



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0100651
(43) 공개일자 2015년09월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
A01K 67/0276 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7014564
- (22) 출원일자(국제) 2013년10월30일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/067502
- (87) 국제공개번호 WO 2014/070887
국제공개일자 2014년05월08일
- (30) 우선권주장
61/720,187 2012년10월30일 미국(US)
61/870,510 2013년08월27일 미국(US)
- (71) 출원인
리컴비네티스 인코포레이티드
미국, 미네소타 55114, 세인트 폴, 스위트301, 유니버시티 애비뉴 웨스트 1246
더 센터 포 아쿠아컬처 테크놀로지스, 아이엔씨.
미국, 캘리포니아 92121, 샌디에고, 스위트 이, 카미노 산타 폐 8395
- (72) 발명자
칼슨, 다니엘 에프.
미국, 미네소타 55125, 우드버리, 주네아우 알코브 9127
파렌크루그, 스캇, 씨.
미국, 미네소타 55418, 미니애폴리스, 헤이즈 스트리트 노스이스트 2751
로우쓰, 사비에르
미국, 캘리포니아 92122, 샌디에고, 레드 디어 스트리트 6672
- (74) 대리인
김순웅

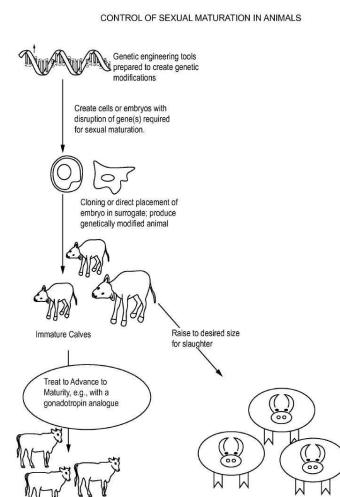
전체 청구항 수 : 총 41 항

(54) 발명의 명칭 동물의 성적 성숙 조절

(57) 요 약

본 발명은 성적 성숙(sexual maturation) 선택적 신경내분비(neuroendocrine) 유전자의 불활성화를 포함하는 계획을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물이고, 상기 유전자의 불활성화는 동물이 성적으로 성숙되는 것을 방지한다. 상기 동물의 이용 방법, 및 생산 방법을 제공한다. 번식과 출산의 최적화 관점에서 기존 가축 사육 방식들은 가축의 성적 성숙 역할에 초점이 맞춰져 있다.

대 표 도 - 도1



- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
- A01K 2207/05 (2013.01)*
A01K 2217/00 (2013.01)
A01K 2227/101 (2013.01)
A01K 2227/108 (2013.01)
A01K 2267/02 (2013.01)
-

특허청구의 범위

청구항 1

성적 성숙(sexual maturation) 선택적 신경내분비(neuroendocrine) 유전자를 불활성화시키는 제제를 가축 세포 및 가축 배아로 구성된 군으로부터 선택된 유기체에 도입하는 단계를 포함하는, 가축 동물 제조 공정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*으로 구성된 군으로부터 선택된 유전자인 것인, 공정.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제제는 상기 세포의 염색체 타겟 위치에 특이적으로 결합하고 이중-가닥 DNA 절단(break)을 유발하여 상기 성적 성숙 선택적 신경 내분비 유전자를 불활성화시키는 것인, 공정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 TALEN, 징크 평거 뉴클레아제(Zinc finger nuclease), Cas9/CRISPR 및 재조합효소(recombinase) 융합 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 공정.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 TALEN을 포함하고, 상기 공정은 상기 TALEN과 함께 재조합효소를 상기 유기체에 공동-도입하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 공정.

청구항 6

제1항 내지 제4항에 있어서, 상기 제제를 발현하는 형질전환 유전자(transgene)는 유기체의 게놈(genome)에 위치하는 것인, 공정.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 재조합효소 융합 단백질이며, 상기 공정은 타겟팅 핵산 서열을 상기 융합 단백질과 함께 도입하는 단계를 포함하고, 상기 타겟팅 핵산 서열은 재조합 효소와 함께 필라멘트를 형성하여 염색체 부위에 특이적으로 결합하는 것인, 공정.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열을 갖는 핵산 주형을 상기 유기체에 도입하는 단계를 추가적으로 포함하고, 상기 유기체의 상기 게놈은 상기 이중-가닥 절단 부위에서 상기 서열을 받는(receiving) 것인, 공정.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기체로부터 동물을 클로닝하는 단계를 추가적으로 포함하는 것인, 공정.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동물은 소, 돼지, 양, 닭, 염소, 토끼 및 어류로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 공정.

청구항 11

제1항 내지 제10항에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 유도가능한 시스템의 조절하에 있는 것인, 공정.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 공정에 의해 제작된 유전적으로 변형된 가축 동물.

청구항 13

동물이 성적으로 성숙되는 것을 막는 유전자 불활성화로서, 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화를 포함하는 게놈을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 성적 성숙 유전자 및/또는 그들의 cis-조절 인자(cis-regulatory element)를 암호화하는 서열 내 하나 또는 그 이상 염기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 것인, 가축 동물.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 유전자는 전사-작용인자(trans-acting factor)에 의해서 불활성화되고, 전사-작용인자는 간접 RNA 및 우성 음성인자(dominant negative factor)로 구성된 군에서 선택되며, 상기 전사-작용인자는 외인성 유전자 또는 내인성 유전자에 의해서 발현되는 것인, 가축 동물.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 유도가능한 시스템의 조절하에 있는 것인, 가축 동물.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동물은 소, 돼지, 양, 닭, 염소 및 어류로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 가축 동물.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성적 성숙 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으

로부터 선택되는 것인, 가축 동물.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동물은 외인성 재조합 단백질을 추가적으로 발현하는 것인, 가축 동물.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 처리없이는 유전적으로 성숙할 수 없는 가축 동물.

청구항 21

세포, 배아, 배반포, 체세포, 일차 세포 및 원시 생식 세포로 구성된 군으로부터 선택된 유기체의 신경내분비 유전자의 녹아웃을 제조하는 단계를 포함하는, 제13항 내지 제20항 중 어느 한 항의 가축 동물의 제조 공정.

청구항 22

성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화에 대한 이형 접합체 계놈을 포함하고, 이것에 의해 상기 불활성화된 유전자에 대한 자손 동형접합이 성적으로 성숙되는 것을 막는, 유전적으로 변형된 가축 동물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 신경내분비 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 동물.

청구항 24

동물의 유전적 성적 성숙 불능을 보상하기 위한 제제로서, 동물의 성적 성숙을 위한 제제를 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 가축 동물 사육 공정.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 제제는 성선자극호르몬(gonadotropin) 또는 성선자극호르몬 유사체를 포함하는 것인, 공정.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 유전적 성숙 불능 동물은 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 유전적 불활성화의 결과인 것인, 공정.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 불활성화된 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 공정.

청구항 28

성적 성숙 유전자의 불활성화를 포함하는 계놈을 포함하는 세포 또는 동물 배반포로 구성된 군으로부터 선택된 생체 외(*in vitro*) 유기체.

청구항 29

제28항에 있어서, 소, 돼지, 양, 닭, 염소, 토끼 및 어류로 구성된 군으로부터 선택된 세포 또는 배아인 것인, 유기체.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 체세포, 일차 세포 또는 원시 생식 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 세포인 것인, 유기체.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화를 위하여 이형 접합체인 계놈을 갖는 것인, 유기체.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경내분비 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 유기체.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 불활성화는 성적 성숙 유전자 및/또는 그들의 *cis*-조절 인자(*cis*-regulatory element)를 암호화하는 서열 내 하나 또는 그 이상 염기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 것인, 유기체.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자는 전사-작용인자에 의해 불활성화 되고, 상기 전사-작용인자는 간접 RNA 및 우성 음성인자(dominant negative factor)로 구성된 군으로부터 선택되며, 상기 전사-작용인자는 외인성 유전자 또는 내인성 유전자에 의해서 발현되는 것인, 유기체.

청구항 35

성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자를 불활성화 시키기 위하여 세포의 염색체 타겟 위치에 특이적으로 결합하는 제제를 가축 세포 및 가축 배아로 구성된 군으로부터 선택된 유기체에 도입하는 단계를 포함하는 생체 외(*in vitro*) 유기체의 제조 공정.

청구항 36

제35항에 있어서, TALEN, 징크 핑거 뉴클레아제, Cas9/CRISPR 및 재조합효소 융합 단백질로 구성된 군으로부터

선택된 제제; 및 선택적으로 재조합 효소를 유기체에 공동-도입하는 단계를 포함하는 것인, 공정.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 제제를 발현하는 형질전환유전자(transgene)는 유기체의 게놈에 위치하는 것인, 공정.

청구항 38

제1항에 있어서, 상기 제제는 상기 재조합효소 융합 단백질이며, 상기 공정은 타겟팅 핵산 서열을 상기 융합 단백질과 함께 도입하는 단계를 포함하고, 상기 타겟팅 핵산 서열은 재조합 효소와 함께 필라멘트를 형성하여 염색체 부위에 특이적으로 결합하는 것인, 공정.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 서열을 갖는 핵산 주형을 상기 유기체에 도입하는 단계를 추가적으로 포함하고, 상기 유기체의 상기 게놈은 상기 이중-가닥 절단 부위에서 상기 서열을 받는(receiving) 것인, 공정.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성적 성숙 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 공정.

청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 불활성화는 유도가능한 시스템의 조절 하에 있는 것인, 공정.

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 상호 참조

[0001] 본 특허는 2012년 10월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 제 61/720,187 호 및 2013년 8월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 제 61/870,510 호의 우선권을 청구하고, 본 명세서의 참고문헌으로 인용된다.

연방 정부 지원 연구에 대한 보고서

[0004] 본 명세서에 기재된 실시예의 양태들은 미국립보건원(National Institutes of Health)으로부터 수여된 제 1R43RR033149-01 AI 및 USDA- 농무부(National Institute of Food and Agriculture)로부터 수여된 생명공학 위험 평가 프로그램 경쟁력(Biotechnology Risk Assessment Program competitive) 제 2012-33522-19766에 의해 지원받았다. 미국 정부는 본 발명의 일정한 권리를 가질 수 있다.

기술분야

[0006] 기술 분야는 가축을 포함한 동물을 생산 및 사육하는 방법에 관한 것으로, 상기 가축은 유전적으로 변형되어 성숙하도록 처리를 하지 않는 한 성적 미성숙 상태를 유지한다.

배경기술

[0007] 번식과 출산의 최적화 관점에서 기존 가축 사육 방식들은 가축의 성적 성숙 역할에 초점이 맞춰져 있다. 예를 들어, 젖소 무리에서 성적 성숙 기간 중 암 송아지의 관리는 일생동안의 생산성에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있어, 신중하게 계획해야 한다. 성적 발달을 위한 최적의 방법은 그들의 첫 해에 조기 교배 및 번식하는 암 송아지가 일생동안 더 나은 생산성 갖을뿐만 아니라 초기 번식까지의 전체 생산 비용이 감소되는 것을 사회적 통념으로 하는 많은 연구의 대상이 되어왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 명세서에 과정들이 제공되며, 기존의 관행과 달리, 가축 성적 성숙은 무한정, 영구적으로, 또는 성적 성숙하도록 처리할 때까지 지연된다. 생, 클론, 선조(founder) 동물을 포함하는 본 명세서에서 기재된 이러한 처리들의 결과로 어류 및 돼지에 이러한 과정들로 처리된다. 고-효율성과 정확한 유전자-교정이 특정 상업적으로 중요한 유전자좌(loci)에서 달성되었다. 효율성이 충분히 높아서 이러한 변화들은 연결된 선택 마커없이 이루어질 수 있다.

[0009] 본 발명의 구현예는 성적 성숙(sexual maturation) 선택적 신경내분비(neuroendocrine) 유전자의 불활성화를 포함하는 계놈을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물이고, 상기 유전자의 불활성화는 동물이 성적으로 성숙되는 것을 방지한다.

[0010] 본 발명의 구현예는 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화에 대한 이형접합체인 계놈을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물이고, 이것에 의해 상기 불활성화된 유전자에 대한 자손 동형접합이 성적으로 성숙되는 것을 방지한다.

[0011] 본 발명의 구현예는 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자를 불활성화 시키기 위하여 세포의 염색체 타겟 위치에 특이적으로 결합하는 제제를 가축 세포 및 가축 배아로 구성된 군으로부터 선택된 유기체에 도입하는 단계를 포함하는 가축 동물 제조 공정이고, 상기 제제는 TALEN, 징크 평기 뉴클레아제, 및 재조합효소 융합 단백질로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0012] 본 발명의 구현예는 가축 동물의 성적 성숙을 위한 제제를 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 가축 동물 사육 공정이고, 상기 제제는 상기 동물의 유전적 성적 성숙 불능을 보상한다.

[0013] 하기의 특히 출원은 모든 목적을 위하여 본 명세서에 참조로 포함될 수 있으며; 논쟁의 경우, 명세서는 조절된다: US2010/0146655, US2010/0105140, US2011/0059160, US2011/0197290, 및 US2013/0117870.

과제의 해결 수단

[0014] 환경 및 에너지 자원을 보존하는 방식으로 가축을 생산하는 것이 바람직하다. 성적으로 미성숙한 동물은 일반적으로 성숙 또는 성숙중인 동물에 비하여 체중의 파운드 당 더 적은 음식을 소비한다. 가축은, 일반적으로, 성숙 전 바람직한 크기에 도달하지 않는다. 그러나, 본원에 개시된, 동물은 성숙 전 바람직한 크기까지 성장할 수 있다.

[0015] 사실상, 본원에 기재된 방법으로 동물은 성적으로 전혀 성숙하지 않는다. 이는 사춘기(pubescence)를 지나지 않고 성숙의 정상적인 나이를 넘어 성장할 수 있다. 성적으로 미성숙한 동물은 생식력이 없다(sterile). 유성 생식은 비용 효율이 높으며, 보조 생식 기술(assisted reproductive techniques, ARTs) 또한 난자와 정자를 제공하기 위해 성숙한 동물이 필요하기 때문에, 따라서 불임 동물의 효율적인 생산은 중요한 도전이다. 일부 구현예에서, 가축 동물은 사춘기(puberty)를 지나지 않으며 성적으로 성숙하도록 특별히 처리되지 않는 한 영구적으로 성적으로 미성숙을 유지한다. 이러한 동물은, 성숙 유도 처리 후에, 사육될 수 있다.

[0016] 성숙할 수 없는 가축 제조의 이점은 이들이 번식할 수 없다는 점이다. 예를 들어, 교배되거나 유전적으로 변형

된 어류의 경우, 이들의 야생으로의 방출 사고에 대한 우려는 배제된다. 유사하게 변형된 기타 동물 또한 변식 할 수 없을 것이므로 가치 있는 유전적 특성을 가진 동물은 구매자에 의한 통제되지 않는 변식의 우려 없이 판매될 수 있다. 또한, 많은 농장 동물(예를 들어, 소, 가금류, 및 어류)에 있어 불임법(sterilization)은 고기의 품질, 지질 함량, 색소 침착 및 질감의 개선뿐만 아니라 생산성을 증가시킬 것이다. 용어 소(cow)는 소(cattle)에 대한 구어체 용어로; 소(cattle)는 큰 유제동물(ungulates), Bos 속(genus)의 가장 광범위한 종이다. 소(cow) 또는 소(cattle)는 유럽 원우(Bos primigenius)의 일종을 말한다. 그리고, 어류의 경우, 불임 생식선 발달 및 성 분화보다는 성장을 위하여 에너지를 보존함으로써 배양시 더 우수한 성능을 입증하여야 한다. 현재, 배수성 조작(ploidy manipulation)(특히, 하나의 여분의 염색체(chromosomes) 세트를 추가한 삼배성(triploidy))을 통한 불임법은 유일하게 수경재배 생산이 가능한 상업적으로 확장 가능한 기술이다. 그러나, 일관되지 않은 결과는 기술의 효과에 대한 우려를 제기했다. 또한, 삼배체(triploid) 유도는, 일반적으로, 종종 처리 집단의 생존 및/또는 성능에 부정적인 영향을 미친다. 그리고 기술의 응용은 노동 집약적이고, 병참학적으로 복잡하며 비용이 많이 듈다.

[0017] 본 발명의 구현에는 동물이 성적으로 성숙해지는 것을 방지하는 유전자의 불활성화 및 성적 성숙을 위해 선택적인, 신경내분비 유전자의 불활성화를 포함한 계획을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물이다. 유전자는 선택적으로 성적 성숙 과정으로 유도되며, 녹아웃(knocked-out) 동물이라면, 이 동물은 야생형 동물이 성적 성숙을 겪는 시기까지 크기 및 체중에 의해 측정된 이의 성장에 있어서 야생형 동물과 비교될 수 있다. 용어 유전자(gene)는 조절 영역(regulatory regions), 전사 영역(transcribed regions) 및/또는 기타 기능적 서열 영역과 연관된 유전 단위에 해당하는, 유전자 서열이 위치할 수 있는 영역을 의미한다. 용어 유전자(gene)는, 본원에 사용된 바와 같이, 단백질 또는 기타 인자를 인코딩하는 부분뿐만 아니라 기능적 서열 영역을 포함한다. 용어 녹아웃(knocked-out)은, 본원에 사용된 바와 같이, 결과로 얻어진 단백질 내 기능을 불활성화시키거나 또는 단백질 생성물의 생성을 제거하는 유전자의 직접 또는 간접적 분열을 말한다.

[0018] 유전자 조작은 성적 성숙을 방지하기 위하여 특정 유전자 또는 유전자 생성물에 대하여 이루어지므로, 성숙에 요구되는 인자는 공지되어 있으며 일반적으로 제공될 수 있다.

성적 성숙을 위한 선택적 신경내분비 유전자

[0020] 동물의 성적 발달은 성적 성숙을 위한 선택적 신경내분비 유전자를 차단함으로써 방지될 수 있다. 성적 발달, 가속 성장, 및 부신의(adrenal) 성숙은 성선자극호르몬-방출호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH1)이 시상하부(hypothalamus)에서 분비되기 시작할 때 개시된다. 유전자 GnRH1은 GnRH1 1 전구체를 인코딩한다. 포유류에서, 선형 데카펩타이드(decapeptide) 최종 생성물은 일반적으로 92-아미노산 프리프로호르몬(92-amino acid preprohormone)으로부터 합성된다. 또한 황체형성호르몬-방출호르몬(Luteinizing-hormone-releasing hormone, LHRH) 및 룰리베린(luliberin)으로서 알려진 성선자극호르몬-방출호르몬(GnRH1)은, 여포자극호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH) 및 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH)의 방출의 원인이 된다. GnRH1은 성선자극호르몬-방출호르몬류에 속한다. 본 발명의 구현에는 가축 동물 내 GnRH1의 불활성화를 포함한다. 성선자극호르몬-방출호르몬 또는 유사체는 성적 성숙을 유도하기 위해 동물에 투여될 수 있다. 여러 종에 대한 GnRH1의 서열, 예를 들어, 소(Bos Taurus)에 있어 768325, 닭(Gallus gallus)에 있어 770134, 또는 맷돼지(sus scrofa)에 있어 397516 IDs 유전자는 잘 알려져 있다. 또한 키스펩틴(Kisspeptin) 수용체(또한 GpR54, KissR, Kiss1R, kissR 등이라 함)로서 알려진 GPR54는, 호르몬 키스펩틴(이전에 메타스틴(metastatin)으로 알려진)에 결합한다. 키스펩틴은 Kiss1 유전자(또한 Kiss, Kiss1, KiSS, Kiss1 등이라 함)로부터 유래된 생성물이다. 키스펩틴-GPR54 신호는 GnRH1의 분비를 개시하는 역할을 가진다. 키스펩틴은 다양한 전신 생리 시스템(whole body physiological systems)을 포함하며 생식 축(reproductive axis)-뇌, 뇌하수체, 생식선(BPG), 및 부속 기관의 모든 수치에서 작용하는, 여러 기능을 가진 RFamide 신경펩타이드(neuropeptide)이다. 키스펩틴은 직접적으로 GnRH 방출을 자극할 수 있으므로(Messenger 등, 2005), 스테로이드 호르몬의 부정 및 긍정적인 피드백 신호를 GnRH 신경 세포(neurons)에 전달하고, 사춘기의 개시에 대한 게이트키퍼(gatekeeper)로서 역할을 하며, 및 중계(relaying) 광주기성(photoperiodic) 정보를 전달한다.

[0021] 본 발명의 구현에는 가축 동물에 있어서 유전자 GPR54 및/또는 Kiss1의 불활성화를 포함한다. 키스펩틴은 Kiss1의 손실을 보충하기 위하여 투여될 수 있으며 이로써 성적 성숙될 수 있다. 또는, Kiss1 및/또는 GPR54가 억제되고 성선자극호르몬-방출호르몬이 동물을 성적 성숙시키기 위하여 투여될 수 있다. 또 다른 구현에는 가축 동물의 계획에 우성 음성 GPR54 삽입에 의한 키스펩틴-GPR54 상호작용의 불활성화이다. 우성 음성 GPR54의 발현은

성적 성숙의 개시를 방지한다. 우성 음성 GPR54의 발현은 수용체의 신호 전달 다운스트림을 방해함으로써 신호 전파(propagation) 및 GnRH1 방출을 방지한다. 여러 종에 대한 GPR54의 서열, 예를 들어, 호모사피엔스(Homo sapiens)에 있어 84634, 제브라 피쉬(Danio rerio)에 있어 561898, 또는 멧돼지(Sus scrofa)에 있어 733704는 잘 알려져 있다. 여러 종에 대한 KiSS1의 서열, 예를 들어, 소(Bos Taurus)에 있어 615613, 멧돼지(sus scrofa)에 있어 733704, 또는 양(Ovis aries)에 있어 100294562는 잘 알려져 있다.

[0022]

Gpr54/Kiss 경로는 대부분의 척추동물 내에서 매우 보호되며 인간 및 마우스에서 사춘기로 가는 게이트키퍼로 알려져 있다(Seminara 등, 2003). 인간 및 마우스에서 Gpr54 및/또는 Kiss 유전자의 불활성화로 인한 불임은 이 소성(ectopic) GnRH 투여에 의해 회복될 수 있다. 마우스 및 인간에 대한 연구는 불활성 Gpr54가 저고나도트로 편성 성기능저하증(hypogonadotropic hypogonadism)에 의한 남녀 모두의 불임을 효과적으로 유도함을 입증한다 (d'Anglemont de Tassigny 등, 2007; de Roux 등, 2003). Kiss-Gpr54 시스템은 오직 하나의 Kiss 및 Gpr54 유전자가 존재하는 척추동물, 특히 포유류에서 매우 보호된다(Tena-Sempere 등, 2012). 여러 별개의 Kiss 유전자가 어류 내에서 확인되는 반면, 수용체 Gpr54는 실험된 하나의 종을 제외하고 모두에서 하나의 유전자에 의해 인코딩된다. Gpr54 돌연변이를 가진 인간 및 마우스는 시상하부의 GnRH가 정상적인 수치를 나타내며 이는 GnRH가 혈류로 방출되도록 한다는 것을 시사한다(Seminara 등, 2003). 이는 Gpr54-결핍 대상에 직접적으로 GnRH 또는 성선자극호르몬을 주사함으로써 Kiss/Gpr54 신호를 우회할 수 있는 기회를 제공한다. 실제로, Gpr54-결핍 인간들은 GnRH 주사에 반응하며(Seminara et al, 2003) 사춘기의 다운스트림 신호 성분이 그대로 남아있음을 나타낸다.

[0023]

현재 생식 생물학 출판물에서 어류의 키스펩틴 역할의 직접적인 증거는 없다. 그러나, kiss 웨ب사이트의 투여는 성적으로 성숙한 암컷 제브라피시(zebrafish)(Kitahashi 등 2008) 및 오렌지 그루퍼(orange grouper)의 뇌하수체 내 성선자극호르몬 유전자 발현, 또는 유럽 바다농어(European sea bass)(Felip 등, 2008) 및 금붕어에서 LH 및 FSH의 분비를 자극함을 나타내었다. 따라서, 이론상, GPR54 및/또는 KiSS1가 녹아웃된, 성적으로 미성숙한 불임 물고기의 생식력은 키스펩틴 유사체 (예를 들어, 키스펩틴 10) 또는 성선자극호르몬 유사체 (LH 또는 FSH)의 외인성 전달에 의해 회복될 수 있다. 상기 개념으로, 상동(homozygous) kiss 또는 kiss 수용체 녹아웃-친어(broodstock)는 교정(corrective) 호르몬이 투여된다면, 생식력의 가역적 조절을 보장하므로 포획하여 사육될 수 있다. KO-친어로부터 얻은 자손은 변형이 유전된다. 이는 경제적 및 환경적 이점을 제공할 것이다.

[0024]

성적 성숙을 위한 선택적 신경내분비 유전자는 많은 과정에 의해 불활성화될 수 있다. 유전자의 불활성화는 단백질 또는 RNA와 같이, 유전자에 의해 인코딩되는 기능적 인자의 발현을 방지한다. 일종의 불활성화는 성적 성숙 인자 및/또는 동물에서 상기 인자의 발현에 필요한 프로모터(promoter) 및/또는 작동유전자(operator)를 인코딩하는 서열에 있어 1 이상의 염기의 삽입, 결실, 또는 치환을 포함한다. 불활성화는 유전자의 녹아웃일 수 있다. 유전자는, 유전자에 의해 인코딩된 기능적 인자의 발현, 간접 RNA (동물의 게놈 또는 동물의 여러 세포 내 유전자에 의해 발현된), 또는 외인성 유전자에 의한 우성 음성 인자의 발현을 방지하기 위한 동물의 게놈으로부터 적어도 일부 유전자의 제거, 유전자의 변형에 의해 불활성화될 수 있다.

[0025]

회복 가능한-불임의 또 다른 시스템은 Tac3/TacR3이다(Young, J., Bouligand, J., Francou, B., Raffin-Sanson, M.L., Gaillez, S., Jeanpierre, M., Grynberg, M., Kamenicky, P., Chanson, P., Brailly-Tabard, S., 등 (2010). TAC3 및 TACR3 결합은 인간에서 시상하부 선천성 저고나도트로편성 성기능저하증을 야기한다(J Clin Endocrinol Metab 95, 2287- 2295). Kiss/Gpr54와 마찬가지로, 인간의 이들 유전자의 결합은 박동성(pulsatile) GnRH 처리에 의해 회복가능한(Young 등, 2010) 저고나도트로편성 성기능저하증을 나타낸다. Tac 및/또는 Tac3은 본원에 개시된 또는 참조된 방법을 이용하여 불활성화될 수 있다.

[0026]

본 발명의 구현예는 소(cattle), 양(sheep), 돼지(pigs), 닭(chickens), 칠면조(turkeys), 염소(goats), 양(sheep), 어류(fish), 벼풀로(buffalo), 에뮤(emu), 토끼(rabbits), 유제류(ungulates), 조류(avians), 설치류(rodents), 및 가축으로 구성되는 군으로부터 선택된 동물에서 GnRH1, GPR54, KiSS1, Tac 및 Tac3으로 구성되는 군으로부터 선택된 1 이상의 유전자를 불활성화하는 방법을 포함한다. 유전자는 이로부터 얻어지는 동물 내 세포 및/또는 배아에서 불활성화될 수 있다. 다양한 방법, 예를 들어, TALENs 또는 징크핑거 뉴클레아제(Zinc Finger Nucleases)를 이용한 세포 또는 배아 내 유전자의 녹아웃, 및 선조(founder) 동물을 제조하기 위하여 세포/배아를 대신 복제 및/또는 이식하는 방법이 본원에 개시된다.

[0027]

도 1은 실험관 내(in vitro)에서 변경되어 송아지를 복제하기 위해 사용되는 소의 세포에 대한 본 발명의 구현 예를 나타낸다. 송아지는 도살하기에 적합한 체중으로 성장하거나 또는 이들을 성숙하도록 하는 인자, 예를 들어, 성선자극호르몬 유사체 또는 직접적으로 제공되는 녹아웃된 유전적 인자로 처리될 수 있다.

[0028]

실시예 1은 TALENs 시스템을 가진 세포를 변경시키는 기술을 설명한다. 실시예 2는 표 1의 결과에서 사용된 희석 복제(dilution cloning) 기술을 설명한다. 실시예 3은 돌연변이 검출 및 RFLP 분석의 기술을 설명한다. 실시예 4(도 2)는 1 l-염기쌍 결실의 소의 GDF8(벨기에 블루(Belgium Blue) 돌연변이)의 엑손-3으로의 이입(introgression)을 설명한다. 도 3은 이입된 하나의 종에서 또 다른 종으로 대립유전자(allele)를 이입시키는 유사한 과정의 결과를 묘사한다. 실시예 5는 올리고 HDR을 이용한 소 세포로의 대립유전자의 이입뿐만 아니라 이의 실험을 설명한다. 실시예 5에서, TALEN-유도된 상동 재조합은 결합된 선택 마커의 필요성을 제거하였다. 단독으로 형질감염된 경우, btGDF8.1 TALEN 쌍은 타겟 부위에서 염색체의 16%까지 절단된다. 1 1bp 결실을 품은 초나선형(supercoiled) 상동 DNA 쌍 주형(template)의 공동 형질감염(Co-transfection)은 바람직한 현상을 위한 선택 없이 3일 째 0.5 내지 5%의 유전자 변환 주기(conversion frequency)(HDR)의 결과를 야기한다. 유전자 변환은 PCR에 의해 스크리닝되는 분리된 콜로니의 1.4 %로 확인되었으며, 성공적 변이를 식별하는 빠른 방법이다. 실시예 6 (도 4)은 돼지 및 소 섬유아세포에서 4개의 의도된 좌위(loci)의 변형을 설명한다. 실시예 7 (도 5)는 유전자 APC, LDLR, p53, p65, 및 btGDF8에 이루어진 변형의 분석을 나타낸다. 실시예 8 (표 1)은 의도된 염기의 삽입/결실(indels)에 대하여 콜로니의 32%까지 변형에 대하여 상동인, 10-64% (평균, 45%)의 회수율(recovery rate)을 나타낸다. 실시예 9 (도 6)는 변형된 DAZL(modified deleted in azoospermia-like) 및 변형된 APC(adenomatous polyposis coli) 유전자로 만들어진 복제된 돼지를 설명한다. 실시예 10 (도 7)는 나타낸 유전자 타겟 전략에 따라 제조된 GPR54 녹아웃을 설명한다; 실시예 11은 GPR54 녹아웃으로 변형된 동물을 제조하는 방법을 설명한다. 실시예 12는 맞춤형 CRISPR/Cas9 엔도뉴클레아제(endonucleases)로 만들어진 변형을 설명한다.

[0029]

이러한 결과는 결합된 선택 마커의 도움없이 의도된 유전자를 효과적으로 변형시키는 기술을 입증하였다. 변형된 세포는 동물을 복제하는데 사용될 수 있다. 의도된 유전적 변형은, 예를 들어, 대립유전자를 이입시키기 위한 또는 유전자를 변형시키기 위한, 특수성을 가지고 조절될 수 있다. 변형은, 예를 들어, 유전자를 방해하거나 또는 녹아웃시키거나, 또는 비기능적 유전자 생성물 또는 대체할 수 있는 생성물을 제조하기 위하여 유전자의 일부를 대체하기 위한 결실 또는 삽입일 수 있다.

[0030]

KiSS1 및 GpR54 (또한 GPR54, Kiss-수용체, KissR, KiSS1R라고 함)이 녹아웃된 어류(틸라피아(tilapia))가 제조되었다. 도 8 및 9는 KISS 및 GpR54에 대한 타겟 영역을 묘사한다. Kiss 유전자의 구조적 조직은 보호되며 2개의 코딩 엑손을 포함하는데, 하나는 신호 웨بت아이드 및 키스펩틴 전구체의 일부를 인코딩하며, 다른 하나는 키스펩틴-10 서열을 포함하는 전구체의 나머지를 인코딩한다. 실시예 14는 Kiss 또는 KissR 녹아웃을 가진 선조(founder) 어류를 제조하는데 사용되는 단계를 설명한다. TALENs에 기반한 기술은 유전자를 녹아웃하는데 사용되었으며 용융 분석은 염기의 삽입/결실(도 10)을 검출하는데 사용되었다. 타겟된 유전자의 다양한 변형은 9개의 다른 뉴클레오티드 결실, 2개의 삽입, 및 3개의 뉴클레오티드 삽입 및 결실의 조합을 포함하는 것으로 확인되었다(도 11). 시퀀싱(sequencing)은 녹아웃이 이를 변형의 적어도 일부로 인한 결과임을 나타낸다. 생식세포 계열(Germ line) 돌연변이가 확인되었다(도 12 참조). Kiss 또는 KissR 녹아웃을 가진 F1 이형 돌연변이는 생성되고 사육되었다. 불활성화 표현형을 나타낼 것으로 예상되는, F2 세대는 현재 성장하고 있다.

[0031]

오직 의도된 부위에 변화를 갖는 형질 전환 동물을 제조하기 위한 과정이 본원에 개시된다. 또한, 상기 과정은 의도된 부위에 특별히 의도된 변이를 만들 수 있다. 결합된-리포터 유전자(reporter genes), 또는 결합된 양성 및 음성 선택 유전자의 사용과 같은 문제로부터 얻어지는 다른 변이를 제거할 필요가 없거나, 또는 무작위 전이 유전자(transgene) 삽입이 우회된다. 또한, 상기 과정은 의도된 부위에 오직 의도된 변이를 가지는 유전적으로 변형된 동물을 제조하기 위한 새로운 세대에서 사용될 수 있다. 다른 과정은 또한 비결합된 마커 유전자 등이 참여한다는 것이 개시된다.

[0032]

타겟된 뉴클레아제 시스템(Targeted Nuclease Systems)

[0033]

TALENs(transcription activator-like effector nucleases) 및 징크핑거 뉴클레아제(ZFNs)와 같은 계놈 편집 도구는 많은 유기체에서 생명 공학, 유전자 치료 및 기능적 계놈 연구의 분야에 영향을 미쳤다. 더욱 최근에, RGENs(RNA-guided endonucleases)는 보완적인 RNA 분자에 의해 그들의 타겟 부위에 연결된다. Cas9/CRISPR 시스템은 REGEN이다. tracrRNA는 또 다른 이러한 도구이다. 이들은 타겟된 뉴클레아제 시스템의 실시예이다: 이들 시스템은 뉴클레아제를 타겟 부위에 국한시키는 DNA-결합 일원(member)을 가진다. 상기 부위는 그 후 뉴클레아제에 의해 절단된다. TALENs 및 ZFNs는 DNA-결합 일원에 융합된 뉴클레아제를 가진다. Cas9/CRISPR는 타겟 DNA 상에서 서로를 찾는 동계(cognates)이다. DNA-결합 일원은 염색체의 DNA 내 동계 서열을 가진다. DNA-결합 일원

은 의도된 부위 부근이 아닌 곳에서 핵산 분해 작용을 얻기 위하여 전형적으로 의도된 동계 서열의 관점에서 고안되었다. 특정 구현예는 이러한 시스템 모두에 제한 없이 적용될 수 있다; 뉴클레아제 재-절단(re-cleavage)을 최소화하는 구현예, 의도된 잔기에서 정밀하게 염기의 삽입/결실을 제조하기 위한 구현예, 및 DNA-결합 부위에서 이입되는 대립유전자의 배치를 포함한다.

[0034] TALENs

TALENs은 유전 공학 도구이다. 유전자 불활성화는 TALENs의 많은 용도 중 하나이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 TALEN은 광범위하며 다른 TALEN의 도움없이 이중 가닥의 DNA를 절단할 수 있는 단량체의 TALEN을 포함한다. 용어 TALEN은 또한 동일 부위에서 DNA를 절단하기 위해 함께 작업하여 설계된 TALENs의 쌍의 하나 또는 둘 다의 일원(member)을 나타내기 위해 사용된다. 함께 작업하는 TALENs은 DNA의 방향(handedness)과 관련하여 좌측-TALEN 및 우측-TALEN으로 나타낼 수 있다. TALEN-변형된 가축을 생산하는데 장벽 중 하나는 동물세포에 대한 변형 생산 효율이 종래의 우수한 실행에서도 겨우 몇 퍼센트인 것이다. 이러한 외인성의 단백질을 발현하거나 내인성 단백질의 발현을 중지하는 것과 같은, 의도된 효과를 실제로 얻지 못할 수 있기 때문에, 의도한 부위에서의 결실 또는 삽입의 성취는 반드시 성공을 의미하지 않는다. 초파리 또는 마우스와 같은 유전적으로 변형된 하등 동물은 성공적으로 변형된 것이 소수인 경우 측정을 위해 수백의 동물의 생산, 시험, 및 스크리닝을 제공하는 끊임없이 생식 주기를 가지기 때문에, 낮은 효율이라도 초파리 또는 마우스와 같은 유전자적으로 변형된 하등 동물의 생산에 유용할 수 있다. 그러나, 종래에 달성된 효율의 수준은 훨씬 더 긴 임신기간 및 비교적 적은 임신 당 자손을 가지기 때문에, 가축 우제류에는 적합하지 않다. 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 포함되는 2012.02.24자로 출원된 미국 특허출원번호 13/404,662 "유전자 변형된 동물 및 이를 제조하는 방법 (Genetically modified animals and method for making the same)"는 (충돌하는 경우, 구체적인 것은 조절된다) 이를 기준의 제한을 해결하는 특정 방법을 제공한다.

가축을 변형하기 위해 TALENs을 이용하는데 또 다른 장벽은 세포가 불안정하기 때문에 일차 세포 내 DNA의 TALEN-매개된 변형이 어렵다는 것이다. 2011.02.11자로 출원된 미국 공개번호 2011/0197290는 이를 세포를 변형하기 위한 유용한 방법을 제공하며, 모든 목적을 위해 참조로서 본원에 포함된다; 충돌하는 경우, 충돌하는 경우, 구체적인 것은 조절된다. 용어 일차 세포는 살아있는 동물로부터 분리된 세포를 의미하며, 상기 세포는 조직으로부터 분리된 후로부터 0 내지 10 사이의 복제를 진행한다. TALENs은 유전자 변형된 우제류의 일차 세포 생산에 사용될 수 있다. 이러한 변형은 복제에 의한 유전자 변형 동물 계보의 선조를 제조하는데 적합하다. 또한 선조 동물 계보의 임신 및 전달을 위해 대리모(surrogate females)로 이식시키는데 적합한 변형된 접합자 또는 배아를 갖는, 접합자 또는 배아를 변형시키는데 사용될 수 있는 직접-배아 주사가 본원에 기재되어 있다.

Miller 등 (Miller 등 (2011) *Nature Biotechnol* 29:143)은 Fok I 뉴클레아제의 촉매성 도메인(catalytic domain)에 TAL 절단(truncation) 변이체를 결합하여 부위-특이적 뉴클레아제 구조에 대한 TALEN의 제조를 보고하였다. 이렇게 얻어진 TALENs은 두개의 주요 진핵생물의 DNA 복구 경로, NHEJ(non-homologous end joining) 및 상동 직접적 복구의 수단에 의해 불멸화된 (immortalized) 인간 세포에서 유전자 변형을 유도하는 것으로 나타났다. TALENs은 특이적 결합을 위해 설계될 수 있다. Miller 등 TALENs의 개선은 2012.08.24자로 출원된 미국 출원번호 13/594,694에 설명된다. 일반적으로 생물학적 분야에서 사용되는 용어로서, 특이적 결합은 비-타겟 조직에 비해 상대적으로 높은 친화도로 타겟에 결합하는 분자를 나타내며, 일반적으로 정전기 상호작용, 반데르발스 상호작용, 수소결합 등과 같은 다수의 비-공유상호작용(non-covalent interaction)을 포함한다. 특이적 결합 상호작용은 항원-항체 결합, 효소-기질 결합, 및 특이적으로 결합하는 단백질-수용체 상호작용을 특징으로 한다.

TALs에 대한 암호(cipher)는 보고되었으며(PCT 출원 WO 2011/072246), 여기서 각 DNA 결합 반복은 타겟 DNA 서열에서 하나의 염기쌍을 인식하는 원인이 된다. 잔기는 DNA 서열을 타겟하기 위해, (a) C/G의 인식을 위한 HD; (b) A/T의 인식을 위한 NI; (c) T/A의 인식을 위한 NG; (d) C/G 또는 A/T 또는 T/A 또는 G/C의 인식을 위한 NS; (e) G/C 또는 A/T의 30 인식을 위한 NN; (f) T/A의 인식을 위한 IG; (g) C/G의 인식을 위한 N; (h) C/G 또는 T/A의 인식을 위한 HG; (i) T/A의 인식을 위한 H; 및 (j) G/C의 인식을 위한 NK로 조립될 수 있다. 간단하게, TALEN의 결합을 위한 타겟 위치를 결정하고, 뉴클레아제 및 타겟위치를 인식하는 일련의 RVDs를 포함하는 융합 분자를 생성한다. 결합 시, 뉴클레아제는 DNA를 절단하여 세포의 복구 조직(repair machinery)이 절단된 말단에서 유전자 변형을 생산하도록 작동할 수 있다. 용어 TALEN은 TAL(Transcription Activator-Like) 작동자 결합 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 포함하는 단백질을 의미하며, 다른 단량체 TALENs와 함께 이량화

(dimerization)를 필요로 하는 다른 단량체뿐만 아니라 그 자체로 기능적인 단량체 TALENs을 포함한다. 이량화는 두개의 단량체 TALEN이 동일한 경우 동형이량체의(homodimeric) TALEN이 될 수 있고, 또는 단량체 TALEN이 다른 경우 이형이량체의(heterodimeric) TALEN이 될 수 있다.

[0039]

일부 구현예에서, 단량체 TALEN이 사용될 수 있다. TALEN은 전형적으로 두개의 TAL 작동자 도메인이 각각 Fok I 제한효소의 촉매 도메인에 융합되도록 스페이서와 함께 이분(bipartite) 인식 부위를 통해 이량체로서 작용하고, 각 결과의 TALEN에 대한 DNA-인식 부위는 스페이서 서열에 의해 분리되고, 인식 부위에서 각 TALEN 단량체의 결합은 스페이서 내에서 이량화하고 이중-가닥 절단을 생산하기 위해 Fok I를 허용한다. 또한, 단량체 TALENs은 생성될 수 있으나, 이러한 단일 TAL 작동자는 기능을 위해 이량화가 필요하지 않은 뉴클레아제에 융합된다. 예를 들어, 이러한 일 뉴클레아제는 두 단량체가 단일 폴리펩티드로서 발현되는 Fok I의 단일-사슬 변이체이다. 다른 자연적으로 발생하거나 설계된 단량체의 가수분해효소 또한 이러한 역할을 할 수 있다. The 단량체 TALEN으로 사용되는 DNA 인식 도메인은 자연적으로 발생하는 TAL 작동자로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, DNA 인식 도메인은 특이적 DNA 타겟을 인식하도록 설계될 수 있다. 설계된 단일-사슬 TALENs는 단지 하나의 설계된 DNA 인식 도메인을 필요로 하는 것처럼, 구성하고 효율적으로 활용하는데 용이할 수 있다. 이량체 DNA 서열-특이적 뉴클레아제는 두개의 다른 DNA 결합 도메인을 이용하여 생산될 수 있다(예를 들어, 하나의 TAL 작동자 결합 도메인 및 분자의 다른 유형으로부터의 하나의 결합도메인). TALENs은 스페이서와 함께 이분 인식 부위를 통해 이량체로서 작용할 수 있다. 또한, 이 뉴클레아제 구조는 하나의 TALEN 단량체 및 하나의 징크 평거 뉴클레아제 단량체로부터 생산된 타겟-특이적 핵산가수분해 효소에 사용될 수 있다. 이러한 경우, TALEN 및 징크 평거 뉴클레아제 단량체에 대한 DNA 인식 부위는 적당한 길이의 스페이서로 분리될 수 있다. 두개의 단량체의 결합은 Fok I가 스페이서 스퀸스내에서 이량화하고 이중-가닥 절단을 생산하도록 할 수 있다. 호메오도메인(homeodomain), myb 반복 또는 류신 지퍼(leucine zipper)와 같은 징크 평거 외에 DNA 결합 도메인은 또한 Fok I에 융합될 수 있고, 기능적인 뉴클레아제를 생산하기 위해 TALEN 단량체와 함께 파트너 역할을 할 수 있다.

[0040]

일부 구현예에서, TAL 작동자는 특정 뉴클레오티드 서열에 다른 단백질 도메인(예를 들어, 비-뉴클레아제 단백질 도메인)을 타겟하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, TAL 작동자는 제한없이 DNA 20 상호작용 효소(예를 들어, 메틸라아제(methylase), 토포이소머라제(topoisomerase), 인테그라아제(integrase), 전위효소, 또는 리가아제(ligase)), 전사 활성제 또는 억제제, 또는 히스톤과 같은 다른 단백질과 상호작용 또는 변형을 하는 단백질로부터의 단백질 도메인에 결합될 수 있다. 이러한 TAL 작동자 융합의 적용은, 후성적(epigenetic) 조절 요소의 생산 또는 변형; DNA에서 위치-특이적 삽입, 결실, 또는 복구; 유전자 발현 조절, 및 염색질 구조 변형을 포함한다.

[0041]

타겟 서열의 스페이서는 TALEN의 특이성 및 활성을 조절하기 위해 선택되거나 또는 변경될 수 있다. 스페이서 길이의 유연성(flexibility)은 스페이서 길이가 높은 특이성을 갖는 특정 서열을 타겟하기 위해 선택될 수 있음을 나타낸다. 또한, 다른 스페이서 길이에 대한 활성의 변이가 관찰되었고, 이는 원하는 수준의 TALEN 활성에 도달하기 위해 스페이서 길이가 선택될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0042]

용어 뉴클레아제(nuclease)는 엑소뉴클레아제(exonuclease) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 포함한다. 용어 엔도뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내의 핵산 사이의 결합의 가수분해(절단)를 촉진 할 수 있는 임의의 야생형 또는 변종의 효소를 나타낸다. 엔도뉴클레아제의 비-제한적인 예는 Fok I, Hhal, HindIII, NotI, BbvCI, EcoRI, BglII, 및 AlwI와 같은 타입 II 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 또한, 엔도뉴클레아제는 약 12-45 염기쌍(bp)의 길이, 보다 바람직하게는 14-45bp의 일반적인 폴리뉴클레오티드 인식 부위를 가질 때 희귀-절단(rare-cutting) 엔도뉴클레아제를 포함한다. 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 정의된 좌위(locus)에서 DNA 이중-가닥 절단(double-strand breaks, DSBs)을 유도한다. 희귀-절단 엔도뉴클레아제는 호밍(homing) 엔도뉴클레아제, Fok I 또는 화학적 엔도뉴클레아제와 같은 제한 효소의 촉매성 도메인과 함께 징크-평거 도메인의 융합으로부터 생긴 키메릭(chimeric) 징크-평거 뉴클레아제(ZFN)일 수 있다. 화학적 엔도뉴클레아제에서, 화학적 또는 웨პ티드의 클레버(cleaver)는 핵산의 중합체 또는 특이적 타겟 서열을 인식하는 다른 DNA에 결합하며, 이로써 특이적 서열에 대한 절단 활성이 타겟으로 된다. 또한 화학적 엔도뉴클레아제는 특이적 DNA 서열에 결합하는 것으로 알려진, 오르토페난트롤린(orthophenanthroline)의 결합과 유사한 합성 뉴클레아제, DNA 절단 분자, 및 삼중나선-형성 올리고뉴클레오티드(triplex-forming oligonucleotides, TFOs)를 포함한다. 이러한 화학적 엔도뉴클레아제는 본 발명에 따른 용어 "엔도뉴클레아제(endonuclease)"를 포함한다. 이러한 엔도뉴클레아제의 예는 I-See I, I-Chii L I- Cre I, I-Csm I, Pi-See L PI-Tti L PI-Mtu I, I-Ceu I, I-See IL I- See III, HO, Pi-Civ I, PI-Ctr L PI-Aae I, PI-Bsii I, PI-Dha I, PI-Dra L PI-Mav L PI-Meh I, PI-Mfu L PI-Mf1 I, PI-Mga L PI-Mgo PI-Min L PI-Mka L PI-Mle I, PI-Mma PI- 30 Pish L PI-Msm I, PI-

Mth I, PI-Mtu PI-Mxe I, PI-Npu I, PI-Pfu L PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp L PI-Fae L PI-Mja I, PI-Pho L Pi- Tag L PI-Thy I, PI-Tko I, PI-Tsp I, I-Msol를 포함한다.

[0043] TALENs 또는 다른 도구에 의한 유전적 변형은 예를 들어, 삽입, 결실, 외인성 핵산 단편의 삽입, 및 치환으로 구성되는 목록으로부터 선택될 수 있다. 용어 "삽입(insertion)"은 염색체로의 삽입 또는 복구를 위한 주형으로서 외인성 서열의 용도로 문자 그대로의 의미로 광범위하게 사용된다. 일반적으로, 타겟 DNA 위치는 확인되고, TALEN-쌍은 위치에 특이적으로 결합되도록 생산된다. TALEN은 예를 들어, 단백질, mRNA로서, 또는 TALEN을 코딩하는 벡터에 의하여 세포 또는 배아로 전달된다. TALEN은 이중-가닥을 절단하여 DNA를 절단한 다음 복구하고, 종종 염기의 삽입/결실을 생성하고, 또는 변형된 서열과 함께 절단의 복구를 위한 주형으로서 염색체로의 삽입 또는 제공되는 외인성 핵산을 수반하는 것에 함유된 서열 또는 다형성을 포함한다. 주형-기반 복구는 염색체 변이 및 세포 내 염색체의 효과적인 변이를 제공하는 유용한 방법이다.

[0044] 용어 외인성 핵산은 핵산이 세포에서 자연적으로 핵산 서열과 동일하거나 또는 다름에도 불구하고, 세포 또는 배아에 추가되는 핵산을 의미한다. 용어 핵산 또는 핵산 단편은 광범위하고, 염색체, 발현 카세트, 유전자, DNA, RNA, mRNA, 또는 이의 일부를 포함한다. 세포 또는 배아는 가축, 우제류, 소, 돼지, 양, 염소, 닭, 토끼, 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 용어 가축은 식품이나 생물학적 물질의 상품으로 사용되는 가축화된 동물을 의미한다. 용어 우제류(artiodactyl)는 각 발에 주로 두개 또는 종종 네개의 발가락을 갖는, 소목(Artiodactyla)의 발굽이 있는 포유류(hoofed mammal)를 의미하며, 소(cattle), 사슴, 낙타, 하마, 양, 및 염소를 포함한다.

[0045] 일부 구현예는 TALEN-쌍에 의해 특이적으로 결합되는 위치에서 세포 또는 배아의 DNA에 유전자 변형을 하는 가축 및/또는 우제류의 세포 또는 배아에 TALEN-쌍을 도입하는 단계, 및 세포로부터 가축 동물/우제류를 생산하는 단계를 포함하는, 유전자 변형 가축 및/또는 우제류를 생산하는 조성물 또는 방법을 포함한다. 직접 주사는 예를 들어, 접합자(zygote), 배반포(blastocyst), 또는 배아에 세포 또는 배아로 사용될 수 있다. 대안적으로, 단백질, RNA, mRNA, DNA, 또는 벡터의 도입을 위해 알려진 많은 기술 중 어느 하나를 이용하여 TALEN 및/또는 다른 인자를 세포로 도입시킬 수 있다. 유전자 변형 동물은 알려진 과정, 예를 들어 임신 숙주로 배아의 이식, 또는 다양한 복제 방법에 따라 배아 또는 세포로부터 생산될 수 있다. 문구 "TALEN에 의해 특이적으로 결합되는 부위에서 세포의 DNA에 유전자 변형" 등은, TALEN이 이의 타겟 부위에 특이적으로 결합될 때, TALEN의 뉴클레아제에 의하여 절단되는 부위에서 유전자 변형이 생성된다는 것을 의미한다. 뉴클레아제는 TALEN-쌍이 결합하는 경우 정확하게 절단되지는 않으나, 두개의 결합 부위 사이로 정의된 부위에서는 다소 절단된다.

[0046] 일부 구현예는 동물의 복제를 위해 사용된 세포의 조성물 또는 처리를 포함한다. 세포는 가축 및/또는 우제류의 세포, 배양된 세포, 일차 세포, 일차 체세포, 접합자, 생식세포(germ cell), 원시 생식세포(primitive germ cell), 또는 줄기세포일 수 있다. 예를 들어, 구현예는 TALEN 단백질 또는 TALEN 또는 TALENs을 인코딩하는 핵산에서 다수의 일차 세포를 노출시키는 단계를 포함하는, 유전자 변형을 만드는 조성물 또는 방법이다. TALENs은 예를 들어, 벡터 내 mRNA 또는 DNA 서열로 인코딩된, 단백질 또는 핵산 단편으로서 도입될 수 있다.

[0047] 세포의 유전적 변형은 리포터(reporter)의 삽입을 포함할 수 있다. 리포터는 예를 들어, 형광 마커(fluorescent marker), 예를 들어, 녹색 형광 단백질 및 노란 형광 단백질일 수 있다. 리포터는 선택 마커, 예를 들어 푸로마이신(puromycin), 간시클로비르(ganciclovir), 아데노신 탈아미노효소(adenosine deaminase, ADA), 아미노글리코시드 인산전달효소(aminoglycoside phosphotransferase, neo, G418, APH), 디히드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase, DHFR), 티미딘 키나제(thymidine kinase, TK), 또는 크산틴-구아닌 포스포리보실트란스퍼라제(xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, XGPRT)일 수 있다. 본 명세서에 상세히 기술 된 바와 같이 리포터, 선택 마커, 및/또는 1 이상의 TALEN 용 벡터는, 예를 들어 플라스미드(plasmid), 트랜스포존(transposon), 트란스포사제(transposase), 바이러스 또는 기타 벡터 일 수 있다.

[0048] TALENs은 다수의 DNA 부위에 연결될 수 있다. 상기 부위는 몇천 또는 수천개의 염기쌍에 의해 분리될 수 있다. DNA는 세포 조직(cellular machinery)에 의해 다시 결합함으로써 상기 부위 사이의 전체 영역의 결실을 유발할 수 있다. 구현예는, 예를 들어, 1-5 메가 염기 사이 또는 염색체의 50% 내지 80% 사이, 또는 약 100 내지 약 1,000,000 염기쌍 사이의 거리에 의하여 분리된 부위를 포함한다; 숙련자는 명백하게 언급된 범위 내의 모든 범위와 값을 고려하여, 예를 들어 약 1,000 내지 약 10,000의 염기쌍 또는 약 500 내지 약 500,000 염기쌍으로 즉시 이해할 것이다. 대안적으로, 외인성 DNA는 외인성 DNA의 삽입, 또는 상기 부위 사이의 DNA의 주형-기반 복구(template-driven repair)를 위한 세포 또는 배아에 침가될 수 있다. 다수 부위에서의 변형은 유전자 변형 세포, 배아, 우제류, 및 가축을 생산하기 위해 사용될 수 있다. 1 이상의 유전자는 이들의 성적 성숙 유전자 또

는 시스-작용(cis-acting) 인자를 포함하며, 완전한 또는 적어도 부분적 결실을 위해 선택될 수 있다.

[0049] **징크 평거 핵산 분해효소**

[0050] 징크-평거 핵산 분해효소(Zinc-finger nucleases, ZFNs)는 DNA-절단 도메인에 징크 평거 DNA-결합 도메인을 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소이다. 징크 평거 도메인은 원하는 DNA 서열을 타겟하도록 설계할 수 있으며, 이는 복잡한 계놈에서 특이 서열을 징크 평거 핵산 분해효소가 타겟하는 것을 가능하게 한다. 내인성 DNA 복구 장치(repair machinery)를 활용함에 있어서, 이러한 시약은 고등 생물의 계놈을 변이하는데 사용될 수 있다. ZFNs는 유전자 불활성화에도 사용 가능하다.

[0051] 징크 평거 DNA-결합 도메인은 약 30개의 아미노산을 가지며, 안정된 구조로 접한다. 각 평거는 먼저 DNA 기질과 삼중(triplet) 결합한다. 주요 위치의 아미노산 잔기는 DNA 부위와 대부분의 서열-특이적인 상호작용에 기여한다. 이러한 아미노산은 필요한 구조를 유지하기 위하여 남아있는 아미노산을 유지하면서 변이될 수 있다. 더 긴 DNA 서열과의 결합은 동시에 여러 도메인 연결에 의하여 수행된다. 비-특이적 FokI 절단 도메인(N), 전사 활성자 도메인(A), 전사 억제자 도메인(R) 및 메틸화효소 (M)와 같은 기타 기능은 ZFP와 융합하여, 각각 징크 평거 전사 활성화제(zinc finger transcription activators, ZFA), 징크 평거 전사 억제제(zinc finger transcription repressors, ZFR) 및 징크 평거 메틸화효소(zinc finger methylases, ZFM)를 형성할 수 있다. 유전자 변형 동물을 제조하기 위하여 징크 평거 및 징크 평거 핵산 분해 효소를 이용하기 위한 시료 및 방법은 예를 들면 US8,106,255, US20120192298, US20110023159, 및 US20110281306에 기술되어 있다.

[0052] **주형 (Templated) 및 비-주형 (non-templated) 복구**

[0053] TALENs, zinc finger nucleases, Cas9/CRISPR 및 재조합효소 융합 단백질은 주형과 함께 또는 없이 사용될 수 있다. 주형은 DNA 내의 이중 가닥 절단 (double stranded breaks, DSB)를 복구하기 위하여 가이드 (주형)로서 사용하도록 세포 복구 장치에 첨가되는 외인성 DNA이다. 이 과정은 일반적으로 HDR 상동성 지향 복구 (homology directed repair, HDR)로 지칭된다. 주형 없는 과정은 DSBs의 생성과 관여하며, 세포 장치 (cellular machinery)가 완전하지 않은 복구를 생성하게 함으로써, 삽입 또는 결실 (인델 (indel))이 생성된다. 비-상동성 말단 연결 (Non-homologous end joining, NHEJ)로 지칭되는 세포 경로는 일반적으로 DSB의 비주형 복구를 중개 한다. 용어 NHEJ는 일반적으로 NHEJ가 관여하는지 여부와 관계없이 이와 같은 모든 비-주형 복구, 또는 대안적 세포 경로를 지칭하는데 사용된다.

[0054] **벡터 및 핵산**

[0055] 녹아웃(knockout) 목적으로, 유전자 불활성을 위해, 또는 다른 목적을 위한 유전자의 발현을 얻기 위해, 다양한 핵산은 우제류 또는 다른 세포로 도입될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 핵산은 DNA, RNA, 및 핵산 유사체, 및 이중 가닥 또는 단일 가닥(예를 들어, 센스 또는 앤티센스 단일 가닥)의 핵산을 포함한다. 핵산 유사체는 핵산의 안정성, 혼성화, 또는 가용성을 향상시키기 위하여, 염기 부분, 당 부분, 또는 포스페이트 백본(phosphate backbone)에서 변형될 수 있다. 염기 부분 (moiety)의 변형은 테옥시티미딘(deoxythymidine)에 대한 테옥시우리딘(deoxyuridine), 테옥시시티딘(deoxycytidine)에 대한 5-메틸-2'-데옥시시티딘 및 5-브로모-2'-데옥시시티딘을 포함한다. 당 부분의 변형은 리보오스 당의 2'-하드록실이 2'-0-메틸 또는 2'-0-알릴(allyl) 당으로의 변형을 포함한다. 테옥시리보오스 포스페이트 백본(deoxyribose phosphate backbone)은 각 염기 부분이 6원인 모폴리노 고리에 결합된 모폴리노 핵산, 또는 테옥시포스페이트 백본(deoxyphosphate backbone)이 슈도펩티드(pseudopeptide) 백본으로 치환되고 4개의 염기가 유지된 웨პ티드 핵산을 생산하기 위해 변형될 수 있다. Summerton 및 Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3):187; 및 Hyrup 등. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5 참조. 또한, 테옥시포스페이트 백본은 예를 들어 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) 백본, 포스포로아미디트(phosphoroamidite), 또는 알킬 포스포트리에스터(alkyl phosphotriester) 백본으로 치환될 수 있다.

[0056] 타겟 핵산 서열은 프로모터와 같은 조절 영역(Regulatory region)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 조절 영역은 돼지 조절 영역일 수 있으며, 또는 다른 종으로부터의 것일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 작용 가능하게 연결된 타겟 핵산의 전사를 허용하거나 또는 용이하게 하는 등의 방법으로 핵산 서열과 관련된 조절 영역의 위치를 나타낸다.

[0057]

프로모터의 임의의 유형은 타겟 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터의 예는 제한 없이 조직-특이적 프로모터, 항시성 프로모터(constitutive promoters), 유도성 프로모터 (inducible promoters), 및 특정 자극에 대해 반응하거나 또는 반응하지 않는 프로모터를 포함한다. 적합한 조직 특이적 프로모터는 베타 세포에서 핵산 전사의 우선적 발현 (preferential expression)을 야기할 수 있으며, 예를 들어, 인간 인슐린 프로모터를 포함한다. 다른 조직 특이적 프로모터는 예를 들어 간세포(hepatocyte) 또는 심장 조직에서 우선적 발현을 야기할 수 있고, 각각 알부민 또는 알파-미오신 중쇄 프로모터(alpha-myosin heavy chain promoters)를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 중요한 조직- 또는 일시적-특이성 없이 핵산 분자의 발현을 용이하게 하는 프로모터가 사용될 수 있다(즉, 항시성 프로모터). 예를 들어, 닭 베타-액틴 유전자 프로모터(chicken beta-actin gene promoter)와 같은 베타-액틴 프로모터, 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터, miniCAGs 프로모터, 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) 프로모터, 또는 3-포스포글리세레이트 키나제(3-phosphoglycerate kinase; PGK) 프로모터 뿐만 아니라, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-T), SV40 프로모터, 또는 거대세포바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 닭 베타 액틴 유전자 프로모터와 CMV 인핸서(enhancer)의 융합이 프로모터로서 사용된다. 예를 들어, Xu et al. (2001) *Hum. Gene Ther.* 12:563; 및 Kiwaki et al. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:821 참조.

[0058]

핵산 구조체(constructs)에서 유용할 수 있는 추가적인 조절 영역은, 폴리아데닐화 (polyadenylation) 서열, 번역 조절(translation control) 서열 (예를 들어, IRES (internal ribosome entry segment)), 인핸서, 유도성 요소(inducible elements), 또는 인트론을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 비록 전사에 미치는 영향, mRNA의 안정성, 전사의 효율성 등에 의해 발현을 증가시킬 수 있지만, 이러한 조절 영역은 필요하지 않을 수 있다. 이러한 조절 영역은 세포(들)에서 핵산의 최적의 발현을 얻기 위해 원하는 대로 핵산 구조체에 포함시킬 수 있다. 그러나, 때때로 이러한 추가적인 요소 없이 충분한 발현을 얻을 수 있다.

[0059]

핵산 구조체는 신호 펩티드 또는 선택 마커를 코딩하는데 사용될 수 있다. 신호 펩티드는 코딩된 폴리펩티드가 특정 세포의 위치(예를 들면, 세포 표면)로 유도되도록 사용될 수 있다. 선택 마커의 비-제한적인 예는 푸로마이신 (puromycin), 간시클로비르(ganciclovir), 아데노신 탈아미노효소(adenosine deaminase; ADA), 아미노글리코시드 인산전달효소(aminoglycoside phosphotransferase, neo, G418, APH), 디히드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase; DHFR), 티미딘 키나제(thymidine kinase; TK), 또는 크산틴-구아닌 포스포리보실트 렌스퍼라제(xanthin-guanine phosphoribosyltransferase; XGPRT)를 포함한다. 이러한 마커는 배양에서 안정한 형질전환체(transformants)를 선택하는데 유용하다. 다른 선택 마커는 녹색 형광 단백질 또는 노란색 형광 단백질과 같은 형광 폴리펩티드 (fluorescent polypeptides)를 포함한다.

[0060]

일부 구현예에서, 선택 마커를 코딩하는 서열은 Cre 또는 F1p과 같은 재조합효소에 대한 인식 서열의 측면에 있을 수 있다. 예를 들어, 선택 마커는 *loxP* 인식 부위(Cre 재조합효소에 의해 인식되는 34-bp 인식 부위) 또는 FRT 인식 위치 측면에 있을 수 있으며, 이러한 선택 마커는 구조체에서 절제될 수 있다. Cre/lox 기술을 검토하기 위해서, Orban, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89:6861, Cr, 및 Brand and Dymecki, *Dev. Cell* (2004) 6:7 참조. 또한, 선택 마커 유전자에 의해 방해받는 Cre- 또는 F1p-활성화할 수 있는 형질전환유전자 (transgene)를 함유하는 전위인자(transposon)는 형질전환유전자의 조건 발현(conditional expression)을 갖는 형질전환 동물을 얻기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 마커/형질전환유전자의 발현을 추진하는 프로모터는 도처에 있거나(ubiquitous) 또는 조직-특이적일 수 있으며, F0 동물(예를 들어, 돼지)에서 마커가 도처에 있거나 또는 조직-특이적 발현이 될 것이다. 형질전환유전자의 조직 특이적 활성은, 조직 특이적 방법으로 Cre 또는 F1p를 발현하는 돼지에게 마커-방해된(marker-interrupted) 형질전환유전자를 도처에 발현하는 돼지를 이종교배함으로써, 또는 Cre 또는 F1p 재조합효소를 도처에 발현하는 돼지에게 조직 특이적 방법으로 마커-방해된 형질전환유전자를 발현하는 돼지를 이종교배함으로써 이루어질 수 있다. 형질전환유전자의 조절된 발현 또는 마커의 조절된 절단은 형질전환유전자의 발현을 허용한다.

[0061]

일부 구현예에서, 타겟 핵산은 폴리펩티드를 코딩한다. 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 코딩된 펩티드의 다음 조작을 용이하게 하기 위해 설계된 "태그(tag)"를 코딩하는 태그 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 편재화 (localization) 또는 검출을 용이하게 함). 태그 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 삽입될 수 있으며, 이러한 코딩된 태그는 폴리펩티드의 카복실 또는 아미노 말단 중 하나에 위치한다. 코딩된 태그의 비-제한적인 예는 글루타티온-S-전이효소(glutathione S-transferase; GST) 및 FLAGTM 태그(Kodak, New Haven, CT)를 포함한다.

[0062]

핵산 구조체는 SssI CpG 메틸라제(New England Biolabs, Ipswich, MA)를 이용하여 메틸화될 수 있다. 일반적으

로, 핵산 구조는 37°C의 완충액에서 S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine) 및 SssI CpG-메틸라제와 함께 배양될 수 있다. 과메틸화(Hypermethylation)는 37 °C에서 1시간 동안 HinfI 엔도뉴클레아제의 하나의 단위와 함께 구조체를 배양하고, 아가로오스 젤 전기영동에 의해 분석하여 확인될 수 있다.

[0063]

핵산 구조체는 난모세포 또는 난자와 같은 생식세포, 전구세포 (progenitor cell), 성체 또는 배아 줄기 세포, 원시 생식 세포(primitive germ cell), PK-15 세포와 같은 신장세포(kidney cell), 섬세포(islet cell), 베타 세포, 간세포(liver cell), 또는 진피 섬유아세포와 같은 섬유아세포를 포함하는, 어느 유형의 배아, 태아, 또는 성인 우제류의 세포에 다양한 기술을 이용하여 도입될 수 있다. 기술의 비제한적인 예는 전위인자 시스템의 이용, 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 바이러스, 또는 리포솜(liposomes) 또는 전기천공법(electroporation), 미세주입(microinjection), 또는 인산칼슘 침전(calcium phosphate precipitation)과 같은 다른 비-바이러스 방법을 포함하며, 핵산을 세포로 전달할 수 있다.

[0064]

전위인자 시스템에서, 핵산 구조의 전사 단위, 즉 타겟 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 영역은 전위인자의 역위 반복에 의해 측면에 위치한다. Sleeping Beauty (미국특허번호 6,613,752 및 미국출원 공개번호 2005/0003542 참조); Frog Prince (Miskey et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:6873); Tol2 (Kawakami (2007) Genome Biology 8(Suppl.1):S7; Minos (Pavlopoulos et al. (2007) Genome Biology 8(Suppl.1):S2); Hsmar1 (Miskey et al. (2007) Mol Cell Biol. 27:4589); 및 Passport를 포함하는 다수의 전위인자 시스템은 마우스, 인간, 및 돼지 세포를 포함하는 세포로 핵산을 도입하기 위해 개발되었다. Sleeping Beauty 전위인자가 특히 유용하다. 전위효소는 타겟 핵산과 동일한 핵산 구조에 코딩된 단백질로 전달될 수 있고, 별도의 핵산 구조체 또는, mRNA를 제공하여 도입될 수 있다(예를 들어, 생체 외에서 전사된, 캡핑된(capped) mRNA).

[0065]

또한, 절연체 요소(Insulator element)는 타겟 핵산의 발현을 유지하고, 숙주 (host) 유전자의 원하지 않는 전사를 억제하기 위해 핵산 구조에 포함될 수 있다. 미국출원 공개번호 2004/0203158 참조. 일반적으로, 절연체 요소는 각 측면의 전사 단위 측면에 있고, 전위인자의 역위 반복된 것의 내부에 있다. 절연체 요소의 비-제한적인 예는 MAR(matrix attachment region) 유형 절연체 요소 및 경계-유형 (border-type) 절연체 요소를 포함한다. 예를 들어, 미국특허번호 6,395,549; 5,731,178; 6,100,448; 및 5,610,053, 및 미국출원 공개번호 2004/0203158 참조.

[0066]

핵산은 벡터 내에 포함될 수 있다. 벡터는 타겟 DNA로 운반체를 이동하도록 설계된 모든 특이적 DNA 부분을 포함하는 넓은 용어이다. 벡터는 에피솜(episome), 플라스미드, 또는 바이러스/파지 DNA 부분과 같은 게놈 또는 다른 타겟 DNA 서열로 DNA 삽입을 가져오는데 필요한 구성요소의 세트인, 발현벡터, 또는 벡터 시스템으로서 나타낼 수 있다. 동물에서 유전자 전달에 사용된 바이러스성 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 통합 파지 바이러스(integrating phage viruses), 및 비-바이러스성 벡터(예를 들어, 전위인자)와 같은 벡터 시스템은, 두개의 기본 구성을 가진다: 1) DNA가 포함된 벡터(또는 cDNA로 역전사된 RNA) 및 2) 전위효소, 재조합효소, 또는 벡터 및 DNA 타겟 서열을 인식하고 타겟 DNA 서열로 벡터를 삽입하는 다른 인테그라제(integrase) 효소. 대부분의 벡터는 종종 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)을 포함하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하며, 여기에서 발현 조절 서열은 각각 다른 DNA 서열 또는 mRNA의 전사 및/또는 번역을 각각 제어 및 조절하는 DNA 서열이다.

[0067]

벡터의 많은 다른 종류가 알려져 있다. 예를 들어, 플라스미드 및 바이러스성 벡터, 예를 들어 레트로바이러스성 벡터가 알려져 있다. 일반적으로 포유동물 발현 플라스미드는 복제원점(origin of replication), 적절한 프로모터 및 임의의 인핸서를 가지고, 또한 어느 필수적인 리보솜 결합 위치, 폴리아데닐화(polyadenylation) 위치, 스플라이스(splice) 공여자(donor) 및 수여자(acceptor) 위치, 전사의 말단 서열, 5' 측면에 있는 (flanking) 비-전사된 서열을 가진다. 벡터의 예는 플라스미드(다른 유형의 벡터의 운반체일 수도 있음), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus; AAV), 렌티바이러스(lentivirus; 예를 들어, 변형된 HIV-1, SIV 또는 FIV), 레트로바이러스(예를 들어, ASV, ALV 또는 MoMLV), 및 전위인자(예를 들어, Sleeping Beauty, P-elements, Tol-2, Frog Prince, piggyBac)를 포함한다.

[0068]

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 핵산은, 예를 들어, cDNA, 게놈 DNA (genomic DNA), 합성(예를 들어, 화학적으로 합성된) DNA, 자연 발생하고 화학적으로 변형된 핵산, 예를 들어 합성 염기 또는 대안적 백본(alternative backbone)을 포함하는 RNA 및 DNA 모두를 지칭한다. 핵산 분자는 이중-가닥이거나 또는 단일-가닥(즉, 센스 또는 안티센스 단일 가닥)일 수 있다. 용어 형질전환은 본 명세서에서 넓게 사용되고, 유전자 물질이 유전공학 기술을 이용하여 변경되는 유전자 변형 유기체 또는 유전자 재조합 유기체로 나타낸다. 따라서, 녹아웃 우제류는 외인성 유전자 또는 핵산이 동물 또는 이의 자손에서 발현되는지 또는 안되는지 여부에 관계없이

형질전환된다.

[0069] 유전자 변형 동물

[0070] 동물은 TALENs, 징크 팅거 뉴클레아제, 또는 공지된 다양한 벡터를 포함하는 기타 유전자 엔지니어링 도구를 이용하여 변형될 수 있다. 이와 같은 도구에 의하여 만들어진 유전자 변형은 유전자의 비활성화를 포함할 수 있다. 용어 "유전자 비활성화"는 기능적 유전자 산물의 형성을 지칭한다. 유전자 산물은 그의 정상 (야생형) 기능을 수행할 때만 기능적이다. 유전자 변형 동물의 시료 및 방법은 모든 목적을 위하여 본 명세서에서 참고문헌으로 인용된 2012년 2월 24일에 출원된 U.S. 출원번호 제13/404,662호, 2012년 5월 9일에 출원된 제13/467,588호, 및 2009년 10월 10일에 출원된 제12/622,886호에 더 자세히 기재되어 있다; 저축의 경우, 본 상세한 설명은 제한된다. 용어 트랜스-작용(trans-acting)은 다른 분자로부터 타겟 유전자에 의 작용 과정을 의미한다 (즉, 분자간(intermolecular)). 트랜스-작용 요소는 일반적으로 유전자를 포함하는 DNA 서열이다. 이 유전자는 타겟 유전자의 조절에 사용되는 단백질 (또는 마이크로 RNA 또는 기타 확산 분자)을 코딩한다. 트랜스-작용 유전자는 타겟 유전자로서 동일한 염색체상에 있을 수 있으나, 활성은 중간 단백질 또는 이를 코딩 하는 RNA에 의한다. 우성 음성(dominant negative)을 이용한 유전자 비활성화는 일반적으로 트랜스-작용 요소를 포함한다. 용어 시스-조절 또는 시스-작용은 단백질 코딩 또는 RNA 없이 작용한다; 유전자 불활성화 상황에서, 이는 일반적으로 유전자 코딩 부분 또는 유전자 기능의 발현에 필수적인 프로모터 및/또는 작동유전자 (operator)의 불활성화를 의미한다.

[0071] 당업계에 공지된 다양한 기술은 선조 동물의 생산 및 동물 주(lines)의 제조를 위하여 녹-아웃 동물의 제조 및/ 또는 동물에 핵산 구조체를 도입하는데에 사용될 수 있으며, 이는 게놈내에 녹아웃 또는 핵산 구조체를 통합시킨다. 상기 기술은, 제한 없이, 전핵 미세주입법(미국특허번호 4,873,191), 생식 계보(germ lines)에 레트로바이러스 매개 유전자 전달(Van der Putten et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-1652), 배아 줄기 세포로 유전자 타겟화(Thompson et al. (1989) Cell 56, 313-321), 배아 전기천공법(Lo (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814), 정자-매개 유전자 전달(Lavitrano et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14230-14235; Lavitrano et al. (2006) Reprod. Pert. Develop. 18, 19-23), 및 난구(cumulus) 또는 유선 세포, 또는 성체 또는 배아 줄기 세포의 생체 외 변환 다음에 핵 이식(Wilmut et al. (1997) Nature 385, 810-813; and Wakayama et al. (1998) Nature 394, 369-374)을 포함한다. 전핵 미세주입법, 정자-매개 유전자 전달 및 체세포 핵 전이는 특히 유용한 기술이다. 유전체적으로 변형된 동물은 생식 계열 세포를 포함하는, 모든 세포가 유전자 변형을 갖는 동물이다. 이의 유전자 변형이 모자이크인 동물의 생산에 방법이 사용되는 경우, 동물은 근친교배될 수 있고 유전자 변형된 자손이 선택될 수 있다. 클로닝은, 예를 들어, 배반포 상태(blastocyst state)에서 세포가 변형되는 경우 모자이크 동물을 제조하는데 이용될 수 있으며, 또는 유전체 변형은 단일-세포가 변형될 때 일어날 수 있다. 변형되어 성적으로 성숙되지 않은 동물은 사용된 특정 방식에 따라 변형에 대하여 동형 또는 이형 접합일 수 있다. 특정 유전자가 녹아웃 변형에 의하여 불활성화된 경우, 동형접합이 일반적으로 요구된다. 특정 유전자가 RNA 간섭 또는 우성 음성(dominant negative) 전략에 의해 불활성화되는 경우, 이형접합성이 보통 적합하다.

[0072] 일반적으로, 배아/접합체 미세주입법에서 핵산 구조체 또는 mRNA는 수정란(fertilized egg)으로 도입된다; 1 또는 2 세포 수정란은 정자의 머리로부터의 유전 물질을 함유하는 전핵(pronuclei)으로서 사용되고, 수정란은 원형질(protoplasm) 내에서 인식할 수 있다. 수정란 단계의 전핵(pronuclear)은 생체 외 또는 생체 내에서 얻을 수 있다(예를 들어, 공여자 동물의 난관으로부터 수술로 회수됨). 생체 외 수정란은 하기와 같이 생산될 수 있다. 예를 들어, 돼지 난소를 도살장에서 수집하고, 이동하는 동안 22-28 °C에서 유지할 수 있다. 난소는 여포성 흡인(follicular aspiration)을 위하여 세척 및 분리될 수 있으며, 4-8mm의 여포(follicles)는 진공 하에 18 게이지 바늘을 이용하여 50mL 원뿔 원심관으로 흡입될 수 있다. 여포액(Follicular fluid) 및 흡인된 난모세포(oocytes)는 시판되는 TL-HEPES (Minitube, Verona, WI)와 함께 프리필터(pre-filters)를 통하여 셋을 수 있다. 밀집한 난구 덩어리(cumulus mass)에 의해 둘러싸인 난모세포는 선택될 수 있으며, 대략 22시간 동안 습한 공기에서 38.7°C 및 5% CO₂에서 0.1mg/mL 시스테인, 10ng/mL 상피세포증식인자(epidermal growth factor), 10% 돼지의 난포액, 50 μM 2-메캅토에탄올, 0.5 mg/ml cAMP, 각각 10 IU/mL의 임신말혈청성자극호르몬(pregnant mare serum gonadotropin; PMSG) 및 인간용모성고나도트로핀(human chorionic gonadotropin; hCG)으로 보충된 TCM-199 OOCYTE MATURATION MEDIUM (Minitube, Verona, WI)에 놓일 수 있다. 이어서, 난모세포를 cAMP, PMSG 또는 hCG를 함유하지 않는 신선한 TCM-199 성숙 배지로 이동시키고, 추가적인 22시간 동안 배양시킨

다. 성숙된 난모세포는 1분 동안 0.1% 히알루로니다제에서 불태싱하여 이들의 난구 세포를 제거할 수 있다.

[0073] 돼지의 경우, 성숙한 난자는 미니튜브 5-웰 수정 접시 내 500 μ l Minitube PORCPRO IVF MEDIUM SYSTEM (Minitube, Verona, WI)에서 수정될 수 있다. 생체 외 수정(in vitro fertilization; IVF)을 준비하기 위해, 새로 수집된 또는 냉동 맷돼지(boar)의 정액을 세척하고, PORCPRO IVF 배지에서 4×10^5 정자가 되도록 혼탁시켰다. 정자 농도는 컴퓨터 보조 정액 분석(SPERMVISION, Minitube, Verona, WI)으로 분석될 수 있다. 최종 생체 외 인공수정은, 맷돼지에 따라, 대략 40 운동성(motile) 정자/난모세포의 최종 농도로 10 μ l 부피에서 수행될 수 있다. 수정하는 난모세포는 모두 38.7°C, 5.0% CO₂ 대기에서 6시간 동안 배양한다. 인공 수정 6시간 후, 추정 접합자는 NCSU-23에서 두번 세척하고, 0.5mL의 동일한 배지로 이동시킬 수 있다. 이러한 시스템은 10-30%의 다정자(polyspermic) 인공수정율로 대부분의 맷돼지에 대해서 일상적으로 20-30%의 배반포를 생산할 수 있다.

[0074] 선형의 핵산 구조체 또는 mRNA는 전핵 중 하나 또는 세포질에 주입될 수 있다. 그 다음, 주입된 난자(egg)를 수여자 암컷(recipient female)에게 (예를 들어, 수여자 암컷 난관으로) 전달할 수 있고, 수여자 암컷에서 형질전환 동물이 생산되도록 개발하는 것이 허용된다. 특히, 생체 외 수정된 배아는 퇴적 지질(sediment lipids)이 전핵의 시각화를 허용하기 위해 5분간 15,000Xg에서 원심분리할 수 있다. 배아는 Eppendorf FEMTOJET 주입기를 이용하여 주입될 수 있으며, 배반포가 형성될 때 까지 배양될 수 있다. 배아 분열(embryo cleavage) 확률, 배반포의 형성 및 질은 기록될 수 있다.

[0075] 배아는 비동기 수여자(asynchronous recipients) 자궁에 수술적으로 전달될 수 있다. 일반적으로, 100-200 (예를 들어 150-200)의 배아를 5.5인치의 TOMCAT[®] 카테터를 이용하여 난관의 자궁관폐대-자궁관잘록 접합점(ampulla isthmus junction)으로 위치시킬 수 있다. 수술 후, 임신의 실시간 초음파 검사가 수행될 수 있다.

[0076] 체세포 핵 전이에서, 배아의 할구(blastomere), 태아 섬유아세포(fetal fibroblast), 성체 귀 섬유아세포(adult ear fibroblast), 또는 상기 기재된 핵산 구조를 포함하는 과립막 세포(granulosa cell)와 같은 형질전환 우제류 세포(예를 들어, 형질전환 돼지 세포 또는 소(bovine) 세포)는 결합된 세포(combined cell)를 확립하기 위해 적출된 난모세포로 도입될 수 있다. 난모세포는 극체(polar body) 근처에서 투명대 절개(partial zona dissection)한 다음, 절개 영역에서 세포질을 눌러서 핵을 제거할 수 있다. 일반적으로, 날카롭고 비스듬한 텁을 가진 주입 피펫은 감수분열 2에서 저지된(arrested) 탈핵 난모세포에 형질전환 세포를 주입하는데 사용된다. 일부 관례에서, 감수분열 2에서 저지된 난모세포는 "에그(egg)"라고 한다. 돼지 또는 소 배아의 생후(예를 들어, 난모세포의 융합 또는 활성화에 의해), 배아는 약 20에서 24시간 후에 활성화(activation)된 수여자 암컷의 난관으로 전달된다. 예를 들어, Cibelli *et al.* (1998) *Science* 280, 1256-1258 및 미국특허 번호 6,548,741 참조. 돼지의 경우, 수여자 암컷은 배아의 전달 후 대략 20-21일에 임신을 확인할 수 있다.

[0077] 표준 육종 기술은 초기 이형접합 선조 동물로부터 타겟 핵산에 대한 동형접합 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 그러나, 동형접합성(homozygosity)은 필요하지 않을 수 있다. 본 명세서에 기재된 형질전환 돼지는 중요한 다른 돼지와 함께 사육될 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, 중요한 핵산 및 선택 마커는 별개의 전위인자에 제공될 수 있으며, 선택 마커를 함유하는 전위인자의 양이 중요한 핵산을 함유하는 전위인자의 양을 훨씬 초과하는(5-10배 과량), 같지 않은 양으로 배아 또는 세포에 제공될 수 있다. 중요한 핵산을 발현하는 형질전환 세포 또는 동물은 선택 마커의 존재 및 발현에 기반하여 분리될 수 있다. 전위인자는 정확하고 연관되지 않은 방법으로(독립적인 전이 결과) 계놈 안으로 통합될 것이기 때문에, 중요한 핵산 및 선택 마커는 유전적으로 연관되지 않으며 일반적인 번식을 통한 유전적 분리에 의하여 쉽게 분리될 수 있다. 따라서, 형질 전환 동물은 일부 공공안전 시각으로부터의 염려 논쟁에서, 다음 세대의 선택 마커 유지가 강요되지 않는다.

[0079] 일단 형질전환 동물이 생산되면, 타겟 핵산의 발현이 표준 기술을 이용하여 평가될 수 있다. 구조의 통합(integration)이 일어나는지 또는 일어나지 않는지를 측정하기 위해 서던 블롯(Southern blot) 분석에 의해 초기 스크리닝이 수행될 수 있다. 서던 분석의 설명의 경우, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Press, Plainview:NY 의 부문 9.37-9.52 참조. 또한, 종합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction; PCR) 기술은 초기 스크리닝에 사용될 수 있다. PCR은 타겟 핵산을 증폭시키는 과정 또는 기술을 나타낸다. 일반적으로, 중요한 또는 그 이상의 영역의 말단으로부터 서열 정보는 증폭되는 주형의 반대 가닥의 서열과 동일하거나 또는 유사한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 설계하기 위해 사용된다. PCR은 총 계놈 DNA 또는 총 세포의 RNA로부터의 서열을 포함하는, RNA 뿐만 아니라 DNA로

부터의 특이적 서열을 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 프라이머는 14 내지 40 뉴클레오티드 길이지만, 길이가 10 뉴클레오티드에서 수백의 뉴클레오티드 범위일 수 있다. PCR은 PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. Dieffenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995에 기술된다. 또한, 핵산은 리가제 사슬 반응 (ligase chain reaction), SDA(strand displacement amplification), 자가 유지 염기서열 복제(self-sustained sequence replication), 또는 NASBA(nucleic acid sequence-based amplified)에 의하여 증폭될 수 있다. 예를 들어, Lewis (1992) *Genetic Engineering News* 12,1 ; Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874; 및 Weiss (1991) *Science* 254: 1292 참조. 배반포 단계에서, 배아는 PCR, 서던 혼성화(Southern hybridization) 및 splinkerette PCR에 의한 분석을 위해 개별적으로 진행될 수 있다 (Dupuy *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:4495 참조).

[0080] 형질전환 돼지의 조직에서 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 발현은 동물로부터 얻은 조직 샘플의 노던 블랏 (Northern blot) 분석, 인시츄 혼성화 분석 (in situ hybridization analysis), 웨스턴 분석, 효소결합면역흡착측정법(enzyme-linked immunosorbent assays)과 같은 면역분석방법(immunoassays), 및 RT-PCR (reverse-transcriptase PCR)을 포함하는 기술을 이용하여 평가될 수 있다.

[0081] 간접 RNA

[0082] 다수의 간접 RNA (RNAi)가 알려진다. 이중-가닥 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA)는 상동 유전자 전사체의 서열-특이적 분해를 유도한다. RNA-유도 사이렌싱 복합체 (RNA-induced silencing complex, RISC)는 dsRNA를 작은 21-23-뉴클레오티드 작은 간접 RNA (siRNAs)로 대사작용한다. RISC는 이중 가닥 RNase (dsRNase, 예를 들어, Dicer) 및 ssRNase (예를 들어, Argonaut 2 또는 Ago2)를 함유한다. RISC는 절단 가능한 타겟을 탐색하기 위하여 안티센스 가닥을 가이드로 사용한다. siRNA 및 microRNA (miRNAs) 모두가 알려져 있다. 유전자 변형 동물에서 유전자의 비활성화 방법은 타겟 유전자 및/또는 핵산에 대한 RNA 간접을 도입하는 단계를 포함하며, 이에 따라 타겟 유전자 및/또는 핵산의 발현이 감소된다.

[0083] 예를 들어, 외인성 핵산 서열은 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 대한 RNA 간접을 유도할 수 있다. 예를 들어, 타겟 DNA에 상동한 이중-가닥 작은 간접 RNA (siRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA (shRNA)는 이 DNA의 발현을 감소시는데에 사용될 수 있다. siRNA에 대한 구조체는 기술된 바와 같이, 예를 들어 Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806; Romano 및 Masino (1992) *Mol. Microbial.* 6:3343; Cogoni *et al.* (1996) *EMBO J* 15:3153; Cogoni 및 Masino (1999) *Nature* 399:166; Misquitta 및 Paterson (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1451; 및 Kemlerdell 및 Carthew (1998) *Cell* 25 95:1017과 같이 제조될 수 있다. shRNA에 대한 구조체는 McIntyre 및 Famling (2006) *BMC Biotechnology* 6:1에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. 일반적으로, shRNA는 상보적인 부분을 함유하는 단일-가닥 RNA 분자으로 전사되며, 이는 어닐링 되어 짧은 헤어핀을 형성할 수 있다.

[0084] 특정 유전자로 유인되는 단일, 개개의 기능적 siRNA 또는 miRNA를 발견할 가능성은 매우 높다. siRNA의 특정 서열에 대한 예측가능성은 예를 들어 약 50%이지만 다수의 간접 RNA는 이중 1종 이상을 효과적일 것이라는 좋은 신뢰성으로 만들어진다.

[0085] 구현예는 성적 성숙을 위하여 선택된 신경 내분비 유전가에 대한 RNAi를 발현하는 *in vitro* 세포, *in vivo* 세포, 및 가축 동물과 같은 유전적 변형 동물을 포함한다. 구현예는 *Gpr54*, *Kiss1*, 및 *GnRHJ*로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자에 대한 RNAi이다. RNAi는, 예를 들어, siRNA, shRNA, dsRNA, RISC 및 miRNA로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0086] 유동성 시스템(Inducible systems)

[0087] 유동성 시스템은 성적 성숙 유전자의 발현을 조절하기 위해 이용될 수 있다. 다양한 유동성 시스템은 유전자의 발현의 시공적인 조절을 허용한다고 알려졌다. 몇몇은 형질전환 동물의 생체 내에서 기능이 입증되었다.

[0088] 유도성 시스템의 예는 핵산의 전사를 조절하는데 사용될 수 있는 테트라사이클린(tet)-on 프로모터 시스템이다. 이 시스템에서, 돌연변이된 Tet 억제제(Tet repressor; TetR)는 tet 또는 독시사이클린(doxycycline; dox)에 의해 조절되는 tTA(tetracycline-controlled transcriptional activator)를 생산하기 위해 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP 16 트랜스-활성제(trans-activator) 단백질의 활성 도메인에 융합된다. 항생제가 없는 상태에서, 전사는 최소화되는 반면, tet 또는 dox의 존재에서 전사는 유도된다. 대안적 유도성 시스템은 엑디손(ecdysone) 또는 라파마이신(rapamycin) 시스템을 포함한다. 엑디손은 곤충의 탈피호르몬으로서, 이의 생성물은 엑디손 수용체의 이형이량체 및 USP(ultraspiracle gene)의 생성에 의하여 조절된다. 발현은 엑디손 또는 무리스테론

A(muristerone A)와 같은 엑디손의 유사체를 처리하여 유도된다. 유도성 시스템을 유발하기 위해 동물에 투여되는 물질을 유도제라고 부른다.

[0089] 테트라사이클린-유도성 시스템 및 Cre/loxP 재조합효소 시스템(구성적 또는 유도성 각각의)은 유도성 시스템으로 더 일반적으로 사용되는 것이다. 테트라사이클린-유도성 시스템은 테트라사이클린-조절되는 트랜스활성제(tTA)/리버스 tTA(rtTA)를 포함한다. 생체 내에서 이러한 시스템을 사용하는 방법은 유전적으로 변형된 동물의 두 라인을 생성하는 것을 포함한다. 하나의 동물 라인은 선택된 프로모터의 조절 하에서 활성제(tTA, rtTA, or Cre recombinase)를 발현한다. 관심 유전자를 발현(또는 변형되는 유전자)하는 형질전환 동물의 다른 세트는 tTA/rtTA 트랜스활성제(또는 loxP 서열에 의해 프랭킹되는)를 위한 타겟 서열의 조절하에서 억셉터를 발현한다. 마우스의 두 종의 결합은 유전자 발현의 조절을 제공한다.

[0090] 테트라사이클린-의존적 조절 시스템(tet systems)은 테트라사이클린-의존적 상태에서 두 개의 구성요소, 예를 들어, 테트라사이클린-조절되는 트랜스활성제(tTA or 1iTA) 및 다운스트림 cDNA의 발현을 조절하는 tTA/rtTA-의 존적 프로모터에 의존한다. 테트라사이클린 또는 이의 유도체(독시사이클린과 같은)의 부재에서, tTA는 tetO 서열과 결합하고, tTA-의존적 프로모터의 전사적인 활성이 허용된다. 그러나, 독시사이클린의 존재에서, tTA는 그 것의 타겟과 상호작용하지 못하고, 전사는 발생하지 않는다. tTA로 사용되는 tet 시스템은 테트라사이클린 또는 독시사이클린은 전사의 하향 조절을 가능하게 하기 때문에, tet-OFF라고 한다. 테트라사이클린 또는 이의 유도체의 투여는 생체 내에서 형질전환유전자의 발현의 시간적 조절을 가능하게 한다. tTA의 변이체인 rtTA는 독시사이클린의 부재하에서 작동하지 않지만 전사촉진을 위한 리간드의 존재를 요구하지 않는다. 이 tet 시스템은 따라서 tet-ON이라고 한다. 이 tet 시스템은 생체 내에서 몇몇의 형질전환유전자, 인코딩 예를 들어, 리포터 유전자, 종양유전자 또는 신호전달계에 관여하는 단백질의 유도성 발현을 위해 사용되었다.

[0091] Cre/lox 시스템은 두 개의 멀리 있는 Cre 인식 서열 예를 들어, loxP 위치 사이의 크로스오버에 의한 위치-특이적 재조합을 촉진시키는 Cre 재조합효소를 사용한다. DNA 서열은 Cre-매개 재조합에 의해 삭제되는 두 loxP 서열(Boxde DNA라 불림) 사이에 도입된다. 형질전환 동물에서 공간적 조절(조직- 또는 세포-특이적 프로모터와 함께) 또는 시간적 조절(유도성 시스템과 함께)을 사용하는 Cre 발현의 조절은 두 loxP 위치 사이에서의 DNA 절단의 조절을 초래한다. 하나의 출원서는 조건부 유전자 불활성화(조건부 녹아웃)를 위한 것이다. 또 다른 방법은 박스형 종결 코돈이 프로모터 서열 및 관심있는 DNA의 사이에 삽입되는 것인, 단백질 과발현을 위한 것이다. 유전적으로 변형된 동물은 Cre가 발현되기 전까지 형질전환유전자를 발현하지 않는다. 이 시스템은 조직 특이적 종양 형성에 적용되고, B 림프구에서 항유전자 수용체 발현을 조절한다. 유도성 Cre 재조합효소가 또한 개발되었다. 유도성 Cre 재조합효소는 오직 외재성 리간드의 투여에 의해서만 활성화된다. 유도성 Cre 재조합효소는 원래의 Cre 재조합 효소 및 특이적 리간드-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. Cre 재조합 효소의 기능적인 활성은 융합 단백질에 있는 이 특이적 도메인에 결합할 수 있는 외부 리간드에 의존적이다.

[0092] 구현예는 유도성 시스템의 조절 하에서 성적 성숙을 위한 신경내분비 유전자의 선택을 함유하는 생체 외 세포, 생체 내 세포 및 가축 동물과 같은 유전적으로 변형된 동물을 포함한다. 동물의 유전적 변형은 게놈의 또는 모자이크일 수 있다. 일 구현예는 유도성 시스템의 조절하에 있는 *Gpr 54*, *Kiss 1*, 및 *GnRHI*로 구성되는 군으로부터의 유전자이다. 유도성 시스템은 예를 들어, Tet-On, Tet-Off, Cre-lox, 및 Hiflalpha으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0093] 우성 음성 (Dominant Negatives)

[0094] 따라서 유전자는 제거 또는 RNAi 억제에 의한 것뿐만 아니라 우성 음성 형질의 생성에 의해 불활성화될 수 있다. 유전자 생산물의 우성 음성 버전은 야생형 형질의 하나 또는 그 이상의 기능의 손실 및 같은 세포에서 지배적으로 정상 유전자 생산물의 발현을 방해하고, 그 결과 우성 음성 형질은 유전자의 정상 기능에 의해 유발될 것으로 예상되는 생리학적인 결과물을 효과적으로 감소 또는 불활성화한다. 예를 들어, 대부분의 단백질의 기능은 다른 단백질과의 상호작용을 요구한다. 이러한 상호작용은 종종 적절한 단백질 국소화, 리간드 결합, 단백질 활성, 또는 업스트림 신호의 다운스트림 형질도입이 필요하다. 멀티-단백질 복합체의 구성요소의 하나 또는 그 이상의 돌연변이는 이러한 과정의 하나를 방해할 수 있다. 따라서 단백질의 돌연변이 형태의 발현은 정상 유전자 생산물의 존재에도 불구하고, 독 "약" 또는 기어박스 속에서 "멍키 렌치"로 작용하여 단백질 기능을 방해할 수 있다. GPCRs은 다양한 단계로 단단히 조절된 메카니즘 및 정확한 GPCR 접힘 및 타겟화를 하게하기 위한 엄중한 퀄리티 컨트롤 시스템에서 세포 표면으로부터 생합성 과정을 통해 돌아다니는 일곱개-트랜스멤브레인(7TM) 도메인 수용체이다. 보조적인 단백질 또는 샤페론과 GPCRs의 연합은 ER(endoplasmic reticulum) 또는 골지를 통

한 앞으로 통행을 위한 중요한 단계이다. 그들이 합성되고, 접하고, 조립되는 곳인 ER에서 GPCRs의 수명은 시작된다. 세포 표면으로의 이들의 이동 동안, GPCRs은 성숙 상태를 달성하기 위해 번역 후 변형을 받는다. ER은 세포의 퀄리티 컨트롤 장치의 일부를 형성하기 때문에, 여기서 기능적으로 비활성화된 돌연변이 GPCRs은 세포 표면에서 발현하는 것을 방지할 수 있다.

[0095]

X-연관된 신장성 요붕증 (X-linked nephrogenic diabetes insipidus), 가족성 저칼륨뇨 고 칼슘혈증(familial hypocalciuric hypercalcemia). 가족성 글루코코티코이드 결핍증(familial glucocorticoid deficiency) 또는 고생식샘자극호르몬생식샘저하증 (hypergonadotropic hypogonadism)과 같은 상태는 ER 또는 골지 부위에서의 세포 내 보유를 초래하는 GPCRs에서의 돌연변이와 관련되어 있다. 수많은 경우에서 세포 표면 막 발현에서의 결함은 이것의 야생형 상태에서의 잘못 접힌 수용체의 우성-음성(DN) 효과와 함께 수용체의 세포 내 연합에 의해 야기된다; 이러한 DN 효과는 한정될 수 있고, 또는 심지어 폐기될 수 있고, 정상적인 수용체 세포막 발현을 따라서 기능상실변이 질환을 유발한다(Ulloa-Aguirre et al., 2004a).

[0096]

GnRHR에서 기능상실변이는 GnRH에 대응하기 위해 부분적인 또는 완전한 HH(hypogonadotropic hypogonadism), 뇌하수체 생식샘 자극세포(pituitary gonadotrope)의 고장으로 이어질 수 있고, 성선자극호르몬(gonadotropin) 분비 및 생식장애를 감소를 야기한다. 돌연변이의 많은 수는 환자에서 수용체의 잘못된 접힘 및 그 결과로 생긴 성선자극호르몬-분비 호르몬 수용체의 잘못된 경로로 부침으로 이어진다(Janovick et al., 2002; Leafios-Mirancla et al., 2002; Ulloa-Aguirre et al., 2004b). 이러한 돌연변이의 대부분은 GnRHR 기능을 위해 우성 음성으로의 역할을 한다(Pask AT et al., 2005 Mol Endocrinol; Brothers SP et al., 2004 Mol Endocrinol; Leafios-Mirancla A et al., 2003 J Clin Endocrinol Metab). 따라서 DN GnRHR 유전자의 목적 발현은 형질전환 동물에서 불임을 유발하는 것으로 예상된다

[0097]

논의된 것처럼 GPR54는 사춘기(puberty)를 시작하는 생식 캐스케이드의 계이트키퍼이다. 수많은 동물 연구는 키스펩틴(kisspeptins)이라고 불리는, 내인성 웨티드 리간드에 의한 GPR54의 참여가 시상하부의 신경세포에서 시상하부 뇌하수체 생식샘 축(hypothalamic-pituitary-gonadal axis)을 활성화시키기 위해 성선자극호르몬-분비 호르몬 분비를 강력하게 자극함을 입증한다. 또한, 인간 상태를 표현형 모사하고 있는 GPR54 KO 마우스의 특성에서 특발성 저생식샘 자극 호르몬 생식샘 저하증(idiopathic hypogonadotropic hypogonadism)의 생식 기능을 위한 GPR54의 필수적인 역할을 검증하였다. GPCRs은 현재 발현, 트랙픽킹, 리간드 결합 및 신호전달의 정확한 시간 및 공간 조절을 주는 GPCR-상호작용 단백질(GIPs)로 구성된 멀티 단백질 복합체로 존재하는 것으로 인식된다. GPR54는 이러한 GIPs와 특별히 상호작용하기로 결정되었다. 끝을 자른 GPCR 절편 변이체의 대부분은 우성 음성 돌연변이로 작용하기 때문에(Wise 2012, J Mol Signal), 하나 또는 그 이상의 트레스멤브레인 도메인이 결여된 GPR54의 발현은 내재성 GPR65의 처리/트래픽킹을 방해할 것으로 예상되고, 따라서 이의 기능을 함께 방해한다. 따라서 DN GPR54 유전자의 목적의식이 있는 발현은 형질전환 동물의 불임을 유발하는 것으로 예상된다.

[0098]

선조 동물, 동물 주, 형질 및 생식 (Founder animals, animal lines, traits, and reproduction)

[0099]

선조 동물은 본 명세서에 기술된 클로닝 및 기타 방법에 의하여 제조될 수 있다. 상기 선조는 접합자 (zygote) 또는 일차 세포가 동형 접합적 변형되는 경우, 유전자 변형에 대해 동형 접합적일 수 있다. 마찬가지로, 선조는 이형 접합적으로 제조될 수 있다. 선조는 계놈적으로 변형될 수 있으며, 이는 계놈 내의 모든 세포가 변형된 것을 의미한다. 선조는 변형에 대하여 모자이크 (mosaic)일 수 있으며, 일반적으로 포배기(blastocyst stage)의, 배아에서 복수의 세포 중 하나에 벡터가 도입될 때 일어날 수 있다. 모자이크 동물의 자손은 계놈적으로 변형된 자손을 확인하기 위하여 검사될 수 있다. 성적으로 변식이 가능하거나, 변식 기술을 이용하여 일괄적으로 변형을 발현하는 이형 또는 동형 자손으로 동물의 풀 (pool)을 형성할 때, 동물 주 (animal line)가 성립된다.

[0100]

가축에서, 많은 대립유전자는 생산 형질, 유형 형질, 가동성 형질(workability trait), 및 기타 기능적인 형질과 같은 다양한 형질과 연관되어 있음이 알려져 있다. 당업자는 이러한 형질을 관찰하고 정량화하는 것에 능숙하며, 예를 들어, Visscher et al., Livestock Production Science, 40 (1994) 123-137, US 7,709,206, US 2001/0016315, US 2011/0023140, 및 US 2005/0153317이다. 동물 주는 생산 형질, 유형 형질, 가동성 형질, 생식력 형질, 포육능력 형질(mothering trait), 및 질병 내성 형질로 이루어진 군의 형질로부터 선택된 형질을 포함할 수 있다. 추가적인 형질은 재조합 유전자 생성물의 발현을 포함할 수 있다.

[0101]

소정의 형질 또는 형질들을 가진 동물들은 이들의 성적 성숙을 막기 위해 변형될 수 있다. 동물들은 성숙될 때 까지 불임이기 때문에, 동물의 보급(dissemination)을 조절하는 수단으로 성적 성숙을 조절하는 것이 가능하다.

따라서, 하나 또는 그 이상의 형질들을 갖기 위해 번식되거나 변형된 동물들은 수여동물(recipients)에게 수여 동물이 동물을 번식시키고 그들에게 형질들의 유용성을 전용할 수 있게 감소된 위험으로 제공할 수 있다. 본 발명의 구현예들은 불활성화된 성적 성숙 유전자를 포함하는 변형된 동물의 유전체를 유전적으로 변형시키는 것을 포함하고 있으며, 여기서 야생형의 동물의 성적 성숙 유전자는 선별적인 성적 성숙을 위한 인자를 발현시킨다. 구현예들은 동물에서 성적 성숙을 유도하는 유전자의 발현 결핍에 의해 야기되는 결핍증을 치료하는 화합물을 투약함으로써 동물을 치료하는 것을 포함한다.

[0102] 성적 성숙을 유도하는 화합물의 투약을 요구하는 동물의 사육은 치료 시설에서 유리하게 이루어질 수 있다. 치료 시설은 일관된 동물을 효과적으로 생산하기 위해 잘-컨트롤된 스톡(stock)에서 표준화된 프로토콜을 수행할 수 있다. 동물 자손은 사육되기 위해 복수개의 장소에 분산될 수 있다. 농장과 농부들(목장과 목장 주인을 포함하는 용어)은 특정된 범위의 나이 및/또는 무게 및/또는 형질을 가진 소정의 수의 자손을 주문할 수 있고, 그들을 소정의 시간 및/또는 위치에 배송받을 수 있다. 그럼 다음, 수령인들, 예를 들어 농부들은, 그 동물들을 사육하고 그들을 그들이 바라는 시장으로 배송할 수 있다.

[0103] 구현예들은 선별적인 성적 성숙을 위해 불활성화된 신경내분비 유전자를 가지는 유전적으로 변형된 가축 동물을 배송하는 것을 포함한다(예를 들어, 하나 또는 그 이상의 위치로, 복수의 오프안(offann)으로). 구현예들은 약 1일 내지 약 180일 사이의 나이를 가진 동물들의 배송을 포함한다. 동물들은 1 또는 그 이상의 형질(예를 들어 소정의 형질 또는 고가치 형질 또는 신규한 형질 또는 재조합 형질)을 가질 수 있다. 구현예들은 또한, 상기 동물 및/또는 상기 동물을 번식하는 것을 포함한다.

[0104] 재조합효소(recombinases)

[0105] 본 발명의 구현예는 재조합효소 또는 DNA 재조합과 관련된 다른 DNA-결합 단백질을 포함하는 TALEN 또는 TALENs 또는 징크 평거 핵산가수분해효소에 대한 투여를 포함한다. 재조합효소는 핵산 단편과 함께 필라멘트를 형성하고, 사실상, 상기 서열과 실질적으로 동일한 DNA 서열을 찾기 위해 세포의 DNA를 찾는다. TALEN-재조합효소의 구현예는 HDR의 주형으로서 역할을 하는 핵산 서열과 재조합효소를 결합하는 단계를 포함한다. HDR 주형 서열은 TALEN/TALEN 상에 의한 절단을 위해 타겟된 위치에 상당한 상동성을 갖는다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, HDR 주형은 대립유전자의 배치, 삽입/결실의 생산, 외인성 DNA의 삽입, 또는 다른 변화에 의해 본래의 DNA의 변화를 제공한다. 본 명세서에 기재된 방법으로 TALEN은 단백질, mRNA로서, 또는 벡터를 사용하여 세포 또는 배아에 위치한다. 재조합효소는 HDR 주형과 결합하여 필라멘트를 형성하고 세포 한쪽에 위치한다. 재조합효소 및/또는 재조합효소와 결합하는 HDR 주형은 단백질, mRNA로서, 또는 재조합효소를 암호화하는 벡터와 함께 세포 또는 배아 한에 위치할 수 있다. 미국출원공개 2011/0059160 (미국출원번호 12/869,232)의 명세서는 모든 목적을 위해 참조로 본 명세서에 포함된다; 논쟁의 경우, 명세서는 조절된다.

[0106] 용어 재조합효소는 세포에서, 두 개의 비교적 긴 DNA 가닥 사이에서 상대적으로 짧은 DNA 조각을 결합시키는, 효소적으로 촉매작용을 하는 유전자 재조합 효소를 말한다. 재조합효소는 Cre 재조합효소, Hin 재조합효소, RecA, RAD51, Cre, 및 FLP를 포함한다. Cre 재조합효소는 loxP 위치 사이의 DNA의 위치-특이적 재조합을 촉진하는 PI 박테리오파지로부터 유래한 타입 I 토포이소머라제이다. Hin 재조합효소는 박테리아 살모넬라에서 발견된 198개의 아미노산으로 구성된 21kD 단백질이다. Hin은 DNA의 절단과 재결합을 시작하기 위해 활성 부위 세린에 의존하는 DNA 전화효소(invertases)의 세린 재조합효소 과(family)에 속한다. RAD51은 인간 유전자이다. 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 DNA 이중 가닥 절단의 복구를 돋는 RAD51 단백질 과의 일원이다. RAD51 과 일원은 박테리아 RecA 및 효모 Rad51 유전자에 상응한다. Cre 재조합효소는 loxP 부위에 의해 플랭킹되는 특정 서열을 제거하는 실험에 사용되는 효소이다. FLP는 빵 효모 (baker's yeast)인 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 2 μ 플라스미드로부터 유래된 플립파제(Flippase) 재조합 효소(FLP 또는 Flp)를 나타낸다.

[0107] RecA는 상동 재조합에 의한 이중 가닥 절단의 복구시의 가닥 교환(strand exchange)을 촉진시키기 위한 이의 재조합효소 활성에 대해 알려져 있다 (McGrew, 2003; Radding, et al., 1981; Seitz et al., 1998). RecA는 또한 예를 들어, LexA 및 λ 억제 단백질의, 단백질 분해(proteolysis)를 촉진하고, DNA-의존성 ATPase의 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 이온화 방사선 또는 다른 해를 끼치는 것으로부터 이중-가닥 절단이 발생한 후, 엑소뉴클레아제(exonuclease)는 DNA 말단 5'에서 3'의 뒤에서 상처를 내고, 이에 의하여 DNA의 한쪽 가닥을 노출시킨다(Cox, 1999; McGrew, 2003). 단일-가닥의 DNA는 단일-가닥 결합 단백질 (single-strand binding protein; SSB)에 의하여 안정화된다. SSB의 결합 후, RecA는 단일-가닥(ss) DNA를 결합하고, 나선형 핵 단백질 필라멘트

(필라멘트 또는 시냅스 전 필라멘트(presynaptic filament)라고도 함)를 형성한다. DNA 복구 동안, RecA의 상동-검색(homology-searching) 기능은 필라멘트를 상동의 DNA로 보내고, 상동성 염기쌍 및 가닥 교환을 촉진시킨다. 이것은 DNA 이형이중가닥(heteroduplex)을 형성한다. 가닥의 침입(invasion) 후, DNA 중합효소(polymerase)는 상동의 DNA 주형을 기반으로 ssDNA를 연장하여 DNA 절단을 복구하고, 교차(crossover) 구조 또는 홀리데이 접합점(Holliday junctions)을 형성한다. 또한, RecA는 교차 구조의 이동에 참여하는 운동 기능을 보여준다(Campbell and Davis, 1999).

[0108]

재조합효소 활성은 많은 다른 기능을 포함한다. 예를 들어, 재조합 효소 활성을 갖는 폴리펩티드 서열은 단일-가닥 DNA에 비-서열-특이적 방법으로 결합하여 핵단백질(nucleoprotein) 필라멘트를 형성할 수 있다. 이러한 재조합-결합된 핵단백질 필라멘트는 이중-가닥의 DNA 분자와 함께 비-서열-특이적 방법으로 상호작용하여, 필라멘트에서 동종 서열인 이중-가닥의 분자에서 서열을 찾을 수 있으며, 이러한 서열이 확인되는 경우, 이중-가닥의 분자의 가닥 중 하나를 치환하여, 필라멘트의 서열 및 이중 가닥의 분자의 가닥 중 하나의 상보적 서열 사이의 염기쌍을 허용한다. 이러한 단계는 총괄하여 "시냅시스(synapsis)"를 의미한다.

[0109]

RecA 및 RecA-유사 단백질(많은 진핵 생물에서 Rad51이라고 불림)은 다양한 진핵 시스템에서 타겟 유전자 및 상동 재조합을 자극시키기 위해 조사되어 왔다. 담배 세포에서, 핵 국소화 신호(nuclear localization signal; NLS)를 포함하는 박테리아 RecA의 발현은 상동 재조합 및 체세포 염색체 내 재조합(상동 염색체 사이의 재조합)에 의한 미토마이신 C-유도된 DNA 손상의 복구를 3에서 10배로 증가시킨다(Reiss et al., 1996). 또한, 담배에서 NLSRecA의 발현은 야생형 수준에 비해 2.4배 이상 차례 염색분체 교환을 자극할 수 있다(Reiss et al., 2000). 체세포 포유동물 세포에서, NLSRecA의 과발현은 상동 재조합에 의한 유전자-타겟화를 10배 자극한다(Shcherbakova et al., 2000). 그러나, 인간 세포에서, RecA의 인간 상동체(homologue)인, hRAD51의 과발현은, 항생제 내성 하에서 야생형 수준에 비해 오직 2 내지 3배 이상 재조합을 자극한다(Yanez, 1999). 제브라피시(zebrafish)에서, 증가된 녹색형광단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP)의 돌연변이체 형태는 ssDNA-RecA 필라멘트를 직접 주입하는 것에 의해 낮은 빈도로 수정되었다(Cui, 2003). Rad51 상위(epistasis) 그룹의 일원인 Rad52는 또한, 돌연변이된 올리고뉴클레오티드를 이용하여 제브라피시에서 단일-가닥 어닐링 및 낮은 수준의 유전자 불활성화를 촉진한다(Takahashi, 2005). 종합하면, 이러한 연구들은 RecA 또는 Rad51의 이소성(ectopic) 발현이 상동 재조합의 적당한 자극이 되지만, 유전자-타겟화에 유용하기에는 충분한 수준으로 증가시키지 않는다는 것을 나타낸다.

[0110]

따라서 재조합효소 활성은 단일-가닥 DNA-결합, 시냅시스, 상동 검색, 단일-가닥 DNA에 의한 이중가닥(duplex) 침입, 이형이중가닥 형성, ATP 가수분해 및 단백질분해를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 원형의(prototypical) 재조합효소는 대장균(*E. coli*)으로부터 유래한 RecA 단백질이다. 예를 들어, 미국특허번호 4,888,274에 나타난다. 또한, 원핵 RecA-유사 단백질은 살모넬라(*Salmonella*), 간균(*Bacillus*) 및 프로테우스(*Proteus*) 종에서 기재되어 있다. 테르무스 아쿠아티кус(*Termus aquaticus*)로부터의, 내열성 RecA 단백질은 미국특허번호 5,510,473에 기재되었다. RecA의 박테리오파지 T4 상동물인 UvsX 단백질이 기재되어 있다. 변환된 재조합효소 활성을 갖는 RecA 돌연변이는, 예를 들어, 미국특허번호 6,774,213; 7,176,007 및 7,294,494에 기재되어 있다. 식물 RecA 상동물은 예를 들어, 미국특허번호 5,674,992; 6,388,169 및 6,809,183에 기재되어 있다. 재조합효소 활성을 함유하는 RecA 단편은 예를 들어, 미국특허번호 5,731,411에 기재되어 있다. 예를 들어, RecA803과 같은 향상된 재조합효소 활성을 갖는 돌연변이체 RecA 단백질이 기재되어 있다. 예를 들어, Madiraju et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6592-6596에 나타난다.

[0111]

또한, 재조합효소 활성을 갖는 RecA의 진핵생물의 상동물은, 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 처음으로 확인된 Rad51 단백질이다. Bishop et al., (1992) *Cell* 69: 439-56 및 Shinohara et al., (1992) *Cell*: 457-70 Aboussekha et al., (1992) *Mol. Cell. Biol.* 72:3224-3234. Basile et al., (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 3235-3246 참조. 식물 Rad51 서열은 미국특허번호 6,541,684; 6,720,478; 6,905,857 및 7,034,117에 기재되어 있다. RecA와 상동성인 다른 효모 단백질은 Dmc1 단백질이다. 대장균(*E. coli*) 및 *S. cerevisiae*가 아닌 다른 유기체의 RecA/Rad51 상동물이 기재되어 있다. Morita et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6577-6580; Shinohara et al. (1993) *Nature Genet.* 4:239-243; Heyer (1994) *Experientia* 50:223-233; Maeshima et al. (1995) *Gene* 160: 195-200; 미국특허번호 6,541,684 및 6,905,857.

[0112]

본 명세서에서, "RecA" 또는 "RecA 단백질"은 필수적으로 모두 또는 대부분의 동일한 기능을 갖는 RecA-유사 재조합 단백질의 과(family)를 의미한다: 특히, (i) DNA 중합효소에 의한 차후 연장에 대해 이들의 상동 타겟 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 적절하게 배치하는 능력; (ii) DNA 합성을 위해 이중가닥 핵산을 위상적으로(topologically) 재조하는 능력; 및, (iii) 상보적 서열 (complementary sequences)을 효율적으로

찾고 결합하는 RecA/올리고뉴클레오티드 또는 RecA/폴리뉴클레오티드 복합체의 능력. 가장 특징적인 RecA 단백질은 대장균으로부터 유래한 것이고; 단백질의 원래의 대립유전자 형태 이외에도 예를 들어, RecA803과 같은 많은 돌연변이 RecA-유사 단백질이 확인되었다. 또한, 많은 유기체들은 예를 들어, 효모, 초파리(*Drosophila*), 인간을 포함하는 포유동물, 및 식물을 포함하는, RecA-유사 가닥-전이 단백질을 가진다. 이러한 단백질은 예를 들면, Reel, Rec2, Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Rad51E, XRCC2 및 DMC1를 포함한다. 재조합 단백질의 일 구현에는 대장균의 RecA 단백질이다. 대안적으로, RecA 단백질은 대장균의 돌연변이체 RecA-803 단백질, 다른 박테리아 근원으로부터의 RecA 단백질 또는 다른 유기체로부터의 상동 재조합 단백질일 수 있다.

[0113] 재조합효소 활성을 갖는 단백질의 추가적인 설명은, 예를 들어, Fugisawa *et al.* (1985) *Nucl. Acids Res.* 13:7473; Hsieh *et al.* (1986) *Cell* 44:885; Hsieh *et al.* (1989) *J Biol. Chem.* 264:5089; Fishel *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3683; Cassuto *et al.* (1987) *Mol. Gen. Genet.* 208:10; Ganea *et al.* (1987) *Mol. Cell Biol.* 7:3124; Moore *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11108; Keene *et al.* (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:3057; Kimec (1984) *Cold Spring Harbor Symp.* 48:675; Kimec (1986) *Cell* 44:545; Kolodner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5560; Sugino *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3683; Halbrook *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:21403; Eisen *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7481; McCarthy *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5854; 및 Lowenhaupt *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:20568에서 확인되며, 이들음 참조로 본 명세서에 포함된다. 또한, Brendel *et al.* (1997) *J. Mol. Evol.* 44:528을 참고한다.

[0114] 재조합효소 활성을 갖는 단백질의 예는 recA, recA803, uvsX, 및 다른 recA 돌연변이 및 recA-유사 재조합효소 (Roca (1990) *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 25:415), (Kolodner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:5560; Tishkoff *et al.* (1991) *Molec. Cell. Biol.* 11:2593), RuvC (Dunderdale *et al.* (1991) *Nature* 354:506), DST2, KEM1 및 XRN1 (Dykstra *et al.* (1991) *Molec. Cell. Biol.* 11:2583), STPa/DST1 (Clark *et al.* (1991) *Molec. Cell. Biol.* 11:2576), HPP-1 (Moore *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9067), 다른 진핵생물의 재조합효소 (Bishop *et al.* (1992) *Cell* 69:439; 및 Shinohara *et al.* (1992) *Cell* 69:457);를 포함하고; 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0115] 재조합효소 활성을 갖는 생체 외(*in vitro*)-진화된 단백질은 미국특허번호 6,686,515에서 기술되었다. 재조합효소에 관련된 추가적인 간행물은 예를 들어, 미국특허번호 7,732,585; 7,361,641 및 7,144,734를 포함한다. 재조합효소에 관한 검토는 Cox (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8173-8180를 참조한다.

[0116] 핵단백질(nucleoprotein) 필라멘트, 또는 "필라멘트"가 형성될 수 있다. 재조합효소에 의한 구조 형성의 맥락에서, 용어 필라멘트는 이 분야의 숙련자에게 알려진 용어이다. 이렇게 형성된 핵단백질 필라멘트는 다른 핵산과 함께 접촉되거나 또는 세포 안으로 도입될 수 있다. 필라멘트가 재조합효소 활성을 갖는 폴리펩티드 서열 및 핵산을 포함하는, 핵단백질 필라멘트의 형성 방법은, 당업계에 잘 알려져 있다. Cui *et al.* (2003) *Marine Biotechnol.* 5:174-184 및 미국특허번호 4,888,274; 5,763,240; 5,948,653 및 7,199,281의 내용은 재조합효소를 핵산에 결합하여 핵단백질 필라멘트를 형성하기 위한 예시적인 기술 공개를 목적으로 포함된다.

[0117] 일반적으로, 재조합효소 활성을 갖는 분자는 선형의, 단일-가닥 핵산과 접촉된다. 선형의, 단일-가닥 핵산은 프로브(probe)일 수 있다. 이러한 단일 가닥 핵산의 제조 방법은 알려져 있다. 반응 혼합물은 일반적으로 마그네슘 이온을 함유한다. 임의로, 반응 혼합물은 완충되고, 또한 임의로 ATP, dATP 또는 γ -티오-ATP (ATP- γ -S) 또는 예를 들어, γ -티오-GTP (GTP- γ -S)와 같은 비가수분해성(nonhydrolyzable) ATP 유사체(analogue)를 함유한다. 또한, 반응 혼합물은 임으로 ATP-발생(generating) 시스템을 함유할 수 있다. 이중-사슬의 DNA 분자는 필라멘트 형성 이전에, 또는 동안에 (예를 들어, 열 또는 알칼리에 의해) 변성될 수 있다. 재조합효소 대 핵산의 물비의 최적화는 당업계의 기술 내에 있다. 예를 들어, 일련의 다른 농도의 재조합효소는 일정한 양의 핵산에 침가될 수 있고, 필라멘트 형성은 아가로오스 또는 아크릴아미드 젤에서의 이동성에 의해 분석된다. 결합된 단백질은 폴리뉴클레오티드의 전기영동 이동성을 지연시키기 때문에, 필라멘트 형성은 핵산의 지연된 이동성에 의해 입증된다. 최대 지연 정도, 또는 지연된 이동성과 함께 이동하는 핵산의 최대 양을 사용하여, 최적의 재조합효소:핵산의 비율을 나타낼 수 있다. 또한, 단백질-DNA 결합(association)은 니트로셀룰로오스에 폴리뉴클레오티드의 결합 능력을 측정하는 것에 의해 정량화될 수 있다.

[0118] 특히 출원서, 특히, 간행물 및 학술지 논문은 모든 목적을 위해 참조로 본원에 제시된 명세서에 포함된다; 논쟁의 경우, 명세서는 조절된다.

도면의 간단한 설명

[0119]

도 1은 성숙의 조절을 위하여 유전적으로 변형된 동물의 생산 및 이용하는 공정의 예시이다.

도 2: 시퀀싱에 의한 벨기에 블루 유전자이입의 확인. 와규(Wagyu) 야생형 GDF8 및 벨기에 블루 주형(BB-HDR)의 도식을 도 2에 나타낸다. 5개의 PCR 양성 콜로니의 상동 팔(homology arms, c 및 d)의 외부에 위치한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 다음 프라이머 b'로 클로닝 및 시퀀싱하였다. 야생형 서열의 비교는 5개의 콜로니 중 4개에서 벨기에 블루 대립유전자(이형접합체)의 예상된 11개의 염기쌍 결실 특성을 나타낸다.

도 3: TALEN을 암호화하는 mRNA 및 ssODNs을 이용한 하나의 종에서 다른 종으로 자연스럽게 발생하는 대립유전자의 유전자이입. 피에몬테 미오스타틴 C313Y를 오사보 내로 도입시켰다.

도 4: 타겟 유전자의 변형. 각 차트는 올리고 공여체(donor) 주형을 이용하여 섬유아세포의 특정 유전자좌(예를 들어, ssIL2RG; 서스 스크로파(Sus scrofa)에 대한 "ss" 및 보스 타우러스(Bos taurus)에 대한 "bt")를 타겟팅한 결과를 표시한다. (삽입된 도면) 음영 박스가 TALEN 결합 부위를 나타내고 스페이서는 흰색으로 나타낸 올리고 주형의 도면들. 3 일 및 10 일 째에 RFLP 분석으로 HDR을 측정하였다(Day3 %HDR 및 Day10 %HDR). 각 막대는 세 종복으로부터의 평균과 SEM을 표시한다.

도 5: TALEN 자극 HDR 대립유전자의 서열 분석. TALEN mRNA 및 올리고 형질전환 세포 집단 유래의 타겟 부위(200-250bp 총)를 플랭킹하는 PCR 앰플리콘들을 ILLUMINA 시퀀싱에 의해 시퀀싱하였다. 총 판독 수는 시료 당 10,000 내지 400,000 범위였다. 의도된 HR 판독 대 야생형 판독의 완벽한 카운트를 플롯팅하였다: 삽입(페널 a) 및 SNP 대립유전자(페널 b). 타겟 유전자좌, 시점 및 올리고에서 BM 포함 여부를 하기에 나타낸다. 페널 c). 타겟 SNP의 유전자이입을 위하여 분류된 btGDF8 및 p65로부터의 판독을 보여주고, 의도(iSNP) 대 추가 돌연변이와 이들(iSNP+Mut)로 분류하여 총 판독 수에 대하여 플롯팅하였다.

도 6: DAZL 및 APC의 HDR 대립유전자를 갖는 클론 돼지. (A) DAZL- 및 APC-변형 랜드레이스 및 오사보 섬유아세포 각각으로부터 유래된 클론 새기 돼지의 RFLP 분석. DAZL 선조에 대하여 예상된 RFLP 산물은 312, 242, 및 70 bp (열린 삼각형)이고, APC에 대한 것은 310, 221, 및 89 bp (채운 삼각형)이다. WT 및 DAZL 선조 간의 312- bp 밴드의 크기 차이는 예상된 결실 대립유전자를 반영한다. (B) 8 마리 중 3 마리 DAZL 선조 및 6 마리 중 6 마리 APC 선조에서 HDR 대립유전자의 존재를 확인하는 서열 분석. 공여체 주형(HDR)에서의 BM은 화살표로 표시하고, 삽입된 염기들은 블록으로 표시하였다. 상부 WT 서열에 있는 굵은 글씨체는 TALEN-결합 부위를 나타낸다.

도 7: 돼지 GPR54 및 녹아웃을 위한 유전자 타겟팅 전략의 개략도를 페널 a에 나타낸다. 돼지 엑손 3 (밑줄 친 부분)에 결합하도록 설계된 TALENs을, 전성숙 정지 코돈 및 HindIII 제한 부위가 도입되도록 설계된 올리고뉴를 레오티드 상동 주형(HDR)과 함께 공동-형질전환시켰다. 페널 b: 2 마이크로그램의 TALEN을 암호화하는 mRNA과 0.2 nMol의 HDR 주형을 돼지 섬유아세포 내로 형질전환시키고, 콜로니들이 나타날 때까지 배양하여 HindIII RFLP 분석에 의해 상동 의존성 복구(homology dependent repair)를 분석하였다. PCR 결과들을 나타낸다; 각 레인은 하나의 콜로니를 나타낸다. 231 및 158bp의 결단 산물은 상동 의존성 회복을 가리킨다. 389bp로 밴드가 있는 콜로니는 HDR, 녹아웃 대립유전자에 대한 이형접합체(열린 삼각형)로 분류되고, 이 밴드가 없는 것은 동형접합체(채운 삼각형)로 분류된다.

도 8: 페널 a: 틸라피아 kisspeptin을 암호화하는 mRNA 뉴클레오티드 및 추정 변역된 아미노산 서열. kiss 유전자의 구조적 구성은, 하나는 시그널 펩티드 및 kisspeptin 전구체의 일부 모두를 암호화하고 다른 하나는 kisspeptin-10 서열을 포함하는 전구체의 나머지를 암호화하는 두 개의 코딩 엑손들을 보존하고 포함한다. 틸라피아(tilapia) kiss mRNA의 인트론의 위치는 삼각형 모양으로 표시된다. 타겟 부위(442bp)의 PCR 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머 위치. TALENs의 두 설계된 쌍의 결합 부위인 kiss1.1a 및 Kiss1.1b은 검은 색과 회색 상자로 표시된다. 페널 b는 kiss펩틴-10 생물학적 활성 펩티드 및 각 kiss1.1a 및 1b 인식 부위의 위치를 나타내는 타겟 kiss 계획 영역의 개략도를 보여준다. indel의 분석을 위한 PCR(442bp) 및 qPCR 프라이머 쌍(138bp 앰플리콘)도 표시된다.

도 9: 페널 a: 틸라피아 GPR-24를 암호화하는 mRNA 뉴클레오티드 및 추정 변역된 아미노산 서열. kissr 유전자의 구조적 구성은, 5 개의 코딩 엑손들을 보존하고 포함한다. 모든 4 개의 인트론의 위치는 삼각형 모양으로 표시된다. KissRE2 및 KissRE3 TALENs 타겟 유전자좌는 코딩 엑손 2(흰색 상자) 및 3(회색 상자)에 각각 위치한다. 센스 왼쪽 및 안티센스 오른쪽 TALEN 제한 부위의 위치는 상자들로 표시된다. 페널 b는 인트론

(Stroked goalpost), KissRE2 및 RE3 유전자좌(흰색 상자)를 함유하는 코딩 엑손 2 및 3(검은색 화살표)의 위치를 나타내는 텔라파아 GPR-24 게놈 영역의 개략도를 보여준다. PCR 및 qPCR 분석에 이용되는 프라이머들의 위치 및 해당 앰플리콘의 크기도 표시된다.

도 10: kiss 및 kissRE3 유전자좌를 함유하는 100-120 bp qPCR 산물의 용융 분석. 패널 a 및 b는 kiss1.1a 및 KissRE3 TALENs 쌍이 처리된 어류의 지느러미에서 추출된 gDNA로부터 생성된 앰플리콘의 용융 커브를 보여준다. 일반 화살표는 비처리된 어류(점선 화살표)와 해당 후보 돌연변이 어류 kiss#41, RE3#1, 4, 6 및 11로부터 얻은 것 이상의 유의한 차이가 있는 용융 프로파일(패널 a) 또는 (패널 b)를 가리킨다. 패널 c: 타겟 Kiss 유전자좌를 함유하는 442bp 게놈 세그먼트는 TALEN 처리 어류 #41로부터 PCR-증폭되었다. 상기 PCR 산물을 TOPO 2.1 TA 벡터(Invitrogen)에 클로닝하고, 형질전환체 콜로니를 포착하여 직접 qPCR 분석하였다. 일반 화살표는 kiss 유전자좌에 있는 상이한 결손들을 함유하는 콜로니로부터 획득된 선별 용융 프로파일을 가리킨다. 패널 d: 클로닝된 다양한 돌연변이들을 보다 가시화하기 위하여, 본 발명자들은 본 QPCR 콜로니 스크리닝을 Ct 대 용융 온도 산포도로 그레프화하였고, 각 E.Coli 콜로니는 그의 Ct를 나타내는 x 및 그의 용융을 나타내는 y인 데이터 포인트(x, y)로 표시된다. 그레프는 어류 RE3#4로부터 증폭된 702bp PCR 단편을 함유하는 콜로니들을 나타낸다. 하기 용융 온도는 타겟 부위에 다양한 결손들이 있는 kissRE3 앰플리콘을 함유하는 모든 야생형 서열의 그것보다 낮았다. Cts: Cycle thresholds.

도 11: kiss 유전자(위치 kiss1.1a)(패널 a) 및 kissR 유전자 위치(KissRE3)(패널 b)에서 설계된 TALENs에 의해 유도된 체세포 돌연변이의 설명. 야생형 서열은 어두운 회색으로 굵게 강조한 센스 왼쪽 및 안티센스 오른쪽 TALEN 인식 요소 부위 및 밑줄로 강조한 센스 스페이서가 있는 각 패널의 상부에 나타낸다. 결손들은 대시로 나타내고 삽입은 소문자의 밝은 회색으로 강조하였다. 각 indel 돌연변이에 의하여 유발된 길이의 순 변화(net change)는 각 서열의 오른쪽에 있다(+, 삽입; -, 결실). 약간의 변경은 서열의 결실 및 삽입 모두에 있다. 각 돌연변이 대립유전자가 분리된 횟수는 팔호 안에 표시된다.

도 12: 패널 a: KissRE3#11의 두 형제 자손으로부터의 PCR 산물의 선별된 시퀀싱 크로마토그래피. 이러한 그레프는 동시에 kissRE3 돌연변이체 및 WT 대립유전자를 판독하는 돌연변이의 존재를 나타낸다. 사각형들은 돌연변이 및 WT 대립유전자 상의 일치하는 뉴클레오티드를 나타내고 화살표는 서열이 분기되고 이러한 결실이 시작되는 위치를 나타낸다. 돌연변이를 특성화하기 위하여, 본 발명자들은 서암에서 독특한 뉴클레오티드 판독 패턴을 분석하였다(크로마토그래피가 상기 백그라운드 비 중복 뉴클레오티드 판독을 보이는 경우). WT 서열 및 증가된 크기 결손 서열의 이동으로 인해, 본 발명자들은 7 pb 및 5 pb 결손이 이러한 크로마토그래피 상에서 단일 뉴클레오티드 판독의 패턴을 재생산한다는 것을 발견하였다. 패널 b: kiss 유전자(kiss1.1a 위치, 상부)(패널 a) 및 kissR 유전자(KissRE3 위치, 하부)에서 설계된 TALENs에 의해 유도된 모든 유전된 indel 돌연변이의 설명. 야생형 서열은 어두운 회색으로 굵게 강조한 센스 왼쪽 및 안티센스 오른쪽 TALEN 인식 요소 부위 및 밑줄로 강조한 센스 스페이서가 있는 상부에 나타낸다. 결손들은 대시로 나타낸다. 각 indel 돌연변이에 의하여 유발된 길이의 순 변화(net change)는 각 서열의 오른쪽에 있다(-, 결실). 각 돌연변이 대립유전자가 분리된 횟수는 팔호 안에 표시된다. 패널 c: kiss 및 kissRE3 위치에서 발견된 가장 심각한 병변의 설명. kiss1.1a 유전자좌에서의 18nt 결실은 kisspetin-10 활성 웹티드(회색으로 강조)의 핵심 서열로부터 6 AA(밑줄) 3의 손실을 야기한다. kissRE3 유전자좌에서의 7nt 결실은 두 AA 치환하고 즉시 정지 코돈을 실시하여 유전자 산물의 유의한 변형을 야기한다. 결과물인 단백질은 214 AA에 의해 C-말단 절두(C-terminally truncated)된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0120] TALENs 생산을 포함하는 일반적인 기술은, 다른 지시가 없는 한, 일반적으로 미국 US2013/0117870호에 기술된 것에 의한다. 이러한 일반적인 기술들의 일부는 추가적으로 본 명세서에 기재된다. 또한, 특정 실시예들은 상세한 실험적 데이터 및 결과들을 제공한다.

실시예 1

[0122] TALEN 설계 및 생산: 일반적인 조건들. 후보 TALEN 타겟 DNA 서열 및 RVD 서열들을 온라인 툴인 "TAL EFFECTOR NUCLEOTIDE TARGETER"를 이용하여 식별하였다. 이어서, 최종 목적 벡터로서 pCGOLDYTALEN (Addgene ID 38143) 및 RCIscrip-GOLDYTALEN (Addgene ID38143)를 사용하여 골든 게이트 조립 프로토콜에 따라 TALEN DNA 형질전환 또는 인 버트로 TALEN mRNA 전사를 위한 플라스미드들을 제작하였다(Carlson 2012). PureLink® HIPURE MIDIPREP 키트 (Life Technologies)을 사용하여 최종 pC-GoldyTALEN 벡터를 제작하고 이를 전에 시퀀싱하였다.

QIAPREP SPIN MINIPREP 키트 (Qiagen)를 사용하여 제작된 조립 RCIScript 벡터는 이전에 표시된 바와 같이 mMESSAGE mMACHINE® T3 키트 (Ambion)를 사용하여 인 비트로 TALEN mRNA 전사를 위한 주형으로 이용되는 SacI에 의해 선형화된다. 이전에 기술한 바와 같이(Carlson 2012), 3'-0-Mem7G(5')ppp(5')G RNA 캡 아날로그(New England Biolabs), 5-메틸시티딘 트리포스페이트 슈도유리딘 트리포스페이트 (TriLink Biotechnologies, San Diego, CA) 및 아데노신 트리포스페이트 구아노신 트리포스페이트로 구성된 리보뉴클레오티드 카테일로 치환하는 RCIScript-GOLDYTALEN 벡터로부터 변형된 mRNA를 합성하였다. 최종 뉴클레오티드 반응 농도는 캡 아날로그에 대하여 6 mM, 구아노신 트리포스페이트에 대하여 1.5 mM, 및 기타 뉴클레오티드에 대하여 7.5 mM이다. 얻어진 mRNA는 정제전에 MEGACLEAR REACTION CLEANUP 키트 (Applied Biosciences)를 사용하여 DNase 처리하였다.

[0123] 조직 배양 및 형질전환: 돼지 또는 소 섬유아세포들을 10 % 소태아 혈청, 100 I.U./ml 폐니실린 및 스트렙토마이신, 및 2mM L-글루타민이 보충된 DMEM으로 5% CO₂에서 37 또는 30°C로 배양하였다(나타낸 바와 같이). 형질전환의 경우, 모든 TALENs 및 HDR 주형들은 특별한 언급이 없는 한 네온 형질전환 시스템(Life Technologies)을 사용하여 형질 전환을 통해 전달하였다. 간단히, 100% 컨플루엔시에 도달하여 저 계대배양한 오사보(Ossabaw), 랜드레이스(Landrace), 와규(Wagyu), 또는 홀스탁인(Holstein) 섬유아세포들을 1:2로 분할하고 다음날 70-80% 컨플루엔시에서 수집하였다. 각각의 형질 감염은 플라스미드 DNA 또는 mRNA 및 올리고가 혼합된 버퍼 "R"에 재현탁된 500,000-600,000 세포로 이루어졌고 하기 파라미터에 의한 I O O μ I 텁을 이용하여 전기영동하였다: 입력 전압; 1800V; 펄스 폭; 20ms; 및 펄스 숫자; 1. 일반적으로, TALEN 발현 플라스미드 2-4 μg 또는 TALEN mRNA 1-2 μg 및 목적 유전자에 특이적인 올리고 2-3 μM를 각 형질전환에 포함시켰다. 이들의 양으로부터의 편자는 도면 설명에 표시된다. 형질전환 후, 각각 30 또는 37°C에서 3 일 배양한 세포들을 60:40으로 6 웨л 접시 중 두 개의 분리된 웨로 분할하였다. 3 일 후, 세포 접단은 증식하였고, 37°C에서 적어도 10 일까지 교정의 안정성을 평가하였다.

[0124] 실시예 2 희석 클로닝.

[0125] 표시된 바와 같이, 희석 클로닝을 일부 경우에 이용하였다. 3 일 형질전환 후, 50 내지 250 세포들을 10cm 접시에 접종하고 각 콜로니가 직경 약 5mm에 도달 할 때까지 배양하였다. 이때, PBS에 1:5(vol/vol)로 희석된 TrypLE(Life Technologies) 6 ml을 첨가하고, 콜로니를 흡인하여, 24-웨л 접시의 웨에 옮기고 동일한 조건 하에서 배양하였다. 컨플루엔시에 도달한 콜로니들을 수집하고, 냉동 보관 및 유전자형분석을 위해 나누었다. 샘플 준비: 6-웨л 접시의 웨로부터 3 일 및 10 일에 형질전환된 세포 접단들을 수집하고, 10-30%를 단백질분해효소 K가 새로 보충된 50 μl의 IX PCR 호환 용해 버퍼: 10 mM Tris-CL pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.45% Tryton X-100(vol/vol), 트윈-20 (vol/vol)에 재현탁하였다. 상기 용해물을 하기 프로그램을 이용하는 열 사이클러로 처리하였다: 60 분 동안 55°C, 15 분 동안 95°C. 희석 클로닝으로부터의 콜로니 시료에 용해 완충액 20-30 μl를 사용하여 상술한 바와 같이 처리하였다.

[0126] 실시예 3 돌연변이 검출 및 RFLP 분석.

[0127] 의도된 부위를 플랭킹하는 PCR을 제조사의 지침에 따라, 세포 용해물 1 μl와 함께 POLYMERASE HIFI (Life Technologies)를 이용하여 실시하였다. 접단에서의 돌연변이 빈도를 제조사의 지침에 따라, PCR 산물 10 μl을 이용하여 SURVEYOR MUTATION DETECTION 키트 (Transgenomic)로 분석하였다. 표시한 제한 효소를 사용하여 상기 PCR 반응물 10 μl로 RFLP 분석을 실시하였다. SURVEYOR 및 RFLP 반응물을 10% TBE 폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리하고 에티듐 브로마이드 염색에 의해 가시화하였다. ImageJ를 사용하여 밴드들의 농도 측정을 실시하였다; Guschin 그룹(2010)에서 기재된 바와 같이 SURVEYOR 반응물의 돌연변이 비율을 계산하였다. 퍼센트 HDR는, 모 (parental) 밴드 + RFLP 단편의 합계 강도를 RFLP 단편의 합계 강도로 나누어 계산되었다. mloxP 삽입 분석을 위해, 삽입 부위를 스패닝한 저 PCR 산물들을 10% 폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리하고, 인서트 대 야생형 대립유전자는 크기에 의해 구별하고 정량화될 수 있다. PCR 산물이 IX MYTAQ RED Mix (Bioline)에 의해 증폭되고, 2.5 % 아가로스 젤에서 분리된 것을 제외하고 콜로니의 RFLP 분석을 유사하게 처리하였다. GDF8 G938A-단독 (신규한 RFLP이 부족한 올리고)의 유전자이입(introgression)을 위한 클론의 분석시, 이형접합체 및 동형접합체 유전자이입을 구별할 수 있는 세 프라이머 분석에 의해 콜로니들을 초기에 스크리닝하였다; 간단히, 돼지 또는 소 콜로니로부터의 용해물을 하기 프라이머 및 프로그램을 이용하여 IX MYTAQ RED MIX (Bioline)를 이용하는 PCR로 분석하였다. 소 GDF8 (Outside F1: 5'-CCTTGAGGTAGGAGAGTGTGTTGGG (SEQ ID NO: 3), Outside R1: 5'-TTC ACC AGAAGAC AAGGAGAATTGC (SEQ ID NO: 1), Inside F1: 5'-TAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGACTA (SEQ ID NO: 2); 및 35

사이클 (95°C, 20 s; 62°C, 20 s; 72°C, 60 s). 돼지 GDF8: Outside F1: 5'-CCTTTTTAGAACTCAAGGTAACAGACAC (SEQ ID NO: 4), Outside R1: 5'-TTGATTGGAGACATCTTGTGGAG (SEQ ID NO: 5), Inside F1: 5'-TAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGATTA (SEQ ID NO: 6); 및 35 사이클 (95°C, 20 s; 58°C, 20 s; 72°C, 60 s). 후보들로부터의 엠플리콘들을 직접적 및/또는 TOPO 클론 (Life Technologies) 시퀀싱하고 Sanger 시퀀싱에 의해 시퀀싱하였다.

[0128]

BB-HDR 주형과 함께 TALEN-매개 HDR을 검출하기 위하여, PCR-용해물(1,000 세포/u1)의 1:10 희석 1 μl 또는 10 μl을 PCR 프라이머 bt GDF8 BB 5-1 (프라이머 "c") 및 프라이머 "c" (BB-Detect 3-1- 5'-GCATCGAGATTCTGTACAATCAA(SEQ ID NO: 7))와 함께 PCR 반응에 첨가하여 IX MYTAQ RED MIX (Bioline)를 사용하여 40 사이클(9459 5°C, 20 s; 66°C, 20 s; 72°C, 60 s)의 PCR을 실시하였다. 상기 PCR에 의하여 식별된 콜로니의 HDR을 확인하기 위하여, 전체 유전자좌의 증폭을 프라이머 GDF8 BB 5-1 및 bt GDF8 BB 3-1로 실시한 후 TOPO 클로닝 및 시퀀싱을 수행하였다.

[0129]

실시예 4 시퀀싱에 의한 벨기에 블루 유전자이입의 확인.

[0130]

와규(Wagyu) 야생형 GDF8 및 벨기에 블루 주형(BB-HDR)의 도식을 도 2에 나타낸다. 5개의 PCR 양성 콜로니의 상동 팔(homology arms, c 및 d)의 외부에 위치한 프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 다음 프라이머 b'로 클로닝 및 시퀀싱하였다. 야생형 서열의 비교는 5개의 콜로니 중 4개에서 벨기에 블루 대립유전자(이형접합체)의 예상된 11개의 염기쌍 결실 특성을 나타낸다. TALENs(btGDF83.1) 및 dsDNA 주형(BB-HDR)은 이중-가닥 절단-유도(Double-Strand Break-induced) 상동 재조합에 의해 소 GDF8(벨기에 블루 돌연변이)의 엑손-3에 11개의 염기쌍 결실을 도입하도록 설계되었다. 좌측 TALEN에 대한 결합 부위의 절반은 BB-HDR 주형에서 없어지고, 따라서 TALEN 절단에 견뎌야 한다. SURVEYOR 어세이는 37°C 및 30°C 모두에서 btGDF83.1 TALEN의 활성을 설명한다. 대립유전자-특이적 PCR은 HDR 유도가 TALENs 및 BB-HDR 주형의 공-형질감염에 의존한다는 것을 설명한다. PCR 어세이는 프라이머 c 및 c'를 이용하여 HDR 변형된 GDF8 대립유전자를 특이적으로 검출하기 위해 개발되었다. 프라이머 c'의 3' 말단은 11개의 염기쌍 결실에 걸쳐있고, 야생형 대립유전자(wt)를 증폭할 수 없다. 500 개의 세포 등가물은 양성 대조군 "C"를 포함하는 각 PCR 반응에 포함되었다. HDR 백분율은 실험군과 대조군 반응 사이의 비교 밀도측정법(comparative densitometry)으로 측정하였다.

[0131]

실시예 5 야생형 와규 소에서 목적 유전자 정밀 변이(Precision alteration).

[0132]

유전자의 타겟 부위를 결실(11 bp 결실)시킴으로써 야생형 와규 소의 유전자를 변형시켰다. 이러한 변이는 와규 소가 벨기에 블루 소의 대립유전자를 갖도록 한다. 단독으로 형질감염되는 경우, btGDF8.1 TALEN 쌍은 타겟 유전자좌에서 염색체의 16%까지 절단하였다. TALENs(btGDF83.1) 및 dsDNA 주형(BB-HDR)은 DSB 유도된 상동 재조합에 의해 소 GDF8(벨기에 블루 돌연변이)의 엑손-3에 11개의 염기쌍 결실을 도입하도록 설계되었다. 좌측 TALEN에 대한 결합 부위의 절반은 BB-HDR 주형에서 없어졌고, TALEN 절단에 견뎌야 한다. SURVEYOR 어세이는 37°C 및 30°C 모두에서 btGDF83.1 TALENs의 활성을 입증하였다. 이 어세이에 사용된 PCR 산물은 프라이머 b 및 b'를 이용하여 생산되었다(미도시). BB-HDR 주형은 btGDF83.1 활성의 평가를 혼란스럽게 하기 때문에, 이러한 복제에 포함되지 않았다. 대립유전자 특이적 PCR은 HDR 유도가 TALENs 및 BB-HDR 주형의 공-형질감염에 의존하였다는 것을 설명하였다. PCR 어세이는 프라이머 c 및 c'를 이용하여 HDR 변형된 GDF8 대립유전자를 특이적으로 검출하기 위해 개발되었다(미도시). 프라이머 c'의 3' 말단은 11개의 염기쌍 결실에 걸쳐있고, 야생형 대립유전자 "wt"를 증폭할 수 없다. 500개의 세포 등가물은 양성 대조군 "C"를 포함하는 각 PCR 반응에 포함되었다. HDR 백분율은 실험군과 대조군 반응 사이의 비교 밀도측정법(comparative densitometry)으로 측정하였다. 벨기에 블루 소로부터의 1623bp DNA 단편을 품은 초나선형 DNA 주형과 함께 공-형질감염은 원하는 결과를 위해 선택없이 3일에 반-정량 PCR에 의해 암시된 것처럼 5% 까지의 유전자 변환 빈도(gene conversion frequency, HDR)를 가져온다. 이러한 결과는 TALENs를 사용하여 대립유전자를 포함하며 마커가 없는 가축에서 외인성 핵산 서열을 효과적으로 놓을 수 있다는 것을 설명하였다. 개개의 콜로니에서 배치의 빈도를 평가하기 위해, 전위인자 공통-내성 방법을 수행하여 DNA 서열분석을 위한 개개의 콜로니를 분리하고 확장하였다. 벨기에 블루 소로부터의 주형을 이용하여 유전자 변환이 PCR에 의해 측정된 366개 중 5개의 콜로니에서 검출되었다. 벨기에 블루 HDR 주형의 외부 프라이머와 함께 증폭 및 서열분석을 4개의 콜로니에서 예상된 11 bp 결실의 존재를 확인하였다.

[0133]

두번째 반복 실험은, 모든 테스트된 콜로니의 약 1%는 두개의 대립유전자 변환에 대하여 양성인 것으로, 모든

테스트된 콜로니의 약 0.5% 내지 약 1%는 대립유전자 변환에 대하여 이형접합체인 것인, 일관성 있는 결과로 실시되었다.

[0134] 유사하게, 또한, 올리고 HDR을 이용하여 대립유전자들을 돼지(오사보) 세포 내로 도입시켰다. 상기 세포들은, TALEN을 암호화하는 mRNA와 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 조합으로 변형시켜서 하나의 종에서 다른 종으로 자연스럽게 발생하는(interspecific migration, 이종간 이동) 대립유전자를 배치하였다. 피에몬테 GFD8 SNP C313Y를 예로 선택하여 오사보 돼지 세포 내로 도입시켰다. 모든 단계의 이러한 세포들은 어떠한 마커도 이용하지 않았다. 0.4 nmol ssODN에서 돼지와 소 세포 간의 HDR의 유사한 피크가 관찰되었으나(미도시), 오사보 섬유아세포에서 ssODN의 높은 농도에 의해 HDR은 소멸되지 않았다.

[0135] 실시예 6 의도된 타겟에서의 변형(Modification).

[0136] 타겟 유전자를 일관되게 변형시켰다. 도 4에 따르면, 각 차트는 올리고 공여체(donor) 주형을 이용하여 섬유아세포의 특정 유전자좌(예를 들어, ssIL2RG; 서스 스크로파(Sus scrofa)에 대한 "ss" 및 보스 타우러스(Bos taurus)에 대한 "bt")를 타겟팅한 결과를 표시하고 TALEN은 플라스미드 DNA 또는 mRNA로서 전달된다. (삽입된 도면) 음영 박스가 TALEN 결합 부위를 나타내고 스페이서는 흰색으로 나타낸 올리고 주형의 도면들. 각 올리고는 RFLP 분석을 위하여 신규한 제한 부위가 도입된 4-bp 삽입(ins4) 또는 결실(de14)를 함유한다. 추정되는 볼록킹 돌연변이(blocking mutations, BM)는 보존-1 티미딘(TALEN 결합 부위에 대해 상대적)을 표시된 뉴클레오티드로 대체한다. 그들의 유사한(cognate) 올리고-상동 주형 3 μ M와 함께 TALEN-암호화 플라스미드(3 μ g) 또는 mRNA(1 μ g)로 섬유아세포들을 형질전환시켰다. 37°C에서 10 일까지 중식 전에 세포들을 37°C 또는 30°C에서 3 일 동안 인큐베이션하였다. 3 일 째에 Surveyor 분석으로 TALEN 활성을 측정하였고(Day3 Surveyor), 3 일 및 10 일 째에 RFLP 분석으로 HDR을 측정하였다(Day3 %HDR 및 Day10 %HDR). 각 막대는 세 중복으로부터의 평균과 SEM을 표시한다. 각 타겟 유전자좌는 성공적으로 변형되었다.

[0137] 실시예 7 유전자에서 의도된 변화를 생성하는 고효율성.

[0138] 도 5는 유전자 APC, LDLR, p53, p65 및 btGDF8에 대해 생성된 변화의 분석을 보여준다. 일부 경우 삽입이 의도된 반면, SNP는 다른 경우에 의도되었다. 상술한 바와 같이 변화는 TALENs 및 HDR 주형으로 생성되었다. 의도된 HR 판독 대 야생형 판독의 완벽한 카운트를 플롯팅하였다: 삽입(패널 a) 및 SNP 대립유전자(패널 b). TALEN 자극 HDR 대립 유전자의 서열 분석을 실시하였다. TALEN mRNA 및 올리고 형질전환 세포 집단 유래의 타겟 부위(200-250bp 총)를 플랫킹하는 PCR 앰플리콘들을 ILLUMINA 시퀀싱에 의해 시퀀싱하였다. 총 판독 수는 시료 당 10,000 내지 400,000 범위였다. 타겟 유전자좌, 시점 및 올리고에서 BM 포함 여부를 하기에 나타낸다. 패널 c는 타겟 SNP의 유전자이입을 위하여 분류된 btGDF8 및 p65로부터의 판독을 보여주고, 의도(iSNP) 대 추가 돌연변이 와 이들(iSNP+Mut)로 분류하여 총 판독 수에 대하여 플롯팅하였다. 따라서, 나타낸 바와 같이, 단일 SNP가 의도된 경우에만, 추가적인 변화가 있었다.

[0139] 실시예 8 HDR 대립유전자를 갖는 콜로니의 회복에 대한 빈도.

[0140] HDR 대립유전자를 갖는 콜로니의 회복에 대한 빈도로 명명된 표 1은 8 분리 유전자좌에 있는 의도된 indel 대립유전자에 대한 세포의 약 650 콜로니 분석 결과를 나열한다. 분석은 교정에 대하여 콜로니 상동 32%인 10-64%의 회복율(평균, 45%)을 나타냈다. 상술한 바와 같이 변화가 TALENs 및 HDR 주형으로 생성되었다. 콜로니들은 약물선택없이 희석 클로닝하여 얻었다.

[0141] 실시예 9 DAZL 및 APC의 HDR 대립유전자를 가진 콜론 돼지.

[0142] 도 6은 클론 동물의 유전적 분석을 보여준다. 돼지 개놈에 있는 두 유전자-교정 유전자좌인 DAZL(deleted in azoospermia-like) 및 APC(adenomatous polyposis coli)를 선택하였다. DAZL 또는 APC의 HDR-또는 NHEJ 교정된 대립유전자로 처리된 배양 세포의 콜로니들을 CT(chromatin transfer)에 의해 클로닝하기 위해 풀링하였다. 각 풀은 세 트랜스퍼들로부터 두 임신으로 산출하였고 각 임신은 기간에 실시되었다. DAZL-변형 세포로부터 총 8 마리의 새끼 돼지가 태어났고, 각각은 NHEJ로 인해 발생된 HDR 대립유전자(선조 1650, 1651, 및 1657) 또는 결

실과 일치하는 선택된 콜로니들의 유전자형을 반영한다(도 5A). 3 마리 DAZL 새끼 돼지(선조 1655-1657)는 사산되었다. APC-변형 세포로부터의 6 마리 새끼 돼지 중 하나는 사산되었고, 3 마리는 1 주내에 사망하였으며, 1 마리는 3 주 후에 사망하였고, 선조 1661만이 살아있다. 유전자형과 생존 사이의 상관 관계의 결여는 조기 사망이 유전자 교정보다는 클로닝과 관련되어 있다는 것을 시사한다. 모든 6 마리 APC 새끼 돼지는 의도된 HDR-교정 대립유전자에 대한 이형접합체였고, 하나를 제외한 모든 새끼 돼지들은 두 번째 대립유전자에서 3 bp의 프레임 삽입 또는 결실을 가졌다(도 6a 및 b). 나머지 동물들은 정자형성 억제(DAZL-/- 선조) 또는 대장암의 발달(APC +/- 선조)의 표현형 분석을 위하여 사육되고 있다. 도 6에 따르면, (a) DAZL- 및 APC-변형 랜드레이스 및 오사보 섬유아세포 각각으로부터 유래된 클론 새끼 돼지의 RFLP 분석. DAZL 선조에 대하여 예상된 RFLP 산물은 312, 242, 및 70 bp (열린 삼각형)이고, APC에 대한 것은 310, 221, 및 89 bp (채운 삼각형)이다. WT 및 DAZL 선조 간의 312-bp 밴드의 크기 차이는 예상된 결실 대립유전자를 반영한다. (b) 8 마리 중 3 마리 DAZL 선조 및 6 마리 중 6 마리 APC 선조에서 HDR 대립유전자의 존재를 확인하는 서열 분석. 공여체 주형(HDR)에서의 BM은 화살표로 표시하고, 삽입된 염기들은 블록으로 표시하였다. 상부 WT 서열에 있는 굵은 글씨체는 TALEN-결합 부위를 나타낸다.

[0143] 실시예 10 GPR54 녹아웃(knockout).

도 7은 표시된 유전자 타겟팅 전략에 따라 제조된 GPR54 녹아웃을 나타낸다. 돼지 엑손 3 (밀줄 친 부분)에 결합하도록 설계된 TALENs을, 전성숙 정지 코돈(박스) 및 HindIII 제한 부위가 도입되도록 설계된 올리고뉴클레오티드 상동 주형(HDR)과 함께 공동-형질전환시켰다. 패널 b에 상기 실험 결과들을 나타내고, 2 마이크로그램의 TALEN을 암호화하는 mRNA과 0.2 nMol의 HDR 주형을 NEON nucleofection system (Life Technologies)을 이용하여 500,000 돼지 섬유아세포 내로 다음과 같이 형질전환시켰다: 1 펄스, 1800 v; 20 ms 폭 및 100 uL 텁. TALENs에 대한 노출 3일 후 세포들을 30°C에서 3 일 동안 배양하고, 10 cm 접시에 1-20 세포/cm²의 밀도 범위로 플레이팅하였다. 직경 3-4 mm의 각각의 콜로니들이 나타날 때까지, 세포를 10-15일간 배양한다. 각 콜로니를 온화한 흡인하에 p-200 피펫으로 흡인하고, 500 μL의 생장 배지(Carlson, Garbe et al. 2011)가 포함된 24-웰 플레이트의 각 웰에 방출한다. 여러 콜로니로부터의 세포의 흡인을 제한하기 위하여 명확하게 확인된 콜로니(~10-30 / plate)의 플레이트를 선발하였다. 콜로니가 24-웰 접시에 70-90퍼센트의 컨플루엔시에 도달하는 경우, 일부를 RFPL 분석을 위해 회수하고, 나머지는 냉동 보존한다. 패널 b) 총 96 콜로니를 HindIII RFLP 분석에 의해 상동 의존성 복구(homology dependent repair)를 분석하였다. 각 콜로니로부터의 DNA를 타겟 부위를 플랭킹하는 PCR 프라이머를 포함하는 PCR 반응에 첨가하였다; 정방향 (5'-aaggatgtcagcacctctctggg (SEQ ID NO : 8)) 및 역방향 (5'-ACCCACCCGGACTCTACTCCTACCA (SEQ ID NO : 9)). PCR 산물(389 bp)에 HindII 제한 효소를 첨가하고, 2.5% 아가로스 젤에서 분리시켰다. 각 레인은 하나의 콜로니를 나타낸다. 231 및 158bp의 절단 산물은 상동 의존성 회복을 가리킨다. 389bp 모 밴드가 있는 콜로니는 HDR, 녹아웃 대립유전자에 대한 이형접합체(열린 삼각형)로 분류되고, 이 밴드가 없는 것은 동형접합체(채운 삼각형)로 분류된다. 상기 세포들 또는 본 기술에 의해 제조된 세포들은 통상적인 기술을 이용하여 동물을 클로닝하는 데 사용될 수 있다.

[0145] 실시예 11 처리없이 성숙되지 않은 가축의 생산.

[0146] GPR54 녹아웃(들)인 가축은 소, 돼지 및 닭을 포함하여, 제작될 수 있다. 상기 예는 하나의 과정에 대한 설명이다. 다음의 구체적인 방법은 돼지에 대해 기재된다; 숙련자는 본 명세서를 읽은 후 다른 가축에 대한 실험에 적용할 수 있을 것이다. Gpr54에 대한 TALENs은 개발되어 이형 및 동형 접합성 녹아웃 세포주를 생성하는 데 사용될 것이다. 수컷 및 암컷 *Gpr54*^{-/-} 및/또는 이종 교배에 의하여 생산된 *Gpr54*^{-/-} 동물과 함께 *Gpr54*^{+/+}에 대하여 이형접합체인 세포주를 이용하여 임신을 확립할 수 있다. *Gpr54*^{-/-} 동물의 개발과 생식력을 평가할 수 있다. 성숙기를 진행하지 않고 불임시킨 *Gpr54*^{-/-} 동물들을 확립한 후, 성선자극호르몬 또는 GnRH1 처리에 의해 생식력을 회복시키는 실험들을 실시할 수 있다. 본 명세서에 사전-입증된 효과적인 TALENs를 생성하는 능력, 돌연변이 콜로니들을 분리하는 능력, 및 세포 또는 접합자로부터 형질전환된 동물들을 생산하는 능력을 잘 설명하고 있다 (참조 Tan et al., PNAS, 110(41): 16526-16531, 2013).

[0147] *Gpr54*^{-/-} 수컷 및 암컷 돼지의 생산

[0148] 실시예 11에서 생산된 바와 같이, 양 대립유전자 모두에 구조이동 돌연변이(frame shift mutations)를 포함하는

10 개의 이중-대립유전자(bi-allelic) KO 수컷 및 암컷 클론들을 SCNT에 의한 클로닝을 위하여 풀링할 수 있다. 클로닝 두 차례(각 3 트랜스퍼)가 실시될 수 있다. 만약 첫번째 차례에서 *Gpr54*^{-/-}로 어떠한 임신도 확립되지 않은 경우, 두번째 클로닝을 *Gpr54*^{+/+} 세포로 실시할 수 있다. 결과물인 동물의 유전자형은 *Gpr54*의 타겟 영역의 시퀀싱에 의해 특성화될 수 있다. *Gpr54*^{+/+} 세포를 이용하여 클로닝하는 경우, *Gpr54*^{-/-} 동물들과 이종 교배하여 생산할 수 있다.

[0149] *Gpr54*^{-/-} 돼지의 표현형 평가. 5 월령에 시작하여 9 월령까지 *Gpr54*^{-/-} 동물들 및 연령-일치 대조군에 대한 테스토스테론 및 FSH(성별당 ≥ 3)의 혈청 수준을 2 주마다 측정하였다. 수컷의 경우, 고환 크기를 측정하여 체중 및 연령에 대해 플로팅할 수 있다. 9 월령에서, 만약 *Gpr54*^{-/-} 돼지가 암생형 대조군 동물로부터 유래되고, 혈청학적 또는 성숙기를 나타내는 행동적 특성(즉, 마운팅(mounting))을 나타내는 데 실패한 경우, 최소 하나의 수컷과 암컷을 희생하여 검증된 병리학자에 의해 생식 기관의 해부학적 및 조직학적 평가받을 것이다.

[0150] *Gpr54*^{-/-} 돼지에서의 생식력 회복에 대한 수단으로서의 *GnRH1* 주입 평가. 성선자극호르몬 또는 박동성 *GnRH1* 치료는 HH와 함께 인간의 생식력을 복원하기 위한 효과적인 치료이다(Buchter, D., Behre, H.M., Kliesch, S., and Nieschlag, E. (1998). 저고나도트로핀성경기능저하(hypogonadotropic hypogonadism)가 있는 남성을 위한 효과적인 치료제인 박동성 *GnRH1* 또는 인간 용모성 성선자극호르몬/인간 폐경성 성선자극호르몬: 42 사례 검토. Eur J Endocrinol 139, 298-303. 치료 중 하나가 성공하려면, 혈청 LH 및 테스토스테론의 수준에서 양성적인 반응이 나타나야 한다. 따라서, 본 발명자들은 *GnRH1* 주입에 대한 반응으로 LH 또는 테스토스테론의 전형적인 스파이크를 나타내는 *Gpr54*^{-/-}가 불임인자의 여부를 결정하기 위해 노력한다(Wise, T., Zanella, E.L., Lunstra, D.D., and Ford, J.J. (2000). 암생 돼지(boars)에서 RH1 및 *GnRH1* 길항제에 반응하는 성선자극호르몬, 테스토스테론 및 코르티솔의 상관 관계를 높고 낮은 난포-자극 호르몬 수치 선택로 선별하였다J Anim Sci 78, 1577-1590). 반복적인 혈액 채취를 위하여 경정맥 카테터를 대상 암생 돼지(n>3)에게 배치시켰다. 시료들을 20 분마다 수집하고 단일 볼루스(bolus)의 *GnRH1*(100 ng/kg 체중)을 120 분동안 투여할 수 있다. *GnRH1* 주입 후, 시료 채취 빈도는 LH 급증(surge)을 모니터링하기 위하여 30 분 동안 매 10 분마다 발생하고, 추가적으로 시료 채취 4 시간 동안 매 20 분마다 실시한다.

[0151] 우성 열성(Dominant Negatives)에 의한 유전자의 불활성화. 유사한 과정을 이용하여 유전자 중 하나 이상을 비활성화시키는 우성 열성을 발현시킬 수 있다. 또한, 예를 들어, 우성 네거티브를 암호화하는 트랜스포존은 적당한 트랜스포제에 의해 염색체 내로 삽입될 수 있다. 생식력을 회복하는 치료는, 예를 들어, 생식력 구조에 대한 약학적 샤퍼론(pharmacoperones)과 식이 치료일 수 있다.

[0152] 실시예 12

[0153] p65의 T1591C 부위를 오버랩핑하는 CRISPR gRNAs를 제작하여 유전자혼입을 평가하였다. 의도된 부위에서 이중-가닥 절단(double stranded breaks, DSBs)의 효율적인 생산이 관찰되었다. CRISPR/Cas9-매개 HDR은 3 일 째에 <6%였고 10 일 째에는 검출 한계 이하였다. TALENs이 SNP 부위에서 35 bp로 절단에도 불구하고, 변형 클론들의 회복은 TALENs보다 CRISPR-매개 HDR가 더 낮았다(표 1). 이러한 부위에서 TALENs에 의해 유도된 HDR의 수준에 도달하지 않았으나, 두번째 유전자좌인 sAPC14.2에서의 CRISPR/Cas9-유도 타겟팅의 분석이 보다 효율적이었다(-30% 대 60%). Tan et al., PNAS, 110(41): 16526-16531, 2013)을 참조한다. CRISPR/Cas9 엔도뉴클레아제들을 쳐치(Church) 실험실 시스템 및 방법(Mali P, et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339(6121):823-826)을 기반으로 하여 생성시켰다.

[0154] 실시예 13

[0155] 도 8에 따르면, kiss 유전자의 구조적 구성은, 하나는 시그널 웹티드 및 kisspeptin 전구체의 일부 모두를 암호화하고 다른 하나는 kisspeptin-10 서열을 포함하는 전구체의 나머지를 암호화하는 두 개의 코딩 엑손들을 보존하고 포함한다.

[0156] 틸라피아(tilapia) kiss mRNA의 인트론의 위치는 삼각형 모양으로 표시된다. 타겟 부위(442bp)의 PCR 증폭을 위한 정방향 및 역방향 프라이머 위치. TALENs의 두 설계된 쌍의 결합 부위인 kiss1.1a 및 Kiss1.1b은 검은 색과 회색 상자로 표시된다. 패널 b는 kiss웹틴-10 생물학적 활성 웹티드 및 각 kiss1.1a 및 1b 인식 부위의 위치를

나타내는 타겟 kiss 계놈 영역의 개략도를 보여준다. indel의 분석을 위한 PCR(442bp) 및 qPCR 프라이머 쌍(138bp 앰플리콘)도 표시된다.

[0157] 실시예 14 어류에서의 kiss 및 kissR 녹아웃.

[0158] A. TALEN 발현 벡터의 구성.

[0159] 구성을 나타내는 표

	Sense Left TALEN - Sense Spacer - Antisense Right TALEN
Kiss1.1a	ACAACCCCTCTCAGCCTT CGCTTGGAACGCT ACAATGGCTACATTTAC (SEQ ID NO: 10)
Kiss1.1b	CGCTTGGAACGCTACAAT GGCTACATTTACAGA AGAGCTGTTAAAGAGGCC (SEQ ID NO: 11)
KissR E2	CCCTTCACCGCCACCCCTT ACCCCCTCCCTGGATGG ATCTTTGGCAACTTCATGTGC (SEQ ID NO:12)
KissR E3	CTACCCCCCTGAAATCTCTT CGGCACCGAACCCCCA AAGTAGCCATGATTGTCAGC (SEQ ID NO: 13)

[0160]

[0161] 이용된 프라이머의 표

Target site	Primer Name	Primer sequence (5'-3')	Experiment	
KissRE2	QPCRE2 F	GCCACTGACATCATCTTCTTG	qPCR (112bp)	SEQ ID NO: 14
	QPCRE2 R2	GAAACAGAAAGTTGAAGTGG		SEQ ID NO: 15
KissRE3	QPCRE3 F	TCACCCCTGACTGCTATGAGTGG	qPCR (143bp)	SEQ ID NO: 16
	QPCRE3 R2	ATGAGTCAGTCGATAATGACACG		sequencing SEQ ID NO: 17
KissRE2	GKRE2F	TTATGAAAAGAAGAAAGGTG	PCR (622bp)	SEQ ID NO: 18
	GKRE2R	GCAGAGTTCGACCTACTTTCATTG		SEQ ID NO: 19
KissRE3	GKRE3F	TATACATAGCCCCATTTTC AGTG	PCR (702bp)	SEQ ID NO: 20
	GKRE3R	GGCAGCAGGTAGGCAGCAA		SEQ ID NO: 21
Kiss1.1a and b	KissF	GTCCTCTGCATTCAAGGAGA ACAG	PCR (442bp)	SEQ ID NO: 22
	KissR	CTAAAAGTATTTATTTACATAGT		SEQ ID NO: 23
Kiss1.1a	QPCRkissF	AGGCAGCTCCTTGCAATGAT	qPCR (138bp)	SEQ ID NO: 24
	QPCRkissR	AGAGAAGGGTGAAAACTTTT		sequencing SEQ ID NO: 25

[0162]

B. TALEN mRNA 합성

pT3Ts-TALEN의 MINIPREP DNA를 200 μ l 반응물에서 2 시간 동안 SacI-고충실도의 5-10x 유닛으로 절단시켰다. 제한 절단물에 8- μ l RNAsurecure(Ambion)을 처리하고 10 분 동안 60°C에서 인큐베이션하였다. DNA가 처리된 RNAsurecure를 MINI LUTE PCR cleanup 키트(Qiagen)를 이용하여 정제하고 10- μ l RNAase 무첨가 주입 버퍼(5 mM Tris C1, pH 7.5; 0.1 mM EDTA)에서 용출하였다. 선형화된 주형 1 μ g 및 mMESSAGE MACHINE T3 키트(Ambion)를 이용하여 합성 mRNA를 생성하고 37°C에 1.5 시간 동안 인큐베이션하였다. 터보 DNAase로 15 분간 처리 후 mRNA를 Ambion MEGACLEAR 키트를 사용하여 정제하고, 가열된 H2O 50- μ L로 2x 용출시켰다.

C. TALENs 쌍의 미세주입(Microinjection).

[0166] 각 TALEN 암(arm)을 암호화하는 RNA를 조합하고 10-200 ng/ μ L의 농도로 클레아제 무첨가 물에 재현탁하였다. 5-20-pL을 하나의 세포 단계 텔라피아 배아에 주입하였다. 비주입된 대조군에 대하여 주입된 배아의 생존을 수정 6 일 후 측정하였다. 50% 생존율을 얻는 RNA 농도를 반복/표준 주사에 이용하여 녹아웃을 생성하였다. 상기 주입된 배아들이 TALENs 유도 돌연변이유발로 인해 사망하는지를 확인하기 위하여, 변형된 태아를 수집하고, 타겟 부위에서의 돌연변이를 QPCR 멜트 프로파일 분석을 이용하여 조사하였다.

[0167] D. 대조군 및 RNA 처리 텔라피아의 조직 수집 및 DNA 추출.

[0168] 6 일령 RNA 처리 배아(변형)들을 탈융모막 마비시키고 난황은 면도날을 사용하여 제거하였다. 배아 조직을 용해 벼파; 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.5% SDS, 100 mg/ml proteinase K로 밤새 분해시키고 whatmanTM unifilter 800, 96 웰 플레이트 (GE Healthcare, UK)를 이용하는 자동화 Research X-tractor, Corbett robotic system으로 추출하였다. 미세주입으로 생존하고 정상적으로 발달(~50% 생존율을 갖는 그룹에서)한 배아는 1 월령까지 사육하고 마비시켰다; 지느러미를 클립핑하고 개별 단지에 배치시키면서 이들의 지느러미 DNA를 분석하였다(상술한 바와 같이 용해 벼파에서의 밤새 분해 후 DNA 추출). kiss나 kissR 유전자좌에서 체세포 돌연변이를 포함하는 GO 수컷으로부터 정자를 제거하고 gDNA를 표준 절차에 따라 DNAzol 시약(Life Technologies)을 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA를 MQ H2O 30 μ l에 재현탁하였다.

[0169] E. QPCR에 의한 돌연변이의 식별.

[0170] ROTOR-GENE RG-3000 REAL TIME PCR 시스템(Corbett Research)으로 실시간 qPCR을 실시하였다. 각 0.4 μ M 농도의 정방향 및 역방향 프라이머 및 7.5 μ L의 2x Brilliant II SYBR GREEN QPCR MASTER MIX (Agilent Technologies)를 포함하는 총 부피 15 μ l로 6- μ L 게놈 DNA(gDNA) 주형(1 ng/ μ l로 희석)을 이용하였다. DNStar 소프트웨어를 사용하여 qPCR 프라이머를 설계하였다(표 1). 95°C에서 15 초, 60°C에서 60 초의 40 사이클을 사용하여 qPCR을 실시하고, 이어서 용융 곡선 분석으로 분석의 특이성(67°C 내지 97°C)을 확인하였다. 이러한 접근법에서, 타겟 kiss 및 kissR 유전자좌에서 DNA 다형성의 발생을 검출하기 위하여, 목적 부위를 포함하는 짧은 PCR 앰플리콘(약 100-140bp)을 gDNA 시료로부터 생성하여 온도-의존적 해리(용융 곡선)를 실시하였다. TALEN-유도 다형성이 주형 gDNA에 존재하는 경우, 이형이중가닥(heteroduplex)뿐만 아니라 다른 동형이중가닥(homoduplex) 분자가 형성될 수 있다. 이중가닥 분자의 다중 형태의 존재는 용융(melting) 프로파일에 의해 검출되고, 이는 이중가닥 용융이 단일 종 또는 1 종 이상의 종으로서 작용한다는 것을 나타낸다. 일반적으로, 용융 곡선 및 용융 온도의 대칭성은 dsDNA 서열 및 이의 길이의 균질성(homogeneity)으로 유추한다. 예를 들어, NHEJ에 의한 TALENs-유도 DSBs의 쌍으로부터 초래된 작은 삽입 또는 결실이 발생하는 경우, 염기-염기 수소 결합을 파괴하는 데 필요한 에너지에 비례하여 그 용융 온도는 결실 또는 삽입의 길이와 양의 연관성이 있을 것이다. 이중가닥 분자의 다중 형태가 존재하는 경우, 온도 의존성 변성은 변형(비대칭적) 용융 프로파일을 나타내는 가장 불안정한 이형이중가닥 및 가장 안정한 동형이중가닥을 함께 검출할 수 있다. 용융 분석은 동일한 마스터 믹스 반응에 별별로 증폭(목적 게놈 영역을 함유하는 비-주입 텔라피아 대조군 또는 플라스미드로부터)된 기준 DNA 시료와 비교함으로써 실시된다. 요컨대, 용융 프로파일의 변화(variation)는 야생형 서열로부터 TALEN-유도 돌연변이를 포함하는 서열을 구별하고, 이에 따라 스크리닝이 가능해진다.

[0171] F. 미세주입된 텔라피아의 체세포 또는 생식세포에서의 돌연변이율 계산 및 TALEN 유도 돌연변이의 특성.

[0172] 어류 체세포 또는 생식 세포 gDNA이 생성하는 비대칭 qPCR 용융 프로파일(후보 돌연변이체)을 추가적으로 분석하여 돌연변이 빈도를 측정하였다. 타겟 부위(kiss의 경우 442bp 및 kissR의 경우 720bp)를 함유하고 있는 게놈 PCR 산물을 지느러미-DNA 또는 정자-DNA로부터 획득하였다. 120-180ng 주형 gDNA, 0.1 μ L Platinum Taq DNA polymerase, 0.2 mM dNTPs, IX Taq DNA polymerase buffer, 2 mM Mg²⁺, 및 0.2 μ M의 각 프라이머를 함유하는 25- μ L 반응 혼합물로 PCR을 실시하였다. 하기 조건 하에서 DNA 증폭을 실시하였다: 95°C에서 5 분 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 및 72 °C에서 45초의 35 사이클 및 최종 연장 72°C에서 2 분. 상기 PCR 산물을 TOPO 2.1 TA 벡터(Invitrogen)에 클로닝하고, 컴페던트 E.coli 세포 (ONE SHOT, Top 10F', Invitrogen)내로 형질전환시켰다. 선택 한천 배지에 리플레이팅하기 전에, 형질전환체 콜로니를 무작위로 멸균 피펫 텁으로 포착하여 개별 qPCR 반응 튜브에 직접 옮겼다. 목적 TALENs 타겟 부위(100-140bp 앰플리콘)를 스패닝하는 프라이머를 이용하여 qPCR을 실시하였다. 특이 산물 증폭을 나타내는 QPCR 반응을 기준 DNA 시료 대조군(야생형 서열)에 대

하여 비교하여 용융 변형 프로파일을 식별하였다(도 10 패널 c 및 d). 100 곱한 분석된 서열의 총 숫자로 나눈 돌연변이체 서열(변이체 용융인 콜로니) 숫자로 DNA 돌연변이율을 계산하였다. 타겟 유전자좌에 존재하는 돌연변이를 시각화하기 위하여, 개별 체세포 또는 정자 세포를 나타내는 클론들을 Ct 대 용융 온도의 산포도로 디스플레이하였다(예를 들어 도 10 패널 D 참조). 이러한 그래프에서, 각 *E.Coli* 콜로니는 그의 Ct를 나타내는 x 및 그의 용융을 나타내는 y인 테이터 포인트(x, y)로 표시된다. 동일한 서열을 포함하는 개별 콜로니들은 유사한 용융 온도로 디스플레이해야 한다. 변이체(variant) 용융 온도를 나타내는 콜로니는 밤새 배양하고 이들의 플라스미드를 추출 및 정제하였다(MINIPREPARATION 키트, QIAGEN). 표시된 바와 같이, kiss 및 kissR에 대하여 선별된 프라이머를 이용하여 TALENs 타겟 부위를 포함하는 영역을 시퀀싱하였다. F1 및 F2 어류에서의 돌연변이를 특성화하기 위하여, 타겟 kiss1.1a 및 KissRE3 유전자좌를 함유하는 442bp 및 702bp 엠플리콘들을 실리카-막-기반 스펀 컬럼(QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT, QIAGEN) 상에서 정제하였다. 정제된 PCR은 내부 프라이머(KissRF)를 이용하여 직접적으로 서열화하였다.

G. 선조(Founder) 스크리닝

[0173] 배우자들(Gametes)을 모든 추정 선조(putative founders)로부터 제거하고 WT 스톡에서 수집된 배우자를 이용한 비트로 수정으로부터 F1 배아들을 생산하였다. 수정 3 주 후, F1 자손은 지느러미-클리핑하고 개별 단지에 별도로 두었다. 지느러미 DNA를 상술한 바와 같이 추출하고(상기 조작 수집 및 DNA 추출 부분 참조), 분광 광도계 NANODROP ND1000)를 사용하여 1 ng/ μ l로 조정하였다. 일반적으로, 각각의 잠재적 선조로부터 10-20 미성숙체(juvenile)를 상술한 용융 분석 전략을 사용하는 QPCR로 스크리닝하였다. 서열 확인을 위하여, 단일 배아/미성숙체로부터의 게놈 DNA를 증폭하고 PCR 산물을 정제한 후 시퀀싱에 제출하였다.

[0175] 두 개의 동시 판독(simultaneous reads)을 보여주는 PCR의 시퀀싱 크로마토그래피는 삽입결실(indel) 존재를 나타낸다. 서열 판독이 분기되는 경우, 결실 또는 삽입의 시작은 일반적으로 시작된다. 이중 서열은 보다 주의 깊게 분석하여 독특한 뉴클레오티드 판독을 검출한다(참조 도 12 패널a). 이어서, 야생형 서열 전체 증분 이동(shifting)으로부터 발생된 인공적인 단일 판독 패턴에 대하여 독특한 뉴클레오티드 판독의 패턴을 분석하였다.

H. 설계된 TALENs의 돌연변이 유발능.

[0177] 설계된 TALENs 및 각 이형이량체(heterodimeric) TALENs을 암호화하는 합성 캡팅 mRNA를 함께 10 내지 250 ng/ μ l의 다양한 농도로 1-세포 단계 틸라피아 배아에 주입하였다. 본 발명자들은 수정 6 일 후(days post fertilization, dpf) 주입 된 배아를 관찰하였다. 10 ng 이하의 TALENs을 주입한 배아는 정상적으로 발달한 반면, 200ng(Kiss1a) 및 100ng(KissRE3)의 용량은 50%의 사망률 또는 변형된 배아를 발생하였다. kiss1.1b 및 kissRE2에 대한 250ng의 용량은 30% 미만의 사망률을 발생하였다. 5 일째에, 형태학적 변형을 가진 것들로부터 일반적으로 발달된 것들 사이에서 주입된 배아를 분리하였다. 돌연변이의 증거를 확인하기 위하여, 각 TALENs 처리군에 대한 3 변형 배아 및 비주입된 대조군으로부터의 3 정상 배아의 풀(pool)에서 게놈 DNA를 분리하였다. 게놈 DNA를 타겟 유전자좌의 QPCR 용융 분석에 이용하였다. kiss1.1a 및 kissRE3 유전자좌를 타겟팅하는 TALENs으로 처리된 배아의 풀에서 비대칭 용융 프로파일이 발견되었으나(데이터 미도시), 다른 2 TALENs쌍으로 처리된 배아에서는 그렇지 않았다.

[0178] 돌연변이의 존재를 확인하기 위해, 각 그룹의 20 내지 40 일반적으로 발달 된 미성숙체를 QPCR 용융 분석에 의해 분석하였다. TALEN KissR-E2 및 Kiss1.1b mRNA를 주입한 어류 중에 어떤 것도 변이체 용융을 생성하지 않았으며 이는 어떠한 것도 돌연변이를 생성하지 않았거나 상기 돌연변이가 검출가능한 용융 변화를 생성하지 않았음을 제시한다. 그럼에도 불구하고, 변이체 용융 프로파일을 생성한 총 8 마리의 어류들을 발견하였다, 각 kiss1.1a 및 KissRE3 유전자좌에 대하여 4 개(도 10 패널a 및 패널 b). 관찰된 용융 변화는 타겟 부위에 미세-삽입 또는 결실된 야생형 및 NHEJ 산물의 혼합물로부터 기인한다는 것을 확인하기 위하여, 각 타겟 영역(Kiss의 경우 442bp 및 KissR의 경우 702p)을 PCR 반응에서 증폭하였다. 결과물인 PCR 단편을 TOPO TA 벡터 내로 클로닝하고 형질전환체 콜로니들을 직접 실시간-PCR로 스크리닝하였다. 테스트된 각 어류의 경우, 14 및 21 *E.Coli* 형질전환체 콜로니들을 손으로 수확하였고(무작위로), Q-PCR 반응 혼합물에 직접적으로 (DNA 경제없이) 첨가하였다.

[0179] 돌연변이된 대립유전자를 포함하는 콜로니를 야생형 비변형된 서열과 비교하여 식별하였다. 50-91% 범위의 변이체 용융 프로파일을 갖는 콜로니의 높은 빈도로 검출되었다(도 10 패널 c 및 d).

[0180]

이들 병변의 일부를 특성화하기 위해, 변이체 엠플리콘이 생성되는 클론으로부터 플라스미드를 추출하고 PCR 인서트를 시퀀싱하였다. 4 및 7 클론 사이에 각 TALEN 처리군 및 돌연변이 대립유전자를 포함하는 하나를 제외한 모두에 대하여 시퀀싱하였다. *kiss* 및 *kissr* 유전자에서 총 14 개의 상이한 체세포 돌연변이가 모든 8 TALENs 처리된 어류(*Kiss1.1a* 유전자좌에서 8 개 및 *KissRE3* 유전자좌에서 6 개)로부터 검출되었다. 9 개의 상이한 뉴클레오티드 결실, 2 개의 삽입, 및 뉴클레오티드 삽입 및 결실의 3 가지 조합이 관찰되었다(도 11 패널 a 및 b). RT-PCR 용융 분석에 의해 3bp만큼 작은 결실/삽입이 검출 가능하였다. TALENs 유도 돌연변이는 모자이크 체세포 돌연변이의 결과로 RNA 처리 어류에서 여러 번 발생하는 것이 관찰되었다(하기 표 참조).

[0181]

용융 변화를 나타내는 콜로니로부터의 서열의 95% 이상은, 변이체 용융을 생성하는 클론의 빈도를 측정함으로써 DNA 돌연변이율이 근사화될 수 있음을 의미하는 돌연변이를 포함한다는 것을 발견하였다. 따라서, 돌연변이의 비율은 어류에 따라 35% 및 91% 사이로 계산되었다. 이러한 결과는 예상 게놈 위치에서 타겟 삽입결실(indel)의 효율적인 도입을 의미한다.

[0182]

체세포 돌연변이 스크리닝의 결과를 요약한 하기 표는, TALENs-주입 틸라피아에 대한 결과를 보여준다. 두번째 컬럼은 indel의 크기를 포함하여 체세포에서 식별된 돌연변이체 서열을 기재하고(+, 삽입; -, 결실) 그 결과물인 단백질 서열 변형은 괄호 안에 나타낸다. 마지막 컬럼에서, 각 어류에 대한 추정 체세포 돌연변이 비율은 변이체 용융 온도를 생성하는 콜로니의 빈도로부터 계산되었다.

[0183]

표: 체세포 돌연변이 스크리닝의 결과 요약

Fish reference (sex)	% F1 with putative mutations (n=total number of F1 screened)	#F1 sequenced (Variant + WT melt)	# of mutants identified	Mutation type
<i>Kiss17</i> (♂)	66% (n=30)	13+2	13	7 {Δ12nt (-4AA)} and 6 {Δ18nt (-6AA)}
<i>Kiss19</i> (♂)	49% (n=37)	10+2	10	10 {Δ12nt (-4AA)}
<i>Kiss20</i> (♂)	73% (n=29)	12+2	12	12 {Δ12nt (-4AA)}
<i>Kiss41</i> (♀)	16% (n=38)	6+2	6	6 {Δ12nt (-4AA)}

Fish reference	% F1 carrying putative mutations (n=total number of F1 screened)	#F1 sequenced (Variant + WT melt)	#of mutants identified	Mutation type
<i>RE3-1</i> (♀)	29% (n=44)	19+2	19	10 {Δ3nt (-1AA, R>Q); 8 {Δ11nt (frame shift/stop)}; 1 {Δ8nt, (frameshift/stop)}}
<i>RE3-4</i> (♂)	90% (n=22)	10+2	10	9 {Δ9nt (-3AA)}; 1 {Δ5nt, (frame shift/stop)}
<i>RE3-6</i> (♂)				
<i>RE3-11</i> (♀)	63% (n=35)	11+2	11	10 {Δ7nt (frame shift/stop); 1 {Δ5nt (frame shift/stop)}}

[0184]

I. TALENs 돌연변이의 서열 분석

[0185]

상이한 유형의 뉴클레오티드 돌연변이 중, 5 및 6은 *kiss* 및 *kissr* 유전자 각각에서 전성숙(premature) 정지 코돈의 발생으로 이어지는 구조변동(frameshift)이 발생하였다. 또한, *kiss1.1a* 유전자좌에서의 12nt 결실이 고빈도였고, 이는 모든 4 TALEN 처리 어류에서 독립적으로 발생되었다. 이러한 돌연변이는 4 개의 아미노산(AA)의 손실을 야기한다.

[0186]

F0 TALENs-돌연변이 틸라피아는 성적으로 성숙하도록 사육하고 이들의 성별을 결정하였다. TALENs 처리된 어류가 유전가능한 돌연변이를 유도할 수 있다는 것을 보여주기 위하여; 게놈 DNA를 각 정자생성하는(spermating) 동물의 정액에서 추출하여 스크리닝하였다. 돌연변이를 포함하는 정자의 빈도는 이전에 설명한 바와 같이 변이체 용융 프로파일을 나타내는 클론의 빈도로 결정하였다. 정자와 관련된 병변을 특성화하기 위해, 변이체 용융을 갖는 콜로니로부터 플라스미드를 추출하고, 시퀀싱하였다. 50% 내지 91% 범위의 생식세포 계열 돌연변이 빈도가 관찰되었다. 서열들은 각 어류의 생식 세포에서의 다수의 indel의 존재를 나타내었다.

[0188]

표: 시퀀싱

Male Fish reference	Mutation type	% of mosaic somatic mutations (n=total number of colonies screened)
Kiss17	Δ12nt (-4AA) and Δ18nt (-6AA)	50% (n=20)
Kiss19	Δ12nt (-4AA); +3nt (+1AA)	65% (n=30)
Kiss20	Δ16nt (frame shift/stop); Δ12nt (-4AA)	91% (n=23)
RE3-4	Not sequenced	88% (n=18)
RE3-6	Not sequenced	

[0189]

[0190] *J. kiss* 및 *kissR* 유전자좌에서 생식세포계열 돌연변이의 분석.

[0191]

생식세포계열에서 Kiss 및 KissR TALENs이 효과적으로 돌연변이를 유도하는지를 추가적으로 설명하기 위해, 8 선조들을 야생형 스톡과 이종교배시켰다. 모든 8 TALENs 처리 어류들은 수태하였고 생존가능한 배아의 클러치를 생산하였다. 이러한 자손을 사용하여 돌연변이 대립유전자의 존재에 대해 스크리닝하였다. 모든 8 선조들은 유전가능한 돌연변이를 전할 수 있다. 상기 분석은 처음, F1 지느러미-DNA 추출물의 QPCR 용융 프로파일 분석에 의해 측정되어 추정 돌연변이를 포함하는 자손의 비율이 16% 및 90% 사이의 범위인 것을 보여준다. 예상대로, TALENs 처리 부모의 모자이크 현상(mosaicism) 범위 및 돌연변이를 포함하는 자손의 빈도 간에 양의 상관관계가 있었다. 모든 변형된 용융 프로파일을 생성하는 선택된 유전자 서열의 분석은 모두 indel 돌연변이의 범위를 나타내고, 이중 일부는 이미 선조들의 체세포 조직에서 발견되었다(도 12 패널 b). 또한, 야생형 용융을 생성하는 F1 어류의 시퀀싱은 모두 야생형 서열을 나타냈다. 단일 선조로부터의 1 종 이상의 유전성 돌연변이는 종종 관찰되었고, 이는 이러한 돌연변이들이 동일한 동물 내 상이한 생식 세포에서 독립적으로 발생한다는 것을 제시한다. 유전된 돌연변이는 3 내지 18 bp 크기 범위의 결실을 포함한다(도 12 패널 b). 4 kiss 돌연변이 선조의 자손에서, 유일한 유전된 돌연변이는 12nt 및 18nt의 결실이었고, 이는 4 및 6 AA의 손실을 야기한다. 비록, 이러한 결실은 구조이동 돌연변이를 야기하지 않았으나, kiss-10 웨티드(도 12 패널 c)의 가장 C- 말단 부위에 하나 또는 세 개의 AA를 제거한다. 이러한 핵심 서열이 필수적으로 발견되고 척추 동물 전체에 걸쳐 kissR 시그널링 전달 경로의 활성화에 충분하기 때문에, 이러한 돌연변이들은 기능 표현형의 손실을 생산할 수 있었다. 또한, kissRE3 유전자좌에서의 구조이동 돌연변이가 식별되었고, 이는 선조에서 이전에 분리되지 않았다. 모든 구조이동 돌연변이는 KissR 단백질의 C-말단 부분으로부터 172 AA에서 215 AA까지 제거하는 전성숙 정지 코돈을 야기한다(Δ7 NT, 도 12 패널 c). 단백질 서열의 57% 만큼 제거하는 이러한 돌연변이들은 유전자 기능을 비활성화시킬 수 있다. 미성숙체 F1 자손들 중 식별 된 모든 kiss 및 kissr 돌연변이는 이형접합체 상태에서만 생존했다.

[0192]

표: 선조 스크리닝 결과의 요약. 각 표의 마지막 컬럼에서, indel 돌연변이를 포함하는 배아의 수는 괄호 외부에 표시되고, indel의 크기는 괄호 안에 표시된다. +, 삽입; -, 결실.

Fish reference (sex)	% F1 with putative mutations (n=total number of F1 screened)	#F1 sequenced (Variant + WT melt)	#of mutants identified	Mutation type
Kiss17 (♂)	66% (n=30)	13+2	13	7 {Δ12nt (-4AA)} and 6 {Δ18nt (-6AA)}
Kiss19 (♂)	49% (n=37)	10+2	10	10 {Δ12nt (-4AA)}
Kiss20 (♂)	73% (n=29)	12+2	12	12 {Δ12nt (-4AA)}
Kiss41(♀)	16% (n=38)	6+2	6	6 {Δ12nt (-4AA)}

Fish reference	% F1 carrying putative mutations (n=total number of F1 screened)	#F1 sequenced (Variant + WT melt)	#of mutants identified	Mutation type
RE3-1(♀)	29% (n=44)	19+2	19	10 {Δ3nt (-1AA, R>Q); 8 {Δ11nt (frame shift/stop)}; 1 {Δ8nt, (frameshift/stop)}}}
RE3-4 (♂)	90% (n=22)	10+2	10	9 {Δ9nt (-3AA)}; 1 {Δ5nt, (frame shift/stop)}
RE3-6 (♂)				
RE3-11 (♀)	63% (n=35)	11+2	11	10 {Δ7nt (frame shift/stop)}; 1 {Δ5nt (frame shift/stop)}

[0193]

[0194] F1 및 F2 세대.

[0195] F1 이형접합체 돌연변이체는 꾸준한 발달하면서도 어떠한 형태학적 결함을 보이지 않았고, 모두 양쪽 성별의 생식력있는 성체로 분화하였다. 성적으로 성숙한 F1 세대에서 생식 표현형의 부재는 선별된 돌연변이의 모든 체세포에서 각 타겟 유전자의 야생형 대립유전자의 존재를 얻을 것으로 예상하지 못한 것이 아니었다. 불 활성화 표현형의 특성은 동형접합체(또는 복합 이형접합체) 상태에서 관련 기능 상실 돌연변이를 포함하는 어류의 F2 세대에서만 가능하다. 동형접합체 돌연변이를 생성하기 위하여, F1 이형접합체 돌연변이체로부터 수집된 정자 및 난자를 F2 세대를 생산하는 데 이용하였고, 이들은 성장하였다; 이러한 F2 세대는 일반적으로 예상되는 성적 성숙의 시간 이전 나이에 시간이 채워졌다.

[0196] 추가 설명

[0197] 1. 동물이 성적으로 성숙되는 것을 막는 유전자 불활성화로서, 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화를 포함하는 계놈을 포함하는 유전적으로 변형된 가축 동물. 2. 1에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 성적 성숙 유전자 및/또는 그들의 *cis*-조절 인자(*cis*-regulatory element)를 암호화하는 서열 내 하나 또는 그 이상 염기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 것인, 가축 동물. 3. 1에 있어서, 상기 불활성화된 유전자는 하기에 의해서 불활성화된 것인, 가축 동물: 동물의 계놈 유래 유전자의 적어도 일부의 제거, 유전자에 의해 암호화되는 기능 인자의 발현을 막기위한 유전자의 변형 또는 전사-작용인자. 4. 3에 있어서, 상기 유전자는 전사-작용 인자에 의해서 불활성화되는 것이며, 상기 전사-작용 인자는 간접 RNA 및 우성 음성 인자로 구성된 군에서 선택되는 것이며, 상기 전사-작용 인자는 외인성 유전자 또는 내인성 유전자에 의해서 발현되는 것인, 가축 동물. 5. 4에 있어서, 상기 전사-작용 인자는 GPR54에 대한 우성 음성을 포함하는 것인, 가축 동물. 6. 1 내지 5에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 유도가능한 시스템의 조절하에 있는 것인, 가축 동물. 7. 6에 있어서, 상기 유도가능한 시스템은 Tet-On, Tet-Off, Cre-lox 및 Hiflalpha로 구성된 군의 일원을 포함하는 것인, 가축 동물. 8. 1 내지 7에 있어서, 상기 동물은 소, 돼지, 양, 닭, 염소 및 어류로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 가축 동물. 9. 1 내지 8에 있어서, 상기 성적 성숙 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 가축 동물. 10. 1 내지 9에 있어서, 상기 동물은 재조합 단백질의 발현 결과로 형질(trait)를 더 발현하는 것인, 가축 동물. 10a. 1 내지 10에 있어서, 상기 동물은 외인성 재조합 단백질을 더 발현하는 것인, 가축 동물. 11. 10에 있어서, 상기 형질은 생산 형질, 유형 형질(type trait), 가동성 형질(workability trait)로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 가축 동물. 12a. 동일 종의 야생형 동물이 성적으로 성숙한 나이에, 성적으로 미성숙한 1 내지 11의 가축 동물. 12b. 처리없이는 유전적으로 성숙할 수 없는 1 내지 11의 가축 동물.

[0198] 13. 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 불활성화를 위한 이형접합 계놈을 포함하고, 이것에 의해 상기 불활성화된 유전자에 대한 자손 동형접합이 성적으로 성숙되는 것을 막는, 유전적으로 변형된 가축 동물. 14. 13에 있어서, 상기 성적 성숙 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 동물.

[0199] 15. 세포 또는 배아로 구성된 군으로부터 선택되는 생체 외(*in vitro*) 유기체로, 성적 성숙 유전자가 불활성화된 것을 포함하는 계놈을 포함하는 생체 외(*in vitro*) 유기체. 16. 소, 돼지, 양, 닭, 염소, 토끼 및 어류로 구성된 군으로부터 선택되는 세포 또는 배아인 15의 유기체. 17. 15 내지 16에 있어서, 상기 불활성화는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 유전자에 존재하는 것인, 유기체.

[0200] 18. 세포의 염색체 타겟 위치에 특이적으로 결합하고, 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자 불활성화를 위하여 이중-가닥 DNA의 손상을 유발하는 제제를 가축 세포 및 가축 배아로 구성된 군으로부터 선택된 유기체에 도입하는 것을 포함하고, 제제는 TALEN, 징크 평거 뉴클레아제, Cas9/CRISPR 및 재조합효소 용합 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 가축 동물의 제조 공정. 19. 18에 있어서, 상기 제제는 염색체의 타겟 위치에 특이적으로 결합하는 서열을 포함하는 유전자에서 이중 가닥의 손상을 만드는 TALEN 또는 TALEN 쌍이며, 첫번째 손상과 두번째 손상 사이로 생각되는 유전자의 일부에서 이차 이중 가닥 손상을 만드는 추가적인 TALEN과 조합하여 염색체 상에서 이중 가닥의 손상을 만드는 것을 포함하는 공정. 20. 18 내지 19는 TALEN 또는 TALENs과 함께 재조합효소를 유기체에 공동- 도입(co-introducing)하는 것을 더 포함하는 공정. 21. 19에 있어서, 상기 제제를 발현하는 형질전환 유전자는 유기체의 계놈에 위치하는 것인 공정. 22. 18 내지 21에 있어서, 상기 유기체로의 제제 도입은 웨타이드인 제제의 직접 주입, 제제를 암호화하는 mRNA의 주입, 제제를 암호화하는 벡터에 유기체 노출 및 제제를 암호화하는 플라스미드의 유기체 도입으로 구성된 군으로부터 선택된 방법을 포함하는 것인, 공정. 23. 18 내지 22에 있어서, 상기 제제는 상기 재조합효소 용합 단백질이며, 상기 공정은 타겟팅 핵산 서열을 상기 용합 단백질과 함께 도입하는 단계를 포함하고, 상기 타겟팅 핵산 서열은 재조합 효소와 함께 필라멘트를

형성하여 염색체 부위에 특이적으로 결합하는 것인, 공정. 24. 18 내지 23에 있어서, 상기 재조합효소 융합 단백질은 재조합효소 및 Ga14를 포함하는 것인, 공정. 25. 18 내지 24에 있어서, 핵산을 유기체에 도입하는 것을 더 포함하고, 상기 핵산은 이중-가닥 손상 또는 첫번째 손상 및 두번째 손상 사이 위치의 유기체의 게놈에 삽입되는 것인, 공정. 25a. 18 내지 24의 공정은 서열을 갖는 핵산 주형을 상기 유기체에 도입하는 단계를 추가적으로 포함하고, 상기 유기체의 상기 게놈은 상기 이중-가닥 절단 부위에서 상기 서열을 받는(receiving) 것인, 공정. 상기 외인성 주형은 이 것이 하나 또는 그 이상의 매커니즘으로 일어나는 것에 대한 학설들에도 불구하고 상기와 동일한 결과를 갖도록 복제되거나 또는 실질적으로 게놈에 삽입될 수 있다. 그 결과 게놈은 주형의 서열을 갖게 된다. 26. 18 내지 25에 있어서, 상기 핵산은 정지 코돈, 리포터 유전자 및 리포터 유전자 카세트로 구성된 군의 일원을 포함하는 것인, 공정. 27. 18 내지 26에 있어서, 유기체로부터 동물을 클로닝하는 것을 더 포함하는 공정. 28. 18 내지 27에 있어서, 상기 동물을 소, 돼지, 양, 닭, 염소, 토끼 및 어류로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 공정. 29. 18 내지 28에 있어서, 상기 성적 성숙 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 공정. 30. 18 내지 29에 있어서, 상기 유전자의 불활성화는 유도가능한 시스템의 조절하에 있는 것인 가축 동물.

[0201]

31. 동물의 유전적 성적 성숙 불능을 보상하기 위한 제제로서, 동물의 성적 성숙을 위한 제제를 동물에 투여하는 것을 포함하는 가축 동물 사육 공정. 32. 31에 있어서, 상기 제제는 성선자극호르몬(gonadotropin) 또는 성선자극호르몬 유사체를 포함하는 것인, 공정. 33. 31 내지 32에 있어서, 자손을 생산하기 위하여 성적 성숙 동물을 교배하는 것을 더 포함하는 공정. 34. 제31 내지 33항에 있어서, 상기 동물의 유전적 성숙 불능은 성적 성숙 선택적 신경내분비 유전자의 유전적 불활성화의 결과인, 공정. 35. 34에 있어서, 상기 불활성화 유전자는 *Gpr54*, *Kiss1* 및 *GnRH11*로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 공정. 36. 34에 있어서, 상기 불활성화 유전자는 하기에 의하여 불활성화된 것인 공정: 동물의 게놈 유래 유전자의 일부 제거, 유전자에 의해 암호화되는 기능 인자의 발현을 막기 위한 유전자의 변형 또는 전사-작용 인자. 37. 31 내지 36에 있어서, 상기 동물을 소, 돼지, 닭, 양, 어류, 토끼 및 염소로 이루어진 군에서 선택되고, 동물로 제제를 투여하는 것은 처리 설비 내에서 일어나며, 자손은 처리 설비부터 복수개의 지역으로 사육을 위해 분산되는 것인 공정.

[0202]

표 1. HDR 대립을 갖는 콜로니의 회복 빈도

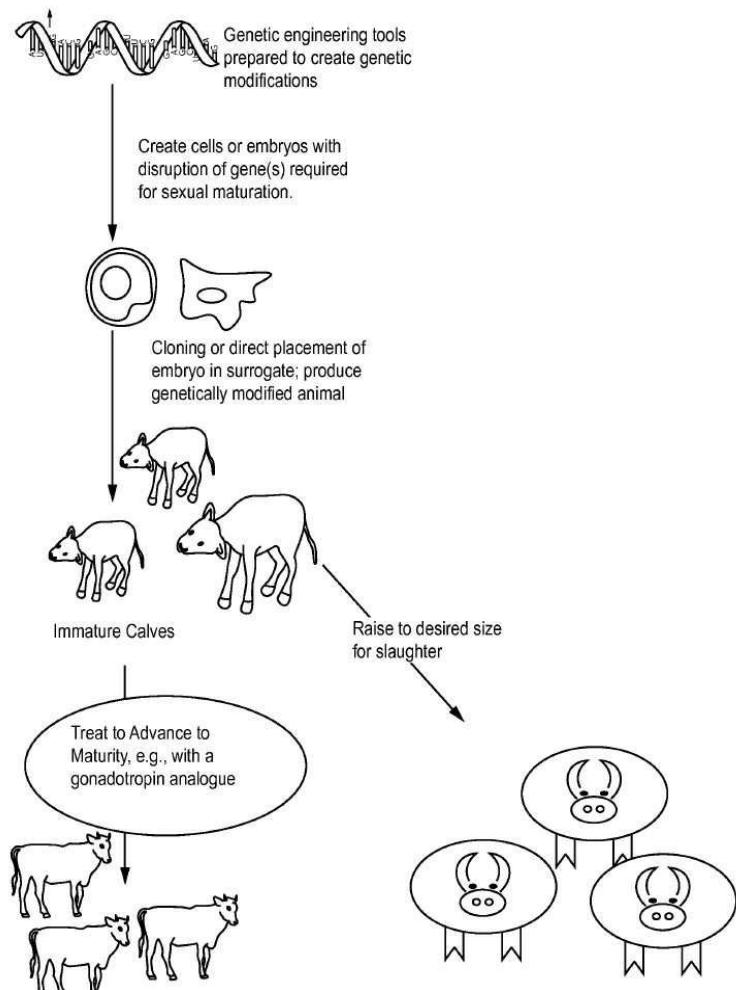
Reagent	ID	Species	Mutation type	nt change	aa change	Day 3 % HDR	HDR+ (%)	Bi-allelic HDR+ (%)
TALEN	ssLDLR2.1 ^a	Pig ♀	Ins/FS	141(ins4)	47ΔPTC	38	55/184 (30)	4/184 (2)
TALEN	ssDAZL3.1 ^b	Pig ♂	Ins/FS	173(ins4)	57ΔPTC	25	34/92 (37)	8/92 (9)
TALEN	ssDAZL3.1 ^{Rep}	Pig ♂	Ins/FS	173(ins4)	57ΔPTC	30	42/124 (34)	7/124 (6)
TALEN	ssAPC14.2 ^b	Pig ♂	Ins/FS	2703(ins4)	902ΔPTC	48	22/40 (55)	4/40 (10)
TALEN	ssAPC14.2 ^{Rep}	Pig ♂	Ins/FS	2703(ins4)	902ΔPTC	50	57/96 (60)	19/96 (20)
TALEN	ssAPC14.2 ^{ld}	Pig ♂	Ins/FS	2703(ins4)	902ΔPTC	34	21/81 (26)	1/81 (1)
TALEN	ssTp53	Pig ♂	Ins/FS	463(ins4)	154ΔPTC	22	42/71 (59)	12/71 (17)
TALEN	ssRAG2.1	Pig ♂	Ins/FS	228(ins4)	76ΔPTC	47	32/77 (42)	13/77 (17)
TALEN	btRosa1.2 ^c	Cow ♂	Ins/mloxP	ins34	NA	45	14/22(64)	7/22(32)
TALEN	ssSRY3.2	Pig ♂	Ins/mloxP	ins34	NA	30	ND	ND
TALEN	ssKissR3.2	Pig ♂	Ins/FS	322(ins6) 323(del2)	107ΔPTC	53	57/96(59)	17/96(18)
TALEN	btGDF83.1	Cow ♂	del/FS	821 (del11)	FS	~10	7/72 (10)	2/72 (3)
TALEN	ssElf4G14.1	Pig ♂	SNPs	G2014A T2017C C2019T	N672D L673F	52	68/102(67)	40/102(39)
TALEN	btGDF83.6N	Cow ♂	SNPs	G938A T945C	C313Y	18	8/94 (9)	3/94 (3)
TALEN	btGDF83.6N ^d	Cow ♂	SNP	G938A	C313Y	NA	7/105 (7)	2/105 (2)
TALEN	ssP65.8	Pig ♂	SNP	T1591C	S531P	18	6/40 (15)	3/40 (8)
TALEN	ssP65.8 ^{Rep}	Pig ♂	SNP	T1591C	S531P	7	9/63 (14)	5/63 (8)
TALEN	ssGDF83.6 ^d	Pig ♂	SNP	G938A	C313Y	NA	3/90 (3)	1/90(1)
TALEN	caFecB6.1	Goat ♂	SNP	A747G	Q249R	17	17/72 (24)	3/72 (4)
TALEN	caCLPG1.1	Goat ♂	SNP	A→G	Non-coding	4	ND	ND
CRISPR	ssP65 G1s	Pig ♂	SNP	T1591C	S531P	6	6/96 (6)	2/96 (2)
CRISPR	ssP65 G2a	Pig ♂	SNP	T1591C	S531P	5	2/45 (4)	0/45
CRISPR	APC14.2 G1a	Pig ♂	Ins/FS	2703(ins4)	902ΔPTC	32	ND	ND

[0203]

도면

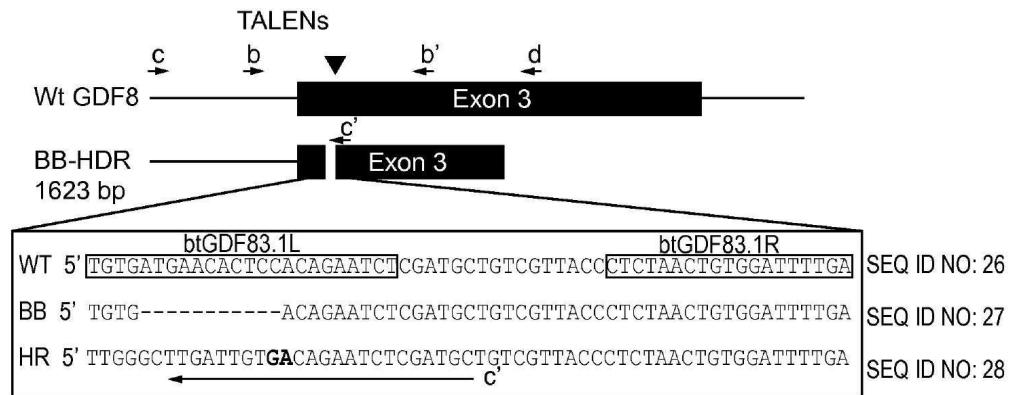
도면1

CONTROL OF SEXUAL MATURATION IN ANIMALS



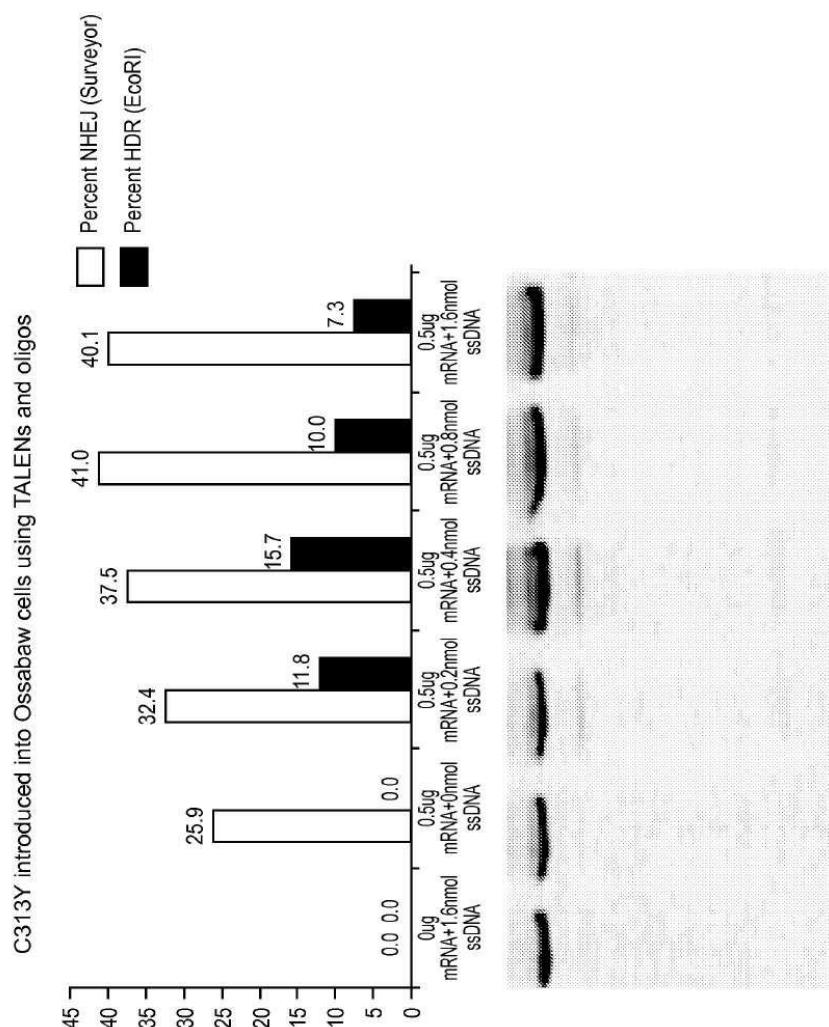
도면2

Introgression with TALENs + plasmid HDR template

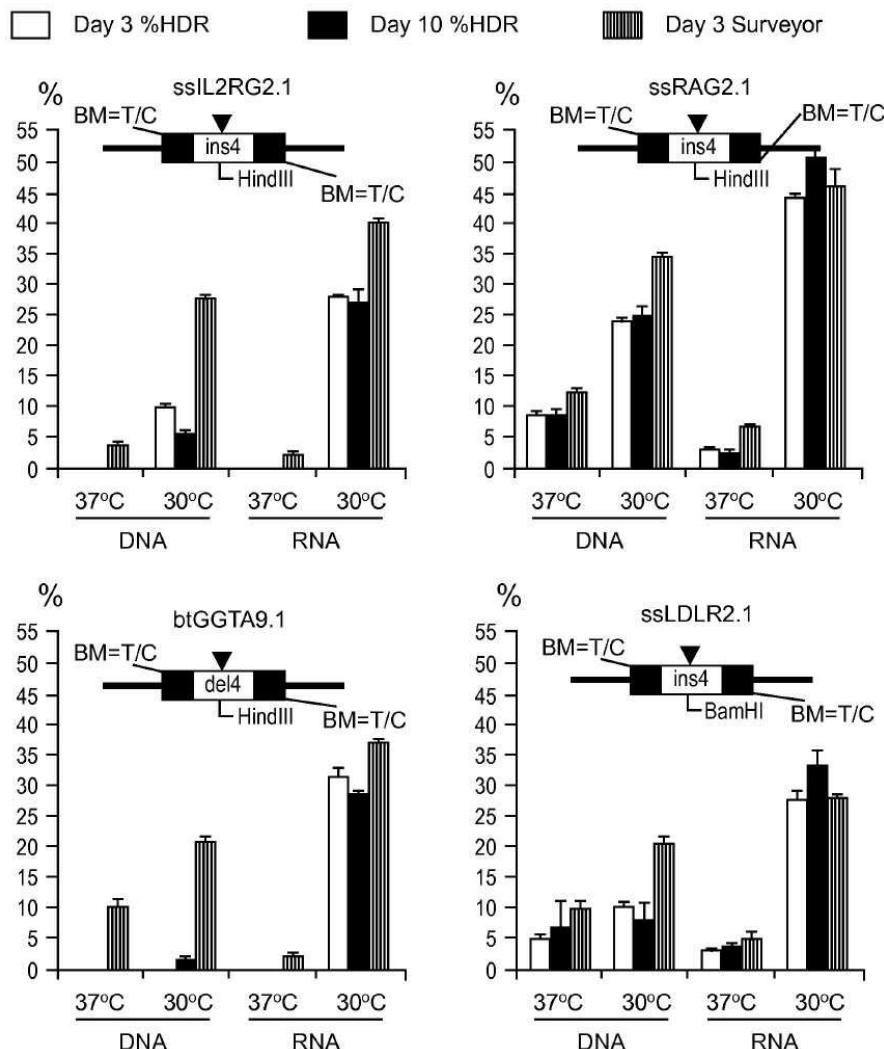


- ~1% BB allelic conversion in population
- 0.5-1% of colonies were heterozygous for BB conversion

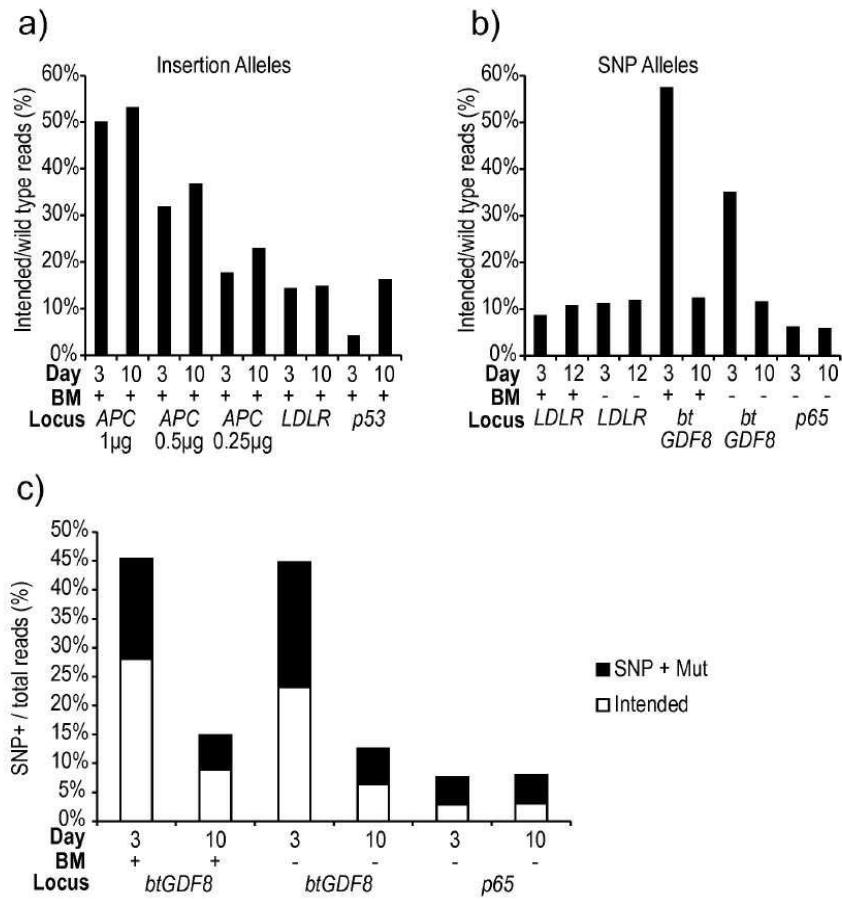
도면3



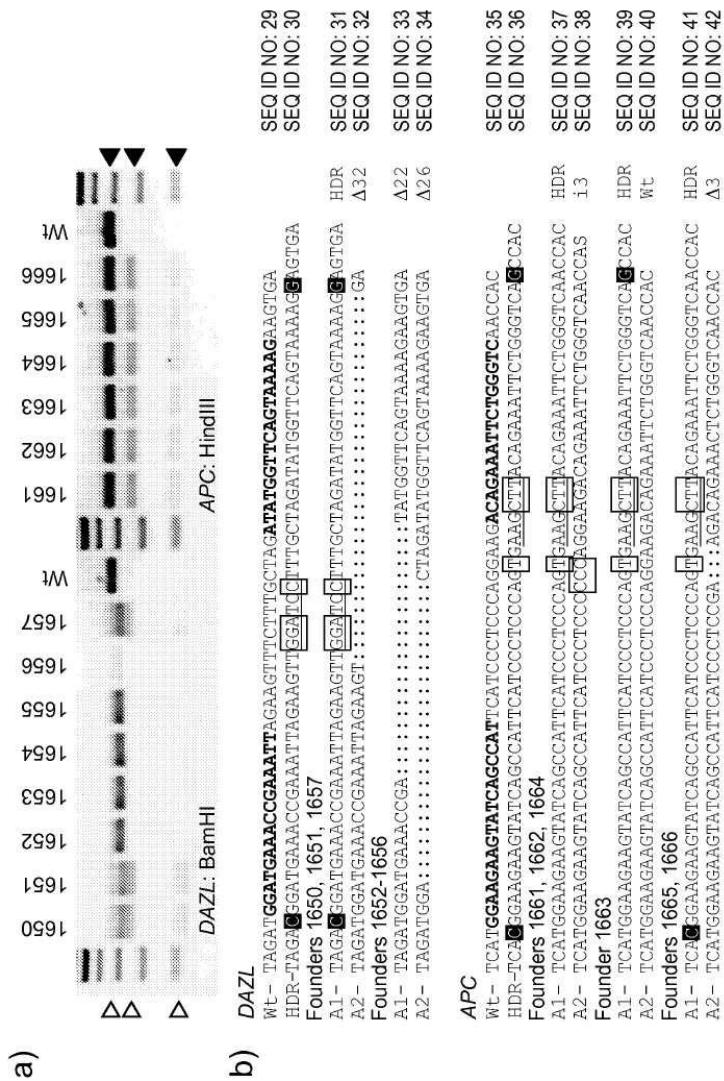
도면4



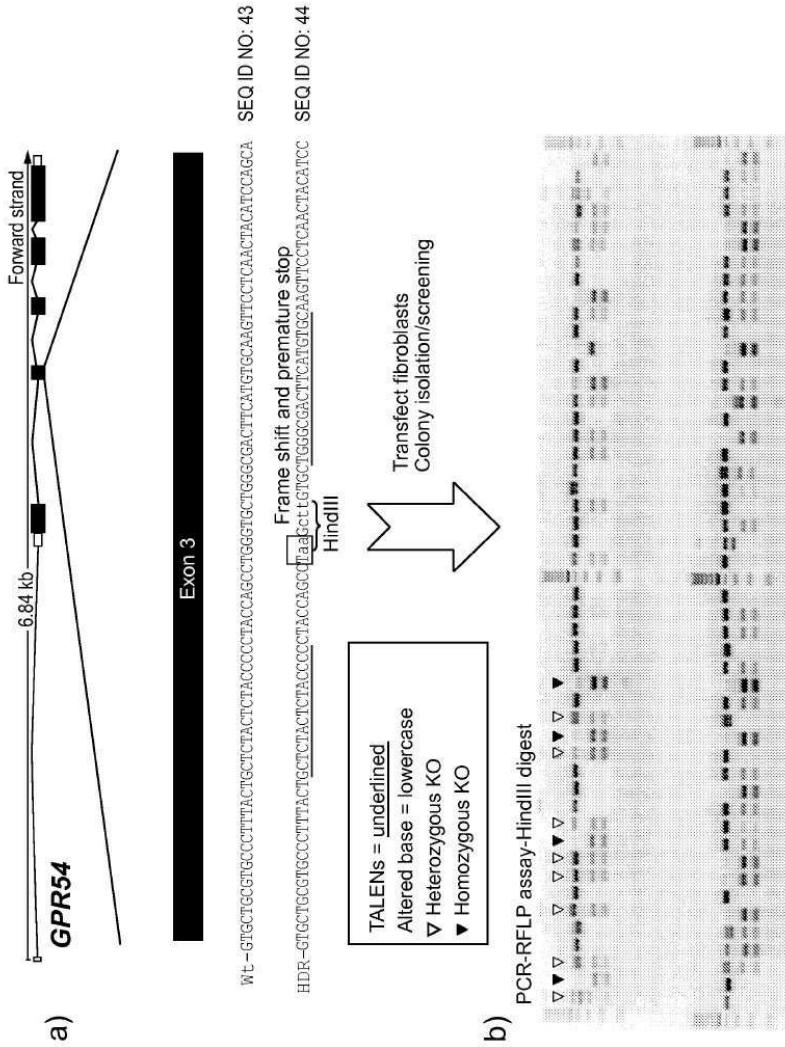
도면5



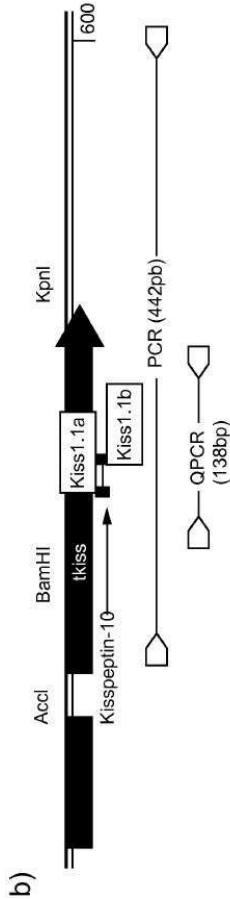
도면6



도면7



도면8



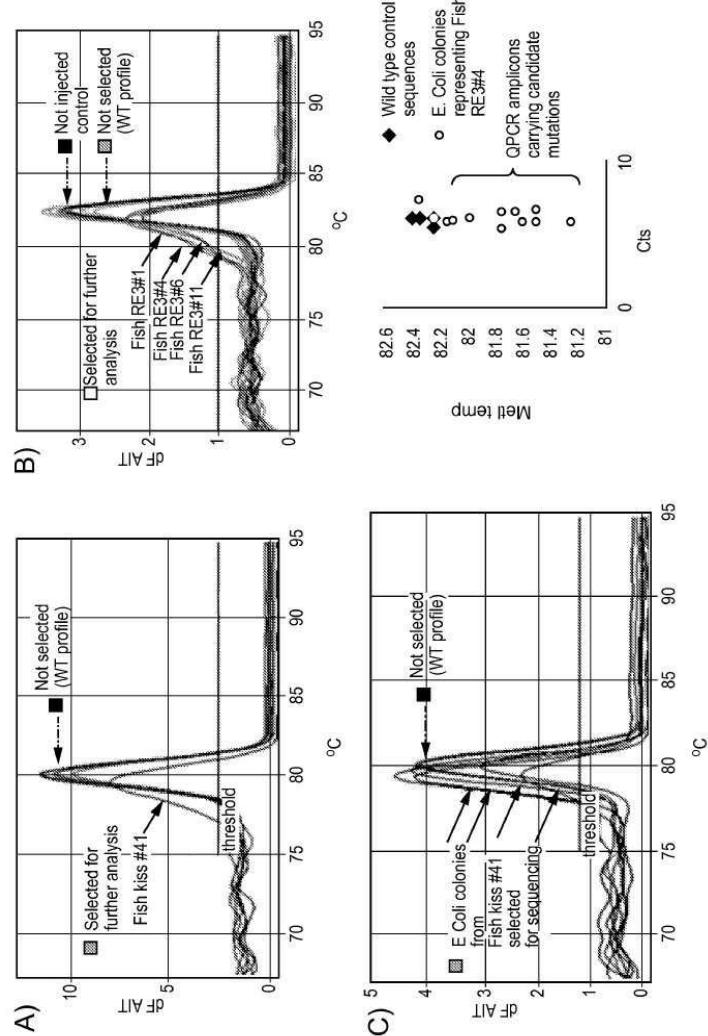
도면9

a)

b)

The diagram illustrates the structure of two genes, KissRE2 and KissRE3, and the experimental approach to analyze them.
KissRE2: The top panel shows the gene structure with an intron 1 (1200 bp), a promoter region, and an exon (KissRE2, 1400 bp). It ends with an intron 2 (1600 bp). Two *Pst*I restriction sites are indicated. A PCR product of 622 pb is shown, with primers located in the intron 1 and intron 2 regions. A QPCR analysis is also indicated, with a product of 112 pb.
KissRE3: The bottom panel shows the gene structure with an intron 2 (1200 bp), a promoter region, and an exon (KissRE3, 1400 bp). It ends with an intron 3 (1600 bp). Two *Bcl*I restriction sites are indicated. A PCR product of 702 pb is shown, with primers located in the intron 2 and intron 3 regions. A QPCR analysis is also indicated, with a product of 143 pb.
Primers are represented by open boxes, and restriction sites by vertical lines with labels.

도면10

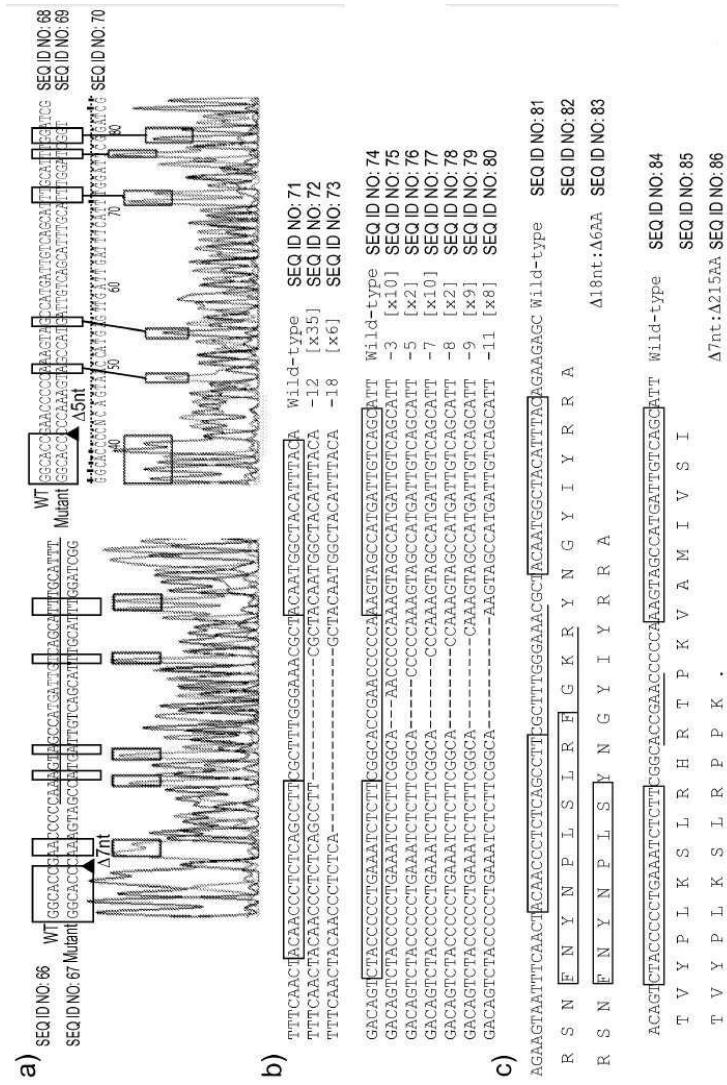


도면11

(a) Human GATA-3 gene sequence (GenBank: NM_002048.3) showing the 5' flanking region. A red box highlights the GATA motif (GATA-3) at position 103-106.

(b) Human GATA-3 gene sequence (GenBank: NM_002048.3) showing the 5' flanking region. A red box highlights the GATA motif (GATA-4) at position 103-106.

도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Carlson, Daniel F.

Fahrenkrug, Scott C.

<120> Cells with Modified Neuroendocrine Genes

<130> 5054.12US02

<150> US 61/870,510

<151> 2013-08-27

<150> US61/720,187

<151> 2012-10-30

<160> 86

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

ttcaccagaa gacaaggaga attgc

25

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

taaggccat tactgctctg gagacta

27

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

ccttgaggta ggagagtggtt ttggg

25

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

cctttttaga agtcaaggta acagacac

28

<210> 5

<211> 25

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer	
<400> 5	
ttgattggag acatcttgt gggag	25
<210> 6	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 6	
taaggccat tactgctcg gagatta	27
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 7	
gcatcgagat tctgtcacaa tcaa	24
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 8	
aaggatgtca gcacctctct ggg	23
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 9	
acccacccgg actctactcc tacca	25
<210> 10	
<211> 50	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Expression Vector
 <400> 10
 acaaccctct cagccttcgc tttggaaac gctacaatgg ctacattac 50
 <
 210> 11
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Expression Vector
 <400> 11
 cgcttggga aacgctacaa tggctacatt tacagaagag ctgttaaag agcc 54
 <210> 12
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Expression Vector
 <400> 12
 ccccttcacc gccaccctt accccctccc tggatggatc tttggcaact tcatgtg 57
 <210> 13
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Expression Vector
 <400> 13
 ctacccctg aatctttc ggcacccgaa cccaaagta gccatgattt tcagc 55

 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 14
 gccactgaca tcatttttt g 21
 <210> 15

<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 15	
gaaacagaaa gttgaagtgg	20
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 16	
tcaccctgac tgctatgagt gga	23
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 17	
atgagtcagt cgataatgac acg	23
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 18	
ttatgcaaaa gaagaaaggt g	21
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 19	

gcagagttcg acctacttcc attg

24

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20

tatacatagc ccccatttc agtg
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 21

ggcagcagg aggccagcaa
 <210> 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22

gtcctctgca ttcaggagaa cag

19

23

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 23

ctaaaagtat tttatttaca tagt
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

24

<220><223> Primer	
<400> 24	
aggcagctcc tttgaatga t	21
<210> 25	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 25	
agagaagggt gaaaactttt t	21
<210> 26	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> Bos primigenius	
<400> 26	
tgtgatgaac actccacaga atctcgatgc tgtcggtacc ctctaactgt ggattttga	59
<210> 27	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 27	
tgtgacagaa tctcgatgct gtcgttaccc tctaactgtg gattttga	48
<210> 28	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 28	
ttggcgttga ttgtgacaga atctcgatgc tgtcggtacc ctctaactgt ggattttga	59
<210> 29	
<211> 61	
<212> DNA	

<213> Sus scrofa
 <400> 29
 tagatggatg aaaccgaaat tagaagttc tttgctagat atggttcagt aaaagaagtg 60
 a 61
 <210> 30
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 30
 tagacggatg aaaccgaaat tagaagttgg atccttgct agatatggtt cagtaaaagg 60
 agtga 65
 <210> 31
 <211> 65
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 31
 tagacggatg aaaccgaaat tagaagttgg atccttgct agatatggtt cagtaaaagg 60
 agtga 65
 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 32
 tagatggatg aaaccgaaat tagaagtga 29
 <210> 33
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele

 <400> 33

tagatggatg aaaccgatat ggttcagtaa aagaagtga	39
<210> 34	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 34	
tagatggact agatatggtt cagtaaaaga agtga	35
<210> 35	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 35	
tcatggaaga agtatcagcc attcatccct cccaggaaga cagaaattct gggtaaccca	60
c	61
<210> 36	
<211>	
> 65	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 36	
tcacggaaga agtatcagcc attcatccct cccagtgaag cttacagaaa ttctgggtca	60
gccac	65
<210> 37	
<211> 65	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 37	
tcatggaaga agtatcagcc attcatccct cccagtgaag cttacagaaa ttctgggtca	60
accac	65
<210>	
38	
<211> 64	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 38

tcatggaaga agtatcagcc attcatccct ccccccagga agacagaaat tctgggtcaa 60

ccac 64

<210> 39

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 39

tcatggaaga agtatcagcc attcatccct cccagtgaag cttacagaaa ttctgggtca 60

gccac 65

<210> 40

<211> 61

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 40

tcatggaaga agtatcagcc attcatccct cccaggaaga cagaattct gggtcaacca 60

c 61

<210> 41

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 41

tcacggaaga agtatcagcc attcatccct cccagtgaag cttacagaaa ttctgggtca 60

accac 65

<210> 42

<211> 58

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 42

tcatggaaga agtatcagcc attcatccct ccgaagacag aaactctggg tcaaccac	58
---	----

<210> 43

<211> 90

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 43

gtgctgcgtg cccttactg ctctactcta ccccctacca gcctgggtgc tggcgactt	60
---	----

catgtgcaag ttccctcaact acatccagca	90
-----------------------------------	----

<210> 44

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<220><221> misc_feature

<222> (45)..(46)

<223> Modified base

<220><221> misc_feature

<222> (48)..(48)

<223> modified base

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> modified base

<400> 44

gtgctgcgtg cccttactg ctctactcta ccccctacca gcctnnnnn gtgctggcgc	60
---	----

acttcatgtg caagttccctc aactacatcc	90
-----------------------------------	----

<210> 45

<211> 630

<212> DNA

<213> Oreochromis Niloticus

<400> 45

acatggggag acaaacaatt tttggatctg gtgctgaaag atgagactac tggcttggc	60
--	----

tgtggttgc gcttcattg ctatccagga tggagggagt gtgggagcag ctctgccagg	120		
agtcgaccct gcacagagaa cacatgcaac aggaggcgtg tcctctgcat tcaggagaac	180		
agcaggcgac ttccctggcag aggatcccag cctctgcctt tccctgagag agaacggagga	240		
ccagaggcag ctcccttgca atgatgcag aagtaatttc aactacaacc ctctcagcct	300		
tcgccttggg aaacgctaca atggctacat ttacagaaga gctgttaaaa gagccagaac	360		
aaaaaaagttt tcacccttct ctctgttctt gcgagaactg gaggtaacca cctgaaacag	420		
aagactttct ctggggatt atgttatttg tttggaaagt caaaactgtga cagcagtgtt	480		
cttaaaaactc ttatattcag aaaaaaaggt ttccctgatt aaaactttt cacctatctt	540		
taatgtaaaa taatttcag atgctacaat ggagagaact atgtaaataa aatacttttta	600		
gagagctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	630		
<210> 46			
<211> 169			
<212> PRT			
<213> Oreochromis Niloticus			
<400> 46			
Met Arg Leu Leu Ala Leu Ala Val Val Cys Ala Leu Ile Ala Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Gly Gly Ser Val Gly Ala Ala Leu Pro Gly Val Asp Pro Ala Gln			
20	25	30	
Arg Thr His Ala Thr Gly Ala Val Ser Ser Ala Phe Arg Arg Thr Ala			
35	40	45	
Gly Asp Phe Leu Ala Glu Asp Pro Ser Leu Cys Phe Ser Leu Arg Glu			
50	55	60	
Asn Glu Asp Gln Arg Gln Leu Leu Cys Asn Asp Arg Arg Ser Asn Phe			
65	70	75	80
Asn Tyr Asn Pro Leu Ser Leu Arg Phe Gly Lys Arg Tyr Asn Gly Tyr			
85	90	95	
Ile Tyr Arg Arg Ala Val Lys Arg Ala Arg Thr Lys Lys Phe Ser Pro			
100	105	110	
Phe Ser Leu Phe Leu Arg Glu Leu Glu Val Pro Thr Asn Arg Arg Leu			
115	120	125	

Ser Leu Gly Asn Tyr Val Ile Cys Leu Glu Ser Gln Thr Val Thr Ala
 130 135 140
 Val Phe Leu Lys Leu Phe Ile Ser Glu Lys Lys Val Ser Leu Ile Lys
 145 150 155 160
 Thr Phe Ala Pro Ile Phe Asn Val Lys
 165

<210> 47
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Oreochromis Niloticus
 <400> 47
 Met Tyr Ser Ser Glu Glu Leu Trp Asn Ser Thr Glu Gln Val Trp Ile
 1 5 10 15
 Asn Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Gly Arg His Glu Asp Asp Glu
 20 25 30
 Glu Glu Glu Gly Asp Lys His Pro Phe Phe Thr Asp Ala Trp Leu Asx
 35 40 45
 Pro Leu Phe Phe Ser Leu Ile Met Leu Val Gly Leu Val Gly Asn Ser

50 55 60
 Leu Val Ile Tyr Val Ile Ser Lys His Arg Gln Met Arg Thr Ala Thr
 65 70 75 80
 Asn Phe Tyr Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Ile Ile Phe Leu Val
 85 90 95
 Cys Cys Val Pro Phe Thr Ala Thr Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Ile
 100 105 110
 Phe Gly Asn Phe Met Cys Lys Phe Val Ala Phe Leu Gln Gln Val Thr

115 120 125
 Val Gln Ala Thr Cys Ile Thr Leu Thr Ala Met Ser Gly Asp Arg Cys
 130 135 140
 Tyr Val Thr Val Tyr Pro Leu Lys Ser Leu Arg His Arg Thr Pro Lys
 145 150 155 160
 Val Ala Met Ile Val Ser Ile Cys Ile Trp Ile Gly Ser Phe Val Leu

165	170	175
Ser Thr Pro Ile Leu Met Tyr Gln Arg Ile Glu Glu Gly Tyr Trp Tyr		
180	185	190
Gly Pro Arg Gln Tyr Cys Met Glu Arg Phe Pro Ser Lys Thr His Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Ile Leu Tyr Gln Phe Ile Ala Ala Tyr Leu Leu Pro Val		
210	215	220
Leu Thr Ile Ser Phe Cys Tyr Thr Leu Met Val Lys Arg Val Gly Gln		
225	230	235
Pro Thr Val Glu Pro Val Asp Asn Asn Tyr Gln Val Asn Leu Leu Ser		
245	250	255
Glu Arg Thr Ile Ser Ile Arg Ser Lys Val Ser Lys Met Val Val Val		
260	265	270
Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Cys Trp Gly Pro Ile Gln Ile Phe Val		
275	280	285
Leu Phe Gln Ser Phe Tyr Pro Asn Tyr Gln Pro Asn Tyr Ala Thr Tyr		
290	295	300
Lys Ile Lys Thr Trp Ala Asn Cys Met Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Val		
305	310	315
Asn Pro Ile Val Tyr Gly Phe Met Gly Ala Ser Phe Gln Lys Ser Phe		
325	330	335
Arg Lys Thr Phe Pro Phe Leu Phe Lys His Lys Val Arg Asp Ser Ser		
340	345	350
Met Ala Ser Arg Thr Ala Asn Ala Glu Ile Lys Phe Val Ala Ala Glu		
355	360	365
Glu Gly Asn Asn Asn Ala Val Asn Ser Arg Ser Phe Asn Ile Arg		
370	375	380
Arg Ile Gly Thr Val Phe		
385	390	
<210> 48		
<211> 1215		

<212> DNA

<213> Oreochromis Niloticus

<400> 48

aactcctgtc acgtgtact cctccgagga gctgtggaac tccaccgagc aggtctggat	60
caacggatcc ggaacaaact tctctctagg aagacacgag gacgatgagg aggaggaagg	120
agacaagcat ccttcttca cggatgcctg gctggccct ctgttcttct ctctcatcat	180
gctggtcgga ctggtggca actctctggt cattatgtc atttcaaaac acagacagat	240
gaggacggca accaacttct acatagcaaa cctggccgcc actgacatca tcttcttggt	300

gtgctgcgtc cccttacccg ccacccctta ccccccctt ggttggatct ttggcaactt	360
catgtgcaaa tttgtcgctt ttctgcagca ggtgacgggtg caagccacct gcatcaccct	420
gactgctatg agtggagacc gctgttacgt gacagrctac cccctgaaat ctcttcggca	480
ccgaacccccc aaagtagcca tgattgtcag catttgcatt tggatcggtt ctttcgctt	540
ctctacacca atttaatgt accagcgat agaggaggc tactggtagc gcccggaggca	600
atactgcattt gagagattt cctctaagac gcatgagagg gctttcatcc tgtaccagtt	660
cattgctgcc tacctgctgc ctgtgctcac tatcttttgc tgctacactc tgatggtaaa	720

gagggttggc cagcccactg tagaacctgt agacaataat tatcaggta atccctgtc	780
ttagagaaca atcagcatcc ggagcaaaat ttccaagatg gtggtagtga ttgtgcttct	840
ctttggccatc tgctggggc ccatccagat ctttgcctc ttccagtctt tctatcctaa	900
ctaccagecct aactacgcca catacaagat caagacgtgg gccaactgca tgcctacgc	960
caactcctct gtcaacccca tagttatgg cttagtggc gcttagttcc aaaagtcttt	1020
caggaaaact ttcccttcc tttcaagca caaggtcaga gacagcagca tggctcaag	1080
gactgccaat gctgagatta agtttggc tgcggaggaa ggcaacaata ataacgcgg	1140

gaactgatcc cgatcatttta acataagaag gataggaca gtttctaat gagaatcctg	1200
aaaaaaaaaaaa aaaaa	1215

<210> 49

<211> 59

<212> DNA

<213> Oreochromis Niloticus

<400> 49

tttcaactac aaccctctca gccttcgctt tggaaacgc tacaatggct acatttaca	59
---	----

<210> 50

<211> 58

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(44)
 <223> modified base
 <400> 50
 tttcaactac aaccctctca gccttcgctt tgggannnn nnnnaacgct acaatggc 58

<210> 51
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(39)
 <223> modified base
 <400> 51
 tttcaactac aaccctctca gccttcgctt tgggannna acgtacaat ggctacatt 59

<210> 52
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <220><221> misc_feature
 <222> (30)..(32)
 <223> Modified Base
 <400> 52
 tttcaactac aaccctctca gccttcgctn nnacgctaca atggctacat ttaca 55

<210
 > 53
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele

<400> 53	
tttcaactac aaccctctca gcctaaccgt acaatggcta catttaca	48
<210> 54	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 54	
tttcaactac aaccctctca gcctacgcta caatggctac atttaca	47
<210> 55	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 55	
tttcaactac aaccctctca gccttcgcta caatggctac atttaca	47
<210> 56	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 56	
tttcaactac gaccctctca gccttcgcta caatggctac atttaca	47
<210> 57	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 57	
tttcaactac aaccctctca gccttcgctg caatggctac atttaca	47
<210> 58	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Modified Allele

<400> 58

tttcaactac aaccctctca acgctacaat ggctacattt aca 43

<210> 59

<211> 64

<212> DNA

<213> Oreochromis Niloticus

<400> 59

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca ccgaaccccc aaagtagcca tgattgtcag 60

catt 64

<210> 60

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(33)

<223> Modified Base

<400> 60

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca nnncccaaa gtagccatga ttgtcagcat 60

t 61

<210> 61

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 61

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca ccccaaagt agccatgatt gtcagcatt 59

<210> 62

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 62
 gacagtctac cccctgaaat ctcttcggcc cccaaagtag ccatgattgt cagcatt 57
 <210> 63
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 63
 gacagtctac cccctgaaat ctctcccc aaagtagcca tgattgtcag catt 54

<210> 64
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(24)
 <223> modified base
 <400> 64
 gacagtctac cccctgaaat nnnnccaaag tagccatgtat tgtcagcatt 50
 <210> 65
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 65
 gacagtctac ccccaaagta cccatgattt tcagcatt 38
 <210> 66
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Oreochromis Niloticus
 <400>
 66
 ggcaccgaac ccccaaagta gccatgattt tcagcattt cattt 45
 <210> 67

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 67
 ggcacccaaa gtagccatga ttgtcagcat ttgcatttg atcgg 45
 <210> 68
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Oreochromis Niloticus
 <400> 68
 ggcaccgaac cccaaagta gccatgattt tcagcattt cattggatc g 51
 <210> 69
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <400> 69
 ggcacccca aagttagccat gattgtcagc attgcattt ggatcggt 48
 <210> 70
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Allele
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> modified base
 <220><221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> modified base
 <400> 70
 ggcaccccn cagtaaccat ganttgattt atttcattt gattcggatc g 51
 <210> 71
 <211> 59

<212> DNA	
<213> Oreochromis Niloticus	
<400> 71	
tttcaactac aaccctctca gccttcgctt tggaaacgc tacaatggct acatttaca	59
<210> 72	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 72	
tttcaactac aaccctctca gccttcgctta caatggctac atttaca	47
<210> 73	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 73	
tttcaactac aaccctctca gctacaatgg ctacatttac a	41
<210> 74	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> Oreochromis Niloticus	
<400> 74	
gacagtctac cccctgaaat ctcttcggca ccgaaccccc aaagttagccca tgattgtcag	60
catt	64
<210> 75	
<211> 61	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Modified Allele	
<400> 75	
gacagtctac cccctgaaat ctcttcggca aaccccaaa gtagccatga ttgtcagcat	60
t	61

<210> 76

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 76

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca ccccaaagt agccatgatt gtcagcatt 59

<210> 77

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 77

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca cccaaagtccatgattgt cagcatt 57

<210> 78

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 78

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca cccaaagtccatgattgtc agcatt 56

<210> 79

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 79

gacagtctac cccctgaaat ctttcgca cccaaagtccatgattgtca gcatt 55

<210> 80

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Allele

<400> 80
 gacagtctac cccctgaaat ctcttcggca aagtacccat gattgtcagc att 53
 <210> 81
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Oreochromis Niloticus
 <400> 81
 agaagtaatt tcaactacaa ccctctcagc cttcgcttg ggaaacgcta caatggctac 60
 atttacagaa gaga 74
 <210> 82
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Protein

<400> 82
 Arg Ser Asn Phe Asn Tyr Asn Pro Leu Ser Leu Arg Phe Gly Lys Arg
 1 5 10 15
 Tyr Asn Gly Tyr Ile Tyr Arg Arg Ala
 20 25

<210> 83
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Modified Protein

<400> 83
 Arg Ser Asn Phe Asn Tyr Asn Pro Leu Ser Tyr Asn Gly Tyr Ile Tyr
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala

<210> 84
 <211> 63

<212> DNA
 <213> Oreochromis Niloticus

<400> 84

acagtctacc ccctgaaatc tcttcggcac cgaacccca aagttagccat gattgtcagc 60

att 63

<210> 85

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Protein

<400> 85

Arg Ser Asn Phe Asn Tyr Asn Pro Leu Ser Leu Arg Phe Gly Lys Arg

1 5 10 15

Tyr Asn Gly Tyr Ile Tyr Arg Arg Ala

20 25

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified Protein

<400> 86

Thr Val Tyr Pro Leu Lys Ser Leu Arg Pro Pro Lys

1 5 10