

SOEing 法构建 EGFP 真核表达载体及其在杜氏盐藻中的表达

李 杰 闫红霞 曲东京 刘红涛 鲁照明 薛乐勋

(郑州大学细胞生物学研究室, 郑州大学第一附属医院, 郑州 450052)

摘要:通过重叠区扩增基因拼接法(Gene splicing by overlap extension, SOEing)构建含有杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)硝酸盐还原酶(NR)基因 5'-上游序列(Pnr) and 3'-端序列(Tnr)的 EGFP 真核表达载体,并将其转化杜氏盐藻。利用改进的 SOEing 法,将杜氏盐藻 NR 基因 Pnr 与报告基因 EGFP cDNA 融合,并与 pEGM-7z 克隆载体连接,顺序将盐藻 NR 基因 Tnr 序列与融合片段相连,构建含 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒的盐藻真核表达载体 p7NET。电击法转化杜氏盐藻,在盐藻转化株中观察到了 EGFP 的瞬时表达。此研究为转基因杜氏盐藻研究和成功建立杜氏盐藻生物反应器奠定了实验基础。

关键词:杜氏盐藻;重叠区扩增基因拼接法(SOEing);增强型绿色荧光蛋白(EGFP);真核表达载体

中图分类号:Q754 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)04-0546-06

杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)是一种单细胞真核绿藻,无细胞壁。该藻突出优点在于抗逆性极强,可在 0.05—5mol/L 的盐水中生长,是迄今所发现的最耐盐的生物之一。杜氏盐藻作为宿主表达外源基因,生产有用的外源蛋白,具有繁殖速度快、培养简单、表达产物下游纯化过程简单等优越性。因此,利用盐藻作为生物反应器具有较高的应用前景^[1]。硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)是一种诱导酶,硝酸盐对 NR 活性有明显诱导作用,而铵则能抑制 NR 的表达,因此 NR 的启动子和终止子已经成为转基因研究中比较理想的诱导性调控元件。Wang 等^[2]报道用小球藻自身的 NR 启动子来驱动外源基因的表达,具有可诱导性和高效性表达的特点。然而利用盐藻 NR 的 5'上游序列(Pnr)及 3'端序列(Tnr)作为驱动外源基因表达的启动子和终止子的研究目前尚未见报道。

重叠区扩增基因拼接法(Gene splicing by overlap extension, SOEing)是利用 PCR 技术在体外进行有效的基因重组和定点突变,不需要内切酶消化和连接酶处理^[3]。众所周知,由于引物只需要与模板有效结合,尤其是 5'端序列不必与模板完全配对,因此扩增引物的 5'端可以添加一种甚至是两种酶切位点以便于后期克隆。SOEing 法正是利用这一特点,向两

个独立基因掺入一段新的序列以达到两个基因出现一个重叠区的目的,进而利用这段重叠区制造“巨型引物”(Mega primers),后者 3'端的可引发性使基因融合或定点突变得以实现。在以前的研究中,我们利用基因组步行法从盐藻基因组中克隆了 NR 基因起始密码子 ATG 上游 1176bp 的 5'上游序列(Pnr)和终止密码子 TGA 下游 881bp 的 3'端序列(Tnr)(此文另发),本研究利用改进的 SOEing 法将 Pnr 和有完整读码框的增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescence protein, EGFP) cDNA 拼接成融合片段,并与 pEGM-7z 克隆载体连接,顺序将 Tnr 序列与融合片段相连,构建含 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒的盐藻真核表达载体(p7NET)。电击法转化杜氏盐藻,以研究通过 SOEing 法构建的含 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒 p7NET 在盐藻中的表达情况。此研究可能会为转基因杜氏盐藻研究和成功建立杜氏盐藻生物反应器奠定重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株和载体 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存;载体 pEGFP-C1(含 EGFP cDNA)购自 Clontech 公司。pEGM-7z 克隆载体、载体 pMD-Pnr(含盐藻 NR

收稿日期:2006-06-12;修订日期:2007-03-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270031)资助

作者简介:李杰(1974—),女,汉族,河南尉氏人;博士;从事分子生物学研究。E-mail:lijiechen@zzu.edu.cn

通讯作者:薛乐勋, E-mail: xuelx@371.net

基因 5 上游序列)和 pMD-Tnr(含盐藻 NR 基因 3 端序列)均由本室构建。

主要试剂 LA Taq DNA 聚合酶、Pyrobest DNA 聚合酶和限制性内切酶、胶回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒均购自大连宝生物公司。分子量 Marker 购自加拿大 MBI 公司。

盐藻藻株和培养 盐藻藻株为 UTEX-LB-1644, 购自美国德克萨斯州立大学(The University of Texas,

USA)。盐藻的培养采用改良的 PKS 盐藻培养基^[4]。培养条件为:温度 26 ℃,光照强度 4500lx,明暗周期为 12h:12h。

1.2 方法

引物设计 根据作者已登录的盐藻 NR 基因 5 上游序列(DQ217416),EGFP 基因序列, NR 基因 3 端序列,采用 Primer Premier 5.0 辅助设计如下引物(表 1)。所有的引物由上海生物工程公司合成。

表 1 设计合成的引物序列

Tab.1 Primers sequences designed

Template	Primers	Enzyme sites	Products(bp)
pMD-Pnr	SOE1:5'- <u>cccaagcttagcttgc</u> cat tattgtg-3' SOE2:5'- <u>ctcgcccttctcaccatt</u> ctgctgctgcggacagg-3'	<i>Hind</i>	1176
pEGFP-C1	SOE3:5' <u>ctgtccgcagcagcagaat</u> gggtgagcaagggcgag-3' SOE4:5'-caat <u>atcgatttacttctacagctcgtccatg</u> -3'	<i>Clal</i>	717
pMD-Tnr	TnrF2:5'- <u>ccgctcaggttctgagcgggctc</u> a-3' TnrR2:5'- <u>cccgacgtcaagcttctgatcagcctttgcaat</u> -3'	<i>XhoI</i> <i>Aat</i> , <i>Hind</i>	887

注:画线部分为酶切位点,SOE2 和 SOE3 为具有互补序列的引物

Note:Underlined are restriction enzyme cut sites;SOE2 and SOE3 are two complemented primers

SOEing 法扩增 NR 基因 5 上游序列和 EGFP cDNA 的融合片段 Pnr-EGFP (1) Pnr 和 EGFP cDNA 的扩增:Pnr 扩增以 pMD-Pnr 为模板,SOE-1 和 SOE-2 为引物,94 ℃ 预变性 4min,94 ℃ 变性 30s,55 ℃ 退火 40s,72 ℃ 延伸 1.5min,共 30 个循环。EGFP cDNA 扩增以 pEGFP-C1 为模板,SOE-3 和 SOE-4 为引物,94 ℃ 预变性 4min,94 ℃ 变性 30s,55 ℃ 退火 40s,72 ℃ 延伸 1.5min,共 30 个循环。PCR 反应体系按 Pyrobest DNA 聚合酶说明书配置。PCR 产物用胶回收试剂盒回收。(2)融合片段 Pnr-EGFP 扩增:由于标准 SOEing 扩增效率很低,参照 Warrens 等^[5]的方法将 SOEing 法进行改进。首先建立不加引物 SOE-1 和 SOE-4 的反应体系,将 400ng 的 Pnr 和 EGFP 产物等量混合作为模板进行 PCR 反应。反应体系如上配置,PCR 反应条件如下:94 ℃ 变性 4min 后,94 ℃ 变性 30s,68 ℃ 退火及延伸 5min,进行 6 个循环。而后将 Eppendorf 管从 PCR 仪中取出并迅速置于冰上,冷却 3—5min 后加入引物 SOE-1 (25μmol/L) 和 SOE-4 (25μmol/L) 各 1μL,瞬时离心后进行第二次反应,PCR 反应条件:94 ℃ 变性 3min 后,94 ℃ 变性 30s,56 ℃ 退火 45s,72 ℃ 延伸 4min,进行 25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10min,扩增产物 Pnr-EGFP 用胶回收试剂盒回收纯化。

真核表达载体 p > NET 的构建 (1)中间载体 p7NE 的构建:将上述回收的产物 Pnr-EGFP 用

*Hind*III 和 *Clal* 进行双酶切,用 PCR 产物纯化试剂盒纯化酶切片段。用相同的酶消化 pEGM-7f 克隆载体,回收载体片段,用 *T4* 连接酶将 Pnr-EGFP 融合片段与克隆载体连接。连接产物转化感受态大肠杆菌 JM109 细胞,对表现 Amp^r 的菌落提取质粒进行酶切鉴定,阳性克隆命名为中间载体 p7NE。(2)表达载体 p7NET 的构建:以含有 NR 基因 3 端序列的载体 pMD-Tnr 为模板,利用引物 TnrF2 和 TnrR2 扩增上游含 *Xho* 酶切位点,下游顺序含 *Hind* 和 *Aat* 两个酶切位点的 Tnr 片段。扩增产物回收方法同上,用 *Xho* 和 *Aat* 双酶切回收产物,PCR 纯化试剂盒纯化酶切产物。同样用 *Xho* 和 *Aat* 双酶切中间载体 p7NE,回收载体大片段,二者在 *T4* 连接酶作用下连接,转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性菌落,酶切鉴定。得到含 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒的盐藻真核表达载体 p7NET。

电击法转化盐藻细胞 质粒 p7NET 用电击法转化杜氏盐藻细胞,参考耿德贵^[6]等的文献报道,并做改动,具体操作如下:收集处于对数生长期的杜氏盐藻细胞,计数,用 2 × HEPES 调整细胞浓度达到大约为 1.0 × 10⁷/mL;取 400μL 2 × HEPES 悬浮的细胞,加入 0.2cm 电击杯内;电击杯中加入 10μL 质粒,混匀,于冰浴中静置 10min。调整电击仪(Gene Pulser, Bio-Rad),设定电击参数为:电容 10μF,电阻 400 Ω,电压 1.5kV 进行电击;电击完毕,电击杯置于冰浴

中,静置 5min;转移到 1.5mL 离心管中,4000r/min 离心 5min,弃电击缓冲液;而后加 3mL PKS 培养基将转化的盐藻细胞转移到试管内,暗处恢复培养 12h。光照培养箱中正常培养 48h 后,荧光显微镜下直接观察 EGFP 报告基因的表达情况。

2 结果

2.1 目的融合片段 Pnr-EGFP 的扩增

以 pMD-Pnr 载体为模板,利用引物 SOE-1 和 SOE-2 PCR 扩增 Pnr 片段,1%琼脂糖电泳检测,可见约 1200bp 的特异条带;以 pEGFP-C1 载体为模板,SOE-3 和 SOE-4 为引物 PCR 扩增 EGFP 基因片段,1%琼脂糖电泳检测可见约 700bp 的特异条带(图 1)。分别取等量的 Pnr 和 EGFP 作模板,SOE-1 和 SOE-4 作引物进行第二次 PCR,扩增融合片段 Pnr-EGFP,琼脂糖电泳检测可见预期的约 1900bp 的融合条带(图 2)。PCR 结果特异,无非特异条带的出现,提示经过改进的 SOEing 法能更加特异地扩增融合片段。

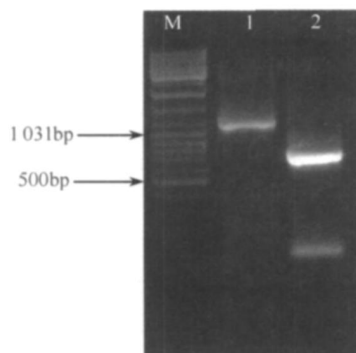


图 1 Pnr 和 EGFP cDNA 扩增结果

Fig. 1 PCR product of NR 5 flanking region and EGFP cDNA

M:DNA 分子量标记;1:Pnr 片段;2:EGFP 片段

M:DNA marker;1:NR5 flanking region;2:EGFP cDNA

2.2 真核表达载体 p > NET 的构建

回收融合片段 Pnr-EGFP,用 *Hind* 和 *Cla* 双酶切回收片段,PCR 纯化试剂盒纯化酶切产物,并与经相同酶切的 pEGM-7 α 克隆载体连接,构建中间载体 p7NE;以 pMD-Tnr 载体为模板,利用引物 TnrF2 和 TnrR2 进行 PCR 反应,1%琼脂糖凝胶电泳回收约 900bp 目的条带(图 3)。用 *Xho*I 和 *Aat*I 进行双酶切,纯化酶切产物,并与经相同酶切的中间载体 p7NE 连接,构建含 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒的盐藻真核表达载体 p7NET。由于在引物设计时,Tnr 下游引物顺序含 *Hind* 和 *Aat*I 两个酶切位点,而 Pnr 上游

引物中含 *Hind* 酶切位点,因此,用 *Hind* 单酶切可得到约 2600bp 的 Pnr-EGFP-Tnr 表达盒条带和约 3000bp 的载体带(图 4)。而且,利用单酶切即可得到完整的表达盒,将纯化的表达盒直接转化宿主非常有利于高效转化的进行。

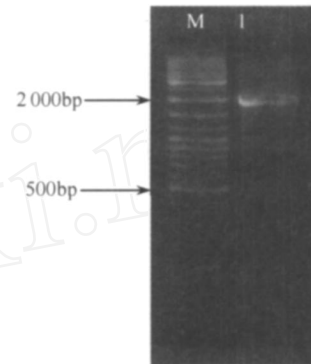


图 2 SOEing 扩增 Pnr-EGFP 结果

Fig. 2 PCR product of Pnr-EGFP with SOEing

M:DNA 分子量标记;1:pnr-EGFP 融合片段

M:DNA marker;1:Fusion product of pnr-EGFP

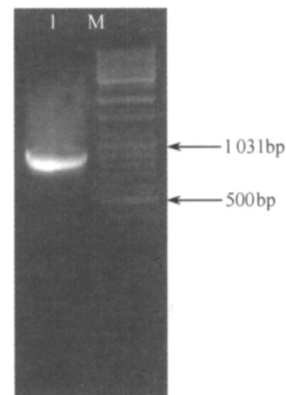


图 3 PCR 扩增 3' 侧翼区序列

Fig. 3 PCR product of 3' flanking region

M:DNA 分子量标记;1:NR 3' 端序列

M:DNA marker;1:3' flanking region of NR

2.3 盐藻细胞的转化结果分析

电击后 48h 开始观察,用质粒 p7NET 电击过的盐藻细胞中有少部分发出绿色荧光,于电击 72h 可见发荧光细胞稍有增多,至第 6 天时达到最多,在视野中呈明亮的绿色,掩盖了盐藻自发的橘红色荧光,未被转化的盐藻细胞呈橘红色,很易区分(图 5)。与野生盐藻细胞游动性相比,转化的盐藻细胞游动稍缓慢,荧光在细胞中没有明显的极性分布。第 8 天后,绿色荧光迅速减弱,第 9 天时绿色荧光消失,视野中只有发橘红色荧光的藻细胞,细胞大小不同

是由于拍照过程中盐藻细胞处于游动状态所致。

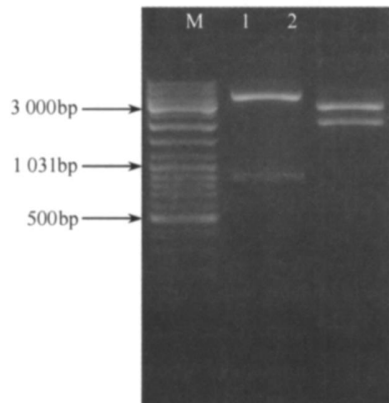


图4 重组质粒 7NET 酶切鉴定

Fig.4 Result of p7NET digestion

M:DNA 分子量标记;1:*Aat* 和 *Xho* 双酶切;2:*Hind* 酶切
M:DNA marker;1:Digestion with *Aat* and *Xho*;2:Digestion with *Hind*

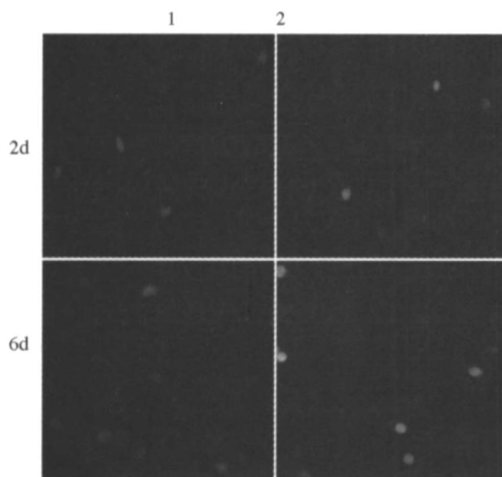


图5 EGFP 在盐藻细胞中瞬时表达的荧光分析

Fig.5 Fluorescence analysis of EGFP gene transient expression in *D. salina*

1:未转化的盐藻细胞;2:p7NET 转化的盐藻细胞

1:Untransformed cells of *D. salina*;2:*D. salina* cells transformed with p7NET

3 讨论

在转基因微藻研究中,构建高效的表达载体是关键。在表达载体的构建过程中,需要选择合适的启动子和终止子。启动子的核心序列一般由以下几个元件组成:TATA 基序、起始子元件、下游核心启动子元件、TFIIB 识别元件^[7]。这些元件决定了转录的起始位点和精确性,是转录所必需的。终止子也是确保外源基因表达的必要元件,已确定其具转录本特异性,它在 mRNA 转录后修饰、细胞内定位及转运、维持 mRNA 稳定性及保证翻译的效率方面都具

重要的调控功能^[8]。利用微藻自身的启动子和终止子来驱动外源基因的表达已经在转基因研究中得到应用^[2,8]。NR 是一种诱导酶,硝酸盐对 NR 活性有明显诱导作用。Posen 等^[9]已经利用硅藻 NR 启动子和 3' UTR 来驱动外源基因高效表达,并且实现了外源基因表达的可控性。本实验利用已经克隆的盐藻 NR 基因 5' 上游序列和 3' 端序列分别作为启动子和终止子,构建含报告基因 EGFP 的盐藻表达载体,以期探讨盐藻 NR 基因表达调控元件的功能及 EGFP 在盐藻中的表达。

由于本实验所用的盐藻 NR 基因的 5' 上游序列和 3' 端序列含有常见的酶切位点如 *EcoR*, *Bam*H 等,从而使常规的基因重组方法受限。本试验通过借助 SOEing 法大大的简化了载体构建的过程。SOEing 法最初是用来在 PCR 产物中间引入突变的一种方法^[10]。Horton 等^[2]首次详述了 SOEing 法,并得到了广泛的运用。作为 DNA 重组的方法,该方法在基因拼接方面有许多优点:产物在体外产生并可以直接用于实验;不需要连接酶和内切酶;不像基因钝端连接那样需鉴定连接方向。然而,SOEing 也有自身的缺点,一个是非特异产物的出现,在 SOEing 法进行第二次 PCR 时,等摩尔的两个片段在退火时可能有四种结合,两种是我们不需要的两条同源链的自身退火产生的非特异产物,另外两种是两条异源链的杂合退火而得到的特异产物^[5]。本试验最初利用常规的 SOEing 法扩增融合片段时,经常只出现 Pnr 的扩增产物,为了避免第二次 PCR 两条同源链的自身退火而引起的非特异扩增,本试验先建立了不加上下游引物 SOE1 和 SOE4 的反应体系,以 68 进行了两阶 PCR,6 次循环后再加入引物 SOE1 和 SOE4,在较低的退火温度进行二次 PCR,最终获得了融合基因片段。这种方法可以增加重叠延伸的概率,大大提高了 SOEing 的效率。另外,SOEing 法 PCR 本身可引入随机错误。为使 PCR 引入随机错误的概率降至最低,可采取以下措施:使用低浓度的 dNTP,使用克隆于载体内的模板,加大模板用量,减少循环次数,镁离子浓度尽可能低,使用高保真 PCR 扩增酶等^[11]。本实验在行重叠区扩增基因拼接法过程中,完全遵循了上述原则,因而得到了正确的融合片段。

在转基因研究中,线性载体的转化效率优于环状载体,而将含目的基因的表达盒直接转化宿主不但大大地增加了转化效率,而且利于转基因整合位点分析^[12]。本实验巧妙的在 NR 基因 5' 上游序列的

上游引物和3'端序列的下游引物均引入 *Hind* 酶切位点,因此利用 *Hind* 单酶切可将含 Pnr-EGFP-Tnr 的表达盒切下,不但利于外源基因的稳定转化,而且简化了下游载体构建的过程。

本实验通过电击转化的方法将所构建的表达载体 p7NET 转化盐藻,并且在盐藻中得到了瞬时表达,EGFP 在盐藻中表达的成功不但为转基因筛选提供了一条新途径,也证实了所克隆的盐藻 NR 基因 5'上游序列和 3'端序列能够保证外源基因的正确表达。然而,在通过荧光显微镜观察转化细胞时,可见有部分死亡细胞呈现绿色,为了与转化细胞鉴别,通过蓝光与可见光的交替观察,可以除去假阳性的非转化细胞。转化细胞发出明亮绿色荧光,并且细胞结构完整,活动性好。而假阳性细胞在可见光下呈现裂解状,不活动。至于此类细胞出现假阳性的机制目前还不清楚。这些研究可能会为转基因杜氏盐藻研究和成功建立杜氏盐藻生物反应器奠定重要的实验基础。

参考文献:

- [1] Chai Y R, Wang T Y, Xue L X. Recent progress in a new bioreactor: *Dunaliella salina* [J]. *China Biotechnology*, 2004, **24** (2): 30—33 [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]
- [2] Wang P, Sun Y R, Li X, et al. Rapid isolation and functional analysis of promoter sequences of the nitrate reductase gene from *Chlorella el-lipsoidea* [J]. *J Appl Phycol*, 2004, **16**: 11—16
- [3] Horton R M. PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes [J]. *Mol Biotechnol*, 1995, **3** (2): 93—99
- [4] Lu Z M, Liu H T, Zang W D, et al. Phylogenetic analysis and cloning of photosystem reactor center *psab* gene of *Dunaliella Salina* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29** (6): 717—720 [鲁照明, 刘红涛, 臧卫东, 等. 杜氏盐藻光系统反应中心 *psab* 基因 cDNA 克隆及系统进化分析. 水生生物学报, 2005, **29** (6): 717—720]
- [5] Warrens A N, Jones M D, Lechler R I. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest [J]. *Gene*, 1997, **186**: 29—35
- [6] Geng D G, Wang Y Q, Li W B, et al. Transient expression of GUS Gene in *Dunaliella Salina* [J]. *High Technology Letters*, 2002, **12** (2): 35—39 [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]
- [7] Oubrahim H, Wang J, Stadtman E R, et al. Molecular cloning and characterization of murine caspase-12 gene promoter [J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 2005, **102** (7): 2322—2327
- [8] Di Liegro C M, Bellafiore M, Izquierdo J M. 3'-untranslated regions of oxidative phosphorylation mRNAs function *in vivo* as enhancers of translation [J]. *Biochem J*, 2000, **352**: 109—115
- [9] Pbsen N, Kroger N. A new molecular tool for transgenic diatoms: control of mRNA and protein biosynthesis by an inducible promoter-terminator cassette [J]. *FEBS J*, 2005, **272** (13): 3413—3423
- [10] Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interaction [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16**: 7351—7367
- [11] Yi P Y, Yu H, Ma W X, et al. Construction of a chimeric SEA-hPLAP-1cDNA with gene splicing by overlap extension [J]. *Journal of Zhejiang University (Medical sciences)*, 2003, **32** (5): 412—414 [易平勇, 余海, 马文学, 等. 重叠区扩增基因拼接法在构建膜锚定金黄色葡萄球菌肠毒素 A 融合基因上的应用. 浙江大学学报(医学版), 2003, **32** (5): 412—414]
- [12] Kohli A, Twyman R M, Abranches R, et al. Transgene integration, organization and interaction in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, **52** (2): 247—258

CONSTRUCTION OF AN EGFP EUKARYOTIC EXPRESSION VECTOR BY SOEING AND ITS TRANSFORMATION TO DUNALIELLA SALINA

LI Jie, YAN Hong-Xia, QU Dong-Jing, LIU Hong-Tao, LU Zhao-Ming and XUE Le-Xun

(Laboratory for Cell Biology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract: Previous studies, including some from our own laboratory, have demonstrated that *Dunaliella salina* (*D. salina*) was one of the most extremely halotolerant eukaryotes and able to live in a variety of salt concentrations ranging from 0.05 to 5M solution of sodium chloride. The simple and cheap culture of *D. salina* makes it have a great potential in bioengineering for producing valuable polypeptides and proteins. However, lack of efficient expression systems has been one of major limitations in the genetic manipulation of this microalga. In order to produce high levels of heterologous proteins in transgenic *D. salina*, it is necessary to obtain a high-efficiently endogenous promoter for expressions of the heterologous genes under controlled conditions. We investigated whether 5'-flanking region (Pnr) and 3'-flanking region (Tnr) of *D. salina* nitrate reductase (NR) would control expression of the heterologous genes. Gene splicing by overlap extension (SOEing) was modified according to following steps: (1) synthesis of two individual DNA fragments of interest with 36 bp overlap by PCR with high-fidelity Pyrobest DNA polymerase;

(2) six cycles of pre-extension without flanking primers after mixing the two fragments above , which ensures the overlap extension between the two individual templates ; (3) 25 cycles of post-extension with flanking primers after cooling the product of pre-extension. An enhanced green fluorescence protein (EGFP) eukaryotic expression vector harboring Pnr-Tnr cassette was constructed based on the method of SOEing and transformed into *D. salina* using electroporation. Using the modified SOEing PCR , a special fusion fragment Pnr-EGFP was obtained with the equal molar Pnr and EGFP cDNA from the first stage PCRs being templates , and a recombinant expression vector p7NET containing Pnr-EGFP-Tnr expression cassette was constructed by inserting Pnr-EGFP and Tnr , which was obtained from the genome of *D. salina* by PCR , into vector pEGM7zf. The resulting recombinant vector p7NET was digested with the double enzymes *Aat* and *Xho* and a single enzyme *Hind* , which showed the expected fragments , respectively. The results of sequencing showed that the sequences of whole Pnr-EGFP-Tnr expression cassette completely conformed to the corresponding sequences of Pnr , EGFP and Tnr , which provides a further evidence for successful construction of the recombinant plasmid by SOEing. Subsequently , the transformants of *D. salina* transformed with the p7NET were observed under fluorescence microscope. Green fluorescence appeared on day 2 after transformation in *D. salina* cells transformed with the p7NET , but not in control cells , in which the chloroplast red autofluorescence appeared. The transformed cells on day 6 after transformation had stronger green fluorescence than those on day 2 , but no noticeable fluorescence on day 9 , indicating that the EGFP gene has successfully been introduced to cells of *D. salina* and Pnr from *D. salina* can drive the expression of the EGFP gene in transgenic *D. salina*. Conclusions : The findings of the present study suggest that the Pnr/ Tnr cassette of the NR gene from *D. salina* may be used to drive the expressions of heterologous gene in transgenic *D. salina* and the modified SOEing is a rapid and efficient method in cloning of fusion fragments and construction of expression vectors.

Key words : *Dunaliella salina* ; Gene splicing by overlap extension (SOEing) ; EGFP ; Eukaryotic expression vector