

翻转课堂第3期：优秀案例



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

“庖丁解牛”般的精准

——基因编辑新利器Retron

洪向群、侯玥延、张妍、张浩天、边奕然

诚朴勇毅



1. 庖丁之刃

2. 刀之肌理

3. 解牛之法

4. 淬刀之术

5. 利刃之用

6. 他刀相较



Part **1**

庖丁之刃

- 1-1 什么是Retron
- 1-2 Retron的结构
- 1-3 Retron的分子机制

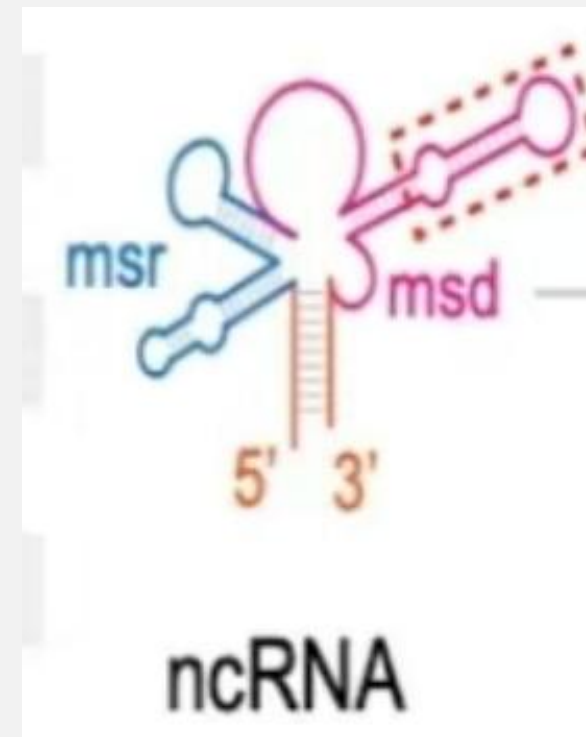
◎ 定义：

Retron（反转录子）是一类存在于细菌中的基因元件，能够通过反转录机制生成独特的DNA-RNA复合体。

Retron的结构

连续的倒置重复序列(编码一段ncRNA)两部分转录生成ncRNA: 由 msr和 msd构成

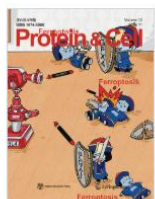
RT、ncRNA (msr、msd) 由同一个启动子启动转录。



Protein & Cell

Issue Advance Articles Submit Alerts About

Protein & Cell



Volume 12, Issue 11
November 2021

Article Contents

FOOTNOTES

JOURNAL ARTICLE

Precise genome editing without exogenous donor DNA via retron editing system in human cells

Xiangfeng Kong, Zikang Wang, Renxia Zhang, Xing Wang, Yingsi Zhou, Linyu Shi, Hui Yang

Protein & Cell, Volume 12, Issue 11, November 2021, Pages 899–902,
<https://doi.org/10.1007/s13238-021-00862-7>

Published: 17 August 2021 Article history

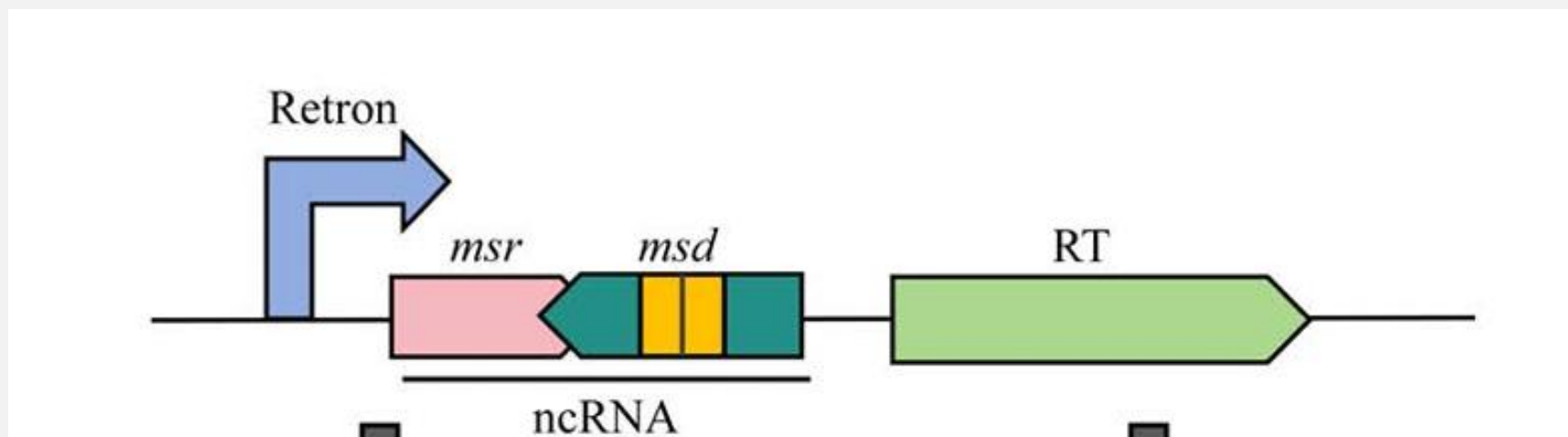
PDF Split View Cite Permissions Share



Retron的分子机制

(1) Retron→RT、ncRNA (*msr*、*msd*) #转录

(2) RT、ncRNA (*msr*、*msd*) →msDNA #逆转录

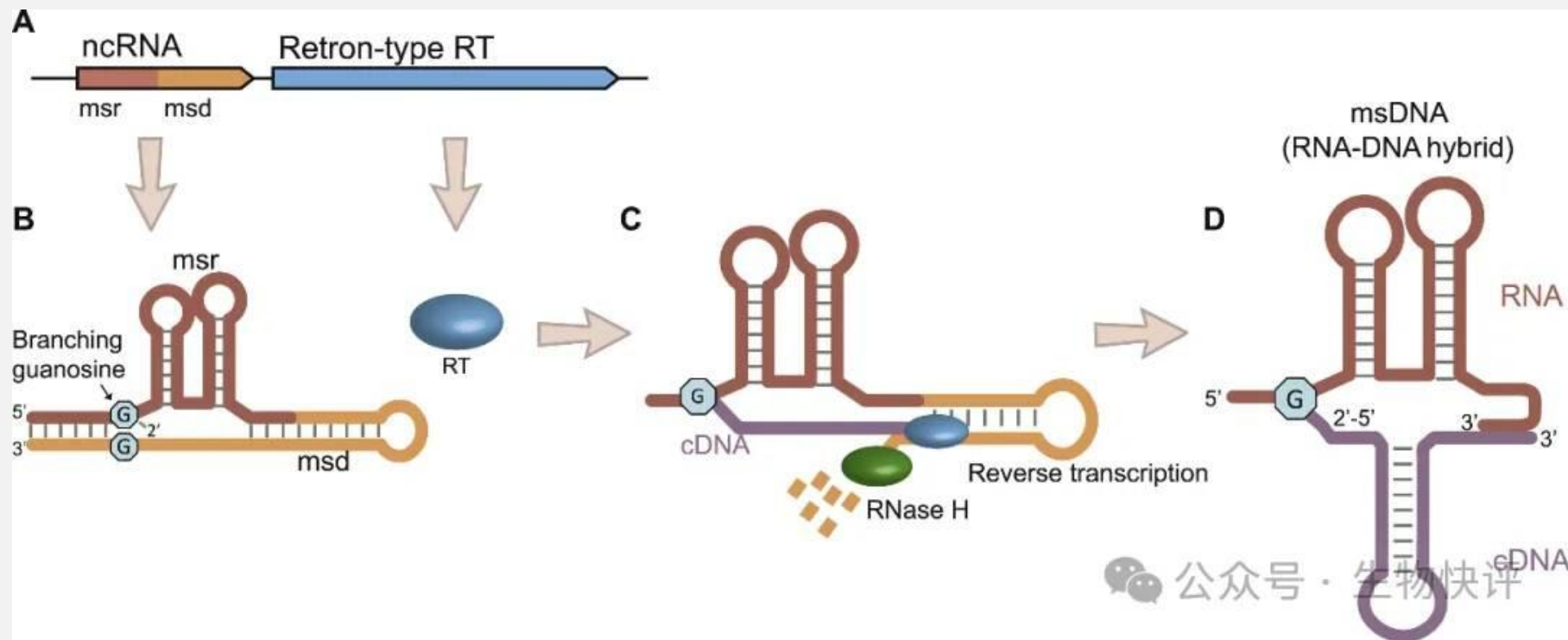


Retron的分子机制

(1) 起始

(2) 延伸

(3) 终止与成型





Part 2

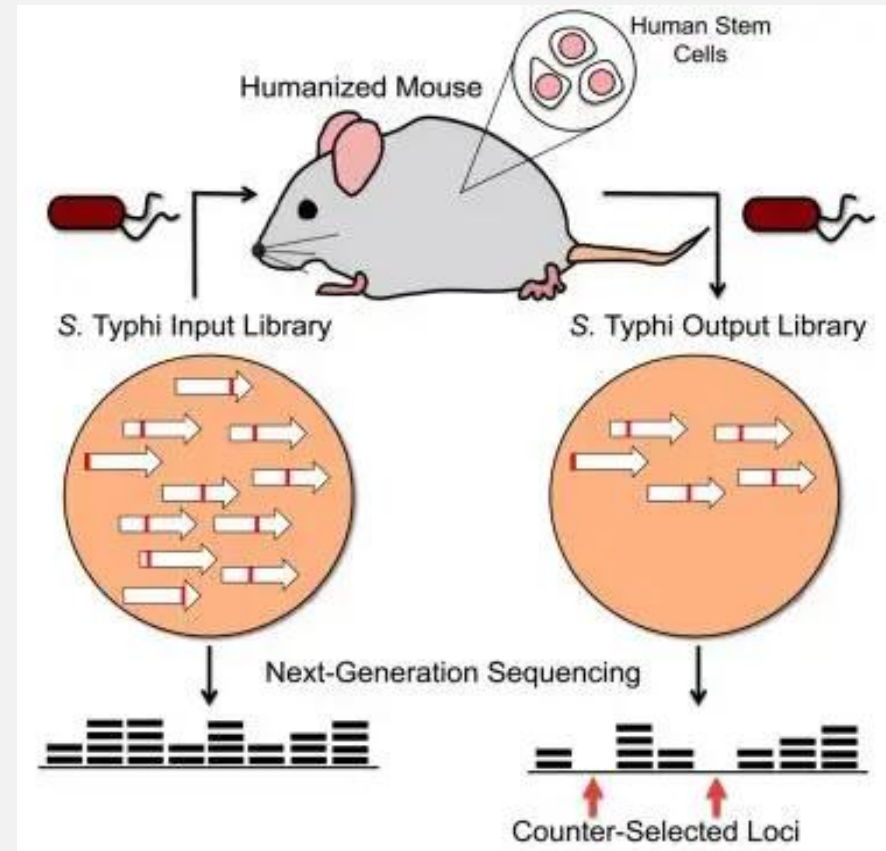
刀之机理

Retron的生物学功能

1.

维持基因组稳定性:

细菌反转录子可通过产生非编码细胞内DNA调节移动元素活性，维持基因组完整，抵御外部DNA不当整合。



鼠伤寒沙门菌作用机理

• 2.

抗噬菌体功能：

作为细菌免疫系统，噬菌体入侵时会激活反转录子，产生防御机制。

nature microbiology

Explore content ▾

About the journal ▾

Publish with us ▾

Subscribe

[nature](#) > [nature microbiology](#) > [articles](#) > article

Article | Published: 18 August 2022

Cryo-EM structures of *Escherichia coli* Ec86 retron complexes reveal architecture and defence mechanism

[Yanjing Wang](#), [Zeyuan Guan](#), [Chen Wang](#), [Yangfan Nie](#), [Yibei Chen](#), [Zhaoyang Qian](#), [Yongqing Cui](#), [Han Xu](#), [Qiang Wang](#), [Fen Zhao](#), [Delin Zhang](#), [Pan Tao](#), [Ming Sun](#), [Ping Yin](#), [Shuangxia Jin](#), [Shan Wu](#)  & [Tingting Zou](#) 



Part **3**

解牛之法

Retron 与重组工程系统联用

Retron与CRISPR/Cas系统联用

理论依据:

RT 和 msr 必须来源于同一个retron 才能在体内表达，但对 msd 的同源性要求并不高，msd 中的部分序列可以被替换为外源序列，因此可以通过编辑retron中的msd序列在体内持续产生作为重组底物的ssDNA。







Retron 与重组工程系统联用的基因编辑系统

- 重组工程执行诱导和替换任务的方式是在细胞复制DNA时引入目标基因片段。

D **Retron Library Recombineering (RLR)**

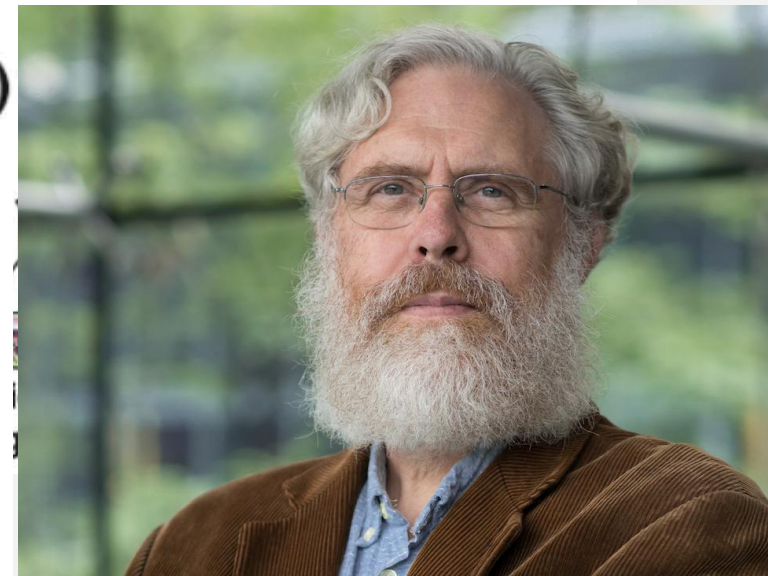
RESEARCH ARTICLE | MICROBIOLOGY | ✓

High-throughput functional variant screens via in vivo production of single-stranded DNA

Max G. Schubert  , Daniel B. Goodman , Timothy M. Wannier ,  , and George M. Church  [Authors Info & Affiliations](#)

Edited by Luciano A. Marraffini, The Rockefeller University, New York, NY, and approved February 26, 2021 (received for review September 4, 2020)

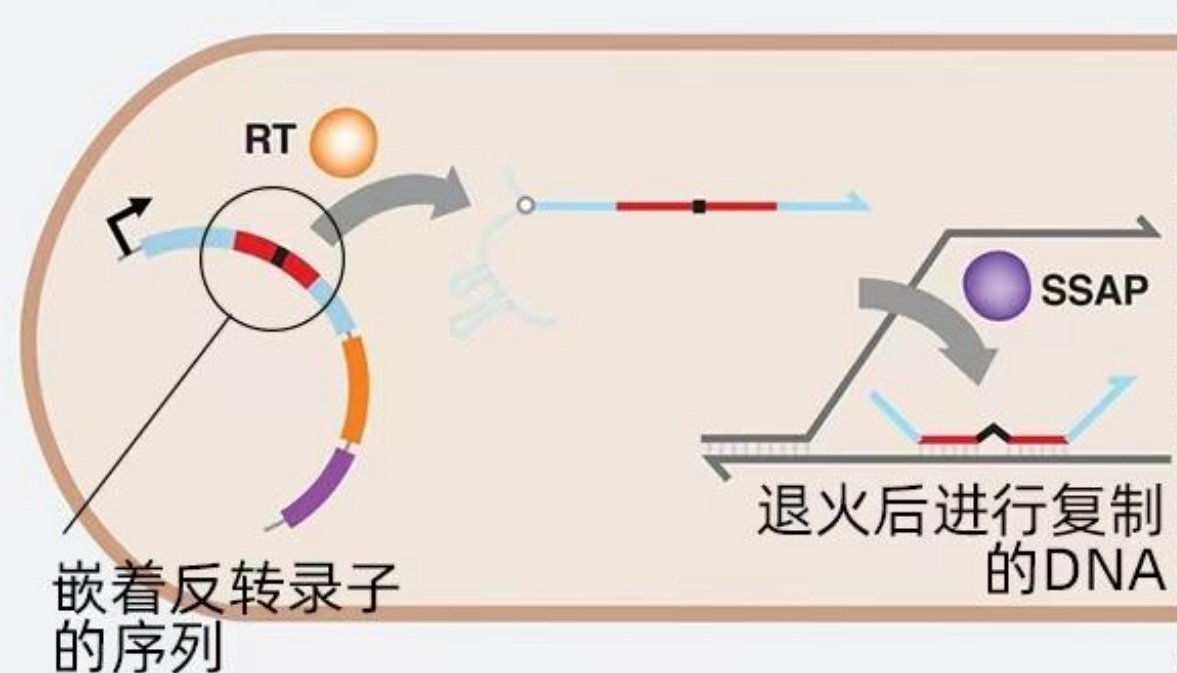
April 27, 2021 | 118 (18) e2018181118 | <https://doi.org/10.1073/pnas.2018181118>



George M. Church团队

Retron 与重组工程系统联用的基因编辑系统

- retron可以在体内持续产生作为重组底物的ssDNA。单链退火蛋白SSAP可以与ssDNA或dsDNA底物结合，并通过刺激互补单链区域的退火来促进同源DNA序列之间的链交换。



Retron与CRISPR/Cas系统联用的基因编辑系统

- 不仅能够借助sgRNA将Cas9靶向到特定的基因组位点进行切割，还可以利用 retron系统在体内持续产生供体DNA的特点，随着子代的富集以及底物源源不断的供给，编辑效率也随之增加。

New Results

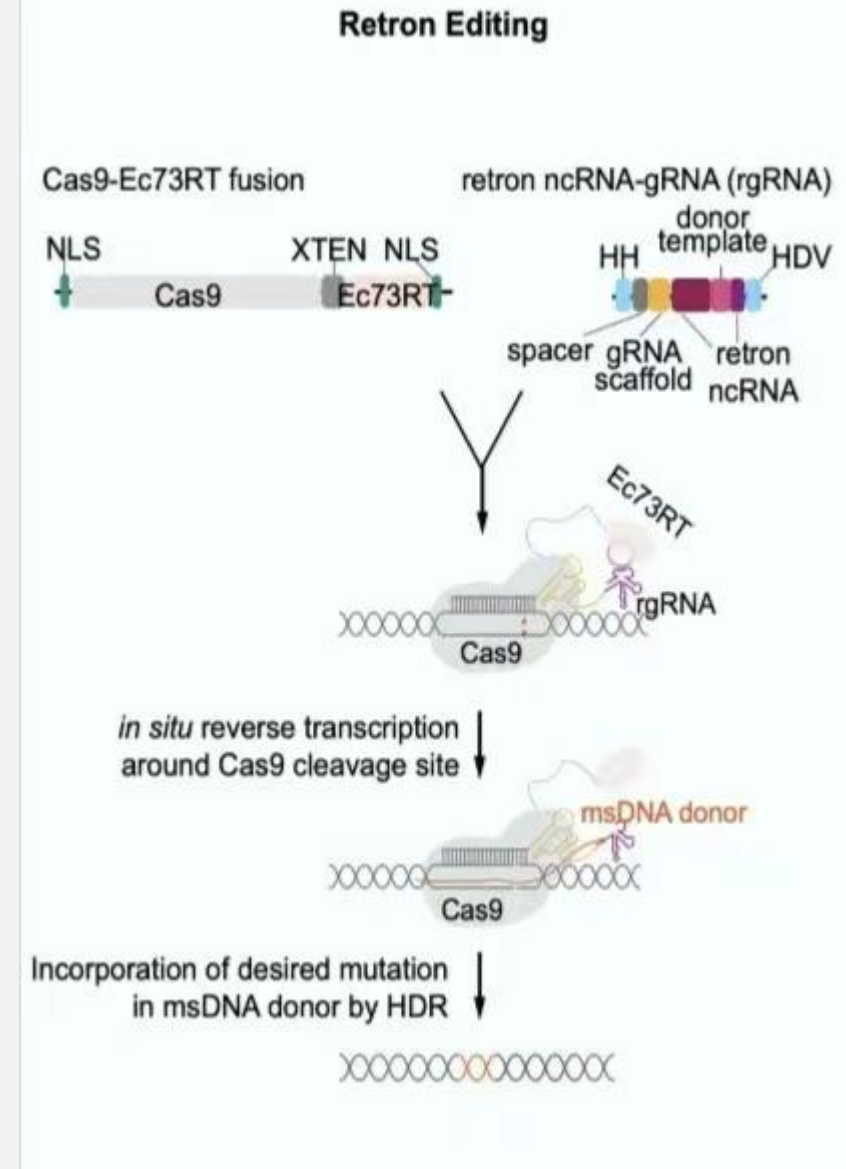
Follow this preprint

Multiplex generation, tracking, and functional screening of substitution mutants using a CRISPR/retron system

Hyeonseob Lim, Soyeong Jun, Minjeong Park, Junghak Lim, Jaehwan Jeong, Ji Hyun Lee, Duhee Bang

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.01.02.892679>

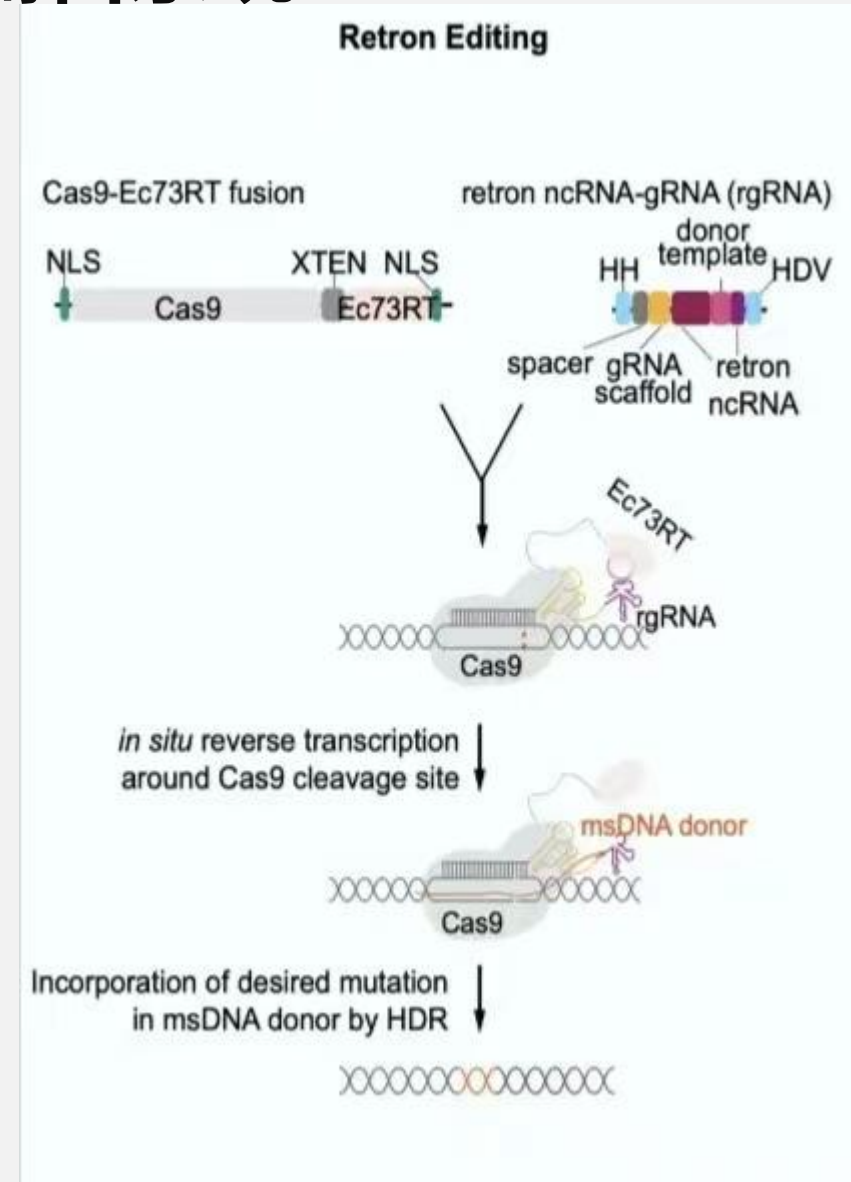
Now published in *ACS Synthetic Biology* doi: [10.1021/acssynbio.0c00002](https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00002)



Retron与CRISPR/Cas系统联用的基因编辑系统



- 核心流程：
- 系统构建：共同导入、设计模板、融合形成rgRNA。
- 靶向定位：Cas9与rgRNA结合。
- 体内生产修复模板：胞内retron系统产生ssDNA。
- CRISPR制造断裂：Cas9蛋白在基因组目标位点制造双链断裂。
- 精准修复：细胞使用附近ssDNA，通过HDR途径进行精准修复。



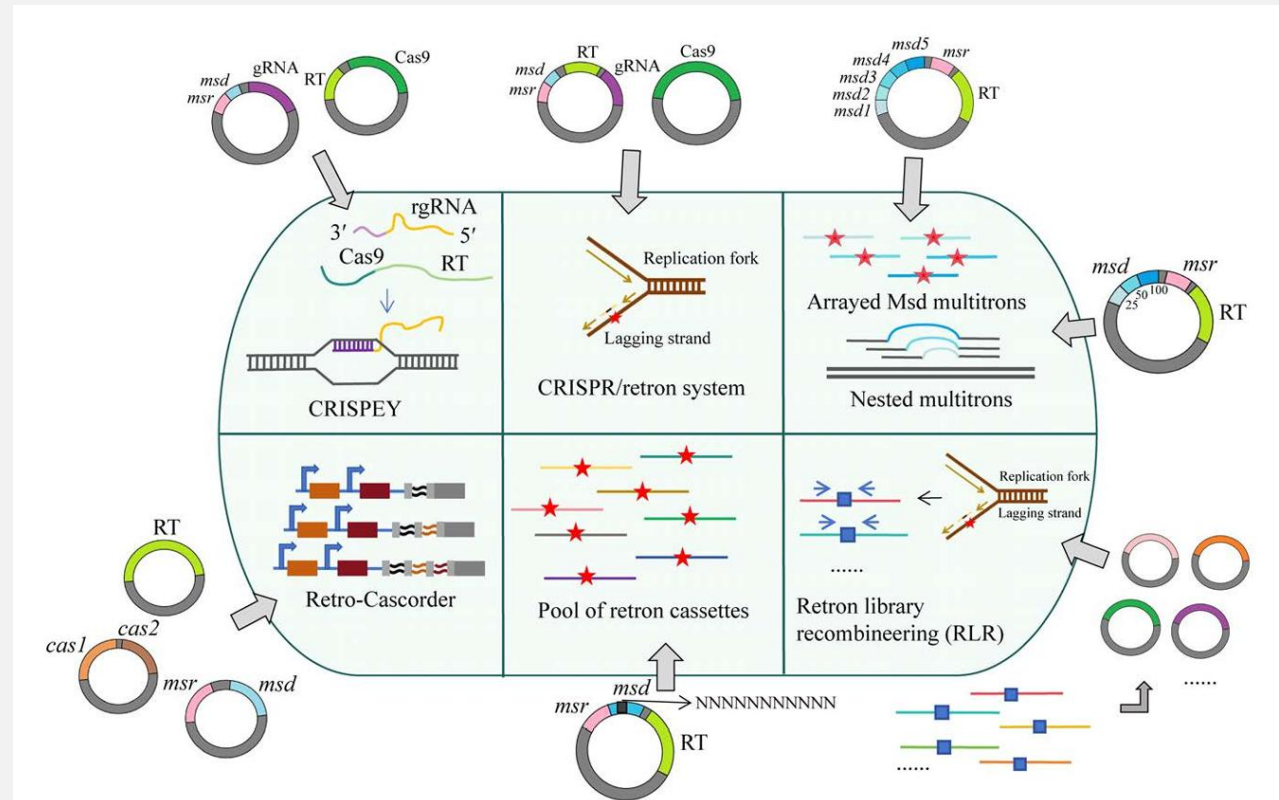


Part **4**

淬刀之术

基于Retron的基因编辑工具
逆向介导基因组编辑系统
反转录子文库重组工程

- Retron与CRISPR结合构建出的CRISPY、CRISPR/retron系统，阵列式retron系统和嵌套式retron系统



逆向介导基因组编辑系统 (REGES)

- REGES系统能够实现多重基因组编辑，包括同时进行多个位点的替代、插入和缺失。相比于现有的CRISPR系统，REGES能够进行连续的蛋白质进化。

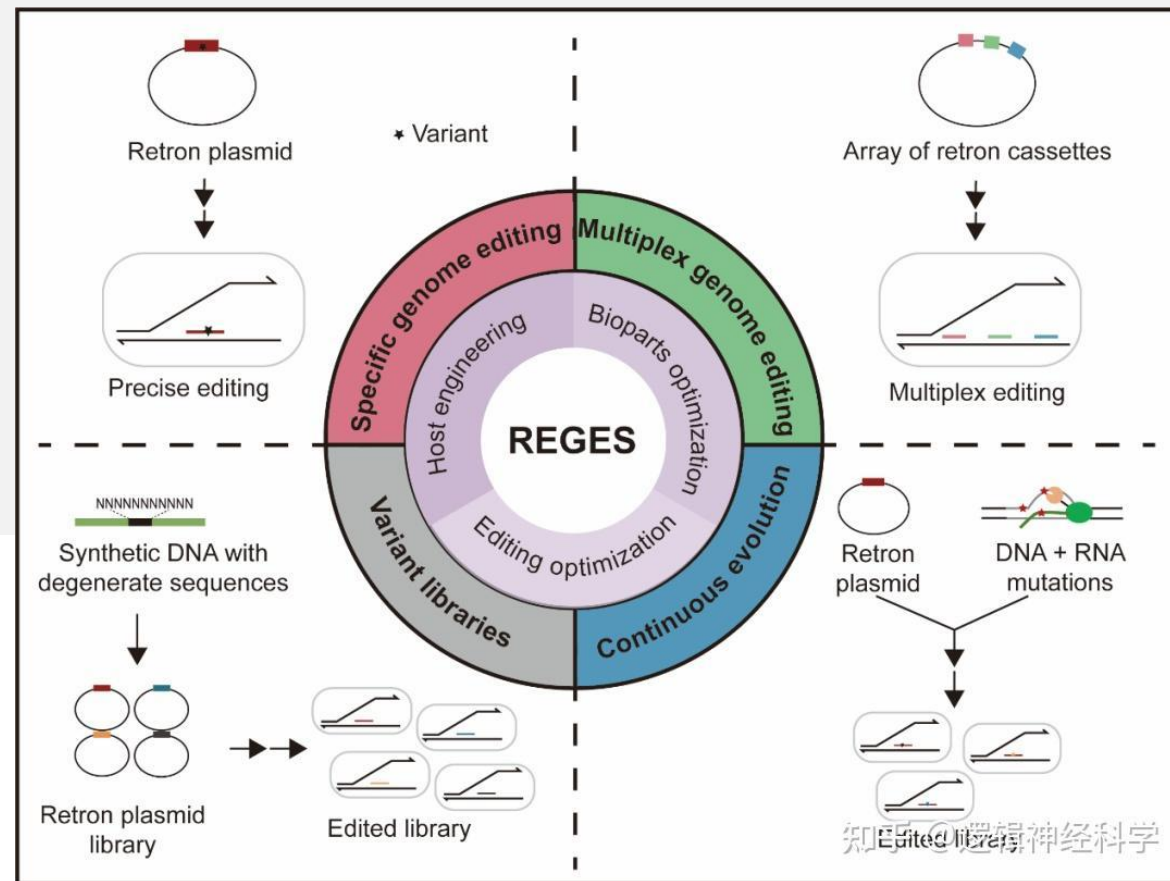
JOURNAL ARTICLE

Retron-mediated multiplex genome editing and continuous evolution in *Escherichia coli*

Wenqian Liu, Siqi Zuo, Youran Shao, Ke Bi, Jiarun Zhao, Lei Huang, Zhinan Xu, Jiazhang Lian

Nucleic Acids Research, Volume 51, Issue 15, 25 August 2023, Pages 8293–8307,
<https://doi.org/10.1093/nar/gkad607>

Published: 20 July 2023 Article history



反转录子文库重组工程 (RLR)

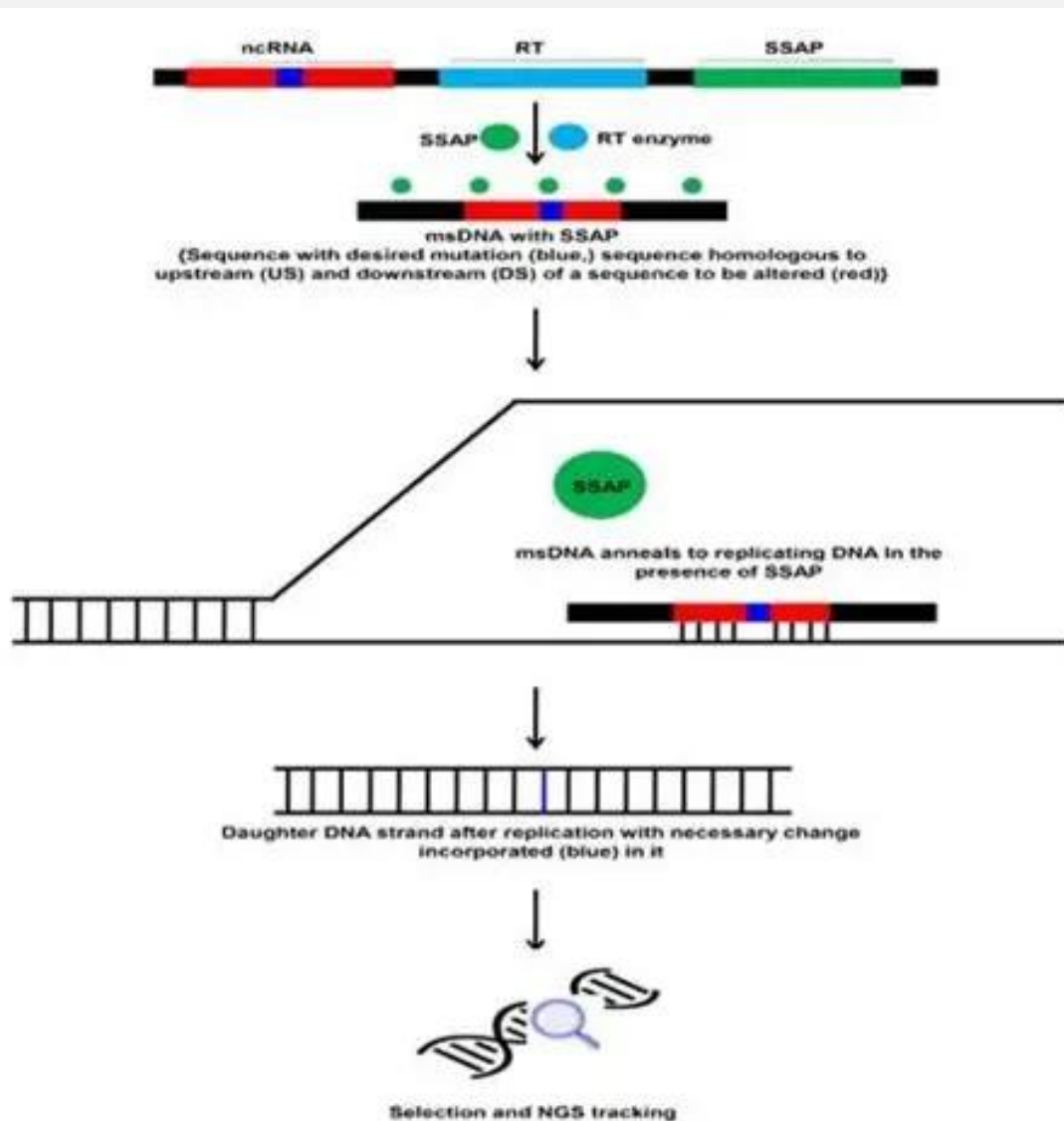
- 3. RLR是基于Retron的多位点基因编辑系统，将DNA库整合进Retron构建质粒库，其逆转录DNA在SSAP协助下整合至基因组，重组规模和特异性媲美CRISPR；RLR可同时产生多达数百万个突变，并将条形码插入突变细胞中，这样整个突变细胞池就可以一次性进行筛选，从而轻松生成和分析大量数据。

ACS Synt

REVIEW

Retro
CRISI

Navdeep K



Jump to Expand

after



Part **5**

建议与总结

- 5-1 问题评估
- 5-2 相关对策
- 5-3 研究总结
- 5-4 成绩与思考

Retron的生物技术应用

- 在基于Retron的细菌基因编辑中，msd与靶基因的一个片段同源。所需的突变也被引入msd。产生msDNA并通过未确定的机制编辑靶序列。

Published online 10 October 2019

Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 21 11007–11019
doi: 10.1093/nar/gkz865

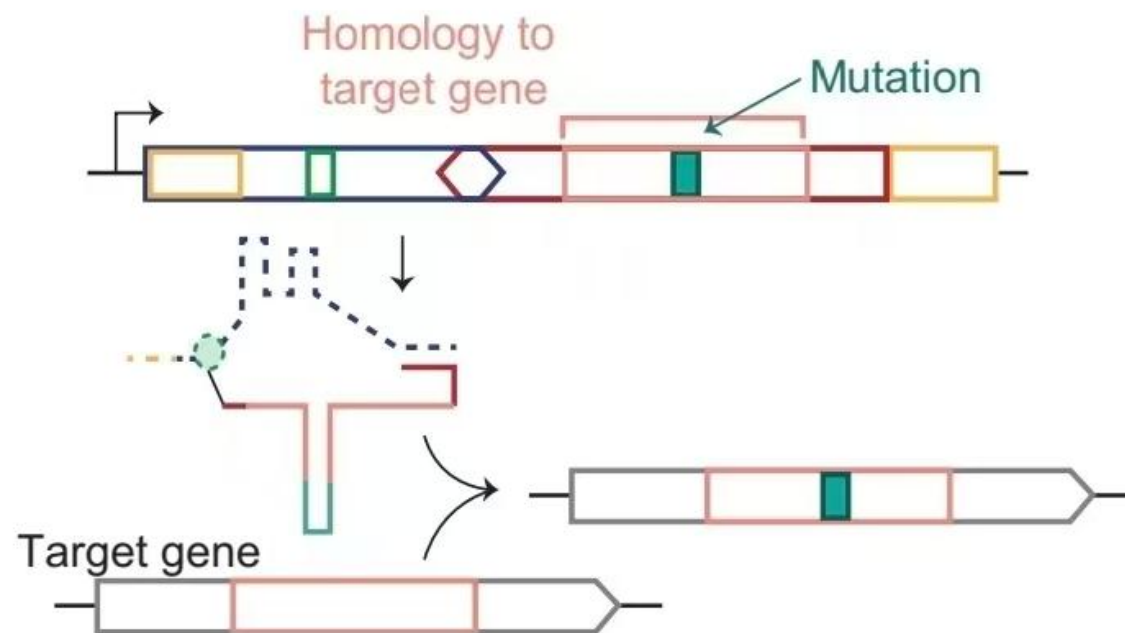
SURVEY AND SUMMARY

Retrons and their applications in genome engineering

Anna J. Simon¹, Andrew D. Ellington and Ilya J. Finkelstein^{1*}

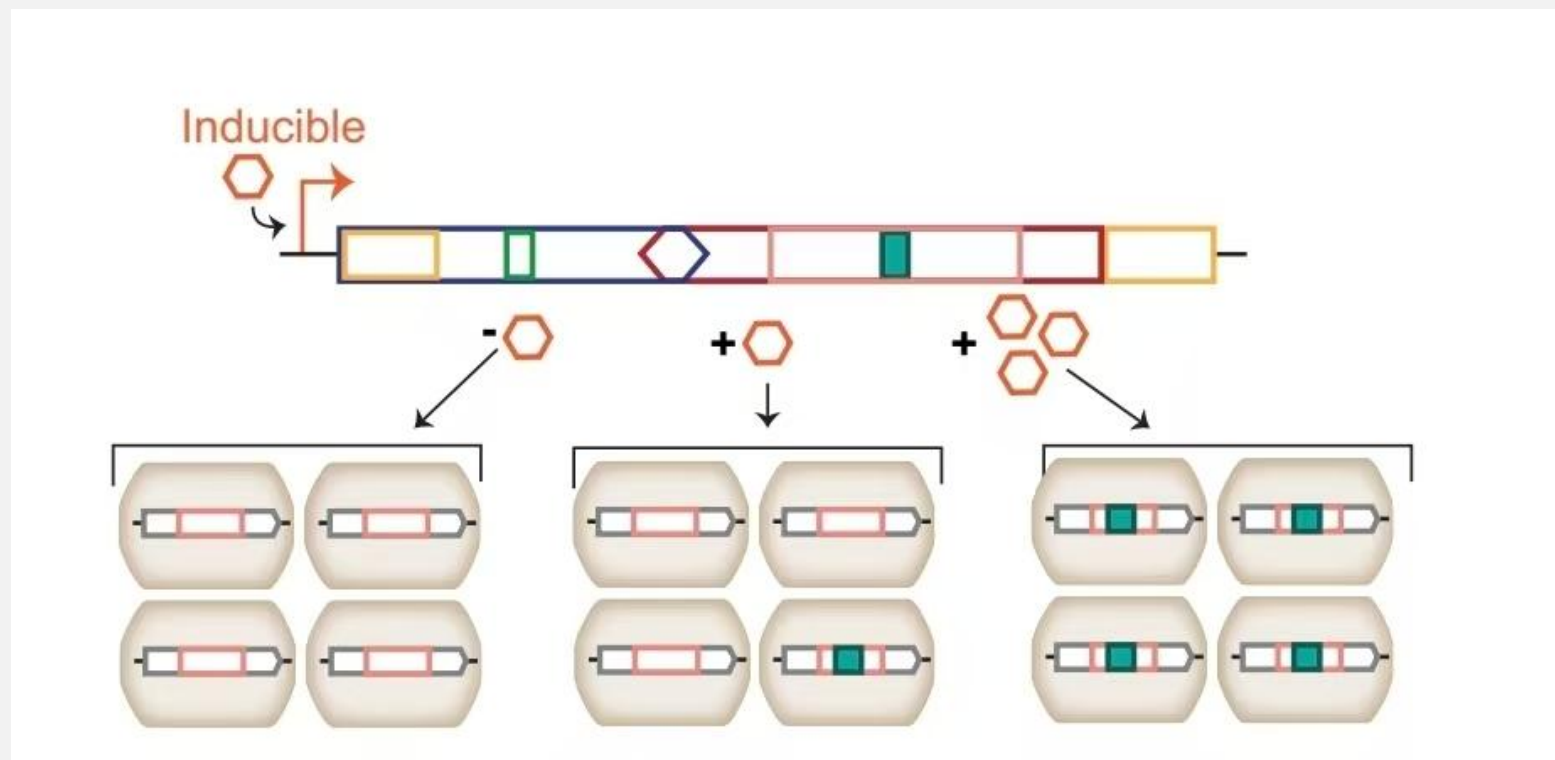
Center for Systems and Synthetic Biology and Department of Molecular Biosciences, University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712, USA

Received April 23, 2019; Revised September 19, 2019; Editorial Decision September 23, 2019; Accepted October 02, 2019



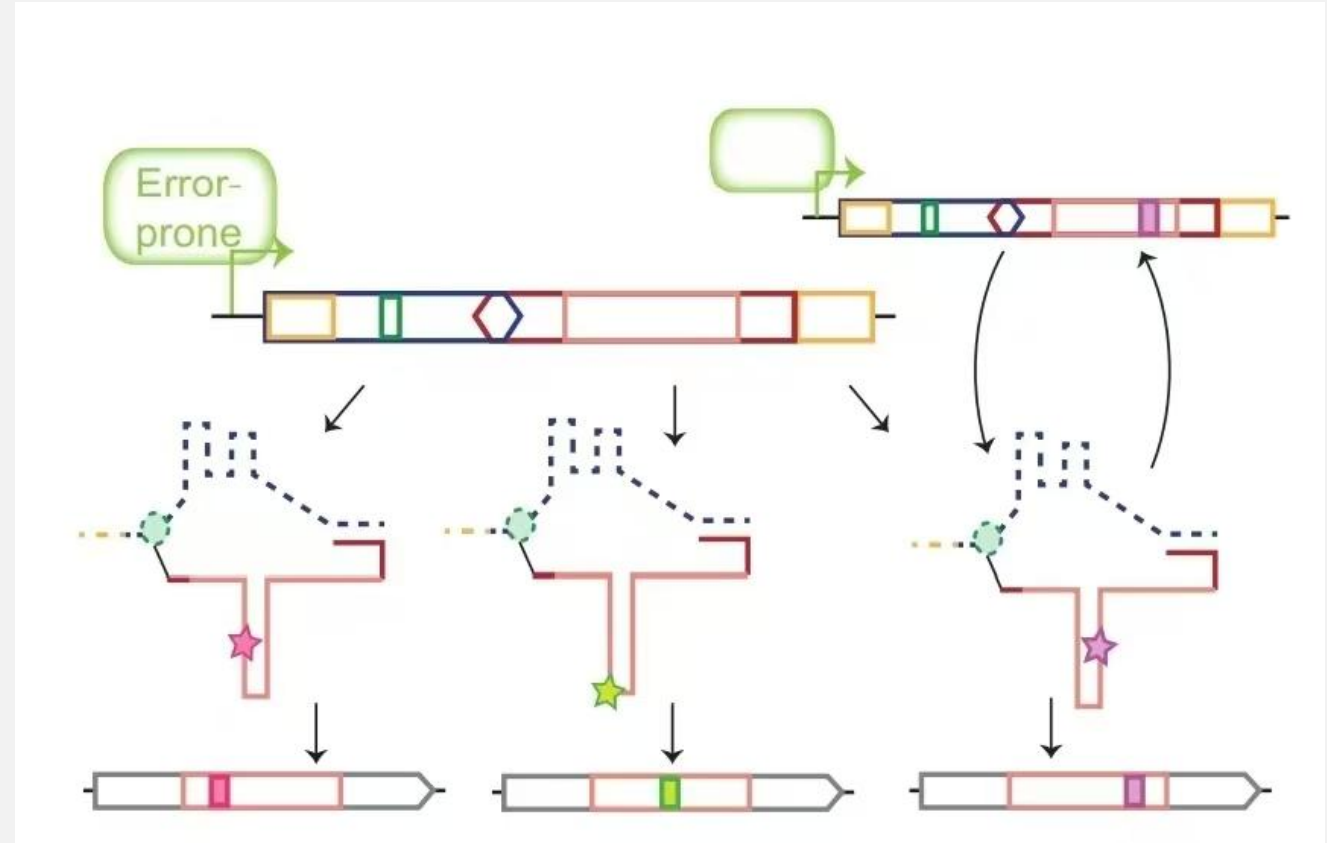
Retron的生物技术应用

- 通过整合生物事件的合成细胞记录器进行Retron介导的基因组记录示意图。一个小分子诱导型Retron被设计用于打开或关闭一个可选标记。可选标记的切换仅在小分子诱导剂存在时发生。



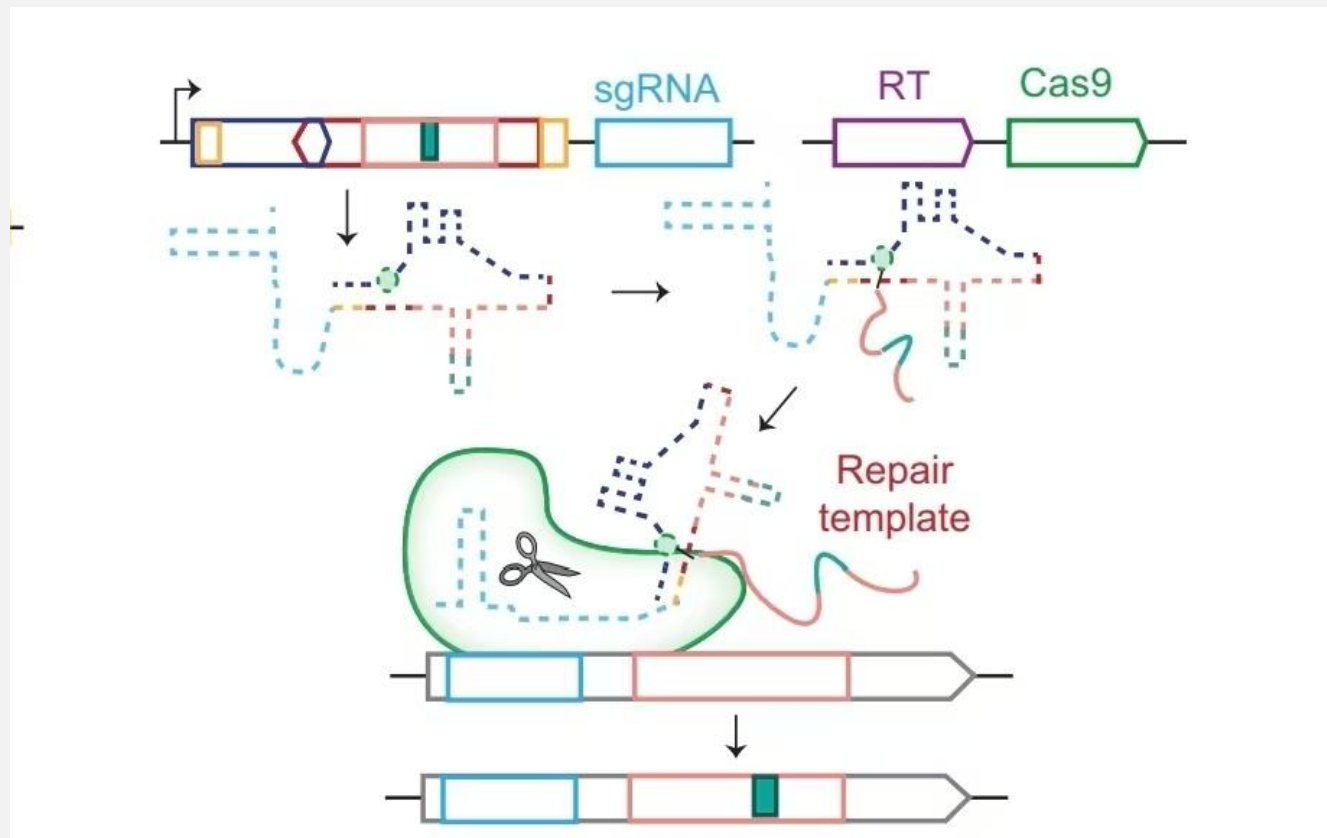
Retron介导的诱变和进化

在此应用中产生的msRNA具有随机突变，随后如应用1中所述引入其靶基因。或者，这些包含突变的msRNA可以编辑亲本Retron序列，从而实现突变的持续积累和进化。



通过同源性进行Cas9 Retron精确平行编辑

一个包含与靶基因同源性和所需编辑的Retron msr/msd序列作为与靶向感兴趣基因的sgRNA的融合体表达。Retron RT和Cas9在反式表达Cas9产生DNA断裂，RT产生的DNA被宿主DNA修复机制用作模板。





Part **6**

利刃之用

Retron vs Prime Editing

Retron vs CRISPR-Cas9



	Retron (反转录子)	Prime Editing (先导编辑)
核心机制	利用逆转录酶产生单链DNA (ssDNA) , 通过同源重组 (HDR) 进行精准编辑, 无需造成DNA双链断裂	将nCas9 (切口酶) 与逆转录酶融合, 通过pegRNA (向导RNA+逆转录模板) 实现靶向定位+序列逆转录+精准修复, 仅产生单链切口 (nick) , 无DSB。
模板DNA来源	细胞内原位合成 无需从外部递送供体DNA模版	整合在pegRNA中的逆转录模板 (RNA形式) , 无需额外供体DNA, 模板设计直接嵌入向导RNA。
主要优势	编辑精准、细胞毒性较低、脱靶效应风险小、适合进行大规模并行的遗传筛选。	仅产生单链nick (无DSB) , 从源头规避DSB引发的细胞毒性、染色体异常及随机插入/缺失 (indel) 。
主要局限	在真核生物 (尤其是人类细胞) 中, 编辑效率仍有待进一步提升和优化。	主要风险为pegRNA的靶向脱靶 (非特异结合)

Retron技术走向成熟应用

提升效率

增强稳定性

拓展应用

- [1] Das T, Anand U, Pal T, Mandal S, Kumar M, Radha, Gopalakrishnan AV, et al. Exploring the potential of CRISPR/Cas genome editing for vegetable crop improvement: an overview of challenges and approaches. *Biotechnol Bioeng.* 2023;120:1215–1228. doi: 10.1002/bit.28344.
- [2] 谭铖,何浩东,王硕,等.反转录子: 结构、功能与应用前景[J].生命的化学,2025,45(05):906-911.DOI:10.13488/j.smhx.20240744.
- [3] Kong, X., Wang, Z., Zhang, R. et al. Precise genome editing without exogenous donor DNA via retron editing system in human cells. *Protein Cell* 12, 899–902 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00862-7>
- [4] PNAS May 4, 2021 118 (18) e2018181118; <https://www.pnas.org/content/118/18/e2018181118>
- [5] Bin Zhao, Shi-An A. Chen, Ji-Woo Lee, Hunter B. Fraser. Bacterial Retrons Enable Precise Gene Editing in Human Cells[J]. *The CRISPR journal* [Mary Ann Liebert, Inc.], 2022-01-25, 5 (1): 31-39. DOI: 10.1089/crispr.2021.0065
- [6] Anna J. Simon et al., Retrons and their applications in genome engineering, *Nucleic acids research*, 2019.
- [7] Bert C. Lampson et al., Retrons, msDNA, and the bacterial genome, *Cytogenetic and genome research*, 2005.



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

演示完毕 感谢垂听!

