



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0054920
(43) 공개일자 2008년06월19일

(51) Int. Cl.

C12N 15/16 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0127592

(22) 출원일자 2006년12월14일

심사청구일자 2006년12월14일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

송영환

부산 해운대구 좌동 대원아파트 102-702

전정민

부산 해운대구 반여4동 692-6 신동타워맨션 102동 1206호

정인영

부산 금정구 남산동 972-22 삼성빌리지 301호

(74) 대리인

김일성

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 양식넙치의 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터

(57) 요약

본 발명은 국내 양식넙치의 멜라닌 농축 호르몬 유전자의 프로모터 및 유전자 조절부위의 용도에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 멜라닌 농축호르몬 유전자의 개시코돈으로부터 5' 상류 -1487번째의 염기서열에 해당하는 프로모터 영역이 인간 배아 신장 세포 (human embryonic kidney cell)에서 리포터 유전자인 개똥벌레의 루시퍼라제의 발현을 최대화함을 밝힌 것으로 고등생물의 유전자의 발현을 유도하여 목적단백질의 동물세포에서 획득함은 물론 양식 어류의 형질전환에 이용될 수 있는 프로모터의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

```

-1487 ttccgtgaga atctctaccc tccacacata atacttaca aataaagct gactctoca
-1427 agtaaatca cttcagctga gtccaagac tatattatct gtccacttc tccacccat
-1367 gacccacac tctgtgagt aaagctttg acgtacaaa aagactaga tgaactttg
-1307 caatgacaa gctcttgagt ttatgtgca tccactttt atactagtt gataatgac
-1247 accacattc atcgtaaaa aaagtctct attagctca tcaagttat gttttaccc
-1187 ctgtctatct actgattgt cagttagta gttagttat tggtagtga attagctgt
-1127 tagttagtt gataattgt tgcacacag gattatgaa aagggctga actgaattc
-1067 atgaacttg ttgagagat gggacacag caagaataa accacttta ttttgagta
-1007 actgagaga aagagagat cagactctt gtaactctt tcttgagaa acaattgtt
-947 gataagtaa tctgcagct ttttaattc caacttate catcgagag tggagtagg
-887 aagactgag atttactac tcaatttaa ctgcctgag tcaagctct gaggaaata
-827 tcaatgatt atcagtagt ttatagctt tgcctcagc actcagtaa gtaataaca
-767 agatttaag tgttaattg tgaagttg atttagtag attttgac ctttagtaa
-707 aaccagagat aaactctct actctgttc cactgtttt gataatcaa cagtctctg
-647 gttagactc atgacacag gaaatcaaa ttacgaatt tagtatatt ctggaatcg
-587 tcaagattt ccttaatat gatacattt tctgcaata ttactcttg ttgagattt
-527 ttctagatt cctgaactt tgcacatct agatttagt tgaacctgt gacccactg
-467 atgtcatca gagaagaga ctaacatga cactctcag tctcatctt gtaacctgt
-407 gttctattt cagagtagg atttttagg aagagatta gatttaatt cagccgttc
-347 acctctgtg agtctcttg acctgctct gtagtagaa ggaattaca gccattata
-287 tttttcttc tttagcatt tgaattcat acatttcaa atagagaga taaccattt
-227 tacacagaa caacttagt gattctaga caattttct ttaagctcc tggacattt
-167 gacctcaac acagattga cctgacaga gacatgagc ctttttact ttaacatca
-107 agacagatca ctcttgagt atataaagc gcaagctgc cagtctaac agtctcagc
-47 caagtagaa tcaatgacg cctcagagc taatatctg agtaccattg gtctcagat
14 ATTCATCTT TTTAGCTTA GTCTGTGTT CTGAGCTGAA CAGCACCTTG CTACT

```

특허청구의 범위

청구항 1

서열 1에 기재된 염기 서열로 표시되는 넙치 멜라닌 농축호르몬의 프로모터와 유전자 조절부위의 DNA

청구항 2

서열 1의 염기서열을 바탕으로 앞쪽 부분의 프라이머들이 각각 -1487, -865, -500, -115, -95 부분부터 시작하는 염기서열로 구성되어 있으며, 뒤쪽 부분의 프라이머는 넙치 멜라닌 농축호르몬(MCH ORF)의 바로 앞부분인 -1에서 시작하는 프라이머로 구성되어 pGL2M-1487, pGL2M-865, pGL2M-500, pGL2M-115, pGL2M-95과 같은 클론을 구성하게 됨을 특징으로 하는 넙치의 멜라닌 농축호르몬의 프로모터와 전사활성을 유도하고 조절하는 발현벡터.

청구항 3

제 2항에 있어서, pGL2M-1487는 루시퍼라제 활성을 통한 넙치의 멜라닌 농축호르몬의 전사활성을 나타내는 발현 벡터

청구항 4

제 3항에 있어서, pGL2M-1487는 양식 어류의 형질전환에 이용될 수 있는 프로모터

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 국내 양식넙치의 멜라닌 농축 호르몬 유전자의 프로모터 및 그 용도에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 멜라닌 농축호르몬 유전자의 개시코돈으로부터 5' 상류 -1487번째의 염기서열에 해당하는 프로모터 영역이 인간 배아 신장 세포 (human embryonic kidney cell)에서 리포터 유전자인 개똥벌레의 루시퍼라제의 발현을 최대화함을 밝힌 것으로 고등생물의 유전자의 발현을 유도하여 목적단백질의 동물세포에서 획득함은 물론 양식 어류의 형질전환에 이용될 수 있는 프로모터의 제조방법에 관한 것이다.
- <8> 일반적으로 멜라닌 농축 호르몬은 연어에서 처음으로 밝혀졌으며 (Kawauchi *et al.*, 1983), 유전자 및 호르몬의 구조 (Kawauchi and Kawazoe, 1988)가 알려졌다. 어류에서 멜라닌 농축호르몬의 기능은 색소침착과 관련이 있으며 (Kawauchi, 2006) 멜라노사이트 자극 호르몬 (melanocytes stimulating hormone)과는 길항적인 관계에 있어 멜라닌 농축호르몬이 분비되면 어류의 표피에 존재하는 색소체가 농축이 되어 색이 열어지는 현상을 보여 색소 침착과 관련이 있다고 알려져 있다. 어류에서 멜라닌 농축 호르몬 유전자가 밝혀진 후 설치류의 멜라닌 농축호르몬 유전자가 밝혀졌으며 (Fellmann *et al.*, 1989; Nahon *et al.*, 1993), 인간의 멜라닌 농축호르몬 유전자도 밝혀지게 되었다 (Presse *et al.*, 1990). 인간은 세 종류의 멜라닌 농축호르몬 유전자를 가지며 인간의 염색체 12q24 에 위치한 3개의 엑손과 2개의 인트론으로 구성된 유전자와 두 종류의 변이 유전자인 PMCHL1(5q14), PMCHL2(5q13)가 존재한다. 포유동물의 멜라닌농축호르몬은 뇌의 시상하부에서 합성되는 19개의 아미노산으로 구성된 원형구조를 하고 있으며 (Borowsky *et al.*, 2002), 체중조절과 에너지 항상성에 중요한 역할을 하고 있다. 쥐에 음식을 하였을 경우 뇌의 멜라닌 농축호르몬의 발현은 증가하고 이 호르몬을 뇌에 주사를 하였을 경우 음식물의 섭취가 증대된다 (Qu *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1998). 특히 멜라닌 농축호르몬이 결여된 생쥐는 음식물의 섭취가 감소되며 대사속도가 증가하게 되어 야위게 된다 (Shimada *et al.*, 1998). 반면 멜라닌 농축호르몬이 과다 발현되는 형질전환 생쥐의 경우 비만을 초래하고 인슐린 저항성을 나타내게 된다 (Ludwig *et al.*, 2001).
- <9> 포유동물의 멜라닌 농축호르몬은 19개의 아미노산으로 구성되지만 어류의 경우 연어 (Minth *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1995), 무지개송어 (Baker *et al.*, 1995), 틸라피아 (Groneveld *et al.*, 1995) 및 뱀장어, 가다랭이 (Kawauchi, 1989)에서는 17개의 아미노산으로 구성된다. 그러나 한국산 양식넙치의 멜라닌 농축호르몬의 경우 25개의 아미노산으로 구성되는 특징이 있다(Jeon and Song, 2003).

<10> 어류의 형질전환은 주로 성장촉진 혹은 질병에 대한 내성에 관한 연구에 집중되고 있으나 형질전환연구에서 가장 중요한 것은 외래유전자를 발현 및 발현조절에 관한 것으로 지금까지 주로 사용되고 있는 베타 액틴(Liu *et al.*, 1990; Higashijima *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 2003; Noh *et al.*, 2003) 과 엘롱게이션 팩터(elongation factor)(Gao *et al.*, 1997; Kinoshita *et al.*, 2000) 유전자의 프로모터를 주로 이용하였다. 그러나 이러한 프로모터들은 발생 및 증식과정에서 항상 발현되는 유전자의 프로모터로서 발현을 조절할 수 있는 기능은 없다. 최근 발현을 조절하기 위한 프로모터를 개발하기 위한 시도들이 이루어지고 있어 양식넙치의 면역관련유전자(complement component C3), 젤라틴 분해관련 효소(gelatinase B), 케라틴, 암괴사 관련인자(tumor necrosis factor) 유전자의 프로모터 영역을 리포터 유전자인 녹색 형광단백질(green fluorescence protein)을 이용하여 분석한 예도 있다(Yazawa *et al.*, 2005).

<11> 프로모터의 활성을 측정하는 방법에서 종래에서 여러 종류의 형광단백질에 원하는 프로모터를 포함하는 DNA 단편을 연결하여 세포주 내에서 혹은 수정란에 이식한 후 형광을 나타내는 영역을 확인하였으나 본 발명에서는 나노 몰 농도의 발광체를 측정할 수 있는 발광 측정장치(LuminMax C, Maxwell Sensor Inc., USA)를 이용하였으며 이장치는 96 웰 플레이트에서 0.2초 동안에 발광되는 발광체의 양을 반복 측정함으로써 기존의 단일 튜브에서 측정함으로 인해 생기는 실험적인 오차를 최소화하였다.

<12> 동물세포주 혹은 형질전환 동물에서의 외래유전자의 발현은 중요한 과제이며 새로운 프로모터를 찾는 연구는 기존 특허의 규제를 피할 수 있는 중요한 요소이나 대부분의 고등생물의 유전자의 프로모터에 관한 연구는 아직도 미진한 실정이어서 본 발명에서 제시하는 양식넙치의 신규프로모터는 그 의미가 있다고 보여 진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 따라서 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래의 여러 가지 문제점을 개선시키기 위하여 안출한 것으로, 국내 양식넙치의 멜라닌 농축 호르몬 유전자의 프로모터 및 그 용도에 관한 것이다. 멜라닌 농축호르몬 유전자의 개시 코돈으로부터 5' 상류 -1487번째의 염기서열에 해당하는 프로모터 영역이 인간 배아 신장 세포(human embryonic kidney cell)에서 리포터 유전자인 개뿔벌레의 루시퍼라제의 발현을 최대화함을 밝힌 것으로 고등생물의 유전자의 발현을 유도하여 목적단백질의 동물세포에서 획득함은 물론 양식 어류의 형질전환에 이용될 수 있는 프로모터의 제조방법에 관한 것이다.

발명의 구성 및 작용

<14> 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명은 넙치의 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터 및 유전자 조절부위에 관한 것이다.

<15> 이하, 본 발명의 구성에 대하여 아래 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하나, 본 발명의 권리범위가 아래 실시예에 만 한정되어지는 것은 아니며, 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능하다.

<16> [실시예 1] 넙치 멜라닌 농축 호르몬(MCH ORF) 유전자의 프로모터(조절부위) 영역의 추출

<17> 도 1은 넙치 멜라닌 농축호르몬 유전자(MCH cDNA ORF) 염기서열의 5' 영역을 나타 내는 서열 1의 것으로, 이를 자세히 설명하면,

<18> MCH cDNA ORF 염기서열의 5' 영역을 나타내는 도 1의 DNA 염기서열을 루시퍼라제 발광을 위한 영역으로 이용하였다(Jeon, J.M. and Song, Y.H., 36, 442-448, 2003). 먼저 도 1의 -1487 bp와 -1487bp의 안쪽 부분에 해당하는 유도체의 염기서열을 증폭할 수 있는 도 3의 프라이머들을 도 1의 특정 염기서열에 해당되는 부분을 합성하였다. 앞쪽 부분의 프라이머들은 각각 -1487, -865, -500, -115, -95 부분부터 시작하는 염기서열로 구성되어 있으며, 뒤쪽 부분의 프라이머는 넙치 멜라닌 농축호르몬(MCH ORF)의 바로 앞부분인 -1에서 시작하는 프라이머로 구성되어 있다. 또한, 이들 앞쪽과 뒤쪽 프라이머의 5' 말단에는 루시퍼라제 발광을 위해 사용되는 pGL2-Basic 벡터에 클로닝하기 위하여 pGL2-Basic 벡터의 클로닝 위치에 존재하는 Kpn I과 Xho I 제한효소 인식 서열을 첨가하여 합성하였다. 각각의 프라이머들은 도 1의 서열을 주형으로 하는 DNA를 100ng, 2 μ l의 dNTP(10mM, Bioneer, Korea), 2 μ l의 PCR buffer, 1 μ l의 DNA 중합효소 (5,000 unit/ml, Bioneer, Korea)와 혼합하여 94℃에서 1분간의 변성과정을 거치고 60℃에서 1분간의 프라이머 부착 단계 후, 72℃에서 1분간의 신장단계를 순차적으로 35회 반복하여 수행하였으며, 이 증폭 과정을 통해 앞쪽과 뒤쪽 부분에 각각 Kpn I과 Xho I 제한효소 인식 서열이 첨가된 1487bp에 해당하는 PCR 산물과 유도체의 산물(4종)을 증폭하여 개개의 넙치 멜라닌 농축호르

본 유전자의 프로모터 영역을 추출하였으며 이들 영역들을 루시퍼라제 발광을 위한 영역으로 이용하였다.

<19> [실시예 2] 얻어진 프로모터 영역을 개뿔벌레 루시퍼라제를 리포터 유전자로 갖는 pGL2-Basic vector에 삽입

<20> 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 증폭된 Kpn I/Xho I(Promega, USA) 제한효소 인식서열을 지닌 개개의 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 5' 영역 부분을 먼저 클로닝 벡터인 pGEM-T 벡터(promega, USA)에 DNA ligase로 재조합하여 클로닝한 후 클로닝된 DNA와 진핵생물체에서 발현 벡터로 이용되는 pGL2-Basic 벡터를 제한효소인 Kpn I과 Xho I으로 절단하였다. 절단된 Kpn I과 Xho I 제한효소 인식서열을 지닌 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 5' 영역부분을 동일하게 절단된 Kpn I과 Xho I 제한효소 인식서열을 지닌 pGL2-Basic 벡터에 DNA ligase로 재조합하여 대장균에 형질전환시키는 클로닝을 수행하여, 도 4와 같은 pGL2M-1487, pGL2M-865, pGL2M-500, pGL2M-115, pGL2M-95 등과 같은 클론을 구성하였다. 이와 같은 재조합 클로닝 DNA인 pGL2M-1487, pGL2M-865, pGL2M-500, pGL2M-115, pGL2M-95 등을 인간 배아 신장세포주에 감염시켜 루시퍼라제 활성의 측정에 이용하였다.

<21> [실시예 3] 세포주 배양

<22> 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)와 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)는 각각의 최적화된 증식 배지를 사용하였고, 배양은 37℃가 유지되고, 5% 이산화탄소 (CO₂)가 유지되는 이산화탄소 배양기에서 이루어졌다.

<23> - 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)는 10 % 혈청(Fetal Bovine Serum, SIGMA, USA), 1% Penicillin/Streptomycin Solution(10,000units Penicillin-G/ml, 10,000 mcg Streptomycin/ml in normal saline, Omega scientific, inc., USA), 0.8% G 418 Sulfate(50mg/ml, Omega scientific, inc., USA) 가 포함된 배양배지 DMEM(13.4g/ℓ, Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, USA)를 이용하여 100mm 플레이트에 배양하였다.

<24>

<25> - 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)는 5 % 혈청(Fetal Bovine Serum, SIGMA, USA), 1% Penicillin/Streptomycin Solution(10,000units Penicillin-G/ml, 10,000 mcg Streptomycin/ml in normal saline, Omega scientific, inc., USA) 이 포함된 배양배지 α-MEM(10.2g/ℓ, Minimum Essential Medium Alpha Medium, GIBCO, USA)를 이용하여 100mm 플레이트에 배양하였다.

<26> [실시예 4] 재조합 DNA를 세포주에 일시감염

<27> [실시예 2]에서 준비된 멜라닌 농축 호르몬 유전자의 프로모터 영역을 포함한 재조합 DNA를 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)와 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)에 일시감염 시키기 위하여 감염용 시약으로 리포펙타민 (LipofectamineTM Reagent, Invitrogen, USA)을 사용하였다.

<28> 세포주의 일시감염을 시키기 위해 먼저 각 세포주를 24 웰 플레이트에 세포개수를 맞추었다. 인간 배아 신장 세포주는 하나의 웰 당 1.2×10^5 세포 수로 맞추어 배양을 하였고, 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)는 하나의 웰 당 8.0×10^4 세포 수로 맞추어 배양하였다. 배양조건은 37℃, 5% CO₂를 유지하며 24 시간을 배양하였으며 각각 배양된 세포에 각각의 재조합 DNA를 24 웰 플레이트에 배양된 세포주에 일시감염을 실시하였다.

<29> 일시감염은 각 웰 당 OPTI-MEM I (Reduced Serum Medium Modification of MEM (Eagle's), GIBCO, USA) 배지 52 μℓ 에 [실시예 2]에서 클로닝 된 재조합 DNA pGL2M-1487, pGL2M-865, pGL2M-500, pGL2M-115, pGL2M-95를 각각 1 μg, LipofectaminTM Reagent 1.26 μℓ 를 혼합하여 45 분간 상온에서 반응시켰다.

<30>

<31> - 인간 배아 신장 세포주에 일시감염을 위하여 24 웰의 배양액을 제거하고 각 웰에 혈청(FBS)이 없는 배양액 (DMEM, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.8% G 418 sulfate) 236 μℓ를 첨가하고 앞에서 상온에서 45 분간 반응시킨 반응액에 OPTI-MEM I 184μℓ를 첨가하여 이를 다시 각 웰에 첨가한다. 24 웰 플레이트를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 5 시간동안 배양한다. 5시간 배양 후 각 웰에 배양배지의 2배의 혈청이 포함된 배지(DMEM, 20% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0.8% G 418 sulfate) 472 μℓ를 첨가하여 48 시간동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양 하였다.

<32> - 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)에 일시감염을 위하여 24 웰의 배양액을 제거하고 각 웰에 혈청이 없는 배양액 (α-MEM, 1% Penicillin/Streptomycin) 236 μℓ를 첨가하고 앞에서 상온에서 45 분간 반응시킨 반응액에

OPTI-MEM I 184 μ l 를 첨가하여 이를 다시 각 웰에 첨가한다. 24 웰 플레이트를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 5 시간 동안 배양한다. 5시간 배양 후 각 웰에 배양배지의 2배의 혈청이 포함된 배지 (α-MEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin) 472 μ l 를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48 시간동안 배양 하였다.

[실시예 5] 루시퍼라제의 측정

[실시예 4] 에서 24 웰 플레이트에서 48 시간동안 배양된 세포주의 배양액을 제거하고 각 웰에 Cell Culture Lysis Reagent (Promega, USA) 150 μ l 를 첨가하여 각 세포를 파쇄한다. 세포 파쇄액을 마이크로 튜브에 옮겨 12,000 g 에서 15 초간 원심분리를 한다. 원심분리 후 상층액 20 μ l 를 새 마이크로 튜브에 옮기고 각 튜브에 Luciferase assay Reagent (Promega, USA) 100 μ l 를 첨가하여 고르게 섞고 이 액을 바닥이 투명하고 웰 벽이 불투명한 96 웰 플레이트에 옮긴다.

96 웰 플레이트는 발광 측정장치 (LuminMax C, Maxwell Sensor Inc., USA)를 이용하여 각 웰에서 0.2초 동안에 발광되는 발광체의 양을 3회씩 반복 측정하였다.

얻어진 결과는 Prism 4.0 (Graphpad, USA)을 이용하여 도식화하였다.

이상과 같은 결과를 종합해보면, 본 발명에 의한 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터는 다음의 (1) 내지 (5)의 특징을 가진다.

(1) 넵치 프로모터 영역은 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)보다 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)에서 발현이 잘 일어난다.

(2) 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)에서 일시적인 발현을 하였을 경우 개시코돈을 기준으로 -1487 상류에 있는 염기서열이 있을 경우 최대 발현을 보인다.

(3) -95 상류를 포함하는 영역에서 진핵생물체의 TATA 박스가 존재하나 이것으로는 pGL2-control에 비하여 37%의 발현정도를 보인다.

(4) -865 상류를 포함하는 영역에서는 pGL2-control에 비하여 22%의 발현양상을 보인다.

(5) -1487 ~ -865 영역에 멜라닌 농축호르몬 유전자의 발현을 최대화 시키는 영역이 포함되어 있다.

이상에서와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시예에 한하여 설명하였지만 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다.

발명의 효과

이상에서 보여준 바와 같이 본 발명은 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터를 이용하여 인간 배아 신장 세포에서 외래 유전자의 발현을 유도할 경우 -1487 ~ -865에 해당하는 영역이 반드시 포함되어야만 최대 발현을 이용할 수 있다. 본 발명에서는 리포터 유전자로 개뿔벌레의 루시퍼라제를 이용하였으나 동물세포를 이용하여 발현하고자 하는 임의의 유용유전자의 발현을 기대할 수 있다. 또한 형질전환 어류의 생산을 위하여 기존의 프로모터 이외에 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터를 사용하여 발현을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1. pGL2-basic 벡터에 도입되는 넵치의 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터와 유전자 조절부위에 해당하는 5 ‘ 부분을 나타내는 서열 1.

도 2. 리포터 유전자인 개뿔벌레의 루시퍼라제를 포함하고 SV40의 프로모터 및 인헨서를 갖는 pGL2-control과 프로모터가 없는 pGL2-basic 벡터의 모식도

도 3. 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터와 유전자 조절부위를 포함한 서열 1을 바탕으로 각각의 발현 벡터 구성을 위한 5 ‘영역의 표시와 이들 영역을 PCR로 확보하기 위한 PCR 프라이머들의 목록

도 4. 서열 1의 넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 프로모터와 조절부위를 포함하는 각각의 발현 벡터에 대한 모식도

도 5. 각각의 발현벡터들을 인간 배아 신장 세포주 (HEK cell)에 감염시켜 일시적인 발현을 유도하여 얻어진 발광정도를 비교한 모식도.

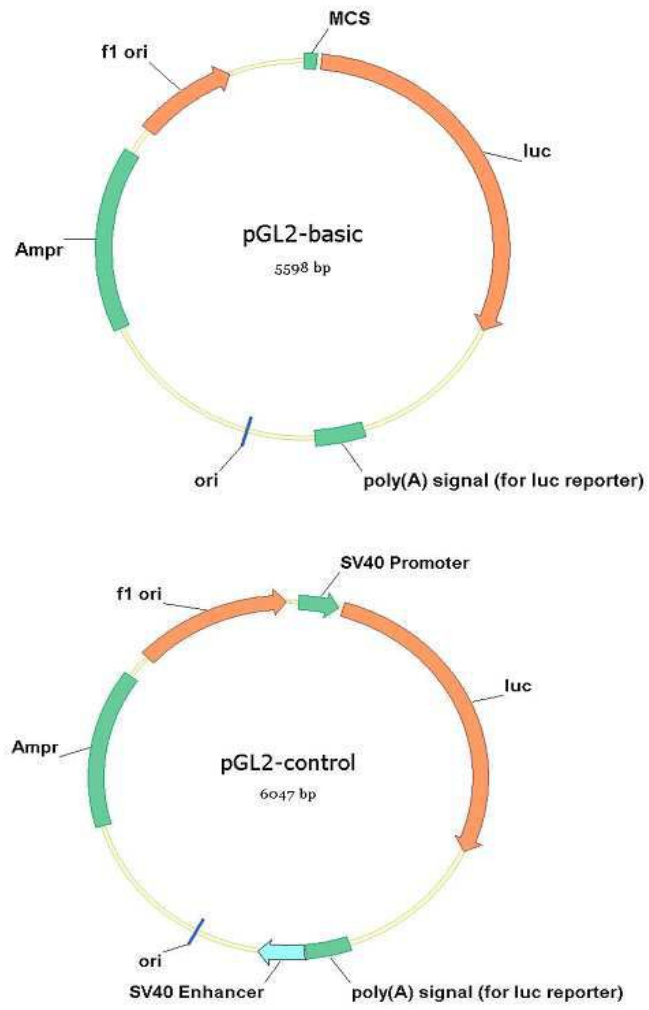
<6> 도 6. 각각의 발현벡터들을 중국산 햄스터 난소 세포주 (CHO cell)에 감염시켜 일시적인 발현을 유도하여 얻어진 발광정도를 비교한 모식도.

도면

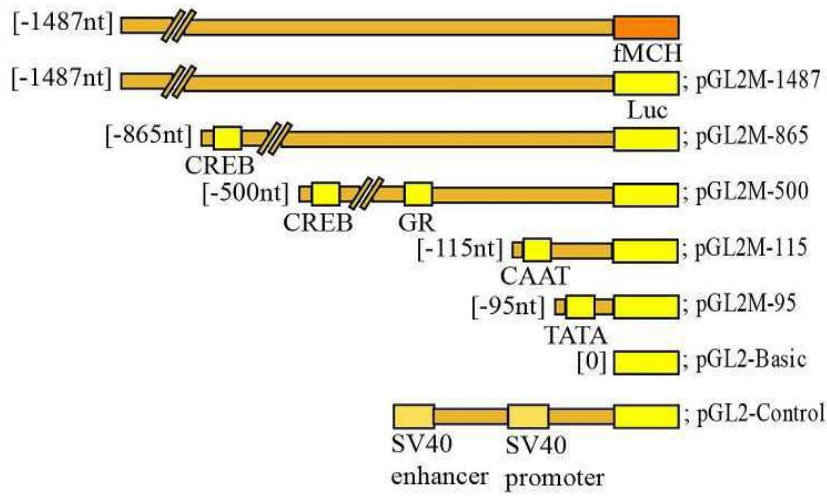
도면1

-1487	ttcagtagaa atcctcacc	tccaacaata atacttaca	aataaaggct gactgtcca
-1427	agtaaaatca cttcagctga	gttcaatagc tattattcat	gtccacttc tccaacccat
-1367	gcaccgcggc tcctgtagg	aaagcctttg agctgagaag	aagactgaga tgagctttgt
-1307	caatgcaaca gctcttcgg	tttatgtgca tccacctttt	atcatcagtt gataatgate
-1247	accacatttc atcgctaaaa	aaagtctctc attagctcca	tccaggttat gttttcacc
-1187	ctgtctatct gctggttgg	cggttggtta gttggttagt	tggttaggta gttggctggt
-1127	tagttggtgt gatggttgg	tgatcagcag gattatgcaa	aaggggctga actgaattcc
-1067	atgaaacttg ttggaggggt	gggacaaagg ccaagaaata	acccaattta ttttggcgt
-1007	gctgaggaga agggcagatc	cagaatctct gtaatcactt	tcttgaaca acaaattggt
-947	gaataagtca tcatgcacgt	tttaattttc ccactttatc	catcgacgg tggcggtgg
-887	agaactgcag atttactcac	tcaggtttaa ctgcctgatg	tcagagctct gagaaaata
-827	tcagtgcatt atcagtgagt	tttatcggct tgactccgag	actcagtcga gtcattaaca
-767	agatttaacg tgttaattag	tgagagtgc atttagatgg	attttgtcac ctttggta
-707	aaccagggat aaactgtctc	aatctgtttc cagtctgttt	gataatctaa cagtgtcctg
-647	gttgagcatc atgaaccagc	ggaatcaaaa ttaagcaatt	tagtataatt ctgggaatcg
-587	tcgagctatt cctttaatat	gattacattt tctgccagta	ttagtctctg tttggagggt
-527	ttcatgggtt cctgaccttt	tgtccatcat aggatttagt	tcagccctgt gcaccactg
-467	atgtcattca gagaaaagga	ctcaccatga cgactctccg	tctccatcct gtcacctgct
-407	gtcttcattt cagcgtgtgg	attttgtgag aagagattta	ggattaattc ccgcccgttc
-347	acctcttggt agtcttcttg	acctcgtctt gtgatgtgga	gggaattaca gccattata
-287	ttttccctc tttggccatt	tgaattcatc acatttcaaa	ataggagaag tgaacccatt
-227	tacacgggaa caacattgat	ggagtcatag cacatttctt	ttaaactgcc tgtgacctt
-167	ggccctcaac acggtgtac	ccctgcagga gacatgatgc	ctttttacct ttaacaatca
-107	agcagaatca ctccctcagt	atataaagcg gccgactgcc	cagtctacac agtcgtcagg
-47	cgaggtgaga tcagtgcag	ccctcagagc taaatatcgt	agataccATG GTCTCAGCAT
14	ATTCCATCCT TTTTACGCTA	GTGCTGTTTT CTGAGCTGAA	CAGCCACTTG CTAAC

도면2

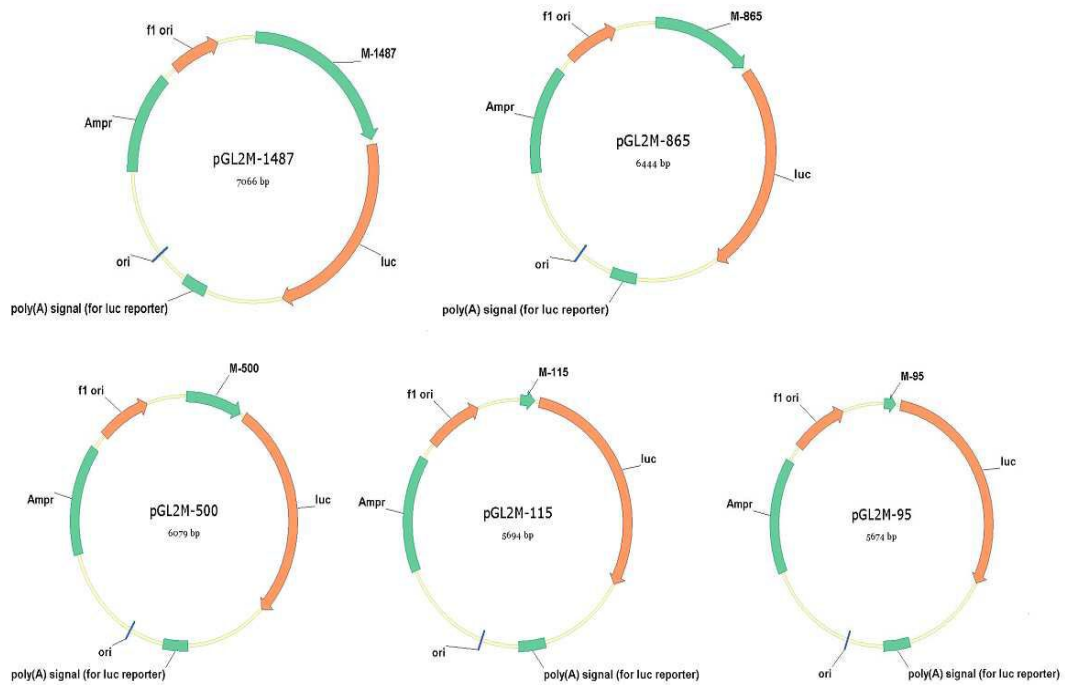


도면3

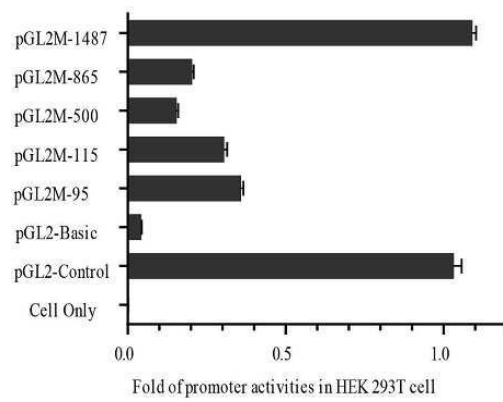


넵치 멜라닌 농축호르몬 유전자의 5' 영역	앞쪽 프라이머 염기서열 (앞부분에 Kpn I 첨가)	뒤쪽 프라이머 염기서열 (앞부분에 Xho I 첨가)
pGL2M-1487 (-1487 ~ -1 nt)	5' - GGT ACC TTC AGT AGA AAT CCT CAC CC -3'	5' - CTC GAG GGT ATC TAC GAT ATT TAG CTC TGA -3'
pGL2M-865 (-865 ~ -1 nt)	5' - GGT ACC AGG TTT AAC TGC CTG ATG TC -3'	5' - CTC GAG GGT ATC TAC GAT ATT TAG CTC TGA -3'
pGL2M-500 (-500 ~ -1 nt)	5' - GGT ACC CAT AGG ATT TAG TTC AGC CC -3'	5' - CTC GAG GGT ATC TAC GAT ATT TAG CTC TGA -3'
pGL2M-115 (-115 ~ -1 nt)	5' - GGT ACC AAC AAT CAA GCA GAA TCA CTC -3'	5' - CTC GAG GGT ATC TAC GAT ATT TAG CTC TGA -3'
pGL2M-95 (-95 ~ -1 nt)	5' - GGT ACC CCT TCA GTA TAT AAA GCG GC -3'	5' - CTC GAG GGT ATC TAC GAT ATT TAG CTC TGA -3'

도면4



도면5



도면6

