

文章编号: 1004-0374(2013)11-1135-09

· 技术与应用 ·

DNA拼接技术研究进展

张双华, 孙 源, 张治洲*

(哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院, 山东省海洋船舶防污工程技术研究中心, 威海 264209)

摘 要: 基因组合成是合成生物学的一个重要环节, 其发展将会对未来的生物、医药、农业、能源等方面的发展产生巨大的推动作用, 同时 DNA 拼接作为基因组合成所需要的一种关键技术也日臻完备。回顾了多种 DNA 拼接技术, 并对其中最具发展潜力的几种方法作了综述, 探讨不同 DNA 拼接技术的原理和特点。

关键词: 基因组合成; DNA 拼接; Gibson 拼接; 酵母同源重组

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A

Research progress in DNA assembly technologies

ZHANG Shuang-Hua, SUN Yuan, ZHANG Zhi-Zhou*

(School of Marine Science and Technology, Marine Antifouling Engineering Technology Center of Shangdong Province, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

Abstract: Genome synthesis constitutes an important part of synthetic biology, and its development will bring huge impact on many disciplines such as biology, medicine, pagriculture, energy and so on. By now DNA assembly is a key technology for genome or long DNA synthesis. Some DNA assembly technologies have acquired strong functional progress. In this review, a series of DNA assembly techniques are described and discussed in the context of their principles, potentials and characteristics.

Key words: genome synthesis; DNA assembly; Gibson assembly; yeast homologous recombination

21 世纪伊始, 人工合成基因组方面的研究成果紧紧抓住了世人的目光。2002 年, Wimmer 研究组用化学方法合成了脊髓灰质炎病毒的全长 cDNA^[1], 开创了以无生命的化合物合成感染性病毒的先河; 2003 年, Smith 等^[2] 仅用 2 周时间便合成了噬菌体 ϕ X174 的基因组; 2007 年, Venter 团队将蕈状支原体的整个基因组分离为“裸露”的 DNA, 并将其移植到山羊支原体中, 实现了不同物种间的基因组转移^[3]; 2008 年, Venter 团队成功完成生殖支原体 *Mycoplasma genitalium* 的全基因组 JCVI-1.0 合成^[4]; 2010 年, Venter 研究组构建了一个能够繁殖的人造细胞“Synthia”^[5]; 2010 年, 他们又发明了简单有效的体外基因合成技术——Gibson 等温一步拼接法^[6]; 2011 年, Dymond 等^[7] 取得了酿酒酵母基因组人工合成计划(SC2.0 Project)的第一个成果——成功设计合成了酿酒酵母的部分染色体, 该项目的最终目标是人工合成构建酿酒酵母基因组。

众多的科研成果表明, 基因及基因组的合成是当前合成生物学的主要内容之一。通过基因合成, 可以获得自然界中存在或者不存在的基因, 为人类改造生命开辟了一个全新的方向, 在可预见的未来, 基因(组)合成将在生命科学领域发挥巨大作用。那么目前长达几万碱基对(base pair, bp)甚至上百万 bp 的基因组 DNA 片段是如何获得的, 实际上, 目前基因的合成过程就是由短的 DNA 片段到长的 DNA 片段的拼接过程, 可见拼接技术在基因组合成中起着至关重要的作用。

本文就目前基因人工合成过程中采用的各种拼

收稿日期: 2013-03-15; 修回日期: 2013-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071170); GRED-BIO基金, HIT (hitwh200904); 985基金和 HITNSRIF (2011101)

*通信作者: E-mail: zhangzzbiox@hitwh.edu.cn

接方法的原理和特点展开试述。

1 体外拼接方法

DNA 体外拼接是指在生物体外通过连接而实现的两个及两个以上的 DNA 短片段到长片段的过程。实现体外拼接的方法有很多种, 根据其原理可以分为: 寡核苷酸链的拼接方法, 基于限制性内切酶和连接酶的连接方法, 基于重叠序列和聚合酶延伸的方法, 以及基于核酸外切酶活性的连接方法等。值得注意的是, 大多数的体外拼接方法存在拼接效率低的缺点, 因此, 往往要结合基因克隆技术, 将体外拼接获得的目的片段插入到能够承受巨大 DNA 片段的载体中, 如细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 或酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC), 然后转化到受体细胞中, 以获得稳定的、高拷贝量的目的产物^[8-11]。

1.1 寡核苷酸链的拼接方法

1.1.1 聚合酶链式拼接 (polymerase chain assembly, PCA)

PCA 法是一种基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 原理的方法, 实现的是由单链寡核苷酸到几百至几千 bp 的双链 DNA 的拼接。用于 PCA 法的单链寡核苷酸彼此之间部分重叠,

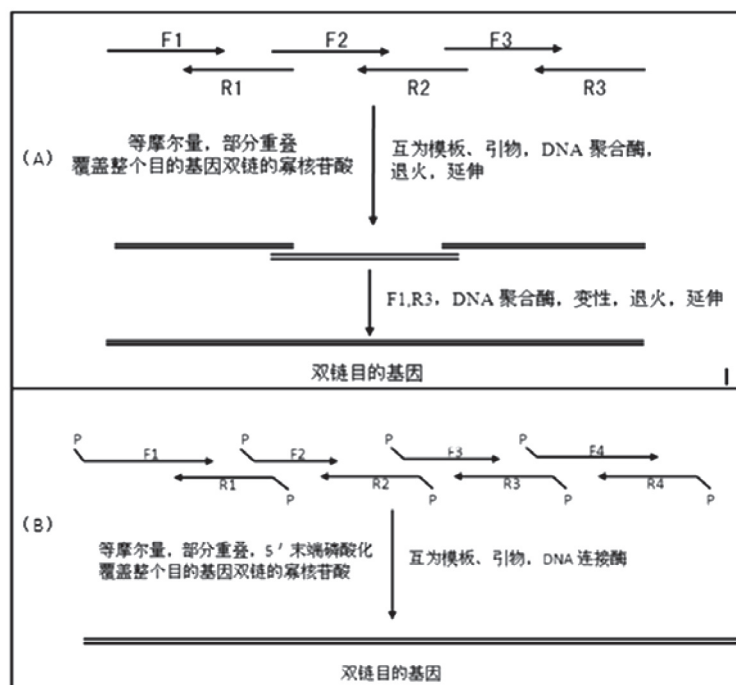
并覆盖整个目的基因序列的双链。拼接时, 这些部分重叠、等摩尔量的寡核苷酸片段彼此互为引物互为模板, 在嗜热性 DNA 聚合酶的作用下, 通过退火、延伸变成更长一些的双链 DNA; 然后, 再通过与其他寡核苷酸片段或延伸产物之间的变性、退火及延伸的循环, 逐步实现寡核苷酸片段的拼接^[11-17] (图 1A)。

PCA 法中参与拼接的寡核苷酸片段不需要磷酸化, 且允许寡核苷酸片段之间有间隔, 因此这个方法的合成费用较低而得到广泛使用。

1.1.2 连接酶链式反应 (ligase chain reaction, LCR)

与 PCA 法相似, LCR 法的作用对象也是寡核苷酸链, 合成的双链 DNA 长度也在几百到几千 bp。与 PCA 法不同的是, LCR 法要求用于拼接的寡核苷酸的 5'-端磷酸化, 因此, 相邻片断之间不能有间隔。这种方法利用嗜热性 Taq 连接酶在高温下修复缺刻和连接 DNA 的功能, 将首尾相连、重叠杂交的 5' 端磷酸化的寡核苷酸片段连接起来^[2,8-10] (图 1B)。

LCR 法的优势是 Taq 连接酶对有错配的末端不能连接, 可以降低连接产物的突变率; 同时由于反应是在较高温度下进行的, 因此, 可以排除 DNA 二级结构的干扰, 但由于这种方法要求用于



A: 聚合酶拼接法(PCA); B: 连接酶拼接法(LCR), 5'端磷酸化, 两种方法获得的DNA片段长度在几百到几千bp

图1 常用的寡核苷酸链的拼接方法

拼接的寡核苷酸片段磷酸化, 因此, 合成费用较 PCA 法高。

1.2 基于限制性内切酶和连接酶的连接方法

基于限制性内切酶和连接酶的连接方法将限制性内切酶的酶切活性, 以及 DNA 连接酶的“基因针线”活性完美地结合在一起, 并借助于克隆载体实现整个拼接过程。其原理: 待拼接的 DNA 片段插入到含有选择性标记的载体中; 然后利用限制性内切酶酶切载体, 以产生用于连接的含有黏性互补末端的两部件, 一种只含有 DNA 片段, 另外一种则是仍然与质粒相连的 DNA 片段; 之后利用 DNA 连接酶将两部件在黏性末端处重新连接; 连接后的产物仍然存在于质粒中, 因此, 通过转化、阳性克隆筛选、提取质粒、酶切等过程, 就可以获得变长的目的产物^[18-19]。

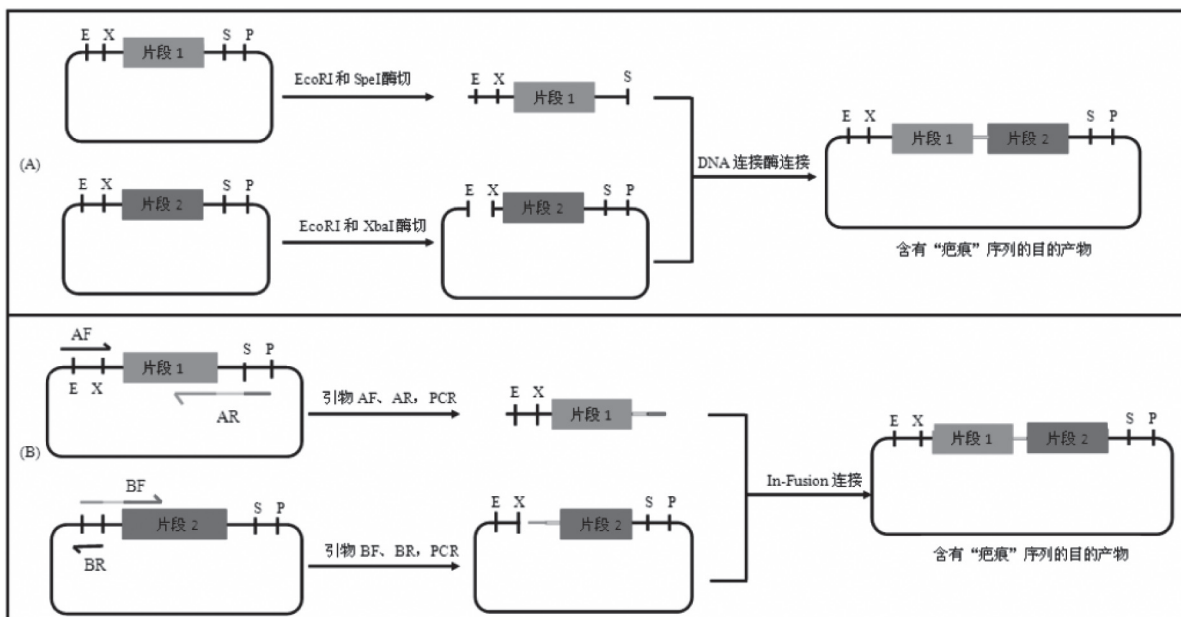
这种依赖限制性内切酶活性的连接方法, 不允许待拼接的 DNA 片段序列内部含有相应的限制性内切酶识别位点, 因此, 在应用方面有很大的局限性。合成生物学中的 Biobrick 连接法和选择性连接法 (ligation by selection, LBS) 就是很典型的基于限制性内切酶和连接酶的连接方法。

1.2.1 Biobrick连接法

合成生物学的基本出发点之一是将复杂的生命系统拆分为各个功能元件, 通过对生物元件进行标准化、模块化定义, 以实现对生物元件的逐级组装,

直至构建一个新的功能系统。Biobrick 就是为了实现能够在活细胞体内搭建上面描述的相应的生物系统而建立的标准。标准的 Biobrick 由 3 部分组成: 前缀 (prefix)、主体 (body) 和后缀 (suffix)。主体部分是一段有特定功能的 DNA 序列, 可以是调控基因、蛋白质编码基因、终止子等, 也可以是它们的组合; 前缀和后缀则是两个含特殊酶切位点的序列, 起到类似于传统机械制造中接口的作用^[8,10,18]。

标准的 Biobrick 连接法中的 biobrick 是一种标准化的质粒, 其前缀含有限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 的识别位点, 后缀中具有限制性内切酶 *SpeI* 和 *PstI* 的识别位点, 其中前缀中的 *XbaI* 和后缀中的 *SpeI* 是同尾酶。同尾酶的使用是 Biobrick 连接法的特殊要求, 也是后续拼接能够获得成功的必要条件。拼接时, 将待拼接的 2 个 DNA 片段 1 和 2, 分别插入到标准化的质粒的预定位置; 然后两重组质粒分别经 *EcoRI* 和 *SpeI* 以及 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切, 分别得到片段 1 以及仍旧连在质粒上的片段 2; 随后将纯化后获得的等比例的两部件以及 DNA 连接酶混匀于同一体系中, 利用连接酶的连接活性将两部件连接起来, 从而获得含有目的产物的重组质粒, 所获得的目的产物中片段 1 和片段 2 是由一段“疤痕”序列连接在一起的, 其本质是质粒上与同尾酶的结合位点 (图 2A)。最后通过筛选阳性克隆、提取质粒、酶切等过程获得目的产物^[18]。Anderson



A: 标准的Biobrick连接法; B: 内融合Biobrick连接法。B中的AF和BR为载体引物, BF和AR为接头引物

图2 Biobrick连接法

等^[19]对标准的 Biobrick 进行了修改, 修改后用同尾酶 *BglII* 和 *BamHI* 分别替换标准的 Biobrick 中的 *XbaI* 和 *SpeI*。他们将这种修改后的生物模块称为 BglBrick, 其连接的原理与标准的 Biobrick 连接法相同, 连接产物中也含有“疤痕”序列。

还有一种特殊的 Biobrick 连接法——内-融合(In-Fusion)BioBrick 连接法^[18]。目前已有家公司研发成功专门的 In-Fusion BioBrick 连接试剂盒, 如 TaKaRa 的 In-Fusion[®] HD Cloning System。与标准的 Biobrick 连接法不同之处在于: 这种方法并不是通过限制性内切酶的酶切作用, 而是通过设计特殊的引物经 PCR 获得两种中间产物的。引物的设计是拼接的关键, 此法所用引物共 4 条, 其中 2 条引物(如图 2B 中的 AF 和 BR)是根据载体序列设计获得的, 称为载体引物。另外 2 条引物(如图 2B 中的 BF 和 AR)的序列包括三部分, 5'→3' 方向依次为: 与之拼接的 DNA 片段的一段碱基序列、“疤痕”序列(5'-TACTAGAG-3')、待拼接片段的引物序列。连接时, 首先将待拼接的两 DNA 片段 1 和 2 插入到标准化的载体的特定位置, 然后利用上述引物组合扩增获得两中间产物, 随后利用 In-Fusion 试剂盒进行组装即可获得含有目的产物的重组质粒, 与普通的 Biobrick 连接法的目的产物相同, In-Fusion BioBrick 连接产物也含有一段“疤痕”序列(图 2B)。

1.2.2 选择性连接法 (ligation by selection, LBS)

LBS 法在利用限制性内切酶、连接酶活性的基础上, 还巧妙地应用了具有抗生素抗性基因的载体, 拼接过程中两载体上的抗生素抗性基因进行了重新

的组合, 因此, 可以通过筛选新的抗生素组合来筛选含目的基因的载体。

2004 年, Kodumal 等^[20]用此法将 8 条长约 3.4 kb 的短片段连接在一起, 最终获得长达 32 kb 的聚酮合酶 (polyketide synthase) 基因。该项研究中用到的两种质粒, 一种具有氨苄青霉素抗性 (ampicillin resistance, Ap^R)、氯霉素抗性 (chloramphenicol resistance, Cm^R) 及四环素抗性 (tetracycline resistance, Tet^R), 另一种则具有氨苄青霉素抗性、卡那霉素抗性 (kanamycin resistance, Km^R) 以及链霉素抗性 (streptomycin resistant, St^R)。连接时, 首先通过 PCR 方法在待拼接的两 DNA 片段 1 和 2 的两端添加限制性内切酶 *BsaI* 和 *BbsI* 的识别位点; 然后将片段 1 和 2 分别插入到上述两种质粒中; 随后分别用 *BbsI* 和 *XhoI* 以及 *BsaI* 和 *XhoI* 将两质粒酶切开, 这样就得到与具有 Tet^R 和 Ap^R 的质粒相连的片段 1 以及与具有 Km^R 的质粒连在一起的片段 2。最后用 DNA 连接酶将纯化后的两片段连接在一起, 获得含有目的产物的重组质粒, 该重组质粒同时具有 Tet^R 和 Km^R, 因此, 通过筛选 Tet^R 和 Km^R 阳性克隆就可以获得目的产物(图 3)。与 Biobrick 连接的产物相同, 用 LBS 法拼接获得目的产物也含有 8~13 bp 的“疤痕”序列。

2008 年, Engler 等^[21]对 LBS 法进行了改进, 改进后的方法称为“Golden Gate”克隆连接法, 此法是一种由 IIS 型限制性核酸内切酶 (IIS restriction enzyme) 介导的, 因此也称为“IIS”克隆连接法。IIS 型限制性内切酶能够特异性识别双链 DNA 上

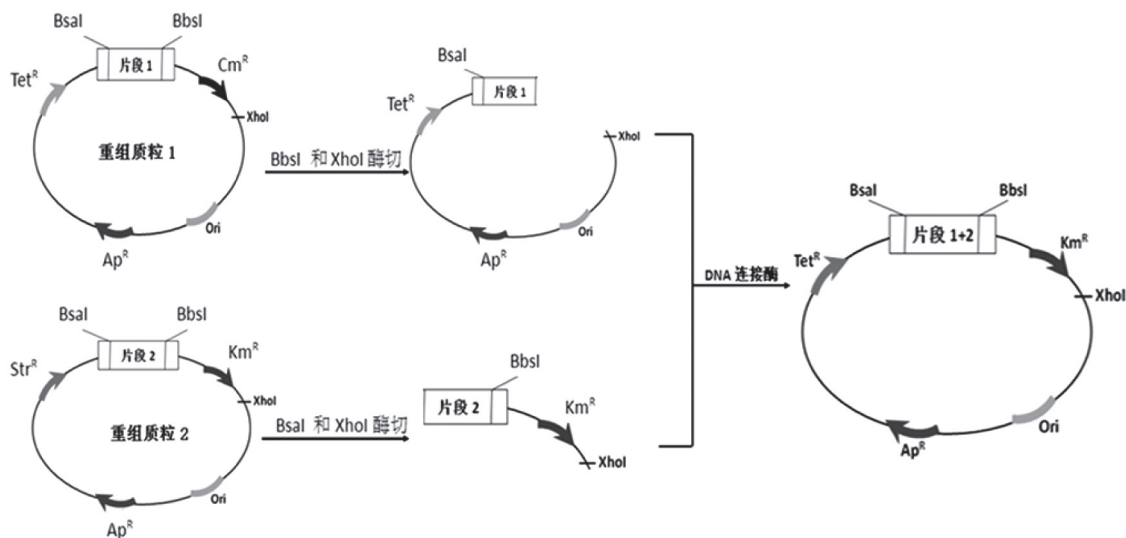


图3 选择性连接法(LBS)

的靶位点, 并在靶位点下游非特异性地对 DNA 双链进行切割, 在 DNA 双链的 5' 或 3' 端产生黏性末端。“Golden Gate”克隆连接法是在同一反应体系中, 利用 IIS 型限制性内切酶, 在识别位点之外切开 DNA, 产生含黏性末端的 DNA 片段, 同时用连接酶将几个 DNA 片段按照既定的顺序连接, 拼接成不含酶识别位点的 DNA 片段, 因此, “Golden Gate”克隆连接法获得的目的产物是“无缝”连接产物。

1.2.3 “MASTER”连接法

“MASTER”为 methylation-assisted tailorable ends rational 的缩写, 于 2013 年由 Chen 等^[22]发现, 是一种新颖的基于限制性内切酶的 DNA 拼接方法。“MASTER”连接法所用到的限制性内切酶 *MspII* 是一种甲基化修饰依赖性核酸内切酶, 能够识别 mCNR(R=A 或 G) 位点并能够在修饰的胞嘧啶 3' 一侧 N9/N13 处切割双链 DNA, 能够识别的胞嘧啶修饰包括: C5-甲基化胞嘧啶 (5-mC) 和 C5-羟甲基化胞嘧啶 (5-hmC)。这种方法不仅适用于 PCR 扩增产物之间的组装, 也适用于限制性内切酶酶切片段之间的拼接。连接时 PCR 扩增产物或者酶切片段分别经甲基化的引物或者甲基化适配器的作用进行甲基化修饰, 然后在 *MspII* 的作用下切割双链 DNA 并进行连接, 从而获得目的产物。

1.3 基于重叠序列和聚合酶延伸的连接方法

重叠延伸 PCR (overlap extension PCR, OE-PCR) 和环形聚合酶延伸法 (circular polymerase extension clone, CPEC) 是常见的两种基于重叠序列和聚合酶

延伸的连接方法^[20-27]。

1.3.1 OE-PCR

OE-PCR 法的原理是具有重叠序列的寡核苷酸片段经变性、退火后形成互补双链, 然后在嗜热性 DNA 聚合酶的作用下进行延伸, 最后利用两末端引物将其扩增出来, 以获得连接产物。该方法方便有效, 但依赖于聚合酶的高保真度, 合成的大片段长度约在 20 kb 以下^[1-2,20-24]。

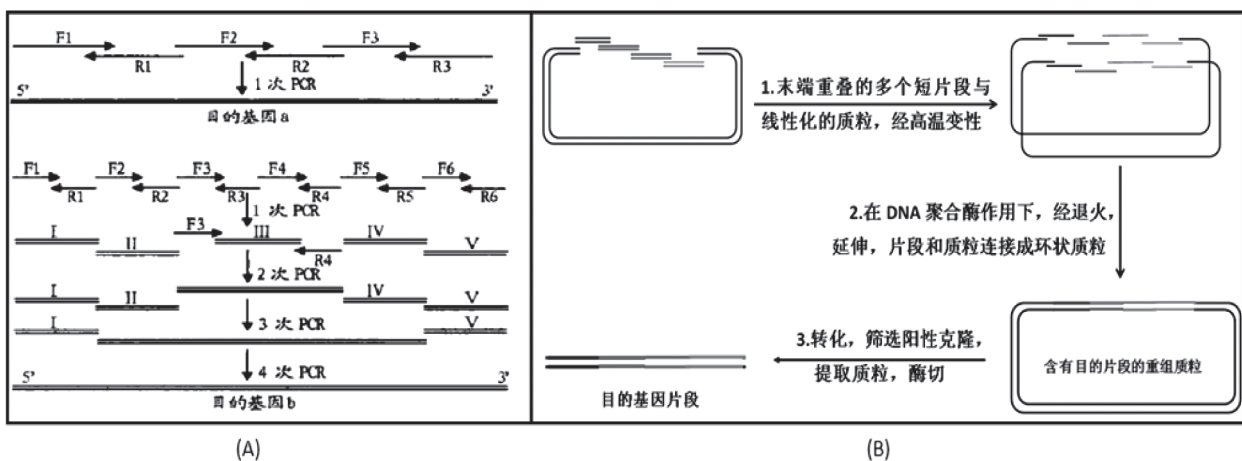
在 OE-PCR 法中, 引物的设计对 OE-PCR 反应的成功与否起着决定性的作用。目前通常按照 Donato 等提出的核心模板方式来设计用于 OE-PCR 法的引物, 该模式的主要原理是从目的基因的中间开始设计引物, 在每一轮的 PCR 反应中都以中间合成的片断为模板, 以两端片段为引物, 逐步实现目的基因由中间到两头的延伸, 这样经过一次 PCR 反应可以获得长度在 400 bp 以内的短产物, 而经过多次的 PCR 反应就可以获得长度在 20 kb 以下的目的产物 (图 4A)。

1.3.2 CPEC

CPEC 法原理与 OE-PCR 类似, 但是这种方法不需要扩增引物, 而是直接将末端重叠的多个片段和载体一步连接成完整的环状质粒, 然后转化进入受体细胞, 在体内实现克隆扩增 (图 4B)^[25-27]。

1.4 Gibson体外同源重组拼接法

Gibson 体外同源重组拼接法是一种基于核酸外切酶活性的连接方法, 更准确的说是一种依赖于重叠序列、核酸外切酶、聚合酶以及连接酶的拼接方法。该法原理: 具有 20~80 bp 末端重叠序列的、等



A: 重叠延伸PCR(OE-PCR), 原理同PCA法; B: 环形聚合酶延伸法(CPEC)

图4 常用的基于重叠序列和聚合酶延伸的连接方法

摩尔量的两个或者多个双链 DNA 片段经核酸外切酶酶切后, DNA 双链中的一条链的部分碱基被切去, 在两 DNA 片段之间暴露出互补的黏性末端, 使待拼接的两片段的重叠区之间可以通过退火而互补, 然后在 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶的作用下将缺口补齐, 实现片段间的连接而获得目的产物。

Gibson 体外同源重组拼接法在其发展过程中经历了变温拼接法到等温一步拼接法的进化过程, 两种方法的原理相同, 只不过由于所用核酸外切酶类型不同, 而导致反应时对温度的要求产生了差异^[4-6,28-30]。

1.4.1 变温拼接法

变温拼接法是 Gibson 等^[4]在合成 *M. genitalium* JCVI-1.0 全长基因组时提出的, 合成的 DNA 片段长度长达几十到几百 kb。此法中所用到的工具酶有 T4 3' 核酸外切酶、Taq DNA 聚合酶以及 Taq DNA 连接酶。由于 T4 3' 核酸外切酶和 Taq DNA 聚合酶都具有 3' → 5' 核酸外切酶活性, 两者存在对底物的竞争关系, 因此, 在反应过程中要借助于温度的变化, 使得在某一温度下两者中只有一种存在酶活性, 而另一种酶的活性则是处于被抑制的状态, 具体的温度设置情况将在后续段落中详述。

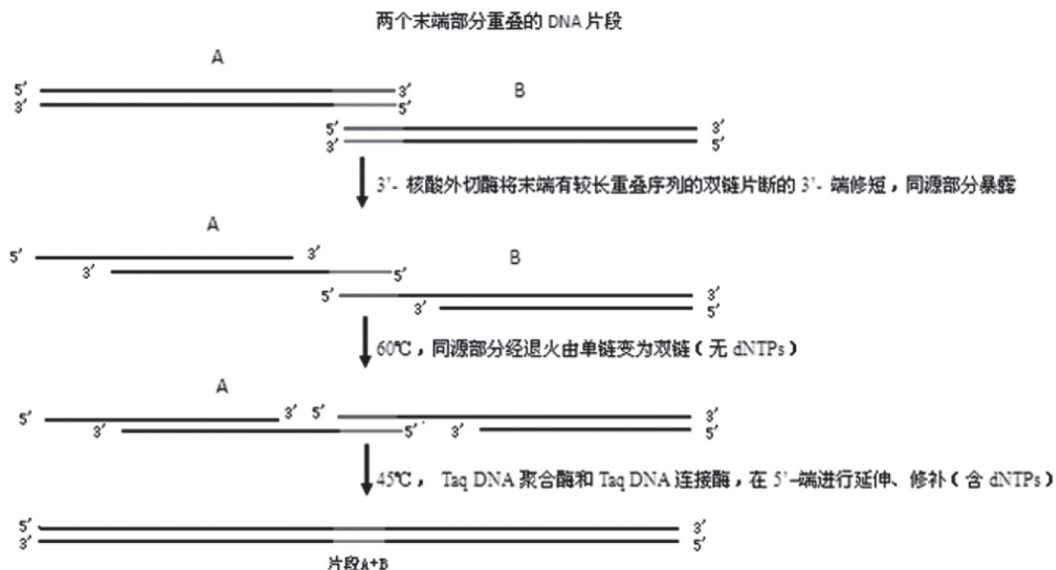
变温拼接法分 3 步进行: (1)用 3' 核酸外切酶切去 DNA 3' 端的部分碱基, 使得相邻的两片段的重叠区之间可以通过退火互补, 该步骤的反应条件为 37 °C 反应 5~15 min, 此后将反应体系放置于

75 °C 条件下 20 min, 以终止反应 (T4 失活); (2)采用逐步降温的方式 (-6 °C /min) 将温度降至 60 °C, 并且保持此温度 30 min, 以使黏性末端充分互补。此后逐步降温 (-6 °C /min) 将温度调至 4 °C; (3)在反应体系中加入 4 种 dNTP, 通过 Taq 聚合酶将缺口补齐, 切去 5' 突出端, 最后经 Taq 连接酶进行连接, 从而获得目的基因 (图 5)。

1.4.2 Gibson 等温一步拼接法(Gibson Assembly)

正如上述描述的那样, 变温拼接法需要在温度循环反应器中进行, 因此, 操作起来十分不便, 这样便限制了变温拼接法的推广应用, 为了解除这种限制, Gibson 等迎头赶上, 随即发明了一种在 50 °C 恒温条件下进行的等温一步拼接法。此方法选用 T5 核酸外切酶、Phusion DNA 聚合酶和 Taq 连接酶三种高效率的酶实现连接反应, 且不像 3' 核酸外切酶与聚合酶那样, T5 核酸外切酶和 Phusion 聚合酶之间不存在对底物的竞争, 因此, 这两种酶可以在同一温度下同时保持酶活性。此外, Phusion DNA 聚合酶具有 3'→5' 核酸外切酶的活性, 扩增途中如果产生了错配的碱基, 它可以将其切掉, 从而保证了扩增的准确性^[4,6]。

该法原理是利用 T5 核酸外切酶的 5'→3' 外切酶活性, 使 DNA 片段双链中的一条链的 5' 末端被酶切掉, 从而暴露出互补黏性末端, 然后两 DNA 片段在单链处通过碱基互补, 形成具有缺口的长 DNA 片段, 最后利用 Phusion DNA 聚合酶和 Taq



图中所示为Gibson变温拼接法的连接原理示意图, 其中代表两片段的重叠部分

图5 Gibson变温拼接法

DNA 连接酶将缺口补齐, 获得完整的目的片段 (图 6)。Gibson 等^[6] 利用此法成功地将 4 个大于 100 kb 的片段在体外组装成完整的 583 kb 的生殖支原体基因组。

2 体内拼接方法

2.1 枯草芽孢杆菌体内同源重组拼接法

2007 年, Itaya 等^[31] 以枯草芽孢杆菌基因组 (*Bacillus subtilis* genome, BGM) 为组装载体, 完成了小鼠线粒体基因组和水稻叶绿体基因组的组装。BGM 载体允许大型 DNA 片段稳定存在于其基因组序列中。他们将这种方法称为 “Domino method”, 此法可以将多个 DNA 片段按一定的顺序, 通过它们之间的重叠序列依次克隆进 BGM 载体, 从而获得目的 DNA。

2.2 酵母体内同源重组拼接法

酵母体内同源重组拼接法是一种利用酵母细胞内高效的同源重组系统来实现多个相互存在同源序

列的 DNA 片段的组装的方法, 其实早在 2002 年利用酵母进行 DNA 装配已经有报道, 但当时只是用来组建小型 DNA 分子 (长度 1 kb 左右), 而多个 DNA 分子同时组装, 且成功组建大型 DNA 分子的案例却未见报道^[4,32-34]。直至 2008 年, Venter 研究组利用变温拼接法和酵母同源重组拼接法构建成长达 582 bp、970 bp 的 *M. genitalium* JCVI-1.0 全基因组, 揭示多个 DNA 片段能够一次组装成目标 DNA 片段^[4]。2009 年, 他们利用酵母同源重组拼接法, 将含重叠序列的 25 条长约 24 kb 的装配子一步组装构建成 *M. genitalium* JCVI-1.1 全基因组也充分证明了这一结论。2010 年, Venter 等又通过此法成功构建了长达 1.1 Mb 的丝状支原体 (*Mycoplasma mycoides*) 基因组, 这个基因组从 1 078 个 1 kb DNA 重叠片段通过 3 个阶段构建完成。拼接时, 10 个有着 80 bp 重叠区域的 DNA 片段利用一个可以在酵母和大肠杆菌中穿梭的梭型载体共转化进入 YAC 载体中; 然后挑取酵母克隆, 经电转化后导入大肠杆菌中纯

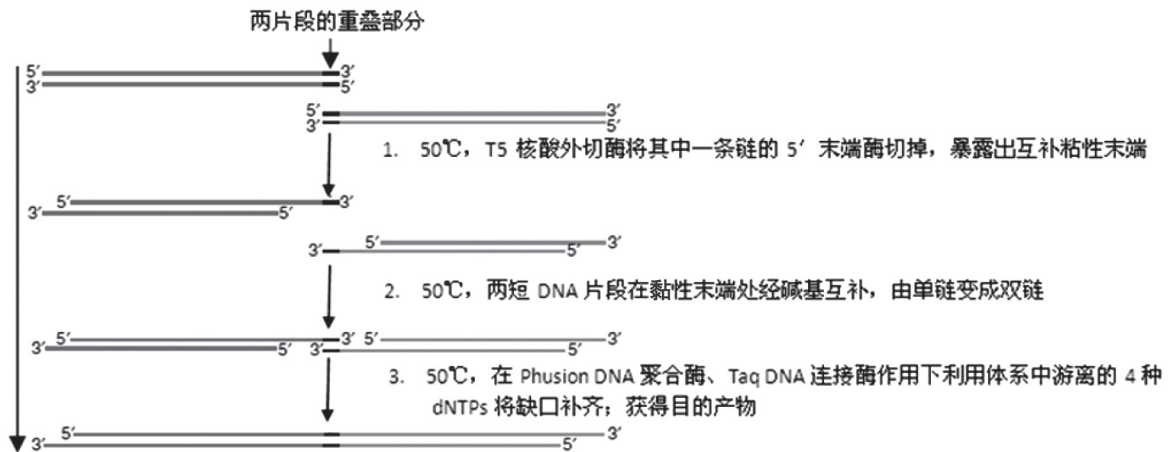


图6 Gibson等温一步拼接法原理图

化装配产物; 最后筛选含有目的片段的克隆^[5]。

酵母体内同源重组拼接法在合成超长的 DNA 如细菌基因组时有很大的优势, 但目前酿酒酵母同源重组装配的上限还不清楚。

3 结语与展望

作为基因合成的关键技术——DNA 拼接技术也顺应了时代的潮流, 正越来越趋于高效化、多样化, 合成的 DNA 片段长度也由原来的几十、几百

bp 发展到了目前的几十万 bp。同时我们看到每一种 DNA 拼接方法在发挥其自身优势的同时, 也都存在着或多或少的不足 (表 1)。

目前, DNA 拼接技术仍处于起步阶段, 合成成本昂贵、合成片段长度有限等缺点还没有得到很好地解决。但我们坚信, 随着科技水平的进步和人们越来越多的关注, DNA 拼接技术及基因合成技术必将取得更大的发展, 为科技的进步、人类的健康做出更大贡献。

表1 不同DNA拼接技术的比较

拼接方法	优势	不足	合成片段长度
PCA	合成费用相对较低; 拼接产物为无“疤痕”产物	合成片段短	几百~几千bp
LCR	突变率低; 排除DNA二级结构的干扰; 拼接产物为无“疤痕”产物	合成费用较PCA法高	几百~几千bp
Biobrick连接法	将拼接片段标准化、模式化	用于拼接的基因片段不能含有相应的限制性内切酶位点, 应用受限; 拼接产物含有8~13 bp的“疤痕”	几十kb
In-Fusion BioBrick连接法	对Biobrick连接法的改进, 可以同时完成多个DNA片段的组装	接头引物的设计成本高; 拼接产物含有8~13 bp的“疤痕”	几kb~几十kb
LBS	巧妙地运用了抗生素抗性基因的重组, 结果显而易见	操作复杂; 用于拼接的基因片段不能含有相应的限制性内切酶位点; 拼接产物含有8~13 bp的“疤痕”	几十kb
MASTER连接法	不仅适用于PCR扩增产物之间的组装, 也适用于限制性内切酶酶切片段之间的拼接; 拼接产物为无“疤痕”产物	待拼接的DNA片段必须经过甲基化或者羟甲基化, 提高了合成的成本	几十kb
OE-PCR	原理简单; 合成成本较低; 拼接产物为无“疤痕”产物	引物的设计和合成较为复杂	在20 kb以下
CPEC	不需要扩增引物; 拼接产物为无“疤痕”产物	需要进行克隆载体的构建	在20 kb以下
Gibson变温拼接法	可以同时实现多个片段的拼接; 拼接产物为无“疤痕”产物	反应需要在温度循环反应器中进行, 操作较繁复	几十~几百kp
Gibson等温一步拼接法	反应在50℃恒温条件下进行, 操作简便; 拼接产物为无“疤痕”产物	合成费用高, 拼接效率低	超过500 kb
枯草芽孢杆菌体内同源重组拼接法	不仅适用于PCR扩增产物之间的组装, 也适用于限制性内切酶酶切片段之间的拼接, 应用范围较广; 拼接产物为无“疤痕”产物	反应逐步完成, 不能同时实现多个DNA片段的组装	几十~几百kb
酵母体内同源重组拼接法	目前报道的最高效的组装DNA大片段的方法; 拼接产物为无“疤痕”产物	研究尚不充分	超过Mb

[参 考 文 献]

- [1] Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, 297(5583): 1016-8
- [2] Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15440-5
- [3] Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, et al. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science*, 2007, 317(5838): 632-8
- [4] Gibson DG, Benders GA, Andrews PC, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215-20
- [5] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52-6
- [6] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343-5
- [7] Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 2011, 477(7365): 471-6
- [8] 田敬东. 从DNA合成技术角度阐述合成生物学. *生命科学*, 2011, 23(9): 931-4
- [9] 邢玉华, 谭俊杰, 李玉霞, 等. 合成生物学的关键技术及应用进展. *中国医药生物技术*, 2012, 7(5): 357-63
- [10] 王冬梅, 洪洞. 从碱基到人造生命—基因组的从头合成. *生命的化学*, 2011, 31(1): 13-20
- [11] Prodromou C, Pearl LH. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng*, 1992,

- 5(8): 827-9
- [12] Stemmer WP, Cramer A, Ha KD, et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 1995, 164(1): 49-53
- [13] Gao X, YO P, Keith A, et al. Thermodynamically balanced inside-out (TBIO) PCR-based gene synthesis: a novel method of primer design for high-fidelity assembly of longer gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(22): e143
- [14] Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC. Dual asymmetric PCR: one-step construction of synthetic genes. *Biotechniques*, 1992, 12(1): 14-6
- [15] Strizhov N, Keller M, Mathur J, et al. A synthetic cryIC gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, confers Spodoptera resistance in alfalfa and tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(26): 15012-7
- [16] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(12): e98
- [17] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(7): e59
- [18] Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, et al. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(8): 2624-36
- [19] Anderson JC, Dueber JE, Leguia M, et al. BglBricks: a flexible standard for biological part assembly. *J Biol Eng*, 2010, 4(1): 1
- [20] Kodumal SJ, Patel KG, Reid R, et al. Total synthesis of long DNA sequences: synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15573-8
- [21] Engler C, Kandzia C, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647
- [22] Chen WH, Qin ZJ, Wang J, et al. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(8): e93
- [23] Tian J, Gong H, Sheng N, et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*, 2004, 432(7020): 1050-4
- [24] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(2): e19
- [25] Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protocols*, 2011, 6(2): 242-51
- [26] Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6441
- [27] Bryksin AV, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 2010, 48(6): 463-5
- [28] Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20404-9
- [29] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*, 2007, 4(3): 251-6
- [30] Schmid-Burgk JL, Xie Z, Frank S, et al. Rapid hierarchical assembly of medium-size DNA cassettes. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): e92
- [31] Itaya M, Fujita K, Kuroki A, et al. Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector. *Nat Methods*, 2007, 5(1): 41-3
- [32] Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by onestep assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(20): 6984-90
- [33] Shao Z, Zhao H, Zhao H. DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(2): e16
- [34] Larionov V, Kouprina N, Graves J, et al. Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(1): 491-6