



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0119283  
(43) 공개일자 2009년11월19일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/67 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0045221

(22) 출원일자 2008년05월15일

심사청구일자 2008년05월15일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

이운규

서울 서초구 반포동 3001-1 디오슈페리움 2 1504호

민본홍

경기도 용인시 수지구 고기동 566-1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

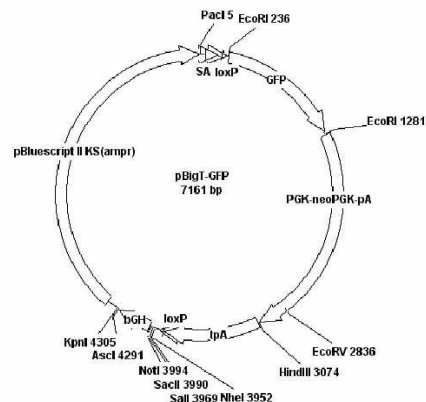
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 녹색형광단백질을 이용한 단백질 과발현 시스템의 향상

### (57) 요약

본 발명은 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널을 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 형질전환 세포 또는 형질전환 동물을 제공한다. 본 발명의 벡터를 이용하면 녹색형광단백질의 발현을 통해 세포나 동물이 상기 재조합 벡터로 형질전환되었음을 일차적으로 확인하고, 상기 형질전환된 세포나 동물에서 Cre 단백질의 발현을 유도하여 녹색형광단백질의 발현이 중지되면 목적 유전자가 발현되었음을 이차적으로 확인할 수 있다. 따라서 하나의 리포터 유전자를 이용하면서도 형질전환 여부를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 목적 유전자의 발현 여부를 계속적으로 모니터링할 수 있으므로 형질전환 동물의 제작에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**심영준**

경기도 의정부시 호원동 현대아이파크 206동 502호

**박인선**

경기도 하남시 하사창동 317-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-0401034031

부처명 농림부

연구사업명 바이오그린21

연구과제명 복제 돼지의 생산 성공률 제고를 위한 복제수정란 생산 및 이식(진동일)

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2007년 04월 01일 ~ 2007년 12월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널을 포함하는 재조합 벡터.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터가 서열번호 1의 염기서열(7161bp)을 갖는 재조합 벡터.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터의 다중클로닝부위에 목적 유전자가 클로닝되어 있는 재조합 벡터.

### 청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포.

### 청구항 5

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 동물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 형질전환된 동물이 마우스, 랫트, 토끼, 닭, 돼지 또는 소인 동물.

### 청구항 7

제3항의 재조합 벡터로 세포를 형질전환시키고;

상기 세포에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고;

상기 형질전환된 세포에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고;

Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광 발현이 변화하는 세포를 선별하는 것을 포함하는

녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 세포를 제조하는 방법.

### 청구항 8

제3항의 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고;

상기 동물에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고;

상기 형질전환된 동물에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고;

Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광 발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는

녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법.

### 청구항 9

제3항의 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고;

상기 동물에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고;

상기 형질전환된 동물에서 조직특이적으로 Cre 단백질의 발현을 유도하고;

Cre 단백질의 발현에 의해 조직특이적으로 녹색형광 발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는

녹색형광 발현의 변화에 의해 조직특이적인 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법.

### 청구항 10

도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터를 EcoRI 제한효소로 절단하고,

절단된 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임 및 전사 종결 시그널을 도입하는 것을 포함하는 제1항의 재조합 벡터의 제조 방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

- <1> 본 발명은 형질 전환 여부 및 목적 유전자의 발현 여부를 확인할 수 있도록 해 주는 녹색형광 리포터 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 그의 제조방법, 상기 재조합 벡터를 이용한 형질전환 세포 또는 동물, 및 상기 재조합 벡터를 이용하여 형질전환 세포 또는 동물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- <2> 종래의 단백질 과발현 시스템은 과발현 벡터가 숙주 계능 상에 무작위적 침입(random integration)에 의해 들어갈 발현되는 방법을 이용하였다. 무작위적 침입에 의한 단백질 과발현 시스템의 경우, 과발현되는 단백질의 발현은 처음 제작시에 고안된 프로모터에 의해서만 조절을 받게된다. 따라서 발현의 시기와 발현의 위치는 동물이 만들어지면서 고정될 수 밖에 없었고 이를 바탕으로 보다 심도있는 접근이 용이하지 않았다. 그러므로 이러한 방법을 이용하여 단백질 과발현 동물 모델을 제작할 경우 원하는 형질을 갖는 형질전환 동물을 수득하기 어려웠다.
- <3> 1997년 Philippe Soriano(PNAS, 90: 3789-3794, 1997)에 의해 ROSA26좌(ROSA 26 locus)에 위치한 유전자는 언제 어디서든 발현됨이 밝혀졌다. 그로부터, 유전자의 녹인(knock-in) 부위로서 ROSA26좌를 이용하여 단백질을 과발현시키는 시스템이 개발되었고 이를 바탕으로 한 연구가 활발하게 계속되고 있다.
- <4> 그러나 종래에 개발되었던 단백질 과발현 시스템에서는 형질전환 여부를 확인하기 위하여 PCR(polymerase chain reaction)이나 써던블롯(Southern blot)과 같은 유전자형(Genotyping) 검사를 하여야 하며, 목적 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해서는 면역염색(immunohistochemistry)이나 웨스턴블롯(Western blot)과 같은 방법을 이용하여 목적 유전자의 단백질 발현을 체크하여야 한다. 형질전환여부를 확인하기 위한 유전자검사의 필요성은 처음 형질전환된 배아줄기세포(embryonic stem cells)를 확인하는 작업에서부터 형질전환된 동물을 얻기 위한 교배에서 나오는 모든 산자들에게 수행되어야 함으로 매우 번거롭고 많은 시간과 노력 및 비용이 요구된다.
- <5> CRE-LOX 시스템을 이용하는 경우 목적 유전자의 발현은 목적 유전자가 형질전환된 동물과 cre 단백질을 발현하는 동물과의 교잡을 통해서 얻어질 수 있다. cre 단백질은 특정 프로모터(promoter)에 의해 조절을 받는데, 이 프로모터의 조절능력에 대해 모든 것을 다 알 수는 없다는 단점이 있다. 다시 말해, 특정 프로모터를 이용한 cre 리포터 동물을 사용할 수는 있지만 cre 단백질이 체내에서 발현되는 부위를 정확 및 적확하게 다 알 수는 없다는 것이다. 이는 목적 유전자의 발현을 정밀하게 추적하기 어렵다는 한계가 있다.

#### 발명의 내용

##### 해결하고자 하는 과제

- <6> 형질전환 여부와 목적 유전자의 발현 여부를 쉽게 모니터링 할 수 있는 기술의 개발이 요구된다.

##### 과제 해결수단

- <7> 본 발명은 형질전환 여부와 목적 유전자의 발현 여부를 녹색형광단백질의 발현 유무로 판단할 수 있도록 하는, 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널을 포함하는 재조합 벡터 및 그의 제조방법을 제공한다.
- <8> 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 동물을 제공한다.
- <9> 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 세포를 형질전환시키고; 상기 세포에서 녹색형광발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 세포에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광발현이 변화하는 세포를 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

<10> 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고; 상기 동물에서 녹색형광발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 동물에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법을 제공한다.

<11> 또한 본 발명은 상기 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고; 상기 동물에서 녹색형광발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 동물에서 조직특이적으로 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 조직특이적으로 녹색형광발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 조직특이적인 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법을 제공한다.

## 효 과

<12> 본 발명의 벡터를 이용하면 녹색형광단백질의 발현을 통해 세포나 동물이 상기 재조합 벡터로 형질전환되었음을 일차적으로 확인할 수 있고, 상기 형질전환된 세포나 동물에서 Cre 단백질의 발현을 유도하여 녹색형광단백질의 발현이 중지되면 목적 유전자가 발현되었음을 이차적으로 확인할 수 있다. 따라서 하나의 리포터 유전자의 발현 유무에 따라 형질전환 여부뿐만 아니라 목적 유전자의 발현 여부를 계속적으로 모니터링할 수 있으므로 형질전환 동물 모델의 제작에 유용하게 사용될 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<13> 본 발명은 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널을 포함하는 재조합 벡터 및 pBigT 벡터를 EcoRI 제한효소로 절단하고, 절단된 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임 및 전사 종결 시그널을 도입하는 것을 포함하는 상기 재조합 벡터의 제조 방법을 제공한다.

<14> 본 발명에서는 하나의 리포터 유전자를 이용하여 형질전환 여부와 목적 유전자의 발현 여부를 판단할 수 있도록 해 주는 재조합 벡터를 개시한다.

<15> "리포터(reporter) 유전자" 라 함은 형질전환된 생명체에서 그들의 표현형이 분석되는 유전자를 말한다. 리포터 유전자를 이용하면 일반적으로 타겟팅 지역의 유전자 삭제 또는 도입 여부, 즉 유전자 녹아웃(knock-out)이나 녹인(knock-in) 분석을 수행할 수 있게 된다. "녹아웃(knock-out)" 이라 함은 염기서열 중 특정 유전자가 발현될 수 없도록 이를 변형 또는 제거하는 것을 의미하며, "녹인(knock-in)"이란 숙주의 게놈상에 특정 외래 유전자가 발현될 수 있도록 도입되는 것을 의미한다. 본 발명에서는 하나의 리포터 유전자로 녹인 분석뿐만 아니라 목적 유전자가 발현되고 있는지를 실시간으로 모니터링할 수 있도록 구성된 재조합 벡터를 제공한다.

<16> 이러한 본 발명의 재조합 벡터의 제작에는 pBigT 벡터가 이용된다.

<17> pBigT 벡터는 "Srinivas, S., Watanabe, T. et al, BMC Developmental Biology(2001) 1:4"에 개시된 ROSA26좌(ROSA26 locus)를 타겟팅하는 벡터이다.

<18> ROSA26좌를 이용하여 녹인된 유전자는 ROSA26좌에 있는 프로모터가 항상적으로 발현되는 특성에 따라 거의 모든 조직에서 발현되는 특성을 나타낸다. 따라서 재조합 벡터를 이용하여 ROSA26좌에 임의의 유전자를 녹인시킬 경우 상기 녹인된 유전자는 개체의 대부분의 조직 내에서 항상 발현되게 된다. pBigT 벡터는 이러한 ROSA26좌에 유전자를 녹인시키고자 할 때 목적 유전자를 효과적으로 클로닝하기 위해 고안된 벡터이다.

<19> Cre 단백질은 염기 서열 내에 존재하는 두 개의 loxP 부위를 인식하여 이들을 절단하고 절단된 양 말단을 연결해 주는 단백질이다. loxP 부위 사이에 종결 서열을 위치시키고 loxP의 하류에 발현시키고자 하는 유전자를 위치시키면 Cre 단백질의 발현 여부에 따라 발현시키고자 하는 유전자의 발현이 조절되게 되므로, pBigT 벡터는 이러한 원리를 이용하여 loxP 부위 사이에 종결 서열을 위치시키고 loxP의 하류에 리포터 유전자를 위치시켜 Cre 유전자의 발현을 모니터링할 수 있도록 구성되었다.

<20> 이러한 pBigT 벡터의 구성은 도 1의 개열지도로서 설명할 수 있다.

<21> 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, pBigT 벡터는 아데노바이러스 스플라이스 엑셉터(adenovirus splice acceptor, SA), 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열(bovine growth hormone poladenylation sequence, BGH polyA), loxP로 둘러싸인 PGK-neoPGK-polyA 카세트(loxP-flanked PGK-neoPGK-polyA cassette) 및 SV40 폴리아데닐화 서열의 삼량체(trimer of the SV40 polyadenylation sequence, tpA)를 포함한다. 아데노바이러스 스플

라이스 억셉터는 ROSA26좌 프로모터에 의해 발현된 트랜스크립트(transcript)가 트랜슬레이션(translation) 될 때 스플라이싱(splicing)을 도와주기 위한 것이며, 소 성장 호르몬 폴리아데닐화서열은 목적 유전자의 mRNA 발현시 이의 안정성을 도와주기 위한 것이다. PGK-neoPGK-polyA는 형질전환체를 감별해 내기 위한 양성선택마커(postivie selection marker)로 사용되었으며 SV40 폴리아데닐화 서열의 삼량체는 ROSA26좌의 프로모터에 의한 발현조절을 loxP 내에서 종결되도록 고안된 종결시그널(stop signal)이다.

- <22> pBigT 벡터에는 loxP 부위와 BGH polyA 사이에 다중클로닝부위가 존재하여 상기 다중클로닝부위에 목적 유전자를 삽입할 수 있도록 구성되어 있다.
- <23> pBigT 벡터에 의해 ROSA26좌에 삽입되었음에도 불구하고 목적유전자는 그의 상류(upstream)에 위치한 전사종결 부위인 tpA의 존재로 인해 발현되지 못한다. 그러나 Cre 단백질의 발현이 유도되면 loxP로 둘러싸인 PGK-neoPGK-polyA 카세트가 절단되어 나가면서 목적 유전자가 발현하게 된다.
- <24> 본 발명에서는 이러한 pBigT 벡터의 구성을 보완하여 녹색형광단백질을 loxP 안에 삽입하였으며 이를 통해, 형질전환 여부와 목적 유전자의 발현 여부를 판단할 수 있도록 해 주는 재조합 벡터를 제작한다.
- <25> 본 발명의 재조합 벡터는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널이 클로닝 되어 있다.
- <26> 여기에서, "EcoRI 부위" 라 함은 EcoRI 제한효소에 의해 자를 수 있는 염기서열 부위를 말한다. "ORF(Open Reading Frame)" 이라 함은 코딩서열(coding sequence, CDS)을 나타내는 것으로 단백질 합성에서 주형(template)이 되는 부분을 말한다. "전사 종결 시그널"이라 함은 전사를 종결시켜 줄 수 있는 염기 서열을 갖는 부위를 말한다. 본 발명에 있어서 녹색형광단백질 또는 전사 종결 시그널은 당업계에 공지된 것이면 어떠한 것이든 이용가능하다.
- <27> 본 발명의 재조합 벡터에서, 리포터 유전자로서 삽입되는 녹색형광단백질 유전자의 오픈리딩프레임과 전사 종결 시그널은 다중클로닝부위가 아닌 두 개의 loxP 부위 안쪽에 ROSA26좌 프로모터에 가장 가까이 위치한 EcoRI 부위에 삽입되어 있다. 따라서 상기 재조합 벡터가 ROSA26좌에 타겟팅되면 Cre 단백질의 발현이 유도되지 않은 상태에서는 녹색형광 단백질은 ROSA26좌의 프로모터에 의해 조절받게 된다.
- <28> 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 상기 벡터를 통해 ROSA26좌에 녹인(knock-in)시키고자 하는 목적 유전자를 다중클로닝부위에 클로닝할 수 있도록 구성되어 있다.
- <29> 본 발명의 재조합 벡터에 의해 세포나 동물이 형질전환된 경우, Cre 단백질의 유도 전에는 녹색형광단백질은 ROSA26좌의 프로모터에 의해 조절된다. ROSA26좌의 프로모터는 거의 모든 조직에서 발현하므로 녹색형광단백질도 대부분의 조직에서 발현되나, 목적 유전자는 형광유전자와 함께 클로닝된 전사 종결 시그널에 의해 발현될 수 없다. 따라서, Cre 단백질의 유도 전에는 형광단백질의 발현을 조사함으로써 형질전환이 성공적으로 수행되었음을 일차적으로 확인할 수 있게 된다. 반면, Cre 단백질의 발현이 유도된 후에는 Cre 단백질에 의해 두 개의 loxP 부위 사이에 있는 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사 종결 시그널을 포함한 모든 부분이 절단되며, 이로써 목적 유전자가 발현될 수 있게 된다. Cre 단백질이 발현됨에 따라 녹색형광단백질이 발현되는 것으로 조사되었던 세포나 동물의 조직에서 녹색형광단백질의 발현은 중지되며, 이와 동시에 목적 유전자의 발현이 개시된다. 그러므로 Cre 단백질의 유도 후에는 녹색형광단백질의 발현 변화를 조사함으로써 Cre 단백질의 활성을 모니터링할 수 있을 뿐만 아니라, 목적 유전자의 발현 여부를 가시적으로 확인할 수 있게 된다.
- <30> 본 발명의 한 구체예에서, 상기 녹색형광단백질은 phrGFPⅡ이나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <31> 본 발명의 한 구체예에서, 상기 전사 종결 시그널은 이에 제한되는 것은 아니나, BGH polyA일 수 있다.
- <32> 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 벡터는 리포터 유전자로서 녹색형광단백질 phrGFPⅡ를 포함하고, 전사 종결 시그널로서 BGH polyA를 포함하는 서열번호 1의 염기서열(7161bp)을 가질 수 있다.
- <33> 본 발명의 한 구체예에서, 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임과 전사 종결 시그널을 포함하는 재조합 벡터는 그의 다중클로닝 부위에 목적 유전자가 클로닝되어 있을 수 있다.
- <34> 본 발명에 있어서, 목적 유전자는 숙주 세포의 게놈에 녹인시키고자 하는 임의의 유전자일 수 있다. 녹인시키고자 하는 목적에 따라 상기 목적 유전자의 종류는 달라질 수 있다. 예컨대, 질병과 관련된 유전자, 치료에 유용될 수 있는 유전자 및 과발현에 의해 유전자의 기능을 연구하고자 하는 유전자 등을 목적 유전자로서 사용할



수 있을 것이다. 예를 들어, 목적 유전자로서 발암 유전자를 이용할 경우 Cre 단백질의 발현을 조절함으로써 발암 유전자의 발현을 제어할 수 있으며, 녹색형광단백질의 발현 유무에 의해 발암 유전자의 발현 여부를 가시적으로 확인할 수 있게 된다.

- <35> 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 상기 목적 유전자로서 클러스터린(clusterin) 유전자가 사용되었다. 클러스터린은 생체 내의 여러 퇴행성 질환, 조직 손상 또는 세포의 자연사 유발시에 증가된다는 사실이 밝혀져 암 또는 퇴행성 질환의 유전자 치료를 위한 표적 유전자로서 주목받고 있는 유전자이다. 따라서 클러스터린을 억제시킨 마우스는 암 또는 퇴행성 질환의 치료제 개발을 위한 동물 모델로서 사용할 수 있다. 본 발명의 벡터를 이용하여 클러스터린을 억제시킨 마우스의 경우 형질전환이 제대로 수행되었는지는 녹색형광 발현으로 확인할 수 있다. 또한, 녹색형광 발현이 일어난 마우스를 선별하여 예컨대, 간 특이적으로 Cre 단백질의 발현을 유도하면 간에서만 클러스터린이 발현되면서 동시에 간에서만 형광 발현이 중지되게 되어, 클러스터린의 발현 조절을 녹색형광단백질의 발현을 통해 확인할 수 있게 된다. 기존의 동물모델로는 형질전환 여부 또는 목적 유전자의 발현 여부를 동물 모델의 표현형을 통해 확인하기 어려웠으며, 특히, Cre 단백질의 발현 여부에 따른 목적 유전자의 발현 변화를 가시적으로 확인할 수 없었다. 그러나 본 발명에 따르면 Cre 단백질의 발현을 조절함으로써 이에 따른 목적 유전자의 발현이 제어되는 것을 시각적으로 확인할 수 있게 된다.
- <36> 본 발명은 또한 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임과 전사 종결 시그널을 포함하고 그의 다중 클로닝 부위에 목적 유전자가 클로닝 되어 있는 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- <37> 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포는 형질전환의 성공 여부를 녹색형광단백질을 이용하여 가시적으로 쉽게 확인할 수 있으며, Cre 단백질의 발현 조절을 통해 목적 유전자의 발현 여부를 쉽게 확인할 수 있다.
- <38> 상기 형질전환되는 세포는 어떠한 것이든 관계없다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 세포는 수정란 또는 배아 줄기세포일 수 있다.
- <39> 본 발명은 또한 도 1의 개열지도를 갖는 pBigT 벡터의 EcoRI 부위에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임과 전사 종결 시그널을 포함하고 그의 다중 클로닝 부위에 목적 유전자가 클로닝 되어 있는 재조합 벡터로 형질전환된 인간을 제외한 동물을 제공한다. 형질전환 여부와 목적 유전자의 발현 여부를 녹색형광단백질의 발현이라는 표현형을 통해 가시화해 주는 형질전환 동물은 동물모델로서 매우 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 형질전환 동물의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니나, 마우스, 랫트, 토끼, 닭, 돼지 및 소 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 형질전환 동물은 마우스일 수 있다.
- <40> 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 세포를 형질전환시키고; 상기 세포에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 세포에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 형광 발현이 변화하는 세포를 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- <41> 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 세포는 녹색형광을 발현하게 되고, 형질전환된 세포에서 Cre 단백질의 발현이 유도되면, Cre 단백질이 두 곳의 loxP 부위를 잘라 그 사이에 존재하던 녹색형광단백질 리포터 유전자 영역과 전사 종결 시그널을 삭제하게 되어 녹색형광 발현이 중지되는 동시에 목적 유전자의 발현이 개시되게 된다. 따라서 Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광 발현이 변화하는 세포는 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현을 판별할 수 있는 세포로서 이용할 수 있게 된다.
- <42> 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고; 상기 동물에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 동물에서 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광 발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법을 제공한다.
- <43> 위와 동일한 원리로 Cre 단백질의 발현에 의해 녹색형광 발현이 변화하는 동물은 녹색형광 발현의 변화에 의해 목적 유전자의 발현을 판별할 수 있는 동물 모델로서 이용할 수 있게 된다.
- <44> 본 발명의 형질전환 동물에서 Cre 단백질은 언제 어디서나 발현되도록 설정하거나 조직특이적 또는 약물특이적으로 발현하도록 설정할 수 있다.
- <45> 예를 들어, Cre 단백질의 발현을 개시할 수 있는 프로모터로서 조직특이적으로 작동되는 프로모터를 사용한 경우 Cre 단백질은 형질전환 동물의 특정 조직에서만 발현되게 된다. 그 결과, Cre 단백질이 발현된 특정 조직에

서만 loxP 부위가 절단되어 리포터 유전자인 녹색형광유전자가 잘려나가고, 목적 유전자의 발현이 개시되게 된다. 이를 통해 목적 유전자가 조직특이적으로 발현되어 있음을 가시적으로 확인할 수 있는 동물 모델을 얻을 수 있게 된다.

<46> 따라서 본 발명은 상기 재조합 벡터로 동물을 형질전환시키고; 상기 동물에서 녹색형광 발현을 조사하여 형질전환 여부를 확인하고; 상기 형질전환된 동물에서 조직특이적으로 Cre 단백질의 발현을 유도하고; Cre 단백질의 발현에 의해 조직특이적으로 녹색형광 발현이 변화하는 동물을 선별하는 것을 포함하는 녹색형광 발현의 변화에 의해 조직특이적인 목적 유전자의 발현 여부를 판별할 수 있는 동물을 제조하는 방법을 제공한다.

<47> 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

## 실시예

<48> **실시예 1: pBigT-GFP 벡터의 제작**

<49> phrGFP II-C 벡터(Stratagene, Cat. number: 240144)로부터 GFP의 ORF와 전사종결시그널을 얻기 위해 하기 표 1에서 보는 바와 같이 GFP-RI-S와 GFP-RI-AS 프라이머를 고안하였다. 이 프라이머들은 양쪽 말단에 EcoRI 제한효소가 인식하는 염기서열을 도입하여 PCR 산물이 EcoRI 제한효소에 의해 절단될 수 있도록 제작되었으며 이를 통해 pBigT 벡터의 EcoRI 제한효소 부위에 클로닝 할 수 있게 하였다. GFP-RI-S 프라이머는 EcoRI 제한효소가 인식하는 염기서열 바로 뒤에 3가지 조합의 종결코돈(stop codon)이 포함되어 있다. 이는 loxP 안에 존재하는 시작코돈(start codon; ATG)에 의해 생길 수 있는 mRNA의 번역(translation)을 목적 유전자의 시작코돈이 개시되기 전에 종결시키기 위하여 고안된 것이다. 구체적으로, GFP-RI-S와 GFP-RI-AS 프라이머를 이용하여 표 1에 나타난 바와 같이 PCR 증폭을 하였으며 증폭된 산물을 EcoRI 제한효소(NEB, Cat. Number: R0101S)로 절단하였다.

<50> [표 1]

EcoRI이 양쪽 말단에 포함된 GFP의 ORF 증폭			
프라이머	서열번호 2(GFP-RI-S): 5'-CACGAATCTCTAGTGAATTGACATGGTGAGCAAGCAGATC-3'		
	서열번호 3(GFP-RI-AS): 5'-CTCGAATTCGCTTACAATTACGCGCGCC-3'		
	밑줄 부분이 EcoRI 제한효소가 인식하는 염기서열이다		
PCR 을 위 한 합성 반 응액	5μl 10×reaction buffer	PCR 조 건	사이클 1: 95℃, 30초 사이클 17: 95℃, 30초/ 55℃, 1분/ 68℃, 5분 사이클 1: 4℃, 2분
	1μl phrGFP II-C 벡터(50ng)		
	1μl GFP-RI-S primer(10pmole)		
	1μl GFP-RI-AS primer(10pmole)		
	1μl dNTP mix		
	41μl ddH <sub>2</sub> O		
	1μl PfuTurbo DNA polymerase(2.5 U/μl)		

<52> Dr. Frank Costantini로 얻은 pBigT 벡터를 EcoRI 제한효소로 절단하고 역시 EcoRI 제한효소로 절단된 PCR 증폭물과 T4 DNA ligase (NEB, Cat. Number:M0202S)로 ligation 하였다. Ligates는 Top10 컴피턴트 세포(competent cell; Invitrogen, Cat. Number: C4040-03)에 형질전환하였다. 생성된 콜로니 중에서 EcoRI으로 절단되어 PCR로 증폭된 산물이 나오는 것을 선별하였고 염기서열분석을 통해 최종적으로 확인하고, "pBigT-GFP 벡터"라고 명명하였다. 도 2는 pBigT-GFP 벡터의 개열지도를 보여준다.

<53> **실시예 2: pBigT-GFP 벡터를 이용한 목적 유전자 녹인벡터 제작**

<54> 실시예 1에서 완성된 pBigT-GFP 벡터를 이용하여 클러스터린을 목적 유전자로 하는 녹인벡터를 다중클로닝 부위에 넣어 제작하였다. 클러스터린 개시코돈 앞에 효과적인 번역을 위해 Kozak 서열(TGTGAC)을 넣었으며, loxP에 존재하는 2개의 개시코돈이 작동되는 경우의 수를 생각하여 다중클로닝 염기서열에서의 리딩 프레임(reading



frame)은 도 3과 같이 조정하였다. 도 3은 클러스터린을 포함한 모든 목적 유전자를 다중클로닝사이트에 클로닝 할 때 고려해야 할 리딩 프레임을 나타낸 것이다.

<55> 구체적으로, 표 2에 기재한 바와 같이 클러스터린 ORF를 PCR로 증폭하기 위하여 각각 *Sa*II과 *Not*I 제한효소가 첨가된 Clusterin-*Sa*II과 Clusterin-*Not*I 프라이머를 고안하였으며, pBigT-GFP의 다중클로닝 부위의 *Sa*II/*Not*I 절단부위에 클로닝을 할 수 있도록 하였다.

<56> [표 2]

<57>

클러스터린 ORF의 PCR 증폭			
프라이머	서열번호 4(Clusterin- <i>Sa</i> II): 5'-TGACGCGTCGACTGTGACATGAAGATTCTCCTG-3'		
	서열번호 5(Clusterin- <i>Not</i> I): 5'-AAGGAAGAAAGCGGCCGCTCATTCCGCACGGCTT-3		
	밑줄 부분이 각각 <i>Sa</i> II과 <i>Not</i> I이 인식하는 염기서열이다		
PCR 을 위 한 합성 반 응액	5μl 10×reaction buffer	PCR 조 건	사이클 1: 95℃, 30초 사이클 17: 95℃, 30초/ 55℃, 1분/ 68℃, 5분 사이클 1: 4℃, 2분
	1μl Clusterin 벡터(50ng)		
	1μl Clusterin- <i>Sa</i> II primer(10pmole)		
	1μl Clusterin- <i>Not</i> I primer(10pmole)		
	1μl dNTP mix		
	41μl ddH <sub>2</sub> O		
	1μl <i>Pfu</i> Turbo DNA polymerase(2.5 U/μl)		

<58> PCR 증폭물과 pBigT-GFP 벡터를 *Sa*II/*Not*I 제한효소(NEB, Cat. Number: R0138S/R0189S)로 절단한 후 T4 DNA ligase (NEB, Cat. Number:M0202S)로 ligation 하였다. Ligates는 Top10 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환하였다. 생성된 콜로니 중에서 *Sa*II/*Not*I 으로 절단되어 PCR로 증폭된 산물이 나오는 것을 선별하였고 염기서열분석을 통해 최종적으로 확인하고, "pBigT-GFP-Clusterin 벡터"라고 명명하였다.

<59> pBigT-GFP-Clusterin 벡터를 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 *Pac*I/*Asc*I 이중 제한효소로 절단하고, Dr. Frank Costantini로부터 얻은 pROSA26PA 벡터 역시 *Pac*I/*Asc*I (NEB, Cat. Number: R0547S/R0558S) 이중 제한효소로 절단한 후 T4 DNA ligase (NEB, Cat. Number:M0202S)로 ligation 하였다. Ligates는 Top10 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환하였다. 생성된 콜로니 중에서 *Pac*I/*Asc*I 으로 절단하여 약 5kb 절편이 나오는 것을 선별하였고 염기서열분석을 통해 최종적으로 확인하고, "pROSA26PA-Clusterin 벡터"라고 명명하였다.

### <60> 실시예 3: 형질전환 세포의 제작

<61> 실시예 2에서 제작된 pROSA26PA-Clusterin 벡터는 R1 생쥐 배아줄기세포 (Heiner Westphal 박사로부터 기증받음)에 도입하여 동종 재조합을 유도하였다. 일반적으로 이용되는 생쥐 배아줄기세포의 배양조건에서 동종재조합을 유도하였으며 양성선택마커(positive selection marker)로 사용된 Neomycin에 대해서 G418 350 ug/ml의 농도로 배양하였다. 배양 8일째 되는 날 형광현미경으로 녹색형광단백질의 발현을 확인하였으며 총 52개의 녹색형광단백질이 발현하는 배아줄기세포 콜로니와 10개의 녹색형광단백질 음성 콜로니(negative colony)를 24-well 조직 배양 플레이트(tissue culture plate)에 배양하였다. 이중 42개의 녹색형광단백질 양성 세포와 2개의 녹색형광단백질 음성 세포가 잘 배양되었고 그 중 5개의 배아줄기세포들 (12번, 22번, 32번, 39번, 40번)이 배아줄기세포의 상태나 녹색형광단백질의 발현이 제일 양호하였다. 44개의 모든 세포들은 각각 냉동처리하여 보관하였으며 각각에 대해 genomic DNA를 준비하여 유전자형 검사를 하였다. 녹색형광단백질을 발현하는 양성 콜로니와 음성 콜로니에 대해 PCR을 이용한 유전자형 검사를 실시하였다. 유전자형 검사는 ROSA26좌를 처음 개발하였던 Philippe Soriano 실험실의 homepage [http://www.fhcrc.org/science/labs/soriano/rosa\_26.html] 에서 제시한 대로 수행하였다. 도 5는 PCR을 이용하여 녹색 형광의 발현 여부에 따른 유전자형을 도시한 것이다. 큰 밴드는 야생형(wild type)을 의미하는 것이고 작은 밴드는 ROSA26좌에 pBigT-GFP 벡터의 *Pac*I/*Asc*I 부분이 들어갔음을 나타내는 것으로서, GFP 음성 클론에서는 야생형의 큰 밴드만 나타나고 GFP 양성 클론에서는 야생형의 큰 밴드와 더불어 작은 밴드로 함께 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 도 6은 GFP 양성 배아줄기세포를 보여주는 사진이다. 컨포컬 현미경 (confocal microscope)을 이용하여 20배로 관찰한 것으로서, 첫번째 패널은 녹색형광 필터로 본 것이고 위에 두번째 패널은 실물사진을 본 것이며, 아래 첫번째 패널은 위의 두 사진을 합쳐 놓은 것으로서 모든 클론에서 녹색형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있다.

<62> 실시예 4: Cre 단백질의 발현 유도 및 형광단백질의 발현 변화 확인

<63> 녹색형광단백질 양성 콜로니 22번, 39번, 40번 배아줄기세포에서 cre 단백질의 발현을 유도한 이후 녹색형광단백질의 발현이 없어지는 배아줄기세포를 선별해 내었고, 이들 배아줄기세포에서 목적단백질인 클러스터린이 과발현하는 것을 확인하였다. 도 7에서 보는 바와 같이 형성된 콜로니 중에서 형광현미경을 이용하여 녹색형광단백질이 없어진 콜로니를 확인할 수 있었으며 22번에서 4개, 39번에서 6개의 콜로니, 그리고 대조군으로서 녹색형광단백질 양성 콜로니 3개를 가려내어 24-웰 조직 배양 플레이트에 배양하였다. 도 8에서 보는 바와같이 생쥐배아줄기세포로 사용한 R1 세포주나 feeder로서 사용한 생쥐섬유아세포(mouse embryonic fibroblast: MEF), 그리고 녹색형광단백질 양성 배아줄기세포에서는 목적단백질인 클러스터린의 발현이 아주 적은 것을 확인할 수 있었다. 반면에, Cre 단백질의 발현에 의해서 녹색형광단백질이 제거된 배아줄기세포에서는 (선별된 세포 중 11번, 12번) 클러스터린의 발현이 증가되어 효과적으로 과발현(over-expression) 되는 것을 최종 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 pBigT 벡터의 개열지도를 도시한 것이다.

<65> 도 2는 pBigT 벡터의 *EcoRI* 자리에 녹색형광단백질의 오픈리딩프레임(ORF) 및 전사종결시그널을 포함하여 제작된 pBigT-GFP 벡터의 개열지도를 도시한 것이다.

<66> 도 3은 목적 유전자를 다중클로닝부위에 클로닝할 때 고려해야 될 리딩 프레임을 나타낸 것이다.

<67> 도 4는 pBigT-GFP 벡터에 목적 유전자를 클로닝한 후 ROSA26PA에 클로닝하는 과정을 도시한 것이다.

<68> 도 5는 PCR을 이용하여 녹색형광의 발현여부에 따른 유전자형을 도시한 것이다.

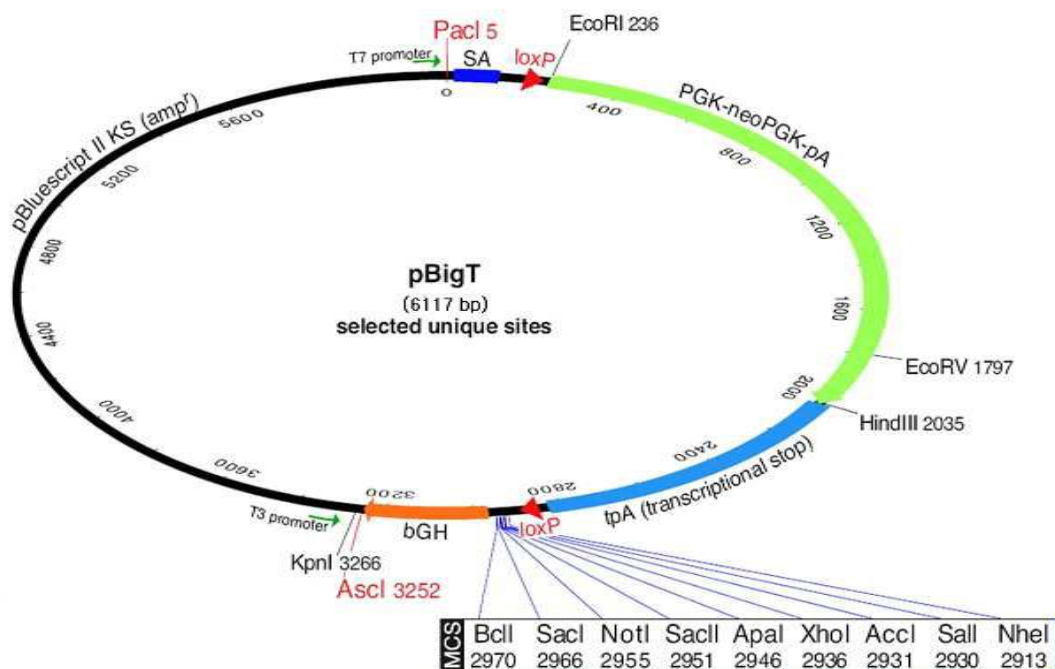
<69> 도 6은 녹색형광단백질이 발현하는 배아줄기세포를 건포컬현미경을 이용하여 찍은 사진이다.

<70> 도 7은 녹색형광단백질을 발현하는 배아줄기세포에 cre 단백질을 발현시켜 녹색형광단백질의 발현이 중지된 배아줄기세포의 사진(화살표)이다.

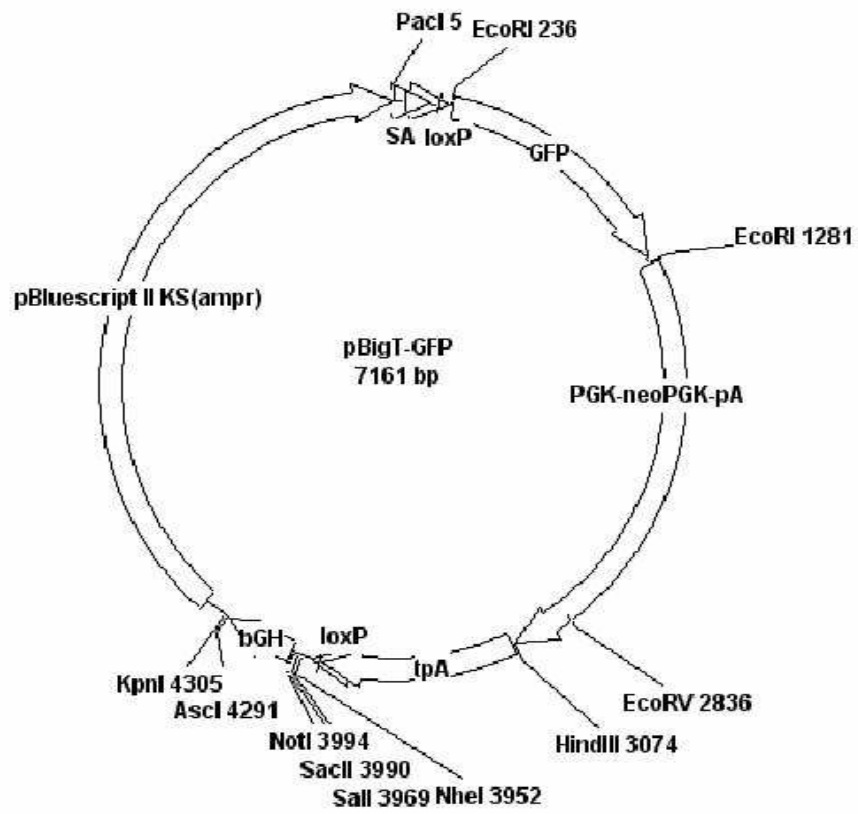
<71> 도 8은 웨스턴 블롯을 이용하여 목적 유전자인 클러스터린의 발현여부를 확인한 것이다.

도면

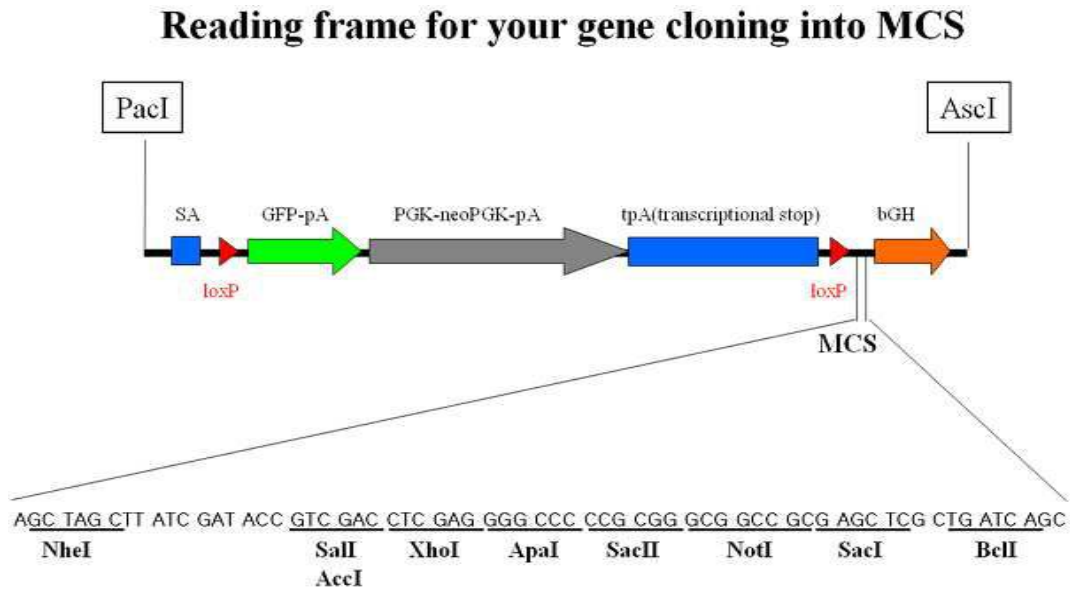
도면1



도면2



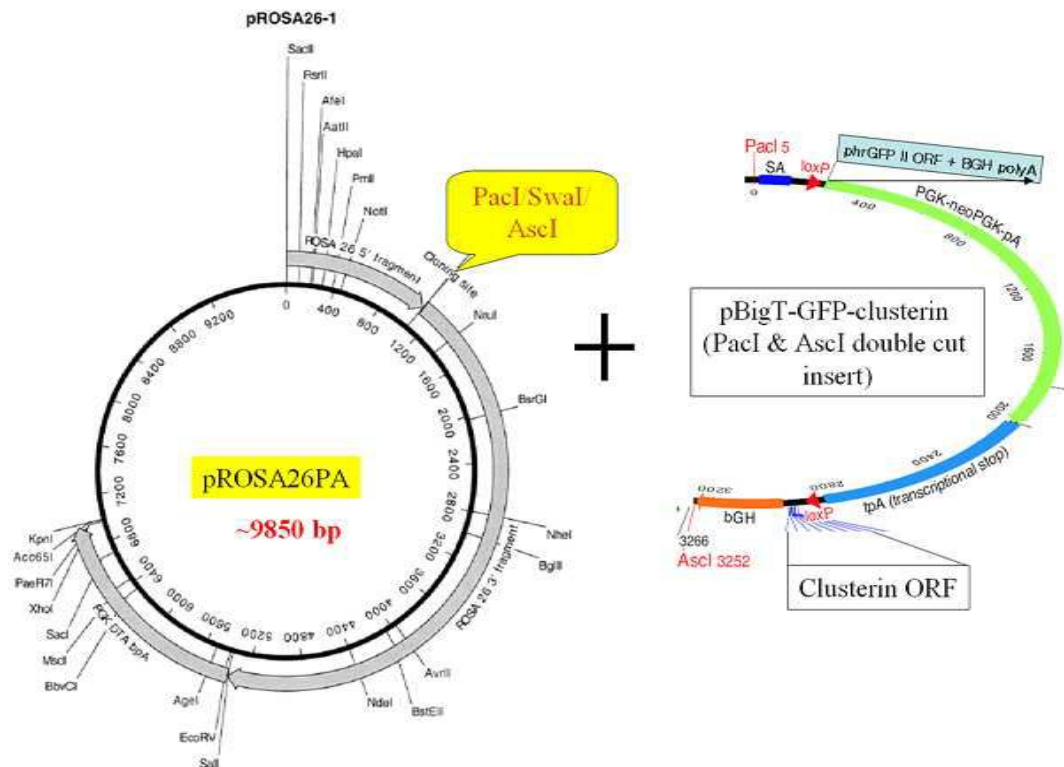
도면3



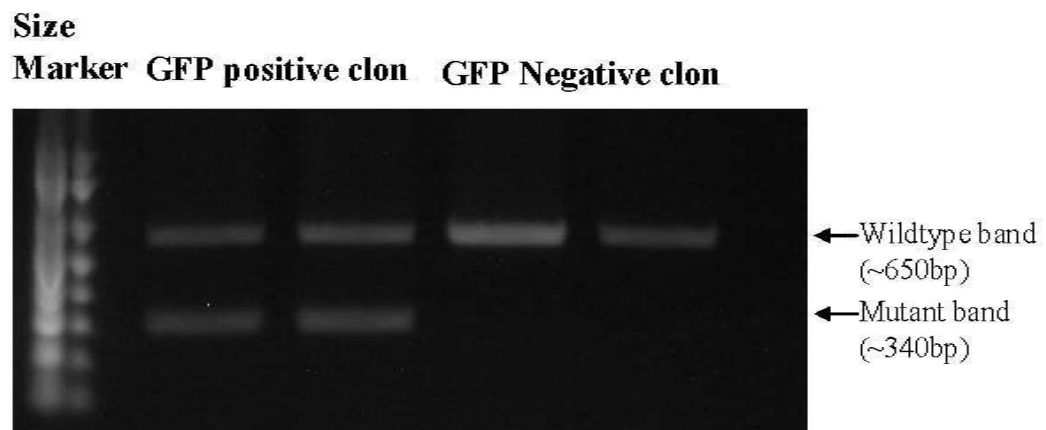
Kozak sequence + start codon of your gene: TGT GAC ATG  
Kozak sequence

loxP sequence : ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT  
possible start codon

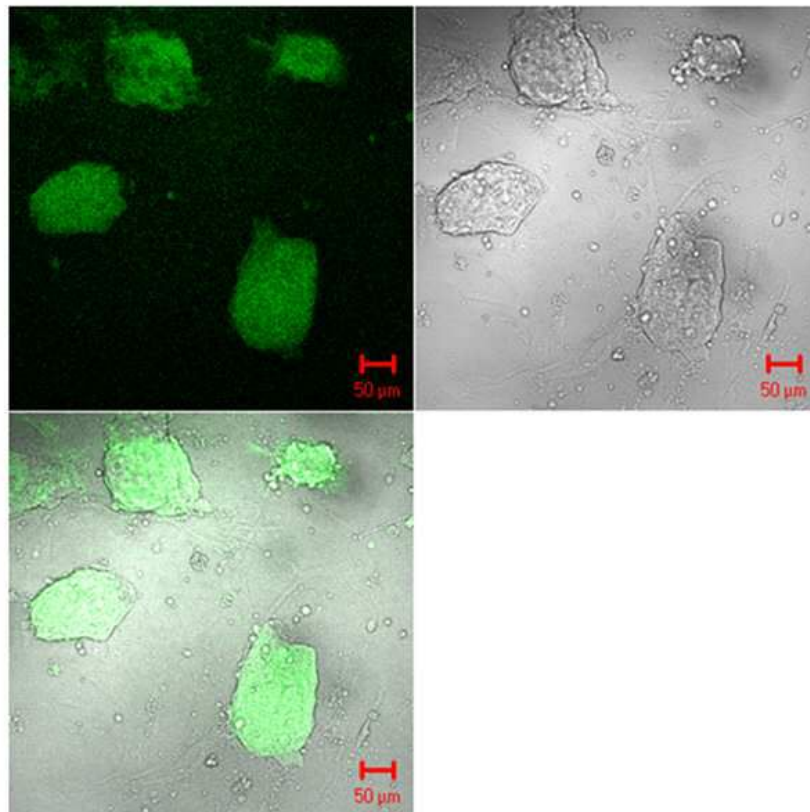
도면4



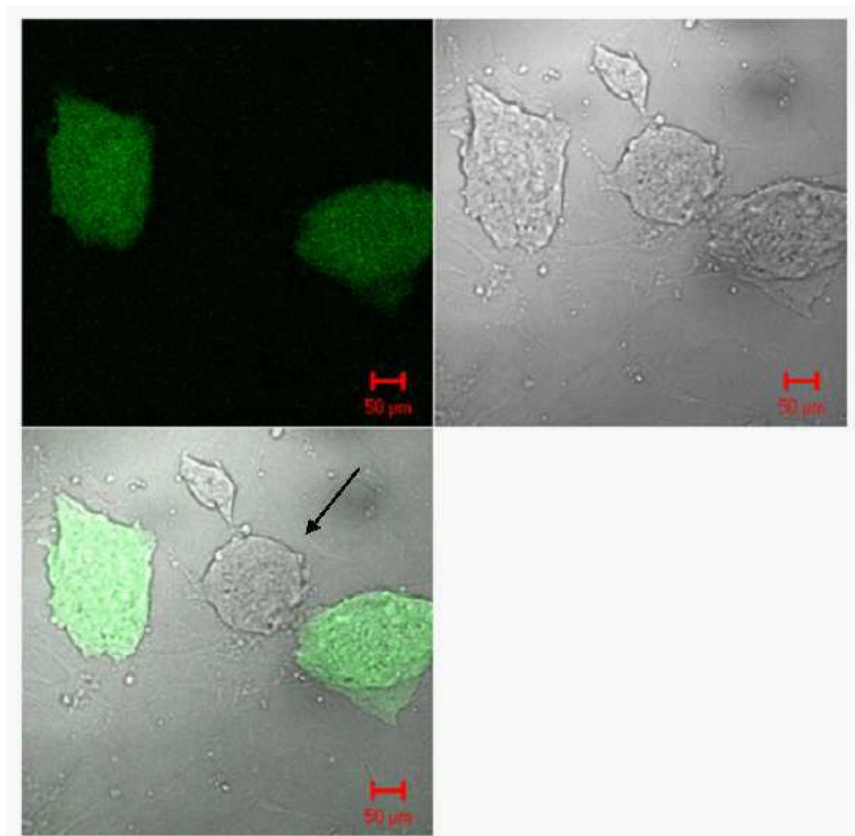
도면5



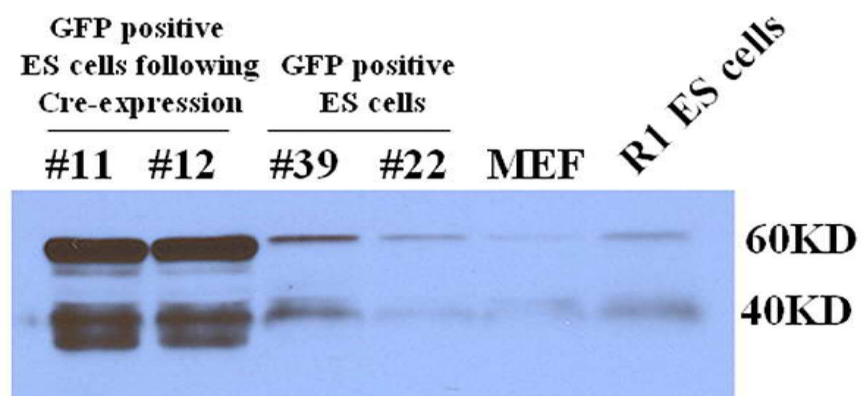
도면6



도면7



도면8



## 서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University  
 <120> Development of protein over-expression system using green  
 fluorescence protein

<130> P08138



<160> 5

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 7161

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pBigT-GFP vector sequence

<400> 1

ttaattaagg gatctgtagg gcgcagtagt ccagggtttc cttgatgatg tcatacttat 60

cctgtccctt tttttccac agctcgcggt tgaggacaaa ctcttcgcgg tctttccagt 120

ggggatcgac ggtatcgtag agtcgaggcc gctctagaac tagtggatcc ggaaccctta 180

atataacttc gtataatgta tgctatacga agttattagg tccttcgacc tgcaggaatt 240

ctagtgaatt gacatggtag gcaagcagat cctgaagaac accggcctgc aggagatcat 300

gagcttcaag gtgaacctgg agggcgtggt gaacaaccac gtgttcacca tggagggtctg 360

cggcaagggc aacatcctgt tcggcaacca gctggtgcag atccgcgtga ccaagggcgc 420

ccccctgcc ttcgccttcg acatcctgag cccgccttc cagtacggca accgcacctt 480

caccaagtac cccgaggaca tcagcgactt cttcatccag agcttccccg ccggcttcgt 540

gtacgagcgc accctgcgt acgaggacgg cggcctggtg gagatccga gcgacatcaa 600

cctgatcgag gggatgttcg tgtaccgct ggagtacaag ggccgcaact tccccaacga 660

cggccccgtg atgaagaaga ccatcaccgg cctgcagccc agcttcgagg tgggttacat 720

gaacgacggc gtgctggtgg gccaggtgat cctggtgtac cgctgaaca gcggcaagtt 780

ctacagctgc cacatgcgca ccctgatgaa gagcaagggc gtggtgaagg acttccccga	840
gtaccacttc atccagcacc gcctggagaa gacctacttg gaggacggcg gcttcgtaga	900
gcagcacgag accgccatcg ccagctgac cagcctgggc aagcccctgg gcagcctgca	960
cgagtgggtg taagctcgag catgcatcia gagggcccta ttccctttag tgagggttaa	1020
ttgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgtgtttt	1080
gcccccccc cgtgcccttc ttgacctgg aaggtgccac tctactgtc ctttcctaat	1140
aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg	1200
tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggcgccgg	1260
cgcgcgtaaa ttgtaagcgg aattctaccg gtagggggag gcgcttttcc caaggcagtc	1320
tggagcatgc gctttagcag ccccgctggc acttggcgct acacaagtgg cctctggcct	1380
cgcacacatt ccacatccac cggtagcgcc aaccggctcc gttcttttgt ggccccttcg	1440
cgccaccttc tactctctcc ctagtcagga agttcccccc cgccccgcag ctcgctcgt	1500
gcaggacgtg acaaatggaa gtagcacgtc tcactagtct cgtgcagatg gacagcaccg	1560
ctgagcaatg gaagcgggta ggcctttggg gcagcggcca atagcagctt tgctccttcg	1620
ctttctgggc tcagaggctg ggaaggggtg ggtccggggg cgggctcagg ggcgggctca	1680
ggggcggggc gggcggaag gtctctccga ggcccggcat tctgcacgc ttcaaaagcg	1740
cacgtctgcc gcgtgttct cctcttctc atctccgggc ctttcgacct gcagccaata	1800
tgggatcggc cattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga	1860
ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc	1920
ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga	1980

atgaactgca ggacgaggca ggcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg	2040
cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggccaagtgc	2100
cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg	2160
atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga	2220
aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc	2280
tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca	2340
tgcccagcgg cgatgatctc gtcgtgacc atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg	2400
tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct	2460
atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg	2520
accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gcctttctatc	2580
gcctttctga cgagtcttc tgaggggatc cgtctgaagt ctgcagaaat tgatgatcta	2640
ttaaacaata aagatgtcca ctaaaatgga agtttttctt gtcatacttt gtaagaagg	2700
gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg tgggggtggg	2760
gtgggattag ataaatgcct gctctttact gaaggctctt tactattgct ttatgataat	2820
gtttcatagt tggatatcat aatttaaaca agcaaaacca aattaagggc cagctcattc	2880
ctcccactca tgatctatag atctatagat ctctcgtggg atcattgttt ttctcttgat	2940
tcccactttg tggttctaag tactgtggtt tccaaatgtg tcagtttcat agcctgaaga	3000
acgagatcag cagcctctgt tccacataca cttcattctc agtatgttt tgccaagttc	3060
taattccatc agaagcttgc agatctgca ctctagagga tctgcgactc tagaggatca	3120

taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcattt aaaaaacctc ccacacctcc	3180
ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgattt attgcagctt	3240
ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatccac aaataaagca ttttttcac	3300
tgcattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tggatctgcg	3360
actctagagg atcataatca gccataccac attttagag gttttacttg ctttaaaaa	3420
ctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt	3480
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa	3540
agcatttttt tcaactgcatt ctagttgttg ttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca	3600
tgctcggatc tgcgactcta gaggatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta	3660
cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt	3720
gttgttgta acttgattt tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca	3780
aatttcacaa ataaagcatt ttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaacatc	3840
aatgtatctt atcatgtctg gatcccatc aagctgatcc ggaacctta atataactt	3900
gtataatgta tgctatacga agttattagg tccctcgacc tgcagcccaa gctagcttat	3960
cgataccgtc gacctcgagg ggcccccgcg ggcgcccgcg agctcgctga tcagcctcga	4020
ctgtgccttc tagttgccag ccactgttg ttgcccctc cccgtgcct tccttgacct	4080
tggaagggtc cactccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc	4140
tgagtaggtg tcattctatt ctgggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt	4200
gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgtgggctc tatggcttct gaggcggaaa	4260
gaaccagctg gggtcgatc ctctagttgg cgcgccaacg gtaccagct ttgttcct	4320

ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	4380
ttgttatccg ctcaacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	4440
gggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca	4500
gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcattt atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg	4560
tttgctatt gggcgtcttt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg	4620
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg	4680
ggataacgca gaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa	4740
ggccgcgttg ctggcgTTTT tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg	4800
acgtcaagt cagaggtagc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc	4860
tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccgat acctgtccgc	4920
ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc	4980
gggttaggtc gticgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg	5040
ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacag acttatcgcc	5100
actggcagca gccactggtt acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga	5160
gttcttgaag tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc	5220
tctgctgaag ccagttacct tcgaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac	5280
caccgtggt agcggtaggt tttttgttg caagcagcag attacgcga gaaaaaagg	5340
atctcaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gtcagtga acgaaaactc	5400
acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttacactaga tccttttaaa	5460

ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta	5520
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt	5580
tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag	5640
tgctgcaatg atacgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	5700
gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc	5760
tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt	5820
tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag	5880
ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggc	5940
tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagtig gccgcagtgt taccactcat	6000
ggttatggca gcaatgcata attctcttac tgcatgcca tccgtaagat gcttttctgt	6060
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc	6120
ttgcccgcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat	6180
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag	6240
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt	6300
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	6360
gaaatgttga atactcatc tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	6420
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc	6480
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctaa attgtaagcg ttaatatatt gttaaaattc	6540
gcgttaaatt tttgttaaat cagctcattt tttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc	6600
ccttataaat caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag	6660



agtcactat taaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc 6720

gatggccac tacgtgaacc atcacctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa 6780

gcactaaatc ggaaccctaa agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg 6840

aacgtggcga gaaaggaagg gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt 6900

glagcgtca cgctgcgct aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgc gctacagggc 6960

gcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggt gcgggcctct 7020

tcgtattac gccagctggc gaaaggggga tgtgtgcaa ggcgattaag ttgggtaacg 7080

ccagggtttt ccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgagcgcgc gtaatacgac 7140

tcactatagg gcgaattggc c 7161

<210> 2  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GFP-RI-S primer

<400> 2  
 cacgaattct agtgaattga catggtgagc aagcagatc 39

<210> 3  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GFP-RI-AS

<400> 3

ctcgaattcc gcttacaatt tacgcgcgcc

30

<210> 4  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Clusterin-SalI primer

<400> 4  
 tgacgcgtcg actgtgacat gaagattctc ctg

33

<210> 5  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Clusterin-NotI

<400> 5  
 aaggaagaaa gcggccgctc attccgcacg gctt

34