

文章编号: 1004-0374(2013)01-0126-07

TALENs: 一种新的基因定点修饰技术

张金脉, 任兆瑞*

(上海市儿童医院, 上海交通大学附属儿童医院医学遗传研究所, 上海 200040)

摘要: 转录激活因子样效应蛋白核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN), 由 TALE (transcription activator-like effector) 结构域和 Fok I 核酸内切酶结构域人工融合而成, 它是近几年发展起来的一种可对基因组定点改造的新技术。TALEN 能够特异识别一段 DNA 序列, 并能够对双链 DNA 进行切割, TALEN 造成 DNA 断裂后可以启动细胞对 DNA 的修复, 从而实现特定位点的基因操作如基因敲除、基因敲进、基因修复等。相比 ZFNs, TALENs 的获得更为容易、效果更为明显, 它在理论上真正实现了对任意序列进行基因操作的可能。综述了 TALEN 技术的研究发展过程、结构与作用机制、构建 TALEN 的方法, 以及目前这一技术的应用等。

关键词: TALEN; 基因定点修饰技术; 作用机制; 构建方法

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A

TALENs: A new genome site-specific modification technology

ZHANG Jin-Mai, REN Zhao-Rui*

(Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) is an artificially engineered hybrid protein that contains a transcription activator-like effector (TALE) domain and a Fok I endonuclease cleavage domain. It has recently emerged as a powerful molecular tool for targeted genome modifications. TALENs recognize and bind to specific DNA sequences to generate a double-strand break (DSB) by its nuclease activity. Based on this finding, various genetic methods, including gene targeting (gene disruption), gene addition, gene editing are being designed to manipulate the genomes at specific loci. Compared with ZFNs, TALENs are obtained more easily and much more effective. It is TALEN that really achieving gene modification at any site of genome. Here, we reviewed the recent progress and prospects of TALEN technology, the mechanism of how it works, construction methods, as well as a collection of species and genes that have been successfully modified by TALEN.

Key words: TALEN; genome site-specific modification technology; mechanism; construction

基因修饰技术是重组 DNA 技术研究的热点之一, 现在已广泛应用到医学与农业领域。为了实现有效的基因修饰, 目前主要发展了以下几种方法: 包括慢病毒载体技术^[1]、Cre/loxP 系统^[2]、PiggyBac 转座子系统^[3]、PhiC31 整合酶系统^[4]、锌指核酶^[5]以及最新研究发展的 TALEN 技术^[6]。每种技术各有其优缺点。慢病毒载体可以介导外源基因整合到基因组中, 其优点为整合效率高、整合时间短; 其缺点是随机整合、插入外源片段相对较小以及病毒基因所带来的安全性问题等^[1]。Cre/loxP 系统最主

要的优点是可以进行条件性基因敲除或者敲进, 因此它在制备实验动物模型中得到广泛应用; Cre/loxP 系统缺点则是首先要向基因组中插入 loxP 序列, 因此不适合用于基因治疗及转基因大动物的制备^[2]。PiggyBac 转座子系统与 phiC31 整合酶存在

收稿日期: 2012-06-22; 修回日期: 2012-08-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2010CB529902)

*通信作者: E-mail: zhrren@sjtu.edu.cn

一些相似的特点, 如都可实现外源基因位点特异性整合, 外源基因的整合依赖于存在于基因组中特异识别位点。PiggyBac 最主要的优点是可以介导大基因片段进入基因组, 并且可以把大片段重新导出基因组; PiggyBac 的缺点则是容易把外源基因整合入基因内, 破坏细胞内源基因^[3]。PhiC31 整合酶系统可以实现外源基因在基因组中稳定的位点特异性整合, 而且整合位点多为基因外区域; 但是 phiC31 整合酶只能实现位点特异整合, 不能实现定点整合^[4], 限制了它在基因治疗等一些领域的应用。

ZFNs (zinc-finger nucleases, ZFNs) 曾被认为是最有潜力的基因改造技术, 它实现了基因的靶向操作, 并得到了广泛的应用。利用 ZFNs 对 HIV 感染者 T 细胞中 CCR5 基因进行敲除, 并把改造后的细胞重新输入患者体内现在已经进入基因治疗的临床试验阶段。然而从商业公司获得高效的 ZFNs 需要支付高昂的费用, 从锌指核酶委员会及 Addgene 上获得的 ZF 模块质粒, 自行组装针对特定 DNA 序列的 ZFNs, 所需的工作量大, 花费也十分昂贵, 而且最终产生的 ZFNs 在细胞内会产生细胞毒性^[5], 因此有必要发展更为高效的基因定点修饰技术。最新发展起来的 TALEN 技术, 具备了 ZFNs 技术特异结合目标 DNA 特异性的优点, 同时消除了它的一些缺点^[6-7]。

1989 年, 科学家在植物病原菌黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 中分离出一类 TALE (transcription activator-like effector) 转录激活因子样效应蛋白, TALEs 蛋白在宿主细胞中能引起植物得病, 为了抵抗病毒 TALEs 蛋白, 植物在进化中也产生了与 TALEs 蛋白类似的蛋白用于抵抗病毒 TALEs 的毒害^[8]; 2007 年, Kay 等^[9]发现 *Xanthomonas* 致病菌可以把合成的 TALE 蛋白——AvrBs3 注入宿主细胞内, 并发现 AvrBs3 能够进入宿主细胞核, 然后结合到宿主 *upa20* 基因的启动子上, 激活宿主 *upa20*; 进一步研究发现植物病原体合成的 PthXo1、AvrXa27 等一系列 TALE 蛋白其发挥作用的方式都与 AvrBs3 类似, 能够识别并结合到宿主基因相应的启动子序列上, 激活宿主基因的表达^[10-12]。2009 年, Moscou 等^[13]在前人工作的基础上, 揭示出了 TALE 蛋白特异结合宿主基因启动子的机制。2011 年, 科学家首次把 TALE 与 FokI 结合在一起组成 TALEN, 并证实了 TALEN 在靶基因操作中的能力^[6,14-15]; 2012 年, 我国科学家施一公带领的团队通过解析 TALE 蛋白的晶体结构, 清晰地揭示了 TALE 蛋白特异识别

DNA 的机理^[16], 为进一步改造和利用 TALEN 打下了基础。

1 TALEN技术的原理

TALENs 蛋白包括两个组成部分。第一个组成部分来自于天然 TALE 蛋白, 其 N 端含有一个易位结构域; 中间是一段由 1.5~33.5 不等的 TALE 单元组成的重复氨基酸序列, 每个单元又由 34 个氨基酸组成, 其中 32 个氨基酸是高度保守的, 只有第 12 位和 13 位氨基酸是可以变化的, 能够特异地结合一个碱基序列, 因此这两个氨基酸又被称为重复变异双残基 (repeat variant diresidue, RVD), 最后的 0.5 个单元只含有前面的 20 个氨基酸; 天然 TALE 蛋白的 C 端含有一个核定位信号以及转录激活因子, 能帮助 TALE 蛋白从细胞质进入细胞核同时发挥转录激活作用。以水稻白叶枯病菌分泌的 TALE-AvrXs10 蛋白为例, 它结合宿主细胞内 19 bp 的 DNA 序列需要 17.5 个单元, 在天然的 TALE 蛋白中发现其 5' 端第一个碱基为 T 不需要 TALE 蛋白单元的结合, 最后一个碱基由最后的 0.5 个单元约 20 个氨基酸结合^[8-13]。清华大学施一公等^[16]利用没有结合 DNA 的 TALE 和结合了 DNA 的 TALE 进行晶体结构解析比较发现 TALE 以一种螺旋-转角-螺旋的方式结合到 DNA 上, 其中第 12 位氨基酸主要起到稳定 RVD 环的功能, 发现只有第 13 位氨基酸是真正识别特异碱基的氨基酸。

2009 年 12 月, Science 第 326 期同时发表了两篇破解植物病毒分泌的 TALEs 蛋白能够特异识别碱基序列的机制, 其中 Moscou 等^[13]完全采用生物信息学的方法得到了 TALEs 蛋白识别碱基的规律, 而 Boch 等^[17]则用实验手段破译了这一“密码”。他们发现 TALEs 蛋白中第 12 位和 13 位氨基酸组合 (天冬酰胺-异亮氨酸-NI)、(天冬酰胺-丙氨酸-NA)、(组氨酸-天冬氨酸-HD)、(天冬酰胺-甘氨酸-NG) 可分别高效特异地识别碱基 A、G、C、T, 并提出将来可以像 ZFNs 一样把它改造成为基因定点修饰的工具。2011 年, Li 等^[6]和 Mahfouz 等^[15]分别对天然 TALE 蛋白进行改造, 把 C 端的转录激活子替换为 FokI 核酸内切酶, 首次实现了 TALE 蛋白的人工改造, 并显示具有良好的效果。此后, 研究人员以天然的 TALEs 蛋白为骨架, 构建了针对人、大鼠、小鼠、斑马鱼等不同生物基因的 dTALEs (design TALE), 并跟 FokI 核酸内切酶、转录因子以及表观遗传修饰酶结合在一起实现对, 不

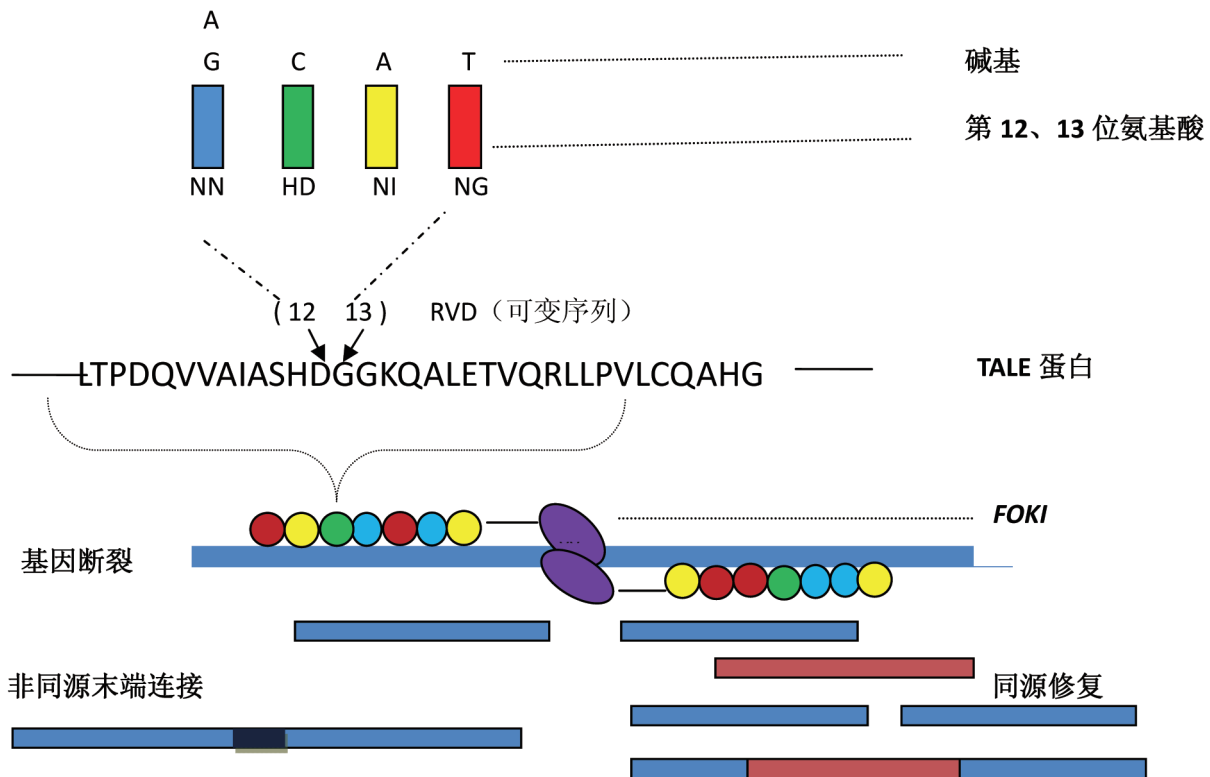
同物种基因组的定点修饰或调控^[18-24]。研究发现,植物病毒合成的天然 TALEs 蛋白中的 C 端和 N 端氨基酸的数目能够影响最终 TALEN 的活性,为了优化 TALEN 技术, Sun 等^[25]采用酵母双杂交系统评价不同的 N 端和 C 端氨基酸数目及结合 DNA 序列数目组合对 TALENs 活性的影响,结果发现 N 端和 C 端氨基酸残基都需要保持在一定数目时 TALEN 才能保持活性。

TALENs 的第二个组成部分为来自细菌的 IIS 型核酸内切酶 FokI, 当两个 FokI 发生二聚化后就会发挥活性对 DNA 双链进行切割, 细胞 DNA 损伤后会启动两种修复机制过程, 一种为末端非同源依赖的修复机制 (NHEJ), 另一种是依赖同源重组的修复机制 (HDR)^[26]。当没有外源的同源序列加入时, 细胞就会启动 NHEJ 修复机制, 将断开的 DNA 末端重新结合在一起, 但是这种修复机制是一种存在缺陷的修复过程, 往往会引入新的突变, 因此也就达到了进行基因敲除的目的 (图 1)。如果此时加

入外源的同源碱基序列就可以启动第二种修复机制 HDR 修复, 利用同源修复机制, 可以帮助我们实现基因敲进和基因修复, 但是如果外源的同源序列是存在缺陷的, 那么同样可以达到基因敲除的效果。

2 TALENs技术的操作要点

利用 TALEN 技术实现基因组定点修饰的流程包括以下几个步骤。第一步, 从选定的目标序列中寻找合适的 TALE 候选靶位点 (如果目的是突变基因, 一般选择比较靠前的外显子中的靶位点), 选择的 DNA 序列 5' 端第一个碱基最好为 T。为了能快速获取合适的 TALE 候选靶位点, 目前已经建立了多个在线软件: (1) <https://boglab.plp.iastate.edu>^[27]; (2) <http://idtale.kaust.edu.sa>^[28]; (3) <http://zifit.partners.org/ZiFiT>^[21]。第二步, 获取针对靶序列的特异 TALE 蛋白。这一步是 TALEN 技术最为重要和复杂的一步, 目前已经有多篇文章报道了改进后的获取 TALEN 的方法^[18-22]。第三步, 选择合适的 FokI



TALEN蛋白的第12、13位氨基酸NN、HD、NI、NG可以特异识别G/A、C、A、T碱基具有特异性的TALE蛋白和FokI核酸内切酶组成TALEN后可以特异识别DNA序列并有效进行切割, 断裂后的DNA序列可以启动细胞的修复机制, 一种是不依赖同源片段的非同源末端连接机制, 另一种是依赖同源片段的同源修复机制, 非同源末端修复往往会引入突变而同源修复可造成基因插入和基因修改。

图1 利用TALEN蛋白进行基因敲除的原理

结构域, 利用分子生物学的方法把 TALE 和 FokI 组装在一起构建完整的 TALEN 蛋白。第四步, 将完整的 TALEN 引入细胞进行基因组定点修饰操作。第五步, 筛选阳性克隆, 评价效果。以上并不是每个 TALEN 必经的步骤, 有的会在第三步与第四步之间加入酵母双杂交等评估, 首先确定其活性, 然后再用于实验。

TALEN 技术的发展主要体现在上述基因组定点修饰流程第二步的不断改进中, 改进的目的则主要围绕在: 减少劳动量、高通量获取、减少构建过程中的突变等方面。到目前为止, 已经发展了以下几种 TALEN 组装方法。(1) Gateway 组装法: 这是最早出现用于构建 TALEN 的方法, Gateway 技术是 Invitrogen 公司的专利技术, 主要有两个步骤, 首先把 TALE 序列克隆进入入门载体, 入门克隆中目的基因的两侧为 attL 序列, 这些 attL 序列用于在重组酶的作用下, 把表达克隆中 TALEN 片段重组进入表达载体中^[15]。(2) Golden Gate 组装方法: 为了加快 TALEN 载体的制备, 北京大学张博等^[29]把 PCR 及 Golden gate shuttle 技术结合, 以 TALE 家族成员 AvrBs3 为骨架, 首先利用 PCR 方法扩增出加入酶切位点识别不同碱基序列的 TALE 单元, 然后把这些单元利用 Golden gate shuttle 方法在一个体系中实现所有的酶切酶连反应, 这种方法大大缩短了构建周期, 可以在一周之内快速完成针对特异序列 TALEN 载体的构建。为了减少 PCR 可能带来的突变问题, Weber 等^[30]改进了 Golden gate 组装方法, 减少了 PCR 的使用量。(3) Toolbox 组装方法: 该法与 Golden Gate 方法类似, 也采用等级组装的方式进行 TALE 蛋白模块的组装, 通过 PCR 方法引入同尾酶的酶切位点, 每六个单元首先组合在一起通过, 然后构建出三个含有六个单元的载体, 再把这三个载体连在一起就构成了含有针对特定碱基序列的全部 TALE 单元载体, 最后再把它插入到 TALEN 克隆骨架中。相比 Golden gate 组装方法, Toolbox 统一了限制性内切酶, 这种方法只需要两种酶就可以实现组装, 因此进行片段的酶切割更为方便, 应用这种方法也可以在一星期之内完成 TALEN 的构建^[31]。Li 等^[28]在已经构建的 100 个质粒的基础上, 同时结合 Golden gate 及 Gateway 技术可以在 24 h 内完成 TALEN 蛋白载体的组装。(4) FLASH 组装方法: 最近美国麻省总医院 Reyon 等^[32]在 *Nature Biotechnology* 上发表了他们开发的构建 TALEN 的新方法, 在已有的 376 个载体基础上,

首先把第一个 TALE 蛋白单元生物素化, 然后再把生物素化的 TALE 蛋白单元与磁珠相连, 这样就可以实现 TALE 蛋白单元的固定化, 随后的酶切酶连反应就可以在自动化仪器中快速完成。他们利用这种方法构建了针对含有 EGFP 报告基因的 48 个 TALENs 载体, 在含有 EGFP 报告基因的人细胞中显示 100% 有效; 针对人细胞的 96 个内源基因设计了 TALEN 蛋白, 证实其中的 84 个有效。他们预测使用这种方法一年内可以制造出超过 7 200 对 TALENs, 而平均每对的价格小于 200 美元, 这些让人欣喜不已。利用 FLASH 组装技术可以大规模地制备 TALEN, 这一点是目前所有筛选 ZFNs 技术达不到的, 因此在未来可以预见 TALEN 技术将在基因靶向操作领域大放光彩。

3 TALENs技术的应用

自 2009 年破译 TALE “机密” 以来, TALEN 技术已经应用到人细胞、植物细胞、酵母、斑马鱼及大、小鼠等模式生物中, 未来 TALEN 技术最具应用价值的领域莫过于基因治疗, 结合干细胞最新的研究成果, 如采用来自患者自身的 iPS 细胞, 利用 TALEN 技术对有缺陷的基因进行改造, 然后把改造后正常的细胞重新输入患者体内, 达到治疗疾病的目的。另外, 在大动物转基因方面, 通过 TALEN 技术实现基因敲进, 将会加快动物乳腺反应器等领域的研究步伐。

3.1 TALEN技术在人细胞中的应用

目前 TALEN 技术针对人基因组基因操作大部分在体外培养的细胞中进行, Sun 等^[25]为了选择最有效的 TALEN, 利用酵母双杂交系统筛选出 TALEN-AvrXa10 最优化的 C 末端和 N 末端组合, 然后根据这一组合设计出针对人镰状细胞病中 HBB 基因位点进行靶向切割的 TALEN。与之前的报道相比, 他们设计的 TALENs 可以有效地结合到 HBB 基因位点并进行有效切割, 切割后发生同源重组的能力比经典的方法提高了 1 000 倍, 而且没有观测到细胞毒性。Sun 等^[25]的研究表明, 优化后的 TALENs 是用于基因修改达到基因治疗的强有力工具。Bultmann 等^[24]对 TALENs 在人胚胎干细胞和 iPS 细胞是否如 ZFNs 一样能够对靶基因序列进行切割进行了评估, 他们选取了 5 个内源基因, 表明 TALEN 可以达到 ZFNs 的精确程度; Sun 等^[25]通过改造 TALE 蛋白的 C 端和 N 端氨基酸数目, 优化 TALEN 的效果, 点对点地比较 TALEN 与 ZFNs 在人细胞中

对内源基因 *NTF3* 和 *CCR5* 的删除效果,发现在效率大体相同的情况下,就目前所得到的实验数据显示 TALEN 所产生的细胞毒性比 ZFNs 小很多。

3.2 TALENs技术在模式生物中的应用

模式生物在基因研究中发挥了重要作用,找到一个合适的基因修饰工具将大大加快基因功能和生产应用的步伐。近年来 TALEN 技术已经在模式动物斑马鱼、小鼠、大鼠等和模式植物拟南芥中成功实现了内源基因的切割和改造。

斑马鱼是生命科学研究中重要的模式动物,长期以来一直缺乏高效的基因敲除方法。最近很多实验室建立了 ZFNs 用于敲除斑马鱼基因的技术平台,但是 ZFNs 筛选复杂,很难实现大规模对斑马鱼基因进行敲除^[20]。TALEN 技术以其快速获取和高效等优点将加快我们对斑马鱼用于基础研究的步伐,在 2011 年先后有两篇文章报道了 TALEN 技术在斑马鱼中的应用。Sander 等^[21] 为了比较 TALEN 与 ZFN 技术的差异,选取了用 ZFNs 实现过敲除的 *Gria3a* 和 *Hey2* 基因来验证 TALEN 的效果,发现两者的基因敲除的效率类似,但是 TALEN 所产生的细胞毒性要远远小于 ZFNs。Huang 等^[22] 则证实利用 TALEN 技术对斑马鱼基因进行切除后,携带基因突变的斑马鱼可以通过生殖细胞稳定传递到下一代,这为 TALEN 技术在其他脊椎动物的应用提供了实验依据。

随着大鼠胚胎干细胞系被建立,大鼠已逐渐成为研究人类疾病的首选模型。2009 年,科学家用 ZFN 技术在大鼠胚胎干细胞中完成了基因敲除实验。为了验证 TALEN 是否同 ZFNs 技术一样可以实现对大鼠基因的靶向操作,2011 年,美国科学家 Tesson 等^[23] 利用 TALEN 技术成功突变了大鼠 *IgM* 基因,并发现注射 TALEN-DNA 产生的突变率为 19%,而注射 mRNA 突变率可以提高到 59%。另外综合比较显示,TALEN 实现基因敲除的效率要比 ZFN 高两倍。

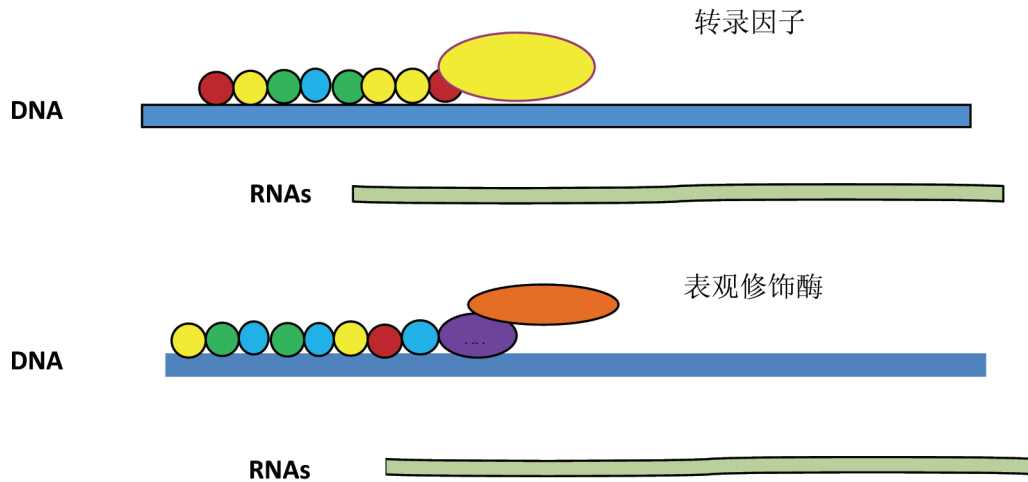
4 TALE蛋白的其他应用

TALE 蛋白不仅可以和 FokI 连接构成 TALE 核酸酶对特定基因进行切割,还可以和转录因子 (transcription factor, TF)、表观遗传修饰酶 (epigenetic modification enzyme, EME) 等结合组成 TALE- 调节蛋白系统来实现基因转录调控。Zhang 等^[29] 利用 Golden gate 组装方法构建了针对人内源基因 *SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*、*Oct4* 的 TALE-TFs,把它们转染进

293T 细胞后,通过 qRT-PCR 检测后发现 *Sox2* 和 *Klf4* 基因比对照组表达分别上调了 5.5 和 2.2 倍,这一结果表明 TALE-TF 可以用于基因表达调控,但是 *c-MYC* 和 *OCT4* 基因的表达并没有发生明显的改变,他们猜测可能与基因所在区域的染色体开放状态有关系。Bultman 等^[24] 通过抑制细胞内的组蛋白甲基化转移酶的功能来验证染色体状态是否影响 TALE-TFs 的作用,发现针对 *OCT4* 基因的 TALE-TF 的调节功能较未加入组蛋白甲基化酶抑制剂之前的 *OCT4* 的表达显著提升,这一研究结果为进一步改造和利用 TALE-TF 提供了有价值的参考。TALE 蛋白是否能与表观修饰酶如组蛋白甲基化转移酶、组蛋白乙酰化转移酶、组蛋白去乙酰化酶、DNA 羟化酶等连接在一起,通过改变表观遗传修饰来调控基因的表达目前仍处于设想阶段 (图 2),并没有实验数据证明。可以想象,在未来很可能开发出新的基因表达调控工具,用于生命科学研究。

5 TALENs技术展望

作为一种新兴的基因组定点修饰工具,TALEN 技术正受到越来越多的关注,在未来可能代替 ZFNs 技术成为基因定点修饰操作的主要技术。相比 ZFNs,TALEN 技术的优势是明显的:第一,TALEN 筛选更为简便,它不需要复杂的筛选过程,只需要简单的分子克隆技术就可以在实验室制造出高效的 TALEN,而 ZFNs 需要付出大量的劳动,甚至是巨额的花费;第二,TALEN 特异识别 DNA 序列的能力更强,用野生型不经改造的 FokI 产生的脱靶率要比 ZFNs 小,而 ZFNs 中 FokI 同源二聚化后会引起细胞毒性;第三,由于 TALEN 结合 DNA 序列更为严格,因此效率比 ZFNs 要高。特别是在一些难以通过传统方法实现基因打靶的模式生物、经济物种或建立的细胞系中,TALEN 技术将发挥不可替代的作用。同时,TALEN 在基因治疗领域将独具潜力,有望成为基因治疗的一个主要手段。但是目前 TALEN 技术还存在一些问题,主要包括以下几个方面:(1) 设计识别 20 个碱基序列的 TALEN 蛋白可能含有一千多个氨基酸,因而可能会引起机体的免疫反应,这将降低 TALEN 在细胞中的作用;(2) TALEN 也存在脱靶的问题,这可能由于细胞中染色体的状态引起,如 TALEN 技术对于处于异染色体结构中的基因序列没有效果;(3) TALEN 技术是否可以胜任掺入大的片段,目前 TALEN 技术的应用主要集中在基因敲除方面,但是否适合大片段的



理论上TALE蛋白可以与转录因子(转录激活子和转录抑制子)结合, 通过调节目基因启动子的活性影响基因转录产生RNAs; TALE蛋白还可以与表观修饰酶(DNA甲基化酶、组蛋白甲基化酶、组蛋白乙酰化酶等)结合, 对目的基因进行表观修饰, 进而调节转录活性。

图2 利用TALE蛋白调控基因表达的设计

基因插入还需进一步研究。

要实现TALEN技术的广泛应用, 在未来需要进一步改进和完善TALEN技术结合靶基因序列的数据库, 建立完善的TALEN信息平台, 以及优化TALE的密码子, 使其更有利于在哺乳动物细胞中发挥作用。可以预见, TALEN技术的发展将大大加快基因操作相关领域的研究步伐。

[参 考 文 献]

- [1] Cao F, Xie X, Gollan T, et al. Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12(1): 15-24
- [2] Du ZW, Hu BY, Ayala M, et al. Cre recombination-mediated cassette exchange for building versatile transgenic human embryonic stem cells lines. *Stem Cells*, 2009, 27(5): 1032-41
- [3] Chen YT, Hou PS, Ku AT, et al. PiggyBac transposon-mediated, reversible gene transfer in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(6): 763-71
- [4] Monetti C, Nishino K, Zhang P, et al. PhiC31 integrase facilitates genetic approaches combining multiple recombinases. *Methods*, 2011, 53(4): 380-5
- [5] Cathomen T, Joung JK. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1200-7
- [6] Li T, Huang S, Jiang WZ, et al. TAL nucleases (TALENs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359-72
- [7] Move over ZFNs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 681-4
- [8] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B, et al. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218(1): 127-36
- [9] Kay S, Hahn S, Marois E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 2007, 318(5850): 648-51
- [10] Gu K, Yang B, Tian D, et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 2005, 435(7045): 1122-5
- [11] Yang B, Sugio A, White FF, et al. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(27): 10503-8
- [12] Romer P, Hahn S, Jordan T, et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 2007, 318(5850): 645-8
- [13] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501
- [14] Miller JC, Tan S, Wang J, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-8
- [15] Mahfouz MM, Li L, Fang X, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623-8
- [16] Deng D, Yan C, Pan X, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720-3
- [17] Boch J, Scholze H, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [18] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-4

- [19] Maury JJ, Choo AB, Chan KK, et al. Technical advances to genetically engineering human embryonic stem cells. *Integr Biol: Camb*, 2011, 3(7): 717-23
- [20] Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, et al. Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN). *PLoS One*, 2009, 4(2): e4348
- [21] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 697-8
- [22] Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699-700
- [23] Tesson L, Usal C, Menoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695-6
- [24] Bultmann S, Morbitzer R, Schmidt CS, et al. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(12): 5368-77
- [25] Sun N, Liang J, Abil Z, et al. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. *Mol Biosyst*, 2012, 8(4): 1255-63
- [26] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(19): 636-46
- [27] Cermak T, Doyle EL, Wang L, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82
- [28] Li L, Piatek MJ, Atef A, et al. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol*, 2012, 78(4): 407-16
- [29] Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 149-53
- [30] Weber E, Gruetzner R, Werner S, et al. Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19722
- [31] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*, 2012, 7(1): 171-92
- [32] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460-5