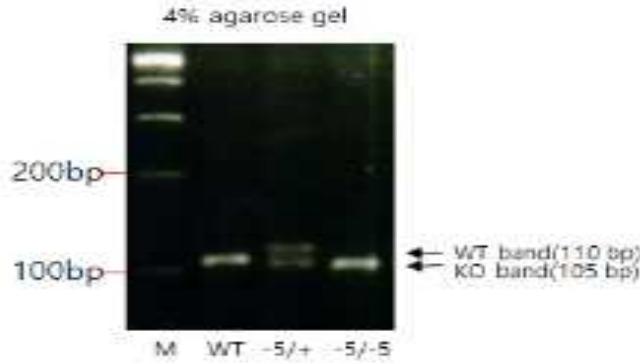




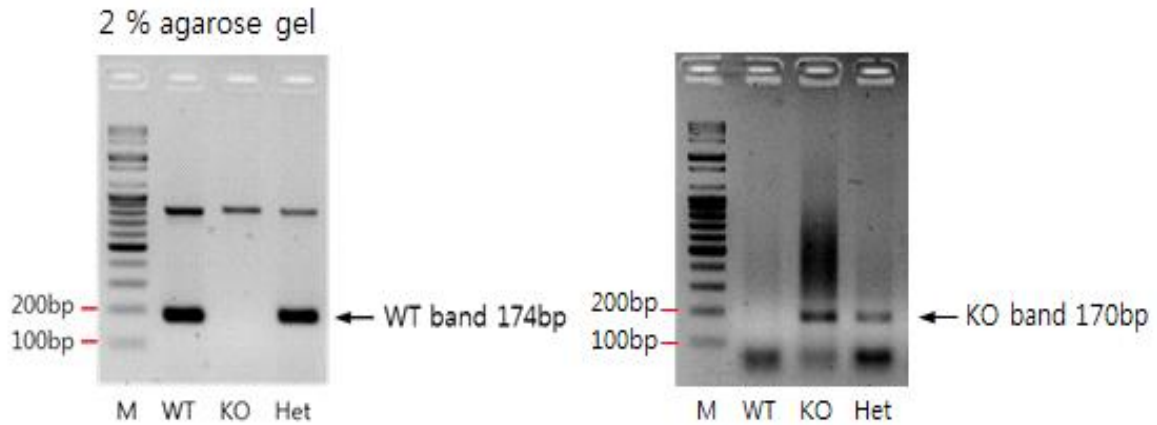
질환모델동물 정보서

관리번호		
질환모델동물 정보		
질환모델동물명	C57BL/6-Lepr ^{em1hwl} /Korl	
유전자 조작 방법	KO created by RGEN-induced NHEJ	
Background Strain	C57BL/6JBomTac	
개발자	성명	이 한 용
	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 receptor	
유전자 기능	Receptor for the fat cell-specific hormone leptin (Knockout 쥐는 비만 및 당뇨병 유발)	
유전자 조작 위치(Chr/gene/exon no. 포함)		
<input type="checkbox"/> Chromosome Location: Chr 4 <input type="checkbox"/> NCBI Gene ID: 16847 <input type="checkbox"/> Targeting Region: Exon 2(This transcript has 18 exons)		
Construct/Mutation Map		
<p>WT TGTGGACCACCGAACACAACCGATGACTCCTTTCTCTCACCTGCTGGAGCCCAACAATGCCTCGGCTTTGAAGGGGGCTTCTGAA C G P P N T T D D S F L S P A G A P N N A S A L K G A S E KO TGTGGACCACCGAACACAACCGATGACTCCTTTCTCTCACCTGCTGGAGCCCAACAATGC-----CTTTGAAGGGGGCTTCTTGA C G P P N T T D D S F L S P A G A P N N A F E G G F * (-5Δ allele)</p> <p>← 20 aa → ← 7 aa (mutant) →</p>		
○ 5-bp deletion created by RGEN-induced NHEJ		
Genotyping Strategy		
Genotyping Primer 정보 및 결과 1		
Primer Sequence	F	'5-CTCCTTTCTCTCACCTGCTG-3'
	R	'5-ACTCAGGAACGTAGATACCACTT-3'



Genotyping Protocol 1

PCR 반응액 조제	구성물		농도		양	
	Sterile water			-	13.9	μl
Genomic DNA	50~100	$\text{ng}/\mu\text{l}$		1	μl	
dNTP	2.5	mM		2	μl	
PCR buffer	10	x		2	μl	
Forward primer	10	pM		2	μl	
Reverse primer	10	pM		2	μl	
Taq polymerase	2	$\text{U}/\mu\text{l}$		0.1	μl	
PCR 반응 조건	단계		온도		시간	
	Pre-denaturation	94	$^{\circ}\text{C}$	2 min	sec	
	1' Denaturation	94	$^{\circ}\text{C}$	min 20	sec	
	1' Annealing	65	$^{\circ}\text{C}$	min 15	sec	
	1' Elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	min 10	sec	
	1' cycle 수	10 (cycle당 annealing temp. 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 씩 감소)				
	2' Denaturation	94	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	2' Annealing	60	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	2' Elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	2' cycle 수	30				
Post-elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	5 min	sec		
증폭 산물 크기	WT				219	bp
	KO				140	bp
특이사항	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2-step PCR method를 사용 ○ 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 					
Genotyping Primer 정보 및 결과 2						
Primer Sequence	wild F	5'-AACCAATGCCTCGGCTTT-3'				
	mutant F	5'-CAAACAATGCCTTTGAAGGG-3'				
	common R	5'-ACTGAAGGGAAGACACTGGC-3'				



Genotyping Protocol 2

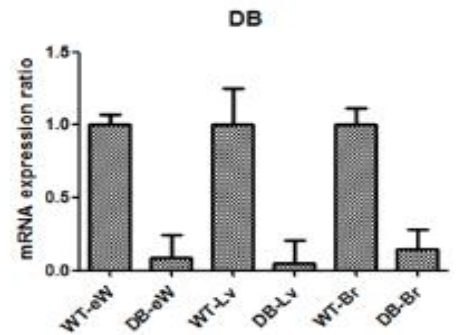
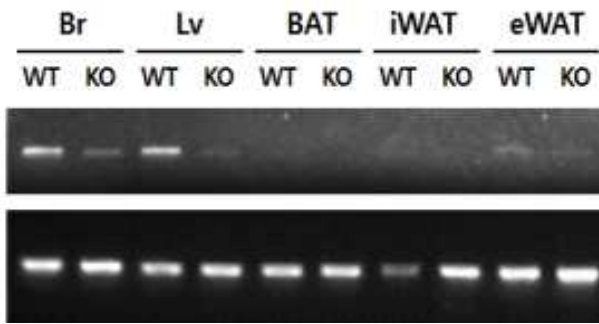
PCR 반응액 조제	구성물		농도		양	
	Sterile water			-	13.9	μl
Genomic DNA	50~100	ng/ μl		1	μl	
dNTP	2.5	mM		2	μl	
PCR buffer	10	x		2	μl	
Forward primer	10	pM		0.5	μl	
Reverse primer	10	pM		0.5	μl	
Taq polymerase	2	U/ μl		0.1	μl	
PCR 반응 조건	단계		온도		시간	
	Pre-denaturation	95	$^{\circ}\text{C}$	3 min	sec	
	Denaturation	95	$^{\circ}\text{C}$	min 20	sec	
	Annealing	58	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	Elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	cycle 수	30				
Post-elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	5 min	sec		
증폭 산물 크기	WT	174			bp	
	KO	170			bp	
특이사항	○ 각 샘플에 대해 두 번의 PCR을 실시함					

Expression test 정보 및 결과

RT-PCR 정보 및 결과

Primer Sequence (leptin)	F	5'-TGATGTGTCAGAAATTCTATGTGGT-3'				
	R	5'-AGCAACAGTGGAAGACTGTTTTG-3'				
Primer Sequence (hprt)	F	5'-AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG-3'				
	R	5'-AGAGGTCCTTTTCACCAGCAA-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	62	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
	Elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	min 30	sec	
Post-elongation	72	$^{\circ}\text{C}$	5 min	sec		

cycle 수 30 cycles



○ RT-PCR 및 qPCR 결과에서 leptin receptor 유전자의 mRNA가 현저하게 감소되어 있음. 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; Lv,Liver; BAT,Brown adipose tissue; iWAT,inguinal white adipose tissue; eWAT,epididymal white adipose tissue

Western blot 정보 및 결과

antibody

해당 없음

Phenotype 정보 (hetero x hetero 기준)

○ 평균산자수 및 성비(n=34)



Total	Female	Male
5.5	33.3%	66.7%

○ 유전형비(n=34)



Wild(+/+)	Hetero(+/-)	Knock out(-/-)
12.1%	57.6%	30.3%

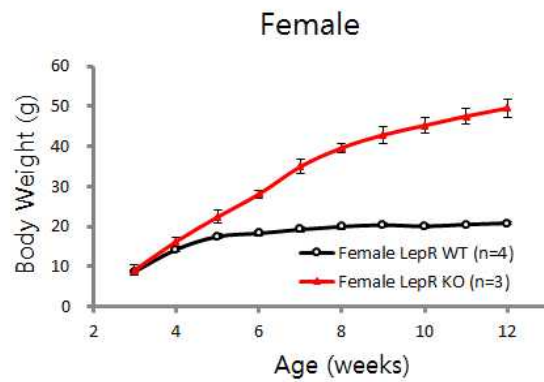
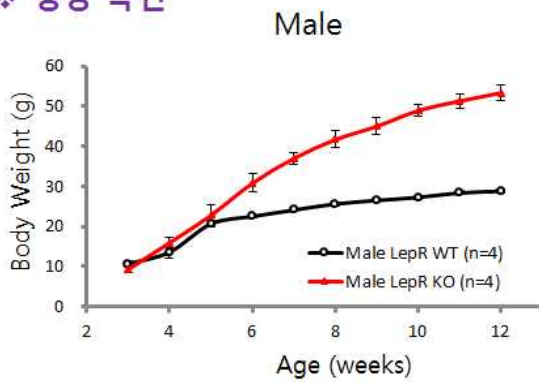
○ 성장그래프



10 weeks old mice

- WT male/female, KO male/female

❖ 성장 곡선



	Genotype \ 주령	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Average	Male LepR WT	10.7	13.6	20.7	22.5	24.1	25.6	26.5	27.3	28.4	28.8
	Male LepR KO	9.3	15.9	22.8	30.8	37.0	41.7	45.0	48.9	51.3	53.4
STE	Male LepR WT	0.7	1.5	0.8	0.4	0.5	0.6	0.6	0.4	0.5	0.5
	Male LepR KO	0.9	1.2	2.6	2.3	1.5	2.1	2.1	1.5	1.9	2.1

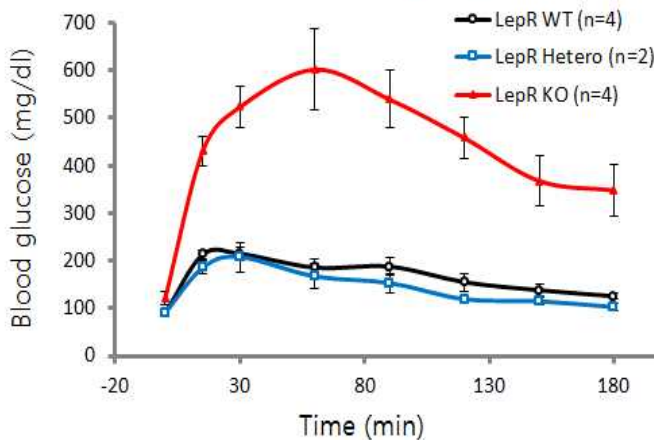
	Genotype \ 주령	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Average	Female LepR WT	10.7	13.6	20.7	22.5	24.1	25.6	26.5	27.3	28.4	28.8
	Female LepR KO	9.3	15.9	22.8	30.8	37.0	41.7	45.0	48.9	51.3	53.4
STE	Female LepR WT	0.7	1.5	0.8	0.4	0.5	0.6	0.6	0.4	0.5	0.5
	Female LepR KO	0.9	1.2	2.6	2.3	1.5	2.1	2.1	1.5	1.9	2.1

- Normal Chow diet에 의해 Homozygote LepR KO 마우스는 4주령에서부터 비만 표현형이 육안으로도 관찰됨. 이후 WT 대비 현저한 몸무게 증가가 확인됨

○ Glucose Tolerance Test(GTT)

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

❖ Glucose tolerance test (GTT)



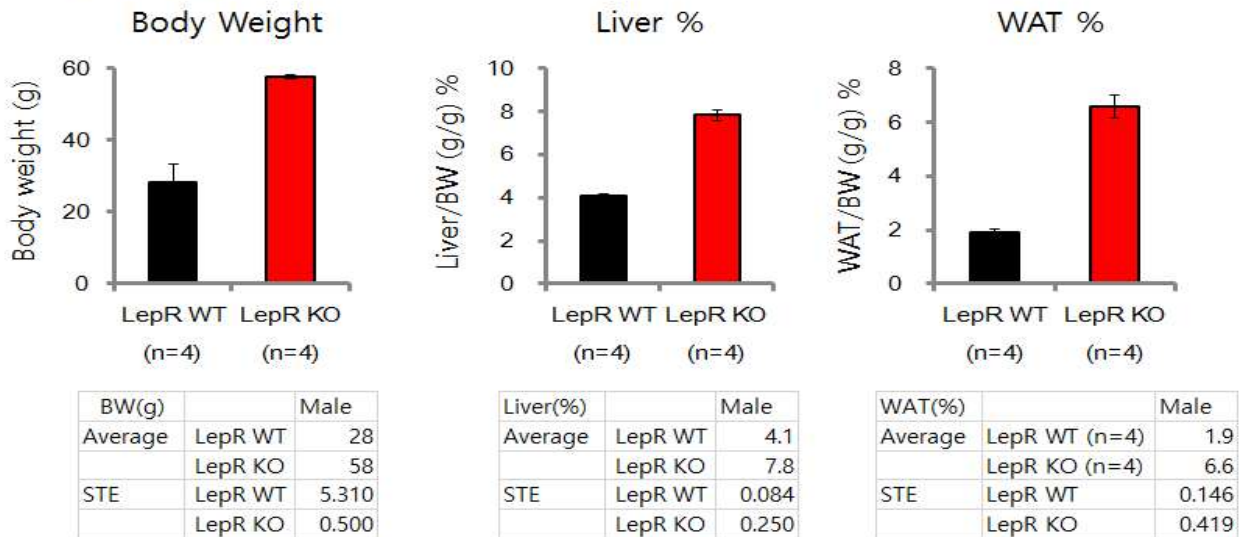
	Genotype \ 시간(분)	0	15	30	60	90	120	150	180
Average	LepR WT	91	213	215	186	188	155	138	126
	LepR Hetero	91	186	208	168	154	120	115	103
	LepR KO	122	430	523	602	539	458	368	348
STE	LepR WT	4.6	8.4	14.5	16.6	18.0	18.8	11.2	6.9
	LepR Hetero	8.0	13.5	31.0	27.5	20.5	6.5	9.0	7.0
	LepR KO	13.8	31.0	44.5	85.8	60.3	42.2	52.9	54.2

- 16시간 금식 후, 1g/kg 농도로 포도당을 IP injection 하고 시간별로 혈중 포도당 농도를 측정함. LepR KO 마우스는 정상쥐와 비교하여 내당능 장애를 보임

○ 장기 무게

- WT male/female, KO male/female

❖ 장기 무게

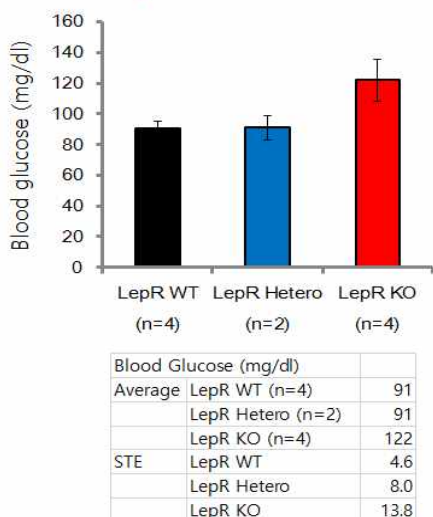


- LepR KO 쥐의 체중은 2배 정도 증가하였으며, 간과 백색지방의 무게가 각각 2배, 3배 정도 LepR KO에서 증가함. 즉, 체중 증가는 대부분 지방 축적 증가에 의한 것으로 여겨짐

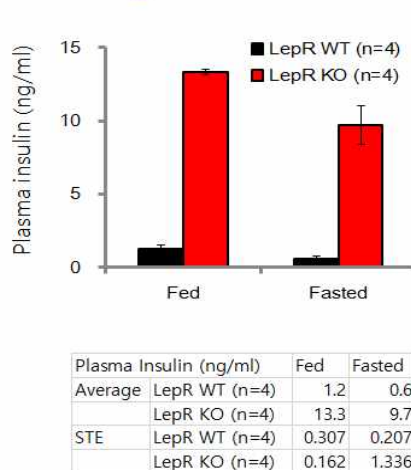
○ 혈중 Glucose 농도

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

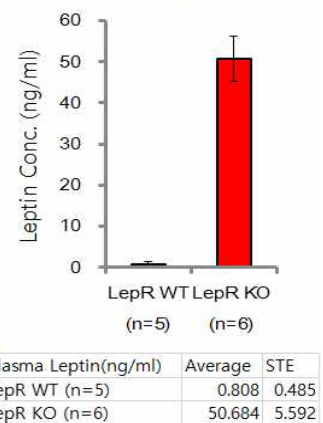
❖ Fasting Blood Glucose



❖ Fasting Plasma Insulin



❖ Plasma Leptin

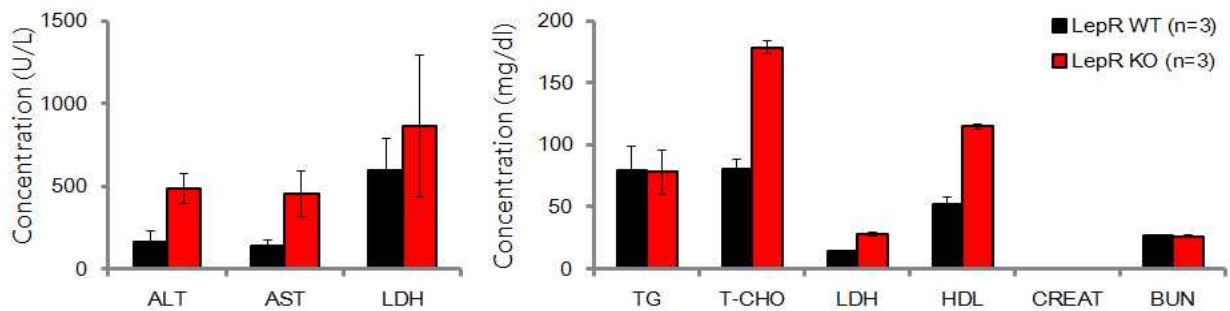


- 공복 혈당 및 인슐린 농도가 LepR KO에서 현저하게 증가하여 있음. LepR KO 마우스에서는 leptin receptor의 결손으로 정상적인 negative feedback signaling이 작동하지 못해서 leptin 발현이 증가되어 있는 것이 확인됨

○ 혈액학적 검사

- WT 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 : 간독성을 나타내는 ALT와 AST농도가 LepR KO에서 높게 나타남. 혈중 중성지방의 농도는 정상쥐와 비교해 높지 않으나, 혈중 콜레스테롤의 농도는 현저하게 증가해 있음. Creatine과 BUN의 농도는 정상쥐와 차이가 없음

❖ Blood biochemistry

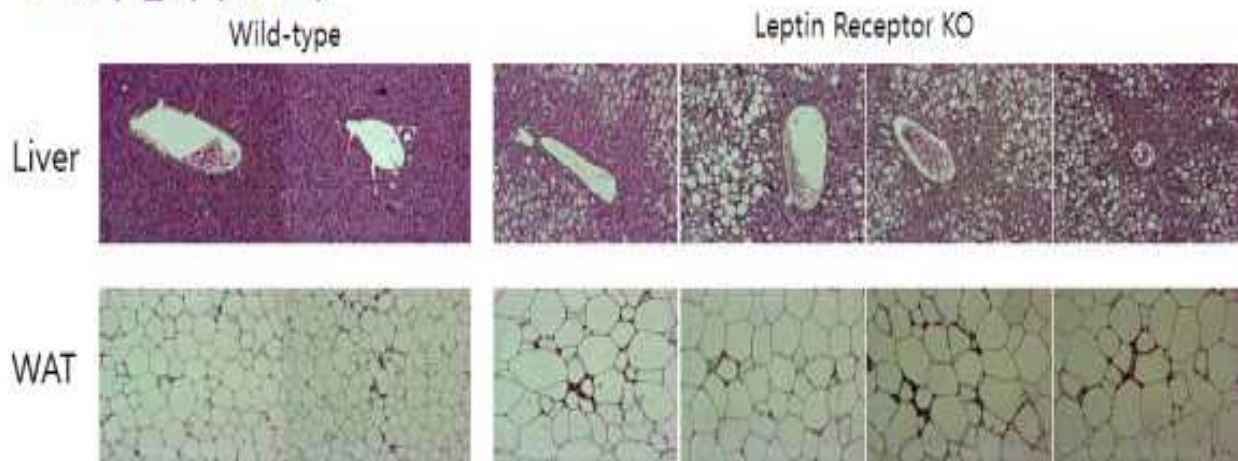


I)		ALT(U/L)	AST (U/L)	CREAT (mg/dl)	BUN(mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	T.G. (mg/dl)	LDH (U/L)	HDL(mg/dl)	LDL(mg/dl)
Average	LepR WT (n=3)	164.8	139.8	0.2	26.5	80.4	79.7	593.1	52.2	14.4
	LepR KO (n=3)	486.3	452.0	0.3	26.3	178.0	78.2	862.8	114.5	28.4
STE	LepR WT (n=3)	64.7	37.7	0.0	0.9	7.5	19.4	196.8	5.8	0.8
	LepR KO (n=3)	91.4	135.1	0.0	1.0	5.2	17.8	431.0	2.3	1.6

○ 조직염색(H&E)

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

❖ 조직 염색 (H & E)

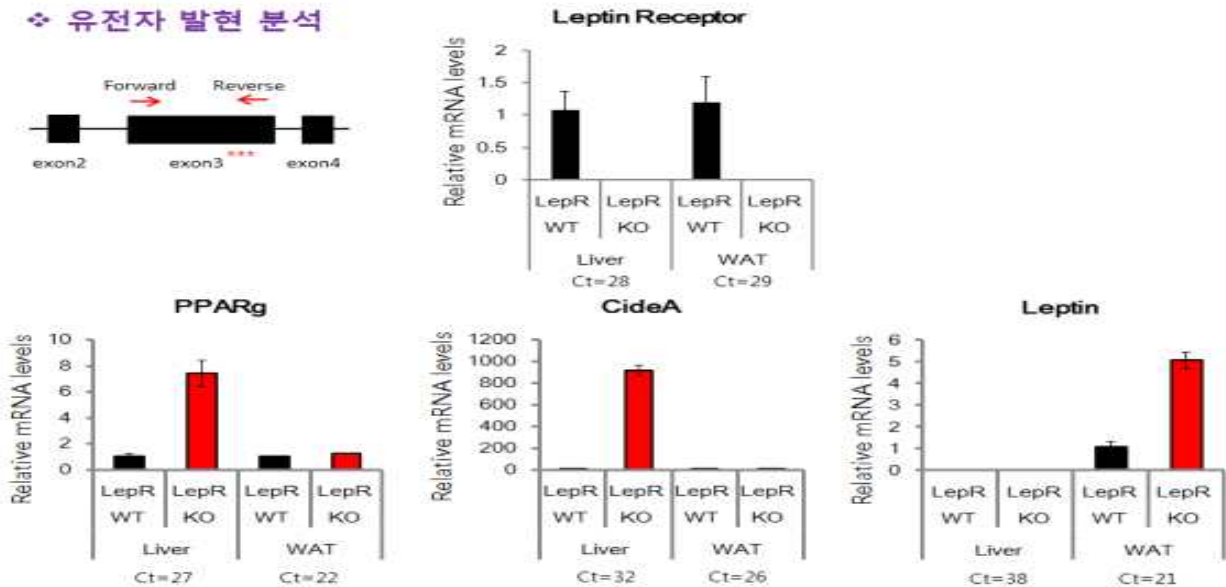


- 소견 : LepR KO 간조직에 지방이 많이 축적되어 있고, macrophage의 침윤이 관찰됨. LepR KO 백색지방 조직의 지방세포의 크기가 매우 크고, macrophage의 침윤이 관찰됨

○ 유전자 발현 분석

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

❖ 유전자 발현 분석



- Quantitative real-time PCR를 이용하여 유전자 발현 분석 실시함
- 소견 : Leptin receptor의 deletion 부위를 확인할 수 있는 primer를 합성하여 확인한 결과, Leptin receptor는 간과 지방조직에 발현되며, KO 쥐의 경우 발현이 되지 않음. 지방 축적과 관련된 유전자 발현을 분석한 결과, PPARg와 CideA의 발현이 LepR KO 간 조직에서 현저하게 발현이 증가되어 있음. 반면에 이들 유전자 발현은 지방조직에서는 발현 변화가 없음. Leptin은 지방조직에서만 발현되는데, LepR KO의 경우 WAT에서 발현이 현저하게 증가함. 이는 leptin 신호가 전달되지 않아 일어나는 현상으로 여겨지며 LepR KO 혈중 leptin 농도가 정상쥐에 비해 증가된 결과임

사육관리 정보

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

- 평균 한배 새끼 수 : 6~10마리
- * Breeding을 위해 HT×WT mating 실시, 평균 7마리(n=46)
- 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

- Coleman DL, Hummel KP. 1973. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. Diabetologia 9(4):287-93.
- Cohen P, Zhao C, Cai X, Montez JM, Rohani SC, Feinstein P, Mombaerts P, Friedman JM. 2001. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. J Clin Invest 108(8):1113-21.