酵母基因组工程

谢泽雄^①, 李炳志^①, 沈玥^②, 戴俊彪^③, 杨焕明^②, 元英进^{①*}

① 天津大学系统生物工程教育部重点实验室, 天津化学化工协同创新中心合成生物学研究平台, 天津 300072;

② 深圳华大基因研究院, 深圳 518031;

③ 清华大学生命科学学院, 合成与系统生物学中心, 北京 100084

* 联系人, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn

收稿日期: 2015-03-16; 接受日期: 2015-04-12

国家自然科学基金(批准号: 21390203), 国家高技术研究发展计划(批准号: 2012AA02A708)和天津市科技计划项目(批准号: 13RCGFSY19800)资助

doi: 10.1360/N052015-00052

摘要 酿酒酵母染色体的人工合成突破了真核生物基因组重新设计与合成, 将引发基因组工程研究新的高潮. 本文以酵母基因组工程为例, 对“自上而下”和“自下而上”两种不同策略的基因组工程研究取得的最新进展进行综述, 并展望其发展前景和趋势.

关键词

人工合成基因组
合成生物学
酿酒酵母
SCRaMbLE 系统

合成生物学是生物学的工程化, 从工程学角度改造和优化现有自然生物体系, 或者设计合成具有预定功能的全新人工生物体系, 为生物产业的发展和人造生命的实现提供了可行的技术支撑^[1]. DNA 双螺旋结构^[2]和“中心法则”^[3]的发现与阐明使人类开始在核酸分子水平上认识生命现象; 基因测序技术的发展^[4]和“人类基因组计划”的完成^[5,6]标志着高通量“读”基因组生命信息的实现; 合成生物学发展推动的通过人工设计合成来“写”基因组信息标志着“人造生命”的开始.

人工 DNA 合成技术和 DNA 大片段操作技术推动了基因组人工合成研究的进步. 丙型肝炎病毒^[7]、脊髓灰质炎病毒^[8]、ΦX174 噬菌体^[9]、T7 噬菌体^[10]、水稻 (*Oryza sativa*) 叶绿体^[11]和小鼠 (*Mus musculus*) 线粒体^[11,12]等基因组序列先后实现了人工改造与合成, 尤其是活性人工基因组设计与合成的成功使人工基因组合成工作受到了世界的极大关注, 即支原体基因组和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 染色体的合成.

2008 年, Venter 研究组^[13]实现了生殖支原体 (*Mycoplasma genitalium*) 基因组的全化学人工合成, 并于 2010 年将人工合成的蕈状支原体 (*Mycoplasma mycoides*) 基因组转入移除自身染色体的山羊 (*Capra aegagrus hircus*) 支原体 (*Mycoplasma capriolum*) 细胞中, 得到了能够发挥正常功能的全新的支原体细胞^[14]. 2011 年, Boeke 研究组^[15]分别对酿酒酵母 VI 号染色体左臂和 IX 号染色体右臂进行了人工设计, 并于 2014 年成功合成了具有生物学活性的完整 III 号人工染色体^[16], 标志着基因组人工合成工作进入真核生物领域 (图 1).

酿酒酵母作为单细胞真核生物, 是生物学研究和生物技术开发的模式生物, 本文将以酵母为例综述基因组工程领域取得的最新进展.

1 “自上而下”基因组工程

“自上而下”基因组工程是指从野生基因组出发,

引用格式: 谢泽雄, 李炳志, 沈玥, 等. 酵母基因组工程. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 985–992

Xie Z X, Li B Z, Shen Y, et al. Yeast genome engineering. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 985–992, doi: 10.1360/N052015-00052

图1 基因组合成研究进展(网络版彩图)

通过删除、替换等方法实现对基因组的工程化改造, 主要研究包括基因组简化和基因组编辑技术。

1.1 基因组简化

基因组的适度精简可使细胞代谢途径得以优化, 改善细胞对底物、能量的利用效率, 大大提高细胞生理性能的预测性和可控性^[17]。酵母基因组简化主要基于“自上而下”的基因敲除策略对酵母非必需基因进行删除, 包括单基因敲除^[18]和 DNA 大片段删除。酿酒酵母必需基因相对分散地分布在各条染色体上, 为 DNA 大片段的删除提供了便利条件。

Sugiyama 等人^[19]首先利用 PCS(PCR-mediated chromosome splitting)法对酿酒酵母 I 号(230 kb)和 X V 号(2091 kb)染色体进行打断, 得到染色体长度介于 29~631 kb 的酵母菌株。该研究组又利用 PCD(PCR-mediated chromosome deletion)法删除了酿酒酵母 X V 号染色体上 38 kb 的 DNA 片段^[20]。Murakami 等人^[21]利用 PCS 法删除 5%酿酒酵母基因组, 得到抗胁迫能力与野生型菌株基本相同的菌株。此外, Hirashima 等人利用“Latour system”方法先后实现了对裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)染色体 100 kb 片段^[22]和 500 kb 片段的敲除^[23]。国内南开大学正在开展酿酒酵母和门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)基因组大片段删减和无痕敲除的相关研究^[24]。

1.2 基因组编辑

人工核酸酶介导的位点特异性基因组编辑方法为基因组理性修饰和改造提供了高效、准确的编辑工具。目前主要的基因组编辑方法有锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)^[25-27]、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[28]和 CRISPR/Cas 系统(clustered

regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system, CRISPR/Cas)^[29-31]。其中 ZFN 和 TALEN 由人工核酸酶介导, CRISPR/Cas 由 Cas9 蛋白与 gRNA 介导(图 2)。

TALEN 和 CRISPR/Cas 在酿酒酵母基因组改造当中得到了充分应用。Aouida 等人^[32]通过对 TALE 上 RVD(repeat-variable diresidue)区域的设计提高了 TALEN 与酵母染色体的结合能力, 将 TALEN 与酿酒酵母基因启动子相结合, 实现了对目标基因表达的调节。利用 CRISPR/Cas 系统可以实现对酿酒酵母基因组的高效编辑, 目标片段整合效率接近 100%, 突变率极低^[33]。Gilbert 等人^[34]通过将抑制因子(repressive effectors)和激活因子(activate effectors)与缺失核酸内切酶活性的 dCas9(catalytically dead Cas9 mutant)结合形成的融合蛋白在酿酒酵母不同效应位点进行表达, 有效地实现了对基因表达的抑制或激活, 同时证明了可以利用 CRISPR 干扰(CRISPRi)^[35]的方式有效沉默酵母目标基因, 并且对非目标基因的转录影响甚微。

全基因组多位点修饰技术为基因组尺度的高通

图2 位点特异性基因组编辑技术(网络版彩图)

量改造提供了新的研究方法, 主要包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的 MAGE(multiplex automated genome engineering), CAGE(conjugative assembly genome engineering) 和酵母菌中 YOG(yeast oligo-mediated genome engineering)技术。

Church 研究组^[36,37]先后提出了 MAGE 和 CAGE 的方法, 实现了对大肠杆菌的高通量改造(图 3A)。利用 MAGE 技术将大肠杆菌 32 个区域的 TAG 终止密码子替换为 TAA, 利用 CAGE 技术将 32 个菌株的基因组进行拼接, 得到大肠杆菌 314 个 TAG 终止密码子全部替换为 TAA 的全新基因组。利用 YOG 技术(图 3B), 将目标寡核苷酸链导入到酵母细胞中, 可以实现高频的基因组修饰^[38]。

2 “自下而上”基因组工程

“自下而上”的策略是通过理性设计, 采用从头合成路线, 利用标准化元件逐步组装构建遗传线路、功能基因模块以至合成基因组^[17]。

2.1 DNA 组装技术

DNA 大片段的合成与组装是自下而上基因组工程和人造生命的基础, 常用的组装技术包括体内组装和体外组装两类。

体外组装是指在体外条件下利用各种生物酶的特性来实现 DNA 片段的组装。Golden Gate 组装(Golden Gate shuffling)^[39]和 MASTER(methylation-assisted tailorable ends rational)组装^[40]分别依赖于 Type IIS 型限制性核酸内切酶和可识别甲基化序列的 Type IIM 型限制性核酸内切酶来实现 DNA 组装。

SLIC(sequence and ligation independent cloning)^[41]依赖于核酸外切酶和聚合酶实现 DNA 大片段的组装, 而 Gibson 组装(Gibson assembly)^[42]则依赖于核酸外切酶、聚合酶和连接酶实现 DNA 大片段的组装(图 4A)。OE-PCR(overlap extension PCR)^[43](图 4B)和 CPEC(circular polymerase extension cloning)^[44]等依赖于 DNA 聚合酶实现 DNA 大片段组装。

体内组装主要为酵母组装(yeast assembly)(图 4C), 利用了酵母自身对 DNA 片段的高效组装能力, 成功应用于基因组的人工合成^[13-45]。

体外组装速度快, 但准确率较低, 组装尺度偏小; 体内组装准确率高, 组装尺度大, 但酵母可能对大肠杆菌复制子产生修饰, 且对同源性较高的片段进行组装时容易发生错误^[46]。合理选择与搭配组装方法可以有效地实现 DNA 大片段乃至基因组合成^[14]。

2.2 酿酒酵母人工基因组设计与合成

酿酒酵母不仅是工业微生物发酵的常用菌种, 也是现代分子和细胞生物学中的真核模式生物。酿酒酵母基因组的人工再设计与全合成被称为第二代酿酒酵母计划(*Saccharomyces cerevisiae* 2.0, Sc2.0), 旨在对酿酒酵母的基因组重新设计并人工合成, 最终得到具有生命活性的全新酿酒酵母菌株。2006 年, Sc2.0 项目由美国霍普金斯大学的 Jef. Boeke 教授(现任职于纽约大学)发起并率先开始。2011 年, 在天津大学元英进教授等的积极推动下, 多个国家和地区的众多研究机构参与到 Sc2.0 项目当中, 推动 Sc2.0 项目逐步走向国际化^[47]。目前, Sc2.0 项目的参与国家包括美国、中国、英国、新加坡、澳大利亚等多个国家, 包括约翰·霍普金斯大学、纽约大学、天津大

图 3 全基因组多位点修饰技术(网络版彩图)

MAGE:多位点自动基因组工程; CAGE: 融合组装基因组工程; YOG: 酵母寡聚核苷酸介导的基因组工程

学、清华大学、帝国理工大学、爱丁堡大学、南洋理工大学、深圳华大基因研究院等在内的数 10 个国际知名院校和研究机构参与到 Sc2.0 项目当中。其中, 中方研究机构参与合成的酿酒酵母染色体包括 II 号、V 号、VII 号、X 号、XII 号、XIII 号等 6 条, 总长度为 4683.9 kb, 占酵母基因组长度的 39%, 美国合成染色体总长度占酵母基因组的 28%(图 4)。

Sc2.0 项目采取了科学研究与本科教学相结合的策略, 霍普金斯大学和天津大学分别开展了 BAG (Build-A-Genome) 课程, 利用酿酒酵母人工染色体合成课题培养本科生的科研兴趣和实验技能。

作为第一条被完整测序的染色体, 酿酒酵母 III 号染色体全长 316617 bp, 包括可读框 182 个^[48]。2014 年, Boeke 研究组^[16]完成了酿酒酵母第一条完整人工染色体——III 号染色体的人工设计合成, 设计后的 III 号染色体全长 272871 bp, 长度比原染色体减小了 13.8%。

酿酒酵母人工染色体在设计过程中保持了野生型染色体的基因顺序, 对亚端粒结构、内含子和转座子进行删除, 将全部的 tRNA 基因转移到一条全新的 tRNA 染色体上, 将 TAG 终止密码子更换为 TAA 密码子, 并利用密码子的简并性设计 PCR 标签引物以区分野生型与合成型染色体; 同时, 合成型染色体在非必需基因终止密码子后添加了对称的 *loxP* 重组位点^[15,16](表 1), 以便于后续的基因组人工操作。

酿酒酵母人工染色体在合成过程中, 遵循了“单链寡核苷酸-小片段 DNA-大片段 DNA-基因组替换”

的操作过程。(i) 利用化学方法合成长约 70 个核苷酸的寡核苷酸链, 相邻寡核苷酸链之间存在互补区域; 利用 PCR 方法将多个相邻寡核苷酸链进行连接, 得到约 750 bp 的 building block; (ii) 将首尾有重叠区域的小片段 DNA 利用酵母体内同源重组快速组装技术得到约 2~4 kb 的 minichunk; (iii) 利用酵母同源重组和迭代替换的方法逐步得到合成型人工染色体^[16,49]。

2.3 SCRaMbLE 系统

酿酒酵母人工染色体引入了众多对称型 *loxP* 重组位点, 这些位点可以在 Cre 酶作用下发生位点特异性重组, 诱导基因组水平的基因重排, 实现基因组的快速进化, 即构成了 SCRaMbLE 系统 (synthetic chromosome rearrangement and modification by *loxP*-sym-mediated evolution)。

Cre-*loxP* 重组酶系统由来源于 P1 噬菌体的 Cre (cyclization recombination enzyme) 重组酶和 *loxP* (locus of X-over P1) 序列组成。*LoxP* 序列共计 34 bp, 左右两端为 13 bp 反向回复序列, 中间为 8 bp 间隔序列。Cre 重组酶特异性识别 *loxP* 序列, 可以引起序列间 DNA 的删除、重复、移位和倒置等^[50]。

携带合成型染色体的酵母菌株中 Cre 重组酶的表达会诱导基因组内 *loxP* 位点之间 DNA 的重排, 实现非必需基因的删除。SCRaMbLE 系统诱导的基因变化具有全局性和多向性, 可以用于快速获得不同酵母基因组的文库, 尤其是基因组简化的文库。传统基

图 4 DNA 组装技术(网络版彩图)

OE-PCR: 重叠延伸聚合酶链式反应

表 1 人工合成染色体设计原则

删除	移位	替换	引入	保留
转座子		TAG 终止密码子替换为 TAA		基因顺序
亚端粒结构	tRNA 基因	单个同义密码子	对称的 <i>loxP</i> 重组位点	非编码区域
内含子		同义密码子串

图 5 酿酒酵母人工染色体研究计划分布图

因敲除方法难以实现所有非必需基因随机组合的敲除，而合成型酿酒酵母染色体中 SCRaMbLE 系统诱导基因缺失的随机性，理论上可以实现所有非必需基因删除的随机组合，获得数量庞大的基因缺失菌株库^[15,16,51]。

此外，SCRaMbLE 系统中添加的是对称型 *loxP* 序列，因此 Cre 重组酶的表达还会导致 *loxP* 序列之间 DNA 的重复、移位或倒置等。全局性基因的变化会使染色体产生大量的、不可想象的变化，进而产生表型多样化、代谢多样化的大量菌株，为酿酒酵母的进化研究提供全新的方法和规模巨大的研究菌株库。通过不同环境压力对重组菌株进行驯化和多轮 SCRaMbLE 改造，可以为生命起源与进化、医药产品生产、环境治理、能源与化学品生产提供丰富的研究材料和优良的底盘菌株^[15,16,51](图 6)。

3 展望

酿酒酵母人工染色体合成工作目前正在全球范

围内有序展开，随着基因合成和测序成本的降低、大片段 DNA 组装技术的发展和染色体合成经验的积累，酿酒酵母染色体合成工作的进展必将逐步加快，携带全部 16 条合成型染色体酵母菌株的问世指日可待。同时，随着基因组工程技术的成熟和完善，有可能在现有人工酵母基因组的基础上进一步进行更深层次的人工再设计与全合成。同时，模式生物人工基因组的设计合成必将推动人造生命研究的快速发展，为人类研究生命的起源、进化演化等问题提供全新的解决策略。

酵母基因组工程在“转基因”、“基因组简化”、“基因组编辑”等对原有基因组进行改造，到人工设计合成全新的染色体的发展过程中，不仅开发了多种基因组工程技术，而且拓宽了酵母工程菌的应用范围。集合了美国、中国、英国、澳大利亚、新加坡等国科研力量的酿酒酵母人工染色体合成项目，在重新设计合成酵母 16 条染色体的同时，添加了可人为操作的 SCRaMbLE 系统，可以实现酵母快速

图6 SCRaMbLE系统及潜在应用(网络版彩图)

进化。

科学理论上, 人工设计与合成酵母基因组及其后续开展基因组快速进化研究, 不仅可实现对酵母全基因组功能研究, 如获取未知基因的功能, 而且通过基因组随机变化产生的酵母菌库, 为研究酵母进化史提供了大量的素材。

技术层面上, 人工设计与合成酵母基因组大幅度带动DNA合成技术发展, 促进DNA合成成本的降低。鉴于酵母是真核模式生物, 其基因组合成累积的

理论和技术, 在一定程度上可以应用于复杂多细胞生物基因组的合成, 这为人类探索合成低等动物基因组起到了极大的支撑作用。

工程应用上, 通过环境压力驯化筛选的人工酵母菌, 可以多角度应用于与人类生存、生活息息相关的领域。如获得耐高温菌、对产物耐受性高或者对不同pH的生存环境有较强适应性的酵母菌等, 对生物制药、污染治理、能源及化学品生物制造产业均有工程应用价值。

参考文献

- 1 贾斌, 李炳志, 元英进. 合成生物学展望. 中国科学: 化学, 2014, 44: 1455-1460
- 2 Watson J D, Crick F H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature, 1953, 171: 737-738
- 3 Crick F. Central dogma of molecular biology. Nature, 1970, 227: 561-563
- 4 Margulies M, Egholm M, Altman W E, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 2005, 437: 376-380
- 5 Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001, 409: 860-921
- 6 Venter J C, Adams M D, Myers E W, et al. The sequence of the human genome. Science, 2001, 291: 1304-1351
- 7 Blight K J, Kolykhalov A A, Rice C M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science, 2000, 290: 1972-1974
- 8 Cello J, Paul A V, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science, 2002, 297: 1016-1018
- 9 Smith H O, Hutchison C A 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: 15440-15445
- 10 Chan L Y, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. Mol Syst Biol, 2005, 1: 20050018
- 11 Itaya M, Fujita K, Kuroki A, et al. Bottom-up genome assembly using the Bacillus subtilis genome vector. Nat Methods, 2008, 5: 41-43
- 12 Gibson D G, Smith H O, Hutchison C A 3rd, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. Nat Methods, 2010, 7: 901-903
- 13 Gibson D G, Benders G A, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome. Science, 2008, 319: 1215-1220
- 14 Gibson D G, Glass J I, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science, 2010, 329:

52–56

- 15 Dymond J S, Richardson S M, Coombes C E, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 2011, 477: 471–476
- 16 Annaluru N, Muller H, Mitchell L A, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, 2014, 344: 55–58
- 17 李扬, 陈涛, 赵学明. 微生物基因组简化的研究进展. *生命科学*, 2011, 23: 838–843
- 18 Giaever G, Chu A M, Ni L, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 2002, 418: 387–391
- 19 Sugiyama M, Ikushima S, Nakazawa T, et al. PCR-mediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques*, 2005, 38: 909–914
- 20 Sugiyama M, Nakazawa T, Murakami K, et al. PCR-mediated one-step deletion of targeted chromosomal regions in haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80: 545–553
- 21 Murakami K, Tao E, Ito Y, et al. Large scale deletions in the *Saccharomyces cerevisiae* genome create strains with altered regulation of carbon metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75: 589–597
- 22 Hirashima K, Iwaki T, Takegawa K, et al. A simple and effective chromosome modification method for large-scale deletion of genome sequences and identification of essential genes in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: e11
- 23 Giga-Hama Y, Tohda H, Takegawa K, et al. Schizosaccharomyces pombe minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 46: 147–155
- 24 Liu Q, Wu Y, Yang P, et al. mazF-mediated deletion system for large-scale genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Res Microbiol*, 2014, 165: 836–840
- 25 Kim Y. G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1156–1160
- 26 Mani M, Smith J, Kandavelou K, et al. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334: 1191–1197
- 27 Ramirez C L, Certo M T, Mussolino C, et al. Engineered zinc finger nickases induce homology-directed repair with reduced mutagenic effects. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 5560–5568
- 28 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326: 1509–1512
- 29 Lillestol R K, Redder P, Garrett R A, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, 2: 59–72
- 30 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 31 Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823–826
- 32 Aoudia M, Piatek M J, Bangarusamy D K, et al. Activities and specificities of homodimeric TALENs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 2014, 60: 61–74
- 33 DiCarlo J E, Norville J E, Mali P, et al. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 4336–4343
- 34 Gilbert L A, Larson M H, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442–451
- 35 Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173–1183
- 36 Wang H H, Isaacs F J, Carr P A, et al. Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*, 2009, 460: 894–898
- 37 Isaacs F J, Carr P A, Wang H H, et al. Precise manipulation of chromosomes *in vivo* enables genome-wide codon replacement. *Science*, 2011, 333: 348–353
- 38 DiCarlo J E, Conley A J, Penttila M, et al. Yeast oligo-mediated genome engineering (YOGIE). *ACS Synth Biol*, 2013, 2: 741–749
- 39 Engler C, Marillonnet S. Generation of families of construct variants using golden gate shuffling. *Methods Mol Biol*, 2011, 729: 167–181
- 40 Chen W H, Qin Z J, Wang J, et al. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e93
- 41 Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*, 2007, 4: 251–256
- 42 Gibson D G, Young L, Chuang R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, 2009, 6:

- 343–345
- 43 Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 1989, 77: 61–68
- 44 Quan J, Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One*, 2009, 4: e6441
- 45 Gibson D G, Benders G A, Axelrod K C, 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: 20404–20409
- 46 李雷, 芦银华, 姜卫红. DNA 组装新方法的研究进展. *生物工程学报*, 2013, 29: 1113–1122
- 47 Pennisi E. Building the ultimate yeast genome. *Science*, 2014, 343: 1426–1429
- 48 Oliver S G, van der Aart Q J, Agostoni-Carbone M L, et al. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature*, 1992, 357: 38–46
- 49 Lin Q, Jia B, Mitchell L A, et al. RADOM, an efficient *in vivo* method for assembling designed DNA fragments up to 10 kb long in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 213–220
- 50 Hoess R H, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the *loxP* spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14: 2287–2300
- 51 Dymond J, Boeke J. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMble system and genome minimization. *Bioeng Bugs*, 2012, 3: 168–171

Yeast Genome Engineering

XIE ZeXiong¹, LI BingZhi¹, SHEN Yue², DAI JunBiao³, YANG HuanMing² & YUAN YingJin¹

¹ Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering (Tianjin), Tianjin University, Tianjin 300072, China;

² BGI Shenzhen, Shenzhen 518031, China;

³ Synthetic Biology Center, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Chemical synthesis of yeast chromosomes realized the redesign and synthesis of the eukaryotic genome, which will eventually emerge as a new hot point of genome engineering. Based on the example of yeast genome engineering, here, we review the progress of genome engineering by applying “top-down” or “bottom-up” strategies and discuss the prospects and trends of genome engineering.

artificial synthesis of genome, synthetic biology, *Saccharomyces cerevisiae*, synthetic chromosome rearrangement and modification by *LoxP*sym-mediated evolution

doi: 10.1360/N052015-00052