

文章编号: 1674-7054(2013)04-0386-07

类转录激活因子效应物及其在生物技术领域的应用

吴伦英¹, 景晓辉¹, 沈雁^{2,3}

(1. 海南省热带作物资源可持续利用重点实验室/海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学 园艺园林学院, 海南 海口 570228; 3. 中国热带农业科学院 椰子研究所, 海南 文昌 571339)

摘要: 综述了类转录激活因子效应物(TALEs) 技术的研究进展及生物技术应用前景, 重点介绍 TALEs 的结构特征、作用机理、广谱抗性基因的人工构建及利用类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator like effector nucleases, TALENs) 进行基因组定点修饰的策略。

关键词: 类转录激活因子效应物; 类转录激活因子效应物核酸酶; 结构特征; 生物技术应用前景

中图分类号: Q 814.9

文献标志码: A

类转录激活因子效应物(Transcription activator like effectors, TALEs) 在结构、功能上各不相同^[1-3]。黄单胞菌属(*Xanthomonas* spp.) 植物病原菌利用Ⅲ型分泌系统将类转录激活因子效应物(TALEs) 注入植物细胞^[1,4], TALEs 进入植物细胞核, 与特异 DNA 序列结合, 激活 TAL 框下游基因的表达^[1,5-7]。细菌利用 TALEs 操纵植物感病基因导致植物感病^[7-9], 植物则在抗性基因启动子区进化出相应的 TAL 框, 特异性识别 TALEs, 引发植物的防卫反应^[2], 因此, TALEs 既是毒性因子, 又是可被植物识别的无毒因子。TALEs 的研究最早始于在辣椒细菌性斑点病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Xcv) 上发现的 AvrBs3 蛋白^[10]。近几年有大量 TALEs 特异性识别靶 DNA 的报道, 这些研究成果有助于进一步了解植物-病原微生物互作。笔者对 TALEs 识别 DNA 的密码、新型结构特点及其在生物技术领域应用的研究进展进行了综述, 旨在为科研人员提供参考。

1 TALEs

1.1 TALEs 的结构特征 TALEs 广泛存在于致病性黄单胞菌中^[4]。单个黄单胞菌菌株可能有 1 个或者几十个 TALEs^[1]。TALEs 具有转录因子典型的结构特征: N 端含有 T3SS 分泌、移位信号及随机重复 DNA 结合的结构域, C 端含有核定位信号(NLS) 及酸激活结构域(AAD)^[1](见图 1)。TALEs 最典型的特征是拥有几乎完全相同的中间随机重复结构域, 每个典型重复为 34 个氨基酸^[3]。最后的重复为半个重复, 重复之间的差异很小, 差异主要在每个重复的 12 及 13 位氨基酸上, 称为重复易变双残基(repeat variable di-residues, RVDs)^[11]。TALEs 的重复次数常在 15.5~19.5 之间^[3]。该重复结构域决定 TALEs 识别 DNA 序列的特异性^[7](见图 1)。2012 年初, 国内外学者同时在《Science》上发表 2 篇论文, 解析 TALE 和 DNA 靶序列相互结合的晶体结构, 并为“1 个重复单位 1 个碱基”提供了关键的分子结构水平的实验证据^[12-13]。

1.2 TALEs 作为转录激活子 TALEs 可特异性地与 DNA 序列结合, 随后诱导植物中靶基因的表达(见

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 海南省自然科学基金项目(809037, 312039); 海南省研究生创新科研课题(Hyb2012-1); 国家公益性行业农业科研专项(200903049)

作者简介: 吴伦英(1986-), 女, 重庆人, 海南大学 2012 级博士研究生。

通信作者: 沈雁(1980-), 女, E-mail: yanshen246@sina.com

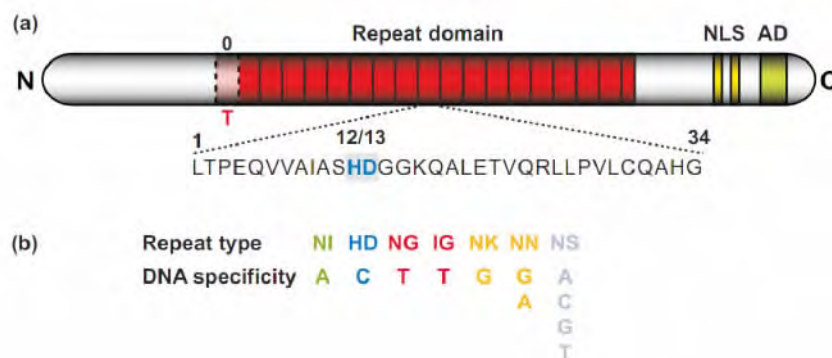


图1 TAL 效应分子-DNA 结合密码^[1]

1. (a) TAL N 端含有Ⅲ型分泌及移位信号(T3S) ,中间为 17.5 个重复单位的重复结构域(红色) ,C 端为 2 个核定位信号(NLS ,黄色) 及 1 个酸激活结构域(AD ,绿色) 。重复之间多态性主要存在于每个重复的 12 ,13 位氨基酸—重复易变双残基(RVDs ,蓝色) 。最后截短的重复也含有 RVDs。重复结构域前面有 1 个推测的重复 0(紫红色) ,其氨基酸序列与其他重复之间同源性较低 ,但其特异性识别 T 碱基。2. (b) 不同 RVDs 对应的 DNA 碱基。3. 图中数字表示氨基酸在重复中的位置

Fig. 1 TAL effector-DNA-binding code

1. (a) TALs contain nuclear localization signals (NLS ,yellow) and an activation domain (AD ,green) to function as transcriptional activators. A central tandem repeat domain (red) confers DNA-binding specificity. Each 34 amino acid (AA) repeat binds to one base pair (bp) with specificity being determined by AA 12 and 13. Repeat zero is indicated nonhomologous with other RVDs specifies for T. 2. (b) Repeat types have specificity for one or several DNA bp. 3. The number refers to aa positions within the repeat

图 2)^[2,6,14]。转录起始位点通常位于 *TAL* 框下游 40 ~ 60 碱基(bp) ,并取决于 *TAL* 框的位置^[15-16]。2005 年的研究发现 ,抗病和感病水稻植株中均含有相同的 *Xa27* 编码区 ,但只有携带 *AvrXa27* 的病原菌感染水稻时 ,才能激活抗性 *Xa27* 的表达 ,导致植物抗病 ,同时异位表达 *Xa27* 也可增强植株对亲和型病原菌的抗性^[17]。这是一种新的效应分子激发的免疫反应 ,有别于传统的保卫学说^[18-19]或诱饵学说^[20]。保卫学说或诱饵学说是 *R* 基因的编码产物并不参与直接或间接识别效应分子 ,而仅仅在植物抗病反应中执行防卫功能。随后的研究还发现 ,水稻感染 *Xoo* 菌株 PX099A 后 ,*PthXo1* 上调 *Os8N3* 基因的表达 ,促进细菌繁殖及病害发生^[8]。病原菌以基因对基因的方式诱导感病基因的表达 ,进而产生感病基因(*S* 基因) 符合 TALEs 的靶标这一观念^[8-9]。人们利用 *AvrBs3* 及其激活的 *Bs3*(抗性基因) 及 *UPA20*(感病基因) 证实了 TALEs 是转录因子^[7,21]。最新实验结果证明了 *Os8N3*/*Xa13* 的 *UPT* 框为唯一顺式作用元件^[22]。

1.3 TALEs 的靶基因 *Xoo* 菌株 PX099A 的 T3SS *PthXo1* 特异性激活水稻 *Os8N3* 基因^[8] ,导致水稻对 *Xoo* 感病性增强。在水稻中 ,*Os8N3* 是花粉正常发育必须的^[23]。组成型表达 *Os8N3* 后 ,水稻对 T3SS *PthXo1* 突变株及野生型 *Xoo* 菌株均表现出感病 ,而 *Os8N3* 沉默的植株则表现出抗病^[8]。其他 *Xoo* 菌株的效应分子 *AvrXa7* ,*PthXo3* 和 *TalC* 均可转录激活 *Os8N3* 家族的另一基因 *Os11N3* 来发挥毒性功能^[24-25]。但目前还不清楚 *Os8N3* 或 *Os11N3* 的激活是如何导致植物感病的。

Xoo 菌株 PX099A 的 TALEs *PthXo6* 可激活水稻 *TFX1* 基因的表达。*TFX1* 是碱性亮氨酸拉链(bZIP) 家族的一员 ,并可受到多个 *Xoo* 菌株的激活 ,这说明效应蛋白 *PthXo6* 在不同 *Xoo* 菌株中是保守且非常重要的。敲除 *OsTFX1* 基因导致 *Xoo* 致病菌株致病能力下降 ,而水稻组成型表达 *OsTFX1* 可恢复 *Xoo* 的致病性^[9]。

AvrBs3 诱导的 *UPA20* 基因编码碱性螺旋-环-螺旋型转录因子。转录激活 *UPA20* 的表达导致在 *Xcv* 位点受到感染的细胞变得肥大^[7] ,细胞的肥大可能在细菌传播至叶表面起到重要作用^[26]。但目前尚未完全研究清楚其他参与感病的 *UPA* 基因。*UPA* 基因的发现导致发现 *UPA* 框 ,*UPA* 框在发现 TALEs 的 DNA 识别机制中起到重要作用 ,笔者将在下文(1.4) 讨论。

1.4 TALEs 靶标的抗性机理 黄单胞菌中分离到的多个 *R* 基因,介导 TALEs 的抗性的图解见图 2。由图 2 可见,TALE 经Ⅲ型分泌系统注入植物细胞,番茄 NB-LRR 类蛋白-Bs4 可在植物细胞质识别 TALEs,Bs4 能够识别全长 TALE AvrBs4 及缺少核定位信号和酸激活结构域的缺失衍生物。TALE 与 importin α 互作,TALEs 转移至细胞核,特异性结合匹配的 *UPT* 框,转录激活相应的易感基因(如 *UPA20*, *Os8N3*, *OsTFIIA1* 或 *OsTFX1*) 的表达,导致植株感病。激活易感基因可受到 RNA II 聚合酶复合物(红色)突变如 *xa5*(褐色)或单个 *UPT* 框突变(*xa13* 突变)的抑制。植株也进化出抗性激活陷阱—正常情况下存在于 *S* 基因启动子的 *UPT* 框亦存在于 *R* 基因,进而激活 *R* 基因的表达,表现抗病。胡椒 *Bs3* 及水稻 *Xa27* 基因分别特异性识别 AvrBs3 和 AvrXa27^[16-17,21,27-28]。2 个 *R* 基因含有效应分子特异的启动子元件,称为 *UPT* 框(upregulated by TALE),*UPT* 框直接与相应的 TALEs 互作,进而激活 *UPT* 框下游的基因的表达^[5,16]。来自 *X. gardneri* 菌株的 AvrHah1 蛋白与来自 *Xcv* 菌株的 AvrBs3 蛋白中间随机重复结构相似,胡椒 *Bs3* 基因不仅能够识别来自 *Xcv* 菌株的 AvrBs3,同样识别来自 *X. gardneri* 菌株的 AvrHah1^[29]。最新的研究结果表明,与 AvrBs3 一样,AvrHah1 转录激活 *Bs3* 基因的启动子^[16]。这样,在 *Bs3* 和 *Xa27* 介导的免疫反应中,*R* 基因启动子介导 TALEs 的识别,而 *R* 蛋白仅执行防卫功能。缺少 NLS 和 ADD 的 TALEs 突变体不能激活相应的 *R* 基因^[30-31],因此,转录激活 *R* 基因启动子可能是植物识别 TALEs 最常见的机理。但来自番茄的 *Bs4* 蛋白是唯一例外,*Bs4* 蛋白直接识别 AvrBs4 的结构,不必受到 AvrBs4 的转录激活^[32-33],似乎 *Bs4* 识别 AvrBs4 的是结构而不是活性。

多数研究表明,核苷酸结合位点富含亮氨酸重复(nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat, NB-LRR)类 *R* 蛋白介导效应分子可激发免疫反应(Effector Triggered Immunity,ETI),这类 *R* 蛋白通过常监控或保卫对植物至关重要的蛋白发挥功能^[20,35],但隐性 *R* 基因很可能为进一步了解 TALEs 的功能提供有用信息。

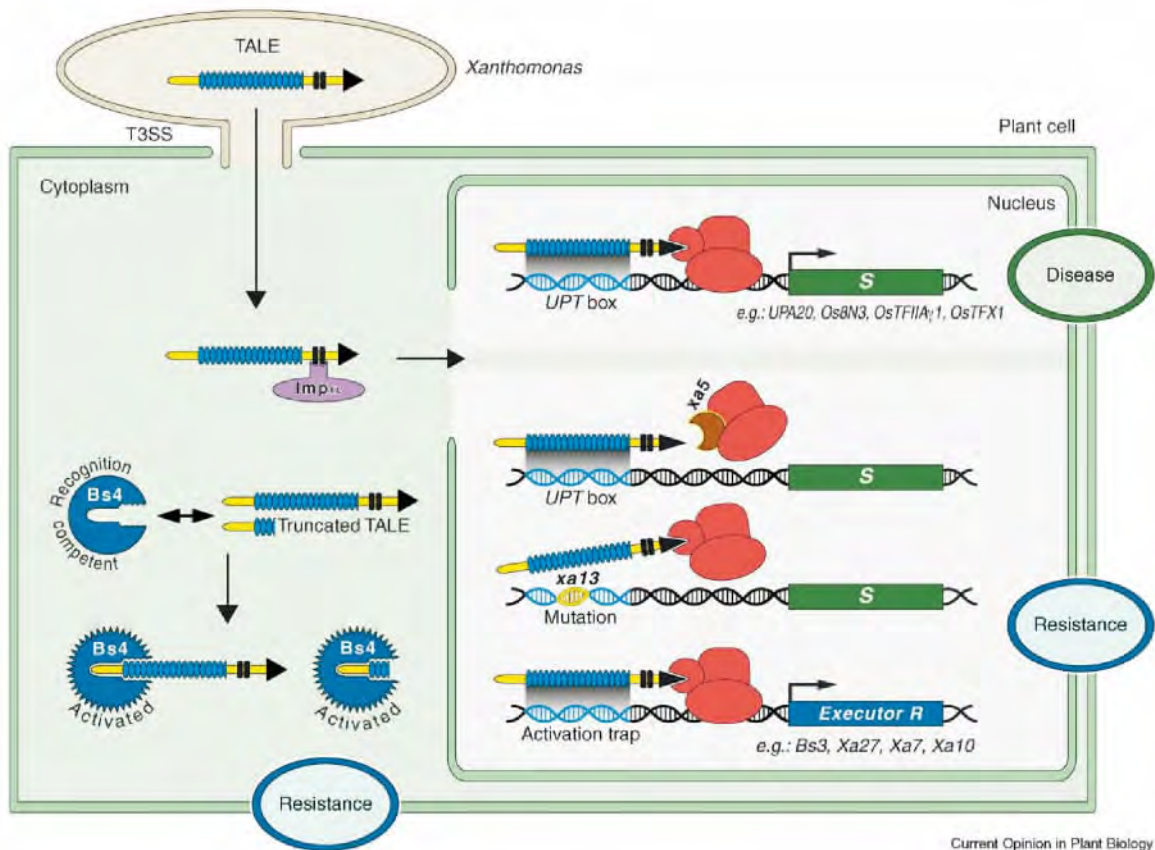


图 2 TALEs 在植物感病及抗病中的作用^[34]

Fig. 2 TALE roles in plant disease and resistance^[34]

2 TALEs 在生物技术领域应用的前景

2.1 广谱抗性基因的人工构建 胡椒 *Bs3* 基因能够抗携带 *AvrBs3* 的 *Xcv* 病原菌; 水稻 *Xa27* 基因能够抗携带 *AvrXa27* 的 *Xoo* 病原菌。胡椒 *Bs3* 基因与水稻 *Xa27* 基因无同源性, 但这 2 个基因均受相应 TALEs 的转录激活, 这说明单子叶植物和双子叶植物具有相同的抗性机理。Romer 将 *AvrBs3*、*AvrBs3*Δrep16 与 *AvrXa27* 对应的 *UPT* 框整合到 1 个植物启动子中, 将这个启动子引入胡椒抗性基因 *Bs3* 的上游, 结果发现只有病原菌将 TALEs 注入植物细胞时, 才能诱导 *Bs3* 基因的表达, 植物表现出抗性^[16]。

目前, 水稻白叶枯病与细菌性条斑病是水稻生产的世界性两大重要病害, 而取得广谱持久抗性是保证全球粮食安全的重要举措。水稻白叶枯病菌与水稻细菌性条斑病菌存在大量 TALEs, 利用 TAL 密码, 可以预测与 TALEs 相结合的 *TAL* 框, 不同的 *TAL* 框以顺式作用元件的方式与 TALEs 结合^[16], 该结合方式在生物技术领域意义重大, 这是由于靶基因可受到不同 TALEs 的诱导, 这些 TALEs 可在启动子区域与 *TAL* 框结合^[2], 进而激活相应基因的表达。本实验室采用全基因人工合成的方式获取相应的 DNA 序列作为水稻抗性基因 *Xa21* 和 *Xa27* 的启动子, 现已成功构建了相应的表达载体并转化水稻, 获得了转基因植株, 病原菌接种发现转基因水稻表现出较好的抗性, 且与非转基因水稻相比转基因水稻的生长发育并未受到明显影响。

2.2 TAL 核酶促进基因组编辑 锌指蛋白 (Zink Finger Protein) 或 TALEs 能够与限制性内切酶的催化结构域融合形成锌指核酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 或 TALE 核酶 (TALE nucleases, TALENs), 进而在基因组靶位点创造出 DNA 双链断裂 (Double-Strand Break, DSB)。由于核酶需要形成二聚体发挥功能, 则需要构建 2 个 DNA 结合蛋白来识别临近的序列, 且二聚体之间需要恰当的距离来使核酶催化结构域, 形成功能性二聚体裂解靶 DNA^[36-38]。通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或 DNA 同源重组 (homologous recombination, HR) 修复断裂的 DNA 双链 (Double-Strand Break, DSB)^[39-40]。DNA 同源重组能够介导内源基因组序列与外源 DNA 发生核苷酸交换, 导致 DNA 插入、缺失或替换。而 NHEJ 常造成 DSB 位点的插入或缺失 (insertions or deletions, indel) 造成误义或无义突变来破坏靶基因的功能^[41]。诱导 DSB 的催化结构域常源自 II S 型限制性内切酶 *Fok I*。近几年, 学者开展多项研究来增加 *Fok I* 结构域的内切活性和特异性, 发现了超级活性的 *Fok I* 突变体 *Sharkey* 能够在体内外增加酶切活性^[42]; 发现了防止形成 homodimer 的 *Fok I* 突变体来降低脱靶 (off-target) 活性^[43]。

TALENs 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 (见图 3)。图 3 显示 (a) TAL 核酶是 TAL 效应分子与 *Fok I* 核酸内切酶结构域的融合子, TAL 重复结构域控制 DNA 结合特异性; (b) 2 个 TAL 核酶与邻近的 DNA 框结合, *Fok I* 二聚化诱导 2 个框之间 DNA 的断裂。DNA 双链的锻炼能促使非同源末端连接 (NHEJ) 或同源 DNA 重组 (HDR), 修饰靶基因组 (缺失或插入)。与 ZFNs 相比, TALENs 技术的优势是明显的, 第一, TALENs 结合 DNA 的方式更易于预测和人为设计; 第二, TALENs 的构建更加简便, 甚至能够实现大规模、高通量的组装; 第三, TALENs 结合 DNA 序列的特异性更强, 而毒性和脱靶 (off-target) 效应则比 ZFNs 低; 第四, ZFNs 识别特定碱基序列的三联体核苷酸, 这使其应用灵活性降低, 为设计和构建针对特定核苷酸序列的 ZFNs 增加了难度。而且, TALEs 可与其他功能性蛋白结构域融合形成新的嵌合体蛋白。通过与转录抑制子结构域融合, TALEs 用于形成人工抑制子来抑制细菌^[44]、酵母^[45]、植物^[46] 和人^[47-48] 特定基因的表达。TALEs 与整合酶融合对基因组特定位点修饰, 与 DNA 甲基转移酶 (methyltransferase) 融合, 从而实现基因组上特定位点的甲基化, 研究表观遗传调控; 与组蛋白去乙酰化酶融合来介导染色单体特异的修饰, 与胞嘧啶脱氨酶 (cytosine deaminase) 融合来进行点突变。由 TALEs 派生形成的因子具有多种功能, 使 TALEs 成为多面手, 应用空间更广阔。

近 10 年来, ZFNs 已广泛应用于人和其他模式生物基因组的精确修饰, 并已进入临床试验, 以治疗糖尿病、神经性疾病、AIDS 和恶性脑胶质瘤。TALENs 技术已经在基因组定点修饰上取得了成功, 甚至在不远的将来有可能代替 ZFNs 技术。但关于 TALEs 和 TALENs 依然还有不少谜团有待揭开。例如: (1) 为什么 TALEs 识别的 *TAL* 框 5' 端紧邻的核苷酸必须是 T; (2) 为什么 TALEs 的最后 1 个识别 DNA 序列的重复单元只是半个重复单元; (3) TALE 对靶位点的结合是否存在核苷酸的偏好性; (4) 是否能够优化

TALEs 单个重复单元的氨基酸序列和长度; (5) TALEs 不同的 RVDs 之间是否相互影响; (6) 为什么不同的 TALENs 活性差异如此之大; (7) 能否采用更有效的内切酶结构域代替 *Fok I*; (8) 识别 20 个碱基序列的 TALEN 蛋白为 1 200 个氨基酸, 如何有效地将 TALENs 导入组织或细胞中, 是通过表达载体还是直接将表达 TALENs 的 mRNA 导入细胞; (9) TALENs 对其靶细胞或个体是否具有毒性仍需要进一步的实验验证, 目前尚无定论; (10) TALENs 是否会导致靶细胞或机体产生免疫反应。

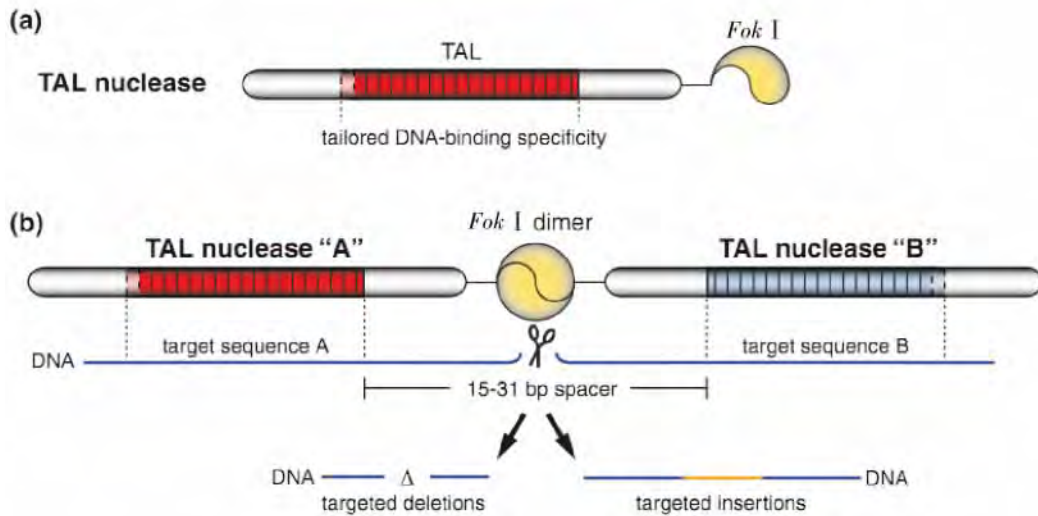


图 3 TAL 核酶促进基因组编辑^[1]

Fig. 3 TAL nucleases (TALENs) promote genome editing^[1]

3 展 望

在完全理解 TALEs 的功能及潜在利用价值之前, 有些疑问仍有待解决: 首先, TALEs 结合 DNA 的结构及结构/功能之间的联系问题, 这将有助于解释 TALEs - DNA 结合密码的复杂性; 其次, TALEs 如何与宿主转录元件互作, TALEs 与 DNA 结合后是否影响内源转录调控子的活性; 第三, 有关 TALEs 的进化: TALEs 的起源, TALEs 的多样性, TALEs 可在细菌中重组, 为何某些作物的病原菌存在大量 TALEs 而其他作物并不存在。

参考文献:

- [1] SCHOLZE H, BOCH J. TAL effectors are remote controls for gene activation [J]. *Current Opinion in Microbiology* 2011, 14 (1): 47 - 53.
- [2] SCHOLZE H, BOCH J. TAL effector-DNA specificity [J]. *Virulence* 2010, 1 (5): 428 - 432.
- [3] BOCH J, BONAS U. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. *Annual Review of Phytopathology* 2010, 48: 419 - 436.
- [4] KAY S, BONAS U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant [J]. *Current Opinion in Microbiology* 2009, 12 (1): 37 - 43.
- [5] ROMER P, STRAUSS T, HAHN S, et al. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles [J]. *Plant Physiology* 2009, 150 (4): 1697 - 1712.
- [6] 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.
- [7] KAY S, HAHN S, MAROIS E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator [J]. *Science* 2007, 318 (5850): 648 - 651.
- [8] YANG B, SUGIO A, WHITE F F. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103 (27): 10503 - 10508.
- [9] SUGIO A, YANG B, ZHU T, et al. Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIAγ1* and *OsTFX1* during bacterial blight of rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104 (25): 10720 - 10725.

- [10] BONAS U, STALL R E, STASKAWICZ B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1989, 218(1): 127–136.
- [11] MOSCOU M J, BOGDANOVE A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326(5959): 1501.
- [12] DENG D, YAN C, PAN X, et al. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors [J]. Science, 2012, 335(6069): 720–723.
- [13] MAK A N, BRADLEY P, CEMADAS R A, et al. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target [J]. Science, 2012, 335(6069): 716–719.
- [14] MORBITZER R, ROMER P, BOCH J, et al. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(50): 21617–21622.
- [15] KAY S, HAHN S, MAROIS E, et al. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Δrep16 [J]. Plant Journal, 2009, 59(6): 859–871.
- [16] ROMER P, RECHT S, LAHAYE T. A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(48): 20526–20531.
- [17] GU K, YANG B, TIAN D, et al. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice [J]. Nature, 2005, 435(7045): 1122–1125.
- [18] DANGL J L, JONES J D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection [J]. Nature, 2001, 411(6839): 826–833.
- [19] VAN DER BIEZEN E A, JONES J D. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1998, 23(12): 454–456.
- [20] VAN DER HOORN R A, KAMOUN S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors [J]. Plant Cell, 2008, 20(8): 2009–2017.
- [21] ROMER P, HAHN S, JORDAN T, et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene [J]. Science, 2007, 318(5850): 645–648.
- [22] YUAN T, LI X, XIAO J, et al. Characterization of *Xanthomonas oryzae*-responsive cis-acting element in the promoter of rice race-specific susceptibility gene *Xa13* [J]. Molecular Plant, 2011, 4(2): 300–309.
- [23] CHU Z, YUAN M, YAO J, et al. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice [J]. Genes Development, 2006, 20(10): 1250–1255.
- [24] ANTONY G, ZHOU J, HUANG S, et al. Rice *Xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3* [J]. Plant Cell, 2010, 22(11): 3864–3876.
- [25] YU Y, STREUBEL J, BALZERGUE S, et al. Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 *Os11N3* gene [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(9): 1102–1113.
- [26] BRUNINGS A M, GABRIEL D W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface [J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(3): 141–157.
- [27] TIAN D, YIN Z. Constitutive heterologous expression of *avrXa27* in rice containing the *R* gene *Xa27* confers enhanced resistance to compatible *Xanthomonas oryzae* strains [J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(1): 29–39.
- [28] GU K, TIAN D, QIU C, et al. Transcription activator-like type III effector AvrXa27 depends on *OsTFIIAγ5* for the activation of *Xa27* transcription in rice that triggers disease resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(6): 829–835.
- [29] SCHORNACK S, MINSVAGE G V, STALL R E, et al. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity [J]. New Phytologist, 2008, 179(2): 546–556.
- [30] YANG B, ZHU W, JOHNSON L B, et al. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9807–9812.
- [31] ZHU W, YANG B, CHITTOOR J M, et al. AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11(8): 824–832.
- [32] SCHORNACK S, PETER K, BONAS U, et al. Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4*-but not in pepper *Bs3*-mediated perception [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(11): 1215–1225.
- [33] SCHORNACK S, BALLVORA A, GURLEBECK D, et al. The tomato resistance protein *Bs4* is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3 [J]. Plant Journal, 2004, 37(1): 46–60.

- [34] BOGDANOVA A J, SCHORNACK S, LAHAYE T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense [J]. *Current Opinion in Plant Biology* 2010, 13(4): 394–401.
- [35] TAKKEN F L, TAMELING W I. To nibble at plant resistance proteins [J]. *Science* 2009, 324(5928): 744–746.
- [36] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics* 2011, 188(4): 773–782.
- [37] URNOV F D, REBAR E J, HOLMES M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases [J]. *Nature Reviews Genetics* 2010, 11(9): 636–646.
- [38] RAHMAN S H, MAEDER M L, JOUNG J K, et al. Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier [J]. *Human Gene Therapy* 2011, 22(8): 925–933.
- [39] PEREZ-PINERA P, OUSTEROUT D G, GERSBACH C A. Advances in targeted genome editing [J]. *Current Opinion in Chemical Biology* 2012, 16(3/4): 268–277.
- [40] SUN N, ABIL Z, ZHAO H. Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems [J]. *Journal of Biotechnology* 2012, 7(9): 1074–1087.
- [41] SUN N, ZHAO H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing [J]. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110(7): 1811–1821.
- [42] GUO J, GAI T, BARBAS C F, 3rd. Directed evolution of an enhanced and highly efficient *Fok I* cleavage domain for zinc finger nucleases [J]. *Journal of Molecular Biology* 2010, 400(1): 96–107.
- [43] DOYON Y, VO T D, MENDEL M C, et al. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures [J]. *Nature Methods* 2011, 8(1): 74–79.
- [44] POLITZ M C, COPELAND M F, PFLEGER B F. Artificial repressors for controlling gene expression in bacteria [J]. *Chemical Communications* 2013, 49(39): 4325–4327.
- [45] BLOUNT B A, WEENINK T, VASYLECHKO S, et al. Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology [J]. *PLoS One* 2012, 7(3): e33279.
- [46] MAHFOUZ M M, LI L, PIATEK M, et al. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein [J]. *Plant Molecular Biology* 2012, 78(3): 311–321.
- [47] CONG L, ZHOU R, KUO Y C, et al. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains [J]. *Nature Communications* 2012(3): 968.
- [48] LI Y, MOORE R, GUINN M, et al. Transcription activator-like effector hybrids for conditional control and rewiring of chromosomal transgene expression [J]. *Scientific Reports* 2012(2): 897.

Transcription Activator Like Effectors and Its Application in Biotechnology

WU Luning¹, JING Xiaohui¹, SHEN Yan^{2,3}

1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Crops Resources / College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Protection, Development and Utilization of Tropical Crops Genetic Resources, Ministry of Education / College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou 571737, China; 3. Coconut Research Institute, CATAS, Wenchang 571339, China

Abstract: Transcription activator like effectors (TALEs) are injected via the type III secretion pathway of many plant pathogenic *Xanthomonas* spp. into plant cells where they contribute to infection of disease or trigger resistance by binding to DNA and turning on TALEs-specific host genes. All TALEs are composed of an N-terminal translocation domain, central tandem repeat DNA binding domain, C-terminal nuclear localization signals and an acidic transcriptional activation domain. Advances in our understanding of TALEs and their targets have yielded new models for pathogen recognition and defense. Recent elucidation of the basis for specificity in DNA binding by TALEs expedites further discovery and opens the door to biotechnological applications. Here, we summarized the recent advances and prospects of TALEs technology with an emphasis on its structure and functions, as well as the transcription activator-like effector nucleases.

Key words: transcription activator like effectors; transcription activator like effectors nucleases; structural features of TALEs; prospects of TALEs in biotechnology