

综 述

基因克隆及组装技术的研究进展*

盛晓菁 齐晓雪 徐 蕾 戚智青** 刁 勇**

(华侨大学医学院分子药物教育部工程研究中心 泉州 362021)

摘要 随着测序技术的发展,已知的 DNA 序列数量呈指数性增加,为了能更快的探索其未知的生物功能,一些简化组装流程的 DNA 克隆及组装新技术争相发展起来。其中大部分需要在菌体外构建重组体,但重组酶纯化过程复杂,运送和保存方法要求严格,致使成本较高。最近研究者开发了一些在菌体内进行 DNA 组装的简易、低成本的新方法。主要对各类基因克隆及组装方法的研究现状、原理和优缺点等进行综述,并结合实际的工作内容展望了未来的发展趋势,希望能为进一步研究开发新技术提供参考。

关键词 DNA 重组 重组酶 体内重组 体外重组

中图分类号 Q78

DNA 重组技术是指将两个或两个以上 DNA 分子重新组合并在适当细胞中增殖形成新 DNA 分子的过程。它的发展不仅改变了我们改造 DNA 的方式,也使得人们几乎可以随心所欲地分离及定向改造基因,实现了对基因的定点插入、敲除等目的。

自然界的 DNA 重组方式有多种,在真核和原核细胞中均可发生的同源重组(homologous recombination, HR)、位点特异性重组(site-specific recombination, SSR)和转座重组(transpositional recombination, TR)等。传统上,基因克隆是利用限制性内切酶和连接酶通过在体外连接的方法构建重组载体,但该方法步骤烦琐且受限于酶切位点。与传统的酶切连接法相比,最近发展起来的利用同源重组和位点特异性重组构建重组体的方法在快速高效等方面具有相当大的优势^[1-6],一些像 MultiSite Gateway® Pro kits (Life Technologies)、pEASY-Uni Seamless Cloning and Assembly Kit (TransGen Biotech) 和 Seamless Assembly Cloning Kit (CloneSmarter)等试剂盒已投入市场,然而这类试剂盒

的高成本令大多数实验室望而却步。

早在 1990 年, Bubeck 和 Oliner 便发现了在大肠杆菌内进行同源重组的现象^[7-8],令人惊讶的是这种方法在当时并没有得到广泛普及,随着生物合成时代的急速发展,酶切位点的日益匮乏及对快速、低成本克隆方法的迫切需求,几种利用大肠杆菌内源同源重组活性^[9-10]的无酶 DNA 克隆方法被重新提出。这些新技术与传统方法相结合,为构建精确的重组 DNA 分子提供了有效的工具。在这篇文章中,我们主要介绍了 DNA 组装方法的最新进展,并从这些方法的适用范围、存在的问题及应用等方面进行了分析和评述。

1 限制性内切酶

20 世纪 70 年代被 Werner Arber, Hamilton O. Smith 和 Daniel Nathans 发现的限制性内切酶(restriction endonuclease, RE)有 I、II 和 III 三种类型,用于 DNA 克隆的是 II 型酶,它能在指定的序列上切割 DNA,产生平末端或黏性末端。被同一种酶切割产生的末端可被连接酶再次连接。该方法虽然至今仍在应用,但在急速发展的 DNA 合成时代,局限性却越来越明显。首先,该法组装多个 DNA 片段耗时的多重克隆步骤难以满足大规模克隆的需要,克隆效率低且残留的模板质粒

收稿日期:2019-05-11 修回日期:2019-08-01

* 福建省科技计划高校产学研合作项目(2018Y4009、2016N5007)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:zqqi@hotmail.com; diaoyong@hqu.edu.cn

在后续的转化实验中易形成假阳性;其次,质粒的构建需找到合适的酶切位点才能完成,尤其想在分子量较大的质粒上找到合适的位点更是困难。此外,操作过程中使用的限制性内切酶和连接酶价格昂贵,对长片段、多片段克隆较为困难,需要大量人工、试剂和时间成本。

为了克服这些限制,研究人员利用同源重组和位点特异性重组原理开发出了各种在菌体内、外构建重组体的方法,这些方法不受载体和目的片段酶切位点和分子量大小的限制,仅依赖两者末端序列的同源性,可任意选择重组位点,操作简单,PCR产物一步定向克隆,节约了大量反应时间,大大发展了DNA重组技术。

2 体外重组

随着克隆技术的发展,我们把在菌体外进行人工操作的DNA重组,称为体外重组。目前上市的大多数同源重组或位点特异性重组试剂盒都是采用从大肠杆菌中提取与重组相关的活性物质在体外进行重组的方法,若线性载体和插入片段之间存在一定长度的同源序列,则可用提取的重组酶在体外进行重组。进行体外重组一般包括以下几个步骤:(1)根据酶切或PCR反应得到线性化载体;(2)对待连接的DNA片段引入同源序列;(3)利用提取的重组酶构建重组DNA分子;(4)将重组子转化到大肠杆菌中进行扩增。目前根据所用重组酶种类的不同大致可分为Gateway技术^[11](Invitrogen)、SLiCE技术^[12]、RecET技术^[13]、ExoCET技术^[14]和CATCH技术^[15]等类型。

2.1 Gateway 技术

由特异位点重组酶催化,在两个DNA序列的特异位点间发生的重组称为位点特异性重组。特异位点重组酶(site-specific recombinase, SSRs)则指的是能识别特定DNA序列并介导两个特定位点之间重组的酶,分为酪氨酸和丝氨酸两个主要家族。由Invitrogen公司研发的Gateway重组技术就是基于Lambda噬菌体位点特异性重组系统形成的体外重组技术^[11]。它使用的酶是酪氨酸家族中的一员,为高通量、多片段克隆提供了一种高效可靠的方法。

利用Gateway技术进行体外重组时,SSRs、宿主整合因子(IHF)、镁离子和含有特异位点的DNA片段是反应的必备条件。该方法需要入门载体和目的载体两种含有不同特异位点的载体,重组过程分两大步:首先,通过BP(attB和attP特异性重组位点)重组反应将

DNA片段连接到入门载体上;然后,将入门载体与目的载体、SSRs和IHF等物质混合后通过LR(attL和attR特异性重组位点)重组反应将DNA片段转移到目的载体上。单片段重组克隆只能将一个含DNA片段的入门载体转移到一个目的载体上,而多片段重组克隆则可以同时构建多个不同的入门载体并将它们同时重组到一个目的载体中。2016年,Bland等^[16]就根据此原理对霍乱弧菌遗传物质进行大规模重组研究了霍乱弧菌遗传物质复制的时间。

Gateway技术相比于传统的酶切克隆具有许多优势^[17]:它适用于高通量克隆、重复克隆和多片段克隆,允许使用多种类型的DNA序列,入门载体上的DNA片段能够快速高效地传递到多个目的载体中且能保持开放阅读框正确的插入方向,目的载体几乎适用于任何蛋白质表达系统。但与无缝克隆方法相比特异性重组位点序列较长且重组后易在目的载体上留下冗余碱基。因此,是否选择此方法取决于目的载体的使用频率,若不需要高度重复的克隆和表达实验,往往不值得采用该技术。

2.2 RecET 技术

噬菌体(phage)是侵袭细菌的病毒,必须生活在活菌中,有严格的宿主特异性。近几年,有人从K-12菌株中分离提取到整合在宿主染色体上Rac噬菌体基因表达的RecE、RecT重组酶和Lambda噬菌体基因表达的Red γ 重组酶用于体外同源重组。这三种重组酶分别扮演着不同的角色:RecE重组酶具有5'-3'的DNA核酸外切酶活性^[18],使双链DNA(double-stranded DNA, dsDNA)片段的同源区域暴露出黏性末端形成单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA),RecT重组酶可结合ssDNA并介导单链退火(single-strand-annealing, SSA)^[19]使其形成环状质粒,而Red γ 重组酶则发挥与大肠杆菌内源RecBCD核酸外切酶结合的功能,抑制其对外源DNA的降解作用。

Red/ET体外同源重组可在靶DNA分子的任意位点进行基因敲除、插入和点突变等操作,具有同源序列短(15bp以上)、不受酶切位点限制、重组效率高、操作简单等优点。

2.3 SLiCE 技术

无缝连接克隆提取物(seamless ligation cloning extract, SLiCE)是一种利用大肠杆菌细胞提取物介导短同源区体外重组的新方法。Zhang等^[20]利用提取物的体外同源重组活性,初步开发出这种新型DNA克隆方

法,尤其是从 PPY 菌株中制备的细胞提取物,更是提高了重组的能力和效率。

随后,为了验证该方法的普适性,Motohashi 等^[21]还尝试了其他没有经过任何基因修饰的 JM109、DH5 α 、XL10-Gold 和 Mach1 T1 等实验室常见菌株是否同样适用于 SLiCE。结果证明,提取条件进行了优化后从这几种种菌株中制备的细胞提取物虽然重组效率不如 PPY 菌株但仍具有足够的重组活性,可以将具有短同源臂(15bp 以上)的 DNA 片段和载体在体外与细胞提取物经过短时间(5~60min)的孵育直接转化进大肠杆菌中进行扩增。

虽然目前该方法的机制尚未完全阐明,但其高效的重组活性确实可以替代商用试剂盒中昂贵的专利酶^[22],并能同时将两个未经纯化的 DNA 片段融合到目的载体中构建重组体,也可应用于定点突变^[23]。除此之外,还能促进含有侧翼异源序列 DNA 片段之间的重组,并删除重组位点侧翼额外的异源序列,在重组位点产生精确的连接。SLiCE 技术不仅具有同时插入多个 DNA 片段的能力,且实验过程不需要基因修饰过的特殊工程菌^[24],可在实验室自制细胞提取液,易于操作,缩短了 DNA 的克隆时间,降低了 DNA 无缝克隆的成本。

2.4 CATCH 技术

近几年,由于 Cas9 蛋白在体内强大的基因编辑功能而被大家所熟知和热议。除此之外,Cas9 在体外的应用也为大片段基因的克隆带来了前所未有的高效和简便性。CATCH (Cas9-assisted targeting of chromosome segments)^[15]技术就是利用由导向 RNA (sgRNA) 引导的 Cas9 核酸内切酶功能与 Gibson 组装技术结合而成。sgRNA 是 crRNA (crispr RNA) 与 tracrRNA (transactivating RNA) 通过碱基配对形成的复合物,指导细胞裂解后 CRISPR-Cas9 在细菌染色体特异位点的切割^[25],利用约 20bp 的特异性识别位点,比传统的限制性内切酶具有更高的靶向特异性。目的基因从细菌染色体上释放出来后,跟设计带有与其 30bp 末端同源序列的载体一起混合在含有 T5 外切酶、TaqDNA 连接酶和高保真聚合酶的 Gibson 组装混合物中形成环状中间体,最后转化到宿主细胞内。

克隆长基因片段是基因工程必不可少的内容,CRISPR-Cas9 的体外应用可以直接克隆长片段基因,简化和加速了克隆工作的流程和时间。2018 年, Gabrieli^[26] 研究组利用优化的 CATCH 技术成功地从原

代人外周血细胞基因组中分离得到一个含有乳腺癌和卵巢癌易感基因 *BRCA1*、长达 200kb 的目的基因。但目前该技术对于长度大于 100kb 片段的克隆效率较低,且克隆的效率还会受到与 Cas9 切割效率有关因素的影响,未来还需要对特异性和效率进行优化,减少 CRISPR-Cas9 系统的脱靶效应^[27]。

2.5 ExoCET 技术

由于细菌和哺乳动物基因组的高度复杂性,线性载体和目的基因转化时同时进入宿主细胞的机会减少,直接限制了 Red/ET 克隆的效率。于是 Wang 等^[14]研发了一种采用体外酶切和退火技术与 RecET 同源重组技术相结合的新技术,ExoCET (exonuclease combined with RecET recombination)。它利用 T4 聚合酶 3' 外切酶活性,将两种线性 DNA 分子在体外转化前重组成环状载体,从而介导了两种线性 DNA 分子之间的高效同源重组。

ExoCET 在扩增 DNA 方面比聚合酶链反应 (PCR) 具有优势,虽然通过 PCR 也可以获得目的基因,但对 10kb 以上的 DNA 克隆仍需依赖于 DNA 文库的构建、基因筛选和亚克隆等步骤获取目的 DNA 进行功能研究。而现在 ExoCET 重组技术提供了一种直接克隆的新途径,它能够绕过 DNA 文库构建、筛选和亚克隆等繁杂的步骤,直接从细菌或哺乳动物复杂的基因组中克隆目的基因并将其连接到表达载体中,极大地简化了工作流程。尤其是人类基因呈多样性,从人类基因组中获得目的基因比菌类或实验动物面临更大的挑战。目前该技术可以实现从白色葡萄球菌的基因组中克隆出约 106kb 的基因片段,从复杂程度至少为 3.0×10^9 bp 的哺乳动物基因组甚至人类血液中成功克隆出 >50kb 的基因片段,为疾病诊断等提供了工具。除此之外,ExoCET 技术还成功地从磷光疟原虫和枯草芽孢杆菌混合的基因组中直接克隆到了 14kb 的 LUX 基因,由于环境样本通常含有多个物种,这就为环境来源样本的基因检测提供了强有效的手段^[14]。

3 体内重组

由于重组酶复杂的提取纯化过程,严格的运送保存要求,加上烦琐的体外重组步骤,研究者开发了一些可以在体内构建重组载体的方法。在体内重组的一个主要优点是它们不需要额外添加重组酶,且利用内源性重组酶构建重组载体时,大肠杆菌体内的复制和修复系统会监控质粒的重组过程,故重组产物基本不发

生突变,具有很高的保真度。我们把这种在细胞内发生 DNA 重组的现象称为体内重组。在体内,可以分为依赖 RecA 重组酶、依赖于 Red/ET 重组系统和其他类型在大肠杆菌中进行重组^[28]。

3.1 Red/ET 重组技术

大肠杆菌 *recBC sbcA* 突变株中的 *sbcA* 突变会激活 *Rac* 噬菌体整合在染色体上的 *RecE* 和 *RecT* 重组酶基因的表达,从而促进体内重组的发生,称为 *RecET* 重组^[13],主要介导线性片段和线性载体的重组 (linear-linear homologous recombination, LLHR)。随后, Muyrers 等^[29] 又将 *Lambda* 噬菌体上的 *Red α* 、*Red β* 、*Red γ* 整合到了大肠杆菌的 W3110 染色体上构建出利用 *Red* 操纵子进行同源重组的 *Red* 重组系统,主要介导线性片段和环状载体的重组 (linear-circular homologous recombination, LCHR),由于这两种重组的原理相似,所以将这两种方法统称为 *Red/ET* 重组。

Lambda 噬菌体的 *Red α* 重组酶与 *RecE* 作用相似, *Red β* 与 *RecT* 的作用相似,当 *RecT* 或 *Red β* 表达量变多时,重组的效率会相应提高。不同的是, *Red α* 、*Red β* 发挥重组功能时有两种重组机制,除了与 *RecE*、*RecT* 相同的单链退火机制介导的重组外,还有一种是需要 *RecA* 重组酶参与的单链侵入机制 (single-strand invasion),发生在 *dsDNA* 无法形成 *ssDNA* 时, *Red β* 重组酶在 *RecA* 等的作用下,侵入到 *dsDNA* 中,形成类似 Holliday 中间体的结构 (holliday juncture structure),之后依赖大肠杆菌的核酸内切酶完成中间体的拆分形成重组体^[30]。

目前,有不可转移系统和可转移系统两种方法可实现 *Red/ET* 重组,最早的 *Red/ET* 重组系统是将重组酶基因整合到宿主菌的染色体上构建出一些特殊工程菌。但由于构建的工程菌灵活性较差,后来使用的 *Red/ET* 重组系统基本都是将重组酶基因插到质粒上的可转移系统。适用于对经过消化处理的基因组 DNA 等长片段 DNA 的组装或细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 的修饰。

目前基于 *Red/ET* 重组的方法也在不断改进,尤其是全长 *RecE* 基因的发现^[31],对 50kb 以内的 DNA 分子可进行一步克隆^[32] 且不产生随机突变,具有很高的保真度,尤其对 BAC 等大分子的修饰具有无可比拟的优势。2019 年, Ma 等^[33] 利用其对革兰氏阴性菌多糖基因簇进行了快速、准确的克隆,用于后续多糖基因的研究。

3.2 基于 DH5 α 的重组

Red/ET 重组系统利用特殊的工程菌 (如 JC8679) 在大肠杆菌内直接将插入片段和载体转化到大肠杆菌中进行重组。近几年,有人发现直接利用实验室最常见的大肠杆菌 DH5 α (来源于 K-12 株) 也能像 JC8679 菌株一样具有内源重组活性,可在菌体内对两个含有同源序列的片段进行重组。有趣的是,早在 1993 年, Bubeck 等就曾证明大肠杆菌 DH5 α 具有重组短同源末端线性 DNA 片段的能力。但有关此方法的报道却很少也尚未被广泛应用于实验室的常规克隆,其原因可能是确切的机制还不清楚^[9-10],且克隆效率相对其他方法较低^[34]。然而,体内重组的简易性已引起了研究人员的重视,最近越来越多的研究致力于改进体内重组的缺陷并探索其重组机制。

Jacobus 和 Gross^[10] 通过大量的实验,得出同源臂长度、DNA 片段数量、DNA 分子大小对重组效率的影响关系,揭示了在大肠杆菌体内重组的内在优点,为达到理想的结果提供了参考。DH5 α 是实验室常用的克隆感受态细菌,利用 DH5 α 介导的重组只需要两个基本步骤:制备 DNA 片段和转化。DNA 扩增, *DpnI* 消化和转化可在一天内完成。这是一个简单、省时,可以最小成本将多个 DNA 片段准确地连接到载体上的 DNA 组装技术,大大节省了人力、时间和试剂成本^[35]。但其缺陷是重组效率相比其他方法较低且不稳定,目前还只适用于小片段 DNA (< 20kb) 的组装^[36]。

3.3 DH5 α 重组方法的初步改进

近年来市场上利用上述各种方法制备的试剂盒虽可方便购得,但大多数为国外进口,进口后对酶的分装、漫长的运输时间和严苛的保存温度不仅提高了试剂成本还可能会降低重组酶的活性,有时还不能及时供应,限制了实验的进程。其中一些重组过程中需要外切酶产生 *ssDNA* 末端的组装技术一般都是通过反应时间控制酶切时间,对酶切后产生的 *ssDNA* 长度无法准确把控,不适用于长度小于 200bp DNA 的组装。且如果酶切后暴露的黏性末端形成了稳定的二级结构,重组效率会大受影响。所以开发一种价低质优的国产重组试剂盒对降低重组实验成本具有重要的意义。

本研究组对基于 DH5 α 的重组方法进行了改进,利用本实验室提取纯化的一种与 DNA 结合的小分子蛋白质与 DNA 片段混合后进行转化^[37]。与未改进的方法相比,不仅稳定了实验结果,重组效率也得到显著提高。该方法组装过程中不需外切酶,利用含有同源序列的 *dsDNA* 末端即可进行重组,不会产生 *ssDNA* 末

端形成二级结构的现象,对较小的 DNA 片段也可以成功组装成重组体。不过该方法目前需要进一步优化实验条件,使之与其他重组技术相比更低价、快速。

4 总结与展望

本文主要对各类重组方法的优缺点进行了对比,对各种方法的效率和实用性进行了评价(表 1)。Gateway 技术在高通量克隆、重复克隆等方面具有独到的优势,但各种特异性重组位点和目的载体种类的缺乏限制了实验选择。相比之下 SLiCE 技术和 Red/ET 重组的主要优点是重组过程不需要可能干扰实验的特异性重组位点^[38]。然而,它们的显著缺点是重组的准确性较 Gateway 技术低,重组产物需要进行后期测序验证,SLiCE 对大片段基因的克隆能力有限,比较适合小分子 DNA 的组装^[39]。CATCH 技术和 ExoCET 技术都可以对大片段 DNA 进行直接克隆,但它们也有各自的优势和缺陷,CATCH 组装时会残留大量的空载导致假阳性现象,且这种方法目前似乎只适用于原核基因组。而 ExoCET 在没有可以定位切割的限制位点的情况下,

也很难从基因组中分离出目的基因进行后续工作。未来可以将两种技术结合起来,在 ExoCET 技术没有限制位点时,利用 CATCH 技术中的 Cas9 作为体外内切酶开发一种新技术^[40]。

总的来说,体内和体外的各种重组技术都具有各自的优势,末端同源区长度对体外重组的影响不大,即便是较短的同源臂,重组效率也高。相对来说体内重组在短同源臂时的克隆效率则低于体外重组,但体内重组不需要经复杂过程分离纯化的重组酶,成本低廉、实验过程中也可省略体外重组步骤、保真度高是体内重组潜在的优势。所以这就要求研究人员在方法选择上结合自身需要选择最佳的方法。未来的新组装技术可以将多种方法结合在一起^[41-44],开发软件工具、引进自动化克隆技术实现像基因合成和 DNA 测序那样的商业外包服务^[45]。随着越来越多地 DNA 片段需要被克隆及组装去探索未知的生物功能,对新技术的研究还需要进一步集中于降低成本,同时提高效率和保真度等方面。

表 1 各种克隆及组装技术的比较
Table 1 Comparison of cloning and assembly techniques

Methods	Principle	Specific site	Homologous sequence	Scar	Multiple fragments	Time	Cost	Fidelity	Efficiency	DNA 大小
限制性内切酶	酶切连接	Yes	No	Yes	No	> 1 week	High	Normal	Low	Short
体外重组	Gateway	SSR	Yes	Yes	Yes	> 4d	High	Normal	Normal	Normal
	RecET	HR	No	Yes	No	< 2d	High	Normal	Normal	Normal
	SLiCE	Not clear	No	Yes	No	< 2d	Low	Normal	Normal	Short
	CATCH	HR	No	Yes	No	< 2d	High	Normal	Normal	Longer
	ExoCET	HR	Yes	Yes	No	< 2d	High	Normal	Normal	Longer
体内重组	Red/ET	HR	No	Yes	No	< 2d	High	High	Normal	Long
	DH5 α	Not clear	No	Yes	No	< 2d	Low	High	Low	Short
	优化的 DH5 α	Not clear	No	Yes	No	< 2d	Low	High	Normal	Short

致谢 本文受泉州市科技计划高层次人才项目(2018C042R)、华侨大学研究生科研创新基金(17013071021)资助

参考文献

[1] Liu C J, Jiang H, Wu L, et al. OEPR cloning: an efficient and seamless cloning strategy for large- and multi-fragments. *Sci Rep*, 2017, 7: 44648.

[2] Trehan A, Kielbus M, Czapinski J, et al. REPLACR-mutagenesis, a one-step method for site-directed mutagenesis by

recombineering. *Sci Rep*, 2016, 6: 19121.

[3] Garcia-Nafria J, Watson J F, Greger I H. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial *in vivo* assembly. *Sci Rep*, 2016, 6: 27459.

[4] Beyer H M, Gonschorek P, Samodelov S L, et al. AQUA cloning: a versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLoS One*, 2015, 10(9): e137652.

[5] Koskela E V, Frey A D. Homologous recombinatorial cloning without the creation of single-stranded ends: exonuclease and ligation-independent cloning (ELIC). *Mol Biotechnol*, 2015, 57(3): 233-240.

- [6] Cao P, Wang L, Zhou G, et al. Rapid assembly of multiple DNA fragments through direct transformation of PCR products into *E. coli* and *Lactobacillus*. *Plasmid*, 2014, 76; 40-46.
- [7] Oliner J D, Kinzler K W, Vogelstein B. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(22): 5192-5197.
- [8] Bubeck P, Winkler M, Bautsch W. Rapid cloning by homologous recombination *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(15): 3601-3602.
- [9] Kostylev M, Otwell A E, Richardson R E, et al. Cloning should be simple; *Escherichia coli* DH5alpha-mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLoS One*, 2015, 10(9): e137466.
- [10] Jacobus A P, Gross J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2015, 10(3): e119221.
- [11] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res*, 2000, 10(11): 1788-1795.
- [12] Zhang Y, Werling U, Edelmann W. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(8): e55.
- [13] Zhang Y, Buchholz F, Muirers J P, et al. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, 1998, 20(2): 123-128.
- [14] Wang H, Li Z, Jia R, et al. ExoCET: exonuclease *in vitro* assembly combined with RecET recombination for highly efficient direct DNA cloning from complex genomes. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(5): e28.
- [15] Jiang W, Zhao X, Gabrieli T, et al. Cas9-assisted targeting of chromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters. *Nat Commun*, 2015, 6: 8101.
- [16] Bland M J, Ducos-Galand M, Val M E, et al. An att site-based recombination reporter system for genome engineering and synthetic DNA assembly. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 62.
- [17] Reece-Hoyes J S, Walhout A. Gateway recombinational cloning. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 1: 94912.
- [18] Weller S K, Sawitzke J A. Recombination promoted by DNA viruses: phage lambda to herpes simplex virus. *Annu Rev Microbiol*, 2014, 68(1): 237-258.
- [19] Ivanov E L, Sugawara N, Fishman-Lobell J, et al. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1996, 142(3): 693-704.
- [20] Zhang Y, Werling U, Edelmann W. Seamless ligation cloning extract (SLiCE) cloning method. *Methods Mol Biol*, 2014, 1116: 235-244.
- [21] Motohashi K. A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 47.
- [22] Okegawa Y, Motohashi K. A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem Biophys Rep*, 2015, 4: 148-151.
- [23] Motohashi K. Seamless ligation cloning extract (SLiCE) method using cell lysates from laboratory *Escherichia coli* strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol*, 2017, 1498: 349-357.
- [24] Messerschmidt K, Hochrein L, Dehm D, et al. Characterizing seamless ligation cloning extract for synthetic biological applications. *Anal Biochem*, 2016, 509: 24-32.
- [25] Garneau J E, Dupuis M E, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [26] Gabrieli T, Sharim H, Fridman D, et al. Selective nanopore sequencing of human BRCA1 by Cas9-assisted targeting of chromosome segments (CATCH). *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(14): e87.
- [27] Sternberg S H, Redding S, Jinek M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, 507(7490): 62-67.
- [28] Lovett S T, Hurley R L, Sutter V J, et al. Crossing over between regions of limited homology in *Escherichia coli*. RecA-dependent and RecA-independent pathways. *Genetics*, 2002, 160(3): 851-859.
- [29] Muirers J P, Zhang Y, Buchholz F, et al. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev*, 2000, 14(15): 1971-1982.
- [30] Lu D, Danilowicz C, Tashjian T F, et al. Slow extension of the invading DNA strand in a D-loop formed by RecA-mediated homologous recombination may enhance recognition of DNA homology. *J Biol Chem*, 2019, 294(21): 8606-8616.
- [31] Fu J, Bian X, Hu S, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 440-446.
- [32] Wang H, Li Z, Jia R, et al. RecET direct cloning and Red $\alpha\beta$ recombineering of biosynthetic gene clusters, large operons or single genes for heterologous expression. *Nature Protocols*, 2016, 11(7): 1175-1190.
- [33] Ma Z, Wang P G. RecET Direct cloning of polysaccharide gene cluster from gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol*, 2019, 1954: 15-23.

- [34] Benoit R M, Ostermeier C, Geiser M, et al. Seamless insert-plasmid assembly at high efficiency and low cost. *PLoS One*, 2016, 11(4): e153158.
- [35] Motohashi K. Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods. *Biochem Biophys Rep*, 2017, 9: 310-315.
- [36] Huang F, Spangler J R, Huang A Y. *In vivo* cloning of up to 16 kb plasmids in *E. coli* is as simple as PCR. *PLoS One*, 2017, 12(8): e183974.
- [37] 华侨大学. 一种利用 DNA 非特异性结合蛋白 HU 蛋白构建克隆载体的方法: 中国(福建), CN201510602398.0. 2019-02-22. [2019-12-15]. <http://www.cnipa.gov.cn/>.
Qi Z Q, Qi X X, Hou D, et al. A method of constructing cloning vector using DNA nonspecific binding protein HU. Chinese: CN105200074B. 2019-02-22. [2019-12-15]. <http://www.cnipa.gov.cn/>.
- [38] Ohtsuka M, Kimura M, Tanaka M, et al. Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(2): 244-251.
- [39] Okegawa Y, Motohashi K. Evaluation of seamless ligation cloning extract preparation methods from an *Escherichia coli* laboratory strain. *Anal Biochem*, 2015, 486: 51-53.
- [40] Wang B, Hu Q, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*, 2018, 17(1): 63.
- [41] Taylor G M, Mordaka P M, Heap J T. Start-stop assembly: a functionally scarless DNA assembly system optimized for metabolic engineering. *Nucleic Acids Res*, 2018, 47(3): e17.
- [42] Lin D, O'Callaghan C A. MetClo: methylase-assisted hierarchical DNA assembly using a single type IIS restriction enzyme. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(19): e113.
- [43] van Dolleweerd C J, Kessans S A, Van de Bittner K C, et al. MIDAS: A modular DNA assembly system for synthetic biology. *ACS Synth Biol*, 2018, 7(4): 1018-1029.
- [44] Ding S, Gu Z, Yan R, et al. A novel mode of DNA assembly at electrode and its application to protein quantification. *Anal Chim Acta*, 2018, 1029: 24-29.
- [45] Casini A, Storch M, Baldwin G S, et al. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(9): 568-576.

The Research Progress of Gene Cloning and Assembly

SHENG Xiao-jing QI Xiao-xue XU Lei QI Zhi-qing DIAO Yong

(Institute of Molecular Medicine, School of MEDicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract With the development of sequencing technology, the number of known DNA sequences increase exponentially. In order to explore their biological functions more quickly, some new techniques have been developed. Most of these techniques require to construct plasmids *in vitro*, but the purification process of recombinant enzymes is complicated, transport and preservation are very difficult, which leads to high cost. Recently, researchers have developed simple and low-cost ways to assemble DNA *in vivo*. The research status, principle, advantages and disadvantages of all kinds of methods are reviewed and the trend is prospected in combination with practical work, hoping to provide a reference for the further research.

Key words DNA recombination Recombinase *In vivo* recombination *In vitro* recombination