

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0131577 2012년12월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/10</i> (2006.01) <i>C12N 15/62</i> (2006.01) <i>C12N 15/85</i> (2006.01) <i>A01K 67/027</i> (2006.01) (21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2011-0049851 2011년05월26일 없음	(71) 출원인 한밭대학교 산학협력단 대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동) 지노믹디자인 주식회사 대전광역시 대덕구 대덕대로1417번길 20 (문평동)	
		(72) 발명자 여상엽 대전광역시 서구 월평북로 11, 주공아파트 202동 1012호 (월평동) 유재호 대전광역시 유성구 지족로 343, 반석마을아파트 210-1102 (지족동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김중관, 권오식, 박창희	

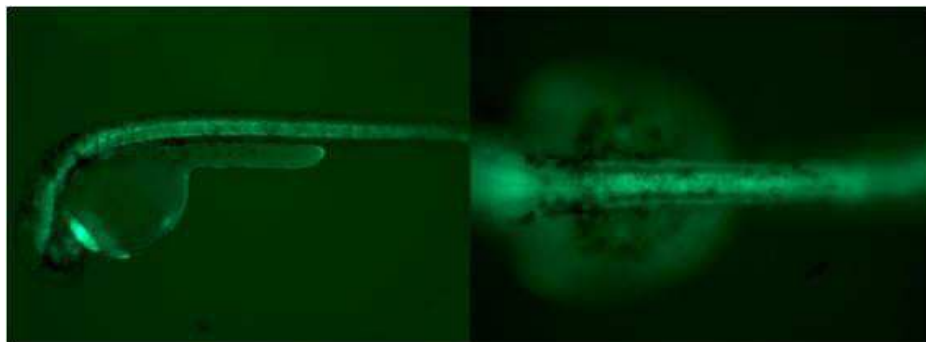
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **수초화 세포 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬**

(57) 요약

본 발명은 수초화 세포 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬에 관한 것으로, 상기 본 발명에 따른 신경계 수초화 (myelination) 세포에 형광단백질이 발현하는 형질전환 제브라피쉬는 수초화 세포의 발달 및 관련된 질환인 다발성경화증을 연구함에 있어서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김철희

대전광역시 유성구 어은로 57, 129동 907호 (어은동, 한빛아파트)

박해철

경기도 안산시 단원구 광덕1로 80, 104동 804호 (초지동, 호수마을)

정승현

충청남도 청양군 비봉면 신원리 162번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000381400110

부처명 중소기업청

연구사업명 산학협력실 지원사업

연구과제명 UV 유도 형광 유전자를 이용한 형질전환 제브라피쉬 library 개발

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2009.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 8의 융합 유전자 컨스트럭트(construct)를 게놈 내 포함하여 수초화 세포 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 서열번호 8의 컨스트럭트는 Tol2 트랜스포존(transposon)과 Tol2 트랜스포존(transposon) 사이에 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터, GAL4 및 EosFP의 유전자 단편을 순차적으로 융합시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 서열번호 8의 컨스트럭트는

- 1) 서열번호 3의 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터를 클로닝하는 단계;
- 2) 서열번호 9의 Gal4VP16 유전자 단편 및 서열번호 10의 2A-EosFP 유전자 단편을 클로닝하는 단계; 및
- 3) 상기 1) 단계의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터와 상기 2) 단계의 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하는 단계;를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 2) 단계의 서열번호 9의 Gal4VP16 유전자 단편은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 증폭하는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 2) 단계의 서열번호 10의 2A-EosFP 유전자 단편은 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머로 증폭하는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 제브라피쉬는 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터에 의해 수초화 세포 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 형광단백질은 GFP(green fluorescent protein) 또는 RFP(Red Fluorescent Protein)인 것을 특징으로 하는 형질전환 제브라피쉬.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수초화 세포 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경계는 크게 중추신경계와 말초신경계로 구성되어 있으며, 중추신경계는 뇌(brain)와 척수(spinal cord)로 구성되어 있다. 신경계를 구성하는 세포들은 그 기능에 따라 전기신호를 전달하는 신경세포(neuron)와 이들 신경세포의 기능을 도와주는 신경교세포(glia)들로 크게 나눌 수 있으며, 또한 신경세포는 존재하는 위치와 그 기능에 따라서 수많은 종류로 나누어지며 신경교세포들은 신경세포의 절연체 역할을 하는 회돌기교세포(Oligodendrocyte, CNS), 신경초세포(Schwann cell, PNS)와 신경세포의 기능을 도와주는 별아교세포(astrocyte), 신경교세포(glia) 그리고 신경세포가 정확하게 자기위치로 이동하는 것을 도와주는 방사교세포(radial glia) 등으로 구성된다. 이들 신경세포 및 신경교세포들은 생체 내에서 서로 복잡한 유기적 구조를 이루어 상호작용을 통하여 신경계가 정상적으로 작동하도록 한다.

[0003] 상기 회돌기교세포는 중추신경계에서, 신경초세포는 말초신경계에서 신경세포의 축색돌기(axon)를 미엘린(myelin)이라는 절연수초로 감싸주어 수초형성(myelination)시킴으로서 신경세포의 전기신호전달에 중요한 역할을 수행하는 신경교세포로서 신경세포와 수초화 세포가 서로 정확한 유기적 구조를 이루었을 때 신경계가 정상적으로 기능할 수 있게 된다. 이러한 수초형성(myelination)은 여러 가지 이유로 손상을 받을 수 있으며 미엘린이라는 절연수초가 손상되어 탈수초화(demyelination)가 일어나면 새로운 수초형성이 이루어지는 것으로 알려져 있다. 하지만 여러가지 원인으로 수초가 손상된 신경세포의 축색돌기에 새로운 수초형성이 이루어지지 않게 되면 신경세포의 축색돌기에서 원활한 전기신호전달이 이루어지지 않아 발생부위에 따라 운동마비, 언어장애, 의식장애 등의 증상이 나타나는 다발성경화증(multiple sclerosis)을 보이게 된다. 상기 다발성경화증은 중추신경계의 가장 일반적인 질병 중의 하나이나 이에 대한 치료법은 아직 잘 알려져 있지 않다.

[0004] 또한, 미엘린 수초의 손상을 유도하거나 손상된 개체에서 다시 재생된다는 사실은 계속적으로 회돌기교세포를 만들어내는 줄기세포가 존재하고 있음을 보여주는 증거이지만, 아직까지 회돌기교세포를 만들어내는 줄기세포에 대하여는 전혀 밝혀진 바가 없다. 또한 손상된 미엘린 수초가 어떤 과정을 통하여 재생되는지에 관한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 신경세포가 정상적으로 기능하기 위해서는 미엘린에 의한 수초형성이 필요하기에 다발성경화증의 치료 및 줄기세포를 이용한 각종 뇌손상 치료를 위해서 신경줄기세포에 대한 연구와 더불어 신경세포의 기능에 필요한 회돌기교세포를 만들어내는 줄기세포의 확인 및 이들의 분화조절기작에 대한 연구가 필요하다.

[0005] 한편, Mbp(myelin-basic protein)는 중추신경계와 말초신경계에서 수초화 세포를 형성하는 회돌기교세포와 신경초세포를 구성하는 단백질이다. 수초화 세포를 연구함에 있어서, mbp 유전자의 경우 수정된 하나의 세포가 완전한 개체로 발생할 때 성숙한 수초화 세포에 발현하며, 신경세포의 전기신호전달함에 있어서 중요한 작용을 한다.

[0006] 최근 연구 동향을 살펴보면 신경발생에서 신경세포와 신경의 축색돌기를 감싸주어 신경세포의 전기신호전달에 중요한 역할을 하는 수초화 세포의 기작에 관한 연구는 각각의 세포에 해당하는 분자적 지표를 이용하여 표지하거나, 형질전환개체를 제작하여 진행되고 있으며, 분자적 지표를 이용하는 경우에는 특정 발생단계에 해당하는 현상만을 관찰하는 한계가 있지만, 안정적인 형질전환개체를 이용할 경우 살아있는 개체에서 실시간으로 신경세포와 수초화 세포의 기작을 관찰 할 수 있어, 이러한 연구흐름에 대비하기 위해서 수초화 세포의 발생에 대한 전반적인 기작을 연구하기 위한 형질전환 제브라피쉬 제작이 필요하다. 이에 본 발명에서는 신경세포에 형광단백질이 발현하는 형질전환개체를 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수초화 세포 특이적으로 발현되는 형질전환 제브라피쉬를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수초화 세포 특이적으로 형광을 발현시켜 다양한 단백질의 생체 내 기능 분석이 가능한 형질전환 제브라피쉬를 제공한다.

[0009] 본 발명에서 용어, “벡터”란 연결되어 있는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터의 하나의

유형인 “플라스미드”는 그 안에 추가적으로 DNA 조각을 연결시킬 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프를 말한다.

- [0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0011] 본 발명은 서열번호 8의 융합 유전자 컨스트럭트(construct)를 게놈 내 포함하여 수초화 세포 특이적으로 형광 단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 제공한다.
- [0012] 상기 서열번호 8의 컨스트럭트는 Tol2 트랜스포존(transposon)과 Tol2 트랜스포존(transposon) 사이에 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터, GAL4 및 EosFP의 유전자 단편을 순차적으로 융합시켜 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 8의 컨스트럭트는
- [0014] 1) 서열번호 3의 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터를 클로닝하는 단계;
- [0015] 2) 서열번호 9의 Gal4VP16 유전자 단편 및 서열번호 10의 2A-EosFP 유전자 단편을 클로닝하는 단계; 및
- [0016] 3) 상기 1) 단계의 인헨서 트랩(enhancer trap) 프로모터와 상기 2) 단계의 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하는 단계;를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 2) 단계의 서열번호 9의 Gal4VP16 유전자 단편은 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 증폭될 수 있으며, 상기 2) 단계의 서열번호 10의 2A-EosFP 유전자 단편은 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머로 증폭될 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 형질전환 제브라피쉬는 mbp(myelin-basic protein)의 프로모터에 의해 수초화 세포 특이적으로 발현되는 것을 특징으로 한다. 상기 mbp 유전자는 회돌기교세포(Oligodendrocyte, CNS)와 신경초세포(Schwann cell, PNS)에 의해 형성되는 수초화 현상에 작용하며, 상기 mbp 유전자의 프로모터에 의한 형광단백질의 발현도 mbp 유전자와 동일하게 수초화 세포에 발현됨을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 수초화 세포를 모니터링하기 위한 방법으로 형광단백질을 암호화하는GFP(green fluorescent protein) 또는 RFP(Red Fluorescent Protein) 유전자를 이용한다.
- [0020] 보다 상세하게는 수초화 세포에 작용하는 유전자의 프로모터 및 형광단백질의 발현을 유도하는 벡터를 융합시켜 제조되는 융합 유전자 컨스트럭트(construct)를 제조한 후 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 직접근육주입법(direct muscle injection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(trnsposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 제브라피쉬에 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에서는 발현 벡터를 제브라피쉬의 배아에 미세주입법으로 형질전환시켰다.
- [0021] 상기 융합 유전자 컨스트럭트가 게놈 내 포함된 형질전환 제브라피쉬는 형광 단백질인 GFP(green fluorescence protein) 유전자가 수초화 세포의 발생과정에서의 발달 단계를 살아있는 개체에서 확인할 수 있을 뿐 아니라 신경세포와 수초화 세포의 발생과정에서의 기작에 대한 탐지가 가능하여 신경세포와 수초화 세포간의 관련 질환에 대한 활용성이 높은 장점이 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 신경계 수초화 (myelination) 세포에 형광단백질이 발현하는 형질전환 제브라피쉬는 수초화 세포의 발달 및 관련된 질환인 다발성경화증을 연구함에 있어서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 mbp 프로모터 부분에 대한 전기영동 사진(A) 및 염기서열(B)을 보여주는 것이고,
- 도 2는 본 발명에 따른 mbp 프로모터:gal4를 갖는 벡터에 대한 구성도를 모식화한 도면이며,
- 도 3은 본 발명에 따른 수초화 세포 특이적 형질전환용 재조합 벡터(pDestTol2CG2-mbp-Gal4VP16-2A-EosFP-pA)의 전체 염기서열을 보여주는 것이고,
- 도 4는 본 발명에 따른 수초화 세포 특이적 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFP를

이용한 형질전환 제브라피쉬를 교배하여 얻은 제브라피쉬의 32시간된 발생배아로, 수초화 세포에서 녹색 형광을 발현하는 것을 형광현미경으로 관찰한 결과이며,

(좌: Lateral view, 우: Dorsal view)

도 5는 본 발명에 따른 수초화 세포 특이적 형질전환용 재조합 벡터를 이용한 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFP 또는 UAS:RFP를 이용한 형질전환 제브라피쉬 교배를 통해 얻은 발생배아로부터 수초화 세포 특이적으로 형광단백질을 확인한 결과이다.

(좌: GFP, 우: RFP)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 구체적인 실시 예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에 종사하는 업자에게는 명백한 것이다.
- [0025] 이 때, 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다.
- [0026] 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.
- [0027] **[실시예 1] 수초화 세포에 발현하는 mbp 유전자의 프로모터 클로닝**
- [0028] 수초화 세포에 발현하는 mbp 유전자의 프로모터를 분리하기 위해 Ensembl Zebrafish Genome Database를 이용하여 염기서열을 확인하고, mbpP Fp(서열번호 1: GTC GAC CAG ATG CTG AGA TGT GACTAC TGC AAA TGA) 및 mbpP Rp(서열번호 2: GGA TCC GTT GAT CTG TTC AGT GGT CTA CAG TCT GGA) 프라이머를 사용하여 95℃ 5분 1번 반복, 95℃ 30초, 58℃ 30초, 72℃ 2분 30번 반복, 72℃ 7분 1번 반복으로 PCR을 수행하여 1,953 bp의 mbp 유전자의 프로모터를 합성하였다.
- [0029] 이를 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하고, 이 벡터의 염기서열을 확인하여 zebrafish ensembl database에 존재하는 mbp 유전체의 조절부위 염기서열을 확인하였다. 결과는 도 1에 나타내었다.
- [0030] 상기의 제작된 벡터의 염기서열은 (주)제노텍에 sequencing을 의뢰하여 확인하였으며, 플라스미드 DNA 정제는 코스모 주식회사에서 판매하는 LaboPass DNA purification Kit를 이용하였다.
- [0031] 분리한 mbp 프로모터는 mbp 유전자의 첫 번째 엑손(exon)으로부터 5' 방향으로 1,873 bp에 해당하고 3' 방향으로 80 bp의 첫 번째 엑손을 포함하는 총 1,953 bp의 길이를 포함하였다(서열번호 3). 프로모터 스캔 데이터베이스(Promoter Scan Database)를 이용하여 프로모터 내에 결합하는 전사조절인자들을 검색한 결과, 첫 번째 엑손으로부터 -601 bp에 sp1, -239 bp에 nkx-2, -214, -68, -59 bp에 sox-10, -50 bp에 pura 와 같은 결합부분이 검색되었다.
- [0032] 상기 검색된 전사조절인자들은 현재 보고된 정보에 의하면 수초화 세포의 발달에 작용하는 것으로, 2003년 Qiou Wei에 의해 *Gene* 저널에 보고된 human, mouse, rat에서 mbp 유전자의 프로모터에 해당하는 약 300 bp 정도에 염기서열과 이에 작용하는 전사인자들을 분석한 결과와 본 발명에서 제시한 제브라피쉬의 것과 매우 동일한 것으로 분석되었다.
- [0033] 상기에서 분리된 mbp 프로모터를 p5E MCS vector에 클로닝 하기 위해 pGEM-T easy 벡터를 제한효소 *Sa*I와 *Bam*HI으로 처리하여 mbp promoter를 분리한 뒤, 역시 제한효소 *Sa*I와 *Bam*HI으로 처리된 p5E MCS vector에 클로닝 하여 p5E-mbp vector를 제작하였다. 각각의 제한효소는 37℃에서 2시간 동안 반응하여 1953 bp의 mbp 프로모터와 2808 bp의 p5E MCS vector를 분리 및 정제 하였으며, 상온에서 Ligation Mix(Takara Co.)를 이용하여 30분간 라이게이션 한 뒤, 이를 DH5 α *E.coli* 균주에 형질전환 하여 p5E-mbp vector를 제작하였다.
- [0034] 벡터의 염기서열은 SolGent에 분석을 의뢰하여 확인하였고, 플라스미드 DNA의 정제는 MACHEREY-NAGEL에서 판매하는 NucleoBond XtraMidi kit을 이용하였으며 p5E MCS vector는 Invitrogen에서 판매되고 있는 gateway

cloning에 사용되는 vector를 구입하여 사용하였다.

[0035] [실시예 2] Gal4VP16 및 2A-EosFP의 클로닝

[0036] Gal4VP16-2A-EosFP를 pME 다중 클로닝 위치 벡터(multiple cloning site vector, 미국 Chien Lab에서 제공)에 클로닝 하기 위하여, 우선 PCR을 통하여 하기의 프라이머 세트를 이용하여 Gal4VP16 유전자 단편 및 2A-EosFP 유전자 단편을 증폭하였다. PCR조건은 annealing 온도 60℃(40초), extension 온도는 72℃(40초), denaturation 온도는 94(1분)으로 하여 30회 운전하였다.

[0037] 상기 유전자 단편은 2A(GenBank: FJ863663.1), Gal4vp16(GenBank: GU452684.1), EosFP(GenBank: AY765217.1)를 이용하였다.

[0038] 서열번호 4: Gal4VP16(F) HindIII (ataagcttTGGACCATGAAGCTACTGTCT),

[0039] 서열번호 5: Gal4VP16(R) BamHI (atggatccCATATCCAGAGCGCCGTAGG),

[0040] 서열번호 6: 2A peptide EosFP(F) BamHI
(GtggatccGGAGCCACGAACCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAACCCCGTCCCATGGATATGAGTGCGA),

[0041] 서열번호 7: EosFP(R) XbaI (tctagaTTATCGTCTGGCATTGTC)

[0042] 상기 증폭된 유전자 단편의 염기서열을 확인한 결과, 도 4의 염기서열을 가진 651 bp의 Gal4VP16 유전자 단편과 도 5의 염기서열을 가진 753 bp의 2A-EosFP 유전자 단편을 수득할 수 있었다.

[0043] 상기 증폭된 유전자 단편을 제한효소 *HindIII*, *BamHI* 및 *XbaI*을 각각 1unit씩 37℃에서 2시간동안 처리한 후, pME 벡터를 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)에 클로닝하여, pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터를 제작하였다.

[0044] [실시예 3] 조직 특이적 형질전환용 재조합 벡터의 제조

[0045] 상기 실시예 1의 p5E-mbp 벡터 및 상기 실시예 2의 pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터를 Tol2 트랜스포존 시스템(transposon system)에 재조합하기 위하여 LR 재조합 시스템(recombination system)을 사용하였다.

[0046] 상기 클로닝된 p5E-mbp 벡터, pME Gal4VP16-2A-EosFP 벡터 및 p3E polyA 벡터(미국 Chien Lab에서 제공)는 각각 10 fmole, pDestTol2CG2 게이트웨이 벡터(invitrogen cat#: 12537-103)는 20 fmole의 양을 1.5 ml 튜브에 전체 양을 7 ul에 맞추도록 TE 버퍼를 사용하였고, 다음에 LR 리컴비네이즈(recombinase) 2 ul를 천천히 혼합하여 상온에서 16시간 동안 반응하였다. 이후 프로테이나제 K(proteinase K)를 1 ul(2 ug/ul)를 넣은 후 37℃배양기에서 15분간 처리한 후, DH5α 대장균 균주에 형질전환하여, pDestTol2CG2-mbp-Gal4VP16-2A-EosFP-pA 벡터(서열번호 8)를 제조하였다.

[0047] 참조: p5E MCS, pME MCS 및 pDestTol2CG2 vector

[0048] 정보: Tol2 kit(http://chien.neuro.utah.edu/tol2kitwiki/index.php/Main_Page)

[0049] [실시예 4] 제브라피쉬를 이용한 재조합 벡터의 미세주입

[0050] 상기 실시예 3에서 만들어진 재조합 벡터를 이용하여 제브라피쉬의 배아에 미세주입 하였다. 미세주입방법은 일반적인 제브라피쉬의 미세주입방법으로 제브라피쉬 1 내지 2세포기 발생배아에 미세주입을 위해 하루 전날 밤에 암컷과 수컷을 각각 세 마리씩 분리하여 교미상자(mating cage)에 넣고 암처리화 하였다. 다음날 아침에 암수를 섞어서 교배시키면서 산란된 발생배아를 수집하여 인젝션용 1% 아가로즈 플레이트(agarose plate)의 일직선의 홈에 차례로 정렬시킨 뒤 끝이 둥근 미세 유리관을 이용하여 발생배의 세포방향이 미세주입기구(microinjector)를 향하도록 하였다. 미세유리바늘(microcapillary)을 이용하여 재조합 된 벡터를 100 ng/ul 농도로 발생배아의 세포질에 적당량(~50 pl)을 주입한 후, 발생배들을 egg water에 옮긴 뒤 28.5℃에서 배양하여 형광현미경하에서 GFP의 발현양상을 관찰하고, 이를 성체까지 유지시키면서 교배하여 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다. 도 4에서도 확인할 수 있듯이, 재조합 벡터의 mbp promoter에 의한 수초화 세포 특이적으로 형광발현을 발생배에서 관찰할 수 있다.

[0051] [실시예 5] 신경세포 특이적인 유전자 발현

[0052] 본 발명에 따른 상기 실시예 4로부터 제조된 형질전환 제브라피쉬 내 GAL4 유전자가 수초화 세포 특이적으로 발현이 되는지를 확인하기 위해서, 상기 실시예 4의 GAL4를 포함하고 있는(pDestTo12CG2-mbp-Gal4VP16-2A-EosFP-pA) 형질전환 제브라피쉬와 UAS:GFPcaxx 형질전환 제브라피쉬를 교배하여, 수초화 세포에서 형광단백질(GFP 또는 RFP)이 발현을 확인하였다.

[0053] 상기 UAS:GFPcaxx는 GAL4에 의해서 녹색 형광단백질이 세포막에 부착되어 발현되도록 제조된 재조합 단백질이고, UAS:RFP는 Red Fluorescent Protein으로 실시예에서는 H2A mcherry를 사용하여 GAL4에 의해서 발현될 경우, 세포핵에서 붉은 형광을 띄도록 제조된 재조합 단백질이다.

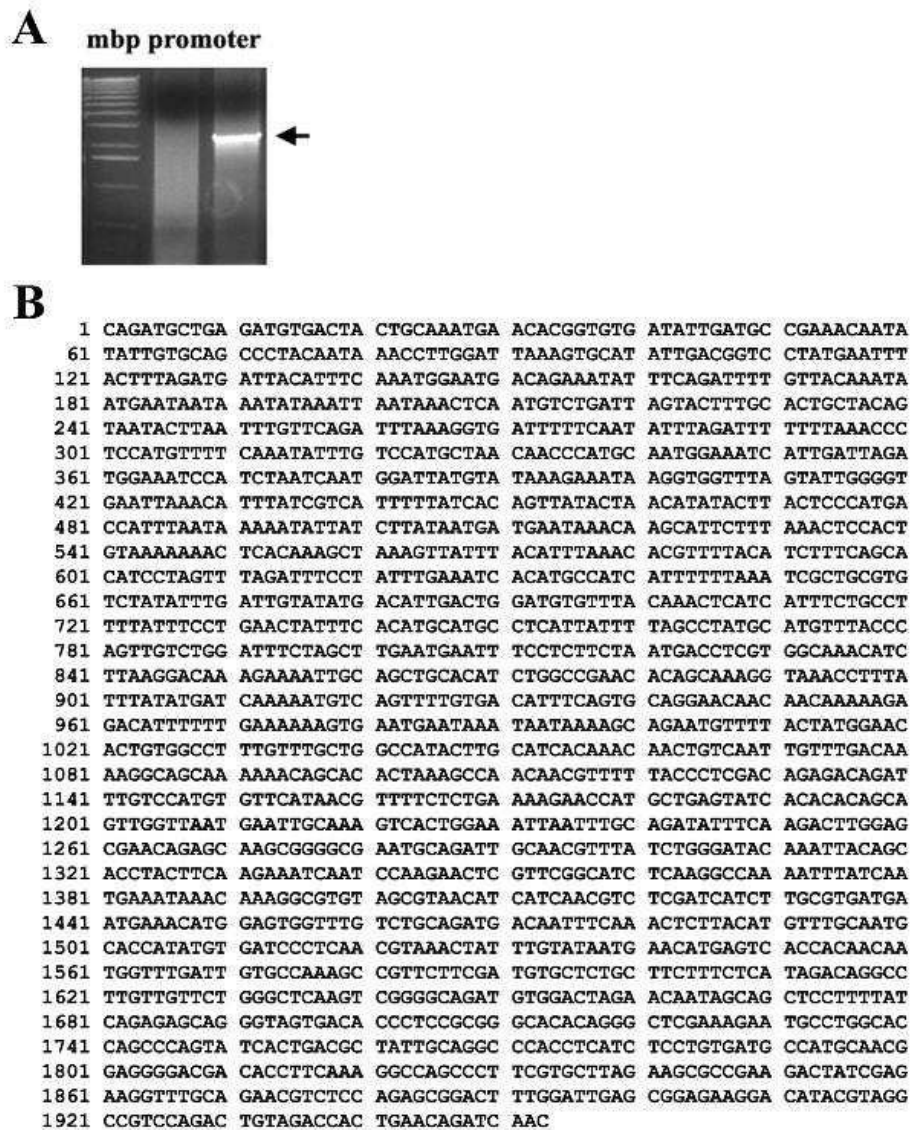
[0054] 그 결과, 도 5에서도 확인한 수 있듯이, 교배를 통해 얻은 발생배아로부터 수초화 세포 특이적으로 형광단백질(GFP, RFP)이 GAL4 유전자에 의해 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 상기의 결과로부터 본 발명에 따른 수초화 세포 특이적 형질전환용 재조합 벡터는 재조합 벡터 내 mbp(myelin-basic protein) 유전자의 프로모터에 의해 수초화 세포 특이적으로 형광단백질이 발현됨을 확인하였고, 더 나아가 수초화 세포에서 안정적으로 GFP가 발현하는 형질전환개체를 제조하여 수초화 세포와 신경세포간의 발생 및 재생, 독성물질에 대한 반응, 다발성경화증과 같은 질환 등의 연구를 수행할 수 있는 장점이 있다.

[0056] 또한 성체에서도 수초화 세포에 형광단백질의 발현이 유지되는 것을 확인함으로써 성체에서도 형질전환개체를 이용한 수초화 세포에 대한 연구가 가능해졌다. 이로써 본 발명은 인간의 수초화 세포 관련 발달 및 질환을 연구함에 있어서, 제브라피쉬 모델 동물을 이용하여 제작한 형질전환개체에서 질환을 유도하고 표현형(phenotype) 및 관련 분자적 메커니즘을 연구할 수 있는 동물모델로의 사용에 크게 기여할 것이다.

도면

도면1



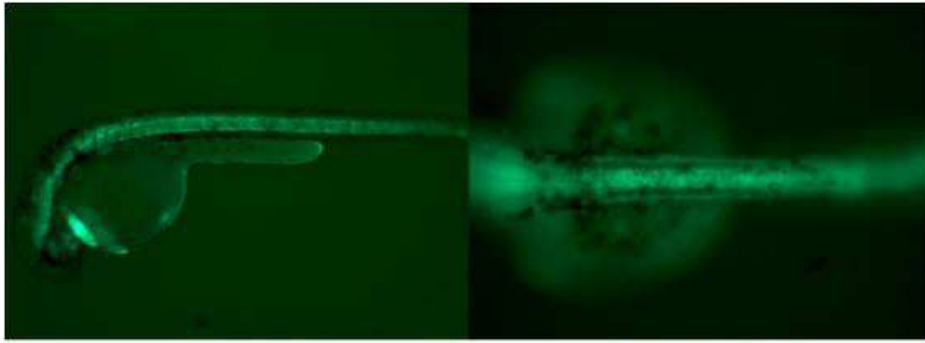
도면2

CCACCTAAATTTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTA
 TAAATCAAAAGATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGACTCCAACGTCAAGGGGCGAAAAAC
 GTCTATCGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTGTGGGTCGAGGTGCGGTAAAGCACTAAATGGAAACCTAAAGGGAGGCCGCC
 GATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGAGCGGAGGCGGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCAACGCT
 GCGCGTAAACCAACACCGCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCATTCAGGCTGGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCC
 TCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGGCGATTAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTCCAGTCAACGCTGTGTAACACGACGGCA
 GTGAGCGCGGTAAATACGACTCCTATAGGGCGAATTTGGTACCGCATATGCTTCTGACAGAGGTGTAAGAAAGTACTCAAAATTTTACTCAAGTGAAGT
 ACAAGTACTTAGGGAAAAATTTACTCAATTTAAAGTAAAGTATCTGGCTAGAATCTTACTTGAGTAAAGTAAAAAGTACTCCATTAAAAATTTGACTTGAG
 TATTAGATCTGGGGCCCCCTCGAGGTGAGCAGATGCTGAGATGTGACTACTGCAATGAACACGGTGTGATATTGATGCGGAAACAAATATTGTGACGCG
 CTACAATAAACCTTGGATTAAAGTGCATATTGACGGTCTATGAATTTACTTTAGATGATTACATTTCAAAATGGAATGACAGAAATATTTCAGATTTTGTTC
 AAATAATGAATAAATAATAA
 ATATTAGATTTTTTAAACCCCTCAATGTTTTCAAAATTTTGTCCATGCTAACACCCCATGCAATGGAATCATTGATTAGATGGAATCCATCTAATCAATG
 GATTATGTATAAAGAAATAGGTGGTTAGTATTGGGTGAATTAACATTTATCGTCAATTTTATCAGATTAATCAATATACCTTACTCCCATGACCAT
 TTAATAAAAAATATTCTTATAATGATGAATAAACAAGCATTCTTAACTCCACTGTAAAAAACTCACAAAGCTAAAGTTATTACATTTAAACACGTTTT
 ACATCTTTACGACATCGCTAGTTTAGATTTCCTATTGAATCAGATGCCATCATTTTTAAATCGCTGGTGTCTATATTGATTGTATATGACATGACGTG
 TGTGTGTTTACAACTCATCTTTCTGCTTTTATTTCTGCACTATTTCACATGATGCCCTCATTTTATAGCTATGCAATTTTACCCAGTTTGTGGATT
 CTAGCTTGAATGAATTTCTCTTCTAATGAACCTCGTGGCAACATCTTAAGGACAAAGAAAAATTCAGCTGACATCTGGCGAACACAGCAAAAGTAAACC
 TTTATTTATATGATCAAAATGTGATTTTTGTGACATTTCACTGACGGAACCAACCAAAAGAGACATTTTTTGAAGAAAGTGAATGAATAAATAAATAAAG
 CAGAATGTTTTACTATGGAACACTGTGGCTTTGTTGCTGGCCTACTTGCATCAACAAACACTGTCAATTTGTGACAAAGGCGAGCAAAACAGCACAC
 TAAAGCCAAACACGTTTTTACCTCGACAGAGACAGATTTGTCATGTGTTCAATACGTTTCTCTGAAAGAACCATGCTGAGTATCACACACAGCATGTGG
 TTAATGAATGCAAGTCACTGGAATTAATTTGACAGATTTTCAAGACTTGGAGCGAACAGAGCAAGCGGGCGAATGCAATTTGCAACGTTTATCTGGGAT
 ACAATTTACAGCACTTACTTCAAGAACTCAATCGAAGCTCGTTGGCATCTCAAGGCAAAATTTATCAATGAAATAAACAAGGGCGTGTAGCGTAACATC
 ATCAACGCTCTGACATCTTTGGTGAATGAATGAACATGGAGTGGTTTGTCTGAGATGACAATTTCAAACTCTTACATGTTTGAATGCAACCATATGATC
 CCTCAAGCTAACTATTGTATAATGAACATGAGTCAACCAACATGGTTTGAATGTGCCAAAGCGTCTTCTGATGTGCTGCTCTTCTATCATAGACAG
 GCCTTGTGTTCTGGCTCAAGTGGGGCAGATGTGACTAGAACAATAGCAGCTCCTTTTATCAGAGAGCAGGAGTGTGACACCTCGCGGGCACACAGGG
 CTGGAAGAAATGGCTGGCAGCAGCCAGTATCACTGACGCTATTGACAGGCCACCTCATCTCTGTGATGCCATGCAACGGAGGGGACGACACCTTCAAGGG
 CAGCCCTTGGTCTTGAAGCGCGAGAGTATCGAGAGGTTTGCAGAACGCTCTCGAGAGCGGACTTTGGATTGAGCGGAGAGGACATACGTAGGGCTCC
 AGACTGTAGCACTGAACAGATCAACGATGCGATAAGCTTTGGACCATGAAGCTACTGCTTCTATCGAACAAGCATGCGATTTTGGCGACTTAAAGAG
 TCAAGTGTCTGGAAGAAACCGAAGTGGCGGCTGGGATGCTGAAGAACACTCGGAGTGTGCTACTCTCCCAAAACCAAAAGGCTCTCGCTGACTAGGGACA
 TCTGACAGAGTGAATCAAGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTCTACTGATTTTCTCTGAGAGACCTTGACATGATTTTGAAGATGGATTCTTTACAG
 GATATAAAGCATTTGTAACAGGATTTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGTGGCTCAGATAGATTTGGCTCAGTGGAGCTGATATGCCCTAATCAT
 TGAGACAGATAGAATAAGTGGACATCATCGGAAGAGAGTGTGAACAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCTCGAGGTGACGCCGGGAATTCAGAT
 CTCTCGAGCGCGCGCGCGCGAGCTGTGAGCTGGGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGAGCTGGCGATGGCGCATGCGCAGCGCTAGACGATTTGAT
 GTTGACATGTTGGGGACGGGGATTTCCCGGGTCCGGGATTTACCCCGCAGCAGCTCCCGCGCTCTGGATATGGGATCCGGAGCCACGAACTTCT
 CTCTGTTAAGGACAGCAGGAGACGTGGGAAGAAACCGCGTCCCATGGATATGAGTGGGATTAAAGCAGACATGAAGATCAACCTCGGTATGGAAGGCAACGT
 AAAGGGCGACCACTTTGTGATCGACGAGATGTCACAGCGAGGCTTTGAGGGAAACAGAGTATGATCTTGAAGTCAAAGAGGGCGGACCTCTGCCTTTT
 GCCTTTGATATGCTGAGCAGCTGATTTCCATTACGGCAACAGGGTATTCGCGGAATATCCAGACCATACAAGACTTTTTAAGCAGTCTGTTTCTAAGGGGT
 ATTGCTGGGAGAGCTTGACTTTTGAAGACGGGGCATTTGCAATTTGCCAGAAACGACATAACAATGGAAGGGGACACTTCTATAAATAAGTTGATTTTCA
 CGGTACAGACTTTCCCGCCAATGGTCCAGTATATCGAAGAGAGAGCTGAAATGGAGCGCTCCACTGAGAAATGATGTGCGTGTGAGTGTGCTGAGGCT
 GATATTACATGGCTTTGTTGCTGAAGGAAATGCCATTACCGATGTGACTTCAGAACTACTTACAAGCTAAGGAGAGGGGTGCAAGTTACCGAGCTACC
 ACTTTGTGACCATGCTATTGAGATTTAAGCCATGACAAGATTACAACAAGGTTAAGCTGTATGAGCATGCTGTTGCTCATTCTGGATTGCTGCACTGTC
 CAGACGATATCTGAACATATAGTGAGTGTATTACGTAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAACTAGAATGAGTGAAGAA
 AATGCTTTATTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTGTGAACATTATAAGCTGCAATAACAAGTTTAAACAACAAATTTGATTTATTTATGTTTCA
 GGTTCAAGGGGAGGTGTGGAGGTTTTTAAATTCGCGCGCGCGTGGAGCTCCTCGAGCGCGCGCGCAAGTGTCTCCAAAAAATAAGTACTTTTGAAGTGA
 ATAAAAATTTGAAGGATAAAAAGTACTTTTTTTCTAAAAAATGTAATTAAGTAAAGTAAAGTATTGATTTTTAATTGTACTCAAGTAAAGTAAAAATCC
 CCAAAAAATAACTTTAAGTACAGTAACTCAAGTAAAAATTACTCAAGTACTTTACACCTCTGGTTCTTGACCCCTACCTTCAGCAAGCCAGCAGATCGCTAGC
 GTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTGGCGTAAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACACATACGAGC
 CGGAAGCATAAAGTGAAGGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGCTAACTCACATTAATTGGTGTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTGCTGTC
 CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTGGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGGCTGCTTGGCTGCTGCG
 TGGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATTAACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGGCAGCAAAAGGC
 CAGGAACCGCTAAAAAGGCGCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCGCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAAGGTTGGCGAAACCGC
 ACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTGCTGCGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTGCGCGCTTTCTCGCT
 CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGGTGTAGGTGCTTCCGCTCAAGCTGGCTGTGTGACAGAACCCCGGTTCAAGC
 CGACCGCTGGCGCTTATCGGTTAACTATGCTCTTGAAGTCAACCGGTAAAGACAGACTTATCGCACTGGCAGCAGGCACTGTAAACAGGATTAGCAGAGCG
 AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGGTTCTTGAAGTGTGGCTTAACACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTTACCT
 TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAAGTGGGCAAAACAAACCGCTGGTACGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAAAAAAAGATC
 TCAAGAAAGATCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAAGCAAACTCAAGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAGGATCTTCAACC
 TAGATCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTTAACTCAATCAAGTATATAGTGAATTAAGTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAAGCACTATCT
 CAGGATCTGTCTATTCTGTTTCAATAGTGTGCTGACTCCCGCTGTGTAGTAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGAT
 ACCGCGAGACCGCTCAGCGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCGAGCGGAGGGCGAGGGCAGAGGAGTGTCTGCAACTTTATCGCGCTCCATC
 CAGTCTATTAAATTTGTTGGCGGGAAGCTAGATAGTGTGCGCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCACTGGTGTGCAAGCTGT
 CGTTTGGTATGGCTCATTGACGCTCCGGTTCACACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCGCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTGGTCTCGAT
 CGTTGTGCAAGATAGTTGGCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTTACTGTATGCGCATCGTAAGATGCTTTTCTGTGACT
 GGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAAGATAGTGTATGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCGCGGTCAATACGGGATTAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
 TAAAGTGTCTCATATTGGAAGGAGCTTTCTGGGGCGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTGTGACCCCACTG
 ATCTTTCAGCATCTTTTCACTTTCACCGAGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCGCGCAAAAGGGGAAATAGGGCGACACGGAAATGTTGAATA
 CTCATCTCTTCTTTTCAATATATTGAGGATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGATTATGAAAAATAAACAATAGGGG
 TTCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTG

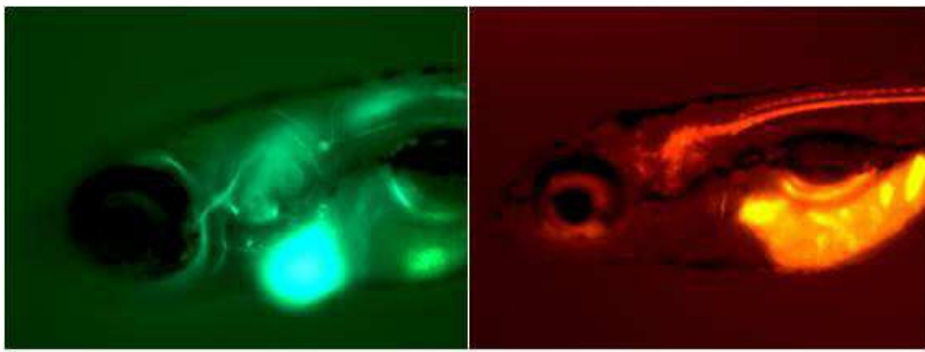
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

- <110> Hanbat National University Industry-Academic Cooperation Foundation
Genomic Design Bioengineering Company
- <120> Myelination in cell-specific transgenic expression of fluorescent
proteins in Zebrafish
- <160> 10
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 36
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> forward primer
- <400> 1
- gtcgaccaga tgctgagatg tgactactgc aaatga 36
- <210> 2
- <211> 36

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	2	
ggatccgttg atctgttcag tggctctacag tctgga		36
<210>	3	
<211>	1965	
<212>	DNA	
<213>	zabrafish	
<220><221>	promoter	
<222>	(1)..(1965)	
<223>	mbp promoter	
<400>	3	
gcaaatgaac acggtgtgat attgatgccg aaacaatata ttgtgcagcc ctacaataaa		60
ccttggatta aagtgcata tgcaggtcct atgaatttac tttagatgat tacatttcaa		120
atggaatgac agaaatatat cagattttgt tacaataat gaataataaa tataaattaa		180
taaactcaat gtctgattag tactttgcac tgctacagta atacttaatt tgttcagatt		240
taaaggatgat ttttcaatat ttagattttt ttaaaccctc catgttttca aatatttgc		300
catgctaaca acctatgcaa tggaaatcat tgattagatg gaaatccatc taatcaatgg		360
attatgtata aagaaataag gtggtttagt attgggtga attaacatt tatcgtcatt		420
tttatcacag ttatactaac atatacttac tcccatgacc atttaataaa aatattatct		480
tataatgatg aataaacaag cattctttta actccactgt aaaaaaactc acaaagctaa		540
agttatttac atttaaacac gttttacatc ttccagcaca tcctagtta gatttcctat		600
ttgaaatcac atgccatcat tttttaaatc gctgcgtgac tatatttgat tgtatatgac		660
attgactgga tgggtttaca aactcatcat ttctgccttt tatttcctga actatttcac		720
atgcatgcct cattatttta gcctatgcat gtttaccag ttgtctggat ttctagcttg		780
aatgaatttc ctcttcta gacctcgtgg caaacatctt aaggacaaag aaaattgcag		840
ctgcacatct ggccgaacac agcaaaggta aacctttatt tataatgatca aaaatgtcag		900
ttttgtgaca ttacagtga ggaacaacaa caaaaagaga cttttttga aaaaagtga		960
tgaataaata ataaaagcag aatgttttac tatggaacac tgtggccttt gtttgcctgc		1020
catacttgca tcacaacaa ctgtcaattg ttgacaaaa ggcagcaaaa aacagcacac		1080

taaagccaac aacgttttta ccctcgacag agacagattt gtccatgtgt tcataacgtt 1140
 ttctctgaaa agaaccatgc tgagtatcac acacagcagt tggttaatga attgcaaagt 1200
 cactggaaat taatttgcag atatttcaag acttggagcg aacagagcaa gcggggcgaa 1260
 tgcagattgc aacgtttatc tgggatacaa attacagcac ctacttcaag aaatcaatcc 1320
 aagaactcgt tcggcatctc aaggccaaaa ttatcaatg aaataaaca aggcgtag 1380
 cgtaacatca tcaacgtctc gatcatcttg cgtgatgaat gaaacatgga gtggtttgtc 1440

tgcagatgac aatttcaac tcttacctgt ttgcaatgca ccatatgtga tcctcaacg 1500
 taaactatgt gtataatgaa catgagtcac cacaacaatg gtttgattgt gccaaagccg 1560
 ttcttcgatg tgctctgctt cttttcata gacaggcctt gttgttctgg gctcaagtcg 1620
 gggcagatgt ggactagaac aatagcagct ccttttatca gagagcaggg tagtgacacc 1680
 ctccgcgggc acacagggtc cgaaagaatg cctggcacca gccagtatc actgacgcta 1740
 ttgcaggccc acctcatctc ctgtgatgcc atgcaacgga ggggacgaca cttcaaagg 1800
 ccagcccttc gtgcttagaa gcgccgaaga ctatcgagaa ggtttgcaga acgtctccag 1860

agcggacttt ggattgagcg gagaaggaca tacgtaggcc gtccagactg tagaccactg 1920
 aacagatcaa cggatccccg ggtaccggtc gccaccatgg tgagc 1965

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 4

ataagctttg gaccatgaag ctactgtct 29

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 5

atggatccca tatccagagc gccgtagg 28

<210> 6

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 6

gtggatccgg agccacgaac ttctctctgt taaagcaagc aggagacgtg gaagaaaacc 60

ccggtcccat ggatatgagt gcga 84

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 7

tctagattat cgtctggcat tgtc 24

<210> 8

<211> 6927

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> pDestTol2CG2 mbp Gal4VP16 2A EosFP pA vector sequence

<400> 8

ccacctaaat tgtaagcgtt aatatcttgt taaaattcgc gttaaatttt tgtaaataca 60

gtctattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 120

ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 180

actccaacgt caaaggcgca aaaaccgtct atcaggcgca tggcccacta cgtgaaccat 240

caccctaate aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 300

ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 360

agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 420

ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacaggcgcc gtcatttcg ccattcaggc 480

tgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 540

aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 600

gttgtaaaac gacggccagt gagcgcgcgt aatcagctc actatagggc gaattgggta 660

ccggcatatg gttcttgaca gaggtgtaaa aagtactcaa aaattttact caagtgaaag 720

tacaagtact tagggaaaaa ttactcaat taaaagtaaa agtatctggc tagaatctta 780

cttgagtaaa agtaaaaaag tactccatta aaattgtact tgagtattag atctgggccc 840

cccctcgagg tcgaccagat gctgagatgt gactactgca aatgaacacg gtgtgatatt	900
gatgccgaaa caatatattg tgcagcccta caataaacct tggattaaag tgcattatga	960
cggtcctatg aatttacttt agatgattac atttcaaatg gaatgacaga aatatttcag	1020
attttgttac aaataatgaa taataaataa aaattaataa actcaatgtc tgatttagtac	1080
tttgactgc tacagtaata cttaatttgi tcagatttaa aggtgatttt tcaatattta	1140
gattttttta aaccctccat gttttcaaat atttgtccat gctaacaacc catgcaatgg	1200
aaatcattga ttagatggaa atccatctaa tcaatggatt atgtataaag aaataaggtg	1260
gttttagtatt ggggtgaatt aaacatttat cgtcattttt atcacagtta tactaacata	1320
tacttactcc catgaccatt taataaaaaat attatcttat aatgatgaat aaacaagcat	1380
tctttaaact ccaactgtaaa aaaactcaca aagctaaagt tatttacatt taaacacgtt	1440
ttacatcttt cagcacatcc tagtttagat ttctattttg aaatcacatg ccatcatttt	1500
ttaaatcgct gcgtgtctat atttgattgt atatgacatt gactggatgt gtttacaac	1560
tcatcatttc tgccttttat ttctgaact atttcacatg catgcctcat tattttagcc	1620
tatgcatgtt taccagttg tctggatttc tagcttgaat gaatttcctc ttctaagac	1680
ctcgtggcaa acatcttaag gacaagaaa attgcagctg cacatctggc cgaacacagc	1740
aaaggtaaac ctttatttat atgatcaaaa atgtcagttt tgtgacattt cagtgcagga	1800
acaacaacaa aaagagacat tttttgaaaa aagtgaatga ataaataata aaagcagaat	1860
gttttactat ggaacactgt ggcctttgtt tgctggccat acttgcacaa caaacaactg	1920
tcaattgttt gacaaaaggc agcaaaaaac agcacactaa agccaacaac gtttttacc	1980
tcgacagaga cagatttgc catgtgttca taacgttttc tctgaaaaga accatgctga	2040
glatcacaca cagcagttgg ttaatgaatt gcaaagtcac tggaatttaa ttgcagata	2100
tttcaagact tggagcgaac agagcaagcg gggcgaatgc agattgcaac gtttatctgg	2160
gatacaaatt acagcaccta cttcaagaaa tcaatccaag aactcgttcg gcatctcaag	2220
gccaaaattt atcaatgaaa taaacaaagg cgtgtagcgt aacatcatca acgtctcgat	2280
catcttgcgt gatgaatgaa acatggagtg gtttgtctgc agatgacaat ttcaaactct	2340
tacatgtttg caatgcacca tatgtgatcc ctcaacgtaa actatttgta taatgaacat	2400
gagtccacc aacaatggtt tgattgtgcc aaagccgttc ttcatgtgc tctgcttctt	2460
tctcatagac aggccttgtt gttctgggct caagtcgggg cagatgtgga ctagaacaat	2520
agcagctcct ttatcagag agcagggtag tgacaccctc cgcgggcaca cagggtcga	2580
aagaatgcct ggcaccagcc cagtatcaat gacgtattg caggcccacc tcatctcctg	2640
tgatgccatg caacggaggg gacgacacct tcaaaggcca gcccttcgtg cttagaagcg	2700

ccgaagacta tcgagaaggt ttgcagaacg tctccagagc ggactttgga ttgagcggag	2760
aaggacatac gtaggccgtc cagactgtag accactgaac agatcaacgg atccgataag	2820
ctttggacca tgaagctact gtcttctatc gaacaagcat gcgatatttg ccgacttaaa	2880
aagctcaagt gctccaaaga aaaaccgaag tgcgccaagt gtctgaagaa caactgggag	2940
tgtcgtact ctcccaaac caaaaggtct ccgctgacta gggcacatct gacagaagtg	3000
gaatcaaggc tagaaagact ggaacagcta tttctactga ttttctctg agaagacctt	3060
gacatgattt tgaatatgga ttctttacag gatataaag cattgttaac aggattattt	3120
gtacaagata atgtgaataa agatgccgtc acagatagat tggcttcagt ggagactgat	3180
atgcctctaa cattgagaca gcatagaata agtgcgacat catcatcgga agagagtagt	3240
aacaaaggtc aaagacagtt gactgtatct tcgaggtcga ccccggaat tcagatctct	3300
cgagccgccc ccccgaccga tgtcagcctg ggggacgagc tccacttaga cggcgaggac	3360
gtggcgtagg cgcatgccga cgcgctagac gatttcgac tggacatgtt gggggacggg	3420
gattccccgg gtccgggatt tccccccac gactccgcc cctacggcgc tctggatatg	3480
ggatccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc	3540
ggtcccatgg atatgagtgc gattaagcca gacatgaaga tcaacctccg tatggaaggc	3600
aacgtaaagc ggcaccactt tgtgatcgac ggagatggta caggcaggcc ttttgaggga	3660
aaacagagta tggatcttga agtcaaagag ggcggacctc tgccttttgc ctttgatc	3720
ctgaccactg cattccatta cggcaacagg gtattcgccg aatatccaga ccacatacaa	3780
gactatitta agcagtcgtt tcctaagggg tattcgtggg aacgaagctt gactttcgaa	3840
gacgggggca ttigcattgc cagaaacgac ataacaatgg aaggggacac tttctataat	3900
aaagttcgat ttcacgttac aaactttccc gccaatggc cagttatgca gaagaagacg	3960
ctgaaatggg agccctccac tgagaaaatg tatgtgcgtg atggagtgt gacgggtgat	4020
attcacatgg ctttgttgct tgaaggaaat gccattacc gatgtgactt cagaactact	4080
tacaaagcta aggagaaggg tgtcaagtta ccaggctacc actttgtgga ccactgcatt	4140
gagattttaa gccatgacaa agattacaac aagggttaagc tgtatgagca tgctgttgct	4200
cattctggat tgcctgacaa tgccagacga taatctagaa ctatagttag tcgtattacg	4260
tagatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt	4320
gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgt atgctattgc tttatttgta accattataa	4380
gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg	4440
aggtgtggga ggttttttta ttccggcccg cgggtggagct cctcgagccg ggcccaagt	4500

atctccaaaa aataagtact ttttgactgt aaataaaatt gtaaggagta aaaagtactt	4560
ttttttctaa aaaaatgtaa ttaagtaaaa gtaaaagtat tgatttttaa ttgtactcaa	4620
gtaaagtaaa aatccccaaa aataatactt aagtacagta atcaagtaaa attactcaag	4680
tactttacac ctctggttct tgacccctta ccttcagcaa gccagcaga tcgctagcgt	4740
tccctttagt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg	4800
tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa	4860
gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct	4920
ttccagtcgg gaaacctgic gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga	4980
ggcggtttgc gtattgggcg ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc	5040
gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa	5100
tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt	5160
aaaaaggccg cgttgcctgc gtttttccat aggctcgcgc cccctgacga gcatcacaaa	5220
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt	5280
ccccctggaa gctccctcgt gcgctcctct gttccgaccc tgcgccttac cggatacctg	5340
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc	5400
agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggtgtgtgac acgaaccccc cgttcagccc	5460
gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcga acccggtgaag acacgactta	5520
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgtg aggcggctgt	5580
acagagtctt tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc	5640
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa	5700
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa	5760
aaaggatctc aagaagatcc ttgatctttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa	5820
aactcacgtt aagggaattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt	5880
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac	5940
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc	6000
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc	6060
cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgtcaccgg ctccagattt atcagcaata	6120
aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc	6180
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg	6240

aacgttgttg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 6300
 ttcagctccg gtcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa 6360
 gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca 6420
 ctcatggta tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt 6480
 tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 6540
 tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 6600
 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 6660

tccagttcga tgtaaccac tegtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 6720
 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataaggcg 6780
 acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 6840
 ggttatgtgc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 6900
 gtccgcgca catttcccg aaaagtg 6927

<210> 9
 <211> 650
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Gal4VP16
 <400> 9

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60

tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120
 tctcccaaac caaaaggctc ccgctgacta gggcacatct gacagaagtg gaatcaaggc 180
 tagaaagact ggaacagcta tttctactga tttttctcga agaagacctt gacatgattt 240
 tgaaaatgga ttctttacag gatataaaag cattgttaac aggattattt gtacaagata 300
 atgtgaataa agatgccgtc acagatagat tggcttcagt ggagactgat atgcctctaa 360
 cattgagaca gcatagaata agtgcgacat catcatcgga agagagtagt aacaaaggtc 420
 aaagacagtt gactgtatct tcgaggtcga ccccggaat tcagatctct cgagccgccc 480

ccccgaccga tgtcagcctg ggggacgagc tccacttaga cggcgaggac gtggcgatgg 540
 cgcatgccga cgcgctagac gatttcgac tggacatgtt gggggacggg gattccccgg 600
 gtccgggatt tacccccac gactccgcc cctacggcgc tctggatatg 650

<210> 10
 <211> 753
 <212> DNA

<213> Unknown

<220><223> 2A-EosFP sequence

<400> 10

ggatccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc	60
gggccatgg atatgagtc gattaagcca gacatgaaga tcaacctccg tatggaagc	120
aacgtaaagc ggcaccactt tgtgatcgac ggagatggta caggcaggcc tttttaggga	180
aaacagagta tggatcttga agtcaaagag ggccggacctc tgccttttgc ctttgatata	240
ctgaccactg cattccatta cggcaacagg gtattcgccg aatatccaga ccacatacaa	300
gactatatta agcagtcgtt tcctaagggg tattcgtggg aacgaagctt gactttcgaa	360
gacgggggca ttgcatcgc cagaaacgac ataacaatgg aaggggacac tttctataat	420
aaagtccgat ttcacggtag aaactttccc gccaatggc cagttatgca gaagaagacg	480
ctgaaatggg agccctccac tgagaaaatg tatgtgcgtg atggagtgtc gacgggtgat	540
attcacatgg ctttgttgct tgaaggaaat gccattacc gatgtgactt cagaactact	600
tacaaagcta aggagaaggg tgtcaagtta ccaggctacc actttgtgga ccaatgcatt	660
gagattttaa gccatgacaa agattacaac aagggttaagc tgtatgagca tgctgttgct	720
cattctggat tgcctgacaa tgccagacga taa	753