(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0050261
(43) 공개일자 2011년05월13일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0107166
(22) 출원일자 2009년11월06일
심사청구일자 2010년08월10일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
전진태
서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호
임현태
울산 중구 약사동 800-33번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

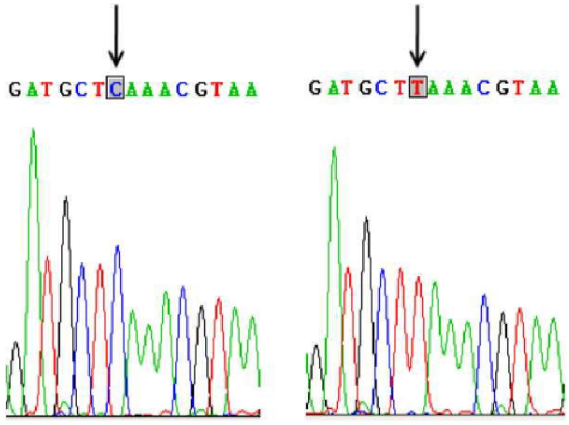
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 흑모색 돼지 품종의 식별방법

(57) 요 약

본 발명은 흑모색 돼지 품종의 식별방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 흑모색 돼지의 *KIT* 유전자 지역의 SNP에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하고, 그 PCR 산물로부터 파악된 SNP로부터 haplotype을 추정한 후, 상기 추정된 haplotype을 준비되어 있는 흑모색 돼지 품종 특이 haplotype과 비교하여 해당 군집을 파악함으로써 흑모색 돼지의 품종을 식별하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

서보영

경상남도 진주시 칠암동 509-9번지

종타오

경남 진주시 가좌동 경상대학교 농업생명과학대학 451동 240호

정은지

경상남도 사천시 사천읍 평화리 2-22번지 평화맨션 201호

유채경

경상남도 통영시 도천동 281-23 2통 2반

이길주

경상남도 창원시 서상동 서문무학마을아파트 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20080401034053

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 Positional cloning 기법을 이용한 재래돼지 유래 형질연 관 마커 개발

기여율

주관기관 2009 년 01 월 01 일 ~ 2009 년 12 월 31일

연구기간 국립축산과학원

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 35 내지 44의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드들로 구성된 군으로부터 1 이상 선택된, 흑모색 돼지의 품종 식별을 위한 일배체형 (haplotype).

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 35 내지 37 및 41의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드들로 구성된 군으로부터 선택되는 1 이상의 일배체형은 한국재래돼지 품종과 연관된 것임을 특징으로 하는 일배체형.

청구항 3

청구항 제 1항의 일배체형을 검사하고자 하는 시료의 일배체형과 비교하는 것을 특징으로 하는 흑모색 돼지 품종의 식별방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 식별방법은,

(1) 흑모색 돼지로부터 채취한 시료로부터 DNA를 분리한 후, 상기 분리한 DNA의 KIT 유전자에 특이적인 프라이머 쌍들을 이용하여 PCR로 증폭하는 단계;

(2) 상기 (1) 단계에서 증폭된 PCR산물을 정제한 후 SNP의 종류를 파악하는 단계;

(3) 상기 (2) 단계에서 파악된 SNP로부터 일배체형을 추정한 후 계통유전학적으로 분류하는 단계; 및

(4) 상기 (3) 단계에서 추정 및 분류된 일배체형을 제 1항의 일배체형과 비교하는 단계;

를 포함하는 식별방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 (1) 단계의 시료는 흑모색 돼지의 혈액 또는 모근으로부터 채취된 것을 특징으로 하는 식별방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 (1) 단계의 프라이머 쌍은 서열번호 1 내지 34로 표시되는 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 식별방법.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 (2) 단계는 염기서열분석, pyrosequencing, MALDI 또는 oligonucleotide ligation assay 방법으로 분석되는 것을 특징으로 하는 식별방법.

청구항 8

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 및, 25 및 26, 27 및 28, 29 및 30, 31 및 32, 33 및 34의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 쌍으로 구성되는 그룹으로부터 1쌍 이상 선택되는, 흑모색 돼지의 KIT 유전자에 특이적인, 흑모색 돼지의 품종 식별을 위한 프라이머.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 흑모색 돼지 품종의 식별방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 흑모색 돼지의 *KIT* 유전자 지역의

SNP에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하고, 그 PCR 산물로부터 파악된 SNP로부터 haplotype을 추정한 후, 상기 추정된 haplotype을 준비되어 있는 흑모색 돼지 품종 특이 haplotype과 비교하여 해당 군집을 파악함으로써 흑모색 돼지의 품종을 식별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 돼지는 세계적으로 사람이 필요로 하는 단백질 섭취를 위한 가장 기본적인 가축으로 각각의 시대와 상황 및 사람들의 기호에 따라 사육되어 왔으며, 우리나라의 경우 돼지고기 중 특정 부위만을 선호하는 경향을 가지고 있다. 현재 돼지고기의 경우 특정부위를 포함해 수입이 되고 있는 상황이고, 또한 국내에서 생산되는 돼지고기는 수많은 브랜드가 만들어져 브랜드육으로 판매되고 있다. 하지만 돼지고기는 육안으로 식별이 불가능하다는 점을 악용하여 일부 부도덕한 유통업자들이 수입육 (냉장 및 냉동육) 및 비 브랜드육 등을 브랜드육으로 둔갑 유통시키고, 수입산 흑모색 돈육이 제주산 흑돼지로 둔갑하는 사례가 증가하고 있다. 따라서 둔갑유통을 방지하기 위한 과학적인 감식기법이 전무한 상황으로 과학적 감식기법 개발을 통한 건전한 유통문화 정착이 절실히 요구되는 실정이다. 세계 각국에서는 유전자원으로서 재래가축에 대한 보존 및 활용의 가치를 인식하면서 (Notter, J. Anim. Sci. 77:61-69, 1999) 가축들의 품종 형성, 유전적 특성, 유전적 다양성, 타 품종간의 유연관계 등의 분석연구를 수행하여 왔다. 소의 품종집단에 대해서는 혈액단백질, 유단백질, 마이크로세틀라이트 (microsatellites), 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA), 등 다양한 유전적 표지인자들을 활용한 연구들이 수행되어 왔다. 쇠고기의 경우 2007년부터 생산이력제 시범사업의 일환으로 DNA 마커를 이용한 개체판별 사업이 시행되었으나, 아직 돼지고기 생산이력에 관련된 연구 등이 국내에서 미비하여 산업에 직접 활용 가능한 기술이 개발되지 못하고 있어 브랜드육의 신뢰성을 높이고 정확한 부정육 식별을 위하여 돼지에 적합한 개체 식별 방법 개발이 필요하다.

[0003] 인도의 동부 지방에서는 돼지가 사육되어 온지 9000년 정도 되었으며, 돼지 사육의 역사는 오래전부터 여러 지방에서 사육되어졌다고 보고되었다. 일반적으로 유럽품종과 아시아 품종들은 각 대륙의 야생 멧돼지 (*Sus scrofa*)에서 유래되었으며, 현재까지 존재하고 있는 품종은 200 여종 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.

[0004] 모색에 관련된 유전자 중 *KIT* 유전자는 mast/stem cell growth factor receptor로 불리우며, 기능은 돼지, 소, 말 그리고 개의 모색을 결정하는 결정적 유전자라고 보고되었다. *KIT*은 hematopoietic 줄기 세포의 표면에 cytokine receptor로 발현하며, 다른 형태의 세포로도 발현된다. 단백질의 형태로는 mast cell growth factor의 transmemberance receptor로 3가지가 존재하고, *KIT*에 포함되어 있는 extracellular domain은 5종류의 immunoglobulin domain을 비롯하여, single transmembrane domain, juxtamembrane domain, 그리고 intracellular protein kinase domain으로 이루어져 있다. *KIT*은 멜라닌 세포분화의 제어, 생존, 사멸, 증식 등 생존에 필수적인 요인으로 역할을 하고 있다. *KIT* 유전자 변이는 소화기관 기질종양, 비만세포병, 얼룩백색증 등에 연관되어있다. 선행연구에 따르면 *KIT*유전자는 유럽돼지품종에서 모색의 표현형을 결정하는 4개의 주 대립유전자를 동정하였다. *i* (wild-type) allele은 야생 및 열성형으로 멧돼지와 유색품종에서 나타나며, I^{P}는 불완전 우성형으로 patch 표현형을 가지며, I^{Be} allele 은 belt형 표현형이며, *I* allele (I^{1}, I^{2}, I^{3}, I^{L}) 은 완전우성으로 전체가 백색인 품종 Landrace와 Large White 우성 백색 품종에서 나타난다고 보고하였다. patch 형과 우성 백색 모두 *KIT* 유전자의 구조적변이에 의함과 동시에 *KIT* 유전자 반복수 변이를 가지고 있다고 보고하였다 . 백색 belt형 표현형은 *KIT*에서는 아직 알려지지 않은 유전자 변이로 야생형 대립유전자 *i* 와는 연관되어 있지 않다고 보고되었다. 그러나 모색에 관련하여 *KIT* 유전자에 관한 연구는 중국 돼지에 대하여는 제한적으로 행해졌으며 , 한국재래돼지에 관한 연구는 더욱 빈약한 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 돼지의 모색 관련 *KIT* 유전자에 대한 기존 연구 영역을 확대하여 백색과 흑모색의 구분뿐만 아니라, 단일염기다형성의 조합으로 나타나는 haplotype의 형태로 흑모색 품종간에, 보다 구체적으로 국내에서 주로 사육되는 Berkshire, Hampshire와 한국재래돼지의 품종 식별 방법을 연구하여 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphisms; SNP)은 염기서열 중에서 염기 하나가 차이 나는 유전적 다형을 말하며, 한 개의 염기가 다른 염기로 바뀌거나 새로운 염기가 삽입 또는 결실되는 형태를 통칭하여 말한다. 이러한 단일염기다형성이 각각의 대립유전자(allele)상에서 1차원적으로 배열하고 있는 특정한 Type을 Haploid type의 합성어인 Haplotype 이라고 한다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 돼지의 단일염기다형성(SNP)에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 흑모색 돼지 품종 간 식별방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명은 돼지의 단일염기다형성(SNP)에 특이적인 프라이머 세트를 제공하고, 돼지 흑모색 품종 간 식별 가능 한 haplotype을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명은 흑모색 돼지 품종의 식별방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 (a) 흑모색 돼지로부터 채취한 시료로부터 DNA를 분리한 후, 상기 분리한 DNA의 KIT 유전자 지역의 SNP에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 증폭된 PCR산물을 정제 후 SNP의 종류를 파악하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 파악된 SNP로부터 haplotype을 추정한 후 계통유연학적으로 분류하는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계에서 추정 및 분류된 haplotype을 준비되어 있는 흑모색 돼지 품종 특이 haplotype과 비교하여 해당 군집을 파악하는 단계;를 포함하는 흑모색 돼지 품종의 식별방법에 관한 것이다.

[0010] 상기 (a)단계에서, 시료는 본 발명의 흑모색 돼지 품종의 식별을 위한 DNA 분리에 사용되는 것으로, 흑모색 돼지의 혈액 또는 모근으로부터 채취하는 것이 바람직하다.

[0011] 상기 (a)단계의 프라이머는 흑모색 돼지의 KIT 유전자 지역의 SNP에 특이적인 프라이머로서, 하기 실시예의 [표 1]에 나타난 서열번호 1 내지 34로 표시되는 염기서열을 가지는 프라이머를 사용하는 것이 바람직하다.

[0012]

[0013] 상기 (d)단계의 흑모색 돼지 품종 특이 haplotype은 본 발명에서 흑모색 돼지 품종을 식별하기 위하여 한국재래돼지, Berkshire 및 Hampshire 군집으로 분류되어 있으며, 그 염기서열은 하기 실시예의 [표 3]에 나타난 바와 같이 서열번호 35 내지 44로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태는 흑모색 돼지의 품종 식별용 프라이머의 서열에 관한 것으로서, 상기 프라이머의 서열은 하기 실시예의 [표 1]에 나타난 서열번호 1 내지 34로 표시되는 것이 바람직하다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 양태는 흑모색 돼지 품종에 특이적인 haplotype에 관한 것으로, 본 발명에 따른 흑모색 돼지 품종의 식별에 사용되며, 그 염기서열은 하기 실시예의 [표 3]에 나타탄 서열번호 35 내지 44로 표시되는 것을 특징으로 한다.

효 과

[0016] 본 발명에 의하면, 돼지에 특이적인 단일염기다형성을 이용하여 PCR을 수행함으로써, 신속하고 효과적으로 한국재래 돼지를 식별할 수 있는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 식별방법을 한국 흑돼지 브랜드육의 식별에 적용함으로써 유통상에 발생하는 부정행위를 제어할 수 있으며, 브랜드에 대한 소비자의 신뢰도를 상승시켜 생산농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지나지 않으며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0018] <실시예>

[0019] 본 발명의 실시예에서는, 돼지의 *KIT* 유전자에 관하여 총 5개의 단일염기다형성을 동정하였다. Haplotype은 크게 서구품종과 아시아품종으로 식별 가능하였으며, mtDNA 분석 결과와 일치하였다. Berkshire와 Hampshire 품종의 모색은 한국재래돼지와 같이 흑모색이다. 이들 세 품종은 기존의 유전자형 분류 방법에 의하면, 모두 *KIT* 유전자형은 *i/i* 이고 *MC1R* 유전자형은 E^{D1}/E^{D1}, E^{D1}/E^{D2}, E^{D2}/E^{D2} 로써 백색 품종인 Landrace, Large White 및 Duroc과는 식별이 가능하나, 흑모색 품종 내에서의 품종 세부 식별은 불가능 하였다. 본 발명을 통하여 서구형 흑모색 품종인 Berkshire, Hampshire와 아시아형인 한국재래돼지를 구분함으로써 보다 구체적으로 흑모색 품종의 식별이 가능한 품종특이 haplotype을 개발하여 최종적으로 흑돼지 품종 중 한국재래돼지의 품종식별을 가능케 하였다.

[0020] **1.KIT 유전자 번역지역내의 SNP의 발굴**

[0021] KIT 유전자의 21개의 exon 지역에서 총 17쌍의 primer를 제작하였다. primer에 대한 정보는 하기 [표 1]과 같다. PCR은 25 ng의 genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.5 mM $MgCl_2$, 10 pmole primer, 150 μM dNTPs, 그리고 1 unit의 Taq polymerase (GenetBio, Korea), 증류수를 첨가하여 최종 부피가 25 ㎕로 반응하였다. PCR 반응조건은 94° C에서 2분간 변성시킨 후 94° C에서 20초, anealing 온도는 50 ~ 66 ℃에서 40초, 72° C에서 60초 신장을 1cycle로 하여 35회 반복수행 하였으며, 72° C에서 5분간 최종 신장시킨 후 8℃에서 종료하였다. 모든 반응은 PTC-200 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., USA)에서 수행하였으며. 증폭된 PCR산물은 Gel Extraction Kit(Qiagen, Netherland)을 이용하여 gel purification을 실시하였다. 이를 주형으로 Direct sequencing을 하여 염기서열 분석을 하였다. DNA sequencing은 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied biosystems, USA)를 이용하였다. Sequencing 된 SNP의 비교 그림은 도 1에서 나타난 바와 같다. 분석된 결과는 Sequencher version 4.7 software (Gene Codes Corporation, USA)를 이용하여 전체 서열을 정렬한 후 Clustal W(Thompson et al.1994)를 이용하여, 한국재래돼지, Berkshire, Hampshire의 서열을 염기정렬 하였다. 각 exon별로 정렬하여 비교된 SNP는 하기 [표 2]와 같다.

[0022] [표 1] 돼지 KIT 유전자의 SNP 지역 증폭을 위한 17쌍의 primer 서열 및 조건

[0023]

Primer Name	Sequence	Product size	TM	서열 번호
KIT_E1F	5′ -GGAACGTGGAAAGGAGCT-3′	205bp	66℃	1
KIT_E1R	5′ -CAGCCACCTCTTCTGACAC-3′			2
KIT_E2F	5′ -ACCCTTGCACCATAAATAGC-3′	498bp	59℃	3
KIT_E2R	5′ -GACTCAGCCATCTATATGTC-3′			4
KIT_E3F	5′ -TCAGATTCGTTAACCACTGC-3′	447bp	64℃	5
KIT_E3R	5′ -TGGCATATCCGCTGATCTA-3′			6
KIT_E4F	5′ -CGAAAGGCCATACAGTGAG-3′	362bp	50℃	7
KIT_E4R	5′ -TGTATGAAAGCAACTATACC-3′			8
KIT_E5F	5′ -TCCCCCCGGGACTGCAGAGATTT GGGAATTATG-3′	548bp	59℃	9
KIT_E5R	5′ -CGCGGATCCTCAACCTACTACTT CTAAGGTGG-3′			10
KIT_E6F	5′ -GAAGACATAAGATGGTGATA-3′	385bp	53℃	11
KIT_E6R	5′ -CTAATATCCATGAGGACGCAGG-3′			12
KIT_E7F	5′ -CCAAAGCAGGCGTGTATTT-3′	344bp	55℃	13
KIT_E7R	5′ -GGTCAAAATTATCATGAAGCAG-3′			14
KIT_E8F	5′ -GTCATCTTCAGCCTCAAGAAAG-3′	313bp	54℃	15
KIT_E8R	5′ -TCTGAAAACATATTTGAAATTC-3′			16
KIT_E9F	5′ -GGCAAATAATTTTTCTTCTAG-3′	293bp	54℃	17
KIT_E9R	5′ -GGATGTTTAGGCTCTGCCTG-3′			18
KIT_E10-11F	5′ -CTTGACTCCTGCCATGATG-3′	536bp	64℃	19
KIT_E10-11R	5′ -CTAGAACAAAGGAAGCTACCG-3′			20

KIT_E12-13F	5′ -GTCCCTGATTCCTTTATTGG-3′	486bp	60℃	21
KIT_E12-13R	5′ -GCTTATCATCAAGGATGGTC-3′			22
KIT_E14F	5′ -GCATGTGAATGGCCGTGATC-3′	322bp	50℃	23
KIT_E14R	5′ -ATCAGCCTTGATTGCAAACC-3′			24
KIT_E15-16F	5′ -CAAAGTCAGCCTCTTATGTGA-3′	910bp	52℃	25
KIT_E15-16R	5′ -CTACGGCTCTAAAATGCTCC-3′			26
KIT_E17F	5′ -TGGCACCATATAACATAGGC-3′	325bp	60℃	27
KIT_E17R	5′ -GGTGTGCATTATGAAACTCAC-3′			28
KIT_E18-19F	5′ -GCAGCAGGAGCAGTATCTAC-3′	482bp	63℃	29
KIT_E18-19R	5′ -GAACCCAGATGTTGAAGGTT-3′			30
KIT_E20F	5′ -GGTGTACACCCAAAGACAG-3′	217bp	63℃	31
KIT_E20R	5′ -CTGTTCAAGGCGTTCCAAGC-3′			32
KIT_E21F	5′ -ACTTGCGATTCTGGACCTGC-3′	271bp	63℃	33
KIT_E21R	5′ -GAATGGCAGTAGGTCGGTGC-3′			34

[0024] [표 2] 발굴된 SNP 품종별 Exon별 요약

[0025]

Sample ID	Exon 번호 (codon/nucleotide position)																					
	2 (40/120)[1]	2 (78/234)	3 (135/405)[2]	3 (163/489)[2]	3 (164/492)[2]	3 (173/518)[2]	3 (174/522)[2]	3 (182/546)[2]	3 (184/552)[2]	3 (195/583)	5 (274/821)[3]	5 (276/828)[3]	6 (336/1008)[3]	9 (488/1464)[3]	12 (621/1863)[2]	13 (633/1899)	14 (662/1986)[2]	15 (733/2199)[2]	18 (834/2502)[3]	19 (867/2601)	19 (887/2661)[2]	19 (893/2678)[3]	20 (916/2748)
J105	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	C	*Y*
J16	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	R	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	C	*Y*
J17	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	C	*G*	C	C	C	*T*	T	C	*T*
J23	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	R	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	C	*Y*
J26	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	T	*A*	G	T	C	*C*	C	C	*C*
J28	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	C	*G*	C	C	C	*T*	T	C	*T*
K-23	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	C	*Y*
K-27	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	R	T	*A*	G	T	C	*C*	C	C	*C*
K-31	G	*T*	C	T	A	A	T	G	A	*G*	A	G	G	G	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	C	*Y*
K5-10	K	*W*	M	Y	R	R	Y	S	M	*G*	R	R	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-143	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-144	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-145	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-146	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*

B-171	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-173	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	A	A	C	*A*	C	C	C	*C*	C	T	*C*
B-175	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	A	A	C	*A*	C	C	C	*C*	C	T	*C*
B-178	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*R*	A	G	R	R	Y	*R*	S	Y	C	*Y*	Y	Y	*Y*
B-177	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*A*	A	G	G	R	C	*R*	C	C	C	*Y*	T	C	*Y*
B-942	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*A*	A	G	G	G	C	*G*	C	C	C	*T*	T	C	*T*
H-3-4	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*G*	G	A	G	G	C	*A*	C	C	T	*C*	C	C	*C*
H-69-3	T	*A*	A	C	G	G	C	C	C	*G*	G	A	G	G	C	*A*	C	C	T	*C*	C	C	*C*

[0026] * 품종구분: 한국재래돼지(K, J); Berkshire(B); Hampshire(H)

[0027] * 염기서열구분: K,T/C; W,T/A; M,C/A; Y,C/T; R,A/G; S,C/G

[0028] * 1, 2, 3 SNP는 기존에 보고된 서열이며, 그 외의 밑줄의 기울임 꼴로 표시된 서열은 본 실시예에서 새로이 발굴한 SNP 서열이다.

[0029] 1: Naohiko et al., J Anim Sci, 79: 303-313, 2008

[0030] 2: Lai et al,. J Hered, 98(1): 84-87, 2007

[0031] 3: Marklund et al., Genome Res, 8(8): 826-833, 1998

[0032] **2. 발굴된 SNP을 이용한 품종 특이 haplotyope의 발굴**

[0033] 상기 [표 2]에서와 같이 동정 된 SNP의의 서열을 바탕으로 PHASE version 2.1 software (http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html)(Stephens et al., American J of Human Genet, 2001; Stephens and Donnelly, American J of Human Genet, 2003; Crawford et al., Nature Genetics 2004; Stephens and scheet, American J of Human Genet, 2005)에 SNP를 Homo나 Hetero의 형태로 입력하여 각 품종의 Haplotype을 제작하였다. 제작 된 Haplotype은 하기 [표 3]에 나타난 바와 같으며, 총 10종류의 Haplotype으로 한국재래돼지 (K1, K2, K3와 K7), Berkshire (K4, K5, K8, K9와 K10)와 Hampshire(K6) 간에는 품종 특이적 haplotype이 존재하고 있어 품종식별이 가능하다. Haplotype 분석은 단일 마커에 의한 분석보다 더 정확하다고 보고 된 바 있다. Haplotype의 빈도 수 계산법은 전체 Haplotype에 Hetero가 나타날 수 있는 가능성을 곱한 값에서 분석 결과로 나온 Haplotype에 해당하는 두수를 나누어 계산한 결과 값이다. 유전적 연관성에 의한 흑모색 품종 간 연관관계는 Network software version 4.5.1.0. (http://fluxus-engineering.com)(Bandelt et al., Mol Biol Evol 16:37-48, 1999)을 이용하여 추정하였으며, 제작 된 network는 도 2와 같다. network를 이용한 계통분류학적 재건은 조상별 유형과 잠재적인 유형을 추측가능하고, 진화된 가지와 변화 또한 평가할 수 있는 장점이 있으며, 다양한 양상의 자료를 제공하였다. 결과적으로, 서구형 흑돼지와 한국재래돼지는 유전적으로 확연히 구분이 되면 이런 특성은 haplotype의 품종 다양한 형태의 이적 차이를 잘 반영하고 있는 것이다. 즉, 한국재래돼지 haplotype들은 서구형 흑돼지 haplotype과는 확연히 구분되는 별도의 군집을 형성하고 있어 기원이 다름을 나타내고 있다.

[0034] 흑돼지 여부는 대한민국 특허 10-2007-0104192에 나타난 기술과 *MC1R*의 유전자형에 E^{D} 또는 E^{D12}를 포함하는 여부를 파악하여 판정하는 기존의 기술로 잘 판별할 수 있다. 일차로 흑돼지 여부가 판정된 미지의 흑돼지 고기 또는 혈액시료에 대한 한국재래돼지 여부에 관한 분석과 판정은 하기 [표 3]의 표준 haplotype에 대한 비교를 통하여 확인할 수 있다. 판정과정은 미지의 시료로부터 DNA를 분리하고 17쌍의 PCR 프라이머 ([표 1])를 이용하여

haplotype을 구성하는 *KIT* 유전자 지역을 증폭한다. 이후 증폭된 PCR산물은 정제 후 염기서열분석 (ABI sequencer) 또는 single base extension 후 pyrosequencing, MALDI를 이용한 질량분석 infinium assay를 이용하는 방법과 oligonucleotide ligation assay 등의 방법에 의하여 SNP의 종류를 파악한다. 이들 SNP들은 PHASE software을 이용하여 haplotype을 추정한다. 추정된 haplotype은 Network software를 이용하여 계통유연학적으로 분류하고 한국재래돼지 군집에 포함되는 haplotype을 갖고 있는지 여부를 파악하여 한국재래돼지 여부를 결정한다. 한국재래돼지의 군집에 속하는 haplotype을 두 개 갖는 경우 한국재래돼지 순종, 하나는 한국재래돼지형 하나는 서구형 haplotype을 갖은 경우 한국재래돼지와의 교잡종, 2개 모두 서구형을 갖는 경우 Birkshire와 Hampshire를 포함하는 서구형 흑돼지로 분류할 수 있다.

[0035] [표 3] Haplotype, 연관된 품종 정리 및 frequency 값

[0036]

Haplotypes		품종	Haplotype 빈도 (%)	서열번호
K1	GTCTAATGAGAGGGCGCCCTTCT	한국재래돼지	50	35
K2	GTCTAATGAGAGGGTAGTCCCCC	한국재래돼지	30	36
K3	GTCTAATGAGAGGATAGTCCCCC	한국재래돼지	15	37
K4	TAACGGCCCGAGAACACCCCCTC	Berkshire	35	38
K5	TAACGGCCCGAGAATAGTCCCTC	Berkshire	5	39
K6	TAACGGCCCGGAGGCACCTCCCC	Hampshire	100	40
K7	TAACGGCCCGGAAACACCCCCTC	한국재래돼지	5	41
K8	TAACGGCCCAAGGGCGCCCTTCT	Berkshire	45	42
K9	TAACGGCCCAAGGACACCCCTCC	Berkshire	5	43
K10	TAACGGCCCAAGAACACCCCCTC	Berkshire	10	44

[0037] 이상에 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기의 상세한 설명보다는 후술할 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

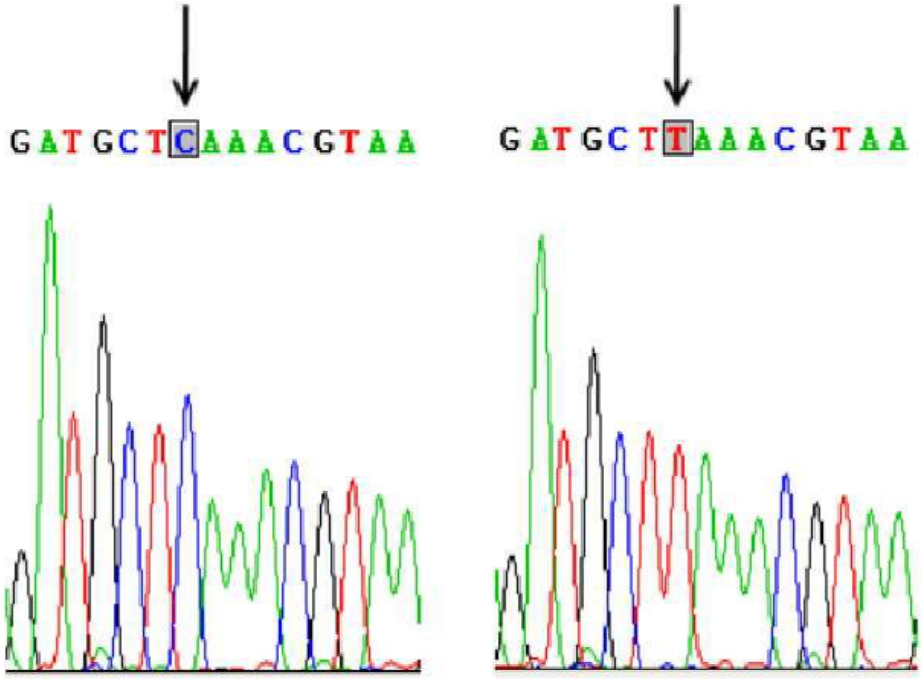
도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 실시예-1에서 발굴된 SNP (C/T)의 염기서열의 분석비교 예시를 나타낸 것이다.

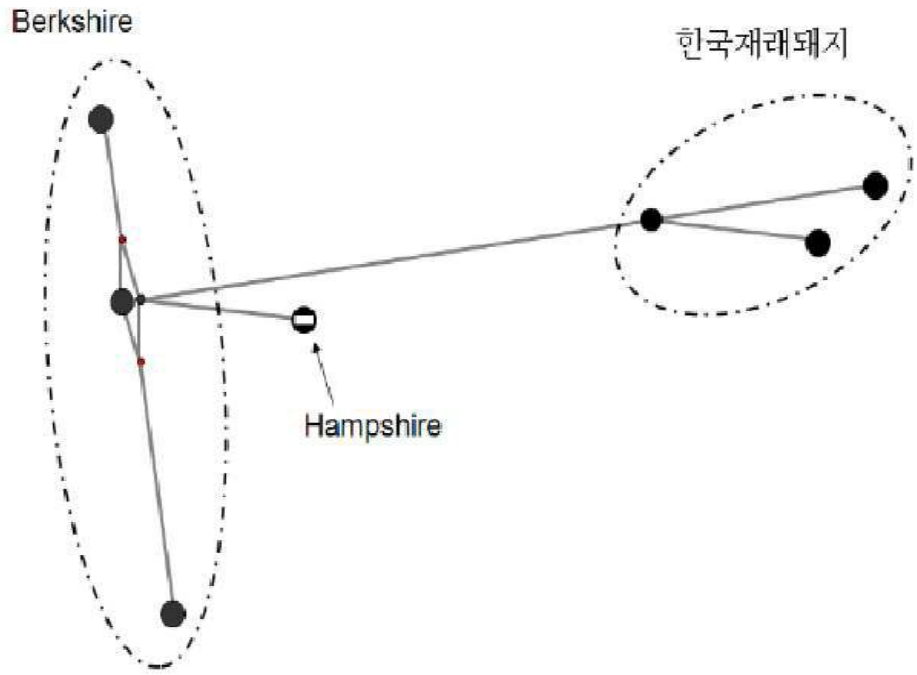
[0039] 도 2는 흑돼지 품종별 haplotype의 유전적 연관성을 나타낸 그림이다.

도면

도면1


GATGCTCAAACGTAA
GATGCTTAAACGTAA

도면2


Berkshire
한국재래돼지
Hampshire

서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Method For Discriminating Breeds Of Pig With Black Coat Colour

<160> 44

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 1
ggaacgtgga aaggagct 18

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
cagccacctc ttctgacac 19

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3

acccttgcac cataaatagc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
gactcagcca tctatatgtc 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
tcagattcgt taaccactgc 20

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tggcatatcc gctgatcta 19

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
cgaaaggcca tacagtgag 19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tgtatgaaag caactatacc 20

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
tccccccggg actgcagaga tttgggaatt atg 33

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10

cgcggatcct caacctacta cttctaaggt gg 32

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
gaagacataa gatggtgata 20

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
ctaatatcca tgaggacgca gg 22

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
ccaaagcagg cgtgtattt 19

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
ggtcaaaatt atcatgaagc ag 22

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
gtcatcttca gcctcaagaa ag 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
tctgaaaaca tatttgaaat tc 22

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17

ggcaaataat ttttcttcta g 21

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
ggatgtttag gctctgcctg 20

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
cttgactcct gccatgatg 19

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
ctagaacaaa ggaagctacc g 21

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
gtccctgatt cctttattgg 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
gcttatcatc aaggatggtc 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
gcatgtgaat ggccgtgatc 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 24

atcagccttg attgcaaacc 20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 25
caaagtcagc ctcttatgtg a 21

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 26
ctacggctct aaaatgctcc 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 27
tggcaccata taacataggc 20

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 28
ggtgtgcatt atgaaactca c 21

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 29
gcagcaggag cagtatctac 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 30
gaacccagat gttgaaggtt 20

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 31

ggtgtacacc caaagacag 19

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 32
ctgttcaagg cgttccaagc 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 33
acttgcgatt ctggacctgc 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 34
gaatggcagt aggtcggtgc 20

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 35
gtctaatgag agggcgccct tct 23

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 36
gtctaatgag agggtagtcc ccc 23

<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 37
gtctaatgag aggatagtcc ccc 23

<210> 38
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 38

taacggcccg agaacacccc ctc 23

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 39
taacggcccg agaatagtcc ctc 23

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 40
taacggcccg gaggcacctc ccc 23

<210> 41
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 41
taacggcccg gaaacacccc ctc 23

<210> 42
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 42
taacggccca agggcgccct tct 23

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 43
taacggccca aggacacccc tcc 23

<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> haplotype

<400> 44
taacggccca agaacacccc ctc 23