

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0109704 (43) 공개일자 2010년10월11일
(51) Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0028095 (22) 출원일자 2009년04월01일 심사청구일자 2010년03월18일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 전진태 서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호 정은지 경상남도 사천시 사천읍 평화리 2-22번지 평화맨 션 201호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅	

전체 청구항 수 : 총 10 항

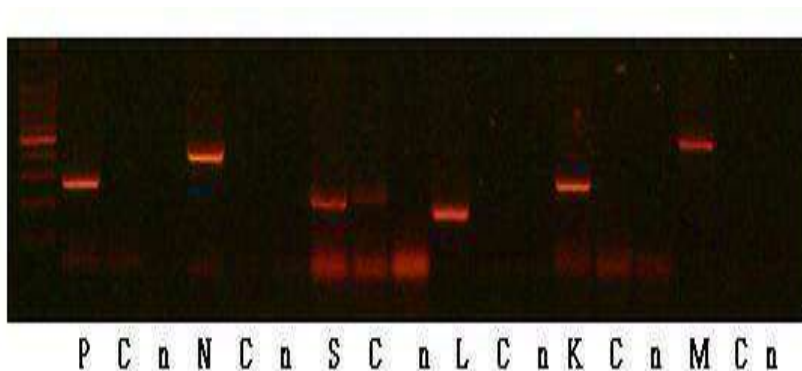
(54) 고양이 배아 줄기-유사세포 바이오 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 고양이 배아 줄기-유사세포 바이오 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC를 규명하고 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 바이오 마커, 이를 이용한 마이크로어레이 및 고양이 배아 줄기-유사세포 (분화) 검출방법에 관한 것이다.

본 발명의 바이오 마커는 인간의 질병연구에 중요한 모델인 고양이 배아 줄기-유사세포를 동정하거나, 유도된 만능줄기세포를 생성함으로써, 환자 맞춤형 치료, 신약 스크리닝, 약물 동물성 실험 및 배아줄기세포 분화 확인용 바이오-마커 등 다양한 분야에서 연구 활용될 수 있어 학문적, 산업적으로 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김재환

제주 남제주군 성산읍 신평리 812-1번지

종타오

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 농업생명과학
대학 451동 240호

유선봉

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 농업생명과학
대학 451동 243호

임현태

울산 중구 약사동 800-33번지

서보영

경남 진주시 칠암동 509-9번지

공일근

경상남도 진주시 신안동 34-4번지 신안한주빌라 가
동 602호

유채경

경상남도 통영시 도천동 만복비치 1차 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2-2008-000-01038-1

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 이공계 대학원 연구장학생

연구과제명 전사인자의 형질도입에 의한 고양이의 체세포로부터 유도만능 줄기세포 구축

기여율

주관기관 한국과학재단

연구기간 2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 6의 폴리뉴클레오티드의 일부 또는 전체로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 동정용 바이오 마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1은 catPOU5F1 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 2는 catNANOG 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 3은 catSOX2 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열번호 4는 catLIN28 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열번호 5는 catKLF4 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열번호 6은 catMYC 유전자인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 8

제1항 내지 제7항에 따른 고양이 배아 줄기-유사세포 동정용 바이오 마커 중 하나 이상 선택된 마커를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 마이크로 어레이.

청구항 9

제1항 내지 제7항에 따른 고양이 배아 줄기-유사세포 동정용 바이오 마커 중 하나 이상 선택된 마커를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 분화 검출용 마이크로 어레이.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출 방법.

배양 중인 고양이 배아 줄기-유사세포 후보세포로부터 핵산시료를 얻는 제1단계; 및

제1항의 고양이 배아 줄기-유사세포 동정용 바이오 마커와 제1단계의 핵산시료를 반응시켜, 유전자 발현의 변화를 검출하는 제2단계.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC과 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 바이오 마커, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 줄기세포 (stem cell)는 몸 안의 기관 혹은 조직을 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화 능력 (pluripotency)을 갖는 세포로서, 미분화상태를 유지하며 반복적인 배양 과정에서 전분화능력을 유지할 수 있는 세포를 의미한다.
- [0003] 줄기세포는 크게 배아 줄기세포, 성체줄기세포 및 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cell; iPS)로 분리된다. 배아줄기세포는 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포로서, 줄기세포 연구 초기단계에서 분리 추출의 용이성, 시험관내에서 장시간 미분화 상태 유지능력, 높은 분화능력을 바탕으로 하여 많은 연구가 수행되었지만, 배아줄기세포로부터 특정세포로의 분화의 어려움, 환자와 공여체와의 면역학적 부적합에 기인하는 면역거부반응 및 윤리적, 도덕적, 종교적인 문제점을 가지고 있어서 그 연구 및 활용이 제한되고 있다. 이에 반해서, 성체 줄기세포는 배아를 직접 사용하지 않고, 제대혈, 골수, 지방 등 분화가 끝난 조직에서 줄기세포를 추출하여 사용하기 때문에 윤리적 문제가 없으며, 면역 거부반응을 극복할 수 있어 현재 활발한 연구가 진행되고 있으나, 배아줄기세포에 비하여 분화능력이 떨어지고, 다량의 줄기세포 수득이 어려우며, 응용할 수 있는 범위(분화 범위)의 제한이 있다.
- [0004] 유도 만능 줄기세포(iPS)란 역분화 줄기세포로도 불리우며, 이미 완전히 분화된 체세포에 역분화 인자 (유전자)를 주입하여 역으로 줄기세포로 유도시키는 기술로서, Oct4, Nanog, Sox2, Lin28, Klf4, cMyc등의 역분화 유전자가 발현된 후 이를 활용한 유도 만능 줄기세포의 생성 및 분화에 관한 활발한 연구가 진행되고 있다. 유도 만능 줄기세포는 배아줄기세포의 윤리적 문제, 성체줄기세포의 활용범위 제한이라는 단점을 모두 극복할 수 있는 세포로서 현재 줄기세포 연구 분야의 핵심을 이루고 있다.
- [0005] 사람과 마우스 등에서 줄기세포에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 원숭이, 돼지, 말, 소, 토끼 등 영장류를 포함한 여러 포유류 중에서 줄기세포가 구축되어 왔다. 현재 사람과 마우스에서 잘 알려진 역분화 인자로, POU5F1, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4, MYC 등이 있다.
- [0006] POU5F1 (POU domain, class5, transcription factor 1)은 POU homeodomain을 포함하고 있는 전사 인자로서 Oct-4라고도 불리우며, 림프전, 뇌하수체분화와 포유류의 발달 초기 과정에서 조직 특이적 발현에 있어 중요한 조절인자로 알려져 있다. POU5F1의 경우 미분화 배아줄기세포의 자리 재생에 있어서, 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 미분화 세포의 마커로서 사용 된다
- [0007] 사람의 NANOG 단백질은 305개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 사람의 정소와 배아줄기세포의 cDNA library의 PCR을 통해 full-length cDNA를 결정하고, Northern blot분석 결과 사람에서 오직 어른 정소에서만 2.2kb 전사체가 약하게 발현되는 것이 보고된 바 있다. RT-PCR을 통하여 어른 정소, 어른과 태아의 난소에서 NANOG 발현을 발견하였으나, 씨토리 세포 증후군을 가진 남자의 정소에서는 NANOG 발현이 관찰되지 않았으며, Real-time PCR의 경우 정상 정소에 비해 고환종에서 더 많은 NANOG의 발현이 발견되었다. NANOG는 미분화된 인간 배아줄기세포에서 발현되었으며, 분화가 진행되면서 발현 양도 감소하였다고 보고되었다.
- [0008] SOX2 (SRY (Sex determining region Y)-box2) 유전자는 317개의 아미노산을 암호화하고 있으며, Sox 유전자들의 활발한 억제제는 신경 전구 세포가 분화를 일찍 시작하도록 촉진시킨다고 알려져 있다. 또한, proneural transcription factor인 neurogenin-2의 신경분화를 촉진시키는 능력이 Sox 유전자 발현을 억제하는 능력에 기반을 두고 있기 때문에 신경발생은 proneural 단백질과 억제 단백질 사이의 상호작용으로 조절된다는 것이 보고된 바 있다.
- [0009] LIN28 (lin-28 homolog)은 발달 시기 조절자인 C. elegans LIN28의 염기서열을 이용하여 database와 비교한 결과 초파리에서 사람까지 여러 종에서 상동성이 확인된 유도 줄기 만능세포 인자이다. 각 종에서 이 단백질은 cold shock domain (CSD), retroviral-type CCHC zinc knuckle와 같이 RNA-binding motif가 나타났으며, 사람과 마우스의 단백질은 97% 서열이 동일하다고 보고되었다. 포유류에서 LIN28 단백질이 배아 근육, 뉴런세포, 상피조직과 배아의 암세포에서 단계 특이적으로 발현된다고 보고되었으나, 반면에 골격근과 심근을 제외한 대부분의 어른 조직에서는 발현이 억제되었다고 보고되었다.
- [0010] 470 아미노산으로 구성되는 KLF4 단백질은 proline-과 serine-rich N terminus를 가지고 있고 C-terminus에 3개의 C2H2 Kruppel 타입 zinc finger를 포함하고 있으며, KLF4는 또한 nuclear localization signal도 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 사람의 KLF4 단백질은 마우스의 EZF와 91% 서열이 동일하며, Northern blot으로 사람의 배꼽 정맥 내피 세포와 사람 대동맥 내피 세포에서 추출한 RNA에서 3.5 kb KLF4 전사체가 확인되었다고 보고된 바 있다.
- [0011] MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)는 protooncogene으로서, DNA-binding을 통하여 전사를

활성화시키거나 억제한다. 이 메커니즘을 통해서 MYC는 세포성장과 세포주기 등 주요 세포 기능을 제어하는 수많은 표적 유전자의 발현을 조절한다. 또한 MYC는 DNA 복제에도 중요하게 작용한다. 다양한 타입의 유전적 변형으로 인한 비 규칙적인 MYC의 발현은 여러 암에서 MYC를 활성화를 유도하고, 종양의 발생을 촉진시킨다고 알려져 있다.

[0012] 상기 6개의 유전자는 사람과 마우스에서 배아줄기세포의 전분화능력의 유지에 중요한 역할을 갖는 인자로 보고되어 있는 반면에, 타 종의 포유류에서의 연구는 미비한 실정이며, 시각, 백혈병 등의 질병 연구를 위한 중요 모델동물인 고양에서는 역분화 인자 관련 연구가 거의 수행되고 있지 않다.

[0013] 고양이는 2007년에 배아 줄기-유사세포 (embryonic stem-like cell)가 구축되어 질병 연구에 활용되고 있으나, 개와 더불어 거의 200 여개의 사람과 유사한 유전적 질병을 갖는 것으로 보고되어 사람의 유전병 치료에 있어서 핵심 모델동물로 인식되고 있는 중요성에 비하여, 줄기세포 구축 및 활용에 있어서는 연구가 미진한 실정이다.

[0014] 따라서, 고양이의 줄기세포 확립 및 이를 활용한 질병치료 방법 개발등에 관한 연구의 필요성이 증대되고 있으며, 이에 본 발명자들은 고양이에서 줄기세포를 확립하고 질병연구 모델을 확립하고자 예의 노력한 결과, 현재 in vivo 상에서 고양이의 배반포로부터 분리되어 있는 ES-like cells을 이용하여 cat POU5F1 (c POU5F1), cat NANOG (cNANOG), cat SOX2 (cSOX2), cat LIN28 (cLIN28), cat KLF4 (cKLF4) 와 cat MYC (cMYC)의 CDS를 구축하고, 이들 유전자가 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 바이오 마커로 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC와 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 바이오 마커, 이를 이용한 마이크로어레이 및 고양이 배아 줄기-유사세포 (분화) 검출방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC와 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 바이오 마커를 제공한다.

[0017] 본 발명의 바이오 마커는, 본 발명에서 규명된 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC의 CDS 전체 또는 일부의 뉴클레오티드, 이들의 상보적 뉴클레오티드 및 구조적 또는 기능적으로 실질적인 동일성을 유지할 수 있는 범위 내에서의 변형형태를 모두 포함하는 개념이다.

[0018] 본 명세서에서, "고양이 배아 줄기-유사세포 "란, 고양이 배반포의 ICM (Inner cell mass; 내세포괴)로부터 분리된 미분화 상태의 세포로서, 체내의 모든 세포로 분화할수 있는 잠재력과 자가 재생능력을 지니고 있는 세포를 의미한다 (Yu et al., Molecular reproduction and development, 75:1426-1432, 2008).

[0019] catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC의 CDS (코딩 시퀀스)를 규명하기 위하여, 고양이의 배아 줄기-유사세포로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성하였다. 사람과 마우스의 줄기세포 인자 염기서열을 바탕으로 하여, 염기상동성이 높은 지역에서 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하여 6개 유전자들의 부분적 coding sequence를 분석한 후, RACE-PCR기법을 사용하여 유전자들의 3' 및 5' UTR 서열분석을 하였으며, 전체 coding 영역을 확인하였다.

[0020] 상기의 방법으로 규명된 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC 유전자들은 각각 서열번호 1 내지 6으로 표시되며, GenBank에 등록되었다.

표 1

[0021] 염기서열이 분석된 유전자 정보

서열 번호	유전자	생물종	GenBank 등록번호	CDS길이 (bp)	사람과의 상동성(%) (염기/아미노산)	쥐와의 상동성(%) (염기/아미노산)
1	<i>POU5F1</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775541	1083	91 / 94	81 / 83
2	<i>NANOG</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775540	936	78 / 67	74 / 57
3	<i>SOX2</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775536	966	98 / 95	95 / 95
4	<i>LIN28</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775537	621	89 / 91	89 / 92
5	<i>KLF4</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775538	1458	89 / 89	87 / 91
6	<i>MYC</i>	<i>Felis catus</i>	FJ775539	1326	90 / 92	87 / 86

[0022] 상기 유전자들 중 NANOG는 사람 및 마우스의 염기와 각각 78%, 74%의 상동성을 가져, 고양이 특이적 마커로 활용하는데 유용하며, POU5F1 및 MYC의 경우 마우스와 각각 81%, 87%의 염기 상동성을 가지는 것으로 파악되었다.

[0023] 또한 본 발명은 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC와 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드, 상보적 뉴클레오티드 또는 이의 실질적인 동일성을 나타내는 변형체를 포함하는 마이크로어레이를 제공하며, 마이크로 어레이를 통하여 고양이 배아줄기세포의 동정 및 세포의 분화여부를 확인할 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC와 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드, 상보적 뉴클레오티드 또는 이의 실질적인 동일성을 나타내는 변형체를 이용한 고양이 배아줄기세포 동정 방법 및 세포분화 검출방법을 제공한다.

[0025] 상기 방법은 배양 중인 고양이 배아 줄기-유사세포 후분화세포로부터 핵산시료를 얻는 제1단계; 및 제1단계의 핵산시료를 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC와 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드, 상보적 뉴클레오티드 또는 이의 실질적인 동일성을 나타내는 변형체로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 고양이 배아 줄기-유사세포 바이오 마커를 사용하여 유전자의 발현여부를 판단하는 단계를 포함한다.

[0026] 본 발명은 상기 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자를 이용하여 유도 만능 줄기세포를 구축하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 규명된 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC 유전자들을 고양이의 분화된 체세포에 형질전환 (유전자 도입) 시킬 수 있으며, 유전자 도입 방법은 종래 당업계에서 유전자 운반체로 이용되어 온 레트로바이러스 벡터 (retroviral vector), 아데노바이러스 벡터 (adenoviral vector), 아데노 연관 바이러스 벡터 (adeno-associated viral vector) 를 포함하는 바이러스 성 벡터, 리포좀, 폴리리신 (polylysine), 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine (PEI)), 프로타민 (protamine), 히스톤 histone), 폴리에스테르아민 (Polyester amine), 폴리에틸렌이민 및 이들 각각의 변형체를 포함하는 양이온성 고분자를 비롯하여, 미셀, 에멀전, 나노입자 등의 비바이러스성 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 아데노 연관 바이러스 벡터 및 레트로 바이러스 벡터, 가장 바람직하게는 레트로 바이러스 벡터를 이용하여 유전자를 세포 내로 전달할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에서는 PLNCX 레트로 바이러스 벡터를 사용하여, 각 유전자의 세포내 도입을 수행하였으며, 세포 내에서 유전자의 발현을 확인함으로써 본 발명의 역분화 유전자를 이용하여 고양이 배아 줄기-유사세포 검출 및 분화여부 판단에 활용할 수 있음을 입증하였다.

[0029] 본 발명에서 사용된 바이오 마커는 서열번호 1 내지 6에 기재된 서열의 전부 또는 일부와 동일한 서열 뿐만 아니라, 상기 서열들에 대해 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타내는, 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지니는 서열들이 본 발명의 범주에 포함되는 당업자에게 자명한 사실이다.

효 과

[0030] 본 발명에 따른 고양이 배아 줄기-유사세포에서의 특이 유전자 규명을 통하여 고양이 배아 줄기-유사세포를 동정하고 분화여부를 검출할 수 있으며, 이들 유전자를 이용하여 고양이에서 유도된 만능 줄기세포를 구축할 수 있게 된다.

[0031] 유도된 만능줄기세포의 경우 환자 맞춤형 치료, 신약 스크리닝, 약물 동물성 실험 및 배아줄기세포 분화 확인용 바이오-마커 등 다양한 분야에서 연구 활용될 수 있어 학문적, 산업적으로 매우 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 고양이 배아 줄기-유사세포 특이 유전자인 catPOU5F1, catNANOG, catSOX2, catLIN28, catKLF4 또는 catMYC 및 이들 유전자로부터 유래되는 뉴클레오티드 또는 상보적 뉴클레오티드를 포함하는 고양이 배아 줄기-유사세포 검출용 바이오 마커, 이를 이용한 마이크로어레이 및 고양이 배아 줄기-유사세포 (분화) 검출방법 및 유도 만능 줄기세포 구축 방법을 제공한다.

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0034] <실시예 1> 고양이 배아 줄기-유사세포 역분화 인자 규명

[0035] 1-1. Database로부터 사람과 마우스의 염기서열 정보를 수집

[0036] GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) database내에서 POU5F1, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4 또는 MYC 의 6개 유전자에 대한 사람과 마우스 mRNA의 서열을 수집하였다.

[0037] 1-2. 고양이 배아 줄기-유사세포로부터 total RNA 추출 및 cDNA를 합성

[0038] Trizol (Gibco BRL, USA)을 사용하여 고양이 배아 줄기-유사세포로부터 total RNA를 추출하였으며, SmartTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20℃에 보관하였다.

[0039] 1-3. 6개 유전자들의 부분적 코딩 시퀀스 분석

[0040] 실시예 1-1.에서 수집한 부분적 코딩 시퀀스를 정렬하여 코딩 서열 중 상동성이 높은 염기서열을 바탕으로 제작한 서열번호 7 내지 30의 primer들과 상기 1-2에서 준비된 고양이 배아 줄기-유사세포의 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. cDNA를 사용한 PCR반응에서 Prime Taq DNA Polymerase 1 unit (Genet Bio, Korea), 10X Reaction buffer 2.5 μ l, dNTP 2 μ l, 10 pmol primer 각각 1.5 μ l, cDNA 2 μ l 그리고 증류수 15.3 μ l를 첨가하여 최종 25 μ l로 반응하였다. PCR반응조건은 94℃에서 2분간 변성시킨 후 94℃에서 30초 annealing 온도는 53℃ ~ 57℃에서 45초, 72℃에서 60초를 1 cycle로 하여 35회 반복수행 하였으며, 72℃에서 5분간 신장시킨 후 8℃에서 종료하였다. 2차 PCR은 1차 PCR product를 주형으로 1 μ l사용하여 동일한 조건으로 수행하였다. 모든 반응은 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, USA)에서 수행 하였으며, 증폭된 PCR산물은 Gel Extraction Kit (Qiagen, Netherland)을 이용하여 gel purification을 실시하였다. 이를 주형으로 Direct sequencing 혹은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning 과정을 거쳐 sequencing을 하여 염기서열 분석을 하였다. DNA sequencing은 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied biosystems, USA)를 이용하였다.

표 2

[0041] 코딩 시퀀스 내부 서열 분석 primer 서열

Gene	primer names	primer sequence	서열번호
POU5F1	RT-first-F	5' -TTCCCATGGCKGGACACCTGGCTTC-3'	7
	RT-first-R	5' -CCTCAGTTTGAATGCATGGGAGAGC-3'	8
	RT-second-F	5' -CTCGRACCTGGCTAAGCTTCCAAG-3'	9
	RT-second-R	5' -AAGTGGGGCTTCCATAGCCTGGGG-3'	10

NANOG	RT-first-F	5' -CTTACAARKGTCTGCTRCTGAGATGC-3'	11
	RT-first-R	5' -AGTTYAGGAATAAATCCATGGYTTGTGG-3'	12
	RT-second-F	5' -CAGCCCTGATTCTTCYACCAGTCC-3'	13
	RT-second-R	5' -CCAAAYMRCCTCCAARTCACTGGCAG-3'	14
SOX2	RT-first-F	5' -TGAACGCCCTTCATGGTGTGG-3'	15
	RT-first-R	5' -CTCTAGTTCACTGTCCAGCC-3'	16
	RT-second-F	5' -CAAGATGGCCCAGGAGAACC-3'	17
	RT-second-R	5' -TGGTAGTGTGGGACATGTG-3'	18
LIN28	RT-first-F	5' -GTGTCCAACCAGCAGTTTGCAGGT-3'	19
	RT-first-R	5' -CACTRGGGCCCTGCTGGGCCTTC-3'	20
	RT-second-F	5' -GGCATCTGTAAGTGGTTCAACGTGC-3'	21
	RT-second-R	5' -GCAGCTTGCACTTCTTGGCATGATG-3'	22
KLF4	RT-first-F	5' -ATGGGTGTCAGCGACGCKCTGCTCC-3'	23
	RT-first-R	5' -AAGGCRAGGTGGTCCGACCTGG-3'	24
	RT-second-F	5' -GAAGACACTGCGTCMAGCAGGTGCC-3'	25
	RT-second-R	5' -TTRCGGTAGTGCCTGGTCAGTTC-3'	26
MYC	RT-first-F	5' -CACCAACAGGAATATGACCTCGAC-3'	27
	RT-first-R	5' -CAAYTCMGGGATCTGGTCACGCAGG-3'	28
	RT-second-F	5' -AGCARCAGCAGAGCGAGCTGCAGC-3'	29
	RT-second-R	5' -CCTCTGRCGYTCCAAGACGTTGTGTG-3'	30

[0042] 1-4. RACE-PCR기법을 사용하여 유전자들의 3' 및 5' UTR 서열분석

[0043] RT-PCR을 수행하여 분석한 서열을 바탕으로 제작한 서열번호 31 내지 54의 primer들과 상기 준비된 고양이 배아 줄기-유사세포의 cDNA를 Smart™ RACE cDNA Amplification (Clontech, USA)을 사용하여 RACE PCR을 수행하였다. cDNA를 사용한 PCR반응에서 Prime Taq DNA Polymerase 1.5 unit (Genet Bio, Korea), 10X Reaction buffer 5 μ l, dNTP 4 μ l, UPM 5 μ l, 10 pmol primer 각각 2 μ l, cDNA 5 μ l 그리고 증류수 28.7 μ l를 첨가하여 최종 50 μ l로 반응하였다. PCR반응조건은 94℃에서 2분간 변성시킨 후 94℃에서 30초 65℃에서 60초, 72℃에서 90초를 1 cycle로 하여 35회 반복수행 하였으며, 72℃에서 5분간 신장시킨 후 8℃에서 종료하였다. 2차 PCR은 1차 PCR product를 주형으로 3 μ l를 주형으로 NUP primer 3 μ l, 10 pmol RACE-second-F 혹은 R primer를 각 3 μ l를 처리 하였으며, 나머지 시료들은 동일하게 첨가하였다. 2차 PCR 반응 조건은 1차 PCR과 동일한 조건으로 수행하였으며, 모든 반응은 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, USA)에서 수행 하였으며, 증폭된 PCR산물은 Gel Extraction Kit (Qiagen, Netherland)을 이용하여 gel purification을 실시하였다. 이를 주형으로 Direct sequencing 혹은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning 과정을 거쳐 sequencing을 하여 염기서열 분석을 하였다. DNA sequencing은 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied biosystems, USA)를 이용하였다.

표 3

[0044] 3' 및 5' UTR 서열 분석 primer 서열

Gene	primer names	primer sequence	서열번호
POU5F1	RACE-first-R	5' -CTTTGATGTCCTGGGACTCC-3'	31
	RACE-second-R	5' -CAACCTGAGGCCACAGTACGTATC-3'	32
	RACE-first-F	5' -CCGAGTGTGGTTCTGCAATCGTCG-3'	33
	RACE-second-F	5' -GCAGTGACTATTGCAACGAGAGG-3'	34
NANOG	RACE-first-R	5' -CTTGATCTGCTGGAGACTGAGG-3'	35
	RACE-second-R	5' -GGTGATCTCCTCTGCAGAAG-3'	36
	RACE-first-F	5' -AAGCCACAGTGTGATACAGC-3'	37
	RACE-second-F	5' -CTACCTGAACATACAGCCTG-3'	38

<i>SOX2</i>	RACE-first-R	5' -TCCGGGTGCTCCTTCATGTGCAGC-3'	39
	RACE-second-R	5' -CGCTTAGCCTCGTCGATGAACGG-3'	40
	RACE-F	5' -AGTATCAGGAGTTGTCAAGGCAG-3'	41
	RACE-R	5' -TTGCTGATCTCCGAGTTGTGCACT-3'	42
<i>LIN28</i>	RACE-first-R	5' -CTCCCTTTGATCTGCGCTTCTGCATG-3'	43
	RACE-second-R	5' -CTCTGGTGCACAAAGACATCCACTGG-3'	44
	RACE-first-F	5' -CTGTGGAGGTCTAGACCACCATGCC-3'	45
	RACE-second-F	5' -CAGCCTAAGAAGTGCCACTTCTGCC-3'	46
<i>KLF4</i>	RACE-first-R	5' -GATCGGATAGCTGAAGCTGCAGGTG-3'	47
	RACE-second-R	5' -GTCCAGGTCCAGGAGATGCTTGAAC-3'	48
	RACE-first-F	5' -AACTGCTGAGCAGCAGGGACTGTC-3'	49
	RACE-second-F	5' -CATCTCAAGGCACACCTGCGAACC-3'	50
<i>MYC</i>	RACE-first-R	5' -TTCTGCAGGTACAAGCTGGAGGTGG-3'	51
	RACE-second-R	5' -AGCTCGGTCACCATCTCCAAGTGGTC-3'	52
	RACE-first-F	5' -ACCACCAGCAGCGACTCTGAGGAAG-3'	53
	RACE-second-F	5' -CGCTGGTCCTTAAGAGATGCCACG-3'	54

1-5. 전체 유전자 코딩 영역 확인

분석된 서열을 바탕으로 5' UTR과 3' UTR의 영역에서 서열번호 55 내지 76의 primer를 제작하여 그 영역 안에 개시코돈과 종결코돈이 포함되도록 하였으며, 준비된 primer로 RT-PCR을 수행하여 CDS의 서열을 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 cloning 과정을 거쳐 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied biosystems, USA)를 이용하여 재확인하였다. 최종 분석된 각 유전자의 mRNA 서열은 상기 표 1에 개시된 바와 같이 GenBank database에 등록 하였다.

표 4

전체 서열 확인 primer

Gene	primer names	primer sequence	서열번호
<i>POU5F1</i>	CDS-first-F	5' -CCAGAGGTCAAGGCTAGTGG-3'	55
	CDS-first-R	5' -CCCAAAGCCCTGGTACAAAC-3'	56
	CDS-second-F	5' -TTGAGCAGTGCCTCGGAGAG-3'	57
	CDS-second-R	5' -CCCATTCTGGGAAAGGTTG-3'	58
<i>NANOG</i>	CDS-first-F	5' -ACTCGGCAACATGAATACGG-3'	59
	CDS-first-R	5' -GCCAAAGCTACGGAATCCTC-3'	60
	CDS-second-F	5' -ACTCGGCAACATGAATACGG-3'	61
	CDS-second-R	5' -GGAGACGGATGAATACGCTC-3'	62
<i>SOX2</i>	CDS-first-F	5' -AMAGTCCCGGCCGGGCGAGGGTYG-3'	63
	CDS-first-R	5' -AGCCCTCATATGTGCGAGAG-3'	64
	CDS-second-F	5' -ACAGCGCCCGCATGTACAAC-3'	65
	CDS-second-R	5' -AGCCCTCATATGTGCGAGAG-3'	66
<i>LIN28</i>	CDS-first-F	5' -CCTTTGCCTYCGGACTTCTC-3'	67
	CDS-first-R	5' -TTCAGAAGCTGGAGCTCTGG-3'	68
	CDS-second-F	5' -ACTACCATGGGCTCTGTGTC-3'	69
	CDS-second-R	5' -GGCACTTCTTAGGCTGAAGG-3'	70
<i>KLF4</i>	CDS-first-F	5' -GGGCTCCCGAGGACCTTCTG-3'	71
	CDS-first-R	5' -TGTGGGTACATCCACTACG-3'	72
	CDS-second-F	5' -ATGAGGCAGCCACCTGGTGAAGTCTG-3'	73
	CDS-second-R	5' -TTAAAAGTGCCTCTTCATGTGTAAGGC-3'	74
<i>MYC</i>	CDS-first-F	5' -CGATGCCCTCAACGTCAGC-3'	75
	CDS-first-R	5' -TCACGAGCAACTCCAGTTCC-3'	76

[0048] <실시예 2> 고양이 배아 줄기-유사세포 역분화 인자의 세포내 도입

[0049] 2-1. 발현벡터 구축

[0050] PLNCX Retroviral Vector (Takara, USA)의 multi-cloning site 내의 제한효소 중 XhoI과 NotI을 각 유전자의 CDS 삽입에 사용하였다. 이 때 증폭을 위한 forward primer에는 XhoI 인지서열을, reverse primer에는 NotI 인지서열을 첨가하여 제작하였으며, 이를 이용하여 각 유전자의 CDS를 증폭하였다. PCR 반응은 iProof High-Fidelity DNA Polymerase 1 unit (biorad, USA), 5X iProof™ HF buffer 10 μ l, dNTP 3 μ l, DMSO 2.5 μ l, 각각의 10 pmol primer 3 μ l, plasmid DNA (100ng/ μ l) 1 μ l 그리고 증류수 27 μ l를 첨가하여 최종 50 μ l로 반응을 수행 하였다. 98℃ 30초간 변성을 시킨 후 98℃ 10초 60℃ 30 초 72℃ 40 ~ 60초를 1cycle로 하여 25 cycle을 수행한 후 72℃ 에서 5분간 신장시킨 후 8℃에서 종료 하였다.

[0051] 증폭된 각 유전자의 CDS와 PLNCX vector는 제한효소 XhoI (Enzynomics, Korea)과 NotI (Enzynomics, Korea)을 각각 처리하고 정제하였다. 그 후 vector 1 μ l (10ng/ μ l), insert DNA 3 μ l (10 ng/ μ l), T4 DNA ligase (Enzynomics, Korea) unit, 10X buffer 2 μ l 와 증류수 14 μ l를 첨가하여 16℃에서 overnight 처리 하였다.

[0052] 이를 DH10b에 형질전환하여 insert DNA의 sequence를 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied biosystems, USA)를 이용하여 확인하였다.

[0053] 구축된 expression vector는 150ml의 LB media에 14시간 배양하여, Endo Free Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Netherland)로 분리하였다.

표 5

[0054] 발현벡터 구축 primer

Gene	primer names	primer sequence	서열번호
POU5F1	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGGCGGGACACCTGGCTTC-3'	77
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTCAGTTTGAATGCATGGGAGAGCC-3'	78
NANOG	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGAATACGGATCCAGCTCAGCC-3'	79
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTCAGGCTGTATGTTTCAGGGTAG-3'	80
SOX2	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGTACAACATGATGGAGACGGAGC-3'	81
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTCACATGTGCGAGAGGGGCAG-3'	82
LIN28	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGGGCTCTGTGTCAAACCAGC-3'	83
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTCAATTCTGGGCCTCTGGGAG-3'	84
KLF4	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGAGGCAGCCACCTGGTGA-3'	85
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTTAAAGTGCCTCTTCATGTG-3'	86
MYC	Xho I -F	5' -CCGCTCGAGATGCCCCCAACGTCAGCTTCG-3'	87
	Not I -R	5' -TTTTCCTTTTGC GGCCGCTTATGCACAAGAGTTCCTTAGCTG-3'	88

[0055] 2-2. 세포내 도입(Transfection)

[0056] 고양이의 fibroblast를 배양하여 plate에 70,000 cell 씩을 깔았다. Serum free media 22 μ l에 실시예 2-1에서 분리한 plasmid 500 ng/ μ l을 1 μ l씩 섞어주었다. 단, 이때 Plasmid DNA를 첨가하지 않은 fibroblast 하나를 control로 추가하여 발현의 유무의 비교군을 추가한다. FuGENE HD Transfection Reagent (Roche, Germany)를 2 μ l씩 더 섞어준 후 15분간 상온에 두었다. 뿌려둔 cell에 mix를 분주하고 섞어준 후 36시간 이상 배양하였다. PBS로 2번 씻어내었다.

[0057] 서열번호 1 내지 6의 고양이 배아 줄기-유사세포 역분화 유전자서열이 삽입된 벡터가 발현되는지를 비교하고자 발현벡터를 삽입한 fibroblast군(실험군)과 삽입하지 않은 일반고양이의 fibroblast(대조군)에서 Trizol (Gibco BRL, USA)을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20℃에 보관하였다. House keeping gene인 GAPDH primer (GAPDH-F: 5' -GCAAAGTGGACATTGTCGCC-3' (서열번호 89), GAPDH-R: 5' -CCTTCTCCATGGTGGTGAAG-3 (서열번호 90))를 제작하여 cDNA의 합성 유무를 확인 하였으며, 삽입한 서열이 포함 된 내부 primer를 선정하여 PCR을 수행하였다. cDNA

를 사용한 PCR반응에서 Prime Taq DNA Polymerase 1 unit (Genet Bio, Korea), 10X Reaction buffer 2.5 μ l, dNTP 2 μ l, 10 pmol primer 각각 1.5 μ l, cDNA 2 μ l 그리고 증류수 15.3 μ l를 첨가하여 최종 25 μ l로 반응하였다. PCR반응조건은 94℃에서 2분간 변성시킨 후 94℃에서 30초 annealing 온도는 57℃에서 30초, 72℃에서 30초를 1 cycle로 하여 32회 반복수행 하였으며, 72℃에서 5분간 신장시킨 후 8℃에서 종료하였다.

표 6

유전자 발현 유무 확인 primer

Gene	primer names	primer sequence	서열번호
POU5F1	indel-F	5' -GGAGTCCCAGGACATCAAAG-3'	91
	indel-R	5' -GCCTGCACAAGTGTCTCTGC-3'	92
NANOG	indel-F	5' -GACAGAAATACCTCAGTCTCC-3'	93
	indel-R	5' -AGTCGTGCAGCTGGCTGTTTC-3'	94
SOX2	indel-F	5' -GTGAACCAGCGCATGGACAG-3'	95
	indel-R	5' -GTAGGACATGCTGTAGGTGG-3'	96
LIN28	indel-F	5' -AGAAGCTGCTAAGGGCCTG-3'	97
	indel-R	5' -GCTTGCATTTCCTTGGCATGG-3'	98
KLF4	indel-F	5' -GTTCAACGATCTCCTGGACC-3'	99
	indel-R	5' -GGCTCACGTCGTTGATGTCC-3'	100
MYC	indel-F	5' -CAAGCTCGTCTCGAAGAAGC-3'	101
	indel-R	5' -CTGTGAGGAGGTTTGTGTG-3'	102

실험결과 는 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, P, N, S, L, K, M 은 고양이의 fibroblast에 각각의 유전자 POU5F1, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4, MYC의 CDS 서열이 삽입된 발현벡터군(실험군)이고, C는 고양이의 fibroblast로 비교대상인 대조군이다. RNA를 추출하여 cDNA를 합성하여, 각각의 primer로 PCR을 수행한 결과 유전자의 염기서열을 삽입한 실험군의 fibroblast에서는 band가 나타났으며, 대조군에서는 SOX2를 제외하고 모두 band가 나타나지 않았다. 이는 유전자서열이 발현함을 증명하는 결과이며, 배아-줄기 유사세포로 추정되는 시료로 PCR을 수행하였을 경우 같은 양상이 나타난다면, 이는 배아 줄기세포임을 입증해 줄 수 있는 바이오마커가 될 수 있는 결과이다.

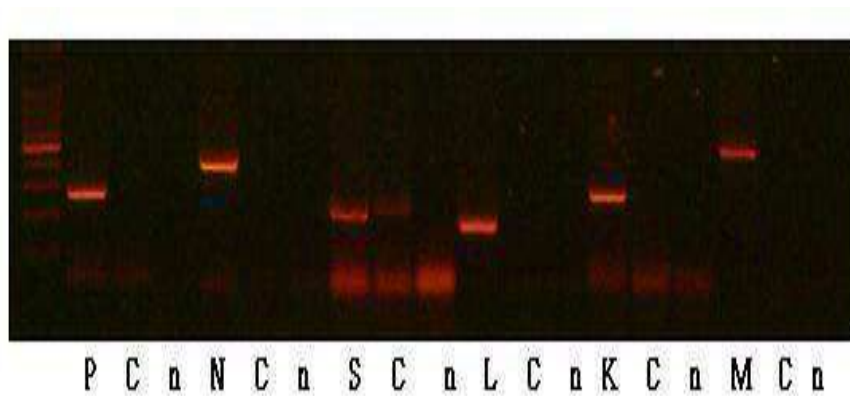
도면의 간단한 설명

도 1은 고양이의 fibroblast에 각각의 유전자 POU5F1, NANOG, SOX2, LIN28, KLF4, MYC의 CDS 서열이 삽입된 발현벡터 실험군(각각 P, N, S, L, K, M)과 고양이의 fibroblast로 비교대상인 대조군(C)의 유전자 발현 여부를 알아본 것이며,

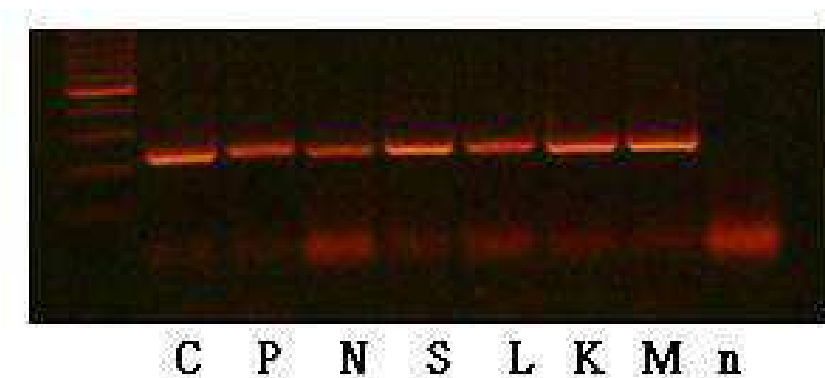
도 2는 cDNA의 합성 유무와 농도차이를 비교하고자 House Keeping Gene인 GAPDH로 PCR을 하여 확인한 도면이다. (P : POU5F1, N : NANOG, S : SOX2, L : LIN28, K : KLF4, M : MYC, n : negative)

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Biomarker for identification of embryonic stem(ES)-like cells in cat and use of the Biomarker

<160> 102

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1083

<212> DNA

<213> Felis catus POU5F1

<400> 1

atggcgggac acctggcttc cgacttggcc ttctcgcccc cgccaggcgg tggaggcgat	60
gcgccgggag ggccggagcc cggctgggtt gaccctcgga cctggctgag cttccaaggc	120
cctcccggcg ggtcaggaat cgggccccgg gttgggccgg gcgctgaggt gtgggggatt	180
ccccgtgcc ccccgccgta tgagtcttgc ggggggatga cgtactgtgg gcctcaggtt	240
ggagtggggc tggtgcccca aggcggcctg gagacctctc agccagaggc cgaaagggga	300
gccggggttg agagcaactc cgagggggcc tcccctgagc cctgcgctgc cccacctggg	360
gctgtgaagc cggacaagga gaagctggag caaacacccg aggagtccca ggacatcaaa	420
gctctgcaga aagacctgga acaatttgcc aaactcctga agcagaagag gatcaccttg	480
ggatatactc aggccgatgt ggggctcacc ctgggggttc tctttgggaa ggtgttcagc	540
caaacaacca tctgccgttt tgaggctttg cagctcagtt tcaagaacat gtgtaagctg	600
cgacccttgc tgcagaagtg ggtggaggaa gctgacaaca acgaaaatct gcaggagata	660
tgcaaagcag agacacttgt gcaggcccca aagagaaagc gaacaagtat cgagaaccga	720
gtgagaggca acctggagaa catgttcttg cagtgccga aaccacacct gcagcagatc	780
agccacattg cccagcagct cgggctggag aaggatgtgg tccgagtgtg gttctgcaat	840
cgtcgccaga agggcaaagc atcaagcagt gactattcgc aacgagagga tttttaggct	900
gctgggtccc ctttctcagg ggcaccagta tcctttctc tggcaccagg gccccat	960
ggtaccccag gctatggaag cctcacttc actacactgt actcctcagt ccttttcct	1020
gagggtgaag cctttccctc tgtgtctgtt accactctgg gctctcccat gcattcaaac	1080

tga	1083
<210> 2	
<211> 936	
<212> DNA	
<213> Felis catus NANOG	
<400> 2	
atgaatacgg atccagctca gcccgaatgc ccgccttgcc ccgaagcgcc cgattctagg	60
gactcttctc cagtgcctga gattgatggg cctgaagaaa attatgcacc ctgCGaatg	120
tcatccgtg agacccccca cacggagacc gtctctctc ttccttctg catggatcta	180
cttgctcagg gcagccccga ttcttccacc agccccagag taaaagtgt gcccacttct	240
gcagaggaga tcaccgcgaa gaaggacgat ccagctcagg gcaagaaaca gaagatcaga	300
accgtcttct ctcagaccca gctatatgta ctcaatgata gatttcagag gcagaaatac	360
ctcagctctc agcagatgca agaactttcc aacattctga accitagcta taagcaggtt	420
aagacctggt tccagaacca gagaatgaaa tgcaagaggt ggcaaaaaaa caactggcca	480
aagaataaca aactgtgtc tcagaacagc tctgcaaatc cagaataccc aggttctat	540
tcctatcacc agggatacct gatgaacact tccggaacc ttccaatatg gggcaaccag	600
acctggaaca gccagtcgtg gagcaaccag acctggaaca gccagtcgtg gagcaaccag	660
acctggaaca gtcagtcgtg gagcaaccag acctggaaca gtcagacctg gtgccccaa	720
gcctggaatg gccagggtg gaacagccag ctgcacgact gtggagagga atccccgcag	780
ccccagatac agttacagca aaattctgtc agcgatttgc agtccatctt agaaacgact	840
ggggaaagcc acagtgtgat acagcaaacg gccaagtatt ttagtgcca gcaaataatg	900
gatttattcc caaactacce tgaacataca gctga	936

<210> 3
 <211> 966
 <212> DNA
 <213> Felis catus SOX2

<400> 3
 atgtacaaca tgatggagac ggagctgaag cgcgcgggcc cgcagcaaac ttcggggggc 60

 ggccggcggcg gcggcggcgg caactccacc gcggcagcgg cgggcggcaa ccagaagaac 120

 agcccggacc gcgtcaagcg gcccatgaac gccttcattg tctgggtccc cgggcagcgg 180

 cgcaagatgg cccaggagaa cccaagatg cacaactcgg agatcagcaa ggcctggggc 240

 gccgagtgga aacttttgc ggagacggag aagcggccgt tcctcgacga ggccaagcgg 300

 ctgcgagcgc tgcacatgaa ggagcacccg gattataaat accggcccg gcggaacc 360

 aagacgtca tgaagaagga taagtacaca ctccccggcg ggctgctggc tccgggcggc 420

 aacagcatgg cgagcggggt cggggtgggc gccggcctgg gcgcgggcgt gaaccagcgc 480

 atggacagct acgcgcacat gaacggctgg agcaacggca gctacagcat gatgcaggac 540

 cagctgggct accgcagca cccgggcctc aacgcgcacg gcgccgcga gatgcagccc 600

 atgcaccgt acgacgtgag gccttcgag tacaactcca tgaccagctc gcagacctac 660

 atgaacggct cccccaccta cagcatgtcc tactcgcagc agggcactcc tggcatggcg 720

 ctctgctcca tgggtcggg gttaagtcc gagccagct ccagcccc cgtggttacc 780

 tcttcctccc actccagggc gccctgccag gccggggacc tccgggacat gatcagcatg 840

 tacctcccc gcgccaggt gccggagccc gccgcccc gcagacttca catgtcccag 900

 cactaccaga gcggcccggt gccgggcacg gccattaacg gcacactgcc cctctcgac 960

atgtga 966

<210> 4
<211> 621
<212> DNA
<213> Felis catus LIN28

<400> 4
atgggctctg tgtcaaacca gcagttcgca ggtggctgcg ccaaggcgcc ggaggaggcg 60

ccggaggacg ccgccccggc ggccgaggag ccgcagctgc tgcacggtgc cggcatctgt 120

aagtgttca acgtgcgcat ggggttcggc ttcctgtcca tgaccgcccg cgccggggtc 180

gcgcttgacc cccagtgga tgtctttgtg caccagagca agctgcacat ggagggttc 240

cggagcctga aggagggtga ggccgtggag ttcaccttta agaagtctgc taaggcctg 300

gaatctatcc ggtcacggg ccccggtggg gtgttctgta ttgggagcga gagcgggccc 360

aaagggaaga acatgcagaa gcgcagatca aaggagaca ggtgctaaa ctgtggaggt 420

ctagaccacc atgccaagga atgcaagctg ccacccagc ctaagaagtg ccacttctgc 480

cagagcatca gccacatggt ggcctcgtgt ccactgaaag ccagcaggc cccagctca 540

cagggaagc cagcctactt tcgggaggag gaagaagaag agatccatag ccctgcctg 600

ctcccagagg ccagaattg a 621

<210> 5
<211> 1458
<212> DNA
<213> Felis catus KLF4

<400> 5
atgaggcagc cacctgggtga gtctgacatg gctgtcagcg acgcactact cccgtccttc 60

tccacgttcg cgtccggccc ggccggaagg gagaagacac tgcgtccagc aggtgccccg 120

aataaccgct ggcgaggga gctctccac atgaagcgac ttcccccggt gcttccggc	180
cgccctacg acctggcggc ggcgaccgtg gccaccgacc tggaaagtgg cggagtcggt	240
gcggcttgcg gcggcaacaa ccagctctc ctaccccgga gggagacgga ggagtccaac	300
gatctcctgg acctggactt tctctctcc aactcactgt cccatcagga gtcagtggcc	360
gccaccgtgt cctcgtcggc atcagcctca tctcgtcct cgccgtcgag cagcggctct	420
gccagtgcgc cctccacctg cagcttcagc tatccgatcc gggccggagg cgacccgggc	480
gtggcgccag gcagcacggg cgccggcctc ctctatggcc gggagtctgt gcctcctccc	540
acagctccct tcaacctggc ggacatcaac gacgtgagcc cctcgggcgg ctctgtggcc	600
gagtccttc ggctgaatt ggaccagtg tatattccgc cgcagcagcc gcagccgcca	660
ggtggcgggc tgatgggcaa gtttgtgtg aaggcgtcgc tgagtcccc tggcagcgag	720
tacggcagcc cgtcggcat cagtgttggc aaaggcagtc cggacggcag ccaccggtc	780
gtagtggcg cctacagtgg cgggccaccg cgcattgtcc ccaagatcaa gcaggaggcg	840
gtctctcat gcaccgtcg tggcccccia gaggccaca tgggcactgg acccctctc	900
agcaatggcc accggccgcc agcccacgac ttccccctgg ggcggcagct cccagcagg	960
actacccga ccttgggtgc cgaggaactg ctgagcagca gggactgtca tctgccta	1020
ccgtcccc caggtttcca tccccacct gggcccaact acccaccctt ttgctgac	1080
cagatgcagc cacaggtgcc accgtccat taccaagagc tcattgccacc tggttcctgc	1140
atgccggagg agcagaaacc aaagaggggg agaaggtcgt ggccgcggaa aaggacagcc	1200
actcacactt gtgactatgc gggctgcggc aaaacctaca cgaagattc tcattcaag	1260
gcacacctgc gaaccacac aggtgagaag ccttaccact gtgactggga tggctcggg	1320

tggaatttg cccgctctga cgaactgacc aggcattacc ggaaacacac cgggcaccgc	1380
ccctttcagt gccagaagtg cgaccgggcc ttctccaggt cggaccacct cgccttacac	1440
atgaagaggc acttttaa	1458
<210> 6	
<211> 1326	
<212> DNA	
<213> Felis catus MYC	
<400> 6	
atgccctca acgtcagctt cgccaacagg aactatgacc tcgactacga ctcggtgcag	60
ccctatttct actgcgacga ggaggagaac ttctaccagc agcagcagca gagcgagctg	120
cagccgccgg cgccagcga ggatatctgg aagaaattcg agctgctgcc caccgcccg	180
ctgtccccga gccgccgctc ggggctctgc tcgccctcct acgtcgctt cgcgtccttc	240
tccccccggg gggacgacga cggcggcggc ggcagctttt ccacggccga ccagtggag	300
atggtgaccg agctgctggg aggagacatg gtgaatcaga gcttcatctg cgaccggac	360
gacgagacct tcatcaaaaa catcatcatc caggactgca tgtggagcgg cttctcggcc	420
gccgccaagc tcgtctcgga gaagctagcc tcctaccagg ctgcgcgcaa agacagcggc	480
agcccagacc cgcgccggg gcccgaggc tgccccacct ccagcttgta cctgcaggac	540
ctgaccgcc cgccctccga gtgcatcgac ccctccgtgg tcttcccta cccgtcaac	600
gacagcagct cgcccaagcc ctgcgcctcc cccgactcgg ccgccttctc cccgtcctcg	660
gactctctgc tctcctcggc ggagtcctcc ccgcccga gcccagacc cctggcgtc	720
cacgaggaga caccgcccac caccagcagc gactctgagg aagaacaaga ggaagaagaa	780

gaaattgatg tcgtttctgt ggagaaaagg cagccccctg ccaaaaggtc ggaatcgggg	840
tcacctctg cctctgccgg aggccacagc aaacctctc acagcccgt ggtccttaag	900
agatgccacg tgcccaccca ccagcacaat tacgcagcgc cccctccac taggaaggac	960
taccagccg ccaagagggc taagtggac agtggcaggg tcctgaaaca gatcagcaac	1020
aaccgcaaat gtatcagccc caggtcttcg gacacggagg agaacgaca gaggcggacg	1080
cacaactct tggaacgcca gaggagaaac gagctgaaac ggagcttttt tgccctgcgc	1140
gaccagatcc cagagttgga aaacaacgaa aaggcccca aggtggtgat ccttaaaaag	1200
gccaccgct acatcctgtc cgtccaagca ggggagcaaa agctcatttc ggaaaaggac	1260
ctgttgagga agcgacgaga acagttgaaa cacaacttg aacagctaag gaactcttgt	1320
gcataa	1326

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-first-F

<400> 7	
ttcccatgg ckggacacct ggcttc	26

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-first-R

<400> 8
cctcagtttg aatgcatggg agagc 25

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-second-F

<400> 9
ctcgracctg gctaagcttc caag 24

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-second-R

<400> 10
aagtgggggc ttccatagcc tgggg 25

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-first-F

<400> 11
cttacaarkg tctgctrctg agatgc 26

<210> 12
<211> 28
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-first-R

<400> 12

agttyaggaa taaatccatg gytgtgg

28

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-second-F

<400> 13

cagccctgat tcttcyacca gtcc

24

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-second-R

<400> 14

ccaaaymrcc tccaartcac tggcag

26

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-first-F

<400> 15

tgaacgcctt catggtgtgg 20

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

<220>
 <223> RT-first-R

<400> 16
 ctctagttca ctgtccagcc 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-second-F

<400> 17
 caagatggcc caggagaacc 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-second-R

<400> 18
 tggtagtgct gggacatgtg 20

<210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-first-F

<400> 19
gtgtccaacc agcagtttgc aggt 24

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

<220>
<223> RT-first-R

<400> 20
cactrgggcc ctgctgggcc ttc 23

<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-second-F

<400> 21
ggcatctgta agtggttcaa cgtgc 25

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RT-second-R

<400> 22

gcagcttgca ttccttggca tgatg

25

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-first-F

<400> 23
 atggctgtca ggcagckct gctcc

25

<210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-first-R

<400> 24
 aaggcraggt ggtccgacct gg

22

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

<220>
 <223> RT-second-F

<400> 25
 gaagacactg cgctmagcag gtgcc

25

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-second-R

<400> 26

tttcggtagt gcctggtcag ttc

23

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-first-F

<400> 27

caccaacagg aactatgacc tcgac

25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-first-R

<400> 28

caaytcmggg atctggtcac gcagg

25

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RT-second-F

<400> 29

agcargcagca gagcgagctg cagc

24

<210> 30
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RT-second-R

<400> 30
 cctctgrcgy tccaagacgt tgtgtg

26

<210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-first-R

<400> 31
 ctttgatgct ctgggactcc

20

<210> 32
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-second-R

<400> 32
 caacctgagg cccacagtac gtcac

26

<210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-first-F

<400> 33

ccgagtgtgg ttctgcaatc gtcg

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-second-F

<400> 34

gcagtgacta ttgcaacga gagg

24

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-first-R

<400> 35

cttgcatctg ctggagactg agg

23

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-second-R

<400> 36

ggtgatctcc tctgcagaag 20

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

<220>
 <223> RACE-first-F

<400> 37
 aagccacagt gtgatacagc 20

<210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-second-F

<400> 38
 ctaccctgaa catacagcct g 21

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-first-R

<400> 39
 tccgggtgct ccttcattgtg cagc 24

<210> 40
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-second-R

<400> 40

cgcttagcct cgtcgatgaa cgg

23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-F

<400> 41

agtatcagga gttgtcaagg cag

23

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-R

<400> 42

ttgctgatct ccgagttgtg cact

24

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-first-R

<400> 43

ctccctttga tctgcgttc tgcattg

26

<210> 44
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-second-R

<400> 44
 ctctggtgca caaagacatc cactgg

26

<210> 45
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-first-F

<400> 45
 ctgtggaggt ctagaccacc atgcc

25

<210> 46
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-second-F

<400> 46
 cagcctaaga agtgccatt ctgcc

25

<210> 47
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-first-R

<400> 47

gatcggatag ctgaagctgc aggtg

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-second-R

<400> 48

gtccaggtcc aggagatgct tgaac

25

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-first-F

<400> 49

aactgctgag cagcaggac tgtc

24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RACE-second-F

<400> 50

catctcaagg cacacctgcg aacc

24

<210> 51
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-first-R

<400> 51
 ttctgcaggt acaagctgga ggtgg

25

<210> 52
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-second-R

<400> 52
 agctcgggtca ccatctccaa ctggtc

26

<210> 53
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> RACE-first-F

<400> 53
 accaccagca gcgactctga ggaag

25

<210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> RACE-second-F

<400> 54
cgctggctct taagagatgc cacg 24

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

<220>
<223> CDS-first-F

<400> 55
ccagaggtca aggctagtgg 20

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

<220>
<223> CDS-first-R

<400> 56
cccaaagccc tggtaacaac 20

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

<220>
<223> CDS-second-F

<400> 57

ttgagcagtg cctcggagag 20

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

<220>
 <223> CDS-second-R

<400> 58
 cccattcctg ggaaaggttg 20

<210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDS-first-F

<400> 59
 actcggcaac atgaatcgg 20

<210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDS-first-R

<400> 60
 gccaaagcta cggaatcctc 20

<210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-F

<400> 61
actcggcaac atgaatacgg 20

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-R

<400> 62
ggagacggat gaatacgtc 20

<210> 63
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-F

<400> 63
amagtcccgg ccgggccgag ggtyg 25

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-R

<400> 64

agccctcaca tgtgcgagag 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDS-second-F

<400> 65
 acagcgcccg catgtacaac 20

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDS-second-R

<400> 66
 agccctcaca tgtgcgagag 20

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CDS-first-F

<400> 67
 cctttgccty cggacttctc 20

<210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-R

<400> 68
ttcagaagct ggagctctgg 20

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-F

<400> 69
actacatgg gctctgtgc 20

<210> 70
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-R

<400> 70
ggcacttctt aggctgaagg 20

<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-F

<400> 71

gggctccga ggaccttctg 20

<210> 72
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-R

<400> 72
tgtgggtcac atccactacg 20

<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-F

<400> 73
atgaggcagc cacctggtga gtctg 25

<210> 74
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-second-R

<400> 74
ttaaaagtgc ctcttcattgt gtaaggc 27

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-F

<400> 75
cgatgccct caacgtcagc 20

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDS-first-R

<400> 76
tcacgagcaa ctccagtcc 20

<210> 77
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Xho1-F

<400> 77
ccgctcgaga tggcgggaca cctggcttc 29

<210> 78
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Not1-R

<400> 78

ttttcctttt gcggccgctc agtttgaatg catgggagag cc 42

<210> 79
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Xho1-F

<400> 79
 ccgctcgaga tgaatacgga tccagctcag cc 32

<210> 80
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Not1-R

<400> 80
 ttttcctttt gcggccgctc aggctgtatg ttcagggtag 40

<210> 81
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Xho1-F

<400> 81
 ccgctcgaga tgtacaacat gatggagacg gagc 34

<210> 82
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Not1-R

<400> 82

ttttcctttt gcggccgctc acatgtgcga gaggggcag

39

<210> 83

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Xho1-F

<400> 83

ccgctcgaga tgggctctgt gtcaaaccag c

31

<210> 84

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Not1-R

<400> 84

ttttcctttt gcggccgctc aattctgggc ctctgggag

39

<210> 85

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Xho1-F

<400> 85

ccgctcgaga tgaggcagcc acctgggtga

29

<210> 86
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Not1-R

<400> 86
ttttcctttt gcggccgctt aaaagtcct cttcatgtg

39

<210> 87
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Xho1-F

<400> 87
ccgctcgaga tgccctcaa cgtcagcttc g

31

<210> 88
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Not1-R

<400> 88
ttttcctttt gcggccgctt atgcacaaga gttccttagc tg

42

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDH-F

<400> 89
gcaaagtgga cattgtcgcc 20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDH-R

<400> 90
ccttctccat ggtggtgaag 20

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> indel-F

<400> 91
ggagtcccag gacatcaaag 20

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> indel-R

<400> 92

gcctgcacaa gtgtctctgc 20

<210> 93
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-F

<400> 93
 gacagaaata cctcagtctc c 21

<210> 94
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-R

<400> 94
 agtcgtgcag ctggctgttc 20

<210> 95
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-F

<400> 95
 gtgaaccagc gcatggacag 20

<210> 96
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> indel-R

<400> 96

gtaggacatg ctgtaggtgg

20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> indel-F

<400> 97

agaagtcctgc taaggcctg

20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> indel-R

<400> 98

gcttgcatc cttgcatgg

20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> indel-F

<400> 99

gttcaacgat ctctggacc 20

<210> 100
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-R

<400> 100
 ggctcacgtc gttgatgtcc 20

<210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-F

<400> 101
 caagctcgtc tcgaagaagc 20

<210> 102
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> indel-R

<400> 102
 ctgtgaggag gtttgctgtg 20