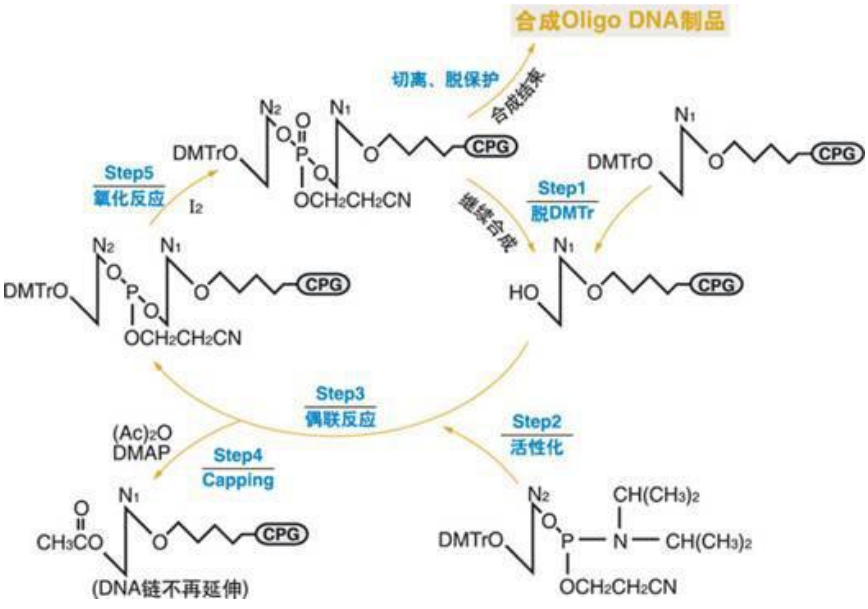
基因合成的原理与应用

摘要：基因合成是体外合成双链 DNA 的一种方法，是获取目的基因的手段之一，本文主要介绍了不同获取目的基因的方法及基因合成的原理、应用与优势。

人工合成基因出现在上世纪 60 年代，通过基因合成，可以获得自然界中不存在的基因。目前，获取目的基因的方法主要有三种：逆转录，PCR 扩增，人工合成 。逆转录法主要适用于获得分子量较大的未知序列的基因，它以目的基因的 mRNA 为模板，设计上下游引物，借助逆转录酶合成碱基互补的 DNA 链（即 cDNA），在 DNA 聚合酶的作用下合成 cDNA，即目的基因的双链 DNA。PCR 主要适用于已知序列的扩增，获得大量的目的片段，供人们肉眼观察（RT-PCR 可实现对起始模板的定量分析）。人工合成法就是采用化学合成的方法获取目的片段，化学合成准确率较高，速度较快，同时根据不同的下游应用和密码子的偏爱性，设计基因序列，提高表达水平。

原理

DNA 合成的方法主要采用固相亚磷酰胺三酯法，运用此方法的 DNA 合成仪有很多，常用的有 ABI 394 合成仪、ABI39OO 高通量合成仪，它们的区别主要在合成效率，试剂用量，耗时等方面，合成的原理是相同的，合成原理如图：



Step 1 :DMTro 是 5’羟基的保护基团 ,用 TCA（三氯乙酸）和预先连接在固相载体（CPG）上的核苷酸的 5’ 端发生反应，脱去 DMT，使 5’羟基端游离

Step 2：亚磷酰胺保护的 dNTP 和活化剂四氮唑混合，得到核苷亚磷酸活化中间体，此时 3’端被活化，5’ -羟基被 DMTro 保护

Setp 3：1、2 步的产物发生缩合反应偶联，形成新键 C-亚磷酯键

Setp 4：1 中会剩下部分未参与反应的 5’ -羟基，通过乙酰化的方法封闭 5’ -羟基

Setp 5：3 步形成的 C-亚磷酯键不稳定，易被水解，所以用氧化剂碘将其氧化成更稳定的磷酸三酯键

通过以上步骤，一个脱氧核苷酸被连接到固相载体上，将其 5’ 端的 DMTro 切除，重复以上步骤合成所有需要的碱基，最后经过氨水高温处理，将合成的链从固相载体 CPG 上切下来，根据不同的下游应用纯化处理后保存。

PCR 扩增简单方便，但不能保证基因序列的完全正确性，扩增存在突变风险，且 PCR 对模板也具有一定的要求，因此适用性存在局限性，相对于此**基因合成**具有如下优势：

优势

1. 可以保证基因序列的完全正确性，无突变
2. 合成周期短
3. 不受模板来源限制
4. 根据不同应用，设计优化基因序列，提高表达水平

应用

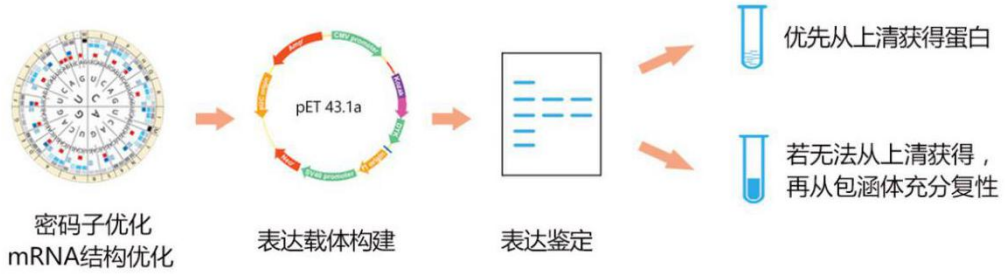
人工**基因合成**具有极大的灵活性，根据需求自行改变设计序列

1. 进行基因优化，提高基因表达
2. 合成已知序列的难扩增基因
3. 合成大量用于微芯片的 cDNA
4. 克隆人鼠抗体或重组抗体
5. 设计合成基因疫苗、基因治疗载体
6. 根据基因的结构功能研究，修改设计基因
7. 合成不同的基因突变株、SNPS、或其它突变株

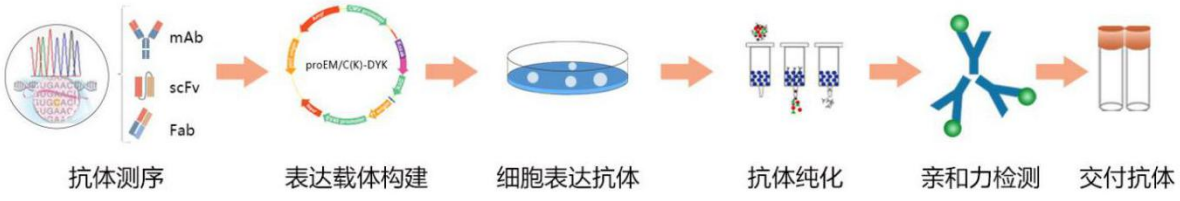
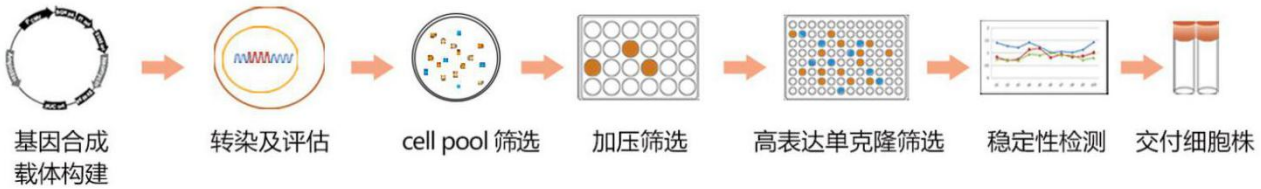
南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障

二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发