

Contact mouse : mouse@macrogen.com
Payment Inquiry: payment@macrogen.com
Technical Support Macrogen Korea: support@macrogen.com
Macrogen-Europe: support-europe@macrogen.com

Update 161228



Genetically
Engineered
Mouse

GEMouse

Added service Guide

Mating

1. 계통유지를 위한 번식관리 요령

- TG mouse & KO mouse의 실험목적과 계통 유지 type, 규모에 따라 mating을 진행한다.
- 마우스의 성성숙 주령 - male : 7~8주, female : 4주
 - ① 교배하고자 하는 male과 female을 같은 케이지(cage)에 넣어 교배를 유도한다. Male은 분리 사육을 원칙으로 하며, 1수의 male에 5수 이하의 female을 넣어 교배를 유도하는 것이 번식 효율이 저하되지 않는다.
 - * 당사에서는 1:2 이하로 교배를 유도하고 있다.
 - ② 임신이 확인되면 분만용 케이지로 female mouse를 옮겨 마우스가 분만 준비를 할 수 있도록 한다.
 - ③ 분만 시기가 되면 매일 2회 이상 monitoring하여 유산이나 기타 이상 징후가 있는지 확인한다.
 - ④ 분만을 하면 12~24시간 이내에 분만 상황을 점검하여야 한다.
 - ⑤ 분만 후 3~4일 이내에는 케이지 및 깔집 교환을 하지 않는다, 이시기에 환경의 급격한 변화는 어미에게 불안감을 갖도록 하여 수유를 하지 않거나, 새끼를 죽일 수 있다.
 - ⑥ 분만 후 수유로 인하여 음료 및 사료의 섭취량이 증가하므로 음료 및 사료의 공급에 신경을 써야 한다. (음료 및 사료가 부족시 Newborn mouse를 키우지 않거나 잡아 먹는 현상이 발생할 수 있다).
 - ⑦ screening의 위하여 tail cut을 할 시에는 생후 12일 이후에 실시하며, 번호 식별을 위하여 발가락을 잘라 개체 번호를 부여 한다.
 - ⑧ 마우스의 경우 생후 21~23일이 경과하면 이유가 가능하므로, 암컷과 수컷을 분리하여 이유시킨다.

Breeding

2. SPF 마우스 사육 및 계통유지

최근의 생명과학 연구는 보다 정밀한 동물 실험을 요구하고 있다. 이와 같은 실험에는 유전적 특성이 명확하고 건강하며, 일정한 기준의 사육환경에서 생산, 유지된 동물의 사용이 필수적이다, 그러나 현재 각종 실험에 사용되고 있는 일반동물은 외견상 건강해 보일지라도 많은 미생물에 자연적으로 감염되어 있다. 동물의 체내에 있는 여러 가지 미생물들은 병원성에 상당한 차이가 있고, 또한 대부분의 자연 감염성 병원체는 휴지 또는 잠복 상태에 있기 때문에 임상증상이 발현되지 않고 있으나, 적합한 환경조건에 이르면 병원성을 나타내게 된다. 이와 같은 동물을 실험에 사용할 경우, 연구자의 의도와는 상관없이 전혀 다른 연구 결과가 초래될 수 있다. 그러므로 정확한 실험을 하기 위해서는 병원성을 나타내는 질병의 예방뿐만 아니라 가능한 모든 감염에 대한 예방이 필수적이며, 특정 병원체 부재 (Specific pathogen free, SPF) 상태가 확인되어야만 한다.

가) 2.1 SPF 유지관리 system

당사는 SPF mouse 를 생산 운영하기 위하여 Barrier system 을 보유 하고 있으며, 마크로젠 표준사육관리운영지침(SOP)을 통하여 이를 운영 및 관리 하고 있다

① 공기 조절 장치 시스템

HEPA(High Efficiency Particulate Air) Filter 여과 멸균법을 채택하여 운영하고 있다. (HEPA Filter 여과 멸균법은 Blower fan 의 흡인력에 의해 공기조절기내로 들어온 외부공기를 Pre-filter(3um,DOP 85%), Medium Filter(1um, DOP 85%), 가운, 가습기 및 HEPA filter(0.2um, DOP 99.97%) 등의 공기 조절장치에 의해 여과.멸균시켜 사육실로 공기를 공급하는 방법이다.

② 공조시설 관리시스템

Computer 를 통해 마우스장의 각 구역별로 온도와 상대습도, 공기압, 공기흐름이 공조 하드웨어 및 소프트웨어에 의해 자동 운영 조절 및 기록 유지 시스템을 보유하고 있다.

③ 반입 시스템

✓ 사육용 자재 (금속제품 및 플라스틱 제품)

- 고압증기 멸균법(121°C에서 20~30분)으로 멸균하여 차폐시설로 반입 사육용 자재 (가열에 변형되는 품목)
- 산화 에틸렌(ethylene oxide) 가스로 멸균하여 차폐시설로 반입

✓ 사료 및 깔집의 반입

- 고압증기 멸균법(121°C에서 20~30분)으로 멸균하여 차폐시설로 반입

✓ 사육 동물

- 검역실에서 검역 후 반입

✓ 관리자

- 멸균작업복 착용 및 air-shower 후 출입

④ 차폐 시설 소독

주 1회 이상 소독 약물 및 UV를 이용하여 소독하고 있다.

⑤ 사육 환경 조건

온도 : 22±2°C	환기 횟수 : 15~17회/hour	소음 : 55 db 이하
습도 : 50±10%	암모니아 농도 : 20 ppm 이하	조도 : 105~300 Lux

나) 품질 관리 시스템

마크로젠 표준사육관리운영지침(SOP)을 통하여 이를 운영 및 관리 하고 있다

① 실험 기록 관리 시스템

마우스를 이용한 실험 현황 및 번식 breeding 등 전반적인 마우스 data 를 기록유지 및 관리 하고 있다.

② 차폐시설 기록 관리 시스템

외부 계절, 기온, 날씨 등 외부 환경적인 변화에 따라 차폐시설의 변화에 대해 시간별, 일별, 월별 기록 관리가 이루어 지고 있다.

③ 낙하균 검사

월 1회 정기적으로 자체 검사를 시행하고 있다 (기준치 : culture dish(blood aga당 낙하세균 3개 이하)

④ 미생물 검사

1999년 5월 제12차 ICLAS 총회에서 ICLAS Monitoring Subcenter로서 인증 된 한국생명공학연구원 질환동물모델평가연구실에 검사를 의뢰하여 년 4회 검사하고 있다.

다) Transgenic mouse 의 세대별 교배 및 계통유지

① Founder mouse를 Normal mouse와 교배하여 F1을 얻는다. 당사에서 제작한 TG는 founder mice이므로 각 라인별로 (founder mouse 각각 1개 라인) normal mouse 와 교배하여 F1을 얻는다.

② 라인별로 F1에서 germline transmission 여부를 확인한다. founder mouse를 교배하여 2~3배(2~3번 출산)정도의 F1마우스를 screening를 진행하였으나, F1에서 한마리의 TG도 얻지 못했다면 germline transmission이 안되는 것으로 간주한다.

③ germline transmission 여부가 확인된 라인은 교배 및 발현 분석을 진행한다. germline transmission 여부가 확인됐다면 발현분석을 진행한다. 발현 정도를 확인 후 심화 실험을 진행하면서 동시에 라인유지를 위한 교배를 진행한다

④ 교배는 실험을 위해 필요한 마우스 수량과 라인 유지를 위한 마우스 규모를 감안하여 행해 준다.

⑤ 교배 방법: 원하는 Gene Type에 맞추어 TG x TG 교배나 TG X Normal 교배를 진행한다. Transgenic mouse의 경우, 근교배가 계속 이루어져 내려가면 세대가 내려갈수록 이식된 유전자의 발현이 약해지거나, 사라지기도 한다. 이를 방지하기 위해 TG x TG 교배와 TG X Normal 교배를 병행하는 것이 좋다.

⑥ 수정란의 동결보존으로, 마우스의 보존이 가능하다. 실험이 정리, 완료되거나 보존가치가 인정되어 마우스 보존이 필요할 때 TG mouse의 수정란을 동결 보존함으로써 원하는 시기에 TG mouse를 재생산 한다.

라) 2.4 Knockout mouse의 세대별 교배 및 계통유지

- ① Chimera mouse와 heterozygous mouse를 생산한다. Electroporation을 통해 획득한 Targeted ES clone(129/SvJ,+/-)을 이용하여 chimera mouse를 생산한다. 생산된 chimera mouse는 C57BL/6N strain의 normal mouse(+/+) 와의 교배를 통하여 F1 mouse (Heterozygous+/-)를 생산한다.
- ② 생산된 F1 mouse의 screening을 통한 germline transmission 여부를 확인한다. chimera mouse와 C57BL/6 strain의 normal mouse의 교배를 통하여 생산된 F1 mouse (Heterozygous founder mouse)의 germline transmission 여부 확인은 1차적으로 mouse coat color에 의해 판단한다. Targeted ES clone 유래의 F1 mouse의 coat color는 agouti이며, normal mouse에서 유래된 F1 mouse의 coat color는 black이다 (F1의 경우만 해당된다.) F1 agouti mouse들은 PCR, Southern blot에 의한 screening을 통해 최종적으로 germline transmission 여부를 확인한다.
- ③ Backcross 교배를 진행 한다. C57BL/6N strain 유지를 위한 Backcross를 진행합니다. 일반적으로 5세대(F5)부터는 96% 이상의 C57BL/6N strain을 갖기 때문에 적어도 5세대(F5)까지 Backcross를 진행합니다. 원칙적으로는 10~12세대에 걸쳐 Backcross를 진행하여야 한다.
* Backcross시에는 heterozygous mouse와 normal mouse(C57BL/6N)와 교배한다.
- ④ 수정란 동결보존을 통한 마우스의 보존
실험이 정리, 완료되거나 보존가치가 인정되어 마우스 보존이 필요할 때 KO mouse의 수정란을 동결 보존함으로써 원하는 시기에 KO mouse를 재생산한다.
* 당사에서는 고객 편의를 위해 수정란 동결 및 융해 서비스를 제공해 드리고 있다.

3. SPF마우스 생산 및 관리

각종 시험 연구에 사용되는 수많은 종류의 실험 동물을 품종이나 계통별로 모두 SPF화하여 유지 및 관리 하는 일은 막대한 시설과 경비가 소요되며, 또한 매번 자궁절단 수술과 인공포육 또는 대리모 포유 등과 같은 어려운 작업을 수행해야만 한다. 다행히 마우스와 같은 실험동물의 경우에는 과배란에 의한 수정란의 회수, 배양, 동결 및 이식에 이르는 전반적인 체외 조작기술이 오래 전부터 확립되어 안정적으로 이용되고 있으므로, 이와 같은 기술을 SPF 동물의 계통 조성에 이용하면, 보다 편리하고 경제적으로 동물의 유지와 관리가 가능하다. 당사에서는 마우스의 수정란을 회수하여 이미 구축되어 있는 SPF 대리모에 이식하여 산자를 생산함으로써 새로운 SPF 마우스 계통을 확립할 수 있는 서비스를 제공하고 있으며, 또한 수정란 동결 기술을 이용하여, 마우스의 수정란을 장기보존 후 고객이 필요한 시기에 SPF 마우스를 생산 공급하는 서비스를 제공하고 있다.

Embryo freezing

4. 수정란 동결 및 융해

포유동물의 수정란은, 초저온 (액체질소 -196°C)에서 유지함으로써 반영구적으로 보존이 가능하다. 이를 이용하여 가축 및 인간뿐만 아니라 실험 동물분야에서는 특히 마우스를 중심으로 넓게 응용되고 있다.

가) 수정란 동결의 원리 및 연구사

수정란 동결은 Whittingham 등(1972)이 동결보존된 생쥐수정란을 이식하여 첫 산자를 생산한 이래 동결 및 융해에 관한 연구를 속행하여 동결과정의 간편화와 동결, 융해 후 생존율의 향상이 이루어져 많은 포유동물에서 동결수정란을 이식하여 많은 산자를 얻고 있다.

수정란 동결보존기법의 기본원리는 수정란을 동결보존액에 평행시켜서 액체질소에 침지할 때 세포내의 유리 수분의 결빙이 최소화 되도록 하여 동결하고, 동결 수정란의 정상적인 기능이 재개되도록 생리적 온도에서 융해하며, 융해 후 희석에 의하여 동결보호제를 제거하는 과정을 거친다.

그동안 이러한 동결 및 융해 조건을 충족시키기 위하여 동결보호제의 성분, 농도, 평형시간과 온도 및 동결, 융해속도 등의 조건을 최적화시키려는 연구를 수행해 왔다. 기존의 배 동결은 초기에는 slow freezing 법이 보편적으로 이용되어왔다. Slow freezing법은 동결완료까지는 장시간(2시간 정도) 이 걸리거나, 냉각속도를 제어하기 위한 고가의 장비(Program freezer)가 필요한 것이 결점이다. 또한 이러한 방법은 침투성 동결보호제를 보편적으로 사용하는데, 동결시 침투성 동결보호제에 의해 생기는 빙정이 세포에 물리적 압력을 가하여 세포내 구조물을 파괴시키는 단점을 갖고 있었다.

그리하여 Fahy 등(1984)은 세포내부의 수분을 탈수시킬 때 일어나는 빙정 형성을 최소화시키고자 급속동결 즉 vitrification 법을 제안하게 되었다. Vitrification 법은 사용되는 동결보호제의 점도가 높아서 동결시 초자화현상을 나타내어 국내에서는 초자화동결이라고 한다. Vitrification 법은, 조작이 간편하고 단기간(1튜브 15분 정도)으로 처리가 가능하며 또한 미수정란으로부터 배반포에 이르기까지 광범위한 배발생 기간의 동결 및 융해가 가능하여 현재 보편적으로 사용되고 있다.

나) 수정란 동결의 유용성

최근에는, 과학 기술이 발전함에 따라 Transgenic mouse나 Knock-out mouse가 많이 제작되고 많은 연구에 이용되고 있지만, 각각의 계통을 유지 하는 것은 사육관리(공간, 노력, 경비)의 면에서 문제가 되고 있다. 이 문제를 해결하기 위해서 마우스 각 계통의 수정란 상태로 동결 보존의 필요성이 높아졌다. 또한 세계화 추세에 따라 마우스의 이동이 국내에서 세계적인 수준으로 활발하게 이루어 지고 있는데, 이것의 운송, 검역의 간편화에도 중요한 방법으로 이용되고 있다. 각각의 시설 동결의 이용방법으로써, 사육관리의 편리에 따른 동결보존 이외에 Transgenic 마우스 제작을 목적으로 전핵기 zygote의 보존, 마우스 clean up 을 위한 일시 보존 그리고 미수정란 보존 등의 목적으로 널리 사용되고 있다..

다) 4.3 수정란 동결 및 융해 과정

① 동결보호제

당사에서는 침투성 동결보호제인 DMSO 및 propylene glycol 그리고 비침투성 동결보호제인 Acetamid를 이용하여 DAP213 (2M DMSO, 1M Acetamid, 3M Propylene glycol)을 제작 및 사용하여 동결 서비스를 제공하고 있다.

② 동결할 수정란의 준비

당사에서는 수정란을 동결에 사용하고 있으며, 교배 후 2.5dpc의 생쥐 난관에서 채란하여 quality가 좋은 수정란을 선별하여 동결에 사용하고 있다.

③ 동결 과정

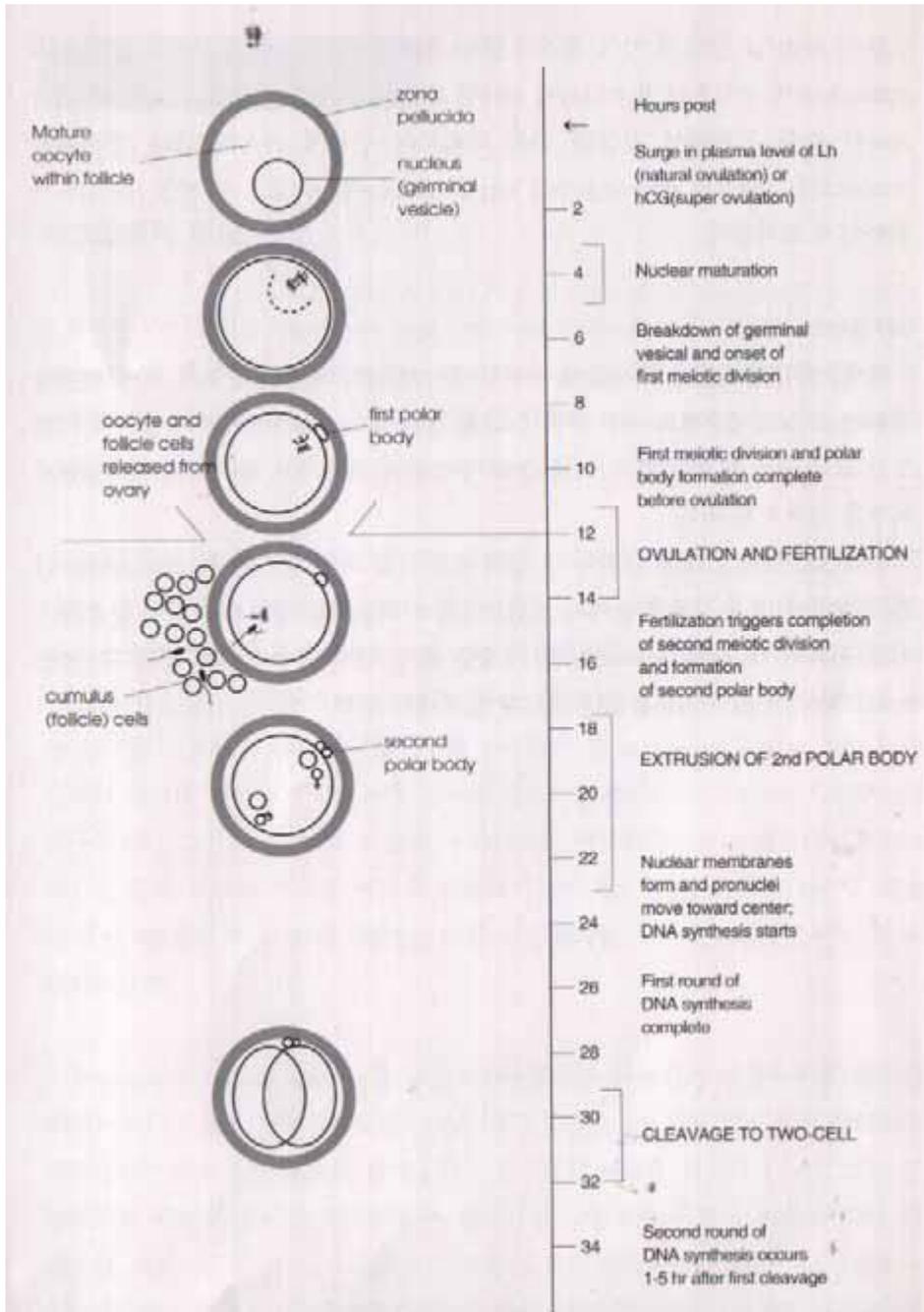
1M의 DMSO에 수정란을 평행시킨 후 냉장온도의 DAP213으로 옮겨 평행시킨 후 액체질소에 넣는 초자화동결(Vitrification)과정으로 서비스를 제공하고 있다.

④ 융해 과정

동결된 수정란을 액체질소로부터 꺼내서 0.25M sucrose를 첨가하여 동결수정란 내부의 동결보호제를 제거 후, 수정란 배양액으로 옮기는 과정으로 융해를 하고 있다.

⑤ 수정란 이식

생존을 확인한 수정란을 1일 배양하여 배반포기배로 발달한 수정란을 2.5dpc의 대리모에 이식한다.



(생쥐의 배란과 수정 과정)

당사의 수정란 동결 및 융해 과정을 통해서 수정란의 생존율은 80% 이상을 기록하고 있어, 적은 수의 수정란 동결로도 계통 및 line의 유지가 가능한 서비스를 제공하고 있다. 특히 특히 출원 시 동결 수정란의 기탁의 과정에 있어서 빠르고 안정적인 서비스로 고객의 요구를 충족시키고 있다. 미세주입된 수정란을 대리모에 이식한 후 19일째가 되면 분만하게 되며, 태어난 생쥐가 2주정도 자란 후에 꼬리를 잘라 genomic DNA를 추출하여 유전자의 삽입 여부를 확인한다. 꼬리에서 genomic DNA를 추출 시, 일반적으로 protease를 사용하는데, protease는 이후 사용될

Mouse service

thermostable polymerase를 digestion하므로 특히 주의하며 organic extraction (e.g., phenol : chloroform extraction) 과정에서 contamination 되지 않도록 pipetting에 주의한다. 추출한 genomic DNA에서 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위해 일반적으로 PCR analysis나 Southern blot 을 하는데, 시간과 비용이 경제적이고 정확하여 PCR analysis가 일반적이다. Founder mouse 분석 용으로 사용될 PCR analysis의 신뢰성을 위해서는 primer design이 specific 해야 한다. 그러기 위해 많은 다양한 software의 사용이 가능하지만, specific software program이 없다면 primer design시 다음 사항을 반드시 명심해야 한다.

- ① primer 길이는 적어도 15bp 이상 되어야 하며 ~20bp 정도가 일반적이다.
- ② 각 primer의 G+C ratio는 50~60%가 적당하다.
- ③ primer sequence내에서 연속적인 Gs와 Cs의 서열은 피한다.
- ④ forward 와 reverse primer의 G+C ratio는 비슷해야 한다.
- ⑤ PCR products는 500bp~1000bp가 적당하다.

specific design된 primer는 founder mouse 검사에 사용하기 전에 반드시 test를 해야한다. 위의 사항들이 고려된다면 PCR analysis는 founder transgenic mouse의 검색 방법과 그 유전자가 자손으로 전이되는 germline transmission 여부를 검색하는 방법으로 아주 신뢰할 만하다.