(表1),以 pBI121 质粒为模板,扩增 CaMV35S 片段回收目的片段,并与 pMD-18T 连接,转化,挑取阳性克隆,提取质粒,用 KpnI 和 BamHI 酶切,得到目的片段 CaMV35S;用同样的方法酶切中间载体 pMDKN,得到大

片段,然后将目的片段与大片段连接,构建中间载体 pMDCKN。转化,挑取阳性克隆,酶切鉴定。

1.2.4 Cat 的克隆与表达载体 pMDCKN-Cat 的构建 以质粒 pCambia2201 为模板,根据已发表的氯霉素(Cat)基因序列,设计引物序列(含有 PstI 和 SphI 酶切位点)(表1),扩增 Cat 基因,电泳回收目的片段,与 pMD-18T 连接,转化 E. coli DH5α,挑取阳性克隆,提取质粒,用 PstI 和 SphI 酶切,得到目的片段 Cat;用同样的方法酶切中间载体 pMDCKN,回收大片段,并与目的片段连接,构建表达载体 pMDCKN-Cat。转化 E. coli DH5α,挑取阳性克隆,酶切鉴定,并将正确的重组克隆进行测序。

1.2.5 盐藻 pMDCKN-Cat 表达载体的遗传转化与筛选

采用本实验室发明的盐藻新型遗传转化方法—LiAc/PEG 法(专利已公开),盐藻细胞采用 10<sup>5</sup> 个/ml 接种量(培养条件:25℃,1250lx 光强,12 h 光照/12 h 黑暗交替静置培养)培养 5 d;取 10 ml 藻液 4000 r/min 离心 10 min,将沉淀悬浮于 TE 缓冲液中,取 1 ml 悬浮液和 0.5 ml 0.2 mol/L LiAc 混合;取 10 μl(600 μg/ml)质粒 DNA 和 0.1 ml 上述混合液于 29℃水浴中保温 30 min;加入 0.1 ml 70% PEG 29℃保温 1 h;加 1.5 ml 无菌海水 4000 r/min 离心 10 min;将沉淀悬浮于 20 ml 培养液中于 26℃孵育 48 h。加入 60μg/ml 氯霉素初步筛选,同时做一个未加表达质粒却加氯霉素的阴性对照,以及一个未加氯霉素的野生型空白对照。一周后将筛选的转基因藻液涂于含有 100μg/ml 氯霉素的固体培养基上作进一步筛选培养,同时用野生型做一个空白对照。待单藻落长出后,挑取至含 80μg/ml 氯霉素的液体培养基中筛选培养。

1.2.6 转基因盐藻的 PCR 检测 分别取野生型与已筛选的转基因藻株,用改良的 CTAB 法提取 DNA 作为模板,采用胰蛋白酶抑制剂 KSTI3 引物进行 PCR 扩增。反应体系:10× Buffer 5.0μl,MgCl<sub>2</sub> 4.0μl,dNTP 4.0μl,引物各 1μl(50pmol/L),盐藻 DNA 0.1μg,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50μl。反应条件:94℃预变性 5min;94℃变性 30s,55℃复性 30s,72℃延伸 1min,30 个循环,72℃延伸 10min。

1.2.7 胰蛋白酶抑制剂 KSTI3 抗血清的制备与 Western blotting 将胰蛋白酶抑制剂 KSTI3 纯品制成浓度为 200μg/ml 的溶液,免疫新西兰大白兔,首次注射 1ml,15d 后进行等量加强免疫,7d 后第二次等量加强免疫,并于 7d 后采血,制备抗血清。

分别取转基因与野生型藻 20ml(1×10<sup>6</sup> 个/ml)离心收集藻细胞,用 PBS 重悬,进行细胞破碎,离心,取上

清,加入上样缓冲液,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至硝酸纤维素膜上、封闭、一抗与碱性磷酸酶标记的二抗分别于 37℃ 孵育 1h、NBT/BCIP 显色后拍照。

2 结果与分析

2.1 终止子 *Nos* 基因的克隆与中间载体 pMDNos 的构建

终止子 *Nos* 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到约 250bp 大小的单一扩增带,这与预期结果一致;回收目的片段,与 pMD18-T 载体连接。连接产物转化 *E. coli* DH5α,筛选出 8 个阳性克隆,经 *Sal* I 和 *Pst* I 双酶切,得到一条 256bp 的插入片段;用 *Sal* I 单酶切,得到一条 268bp 的条带与预期一致(图 1),说明目的片段插入在载体 pMDNos 上并且方向正确。

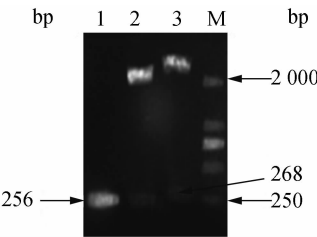


图 1 重组克隆 pMDNos 的酶切鉴定  
Fig. 1 Restriction enzyme analysis of the recombinant clone

M:DL2000 DNA marker;1:PCR product of *Nos*;2:pMDNos/*Sal*I + *Pst* I;3:pMDNos/*Sal* I

2.2 中间载体 pMDKN 的构建

酶切载体 pMDKSTI3 与 pMDNos,得到 *KSTI3* 基因与载体大片段,连接,构建中间载体 pMDKN。经 *Bam*H I 与 *Xba* I 酶切检测,得到的基因片段为 654bp 与 *KSTI3* 基因大小一致(图 2),表明 *KSTI3* 基因已经连接到载体上。

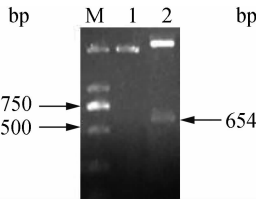


图 2 重组克隆 pMDKN 的酶切鉴定  
Fig. 2 Restriction enzyme analysis of the recombinant pMDKN

M:DL2000 DNA marker;1:plasmid pMDKN;2:pMDKN/*Xba* I + *Bam*H I

2.3 *CaMV35S* 启动子的克隆与中间载体 pMDCKN 的构建

*CaMV35S* 启动子基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到一条 835bp 大小的特异带与预期一致,回收目的片段,并与 pMD-18T 连接,构建克隆载体 pMDCaMV35S。用 *Kpn*I 和 *Bam*H I 酶切 pMDCaMV35S 与 pMDKN,得到 *CaMV35S* 启动子基因片段与载体大片段,连接,构建中间载体 pMDCKN。经酶切鉴定,得到一条 835bp 大小的插入片段(图 3),说明 *CaMV35S* 启动子基因已成功连接到 pMDKN 载体上。

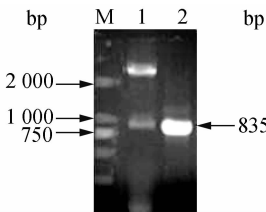


图 3 重组克隆 pMDCKN 的酶切鉴定  
Fig. 3 Restriction enzyme analysis of the recombinant pMDCKN

M:DL2000 DNA marker;1:pMDCKN/*Kpn* I + *Bam*H I;2:PCR product of *CaMV35S*

2.4 抗性基因 *Cat* 的克隆与表达载体 pMDCKN-Cat 的构建

抗性基因 *Cat* 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到一条 660bp 大小的单一条带与预期一致。回收目的片段,与 pMD-18T 连接,构建克隆载体 pMDCat。酶切 pMDCat 与 pMDCKN,得到 *Cat* 基因片段与载体大片段,连接,构建中间载体 pMDCKN-Cat,用 *Pst* I 和 *Sph* I 做双酶切,得到一条与 PCR 产物大小一致的片段(图 4),说明 *Cat* 基因插入在 pMDCKN 载体上。

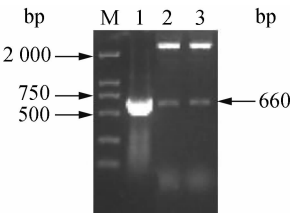


图 4 重组克隆 pMDCKN-Cat 的酶切鉴定  
Fig. 4 Restriction enzyme analysis of the recombinant pMDCKN-Cat

M:DL2000 DNA marker;1:PCR product of *Cat* gene;2,3:pMDCKN-Cat/*Pst* I + *Sph* I

经 DNA 序列分析,结果表明,终止子 *Nos* 基因、目的基因 *KSTI3*、*CaMV35S* 启动子基因、抗性基因 *Cat* 序列与已知一致并按照正确的顺序连接到 pMD-18T 载体中,表明表达载体 pMDCKN-Cat 得到成功构建。

## 2.5 目的基因的转化及转基因盐藻的 PCR 检测

用 LiAc/PEG 法转化盐藻,并加入 60 μg/ml 氯霉素进行初步液体筛选,7d 后转化藻株与空白对照无明显变化,呈现绿色,阴性对照全部死亡。将初步筛选的 100 μl 转化藻液涂于含 100 μg/ml 氯霉素的固体培养基上培养约 45d,出现绿色单藻落,经计算得到 170 个转化单藻落/μgDNA,而野生型在该固体培养基上没有任何生长(图 5)。挑取单藻落于含 80 μg/ml 氯霉素的液体培养基中扩大培养。用野生型和筛选的转基因盐藻 DNA 作为模板,PCR 扩增 *KSTI3* 基因,结果转基因盐藻的 PCR 产物大小与目的基因一致。而阴性对照组没有出现该条带(图 6)。

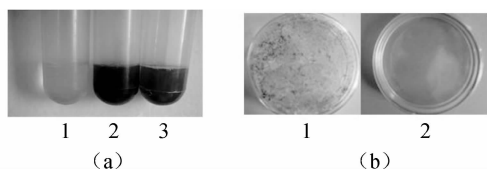


图 5 转化子的筛选

Fig. 5 Selection of *D. salina* transformant

(a) 1: Wild-type *D. salina* with chloramphenicol 2: Transformed *D. salina* with chloramphenicol 3: Wild-type *D. salina* control  
(b) 1: Transformed *D. salina* with chloramphenicol 2: Wild-type *D. salina* with chloramphenicol

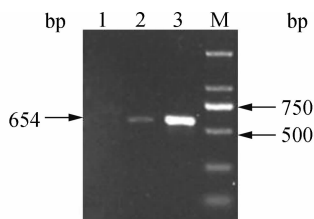


图 6 转基因盐藻的 PCR 检测

Fig. 6 The PCR analysis of transgenic *D. salina*

M: DL2000 DNA marker; 1: Wild-type *D. salina*; 2: Transgenic *D. salina*; 3: Positive control

## 2.6 转基因盐藻的 Western blotting 检测

将胰蛋白酶抑制剂注射新西兰大白兔,4 周后采血,制备血清即胰蛋白酶抑制剂 *KSTI3* 抗体。分别取转基因盐藻与非转基因盐藻,离心收集藻细胞,细胞破碎后制备可溶性蛋白样品,考马斯亮蓝法测定蛋白质

的浓度,取 20 μl (100 μg) 样品进行 SDS-PAGE 电泳,电转印至硝酸纤维素膜,经过封闭、一抗与二抗孵育、显色等过程,结果显示转基因盐藻出现清晰的杂交带,而非转基因盐藻没有出现杂交信号(图 7)。说明胰蛋白酶抑制剂基因在盐藻细胞内得到了成功表达。

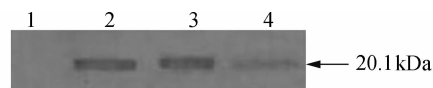


图 7 转基因盐藻的 Western blotting

Fig. 7 Western blotting of transgenic *D. salina*

1: Wild-type *D. salina*; 2: Positive control; 3, 4: Transgenic *D. salina*

## 3 讨论

载体的构建是研究外源基因表达的重要前提,目前盐藻遗传转化多用植物表达载体。但由于植物表达载体分子量较大(通常 >10kb),这使得载体的构建和目的基因的转化都很困难,并且还会影响目的基因的表达。为了解决这些问题,本实验尝试将 pMD18-T 作为初始载体,将组成型启动子 *CaMV35S*、终止子 *Nos* 和盐藻的筛选基因 *Cat* 进行亚克隆再连接到载体上,构建表达载体的基本框架,最后将外源基因 *KSTI3* 插入到启动子下游,成功地构建了分子量约为 4000bp 的真核表达载体。

盐藻作为一类极端耐盐的单细胞真核绿藻,没有细胞壁,是天然的原生质体,在遗传转化方面比高等植物操作更加简便。目前常用的遗传转化方法有电转化法<sup>[13]</sup>、基因枪法<sup>[14]</sup>和玻璃珠转化法<sup>[15]</sup>,其中电击法与基因枪法需要昂贵的仪器设备、操作复杂、实验耗材成本高;玻璃珠法虽然操作简单,但转化后细胞成活率不高。本室采用 LiAc/PEG 介导法转化盐藻细胞,该法与以上三种方法相比,操作简单,成本低廉,对细胞的损伤较小,且转化率较高,为盐藻转化系统的建立提供了新方法。

外源基因被导入盐藻细胞后,能否表达是研究转基因盐藻生物反应器最重要的一步。目前的研究表明,大多外源基因如报告基因 β-葡萄糖苷酸酶(*GUS*)<sup>[13]</sup>、抗草丁膦基因(*Bar*)<sup>[14]</sup>、氯霉素乙酰转移酶基因(*CAT*)<sup>[15]</sup>、增强型绿色荧光蛋白报告基因(*EGFP*)<sup>[16]</sup>都在盐藻中得到了瞬时表达;而外源基因在盐藻中稳定表达的例证则相对较少,Geng 等<sup>[17]</sup>构建的含有乙肝病毒表面抗原基因(*HBsAg*)的载体在盐藻中得到了长达 60 代的稳定表达。本实验得到的转基因

藻株在生长 30 代时仍能够得到稳定的表达,这与构建的表达载体和 LiAc/PEG 介导转化法的共同作用是密不可分的。因而,这种方法为外源基因在盐藻生物反应器中的稳定表达提供了一条新途径。

### 参考文献

- [1] 蔡祖花,王凤山,张天民. 胰蛋白酶抑制剂的临床研究概况. 中国生化药物杂志,2000,21(3):157-159.  
Cai Z H, Wang F S, Zhang T M. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2000, 21(3):157-159.
- [2] 薛晓鸥,张少娟,谢伟,等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对子宫内膜癌细胞增殖影响的实验研究. 北京医学, 2008, 30(4): 251-253.  
Xue X O, Zhang S J, Xie Wei, et al. Beijing Medical Journal, 2008, 30(4):251-253.
- [3] 刘同祥,张少娟,艾浩,等. 大豆胰蛋白酶抑制剂抑制肺癌 PG 细胞生长及诱导细胞凋亡的研究. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2180-2181.  
Liu T X, Zhang S J, Ai Hao, et al. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(9):2180-2181.
- [4] Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. Clin Exp Metastasis, 2004, 21(2):159-166.
- [5] Ceci L R, Volpicella M, Rahbe Y. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. Plant J, 2003, 33(3):557-566.
- [6] Baldwin I T, Halitschke R, Kessler A, et al. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. Plant Biology, 2001, 4(4):351-358.
- [7] Lee S I, Lee S H, Koo J C, et al. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper in transgenic rice. Molecular Breeding, 1999, 5(1):1-9.
- [8] 谭竹钧,沈明才,张峰,等. 胰蛋白酶抑制剂研究进展. 广东工业大学学报, 2007, 24(3):6-10.  
Tan Z J, Shen M C, Zhang F, et al. Journal of Guangdong University of Technology, 2007, 24(3):6-10.
- [9] Tara L Walker, Saul Purton, Douglas K Becker et al. Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep, 2005, 24(11):629-641.
- [10] Nikookar K, Moradshahi A, Hosseini L. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. Biomol Eng, 2005, 22(4):141-146.
- [11] 柴玉荣,王天云,薛乐勋. 新型生物反应器—杜氏盐藻研究进展. 中国生物工程杂志, 2004, 24(2):30-33.  
Chai Y R, Wang T Y, Xue L X. China Biotechnology, 2004, 24(2):30-33.
- [12] 柴晓杰,吕品,张宇,等. 胰蛋白酶抑制剂 *SKTI3* 基因的克隆及其植物表达载体的构建. 大连水产学院学报, 2007, 22(5):384-386.  
Chai X J, Lv P, Zhang Y, et al. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(5):384-386.
- [13] 耿德贵,王义琴,李文彬,等. GUS 基因在杜氏盐藻细胞中的瞬时表达. 高技术通讯, 2002, 12(2):35-39.  
Geng D G, Wang Y Q, Li W B, et al. High Technology Letters, 2002, 12(2):35-39.
- [14] 吕玉民,谢华,牛向丽,等. 用基因枪法将 bar 基因导入杜氏盐藻及转基因藻株的检测. 郑州大学学报, 2004, 39(1):31-35.  
Lv Y M, Xie H, Niu X L, et al. Journal of Zhengzhou University, 2004, 39(1):31-35.
- [15] 冯书营,贾岩龙,刘红涛,等. 杜氏盐藻玻璃珠新型转化方法的建立. 生物工程学报, 2007, 23(2):358-362.  
Feng S Y, Jia Y L, Liu H T, et al. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(2):358-362.
- [16] 李杰,闫红霞,曲东京,等. SOEing 法构建 EGFP 真核表达载体及其在杜氏盐藻中的表达. 水生生物学报, 2007, 31(4):546-551.  
Li J, Yan H X, Qu D J. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(4):546-551.
- [17] Geng D G, Han Y, Wang Y Q, et al. Construction of a system for the stable expression of foreign genes in *Dunaliella salina*. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(3):342-346.

## Construction of Trypsin Inhibitor *KSTI3* Gene New Eukaryotic Expression System and Expression in *Dunaliella salina*

XU Wen-qi CHAI Xiao-jie ZHANG Ting DAI Jing-yu ZHANG Xiao-lin

(Key Laboratory of Marine Bio-resources Restoration and Habitat Reparatation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract** To construct cloning vector pMDNos, terminator *Nos* was amplified from the template pBI121 plasmid by PCR. pMDKN vector was formed by combination between pMDNos fragment and *KSTI3* from plasmid pMDKSTI3 by restriction enzyme digestion. Finally, promoter *CaMV35S* and chloramphenicol resistance gene *Cat* cloned from pCambia2201 were all introduced to the vector pMDKN. DNA sequencing result showed that *KSTI3* gene, promoter *CaMV35S*, terminator *Nos* and *Cat* gene were completely consistent with the original sequence, so new eukaryotic expression vector pMDCKN-Cat was successfully constructed. pMDCKN-Cat was transformed into *Dunaliella salina* (*D. salina*) with LiAc/PEG method, and recombinant *D. salina* was selected under chloramphenicol pressure and by PCR detection. Western blotting ultimately showed that a clear strip with the molecular weight of 20.1 kDa appeared on the nitrocellulose membrane, and proved that trypsin inhibitor *KSTI3* was expressed in *D. salina* cells.

**Key words** Trypsin inhibitor *KSTI3* gene *Dunaliella salina* LiAc/PEG mediated method Eukaryotic expression system

## 广 告 索 引

广州艾贝泰制药设备科技有限公司(封面),默克化工技术(上海)有限公司(封二),爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司(彩1),上海日泰医药设备工程有限公司(彩2),上海森松制药设备工程有限公司(彩3),镇江东方生物工程设备公司(彩4-5),上海伯豪生物技术有限公司(彩6),安倍医疗器械贸易(上海)有限公司(彩7),中国长沙华生论坛(彩8),宝生物工程(大连)有限公司(彩9),克瑞配料贸易(上海)有限公司(彩10),Waters(中彩1),艾本德中国有限公司(中插2-3),上海国强生化装备工程有限公司(中插4-5),武汉禾元生物科技有限公司(中彩6),GE imagination at work(封三),基因有限公司(封底)。