



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0043941
(43) 공개일자 2015년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/12 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0122976
(22) 출원일자 2013년10월15일
심사청구일자 2013년10월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
홍기창
경기 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 304동 303호 (주공아파트)
전태훈
서울 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 돼지 RGS16 유전자의 SNP를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커

(57) 요약

본 발명은 돼지의 *RGS16* 유전자 내에 존재하는 SNP를 이용하는 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 살아있는 돼지의 혈액시료만으로 PCV2 증식에 저항성이 있는 우수한 형질의 돼지를 용이하게 선발할 수 있다.

대표도 - 도3

```

1  gggtgaacct cttctctgct gtttgcactc tttcttgact cgtttccagg cctcgctgag
61  gagtagcaac tctgaaatgc cctttgtgaa aaacacttcg actccaagag tcacaaaaac
121 acgctccctt tccttatgtt cttagcaggcc cagtatccct attacgtaaa cctgagagct
181 gaggtacact gagtgccgac tacGagccaa gcactgtgcc aagcaccgta cagggtgtgt
241 ggcagggAcc ggggtgcgtt ttccagatcc gtGtgggatac aggcctcgt tcccaggggt
301 gctgtctgct gtaggctccc agcagtctct ctccaggagc tgctcttggc agaggggaacg
361 gccttgitta agattacgcc agcctggagt tcccatcgtg aTgcagcggg aacgaatc[T/C]g
421 accaggagcc atgagtttgc gggcttgatc cctggccttg ctgagtggtg taagggctctg
481 gcgttgctgt gagctgtgtg gtaggtcgca gacggggctc agatccagca tggctgtggc
541 tgttgtgtag gccggcagct gtagctctga ttggatccct agcctgggaa cctccatatg
601 ccaaggggtgc agcccttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaagaa agaaaaaaaa
661 attaggctgt ccagtgaaca gctgatgtgg gacgcaaggc cgccccttgc ttactgcag
721 cgactgctct gaagggccat ccactccag agcatccctt gggaccagct tcagcatccg
781 ttccccctc tgcccaaccc tgcttccctc acaccctctt agttccga
    
```

(72) 발명자

임규상

대전 서구 둔산로 223, 4동 1105호 (둔산동, 청솔
아파트)

이은아

서울 강서구 강서로 266, 123동 1502호 (화곡동,
우장산아이파크이편한세상)

강지훈

서울특별시 성북구 안암로7길 54

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R1106843

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

DNA 연구과제명 [세부2] 자돈소모성질환 내성증대를 위한 PCV2와 숙주세포의 상호기전구명과 이를 이용한
마커개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서, 419번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 828개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커.

청구항 2

서열번호 2의 염기서열에서, 151번째 A 염기와 507번째 A 염기 중 적어도 하나 이상을 포함하는 서열번호 2의 15 내지 704개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커.

청구항 3

서열번호 3과 서열번호 4,

또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 *RGS16* 유전자의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 프라이머 세트.

청구항 4

제3항 기재의 프라이머 세트와; 및

PCR 반응혼합물을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트.

청구항 5

a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *RGS16* 유전자의 5' 상위영역인 서열번호 1의 419번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;

c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및

d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 419번째 염기가 C염기에서 T염기로 치환되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는

서열번호 1의 419번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법.

청구항 6

a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *RGS16* 유전자의 인트론 영역인 서열번호 2의 151번째 염기 또는 507번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;

c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및

d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 2의 151번째 염기가 T염기에서 A염기로, 또는 507번째 염기가 G염기에서 A염기로 치환 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 2의 151번째 또는 507번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 돼지 *RGS16* 유전자의 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism, 이하 SNP라고 함)를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 돼지의 *RGS16* 유전자 내에 존재하는 SNP를 이용하여 PCV2의 증식에 미치는 효과를 확인함으로써 PCV2 증식에 저항성이 우수한 돼지를 부검없이 용이하게

선발할 수 있는 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 돼지 이유후 전신소모성 질환(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)은 1991년 캐나다에서 처음 보고된 이래(Harding, 1997; Clark, 1997), 전 세계적으로 양돈농가에 피해를 주고 있는 대표적인 질병이다. PMWS는 갑작스런 위축이나 설사 및 황달 등의 임상적 증상과, 림프절 비대증 및 림프구 소실 등의 병리학적 증상을 특징으로 하며, 다양한 원인에 의해 발병한다(Allan and Ellis, 2000; Segales et al., 2005). PMWS의 주요 병인은 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)으로 보고되었다(Chae, 2005; Segales et al., 2005; Opriessnig et al., 2007).
- [0003] PMWS는 우리나라 양돈농가에서 가장 많은 피해를 주고 있는 질병 중 하나로 8~12주령의 이유자돈에서 주요하게 발병한다. 우리나라에서는 1998년 처음 PMWS가 보고된 이래, 2000년 전후 전국으로 확산되었으며, 현재는 거의 대부분의 양돈장에 PCV2가 감염되어 있는 것으로 추정되고 있다. 2009년 농식품부와 양돈협회가 공동조사한 질병실태조사보고서에 따르면 조사대상 양돈장 모돈의 약 95%가 PCV2에 대한 항체를 가지고 있으며, 약 80%의 양돈장에서 PCV2 감염이 진행되고 있다고 보고된 바 있다. 따라서, 일부를 제외한 국내 대부분 양돈장이 PCV2에 감염되어 있다고 판단된다(박, 2008).
- [0004] PMWS는 호흡기질환 등의 임상증상과, 림프구 소실 등의 조직병리학적 소견, 및 병변 내 PCV2검출의 3가지 기준이 모두 충족되어야 최종 진단되기 때문에 부검이 없는 진단할 수 없는 어려움이 있다(도 1 참조). 따라서, 부검 없이도 용이하게 PCV2 증식에 저항성이 우수한 돼지를 선발할 수 있는 방법이 필요한 실정이다.
- [0005] PMWS는 도 2와 같이 돼지 쉼코바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV2)의 과다증식이 직접적인 원인으로 작용하게 되어, 림프구를 파괴함으로써 면역기능저하를 유발한다. 이에 따라 면역력이 현저히 낮아진 PMWS발병 개체에 대한 2차 세균 및 바이러스 등의 복합감염으로 질병이 악화되고 또 다른 질병을 촉발시키는 심각성을 가지고 있다(reviewed by Opriessnig et al., 2007). 따라서, PCV2증식수준은 PMWS발병과 관련하여 중요한 지표로 판단된다.
- [0006] PCV2 감염시 PCV2 바이러스 DNA (PCV2 viral DNA)는 돼지의 림프절에서만 검출되는 것이 아니고 바이러스혈증(viremia)에 의해 혈액에서 검출되며, 각 개체별로 다양하게 양적인 변화를 나타내고 있음이 보고된바 있다(Olvera 등, 2004). 또한 혈액 내 PCV2 게놈 DNA양은 PMWS의 발병 여부 및 임상증상의 정도와 관련되어 있음도 보고되었다(Segales 등, 2005).
- [0007] 돼지 쉼코바이러스는 포유류에서 자가증식할 수 있는 가장 작은 바이러스로서(Mankertz et al, 1997), 환형 단일가닥 DNA의 유전체를 가지고 있고, 3개의 ORF(open reading frame)을 가지고 있다(Todd et al, 1991; Studdert, 1993; Mankertz et al, 1997). 이 중 ORF1은 바이러스 복제를 위한 단백질(Mankertz et al., 1998), ORF2는 약 30kDa의 분자량을 갖는 당단백질로서 바이러스의 유전체 핵산을 둘러싸는 캡시드(capsid) 단백질(Mankertz et al., 1998; Nawagitgul et al., 2000), ORF3는 바이러스 복제에는 영향을 미치지 않고 숙주세포의 세포사멸을 유도하는 단백질 (Liu et al., 2005)을 각각 발현하는 것으로 보고되어있다. 현재까지 PCV2의 3개 ORF 단백질들과 상호작용하는 돼지 단백질들이 16여 개가 보고되었다(Finsterbusch 등, 2009; Liu 등, 2007; Timmusk 등, 2006). 이러한 상호작용단백질들은 PCV2의 증식과 관련하여 주요한 역할을 할 것으로 판단된다.
- [0008] 이 중 RGS16 (Regulators of G protein signalling 16) 단백질은 G protein-coupled receptors를 통해 일어나는 신호전달을 조절하는 RGS 단백질의 subfamily에 속한다. 돼지의 RGS16 (Regulators of G protein signalling 16) 단백질은 PCV2 ORF3와 상호작용하는 것으로 보고되었으며(Timmusk 등, 2006), PCV2의 ORF3단백질이 세포핵으로 들어가게 하는 역할(translocation)을 하는 것으로 알려져 있다(S. Timmusk, 2009). 돼지 RGS16 유전자는 염색체 9번에 위치하고, 5개의 Exon으로 구성되어 있으며 202개의 아미노산을 코딩한다.
- [0009] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 Olvera et al (2004)이 PCV2의 ORF2영역에 대한 프라이머/프로브 세트를 이용한 혈액내 PCV2 DNA 분석방법을 공개한바 있으나, 국내 돼지에서 얻은 혈액시료에 대해 검출 민감도가 낮았다. 또한, 대한민국 특허공보 제10-0806868호(2008.02.22)에는 PCV의 ORF1(open reading frame 1) 유전자 증폭용 프라이머 세트를 포함하는, PRV, PCMV 및 PCV에 특이적인 다중 PCR 프라이머 세트 및 그를 이용하여 표적 서열을 검출하는 방법 및 키트에 관해 기재되어 있으나 PCV2 ORF1 증폭용 프라이머 세트로 PCV 정성분석에 관한 것

이다. 한편, 현재까지 돼지의 *RGS16* 유전자에서 특정부위의 SNP를 이용하여 PCV2 증식에 대한 저항성 개체를 선별하는 방법은 확인된 바는 없다.

[0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0806868호(2008.02.22)

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Olvera et al., Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs, J Virol Methods. 2004 Apr;117(1):75-80.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 PCV2과다증식과 관련하여 돼지의 *RGS16* 유전자를 주요한 후보유전자로 판단하고, 돼지의 *RGS16* 유전자에서 신규 SNP를 발굴하여, 발굴된 SNP에 대한 유전자형 진단기법을 개발하였으며 PCV2백신을 접종하지 않은 자연감염집단에서 PCV2증식과 관련된 SNP의 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 돼지의 *RGS16* 유전자의 SNP를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 PCV2 증식 관련 DNA 마커를 이용한 PCV2 저항성 여부를 판별하여 PCV2 저항성이 우수한 돼지를 선발하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 419번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 828개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열에서, 151번째 A 염기와 507번째 A 염기 중 적어도 하나 이상을 포함하는 서열번호 2의 15 내지 704개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3과 서열번호 4, 또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, 돼지 *RGS16* 유전자의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머 세트와; 및 PCR 반응혼합물을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기

a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 RGS16 유전자의 5' 상위영역인 서열번호 1의 419번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 419번째 염기가 C염기에서 T염기로 치환되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 419번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 RGS16 유전자의 인트론 영역인 서열번호 2의 151번째 염기 또는 507번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 2의 151번째 염기가 T염기에서 A염기로, 또는 507번째 염기가 G염기에서 A염기로 치환 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 2의 151번째 또는 507번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

[0023] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0024] 돼지의 RGS16 유전자에서 특정부위의 SNP를 이용하여 PCV2 증식에 대한 저항성 개체를 선별하는 방법은 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 PCV2 증식에 대한 저항성 관련 RGS16 유전자의 SNP를 처음으로 밝혔다.

[0025] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 419번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 828개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.

[0026] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 RGS16 유전자 중에서 5' 상위 영역에서 PCV2 증식에 대한 저항성 특성과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 PCV2 증식 저항성 특성과의 연관성을 확인하였다. 상기 DNA 마커는 PCV2의 ORF 단백질과 상호작용하는 RGS16 유전자의 5' 업스트림 영역 중 일부로서, 서열번호 1의 염기서열에서, 419번째(C→T) 위치에서 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다.

[0027] 본 발명에 있어, 상기 DNA 마커의 크기는 상기 SNP 부위 1 이상을 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 828개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열에서, 151번째 A 염기와 507번째 A 염기 중 적어도 하나 이상을 포함하는 서열번호 2의 15 내지 704개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.

[0029] 본 발명자들은 서열번호 2로 표시된 RGS16 유전자 중에서 인트론 1 영역에서 PCV2 증식에 대한 저항성 특성과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 PCV2 증식 저항성 특성과의 연관성을 확인하였다. 상기 DNA 마커는 PCV2의 ORF 단백질과 상호작용하는 RGS16 유전자의 인트론 1 영역 중 일부로서, 서열번호 2의 염기서열에서, 151번째(T→A) 위치 또는 507번째(G→A) 위치에서 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다.

[0030] 본 발명에 있어, 상기 DNA 마커의 크기는 상기 SNP 부위 1 이상을 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 704개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 마커는 PCV2 증식 억제와 관련된 것임을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예 5에서와 같이, 서열번호 1의 419번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형(TT, TC, CC)과 PCV2 증식 억제의 연관성을 분석하여 TT 유전자형이 향상된 PCV2 증식에 대한 저항성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 서열번호 2의 151번째 및 507번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형(AA-AA, AT-AG, TT-GG)과 PCV2 증식 억제의 연관성을 분석하여 AA-AA 유전자형이 향상된 PCV2 증식에 대한 저항성을 나타냄을 확인하였다.

- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3과 서열번호 4, 또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 *RGS16* 유전자의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 프라이머쌍은 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, *RGS16* 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1에서 419번째 염기, 또는 서열번호 2에서 151번째 및 507번째)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머 세트와; 및 PCR 반응혼합물을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP 분석용 키트는 *RGS16* 유전자의 발현 조절 즉, PCV2 증식에 대한 저항성 특성에 관여하는 유전자의 다양한 발현을 분석하기 위한 것이다.
- [0034] 상기 프라이머를 이용하여 제조된 유전자 단편의 염기서열의 결정은, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 법에 의하여 직접적인 핵산의 뉴클레오티드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나, SNP 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오티드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 혼성화의 정도는 예를 들면, 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA 만을 특이적으로 검출함으로써 이루어질 수 있으나, 그의 전기적 신호 검출방법 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 구체적으로, 대립형질 특이적 프로브 혼성화 방법(allele-specific probe hybridization), 대립형질 특이적 증폭 방법(allele-specific amplification), 서열분석법(sequencing), 5' 뉴클레아제 분해법(5' nuclease digestion), 분자 비콘 어세이법(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오티드 결합 어세이법(oligonucleotide ligation assay), 크기 분석법(size analysis), 단일 가닥 배좌 다형성법(single-stranded conformation polymorphism) 등의 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 실시예 5에서는, 본 발명의 상기 변이 부위 (SNP site)인 서열번호 1의 염기서열에서의 419번째 (C→T 치환) 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 3과 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 구성되는 프라이머 세트로 증폭한 DNA 단편(828bp)을 이용하여 서열번호 1의 염기서열에서 419번째 유전자형을 TT, TC, CC로 구분할 수 있었다(도 3 참조).
- [0037] 또한, 본 발명의 상기 변이 부위 (SNP site)인 서열번호 2의 염기서열에서의 151번째(T→A) 부위 및/또는 507번째(G→A) 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 5과 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 구성되는 프라이머 세트로 증폭한 DNA 단편(704bp)을 이용하여 서열번호 2의 염기서열에서 151번째 및 507번째 유전자형을 AA-AA, AT-AG, TT-GG로 구분할 수 있었다(도 4 참조).
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *RGS16* 유전자의 5' 상위영역인 서열번호 1의 419번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 419번째 염기가 C염기에서 T염기로 치환되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 419번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 방법에서, 상기 a) 단계에서 돼지 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 상기 혈청으로부터 게놈 DNA를 분리한다. 본 발명에서 돼지 혈액으로 DNA를 분리 및 정제하는 것은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 이용할 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual(2001) 등).
- [0040] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 3과 서열번호 4로 표시된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 *RGS16* 유전자의 5' 상위영역인 서열번호 1의 419번째 염기가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 3과 서열번호 4로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 증합효소에 의한 증폭 반응은 통상적인 (i) 초기 변성(denaturation) 과정, (ii) 변성(denaturation) 및 어닐링(annealing)-연장(elongation)으로 이루어지는 한 사이클을 수회 내지 수십 회 반복하는 과정 및 (iii) 최종 열처리 과정 또는 이들 과정을 적합하게 변형한 열 사이클(thermal cycle) 프로그램을

통해 행한다.

[0042] 본 발명에 의한 상기 SNP는 돼지 PCV2 증식 저항성 특성과 관련이 있으므로, 상기 SNP의 변이를 확인함으로써 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 용이하게 확인할 수 있다. 상기 SNP의 변이는 공지된 다양한 방법에 의해 확인할 수 있으며, 예를 들어 직접서열분석법 등을 이용할 수 있다. 본 발명의 방법에서, 상기 SNP 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분할 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *RGS16* 유전자의 인트론 영역인 서열번호 2의 151번째 염기 또는 507번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 2의 151번째 염기가 T염기에서 A염기로, 또는 507번째 염기가 G염기에서 A염기로 치환 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 2의 151번째 또는 507번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 5과 서열번호 6으로 표시된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 *RGS16* 유전자의 인트론 1 영역인 서열번호 2의 151번째 및/또는 507번째 염기가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시된 올리고뉴클레오타이드로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명의 마커는 양돈현장에서 주요하게 문제를 일으키고 있는 PCV2에 대한 것으로, 실제 농장에 대한 현장적용의 용이성을 높이기 위해 SNP 분석용 키트를 제공한다. 분석용 키트는 이유자돈의 PCV2증식과 관련된 DNA마커를 이용하여 유전자형 진단을 할 수 있는 키트로서 양돈질병관리에 용이하게 활용될 수 있다.

[0046] 기존 육종방법의 한계성 및 후대검정을 통한 선발의 어려움을 보완하기 위해 나날이 발전하고 있는 분자유전학적 기술이 양돈연구에 활용되고 있다. DNA를 기반으로 한 축종 혹은 개체 식별기술, 유전적인 소질, 경제형질과 관련된 유전적 표지(Genetic Marker)를 통해 가축의 육종 프로그램에 적용함으로써 가축의 유전적 능력 개량에 이용되고 있는 것이 국제적 추세이다. 따라서 본 발명에 의한 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트를 통해 분자유전학적 기법을 가축의 능력개량에 활용할 수 있으며 축산업계에 용이하게 보급가능하다.

발명의 효과

[0047] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 이유자돈의 PCV2증식 억제에 영향을 주는 돼지 *RGS16* 유전자의 SNP1, SNP2, 및 SNP3을 이용한 DNA 마커 및 이를 포함하는 SNP 분석용 키트를 제공한다. 따라서 본 발명에 의한 DNA 마커를 이용하여 살아있는 돼지의 혈액시료만으로 PCV2 증식에 저항성이 있는 우수한 형질의 돼지를 용이하게 선발할 수 있고, PCV2 감염을 농장 및 개체수준에서 용이하게 감시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 종래 기술에 의한 PMWS의 진단기준을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 PMWS 발병기작을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 3은 *RGS16* 유전자의 R1 앰플리콘 염기서열 및 SNP1 (T>C) 위치를 보여주는 도면이다.

도 4는 *RGS16* 유전자의 R2 앰플리콘 염기서열 및 SNP2 (A>T), SNP3 (A>G) 위치를 보여주는 도면이다.

도 5는 본 발명에 의한 *RGS16* 유전자의 SNP1 유전자형별 염기서열을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

도 6은 본 발명에 의한 *RGS16* 유전자의 SNP2 및 SNP3 유전자형별 염기서열을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0050]

[실시예 1] 돼지 *RGS16* 유전자 영역내 SNP 탐색

[0051]

NCBI database를 이용하여 돼지 염색체 9번에 위치하고 있는 *RGS16* 유전자의 서열 및 구조를 확인했다 (accession number: NC_010451.3). 돼지 *RGS16* 유전자의 크기는 2330 bp이며, 이 중 coding 영역은 552 bp로 4 개의 Exon으로 구성되어 있고 intron이 길게 나타나는 특징이 있다.

[0052]

품종간 및 품종내 돼지 *RGS16* 유전자 영역내 SNP를 발굴하기 위해 4개 품종(Yorkshire, Landrace, Duroc, Berkshire)의 DNA를 이용하였으며, 유전자 발현을 조절할 수 있는 5' upstream 영역을 포함하여 full length sequencing을 실시했다. 총 9개의 앰플리콘(amplicon)을 Polymerase chain reaction (PCR) 증폭하여 염기서열 분석을 실시했고, 이 중 PCV2증식억제 관련 효과가 확인된 SNP가 포함된 앰플리콘은 R1 및 R2이다(표 1). 각 앰플리콘은 특이프라이머(서열번호 3 ~ 6, 표 1)를 포함하는 혼합물조성(표 2)으로 PCR 반응을 실시했다(표 3 및 표 4).

[0053]

상기 R1 앰플리콘에서는 5개, R2 앰플리콘에서는 9개의 SNP가 발굴되었으며, 이 중 PCV2증식억제 효과가 확인된 SNP는 표 5와 같다. 본 발명의 SNP1 (T>C, 도 3)은 *RGS16* 유전자의 5' upstream 영역에, SNP2 (A>T, 도 4)와 SNP 3 (A>G, 도 4)은 Intron 1에 위치하고 있었으며, 이 SNP들은 4개 품종에서 모두 변이가 나타났다.

표 1**표 1. Sequencing을 위한 PCR 사용된 프라이머 및 반응조건**

서열 번호	Primer sequence	Amp- licon	Binding region	T _{Ann} ¹	PCR cycle	PCR size
3 4	5'-GGTGGAACTCTTCTCTGCT-3' 5'-TCGGAACTAAGAGGGTGTGA-3'	R1	5'upstream region	58°C	30	828bp
5 6	5'-CTGCCTGGAGAAAGAAGTCC-3' 5'-AGCTGTGCCTCCATAGGTCT-3'	R2	Intron 1	60°C	33	704bp

[0054]

¹ Annealing temperature in PCR**표 2****표 2. 앰플리콘 증폭 시 PCR 혼합물 조성**

Reagent		Volume (μL)
5x Polymerase buffer		4.0
dNTP (2mM each)		0.4
Phire II polymerase		0.2
Nuclease-free Water		12.4
Primer	Forward	1.0
	Reverse	1.0
Genomic DNA		1.0
Total volume		20.0

[0055]

표 3

표 3. R1 및 R2 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응 조건

PCR steps		Temperature	Time
Initial denaturation		98.0 °C	30 s
Denaturation	30 cycle	98.0 °C	10 s
Annealing		61.0 °C	10 s
Extension		72.0 °C	30 s
Final extension		72.0 °C	5 min

[0056]

표 4

표 4. R2 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응 조건

PCR steps		Temperature (°C)	Time
Initial denaturation		94.0 °C	10 min
Denaturation	33 cycle	94.0 °C	1 min
Annealing		60.0 °C	1 min
Extension		72.0 °C	3 min
Final extension		72.0 °C	5 min

[0057]

표 5

표 5. 돼지 *RGS16* 유전자 영역에서 발굴된 SNP

SNP	Amp-licon	Region	Nucleotide
SNP1	R2	5'upstream region	T/C
SNP2	R3	Intron 1	A/T
SNP3	R3	Intron 1	A/G

[0058]

[0059]

[실시예 2] 돼지 DNA 및 viral DNA 추출

[0060]

본 발명에서 SNP의 PCV2증식억제 관련 효과확인을 위해 총 142두(거세수컷 66, 암컷 78)의 요크셔(Yorkshire) 품종의 돼지가 사용되었다. 본 돼지들은 같은 농장에서 태어났고 PCV2백신을 접종하지 않았으며, 4주령에 이유 후 10주령까지 4개의 배치에서 동일한 환경조건으로 사육되었다. 4주 및 10주령 시기에 각각 돼지의 경정맥에서 혈액을 채취하였다. 돼지의 DNA는 EDTA를 처리한 혈액표본에서 Sambrook 등(1989)의 방법 또는 상용 DNA 추출 키트(commercial DNA extraction kit, Intronbio)를 통해 추출하였다. 또한 혈액응고 후 원심분리를 3000 rpm의 속도로 10분간 실시하여 혈청을 분리하여 80℃에 보관하였으며, 분리된 혈청 300 μ l로부터 상용 바이러스 DNA

키트(commercial viral DNA kit, Qiagen)를 이용하여 전체 바이러스 DNA(total viral DNA)를 추출했다.

[실시예 3] 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)을 통한 혈액내 PCV2 DNA 정량

동일 개체에서 4주와 10주 때 2차례에 걸쳐 혈액을 채취하여 PCV2 viral load를 분석하였으며, 이를 통해 4주에서 10주 사이에 PCV2가 증식된 양을 분석하였다.

1) PCV2 특이 프라이머 세트 및 프로브 제작

돼지 혈액내 PCV2 DNA 정량분석에는 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)을 이용하였으며, 이를 위해 프라이머 세트를 다음과 같이 Forward Primer 5'-TCG ATC TCA AGG ACA ACG GAG T-3' (22 mer; 서열번호 7), Reverse Primer 5'-TTG GTC TTC CAA TCA CGC TTC TGC-3' (24 mer; 서열번호 8)로 제작하였다. 또한 Probe 5'-FAM-CAG AGC AGC ACC CTG TAA CGT TTG TCA-TAMRA-3' (27 mer; 서열번호 9)로 제작되었으며 형광물질은 5'말단에는 FAMTM (6-carboxyfluorescein)을 3'말단에는 TAMRATM (6-carboxytetramethylrhodamine)를 표지하였다.

2) 표준곡선 제작(Standard curve construction)을 위한 pPCV2 제작 및 희석

돼지 혈액내 PCV2 DNA의 정량에 이용되는 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)에 대한 표준곡선 제작(standard curve construction)을 위해 플라스미드 PCV2 DNA (pPCV2)를 제작하였다. pPCV2 제작을 위하여 실시예 1에서 분리한 PCV2 게놈(genome) 중 314 bp 크기 ORF3 영역의 cDNA를 PCR을 이용하여 클로닝(cloning)하였으며, *Xho*I과 *Not*I site를 이용하여 T-easy vector (Promega)에 삽입하였다. 이렇게 제작된 플라스미드를 PCV2의 숙주세포인 PK-15 (ATCC)에서 증식시킨 후 상용 플라스미드 DNA 키트(commercial plasmid DNA kit, Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 분광광도계(spectrophotometer, Thermo Scientific)를 이용하여 DNA의 농도를 확인하였다. 이후 2.5 μ l 샘플당 10^{11} ~ 10^1 플라스미드(plasmids)의 농도로 연속 희석(serial dilution)을 실시하였다.

3) 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR) 반응

각각 돼지의 혈액에서 분리된 바이러스 DNA(viral DNA)를 이용하여 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR)을 실시했다. 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 프라이머 500 nM (서열번호 7과 서열번호 8), 프로브 250 nM (서열번호 9), 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 25 μ l 그리고 바이러스 DNA 2.5 μ l가 포함되며 최종부피 50 μ l이 되도록 Nuclease-free water를 추가하여 반응시켰다. 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR) 반응에는 CFX connect (Bio-rad)를 사용하였으며, 반응조건은 50° C 2분, 95° C에서 10분 반응하고, '95°C에서 15초 58°C 1분'을 한 cycle로 하여 총 45 cycle을 반복하였다.

4) 혈액내 PCV2 DNA정량 분석을 위한 표준곡선 제작

플라스미드 PCV2 DNA 3 set (농도: 10^{11} ~ 10^1 plasmids per 2.5 μ l sample, 3반복)에 대해 상기 혼합물조성 및 반응조건으로 태크맨 프로브 리얼타임 PCR을 실시하였다. 이를 바탕으로 cycle threshold 값과 plasmid copy 농도의 log값을 사이의 관계그래프를 통해 추세선을 구함으로써 표준곡선을 제작했다.

[실시예 4] PCR 및 직접염기서열분석을 통한 유전자형분석

각각의 앰플리콘에서 다수의 SNP가 위치하고 있었으므로 PCR 및 직접염기서열분석(direct sequencing)을 통해 개체별 유전자형 분석을 실시하였다. 서열번호 3 ~ 6의 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다(표 2 ~ 표 4). 이와 같이 확보된 PCR 산물(PCR product)을 직접염기서열분석을 통하여 분석대상 개체의 유전자형 진단을 할 수 있었다(도 5 및 도 6).

[실시예 5] 유전자형과 PCV2 viral load와의 연관성 분석

공시돈 142두에 대해 본 발명의 SNP에 따른 유전자형과 4-10주령 PCV2 증식수준(혈액내 viral load)과의 연관성 분석을 실시했다. 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.3 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 통계분석모델에서 Genotype, Sex, Batch를 고정효과로 분석하였으며, 각 유전자형의 최소제곱평균(Least Square Means)을 구하여 유의차를 평가하였다.

본 발명에서 공시돈에 대한 유전자형 및 대립유전자 빈도는 하기 표 6과 같다. 각각의 SNP 유전자형에서 모두 이형접합체형이 다른 두 동형접합체형보다 높은 빈도로 나타났으며(각각 0.67, 0.65, 0.65), 또한 모든 SNP에서 두 대립유전자의 빈도는 유사하게 나타났다. SNP2의 A, T 대립유전자는 각각 SNP3의 A, G 대립유전자와 완전연관되어 나타났다. 따라서, 연관성시에 SNP2과 SNP3을 하나의 유전자형으로 분석했다.

표 6

표 6. RGS16 유전자의 SNP에 대한 유전자형 및 대립유전자 빈도

SNP	N	Genotype			Gene	
		TT	TC	CC	T	C
SNP1	142	0.19 (27)	0.67 (95)	0.14 (20)	0.52	0.48
SNP2	142	AA	AT	TT	A	T
		0.19 (27)	0.65 (92)	0.16 (23)	0.51	0.49
SNP3	142	AA	AG	GG	A	G
		0.19 (27)	0.65 (92)	0.16 (23)	0.51	0.49

유전자형과 PCV2 증식수준과의 연관성분석 결과는 다음과 같다.

표 7의 결과에서 SNP1에서 TT 유전자형을 가진 개체들은 TC 유전자형을 가진 개체들보다 혈액내 PCV2 DNA증가수준이 낮게 나타났다($P = 0.033$). SNP1의 다른 동형접합체인 CC 유전자형을 가진 개체들도 유의적인 차이는 없었으나 이형접합체인 TC 유전자형을 가진 개체에 비해 낮은 경향을 나타냈다.

SNP2-SNP3 유전자형에서도 SNP1과 유사한 경향이 나타났다(표 8). 4-10주 혈액내 PCV2증식량이 동형접합체인 AA-AA 유전자형이 이형접합체인 AT-AG 유전자형보다 낮게 나타났으며($P = 0.037$), 다른 동형접합체인 TT-GG 유전자형은 중간 정도를 나타냈다.

또한, 세 SNP 조합형에 대한 연관성 분석을 실시했을 때도 유사한 결과를 확인할 수 있었다(표 9). TT-AA-AA 유전자형을 가진 개체들($n=25$)이 TC-AT-AG 유전자형을 가진 개체들($n=90$)보다 4-10주령 혈액내 PCV2증식수준이 낮게($P = 0.035$) 나타났다.

왜지는 이유후 군사가 이루어지기 때문에 돈사 혹은 같은 배치안에서 PCV2감염돈이 발생했을 때, 상호접촉에 의해 PCV2감염이 전파된다(Albina 등, 2001; Bolin 등, 2001). 따라서, 다른 동기군 개체들과 다르게 4-10주 혈액내 PCV2증식수준량이 낮은 것은 PCV2증식에 저항성이 있다고 할 수 있다. 따라서, SNP1의 TT 유전자형과 SNP2-SNP3의 AA-AA 유전자형을 가진 개체가 PCV2증식관련 저항성이 우수하다고 판단할 수 있으며, 본 발명의 SNP를 통해 PCV2증식에 대항 저항성 여부를 판단할 수 있는 DNA 마커로서 사용될 수 있음을 증명하였다.

표 7

표 7. *RGS16* 유전자의 SNP1 유전자형과 형질과의 연관성 분석

Trait	Genotype			P-value
	TT (n=27)	TC (n=95)	CC (n=20)	
Viral load ¹ (log PCV2 copies/ml)	2.44 ^b (0.36) ²	3.46 ^a (0.19)	2.93 ^{ab} (0.42)	0.033

¹ The level of proliferation of PCV2 viral load from 4 weeks to 10 weeks old pig

² Least square means and standard error

[0082]

표 8

표 8. *RGS16* 유전자의 SNP2-SNP3 유전자형과 형질과의 연관성 분석

Trait	Genotype			P-value
	AA-AA (n=27)	AT-AG (n=92)	TT-GG (n=23)	
Viral load ¹ (log PCV2 copies/ml)	2.78 ^b (0.30) ²	3.64 ^a (0.16)	3.27 ^{ab} (0.33)	0.037

¹ The level of proliferation of PCV2 viral load from 4 weeks to 10 weeks old pig

² Least square means and standard error

[0083]

표 9

표 9. *RGS16* 유전자의 SNP1-SNP2-SNP3 유전자형과 형질과의 연관성 분석

Trait	Genotype			P-value
	TT-AA-AA (n=25)	TC-AT-AG (n=90)	CC-TT-GG (n=20)	
Viral load ¹ (log PCV2 copies/ml)	2.47 ^b (0.37) ²	3.51 ^a (0.19)	2.92 ^{ab} (0.42)	0.035

¹ The level of proliferation of PCV2 viral load from 4 weeks to 10 weeks old pig

² Least square means and standard error

[0084]

[0085]

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

```

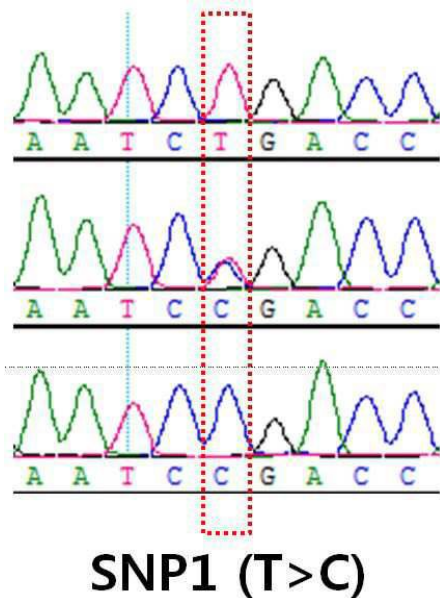
1  ggTggaacct cttctctgct gtttgacatc ttttctgact cgtttccagg cctcgctgag
61  gagtagcaac tctgaaatgc cccttgtgaa aaacacttcg actccaagag tcacaaaaac
121 acgctccctt tcttatttgt ctacgaggcc cagtatccct attacgtaaa cctgagagct
181 gaggtagact gagtcccgac tacGagccaa gcactgtgcc aagcaccgta caggtgtggt
241 ggcagggAcc ggggtgcgtt ttccagatcc gtGtgggac aggccctcgt tccccagggt
301 gctgtctgct gtaggctccc agcagtctct ctccaggagc tgctcttgcc agagggaaacg
361 gccctgttta agattacgcc agcctggagt tcccatcgtg aTgcagcgga aacgaatc[T/C]g
421 accaggagcc atgagtttgc gggcttgatc cctggccittg ctcagtgggt taagggtctg
481 gcgttgctgt gagctgtggt gtaggtcgca gacgcggctc agatccagca tggctgtggc
541 tgtggtgtag gccggcagct gtagctctga ttggatccct agcctgggaa cctccatatg
601 ccaaggggtgc agcccttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaagaa agaaaaaaaa
661 attaggctgt ccagtgaaca gctgatgtgg gacgcaaggc cggcccttgc ttcactgcag
721 cgactgtctt gaagggccat ccactccag agcatccctt gggaccagct tcagatccg
781 ttccccctc tgccaaccc tgcttccctc acaccctctt agttccga
    
```


도면4

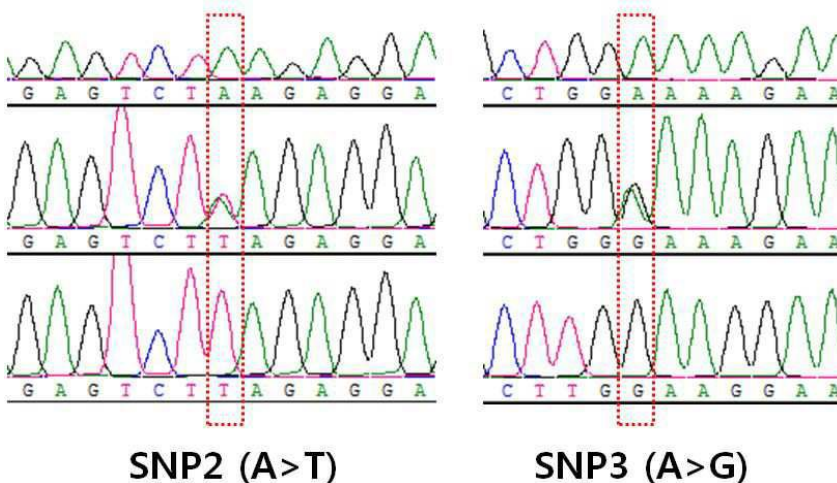
```

1 ctgcctggag aaagaagtc aagtcctac aaccttagga agcggagcgg cagccttggg
61 gacctgggtg ggcaggagca tgggacgcta gtaacttgaa aggtggaggt caacttgggt
121 ccgcgttcac agatgcctcc cttagagtct [A/T]agaggagga tggaccacca gaaggagaa
181 ggcgaattaa aggaagcag agggtcgct gcttattggc attcccatc ctctgcacaa
241 gtgcagttc tacctggctg acctgctgaa gtctcgctg caggaagacc tgggtgtggc
301 atcaccaggc agaactgtct tcctgggtt cttagcact tggtttctgt tttaaagccc
361 agagctaggc ccctggcctc ctgaggtgct ggaaggcag ggaagtgtt ttcagcgtcc
421 ccccttccc cccacctggt gagagatgtg ccacttccc aggggacttc tcagcctcac
481 caatctttgc tgaagctgga ggctgg[A/G]aaa gaaaaagtaa agatgaaggt agaatcaac
541 ttccacacag ttctagaaat attgtaaca agcccagagt gtctgaact gccttctgct
601 catcagctgg cacaagata gattggtgtg acttaatgcc aaaaagccca tgaatacagc
661 tgtattgtag acccagaaag tataagacct atggaggcac agct
    
```

도면5



도면6



서열 목록

<110>	KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION	
<120>	DNA markers associated with the proliferation of PCV2 in pigs using a SNPs in porcine RGS16 gene	
<130>	P11-131004-01	
<160>	9	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	828	
<212>	DNA	
<213>	Sus scrofa	
<400>	1	
	ggtggaacct cttctctgct gtttgactc tttctgact cgtttccagg cctcgctgag	60
	gagtagcaac tctgaaatgc cccttgtgaa aaacacttcg actccaagag tcacaaaaac	120
	acgtccctt tccttattgt ctagcaggcc cagtatccct attacgtaaa cctgagagct	180
	gaggtacact gagtgccgac tacgagccaa gcactgtgcc aagcaccgta caggtgtggt	240
	ggcagggacc ggggtgctt ttccagatcc gtgtgggac aggcctcgt tccccagggt	300
	gctgtctgct gtaggctccc agcagtctct ctccaggagc tgctcttggc agagggaacg	360
	gccttgttta agattacgcc agcctggagt tcccatcgtg atgcagcgga aacgaatctg	420
	accaggagcc atgagtttgc gggcttgatc cctggccttg ctgagtgggt taagggtctg	480
	gcgttgctgt gagctgtggt gtaggtcgca gacgcggctc agatccagca tggctgtggc	540
	tgtggtgtag gccggcagct gtagctctga ttggatccct agcctgggaa cctccatatg	600
	ccaagggtgc agcccttaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaagaaagaa agaaaaaaaa	660
	attaggctgt ccagtgaaca gctgatgtgg gacgcaaggc cgccccttgc ttcactgcag	720
	cgactgctct gaagggccat cccactccag agcatccctt gggaccagct tcagcatccg	780
	tccccccctc tgeccaacce tgettcctc acaccctctt agttccga	828
<210>	2	
<211>	704	
<212>	DNA	
<213>	Sus scrofa	
<400>	2	
	ctgcctggag aaagaagtcc aagtcctatc aaccttagga agcggagcgg cagccttggg	60

gacctgggtg ggcaggagca tgggacgcta gtaacttgaa aggtggaggt caacttggtt	120
ccgcgttcac agatgcctcc cttagagtct aagaggagga tggaccacca gaaggagaaa	180
ggcgaattaa agggaagcag agggtecgct gcttattggc attccccatc ctctgcacaa	240
gttcagttc tacctggctg acctgctgaa gtctcggtg caggaagacc tgggtttggc	300
atcaccaggc agaactgtct tccctggttt ctttaagcact tggttttcgt tttaaagccc	360
agagctaggg ccttggcctc ctccaggtgct gggaaggcag ggaagtgttt ttcagcgtcc	420
cccccttccc cccacctggt gagagatgtg cccacttccc aggggacttc tcagcctcac	480
caatctttgc tgaagctgga ggctggaaaa gaaaaagtaa agatgaaggt agaaatcaac	540
ttccacacag ttctagaaat atttgtaaca agcccagagt gtgctgaact gccttctgct	600
catcagctgg cacaagata gattgggtg acttaatgcc aaaaagccca tgaatacagc	660
tgtattgtag acccagaaag tataagacct atggaggcac agct	704
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR PRIMER	
<400> 3	
ggtggaacct cttctctgct	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR PRIMER	
<400> 4	
tcggaactaa gaggtgtga	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR primer	
<400> 5	
ctgcctggag aaagaagtcc	20

<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	6	
agctgtgcct ccataggtct		20
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	7	
tcgatctcaa ggacaacgga gt		22
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	8	
ttggtcttcc aatcacgctt ctgc		24
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR probe	
<400>	9	
cagagcagca ccctgtaacg tttgtca		27