



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0049247

(43) 공개일자

2014년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0115246

(22) 출원일자

2012년10월17일

심사청구일자

2012년10월17일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이준현

대전 유성구 어은로 57, 103동 606호 (어은동, 한빛아파트)

임현태

대전 유성구 문화원로 13, 111동 303호 (장대동, 드림월드아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 동원

전체 청구항 수 : 총 5 항

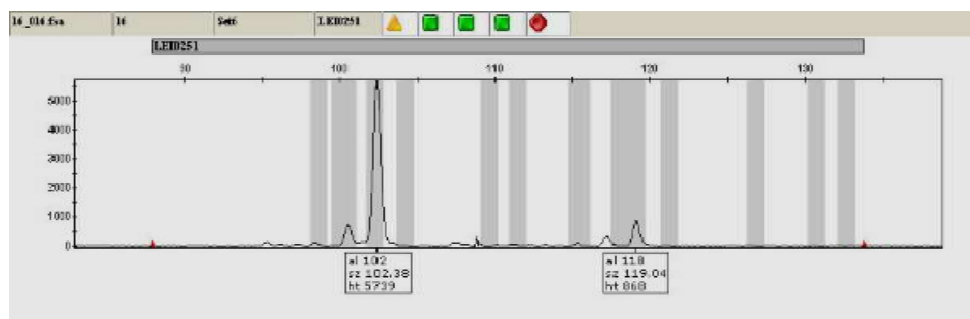
(54) 발명의 명칭 **재래닭의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 재래닭의 개체식별 방법**

(57) 요약

본 발명은 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 재래닭의 개체식별 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 마이크로새틀라이트 마커인, LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304로 이루어진 제1세트, LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304, ADL0324, MCW0063, MCW0264로 이루어진 제2세트 중 한세트 이상을 조합한 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 PCR 증폭하는 단계 및 상기 증폭단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 이용해 대립유전자를 검출하고 크기를 분석하여 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 재래닭의 개체식별 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 방법은 높은 개체식별력을 가지고 있는 마이크로새틀라이트 마커를 이용함으로써 재래닭의 식별에 형태학적인 분류기준보다 정확하게 재래닭의 개체식별과 친자감별이 가능하다. 따라서 본 발명의 방법을 재래닭의 개체식별에 적용하여 재래닭의 보전 및 신뢰도에 긍정적인 영향으로 불법유통을 제어하고, 재래닭 산업의 발전과 농가의 소득 증대에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서동원

대전 동구 홍도로39번길 5, 2층 (홍도동)

최누리

대구 북구 칠곡중앙대로51길 6, 102동 205호 (태전동, 협화맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008133

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고급육질형 종계 육성을 위한 유전체 선발 기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 동물유전체육종연구사업단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304, ADL0324, MCW0063 및 MCW0264로 이루어진 군에서 선택된 12개 이상의 재래닭 개체식별용 마이크로새틀라이트 마커.

청구항 2

제 1항의 마이크로새틀라이트 마커의 특이적인 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24, 25 및 26, 27 및 28, 29 및 30의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 12쌍 이상의 재래닭 개체 식별용 프라이머.

청구항 3

제 2항의 프라이머를 포함하는 재래닭 개체 식별용 키트.

청구항 4

(a) 분석하고자 하는 핵산시료를 LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304, ADL0324, MCW0063 및 MCW0264로 이루어진 군 중에서 선택된 12개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자(allele)를 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 재래닭 개체식별 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기(a) 단계의 프라이머는 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24, 25 및 26, 27 및 28, 29 및 30의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 12쌍 이상의 프라이머임을 특징으로 하는 재래닭 개체의 식별 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 재래닭의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 재래닭의 개체식별 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다형지수가 높은 마이크로새틀라이트를 선발, 그 중 이형접합률이 높은 순서와 증폭산물의 크기, 분석시 발생하는 경제적 비용 등을 고려하여 마이크로새틀라이트 마커의 조합을 확립하고 이를 이용한 재래닭의 개체식별 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 가금육은 우리나라 전체 육류생산량의 20% 이상을 차지하고 있을 정도로 농가의 소득 및 농촌 경제에 중요한 역할을 담당하고 있다. 그 중에서 가장 높은 비율을 차지하는 닭은 그 종자를 대부분 축산선진국(미국, 영국, 프랑스, 독일, 덴마크 등)으로부터 수입에 의존하고 있는 실정이다.

[0003] 재래닭은 1990년대 축산과학원 가금과에서 "재래닭 복원사업"으로 5품종 9계통을 확보하고 있으며 이는 소비자의 선호를 고려한 '우리맛닭'으로 개발됨에 따라 고급 육질을 가진 종계로 산업화를 해나가고 있는 실정이다.

[0004] 소, 돼지의 경우 생산이력제 사업이 시행되거나 추진되어 국내종과 수입종의 구분으로 신뢰성을 확보해 나가고 있는 반면, 재래닭의 경우 보존 및 개발이 많이 이루어져 있지 않은 상태에 있으며 그 명칭이나 구분이 명확하지 않아 국내종으로서의 신뢰성 확보가 시급한 실정이다.

- [0005] 따라서, 앞으로 개발될 재래닭 종자 또한 유전자형을 이용한 개체식별 방법을 확립하여 고급육을 브랜드육으로 발전시키고, 재래닭의 신뢰성을 증가시키기 위한 재래닭에 적합한 마이크로새틀라이트 마커의 개발이 필요하다.
- [0006] 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 개체식별은 1990년대부터 인간뿐만 아니라 동물에서도 계통분류나 유전적 유연관계를 분석하기 위한 가장 효율적인 분자마커로 활용되고 있으며, 최근에는 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 특정 개체의 품종식별 결과를 활용한 통계분석들이 제안되었고, 가축의 경우에는 국제동물유전학회나 Rosline 연구소 등에서 권장하는 마커를 사용하여 계통유전학이나 생산이력제, 친자감별 등에 대립유전자의 다형성이 크게 편극 되어있지 않은 특성을 이용하여 활용되고 있다.
- [0007] 현재, 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 국내에서 재래닭 유전자의 보존 측면과 품종 간 유전적 다양성 연구 및 친자확인 등 유전적 감식 기법이 진행되고 있지만, 아직 그 유용성 및 정확도가 떨어지는 단점을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 출원번호 10-2004-0088540 초위성체 유전자를 이용한 계육의 원산지 추적 및 개체식별 방법

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 종래기술보다 효과적으로 재래닭의 개체식별에 사용할 수 있고, 높은 수준의 검정력을 확보하면서 정확하게 식별할 수 있는 신규한 마이크로새틀라이트 마커들을 이용하여 조합을 형성, 이를 이용한 재래닭 개체식별 방법 및 재래닭 개체식별용 검출키트를 제공하는 것을 목적으로 둔다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304, ADL0324, MCW0063 및 MCW0264로 이루어진 군 중에서 선택된 12개 이상의 재래닭 개체 식별 용 마이크로새틀라이트 마커를 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24, 25 및 26, 27 및 28, 29 및 30의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 12쌍 이상의 재래닭 개체식별용 프라이머를 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 프라이머를 포함하는 재래닭 개체식별 키트를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 분석하고자 하는 핵산 시료를 LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107, ADL0304, ADL0324, MCW0063 및 MCW0264로 이루어진 군에서 선택된 12개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 및 상기 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자(allele)를 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 재래닭 개체의 식별방법을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 PCR 증폭 단계의 프라이머는 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24, 25 및 26, 27 및 28, 29 및 30의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 12쌍 이상의 프라이머임을 특징으로 하는 재래닭 개체의 식별방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 본 발명은 재래닭의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 재래닭의 개체식별 방법은, 종래 기술에서 사용된 마커들 보다 높은 개체식별력을 가진 마이크로새틀라이트 마커들로 구성, 이에 특이적인 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하고 그 결과를 이용하여 좀 더 정확한 닭의 개

체식별력을 제공하는 효과가 있다. 또한 본 발명에 따른 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 재래닭의 개체식별 방법은 재래닭의 유통과정에 부정행위를 방지할 수 있는 수단으로 활용할 수 있으며, 이에 따라 재래닭에 대한 소비자의 신뢰도를 상승시켜 생산농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 마이크로새틀라이트 마커 LEI0251에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 2마이크로새틀라이트 마커 ADL0259 에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 마이크로새틀라이트 마커 ADL0021에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 마이크로새틀라이트 마커 MCW0104에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 마이크로새틀라이트 마커 MCW0261에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 마이크로새틀라이트 마커 MCW0087에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 마이크로새틀라이트 마커 ADL0292에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 마이크로새틀라이트 마커 GCT0016에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 마이크로새틀라이트 마커 MCW0029에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 마이크로새틀라이트 마커 MCW0145에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 마이크로새틀라이트 마커 LEI0107에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 마이크로새틀라이트 마커 ADL0304에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 마이크로새틀라이트 마커 ADL0324에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 마이크로새틀라이트 마커 MCW0063에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 마이크로새틀라이트 마커 MCW0264에 특이적인 프라이머를 이용하여 수득한 PCR 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0018]

실시예 1 : 재래닭의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 선발

[0019]

재래닭 개체식별에 효과적으로 사용될 수 있는 마이크로새틀라이트 마커를 선발하기 위해, 국제동물유전학회에서 제안하고 있는 닭의 크로모솜 전 영역에 위치한 닭 다형성 분석용 마이크로새틀라이트 마커 150개 중, 가능

한 다양한 크로모솜을 포함할 수 있도록 다형지수가 높은 마커로 15개 선발하였다.

[0020] 선발된 마이크로새틀라이트 마커의 대립유전자의 수는 6개 이상, 이형접합률은 70% 이상으로, 이는 특허문헌 1에서 사용된 마이크로새틀라이트 마커의 선발기준보다 높은 개체식별의 정확도를 가지고 있다. 여기서 대립유전자의 수는 PIC(Polymorphic Information Contents)에 영향을 미치게 되며, 또한 다음 세대의 이형접합도에도 영향을 준다. 따라서, 마이크로새틀라이트 마커의 대립유전자 수가 많다는 것은 유전적 다양성이 높아진다는 것을 의미하며, 이는 개체식별률이 그만큼 높아진다는 것을 의미한다.

[0021] 실시예 2 : 공시축 및 DNA 시료

[0022] 성환 축산과학원 가금과에서 보존하고 있는 5품종 재래닭 88수와 그의 자손집단 597수, 총 685수의 혈액을 채취하여 공시재료로 사용하였다. 재래닭의 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 과정은 다음과 같다.

[0023] 685수의 혈액은 EDTA가 든 튜브에 채취하여 혈액 5ml당 버퍼 A(0.32M Sucrose, 1mM TrisHCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100, dH₂O)를 4배 볼륨으로 희석한 후 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 제거하였다. 상기 과정을 3번 반복하여 상층액을 제거한 후, 버퍼 B(400mM NaCl, 2mM EDTA, 10mM TrisHCl, dH₂O) 2.25ml과 버퍼 C(5% SDS, 2mg/ml Proteinase K, 2.6ml) 250μl를 첨가한 후 천천히 위아래를 뒤집어 여러번 섞은 후 50℃ 진탕배양기에 하루 정도 침지시켜 두었다. 상기 배양액에 6M NaCl 675μl를 첨가하여 15초간 강하게 흔들어 준 후, 3000rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액을 새 튜브에 옮겨주었다. 상기 튜브에 2배 볼륨의 99% EtOH를 첨가하여 DNA를 침전시킨 후 침전물은 70% EtOH로 세척해주고, 최종적으로 TE buffer를 500μl 첨가시켜 응집된 DNA를 녹여 수집한다.

[0024] 실시예 3 : 마이크로새틀라이트 마커 특이적 프라이머 제작

[0025] 실시예 1을 통해 선발된 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 (주)LSK에 의뢰하여 주문 제작하였다. 각 프라이머 중 정방향 프라이머 끝에 FAM, VIC, NED, PET으로 이루어진 표지 형광물질을 부착하였으며, 각각의 프라이머의 명칭, 표지 형광물질 및 염기서열을 표 1에 나타내었다.

표 1

위치	크로모솜	표지	프라이머 서열		서열번호
LEI0251	13	NED	F	GATCTAGAAATGGCTGACTGAC	1
			R	GGGTTACTCTTATGTTAATGATGTC	2
ADL0259	9	VIC	F	CTCATTGCAGAGGAAGTTCT	3
			R	GTAATGGAGGATGCTCAGGT	4
ADL0021	9	PET	F	GCTCCTCGCTTTGCTCTGAA	5
			R	GCTTAGCCTCATCTCTGTGA	6
MCW0104	13	FAM	F	TAGCACAACCAAGCTGTGAG	7
			R	AGACTTGCACAGCTGTGTACC	8
MCW0261	3	FAM	F	GAGCAGTTCATATGAAGTCAG	9
			R	GTAGTAGCAGCTACACCAGAG	10
MCW0087	2	NED	F	ATTCTCTGCAGCCAAGTTGGAG	11
			R	CTCAGGCAGTTCTCAAGAACA	12
ADL0292	5	FAM	F	CCAAATCAGGCAAACTTCT	13
			R	AAATGGCCTAAGGATGAGGA	14
GCT0016	9	NED	F	TCCAAGGTTCTCCAGTTC	15
			R	GGCATAAGGATAGCAACAG	16
MCW0029	5	VIC	F	GTGGACACCCATTTGTACCCTATG	17
			R	CATGCAATTCAGGACCGTGCA	18
MCW0145	1	FAM	F	ACTTTATTCTCCAAATTGGCT	19
			R	AAACACAATGGCAACGGAAC	20
LEI0107	1	NED	F	GCTGCTCAGAAGCATCTGTGC	21
			R	ATCATTGCTACACCATGGTTC	22

ADL0304	18	FAM	F	GGGGAGGAACTCTGGAATG	23
			R	CCTCATGCTTCGTGCTTTT	24
ADL0324	20	NED	F	TTGCCTCGACGGACCACAAT	25
			R	GCAGCCCCGCCAAGTAACTG	26
MCW0063	2	FAM	F	GGCTCCAAAAGCTTGTCTTAGCT	27
			R	GAACACAGTAAAGCTTCTTAC	28
MCW0264	2	FAM	F	CTTACTTTTTCACGACAGAAGC	29
			R	AGACTGAGTCACACTCGTAAG	30

[0027] 실시예 4 : PCR 증폭

[0028] 상기 실시예 1에서 수집된 DNA 시료를 주형으로 하고, 실시예 2를 통해 제작된 15쌍의 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 다음과 같은 조건으로 수행하였다. PCR은 주형 DNA 25ng, 각각의 프라이머(10pmole) 양 방향 1.0 μ l씩, Taq DNA 중합효소 0.2unit, 10X 완충용액 2.0 μ l, 2.5mM dNTP 2.0 μ l의 조성액 증류수를 채워 총 반응액은 20.0 μ l가 되도록 하였다. 상기 혼합물은 서멀 사이클러 PTC-0240(MJ Research, Inc., MA, USA)을 이용하여 94℃에서 10분간의 첫 반응을 시작으로 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 프라이머 결합, 72℃에서 30초간 신장반응을 하여 35cycles 반복하고, 그 후 72℃에서 10분간 최종 신장반응 후 4℃에서 PCR 반응을 종료하였다.

[0029] PCR 후 증폭된 산물은 ABI3130 DNA 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기 및 형광 물질별로 분류되도록 전기영동을 실시하고, Genemapper version 3.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 PCR 산물의 크기와 마커 종류별 대립유전자수 등을 분류하여 자료를 수집하였다.

[0030] 실시예 5 : 마이크로새틀라이트 마커의 다형지수 분석

[0031] 실시예 3으로부터 얻어진 결과로 각각의 마이크로새틀라이트 다형지수인 이형접합률(He, Heterozygosity) 및 다형정보지수(PIC, polymorphic Information Content)를 Cervus version 3.0.3을 이용하여 계산하였다(Marshall et al(1998) *Mol. Ecol.* 7:639-655).

[0032] 그 결과, 각 마이크로새틀라이트의 다형지수는 표 2에 나타난 바와 같다. 본 발명은 각 마이크로새틀라이트 중 이형접합률이 높은 순서와 증폭산물의 크기, 분석시 발생하는 경제적 비용 등을 고려하여 15개 중 12개의 마이크로새틀라이트(LEI0251, ADL0259, ADL0021, MCW0104, MCW0261, MCW0087, ADL0292, GCT0016, MCW0029, MCW0145, LEI0107 및 ADL0304)를 재래닭의 개체식별을 위한 마커 제1세트로 확립하였고, 나머지 3개의 마이크로새틀라이트 마커(ADL0324, MCW0063 및 MCW0264)를 포함한 15개의 마이크로새틀라이트 마커를 재래닭의 개체식별을 위한 제2세트로 확립하였다.

표 2

[0033]

위치	대립 유전자 수	N	크기 범위(bp)	Hobs	HExp	PIC
LEI0251	12	88	84~124	0.852	0.882	0.865
ADL0259	9	88	92~132	0.773	0.846	0.826
ADL0021	8	88	145~185	0.795	0.849	0.825
MCW0104	11	88	190~234	0.659	0.846	0.823
MCW0261	8	88	231~271	0.83	0.842	0.817
MCW0087	9	88	239~279	0.761	0.83	0.806
ADL0292	7	88	108~148	0.716	0.821	0.791
GCT0016	8	88	201~241	0.466	0.804	0.773
MCW0029	11	88	166~206	0.739	0.789	0.77
MCW0145	7	88	188~222	0.727	0.791	0.759
LEI0107	8	88	185~225	0.716	0.77	0.739
ADL0304	8	87	119~159	0.678	0.768	0.735
ADL0324	6	88	146~186	0.568	0.767	0.723
MCW0063	8	88	114~154	0.648	0.712	0.665
MCW0264	6	87	217~257	0.713	0.709	0.648

- [0034] HObs : Observed Heterozygosity value
- [0035] HExp : Expected Heterozygosity value
- [0036] PIC : Polymorphic Information content

[0037] **실시예 6 : 통계분석**

- [0038] 실시예 3으로부터 얻어진 결과 중, 자손집단 597수를 제외한 5품종 재래닭 88수를 대상으로 다음의 방법을 통해 통계분석 하였다.
- [0039] F-통계량 추정치에 대한 유의성 검정은 Goudet(2001)이 제안한 방법에 의하여 PT(permutation test)를 실시하여 얻었으며, 마터의 다형지수인 이형접합률(*He*), 다형정보지수(*PIC*) 및 배재력(exclusion probability, *PE*)은 Cervus version 3.03(Marshall 등, 1998)을 이용하였다. 또한 추정된 F_{st} 와 F_{is} 에 근거하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단에서의 동일개체 출현가능확률은 API-CALC version 1.0(Ayres와 Overall (2004) Molecular Ecology Notes 4:315-318)을 사용하여 계산하였다.
- [0040] 추정된 F-통계량을 이용하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단을 가정하여 마이크로새틀라이트 마커 유전자형의 동일한 개체 출현확률(Probability of identity; *PI*와 Probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$)과 친자감정확률(Probability of parent exclusion when both parentas are unconfirmed; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; *PE*)을 API-CALC version 1.0과 Cervus version 3.0.3을 이용하여 추정하였다.
- [0041] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 전체의 마이크로새틀라이트 마커를 사용할 경우 무작위 교배집단에서 1.01×10^{-20} , 반형매 교배집단에서는 3.85×10^{-15} 으로 나타났다. 이러한 추정치의 의미는 제1세트의 12개 마이크로새틀라이트 마커를 친자감별 및 개체식별에 사용할 경우 부모의 유전자형과 교배기록을 알고 있을 때 100% 친자감별 및 개체식별이 가능하며, 나머지 세개의 마커가 추가된 제2세트는 이를 보완하는 역할로 사용할 수 있다. 또한 국내에서 재래닭 5품종으로부터 생산된 개체들을 이용한 종모계를 생산하여 농가에 보급할 경우 이들의 절대적인 유전적 기여에 의한 거대한 반형매 교배집단으로 가정하고 하나의 생산라인이나 브랜드를 구축하기 위하여 적정 사육두수를 감안하더라도 동일개체가 출현할 확률이 없다고 보아도 무방할 것으로 사료되는 결과이다.

표 3

[0042]

구분	<i>PI</i>	$PI_{half-sibs}$	PI_{sibs}	<i>PE</i>
제1세트	1.01×10^{-20}	3.85×10^{-15}	1.69×10^{-7}	0.999555
제2세트	7.98×10^{-29}	2.28×10^{-20}	1.25×10^{-8}	0.999858

[0043] **실시예 7. 본 발명의 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 재래닭의 개체식별**

- [0044] 본 발명에서 선발한 제1세트, 제2세트의 마이크로새틀라이트 마커의 친자감별 효과를 확인하기 위해 표1에 나타난 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 재래닭 685수를 대상으로 대립유전자형을 분석하였다. 보다 구체적으로, 재래닭 5품종 계통에서 부모집단 88수와 자손집단 597수로 부터 혈액을 채취, 혈액으로부터 실시예 1과 같은 방법으로 DNA를 분리하고, 이를 주형으로 하여 실시예 3과 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 ABI3130 DNA 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기 및 형광물질별로 분류되도록 전기영동을 실시하고, Genemapper version 3.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 형광물질의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다. 취합된 자료를 기초로 하여 대립유전자형을 분석하고 친자감별을 실시하여 교배 조합표와 비교하였다.

[0045]

그 결과, 친자감별력에서 100% 친자확인이 가능하였으며, 부모세대의 유전자형을 이용한 동일개체 출현빈도를 계산한 결과 본 발명에 제공되는 제1세트 마이크로새틀라이트 마커를 사용하였을 때 다음 세대에 동일 개체가 출현할 확률이 0이 되는 추정치를 확인할 수 있었다. 따라서, 토대로 재래닭의 순계 5계통을 이용하여 품종을 개발 및 보급하였을 때, 본 발명의 마이크로새틀라이트 마커 조합으로 품종 특이적 차이까지 구분할 수 있으며, 이를 통해 재래닭 품종의 생산이력제 기술에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

표 4

[0046]

	ADL0292		GCT0016		MCW0029		MCW0145		LEI0107		ADL0304	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
부	112	136	108	130	187	187	202	206	222	222	140	156
모	134	136	110	130	161	161	190	206	210	212	156	156
R044	112	136	130	130	161	187	190	202	212	222	156	156
R046	112	134	108	110	161	187	206	206	212	222	156	156
R047	112	134	108	110	161	187	190	202	210	222	140	156
R264	112	136	130	130	161	187	190	206	210	222	152	152
R265	112	134	108	130	161	187	206	206	212	222	156	156
R266	112	136	130	130	161	187	190	206	210	222	156	156
R267	112	136	130	130	161	187	202	206	212	222	156	156
R268	112	134	108	130	161	187	190	202	212	222	140	156
	LEI0251		ADL0259		ADL0021		MCW0104		MCW0261		MCW0087	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
부	100	126	110	128	184	188	196	206	241	245	267	275
모	102	118	110	146	166	186	188	206	225	243	275	277
R044	100	102	110	146	166	184	206	206	225	241	275	277
R046	100	102	110	128	186	188	206	206	241	243	275	275
R047	118	126	110	146	186	188	188	196	243	245	267	277
R264	102	126	110	128	184	186	196	206	237	241	275	277
R265	102	126	110	128	166	188	188	196	241	243	275	275
R266	100	102	110	146	166	184	188	206	225	241	275	277
R267	100	102	110	110	166	184	188	206	241	243	275	275
R268	118	126	110	128	166	188	196	206	243	245	267	277

표 5

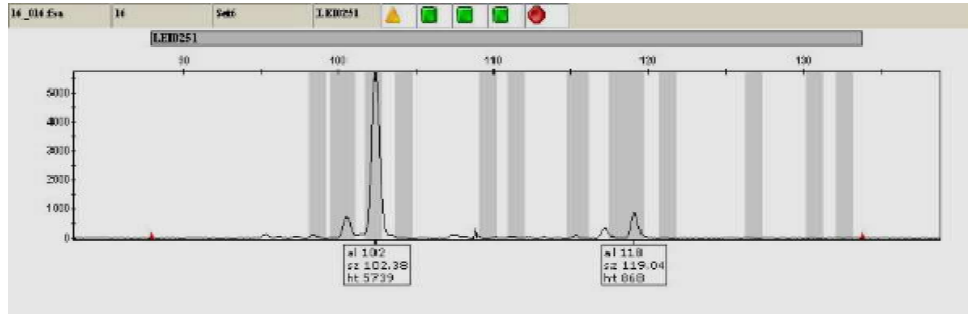
[0047]

	LEI0251		ADL0259		ADL0021		MCW0104		MCW0261		MCW0087		ADL0292		GCT0016	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
부	118	130	106	112	174	184	202	226	225	245	275	287	120	134	132	154
모	116	120	112	128	184	186	202	210	225	243	271	283	120	134	110	110
L013	118	120	112	128	184	186	210	226	243	245	271	287	120	120	110	132
L014	118	130	112	112	174	184	202	210	225	243	283	287	120	134	110	154
L015	120	130	106	128	184	184	202	202	225	243	275	283	134	134	110	132
L016	118	130	106	112	184	184	202	210	225	225	283	287	134	134	110	132
L017	116	118	112	112	184	186	202	210	225	225	271	287	120	134	110	132
L018	118	130	112	112	184	184	210	226	225	225	283	287	120	120	110	132
L019	116	118	106	128	174	186	210	226	225	243	283	287	120	120	110	154
L205	118	120	112	112	184	184	210	226	243	245	271	287	120	134	110	132
	MCW0029		MCW0145		LEI0107		ADL0304		ADL0324		MCW0063		MCW0264			
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2		
부	161	185	190	200	210	210	140	158	166	182	132	140	233	233		
모	161	181	204	210	210	212	140	152	166	172	140	140	233	239		
L013	161	161	200	210	210	210	140	140	172	182	140	140	233	239		
L014	161	181	200	204	210	210	140	158	166	182	140	140	233	233		
L015	161	181	190	204	210	212	140	152	166	172	132	140	233	239		
L016	161	181	190	210	210	210	140	152	166	172	132	140	233	239		
L017	161	161	200	204	210	212	140	152	166	182	132	140	233	233		

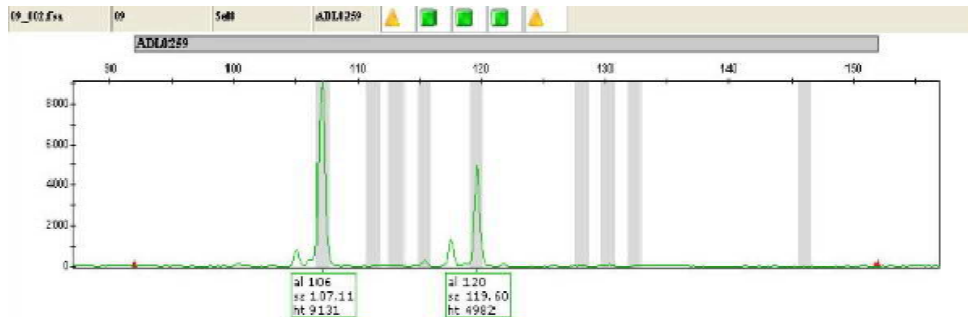
L018	161	161	190	204	210	210	140	140	166	166	140	140	233	239		
L019	181	185	190	204	210	210	140	140	166	182	140	140	233	233		
L205	181	185	200	210	210	212	140	152	166	172	140	140	233	233		

도면

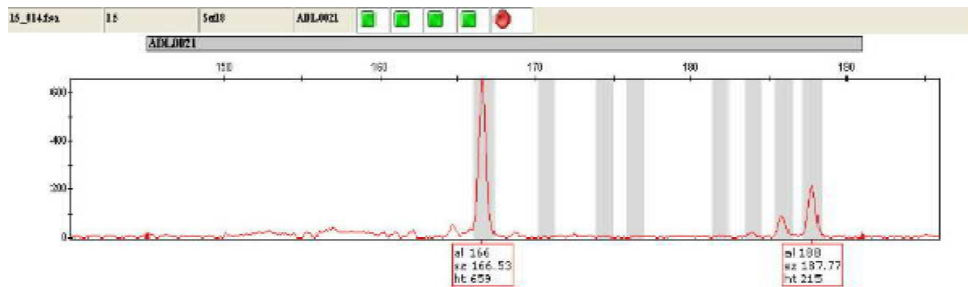
도면1



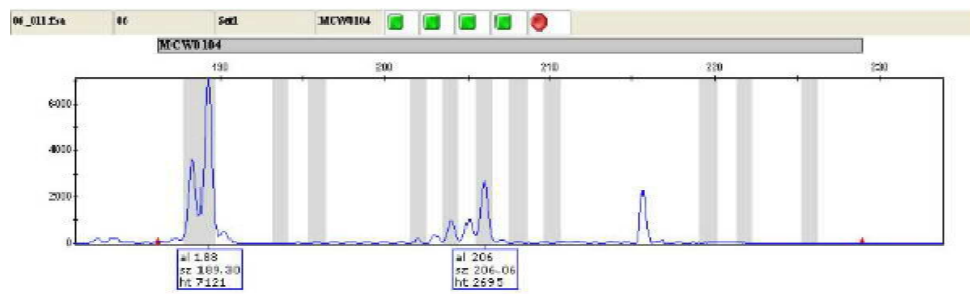
도면2



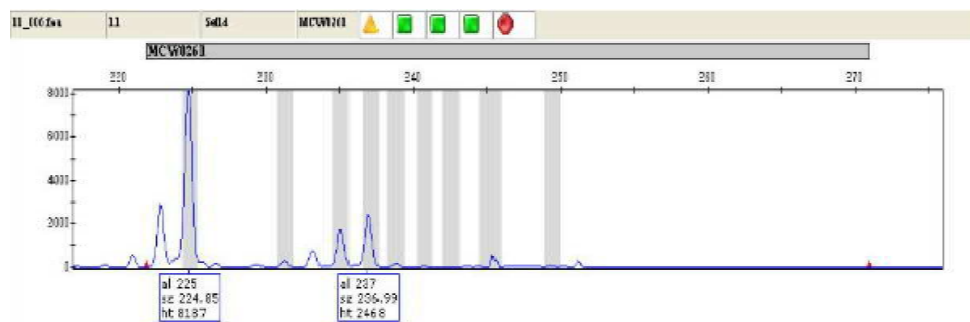
도면3



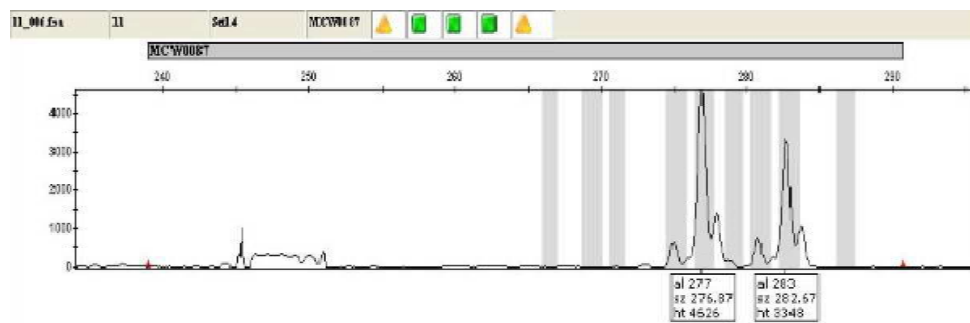
도면4



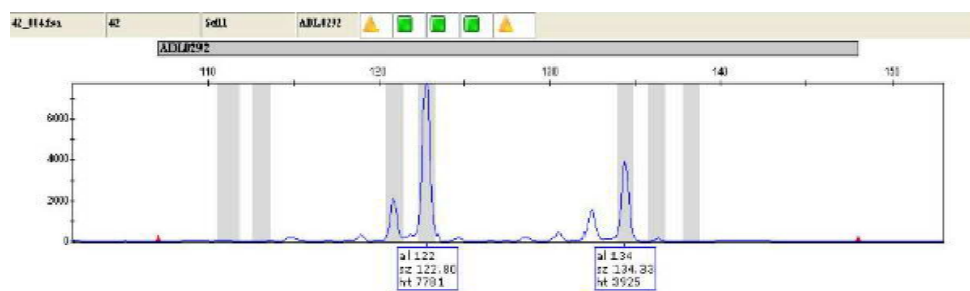
도면5



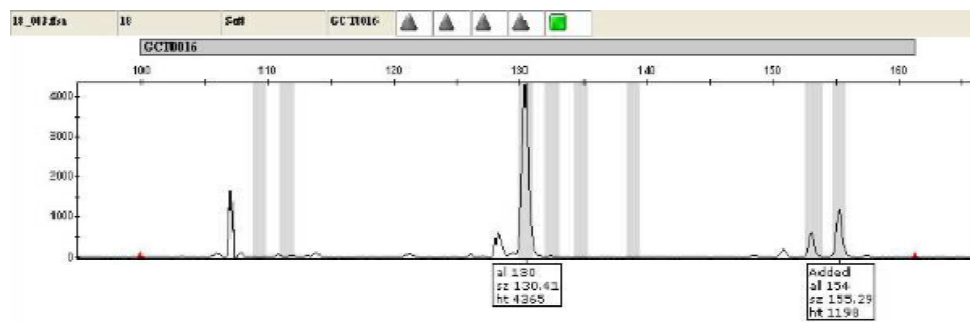
도면6



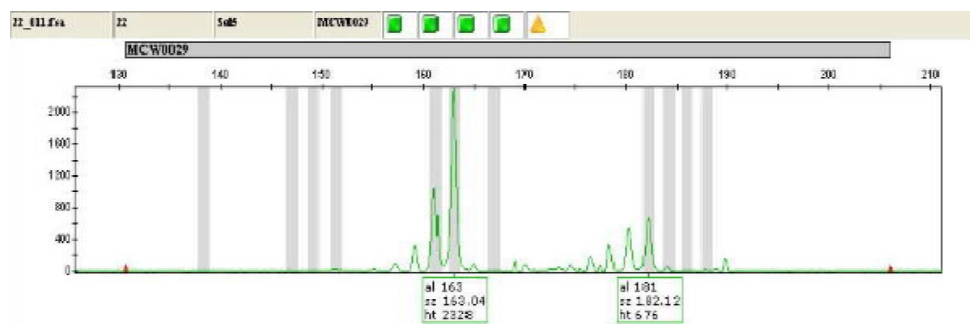
도면7



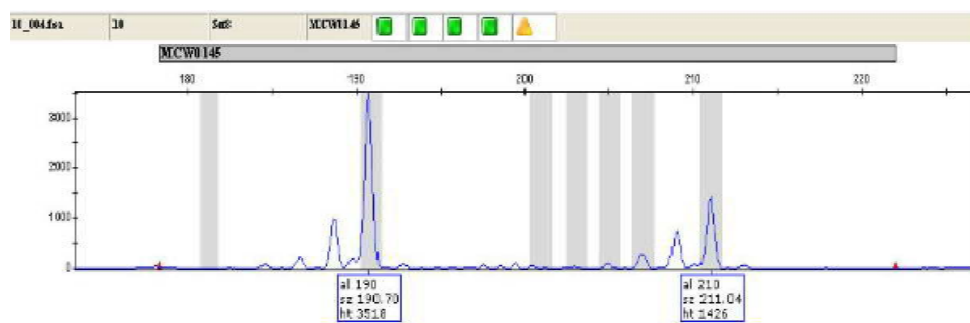
도면8



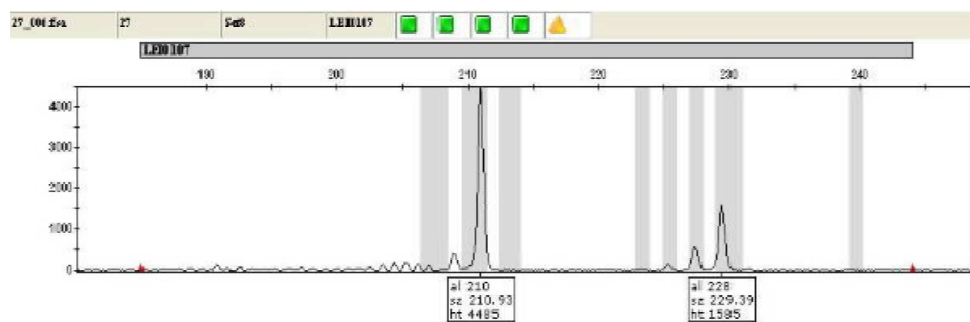
도면9



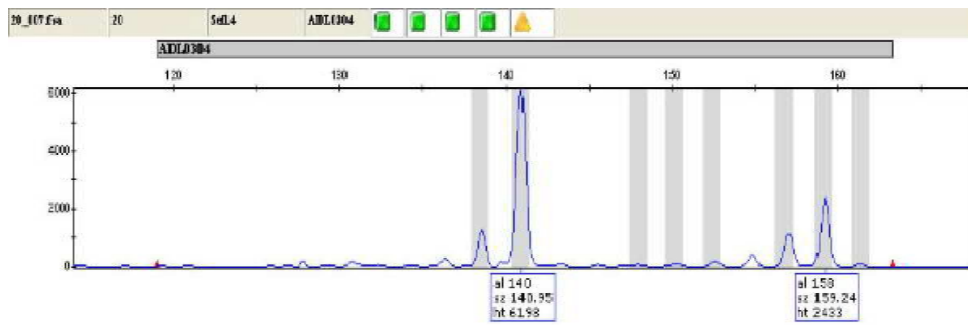
도면10



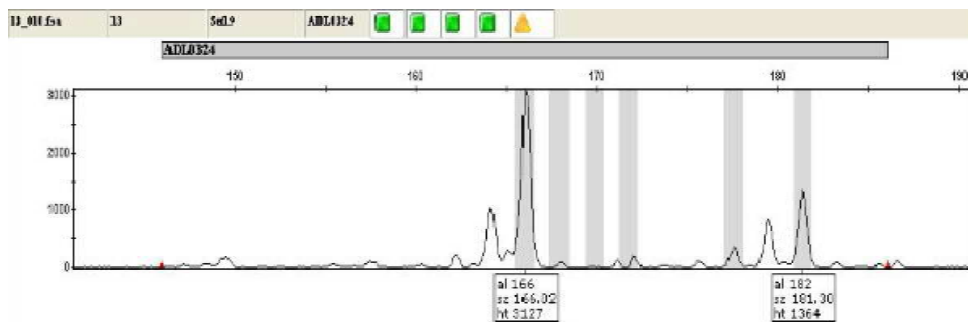
도면11



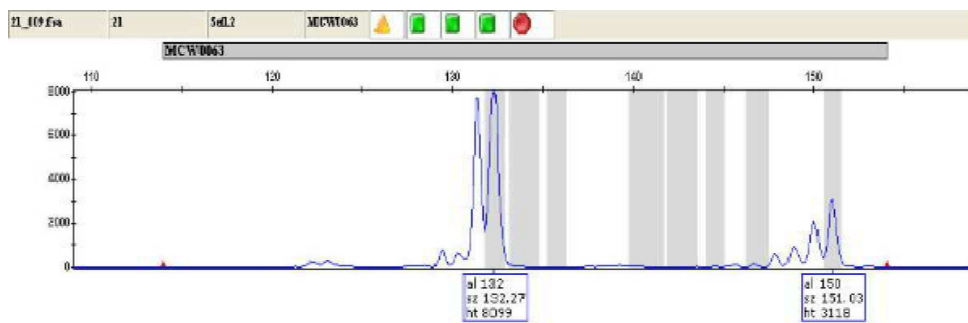
도면12



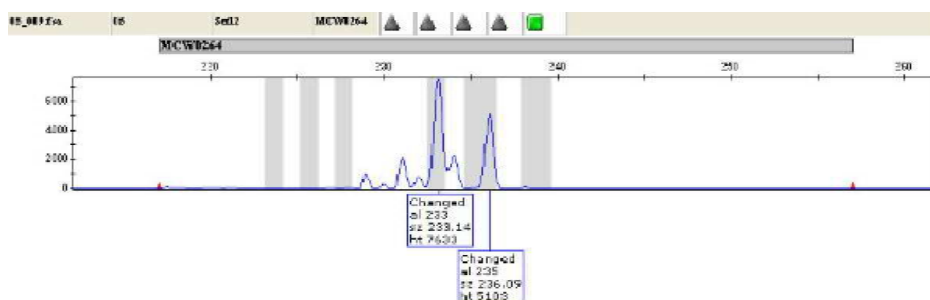
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> ChungNam National University Foundation of University-Industry Cooperation
- <120> Microsatellite Marker for individualization in Korean native chicken and individualizing Method Using the Same

<130> P12-0034
 <160> 30
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LEI0251_F
 <400> 1
 gatctagaaa tggctgactg ac 22
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><223> LEI0251_R
 <400> 2
 gggttactct tatgtttaat gatgtc 26
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0259_F
 <400> 3
 ctcattgcag aggaagtctt 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0259_R
 <400> 4
 gtaatggagg atgctcaggt 20
 <210> 5
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0021_F
 <400> 5
 gctcctcgct ttgctctgaa 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0021_R
 <400> 6
 gcttagcctc atctcttgta 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0104_F
 <400> 7
 tagcacaact caagctgtga g 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0104_R
 <400> 8
 agacttgac agctgtgtac c 21
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0261_F
 <400> 9
 gagcagttca tatgaagtgc ag 22
 <210> 10

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0261_R
 <400> 10
 gtagtagcag ctacaccaga g 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0087_F
 <400> 11
 atttctgcag ccaacttgga g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0087_R
 <400> 12
 ctcaggcagt tctcaagaac a 21

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0292_F
 <400> 13
 ccaaatacagg caaaacttct 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADL0292_R
 <400> 14

aaatggccta aggatgagga	20
<210> 15	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GCT0016_F	
<400> 15	
tccaaggttc tccagttc	18
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GCT0016_R	
<400> 16	
ggcataagga tagcaacag	19
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MCW0029_F	
<400> 17	
gtggacaccc attgtaccc tatg	24
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MCW0029_R	
<400> 18	
catgcaattc aggaccgtgc a	21
<210> 19	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MCW0145_F	

<400>	19	
actttattct ccaaatttgg ct		22
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MCW0145_R	
<400>	20	
aaacacaatg gcaacggaaa c		21
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LEI0107_F	
<400>	21	
gctgctcaga agcatctgtg c		21
<210>	22	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LEI0107_R	
<400>	22	
atcattgcta caccatggtt c		21
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ADL0304_F	
<400>	23	
ggggaggaac tctggaaatg		20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADL0304_R

<400> 24

cctcatgctt cgigcttttt 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADL0324_F

<400> 25

ttgcctcgac ggaccacaat 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ADL0324_R

<400> 26

gcagccccgc caagtaactg 20

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCW0063_F

<400> 27

ggctccaaaa gcttgttctt agct 24

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCW0063_R

<400> 28

gaaaaccagt aaagcttctt ac 22

<210> 29

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0264_F
 <400> 29
 cttacttttc acgacagaag c 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCW0264_R
 <400> 30
 agactgagtc acactcgtaa g 21