

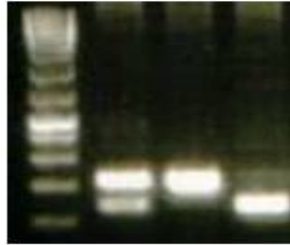


질환모델동물 정보서

관리번호		
질환모델동물 정보		
질환모델동물명	C57BL/6-Lep ^{em1hwl} /Korl	
유전자 조작 방법	KO created by RGEN-induced NHEJ	
Background Strain	C57BL/6JBomTac	
개발자	성명	이 한 웅
	연락처	02-2123-7642 / hwl@yonsei.ac.kr
분석자	성명	차 지 영
	연락처	032-899-6070 / jycha1014@gmail.com
개발일	2015-09-01	
이관동물 세대수		
Live animal	F3	
수정란/정자		
Genetic Engineering 정보		
유전자명	Leptin	
유전자 기능	satiety hormone made by adipose cells, 포만신호로 작용하며 KO 쥐는 비만 및 인슐린 저항성 유발	
유전자 조작 위치(Chr/gene/exon no. 포함)		
<input type="checkbox"/> Chromosome Location: Chr 6 <input type="checkbox"/> NCBI Gene ID: 16846 <input type="checkbox"/> Targeting Region: Exon 2(This transcript has 3 exons)		
Construct/Mutation Map		
○ 79-bp deletion created by RGEN-induced NHEJ		
Genotyping Strategy		
Genotyping Primer 정보 및 결과		
Primer	F	'5-TCCCAGGGAGGAAAATGTGCT-3'
Sequence	R	'5-TGACATGTTTCTCAGACTCTGGTT-3'

Loading: 2% agarose gel

Leptin KO



200 ← WT (219bp)
100 ← KO (140bp)

PCR result: M HT WT KO

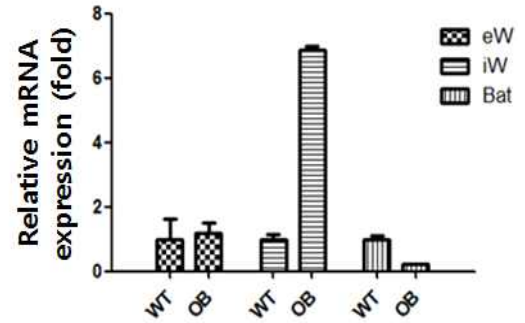
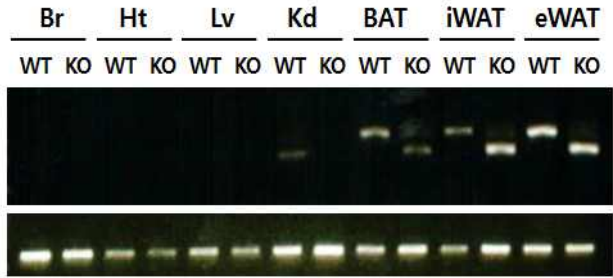
Genotyping Protocol

PCR 반응액 조제	구성물		농도		양	
	Sterile water			-	13.6	μl
	Genomic DNA		100	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1	μl
	dNTP		10	mM	0.4	μl
	PCR buffer		10	x	2	μl
	Forward primer		10	pM	1	μl
	Reverse primer		10	pM	1	μl
	Taq polymerase		1	$\text{U}/\mu\text{l}$	1	μl
PCR 반응 조건	단계		온도		시간	
	Pre-denaturation		95	$^{\circ}\text{C}$	5 min	00 sec
	Denaturation		95	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Annealing		60	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Elongation		72	$^{\circ}\text{C}$	0 min	30 sec
	Post-elongation		72	$^{\circ}\text{C}$	5 min	00 sec
	cycle 수		30 Cycles			
증폭 산물 크기	WT		219			bp
	KO		140			bp
특이사항	○ 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					

Expression test 정보 및 결과

RT-PCR 정보 및 결과

Primer	F	5'-AGCTGCAAGGTGCAAGAAGAA-3'				
	Sequence	R	5'-GGAATGAAGTCCAAGCCAGTGAC-3'			
PCR 반응 조건	단계		온도		시간	
	Pre-denaturation		94	$^{\circ}\text{C}$	3 min	sec
	Denaturation		94	$^{\circ}\text{C}$	min	30 sec
	Annealing		60	$^{\circ}\text{C}$	min	30 sec
	Elongation		72	$^{\circ}\text{C}$	min	15 sec
	Post-elongation		72	$^{\circ}\text{C}$	5 min	sec
	cycle 수		30 cycles			



- RT-PCR 및 qPCR 결과에서 leptin 유전자의 mRNA는 검출됨. 하지만 construct/mutation map에서 볼 수 있는 것처럼 mRNA sequence 상에서 premature stop codon이 유도되어 functional protein의 발현은 일어나지 못함. 결과적으로 비만 표현형 관찰되고 있음
 - 항목 : Br,Brain; Ht,Heart; Lv,Liver; Kd,Kidney; BAT,Brown adipose tissue; iWAT,inguinal white adipose tissue; eWAT,epididymal white adipose tissue
- Functional leptin의 결손으로 체내에서는 정상적인 negative feedback signaling이 작동하지 못하므로 inguinal white adipose tissue (iWAT)에서 leptin mRNA level이 증가되는 것이 확인됨

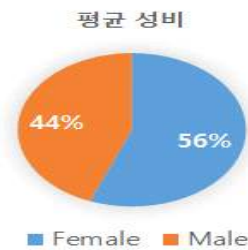
Western blot 정보 및 결과

antibody

해당 없음

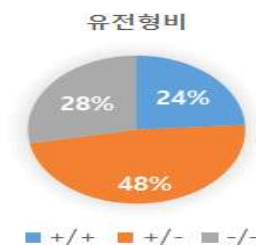
Phenotype 정보 (hetero x hetero 기준)

- 평균산자수 및 성비(n=25)



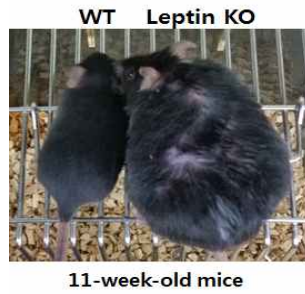
Total	Female	Male
5.0	56%	44%

- 유전형비(n=25)



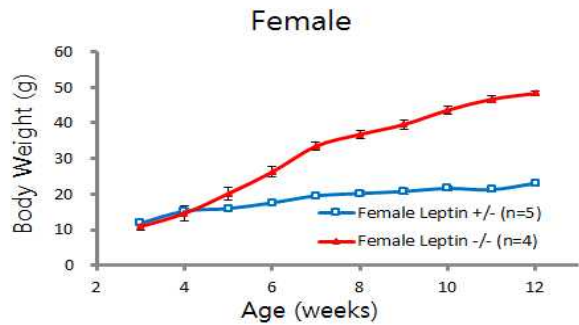
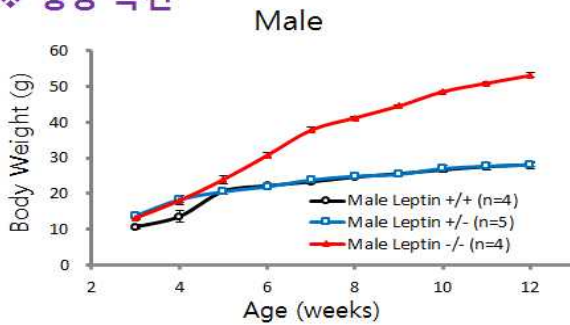
Wild(+/+)	Hetero(+/-)	Knock out(-/-)
24%	48%	28%

○ 성장그래프



- WT male, HT male/female, KO male/female

❖ 성장 곡선



Genotype	주령	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Average	Male Leptin +/+	10.7	13.6	20.7	22.2	23.3	24.7	25.6	26.7	27.6	28.1
	Male Leptin +/-	13.8	18.3	20.5	21.9	23.8	24.9	25.4	27.0	27.7	28.0
	Male Leptin -/-	13.2	18.1	23.9	30.7	37.8	41.3	44.6	48.6	51.0	53.2
STE	Male Leptin +/+	0.7	1.5	0.8	0.5	0.4	0.5	0.4	0.3	0.3	0.5
	Male Leptin +/-	0.9	0.6	0.2	0.3	0.8	0.7	0.7	0.9	1.0	1.0
	Male Leptin -/-	0.4	1.3	1.1	0.9	0.9	0.2	0.2	0.2	0.3	0.7

Genotype	주령	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Average	Female Leptin +/-	11.9	15.3	16.0	17.6	19.6	20.2	20.8	21.6	21.3	23.1
	Female Leptin -/-	11.0	14.6	20.2	26.3	33.5	36.8	39.6	43.6	46.7	48.3
STE	Female Leptin +/-	0.7	0.7	0.5	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7
	Female Leptin -/-	1.0	2.0	1.8	1.5	1.2	1.2	1.2	1.1	0.9	0.8

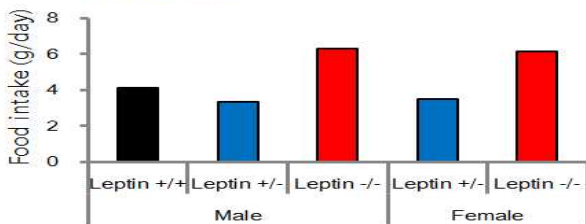
- Normal Chow diet에 의해 Homozygote Lep KO 마우스는 4주령에서부터 비만 표현형이 육안으로도 관찰됨

○ 사료섭취량 그래프

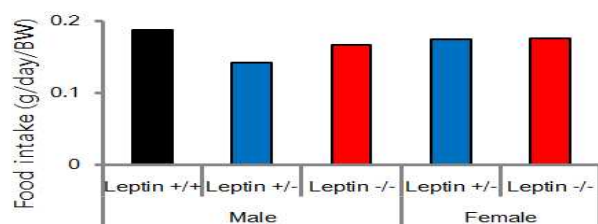
- WT male, HT male/female, KO male/female

- 사료명 : 일반 chow diet

❖ 식이 섭취량



Gender	Genotype	Food intake average (g/day)
Male	Leptin +/+ (n=4)	4.1
	Leptin +/- (n=5)	3.3
	Leptin -/- (n=4)	6.3
Female	Leptin +/- (n=5)	3.5
	Leptin -/- (n=4)	6.2



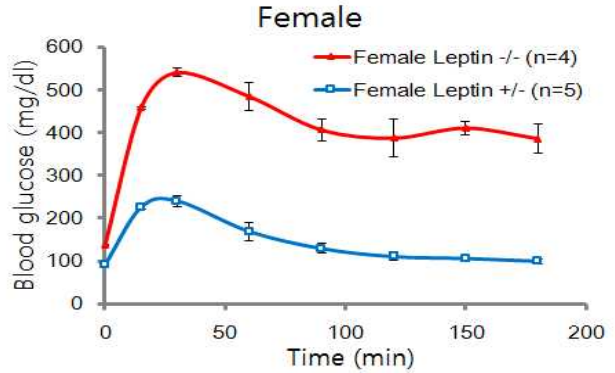
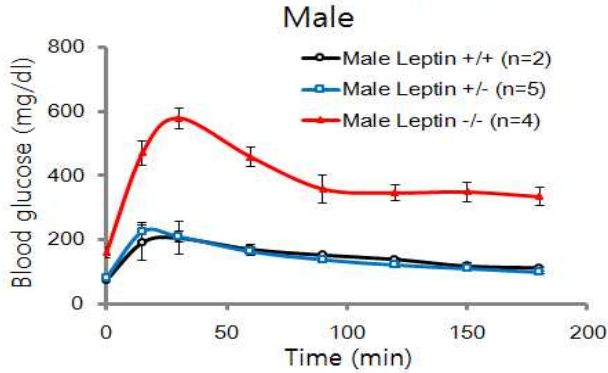
Gender	Genotype	Food intake average (g/day/BW)
Male	Leptin +/+ (n=4)	0.187
	Leptin +/- (n=5)	0.143
	Leptin -/- (n=4)	0.166
Female	Leptin +/- (n=5)	0.175
	Leptin -/- (n=4)	0.175

- Normal Chow diet에 대해 Lep KO 마우스의 식이 섭취량이 높으나, 체중으로 보정하면 차이가 없는 것으로 나타남

○ Glucose Tolerance Test(GTT)

- WT male, HT male/female, KO male/female

❖ Glucose tolerance test (GTT)



	Genotype \ 시간(분)	0	15	30	60	90	120	150	180
Average	Male Leptin +/+	74	191	205	170	152	139	117	112
	Male Leptin +/-	81	225	209	163	137	121	109	98
	Male Leptin -/-	159	470	579	458	358	346	349	334
STE	Male Leptin +/+	5.0	54.5	50.5	14.5	1.5	4.5	12.0	0.0
	Male Leptin +/-	6.3	28.8	15.5	13.7	7.7	8.3	6.4	4.1
	Male Leptin -/-	16.2	37.4	31.9	31.8	45.3	26.4	31.6	28.5

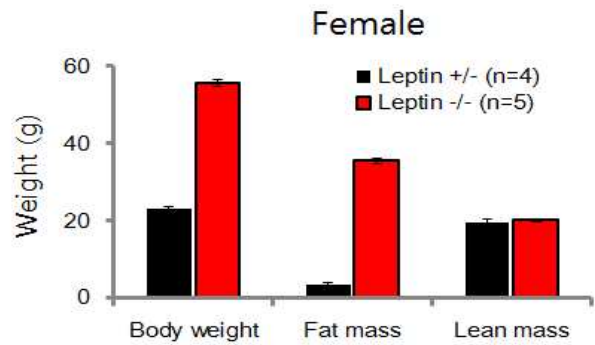
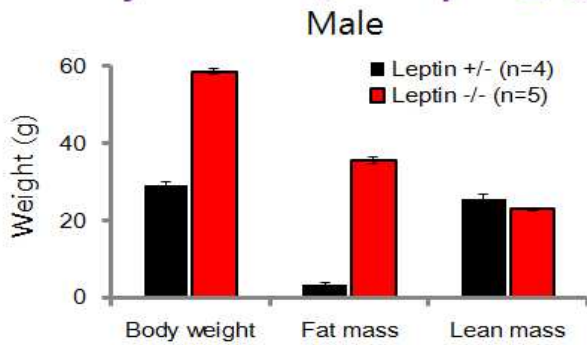
	Genotype \ 시간(분)	0	15	30	60	90	120	150	180
Average	Female Leptin +/-	91	226	241	169	129	110	106	99
	Female Leptin -/-	137	458	541	485	407	388	411	386
STE	Female Leptin +/-	0.6	5.8	12.9	22.0	11.3	9.9	6.9	5.9
	Female Leptin -/-	0.9	2.7	10.4	31.6	26.0	44.9	15.7	33.0

- 12~13주령 쥐를 대상으로 GTT를 실시한 결과 정상쥐에 비해 Leptin KO 쥐는 포도당 흡수능이 떨어져 있음

○ Body Contents (Mini-spec)

- HT male/female, KO male/female

❖ Body contents (Mini-Spec 결과)



	Male	BW (g)	Fat (g)	Lean (g)
		Body weight	Fat mass	Lean mass
Average	Leptin +/- (n=4)	29	3.5	25.5
	Leptin -/- (n=5)	59	35.7	22.9
STE	Leptin +/-	0.979	0.373	1.219
	Leptin -/-	0.832	0.921	0.425

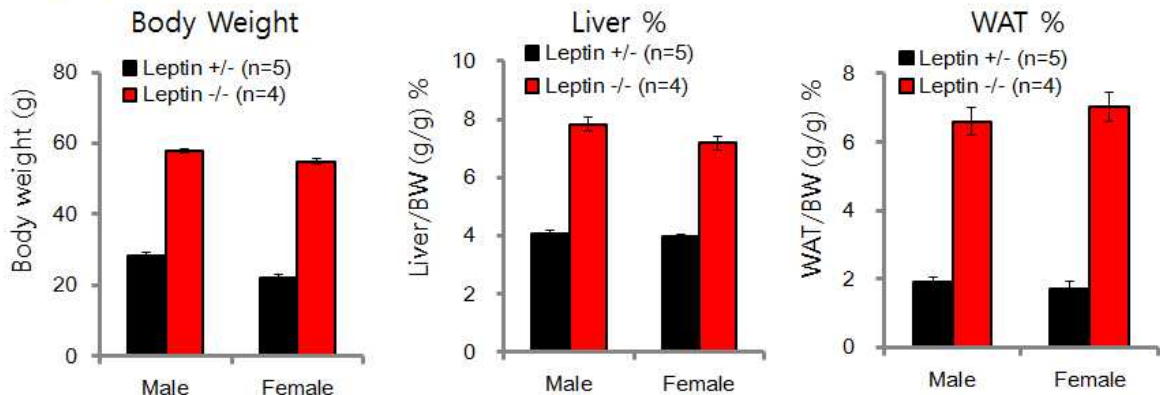
	Female	BW (g)	Fat (g)	Lean (g)
		Body weight	Fat mass	Lean mass
Average	Leptin +/- (n=4)	23	3.4	19.6
	Leptin -/- (n=5)	56	35.4	20.1
STE	Leptin +/-	0.768	0.439	0.649
	Leptin -/-	0.786	0.740	0.385

- Leptin KO쥐의 체중이 많이 증가되어 있으며, 이는 지방량 증가 때문임

○ 장기 무게

- HT male/female, KO male/female

❖ 장기 무게



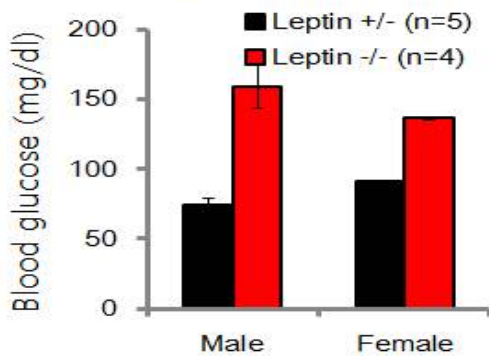
	BW(g)		Liver(%)		WAT(%)		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
Average	Leptin +/- (n=5)	28	22	4.1	4.0	1.9	1.7
	Leptin -/- (n=4)	58	55	7.8	7.2	6.6	7.0
STE	Leptin +/-	1.011	0.780	0.084	0.078	0.146	0.251
	Leptin -/-	0.733	0.787	0.250	0.249	0.419	0.421

- 장기 무게를 측정한 결과 간과 백색지방의 양이 Leptin KO 쥐에서 현저히 증가해 있음

○ 혈중 Glucose 농도

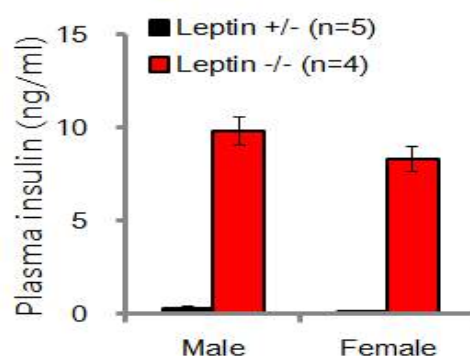
- HT male/female, KO male/female

❖ Fasting Blood Glucose



	Blood Glc(mg/dl)		
	Male	Female	
Average	Leptin +/- (n=5)	74	91
	Leptin -/- (n=4)	159	137
STE	Leptin +/-	5.000	0.570
	Leptin -/-	16.190	0.859

❖ Fasting Plasma Insulin



	Insulin (ng/ml)		
	Male	Female	
Average	Leptin +/- (n=5)	0.3	0.1
	Leptin -/- (n=4)	9.8	8.3
STE	Leptin +/-	0.093	0.044
	Leptin -/-	0.742	0.662

- Gender와 상관없이 공복 시 혈중 포도당 농도와 혈장 인슐린 농도가 Leptin KO에서 높게 나타남. 혈중 leptin 농도는 측정하였으나, 농도가 낮아 detection 되지 않음 (5주령 male)

○ 혈액학적 검사

- HT male/female, KO male/female

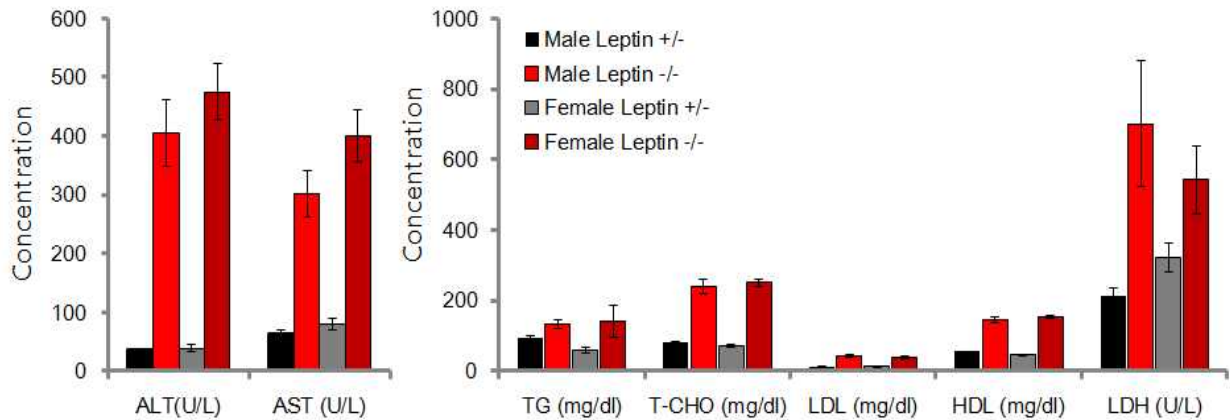
- 분석기기 : AU-480 Olympus(Japan)

- 항목 : ALT(Alanine aminotransferase), AST(Aspartate aminotransferase), Crea(Creatinine),

BUN(Blood urea nitrogen), CHO(Cholesterol), TG(Triglyceride), LDH(Lactate dehydrogenase)

- 소견 : 간손상 마커인 ALT와 AST의 농도가 male, female Leptin KO에서 높게 나타남.
- 혈중 중성지방, 콜레스테롤, LDH의 농도가 male, female Leptin KO에서 높게 나타남.
- Creatine, BUN 농도는 gender, genotype과 상관없이 wild type과 비슷한 양상을 보임

❖ Blood biochemistry

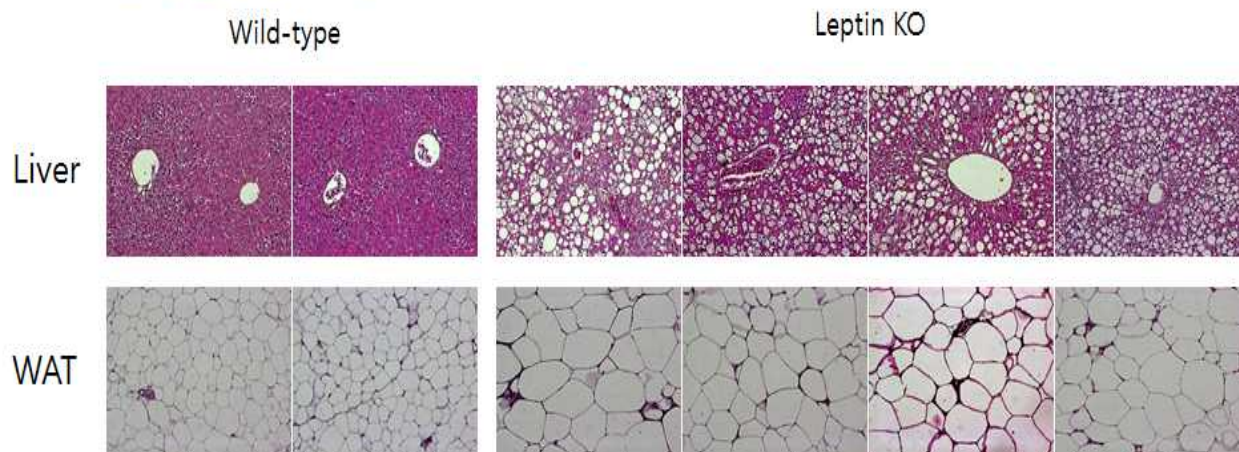


		ALT(U/L)	AST (U/L)	CREAT (mg/dl)	BUN(mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	T.G. (mg/dl)	LDH (U/L)	HDL(mg/dl)	LDL(mg/dl)
average	Male Leptin +/- (n=5)	35.4	63.0	0.28	22.1	80.3	93.2	212.9	56.0	12.0
	Male Leptin -/- (n=4)	405.2	300.8	0.32	27.3	239.9	134.5	701.0	145.8	42.3
	Female Leptin +/- (n=5)	38.7	79.8	0.24	20.5	69.9	59.8	321.4	45.5	12.2
	Female Leptin -/- (n=4)	474.9	400.8	0.30	27.4	250.2	142.3	542.6	154.6	39.9
ste	Male Leptin +/-	1.932	7.137	0.005	1.752	1.573	6.310	22.201	0.889	0.641
	Male Leptin -/-	56.012	39.107	0.005	2.172	20.861	12.470	179.831	7.955	4.741
	Female Leptin +/-	6.294	8.978	0.007	0.956	4.128	8.492	39.926	2.882	0.534
	Female Leptin -/-	48.187	44.072	0.014	0.533	11.794	44.488	96.484	4.502	4.107

○ 조직염색(H&E)

- WT male/female, KO male/female
- 배율 : 20X

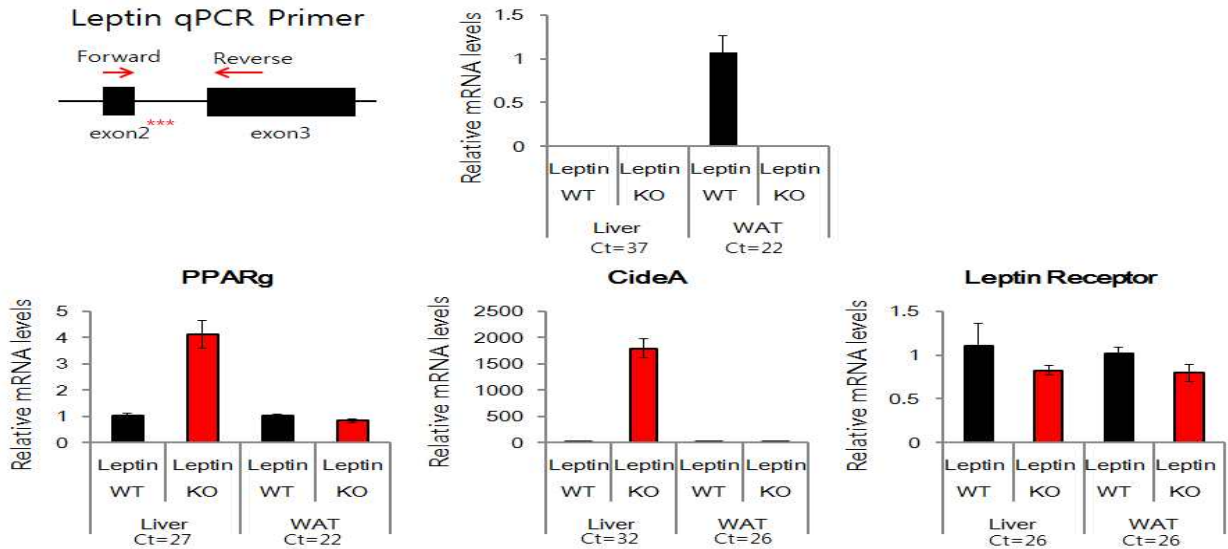
❖ 조직 염색 (H & E)



- 소견 : 정상쥐에 비해 Leptin KO는 Liver에 lipid droplet이 많고 macrophage의 침윤이 관찰됨. 정상쥐에 비해 Leptin KO는 WAT의 크기가 크고 macrophage의 침윤이 관찰됨

- 유전자 발현 분석
- WT male/female, KO male/female

❖ 유전자 발현 분석



- Quantitative real-time PCR를 이용하여 유전자 발현 분석 실시함
- 소견 : Leptin 유전자 deletion부위를 확인할 수 있는 primer를 제작하여 확인한 결과 Leptin 유전자 발현은 liver에서 매우 낮고 주로 WAT에서 발현됨. Leptin KO liver와 WAT에서 검출 되지 않음. 지방세포 축적과 관련된 PPARg와 CideA의 발현 증가가 liver에서 관찰됨. 한편 이들 유전자 발현은 WAT에서는 정상쥐와 비교하여 차이가 없음. Leptin Receptor의 발현은 leptin 유전자 KO에 영향을 받지 않음

사육관리 정보

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

- 평균 한배 새끼 수 : 6~10마리
- * Breeding을 위해 HT×WT mating 실시, 평균 8.5마리(n=77)
- C57BL/6J strain으로 생산되었으며, genetic background를 유지하기 위해 C57BL/6J strain의 마우스로만 mating을 실시하여 strain을 유지
- homozygote mouse는 불임이므로 heterozygote 상태로 breeding 유지할 것

사육관리에서 특별히 요구되는 사항

- homozygote mouse의 경우 low fat 사료 투여 바람

Reference

- Zhang F et al., Crystal structure of the obese protein leptin-E100. Nature 387(6629): 206-9. 1997.