



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0115212
(43) 공개일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2013.01)

C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0042431

(22) 출원일자 2015년03월26일

심사청구일자 2015년03월26일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

서준교

강원도 춘천시 충열로 29, 107-303 (우두동, 롯데
인벤스아파트)

정혜리

강원도 춘천시 삭주로 40번지 101

남하진

강원도 춘천시 보안길 40, 318동 201(주공3차아파
트)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 3 항

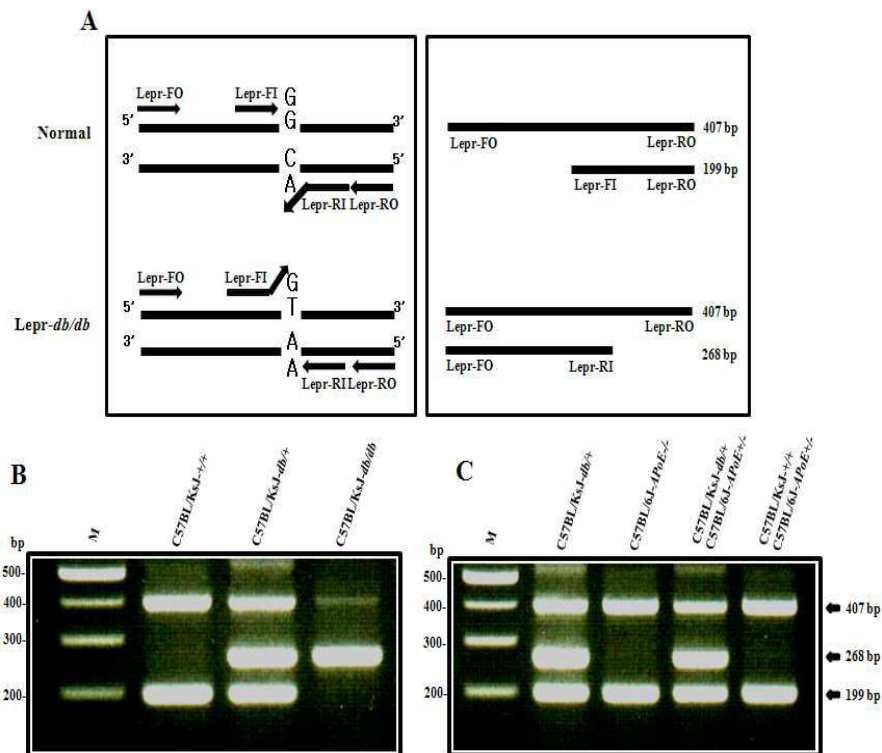
(54) 발명의 명칭 **마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별방법**

(57) 요약

동형접합체 불임을 나타내는 마우스 모델을 유지하는데 있어서 빠르고 효과적인 유전자형 확인이 매우 중요하다. 동형접합체 불임을 나타내는 렙틴 수용체 돌연변이 (C57BL/KsJ-*db/db*) 마우스는 비인슐린 의존적 당뇨병 동물모델로 일반적으로 이용되고 있다. 본 발명자들은 C57BL/KsJ-*db/db* 마우스의 빠르고 효과적인 유전자형 확인을 위

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



해 테트라-프라이머 ARMS-PCR 방법을 이용하였다. 정상 (+/+) 마우스로부터 407bp 및 199bp PCR 산물이 증폭되었고; 반면, 동형접합체 (db/db) 마우스에서는 407bp 및 268bp PCR 산물이 증폭되었으며; 이형접합체 (db/+) 마우스에서는 497bp, 268bp 및 199bp PCR 산물이 증폭되었다. 뿐만 아니라, 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석법은 C57BL/6J 유전자 배경을 갖는 다른 마우스에서도 효과적이었다. 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석법은 1) C57BL/KsJ-db/db를 계통 유지하는데 유용하며, 2) 효율적으로 실험에 사용이 가능한 동형접합체(db/db)를 대량 생산에 유용하며, 3) 랩틴 수용체 돌연변이를 포함하는 이중 녹아웃 마우스를 고속 대량생산하는데 유용하다.

(52) CPC특허분류

A01K 2267/0362 (2013.01)

C12Q 2535/137 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0024062

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 제2형 당뇨병 모델동물에서 피브로인의 항 당뇨 기전에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

(가) 시험대상 마우스 유전체 DNA에 대하여

Lepr-FO(Leptin receptor-forward outer primer); AGGGTTAGAGATCTTTCATCTTTAGCT,

Lepr-FI(Leptin receptor-forward inner primer); TTAGAACATGTTTACATTTTGATGGAGGG,

Lepr-RI(Leptin receptor-reverse inner primer); ATTTGTTTGGATTGATACCAAACCTACTG 및

Lepr-RO(Leptin receptor-reverse outer primer); AAATTTCAACTATACTACCTGAGACGTA를 프라이머로 하여 테트라-프라이머 ARMS-PCR(amplification-refractory mutation system- polymerase chain reaction)을 수행하는 단계;

(나) 얻어진 PCR 산물을 전기영동하는 단계; 및

(다) 전기영동 결과 전개된 PCR 산물이

407bp 및 199bp인 경우 정상 (C57BL/KsJ-+/+) 마우스;

407bp 및 268bp인 경우 동형접합체 (C57BL/KsJ-db/db) 마우스;

497bp, 268bp 및 199bp인 경우 이형접합체 (C57BL/KsJ-db/+) 마우스로 결정하는 단계;를 포함하는 마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

마우스 유전체 DNA는 표준 SDS/프로티네이즈 K 용균 및 페놀/클로로포름 추출방법으로 추출함을 특징으로 하는 마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별방법.

청구항 3

(가) DNA 중합효소;

(나) dNTPs;

(다) PCR용 완충용액; 및

(라)

Lepr-FO(Leptin receptor-forward outer primer); AGGGTTAGAGATCTTTCATCTTTAGCT,

Lepr-FI(Leptin receptor-forward inner primer); TTAGAACATGTTTACATTTTGATGGAGGG,

Lepr-RI(Leptin receptor-reverse inner primer); ATTTGTTTGGATTGATACCAAACCTACTG 및

Lepr-RO(Leptin receptor-reverse outer primer); AAATTTCAACTATACTACCTGAGACGTA로 이루어진 프라이머 셋트;를 포함하는 마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별용 PCR 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별방법에 관한 것으로서, 테트라-프라이머 ARMS-PCR 방법을 이용하여 동형접합체 불임을 나타내는 렙틴 수용체 돌연변이 (C57BL/KsJ-db/db) 마우스 유전자형을 빠르고 효율

적으로 확인할 수 있다.

배경 기술

- [0002] C57BL/KsJ-*db/db* 마우스는 렙틴 수용체(leptin receptor)에 돌연변이가 있어, 가장 널리 이용되는 비인슐린-의존성 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM)의 동물모델이다. C57BL/KsJ-*db/db* 마우스는 렙틴 수용체 유전자에서 하나의 G → T 점 돌연변이를 갖는다(Chen *et al.*, 1996). C57BL/KsJ-*db/db* 마우스의 동형접합체(homozygote, *db/db*)는 생식력이 없어, C57BL/KsJ-*db/db* 계통을 효율적으로 유지하기 위해서는 이형접합체(heterozygotes, *db/+*)를 효율적으로 구별하는 것이 매우 중요하다.
- [0003] 위에서 언급한 렙틴 수용체 유전자 돌연변이는 상염색체 열성 유전을 하므로 정상 마우스와 이형접합체(*db/+*) 마우스 사이에는 표현형의 차이가 없다. 따라서 지금까지 이형접합체(*db/+*) 마우스를 확인하기 위해 후대검정(progeny testing)을 사용하였다. 하지만 후대검정은 양친의 자식에서 동형접합체(*db/db*)가 있으면, 양친이 이형접합체(*db/+*)임을 알 수 있어 결과를 알기위해서 많은 시간과 노력이 필요하였다.
- [0004] 이러한 문제점을 해결하기 위해서 Coleman과 Hummel은 돌연변이가 있는 마우스 렙틴 수용체 돌연변이 유전자(*db* 유전자) 근처에 미스티 유전자(misty gene; *m*)를 도입하였다(Coleman and Hummel, 1975). Coleman과 Hummel의 방법을 사용하면 정상마우스(+/*+*)는 검은색 모색, 이형접합체(*db/+*)는 생후 3-4주부터 미스티 모색(毛色)을 보여 유전자형을 구별할 수 있다. 하지만 Coleman과 Hummel 방법의 단점은 생후 3-4주가 되어야 이종접합체와 정상을 구별할 수 있으며, 낮은 빈도로 *db* 유전자와 미스티 유전자 사이에 교차가 일어나면 모색으로 유전자형을 구별할 수 없다. Horvat와 Bunger는 이 문제를 해결하기 위하여 PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 분석법을 개발하였다(Horvat and Bunger, 1999). 이 방법 또한 시간이 걸리고 비용이 많이 소요된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI and JP Morgenstern, 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell*, 84:491-495.
- (비특허문헌 0002) Coleman DL and KP Hummel, 1975. Symposium IV: Diabetic syndrome in animals. Influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. II. Studies on background modifiers. *Isr J Med Sci.*, 11:708-713.
- (비특허문헌 0003) Collins A and X Ke, 2012. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *The Open Bioinformatics Journal*, 6:55-58.
- (비특허문헌 0004) Horvat S and L Bunger, 1999. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the mouse leptin receptor (*Lepr(db)*) mutation. *Lab. Anim.*, 33:380-384.
- (비특허문헌 0005) Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC and AF Markham, 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17(7):2503-16.
- (비특허문헌 0006) Oh SH, Nam H and JG Suh, 2013. A high resolution genetic mapping of the faded (*fe*) gene to a region between D10mit156 and D10mit193 on mouse chromosome 10. *Lab Anim Res.* 29:33-38
- (비특허문헌 0007) Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR and IN Day, 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29(17):E88-8.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 기존 C57BL/KsJ-*db/db* 마우스의 유전자형을 구별법보다 신속, 정확하면서, 경제적으로 마우스 랩틴 수용체 돌연변이의 유전자형을 구별할 수 방법을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명에서는 가장 최근에 개발된 Horvat와 Bunker의 방법(PCR-RFLP 방법)보다 신속, 정확하면서, 경제적으로 마우스 랩틴 수용체 돌연변이의 유전자형을 구별할 수 방법을 개발하였다. 본 발명에서는 ARMS-PCR(tetra-primer amplification-refractory mutation system- polymerase chain reaction) 분석법을 이용하여 마우스 랩틴 수용체 돌연변이의 유전자형을 구별할 수 있다. 본 발명자들은 ARMS-PCR 분석방법을 이용하여 C57BL/KsJ-*db/db* 마우스의 유전자형을 확인하는 방법을 발명하였다.

[0008] 본 발명은

[0009] (가) 시험대상 마우스 유전체 DNA에 대하여

[0010] Lepr-FO(Leptin receptor-forward outer primer); AGGGTTAGAGATCTTTCATCTTTAGCT,

[0011] Lepr-FI(Leptin receptor-forward inner primer); TTAGAACATGTTTACATTTTGATGGAGGG,

[0012] Lepr-RI(Leptin receptor-reverse inner primer); ATTTGTTTGGATTTGATACCAAACCTTACTG 및

[0013] Lepr-RO(Leptin receptor-reverse outer primer); AAATTTCAACTATACTACCTGAGACGTA를 프라이머로 하여 테트라-프라이머 ARMS-PCR(amplification-refractory mutation system- polymerase chain reaction)을 수행하는 단계;

[0014] (나) 얻어진 PCR 산물을 전기영동하는 단계; 및

[0015] (다) 전기영동 결과 전개된 PCR 산물이

[0016] 407bp 및 199bp인 경우 정상 (C57BL/KsJ-+/+) 마우스;

[0017] 407bp 및 268bp인 경우 동형접합체 (C57BL/KsJ-*db/db*) 마우스;

[0018] 497bp, 268bp 및 199bp인 경우 이형접합체 (C57BL/KsJ-*db/+*) 마우스로 결정하는 단계;를 포함하는 마우스 랩틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별방법에 관한 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은

[0020] (가) DNA 중합효소;

[0021] (나) dNTPs;

[0022] (다) PCR용 완충용액; 및

[0023] (라)

[0024] Lepr-FO(Leptin receptor-forward outer primer); AGGGTTAGAGATCTTTCATCTTTAGCT,

[0025] Lepr-FI(Leptin receptor-forward inner primer); TTAGAACATGTTTACATTTTGATGGAGGG,

[0026] Lepr-RI(Leptin receptor-reverse inner primer); ATTTGTTTGGATTTGATACCAAACCTTACTG 및

[0027] Lepr-RO(Leptin receptor-reverse outer primer); AAATTTCAACTATACTACCTGAGACGTA로 이루어진 프라이머 셋트; 를 포함하는 마우스 랩틴 수용체 돌연변이 유전자형 판별용 PCR 키트에 관한 것이다. 이 PCR 키트에 분석하고자 하는 유전체 DNA를 가하여 PCR 반응을 진행하면 유전자형 분석을 신속, 정확하고 경제적으로 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석방법을 이용하면 종래의 후대검정이나 미스티 유전자를 이용하는 방법

및 PCR-RFLP로 유전자형을 확인하는 방법에 비하여 짧은 시간 내에 유전자형을 정확히 판별할 수 있으므로 매우 경제적이고 간편하다.

- [0029] 본 발명의 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석방법은 1) C57BL/KsJ-*db/db*를 계통 유지하는데 유용하며, 2) 효율적으로 실험에 사용이 가능한 동형접합체(*db/db*)를 대량 생산에 유용하며, 3) 랩틴 수용체 돌연변이를 포함하는 이중 녹아웃 마우스를 고속 대량생산하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 랩틴 수용체 돌연변이 및 정상 유전자(NCBI, Gene ID: 16847)의 핵산 서열을 나타낸다. ARMS-PCR용 프라이머는 테트라-프라이머 ARMS-PCR을 위한 프라이머 디자인 웹 서비스를 이용하여 디자인하였다. 랩틴 수용체 유전자의 돌연변이는 점 돌연변이 ($G \rightarrow T$)를 나타낸다.

도 2는 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석에 의한 랩틴 수용체 돌연변이의 탐지를 나타낸다. A. ARMS-PCR을 위한 테트라-프라이머의 디자인 및 예상 PCR 산물 결과. 랩틴 수용체 돌연변이 좌위 (268 bp, *Lepr*-FO 및 *Lepr*-RI), 정상 좌위 (199 bp, *Lepr*-FI 및 *Lepr*-RO), 양쪽 좌위 유래 내부 대조군 (407 bp, *Lepr*-FO and *Lepr*-RO). B. 테트라-프라이머 ARMS-PCR에 의한 랩틴 수용체 돌연변이 마우스의 유전자형 분석. C. 테트라-프라이머 ARMS-PCR에 의한 더블 녹아웃 마우스의 유전자형 분석. M: 100 bp 분자량 마커.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 살펴본다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위 내로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

- [0032] C57BL/KsJ-*db/db* 마우스는 한림대 동물실험센터에서 제공받았다. 동물은 특정병원균부재 (SPF) 시설에서 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 빛 08:00 a.m ~ 20:00 p.m. 조건에서 사육하였다. 동물 실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회(IACUC)의 규정에 따라 수행하였다(Hallym 2013-132). 유전체 DNA는 표준 SDS/프로테이네이즈 K 용균 및 페놀/클로로포름 추출법(Oh *et al.*, 2013)으로 마우스 꼬리에서 추출하였다. ARMS-PCR 프라이머 디자인은 테트라-프라이머 ARMS-PCR용 프라이머 디자인 웹 서비스를 이용하였다(Collins and Ke, 2012).

- [0033] PCR 시료는 50ng 유전체 DNA, $6\mu\text{l}$ rTaq plus 5x PCR master mix (1 unit/ $4\mu\text{l}$ 열안정성 DNA 폴리머레이즈, 50mM Tris-HCl, PH 9.0, 16mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.75 mM MgCl_2 , 2% DMSO, 0.1% Tween 20, 0.1 mg/ml BS, 0.05% 브로모페놀 블루, 12% 글리세롤) 및 2.5 p/mol 프라이머로 이루어진다. 표적 DNA는 Cyclogene Dri-Block cycler (Techne Cambridge Ltd., U.K.)에서 증폭시켰고, 94°C 로 5분간 변성시킨 다음 94°C 로 30초, 49.1°C 로 45초 및 72°C 로 45초를 30회 처리하고 최종 연장(elongation)은 72°C 로 10분 처리하였다. PCR 산물은 3% 아가로스 젤에서 전기영동하였다.

- [0034] **결과**

- [0035] 마우스 랩틴 수용체 서열(C57BL/6J)은 NCBI (Gene ID: 16847)에서 검색하였다. C57BL/KsJ-*db/db* 마우스는 랩틴 수용체의 인트론 18에 점 돌연변이($G \rightarrow T$)를 가지고 있다(Chen *et al.*, 1996). 이 돌연변이는 splicing donor site를 만들고, 예외적으로 짧은 돌연변이 전사체를 만든다. 본 발명자들은 테트라-프라이머 ARMS-PCR용 프라이머 디자인 웹 서비스를 이용하여 랩틴 수용체 돌연변이 및 정상 좌위로부터 좌위-특이적 PCR 산물의 증식을 위해 네 개의 프라이머를 디자인하였다(도 1). 네 개의 프라이머는 다음과 같다. *Lepr*-FO(*Lepr*-forward outer primer); AGGGTTAGAGATCTTTCATCTTTAGCT, *Lepr*-FI(*Lepr*-forward inner primer); TTAGAACATGTTTACATTTGATGGAGGG, *Lepr*-RI(*Lepr*-reverse inner primer); ATTTGTTTGGATTGATACAACTTACTG, *Lepr*-RO(*Lepr*-reverse outer primer); AAATTCAACTATACTACCTGAGACGTA. 랩틴 수용체 돌연변이 좌위 (*Lepr*-FI and *Lepr*-RO primers) 및 정상 좌위 (*Lepr*-FO and *Lepr* RI primers)로부터 각각 268bp 및 199bp의 PCR 산물이 증폭되었다. 내부 대조군으로 *Lepr* FO 및 *Lepr*-RO 프라이머를 이용한 경우 랩틴 수용체 돌연변이와 정상 좌위로부터 407bp의 PCR 산물이 증폭되었다(도 2A).

- [0036] 본 발명자들은 세 개의 유전자형 즉, *db/db*, *db/+*, *+/+*에 대하여 테트라-프라이머 ARMS-PCR로 가설을 시험하였

다. 정상 (+/+) 마우스로부터 407bp 및 199bp PCR 산물이 증폭되었고; 반면, 동형접합체 (*db/db*) 마우스에서는 407bp 및 268bp PCR 산물이 증폭되었으며; 이형접합체 (*db/+*) 마우스에서는 497bp, 268bp 및 199bp PCR 산물이 증폭되었다 (도 2B). 테트라-프라이머 ARMS-PCR로 이형접합체를 확인하는 방법은 후대검정으로 다시 확인되었다. 또한 C57BL/KsJ-*db/+* 및 C57BL/6J-ApoE 녹아웃 마우스의 교배에서 얻어진 후대에 대하여 유전자형을 확인함으로써 C57BL/6J 유전자 배경을 가지는 다른 종류의 마우스에서도 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석이 가능함을 밝혔다. 407bp, 268bp 및 199bp의 PCR 산물을 이중 이형접합체(double heterozygote) (*db/+*, *ApoE/-*) 마우스에서 증폭하였다 (도 2C). 이 결과는 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석이 C57BL/6J 유전자 배경을 갖는 마우스에서 효과적임을 말해준다.

[0037] 현재 렙틴 수용체 돌연변이를 확인하는 데에 세 가지 방법이 알려져 있었다. 후대검정으로 유전자형을 확인하는 것은 시간이 많이 소요된다. 미스티 유전자로 간접적으로 유전자형을 확인하는 방법은 출생 직후부터 3주까지의 기간에는 이형접합체와 정상 마우스 간에 구별을 할 수 없다 (Coleman DL and KP Hummel, 1975). PCR-RFLP로 유전자형을 확인하는 방법은 비용이 많이 소요되고, PCR, 제한효소 절단 및 전기영동과 같은 여러 단계의 실험을 필요로 한다 (Horvat S and L Bunger, 1999).

[0038] 본 발명의 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석은 PCR과 아가로즈 젤 전기영동의 두 단계만을 필요로 한다. 따라서, 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석은 C57BL/6J 유전자 배경을 갖는 동물에서 렙틴 수용체 돌연변이를 확인하는 가장 효율적이고 빠른 유전자형 분석법이다.

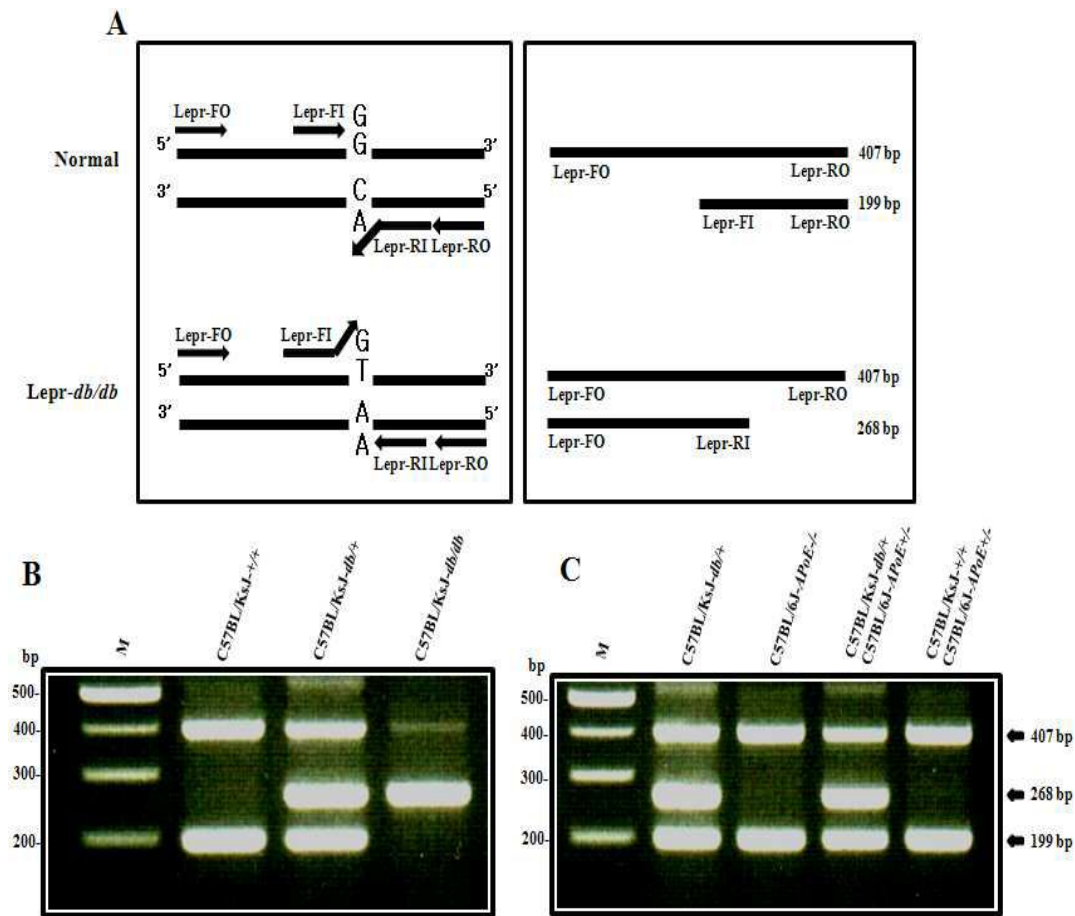
[0039] 종합하면, 테트라-프라이머 ARMS-PCR 분석방법은 1) C57BL/KsJ-*db/db*를 계통 유지하는데 유용하며, 2) 효율적으로 실험에 사용 가능한 동형접합체(*db/db*) 대량 생산에 유용하며, 3) 렙틴 수용체 돌연변이를 포함하는 이중 녹아웃 마우스를 고속 대량생산하는데 유용하다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Genotyping method for the mouse leptin receptor mutation

<130> HallymU-JGSuh-genotyping

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

agggttagag atctttcatc tttagct

<210> 2

<211> 29

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 ttagaacatg ttacatttt gatggaggg 29

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 atttgtttgg atttgatacc aaacttactg 30

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 aaatttcaac tataactacc tgagacgta 29