中国科学: 生命科学 2025 年 第 55 卷 第 10 期: 1989 ~ 2001
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
评 述 中国知名大学及研究院所专栏 天津大学合成生物学20周年专辑

大片段DNA的组装、转移与基因组复活研究进展

黄昕阳[1,2†], 白松[1,2†], 佟函泽[1,2], 吴毅[1,2*]

1. 合成生物技术全国重点实验室, 教育部合成生物学前沿科学中心, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072
2. 天津大学合成生物前沿研究院, 天津 300072
† 同等贡献
* 联系人, E-mail: yi.wu@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-06-30; 接受日期: 2025-09-09; 网络版发表日期: 2025-09-25
国家重点研发计划(批准号: 2024YFA0917400)、国家自然科学基金(批准号: 32471483)和天津市自然科学基金(批准号: 23JCYBJC00220)资助

摘要 合成基因组学的发展赋予人类前所未有的遗传密码改写能力. 大片段DNA的组装、转移与异源表达是该领域的核心使能技术. 当前, 这些使能技术正经历快速迭代, 重塑着合成基因组学的研究路径与应用图景. 本文旨在系统梳理大片段DNA组装、转移与异源表达三大核心使能技术的最新研究进展, 并展望其在创制新生物功能和基因组复活等方面的广阔前景.

关键词 大片段DNA组装, 大片段DNA转移, 大片段DNA异源表达, 基因组复活, 合成生物学

随着人类基因组计划的完成[1,2]及NGS测序的革命性突破[3], 获取基因组信息变得前所未有的快速和廉价, 将海量的基因组信息转化为可用于构建生物系统的遗传元件便成了研究的关键所在. 从设计单个基因回路到构建完整的人工基因组, 人们致力于将生命科学转变为一门具备设计、构建与预测能力的工程科学. 这一宏伟目标的实现, 依赖于对大片段DNA分子的精准操控, 其核心技术可归结为三个部分: 大片段DNA的高效精确组装, 跨细胞或跨物种的稳定转移, 以及在宿主细胞中实现异源表达, 甚至完全替代原有基因组.

近年来, 大片段DNA的操纵能力已达到Mb尺度, 涌现了一系列体内组装技术, 使得合成完整的病毒、原核生物基因组成为可能, 简单的真核生物基因组完整合成也接近实现, 目前已经实现了脊髓灰质炎病毒[4]、丝状支原体[5]、大肠杆菌[6]的完整基因组合成, 及酿酒酵母的全部染色体人工合成[7]. 本文中的大片段DNA主要指长度在百kb到数Mb的DNA片段. 组装得到的大片段DNA通过转移技术进入受体细胞进行异源表达. 大片段DNA的转移主要通过接合转移、酵母交配、细胞融合等细胞间转移方法进行. 大片段DNA异源表达既指在异源宿主中激活表达大片段DNA, 也指更进一步地将合成的完整基因组转移至目的细胞并替代原基因组. 目前已经实现了将疾病、免疫相关基因簇导入模式动物中表达以构建人源化疾病模型[8], 人工合成的丝状支原体、大肠杆菌基因组移植也已经实现[6,9]. 大片段DNA组装、转移与异源表达的技术日趋成熟, 共同构成了合成生物学的核心驱

引用格式: 黄昕阳, 白松, 佟函泽, 等. 大片段DNA的组装、转移与基因组复活研究进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1989–2001
Huang X Y, Bai S, Tong H Z, et al. Advances in assembly, transfer of large-fragment DNA and genome resurrection (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1989–2001, doi: 10.1360/SSV-2025-0208

© 2025《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

动力. 这些技术的发展让人们能够通过设计和构建去验证和深入理解生命的基本原理, 甚至使我们能够创造全新的生命形式.

1 大片段DNA组装技术

DNA组装主要分为体外组装与体内组装, 体外组装主要依靠DNA连接酶, 通常使用基于PCR体系的PCA[10]和OE-PCR组装[11], 基于限制性内切酶的Bio-Brick[12]和GoldenGate[13]组装, 基于核酸外切酶的SLIC(sequence and ligation-independent cloning)组装[14]和Gibson组装[15]. 体外组装技术各具特色, 可以根据DNA片段的数量、目标序列的复杂性、是否需要无痕连接以及成本等因素灵活选用. 但大片段DNA在体外操作时容易受剪切力影响导致断裂, 其组装主要依赖于体内组装. 体内组装常用的宿主菌包括大肠杆菌与枯草芽孢杆菌等原核生物以及酿酒酵母等真核生物(表1). 大肠杆菌的优势在于易于培养, 组装周期短; 枯草芽孢杆菌则具备天然感受态, 易于接受外源DNA; 而酿酒酵母拥有更强的外源DNA承载能力与重组能力, 成为大片段DNA体内组装的首选宿主.

1.1 基于原核生物的大片段DNA组装技术

大肠杆菌作为常用的模式生物, 结合λ-Red和CRISPR系统发展出REXER(replicon excision enhanced recombination)及GENESIS(genome stepwise interchange synthesis), 两种技术都被用于组装完整的大肠杆菌基因组[6,16]; CONEXER(conjugation coupled with

表 1 大片段DNA的体内组装技术对比表

Table 1 Comparison of *in vivo* assembly technologies for large DNA fragments

组装平台	组装方法	组装原理	单次组装周期#	多轮组装尺度*	优点	不足
大肠杆菌	REXER/ GENESIS	电转化 CRISPR λ-Red	5天	5轮反应, 用5个100 kb片段替换大肠杆菌基因组内0.5 Mb片段	组装过程中进行功能调试	依赖电转化导入片段, 导致效率较低
	CONEXER/ BASIS	接合转移 CRISPR λ-Red	2天	9轮反应, 将9个100 kb片段组装为1.1 Mb人类21号染色体片段	通过接合转移提升片段导入效率, 实现快速连续组装	需敲除参与重组的*recA*基因提升组装效率
	CALBIA	接合转移 λ-Red	3天	11轮反应, 将11个200 kb片段组装为2.13 Mb人类18号染色体片段	组装产物为线性染色体	底盘菌染色体线性化后复制受影响, 生长受损, 需编辑*tus*基因、*matP*基因
枯草芽孢杆菌	IWe/ Domino	Rec-A	1~2周	用100 kb片段组装3.5 Mb蓝藻基因组, 组装轮数未报道	适用于组装高GC含量片段	组装产物整合进入基因组, 难以分离
酿酒酵母	TAR	HDR	5天	1轮反应, 将11个100 kb片段组装为1.1 Mb支原体基因组	组装周期短	多片段组装效率低
	CasHRA	原生质体融合 CRISPR HDR	9天	2轮迭代反应, 将5个200 kb片段组装为1.03 Mb大肠杆菌基因组	快速诱导清除gRNA质粒, 便于下一轮组装	原生质体融合效率低
	SwAP-In	HDR 营养标签筛选	5天	18轮反应, 将18个60 kb片段组装为0.7 Mb酿酒酵母10号染色体	组装过程中同步进行功能调试	无法并行组装, 组装Mb级别DNA效率较低
	MRA	酵母交配 减数分裂	2周	3轮迭代反应, 将6个150 kb片段组装为1.1 Mb酿酒酵母12号染色体	通过酵母交配提升大片段DNA导入效率	借助减数分裂重组进行的组装效率较低, 生孢周期长
	YLC	酵母交配 CRISPR 减数分裂	11天	2轮迭代反应, 将5个200 kb片段组装为1.26 Mb人类IGH重链基因	借助减数分裂实现组装产物分离	生孢周期长, 拆孢操作复杂
	HAnDy	酵母交配 CRISPR 单倍体化	6天	5轮迭代反应, 将32个32 kb片段组装为1.024 Mb从头设计的附属染色体	实现程序性单倍体化, 便于并行组装	需定制构建组装元件, 在染色体着丝粒处插入Cas切割位点

#: 本列的单次组装周期为一次片段组装与验证所需的时间; *: 本列内容仅列出文献中组装DNA的片段长度, 用户可根据实际需要自定义组装的片段长度

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

programmed excision for enhanced recombination)及其迭代重复BASIS(BAC stepwise insertion synthesis)也展现出了显著潜力[17](图1A). REXER使用CRISPR/Cas9和λ-Red两个系统, 通过Cas蛋白精准切割, 形成双链断裂后由λ-Red系统进行同源重组, 能够以高准确度将>100 kb的大肠杆菌基因组一步替换为合成DNA. 此

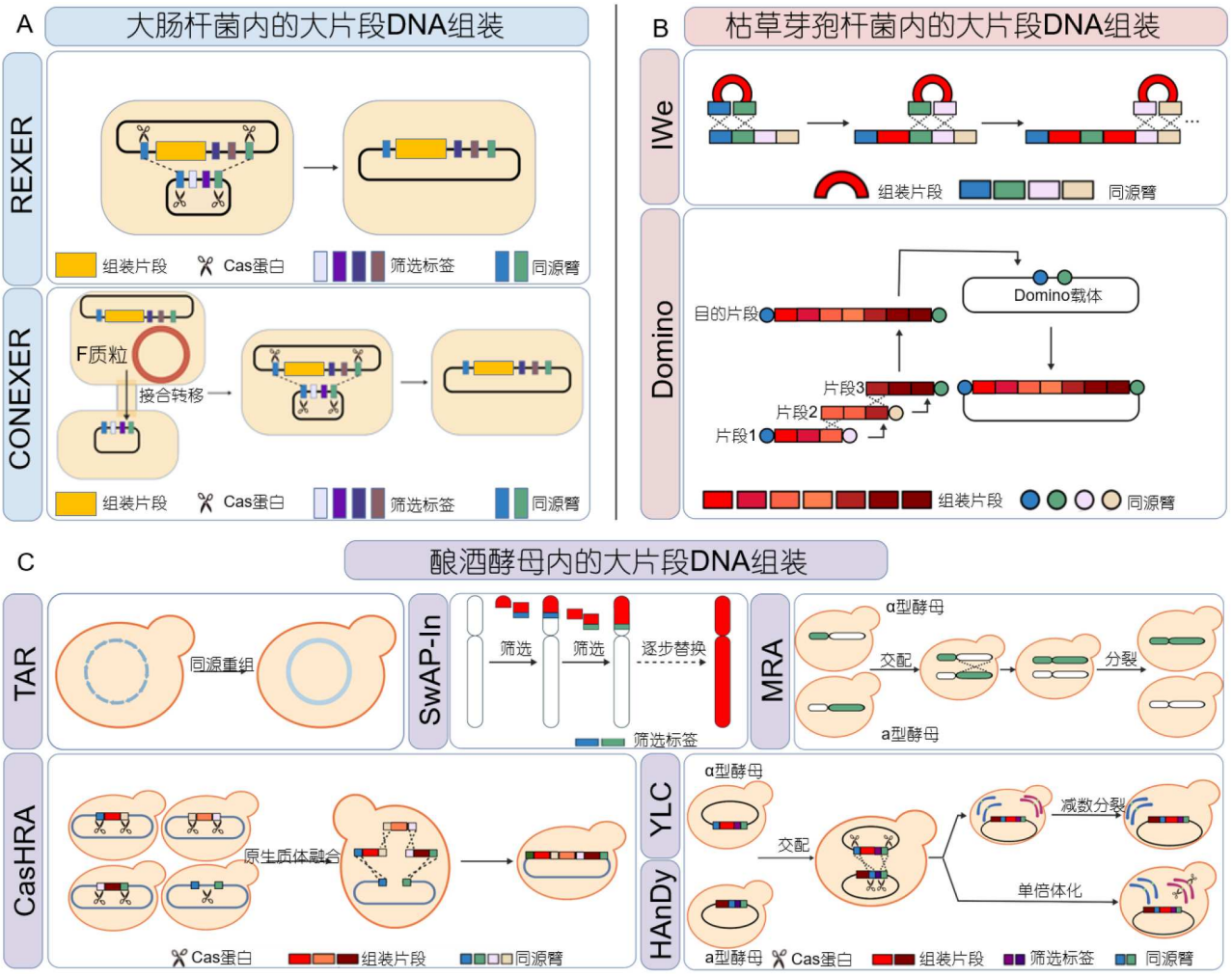


图 1　大片段DNA的体内组装技术示意图. A: 大肠杆菌中的大片段DNA组装技术, 两种技术都依赖Cas蛋白切割后同源重组, 其中REXER通过电转化转移质粒, CONEXER则通过接合转移实现质粒转移; B: 枯草芽孢杆菌中的大片段DNA组装技术, IWe与Domino都通过同源重组逐步延长DNA片段并插入载体; C: 酿酒酵母中的大片段DNA组装技术, TAR技术主要通过片段间同源臂直接相互连接实现体内组装, SwAP-In则通过筛选片段与营养标签逐步替换原染色体片段实现组装, CasHRA通过Cas蛋白切割暴露同源臂后有序连接实现组装, MRA通过酵母交配后减数分裂期发生的交叉互换实现染色体片段级别组装, YLC通过酵母交配后Cas蛋白切割暴露同源臂实现组装并筛选减数分裂后产生的酵母细胞, HAnDy则利用Cas蛋白选择性切割其中一套染色体实现快速单倍体化

Figure 1　Schematic diagram of *in vivo* assembly technologies for large DNA fragments. A: Large-fragment DNA assembly technologies in *Escherichia coli*. Both technologies rely on homologous recombination after cleavage by Cas proteins. REXER transfers plasmids via electroporation, while CONEXER achieves plasmid transfer through conjugation; B: large-fragment DNA assembly technologies in *Bacillus subtilis*. Both IWe and Domino progressively extend DNA fragments and insert them into a vector through homologous recombination; C: large-fragment DNA assembly technologies in *Saccharomyces cerevisiae*. TAR technology primarily achieves *in vivo* assembly through the direct connection of homologous arms between fragments. SwAP-In achieves assembly by sequentially replacing native chromosome segments with fragments containing selectable nutritional markers. CasHRA achieves ordered assembly by connecting homologous arms exposed after cleavage by Cas proteins. MRA achieves chromosome-fragment level assembly through the crossing over that occurs during meiosis after yeast mating. YLC uses Cas protein cleavage after yeast mating to expose homologous arms for assembly, followed by screening of the yeast cells produced after meiosis. HAnDy utilizes Cas proteins to selectively cleave one set of chromosomes to achieve rapid haploidization

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

外，该技术也可以识别合成基因组片段[16]. GENESIS作为REXER的迭代重复, 拥有在其之上的大片段DNA组装能力，通过理性设计与拆分，使用GENESIS已经实现了在大肠杆菌中组装完整的4 Mb大肠杆菌基因组[18]. CONEXER技术是一种Mb级别的大片段DNA片段的无痕迭代组装方法，利用接合转移的方式实现快速向大肠杆菌中转入待组装片段, 组装原理与REXER类似，已成功用于在大肠杆菌中组装1.1 Mb的人类基因组[17]. 此外, 该方法支持并行和连续合成, 能够在10天内组装0.5 Mb的大肠杆菌基因组，且由于迭代替换过程中包含阳性筛选压力, 无需测序验证[17]. CALBIA (conjugation-associated linear-BAC iterative assembling)组装技术通过逐级替换不断延长线性染色体长度，目前已经实现在大肠杆菌内组装2.1 Mb大小的线性人类染色体片段[19]. 大肠杆菌作为组装工具的优点大肠杆菌生长快, 便于筛选与快速扩增, 且相关的操作技术也已经非常成熟. 其不足之处在于随着大片段DNA尺度增大, 在大肠杆菌中的稳定性有所下降, 在体内复制过程中发生缺失、错误等情况的概率上升[20]; 组装的大片段DNA如存在重复序列，可能引发非特异重组，破坏大片段DNA序列[21].

枯草芽孢杆菌因其天然感受态和内源重组系统被用作DNA组装工具，并发展出IWe(inchworm elongation)和Domino等技术(图1B), 成功组装Mb级别的基因组[22,23]. 然而，这些方法各自存在局限性，如IWe对DNA质量要求高，而Domino组装则受限于可转化的DNA片段大小及重组效率. 为克服这些缺点, iREX(inducible RecA expression BGM vector)等新技术通过诱导型RecA和细胞接合提升了重组可控性与DNA转移长度[24]. 枯草芽孢杆菌作为组装工具的优点是转化方便且生物安全性高(无内毒素). 其缺点在于其分子工具较少，对超大质粒耐受力弱，且组装产物通常整合在基因组中, 不易于后续直接应用.

1.2 基于酿酒酵母的大片段DNA组装技术

酿酒酵母具有强大的同源重组系统，目前已经开发了数种用于组装大片段DNA的技术(图1C). TAR (transformation-associated recombination)是一种广泛使用的组装技术，该技术利用设计的同源臂促进特定染色体片段的克隆和酵母人工染色体的构建[25]. 该技术能够与短片段体外组装技术结合，高效地进行大片段的分级组装. 例如Venter团队[5]结合TAR和Gibson组装技术, 成功使用101个片段为原料构建了完整生殖支原体基因组. 在Sc2.0(synthetic yeast genome project)中, 主要的组装方法是SwAP‐In(switching auxotrophies progressively for integration). 该方法依赖于酵母的同源重组能力，用导入的携带不同营养缺陷的DNA片段替换染色体上的同源部分，通过交替利用不同的营养缺陷基因来筛选成功组装的菌株，实现全染色体的组装[26]. 为了弥补SwAP‐In只能在染色体上进行替换以组装DNA的缺陷，Mitchell团队[27]开发了eSwAP‐In以在染色体外组装环状DNA，并已用于构建101 kb的人类*HPRT1*基因.

Zhang团队[28]开发了MRA(meiotic recombination-mediated assembly)技术，并应用于酿酒酵母染色体Ⅻ的组装. 该方法利用减数分裂过程中的交叉重组实现大片段DNA组装. 酿酒酵母染色体Ⅱ和V的组装也应用了该技术，并添加了I-*Sce* Ⅰ位点以诱导双链断裂并提高整合效率[29,30]. CRISPR技术可以精准引入双链断裂, 随后经酿酒酵母的同源重组系统实现组装, 显著提高特定位点的重组效率. Qin团队[31]开发的CasHRA(Cas9-facilitated homologous recombination assembly), 可用于DNA的体内组装, 通过原生质体融合的方式将待组装的大片段DNA导入酵母细胞，避免体外操作时发生的长链断裂. CasHRA技术可以实现组装大肠杆菌的1.03 Mb基因组. 原生质体融合的操作繁琐, 为克服这一缺点, He等人[32]开发了YLC(yeast life cycle)组装技术，该技术通过酵母交配导入待组装片段, 随后由Cas蛋白切割后通过内源重组系统实现组装, 组装完成后酵母能够重新产生孢子, 继续进行交配-组装循环, 实现迭代组装. 目前, 该技术已经实现了人类免疫球蛋白重链基因座DNA的1.26 Mb片段的体内组装. 然而, 由于孢子形成过程较为缓慢, 孢子拆分较为困难, 每一轮组装都需要较长的周期, 约两周才能完成一轮组装. HAnDy(haploidization-based DNA assembly and delivery in yeast)技术克服了这一缺点，通过CRISPR/Cas系统在酵母交配后特异性切割其中一组染色体, 实现了酵母交配后单倍体化, 无需等待孢子生成, 直接进入下一轮交配-组装循环, 通过5轮迭代成功组装了1.024 Mb人工染色体, 大大缩短了组装周期[33].

酿酒酵母作为大片段DNA组装宿主菌的优势，除强大的重组能力外，还在于其强大的大片段DNA承载

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

能力, 可以耐受高达10 Mb的单个染色体或两个6.0 Mb染色体[34,35], 这也体现了其作为组装更大片段DNA工具的可行性.

2　大片段DNA转移技术

在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母等底盘细胞中进行组装后, 大片段DNA需要转移进入受体细胞以进一步发挥作用. 传统的电转化法、化学转化法对细胞膜通透性改变程度有限; 阳离子聚合物转染法进行转移后, 囊泡容易与溶酶体结合, 导致DNA降解难以稳定保存[36], 近年来虽然通过优化反应条件与提升DNA纯度等方式实现了通过电转化与化学转化实现Mb级别大片段DNA转移[37,38]; 阳离子聚合物转染也成功将2.3 Mb的酵母人工染色体转入HT1080细胞[39], 但是传统方法转移大片段DNA需要多次转移导致效率下降, 在胞外环境中操作大片段DNA容易引发断裂[40]. 细胞间的转移方式可以避免体外操作带来的弊端, 更适用于大片段DNA的转移, 目前细胞间转移技术包括接合转移、酵母交配与诱导细胞融合等(图2).

2.1　基于接合转移的大片段DNA转移

接合转移是细菌主要的基因水平转移方式, DNA从供体细胞单向转移至受体细胞[41]. 供体细胞通过T4SS(Ⅳ型分泌系统)形成性菌毛、识别oriT(转移起始点), 将DNA泵入受体细胞[42]. 受体细胞内的机制尚不明确, 导致跨物种转移效率较低[43~45]. 接合转移在细胞接触时由供体驱动, 通过性菌毛转移DNA, 能有效保护DNA完整性. 2019年, Chin团队[6]通过接合转移向大肠杆菌内转移了4 Mb大小的完整大肠杆菌基因组, 2025年, Qin团队[19]则通过接合转移实现了将2.1 Mb人类DNA转移进入大肠杆菌. 接合转移的优点在于无需体外操作大片段DNA, 同时接合转移后大片段DNA可以通过宿主细胞的整合系统整合进入宿主基因组或通过宿主细胞的质粒维持系统维持游离质粒形态, 但是大片段DNA在进入新宿主后可能不稳定, 容易发生重组、缺失或被宿主的限制性修饰系统降解从而导致转移失败[46]. 未来研究重点是改进技术以提高效率, 调整供体与受体的混合比例、接合时间、温度和培养基等, 以找到最佳转移条件, 适应更多细胞类型, 开发或改造新的转移系统, 拓宽宿主范围, 敲除受体菌的限制性修饰系统, 深入理解分子机制以推动其在大DNA转移中的应用[47].

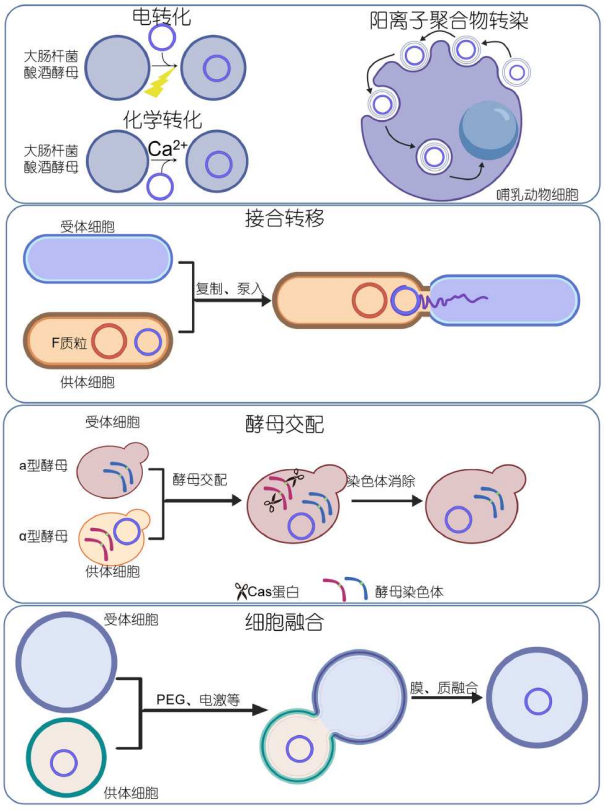


图 2　大片段DNA的转移技术示意图: 电转化与化学转化通过改变细胞膜通透性使外源DNA进入细胞; 阳离子聚合物转染通过胞吞将阳离子膜包裹的外源DNA转移进入细胞; 接合转移通过性菌毛接触形成通道, 将待转移DNA边复制边泵入受体细胞; 酵母交配通过不同交配型单倍体酵母自发融合, 直接将大片段DNA转移进入细胞核; 细胞融合可以实现跨物种大片段DNA直接转移, 能够直接转移完整基因组

Figure 2　Schematic diagram of large-fragment DNA transfer technologies: electroporation and chemical transformation introduce exogenous DNA into cells by altering cell membrane permeability; cationic polymer transfection delivers exogenous DNA into cells through endocytosis, with the DNA wrapped by cationic membranes; conjugation transfer utilizes a sex pilus to form a channel, through which the DNA is replicated and pumped into the recipient cell; yeast mating involves the spontaneous fusion of haploid yeast cells of different mating types, directly transferring large DNA fragments into the nucleus; cell fusion enables the direct transfer of large DNA fragments across species boundaries, allowing even entire genomes to be transferred

2.2　基于酵母交配的大片段DNA转移

酵母交配是不同交配型单倍体酵母自发融合形成二倍体酵母的过程, 能在核融合时将大片段DNA直接

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

转入细胞核[48]. 酵母交配能转移完整基因组, 目前成功实现将野生型酿酒酵母中超过一半DNA替换成人工合成DNA[49]. YLC技术通过酵母交配能够实现迭代转移与组装[32], 但是由于酵母减数分裂形成孢子速度较慢, 孢子拆分操作较为繁琐, DNA转移效率低. 而HAnDy技术通过CRISPR-Cas9实现在交配后单倍体化, 提升了DNA转移效率, 并实现了用一种酿酒酵母将1.024 Mb染色体转入6种不同酵母内[33]. 使用带有突变*kar1*基因的酵母进行交配, 此时酵母细胞不发生核融合, 形成一个双核细胞, 染色体仍有概率转移进入另一细胞核中实现大片段DNA转移[50]. 在Sc2.0中, 该技术与染色体驱动技术组合使用, 通过敲除受体细胞对应的野生染色体实现了将人工合成染色体导入野生型酵母并替换原染色体[51]. 酵母交配进行大片段DNA转移优点在于转移过程精确, 与酵母的各种遗传操作工具相互兼容, 并且可以实现组装-转移两个环节的一体化, 提升大片段DNA操纵的效率. 酵母交配进行大片段DNA转移的主要挑战是减数分裂时导入染色体与野生染色体可能发生交叉互换. 为解决此问题, 已有多种策略: 如在着丝粒插入GAL1启动子以删除天然染色体[26], 使用Vika/vox系统敲除野生型染色体[52], 或利用CRISPR-Cas9系统在野生染色体着丝粒处切割以消除整个染色体[53].

2.3 基于细胞融合的大片段DNA转移

诱导细胞融合(通过化学、电激或病毒蛋白介导)是一种相对通用的大片段DNA转移方法, 能规避细胞外操作对DNA的损伤[54]. 目前已经实现了通过细胞融合将1.8 Mb细菌基因组导入酵母(去除供体限制修饰系统可提升效率)[55], 构建1 Mb级合成DNA[31], 以及将Mb级酵母人工染色体转入哺乳动物细胞[56]. 使用PEG介导, 酵母原生质体可以与多种哺乳动物细胞进行融合, 实现各种大小的DNA转移[57]. 若在细胞分裂M期进行细胞融合, 由于核膜的暂时解体, 大片段DNA进入细胞核的效率可得到提升[57]. 微细胞融合是另一种染色体级别的大片段DNA转移手段, 通过秋水仙素和细胞松弛素B处理细胞后离心以获取含染色体的微细胞[58]. 化学介导融合对微细胞毒性较高, 病毒或辐射介导融合对微细胞的毒性更低. 目前微细胞融合转移大片段DNA的成功案例包括将2.4 Mb人类人工染色体[58]、10 Mb人类染色体片段[59]、154 Mb完整人类X染色体[60]转入小鼠细胞. 细胞融合可以同时转移多条染色体甚至完整的基因组, 并且能够直接跨越物种隔离, 同时转移细胞器中的DNA, 但是诱导细胞融合会导致两个基因组的混合, 产生的多倍体细胞不稳定; 在微细胞融合过程中, 染色体可能会发生断裂或重排, 导致转移的DNA片段不完整[61]. 未来研究应致力于通过优化条件及深入理解融合机制来提高转移效率, 测试不同的微核诱导剂的浓度和处理时间, 以提高微核的形成效率[62], 也可以结合synNICE等新兴的酵母细胞核提取-移植技术实现大片段DNA的精准转移[63].

3 大片段DNA异源表达

大片段DNA转移进入受体细胞后, 会受到受体细胞内环境影响, 获得表观修饰并形成3D结构. 大片段DNA也需要在新的遗传背景下进行表达, 为此发展出了多种调控策略, 如启动子工程、受体细胞适配改造和大片段DNA缺陷定位技术, 并实现了人工染色体异源激活、人源化疾病模型构建等研究.

3.1 大片段DNA的异源调控机制与策略

异源大片段DNA进入受体细胞后会受到受体细胞内的表观遗传修饰并形成相应的3D结构. 元英进团队[63]将无修饰的1.14 Mb人类基因导入小鼠胚胎细胞中后, 观察到小鼠组蛋白自发与异源大片段DNA结合形成核小体结构, 异源大片段DNA也受到甲基化修饰并在胚胎中得到表达. Koszul团队[64]将GC含量不同的大片段DNA导入酿酒酵母细胞核后观察发现, 与宿主基因组GC含量接近的外源大片段DNA与组蛋白结合后定位成为常染色体并被激活, GC含量差别大的大片段DNA则成为异染色质遭到沉默, 这说明外源大片段DNA的3D结构主要由其自身的序列, 特别是GC含量决定. 外源大片段DNA的元件构成也决定其是否能够在宿主中稳定留存. Black团队[65]将带有着丝粒序列的0.75 Mb人类基因通过原生质体融合导入哺乳动物细胞中, 观察到该异源大片段DNA在宿主细胞中逐渐形成单拷贝的环状人工染色体. Kazuki团队[66]使用小鼠着丝粒构建的包含完整人类免疫球蛋白基因的人工染色体在小鼠体内同样实现了功能正常与稳定遗传, 留存率达96%.

启动子工程是促进大片段DNA异源表达的重要

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

策略, 启动子工程首先需要构建一个经过充分表征的、具有不同强度的启动子元件库[67]. 这些启动子可以是来源于宿主内源的高表达基因, 也可以是人工设计的合成启动子. 通过替换关键基因的启动子, 可以实现对大片段DNA表达水平进行调节[68,69]. 在使用HAnDy技术组装人工染色体时, 通过在设计阶段为183个非同源基因使用从1亿个酵母启动子中筛选出的183个高强度启动子, 成功实现了人工染色体在酿酒酵母中的表达[33]. 基于机器学习和高通量筛选的方法也被用于设计和筛选具有特定强度的启动子, 为更复杂的生命过程重建提供了可能[70].

促进异源DNA表达的另外一个策略是CRISPRa技术, 通过将失去切割能力的dCas9蛋白与转录激活因子结合, 通过设计gRNA靶向结合需要激活的基因, 由转录激活因子招募DNA聚合酶启动转录[71]. 目前已有通过该技术实现沉默合成基因簇的激活的报道[72], 且在多种宿主中都能起到激活效果[73,74], 说明该技术存在广泛用于多种异源宿主的可能性.

理想的异源宿主应当为外源DNA的稳定维持与高效表达提供最佳的细胞环境. 细菌拥有限制性核酸内切酶系统, 可以降解外源DNA, 这导致大片段DNA难以在细菌中稳定维持[75]. 为了克服这一障碍, 对宿主进行改造, 敲除其限制酶基因, 构建出对外源DNA友好的宿主菌株, 是构建异源表达底盘细菌的必要步骤. 通过敲除限制酶基因, 这些宿主细菌的大片段DNA维持能力得到提升, 为后续的表达与遗传奠定了坚实的基础[9,76].

大片段DNA由于涉及很多遗传信息, 一旦表达异常, 对缺陷序列的定位就充满挑战. Venter团队[9]在合成完整丝状支原体基因组的过程中, 通过将组装中间体分别替换进入野生型基因组中观察生长状况, 实现了合成缺陷定位, 为完整基因组合成过程中定位合成缺陷提供了可行方案. 在合成酿酒酵母染色体的过程中, 为了实现合成缺陷的快速定位, 开发了PoPM (pooled PCRTag mapping)技术, 将合成型菌株与野生型菌株交配后减数分裂产生的混菌库进行表型筛选, 分出生长缺陷菌与表型正常菌, 分别对其进行PCR分析, 结合PCRTag的定位即可实现合成缺陷的快速定位[77].

3.2　基于大片段DNA的人源化模型构建

将大片段DNA在异源宿主中成功激活并表达其编码的特定功能, 是大片段DNA异源表达的重要体现. 2022年, Boeke团队[78]开发了人工染色体构建的新方法, 通过将基因簇与重复序列序列导入酵母实现了自下而上的人工染色体构建, 并在该过程中实现对人工染色体的编辑. Watanabe等人[79]成功将完整的2.4 Mb杜氏肌肉营养不良基因组装成为人类人工染色体, 转移进敲除杜氏肌肉营养不良基因猪体内, 实现了异源表达并缓解肌营养不良症状, 体现了大片段DNA异源表达在基因治疗方面的相关潜力. 在抗体生产领域, Luke等人[80]和Wu等人[81]分别将包含全套人类免疫球蛋白重链和轻链基因的5 Mb人类人工染色体导入牛与山羊, 获得了能够表达功能性人源多克隆抗体的转基因动物, 相关抗体在病毒感染动物模型中展现了良好保护效果, 具备生物医药开发前景. 人源化模型是表现出类似人类的代谢过程或类似人类疾病的生理特征的模式生物, 是理解代谢通路、研究人类疾病致病机理、筛选治疗药物的重要手段[82]. Kazuki团队[83]于2013年实现了将0.7 Mb大小的*CYP3A*基因导入小鼠, 构建了与约50%市售药品代谢相关的人源化药物代谢动力学模型, 该团队又于2019年将1.5 Mb大小的*UGT2*编码区导入大鼠, 构建了人源化糖基化药物代谢动力学模型[84]. 在人源疾病模型方向, 目前已经实现通过微细胞融合将人类21号染色体导入小鼠细胞并构建了人唐氏综合征的小鼠模型[8]; Ikeno团队[85]成功构建了导致地中海贫血的人类β-珠蛋白基因簇, 并通过替换小鼠体内的相关血红蛋白基因, 提供了研究地中海贫血致病机理的新方法. Boeke团队[86]通过将150 kb人类*ACE2*基因组装成人工染色体并导入小鼠构建了人源化新冠病毒感染模型, 为研究新冠病毒长期影响提供了宝贵的工具. 人源化模型构建致力于在模式生物中精确模拟人类的复杂性状与疾病. 通过将人类的致病基因、代谢通路乃至完整染色体导入小鼠等模式生物中, 可以使其重现人类特有的生理或病理特征. 这为研究人类遗传疾病的发病机理、进行大规模药物筛选以及评估药物代谢过程提供了实用的活体工具.

4　完整基因组复活

随着大片段DNA的组装、转移、异源表达技术逐渐发展, 用一个人工合成的基因组完全取代原有的遗传物质, 实现基因组复活, 创造由人工基因组控制

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

的、具有特定功能的生命, 成为全新的研究方向. 病毒因其结构简单, 成为首类被人工从头合成并复活的生命形式. 自2002年脊髓灰质炎病毒基因组首次被成功合成以来[4], 人们已能合成并复活越来越大、越来越复杂的病毒基因组, 如噬菌体φX174 [87]、马痘病毒[88]乃至新冠病毒[89]. 更进一步的研究首先在基因组相对简单的原核生物中取得了突破, 并逐渐向更为复杂的真核生物发展.

4.1 原核生物基因组复活

原核生物基因组的组成相对真核生物更简单, 对其研究也相对充分. 目前已经实现了对部分原核生物基因组的完全合成, 如支原体[90]、大肠杆菌[6]. 2010年, Venter团队[9]取得了历史性突破, 在实验室中化学合成了长达1.1 Mb的丝状支原体基因组, 将这个合成的基因组移植到去除限制性内切酶系统的山羊支原体细胞中, 合成的丝状支原体基因组成功被激活并接管了山羊支原体细胞, 由此创造了由合成DNA控制的丝状支原体JCVI-syn1.0, 这也是第一个完全由化学合成基因组控制的、能够自我复制的生物体, 标志着合成生物学进入了一个新时代. 在成功创造JCVI-syn1.0之后, Venter团队[91]对JCVI-syn1.0基因组进行多轮的设计、合成和测试, 通过删除非必需基因, 在2016年创造出拥有最小基因组的可自我复制生物体JCVI-syn3.0, 其基因组仅包含473个基因的0.53 Mb DNA, 且能维持生命活动和自我复制. 然而, 这473个基因中仍有约三分之一的功能尚不明确, 且在复制时细胞形态会出现异常, 这说明对生命核心功能的认知仍有待深入. 在2021年, 该团队向JCVI-syn3.0中引入了7个细胞分裂相关基因, 创造了能够避免复制过程中形态异常、实现均匀分裂的JCVI-syn3A[91]. 近年来, 计算机辅助基因组从头设计也有了长足发展. Baker团队[92]在2019年使用计算机从头设计并合成了一个0.8 Mb大小, 含680个基因的弯曲杆菌基因组必需基因部分, 其中有超过80%的基因能够保持原本功能. 除了对最小基因组的探索, 合成原核生物基因组的另一个研究方向是对原核生物基因组的完全重新编码. Chin团队[6]在2019年设计并合成了一个4 Mb的大肠杆菌基因组, 其中将天然64种密码子中的3种替换为其同义密码子, 最终创造了一个仅使用61种密码子来编码20种标准氨基酸的大肠杆菌. 对基因组进行重编码不仅为引入非天然氨基酸、创造新型蛋白质提供了可能, 也使该菌株对某些依赖宿主细胞的完整翻译系统的病毒具备了天然的抵抗力. 2025年, 该团队进行了更进一步的重编码, 合成了仅含有57个密码子的大肠杆菌基因组[18], 为非天然氨基酸的引入提供了更多可选择的空密码子. Isaacs团队[93]通过将所有基因组中的TGA终止密码子替换为同义的TAA, 结合对tRNA和释放因子2 (RF2)的工程化改造减少了对UGA的识别, 同时引入与大肠杆菌兼容的正交翻译系统, 得到了将UAG和UGA作为非天然氨基酸密码子的大肠杆菌. 这些研究为从根本上理解生命、设计具有病毒抗性等全新功能的人造细菌开辟了前所未有的道路.

4.2 真核生物基因组复活

与原核生物相比, 真核生物基因组规模更大、结构更复杂(包含多个线性染色体、大量非编码区和重复序列), 其完全合成面临着巨大挑战. 尽管如此, 在该领域也已取得里程碑式的成就, 其中最引人注目的是Sc2.0. Sc2.0的目标是从头设计并化学合成酿酒酵母的全部16条染色体[94]. 该项目的目标不仅是合成酿酒酵母基因组, 更是创造一个经过全新设计的模块化、可编辑的基因组[26]. Sc2.0的设计原则包括: 基因组精简、密码子替换、引入快速重排系统和引入tRNA辅助染色体. 2014年, Boeke团队[95]率先实现了Ⅲ号染色体的完全合成, 2014~2023年期间全球多个团队通力合作, 实现了全部16条染色体以及1条人工tRNA染色体的合成[7,28~30,77,96,97]. 目前已经实现了用7.5条合成染色体替代野生染色体, 创造了由50%以上合成染色体操纵的酿酒酵母[49]. Sc2.0的下一个目标是将全部17条人工合成染色体完全转入酿酒酵母细胞, 创造一个完全由人工合成染色体控制的酿酒酵母细胞. Sc3.0则提出了对酿酒酵母基因组的进一步重构与精简以实现工业运用与进一步模块化设计的目标[98]. 戴俊彪团队发起的小立碗藓基因组合成计划SynMoss也实现了18号染色体左臂的合成[99], 并提出了与Sc2.0类似的基因组设计原则, 发布了基因组设计工具GenoDesigner[100]. 以合成哺乳动物基因组为目标的GP-Write计划也正在进行中, 目前已经开发了用于Gb级别基因组设计的计算机辅助设计(CAD)平台[101]. Boeke团队开发了向哺乳动物细胞内整合上百kb长度DNA的Big-IN技术[102], 该团队也提出了用于哺乳动物基因组合成的mSwAP-

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

In技术，实现了向小鼠基因组内写入数百kb大小的人类基因片段[86]. 这些研究为深度解析真核生命蓝图、创造高度可编辑的人造真核细胞奠定了坚实基础.

5 总结与展望

大片段DNA组装不断更新迭代, 以REXER, CLABIA, YLC和HAnDy等为代表的组装技术不断涌现, 通过结合细胞内源重组机制、酵母交配与CRISPR/Cas9基因编辑工具，显著提升了组装的效率、精度和规模. 完成组装后，大片段DNA可以在组装细胞中直接发挥作用, 或根据需要转移至其他受体细胞中. 目前已经开发了包括阳离子聚合物转染、细菌接合、酵母交配、细胞融合在内的多种大片段DNA转移技术，有效保护了DNA的完整性，并实现了跨物种的大片段DNA转移. 将人类免疫、代谢相关基因簇导入模式动物，构建了用于疾病研究和药物筛选的人源化模型. 人工合成病毒基因组已成功复活并应用于医疗. Venter团队创造了拥有最小基因组的支原体JCVI-syn3.0. 国际Sc2.0项目从头设计与合成了酿酒酵母的全部染色体.

大片段DNA的组装、转移与异源表达仍面临诸多挑战. 在大片段DNA的组装方面，合成基因组领域已经具备了高效组装Mb级别大片段DNA的能力，然而，更大规模的DNA组装，仍然是组装领域的技术空白与重大挑战，如合成组装10 Mb级完整真核微生物基因组. 组装结构更为复杂的大片段DNA是另一个挑战, 如高度重复的序列. 在大片段DNA的转移方面, 目前细胞间转移方法所使用的供体细胞仅局限于数种细胞，转移的尺度、效率与普适性都难以满足更大的DNA片段操作的需要, 同时转移的大片段DNA在受体细胞内的稳定遗传也是一个巨大挑战. 在大片段DNA异源表达方面，未来的研究必须深入到基因组表达的更底层的规律，如探索表观遗传修饰、三维基因组结构和时序性基因表达调控网络的规律，以确保合成基因组能在宿主细胞中正常遗传、表达. 在基因组复活这一基础研究领域，目前仅能实现病毒与部分原核生物的基因组复活，在不久的未来，除了化学合成基因组替换同源宿主基因组实现功能复活，有望实现对真核微生物基因组的异源复活. 这不仅有助于深入理解生命的基本机制，还有望开创“人造生命”和物种保护的新研究途径. 大片段DNA的组装、转移与基因组复活技术为深入理解生命、理性改造生命乃至从头创造全新的生命形式提供了前所未有的强大工具和无限可能.

参考文献

1 Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001, 409: 860–921
2 Venter J C, Adams M D, Myers E W, et al. The sequence of the human genome. Science, 2001, 291: 1304–1351
3 Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol, 2008, 26: 1135–1145
4 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
5 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
6 Fredens J, Wang K, de la Torre D, et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. Nature, 2019, 569: 514–518
7 Schindler D, Walker R S K, Cai Y. Methodological advances enabled by the construction of a synthetic yeast genome. Cell Rep Methods, 2024, 4: 100761
8 O'Doherty A, Ruf S, Mulligan C, et al. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with down syndrome phenotypes. Science, 2005, 309: 2033–2037
9 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
10 TerMaat J R, Pienaar E, Whitney S E, et al. Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. J Microbiol Methods, 2009, 79: 295–300
11 Zhang P, Ding Y, Liao W, et al. A simple, universal, efficient PCR-based gene synthesis method: sequential OE-PCR gene synthesis. Gene, 2013, 524: 347–354
12 Shetty R P, Endy D, Knight Jr T F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. J Biol Eng, 2008, 2: 5

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

13 Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. PLoS One, 2009, 4: e5553
14 Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. Nat Methods, 2007, 4: 251–256
15 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
16 Robertson W E, Funke L F H, de la Torre D, et al. Creating custom synthetic genomes in *Escherichia coli* with REXER and GENESIS. Nat Protoc, 2021, 16: 2345–2380
17 Zürcher J F, Kleefeldt A A, Funke L F H, et al. Continuous synthesis of *E.coli* genome sections and Mb-scale human DNA assembly. Nature, 2023, 619: 555–562
18 Robertson W E, Rehm F B H, Spinck M, et al. *Escherichia coli* with a 57-codon genetic code. Science, 2025, doi: 10.1126/science.ady4368
19 Zhong L, Zhang Q, Lu N, et al. The conjugation-associated linear-BAC iterative assembling (CALBIA) method for cloning 2.1-Mb human chromosomal DNAs in bacteria. Cell Res, 2025, 35: 309–312
20 Mukai T, Yoneji T, Yamada K, et al. Overcoming the challenges of megabase-sized plasmid construction in *Escherichia coli*. ACS Synth Biol, 2020, 9: 1315–1327
21 Ribeiro S C, Oliveira P H, Prazeres D M F, et al. High frequency plasmid recombination mediated by 28 bp direct repeats. Mol Biotechnol, 2008, 40: 252–260
22 Itaya M, Tsuge K, Koizumi M, et al. Combining two genomes in one cell: Stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 15971–15976
23 Itaya M, Fujita K, Kuroki A, et al. Bottom-up genome assembly using the *Bacillus subtilis* genome vector. Nat Methods, 2008, 5: 41–43
24 Ogawa T, Iwata T, Kaneko S, et al. An inducible *recA* expression *Bacillus subtilis* genome vector for stable manipulation of large DNA fragments. BMC Genomics, 2015, 16: 209
25 Kouprina N, Noskov V N, Larionov V. Selective isolation of large segments from individual microbial genomes and environmental DNA samples using transformation-associated recombination cloning in yeast. Nat Protoc, 2020, 15: 734–749
26 Richardson S M, Mitchell L A, Stracquadanio G, et al. Design of a synthetic yeast genome. Science, 2017, 355: 1040–1044
27 Mitchell L A, McCulloch L H, Pinglay S, et al. *De novo* assembly and delivery to mouse cells of a 101 kb functional human gene. Genetics, 2021, 218: iyab038
28 Zhang W, Zhao G, Luo Z, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome. Science, 2017, 355: eaaf3981
29 Shen Y, Wang Y, Chen T, et al. Deep functional analysis of synII, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome. Science, 2017, 355: eaaf4791
30 Xie Z X, Li B Z, Mitchell L A, et al. “Perfect” designer chromosome V and behavior of a ring derivative. Science, 2017, 355: eaaf4704
31 Zhou J, Wu R, Xue X, et al. CasHRA (Cas9-facilitated Homologous Recombination Assembly) method of constructing megabase-sized DNA. Nucleic Acids Res, 2016, 44: e124
32 He B, Ma Y, Tian F, et al. YLC-assembly: Large DNA assembly via yeast life cycle. Nucleic Acids Res, 2023, 51: 8283–8292
33 Ma Y, Su S, Fu Z, et al. Convenient synthesis and delivery of a megabase-scale designer accessory chromosome empower biosynthetic capacity. Cell Res, 2024, 34: 309–322
34 Luo J, Sun X, Cormack B P, et al. Karyotype engineering by chromosome fusion leads to reproductive isolation in yeast. Nature, 2018, 560: 392–396
35 Shao Y, Lu N, Wu Z, et al. Creating a functional single-chromosome yeast. Nature, 2018, 560: 331–335
36 Shi B, Zheng M, Tao W, et al. Challenges in DNA delivery and recent advances in multifunctional polymeric DNA delivery systems. Biomacromolecules, 2017, 18: 2231–2246
37 Yoneji T, Fujita H, Mukai T, et al. Grand scale genome manipulation via chromosome swapping in *Escherichia coli* programmed by three one megabase chromosomes. Nucleic Acids Res, 2021, 49: 8407–8418
38 Lartigue C, Vashee S, Algire M A, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. Science, 2009, 325: 1693–1696
39 Marschall P, Malik N, Larin Z. Transfer of YACs up to 2.3 Mb intact into human cells with polyethylenimine. Gene Ther, 1999, 6: 1634–1637
40 Levy M S, Collins I J, Yim S S, et al. Effect of shear on plasmid DNA in solution. Bioprocess Eng, 1999, 20: 7–13
41 Lederberg J, Tatum E L. Gene recombination in *Escherichia coli*. Nature, 1946, 158: 558

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

42 Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, et al. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. Nature, 2009, 462: 1011–1015

43 Hayman G T, Bolen P L. Movement of shuttle plasmids from *Escherichia coli* into yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae* using trans-kingdom conjugation. Plasmid, 1993, 30: 251–257

44 Heinemann J A, Sprague Jr G F. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. Nature, 1989, 340: 205–209

45 Waters V L. Conjugation between bacterial and mammalian cells. Nat Genet, 2001, 29: 375–376

46 Dimitriu T, Szczelkun M D, Westra E R. Various plasmid strategies limit the effect of bacterial restriction-modification systems against conjugation. Nucleic Acids Res, 2024, 52: 12976–12986

47 Wang X K, Jin J L. Crucial factor for increasing the conjugation frequency in *Streptomyces netropsis* SD-07 and other strains. FEMS Microbiol Lett, 2014, 357: 99–103

48 Philips J, Herskowitz I. osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 1997, 138: 961–974

49 Zhao Y, Coelho C, Hughes A L, et al. Debugging and consolidating multiple synthetic chromosomes reveals combinatorial genetic interactions. Cell, 2023, 186: 5220–5236.e16

50 Spencer F, Hugerat Y, Simchen G, et al. Yeast *kar1* mutants provide an effective method for YAC transfer to new hosts. Genomics, 1994, 22: 118–126

51 Guo Z, Yin H, Ma L, et al. Direct transfer and consolidation of synthetic yeast chromosomes by abortive mating and chromosome elimination. ACS Synth Biol, 2022, 11: 3264–3272

52 Zhou S, Wu Y, Zhao Y, et al. Dynamics of synthetic yeast chromosome evolution shaped by hierarchical chromatin organization. Natl Sci Rev, 2023, 10: nwad073

53 Xu H, Han M, Zhou S, et al. Chromosome drives via CRISPR-Cas9 in yeast. Nat Commun, 2020, 11: 4344

54 Lengsfeld C S, Anchordoquy T J. Shear-induced degradation of plasmid DNA. J Pharm Sci, 2002, 91: 1581–1589

55 Karas B J, Jablanovic J, Sun L, et al. Direct transfer of whole genomes from bacteria to yeast. Nat Methods, 2013, 10: 410–412

56 Li L, Blankenstein T. Generation of transgenic mice with megabase-sized human yeast artificial chromosomes by yeast spheroplast-embryonic stem cell fusion. Nat Protoc, 2013, 8: 1567–1582

57 Brown D M, Chan Y A, Desai P J, et al. Efficient size-independent chromosome delivery from yeast to cultured cell lines. Nucleic Acids Res, 2017, 45: e50

58 Liskovykh M, Larionov V, Kouprina N. Highly efficient microcell-mediated transfer of HACs containing a genomic region of interest into mammalian cells. Curr Protocols, 2021, 1: e236

59 Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, et al. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. Nat Biotechnol, 2000, 18: 1086–1090

60 Uno N, Miyamoto H, Yamazaki K, et al. Microcell-mediated chromosome transfer between non-identical human iPSCs. Mol Ther Nucleic Acids, 2024, 35: 102382

61 Agustinus A S, Al-Rawi D, Dameracharla B, et al. Epigenetic dysregulation from chromosomal transit in micronuclei. Nature, 2023, 619: 176–183

62 Suzuki T, Kazuki Y, Oshimura M, et al. Highly efficient transfer of chromosomes to a broad range of target cells using Chinese hamster ovary cells expressing murine leukemia virus-derived envelope proteins. PLoS One, 2016, 11: e0157187

63 Liu Y, Zhou J, Liu D, et al. *De novo* assembly and delivery of synthetic megabase-scale human DNA into mouse early embryos. Nat Methods, 2025, 22: 1686–1697

64 Meneu L, Chapard C, Serizay J, et al. Sequence-dependent activity and compartmentalization of foreign DNA in a eukaryotic nucleus. Science, 2025, 387: eadm9466

65 Gambogi C W, Birchak G J, Mer E, et al. Efficient formation of single-copy human artificial chromosomes. Science, 2024, 383: 1344–1349

66 Satofuka H, Abe S, Moriwaki T, et al. Efficient human-like antibody repertoire and hybridoma production in trans-chromosomic mice carrying megabase-sized human immunoglobulin loci. Nat Commun, 2022, 13: 1841

67 Alper H, Fischer C, Nevoigt E, et al. Tuning genetic control through promoter engineering. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 12678–12683

68 Partow S, Siewers V, Bjørn S, et al. Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2010, 27: 955–964

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

69 Fang F, Salmon K, Shen M W Y, et al. A vector set for systematic metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2011, 28: 123–136

70 Zrimec J, Fu X, Muhammad A S, et al. Controlling gene expression with deep generative design of regulatory DNA. Nat Commun, 2022, 13: 5099

71 Roux I, Woodcraft C, Hu J, et al. CRISPR-mediated activation of biosynthetic gene clusters for bioactive molecule discovery in *Filamentous fungi*. ACS Synth Biol, 2020, 9: 1843–1854

72 Leal K, Rojas E, Madariaga D, et al. Unlocking fungal potential: the CRISPR-Cas system as a strategy for secondary metabolite discovery. JoF, 2024, 10: 748

73 Omachi K, Miner J H, Varshney G. Comparative analysis of dCas9-VP64 variants and multiplexed guide RNAs mediating CRISPR activation. PLoS One, 2022, 17: e0270008

74 Chavez A, Tuttle M, Pruitt B W, et al. Comparison of Cas9 activators in multiple species. Nat Methods, 2016, 13: 563–567

75 Sitaraman R. The role of DNA restriction-modification systems in the biology of *Bacillus anthracis*. Front Microbiol, 2016, 7

76 Xu X, Liu Y, Du G, et al. Microbial chassis development for natural product biosynthesis. Trends Biotechnol, 2020, 38: 779–796

77 Wu Y, Li B Z, Zhao M, et al. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X. Science, 2017, 355: eaaf4706

78 Pinglay S, Bulajić M, Rahe D P, et al. Synthetic regulatory reconstitution reveals principles of mammalian *Hox* cluster regulation. Science, 2022, 377: eabk2820

79 Watanabe M, Miyamoto H, Okamoto K, et al. Phenotypic features of dystrophin gene knockout pigs harboring a human artificial chromosome containing the entire dystrophin gene. Mol Ther Nucleic Acids, 2023, 33: 444–453

80 Luke T, Wu H, Zhao J, et al. Human polyclonal immunoglobulin G from transchromosomic bovines inhibits MERS-CoV *in vivo*. Sci Transl Med, 2016, 8: 326ra21

81 Wu H, Fan Z, Brandsrud M, et al. Generation of H7N9-specific human polyclonal antibodies from a transchromosomic goat (caprine) system. Sci Rep, 2019, 9: 366

82 van der Weyden L, White J K, Adams D J, et al. The mouse genetics toolkit: Revealing function and mechanism. Genome Biol, 2011, 12: 224

83 Kazuki Y, Kobayashi K, Aueviriyavit S, et al. Trans-chromosomic mice containing a human*CYP3A* cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans. Hum Mol Genet, 2013, 22: 578–592

84 Kazuki Y, Kobayashi K, Hirabayashi M, et al. Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomic rats for improved prediction of human drug metabolism. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 3072–3081

85 Suzuki N, Itou T, Hasegawa Y, et al. Cell to cell transfer of the chromatin-packaged human β-globin gene cluster. Nucleic Acids Res, 2010, 38: e33

86 Zhang W, Golynker I, Brosh R, et al. Mouse genome rewriting and tailoring of three important disease loci. Nature, 2023, 623: 423–431

87 Smith H O, Hutchison Iii C A, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ΦX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 15440–15445

88 Noyce R S, Lederman S, Evans D H, et al. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. PLoS One, 2018, 13: e0188453

89 Thi Nhu Thao T, Labroussaa F, Ebert N, et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. Nature, 2020, 582: 561–565

90 Pelletier J F, Sun L, Wise K S, et al. Genetic requirements for cell division in a genomically minimal cell. Cell, 2021, 184: 2430–2440.e16

91 Hutchison C A, Chuang R Y, Noskov V N, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science, 2016, 351: aad6253

92 Venetz J E, Del Medico L, Wölfle A, et al. Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 8070–8079

93 Grome M W, Nguyen M T A, Moonan D W, et al. Engineering a genomically recoded organism with one stop codon. Nature, 2025, 639: 512–521

94 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

95 Annaluru N, Muller H, Mitchell L A, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. Science, 2014, 344: 55–58

96 Mitchell L A, Wang A, Stracquadanio G, et al. Synthesis, debugging, and effects of synthetic chromosome consolidation: SynVI and beyond. Science, 2017, 355: eaaf4831

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208

97 Schindler D, Walker R S K, Jiang S, et al. Design, construction, and functional characterization of a tRNA neochromosome in yeast. Cell, 2023, 186: 5237–5253.e22
98 Dai J, Boeke J D, Luo Z, et al. Sc3.0: revamping and minimizing the yeast genome. Genome Biol, 2020, 21: 205
99 Chen L G, Lan T, Zhang S, et al. A designer synthetic chromosome fragment functions in moss. Nat Plants, 2024, 10: 228–239
100 Yu W, Zhang S, Zhao S, et al. Designing a synthetic moss genome using GenoDesigner. Nat Plants, 2024, 10: 848–856
101 Boeke J D, Church G, Hessel A, et al. The genome project-write. Science, 2016, 353: 126–127
102 Brosh R, Laurent J M, Ordoñez R, et al. A versatile platform for locus-scale genome rewriting and verification. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118: e2023952118

Advances in assembly, transfer of large-fragment DNA and genome resurrection

HUANG XinYang[1,2†], BAI Song[1,2†], TONG HanZe[1,2] & WU Yi[1,2*]

[1] *State Key Laboratory of Synthetic Biology, Frontiers Science Center for Synthetic Biology (Ministry of Education), Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China*
[2] *Frontiers Research Institute for Synthetic Biology, Tianjin University, Tianjin 300072, China*
† *Contributed equally to this work*
* *Corresponding author, E-mail: yi.wu@tju.edu.cn*

The development of synthetic genome has endowed humanity with an unprecedented ability to rewrite the genetic code. The assembly, transfer, and heterologous expression of large-fragment DNA are the core enabling technologies in this field. Currently, these technologies are undergoing rapid iteration, reshaping the research pathways and application landscape of synthetic genome. This article aims to systematically review the latest research progress of large DNA fragment assembly, transfer, and heterologous expression, and to provide a perspective on their broad prospects in creating new biological functions and genome resurrection.

large-fragment DNA assembly, large-fragment DNA transfer, heterologous expression of large-fragment DNA, genome resurrection, synthetic biology

doi: 10.1360/SSV-2025-0208

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0208