(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0087785
(43) 공개일자 2014년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0158429
(22) 출원일자 2012년12월31일
심사청구일자 2012년12월31일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
경기도 수원시 권선구 수인로 126 (서둔동, 농촌진흥청)
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조인철
제주 제주시 산록북로 593-50, (오등동)
임현태
대전 유성구 문화원로 13, 111동 303호 (장대동, 드림월드아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

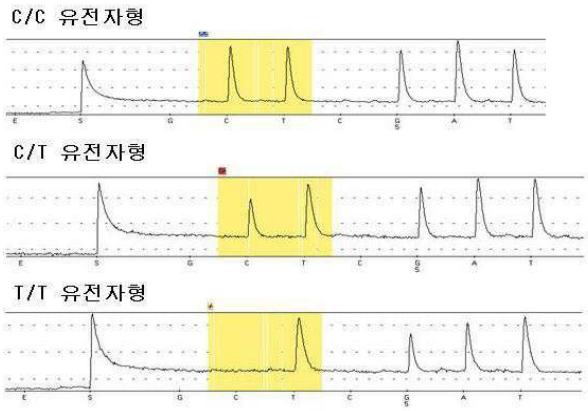
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **돼지의 흑모색 판단용 ＳＮＰ 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 SNP 마커, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 키트 또는 마이크로어레이 및 상기 SNP 마커의 다형성 부위를 결정하는 단계를 포함하는 돼지의 흑모색 판단방법에 관한 것이다. 본 발명의 SNP 마커는 돼지의 흑모색을 판단하는 특이적 SNP 마커로서, 육안으로 구별되지 않는 돼지의 흑모색을 객관적으로 평가할 수 있는 수단으로 사용되므로, 돼지육의 유통질서 확립에 이바지할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

한상현

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

고문석

제주 제주시 산록북로 593-50, (오등동)

이성수

경기도 수원시 권선구 축산길 77

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008016
부처명	국립축산과학원 난지축산시험장
연구사업명	돼지의 강건성과 스트레스 연관 유전자 발굴 및 제어 기술 개발을 통한 계통 육성 연구
연구과제명	돼지 강건성과 면역력이 우수한 개체선발을 위한 참조 축군조성
기 여 율	1/1
주관기관	국립축산과학원
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 KIT 유전자 유래 폴리뉴클레오티드에서, 258 번째 염기가 C 또는 T이고, 상기 258 번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 돼지의 흑모색 판단용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커.

청구항 2

제1항의 돼지의 흑모색 판단용 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 돼지의 흑모색 판단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제제는 서열번호 2 내지 4로 구성된 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오티드로 표시되는 프라이머인 것인 돼지의 흑모색 판단용 조성물.

청구항 4

제2항의 조성물을 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DAN 칩 키트인 것인 돼지의 흑모색 판단용 키트.

청구항 6

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 돼지 흑모색 판단용 마이크로어레이.

청구항 7

(a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 제1항의 SNP 마커의 다형성 부위를 증폭시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 증폭된 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 돼지 흑모색을 판단하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

서열번호 1의 폴리뉴클레오티드에서, SNP 위치인 258 번째 염기의 대립유전자가 T/T인 경우 돼지가 흑모색을 갖는 것으로 판단하는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 돼지의 흑모색 판단용 SNP 마커 및 이의 이용방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 SNP 마커, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 키트 또는 마이크로어레이 및 상기 SNP 마커의 다형성 부위를 결정하는 단계를 포함하는 돼지의 흑모색 판단방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 약 9000년 전에 인도의 동부 지방에서 사육된 이래로, 돼지는 세계적으로 사람이 필요로 하는 단백질 섭취를 위한 가장 기본적인 가축으로 각각의 시대와 상황 및 사람들의 기호에 따라 사육되어 왔다. 일반적으로 유럽품종과 아시아 품종들은 각 대륙의 야생 멧돼지(Susscrofa)에서 유래되었으며, 현재까지 존재하고 있는 품종은 200여종 이며, 최근 FAO (Finance and Accounts Office)에서 발표한 결과에 따르면 아시아품종이 30%, 유럽품종이 33% 정도임이 보고되었다. 이 품종들 사이에 표현형의 차이는 모색, 크기, 체형 등이 있다.

[0003] 최근에는, 돼지육의 품질을 제고하기 위하여, 돼지를 일정한 규격에서 사육하고 과학적으로 관리하고, 이로부터 얻어진 돼지육을 브랜드화하고 있으며, 이미 다양한 브랜드의 돼지육이 상업적으로 판매되고 있다. 그러나, 이처럼 브랜드화된 돼지육과 브랜드화되지 않은 돼지육은 일반인이 육안으로 식별하기 어렵기 때문에, 이러한 점을 악용하여 브랜드화되지 않은 돼지육을 브랜드화된 돼지육으로 속여서 판매하는 방식으로 돼지육의 유통질서를 교란시키는 사건이 빈번하게 발생하고 있다. 실제로, 브랜드화된 돼지와 브랜드화되지 않은 돼지육을 구별하는 것은 전문가의 수준에서도 매우 어려운 일이기 때문에, 정품 브랜드의 돼지육을 판단하는 객관적인 기준을 마련하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 이러한 연구의 일환으로서, 돼지육의 유전자를 분석하여 정품 브랜드의 돼지육을 판단하는 방법이 개발되었는데, 이처럼 유전자를 분석하는 방법은 PCR 기술을 이용하는 RAPD(random amplified polymorphic DNA), SSCP(single strand conformation polymorphisms) 기법 등의 다양한 DNA 분석기법을 이용하여 돼지육의 품종을 판별하는 방법을 개발 및 발전시키려는 방향으로 활발한 연구가 이루어지고 있다. 예를 들어, 특허공개 제2004-0039059호에는 돼지의 일당증체량, 등지방두께, 등심단면적에 관련된 특이 DNA marker를 이용하여 돼지의 형질이 우수한 돼지를 선발할 수 있는 유전자 검정방법이 개시되어 있고, 특허공개 제2007-0113336호에는 돼지의 근세포 분화에 관여하는 것으로 알려진 Myogenin 유전자의 5' promoter 부위의 단일 염기서열 차이에 의한 변이(SNP)를 이용한 돼지 근세포수 증가 확인용 DNA 표지인자가 개시되어 있으며, 특허공개 제2011-0011443호에는 KIT 유전자에 대한 한국재래돼지 특이적인 DNA marker를 검출하여, 한국재래돼지와 기타 개량종 돼지와의 정확한 품종을 판별하는 기술이 개시되어 있고, 특허공개 제2011-0050261호에는 흑모색 돼지의 KIT 유전자 지역의 SNP로부터 추정된 haplotype을 이용하여 흑모색 돼지의 품종을 식별하는 방법이 개시되어 있으며, 특허공개 제2011-0139011호에는 돼지 근내지방 함량 진단용 단일형질 다형성 바이오마커를 이용하여 육질을 평가하는 방법이 개시되어 있고, 특허공개 제2012-0046968호에는 돼지의 유전자를 이용하여 전단력이 우수한 형질의 돼지를 선별하는 방법이 개시되어 있으며, 특허공개 제2012-0049624호에는 돼지의 유전자를 이용하여 육색이 우수한 형질의 돼지를 선별하는 방법이 개시되어 있고, 특허공개 제2012-0052796호에는 돼지의 육질 특성에 관여하는 PPARGC1A 유전자의 새로운 유전적 변이(SNP) 부위를 이용한 돼지의 육질 증가 여부 확인용 DNA 표지인자가 개시되어 있으며, 특허공개 제2012-0072871호에는 돼지의 불포화 지방산 함량 확인용 단일염기다형성(SNP) 마커를 이용하여 고품질의 돼지육을 확인하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 여전히 돼지의 흑모색을 정확하게 판단하기 위한 방법에 대하여는 개발되지 않고 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 돼지의 흑모색을 기준으로 하여 돼지육의 품질을 판단할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 돼지의 모색에 관여하는 KIT 유전자에 포함된 SNP를 이용할 경우, 유전적으로 결정되는 돼지의 모색을 판별하여, 돼지육의 품질을 판단할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 SNP 마커를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 키트 또는 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 SNP 마커의 다형성 부위를 결정하는 단계를 포함하는 돼지의 흑모색 판단방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 단일염기다형성인 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커를 제공한다.

[0011] 상기 마커는 바람직하게는 KIT 유전자의 SNP를 포함하는 전체 또는 일부 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드의 전체 또는 일부 폴리뉴클레오티드일 수 있으며, 가장 바람직하게는 KIT 유전자의 SNP 위치인 586번째 염기에 해당하는 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오티드의 258번째 염기가 G 또는 A이고, 상기 SNP 위치를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 SNP 마커일 수 있다.

[0012] 본 발명의 용어 "KIT 유전자"란, mast/stem cell growth factor receptor라는, 돼지, 소, 말, 개 등의 가축의 모색을 결정하는 단백질을 코딩하는 유전자를 의미하는데, 상기 KIT 유전자는 돼지의 경우 21개의 exon으로 구성되고, mRNA 염기서열을 기준으로 2,919bp의 길이를 가지며, 아미노산 서열을 기준으로는 949aa의 길이를 갖는다. 상기 KIT 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있는데, 그 예로서, GenBank Accession No. NG_007456.1로 표시되는 유전자가 될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. KIT 유전자는 멜라닌 세포분화의 제어, 생존, 사멸, 증식 등 생존에 필수적인 요인으로 역할을 수행하고, 상기 KIT 유전자의 변이는 소화기관 기질종양, 비만세포병, 얼룩백색증 등에 연관된다고 알려져 있다. 특히, 돼지의 KIT 유전자는 유색과 백색을 식별하는데 유용하게 이용되는데, 백색돼지의 KIT 유전자는 2개 이상 유전자가 중복되는 특성(CNV, copy number variation)을 갖고 있으나, 흑색과 적색 등 유색을 나타내는 돼지는 한 개의 KIT 유전자만을 보유하는 것으로 알려져 있다.

[0013] 본 발명에서 용어, "다형성(polymorphism)"이란 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 경우를 말하며 다형성 부위 중에서, 사람에 따라 단일 염기만이 다른 것을 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이라 한다. 바람직한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 더욱 바람직하게는 5% 또는 10% 이상의 발생빈도를 나타내는 두 가지 이상의 대립유전자를 가진다.

[0014] 본 발명에서 용어, "대립유전자(allele)"는 상동염색체의 동일한 유전자좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 말한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류의 대립인자(biallele)를 갖는다.

[0015] 상기 "서열번호 1"은 다형성 부위를 포함하는 다형성 서열(polymorphic sequence)이다. 다형성 서열이란 폴리뉴클레오티드 서열 중에 SNP를 포함하는 다형성 부위(polymorphic site)를 포함하는 서열을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 DNA 또는 RNA가 될 수 있다.

[0016] 본 발명의 SNP 마커는 상기 SNP 마커의 다형성 부위가 T/T 유전자형일 경우, 이를 포함하는 돼지가 전신 흑모색을 갖는다고 판단할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 제주재래흑돼지와 랜드레이스 돼지를 교배하여 전신 백색 돼지 676두, 전신 흑색 돼지 186두 및 조모색 돼지 40두의 2세대 자손을 수득하고, 상기 2세대 자손을 대상으로 MS 마커 또는 대용량 SNP chip을 이용하여 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행한 결과, 전신 흑모색에 관여하는 유전자는 8번 염색체에 존재함을 확인하고(도 1a 및 도 1b), 상기 2세대 자손돼지의 모색별(흑모색, 백색 등) 피부조직에서 추출된 mRNA를 이용하여 KIT 유전자의 염기서열을 확인한 결과 흑모색은 상기 SNP인 c.586G>A 변이에 의해 흑모색이 결정됨을 확인하였으며(도 2), 8번 염색체에 존재하는 KIT 유전자의 2번 액손에 존재하는 SNP(c.586G>A)가 돼지의 전신 흑모색과 밀접한 연관성이 있음을 확인하고(도 3), Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행한 결과 상기 SNP(c.586G>A) 변이인 C/C 유전자형, C/T 유전자형 및 T/T 유전자형의 경우 각각 서로 다른 결과를 나타냄을 확인하였으며(도 4), 2세대 자손돼지 중에서 C/C 유전자형은 검출되지 않았고, C/T 유전자형 및 T/T 유전자형만이 검출되었으며 , 상기 검출된 유전자형 중에서 T/T 유전자형이 전신 흑모색과 일치함을 확인할 수 있었다(표 1).

[0018] 따라서, 본 발명의 SNP(c.586G>A)의 유전자형을 검출하거나 또는 상기 유전자형을 검출할 수 있는 프라이머를 이용하면, 전신 흑모색을 나타내는 돼지를 정확하게 판별할 수 있을 것으로 기대되며, 상기 SNP는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이다.

[0019] **(보내주신 자료에는 SNP(c.586G>A)라고 기재되어 있고, 이는 586번 뉴클레오티드가 G 또는 A 중의 하나가 된다는 것으로 이해됩니다. 그러나, 이후의 실험결과에서는 T 또는 C를 검출한다고 기재되어 있어, 상기 실험결과를 이해하는데 어려움이 있사오니, 이에 대한 구체적인 설명을 부탁드립니다)**

[0020] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 용어 "SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제"란, 상기와 같은 유전자의 다형성 부위를 증폭을 통해 확인하여 돼지의 흑모색을 판단할 수 있는 조성물을 의미하며, 바람직하게는 상기 SNP 마커의 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 의미한다. 상기 SNP 마커 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 상기 프라이머 서열은 상기 SNP 마커와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 상기 SNP 마커와 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

[0022] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 사상체질 특이적 복부비만을 예측할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0023] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의

변형이 있다.

[0024] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 키트를 제공한다. 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 분석용 (예, DNA 칩) 키트일 수 있다.

[0025] 본 발명의 키트는 돼지의 흑모색 판단용 마커인 SNP 마커를 증폭을 통해 확인하거나, SNP 마커의 발현 수준을 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 돼지의 흑모색을 판단할 수 있다. 구체적인 일례로서, 본 발명에서 돼지의 흑모색 판단용 SNP 마커의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 상기 SNP 마커의 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 RT-PCR 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 또한 바람직하게는, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 돼지 흑모색 판단용 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 일반적으로 편평한 고체 지지판, 전형적으로는 현미경용 슬라이드보다 크지않은 유리 표면에 핵산 종을 격자형 배열(gridded array)로 부착한 것으로, 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응이 일어나 대량 병렬 분석이 가능하도록 하는 도구이다.

[0026] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 돼지의 흑모색 판단용 SNP 마커의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 돼지의 흑모색 판단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0027] 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오티드에 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어진다.

[0028] 프로브 폴리뉴클레오티드를 기판상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 프로브 폴리뉴클레오티드는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립유전자 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 이 경우 혼성화 조건은 대립유전자간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립유전자 중 하나에만 혼성화 하도록 충분히 엄격해야 한다. 이렇게 함으로써 다른 대립유전자 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 본 발명의 상기 프로브는 대립유전자를 검출하여 돼지의 흑모색 판단 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 판단방법에는 서던 블롯트 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다. 상기 혼성화란 엄격한 조건, 예를 들면 1M 이하의 염 농도 및 25 ℃ 이상의 온도 하에서 보통 수행될 수 있다. 예를 들면, 5x SSPE(750 mM NaCl, 50 mM Na Phosphate, 5 mM EDTA, pH 7.4) 및 25-30℃의 조건이 대립유전자 특이적 프로브 혼성화에 적합할 수 있다.

[0029] 본 발명의 돼지의 흑모색 판단과 연관된 프로브 폴리뉴클레오티드의 기판상에 고정화하는 과정도 또한 이러한 종래 기술을 사용하여 용이하게 제조할 수 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 예를 들면, 핵산 시료를 형광 물질 예를 들면 Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.

[0030] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 상기 SNP 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프로브와 혼성화하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 증폭된 또는 혼성화된 다형성 부위의 염기를 결정하는 단계를 포함하는, 돼지의 흑모색 판단방법을 제공한다. 이때, 상기 분리된 시료의 DNA는 개체로부터 분리된

시료로부터 수득할 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어 "개체"란, 흑모색을 나타내는 지의 여부를 확인하고자 하는 대상인 돼지를 의미하며, 상기 돼지로부터 얻어진 검체를 이용하여, 상기 SNP의 유전자형을 분석함으로써 상기 돼지가 흑모색을 갖는지의 여부를 판단할 수 있다. 상기 검체로는 털, 뇨, 혈액, 각종 체액, 분리된 조직, 분리된 세포 또는 타액과 같은 시료 등으로부터 DNA를 수득할 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[0032] 상기 (a) 단계의 DNA로부터 상기 SNP 마커의 다형성 부위를 증폭하거나 프로브와 혼성화하는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다. 그 외 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭(transcription amplification)(Kwoh 등, Proc. Natl.Acad. Sci. USA 86, 1173(1989)) 및 자가유지 서열 복제(Guatelli 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA)이 사용될 수 있다.

[0033] 상기 방법 중 (b)단계의 다형성 부위의 염기를 결정하는 것은 서열 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이나믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allele-specifichybridization, DASH), PCR 연장 분석, PCR-SSCP, PCR-RFLP 분석 또는 TaqMan 기법, SNPlex 플랫폼(Applied Biosystems), 질량 분석법(예를 들면, Sequenom의 MassARRAY 시스템), 미니-시퀀싱(mini-sequencing) 방법, Bio-Plex 시스템(BioRad), CEQ and SNPstream 시스템(Beckman), Molecular Inversion Probe 어레이 기술(예를 들면, Affymetrix GeneChip), 및 BeadArray Technologies(예를 들면, Illumina GoldenGate 및 Infinium 분석법)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 방법들 또는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 이용 가능한 다른 방법에 의해, 마이크로새틀라이트, SNP 또는 다른 종류의 다형성 마커를 포함한, 다형성 마커에서의 하나 이상의 대립유전자가 확인될 수 있다. 이와 같은 다형성 부위의 염기를 결정하는 것은 바람직하게는 SNP 칩을 통해 수행할 수 있다.

[0034] 본 발명의 용어 "SNP 칩"이란, 수십만 개의 SNP의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다.

[0035] TaqMan 방법은 (1) 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하는 단계; (2) 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지(Applied Biosystems)하는 단계; (3) 상기 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 및 탐침을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; (4) 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 핵산 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 (5) 상기 분석결과로부터 단계 (1)의 폴리뉴클레오티들의 유전자형을 결정하는 단계를 포함한다.

[0036] 상기에서, 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR은 SNP가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트로 상기 SNP가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. 상기 방법의 원리는, 예를 들어, 특정 염기가 A에서 G로 치환된 경우, 상기 A를 3' 말단염기로 포함하는 프라이머 및 적당한 크기의 DNA 단편을 증폭할 수 있는 반대 방향 프라이머를 고안하여 PCR 반응을 수행할 경우, 상기 SNP 위치의 염기가 A인 경우에는 증폭반응이 정상적으로 수행되어 원하는 위치의 밴드가 관찰되고, 상기 염기가 G로 치환된 경우에는 프라이머는 주형 DNA에 상보결합할수 있으나, 3' 말단 쪽이 상보결합을 하지 못함으로써 증폭반응이 제대로 수행되지 않는 점을 이용한 것이다. DASH는 통상적인 방법으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 프린스 등에 의한 방법에 의하여 수행될 수 있다.

[0037] 한편, PCR 연장 분석은 먼저 단일염기 다형성이 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭을 한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 SNP 특이적 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. 이때, 연장 프라이머는 SNP가 위치하는 염기의 5' 방향의 바로 인접한 염기를 3' 말단으로 삼으며, dNTP 혼합물에는 디디옥시뉴클레오티드와 동일한 염기를 갖는 핵산이 제외되고, 상기 디디옥시뉴클레오티드는 SNP를 나타내는 염기 종류 중 하나에서 선택된다. 예를 들어, A에서 G로의 치환이 있는 경우, dGTP, dCTP 및 TTP 혼합물과 ddATP를 반응에 첨가할 경우, 상기 치환이 일어난 염기에서 프라이머는 DNA 중합효소에 의하여 연장되고, 몇 염기가 지난 후 A 염기가 최초로 나타나는 위치에서 ddATP에 의하여 프라이머 연장반응이 종결된다. 만일 상기 치환이 일어나지 않았다면, 그 위치에서 연장반응이 종결되므로, 상기 연장된 프라

이머의 길이를 비교함으로써 SNP를 나타내는 염기 종류를 판별할 수 있게 된다.

[0038] 이때, 검출방법으로는 연장 프라이머 또는 디디옥시뉴클레오티드를 형광 표지한 경우에는 일반적인 염기서열 결정에 사용되는 유전자 분석기(예를 들어, ABI사의 Model 3700 등)를 사용하여 형광을 검출함으로써 상기 SNP을 검출할 수 있으며, 무-표지된 연장 프라이머 및 디디옥시뉴클레오티드를 사용할 경우에는 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) 기법을 이용하여 분자량을 측정함으로써 상기 SNP를 검출할 수 있다.

[0039] 바람직하게, 상기 (b) 단계에서 결정된 염기서열 중, 서열번호 1로 기재되는 폴리뉴클레오티드에 있어서, SNP 부위인 258번째 염기가 T인 경우, 돼지가 흑모색을 갖는다고 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 SNP 마커는 돼지의 흑모색을 판단하는 특이적 SNP 마커로서, 육안으로 구별되지 않는 돼지의 흑모색을 객관적으로 평가할 수 있는 수단으로 사용되므로, 돼지육의 유통질서 확립에 이바지할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a은 MS 마커를 이용하여 2세대 자손의 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이고,

도 1b는 대용량 SNP chip을 이용하여 2세대 자손의 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 2세대 자손돼지 중에서 전신 백색 돼지와 전신 흑색 돼지로부터 유래된 각 KIT 유전자의 염기서열을 비교한 결과를 나타내는 그림이다.

도 3은 본 발명의 SNP(c.586G>A)와 전신 흑모색과의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행하여 상기 SNP(c.586G>A) 변이를 검출한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1: 제주재래흑돼지와 랜드레이스의 교배자손에서 전신 흑모색 QTL 분석 결과**

[0044] 제주재래흑돼지와 랜드레이스 돼지를 교배하여 다음과 같은 2세대 자손을 수득하였다: 전신 백색 돼지 676두, 전신 흑색 돼지 186두 및 조모색 돼지 40두.

[0045] 상기 2세대 자손을 대상으로 MS(microsatellite) 마커 또는 대용량 SNP chip(illumina, USA)을 이용하여 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행하였다(도 1a 및 도 1b). 도 1a은 MS 마커를 이용하여 2세대 자손의 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 1b는 대용량 SNP chip을 이용하여 2세대 자손의 전신 흑모색에 대한 QTL 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a 및 도 1b에서 보듯이, 전신 흑모색에 관여하는 유전자는 8번 염색체에 존재함을 확인할 수 있었다.

[0046] **실시예 2: 돼지 모색별 피부조직을 이용한 염기서열 해독 및 돌연변이 검출**

[0047] 8번 염색체에 존재하는 KIT 유전자가 돼지의 모색결정에 관여함이 알려져 있으므로, 상기 각 2세대 자손돼지의 모색별(흑모색, 백색 등) 피부조직에서 추출된 mRNA를 이용하여 KIT 유전자의 염기서열을 확인하였다(도 2). 도 2는 2세대 자손돼지 중에서 전신 백색 돼지와 전신 흑색 돼지로부터 유래된 각 KIT 유전자의 염기서열을 비교한 결과를 나타내는 그림이다. 도 2에서 보듯이, 전체 coding sequence중에서 유일하게 단백질 서열이 변화는 Non-synonymous SNP이 1개 존재하였고, 흑모색은 상기 SNP인 c.586G>A 변이에 의해 흑모색이 결정됨을 확인하였다.

[0048] **실시예 3: SNP(c.586G>A)와 전신 흑모색과의 연관성 분석**

[0049] 상기 SNP(c.586G>A)와 전신 흑모색과의 연관성을 분석하였다(도 3). 도 3은 본 발명의 SNP(c.586G>A)와 전신 흑모색과의 연관성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 8번 염색체에 존재하는 KIT 유전자의 2번 액손에 존재하는 SNP(c.586G>A)가 돼지의 전신 흑모색과 밀접한 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0050] 일반적으로, 모색은 질적형질로서 태어날 때 모색이 성장해서라도 변하지 않는 특성이 있고, 초위성체마커나 SNP chip data를 분석했을 때 돼지 8번 염색체에서 흑모색 좌위가 확인 되었고, 유의성이 가장 높은 SNP를 기준으로 주변 유전자들 사이에 모색유전자로 많이 알려져 있는 KIT 유전자의 존재를 확인하였다. 상기 KIT 유전자는 모색이 백색인 경우 KIT 유전자가 2개 이상 중복되는 특성이 있는 반면 유색은 1개의 유전자만 존재하는 특성으로 인하여 유색과 백색으로 식별하는 유전자로 분석에 이용되었으므로, 흑모색과 관련된 KIT 유전자 보고는 전무한 상태여서 KIT 유전자에 대해 모색별로 mRNA 서열을 전장 시컨싱을 통해 염기서열 변이를 발굴하였다. 그 결과, 흑모색과 백색이 CNV이외에 SNP 수준에서 변이를 보였고, 그 염기서열상의 변이 위치가 전체 exon 21개 중에서 exon2에서만 단백질의 변화가 확인되었다.

[0051] **실시예 4: Pyro-sequencer 분석을 통한 SNP 유전형 분석**

[0052] Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행하여 상기 SNP(c.586G>A) 변이를 검출할 수 있는 프라이머를 다음과 같이 제작하였다:

[0053] KIT_e2F: 5'-CACAGAACCCTTGCACCATA-3'(서열번호 2)

[0054] KIT_e2R: 5'-CTCTGCTTTCTCCACGATCC-3'(서열번호 3)

[0055] KIT_e2_seq: 5'-ACTGTCTCCACCATCCATCC3'(서열번호 4)

[0056] 상기 프라이머 중, KIT_e2R은 그의 5'-말단에 바이오틴이 결합된 형태로 제작하였다.

[0057] 상기 제작된 각 프라이머를 이용하여 Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행하였다(도 4). 도 4는 Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행하여 상기 SNP(c.586G>A) 변이를 검출한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4에서 보듯이, 상기 SNP(c.586G>A) 변이인 C/C 유전자형, C/T 유전자형 및 T/T 유전자형의 경우 각각 서로 다른 결과를 나타냄을 확인하였다.

[0058] 상기 결과로부터, 상기 프라이머를 이용하여 Pyro-sequencer를 이용한 유전자형 분석을 수행하면, KIT 유전자의 돌연변이를 용이하게 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0059] **실시예 5: KIT 유전자내 SNP 유전형과 돼지모색 표현형의 연관성 분석**

[0060] 상기 2세대 자손을 대상으로 상기 프라이머를 이용하여, CNV(copy number variation), CNV에 기초한 KIT 유전자형 및 KIT exon 2 유전자형을 분석하고, 그 결과를 표현형과 비교함으로써, 상기 프라이머가 돼지의 모색판단에 사용가능한지의 여부를 확인하였다(표 1).

표 1

[0061] KIT 유전자내 SNP 유전형과 돼지모색 표현형의 연관성 분석결과

표현형	분석 두수	CNV	KIT 유전자형	KIT exon 2 유전자형
전신 백모색(uniform white)	676	2개 이상	*I*/_	C/T
전신 흑모색(uniform balck)	186	1개	*i*/*i*	T/T
조모색(Roan)	40	1개	I^{RN}/i	C/T

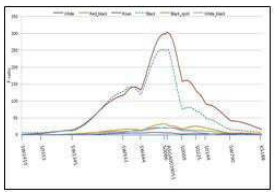
[0062] 상기 표 1에서 보듯이, 2세대 자손돼지 중에서 C/C 유전자형은 검출되지 않았고, C/T 유전자형 및 T/T 유전자형만이 검출되었으며, 상기 검출된 유전자형 중에서 T/T 유전자형이 전신 흑모색과 일치함을 확인할 수 있었다.

[0063] 일반적으로, 백색돼지의 경우 KIT 유전자가 2개 이상 중복되어 존재하여야 하므로, CNV가 2이상이 될 수 있는데, 상기 표 1의 전신 백모색을 나타내는 돼지는 첫 번째 KIT 유전자의 SNP가 C를 나타내고, 두 번째 KIT 유전자의 SNP가 T(C/T)를 나타낸 반면, 전신 흑모색을 나타내는 돼지와 조모색을 나타내는 돼지는 CNV가 1이며, 특히, 전신 흑모색을 나타내는 돼지는 T/T의 형질을 나타냄을 알 수 있었다.

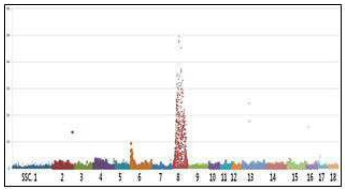
[0064] 따라서, 본 발명의 SNP(c.586G>A)의 유전자형을 검출하거나 또는 상기 유전자형을 검출할 수 있는 프라이머를 이용하면, 전신 흑모색을 나타내는 돼지를 정확하게 판별할 수 있을 것이다.

도면

도면1a

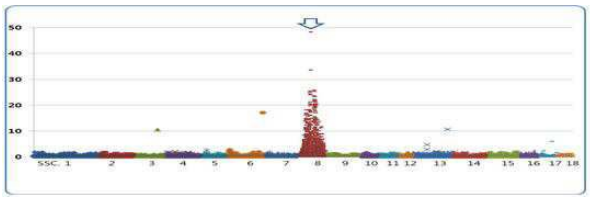


도면1b

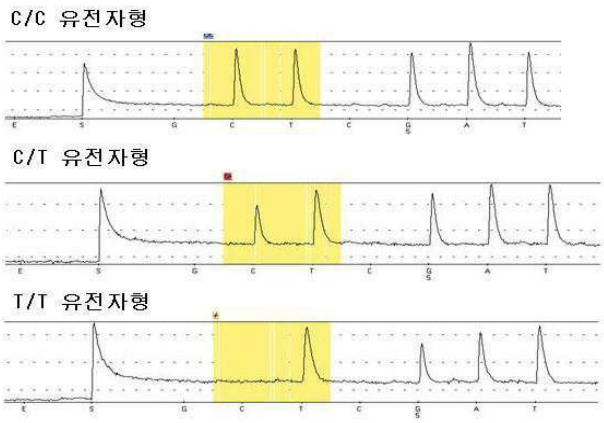


도면2

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Novel SNP marker for discriminating Black Coat Colour of Pig and use thereof

<130> PA121037/KR

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 490

<212> DNA

<213> KIT gene

<400> 1

agcattttag atttttatca catgttttca gtgtctgtga ccggccattc aaactcctga 60

ttgttgatat gctgcagatc ctgagaagct tttcctcgtc gaccctccct tgtatgggaa 120

ggaggacaat gacgcgctgg tccgatgtcc tctgacggac ccagaggtga ccaattactc 180

cctcacgggc tgcgagggga aacccccttcc caaggatttg accttcgtcg cggaccccaa 240

ggccggcatc accatcaraa acgtgaagcg cgagtatcat cggctctgtc tccactgctc 300

cgccaaccag gggggcaagt ccgtgctgtc gaagaaattc accctgaaag tgagggcagg 360

tacgagctct tgctggcttg cttctgggag ctggcatatc cgctgatcta aaagtagaca 420

tctctcttct cactggtcca tgtttgtatg tcacttggat agccgctctg gtcttttccc 480

ccagcttcaa 490

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIT_e2_F primer

<400> 2

ggccattcaa actcctgatt 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIT_e2_R primer

<400> 3

cagaagcaag ccagcaagag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIT_e2 primer

<400> 4

gatactcgcg cttcacgttt 20