

Supplementary Table S1. Custom TALENs and target sites.

Gene	Organism	TAL1, TAL2 Plasmids	TAL1, TAL2 Repeat number	Spacer	TAL1, TAL2 RVD Sequences	DNA Target Sequence with Spacer (TAL1, TAL2 underlined)
HPRT1 A	Human	pTAL141N, pTAL142N	17,20	15	TAL1: NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG TAL2: HD HD NI NG NN NI NN NN NI NI NG NI NI NI HD NI HD HD NG	5' - <u>GCATACCTAATCATTAT</u> GCTGAGGATTGGAA AGGGTGTATTTCCTCATGG
HPRT1 B	Human	pTAL143N, pTAL144N	20,17	15	TAL1: HD HD NI NG NG HD HD NG NI NG NN NI HD NG NN NG NI NN NI NG TAL2: NI NG NI HD NG HD NI HD NI HD NI NI NG NI NN HD NG	5' - <u>CCATTCCTATGACTGTAGAT</u> TTTATCAGACTGAAG AGCTATTGTGTGAGTAT
CFTR A	Human	pTAL148N, pTAL149N	29,30	28(25)	TAL1: NN NN NI NG NG NI NG NN HD HD NG NN NN HD NI HD HD NI NG NG NI NI NI NN NI NI NI NI NG TAL2: NN NN HD NI NG NN HD NG NG NG NN NI NG NN NI HD NN HD NG NG HD NG NN NG NI NG HD NG NI NG	5' - <u>GGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAAT</u> ATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAAT <u>ATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCC</u>
CFTR B	Human	pTAL150N, pTAL151N	23,28	25(22)	TAL1: NN NN HD NI HD HD NI NG NG NI NI NI NN NI NI NI NG NI NG HD NI NG TAL2: NN NN HD NI NG NN HD NG NG NG NN NI NG NN NI HD NN HD NG NG HD NG NN NG NI NG HD NG	5' - <u>GGCACCATTAAAGAAAATATCAT</u> CTTTGGTGTTCCTATGATGAATAT <u>AGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCC</u>
gridlock	Zebrafish	pTAL112, pTAL117	17,16	18	TAL1: NI NG NG NG HD NN NI HD NN HD NG HD NI NG NG HD NG TAL2: HD HD HD NN NN NI NI NN HD HD NN NI NG NN HD NG	5' - <u>ATTTGACGCTCATTCT</u> CTGCCATGGACTTCTTG AGCATCGGCTTCCGGG
white	Drosophila	pTAL152N, pTAL153N	22,24	24	TAL1: HD HD NG NN NI HD HD NI NG NG HD NI NG HD NI NN HD HD NN NG HD NG TAL2: NN HD HD HD NG HD NN NN HD HD NI NG HD NI NN NI NI NN NN NI NG HD NG NG	5' - <u>CCTGACCATTATCAGCCGTCT</u> TCCGAGCTGTTTGAGCTCTTTGAC AAGATCCTTCTGATGGCCGAGGGC
GFP	Jelly Fish	pTAL156N, pTAL157N	26,25	25	TAL1: HD HD NI NG NN NN HD HD NI NI HD NI HD NG NG NN NG HD NI HD NG NI HD NG NG NG TAL2: NN HD HD NN HD NG NG HD NI NG NI NG NN NI NG HD NG NN NN NN NG NI NG HD NG	5' - <u>CCATGGCCAACACTTGTCACTACTTT</u> CTCTTATGGTGTCAATGCTTTTCA <u>AGATACCCAGATCATATGAAGCGGC</u>
eGFP	Jelly Fish	pTAL158N, pTAL159N	24,26	21	TAL1: NI HD NI NI HD NG NI HD NI NI HD NI NN HD HD NI HD NI NI HD NN NG HD NG TAL2: HD NG NG NN NI NI NN NG NG HD NI HD HD NG NG NN NI NG NN HD HD NN NG NG HD NG	5' - <u>ACAACACTACAACAGCCACAACGTCT</u> ATATCATGGCCGACAAGCAGA AGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAG
Plasmepsin A	Plasmodium	pTAL160N, pTAL161N	19,22	15	TAL1: HD NN HD NI NI NI NN NI NI NG NG NG HD NG NG NG NI NI NG TAL2: NI HD NI HD NN NN NN NI NI NI HD NG NG NI NI HD NN NI NI NN NI NG	5' - <u>CGCAAAGAATTTCTTTAAT</u> TCTAGATACAGGTTT ATCTTCGTTAAGTTTCCCGTGT
Plasmepsin B	Plasmodium	pTAL162N, pTAL163N	23,24	15	TAL1: NI NG NG NI NG NG NN NN HD HD NG NG NI NI HD HD NI NG NI HD NG HD NG TAL2: HD HD NI NG NN NG NI NI NI NI HD NI NG NG NG NG NG HD NG NN NI HD NI NG	5' - <u>ATTATTGGCCTTAACCATACTCT</u> TATCTCTTATTCTTT ATGTCAGAAAAATGTTTTACATGG
TT4 A	Arabidopsis	pTAL164N, pTAL165N	19,22	15	TAL1: HD HD NI NG HD NG HD HD NG HD NI NI NN NN NI NG NN NG NG TAL2: HD NG NI NN NI HD NG HD NG NG HD NI	5' - <u>CCATCTCCTCAAGGATGTT</u> CCCGGCTCATCTCC AAGAACATTGTGAAGTCTAG

					HD NI NI NG NN NG NG HD NG NG	
TT4 B	Arabidopsis	pTAL166N, pTAL167N	15,16	15	TAL1: NN NG HD NN NG HD NG NG HD NG NN HD NI HD NG TAL2: NI NN NG HD NI NN HD NI HD HD NI NN NN HD NI NG	5'- <u>GTCGTCTTCTGCACT</u> <u>ACCTCCGGCGTCGAC</u> <u>ATGCCTGGTGCTGACT</u>
ADH1	Arabidopsis	pTAL 69N, pTAL 74N	15,15	18	TAL1: HD HD NN NN NI NG NN HD NG HD HD NG HD NG NG TAL2: NI NN NI HD NI NI NI HD HD NI HD NI NI HD NG	5'- <u>CCGGATGCTCCTCTT</u> <u>GACAAGGTCTGTATTGTC</u> <u>AGTTGTGGTTTGTCT</u>
SuRB A	Tobacco	pZHY096 pZHY106	17,20	15	TAL1: NI HD NG NN NI NI NG NI NI NG HD NI NI HD NI HD NG TAL2: NI NG NI NN NI NI HD HD NN NI NG HD HD NG HD HD HD NI NG NG	5'- <u>ACTGAATAATCAACACT</u> <u>TGGGAATGGTGGTTC</u> <u>AATGGGAGGATCGGTTCTAT</u>
SuRB B	Tobacco	pZHY108 pZHY109	19,19	15	TAL1: NI HD HD NG HD NI NG HD NI NN NN NI NI HD NI NG NN NG NG TAL2: HD NG NG NG NN NI NI NI NN HD HD HD HD NN HD HD NI HD NG	5'- <u>ACCTCATCAGGAACATGTT</u> <u>CTACCTATGATTCCC</u> <u>AGTGGCGGGGCTTTCAAAG</u>

Supplementary Table S2. Activity, conformity to rules, and length of TALENs tested in the yeast assay. Activity: – no activity, + activity less than 25% of ZFN Zif268, ++ activity 25-50% of ZFN Zif268, +++ activity 50-75% ZFN Zif268, ++++ activity >75% ZFN Zif268.

TALEN	RVDs	Activity	% GATC	Ends in NG	RVD Sequence
ADH1_1R12	12	-	y	n	HD HD HD NI NN NI NI NN NG NI NI NI
ADH1_2R12	12	-	n	n	NI NN NI HD NI NI NI HD HD NI HD NI
tt4_1L15	15	-	y	y	NN NN HD NI HD NG NN HD NG NI NI HD HD HD NG
telo_1R15	15	-	n	y	HD NN NN NG NG NG NN HD NG NI NG HD NN NG NG
ADH1_1R15	15	+	y	y	HD HD HD NI NN NI NI NN NG NI NI NI HD NI NG
ADH1_2L12	12	+	y	y	HD HD NN NN NI NG NN HD NG HD HD NG
grid_1R10	10	+	n	n	NI HD HD HD HD NG HD NG HD HD
telo_1L15	15	+	y	y	HD NG NG NN NG HD HD NN HD NI NG NN NI NG NG
telo_2L16	16	+	y	y	NI NG NG HD HD HD HD NI HD NN NI NN HD NG HD NG
telo_2R17	17	+	n	y	NI NN NI HD NI NN NN NI NI NN NG NN NN NI NN HD NG
ADH1_1L12	12	++	y	n	NI NG HD NI NI NN NI NG NG HD NG HD
ADH1_2R15	15	++	y	y	NI NN NI HD NI NI NI HD HD NI HD NI NI HD NG
grid_1R13	13	++	y	y	NI HD HD HD HD NG HD NG HD HD NN HD NG
ADH1_2L15	15	+++	y	y	HD HD NN NN NI NG NN HD NG HD HD NG HD NG NG
grid_1L16	16	++++	y	y	NI HD HD HD HD NG HD NG HD HD NN HD NG NG HD NG

Module

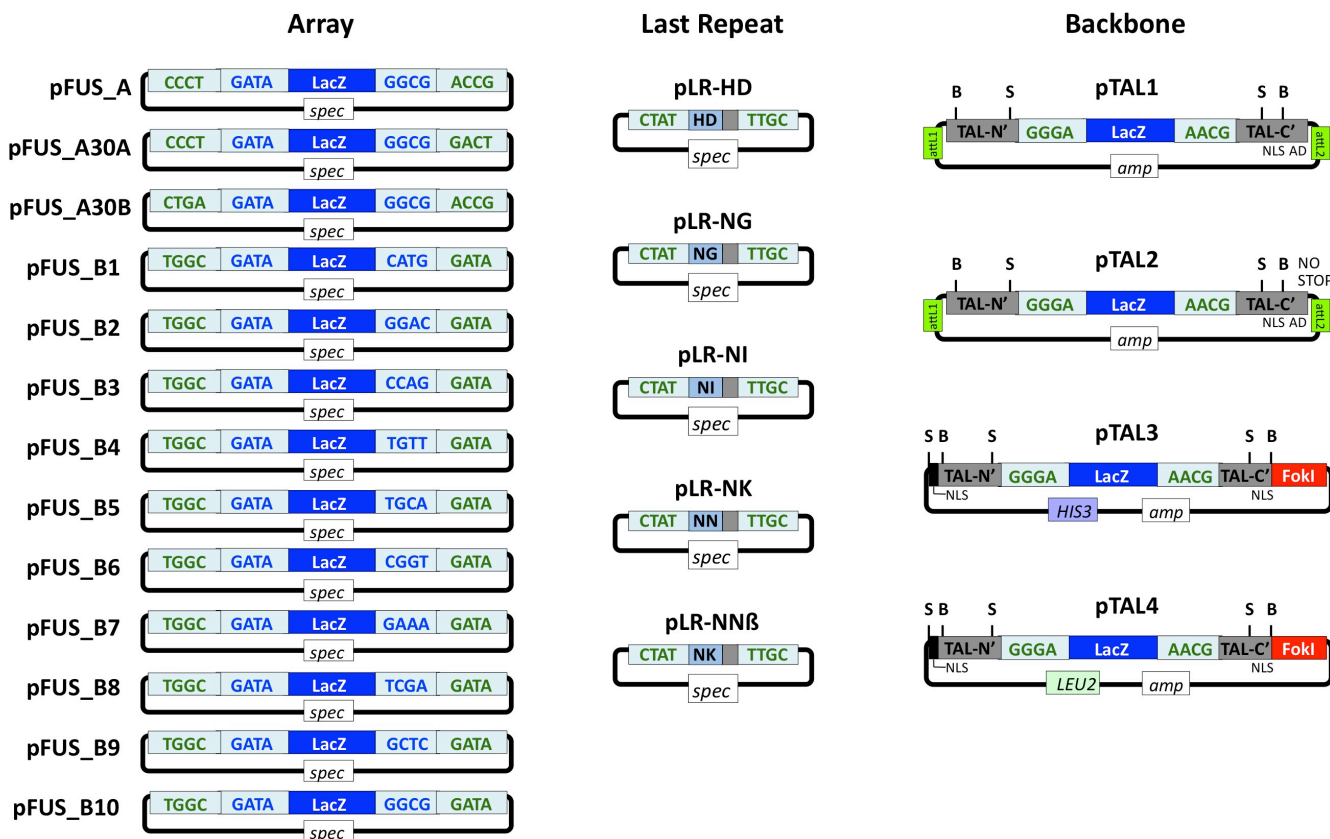
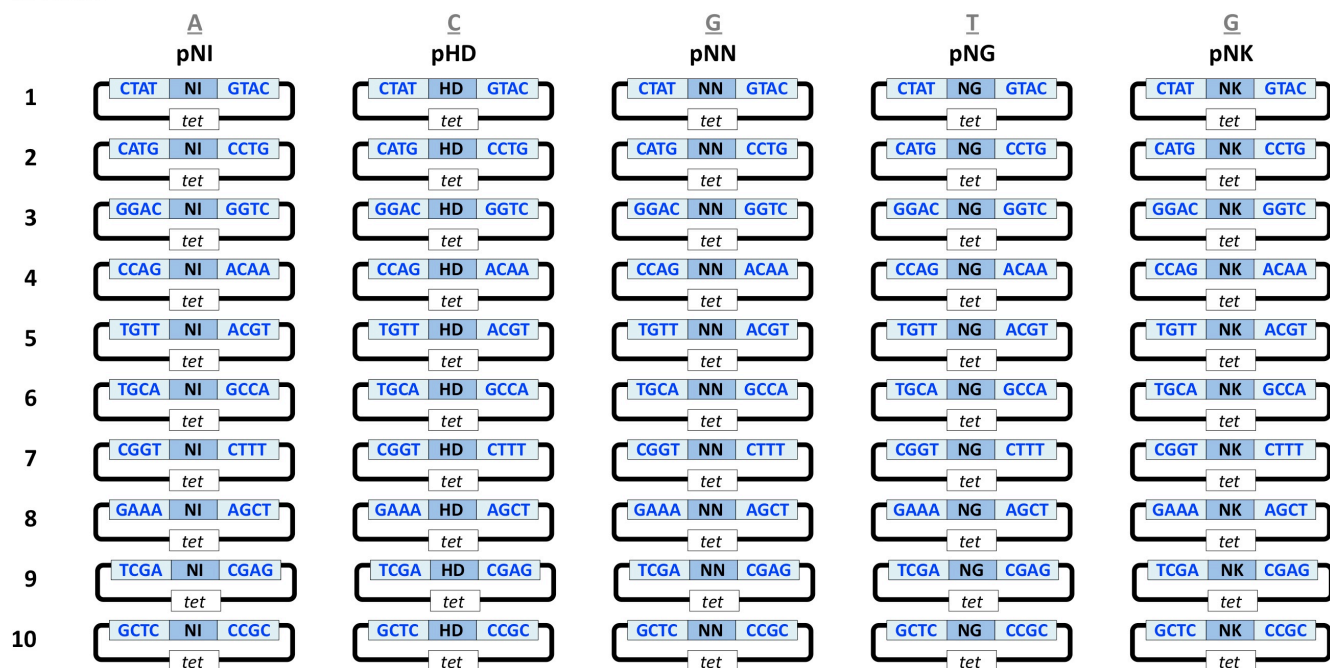


Fig. S1. Module, array, last repeat, and backbone plasmids. Overhangs left by *Bsa*I digestion are shown in blue font and by *Esp*3I in green. HD modules 2-10 contain a *Bsp*EI site (not shown) not present in the other modules. NLS, nuclear localization signal(s); AD, transcriptional activation domain; *tet*, tetracycline; *spec*, spectinomycin; *amp*, ampicillin; attL1 and attL2, recombination sites for Gateway cloning; B, *Bam*HI, and S, *Sph*I. Unique restriction enzyme sites flanking the entire coding sequences of the backbone constructs are not shown but can be found in the sequence files.

a

gglabx.plp.iastate.edu/TALENT/

from ... Gramene Rice Genome Annot... The R Project for St... Welcome to BioCon... Python Program

NG Image, 641x106 pixels) HTML Color Picker Find Engineered TAL Sites Python Program

TALE-NT

TAL Effector-Nucleotide Targeter

Home | Help | About

Enter FASTA sequences
 Enter up to 5000 total bases.
 (e.g. You may have 1 sequence of 5k bases, 5 sequences with 1k bases, or any such combinations)

```
>HPRT1_sequence
CTACAGGCATGTGTCCACACACCCGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGCGGGATTCACCGTGT
GCCAGGCTGTCTCGAATCCTGAGCTCAGGCAGTCTGCCTCAGCTCCCAAGTCTGGGATTA
CAGCTGTGAACCAACCCCGCCGCTGTTGTTTTCTACATAATTCATTATCATACCTACAAAGTAAACA
GTTACTAATCATCTTACACCTAAATTTCTCTGATAGACTAAGGTATTTTTAACATCTTAATCCAAT
CAAAATGTTGTATCCTTAATGCTCTCATTGAACAGCTATATTTCTTTTCAGATTAGTGATGATGAAC
CAGGTATGACCTTGATTTATTTGATACCTAATGATGCTGAGGATTTGGAAAGGGTGTATTCC
TCATGGACTAATATGGACAGGTAAGTAAGTCTTAAAATGAGGTTTTTACTTTTCTTGTTAATTT
CAAAATCAGGAGCTGTTCTGAGTACTTGTCTTGAACATAAAGTGGCCAACTTAAATAACTGAT
GCTTTCTAAAATGCTTTTATTTAAAATAAAAGAGGGGCTTACTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
ATAGTGGACTCTGTAGGACCAAGCAAAAGTAAACATTTAAGGGAGATGGAAGAGGACTCTAGCCAG
AGTCTTGATTTCTCAGTCTAAACAGGGTAATGACTGGGCTGAATCACTAAAGGCAAGGTGAGATT
TTTATTATTGCACATCTAGCTGAAATTTTTCTGTTAAGTCAATTACAGTGAACAACTTACTGCTGTA
TTGAATGCTGCATTGTATGCTGCCTATTCTGTGTTTTTAAATTAATAATCAAATATTTGT
GTTATAAAATTTCTAACTATGGAGCCATAAACAAGAACTAAAGTCTCTCTTTCAGCCTTCTGTA
CACATTTCTCTCAAGCACTGGCTGATGTACTACTATGAAAAGTACATATATACATTTATATTT
AACGTATGAGTATAGTTTTAAATGTTATTGGACACTTTTAAATTTAGTGTCTAGAGCTATCAATATA
TTTTAAAGGTTGCATAGCATTCTGTTTAAAGGATACCATAACTGATTTAAACAGTCACTATTGATAG
ACACTATTTTGTCTTACCAGCTGTACTAGAAGAAACATTCTTTACATGTTTGGTACTTGTTCAGCTTT
ATTCAAGTGAATTTCTGGTCAAGGGGAAAGATTTTGAATATTTGTTGATTTGCCAATTTCTCTCT
AAGAAGTTGAATCATTATCTCCTGATGTTATGAGAGTACCTTCTTCCAAATTTGTCTTTCT
```

Spacer Min Max
 (Default spacers are 15, 18-30 bases. Check this option to enter a min and max to search a range of spacer sizes)

Require A, C, or G at position 1 (not a T)
 Require C, G, or T at position 2 (not an A)
 Require a T at position N
 Allow sites to end in G
 Percent composition

b

1295645253_TALEN_pairs_all.txt - OpenOffice.org Calc

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	Gene	TAL1_star	TAL2_star	TAL1_len	TAL2_len	Spacer_length	Spacer_range	Perfect_TAL1	Perfect_TAL2	Plus_strand_sequence
2	HPRT1_sequence	374	442	15	28	26389-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	ATGCTGAGGATT
3	HPRT1_sequence	374	425	17	20	15391-405	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	HD HD NI NG NN NI NN NN NI NI NG NI NI NI HD NI HD HD	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
4	HPRT1_sequence	374	428	17	23	15391-405	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI NN NG HD HD NI NG NN NI NN NN NI NI NI NI NI HD	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
5	HPRT1_sequence	374	436	17	22	24391-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG HD HD NI NG NN NI	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
6	HPRT1_sequence	374	438	17	24	24391-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG HD HD NI NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
7	HPRT1_sequence	374	442	17	28	24391-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
8	HPRT1_sequence	374	436	20	22	21384-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
9	HPRT1_sequence	374	438	20	24	21384-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NN HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG HD HD NI NG NI	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
10	HPRT1_sequence	374	442	20	28	21384-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GCTGAGGATT
11	HPRT1_sequence	374	436	20	15	28394-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	GCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GAGGATT
12	HPRT1_sequence	374	438	20	17	28394-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NN NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG HD HD NI NG	GCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GAGGATT
13	HPRT1_sequence	374	442	20	21	28394-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GAGGATT
14	HPRT1_sequence	374	446	20	25	28394-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GAGGATT
15	HPRT1_sequence	374	449	20	28	28394-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	GAGGATT
16	HPRT1_sequence	374	436	26	22	15400-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
17	HPRT1_sequence	374	438	26	24	15400-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
18	HPRT1_sequence	374	442	26	28	15400-414	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
19	HPRT1_sequence	374	436	26	15	22400-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	GCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
20	HPRT1_sequence	374	438	26	17	22400-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	GCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
21	HPRT1_sequence	374	442	26	21	22400-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
22	HPRT1_sequence	374	446	26	25	22400-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
23	HPRT1_sequence	374	449	26	28	22400-421	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	HPGCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T
24	HPRT1 sequence	374	442	26	17	26400-425	NN HD NI NG NI HD HD NG NI NI NG HD NI NG NG NI NG	NI HD HD NG NN NG HD HD NI NG NI NI NG NG NI NN NG	GCATACCTAATCATTATGCTGAGGATT	T

Fig. S2. The TAL Effector-Nucleotide Targeter. (a) Screenshot showing the DNA sequence input window and options to include or exclude specific guidelines and to specify spacer lengths. (b) Sample output for the human *HPRT1* gene showing candidate target sequences and corresponding TALEN RVD sequences. Highlighted in the top row is the *HPRT1* A (Fig. 5) target site information. The targeter URL is boglabx.plp.iastate.edu/TALENT/.

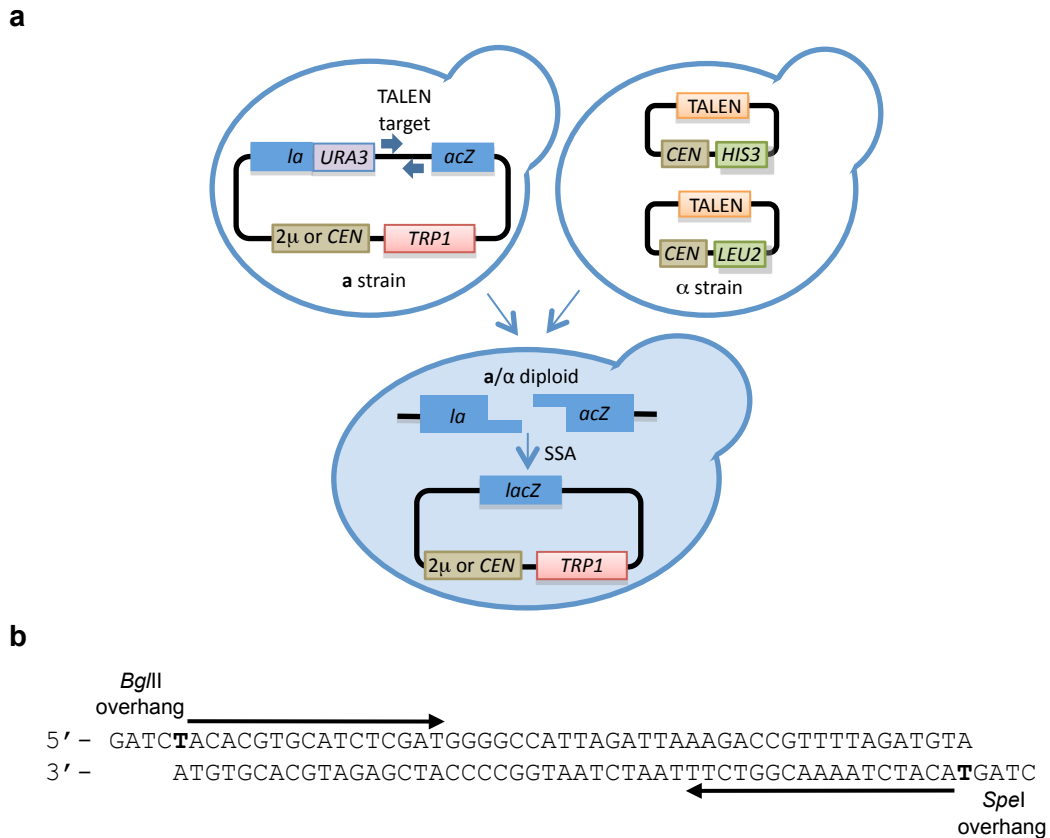


Fig. S3. The yeast assay for testing TALEN function. (a) Schematic of the assay (see text for details). SSA, single-strand annealing. (b) Example of target site oligonucleotides that are synthesized, annealed and cloned into the target plasmid pCP5. Arrows indicate the opposing TALEN monomer binding sites, separated by a spacer. The T preceding each site is in bold.