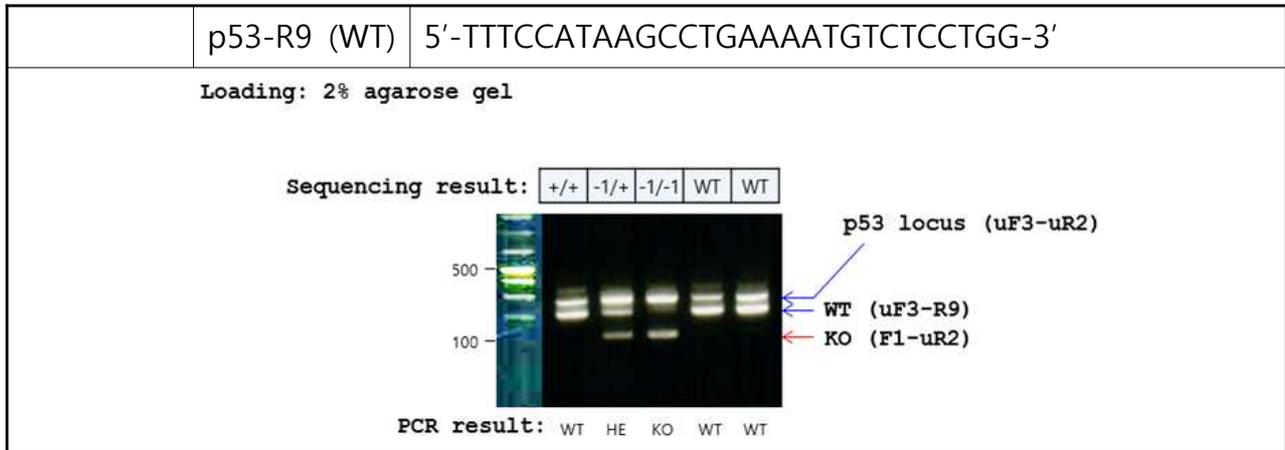




# 질환모델동물 정보서

관리번호		
<b>질환모델동물 정보</b>		
질환모델동물명	C57BL/6-Trp53 <sup>em1hwl</sup> /Korl	
유전자 조작 방법	KO created by TALEN-induced NHEJ	
Background Strain	C57BL/6JBomTac	
개발자	성명	이 한 웅
	연락처	02-2123-7642 / hwl@yonsei.ac.kr
분석자	성명	남 기 택
	연락처	010-3672-5043 / kitaek@yuhs.ac
개발일	2015-03-17	
<b>이관동물 세대수</b>		
Live animal	F2	
수정란/정자		F2
<b>Genetic Engineering 정보</b>		
유전자명	Transformation related protein 53 (Trp53)	
유전자 기능	Tumor suppressor	
유전자 조작 위치(Chr/gene/exon no. 포함)		
<input type="checkbox"/> Chromosome Location: Chr 11 <input type="checkbox"/> NCBI Gene ID: 22059 <input type="checkbox"/> RefSeq: NM_011640 <input type="checkbox"/> Targeting Region: Exon 2		
<b>Construct/Mutation Map</b>		
○ 1-bp deletion created by TALEN-induced NHEJ		
<b>Genotyping Strategy</b>		
<b>Genotyping Primer 정보 및 결과</b>		
Primer Sequence	p53-uF3	5'-ATTTCCCTACTGGATGTCCCACC-3'
	p53-uR2	5'-TTCTCTCAGGCAAGGGGAGGATA-3'
	p53-F1 (KO)	5'-TCGAGCTCCCTCTGAGCA-3'

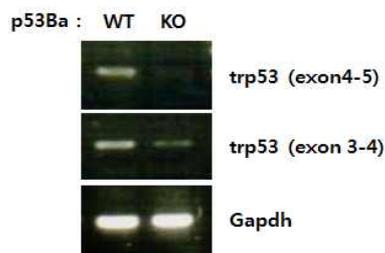


### Genotyping Protocol

PCR 반응액 조제	구성물	농도		양	
	Sterile water			-	11.6
Genomic DNA	100	ng/ $\mu\text{l}$		1	$\mu\text{l}$
dNTP	10	mM		0.4	$\mu\text{l}$
PCR buffer	10	x		2	$\mu\text{l}$
Forward primer	10	pM		1	$\mu\text{l}$
Reverse primer	10	pM		1	$\mu\text{l}$
WT-specific primer	10	pM		1	$\mu\text{l}$
KO-specific primer	10	pM		1	$\mu\text{l}$
Taq polymerase	1	U/ $\mu\text{l}$		1	$\mu\text{l}$
PCR 반응 조건	단계	온도		시간	
	Pre-denaturation	94	$^{\circ}\text{C}$	3 min	00 sec
	Denaturation	94	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Annealing	68	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Post-elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	3 min	00 sec
cycle 수	35 Cycles				
증폭 산물 크기	WT	212			bp
	KO	115			bp
특이사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 총 4개의 genotyping primer를 사용함. WT과 KO allele을 각각 amplification하고자 할 때는 WT (uF3-R9)과 KO (F1-uR2)에 대한 각각의 primer set을 이용함</li> <li>○ 반응액 조성에 필요한 dNTP, PCR buffer, Taq polymerase는 PCR Premix로 대체하여 사용할 수 있음. 본 결과의 PCR 조건 확립에는 PCR Premix (SuperBio., LTD. Cat#P3003)가 사용되었음</li> </ul>				
Expression test 정보 및 결과					
RT-PCR 정보 및 결과					
Primer Sequence (Set1)	F	5'-ACATGACGGAGGTCGTGAGA-3' (exon4-5)			
	R	5'-TTTCCTTCCACCCGGATAAG-3' (exon4-5)			

<b>Primer Sequence (Set2)</b>	<b>F</b>	5'-CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT-3' (exon3-4)		
	<b>R</b>	5'-AGCTGGCAGAATAGCTTATTG-3' (exon3-4)		
<b>PCR 반응 조건</b>	단계	온도		시간
	Pre-denaturation	94	°C	3 min sec
	Denaturation	94	°C	min 30 sec
	Annealing	56	°C	min 30 sec
	Elongation	72	°C	min 15 sec
	Post-elongation	72	°C	5 min sec
cycle 수	30 cycles			

**RT-PCR in Liver**

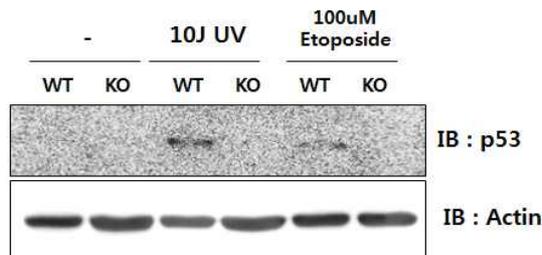


**Western blot 정보 및 결과**

**antibody**

anti-p53 (Pab240, sc-99, Santa cruz)

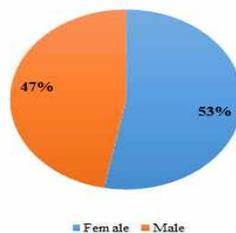
**WB in MEF**



\* p53 antibody: Pab 240, Santa Cruz

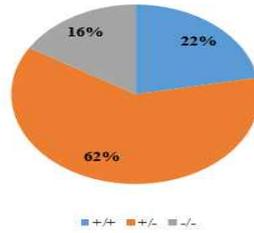
**Phenotype 정보 (hetero x hetero 기준)**

○ 평균산자수 및 성비



Average litters size	Female	Male
9.31 (n=121)	4.85 (n=63)	4.29 (n=58)

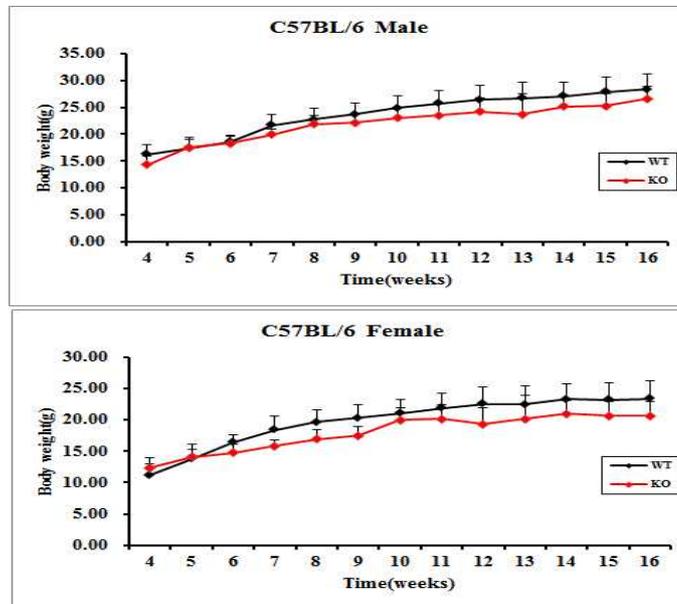
○ 유전형비



WT	HT	KO
22% (n=30)	62% (n=71)	17% (n=20)

○ 성장그래프

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7



단위 : g

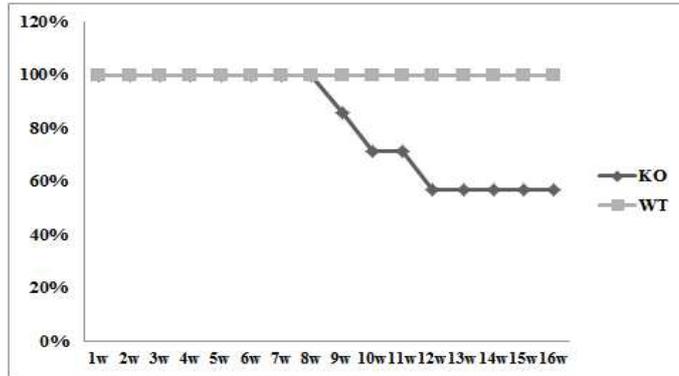
유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT male	AVR	16.29	17.43	18.57	21.64	22.71	23.71	24.86	25.71	26.43	26.71	27.07	27.86	28.36
	S.D.	1.687	1.400	1.083	1.959	1.887	1.997	2.065	2.202	2.470	2.657	2.367	2.503	2.628
KO male	AVR	14.29	17.50	18.29	19.93	21.86	22.21	23.00	23.50	24.21	23.71	25.17	25.08	26.30
	S.D.	1.485	1.852	1.305	0.942	1.432	1.332	1.753	2.087	2.403	3.463	1.908	1.924	1.939

단위 : g

유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT female	AVR	11.21	13.79	16.43	18.43	19.64	20.36	21.07	21.93	22.57	22.50	23.29	23.21	23.43
	S.D.	0.920	1.849	1.741	0.863	1.059	1.575	1.591	1.348	1.781	1.690	1.578	1.385	1.545
KO female	AVR	11.07	12.79	14.43	15.71	16.86	17.50	19.42	19.58	19.40	20.00	20.90	20.42	20.50
	S.D.	2.569	2.603	2.259	2.839	3.492	3.402	2.299	2.457	1.800	1.871	2.035	1.426	1.643

○ 생존율 분석

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7



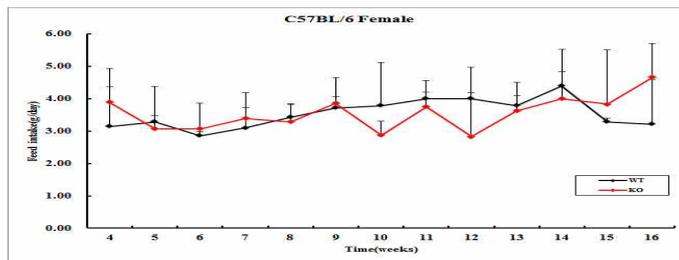
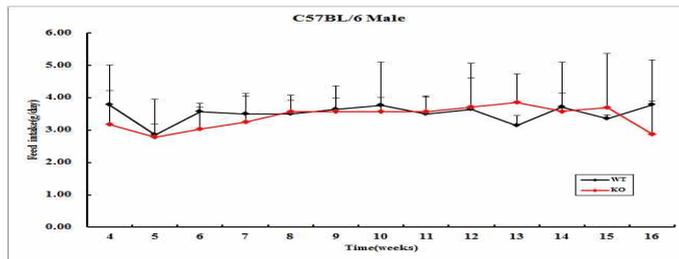
단위 : %

주령	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
KO	100	100	100	100	100	100	100	100	86	71	71	57	57	57	57	57

○ 사료섭취량 그래프

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7

- 사료명 : 일반 chow diet(Altromin사, Cat.no.1314)



단위 : g

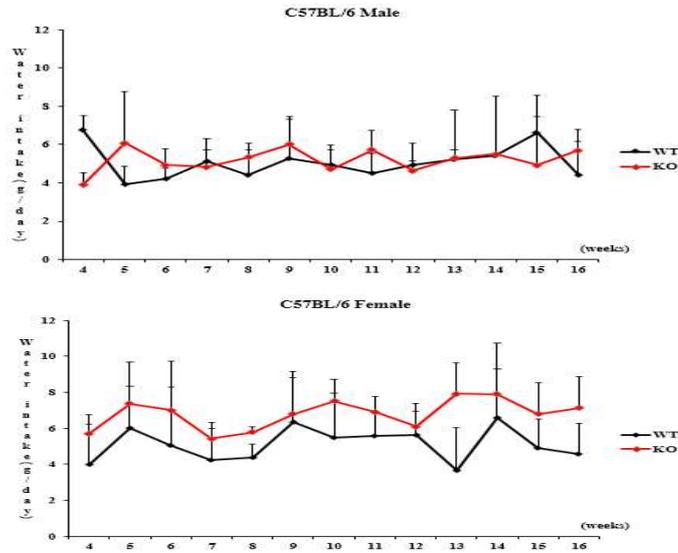
유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT male	AVR	3.79	2.86	3.57	3.50	3.50	3.64	3.77	3.50	3.64	3.14	3.71	3.36	3.79
	S.D.	1.129	1.016	0.113	0.582	0.378	0.314	1.234	0.512	0.901	0.284	0.404	0.097	1.278
KO male	AVR	3.18	2.79	3.04	3.25	3.57	3.57	3.57	3.57	3.71	3.86	3.58	3.58	3.20
	S.D.	0.961	0.364	0.737	0.732	0.476	0.728	0.394	0.416	1.249	0.822	1.389	1.389	1.030

단위 : g

유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT female	AVR	3.14	3.29	2.86	3.10	3.43	3.72	3.78	4.00	4.00	3.79	4.39	3.28	3.22
	S.D.	0.124	0.410	0.497	0.497	0.175	0.403	0.554	0.820	0.231	0.721	0.653	0.485	0.500
KO female	AVR	3.86	3.14	3.00	3.18	3.21	3.71	2.83	3.75	2.70	3.75	4.10	3.75	4.20
	S.D.	0.375	0.639	1.035	0.787	0.589	0.589	0.898	0.382	0.400	0.382	1.158	0.559	0.748

○ 음수섭취량

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7



단위 : g

유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT male	AVR	6.75	3.92	4.21	5.14	4.42	5.28	4.93	4.49	4.92	5.21	5.41	6.61	4.43
	S.D.	0.75	0.92	0.56	0.58	1.31	2.17	0.80	1.01	1.11	2.59	0.09	1.95	2.34
KO male	AVR	3.89	6.07	4.92	4.82	5.32	6	4.71	5.71	4.64	5.28	5.5	4.91	5.7
	S.D.	0.65	2.68	0.85	1.48	0.72	1.29	1.27	1.01	0.49	0.45	3.02	2.56	0.48

단위 : g

유전형/주령		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
WT female	AVR	4	6	5.03	4.24	4.35	6.35	5.49	5.56	5.64	3.64	6.57	4.92	4.57
	S.D.	1.06	2.32	1.31	0.54	0.31	2.38	1.21	0.84	1.28	1.73	1.39	1.73	1.74
KO female	AVR	5.70	7.35	7	5.42	5.78	6.78	7.5	6.91	6.1	7.91	7.9	6.8	7.12
	S.D.	2.24	2.35	4.67	2.09	0.74	2.47	2.43	1.30	1.31	2.40	4.16	1.56	1.70

○ 뇨검사

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7

- 분석기기 : URiSCAN optima 2 urine analyzer(Yeongdong electronics Co.Ltd. Korea)

- 항목 : BLD(Blood), BIL(Bilirubin), URO(Urobilirubin), KET(Ketone), PRO(Protein), NIT(Nitrite), GLU(Glucose), pH(pH value), S.G(Specific gravity), LEU(Leukocyte), VTC(Vitamin C)

- 소견 : 뇨검사 결과, WT이 KO에 비하여 몇몇 항목에서 비교적 높은 수치를 보이거나 WT와 KO 모두 정상 범위내의 수치를 보이며 뇨검사 상 특이한 점을 관찰하지 못하였음

	BLD (cell/uL)	BIL (mg/dL)	URO (mg/dL)	KET (mg/dL)	PRO (mg/dL)	NIT	GLU (mg/dL)	p.H	S.G	LEU (cell/uL)	VTC (mg/dL)
WT	1.67±2.462	7.5±3.503	39.68±27.842	0.75±0.337	0.71±0.360	Neg	0.92±2.141	7.17±0.749	1.02±0.005	47.92±29.112	2.43±0.856
KO	Neg	Neg	13.73±26.383	0.17±0.258	0.47±0.423	Neg	Neg	6.57±0.345	1.02±0.007	14.29±13.363	2.09±1.232

○ 혈액학적 검사

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7
- 분석기기 : ADVIA 2120i hematology system(Siemens, Germany)
- 항목 : WBC(White blood cell), RBC(Red blood cell), HGB(Hemoglobin), HCT(Hematocrit), MCV(Mean corpuscular volume), MCH(Mean corpuscular HGB), MCHC(MCH concentration), CHCM(Cellular hemoglobin concentration mean), CH(Cellular hemoglobin content), RDW(Red blood cell distribution width), HDW(Hemoglobin distribution width), PLT(Platelets), MPV(Mean platelet volume)
- 소견 : 전체적으로 비슷한 수치를 보였으나, KO가 WT에 비하여 PLT 수치가 낮은 경향을 보였으며, 이는 KO 개체의 해부 시 흉선과 비장의 크기가 증가된 점을 보아 혈액암 관련이 있다 생각됨

	WBC (10 <sup>3</sup> cell/uL)	RBC (10 <sup>6</sup> cell/uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	CHCM (g/dL)	CH (pg)	RDW (%)	HDW (g/dL)	PLT (10 <sup>3</sup> cell/uL)	MPV (fL)
WT	4.48±2.424	9.64±0.567	13.78±2.903	46.26±2.636	48±1.427	14.24±2.667	29.6±5.105	30.88±1.143	14.8±0.3	12.42±0.179	2.40±0.124	1011.60±141.375	5.84±0.336
KO	7.62±14.010	7.08±2.082	11.67±2.771	38.39±7.812	56.18±9.837	16.85±2.139	30.20±1.730	28.35±1.718	15.79±2.044	15.20±3.786	2.41±0.377	660.27±368.25	6.53±1.624

○ 혈청학적 검사

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7
- 분석기기 : Automated chemical analyzer BS-120(Mindray medical international limited, China)
- ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase), TP(Total protein), ALB(Albumin), Bil-T(Total bilirubin), BUN(Blood urea nitrogen), Crea(Creatinine), Glu(Glucose), CHO(Cholesterol), TG(Triglyceride), Ca(Calcium), LDH(Lactate dehydrogenase)
- 소견 : 검사 결과, KO가 WT에 비하여 Crea와 Ca 수치가 높게 나왔으며 해당 수치는 일반적인 정상범위를 초과한 수치를 보였음. 통상 높은 Crea 수치는 신장 기능의 이상을 Ca의 높은 수치는 림프종 또는 골육종 관련이 있을 경우 보임

	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	Bil-T (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	Glu (mg/dL)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	Ca (mg/dL)	LDH (U/L)
WT	32.85±4.881	55.31±7.289	108.23±19.103	4.94±0.173	3.1±0.1	0.02±0.042	26.23±7.182	0.49±0.047	244±43.463	81.22±12.156	81.85±49.331	9.36±0.387	268.04±95.884
KO	32.8±7.820	63±10.8259	117.1±27.464	4.25±0.795	3.74±1.036	Neg	21.43±15.180	10.23±15.163	330.34±119.324	79.24±9.547	90.43±43.876	131.684±123.129	176.78±135.306

○ 장기, 체온 및 체장

- WT male/female, KO male/female, 각 n=7

해부데이터(WT)

Sex	체온 (°C)	체장 (cm)	생식소 (mg)	신장 (mg)	부신 (mg)	비장 (mg)	간 (mg)	심장 (mg)	흉선 (mg)	폐 (mg)	뇌 (mg)
Female	31.6286	9.2714	0.0167	0.3085	0.0077	0.0838	1.1610	0.1284	0.0833	0.1785	0.4697
Male	30.9750	9.5250	0.2260	0.4637	0.0073	0.0914	1.4441	0.1430	0.0648	0.1804	0.4596

해부데이터(KO)

Sex	체온 (°C)	체장 (cm)	생식소 (mg)	신장 (mg)	부신 (mg)	비장 (mg)	간 (mg)	심장 (mg)	흉선 (mg)	폐 (mg)	뇌 (mg)
Female	29.6000	8.7000	0.0820	0.2973	0.0094	0.0881	1.2032	0.1132	0.2693	0.1565	0.4387
Male	30.36667	9.033333	0.201833	0.3492	0.0081	0.096267	1.219567	0.141733	0.044633	0.165533	0.458467

○ 조직병리학적 소견

- 주령: 16주령
- KO male/female, 각 n=7
- 관찰된 시료: 5건
- 암 진단 결과

Diagnosis	incidence
Astrocytoma	2
Lymphocytic Leukemia	21
Malignant Thymoma	6
Sarcoma	17
TOTAL : 170 slides	

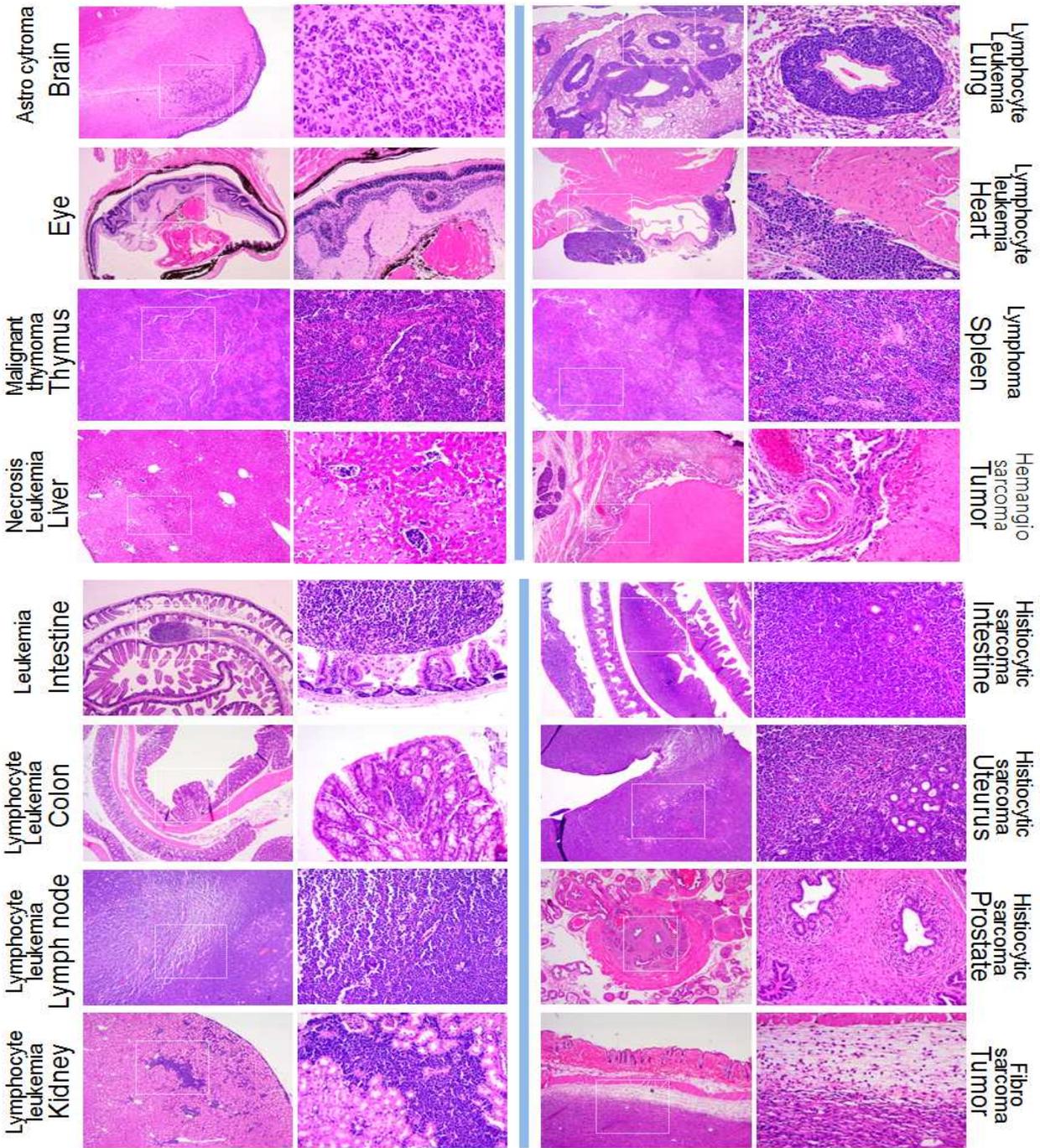
단위 : 암 발병 시기(일수)

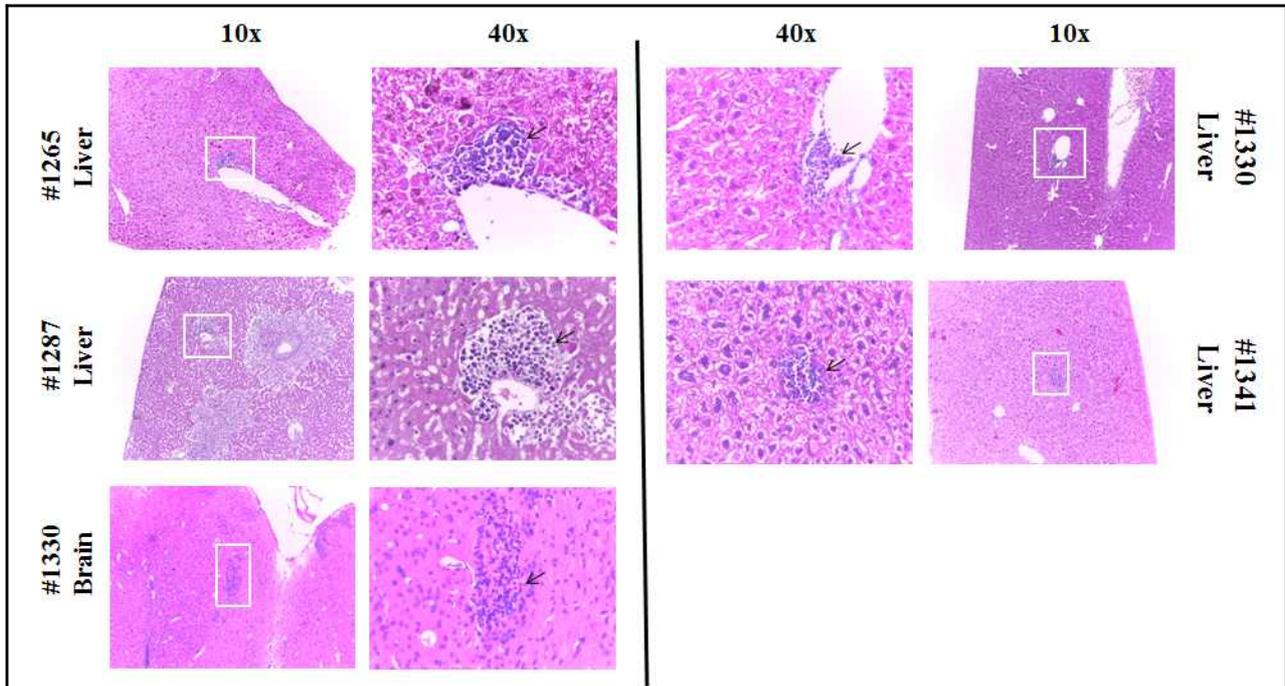
Tissue	Diagnosis	Incidence	Tissue	Diagnosis	Incidence
Brain	Astrocytoma	2	Lung	Hemangio sarcoma	1
	Neoplastic Perivascular cuffing	1		Leukemia	1
Liver	Hypertrophy	1		Lymphocytic leukemia	3
	Leukemia	2		Histiocytic sarcoma	2
	Lymphocytic leukemia	3	Malignant lymphoma	1	
	Necrosis	1	Lymph node	Leukemia	1
	Histiocytic sarcoma	3		Hemangio sarcoma	1
Malignant lymphoma	1	Histiocytic sarcoma		1	
kidney	Interstitial Nephritis	1	Small Intestine	Lymphoma	1
	Lymphocytic leukemia	3		Leukemia	1
spleen	Lymphoma	1		Lymphocytic leukemia	1
	Lymphocytic leukemia	2	Histiocytic sarcoma	1	
	Histiocytic sarcoma	2	Colon	Lymphocytic leukemia	1
	Malignant lymphoma	1		Bladder	Hypertrophy
Pancreas	Necrosis	1	Utreus		Lymphocytic leukemia
				Histiocytic sarcoma	1

<b>Heart</b>	Leukemia	1	<b>2/17</b> (210.5)	<b>Prostate</b>	Histiocytic sarcoma	1	<b>1/17</b> (213)
	Lymphocytic leukemia	1			Hemangio sarcoma	1	
<b>Thymus</b>	Thymoma Malignant	1	<b>5/17</b> (171)	<b>Tumor</b>	Fibro sarcoma	1	<b>3/17</b> (282.5)
	Sinusoid hyperplasia	1			Histiocytic sarcoma	1	
	Malignant thymoma	3					

○ 조직병리학적 검사

- 배율 : 좌; 100X, 우; 400X





### 사육관리 정보

#### 번식능력 및 번식방법(Breeding Scheme) (HT×WT 기준)

- 평균 한배 새끼 수 : 6~9마리
  - \* Breeding을 위해 HT×WT mating 실시
- C57BL/6J strain으로 생산되었으며, genetic background를 유지하기 위해서 p53 heterozygote(+/-) 또는 homozygote(-/-) 마우스를 C57BL/6J strain의 마우스로만 mating을 실시하여 strain을 유지
- homozygote mouse is also viable and fertile

#### 사육관리에서 특별히 요구되는 사항

- 16주 이상 수컷은 사나워 교배 시 암컷에 손상을 주는 경우가 많이 발생함
- C57BL/6 strain의 homozygote 마우스는 이르면 4개월부터 암이 발생하고, heterozygote도 연령이 증가하면서 암이 발생하므로 Trp53 KO strain을 유지하기 위해 각 세대는 3개월령 이전에 교배를 실시할 것을 권장함

### Reference

- Reinbold M *et al.* 2008. Common tumour p53 mutations in immortalized cells from Hupki mice heterozygous at codon 72. *Oncogene* 27(19):2788-94. PubMed: 17998932 MGI: J:135505