

DNA 克隆和组装技术研究进展

史晏榕 孙宇辉*

(武汉大学药学院 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室 湖北 武汉 430071)

摘要: DNA 克隆和组装技术是重要的分子生物学工具。近年来,随着合成生物学的飞速发展,对大片段 DNA 元件的快速有效组装就显得尤为关键。同时,各种 DNA 克隆和组装技术也竞相发展起来。通过对基于非典型酶切连接、PCR、同源重组、单链退火拼接等原理发展起来的各种 DNA 克隆和组装技术进行综述,为合成生物学的进一步发展提供有效的操作工具。

关键词: DNA 克隆和组装, 非典型酶切连接, PCR, 同源重组, 单链退火拼接

Progress in DNA cloning and assembly techniques

SHI Yan-Rong SUN Yu-Hui*

(Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: DNA cloning and assembly techniques are essential tools for molecular biology research. With the recent advances in synthetic biology, efficient and fast assembly of large DNA including a number of genes is becoming more and more important. Meanwhile, a variety of DNA assembly methods are also developed very quickly. In this paper, various DNA assembly methods based on atypical enzyme digestion and ligation, PCR, homologous recombination, single strand annealing and splicing are summarized for providing effective technique tools for the further development of synthetic biology.

Keywords: DNA cloning and assembly, Atypical enzyme digestion and ligation, PCR, Homologous recombination, Single strand annealing and splicing

DNA 克隆和组装技术是现代分子生物学的一项重要重要工具。近年来,随着结构组学和蛋白组学的发展,特别是旨在应用工程学的研究思路及手段去设计改造基因、生物元件、生物途径,甚至整个基因组的合成生物学的迅速发展,组装 DNA 元件就显的越来越重要。虽然传统的利用 II 型限制性内切酶产生合适的 DNA 片段的酶切连接克隆策略仍然

在发挥着重要作用,但是由于酶切位点有限,这种方法在平行无缝克隆或多 DNA 片段组装方面已显现出其不足之处^[1]。本文综述了近年来根据非典型酶切连接、PCR、同源重组、单链退火拼接等原理发展起来的各种 DNA 克隆和组装技术,为合成生物学更加快速而高效地进行大片段 DNA 的克隆和组装提供技术支持。

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2012CB721005); 国家自然科学基金项目(No. 31470186)

*通讯作者: Tel: 86-27-68756642; 信箱: yhsun@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-29; 接受日期: 2015-03-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-04

1 非典型酶切连接技术

传统的利用II型限制性内切酶的酶切连接克隆策略虽然仍然在分子生物学领域发挥着重要作用,但是由于可用的酶切位点有限,其越来越难以满足研究者通过多片段组装来获得大片段DNA的需要。因此,迫切需要一些不受酶切位点限制的技术来解决这一问题。例如,依赖于同尾酶的BioBrick™技术和依赖于IIs型限制性内切酶的金门分子克隆技术(Golden gate cloning)技术。

1.1 依赖于同尾酶的BioBrick™技术

同尾酶(如 *Xba* I 和 *Spe* I、*Bgl* II 和 *Bam*H I 等)是指一类能够识别DNA分子中不同核苷酸序列,但能产生相同黏性末端的限制性内切酶。当酶切后的两个片段相连时,原来的酶切位点将不复存在,也就不能再被原有的限制性内切酶所识别,达到“焊死”状态。

BioBrick™技术最初由美国麻省理工学院的

Knight 研究组于2003年提出,它是通过在目的生物元件两端设计前置序列和后置序列(即同尾酶),然后利用这些同尾酶将这些不同的生物元件组合在一起产生新的有功能的元件^[2](图1)。因此,BioBrick™技术最大的优势就是能够利用一对同尾酶实现多个DNA片段的组装。当然,该法仍不能避免对DNA序列本身的依赖性,而且最主要的缺点是在元件连接处会留有额外新增的8bp的“疤痕”,而这段“疤痕”在某些情况下是不可接受的^[3]。

利用BioBrick™技术可以将一系列独立的生物元件,包括启动子、核糖体结合位点(RBS)、开放阅读框(ORF)及终止子等按照一定的顺序组装成一个有功能的基因或生物途径^[4]。在2013年,韩国玄武大学的Sohng研究组就成功利用BioBrick™技术将来自于环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)参与2-脱氧链霉素(2-Deoxystreptamine, 2-DOS)生物合成的3个基因 *btrC* (DOI合成酶基因)、*btrS* (氨基转移酶基

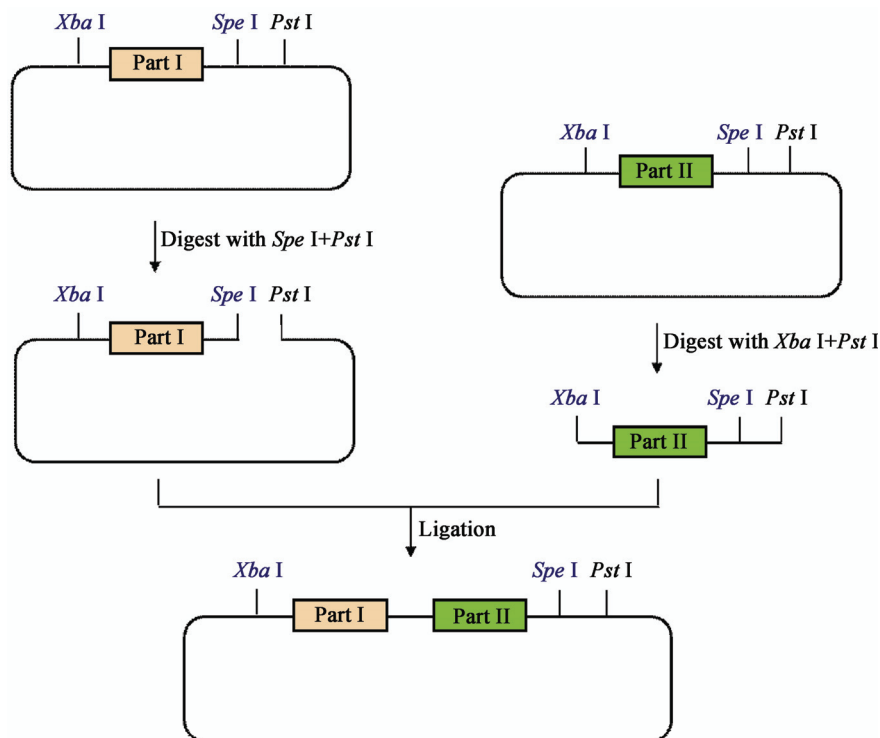


图1 BioBrick™技术组装流程
Figure 1 BioBrick™ assembly

因)和 *btrN* (脱氢酶基因)以及其相应的 T7 启动子、*lacO* 操纵子、RBS 序列及 T7 终止子进行体外组装,并在大肠杆菌中成功实现了异源表达^[5]。本研究组在庆大霉素(Gentamicin)等氨基糖苷类抗生素生物合成机制研究过程中^[6],通过 BioBrick™ 技术对参与庆大霉素前体生物合成所需基因 *genC* (DOI 合成酶基因)、*genS1* (氨基转移酶基因)、*genE* (脱氢酶基因)、*genM1* (糖基转移酶基因)进行了定向拼接,并成功检测到目标产物 2-N-acetylparomamine。

1.2 依赖于 IIs 型限制性内切酶的 Golden gate cloning 技术

IIs 型限制性内切酶(如 *Bsa* I、*Bbs* I、*BsmB* I 和 *Sap* I 等)是一类特殊的限制性内切酶,与分子生物学最常用的 II 型限制性内切酶(识别位点为回文对称序列,切割位点与识别序列重叠)不同,其识别位点是一个非回文对称的序列,而切割位点位于识别位点的外侧。因此,当被 IIs 型限制性内切酶酶切后的两个片段相连时,原来的识别位点将不复存在,在后续的酶切连接反应中也就不会再次被切割,也达到“焊死”的效果。

Golden gate cloning (图 2)就是利用 IIs 型限制性内切酶的这一特性在这些酶的识别序列外侧人为地设计切割位点不同的序列,然后利用同一限制性内切酶产生不同的黏性末端,从而一次性组装多个片段^[7],克服了传统多片段组装中需要同时使用多个不同限制性内切酶的不足。相对于 BioBrick™ 技术而言,该技术的最大特点是不会引入任何额外的“疤痕”,从而实现了 DNA 片段的无痕连接,但缺点是仍然避免不了内切酶本质上对 DNA 识别序列的依赖性。

2004 年,美国加利福尼亚大学旧金山分校的 Kodumal 等就利用 IIs 型限制性内切酶 *Bsa* I 和 *Bbs* I 对红霉素生物合成中 6-脱氧红霉内酯 B (6-Deoxyerythronolide B, 6-DEB)的所有合成模块进行碱基优化和克隆,组装成了一个连续的 32 kb 的聚酮合酶生物合成基因簇,并将其在大肠杆菌中成功异源表达^[8]。2013 年,中国科学院上海生命科学

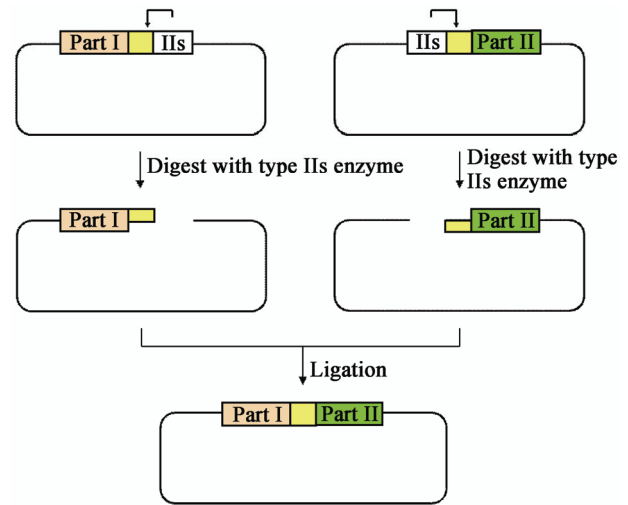


图 2 Golden gate cloning 技术组装流程
Figure 2 Golden gate cloning assembly

研究院的赵国屏研究组又利用一种可识别甲基化序列 ^mCNNR (R=A or G)的 IIs 型限制性内切酶 *MspJ* I, 发展了一种甲基化辅助末端连接 (Methylation-assisted tailorable ends rational ligation, MASTER)方法,并利用该方法成功组装完成了 29 kb 的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)放线紫红素生物合成基因簇^[9]。

2 PCR 技术

自从 20 世纪 90 年代 PCR (Polymerase chain reaction)技术被用于基因合成以来,一系列依赖于 PCR 的 DNA 克隆和组装技术也逐渐发展起来了。例如重叠延伸 PCR (Overlap extension PCR, OE-PCR)和环形聚合酶延伸克隆 (Circular polymerase extension cloning, CPEC)技术,这些技术都可以解决上述典型和非典型酶切连接对于序列依赖的问题,达到无痕、非序列依赖性的效果。

2.1 OE-PCR 技术

又称融合 PCR,它是利用两个具有互补末端的引物,使两段 PCR 产物末端产生重叠序列,然后通过重叠序列变性退火形成互补双链,在 DNA 聚合酶的作用下进行延伸,最后再利用两端引物扩增产生完整的融合双链 DNA^[10](图 3)。该法操作简单,

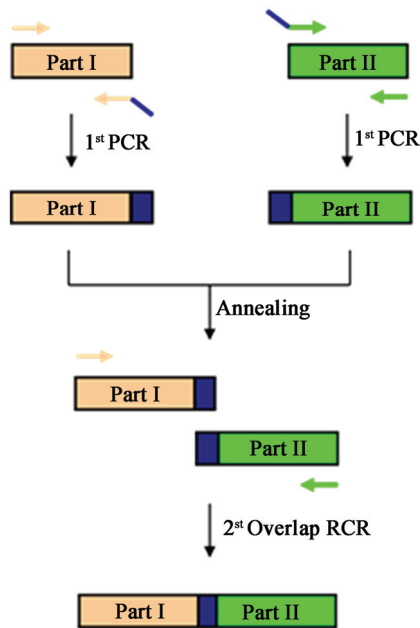


图3 重叠延伸 PCR 技术组装流程

Figure 3 OE-PCR assembly

周期短,已经广泛应用于基因克隆、定点突变和基因拼接等研究中^[11],而且国内外许多公司已经将其商业化。例如 Stratagene 公司研制的 QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kits 就是基于 OE-PCR 技术开发出来的进行基因定点突变的成熟试剂盒,并已经在许多研究工作中得到成功应用。如本课题组在探索兰卡杀菌素(Lankacidin)生物合成机制时,就利用该技术对可能参与其合成的两个脱水酶 LkcB 和 LkcC 中的活性催化位点进行定点突变,从而证明该脱水酶活性对于兰卡杀菌素的生物合成是必不可少的^[12]。

相对于上述的非典型酶切连接而言,OE-PCR 技术除需要依赖目的 DNA 片段末端序列产生重叠区外,整个 PCR 反应不受序列的限制,而且能够实现无痕连接,但却避免不了对 DNA 聚合酶高保真度的依赖。随着 DNA 片段长度的增加,PCR 反应效率逐渐降低,引入错误的概率也逐渐升高,因此,难以通过该技术组装较大的 DNA 片段。

2.2 CPEC 技术

与 OE-PCR 类似,CPEC 首先利用具有互补末端的引物,使线性双链 DNA 片段和载体末端产生重叠序列,然后通过该具有末端重叠序列的线性双链 DNA 片段和载体经过变性和退火得到具有重叠末端的单链产物,最后彼此互为模板和引物,在 DNA 聚合酶的作用下进行延伸得到环状载体,得到的重组载体直接转化大肠杆菌,利用大肠杆菌体内的修复机制得到完整双链环状目的克隆^[13](图 4)。这种方法最大的优势就是仅依赖于 DNA 片段之间以及片段与载体之间的末端重叠序列就可以简单高效地完成多个 DNA 片段的组装。但是由于该方法也依赖于 PCR,当序列高度重复或 G+C 含量较高时,就难以保证组装的精确性。

3 同源重组技术

同源重组是指含有重叠序列的 DNA 分子之间或分子内部的重新组合,其已经广泛应用于分子生物学研究中。当操作较大的 DNA 分子时,DNA 体外组装就会变得较为困难,这时就需要体内大片段 DNA 组装方法,例如目前最常用的酿酒酵母体内的转化耦联重组技术 (Transformation-associated recombination, TAR)和大肠杆菌体内的 Red/Rec 同源重组技术。

3.1 TAR 技术

TAR 是利用酿酒酵母体内高效的同源重组系统实现多个具有末端重叠序列的 DNA 片段的一步组装方法^[14](图 5)。它不仅能够方便地将较短的 DNA 片段组装成较长的 DNA 片段^[15],甚至还能够实现整个基因组的组装。

早在 2008 年,美国 J. Craig Venter 研究所的 Venter 课题组就在酿酒酵母中通过该技术完成了生殖道支原体(*Mycoplasma genitalium*)基因组(582 970 bp)的最后一步组装^[16]。2009 年,他们又对其进行了改进,将 25 个具有末端重叠序列的片段(17–35 kb)及一个线性化的载体在酿酒酵母中直接组装成一个携带该基因组的环形质粒^[17]。同样,他们在 2010 年利

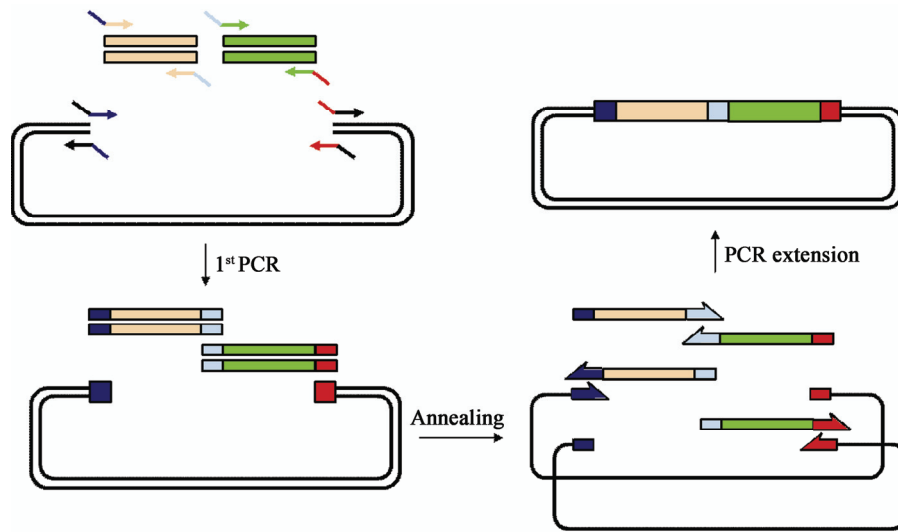


图 4 环形聚合酶延伸克隆技术组装流程
Figure 4 CPEC assembly

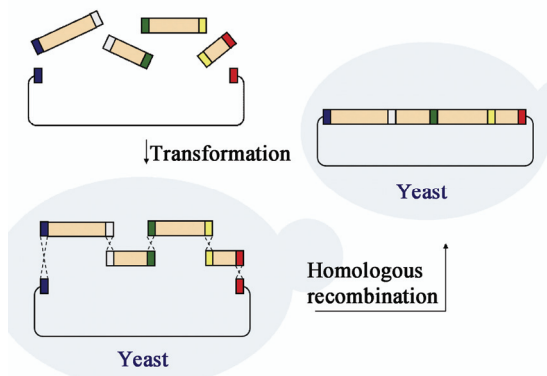


图 5 TAR 技术组装流程
Figure 5 TAR assembly

用酿酒酵母同源重组系统完成了 1 078 条大小为 1 080 bp 的 DNA 片段的组装, 最终人工合成了 1.08 Mb 的丝状支原体(*Mycoplasma mycoides*)基因组^[18]。

酵母体内的同源重组是到目前为止最高效的 DNA 大片段的组装方法, 在合成更长的 DNA 片段如基因组时有较大的优势。同时, TAR 克隆经过多年的发展、改进, 已经成为一种成熟的技术, 也已经应用到多个领域, 但是它也有自身的不足。例如, 当克隆大于 250 kb 的 DNA 片段时, DNA 断裂将成为一个重要的限制因素; 当克隆区域富含

重复序列时, 可能会在酵母有丝分裂过程中发生片段缺失; 当克隆区域富含 GC 时, 也难于在酿酒酵母中准确克隆。

3.2 Red/Rec 技术

Red/Rec 技术是一种基于 λ 噬菌体 Red 操纵子和 Rec 噬菌体 RecE/RecT 同源重组系统的 DNA 克隆技术。Red 同源重组系统主要由 Exo、Beta、Gam 蛋白组成, 分别由 λ 噬菌体 *exo*、*bet*、*gam* 基因编码。其中, Exo 具有 5'→3' 双链核酸外切酶活性, 能够形成末端 DNA 单链; Beta 是单链结合蛋白, 能够促进 DNA 分子间退火; Gam 能够阻止单链 DNA 片段的降解, 提高单链 DNA 分子的稳定性, 从而间接提高同源重组的效率。Rec 同源重组系统中除上述 Gam 蛋白外, Rec 噬菌体编码的 RecE 和 RecT 蛋白也能高效促进同源重组^[19]。

相对于线型-线型同源重组 (Linear-linear homologous recombination, LLHR) 而言, Red/Rec 同源重组系统对于线型-环型同源重组 (Linear-circular homologous recombination, LCHR) 更为高效 (图 6A)。目前, 在大肠杆菌中进行基因敲除最常用的 PCR-targeting 技术就是依赖于 λ Red 系统介导的 LCHR 发展起来的^[20]。

2012年,德国亥姆霍兹药物研究院的Müller研究组证明了全长的RecE蛋白和RecT能够高效促进线型-线型同源重组(图6B),并利用该策略克隆了10个来自无色杆菌(*Photorhabdus luminescens*)的生物合成基因簇(10–52 kb),同时对其中两个成功进行了异源表达^[21]。此方法与传统的文库构建、筛选获得含目的DNA片段的方法相比,大大简化了筛选流程,而且由于文库构建具有随机性、包装容量有限,通常难以直接得到含完整目的DNA片段的载体,而全长的RecE/T则能更容易获得全长的目标基因簇。但是,相对于上述的TAR技术而言,全长的RecE/T介导的LLHR只能克隆中等尺度的DNA大片段,而TAR则可以组装更大尺度的DNA片段,甚至基因组。

4 单链退火拼接技术

单链退火拼接技术,即所谓的Chew-back组装^[22],是指创造DNA分子之间的重叠区,通过连接或聚合的思想实现分子间的拼接。这种技术既跳出了限制酶的使用,利用DNA外切酶产生了较长的黏性末端;又应用等级化组装模式很好地规避了逐级添加的耗时耗力与一次性组装可能不正确的拼接,使得无论在组装的DNA片段数目还是尺度上变得更为高效。例如目前最常用的Gibson assembly和SLIC技术。

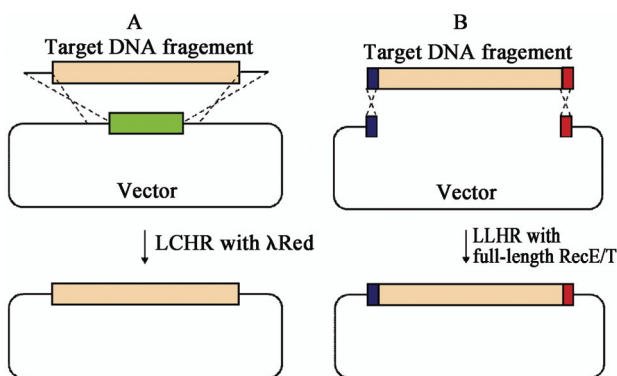


图6 λ Red介导的LCHR(A)和全长的RecE/T介导的LLHR(B)

Figure 6 LCHR mediated by λ Red (A) and LLHR mediated by full-length RecE/T (B)

4.1 Gibson assembly 技术

Gibson assembly技术又被称为“Gibson恒温一步组装法”,是美国J. Craig Venter研究所的Gibson等创建的一种DNA组装方法^[23],即利用T5核酸外切酶、DNA聚合酶及连接酶的协同作用在体外将多个带有末端重叠序列的DNA片段组装起来。其中,T5核酸外切酶具有5'→3'核酸外切酶活性,能够从5'端切割有重叠区的DNA片段产生3'突出末端,然后该单链DNA的重叠序列在50℃特异性退火(此时T5核酸外切酶逐渐失活),最后DNA聚合酶和Taq连接酶修复连接而成的双链DNA,从而形成完整的DNA分子,实现无缝拼接(图7)。

在2008年,Gibson等在构建生殖道支原体基因组时,首先采用自创的体外变温两步组装法获得了支原体1/4大小基因组^[16],然后对该技术进行改进,将这4个超过100 kb的片段在体外组装成了完整的583 kb的生殖支原体基因组。2010年,Gibson研究组又通过条件优化将600个带有20 bp重叠序列的60 bp的寡核苷酸在体外成功人工组装合成了16.3 kb的小鼠线粒体基因组^[24]。

由此可见,Gibson拼接技术可以简单快速地实现多个DNA片段的一次性无缝组装,而且组装尺度非常可观,现已成功组装的最大的DNA分子大小为1.08 Mb。但是随着一次组装的DNA片段的增多,其效率和正确率也会随之降低,而且需要的重叠序列也较长,引物合成的费用也相应增加。

4.2 SLIC (Sequence and ligation-independent cloning)技术

SLIC是一种不依赖于序列和连接反应的克隆方法^[25],主要利用T4 DNA聚合酶在无dNTPs存在的情况下发挥3'→5'核酸外切酶活性,将DNA片段消化产生含有末端重叠序列的5'黏性末端,然后DNA片段之间或DNA片段与载体之间依靠重叠序列退火(RecA可提高重组效率),形成环状中间体,最后直接转化大肠杆菌感受态细胞,利用大肠杆菌本身的修复系统修复成完整的环状重组质粒(图8)。2009年,美国哈佛医学院的Stephen Elledge研究组

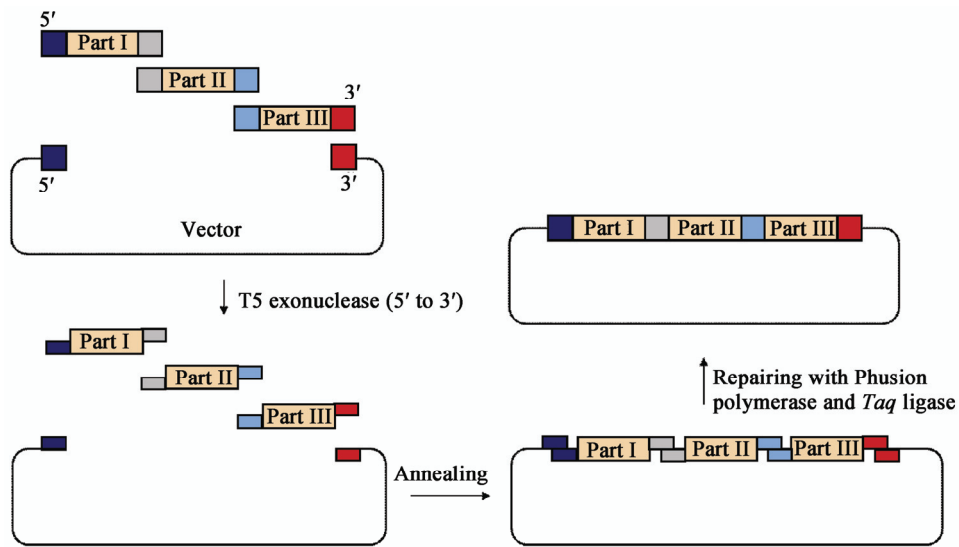


图 7 Gibson 拼接组装流程
Figure 7 Gibson assembly

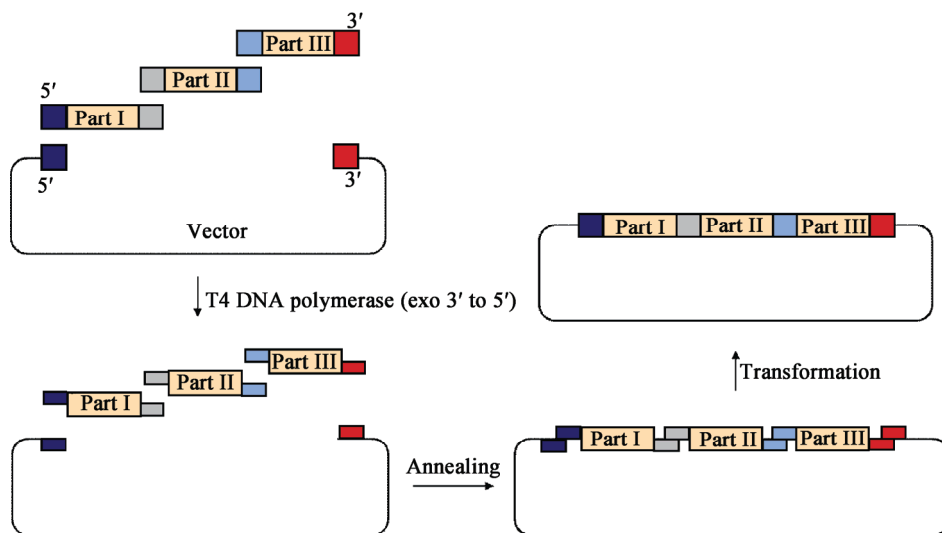


图 8 SLIC 标准流程
Figure 8 SLIC assembly

利用 SLIC 实现了 9 个含 40 bp 末端重叠序列的 DNA 片段(275–980 bp)的一步拼接^[26]。

SLIC 拼接法不需要连接酶,也不需要考虑插入的 DNA 片段本身的序列,可以实现多个 DNA 片段的一次性组装,是构建生物合成途径的一个有效技术。目前,国外许多公司已经将其商业化,例如 Novagen 公司的 Radiance™ 系统和 Invitrogen 公司

的 Gateway™ 系统都是基于此技术开发出来的。相对于上述 Gibson assembly 技术而言,SLIC 只需要一种酶(T4 DNA 聚合酶)即可完成多片段组装,而 Gibson assembly 则需要 T5 核酸外切酶、DNA 聚合酶及 Taq 连接酶的协同作用。但是该技术只能组装中等尺度的 DNA 片段,而 Gibson assembly 则可以组装高达 580 kb 的 DNA 大片段。

此外, In-Fusion™ Cloning^[27]也是一种与 SLIC 类似的不依赖于连接反应的组装技术, 不同的是 In-Fusion™ Cloning 使用的是一种功能类似的牛痘 DNA 聚合酶而非 T4 DNA 聚合酶, 而且它只需要 15 bp 的重叠序列, 而 SLIC 则需要至少 40 bp 的重叠序列。

5 总结与展望

综上所述, DNA 克隆与组装技术正处于一个快速发展的阶段, 除了本文中提到的系列 DNA 组装技术以外, 许多其他技术也快速发展起来。依赖于位点特异性重组酶的位点特异性重组 (Site-specific recombination) 可以对 DNA 片段进行一次性组装^[28-29], 而且不会进入任何错误; 依赖于特异性切割尿嘧啶的试剂的 USER cloning^[30]也是一种常用的 DNA 拼接技术; 依赖于单链退火拼接的一种连接酶循环克隆技术 LCR^[31]是一种高效高通量的体外 DNA 一步拼接法; 枯草芽孢杆菌体内重组方法的发展也使其成为组装基因组等大片段的候选底盘生物。此外, 用于从特异性和非特异性 PCR 产物中克隆特异性目的片段的 Quick and clean cloning 技术^[32]以及用于将外源 DNA 片段插入到目的载体的任何一个位置的 Restriction-free cloning^[33]和 Transfer-PCR cloning^[34]都是一些我们可以借鉴的 DNA 克隆技术。

当然, 无论是非典型酶切连接技术还是依赖于 PCR 的技术, 无论是体内的同源重组技术还是体外的单链退火拼接技术, 目前还没有一个理想的组装方法可以同时满足无序列依赖性、无痕、可按预设顺序进行快速平行组装, 并同时适用于基因、生物合成途径甚至是基因组的组装。不同的组装技术具有不同的适用性, 通常的策略都是几项技术的联合使用。同时, 要根据组装的 DNA 分子尺度、能否容忍 DNA 片段连接处“疤痕”的存在及组装序列的同源性程度等选择最适合的方法。

毋庸置疑, 未来的 DNA 组装将大大受益于计算机软件, 美国联合生物能源研究所就针对相邻片

段之间序列依赖性的模块化理解开发了一个专门的软件包 J5, 能够结合软件利用机器人进行自动化组装^[35]。相信在可预见的未来, DNA 合成将会更加快速、高效而廉价, 大规模基因组的合成将会成为现实; DNA 组装技术也会更加成熟, 很可能作为现代分子克隆技术的一个重要工具得到广泛的应用。

参考文献

- [1] Valla S, Lale R. DNA cloning and assembly methods[A]//Methods in Molecular Biology[M]. New York: Humana Press, 2014, 1116: 1-303
- [2] Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, et al. In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(8): 2624-2636
- [3] Anderson JC, Dueber JE, Leguia M, et al. BglBricks: a flexible standard for biological part assembly[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 4(1): 1
- [4] Vick JE, Johnson ET, Choudhary S, et al. Optimized compatible set of BioBrick™ vectors for metabolic pathway engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(6): 1275-1286
- [5] Chaudhary AK, Park JW, Yoon YJ, et al. Re-engineering of genetic circuit for 2-deoxystreptamine (2-DOS) biosynthesis in *Escherichia coli* BL21(DE3)[J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(2): 285-293
- [6] Guo JH, Huang FL, Huang C, et al. Specificity and promiscuity at the branch point in gentamicin biosynthesis[J]. *Chemistry & Biology*, 2014, 21(5): 608-618
- [7] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553
- [8] Kodumal SJ, Patel KG, Reid R, et al. Total synthesis of long DNA sequences: Synthesis of a contiguous 32-kb polyketide synthase gene cluster[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15573-15578
- [9] Chen WH, Qin ZJ, Wang J, et al. The MASTER (methylolation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(8): e93
- [10] Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. 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(1): 29-35
- [11] Wei HL, Hu J, Wang L, et al. Rapid gene splicing and multi-sited mutagenesis by one-step overlap extension polymerase chain reaction[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 429(1): 76-78
- [12] Dickschat JS, Vergnolle O, Hong H, et al. An additional dehydratase-like activity is required for lankacidin antibiotic biosynthesis[J]. *ChemBioChem*, 2011, 12(16): 2408-2412
- [13] Quan JY, Tian JD. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6441
- [14] Kouprina N, Larionov V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(10): 805-812
- [15] Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(20): 6984-6990

- [16] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1215-1220
- [17] 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(51): 20404-20409
- [18] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome[J]. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56
- [19] Ni XP, Ji ZX, Xia HZ. Manipulation of large DNA fragment using homologous recombination[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2014, 31(8): 663-668 (in Chinese)
倪现朴, 季州翔, 夏焕章. 同源重组方法在制备 DNA 大片段中的应用[J]. *沈阳药科大学学报*, 2014, 31(8): 663-668
- [20] Gust B, Challis GL, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(4): 1541-1546
- [21] Fu J, Bian XY, Hu SB, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440-446
- [22] Li L, Lu YH, Jiang WH. Perspective on the novel methods for DNA assembly[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(8): 1113-1122 (in Chinese)
李雷, 卢银华, 姜卫红. DNA 组装新方法的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(8): 1113-1122
- [23] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343-345
- [24] Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA III, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(11): 901-903
- [25] Li MZ, Elledge SJ. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning[A]//*Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*[M]. New York: Humana Press, 2012, 852: 51-59
- [26] Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 251-256
- [27] Berrow NS, Alderton D, Owens RJ. The precise engineering of expression vectors using high-throughput In-Fusion™ PCR cloning[A]//*High Throughput Protein Expression and Purification. Methods in Molecular Biology*[M]. New York: Humana Press, 2009, 498: 75-90
- [28] Herrmann S, Siegl T, Luzhetska M, et al. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1804-1812
- [29] Colloms SD, Merrick CA, Olorunniji FJ, et al. Rapid metabolic pathway assembly and modification using serine integrase site-specific recombination[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(4): e23
- [30] Nour-Eldin HH, Geu-Flores F, Halkier BA. USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories[A]//*Plant Secondary Metabolism Engineering. Methods in Molecular Biology*[M]. New York: Humana Press, 2010, 643: 185-200
- [31] de KS, Stanton LH, Slaby T, et al. Rapid and reliable DNA assembly *via* ligase cycling reaction[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(2): 97-106
- [32] Thieme F, Engler C, Kandzia R, et al. Quick and clean cloning: a ligation-independent cloning strategy for selective cloning of specific PCR products from non-specific mixes[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20556
- [33] Bond SR, Naus CC. RF-Cloning. org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Web Server issue1): W209-W213
- [34] Erijman A, Dantes A, Bernheim R, et al. Transfer-PCR (TPCR): a highway for DNA cloning and protein engineering[J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 175(2): 171-177
- [35] Hillson NJ, Rosengarten RD, Keasling JD. j5 DNA assembly design automation software[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(1): 14-21