



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년07월11일
(11) 등록번호 10-1048417
(24) 등록일자 2011년07월05일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0073606
(22) 출원일자 2008년07월28일
심사청구일자 2008년07월28일
(65) 공개번호 10-2010-0012295
(43) 공개일자 2010년02월08일
(56) 선행기술조사문헌
Transgenic Res., Vol. 17, No. 5, pp. 783-791 (2008. 3. 19)*
J. Clin. Invest., Vol. 116, No. 12, pp. 3204-3210 (2006)
Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 305, No. 3, pp. 548-551 (2003)
J. Cell. Sci., Vol. 116, No. Pt 13, pp. 2775-2779 (2003)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인서울대학교산학협력재단
서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지
(72) 발명자
유한상
경기도 과천시 과천동 337-8
강상균
서울특별시 강서구 염창동 태영송화아파트 104동 607호
노유미
서울특별시 도봉구 창4동 동아청솔아파트 112동 1404호
(74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 박영관

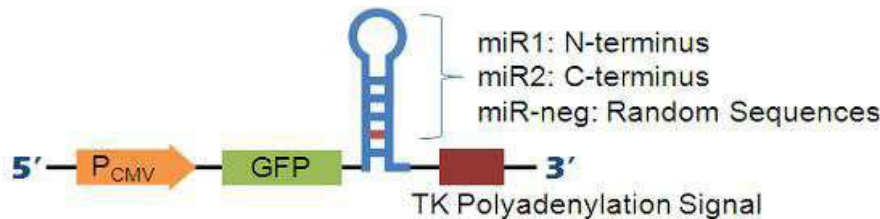
(54) 마우스의 프리온 유전자에 대한 마이크로 RNA 및 프리온유전자의 발현이 녹다운된 마우스 세포

(57) 요약

본 발명은 마우스 프리온(prion) 유전자를 표적으로 하는 마이크로 RNA(micro RNA, miRNA), 상기 miRNA를 포함한 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환되어 프리온 유전자의 발현이 녹다운(knock-down)된 마우스 세포에 관한 것이다.

본 발명의 miRNA 및 이에 의해 형질전환된 마우스 세포는 프리온 단백질의 기능 및 프리온 질병의 병원성 기작을 연구하는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1에 나타낸 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드 및 서열번호: 2에 나타낸 마우스 프리온 유전자의 852 내지 870 뉴클레오타이드를 표적화하는 miRNA.

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호: 3에 나타낸 염기서열 및 서열번호: 4에 나타낸 염기서열로 이루어진 pre-miRNA.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 3항에 따른 pre-miRNA를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 11항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환되어 프리온 유전자의 발현이 녹다운된 마우스 세포.

청구항 15

제 14항에 있어서,

마우스 세포는 마우스의 신경아세포종 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 16

마우스 세포를, 서열번호: 1에 나타낸 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 miRNA와 서열번호: 2에 나타낸 마우스 프리온 유전자의 852 내지 870 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 miRNA로 동시에 형질전환하여 마우스 세포의 프리온 유전자 발현을 억제하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마우스의 프리온 유전자에 대한 마이크로 RNA 및 프리온 유전자의 발현이 녹다운된 마우스 세포에 관한 것으로, 보다 자세하게는 마우스 프리온 유전자를 표적으로 하는 miRNA, 상기 miRNA를 포함한 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환되어 프리온 유전자의 발현이 녹다운된 마우스 세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광우병을 포함한 프리온 질병은 사람을 포함한 여러 동물에서 신경퇴행성 질병을 유발하는 질병으로 세포표면 당단백질인 정상 프리온 단백질(PrP^C)이 비정상 병원성 프리온 단백질(PrP^{Sc})로 전환되어 발병한다. 잠복기가 매우 길며, 폐사율이 100%인 치명적인 만성 진행성 질병으로 현재까지 백신이나 해독제 및 치료법이 전혀 알려져 있지 않다.

[0003] *Prnp* 녹-아웃 (knock-out) 마우스를 이용한 연구를 프리온 가설이 널리 인정되었으며 이에 기초한 많은 실험들이 이루어지고 있지만, 아직도 정상 프리온의 기능 및 분자 생물학적 특성, 병원성 프리온의 복제 방법, 병원성 기작 등이 명확하게 알려져 있지 않다. 또한, 각각의 프리온 스트레인(strain), 변종(mutant) 및 숙주 종(species)에 따라 임상적, 병리학적 증상이 서로 상이하다고 보고되어 있다.

[0004] 녹-아웃 방법은 특정 유전자의 발현을 억제할 목적으로 주로 사용되는 고전적인 방법이다. 하지만 *Prnp*의 발현 억제를 위해 녹-아웃 기법이 사용된 경우, 유전자가 스플라이싱(intergenic splicing) 과정 중에 도플 단백질을 암호화하는 *Prnd* 이소(ectopic) 발현이 유도되었다. 이는 유전자간 스플라이싱에 의해 *Prnd*가 *Prnp* 프로모터의 지배를 받아 일어난 현상으로 보고되어 있다. 도플은 N-말단 부분이 제거된 프리온 단백질과 유사한 단백질이며, 프리온 단백질과는 달리 옥타머 리피트(octamer repeat)가 없다. *ZrchII*, *Nsgk*, *Rcm0* 및 *Rikn* 녹-아웃 마우스에서 발현된 도플 단백질이 Purkinje 세포의 변성을 일으키고 운동실조 및 기능장애 등의 증상 야기하였다.

[0005] 한편, RNA는 DNA에 담겨있는 유전정보를 단백질로 변환시키는 과정에서 전달자의 역할만 하는 것으로 인식되어 왔으나, 다양한 형태로 존재가 알려지고 있는 작은 RNA가 유전자의 발현과 조절 과정에 다양한 형태로 관여해 세포의 기능을 총괄 조정하는 것으로 밝혀지고 있다.

[0006] siRNA(small interfering RNA)는 Dicer에 의해 절단되어 생성된 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 염기서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 단백질 발현을 억제하는 것으로 밝혀져 있다. siRNA 기법은 현재 가장 강력한 유전자 침묵 기법으로 고려되고 있다. 크게 siRNA, shRNA (short hairpin RNA) 및 miRNA(micro RNA)로 구분되며 이들을 포괄적으로 RNAi (RNA interference)라고 부른다.

[0007] 많은 연구자들이 RNAi 기법을 동물세포배양 및 동물모델을 대상으로 유전자 기능 분석을 비롯한 다양한 연구에 적용하고 있다: 1) 특정 유전자의 기능에 관한 연구, 2) 세포 배양 모델을 이용한 신약 개발 연구, 3) 암의 발생부터 말기까지 진행되는 과정에 관한 연구, 4) 암 또는 바이러스성 질환에 대한 치료제 개발, 5) siRNA 라이브러리 (library) 구축을 통하여, 인체 질환과 관련된 모델 시스템을 개발하고 각종 유전자들의 연구에 이용하고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명은 전사 후(post-transcriptional) 유전자 침묵 메커니즘인 miRNA 기법을 이용하여 마우스 *Prnp*를 녹-다

운함으로써 프리온 단백질의 기능 및 프리온 질병의 병원성 기작을 연구하는데 적합한 세포를 확립하는데 있다.

- [0009] 본 발명은 한 관점으로서, 마우스 프리온 유전자를 표적으로 하는 miRNA를 제공한다.
- [0010] 다른 관점으로서, 상기 miRNA를 포함한 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0011] 또 다른 관점으로서, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환되어 프리온 유전자의 발현이 녹다운된 마우스 세포를 제공한다.

과제 해결수단

- [0012] 마이크로 RNA(micro RNA/miRNA)의 생성은 두 단계의 프로세싱으로 이루어진다. 최초의 마이크로 RNA(primary miRNA/pri-miRNA)가 핵 안에서 Drosha라는 RNase III형 효소에 의해 60-90 뉴클레오타이드 정도의 스템-루프(stem-loop) 구조의 pre-mRNA로 만들어지고, 이후 세포질로 이동하여 Dicer라는 효소에 의해 절단되어 21-25 뉴클레오타이드의 성숙한 miRNA로 만들어진다. 따라서, 본 발명에서 miRNA는 이 miRNA가 유래될 수 있는 pri-miRNA 또는 pre-mRNA일 수도 있다.
- [0013] 본 발명에서 마우스 프리온 유전자를 표적으로 하는 miRNA는 마우스 프리온 유전자의 일부에 상보적인 서열을 가지고, 프리온 유전자의 mRNA를 분해하거나, 번역을 억제할 수 있는 RNA를 의미한다. 상보성이 80-90%인 경우에는 mRNA의 번역을 억제할 수 있고, 100%인 경우에는 mRNA를 분해시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 miRNA는 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드(서열번호: 1)를 표적으로 하는 것이 바람직하다. 이를 위하여 pri-miRNA, pre-miRNA 또는 miRNA는 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 80%, 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 100% 상동성을 갖는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드(서열번호: 1)를 표적으로 하는 pre-miRNA는 서열번호: 3에 나타난 염기서열로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0015] 또한, 본 발명의 miRNA는 마우스 프리온 유전자의 852 내지 872 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 것이 바람직하다. 이를 위하여 pri-miRNA, pre-miRNA 또는 miRNA는 마우스 프리온 유전자의 852 내지 872 뉴클레오타이드에 대한 상보적인 서열에 대하여 80%, 바람직하게는 90%, 특히 바람직하게는 100% 상동성 갖는 염기서열을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 마우스 프리온 유전자의 852 내지 872 뉴클레오타이드(서열번호: 2)를 표적으로 하는 pre-miRNA는 서열번호: 4에 나타난 염기서열로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 miRNA는 당업계에 공지된 RNA 분자의 제조방법에 따라 제조할 수 있다. RNA 분자를 제조하는 방법으로는 화학적 합성 방법 및 효소적 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, RNA 분자의 화학적 합성은 문헌에 개시되어 있는 방법을 사용할 수 있으며(Verma and Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 67, 99-134, 1999), RNA 분자의 효소적 합성은 T7, T3 및 SP6 RNA 폴리머라제와 같은 파아지 RNA 폴리머라제를 이용하는 방법이 문헌에 개시되어 있다(Milligan and Uhlenbeck, *Methods Enzymol.* 180:51-62, 1989).
- [0017] 본 발명에서 miRNA는 그 자체로 또는 벡터에 클로닝하여 마우스 세포에 도입할 수 있으며, 후자가 보다 바람직하다. 본 발명은 본 발명의 miRNA를 포함한 재조합 발현벡터에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 발현벡터는 마우스 프리온 유전자의 220 내지 240 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 miRNA와 852 내지 872 뉴클레오타이드를 표적으로 하는 miRNA를 모두 포함하는 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명의 재조합 발현벡터는 당해 분야에 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 구성될 수 있다. 상기 발현벡터는 포유류 세포 또는 그 밖의 표적 세포 유형에 복제 및 발현에 이용되는, 당해 분야에 공지된 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 전술된 바와 같이 miRNA를 합성하여 발현벡터에 삽입할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 상기 재조합 발현벡터를 마우스 세포에 도입하여 제조된 프리온 유전자가 녹다운된 마우스 세포에 관한 것이다. 도입 방법은 이에 제한되는 것은 아니지만, 인산칼슘을 이용한 형질감염, DEAE 빅스트란에 의한 형질감염, 미세주사에 의한 형질감염, 전기천공(electroporation) 및 리포펙션 등이 이용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 마우스 세포는 마우스 신경아세포종 (mouse neuroblastoma, N2a)인 것이 바람직하다. N2a 세포는 프리온 질병 연구에 통상적으로 이용되는 세포이다.

효 과

[0021] 본 발명의 마우스 프리온 유전자가 녹다운된 세포는 프리온 단백질의 기능 및 프리온 질병의 병원성 기작을 분자세포생물학적 수준에서 연구하는데 적합하여 질병에 대한 이해를 돕고, 이를 바탕으로 조기진단을 위한 새로운 바이오 마커의 개발의 가능성을 높여줄 것이다. 뿐만 아니라, 현재 개발되어 있는 다양한 전달 시스템(delivery system)을 이용하여 클로닝된 miRNA들은 생체내 실험에 적용함으로써 RNAi 기법을 이용한 유전자 치료제(gene therapy) 개발을 촉진시킬 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0023] 실시예 1: 마우스의 *Prnp*를 표적화하는 pre-miRNA의 디자인 및 합성

[0024] 마우스 *Prnp*를 하향 조절하기 위한 표적 부위 선발을 위해 알고리즘을 이용하여 N-말단을 표적화하는 pre-miRNA1과 C-말단을 표적화하는 pre-miRNA2를 각각 디자인하였다. 구체적으로, 마우스 *Prnp*의 발현을 억제하기 위하여 Genebank accession 번호 NM_011170인 마우스 *Prnp*의 220부터 240 뉴클레오타이드(TGTGACTATGTGGACTGATGT-서열번호: 1)를 표적화하는 pre-miRNA1과 852부터 872 뉴클레오타이드(CCTATTACGACGGGAGAAGAT-서열번호: 2)를 표적화하는 pre-miRNA2를 디자인하였다. 또한, 발현 벡터에 직접 클로닝하기 위하여 5' 말단에 TGCT (top)를 3' 말단에 CAGG를 삽입하였고, 19 뉴클레오타이드의 말단 루프와 2 뉴클레오타이드의 내부 루프가 형성되도록 디자인하였다.

[0025] pre-miRNA1의 염기서열(서열번호: 3)

[0026] 5'-TGCTGACATCAGTCCACATAGTCACAGTTTTGGCCACTGACTGACTGTGACTATGGACTGATGT-3'

[0027] pre-miRNA2의 염기서열(서열번호: 4)

[0028] 5'-TGCTGATCTTCTCCGTCGTAATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTATTACCGGAGAAGAT-3'

[0029] 실시예 2: pre-miRNA1 또는 2 또는 이 둘 모두를 포함한 벡터 작제

[0030] 2-1: 단일 pre-miRNA를 포함한 벡터 작제

[0031] 합성된 pre-miRNA1과 2의 top-가닥, bottom-가닥은 각각 상온에서 10분간 어닐링을 실시하여 이중가닥 올리고를 생성하였다. 준비된 이중가닥 올리고는 T4 DNA 라이가제(ligase)를 이용하여 상온에서 30분간 pcDNA6.2-GW/EmGFP 벡터에 라이게이션을 하고, TOP10 competent *E. coil*에 형질전환하였다. Mini-prep을 사용하여 클로닝된 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA1, 2와 음성 miRNA (miRNA_{neg})를 정제하고 서열분석하여 pre-miRNA의 삽입을 확인하였다(도 1a).

[0032] 2-2: 다중 pre-miRNA를 포함한 벡터 작제

[0033] 다중 pre-miRNAs의 발현을 통해 보다 효율적으로 마우스 *Prnp*를 하향 조절하기 위하여 클로닝된 pre-miRNA1과 2를 연쇄화(chaining)하였다. 우선, miRNA 1번을 *Bgl* II와 *Xho* I으로 절단시켜 (digestion) 백본(backbone)으로 사용하였고 miRNA 2번을 *Bam* HI과 *Xho* I으로 절단시켜 (digestion) 삽입물(insert)로 사용하였다. 소화된 절편들은 각각 1%와 3% 아가로스 겔에서 전기 영동하여 확인하였고, 겔-추출을 실시하여 정제하였다. 정제된 백본과 삽입물은 T4 DNA 라이가제를 이용하여 연쇄화하였고 TOP10 competent *E. coil*에 형질전환하였다. Mini-prep을 사용하여 클로닝된 벡터를 정제하였고, 서열분석을 통하여 pre-miRNAs의 연쇄화 즉, pcDNA6.2-GW/EmGFP-miRNA1-2를 확인하였다 (도 1b).

[0034] 실시예 3: 형질전환

[0035] 클로닝된 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR1, 2, 1-2 및 miRNAneg를 각각 N2a 세포에 형질감염 (transfection)하기 위해 우선, 실험 전날 N2a 세포를 1×10^5 세포가 되도록 6구 세포배양 판 (6well plate)에 계대배양하고 lipofectamine 2000을 이용하여 항생제와 혈청이 포함되지 않은 배지에서 6시간 동안 형질감염을 실시하였다. 24시간 후, 형광현미경 하에서 형질감염 여부를 확인하였고, 20 μ g/ml의 blasticidine S가 포함된 배지에서 2주간 약물에 의한 선별을 실시하였다.

[0036]

[0037] 실시예 4: 형질감염 확인

[0038] Genomic DNA 정제 키트를 이용하여 형질감염된 각각의 세포로부터 genomic DNA를 분리, 정제하고, 300ng/ μ l가 되도록 희석하였다. 형질감염된 pre-miRNA의 삽입 여부를 확인하기 위하여 pcDNA6.2-GW/EmGFP 벡터에 대하여 증폭산물 크기가 352bp가 되도록 프라이머 세트를 디자인하였고, 정제된 genomic DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. 실험 결과, miRNA1 (N2amiR1), miRNA2 (N2amiR2) 및 miRNAneg로 형질감염된 N2a 세포 (N2amiRn)에서 412bp 크기의 증폭산물(amplicon)이 관찰되었고, miRNA1-2가 형질감염된 N2a 세포 (N2amiR1-2)에서 550bp 크기의 증폭산물을 관찰할 수 있었다 (도 2).

[0039] 실시예 5: Western blot에 의한 *Prnp*의 하향 조절 효율 확인

[0040] pre-miRNA 삽입이 확인된 각각의 세포 풀(pool)에서 마우스 *Prnp*의 하향 조절 효율을 평가하기 위해 Western blot을 실시하였다. 각각의 세포는 RIPA 용균용 완충용액을 첨가하여 용균하였고 단백질을 정량하였다. 4-12% gradient SDS-PAGE에 10 μ g의 단백질을 로딩하여 전기영동을 실시하고 니트로셀룰로오스 멤브레인에 블로팅하였다. 1차 항체로 3F10 항-프리온 모노클로날 항체를 사용하였고, HRP로 콘주게이션된 (conjugation) 2차 항체와 반응시켰다. 항체와 반응한 프리온 단백질은 화학발광(chemiluminescence)을 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜 확인하였다. 3F10으로 프리온 단백질의 발현 양을 확인한 후, 멤브레인에 이미 반응된 1차, 2차 항체 및 화학발광물질들을 stripping 과정을 통하여 제거하였고 동일한 방법으로 세포 마커인 GAPDH에 특이적인 항체와 반응시켰다. 마우스 *Prnp*의 하향 조절 효율은 densitometry를 이용하여, GAPDH의 양에 대한 프리온 단백질 양으로 평가하였다. 실험결과, N2amiRn은 wild type N2a 세포와 비교하여 차이가 없었으나, N2amiR1은 10.6%, N2amiR2는 18.7%로 마우스 *Prnp*의 발현이 감소하였고, N2amiR1-2는 77.5%로 효율적으로 표적 마우스 *Prnp*의 발현을 녹-다운(knock-down) 시킴을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0041] 실시예 6: *Prnp*의 하향 조절 효율이 높은 N2amiR1-2 클론의 발굴

[0042] N2amiR1-2 세포 풀에서 마우스 *Prnp* 발현을 효율적으로 녹-다운시키는 양성 세포 클론을 제한 희석을 실시하였다. 우선, N2amiR1-2 세포 풀을 5세포/ml 농도로 20 μ g/ml blasticidine S가 포함된 완전 배지에 희석하고 96구 세포배양 판 (96well plate)에 100 μ l씩 분주하였다. 2주 후, 각각의 세포 클론에서 genomic DNA를 분리하고 PCR을 실시하였다(도 4). miRNA1-2의 삽입이 확인된 24개 세포 클론들에 대하여 위와 동일한 Western blot 방법으로 마우스 *Prnp* 하향 조절 정도를 평가하였다. 실험 결과, 15번 세포 클론에서 마우스 프리온 단백질의 발현이 97.7% 이상 억제되었음을 확인할 수 있었다(도 5). 또한 선발된 15번 세포 클론에서 pcDNA6.2-GW/EmGFP 벡터의 리포터 유전자인 GFP의 발현도 확인할 수 있었다 (도 6).

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a는 발현 벡터인 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 벡터에 클로닝된 miRNA 1, miRNA2, miRNAneg의 모식도이다.

[0044] 도 1b는 연쇄화된 miRNA1-2 카세트의 모식도이다.

[0045] 도 2는 N2a 세포 내로 miRNA가 삽입되었는지 여부를 확인하기 위한 다중 PCR 결과이다(laneL: 100bp DNA ladder, lane1: 소 *Prnp*가 클로닝된 벡터, lane2: miRNAneg가 클로닝된 벡터, lane3: miRNA1이 삽입된 N2a 세포, lane4: miRNA2가 삽입된 N2a 세포, lane5: miRNAneg가 삽입된 N2a 세포, lane6: 연쇄화된 miRNA1-2가 삽입

된 N2a 세포, lane7: wild type N2a 세포, lane8: 소 *Prnp*가 삽입된 N2a 세포, lane9는 주형이 없는 대조군).

[0046] 도 3은 miRNA1, 2와 연쇄화된 miRNA1-2에 의한 마우스 *Prnp* 발현 억제 정도를 확인하기 위한 Western blot의 결과로서, (가)는 프리온 단백질에 특이적인 단클론 항체인 3F10과 (위) GAPDH에 특이적인 다클론 항체를 (아래) 이용하여 Western blot을 실시한 결과이고, (나)는 densitometry를 이용하여 Western blot을 평가한 결과이다.

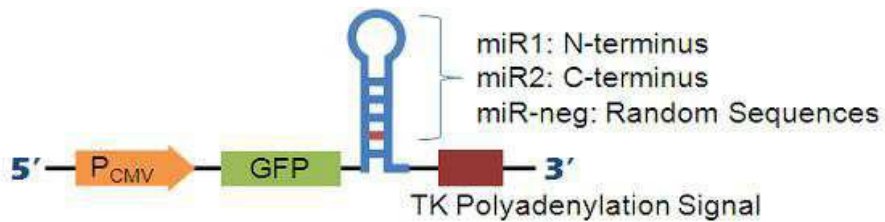
[0047] 도 4는 N2a 세포 내로 miRNA1-2가 삽입되었는지 여부를 확인하기 위한 genomic PCR 결과이다(LaneL: 100bp DNA ladder, lane1: miRNA1-2가 클로닝된 벡터, lane2: miRNA1-2가 클로닝된 벡터, lane3: N2a세포 대조군, lane4-20: 제한 효소를 통해 얻은 세포 클론 1번부터 17번, laneN: 주형이 없는 대조군).

[0048] 도 5는 제한 효소를 통해 얻은 N2amiRNA1-2 세포 클론에서 마우스 *Prnp* 발현 억제 정도를 확인하기 위한 Western blot의 결과로서, (가)는 프리온 단백질에 특이적인 단클론 항체인 3F10과 (위) GAPDH에 특이적인 다클론 항체를 (아래) 이용하여 Western blot을 실시한 결과이고, (나)는 densitometry를 이용하여 Western blot을 평가한 결과이다.

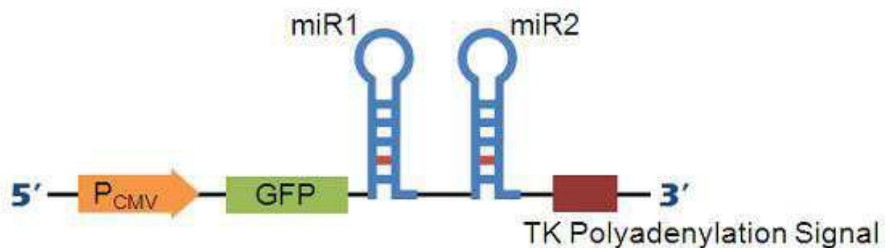
[0049] 도 6은 마우스 *Prnp*가 지속적으로 녹-다운된 N2amiRNA1-2의 현미경 사진으로서, (가)와 (나)는 wild type N2a 세포이고 (다)와 (라)는 N2amiRNA1-2 세포이며, (가)와 (다)는 형광현미경 하에서 리포터 유전자인 GFP의 발현을 확인한 세포 사진이고, (나)와 (라)는 DAPI 염색한 세포 사진이다.

도면

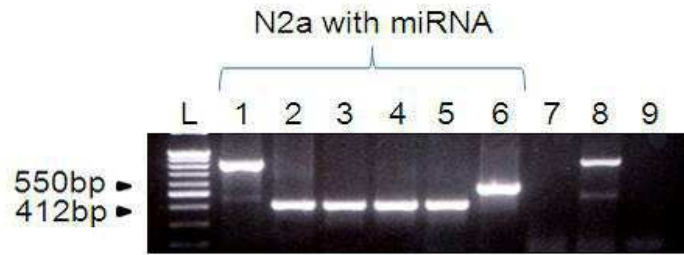
도면1a



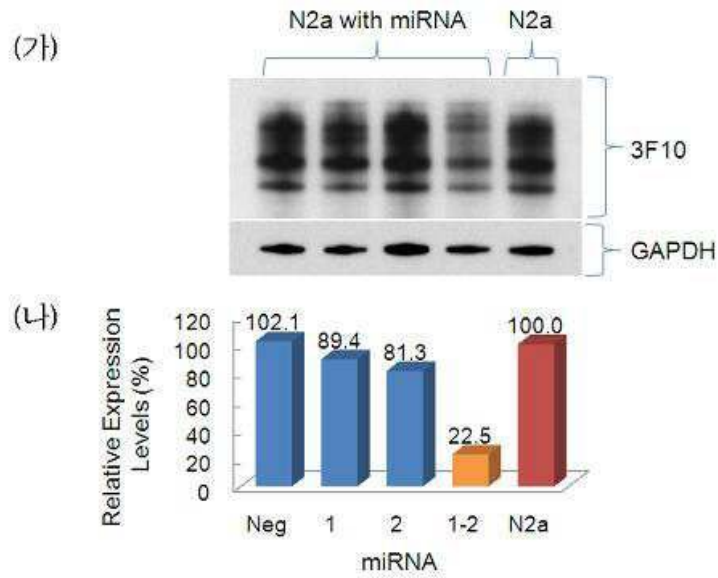
도면1b



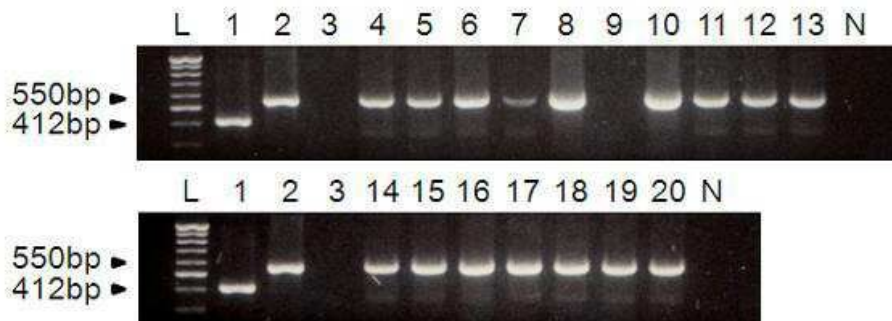
도면2



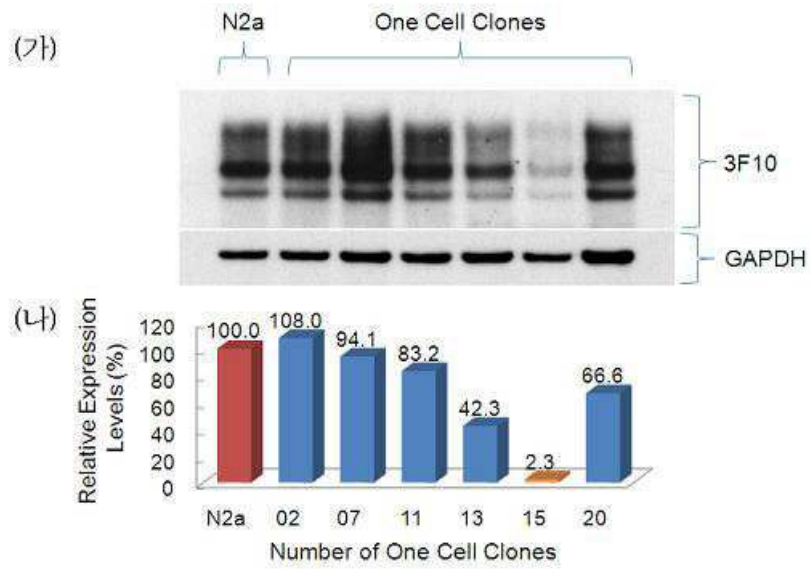
도면3



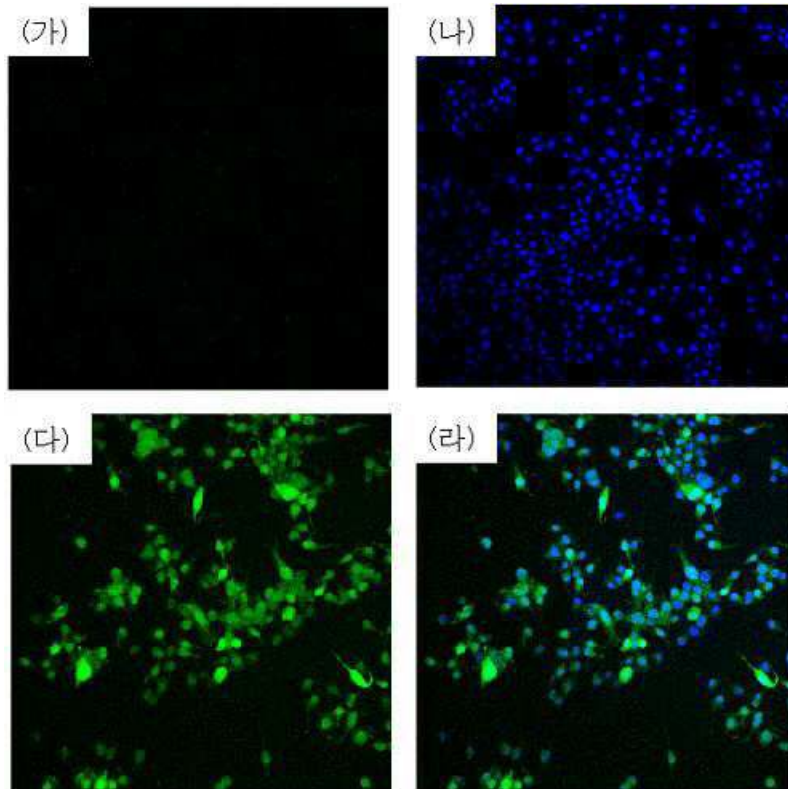
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Seoul National University Industry Foundation
- <120> Micro RNA Targeting Mouse Prion Gene and Prion Gene Knock-down

Mouse Cell

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> mouse prion gene 220-240nt

<400> 1
 tgtgactatg tggactgatg t 21

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> mouse prion gene 852-870nt

<400> 2
 cctattacga cgggagaaga t 21

<210> 3
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> pre-miRNA1

<400> 3
 tgctgacatc agtccacata gtcacagttt tggccactga ctgactgtga ctatggactg 60

atgt 64

<210> 4
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> pre-miRNA2

<400> 4

tgctgatcctt ctcccgtcgt aatagggttt tggcactga ctgacctat taccgggaga 60

agat 64