



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0067329
(43) 공개일자 2012년06월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/09 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0062645(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2012년06월12일
심사청구일자 2012년06월12일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2008-0123029
원출원일자 2008년12월05일
심사청구일자 2008년12월05일</p> <p>(30) 우선권주장
1020070126410 2007년12월06일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
공일근
경상남도 진주시 신안동 34-4번지 신안한주빌라
가동 602호
조수진
광주광역시 북구 운암동 운암중흥파크 102동
1201호
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김순용</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 5 항

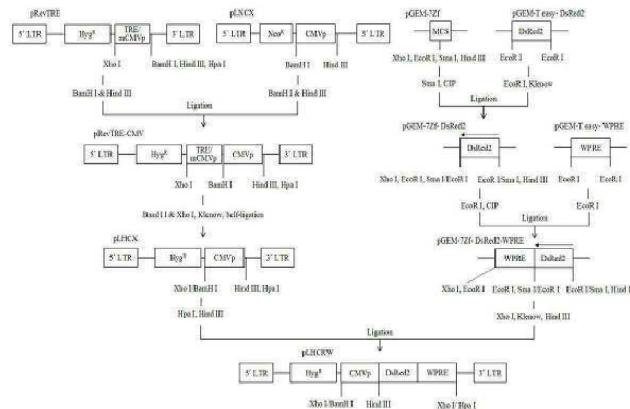
(54) 발명의 명칭 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 생산방법

(57) 요약

적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 생산방법이 개시된다. 본 발명에 따른 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 생산방법을 이용하면 높은 효율로 적색 형광단백질 유전자가 도입된 고양이를 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 유전적으로 설계된 "변형 애완동물"을 생산하는데 유용하다. 또한 본 발명에 따른 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이는 인간 질병치료를 위한 임상모델로 유용하게 이용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그의 자손에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그의 자손으로부터 분리된 세포에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이영수

전라남도 여주시 읍촌면 신평리 1017-13번지

이효상

전라남도 순천시 가곡동 시영아파트 1동 1001호

최유진

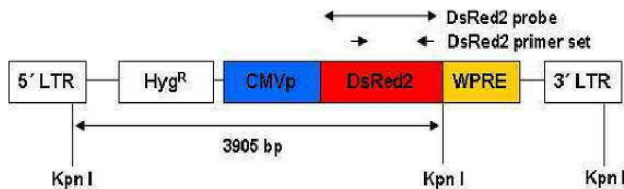
경상남도 진주시 정촌면 화개리 1698-3번지

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 고양이로부터 체세포를 분리하는 단계;
- (b) 적색 형광단백질을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 도 2의 개열지도를 가지며, 서열번호 1의 CMV 프로모터, 서열번호 2의 DsRed유전자 및 서열번호 3의 WPRE를 포함하는 적색형광단백질 발현용 pLHCRW 벡터를 제조하는 단계;
- (c) 상기 발현 벡터 pLHCRW를 레트로바이러스 패키징 세포에 트랜스팩션시켜 LHCRW바이러스를 수득, 배양하는 단계;
- (d) 상기 수득, 배양한 LHCRW바이러스로 상기 (a)단계에서 분리된 체세포를 감염시켜, 적색형광단백질로 형질 전환하고 배양하는 단계;
- (e) 고양이로부터 채취한 난자의 핵을 제거한 후, 상기 (d)단계에서 형질전환된 체세포와 전기융합시켜 배아를 제조하고, 전기 통전으로 활성화 시키는 단계
- (f) 적색형광 단백질의 발현여부로 형질전환된 배아를 분리하고 배반포 상태로 배양하는 단계; 및
- (g) 상기 형질 전환된 배반포를 회수한 후, 대리모 고양이의 난관에 이식하여, 새끼를 생산하는 단계; 를 포함하는 적색형광 단백질을 발현하도록 형질전환한 후 체세포 복제한 고양이의 생산방법.

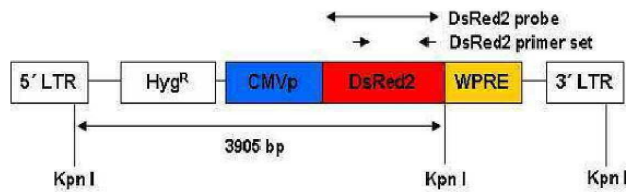
[도 2]



청구항 2

- (a) 고양이로부터 체세포를 분리하는 단계;
- (b) 적색 형광단백질을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 도 2의 개열지도를 가지며, 서열번호 1의 CMV 프로모터, 서열번호 2의 DsRed유전자 및 서열번호 3의 WPRE를 포함하는 적색형광단백질 발현용 pLHCRW 벡터를 제조하는 단계;
- (c) 상기 발현 벡터 pLHCRW를 레트로바이러스 패키징 세포에 트랜스팩션시켜서 LHCRW바이러스를 수득, 배양하는 단계;
- (d) 상기 수득, 배양한 LHCRW바이러스로 상기 (a)단계에서 분리된 체세포를 감염시켜, 적색형광단백질로 형질 전환하고 배양하는 단계;
- (e) 고양이로부터 채취한 난자의 핵을 제거한 후, 상기 (d)단계에서 형질전환된 체세포와 전기융합시켜 배아를 제조하고, 전기 통전으로 활성화 시키는 단계
- (f) 적색형광 단백질의 발현여부로 형질전환된 배아를 분리하고, 배반포 상태로 배양하는 단계; 및 상기 배반포를 회수한 후, 배반포에서 배아줄기세포를 분리하는 단계; 를 포함하는 적색형광 단백질을 발현하도록 형질 전환한 후 체세포 복제한 고양이의 배아줄기세포를 생산하는 방법.

[도 2]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (e) 단계의 전기융합은 0.1mM의 Mg^{2+} 가 함유된 0.3M 만니톨 배양액에서 2.0kV/cm의 직류 전압으로 20 μ sec 동안 2회 통전시키고, 상기 활성화는 0.1mM의 Mg^{2+} 가 함유된 0.3M 만니톨 배양액에서 1.0kV/cm의 직류전압으로 각각 20 μ sec 및 0.1 sec 동안 통전시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (f) 단계에서 배아의 배반포 상태로의 배양은, eCG 및 gCG 처리 36시간 후, 상기 (e) 단계에서 활성화된 배아를 대리모 난관에 이식시켜 7일간 체내에서 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (g) 단계에서 회수된 배반포를 대리모 고양이의 난관으로 이식하는 단계는, 대리모 고양이의 배란 96시간 후, 100 IU hCG 주사를 통해 동기화된 고양이를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 생산방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 변형된 애완동물의 생산뿐만 아니라 인간 질병치료를 위한 임상모델로 유용하게 사용될 수 있는 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 생산방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산되고 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 또는 그의 자손 및 그로부터 분리된 세포에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 고양이들은 인간들과 계통학적으로 가깝다. 그리고 고양이과의 동물 유전자 지도는 설치류 동물들 또는 다른 실험실용 포유 동물들보다 인간들과 같이 높은 수준의 체계적인 보존을 보이고 있다(Menotti-Raymond M, *et al.*, Genomics 1999; 57: 9-23). 또한, 약 250여가지의 유전학적 질병이 사람의 질병과 유사해 각종 난치성 질병을 연구하는데 중요 실험 모델로서 제안되고 있다(Gomez MC *et al.*, Theriogenology, 2006; 66: 72-81; Pontius JU *et al.*, Genome Research, 2007; 17:1675-1689).

[0003] 고양이의 유전자 조작은 생쥐에서 돌연변이를 목적으로 주로 생산하기 위해 사용되는 줄기 세포들(ES)과 같이 적합한 기술 부족에 의하여 제한을 받는다. 체세포 핵치환(SCNT)을 통하여 복제를 하는 것은 줄기세포 기술이 부재한 종들의 잠재적인 대체 접근방법이다. 체세포 복제는 분화된 체세포를 핵이 제거된 난자에 넣어 활성화시킨 다음에 일반 수정란과 동일한 방법으로 발생시키는 기술이다. 이와 같은 복제기술은 발생생물학 분야를 비롯한 기초과학 분야의 연구에 널리 이용될 수 있을 뿐만 아니라 유용 단백질의 생산, 질환 모델의 개발 및 장기 이식 분야 등 다양한 의학 및 의약 분야에 크게 기여할 것으로 예상되어 그 산업적 유용성이 매우 크다고 할 수 있다.

- [0004] 체세포 핵치환 기법은 형질전환과 복제 소(Cibelli JB *et al.*, Science, 1998; 280: 1256-1258.), 양(Denning C. *et al.*, Nature Biotechnology, 2001; 19: 559-562, McCreath KJ *et al.*, Nature, 2000; 405: 1066-1069), 염소(Keefer CL *et al.*, Biology of Reproduction, 2001; 64: 849-856), 그리고 돼지(Dai Y *et al.*, Nature Biotechnology, 2002; 20: 251-255, Lai L & Prather RS., Annals of Medicine, 2002; 34: 501-506)를 생산하기 위해 사용되어져 왔다.
- [0005] 체세포 핵치환으로 형질전환 동물의 생산능력을 향상시키기 위하여, 대리모에 배아를 이식하기 전에 유전적으로 변형된 도너세포와 재건된 배아들을 선발하는 방법은 아주 중요하다. 체세포 핵치환으로 형질전환 새끼를 얻기 위해 생쥐(Sato K *et al.*, Human Cell, 2001; 14: 301-304), 돼지(Park KW *et al.*, Biology of Reproduction, 2002; 66: 1001-1005) 그리고 소(Bordignon V *et al.*, Biology of Reproduction, 2003; 68: 2013-2023)로부터 생산하고자 도너 세포로서 녹색 형광단백질(GFP)이 쓰여졌다. GFP 유전자의 적중은 염색체 단백질 표지 및 특정 염색체 부위의 태깅(tagging)의 용이성, 세포질의 많은 단백질과 결합이 가능하며, 그 무해성으로 인하여 살아있는 세포에서 같은 성질의 세포골격사(cognate cytoskeletal filaments)를 발현시키는데 많이 이용되고 있다. 1994년 샤펜(Chalfie) 등은 해파리(Aequorea victoria)에서 얻은 GFP를 형광성 단백질 인식지표로 적용하여 돼지의 배아를 비롯한 살아있는 세포의 다양한 분자생물학적 변화를 관찰하였다. 이후 더욱 기능이 향상된 EGFP(enhanced GFP)가 개발되어 여러 동물에서 마커 유전자(marker gene)로 이용되고 있다. 적색 형광단백질(RFP)은 말미잘과 친척인 Discosoma [Matz MV *et al.*, Nature Biotechnology, 1999; 17: 969-973]로부터 DsRed로서 처음 분리된 일종의 형광단백질이다.
- [0006] 목적 형광단백질 유전자를 체세포에 이식시키기 위한 방법으로는 바이럴 벡터(viral vector)로 감염시키거나, DNA를 옮기는 지질(리포솜) 또는 비지질(중합체) 물질로 전기천공(electroporation)하는 방법 등이 알려져 있다. 예를 들면, GFP 돼지를 생산하기 위해 retroviral vector를 사용하는 방법(Park KW *et al.*, Animal Biotechnology, 2001; 12: 173-181), a-1,3-galactosyltransferase knockout 복제 돼지를 생산하기 위해 electroporation을 사용한 방법(Lai L *et al.*, Science, 2002; 295: 1089-1092), 형질전환 돼지를 생산하기 위해 리포솜의 조절로 유전자를 이식하여 GFP 유전자를 삽입한 방법(Hyun S *et al.*, Biology of Reproduction, 2003; 69:1060-1068) 등이 있다. 하지만, 아직까지 외부로부터 유래한 유전자를 발현하는 형질전환 복제 고양이에 대한 보고는 없었으며, 이를 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.
- [0007] 임상적으로 많이 확인되는 망막성 퇴행에서 두드러지게 나타나는 결과는 시각기능의 쇠퇴를 일으킬 수 있는 광수용체(photoreceptor)와 같은 세포들의 손실이다. 이 상황에서 시각과 관련된 질병을 근본적으로 해결할 수 있는 발달치료 측면에서 해결점을 찾아야 된다. 여러 동물 모델로부터 망막이식 또는 망막전구세포나 뇌전구세포와 같은 세포를 망막질환 동물에 이식하여 외부 세포의 증식과 망막세포로의 분화를 통하여 시력기능으로서의 회복이 가능한지에 대한 여러 연구들이 진행되어 오고 있었다.
- [0008] 신경조직 이식은 파킨슨 또는 헌팅턴 질병과 같은 신경퇴행성 장애를 치료할 수 있는 새로운 형식으로 제공될 수 있을 것이다. 신경이식의 임상적용을 위해서 가장 진척이 되고 있는 질병이 선조체 도파민의 고갈과 퇴행을 가져오는 파킨슨 질병이다. 사람에게 제공이 용이하고 도덕적 문제가 없는 방법을 사용하기 위해서는 먼저 동물의 장기로 적합하게 대체가 가능하여야 하고, 유전적으로 조작이 가능하다는 이점을 가지고 있어야 한다.
- [0009] 줄기세포(stem cell)는 대칭적 (symmetry)이거나 비대칭적 (asymmetry) 인 세포 분열 방법으로 무한 기간동안 자기의 분화 능력을 유지하거나 (self-renewal) 특정한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 포유동물의 배아 발달과정에서 정자와 난자에 의해 수정이 이루어진 직후 세포를 일컬어 전분화능(totipotent) 세포의 성격을 지니고 있다고 말할 수 있으며 상질배 단계까지 이러한 세포의 성격을 지닌다. 그 뜻은 모든 세포로의 분화뿐만 아니라 독립적으로 세포를 분리하여 자궁에 착상한다면 태아로 발달할 수 있다. 수차례의 세포 분할이 된 다음 배아는 좀 더 특정한 성격을 지니며 안쪽이 공벽으로 남아있는 이른바 배반포 단계를 거치게 된다. 배반포는 영양막 (trophoblast)과 속세포 덩어리 (Inner cell mass, ICM)로 구성되어 있으며 영양막은 자궁에서 태아 발달에 필요한 지지조직이나 태반을 형성하며 ICM은 실제로 모든 기관으로 분화 가능한 포텐셜을 가지는 세포가 형성된다. 이러한 ICM의 세포들은 전분화능 세포로 규정되며 모든 필요한 세포로 분화되지만 완전한 기관을 형성하지는 못한다. 이러한 ICM 세포를 배양하여 전분화능 상태의 배아 줄기 세포 (embryonic stem cell)가 형성되는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 사람 질병의 생체 임상에 적용할 수 있는 질환 모델 동물로서의 고양이에 주목하여, 표지인자인 적색형광단백질이 도입되어 유전적으로 변형된 고양이를 체세포 핵 치환법으로 제조하고자 하였다.
- [0011] 이에, 본 발명자들은 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus; VSV)의 표면 당단백질인 VSV-G 단백질에 의해 슈도타입화된 몰로니(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스(MoMLV)에 기초한 pLHCRW 벡터를 이용하면, 적색 형광단백질 유전자를 고양이 체세포에 높은 효율로 도입시키고, 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이를 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [0012] 본 발명의 목적은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 생산방법을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 고양이의 생산에 사용될 수 있는 적색 형광단백질 발현용 벡터를 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 적색 형광단백질을 발현하는 유전자가 고양이 염색체 안에 통합되어 있는 형질전환 고양이 또는 그의 자손을 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 자손으로부터 분리된 세포를 제공하는데 있다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 고양이로부터 체세포를 분리하는 단계; (b) 적색 형광단백질을 코딩하는 핵산서열을 포함하는 도 2의 개열지도를 갖는 발현벡터 pLHCRW를 제조하는 단계; (c) 상기 발현벡터 pLHCRW를 상기 분리된 체세포에 도입하고, 배양하는 단계; (d) 고양이로부터 채취한 난자의 핵을 제거한 후, 상기 (c)단계에서 배양된 발현벡터 pLHCRW가 도입된 체세포와 융합시켜 형질전환된 배아를 제조하고, 활성화시키는 단계; 및 (e) 상기 형질전환된 배아를 대리모 고양이의 난관에 이식하여, 새끼를 생산하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 생산방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 형질전환 고양이는 적색 형광단백질을 발현하는 외부 유전자가 고양이의 염색체 내에 안정하게 통합되도록 유전자 조작된 고양이를 의미한다. 또한, 고양이의 염색체 내에서 추가로 녹아웃(knock-out) 또는 녹인(knock-in)될 수 있다. 이 경우, 형질전환 고양이는 적색 형광단백질을 발현할 뿐만 아니라 고양이의 특정 유전자가 녹아웃 또는 녹인 되면서, 목적에 맞는 유전 형질을 추가로 획득할 수 있게 된다.
- [0018] 녹아웃 또는 녹인 되는 유전자는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 유용 단백질의 생산, 질환 모델의 개발 등의 목적으로 특정 유전자를 녹아웃 또는 녹인시킬 수 있다.
- [0019]
- [0020] 본 발명의 형질전환 고양이의 생산방법은 체세포 핵치환법에 따르며, 적색형광단백질을 코딩하는 유전자가 염색체 내에 삽입되어 구축될 수 있도록 도 2의 개열지도를 갖는 발현벡터 pLHCRW를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 발현벡터 pLHCRW는 서열번호 1의 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 서열번호 2의 DsRed2 유전자 및 서열번호 3의 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 발현벡터 pLHCRW는 고양이 염색체 내 특정 유전자를 녹아웃 또는 녹인시킬 수 있는 핵산서열을 추가로 포함할 수 있다. 이 경우, 하나의 pLHCRW 벡터에서, 적색 형광단백질을 발현하는 벡터내 시스템과 별도로, 고양이 염색체 내 특정 유전자를 녹아웃 또는 녹인시킬 수 있는 핵산서열이 별도의 프로모터하에서 발현되는 형태이다. 상기 벡터는 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있다.

- [0023] 또한, 상기방법에 의해 생산되고, 염색체 안에 서열번호 1의 CMV(cytomegalovirus) 프로모터, 서열번호 2의 DsRed2 유전자 및 서열번호 3의 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element)를 포함하는 재조합 융합 유전자가 통합되어 있는 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그의 자손을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 따른 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 생산방법을 이용하면, 대리모로 이식되기 전 양성반응을 보인 배아들을 선택할 수 있기 때문에 높은 효율로 적색 형광단백질 유전자가 도입된 고양이를 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 알레르겐-프리(allergen-free) 고양이와 같은 유전적으로 설계된 "변형 애완동물"을 생산하는데 유용하다. 또한 본 발명에 따른 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이는 인간 질병 치료를 위한 임상모델로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0025] 또한, 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이를 정상 고양이와 교배하여 얻은 자손에서도 적색 형광단백질을 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다. 즉, 한 세대에서 후대로 전달되는 유전성을 획득한 것이다.
- [0026] 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 자손은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이를 정상 고양이 또는 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이와 교배하여 얻을 수 있으며, 형질전환 고양이의 체세포를 복제하여 얻을 수도 있다. 각 세대가 1세대 형질전환 고양이와 같은 유전자형 및 표현형을 가지는지를 체크하도록 한다.
- [0027] 또한, 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 자손으로부터 분리된 세포를 제공한다.
- [0028] 당업자는 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 자손의 다양한 발생 단계의 다양한 기관에서 다양한 세포를 당업계에서 공지된 방법으로 분리할 수 있다. 조직 기원과 분리 방법에 따라 최종 분리된 세포의 특징은 차이가 나나, 본 발명의 형질전환 고양이 및 그 자손으로부터 분리된 세포 적색 형광단백질을 발현하는 특징을 가진다.
- [0029] 예를 들어, 망막, 뇌 등의 조직으로부터 망막전구세포를 분리할 수 있으며, 골수로부터 중간엽 세포를 분리할 수 있으며, 고양이의 배반포로부터는 배아 줄기세포를 분리할 수 있다.
- [0030] 각 조직으로부터, 세포를 분리하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 공지된 일반적인 방법들을 이용할 수도 있다. 예를 들어, 세포 밀도(cell density), 세포 표면 에피토프에 대한 항체 친화도, 세포 크기(cell size), 형광 방출(fluorescent emission) 정도에 의존하여 분리할 수 있다. 구체적으로, 밀도 구배 원심분리(density gradient centrifugation), 항체를 이용하는 방법으로는 MACS(magnetic activated cell sorter) 등의 방법을, 형광을 이용하는 방법으로는 FACS 등의 방법이 있다.
- [0031] 조직으로부터 분리된 세포를 배양하면 다양한 성질을 가지는 세포들이 포함될 수 있는데, 이런 세포 집단으로부터 특정세포만을 분리하기 위하여, 세포 표면 표지자를 이용하여, FACS를 이용하여 분리할 수도 있다.
- [0032] 즉, 형질전환 고양이 및 그 자손의 다양한 발생 단계 및 생체내의 다양한 기관에서 다양한 세포 집단을 재현성 있게 획득할 수 있다. 분리된 세포는 공지된 방법으로 배양, 분화시킬 수 있으며 다양한 목적으로 사용될 수 있다. 배양 및 분화 방법은 특별히 제한되지 않고, 분화를 촉진하는 인자를 목적에 맞게 처리할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0033] 본 발명은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이의 생산방법을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 고양이의 생산에 사용될 수 있는 적색 형광단백질 발현용 벡터를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 적색 형광단백질을 발현하는 유전자가 고양이 염색체 안에 통합되어 있는 형질전환 고양이 또는 그의 자손을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 적색 형광단백질을 발현하는 형질전환 고양이 및 그 자손으로부터 분리된 세포를 제공한다.

발명의 효과

[0037]

본 발명은 발생생물학 분야를 비롯한 기초과학 분야, 질환 모델의 개발 및 장기 이식 분야 등의 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 본 발명에 따른 pLHCRW 벡터의 제작과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 적색 형광단백질 발현용 pLHCRW 벡터의 개열지도를 개략적으로 나타낸 도면이다(LTR: long terminal repeat, Hyg^R: hygromycin-resistant gene, CMVp: cytomegalovirus promoter, DsRed2: 적색 형광단백질, WPRE: woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, 대략적인 Southern blotting probe 위치와 DsRed2 (or RFP) 유전자염기서열 증폭을 위한 PCR 프라이머 세트를 표시함).

도 3은 체세포 핵융합(SCNT)과정 및 고양이 섬유아세포에서의 RFP 발현을 나타낸 사진이다(a: semi-confluence 세포를 밝은빛 아래서 촬영한 것, b: 세미-콘플루언스(semi-confluence) 세포를 형광 아래서 촬영한 것, c: SCNT 전에 밝은 적색을 방출하는 트립신이 처리된 세포를 밝은빛 아래서 촬영한 것, d: SCNT 전에 밝은 적색을 방출하는 트립신이 처리된 세포를 형광 아래서 촬영한 것, e: RFP-양성 세포를 탈핵된 난자에 주입하는 것을 밝은빛 아래서 촬영한 것 f: RFP-양성 세포를 탈핵된 난자에 주입하는 것을 형광 아래서 촬영한 것, $\times 200$).

도 4는 TG 고양이의 PCR 및 써던 블랏(Southern blot) 분석 사진이다(I) PCR분석: pLHCRW 플라스미드(P), LHCRW 레트로바이러스로 유전자 변형된 고양이 섬유아세포(cell+), 유전자 변형 안된 고양이 섬유아세포(cell-), 유전자 변형 안된 고양이의 근육(NTM), 사산된 TG 고양이의 근육(M), 간(L), 신장(K), 뇌(B), 대장(I), 심장(H), 피부(S), 고환(T); TG 생자의 태반(PL), 증폭된 RFP 유전자 산물의 기대된 사이즈(화살표); (II) 써던 블랏 분석: 플라스미드 DNA(pLHCRW) 양성대조군(P), 마커(M), 비-TG 고양이(N) 사산된 TG 고양이(T), RFP 유전자 단편의 기대된 사이즈(화살표).

도 5는 생후 60일의 형질전환 복제고양이(왼쪽) 및 대조군 고양이(오른쪽)의 RFP 발현사진이다(a: 가시광선 사진, a': 형광사진, a' 에서의 적색 형광은 $540 \pm 20\text{nm}$ 의 조사(illumination) 및, $600 \pm 25\text{nm}$ 파장의 최장 투과도를 가진 emission filter로 검출한 것임).

도 6은 비-형질전환 고양이(왼쪽) 및 사산된 형질전환 고양이(오른쪽)의 몸과 장기를 자연광(왼쪽 사진)과 형광(오른쪽 사진) 아래에서 찍은 사진이다(a 및 a': 털, b 및 b': 근육, c 및 c': 뇌, d 및 d': 심장, e 및 e': 신장, f 및 f': 위와 장, g 및 g': 기관지와 폐, h 및 h': 간, i 및 I': 비장, j 및 j': 혀, k 및 k': 배설물).

도 7은 도너 세포 표면에서 RFP 발현을 측정된 결과로, (A) 가시광선 이미지, (B) 도너 세포의 적색 형광 방출, (C) Non-RFP TG cat 세포주 (음성 대조군), (D) First RFP TG cat 세포주 (도너 세포). (E) RFP 유전자 형질전환된 세포주 (양성 대조군)를 나타낸다.

도 8은 Re-RFP TG (좌) 및 non-TG 대조군(우) 고양이에서 RFP 발현을 나타낸다. (A) 가시광선 이미지 및 (B) 형광 이미지

도 9는 Re-RFP TG 고양이의 PCT 분석 결과이다. PCR 증폭에 사용된 지놈 DNA는 다양한 기관에서 분리되었다 (a) 정소, (b) 간, (c) 대장, (d) 비장, (e) 신장, (f) 심장, (g) 십이지장, (h) 위, (i) 췌장, (j) 폐, (k) 피부, (l) 태반, (m) non-TG control cat, (n) 음성 대조군 II: Re-RFP TG cat (Re-TG), non Re-RFP TG control cat (non Re-TG), 및 음성대조군 (negative).

도 10은 F-1 고양이의 RFP 발현에 대한 가시광선 이미지 및 형광 이미지이다.

도 11은 F1 자손-RFP 형질전환체는 RFP 형질전환 수컷 고양이 (1)~(6)으로 RFP 트랜스 유전자를 유전됨을 보여주는 PCR 결과이다 (M) 마커, (a) non-TG, (b) 음성, (c) 간, (d) 근육, (e) 뇌, (f) 대장, (g) 방광, (h) 비장, (i) 생식기관, (j) 소장, (k) 신장, (l) 심장, (m) 위, (n) 췌장, (o) 간, (P) 피부.

도 12는 첫 분리배양 후 날짜가 지남에 따라 망막전구세포가 증식되고 있는 모습과 RFP 발현 정도를

보여준다.

도 13은 첫 분리배양 후 날짜가 지남에 따라 뇌전구세포가 증식되고 있는 모습과 RFP 발현 정도를 보여주고 있는 모습을 보여준다.

도 14는 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체 (striatum)에 이식한 2주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, III-튜블린 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진

도 15는 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체 에 이식한 2주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, NF-M 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진.

도 16은 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 2주 후의 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, GFAP 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진

도 17은 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 2주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, MOSP 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진

도 18은 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 3주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, III-튜블린 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진

도 19는 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 3주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, NF-M 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진.

도 20은 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 3주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, GFAP 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진.

도 21은 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 3주 후 형광 사진이다. A, 일반 사진. B, RFP 발현 중인 이식 세포. C, MOSP 양성 형광사진. D, DAPI 핵 염색 사진. E, B와 C, D의 합성 사진.

도 22는 RFP-형질전환 고양이의 골수 유래 MSC를 성체 쥐 오른쪽 선조체에 이식한 4, 5, 6주 후 형광 사진이다. A, D, G는 일반 사진. B, E, H는 RFP 발현 중인 이식 세포. C, F, I는 DAPI 핵 염색 사진

도 23은 고양이 태아에서 유래한 고양이 배아섬유아세포(embryonic fibroblasts)이다 (A) 태아는 임신 4주 후에 암컷 고양이에서 얻었으며 (B) 배양 동안에 cEF 세포 증식을 보여준다 (100X).

도 24는 cEF 피더 층에서 성장한 후에 배반포에서 유래한 유사배아줄기세포를 나타낸다. (A) 인 비보-생성된 배반포 (63X). (B) 배반포의 ICM (100X). (C-F) KSR-배지(C, 100X; D, 200X) 또는 FBS-배지 (E, 40X; F, 200X) 에서 고양이 ES 유사 세포 콜로니의 형성을 나타낸다.

도 25는 3계대 ES-유사 세포 콜로니에서 비분화 특성을 나타낸다. (A) AP 발현 (100X). (D, G, J) ES-유사 세포의 위상차 이미지 (B, E, H, K) Hoechst33342로 역염색한 이미지 (C, F, I, L) Oct-4, SSEA-1, SSEA-3 및 SSEA-4 발현 검출을 위한 면역형광 염색을 나타낸다 (100X).

도 26은 다양한 세포 타입으로의 EB의 분화를 보여준다. (A) A simple EB (좌) 및 cystic EB (우) (40X). (B) 상피세포-유사 세포 (100X). (C) 뉴런-유사 세포(200X). (D) 고양이 ES-유사 세포의 위상차 이미지 (E 및 F) Hoechst33342 (푸른색)으로 역염색되고 중배엽(mesoderm) 마커인 desmin으로 면역형광염색된 동일 EB (G) 배양 2주 후에 미오카디오사이트(myocardiocytes) 로 자발적으로 분화한 ES-유사 콜로니의 상대비 이미지(40X). (H 및 I) Hoechst33342로 역염색(푸른색) 및 α-액틴으로 면역형광염색(적색)된 것을 보여주는 동일 콜로니 (40X).

도 27은 *cPOU5F1*(GenBank accession no. EU366914), 인간 (GenBank accession no. NM_002701) 및 마우스 (GenBank accession no. NM_013633) 상동체간의 아미노산 서열 비교를 나타낸다. POU-특이적 및 POU 호메오도

메인은 밑줄 및 굵은 글씨체로 표시하였다. 두 도메인 영역을 연결하는 링커 영역은 밑줄로 표시하였다.

도 28은 cNANOG(GenBank accession no. EU366913), 인간 (GenBank accession no. NM_024865) 및 마우스 (GenBank accession no. NM_028016) 동족체의 아미노산 서열 비교를 나타낸다. SMAD4 상동 도메인 및 호메오도메인은 밑줄 및 굵은 글씨체로 나타내고 트립토판 (W) 반복 도메인은 박스로 나타내었다. 서열 배열은 Clustal W를 이용하여 수행하였다.

도 29는 3세대 ES-유사 세포와 섬유아세포 피터 세포에서 cPOU5F1 및 cNANOG mRNA 발현을 나타낸다. cPOU5F1, cNANOG 및 GAPDH 발현은 RT-PCT로 측정하였다. cPOU5F1, cNANOG 및 GAPDH에 해당하는 PCT 산물의 크기는 각각 285, 271, 246 bp 이다. Li, 간; St, 위; Sp, 비장; Ov, 난소; Lu, 폐; Br, 뇌; S, cat ES-like cells; F, fibroblast feeder cells; B, blastocyst; N, 음성 대조구.

도 30은 인 비보-생성된 고양이 배반포 및 비분화 ES-유사 세포 콜로니에서의 면역세포화학 결과를 나타낸다. A 및 D, 배반포에서 핵을 Hoechst33342 로 염색(푸른색) B 및 E, 양성 대조구로 배반포의 ICM 세포에서 POU5F1 및 NANOG 발현; C 및 F, 음성 대조구로 2차 항체로 염색; G 및 J, ES-유사 세포의 위상차 이미지; H 및 K, Hoechst33342로 역염색(blue); I 및 L, ES-유사 세포에서 POU5F1 및 NANOG 발현 (red). 확대, 200X.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] 시약 출처

[0041] 특별히 언급되지 않는 한 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Lorraine, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0042] 동물의 관리와 사용

[0043] 난자 제공자로서 사용할 야생 고양이를 $0.9 \times 0.7 \times 0.65\text{m}$ 스테인레스 철장 안에서 관리하였고, 사료와 물은 자유급여 하였다. 실험동물들은 06:00에 빛을 받도록 하여 하루 14(Light) : 10(Dark) 광주기로 조절되는 방에서 사육되었다. 실험동물들의 관리와 사용방법은 국립순천대학교 기관 동물관리사용위원회의 승인을 받았다.

[0044] 통계 분석

[0045] 본 발명에서 실시된 각각의 실험은 적어도 3번 반복되었다. 활성화된 난자의 난할과 배반포까지의 발달의 다양한 배양액의 효과는 chi-square test로 분석되었다. 배반포의 수와 그룹들간의 차이는 student's t-test에 의하여 평가되었다. 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 맞추었다.

[0046] [실시예 1] 레트로바이러스 벡터 제작 및 바이러스 생산

[0047] 가. 레트로 바이러스 벡터(pLHCRW) 제작

[0048] 도 1에 나타난 바와 같이, RFP 유전자가 포함된 pLHCRW 플라스미드는 다음과 같이 구축되었다. 즉, 상업적으로 시판되고 있는 pLNCX (Clontech Mountain View, CA, USA)에 제한효소 BamH I과 Hind III를 처리하여 CMV 프로모터를 분리하여, 이를 동일한 제한효소를 처리한 pRevTRE (Clontech Mountain View, CA, USA) 플라스미드와 결합시켜 pRevTRE-CMV를 구축하였다. 구축한 pRevTRE-CMV 플라스미드에 Xho I과 BamH I의 제한효소를 처리하여 TRE 부분을 제거하고 Klenow 반응을 완료한 후 self-ligation시켜 pLHCX를 제작하였다. 다음으로 pDsRed2-C1 (Clontech Mountain View, CA, USA)으로부터 DsRed2 유전자를, 그리고 woodchuck 간염 바이러스 2 게놈 DNA (GenBank Accession No. M11082)로부터 WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 함유하는 프래그먼트를 PCR을 이용하여 클로닝한 후 몇가지의 중간 과정을 거친

후, pLHCX에 삽입[Zufferey *et al.*, Journal of Virology 1999; 73: 2886-2892]하여 최종적으로 pLHCRW 플라스미드를 구축하였다.

[0049] 나. 바이러스 생산

[0050] 레트로바이러스가 생산하는 세포들은 Koo *et al.*[FASEB Journal 2006; 20: 2251-2260]에 의해 설명된 방법에 따라서 제조하였다. 먼저, PT 67 세포(Clontech Mountain View, CA, USA)를 일시적으로 pLHCRW로 트랜스펙션시키고, 트랜스펙션된 PT 67세포로부터 수득한 바이러스를 GP2-293 세포(Clontech Mountain View, CA, USA)에 감염시켰다. PT 67은 레트로바이러스 패키징 세포로서, MoMLV(Moloney murine leukemia virus)의 gag 유전자 및 pol 유전자와 Gibbon ape leukemia 바이러스 막 유전자를 발현시키고, GP2-293 세포는 MoMLV의 gag 유전자 및 pol 유전자를 발현시킨다. LHCRW-감염된 GP2-293 세포를 2주 동안 하이그로마이신 (150 µg/ml)을 이용하여 선별하였고, 이러한 Hyg^R(hygromycin-resistant) 세포들을 pVSV-G(Clontech Mountain View, CA, USA)로 트랜스펙션 하여 VSV-G 단백질을 발현시켰다.

[0051] 트랜스펙션 후 48시간 후에 VSV-G 단백질로 포장된 바이러스들을 수득하였다. 바이러스를 생산하는 세포를 포함한 모든 세포들을 4.5 g/l 글루코오스(GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 소 태아 혈청(10%) 및 스트렙토마이신(100 µg/ml)을 함유하고 있는 DMEM 배지에서 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 상기의 감염 및 트랜스펙션된 GP2-293 세포로부터 수거한 바이러스-함유 배지는 0.45 µm 포어(pore) 크기의 필터를 통해 여과한 후, 고양이의 섬유아세포들을 감염시키는데 사용하였다. 감염과정을 거친 섬유아세포는 하이그로마이신 (150 µg/ml)으로 6일간 선별하였다.

[0052] [실시예 2] 고양이 섬유아 세포 수립

[0053] 흰색의 오드 아이 흰색 고양이에서 6 mm의 피부조직을 떼어 내어 몇개의 섬유아세포 라인을 만들었다. 멸균된 가위로 35 mm 페트리디쉬(Nunc, Denmark)에서 피부세포를 잘게 썰어 초기 배양을 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에 5% CO₂ 의 38°C 배양기(incubator)에서 90%의 컨플루언스(confluence)가 보일 때까지 배양시켰다. 세포들을 트립신 처리하여 1x10⁶ cells/ml에 맞춰 다시 배양하였고, 10% DMSO(dimethylsulfoxide)와 10% FBS가 첨가된 DMEM(Gibco, USA)에 있는 제로(zero) 단계에 있는 세포(1 vial/35 mm dish) 상태에서 동결하였다. 세포들을 녹인 후, RFP 유전자를 형질전환(transfection)하기 위해 배양하였다. 3일 동안 무혈청 배양액에서 배양한 후, 충분히 자란 RFP 형질전환된 세포들을 체세포 핵치환(SCNT)을 위해 사용하였다(Yin XJ *et al.*, Theriogenology 2007; 67: 816-823). 개개의 RFP-transfect된 세포들은 G-2A filter (EX 510-560 nm, BA 590 nm)가 있는 inverted 현미경에서 선별하였다(도 3 참조).

[0054] [실시예 3] 난소 회수와 난자 성숙

[0055] 200 IU의 말 융모성 성선자극호르몬(eCG; 대성, 한국)을 성체 고양이에 주사하여 난포 발달을 자극하였고, 4일 후 사람 융모 성선자극호르몬(hCG; 대성, 한국) 100 IU를 처리하여 난자 성숙을 유도하였다. hCG 주사 24시간 후, 보통의 난소절개술 방법으로 난소를 회수하였고, m-Tyrode's HEPES 배양액에서 난자들이 나올 수 있도록 메스날로 잘게 썰었다. 10% FBS (fetal bovine serum; Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 및 1% 페니실린 G (penicillin G)/스트렙토마이신(streptomycin) (P-4333)가 첨가된 TCM 199에서 골라낸 난자들을 5% 탄소가 포함되어 있는 38°C에 4시간 동안 성숙시켰다.

[0056] [실시예 4] 체세포 핵치환(SCNT)

[0057] 0.1% 히알루로니다제(hyaluronidase)가 포함된 TCM199에서 부드럽게 피펫팅을 해주어 성숙된 난자로부터 난구 세포들을 제거하였다. 벗겨진 난자들을 0.2 µg/ml 디메콜신(demecolcine)이 함유된 TCM199에서 1시간 동안 배양한 후, 5 µg/ml 사이토크라신 B(cytochalasin B) 및 0.2 µg/ml 디메콜신(demecolcine)이 함유된 TCM199에서 넣었다. 돌출된 제1극체와 염색질을 호프만(Hoffman) 조절식 대조 광학을 사용하는 inverted 현미경(Nikon, Japan)에서 관찰하면서 micromanipulator(Narishige, Japan)에 장착된 마이크로 피펫을 사용하여 제거

하였다. 다음으로, Hoechst 33342(5 $\mu\text{g/ml}$)로 난자를 염색하고, 자외선 아래서 형광현미경으로 관찰함으로써, 탈핵이 성공적으로 이루어졌는지 여부를 확인하였다.

[실시예 5] 세포융합 및 활성화

실시예 2에서 수립된 섬유아 도너 세포를 1% 트립신-EDTA를 사용하여 분리하였고, 0.3% BSA(fatty acid-free)가 첨가된 D-PBS(Ca^{2+} 및 Mg^{2+} free)에 넣었다. 중간 사이즈(20-25 μm)의 도너 핵세포를 현미 조작(micromanipulation) 방법으로 각각의 탈핵된 난자의 위관강에 삽입시켰다. 난형질/세포(Cytoplasm/cell couplets)를 0.1 mM Mg^{2+} 이 함유된 0.3 M 마니톨에 평형시킨 후, 동일 배양액이 들어있는 전기융합 챔버에 옮겨놓은 후, 전기발전기(Nepagene, Ichikawa, Chiba, Japan)로 2.0 kV/cm의 직류전압에서 20 μsec 의 시간으로 2회 통전시켜 세포융합을 수행하였다. 융합된 배아를 챔버에서 꺼내고, 몇차례 세척을 한 후, 0.3% BSA가 함유된 TCM199 배양액에 넣은 후, 38°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 전기융합 1시간 후, 융합된 배아는 0.1 mM Ca^{2+} 및 0.1 mM Mg^{2+} 가 포함된 0.3 M 마니톨에 평형시키고, 동일 배양액이 들어 있는 융합 챔버에 넣고, 1.0 kV/cm의 직류전압에서 20 μsec 의 시간 및 0.1 sec의 시간으로 각각 통전시켜 활성화시켰다. 활성화된 배아를 세척시킨 후, 0.3% BSA 및 2 mM 6-DMAP가 추가된 TCM199 배양액에서 38°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

그 결과, 융합 후 1시간 내에 재건된 난자에서 강한 형광을 확인하였다. 이 형광은 도너 세포 지놈(genome)에서 전사되어 발현되거나 RFP 단백질처럼 RFP mRNA를 포함하는 도너 세포질 내에서 발현된 것으로 유추된다. 또한, 돼지[Lai L. *et al.*, Molecular Reproduction & Development 2002; 62: 300-306]에서 보고된 것과 비슷하게 4cell 및 상실배(morula) 단계에서 형광발현이 NT(Nuclear Transfer) 배아에서 약하게 검출되었다. 융합 후 2시간째에, 재건된 난자에서 강한 형광발현이 지속되었으며, 융합 후 15-48시간이 지나면, NT 배아에서 형광발현은 약해지거나 사라졌다. 3일 후, 2~4 cell 단계의 난할된 배아에게서 RFP가 다시 발현되기 시작하는 것을 확인할 수 있었다.

[실시예 6] RFP 형질전환 섬유아세포들로부터 유래한 복제배아의 체외 및 체내 발달 확인

가. 체외(in vitro) 배양

실시예 5에서 수립된 활성화된 배아를 1% MEM 비필수 아미노산(non-essential amino acid) 151 (NEAA) 및 3 mg/ml BSA(Tyrod's 1)가 첨가된 m-Tyrod's medium(50 $\mu\text{l} \times 150$ droplets)[Gomez MC *et al.*, Biol Reprod., 2003; 69: 1032-1041]에서 3일간 배양시키고, 1% NEAA, 2% MEM BME amino acids (EAA) 및 10% FBS (Tyrod's 2)가 첨가된 m-Tyrod's 배양액에서 4일간 더욱 배양시켰다. 3일 이후 분할을 확인하였고, 7일째 되는 날 배반포로의 발달 여부를 눈으로 확인하였다. 다음으로, 배반포를 3.7% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 및 0.1% BSA가 포함된 PBS에서 15분동안 실온에서 고정시킨 후, Hoechst 33342 (20 $\mu\text{g/ml}$)로 염색시켰다. 염색된 배아들을 슬라이드 위에 있는 글리세롤 drop에 올려놓은 후, 커버유리로 덮고, 형광현미경으로 염색된 핵을 관찰하고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

나. 체내(in vivo) 배양

체내 배아를 수집하기 위해 3마리의 암고양이에 eCG와 hCG를 처리하였다. hCG 처리 36시간 후, 활성화된 배아를 수술을 통하여 대리모 난관에 이식시켰다. 이식 7일 후, 0.3% BSA (A-9647)가 포함된 TALP-Hepes buffered saline으로 절개한 자궁에서 배반포를 관류해 내었다. 다음으로, 배반포를 3.7% 파라포름알데하이드 및 0.1% BSA가 포함된 PBS에서 15분 동안 실온에서 고정시킨 후, Hoechst 33342 (20 $\mu\text{g/ml}$)로 염색시켰다. 염색된 배아들을 슬라이드 위에 있는 글리세롤 drop에 올려놓은 후, 커버 유리로 덮고, 형광현미경으로 염색된 핵을 관찰하고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Oocyte source	난자 수	융합된 수(%)	배양된 수	No. (%) of		양성반응을 보인 배반포 수 (%)	배반포에서의 세포 수/ 배반포 수*
				분할	배반포		
체외	456	261 (57.2)	258	202 (78.3) ^a	8 (3.1) ^a	8 (100)	78.2 ± 45.5/8 ^a
체내			46/71 ^{**}	32 (69.6) ^a	3 (6.5) ^b	3 (100)	508 ± 477.9/3 ^b

Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

* 배양 7일째의 배반포에서 세포 수 (Mean ± S.E.M).

** 체내 배양 7일 후 총 이식된 배아 분의 회수된 복제 배아 수.

표 1로부터, 복제배아의 수가 통계적인 분석을 위해 충분하지는 않았으나, 각각의 배아들이 양성적으로 RFP (각각의 그룹에서 100%)를 발현시켰음을 알 수 있었다. 배반포까지의 발달율은 체외배양보다 체내 배양이 더 높게 나타났다(6.5% vs. 3.1%; $P < 0.05$). 체내 배반포의 평균 세포수 또한 체외 배반포의 평균 세포수 보다 높게 나타났다(508 ± 477.9 vs. 78.2 ± 45.5; $P < 0.05$). 따라서, 체외 배양 시스템은 고양이 배아를 배양 시키는데 적합하지 않음을 알 수 있다.

[실시예 7] 동기화된 대리모에 복제배아 이식

활성화된 배아들을 미네랄 오일로 덮여있는 4 mg/ml BSA가 포함된 TCM-199 50 μ l drop에서 5% CO₂가 있는 습한 조건에서 배양하였다. 2 cell에서 4 cell 단계에 있는 배아들의 수(176개)를 파악한 다음, 이들을 100 IU PMSG를 주사 하고, 배란 96시간 후 100 IU hCG 주사를 통해 동기화된 건강하고 성숙한 길들여진 암고양이 (S1~S11)의 난관에 이식하였다. 복제된 배아의 이식은 약 hCG 주사 30시간 후 수행되었다. 대리모들은 개복술 전 아세프로마진 말레이트 (acepromazine maleate)(0.025 mg/kg, Sedaject; Samwoo, S. Korea) 및 케타민 (ketamine)(5 mg/kg; Daesung, S. Korea)로 마취시켰으며, 난소에 새로운 배란 위치를 가지고 있는 고양이만을 대리모로 사용하였다. 이식 40 또는 45일 후, 7.0 MHz 선형 프로브(linear probe)가 부착된 SONOACE 900 초음파 스캐너(Medison Co. LTD, Seoul, S. Korea)를 사용하여 임신여부를 진단하였다. 이 후에도 2주일 간격으로 초음파검사를 통하여 임신지속여부 및 태아의 발육상태 등을 확인하면서, 출산을 시켰으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

대리모 (S)	이식된 SCNT 배아 수(mean)	임신 여부	출산 (at Days)	현 상태와 RFP 발현 여부
S1	13	Yes	유산 (ND*)	-
S2	14	Yes	산자 (65)(TG-A와 합) 1마리 사산자 (65)(TG-B와 합) 1마리	TG-A 및 TG-B 모두 RFP 발현
S3	9	Yes	산자(66) (TG-C와 합) 1마리	TG-C RFP발현
S4 - S11	140	No	-	-
Total	176 (16 ± 7.5)	3/11 (27.3%)	2/11 (18.2%)	3/3 (100%)

* ND, 발견 못함.

표 2로부터, 40~50일째 초음파 검사에서 11마리의 대리모 중 3마리가 임신(27.3%) 되었음을 확인하였다. S-2 고양이는 임신 65일째 한마리의 생자와 한마리의 사산된 고양이(TG-A와 -B)를 생산하였고, S-3고양이는 임신 66일째 되는 날 한마리의 생자 고양이(TG-C)를 생산하였음을 알 수 있다.

복제 고양의 들의 생시 체중 및 태반의 무게를 측정하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

복제 고양이	체중 (g)	태반 무게 (g)
TG-A	110	20
TG-B	122	ND
TG-C	136	29

TG, 형질전환 ND, 확인 안됨.

TG-A, -B와 -C의 생시체중은 각각 110, 122 그리고 136 g이었다. TG-A와 -C고양이의 태반무게는 각각 20과 29 g이었으며, TG-B의 태반은 밤 중 자연출산으로 인하여 회수하지 못하였다.

[실시예 8] 복제고양이의 초위성체(Microsatellite) 분석

실시예 7에서 생산된 TG 고양이들의 친자감별을 실시하였다. 새끼, 대리모 그리고 도너 체세포의 조직으로부터 DNA를 추출하였다. 복제고양이와 도너 섬유아세포가 유전적으로 일치하는지를 확인하기 위해 9개의 고양이 특이적인 DNA 마이크로세텔라이트(microsatellite) 마커(FCA229, FCA290, FCA305, FCA441, FCA078, FCA201, FCA224, FCA170 그리고 FCA304)들을 사용하였다[Yin XJ et al., Theriogenology 2007; 67: 816-823]. 지노믹 DNA는 HEX (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 이용하여 형광으로 붙여진 9개의 고양이 마이크로세텔라이트 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 모든 PCR 산물은 3100 유전자 분석기로 분석되었고, 대립유전자형질(allele) 크기들은 Genescan 프로그램(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)으로 계산되었으며, 초위성체(Microsatellite) 분석 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Cloned cat	Feline microsatellite markers								
	FCA078	FCA170	FCA201	FCA224	FCA229	FCA290	FCA304	FCA305	FCA441
초기 도너 세포	200/200	109/113	140/150	150/150	171/171	212/218	110/110	185/191	155/159
TG-A	200/200	109/113	140/150	150/150	171/171	212/218	110/110	185/191	155/159
TG-B	200/200	109/113	140/150	150/150	171/171	212/218	110/110	185/191	155/159
TG-C	200/200	109/113	140/150	150/150	171/171	212/218	110/110	185/191	155/159
S2	202/202	89/109	140/156	158/158	151/169	214/214	110/112	195/195	159/159
S3	184/200	118/122	140/154	150/170	167/169	213/213	110/116	194/196	155/159

S: 대리모, TG: 형질전환.

표 4로부터, 도너 고양이와 복제고양이는 서로 유전적으로 일치하다는 것을 확인하였다.

[실시예 9] 지노믹 DNA 분석

가. PCR 분석

복제된 고양이(TG-A, TG-B, TG-C)의 지노믹 DNA를 G-DEX Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON 생물 공학 (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Seoul, S. Korea)를 이용하여 추출하였다. PCR로 RFP 유전자를 증폭시키기 위해, pDsRed2-C1 클로닝 벡터(Clontech, Mountain View, CA; Cat. Number 632407)의 염기서열을 이용하여 804-827 및 1218-1241 위치에 있는 pDsRed2-C1의 염기서열과 상응하는 상부 프라이머(upstream primer)(서열번호 4: 5' GTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTA3') 및 하부 프라이머(downstream primer)(서열번호 5: 5' ATGGTGTAGTCTCGTGTGGGAG3')를 합성하였다(도 2 참조).

[0089] 다음으로, 100 ng의 지노믹 DNA 추출물, 10 pmol 프라이머(서열번호 4, 5) 및 10 μ l 2X GoTaq[®] Green Master Mix(Promega, Madison, WI, USA)를 포함하는 반응혼합물(20 μ l)을 제조하고, PCR을 수행하였다. 초기변성은 PCR 증폭 35 사이클 후, 94℃에서 5분 동안 진행하였다. 다음 3단계의 증폭조건은: 94℃ 30초 동안(변성), 58℃에서 30초 동안(폴림), 그리고 72℃ 30초 동안(증폭) 35 cycle 증폭 후, 증폭된 확실하게 하기 위해 72℃에서 7분 동안 유지하였다. 그 결과 438 염기쌍의 증폭 결과물을 얻었다(도 4 참조).

[0090] 나. Southern Blot 분석

[0091] 복제된 고양이(TG-A, TG-B, TG-C)의 지노믹 DNA (25 μ g)를 Kpn I로 절단시키고, RFP유전자의 전체 서열을 포함하는 잘라진 단편들을 0.8% 아가로스 젤에서 분리시켰다. 썬던 블랏 분석에 이용되는 RFP 유전자 프로브(probe)를 합성하기 위하여, 606-623 및 1270-1287 위치에 있는 pDsRed2-C1의 염기서열에 상응하는 상부 프라이머(upstream primer)(서열번호 6: 5'CGCCACCATGGCCTCCTC3') 및 하부 프라이머(downstream primer)(서열번호 7: 5'CAGGAACAGGTGGTGGCG3')를 합성하였다(도 2 참조). 프로브(probe)는 PCR DIG Probe Synthesis kit(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 합성하였고, 합성된 프로브는 아가로스 겔(agarose gel) 전기영동으로 정제하고, 다이곡시제닌(digoxigenin)으로 라벨링 한 후, 하이브리제이션(hybridization)에 이용하였다. 하이브리다이제이션 후, DIG luminescent 검출 키트(Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여, 양성 전하를 가지는 나일론 막(positively-charged nylon membrane)에 위치한 라벨된 DNA를 검출하였다(도 4 참조).

[0092] [실시예 10] 적색 형광단백질 확인

[0093] 생자(TG-A, TG-C)와 사산된 고양이(TG-B)의 적색 형광은 여기방출필터 셋(excitation-emission filter sets)을 사용하여 확인하였다. 빛은 여기 필터(excitation filter)(HQ 540/40; Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA)가 장착된 70W 수술용 전등에서 공급받았다. 고양이와 내장들로부터 나오는 적색 형광방출을 카메라 렌즈 기부에 부착된 방사 필터(emission filters)(HQ 600/50; Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA)가 장착된 삼성 디지털 카메라(GX10, Republic of Korea)를 사용하여 확인하였다. 필터는 백색광과 조명으로 이미지를 위해 쉽게 제거되었다(도 5 및 도 6 참조).

[0094] 도 5에 나타난 바와 같이, 형광 조명에서 형질전환 고양이는 적색을 표현하였고, 이는 일반고양이와 쉽게 구별할 수 있었다.

[0095] 도 6에 나타난 바와 같이, RFP 형질전환 유전자의 발현 패턴은 사산된 TG고양이(TG-B)와 비-TG 고양이에서 채취한 몇몇 조직으로 판별하였다. 뇌, 심장, 간, 신장, 고환, 폐, 근육, 장, 흉선, 비장, 정낭, 피부, 털, 지방조직 및 형질전환 고양이의 체대혈을 분리한 후, 배양시킨 혈액세포에서 적색 형광발현을 확인할 수 있었으며, 이중 심장조직에서는 비교적 희미한 적색 형광발현이 확인되었다. 그러나 대조군으로 쓰인 고양이의 조직에서는 적색 형광의 발현을 보지 못하였다. 또한, 형질전환 고양이는 뇌와 근육의 발현을 포함하여 높은 RFP 발현을 하였음에도, RFP 형질전환 고양이는 겉으로 정상하였고 대조군 고양이와 비슷한 행위를 나타내었다.

[0096] 제 1세대의 형질전환 복제 고양이의 체세포를 통해 2세대(second generation cloned transgenic cat)에서의 유전자 발현의 확인은 형질 전환 전한 되어진 복제 고양이의 유전자 전이가 정상적으로 이루어지는지 검증하고자 하였다. 제 1세대의 복제고양이의 피부 섬유아세포 라인을 설립하기위해 피부 조직에서 채취하여 섬유아 세포라인을 건립하였다. 건립 되어진 세포라인은 FACS 분석을 통해 유전자 발현 여부를 확인하였다 (도 7). 정상적으로 발현 되어진 제 1세대의 형질 전환 복제 고양이의 피부 섬유아세포는 제 2세대 복제 고양이 생산을 위해 도너 세포로 이용되어 핵치환에 사용하였다. 이와 같이 태어난 제 2세대 형질 전환 복제 고양이는 각 장기와 전 피부 조직에서의 발현 여부를 PCR 분석을 통해 지노믹 DNA 와 mRNA 에서의 발현 여부를 확인할 수 있었으며, 정상적으로 제 2세대 복제 에서도 형질 전환 시킨 유전자가 전이되었음을 확인할 수 있었다 (도 8, 9).

[0097] 마지막으로, 제1세대의 형질 전환 복제 수고양이의 번식 능력과 함께 생식선(germ-line transmission)을 통해 다음 세대에 그 특정 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다. 이 연구에서는 제 1세대의 형질 전환 복제 수 고양이와 일반 암 고양이와의 자연 교미를 시도 하였으며 한 대리모에서 건강한 6마리의 산자를 얻을

수 있었다. 6마리의 산자에서 유전자 발현 여부를 형광 필터를 이용하여 형광 발현을 확인(도 10) 하였으며 PCR 분석을 통해 각 장기의 지놈 DNA 와 mRNA 에서의 발현 여부를 확인할 수 있었다 (도 11).

[0098] RFP 유전인자들은 배아이식에 앞서 형질전환 핵치환 배아의 확인을 위해 유용한 마커이다. 이 보고된 유전자의 사용은 형질전환 동물을 효율적으로 생산하는데 현저하게 증대시킬 수 있을 것이다. 왜냐하면 이들 유전자의 발현은 대리모로 이식되기 전 양성반응을 보인 배아들을 선택할 수 있기 때문이다. 또한, RFP를 형질전환 복제 연구는 세포로 필요로 하는 사람 임상 기초 연구에 중요하게 적용될 수 있다. 즉, 유전적으로 변형된 고양이를 생산하기 위한 SCNT 방법의 응용은 변형된 애완동물 생산뿐만 아니라 사람 질병의 임상모델 동물 생산에 가치를 둘 수 있음 제시한다.

[0099] **[실시예 11] RFP-형질전환고양이 망막과 뇌에서 분리한 망막전구세포와 뇌전구세포의 건립과 분화**

[0100] RFP 형질복제고양이의 산자로부터 망막전구세포와 뇌전구세포를 분리하여 망막과 관련된 질환을 앓고 있는 고양이에 이식하여 경과를 지켜보는 실험을 가져보고자 하였다.

[0101] 임신 45일 쯤 되는 RFP 형질전환 복제고양이의 산자를 임신 중인 대리모를 마취시킨 후 제왕절개를 통해 태아를 꺼내었다. 산자의 안구와 뇌 부분을 분리한 후, 페트리 디쉬에서 차가운 PBS로 행군 후 1 ml 피펫으로 망막을 작은 조각으로 쪼개고, 뇌는 블레이드(blade)를 사용하여 최대한 조각낸 후 15 ml 튜브에 1000 rpm× 5 분 동안 원심분리시켰다. 상층액 제거 후 1ml 트립신으로 1분 동안 방치하여 1ml 트립신 억제제(trypsin inhibitor)를 사용해 트립신 작용을 멈추게 한다. 파스퇴르 유리 피펫으로 15~20번 피펫팅한 후, 13 ml 차가운 PBS로 1,000 rpm× 4분 동안 원심분리하고, UL 배양액 + 5% FBS로 원심분리된 덩어리를 다시 부서뜨렸다. 세포수를 센 후 $5 \sim 7 \times 10^6$ cells/T75 양을 피브로넥틴(Fibronectin)으로 코팅 된 T75 플라스크에 배양시킨다. 약 하루가 지난 후 UL 배양액+5% FBS를 무혈청(serum-free) 배양액으로 완전히 교체하였다.

[0102] 망막전구세포와 뇌전구세포의 계대는 다음과 같이 행하였다. 배양 중인 세포가 들어 있는 플라스크에 있는 배양액을 모두 버려 4 ml 트립신을 플라스크에 넣은 후 5분 동안 인큐베이터에 방치시켰다. 4 ml DMEM + 5% FBS 배양액을 플라스크에 넣어 트립신 작용을 정지시킨 후 모두 15ml 튜브에 옮겨 넣는다. 1,000 rpm× 5 min 동안 원심분리 한 후 상층액을 모두 제거하여 파스퇴르 유리 피펫으로 UL culture 배양액과 함께 원심분리된 덩어리를 부서뜨려 새로운 T75 플라스크에 배양에 필요하게 될 배양액을 10 ml 맞출 수 있도록 세포가 들어있는 15ml 튜브에 약 9 ml UL 배양액을 추가하여 피펫팅하여 모두 플라스크에 옮긴다. 37℃, 5% CO₂, 95% 인큐베이터에서 배양시켰다.

[0103] 전구세포들의 동결은 위에 방법처럼 트립신 처리하여 세포들을 모은 후 동결 배양액 (UL culture medium + 10% DMSO)으로 동결 튜브에 옮겨 -80℃ 냉동고 (freezer)에 저장하고 해동시에 동결 튜브를 항온수조에 2~3분 정도 녹여, 15 ml 튜브에 옮겨 DMEM + 10% FBS 배양액 10 ml에 희석시켜 원심분리 후 UL 배양액과 함께 배양하였다.

[0104] 배양되고 있는 망막전구세포의 특징은 2개월 전까지 증식 속도가 느리며 2개월 후 증식속도가 급작스럽게 올라간다는 것이 특징이다. 망막전구세포의 자라는 형태는 도 12와 같다. 뇌전구세포는 비교적 망막전구세포와 달리 증식과 다루기가 쉬운 편이다. 뇌전구세포의 자라는 형태는 신경들이 서로 가지같이 엉켜 자라는 것을 볼 수 있었다 (도 13). 두 세포 모두 처음 각 조직에서 분리하여 배양시킨 그 때는 RFP 발현이 현저히 낮은 것을 볼 수 있고 그것 역시 주로 조직들의 발현이고 배양되고 있는 세포의 발현은 없었다 (도 12의 F, 도 8의 F). 첫 분리 후 배양된지 5일 후 양 전구세포 모두 50~60% 이상의 세포들이 RFP를 발광하고 있는 모습을 볼 수 있었다(도 12의 H, I, J, 도 8의 H, I, J). 10여일 지나 거의 100% 가까운 세포들이 RFP 발현하고 증식도 안정적인 모습을 보였다 (도 12의 J, 도 13의 J).

[0105] 실험동물로서의 고양이는, 고양이에서 나타나는 250여 종의 유전적 질병 중 많은 것이 인간의 유전적 질병과 유사해 고양이 유전자 연구로 인간의 난치성 질병의 원인을 밝히는데 크게 기여할 수 있다는 점이 있어, 사람을 대상으로 응용하기 전 임상실험 절차상의 대(大)동물 실험동물의 가치로서 많은 이점을 가지고 있다.

[0106] 더욱이 RFP 형질전환 복제고양이는 표지유전자인 RFP 유전자가 적색을 발현하고 있어 배아줄기세포, 성체줄기세포 등의 분화유도, 다른 개체에 이식 후 유전자적 추적은 물론 부가적인 처리 없이 광학상으로도 쉽게 추적 가능해 다양한 인간의 질환동물로서 효율적으로 활용할 수 있다.

[0107] 현재까지 진행은 망막전구세포와 뇌전구세포 구축과 확보이며, 이후 이식 실험은 다른 연구협력자와 공동연구

협력을 거쳐 망막성 질환을 가지고 있는 실제 질환모델, 현실적으로 실험이 용이하며 접근이 쉽고 인간과 가장 유전학적, 질병학적으로도 가까운 고양이에 적색 형광 단백질의 유전자를 가진 형질전환 복제고양이에서 뇌전구세포와 망막전구세포를 분리해 이식을 진행하여 시신경과 시세포를 원천적으로 치료할 수 있는 가능성을 이식된 세포의 증식, 발달, 분화 측면에서 적색 형광 단백질을 표시인자로 용이하게 확인?증명할 것 같다.

[0108] **[실시예 12] RFP-형질전환고양이 골수에서 분리한 중간엽세포의 쥐 뇌에서의 생존과 신경분화**

[0109] RFP 형질복제고양이의 골수에서 MSC를 분리하여 내여 쥐 뇌 선조체 (striatum) 부위에 세포를 이중간 이식하여 향후 결과를 지켜봄으로써 이식된 세포가 어떻게 증식?분화되는지 지켜보고자 하였다.

[0110] 골수 채취와 이식 및 분석까지의 과정을 살펴보면, RFP-형질전환 고양이를 마취 시켜 대퇴골 상부의 돌기 주위를 블레이드(Blade)로 절개를 하였다. 주사기를 사용해 돌기에서 움푹 들어간 쪽을 향하여 찔러 넣어 조심스럽게 1 cc~2 cc정도 골수를 채취한 후 곧바로 해파린이 포함되어 있는 혈액튜브에 옮긴다. PBS로 혈액을 모두 씻으면서 건져내어 15 ml 튜브로 옮기고 1800 rpm에서 10분 동안 원심분리 시킨다. 이후 밑에 가라앉은 혈액 층 전부를 DMEM + 10% FBS 배양액(이하 DMEM 배양액) 10 ml 양과 함께 T75 플라스크에 배양시킨다. 약 5일 후 배양액을 전액 새 배양액으로 교체 해 주고 다시 2일 배양시킨 후 약 1주일 쯤 되는 때에 계대배양을 거치면서 혈액 역시 조심스럽게 제거해 나갔다. MSC 계대는 다음과 같이 행하였다. 배양 중인 세포가 들어있는 플라스크에 있는 배양액을 모두 버려 4 ml 트립신을 플라스크에 처리한 후 5분 동안 인큐베이터에 방치하였다. 4 ml DMEM + 10% FBS 배양액을 플라스크에 처리하여 트립신 작용을 정지시킨 후 모두 15ml 튜브에 옮겨 넣는다. 1,000rpm × 5 min 동안 원심분리 한 후 상층액을 모두 제거하여 1ml 피펫으로 배양액과 함께 원심분리된 덩어리를 부서뜨려 새로운 T75 플라스크에 배양에 필요하게 될 배양액을 10ml 맞출 수 있도록 세포가 들어있는 15ml 튜브에 약 9 ml DMEM 배양액을 추가하여 피펫팅하여 모두 플라스크에 옮긴다. 37℃, 5% CO₂, 95% 인큐베이터에서 배양시켰다.

[0111] 전구세포들의 동결은 위에 방법처럼 트립신 처리하여 세포들을 모은 후 동결 배양액 (DMEM 배양액 + 10% DMSO)으로 동결 튜브에 옮겨 -80℃ 냉동고에 저장하고 해동시에 동결 튜브를 항온수조에 2~3분 정도 녹여, 15 ml 튜브에 옮겨 DMEM + 10% FBS 배양액 10ml에 희석시켜 원심분리 후 DMEM 배양액과 함께 배양하였다.

[0112] 이식에 쓰인 MSC는 계대배양 4번 쯤 단계의 세포들을 사용하였다. 36마리의 실험쥐들이 준비되었고, 이들을 6개 그룹과 1개의 대조군 그룹을 나누었다. 6개 그룹은 MSC를 이식한지 각각 2주, 3주, 4주, 5주, 6주가 되는 때에 각 그룹별로 이식되었던 부위를 단면절개를 목적으로 나누었고 각 그룹 6마리 중 3마리는 사이클로스포린 A(cyclosporine A) 면역억제제를 마지막 분석 날까지 투여하였다. 정해진 날이 지난 그룹의 쥐들에게서 뇌를 분리하여낸 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시켜 O.C.T. 화합물에 엠베딩(embedding) 후 표본들을 냉동보관하였다.

[0113] 냉동보관된 표본들을 슬라이드 글라스(slide glass)에 단면절편하여 부착하고, β III-튜불린 (1:400 dilution, mouse monoclonal; Sigma), NF-M (1:40 dilution, mouse monoclonal; Sigma), GFAP (1:1000 dilution, rabbit polyclonal; Chemicon), 그리고 미엘린/올리고덴드로사이트 특이적 단백질 (myelin/oligodendrocyte specific protein) (MOSP, 1:1000 dilution, mouse monoclonal; Chemicon)을 1시간 30분 동안 인큐베이터에 보관, 다시 FITC-콘주게이트된 항-마우스 IgG 또는 IgM (1:64 or 1:128; Sigma), anti-chicken IgG (1:320; Sigma), 그리고 항-래빗 IgG (1:80; Sigma)와 함께 1시간 동안 인큐베이터에 보관하여 항체 염색을 하였다. 핵 염색은 DAPI로 실온에서 염색하였다.

[0114] 이식 실험 결과 주 별로 이식된 세포들의 증식과 분화 관찰한 것을 보면, 이식된 세포들은 이식 후 생존율이 2주 쯤 (도 14~도 17)와 3주 쯤 (도 18~도 21)에서 높게 상승된 것을 알 수 있었다. 게다가 세포 모두 β III-튜불린, NF-M, GFAP, 그리고 MOSP 항체반응에 양성을 보여 고양이의 RFP-형질전환된 MSC가 뉴런, 아스트로사이트 그리고 올리고덴드로사이트로 분화된 것을 의미한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 이식된 세포들은 4주에서 5주 후에 눈에 띄게 감소되는 것을 볼 수 있었고 6 주 후에는 모두 사라 졌었다 (도 22). 이식 후 이식된 세포들의 이동 역시 3주에서 4주 쯤 사이에서 관찰되었다. 면역억제제 사이클로스포린 A 처리 하였던 그룹의 쥐들은 이식 세포들의 생존과 신경 분화에 특별히 영향을 미치지지는 않아 보였다. 본 연구는 쥐 뇌에 고양이에서 유래하여 이중 이식한 세포의 생존과 신경분화에 초점을 맞춘 것이다. 이식 후 2주에서 3주 사이에 생존된 세포들이 증식되는 것을 알 수 있었고 그리고 나서 4주를 시작으로 줄어드는 것을 알 수 있었다. 이는 이식된 세포가 이미 RFP라는 고유의 형광 표시인자를 가지고 있기 때문에 쉽게 뇌에서의 다른 세포 또는 신경과 구별이 가능했던 것이다. 이 결과는 이식된 부위의 영양인자들의 고갈과 혈관조직의 열악성이 이러한

결과를 가져온 것 같다. 이로부터 고양이의 RFP 형질전환 골수 유래 MSC가 쥐 선조체(striatum) 부위에서 생존과 함께 신경세포로 분화되는 것을 알 수 있었고, 따라서 RFP-형질전환 MSC는 줄기세포 이식을 위한 유용한 대체수단으로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

[실시예 13] RFP 형질전환 복제고양이로부터 줄기세포 유도

고양이 배아줄기세포의 효율적인 분리유도 및 검증에 관한 연구를 진행하고자 아래와 같은 실험을 수행하였다.

고양이 배아줄기세포를 분리유도하기 위하여 체내유래 배반포로부터 기계적 방법으로 ICM(Inner cell mass)을 분리하여 (도 24 A,B) FBS가 첨가된 배지와 KSR이 첨가된 배지에서 각각 키워 비교하였다. 피더세포(feeder cell)는 고양이 배아섬유아세포(embryonic fibroblast cell)로 하였다 (도 23). 결과 KSR 배지에서는 초기유사배아줄기세포 부착에서는 보다 좋은 성적을 보였으나 세포 증식속도 면에서는 FBS가 더 좋게 나타났다. 이렇게 유도한 유사배아줄기세포들은 핵이 크고 세포질이 적은 배아줄기세포의 형태학적 특징을 갖고 있었으며 (도 24) 미분화 상태의 배아줄기세포 검증은 AP(alkaline phosphatase), Oct4, SSEA-1, SSEA-3와 SSEA-4 등 줄기세포 특이성 마커들을 사용하여 검증하였으며 그 결과 미분화상태의 유사배아줄기세포에서 이러한 마커들이 명확히 발현됨을 확인하였다 (도 25). 유사배아줄기세포의 분화능력을 검증하기 위하여 우선 EB를 만들었고 EB를 조직배양접시에 배양시킨 결과 유사 상피세포, 유사 신경세포 등으로 분화된 것을 형태학적으로 확인을 하였으며 EB에서 중배엽 마커인 Desmin의 발현을 확인하였고 FBS에서 배양시킨 유사배아줄기세포 콜로니 2개는 3번째 계대배양을 하였을때 자발적으로 자율적으로 박동하는 심근세포로 분화되었으며 이 또한 심근세포 특이성 마커인 α -actinin의 발현으로 검증하였다 (도 26). 이러한 결과는 우리가 처음으로 고양이 배아줄기세포를 분리배양 하는데 성공했음을 시사한다.

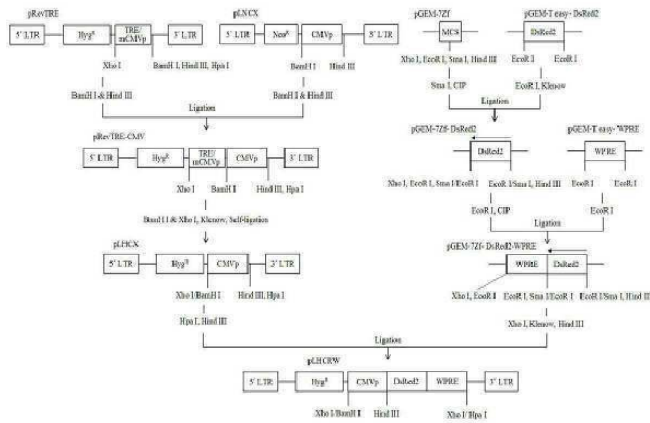
고양이 유사배아줄기세포를 유도 성공한 전제하에서 고양이에서 아직 배아줄기세포 검증에서 매우중요한 두 유전자인 POU5F1와 NANOG 염기서열이 밝혀지지 않았기 때문에 이 두 유전자의 염기서열을 밝혀내고자 하였다. 고양이 POU5F1와 NANOG의 CDSs(coding sequences)를 결정하였고 오르소로그유전자(orthologous genes)를 분석한 결과 고양이 POU5F1 유전자는 뉴클레오타이드 수준에서 사람과 마우스와 각각 92%와 82%가 동일하였고 아미노산 수준에서는 각각 94%와 83%가 동일함을 확인하였다. 또한 POU5F1의 CDS에서 POU 특이성과 POU 호메오도메인 서열(homeodomain sequences)을 분석한 결과 사람과 마우스와 각각 69%와 68%가 동일하였고(도 27) 고양이 NANOG 유전자는 뉴클레오타이드 수준에서 사람과 마우스와 각각 69%와 68%가 동일하였고 아미노산 수준에서는 각각 69%와 58%가 동일하였다(도 28). 또한 호메오도메인인 NANOG의 CDS에서 SMAD4 도메인과 트립토판 반복 도메인(tryptophan repeat domain)(W/QXXXX)을 확인하였다(도 28). 그리고 RT-PCR 방법으로 고양이 유사배아줄기세포와 배아섬유아세포에서 POU5F1와 NANOG mRNA의 발현을 검증한 결과 POU5F1는 고양이 유사배아줄기세포에서는 높은 발현을 보인 반면 배아섬유아세포에서는 발현되지 않았고 NANOG는 유사배아줄기세포에서 배아섬유아세포에서 보다 많이 발현됨을 알 수 있었다(도 29). 또한 면역염색법으로 이 두 유전자의 발현을 검증하였다. 그 결과 고양이 유사배아줄기세포에서는 높은 발현을 보였으면 배아섬유아세포에서는 검출되지 않았다(도 30). 이러한 결과로부터 볼 때 성공적으로 고양이 배아유사줄기세포를 분리해냄을 알 수 있으며 이러한 고양이 유전자의 염기서열을 밝혀냄으로서 앞으로 고양이 줄기세포 검증을 위한 바이오마커에 사용되는 등 다양한 연구에 활용될 수 있다.

그럼으로 우리가 현재 보유하고 있는 배아줄기세포 분리 및 배양 기술을 이용하여 우리 실험실에서 세계최초로 복제한 RFP 발현 형질전환 고양이로부터 추출한 배반포 또는 복제 배반포로부터 배아줄기세포를 분리 배양하여 RFP 표적 마커가 발현되는 배아줄기세포 또는 면역거부반응이 없는 특이한 배아줄기세포를 생산하여 임상 전실험에 적용하면 우리가 이식한 세포를 체내에서 쉽게 추적할수 있는 장점을 갖고 있다. 또한 ips (Induced pluripotent stem cell) 기술을 적용하여 RFP 형질전환 고양이 체세포로부터 전능성 줄기세포를 유도해냄으로서 임상 전실험에 사용할 수 있는 장점도 갖고 있다.

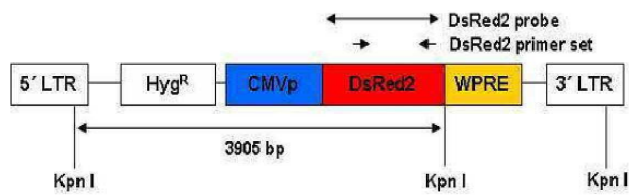
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

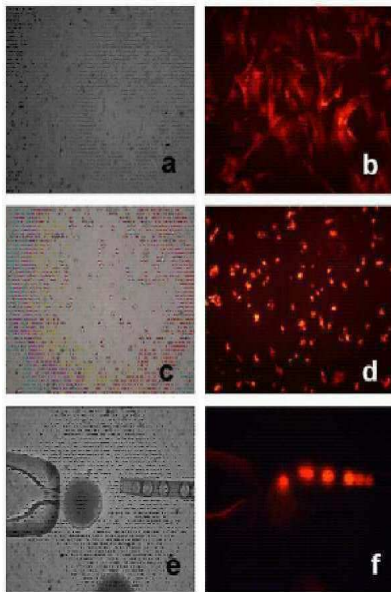
도면1



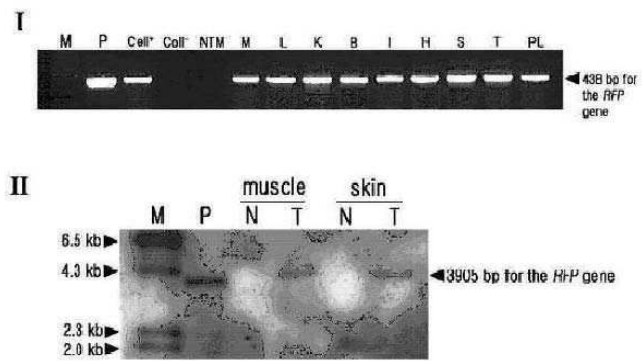
도면2



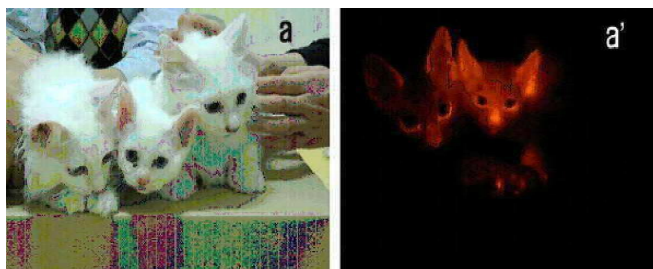
도면3



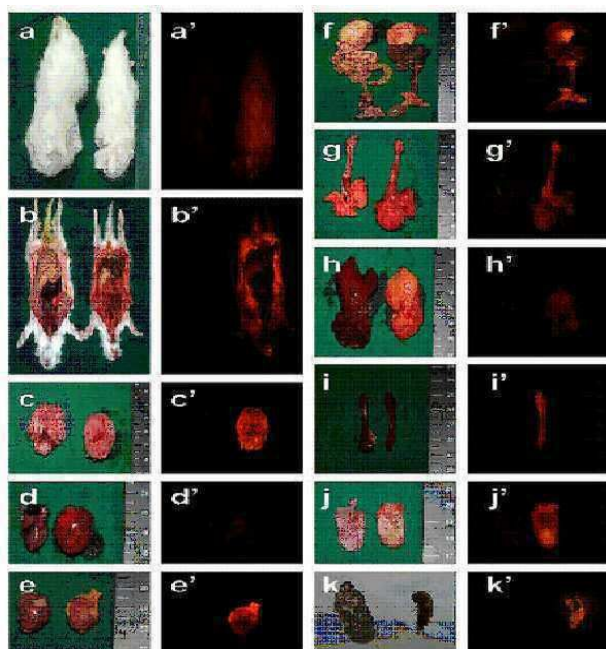
도면4



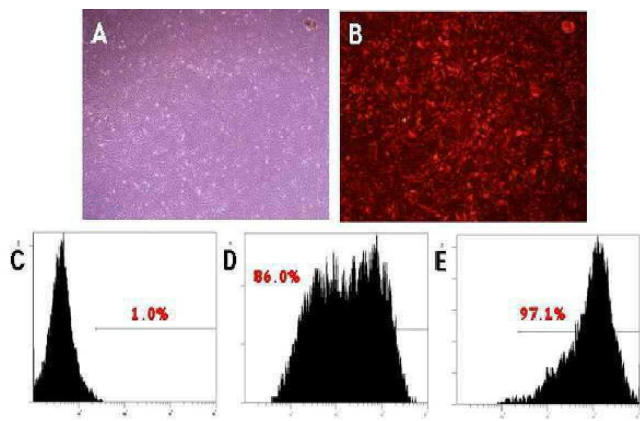
도면5



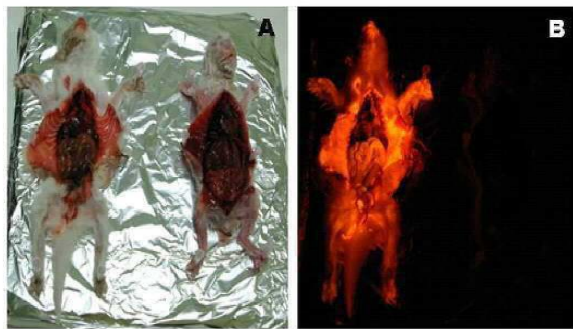
도면6



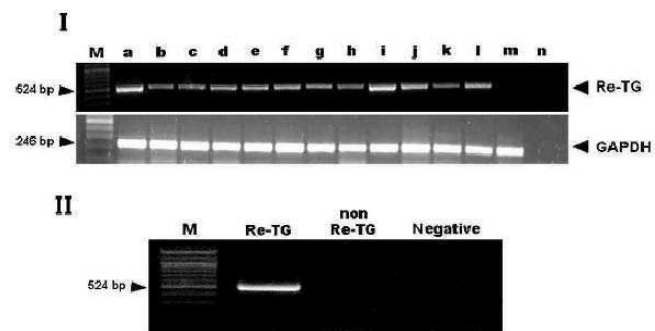
도면7



도면8



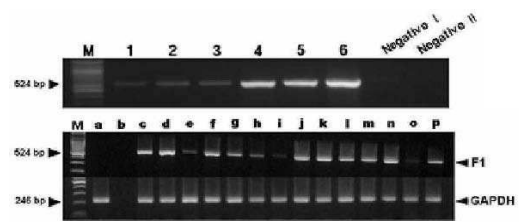
도면9



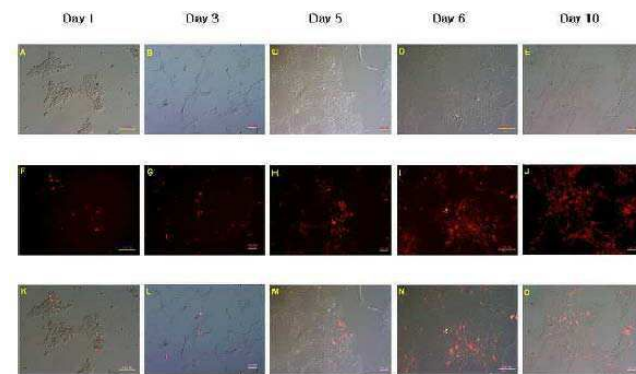
도면10



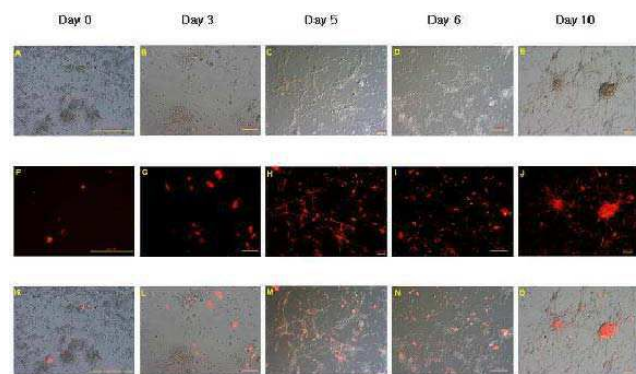
도면11



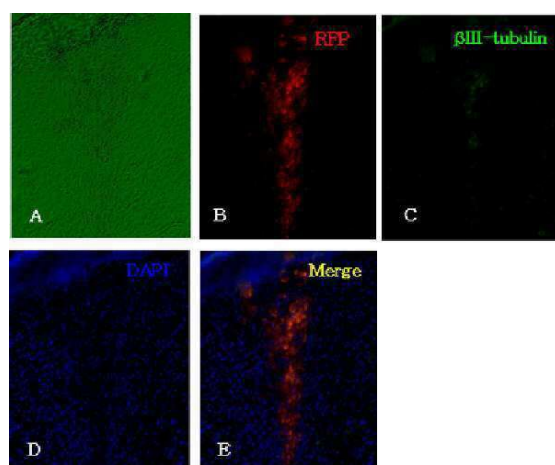
도면12



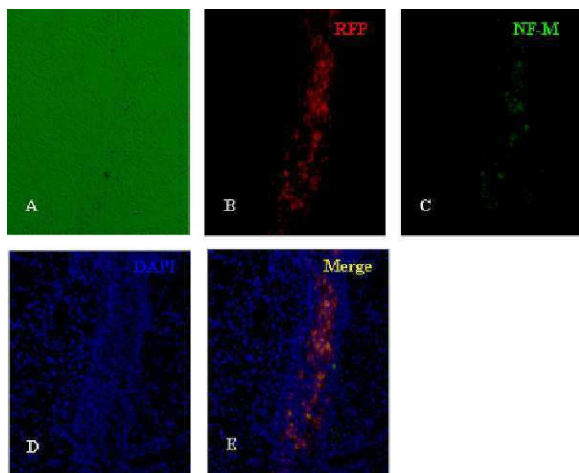
도면13



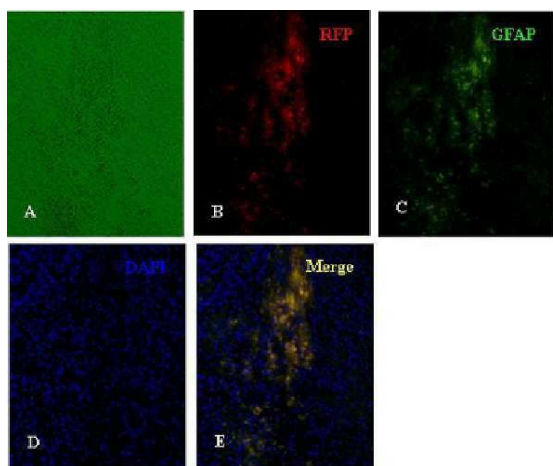
도면14



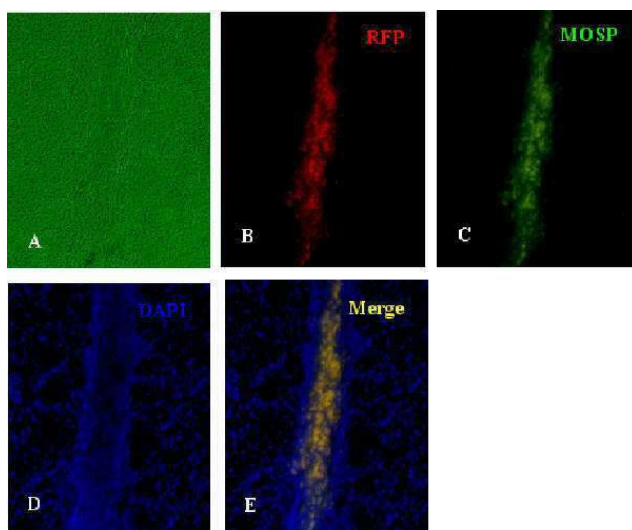
도면15



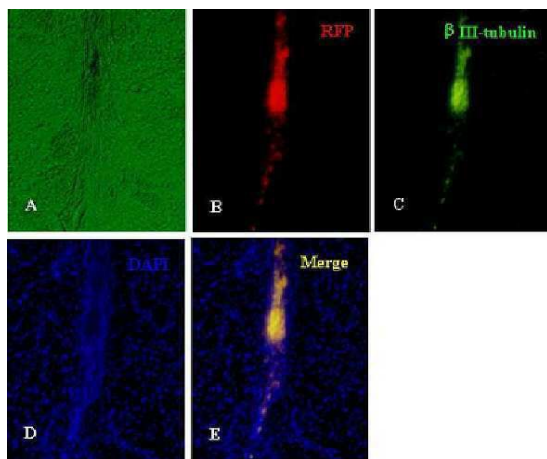
도면16



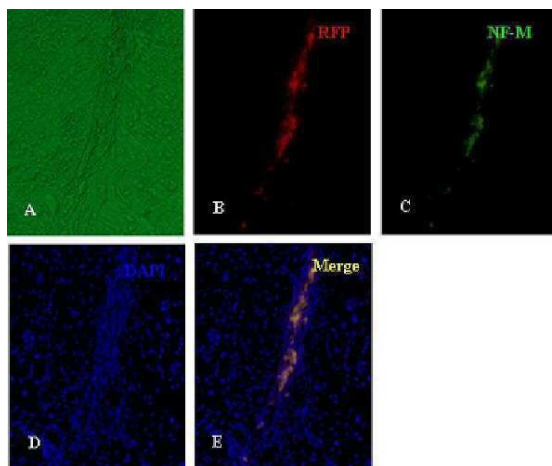
도면17



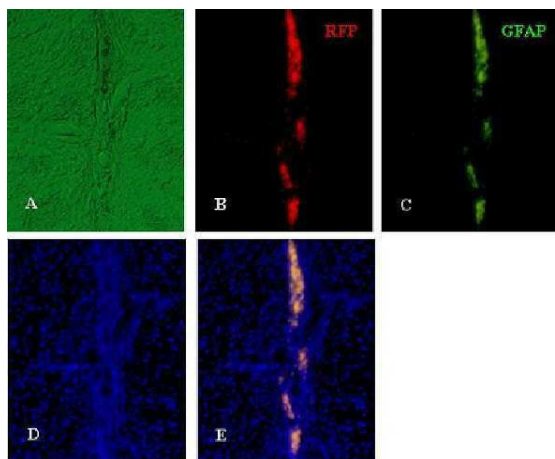
도면18



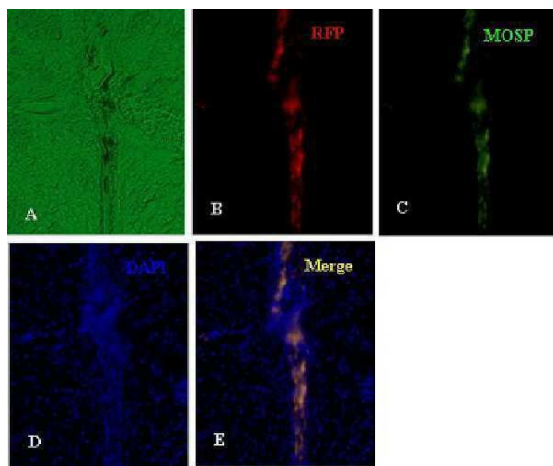
도면19



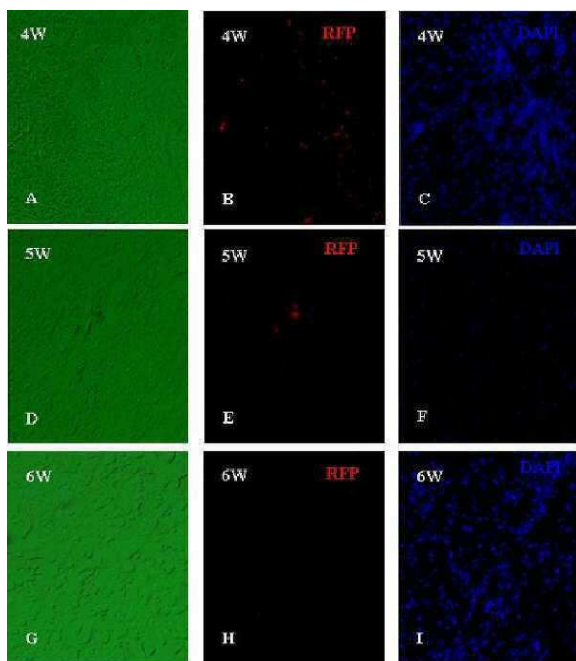
도면20



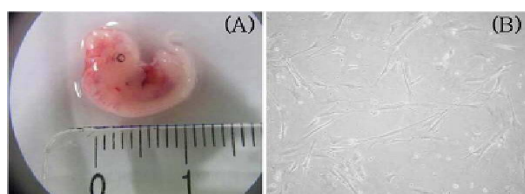
도면21



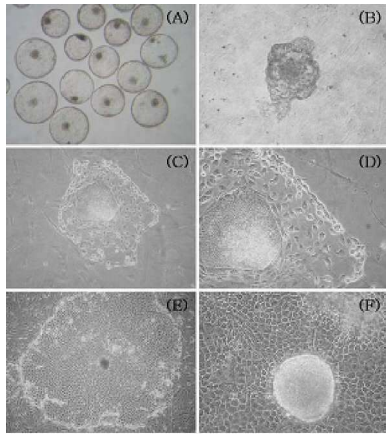
도면22



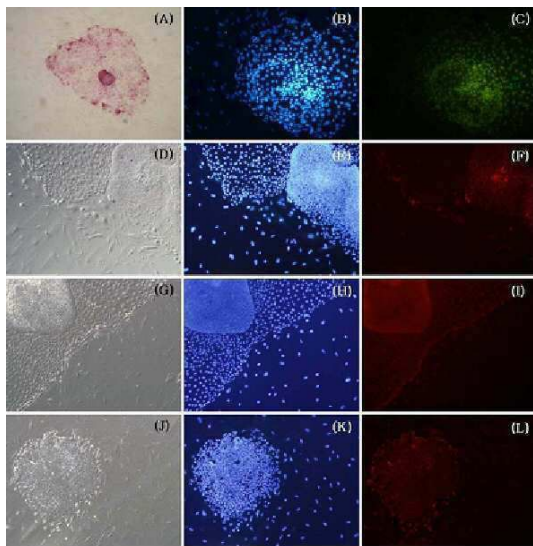
도면23



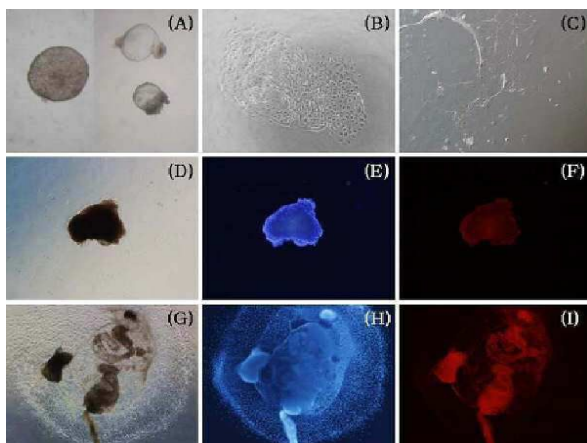
도면24



도면25



도면26



도면27

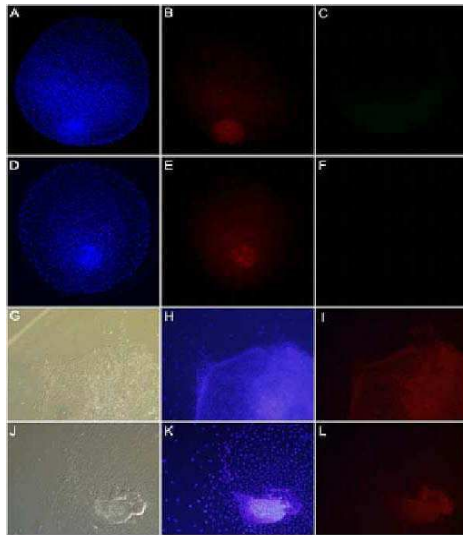
Cat.		RTMLSPQRLDGGSGCTGTCGTCATVWCT	28
Human	MAGHLASDFAFSPPPGGGGGPGGGPEGVDP	P.....S.....	60
Mouse	SAL.....	I.....S.....L.....	55
Cat.	PPCPPPYZFCGGTGYCGPQVGVGLVPGGGLTSQPEFCERGAGVSNSEGASPEPCAAATPG	A.....V.....D.....	83
Human	A.....L.....V.....V.....L.....QAAR.....E.T.S.....	TVL.....	130
Mouse	A.....L.....V.....V.....L.....QAAR.....E.T.S.....	ADH.....	140
Cat.	AVKPDKEKLEQNTSESODIKALOKLEQFAKLLKORRILGYTQADVGLTLGLVFGKVF		148
Human	LE.....P.....E.....		180
Mouse	LE--V.FTP.....H.....E.....		170
Cat.	OTLICRFEALOLSFKNNCKLRPLLOKWEEDNSESLOETCRAETLVQARKKRKTSIENR	N.....	208
Human	L.....E.....N.....S.....		240
Mouse	L.....E.....N.....S.....		233
Cat.	VRGNLEIMLQCPFKTLQQISIMAQGLGKDVVRVWFCNRQRQGRSSDYVQDFEFA	A.....	260
Human	WS.....TH.....K.....S.....T.....N.....		300
Mouse	WS.....TH.....K.....S.....T.....N.....	IE.S.....EY.....	293
Cat.	AGSPFSGAPVSPFLAPGPHFGITGCGSPHITLSSVVPFECHAPFSVSYVITLGGSPHNS	A.....P.....P.....	328
Human	T.T.....P.G.A.....P.....T.....S.P.....A.....		360
Mouse	T.T.....P.G.A.....P.....T.....S.P.....A.....		352

도면28

[illegible]

도면29

도면30



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Transgenic Cats Expressing Red Fluorescence Protein and Producing Method Thereof
- <130> 1.63P
- <150> KR10-2007-0126410
- <151> 2007-12-06
- <160> 7
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 812
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CMV promoter
- <400> 1

gatccggcca ttagccatat tattcattgg ttatatagca taaatcaata ttggctattg 60

gccattgcat acgttgatc catatcataa tatgtacatt tatattggct catgtccaac 120

attaccgcca tgitgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 180

attagttcat agcccatata tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 240

tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 300

aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca 360

cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 420

taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 480

gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa 540

tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 600

tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 660

cccattgacg caaatgggcg gtaggcatgt acggtgggag gtctatataa gcagagctcg 720

tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc tgttttgacc tccatagaag 780

acaccgggac cgatccagcc tccgcggccc ca 812

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DsRed2

<400> 2

atggcctcct ccgagaacgt catcaccgag ttcatgcgct tcaaggtgcg catggagggc 60

accgtgaacg gccacgagtt cgagatcgag ggcgaggcg agggccgccc ctacgagggc 120

cacaacaccg tgaagctgaa ggtgaccaag ggcgcccccc tgccttcgc ctgggacatc 180

ctgtcccccc agttccagta cggtccaag gtgtacgtga agcaccgcc cgacatcccc 240

gactacaaga agctgtcctt ccccgagggc ttcaagtggg agcgcgatgat gaacttcgag 300

gacggcggcg tggcgaccgt gaccaggac tctccctgc aggacggctg cttcatctac 360

aaggtgaagt tcatcgcgct gaacttcccc tccgacggcc ccgtgatgca gaagaagacc 420

atgggctggg aggcctccac cgagcgctg taccgccg agggcgctgt gaaggcgag 480

accacaagg ccctgaagct gaaggacggc ggccactacc tggaggagt caagtcac 540

tacatggcca agaagccgtg gcagctgccc ggctactact acgtggacgc caagctggac 600

atcacctccc acaacgagga ctacaccatc gtggagcagt acgagcgac cgagggccgc 660

caccacctgt tctgtaa 678

<210> 3

<211> 591

<212> DNA

<213> Woodchuck hepatitis virus

<400> 3

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gatgactgg tattcttaac tatgttgctc 60

cttttacgct atgtggatac gctgctttta tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgt 120

ttgctttcat ttctcctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgt 180
 ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacga acccccactg 240
 gtggggcat tgccaccacc tgtcagctcc ttccgggac ttctgcttc cccctcccta 300
 ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgccgctg ctggacaggg gctcggctgt 360
 tgggcactga caattccgtg gtgttgctgg ggaagctgac gtcctttcca tggtgctcg 420
 cctgtgttg cacttgatt ctgcgcgga cgtcttctg ctacgtccct tcggccctca 480
 atccagcga ccttcttcc cgcgcctgc tgccgctct gcggcctctt ccgcgtcttc 540

gccttcgcc tcagacgagt cggatctccc ttggggccgc cteccgcct g 591

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> upstream primer

<400> 4

gttcagtag ggctccaagg tgta 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> downstream primer

<400> 5

atggtgtagt cctcgttggt ggag 24

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> upstream primer

<400> 6

cgccaccatg gcctcttc 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> downstream primer

<400> 7

caggaacagg tggaggcg

18