

基于反转录子的微生物基因编辑技术研究进展

刘婷婷, 刘嘉琪, 刘洋, 卞小莹*

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266237

刘婷婷, 刘嘉琪, 刘洋, 卞小莹. 基于反转录子的微生物基因编辑技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 4854-4868.

LIU Tingting, LIU Jiaqi, LIU Yang, BIAN Xiaoying. Research progress in microbial gene editing based on retrons[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 4854-4868.

摘要: 反转录子(retron)主要是由非编码 RNA 和逆转录酶所组成的参与抗噬菌体防御系统的细菌遗传元件。基于 retron 能产生多拷贝单链 DNA 的特性, 将其与同源重组蛋白或 CRISPR/Cas 蛋白相结合已经在细菌和酵母中实现高效精准的基因编辑, 而不依赖于外源 DNA 的直接引入。Retron 系统经过不同优化, 可应用于突变子文库构建、分子记录仪、蛋白连续进化等多个方向。本文首先介绍了 retron 的结构与分子机制, 重点总结了基于 retron 的基因编辑技术在细菌和真菌中的应用, 并对其优势和限制因素进行分析。最后对基于 retron 的基因编辑技术的未来发展进行了展望。**关键词:** 反转录子; 逆转录元件; 微生物基因编辑; 重组工程; CRISPR/Cas

Research progress in microbial gene editing based on retrons

LIU Tingting, LIU Jiaqi, LIU Yang, BIAN Xiaoying*

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, Shandong, China

Abstract: A retron, a bacterial genetic element mainly composed of a non-coding RNA and a reverse transcriptase, is involved in the anti-phage defense system. Since retrons can produce multi-copy single-stranded DNAs, combining retrons with proteins of homologous recombination or CRISPR/Cas has achieved efficient and accurate gene editing in bacteria and yeast, without relying on the direct introduction of exogenous DNAs. The optimized retron system can be applied in multiple fields such as mutant library construction, molecular recorder, and continuous evolution of proteins. This review introduces the structures and molecular

资助项目: 青岛市博士后应用研究项目(QDBSH20230202047); 微生物技术国家重点实验室生命科学领域校内联合项目基金(SKLMTIJP-2024-04); 山东大学基本科研业务费专项资金(2023QNTD001)

This work was supported by the Qingdao Postdoctoral Applied Research Project (QDBSH20230202047), the Intramural Joint Program Fund of State Key Laboratory of Microbial Technology (SKLMTIJP-2024-04), and the Fundamental Research Fund of Shandong University (2023QNTD001).

*Corresponding author. E-mail: bianxiaoying@sdu.edu.cn

Received: 2024-07-13; Accepted: 2024-10-12; Published online: 2024-10-23

mechanisms of retrons, summarizes the application of retron-based gene editing in bacteria and fungi, and analyzes the advantages and limitations of this technology. Finally, the future development of gene editing based on retrons is prospected.

Keywords: retron; retroelements; microbial gene editing; recombineering; CRISPR/Cas

基因编辑技术在基因功能研究、作物育种、疾病治疗等方面具有广阔的应用场景。基于同源重组(homologous recombination, HR)的基因编辑技术是通过供体 DNA 两端与目标 DNA 两端的同源序列发生交换重组完成的定向改造^[1-2]。来源于大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rac 原噬菌体的蛋白对 RecE/RecT^[3]和 λ 噬菌体的蛋白对 Red α /Red β ^[4]能够高效地介导体内短臂同源重组的发生,这两种重组酶体系被合并称为 Red/ET 重组工程(Red/ET recombineering)^[5]。Red/ET 的优势在于其双链供体 DNA 仅需要 40–50 bp 的同源臂就能实现同源重组^[6]。但这种方法依旧存在编辑效率低的问题。基于核酸酶切割 DNA 的基因编辑技术有归巢内切酶^[7]、锌指核酸酶^[8](zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应的核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALEN)^[9]和规律成簇的间隔短回文重复序列/相关蛋白[clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas)]技术^[10],它们能够特异性地识别与切割特定的 DNA 序列,产生 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB),修复 DSB 的方式通常为非同源末端连接或同源介导的修复(homology-directed repair, HDR),HDR 可以借助 DNA 模板实现不同类型的基因编辑^[11]。相较于其他 3 种基因编辑技术,利用 RNA 引导的核酸酶在特定位置切割 DNA 的 CRISPR/Cas 技术可以在 PAM 序列的限制范围内灵活地更改靶向目标,是近年来应用最广泛的基因编辑技术之一^[12]。对 Cas 核酸酶的研究

和人工改造促进了基于 CRISPR 编辑工具的迅速发展,其编辑系统高度多样化、编辑效率显著提高,因而得到了更加广泛的应用^[13-15]。但 CRISPR/Cas 技术在进行基因插入与替换时也有着不可忽视的局限性,比如外源 DNA 模板的胞内递送效率低下等瓶颈。同时因为递送方式是不可持续性的,所以供体 DNA 在细胞中的浓度会随着细胞增殖和降解快速降低,导致整体的编辑效率偏低,这会大大增加构建突变库时筛选所需的成本和劳动力^[16]。此外,对于部分细胞而言,将外源 DNA 递送入胞内存在困难或多次递送外源 DNA 会对细胞产生不可逆转的伤害。相较于体外递送供体的方式,体内直接产生 DNA 底物能够在简化操作流程的同时提高编辑效率。

反转录子(retron)作为一种原核细胞逆转录元件,能够在细胞内产生单链 DNA。基于 retron 系统的可编辑性,retron 可以作为同源重组编辑中 DNA 底物的提供者,并通过在胞内持续产生高拷贝供体 DNA,克服部分细胞对外源 DNA 转化效率低的难题。Retron 系统与介导单链重组的单链退火蛋白 Red β 相结合,提升了大肠杆菌的基因编辑效率,能够实现持续进化和多位点编辑。此外, retron 系统与 CRISPR 结合也能够酵母和人类细胞中实现高效精准的基因编辑。本文以 retron 的结构和分子机制为基础,介绍了基于 retron 的基因编辑技术在大肠杆菌和酵母等微生物中的应用,并对该技术的优势和限制因素进行总结,最后也对基于 retron 开发的新型高效基因编辑技术的发展趋势进行了展望。

1 Retron 简述

Retron 是由一段非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 和一个逆转录酶(reverse transcriptase, RT) 所组成的遗传元件, 可以产生嵌合 RNA/DNA 分子, 即 multicopy single-stranded DNA (msDNA), 其中单链 RNA (*msr*) 和单链 DNA (*msd*) 通过磷酸二酯键共价连接^[17-18]。1984 年研究人员首次在黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*) 中发现大量 msDNA^[19-20], 1989 年研究人员在黄色黏球菌和大肠杆菌(*Escherichia coli*) 中发现了 RT 且 msDNA 的形成与 RT 有关^[21-22]。由于细菌中的 msDNA 合成系统可能代表了一种逆转录元件的原始形式, 因此将这种系统命名为 retron^[23-24]。

1.1 Retron 的结构

Retron 通常编码一段 ncRNA 和一个 RT, 大约三分之一已经研究注释过的 retron 还包含一个附属开放阅读框, 其编码的蛋白功能未知, 其中一些被推测为是腺苷结合蛋白或冷激蛋白^[25-26]。RT 可以使用 ncRNA 作为模板产生 msDNA。ncRNA 的序列和长度往往差异较大, 但二级结构彼此相似。在这个二级结构中 *msr* 区域包含 1-3 个稳定的发夹结构, 每个发夹包括约 7-10 个碱基(bp)的长茎和约 3-10 个核苷酸(nt)的环, *msd* 区域只包含一个茎长约 10-50 bp 的发夹结构, *msr* 的 5'末端与 *msd* 的 3'端约有 8-30 bp 的互补配对区域, 分别命名为 a1 臂和 a2 臂。RT 在 *msd* 下游起始逆转录, 终止于 *msr* 区域前, 产生嵌合的 msDNA 分子; msDNA 内部的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 与单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA) 通过 *msd* 5'端磷酸基团与 *msr* 保守的 AGC 序列中的引物鸟苷形成 2'-5'磷酸二酯键相连^[26-28] (图 1)。在逆转录过程中, RNase H1 降解作为模板的 RNA 部分,

留下单链 DNA^[29]。研究表明逆转录的终止也是由 RNase H1 降解模板 RNA 介导的^[19,29]。

1.2 Retron 的功能

虽然 retron 的结构在多年前已经得到报道, 但其功能一直未能确定。Pilousova 等^[30]研究表明当用敲除逆转录酶的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 感染小鼠时, 相较于被野生型菌株感染的小鼠, 实验组小鼠在更短时间内死亡, 表明 retron 可能与细菌致病性相关。Elfenbein 等^[31]发现缺乏由逆转录酶产生的 msDNA 的鼠伤寒沙门氏菌突变体出现肠道定殖缺陷, 而缺乏逆转录酶的大肠杆菌也出现了类似的肠道定殖持久性缺陷问题, 推测逆转录酶产生的 msDNA 能够通过调节蛋白丰度在肠道病原菌的正常定殖中发挥重要作用。

近年来多项研究表明 retron 具有抗噬菌体功能^[17,32-33]。Millman 等^[17]发现 retron 抗噬菌体机制的激活是通过监测 RecBCD 复合物的非正常活动。RecBCD 蛋白是细菌内源性同源重组系统 RecA 重组系统的辅助蛋白, 是一个由 RecB、RecC 和 RecD 组成的复合体^[34]。RecBCD 复合物具有核酸外切酶活性, 可迅速降解线性 dsDNA^[35], 在 DNA 修复和抗噬菌体过程中起核心作用^[36]。为了防止线性的噬菌体 DNA 被宿主的 RecBCD 降解, 噬菌体入侵后会编码抗 RecBCD 蛋白(如噬菌体 λ -vir 蛋白 Gam)与 RecBCD 结合并抑制其活性; Retron 识别到 RecBCD 完整性被破坏, 就会启动流产感染导致宿主细胞生长停滞或死亡^[17]。除此之外, 防御系统可以感知替代信号或保护细胞的其他中心成分, 以减轻噬菌体感染^[17]。还有推测认为 retron 是自私基因^[37]或者在应对饥饿^[38]和细胞特化^[26]方面发挥作用, 但目前仍缺乏直接的证据证明。

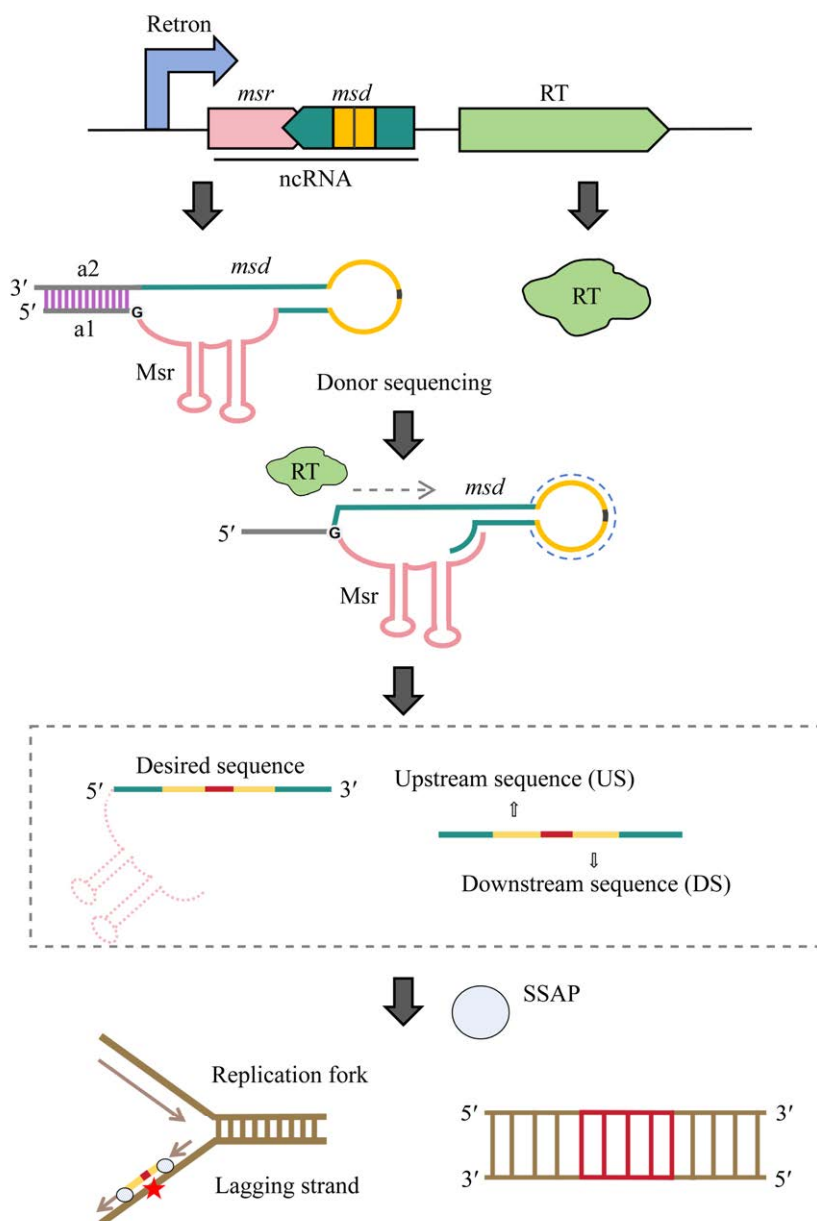


图 1 Retron 结构和 msDNA 示意图 Retron 主要包括逆转录酶(RT)和非编码 RNA (ncRNA)两部分(ncRNA 由 *msr* 和 *msd* 构成), RT、*msr*、*msd* 由同一个启动子启动转录, retron 首先转录形成一个高度结构化的二级结构, RT 起始逆转录产生 msDNA. 逆转录起始于 *msd* 下游, 终止于 *msr* 区域前. ssDNA 在单链退火蛋白的协助下, 在细胞内进行精确的基因编辑

Figure 1 Schematic diagram of the retron structure and msDNA. Retron mainly consists of reverse transcriptase (RT) and non-coding RNA (ncRNA) (ncRNA is composed of *msr* and *msd*). RT, *msr* and *msd* are initiated by the same promoter to transcribe and form a highly structured secondary structure at first, and RT initiates reverse transcription to produce msDNA. Reverse transcription begins downstream of *msd* and ends in front of *msr* region. ssDNA performs precise gene editing inside the cell with the assistance of the single strand annealing protein (SSAP).

2 基于 Retron 的基因编辑系统

研究表明 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^[39]。这一特点吸引研究人员不断探索其应用于基因编辑的潜力。近年来,将 retron 与重组工程蛋白或 CRISPR/Cas 蛋白联用(图 2),成功地在大肠杆菌和酵母中实现了高效的基因编辑^[40-45]。

2.1 Retron 与重组工程系统联用的基因编辑系统

单链退火蛋白 (single-strand annealing protein, SSAP) 在一些微生物中具有高效的重组

能力。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^[46]。基于 retron 可以在体内持续产生作为重组底物的 ssDNA 的特点,将 SSAP 与 retron 相结合可以显著优化重组效率。

2.1.1 Retron 与 Red β 联用的基因编辑技术

Red β 来自大肠杆菌 λ 噬菌体 Red 操纵子,由 *bet* 编码。Red β 是 ssDNA 退火蛋白,能够与核酸外切酶 Red α 产生的 ssDNA 结合形成一个 ssDNA-Red β 复合物,保护暴露出来的 ssDNA 免受单链 DNA 核酸酶的攻击,并且可以催化互补的同源序列退火形成 dsDNA,完成重组^[47]。而单独的 Red β 也已被证明能够促进外源的 ssDNA 进行同源重组^[48]。研究人员将 Red β 与 retron 共表达,重组效率较单独使用 retron 显著提升^[40-43]。

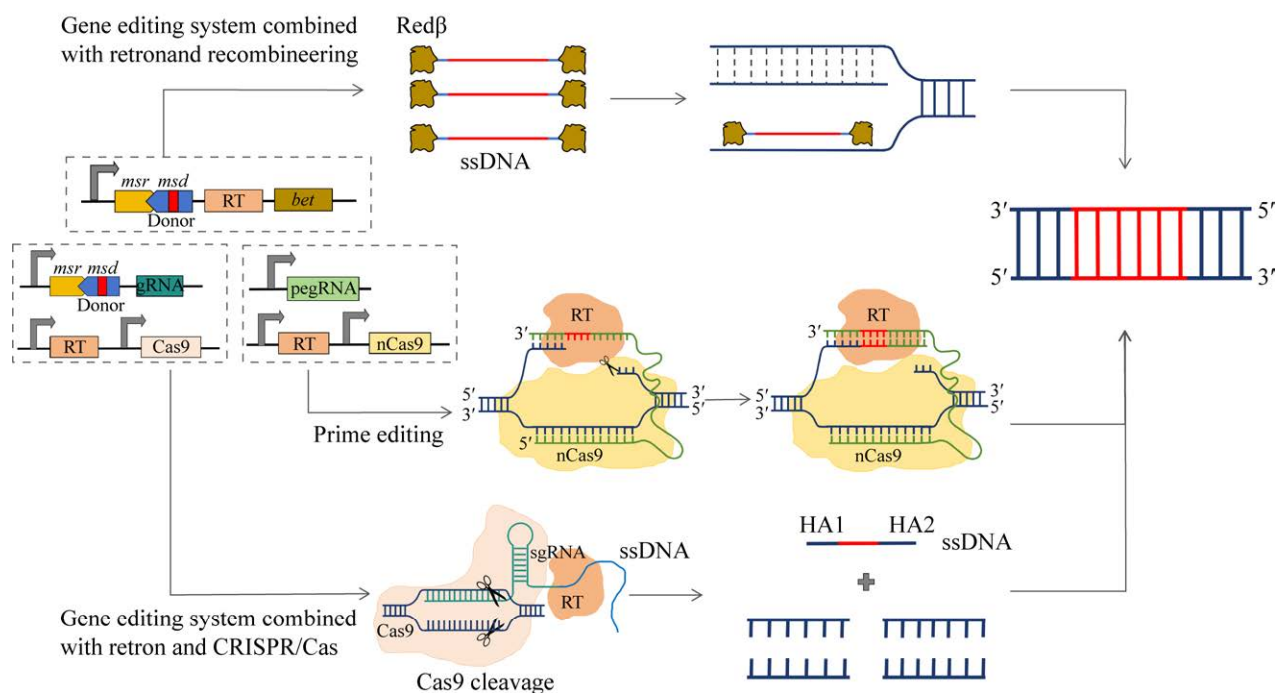


图 2 基于 Retron 的基因编辑系统示意图 上半部分为 retron 与重组工程联用的基因编辑系统,下半部分为 retron 与 CRISPR/Cas 联用的基因编辑系统

Figure 2 Schematic of retron-based gene editing system. The upper part of the diagram is a gene editing system that combines retron with recombineering, and the lower part is a gene editing system that combines retron with CRISPR/Cas.

2014年, Farzadfard 等^[40]利用大肠杆菌 BL21 来源的 retron 构建了一个基因编辑平台, 将 *msd* 中部分序列替换为 74 bp 的靶标序列, 其中包括目标碱基(两个连续的终止密码子)的替换序列以及其上游同源序列和下游同源序列。构建在同一质粒上的 retron (由 *lac* 启动子控制)和 *bet* (由 *tet* 启动子控制)在大肠杆菌细胞中同时表达, 首先 retron 转录形成的 ncRNA 由 RT 启动逆转录, 在细胞中产生作为重组底物的 ssDNA; Red β 蛋白与 ssDNA 结合, 并促进上下游同源序列的退火, 使 ssDNA 整合到基因组目标位点上; 在大肠杆菌细胞中, 同时添加异丙基硫代半乳糖苷(*lac* 启动子的诱导剂)和无水四环素(*tet* 启动子的诱导剂)诱导 retron 和 Red β 表达的编辑效率比不添加两种诱导剂的编辑效率高 10^4 倍, 比只诱导 retron 的编辑效率高 10^3 倍^[40]。基于这一结果, 他们构建了 SCRIBE(kanR)ON 盒, 在特定分子或条件(比如光)的诱导下, retron 产生 ssDNA 并重组到基因组上的目标位点, 通过对大肠杆菌进行基因组工程改造存储化学暴露等事件的长期记忆, 这是早期 retron 在基因编辑上的应用^[40]。Lim 等^[41]在大肠杆菌 EcHB3 中利用 retron 系统修复基因组上一个基因的单碱基突变, 结果显示在 Red β 存在的情况下重组效率比仅使用 retron 编辑效率高, 也证明了 Red β 有利于提高 retron 的编辑效率。

反转录子文库重组工程 (retron library recombineering, RLR)^[42-43]是一种基于 retron 的多位点基因编辑系统, 将合成或天然的 DNA 库整合到 retron 中构建 retron 质粒库并用于重组, 逆转录产生的 DNA 在 SSAP 的帮助下整合到基因组上, 其在重组规模和特异性上均可与 CRISPR 系统相媲美。RLR 可以同时基因组上引入多个突变, 其中 retron 上的序列可以作为条形码用于筛选, 通过互补引物对目标片段

进行高通量测序来表征这些突变; RLR 实现了抗生素耐药基因的高通量鉴定, 支持数百万个反应同时进行从而有助于在整个基因组范围上观测突变对表型产生的影响; 与 CRISPR 依赖 PAM 序列靶向目标位点产生 DSB 再修复的方式相比, RLR 摆脱了引导序列加供体的传统模式, 作为简单灵活的基因组编辑工具和高通量筛选方法具有广阔的应用前景^[42-43]。

2.1.2 Retron 与 CspRecT 联用的基因编辑技术

1999年 Muyrers 等^[4]发现 Lambda 噬菌体的 Red 操纵子编码的重组酶 Red α /Red β 能够在体内介导高效同源重组, 基于噬菌体同源重组酶 Red α /Red β 建立的同源重组系统 Red 系统可以在与大肠杆菌亲缘关系比较近的菌株中进行重组, 但是在一些与大肠杆菌亲缘关系较远的菌株中一般不能发挥重组功能^[47]。因此为了可以在其他 Lambda Red 重组系统不能工作的菌株中实现基因编辑, 近年来许多研究致力于筛选来自噬菌体的 Red β 同源物。2020年, Wannier 等^[49]开发了一种连续富集的高效重组方法 (serial enrichment for efficient recombineering, SEER), 他们首先构建出 SSAP 库并转入大肠杆菌底盘中, 之后利用抗生素筛选法对能够介导高效重组的 SSAP 进行多轮富集, 最后通过深度测序对筛选出的 SSAP 进行分析, 他们利用 SEER 筛选出来自柯林斯菌属 (*Collinsella stercoris*) 噬菌体的 CspRecT, 其在大肠杆菌中的重组效率达到了 Red β 的 2 倍。

Schubert 等^[43]在实验中发现有益突变对编辑效率要求相对较低, 而有害突变或对细胞产生致命影响的突变需要更高效的基因编辑才能鉴定到。为了找到一种能够提高基因编辑效率的 SSAP, 他们选择了 CspRecT 在大肠杆菌中进行实验, 发现使用 CspRecT 替代 Red β 与 retron 共表达在 2 个不同位点的编辑效率均有

明显提高；同时实验表明在敲除核酸外切酶编码基因 *sbcB*、*recJ* 和错配修复蛋白编码基因 *mutS* 的条件下，CspRecT 与 retron 共表达也表现出比 Red β 与 retron 共表达更高的编辑效率^[43]。多个 *msd* 串联构建的阵列式 retron 与 CspRecT 联合应用可以实现大肠杆菌和酵母中 5 个位点的同时精确编辑以及人体细胞中 3 个位点的精确编辑，扩展了 retron 在基因编辑中的应用潜力^[44]。

2.2 Retron 与 CRISPR/Cas 系统联用的基因编辑系统

CRISPR/Cas 系统作为简单有效的可编程基因编辑工具，极大地推动了相关领域的基础和应用研究，为各种生物技术和靶向基因治疗的应用奠定了基础。近年来，通过将 retron 或者相关元件与 CRISPR/Cas 联用，进一步实现更加精准简便的基因组编辑(图 2)^[12,41,45]。

2.2.1 Retron 与 CRISPR/Cas 联用的基因编辑技术

将 retron 与 CRISPR/Cas 联合应用于基因组编辑，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。

2018 年，Sharon 等^[45]开发了一种基于 retron 和 CRISPR/Cas9 的高通量基因组编辑方法 cas9 retron preCIS parallel editing via homology (CRISPEY)，将化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 (SpCas9)和 Ec86 逆转录酶(Ec86-RT)整合到基因组中，retron-Eco1(Ec86)*msr-msd* 的 3' 末端与 gRNA 相连，以低拷贝质粒的形式表达，*msd* 中间可编辑部分被替换为两端含有约 50 bp 同源臂的目标序列；他们在单倍体酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中共表达 sgRNA-

retron-ncRNA、retron-Eco1(Ec86)-RT 和 Cas9，由 sgRNA 引导 Cas9 在靶标位点进行切割，retron 逆转录形成 ssDNA 在目标位点进行高效的同源重组；48 h 后编辑效率达到了 100%且检测的 95 个单克隆中不存在非目标突变，插入 765 bp 外源 DNA 序列的效率达到 87%^[45]。

2020 年，Lim 等^[41]在大肠杆菌 EcHB3 [携带编码 T7RNA 聚合酶(T7RNAP)和 Cas9 的质粒]中诱导 retron 表达用于替换一个碱基，以修复半乳糖激酶(由 *galK* 编码)中的一个无义突变，经过 15 次稀释循环后编辑效率达到了 5.7%；他们对这套系统进行多方面优化，经过实验证明应用 95 bp 的 ssDNA、与 Red β 重组酶共表达以及使用中间错配的 sgRNA 的优化组合可以有效提高编辑效率；他们将这套优化的 CRISPR/retron 系统应用到基因组规模的数千个突变筛选，通过构建突变体库向大肠杆菌基因组中的 3 222 个基因(每个基因对应一个 sgRNA)中引入终止密码子实现基因敲除，并观察敲除基因对大肠杆菌生长表型的影响，最终鉴定到一个参与调节大肠杆菌生长的基因 *ygbT*。

目前 retron 与 CRISPR 联用的基因编辑技术除了应用在大肠杆菌和酵母以外，在哺乳动物和人体细胞中也实现了高效的基因编辑^[16,44,50]，未来通过对 retron 与 CRISPR/Cas 联用系统进行优化，将在基因编辑方面有更广阔的应用空间。

2.2.2 先导编辑

虽然 CRISPR 基因编辑技术的简便性和多功能性使其成为位点特异性基因编辑中使用最广泛的技术^[51]，但 CRISPR 编辑系统依然受到多种因素的限制，如双链断裂的脱靶风险和细胞毒性问题，以及不必要的非同源末端连接。研究人员将逆转录酶与具有单链切割活性的 Cas9 切口酶(cas9 nickases, nCas9s)融合开发出先导编辑(prime editing, PE)，可以在不产生双链

断裂的情况下进行细胞内的精确基因编辑^[52-53]。

先导编辑由先导编辑向导 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA)和先导编辑融合蛋白两部分组成, pegRNA 包括向导 RNA 支架、指定目标位点的间隔序列、与目标 DNA 互补的引物结合位点和逆转录模板。先导编辑融合蛋白由 Cas9 突变体 nCas9 和工程逆转录酶所组成^[54]。在细胞内, 先导编辑蛋白与 pegRNA 结合, 在 pegRNA 的间隔序列的指导下, 与目标 DNA 配对并切割另一条 DNA 链释放一个 3' DNA 末端, 逆转录酶与引物模板复合物结合并启动 pegRNA 中逆转录模板的逆转录, 最终将其整合到基因组中^[54]。

PE 可以精确实现多种类型的编辑, 包括 12 种类型的单碱基替换、多碱基替换和小片段的插入或删除。通过增强先导编辑器效应蛋白、优化 pegRNA 和构建 PE 变体等方式, 先导编辑技术得到一系列优化, 在疾病治疗、基因突变的功能性筛选、标记内源基因、分子记录等多个方面发挥作用^[55]。

2.3 Retron 编辑系统的优化

Retron 作用机制是在胞内直接产生 ssDNA 进行重组编辑, 提高 retron 在体内的 ssDNA 产量及增加 ssDNA 在宿主细胞中的稳定性对提高 retron 编辑效率有很大帮助。因此优化 retron 编辑效率的方式大致分为两种类型, 分别是增加胞内 ssDNA 的产量和减少 ssDNA 的降解即 ssDNA 能够稳定存在。

2.3.1 宿主菌的优化

研究推测 retron 的作用机制是产生的 ssDNA 与复制叉处的滞后链或前导链的同源序列退火, 掺入到新生的双链 DNA 中, 随着 DNA 的下一轮复制使得突变位点稳定遗传。基于这种猜测, 敲除或抑制编码胞内核酸外切酶的基因、错配修复基因等可能有助于胞内 ssDNA 的稳定

存在并增加体内 retron-DNA 的数量, 进而提高重组效率^[42,56]。2018 年 Simon 等^[56]对 retron 表达体系和宿主细胞进行优化从而提高了编辑效率。首先以更高效和严谨的 T7 启动子取代了 *lac* 启动子, 将重组效率由 $(2.6 \times 10^{-4}) \pm (2.7 \times 10^{-5})$ 提高至 $(8.5 \times 10^{-4}) \pm (5.3 \times 10^{-5})$; 此外, 通过分别敲除核酸外切酶基因 *exoX* 和错配修复蛋白编码基因 *mutS*, 编辑效率分别提高到 $0.0046 \pm (5.3 \times 10^{-5})$ 和 0.018 ± 0.0016 , 同时敲除 *exoX* 和 *MutS* 编辑效率进一步提高为 0.066 ± 0.011 , 是野生型的 78 倍; 在工程化改造的大肠杆菌中, 他们在 31 bp 的 DNA 窗口中实现了 13 个碱基的编辑^[56]。2021 年 Schubert 等^[43]最初在大肠杆菌中尝试使用 retron 进行重组编辑, 但检测到的编辑效率仅不到 0.1%, 敲除 *mutS* 后, 对基因组上 *gyrA* 和 *rpoB* 的编辑效率分别提高了 150 倍和 2 倍, 同时敲除 2 个核酸外切酶基因 *recJ* 和 *sbcB* 后, 重组效率分别提高了 131 倍和 201 倍。Liu 等^[57]最初在大肠杆菌中应用 *lac* 启动子驱动的 retron 未检测到目标位点的成功编辑, 之后通过单独或组合敲除 3 种核酸外切酶基因 *xseA*、*recJ* 和 *xonA*, 以及错配修复蛋白编码基因 *mutS* 构建了一系列突变菌株, 实验结果表明单独敲除 *xseA* 或 *mutS* 后编辑效率无明显变化, 而分别失活 *recJ* 和 *xonA* 后编辑效率显著增加, 同时敲除 *recJ* 和 *xonA* 后效率较原始系统提高 130 倍。这些研究结果表明, 在不同实验条件下, 在宿主菌中影响 retron 编辑效率的因素不尽相同, 为将来对该技术的优化和应用提供了参考, 促进了该领域的进一步发展和创新。

2.3.2 Retron 体系的优化

对 retron 体系进行优化, 如改变 a1/a2 互补链长度可以提高 ssDNA 产量^[58]、对逆转录 ncRNA 进行修饰得到的 multitrons 架构在逆转录后可以实现单个转录本同时产生多个不同多拷贝供

体 ssDNA, 与单链退火蛋白或 CRISPR 联用可分别在原核细胞和真核细胞中实现多位点编辑^[44]。2022 年 Lopez 等^[58]构建了 3 个突变库来分别检验 *msd* 茎的长度、*msd* 茎顶端环的长度和 a1/a2 互补链的长度对 ssDNA 产量的影响, 实验结果表明 *msd* 的最佳茎长为 12–30 bp, *msd* 顶端环的最佳长度是少于 14 bp, 适当延长 a1/a2 互补链的长度有助于增加 ssDNA 的产量。基于这个结果, 他们在大肠杆菌 BL21 中使用优化过的 retron 系统对 *rpoB* 中的一个核苷酸进行编辑, 发现细胞内产生了更多的 ssDNA 并且编辑效率得到明显提升, 他们推测高产量的 ssDNA 降低了内源性 DNA 外切酶产生的影响使得编辑效率得到提高; 除此之外在酵母中应用此优化系统也实现了精确的基因编辑, 这一实验结果也证明了 ssDNA 模板数量是重组的限制因素之一^[58]。其他几项实验中也采用改良 a1/a2 互补链长度的方式来提高编辑效率^[59–60]。尽管增加 a1/a2 互补链长度在人体细胞中并未发现 ssDNA 模板数量的明确增加, 但这为后续优化 retron 系统在人体细胞中的应用提供了思路。在这项实验中也发现了一种可以通用于细菌、酵母和哺乳动物的 retron 操纵子反向排列方式, 将 ncRNA 放置于 mRNA 帽的 5'端和 RT 的起始密码子之间, 可以降低 a1/a2 结构的改变对 RT 逆转录的影响^[58]。

2024 年 González-Delgado 等发现在单链退火蛋白 CspRecT 的协助下, 在 retron 的 *msd* 中将 2 个供体序列串联起来, 可以实现大肠杆菌中 *rpoB* 和 *gyrA* 两个位点的精确编辑^[44]。这种可以同时逆转录产生不同供体 DNA 序列对多个位点进行编辑的 retron 结构被命名为 multitrons; 最初测试的 multitrons 架构方式是在单个 *msd* 环中串联多个 70 bp 供体 DNA 的序列, 其中不同供体对应位点的编辑效率与供体在 *msd* 中的

位置顺序有关, 因此这种 multitrons 结构可以实现多个位点编辑时的动态变化记录, 当其应用于分子记录仪时可以增加鲁棒性。为克服位置效应对基因组多位点编辑的影响, 他们进而设计了多个 *msr-msd* 串联的 retron 阵列, 其中每个 *msd* 包含靶向不同位点的供体序列且每个供体与 RT 启动位点距离相同, 优化后的 multitrons 编辑效率与单个 retron 编辑效率相当。但过长的串联 *msr-msd* 对质粒的构建组装以及在胞内的表达都增加了挑战性。因此他们在此基础上优化并设计了第三种 multitrons 结构, 使 *msr* 作为一个单独的转录本反式表达, 将编码不同供体的 *msd* 串联, 使得重复序列减少到 74 个碱基。反式 *msr* 可以与串联序列中的任意 *msd* 相互作用, 不仅解决了供体的位置效应和串联长度问题, 其编辑效率也没有下降。当对 5 个位点进行同时编辑时, 每个位点编辑效率可达到 5%–25%, 证明 multitrons 是进行多重基因组编辑的强有力工具^[44]。基于这种反式 *msr* 的 *msd*-multitrons 嵌套式 retron 的构建也成功克服了长片段敲除效率低下的问题, 串联 *msd* 供体均靶向同一位点, 能够逐步增大该位点的缺失长度^[44]。基于对 multitrons 多位点编辑能力的评估, 他们使用 multitrons 对细菌番茄红素合成途径中的 5 个基因的 RBS 区域进行修饰以获得提高番茄红素产量的突变株, 最终得到了一株 *dxs* 和 *idi* 的 RBS 突变的分离株, 其中的番茄红素产量提高了 400%以上^[44]。除了将 multitrons 与 CspRecT 结合在原核细胞中实现多位点编辑, 他们也将 multitrons 与 CRISPR 相结合应用到真核细胞中; 真核细胞中的阵列 *msd*-gRNA multitrons 与原核细胞中的类似, *msr* 作为单独的转录本表达, 编码供体的 *msd* 与相应的 gRNA 融合, 靶向不同位点的 *msd*-gRNA 串联, 在酵母细胞中分别实现了 2、3 和 5 个不相邻位点的

同时编辑,在人类胚肾细胞 HEK293T 中实现了 3 个不相邻位点的同时精确编辑^[44]。

3 基于 Retron 的基因编辑技术应用

相较于传统的重组系统,retroon 最大的优势在于供体 DNA 是在胞内产生的,无须外源导入,能够避免 DNA 导入效率低带来的影响,目前已在细菌、酵母和哺乳动物中应用广泛。除此之外,retroon 结构紧凑、有严格定义的逆转录起始和终止位点、无已知的宿主因子要求、无

转位因子和具有灵活性且对宿主细胞不造成伤害等特点吸引人们不断开发其应用于生物技术的潜力^[58]。因此,相关领域研究者尝试基于 retroon 系统开发出新的高效基因组工程技术,将 retroon 应用于更多领域(图 3)。

近期,一项研究在大肠杆菌中以模块化和系统化的方式对 retroon 进行优化,构建了一种高效的、多功能的 retroon 介导的基因组编辑系统(retroon-mediated genome editing system, REGES)^[57],该研究从宿主菌改造(敲除内源性核酸酶)、retroon 系统元件优化(复制子、启动子、

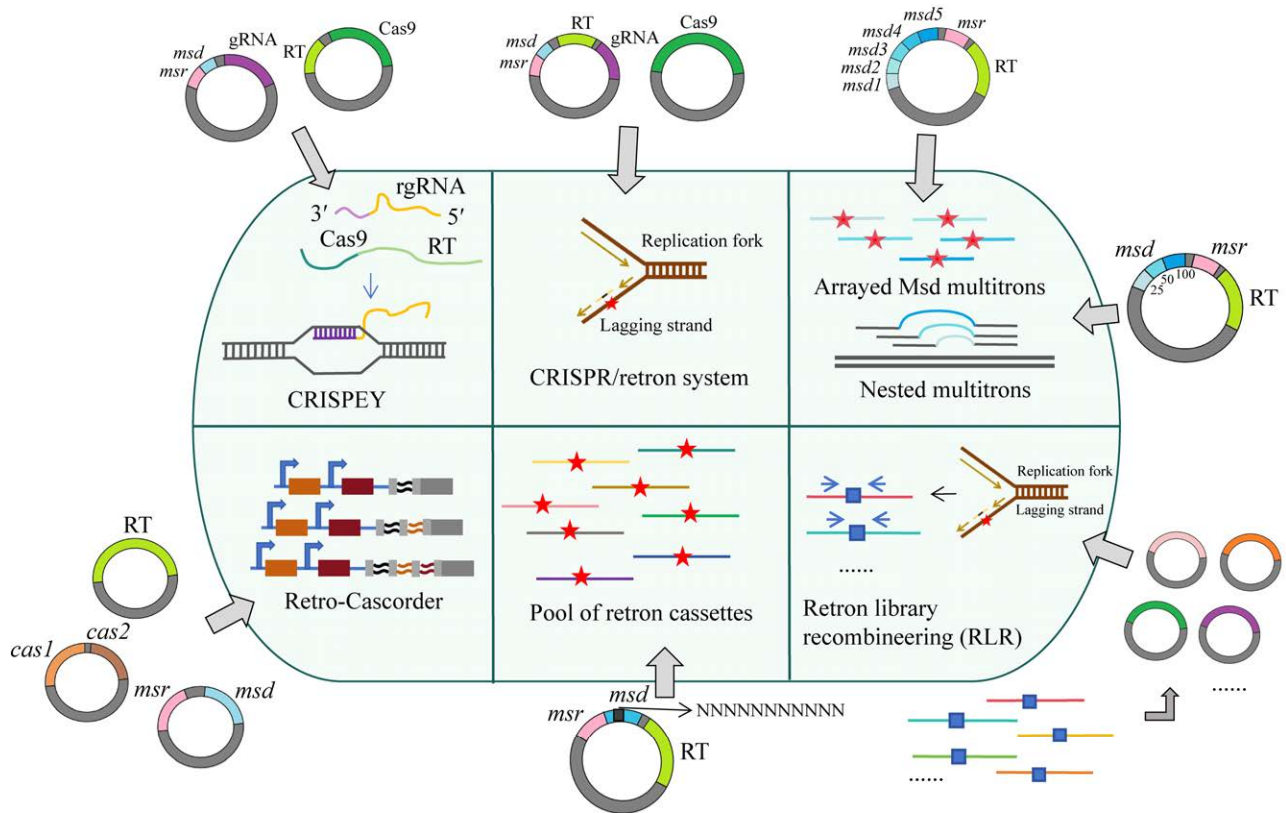


图 3 基于 Retron 开发出的基因编辑工具应用 Retron 与 CRISPR 结合构建出的 CRISPEY、CRISPR/retron 系统、阵列式 retron 系统和嵌套式 retron 系统,应用于分子记录仪的 retro-Cascorder、突变库的构建以及重组筛选系统

Figure 3 Application diagram of gene editing based on retron. CRISPEY constructed by retron and CRISPR, CRISPR/retron system, array retron system and nested retron system, retro-Cascorder for molecular recorder, construction of mutation library and recombination screening system.

RBS、供体)和编辑条件(温度、诱导条件、编辑时间)这3个方面探索影响 REGES 编辑效率的因素,利用优化后的 REGES 系统实现了对 140 bp DNA 片段的插入和替换,能够以(27±5)%的效率敲除约 300 bp 的片段,以及以极低的效率实现了对接近 5 000 bp 长片段的删除;在进行多重基因组编辑时,REGES 同时编辑 2、3 和 4 个位点的效率分别达到了 85%、69%和 25%^[57]。通过 REGES 将由简并序列构建的 RBS 文库批量替换胞内目的基因的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS),以获得不同表达水平的菌株,他们得到了乙醇抗性菌株和生物素过表达菌株;同时 REGES 通过使用易错 RNA 聚合酶(PmCDA1-epT7RNAP)驱动 retron 表达,在转录过程中引入随机突变,在体内产生突变的 DNA 模板文库,从而实现体内蛋白质连续进化;在该研究中他们仅用 2 d 的时间就构建并筛选得到了一个含有 5 个位点突变的高产番茄红素生产菌株,表明 REGES 是微生物细胞工厂的快速构建以及合成生物学发展的良好工具^[57]。

除此之外, Farzadfard 等^[40]基于 2014 年开发的 SCRIBE(kanR)ON 盒,通过抑制核酸外切酶、敲除错配修复基因等构建了一个更高效的 DNA 书写系统 HiSCRIBE (High-efficiency SCRIBE)^[61],通过引入一个更强的核糖体结合位点过表达来自 Lambda 噬菌体的 SSAP,将编辑效率提高了 60%。2022 年 Bhattarai-Kline 等^[59]构建了一个基于 retron/CRISPR 的分子记录仪系统,将其命名为 retro-cascorder。当目标基因被激活时,其对应的 retron 也会产生一个携带该基因特有条形码的 DNA 序列, Cas1 和 Cas2 蛋白捕获该序列并将其插入到 CRISPR 阵列中,依照不同基因的先后表达顺序形成 CRISPR 对应的条形码数量差异,进而形成永久性的记录^[59](表 1)。

4 展望

细菌与噬菌体在长期的博弈中进化出许多精妙的防御对抗体系^[62],如 CRISPR/Cas 系统和 Red/ET 重组工程,目前已广泛应用于基因组编辑。但依赖于外源 DNA 导入受体细胞作为模板的条件限制了众多基因编辑工具的应用,除了每次仅能递送一定量的模板 DNA 进入靶细胞,外源 DNA 的数量也会随着传代而在胞内逐渐稀释,因此这些技术往往更适用于具备高转化效率的菌株。40 年前发现的 retron 也是一种噬菌体防御系统,且能够在胞内通过反转录产生 msDNA 作为基因编辑的供体,无须依赖外源 DNA 导入^[17,39]。此外,将 retron 与 Red/ET 重组工程或 CRISPR/Cas 系统联用进一步拓展了基因编辑技术的适用范围,尤其是难以直接引入外源 DNA 的宿主。

通过对宿主菌和 retron 体系的改造,供体 DNA 在胞内的含量得到显著提高进而促进重组的发生。目前, retron 虽然已经实现了在细菌、酵母和人体细胞中的应用,但通常需要与 CRISPR/Cas 系统或 Red/ET 重组工程联用提高效率^[42],未来还需要筛选或人工优化改造 retron 以实现在真核细胞中更简便高效的编辑。此外,多个研究表明, retron 在应用时需要抑制体内核酸外切酶和错配修复蛋白等的表达^[40-41,53,55],这给基因编辑带来了一定的难度,同时敲除这些基因可能会在基因组上留下痕迹,使得基因组背景更复杂,影响菌株后续的应用。

随着对基因编辑需求的不断提高,基于 retron 的基因编辑技术也随之发展和优化。Retro-Cascorder、REGES 等基因编辑方法将 retron 应用到连续进化、活体生物存储器、高通量功能变异筛选和突变库构建等多个方面。Retron 在体内持续产生供体 DNA 的独特优势,将有助于

表 1 基于 Retron 的基因编辑工具特点与应用

Table 1 Features and application of gene editing tool based on retron

Gene editing tool	Composition and feature	Type of editing cell	Application	Reference
Cas9 retron precise parallel editing via homologY (CRISPEY) CRISPR/Retron system	Coupling retron with CRISPR/Cas9 sgRNA guided+Cas9 cleavage+Retron reverse transcription	Prokaryotic cells (<i>Escherichia coli</i>) Eukaryotic cells (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mammalian cells, human cells)	Efficient genome editing	[41,45]
Retron library recombineering (RLR)	Producing pooled and barcoded variant libraries addressable by targeted deep sequencing; Pooled experiments presents avenues for exploring variation across the genome	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>)	Screening tools of genome editing	[42-43]
Multitrons	Producing multiple donor-encoding DNAs from a single transcript; Modifying multiple sites precisely on a single genome simultaneously using retron arrays; Nested multitron achieves large fragment deletion	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>) Eukaryotic cells (<i>S. cerevisiae</i>)	Multi-site editing and long fragment deletion	[44]
Retron-mediated genome editing system (REGES)	Optimizing Retron in a modular and systematic manner; A mutant library was constructed to fine-tune the expression level of intracellular genes; Continuous <i>in vivo</i> protein evolution applications	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>)	Multiple genome editing and continuous evolution tools	[57]
Synthetic cellular recorders integrating biological events (SCRIBE)	Producing single-stranded DNA (ssDNA) inside of living cells in response to a range of regulatory signals	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>)	Molecular recorder	[40]
High-efficiency SCRIBE (HiSCRIBE)	Optimizing SCRIBE to improve editing efficiency; Recording transient spatial information into genomic DNA; Continuous optimization of a trait of interest under the selection pressure	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>)	DNA writing system	[61]
Retro-Cascorder	Reverse transcribing engineered RNA barcodes into DNA and integrating DNA into the genome using the CRISPR/Cas system	Prokaryotic cells (<i>E. coli</i>)	Molecular recording system	[59]

其在基因组编辑、合成生物学等相关领域发挥更重要的作用。

REFERENCES

- [1] LIN FL, SPERLE K, STERNBERG N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82(5): 1391-1395.
- [2] van den BOSCH M, LOHMAN PHM, PASTINK A. DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. Biological Chemistry, 2002, 383(6): 873-892.
- [3] ZHANG Y, BUCHHOLZ F, MUYRERS JP, STEWART AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*[J]. Nature Genetics, 1998, 20(2): 123-128.
- [4] MUYRERS JP, ZHANG Y, TESTA G, STEWART AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(6): 1555-1557.
- [5] ZHANG YM, MUYRERS JPP, RIJNTJES J, STEWART AF. Phage annealing proteins promote

- oligonucleotide-directed mutagenesis in *Escherichia coli* and mouse ES cells[J]. BMC Molecular Biology, 2003, 4(1): 1.
- [6] 郑文韬, 张友明, 卞小莹. Red/ET 同源重组技术及其在微生物基因组挖掘中的应用进展[J]. 微生物学报, 2017, 57(11): 1735-1746.
ZHENG WT, ZHANG YM, BIAN XY. Advances in Red/ET recombineering and its application for microbial genome mining[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(11): 1735-1746 (in Chinese).
- [7] LANIGAN TM, KOPERA HC, SAUNDERS TL. Principles of genetic engineering[J]. Genes, 2020, 11(3): 291.
- [8] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases[J]. Genetics, 2011, 188(4): 773-782.
- [9] CHANDRASEGARAN S, CARROLL D. Origins of programmable nucleases for genome engineering[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 428(5Pt B): 963-989.
- [10] RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [11] YANG H, REN SL, YU SY, PAN HF, LI TD, GE SX, ZHANG J, XIA NS. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6461.
- [12] PACESA M, PELEA O, JINEK M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies[J]. Cell, 2024, 187(5): 1076-1100.
- [13] COX DBT, GOOTENBERG JS, ABUDAYYEH OO, FRANKLIN B, KELLNER MJ, JOUNG J, ZHANG F. RNA editing with CRISPR-cas13[J]. Science, 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [14] CHEN JS, MA EB, HARRINGTON LB, Da COSTA M, TIAN XR, PALEFSKY JM, DOUDNA JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity[J]. Science, 2018, 360(6387): 436-439.
- [15] LIU GW, LIN QP, JIN S, GAO CX. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies[J]. Molecular Cell, 2022, 82(2): 333-347.
- [16] ZHAO B, CHEN SA A, LEE J, FRASER HB. Bacterial retrons enable precise gene editing in human cells[J]. The CRISPR Journal, 2022, 5(1): 31-39.
- [17] MILLMAN A, BERNHEIM A, STOKAR-AVIHAIL A, FEDORENKO T, VOICHEK M, LEAVITT A, OPPENHEIMER-SHAANAN Y, SOREK R. Bacterial retrons function in anti-phage defense[J]. Cell, 2020, 183(6): 1551-1561.e12.
- [18] FURUICHI T, DHUNDALE A, INOUE M, INOUE S. Branched RNA covalently linked to the 5' end of a single-stranded DNA in *Stigmatella aurantiaca*: Structure of msDNA[J]. Cell, 1987, 48(1): 47-53.
- [19] LAMPSON BC, VISWANATHAN M, INOUE M, INOUE S. Reverse transcriptase from *Escherichia coli* exists as a complex with msDNA and is able to synthesize double-stranded DNA[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(15): 8490-8496.
- [20] YEE T, FURUICHI T, INOUE S, INOUE M. Multicopy single-stranded DNA isolated from a gram-negative bacterium, *Myxococcus xanthus*[J]. Cell, 1984, 38(1): 203-209.
- [21] LAMPSON BC, INOUE M, INOUE S. Reverse transcriptase with concomitant ribonuclease H activity in the cell-free synthesis of branched RNA-linked msDNA of *Myxococcus xanthus*[J]. Cell, 1989, 56(4): 701-707.
- [22] LIM D, MAAS WK. Reverse transcriptase-dependent synthesis of a covalently linked, branched DNA-RNA compound in *E. coli* B[J]. Cell, 1989, 56(5): 891-904.
- [23] LAMPSON BC, SUN J, HSU MY, VALLEJO-RAMIREZ J, INOUE S, INOUE M. Reverse transcriptase in a clinical strain of *Escherichia coli*: production of branched RNA-linked msDNA[J]. Science, 1989, 243(4894Pt 1): 1033-1038.
- [24] TEMIN HM. Reverse transcriptases. retrons in bacteria[J]. Nature, 1989, 339(6222): 254-255.
- [25] RYCHLIK I, SEBKOVÁ A, GREGOROVA D, KARPISKOVA R. Low-molecular-weight plasmid of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis codes for retron reverse transcriptase and influences phage resistance[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(9): 2852-2858.
- [26] SIMON AJ, ELLINGTON AD, FINKELSTEIN IJ. Retrongs and their applications in genome engineering[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(21): 11007-11019.
- [27] INOUE M, INOUE S. Retrongs and multicopy single-stranded DNA[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(8): 2419-2424.
- [28] MESTRE MR, GONZÁLEZ-DELGADO A, GUTIÉRREZ-RUS LI, MARTÍNEZ-ABARCA F, TORO N. Systematic prediction of genes functionally associated with bacterial retrongs and classification of the encoded tripartite systems[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(22): 12632-12647.

- [29] PALKA C, FISHMAN CB, BHATTARAI-KLINE S, MYERS SA, SHIPMAN SL. Retron reverse transcriptase termination and phage defense are dependent on host RNase H1[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(6): 3490-3504.
- [30] PILOUSOVA L, MATIASOVICOVA J, SISAK F, HAVLICKOVA H, RYCHLIK I. Retron reverse transcriptase (rrtT) can be lost in multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 strains and influences virulence for mice[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 111(3/4): 191-197.
- [31] ELFENBEIN JR, KNODLER LA, NAKAYASU ES, ANSONG C, BREWER HM, BOGOMOLNAYA L, ADAMS LG, McCLELLAND M, ADKINS JN, ANDREWS-POLYMENIS HL. Multicopy single-stranded DNA directs intestinal colonization of enteric pathogens[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(9): e1005472.
- [32] GAO LY, ALTAE-TRAN H, BÖHNING F, MAKAROVA KS, SEGEL M, SCHMID-BURGK JL, KOOB J, WOLF YI, KOONIN EV, ZHANG F. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes[J]. *Science*, 2020, 369(6507): 1077-1084.
- [33] MAXWELL KL. Retrons: complementing CRISPR in phage defense[J]. *The CRISPR Journal*, 2020, 3(4): 226-227.
- [34] 田雨顺, 罗鹏, 刘秋婷, 胡超群. 细菌重组系统及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 473-482.
TIAN YS, LUO P, LIU QT, HU CQ. Progress on bacterial recombination systems and their application[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 473-482 (in Chinese).
- [35] DILLINGHAM MS, KOWALCZYKOWSKI SC. RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 72(4): 642-671.
- [36] CHENG KY, WILKINSON M, CHABAN Y, WIGLEY DB. A conformational switch in response to Chi converts RecBCD from phage destruction to DNA repair[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2020, 27(1): 71-77.
- [37] RICE SA, LAMPSON BC. Bacterial reverse transcriptase and msDNA[J]. *Virus Genes*, 1995, 11(2/3): 95-104.
- [38] HERZER PJ. Starvation-induced expression of retron-Ec107 and the role of ppGpp in multicopy single-stranded DNA production[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(15): 4438-4444.
- [39] SHIMAMOTO T, HSU MY, INOUE S, INOUE M. Reverse transcriptases from bacterial retrons require specific secondary structures at the 5'-end of the template for the cDNA priming reaction[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(4): 2684-2692.
- [40] FARZADFARD F, LU TK. Synthetic biology. Genomically encoded analog memory with precise *in vivo* DNA writing in living cell populations[J]. *Science*, 2014, 346(6211): 1256272.
- [41] LIM H, JUN S, PARK M, LIM J, JEONG J, LEE JH, BANG D. Multiplex generation, tracking, and functional screening of substitution mutants using a CRISPR/retron system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(5): 1003-1009.
- [42] KAUR N, PATI PK. Retron library recombineering: next powerful tool for genome editing after CRISPR/Cas[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(4): 1019-1025.
- [43] SCHUBERT MG, GOODMAN DB, WANNIER TM, KAUR D, FARZADFARD F, LU TK, SHIPMAN SL, CHURCH GM. High-throughput functional variant screens *via in vivo* production of single-stranded DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(18): e2018181118.
- [44] GONZÁLEZ-DELGADO A, LOPEZ SC, ROJAS-MONTERO M, FISHMAN CB, SHIPMAN SL. Simultaneous multi-site editing of individual genomes using retron arrays[J]. *Nature Chemical Biology*, 2024, 20: 1482-1492.
- [45] SHARON E, CHEN SA A, KHOSLA NM, SMITH JD, PRITCHARD JK, FRASER HB. Functional genetic variants revealed by massively parallel precise genome editing[J]. *Cell*, 2018, 175(2): 544-557.e16.
- [46] DENG MT, WU YK, LV XQ, LIU L, LI JH, DU GC, CHEN J, LIU YF. Heterologous single-strand DNA-annealing and binding protein enhance CRISPR-based genome editing efficiency in *Komagataella phaffii*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(11): 3443-3453.
- [47] 李瑞娟, 赵晓雨, 杨润雨, 刘洋, 颜富, 王海龙, 张友明, 符军. 噬菌体重组酶介导的 DNA 同源重组工程[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3230-3248.
LI RJ, ZHAO XY, YANG RY, LIU Y, YAN F, WANG HL, ZHANG YM, FU J. Recombineering mediated by bacteriophage recombinases[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3230-3248 (in Chinese).
- [48] NEWING TP, BREWSTER JL, FITSCHEN LJ, BOUWER JC, JOHNSTON NP, YU HB, TOLUN G. Red β_{177} annealase structure reveals details of oligomerization and λ Red-mediated homologous DNA

- recombination[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 5649.
- [49] WANNIER TM, NYERGES A, KUCHWARA HM, CZIKKELY M, BALOGH D, FILSINGER GT, BORDERS NC, GREGG CJ, LAJOIE MJ, RIOS X, PÁL C, CHURCH GM. Improved bacterial recombineering by parallelized protein discovery[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(24): 13689-13698.
- [50] KONG XF, WANG ZK, ZHANG RX, WANG X, ZHOU YS, SHI LY, YANG H. Precise genome editing without exogenous donor DNA *via* retron editing system in human cells[J]. *Protein & Cell*, 2021, 12(11): 899-902.
- [51] ZHAO ZH, SHANG P, MOHANRAJU P, GEIJSSEN N. Prime editing: advances and therapeutic applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2023, 41(8): 1000-1012.
- [52] ANZALONE AV, RANDOLPH PB, DAVIS JR, SOUSA AA, KOBLAN LW, LEVY JM, CHEN PJ, WILSON C, NEWBY GA, RAGURAM A, LIU DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [53] TANG S, STERNBERG SH. Genome editing with retroelements[J]. *Science*, 2023, 382(6669): 370-371.
- [54] DOMAN JL, PANDEY S, NEUGEBAUER ME, AN MR, DAVIS JR, RANDOLPH PB, McELROY A, GAO XD, RAGURAM A, RICHTER MF, EVERETTE KA, BANSKOTA S, TIAN K, TAO YA, TOLAR J, OSBORN MJ, LIU DR. Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors[J]. *Cell*, 2023, 186(18): 3983-4002.e26.
- [55] CHEN PJ, LIU DR. Prime editing for precise and highly versatile genome manipulation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2023, 24(3): 161-177.
- [56] SIMON AJ, MORROW BR, ELLINGTON AD. Retroelement-based genome editing and evolution[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(11): 2600-2611.
- [57] LIU WQ, ZUO SQ, SHAO YR, BI K, ZHAO JR, HUANG L, XU ZN, LIAN JZ. Retron-mediated multiplex genome editing and continuous evolution in *Escherichia coli*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(15): 8293-8307.
- [58] LOPEZ SC, CRAWFORD KD, LEAR SK, BHATTARAI-KLINE S, SHIPMAN SL. Precise genome editing across Kingdoms of life using retron-derived DNA[J]. *Nature Chemical Biology*, 2022, 18(2): 199-206.
- [59] BHATTARAI-KLINE S, LEAR SK, FISHMAN CB, LOPEZ SC, LOCKSHIN ER, SCHUBERT MG, NIVALA J, CHURCH GM, SHIPMAN SL. Recording gene expression order in DNA by CRISPR addition of retron barcodes[J]. *Nature*, 2022, 608(7921): 217-225.
- [60] JIANG WJ, RAO GS, AMAN R, BUTT H, KAMEL R, SEDEEK K, MAHFOUZ MM. High-efficiency retron-mediated single-stranded DNA production in plants[J]. *Synthetic Biology*, 2022, 7(1): ysac025.
- [61] FARZADFARD F, GHARAEI N, CITORIK RJ, LU TK. Efficient retroelement-mediated DNA writing in bacteria[J]. *Cell Systems*, 2021, 12(9): 860-872.e5.
- [62] DORON S, MELAMED S, OFIR G, LEAVITT A, LOPATINA A, MAI KR, AMITAI G, SOREK R. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome[J]. *Science*, 2018, 359(6379): eaar4120.