

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0051232 (43) 공개일자 2012년05월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2010-0112569	(22) 출원일자 2010년11월12일 심사청구일자 2010년11월12일	(72) 발명자 홍기창 경기도 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 주공@ 304-303 김세현 서울특별시 강남구 학동로 609, 삼익@ 14동 100 2호 (청담동) (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 이문섭

전체 청구항 수 : 총 11 항

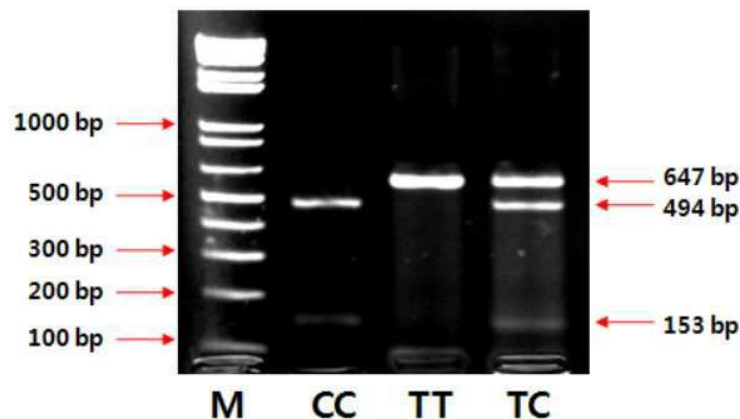
(54) 발명의 명칭 **돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자**

(57) 요약

본 발명은 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 염기서열에서 249번째 T 염기를 포함하는 15-800개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자에 관한 것이다.

본 발명은 웅취의 주요 원인물질로서 안드로스테논의 생성과 분해에 동시에 관여하는 3 β -HSD 유전자에서 나타나는 SNP가 안드로스테논 함량에 영향을 주어 웅취 발생을 감소시킬 수 있음을 발견하였으며, 이러한 SNP를 손쉽게 탐지할 수 있는 분석기법을 개발하였다. 따라서 본 발명의 SNP는 수퇘지의 웅취를 제거할 수 있는 DNA 표지인자로 사용될 수 있으며, 돈육의 웅취 제거 및 생산성 향상 등과 같은 돼지 육종 산업에 매우 유용한 기술로서 적용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

전태훈

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌
아파트 236동 1802호 (방이동)

이동호

서울특별시 성북구 정릉1동 1020번지 우성아파트
105-802

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 108172032SB030

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발연구

연구과제명 옹취원인물질 관련 DNA표지인자 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.12.20 ~ 2010.12.19

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서, 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 DNA 표지인자는 돼지 등지방내 안드로스테논의 함량을 감소시켜 옹취를 감소시키는 것을 특징으로 하는 DNA 표지인자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 옹취의 감소는 안드로스테논의 함량이 0.5 ppm 이하인 것을 특징으로 하는 DNA 표지인자.

청구항 4

서열번호 1의 염기서열에서, 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 상기 연속서열을 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 조성물.

청구항 5

서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 3 β -HSD 유전자 내 안드로스테논 감소 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머.

청구항 6

제 5항의 프라이머와 PCR 반응혼합물 및 RFLP 분석용 제한효소인 *FauI*을 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 관련 SNP 분석용 키트.

청구항 7

하기 단계들을 포함하는, 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부를 확인하는 방법:

- a) 돼지로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1로 표시된 3 β -HSD 유전자 단편의 249번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;
- c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *FauI*으로 처리하는 단계; 및
- d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들의 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 프라이머를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

서열번호 1의 염기서열에서, 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브를 지지체에 부착하여 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부를 확인하기 위한 마이크로어레이.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 지지체는 슬라이드글라스, 플라스틱, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘, 젤(gel), 나노(nano) 재료, 세라믹, 금속재료, 광섬유 또는 이들을 조합하여 만들어지는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 11

시료에 존재하는 핵산을 분리하는 단계,

상기 분리된 핵산 중 서열번호 1로 표시된 3 β -HSD 유전자 단편의 249번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭하는 단계,

상기 증폭된 DNA를 제 9에 따른 마이크로어레이 상의 프로브 혼성화 반응 단계, 및

상기 형성된 하이브리드의 시그널 검출 단계를 포함하는 돼지에서 안드로스테논이 감소된 개체의 선별방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 염기서열에서 249번째 T 염기를 포함하는 15-800개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 수퇘지에서 식육으로서 치명적인 풍미를 유발하는 웅취(boar taint)를 제거하기 위해서, 수퇘지의 성숙숙이 진행되기 이전에 외과적 시술을 통해서 고환을 제거하는 방법인 거세(castration)가 일반적으로 시행되어져 왔다. 이러한 외과적 거세방법은 시술이 비교적 간단하고 비용이 저렴하면서도 웅취를 효과적으로 제거할 수 있어서, 우리나라의 경우 비육돈에 대해서 대부분 이루어지고 있다.

[0003] 그러나 이러한 외과적인 거세는 생산력 감소와 질병에 대한 저항성 약화로 인한 손실문제가 보고되고 있다. 수퇘지의 거세로 인한 생산력감소 연구 중 하나에서는 적육생산량을 높이는 안드로겐(androgen)의 자연적 동화작용을 막으며, 그 결과 실제로 거세돈은 비거세돈에 비해 사료효율이 약 12% 떨어지고, 적육생산량이 6.5% 저하된다고 보고된 바 있다 (Jensen, M. et al. 1995. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3180-3184). 또한, 어린시기의 과도한 스트레스로 인해 체내의 면역력 감소와 그에 따른 질병저항성 약화를 일으켜, 실제로 폐사율을 높이는 원인을 제공하기도 한다 (English, P. et al. 1975. Vet Ann 15: 95-104; English, P. et al. 1984. Pig News and Information 5: 369-376). 이러한 결과는 비외과적 거세의 활용이 돈육생산의 수익성을 30% 정도 향상시킬 것으로 판단한 연구결과와 연결지을 수 있다 (Lange, C. et al. 1995. Ontario Swine Research Review: 41-44).

[0004] 더욱이 비육돈과는 별도로, 종돈개량의 경우에도 외과적인 거세로 인한 수퇘지의 능력검정두수 저하가 심각하다. 이는 검정 후 종돈으로 선발되지 않고 도축장으로 출하될 경우 도체등급하락 및 경락가격의 차이에 따른

경제적인 손실을 줄이기 위해 어릴 때 거세를 함으로써 수정능력을 상실하기 때문이다. 실제로 거세돈과 비거세돈의 경락가 차이는 2009년 평균 1100원/kg의 단가차이를 보였다. 이러한 능력검정두수 제한의 결과 중돈의 선발강도가 낮아져 유전적 개량량이 상대적으로 감소되며, 능력이 우수한 중돈의 선발이 어렵게 되어, 국산 중돈의 능력이 저하되고, 중돈개량을 수입중돈에 의존하게 되는 악순환이 발생하게 되었다.

[0005] 기존의 외과적 거세의 문제점을 극복하기 위해서 이미 외국은 오래전부터 연구를 진행해 왔고, 호주의 화이자社は 임프로박(Improvac)이라는 획기적인 제품을 개발한 바 있다. 외과적인 수술을 통해 고환을 제거하는 대신에 돼지의 면역체계를 이용한 백신을 통해서 고환의 기능을 저하시켜 거세효과를 내는 방식으로써, 이미 그 효과를 검증받고 여러 나라에서 상용화 되었으며, 우리나라에서도 최근 시판되고 있을 정도로 인지도가 높다. 소위 거세백신(immuno castration)이라 불리는 이 제품은 거세의 효과를 통해서 웅취를 제거시킬 수 있을 뿐만 아니라, 일당증체량과 사료섭취율, 등지방층 두께 등 성장능력이 일반거세돈에 비해 증가시킬 수 있는 장점이 있는 것으로 알려져 있다 (Dunshea, F. et al. 2001. Journal of Animal Science 79: 2524).

[0006] 그러나 이 백신의 원리는 성선호르몬 분비인자(GnRH)에 대한 항체를 형성시켜 거세 효과를 유발하는 것으로서, GnRH의 중화를 통해 2차적으로 성선자극 호르몬(FSH)과 황체호르몬(LH) 및 테스토스테론의 생산을 감소시켜 고환의 성장과 기능을 차단시킨다. 이는 결과적으로 거세와 동일한 효과를 얻을 수 있어, 웅취를 제거시키는 효과는 얻을 수 있지만, 결과적으로 융성호르몬의 분비를 막아 융성 특이적인 우수한 성장능력을 저해시키고, GnRH 하위단계의 다른 호르몬 체계에 이상을 줄 수도 있다. 더욱이, 생물에 투여한 ‘호르몬 유사 억제제’라는 점은 혈액내 잔류되었을 시 돈육식품으로써의 안전성에 있어서 심각한 문제를 초래할 수 있다 (국민건강을 위한 수의사연대 뉴스, 2007; e축산뉴스, 2008). 뿐만 아니라, 화이자사가 2번에 걸쳐 등급판정소에 등급판정을 의뢰한 결과 각각 63%와 51%만이 거세판정을 받았다는 점(양돈수의사회 심포지엄, David Hennessy, 2007)은 우리나라 현행기준에서 백신의 성공 효율도 문제가 있음을 알 수 있다. 또한, 백신접종에 따른 스트레스 유발문제도 무시할 수 없을 것으로 판단된다.

[0007] 국내시험 결과 임프로박 접종돈은 거세돈 판정으로 인한 돼지 경락가격 상승으로 일반거세돈보다 두당 약 2만 2천원 정도의 이익을 제시한 바 있지만 (제3회 양돈연구포럼, 이득훈, 2008), 마리당 2회에 걸친 접종과 한 건당 5천원에 육박하는 백신비용은 생산자 측면에서 볼 때, 앞서 언급한 거세판정비용과 합쳐져 다시 한 번 적용을 고려해 보게 한다. 또한, 향후 국내 양돈 산업 전반에 걸친 확대적용을 고려해 보면, 외국계 제약회사의 제품사용에 대한 로열티 지불과 그에 따른 상대적 외화낭비는 사료수입비용과 함께 부담으로 다가온다.

[0008] 따라서, 이와 같은 기존의 외과적 거세 방법의 문제점과 상용화 된 백신의 문제점을 극복하기 위해서는 웅취를 발생시키는 직접적인 요인을 찾아 이들만을 효과적으로 제거시키기 위한 연구개발이 요구된다.

[0009] 웅취는 수태지의 성숙숙시 분비되는 스테로이드 호르몬 종류인 안드로스테논 스케이틀에 의해서 발생하는 것으로 알려져 있다. 안드로스테논은 성숙숙시 고환에서 생성되는 스테로이드계통의 호르몬이다. 이러한 이유로 성호르몬(somatotropin) 처리로 지방의 안드로스테논양을 줄일 수 있다고 보고된 바 있다 (Bonneau, M. et al. 1992. Livestock Production Science (Netherlands)). 암돼지에서는 생식기능을 조절하는 성 페로몬(sex pheromone)의 활성화에 변화를 주게 되는 침샘 안에 농축된다. 또한, 무극성이기 때문에 지방 축적이 용이하게 되어 식욕의 조리시 지방이 가열되었을 때 냄새를 발생하게 된다. 스케이틀은 돼지의 장내에 있는 트립토판(tryptophan)이 박테리아, 특히 몇몇 락토바실러스(Lactobacillus)와 클로스트리디움(Clostridium)에 의해 분해되어 만들어진 산물로 혈관에 흡수된다. 그 중 대부분은 간에서 대사되고 배출되는데 남은 것이 지방에 흡수되어서 웅취를 일으키게 된다.

[0010] 안드로스테논의 유전력이 0.25 ? 0.87 정도로써 도체내 함량에 큰 영향을 줄 수 있을 것으로 연구된 바 있다 (Willeke, H. 1993. Pig News and Information 14:31N-3; Sellier, et al. Journal of Animal Breeding and Genetics 105: 11-20). 비록 안드로스테논이 대부분 성숙숙시에 생성되지만, 유전적으로 생성 자체가 적은 돼지도 있다. 이와는 다르게, 유전적으로 성숙숙 자체가 늦게 일어나 도축일령(또는 체중)에 다다르더라도 안드로스테논의 생성이 낮은 개체도 있다. 또한 안드로스테논의 발현 수준은 품종 간에서도 그 변이가 크게 나타난다 (Xue, J. et al. 1996. J. Anim Sci. 74: 2170-2177; Squires, E. et al. 1995. Levels of boar taint in purebred entire male pigs in canada. p 27-29). 반면, 스케톨(skatoles)은 중간 정도의 유전력을 가지며 (Pedersen, B. 1998. Skatoles and boar taint: 129-136), 유전적인 요인보다는 환경 또는 영양 요인에 의해 조절되는 특징이 있다 (Jensen, B. et al. 1998. Skatoles and boar taint: 41-75). 따라서 분자유전학적 기법을 이용한 개량에 스케이틀에 비해 안드로스테논이 더욱 용이할 것으로 판단된다.

[0011] 안드로스테논의 대사과정은 합성과 분해의 2가지 단계로 나눌 수 있으며, 본 발명에서는 대사에 관여하는 대

사경로(metabolic pathway) 상에서 주요하게 작용하는 것으로 알려진 효소를 코딩하는 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) 유전자를 분석하였다. 3 β -HSD 유전자에 대한 전장(full length) 염기서열 분석을 통해, 새로 발견한 변이 중 인트론(intron) 3에 있는 단일염기변이(SNP)는 T→C로 염기가 치환(transition)됨으로써, 유전자의 발현에 차이를 주게 되어 간에서의 분해 작용에 관여하여 안드로스테논 함량에 주요하게 영향을 미칠 것으로 판단된다.

- [0012] 이에, 본 발명자들은 돼지에서 실제 등지방내 안드로스테논 함량을 측정하고, 3 β -HSD 유전자 내 SNP에서 유전자형 분석결과를 토대로 연관성 분석을 실시하였다. 이를 통해서 본 발명의 유전자 내 SNP가 안드로스테논 감소를 통한 옹취 감소관련 기능을 규명하고, 관련 DNA 표지인자로서의 효용성을 검증하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 돼지의 3 β -HSD 유전자의 특정부위의 SNP를 이용하여 등지방내 안드로스테논 함량 감소 여부를 확인할 수 있고 나아가 옹취가 적은 개체를 선별할 수 있는 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자, 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800 개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 DNA 표지인자를 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 3 β -HSD (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) 유전자의 엑손 4에서 돼지의 등지방내 안드로스테논 함량과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)를 찾아내고, 이러한 SNP가 돼지 개체로부터 등지방내 안드로스테논 함량 및 유전자형과의 연관성을 분석하였다. 상기 DNA 표지인자는 돼지의 등지방내 분포하는 안드로스테논의 생성과 분해에 동시에 관여하는 효소인 3 β -HSD 유전자의 서열 중 일부분으로, 특정부위에서 C 또는 T로 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다. 상기 SNP는 3 β -HSD 유전자의 8399번째 염기에 위치한다 (도 2 참조).
- [0016] 본 발명은 3 β -HSD 유전자의 전체 서열 중에서 안드로스테논 감소를 일으키는 SNP (C→T 치환) 부위를 밝혀내고 이를 포함하는 DNA 단편의 “돼지의 등지방내 안드로스테논 감소여부 확인용 DNA 표지인자”로서의 신규한 용도에 관한 것이다.
- [0017] 상기 3 β -HSD 유전자는 돼지에서 안드로스테논의 합성과 분해의 대사과정에 관여하는 것으로 알려져 있고, 특히 정소에서 안드로스테논의 생성에, 간에서는 안드로스테논의 분해에 관여하여 등지방내 안드로스테논의 함량에 영향을 미치는 것으로 판단되고 있다. 그러나 돼지의 3 β -HSD 유전자에서 특정 부위의 SNP를 이용하여 안드로스테논 함량이 낮은 개체를 선별하는 방법은 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 이러한 안드로스테논 함량 관련 SNP를 처음으로 밝혔다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편은 돼지 등지방내 안드로스테논 함량과 관련한 3 β -HSD 유전자 엑손 4의 새로운 유전적 변이 부위(SNP site)로서 서열번호 1에서 249번째 T 염기를 포함하는 DNA 표지인자이다. 이 유전적 변이 부위는 C→T로 염기가 치환되어 유전자의 발현에 차이를 주게 되어 결과적으로 안드로스테논 함량이 감소되어 옹취 발생을 감소시킬 수 있다. 상기 DNA 단편의 크기는 3 β -HSD 유전자의 full length가 아닌 한 상기 SNP 부위를 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 800 염기일 수 있다. 특히 12 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있으며, 그 이상의 크기를 갖는 염기의 경우는 본 발명의 실시예에서와 같이, PCR-RFLP 방법으로 탐지하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 도 3과 같이, 상기 SNP 부위를 포함하는 749 bp 크기(서열번호 1)의 DNA 단편을 DNA 표지인자로 이용하였다.
- [0019] 또한 본 발명에 있어서, 상기 옹취의 감소는 안드로스테논의 함량이 0.5 ppm 이하인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예 4에서와 같이, SNP에 따른 유전자형(TC, CC)과 안드로스테논 함량의 연관성을 분석하여 TC 유전자형이 안드로스테논이 감소된 개체로 확인되었으며, 이러한 개체는 Babol과 Squires (1995)이 보고한 옹취를 발생시킬 수 있는 등지방내 안드로스테논 함량의 역치 수준인 0.5 ppm 보다 낮은 0.41 ppm이므로 옹취가

현저히 감소된 개체로 판단할 수 있다.

- [0020] 본 발명에서, “안드로스테논 감소”란 SNP로 인한 개체별 유전자형(TC, CC)에 따라 돼지의 등지방내 안드로스테논 함량을 비교하여 안드로스테논 함량이 상대적으로 낮게 나타나는 것을 의미한다. 즉, TC 유전자형 개체가 CC 유전자형 개체와 비교하여 안드로스테논 함량이 감소된 상태를 의미한다.
- [0021] 본 발명에 사용된 “PCR-RFLP” 방법은 가축의 유전적 특성이나 능력개량을 위한 다양한 DNA 분석기술 중, PCR(Polymerase Chain Reaction) 기술을 이용한 유전자 단편들의 다형성(Restriction Fragment length polymorphism)을 분석하는 기법으로, 특정 점 돌연변이(point mutation) 부위에 제한효소 인지부위가 존재할 경우, 각 개체의 유전자형 차이에 따라 제한효소에 의해 절단되어 생기는 절편의 길이가 다양하게 나타나는 DNA의 다형성을 비교하여 각 개체의 바람직한 유전자형을 보다 신속하고 정확하게 판정하는 방법이다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 상기 연속서열을 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 돼지 등지방내 안드로스테논 감소 여부 확인용 조성물에서, 상기 “프라이머”란 중합효소에 의한 뉴클레오티드의 중합반응에서, 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥의 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들면, 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 (즉, 4종의 다른 뉴클레오티드 트리포스페이트 및 중합반응 효소의 존재) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.
- [0024] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 상기 프라이머는 상기한 연속서열 자체뿐만 아니라, 상기한 연속서열에 특이적으로 혼성화하는 서열로서 중합반응에서 개시점으로 작용할 수 있는 것도 포함된다. 예를 들면, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드에 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 상보성을 갖는 서열일 수 있다.
- [0025] 상기 폴리뉴클레오티드가 PCR 프라이머로서 사용되는 경우, 상기 폴리뉴클레오티드에 더하여, 그의 상보적 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 사용된 용어 “프로브”란 상기 DNA 표지인자에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일가닥 형태일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 또한, 상보적 뉴클레오티드에 수소 결합에 의하여 혼성화될 수 있는 성질을 갖는 것이면, 천연 뉴클레오티드로 구성된 것뿐만 아니라, 천연 뉴클레오티드, 천연 뉴클레오티드의 유사체, 천연 뉴클레오티드의 당, 염기 또는 인산 부위가 변형되어 있는 뉴클레오티드 및 이들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 PNA를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 분석 반응에서 상기 폴리뉴클레오티드 또는 그가 결합되어 있는 복합체의 검출의 편이를 위하여, 검출가능한 표지 (예, Cy3, Cy5 형광성 물질)가 부착, 예를 들면, 3'말단 또는 5'말단에 부착되어 있는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 완전 상보적인 서열일 수 있다. 또한, 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대한 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 상보적인 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대한 특이적 혼성화를 손상되지 않는 범위 내에서, 변형된 뉴클레오티드를 갖는 것일 수 있다. 상기 프로브의 예는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 완전 상보적인 서열로 이루어진 완전 매치 프로브(perfect probe) 및 SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대하여, 상기 SNP 부위를 제외한 모든 서열에 대하여 완전 상보적인 서열을 갖는 미스매치(mismatch probe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 프라이머 및 프로브를 사용하여 SNP 부위에 특정한 대립인자를 가진 뉴클레오티드 서열을 증폭하거나 그 존재를 확인할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 3 β -HSD 유전자 내 안드로스테논 감소 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머를 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 GeneBank (accession no. CR938722)에 등록된 유전자 서열에 기초하여 본 발명의 3 β -HSD 유전자에 존재하는 SNP를 탐색할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 본 발명의 프라이머는 종래 밝혀지지 않은 SNP

를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, 돼지 3 β -HSD 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1에서 249번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다.

- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머와 PCR 반응혼합물 및 RFLP 분석용 제한효소인 *FauI*을 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP 분석용 키트는 PCR-RFLP 기법을 이용하는 것으로, 3 β -HSD 유전자의 발현 조절 즉, 안드로스테논 함량에 관여하는 유전자의 다양한 발현을 분석하기 위하여 특정한 제한효소인 *FauI*을 포함한다. 이러한 특정 제한효소는 본 발명자들이 안드로스테논 함량의 변화를 일으키는 SNP를 밝혀내고 이 SNP에 기초하여 선택된 것이다. 따라서 본 발명의 SNP를 탐색하기 위한 키트는 상기 구성요소를 반드시 포함하여야 한다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *FauI*의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머로 증폭하였을 경우 유전자형은 TT, TC, CC로 나타나며, T allele는 647 bp의 밴드가, C allele는 647 bp가 절단되어 494 bp, 153 bp의 밴드가 나타남을 확인하였다 (도 3 참조).
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부를 확인하는 방법을 제공한다:
- [0033] a) 돼지로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0034] b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1로 표시된 3 β -HSD 유전자 단편의 249번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;
- [0035] c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *FauI*으로 처리하는 단계; 및
- [0036] d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들의 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.
- [0037] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 프라이머를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 3 β -HSD 유전자 엑손 4의 SNP (서열번호 1에서 249번째 염기)가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성된 프라이머를 이용하여 증폭시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 방법에서, 상기 유전자 단편들의 다형성은 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 어떠한 제한효소로 처리하는 것이 가능하나, 바람직하게는 제한효소 *FauI*으로 처리하는 것이 적당하다. 본 발명은 상기 SNP 부위 인식에서 표지유전자를 한 번의 PCR 반응과 효소처리로서 탐색하고 진단해 낼 수 있는 가장 효율적인 방법의 하나로 PCR-RFLP 방법을 이용한 탐색기법을 개발하였다. 구체적으로, 본 발명의 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *FauI*의 처리에 따라 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서 249번째 T 염기를 포함하는 15 내지 800개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브를 지지체에 부착하여 포함하는 돼지의 등지방내 안드로스테논 감소 여부를 확인하기 위한 마이크로레이를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 마이크로레이에 있어서, 상기 프로브는 센스(sense) 또는 안티센스(antisense)용으로 제작될 수 있다. 따라서, 상기 DNA 표지인자는 상기 서열번호 1의 염기서열 또는 이에 상보적인 서열을 가질 수 있다.
- [0041] 본 발명의 마이크로레이에 있어서, 상기 지지체는 슬라이드글라스, 플라스틱, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip), 실리콘, 젤(gel), 나노(nano) 재료, 세라믹, 금속재료, 광섬유 또는 이들을 조합하여 만들어질 수 있다. 본 발명의 마이크로레이는 당업계에 알려진 통상의 핀 마이크로레이(pin microarray)(Microarray printing technology, Don Rose, Ph.D., Cartesian Technologies, Inc., Anal Biochem, 320(2):281-91(2003)), 잉크젯(ink jet)(Nat Biotech, 18:438-441(2000), Bioconjug Chem, 13(1):97-103(2002)), 포토리소그래피(photolithography)(Cur Opin Chem Biol, 2:404-410(1998), Nature genetics supplement, 21:20-24(1999)), 또는 전기어레이(electric array)(Ann Biomed Eng. 20(4):423-37(1992), Psychiatric Genetics, 12:181-192(2002)) 방법 등으로 제작될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 마이크로어레이는 진단키트의 형태로 제공될 때, 본 발명의 마이크로어레이 외에 DNA 표지인자를 분리하기 위한 추출용 시약, DNA 표지인자를 증폭하기 위한 프라이머가 포함된 PCR 키트, 혼성화 반응용액, 비혼성화 반응 DNA 세척용 용액, 커버슬립, 염료, 비염료 결합 세척용 용액 및 사용설명서 등을 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시료에 존재하는 핵산을 분리하는 단계, 상기 분리된 핵산 중 서열 번호 1로 표시된 3 β -HSD 유전자 단편의 249번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭하는 단계, 상기 증폭된 DNA를 상기 마이크로어레이 상의 프로브 혼성화 반응 단계, 및 상기 형성된 하이브리드의 시그널 검출 단계를 포함하는 돼지에서 안드로스테논이 감소된 개체의 선별방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명에 따른 안드로스테논이 감소된 개체 선별방법에서, 상기 SNP를 포함하는 특정부위의 DNA를 증폭하는 단계는 일반적인 PCR 반응뿐만 아니라, Hot-start PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, RT-PCR(reverse transcriptase PCR), DOP(degenerate oligonucleotide primer) PCR, Quantitative RT-PCR, In-Situ PCR, Micro PCR, 또는 Lab-on a chip PCR 반응과 같은 변형된 PCR 반응과 RCA(rolling circle amplification) 등의 등온증폭(isothermal amplification)방법을 이용할 수도 있다.
- [0045] 또한 위의 증폭 단계를 거치거나 또는 거치지 않고 tyramide signal amplification이나 gold nanoparticle probe와 Raman-active dye, branched DNA와 같은 probe amplification과 signal amplification 반응을 이용할 수도 있다((Karsten SL, et al., Nucleic Acids Res. 30:e4(2002), Cao YC, et al., Science, 297:1536-1540(2002)).
- [0046] 본 발명에 따른 안드로스테논이 감소된 개체 선별방법에서, 핵산의 분리는 통상의 DNA 또는 RNA 분리방법이나 키트를 사용하여 수행될 수 있으며, DNA 증폭은 통상의 PCR 방법으로 수행될 수 있으며, PCR 검출 방법은 통상의 아가로스 겔을 이용하여 전기영동 분석 방법으로 수행하거나, 마이크로어레이 시그널 검출은 통상의 Cy5 또는 Cy3 등 형광 염료 결합 및 시그널 검출용 스캐너를 이용하여 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 3 β -HSD 유전자에 존재하는 유전적 변이(SNP)는 돼지 등지방내 안드로스테논 함량에 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있으며, 이러한 안드로스테논 함량 변화가 수태지의 옹취에 영향을 주는 것으로 유추할 수 있다. 따라서 본 발명의 SNP는 성돈의 지방에 축적된 안드로스테논 함량에 따른 옹취 발생을 탐지할 수 있는 표지인자로서 사용될 수 있으며, 본 발명은 이러한 SNP를 손쉽게 탐지할 수 있는 분석기법을 개발하였다. 이러한 표지인자를 통해서 옹돈을 선별하게 된다면 기존의 거세기법들과는 달리 옹취를 제거하면서도 옹성기능이 상실되지 않고 스트레스를 주지 않게 되어, 돈육식품안전성을 확보할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 돼지의 3 β -HSD 유전자 엑손 4 영역에서 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 서열이며, 249번째 위치의 염기가 C/T로 치환된 SNP임을 나타낸다.
- 도 2는 돼지의 3 β -HSD 유전자의 알려져 있는 구조와 본 발명에서 실시한 full length에 대한 염기서열 분석한 결과이다. 염기서열 분석에는 20개의 primer set으로 증폭된 20개의 amplicon이 이용되었으며, 총 36개의 단일염기변이부위(SNP; single nucleotide polymorphism)와 3개의 삽입/결실(insertion and deletion, InDel)이 발견되었다.
- 도 3은 3 β -HSD 유전자의 엑손 4에 위치한 *FauI* site에 대한 PCR-RFLP 단편을 나타낸다.
- 도 4는 GC-MS를 이용하여 돼지 등지방내 안드로스테논과 스케톨함량을 측정하는 과정을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위

한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0050] 실시예 1. 돼지 3 β -HSD 유전자에 대한 전장 염기서열 분석

[0051] 3 β -HSD 유전자의 5' upstream 영역부터 3' downstream 영역을 포함하는 전장(full length) 염기서열 분석을 위해, 최근에 보고된 177,720 bp 크기의 클론(clone) (CH242-150C11, chromosome 4, GeneBank accession number CR938722)을 토대로 20개의 앰플리콘(amplicon)을 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작하였다 (표 1).

표 1

Amplicon	Primer sequence	Binding region	Size (bp)
1	5'-GCAGATCCCTGTTGTCAGTG-3' 5'-AGCACGGTGAAGGACACTTT-3'	5'unpsteam	769
2	5'-AAAGTGTCTTCACCGTGCT-3' 5'-TGTGACTTGTGGCCTTATGC-3'	5'unpsteam	827
3	5'-AGAGGCACCTGAGACTTTGG-3' 5'-CTGGGTTCTGGTCTCCTGAT-3'	Exon 1, Intron 1	783
4	5'-AGAGGCAAGGGCACATAAG-3' 5'-AGACGGTGCAAGCAAGTG-3'	Exon 2	810
5	5'-CCGGTCTGACCAAGAACTA-3' 5'-TCCCCTGTGCCTGTATTCTC-3'	Intron 2	714
6	5'-GCAGTGGGCTAGGTGTTTT-3' 5'-CCTTCAGGCAACCTAGTGCT-3'	Intron 2	726
7	5'-GAAGTGGATTGTAGGGGACA-3' 5'-AGGCCAGAGAACAGTGGAGA-3'	Intron 2	645
8	5'-TGGCAGAGGCTTAGATGGTT-3' 5'-TCAAAGACAGCCCTCCGTAT-3'	Intron 2	679
9	5'-TCAAGTCCATCCATCATTCG-3' 5'-CGGGTGTGGAATTAAGGAG-3'	Intron 2	369
10	5'-TCCTCGTGTGAAAGGTGATG-3' 5'-CGTGAACAGGACTCAGGTCA-3'	Exon 3	788
11	5'-CCCATCCACCTGTC TTGA-3' 5'-TTAGAGCCACGCAGAAAGTT-3'	Exon 3	708
12	5'-CTTTTGCTGCTGTC AAGTGC-3' 5'-TGTGGTCTAGAGGGATTGG-3'	Intron 3	687
13	5'-CTTCTGAATCGTGGCTTTC-3' 5'-TGCAGAGGGAGCAATGACTA-3'	Intron 3	512
14	5'-GCACCTGAGCCTTTGAAATC-3' 5'-AGCACCTGATTGTGGTTCT-3'	Intron 3	579
15	5'-TCCGGGTAAACAGAGTCACA-3' 5'-AGCGCTAGTCCTTAGGCAAA-3'	Intron 3	553
16	5'-TGGGACCTTCCACATGCT-3' 5'-CCTGTGCCTTCAATTTTGG-3'	Intron 3	900
17	5'-AAGAAAGGAAGGGTGGAAGA-3' 5'-CATGTGGGCAAGATGAATG-3'	Intron 3	721
18	5'-GGCTCTTCAGAACGGTGGTA-3' 5'-GCGAGAAGCAGACAAGAAGG-3'	Exon 4	782
19	5'-CGCTGAAAACCAAGACTCACT-3' 5'-CTGGGTTAAGCATCCTGGTC-3'	Exon 4	749
20	5'-CAAGCACCCACTCTGTTTCA-3' 5'-GAGAAGGCCAGTGATGAAGG-3'	3' downstream	744

[0052]

[0053] 유전자 구조분석과 동시에 품종 간 및 품종 내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 4개 품종(Yorkshire, Landrace, Berkshire, Duroc)의 순종 돼지의 DNA를 각 품종별로 10두씩 혼합하여 3개 샘플을 염기서열 분석에 이용하였다. 표 1에 개시된 특이 프라이머와 혼합된 DNA 샘플을 이용하여 PCR 방법을 통해서 20개의 앰플리콘(amplicon 1 ~ amplicon 20)을 증폭시켰으며, 이를 ABI PRISMBigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 돼지 3 β -HSD 유전자의 전장 염기서열 분석 결과를 기존의 클론 서열(clone sequence)과 비교(alignment)하여 품종 간 및 품종 내 변이를 탐색하였다.

[0054] 그 결과, 총 39개의 변이를 발견하였다. 단일염기변이(Single nucleotide polymorphism, SNP)는 총 36개였으

며, 삽입 또는 결실(insertion and deletion, InDel)은 총 3개가 발견되었다 (도 2). 이 중 엑손 4에 위치하고 제한효소 *FauI*로 인식되는 SNP는 염기서열분석에 사용된 4개 품종에서 모두 변이가 나타났으며 이에 본 발명의 SNP로 선정하였다. 본 발명의 SNP는 애플리온 19에서 발견되었으며 3 β -HSD 유전자의 8399번째 염기에 위치한다.

[0055] 실시예 2. 돼지의 genomic DNA 추출

[0056] 본 실험을 위해서 실험축군(resource population)으로 선정된 비거세 수돼지 147두를 대상으로 실시하였다. 실험군 돼지의 경정맥으로부터 혈액을 채취하여, DNA 추출에 이용하였다.

[0057] 유전자 다형성 분석을 위한 genomic DNA의 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 돼지의 경정맥에서 10 ml의 혈액을 채취한 후, 응고를 방지하기 위해서 ACD 용액 (citric acid 0.48 g, sodium citrate 1.32 g, glucose 1.47 g to H₂O 100 ml) 2 ml를 첨가하여 4℃ 유지하여 실험실까지 운반하였다. 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1,300 g에서 15분간 원심분리하여 백혈구연층(buffy coat)을 모아 15 ml의 DNA 추출버퍼(extraction buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 0.1 M EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS; 20% μ g/ml)를 넣고 잘 섞은 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 Proteinase K (200 μ g/ml, BRL)를 혼합하여 37℃ 항온수조에서 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 동량의 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0)으로 준비된 페놀(Phenol)에 넣고 30분 동안 섞어 추출한 후 실온에서 15분간 5,000 g로 원심분리하여 층이 생기도록 하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 직경이 0.3 cm되는 피펫(pipet)으로 상층액을 취하여 50 ml Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) 4L에서 18시간 동안 4℃에서 투석하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 분리된 DNA 순도는 spectrophotometer (Beckman, USA)를 이용하여 흡광도 A260과 A280의 비율로 측정하였으며, 0.8% 아가로즈 겔 전기영동을 시행하여 DNA의 분자량을 확인하였다.

[0058] 실시예 3. PCR-RFLP 분석

[0059] DNA 표지 유전자를 한 번의 PCR 반응과 효소 처리로 탐색하고 진단해 낼 수 있는 가장 효율적인 방법의 하나로 PCR-RFLP 방법을 이용하여 탐색기법을 개발하였다. Restriction mapper software program(<http://www.restrictionmapper.org/>)을 이용해서 목표한 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소(Restriction enzyme)를 찾았고, 그렇게 찾아낸 제한효소인 *FauI*의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드(band) 형태를 파악하여 유전자형을 구분할 수 있었다.

[0060] PCR 반응시 프라이머는 Forward (5' - CGC TGA AAA CCA AGA CTC ACT - 3', 21mer)(서열번호 2)와 Reverse (5' - CTG GGT TAA GCA TCC TGG TC- 3', 20mer)(서열번호 3)로 제작하여 각각 1 μ l(5 pmol/ μ l)씩 첨가하였고, 그 외의 반응 첨가물은 10 $\times$ PCR buffer(100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl) 2 μ l, 10 $\times$ dNTP mix(each 25 mM) 2 μ l, Taq DNA polymerase(5 unit/ μ l; Intron bio.) 0.2 μ l과 ddH₂O 12.8 μ l, Template DNA 1 μ l(약 100 ng)이었다. PCR 반응에는 Mastercycler(Eppendorf Co., Germany) 기기를 사용하였고, PCR 반응조건은 94℃에서 15분간 pre-denaturation 한 후, 94℃에서 denaturation 1분, 60℃에서 annealing 1분, 72℃에서 extension 1분을 한 cycle로 하여 30 cycle을 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 10분으로 PCR 반응을 종료하였다.

[0061] 이렇게 확보된 3 β -HSD 유전자의 exon4의 일부를 포함하는 PCR product(749 bp)를 restriction mapper software program을 이용해서 찾아낸 *FauI* 제한효소로 처리하였다. *FauI* enzyme 처리 첨가물은 *FauI* enzyme 0.5 μ l(5 unit/ μ l, NEB(New England BioLabs)), 10 $\times$ Enzyme buffer 0.7 μ l, ddH₂O 0.8 μ l, PCR product 5 μ l로 총 volume이 7 μ l이었다. 이 혼합물을 55℃ 인큐베이터에서 약 6시간 동안 반응시키고, 2% 아가로즈 겔에 100V로 30분 동안 전기영동(electrophoresis)하여 그 밴드 패턴을 확인하였다 (도 3 참조).

[0062] 도 3은 3 β -HSD 유전자의 exon4번에 위치한 *FauI* site에 대한 PCR-RFLP 단편을 나타낸다. 사이즈 마커는 1Kb plus DNA ladder (invitrogen)를 이용하였다. 749 bp의 PCR product(서열번호 1)는 제한효소 *FauI*에 의해 647 bp, 88 bp 및 14 bp의 단편이 만들어 진다(TT 유전자형). 14 bp와 88 bp의 단편은 모든 유전자형에서 동일하게 만들어지며, CC 유전자형의 경우 647 bp가 절단되어 494 bp와 153 bp의 단편이 만들어진다. 또한 이형접합체(TC 유전자형)의 경우 647 bp, 494 bp, 153 bp의 단편이 모두 나타난다.

[0063] 총 147두 비거세 수돼지의 유전자형 분석결과에 대하여, 돼지 3 β -HSD 유전자의 유전자형 및 유전자 빈도는

하기 표 2에 나타내었다. 유전자형(Genotype)은 CC 유전자형(66%)을 가진 개체가 가장 많이 나타났으며, TC 유전자형(23%) TT 유전자형(11%)순으로 나타났다. 이에 따라 유전자빈도에서 T allele(78%)이 C allele(22%)과 비교하여 높게 나타났다. 따라서 웅취원인물질과의 연관성 분석에서 빈도가 가장 적게 나온 TT 유전자형을 제외하였다.

표 2

Restriction Enzyme	Site	N ¹	Genotypes			Gene	
			CC	TC	TT	C	T
<i>FauI</i>	Exon4	147	0.66 (97)	0.23 (34)	0.11 (16)	0.78	0.22

¹ number of Pigs.

[0064]

[0065] 실시예 4. 표지 유전자형 별 등지방내 안드로스테논 함량차이 확인

[0066] 도 3에서 보는 바와 같이, CC, TC, TT의 세 가지 유전자형을 확인할 수 있으며, 전체 147마리 수퇘지에 대해 등지방내 안드로스테논과 스케톨 함량을 분석하였다. 돼지 등지방 1.5 g를 적출하여 도 4의 과정을 거쳐 전 처리를 한 후, Agilent 7890 기체크로마토그래피와 5975 Mass Selective Detector(GC-MSD)를 사용하여 안드로스테논 및 스케톨에 대한 정량분석을 실시하였다. 컬럼은 안드로스테논의 경우 DB-5MS, 스케톨의 경우 DB-1MS를 사용하였고, 오븐 온도는 초기 120℃에서 2분간 머무른 후 분당 15℃/min으로 250℃까지 올린 후 분당 10℃/min으로 260℃까지 올리게 하였다.

[0067] 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.13 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 최소제곱평균 (Least Squares Means)을 구하여 유의차를 평가하고 연관성을 분석하였다. 통계분석 모델은 다음과 같다.

[0068]
$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Geno}_i + \text{Period}_j + e_{ijk}$$

[0069]
$$Y_{ijkl} = \text{각 형질의 측정치}$$

[0070]
$$\mu = \text{전체 평균}$$

[0071]
$$\text{Geno}_i = 3\beta\text{-HSD 유전자의 BsmAI site에 대한 유전자형 (i=1,2,3)}$$

[0072]
$$\text{Period}_j = \text{도축시기에 따른 효과 (j=1,2,3,4,5)}$$

[0073]
$$e_{ijk} = \text{임의 오차}$$

[0074] 하기 표 3은 수퇘지의 등지방내 안드로스테논 및 스케톨 함량 측정치와 유전자형 간의 상관관계를 분석한 결과이다.

표 3

Traits	Faul		Significance
	CC (n=97)	TC (n=34)	
Androstenone (ppm)	0.79 ^a (0.11) ¹	0.41 ^b (0.15)	†
Skatole (ppm)	0.22 (0.01)	0.23 (0.02)	NS

¹ Least square means and standard error

Levels of significance: NS, not significant; † P < 0.10; * P < 0.05

표 3에서 보는 바와 같이, 스케톨 함량은 유전자형간에 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 등지방내 안드로스테논 함량은 TC 유전자형이 CC 유전자형에 비해 10% 유의수준에서 낮게 나타났다. 또한 본 발명의 실시예에서 확인된 TC 유전자형 개체들의 안드로스테논 함량 평균치는 0.41 ppm으로 기보고된 안드로스테논의 웅취발생 역치수준인 0.5 ppm보다 낮다. 따라서 본 발명의 돼지 3β-HSD 유전자의 Exon4번에 위치한 SNP, 즉 서열번호 1의 249번째에서 C염기가 T염기로 치환(substitution)된 경우 웅취원인물질인 안드로스테논의 함량이 낮은 것으로 판단할 수 있으므로, 본 발명의 SNP가 안드로스테논 함량을 결정할 수 있는 DNA 표지인자로서 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면

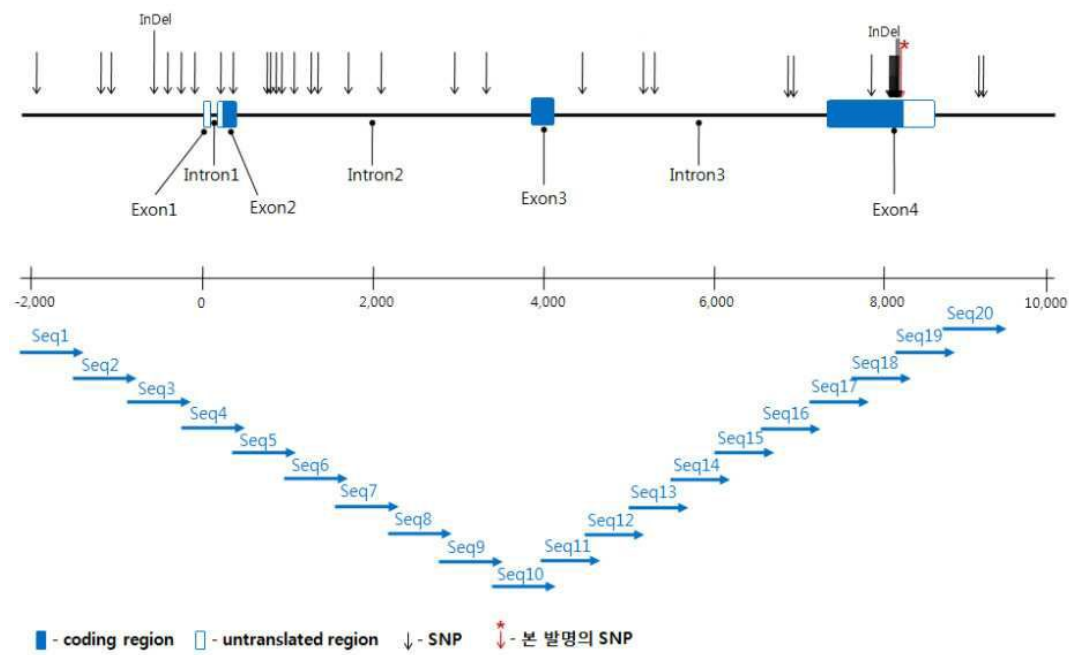
도면1

```

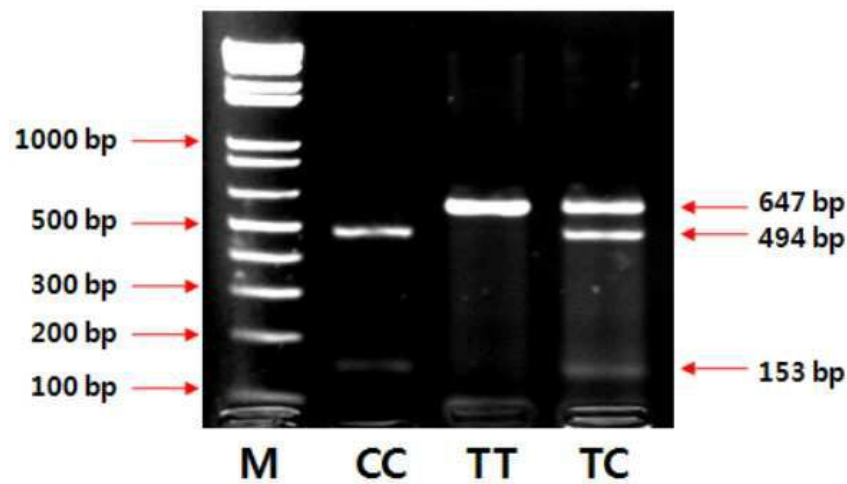
1 cgctgaaaac caagactcac tgacctgggc tgacgaccac gtggatgtgg gtgtgagggg
61 aactccgtcg agctgttccc ccgccgtgc ccccccggc cccaccgcca ctggcttcat
121 acagaaagta gcacaggcac gaagccaggt cctccagcct cgctttccga ggtggtcacc
181 ttcttgtctg cttctcgcca ccGgaaccct cccctgtcac tggcgcagga gatgctgtct
241 gacctccc[C/T]g cccttccggg gaaggacaag gggactgggc gtggccgctg gcaccaagt
301 ctcagttgct gattctgagc cttttggggg cttctttgaa ctttgagttt tgcctcttca
361 ttccctttcc tttgttaaat gcaaaagcct tttttttaa agtatgtatc cttcacgca
421 gctccatgaa aataataaac gttttaatga ctcatctgga ggaagtgggt atgtctgggc
481 acacagggga cttttccttt ccctccattt ctaggtctca ccctctctgt ttagaaaaat
541 tgcacagaac aggggtgggcg gcagtgtctg gaaggggagc caggatcaac caagcaccca
601 ctctgtttca ggcctgtgct aggtgactga tgtgtttgct ttaatcctca ccggaagccc
661 acgaggtagg ggtgactgtt ccctcttatg aataaggaaa cttgttctca gccacagtaa
721 ctgggaagag accaggatgc ttaaccag

```

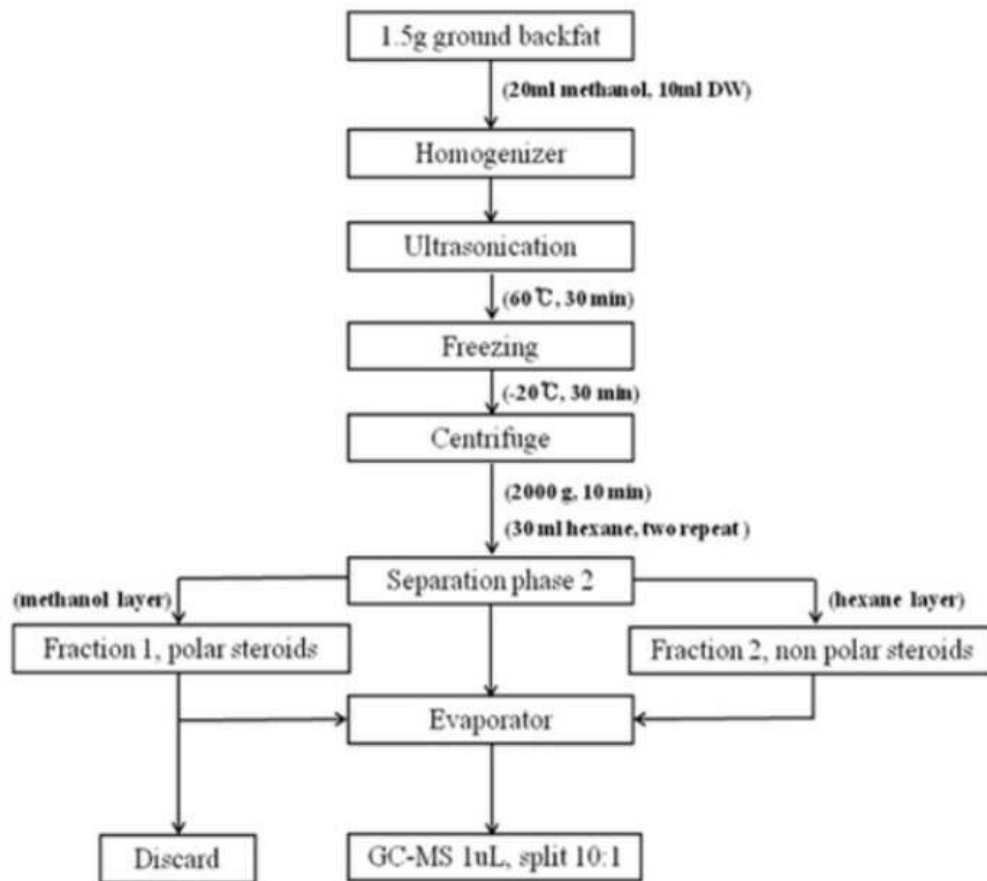
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> DNA markers for detecting decrease of androstenone within backfat
in pigs
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 749
- <212> DNA
- <213> a part of exon 4 of porcine 3beta HSD gene
- <400> 1

cgctgaaaac caagactcac tgacctgggc tgacgaccac gtggatgtgg gtgtgagggg	60
aactccgtcg agctgttccc ccgccgtgc cccccgccccc cccaccgcca ctggcttcat	120
acagaaagta gcacaggcac gaagccaggt ctccagcct cgctttccga ggtggtcacc	180
ttcttgtctg ctctcgcca ccggaacct ccctgtcac tggcgcagga gatgctgtct	240
gacctcctg ccttccggg gaaggacaag gggactgggc gtggccgtg gcaccaagt	300

ctcagttgct gattctgagc cttttggggg cttctttgaa ctttgagttt tgcctcttca 360
 ttccctttcc ttgtttaaag gcaaaagcct ttctttttaa agtatgtatc ctttcacgca 420
 gtcctatgaa aataataaac gttttaatga ctcatctgga ggaagtgggt atgtctgggc 480
 acacagggga cttttccttt cctccattt ctaggctctca ccatctctgt ttagaaaaat 540
 tgcacagaac aggttgggag gcagtgtctg gaaggggagc caggatcaac caagcaccca 600

ctctgtttca ggcctgtgct aggtgactga tgtgtttgct ttaatcctca ccggaagccc 660
 acgaggtagg ggtgactgtt cctctttatg aataaggaaa cttgtttctca gccacagtaa 720
 ctgggaagag accaggatgc ttaaccag 749

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for PCR

<400> 2

cgctgaaaac caagactcac t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for PCR

<400> 3

ctgggttaag catcctggtc 20