



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0117841
(43) 공개일자 2011년10월28일

(51) Int. Cl.

C12N 5/075 (2010.01) C12N 15/873 (2010.01)

A01K 67/027 (2006.01) C12N 5/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0037299

(22) 출원일자 2010년04월22일

심사청구일자 2010년04월22일

(71) 출원인

황우석

서울 영등포구 여의도동 61-5 리버타워 3103호

(72) 발명자

황우석

서울 영등포구 여의도동 61-5 리버타워 3103호

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 13 항

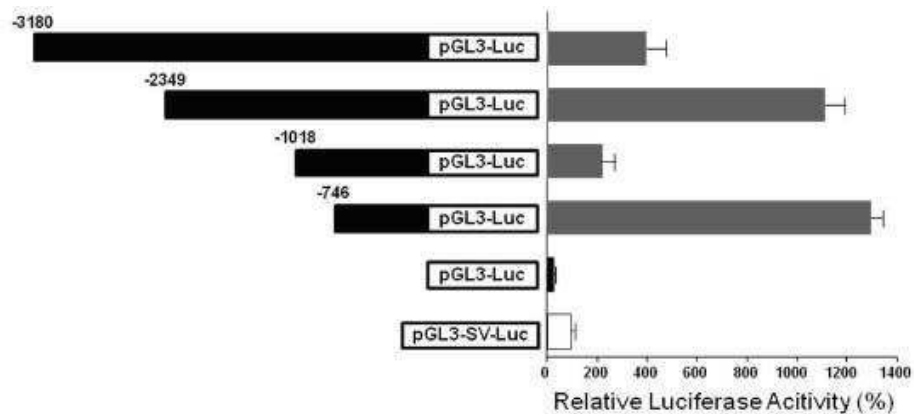
(54) PEPCK 과발현 형질전환 복제 개과 동물 및 이의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 PEPCK (Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase)를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물 및 이의 생산방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 PEPCK 유전자로 형질전환된 개과 동물 유래 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 개과 동물의 핵 이식란과 이의 생산방법 및 상기 핵 이식란을 대리모의 난관에 이식하여 생산된 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물 및 이의 생산방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 PEPCK 유전자를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물은 당뇨병 동물 모델로서, 제2형 당뇨병의 유전적 원인 규명과 진단 시약 및 치료제 개발에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

PEPCK (Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase)를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 개과 동물 유래 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 개과 동물의 핵 이식란.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 핵 이식란은 수탁번호 제 KCTC11360BP 호로 기탁된 것을 특징으로 하는 핵 이식란.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 PEPCK 코딩 핵산은 (1) 개의 PEPCK 유전자에 천연적으로 존재하는 전장의 프로모터, (2) 상기 전장의 프로모터로부터 -2349 염기까지 제거된 프로모터, (3) 상기 전장의 프로모터로부터 -1018 염기까지 제거된 프로모터, (4) 상기 전장의 프로모터로부터 -746 염기까지 제거된 프로모터로 이루어진 그룹으로부터 선택된 프로모터의 조절하에 위치하는 것을 특징으로 하는 핵 이식란.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 PEPCK 코딩 핵산은 개과 동물로부터 유래된 것을 특징으로 하는 핵 이식란.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 개과 동물의 체세포는 태아의 섬유아세포인 것을 특징으로 하는 핵 이식란.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 개과 동물은 개임을 특징으로 하는 핵 이식란.

청구항 7

(a) 개과 동물에서 유래한 체세포주를 PEPCK 코딩 핵산으로 형질전환시키는 단계를 포함하여 공여핵원세포를 준비하는 단계; (b) 개과 동물의 성숙난자로부터 핵을 제거하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 탈핵 난자에 (a) 단계의 공여핵원세포를 미세주입하고 전기 융합시키는 단계를 포함하는 PEPCK 유전자로 형질전환된 개과 동물의 핵 이식란의 생산방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 핵 이식란은 수탁번호 제 KCTC11360BP 호로 기탁된 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 개과 동물의 성숙난자는 개과 동물의 배란일로부터 70 ~ 90 시간에 회수된 것임을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 전기융합은 직류 전압 1.9~2.2kV/cm로, 시간은 15~45 μ s 동안, 회수는 1~3회 수행하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 11

제 1항에 따른 핵 이식란을 대리모의 난관에 이식하여 산자를 출생하는 단계를 포함하는 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물의 생산방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 핵 이식란은 수탁번호 제 KCTC11360BP 호로 기탁된 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 13

제 11항에 따른 방법에 의하여 생산된 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 PEPCK(Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase)를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물 및 이의 생산방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 PEPCK 유전자로 형질전환된 개과 동물 유래 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 개과 동물의 핵 이식란과 이의 생산방법 및 상기 핵 이식란을 대리모의 난관에 이식하여 생산된 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물 및 이의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우리나라도 경제가 발달하면서 식생활의 변화, 스트레스, 공해, 인스턴트 식품의 피해 등으로 대사성 질환이 지속적으로 증가하고 있는 추세이며, 특히 당뇨병(diabetes mellitus)의 발병 및 당뇨병으로 인한 사망률이 매년 증가하고 있는 추세이다. 당뇨병의 유병률은 인종이나 종족 생활환경 등에 따라 차이가 있으나, 경제가 발전하고 생활양식이 서구화됨에 따라 전세계적으로 유병률이 증가하고 있다. 우리나라에서도 1970년 1% 미만으로 추정되던 당뇨병 유병률이 1980년대 말에는 약 3%, 1990년대에는 5-8%로 점차 증가하는 추세에 있다 (대한당뇨병학회, 당뇨병학, 서울, 고려의학, 1998). 우리나라 사람들은 서구인에 비하여 췌장 베타세포의 인슐린 분비 능력이 낮은 것으로 보고되고 있으며, 비만형이 많은 것이 특징으로 되어 있다.

[0003] 당뇨병은 가장 흔한 대사성 질환으로, 여러 가지 요인들이 관여된 복잡한 질환으로, 전체 인구의 약 5-8% 정도가 당뇨병을 앓고 있다. 당뇨병은 유전, 바이러스 또는 유해 화학물 등의 여러 원인에 의해 유발되는데 췌장 베타세포에서 분비되어 혈당을 낮추는 호르몬인 인슐린 (insulin)에 문제가 생겨 혈당이 증가되어 유발되는 질환이다. 당뇨병은 췌장 베타세포가 파괴되어 인슐린의 절대량이 부족하여 유발하는 제1형 당뇨병 (Type 1 diabetes, insulin-dependent diabetes mellitus)과, 생체 내 인슐린에 대한 수용체 및 신호전달에 관련된 물질의 이상으로 인슐린의 효율이 떨어지는 제2형 당뇨병 (Type 2 diabetes, noninsulin-dependent diabetes mellitus)으로 구분할 수 있으며, 적절한 치료 없이 오랫동안 지속되면 눈(diabetic retinopathy), 신장(diabetic nephropathy), 신경(diabetic neuropathy) 등의 손상을 유발하여 결국 죽음에 이르게 하는 질환이다 (Harrison, T.R. Diabetes Mellitus; Principles of Internal Medicine 11th ed. 1778-1797, 1987; Mahler, R.J. et al, Type 2 Diabetes Mellitus : Update of diagnosis, pathophysiology, and treatment. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84(4), 1165~1169, 1999).

[0004] 글루코오스 생산의 제어는 당뇨병 치료의 주요 측면 중 하나이다. 제2형 당뇨병에서는 식후 및 공복시 혈액 글루코오스가 높은 수준을 보인다 (Consoli, A. et al., J. Diabetes 38, 550-7, 1989; Shulman, GI Am. J. Card. 84 (Suppl. 1A):3J-10J, 1999). 과도한 간 글루코오스 생산(HGP)이 제2형 당뇨병 환자에서 특이적으로 관찰되는 공복 고혈당증과 관련이 있다 (Gastadeli, A. et al., Diabetes 49:1367-1373, 2000). 글루코오스 신합성이 글루코오스 생산 증가의 주요 경로인 것으로 여겨지고 있다 (DeFronzo. R. A. et al., Diabetes Care 15:318-367, 1992).

[0005] 포스포엔올피루베이트 카르복시키나제 (PEPCK)는 글루코오스 신합성 경로에 있어서 주요한 조절 효소이다. PEPCK는 이러한 경로에 있어서 플럭스 제어-속도 제한 효소로 여겨지기 때문에 (Cimbala, A. L. et al., J.Biol.Chem. 257:7629-7636, 1982), 이 효소의 억제제는 글루코오스 항상성을 개선시키기 위한 새로운 방안이 될 것이다. 글루코오스 신합성의 억제를 통한 간의 글루코오스 생산을 제어하기 위한 이전의 시도는 HGP를 억제하는 메트포르민과 같은 비구아나드제로 한정된다 (DeFronzo, R.A. et al., Diabetes Review 6:89-131, 1998). 그러나, 메트포르민은 위장관 장애 및 락탄산 과다증과 같은 부작용을 갖는 것으로 알려져 있다. PEPCK의 억제제는 우수한 역할을 제공하고, 부작용을 감소시키고, 제2형 당뇨병에 대한 새로운 치료법을 제공할 것이다.

[0006] 이를 위해서는 PEPCK를 과발현하여 당뇨병이 유발된 동물 모델이 필요할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자는 당뇨병 동물 모델을 제조하기 위하여 개과 동물에서 유래한 체세포주를 PEPCK 유전자로 형질전환시켜 공여핵원세포를 준비하고, 개과 동물의 성숙난자로부터 핵을 제거하고, 상기 탈핵 난자에 상기 공여핵원세포를 미세주입하고 전기 융합시켜 PEPCK 유전자로 형질전환된 개과 동물의 핵 이식란을 제조한 후 이 핵 이식란을 이용하여 PEPCK 유전자를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물을 생산하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0008] 본 발명은 한 관점으로서, PEPCK (Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase)를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 개과 동물 유래 체세포 핵을 탈핵된 난자에 이식하여 형성된 개과 동물의 핵 이식란 (KCTC 11360BP)을 제공한다.
- [0009] 다른 관점으로서, (a) 개과 동물에서 유래한 체세포주를 PEPCK 코딩 핵산으로 형질전환시키는 단계를 포함하여 공여핵원세포를 준비하는 단계; (b) 개과 동물의 성숙난자로부터 핵을 제거하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 탈핵 난자에 (a) 단계의 공여핵원세포를 미세주입하고 전기 융합시키는 단계를 포함하는 PEPCK 유전자로 형질전환된 개과 동물의 핵 이식란의 생산방법을 제공한다.
- [0010] 또 다른 관점으로서, 상기 핵 이식란을 대리모의 난관에 이식하여 산자를 출생하는 단계를 포함하는 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물의 생산방법을 제공한다.
- [0011] 또 다른 관점으로서, 상기 방법에 의하여 생산된 PEPCK를 과발현하는 형질전환 복제 개과 동물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명에서 사용된 용어 '핵 이식'은 핵이 없는 세포에 다른 세포의 핵 DNA를 인공적으로 결합시켜 동일한 형질을 갖도록 하는 유전자 조작기술을 말한다.
- [0013] 본 발명에서 사용된 용어 '핵 이식란'은 공여핵원세포가 도입 또는 융합된 난자를 말한다.
- [0014] 본 발명에서 사용된 용어 '복제'는 한 개체와 동일한 유전자 세트를 가진 새로운 개체를 만드는 유전자 조작기술로서 특히 본 발명에서는 세포, 배아 세포, 태아 세포 및/또는 동물 세포가 다른 세포의 핵 DNA 서열과 실질적으로 동일한 핵 DNA 서열을 갖는 것을 말한다.
- [0015] 본 발명에서 사용된 용어 '공여핵원세포'는 핵 수용체인 수핵 난자로 핵을 전달하는 세포 또는 세포의 핵을 말한다.
- [0016] 본 발명에서 사용된 용어 '수핵 난자'는 탈핵 과정을 통해 본래의 핵이 제거되고 공여핵원세포로부터 핵을 전달받는 난자를 말한다.
- [0017] 본 발명에서 사용된 용어 '성숙 난자'는 제2차 감수분열 중기까지 도달한 난자를 말한다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어 '탈핵 난자'는 난자의 핵이 제거된 것을 말한다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 '융합'은 공여핵원세포와 수핵 난자의 지질막 부분의 결합을 의미한다. 예를 들어, 지질막은 세포의 플라즈마 막 또는 핵막이 될 수 있다. 융합은 공여핵원세포와 수핵 난자가 서로 인접하게 위치해 있는 경우 또는 공여핵원세포가 수핵 난자의 위란강 (perivitelline space) 내에 위치해 있는 경우에 전기적 자극을 가함으로써 일어날 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 '활성화'는 핵 전이 단계 전, 핵 전이 단계 동안 및 핵 전이 단계 후에 세포가 분열하도록 자극을 주는 것을 말한다. 바람직하게는, 본 발명에서는 핵 전이 단계 후 세포가 분열하도록 자극을 주는 것을 말한다.
- [0021] 본 발명에서 '개과 동물'로는 개, 늑대, 여우, 재칼, 코요테, 승냥이 및 너구리가 포함될 수 있다. 바람직하게는 개 또는 늑대가 포함된다. 상기 개는 야생의 늑대가 가축화된 것으로 알려져 있으며 이에 따라 늑대와 개는 염색체 수가 동일하고 임신기간, 성 호르몬의 변화가 유사한 양상을 나타낸다 (Seal US et al., Biology Reproduction, 1979, 21:1057-1066).

[0022] 제1단계: PEPCK를 코딩하는 핵산으로 형질전환된 공여핵원세포의 제조

[0023] (1) PEPCK(Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase)를 과발현시킬 수 있는 프로모터의 제작

[0024] 본 발명에서는, PEPCK의 과발현을 유도할 수 있는 프로모터를 제작하기 위해, PEPCK 유전자에 천연적으로 존재하는 전장의 프로모터(from nucleotides -3180 ~ +1 = 전사 시작 부위; 서열번호 1)와 이 전장의 프로모터로부터 -3180부터 -2349 염기까지, -3180부터 -1018 염기까지, -3180부터 -746 염기까지가 각각 제거된 프로모터를 제작하였다. 서열번호 1의 전장의 프로모터 서열은 하기와 같다.

[0025] -3180 gctagccatg gcttcctttc cactgtttac ctggaaggca
 [0026] -3140 gctgttccct gccccactc tcacctgctc acaccttttg agtcttggcc attctagact
 [0027] -3080 gctgtgcagt ttccatggtg cttctcagc ttccctgctc cacacaggct ttccagagtc
 [0028] -3020 ctgetccctc cctcctcgga tectgaggac agccaggctg cagcttcaac agcaacaaat
 [0029] -2960 gtgctggaa cctcacaagg agaagtgaag acgttaactt tggagttgga aactatTTTT
 [0030] -2900 ttctgtgtct actgcctcct tctccttctt tcagcaaaaa caattttgtc tgggttcaac
 [0031] -2840 tttgtatatg gtattaaaag gaggagcagt cttgcatctt aagccagcct cgagaagtta
 [0032] -2780 ggaggtcccc atggcattta ttgcagaagt gacaaatgca gcccatactg ggagaccatt
 [0033] -2720 accattatga ttacacagt ccccgttggg ccctatcaac actgggatag ggacgccggg
 [0034] -2660 gtggctcagg gctgccttt ggctcaggtt gttatcctgg ggtccaggat cgagtcccac
 [0035] -2600 atcgggtccc ctgcgaggag cctgtttctc cctttaccta tgtctctgcc tctctctgtg
 [0036] -2540 tgtctctcgt gaataagtga ataaataaaa tttttaaaaa acaaaact gggataagcg
 [0037] -2480 aactttgtcc atacttctgc cgcgtgtcct caacatcctg gcttctgtct gcatcactct
 [0038] -2420 tttccaacgg actcagtact ttcaggtaaa tctgcaacct gatgtttgcc tttcatgtt
 [0039] -2360 atttgaggg acagttgcaa aggaataatg ccagccttcc ctggggtcag tgtgaataat
 [0040] -2300 taagcaattg gcggggggca gtggtagcct cctgttccta cattttaatc gagctggcta
 [0041] -2240 tttctctcca ggaagactcc aaacataaac accttgaatt tatgggtagc atttagaacc
 [0042] -2180 acaataagt tctggtttct catttttgtt ttcaatctat gtgctcttcg agggaaatgaa
 [0043] -2120 acctatcaca gttttatcag caaaatggga atctctacc atttggtgag atggaccgca
 [0044] -2060 ctggcataaa tgtgtgtgtt gctgtgcatt tgaatggcta atttcactgg tgtcagatgc
 [0045] -2000 taagacagtg tcctcagca actgaacatt acgtcgtagt tgaatttcga catgacacaa
 [0046] -1940 acttatatgg ttggcagcgc cactaagaat gaaatctggg gacctaatg ggaaataatt
 [0047] -1880 ttaaactaaa tgaaaacctc agtttatact gaaagattca attggttaaa tacaactctg
 [0048] -1820 ggggggatcc ctgggtggct cagaggttta gtgcctgcct tcggcccagg gtgtgatcct
 [0049] -1760 ggagtcctgg gatcagatcc cgcgtcgggc tcccagcatg gacctgctt ctcctctgc
 [0050] -1700 ctgtgtctct gcctctttct cctctctct gtgtatctca tgaataaata aaataaaaat
 [0051] -1640 attaaaaaat acaaatctgg gtaaatgaga cattggaata ggttggcaat tttggtggaa
 [0052] -1580 gttggtgatg tgtgtatacc taatgtcaca atgggaacca agccttaagg ggtagtcctt

[0053] -1520 cagatattct tggctgaga ttgccattcc caaagccttg tattcctata gctccttaag
 [0054] -1460 gacacagtca cagaattatc tctgcacacc ccacgtggga ggcaggcaaa tcctaccba
 [0055] -1400 ccgtcctcca aagcacaggg tgcccactga ctgcactgtt gggttccctg tgaagagtgg
 [0056] -1340 gagcctggcc ccaagtcct gacttctcac ccagtgtctt caaatgcca gcaagtagca
 [0057] -1280 ccagagttca ctgaattgga ctgaatttct tatggcttgc aaagcgaatt ctttacagct
 [0058] -1220 ggcataaagg tctcattgct caagtgtaat ctagcaaac caccaagccc cctcccctcc
 [0059] -1160 ccagacgtc agactctcaa gggcattgag aagtgtgcag tcattctttt gtagctgcat
 [0060] -1100 ccagcccaga actacttggga gaataatagg aaagtccag aaaagagaat ggcacctcac
 [0061] -1040 aaggacagc atggtaggt gctccagatc cccagtggct tatgttccaa tcttccctct
 [0062] -980 atcactctac aaccaggagt tgggagtagc cacttggcct gcacgattc agtgcctacc
 [0063] -920 gtgtgctagg aaccgtacag acaaaaaata acaggacagg cagagattct tggccttggga
 [0064] -860 gagtttatat ttgggtgggt gggcacacag gggagactca gtaaggttat tagccctccg
 [0065] -800 ttaggtctgg acttttgcta atgagccaaa tgtttattta catttgggca catccttctt
 [0066] -740 ataggccttg gctgtgtggt gacacctcac cactgtgtgt tttgtcagc cagcagccat
 [0067] -680 cggtagacag aatgtgtgtc caataaccct tgatgtccgg aaggtgttcc cgccagcctt
 [0068] -620 gcaggatccc acctgcctgt cagtggagg acggagtgtt ttacatcagc agtgaactgg
 [0069] -560 gtcaaagttt agtcaatcac aagtgtgtga agaacttgcg gtggctgtgc taaggacaaa
 [0070] -500 ggcctcccag cactcattaa caactatctg ttcaatgatt atctccctgg ggcttattgt
 [0071] -440 ggtgagcccg tccagaagca tgacggacag tggccatgat ccaaagtctt gccctgacg
 [0072] -380 tcagagacga gcctccctgg gtgtagccga ggggtggggc ctttctctc aatgggattt
 [0073] -320 aagaccagga ggctctgca cccaacagcg agcacggcct tcccactggg aacgcacggc
 [0074] -260 tactagcagg aagaaccgag aaaagaaacc ctggatctc tcacgaggt catcccaaaa
 [0075] -200 caagaacagt aggtagagat ttttaattta cgtttctaaa aattacagag gtaacaccaa
 [0076] -140 cccgttctt tttctctta gagcttcggc tgtctctgta tgtgtcacc aaagaagcat
 [0077] -80 gtggagtctc ttgagggtg tctgtcattt tgttcaagga gcctgtgtt tctgtttcag
 [0078] -20 gaagccttgg gtcaagctt

[0079] 이렇게 제작된 프로모터들 중에서 -2349 프로모터와 -746 프로모터, 그 중에서도 특히, -746 프로모터가 이의 조절하에 있는 코딩 서열의 발현을 강하게 유도함을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서는 PEPCK 코딩 핵산을 -746 프로모터 변이체와 작동가능하게 연결하여 형질전환시키는 것이 바람직하다.

[0080] (2) PEPCK 코딩 핵산을 포함한 재조합 발현 벡터의 제작

[0081] PEPCK 유전자는 특정 개체의 게놈 DNA를 주형으로, 공지된 그 개체의 PEPCK 유전자의 염기서열을 참조하여 이들의 양 말단 부분에 상보적인 염기서열을 가진 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 이용하여 PCR을 실시함으로써 제조할 수 있다. 또는, 공지된 특정 개체의 PEPCK 유전자의 염기서열을 참조하여 화학적으로 합성하거나, 상업적으로 입수 가능한 자동 DNA 합성기 (예, 바이오서치, 어플라이드 바이오시스템™ 등으로 구입할 수 있는 것)를 이용하여 제조할 수도 있다. 본 발명에서 PEPCK 유전자는 개과 동물, 바람직하게는 개로부터 유래된 것이다.

- [0082] 본 발명에서 PEPCK 코딩 핵산을 벡터에 클로닝하여 공여핵원세포로 형질전환시키는 것이 적합하다. 본 발명은 개과 동물의 췌장 베타세포에서 PEPCK 유전자를 과발현시키는 것이므로 벡터는 재조합 발현 벡터 형태이어야 한다. 상기 재조합 발현 벡터는 상업적으로 입수 가능한 기본 벡터 (즉, 백본 벡터)에 PEPCK 코딩 핵산과 개과의 췌장 베타세포에서 기능을 발휘할 수 있는 조절 서열 (예, 프로모터, 분비 서열, 인핸서, 업스트림 활성화 서열, 전사종결인자 등)에 작동 가능하게 연결하여 제조할 수 있다. 특히 재조합 발현 벡터는 선택 마커를 포함하는 것이 바람직하며, 선택 마커로는 가나마이신 저항성 유전자, 네오마이신 저항성 유전자와 같은 항생제 저항성 유전자와 녹색 형광 단백질 등이 이용될 수 있다.
- [0083] 본 발명에서는 한 양태로서, 기본 벡터로서 상업적으로 입수 가능한 pGL3-Basic (Promega Co., Madison, WI, US)을 이용하여, PEPCK 코딩 핵산으로는 비글견의 간세포에서 유래된 염기서열을 포함하고, 프로모터로는 개의 PEPCK 유전자에 천연적으로 존재하는 전장의 프로모터로부터 -746 염기까지 제거된 프로모터를 포함하고, 선택 마커로는 네오마이신 저항성 유전자와 녹색 형광 단백질을 포함하는 재조합 발현 벡터 'pGL3-dPEPCK'를 제조하였다 (도 3 참조).
- [0084] (3) 개과 동물로부터 유래한 공여핵원세포의 제조
- [0085] 공여핵원세포로는 개과 동물로부터 유래된 체세포가 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 체세포로는 개과 동물의 배아세포(embryonic cell), 태아세포(fetus cell), 유세포(juvenile cell), 성체세포(adult cell)로부터 수득될 수 있다.
- [0086] 본 발명에서 사용될 수 있는 체세포로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 난구세포, 상피세포, 섬유아세포, 신경세포, 각질세포, 조혈세포, 멜라닌 세포, 연골세포, 적혈구, 마크로파지, 단구세포, 근육세포, B 림프구, T 림프구, 배아 줄기세포, 배아 생식세포, 태아세포, 태좌세포 및 배아세포 등이 있다.
- [0087] 보다 바람직하게, 본 발명에서 사용되는 체세포는 성체, 자연개체 또는 재복제된 태아의 섬유아세포일 수 있다. 본 발명에서는 일반 태아의 섬유아세포가 보다 더 바람직하다.
- [0088] 공여핵원세포로 제공되는 체세포는 외과용 표본 또는 생체검사용 표본을 제조하는 방법으로부터 수득될 수 있으며 상기 표본으로부터 공지된 방법을 사용하여 단일세포를 수득할 수 있다. 예를 들면, 대상동물로부터 조직의 일부를 무균적으로 절개하여 상기 외과용 표본 또는 생체검사용 표본을 수득하고 이를 미세하게 세절하여 교원질 분해 효소(collagenase)로 처리한 다음 조직 배양용 배지에서 배양한다. 조직 배양용 배지에서 3~4일 배양 후에 배양 접시(dish)에 자라는 것을 확인하고, 완전히 다 자라면 일부는 추후 사용을 위하여 동결하여 액체 질소에 보관하며, 나머지는 핵 이식에 이용하기 위하여 계속 배양을 실시한다. 계속 배양하여 핵이식에 사용할 세포는 10번 계대 배양 이하를 전체로 하여 세포가 과도하게 커지는 것을 방지하는 것이 바람직하다. 상기에서 조직 배양용 배지로는 당업계에 공지된 것을 사용할 수 있으며 예를 들면, TCM-199, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 등이 있다.
- [0089] (4) PEPCK 코딩 핵산으로 형질전환된 공여핵원세포의 제조
- [0090] 앞서 제조한 PEPCK 코딩 핵산을 포함한 재조합 발현 벡터로 상술한 공여핵원세포를 형질전환시킨다.
- [0091] 형질전환은 공지된 방법에 따라 진행할 수 있는데, 예를 들면 칼슘 포스페이트 형질전환 (calcium phosphate transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 미세주입(microinjection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-transfection), 총알식 도입(ballistic introduction) 등을 포함한다.
- [0092] PEPCK 코딩 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터는 상기 형질전환에 의해 세포내로 유입되고, 이어서 핵 내로 유입된 후 핵분열 시기에 지노믹 DNA(genomic DNA)로 삽입된다. 개과 동물의 체세포주의 지노믹 DNA는 천연적으로 PEPCK 유전자를 보유하고 있으나, 본 발명에 따라 외래 PEPCK 코딩 핵산이 인위적으로 추가로 도입됨에 따라 야생형 개과 동물과 비교하였을 때 PEPCK 유전자를 과발현하게 될 것이다. 특히, 본 발명에 따라, 상기 외래 PEPCK 코딩 핵산이 이의 과발현을 유도할 수 있는 프로모터(예, 전술된 -746 변이체)의 조절하에 위치하는 경우에는 PEPCK 유전자를 보다 더 과발현하게 될 것이다. 본 발명에서 '과발현'이란 야생형 개과 동물에 비해 많은

양이 발현된다는 것을 의미한다.

[0093] 제2단계: 수핵 난자의 탈핵

[0094] 개과 동물은 다른 포유동물의 경우와는 달리 배란 후 수 시간 동안 난관에 머물면서 미성숙 난자가 성숙 난자가 된다. 포유동물의 경우 난자는 성숙 난자, 즉 제2차 감수분열 중기(metaphase II)에 배란이 되는데 반해, 개과 동물의 난자는 제1차 감수분열 전기에 배란되어 난관 내에서 48-120시간 동안 머물면서 성숙과정을 거치는 것이 특징이다. 이러한 특징적인 번식 생리와 더불어 많은 연구진들의 연구(Lee et al, *Reprod. Domest. Anim.*, 42(6):561-5, 2007; Lee et al, *Zygote*, 15(4):347-53, 2007)에도 불구하고 개과 동물에 있어서 난자의 체외성숙 (*in vitro* maturation) 효율은 여전히 낮은 편이다. 따라서 개과 동물의 생체 내에서 성숙된 난자를 회수하여 체세포 핵이식의 수핵 난자로 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0095] 성숙난자를 회수하기 위해 개과 동물에 있어서 배란정기를 판단하는 방법은 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 질세포 도말검사를 통해 각화상피세포가 70% 이상임을 확인하였을 때를 최적기로 판단하는 방법과 초음파 영상을 통해 난포의 성장과 발육상태를 실시간으로 확인하는 방법 및 혈장 프로게스테론을 측정하여 적기를 판단하는 방법들이 있다.

[0096] 본 발명에서는 수핵 난자를 제공하는 공여견의 혈중 프로게스테론의 농도를 측정함으로써 난자 성숙 정도를 판단하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 혈장 프로게스테론 농도가 4.0~7.5ng/mL일 때를 배란일로 간주하여 난자를 회수한다. 상기 혈장 프로게스테론의 농도는 지금까지 알려진 일반적인 난자 회수시의 배란일로 판단하는 혈장 프로게스테론의 농도보다 낮은 특성이 있다. 난자의 혈장 프로게스테론이 급하게 상승($\geq 3.6\text{ng/ml/day}$)하는 개체들의 경우 배란일로부터 70-80시간째 회수하는 것이 최적기이고, 천천히 상승 ($< 3.6\text{ng/ml/day}$)하는 개체들의 경우 배란일로부터 80-90시간째 회수하는 것이 바람직하다. 이는 개체별로 프로게스테론의 증가 속도에 차이가 있기 때문이다.

[0097] 생체 내 성숙 난자를 회수하는 방법으로는 대상 동물을 마취한 후 회복시키는 것을 포함하는 외과적 방법을 사용할 수 있다.

[0098] 보다 구체적으로, 생체 내 성숙 난자의 회수는 당업계에 공지된 방법인 난관 절제법을 사용할 수 있다. 상기 난관 절제법은 난관을 수술적으로 잘라낸 후 배아 수집 배지를 난관 내부에 관류시켜 관류액을 수득하고 상기 관류액으로부터 난자를 회수하는 방법이다.

[0099] 또한, 생체 내 성숙 난자는 카테터를 난관체에 장착한 후 난관-자궁 접합부위에 주사침을 이용하여 관류액을 주입함으로써 회수할 수 있다. 이 방법은 난관을 손상시키지 않기 때문에 난자를 공여하는 동물을 다음 발정에도 이용할 수 있다는 장점이 있다.

[0100] 따라서, 바람직하게는 생체 내 성숙 난자의 회수는 난관을 손상시키지 않는 카테터를 이용한 방법을 사용한다.

[0101] 보다 바람직하게, 카테터를 이용한 난자 회수 방법에 있어서, 본 발명자들이 개발한 니들의 앞부분이 둥글게 처리되어 있어 난관 입구에 장착이 용이한 16 게이지 존대(Sonde)를 이용하여 난자를 회수할 수도 있다. 이 방법은 앞부분이 둥글게 처리된 난자 회수용 니들을 난관 내에 삽입-결찰한 후 난관-자궁 접합부에 난자회수용 배지를 관류시켜 상기 난자 회수용 니들에 관류액이 유입되도록 하고 상기 관류액을 현미경으로 검경하여 성숙한 난자를 수득하는 방법이다.

[0102] 성숙한 난자를 회수한 다음에는 난자의 반수체 핵을 제거한다. 난자의 탈핵은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다(미국특허 제4994384호, 미국특허 제5057420호, 미국특허 제5945577호, 유럽특허 공개공보 제0930009A1, 대한민국특허 제342437호, Kanda et al, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4):641-646, 1995; Willadsen, *Nature*, 320:63-65, 1986, Nagashima et al., *Mol. Reprod. Dev.* 48:339-343 1997; Nagashima et al., *J. Reprod Dev* 38:37-78, 1992; Prather et al., *Biol. Reprod* 41:414-418, 1989, Prather et al., *J. Exp. Zool.* 255:355-358, 1990; Saito et al., *Assis Reprod Tech Andro*, 259:257-266, 1992; Terlouw et al., *Theriogenology* 37:309, 1992).

[0103] 바람직하게는, 수핵 난자의 탈핵은 크게 두 가지 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 한 가지 방법으로는 성숙한

수핵 난자의 난구 세포(cumulus cell)를 제거한 다음, 미세침을 이용하여 수핵 난자의 투명대 일부를 절개하여 절개창을 형성하고 이를 통하여 제1극체, 난자의 핵 및 세포질(가능한 적은 양)을 제거하는 것이다.

[0104] 다른 방법으로는 수핵 난자의 난구 세포를 제거한 다음 난자를 염색하고 미세 흡입 피펫(aspiration pipet)을 이용하여 제1극체 및 난자의 핵을 제거하는 것이다.

[0105] 보다 바람직하게는, 난자에 절개창을 형성하여야 하는 쥐어짜기 (Enucleation; Squeezing method)방법으로 탈핵한다. 이는 홀딩 마이크로 피펫으로 수핵 난자를 고정한 후 제1극체와 난자 핵 그리고 일부 세포질을 제거하는 방법으로 수행한다.

[0106] 보다 구체적인 방법은 이하와 같다. 예를 들어, 절개한 난자를 회전시켜 절개창을 수직으로 위치시킨 후 고정용 피펫을 난자의 밑 부위에 위치시켜 난자가 아래쪽으로 움직이지 못하도록 받친 뒤 절개 피펫을 난자의 위에서 눌러 제 1극체를 포함하여 세포질을 10~30% 탈핵을 실시한다. 또는 난자의 절개창을 3시 방향에서 수직으로 회전시킨 후 고정용 피펫과 절개 피펫을 아래 위에서 눌러서 제 1극체를 포함하여 세포질의 10~30% 탈핵을 실시한다. 탈핵시킨 1군의 난자는 TCM-W로 세정하고 핵이식 전까지 IVM용 TCM 199(B-①)에 정치시킨다. 탈핵 후의 난자는 매우 취약하기 때문에 마우스 피펫은 최소한 내경이 300 μ m 이상 되는 것을 사용하여 작업 후 난자의 세포질이 절개창을 통해 빠져나오지 않도록 주의한다.

[0107] **제3단계: 공여핵원세포의 미세주입 및 융합/활성화**

[0108] 탈핵 난자에 공여핵원세포의 미세주입은 이식용 피펫을 사용하여 공여핵원세포를 탈핵 난자의 세포질과 투명대 사이에 주입함으로써 수행할 수 있다.

[0109] 상기 공여핵원세포의 미세주입이 완료된 탈핵 난자는 세포 조작기를 이용하여 전기적으로 공여핵원세포와 융합시킨다. 전기적 융합에서 전류는 교류 또는 직류일 수 있으며, 전압 1.5~4.0kV/cm 조건으로 수행할 수 있다.

[0110] 바람직하게는 직류전압 1.9~2.2kV/cm로, 보다 바람직하게는 2.1kV/cm로, 시간은 15~45 μ s 동안, 보다 바람직하게는 30 μ s 동안, 회수는 1~3회, 보다 바람직하게는 2회 수행할 수 있다.

[0111] 공여 핵 세포와 난자의 전기적 자극에 의한 융합은 융합용 배지 내에서 수행할 수 있다. 상기 융합용 배지로는 만니톨, Mg₂SO₄, HEPES, BSA가 혼합된 배지를 사용할 수 있다. 바람직하게는 0.2~0.3 M 만니톨 용액, 0.4~0.6 mM HEPES (0.01 내지 0.2mM CaCl₂와 0.01 내지 0.2mM MgSO₄를 첨가)에 0.05~0.1 % (w/v) BSA가 혼합된 배지에서 수행될 수 있다. 더 바람직하게는, 0.26M 만니톨 용액, 0.5mM HEPES (0.1mM CaCl₂와 0.1mM MgSO₄를 첨가)에 0.05~0.1 % (w/v) BSA가 혼합된 배지에서 수행될 수 있다.

[0112] **제4단계: 융합된 핵 이식란의 활성화**

[0113] 융합된 핵 이식란의 활성화는 체외성숙단계에서 제2감수분열 중기에 멈추어있는 세포주기를 재개시키는 과정을 의미한다. 이를 위해서는 세포주기를 정지시키는 물질인 MPF, CSF 등의 높은 활성화도는 낮추고, 제2감수분열 중기에서 후기로 전이를 촉진하는 APC의 낮은 활성화도는 높여주어야 한다.

[0114] 일반적으로 핵 이식란을 활성화시키기 위해서는 세포 내 Ca²⁺ 이온의 농도를 증가시켜 염색체 응축과 배아발달을 유도해야 하며, 이를 위해 물리적인 방법, 화학적인 방법, 또는 전기적인 방법이 사용된다. 물리적인 방법으로는 기계적인 자극, 열, 그리고 직류를 이용하는 방법이 있다. 화학적 방법으로는 에탄올, 이노시톨 트리포스페이트, Ca²⁺ 또는 Sr²⁺, 사이토칼라신 B, 칼슘 아이오노포어, 6-디메틸아미노퓨린, 사이클로헥시미드, 그리고 포블 12-미리스테이트 13-아세테이트와 같은 물질로 처리하는 방법이 있다. 상기 화학적 방법으로, 바람직하게는 DMAP(6-dimethylaminopurine)를 2-4시간 동안 융합된 난자에 처리하는 방법을 사용할 수 있다. 전기적인 활성화 방법으로서, 직류전압 1.5~2.5kV/cm 조건으로 30~60 μ s 동안 1~3회 수행할 수 있다.

[0115] 본 발명에서는 상기 활성화 단계를 생략하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0116] 앞서 주지된 바와 같이 당업계에서 공지된 많은 당뇨병 치료제들이 심각한 부작용을 유발하고 있다. 당뇨병은 만성 질환이기 때문에 치료제 또한 장기간 복용하여야 한다는 점을 감안하면 당뇨병 치료제는 부작용으로부터 자유로워야 한다.

[0117] 본 발명에 따라 수득 가능한 PEPCK를 과 발현하는 복제 개과 동물은 새로운 당뇨병 치료제의 임상 시험에 당뇨병 동물 모델로서 이용할 수 있어 당뇨 치료 효과뿐만 아니라 부작용이 없는 당뇨병 치료제를 개발하는데 기여할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0118] 도 1은 H411IE 세포에서 개의 PEPCK 프로모터의 활성을 나타낸 것이다.
 도 2는 H411IE 세포에서 개의 PEPCK 프로모터의 활성을 웨스턴 블롯 분석으로 나타낸 것이다.
 도 3은 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터 pGL3_dPEPCK의 모식도를 나타낸 것이다.
 도 4는 형질전환 공여핵원세포와 형질전환된 복제건의 유전체 DNA에 대한 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다.
 도 5는 일반광(a)과 형광(b)하에서 EGFP의 발현 유무를 확인한 결과를 나타낸 것이다(좌측면: 일반 복제건 보스턴 테이러, 우측면: 형질전환 복제건 비글).
 도 6은 공여핵원, 복제자건과 대리모의 Microsatellite 분석 결과를 나타낸 것으로, 공여핵원과 DMP-108, DMP110 피크값이 같음을 알 수 있고, 이를 통해 공여핵원과 복제산자가 유전적으로 일치함을 밝혔다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0119] 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 국한되는 것은 아니다.

[0120] 실시예 1. PEPCK의 과발현을 유도할 수 있는 프로모터의 제작

[0121] 실시예 1-1. 세포 배양

[0122] 미국 ATCC 연구소에서 분양받은 랫 간세포주 (H411E)를 10% FBS가 첨가된 DMEM (50 U/ml 페니실린 및 50/ml 스트렙토마이신)에 37°C에서 유지하였다.

[0123] 실시예 1-2. 프로모터 및 이를 포함하는 재조합 발현 벡터의 제작

[0124] PEPCK의 과발현을 유도하기 위해, PEPCK 유전자에 천연적으로 존재하는 전장의 프로모터(from nucleotides -3180 ~ +1 = 전사 시작 부위; 서열번호 1)와 이 전장의 프로모터로부터 -3180부터 -2349 nt까지, -3180부터 -1018 nt까지, -3180부터 -746 nt까지 각각 제거된 프로모터 변이체를 제작하였다. 각각의 프로모터 증폭을 위해,

[0125] -3180부터 +1 nt까지의 정방향 프라이머 5'-cccgctagccatggcttcctttccact-3' (서열번호 2)와 역방향 프라이머 5'-ccaagcttgacaccaaggcttcctga-3' (서열번호 3), -2349부터 +1 nt까지의 정방향 프라이머 5'-cccgctagcgacagttgcaaaggaataa-3' (서열번호 4)와 역방향 프라이머 5'-ccaagcttgacaccaaggcttcctga-3' (서열번호 5), -1018부터 +1 nt까지의 정방향 프라이머 5'-cccgctagcaaggcattgagaagtgt-3' (서열번호 6)와 역방향 프라이머 5'-ccaagcttgacaccaaggcttcctga-3' (서열번호 7), -746부터 +1 nt까지의 정방향 프라이머 5'-cccgctagctcctataggccttggtg-3' (서열번호 8)와 역방향 프라이머 5'-ccaagcttgacaccaaggcttcctga-3' (서열번호 9)와 비글건의 섬유아세포의 지놈 DNA를 이용하여 제작하였다. PEPCK 프로모터의 여러 부위가, 5' 말단의 NheI과 3' 말단의 NcoI을 포함한, 비글건 섬유아세포의 유전체 DNA를 주형으로 제작되었다. 증폭된 단편을 NheI, NcoI 제한효소로 잘라내었고, 프로모터가 존재하지 않는 pGL3-basic 벡터에 옮겨(Promega Co., Madison, WI, USA) “재조합 pGL3_PEPCK 프로모터 플라스미드”를 제작하였다.

- [0126] 실시예 1-3. 일시적인 트랜스펙션과 reporter 유전자 assay
- [0127] 일시적인 트랜스펙션은 lipofectamin™ 2000을 이용하여 수행하였다. 재조합 pGL3_PEPCK 프로모터 플라스미드 (또는 ‘luciferase 제작물’ 이라고 칭함)들의 트랜스펙션 효율성을 조절하기 위해, H4IIE 세포에 luciferase 제작물과 함께 Rous 육종 바이러스 (RSV) - lacZ 플라스미드를 같이 트랜스펙션하였다. 간단하게 서술하면, 트랜스펙션 전 하루 동안, 3×10^5 개의 세포를 6 well 조직 배양접시에 배양하였고, 0.5 μg 의 RSV - lacZ 플라스미드와 4 μg 의 luciferase 제작물을 혈청이 없는 조건에서 세포에 트랜스펙션하였다. 4시간 트랜스펙션 후, 배양액이 처리 배양액 (기존 배양액에 dexamethasone 1 mM을 포함)으로 교체되었고, 추가적으로 48시간 동안 세포들이 배양되었다. 150 μl 의 reporter 용해 버퍼 (Promega, Co.)를 통해 세포 용해질이 준비되었고, luciferase assay 시스템 (Promega, Co.)을 통해 luciferase 활성이 측정되었다. β -galactosidase 효소 assay 시스템 (Promega, Co.)을 통해 β -galactosidase 활성이 측정되었으며, 프로모터 활성이 β -galactosidase 활성에 대한 상대적인 luciferase 값 (%)을 계산함으로써 측정되었다.
- [0128] 도 1에서 보여지는 것과 같이, PEPCK 유전자에 천연적으로 존재하는 전장의 프로모터에서 -2349 nt, -746 nt 까지 제거된 프로모터 변이체는 luciferase 활성을 각각 110배, 130배 증가시켰다. 그러나 PEPCK 프로모터에서 -3180 nt, -1018 nt까지 제거된 프로모터 변이체는 luciferase 활성에서 유의할 만한 증가를 유도하지 않았다. 결과적으로, 전장의 PEPCK 프로모터로부터 -2349 nt, -746 nt 까지 제거된 프로모터 변이체에서 luciferase 활성이 가장 강했다.
- [0129] 실시예 1-4. 웨스턴 블로팅
- [0130] 0.9% NaCl의 차가운 무균 용액을 통해 H4IIE rat 간종양 세포주를 획득하고 세척하였으며, 단백질은 Pro-prep (InTron. Inc., Seoul, Korea)을 통해 분리하였다. 각 레인당 30 μg 의 세포질 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 젤에서 전기영동하였으며, TransBlot Cell (TE-22, Hoefer co.)을 통해 polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane (Perkin Elmer Co., Wellesley, MA)으로 옮겼다. 옮겨진 blot은 120분 동안 5% 무지방 우유를 포함한 TBS-T에서 블로킹되었고, PEPCK (diluted 1:500, CAYMAN) 또는 GAPDH (diluted 1:2000, Assay Design Inc.) 1차 항체로 반응시켰다. 버퍼를 이용하여 blot membrane을 씻어낸 뒤, 상온에서 1시간 동안 정량의 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체 (diluted 1:2500, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 반응시켰다. 다시 blot membrane을 씻어내고, ECL 화학 발광 시약(Amersham Biosciences)에서 반응시킨 후, 1-5분 동안 Biomax™ Light film (Kodak)에 현상하였다.
- [0131] 상기 실시예 1-3에서, 전장의 PEPCK 프로모터로부터 -2349 nt, -746 nt 까지 제거된 프로모터 변이체가 가장 강한 활성을 나타냄을 확인했다. 이에 실시예 1-4에서는, PEPCK 프로모터에 의해 유도된 PEPCK 발현에서 -2349 nt, -746 nt 변이체가 Dex(dexamethasone)가 유도된 PEPCK 발현에 관계하는지 살펴보았다. H4IIE 세포들에 1mM Dex를 24시간 동안 처리했을 때, Dex 부재시 세포와 비교할 때, PEPCK 발현 레벨이 증가하였다. 추가적으로, PEPCK 발현이 트랜스펙션된 세포에서 특이적으로 과발현됨을 확인할 수 있었다. PEPCK 발현에 유의할 만한 증가는 트랜스펙션된 세포에서 Dex 존재시에 관찰되었다. PEPCK 발현 레벨은 Dex 존재시, PEPCK 프로모터에서 -2349 nt 변이체보다 -746 nt 변이체에서 더 높게 나타났다 (도 2). 이 결과는 상기 실시예 1-3에서, -746 nt 변이체가 luciferase 활성이 가장 높았던 것과 일치하는 것이다.
- [0132] 실시예 2. PEPCK 과발현 형질전환 복제건 생산
- [0133] 실시예 2-1. 개 PEPCK 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터의 제조
- [0134] 개 PEPCK 유전자를 쥐장 배타세포에서 과발현하기 위해, 실시예 1에서 제작한, 전장의 PEPCK 프로모터에서 -746 nt까지 제거된 프로모터 변이체를 프로모터가 존재하지 않는 pGL3-basic 벡터에 옮겼다. PEPCK 발현 카세트 플

라스미드를 몇 가지 단계로 제작하였다. PEPCK cDNA는 비글견의 간세포를 주형으로 제작되었고, 프라이머는 5' 말단은 NcoI, 3' 말단은 XbaI을 포함한 정방향 프라이머 5'-ccccatggcgagggtcatcccaaaacaag-3' (서열번호 10)와 역방향 프라이머 5'-ccctctagagggtctgatcacatctggct-3' (서열번호 11)을 이용하여 증폭하였다. 증폭된 단편을 NcoI, XbaI 제한효소로 잘라내었으며, 재조합 pGL3_PEPCK 프로모터 플라스미드에 옮겼다. EGFP는 pIRES2_EGFP(BD Biosciences Clontech, USA)를 주형으로 제작되었고, 프라이머는 5' 말단은 EcoRV, 3' 말단은 BamHI을 포함한 정방향 프라이머 5'-gatatccacaaccatggtgagcaaggcgca-3' (서열번호 12)와 역방향 프라이머 5'-cggatccttacttgtacagctcgtccatgcc-3' (서열번호 13)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 단편을 EcoRV, BamHI 제한효소로 잘라내었으며, pIRES Neo vector로 옮겼다(BD Biosciences Clontech, USA). 선택 카세트는 재조합 pIRES EGFP Neo 플라스미드를 이용하여 증폭시켰다. 프라이머는 5' 말단은 MuiI, 3' 말단은 NheI을 포함한 정방향 프라이머 5'-ggacgcgttgacattgattattgact-3' (서열번호 14)와 역방향 프라이머 5'-gcgctagctagagggtcgacgggtatac-3' (서열번호 15)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 단편을 MuiI, NheI 제한효소로 잘라내었고, 재조합 pGL3_PEPCK 프로모터 PEPEK cDNA 플라스미드로 옮겼다. 각 서열 염기들은 뉴클레오티드 염기서열분석 (Genotech Co. Ltd., Daejeon, Korea)에 의해 확인되었다.

[0135] 실시예 2-2. 개의 공여핵원 섬유아세포 확립

[0136] 개의 공여핵원세포의 확립은 Hossein et al.(Animal reproduction science, 2009, 114(4), 404-414)이 보고한 바와 같이 확립하였다. 간략하게 기술하면, 태아 섬유아세포는 인공수정과 복제란 이식을 통해 임신한 30일령의 모견에서 제왕절개를 통해 분리한 태아로부터 회수하였고, 성체세포는 성견의 복부 피부조직에서 생검하였다. 재복제된 태아섬유아세포의 확립은 복제란의 이식을 통해 임신시킨 후 30 일령의 모견을 초음파를 통해 임신 여부를 확인한다. 임신이 확인되었을 때, 모견에서 제왕절개를 통해 분리한 태아로부터 섬유아세포를 확립한다. 이렇게 얻어진 세포를 화학적 물리적으로 파쇄한 뒤, Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM)에서 배양접시에 90% 이상 잘 때까지 배양한 뒤 액체질소에 동결하였다.

[0137] 실시예 2-3. 개 PEPCK 유전자의 공여핵원세포로의 형질전환

[0138] 상기 실시예 2-1에서 제작한 PEPCK 유전자의 과발현 제작물을 MuiI 제한효소 처리로 선형화시켰다. 선형화된 fragment를 분류하여, 실시예 2-1에서 확립된 공여핵원세포에 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 하루 전에 공여핵원세포를 배양 접시에 배양하여 그 성장률이 배양 접시의 70-80%의 표면적을 덮을 정도로 배양시켰다. 이 세포 배양액에 PEPCK 유전자의 과발현 제작물 및 Lipofactamine 2000을 1 μ g:5 μ l의 비율로 섞어준 후 20분간 상온에서 정치한 다음 분주하였다. 트랜스펙션 후, 배양액을 350 μ g/ml의 G-418이 첨가된 DMEM으로 대체하였고, 이러한 세포들 중 neomycin 내성 세포들을 분류하기 위해 4주 동안 배양하였다. 살아남은 세포 군체들 중, 형광 현미경을 통해 EGFP 형광을 가진 세포들만이 분류하였다. 세포들을 몇 번 계대 배양한 후, EGFP 형광을 지속적으로 발현하는 세포주들을 선택하였고, 이러한 세포주들의 스크린은 PCR을 통해 수행되었다.

[0139] 실시예 2-4. 실험동물의 관리

[0140] 성숙난자를 제공할 공여견과 복제란을 이식할 수란견으로는 1-7연령, 몸무게 20-25kg인 암개 잡종견을 사용하였고, 사용된 실험견은 실내견사에서 한 마리씩 일반 사육용 사료를 자유 급이하며 사육 관리되었다. 이 모든 실험견의 관리는 수암생명공학연구원의 실험동물 윤리규정에 의거하여 수행되었다.

[0141] 실시예 2-5. 개과의 복제

[0142] 본 실시예는 본 발명의 출원인에 의해 출원된 대한민국특허출원 10-2009-0038315에 개시된 절차에 따라 수행되었다.

[0143] 암개의 발정주기를 매주 확인한 뒤, 배란 시기가 다가오면 매일 2ml의 혈액을 뽑아서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 Cobas E411 (Roche Diagnostics,)의 ECLIA를 이용하여 혈중 프로게스테론의 농도를 확인하였다. 혈중 프로게스테론의 농도가 4.5ng/ml에 이르렀을 때 외과적인 방법을 통해 성숙난자를 TCM199 배지로 회수하였다. Hossein et al.(Animal reproduction science, 2009, 114(4), 404-414)에서 기술한대로, 회수된 개의 체

의 성숙난자의 난구세포를 체세포 핵이식에 적합하게 분리하였다. 난자를 5 μ g/ml bisbenzimidazole를 처리하여 난자의 핵을 염색한 후 체세포 핵이식을 수행하였다. 난구세포가 제거된 성숙난자에 미세조작을 통해 공여핵원을 탈핵된 난자에 요란강에 주입한 뒤 0.26M 만니톨 용액 0.5mM HEPES, 0.1mM CaCl₂와 0.1mM MgSO₄를 첨가)에서 전기자극을 통해 전기적 활성화 및 융합을 수행하였다. 전기 융합은 BTX Electro-Cell Manipulator 2001을 사용하여 2회의 직류 전압 1.9, 2.0, 2.1 또는 2.2kV/cm로 30 μ s에 전기자극을 주었다.

[0144] 이러한 과정으로 획득한 핵이식란은 특히 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약의 규정에 따라, 2008년 7월 6일자로 KCTC (Korean Collection for Type Cultures, 한국생명공학연구원)에 수탁번호 제 KCTC11360BP 로 기탁하였다.

[0145] 실시예 2-6. 대리모에 복제란을 외과적으로 이식

[0146] 대리모를 외과적인 방법으로 개복을 한 뒤, 양쪽 난소에 황체가 많은 쪽을 확인하였다. 확인된 난소의 나팔관을 미세한 겸자를 이용하여 노출시킨 뒤, Tomcat 카테터 (Severeign, Sherwood, USA)에 로딩된 복제란을 난관 원위단에 이식하였다. 이렇게 이식된 대리모는 30 일령에 초음파로 확인하였다.

[0147] 실시예 2-7. Microsatellite 분석

[0148] 태어난 산자의 세포를 대리모 세포, 공여핵원세포와 난자 공여건의 세포와 비교하였다. 각각의 샘플로부터 gDNA 추출하고, 10개의 표지인자를 통해 (PEZ1, PEZ 3, PEZ 5, PEZ 6, PEZ 8, PEZ 12, PEZ 20, FHC 2010, FHC 2054, and FHC 2079) 친자 감별을 수행하였다.

[0149] 실시예 2-8. 유전체 DNA 추출과 polymerase chain reaction (PCR)

[0150] 세포들과 유전자 이식 강아지 태줄의 유전체 DNA가 G-DEX™ IIC 유전체 DNA 추출키트 (Intron Biotechnology, Suwon, Korea)를 통해 분리되었다. 1 μ g의 유전체 DNA가 1 유닛의 Ex-Taq polymerase (TaKaRa, Japan.), 2 mM dNTP, 10 pmol의 특정 프라이머를 포함한 20 μ l PCR 반응을 통해 증폭되었다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 이중가닥을 분리, 62 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 프라이머를 단일 가닥에 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 1 또는 3분 동안 염기를 이어나가는 과정으로 진행하였다. 선택 카세트에 대한 프라이머는 정방향 프라이머 5'- catgaagcagcagcacttct -3' (a 프라이머, 서열번호: 16)와 역방향 프라이머 5'- cctaggaatgctcgctcaaga-3' (b 프라이머, 서열번호: 17)이고, PEPCK 발현 카세트에 대한 프라이머는 정방향 프라이머 5'- tcctataggccttggtg-3' (c 프라이머, 서열번호: 18)와 역방향 프라이머 5'- gggtctgatcacatctgget-3' (d 프라이머, 서열번호: 19)이다. PCR 결과물 (8 μ l)은 0.7% 아가로스 겔에서 전기영동하였고, ethidium bromide와 함께 염색되었으며, UV-illumination 아래에 사진 관찰되었다. 사진은 Gel Doc EQ (Bio-rad Laboratories, Inc.)를 통해 스캔되었다.

[0151] 실시예 3. 실시예 2에 대한 결과

[0152] 3-1. PCR 스크린 결과

[0153] 상기 실시예 2-1에서 제작한 PEPCK 유전자의 과발현 제작물에서 PEPCK 발현 카세트 제작물과 선택 카세트 제작물의 구조는 도 3(A)에서 볼 수 있다. 선택 카세트 제작물은 CMV, EGFP, Neo를 포함한다. 그리고 PEPCK 발현 카세트 제작물은 PEPCK 프로모터의 -749 nt, PEPCK cDNA 유전자, SV40 poly A 신호를 포함한다. 트랜스펙션된 세포주들의 스크린은 PCR을 통해 수행되었다. a 프라이머와 b 프라이머를 이용해 Neo 부위와 EGFP를 포함하는 ~1kb 단편을 증폭시켰다(도 3(B)). c 프라이머와 d 프라이머를 이용하여, ~2.7kb와 5.2kb 단편을 증폭시켰다(도 3(C)). 5.2kb 단편은 내인성의 PEPCK 부위를 포함하고, 2.7kb 단편은 PEPCK 발현 카세트 부위를 포함한다. 이렇게 확인된 세포 균체들을 확장하고, 이차적인 확인 및 정량적 확인을 통해 0.6 x 10⁶ 개의 세포 농도로 동결하였으며, 핵 치환에 이용하였다. 후보군 유전체 DNA는 후보군 유전자 이식 강아지들의 태줄로부터 분리되었다. 그 결과 세 마리 동물 중, 두 마리의 양성적인 동물들(1번, 3번)을 확인하였다(도 3).

[0154] 3-2. 적용된 전압에 따른 개의 복제란의 체내 발육율

표 1

[0155] 적용된 전압에 따른 개의 복제란의 체내 발육율 비교

S-D-T ^a	No. of oocytes transferred	No. of recipients	No. of pregnancy (%)	No. of puppies born (%)
1.9-30-2	66	6	1 (16.7)	1 (1.5)
2.0-30-2	94	9	3 (33.3)	3 (3.2)
2.1-30-2	51	5	3 (60.0)	3 (5.9)
2.2-30-2	32	2	1 (50.0)	1 (3.2)

[0156] ^aS-D-T=S; 전압(kV), D; 통전 시간 (usec), T; 통전 횟수

[0157] ^bCumulative from 3 independent trials that yielded similar findings

[0158] 상기 결과는 22마리의 대리모에 복제란을 이식하여 얻은 결과다. 2.1kV/cm 전압에 핵융합 및 난자 활성화 유의적으로 높은 산자율을 보였다.

[0159] 3-3. 공여핵원별 임신의 양태

표 2

[0160] 공여핵원별 임신의 양태

세포의 종류	No. and (%) of oocytes		No. of recipients	Pregnancy status (%) of recipients		No. of puppies born
	Used for NT	Successfully fused		Day 30 pregnancy	Full term	
성체 섬유아세포	152	147 (96.7)	9	1 (11.1)	1 (11.1)	1
재복제된 태아 섬유아세포	118	115 (97.5)	10	3 (30.0)	2 (20.0)	2
일반 태아 섬유아세포	66	51 (77.3)	4	2(50.0)	2 (50.0)	2

[0161] 336개의 개 복제란을 제작하여 23마리의 대리모에 이식하였다. 성체 섬유아세포, 재복제된 태아 섬유아세포와 일반 태아 섬유아세포를 각각 공여핵원으로 사용하였고, 그 핵 융합율은 96.7%, 97.5%와 77.3%였다. 각 세포 유래의 산자율은 11.1%, 30%와 50%로 일반 태아 섬유아세포를 사용하였을 때 그 산자 복제 효율이 유의적으로 높았다. 일반 태아 섬유아세포를 공여핵원으로 사용하였을 때, 각 출생시 체중 380g과 360g의 건강한 복제 비글견을 생산하였고, 친자 감별을 통해 공여핵원과 일치하는 복제견임을 확인하였다.

[0162] 실시예 3-4. 생산된 복제 자견의 양상

[0163]

표 3

[0164]

생산된 복제 자건의 양상

Offspring identification	Karyoplast passage no.	Gestation length	Birth weight (g)	Delivery method	GFP expression ^c
DFN59	5	44	N/A ^a	Natural	-
DFN60	5	65	380 ^b	Cesarean section	-
DFN64	5	63	340	Cesarean section	-
DMP108	6	62	380	Cesarean section	+
DMP110	6	63	360	Cesarean section	+

[0165]

N/A, not applied

[0166]

^a 임신 44일령에 유산

[0167]

^b 분만후 1일령에 폐사

[0168]

^c B-filter에서 형광발현 유무

수탁번호

[0169]

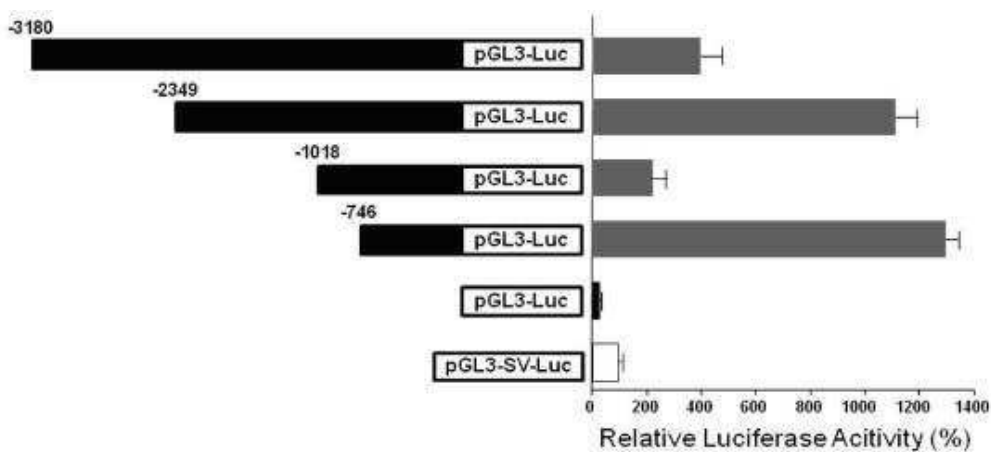
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11360BP

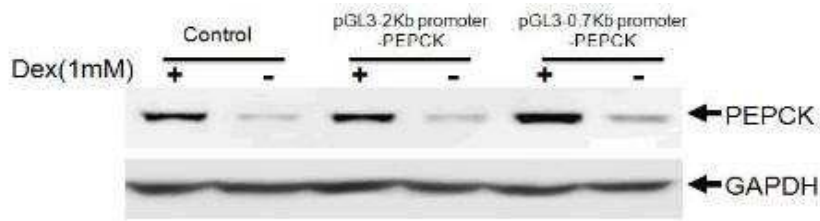
수탁일자 : 20080706

도면

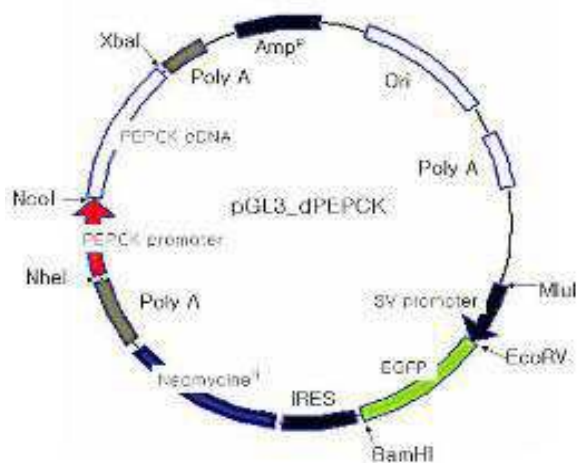
도면1



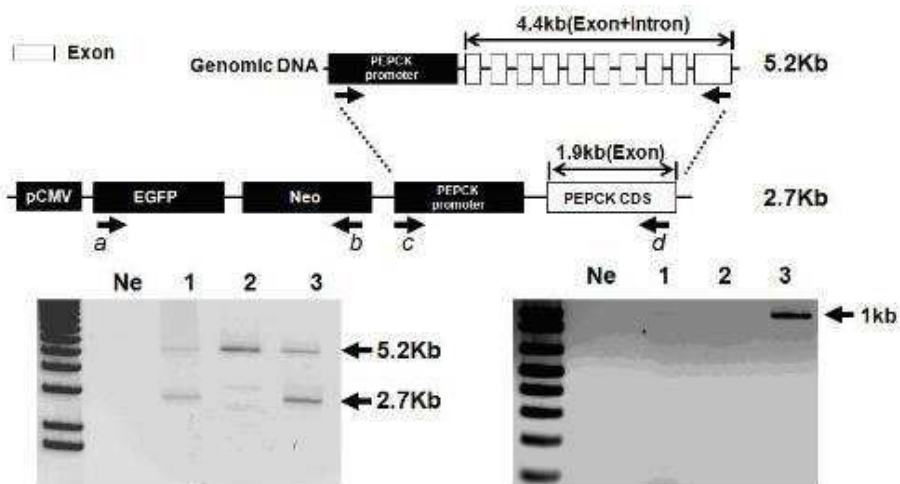
도면2



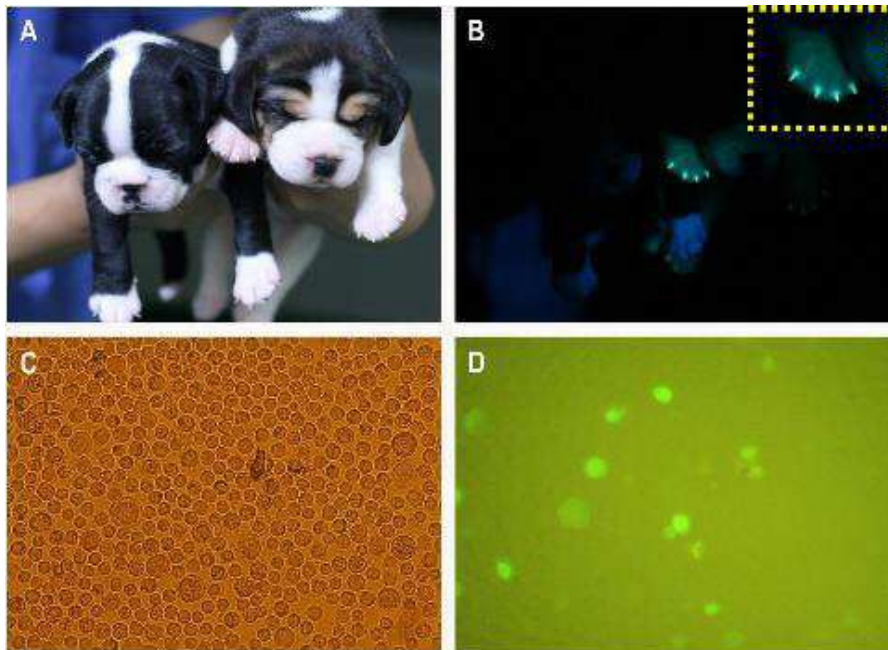
도면3



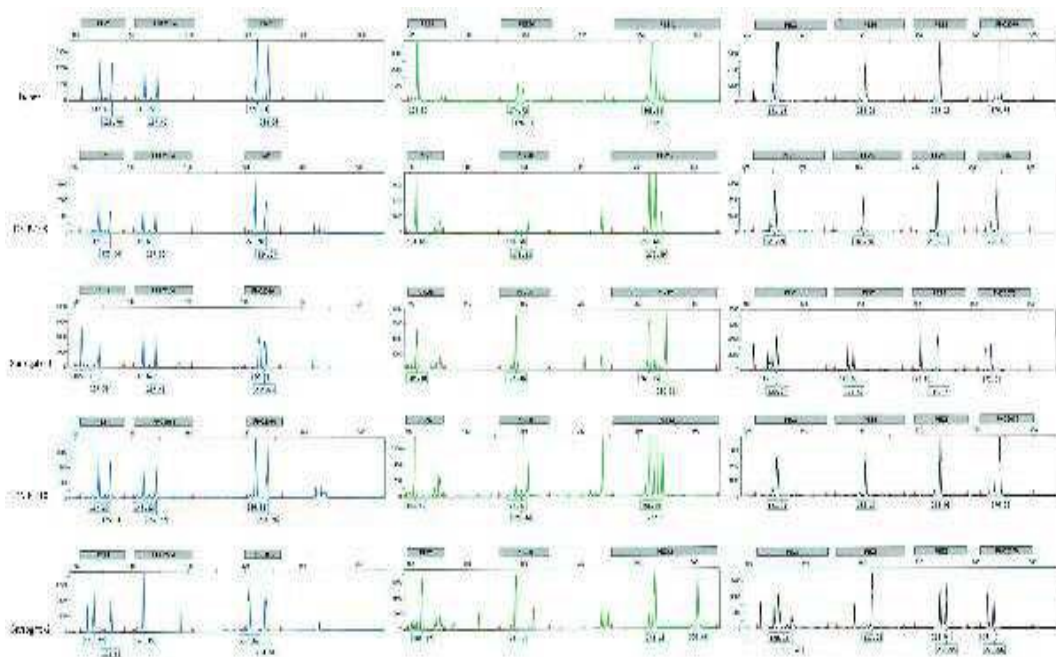
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> HWANG, WOO SUK
- <120> Transgenic Cloned Caninds with PEPCK Gene and Method for Producing Thereof
- <160> 19
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 3180

<212> DNA

<213> canine

<400> 1

```

gctagccatg gcttcctttc cactgtttac ctggaaggca gctgttcctt gccccactc      60
tcacctgctc acaccttttg agtcttggcc attctagact gctgtgcagt ttccatggtg      120
ccttctcagc ttccctgctc cacacaggct ttccagagtc ctgctccctc cctcctcgga      180
tcctgaggac agccaggctg cagcttcaac agcaacaatg gtgcgtggaa cctcacaagg      240

agaagtgaag acgttaactt tggagttgga aactattttt tctgtgtctt actgcctcct      300
tctccttctt tcagcaaaaa caattttgtc tgggttcaac tttgtatatg gtattaaaag      360
gaggagcagt ctgcatctt  aagccagcct cgagaagtta ggaggtcccc atggcattta      420
ttgcagaagt gacaaatgca gcccatactg ggagaccatt accattatga ttacacagt      480
ccccgttggg ccctatcaac actgggatag ggacgccggg gtggctcagg gcctgccttt      540
ggctcaggtt gttatectgg ggtccaggat cgagtcccac atcgggctcc ctgcgaggag      600
cctgtttctc cctttaccta tgtctctgcc tctctctgtg tgtctctcgt gaataagtga      660

ataaataaaa ttttaaaaa acaaaact gggataagcg aactttgtcc atacttctgc      720
cgcgtgtcct caacatctg gcttctgtct gcatactct tttccaacgg actcagtact      780
ttcaggtaaa tctgcaacct gatgtttgcc tttcatgtt atttgaggg acagttgcaa      840
aggaataatg ccagccttc ctggggtcag tgtgaataat taagcaattg gcggggggca      900
gtggtagcct ccgttctca cattttaatc gagctggcta tttctctcca ggaagactcc      960
aaacataaac acctgaatt tatgggtagc atttagaacc acaataagt tctggtttct      1020
catttttgtt ttcaatctat gtgctcttcg agggaatgaa acctatcaca gttttatcag      1080

caaaatggga atctctacc atttgtgag atggaccgca ctggcataaa tgtgtgtgtt      1140
gctgtgcatt tgaatggcta atttcactgg tgcagatgc taagacagtg tccctcagca      1200
actgaacatt acgtcgtagt tgaatttcga catgacacaa acttatatgg ttggcagcgc      1260
cactaagaat gaaatctggg gacctaaatg ggaataaatt ttaactaaa tgaaaacctc      1320
agtttatact gaaagattca attggttaaa tacaactctg ggggggatcc ctgggtggct      1380
cagaggttta gtgcctgcct tcggcccagg gtgtgatcct ggagtcctgg gatcgagtcc      1440
cgcgtcgggc tccagcatg gacctgctt ctccctctgc ctgtgtctct gcctctttct      1500

ccctctctct gtgtatctca tgaataaata aaataaaaat attaaaaaat acaaatctgg      1560
gtaaatgaga cattggaata ggttgcaat tttggtggaa gttggtgatg tgtgtatacc      1620

```

taatgcaca atgggaacca aggcttaagg ggtagtcctt cagatattct tggctcgaga 1680
 ttgccattcc caaagccttg tattcctata gtccttaag gacacagtca cagaattatc 1740
 tctgcacacc ccacgtggga ggcaggcaaa tccctaccca ccgtcctcca aagcacaggg 1800
 tgcccactga ctgcactgtt gggttccctg tgaagagtgg gagcctggcc ccaagctcct 1860
 gacttctcac ccagtgcctc caaaatgcca gcaagtagca ccagagttca ctgaattgga 1920

ctgaagttct tatggcttgc aaagegaatt ctttacagct ggcataaagg tctcattgct 1980
 caagtgtaat ctagcaaac caccaagccc cctcccctcc ccagacgctc agactctcaa 2040
 gggcattgag aagtgtgac tcatctttt gttagctgcat ccagcccaga actacttga 2100
 gaatatatgg aaagttccag aaaagagaat ggcacctcac aaggacagc atggtgaggt 2160
 gctccagatc ccagtggtt tatgttcaa tcttccctct atcactctac aaccaggagt 2220
 tgggagtgc cacttggct gcacgcattc agtgcctacc gtgtgctagg aaccgtacag 2280
 acaaaaaata acaggacagg cagagattct tgccttggga gagtttatat ttgggtggt 2340

gggcacacag gggagactca gtaaggttat tagccctccg ttaggtctgg acttttgcta 2400
 atgagccaaa tgttattta catttgggca catccttct ataggccttg getgtgtggt 2460
 gacacctcac cactgctgtg ttttgcagc cagcagccat cggtagacag aatgtgctgc 2520
 caataacct tgatgtccgg aagggttcc cggcagcctt gcaggatccc acctgcctgt 2580
 cagtgaagg acggagtgtt ttacatcagc agtgaactgg gtcaaagttt agtcaatcac 2640
 aagttgtgta agaacttct gtggctggtc taaggacaaa ggcctcccag cactcattaa 2700
 caactatctg ttcaatgatt atctccctgg ggcttatgt ggtgagccc tccagaagca 2760

tgacggacag tggccatgat ccaaagtcct gccctgacg tcagagacga gcctccctgg 2820
 gtgtagccga ggggtgggc ctttctctc aatgggattt aagaccagga ggctctgca 2880
 cccaacagcg agcacggcct tcccactggg aacgcaggc tactagcagg aagaaccgcg 2940
 aaaagaaacc ctiggatctc tcatcgaggt catcccaaaa caagaacagt aggtagagat 3000
 ttttaattta cgtttctaaa aattacagag gtaacaccaa cccgttctc tttctcctta 3060
 gagcttcgce tctctctga tgtgcacc aaagaagcat gtggagtctc tttgagggtg 3120
 tctgtcattt tgtcaagga gcctgtgttt tctgtttcag gaagccttgg tgtcaagctt 3180

3180

- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for PEPCK promoter (from -3180 to +1 nt)
 <400> 2
 cccgctagcc atggcttctt ttccact 27
 <210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK promoter (from -3180 to +1 nt)
 <400> 3
 cccaagcttg acaccaaggc ttcctga 27

 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for PEPCK promoter (from -2349 to +1 nt)
 <400> 4
 cccgctagcg acagttgcaa aggaataa 28
 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK promoter (from -2349 to +1 nt)
 <400> 5
 cccaagcttg acaccaaggc ttcctga 27
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for PEPCK promoter (from -1018 to +1 nt)
 <400> 6
 cccgctagca agggcattga gaagtgt 27
 <210> 7
 <211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK promoter (from -1018 to +1 nt)
 <400> 7
 cccaagcttg acaccaaggc ttcctga 27
 <210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > forward primer for PEPCK promoter (from -746 to +1 nt)
 <400> 8
 cccgctagct cctataggcc ttggctg 27
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK promoter (from -746 to + 1 nt)
 <400> 9
 cccaagcttg acaccaaggc ttcctga 27
 <210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for PEPCK cDNA
 <400>
 > 10
 ccccatggc gaggtcatcc caaacaag 29
 <210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK cDNA
 <400> 11
 ccctctagag ggtctgatca catctggct 29

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for EGFP cDNA
 <400> 12
 gatatccaca accatggtga gcaagggcga 30

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for EGFP cDNA
 <400> 13
 cggatcctta cttgtacagc tcgtccatgc c 31

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for selection cassette
 <400> 14
 ggacgcgttg acattgatta ttgact 26

<210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for selection cassette
 <400> 15
 gcgctagcta gaggtcgacg gtatac 26

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for selection cassette

<400> 16
 catgaagcag cagacttct 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for selection cassette
 <400> 17
 cctaggaatg ctcgtcaaga 20

 <210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for PEPCK expression cassette
 <400> 18
 tcctataggc cttggctg 18
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for PEPCK expression cassette
 <400> 19
 ggtctgatc acatctggct 20