

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0107969 (43) 공개일자 2019년09월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/67 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)	(71) 출원인 대한민국 (식품의약품안전처장) 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(52) CPC특허분류 C12N 15/8509 (2013.01) A01K 67/0276 (2013.01)	(72) 발명자 박지원 세종특별자치시 달빛로 135, 605동 1003호(상록어 울림아파트 6단지) 장대영 서울특별시 서초구 신반포로 9, 반포아파트 76동 203호 이정웅 대전광역시 유성구 가정로 43, 109동 1604호(삼성 한울아파트)	
(21) 출원번호 10-2018-0029354	(74) 대리인 조정환	
(22) 출원일자 2018년03월13일 심사청구일자 2018년03월13일		

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **한국인 위암 특이적인 돌연변이 유전자 RNF-43의 녹아웃 마우스 개발**

(57) 요약

본 발명은 RNF-43 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도에 관한 것으로, RNF-43유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 종양의 형성이나 기타 조직이나 장기에서 나타나는 표현형을 관찰하여 발암모델의 타당성을 유용하게 확인할 수 있다.

또한, 본 발명의 RNF-43유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 병리학적 및 분자병리학적 분석을 통해 발암에 관여하는 기전을 밝힐 수 있는 효과적인 동물모델로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도4

Target 1: GCAACCCTGCACGCAGGCTT

Target 2: CACGCAGGCTTCGGACACAC

Target 3: AGGCTTCGGACACACAGGAC

Target 4: CGGACACACAGGACGGGTGC

(52) CPC특허분류

C12N 15/67 (2013.01)

C12N 9/104 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/706 (2013.01)

A01K 2267/0331 (2013.01)

C12N 2015/8572 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 15182 한임평 512

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 독성평가연구부 임상연구과

연구사업명 주요사업

연구과제명 한국인 특이적 위암 원인유전자 발굴 및 표적치료제 선별 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 동물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RNF-43 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 4으로 표시되는 염기서열 중 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 동물

청구항 3

제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는 형질전환 동물

청구항 4

RNF-43 유전자 녹아웃(Knock-out) 벡터를 제조하는 단계; 상기 벡터를 수정란에 도입하는 단계; 및 상기 벡터를 도입한 수정란에서 RNF-43 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하여 이루어지는 형질전환된 위암 마우스의 제조방법

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 형질전환된 위암 마우스를 야생형과 교배시켜 동형접합 형질전환체를 제조하는 단계를 더 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환된 위암 마우스의 제조방법

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 벡터는 px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9벡터인 것을 특징으로 하는 형질전환된 위암 마우스의 제조방법

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 벡터를 제조하는 단계는 CRISP/Cas9 유전자 가위를 이용하여 벡터를 제조하는 것을 특징으로 하는 형질전환된 위암 마우스의 제조방법

청구항 8

제 4항 내지 제7항에 있어서, 상기 RNF-43 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 4으로 표시되는 염기서열 중 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 형질전환된 위암 마우스의 제조방법

청구항 9

RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 마우스를 이용하는 것을 특징으로 하는 위암에 대한 정보를 제공하는 방법

청구항 10

RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 마우스를 이용하는 것을 특징으로 하는 위암에 대한 정보를 제공하는 방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RNF-43 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 형질전환 동물모델 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 위암은 세계적으로 암에 의한 사망원인 중 3위이며 발병율은 5위인 암으로, 국가암등록 통계에 따르면 2013년 국내에서 위암은 갑상선암을 제외하면 발생률 1위라고 알려져있다. 지금까지 위암의 발생과 진행 과정은 여러 가지 복잡한 유전적, 환경적 상호작용에 의한 것으로 알려져있다.
- [0004] 위암 환자 34쌍의 위암 조직에서 전사체 분석결과, 한국인 위암환자 특이적 돌연변이인 RNF43이 발견되었다. 34명의 환자 중 7명에서 5종의 돌연변이가 관찰되었으며, 흥미롭게도 모두 틀이동(frameshift) 및 정지돌연변이(nonsense mutation)로서 본래의 유전자의 기능에 심각한 손상을 줄 것으로 추정되어 RNF43은 본래 위암에서 강력한 종양억제유전자로 작용하리라 판단하게 되었다.
- [0005] RNF43 유전자는 세포 막 E3 ubiquitin ligase를 구성 단백질로 종양형성(tumor formation progression)에 중요한 역할을 한다. 또한 RNF43은 Wnt 신호 전달을 억제하여 위장관 세포에서 종양억제 유전자 역할을 하는 것으로 알려져 있다
- [0006] 따라서 한국인 위암의 발암과정에서 매우 중요하고 강력한 기능을 할 것이라고 추정되며 동시에 독창성을 가진 본 RNF43 유전자를 대상으로 녹아웃(knock-out) 마우스를 제작하기로 하였다.
- [0007] 본 출원에서 임의의 참조 문헌의 언급은, 참조 문헌이 본 출원에 대한 관련 선행 기술이라는 것을 허용하는 것은 아니다.
- [0009] 선행기술문헌
- [0010] -특허문헌
- [0011] (특허문헌 1) KR 10-2010-0047592
- [0012] (특허문헌 2) KR 10-2016-0087289

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 동물을 제공 하는 것이다.
- [0015] 또 다른 본 발명의 목적은 RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 동물을 제조하는 방법을 제공 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 RNF-43 유전자를 녹아웃(Knock-out) 시킨 형질전환 동물 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 RNF-43 유전자가 녹아웃된 형질전환 수정란을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 RNF-43 유전자 녹아웃(Knock-out) 벡터를 제조하는 단계; 상기 벡터를 수정란에 도입하는 단계; 및 상기 벡터를 도입한 수정란에서 RNF-43 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 위암 마우스 모델의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에서 제공하는 위암과 관련된 RNF-43유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 종양의 형성이나 기타 조직이나

장기에서 나타나는 표현형을 관찰하여 발암모델의 타당성을 유용하게 확인하는 데에 사용할 수 있다.

[0021] 또한, RNF-43 유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 병리학적 및 분자병리학적 분석을 통해 발암에 관여하는 기전을 밝힐 수 있는 효과적인 동물모델로 유용하게 이용 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 Rnf43 유전자 상의 CRISPR/Cas9 엑손 표적부위를 나타낸다.
- 도 2는 게놈상의 마우스 RNF43 유전자 Exon1 부분 염기서열을 나타낸다.
- 도 3은 px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 벡터 모식도를 나타낸다.
- 도 4는 Exon 1 에서 임의로 4부분을 타깃으로 선정한 염기서열을 나타낸다.
- 도 5는 4종의 CRISPR/Cas9 표적부위를 적용한 테스트 결과를 나타낸다.
- 도 6은 RNF43 녹아웃마우스 F0세대(키메라마우스)의 생어 염기서열 분석을 통한 1차 유전자형분석 결과를 나타낸다.
- 도 7은 RNF43 녹아웃마우스 F0세대의 클로닝 과정을 거친 2차 유전자형분석(genotyping)결과를 나타낸다
- 도 8은 RNF43 녹아웃마우스 F0세대에서 표적벡터의 인공적인 유전체 삽입여부를 확인한 것이다.
- 도 9은 Rnf43 녹아웃마우스 F1세대(이형접합체)의 생어 염기서열분석을 통한 1차 유전자형분석결과를 나타낸다.
- 도 10는 생어 염기서열 분석을 통한 유전형 확인 및 구분법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0024] 본 발명은 RNF-43 유전자가 녹아웃(knock-out)된 형질전환 동물을 제공한다.
- [0025] 상기 RNF-43 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 4로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0026] 또한, 상기 형질전환 동물은 위암 관련 질환을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 상기 제조방법의 형질전환 동물은 마우스인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 제브라피쉬, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물이 이에 해당할 수 있다.
- [0028] 본 발명은, RNF-43 유전자 녹아웃(Knock-out) 벡터를 제조하는 단계; 상기 벡터를 수정란에 도입하는 단계; 및 상기 벡터를 도입한 수정란에서 RNF-43 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 위암 마우스 모델의 제조방법이 제공된다. 상기 단계의 RNF-43 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 4 중에서 선택된 어느 하나 이상인 것으로 구성되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0029] 또한, 상기, RNF-43 유전자 녹아웃(Knock-out) 벡터의 녹아웃 벡터는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 ZFN(zinc-finger nuclease), TALEN(transcription activator-like effector nuclease) 및 CRISPR/Cas9(clustered regulary interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함하는 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 CRISPR/Cas9을 선택하여 사용하였다. 또한, 상기 CRISPR/Cas9을 포함하는 돌연변이 유발 전달체는 RNF-43를 녹아웃시키는 것이 바람직하나, RNF-43 서열 전체뿐만 아니라 서열의 일부만 녹아웃된 경우도 모두 포함한다.
- [0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 임상 보고서를 바탕으로 위암과 관련된 환자들에게서 RNF-43 돌연변이 유전자를 갖는 것을 발견하였으며, 이를 바탕으로 다형성 분석(Polymorphism analysis) 및 발현 조직 분석을 통해 RNF-43 유전자의 변이 및 발현 조직을 확인하였다.
- [0032] 상기 RNF43 유전자는 총 9개의 엑손(exon)을 지니고 있으며 9개 엑손(exon) 중 개시코돈(start codon)을 포함하고 있는 맨앞의 1번 엑손(exon)을 표적으로 정하였다. 1번 엑손으로 선별 한 기준은 단백질 합성의 시작이 1번

엑손부터이기 때문에 1번 엑손 이후로 잘리거나 변형된 단백질이 만들어져 보다 강력한 유전자 결손을 피할 수 있다(도 1).

- [0033] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 마우스 게놈상에 존재하는 RNF43유전자 엑손1 표적부위의 염기서열을 확인하였으며, 상기 염기서열 중 초록색 음영은 유전자형 분석(genotyping)에 사용된 프라이머 부위이며, 밑줄 굵은 글씨는 엑손 1번을 나타낸다. 또한 Cas 단백질이 인지하는 PAM 4종의 염기서열을 빨간색 글씨로 표시해두었다(도 2). CRISPR/CAS9 시스템이 적용된 플라스미드는 px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 벡터를 사용하였다(도 3).
- [0034] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 상기 벡터 (px330)를 제한효소 BbsI 으로 자르고 타깃 타깃 서열번호 1내지 서열번호 4로 이루어진 염기서열을 각각 삽입한 후 클로닝 및 시퀀싱을 통해 타깃 부위가 정확히 들어갔음을 확인하였다(도 4).
- [0035] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 선정된 타깃 염기서열은 Exon 1 에서 임의로 4부분을 타깃으로 선정하여 벡터를 제작하였으며, 벡터 활성도를 확인하기 위해 체세포에 Transfection 후 48시간 뒤 T7E1 assay 를 통해 벡터 활성도를 확인하였다. 그 결과 Targeting Vector 1에서 활성도가 나타남에 따라 Targeting Vector 1번으로 마우스를 제작하였다(도 5).
- [0036] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 1번 표적벡터를 정상 마우스의 난자에 미세주입(microinjection)하고 이렇게 확립된 키메라 배아를 대리모(surrogate mother)의 나팔관에 이식시켜 정상 세포들과 표적유전자가 손상된 세포들이 공존하는 F0세대의 키메라 마우스를 생산하였다.
- [0037] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 위의 마우스 제작 및 생산은 3회에 걸쳐 이루어졌으며, 3회에 걸쳐 총 5계통의 F0세대 키메라 마우스를 확립하였다. 생산한 마우스 계통은 유전체 DNA를 추출하고 PCR과 염기서열분석을 통해 유전자형분석(genotyping)을 실시하였다.
- [0038] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 각 회에 걸쳐 생산된 F0세대 키메라 마우스를 정상(야생형) 마우스와 교배시켜 이형접합형(heterozygous) F1세대 녹아웃 마우스를 생산하였고, 생산한 마우스 계통은 유전체 DNA를 추출하고 PCR과 염기서열분석을 통해 유전자형분석(genotyping)을 실시하였다.
- [0039] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 표현형 발현의 측진을 위해 동형접합형(homozygous) RNF43 녹아웃마우스(F2세대)를 생산하고자 위에서 확보한 이형접합형 F1세대 간의 교배를 진행하였다. 표현형의 발현의 측진을 위해 동형접합형(homozygous) RNF43 녹아웃 마우스(F2 세대)를 생산하고자 위에서 확보한 이형접합형 F1세대 간의 교배를 진행하였다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 위암과 관련된 RNF-43유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 종양의 형성이나 기타 조직이나 장기에서 나타나는 표현형을 관찰하여 발암모델의 타당성을 유용하게 확인할 수 있으며, RNF-43유전자를 사용한 녹아웃 마우스는 병리학적 및 분자병리학적 분석을 통해 발암에 관여하는 기전을 밝힐 수 있는 효과적인 동물모델을 제작하였다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0043] **RNF43 녹아웃 마우스의 표적 염기서열 선정 방법**
- [0044] RNF43 유전자는 총 9개의 엑손(exon)을 지니고 있으며 9개 엑손(exon) 중 개시코돈(start codon)을 포함하고 있는 맨 앞의 1번 엑손(exon)을 표적으로 정하였다. 상기 1번 엑손으로 선별 한 기준은 단백질 합성의 시작이 1번 엑손부터이기 때문에 1번 엑손 이후로 잘리거나 변형된 단백질이 만들어져 보다 강력한 유전자 결손을 피할 수 있다 (도 1).
- [0045] 마우스 게놈상에 존재하는 RNF43 유전자 엑손 1 표적부위의 염기서열을 확인하였고, 초록색 음영은 유전자형 분석(genotyping)에 사용된 프라이머 부위이며, 밑줄 굵은 글씨는 엑손 1번을 나타낸다. 또한 Cas 단백질이 인지하는 PAM 4종의 염기서열을 빨간색 글씨로 표시해두었다(도 2).

실시예 2

[0047] 타겟 벡터 디자인

[0048] CRISPR/CAS9 시스템이 적용된 플라스미드는 px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 벡터를 사용하였고(도 3), 도 3의 벡터(px330)를 제한효소 BbsI으로 자르고 타겟 서열번호 1 내지 서열번호 4(도 4)로 이루어진 염기서열을 각각 삽입한 후 클로닝 및 시퀀싱을 통해 타겟 부위가 정확히 도입되었음을 확인하였다.

[0049] 상기 타겟 염기서열은 엑손 1 에서 임의로 엑손 4 부분을 타겟으로 선정하여 벡터를 제작하였고, 상기 벡터의 활성도를 확인하기 위해 체세포에 Transfection 후 48시간 후에 T7E1 assay를 통해 벡터 활성도를 확인하였다. 그 결과 Targeting Vector 1에서 활성도가 나타남에 따라 Targeting Vector 1번으로부터 형질전환된 마우스를 제작하였다(도 5).

실시예 3

[0051] 활성도 확인된 벡터를 수정란에 이식하는 과정

[0052] 상기 선정된 서열번호 1의 염기서열이 삽입된 표적벡터를 정상 마우스의 난자에 미세주입(microinjection) 한 뒤 상기에서 확립된 키메라 배아를 대리모(surrogate mother)의 나팔관에 이식시켜 정상 세포들과 표적유전자가 손상된 세포들이 공존하는 F0세대의 키메라 마우스를 생산하였다.

실시예 4

[0054] 키메라 마우스 확립 후 유전자형 분석(genotyping)

[0055] 상기 F0세대의 키메라 마우스 제작 및 생산은 3회에 걸쳐 이루어졌으며, 3회에 걸쳐 총 5계통의 F0세대 키메라 마우스를 확립하였다. 상기 생산한 F0세대의 키메라 마우스 계통의 유전체 DNA를 추출하고 PCR과 염기서열분석을 통해 유전자형분석(genotyping)을 실시하였다.

[0056] (표1) F0 세대의 키메라 마우스 확립 후 유전자형 분석(genotyping)

구 분		1차	2차	3차
F0 세대 (키메라)	번호	2016. 6. 5 출생	2016. 6. 28 출생	2016. 7. 15 출생
	#1	♂ (정상/-6bp/-1bp)	♀ (정상/+38/-2bp/-6bp/+18/-14bp)	♂ (정상/+38/-2bp/+18/-13bp)
	#2	♂ (정상/-6bp/-1bp)		♀ (정상/-15bp)

<비고> ♂: 수컷 마우스, ♀: 암컷 마우스, (/): 클로닝과 염기서열분석으로 확인된 *Rnf43*의 유전형

[0058] 구체적으로 PCR과 생어 염기서열 분석(Sanger sequencing)으로 대략적인 삽입과 결손 유무를 확인하였다. 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이 키메라 마우스는 여러 유형의 유전자가 섞여있어 표적부위 주변에 여러 염기서열이 혼합된 분석 패턴으로 존재하게 된다는 것이 확인하였으며, 또한, 정확한 유전자형을 확인하기 위해 2차적으로 클로닝과정을 거쳐 한 유형의 유전자만을 선별하여 염기서열분석으로 확인하였다(도 7).

[0059] 또한, 간혹 F0세대에서 표적벡터가 마우스의 유전체에 삽입되어 원치 않는 인공적인 (artificial) 유전자형 및 표현형이 나타날 수 있으므로 도8에 나타나는 것 과 같이 벡터에 있는 인공적인 염기서열이 마우스의 유전체에 존재하지 않음을 확인하였다.

[0060] 각 회에 걸쳐 생산된 상기 F0세대 키메라 마우스를 정상(야생형) 마우스와 교배시켜 이형접합형(heterozygous) F1세대 녹아웃 마우스를 생산하였고, 상기 생산한 F1세대 녹아웃 마우스 계통은 유전체 DNA를 추출하고 PCR과 염기서열분석을 통해 유전자형분석(genotyping)을 실시하였다(표 2).

[0061] (표2) F1세대 녹아웃 마우스 확립 후 유전자형 분석(genotyping)

구분		1차	2차	3차
F1 세대 (이형 접합체)	번호	2016. 8. 16 출생	2016. 9. 10 출생	2016. 9. 17 출생
	#1	♂ (정상/-6bp)	♂ (정상/-13bp)	♂ (정상/-15bp)
	#2	♀ (정상/-6bp)	♂ (정상/-13bp)	♂ (정상/-1bp)
	#3		♂ (정상/+1bp)	♀ (정상/-15bp)
	#4		♀ (정상/+1bp)	♀ (정상/-1bp)
	#5		♀ (정상/+1bp)	♀ (정상/-15bp)
	#6			♀ (정상/-15bp)

[0062] <비고> ♂: 수컷 마우스, ♀: 암컷 마우스, (/): 클로닝과 염기서열분석으로 확인된 *Rnf43*의 유전형

[0064] 구체적으로 PCR과 생어 염기서열분석(Sanger sequencing)으로 삽입 또는 결손된 대립유전자(allele)가 존재하는지를 확인하였다. 그 결과 도 9에 나타난 바와 같이 이형접합체(heterozygote)에는 두 가지 유형의 유전자가 공존하여 표적부위 주변에 두 유형의 염기서열이 혼합된 분석 패턴이 존재함을 확인하였다.

[0065] 따라서, 정확한 유전자형을 확인하기 위해 2차적으로 클로닝 과정을 거쳐 한 유형의 유전자만을 선별하여 염기서열분석으로 확인하였다.

[0066] 표현형 발현의 축진을 위해 동형접합형(homozygous) RNF43 녹아웃마우스(F2세대)를 생산하고자 상기 확보한 이형접합형 F1세대 간의 교배를 진행하였다.

[0067] 표현형의 발현의 축진을 위해 동형접합형(homozygous) RNF43 녹아웃 마우스(F2 세대)를 생산하고자 위에서 확보한 이형접합형 F1세대 간의 교배를 진행하였다(표 3).

[0068] (표 3) RNF43 녹아웃 마우스 생산 현황(F2세대)

구분		계통 1-1	계통 1-2	계통 2	계통 3
F2 세대 (동형 접합체)	번호	2016. 11. 23 출생	2017. 1. 13 출생	2016. 12. 8 출생	2016. 12. 8 출생
	#1	♂ (+1bp/+1bp)	♀ (+1bp/+1bp)	♀ (-17bp/-17bp)	♀ (-2bp/-2bp)
	#2	♀ (+1bp/+1bp)			
	#3	♀ (+1bp/+1bp)			
	#4	♀ (+1bp/+1bp)			
	#5				
	#6				

[0069] <비고> ♂: 수컷 마우스, ♀: 암컷 마우스, (/): 클로닝과 염기서열분석으로 확인된 *RNF43*의 유전형

실시예 5

[0071] RNF43 녹아웃 마우스 mutant type (-/-) 유전형 확인 하는 방법

[0072] RNF43 녹아웃 마우스 확립 후 각 마우스들의 유전형 확인을 위해 유전자형 분석 (genotyping)이 필요하다. 유전자형 확인에 사용한 시발체(primer) 아래와 같다(표4).

[0073] (표4) RNF43 녹아웃 마우스 확인에 사용되는 시발체(primer)

정 방향 시발체 (forward primer)	5' -TTTGGGATGAGCTGGTAGTAG-3'
역 방향 시발체 (Reverse primer)	5' -ATCTTTCAAGCAGACAGAAGG-3'

[0074]

[0075] 유전형 확인은 간단하게 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 확인할 수 있으며 조건은 아래와 같으며 유전자 사이즈는 361bp로 확인된다.

[0077] (표5) RNF43 녹아웃 마우스 확인에 사용되는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 조건

95°C, 30초	35 cycle	
58°C, 30초		
72°C, 30초		

[0078]

[0079] 생어 염기서열 분석을 통해 각 마우스의 유전형이 녹아웃인지, 정상타입인지 확인할 수 있다(도 10).

도면

도면1

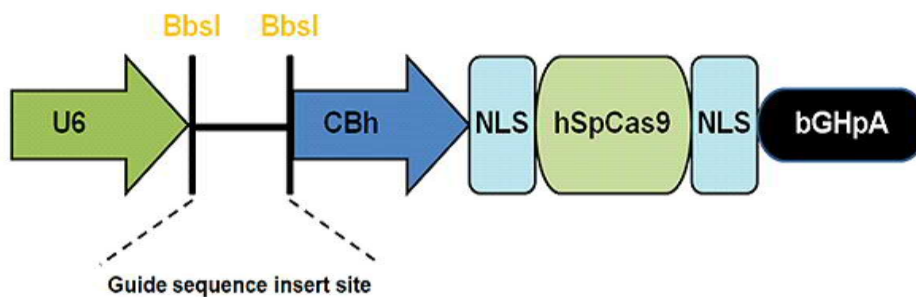


도면2

mRnf43 sequence on Genome

CGATGGGAGAAAAGGACATACCTGCCCCAGAGGTGGGCTGAAAAGGCCATCTTCTGCTCCCAATCA
 GGAAATACCCCTGTGCTTGGGAATCTACGTTAGAAAAAGGAAGGACCAGAACTGACTTGGCTCT
 CTGAAACGGAGGGCTAGCACCTTCTCCCATTCGTTTTCTGCATTGAGGACCTGCCCTTGGGATGAT
 CTGCTAGTAGAAGCGGTATGCATGGCCGAAGAGCATTGATGCAGCTGGTAGCATGAGTGGTGGCCA
 CCAGCTGCAGCTGGCTGTCCTCTGGCCCTGGCTGCTGATGGCAACCCTGCACGCAGGCTTCGGACACA
 CAGGACGGGTGCTGGCGGGCGCAGTGGAGTCCGAAAGATCAGCAGAACAGAAAGCTGTTATCAGAGT
 GATCCCTTGAAGTGGACCCACAGGAAAAGTGAACCTCAGTTTGAAGGCGTGTGCTGGTGT
 GCAGAAAGTGACTCCAGCAGAAAGGAAGCTAATGCAGGCAAGTAGAATGCGGTTCTGTTTATCTTT
 TGTCTGCTTGAAAGAGAGCGGGTCTTCTTTTAGTTTGGCAAAGCAAAAACCCATGCAAGGGCTTCC
 ATTGCTTAGTGTTGCATTTATTCAGTTTTGTGAAGACATTGCTTTATTGGTAGTGAAGGCAT
 ATTCTTATTTTATAT

도면3



도면4

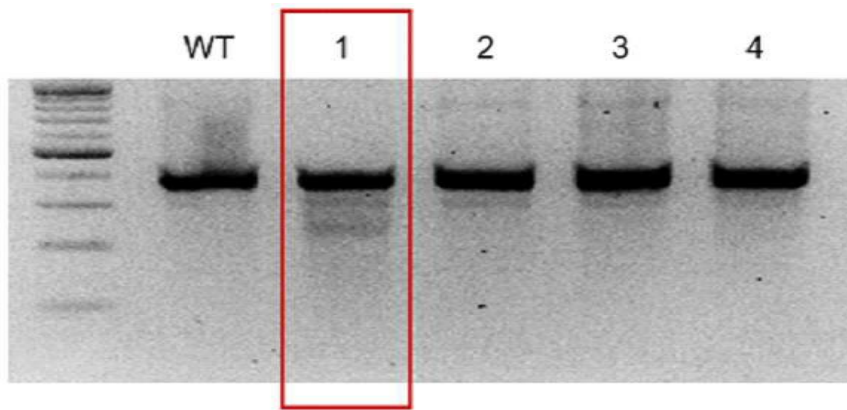
Target 1: GCAACCCTGCACGCAGGCTT

Target 2: CACGCAGGCTTCGGACACAC

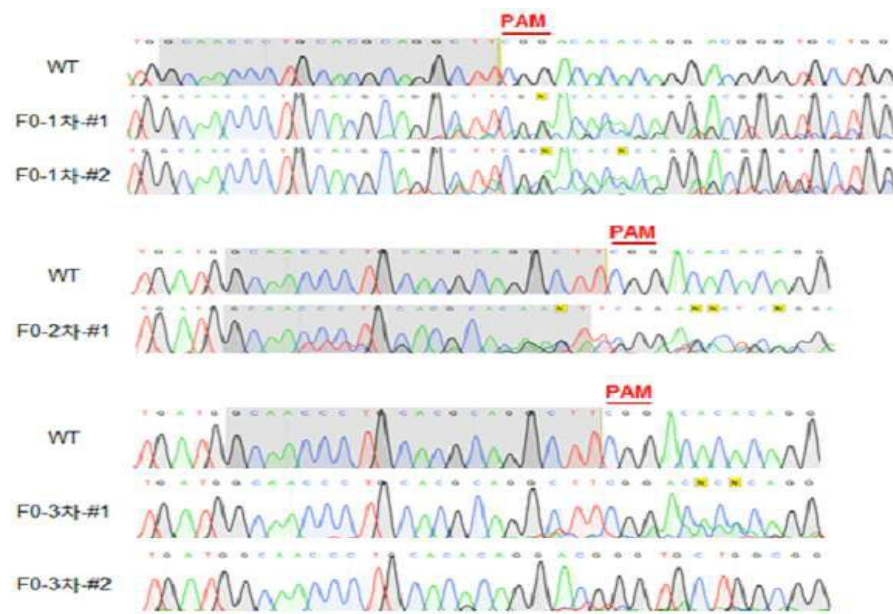
Target 3: AGGCTTCGGACACACAGGAC

Target 4: CGGACACACAGGACGGGTGC

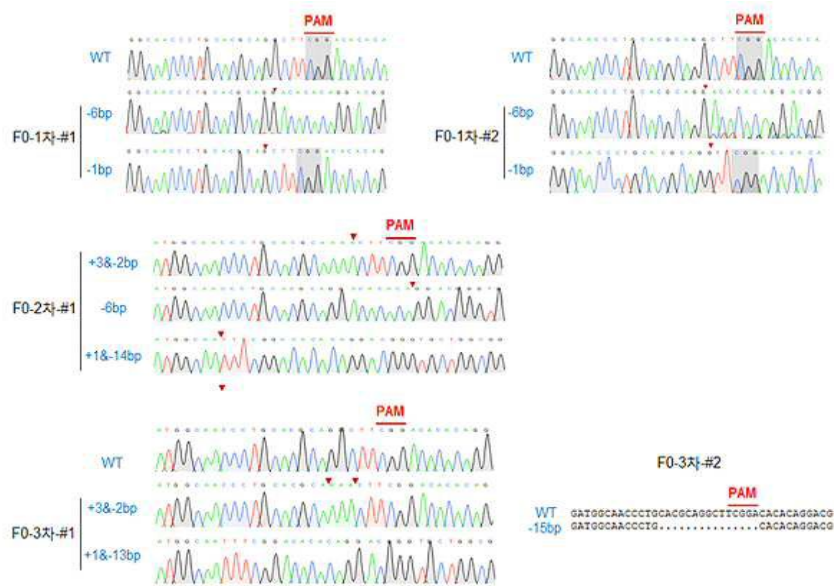
도면5



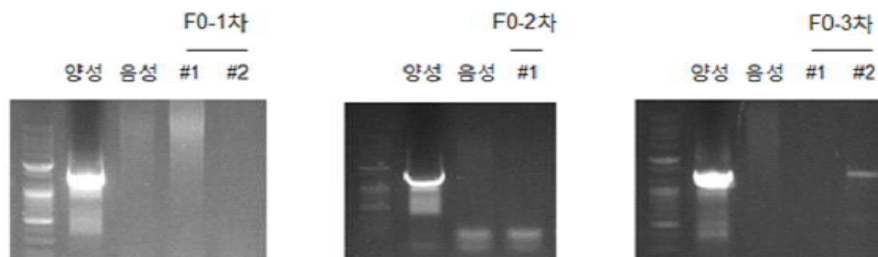
도면6



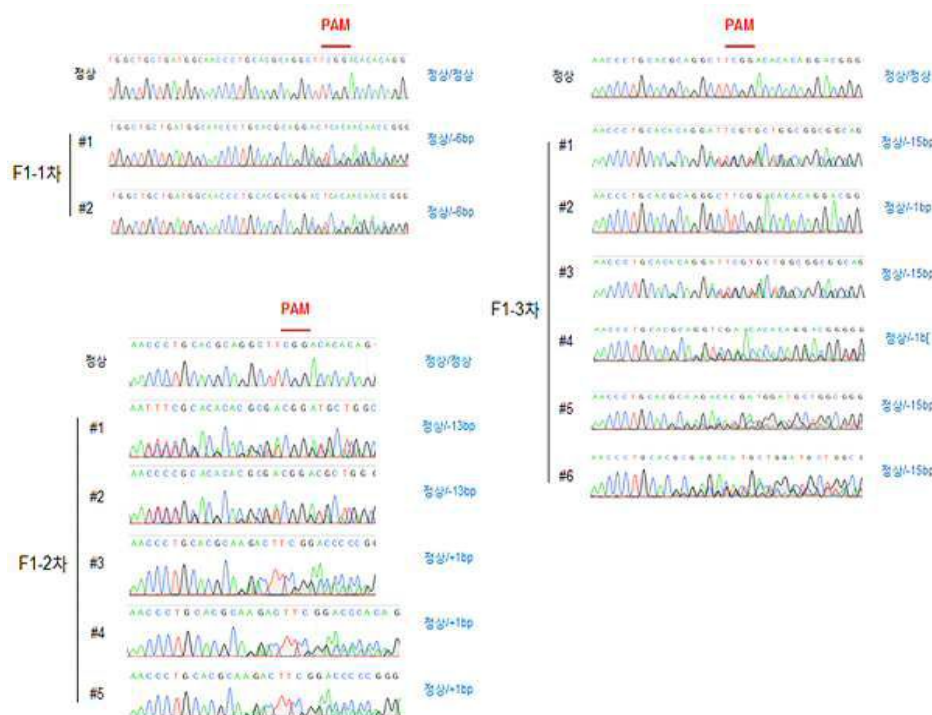
도면7



도면8

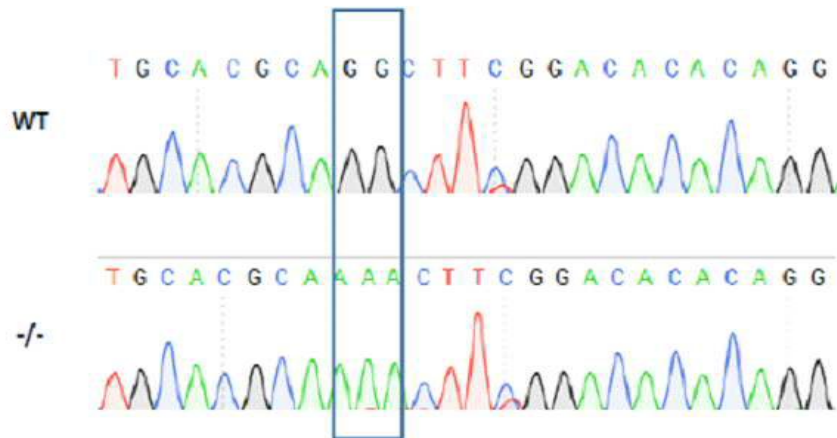


도면9



도면10

cas9-mRNF43 confirm (D.O.B. 17.02.15)



서열 목록

<110> KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION
Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> RNF-43 knock-out transgenic animal model and using thereof

<130> 18-FP-018

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target1

<400> 1

gcaaccctgc acgcaggctt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Target2

<400> 2

cacgcaggct tcggacacac 20

<210> 3

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Target3	
<400>	3	
aggcttcgga cacacaggac		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Target4	
<400>	4	
cggacacaca ggacgggtgc		20