



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0075845
(43) 공개일자 2013년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/12 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0144110

(22) 출원일자 2011년12월28일

심사청구일자 2011년12월28일

기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

허성오

강원도 춘천시 삭주로 89-7, 106동 107호 (후평동, 에리트아파트)

양해걸

강원도 춘천시 한림대학길 1, 의과대학 약리학교실 (옥천동, 한림대학교)

(뒷면에 계속)

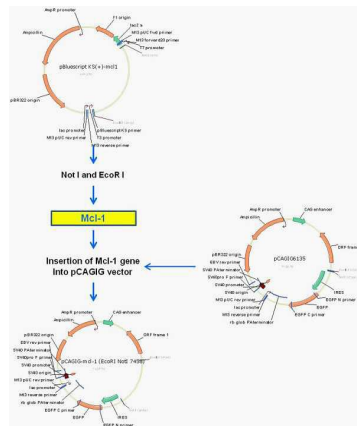
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 Mc1-1 과발현에 의해 매개되는 배아기 마우스 뇌에서 목적 단백질이 과발현되는 동물모델의 제작기술

(57) 요약

본 발명은 세포사멸에 관여하는 Mc1-1 재조합유전자를 대장균을 숙주로 사용하여 과생산시켜 생체내유전자주입기법을 이용하여 배아기 마우스 뇌에 Mc1-1유전자를 주입시켜, 뇌 발달단계에서 신경세포사멸 특정유전자 과발현 동물모델을 제작하는 기술 창출에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

심은주

서울특별시 양천구 신목로 70-1 (신정동)

김남호

강원도 춘천시 후평1동 봉의아파트 6-204

오성민

강원도 춘천시 후평1동 봉의아파트 1-401

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 3044-20110034

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C프론티어사업(뇌기능활용및뇌질환치료기술개발연구사업)

연구과제명 신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능향진기술 개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

대장균을 숙주로 하여 과생산시킨 pCAGIG-Mc1-1 재조합 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 pCAGIG-Mc1-1 재조합 유전자의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 마커 유전자는 GFP 발현유전자 및/또는 카베니실린 저항 유전자인 것을 특징으로 하는 재조합 유전자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 재조합 유전자의 생체내에 주입양과 주입방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항에 있어서, pCAGIG-Mc1-1 재조합 유전자를 배아기 마우스 뇌에 주입 후 뇌 신경발달단계의 질환동물모델을 제작하는 기술에 관한 연구를 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 동물이 배아기 (E15.5) 마우스인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 Mc1-1 유전자의 재조합 및 제조방법에 관한 것으로 대장균을 숙주로 하여 과생산을 유도하여 얻은 유전자를 배아기 마우스의 생체내에 주입시켜 뇌 발달단계에서 특정유전자 과발현질환 동물모델을 제작하는 기술 창출에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 모든 생물이 동일한 유전암호를 사용한다는 것은 한 생명체의 유전자를 다른 생명체에서 발현시킬 수 있음을 의미한다. DNA 재조합 기술은 이러한 사실을 이용하여 원하는 단백질을 세균에서 대량으로 생성하는 것이다. 인슐린, 혈액응고제, 호르몬제 등과 같은 의약품을 만드는데 이러한 기술이 이용된다. 재조합DNA를 만들기 위해서는 DNA를 자르는 제한효소, DNA를 운반하는 클로닝벡터, 숙주세포, 그리고 원하는 유전자를 지닌 세포만을 찾아내는 방법과 그 유전자를 발현하게 하여 원하는 단백질을 얻어내는 방법이 있다. 가장 흔한 유형의 벡터는 플라스미드(plasmid)이다. 이는 세균, 효모, 식물 등에서 발견할 수 있는 작은 원형으로 된 이중나선 DNA이다. 벡터는 DNA를 운반하도록 조작할 수 있는 것이다. 재조합DNA를 만들기 위하여 원하는 DNA와 플라스미드를 같은 제한효소로 자른 후 리가아제(ligase)를 넣어 주면 잘린 부분이 서로 연결되어 두 개가 하나의 DNA속에 포함되며 재조합DNA가 만들어진다. 만들어진 재조합DNA는 숙주세포로 옮겨진다. 재조합DNA를 갖는 세포가 분열하면 플라스미드도 같이 분열되어 짧은 시간 내에 재조합DNA가 많아지게 되고, 전사와 해독을 거쳐 결국 대량의 단백질을 만들게 된다. 이렇게 특정 DNA서열을 지닌 동일한 복사본을 많이 만들어내는 클로닝 과정을 거쳐 필요한 목표물을 제작한다.

[0003] 세포사멸(apoptosis)은 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽어가는 방식의 한 형태로 세포의 괴사와는 구별되는 현상이다. 세포사멸은 유전자의 단편화(DNA fragmentation), 염색체 응축(chromosome condensation), 세포사멸체(apoptotic body)형성 등 형태학적인 특징을 가지고 있다. 세포사멸은 세포 조직이 스스로 파괴되는 현상으로, 세포의 생존과 사멸을 조절함으로써 항상성을 유지한다 (Thompson, 1995). 세포사멸의 신호전달은 FAS(CD95), TNF-R(tumor necrosis factor-receptor), TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand) receptor 등과 같은 death receptor에 ligand와 결합을 통해서 전달되는 extrinsic pathway와 미토콘드리아에 의존적으

로 신호가 전달되는 intrinsic pathway가 존재한다. Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 의존적인 세포사멸에 중요한 역할을 수행하며, 그 종류는 다양하다. Bcl-2 family 단백질은 기능적으로 크게 두 그룹으로 분류한다. 세포의 생존을 유도하는 pro-survival Bcl-2 family 단백질은 Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL 등이 있으며, 이들 대부분 단백질은 pro-apoptotic protein과 결합하여 세포의 생존을 유도한다. 또한 세포 사멸을 유도하는 pro-apoptotic Bcl-2 family 단백질은 Bax, Bak 등이 있다.

[0004] Mcl-1(myeloid cell leukemia-1)은 human myeloblastic leukemia cell의 분화초기에 많이 발현되는 단백질로서, anti-apoptotic Bcl-2 sub-family에 속한다(kozopas,1993). Mcl-1단백질은 세포의 사멸과 성장을 결정짓는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(nijhawan et al., 2003; Opferman et al., 2005). Mcl-1은 cell cycle, proliferation, immortalization 에 관여하는 여러 가지 단백질과 결합하고 있으며, 다른 Bcl-2 family protein 과도 결합하는 것으로 밝혀졌다(bae et al., 2003; Chen et al., 2005; Jamil et al., 2005). 또한 Mcl-1은 고형종양(Solid tumors)에서 높이 발현하고 원발성 간암, 췌장암, 고환암, 자궁경부암, 비소세포폐암, 흑색종, 난소암에서도 높이 발현되고 있는 단백질로 보고되었다(Warr & Shore, 2008). 뿐만 아니라 신경발생과정 중에서도 많은 중요한 역할을 하고 있다.

[0005] 따라서, 세포사멸과 연관성이 있는 Mcl-1유전자를 배아기 마우스 생체내에 주입시켜 뇌신경발달과정 중에 특정 유전자의 과다발현에 따른 신경발달장애질환에 대한 연구를 위한 새로운 기술이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 Mcl-1활성을 갖는 pCAGIG-Mcl-1 유전자를 과생산함으로써 대량의 pCAGIG-Mcl-1 재조합유전자를 용이하게 얻을 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한 본 발명은 pCAGIG-Mcl-1을 생체내 특정유전자를 주입시켜 뇌 발달단계의 동물모델을 제작하는 기술을 창출하고 Mcl-1 신호전달규명을 위한 실험방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 대장균을 숙주로 사용하여 Mcl-1유전자를 과생산함으로써 정제된 대량의 Mcl-1재조합 유전자를 용이하게 얻을 수 있는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 배양 동물세포를 숙주로서 사용하여 Mcl-1유전자를 제조하는 기술의 문제점인 바이러스 및 이상 프리온 등에 의한 오염문제 및 고비용 문제를 해결하기 위하여 대장균을 숙주로 사용하는 재조합 Mcl-1 유전자의 생산방법에 관한 것이며, 순수한 Mcl-1 유전자의 생산을 증가시킬 수 있다는 점에 착안하여 이루어진 것이다.

[0010] 본 발명은 Mcl-1유전자를 생체내 주입시켜, 뇌신경발달단계에서의 질환 동물모델을 제작하는 것을 주 목적으로 한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 유전자재조합의 방법을 이용하여 pCAGIG-Mcl-1대량으로 생산할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 pCAGIG-Mcl-1을 생체내유전자주입 기법을 이용하여 배아기의 마우스 뇌에 주입하여 Mcl-1 신호전달을 규명을 위한 실험에 용이하게 이용할 수 있다.

[0013] Mcl-1은 배아기 뇌신경발생단계에서 중요한 작용을 일으키는 것으로 알려져 있으므로 본 발명의 단백질들은 뇌신경발달단계 질환의 치료제 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 마우스 벡터 pCAGIG-Mcl-1 제작물의 제조과정을 나타내는 개념도이다.

도 2는 Mcl-1 유전자를 얻기 위해 pBluescript-Mcl-1을 Not I 과 EcoR I 효소로 완전 절단한 부분을 확인하기 위하여 1% agarose gel을 이용한 전기영동 사진이다. 제1열은 마커, 제2열은 Uncut, 제3열은 EcoR I 과 Not I 효소로 절단한 후 얻은 핵산 절편을 나타낸 것이다.

도 3은 Mcl-1 유전자를 삽입하기 위해 pCAGIG 벡터에 EcoR I 과 Not I 효소로 완전 절단한 부분을 확인하기 위하여 1% agarose gel을 이용한 전기영동 사진이다. 제1열은 마커, 제2열은 Uncut, 제3열은 EcoR I 효소만으로 절단, 제4열은 Not I 효소만으로 절단, 제5열은 EcoR I 과 Not I 으로 절단한 후 얻은 핵산 절편을 나타낸 것이다.

도 4는 전 단계에서 얻은 네가지 샘플(1, 3, 7, 10)에서 Xba I 효소를 이용하여 벡터와 인설트의 확실한 접합을 확인하기 위해 1% agarose gel을 이용한 전기영동 사진이다. 사진에서 제1열은 마커, 제2열은 샘플 1번의 Uncut, 제3열은 샘플 1번의 Xba I 효소를 이용한 절단 절편, 제4열은 샘플 3번의 Uncut, 제5열은 샘플 3번의 Xba I 효소를 이용한 절단 절편, 제6열은 샘플 7번의 Uncut, 제7열은 샘플 7번의 Xba I 효소를 이용한 절단 절편, 제8열은 샘플 10번의 Uncut, 제9열은 샘플 10번의 Xba I 효소를 이용한 절단 절편을 나타낸 것이다.

도 5a는 생체내 유전자주입기기를 이용한 유전자 주입 모식도이다.

도 5b는 생체내 유전자주입 후 전압을 주는 방법을 나타내는 모식도이다.

도 5c는 Mcl-1 특정유전자가 뇌의 일정구역에서의 발현을 나타내는 사진이다.

도 5d는 Mcl-1 특정유전자가 뇌 히포캄퍼스에서의 발현 패턴을 보여주는 형광현미경 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0016] 실시예 1: 대장균을 이용한 재조합 Mcl-1 유전자의 발현 및 분리

[0017] 대장균의 형질전환은 변형된 Mandel과 Higa (1970)의 방법에 따라 수행되었다. 대장균으로부터 플라스미드 DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 이용하였고, 염기서열 분석을 위한 플라스미드 순수 분리는 plamid extraction kit (iNtRON Co.)을 이용하였다. 제한효소 절단, ligation 및 agarose gel 전기영동은 Sambrook의 방법에 따라 수행하였다.

[0018] 플라스미드 pBluescript-Mcl-1은 addgene사가 시판하고 있으며, Lac프로모터 서열과 lac-알파전사 터미네이트를 포함하고, 구조 유전자를 삽입할 수 있는 복수개의 클로닝 부위를 갖는다. 이 플라스미드는 또한 복제를 위한 f1 오리진과 ColE1 및 앰피실린-내성 유전자를 추가로 함유한다.

[0019] 상기 pBluescript-Mcl-1 0.5ug을 재조합 단백질 발현용 대장균인 DH5a에 형질전환시켰다. 형질전환체들은 Luria-Bertani (LB)배지 (2% trypton, 1% yeast extract, 1% sodium chloride)에 도입된 클로닝 벡터의 안정성을 위해 카베니실린 (50ug/ml)을 첨가하고 37℃에서 16시간 배양하였다. 배양 후 정확한 형질전환이 일어난 균주(흰색 콜로니)만을 얻어내었다.

[0020] 상기 선별된 균주를 50ug/ml농도의 카베니실린이 함유된 액체 LB배지에서 37℃ 190rpm으로 18시간 진탕 배양한다. 원심분리기(Hanil Science Industrial Co., Ltd. Supra 22K, A500S-6 rotor)를 이용하여 6000rpm에서 15분간 원심분리하여 박테리아 세포 침전물을 수거하였다.

[0021] 플라스미드 pBluescript-Mcl-1 10ug를 Not I 과 EcoR I 으로 완전히 절단한 다음 1% agarose gel을 이용한 전기영동으로 분리하여 1335 염기쌍 핵산 절편을 얻었다.

[0022] 한편 상기 단계에서 pCAGIG 서브클로닝 벡터 10ug를 EcoR I 과 Not I 로 완전 절단한 다음 1% agarose gel을 이용한 전기영동으로 분리하여 6116 염기쌍의 핵산 절편을 얻었다. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., CA, USA)를 사용하여 DNA 추출하고 농도를 측정한다.

[0023] 실시예 2: 재조합 유전자를 포함하는 pCAGIG-Mcl-1 서브클로닝 벡터의 제조

[0024] 접합반응 튜브에 상기 1335 염기쌍의 pBluescript-Mcl-1 핵산 절편 및 상기 6116 염기쌍의 pCAGIG 핵산 절편을 1:3 비율로 넣은 다음, 2ul의 10배 접합반응용액 및 10단위체의 T4 DNA 리가아제와 함께 총 부피가 20ul가 되도록 증류수를 가하였다. 이를 25℃에서 30분간 반응시킨 후, 65℃ 10분간 효소를 불활성화시켰다. 반응이 끝난 뒤 이노우에 방법(inoue et. Al., Gene 96:23-28, 1990)을 사용하여 제작된 DH5a ultra-competent 세포에 형질

전환시켜 Mcl-1 유전자를 포함한 pCAGIG-Mcl-1을 얻었다.

[0025] 실시예 3: DNA 염기서열의 결정

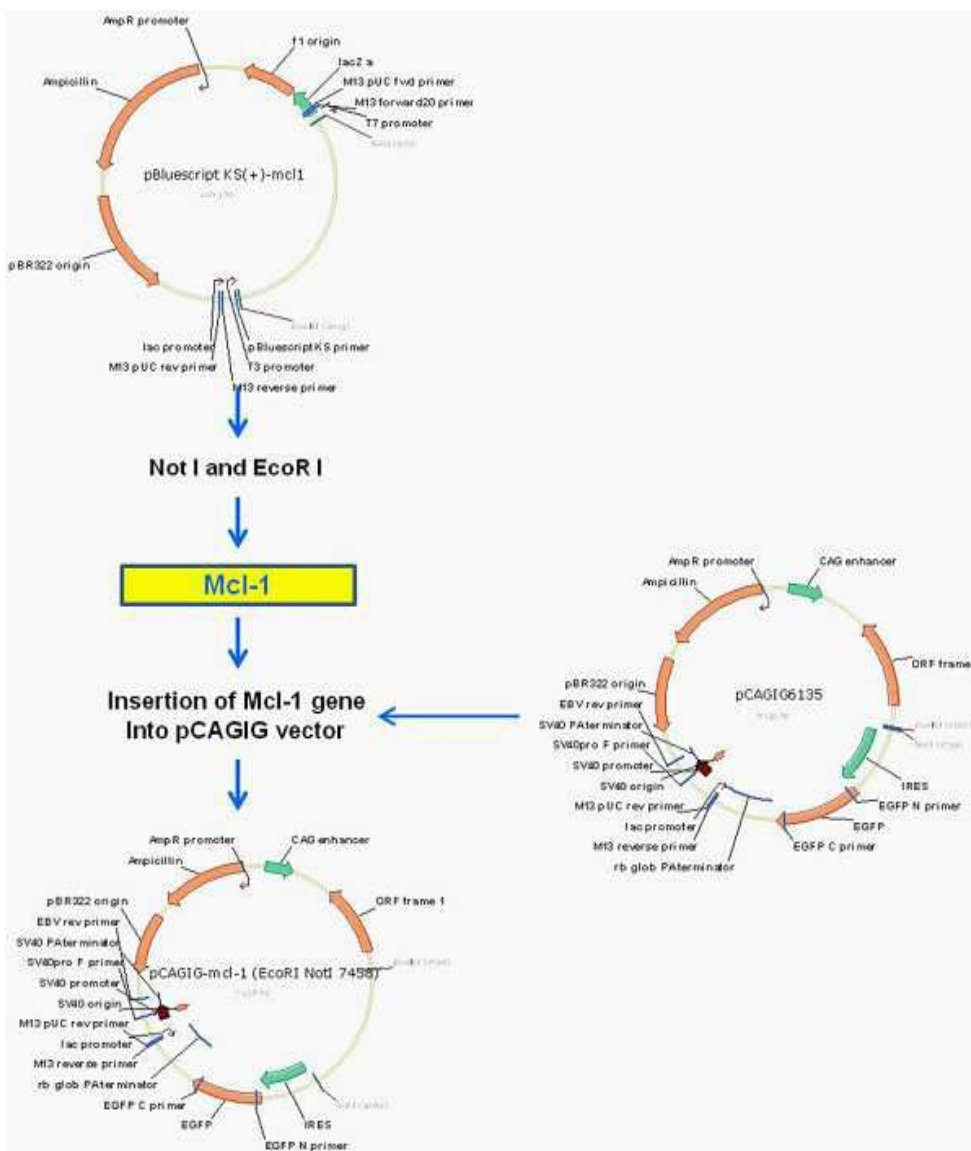
[0026] 유전자 염기서열 분석은 바이오니아사에 의뢰를 하였으며, 결정된 염기 및 아미노산 서열에 대한 유사성 검색은 Genebank database 검색 프로그램인 BLASTN 및 BLASTX와 VECTOR NTI suite 8 program을 이용하였다.

[0027] 실시예 4: 생체내 유전자주입기법을 이용한 뇌신경발달장애 동물모델의 제작

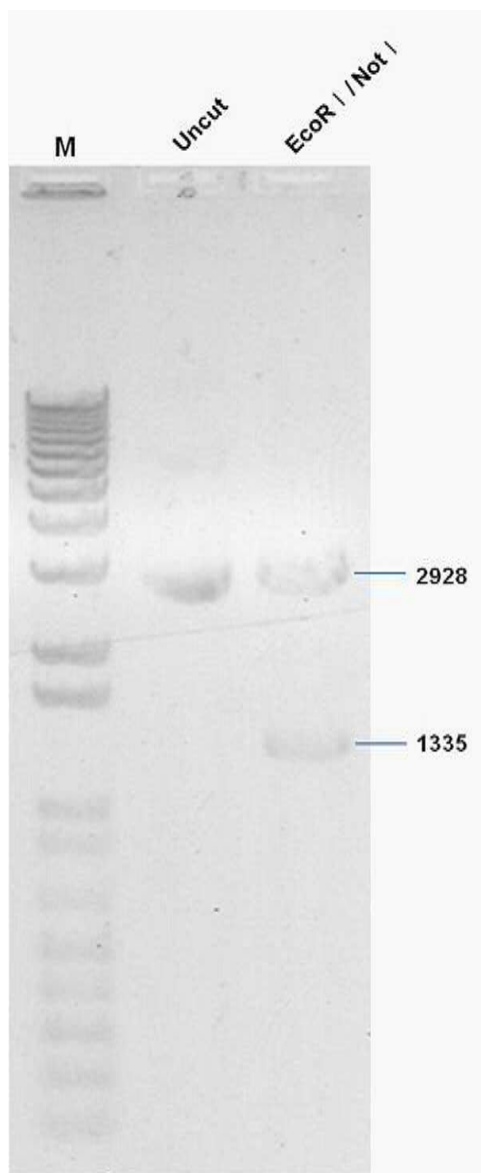
[0028] 상기 실시예에서 얻은 pCAGIG-Mcl-1을 배아기(E15.5) 마우스의 뇌에 생체내유전자주입기법을 이용하여 주입시키고, 유전자 주입시킨 부위에 전압을 가하여 pCAGIG-Mcl-1이 배아기 뇌의 신경세포에서의 발현양상을 관찰한다. 주입시킨 유전자의 양은 약 0.1ug/ml 내지 약 100ug/ml, 더욱 바람직하게는 약 1ug/ml 내지 10ug/ml로 존재한다.

도면

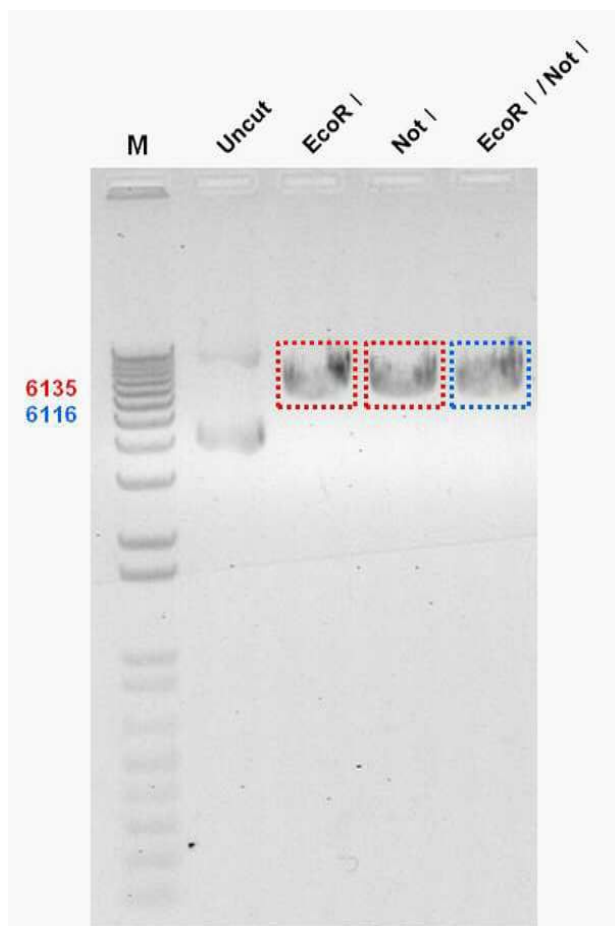
도면1



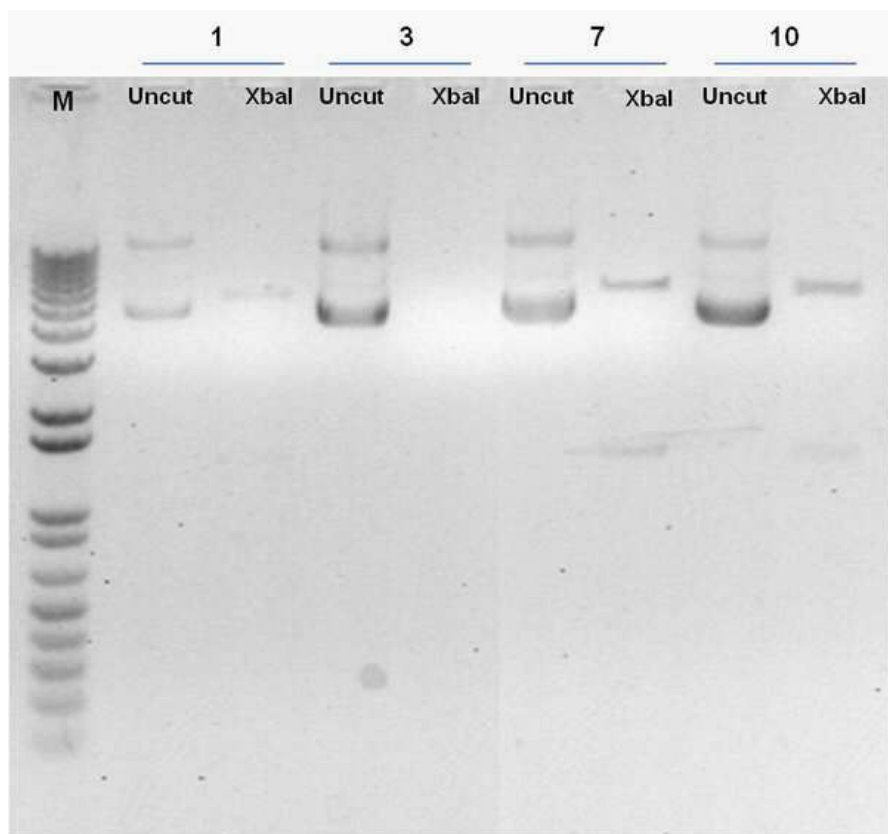
도면2



도면3



도면4



도면5

