



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0097526
(43) 공개일자 2009년09월16일

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0022720

(22) 출원일자 2008년03월12일

심사청구일자 2008년03월12일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

이준현

대전 유성구 어은동 한빛아파트 103-606

박용현

충남 계룡시 금암동 167-1 우림루미아트아파트
111-1403

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 5 항

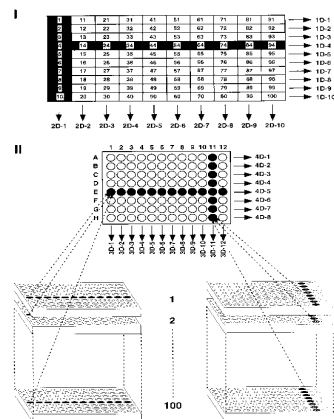
(54) 돼지 내인성 레트로바이러스의 검출을 위한 연결서열 및 프라이머쌍

(57) 요약

본 발명은 돼지 유전자에 삽입되어 있는 PERV의 연결서열 및 이를 이용한 PERV 검출용 프라이머 쌍에 관한 것으로, 연결서열인 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나를 포함하는 염기서열과, ① 상기 연결서열을 포함하는 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드와, ② PERV 유전자 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드로 이루어진 돼지 게놈 내 융합된 PERV 검출을 위한 프라이머 쌍에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 돼지의 조직 또는 장기로부터 이중익식 시 문제의 소지가 있는 PERV의 존재를 사전에 검출할 수 있으며, 더 나아가 해당 유전자를 녹아웃(knock-out)시키는 데 이용할 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

정기철

인천 중구 신흥동3가 7-235 신흥아이파크 106-1502

정우영

충남 공주시 신탄동 19 주공아파트 411-801

유성란

대전 유성구 신성동 152-1 대림두레아파트 105-902

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070101080009

부처명 농촌진흥청

연구사업명 현장협력기술개발

연구과제명 한국재래돼지에서 내인성 리트로바이러스(PERV)의 특성분석

주관기관 충남대학교

연구기간 2005. 4. 30~2008. 4. 30

특허청구의 범위

청구항 1

돼지 게놈에 융합된 돼지 내인성 레트로바이러스(PERV)에 대한 3'- 또는 5'-연접서열로서, 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나를 포함하는 염기서열.

청구항 2

제 1 항의 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드와, PERV 유전자 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드로 이루어진 것을 특징으로 하는 돼지 게놈 내 융합된 PERV 검출을 위한 프라이머 쌍.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 프라이머 쌍은 서열번호 15-16, 17-18, 19-20, 21-22, 23-24, 25-26, 27-28 또는 29-30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 돼지 게놈 내 융합된 PERV 검출을 위한 프라이머 쌍.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항의 프라이머 쌍을 사용하여 돼지 조직 또는 장기 검체로부터 PCR에 의해 PERV를 검출하는 방법.

청구항 5

제 2 항 또는 제 3 항의 프라이머 쌍을 사용하여 돼지 게놈 DNA로부터 PERV를 녹아아웃하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 한국 재래돼지(Korean native pig; *Sus scrofa*) 유전자에 삽입되어 있는 돼지 내인성 레트로바이러스(PERV)의 연접서열(flanking sequence) 및 이를 이용한 PERV 검출용 프라이머 쌍에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 장기이식이란 환자를 치료하기 위하여 인간 또는 동물의 생체 또는 사체로부터 적출한 조직 또는 장기를 환자의 체내에 이식하여 그 기능을 대행시키기 위한 외과적 처치를 말한다. 장기이식은 이식용 대체조직 또는 대체장기의 취득대상에 따라 이식용 장기를 환자 자신의 다른 신체부위로부터 취하는 자가이식, 다른 사람으로부터 적출하여 이식하는 동종이식, 인공장기를 포함하여 사람이 아닌 동물로부터 구하는 이종이식으로 나눌 수 있다.
- <3> 이 중 자가이식은 취득대상 장기의 종류에 한계가 있어 동종이식이 주로 행해지고 있으나, 수급의 불균형이 심각하기 때문에 아직 실험 단계에 머물고 있는 이종이식의 실현이 절실히 요구되고 있다.
- <4> 이종간 장기이식(Xenotransplantation)시 가장 적합한 동물은 돼지이다. 장기의 크기가 사람과 비슷하고 원숭이 등의 영장류와 다르게 윤리적으로 문제가 되지 않기 때문이다(Chari et al., 1994; Groth et al., 1994; Deacon et al., 1997; Lee and Moran, 2001). 또한 인간과 유전적 일치도도 비교적 높은 편이며 산자수도 평균 10여마리 정도로 많고 성장 기간도 짧은 장점이 있다.
- <5> 그러나, 이종이식에는 해결해야 할 문제점이 있는데 그 하나가 면역적 불일치의 문제이다. 세포 표면에는 종고유의 당단백질(glycoprotein)이 있고 이것이 항원으로 작용함으로써 특정 세포가 이종세포인지 여부를 구별할 수 있게 된다. 돼지의 고유 당단백질 성분의 하나인 알파-1,3-갈락토스는 인체에 면역계에 대해 항원으로 작용하므로, 돼지 세포가 침입(이식)되면 인체의 면역세포들이 이에 민감하게 반응을 하는 소위 '면역거부반응'이 일어나게 된다. 최근에는 돼지의 체세포의 핵에서 상기 알파-1,3-갈락토스를 만드는 효소를 생성하는 유전자를 제거한 복제돼지가 생산되어 급성 면역거부반응을 피할 수 있는 길이 열렸다. 그러나 돼지에는 인간과 다른 종류의 당 성분이 몇 가지 더 존재하기 때문에 면역거부반응 문제가 완전히 해소된 것은 아니다.

- <6> 이종이식의 또 다른 문제점은 돼지 내인성 레트로바이러스(Porcine Endogenous Retrovirus, PERVs)로 인한 것이다. 자연계의 동물은 모두 자신에게 적응된 바이러스를 유전자에 갖고 있는데, 이 바이러스는 숙주에게는 해가 되지 않지만 이식한 장기에서는 어떤 영향을 끼칠지 알 수 없다. 수 백만년 전에 숙주인 돼지의 genome에 끼어든 것으로 분석되는 상기 PERV는 그 기능이 명확히 밝혀져 있지는 않지만, 멘델의 유전 양식에 의하여 다음 세대로 유전된다.
- <7> 최근, 돼지의 장기를 인간에게 이식했을 때 PERVs가 인간의 세포를 감염시킨다는 연구결과가 발표된 이후 이에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다. AIDS 바이러스나 Ebola 바이러스와 같이, 돼지를 이용한 장기이식시 PERV가 인간에게 감염되어 새로운 형태의 바이러스가 생겨나서 치명적인 질병을 야기할 수 있기 때문에 안전성 검사에 대한 연구도 진행 중이다. 아직까지 PERV가 이종이식에서 인간에게 직·간접적으로 치명적이라는 연구 결과는 없으나, 상당한 위험이 존재하는 만큼 장기이식 전에 돼지의 장기 또는 조직에서 PERV 유전자를 제거하는 것이 바람직하다.
- <8> PERV(도 1)는 env(envelop gene)의 유전자형에 기초하여 3개의 타입(PERV-A, PERV-B, PERV-C)으로 나눌 수 있으며 돼지의 genome에 30-50개가 존재한다고 알려져 있다(Le Tissier et al. 1997, Rogel-Gaillard et al. 1999, 2001). 돼지의 genome 내에 존재하는 상기 PERV 유전자의 녹아웃(knock-out)을 위해서는 정확한 PERV의 유전좌위 및 연결서열(fanking sequence)을 알아야만 한다. 그러나 돼지 genome sequence project가 아직 진행 중이기 때문에 정확한 PERV의 유전좌위 및 연결서열을 찾는 것은 쉽지 않다. 나아가 PERV의 유전좌위는 종마다 다르고 변이가 심하기 때문에 이를 한국재래돼지에 적용하는 데에는 많은 문제가 있다. 따라서, 유전자원 차원에서 뿐만 아니라, 이종이식에 사용하기 위한 PERV의 녹아웃을 위해서 한국 재래돼지 유래의 PERV 유전좌위 및 연결서열에 대한 연구가 요구되고 있다. 또한 한국 재래돼지에서 PERV를 효과적으로 탐색할 수 있는 프라이머 쌍 역시 요구된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <9> 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 한국 재래돼지에서 PERV의 유전좌위를 밝히고 해당 유전자위에서 PERV의 연결서열을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.
- <10> 본 발명의 다른 목적은 상기 PERV의 연결서열과 PERV의 서열 정보로부터 돼지의 장기 또는 조직에서 PERV를 효과적으로 검출해 낼 수 있는 프라이머 쌍들을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <11> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 돼지 게놈에 융합된 돼지 내인성 레트로바이러스(PERV)에 대한 3'- 또는 5'- 연결서열로서, 서열번호 1 내지 14 중 어느 하나를 포함하는 염기서열에 관한 것이다.
- <12> 또한 본 발명은, ① 상기 연결서열을 포함하는 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드와, ② PERV 유전자 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오티드로 이루어진 돼지 게놈 내 융합된 PERV 검출을 위한 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 서열번호 15-16, 17-18, 19-20, 21-22, 23-24, 25-26, 27-28 또는 29-30 중 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- <13> 또한 본 발명은, 프라이머 쌍을 사용하여 돼지 조직 또는 장기 검체로부터 PCR에 의해 PERV를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- <14> 또한 본 발명은, 상기 프라이머 쌍을 사용하여 돼지 게놈 DNA로부터 PERV를 녹아웃하는 방법에 관한 것이다.
- <15> 본 발명의 완성을 위한 실험과정은 다음과 같았다.
- <16> 도 2에 도시된 방법에 따라 한국재래돼지 게놈 내 융합된 PERV의 유전정보 및 유전좌위를 결정하였다. 도 2a는 BAC library의 구축과정(I, II)을, 도 2b는 BAC library에서 PERV가 삽입된 클론을 선별하는 과정을, 도 2c는 PERV가 삽입된 클론 중 PERV-A 또는 PERV-B를 구분하는 과정을, 도 2d는 T7과 SP6 프라이머쌍을 이용한 말단 염기서열 분석과정을, 도 2e는 PERV의 유전좌위 위치 규명과정을, 도 2f는 PERV의 전장서열 및 연결서열 분석과정을 보여준다.
- <17> 먼저 한국재래돼지의 BAC library로부터 PERV 유전자가 삽입되어 있는 1개의 PERV-A 타입과 6개의 PERV-B 타입인 총 7개의 클론을 선별하였다. 선별된 7개의 클론에 대해 각각 BAC 말단 서열을 분석하였으며, 상기 말단

서열을 이용하여 mapping에 의해 PERV의 유전좌위를 결정하였다. 기존에 밝혀진 PERV의 염기서열을 이용하여 프라이머 walking 및 contig 작업을 통해 PERV의 전장서열 및 연결서열을 분석하였다. 특히 PERV의 전장 서열 및 5'-와 3'-의 연결서열을 분석하고 연결서열에 대하여 서열번호 1~14를 부여하였다.

<18> 상기 방법에 의해 얻어진 PERV의 전장서열 및 연결서열로부터 돼지의 조직 또는 장기 내 DNA에서 특정 유전좌위의 PERV를 검출할 수 있는 프라이머 쌍을 고안하였다. 즉, 상기 연결서열 중 일부 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오타이드와 PERV의 전장 서열 중 일부 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고 뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 쌍을 제작하여 PERV의 검출에 이용하였다. 본 발명의 실시예에서는 상기 프라이머 쌍의 예로서 서열번호 15-16, 17-18, 19-20, 21-22, 23-24, 25-26, 27-28 및 29-30의 프라이머 쌍을 이용하여 돼지 조직 또는 장기로부터 PERV를 검출하였으나, 이에 한정되는 것은 아니며 본 발명에 의해 밝혀진 유전좌위에 대한 정보로부터 한국재래돼지 게놈 내 융합된 PERV를 효과적으로 검출할 수 있다.

<19> 상기 프라이머 쌍을 사용하여 돼지 조직 또는 장기의 검체를 PCR 하는 것에 의해 PERV를 검출하는 것이 가능하다.

<20> 또한 상기 프라이머 쌍에 관한 정보를 활용하여 종래 알려진 다양한 방법으로 PERV를 녹아웃하는 것도 가능하다.

효 과

<21> 이상과 같이 본 발명은 한국재래돼지에서 밝혀진 PERV 서열, 유전자위 및 연결서열을 제공한다. 따라서, 본 발명에 의하면 한국재래돼지의 고유한 PERV 서열 및 그 연결서열을 알 수 있으므로 이에 특이적인 프라이머를 사용하여 돼지의 조직 또는 장기로부터 PERV를 검출할 수 있다.

<22> 이렇게 본 발명에 의하면 돼지의 조직 또는 장기로부터 이종이식 시 문제의 소지가 있는 PERV의 존재를 사전에 검출하여 상기 조직 또는 장기가 이식에 적합하지 판별할 수 있으며, 더 나아가 해당 유전자를 녹아웃(knock-out)시키는 데 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<23> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예>

<25> 실시예 1 : 한국재래돼지의 BAC library 구축

<26> 한국재래돼지의 BAC library는 Jeon 등(Jeon, J. T., Park, E. W., Jeon, H. J., Kim, T. H., Lee, K. T. and Cheong, I. C. 2003. A large-insert porcine library with sevenfold genome coverage: a tool for positional cloning of candidate genes for major quantitative traits. Mol. 세포s 16:113-116.)에 의해 구축된 것을 농촌진흥청 축산과학원에서 분양받았으며, 4D 방식으로 pooling된 BAC library는 2 step PCR 방식에 맞게 구축되어 있다.

<27> 실시예 2 : BAC library 에서 PERV 클론의 선발

<28> 19개의 Master pool sets에서 PERV가 삽입되어 있는 클론을 선발하기 위하여 하기 표 1의 pol 프라이머쌍으로 PCR을 실시한 후, 밴드가 검출된 master에 해당되는 PR(Plate Row), PC(Plate Column), WR(Well Row), WC(Well Column) pool set에 대하여 다시 pol 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하여 PERV 클론들을 선발하였다. PCR 반응액 조성은 PCR 반응용 버퍼액(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)와 0.25 mM each of dNTPs, 10 pmol 프라이머, 10 ng 주형 DNA, 0.5 U Taq DNA polymerase(TaKaRa Shuzo co., Shiga, Japan)와 1/5 volume의 Cresol red (60% Sucrose, 4 mM Cresol red), ddH₂O를 사용하여 총 반응액은 20 μ l로 하였다(도 2). 94℃에서 10분간 pre-denaturation한 후, 94℃에서 30초간 denaturation(변성), 65℃ 중 각 프라이머의 적정온도에서 45초간 annealing(복원), 72℃에서 40초간 프라이머 extension을 30 cycles을 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 extension과정을 수행하였다.

표 1

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호	크기 (bp)
Pol F	GCTACAACCATTAGGAAAACTAAAAG	31	811
Pol R	AACCAGGACTGTATATCTTGATCAG	32	

실시예 3 : PERV가 포함되어 있는 BAC DNA의 추출

단일 클론을 클로람페니콜 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 함유되어 있는 LB 배지에서 50 ml을 37℃, 250 rpm 상태에서 배양하였다. 충분히 자란 세포를 centrifuge 튜브에 옮겨 5000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후 Solution I (25 mM Tris-Cl, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) 2 ml을 분주 후 vortexing하여 세포 펠릿을 충분히 풀어주었고 Solution II (1% SDS, 0.2 N NaOH)를 4 ml 분주 후 가볍게 4~6회 상하로 흔들어서 주었다. solution III (5M potassium acetate, glacial acetic acid)를 3 ml을 분주하여 가볍게 4~6회 상하로 흔들어서 주었고 시료가 서로 잘 혼합되도록 30분 가량 얼음 위에 두었다. 서로 잘 혼합된 시료를 6000~7000 rpm 속도로 4℃에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리된 시료에서 상층액을 펠터를 이용하여 새로운 튜브로 옮기고 상온상태의 이소프로판올을 0.7배 분량을 분주하고 가볍게 흔들어서 주었다. 그 후 1200 rpm 속도로 4℃에서 30분간 원심분리를 실시하여 펠릿을 회수하였다. 회수된 펠릿은 70% 에탄올을 이용하여 세척한 후 DNA 펠릿을 air-dry를 실시하여 완전하게 마른 DNA 펠릿을 TE (pH 8.0) 20 μl 로 상온에서 용해시켰다. Spectrophotometer(Pharmacia Biotec, England)를 이용하여 260~280 nm 흡광도에서 OD260 : OD280의 비가 1.5 ~ 1.8이 되는지를 측정하였고 농도는 BAC-end sequencing에 적합한 300 ng/ μl 이상이 되도록 하였다.

실시예 4 : PERV-A 및 PERV-B type 구분

실시예 3에서 추출된 BAC DNA를 이용하여 PERV-A type과 PERV-B type을 구분하기 위해 표 2의 프라이머쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다.

표 2

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호	크기 (bp)
env-A F	GAGATGGAAAGATTGGCAACAGCG	33	359
env-A R	AGTGATGTTAGGCTCAGTGGGGAC	34	
env-B F	AATTCTCCTTTGTCAATTCCGGCCC	35	263
env-B R	CCAGTACTTTATCGGGTCCCACTG	36	

PERV-A type을 선별하기 위해서 PERV-A에 특정부위의 염기서열을 인식하는 프라이머 서열번호 33과 34를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 하여 359 bp의 밴드를 갖는 클론만 선별하였다. 94℃에서 10분간 pre-denaturation한 후, 94℃에서 30초간 denaturation, 69℃ 중 각 프라이머의 적정온도에서 45초간 annealing, 72℃에서 40초간 프라이머 extension을 28 cycles을 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 extension과정을 수행하였다.

PERV-B type을 선별하기 위해서 PERV-B에 특정부위의 염기서열을 인식하는 프라이머 서열번호 35와 36를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 하여 263 bp의 밴드를 갖는 클론만 선별하였다. 94℃에서 10분간 pre-denaturation한 후, 94℃에서 30초간 denaturation, 69℃ 중 각 프라이머의 적정온도에서 45초간 annealing, 72℃에서 40초간 프라이머 extension을 27 cycles을 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 extension과정을 수행하였다.

PCR 반응액 조성은 10X gold buffer(Applied Biosystems, USA), 2 mM MgCl_2 (Applied Biosystems, USA), 10 mM of dNTP (Toyobo, Japan), 10 pmol 프라이머 각각, 0.5 units Amplitaq Gold (Applied Biosystems, USA), BAC

DNA, ddH₂O를 사용하여 총 반응액은 20 μ l로 하였다.

<38> **실시예 5 : 선발된 BAC 클론에서 말단 서열 분석**

<39> 효율적인 BAC 말단서열분석(말단서열분석)을 위하여, 추출된 BAC DNA를 제한효소로 처리하였다. RNase(10 mg/ml 처리, Promega USA)와 EcoRV 제한효소(Promega, USA) 처리한 후, QiaexII kit(Qiagen, USA)를 이용하여 염기를 제거하였다. 말단염기서열 분석을 위하여 Sequencing 반응은 DNA 주형(template)으로는 위에서 추출한 BAC DNA 5 μ l를 사용하였고 Big Dye terminator v3.1(Applied Biosystems, USA)과 T7 프라이머(TAATACGACTCACTATAGGG), SP6 프라이머(ATTAGGTGACACTATAG) 그리고 5X Buffer (400 mM Tris 10 mM MgCl₂)를 포함하는 총 반응액을 20 μ l로 하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600(Perkin-Elmer Co., USA)을 이용하였고, PCR 조건은 95℃에서 5분간 denaturing 후, 95℃에서 30초, 50℃에서 10초, 60℃에서 4분을 50회 수행하였다. PCR 산물은 이소프로판올과 에탄올 정제를 하였으며 상온 건조된 펠릿에 formamide를 10 μ l를 분주 후 40분 동안 DNA를 녹인 후 ABI3730(Applied Biosystems, USA)으로 염기서열 분석을 하였다.

<40> 본 연구에서 이용한 BAC library는 5X genome coverage를 가지기 때문에 같은 insert를 가진 PERV 클론을 제거하여야 한다. 이를 위해 PERV를 함유한 BAC 클론의 말단염기서열 분석에 기초하여 contig를 작성하였다. BAC 클론의 말단염기서열에는 반복염기서열이 존재하기 때문에 말단염기서열 분석을 통해 나온 모든 sequence를 바로 이용할 수가 없었다. 따라서 RepeatMasker program (<http://www.repeatmasker.org/>)을 통하여 나온 결과에 기초하여 repetitive elements를 제거한 후 contig작성을 위한 프라이머를 제작하였다.

<41> 각 클론들의 BAC 말단 염기서열에서 벡터와 *E coli* 염기서열을 제거하기 위한 trimming 작업을 수행을 통하여 해당 염기서열을 제거하였으며, 정리된 염기서열은 다시 정확하지 않은 염기를 제거하기 위한 phred score가 20 이 넘지 않는 염기는 제거하였다(Genome Res. 8:186-194). 이렇게 2차 정렬된 염기서열에 대하여 repeat masker (<http://www.repeatmasker.org/>)를 이용하여 유전체 전체에 퍼져있는 반복염기서열을 제거하였다. 이 과정을 통하여 나온 최종 염기서열로부터 프라이머 45쌍을 제작하였다.

<42> 프라이머의 제작은 PRIMER3(<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) 프로그램을 이용하였다. 제작된 프라이머들은 STS(Sequence-tagged site) marker로써 contig map을 작성하는데 이용되었다. 그러나 BAC-end sequence들 중에는 repetitive elements가 존재하기 때문에 모든 BAC-end에서 프라이머 디자인이 가능하지는 않았다.

<43> 이들 프라이머들은 본 발명이 원하는 권리범위에 대한 것이 아니며, 전술한 방법과 정보에 의해 동일한 용도의 같거나 다른 프라이머들의 제작이 가능하므로 서열의 제시를 생략한다.

<44> BAC end sequence로부터 얻어진 상기 45쌍의 프라이머들을 이용하여 Contig를 작성한 결과(도 3a 및 도 3b), 9 개(A-I)의 contigs가 확인되었고 최종적으로 7개(532G9, 465D1, 742H1, 1155D9, 102H6, 491C7, 907F8)의 non-redundant PERV 클론을 선발하였다.

<45> **실시예 6 : 한국재래돼지 게놈에서의 PERV 유전좌위 결정**

<46> (1) 체세포 hybrid panel을 이용한 유전자 좌위 결정

<47> 실시예 5에서 확인된 7개의 non-redundant PERV 클론 각각에 대한 염색체 상 위치를 확인하였다.

<48> 체세포 hybrid panel(Cytogenet. Cell Genet. 73:194-202)방법을 이용한 mapping(SCH mapping)을 위하여 돼지와 햄스터가 혼성화된 27개의 클론(INRA, France)과 하기 표 3의 프라이머쌍을 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 반응은 총 25 μ l로, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.001% gelatin으로 구성된 10 $\times$ 반응용 버퍼액, 0.2 mM dNTP, 10 pmol 각각의 프라이머, 25 ng radiation hybrid DNA, 1.5 unit Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan)에 증류수를 첨가하였다. 유전자의 증폭을 위해서 DNA 변성은 94℃에서 30 초, 프라이머 결합은 57℃, DNA 가닥의 신장은 72℃에서 45초로 설정하여 35 cycle을 실시하였다. PCR 산물의 분석은 아가로스 전기영동으로 확인(제시 생략)하였으며, positive 밴드의 유무에 따라서 + 혹은 - 를 부여하였다 (<http://www2.toulouse.inra.fr/lgc/pig/hybrid.htm>). 이 과정에서 돼지의 DNA만을 첨가시킨 positive control, 햄스터 DNA만 첨가된 background DNA control 그리고 negative control(3 Distilled water)을 분석에 함께 포함시켰다.

<49> 실험 결과를 표 4에, 체세포 hybrid panel을 이용하여 결정된 PERV의 유전좌위를 표 5에 나타내었다.

표 3

PERV 클론 ID	프라이머 (5'→3')	서열	서열번호	Size (bp)
742H1T7	Forward	CCTGGATGCCTGACATTACT	37	501
	Reverse	CACATGGATTGAACACGAGG	38	
742H1SP6	Forward	TGACCTATGCTACCTGATCC	39	380
	Reverse	GGATCTGATGTTGTCACTGC	40	
491C7T7	Forward	GGCGATTACGTGGTATAAGC	41	261
	Reverse	GTGAATATCTGTGTGCGCCT	42	
1155D9T7	Forward	AGTAAGCCTCACTCAACTCC	43	346
	Reverse	CCTAAGCATCTGGTTGTCCT	44	
465D1T7	Forward	GGTCAGATGAGGTGAACTTG	45	214
	Reverse	TGTTCTAGTCTTGCTCCTGC	46	
465D1SP6	Forward	CAGTCCTATGGTCGTTGTCA	47	292
	Reverse	ATCCTTAGTACCTGCCTTGC	48	
102H6SP6	Forward	GAACACACGCACATCATCAG	49	275
	Reverse	AGCCACCTCACAGTCATTCT	50	
907F8T7	Forward	CTCGAATGACCTTGACTCCT	51	575
	Reverse	CTATACCTACGCAGTGCTCT	52	
907F8SP6	Forward	CATGGTCCAATGATCTCAGC	53	175
	Reverse	CACATCAGCCATGCAGAGTA	54	
532G9T7	Forward	CTGCTTCCTTCTCCTTGGCT	55	116
	Reverse	TCCGAGGATGACTCCAGGAC	56	
532G9SP6	Forward	CACAGCACTCCAACTCAGTC	57	289
	Reverse	GCTCAACCTGCTGCTTCCTT	58	

<50>

표 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
742H1T7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
742H1SP6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
491C7T7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	
1155D9T7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
465D1T7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
465D1SP6	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
102H6SP6	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
907F8T7	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		
907F8SP6	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		
532G9T7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		
532G9SP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		

<51>

표 5

BAC sequence	염색체 번호 (위치)	Error risk (%)	Max. correlation
742H1 T7	2 (1/2 q21)-(1/2 q22)	5	0.8
742H1 SP6	2 (1/2 q21)-(1/2 q22)	5	0.8
491C7 T7	7 (1/2 p11)-p12	0.5	0.85
1155D9 T7	7 (1/2 p11)-p12	0.1	1
465D1 T7	9 q11 or q12-(1/3 q21) or (2/3 q21)-q26	0.1	0.93
465D1SP6	9 q11 or (2/3 q21)-q26	0.1	1
102H6 SP6	11 q11-q17	1	0.71
907F8 T7	17 q11-q14	1	0.85
907F8 SP6	17 q11-q14	0.5	1
532G9 T7	17 (1/2 q21)-q23	0.5	1
532G9 SP6	17 (1/2 q21)-q23	0.5	1

<52>

<53>

상기 표 5의 "염색체 번호 (위치)"는 해당 PERV가 존재하는 염색체 번호와 염색체상의 위치를 의미한다. 예를 들면, 742H1 T7에서 "2 (1/2 q21)-(1/2 q22)"는 돼지 염색체 2번 q-arm 1/2 q21부터 1/2 q22에 위치한다는 것이다.

<54>

테스트 결과, 모두 error risk는 낮은 편이며 correlation 역시 1에 가깝기 때문에 상기 테스트에 의해 정해진 유전좌위가 높은 신뢰도를 가지고 있음을 알 수 있다.

<55>

(2) Radiation hybrid panel을 이용한 유전자 좌위의 재확인

<56>

전술한 (1)에서 결정된 PERV 클론들의 유전좌위가 정확한지를 재확인하기 위하여 radiation hybrid panel (Yerle 등, 1998)을 사용하여 PCR 분석을 수행하였다.

<57>

RH(radiation hybrid) mapping을 위하여 118개의 hybrid 클론들로 구성된 INRA (France)와 Minnesota 대학의 5000-rad porcine radiation hybrid (IMpRH) panel을 이용하였다. 25 ng radiation hybrid 클론(INRA, France) (Cytogenet. Cell Genet. 82:182-188), 1.5 unit Taq DNA 폴리머라제(TaKaRa, Japan), SCH(체세포 hybrid panel)에서 사용된 프라이머쌍(표 3)으로 이루어진 반응액에서 실시하였다. PCR 반응은 총 25 μ l로, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.001% gelatin으로 구성된 10 $\times$ 반응용 버퍼액, 0.2 mM dNTP, 10 pmol 각각의 프라이머, 25 ng radiation hybrid DNA, 1.5 unit Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan)에 증류수를 첨가하였다. 유전자의 증폭을 위해서 DNA 변성은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 프라이머 결합은 65 $^{\circ}$ C, DNA 가닥의 신장은 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 설정하여 35 cycle을 실시하였다. PCR 반응은 동일한 조건하에서 두 번 반복하여 실시하였다.

<58>

PCR 산물을 2% 아가로스 gel을 이용한 전기영동으로 확인(제시 생략)하였으며, positive 밴드의 유무에 따라 1 혹은 0을 부여하였다(제시 생략). RH panel 대한 결과 분석은 프랑스의 INRA(<http://imprh.toulouse.inra.fr/>) 연구소에서 제공하는 분석프로그램을 활용하였다.

<59>

상기 방법에 의해 상기 7개 PERV 클론의 염색체상의 위치를 확인하였다(표 6).

표 6

BAC sequence	Chromosome	Linked marker	LOD
742H1 T7	2	SWR1342	17.65
742H1 SP6	2	SWR1342	14.12
491C7 T7	-	-	-
1155D9 T7	7	TNFB	14.84
465D1 T7	9	SW749	3.95
465D1 SP6	9	SW749	3.95
102H6 SP6	11	S0071	24.65
907F8 T7	17	SW1891	5.59
907F8 SP6	17	SW1891	5.29
532G9 T7	17	SW1920	3.61
532G9 SP6	17	SW1920	4.89

marker의 위치는 database로 확인할 수 있으며, LOD 값이 3 이상이면 Linked marker와 연관이 있다고 인정된다. 따라서 상기 테스트 결과는 매우 높은 신뢰도를 가짐을 알 수 있다.

같은 contig상에 위치한 클론이 동일한 SCH 및 RH mapping결과를 나타낸 것으로 보아 이상에서 결정된 유전좌위가 정확한 것임을 알 수 있다.

이상과 같이, BAC contig와 SCH와 RH Mapping 결과를 바탕으로 한국재래돼지의 게놈에 내재된 7개의 Non redundant PERV 클론이 선발되었으며, 그 유전좌위가 이중으로 확인되었다.

실시예 7 : PERV의 전장 서열 및 연결 분석

(1) 선발된 BAC DNA를 이용한 Long-Range PERV PCR

PERV mapping 및 BAC contig에 의해서 선발된 7개의 non-redundant PERV 클론이 모두 LTR, gag, pol, env를 포함하는 8 Kb 정도의 염기서열을 가지고 있는지 확인하기 위하여 long PCR을 실시하였다.

표 7의 프라이머쌍 (J. Virol. 74(9): 4028??4038) 각각 10 pmol, 17.5 mM MgCl₂, 0.5 units of Taq polymerase (Expand long 주형 PCR system, Roche, Germany), 10× buffer(Cat. No. 1 681 834), BAC DNA로 총 양을 25 μl로 하였다. 유전자의 증폭을 위해서 DNA 변성은 94℃에서 5분, 프라이머 결합은 68℃에서 30초, DNA 가닥의 신장은 72℃에서 7분으로 설정하여 35 cycle을 실시하였다.

표 7

프라이머	서열 (5'→3')	서열번호
Long-Range F	ATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	59
Long-Range R	CCACGCAGGGGTAGAGGACTGCGG	60

PCR 결과(도 4), 선발된 7개 중 6개 PERV 클론의 long-range PCR 산물의 크기가 모두 약 8kb로, 완전한 insert를 가진 PERV 클론들로 판명되었다. 그러나 1개의 PERV 클론(102H6)은 PCR 산물의 크기가 약 6 kb로 다른 클론들과 크기가 다른 insert를 가지고 있으며, sequencing 결과 5'-LTR과 3'-LTR사이에 약 2kb의 deletion이 있는 것을 확인하였다. 전기영동 사진에서 M은 1kb ladder size marker이고 lane 1-11은 유전좌위가 밝혀진 클론들이다. 본 발명과 관련된 클론을 박스로 표시하였다.

(2) Shotgun library 제작

PERV 전장 염기서열을 알기 위하여 long-range PCR 산물을 이용하여 shotgun library를 제작하였다(마크로젠 의

되). shotgun library는 T7과 T3의 프라이머쌍을 이용을 하고, 위의 (1)에서 획득한 long-range PCR 산물을 주형으로 하여 제작하였다.

<72> Shotgun library에서 얻어진 random 클론들(제시 생략)을 insert checking한 후 서열결정을 위한 주형으로 하고 T3와 T7 프라이머를 이용하여 sequencing을 수행하였다(도 5). Sequencing 결과로부터 나온 염기서열들은 Chromas software(Technelysium, Australia)를 사용하여 peak가 A, T, G, C 염기서열 중 어느 것인가를 판단하는 base-calling작업을 수행하였고, 각 염기서열의 벡터와 *E. coli* 염기서열을 제거하여 assembly의 정확성을 높이기 위한 trimming 작업을 수행을 통하여 해당 염기서열을 제거하였으며, 정리된 염기서열은 다시 quality가 낮은 염기를 제거하기 위한 Phred(University of Washington Genome Center) score가 20이 넘지 않는 염기는 제거하여 평균 107 bp의 높은 quality의 염기들만 남겨졌다. 이렇게 각 PERV 클론들로부터 shotgun sequencing에 의해서 sequencing된 염기서열들은 Pairwise sequence alignment를 통하여 염기서열을 맞추어서 각 PERV 클론별 consensus sequence로 만들어 full-sequencing을 완성하였다. Full-sequencing 결과에 대한 염기서열 분석은 NCBI의 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 통하여 retrovirus의 구조(5'-Franking region, 5'LTR, *Gag*, *Pol*, *Env*, 3'LTR, 3'-Franking region)를 영역별로 확인할 수 있었다.

<73> Full-sequencing결과 각각 클론에 의한 contig의 길이가 평균적으로 7.5 kb로 full-length PCR 결과와 거의 동일하였고, 18G5 클론도 역시 다른 클론들과 비교하여 약 2kb가 deletion 되어있음을 확인하였다.

<74> (3) PERV의 연결서열 분석

<75> 각각의 PERV 클론의 5' 및 3' 연결서열을 분석하기 위해 5' LTR과 3' LTR의 염기서열과 상보적인 프라이머쌍들(제시 생략)을 이용하여 DNA walking(마크로젠에 의뢰하여 분석, *PCR Methods Appl.* **1**, 39~42)방법을 수행하였다. 도 6에 DNA walking 개념을 도시하였고, 그 결과 각 클론의 PERV 5'- 및 3'-연접서열들을 표 8a~8g에 나타내었다.

표 8a

클 론	서 열		서열번호
742H1	5'-연접	5'-CAAAAAAAAAATCAAAAAACAGACAAAAAAAAACAACCCA ATGTTCCCTTCAATTTCTGCTGTTCAAGTGACCCAGTC ACACATATATGCACATTCTTTTTTATACTATCTTCCATCAT GTTC-3'	1
	3'-연접	5'-GTTCAAACCCGAGAAATTAGACAGAGTTCCTGTGCTGT GCAGTAGAACCCCATTTGCTTATCCATTTCAAATCTTATTTT TAAATATAAACATTTAACACTATTTGCTTCAGATCTCACATT TTATACAGATTTGAAATATTACTGATATAATTTGCCTTTTATG GCACCTCATGCTCCATCCCACTTCTGAAATCCAGGAGGAG CCTATGGTACCCTCCCAAGGACAAAAGCCTTTCTGTGTCC TCCATTTCTGTATGAAGGGAAAAT-3'	2

표 8b

클 론	서 열		서열번호
491C7	5'-연접	5'-TAGGATTTTAGCAGTTC-3'	3
	3'-연접	5'-CTTCACTGCTTAAACTGAAATGTCTATGTCTAAAAGCTT TTCACACTC-3'	4

표 8c

클론	서열		서열번호
1155D9	5'-연접	5'-GTCAAGTTAATTCAGGAGTTTTAATAACCAGACTTTTGT GATAAAGAAGTACAAAGTCTGACAGTAGGAGTTATTTGTCC AAGAGTACAGATTTAATATTTATAAATAATCATTGCAGTTTC ATACCCATTATTTTTCTACTACTCCATGGATATTTTGAAAG AAAAAAGAAAGGCTAATACAATGGAGTTACTGGATAAAAC CATGTTGAATTTTTTAAAGTTTTTATTAAAGTATAGTTGATT TACAATGTTTCCTTCAATTTCTGCTGCTACTGCCAAGTGAAAA ACATGTTGAATTTTAATGTTGACATCCAAATGGGGTGAGTC TGGATTAGTAATGCTCAATAACTTGGAGCGAGAAAAGCCA GATCAAATTTGGAAGTGCTGCTTTTTTTGTTTGTCTT TGTTTTCTTAGCTGCACCTACAGCATATGGAAGTTCCTA GGCCAGGGATCAAATCCAAGGCACAGCTGTGACCTACTC CATAGCTGTAGCAACACTGGATCCTTAACCCACCATTCCA CAGCAGGAAC-3'	5
	3'-연접	5'-GAACTCCTGGAAGCATTGGTTTTCTTCTAGTGCACCT GGCTATAATCTTGGACAAGTTAGTTGATTTTTCTAAGTTTGA GAATTGTTGTTAGGTAAATATGAATTATTTAAATGTATTCCC CTAATTTATATAGTG-3'	6

<78>

표 8d

클론	서열		서열번호
465D1	5'-연접	5'-TCACAGACTGCACATGGAAATTGAAATCAAGCCAGGAA AACCCCAATTTTTCACCTGCCTGTCACTTCGCAGACATTCC AAGCGCGGGGTCTGTCTTCCGGGGCCTGGGCCCTCTGCC TTCTTCCATCATCTTAGAGCAGGTGCTCTCAGACTGCCCT TGGCTTGCATAGCTCGTGTCTGACTTCCAG-3'	7
	3'-연접	5'-CCAGTCCTTTCTTTTCTTTCTGCCTCAGCATGTCATCC ACCGGCGGACCGGATACTTTGTTTATCTTGAACTGTGTGT TAACATTTAGCACAAACATTTAAAGGACAGTTGGAATCTAAA ACAAA-3'	8

<79>

표 8e

클론	서열		서열번호
102H6	5'-연접	5'-CATAATAACATCAAATTATTTCTAAACTGATTATACCAA TTTATATTTTAAGCAGCAATGTATAAGCATCCCCTCCATATA CATTTTCTCTAACATATGCTATTTGAAGCACTTTAATTTTG AC-3'	9
	3'-연접	5'-TGACAATCCATAGTAAAAGTAAAATAATCC-3'	10

<80>

표 8f

클론	서열	서열번호
907F8	5'-연접 5'-TGTTTACATTATTATTTTTGTGGTGAAGAGAAGGAATATT CAGTGCTTTGGATCAGTGCATTAAACAAAGAGAAAGGGGT CTTTTCCTCTTTGTTTAGAAGCTTGGATGTTTTGAGCATGTGT CGTACACCTGGCAGAAAGTCTAAGCAACCCTTCTCCATCCT GGCAGGTGTGTGATACCCAGTGGATGGAGCTAAGGAATTT TATAAACTTTTTACCCAGAGAGAGCCATGTATTGCATGAA GCAGCAGGGTGCCCTCAAGAATCACGTGACCTGGCAGAG GCAGCAGTGTCCATGGCAGTGGCCAGTATCCATTGGATGA GGGGCAGGTCTGTTGGAGCCTCAAGGTAAGTGGTGGTGA AATGAGTCCACAGTAGGCT-3'	11
	3'-연접 5'-GGCTGAGGTACTAAACCTGGAAAATGGCAGCCAAACAT AAGTGTCCATTCAATGTTAGTTCATTCTAGT-3'	12

<81>

표 8g

클론	서열	서열번호
532G9	5'-연접 5'-GCTGGTGGTGGAGCTACCCTGGGGCCCCATTGCCTCC TAGGACTTCCTTCCTGGACCCTTGCTCTGCCTTCTCCTCA CTCAGTCCCTCCCACATCCTCAGCCCTGCTTCGGCACTA ATCCCTCCTGGACAGTGTGGACTTGTTGGGTGTACCCCC CCCATGCTGTAATCTTGAGGGCAGTGCCTCTGTCGTGTTT TGCGTTGTGTGTGTTGCCTGATATATGGCACCTGGACAA AAATAACAACCTGAAGAGCTGGTGGTGACACGGTTGGTAC AGGGTGCTGGGGCCCAGGGCTTCTCCTATTGCAGGGTC AGGGAGCCATGCCCTCCAGCAGGCCAGCCTGTGGGGGT TGAGCCTGTCTCTTCTCACTGGAAGTGTTGAGTTTGTAA GAAAGGTAGACTTGTTATCATCTACCTTTGATCCTGGCCA CGAGCAGGGCCTGTGGCCCTTTGGGGGTGGTTTCCTAAT AACTGACCTGCACGAAGCACAGAATAGTCAAGGCTGTGT ATGTCCATGGCCCTTATACTAGATGGTAGACAGGGCCCC AC-3'	13
	3'-연접 5'-CACCACCTGCTACCTTTCCCCATCCATGCTAGTTGCT GCCAGTCAGCCCTGGTATGTTCCCCCAAACCTGGTCTTT TGGTTGGCAACAAATTAATCACAGTTGGCACATCAGATA GCATGGGTGTTACTCCTGTCATAGGTGATCTGCGGACCC CTTCCTAGAATTAAGTTGTCTTGTCTGAGACAGTAGGTG TGGCCATTACAGTACTACAGTAACAGCCCAGGTTTGTGG GTGCCAGGACCTGCCAGCTCCCGTGCCAAGTGTTATCTA TCCGTGAGGGCCTGCTGTGAGTGCCTGTTACGACGTTG CTCTTTGAGGTGGATCTGTGTACACAGGCTCCGTGGAGG TTCCTCTTCATGTCAGCCAGGCGCTAGACCCTGGGGCCT C-3'	14

<82>

<83>

실시예 8 : 돼지의 조직 또는 장기에서 PERV의 스크리닝

<84>

실시예 7에서 얻은 PERV의 전장서열과 연결서열로부터 돼지의 조직 또는 장기에서 PERV를 스크리닝할 수 있는 프라이머를 고안하고 그 실효성을 확인하였다.

<85>

(1) 프라이머의 디자인

<86>

돼지의 genome 상에 있는 PERV의 삽입 유무를 확인하기 위한 프라이머는 각각 유전좌위 마다 다른 5' 연결서열 또는 3' 연결서열[표 8a 내지 표 8g] 과 PERV의 5'LTR과 env 염기서열을 주형으로 PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 프로그램을 이용하여 연결과 전장서열 양쪽에 걸쳐지는 프라이머쌍을 디자인하였다 (도 7 참조). 이렇게 선정된 프라이머쌍과 해당 염색체상 위치를 표 9에 기재하였다.

표 9

염색체상 위치	프라이머 서열(5'→3')		서열 번호	비고
SSC 2 (1/2 q21)-(1/2 q22)	F	ANGAGTGAGTGCAGTCCAGA	15	3'연접과 3' env 서열을 이용
	R	ACCATAGGCTCCTCCTGGAT	16	
SSC 7 (1/2 p11)-p12	F	AYRAGTGAGTGCAGTYCRGA	17	3'env 서열과 3' 연접을 이용
	R	GACATAGACATTTTCAGTTTAAGCAGT	18	
SSC 7 (1/2 p11)-p12	F	AGCGAGAAAAGCCAGATCAA	19	5'연접과 5' LTR 서열을 이용
	R	TTGATGCAAACAGCAAGAGG	20	
	F	AYRAGTGAGTGCAGTYCRGA	21	3'env 서열과 3' 연접을 이용
	R	AGCCAGGTGCACTAGGAAGA	22	
SSC 9 q11 or (2/3 q21)-q26	F	AYRAGTGAGTGCAGTYCRGA	23	3'env 서열과 3' 연접을 이용
	R	GATGACATGCTGAGGCAGAA	24	
SSC 11 q11-q17	F	CAATGTATAAGCATCCCCCTCCA	25	5'연접과 5' LTR 서열을 이용
	R	TTGATGCAAACAGCAAGAGG	26	
SSC 17q 11-q14	F	CCAGTGAGTGGAGCTAAGGA	27	5'연접과 5' LTR 서열을 이용
	R	TTGATGCAAACAGCAAGAGG	28	
	F	AYRAGTGAGTGCAGTYCRGA	29	3' env 서열과 3' 연접을 이용
	R	TTATGTTTGGCTGCCATTTTC	30	

<87>

<88>

(2) PERV의 스크리닝

<89>

농촌진흥청 난지농업연구소 및 경상대 축산학과에서 분양받은 돼지의 genomic DNA 를 주형으로 하여 PERV를 스크리닝하였다. 그 중 돼지 63마리 (번호 1~63)의 DNA가 사용되었다.

<90>

각각의 시료 genomic DNA 100ng/μl을 10× PCR 완충용액(Tris-HCl (pH 9.0), (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂, PCR enhancers), 상기 표 9의 프라이머 쌍 10pmol, dNTP 10mM, taq 폴리머라제 5 units/μl 및 증류수로 이루어진 총 10μl의 반응액에서 PCR 증폭하였다. PCR은 94℃에서 5분간 denaturing 후, 94℃에서 30초, 65℃에서 40초, 72℃에서 1분, 72℃에서 10분의 조건에서 40회(cycle) 수행하였다.

<91>

각 프라이머 쌍을 이용한 PCR 산물에 대한 전기영동 사진을 도 8a~8h 에 도시하였다. 도면에서 M은 100bp의 size marker를 나타낸다. 실험 결과를 하기 표 10에 정리하였다.

표 10

	PERV positive	PERV negative
도 8a	1, 2, 4, 5	3
도 8b	6, 7, 8	9
도 8c	10, 11, 12	13
도 8d	17, 19	14, 15, 16, 18, 19
도 8e	20, 21, 22, 23, 24	25
도 8f	26, 27, 28, 29, 31	30
도 8g	32-46, 49, 50	47, 48
도 8h	32-46, 49, 50	47, 48

<92>

<93>

표 10에서 볼 수 있듯이, 위 프라이머 쌍을 이용하여 돼지에서 유전좌위별 PERV의 삽입유무를 확인할 수 있었으며 이를 이용하여 PERV의 삽입이 없는 돼지를 선발하는데 유용하게 사용할 수 있음이 확인되었다.

<94>

가능실시예 9 : 돼지 조직 또는 장기에서의 PERV knock-out

<95>

본 발명에 의해 밝혀진 돼지 게놈에 내재된 PERV의 유전좌위와 연결서열 정보를 이용하여 토종돼지에 존재하는 PERV를 경제적으로 knock-out시킬 수 있다. 특정 유전자의 서열과 그의 연결서열 정보를 이용하여 상기 유전자를 knock-out시키는 방법(Gene Targeting Protocols, Eric B. Kmieciak, 2000, Humana Press)은 본 발명이 속하는 기술분야에서 널리 알려져 있으므로 이하에서는 간단하게 설명한다.

<96>

PERV Knockout을 위한 gene targeting 벡터는 pBS226 (Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian Cells. 1992. Fukushima S and Sauer B. PNAS 89(17):7905-7909)와 PERV 전장서열 및 새로 밝혀진 5'-연접서열과 3'-연접서열을 이용하여 벡터를 구축한다. 이렇게 구축된 벡터는 homologous recombination에 의해 특정 유전좌위에 존재하는 PERV 유전자를 Knock-out을 할 수 있게 해준다.

<97>

Knock-out 은 특정위치에 존재하는 한 개의 PERV 씩 개별적으로 이루어져야 하는데, 이를 위해서는 유전좌위(즉, 연결서열)를 알아야 한다. 따라서 본 발명에 의한 프라이머쌍을 이용하면 용이하고도 경제적으로 토종돼지에 내재하는 PERV를 Knock-out시킬 수 있으며, Knock-out이 잘 되었는지 여부도 용이하게 확인할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

<98>

도 1은 PERV의 구조를 보여주는 개략도.

<99>

도 2a~2f는 본 발명에 의한 PERV 유전정보 및 유전좌위 결정을 위한 실험방법의 개략도.

<100>

도 3a, 3b는 PERV 분석을 위한 Contig mapping 개념도.

<101>

도 4는 선발된 7개 클론의 Long-range PCR 결과 전기영동 사진.

<102>

도 5는 T3와 T7 프라이머를 이용한 시퀀싱을 보여주는 예.

<103>

도 6은 연결서열 분석을 위한 DNA walking의 개념도.

<104>

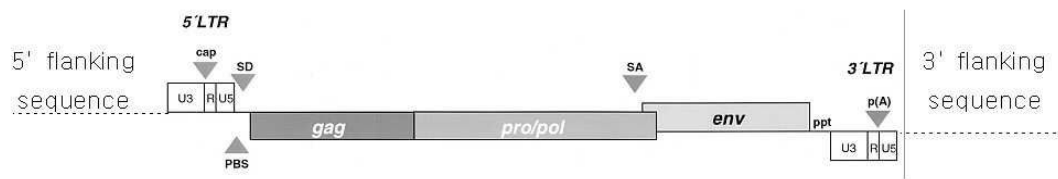
도 7은 PERV 스크리닝을 위한 프라이머쌍의 위치를 예시한 도면.

<105>

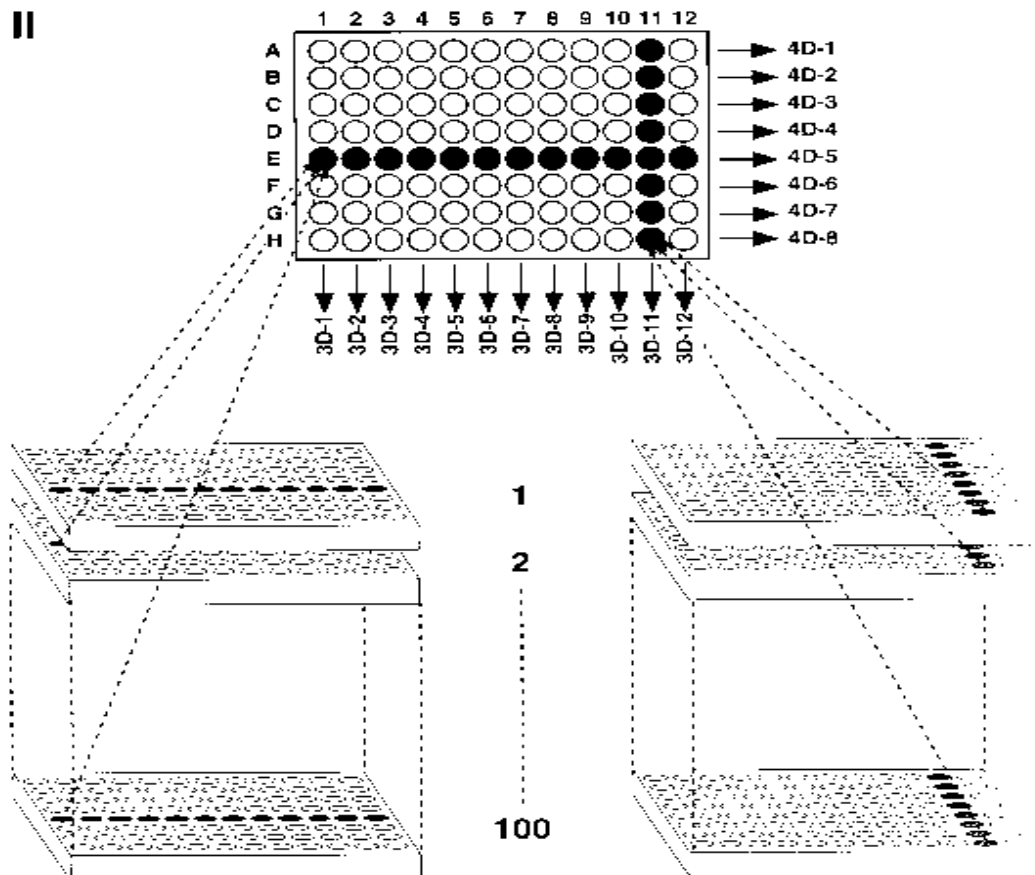
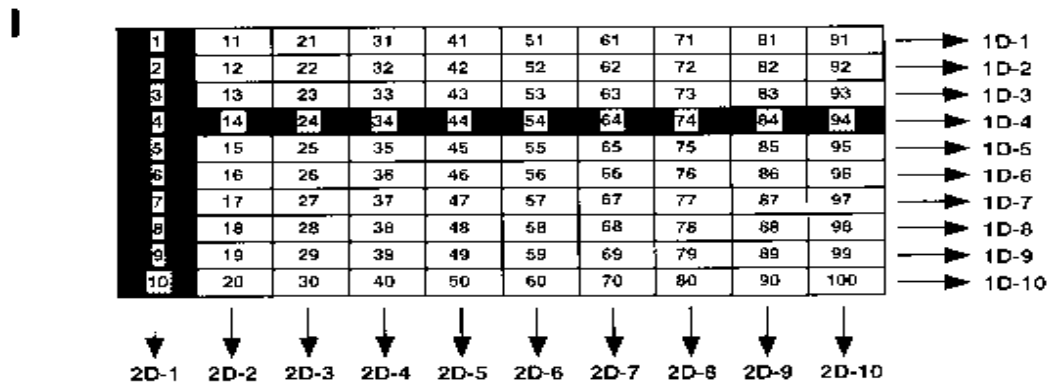
도8a~8h는 본 발명의 일 실시예의 프라이머 쌍에 의해 돼지 검체 시료로부터 PERV를 검출한 전기영동 사진.

도면

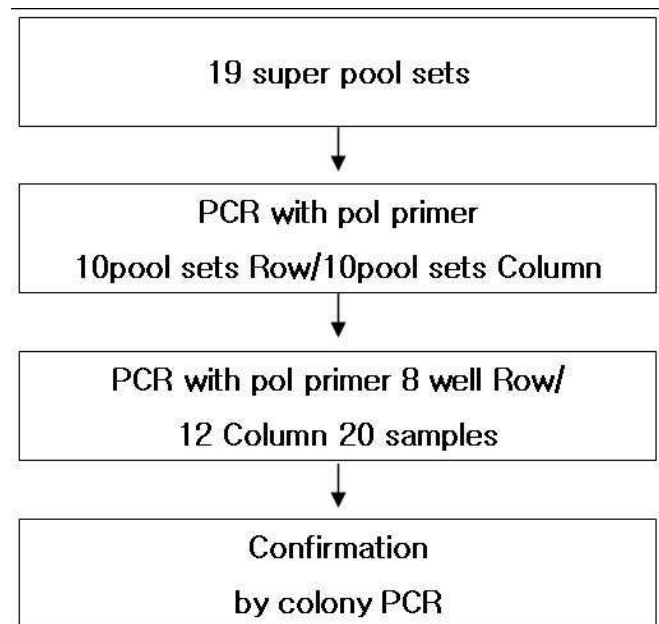
도면1



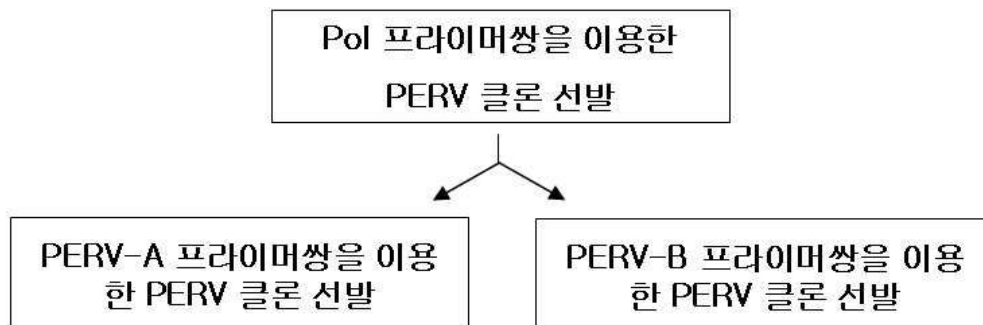
도면2a



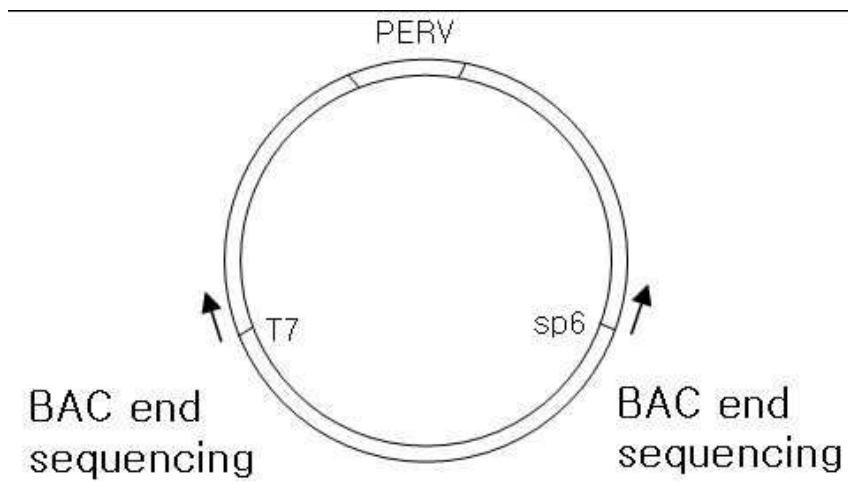
도면2b



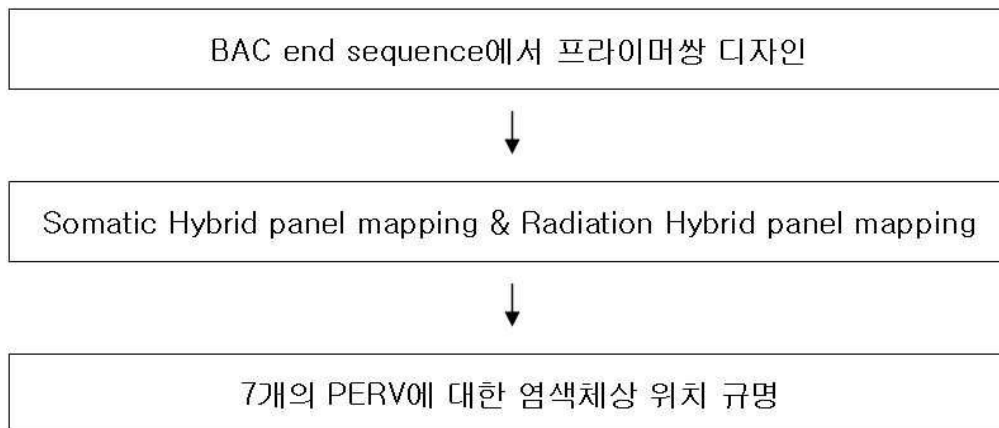
도면2c



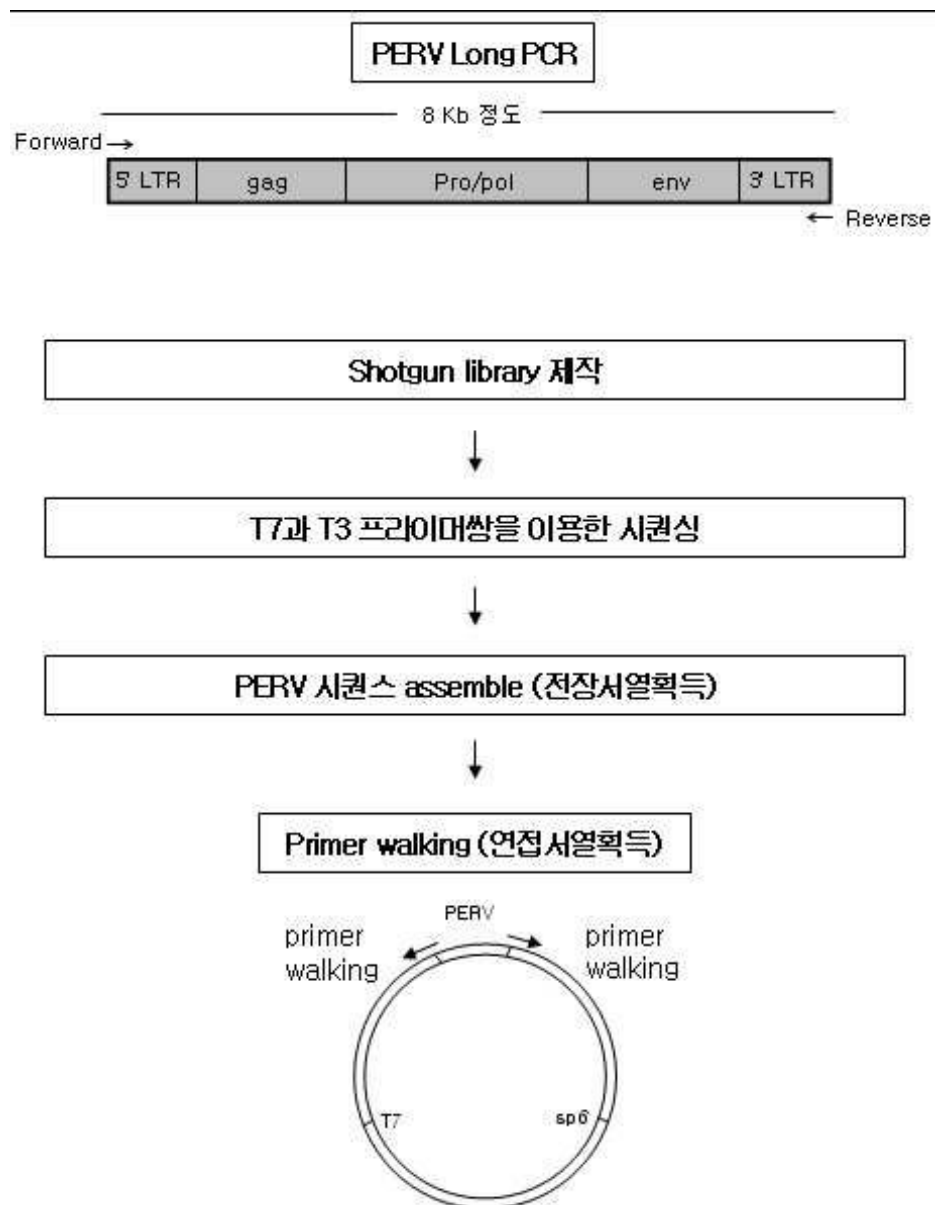
도면2d



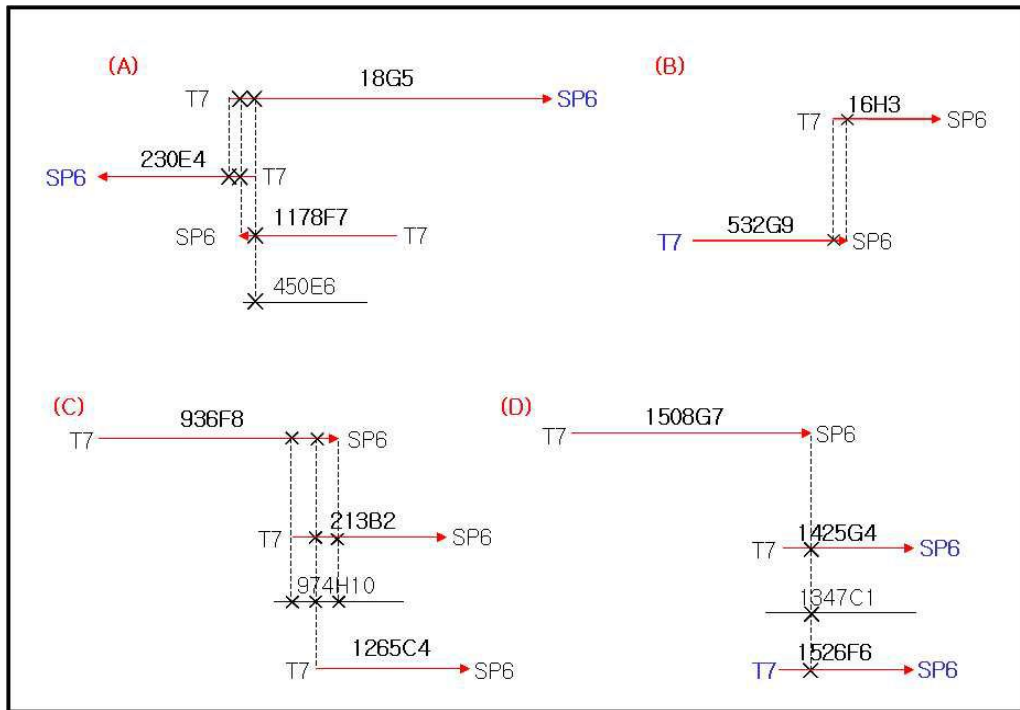
도면2e



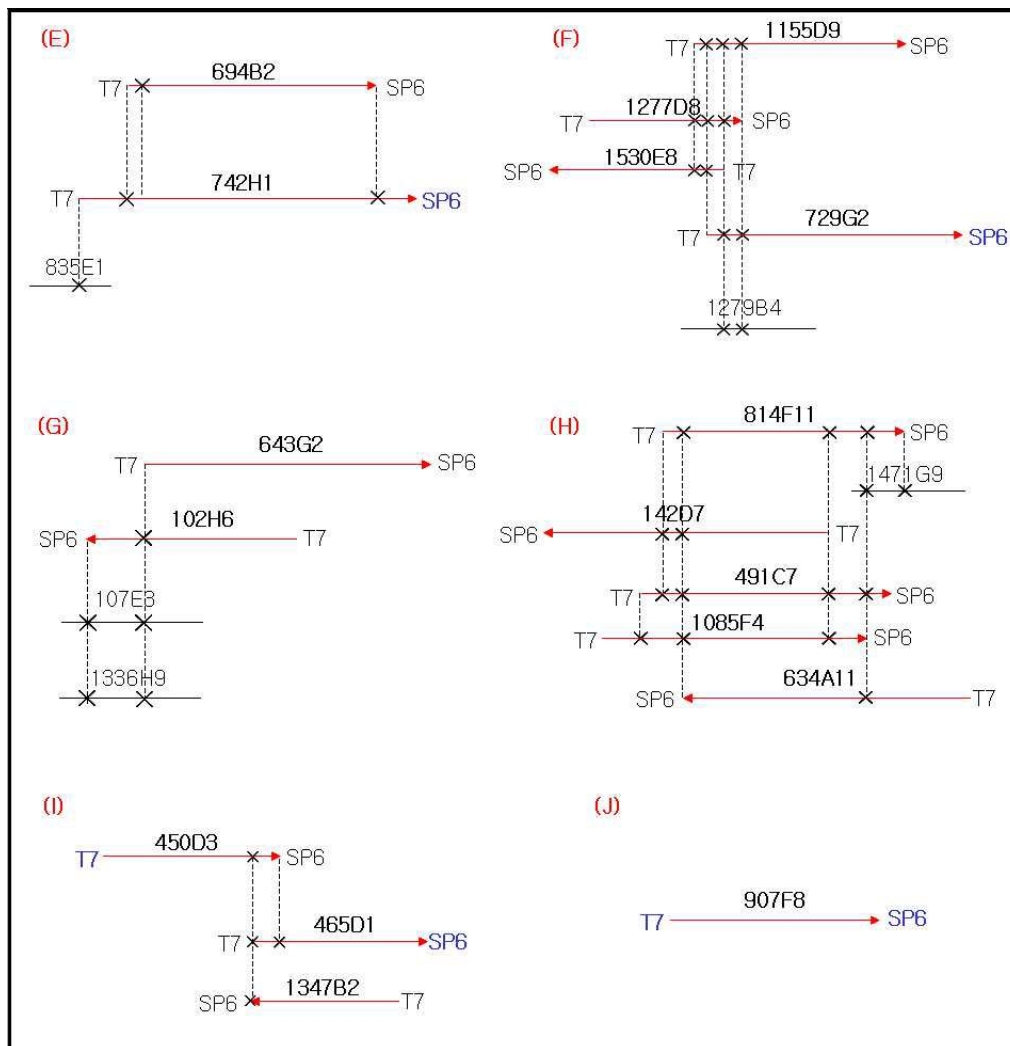
도면2f



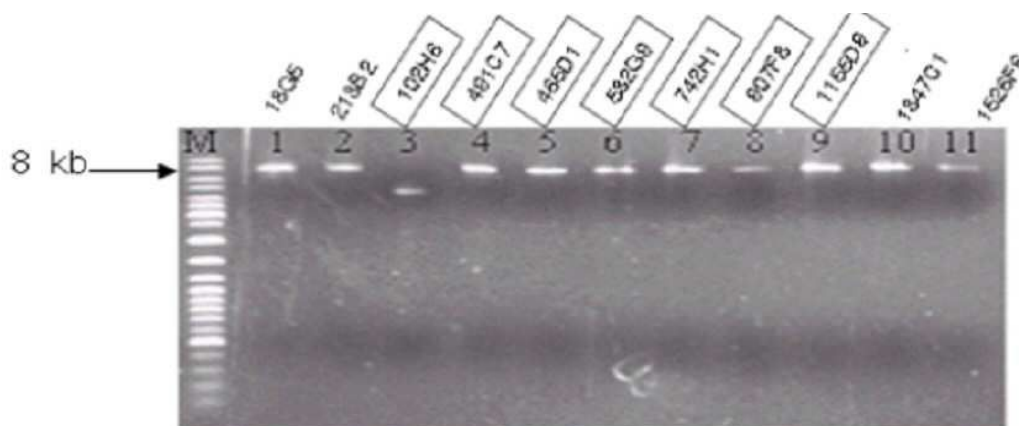
도면3a



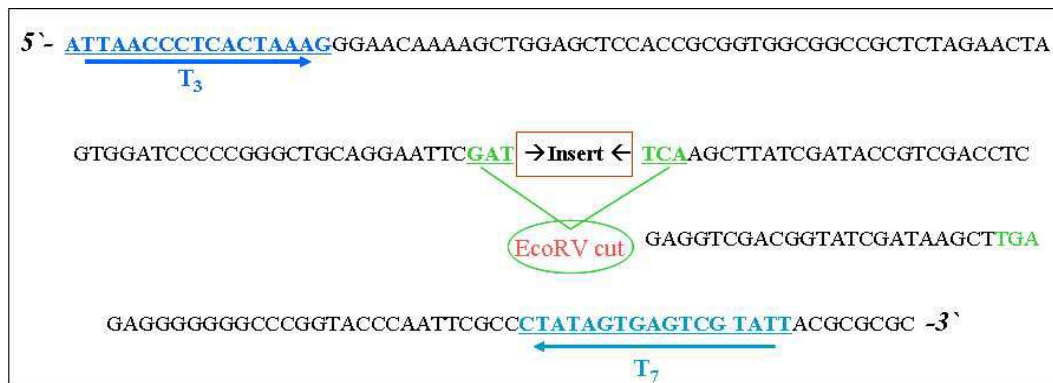
도면3b



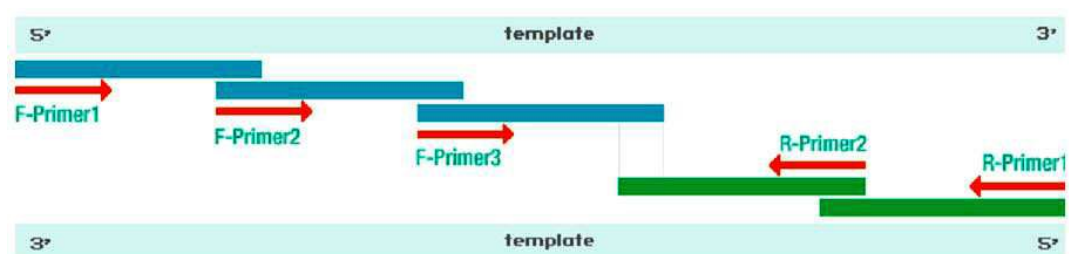
도면4



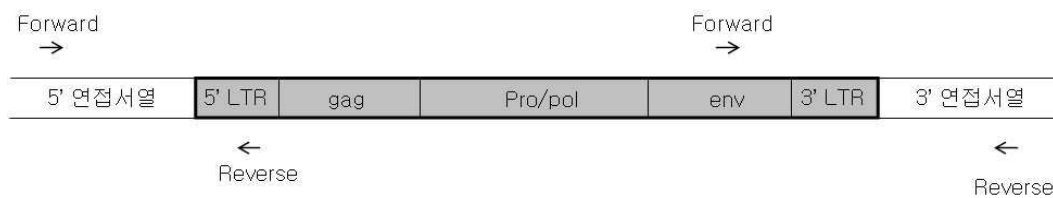
도면5



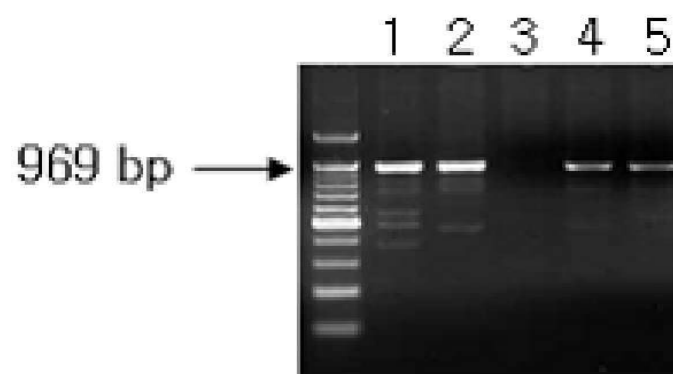
도면6



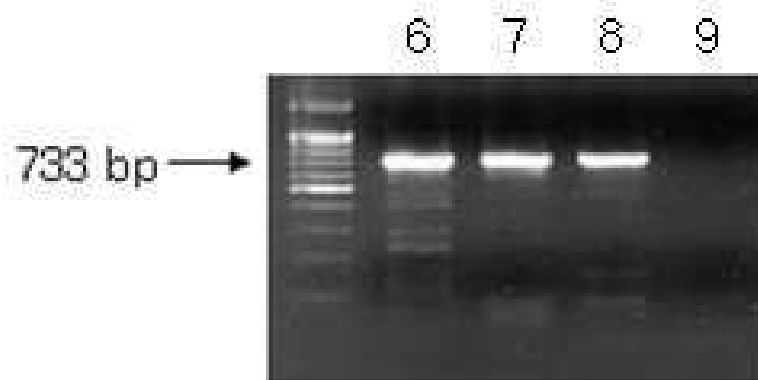
도면7



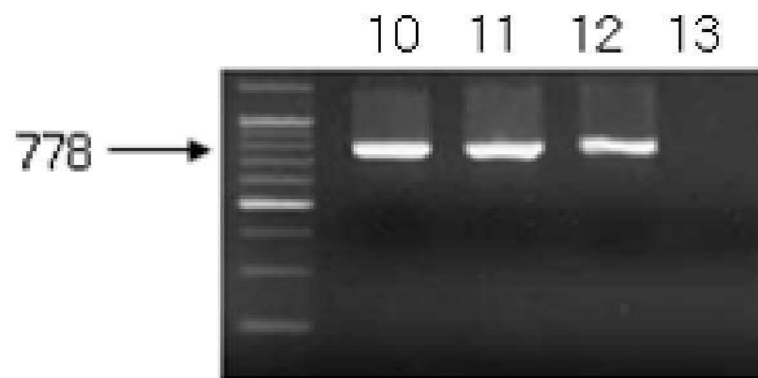
도면8a



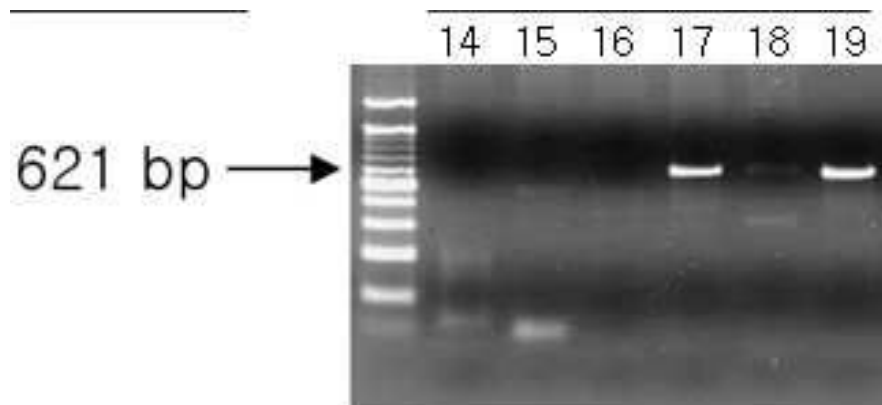
도면8b



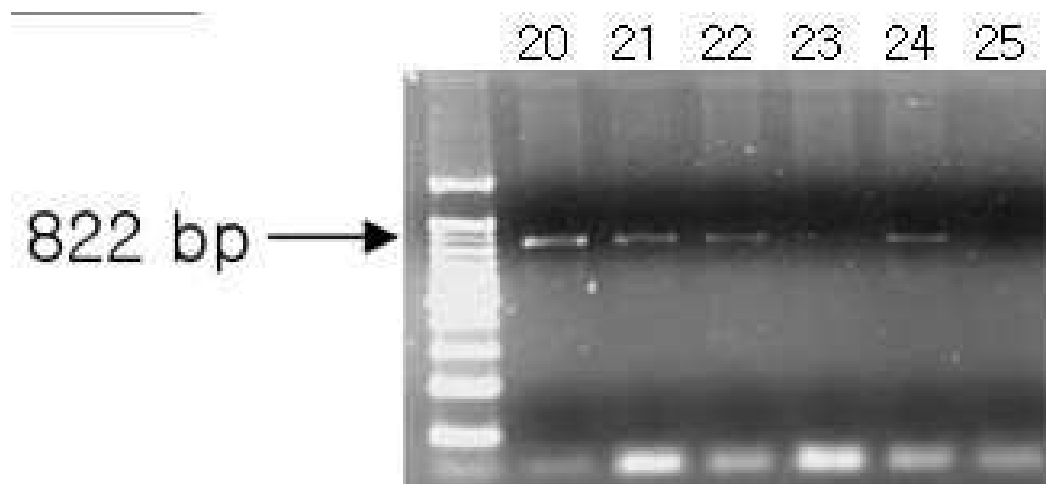
도면8c



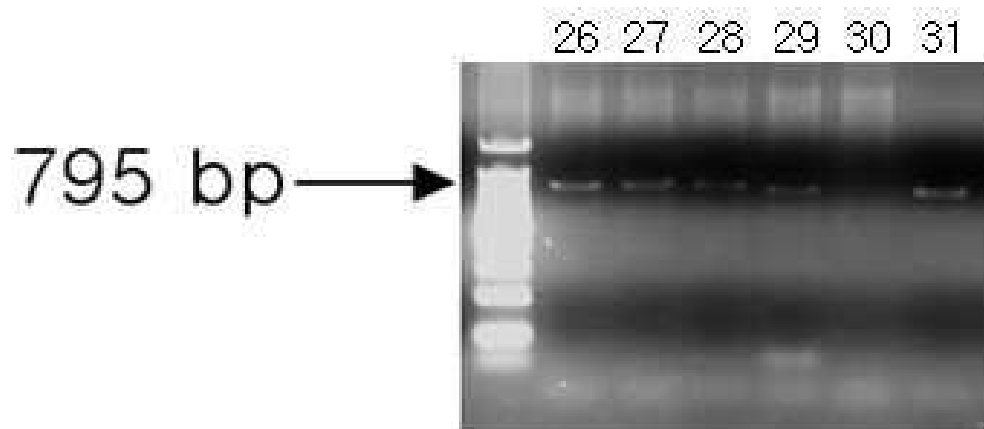
도면8d



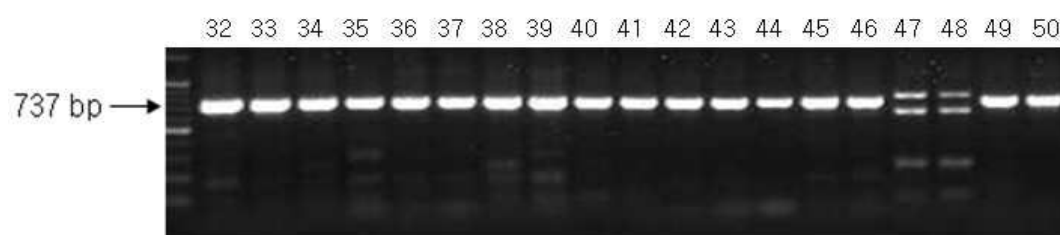
도면8e



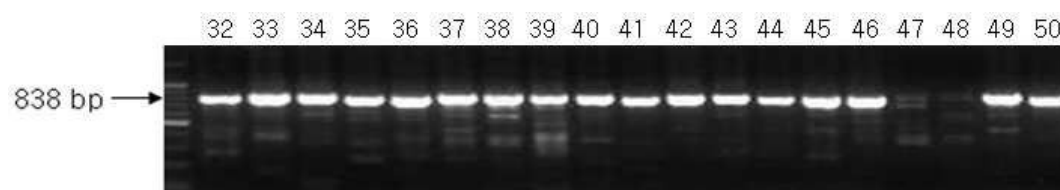
도면8f



도면8g



도면8h



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Flanking sequences and sets of primer for determining PERV

<160> 60

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 125

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 1

caaaaaaaaa tcaaaaaaca gacaaaaaaaa acaaccaat gttccttcaa tttctgctgt 60

tcagcaaagt gaccagtcacacacatatg cacattcttt tttatacta tcttccatca 120

tggttc 125

<210> 2

<211> 270

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 2

gttcaaaccc gagaaattag acagagttcc tgtgctgtgc agtagaaccc cattgcttat 60

ccatttcaaa tcttattttt taaatataaa catttaacac tatttgcttc agatctcaca 120

ttttatacag atttgaaata ttactgatat aatttgctt ttatggcacc tcatgctcca 180

tcccacttct gaaatccagg aggagcctat ggtaccctcc caaggacaaa agcctttctg 240

tgctctccat ttctgtatg aagggaaaat 270

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213>	Sus scrofa	
<400>	3	
	taggatttta gcagttc	17
<210>	4	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Sus scrofa	
<400>	4	
	cttcactgct taaactgaaa tgtctatgic taaaagcttt tcacactc	48
<210>	5	
<211>	542	
<212>	DNA	
<213>	Sus scrofa	
<400>	5	
	gtcaagttaa ttcaggagtt ttaataacca gacttttgtg ataaagaagt acaaagtctg	60
	acagtaggag ttatttgicc aagagtacag atttaatatt tataaataat cattgcagtt	120
	tcatacccat tatttttcct actactccat ggatattttg aaagaaaaaa gaaaggctaa	180
	tacaatggag ttactggata aaaccatgtt gaattttttt aaagttttta ttaaagtata	240
	gttgatttac aatgttcctt caatttctgc tgtactgcca agtgaaaaac atgttgaatt	300
	ttaatgttga catccaaatg gggtagtctt ggattagtaa tgctcaataa ctggagcga	360
	gaaaagccag atcaaatttg gaagtgtgc tttttttgtt tgtttttgic tttgttttct	420
	tatagctgca cctacagcat atggaagttc ctaggccagg gatcaaattc aaggcacagc	480
	tgtgacctac tccatagctg tagcaacact ggatccttaa cccaccattc cacagcagga	540
	ac	542

<210> 6
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 6
 gaactcctgg aagcatttgt tttcttcta gtgcacctgg ctataatctt ggacaagtta 60
 gttgattttt ctaagtttta gaattgttgt taggtaaata tgaattatta aaatgtattc 120
 ccctaattta tatagtg 137

<210> 7
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 7
 tcacagactg cacatggaaa ttgaaatcaa gccaggaaaa cccaatttt tcacctgcct 60
 gtcacttcgc agacattcca agcgcgggggt ctgtcttcg gggcctgggc cctctgcctt 120
 ctttccatca tcttagagca ggtgctctca gactgccctt ggcttgcata gctcgtgtcg 180
 tacttccag 189

<210> 8
 <211> 126
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa

<400> 8
 ccagtccttt cttttcttt ctgcctcagc atgtcatcca ccggcggacc ggatactttg 60
 tttatcttga aactgttgt taacatttag cacaacattt aaaggacagt tggaatctaa 120
 aacaaa 126

<210> 9
 <211> 127
 <212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 9

cataataaca tcaaattatt ttctaaactg attataccaa tttatatatt aagcagcaat 60

gtataagcat cccctccata tacattttct ctaacatatg ctattttgaa gcactttaat 120

ttttgac 127

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 10

tgacaatcca tagtaaaagt aaaataatcc 30

<210> 11

<211> 380

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 11

tgtttacatt attatatttg tggatgaagag aaggaatatt cagtgccttg gatcagtgca 60

ttaaacaag agaaaggggt cttttcctct ttgttttagaa ctgggatgtt ttgagcatgt 120

gtcgtacacc tggcagaagt ctaagcaacc cttctccatc ctggcaggtg tgtgataccc 180

agtggatgga gctaaggaat tttataaac tttttaccca gagagagcca tgtattgcat 240

gaagcagcag ggtgcctca agaatcacgt gacctggcag aggcagcagt gtccatggca 300

gtggccagta tccattggat gaggggcagg tcctgttga gcctcaaggt acttggtggt 360

gaatgagtcc acagtaggct 380

<210> 12

<211> 71

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 12

ggctgaggta ctaaacctgg aaaatggcag ccaaacataa ctgttccat tcaatgttag 60

ttcattctag t 71

<210> 13

<211> 547

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 13

gtgtgtggtg gagctacct ggggccatt gcctcctagg acttccttc tggaccttg 60

ctctgccttc tectactca gtcttccca catctcage cctgttcgg cactaatccc 120

tcctggacag tgtggacttg ttgggtgtac ccccccatg ctgtaatctt gagggcagtg 180

cctctgtcgt gttttgcgtt gtgtgtgttg cctgatatat ggcacctgga caaaaataac 240

aactgaagag ctggtggtga cacggttgg acagggtgct ggggccagg gcttctccta 300

ttgcagggtc agggagccat gccctccagc aggccagcct gtgggggttg agcctgtctc 360

ttctcactgg aagtgttag tttgtaatga aaggtagact tgttatcatc tacctttgat 420

cctggccacg agcagggcct gtggcccttt gggggtggtt tcctaataac tgacctgcac 480

gaagcacaga atagtcaagg ctgtgtatgt ccatggcct tatactagat ggtagacagg 540

gccccac 547

<210> 14

<211> 390

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 14

caccacctgc tacctttccc catccatgct agttgctgcc agtcagccct ggtatgttcc 60

cccaaacctg gtcttttggg tggcaacaaa ttaatcacag ttggcacatc agatagcatg 120

ggtgttactc ctgtcatagg tgatctgcgg accccttccct agaattaagt tgtcttggtc 180

tgagacagta ggtgtggcca ttcaggtact acagtaacag cccaggtttg tgggtgccag 240

gacctgccag ctcccgctgcc aagtgttata tatccgtcag ggctgctgt gagtgcctgt 300

tcacgacgtt gctctttcag gtggatctgt gtacacagge tccgtggagg ttcctcttca 360

gtcagccag gcgctagacc ctggggcctc 390

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 15
 angagtgagt gcagtcaga 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 16
 accataggct cctcctggat 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 17

ayragtgagt gcagtycrga

20

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 18

gacatagaca tttcagttta agcagt

26

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 19

agcgagaaaa gccagatcaa

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 20

ttgatgcaaa cagcaagagg 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 21
 ayragtgagt gcagtycrga 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 22
 agccaggtgc actaggaaga 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 23
 ayragtgagt gcagtycrga 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 24

gatgacatgc tgaggcagaa

20

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 25

caatgtataa gcatcccctc ca

22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 26

ttgatgcaaa cagcaagagg

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 27

ccagtggatg gagctaagga 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 28
 ttgatgcaaa cagcaagagg 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 29
 ayragtgagt gcagtycrga 20

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 30
 ttatgtttgg ctgccatttt c 21

<210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 31

gctacaacca ttaggaaaac taaaag

26

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 32

aaccaggact gtatatcttg atcag

25

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 33

gagatggaaa gattggcaac agcg

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 34

agtgatgtta ggctcagtgg ggac 24

<210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 35
 aattctcctt tgtcaattcc ggccc 25

<210> 36
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 36
 ccagtacttt atcgggtccc actg 24

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 37
 cctggatgcc tgacattact 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 38
cacatggatt gaacacgagg 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 39
tgacctatgc tacctgatcc 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 40
ggatctgatg ttgtcactgc 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 41

ggcgattacg tggataagc

20

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 42
 gtgaatatct gtgtgcgcct

20

<210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 43
 agtaagcctc actcaactcc

20

<210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 44
 cctaagcatc tggttgtcct

20

<210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 45

ggtcagatga ggtgaacttg

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 46

tgttctagtc ttgctcctgc

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 47

cagtcctatg gtcgttgtca

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 48

atccttagta cctgccttgc 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 49
 gaacacacgc acatcatcag 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 50
 agccacctca cagtcattct 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 51
 ctcgaatgac cttgactcct 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 52
ctatacctac gcagtgctct 20

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 53
catggtccaa tgatctcagc 20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 54
cacatcagcc atgcagagta 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 55

ctgcttcctt ctccttggt 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 56
 tccgaggatg actccaggac 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 57
 cacagcactc caactcagtc 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 58
 gctcaacctg ctgcttcctt 20

<210> 59
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 59
atcagcagac gtgctaggag gatc 24

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 60
ccacgcaggg gtagaggact gcgg 24