



동물실험계획 승인신청서

접수일자 :

연구 과제명	(국문) 유방암 특이적 삽입/ 결손 (InDel) 돌연변이를 표적으로 하는 CRISPR-Cas9 유전자 가위 기반 치료법 기술 개발			
	(영문) Development of CRISPR-Cas9 based gene therapy that targets breast cancer-specific InDel mutation			
연구 책임자	성 명	주진명	직 위	부교수
	소 속	UNIST / 바이오메디컬공학과		
	연락처	052-217-3251	E-mail	jjoo@unist.ac.kr
	동물실험윤리교육 이수번호		BIC-Study-202402-399	

* 동물실험계획 심의 후 승인 된 것에 한해서만 승인번호를 부여합니다. *

[윤리적 동물실험 방법의 준수]

1. 본인은 UNIST 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 규정 및 동물실험 관련 법규를 준수할 것을 약속합니다.
2. 본인은 제출한 계획서의 실험 방법을 준수할 것이며 방법 또는 실험동물 마리 수 등 계획을 변경할 경우 변경신청서를 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.
3. 본인은 동물이 참을 수 없는 고통을 호소하거나 질병에 이환되었을 때 안락사를 포함한 수의사의 응급조치가 이루어지는 것에 동의합니다(응급조치 전에 수의사의 지시가 있을 것입니다).
4. 생체효능검증실 시설을 이용하여 동물실험에 참여하는 경우, 해당 하는 모든 연구자는 생체효능검증실 이용자 교육과 동물실험윤리 교육을 이수하였습니다.
5. 본 계획서와 연관이 있는 논문 발표 후 해당 논문에 대한 정보를 위원회에 제공할 예정입니다.
6. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 기간 만료 전 재승인(연장)신청을 통해 동물실험윤리위원회에 이를 알리고 동의를 얻을 것입니다.

계획서에 기재된 사항들은 정확하며 위 사실의 위반 시 동물실험 및 동물실험시설의 이용 제한을 포함한 불이익을 감수할 것을 아래와 같이 서약합니다.

2024 년 03 월 05 일

연구책임자

주진명

(서명 또는 인)



1. 실험 수행 기본 정보 (Information of Investigators)

1-1. 동물실험 수행자에 대한 정보를 기입하여 주십시오.

성명 (Name)	소속 (Department)	직급 (Position)	연락처(Contact) (Cell-phone#)	동물실험윤리교육 이수번호	연구자의 역할 (Role) (담당연구자/참여연구자)
주진명	바이오메디컬공학과	부교수	010-6676-5270	BIC-Study-2024 02-399	(연구책임자)
임지수	바이오메디컬공학과	대학원생	010-4758-8340	BIC-Study-2024 02-319	(담당연구자)

* 동물실험을 수행할 모든 연구자를 기입하기 바라며, 각 연구자가 실험 중 어떤 역할을 하는지 기입해주시요.

연구책임자가 직접 동물실험을 수행할 경우 아래와 같이 위 란에 **해당 정보를 기입하여** 주시기 바랍니다.

* **관리담당연구자**는 동물실험윤리위원회(IACUC) 및 생체효능검증실과 연락 및 관련 업무 관리를 담당해야 합니다.
반드시 한 명 이상 지정해야 합니다.

1-2. 실험수행 기간

동물실험윤리위원회 승인일 ~ 2025 년 6월 30 일 까지 / 총 (1)년 중 (1)년째

* **1회 과제 승인 기간은 최대 1년**이며, 1년을 초과하여 실험이 진행 될 경우, 반드시 **기간 만료 전 재승인(연장) 신청**이 이루어져야 합니다.

* 재승인 신청은 최대 2회(총 연구기간 3년)까지 가능합니다.

2. 동물실험의 범주 및 종류 (Grade and Procedure of Study)

2-1. 동물실험의 범주를 선택하여 주십시오. (Level of Pain)

	Grade A: 죽은 생물체를 이용하는 실험 또는 식물, 세균, 원충 또는 무척추동물을 이용한 교육 또는 연구
	Grade B: 척추동물을 사용하지만 거의 스트레스를 주지 않는 교육 또는 연구
	Grade C: 척추동물을 대상으로 단시간의 경미한 통증 또는 스트레스가 가해지는 교육 또는 연구
V	Grade D: 척추동물을 대상으로 중등도 이상의 고통이나 억압을 동반하는 교육 또는 연구
	Grade E: 척추동물을 대상으로 극심한 고통이나 억압 또는 회피할 수 없는 스트레스를 동반하는 교육 또는 연구



2-2. 동물실험의 종류를 선택하여 주십시오. (V) (Select Procedure)

V	시료의 투여 및 접종 (Material injection or inoculation)	V	재료 및 시료의 채취 (Sampling)	유전 및 육종 (Genetics or Breeding)
V	외과적 처치 (Surgical procedure)		방사선 조사 (Irradiation)	감염 (Infection)
	생리적 상태 및 행동 관찰 (Observation of physical status or behavior)	V	발암 (Carcinogenesis)	기타 (Other)

3. 실험동물 (Laboratory Animals)

- * 생체효능검증실로 동물을 반입할 경우, 지정된 동물생산회사에서는 신청 후 다음 주에 반입 가능합니다.
(대한바이오링크, 오리엔트바이오, 중앙실험동물)
- * 지정되지 않은 동물생산회사 및 연구협력기관(국내외)으로부터의 동물 반입을 원하실 경우 health report(최근 18 개월 분량), SPF certification을 사전에 제출하셔야 합니다.

구분	1		2		3	
품종(Species)	mouse		mouse			
계통명(Strain)	BALB/c		BALB/c-nude			
유전자형 (Genotype_)	Wild(V)	GEM()	Wild()	GEM(V)	Wild()	GEM()
성별(Sex)	Female		Female			
일령, 주령(Age)	4~6weeks		4~6weeks			
체중(Weight)	18-20g		18-20g			
수량(Numbers)	268		86			
미생물 성장 (Microbiological status)	germfree	SPF V	germfree	SPF V		
	gnotobiotic	conventional	gnotobiotic	conventional		
공급처(시설명) Source(vender)	오리엔트 바이오		오리엔트 바이오			

* 필요한 경우 동물정보 입력 칸은 추가하여 입력가능 하며, 추가하실 경우 위 표를 [복사]해서 이 줄에 [붙여넣기]하시면 됩니다.

4. 동물실험 대체법과 불필요한 동물실험의 금지 (Alternatives and Rationale for Animal use)

* 가능하면 동물실험을 줄이기 위한 노력을 확인하고자 합니다.

4-1. 동물실험의 타당성을 확인하기 위한 것입니다. 다음 사항을 기술하여 주십시오.
(To verify the validity of animal experiments. Please describe the followings.)

정보 확인처 또는 데이터 베이스(Data References):

[World J Oncol. 2022 Oct; 13\(5\): 249-258.](#)

[Molecules. 2019 Sep; 24\(18\): 3241.](#)

동물 종 선택의 적절성(Appropriateness of the selected species):

1. 비인간 영장류 대동물 모델은 마우스보다 인간과 더 유사하지만 비용, 관리, 데이터의 통계적 유의성 측면에서 현실적으로 사용이 어렵다.
2. 랫과 비교해서는 마우스 모델이 형질전환모델과 분자생물학 실험을 하는데 필요한 항체에 접근이 용이하고, 약물 투여 실험의 경우 마우스가 몸집이 더 작아 더 적은 양의 약물을 사용할 수 있어 더 경제적인 실험이 가능하다.
3. 마우스 모델은 예쁜꼬마선충, 초파리, 제브라 피시에 비교해서 인간과 상대적으로 더 유사하고 암 세포주를 주사해 종양을 만들 수 있어 암을 연구하기에 적합한 모델이다.
4. Mouse 유래 유방암세포주인 4T1 세포를 이용하는데 많이 쓰이는 Balb/c mouse를 쓰고자 한다. 또한, 4T1세포는 Balb/c mouse 유래 세포이므로 생리적 면역반응을 관찰하기에 적합하다.
5. 누드마우스의 경우, 면역체계가 망가져 있기 때문에 면역반응의 차이를 관찰하는데 필요하다.

사용동물 수에 대한 적절성(Appropriateness of the number of animals):

세포주, 마우스 종류

1. 마우스 4T1 cell 주입한 야생형 마우스 Balb/c or Balb/c nude
2. 종양 모델 제작하지 않은 야생형 마우스 Balb/c or Balb/c nude

모델을 만드는데 이때 성공율이 약 70 % 정도되며, mortality도 약 10% 된다.

따라서 수식은 목표n수/0.9(생존율)*0.7(모델형성율) 이다.

대조군

1. 아무 처리하지 않은 대조군

질병 모델

2. PBS 주입한 마우스 실험군
3. target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (gRNA 농도 5개(High,+/middle/-.low))
4. Non-target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (gRNA 농도 5개(High,+/middle/-.low))
5. gRNA 주입한 마우스 실험군(gRNA 농도 5개(High,+/middle/-.low))

실험실에서 새롭게 발굴해낸 암세포 targeting gRNA를 이용해서 동물 모델에서의 tumor 성장 억제를 확인하려고 하는 실험을 진행할 예정이고 gRNA 의 양을 최적화하기 위해 농도를 다르게 설정함.



사용동물 수

1. 아무 처리하지 않은 대조군 Control (실험군 1) : 종양이 없고 아무것도 처리되지 않은 동물 동물실험 기준에 어긋나지 않고 건강한 동물을 기준으로 한다. 다만, 6마리 중 1 마리는 건강하지 않을 수 있으므로 (꼬리 휘어짐, 치아 손상, 탈모 등) 6 마리로 한다

$$n = 5\text{일 경우} : 20\% \text{는 건강하지 않다 가정하여 } 6\text{마리}$$

2. 암세포주 주입 후 syngernic model 제작 성공률 = 0.9(생존율)*0.7(모델형성율)

따라서 수식은 $n\text{수} / 0.9(\text{생존율}) * 0.7(\text{모델형성율})$ 이다.

$$\text{각각 } n=5 \text{ 일 경우} : 5(\text{목표수}) / (0.9(\text{생존율}) * 0.7(\text{모델형성율})) = 8\text{마리}$$

해당 실험을 재현성 실험 및 실험 조건 최적화를 위해 $n=5$ 로 설정함.

따라서 한 실험 당 필요한 Balb/c wild mouse의 마리 수는

대조군 1 + 실험군 2 + 실험군 3 (5개의 농도) + 실험군 4 (5개의 농도) + 실험군 5 (5개의 농도)

$$= 6+8+(8 \times 5)+(8 \times 5)+(8 \times 5) = 134\text{마리}$$

$$134 \times 2(\text{반복횟수 } 2\text{회}) = 268\text{마리}$$

면역 반응 유무에 의한 종양 억제력 차이를 알아보기 위해 해당 실험을 Balb/c mouse와 Balb/c nude mouse를 독립적으로 진행함. 단, Balb/c nude를 사용할 때는 보다 적은 실험군으로 실험하고 반복 실험 없이 1회만 실험하여 사용해야 하는 마리 수를 줄이고자 함.

앞서 Balb/c 야생형 마우스로 실험한 결과를 바탕으로 유효한 gRNA 3가지 농도로 실험.

대조군

1. 아무 처리하지 않은 대조군

질병 모델

2. PBS 주입한 마우스 실험군

3. target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (gRNA 농도 3개 (High,middle,low))

4. Non-target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (gRNA 농도 3개(High,middle,low))

5. gRNA 주입한 마우스 실험군(gRNA 농도 3개(High,middle,low))

따라서 한 실험 당 필요한 Balb/c nude mouse의 마리 수는

대조군 1 + 실험군 2 + 실험군 3 (3개의 농도) + 실험군 4 (3개의 농도) + 실험군 5 (3개의 농도)

$$= 6+8+(8 \times 3)+(8 \times 3)+(8 \times 3) = 86\text{마리}$$

따라서 본 연구에 필요한 mouse는

Balb/c mouse 268마리

Balb/c nude mouse 86마리

총합 354 마리

5. 실험동물의 사육관리 (Husbandry Management)

- * 생체효능검증실 이용자 교육을 이수하지 않은 연구자는 생체효능검증실에 출입할 수 없습니다.
- * 생체효능검증실에서 사육되는 실험동물은 수의사와 실험동물 기술사에 의해 사육관리가 수행됩니다.
- * 생체효능검증실에서는 정기적으로 미생물 모니터링과 환경모니터링을 실시합니다.

5-1. 실험동물 사육장소 (V) (Housing Zone)



Small animals zone	V	Return animal zone
BSL-2 zone		Others (_____)

* 생체효능검증실 이외 시설에서의 사육 또는 실험 시 해당 건물명, 층호수, 연구실 명 등을 기재하여 주시기 바랍니다.

5-2. 실험에 필요한 특수한 반입 물품 (Special Materials)	No search remarks (v)
생체효능검증센터에 반입이 필요한 장비 및 도구: 수술도구, 일회용 주사기, 마취제	
특정사료 공급:	V
그 외 기타: , 암세포주, gRNA, gRNA 전달용 나노입자	

* 생체효능검증실에서 제공하는 물품 이외의 장비 및 도구를 연구자가 실험실 내로 직접 반입하고자 하는 경우, 사전에 담당자와 협의 후 멸균하여 반입

5-3. 실험동물 사육구역 이외의 장소로 실험동물 이동(Relocation)	No search remarks (v)
장소: IVRC 영상분석실, 수술실, 해부실 110동 803호 주진명 교수님 연구실	
사용장비: IVIS, MRI, CT, 마취장치, perfusion 장비	
실험내용: 마우스 체내 종양 세포 주입 종양 크기 측정 실험 종류 후 장기 적출, 이미징	

* 생체효능검증실 SPF 구역 내의 mouse, rat은 외부 반출 후 SPF zone으로의 재반입이 불가능합니다.
 * 동물이 반출되는 모든 경우, 반출되기 최소 2일전에 허가를 받아야 합니다. (반출신청서 작성하여 제출)
 * 실험동물 사육구역(4zone) 내에서 해당 구역 이외의 장소로 동물을 이동시켜 실험할 경우 장소, 이용 장비 및 연구 내용을 기재하여 주십시오. (생체효능검증실 지하층 영상분석실은 사육구역에 포함되지 않습니다.)

5-4. 사료 및 음수 제한 (실험과정 중 실험동물의 사료 및 음수 섭취를 강제적으로 제한 할 경우) (Restriction of Feed and Water)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V
1회 처치 시간	V
반복 횟수	V
제한 사유	V

5-5. 실험 기간 중 운동제한 (실험과정 중 실험동물의 운동을 강제적으로 제한할 경우) (Require of Mechanical Restraint)	No search remarks (v)
실험기간	V
방 법	V



1회 처치 시간		√
반복 횟수		√
제한 사유		√

6. 실험동물의 수의학적 관리 (Veterinary care)

- * 실험과정 중 또는 종료 시에 실험동물의 고통을 줄이기 위해서 적절한 조치를 취해야 합니다.
- * 해당 약제에 표시하여 주십시오. 기타 약제일 경우 기타 난에 기입하여 주십시오.
- * 약품 구입시 처방전이 필요할 경우 생체효능검증실에서 발행해 드립니다.
(문의 : 생체효능검증실 수의사 이윤진, T.5214, leeyj0926@unist.ac.kr)

6-1. 실험 중 실험동물의 고통 관리(마취제/ 용량/투여방법/횟수) Pain Control (description of agent name, dose and route)		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
진정/마취제 (Tranquilization/Anesthesia)	Isoflurane / 2% / face mask를 이용한 호흡마취 / 관류 전 약 10분 미만 마취 1회	임지수	
진통(Analgesics)			√
기타방법(Others)			√

6-2. 안락사 방법 (Method of Euthanasia)	Operator
Isoflurane / 2% / face mask를 이용한 호흡마취 /관류 전 약10분 미만 마취 1회	임지수

- * 일반적으로 물리적 방법(경추탈골, 단두)보다 화학적 방법(흡입약제, 주사제, CO2)을 권장합니다.
- * 안락사에 대한 2007년 미국 수의사회 가이드라인(AVMA Guideline on Euthanasia : Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2007) : <http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf>참고

6-3. 수술 후 관리(*생존성 수술인 경우, 약제종류/용량/투여방법/횟수 등) (Postoperative Care (Describe agent name, dose and route in the survival surgery))		실시자 (Operator)	No search remarks (v)
항생제 투여 (Antibiotics Therapy)			√
진통제 투여 (Analgesics Therapy)			√
기타 (Others)			√

6-4. 인도적인 실험 종료의 기준 (*만약 인도적인 안락사 기준이 필요 없을 시라도 그 사유에 대하여 기술해 주십시오.) (Criteria of Endpoint in Animal study (*If don't need criteria, describe what the reason))	No search remarks (v)
실험 중 임상증상의 발현 등이 관찰되거나 감염 등으로 인해 비슷한 주령의 정상동물의 체중과 비교하여 20%이상의 체중감소가 있을 시 실험을 중단하고 안락사 예정	

- * 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상되는 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료(humane endpoint) 또는 안락사를 취하기 위한 기준을 제시하여 주십시오. (예: 통증으로 인한 사료섭취량의 감소나 정상



체중의 20% 이상 체중감소 시, 정상 체중의 10%를 초과하는 종양의 형성, 발암 실험의 경우 암 병소의 직경이 20mm이상 발생 시 등)

7. 생물학적 위해 물질 실험 (Animal Study using Biohazards)

- * 안전성 관련 서류를 계획서에 첨부해 주십시오. (예: RI 동위원소의 경우 "방사성동위원소 사용허가증" 첨부, 생물학적 안전도에 대한 근거자료 및 LMO신고서류 등)
- * Infectious agent의 경우 미국 CDC의 Biological level을 참조하시기 바랍니다. 판매처에 근거자료를 요청하시면 편리합니다.
- * 생체효능검증실은 BSL 1~2 등급의 생물학적 위해물질을 이용한 동물실험이 가능한 시설입니다. 그 외 병원균을 이용한 실험은 생체효능검증실로 문의해 주십시오. (이용 가능 물질 : 유전자재조합지침 별표2 참고)

7-1. 실험과정 중 방사선 핵종, 생물학적 물질, 위험 화학물, 재조합 DNA 등을 투여하는 경우 (Injection of Radionuclides, Biological agents, hazardous chemicals, recombinant DNA and Others)		No search remarks (v)
투여 물질(Agent): mouse breast cancer (4T1), gRNA 전달용 지질나노입자(Lipid nanoparticle), gRNA		
용량 및 횟수(Dose): 세포주: 2×10^6 개 1회; 지질나노입자: 10 mg kg^{-1} 8회; gRNA 5가지 (or 3가지)농도로 8회		
투여 방법(Route): 세포주 - mamary fat pad 주사 / 지질나노입자,gRNA - 종양내 주사 (Intratumoral injection), 정맥주사 (IV injection)		
처리 방법(Disposal Method): 고온고압멸균 후 처리		
위해도 유무 및 정도(Infectious potential of Biohazards): 없음		
동물 → 사람 전염 가능성 (Animal to person)	동물 → 동물 전염 가능성 (Animal to Animal)	
생물 유해 물질이 동물에서 배출될 가능성 (Excretion)	배출 경로(Excretion route) :	

7-2. 생물학적 안전도 (생물학적 물질을 투여하는 경우)(v) (Bio-safety Level)					No search remarks (v)
Grade	BS- I	BS-II	BS-III	BS-IV	
	V				

8. 동물실험의 내용 (Outline of Animal Study)

- * 실험동물에 행해지는 동물실험의 내용에 관하여 상세히 기술해 주십시오. 특히 실험동물을 각 군으로 나눌 경우 이에 관하여 상세히 기술하십시오.
- * 비전문가도 이해할 수 있는 용어로 써주시고, 인간과 동물복지, 학문 및 사회발전에 미치는 영향에 대해 설명하여 주십시오.
- * 필요한 만큼 칸을 확장하여 기술해 주십시오.



*필요한 경우, 관련 서류를 첨부해 주십시오.

8-1. 동물실험의 목적과 예상되는 성과 (Objective and Expected Results of Animal Study)

유방암은 전 세계적으로 여성 사망률의 주요 원인입니다. 유방암을 극복하려는 연구는 오랜 시간 행해지고 있었지만, 방사선, 화학 항암제를 사용하는 기존 치료법은 암세포 뿐만 아니라 정상세포의 DNA 이중나선구조까지 손상 시켜 탈모, 구토 등 심각한 부작용을 초래하였습니다. 본 연구진에서는 선행 연구에서 생물학적 분석을 통해 암세포에만 특이적으로 존재하는 고유의 삽입/결손(InDel) 돌연변이를 찾아냈고, 연구실에서 이를 표적으로 하는 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 제작하여 암세포만 선택적으로 죽일 수 있음을 밝혀냈습니다.

전임상 연구와 임상 연구의 차이를 해소하기 위해 쥐 모델은 유방암의 발병을 모방하고 치료 전략의 효과를 평가하는 데 널리 사용됩니다.

이종이식 모델은 안전성과 효능을 위해 약물을 선별하는 데 지배적인 역할을 합니다. 이러한 유형의 모델은 조작이 쉽고 스테로이드 수용체 신호전달 및 약물 내성 억제제를 연구하는 데 널리 사용됩니다. 그러나 유방암과 같은 고형 종양의 형성은 쥐의 면역 결핍 정도에 의해 영향을 받습니다.

면역 결핍 마우스의 종양 이종이식은 종양-숙주 상호작용을 제거하고, 전이성 미세환경을 손상시키며, 거짓 양성 결과를 생성하는 경향이 있습니다.

따라서 Mouse 유래 Breast cancer cell line인 4T1을 면역 정상 mouse(Balb/c wild)에 주입하여 syngeneic model을 만들 예정입니다.

in vitro 세포 환경 실험의 결과를 바탕으로 암세포 성장 억제 효과를 동물 모델 실험에서 확인하는 것을 목표로 실험할 예정이고, gRNA의 농도에 따른 효과 차이, gRNA injection 횟수, gRNA 양 등 다양한 변수를 조절하며 약물의 효율성 향상시킬 것입니다.

또한 Balb/c nude를 사용하여 동일한 실험 방법으로 면역 반응에 따른 경향성의 차이를 밝힐 예정입니다.

이 연구를 통해 기존 항암치료의 부작용을 없애고 모든 암에 적용 가능한 정밀 의료 플랫폼을 개발한다면, 암으로 고통받는 수많은 환자들의 의료부담을 덜어줄 뿐만 아니라 암 치료의 새로운 패러다임을 구현하게 될 것으로 기대합니다.

8-2. 동물실험 계획 및 방법 (구체적인 기술)

(Schedule and Methods of Animal Study (Describe detail))

2024년 6월 : 4주령 마우스 구매 후 5~6주령일 때 Isoflurane 호흡 마취 후 각 **야생형 마우스(BALB/c)** 한 마리당 암 세포주 2×10^6 개를 Mammary fat pad에 주사하여 종양모델 마우스 제작.

2024년 7월 : 종양생성을 육안으로 확인한 후 종양크기가 80 mm^3 정도되었을 때 마우스를 5마리씩 16그룹(크게 4그룹/ 2,3,4번 실험군 각 농도 5개씩 = 총 실험군 수 = $1+5+5+5 = 16$)으로 나누어 각 그룹을 다음과 같이 실험을 진행

(128마리 제작하였을 경우 model 제작 성공률을 $0.9(\text{생존률}) \times 0.7(\text{모델형성율})$ 로 계산하여, 총 80마리를 실험에 사용할 수 있을 것으로 예상함)

질병(cancer) 모델

2. PBS 주입한 마우스 실험군
3. target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (**gRNA 농도 5개 (High,+/middle-/low)**)
4. Non-target gRNA 담지 지질 나노입자 주입한 마우스 실험군 (**gRNA 농도 5개(High,+/middle-/low)**)

5. gRNA 주입한 마우스 실험군 (농도 5개 (High,+/middle-/low))

마우스에 물질을 주입할 때는 종양내 주사(Intratumoral injection)를 하게 되며 종양내 주사 시에는 사전에 isoflurane으로 호흡마취를 한 후 진행함.

처음하는 실험이므로 적절한 파티클의 농도가 얼마인지 확인하는 실험이 필요하다. 타 레퍼런스를 참고해서 생각하는 적절한 농도를 설정한 뒤, 그보다 많은 농도를 선정해서 총 5가지 농도로 실험해 보고자 함.

gRNA 는 지질나노입자 내부에 넣은 후 이를 운반체로 이용하여 전달하게 되고 각 마우스의 체중을 측정하여 PBS 및 gRNA 는 2일마다 총 8회 투여할 예정임.

그 후 한 달간 마우스의 무게 및 종양 크기를 지속적으로 모니터링할 예정임.

2024년 8~9월 : 앞서 실험했던 마우스를 isoflurane으로 호흡마취하고 PBS로 관류하여 안락사한 후, 종양과 주요 장기를 적출 후 냉동절편 후 H&E, TUNEL assay 등을 통해 조직 분석을 진행하고 앞선 실험을 통해 얻은 데이터 분석 및 피드백 진행함.

2024년 10월~2023년 12월 : 재현성 실험을 위해 위 실험과 같이 동일한 방법으로 **야생형 마우스(BALB/c)** 종양 모델 마우스를 제작하고 동일한 방식으로 실험을 진행. 앞서 실험을 통해 얻은 데이터 분석 및 피드백 진행.

2024년 1월~2023년 3월 : **면역결핍 마우스(BALB/c nude)**를 사용하여 종양모델 제작하고 위 실험과 동일하게 반복함. 면역결핍 마우스를 사용함으로써 앞선 실험결과와 비교하여 면역 반응에 따른 경향성의 차이를 밝힐 수 있을 것으로 예상함.

*단 앞서 야생형 마우스로 실험한 결과를 바탕으로 유효한 gRNA 농도를 3가지로 설정하여 보다 적은 마리수로 실험하고자 함. - 5마리씩 10 그룹 (종양모델 실험군 수 = 1 + 3+ 3+ 3 = 10 (80 마리 제작하였을 경우 model 제작 성공률을 0.9(생존률)*0.7(모델형성율)로 계산하여, 총 50마리를 실험에 사용할 수 있을 것으로 예상함)

2025년 4월~6월 : 앞선 실험을 통해 얻은 데이터 분석 및 피드백 진행함.
 데이터 분석, 정리 및 논문 작업

● 이상 실험 동물계획이었으며, 실험에 필요한 개체수는

- Balb/c wild

정상모델 : 6마리 + 질병모델 : 128마리 = 134마리

134 x 2(반복횟수) = **268마리**

- Balb/c nude

+ 정상모델 : 6마리 + 질병모델 : 80마리 = **86마리**

= **354 마리**