

TALEN 构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠及初步分析

吴子环^{1,2}, 胡雄兵³, 毛凤仪², 王超⁴, 张彬², 庄峰锋³, 胡克平², 孙晓波²,
刘 晓¹, 匡世焕^{2,4}, 金 文²

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315000; 2. 中国医学科学院药用植物研究所药理毒理中心中药(天然药物)创新药物研发北京市重点实验室、中国医学科学院-普渡大学脂肪代谢联合实验室, 北京 100193;
3. 北京唯尚立德生物科技有限公司, 北京 100085; 4. 普渡大学动物系, 美国)

【摘要】 目的 通过构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠, 为后续的研究提供动物模型。**方法** 运用 TALEN 技术在 *Fndc5* 基因 FNIII domain 中造成缺失突变, 并通过测序进行基因型鉴定。通过配对建立稳定遗传系并在 mRNA 和 DNA 水平鉴定出生小鼠基因型; 对不同年龄段出生小鼠进行体重、血糖分析; 通过 qPCR 确定 *Fndc5* 在肾脏、肝脏、大脑、肌肉、心脏等组织中的表达情况。**结果** 成功构建并鉴定得到 4 种不同的 *Fndc5* 基因敲除小鼠品系; 不同年龄段出生小鼠体重、血糖未见显著性差异; 确定 *Fndc5* 在肌肉、心脏等组织中高表达。**结论** 本实验在国际上成功构建了 *Fndc5* 基因敲除小鼠, 并进行了初步分析, 为深入研究 *Fndc5* 基因在体内的功能提供了动物模型。

【关键词】 骨骼肌; *Fndc5* 基因; 纤维连接蛋白; TALEN

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)06-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.06.008

Construction of a *Fndc5* knockout mouse model by TALEN-mediated DNA targeting

WU Zi-huan^{1,2}, HU Xiong-bing³, MAO Feng-yi², WANG Chao⁴, ZHANG Bin², ZHUANG Feng-feng³,
HU Ke-ping², SUN Xiao-bo², LIU Xiao¹, KUANG Shi-huan^{2,4}, JIN Wen²

(1. School of Ocean Biology, Ningbo University, Ningbo 315000, China; 2. Beijing Key Laboratory of Innovative Drug Development of Traditional Chinese Medicine (Natural Medicine) and Translational Medicine, CAMS-Purdue Associate Laboratory of Adipose Metabolism, Center of Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193;
3. Beijing Viewsolid Biotech Company Ltd., Beijing 100085; 4. Department of Animal Science, Purdue University, USA)

【Abstract】 Objective To construct *Fndc5* knockout mouse models and provide animal models for related studies in the future. **Methods** Indels were introduced into FNIII domain of *Fndc5* gene by TALEN technology in mice, and genotypes were identified by sequencing. To set stable genetic system by pairing. Then at mRNA and DNA levels identified the genotype of born mice. At the same time the body weight and blood glucose of the mice at different ages were analyzed. Finally the *Fndc5* expression in the kidney, liver, brain, muscles, heart and other organs was determined by qPCR. **Results** Four different *Fndc5*-KO lines were generated. The body weight and blood glucose of the mice at different ages

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81471070); “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101、2012ZX09301002-001); 诺华诺德-协和和英才基金(肌信息素抵抗肥胖作用机理的研究); 药植所创新团队发展计划资助。

【作者简介】 吴子环(1990-), 男, 硕士研究生, 专业: 生物功能基因研究, E-mail: wuzihuan1122@163.com。

【通讯作者】 金文(1971-), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 代谢性疾病药物药效学研究, E-mail: wjin@implad.ac.cn。

showed no significant differences. Finally high *Fndc5* expressions in the muscles, heart and other organs were determined.

Conclusions We Have for the first time successfully generated *Fndc5* knockout (KO) mouse model using TALEN mediated DNA targeting technique, and performed preliminary analysis. This *Fndc5* knockout (KO) mouse model provides a novel tool for further studies on the in vivo function of *FNDC5*.

[Key words] Skeletal muscle; *Fndc5*; Fibronectin; TALEN; Knockout mouse model

骨骼肌在调控系统能量稳态上扮演着重要的角色。而且骨骼作为一个分泌器官渐渐被认同,肌肉分泌和表达的细胞因子和其他多肽类,并且通过自分泌、内分泌、旁分泌的方式在不同组织发挥作用的物质叫“肌因子”^[1-3]。其中,肌因子 irisin 越来越受到关注,其前体 *Fndc5* (fibronectin type III domain containing protein 5) 是一个跨膜蛋白,它的胞外域裂解产生一个溶解的激素 irisin^[4]。*Fndc5* 最早是在对 fibronectin type III domains 的基因组搜索中发现的^[5]。最初,研究发现 *Fndc5* 在运动的刺激下作为 PGC1- α 依赖的产物,随后裂解产生 irisin 进入血液作用于白色脂肪,刺激 UCP1 表达提高产热;促使白色脂肪棕色化,从而提高和改善了肥胖和糖尿病患者的代谢状态,为治愈肥胖和糖尿病提供了可能^[2]。随着研究的深入,关于 *Fndc5* 的许多其他功能都被证实。

TALEN (transcription activator-like (TAL) effector nuclease) 靶向基因敲除基因修饰是第二代新型基因编辑分子生物学工具,首次发现于黄单胞杆菌 (*Xanthomonas*) 中^[6,7]。TALE 中的重复可变双残基 (repeat variable di-residue, RVD)^[6] 与 A、C、T、G 有恒定的对应关系^[8,9]。因此,为识别某一特定氨基酸序列,只需设计相应 TALE 单元串联克隆,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 TALEN^[10,11],利用其特异性内切酶活性切割特定的 DNA 序列,最后细胞可以通过 NHEJ (non-homologous end joining) 途径修复 DNA 损伤,在此修复过程中随机插入或删除了一定数目的碱基,造成移码突变,形成了目标基因敲除的突变体^[12,13]。目前,TALEN 技术已在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)^[14,15]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[16]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[17]、大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[18]、小鼠 (*Mus musculus*)^[19] 等模式动物的基因敲除研究中获得了成功。

Fndc5 作为新肌因子 irisin 的前体从研究初始其在体内外的功能就备受热议。它在小鼠、人体内的功能研究已经取得了初步进展,但是其在肌肉中的功能研究还未开展。我们通过 TALEN 技术在国

际上构建 *Fndc5* 基因敲除小鼠,并进行了初步分析,为后期研究 *Fndc5* 在体内尤其肌肉中的功能提供了敲除小鼠模型,对于 *Fndc5*/irisin 对肌肉本身的影响的认识,将填补这一认知领域的空白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级 C57BL/6 小鼠品系,购自北京维通利华有限公司,动物生产合格证号:SCXK(京)2014-0001。饲养于中国医学科学院药用植物研究所 SPF 级动物房,实验动物使用许可证:SYXK(京)2013-0023,动物房温度(20~26)℃,相对湿度 40%~70%。

1.1.2 TALEN 质粒:TALEN 质粒 pCS5-eTALEN-T 由北京唯尚立德生物科技有限公司合成。靶位点位置 T1:TTTCTAGAAGAAGGATGT gcggatgctccggtt CATTCAGGAGGTGAACA,其中左边 TALE 识别序列:TTCTAGAAGAAGGATGT 17 bp,右边 TALE 识别序列:GTTCACCTCCTGAATG 16bp,间隔 15 bp。靶位点位置 T3:TCCGGCACCTCAAGGCC aactetgccgtggtcag CTGGGATGTCCTGGAGGA,其中左边 TALE 识别序列:CCGGCACCTCAAGGCC 16 bp,右边 TALE 识别序列:CCTCCAGGACATCCCAG 17 bp,间隔 17 bp。

1.1.3 引物:对于靶点位置 1,设计基因型检测 PCR 引物:CATGTTTCCTTAGCTCTACTGTGG (正向),GGAGAAAGCATGCATGGCAGTCTC (反向)PCR 片段长度为 518 bp;对于靶点位置 3,设计基因型检测 PCR 引物:GGACCCTTGTTTGGCCAGTCTA (正向),CTCTACCATCATCCTCCATGCCTG (反向)PCR 片段长度为 479 bp。Real-Time 引物:*FNDC5*-F:ATGAA GGATGGGGAGGAA, *FNDC5*-R:GCGGCAGAAGAGAG CTATAACA, 18s-F:CATGCAGAACC CACGACAGTA, 18s-R:CCTCACGCAGCTTGTTG TCTA。

1.1.4 试剂:本实验的引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。Amp PCRmix (TAKARA, Ro74A) 试剂盒、TransZol Up Plus RNA Kit (Tran, ER501-01)、EasyScript First-Strand cDNA Synthesis

SuperMxi (Tran, AE301-03)、TransStrt Top Green qPCR SupreMix (Tran, AQ131-02)、Base (碱液)、Neutrization(中和液)等。

1.2 方法

1.2.1 *Fndc5* 基因敲除 TALEN 靶点位置的设计: 根据 *Fndc5* 的基因组结构, *Fndc5* protein domain 的分析, 破坏 the FNIII domain, 将 TALEN 的靶点位置设计在外显子 3 上或者外显子 3 前, 测定 SSA 活性, 选择活性比较高的靶点进行后续的 *Fndc5* 基因敲除小鼠的构建。

1.2.2 *Fndc5* 基因敲除鼠的构建流程: 将 *Fndc5*-T1 和 *Fndc5*-T3 的 TALEN 质粒对, 体外转录成 mRNA 后, 共显微注射 mRNA 到小鼠的受精卵中, 共注射 120 个受精卵, 出生 23 只小鼠。两周龄后, 剪取 4 周龄出生小鼠任一只耳朵大约 1/3, 放置在做好标记的 1.5 mL 的离心管中, 加入 75 μ L 碱液 (base) 95 $^{\circ}$ C 以上 40 min; 然后加入 75 μ L 中和液 (neutrization), 常温静置 5 min, 溶液即为提取的基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 产物测序并根据峰图进行基因型鉴定。

2 结果

2.1 四品系 *Fndc5* 基因敲除小鼠的建立

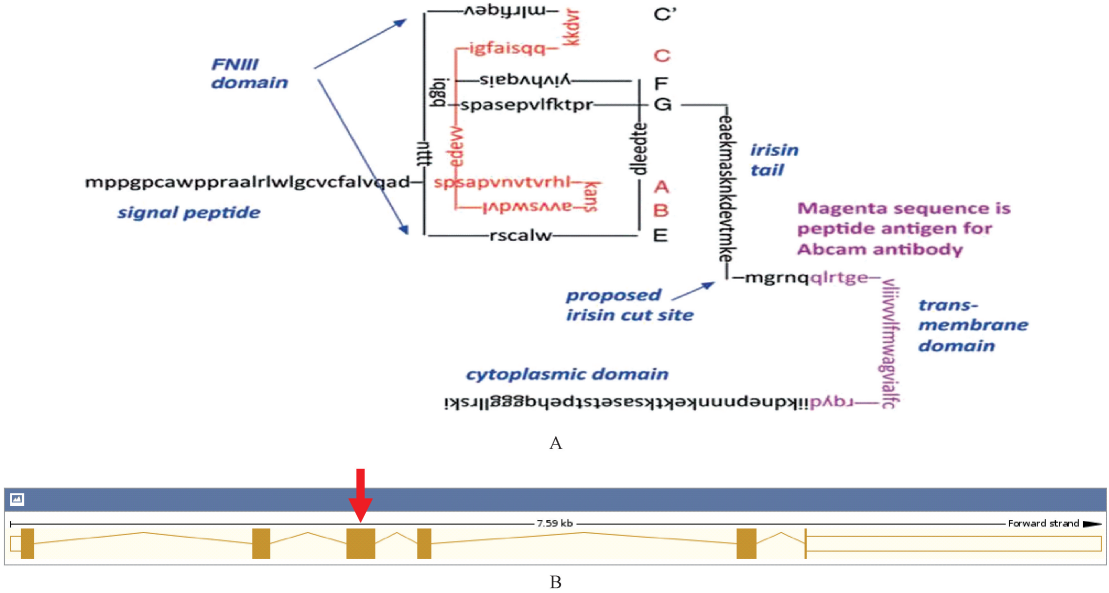
2.1.1 *Fndc5* 基因敲除 TALEN 靶点位置的设计: 根据 *Fndc5* 的基因组结构, *Fndc5* protein domain 的

分析, 决定破坏 the FNIII domain, 因此 TALEN 的靶点位置将设计在外显子 3 上或者外显子 3 前, 设计结果如图 1 箭头所示。

2.1.2 *Fndc5* TALEN 的 SSA 活性检测: 根据 SSA 活性结果, 我们选择活性比较高的靶点 *Fndc5*-T1 和 *Fndc5*-T3 进行后续的 *Fndc5* 基因敲除小鼠的构建, 结果见图 2。

2.1.3 *Fndc5* 基因敲除首建鼠的鉴定: 将受精卵注射后出生 23 只小鼠, 对出生两周的小鼠进行基因型分析和鉴定。结果如图 3 所示, 我们选取 Founder 7 (T1 一条缺失 2 bp, 一条缺失 4 bp) 进行测序图分析。测序峰形图在突变位点开始出现双峰, 表明为杂合子。通过峰形分析, 可以将突变型 1 的 DNA 序列 (下指箭头所指峰形) 和突变型 2 的 DNA 序列 (上指箭头所指峰形) 分析出来。结果为一条在 CCGGTCATTCAGGA 前缺失 2 个碱基 CT; 一条在 CCGGTCATTCAGG 前缺失 4 个碱基 GCTC, 均发生移码突变。

2.1.2 F1 代四品系 *Fndc5* 基因敲除鼠的鉴定: 根据发生移码突变情况, 选取的 Founder 7 小鼠、Founder 13 小鼠、和 Founder 18 小鼠分别与野生型 C57 小鼠交配, 出生的小鼠两周龄后按上述方法进行基因型鉴定。通过测序图可分析 F1 代小鼠的突变情况; 如果测序峰全是单峰说明该小鼠是 WT (野生型); 如果测序图出现双峰则该小鼠为杂合子; 如



注: A 为 FNDC5 蛋白质的一级结构, B 为 *Fndc5* 基因组结构(箭头为 TALEN 的靶点位置)。

图 1 FNDC5 蛋白质一级结构及 *Fndc5* 的基因组

Note. A is the primary structure of FNDC5 protein; B is the *Fndc5* genome structure (red arrow for TALEN target site).

Fig. 1 The primary structure of FNDC5 protein and the *Fndc5* genome.

果测序图也是单峰但是在预期位置出现缺失突变则该小鼠为纯合基因敲除小鼠,这在图 3 中已经进行了类似分析。我们从中选出 4 种突变类型#7-T1-1(T1 缺失 2 个碱基 CT)、#7-T1-2 (T1 缺失 4 个碱基 GCTC)、#13-T1-1 (T1 缺失 2 个碱基 TG)、#18-T1-1 (T1 缺失 2 个碱基 TC)建立稳定遗传 F1 小鼠品系。四品系 F1 小鼠的突变位点及突变后导致提前产生终止密码子的位置见表 1。基因型中黑体标记部分是 TALEN 设计敲除的靶位点序列,下划线部分为敲除的基因序列,这些缺失突变都会导致提前产生终止密码子。

2.2 Fndc5 敲除小鼠的初步分析

2.2.1 Fndc5 小鼠体重分析:通过成功建立和鉴定四品系 F1 小鼠后,将每个品系之间进行杂交配对,对出生的小鼠进行基因分型鉴定,分别在 1 月龄、2 月龄进行所有出生小鼠的体重测量,体重分析时将雌雄分开,进行纯合子与 WT 之间的体重差异分析,结果见图 4。结果表明小鼠生长正常,在 1 月龄、2 月龄纯合子和 WT 小鼠之间体重没有统计学差异。

2.2.2 Fndc5 在 小鼠不同组织的表达情况分析:检测 Fndc5 在不同组织内的表达情况有助于下一步的体内功能研究。提取小鼠不同组织 H(心脏)、K(肾脏)、B(大脑)、L(肝脏)、TA(肌肉)进行液氮研磨提取 mRNA,反转录成 cDNA 进行荧光定量 PCR,选取 18s 作为内参,结果发现 Fndc5 在 H、B、TA 中表达量较高,在 K、L 中表达很少,如图 5。

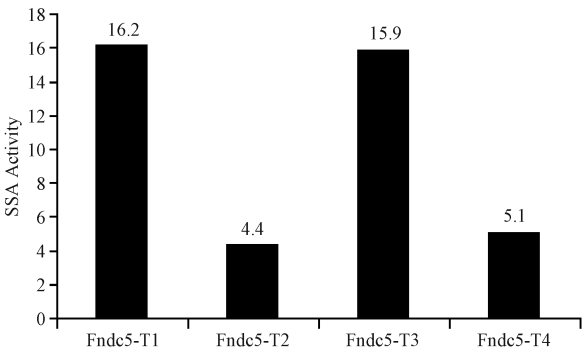
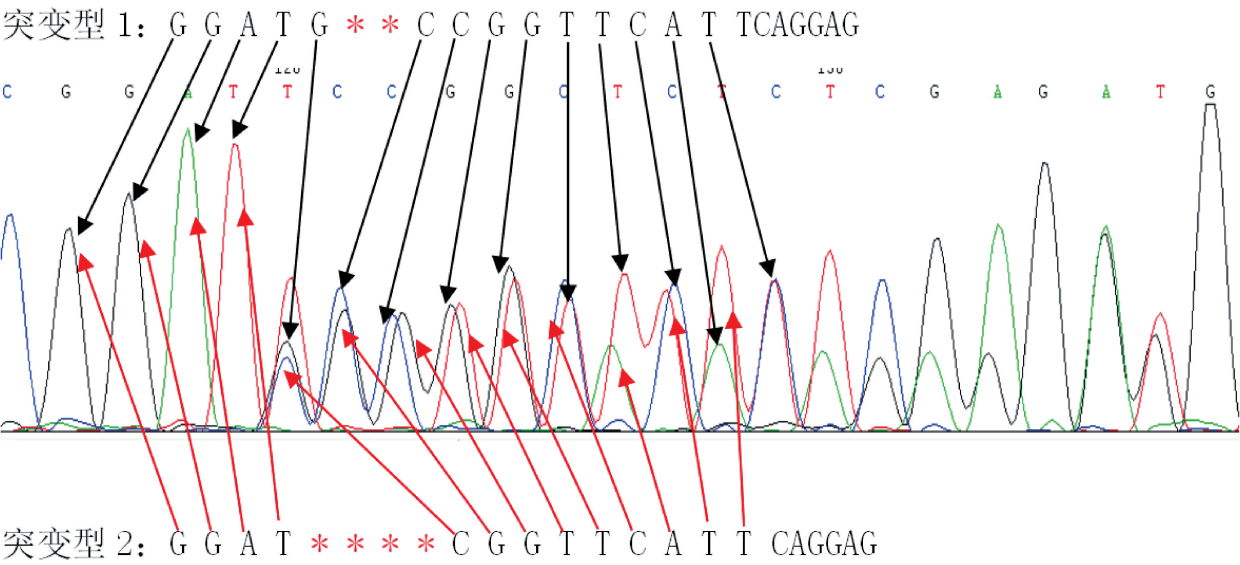


图 2 Fndc5 TALEN 的 SSA 活性检测

Fig. 2 Detection of the Fndc5 TALEN SSA activity



注:突变型 1 的 DNA 序列(下指箭头所指峰形)和突变型 2 的 DNA 序列(上指箭头所指峰形)。

图 3 Fndc5 基因敲除首建鼠的鉴定

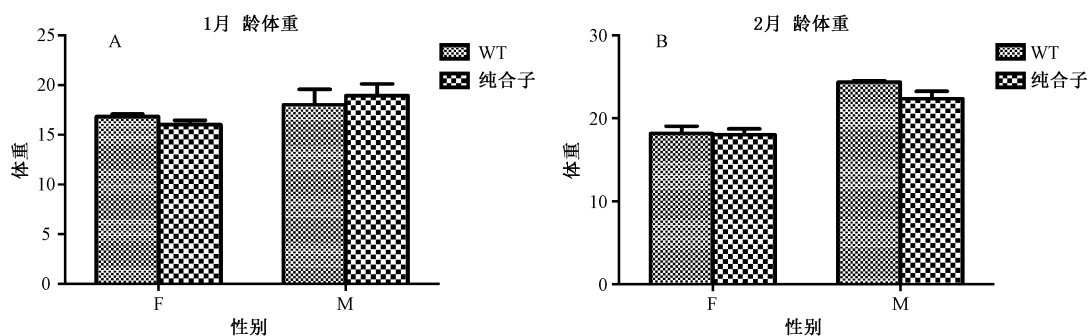
Note. The DNA sequence of mutant 1 peak shape (black arrows) and the DNA sequence of mutant 2 peak shape (red arrows).

Fig. 3 Identification of Fndc5 first built knockout mice

表 1 四品系 F1 小鼠的突变情况

Tab.1 The mutation of four different Fndc5-KO lines of mice

小鼠品系	基因型	蛋白发生移码突变的位置	终止密码子产生位置
WT(野生型)	AGGATGTGCGGATGCTCCGGTTCATTACAGG	无	第 209 个氨基酸
#7-T1-1	AGGATGTGCGGATG__CCGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 73 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸
#7-T1-2	AGGATGTGCGGAT____CGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 72 位开始发生移码突变	第 79 个氨基酸
#13-T1-1	AGGATGTGCGGA__CTCCGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 72 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸
#18-T1-1	AGGATGTGCGGATGC__CGGTTCATTACAGG	氨基酸从第 73 位开始发生移码突变	第 114 个氨基酸

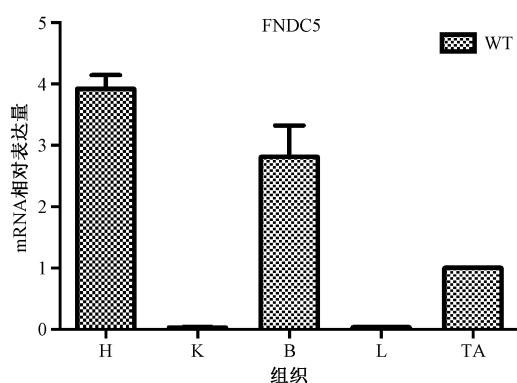


注:A 为 1 月龄体重分析结果,B 为 2 月龄体重分析结果。

图 4 *Fndc5* 小鼠不同年龄体重分析

Note. A: The Results of body weight analysis at one month of age. B: The Results of body weight analysis at two months of age.

Fig. 4 Analysis of body weight of the *Fndc5* mice at different ages.



注:H - 心脏,K - 肾脏,B - 大脑,L - 肝脏,TA - 肌肉

图 5 *Fndc5* 在小鼠不同组织的表达情况分析。

Note. H - heart. K - kidney. B - brain. L - liver. TA - muscle

Fig. 5 *Fndc5* expression in different tissues in the mice.

3 讨论

Fndc5 作为 Irisin (myokine) 的前体,作用于白色脂肪提高了全身的产热能力,促进了白色脂肪向棕色脂肪的转化,这一研究从发现伊始就被认为可作为治疗糖尿病的靶点。但是经过几年的研究,争议一直没有平息:*Fndc5* 裂解产生 irisin 的机制是什么? Irisin 在不同组织细胞发挥作用的受体? Irisin 在人体内是否发挥积极作用? 总而言之关于它在小鼠及人体内的研究还急需广泛开展。

目前关于它在脑、骨髓中的功能研究已经取得了一些进展,但是关于它在肌肉中的研究还未见报道,我们已经成功构建了 4 种品系 *Fndc5* 敲除小鼠,各自的突变类型在上文中也进行了分析,并建立了稳定遗传 F1 小鼠。我们发现每个品系出生小鼠符合正常的孟德尔比率,生长没有受到影响,在不同年龄段体重没有出现明显差异,我们也分析了 *Fndc5* 在不同组织内的表达分析,发现其在 H、B、TA

中表达量较高,这为我们下一步开展其在肌肉中的功能研究提供了基础。有趣的是,通过 *Fndc5* 抗体进行检测敲除小鼠时发现 WT 和纯合子都出现条带,我们认为本实验中利用 TALEN 技术构建敲除小鼠模型只是在 *Fndc5* 的 FNIII domain 缺失了几个碱基,导致终止密码子提前产生,从而是蛋白质的功能缺失。但是经过缺失突变的 *Fndc5* 还是会产生 70 - 110aa 长的蛋白质,关于这部分蛋白质是否能发挥一定的功能还不知道,所以后续可能还需要其他的手段去确切的证实 *Fndc5* 敲除小鼠是否成功。

参考文献:

- [1] Baskin KK, Winders BR, Olson EN. Muscle as a “mediator” of systemic metabolism [J]. Cell Metab. 2015, 21 (2): 237 - 248.
- [2] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. Nature 2012, 481: 463 - 468.
- [3] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ [J]. Nat Rev Endocrinol. 2012, 8(8): 457 - 465.
- [4] Erickson HP. Irisin and *FND5* in retrospect: An exercise hormone or a transmembrane receptor? [J]. Adipocyte 2013, 2 (4): 289 - 293.
- [5] Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, et al. *Frcp1* and *Frcp2*, two novel fibronectin type III repeat containing genes [J]. Gene. 2002, 297(1 - 2): 79 - 83.
- [6] Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. Annu Rev Phytopathol, 2010, 48: 419 - 436.
- [7] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326 (5959): 1501 - 1501.

(下转第 47 页)

- [18] Ho ML, Chen YH, Liao HJ, et al. Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats [J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(4): 296–303.
- [19] Seferos N, Pantopoulou A, Kotsiou A, et al. The influence of simvastatin in rats mandible and femur bone mass under Freund's adjuvant arthritis [J]. Stomatologija, 2012, 14(2): 46–52.
- [20] Chan MH, Mak TW, Chiu RW, et al. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterolaemia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4556–4559.
- [21] Meier CR, Schlienger RG, Kraenzlin ME, et al. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures [J]. JAMA, 2000, 283: 3205–3210.
- [22] Yao W, Farmer R, Cooper R, et al. Simvastatin did not prevent nor restore ovariectomy-induced bone loss in adult rats [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006, 6(3): 277–283.
- [23] Chen C, Liang MK, Zhang H, et al. Relationships between age-related biochemical markers of bone turnover and OPG, TGF- β 1 and TGF- β 2 in native Chinese women [J]. Endocr Res, 2014, 39(3): 105–114.
- [24] Bauer DC, Garnero P, Harrison SL, et al. Biochemical markers of bone turnover, hip bone loss, and fracture in older men; the 18MROS study[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(12): 2032–2038.
- [25] Burshell AL, Möricke R, Correa-Rotter R, et al. Correlations between biochemical markers of bone turnover and bone density responses in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate [J]. Bone, 2010, 46(4): 935–939.
- [26] Boonyanurak P, Wilawan K. Levels of biochemical bone marker procollagen type I N-propeptide (PINP) in Thai women aged 40–70 years [J]. J Med Assoc Thai, 2009, 92(7): 873–877.
- [27] Naylor KE, Jacques RM, Paggiosi M, et al. Response of bone turnover markers to three oral bisphosphonate therapies in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(1): 21–31.
- [28] Chen SH, Chou FF, Ko JY. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system [J]. Chang Gung Med J, 2010, 33(5): 509–51.

〔修回日期〕2016–03–23

(上接第 41 页)

- [8] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science, 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [9] 靳玉珠, 王世山, 向华, 等. TALEN 靶向基因修饰新技术研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, (19): 149–152.
- [10] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. Nat Biotechnol, 2010, 29(2): 143–148.
- [11] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [J]. Nucleic Acids Res 2000, 28(17): 3361–3369.
- [12] 汪加兴, 张淑君. TALEN 和 CRISPR/Cas 两个基因编辑新技术 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015, (2): 22–26.
- [13] 倪培凌, 刘畅, 陈凌懿. DNA 剪刀—TALEN 和 CRISPR/Cas [J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(1): 1–7.
- [14] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity [J]. Nucl Acids Res, 2011, 39(21): 9283–9293.
- [15] Lei Y, Guo X, Liu Y, et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17484–17489.
- [16] Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, et al. Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases [J]. Genetics, 2013, 193(3): 739–749.
- [17] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 697–698.
- [18] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695–696.
- [19] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 23–24.

〔修回日期〕2016-02-25