

- 심사관 : 최성호

(52) CPC특허분류

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/90 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

A01K 2207/05 (2013.01)

A01K 2217/07 (2013.01)

A01K 2227/10 (2013.01)

A01K 2267/0318 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

김동연

대전광역시 유성구 대학로163번길 61, 죽림빌라
301호

지국빈

대전광역시 유성구 대학로155번길 66, 스타빌리지
203호

명세서

청구범위

청구항 1

제1 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 DJ-1(PARK-7, Protein deglycase DJ-1) 유전자를 표적으로 하는 gRNA(guide RNA); 및

제2 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 암호화하는 유전자를 포함하는, 파킨슨 병 개 모델 제작용 재조합 벡터로서,

상기 제1 프로모터는 U6(human U6) 프로모터이고, gRNA(guide RNA)는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것이고, 상기 제2 프로모터는 CBh(chicken beta-actin) 프로모터인 것인, 파킨슨 병 개 모델 제작용 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항의 재조합 벡터를 개체에 도입하는 단계를 포함하는, 파킨슨 병 개 모델 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, a) 상기 재조합 벡터를 체세포에 주입하여 형질전환하는 단계; b) 상기 형질전환된 체세포의 핵을 분리하여 대리모 동물로부터 수득된 난자의 핵과 치환하는 단계; 및 c) 상기 핵치환된 난자를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함하는 파킨슨 병 개 모델의 제조 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항의 방법으로 제조된 파킨슨 병 개 모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파킨슨 병 유도 벡터 및 이를 이용한 개 모델의 제조방법에 관한 것으로서, 구체적으로는 개의 DJ-1 유전자를 결핍시켜 파킨슨 병을 유도할 수 있는 벡터 및 이를 이용하여 파킨슨 병이 발현된 개 모델을 제조할 수 있다.

배경 기술

[0002] 질병 모델 동물을 만드는 것은 인간의 질병을 극복하는데 필요한 치료제 개발 및 질병의 형태를 이해하는데 도움이 된다. 하지만 마우스와 같은 소동물의 경우 인간과의 다른 생활 환경을 갖고, 유전 계통학적으로 상이하여 질병의 발현 형태를 정확히 알 수 없다. 더욱이 파킨슨과 같은 신경 정신과적 병증에 관한 연구는 소동물을 이용하는데 한계가 있다. 따라서 최근 대동물을 이용한 연구가 다수 진행이 되고 있다.

[0003] 질병에 대한 모델 동물의 연구로는 유전자의 결손을 이용한 Knock-Out을 이용하는 방식이 있다. 특히 알츠하이머와 파킨슨 병은 유전자의 결손 및 돌연변이로 인한 문제점이 유발되기 때문에 Knock-Out을 이용하기에 적합하다.

[0004] 한편, 최근 3세대 유전자 가위인 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 편집(genome editing)이 생명공학 분야에서 새로운 혁신을 가져오고 있다. CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질과 guide RNA의 결합을 통해 표적 유전자를 효과적으로 절단하여 DNA 이중가닥 절단(double strand breaks, DSBs)을 일으킨다. 이중가닥절단이 형성되면, 잘린 DNA는 크게 비상동성 말단 접합(non-homologous end joining, NHEJ) 또는 상동 재조합(homologous recombination, HR)의 두 가지 경로에 의해 수선되는데, 이 때 표적 특이적인 돌연변이 및 유전자 변형이 일어나게 된다. 이와 같은 CRISPR/Cas9 시스템에 기반하여 표적화된 유전자 조절이 가능하다.

[0005] 파킨슨 병에서 PARK-7(Parkinson disease protein 7)이라고도 알려진 DJ-1(Protein deglycase DJ-1) 유전자 손상은 파킨슨 병을 유발하는 것으로 알려져 있지만, 대동물에서 연구된 바가 없어 정확한 패턴 분석이나 질병을 이해하기 어려운 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명자들은 대동물이고 인간과 유사한 행동이나 질병 형태를 보이므로 파킨슨 병 연구에 적합한 개를 동물 모델로 선정하고, CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 DJ-1 유전자를 결손시킴으로써 파킨슨 병을 유도하고자 하였다. 그 결과, 개체에서 DJ-1 유전자만 특이적으로 결손을 유도하고, 파킨슨 병 증상을 나타내는 개 모델을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명의 목적은, DJ-1(PARK-7, Protein deglycase DJ-1, Parkinson disease protein 7로도 알려짐) 유전자를 표적으로 하는 gRNA(guide RNA) 및 Cas9(CRISPR associated protein 9)을 암호화하는 유전자를 포함하는, 파킨슨 병 개 모델 제작용 재조합 벡터를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은, 상기 재조합 벡터를 이용하여 파킨슨 병 개 모델의 제조 방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조된 파킨슨 병 개 모델을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 상기 파킨슨 병 개 모델 제작용 재조합 벡터는 제1 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 DJ-1 유전자를 표적으로 하는 gRNA; 및 제2 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 Cas9을 암호화하는 유전자를 포함한다.

[0011] 용어 "CRISPR/Cas9" 또는 "CRISPR/Cas9 시스템"은, 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 게놈 편집 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(gRNA)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 단백질로 구성된다. 이러한 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하면 세포나 동물에 플라스미드 DNA를 도입하여 특정 유전자의 기능을 억제할 수 있는 녹-아웃(knock-out)이 가능하다.

[0012] 용어 "Cas9(CRISPR associated protein 9) 단백질"은, CRISPR/Cas9 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미한다. Cas 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터(national center for biotechnology information, NCBI)의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관(CRISPR-associated, cas) 유전자는 종종 CRISPR-반복 스페이스 배열(CRISPR repeat-spacer array)과 관련된다. CRISPR-Cas 시스템은 세 종류가 있고, 이들 중에서 Cas9 단백질 및 crRNA 및 tracrRNA를 수반하는 타입 II CRISPR/Cas 시스템이 대표적이며, 잘 알려져 있다. Cas 단백질은 단백질 전달 도메인(protein transduction domain)과 연결될 수 있다. 상기 단백질 전달 도메인은 폴리-아르기닌(poly-arginine) 도메인 또는 HIV로부터 유래한 TAT 단백질일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. Cas 단백질은 가이드 RNA와 복합체를 형성할 때 엔도뉴클레아제 또는 니카아제 활성을 갖는다면, 어떠한 Cas 단백질일 수 있다.

[0013] 용어 "프로모터"는, RNA 중합효소에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 다운스트림(downstream) 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 암호화 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산 서열을 말한다.

- [0014] 용어 "벡터"는, 목적하는 DNA 단편을 숙주균 등에 도입시켜 주고 증식할 수 있는 DNA로서, 클로닝 운반체(cloning vehicle)라고도 하는데, 벡터 DNA는 제한효소 등으로 절단하여 개환하고 여기에 목적으로 하는 DNA 단편을 삽입하여 연결하고 숙주균에 도입시킨다. 목적 DNA 단편을 연결한 벡터 DNA는 숙주균이 증식됨에 따라 복제하여 균의 분열과 더불어 각 낭세포로 분배되어 목적 DNA 단편을 대대로 유지하여 이어져 나가며, 플라스미드, 파지 염색체를 주로 사용한다. 상기 벡터는 발현시키고자 하는 목적 폴리펩타이드의 암호화 유전자가 작동 가능하게 연결된 "재조합 벡터"로 제작되어 사용될 수 있다.
- [0015] 용어 "재조합 벡터"는, CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 특정 유전자 부위에 염기서열 이중나선 결손을 유도하여 유전자 편집을 실시하고, 적절한 숙주 세포에서 효율적으로 타겟 유전자를 변형시키는 벡터로서 사용될 수 있다. 숙주 세포는 바람직하게는 진핵세포일 수 있으며, 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer) 등과 같은 발현 조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 유전자 도입의 성공 여부를 판단할 수 있는 구성 요소를 더 포함할 수 있고, 이는 예를 들어 형광 단백질일 수 있다.
- [0016] 용어 "gRNA(guide RNA)"는, RNA를 편집할 때 수식반응의 주형이 되는 염기순서정보를 갖는 45~70 bp 가량의 작은 RNA를 지칭하는데, gRNA의 5' 말단 측 영역은 RNA 편집되는 mRNA의 일부와 상보적 순서로 되어 있고, 이 영역을 매개로 하여 mRNA에 결합되며, 3' 말단 측 영역에는 편집 후의 최종적 mRNA의 순서에 상보적 염기순서가 존재하고, 그 순서정보에 따라 우리딘(uridine) 염기의 삽입이나 결실이라는 RNA수식반응이 일어난다.
- [0017] 용어 "세포주"는 세포를 분리해서 순수 배양하여 계대배양해 나갈때 세포계의 각 개체를 말하며, 이때 세포주는 유전적 형질에 의해 다른 세포주와 구별될 수 있으며, 계대배양에도 원 세포의 형질이 유지되는 것을 말한다.
- [0018] 용어 "형질전환"은 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것으로, 즉 생물의 어떤 계통의 세포에서 추출된 핵산의 일종인 DNA를 다른 계통의 살아있는 세포의 주었을 때 DNA가 그 세포에 들어가서 유전형질이 변화하는 현상으로 형질변환, 형전환 또는 형변환 등이라고도 한다. 즉, "형질전환"이란 유전자를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있도록 하는 것을 의미한다.
- [0019] 상기 "DJ-1"은 파킨슨 병을 유발하는 유전자 돌연변이와 관련된 단백질로, 파킨슨 병 환자의 뇌세포에서 침전물의 형태로 존재하여 기능을 상실한 상태로 발견된다고 알려져 있다. 상기 "DJ-1" 단백질과 관련된 유전자는, GenBank ID로 BAB71782.1, XP_022274722.1, XP_859031.1, XP_536733.1, 또는 XP_022274721.1 등의 아미노산 서열로 정의될 수 있다.
- [0020] 상기 제1 프로모터는 gRNA의 발현을 개시할 수 있는 프로모터라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 당업자에게 자명한 공지의 모든 프로모터를 사용할 수 있으나, 바람직하게는 CMV(cytomegalovirus), CAG(chicken beta-actin), CBh(hybrid form of the chicken beta-actin), U6 등의 유비쿼터스(ubiquitous) 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터를 목적에 따라 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 인간 U6 프로모터(human U6 promoter)를 사용할 수 있다.
- [0021] 상기 재조합 벡터의 구성 요소 중 gRNA로 전사되는 구역은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으나, 목적하는 유전자인 DJ-1을 표적할 수 있는 범위 내에서 서열번호 1의 염기서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상의 상동성을 갖는 것일 수 있다. 서열번호 1에서 N은 A, T, C, 및 G 중 선택된 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 N은 T이고, 이 경우 서열번호 7로 표시될 수 있다. 용어 "표시되는"은 DJ-1의 표적 기능을 발휘하는 범위 내에서 해당 염기서열을 포함하되 서열의 5'말단 또는 3'말단에 10bp 이상, 5 bp 이상 또는 1 bp 이상의 염기서열을 더 포함하는 것을 의미할 수 있고, 또는 그러한 염기서열로 이루어지는 것을 의미할 수 있다.
- [0022] 상기 제2 프로모터는 Cas9 단백질의 발현을 개시할 수 있는 프로모터라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어, CMV(cytomegalovirus), CAG(chicken beta-actin), CBh(hybrid form of the chicken beta-actin), U6 등의 유비쿼터스(ubiquitous) 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터를 목적에 따라 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 CBh(chicken beta-actin) 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 재조합 벡터는 도 1에 기재된 개열 지도를 갖는 것일 수 있고, DJ-1의 결손을 유발할 수 있는 벡터라면 부수적인 구성은 변경되거나 서열이 추가로 조작될 수 있다.
- [0024] 상기 재조합 벡터를 이용하여, DJ-1이 결손된 세포주를 제조할 수 있다. 이러한 세포주는 DJ-1이 결손됨으로 인해서 파킨슨 병이 발현되는 메커니즘을 이해하는데 기여할 수 있다. 상기 세포주는 바람직하게는 개 유래의 것

으로서, 난모세포주, 섬유아세포주 또는 신장세포주일 수 있고, 이에 제한되지 않는다.

- [0025] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위해, 일 구체예에 따른 재조합 벡터를 개체에 도입하는 단계를 포함하는, 파킨슨 병 개 모델 제조 방법을 제공한다. 상기 개체는 포유 동물의 체세포일 수 있고, 보다 구체적으로 배아일 수 있다.
- [0026] 상기 파킨슨 병 개 모델 제조 방법은 구체적으로, a) 상기 재조합 벡터를 체세포에 주입하여 형질전환하는 단계; b) 상기 형질전환된 체세포의 핵을 분리하여 대리모 동물로부터 수득된 난자의 핵과 치환하는 단계; 및 c) 상기 핵치환된 난자를 대리모 동물의 난관에 외과적 방법으로 이식하는 단계를 포함하는 파킨슨 병 개 모델의 제조 방법을 제공한다. 상기 대리모 동물은 포유 동물로서 암컷 개일 수 있고, 동일하거나 상이한 품종일 수 있다. 상기 체세포는 섬유아세포일 수 있다.
- [0027] 단계 b)는 체세포의 핵을 핵이 제거된 난자에 주입한 후, 32V 내지 34V에서, 12 μ sec 내지 15 μ sec 간, 2 내지 3 펄스를 가하여 융합을 유도하는 단계를 포함할 수 있다. 핵 치환 조건은 안정적인 수정란을 만드는데 중요하다. 핵 치환 후, 수정란을 안정시키기 위해 약 20분 내지 30분 간 인큐베이션할 수 있고, 수정란의 활성화를 위해 1.5 내지 2.0 mM 6-디메틸아미노푸린을 처리하고, 추가로 3 시간 내지 4 시간 동안 배양할 수 있다.
- [0028] 상기 세포주 제조 및 파킨슨 병 개 모델 제조 방법에서 세포 또는 배아에 재조합 벡터를 주입하는 방법은 예를 들어, 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질전환, 형질도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 형질전환된 배아나 세포의 선별을 위해 항생제 내성 유전자를 사용할 수 있고, 예를 들어 네오마이신, 푸로마이신, 페니실린, 암피실린 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조된 파킨슨 병 개 모델을 제공한다.
- [0031] 상기 개는 개과 개속에 속하는 동물로, 학명은 *Canis lupus familiaris*로 정의될 수 있고, 상기 재조합 벡터는 개의 품종과 무관하게 적용 가능 하다.
- [0032] 상기 파킨슨 병 개 모델은 체세포에서 DJ-1 유전자가 결실된 특징을 갖고, 파킨슨 병 증상에 해당하는 운동 실조, 근육 경직, 움직임 속도 저하가 나타나고, 어떤 경우에는 치매, 우울증 등과 같은 정신질환이 함께 나타나는 특징을 갖는다. 포유 동물 질병 모델 중, 개 모델의 경우 전신 경직, 경련, 우울증 등과 같은 사람과 유사한 증상을 나타내어, 파킨슨 병의 동물 모델로서 탁월하다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따른 파킨슨 병 개 모델 제작용 재조합 벡터 및 이를 이용하여 제조된 파킨슨 병 개 모델은 DJ-1 유전자 결손에 의한 인간의 파킨슨 병 패턴 및 증상을 인간을 대신하여 보다 정확히 이해하는데 유용하다. 또한 유전자 결손으로 인한 전신적(systemic) 증상과 그에 수반되는 메커니즘을 정확하게 이해할 수 있고, 학술 연구 및 파킨슨 병 치료 약물 개발 등에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 본 발명에 따른 CRISPR/Cas9 재조합 벡터의 개열지도를 도식적으로 나타낸 것이다. 상기 벡터는 Cas9 단백질 코딩 서열, DJ-1 타겟 gRNA(guide RNA), 네오마이신 저항성 유전자를 포함하며, 이를 세포에 도입하여 형질전환시켰다. ITR: 역반복 서열(Inverted Terminal Repeat Sequence), U6: 인간 U6 프로모터(human U6 promoter), CBh: 닭 베타-액틴 프로모터(chicken beta-actin short promoter), hCas9: human Cas 9 단백질, SV40 late pA: Simian virus 40 late polyA, CMV promoter: 거대세포바이러스(Cytomegalovirus) 프로모터, Amp: 암피실린(ampicillin), Neo: 네오마이신 저항성 유전자, EGFP: 증진 녹색 형광 단백질(Enhanced green fluorescent protein), BGH pA: 소 성장 호르몬 pA (bovine growth hormone polyA).

도 2는 본 발명에 따른 재조합 벡터를 이용하여 형질전환된 세포를 EGFP 발현에 따른 형광으로 확인한 이미지이다.

도 3은 파킨슨 병이 유도된 개 모델에서 DJ-1의 결손을 확인한 것이다.

도 4는 본 발명의 유전자 구조체를 이용하여 교정된 후 분만된 개체의 이미지와 GFP 발현을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

<제조예 1> CRISPR/Cas9 시스템을 통한 DJ-1 타겟 재조합 벡터 제조

DJ-1을 타겟하여 결손을 유발하기 위해 DJ-1을 타겟하는 gRNA를 Exon2에서 지정하기로 결정하고, TGG인 sequence를 PAM으로 지정하고 이 위치의 앞 20bp를 gRNA로 설정하여 vector를 제작하였다. 상기 TGG는 PAM의 일 예로서 NGG(N은 A, T, C, 및 G 중 선택되는 것)로 대체될 수 있고, 실시예에 실제 적용된 PAM은 TGG였다. CRISPR/Cas9 시스템의 중요 구성 중 하나인 gRNA는 일부 다른 서열에 비특이적으로 작동하는 오프-타겟 효과(off-target effect)가 발생할 수 있다. 이에 다양한 gRNA 후보를 설정하였고, 후보 서열은 하기의 표 1과 같다.

표 1

후보	서열
DJ-1 표적 gRNA 후보 1 (실시예1)	5'-CCTGTAGATGTCATGAGACGAGCNGG-3' (서열번호 1)
DJ-1 표적 gRNA 후보 2 (실시예2)	5' -TTTAAAAATCAACATAAAAAANGG-3' (서열번호 2)
DJ-1 표적 gRNA 후보 3 (실시예3)	5' -AATGGCTTCGAAAAGAGCTCNGG-3' (서열번호 3)
DJ-1 표적 gRNA 후보 4 (실시예4)	5' -GGCCAAAGGAGCAGAGGAGANGG-3 (서열번호 4)

Vector는 CRISPR/Cas9과 선별을 위한 Neomycin 항생제 저항 유전자와 형광을 발현하는 EGFP 유전자를 넣어 선별이 쉽도록하고, Vector의 기본 틀은 piggybac system을 이용한 방식으로 세포주의 DNA에 도입될 수 있도록 설계하여, Vectorbuilder(USA)에 의뢰해 제작하였다. 제작된 벡터의 구성을 도 1에 도식화 하였다.

<시험예 1> DJ-1 녹-아웃 기능 확인 및 세포주 생산

제조예 1의 재조합 벡터 후보를 이용하여, DJ-1이 녹-아웃된 세포를 생산하였다.

본 시험예에서 사용한 모든 세포 배양액은 DMEM, GlutaMax 45ml, FBS 5ml 그리고 P/S(penicillin/streptomycin)가 500 μ l를 혼합한 것이고, 배양액은 실험 시작 30분 전에 37~38℃에서 수조에서 데워서 사용하였다. 세포주는 개의 귀에서 분리해 낸 섬유아세포(fibroblast)를 이용하였다. 동결된 세포주를 녹여서 60 파이 접시에 1.5~2.0 x 10⁶ 세포로 접종(seeding)하고, 100 파이 접시에서 90 내지 100% 성장하면 실험에 사용하였다. 세포 배양접시에서 기존의 배양액을 깨끗하게 제거한 후, PBS 4~6ml를 넣어 남아 있는 배양액도 제거하였다. 이후 Trysin-EDTA 1ml를 넣어 37~38℃ CO₂ incubator에서 3분가량 활성화시켜준 후 배양액 9ml를 넣어 Trysin-EDTA를 중화시켜주고 900g/5분동안 원심분리 하고, PBS로 세척하여 얻어진 세포를 세포 수 1~2 x 10⁵ 세포 수로 하나의 반응에 사용하였다. 형질전환 시약 (TurboFect, Thermo)과 제조예 1의 각 벡터를 혼합하고, 6 웰을 기준으로 벡터 량 2 μ g으로 혼합액 및 Transposase를 넣어 형질전환하였다. 6시간 후 새 배양액으로 교체한 후 24시간 후에 EGFP의 발현으로 도입여부를 확인하였다. 여기서 형질전환된 세포주만 선별하기 위해 3일 후 네오마이신 1 μ g/ml 을 처리하고, 배양액을 이틀에 한 번씩 교체하였다.

반복 실험한 결과, 표 1의 후보 중 서열번호 1로 표시되는 gRNA로 설계된 재조합 벡터(실시예 1)가 가장 안정적인 작동을 보였고, 도 2와 같이 형질전환된 세포의 EGFP 발현으로 인한 형광을 나타내어, 형질전환이 성공적으로 이루어진 세포주 생산에 가장 적합함을 확인하였다.

<시험예 2> 파킨슨 병 개 모델의 생산 및 확인

2-1. 파킨슨 병 개 모델의 생산

제조예 1의 재조합 벡터를 이용하여 파킨슨 병 개 모델을 생산하였다.

[0051] 먼저, 1~5년령의 잡종 발정견으로부터 수술적인 방법으로 성숙된 난자를 회수하였다. 구체적으로, 발정이 관찰된 날로부터 매일 채혈하고 Vetchroma (Anivet, Korea)을 이용하여 혈청 내 프로게스테론(P4)을 측정하였다. 프로게스테론 농도가 10ng/ml 이상되는 날을 배란일로 잡고, 그 후 72시간 후에 외과적 수술을 통하여 체내에서 성숙된 수컷 난자를 회수하였다. 발정견을 6mg/ml 케타민(ketamine)으로 마취한 후, 2% 아이소플루란(isoflurane)으로 마취를 유지하고, 개복하여 자궁을 꺼내고 고정시킨 후, 난소를 싸고 있는 버사의 슬릿을 통해 난관 개시부에 플러싱 니들(flushing needle)을 장착하였다. 난관 접합부에 인접한 난관에 혈관 내 튜브 카테터(IV catheter)를 삽입하고 플러싱 배지를 사용해 성숙된 난자를 회수하였다.

[0052] 회수된 난자에서 난구세포를 제거하고, 제1극체 및 중기-II 염색체를 흡입 피펫을 사용하여 제거하고, 탈핵 난자의 위관강으로 시험에 1에서 준비된 체세포를 주입한 후, 융합 배지에 재구축된 수정란을 침전시키고, 32-34V, 15 μ sec 지속시간으로 2 펄스를 가하며 백금 바늘을 이용하여 융합을 유도하였다. 30분 후, 융합된 수정란에 화학적 활성화를 유도한 후, 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린을 처리하고 4시간 동안 배양하였다. 자연발정으로 동기화시킨 대리모를 마취시킨 후 배양된 체세포 복제란을 수술적 방법을 이용해 난관 내에 이식하였다.

[0054] **2-2. 개체의 확인**

[0055] 상기 2-1의 과정을 통해 갓 태어난 개체의 털줄을 이용하여 유전자를 분석하였다. 실시예 2 및 3의 경우 개체가 태어나지 않았고, 실시예 4의 경우 수정란으로 제대로 분화하지 않아 개체 이식이 불가하였다. 따라서 실시예 1에 대해서만 발현 양상을 구체적으로 확인할 수 있었다. 털줄에서 게놈 DNA를 추출하여 DJ-1의 타겟 부위로부터 양쪽으로 약 300bp 가량을 하기의 표 2와 같은 프라이머 (쥬바이오니아)를 이용하여 PCR로 증폭하고, T-easy vector에 서브클로닝(subcloning)하여 분석 업체(쥬바이오니아)에 의뢰해 서열을 확인하였다.

표 2

프라이머 분류	서열
DJ-1 Forward Primer	5' -CTGCTGTGTTTTCATCTC-3' (서열번호 5)
DJ-1 Reverse Primer	5' -AGTATCCAGGAAATTAC-3' (서열번호 6)

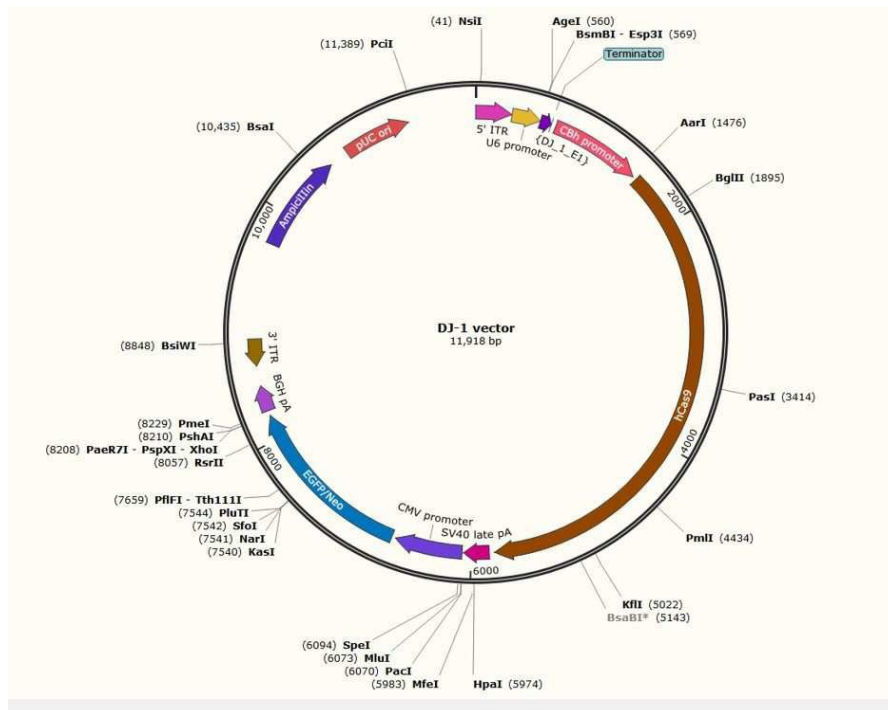
[0057] 그 결과, 도 3과 같이 DJ-1의 유전자가 손상된 것을 확인할 수 있다.

[0058] 상기와 같이 생산된 개체는 도파민 분비량이 적고, 운동 기능 손실, 반사 신경 저하, 근육 쇠약으로 인한 굽은 뒷다리, 활동성 저하되는 등 인간의 파킨슨 병과 유사한 증상을 보인다. DJ-1 유전자가 손상된 개체는 도 4와 같이 말단, 특히 발톱 부위에서 GFP에 의한 강한 형광으로 확인할 수 있다. 이는 성장해서도 사라지지 않으므로 병인의 판단과 개체를 구별하는데 매우 유용하다.

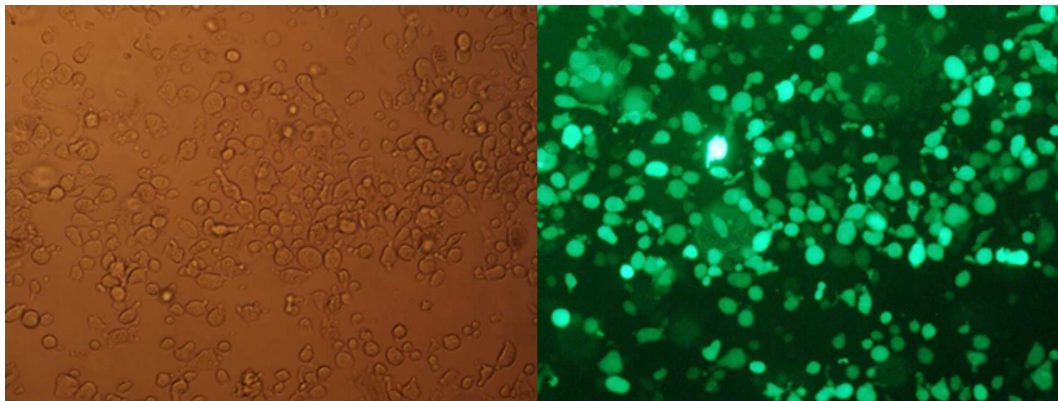
[0059] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

도면1



도면2



도면3

PARK7.seq (1>1076)		
1_1_M13F(-40)	...abl (4>1049)	CTCTGGTCATCTCGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATAGTGCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTC
1_3_M13F(-40)	...abl (11>1067)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGAGTCA
2_1_M13F(-40)	...abl (9>878)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCAG-AG-C-TGGA
2_2_M13F(-40)	...abl (12>1103)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCAG-AG-C-TGGA
2_3_M13F(-40)	...abl (2>1017)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCAG-AG-C-TGGA
2_4_M13F(-40)	...abl (1>1096)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCAG-AG-C-TGGA
2_6_M13F(-40)	...abl (8>1027)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCATGAGACGCT-TGGA
2_8_M13F(-40)	...abl (1>912)	CTCTGGTCATCTCGGCCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCCTGTGATGTCATGAGACGCT-TGGA

도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MKbiotech
- <120> Parkinson's disease inducible recombinant vector and the method
for producing dog model using thereof
- <130> WP203169
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220><223> DJ-1 gRNA1 (n: a, t, c, g)
- <400> 1
cctgtagatg tcatgagacg agcngg 26
- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 gRNA2 (n: a, t, c, g)

<400> 2

tttaaaaatc aacataaaaa ngg 23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 gRNA3 (n: a, t, c, g)

<400> 3

aatggttcg aaaagagctc ngg 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 gRNA4 (n: a, t, c, g)

<400> 4

ggccaaagga gcagaggaga ngg 23

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 forward primer

<400> 5

ctgctgtgtt ttcatttc 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 reverse primer

<400> 6

agtatccagg aaatttac 18

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DJ-1 gRNA1

<400> 1

cctgtagatg tcatgagacg agctgg

26