

多片段酶切/连接反应结合同源重组的 DNA 组装方法

饶欣悦^{1,2}, 崇金阳^{1,2}, 贺诚^{1,2}, 毕莹莹^{1,2}, 唐刚敏^{1,2}, 吕育财^{1,2}, 龚大春^{1,2}, 杨潇^{1,2*}

1 三峡大学生物与制药学院 中国轻工业功能酵母重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2 三峡大学生物与制药学院 湖北省生物酵素工程技术研究中心, 湖北 宜昌 443002

饶欣悦, 崇金阳, 贺诚, 毕莹莹, 唐刚敏, 吕育财, 龚大春, 杨潇. 多片段酶切/连接反应结合同源重组的 DNA 组装方法[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1559-1570.

RAO Xinyue, CHONG Jinyang, HE Cheng, BI Yingying, TANG Gangmin, LÜ Yucai, GONG Dachun, YANG Xiao. DNA assembly by multi-fragment digestion/ligation and homologous recombination[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1559-1570.

摘要: 为了寻找一种准确高效的多片段组装及多点突变方案, 将目前常用的多片段组装方法进行了整合与优化, 并以果糖-1,6-二磷酸酶 1 (fructose-1,6-diphosphatase 1, FBP1) 基因 4 位点突变为例进行验证。通过引入突变位点和 *Bsa* I 识别序列连接含有突变位点的片段, 经过酶切/连接反应后扩增组装成功的目的片段, 并引入与线性化载体两端同源的序列, 最后进行片段与线性化载体的重组并转化大肠杆菌。经筛选与测序, 得到 4 位点突变重组质粒。该方案弥补了常规的 Gibson 组装和 Golden Gate 组装的部分缺点, 是一种高效进行多片段组装和多点突变的实验方案。

关键词: 定点突变; 多片段组装; IIS 限制性内切酶; 同源重组克隆

资助项目: 国家自然科学基金(32100946)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100946).

*Corresponding author. E-mail: yangxiao@ctgu.edu.cn

Received: 2023-11-19; Accepted: 2024-02-28

DNA assembly by multi-fragment digestion/ligation and homologous recombination

RAO Xinyue^{1,2}, CHONG Jinyang^{1,2}, HE Cheng^{1,2}, BI Yingying^{1,2}, TANG Gangmin^{1,2}, LÜ Yucai^{1,2}, GONG Dachun^{1,2}, YANG Xiao^{1,2*}

1 Key Laboratory of Functional Yeast of China Light Industry, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2 Hubei Research Center of Bioenzyme Engineering Technology, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

Abstract: To develop an accurate and efficient protocol for multi-fragment assembly and multi-site mutagenesis, we integrated and optimized the common multi-fragment assembly methods and validated the established method by using fructose-1,6-diphosphatase 1 (FBP1) with 4 mutant sites. The fragments containing mutations were assembled by introducing mutant sites and *Bsa* I recognition sequences. After digestion/ligation, the ligated fragment was amplified with the primers containing overlap region to the linearized vector. The amplified fragment was ligated to the linearized vector and the ligation product was transformed into *Escherichia coli*. After screening and sequencing, the recombinant plasmid with 4 mutant sites was obtained. This protocol overcame the major defects of Gibson assembly and Golden Gate assembly, serving as an efficient solution for multi-fragment assembly and multi-site mutagenesis.

Keywords: site-directed mutagenesis; multi-fragment assembly; IIS restriction endonuclease; homologous recombination and cloning

对蛋白编码基因进行定点突变、片段缺失和插入是对蛋白质性质进行研究和改造的重要手段。目前定点突变的方法主要有两类：质粒滚环扩增和多片段组装。基于滚环扩增法的 Stratagene QuikChange 定点突变试剂盒在研究中被广泛采用。Hunter 等使用 QuikChange 法对哺乳动物糖异生关键蛋白果糖-1,6-二磷酸酶 1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1, FBP1)进行了定点突变,发现 T32V 和 M178A 位点突变使得内源性变构抑制剂 5'-AMP 对 FBP1 的 IC_{50} 由 13.6 $\mu\text{mol/L}$ 分别变为 809 $\mu\text{mol/L}$ 和 3.78 $\mu\text{mol/L}$ ^[1];王睿等发现对华根霉脂肪酶的点突变(S85C/Q145C)引入的二硫键提高了酶的热稳定性^[2]。但是难以单独通过 QuikChange 法进行片段的缺失或插入^[3];除此之外,QuikChange 法需要进行质粒

骨架的扩增和模板的充分消化,对 PCR 酶的长片段扩增能力及 *Dpn* I 内切酶消化模板的效率有较高要求。实践中基于成本和时间的考虑,一般只会对突变区域进行测序,质粒骨架扩增中可能出现的突变难以被发现^[4]。

通过引物设计引入非配对碱基,再通过 PCR 扩增即可将突变位点引入至产物的两端。将含有突变位点的片段进行组装,即可得到多点突变的片段。而多片段组装不但可以用于点突变,还可以进行片段的缺失或者插入,并且无需进行质粒骨架的扩增,有效地弥补了 QuikChange 法的缺陷。此外,在合成生物学中,多片段组装可以将启动子、编码序列和终止子等元件按顺序组装到载体上构成特定的表达模块,用于人工设计非天然的代谢途径^[5]。多片段组装还可以将绿色荧光

蛋白(green fluorescent protein, GFP)等蛋白标记或其他蛋白与目的蛋白融合,用于表达非天然重组蛋白^[6]。因此高效准确的多片段组装方法具有更广泛的应用场景。

目前常用的多片段组装方法较多,如重叠延伸 PCR (overlap extension PCR, OE-PCR)、Golden Gate 组装、Gibson 组装和酵母体内组装法等。其中酵母体内组装法步骤多、工作量大,仅在涉及酵母的相关研究中使用,可以直接通过酵母体内的同源重组完成载体构建^[7]。重叠延伸 PCR 是传统的多片段组装方法,也常被用于定点突变和片段的缺失或插入。该方法成功的关键在于不同片段之间的重叠区域能否在退火阶段正确结合,然后互为引物延伸得到正确的融合片段。Heckman 等提出,需要通过对片段用量及退火温度的调整优化来避免产生错误大小的组装片段^[8]。重叠延伸 PCR 用于长片段或两个以上的多片段组装时效果较差^[4]。当需要进行多片段组装时,往往需要先进行相邻两片段间的重叠延伸,逐渐融合得到更大的片段,实验周期将随着片段数量增加而延长^[9-10]。Cha-aim 等的研究发现,片段之间重叠区域的序列会对片段融合有较大的影响,即使延长重叠区域的长度,改变退火温度有时也无法产生融合片段^[11]。GC 含量的不合适、复杂二级结构都可能会导致融合失败^[12]。还有研究者提出了其他优化的策略,例如加入 GC 增强剂等^[13]。因此实践中重叠延伸 PCR 影响因素较为复杂,有时需要反复优化实验条件才能获得融合片段再克隆到载体上,导致实验周期延长甚至无法获得融合片段。

Gibson 组装和 Golden Gate 组装是近年来常用的多片段一步组装方法,也被用于定点突变载体的构建。程盈盈等利用 Gibson 法对细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4)进行了单点和两点突变^[14]; Yan 等将 Golden Gate 组装用于多点突变载体的构建^[3]。相

较于重叠延伸 PCR 法,这两种一步组装法步骤明显简化,但这两种方法仍有一些不足:Gibson 组装受影响因素较多,当片段数量增加时,重组效率会显著降低且容易发生错误的重组^[15];Golden Gate 组装的“一锅法”酶切-连接反应用于多片段组装时准确度高,但对载体有一定的限制^[16]。

为了弥补上述方法在多片段组装及多点突变应用中的不足,本研究以 *fbp1* 基因(NM_019395.3)进行 4 位点突变为例,将 Golden Gate 组装和 Gibson 组装进行组合,并且对实验操作流程进行了优化,提供了一种高效、准确并且容易操作的多片段组装方法。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 DH5 α 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,质粒 pET28a 和 pET28a-FBP1 为本实验室保藏。使用氯化钙法制备大肠杆菌感受态^[17]。

1.2 试剂

2 \times KeyPo Master Mix、2 \times Rapid Taq Master Mix、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自南京诺维赞生物科技股份有限公司。*Bam*H I、*Xho* I、*Bsa* I 购自 New England Biolabs; T4 DNA Ligase 和 Seamless Cloning Kit 购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 引物设计及合成

引物采用 Primer Premier 5.0 软件和 NEB Golden Gate 在线工具(<https://goldengate.neb.com>)进行设计,并引入突变位点(T32V/Y82F/M178A/E281D)。以 4 个突变位点为界,*fbp1* 基因被分成 5 个片段,将这 5 个片段的序列导入 NEB Golden Gate 在线工具,用于设计片段与片段组装所需引物^[18]。片段两端引物参考 Seamless Cloning Kit 说明书设计引入同源序列。引物由武汉擎科生物科技有限公司合成,序列见表 1。其中 T7 为 pET28a

反应体系中完成, 特异的黏性末端使得片段可按顺序组装; 通过 PCR 扩增组装正确的目的片段, 片段两端含有线性化载体两端同源的序列; 扩增得到的片段与线性化载体重组, 转化大肠杆菌后进行筛选与鉴定。

2.2 片段的扩增、连接、重组和转化

以 pET28a-FBP1 质粒为模板, 以引物 F1f/F1r、F2f/F2r、F3f/F3r、F4f/F4r 和 F5f/F5r 扩增片段 F1-F5。PCR 产物经电泳检测, 得到 5 个预期大小的 DNA 片段(图 2A)。从凝胶中分

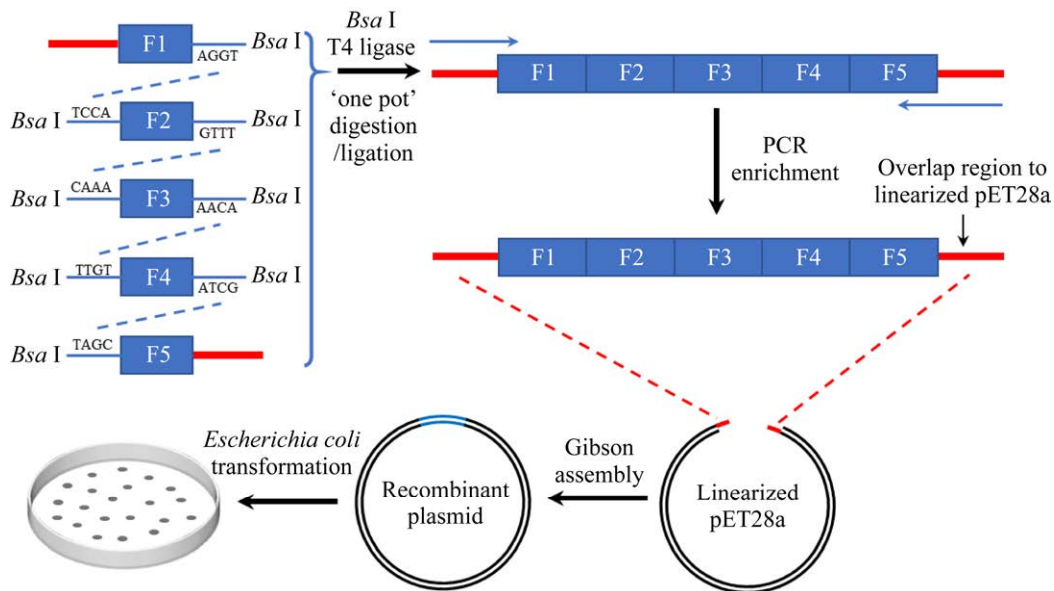


图 1 突变克隆过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of mutation cloning. DNA fragments containing the site mutation and *Bsa* I recognition sites were amplified from wild type pET28a-FBP1 plasmid. Fragments were assembled using 'one pot' digestion/ligation reaction with *Bsa* I and T4 ligase. Assembled fragment was amplified with primers containing overlap region to linearized pET28a. The amplified fragment was ligated with linearized plasmid using Gibson assembly and transformed into competent *Escherichia coli*.

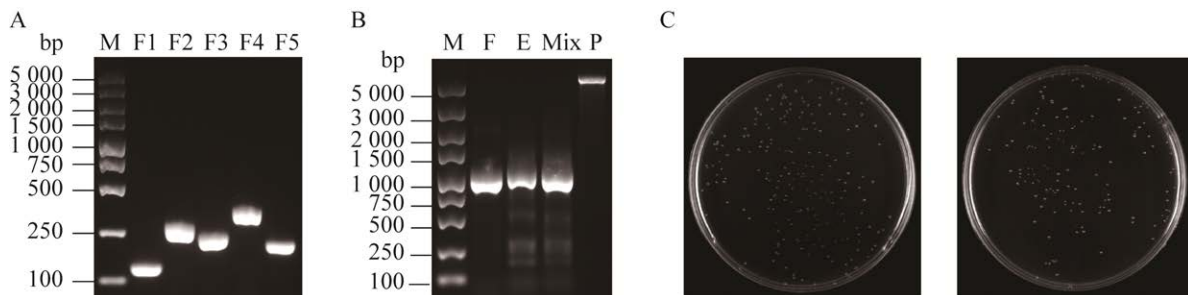


图 2 含突变位点的载体构建 A: 含突变位点的片段扩增. B: 组装片段及线性化载体的制备. C: 重组转化的菌落

Figure 2 Construction of plasmid containing mutations. A: Preparation of fragments containing mutant sites. Lane F1 to F5 were PCR products with F1f/F1r, F2f/F2r, F3f/F3r, F4f/F4r, F5f/F5r primers, respectively. B: Preparation of ligated fragments and linearized plasmid. Ligated fragments were amplified from cut-ligation reaction using F1f/F5r primers, using fragments with equal molecular ratio (E) or mixture of fragments (Mix) respectively. Lane F was amplified from pET28a-FBP1 as control. Lane P was linearized pET28a. M stands for DL5000 DNA Marker. C: Bacterial colonies of transformation using ligated fragments from cut-ligation reaction products using fragments with equal molecular ratio (left) or mixture of fragments (right).

别纯化每个 DNA 片段或将含有不同片段的凝胶混合后进行纯化,将得到的 DNA 片段或 DNA 片段的混合物用于后续的组装反应。使用等摩尔比的不同 DNA 片段(0.04 pmol)混合物及总量相当的 DNA 片段混合物(30 ng)进行酶切-连接反应后,以引物 F1f/F5r 扩增均能得到预期大小的组装片段,与以 pET28a-FBP1 质粒为模板扩增得到的未突变片段的大小一致;pET28a 载体经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切得到了预期大小的

线性化载体(图 2B)。将扩增得到的组装片段与线性化载体重组后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经卡那霉素平板筛选均能得到大量菌落(图 2C)。

2.3 重组质粒的鉴定及测序

分别从上述平板各挑取 10 个单菌落,以引物 T7/F5r 进行菌液 PCR 鉴定,结果显示所有克隆均为阳性(图 3A)。为检测重组质粒是否得到了预期的突变,分别取 2 个质粒进行了测序鉴

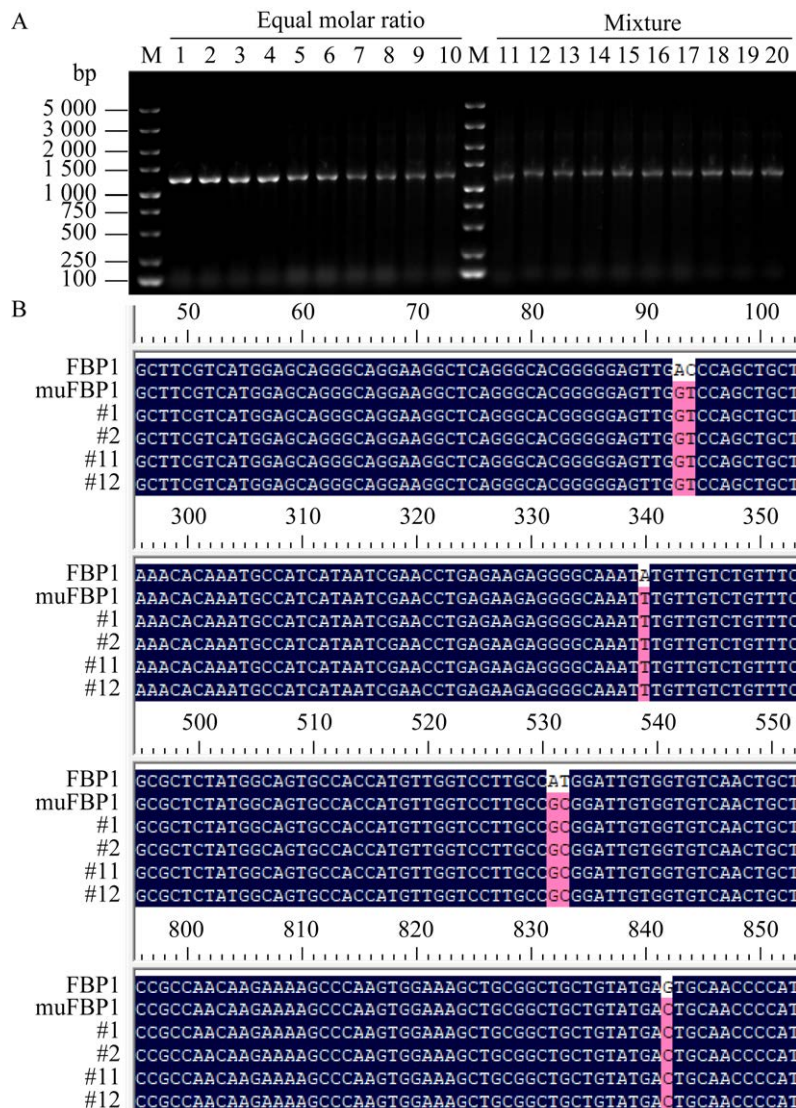


图 3 重组质粒的鉴定与测序

Figure 3 Identification and sequencing of recombinant plasmid. A: The detection result of PCR with T7/F5r primers from liquid cultures of different colonies. B: Multiple alignments between mutant FBP1 (#1, 2, 11, 12) with wild type FBP1 gene and their expected sequence. The red boxes show the position of mutant sites on the plasmid. FBP1 refers to pET28a-FBP1 plasmid. muFBP1 refers to expected mutant FBP1 sequence.

定。序列比对发现, #1-2 和#11-12 都发生了预期的 4 点突变, 未发生非预期突变(图 3B)。说明#1-2 和#11-12 均为正确的突变体, 即将含有目的片段的凝胶混合后进行纯化, 再通过酶切-连接反应进行组装, 最终可以通过 PCR 扩增得到正确组装的目的片段。

2.4 片段用量对组装的影响

通常进行的多片段组装中, 对于反应体系中片段和载体的用量有一定的要求, 进而保证重组和转化的成功率。由图 4 可以看出, 减少混合片段的用量, 会对扩增效率有一定影响, 5 ng 时扩增效率显著降低, 1 ng 时已经无法扩增出组装片段。

2.5 内切酶用量对组装的影响

酶切/连接反应需要在内切酶的作用下形成黏性末端, 在连接酶的作用下, 黏性末端正确连接完成组装。改变反应体系中内切酶的用量, 发现内切酶用量降低对组装片段的扩增影响较小, 仅当内切酶用量降至 1 U 后条带亮度有所降低, 并且 0.5 U 时仍能得到明显的目的条带(图 5), 说明反应体系中内切酶的用量对于片段的组装影响较小。

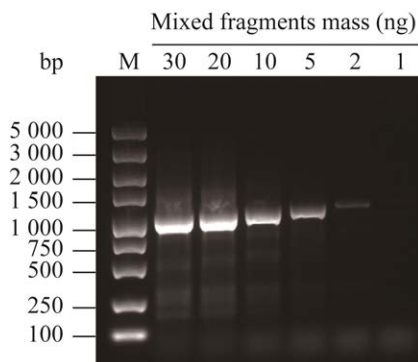


图 4 片段用量对组装和扩增的影响

Figure 4 Influence of fragments mass on the assembly and amplification. Band 30 to 1 represents the fragments mass (ng) used in the digestion/ligation reaction. M stands for DL5000 DNA marker.

2.6 连接酶用量对组装的影响

片段间互补的黏性末端需要在 T4 DNA 连接酶的作用下完成连接。如图 6 所示, 初始条件使用 500 U 的 T4 DNA 连接酶, 随着连接酶用量的减小, 扩增出的条带亮度逐渐减弱。当 T4 DNA 连接酶酶量为 100 U 时, 已无法检测到目的条带, 说明 T4 DNA 连接酶用量对片段的组装影响较大。

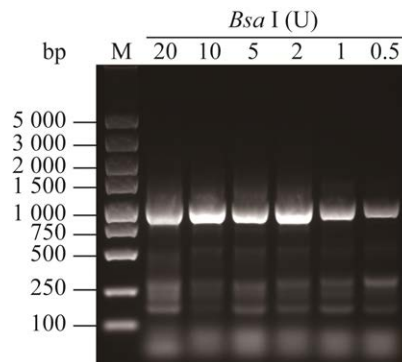


图 5 内切酶 *Bsa I* 用量对组装和扩增的影响

Figure 5 Effects of endonuclease *Bsa I* on the assembly and amplification. Band 20 to 0.5 represents *Bsa I* (U) used in the digestion/ligation reaction. M stands for DL5000 DNA marker.

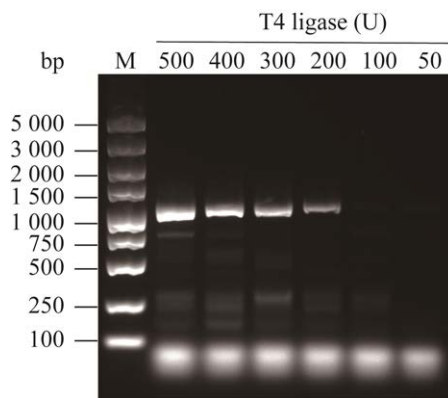


图 6 T4 DNA 连接酶用量对组装和扩增的影响

Figure 6 Influence of T4 DNA ligase on the ligation and amplification. Band 500 to 50 represent T4 DNA ligase (U) used in the digestion/ligation reaction. M stands for DL5000 DNA marker.

3 讨论

兼顾效率、成本与成功率是选择实验方法的重要参考因素。Gibson 法和 Golden Gate 法可以一步完成片段的组装及与载体的重组,被广泛用于多片段组装及定点突变。Gibson 组装是在核酸外切酶、DNA 聚合酶和连接酶的共同作用下的等温拼接^[19]。Gibson 组装不受片段上酶切位点的限制,能兼容各种载体,主要是通过同源序列的互补完成组装,是一种体外同源重组反应。但是随着组装片段数量的增加,组装成功率会大幅下降。de Kok 等研究发现, Gibson 组装法在进行 2 片段组装克隆时,正确菌落数占总菌落数的百分比在 80%以上, 4 片段为 70%, 6 片段时则大幅下降至 25%左右, 8 片段时成功率低至 20%以下^[20]。Fu 等的研究表明, Gibson 法单片段克隆成功率达到 98%, 而 3 片段成功率下降至 65%左右, 并且菌落总数只相当于单片段的 60%^[21]。因此,随着组装片段数量的增加,菌落总数和阳性菌落比例都会显著下降。转化后的菌落总数还受到制备的感受态效率和使用的质粒大小影响,随着质粒的增大,转化效率将显著下降^[22]。此外,由于 Gibson 组装中的核酸外切酶可在短时间内完全破坏小于 250 bp 的 DNA 片段,导致克隆失败,这种情况下需要增加反应体系中短片段的用量^[23]。同源序列区域 GC 含量过低或容易形成二级结构的序列也会导致重组失败或者错误的组装结果^[24-25]。在本研究的例子中,设计的 4 个突变位点将目的基因分成了 5 个 350 bp 以下的短片段,并且有 3 个片段小于 250 bp,使用 Gibson 一步组装失败概率较大。

与 Gibson 法不同,Golden Gate 法是利用 IIS 型限制性内切酶使片段和载体间产生互补黏性末端连接完成片段的组装,可以无需对载体进行线性化处理。Golden Gate 法常用的 IIS 型内切酶

包括 *Bsa* I、*BsmB* I、*Bbs* I 和 *Sap* I。粘性末端序列的准确连接是多片段能正确组装的关键。*Bsa* I、*BsmB* I 和 *Bbs* I 产生的 4 碱基黏性末端共有 256 种不同序列,*Sap* I 产生的 3 碱基黏性末端也有 64 种不同序列。Hamedirad 等对所有 4 碱基黏性末端的连接效率和准确性进行了评估,尽管部分黏性末端之间存在错配的可能,但将其中 96 种进行优化组合,可以用于多至 10 片段的准确组装^[26]。Pryor 等通过对黏性末端的筛选组合,使用 3 碱基黏性末端成功进行了 13 片段的准确组装^[18]。*Bsa* I、*BsmB* I 和 *Bbs* I 识别 6 碱基序列;而 *Sap* I 更为特殊,识别 7 碱基序列,出现的几率更低。一般可以从这 4 种酶中选择片段中没有出现的用于 Golden Gate 组装,也可以通过定点突变去除出现的识别序列^[18]。Agmon 等研究发现随着片段数量的增加,转化后的菌落数也明显减少,但 3 片段与载体组装成功率在 92%以上,7 片段时成功率仍可以达到 72%^[27]。因此多数情况下,Golden Gate 用于多片段组装的准确度优于 Gibson 组装及重叠延伸 PCR,其唯一的限制因素是载体。一般与 Golden Gate 法配套的载体的 IIS 内切酶识别位点多成对出现在多克隆位点区域,而不是载体骨架区域(如 NEB 公司 Golden Gate 试剂盒中的 pGGASelect, addgene #195714)。因此不但避免了 IIS 内切酶对骨架的切割,并且无需对载体进行线性化处理即可一步完成组装与克隆。而其他的常用载体不但多克隆位点区域没有成对出现的 IIS 酶切位点,并且在骨架区域含有 Golden Gate 常用的 IIS 酶切位点中的一种或几种,难以在 Golden Gate 组装中直接使用。例如氨苄青霉素抗性基因序列上常有 *Bsa* I,卡那霉素抗性基因序列上常常有 *BsmB* I,而酿酒酵母载体中常用的 URA3 营养缺陷标记序列中同时含有上述 4 种酶切位点。如果先使用 Golden Gate 一步组装到配套载体上,用其他方

法将整个片段克隆到目标载体上,则整个流程实际上进行了 2 次克隆,周期明显增加。Agmon 等移除了酿酒酵母研究中常用的 pRS 系列载体骨架上的 *Bsa* I 和 *BsmB* I 酶切位点,并对多克隆位点进行改造,构建了 pAV 系列载体,可以直接使用 Golden Gate 法组装酿酒酵母转录模块^[27]; Kowarschik 等对大肠杆菌 pET-28b 表达载体进

行改造,构建了可直接用于 Golden Gate 组装的 pET-28GG 载体^[28]。但经过改造适合 Golden Gate 一步法的载体仍然是极少数,未被广泛使用。

因此 Gibson 法和 Golden Gate 法的一步组装虽然简单高效,但上述缺点和限制因素使得在一些情况下难以一步完成组装与克隆。实验条件的调整或者 2 次克隆都将显著增加实验周期。表 2

表 2 几种 DNA 多片段组装方案的比较

Table 2 Comparison of several DNA assembly methods

Method	Day 1	Estimated time	Day 2	Feature
Overlap extension PCR (OE-PCR) (6.5 h in total)	① Amplification of each fragment and electrophoresis	1.5 h	Identification of clones with PCR	Assembling more than 2 fragments or optimizing step 3 will extend the time cost as it is not easy to generate desired full-length fragment in this step. Re-designing primers will extend the periodicity to 3 days or more
	② Purification of each fragment	0.7 h		
	③ Overlap extension PCR, electrophoresis and purification of desired full-length fragment	2.5 h		
	④ Insert into linearized plasmid	0.3 h		
	⑤ Competent cell transformation	1.5 h		
Gibson assembly (4.2 h in total)	① Amplification of each fragment and electrophoresis	1.5 h	Identification of clones with PCR	The time cost is minimal, but identification can only be conducted the day after transformation (day 2). It is not easy to assemble more than 3 fragments or short fragments. Repeating experiment or re-designing primers will extend the periodicity to 3 days or more
	② Purification of each fragment	0.7 h		
	③ Gibson assembly reaction	0.5 h		
	④ Competent cell transformation	1.5 h		
Golden Gate assembly (4.7 h in total)	① Amplification of each fragment and electrophoresis	1.5 h	Identification of clones with PCR	The time cost is similar to Gibson assembly. The ligation efficiency and fidelity are the best. Vector used is restricted. If not, additional clone is needed. The periodicity will be more than 3 days in this situation
	② Purification of each fragment	0.7 h		
	③ Golden Gate reaction with specific vector	1.0 h		
	④ Competent cell transformation	1.5 h		
Method in this research (7.3 h in total)	① Amplification of each fragment and electrophoresis	1.5 h	Identification of clones with PCR	The time cost is similar to OE-PCR. The fidelity is equivalent to Golden Gate assembly, but additional clone is avoided with the PCR after Golden Gate assembly. Purification of mixed PCR products in step 2 is concise and efficient
	② Purification of fragment mixture	0.5 h		
	③ Golden Gate reaction without vector	1.0 h		
	④ Amplification, electrophoresis and purification of desired full-length fragment	2.5 h		
	⑤ Gibson assembly reaction	0.3 h		
	⑥ Competent cell transformation	1.5 h		

比较了包含本文方法在内的几种常见方法在同等条件下进行多片段(如片段数量超过 3 个, 含有短片段)组装的流程、预计的时间和特点。本方案由 Golden Gate 组装、PCR 扩增和 Gibson 组装 3 步组成。相较于一步组装, 虽然步骤增加, 但主要步骤仍可在一天内完成。更重要的是, 该方案具备 Golden Gate 组装和 Gibson 组装各自的优点: 片段间的组装是参考 Golden Gate 法的粘性末端连接, 准确度高; 而片段与载体的重组是单片段 Gibson 组装, 相较于用 Gibson 法一步组装多个片段成功率大大提高; 与 Golden Gate 一步组装相比, 不受载体限制, 直接将目的片段克隆到目标载体上, 避免了二次克隆, 实验周期更短。

此外, 使用 Gibson 法进行一步组装时, 各个片段以及载体间需要保证一定的摩尔比以保证重组效率, 这一点在进行多片段克隆时尤为重要。因此实际操作中需要对各个片段分别进行纯化和定量, 结合片段大小计算后进行稀释及混合等繁琐操作^[19,29]。重叠延伸 PCR 和 Golden Gate 法对片段用量和比例也有类似的要求。而本研究提供了一种较为特殊的操作, 即将扩增的多个待组装片段进行电泳分离后, 不再对各个片段分别进行纯化, 而是将含有不同片段的琼脂糖凝胶块混合一管后进行纯化, 即得到片段的混合物, 然后取一定量的片段混合物进行 Golden Gate 组装, 反应产物进行稀释后即可进行 PCR 扩增。对不同大小的片段进行混合纯化, 虽无法保证反应体系中各片段的摩尔比的一致性, 使得片段间的组装效率较低, 但通过 PCR 即可将其中少量组装成功的片段大量扩增, 用于完成与载体的重组。这种操作将多片段组装中对各个片段分别进行的纯化、浓度测定、稀释和混合等常见步骤进行了简化。

实验成本也是很多研究者需要考虑的因素。

本研究发现, 减少内切酶 *Bsa* I 的使用量对最终片段的扩增影响较小, 这可能是因为后续的 PCR 可以将体系中少量组装成功的片段扩增, 即使酶用量的减少可能使得片段的酶切-连接反应不充分。由于 IIS 型内切酶价格较高, 通过此方案可大幅减少酶的用量从而降低成本。此外, 有研究表明, 利用大肠杆菌对质粒缺口的修复机制, 仅采用 T5 核酸外切酶可以替代 Gibson 组装中的 3 种酶进行片段与线性化载体的重组, 这有望进一步降低实验成本^[30-31]。

综合分析, 本方案具有 Gibson 组装兼容各种载体和 Golden Gate 组装准确度高的特点, 同时弥补了 Gibson 组装和 Golden Gate 组装的主要缺陷; 该方案成功率高且操作简便, 测序结果表明该方案能够通过准确的多片段组装实现多点突变, 未在接头处发现插入、缺失或错配等情况; 优化实验条件可以进一步提高实验效率和降低实验成本, 是一种准确且高效进行复杂多片段组装的实验方案。

REFERENCES

- [1] HUNTER RW, HUGHEY CC, LANTIER L, SUNDELIN EI, PEGGIE M, ZEQRARAJ E, SICHERI F, JESSEN N, WASSERMAN DH, SAKAMOTO K. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24: 1395-1406.
- [2] 王睿, 喻晓蔚, 徐岩. 理性设计二硫键提高华根霉脂肪酶热稳定性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2311-2319. WANG R, YU XW, XU Y. Rationale design of disulfide bond in *Rhizopus chinensis* lipase to improve thermostability[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2311-2319 (in Chinese).
- [3] YAN P, GAO XZ, SHEN WT, ZHOU P, DUAN J. Parallel assembly for multiple site-directed mutagenesis of plasmids[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 430(1): 65-67.
- [4] 肖娟, 马梦琪, 梁明星, 贺如阳, 陈华波. 部分扩增与双片段连接相结合制作长基因定点突变[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1232-1240.

- XIAO J, MA MQ, LIANG MX, HE RY, CHEN HB. Site-directed mutagenesis of long gene by partial amplification combining with double fragments ligation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(6): 1232-1240 (in Chinese).
- [5] 黄鹏伟, 龚大春, 戴传超, 梅艳珍. 基因组装技术在合成生物学中的应用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1358-1368.
- HUANG PW, GONG DC, DAI CC, MEI YZ. Application of gene assemblies in synthetic biology[J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1358-1368 (in Chinese).
- [6] YAN P, ZENG YJ, SHEN WT, TUO DC, LI XY, ZHOU P. Nimble cloning: a simple, versatile, and efficient system for standardized molecular cloning[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 7: 460.
- [7] SIKKEMA AP, TABATABAEI SK, LEE YJ, LUND S, LOHMAN GJS. High-complexity one-pot golden gate assembly[J]. Current Protocols, 2023, 3(9): e882.
- [8] HECKMAN KL, PEASE LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. Nature Protocols, 2007, 2: 924-932.
- [9] WÄNESKOG M, BJERLING P. Multi-fragment site-directed mutagenic overlap extension polymerase chain reaction as a competitive alternative to the enzymatic assembly method[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 444: 32-37.
- [10] ZENG FL, ZHANG YJ, ZHANG Z, AHMAD MALIK A, LIN YB. Multiple-site fragment deletion, insertion and substitution mutagenesis by modified overlap extension PCR[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2017, 31(2): 339-348.
- [11] CHA-AIM K, FUKUNAGA T, HOSHIDA H, AKADA R. Reliable fusion PCR mediated by GC-rich overlap sequences[J]. Gene, 2009, 434(1/2): 43-49.
- [12] LUO ZX, WANG SH, JIAO BL, YUAN D, DAI DM, WANG LX, XU K, WANG X. Gene cloning and seamless site-directed mutagenesis using single-strand annealing (SSA)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(23): 10119-10126.
- [13] HILGARTH RS, LANIGAN TM. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction[J]. MethodsX, 2019, 7: 100759.
- [14] 程盈盈, 李国庆, 刘君怡, 陈婉煜, 陈华波. 多片段扩增结合 Gibson 组装法克隆基因定点突变[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1218-1226.
- CHENG YY, LI GQ, LIU JY, CHEN WY, CHEN HB. Using multiple-fragment amplification combined with Gibson assembly to clone genes with site-directed mutations[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(3): 1218-1226 (in Chinese).
- [15] 冯延叶, 胡霞, 柴智, 刘绍辉, 杨敏敏, 吴典, 杨佳豪. 一种一步法 *Bsa* I 酶切连接片段组装方法、组装试剂盒及应用: CN114250241A[P]. [2022-03-29].
- FENG YY, HU X, CHAI Z, LIU SH, YANG MM, WU D, YANG JH. A one-step fragments assembly method, kit and application with *Bsa* I based digestion and ligation: CN114250241A[P]. [2022-03-29].
- [16] BIRD JE, MARLES-WRIGHT J, GIACHINO A. A user's guide to golden gate cloning methods and standards[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(11): 3551-3563.
- [17] 谢翎, 陈红梅, 尹翀, 项小燕, 黄勃. 大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态制备及转化率变化研究[J]. 生物学杂志, 2011, 28(4): 4-6.
- XIE L, CHEN HM, YIN C, XIANG XY, HUANG B. Study on variation of transformation rate of *E. coli* DH5 α competent cells[J]. Journal of Biology, 2011, 28(4): 4-6 (in Chinese).
- [18] PRYOR JM, POTAPOV V, KUCERA RB, BILOTTI K, CANTOR EJ, LOHMAN GJS. Enabling one-pot Golden Gate assemblies of unprecedented complexity using data-optimized assembly design[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0238592.
- [19] GIBSON DG, YOUNG L, CHUANG RY, VENTER JC, HUTCHISON CA, SMITH HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6: 343-345.
- [20] de KOK S, STANTON LH, SLABY T, DUROT M, HOLMES VF, PATEL KG, PLATT D, SHAPLAND EB, SERBER Z, DEAN J, NEWMAN JD, CHANDRAN SS. Rapid and reliable DNA assembly via ligase cycling reaction[J]. ACS Synthetic Biology, 2014, 3(2): 97-106.
- [21] FU CL, DONOVAN WP, SHIKAPWASHYA-HASSER O, YE XD, COLE RH. Hot fusion: an efficient method to clone multiple DNA fragments as well as inverted repeats without ligase[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115318.
- [22] CHAN V, DREOLINI L, FLINTOFF KA, LLOYD S, MATTENLEY AA. The effect of increasing plasmid size on transformation efficiency in *Escherichia coli*[J]. Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 2002, 2: 207-223.
- [23] SANTOS-MORENO J, SCHAERLI Y. A framework for the modular and combinatorial assembly of synthetic gene circuits[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(7):

- 1691-1697.
- [24] LI L, ZHAO YW, RUAN LJ, YANG S, GE M, JIANG WH, LU YH. A stepwise increase in pristinamycin II biosynthesis by *Streptomyces pristinaespiralis* through combinatorial metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 12-25.
- [25] 张阳璞, 杨淑慎. 几种新型植物基因表达载体的构建方法[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(3): 311-327.
- ZHANG YP, YANG SS. Methods for construction of transgenic plant expression vector: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(3): 311-327 (in Chinese).
- [26] HAMEDIRAD M, WEISBERG S, CHAO R, LIAN JZ, ZHAO HM. Highly efficient single-pot scarless golden gate assembly[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(5): 1047-1054.
- [27] AGMON N, MITCHELL LA, CAI YZ, IKUSHIMA S, CHUANG J, ZHENG A, CHOI WJ, MARTIN JA, CARAVELLI K, STRACQUADANIO G, BOEKE JD. Yeast golden gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(7): 853-859.
- [28] KOWARSCHIK K, HOEHENWARTER W, MARILLONNET S, TRUJILLO M. UbiGate: a synthetic biology toolbox to analyse ubiquitination[J]. *The New Phytologist*, 2018, 217(4): 1749-1763.
- [29] WERNER S, ENGLER C, WEBER E, GRUETZNER R, MARILLONNET S. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system[J]. *Bioengineered Bugs*, 2012, 3(1): 38-43.
- [30] 蔡松, 唐梅, 杨东成, 刘枣, 王金华, 王永泽. 无缝克隆技术的研究进展[J]. *生物加工过程*, 2023, 21(2): 144-152.
- CAI S, TANG M, YANG DC, LIU Z, WANG JH, WANG YZ. Research progress of seamless cloning technology[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2023, 21(2): 144-152 (in Chinese).
- [31] XIA YZ, LI K, LI JJ, WANG TQ, GU LC, XUN LY. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(3): e15.

(本文责编 陈宏宇)