

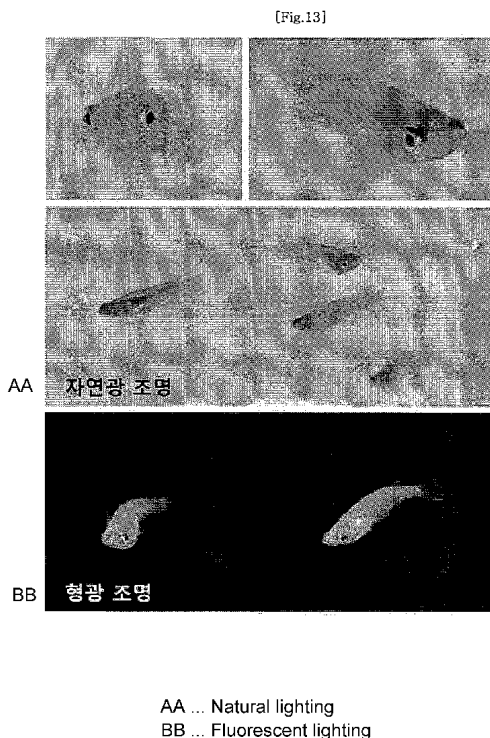


- (51) 국제특허분류: C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/005682
- (22) 국제출원일: 2010년 8월 25일 (25.08.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2010-0061446 2010년 6월 28일 (28.06.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 부경대학교 산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 부산광역시 남구 용당동 산 100 번지 부경대학교내, 608-739 Busan (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김동수 (KIM, Dong-Soo) [KR/KR]; 부산광역시 남구 용호동 LG 메트로시티 4 차 214 동 1002 호, 608-090 Busan (KR). 남윤권 (NAM, Yoon-Kwon) [KR/KR]; 부산광역시 남구 용호동 LG 메트로시티 5 차 223 동 903 호, 608-090 Busan (KR). 박철홍 (PARK, Chul-Hong) [KR/KR]; 경상남도 함양군 백전면 오천리 280-1 디노빌영어조합법인,
- (74) 대리인: 이병현 (LEE, Byung-Hyun); 서울특별시 강남구 역삼동 824-11 한라클래식빌딩 4 층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DOUBLE TRANSGENIC STERILE ORYZIAS DANCENA

(54) 발명의 명칭 : 더블 형질전환 불임성 형광 바다 송사리



(57) Abstract: The present invention relates to transgenic allotriploid sterile fish that acquire a novel fluorescent phenotype, and more particularly, to double transgenic *Oryzias dancena* which can express not only strong fluorescent expression in the skeletal muscle but also ubiquitous fluorescent expression in all other tissue, and to sterile allotriploid produced from the double transgenic *Oryzias dancena*. This novel transgenic allopolyploid can be used as a fluorescent ornamental organism with good ornamental quality because it has a novel fluorescent phenotype which is significantly improved over typical fluorescent transgenic fish; there is no risk of ecosystem transition of foreign genes through genesiological means even through intentional or unintentional release to the environment because of the perfectly sterile characteristic of the fish; and various options can be provided to consumers in the ornamental fish markets because said fish can live and grow normally in fresh water, brackish water, and seawater conditions.

(57) 요약서: 본 발명은 신규 형광 표현형을 획득한 형질전환(transgenic) 잡종 3 배체(allotriploid) 불임 어류에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 골격 근육(skeletal muscle)에서 강한 형광 발현과 함께 여타 모든 조직에서 보편적(ubiquitous) 형광 발현을 동시에 표현할 수 있는 더블 형질전환(double transgenic) 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 및 이들로부터 생성된 불임의 잡종 3 배체(sterile allotriploid)를 제공한다. 이들 신규의 형질전환 잡종 배수체는, 종래의 형광 형질전환 어류들에 비해 대폭 개선된 신규 형광 표현형을 보유함으로써觀賞 가치가 뛰어난 형광觀賞 생물로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 완벽한 불임의 특징을 보유함으로써 의도적 또는 비의도적 환경 방출 시에도 생식학적 경로를 통한 외래 유전자의 생태계 전이 위해성이 없으며, 담수, 기수 및 해수 조건에서 정상적인 생장이 가능하며, 관

상 어류 시장에 있어 소비자들에게 보다 넓은 선택의 폭을 제공할 수 있다.

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 더블 형질전환 불임성 형광 바다 송사리

기술분야

- [1] 본 발명은 신규 핵산 단편들의 조절에 의한 유전자 이식, 이중간 교배(interspecific breeding) 및 염색체조 조작(chromosome-set manipulation)을 통해 신규 형광 표현형을 획득한 형질전환(transgenic) 잡종3배체(allotriploid) 불임 어류에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 골격 근육(skeletal muscle)에서 강한 형광 발현과 함께 여타 모든 조직에서 보편적(ubiquitous) 형광 발현을 동시에 표현할 수 있는 더블 형질전환(double transgenic) 바다 송사리(오리지아스 단세포; *Oryzias dancena*) 및 이들로로부터 생성된 불임성 잡종3배체(sterile allotriploid)에 관련된다.

배경기술

- [2] 어류 형질전환 기술은 척추동물의 발생 유전학 및 유전체학 연구 등에 있어 중요한 연구기법으로 인정받고 있으며, 또한 유용 어종들에게 경제적으로 중요시 되는 형질(고속성장, 질병저항성, 영양 대사 조작 등)을 새로이 획득시킴으로써 양식생물 산업의 생산성을 대폭 개선하기 위한 전략으로도 중요시되고 있다(Hackett, P. B. & Alvarez, M. C. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. In *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 4 (Fingerman, M. & Nagabhushanam, R., eds), pp. 77145. Enfield, NH: Science Publishers Inc.; Nam YK, Maclean N, Fu C, Pandian TJ, Eguia MRR (2007) Development of transgenic fish: scientific background. In: Kapuscinski AR, Hayes KR, Li S, Dana G (eds.) *Environmental risk assessment for genetically modified organisms*. Vol 3. CABI Press, Cambridge, pp 6194; Nam YK, Maclean N, Hwang G, Kim DS (2008) Autotransgenic and allotransgenic manipulation of growth traits in fish for aquaculture: a review. *J. Fish Biol.* 72:126; Nam, Y. K., Noh, J. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Cho, K. N., Kim, C. G. & Kim, D. S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research* 10, 353362). 아울러 소형 어류들을 대상으로 생체 형광 단백질(living fluorescent protein) 유전자 등을 이식함으로써 새로운 관상 어류 제조 방안으로도 사용되고 있다. 형질전환 관상어로는 현재까지 지브라휘시(zebrafish; *Danio rerio*) 및 담수산 일본 송사리(Japanese medaka; *Oryzias latipes*)를 대상으로 형광 형질을 획득시킨 형질전환 계통이 개발된 바 있으며, 여타 다른 소형 어류 종들에서도 형광 어류 개발을 위한 실험적 연구들이 시도되고 있다(Gibbs PD, Schmale MC (2000) GFP as a genetic marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebrafish. *Mar. Biotechnol.* 2:107125; Chou CY, Horng LS, Tsai HJ (2001) Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res.*

10:303315; Gong Z, Ju B, Wan H (2001) Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica* 111:213225; Pan X, Zhan H, Gong Z (2008) Ornamental expression of red fluorescent protein in transgenic founders of white skirt tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). *Mar. Biotechnol.* 10:497501)

- [3] 그러나 형질전환 어류를 상용화하여 이용하는 것은, 여러 생물 산업 분야에서 새로운 부가가치를 창출한다는 측면에서는 그 유용성이 인정되지만, 형질전환 어류의 의도적 또는 비의도적 환경 방출로 인해 생태계의 유전자를 오염시키는 등 생물 다양성에 매우 부정적인 잠재 위해성을 동시에 내포하고 있다(Maclean, N. & Laight, R. J. (2000). Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries* 1, 146172; Kapuscinski, A. R. (2005). Current scientific understanding of the environmental biosafety of transgenic fish and shellfish. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 24, 309322). 어류의 경우, 육상 유전자 변형 곡물과는 달리, 이동성이 매우 높기 때문에 유전자 변형 어류의 원치 않는 환경 방출이 일어날 경우 그 회수가 현실적으로 불가능하고, 위해 생태계의 범위가 매우 광범위하다는 문제가 있다(Kapuscinski, A. R., Hayes, K. R., Li, S. & Dana, G. (2007). Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms, Volume 3: Methodologies for Transgenic Fish. Oxfordshire: CABI Publishing.). 따라서, 형질전환 어류의 안전한 상업적 이용을 위해서는 형질전환 어류를 대상으로 도입 유전자의 환경전파를 방지할 수 있는 생식생물학적 격리가 최소한의 조치로서 반드시 수반되어야만 한다. 특히, 관상 목적의 유전자 변형 어류의 경우, 첫째, 반드시 살아있는 형태로 불특정 다수의 최종 소비자들에게로 유통된다는 점, 둘째, 소비자 또는 애호가들 간에 교환 및 소규모 거래 등이 빈번히 일어남으로써 1차 소비 단계 이후에도 살아있는 유전자 변형 생물의 추가 유통이 쉽게 일어날 수 있다는 점, 그리고 셋째, 소비자들의 기호 변화로 인해 살아있는 유전자 변형 어류의 의도적인 환경 방출(예컨대 무분별한 방생 등) 가능성이 높다는 점을 고려할 때, 비록 형질전환 관상 어류가 일반적으로 실내에서 주로 이용된다 할지라도 환경 방출에 의한 생태학적 위해성 야기 가능성이 항시 존재한다. 따라서, 형질전환 관상 어류의 상용화를 위해서는 환경 방출시 야기될 수 있는 생식학적 경로의 유전자 전이를 차단할 수 있는 생물학적 격리 방법이 매우 중요시된다.
- [4] 종래 형질전환 기술에 의해 형광 관상 어류로 개발된 사례로는 지브라회시와 일본산 담수 송사리가 주를 이룬다. 형광 지브라회시 개발시, 원래 지브라회시 체표면에는 검정 반문 등이 존재하기 때문에 상품성이 높은 형광 관상어를 제조하기 위해서는 알비노(albino) 또는 황금색 변이 계통을 주로 이용한다. 종래 개발되어 있는 형광 지브라회시 계통들은, 외래 단백질을 골격 근육에 특이적으로 발현시킬 수 있는 유전자 조절 부위 단편들(예컨대 myosin light chain 2 polypeptide 유전자 프로모터, a-actin 유전자 프로모터 또는 muscle creatine kinase 유전자 프로모터 등)을 주로 이용하여 제조하였기 때문에 골격

근육계에서는 강한 형광발현을 나타내지만, 지느러미나 눈 등에서는 관상이 가능한 형광 표현형을 유도할 수 없고 오직 근육에만 형광의 표현 부위가 국한되어 있다(Xu Y, He J, Tian HL, Chan CH, Liao J, Yan T, Lam TJ, Gong Z (1999) Fast Skeletal Muscle-Specific Expression of a Zebrafish Myosin Light Chain 2 Gene and Characterization of Its Promoter by Direct Injection into Skeletal Muscle. *DNA AND CELL BIOLOGY* 18: 85-95; Ju B, Xu Y, He J, Liao J, Yan T, Hew CL, Lam TJ, Gong Z (1999) Faithful Expression of Green Fluorescent Protein (GFP) in Transgenic Zebrafish Embryos Under Control of Zebrafish Gene Promoters. *DEVELOPMENTAL GENETICS* 25:158167; Gong Z, Ju B, Wan H (2001) Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica* 111:213225).

일부 연구에서는 지브라휘시 세포골격(cytoskeleton)의 형성에 관여하는 베타-액틴(beta-actin) 유전자 프로모터를 비롯하여 여러 조직에서 외래 유전자 발현을 유도할 수 있는 항시구성적(constitutive and ubiquitous) 유전자들의 프로모터 조절부위를 이용, 형광 발현을 유도한 바 있다(Gibbs PD, Schmale MC (2000) GFP as a genetic marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebrafish. *Mar. Biotechnol.* 2:107125; Chou CY, Horng LS, Tsai HJ (2001) Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res.* 10:303315; Burket CT, Montgomery JE, Thummel R, Kassen SC, FaFave MC, Langenau DM, Zon LI, Hyde DR (2008) Generation and characterization of transgenic zebrafish lines using different ubiquitous promoters. *Transgenic Res.* 17:265279).

그러나, 이들 항시구성적 유전자 프로모터들에 의해 조절되는 형광 발현 벡터들을 이식하여 제조된 형질전환 어류들은, 여러 조직에서 보편적 형광 표현형을 유도할 수는 있지만 그 형광 강도가 상기 근육 특이적인 유전자 프로모터를 이용하는 경우 보다 많이 낮기 때문에 형광 관상 어류로서 우수한 상품성을 갖추기에는 부족함이 있다. 특히 베타-액틴 프로모터의 경우에는 내부장기 등 많은 조직 및 기관에서 높은 유전자 발현을 유도하지만 골격 근육에서는 상대적으로 낮은 활성을 나타내므로, 우수한 외적 형광 표현형을 생성시키는 데 제한적일 가능성이 높다. 일본산 담수 송사리의 경우도 역시 베타-액틴 유전자 프로모터 단편, 또는 앞서 지브라휘시 형질전환에 사용된 바 있는 지브라휘시 근육 특이 발현 유전자 프로모터들을 이용하여 형광 어류가 개발된 바 있으나(Hamada K, Tamaki K, Sasado T, Watai Y, Kani S, Wakamatsu Y, Ozato K, Kinoshita M, Kohno R, Takagi S, Kimura M (1998) Usefulness of the medaka beta-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7:173180; Hsiao C-D, Tsai HJ (2003) Transgenic zebrafish with fluorescent germ cell: a useful tool to visualize germ cell proliferation and juvenile hermaphroditism in vivo. *Dev. Biol.* 262:313323; Zeng Z, Liu, Seebah S, Gong Z (2005) Faithful Expression of Living Color Reporter Genes in Transgenic Medaka Under Two Tissue-Specific Zebrafish Promoters

DEVELOPMENTAL DYNAMICS 234:387392), 이들 역시 지브라회시에서 관찰된 현상과 유사한 결과를 나타낸다. 뿐만 아니라, 종래의 형광 지브라회시 및 일본 송사리는 모두 담수 어류로서, 해수 환경에서는 정상적인 생장과 원활한 사육이 용이하지 못하다. 즉, 현재까지 형질전환 기술을 이용한 형광 관상 어류의 이용은 담수 환경으로 국한되어 있다.

- [5] 이상과 같은 문제점을 고려하여 본 발명에서는, 종래 단독 형질전환 방식으로는 불가능하였던 형광 표현형, 즉, 골격 근육에서의 강한 형광 발현과 함께 여타 모든 조직들에서도 동시에 형광을 표현할 수 있는 우수한 관상 가치의 해산 형질전환 관상 어류를 제공하고자 하였다. 아울러, 형질전환 어류로부터 이종간 교배 및 염색체조 조작을 통해 불임형질을 유도함으로써 생식학적으로 격리된, 보다 안전한 유전자변형 형광 어류 이용 방안을 제공하고자 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 서로 다른 두 종류의 신규 유전자 조절부위 단편들을 이용하여 골격 근육에서의 강한 형광 발현과 여타 모든 조직에서의 보편적 형광 발현 특성을 동시에 획득한 더블 형질전환 동형접합성 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 계통을 생성시키고, 이들로부터 염색체조 조작 및 이종간 교배 프로그램을 통해 생식학적으로 격리된 새로운 해산 형광 형질전환 관상어류를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는, 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 마이오신 라이트체인 폴리펩타이드 아이소폼 2-2(myosin light chain polypeptide isoform 2-2; *mlc2-2*) 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 구조 유전자(structural gene)를 포함하고, 바람직하게는 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)를 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) *mlc2-2* 3'-UTR 단편을 추가로 포함하는, 바다 송사리(*O. dancena*) 근육에서 강한 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터; 그리고,
- [8] 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 베타-액틴 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 구조 유전자(structural gene)를 포함하고, 바람직하게는 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)를 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) 베타-액틴 3'-UTR 단편을 추가로 포함하는, 바다 송사리(*O. dancena*) 전 조직에서 보편적 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명에서는 상기 각각의 발현 벡터에서 형질전환 유전자 단위를 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 수정란에 미세현미주입하고 부화시켜 형질전환 바다 송사리(F0)를 얻고, 이를 비형질전환 바다 송사리와 교배시켜 단가접합성(hemizygous) 형질전환 바다 송사리(F1)를 얻고, 형질전환 암수간

교배시켜 동형접합성(homozygous) 형질전환 바다 송사리(F2)를 생산하는 방법; 그리고

- [10] 이러한 방법에 의해 생산된, 근육에서 강한 형광을 발현하는 형질전환 바다 송사리, 및 근육에서는 상대적으로 약한 형광을 발현하면서 전 어체에서 보편적이고 항시구성적인 형광을 발현하는 형질전환 바다 송사리를 제공한다.
- [11] 본 발명의 최종 목적을 달성하기 위해서는, 상기 방법에 의해 생산된 근육에서 강한 형광을 발현하는 형질전환 바다 송사리 및 근육에서는 상대적으로 약한 형광을 발현하면서 전 어체에서 보편적이고 항시구성적인 형광을 발현하는 형질전환 바다 송사리를 종내 교배(intraspecific cross)시켜 단가접합성(hemizygous) 더블 형질전환 바다 송사리를 얻고, 더블 형질전환 암수간 교배시켜 동형접합성(homozygous) 더블 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법; 그리고 이에 의해 생산된, 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서도 형광을 동시에 표현하는 더블 형질전환 바다 송사리를 제공한다.
- [12] 궁극적으로 본 발명에서는, 위와 같이 생산된 바다 송사리를 근연종 송사리(*Oryzias javanicus*)와 이종간 잡종 교배(interspecific hybridization)시키는 단계를 포함하는 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체(allotriploid)를 생산하는 방법, 그리고 이에 의해 생산되어 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서도 형광을 동시에 표현하며 생식능력이 제거된 불임성 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 잡종3배체(allotriploid)를 제공한다.
- [13] 본 발명에서는 담수, 기수 및 해수 환경 모두에서 정상적인 생장이 가능한 광염성 바다 송사리(*Oryzias dancena*)로부터 근육 특이적 또는 항시구성적 외래 유전자 발현을 유도할 수 있는 신규 프로모터들을 발굴하여, 형광 단백질 유전자와 융합된 형질전환 벡터들을 제조하였다. 유전자 이식 기법을 통해 각 형질전환 벡터를 바다 송사리에 이식 후 교배 프로그램을 통해 근육에 강한 형광 발현을 나타내는 형질전환 동형접합성(homozygous) 계통과 전 조직에 보편적 형광을 표현할 수 있는 형질전환 동형접합성 계통을 확립하고, 이들 두 동형접합 계통들 간의 교배 프로그램에 의해 두 형광 표현 형질을 함께 획득한 더블 형질전환(근육에 강한 형광과 여러 조직에서 보편적 형광 발현의 동시 표현) 동형접합 계통을 생성시켰다. 또한 이들 더블 형질전환 계통의 생식학적 격리를 위해서 근연종 송사리(오리지아스 자바니쿠스; *Oryzias javanicus*)와의 이종 교배 및 배수체 유도를 통해 더블 형광형질을 보존한 채 생식능력이 완전히 제거된 신규 형질전환 바다 송사리 잡종3배체를 제조할 수 있었다.
- [14] 본 발명의 구성에 관한 개요는 다음과 같다.
- [15] 첫째, 골격 근육에 특이적으로 강한 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터인 myosin light chain 2 polypeptide isoform #2 유전자 프로모터(이하 mlc2-2 프로모터)와, 골격 근육에서는 상대적으로 낮은 활성을 나타내지만 전 어체(whole fish body)의 모든 조직에 걸쳐 보편적 유전자 발현을 유도할 수 있는 베타-액틴 유전자 프로모터를 바다 송사리(*O. dancena*)로부터 새로이 분리하고,

적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 구조 유전자(structural gene)와의 융합 유전자(fusion gene)를 구축한다. 이어서 바다 송사리(*O. dancena*) mlc2-2 유전자와 베타-액틴 유전자의 3'-UTR(untranslated region) 단편을 분리하여 상기 두 융합 유전자 각각의 말단에 연결시킴으로써, 바다 송사리(*O. dancena*) 근육에서 강한 형광발현을 표현하거나 또는 전 조직에서 보편적 형광을 표현할 수 있는 형광 발현 벡터 2종을 구축한다.

- [16] 둘째, 상기 발현 벡터들로부터 형질전환 유전자 단위(transgene unit) 절편을 분리하여, 각각 바다 송사리(*O. dancena*) 수정란에 미세현미주입(microinjection)하고 형질전환 어류 선발 및 교배 프로그램을 통해, 근육에 강한 형광을 표현하는 바다 송사리(*O. dancena*) 형질전환 동형접합성 계통과, 근육에서는 상대적으로 약한 형광을 발현하지만 전어체에서 보편적이고 항시구성적인 형광을 표현할 수 있는 형질전환 바다 송사리(*O. dancena*) 동형접합성 계통을 각각 확립한다.
- [17] 셋째, 상기 두 형질전환 동형접합 계통들 간의 종내 교배(intraspecific cross)를 통해 근육에서 강한 형광과 함께 눈, 지느러미, 두부, 아가미 등 전 조직에서도 형광을 동시에 표현하는 더블 형질전환 형광 바다 송사리(*O. dancena*) 계통을 생산하고, 교배 프로그램 및 자손 검정법(progeny test)을 통해 이들로부터 두 형질전환 유전 좌위(transgene loci) 모두에서 동형접합성인 계통을 확립한다.
- [18] 넷째, 상기 더블 형질전환 바다 송사리(*O. dancena*)의 생식학적 격리를 위해 근연종인 *O. javanicus*와의 이종간 잡종 교배(interspecific hybridization)를 실시하는데, 이때 이종간 형성된 잡종 수정란의 제2극체 방출 억제를 위해서 온도 자극 처리를 수행한다. 이를 통해서 잡종3배체를 유도하고 더블 형광 표현형의 보전과 생식소 발달이 억제된 불임성을 검증함으로써 본 발명의 최종 산물을 제공한다.
- [19] 도 1은 본 발명의 구성과 흐름을 보여주는 개괄도이다. 여기에서 보듯이, 본 발명의 구성은 형질전환, 교배 및 염색체조 조작 프로그램을 중복 사용함으로써 종래 기술에서 볼 수 없었던 형광 관상 어류의 새로운 복합 형질을 확보하는 동시에, 완전한 생식학적 격리를 통해 생태학적으로 보다 안전한 방식의 유전자변형 관상 어류의 이용 방안을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [20] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- [21] (1) 형광 형질전환 어류 제조를 위한 발현 벡터 제조
- [22] 형질전환 어류를 제조하기 위해서 광염성 바다 송사리(*O. dancena*)로부터 골격 근육의 형성 및 운동 기능을 담당하는 마이오신 라이트체인 폴리펩타이드 아이소폼 2-2(myosin light chain polypeptide isoform 2-2; mlc2-2) 유전자와 그 조절부위를, 그리고 세포 골격 형성에 관여하는 항시구성적 발현 유전자인 베타-액틴 유전자와 그 조절부위를 분리한다. 본 발명을 위해 구축된 바다 송사리 발현 유전체(expressed gene transcripts) 데이터베이스로부터 상기 mlc2-2 및 베타-액틴 유전자들의 cDNA 염기서열을 각각 확보하고, 이로부터

PCR(polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 genomic DNA 유전자 단편 염기서열을 확보한다. 각 유전자 cDNA 또는 gDNA 염기서열을 바탕으로 5 방향으로의 genome walking을 수행하고, *mlc2-2* 및 베타-액틴 유전자별로 각각 5-upstream 영역을 확보한다. 이들 두 유전자 프로모터 각각을 이용하여 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP; Clontech사 pDsRed2 벡터에서 제공) 유전자와의 융합구조를 제조하기 위해서, 상기 확보된 염기서열 단편들을 미리 준비된 pDsRed2 절편 내로 리게이션(ligation) 반응을 실시함으로써 유전자 프로모터 단편을 RFP 유전자 바로 앞에 각각 삽입한다. 또한 RFP 유전자의 오리지아스 단세포나 세포내 발현을 용이하게 하기 위해서, RFP 유전자 종결 코돈 직후 pDsRed2 내 존재하는 NotI 위치로 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)을 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) *mlc2-2* 3'-UTR 단편 또는 베타-액틴 3'-UTR 단편을 추가로 각기 삽입한다. 결과적으로, 바다 송사리(*O. dancena*) 근육에서 강한 적색 형광 발현을 유도할 수 있는 형광 발현 벡터로서 *podmlc2-2RFP*와, 바다 송사리(*O. dancena*) 전 조직에서 보편적 형광을 표현할 수 있는 발현 벡터로서 *podb-actRFP*를 최종 구축한다.

[23] (2) 형질전환 형광 바다 송사리 제조 및 동형접합성 계통 확립

[24] 형광 형질전환 바다 송사리(*O. dancena*)를 제조하기 위해, 상기 두 종류의 플라스미드 벡터 각각으로부터 KpnI 및 AatII 제한효소 절단(*podmlc2-2RFP*의 경우), 또는 SalI 및 AatII 제한효소 절단(*podb-actRFP*의 경우)을 통하여 프로모터(*mlc2-2* 또는 베타-액틴 프로모터)-RFP 유전자-3'-UTR(*mlc2-2* 또는 베타-액틴 3'-UTR)로 연결되는 형질전환 유전자 단위(transgene unit)만을 분리한 후 순수 정제한다. 형질전환 유전자 단편을 오리지아스 단세포나 수정난 제1세포기에 미세현미주입하고 미세현미주입된 난으로부터 부화한 자어를 대상으로 형광현미경 검경을 이용하여 RFP 형광을 발현하는 개체들을 선발하여 성체까지 사육한다. 성체 단계까지 형광 발현을 유지하고 있는 F0(founder generation) 개체들을 선발하고, 선발한 형질전환 F0 개체들을 대상으로 일반 바다 송사리와의 교배 및 자손 검정 실험 통해 F1 세대로 형광 발현을 전달할 수 있는 개체들을 다시 선발한다. 형광을 발현하는 형질전환 F1 개체들을 선발하여 성체까지 성장시킨 후 형광 표현형을 분석함으로써, *mlc2-2-RFP* 형질전환 유전자 이식 그룹으로부터 골격 근육에서 일양하고 강한 적색 형광 발현을 표현하는 표현형적 특징을 확인하는 반면, 베타-액틴-RFP 이식 그룹으로부터는 전 어체에서 보편적인 적색 형광을 발현하는 표현형적 특징을 확인한다. 이들 두 계통을 대상으로 각 형질전환 계통 내에서 암컷 F1과 수컷 F1과의 형매 교배(brother-sister mating)를 실시하여 동형접합성 F2 개체들을 생성시키고, 다시 일반 바다 송사리와의 검정 교배를 통해 F3 자손 100% 모두에게 형광 형질을 전달할 수 있는 최적 동형접합계통을 베타-액틴-RFP 그룹과 *mlc2-2-RFP* 그룹에서 각각 확립한다.

[25] (3) 더블 형질전환 형광 바다 송사리 제조 및 동형접합성 계통 확립

- [26] 상기 확립된 두 형질전환 동형접합성 계통(mlc2-2RFP 및 b-actRFP 계통)들간의 종내 교배(형질전환 계통간 교배)를 통하여 근육에 강한 형광발현과 동시에 전 조직에 보편적 형광 발현을 함께 획득한 신규 더블 형광 표현형의 형질전환 개체들을 생산한다. 각 동형접합체 계통들 간에 암수를 상호 교환하는 방식으로 형질전환 계통간 교배를 실시하고, 이를 통해서 요구되는 목적 표현형을 획득한 계통간 잡종 형질전환 어류들을 생성한다. 선발된 형질전환 어류들은 mlc2-2 프로모터에 의해 골격 근육에서 강한 적색 형광을 표현하는 동시에, 베타-액틴 프로모터에 의해 눈, 지느러미, 아가미, 표피를 포함한 모든 조직에서 보편적 적색 형광을 함께 표현하는 더블 형질전환 계통임을 확인한다. 생성된 더블 형질전환 개체들로부터 두 형질전환 유전자좌위(loci)에 대해서 모두 동형접합성을 나타내는 개체들을 생성시키기 위해 형제 교배를 실시한다. 검정 교배를 통해 두 형질전환 유전자가 염색체상에 서로 연관(link)되어 있지 않음을 우선적으로 확인한 후 형제 교배를 수행하여, 두 형질전환 유전자의 독립 유전방식에 의해 형성된 동형접합성 더블 형질전환 개체들을 선발하고, 선발된 동형접합체들로부터 후대로 더블 형질전환 특징이 100% 전달되는 결과를 검정한다.
- [27] (4) 불임 잡종3배체 더블 형질전환 형광 바다 송사리 제조
- [28] 상기 신규 형성된 더블 형질전환 형광 바다 송사리 계통에 대한 생식학적 격리를 위해서 이종간 잡종 배수체를 유도한다. 본 발명에서 사용한 오리지아스 단세나를 포함한 대부분의 송사리들은 산란력이 매우 높고 연중 산란 특성을 나타내기 때문에 이들을 이용한 형질전환 관상어가 의도적 또는 비의도적으로 환경에 노출될 경우, 생태계 서식하는 동종 또는 근연종들과의 교배를 통해서 생태계 유전자 오염 가능성이 높을 뿐만 아니라 나아가 넓은 범위의 생태계 점유 가능성이 높다. 따라서, 본 발명을 통해 생성된 더블 형질전환 형광 송사리 개체들의 생태학적 안전성을 확보하기 위해, 생식소 발달 및 산란 기능이 억제된 불임의 형질전환체들을 제공하고자 한다. 현재 어류에게 불임성을 유도할 수 있는 방법으로서 3배체 유도에 의한 감수분열 억제가 널리 이용되고 있으나, 일부 어종들에서는 3배체 유도만으로는, 특히 3배체 수컷의 경우에 완벽한 생식소 수준의 불임이 얻어지지 못할 수 있음이 보고된 바 있다(Arai K (2001), Genetic improvement of aquaculture finfish species by chromosome manipulation techniques in Japan. *Aquaculture* 197, 205228; Lee C-S, Donaldson EM (2001) General discussion on reproductive biotechnology in finfish aquaculture. *Aquaculture* 197, 303320). 이러한 점을 고려하여 본 발명에서는 단순 3배체가 아닌, 근연종과의 이종간 잡종3배체를 유도함으로써 암수 모두에서 완벽한 불임 형질전환체를 제공하고자 한다.
- [29] 이종간 잡종 배수체 유도를 위한 후보 종으로서, 본 발명에서는 바다 송사리(*O. dancena*)의 광염성 특징과 투명한 체색을 잡종 배수체에서도 유지할 수 있는 근연 해산 송사리 *O. javanicus*를 선택하였다. 동형접합성 더블 형질전환 *O.*

dancena 암컷과 일반 *O. javanicus* 수컷간의 교배를 실시하고, 잡종 수정란의 제2극체 방출을 억제하기 위해 온도자극 처리를 한다. 온도 자극 처리는 수정 3분 후 0 °C에서 30~45분간 실시하고, 처리된 수정란으로부터 배 발생(embryonic development)과 부화를 유도한다. 잡종3배체 처리 그룹으로부터 확보된 형질전환 개체들을 대상으로 DNA 함량과 특정 유전자 단편 염기서열 조사 방법을 이용하여 잡종 배수체 형성을 확인하고, 확인된 개체들을 성장시켜 더블 형질의 표현 유무와 생식학적 격리 유무를 확인한다.

- [30] 본 발명에 따라 생성된 이종간 잡종3배체 더블 형광형질전환 어류들은 모계 *O. dancena*의 더블 형질전환 특성(즉, 근육의 강한 형광과 다른 여타 모든 조직에서의 보편적 형광 발현)을 안정적으로 잘 보존하고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 형질전환 잡종3배체들은 일반 *O. dancena* 또는 *O. javanicus*와의 장기간 교배 유도에서 전혀 생존력 있는 수정란을 생성하지 못하는 것으로 나타남으로써, 이들 이종간 잡종 배수체 형질전환 바다 송사리는 암, 수 모두에서 기능적인 불임성을 획득하였음을 입증하였다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 본 발명의 구성과 흐름을 보여주는 개괄도,
 [32] 도 2는 podmlc2-2RFP 형광 발현 벡터 모식도,
 [33] 도 3은 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 성체 조직들에서 mlc2-2 mRNA의 발현 분포 및 수준을 나타낸 그래프,
 [34] 도 4는 podb-actRFP 형광 발현 벡터 모식도,
 [35] 도 5는 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 성체 조직들에서 베타-액틴 mRNA의 조직 발현 분포 및 수준을 나타낸 그래프,
 [36] 도 6은 형질전환유전자 mlc2-2-RFP가 미세현미주입된 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 배(embryo)에서의 형광 발현을 보여주는 사진,
 [37] 도 7은 형질전환유전자 mlc2-2-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 및 일반 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 외형 사진,
 [38] 도 8은 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 미세현미주입된 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 배(embryo)에서의 형광발현을 보여주는 사진,
 [39] 도 9는 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 외형 및 외부 조직들에서의 RFP 발현을 보여주는 사진,
 [40] 도 10은 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 다양한 내부 장기들에서의 RFP 발현을 보여주는 사진,
 [41] 도 11은 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서 형광을 표현하는 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 사진,
 [42] 도 12는 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)로부터 형질전환 유전자들의 PCR 증폭을 나타낸 결과,
 [43] 도 13은 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)와 오리지아스

자바니쿠스(*O. javanicus*)와의 이종간 교배 및 배수체 유도를 통해 생성된 불임성 형질전환 잡종3배체의 사진.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들만으로 제한되는 것은 아니다.
- [45] 실시예 1: 바다 송사리 *mlc2-2* 프로모터를 포함하는 형광 발현 벡터 제조
- [46] 바다 송사리(*O. dancena*) 전 어체 total RNA를 이용하여 구축된 cDNA 라이브러리로부터 EST(expressed sequence tag) 분석을 실시하고, EST 데이터베이스 분석을 통해 *mlc2-2* cDNA 염기서열(서열번호 1)을 확보하였다. 확보된 *mlc2-2* cDNA 유전자 단편 염기서열을 바탕으로 *mlc2-2* 유전자 upstream의 프로모터를 포함한 조절영역을 확보하기 위해 genome walking을 실시하였다. Genome walking은 Universal Genome Walker kit(Clontech Laboratories, USA)를 이용하여 제조사의 권고 방법대로 수행하였으며, 이때 바다 송사리(*O. dancena*) *mlc2-2* 유전자에 특이적인 역방향 프라이머 2 종(ODMlc2-2 GW1; 서열번호 2 및 ODMlc2-2 GW2; 서열번호 3)을 합성하여 이용하였다. Genome walking을 위한 반응 조성물 및 PCR 증폭 조건은 아래의 표 1과 같다. 1차 genome walking의 결과를 바탕으로 동일한 방식에 의해 2차 genome walking을 실시하였으며, 이때 역방향 프라이머 2 종(ODMlc2-2 GW3; 서열번호 4 및 ODMlc2-2 GW4; 서열번호 5)을 이용하였다. 다음 표 1은 MLC2-2 프로모터 영역으로의 genome walking을 위한 PCR 반응 조성물과 증폭 조건을 나타낸 것이다.
- [47] 표 1

Genome walking용 PCR 반응 조성물			PCR 증폭 조건			
1 차	1st PCR	바다 송사리 genome walker library	1 µl	94℃	2분	1 cycle
		10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 µl	94℃	25초	7
		dNTP (각 10 mM)	1 µl			
		AP1 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 µl	68℃	3분	cycles
		ODMlc2-2 GW1 (5 uM)	2 µl	94℃	25초	
		3차 증류수	39 µl			72℃
		50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)	1 µl	32		
	총량	50 µl	72℃		7분	1 cycle
	2nd PCR	증류수로 50배 희석한 1st PCR 증폭 산물	1 µl	94℃	2분	1 cycle
		10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 µl	94℃	25초	5
		dNTP (각 10 mM)	1 µl			
		AP2 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 µl	68℃	3분	cycles
		ODMlc2-2 GW2 (5 uM)	2 µl	94℃	25초	
		3차 증류수	39 µl			72℃
50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)		1 µl	20			
총량	50 µl	72℃		7분	1 cycle	
2 차	1st PCR	바다 송사리 genome walker library	1 µl	94℃	2분	1 cycle
		10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 µl	94℃	25초	7
		dNTP (각 10 mM)	1 µl			
		AP1 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 µl	68℃	3분	cycles
		ODMlc2-2 GW3 (5 uM)	2 µl	94℃	25초	
		3차 증류수	39 µl			72℃
		50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)	1 µl	32		
	총량	50 µl	72℃		7분	1 cycle
	2nd PCR	증류수로 50배 희석한 1st PCR 증폭 산물	1 µl	94℃	2분	1 cycle
		10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 µl	94℃	25초	5
		dNTP (각 10 mM)	1 µl			
		AP2 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 µl	68℃	3분	cycles
		ODMlc2-2 GW4 (5 uM)	2 µl	94℃	25초	
		3차 증류수	39 µl			72℃
50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)		1 µl	20			
총량	50 µl	72℃		7분	1 cycle	

[48] Genome walking을 통해서 확보한 *mlc2-2* 유전자의 5-upstream 조절부위 단편(서열번호 6)을 이용하여, 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; RFP; Clontech사 pDsRed2 벡터에서 제공) 유전자와의 융합구조를 제조하기 위하여, 상기 확보된 염기서열 단편들을 PCR로 다시 분리하였다. 다음 표 2는 *mlc2-2* 프로모터의 PCR 분리를 위한 반응 조성물 및 증폭 조건을 나타낸 것이다. 이때 RFP 유전자와의 융합을 용이하게 하기 위해서 정방향(forward; KpnI-ODMlc2-2 1F; 서열번호 7) 및 역방향(reverse; AgeI-ODMlc2-2 1R; 서열번호 8) PCR 프라이머 각 5-말단에 KpnI 제한효소 인식 서열(AAT **GGTACC**) 및 제한효소 AgeI 인식 서열(AAT **ACCGGT**)을 각각 인위적으로 삽입하였다. PCR 산물을 pGEM T-easy vector(Promega)에 제조사의 권고 방법대로 클로닝한 후 다시 KpnI

및 AgeI 제한 효소 처리를 통해 절편을 회수하고, 동일 제한효소 처리를 통해 미리 준비된 pDsRed2 절편과의 리게이션(ligation) 반응을 실시함으로써 유전자 프로모터 단편을 RFP 유전자 바로 앞에 각각 삽입하였다. 표 3은 *mlc2-2* 프로모터와 RFP 유전자와의 융합 구조를 위한 리게이션 반응 조성물 및 반응 조건을 나타낸 것이다.

[49] 표 2

PCR 반응 조성물		PCR 증폭 조건		
바다 송사리 genomic DNA (100 ng/μl)	1 μl	94℃	2분	1 cycle
10× Expand HF 완충용액(Roche, Germany)	5 μl	94℃	15초	
10×dNTPs (각 2.5 mM)	5 μl	58℃	30초	10 cycles
KpnI-ODMlc2-2 1F (5 uM)	5 μl	72℃	3분	
AgeI-ODMlc2-2 1R (5 uM)	5 μl	94℃	15초	
3차 증류수	28 μl	58℃	30초	20 cycles
Expand High Fidelity System (Roche, Germany)	1 μl	72℃	3분 [1 cycle마다 5 초씩 증가]	
총량	50 μl	72℃	7분	1 cycle

[50] 표 3

리게이션 반응 조성물		반응 조건
<i>KpnI</i> 및 <i>AgeI</i> 절단 처리 후 정제한 pDsRed2-1 벡터 절편	3 μl	12℃에서 16시간 동안 형은 반응
<i>KpnI</i> 및 <i>AgeI</i> 절단 처리 후 정제한 MLC2-2 프로모터 절편	5 μl	
10×리게이즈 완충용액 (Promega, USA)	1 μl	
T4 DNA 리게이즈 (Promega, USA)	1 μl	
총량	10 μl	

[51] 리게이션 반응이 완료되면, 반응물 5 μl를 이용하여 대장균 XL-blue MRF' strain(Stratagene, USA)에 제조사의 권고 방법대로 형질도입하고, 재조합 균주를 선발하여 플라스미드 DNA를 회수하였다. 염기서열 분석을 통해 정확한 리게이션 반응이 수행된 클론을 검정, 선발하였다.

[52] 상기 선발된 플라스미드 벡터를 대상으로, 바다 송사리(*O. dancena*) 세포 내에서 RFP 유전자의 발현을 보다 용이하게 위해 RFP 유전자 종결 코돈 직후에 존재하는 NotI 제한효소 위치로 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)를 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) *mlc2-2* 유전자 3'-UTR 단편(182 bp; 서열번호 9)을 추가로 삽입하였다. 해당 *mlc2-2* 유전자의 3'-UTR 단편은 두 개의 프라이머(정방향 프라이머 NotI-ODMlc2-2 3UFW1; 서열번호 10 및 역방향 프라이머 NotI-AatII-ODMlc2-2 3URV1; 서열번호 11)를 사용하여 PCR 분리를 통해 확보하였다. 다음 표 4는 *mlc2-2* 유전자 3'-UTR 영역의 PCR 분리를 위한

반응 조성물 및 증폭 조건을 나타낸 것이다. 이때 pDsRed2 플라스미드의 NotI 위치로의 삽입을 위해 두 프라이머 5-말단에는 NotI 인식 서열(ATA **GCGGCCGC**)를 인위적으로 삽입하였고, 또한 추후 미세현미주입을 위해 형질전환 유전자 단위 절편만을 회수할 수 있도록 역방향 프라이머에는 AatII 제한효소 인식 서열(ATAGCGGCCGC **GACGTC**)를 추가로 삽입하였다. 결과적으로, 바다 송사리(*O. dancena*) 근육에서 강한 적색 형광 발현을 유도할 수 있는 형광 발현 벡터로서 podmlc2-2RFP를 제조하였다. 도 2는 podmlc2-2RFP 형광 발현 벡터 모식도이다.

[53] 표 4

PCR 반응 조성물		PCR 증폭 조건		
AccuPower [®] HF PCR premix 20 (Bioneer, Korea)		94℃	2분	1 cycle
바다 송사리 genomic DNA (100 ng/μl)	1 μl	94℃	30초	35 cycles
NotI-ODMlc2-2 3UFW1 (5 uM)	2 μl			
NotI-AatII-ODMlc2-2 3URV1 (5 uM)	2 μl	58℃	30초	
3차 증류수	15 μl	72℃	1분	
총량	20 μl			

[54] 실시예 2: 바다 송사리 내재 mlc2-2 유전자의 조직 발현 특징 분석

[55] 본 발명의 바다 송사리(*O. dancena*) mlc2-2 프로모터의 조직 특이적 활성을 확인하기 위해, 바다 송사리(*O. dancena*)의 다양한 조직에서 mlc2-2 유전자 mRNA 발현 수준을 실시간 역전사 PCR(real-time reverse transcription-PCR) 방법을 통해 조사하였다. 암수 성체 각 12마리의 바다 송사리들로부터 다양한 장기들(뇌, 아가미, 심장, 소화관, 신장, 간, 근육, 비장, 생식소)을 적출하여 RNeasy Mini-kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 각 조직별 분리된 total RNA 2 μg을 대상으로 Omniscript Reverse Transcription System(Qiagen, Germany)을 사용하여 제조사의 권고 방법에 의거하여 cDNA를 합성하였으며, 이때 normalization 대조군으로서 18S rRNA를 역전사 반응물에서 함께 준비하였다. 바다 송사리 조직별 mlc2-2 mRNA 발현 유무 및 발현 수준을 조사하기 위하여, mlc2-2 mRNA 단편을 증폭할 수 있는 PCR 프라이머 쌍으로는 정방향 프라이머 qODMlc2-2 1F(서열번호 12) 및 역방향 프라이머 qODMlc2-2 1R(서열번호 13)을 합성하여 이용하였고, 실시간 PCR 증폭 양의 변화는 Bio-Rad 사(USA)의 iCycler real-time PCR optic module을 이용하여 추적하였다. 다음 표 5는 mlc2-2 mRNA의 실시간 정량 증폭을 위한 PCR 반응 조성물 및 열순환 증폭 조건을 나타낸 것이다. 각 조직별 mlc2-2 mRNA의 발현 수준은 해당 조직의 18S rRNA 대조군의 수준을 기준으로 보정하였으며, 조직간 상대 정량은 Kubista 등의 문헌(Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, JonJ, Lind K, Sindelka R, SjR, SjB, StrL, StA, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95125)에 기술된 방법에 의거하여 실시하였다.

[56] 표 5

PCR 반응 조성물		PCR 증폭 조건		
2X SYBR Super mix (Bio-Rad)	12.5µl	94℃	2분	1 cycle
바다 송사리 조직별 cDNA 주형	1 µl			
qODMlc2-2 1F (5 uM)	2 µl	94℃	20초	
qODMlc2-2 1R (5 uM)	2 µl	58℃	20초	45 cycles
3차 증류수	7.5 µl			
총량	25 µl	72℃	20초	

[57] 도 3은 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 성체 조직들에서 *mlc2-2* mRNA의 발현 분포 및 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 바다 송사리 *mlc2-2* 유전자 발현의 대부분은 근육에 강하게 집중되어 있으며 여타 나머지 조사한 조직들에서는 유전자 발현이 검출되지 않거나 매우 미비한 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에서 *mlc2-2* 프로모터에 의한 형광 발현을 형질전환 바다 송사리 성체에서 표현할 경우, 그 형광 발현이 근육에 강하게 집중될 수 있음을 잘 보여준다.

[58] 실시예 3: 바다 송사리 베타-액틴 프로모터를 포함하는 형광 발현 벡터 제조

[59] 바다 송사리 전 조직에서 보편적이고 항지구성적인 형광 발현을 유도할 수 있는 발현 벡터를 제조하기 위하여 베타-액틴 프로모터를 분리하였다. 상기 실시예 1에서 기술한 바다 송사리 EST 데이터베이스로부터 베타-액틴 cDNA 전체 염기서열(서열번호 14)을 확보하였고, 실시예 1에서와 같이 genomic 유전자 단편의 분리 및 genome walking을 통해서 5-upstream 조절부위 단편을 확보하였다. 이때 genomic 베타-액틴 유전자 단편의 분리 및 genome walking에 사용한 프라이머들은 서열번호 15 내지 18로 나타내었다. 다음 표 6은 베타-액틴 genomic 유전자 분리 및 프로모터 영역으로의 genome walking을 위한 PCR 반응 조성물과 증폭 조건을 나타낸 것이다.

[60] 표 6

Genomic 유전자 분리					
PCR 반응 조성물			PCR 증폭 조건		
AccuPower [®] HF PCR premix 20 (Bioneer, Korea)			94°C	2분	1 cycle
바다 송사리 genomic DNA 주형 (100 ng/μl)	1 μl		94°C	30초	
ODb-ACTg FW (5 uM)	2 μl		58°C	30초	30 cycles
ODb-ACT RV (5 uM)	2 μl		72°C	3.5분	
3차 증류수	15 μl		72°C	5분	1 cycle
총량	20 μl				
Genome walking					
PCR 반응 조성물			PCR 증폭 조건		
1st PCR	바다 송사리 genome walker library	1 μl	94°C	2분	1 cycle
	10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 μl	94°C	24초	7 cycles
	dNTP (각 10 mM)	1 μl	68°C	3분	
	AP1 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 μl	94°C	24초	32 cycles
	ODb-ACT GW1 (5 uM)	2 μl	72°C	3분	
	3차 증류수	39 μl	72°C	7분	1 cycle
	50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)	1 μl			
	총량	50 μl			
2nd PCR	증류수로 50배 희석한 1st PCR 증폭 산물	1 μl	94°C	2분	1 cycle
	10x Advantage 2 PCR 완충용액(Clontech, USA)	5 μl	94°C	24초	5 cycles
	dNTP (각 10 mM)	1 μl	68°C	3분	
	AP2 프라이머(10 uM; Clontech, USA)	1 μl	94°C	24초	20 cycles
	ODb-ACT GW2 (5 uM)	2 μl	72°C	3분	
	3차 증류수	39 μl	72°C	7분	1 cycle
	50x Advantage 2 중합효소 혼합물(Clontech, USA)	1 μl			
	총량	50 μl			

[61] Genome walking을 통해서 확보된 베타-액틴 조절부위는 5-upstream 영역, 비-번역 엑손 I(non-translated exon I) 및 인트론 I(intron I)이 연결되어 있는 총 3.88 kb의 서열이다(서열번호 19). 실시예 1에서와 유사하게 인위적으로 삽입된 제한효소 Sall 인식 서열(AT **GTCGAC**)을 포함한 정방향 프라이머(ODb-ACTp 2F; 서열번호 20)와 AgeI 인식 서열(AT **ACCGGT**)을 포함한 역방향 프라이머(ODb-ACTp 2R; 서열번호 21)를 이용하여 PCR 분리 후, pDsRed2 벡터의 RFP 유전자 upstream으로 클로닝하였다. 또한 RFP 유전자 발현을 용이하게 하기 위해, 실시예 1에서와 마찬가지로 NotI 인식 서열을 포함한 정방향 프라이머(NotI-ODb-ACT 3UFW1; 서열번호 22)와, NotI/AatII 인식 서열을 포함한 역방향 프라이머(NotI-AatII-ODb-ACT 3URV1; 서열번호 23)를 이용하여 베타-액틴 3'-UTR 단편(650 bp; 서열번호 24)을 PCR 분리 후 RFP 종결 코돈 downstream에 추가로 연결하였다. 결과적으로, 바다 송사리(*O. dancena*) 전어체에서 항시구성적 적색 형광 발현을 유도할 수 있는 형광 발현 벡터로서 podb-actRFP를 제조하였다. 도 4는 podb-actRFP 형광 발현 벡터 모식도이다.

[62] 실시예 4: 바다 송사리 내재 베타-액틴 유전자의 조직 발현 특징 분석

- [63] 바다 송사리 베타-액틴 유전자 발현 조절이 모든 조직에서 보편적으로 일어나는지를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 준비된 성체 조직별 cDNA를 대상으로 실시간 역전사 PCR 분석을 실시하였다. 사용한 반응물의 조성 조건은 실시예 2에서와 동일하며, 단 베타-액틴 mRNA 단편을 증폭하기 위한 프라이머 쌍으로 정방향 프라이머 qODb-ACT 1F(서열번호 25) 및 역방향 프라이머 qODb-ACT 1R(서열번호 26)을 이용하였다. 조직 발현의 보정과 조직간 상대 정량도 역시 실시예 2에서와 동일하게 수행하였다.
- [64] 도 5는 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 성체 조직들에서 베타-액틴 mRNA의 조직 발현 분포 및 수준을 나타낸 그래프이다. 여기에서 보듯이, 바다 송사리 베타-액틴 유전자는 분석한 모든 조직에서 mRNA의 발현을 나타내어, 베타-액틴 유전자의 보편적 조절 특징을 잘 보여주고 있다. 한편, 도 5에 의하면 베타-액틴 mRNA의 발현 수준은 조직별로 서로 크게 다르게 나타났는데, 소화관, 신장, 비장 및 난소 등에서 높은 발현 수준을 나타낸 반면 뇌, 아가미, 심장, 정소 조직에서는 상대적으로 온화한 발현을, 그리고 근육 및 간 조직에서 가장 낮은 발현을 나타내었다. 따라서, 바다 송사리 베타-액틴 조절부위를 이용한 외래 형광 유전자 발현 유도시, 형질전환 바다 송사리 성체는 모든 조직에서 보편적으로 형광을 표현할 수 있지만, 조직마다 발현율의 차이가 예상되고, 특히 골격 근육계에서는 강한 외래 유전자 단백질의 표현을 기대하기 어려운 것으로 나타났다.
- [65] 실시예 5: mlc2-2 프로모터 조절에 의한 형광 바다 송사리 계통 확립
- [66] 근육에 집중된 강한 형광 단백질의 발현을 유도할 수 있는 형질전환 바다 송사리를 제조하기 위하여, 상기 podmlc2-2RFP로부터 KpnI/AatII 제한효소 처리를 통해 회수한 형질전환 유전자 절편을 바다 송사리 수정란에 미세현미주입하였다. 이를 위하여, 바다 송사리 암컷 및 수컷 성체를 30 L 크기의 25 °C 수조에 암:수=2:1 비율로 수용하고 교배 및 산란 행동을 관찰하였다. 산란이 확인되면 즉시 수정란을 회수하여 제1난할기에 있는 수정란을 선택, 현미경 하에서 세포질 내로 미세현미주입하였다. 미세현미주입은 미세현미조작기(micromanipulator; Narishige, Japan)를 이용하였으며, 미세현미주입을 위한 DNA는 10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA pH 8.0 완충용액에 100 µg/ml 농도로 조정하여 사용하였다. 1차 미세현미주입된 배(embryo) 110 개를 대상으로 형광 현미경 검경을 통해 발생 단계별 RFP 발현 유무와 양상을 관찰하였다. 그 결과, mlc2-2 프로모터의 조절에 의한 RFP 발현은 후기 배에서 근육특이적인 양상으로 관찰됨에 따라 mlc2-2 유전자 조절의 특징과 잘 일치하는 것으로 나타났다. 도 6은 형질전환유전자 mlc2-2-RFP가 미세현미주입된 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 배(embryo)에서의 형광 발현을 보여주는 사진이다.
- [67] 1차 분석 결과를 바탕으로 형질전환 어류를 생산하기 위하여, 다시 총 981 개의 수정란에 미세현미주입을 실시하였다. 이 중 342 개체(34.9%)가 부화하였으며,

부화된 개체들 중 267 마리가 최종 성숙단계에 도달하였다. 성체 267 마리 중 35 마리(13.2%)에서 적색 형광 발현이 관찰되었고, RFP 형광 발현은 모두 골격 근육에 국한 관찰되어 *mlc2-2* 프로모터의 조절에 의한 근육 집중형 발현 특징을 잘 보여주었다. 생성된 F0 개체들은 모두 모자이크 형태의 발현을 나타내었지만, 일반 바다 송사리와의 교배를 통해 생성된 F1 형질전환 개체들은 F0 부모와는 달리 전 골격 근육에서 매우 강한 형광 발현을 나타내었다. 아래 표 7은 *mlc2-2*-RFP 형질전환 F0에서 F1 자손으로의 형광발현 전달을 나타낸다.

[68] 표 7

FO no.	성 (sex)	수정율 (%)	부화율 (%)	RFP 발현 빈도(%)
MLC2-2 TG#1	암	95.1±2.4	89.5±5.4	0.0
MLC2-2 TG#2	수	98.4±2.0	90.1±6.4	12.5
MLC2-2 TG#3	수	91.2±6.3	85.6±3.7	0.0
MLC2-2 TG#4	암	96.5±5.5	92.0±3.9	4.1
MLC2-2 TG#5	암	94.7±4.0	88.1±8.1	0.0
MLC2-2 TG#6	암	90.5±3.4	86.5±5.5	9.2
MLC2-2 TG#7	암	90.2±4.5	85.0±5.0	0.0
MLC2-2 TG#8	수	91.8±1.8	85.1±3.0	21.5

[69] 도 7은 형질전환유전자 *mlc2-2*-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 및 일반 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 외형 사진이다. 여기에서 보듯이, 이들 형질전환 바다 송사리의 경우 형광 조명 없이 육안으로도 강한 적색 형광을 손쉽게 관찰할 수 있으며, 그 형광 발현 양상은 골격 근육 특이적으로 나타남으로써 눈, 지느러미, 상악 위쪽의 두부에서는 RFP 발현이 없는 것을 알 수 있다.

[70] F1 단가접합성(hemizygous) 형질전환 개체들로부터 동형접합성(homozygous) 형질전환 계통을 확립하기 위하여, F1 암컷 및 수컷 간 1:1 비율로 형매 교배를 실시하였다. 형매 교배를 통해서 확보된 F2 형질전환 표현형 보유 개체들 중 상대적으로 강한 형광 강도를 보이는 개체를 무작위로 6 마리 선발하여 일반 바다 송사리와의 검정 교배를 실시하였다. 생산된 F3 자손의 형광 발현 유무 조사를 통해 100% 형광 발현을 후대에 전달할 수 있는 4마리의 형질전환 개체들을 확보함으로써, 염색체에 삽입된 형질전환 유전자 좌위가 동형접합화된 계통을 확립하였다. 다음 표 8은 자손검정을 통한 *mlc2-2* 동형접합성 형질전환 F2의 선발을 나타낸 것이다.

[71] 표 8

F2 형질전환		비형질전환 대조군 (성, sex)	F3 자손의 RFP 발현 빈도	
계통 번호	개체번호(성, sex)		#	%
MLC2-2 F2#2	#2-A(암컷)	NTG-1(수컷)	91/91	100.0
	#2-B(수컷)	NTG-2(암컷)	64/64	100.0
MLC2-2 F2#4	#4-A(수컷)	NTG-3(암컷)	48/82	58.5
MLC2-2 F2#6	#6-A(수컷)	NTG-4(암컷)	44/44	100.0
MLC2-2 F2#8	#8-A(암컷)	NTG-5(수컷)	61/61	100.0
	#8-B(수컷)	NTG-6(암컷)	99/100	99.0

[72] 실시에 6: 베타-액틴 프로모터 조절에 의한 형광 바다 송사리 계통 확립

[73] 전 어체 조직에서 형광을 발현하는 오리지아스 동형접합계통을 제조하기 위해, 위에서 개발한 형질전환 발현벡터 podb-actRFP의 SalI/AatII 절편을 미세현미주입하였다. 예비 평가용 실험으로써 *O. dancena* 세포에서 본 발명의 베타-액틴 프로모터가 보편적인 RFP 발현을 유도할 수 있는지의 여부를 1차 조사하기 위하여, 형질전환 유전자를 수정란에 미세현미주입한 후 발생 배(embryo)에서 형광발현을 조사하였다. 미세현미주입된 배(embryo)들은 초기 체절기부터 강한 형광 발현을 나타내기 시작하였으며, RFP 발현 배체별로 그 발현 양상은 다양하고, 세포 유형별 특이적인, 또는 발생 단계 특이적인 양상 없이 대부분의 모든 세포에서 보편적인 발현 특징을 나타내었다. 도 8은 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 미세현미주입된 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 배(embryo)에서의 형광발현을 보여주는 사진이다.

[74] 본 결과를 바탕으로 본격적인 형질전환 어류를 제조하기 위해서 총 1189 개의 수정란에 다시 미세현미주입을 실시하여, 이 중 386 마리(32.5%)가 부화하였고, 최종 개체가 성숙이 가능한 성체까지 도달하였다. 성체를 대상으로 외부 형광 표현형을 조사한 결과, 분석한 271 개체들 중 28 개체(10.3%)들에서 RFP 발현이 검출되었고, 이 중 9 미는 형광 조명의 도움 없이도 육안으로 RFP를 쉽게 검출할 수 있을 만큼 충분한 적색 형광을 나타내었다. F0 세대의 개체들은 대부분 모자이크 형태의 형광분포를 나타내었지만, 그 적색 형광의 발현 양상은 특정 세포 또는 조직 유형에 국한된 특이 양상 없이 아가미, 지느러미, 근육 등 다양한 조직 유형에 걸쳐 형광 발현을 나타내었다. 이들 형광 표현 F0 개체들 중 무작위로 선발된 개체들을 일반 바다 송사리와 교배를 통해 F1 후대로의 형질전환 발현 전달이 가능한 계통을 선발하였다. 최종 선발된 총 9 미의 F0 개체들을 대상으로 대조군과의 교배를 수행한 결과, 5 미의 F0 개체들이 F1으로 형광발현을 성공적으로 전달하였으며, 전달 빈도는 개체별로 다양하게 나타났다. 다음 표 9는 베타-액틴 RFP 형질전환 F0에서 F1 자손으로의 형광발현 전달을 나타낸다.

[75] 표 9

FO no.	성 (sex)	수정율 (%)	부화율 (%)	RFP 발현 빈도(%)
B-ACT TG#1	수	90.1±5.5	79.0±3.8	0.0
B-ACT TG#2	암	88.4±2.8	82.1±5.0	2.1
B-ACT TG#3	수	93.5±4.9	83.3±4.9	0.0
B-ACT TG#4	수	86.1±7.5	76.5±6.3	14.1
B-ACT TG#5	암	90.5±6.2	83.5±5.5	0.0
B-ACT TG#6	수	86.5±4.8	80.2±7.1	0.0
B-ACT TG#7	수	80.5±3.3	76.5±2.2	15.1
B-ACT TG#8	암	76.5±4.9	71.1±5.8	0.9
B-ACT TG#9	수	88.8±6.4	81.1±3.7	21.9

[76] 형광 표현이 모자이크 형태로 관찰되는 F0 세대와는 달리, 모든 세포가 단가접합체(hemizygote) 형태로 형질전환 유전자를 포함하는 F1 개체들의 경우, 전 세포 및 조직에서 RFP 형광을 성공적으로 발현하는 것으로 나타나, 본 발명의 효과를 잘 보여주고 있다. 도 9는 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 외형 및 외부 조직들에서의 RFP 발현을 보여주는 사진이다. 이들 F1 개체들은 근육 전반에 걸쳐 온화한 RFP 형광 강도를 가지며, 여타 다른 조직에서는 조직별로 다양한 강도의 형광을 표현하고 있다. 외부 표현형에 있어 본 형질전환 개체들은 눈, 비늘, 두부, 지느러미에도 모두 RFP 형광을 발현하며, 뿐만 아니라 내부 장기에 있어서도 신장, 소화관, 비장 등 여러 장기에서 다양한 형광 세기를 나타내는 등 베타-액틴 유전자 발현의 특징을 잘 따르는 것으로 나타났다. 도 10은 형질전환유전자 베타-액틴-RFP가 이식된 F1 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 다양한 내부 장기들에서의 RFP 발현을 보여주는 사진이다. 따라서, 본 형질전환 계통들은 상기 실시예 5의 근육 집중형 형광 발현 계통에서와 같이 근육에 강한 형광을 표현하지는 않지만, *mlc2-2-RFP* 형질전환에서는 확보할 수 없는 모든 조직에서의 보편적 형광 발현 분포를 표현한다.

[77] 이들로부터 선발된 계통의 암, 수 F1 개체들 간의 형매 교배를 통해서 F2 형질전환 개체들을 생성하였다. F1 형질전환 개체들 간의 교배를 통해 수정율, 부화율 및 초기 생존율에 있어서는 일반 대조군간의 교배와 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으며, 형질전환 유전자의 발현 빈도 분석시 약 75%로 나타나 멘델 유전 방식과 일치함을 보여주고 있다. 또한, 감수 분열 등 형질전환 후대 전달과정에서 형질전환 유전자 발현의 감소 또는 소실 등 없이 안정적인 생식 계통이 형성되었음을 잘 보여주고 있다. 생성된 F2 자손들을 대상으로 형광의 육안 평가를 통해 상대적으로 높은 형광 강도를 나타내는 F2들을 선발하여 일반 바다 송사리들과 교배시켰으며, 부화 자어를 형광현미경으로 검경하여 100%

형질전환 발현의 전달이 가능한 개체들을 선발하였다. 다음 표 10은 자손검정을 통한 베타-액틴 RFP 동형접합성 형질전환 F2의 선발을 나타낸 것이다.

[78] 표 10

F2 형질전환		비형질전환 대조군 (성, sex)	F3 자손의 RFP 발현 빈도	
계통 번호	개체번호(성, sex)		#	%
B-ACT F2#2	#2-A(수컷)	NTG-1(암컷)	47/89	52.8
	#2-B(암컷)	NTG-2(수컷)	77/77	100.0
B-ACT F2#4	#4-A(수컷)	NTG-3(암컷)	68/68	100.0
	#4-B(수컷)	NTG-4(암컷)	66/68	97.1
	#4-C(암컷)	NTG-5(수컷)	81/81	100.0
	#4-D(암컷)	NTG-5(수컷)	58/58	100.0
B-ACT F2#7	#7-A(수컷)	NTG-6(암컷)	55/55	100.0
	#7-B(수컷)	NTG-7(암컷)	95/95	100.0
B-ACT F2#9	#9-A(암컷)	NTG-8(수컷)	62/66	93.9
	#9-B(수컷)	NTG-9(암컷)	39/39	100.0

[79] 실시예 7: 더블 형질전환 형광 바다 송사리 (*O. dancena*) 계통 확립

[80] 상기 실시예 5 및 6에서 확보한 형질전환 동형접합체 F2들을 대상으로 형질전환 계통간 교배를 실시하였다. 교배는 암:수=1:1 방식으로 수행하였으며, 산란 및 교배를 통해 얻어진 수정란의 수정율, 부화율 및 초기 생존율을 조사하였다. 그 결과 수정율 및 부화율 모두 일반 대조군간의 교배와 큰 차이가 없었으며, 따라서 생존력에 전혀 장애가 없이 두 형질전환 표현형을 동시에 획득한 더블 형질전환 개체들이 형성될 수 있는 것으로 판단되었다.

[81] 형질전환 성체를 대상으로 형광 발현의 양상을 분석한 결과 더블 형질전환 개체들은 양친의 형광 형질을 모두 온전하게 표현함으로써, 베타-액틴 프로모터 조절에 의해 모든 조직에서 형광 발현을 나타냄은 물론, *mlc2-2* 프로모터 조절에 의해 골격 근육계에서 강한 형광 발현을 나타내었다. 따라서, 베타-액틴 프로모터 단독 조절에 의한 형질전환 형광 발현이 골격근육에서 낮게 나타나는 단점을 해결하는 동시에, *mlc2-2* 프로모터 단독 조절에 의해서는 얻을 수 없었던 지느러미, 눈 및 두부에서의 항시구성적 형광 발현을 함께 획득함으로써, 종래에는 얻을 수 없었던 신규 형광 표현형이 확보되었음을 잘 보여주고 있다. 도 11은 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서 형광을 표현하는 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 사진이다.

[82] 두 동형접합성 형질전환 양친의 교배를 통해 형성된 더블 형질전환 개체들은 각 형질전환 유전좌위에 대해 단가접합성(hemizygous) 상태를 나타내며, 검정교배 시 두 형질이 독립적으로 전달된다는 점으로 미루어볼 때 본 발명에서 선발한 계통들의 경우 두 형질전환 유전좌위는 물리적으로 서로 연관되어 있지 않은 것으로 나타났다. 이에 따라, 더블 형질전환 개체들의 두 형질전환

유전좌위를 모두 동형접합 상태로 전환시키기 위해서 더블 형질전환 개체들간 형매 교배를 다시 수행하였고, 이로부터 형성된 전체 자손 들 중 더블 형질전환(강한 근육 발현 및 여타 조직에서의 항시구성적 발현)을 표현하는 개체들의 출현 빈도는 약 52%로서 멘델 유전 9:7(3:3:1) 방식의 유전 빈도와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이들 더블 형질전환 표현형을 나타내는 개체들 중 총 25마리 대상으로 일반 바다 송사리와의 교배를 실시하였고, 이중 3개체(3/25=12%)들이 안정적으로 다음 세대로 더블 형질전환을 전달하는 동형접합체인 것으로 나타나, 역시 멘델의 독립 유전(1:2:2:4) 방식을 잘 따르는 것을 보여주었다. 표 11은 자손검정을 통한 더블형질전환 동형접합성 형질전환 계통 선발을 나타낸 것이다.

[83] 표 11

순번	더블 형질전환 개체 식별 번호	더블 형질전환 표현형의 자손 내 출현 빈도	
		#	%
1	Db-TG#007	15/64	23.4
2	Db-TG#012	21/87	24.1
3	Db-TG#013	29/100	29.0
4	Db-TG#029	51/99	51.5
5	Db-TG#039	48/48	100.0
6	Db-TG#047	33/60	55.0
7	Db-TG#054	16/79	20.3
8	Db-TG#065	19/42	45.2
9	Db-TG#078	31/70	44.3
10	Db-TG#081	15/35	42.9
11	Db-TG#091	22/100	22.0
12	Db-TG#105	20/95	21.1
13	Db-TG#108	24/40	60.0
14	Db-TG#112	27/50	54.0
15	Db-TG#114	18/81	22.2
16	Db-TG#132	51/99	51.5
17	Db-TG#152	16/81	19.8
18	Db-TG#212	15/75	20.0
19	Db-TG#222	29/55	52.7
20	Db-TG#242	65/65	100.0
21	Db-TG#285	59/59	100.0
22	Db-TG#291	19/36	52.8
23	Db-TG#325	27/99	27.3
24	Db-TG#348	22/79	27.8
25	Db-TG#361	35/69	50.7

[84] 선발된 더블 형질전환 계통들의 개체들을 대상으로, 실제 두 형질전환 유전자가 한 개체 내 함께 존재하는지를 확인하기 위해서 *mlc2-2-RFP* 형질전환 유전자 및 베타-액틴-RFP 형질전환 유전자의 단편을 PCR로 검출하였다. PCR

검출을 위해 형질전환 어류로부터 추출한 100 ng의 genomic DNA를 주형으로 하여, *mlc2-2* 프로모터에 특이적인 제1 정방향 프라이머(TGODMlc2-2 2F; 서열번호 27), 베타-액틴 프로모터에 특이적인 제2 정방향 프라이머(TGODb-act 1F; 서열번호 28), 그리고 두 형질전환 유전자의 공통 구조유전자인 RFP에 특이적인 역방향 프라이머(TGRFP 1R; 서열번호 29)를 동시에 이용하여 다중방식 PCR(multiplex PCR)을 실시하였다. 다음 표 12는 더블 형질전환 개체의 PCR 동정을 위한 반응물의 조성 및 열 순환(thermal cycling) 증폭 조건을 나타낸 것이다.

[85] 표 12

PCR 반응 조성물		PCR 증폭 조건		
<i>AccuPower</i> [®] HF PCR premix 20 (Bioneer, Korea)		94℃	2분	1 cycle
바다 송사리 genomic DNA 주형 (100 ng/μl)	1 μl			
TGODMlc2-2 2F (5 uM)	2 μl	94℃	20초	
TGODb-act 1F (5 uM)	2 μl			32 cycles
TGRFP 1R (5 uM)	2 μl	60℃	20초	
3차 증류수	13 μl			
총량	20 μl	72℃	20초	

[86] 도 12는 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)로부터 형질전환 유전자들의 PCR 증폭을 나타낸 결과이다. 여기에서 보면, 분석한 모든 개체에서 두 형질전환 유전자 단편이 검출되었으며, 따라서 본 발명의 더블 형질전환 계통에서 관찰되는 형광 표현형이 도입된 형질전환 유전자의 작동에 의해 획득된 것임을 잘 보여주고 있다.

[87] 실시예 8: 이종간 잡종 배수체 유도를 통한 형질전환 불임 잡종 배수체 형광어류 제조

[88] 상기 실시예 7에서 선발된 더블 형질전환 동형접합체들의 생식학적 격리를 위해서, *Oryzias javanicus*와의 이종간 교배 및 배수체 유도를 통해 잡종배수체 더블 형질전환체를 생성하였다. 더블 형질전환 *O. dancena* 암컷 2미와 일반 *O. javanicus* 수컷 1미를 3개 수조 각각에 수용하고 잡종 교배 및 산란을 유도하였다. 교배를 위한 산란 수조로는 30 L 용량의 25℃ 향온 수조를 이용하였고, 광주기는 명암 16h:8h으로 조정하였으며, 염분도는 15 ppt 기수 조건을 이용하였다. 산란 직후 수정란을 회수하여 온도자극 처리를 통해 제2극체 방출을 억제하였다. 온도 자극 처리는 수정 3분 후 0℃에서 45분간 수행하였고, 처리가 끝난 뒤 다시 25℃ 향온 부화조(15 ppt)로 옮겨 부화를 유도하였다. 총 3회 반복처리 실시하였다. 이들 두 종간 잡종 교배시 수정률은 90.5%로 나타나 종내 교배시와 큰 차이를 나타내지 않았고, 부화율은 평균 80.5%로서 양친의 종내 교배에 비해 다소 낮은 값을 나타내었다. 온도 처리를 받은 이종간 배수체 처리군의 경우 평균 부화율은 68.8%로서 무처리 이배체 잡종군에 비해 유의적으로 나타나,

부화율 감소는 온도 처리에 기인한 것으로 판단되었다. 잡종 배수체 발생 배(embryo) 또는 부화 자어를 형광 현미경으로 관찰한 결과 모든 관찰 시료에서 100% RFP 형광을 나타냄으로써, 사용한 암컷 더블 형질전환 *O. dancena*로부터 전달된 형질전환 유전자가 이종간 세포핵융합(karyogamy) 상태에서도 안정적으로 작동할 수 있음을 잘 보여주었다. 다음 표 13은 *Oryzias dancena*(F)×*O. javanicus*(M) 교배에 의한 이종간 잡종 및 잡종3배체 제조를 나타낸 것이다.

[89] 표 13

실험 교배군	수정율 (%)	부화율 (%)	RFP 발현 빈도 (%)
<i>O. dancena</i> ¹ × <i>O. dancena</i> ²	94.5±1.2	92.1±2.5	100.0
<i>O. javanicus</i> × <i>O. javanicus</i>	93.4±5.1	89.8±4.1	-
<i>O. dancena</i> ³ × <i>O. javanicus</i>	90.5±3.8	80.5±3.9	100.0
<i>O. dancena</i> ³ × <i>O. javanicus</i> + CS ⁴	90.1±5.0	68.8±5.4	100.0

1: 더블 형질전환(Db-TG#242)
 2: 비형질전환 일반 바다 송사리
 3: 더블 형질전환(Db-TG#285)
 4: 저온자극 처리(cold shock - 수정 3분 후 0℃에서 45분간 처리)

[90] 온도 처리에 의한 제2극체 방출 억제를 통한 3배체 배수성을 확인하기 위해, 잡종3배체 형질전환 개체들을 대상으로 flow cytometry를 이용한 DNA 함량을 조사하였다. 그 결과, 이배체 *O. dancena* 암컷×*O. javanicus* 수컷 잡종의 세포 당 평균 DNA 함량은 1.7 pg/cell로 나타난 반면, 잡종3배체는 2.6 pg/cell로 나타나 1.5배 증가된 예상값과 매우 유사하였다. 다음 표 14는 *Oryzias dancena*(F)×*O. javanicus*(M) 잡종 및 잡종3배체의 세포 당 DNA 함량을 나타낸 것이다.

[91] 표 14

유전형	DNA 함량 (pg/cell)
<i>O. dancena</i>	1.76±0.09
<i>O. javanicus</i>	1.74±0.10
<i>O. dancena</i> × <i>O. javanicus</i> 2N (잡종이배체)	1.74±0.08
<i>O. dancena</i> × <i>O. javanicus</i> Allo-3N (잡종3배체)	2.63±0.10

[92] 따라서, 제2극체 방출 억제를 통해 형성된 잡종 배수체 더블 형질전환 개체들은 모계(더블 형질전환 *O. dancena* 암컷)의 반수체 2조와 부계(일반 *O. javanicus* 수컷) 반수체 1조를 포함한 3배체 잡종 어류로서, 모계에서 유래한 더블 형질전환 유전자들의 작용에 의해 근육에서 강한 형광 발현(*mlc2-2* 프로모터 조절) 및 여타 조직들에서의 형광발현(베타-액틴 프로모터 조절)을 동시에 나타내며, 그 표현형적 특징은 2배체 염색체조를 제공한 모계의 표현형과 매우

유사하였다. 도 13은 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*)와 오리지아스 자바니쿠스(*O. javanicus*)와의 이종간 교배 및 배수체 유도를 통해 생성된 불임성 형질전환 잡종3배체의 사진이다.

[93] 이들 잡종 배수체 더블 형질전환 어류의 생식소 발달 유무를 관찰하기 위해서 5개월간 성장시킨 성체 암, 수를 대상으로 생식소 조직의 해부학적 외견 검사를 실시하였다. 그 결과, 모든 개체에서 일반 *O. dancena* 및 *O. javanicus* 성체들은 성숙된 배우자를 포함한 잘 발달된 난소와 정소 조직을 보유하는 반면, 잡종 배수체들은 생식소 발달이 완전히 억제되어 극히 작은 미발달 생식소가 관찰되거나 또는 육안으로 생식소를 쉽게 구분하기 어려울 정도 발달이 억제되어 있었다.

[94] 이와 같이 미발달 억제형 생식소를 갖는 잡종 배수체 개체들이 일반 *O. dancena* 및 *O. javanicus*와의 교배를 통해 생존력 있는 수정란을 형성할 수 있는지의 유무를 조사하였다. 1개월간의 1:1 교배(잡종배수체×*O. dancena* 교배군 6개 및 잡종 배수체×*O. javanicus* 교배군 6개)를 통해 산란 및 수정란 생성 유무를 조사한 결과를 다음 표 15에 나타낸다. 표 15는 더블 형질전환 잡종3배체의 생식능력을 평가한 결과이다.

[95] 표 15

교배군	산란 알수	수정률 (%)
DSAlloT#1f x ODm	0	0.0
DSAlloT#2f x OJm	0	0.0
DSAlloT#3m x ODf	0	0.0
DSAlloT#4m x ODf	41	0.0
DSAlloT#5m x ODf	0	0.0
DSAlloT#6f x OJm	0	0.0
DSAlloT#7m x ODf	19	0.0
DSAlloT#8m x OJf	0	0.0
DSAlloT#9f x OJm	0	0.0
ODf x ODm	787	96.5
OJf x OJm	291	92.4
DsAlloT: 더블형질전환 잡종 3배체		
ODm: <i>O. dancena</i> 수컷 대조군		ODf: <i>O. dancena</i> 암컷 대조군
OJm: <i>O. javanicus</i> 수컷 대조군		OJf: <i>O. javanicus</i> 암컷 대조군

[96] 여기에서 보면 *O. dancena*간 또는 *O. javanicus* 간 교배에서는 1개월간 매우 활발한 교배 및 산란을 통해 수정란을 생산한 반면, 잡종 배수체와의 교배에서는 모든 교배군에서 전혀 생존력 있는 수정란을 생산하지 못한 것으로 나타났다. 몇몇 교배군에서 잡종배수체와 함께 수용된 일반 *O. dancena* 또는 *O. javanicus* 암컷들이 일부 산란을 보였지만, 산란된 모든 알들은 100% 미수정란이었다.

- [97] 이상의 결과에서 보듯이, 본 발명에 의해 생성된 더블 형질전환 잡종 배수체 개체들은 목적 형광 표현형을 잘 유지하지만, 생식학적으로는 완전한 기능적 불임으로서 일반 송사리 종들과의 교배를 통한 수정란 생산 능력이 온전히 제거되었음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명을 통해 신규 형성된 더블 형질전환 잡종 배수체 바다 송사리는 생태학적으로 보다 안전한 방식의 형광 관상 어류의 유통 및 이용 방안을 제공한다.

산업상 이용가능성

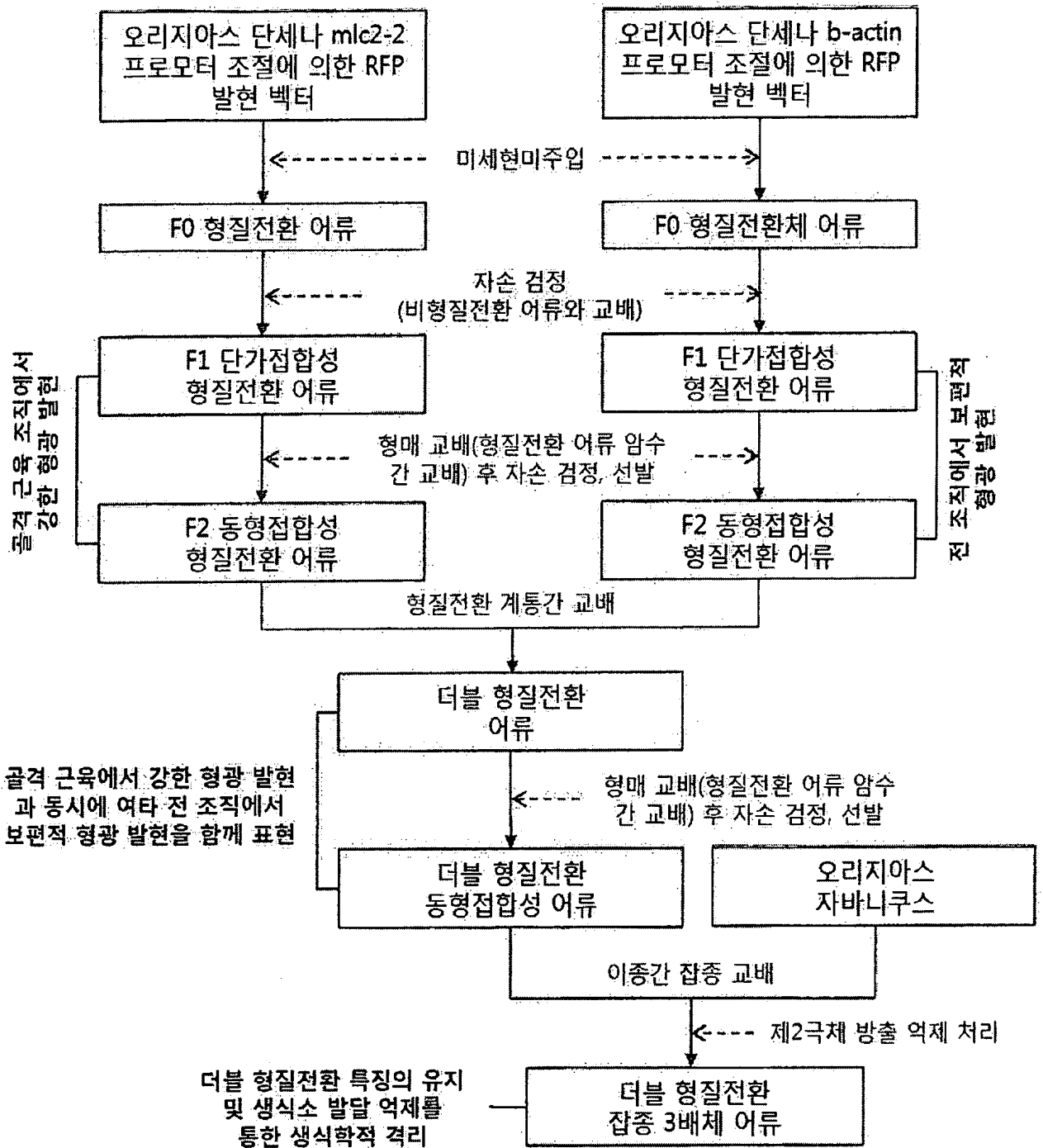
- [98] 본 발명에 따른 신규 형질전환 잡종 배수체는, 종래의 형광 형질전환 어류들에 비해 대폭 개선된 신규 형광 표현형을 보유함으로써 관상 가치가 뛰어난 형광 관상 생물로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 완벽한 불임의 특징을 보유함으로써 의도적 또는 비의도적 환경 방출 시에도 생식학적 경로를 통한 외래 유전자의 생태계 전이 위해성이 없으므로 안전한 유전자변형 형광 관상 어류의 이용이 가능하다. 또한, 본 발명에 따르면 담수, 기수 및 해수 조건에서 정상적인 생장이 가능한 광염성 형질전환 관상 어류를 제공하므로, 관상 어류 시장에 있어 소비자들에게 보다 넓은 선택의 폭을 제공할 수 있다.

청구범위

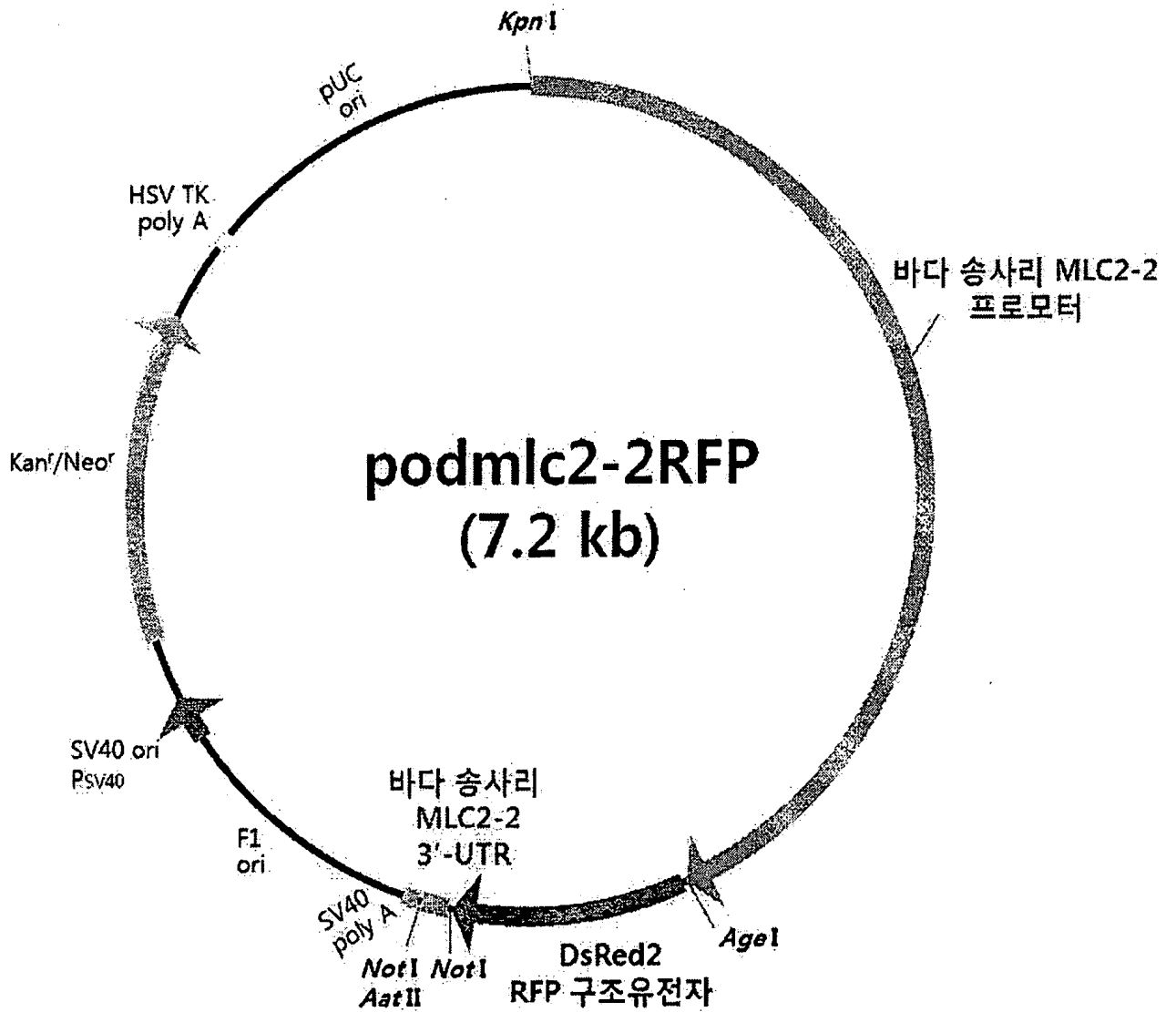
- [청구항 1] 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 마이오신 라이트체인 폴리펩타이드 아이소폼 2-2(myosin light chain polypeptide isoform 2-2; *mlc2-2*) 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 구조 유전자(structural gene)를 포함하는, 바다 송사리(*O. dancena*) 근육에서 강한 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)을 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) *mlc2-2* 3'-UTR 단편을 추가로 포함하는 형광 발현 벡터인 *podmlc2-2RFP*.
- [청구항 3] 바다 송사리(*Oryzias dancena*)의 베타-액틴 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 구조 유전자(structural gene)를 포함하는, 바다 송사리(*O. dancena*) 전 조직에서 보편적 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal)을 포함하는 바다 송사리(*O. dancena*) 베타-액틴 3'-UTR 단편을 추가로 포함하는 형광 발현 벡터인 *podb-actRFP*.
- [청구항 5] 제 1 항의 벡터에서 형질전환 유전자 단위를 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 수정란에 미세현미주입하고 부화시켜 형질전환 바다 송사리(F0)를 얻고, 이를 비형질전환 바다 송사리와 교배시켜 단가접합성(hemizygous) 형질전환 바다 송사리(F1)를 얻고, 형질전환 암수간 교배시켜 동형접합성(homozygous) 형질전환 바다 송사리(F2)를 생산하는 방법.
- [청구항 6] 제 5 항의 방법에 의해 생산된, 근육에서 강한 형광발현을 표현하는 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*).
- [청구항 7] 제 3 항의 벡터에서 형질전환 유전자 단위를 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 수정란에 미세현미주입하고 부화시켜 형질전환 바다 송사리(F0)를 얻고, 이를 비형질전환 바다 송사리와 교배시켜 단가접합성(hemizygous) 형질전환 바다 송사리(F1)를 얻고, 형질전환 암수간 교배시켜 동형접합성(homozygous) 형질전환 바다 송사리(F2)를 생산하는 방법.
- [청구항 8] 제 7 항의 방법에 의해 생산된, 근육에서는 상대적으로 약한 형광을 발현하면서 전 어체에서 보편적이고 항시구성적인 형광발현을 표현하는 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*).
- [청구항 9] 제 6 항의 바다 송사리(*Oryzias dancena*)와 제 8 항의 바다 송사리를 종내 교배(intraspecific cross)시켜 단가접합성(hemizygous) 더블 형질전환 바다 송사리를 얻고, 더블 형질전환 암수간 교배시켜

- 동형접합성(homozygous) 더블 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법.
- [청구항 10] 제 9 항의 방법에 의해 생산된, 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서도 형광을 동시에 표현하는 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*).
- [청구항 11] 제 10 항의 바다 송사리(*Oryzias dancena*)를 근연종 송사리(*Oryzias javanicus*)와 이종간 잡종 교배(interspecific hybridization)시키는 단계를 포함하는 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체(allotriploid)를 생산하는 방법.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 수정란을 0 °C에서 30 내지 45 분간 처리하여 제2극체 방출을 억제시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제 11 항 또는 제 12 항의 방법에 의해 생산된, 근육에서 강한 형광과 함께 전 조직에서도 형광을 동시에 표현하며 생식능력이 제거된 불임성 더블 형질전환 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 잡종3배체(allotriploid).

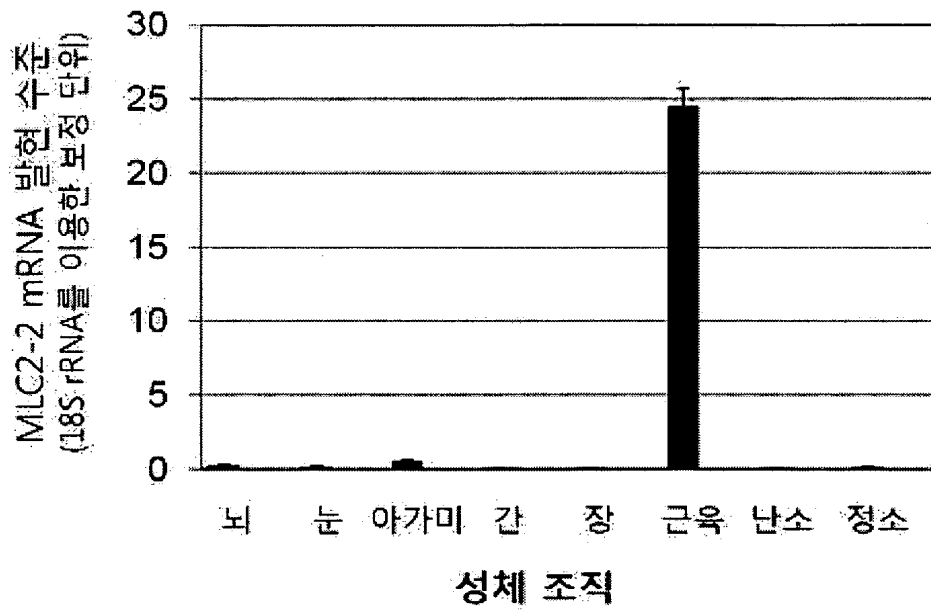
[Fig.1]



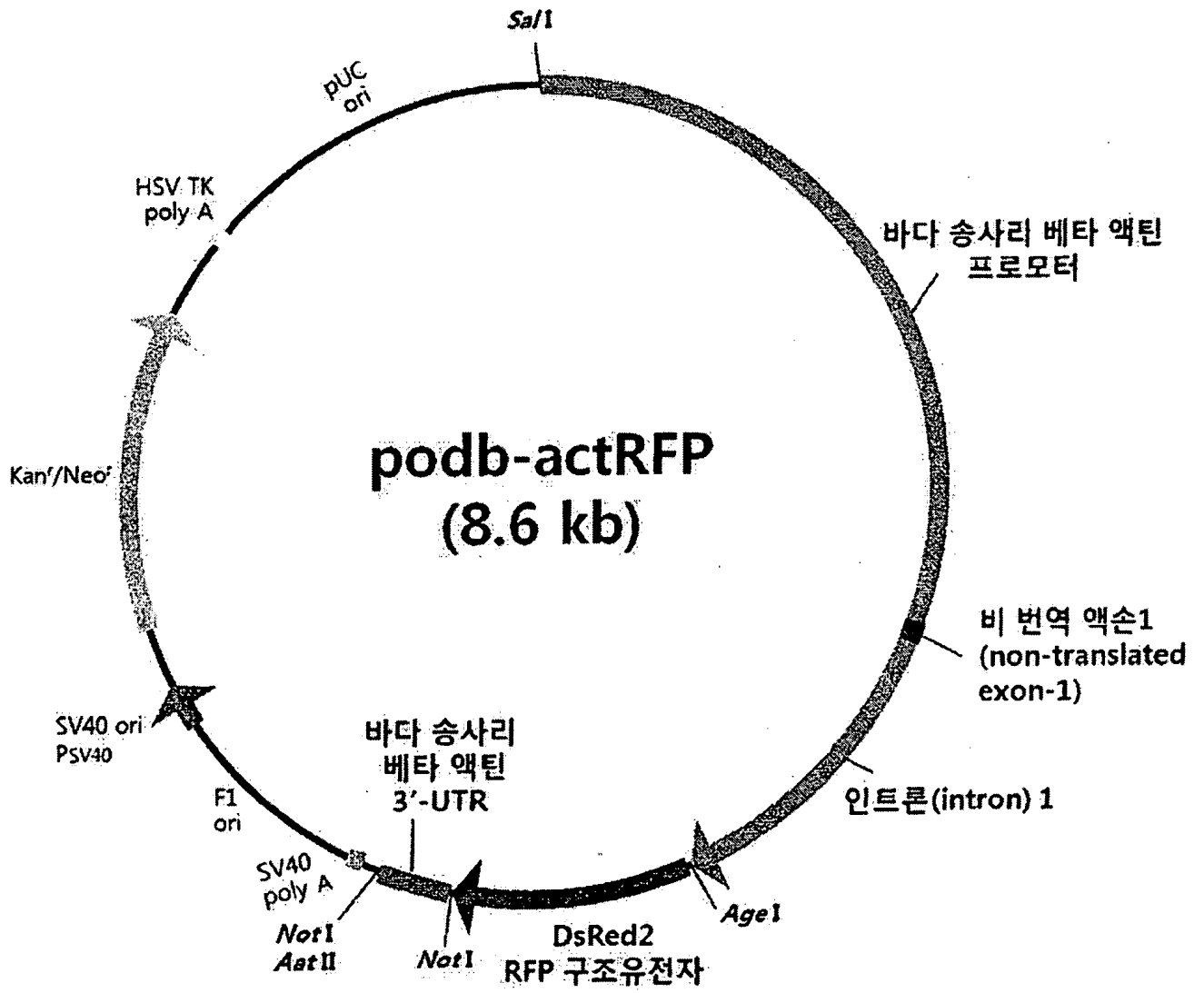
[Fig.2]



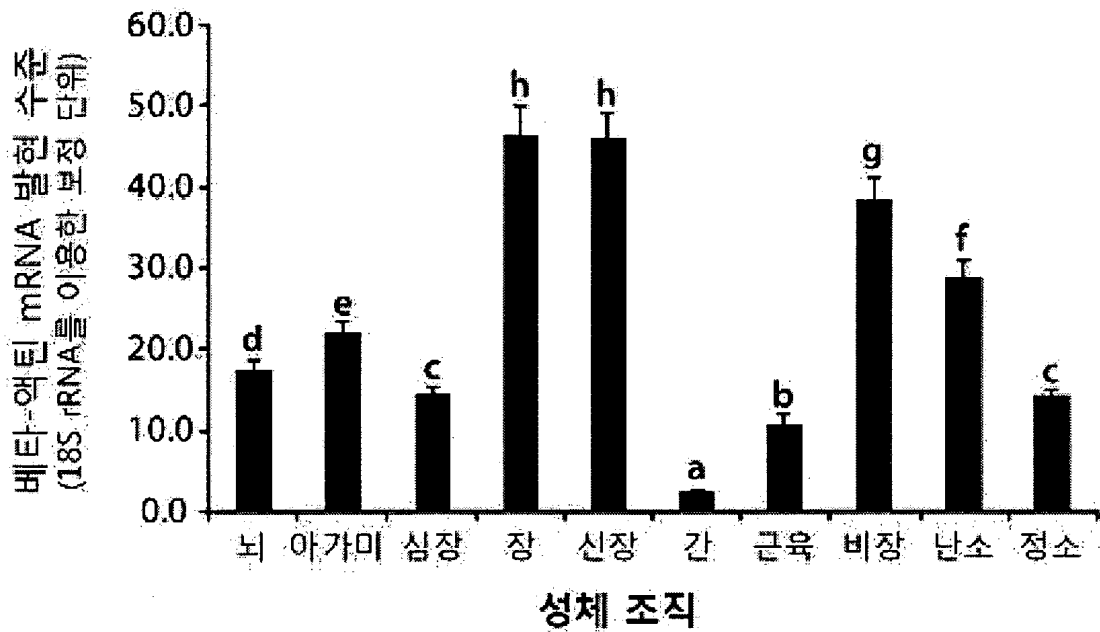
[Fig.3]



[Fig.4]



[Fig.5]

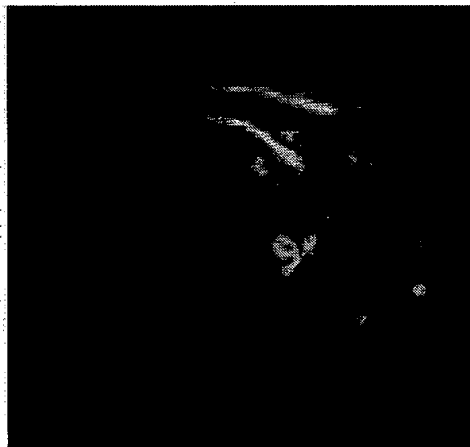


*서로 다른 알파벳 기호 (a - h)를 갖는 평균(막대그래프)는 통계적으로 유의한 차이 있음(P<0.05)

[Fig.6]

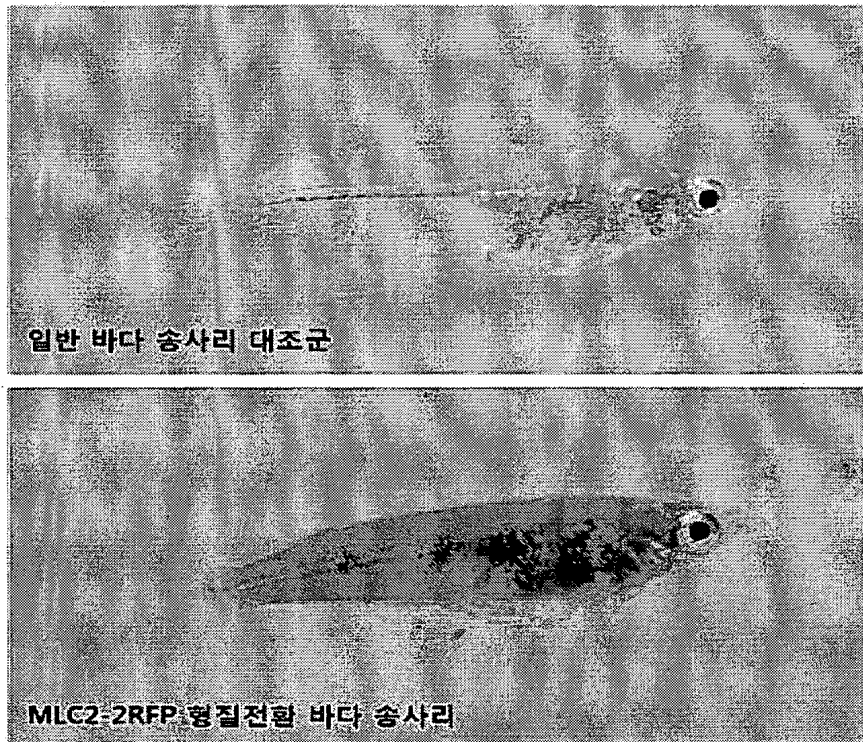


광학 현미경상

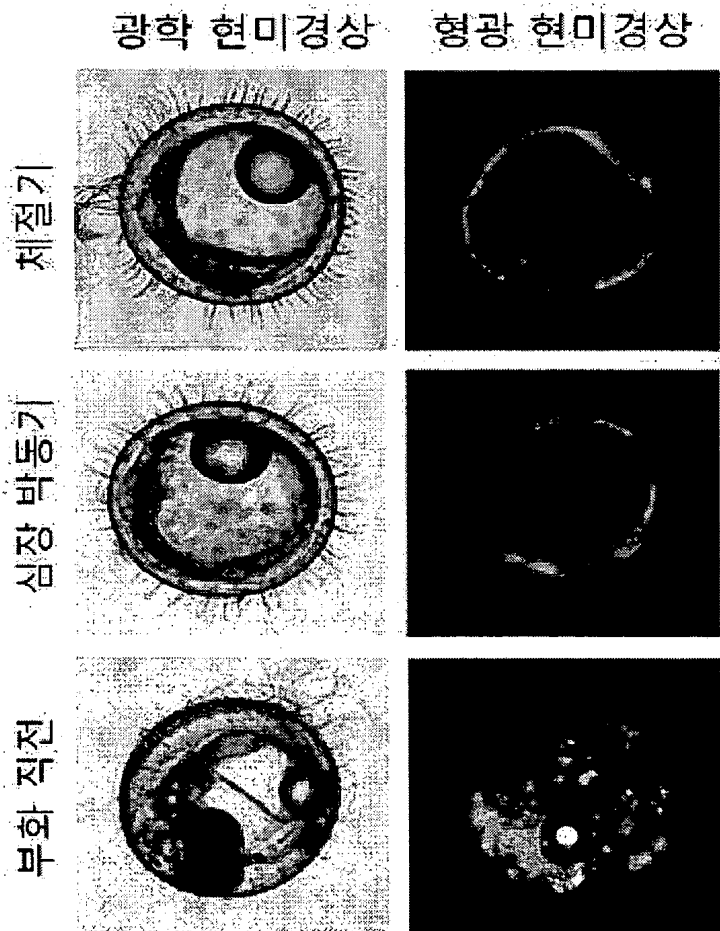


형광 현미경상

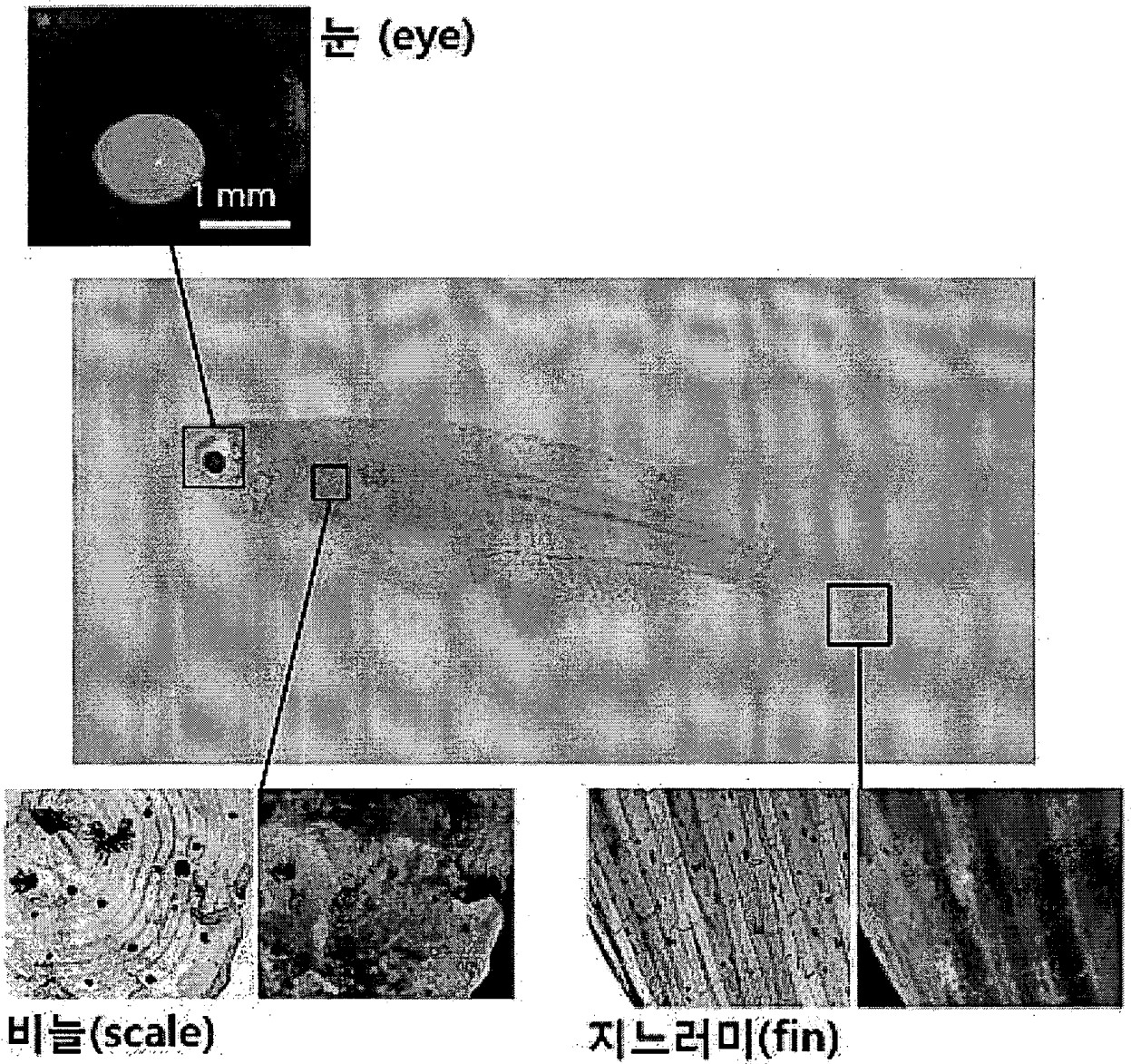
[Fig.7]



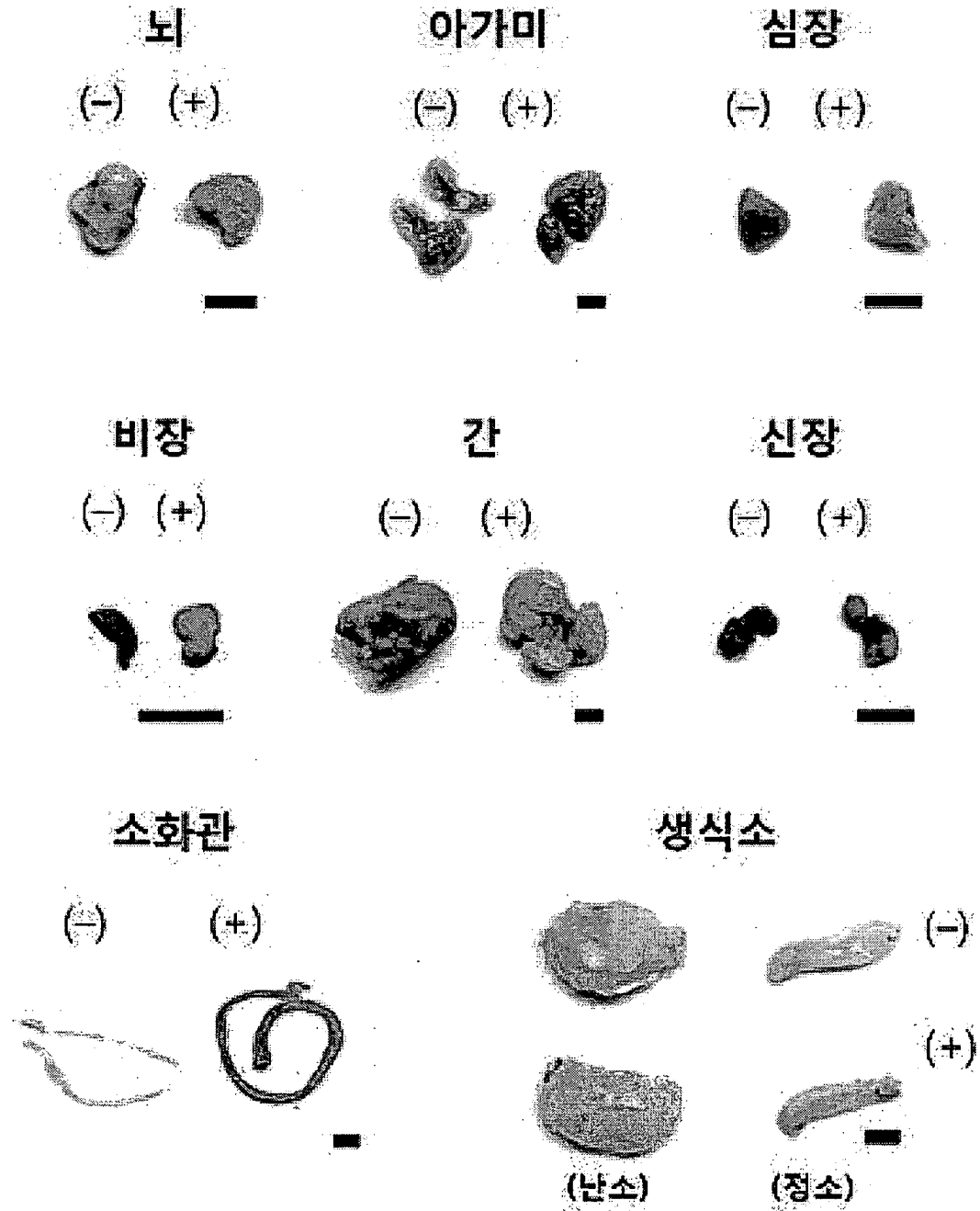
[Fig.8]



[Fig.9]



[Fig.10]

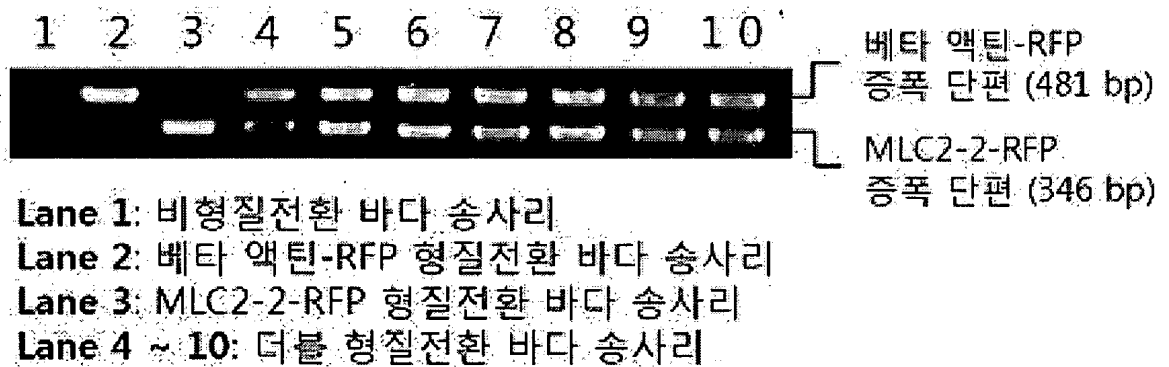


Bars = 1 mm, (-) 대조군 (+) RFP-형질전환

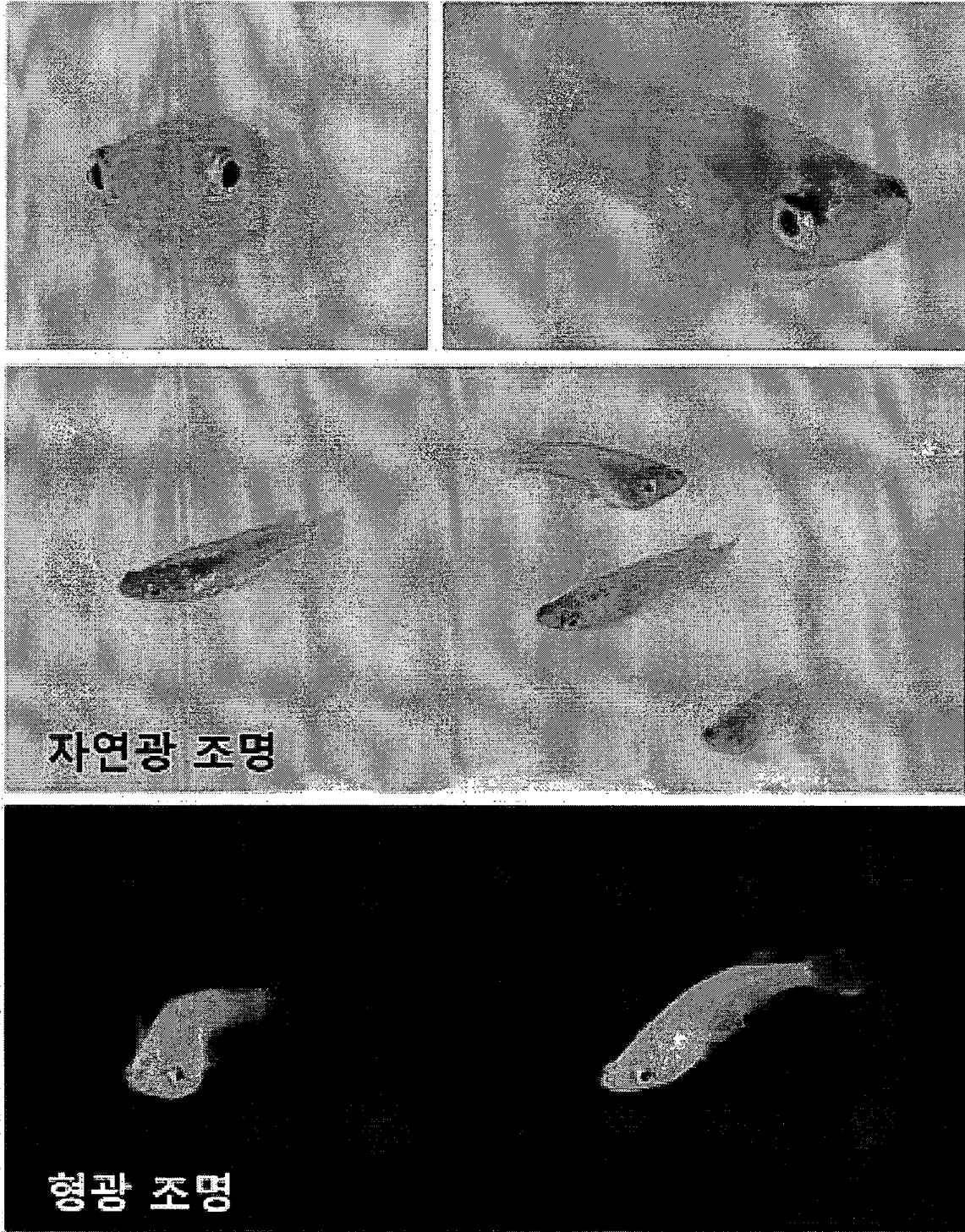
[Fig.11]



[Fig.12]



[Fig.13]



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85; A01K 67/00; C12N 15/12; A01K 61/00; C12N 15/11; A01K 67/027; C12N 15/13

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: *Oryzias dancena*, *Oryzias dancena*, myosin light chain polypeptide isoform 2-2, mlc2-2, red fluorescent protein, RFP, beta-actin gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2005-0089126 A (TAIKONG CORP.) 07 September 2005 See abstract, claims 1-3, examples 1, 2 etc.	1,2,5,6,9-13
Y	US 7135613 B1 (ZHIYUAN GONG et al.) 14 November 2006 See abstract, claims 1, 2 etc.	1,2,5,6,9-13
A	US 2009-0025645 A1 (ALAN BLAKE et al.) 29 January 2009 See the entire document	1,2,5,6,9-13
A	KR 10-2000-0000576 A (KIM, CHUL GEUN et al.) 15 January 2000 See the entire document	1,2,5,6,9-13
A	MASATO KINOSHITA et al. Transgenic medaka with brilliant fluorescence in skeletal muscle under normal light. Fisheries Science. 2004, Vol. 70, No. 4, pp. 645-649 See the entire document	1,2,5,6,9-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

19 OCTOBER 2011 (19.10.2011)

Date of mailing of the international search report

20 OCTOBER 2011 (20.10.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1,2,5,6,9-13

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2005-0089126 A	07.09.2005	AU 2005-201031 A1	22.09.2005
		CA 2499190 A1	03.09.2005
		EP 1571222 A2	07.09.2005
		EP 1571222 A3	09.05.2007
		JP 2005-245435 A	15.09.2005
		KR 10-0628452 B1	26.09.2006
		KR 10-2005-0089138 A	07.09.2005
		KR 10-2006-0090630 A	14.08.2006
		KR 10-2006-0090631 A	14.08.2006
		US 2005-0198701 A1	08.09.2005
US 7135613 B1	14.11.2006	US 2004-0143864 A1	22.07.2004
		US 2008-0052787 A1	28.02.2008
		US 7834239 B2	16.11.2010
		WO 00-49150 A1	24.08.2000
US 2009-0025645 A1	29.01.2009	US 2010-0037331 A1	11.02.2010
		US 2010-0050280 A1	25.02.2010
		US 2010-0145889 A1	10.06.2010
		US 7700825 B2	20.04.2010
		WO 2008-022208 A2	21.02.2008
		WO 2008-022208 A3	13.11.2008
KR 10-2000-0000576 A	15.01.2000	JP 03-184182 B2	27.04.2001
		JP 2000-004889 A	11.01.2000
		JP 3184182 B2	09.07.2001
		KR 10-0290007 B1	15.05.2001
		US 6372959 B1	16.04.2002

(Continuation of: Box No. III)

The International Searching Authority found multiple inventions, as follows:

Claims 1, 2, 5, 6, 9-13 (the invention of group 1) relate to a fluorescence expression vector which has a strong fluorescence expression in the muscles of *Oryzias dancena*, containing an *Oryzias dancena* myosin light chain polypeptide isoform 2-2 gene promoter and red fluorescent protein structural gene (claims 1 and 2), a method for producing a homozygous transgenic *Oryzias dancena* (claim 5), the transgenic *Oryzias dancena* (claim 6), a method for producing a homozygous double transgenic *Oryzias dancena* (claim 9), the double transgenic *Oryzias dancena* (claim 10), a method for producing a sterile double transgenic *Oryzias dancena* allotriploid (claims 11 and 12), and the sterile double transgenic *Oryzias dancena* allotriploid (claim 13).

Claims 3, 4, and 7-13 (the invention of group 2) relate to a fluorescence expression vector which has general fluorescence expression in the entire tissue of *Oryzias dancena*, containing an *Oryzias dancena* beta-actin gene promoter and a red fluorescent protein structural gene (claims 3 and 4), a method for producing a homozygous transgenic *Oryzias dancena* (claim 7), the transgenic *Oryzias dancena* (claim 8), a method for producing a homozygous double transgenic *Oryzias dancena* (claim 9), the double transgenic *Oryzias dancena* (claim 10), a method for producing sterile double transgenic *Oryzias dancena* allotriploid (claims 11 and 12), and the sterile double transgenic *Oryzias dancena* allotriploid.

Comparing the inventions of group 1 and 2, a similar or corresponding technical feature is [a fluorescence expression vector having a fluorescence expression in *Oryzias dancena*, containing a red fluorescent protein structural gene of *Oryzias dancena*]. However, the special technical feature is described in the cited document [KR 10-2005-0089126 A (TAIKONG CORP.) 7 September 2005] published prior to the present application. Thus, the special technical feature of the inventions are not considered to be novel or involve an inventive step over the prior art.

Therefore, since the two groups of inventions are not considered to have an improved similar or related special technical feature over the prior art, the present application does not meet the requirement of unity of invention [PCT Rules 13.1 and 13.2].

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/12(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

B. 조사된 분야
 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
 C12N 15/85; A01K 67/00; C12N 15/12; A01K 61/00; C12N 15/11; A01K 67/027; C12N 15/13

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
 eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바다 송사리, *Oryzias dancena*, myosin light chain polypeptide isoform 2-2, mlc2-2, red fluorescent protein, RFP, 베타-액틴 유전자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2005-0089126 A (타이콩 코퍼레이션) 2005.09.07 요약, 청구항 제1-3항, 실시예 1, 2 등 참조	1,2,5,6,9-13
Y	US 7135613 B1 (ZHIYUAN GONG 등) 2006.11.14 Abstract, 청구항 제1, 2항 등 참조	1,2,5,6,9-13
A	US 2009-0025645 A1 (ALAN BLAKE 등) 2009.01.29 전체 문헌 참조	1,2,5,6,9-13
A	KR 10-2000-0000576 A (김철근 등) 2000.01.15 전체 문헌 참조	1,2,5,6,9-13
A	MASATO KINOSHITA 등. Transgenic medaka with brilliant fluorescence in skeletal muscle under normal light. Fisheries Science. 2004, Vol. 70, No. 4, pp. 645-649 전체 문헌 참조	1,2,5,6,9-13


추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌	“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌	“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌	

국제조사의 실제 완료일 2011년 10월 19일 (19.10.2011)	국제조사보고서 발송일 2011년 10월 20일 (20.10.2011)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 최준호 전화번호 82-42-481-5569
--	-----------------------------------



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.
추가 용지 참조

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.
1, 2, 5, 6, 9-13

- 이의신청에 관한 기재
- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
 - 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
 - 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2005-0089126 A	2005.09.07	AU 2005-201031 A1	2005.09.22
		CA 2499190 A1	2005.09.03
		EP 1571222 A2	2005.09.07
		EP 1571222 A3	2007.05.09
		JP 2005-245435 A	2005.09.15
		KR 10-0628452 B1	2006.09.26
		KR 10-2005-0089138 A	2005.09.07
		KR 10-2006-0090630 A	2006.08.14
		KR 10-2006-0090631 A	2006.08.14
		US 2005-0198701 A1	2005.09.08
US 7135613 B1	2006.11.14	US 2004-0143864 A1	2004.07.22
		US 2008-0052787 A1	2008.02.28
		US 7834239 B2	2010.11.16
		WO 00-49150 A1	2000.08.24
US 2009-0025645 A1	2009.01.29	US 2010-0037331 A1	2010.02.11
		US 2010-0050280 A1	2010.02.25
		US 2010-0145889 A1	2010.06.10
		US 7700825 B2	2010.04.20
		WO 2008-022208 A2	2008.02.21
		WO 2008-022208 A3	2008.11.13
KR 10-2000-0000576 A	2000.01.15	JP 03-184182 B2	2001.04.27
		JP 2000-004889 A	2000.01.11
		JP 3184182 B2	2001.07.09
		KR 10-0290007 B1	2001.05.15
		US 6372959 B1	2002.04.16

(제3기제란의 연속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

청구항 제1, 2, 5, 6, 9-13항(제1군의 발명에 해당)은 바다 송사리의 마이오신 라이트체인 폴리펩타이드 아이소폼 2-2 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질 구조 유전자를 포함하는, 바다 송사리 근육에서 강한 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터(제1, 2항), 동형접합성 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법(제5항), 형질전환 바다 송사리(제6항), 동형접합성 더블 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법(제9항), 더블 형질전환 바다 송사리(제10항), 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체를 생산하는 방법(제11, 12항), 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체(제13항)에 관한 것이고, 청구항 제3, 4, 7-13항(제2군의 발명에 해당)은 바다 송사리의 베타-액틴 유전자 프로모터 및 적색 형광 단백질 구조 유전자를 포함하는, 바다 송사리 전 조직에서 보편적 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터(제3, 4항), 동형접합성 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법(제7항), 형질전환 바다 송사리(제8항), 동형접합성 더블 형질전환 바다 송사리를 생산하는 방법(제9항), 더블 형질전환 바다 송사리(제10항), 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체를 생산하는 방법(제11, 12항), 불임성 더블 형질전환 바다 송사리 잡종3배체(제13항)에 관한 것입니다.

상기 제1군과 제2군을 비교하면 동일하거나 상응하는 기술적 특징은 [바다 송사리의 적색 형광 단백질 구조 유전자를 포함하는, 바다 송사리에서 형광발현을 표현하는 형광 발현 벡터]에 관한 것이나, 이 출원의 출원 전에 공개된 인용문헌[KR 10-2005-0089126 A (타이콩 코포레이션) 2005.09.07]에 상기 특별한 기술적 특징이 기재되어 있어서, 상기 발명들 간의 특별한 기술적 특징은 상기 선행기술에 의해 신구성 또는 진보성이 인정될 수 없습니다.

따라서 상기 2개 군의 발명들 간에는 선행기술에 비해 개선된 동일하거나 연관된 특별한 기술적 특징을 가지고 있는 것으로 볼 수 없으므로, 이 출원은 발명의 단일성 요건을 만족하지 못합니다[PCT Rules 13.1 and 13.2].