



元英进教授主要研究领域为合成生物学、生物制药和生物能源,是国家杰出青年基金获得者、基金委国家创新研究群体带头人、973 项目首席科学家和 Fellow of IchemE。近年来主要致力于基因组设计与合成研究,完成了酿酒酵母 5 号和 10 号染色体的从头合成,突破了合成型基因组导致细胞失活的难题,并设计构建染色体成环疾病模型,开发出染色体缺陷靶点定位及修复技术。2017 年 3 月以独立通讯作者在 *Science* 同时发表 2 篇论文报道相关工作。近 5 年承担了国家基金委重大项目课题和国家创新群体研究项目等项目,已经在 *Science*、*Chemical Society Reviews*、*Metabolic Engineering*、*ACS Synthetic Biology* 等期刊上发表 SCI 论文 200 余篇,申请发明专利 70 余项。

酿酒酵母染色体设计与合成研究进展

徐赫鸣^{1,2}, 谢泽雄^{1,2}, 刘夺^{1,2}, 吴毅^{1,2}, 李炳志^{1,2}, 元英进^{1,2}

1. 天津大学化工学院, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072;

2. 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台, 天津 300072

摘要: 随着合成生物学的蓬勃发展, 基因组学的研究正在由读取基因组信息拓展到以编写基因组信息为主的合成基因组学时代。2009 年, 由 Jef D. Boeke 教授提出的人工合成酵母基因组计划(Sc2.0)旨在合成世界上首个真核生物基因组。在美、中、英、法、澳大利亚、新加坡等多国科学家的努力下, 目前已经完成 1/3 的酵母染色体的人工合成。本文从合成基因组学领域的发展历程出发, 介绍了 Sc2.0 计划中酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)染色体设计与合成的最新进展, 包括酿酒酵母 9 号染色体右臂、3 号染色体、2 号染色体、5 号染色体、6 号染色体、10 号染色体和 12 号染色体的设计与合成过程, 阐述了其各自的合成策略以及生物学意义, 以期为合成基因组学的深入开展提供借鉴与参考。

关键词: 合成基因组学; 合成酵母基因组计划(Sc2.0); 合成型酵母染色体

Design and synthesis of yeast chromosomes

Heming Xu^{1,2}, Zexiong Xie^{1,2}, Duo Liu^{1,2}, Yi Wu^{1,2}, Bingzhi Li^{1,2}, Yingjin Yuan^{1,2}

1. Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: With the rapid growth and development of synthetic biology, research in the genomics is advancing from

收稿日期: 2017-05-31; 修回日期: 2017-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 21390203, 21576198)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21390203, 21576198)]

作者简介: 徐赫鸣, 硕士研究生, 专业方向: 合成生物学。E-mail: 102569592@qq.com

通讯作者: 元英进, 博士, 教授, 研究方向: 合成生物学。E-mail: yjyuan@tju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.17-199

网络出版时间: 2017/9/21 13:33:50

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170921.1333.001.html>

genome sequencing to genome synthesis. In 2009, Professor Jef D. Boeke proposed the Synthetic Yeast Genome Project (Sc2.0), which aims to synthesize the world's first eukaryotic genome. With the efforts of scientists from the United States, China, Britain, France, Australia, Singapore and other countries, a third of the *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes has now been synthesized. In the perspectives of synthetic genomics, we here review the recent progress in the Sc2.0 project, including discussion on the right arm of chromosome , and chromosomes , , , in terms of their designs and synthetic strategy as well as the biological significance, thereby providing a reference for further research in synthetic genomics.

Keywords: synthetic genomics; synthetic yeast genome project (Sc2.0); synthetic yeast chromosomes

21 世纪初, 众多物种基因组的测序工作相继完成, 为运用合成生物学方法设计物种遗传基因, 赋予生命体全新遗传性状提供了数据支持。从 2004 年美国麻省理工学院举办第一届合成生物学国际会议 (SB1.0) 到 2017 年第七届国际合成生物学大会 (SB7.0) 在新加坡举行的 14 年间, 合成生物学研究逐渐步入快速发展的阶段, 合成生物技术也不断成熟。合成基因组学 (synthetic genomics) 包括对基因组的设计、化学合成、组装与移植等关键技术的研究, 尤其侧重于对基因组整体的设计与合成。在合成生物学蓬勃发展的背景下, 从合成基因组角度开展的科学

研究正受到越来越多的关注 (图 1)。

早期基因组合成工作属于“复制合成”, 即在不对天然基因组序列进行大量变动的前提下, 实现具有生命活性基因组的全化学合成。这一时期的研究主要是利用反向遗传学的方法重建病毒基因组。例如, 2002 年 Cello 等^[1]合成了长度为 7.5 kb 的脊髓灰质炎病毒; 2003 年, Smith 等^[2]合成了长约 5.4 kb 的 X174 噬菌体病毒基因组。病毒基因组大小从几 kb 到几百 kb 不等, 从功能上来说相对简单。随着合成基因组学的发展^[3,4], 人们逐渐开始挑战更大尺度基因组的合成。2008 年, Gibson 等^[5]合成了已知

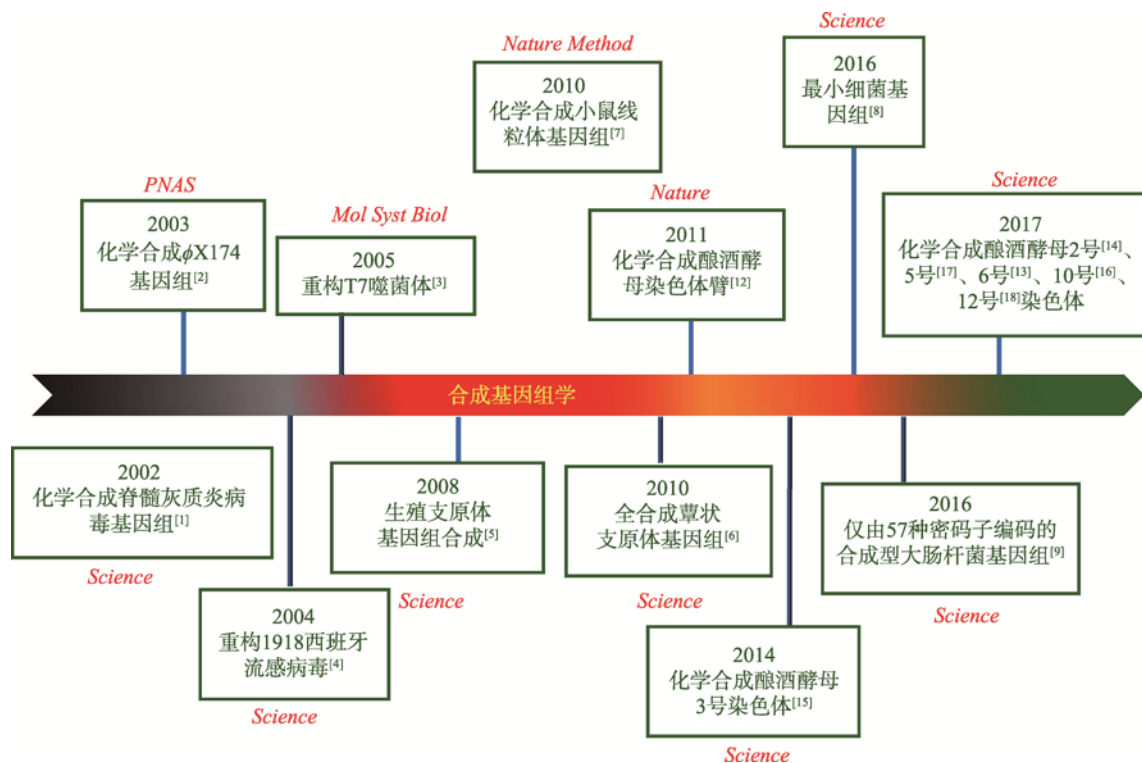


图 1 合成基因组学研究领域取得的重要性成果

Fig. 1 Milestones in synthetic genomics

的最小原核细胞基因组, 全长约 582 kb 的生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)基因组。2010 年, 又合成了全长 1.08 Mb 的蕈状支原体(*Mycoplasma mycoides*)基因组, 同时引入了水印标签^[6]。此后, 合成基因组学逐渐进入“设计合成”时代^[7], 人们开始对基因组中的某些结构进行设计, 再进行重建。其中, 具有代表性的工作主要有最小化支原体基因组、重编码大肠杆菌(*Escherichia coli*)基因组以及人工合成酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)染色体等。2016 年, Venter 课题组通过对合成型蕈状支原体基因组进行多轮设计、合成和检测, 最终得到维持支原体生长所必需的最小基因组(JCVI-syn 3.0), 将蕈状支原体基因组从 2010 年的 1.08 Mb 缩减到 531 kb^[8]。同年, Church 课题组对大肠杆菌基因组进行了重编码, 成功设计出仅含有 57 个密码子的大肠杆菌基因组^[9], 其在设计中留下的 7 个空白的密码子为利用密码子拓展等技术^[10,11]向生命体中引入非天然氨基酸奠定了基础, 在合成生物学领域研究中具有重要意义。2009 年, Jef D. Boeke 教授提出人工合成酵母基因组计划(Sc2.0 Project)^[12]。至今, 已有 6 条染色体被成功设计与合成出来^[13-18]。

本文从 DNA 合成与组装技术角度, 对酿酒酵母染色体合成计划(Sc2.0)及其相关的研究进展进行介绍, 以为合成基因组学方面的研究提供借鉴与参考。

1 合成酵母基因组计划(Sc2.0)

1989 年 1 月, 酵母基因组测序计划启动。1996 年 1 月, 酿酒酵母基因组测序工作完成, 16 条酿酒酵母染色体, 12 Mb 基因组序列首次被揭示出来。在这次测序工作中, 人们发现了约 2000 个未知功能的基因, 这是此次测序中的重大发现, 它们的功能一旦研究透彻, 将会大大加深人们对酵母生命过程的认识。于是, 就在同一年, 欧洲成立了联合研究组织 EUROFAN(European Functional Analysis Network), 旨在完成对酵母未知功能基因的研究标注工作(Sc1.0 计划), 在 EUROFAN 的带动下, 许多科研组织也加入了对未知基因的功能进行探索的行列。

随着基因功能标注工作的完成, 越来越多关于酵母的研究文章得以发表, 对酵母生命过程的认识也达到了一个新的水平。2009 年, Boeke 教授提出

人工合成酵母基因组计划(Sc2.0 计划), 旨在对酿酒酵母整个基因组进行重新设计与化学再造。这是一项比较大胆的挑战, 直接关系到人们对目前酵母已标注基因的功能判断是否准确, 以及能否根据已有的知识做到真核生物基因组尺度上的重建。2011 年, Boeke 课题组成功实现了酿酒酵母 9 号染色体右臂和 6 号染色体左臂的设计与合成^[12], 提出了酿酒酵母人工染色体设计与合成应遵循的基本原则, 为这个项目的后续工作打下了很好的基础。许多高校、研究机构开始参与其中, 逐渐形成了一个美、中、英、法、澳大利亚、新加坡等多国联合的国际研究组织, 这是首次尝试对真核生物基因组的从头设计与合成。

酿酒酵母作为真核微生物研究的模式生物是首个被全基因组测序的研究对象。对酿酒酵母基因组的设计与重建是对目前酵母领域知识储备的直接检验。除此之外, 酿酒酵母在能源、医药、食品、环境等领域也有广泛应用。因此, 对酿酒酵母基因组的设计与合成, 不仅有利于人类对生物学基本问题的探索, 而且有利于酿酒酵母在工业、农业中的充分开发和利用。

2 人造酵母染色体的设计

2011 年, Boeke 课题组完成酿酒酵母 9 号染色体右臂和 6 号染色体左臂的设计合成^[12], 提出了酿酒酵母染色体设计的 3 个基本设计合成原则: (1)设计合成后, 在酵母生长情况、环境响应、组学变化等方面验证, 合成型菌株与野生型菌株表型尽可能相似, 即设计不影响生长; (2)在设计后的菌株中, 通常会删掉亚端粒、转座子、内含子等不稳定和基因组功能非必需的部分, 转移了 tRNA 基因的位置, 所以应尽可能保持设计后菌株的稳定性; (3)增加基因组操作的灵活性, 为后续对合成型染色体研究(如 SCRaMbLE 等)做准备。

2017 年, 基于上述原则的酿酒酵母基因组总设计方案全部完成^[19], 其中包括终止密码子 TAG/TAA 的替换、合成型 PCR 标签的引入, 冗余 tRNA 基因的删除, 以及 LoxPsym 位点的插入等。在这个设计方案指导下, 酿酒酵母的 2 号^[14]、5 号^[17]、6 号^[13]、10 号^[16]、12 号^[18]染色体合成工作相继完成。在总设

计方案中,野生型酿酒酵母基因组全长 12.07 Mb,设计后基因组长度为 11.35 Mb,其中 TAG/TAA 终止密码子替换了 1416 处,设计并引入合成型 PCR 标签,共计长度 0.19 Mb,tRNA、重复序列等被删除共计 0.15 Mb。利用密码子同义突变在酿酒酵母基因组的蛋白编码区引入了许多限制性核酸内切酶位点(RE site),长度共计 16 080 bp。

此外,在酿酒酵母基因组整体设计中,创新性地引入了 3932 处 loxPsym 位点。基因组整体构建一经完成,引入如此大规模的 loxPsym 位点重组将会使基因组结构产生巨大变化,非常有利于对基因组结构深入研究。LoxPsym 位点序列是回文结构的 loxP 序列,诱导表达 Cre 酶后,可在 loxPsym 位点处实现片段的插入、重复、转位、倒置以及删除。酿酒酵母基因组的整体设计中,非必需基因的 3'端都引入了 loxPsym 位点。Cre 酶可以诱导酿酒酵母染色体或基因组发生随机重排,这种重排机制被称为 SCRaMbLE 系统^[20]。应用 SCRaMbLE 系统,可以加速合成型染色体的进化过程,从而获得大量不同基因型和表型的合成型酵母^[21],为挖掘基因组新表型和提升生物性能建立了一个新平台。

3 人造酵母染色体的合成

3.1 DNA 合成与组装技术

1955 年,Michelson 等^[22]成功用 3',5'-磷酸二酯键首次将两个核苷酸连接,DNA 合成技术就此开始产生。1981 年,Beaucage 等^[23]实现寡聚脱氧核糖核苷酸(Oligo)自动化连接,在此基础上,慢慢形成了早期的柱式合成法。随后在 1991 年,固相亚磷酸胺化学合成法出现^[24],这一方法逐渐形成如今的芯片合成法,它将寡聚脱氧核糖核苷酸的合成过程从柱式合成法中解放出来,使 Oligo 的合成具备了高通量、低成本的特性,这对合成基因组学的发展有着重要意义。

DNA 片段组装技术多种多样、各具特点,短片段组装一般在体外进行。借助合成生物学模块化的思想,早期对 DNA 片段组装常采用 BioBrick 方法^[25],即 类限制性核酸内切酶介导的组装。该组装方法利用目的基因和载体两端特定的酶切位点,酶切后

将所需目的基因直接连入载体,进行扩增或表达。此种组装方法在当时大大标准化了合成生物学中的模块,降低了实验室之间模块互通时的不必要成本,然而其组装产物中会留有一段酶切连接后形成的疤痕,有时需要删除。于是在此基础上,出现了 Golden Gate 组装方法^[26],利用某些 类限制性核酸内切酶识别位点与切割位点不重叠的特点,进而实现无痕组装。BioBrick 和 Golden Gate 两种组装方法都具备标准化的特点,适合建立元件库,以便对基因进行保存以及后续克隆表达研究。但由于两种方法都要依赖限制性内切酶的识别位点,所以在大片段组装中两种方法的使用还有限制,这也是这类组装方法受长度限制(10 kb 左右)的主要原因之一。体外进行长片段组装通常还采用 Gibson 组装的方法^[27]。Gibson 组装主要利用核酸外切酶从片段的 5' 3'端进行消解,产生黏性末端,再利用连接酶将互补在一起的黏性末端进行连接,通常利用 Gibson 组装方法可以实现几十 kb 到几百 kb 片段的组装。

对更长 DNA 片段的组装通常在细胞内进行。按照组装机制不同,细胞内组装方法主要分为同源重组和位点特异性重组两种类型。同源重组是利用组装片段两端存在的同源序列进行重组。在大肠杆菌中,比较常用的同源重组如 Red/ET 系统,利用目的片段与载体片段的同源序列实现插入、替换、敲除以及点突变等组装或编辑操作^[28,29],以 BAC 为载体,最高可插入长达 300 kb 大片段。在酿酒酵母中,常利用酵母内源的同源重组机制进行大片段组装,有时利用 CRISPR 技术^[30-33]在同源序列处进行切割,进一步提高同源重组效率。2016 年,覃重军课题组将 Gibson 组装方法与酵母内源的同源重组机制结合,在酿酒酵母中实现了长达 1.03 Mb 大片段的组装^[34]。同源重组的优越之处在于不需设计特定位点,同源序列即可完成组装过程,适用性更广,仅在处理重复序列时存在问题。因此,除同源重组外,根据 DNA 序列特点有时还会用到 Cre/loxP^[35-39]、attB/P^[40]等位点特异性重组,将大片段 DNA 向染色体或质粒载体中的特定位置进行整合。与限制性内切酶类似,位点特异性重组也很依赖位点序列,所以在组装过程中,还要针对不同的目的片段,灵活选择具体组装的方法(表 1)。

表 1 常见 DNA 组装方法

Table 1 Common DNA assembly methods

组装技术	原理	适用长度	优点	不足	位置	参考文献
BioBrick	限制性内切酶识别	<10 kb	操作简便	位点限制, 疤痕	体外	[25]
Golden Gate	限制性内切酶识别	<10 kb	适于多次组装	位点限制	体外	[26]
attB/P	位点特异性重组	<20 kb	位点特异性整合	位点限制	胞内	[40]
Cre/loxP	位点特异性重组	<40 kb	诱导调控	位点限制	胞内	[35~39]
Red/ET	同源重组	<300 kb	重组效率高	同源性限制	胞内	[28,29]
Gibson assembly	外切酶、连接酶作用	<900 kb	操作简便	价格昂贵	体外	[27,34]
Yeast homologous recombination	同源重组	<1 Mb	重组效率高	同源性限制	胞内	[34]

3.2 合成型酿酒酵母染色体的层级组装

酿酒酵母染色体组装过程首先由 Oligo(~75 bp) 的合成开始。利用成熟的芯片合成技术, 将核苷酸逐步连接得到 Oligo, 然后通过重叠延伸 PCR (OE-PCR) 技术对 Oligo 进行组装, 得到 Building Block(~750 bp)。随后, 将 Building Block 进一步在体外或胞内组装为 Minichunk(~3 kb)、Chunk(~10 kb) 或 Megachunk(~50 kb)。然后, 利用酵母内源的同源重组机制向染色体中进行替换, 最终得到完整的合成型酿酒酵母染色体(图 2)。

短片段如 Oligo、Building Block、Minichunk 等主要通过体外构建的方式进行组装, 并以质粒为载体利用大肠杆菌自身复制对所需 DNA 片段进行富

集。针对稍长片段如 Chunk 或 Megachunk, 主要利用酵母内源的同源重组机制进行组装。组装过程巧妙利用 Leu 和 Ura 标签, 轮流将目的 DNA 片段带入染色体, 最终实现合成型基因片段向染色体中的替换。整个过程采取层级组装的方法, 与一般 DNA 组装过程相比, 更有利于对超大 DNA 中错误位点的修复。

3.3 酿酒酵母人工染色体设计与合成研究进展

3.3.1 人工合成酿酒酵母 9 号染色体右臂和部分 6 号染色体左臂

9 号染色体右臂是酿酒酵母染色体右臂中最小的一段, 是首先被设计合成的^[12]。Boeke 研究组选

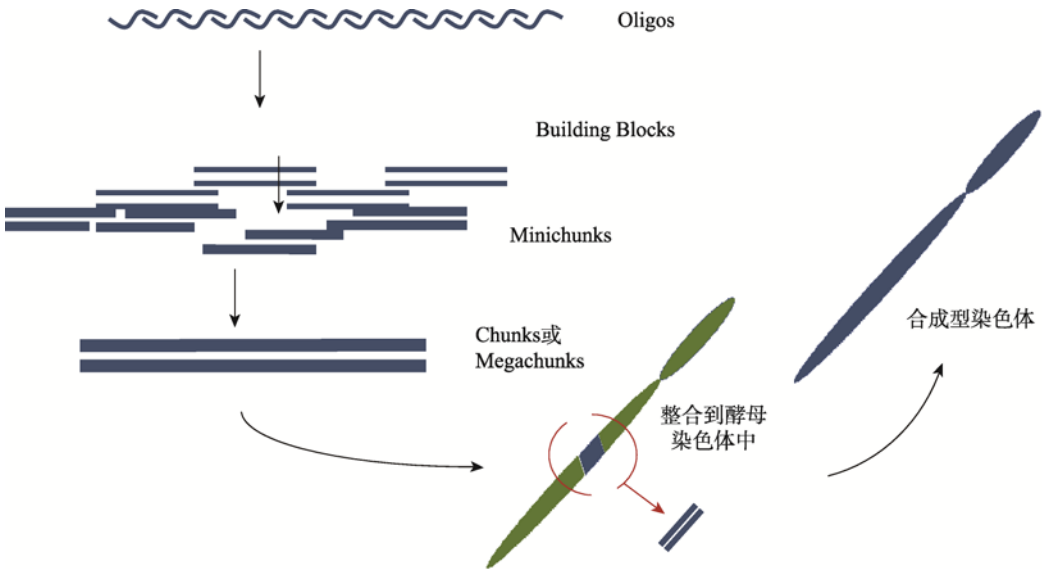


图 2 酿酒酵母染色体组装过程

Fig. 2 Chromosome assembling process of *Saccharomyces cerevisiae*

取染色体上 *YIL002W* 基因到右臂端粒部分的序列进行从头设计合成, 该区域位于野生型基因组的 350 585~438 993 bp 区段。设计部分删去了目标序列中的一个 tRNA 基因、一段长末端重复序列 Ty1 和区域中的端粒序列。除此之外, 还将所有的 TAG 终止密码子都替换为 TAA, 并在序列中引入了合成型 PCR 标签和 loxPsym 位点。设计后的染色体整体长度为 91 010 bp。由于设计部分删除了端粒, 所以整体片段最终插入到环形 BAC 载体上, 进而导入细胞作为环形 9 号染色体右臂开展后续研究。

9 号染色体右臂构建完成后, 将其导入了野生型二倍体酵母中, 并以 Leu 作为营养标签进行筛选。同时, 将截短了的野生型的 9 号染色体右臂替换为同时带有 Ura 标签和右臂端粒的 DNA 片段, 获得带 Ura 但不含野生染色体右臂基因的 9 号染色体, 即 9 号染色体左臂。紧接着, 通过对二倍体细胞 9 号染色体进行拆分, 将野生型的 9 号染色体、9 号染色体左臂以及环形 9 号染色体右臂相互分离, 最终通过 Leu 和 Ura 双标签筛选以及合成型 PCR 标签的验证, 获得同时含有 9 号染色体左臂和环形右臂的单倍体酵母(SynIXR 酵母)。

得到 SynIXR 酵母之后, 对合成型右臂部分的 RNA 丰度即转录组进行了分析。结果显示 SynIXR 酵母的转录组与野生型酵母转录组没有明显差异, 基本证明设计后的环形 9 号染色体右臂与野生型 9 号染色体右臂在功能上具有一致性。随后在 SynIXR 酵母中诱导表达了 Cre 重组酶, 通过合成型 PCR 标签进行筛选验证, 证实了 LoxPsym 位点间能够发生序列重排。并通过传代培养证明了引入的 LoxPsym 位点可以稳定存在并正常发挥功能, 整体上体现了设计之初所提出的设计原则。

除此之外, Boeke 研究组还对 6 号染色体右臂进行了类似的设计与合成。

3.3.2 人工合成酿酒酵母 3 号染色体

酿酒酵母 3 号染色体的设计与合成工作也是由美国霍普金斯大学 Boeke 课题组承担, 并在 2014 年完成^[15]。野生型 3 号染色体全长 316 617 bp, 设计过程针对染色体中 44 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换, 共向染色体序列中引入

100 处 loxPsym 位点, 通过引入合成型 PCR 标签修改染色体序列长度 5272 bp, 引入限制性核酸内切酶位点修改染色体序列长度 250 bp, 删除了 10 处 tRNA 编码序列共 794 bp, 删除重复序列共 7358 bp, 设计后的 3 号染色体总长度为 272 195 bp。

3 号染色体中含有酿酒酵母交配型性状控制基因, 是最早被设计与合成出的完整酿酒酵母染色体。Boeke 研究组以小的寡核苷酸单链(Oligo)开始逐步合成小的 Building Block(BB), 再到大一点的 Minichunk, 通过体内同源重组进行野生型染色体中 DNA 片段的替换, 最终通过合成型 PCR 标签进行验证, 得到了从头设计合成的 3 号染色体。组装过程完成后, 研究组对合成型 3 号染色体进行测序, 结果显示染色体中有 10 个位置与设计不一致, 9 处为碱基突变, 另一处是 loxPsym 位点处的大段丢失。进一步研究显示 9 处碱基突变中有 4 处为组装整合过程中引入的, 说明了同源重组过程中偶尔会引起 DNA 片段发生突变。

此外, 为了验证合成型 3 号染色体的功能, 该研究组对带有合成型 3 号染色体的酵母与野生型酵母 BY4742 进行了对比, 在菌落大小、生长曲线以及不同环境条件下的菌落形态等 3 个方面进行了比较, 结果显示野生型酵母与合成型酵母之间的生长差异不大。随后对合成型和野生型的酵母进行了转录组分析对比, 结果显示野生型酵母与合成型酵母之间有 10 处较大的差异, 8 处与设计时的预期结果一致, 其余 2 处分别为合成型酵母中 3 号染色体上 *HSP30* 基因的表达下调 16 倍, 以及 14 号染色体上 *PCL1* 基因的表达上调 16 倍。

该研究还对删除 tRNA 是否影响染色体稳定性的问题也进行了探究。通过与野生型染色体对比, 发现在较长的染色体中删除 tRNA 对染色体的稳定性影响不是很大。此外, 研究发现 SCRaMbLE 系统对单倍体的致死率很高。他们借助对杂合二倍体进行 SCRaMbLE, 寻找其中的原因。研究利用带有交配型基因(位于合成型 3 号染色体上)的单倍体合成型酵母, 与野生 a 型单倍体酵母进行交配形成杂合二倍体, 随后诱导其开启 SCRaMbLE 系统, 结果显示多数酿酒酵母菌体在显微镜下呈现出芽生殖形态。通过对交配型基因测序验证, 发现绝大多数合

成型染色体中丢失 基因。所以,单倍体 SCRaMbLE 实验中致死率很高的问题,很大程度上是由 Cre 酶诱导染色体基因重排到质的必需基因删除所致。

酿酒酵母 3 号染色体作为第一条被完整合成出来的酵母染色体,对 Sc2.0 计划的发展有着很重要的影响。

3.3.3 人工合成酿酒酵母 2 号染色体

酿酒酵母 2 号染色体的设计与合成工作是由深圳华大基因公司承担,并于 2017 年完成^[14]。野生型 2 号染色体全长 813 184 bp,设计过程针对染色体中 93 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换,共向染色体序列中引入 271 处 loxPsym 位点,通过引入合成型 PCR 标签而修改染色体序列长度 13 651 bp,引入限制性核酸内切酶位点修改染色体序列长度 1215 bp,删除了 13 处 tRNA 编码序列共 993 bp,删除重复序列共 7030 bp,设计后的 2 号染色体总长度为 770 035 bp。

设计中分别对 2 号染色体的左臂和右臂进行了合成,然后利用同源重组将左臂与右臂整合到一起,从而得到完整的 2 号染色体。在大片段整合的过程中,采用了 *-Sce* 位点介导的大片段整合策略。首先向片段中引入依靠营养缺陷筛选的标签基因和 *-Sce* 位点,然后通过同源重组将整个片段插入到染色体中,紧接着向酵母中导入带有 *-Sce* 限制性核酸内切酶基因的质粒,并利用半乳糖诱导该限制性核酸内切酶的表达,对 *-Sce* 位点进行特异性切割,最后,利用酵母自身的同源重组,将酶切后的两段染色体再一次进行重组,同时也利用这次重组将第一次引入的营养筛选标签成功删掉,以便后续利用。这种组装策略解决了整合过程中筛选标签的问题,在人工染色体的构建当中是一个值得借鉴的组装思路。

合成型 2 号染色体的重建过程遇到了许多问题。50 个单核苷酸发生了突变,5 个回文 LoxP 位点产生了丢失,4 处基因被删除和 2 处结构发生突变。由于 50 个单核苷酸突变都不存在于编码区,故未进行修正。两处结构突变和其余异常的部分都分别用上述 *-Sce* 位点介导的重组方法成功进行了修复。

此外,从菌体生长曲线、细胞表型和细胞形态

等 3 个方面对合成型酵母和野生型酵母对比分析发现,带有合成型 2 号染色体的酵母具有明显的生长缺陷。通过回补实验发现,一些设计序列,如筛选标签、合成型 PCR 标签等,影响了染色体中某些关键基因的表达。整个修复过程采用了 10 号染色体的纠错方法,极大体现了 Sc2.0 设计上的优越性。相较于细菌基因组的合成工作,引入合成型 PCR 标签和 loxPsym 位点之后,纠错与修复工作简单了许多,可以利用“混菌 PCR 标签定位技术”迅速找到错误位点。修复时在 4 个 Megachunk 中均发现筛选标签插入影响基因表达的情况,故将其删除,在 1 处合成型 PCR 标签的设计中,发现引入的 PCR 标签影响了 *YBR365W* 基因的表达,因此,对 *YBR365W* 基因中的 PCR 标签进行了重新设计。修复后的合成型 2 号染色体在形态学上对酵母细胞的生长不再有明显的影

响。为了在功能上对合成型 2 号染色体做进一步的验证,深圳华大基因对合成型 2 号染色体在酵母传代过程中的稳定性进行了研究,并在多种组学性质上与野生型酵母进行对比。已知在细胞分裂周期中,早期激活的复制起始位点都与 tRNA、转座子以及某些长末端重复的序列相邻。而在酿酒酵母 2 号染色体的设计过程中,这些位点大多都被删除,这很可能对染色体稳定性、细胞生长方面产生影响。通过进一步的实验发现,在合成型 2 号染色体中,这些早期激活的复制起始位点的功能并未受到影响,而且通过传代实验,也证实了合成型 2 号染色体在细胞中的稳定性。通过多种组学分析实验发现,除了删除某些 tRNA 基因引起的对应基因表达量正常变动外,合成型 2 号染色体与野生型 2 号染色体在功能上基本保持一致。

3.3.4 人工合成酿酒酵母 5 号染色体

酿酒酵母 5 号染色体的设计与合成工作由本课题组承担完成^[17]。野生型 5 号染色体全长 576 874 bp,设计过程针对染色体中 61 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换,向染色体序列中共引入 174 处 loxPsym 位点,通过引入合成型 PCR 标签修改染色体序列长度 8760 bp,为引入限制性核酸内切酶位点而修改染色体序列长度 813 bp,删除 20 处

tRNA 编码序列共 1471 bp, 删除重复序列共 11 181 bp, 设计后的 5 号染色体总长度为 536 024 bp。

酿酒酵母 5 号染色体的合成组装过程完成后, 从菌落大小、生长曲线以及细胞形态等三个方面对合成型酵母和野生型酵母进行了比较。结果显示合成型酵母与野生型酵母没有明显差别。紧接着对合成型 5 号染色体进行测序验证。发现在合成型染色体中, 共存在 34 处序列变化, 其中包括 31 处碱基发生了突变、2 处长片段重复突变和 1 处短片段重复突变。通过同源重组, 对全部 34 处序列变化成功修复。转录组测序结果显示合成型 5 号染色体与野生型 5 号染色体在主要基因的表达量上并无明显差异, 证明了合成型 5 号染色体与野生型在功能上具有一致性。

此外, 还对合成型 5 号染色体进行了环化研究。环形的 5 号染色体删除了两端的端粒序列, 在功能上与野生型基本无异, 但环化后的 5 号染色体在减数分裂过程中会导致子代孢子大量死亡, 对此还在进一步研究。

酿酒酵母 5 号染色体的最终序列与设计完全一致, 在合成过程中也不断对设计进行反馈优化, 实现了设计与合成的完美统一。

3.3.5 人工合成酿酒酵母 6 号染色体

酿酒酵母 6 号染色体的设计与合成工作是由美国约翰霍普金斯大学、纽约大学、以及 GenScript 公司共同承担合作完成^[13]。野生型 6 号染色体全长 270 148 bp, 设计过程针对染色体中 30 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换, 向染色体序列中共引入 69 处 loxPsym 位点, 通过引入合成型 PCR 标签修改染色体序列长度 4553 bp, 引入限制性核酸内切酶位点修改染色体序列长度 369 bp, 删除 10 处 tRNA 编码序列共 835 bp, 删除重复序列共 9297 bp, 设计后的 6 号染色体总长度为 242 745 bp。

在酿酒酵母 6 号染色体的合成过程中发现, 6 号染色体端粒侧旁的 *YFL055W* 基因编码的蛋白不能正常表达。于是, 对该基因是否受到端粒影响进行了探究, 对合成型的 6 号染色体进行了环化(删去端粒), 环化后的合成型 6 号染色体可以正常表达 *YFL055W* 基因。研究人员推测是由设计过程中删除

了亚端粒区序列(可缓冲端粒对邻近基因的影响)而导致, 于是通过回补实验对上述问题进行修正, 发现细胞仍在生长形态上具备缺陷。通过利用合成型 PCR 标签筛选确定, 该现象由 *PRE4(YFR050C)* 基因异常表达造成的。在对该基因的密码子进行同义替换后, 细胞成功恢复了正常。

酿酒酵母 6 号染色体的合成组装完成后, 研究人员选取合成型的 3 号、6 号染色体和环形 9 号染色体右臂共同转化酵母细胞进行研究。在细胞生长和形态方面, 同时含有 3 个合成型染色体的酵母细胞倍增时间相比野生型酵母增加了 15%, 细胞菌落比野生型略小。研究人员推测可能是删去的 tRNA 基因降低了代谢的水平所导致, 但该推测还需要等待 tRNA 的回补染色体完成后进行进一步实验来验证。同时含有合成型 3 号和 6 号染色体而不包含环形 9 号染色体右臂的酵母细胞在细胞生长和形态方面与野生型酵母并没有较大区别。此外, 转录组学分析发现, 同时含有 3 个合成型染色体的酵母中存在两种微型质粒的丢失。这在后续 10 号染色体的设计合成过程当中也有同样情况发生, 可能是对酵母细胞不断传代分纯所致。此外, 利用蛋白质组学分析发现, 将 1 处的 tRNA 基因按照设计原则删掉并插入 LoxP 位点后, *HIS2* 蛋白的表达量下调。进一步分析发现, 删除 tRNA 基因并插入 LoxP 位点后, 恰好在 *HIS2* 编码基因的上游形成了一个对 *HIS2* 蛋白表达的抑制位点。这些研究结果也显示了多种组学分析在合成基因组学研究中的重要性。

3.3.6 人工合成酿酒酵母 10 号染色体

酿酒酵母 10 号染色体的设计与合成工作也是由本课题组承担完成^[16]。野生型 10 号染色体全长 745 751 bp, 设计过程针对染色体中 85 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换, 向染色体序列中共引入 249 处 loxPsym 位点, 引入合成型 PCR 标签修改染色体序列长度 12 582 bp, 引入限制性核酸内切酶位点修改染色体序列长度 1102 bp, 删除 24 处 tRNA 编码序列共 1853 bp, 删除重复序列共 7523 bp, 设计后的 10 号染色体总长度为 707 459 bp。

酿酒酵母 10 号染色体是从 Minichunk 开始组装以及整合的, 在 10 号染色体的初始设计合成的过程

中, 合成型酵母偶尔会出现表型缺陷, 对此开发了“混菌 PCR 标签定位技术”(pooled PCRTag mapping, PoPM), 成为这项工作的又一个重要亮点。PoPM 技术依靠染色体设计中引入的合成型 PCR 标签来发挥功能, 主要针对并解决由于序列设计失误而导致的合成型酵母表型缺陷的问题, 可以迅速确定染色体序列中设计失误的基因区段。将 Megachunk 转化酿酒酵母进行同源重组整合后偶尔会出现表型缺陷问题, 理论上按照表型和基因组成不同平板上的酵母菌落可分为 4 类, (1) 不含有设计失误基因区段的合成型酵母, 表型正常; (2) 含有设计失误基因区段的合成型酵母, 表型缺陷; (3) 含有正常序列的野生型酵母, 表型正常; (4) 不含有正常序列的野生型酵母, 表型缺陷。按照表型正常或缺陷将平板上的菌落分别进行收集, 理论上用合成型 PCR 标签不能扩增出表型正常组中的目的基因区段, 用野生型 PCR 标签不能扩增出表型缺陷组中的目的基因区段, 两者重叠区域即为出现问题的基因区段。上述即为 PoPM 技术的基本原理, 利用 PoPM 技术可迅速对问题基因区段进行确定并修补, 极大地推动了酿酒酵母染色体的设计与合成进程。

3.3.7 人工合成酿酒酵母 12 号染色体

酿酒酵母 12 号染色体的设计与合成工作是由清华大学戴俊彪课题组承担并完成^[18]。野生型 12 号染色体全长 1 078 177 bp, 设计过程针对染色体中 122 处 TAG 终止密码子进行了 TAG/TAA 的密码子替换, 向染色体序列中共引入 291 处 loxPsym 位点, 引入合成型 PCR 标签修改染色体序列长度 15 129 bp, 引入限制性核酸内切酶位点修改染色体序列长度 1539 bp, 删除 19 处 tRNA 编码序列共 1646 bp, 删除重复序列共 10 843 bp, 设计后 12 号染色体总长度为 999 406 bp。

合成过程将整个 12 号染色体分为了 6 段, 分别放入 6 个不同的酿酒酵母中, 采用分级组装的方式, 利用减数分裂时染色体之间发生同源重组的原理对 6 个片段进行组装, 并用合成型标签进行筛选验证, 最终得到全长的合成型酿酒酵母 12 号染色体。

酿酒酵母 12 号染色体中有许多串联排列的 rDNA 重复片段。rDNA 重复区的长度约为 1.5 Mb,

在酿酒酵母 12 号染色体的设计中, 删除了这些串联的 rDNA 重复片段。rDNA 中编码核糖体 RNA 的内部转录间隔区(ITS)在植物和真菌中一直被当做 DNA 分子标签, 以用于生物种属的鉴定。实验过程中以贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)的内部转录间隔区序列对合成型染色体进行替换, 获得可使合成型酵母被鉴定为贝酵母的 12 号染色体, 在不引起酵母细胞表型缺陷的情况下同样可以正常发挥功能。

4 结语与展望

通过对酿酒酵母染色体设计与合成, 人们从更深的层面理解了碱基与基因以及基因与染色体之间的关系。在染色体的某些位置上, 碱基突变并不会使细胞发生明显的变化, 但在一些关键位点, 碱基突变可直接导致细胞的死亡。染色体上同时存在严格控制生命变化的基因区域以及松散可变的基因区域。设计合成过程中发现, 染色体中如亚端粒区域等一些目前未知功能区域会影响邻近基因的表达, 染色体自身的空间结构也会对基因的表达造成影响。此外, 染色体上许多 tRNA 基因删除, 可能会影响菌体的生长。同时含有 3 条合成型染色体的合成型酵母倍增时间增加了 15%, 菌落形态变小。21 世纪初至今, 合成生物学不断发展, 但人类对染色体整体的认识还十分有限, 基因组中还有许多序列以及序列间的协同功能是人们所未知的, 还需要通过设计合成过程对其进行深入探索。

从 2014 年开始至今, 6 条酿酒酵母人工染色体设计与合成工作相继完成, 中国科学家完成了其中 4 条的合成工作, 并各具特点。华大基因利用 I-SecI 位点特异性组装方法对 2 号染色体进行设计合成; 天津大学设计合成了与序列完美一致的 5 号染色体, 同时在 10 号染色体的合成过程中建立了“混菌 PCR 标签定位技术”对合成型酵母染色体进行纠错与修复; 清华大学采用分级组装的方式完成对 12 号染色体的合成, 这些突破说明我国已在合成基因组学的技术手段方面已达到世界先进水平。

随着合成基因组学技术的发展, DNA 合成成本持续降低, 研究对象也从最初的病毒、细菌, 逐步到酵母, 其中的层级调控也越来越复杂。但人类对基因的探索不会止步于酵母, 终有一天会向人类自

身进发, 那时将需要每一个科研工作者不懈努力, 从而在合成生物学研究中取得好的成绩。

参考文献(References):

- [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): 1016–1018. [DOI]
- [2] Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15440–15445. [DOI]
- [3] Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol*, 2005, 1(1): 2005.0018. [DOI]
- [4] Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Sol ó rzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, Garc í a-Sastre A. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 2005, 310(5745): 77–80. [DOI]
- [5] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, Zaveri J, Stockwell TB, Brownley A, Thomas DW, Algire MA, Merryman C, Young L, Noskov VN, Glass JI, Venter JC, Hutchison III CA, Smith HO. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215–1220. [DOI]
- [6] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA, Smith HO, Venter JC. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52–56. [DOI]
- [7] Gibson DG, Smith HO, Hutchison III CA, Venter JC, Merryman C. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 901–903. [DOI]
- [8] Hutchison III CA, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, Gill J, Kannan K, Karas BJ, Ma L, Pelletier JF, Qi ZQ, Richter RA, Strychalski EA, Sun LJ, Suzuki Y, Tsvetanova B, Wise KS, Smith HO, Glass JI, Merryman C, Gibson DG, Venter JC. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, 2016, 351(6280): aad6253. [DOI]
- [9] Ostrov N, Landon M, Guell M, Kuznetsov G, Teramoto J, Cervantes N, Zhou M, Singh K, Napolitano MG, Moosburner M, Shrock E, Pruitt BW, Conway N, Goodman DB, Gardner CL, Tyree G, Gonzales A, Wanner BL, Norville JE, Lajoie MJ, Church GM. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science*, 2016, 353(6301): 819–822. [DOI]
- [10] Young TS, Schultz PG. Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon. *J Biol Chem*, 2010, 285(15): 11039–11044. [DOI]
- [11] Lee KB, Hou CY, Kim CE, Kim DM, Suga H, Kang TJ. Genetic code expansion by degeneracy reprogramming of arginyl codons. *ChemBioChem*, 2016, 17(13): 1198–1201. [DOI]
- [12] Dymond JS, Richardson SM, Coombes CE, Babatz T, Muller H, Annaluru N, Blake WJ, Schwerzmann JW, Dai JB, Lindstrom DL, Boeke AC, Gottschling DE, Chandrasegaran S, Bader JS, Boeke JD. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 2011, 477(7365): 471–476. [DOI]
- [13] Mitchell LA, Wang A, Stracquadanio G, Kuang Z, Wang XY, Yang K, Richardson S, Martin JA, Zhao Y, Walker R, Luo YS, Dai HJ, Dong K, Tang ZJ, Yang YL, Cai YZ, Heguy A, Ueberheide B, Fenyő D, Dai JB, Bader JS, Boeke JD. Synthesis, debugging, and effects of synthetic chromosome consolidation: synVI and beyond. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4831. [DOI]
- [14] Shen Y, Wang Y, Chen T, Gao F, Gong JH, Abramczyk D, Walker R, Zhao HC, Chen SH, Liu W, Luo YS, Müller CA, Paul-Dubois-Taine A, Alver B, Stracquadanio G, Mitchell LA, Luo ZQ, Fan YQ, Zhou BJ, Wen B, Tan FJ, Wang YJ, Zi J, Xie ZX, Li BZ, Yang K, Richardson SM, Jiang H, French CE, Nieduszynski CA, Koszul R, Marston AL, Yuan YJ, Wang J, Bader JS, Dai JB, Boeke JD, Xu X, Cai YZ, Yang HM. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4791. [DOI]
- [15] Annaluru N, Muller H, Mitchell LA, Ramalingam S, Stracquadanio G, Richardson SM, Dymond JS, Kuang Z, Scheifele LZ, Cooper EM, Cai YZ, Zeller K, Agmon N, Han JS, Hadjithomas M, Tullman J, Caravelli K, Cirelli K, Guo ZY, London V, Yeluru A, Murugan S, Kandavelou K, Agier N, Fischer G, Yang K, Martin JA, Bilgel M, Bohutskyi P, Boulter KM, Capaldo BJ, Chang J, Charoen K, Choi WJ, Deng P, DiCarlo JE, Doong J, Dunn J, Feinberg JI, Fernandez C, Floria CE, Gladowski D, Hadidi P, Ishizuka I, Jabbari J, Lau CYL, Lee PA, Li S, Lin D, Linder ME, Ling J, Liu J, Liu J, London M, Ma H, Mao J, McDade JE, McMillan A, Moore AM, Oh WC, Ouyang Y, Patel R, Paul M, Paulsen LC, Qiu J, Rhee A, Rubashkin MG, Soh IY, Sotuyo NE, Srinivas V, Suarez A, Wong A,

- Wong R, Xie WR, Xu YJ, Yu AT, Koszul R, Bader JS, Boeke JD, Chandrasegaran S. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, 2014, 344(6179): 55–58. [DOI]
- [16] Wu Y, Li BZ, Zhao M, Mitchell LA, Xie ZX, Lin QH, Wang X, Xiao WH, Wang Y, Zhou X, Liu H, Li X, Ding MZ, Liu D, Zhang L, Liu BL, Wu XL, Li FF, Dong XT, Jia B, Zhang WZ, Jiang GZ, Liu Y, Bai X, Song TQ, Chen Y, Zhou SJ, Zhu RY, Gao F, Kuang Z, Wang XY, Shen M, Yang K, Stracquadanio G, Richardson SM, Lin YC, Wang LH, Walker R, Luo YS, Ma PS, Yang HM, Cai YZ, Dai JB, Bader JS, Boeke JD, Yuan YJ. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4706. [DOI]
- [17] Xie ZX, Li BZ, Mitchell LA, Wu Y, Qi X, Jin Z, Jia B, Wang X, Zeng BX, Liu HM, Wu XL, Feng Q, Zhang WZ, Liu W, Ding MZ, Li X, Zhao GR, Qiao JJ, Cheng JS, Zhao M, Kuang Z, Wang XY, Martin JA, Stracquadanio G, Yang K, Bai X, Zhao J, Hu ML, Lin QH, Zhang WQ, Shen MH, Chen S, Su W, Wang EX, Guo R, Zhai F, Guo XJ, Du HX, Zhu JQ, Song TQ, Dai JJ, Li FF, Jiang GZ, Han SL, Liu SY, Yu ZC, Yang XN, Chen K, Hu C, Li DS, Jia N, Liu Y, Wang LT, Wang S, Wei XT, Fu MQ, Qu LM, Xin SY, Liu T, Tian KR, Li XN, Zhang JH, Song LX, Liu JG, Lv JF, Xu H, Tao R, Wang Y, Zhang TT, Deng YX, Wang YR, Li T, Ye GX, Xu XR, Xia ZB, Zhang W, Yang SL, Liu YL, Ding WQ, Liu ZN, Zhu JQ, Liu NZ, Walker R, Luo YS, Wang Y, Shen Y, Yang HM, Cai YZ, Ma PS, Zhang CT, Bader JS, Boeke JD, Yuan YJ. "Perfect" designer chromosome V and behavior of a ring derivative. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4704. [DOI]
- [18] Zhang WM, Zhao GH, Luo ZQ, Lin YC, Wang LH, Guo YK, Wang A, Jiang SY, Jiang QW, Gong JH, Wang Y, Hou S, Huang J, Li TY, Qin YR, Dong JK, Qin Q, Zhang JY, Zou XZ, He X, Zhao L, Xiao YB, Xu M, Cheng EC, Huang N, Zhou T, Shen Y, Walker R, Luo YS, Kuang Z, Mitchell LA, Yang K, Richardson SM, Wu Y, Li BZ, Yuan YJ, Yang HM, Lin JW, Chen GQ, Wu QY, Bader JS, Cai YZ, Boeke JD, Dai JB. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf3981. [DOI]
- [19] Richardson SM, Mitchell LA, Stracquadanio G, Yang K, Dymond JS, DiCarlo JE, Lee D, Huang CLV, Chandrasegaran S, Cai YZ, Boeke JD, Bader JS. Design of a synthetic yeast genome. *Science*, 2017, 355(6329): 1040–1044. [DOI]
- [20] Dymond J, Boeke J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioeng Bugs*, 2012, 3(3): 168–171. [DOI]
- [21] Shen Y, Stracquadanio G, Wang Y, Yang K, Mitchell LA, Xue YX, Cai YZ, Chen T, Dymond JS, Kang K, Gong JH, Zeng XF, Zhang YF, Li YR, Feng Q, Xu X, Wang J, Wang J, Yang HM, Boeke JD, Bader JS. SCRaMbLE generates designed combinatorial stochastic diversity in synthetic chromosomes. *Genome Res*, 2016, 26(1): 36–49. [DOI]
- [22] Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J Chem Soc*, 1955: 2632–2638. [DOI]
- [23] Beaucage SL, Caruthers MH. ChemInform abstract: Deoxynucleoside phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *ChemInform*, 1981, 12(36), doi: 10.1002/chin.198136353. [DOI]
- [24] Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, 251(4995): 767–773. [DOI]
- [25] Shetty RP, Endy D, Knight TF Jr. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *J Biol Eng*, 2008, 2: 5. [DOI]
- [26] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647. [DOI]
- [27] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison III CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 343–345. [DOI]
- [28] Fu J, Bian XY, Hu SB, Wang HL, Huang F, Seibert PM, Plaza A, Xia LQ, Müller R, Stewart AF, Zhang YM. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 440–446. [DOI]
- [29] Wang HL, Li Z, Jia RN, Hou Y, Yin J, Bian XY, Li AY, Müller R, Stewart AF, Fu J, Zhang YM. RecET direct cloning and Red α recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression. *Nat Protoc*, 2016, 11(7): 1175–1190. [DOI]
- [30] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [31] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [32] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo

- JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [33] Cobb RE, Wang YJ, Zhao HM. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol*, 2015, 4(6): 723–728. [DOI]
- [34] Zhou JT, Wu RH, Xue XL, Qin ZJ. CasHRA (Cas9-facilitated homologous recombination assembly) method of constructing megabase-sized DNA. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(14): e124. [DOI]
- [35] Sternberg N. Bacteriophage P1 site-specific recombination: III. Strand exchange during recombination at *lox* sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 603–608. [DOI]
- [36] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between *loxP* sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 467–486. [DOI]
- [37] Sternberg N, Hamilton D, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination: II. Recombination between *loxP* and the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 487–507. [DOI]
- [38] Abremski K, Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem*, 1984, 259(3): 1509–1514. [DOI]
- [39] Abremski K, Wierzbicki A, Frommer B, Hoess RH. Bacteriophage P1 Cre-*loxP* site-specific recombination. Site-specific DNA topoisomerase activity of the Cre recombination protein. *J Biol Chem*, 1986, 261(1): 391–396. [DOI]
- [40] Kuhstoss S, Rao RN. Analysis of the integration function of the streptomyces bacteriophage ϕ C31. *J Mol Biol*, 1991, 222(4): 897–908. [DOI]

(责任编辑: 刘钢)