

特约综述



本实验室对体外培养的胚胎干细胞和体内的着床前胚胎进行研究,以加深对维持和建立多能性(pluripotency)分子机制的理解,进而改进现有的建立和维持多能性干细胞的方法。主要研究方向包括:(1)小鼠胚胎干细胞维持多能性的分子机制;(2)小鼠胚胎早期发育中调控发育潜能和细胞命运决定的机制。

<http://chenly-lab.org/>

DNA剪刀——TALEN和CRISPR/Cas

倪培凌 刘畅 陈凌懿*

(南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要 对基因组中特定位点进行修饰的实验手段称为基因组编辑。它在研究基因的功能和基因修复以及细胞替代治疗上有广泛的应用前景。该文将回顾基因组编辑技术的最新进展和应用,着重介绍两种最新出现的序列特异核酸酶——TALEN和CRISPR/Cas在基因组编辑技术中的应用。

关键词 基因组编辑; TALEN; CRISPR/Cas

DNA Scissors – TALEN and CRISPR/Cas

Ni Peiling, Liu Chang, Chen Lingyi*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Genome editing refers to the experimental technique which could modify the DNA sequence at a certain region in the genome. It has important application value in studying the function of genes, as well as gene correction and cell replacement therapy. In this paper, we summarize the recent progress and application of genome editing technology, with emphasis on two sequence-specific nucleases — TALEN and CRISPR/Cas.

Key words Genome editing; TALEN; CRISPR/Cas

研究基因生物学功能的主要手段是通过对其进行修饰以影响其功能, 这些修饰包括基因敲除、突变或过表达。传统的正向遗传学, 通过化学诱变或转座子介导的突变来研究基因功能, 但是这些筛

国家自然科学基金(批准号: 31271547)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2010CB833603)、教育部2013新世纪优秀人才支持计划和国家基础学科人才培养基金(批准号: J1103503)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-23505821, E-mail: lingyichen@nankai.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271547), the National Key Basic Research and Development Program of China (Grant No.2010CB833603), the Program for New Century Excellent Talents and the Funds for National Basic Science Personnel Training (Grant No.J1103503)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23505821, E-mail: lingyichen@nankai.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-23 14:35 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.9001.html>

选最主要的限制因素就是不能进行特定位置的修饰。而同源重组介导的基因敲除或敲入,虽然可以准确地对特定基因进行修饰,但其操作步骤多,且效率偏低,在应用上有一定的局限性。因此,遗传学家们一直期待一种可高效地编辑任何基因序列的实验手段——基因组编辑(genome editing)。近几年来,基因组编辑的实验技术得到了快速的发展。我们将在此综述中总结基因组编辑技术的最新进展及其应用,着重介绍转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和CRISPR/Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)这两种技术。

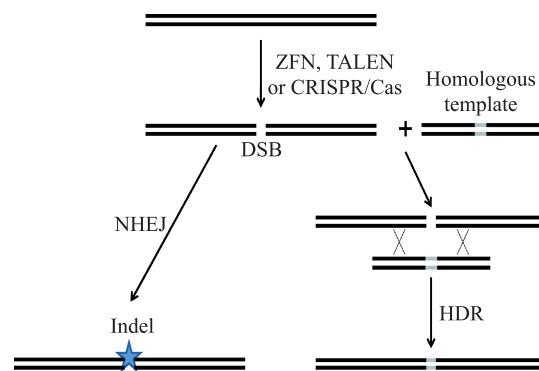
现在的基因组编辑技术主要依赖于一些识别特定序列的核酸酶在DNA上切割,产生双链DNA断点,然后通过非同源末端连接机制(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组机制(homologous recombination)来修复DNA断点,与此同时,对DNA断点附近的序列进行编辑(图1)。非同源末端连接修复机制可以将断裂的双链末端直接连接起来,在修复的过程中容易出现插入或缺失突变:如果造成移码突变,则会使基因的功能遭到破坏,从而实现基因的敲除;如果删除或插入的DNA片段的碱基数正好是3的整数倍,则在蛋白水平上导致氨基酸残基的缺失或增加,也可能对蛋白的功能有影响。双链DNA断点产生后,若同时引入模板DNA序列,通过同源重组的作用,可以根据所设计的模版,插入特定的一段序列(knock in)、删除特定的序列(knock out)或突变特定的碱基或序列。引入的模版序列可以是单链DNA,也可以是带有长的同源臂的双链DNA。同源重组修复机制和传统意义上的同源重组介导的基因敲除和敲入没有本质的区别,但是因为双链DNA断点的存在,可大大提高在DNA断点处同源重组的概率,从而保证了基因组编辑的效率。同源重组修复机制发生的概率要比非同源末端连接修复机制低,但由于该机制在修复的过程中有同源链作为模板,因此可以实现精确的突变。

目前,已成功应用于基因组编辑技术的序列特异性的核酸酶包括锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、TALEN和CRISPR/Cas。锌指核酸酶技术利用一个锌指结构域可识别三个DNA碱基的原理来设计,可以对基因组上特定位点进行精确的修饰,

但因为锌指结构域识别DNA的特异性不高,导致其成功率低,需要构建多个ZFNs,并从中筛选特异性和切割效率均高的ZFNs^[1-2]。所以,随着TALEN和CRISPR/Cas技术的出现,更多的科学家选择了TALEN和CRISPR/Cas来进行基因组编辑。

1 转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)

转录激活子样效应因子(transcription activator-like effector, TALE)最初是在植物致病菌黄单胞杆菌属(*Xanthomonas*)中发现的。这类植物致病菌通过III型分泌系统将TALE蛋白注射到植物细胞质中,然后TALE被转运到细胞核中,模拟真核细胞的转录因子指导宿主细胞基因转录^[3-5]。TALE的结构包括几个重要功能部分:核定位信号和C-端的酸性激活区,位于中间的结合DNA的串联重复区域^[6-7]。中间的DNA结合区域由一系列数目可变的可重复单元构



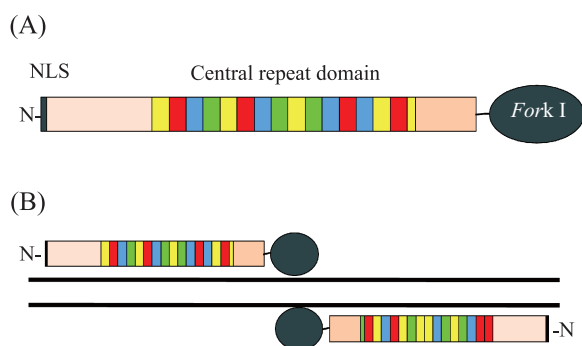
在序列特异核酸酶(包括ZFN、TALEN或CRISPR/Cas)的作用下,在特定位点上造成双链DNA断点,然后此断点通过非同源末端连接或者通过同源重组进行修复。不正确的非同源末端连接修复后在基因组DNA可导致插入或删除突变,但插入或删除的DNA大小不可控;同源重组介导的修复需要供体同源模板DNA(可以是双链或单链DNA),根据不同的模板进行修复可导致与模板DNA一致的插入或点突变。DSB: 双链DNA断点; NHEJ: 非同源末端连接; HDR: 同源重组介导的修复; Indel: 插入或删除。

Double strand break (DSB) is generated by sequence-specific nucleases, including ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas. Subsequently, DSB is repaired either through non-homologous end joining (NHEJ) or homology directed recombination (HDR). Imperfect NHEJ repair leads to insert or delete (indel) at the DSB site. HDR requires homologous DNA donor, and the insertion or point mutation introduced to the DSB site is identical to donor DNA. DSB: double strand break; NHEJ: non-homologous end joining; HDR: homology directed repair; Indel: insert or delete.

图1 现有基因组编辑技术的基本原理

Fig.1 The mechanism of current genome editing technology

成,天然TALE的可重复单元数目一般为8.5~28.5个,常见的为17.5个^[7-8]。每个重复单元包括33~35个氨基酸,特异识别一种碱基。在这33~35个氨基酸中,位于第12和第13位的两个相邻的氨基酸决定了这个重复单元所特异识别的碱基,这两个氨基酸被称为重复可变双残基(repeat variable di-residue, RVD)^[9],这两个氨基酸决定了每个重复单元所识别的DNA碱基,例如:HD识别C、NI识别A、NG识别T、NN识别A或G^[7,10]。基于每个重复单元对应一个碱基,可将不同的重复单元串联起来,通常为14~20个重复单元,使之识别特定的DNA序列。然后在N-端加上核定位信号,并在C-端融合上Fork I核酸内切酶的切割区,就构建成了TALE核酸酶(TALE nuclease, TALEN)(图2A)。由于Fork I需要形成二聚体发挥切割作用,因此需要一对TALEN共同起作用。两个TALEN识别的DNA位点之间的DNA序列片段称为spacer,一般为14~18 bp^[8]。两个TALEN结合到各自的DNA序列上,此时,两个TALEN中Fork I核酸内切酶结构域可在spacer处形成二聚体,将DNA进行切割,形成双链DNA断点(图2B)^[11]。而TALEN切割位点的特异性由两个TALEN的识别序列共同决定。如每个TALEN识别16个碱基的DNA序列,那么TALEN的切割点的特异性就由32个碱基长度的DNA序列决定。因此,TALEN切割DNA的特异性高,这在许多实验中也得到了证实^[12-13]。



A: TALEN的重要功能区包括氮端的核定位信号(NLS),中部重复区和碳端的Fork I酶催化区; B: 两个TALEN结合到双链DNA相近的两个位点上,此时, Fork I酶催化区形成二聚体并切割双链DNA。

A: a TALEN is composed of three important functional regions, a nuclear localization signal (NLS) at the N-terminus, a central repeat domain and a Fork I catalytic domain at the C-terminus; B: two TALENs bind to two neighboring DNA sites allowing Fork I domains to dimerize and cleave DNA.

图2 TALEN的结构和作用机制

Fig.2 The structure and mechanism of TALEN

相比ZFN技术,TALEN的DNA识别序列由串联的重复单元决定,一个重复单元对应一个碱基,因此,TALEN的设计思路简单,而且靶向更长的DNA序列以保证切割位点的特异性^[14-15]。因此,TALEN技术出现后很快被众多实验室采用。

2 CRISPR/Cas系统

CRISPR/Cas技术是最近兴起的一项基因编辑技术。CRISPR的全称为成簇的、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)。早在1987年,科学家就已经发现在细菌中存在CRISPR序列,但该序列一开始并没有引起人们足够的重视。随着研究的深入,科学家已经在许多细菌和古生菌中发现了CRISPR序列和CRISPR相关(Cas)基因。CRISPR/Cas系统是细菌和古细菌中的一种免疫保护机制,该系统可以介导外源DNA的降解,从而抵御病毒等外来入侵者^[16-17]。目前,已发现了三种类型的CRISPR/Cas系统。每种CRISPR-Cas系统均包含具有核酸酶活性的CRISPR相关(Cas)基因和决定切割位点特异性的非编码RNA^[18-21]。II型CRISPR/Cas系统在发挥功能时仅需要一种蛋白,即Cas9核酸酶参与;而I、III型CRISPR/Cas系统则需要多种蛋白形成复合物才能行使功能^[20]。因此,II型CRISPR/Cas系统比其他两种CRISPR系统更为简便,因此最适合在基因组编辑中应用。现在基因组编辑中CRISPR/Cas技术也主要是应用Cas9系统。Cas9核酸酶复合体由Cas9蛋白和两个非编码的RNA-crRNA前体(precursor CRISPR RNA, pre-crRNA)和trans-activating crRNA (tracrRNA)组成。在酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)中,pre-crRNA和tracrRNA均由CRISPR位点上转录而来,然后pre-crRNA通过其含有的重复序列(direct repeat)和tracrRNA形成RNA异二聚体,并结合到Cas9蛋白上,Cas9蛋白再对pre-crRNA进行剪切以获得成熟的crRNA,成熟的crRNA上长度为20个碱基的向导序列(guide sequence)通过与目的DNA的序列互补来引导整个Cas9复合体去切割目的DNA(图3A)。除了成熟的crRNA上的向导序列外,在向导序列的3'端,Cas9识别的DNA位点还必须有一个PAM(protospacer adjacent motif)区域。在酿脓链球菌的CRISPR系统里,紧跟于靶序列后的PAM序列是5'-NGG^[22]。而Cas9识别位点的特异性就由

20个碱基的向导序列和3个碱基的PAM序列共同决定。这样的CRISPR/Cas系统应用于基因组编辑时,就需要表达Cas9蛋白、pre-crRNA和tracrRNA三个组分^[23]。研究发现,将pre-crRNA和tracrRNA构建成一个融合RNA(single-guide RNA, sgRNA)来模拟成熟的crRNA和tracrRNA,同样可以与Cas9共同作用特异地切割目的DNA,从而将CRISPR/Cas系统简化成Cas9蛋白和sgRNA两个组分(图3B)^[22,24]。此外,我们实验室应用Cas9系统时发现,在大多情况下,Cas9蛋白和sgRNA两个组分切割DNA的效率比Cas9蛋白、pre-crRNA和tracrRNA三个组分的效率高。

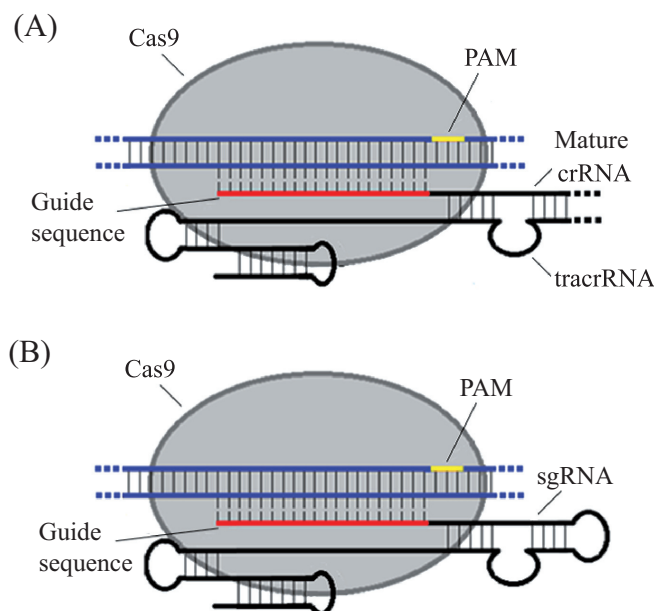
3 TALEN和CRISPR/Cas的比较

TALEN和CRISPR/Cas技术从设计原理上都很简单,易于推广。TALEN技术是根据一个重复单元对应一种碱基,将多个重复单元串联在一起来决定识别序列的特异性。而CRISPR/Cas技术则依赖于crRNA或sgRNA上20个碱基的向导序列与目的DNA的互补,以及紧跟于靶序列后的PAM序列来决定切割位点的特异性。整体来说,CRISPR/Cas切割DNA的效率要高于TALEN^[23,25]。所以,利用CRISPR/Cas

系统的高效切割,可同时对基因组的多个位点进行切割和修饰,甚至用一次注射多个sgRNA和模板DNA获得条件敲除的小鼠^[26-28]。

从TALEN或Cas9的质粒构建上来看,CRISPR/Cas系统也相对简单。TALEN技术中需要将多个重复单元通过分子克隆或是以固相为基础的TALE重复组装方法串联起来^[12,14-15,29-31];而CRISPR/Cas系统中只需改变sgRNA或crRNA中20或30个碱基的向导序列即可,一步简单的分子克隆实验就可完成^[23-24]。因为sgRNA的长度仅仅为约100个碱基,通过化学合成的方法也可获得。

但是,从切割位点的特异性来说,TALEN要比CRISPR/Cas系统更好。TALEN切割位点的特异性由两个TALEN的识别序列共同决定。如每个TALEN识别16个碱基的DNA序列,那么TALEN的切割点的特异性就由32个碱基长度的DNA序列决定,即在 4^{32} (1.84×10^{19})个碱基长度的随机DNA序列中才会发现一个TALEN切割位点。而CRISPR/Cas的特异性取决于20个碱基的向导序列和PAM序列(如Cas9的5'-NGG),那么在 4^{22} (1.76×10^{13})个碱基长度的随机DNA序列中就会发现一个Cas9的切割位点。此



A: crRNA与tracrRNA形成复合物介导Cas9蛋白切割目的DNA示意图; B: sgRNA介导Cas9蛋白切割目的DNA示意图。Cas9复合体通过向导序列(guide sequence, 图中用红色标注)与DNA靶位点(蓝色标注)结合,而且靶序列下游必须为PAM区域(黄色标注)。

A: schematic illustration of the crRNA:tracrRNA complex-guided Cas9 nuclease; B: schematic illustration of the sgRNA-guided Cas9 nuclease. The Cas9 complex recognizes its DNA target through the pairing between the guide sequence (marked with red) and the target DNA sequence (marked with blue) upstream of a PAM (marked with yellow).

图3 RNA介导Cas9蛋白切割目的DNA示意图

Fig.3 Schematic illustration of RNA-guided Cas9 nuclease

外, CRISPR/Cas向导序列5'端的若干个碱基与识别位点的互补的要求不严格, 突变向导序列5'端的1~3个碱基只是降低了Cas9的切割效率, 并不完全阻止Cas9对错配DNA的切割^[23,28]。尽管Cas9切割位点还要求PAM序列——5'-NGG, 但Cas9仍能以一定的效率识别并切割序列为5'-NAG的PAM序列, 进一步降低了Cas9的特异性^[32]。即使CRISPR/Cas技术的特异性稍低, 但在对CRISPR/Cas介导获得的基因修饰小鼠和胚胎干细胞进行DNA序列分析后, 也只是发现少量的脱靶现象, 而且脱靶的位点主要是只含有1~2个错配碱基, 且错配碱基靠近sgRNA识别位点5'端^[28]。这样, 我们在选择CRISPR/Cas切割位点时, 可对全基因组序列进行全面的分析, 以降低脱靶的概率。

为了进一步提高CRISPR/Cas系统的特异性, 可通过对Cas9蛋白的突变来调控Cas9蛋白的核酸酶活性。Cas9蛋白含有HNH和RuvC两个带核酸酶活性的结构域, 切割DNA时, HNH结构域切割与crRNA向导序列互补的DNA单链, 而RuvC结构域则剪切非互补DNA单链, 从而形成双链DNA断点^[22]。如果将RuvC结构域中一个天冬氨酸突变为丙氨酸(D10A), 则可以使RuvC结构域失去核酸酶活性, 导致突变的Cas9蛋白(Cas9n)只能在双链DNA上产生单链缺口(nick)。这样, Cas9的内切酶活性就变为Cas9n的切口酶活性(nickase)。为了在DNA上切割产生双链DNA断点, 就需要用Cas9n和一对sgRNA分别在双链DNA的每条单链上切出单链缺口。而只被一个Cas9n切割产生的单链缺口会被高保真性的碱基切除修复途径(base excision repair, BER)修复, 不会在基因组DNA上造成突变。这时, 双链DNA断点的特异性就由两个sgRNA的识别位点共同决定, 即在 $4^{22} \times 4^{22} (3.09 \times 10^{26})$ 个碱基长度的随机DNA序列中才会发现一个同时被两个Cas9n切割的位点。因此, 通过用两个Cas9n产生两个单链DNA缺口以造成双链DNA断点的策略, 可有效地提高CRISPR/Cas系统的特异性, 而且此方法并不降低双链DNA断点产生的效率^[33]。

4 TALEN和CRISPR/Cas的应用及前景

TALEN和CRISPR/Cas都能有效地切割DNA以产生双链DNA断点, 是基因组编辑中可利用的有效工具, 改变了传统的基因敲除和敲入动物的构建方

法。传统的基因敲除和敲入需要在胚胎干细胞上完成基因组DNA的遗传修饰, 然后将修饰后的胚胎干细胞注射到囊胚中获得嵌合体后代, 再通过生殖系转移才能获得基因敲除或敲入动物。这样的操作耗时长, 且成功率低。而应用TALEN和CRISPR/Cas, 可将编码TALEN的mRNA, 或将编码Cas9的mRNA和sgRNA, 注射入受精卵中。TALEN和CRISPR/Cas切割产生的双链DNA断点, 如果通过NHEJ修复, 造成移码突变, 可导致基因功能的丧失, 则造成基因敲除; 在TALEN和CRISPR/Cas切割DNA的同时, 提供单链或双链的模板DNA, 可通过同源重组修复断点以引入特定的突变或者是插入DNA片段。利用TALEN或CRISPR/Cas, 已经获得了基因敲除或敲入的大鼠、小鼠、斑马鱼、家畜、果蝇、水稻、小麦、烟草和拟南芥等^[14,26-28,34-46]。因为CRISPR/Cas的高切割效率, CRISPR/Cas技术可同步一次性地敲除两个甚至多个基因^[26-27]。更重要的是, CRISPR/Cas系统可同时对两个位点切割, 然后在单链DNA模板的介导下进行同源重组, 在两个位点同时引入LoxP序列, 从而构建条件性敲除的位点, 这就大大缩短了构建条件性敲除转基因动物的时间^[28]。

TALEN和CRISPR/Cas介导的基因敲除和敲入在细胞水平上也可实现, 不仅可促进基因功能的研究, 还可应用于疾病模型的建立和细胞替代治疗。在构建疾病模型上, Piganeau等^[47]利用TALEN技术将细胞的两条染色上特定位置切断并重新结合, 模拟间发性大细胞淋巴瘤(anaplastic large cell lymphoma, ALCL)相关的染色体易位。在疾病治疗方面, 将病人来源的iPS细胞中致病突变通过TALEN技术进行修正, 为诸如镰刀形红细胞贫血症和地中海贫血症这样的血液疾病的细胞替代治疗提供了可能^[48-49]。隐性营养不良性大疱性表皮松解(recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB)是由COL7A1基因缺陷导致的, 通过TALEN介导的病人特异基因突变的原位修正, 将可能治疗这种疾病^[50]。除了基因组DNA, TALEN技术还可以消除突变的异常线粒体, 治疗线粒体基因突变导致的疾病^[51]。

总之, TALEN和CRISPR/Cas技术的出现, 大大提高了科学家对基因组序列进行修饰和编辑的能力, 这将推动对基因功能的研究, 也将促进细胞替代治疗的应用。而作为两个新兴的基因组编辑的技术, TALEN和CRISPR/Cas技术还处在不断发展的阶段,

技术的完善和优化, 将克服现有的一些缺点, 例如 CRISPR/Cas 技术的脱靶效应, 进一步提高 DNA 切割的效率, 使得 TALEN 和 CRISPR/Cas 技术有更广阔的应用。除了改进切割 DNA 的核酸酶的效率和特异性外, 如何更好地激活细胞自身的同源重组活性, 进一步提高同源重组介导的基因组编辑效率, 也是基因组编辑技术发展中有待解决的问题。

参考文献 (References)

- Collin J, Lako M. Concise review: Putting a finger on stem cell biology: Zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2011; 29(7): 1021-33.
- Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, *et al.* Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 2005; 435(7042): 646-51.
- 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.
- 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.
- Kay S, Bonas U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12(1): 37-43.
- Gurlebeck D, Thieme F, Bonas U. Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* 2006; 163(3): 233-55.
- 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.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2010; 29(2): 143-8.
- Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 2010; 48: 419-36.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009; 326(5959): 1501.
- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(17): 3361-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012; 482(7385): 331-8.
- Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14(3): 321-7.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007; 315(5819): 1709-12.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008; 321(5891): 960-4.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(6): 467-77.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008; 322(5909): 1843-5.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.
- 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.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4): 393-4.
- Li W, Teng F, Li T, Zhou Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 684-6.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-Mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153(4): 910-8.
- Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 154(6): 1370-9.
- Sakuma T, Hosoi S, Woltjen K, Suzuki K, Kashiwagi K, Wada H, *et al.* Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* 2013; 18(4): 315-26.
- 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.
- Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, *et al.* A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 251-8.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013; 31(9): 827-32.
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino

- AE, *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013; 154(6): 1380-9.
- 34 Sung YH, Baek I-J, Kim DH, Jeon J, Lee J, Lee K, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nature Biotechnology* 2013; 31(1): 23-4.
- 35 Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, *et al.* Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology* 2011; 29(8): 695-6.
- 36 Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, *et al.* Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2013; 23(10): 1229-32.
- 37 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 227-9.
- 38 Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 688-91.
- 39 Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, *et al.* Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 681-3.
- 40 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 691-3.
- 41 Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(34): 13904-9.
- 42 Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto-Kato A, Yamamoto T, Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Dev Growth Differ* 2013; doi: 10.1111/dgd.12097.
- 43 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.
- 44 Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabe de Angelis M, Hansen J, Wurst W, *et al.* Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(10): 3782-7.
- 45 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.
- 46 Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, *et al.* TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods* 2013; 10(4): 329-31.
- 47 Piganeau M, Ghezraoui H, de Cian A, Guittat L, Tomishima M, Perrouault L, *et al.* Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res* 2013; 23(7): 1182-93.
- 48 Sun N, Zhao H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. *Biotechnol Bioeng* 2013; doi: 10.1002/bit.25018.
- 49 Ma N, Liao B, Zhang H, Wang L, Shan Y, Xue Y, *et al.* TALEN-mediated gene correction in integration-free beta-thalassemia iPSCs. *J Biol Chem* 2013; 288(48): 34671-9.
- 50 Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, *et al.* TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther* 2013; 21(6): 1151-9.
- 51 Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med* 2013; 19(9): 1111-3.