

DOI: 10.11844/cjcb.2013.08.0052

分子“剪刀”——TALENs介导的定点基因修饰技术

何丽夏子¹ 陈海德² 肖磊^{2*}(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ²浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘要 转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effectors nucleases, TALENs)是最近新兴的又一种重要的基因工程工具, 利用其造成的DNA的双链断裂(double-strand break, DSB)可以介导各种高效率的遗传操作, 包括基因修复、基因打靶、基因定点插入等。该技术的突出优势在于, 相较于之前的方法, TALENs更容易实现在基因组上的定点修饰: TALENs中每一个重复片段(repeat)针对一个靶向基因的碱基, 使得其设计与构建更为容易且高效; 不存在对宿主基因组的外源基因插入; 有很好的可操作性, 对物种没有选择性; 并且可以在细胞和个体水平进行遗传操作。该文将就TALENs研究发展的历程及应用前景进行综述。

关键词 TALENs; 基因组定点修饰; 基因打靶

Molecular “Scissors” ——TALENs Mediated Site-specific Gene Modification Technology

He Lixiazi¹, Chen Haide², Xiao Lei^{2*}(Shanghai Institute for Biological Sciences, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Transcription activator-like effectors nucleases (TALENs), has been a new important genetic tools for targeted gene modification these years. TALENs are constructed to mediate multiple genetic manipulation including gene targeting, gene site-specific insertion or correction, through forming double-strand break (DSB). The advantage of this technology is that TALENs mediate site-specific modification much more easily compared to the former methods: each repeat of TALENs recognizes one base of target DNA, which makes the designation and construction of TALENs more efficiently, and TALENs are able to manipulate the genomes of different species without epigenetic gene insertion and manipulate genome in both cellular and organismal level. Here, we review the recent progress and prospects of TALENs technology.

Key words TALENs; site-specific genome modification; gene targeting

1 引言

目前, 科技的发展使得越来越多不同物种的基因组完成测序得以实现, 在此基础上研究物种中基因的功能也逐渐被科研工作者所重视。而在基因组上精确高效地进行定点基因修饰是进行基因组改造与研究基因功能的一个重要手段。比如在家畜中使用定点基因改造可以优化异种器官移植以及生物制

药产品, 还可以用于产生人类疾病模型^[1]。然而, 目前仅在小鼠^[2]和果蝇^[3]等少数模式生物中建立了较为成熟的基因敲除(knock-out)技术, 此外的绝大多数物种在这方面尚缺乏有效或成熟的技术手段, 从而严重阻碍了这些物种中基因功能研究的深度。

定点基因修饰主要是通过造成DNA的双链断裂(double-strand break, DSB)再利用细胞自身的同源重组(homologous recombination, HR)或非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)修复机制对基因组的特定位点进行各种遗传修饰。HR是通过外源基因与相应内源基因两侧的同源序列进行配

收稿日期: 2013-03-04 接受日期: 2013-05-03

*通讯作者。Tel: 0571-88982506, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

Received: March 4, 2013 Accepted: May 3, 2013

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982506, E-mail: leixiao@zju.edu.cn

网络出版时间: 2013-07-15 16:27

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130715.1627.006.html>

对,造成两者位置互换,从而实现外源基因定点插入,缺失或者替换。而NHEJ是指在不依赖同源性的情况下,两个DNA片段在DSB区域进行强行连接的修复机制,可能会导致小片段缺失或者插入。

针对这种情况,研究者在某些生物中发现了一些天然的蛋白结构域,它们能够识别特异的DNA序列,比如锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP),每个锌指蛋白特异识别三个碱基。锌指核酸酶(Zinc finger nuclease, ZFN)就是将多个锌指蛋白模块串联后与Fok I切割结构域融合而成的,Fok I通过二聚化产生核酸内切酶活性,在ZFP识别的序列附近造成DNA的双链断裂。利用ZFN在斑马鱼的基因组上产生DSB从而进行定点基因改造产生了许多突变^[4-7],而且在哺乳动物中用利用ZFN也成功的实现了基因改造^[7],对于研究基因功能或产生转基因动物意义巨大。因为ZFN是利用多个ZFP串联组装形成,受上下文依赖效应的影响,这些蛋白的氨基酸序列与靶点的DNA碱基序列之间并没有十分稳定的一一对应关系,并不能靶向所有序列^[8],而且能够影响邻近ZFP对DNA序列的识别,所以使用前需要大量的筛选和鉴定工作;此外,可能会产生脱靶切割,引入无法预期的基因突变或染色体变异^[9-10]。

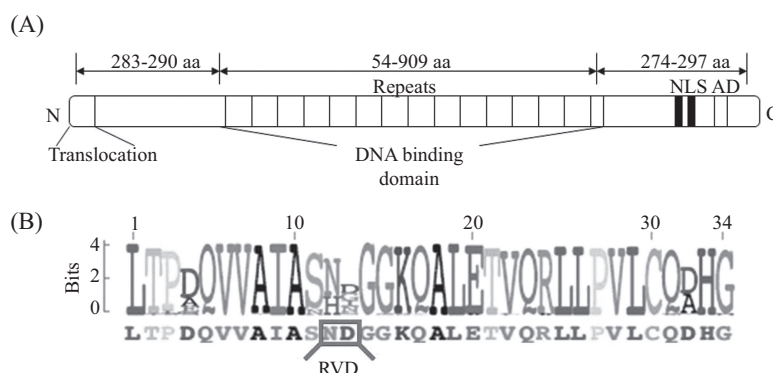
近年来,另外一种来自于植物病原微生物的菌体蛋白转录激活子样效应因子(transcription activator like effectors, TALEs)逐渐进入了研究者的视线。参考ZFN构建的思路,已有多个实验室报道将TALE上用于识别特异DNA序列的结合结构域融合到一个能在DNA序列上产生DSB的内切核酸酶的催化性结构域上(如Fok I),便产生了TALENs(transcription activator-like effectors nucleases),并使用该技术对包

括人类在内的多种物种的基因组实施定点修饰并获得了显著的效果。其基因定点修饰效率与先前开发的ZFN技术不相伯仲^[11-12]。本文将具体介绍TALENs技术成熟的过程及目前应用的状况及前景。

2 TALENs的结构和作用原理

TALE首先是在植物病原菌黄单胞菌属*Xanthomonas*中发现的一种菌体蛋白。早在1992年就有研究表明,该类病原微生物会通过T3S(type III secretion system)将TALE蛋白传送到植物细胞中,通过调节细胞特定基因的转录使得病原体在植物体中易于增殖、扩散以及产生毒害作用^[13]。进一步研究发现,TALE是一类比较保守的细菌蛋白,能够识别并结合特异的DNA序列^[14],使得该病原菌在感染过程中通过模拟宿主基因转录来实现对植物基因转录的调控^[15-20]。TALE蛋白的中游是DNA特异结合域(DNA-binding domain),其上下游都有一些信号位点,包括N-端的type III传送系统的信号位点(translocation),C-端的核定位信号位点(nuclear localization, NLS)、转录激活信号位点(transcriptional activation, AD)等。天然TALE中,DNA特异结合域一般是由串联的重复片段(repeats)组成,每个重复片段由33~35个氨基酸组成,最后一个重复片段一般只有20个氨基酸,所以被称为半重复片段(half-repeat)。天然TALE一般具有1.5到33.5个重复片段,每个片段负责靶向一个DNA碱基,并且研究人员发现,决定这种特异性识别的是重复片段中的第12~13位氨基酸,也被称为RVD(repeat variable di-residue)(图1B)。

正是因为天然TALE具有的这些特性,研究人员考虑通过合成人工设计的TALE用于靶向特定的



A: 天然TALE的基本结构; B: 34个氨基酸组成的repeats的一般序列。

A: the basic structure of natural TALE; B: an aa consensus sequence logo of a typical 34-aa repeats.

图1 天然TALE的一般性组成及结构(根据参考文献[11]修改)

Fig.1 The general composition and structure of natural TALE (modified from reference [11])

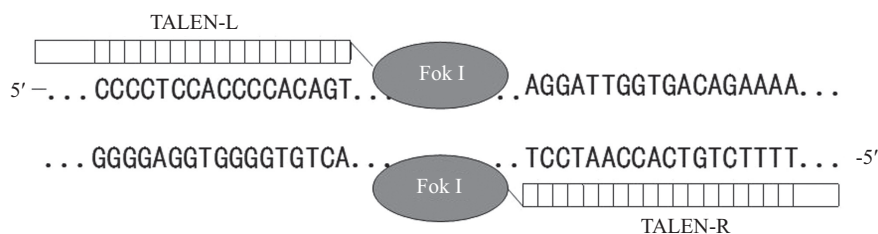


图2 TALEN实现DNA定点切割

Fig.2 DNA site-specific incision achieved by TALEN

DNA序列从而进行基因改造。TALE这一蛋白家族高度保守,主要的差别就是重复片段的数量和RVD^[21]。RVD与DNA碱基基本处于一对一的相对保守稳定关系。为了能够有效地使用TALE,研究者首先必须要确定每个碱基对应的相对保守的RVD。在2009年,就有两个研究团队分别发表了相关报道,比较完善地阐释了RVD与碱基的关系^[22-23]。如同密码子与氨基酸的关系,一些RVD倾向于识别特异性的碱基对,而另外的RVD则可以识别多个碱基对,如HD识别胞嘧啶、NG识别胸腺嘧啶、NI识别腺嘌呤、NN识别腺嘌呤和鸟嘌呤、IG识别胸腺嘧啶等等。

Fok I切割结构域来源于一种IIS型限制性内切酶Fok I,该酶具有两个功能域,N-端的DNA结合结构域识别结构域可以特异识别GGATG序列,然后利用C-端的DNA切割结构域在这段序列下游的同一条DNA链上9 bp处及互补链的13 bp处发生切割,留下一个4 bp的5'黏性末端。Fok I的切割活性依赖于其切割结构域的二聚化。1996年,研究者首次将ZFP蛋白与Fok I的C-端的切割结构域融合为ZFN,利用ZFN成功实现了对双链DNA的特异切割^[24]。对于Fok I切割结构域本身,已有多个研究组对其进行各种修饰,以增强切割效率、提高特异性和减少毒性等^[25-27]。由于野生型Fok I以同源二聚体的形式发生作用,为了防止自身二聚化导致非特异切割,研究者将Fok I进行突变使其在异源二聚化时才能实现有效切割。目前,研究者将Fok I切割结构域同TALE的C-端融合后构成TALEN单体,然后利用两个TALEN单体分别识别靶点的上下游,当两个TALEN单体各自的识别位点特异结合并且这两个位点在DNA双链上的距离和方向符合一定的要求,这两个Fok I切割结构域就可形成二聚体的活性形式,在两个结合位点的间隔区(Spacer)中发生切割,产生DSB(图2)。

3 TALENs的结构优化及组装技术的建立

经过对某些天然TALE的DNA靶点的分析,研究者发现,在识别位点的5'端是比较保守的碱基T,被认为是TALE识别靶向基因的一大关键。但是之后科研人员证明,当C-端域(C-terminal segment, CTS)的长度较短,如31个氨基酸的情况下,5'端为T确实可以增强TALE的结合效率;但是在CTS的长度较长(63~117个氨基酸)的情况下,5'端即使是其他三种碱基也不会对其结合效率有很大的影响^[28]。

在基因打靶时,重复片段同样是一个需要考虑的问题。重复片段数量越多其特异性越好,出现脱靶失误的概率就比较小,具有更好的安全性。研究人员发现,由34个氨基酸组成的重复片段具有比较合适的活性,并且天然的重复片段多数是34个氨基酸,可以为进一步人为改造TALENs提供丰富的原始参考模块。重复片段数量较少的TALE诱导基因表达的活性较弱。研究表明,至少需要6.5个重复片段才能够诱导基因表达,10.5个或者更多的重复片段则会表现出更强的诱导基因表达活性。

在TALENs发现之后,多个研究团队致力于研究其在动物细胞中的可行性并获得了成功。他们利用体外试验、酵母、真核细胞等验证体系明确了其特异性切割活性,其中TALENs形成的DSB能够通过HR或NHEJ进行修复^[29-31]。特别是在斑马鱼中使用TALENs成功获得了多种突变^[32-35]。研究人员还尝试研究一些影响TALENs作用活性和效率的因素,包括调整两个TALEN单体识别位点中间的Spacer长度、TALE NTS(N-terminal segment, NTS)和CTS数量、使用不同种类的李核糖体、改变细胞经TALENs处理后的培养条件、以及使用特异性更好的RVD^[11,36-37]等。因为天然TALE的N-端含有蛋白质分泌信号多肽,C-端拥有NLS以及AD,都会影响Fok I的剪切活性,所以Miller等^[36]将N-端序列减少到136个氨基酸,同时研究了不同数量的C-端氨基酸残基对TALENs效率的影响。他们发现当C-端残基数量为63个,就可以

介导有效的基因修饰,这种TALENs偏好Spacer的长度为12~20个碱基,如果偏长或偏短,都会对TALENs效率产生影响;TALENs的C-端残基最短到28个便可以产生酶切效率,但是此时Spacer的偏好性为12~13个碱基;而63个残基相较于28个残基的TALENs,TALENs效率有明显增加;此外,30 °C培养相较于37 °C培养,TALENs的效率更高,可能是因为在温度低时蛋白质识别核苷酸的效率上升^[36]。Sun等^[38]构建了10种含有不同数量NTS及CTS的TALENs,进行10×10的矩阵研究,确定了2种在人体细胞及酵母中都能产生高效率切割的TALENs,一种含有207个氨基酸的NTS和31个氨基酸的CTS;另一种含有207个氨基酸的NTS和63个氨基酸的CTS。另外,需要注意的是,当NTS的数量少于50个氨基酸,则无法对目的片段进行切割。值得一提的是,Miller等^[36]使用的含有137个氨基酸NTS和63个氨基酸CTS的TALENs框架被称为GoldyTALEN,为TALENs构建提供黄金依据。利用该TALENs已经成功完成对斑马鱼基因组的修饰^[36],而且在家畜的基因敲除过程中也可产生作用^[39]。Bedell等^[40]在GoldyTALENs的基础上,在NTS上替换9个氨基酸,在CTS上替换5个氨基酸,从而发展出第二代GoldyTALENs,并在斑马鱼基因操作体系中验证具有更高的效率。

因为TALENs是由多个重复片段组成的,每个重复片段只有中间的RVD不同,即编码重复片段的DNA序列相似度很高,并且编码整个TALENs的DNA序列很长,所以使用常规的DNA克隆技术如PCR等很难构建完成,会有可能产生重组及突变^[41];使用商业合成DNA很有效率,但是非常昂贵^[36];利用获得的模块序列连续连接便宜但是耗时巨大^[42]。所以近些年来,科学家们潜心研究,使得TALENs构建技术得到长足的发展。首先,基于基本的克隆技术,Sander及其同事创建了限制性酶切连接方法(restriction enzyme and ligation, REAL),使单个的重复片段拼接在一起来构建TALENs^[32]。他们利用DNA合成方法构建了一个识别各个碱基的TALE重复片段的质粒库;然后用限制性内切酶切割并且将两个相邻的重复片段连接在一起;再将两个连接好的聚合片段用相同的酶切连接方法连接在一起实现四个重复片段的连接;重复以上步骤直到合成目的片段。后来又有研究组利用Nhe I与Spe I的同尾酶关系,简化了该方法^[33]。此后发展起来的Golden Gate Cloning

方法更是大大提高了合成TALENs的速度^[8-11,37]。该方法引入了IIS型限制性内切酶,因为其切割位点在识别位点的外侧,酶切后产生独特的四碱基黏性末端。因为这种内切酶的识别序列与切割序列并不相同,可以形成不同的黏性末端,所以利用不同的PCR引物导入设计好的相应的序列就可以使相邻的重复片段产生互补的粘性末端;而之后由于正确连接的片段不存在被内切酶识别的位点,所以不能被再次切割。正是由于以上优势,该方法可以将酶切与连接在同一个反应体系内完成,一轮可以连接6~10个片段,所以利用两轮即可以完成TALENs的构建。如此构建的15对针对不同物种包括哺乳动物、斑马鱼、果蝇、植物的TALENs都具有活性。使用这种方法获得TALENs比通过商业合成获得TALENs更加经济而且快捷。基于这种方法发展出单步Golden Gate方法,先构建三聚或者四聚重复片段组成的库,可以在两天内得到设计好的TALENs,证明构建TALENs非常快捷简易,为TALENs的广泛应用提供基础^[43]。之后又快速发展起固相连接合成法(solid-phase ligation strategy)使得TALENs高通量合成成为现实^[38,44-45]。该方法使用链霉亲和素包被的磁珠,其上含有DNA双链受体,可以不断向磁珠单向募集TALE的重复片段,最后将游离的TALE重复片段洗去就可以快速得到所需的TALENs,简化了构建TALENs的步骤。最近,不依赖连接的克隆(ligation-independent cloning, LIC)技术又发展起来^[46],LIC依赖更长(10~30 bp)的非回文结构末端进行两个片段的相互连接,该片段是由T4 DNA聚合酶的3'-5'外切酶活性造成的,两个片段退火后可以进行特异性连接,并且该退火产物可以直接进行转化,在三天之内完成18.5个重复片段的TALENs构建。

为了简化TALENs的设计及构建,Bogdanove和Voytas实验室还开发了一个设计TALENs的软件,其网址为<http://boglabx.plp.iastate.edu/TALENT/>,人们可以根据自己的需要设计相应的TALENs;此外,研究人员还提供了网址<http://eendb.zfgenetics.org/>,可以设计包括TALENs和ZFN在内的序列^[47];而且,Ad-gene公司也提供了相应的质粒库,保证在5天之内利用1~2个反应完成TALENs的构建。

4 总结与展望

目前,除了TALENs之外,还有多种基因操作的重要工具,包括ZFN、大范围核酸酶(meganucleases)、

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)可以介导DNA双链断裂。大范围核酸酶是一种活性高、特异性强的核酸内切酶,但是很难识别特异DNA片段,所以在定点基因操作中应用价值不高;组装ZFN识别特定DNA片段相对容易,可是需要前期大量筛查,还需要承担脱靶的风险;最近兴起的CRISPR介导的DNA断裂系统可以用于基因操作^[48-49],其设计构建简单快捷且效率很高,但是也存在脱靶以及PAM(proto-spacer adjacent motif)限制打靶位点的问题。而相比上述方法,TALENs具有高特异性以及模块性的优势。但是TALENs也存在一些不足:首先,TALENs的重复片段很多,导致其序列偏长,也许会限制其广泛应用;在真核细胞中,表观遗传修饰也会对TALENs的识别造成影响;与ZFN相比,TALENs的脱靶效率较低,但依然还是存在脱靶情况,这一缺陷使得TALENs的应用存在着一些限制以及不确定性,特别是在基因治疗等领域;此外,ZFN已经被证明其免疫原性非常低,并不会影响细胞水平和个体水平操作,而TALENs的免疫原性还需要进一步验证。综上,无论是先驱ZFN还是后来者TALENs都还有很长的一段路要走,它们都有不断完善和进步的空间。

应用TALENs实现基因组定点修饰的过程包括以下步骤:首先要确定目标序列,通过软件或人工寻找合适的TALENs候选靶位点(如果目的是突变基因,一般选比较靠前的外显子内的靶位点),然后构建与之高效特异结合的TALENs。其次,将TALENs转入生物体或培养细胞中进行基因组定点修饰操作。再次,检验修饰结果和脱靶切割情况,筛选突变体等。

到目前为止,已有多个研究团队成功地使用TALENs对大鼠、猪、人等高等动物细胞进行了基因修饰^[39,42-43]。研究中TALENs在基因组订制(genome customization)方面表现出较高的效率和潜力。同时,由于该技术原理与操作简单、对细胞使用要求不高,使其有可能适用于包括动植物在内的大多数物种及各种体外培养细胞,成为很有前景的一种新型基因打靶技术。在大动物中利用TALENs在基因组上进行基因修饰、敲除等操作对于提高家畜的生产性状,提高其耐性都有巨大的应用前景;而且可以在这些大动物上建立人类疾病模型,为研究人类疾病的发生和发展提供依据;此外,可以对异种器官移植进行优化,提高病人的生存几率。正是由于高效快速的TALENs技术的发现,研究人员在人类全基因组上进

行定点基因打靶成为了现实,利用人类多能性干细胞(包括胚胎干细胞和iPS细胞)可以产生人类疾病模型,为研究各种疾病产生的机制以及药物筛选提供依据;也可以对病人本身的病变细胞进行基因改造,从而实现个体化细胞治疗,在临床应用方面有着不可小觑的前景。

人类知识的拓展往往离不开技术的进步。基于胚胎干细胞的基因敲除技术和诱导转录后基因沉默的RNAi技术曾为遗传学与发育生物学的研究带来了有目共睹的影响。可以预见,TALENs技术的发展也必将使遗传与发育的研究再次产生革命性的飞跃。

参考文献 (References)

- 1 Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, *et al.* Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 2008; 321(5897): 1837-41.
- 2 Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244(4910): 1288-92.
- 3 Bellaiche Y, Mogila V, Perrimon N. I-SceI endonuclease, a new tool for studying DNA double-strand break repair mechanisms in *Drosophila*. *Genetics* 1999; 152(3): 1037-44.
- 4 Foley JE, Yeh JR, Maeder ML, Reyon D, Sander JD, Peterson RT, *et al.* Rapid mutation of endogenous zebrafish genes using zinc finger nucleases made by Oligomerized Pool ENgineering (OPEN). *PloS One* 2009; 4(2): e4348.
- 5 Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, *et al.* Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2008; 26(6): 702-8.
- 6 Traver D, Paw BH, Poss KD, Penberthy WT, Lin S, Zon LI. Transplantation and *in vivo* imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat Immunol* 2003; 4(12): 1238-46.
- 7 Orlando SJ, Santiago Y, DeKolver RC, Freyvert Y, Boydston EA, Moehle EA, *et al.* Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(15): e152.
- 8 Geissler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens SE, *et al.* Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS One* 2011; 6(5): e19509.
- 9 Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 2012; 7(1): 171-92.
- 10 Weber E, Gruetzner R, Werner S, Engler C, Marillonnet S. Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. *PLoS One* 2011; 6(5): e19722.
- 11 Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(21): 9283-93.
- 12 Kim H, Kim MS, Wee G, Lee CI, Kim JS. Magnetic separation and antibiotics selection enable enrichment of cells with ZFN/TALEN-induced mutations. *PLoS One* 2013; 8(2): e56476.
- 13 Hopkins CM, White FF, Choi SH, Guo A, Leach JE. Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae*

- pv. *oryzae*. Mol Plant Microbe Interact 1992; 5(6): 451-9.
- 14 Boch J, Bonas U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. Annu Rev Phytopathol 2010; 48: 419-36.
 - 15 Kay S, Bonas U. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. Curr Opin Microbiol 2009; 12(1): 37-43.
 - 16 Bai J, Choi SH, Ponciano G, Leung H, Leach JE. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. Mol Plant Microbe Interact 2000; 13(12): 1322-9.
 - 17 Gu K, Yang B, Tian D, Wu L, Wang D, Sreekala C, et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 2005; 435(7045): 1122-5.
 - 18 Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. Science 2007; 318(5850): 648-51.
 - 19 Romer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. Science 2007; 318(5850): 645-8.
 - 20 Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes OsTFIIAgamma1 and OsTFX1 during bacterial blight of rice. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(25): 10720-5.
 - 21 Yang B, Sugio A, White FF. Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol Plant Microbe Interact 2005; 18(2): 142-9.
 - 22 Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science 2009; 326(5959): 1509-12.
 - 23 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science 2009; 326(5959): 1501.
 - 24 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(3): 1156-60.
 - 25 Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. Mol Cell Biol 2001; 21(1): 289-97.
 - 26 Handel EM, Alwin S, Cathomen T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. Mol Ther 2009; 17(1): 104-11.
 - 27 Shimizu Y, Bhakta MS, Segal DJ. Restricted spacer tolerance of a zinc finger nuclease with a six amino acid linker. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19(14): 3970-2.
 - 28 Sun N, Liang J, Abil Z, Zhao H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. Mol Biosyst 2012; 8 (4): 1255-63.
 - 29 Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. Nucleic Acids Res 2011; 39(14): 6315-25.
 - 30 Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. 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.
 - 31 Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(50): 21617-22.
 - 32 Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. Nat Biotechnol 2011; 29(8): 697-8.
 - 33 Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. Nat Biotechnol 2011; 29(8): 699-700.
 - 34 Cade L, Reyon D, Hwang WY, Tsai SQ, Patel S, Khayter C, et al. Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs. Nucleic Acids Res 2012; 40(16): 8001-10.
 - 35 Moore FE, Reyon D, Sander JD, Martinez SA, Blackburn JS, Khayter C, et al. Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs). PloS One 2012; 7(5): e37877.
 - 36 Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 2011; 29(2): 143-8.
 - 37 Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, 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.
 - 38 Briggs AW, Rios X, Chari R, Yang L, Zhang F, Mali P, et al. Iterative capped assembly: Rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. Nucleic Acids Res 2012; 40(15): e117.
 - 39 Carlson DF, Tan W, Lillico SG, Stverakova D, Proudfoot C, Christian M, et al. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(43): 17382-7.
 - 40 Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug RG 2nd, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. Nature 2012; 491(7422): 114-8.
 - 41 Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. Nat Biotechnol 2011; 29(2): 149-53.
 - 42 Tong C, Huang G, Ashton C, Wu H, Yan H, Ying QL. Rapid and cost-effective gene targeting in rat embryonic stem cells by TALENs. J Genet gGenomics 2012; 39(6): 275-80.
 - 43 Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. Cell Stem Cell 2013; 12(2): 238-51.
 - 44 Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. Nat Biotechnol 2012; 30(5): 460-5.
 - 45 Wang Z, Li J, Huang H, Wang G, Jiang M, Yin S, et al. An integrated chip for the high-throughput synthesis of transcription activator-like effectors. Angew Chem Int Ed Engl 2012; 51(34): 8505-8.
 - 46 Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Kaiser V, Honing K, Hornung V. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. Nat Biotechnol 2013; 31(1): 76-81.
 - 47 Xiao A, Wu Y, Yang Z, Hu Y, Wang W, Zhang Y, et al. EENdb: A database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering. Nucleic Acids Res 2013; 41(Database issue): D415-22.
 - 48 Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 2013; 339(6121): 819-23.
 - 49 Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol 2013; 31(3): 230-2.