

引文格式:

江湘儿, 王勇, 沈玥. DNA 合成技术与仪器研发进展概述 [J]. 集成技术, 2021, 10(5): 80-95.

Jiang XE, Wang Y, Shen Y. The review of DNA synthesis technologies and instruments development [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(5): 80-95.

DNA 合成技术与仪器研发进展概述

江湘儿^{1,2,3#} 王 勇^{1,2,3#} 沈 玥^{1,2,3*}

¹(深圳华大生命科学研究院 深圳 518083)

²(广东省高通量基因组测序与合成编辑应用重点实验室 深圳 518120)

³(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 深圳 518055)

摘 要 基因组解读促使生命进入数字化时代, 合成生物学赋予人类探索生命本质并改造利用的能力, 且在医疗、化工、农业及信息等交叉融合领域实现快速发展。DNA 合成是合成生物学的基础性技术, 其重要性堪比测序技术对基因组学与精准医学的支撑。该文围绕 DNA 合成方法、技术路径及仪器研制与产业化进展进行了系统性的分析比较, 并结合未来需求, 对 DNA 合成技术拟解决的瓶颈问题及突破方向进行总结和建议。

关键词 寡核苷酸合成技术; 化学法合成; 生物法合成; 柱式合成仪; 芯片合成仪

中图分类号 Q 819 **文献标志码** A **doi:** 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427002

The Review of DNA Synthesis Technologies and Instruments Development

JIANG Xianger^{1,2,3#} WANG Yong^{1,2,3#} SHEN Yue^{1,2,3*}

¹(BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083, China)

²(Guangdong Provincial Key Laboratory of Genome Read and Write, Shenzhen 518120, China)

³(Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology,
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Author: shenyue@genomics.cn

#Equal Contribution

Abstract Comparing with genome sequencing, which facilitates the digitization of life, synthetic biology has enabled human beings to explore the nature of life and promote the cross-disciplinary applications in medicine, chemical industry, agriculture and IT technologies. Since DNA synthesis serves as the fundamental technology of synthetic biology. This paper makes a systematic review of DNA synthesis

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-11

基金项目: 国家自然科学基金研究项目(21901165); 广东省高通量基因组测序与合成编辑应用重点实验室计划项目(2017B030301011)

作者简介: 江湘儿(共同第一作者), 博士, 研究方向为基因合成与下游应用; 王勇(共同第一作者), 博士, 研究方向为核酸合成及其装备研制; 沈玥(通讯作者), 研究员, 研究方向为 DNA 合成使能技术与装备、合成基因组学及其下游应用、DNA 数据存储, E-mail: shenyue@genomics.cn.

technology and its instrumental development. In addition, the current technical bottlenecks and potential approaches for breaking through are also discussed.

Keywords oligo nucleotide synthesis; DNA chemical synthesis; DNA enzymatic synthesis; column-based DNA synthesizer; chip-based DNA synthesizer

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (21901165), and Guangdong Provincial Key Laboratory of Genome Read and Write (2017B030301011)

1 引言

合成生物学促进了生命科学从基于观测、描述及经验的科学跃升为可预测、可定量及可工程化的科学,并在医疗、能源、工业、农业、环境、信息等领域的应用日益广泛,潜力巨大,已成为各国科技战略布局的必争之地^[1-5]。DNA 合成作为合成生物学的关键基础性技术,其重要性堪比测序技术对基因组学的支撑^[6]。合成技术及核心工具合成仪的创新,将解决合成生物学发展的限速问题;合成技术及核心工具合成仪的自主,也将标志着合成生物学领域中关键“卡脖子”技术取得重要突破,并保障生命科学产业自主发展。

DNA 合成原理主要包括化学法及生物法。其中,化学法(尤其是固相亚磷酰胺三酯合成法)最为成熟且被广泛应用,而有关生物法合成技术的一系列产业布局也陆续在欧美国家出现,但总体仍处于原理验证阶段。自 20 世纪 80 年代开始,基于化学法原理的 DNA 合成仪经历了从柱式合成到高通量芯片合成的两个关键时期。本文围绕 DNA 合成技术与仪器,系统阐述 DNA 合成方法及配套设备研制的进展,并结合日益增长的需求与法律法规的完善对未来发展方向进行了展望。

2 DNA 合成技术

2.1 寡核苷酸合成技术概述

寡核苷酸(Oligonucleotide)是一类多个相邻核

苷酸残基以磷酸二酯键连接的短链核苷酸(包括脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)内的核苷酸)的总称,其人工化学合成过程是一个多步连续的反应,目标产物的得率受合成过程中副反应发生(如脱嘌呤等)的影响。因此,化学合成过程中一般先将不参与反应的基团暂时保护起来,经过一轮缩合反应后再将上一轮被保护基团上的保护基脱除下来,以形成目标磷酸二酯键^[7]。

寡核苷酸化学合成起步于 20 世纪 40 年代末。1955 年,剑桥大学的 Todd 实验室,第一次化学法成功合成了简单二聚寡核苷酸,并获得 1957 年诺贝尔奖(图 1)^[8]。1965 年, Khorana 等利用化学方法大量合成脱氧核苷的单一聚合物或 2 种、3 种脱氧核苷的重复序列,同时将人工合成的 64 种核糖三糖苷用于研究蛋白质的生物合成过程,从而确定了氨基酸的三联密码子,并获得 1968 年诺贝尔奖^[8]。

随后的 60 至 70 年代,寡核苷酸的化学合成方法不断被完善,主要包括改善亚磷酰胺单体的稳定性和反应活性以提高单体偶联步效率,以及优化保护基团的反应活性和产物的稳定性以提高氧化环节的氧化效率等。逐渐形成了今天被广泛应用的固相亚磷酰胺三酯合成法,该方法于 20 世纪 80 年代由 Marvin Caruthers 课题组提出^[7]。然而,由于每一步化学反应的不完全性和副反应的发生,随着寡核苷酸合成链的延长,合成错误率急剧上升,合成产物得率也显著下降。此外,由于合成过程中需要大量使用有毒化学试剂,

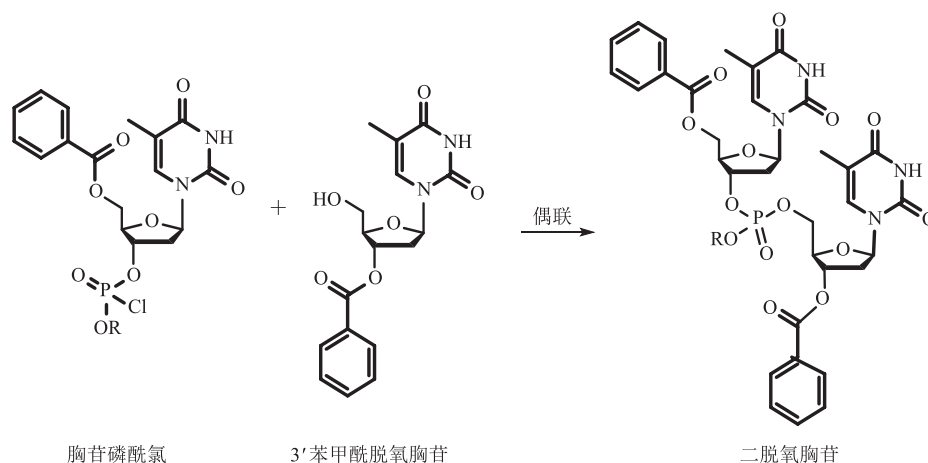
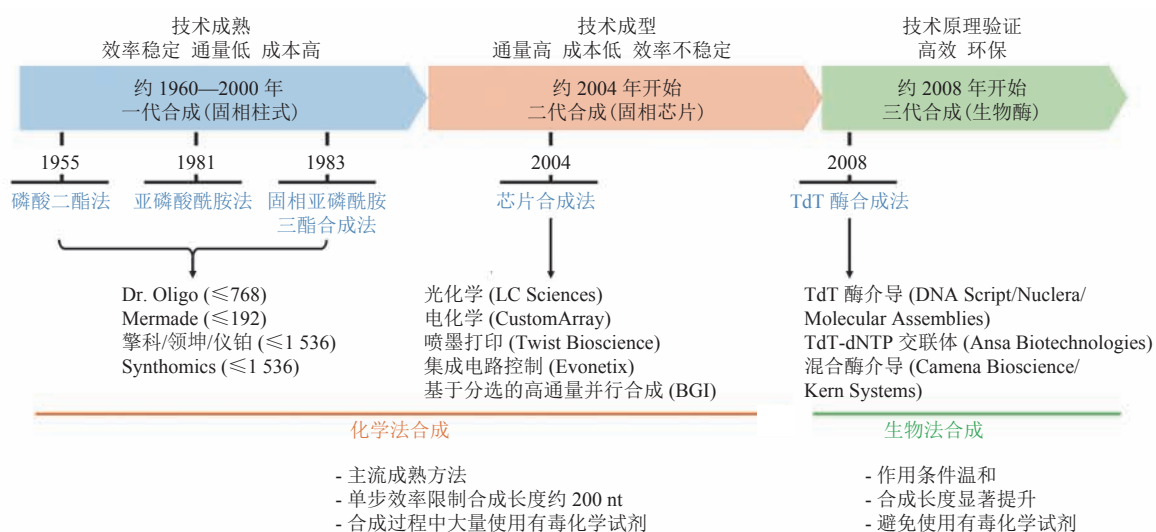
图1 首次化学合成寡核苷酸^[8]Fig. 1 The first attempt of oligonucleotides synthesis by chemistry^[8]

图2 DNA合成技术发展历程

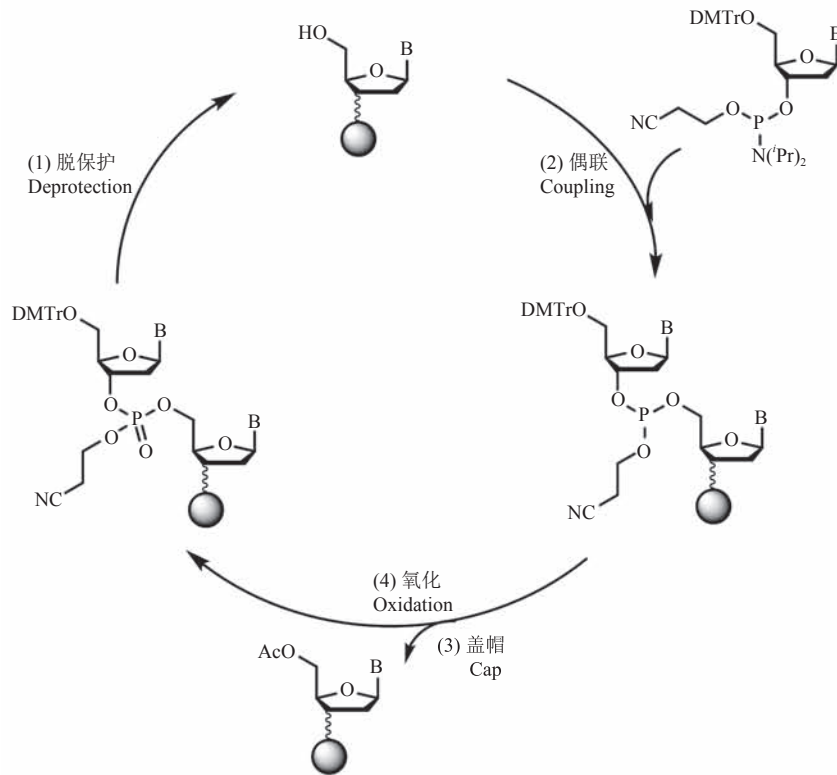
Fig. 2 The development of DNA synthesis technology

所产生的废液、废气也需要特殊处理。为此，近年来科研人员发展了很多方法来提高合成效率、降低副反应发生率。同时，尝试开发不依赖有毒化学试剂的合成方法，主要包括光化学脱保护合成法、电化学脱保护合成法、氢磷酸酯合成法、两步合成法、双碱基单体合成法等寡核苷酸化学合成技术，以及基于末端脱氧核苷酰转移酶 (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, TdT) 等生物合成技术^[9]。总体而言，DNA合成技术发展历程如图2所示。

2.2 寡核苷酸化学法合成技术

2.2.1 亚磷酰胺三酯合成法

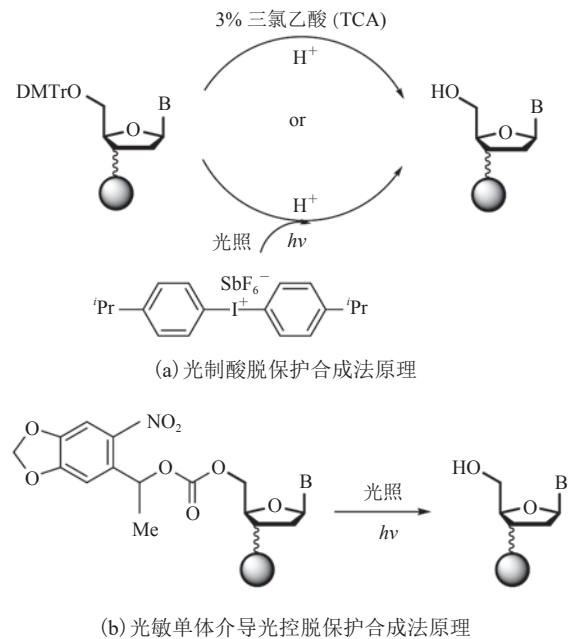
亚磷酰胺三酯合成法是最为广泛使用的寡核苷酸合成法，也是目前国内外主流DNA合成仪采用的合成方法，包括脱保护、偶联、盖帽和氧化4步循环(图3)^[8-9]。按照预定碱基序列，通过液路系统依次在提前做好表面修饰的固相载体上加入相应的4种亚磷酰胺合成单体(A、T、C、G)及其他必须的化学试剂，以完成指定寡核苷酸序列的合成。待合成后，通过氨气或利用其他

图 3 亚磷酰胺三酯合成法原理^[9]Fig. 3 The mechanism of phosphoramidite chemistry^[9]

碱性条件, 将产物从固相载体上切除并收集, 即可获得目标碱基序列的寡核苷酸。但由于每一步化学反应的不完全性和副反应的发生(如脱保护过程中的脱腺苷等), 寡核苷酸合成链越长, 合成效率越低, 合成错误率也越高, 这极大地限制了寡核苷酸合成的长度及合成质量。

2.2.2 光化学脱保护合成法

按合成原理, 光化学脱保护合成法可细分为光制酸脱保护合成法和光敏单体介导光控脱保护合成法(图 4)^[10-16]。光制酸脱保护技术原理为, 光制酸前体通过光照产生酸, 从而进行 5'-二甲氧基三苯甲基(N, N-Dimethyltryptamine, DMT)保护基团的脱保护。该技术遵循成熟的化学合成工艺, 可以确保高效的偶联效率和高保真的合成质量。同时, 该方法非常灵活, 任意修饰的单体分子都可以用来合成一系列修饰寡核苷酸。但光制酸效率较低, 需要复杂的光控条件, 且仪器设

图 4 光化学脱保护合成法原理^[10]Fig. 4 The mechanism of DNA synthesis by photochemical deprotection^[10]

计及操作也相对比较繁琐。光敏单体介导光控脱保护合成法需要特定光敏保护基团的合成单体，与传统合成单体相比，同样需要特殊避光保存，但反应效率显著降低，合成过程中容易产生更多随机合成突变，导致合成序列保真度较低，因此限制了该方法的应用。

2.2.3 电化学脱保护合成法

与经典亚磷酰胺 4 步法直接加入有机酸或利用光制酸脱保护技术光照原位生产酸相比，电化学合成法中脱保护过程所需酸的来源不同。该方法利用通电条件下，在电极阳极表面原位产生质子酸，来脱除 DMT 保护基团，随后进行常规的偶联、盖帽和氧化步骤，并进行下一个循环。尽管该合成方法脱保护体系中加入了 2,6-二甲基吡啶作为有机碱，用来中和扩散出来的酸以避免相邻电极上的 DMT 基团脱保护，但在高密度阵列反应点中，当相邻距离过近时，则无法有效控制扩散(图 5)^[17-21]。此外，该方式产生酸的效率较低，需要较长时间通电，且电化学过程对反应环境较为敏感，致使合成稳定性较低、合成错误率偏高。

2.2.4 氢磷酸酯合成法

经典亚磷酰胺 4 步法中，采用三价磷的亚磷酰胺为合成单体，该三价磷分子结构易被氧化或与水反应而变质。为了保证高效的偶联效率以及高保真的合成质量，整个偶联反应过程需要严格

的无水无氧环境，这不可避免地增加了寡核苷酸合成过程控制的难度，继而影响合成的成本。而氢磷酸酯合成法是将传统的三价亚磷酰胺单体发展为五价磷单体，该单体在空气环境下相对稳定，理论上可以降低经典亚磷酰胺四步法对水氧环境的要求(图 6)^[22-23]。然而，由于该方法的偶联反应活性比三价亚磷酰胺的低，导致合成效率也较低，因此限制了该方法的进一步应用。

2.2.5 两步合成法

两步合成法的关键是用芳氧基羰基(Aryloxycarbonyl)取代 5'-DMT 封闭基团，并且利用 N-二甲氧基三苯甲基保护腺嘌呤和胞嘧啶的环外氨基。通过这些修饰，每个 2'-脱氧核苷-3'-亚磷酰胺与固相载体上延伸的寡聚脱氧核苷酸偶联之后，可用过氧阴离子缓冲溶液(pH<10)处理。该过氧阴离子溶液不仅具有较强的亲核性，还具有温和的氧化性。其中，该试剂的强亲核性能不可逆地除去 5'-氧-碳酸酯保护基团，且其温和的氧化电位能定量地氧化核苷酸之间的亚磷酸三酯，而不会氧化杂环碱基，一并完成氧化和脱保护两个步骤。与此同时，在合成较短寡核苷酸链过程中，可以省略盖帽步骤，从而实现两步法合成(图 7)^[24]。但该方法所涉及的缓冲体系稳定性较差，需要现配现用，且省略盖帽步骤会产生很多偶联不完全的副产物，难以应用于长链寡核

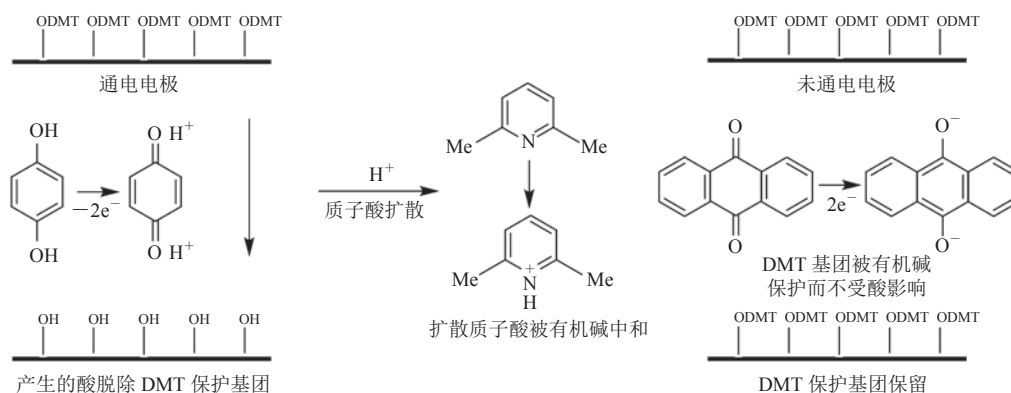
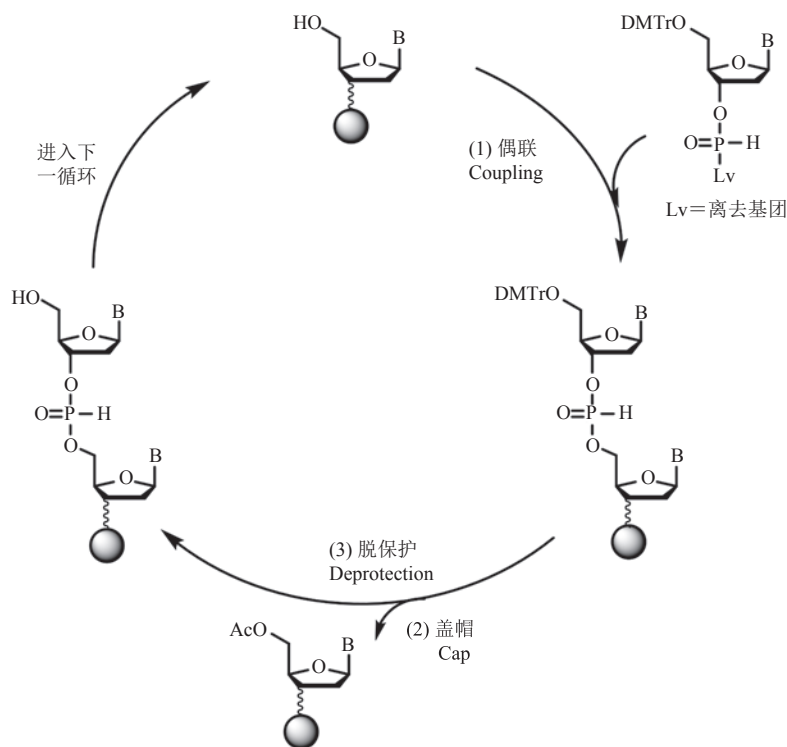
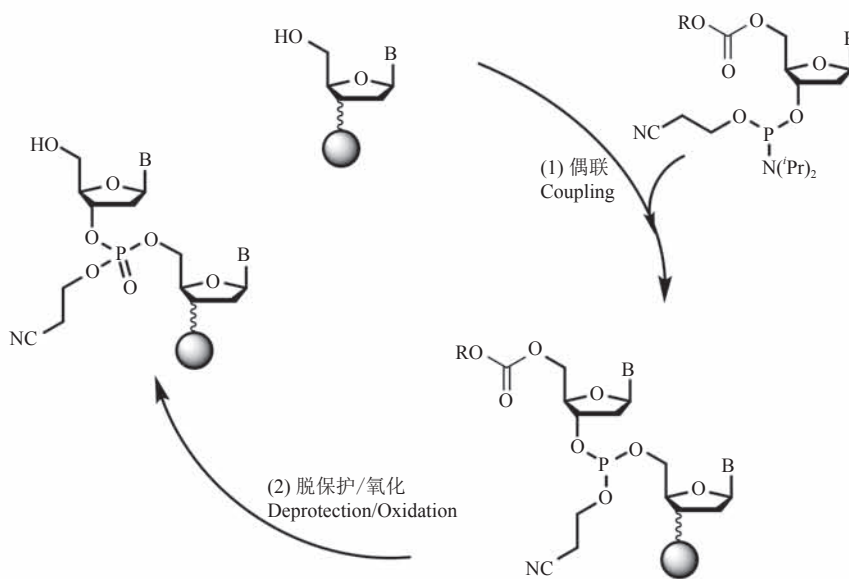


图 5 电化学脱保护合成法原理^[21]

Fig. 5 The mechanism of DNA synthesis by electrochemical deprotection^[21]

图 6 氢磷酸酯合成法原理^[22-23]Fig. 6 The mechanism of DNA synthesis by H-phosphonate chemistry^[22-23]图 7 两步合成法原理^[24]Fig. 7 The mechanism of DNA synthesis by two-step cycle chemistry^[24]

苷酸的合成。

2.2.6 双碱基单体合成法

与经典的亚磷酰胺三酯合成法相比, 光化学

脱保护合成法、电化学脱保护合成法、氢磷酸酯合成法和两步合成法等新发展的生化体系, 普遍存在合成效率不高及稳定性较差等问题, 较难实

现长链寡核苷酸的高质量合成，而双碱基单体合成法则有望解决这些问题。其原理是基于较成熟的亚磷酰胺 4 步循环法，采用双碱基亚磷酰胺单体作为基本反应单元进行合成反应(图 8)^[25]。合成同样长度的寡核苷酸序列，双碱基单体合成法所需反应循环数较亚磷酰胺 4 步循环法减半，因此双碱基反应效率大幅提升，且反应错误率也会相应地降低。而在同样的反应循环数下，采用双碱基合成法能快速高效地得到长链寡核苷酸目标序列。其中，在 >200 nt 长链寡核苷酸高效合成时，双碱基合成法更具优势。然而，当前该方法的单体成本较高，且双碱基单体溶解度较差而易结晶堵塞试剂管道，所需配套的仪器液路系统复杂度高，因此暂未形成基于该方法的设备与应用。随着

双碱基单体大规模制备工艺的逐步完善，及硬件系统设计与搭建能力的不断提升，有望研制出基于该方法的合成仪，从而在合成成本、合成错误率及合成长度等方面实现技术突破。

2.3 寡核苷酸生物法合成技术

如上所述，传统亚磷酰胺化学合成法受化学反应效率限制，DNA 合成产物长度仅能达到约 200~250 nt^[26]，极大地限制了下游应用。合成过程中涉及强酸、强氧化剂，产生较多对环境有害的化学废液，导致后续处理费用高昂。而生物酶法 DNA 合成技术通常在水相环境下进行，可有效避免上述问题，并有望以更低的成本合成更长的 DNA 分子^[27-31]。2020 年 10 月，*Nature Biotechnology*《自然生物技术》杂志在题为

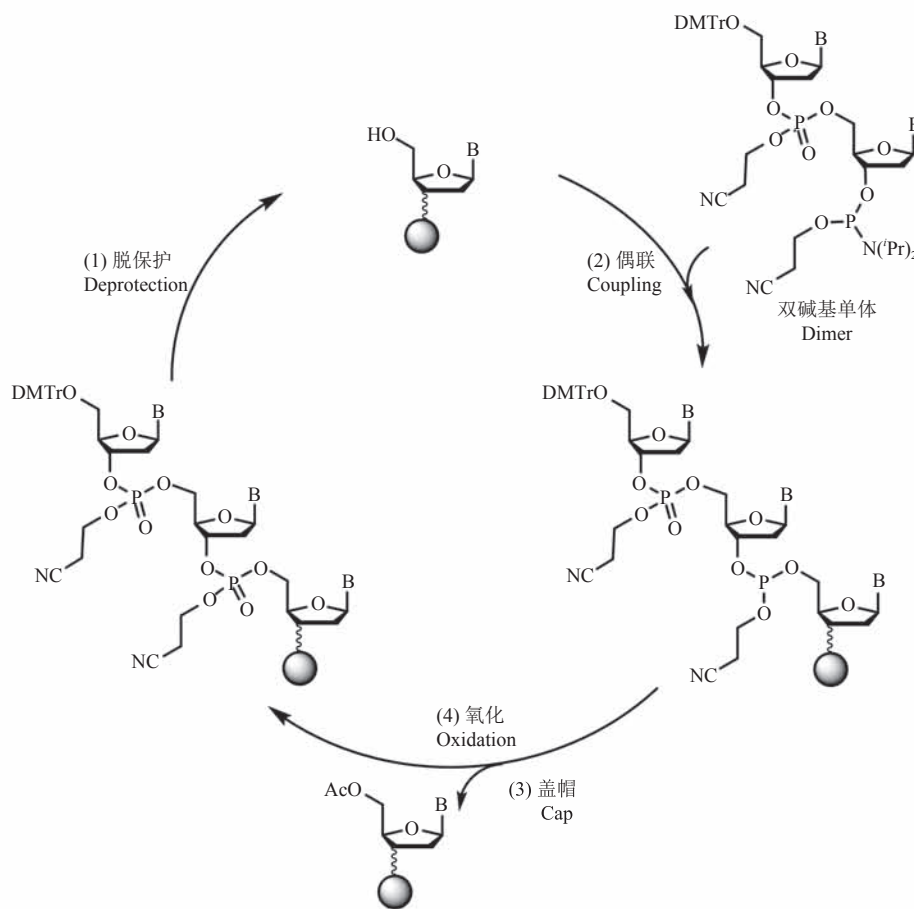


图 8 双碱基单体合成法原理^[25]

Fig. 8 The mechanism of DNA synthesis by dimer phosphoramidite chemistry^[25]

“Enzymatic DNA synthesis enters new phase”的新闻报道中提到, 一些新创公司把酶法合成作为更快且更高效合成长链 DNA 分子的新技术手段, 同时极大地降低了合成和 DNA 链的组装成本^[32]。

DNA 分子的体内合成主要是由各种 DNA 聚合酶催化并依赖于 DNA 模板进行合成。DNA 末端转移酶和部分种类的 DNA 聚合酶可以不依赖于已有的 DNA 模板分子, 直接催化 DNA 链的合成^[33-34]。发展基于生物酶的 DNA 合成新技术, 并结合同源重组等体内组装方法, 可以使寡核苷酸合成长度和准确度提升数个量级, 这将极大地提高利用合成生物学设计与构建的能力。同时, 这一技术也将促进如 DNA 数据存储和新材料的设计制造等新兴领域的重大突破。与 DNA 化学法合成相比, 生物酶法合成潜力巨大, 有望在合成长度和产量方面实现显著提升, 并大幅降低成本^[35]。

2.3.1 TdT 酶介导的酶促合成反应

TdT 酶介导的酶促合成反应是目前酶法合成 DNA 的研究热点。TdT 是一种非模板依赖性酶, 通常以随机方式延伸 DNA 链, 可将 4 种天然碱基加到 DNA 链的 3' 端^[33-34,36]。如何控制反应的启动与终止, 实现某一特定序列的片段合成, 是利用该酶促反应实现从头合成 DNA 的关键问题。

此外, 酶促反应的催化效率、酶对修饰单体的特异性以及单体的特异性添加问题, 亦是难点。

从 2013 年开始, 3 家以 TdT 酶为基础的 DNA 合成公司: Molecular Assemblies、DNA Script 和 Nuclera 相继成立。该方法本质上都是通过修饰核苷酸分子, 化学合成带有可逆终止基团的核苷酸单体, 然后利用 TdT 酶将碱基不断地添加到所合成序列的末端。其原理是通过化学反应控制核苷酸分子上的化学修饰基团, 使该酶每次只能延伸目标单碱基, 随后除去终止基团并开始下一个目标碱基的合成, 最终实现控制 DNA 链中目标碱基的有序连接(图 9)^[29-30,37-40]。鉴于 TdT 酶对其所修饰的基团要求极高, 该方法前期投入较大, 需耗费大量的人力和物力进行蛋白质改造研究及化学修饰基团筛选。

2.3.2 TdT-dNTP 交联体介导的酶促合成反应

由 Dan Arlow 和 Sebastian Palluk 等人于 2018 年共同成立的 Ansa Biotechnologies 公司(<https://ansabio.com/>), 针对 TdT 酶难以接受修饰核酸的问题, 提出 TdT-dNTP 交联体介导的可逆终止合成法。TdT 酶与单独 3' 端带可逆接头的脱氧核苷三磷酸(dNTP)结合, 当新合成链的 3' 端暴露出来时, 该 TdT 酶与核苷酸的偶联物就能连

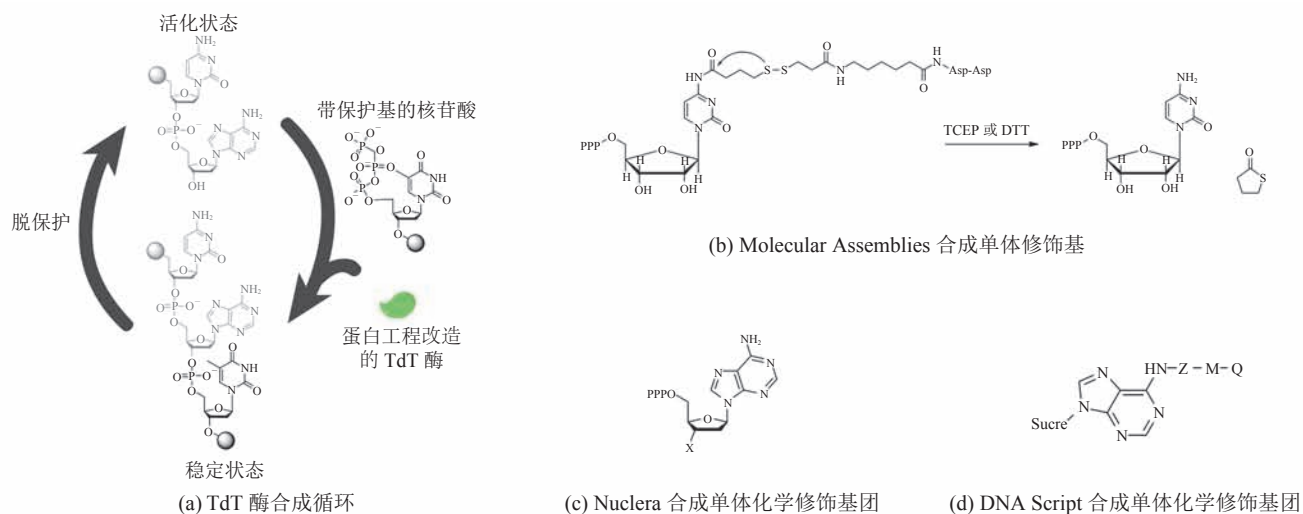


图 9 TdT 酶介导的酶促合成反应^[29-30,37-40]

Fig. 9 Enzymatic DNA Synthesis by TdT^[29-30,37-40]

接上去, 新目标碱基也随之被引入。同时, TdT 酶继续停留在 3' 端上阻止其他偶联物继续添加 (图 10)^[34,41-42]。与 TdT 酶介导的生物酶法合成相比, 该策略由于要先将 TdT 酶与核苷酸偶联, 导致 TdT 酶消耗量更大。

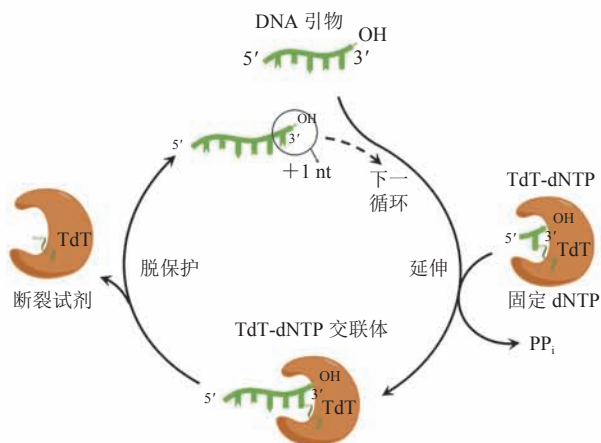


图 10 TdT-dNTP 交联体介导的酶促合成反应原理^[34]

Fig. 10 TdT-dNTP conjugates for reversible termination of primer elongation^[34]

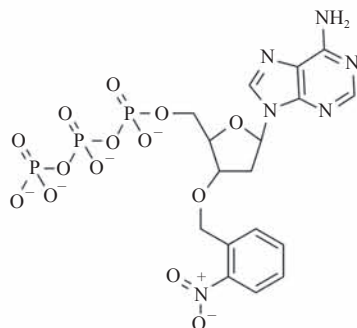
2.3.3 混合酶介导的酶促反应

成立于 2016 年的英国 Camena Bioscience 公司利用特定组合的酶在三核苷酸异构体中实现无模板的 DNA 合成。它们的从头酶法合成和基因组组装技术叫 gSynthTM, 每条引物的 3' 端都由可逆终止核苷酸 (rtNTP) 组成, 包含特定组合的酶

或有末端转移酶活性的核糖酶, 通过不断的重复延伸, 合成 300 nt 长度的引物 (图 11)^[43-44]。与同为 300 nt 长度碱基的合成片段相比, 因其减少了连接步骤, 故准确率较化学法合成有明显提升。该公司于 2020 年初, 利用自己特有技术与平台从头合成了 2.7 kb 长度的质粒 (pUC19), 亦证明该方法具有实际应用价值, 未来可应用于蛋白改造及微生物菌株构建等领域。

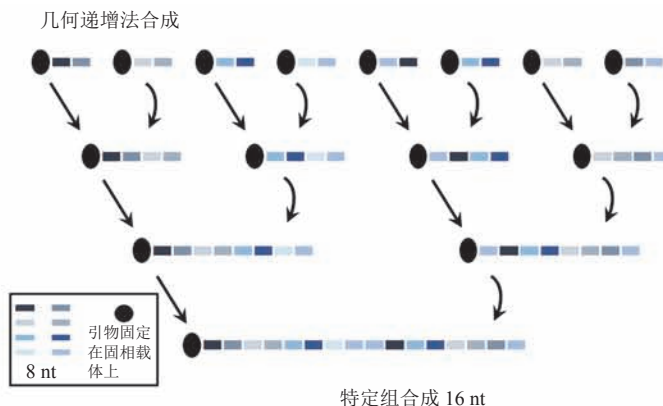
此外, Kern Systems 公司从 DNA 存储的应用需求出发, 采用一种免修饰的策略合成 DNA。该方法利用两种酶之间的竞争, 首先 TdT 酶将核苷酸整合到 DNA 链末端, 此时体系内存在另一种酶——三磷酸腺苷双磷酸酶作为核酸降解酶, 可以使体系中核苷酸浓度降低, 最终导致无法进行新一轮的合成^[45]。该方法因不能严格控制碱基的添加与终止, 可能会导致合成错误率较高。但通过加入特定冗余及纠错机制等方式可以实现应用该技术进行 DNA 存储^[46]。

迄今为止, 以上提及的 6 家酶法合成公司先后已获得超过 1.5 亿美元的融资, 但整体仍处于概念验证阶段, 尚未达到大规模商业应用水平 (表 1)。我国亦有如中国科学院天津工业生物技术研究所及湖南大学等科研院所的研发团队在生物法合成方向有所布局。



3'-氧-(2-硝基苄基)-2'-脱氧腺苷三磷酸

(a) Camena 公司的三核苷酸异构体结构式



(b) gSynthTM 原理示意图

图 11 混合酶介导的酶促反应^[43-44]

Fig. 11 Multiplexed enzymatic DNA synthesisTM^[43-44]

表 1 主流生物酶法合成公司概况

Table 1 Enzymatic DNA synthesis companies

| 主流生物酶法合成公司 | 国家 | 成立时间 | 合成策略 | 优点 | 缺点 |
|----------------------|----|------|--|--------------------|--|
| Molecular Assemblies | 美国 | 2013 | TdT 酶介导的酶促反应, 修饰后的核苷酸可通过添加特定化学基团的试剂来终止反应 | 准确性较高 | 因需要同时保证酶效、单体与酶的结合率、保护基的阻断率及脱保护率, 化学修饰基团筛选和蛋白质筛选改造难度大 |
| Nuclera | 英国 | 2013 | | | |
| DNA Script | 法国 | 2014 | | | |
| Camena Bioscience | 英国 | 2016 | 基于三核苷酸异构体及特定组合的酶 | 准确性较高 | 因制备工艺流程复杂, 涉及多步反应, 制备成本高 |
| Ansa Biotechnologies | 美国 | 2018 | TdT 酶与核苷酸偶联 | 避免 TdT 酶与修饰核酸结合的难点 | TdT 酶消耗量大 |
| Kern Systems | 美国 | 2019 | 通过添加可与 TdT 酶竞争的三磷酸腺苷双磷酸酶 | 免修饰策略 | 无法严格控制碱基的添加与终止, 合成错误率较高 |

3 DNA 仪器研发

3.1 仪器发展概述

DNA 合成仪是 DNA 合成的核心装备。自 20 世纪 90 年代起, 以美英为首的西方发达国家在经典化学合成法原理基础上开始了 DNA 合成仪的研发与商业化, 经历了从第一代柱式合成仪到第二代高通量芯片合成仪两个关键时期。目前, 第一代柱式合成仪有多款机型在市场上流通, 其中接受度较高的代表是 Bioautomation-Mermade 和 Biolytic-Dr.Oligo 系列合成仪。第二代高通量芯片合成仪于 2000 年面世, 根据其技术原理的不同, 大致分为 5 类, 包括美国 LC Sciences 公司为代表的光脱保护 μ Paraflo 合成仪、美国 CustomArray 公司为代表的电化学合成技术合成仪(于 2017 年被金斯瑞生物收购)、美国 Agilent Technologies 及 Twist Bioscience 公司为代表的喷墨打印合成仪、英国 Evonetix 公司为代表的集成电路控制合成仪(仅发布技术, 未见商业机器发布)及中国华大基因为代表的基于芯片分选原理的高通量合成仪等^[9,47-50]。其中, 国外以美国 Twist Bioscience 公司的高通量喷墨

合成仪的综合性能较为突出。尽管基于生物酶法合成技术(如 TdT 酶合成法)陆续在欧美国家出现一系列产业布局, 但总体仍处于原理验证阶段, 而国内对该领域的布局较晚, 尚未出现商业化设备(图 12)。

3.2 基于化学合成法的合成仪

3.2.1 一代柱式合成仪

柱式合成仪的合成载体为管道合成柱, 其内部填充的可控多孔玻璃为真正的反应介质。柱式合成仪通过电脑程序控制与可控多孔玻璃反应试剂的加入, 最终合成单链 DNA。目前国际上具有柱式 DNA 合成仪自主研发和生产能力的研究机构及企业主要集中在发达国家和地区, 包括美国的 GE、ABI、贝克曼库尔特、Biolytic、Bioautomation、Synthomics 等公司, 德国的 K&A Laborgeraete、PolyGen 等公司, 韩国的 Bioneer 公司, 丹麦的 TAG Copenhagen A/S, 日本的瑞翁医疗株式会社等^①。随着寡核苷酸合成需求的不断提升, 国内也涌现出多家开发一代柱式合成仪的公司, 如北京擎科生物科技有限公司、上海仪铂生物科技有限公司、江苏领坤生物科技有限公司、北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司等。

注^①: 美国 GE (<https://www.gehealthcare.cn/>), 美国 ABI (<https://www.thermofisher.cn/zh/home/brands/applied-biosystems.html>), 贝克曼库尔特 (<https://www.beckmancoulter.cn/>), Biolytic (<https://www.biolytic.com/>), Bioautomation (<https://bioautomation.com/>), Synthomics (<https://tracxn.com/d/companies/synthomics.com>), K & A Laborgeraete (<https://www.dna-synthesizer.de/company/>), PolyGen (<http://www.polygen.de/index.html>), TAG Copenhagen A/S (<http://tagc.dk/>), 瑞翁医疗株式会社 (<https://www.zeonmedical.co.jp/c/>)



图 12 DNA 合成仪汇总

Fig. 12 The summary of DNA synthesizers

当前，柱式合成仪单批次合成通量最高可达 1 536 条寡核苷酸，最大合成长度一般在 150~200 nt，超过该长度以后，每步副反应和合成效率会显著影响寡核苷酸的序列准确性与产率。产量一般在 0.5~1 000 nmol 水平，合成错误率约为 1/1 000 nt，成本为 0.05~0.5 元/nt。尽管 1 536 通量的一代柱式合成仪的较早期低通量型号设备在合成时间和效率已有较大提高，但仍无法从根本上大幅降低单碱基合成成本，继而无法满足捕获探针、大规模基因合成及 DNA 存储等通量较高的应用需求。因此，通过技术创新以提升通量、降低合成成本成为当下亟待解决的难题。

3.2.2 二代高通量芯片合成仪

芯片合成仪是以芯片为合成载体，其单张芯片可实现成千上万条长度不等的单链 DNA 合成。该类型设备可在提供高通量合成的同时，降低试剂的消耗，初步实现低成本高通量的寡核苷酸合成。其中，国外技术与市场布局发展较早，前期技术积累超过 10 年。相比一代技术，二代技术通量高、成本低，但目前市场上尚无商业化仪器，仅提供技术服务。根据合成原理，高通量合成仪主要包括 5 类(表 2)。

3.2.2.1 光化学原理

LC Sciences 公司基于光脱保护原理的高通量 DNA 合成仪，采用数字化光源投影技术，将电脑可控的高分辨率多点平行光投影到反应位点，通过光照来控制各反应位点进行脱保护反应，以控制每个位点进行合成反应。相较于一代合成仪，该装置利用微流控技术，实现合成过程中所需单体等试剂的可控输送，使试剂消耗量少、单碱基合成成本低。但目前单循环得率约为 98.5%，不适合较长寡核苷酸的合成，且微流控芯片加工制作复杂，合成通量较难大幅提升，需要从脱保护效率及光控系统的精确度上进行优化改进^[10-16]。

3.2.2.2 电化学原理

CustomArray 公司基于电化学原理的高通量 DNA 合成仪是目前唯一被商业化的高通量芯片 DNA 合成仪。通过电化学脱保护将合成反应缩小到微米级别的反应孔内，从而实现一张芯片上集成上万个反应点。该原理的优点是试剂(碱基单体等)消耗量少，单碱基合成成本极低；通量高(12 000~90 000)，一次可合成高达上万种单链 DNA。缺点是单位点的产量低、合成效率不稳定及错误率高^[17-21]。未来，可在芯片设计与加工工艺方面进行设计与优化，最大程度避免氢离

表 2 二代高通量芯片合成仪代表性公司概况

Table 2 The high throughput chip-based DNA synthesizers and corresponding companies

| 代表性公司 | 国家 | 发布年份 | 技术原理 | 错误率 (%) | 优点 | 缺点 |
|------------------|----|------|--------------|---------|---|---|
| LC Sciences | 美国 | 2006 | 光化学 | 约 5~10 | 合成通量较高, 单芯片合成通量 4 k; 试剂消耗量少, 单碱基合成成本较低 | 核苷酸合成; 微流控芯片加工制作复杂, 合成通量较难大幅提升; 仅适用于寡核苷酸库合成 |
| CustomArray | 美国 | 2011 | 电化学 | 约 3~12 | 合成通量高, 单芯片合成通量 12~90 k; 试剂消耗量少, 单碱基合成成本低 | 合成稳定性差, 错误率高; 芯片集成度高, 加工复杂; 仅适用于寡核苷酸库合成 |
| Twist Bioscience | 美国 | 2013 | 喷墨打印 | 约 5 | 合成通量高, 单芯片通量可达百万; 合成稳定性较好, 错误率较光化学及电化学原理低 | 单条寡核苷酸合成产量极低 |
| Evonetix | 英国 | 2016 | 集成电路控制 | 不详 | 合成通量很高, 扩展提升相对简单方便, 官方宣称可达亿级; 可实现原位组装和纠错; 暂未发布设备, 实际应用效果有待观察 | 试剂消耗量较大, 物料和时间成本并不占优势; 芯片集成度很高, 加工复杂 |
| 华大基因 | 中国 | 2020 | 基于分选的高通量并行合成 | 约 1~3 | 合成通量较高, 可达万级, 扩展相对简单方便; 合成质量稳定, 错误率低; 芯片加工简单, 且可重复使用, 单碱基成本低; 产物形式灵活, 可单条交付或寡核苷酸库交付 | 芯片物理兼容性有待进一步提升 |

子串扰的问题, 以进一步提高合成质量。

3.2.2.3 喷墨打印原理

Agilent 公司最早实现利用喷墨打印原理进行 DNA 合成, 随后, Twist 公司进一步改进合成芯片的设计, 并开发了高通量 DNA 合成仪。该技术利用高速的微量喷墨打印作为单体等试剂的输送方式, 在特殊处理的微米级硅基通孔上合成寡核苷酸, 可实现上百万条寡核苷酸的高通量合成, 再利用匹配的反应器与这些微孔对接, 进行原位的 DNA 拼接和组装, 从而直接得到大量长片段的 DNA 分子^[51-52]。该合成仪集成了微流控技术、半导体加工技术和分子组装技术等一系列前沿技术。由于合成通量依赖芯片反应位点数量, 如需进一步提高芯片反应位点密度, 则要提供更为复杂的半导体精加工技术以及可实现针对高密度反应位点的超高打印精度喷头, 因此较难进一步降低成本。此外, 其微量生化反应体系中 DNA 合成产物的载量仅能达到 fmol 水平, 需要通过扩增的方式提升载量, 但难以达到 pmol~nmol 的水平。

3.2.2.4 集成电路控制原理

Evonetix 公司基于集成电路控制原理的高通

量 DNA 合成仪, 通过在具有特殊设计的大规模可寻址的合成位点的封闭腔室内, 加入低熔点的可反复加热的阻断材料, 利用电路信号控制位点的通电与否对其进行加热。在加热情况下, 特殊材料可吸附在相应位点上, 并阻止后续通入的试剂在其上反应, 如需在该位点进行后续合成, 可用溶剂将该材料清洗掉, 使该位点暴露出来以进行合成反应^[53]。Evonetix 公司合成仪的核心技术是在接近十亿个位点的寡核苷酸合成和可实时监测的高保真 DNA 纠错组装技术(暂无相关公开信息), 但该技术还处于研发阶段, 实际应用效果还有待验证。

3.2.2.5 基于分选的高通量并行合成原理

华大基因自主研发的基于分选的高通量并行合成原理的 DNA 合成仪, 按照预合成序列信息将带有特殊标记的芯片合成载体, 快速移动并依次排列, 集合到相应的反应腔室中进行碱基合成延伸, 反应结束后回收芯片进入下一个合成循环, 直至序列合成完毕。该技术原理的优势包括: (1) 芯片加工工艺简单, 无需复杂的微阵列芯片加工工艺, 且可重复使用, 对成本控制有利; (2) 合成通量拓展灵活性大, 合成通量取决

于合成载体和反应腔室大小, 通量提升不依赖于复杂加工工艺; (3) 带有特殊标记的芯片合成载体可单独分离, 从而实现合成产物回收的可控。目前, 华大基因自主知识产权高通量合成仪技术与仪器设计均已申请多项自主核心专利, 并完成了原型机及多款升级机型的搭建和测试。目前最高通量达 10 万级, 在错误率(约 1%~3%)及合成载量(>pmol 级别)方面具有突出优势, 有望快速实现合成成本的指数级下降。由于芯片在连续分选和物理转移过程中会导致表面磨损, 进而影响芯片的可识别性, 因此未来需要从芯片选材及结构加工上进一步提升其物理兼容性。

3.3 基于生物酶法合成的合成仪

DNA Script 公司基于生物酶技术, 于 2020 年推出了世界上首台桌面型 DNA 酶促打印机。据其官网(<https://dnascript.com/products/>)介绍, 单孔产量可达 200 pmol, 单步反应效率高达 99.5%, 合成过程中无需有机试剂, 比现有化学法 DNA 合成仪器更环保, 可大大提升 DNA 合成的普及性。2021 年 2 月, DNA Script 获得 Baseclick 公司授权售卖含该公司试剂的试剂盒, 从而使用户可通过点击化学(Click Chemistry)进行修饰引物的合成, 借此加快分子诊断研发进程。此外, Molecular Assembly、Ansa Biotechnologies 等公司也在积极研究新的酶法合成技术, 期望打破现有化学法合成的技术壁垒, 以生产出长序列、高质量、特定序列的 DNA, 但均暂未见配套仪器。

4 总结与展望

从 20 世纪 80 年代开始, DNA 合成经历了从第一代柱式合成到第二代高通量芯片合成两个关键时期。第一代柱式合成仪自 20 世纪 90 年代起开始商业化, 而我国在合成仪器研发上起步相对较晚, 当前国内各大 DNA 合成服务商的核心

零部件或仪器大部分依赖于进口。随着 DNA 合成市场需求的迅速增长, 自 2000 年起, 欧美国国家便开始部署高通量芯片合成仪研发。然而, 高通量芯片合成技术发展至今, 仍普遍存在以下局限性: (1) 受生化效率影响, 合成长度难以提升, 且错误率较高; (2) 合成产物处于混合状态, 无法高效分离单种寡核苷酸, 且质量均一性不稳定; (3) 不适用于高通量基因组(原位组装及自动化拼接); (4) 合成产物的载量基本在 0.1~100 fmol 水平, 难以显著提升。这些问题极大地限制了基于高通量芯片技术的下游应用发展。为解决以上技术瓶颈, 华大基因自主研发了基于芯片分选原理的高通量合成仪, 综合了一代柱式的高质量合成和二代芯片的高通量合成优势, 能更好地兼容下游各种需求, 标志着我国在全自主知识产权 DNA 合成技术领域实现重大突破。

随着生命科学、合成生物学以及生物与信息技术交叉融合新兴领域(如 DNA 存储)的快速发展, 对 DNA 合成的需求量与性能提出了更高的要求, 全球寡核苷酸合成市场预计将由 2021 年的 69 亿美元, 增长到 2026 年的 141 亿美元, 年复合增长率达 17.6%^[27]。然而, 现有的 DNA 合成技术和合成仪性能, 仍难以从通量、质量、成本及载量等方面满足日益增长的 DNA 合成需求。此外, 随着全球生态和环境问题的日益严重, 基于化学法的 DNA 合成技术将面临较大的挑战, 而生物酶法合成潜力巨大, 有望成为未来 DNA 合成技术的重要发展方向。近年来, 欧美国家陆续出现如 Molecular Assemblies、DNA Script 等代表性的初创公司, 尽管大都处于概念验证阶段, 尚未形成大规模的商业应用, 但相较于我国, 已储备一定的先发优势。从科研产业需求以及战略布局的双重考量出发, 我国都应加大投入, 快速推进。

此外, 合成生物学的迅猛发展也对国家安全监管体系带来严峻的挑战。2021 年 4 月 15 日,

《中华人民共和国生物安全法》正式施行, 该法梳理了包括生物技术发展在内的当前我国生物安全领域存在的主要风险及防控制度。只有真正掌握以 DNA 合成为基础的合成生物学创新技术体系, 早日突破欧美国家“卡脖子”的技术封锁, 引领全球该领域第一梯队, 为我国生命科学的自主发展打下坚实基础, 方能在未来可能发生的生物战争中最大程度地保障国家安全。

参 考 文 献

- [1] VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis [J]. *BioTechniques*, 2008, 44(5): 619-626.
- [2] Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(12): 1444-1454.
- [3] Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(13): 2567-2582.
- [4] Follmann H. Deoxyribonucleotides: the unusual chemistry and biochemistry of DNA precursors [J]. *Chemical Society Reviews*, 2004, 33(4): 225-233.
- [5] Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy [J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(6): 453-458.
- [6] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1135-1145.
- [7] Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis [J]. *Tetrahedron Letters*, 1981, 22(20): 1859-1862.
- [8] Lin X. Oligodeoxynucleotide synthesis using protecting groups and a linker cleavable under non-nucleophilic conditions [D]. Michigan: Michigan Technological University, 2013.
- [9] Kosuri S, Church GM. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications [J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 499-507.
- [10] Gao XL, Yu PL, LeProust E, et al. Oligonucleotide synthesis using solution photogenerated acids [J]. *Journal of American Chemical Society*, 1998, 120(48): 12698-12699.
- [11] Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis [J]. *Science*, 1991, 251(4995): 767-773.
- [12] Lipshutz RJ, Fodor SPA, Gingeras TR, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays [J]. *Nature Genetics*, 1999, 21: 20-24.
- [13] Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(11): 5022-5026.
- [14] Agbavwe C, Kim C, Hong D, et al. Efficiency, error and yield in light-directed maskless synthesis of DNA microarrays [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, 9(1): 1-17.
- [15] Sack M, Kretschy N, Rohm B, et al. Simultaneous light-directed synthesis of mirror-image microarrays in a photochemical reaction cell with flare suppression [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(18): 8513-8517.
- [16] Kretschy N, Holik AK, Somoza V, et al. Next-generation o-nitrobenzyl photolabile groups for light-directed chemistry and microarray synthesis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(29): 8555-8559.
- [17] Ghindilis AL, Smith MW, Schwarzkopf KR, et al. CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosens [J]. Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(9): 1853-1860.
- [18] Egeland RD, Southern EM. Electrochemically directed synthesis of oligonucleotides for DNA microarray fabrication [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(14): e125.
- [19] Maurer K, Yazvenko N, Wilmoth J, et al. Use of a multiplexed CMOS microarray to optimize and compare oligonucleotide binding to DNA probes synthesized or immobilized on individual electrodes [J]. *Sensors*, 2010, 10(8): 7371-7385.

- [20] Cooper J, Yazvenko N, Peyvan K, et al. Targeted deposition of antibodies on a multiplex CMOS microarray and optimization of a sensitive immunoassay using electrochemical detection [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9781.
- [21] Maurer K, Cooper J, Caraballo M, et al. Electrochemically generated acid and its containment to 100 micron reaction areas for the production of DNA microarrays [J]. *PLoS One*, 2006, 1(1): e34.
- [22] Roy S, Caruther M. Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries [J]. *Molecules*, 2013, 18(11): 14268-14284.
- [23] Knouse KW, deGruyter JN, Schmidt MA, et al. Unlocking P(V): reagents for chiral phosphorothioate synthesis [J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1234-1238.
- [24] Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR, et al. Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: a two-step cycle using peroxy anion deprotection [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(44): 13427-13441.
- [25] Kumar G, Poonian MS. Improvements in oligodeoxyribonucleotide synthesis: methyl N,N-dialkylphosphoramidite dimer units for solid support phosphite methodology [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1984, 49(25): 4905-4912.
- [26] Caruthers MH. The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(2): 1420-1427.
- [27] Oligonucleotide synthesis market by product (drug, synthesized oligos (primer, probe), reagents), type (custom, predesign), application (therapeutic (ASO, siRNA), research (PCR), diagnostic), end user (hospital, pharma, CROs) - Global Forecast to 2026 [R]. *MarketsandMarkets-BT2680*, 2021.
- [28] Hiatt AC, Rose F. Compositions for enzyme catalyzed template-independent formation of phosphodiester bonds using protected nucleotides: US6214987B1 [P/OL]. 2001-04-10[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/US6214987B1>.
- [29] Efcavitch JW, Siddiqi S. Methods and apparatus for synthesizing nucleic acids: US8808989B1 [P/OL]. 2014-08-19[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/US8808989B1>.
- [30] Efcavitch JW, Sylvester JE. Modified template-independent enzymes for polydeoxynucleotide synthesis: US20160108382A1 [P/OL]. 2018-08-28[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/US20160108382A1>.
- [31] Mathews AS, Yang HK, Montemagno C. Photocleavable nucleotides for primer free enzyme mediated DNA synthesis [J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2016, 14: 8278-8288.
- [32] Eisenstein M. Enzymatic DNA synthesis enters new phase [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(10): 1113-1115.
- [33] Mathews AS, Yang HK, Montemagno C. 3'-O-Caged 2'-Deoxynucleoside triphosphates for light-mediated, enzyme-catalyzed, template-independent DNA synthesis [J]. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2017, 71(1): 13-17.
- [34] Palluk S, Arlow DH, De Rond T, et al. De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates [J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(7): 645-650.
- [35] 卢俊南, 罗周卿, 姜双英, 等. DNA 的合成、组装及转移技术 [J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1174-1183.
Lu JN, Luo ZQ, Jiang SY, et al. Technologies for DNA synthesis, assembly, and transplantation [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1174-1183.
- [36] Barthel S, Palluk S, Hillson NJ, et al. Enhancing terminal deoxynucleotidyl transferase activity on substrates with 3' terminal structures for enzymatic de novo DNA synthesis [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(1): 102.
- [37] Chen MC, Lazar RA, Huang JH, et al. Novel use: WO2016128731A1 [P/OL]. 2016-08-18[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2016128731A1>.
- [38] Chen MC, Lazar RA, Huang JH, et al. A process for the preparation of nucleic acid by means of 3'-O-Azidomethyl nucleotide triphosphate:

- US20180016609A1 [P/OL]. 2016-03-13[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/US20180016609A1>.
- [39] Thomas Y, GARIEL S. Modified nucleotides for synthesis of nucleic acids, a kit containing such nucleotides and their use for the production of synthetic nucleic acid sequences or genes: WO2016034807A1 [P/OL]. 2015-09-01[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2016034807A1>.
- [40] Thomas Y, Marc Delarue. Variants of a DNA polymerase of the polx family [P/OL]. 2017-06-13[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2017216472A2/fr>.
- [41] Barthel S, Palluk S, Hillson NJ, et al. Enhancing terminal deoxynucleotidyl transferase activity on substrates with 3' terminal structures for enzymatic de novo DNA synthesis [J]. *Genes*, 2020, 11(1): 102.
- [42] Arlow D, Palluk S. Nucleic acid synthesis and sequencing using tethered nucleoside triphosphates: WO2017223517A1 [P/OL]. 2017-12-28[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2017223517A1>.
- [43] Stemple DL, Mankowska SA, Harvey SA. Compositions and methods for template-free enzymatic nucleic acid synthesis: WO2018152323A1 [P/OL]. 2018-08-23[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2018152323A1>.
- [44] Stemple DL, Fraser AG, Mankowska S, et al. Compositions and methods for template-free geometric enzymatic nucleic acid synthesis. WO2019140353A1 [P/OL]. 2019-07-18[2021-05-10]. <https://patents.google.com/patent/WO2019140353A1>.
- [45] Lee HH, Kalhor R, Goela N, et al. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1-2.
- [46] Lee H, Wiegand DJ, Griswold K, et al. Photon-directed multiplexed enzymatic DNA synthesis for molecular digital data storage [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-9.
- [47] Pirrung MC. How to make a DNA chip [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(8): 1276-1289.
- [48] Engels JW. Gene synthesis on microchips [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(44): 7166-7169.
- [49] 彭凯, 逯晓云, 程健, 等. DNA 合成、组装与纠错技术研究进展 [J]. *合成生物学*, 2020, 1(6): 697-708.
- Peng K, Lu XY, Cheng J, et al. Advances in technologies for de novo DNA synthesis, assembly and error correction [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(6): 697-708.
- [50] 闫汉, 肖鹏峰, 刘全俊, 等. DNA 微阵列原位化学合成 [J]. *合成生物学*, 2021, 2(3): 354-370.
- Yan H, Xiao PF, Liu QJ, et al. *In situ* chemical synthesis of DNA microarrays [J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(3): 354-370.
- [51] Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, 11(6): 687-690.
- [52] Hughes TR, Mao M, Jones AR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 342-347.
- [53] Crosby S. Unlocking synthetic biology through DNA synthesis [J]. *Chimica Oggi - Chemistry Today*, 2020, 38(4): 22-24.