

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2005-519633(P2005-519633A)

【公表日】平成17年7月7日(2005.7.7)

【年通号数】公開・登録公報2005-026

【出願番号】特願2003-586344(P2003-586344)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

A 0 1 K 67/02

A 0 1 K 67/027

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 0 1 K 67/02

A 0 1 K 67/027

【手続補正書】

【提出日】平成16年10月7日(2004.10.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 豚から採取して培養した細胞株を核供与細胞として準備する段階と、

(b) pEGFP-N1と脂質成分又は非脂質カチオンポリマー媒介体を混合して脂質(又はカチオンポリマー)-DNA構造複合体を形成させた後、前記脂質(又はカチオンポリマー)-DNA構造複合体を前記核供与細胞培養液に添加した後培養し、前記GFP遺伝子を前記核供与細胞に導入して発現させる段階と、

(c) 前記GFP遺伝子が導入された核供与細胞を脱核された豚受核卵に移植して、形質転換された核移植卵を生産し、活性化させる段階と、

(d) 前記核移植卵を代理母に移植して産子を生産する段階とを含む、GFP遺伝子が導入された豚を生産する方法。

【請求項2】

(b) 段階の脂質成分がヒュジン6(FuGENE6)又はリポフェクトアミンプラス(LipofectAmine Plus)であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

(b) 段階の非脂質カチオンポリマー成分がエクスジェン500(ExGen500)であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】

請求項1の(a)~(c)段階の方法で製造された豚の核移植卵SNU-P1(豚NT胚芽)(SNU-P1[Porcine NT embryo])、KCTC 10145BP。

【請求項5】

請求項1の(d)段階の方法を行い、請求項4のSNU-P1(豚NT胚芽)(SNU-P1[Porcine NT embryo])から生産されたGFP遺伝子を発現する複製豚。

【請求項6】

(a) 豚から採取して培養した細胞株を核供与細胞として準備する段階と、

(b) 豚ゲノムBACライブラリからGT遺伝子クローンを分離した後、前記GT遺伝

子クローンを用いて、G T 遺伝子の蛋白質発現部位の一部分で相同組換えによってG T 蛋白質発現部位を標識遺伝子で代置して正常的なG T 蛋白質が発現されないようにする遺伝子ターゲティング用ベクターを作製する段階と、

(c) 前記の遺伝子ターゲティングベクターを脂質又は非脂質成分と混合して複合体を形成させた後、前記複合体を前記核供与細胞培養液に添加して前記組換えG T 遺伝子を核供与細胞内に導入してターゲティングさせる段階と、

(d) 前記組換えG T 遺伝子が導入された核供与細胞を脱核された豚受核卵に移植して、形質転換された核移植卵を生産し、活性化させる段階と、

(e) 前記核移植卵を代理母に移植して産子を生産する段階とを含むことを特徴とするG T 遺伝子が除去された豚を生産する方法。

【請求項7】

(a) 段階の細胞が豚の胎児から分離した繊維芽細胞であることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】

前記(b)段階で遺伝子ターゲティングベクターは外因性プロモータを持たないようにプロモータトラップ方法で製造されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項9】

(b) 段階の前記遺伝子ターゲティング用ベクターが、G T 遺伝子のうちイントロン8の一部分、エクソン9(蛋白質発現部位)及びイントロン9の一部配列を含む相同切片を含み、前記G T 遺伝子の蛋白質発現部位のうちD r a I I I 制限酵素及びA v a I 制限酵素で切断された断片のアミノ酸配列に該当する遺伝子の塩基配列がピューロマイシン抵抗遺伝子発現部位-S V 4 0 ポリ(A)配列で代置されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項10】

(c) 段階の脂質媒介体がヒュジン6(F u G E N E 6)であることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項11】

請求項6の(a)~(d)段階の方法で製造された豚の核移植卵S N U - P 2(豚N T 胚芽)(SNU-P2[Porcine NT embryo])、K C T C 1 0 1 4 6 B P。

【請求項12】

請求項6の(e)段階の方法を行い、請求項11のS N U - P 2(豚N T 胚芽)(SNU-P2[Porcine NT embryo])から生産されたG T 遺伝子が除去された複製豚。

【請求項13】

G T 遺伝子のうちイントロン8の一部分、エクソン9(蛋白質発現部位)及びイントロン9の一部配列を含む相同切片を含み、前記G T 遺伝子の蛋白質発現部位のうちD r a I I I 制限酵素及びA v a I 制限酵素で切断された断片のアミノ酸配列に該当する遺伝子の塩基配列がピューロマイシン抵抗遺伝子発現部位-S V 4 0 ポリ(A)配列で代置されたベクター。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 9】

〔第3段階：G T 遺伝子が除去されたベクター製作及び核供与細胞への導入〕

前記で分離されたG T 遺伝子クローンを用いて遺伝子ターゲティング用ベクターを作製する。すなわち、G T 遺伝子の蛋白質発現部位の一部分を代置した標識遺伝子が相同組換え(homologous recombination)によってG T 蛋白質発現部位を代置して正常的なG T 蛋白質が発現されないようにターゲティングベクターを作製する。ターゲティングされた細胞の選別効率を高めるために、ターゲティングベクターは外因性プロモータ(exogenous pro

moter)を持たないように、すなわちプロモータートラップ(promoter trap)方法を用いる。ターゲティングベクターは、GT遺伝子のうちイントロン(intron)8の一部分、蛋白質発現部位(エクソン9[Exon9])、及びイントロン9の一部配列を含む相同切片と、GT遺伝子の蛋白質発現のうちAvaIとDraIII制限酵素で切断された断片のアミノ酸配列に該当する遺伝子の塩基配列を代置するピューロマイシン抵抗遺伝子発現部位-SV40ポリ(A)配列を含む。このようなターゲティングベクターは、相同切片では相同組換えが起こってピューロマイシン抵抗遺伝子発現部位-SV40ポリ(A)配列部位が正常的なエクソンに挿入されてGT遺伝子を破壊する(図9)。前記ターゲティングベクターを核供与細胞としてGF P形質転換動物生産方法で言及されたヒュジン6を用いて導入する。ターゲティングベクターが導入された体細胞は、適切な抗生剤を含んだ培地で1~2週日間培養して選別した後、ターゲティングしたか否かをサザンブロット又は重合酵素連鎖反応などの通常の方法で確認する。