



# 靶向基因修饰技术在免疫缺陷动物模型研究中的应用进展

信吉阁<sup>1,2</sup>, 曾养志<sup>1\*</sup>

(1. 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 云南 昆明 65020;  
2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

**【摘要】** 免疫缺陷动物模型在人类相关疾病机理研究、药物研发、器官移植研究和干细胞研究中有重要的应用。但由于传统基因修饰动物构建技术难度大、效率低等限制,在中型、大型动物中获得的免疫缺陷动物模型还很少。近年来新兴的靶向基因修饰技术,包括 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 等,为高效率免疫缺陷动物模型构建提供了技术基础。本文就 ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 的技术原理及研究进展进行概况介绍,并详细地阐述这些技术在中型和大型动物中免疫缺陷动物模型构建方面取得的进展,包括 KO *Rag1/Rag2* 兔、KO *Rag1/Rag2* 猪、KO *IL2rg* 猪、KO *Ppar-γ/Rag1* 猴等。这些免疫缺陷动物模型不仅能用于人类 SCID 相关疾病研究,评价干细胞移植的效率和安全性,且可进行临床前手术治疗研究,生产人源化动物模型等,进而架起实验动物与医学应用的桥梁,促进临床前细胞再生策略的综合评价体系的发展。

**【关键词】** 免疫缺陷;动物模型;靶向基因修饰技术;*Rag* 基因;*IL2rg* 基因

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0535-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.018

## Research progress of immunodeficient animal models using gene modification techniques

XIN Ji-ge<sup>1,2</sup>, ZENG Yang-zhi<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Banna Minipig Inbred Line of Yunnan Province, Kunming 650201, China;  
2. Animal Science and Technology College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

**【Abstract】** The established immunodeficient animal models could be used as valuable resource for mechanism research of related disease in humans, drug discovery and development, translational research and stem cell research. However, it is difficult and low-efficient to establish the genetic modified animal models using traditional technologies. The reports for immunodeficient animal models are few in middle-size and large animals. Recently, several effective gene-targeting tools, including ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9, develop quickly and provide technology basis for the establishment of immunodeficient animal models. In this paper, the technology principles and research progresses of ZFNs, TALENs, CRISPR/Cas9 are introduced. The significant progresses of these emerging technologies achieved in immunodeficient animal models are also elaborated, including KO *Rag1/Rag2* rabbit, KO *Rag1/Rag2* pig, KO *IL2rg* pig, KO *Ppar-γ/Rag1* monkey, and so on. In addition to being models for researching SCID-related diseases in humans, and evaluating the efficacy and safety of stem-cell engraftment, these models may be also useful to develop surgical procedures for placement of grafts before clinical trials in humans, to produce humanized animals and bridge the gap between laboratory animal and medicinal research. The immunodeficient animal models described here represent a step toward the comprehensive evalua-

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31360532);云南省应用基础研究计划项目(2013FB041);校博士科研启动基金项目(2002374)。

[作者简介] 信吉阁,女,讲师,博士,研究方向:现代生物技术。E-mail: synlelovely@163.com

[通讯作者] 曾养志,男,教授,硕士生导师,研究方向:遗传学研究。E-mail: zengyangzhi@sina.com

tion of preclinical cellular regenerative strategies.

**【Key words】** Immunodeficiency; Animal models; Gene-targeting technology; Gene modification techniques *Rag* gene; *IL2rg* gene

Corresponding author: ZENG Yang-zhi, E-mail: zengyangzhi@sina.com

实验动物和动物模型常被称为人类替难者,科研活试剂,利用动物实验开展的与人类相关的基础研究,已在医学各个领域做出了许多创造性、里程碑式的科研成果。而免疫缺陷动物是指由于先天性遗传突变或人工方法造成免疫系统某种或多种成分缺陷的动物,是一种进行生物医学研究的重要工具。从先天性无胸腺的裸鼠(nude mouse)、严重联合免疫缺陷症(severe combined immunodeficient disease, SCID)小鼠的发现,到移植了人免疫组织或免疫细胞使之具有人类部分免疫系统的 SCID-hu 小鼠,利用这些免疫缺陷动物模型,已在细胞水平和分子水平阐明了造血系统和免疫系统的发生和调节的关键问题,而且在病毒学、免疫学、血液病学等研究领域有广泛的应用。此外还在犬<sup>[1,2]</sup>、猪<sup>[3,4]</sup>、马<sup>[2,5]</sup>等大型哺乳动物中发现的先天性自发的免疫缺陷动物。但先天性的免疫缺陷动物数量和类型少,且不能人为控制。

转基因修饰技术和体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)的发展和完善,为生产免疫缺陷动物模型的构建开辟了崭新的途径。常用的基因修饰技术有逆转录病毒载体法、原核显微注射、精子载体法、SCNT 及胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)法等。每种方法都存在一定的优劣势。其中原核显微注射技术被认为是生产转基因动物最可靠的方法,特别是在小鼠中,这一技术得到了广泛的应用,但易产生嵌合体,且需要在获得大量的动物个体基础上再进行转基因整合和表达的筛选。尽管基于完善的 ES 系统和胚胎重建技术,小鼠基因敲除操作技术得以较广泛地应用。如已获得多种与免疫缺陷相关的基因修饰鼠<sup>[6-9]</sup>。但大多数动物尚未建立完善的 ES 系统,科学研究者在大动物 ES 建系方面虽然做了很多努力,但都没有能够得到生殖系嵌合 ES。由于缺少真正的 ES,大动物的基因打靶难以实现,利用传统方法获得基因敲除动物的报道很少。

## 1 新兴的靶向基因敲除技术

近年来新兴了多种基因高效靶向修饰和调控技术,包括锌指核酸酶技术(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应因子核酸酶技术(tran-

scription activator-like effector nuclease, TALENs)及 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated 9) 技术等。这些技术提高了基因敲除的效率和特异性,不仅为研究基因功能开辟了新的途径,也能有助于大动物免疫缺陷模型构建研究,进而促进生物学、医学等相关领域的研究的发展。

### 1.1 ZFNs

ZFNs 技术的核心设计原则是将特异性识别模块和功能模块这两种有特定功能的结构域融合,形成具有特定功能的蛋白<sup>[10]</sup>。3-6 个 Cys2-His2 锌指蛋白重复单位构成单个 ZFN 的 DNA 结合结构域,其功能是特异性识别 1 个三联体碱基;FokI 的 C 端的 96 个氨基酸残基组成单个 ZFN 的 DNA 剪切域,具有非特异性核酸内切酶功能。一个锌指蛋白组与一个 FokI 单体相连组成一个 ZFN,识别特定的基因靶位点,当两个靶位距离为 6-8 bp 时,两个单体 ZFN 相互作用而产生酶切功能<sup>[11]</sup>。在这特异位点产生 1 个 DNA 双链切口(double strand breaks, DSB),然后利用细胞固有的(homologous recombination, HR)或非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)这两种修复机制进行切口修复。HR 途径可使基因组 DNA 得到完全的修复,或是在 DSB 位置发生基因交换,而 NHEJ 途径可基因组 DNA 会产生插入碱基或者缺失碱基,可能会产生移码突变,进而导致基因功能丧失<sup>[12,13]</sup>。

利用 ZFNs 技术在特定基因位点产生的 DSB,研究者近年来已经在植物、线虫、果蝇、两栖类、人体细胞等多物种中进行高效率的基因定点修饰<sup>[14]</sup>。2009 年 ZFNs 在啮齿类哺乳动物中应用成功,获得了基因打靶大鼠<sup>[15]</sup>。2011 年 Lai 等<sup>[16]</sup>首次采用这一技术成功获得 PPAR- $\gamma$  基因打靶猪,这是世界上首次采用该技术在大型哺乳动物上实现内源基因的定点修饰,为缺少有效 ES 细胞的大动物的基因打靶提供了高效的技术路线。

### 1.2 TALENs 技术

研究在植物细菌 *Xanthomonas sp* 中发现了 TAL 蛋白氨基酸序列与核苷酸序列的对应关系,即其核酸结合域的氨基酸序列和其靶位点的核苷酸序列的

确定关系,NI 识别 A、NG 识别 T、HD 识别 C、NN 识别 G。重复单元由 34 个氨基酸重复序列组成,其被称为重复可变双残基(repeat variable di-residue, RVD)的第 12 和 13 个氨基酸能对应识别特定碱基<sup>[17,18]</sup>。利用 TAL 蛋白的特性,组成能特异结合碱基序列的模块蛋白,可以实现定点基因修饰。利用 TAL 的序列模块,可构建识别任意靶序列的重组核酸酶,如研究者将 TALEs 蛋白 C 末端的 AD 替换为 FokI 限制性内切酶,构建了具有较高效率的人工核酸酶 TALENs<sup>[19]</sup>,实现在特异的位点切断靶基因,然后在位点进行敲入,敲除或点突变操作。

TALENs 与 ZFNs 效率相似,但在基因序列选择、细胞、物种选择上具有优势。同时 TALENs 实验设计步骤更简单准确,实验所需成本低,脱靶现象少而产生的毒性低。TALENs 技术可在植物、人类细胞、酵母、斑马鱼以及大、小鼠、爪蟾、家蚕等各物种上进行基因修饰操作<sup>[20]</sup>。Carlson 等<sup>[21]</sup>利用构建的 TALENs,在牛和猪上采用胚胎显微注射和筛选细胞克隆的方法尝试获得基因敲除家畜,成功地得到了 *Ldlr* 基因敲除猪。Lai 等<sup>[22]</sup>采用体外转录 TALENs mRNA 向兔受精卵胞质内注射的方法,获得 *Rag1* 和 *Rag2* 基因敲除兔。Liu 等<sup>[23]</sup>利用 TALENs 技术在恒河猴和猕猴上实现了基因敲除。TALENs 基因打靶技术的研究和应用为高效率的基因打靶提供了技术基础,将推动转基因动物技术的发展。

### 1.3 CRISPR/Cas

CRISPR/Cas 是研究者基于细菌和古细菌一种不断进化适应的免疫防御系统改造而建立起来,研究者发现细菌被外来的噬菌体或病毒入侵时,能通过 CRISPR,即被称为成簇的有规律间隔的短回文重复序列,或是与之相关 Cas 的序列在 RNA 的介导下剪切外来基因,达到抵御的作用<sup>[24]</sup>。研究人员设计单链引导 RNA(single guide RNA, sgRNA),能模拟 crRNA 和 tracrRNA 的结构特征且具备了 crRNA-tracrRNA 复合物的功能,即在 sgRNA-Cas 系统中 sgRNA 部分能与 Cas9 结合并定向识别 DNA 序列,而 Cas9 则具有核酸内切酶的活性<sup>[25]</sup>。

与 ZFNs 技术和 TALENs 技术相比较,CRISPR/Cas 特点是制作过程简单、成本低廉、效率高<sup>[26]</sup>。Wang 等<sup>[27]</sup>研究者用 CRISPR/Cas9 系统一步法获得了多基因突变的小鼠。利用 CRISPR/Cas9 已获得多种基因打靶动物,如大鼠<sup>[28]</sup>、小鼠<sup>[29]</sup>、猪<sup>[30]</sup>、猴<sup>[31]</sup>等。Whitworth 等<sup>[32]</sup>报道通过 CRISPR/Cas9

系统获得 *CD163* 和 *CD1D* 基因敲除体细胞,然后进行 SCNT 获得了基因敲除猪。2014 年 10 月 Zou 和本文作者等利用 CRISPR/Cas9 系统和改造后的 Cas9-nickase 系统,选择 *PARK2* 和 *PINK1* 及编码酪氨酸酶的 *TYR* 基因,进行基因敲除操作,通过对 PFFs 转染一对 gRNA 质粒和 Cas9n 质粒成功获得 20 头 *PARK2* 和 *PINK1* 双基因敲除和 15 头具有典型白化表型特征的 *TYR* 基因敲除猪模型<sup>[33]</sup>。

作为一个新兴的技术,CRISPR/Cas9 目前存在最大的争议就是脱靶问题,相比于 ZFNs 技术和 TALENs 技术,因识别的靶位点序列短,CRISPR/Cas9 系统似乎更容易出现脱靶问题。多项研究通过提高 CRISPR/Cas9 的特异性以减少脱靶现象的发生<sup>[34,35]</sup>。

## 2 新技术在免疫缺陷动物模型构建上的应用

ZFNs、TALENs、CRISPR/Cas9 技术等多种基因高效靶向修饰和调控技术,已在多种动物上实现了基因修饰模型的构建,这里主要介绍在中型和大动物上已获得的与免疫缺陷相关的动物模型。这些工作主要集中在是对重排激活基因(recombination activating gene, *Rag*)基因和白介素 2 受体基因(interleukin-2 receptor gamma, *IL2rg*, 或  $\gamma$  *CD132*)基因敲除研究。RAG 基因主要是负责 T 细胞和 B 细胞重排的重组激活基因,RAG1/2 基因编码酶,能催化 Ig 和 TCR 基因 V(D)J 重排,在 B 和 T 淋巴细胞前体细胞产生多样性的 B 和 T 细胞初级免疫。*Rag1/2* 基因是两个相邻的基因,位于常染色体,编码的酶是蛋白复合体协同地行使功能。两个基因中的任意一个打断,V(D)J 重排不能完成,B 和 T 细胞的发育停滞在不成熟阶段。*Rag1/2* 基因功能在不同的哺乳动物物种里是保守的。在人类中,*Rag1/2* 突变导致 B 和 T 细胞完全缺失,称为 Omenn,不正常的 T 细胞没有足够的重排,能引起自体反应,病人症状与移植物抗宿主疾病相似。*Rag1/2* 敲除小鼠免疫缺陷,特征是缺少成熟 B、T 细胞<sup>[6,7]</sup>。*IL2rg* 基因突变会严重阻碍 B 细胞,T 细胞的发育和功能,完全阻碍了 NK 的发育,影响了淋巴结间叶原基的发育,继而淋巴结发育和组织不完全。哺乳动物 *IL2rg* 同源基因特异地位于 X 染色体,人类 *IL2rg* 突变将导致 X 染色体连锁重症联合免疫缺陷(X-linked severe combined immunodeficiency, XSCID)。T 细胞、NK 细胞缺失或数量极度减少,但 B 细胞数量上正常(或

是增加)但功能丧失。*IL2rg* 基因突变已发展了许多不同免疫缺陷小鼠品系<sup>[8]</sup>。

现在在兔、猪、猴这些中大型动物上已获得的免疫缺陷模型及相关研究进展简要介绍如下。

### 2.1 免疫缺陷兔模型

兔是一种重要的实验动物,对其某些遗传性状进行定向修饰,可大大地拓展家兔在生物医药研究领域的应用价值。但是,由于世界上还没有建立起具有生殖系嵌合能力的家兔胚胎干细胞系,兔的克隆效率又极低,获得基因敲除兔的难度极大。Song 等<sup>[22]</sup>首次将 TALENs 技术应用于兔基因敲除研究,根据 TALENs 靶点设计原则,分别在 *Rag1* 和 *Rag2* 上设计一对 TALENs,经体外转录后进行胞质注射,移植受体后分别获得了 18 和 15 个仔兔,突变率分别高达 94.4% 和 93.3%,其中, *Rag1* 有 11 只(61.1%)仔兔发生双敲, *Rag2* 有 7 只(46.7%)仔兔产生双敲。该研究获得了世界首例免疫缺陷家兔疾病模型,并建立了兔基因打靶的高效技术平台。

兔是常用的实验动物,与小鼠相比,其生理结构、发病症状等都更接近于人类。且体型适中,适合进行反复活体监测、采样等操作;同时繁殖快、饲养成本低适合大样品量实验数据的收集。而且一些致病突变在兔上引起的症状和在人类上引起的症状非常相似。诱发和自发突变的兔品种构建多种疾病模型,包括动脉粥样硬化、肥厚性心肌疾病、糖尿病等<sup>[39,40]</sup>。该研究获得的 *Rag* 基因敲除兔细胞和 B 细胞发育停滞,丧失了绝大部分的免疫功能等表型,将为生物医学研究包括人类相关疾病(如 Omenn 综合征)发病机制、药物开发、器官移植研究和干细胞研究提供了重要动物模型。

### 2.2 免疫缺陷猪模型

Huang 等<sup>[36]</sup>分别针对猪的 *Rag1* 和 *Rag2* 的外显子设计了 TALENs 质粒对,对猪的胎儿成纤维细胞进行转染后获得杂合和纯合的 *Rag1/2* 敲除的细胞克隆。细胞克隆用于体细胞核移植后获得 27 头克隆猪,其中有 10 头为 *Rag2* 单等位碱基缺失,9 头为 *Rag1* 双等位碱基缺失,3 头为 *Rag2* 双等位碱基缺失,这些碱基缺失都导致了外显子读码框移码。*Rag1/2* 双等位敲除猪表现出了典型的 SCID 特征,包括胸腺萎缩,脾脏发育不良,淋巴细胞减少,体细胞基因组 V(D)J 重排消失,无成熟的 T、B 细胞。由于猪在体型、寿命、生理指标,特别是免疫机制等与人类相近,该研究成功建立的 *Rag* 敲除的 SCID

小型猪模型有望在生物医药和转化医学中发挥重要作用。

Lee 等<sup>[37]</sup>进行了移植人 iPS 细胞和同种异体猪细胞到 *Rag2* 基因敲除重症联合免疫缺陷猪的研究。利用 TALENs 系统,SCNT 获得了 *Rag2* 基因敲除猪。双敲的猪或是缺失胸腺,或是发育不全。B、T 细胞脾脏骨髓缺失。在普通的饲养环境,在四周时与年龄相当野生型猪相比, *Rag2* 基因敲除猪表现出生长发育迟缓,脾脏有炎症和细胞凋亡现象。饲养在干净的环境里会更健康,注射人的 iPS 细胞,很快形成畸胎瘤,具有 3 胚层。进行同种异体滋养层干细胞移植有耐受性。

Masaito 等<sup>[38]</sup>研究者采用了一种操作简单且无外源基因整合的策略获得了 *IL2rg* 基因敲除猪,利用 ZFN-编码 mRNA 转染猪胎儿成纤维细胞,获得基因敲除细胞后进行 SCNT,共出生 4 头雄性 *IL2rg* 基因敲除猪。表型分析发现基因敲除猪完全缺失胸腺,T 细胞,NK 细胞几乎检测不到,B 细胞数量正常,这些与人类 X-连锁 SCID 疾病相似。

Shunichi 等<sup>[41]</sup>利用同源重组和连续核移植的方法也获得了杂合子 *IL2rg*<sup>+/-</sup> 雌性猪和 *IL2rg* 基因敲除雌性猪和 *IL2rg*<sup>-/Y</sup> 的雄性猪,表型为无胸腺,免疫球蛋白显著受损,T 细胞,NK 细胞明显减少,与人类 SCID 症状相似。同种异体骨髓移植,供体细胞在 *IL2rg*<sup>-/Y</sup> 杂合子中稳定整合。

因猪生理学与人类更接近,与啮齿类模型相比,猪动物模型能高保真地复制一些人类疾病,尤其对一些免疫系统相关的疾病。SCID 猪模型能为再生医学研究、异种器官移植、肿瘤发育提供有效的模型,有助于发展人类 SCID 疾病治疗策略,在移植生物学中也将有广泛的应用。

### 2.3 RAG1 基因敲除猴

2014 年 2 月 Niu 等<sup>[31]</sup>研究者首次获得了靶向基因编辑猴。猴是重要的动物模型,猴疾病模型能更好地模拟人类疾病,降低药物研究的风险,开发有效的治疗方案等。该研究利用 CRISPR/Cas9 系统,经胚胎细胞注射方法,同时对调节代谢的基因 *Ppar-γ*,调节免疫功能的基因 *Rag1*,调节干细胞和性别决定的基因这三个基因进行敲除,在对 15 个胚胎的基因组 DNA 进行测序后,发现其中有 8 个胚胎显示出两个靶基 *Ppar-γ* 和 *Rag1* 同时突变。随后,将基因修饰过胚胎移植到代孕母猴体内,生出了一对孪生猴。检测这对孪生猴的基因组 DNA 证实的确存在

*Ppar-γ* 和 *Rag1* 基因突变。研究人员指出, 婴儿猴目前仍太小, 尚不能断定基因编辑是否会对其产生生理和行为学影响。3 年后猴成年时, 还需观察这些基因编辑对后代是否有影响。该研究首次成功获得了基因工程灵长类, 证明了 CRISPR/Cas9 系统在猴基因敲除研究的有效性。

### 3 应用前景

干细胞在再生医学上有广泛应用前景, 现已获得的人 iPSCs, 可能为个体移植治疗提供组织来源。但仍需考虑的问题是获得的 iPSC 是否有潜在全能性, 应用于移植治疗是否安全。因此研究者越来越认识到除了啮齿类, 在许多生物医药应用上需要建立更多其他动物模型<sup>[42, 43]</sup>, 用于器官和细胞移植方案的研究。而且, 啮齿类小鼠和人类免疫系统功能和调节的各方面都有显著的不同<sup>[44]</sup>, 不适用于模拟一些人类遗传疾病和感染疾病, 且对于外科手术和临床监测操作来说, 啮齿类体型过小<sup>[45]</sup>。研究者试图通过非人灵长类来弥合啮齿类和人类之间的空白。但存在苛刻的伦理道德限制, 在欧洲禁止使用黑猩猩用于生物医学研究, 美国 NIH 也在 2011 年下令停止黑猩猩用于开展新的研究。综合考虑猪是理想的免疫缺陷动物模型。在 Lee 等<sup>[37]</sup> 研究中发现 *Rag2* 敲除猪和 *Rag2* 敲除鼠在表型上存在明显不同, 敲除鼠有小的但可检测到的胸腺<sup>[7]</sup>, 而猪则为完全没有胸腺或完全没有发育。在 *IL2rg* 基因敲除猪中也有相似的发现<sup>[38, 41]</sup>。*IL2rg* 基因打靶小鼠尽管表现出免疫缺陷表型<sup>[46]</sup>, 包括 NK 细胞活性消失, 注射纯化的人类造血干细胞, 可重构有功能的人类造血系统和免疫系统。但人的 XSCID 与 *IL2rg* 敲除小鼠存在表型上区别, *IL2rg* 敲除小鼠 B 细胞减少, *IL2rg* 敲除猪有 B 细胞, 与人类 XSCID 表型更接近。利用新技术高效获得带有  $T^+ B^- NK^+ SCID$  表型的 *Rag2* 突变猪,  $T^+ B^- NK^- IL2rg$  基因敲除猪, 能作为人类 SCID 相关疾病的模型, 评价干细胞移植的效率和安全性, 进行临床前手术治疗研究, 生产人源化猪。

近年来新兴的靶向基因敲除技术的出现, 新技术突破了传统技术的低效性, 且特异性极高, 极大地促进了动物模型构建研究的发展, 已在多个物种上成功实现基因定点修饰<sup>[47]</sup>。同时通过对小鼠等模式动物的基础研究, 现在对多种严重的人类疾病的分子基础已经了解清楚, 再利用近年来新兴的靶向

基因敲除技术可以实现在兔、猪、猴等动物上复制遗传疾病候选基因的损伤。大动物在基础研究方面不太可能代替小鼠, 但已经为平移研究提供强大的补充资源, 架起实验室研究与医学应用的桥梁。当然, 建立新的动物品系需要进行详细深入的特征描述, 充分地在动物上模拟人类疾病特征。在中型和大动物上的获得免疫缺陷模型使临床前细胞再生策略的综合评价体系迈进了一大步。

### 参 考 文 献

- [1] Felsburg PJ, Hartnett BJ, Henthorn PS, et al. Canine X-linked severe combined immunodeficiency [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1999, 69(2-4): 127-135.
- [2] Perryman LE. Molecular pathology of severe combined immunodeficiency in mice, horses, and dogs [J]. Vet Pathol, 2004, 41(2): 95-100.
- [3] Basel MT, Balivada S, Beck AP, et al. Human xenografts are not rejected in a naturally occurring immunodeficient porcine line: a human tumor model in pigs [J]. Biores Open Access, 2012, 1(2): 63-68.
- [4] Ozuna AG, Rowland RR, Nietfeld JC, et al. Preliminary findings of a previously unrecognized porcine primary immunodeficiency disorder [J]. Vet Pathol, 2013, 50(1): 144-146.
- [5] Felsburg PJ, Somberg RL, Perryman LE. Domestic animal models of severe combined immunodeficiency: canine X-linked severe combined immunodeficiency and severe combined immunodeficiency in horses [J]. Immunodef Rev, 1992, 3(4): 277-303.
- [6] Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes [J]. Cell, 1992, 68(5): 869-877.
- [7] Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement [J]. Cell, 1992, 68(5): 855-867.
- [8] Ito M, Hiratsuka H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. Blood, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [9] Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice [J]. Science, 2004, 304(5667): 104-107.
- [10] Morton J, Davis M W, Jorgensen EM, et al. Induction and repair of zinc-finger nuclease-targeted double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans* somatic cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(44): 16370-16375.
- [11] Dreier B, Beerli R R, Segal DJ, et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors [J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29466-29478.
- [12] Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, et al. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair [J]. DNA Repair (Amst), 2006, 5