



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0045113
(43) 공개일자 2013년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0109588
(22) 출원일자 2011년10월25일
심사청구일자 2011년10월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이영식
서울특별시 노원구 덕릉로77길 5, 102동 103호 (중계동, 벽산아파트)
홍기창
경기도 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 주공@304-303
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김선애

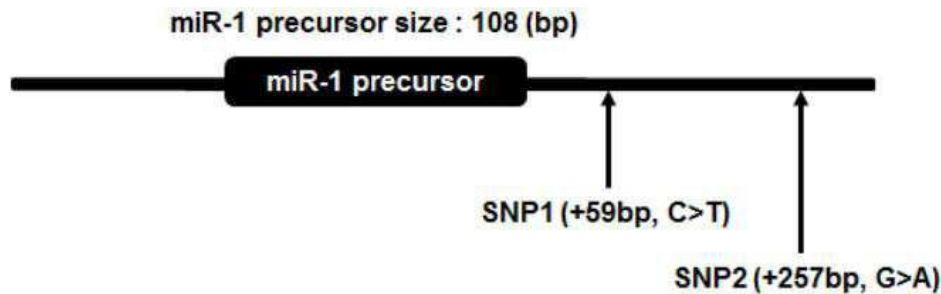
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 근육 특이적 마이크로 RNA-1 영역의 SNP s를 이용한 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자

(57) 요약

본 발명은 1차 마이크로 RNA-1 영역의 SNP를 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 C 염기 및 632번째 G 염기 중 하나 이상을 포함하는 15 내지 700개의 연속서열로 구성되는 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 돼지의 육질 특성에 관여하는 1차 마이크로 RNA 영역에서 새로운 SNP 부위를 발견하고 이러한 SNP를 이용한 표지인자를 제공하여, 육질이 향상된 개체를 용이하게 선별할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이준성

서울특별시 성북구 보문로26길 83-7, 보승빌딩 301호 (안암동1가)

홍재상

서울특별시 강동구 고덕로 133, 118동 2402호 (암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)

노수현

인천광역시 동구 송현동 솔빛아파트 119동 1106호

임규상

대전광역시 서구 둔산3동 청솔아파트 4동 1105호

김준모

서울특별시 성북구 보문로 66 (보문동4가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201107013055560010200

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 [주관] 돼지 이유후전신소모성증후군(PMWS) 발병 방지를 위한 면역 조절 기전 구명 및 이를 이용한 질병저항성 활용 기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 C 염기 및 632번째 G 염기 중 하나 이상을 포함하는 15 내지 700개의 연속 서열로 구성되는 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DNA 단편 표지인자는, 육질 관련 형질인 pH_{45min}를 증가시키는 동시에 유리육수량(drip loss)을 감소시키거나, 돼지의 근육 내 근섬유 수 및 단면적 조성 중 근섬유 타입 I의 비율을 증가시키는 것과 관련된 것임을 특징으로 하는 DNA 단편 표지인자.

청구항 3

서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 여부 관련 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 프라이머.

청구항 4

서열번호 4와 서열번호 5로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되거나 서열번호 7과 서열번호 8로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 여부 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머 세트.

청구항 5

제4항의 프라이머 세트와, PCR 반응혼합물, 및 RFLP 분석용 제한효소인 *FauI*를 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트.

청구항 6

서열번호 6 또는 서열번호 9로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는 DNA 단편 표지인자.

청구항 7

서열번호 1의 434번째 및 632번째 염기 중 하나 이상의 염기의 SNP를 이용하여 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법.

청구항 8

하기 단계들을 포함하는, 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법:

- a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 434번째, 또는 632번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계;
- c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *FauI*로 처리하는 단계; 및
- d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에서 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.

청구항 9

하기 단계들을 포함하는, 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법:

- a) 돼지로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 434번째, 또는 632번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계;

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

d) 상기 c)단계의 염기서열 분석 결과로부터 서열번호 1의 염기서열의 434번째 C 염기가 T 염기로 치환, 또는 서열번호 1의 염기서열의 632번째 G 염기가 A로 치환된 여부를 확인하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 근육 특이적 마이크로 RNA-1 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용한 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 도축 45분 후 근육 pH 증가, 유리옥즙량(Drip loss) 감소 및 근섬유 타입 I 증가와 관련된 근육 특이적 마이크로RNA-1 영역의 2개 SNP를 발굴하여 이를 이용하여 육질이 향상된 개체를 조기에 진단하고 선별할 수 있는 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자 및 상기 표지인자를 이용하여 돼지 육질 향상 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 오랜 기간 돼지육종은 사료효율과 성장률을 증가시키는 방향으로 이루어져 왔으며, 등지방을 비롯한 지방량을 줄이고 적육비율을 높인 살코기형 돈육생산 방향으로 진행되어왔다. 현재 적육생산 효율면에서 상당한 발전을 가져왔으나 이는 주로 근세포의 크기 성장에 의한 결과로 해석되고 있으며, 이러한 결과로 스트레스에 민감한 돼지가 발생하고 이상돈육 발생이 증가하는 등 육질의 저하를 가져오게 되었다. 따라서, 기존의 적육생산능력과 함께 육질을 향상시키기 위한 개량체계의 마련은 시급하다.

[0003] 골격근의 성장과 발달을 이해하는 것은 육용가축의 적육생산량과 육질적 측면에서 매우 중요한 의미를 지니고 있다. 근육은 근섬유로 이루어져 있으며 근육생산량은 근섬유의 수와 크기에 의해 결정되는데, 출생 전 결정되는 근섬유의 수와 출생 후 근섬유 크기 성장을 통해 적육생산량이 증가하게 된다. 그러나 육질의 경우는, 근섬유 수와 크기보다는 근섬유조성에 의해 크게 영향을 받는다 (Ryu, Y. et al. 2005. Meat Science 71: 351-357).

[0004] 돼지의 근육 내 근섬유는 ATPase 활성을 담당하는 myosin heavy chain의 종류에 따라서 크게 세 가지 형태(type I, type IIa, type IIb)로 구분되며 육질과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다. 타입 I의 경우 느린 산화작용의 성질을 띠어 사후 대사속도를 지연시켜 함량이 높을 경우 육질에 긍정적인 영향을 미치게 되는 반면, 타입 IIb는 빠른 당분해의 성질을 가져 빠른 사후 대사속도로 인해 함량이 많을 경우 육색이 창백하고 조직이 흐물거리며 육즙이 많이 나오는 이상육(pale, soft, exudative; PSE)으로 판정될 가능성이 커진다. 타입 IIa의 경우는 타입 I과 타입 IIb의 중간 성질인 느린 당분해 성질을 갖는다. 이들 세 가지 근섬유 형태에 따라 근섬유 조성이 결정되며, 돼지의 등심근은 대부분 백색근 계열로서 타입 IIb가 80% 정도를 차지하기 때문에, 육질 개선을 위해 근육 내 근섬유 조성 중 타입 I의 비율을 높여주기 위한 연구가 필요하다.

[0005] 한편, RNA 간섭현상(RNA interference, RNAi)은 진핵생물에서 진화적으로 보존되는 현상으로, 약 22-뉴클레오타이드(nucleotide, nt)의 크기의 작은 RNA가 염기서열 상보적인 메신저 RNA(messenger RNA, mRNA)를 분해하거나, 단백질로의 번역을 억제함으로써 특정 유전자 발현을 조절하는 현상이다. 이러한 RNA 간섭현상은 생체의 발생 및 생리, 세포의 분화, 증식, 사멸, 유전체 안정성(genome stability), 바이러스에 대한 저항성, 그리고 다양한 인간 질병 등 다양한 생물학적 과정에 관련하는 것으로 보고되고 있다 (Hannon G. J., 2002, Nature 418:244-251). RNA 간섭현상의 기전(mechanism)은 다양한 모델 시스템에서 유전학 및 생화학적 방법들을 이용한 연구들을 통해 일부 이해되고 있지만, 아직도 명확하게 설명을 하지 못하고 있으며, 현재 활발한 연구가 경쟁적으로 진행되고 있다.

[0006] RNA 간섭현상에서 다이서(Dicer)는 이중가닥 RNA(double-stranded RNA, dsRNA) 또는 전구체 마이크로 RNA(precursor microRNA, pre-miRNA)를 인식해 절단(processing)함으로써 21-23 뉴클레오타이드 길이를 갖는 두 종류의 작은 RNA들을 생산한다. 그 중 하나는 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA)로 이들은 작은 RNA 간섭현상 유도 복합체(siRNA-induced silencing complex, siRISC)가 염기서열 상보적인 mRNA들을 절단하는 데 있어 안내자(guide)역할을 한다. 다른 하나는 마이크로RNA(microRNA, miRNA)로, 마이크로 RNA 간섭현상 유도 복합체(miRNA-induced silencing complex, miRISC)로 들어가, 동물의 경우 주로 표적(target) mRNA들과의 부분적인 염기서열로의 접합으로 인한 mRNA들이 단백질로 번역되는 것을 저해 또는 절단을 유도하는 안내자 역할

을 한다 (Zamore P. D. et al, 2005, Science 309:1519-1524, Bartel D.P., 2004, Cell 116:281-297). RNA 간섭현상의 기전은 완전하게 규명된 것이 아니기에 작은 RNA (small RNA)들의 발생 및 작용 기전을 명확하게 밝히기 위한 연구들이 진행되고 있는 시점이지만, 현재까지 알려진 발생 및 작용기전을 이용한 기술의 축적을 통한 경쟁력을 확보하는 것은 필수적이다.

[0007] RNA 간섭현상의 중요한 구성요소인 마이크로 RNA는 여러 종에 걸쳐 보존되어 있어 생체의 생리작용을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있으며, 특히 암(cancer)을 비롯한 특이 질병에 대한 유발 혹은 억제인자로 기능을 한다 (Jun Lu et al. 2005. Nature 435:834-838). 생체 내 중요한 역할을 담당하고 있는 마이크로 RNA는 전사체의 분절로 유전체에 암호화되어 전사체의 어느 부위에든 존재한다.

[0008] 특히, 마이크로 RNA의 특징적인 구조는 그들의 동정 및 표적 유전자의 예측을 용이하게 한다. 1차 마이크로 RNA (primary-microRNA, pri-miRNA)에서 발생하는 전구체 마이크로 RNA (precursor microRNA, pre-miRNA)는 독특한 2차 구조를 가지고 있으므로, 전사체의 접힘(folding) 구조를 파악함으로써 마이크로 RNA의 존재를 유추할 수 있다. 1차 마이크로 RNA는 특정 구조를 인식할 수 있는 효소(Drosha)에 의해 세포핵에서 전구체 마이크로 RNA를 생성하게 되고 세포질로 이동하게 된다. 세포질로 이동한 전구체 마이크로 RNA는 또 다른 효소(Dicer)에 의해 성숙된 마이크로 RNA를 생성하게 된다. 성숙된 마이크로 RNA는 표적 mRNA와 염기서열 상보성에 의존하여 표적 유전자의 발현을 조절한다. 마이크로 RNA와 표적 RNA간의 염기쌍 전형적으로 마이크로 RNA의 5'의 2-9번 염기서열인 종자 잔기(seed residue)와 표적 RNA의 염기서열과의 상호작용을 통해 형성된다 (Andrew Grimson et al, 2007, Molecular Cell 27:91-105). 이에 근거하여 조절되는 후보 표적유전자들 또한 예측이 가능하다. 본 발명에서는 근육에서 특이적으로 발현하며 근육의 분화 및 근육의 주요 구성성분 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되는 마이크로 RNA를 선정하여 마이크로 RNA 전사체상의 염기서열을 비교분석하여 육질과의 연관성을 확인하였다.

[0009] 최근 단일염기다형성 (Single nucleotide polymorphism, SNP)과 마이크로 RNA의 상호작용에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 마이크로 RNA는 미성숙의 일차 전사체 (primary transcript)로 최초 발현된 후, 두 개의 서로 다른 RNase III 효소인 Drosha와 Dicer에 의해 핵과 세포질에서 연속적으로 절단(processing) 되어 성숙됨으로써 최종적으로 생성된다. 따라서 마이크로 RNA 유전자의 전사에 필요한 cis-regulatory element (예: promoter)의 염기서열 변화, Drosha와 Dicer의 발생에 영향을 미칠 수 있는 염기서열 변화, 그리고 성숙한 마이크로 RNA에 해당하는 염기서열 변화는 그 마이크로 RNA에 의한 표적 유전자 발현억제 기작에 모두 영향을 미칠 수 있다. 이러한 염기서열 변화로 인한 마이크로 RNA의 생성 및 표적유전자의 발현억제 활성 차이는 이미 인간에서 보고된 바 있다 (Sun G. et al., 2009 RNA 15:1640-1651). 이에 근육 특이적 miRNA 유전자와 그들에 의해 발현이 조절되는 표적 유전자에서 생물학적 의미를 갖는 염기 다형성을 돼지군 별로 이미 분석된 육질 데이터와 비교 분석함으로써 상호 연관성을 분석하는 것이 절실하다.

[0010] 마이크로 RNA-1, -133, -206은 실험적으로 근육에서 특이적으로 발현하는 마이크로 RNA 집단으로, 근육의 분화 및 발달 과정에 중요한 역할을 하는 유전자의 발현을 조절한다. 예를 들어, 마이크로 RNA-1은 근육 유전자 발현의 억제자인 histone deacetylase 4 (HDAC4)의 발현을 조절하여 근육분화를 촉진하며, 마이크로 RNA-133은 serum response factor (SRF)의 발현을 조절하며 근육분화세포의 증식을 촉진한다고 보고되었다 (Jian-Fu Chen et al., 2005, Nature Genetics 38:228-233). 본 발명에서는 돼지 근육에서 특이적으로 발현하는 마이크로 RNA-1 전구체 주변 영역 염기에 존재하는 SNP를 발굴하여 개체군 내에서 돼지의 근육의 특성을 파악하였고, 그에 따른 육질 향상 기능을 규명하여 관련 DNA 단편 표지인자로서 효용성을 검증하였다.

[0011] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 특허공보 제10-0784166호(2007.12.04)의 Myogenin 유전자 관련 돼지 근세포수 증가 확인용 DNA 표지인자 및 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0067941호(2011.06.22)의 PPARGC1A 유전자 관련 돼지의 근육 내 근섬유 타입 I 증가 확인용 DNA 표지인자가 공개되어 있으나, 돼지 근육에서 특이적으로 발현하는 마이크로 RNA-1 전구체 주변 영역 염기에 존재하는 SNP와 관련된 DNA 표지인자에 대해서는 전혀 언급되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0784166호(2007.12.04)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0067941호(2011.06.22)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 따라서, 본 발명의 주된 목적은, 육류의 품질 관리 및 생물 생산 시스템의 기반이 되는, 돼지의 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 SNP를 이용한 돼지 육질 향상 관련 DNA 단편 표지인자 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 육질 향상 관련 DNA 단편 표지인자를 이용한 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 C 염기 및 632번째 G 염기 중 하나 이상을 포함하는 15 내지 700개의 연속서열로 구성되는 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자를 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 돼지 1차 마이크로 RNA-1 중에서 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 돼지의 육질 특성과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 돼지 육질 특성 및 유전자형과의 연관성을 분석하였다. 상기 DNA 단편 표지인자는 가축의 육질 관련 후보유전자로 알려져 있는 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역 서열 중 일부로서, 서열번호 1 염기서열에서, 434번째(C→T), 632번째(G→A) 위치에서 각각 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다.
- [0018] 본 발명은 돼지의 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 육질의 향상과 관련된 것으로, 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 (C→T 치환), 632번째 (G→A 치환) 부위를 발굴하고 이를 포함하는 DNA 단편의 “돼지의 육질 향상 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자”로서의 신규한 용도에 관한 것이다.
- [0019] 상기 마이크로 RNA-1은 돼지의 근육조직 특이적으로 발현하는 마이크로RNA 중 하나이고 근육 조직에서의 육질 관련 유전자의 발현 조절 기능이 있을 것이라 예상되고 있다. 그러나 돼지의 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 특정부위의 SNP를 이용하여 육질이 향상된 개체를 선별하는 방법은 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 이러한 육질 향상 관련 SNP를 처음으로 밝혔다.
- [0020] 본 발명에서, 용어 “마이크로 RNA”는 여러 종에 걸쳐 게놈 상에 암호화되어있는 작은 RNA로, 1차 마이크로 RNA (primary miRNA), 전구체 마이크로 RNA (precursor miRNA), 및 성숙한 마이크로 RNA (mature miRNA)로 발생되어 기능을 하게 된다. 따라서 상기 “1차 마이크로 RNA”란 마이크로 RNA-1 유전자로부터 전사(transcription)된 미성숙의 1차 마이크로 RNA를 의미하고, 상기 “마이크로 RNA-1 전구체”는 상기 1차 마이크로 RNA가 RNase III 효소인 Drosha에 의해 생성되는 전구체(precursor miRNA)를 의미한다.
- [0021] 또한 상기 용어 “마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역”은 돼지 게놈 DNA(genomic DNA) 상에서 상기 마이크로 RNA-1 전구체를 중심으로 upstream과 downstream 방향으로 염기서열을 포함하는 영역을 의미하는 것으로, RNase III 효소에 의해 제거될 부위이나, 본 발명자들은 상기 주위 영역에서 SNP를 발견하였다.
- [0022] 본 발명에서 서열번호 1의 434째, 632번째 염기에 위치한 SNP들은 마이크로 RNA-1 전구체에서 downstream으로 59번째, 257번째 염기이다(도 2 참조).
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편은 서열번호 1로 표시된 돼지 1차 마이크로 RNA-1 중에서 돼지의 육질 특성과 관련한 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 새로운 유전적 변이 부위(SNP site)인 434번째 C 염기, 및/또는 632번째 G 염기를 포함하는 DNA 표지인자이다. 이 유전적 변이 부위는 C→T로 혹은 G→A로 염기가 치환되어 결과적으로 육질 향상에 영향을 미치게 된다. 상기 DNA 단편의 크기는 상기 SNP 부위 1 이상을 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 700개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위

한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있다.

- [0024] 또한 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편 표지인자는 육질 관련 형질인 도축 45분 후 근육 pH(pH_{45min})를 증가시키고, 유리육즙량(drip loss)을 감소시키고, 근섬유 타입 I을 증가시킴으로써 육질을 향상시키는 것과 관련된 것임을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 실시예 5에서와 같이, 434번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형(CC, CT, TT)과 근섬유조성 및 육질특성의 연관성을 분석하여 CC, TT 유전자형이 향상된 육질을 나타냄을 확인하였다(표 10 참조). 또한, 632번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형(AA, AG, GG)과 근섬유조성 및 육질특성의 연관성을 분석하여 AA, AG 유전자형이 향상된 육질을 나타냄을 확인하였다(표 11 참조).
- [0026] 본 발명에서, “육질의 향상”이란 SNP로 인한 개체별 유전자형(CC, CT, TT)에 따라, 육질 관련 형질인 pH_{45min}가 증가되고, 유리육즙량(drip loss)이 감소되는 것을 의미한다. 즉, 434번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형 중 CC와 TT 유전자형 개체가 CT 유전자형 개체와 비교하여 pH_{45min}가 증가되고, 유리육즙량이 감소된 상태를 의미한다. 또한, 632번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형 중 AA 유전자형 개체들이 GG 유전자형을 가진 개체들보다 근섬유 타입 I의 수 및 면적 조성이 크게 나타남을 의미한다.
- [0027] 본 발명에 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 (C→T 치환), 632번째 (G→A 치환)부위에 사용된 “PCR-RFLP” 방법은 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.
- [0028] 본 발명에서, 돼지의 육질특성은 도축 45분 후 근육 pH (pH_{45min}), 유리육즙량 (drip loss), 육색 명도(lightness) 등에 따라 측정될 수 있으며, 이 중 특히 pH는 돼지의 육질특성을 나타내는데 중요한 판별 기준이 된다. 최근 돼지고기의 가격이 급등하고 있기 때문에 육질이 우수한 돼지를 선발하고 육종 및 생산함으로써 품질이 향상된 고급육의 개발이 중요하다. 따라서 본 발명의 DNA 단편 표지인자를 이용하면 육질이 향상된 개체를 조기에 진단하고 선별하여 육질이 향상된 고급육을 손쉽게 생산할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 여부 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머를 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 대표적인 마이크로 RNA portal site (<http://www.mirbase.org/>)에 명시된 ssc-miR-1 (accession no. CU607084.3)의 stem-loop의 염기서열에 근거하여 주변 게놈 DNA 염기서열을 확인하여 SNP를 탐색할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 본 발명의 프라이머는 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1에서 434번째 염기 혹은 서열번호 1에서 632번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다.
- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 4와 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오티드, 또는 서열번호 7과 서열번호 8로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 여부 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 대표적인 마이크로 RNA portal site (<http://www.mirbase.org/>)에 명시된 ssc-miR-1 (accession no. CU607084.3)의 stem-loop의 염기서열에 근거하여 주변 게놈 DNA 염기서열을 확인하여 SNP를 탐색할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 본 발명의 프라이머는 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1의 염기서열의 434번째, 632번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다. 바람직하게 상기 유전자 단편은 서열번호 6 또는 서열번호 9로 표시되는 염기서열로 구성된다 (도 4 및 도 5 참조).
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 서열번호 4와 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오티드, 또는 서열번호 7과 서열번호 8로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는 프라이머세트와 PCR 반응혼합물 및 RFLP 분석용 제한효소인 *FauI*을 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP

분석용 키트는 PCR-RFLP 기법을 이용하는 것으로, 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역 유전자의 발현 조절 즉, 육질 특성에 관여하는 유전자의 다양한 발현을 분석하기 위하여 특정한 제한효소인 *FauI*를 포함한다. 이러한 특정 제한효소는 본 발명자들이 육질 특성의 변화를 일으키는 SNP를 밝혀내고 이 SNP에 기초하여 선택된 것이다. 본 발명의 상기 SNP 분석용 키트는 돼지의 육질 품질 관리 및 생물 생산 시스템에 유용하게 이용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 실시예 3에서는 구체적으로, 본 발명의 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *FauI*의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 4와 서열번호 5의 프라이머로 증폭하였을 경우 SNP1의 유전자형은 CC, CT, TT로 구분될 수 있으며, C allele는 229 bp, 114 bp, 45 bp, 26 bp, 20 bp의 밴드가, T allele는 229 bp, 140 bp, 45 bp, 20 bp의 밴드가 나타나지만, 229 bp, 140 bp, 114 bp로 allele 구별할 수 있다. 또한 서열번호 7과 서열번호 8의 프라이머로 증폭하였을 경우 SNP2의 유전자형은 GG, GA, AA로 구분될 수 있으며, G allele는 155 bp, 71 bp, 42 bp의 밴드가, A allele는 226 bp, 42bp의 밴드가 나타난다 (도 3 참조). 이 또한 226 bp, 155 bp, 71 bp로 allele 구별을 할 수 있다.

[0033] 상기 프라이머를 이용하여 제조된 유전자 단편의 염기서열의 결정은, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 법에 의하여 직접적인 핵산의 뉴클레오티드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나, SNP 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오티드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 혼성화의 정도는 예를 들면, 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA 만을 특이적으로 검출함으로써 이루어질 수 있으나, 그외 전기적 신호 검출방법 등이 사용될 수 있다.

[0034] 구체적으로, 대립형질 특이적 프로브 혼성화 방법(allele-specific probe hybridization), 대립형질 특이적 증폭 방법(allele-specific amplification), 서열분석법(sequencing), 5' 뉴클레아제 분해법(5' nuclease digestion), 분자 비콘 어세이법(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오티드 결합 어세이법(oligonucleotide ligation assay), 크기 분석법(size analysis), 단일 가닥 배좌 다형성법(single-stranded conformation polymorphism) 등의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0035] 본 발명의 실시예 4에서는, 본 발명의 상기 변이 부위 (SNP site)인 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 (C→T 치환), 632번째 (G→A 치환)부위를 포함하는 DNA단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머로 증폭한 DNA 단편(735bp)을 이용하여 서열번호 1의 염기서열에서 434번째 유전자형을 CC, CT, TT로, 632번째 유전자형을 GG, GA, AA로 구분할 수 있었다(도 6 참조).

[0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 6 또는 서열번호 9로 표시되는 상기 DNA 단편 표지인자, 및 상기 표지인자에 상보적으로 결합하는 프로브(probe)를 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명에서 프로브(probe)란 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 본 발명의 상기 프로브는 SNP를 검출하기 위한 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 검출 방법에는 서던 블롯팅 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, 마이크로어레이를 이용한 방법에서 마이크로어레이의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 1의 434번째, 및 632번째 염기 중 하나 이상의 염기의 SNP를 이용하여 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에 의한 상기 SNP는 pH 및 유리옥증량(drip loss)을 포함하여 돼지의 육질특성과 관련이 있으므로, 상기 SNP의 변이를 확인함으로써 돼지의 육질 향상 여부를 용이하게 확인할 수 있다. 상기 SNP의 변이는 공지된 다양한 방법에 의해 확인할 수 있으며, 예를 들어 PCR-RFLP 분석법 및 직접서열분석법 등을 이용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다:

[0040] a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

[0041] b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 434번째, 또는 632번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭

시키는 단계;

c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *FauI*로 처리하는 단계; 및

d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에서 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.

본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 4와 서열번호 5로 표시되는 프라이머 세트, 또는 서열번호 7과 서열번호 8로 표시된 염기서열로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 434번째, 또는 632번째 염기가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 4와 서열번호 5로 표시되는, 또는 서열번호 7과 서열번호 8로 표시된 염기서열로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.

본 발명의 방법에서, 상기 유전자 단편들의 다형성은 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 어떠한 제한효소로 처리하는 것이 가능하나, 바람직하게는 제한효소 *FauI*로 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.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다:

하기 단계들을 포함하는, 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법:

a) 돼지로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 434번째, 또는 632번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계;

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

d) 상기 c)단계의 염기서열 분석 결과로부터 서열번호 1의 염기서열의 434번째 C 염기가 T 염기로 치환, 또는 서열번호 1의 염기서열의 632번째 G 염기가 A로 치환된 여부를 확인하는 단계.

본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 프라이머를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 434번째, 또는 632번째 염기가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오타이드로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.

본 발명의 방법에서, 상기 SNP 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분할 수 있다. 상기 방법에 따르면, 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머로 증폭한 DNA 단편에 존재하는 SNP 부위의 염기를 확인함으로써 서열번호 1의 염기서열에서 434번째 유전자형을 CC, CT, TT로, 632번째 유전자형을 GG, GA, AA로 구분할 수 있다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 SNP들은 돼지의 육질특성 중 pH_{45min} (도축 45분 후 근육 pH) 증가, 유리육즙량(drip loss) 감소와 관련이 있어 육질 향상에 영향을 주며, 근섬유조성 중 근섬유 타입 I 증가와 관련이 있어 근섬유특성에 영향을 준다. 따라서, 본 발명의 SNP는 이러한 특성을 통해서 육질 개량과 관련한 DNA 마커로서 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명은 육질이 향상된 개체를 조기에 진단하고 선별하여 육종 및 생산함으로써 품질이 향상된 고급육의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서열번호 1로 표시된 돼지 1차 마이크로 RNA-1 중에서 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 염기서

열을 분석한 결과이다. 434번째 염기(C→T 치환), 632번째 염기 (G→A 치환)는 새로 발견한 단일염기변이부위 (SNP)이다. 빨간색으로 표시된 부분이 마이크로 RNA-1 전구체의 서열이다.

도 2는 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 발견된 SNP의 위치를 나타내는 모식도이다.

도 3은 본 발명에 따른 서열번호 4와 서열번호 5로 표시되는 프라이머 세트, 또는 서열번호 7과 서열번호 8로 표시된 프라이머 세트를 이용하여 PCR-RFLP를 실시한 결과이다. 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 발견된 서열번호 1의 염기서열에서 434번째, 632번째 염기서열의 제한효소인 *FauI* 위치를 증폭시켜 줄 수 있게 제작되었다. 제한효소 *FauI*을 이용한 RFLP 방법에 의해 서열번호 1의 434번째 유전자형은 각각 CC, CT, TT로 구분될 수 있으며, C allele는 229 bp, 114 bp, 45 bp, 26 bp, 20 bp의 밴드가, T allele는 229 bp, 140 bp, 45 bp, 20 bp의 밴드가 나타나며, 229 bp, 140 bp, 114 bp로 allele를 구별할 수 있다. 또한 서열번호 1의 632번째 유전자형은 GG, GA, AA로 구분될 수 있으며, G allele는 155 bp, 71 bp, 42 bp의 밴드가, A allele는 226 bp, 42bp의 밴드가 나타나며, 226 bp, 155 bp, 71 bp로 allele를 구별할 수 있다.

도 4는 본 발명에 따른 DNA 단편 표지인자의 일례로서, 서열번호 4와 서열번호 5로 표시된 프라이머를 이용한 PCR-RFLP 분석에 사용된 DNA 단편을 나타낸다. 빨간색으로 표시된 부분이 마이크로 RNA-1 전구체의 서열이다.

도 5는 본 발명에 따른 DNA 단편 표지인자의 일례로서, 서열번호 7과 서열번호 8로 표시된 프라이머를 이용한 PCR-RFLP 분석에 사용된 DNA 단편을 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 SNP에 대한 PCR 및 직접염기서열분석(direct sequencing)을 실시하여 염기에 따른 peak의 차이를 이용하여 유전자형을 분석하는 방법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0057] 실시예 1. 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역의 염기서열 분석 및 변이 탐색

[0058] 돼지 마이크로 RNA-1에 대한 정보를 miRBase 홈페이지 (<http://www.mirbase.org/>)를 활용하여, 17번 염색체에 위치하여 서로 다른 유전자간 (ENSSSCT00000008267; intron 4)에 위치하는 전구체 마이크로 RNA-1과 주변의 게놈 DNA의 염기서열을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1

돼지 전구체 마이크로 RNA-1에 대한 정보

miRNA	Genomic context	Overlapping transcript
ssc-miR-1	chromosome 17 64096222 ~ 64096329	antisense ENSSSCT00000008267; intron 4

[0059]

[0060] 품종 간 및 품종 내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 3개 품종(Yorkshire, Landrace, Berkshire)의 실험군에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 확보된 염기서열을 바탕으로 특이 제작된 Foward primer (5'-CCT GGG TCC TTT CTT GTG TC-3', 20mer; 서열번호 2)와 Reverse primer (5'-AGA CTG CTT TGC CTC TGA GC-3', 20mer; 서열번호 3)를 이용하여 (표 2), PCR을 통해 (표 3 및 4) 돼지 전구체 마이크로 RNA-1 전구체(108 nt)를 중심으로 upstream으로 267 bp의 염기가 추가되고, 또한 downstream으로 360 bp의 염기를 포함한 735 bp의 앰플리콘 (amplicon; 서열번호 1)에 대해 염기서열을 분석함으로써 돼지 마이크로 RNA-1을 비롯한 그의 전구체와 전구체 주위의 염기서열을 확인하였다. 염기서열 분석 결과를 품종 내 변이를 탐색하여 단일염기부위(SNP)를 확인하였고, 전구체 돼지 마이크로 RNA-1의 염기서열에서 upstream에서 59번째 C염기가 T염기로 (서열번호 1로 표시된 염기서열에서 434번째 염기), downstream으로 257번째 G염기가 A염기로 (서열번호 1로 표시된 염기서열에서 632

번째 염기) 치환된 것을 확인하였다 (도 2).

표 2

735 bp의 앰플리콘 증폭에 사용된 프라이머

Primer	Length (nt)	Product size (nt)	Primer sequences
서열번호 2	20	735	CCTGGGTCCTTTCTTGTGTC
서열번호 3	20		AGACTGCTTTCCTCTGAGC

[0061]

표 3

735 bp의 앰플리콘 증폭 시 PCR 혼합물 조성

Reagent		Volume (ul)
10x Polymerase buffer		5.0
dNTP (2mM each)		5.0
DNA polymerase		0.5
Distilled Water		33.5
Primer (10uM)	Forward	2.0
	Reverse	2.0
Genomic DNA		2.0
Total volume		50.0

[0062]

표 4

735 bp의 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응 조건

PCR steps		Temperature (°C)	Time (minute)
Initial denaturation		94.0	10
Denaturation	30 cycle	94.0	1
Annealing		58.5	1
Extension		72.0	1
Final extension		72.0	10
Hold		4.0	∞

[0063]

[0064] 실시예 2. 돼지의 게놈 DNA(genomic DNA) 추출

[0065] 상기 유전자 다형성 분석을 위한 게놈 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℃를 유지하여 실험실까지 운반하였다. 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1,300 g에서 15분간 원심분리하여 buffy coat을 모아 15 ml의 DNA 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 0.5M 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 cm 되는 피펫(pipet)으로 상정액을 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.

[0066] 실시예 3. PCR-RFLP 분석

[0067] 전구체 돼지 마이크로 RNA-1 주위 영역에서 확인한 SNP의 효율적인 유전자형 분석을 위하여 PCR과 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 기법을 기반으로 유전자형 진단기법을 이용하였다. 실시예 1에서 발견한 SNP에서, 서열번호 1로 표시된 염기서열에서 434번째 염기와 632번째에 가용한 *FauI*를 NEB cutter V2.0 program (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)을 이용하여 탐색하였다. 탐색된 제한효소인 *FauI*의 처리에 따라 다른 크기로 나타나는 아가로즈 겔(agarose gel) 상에서의 밴드(band)의 형태를 파악하여 유전자형을 구분할 수 있었다.

[0068] PCR 반응 시 제한효소 *FauI*를 이용한 RFLP 기법을 적용하기 위하여 효율적으로 적용하기 위하여, 확보된 염기서열을 바탕으로 서열번호 1의 염기서열에서 434번째 염기를 위해 제작된 Foward primer (5'-TCC GAG GTC AGA GGG ACA-3', 18mer; 서열번호 4)와 Reverse primer (5'-GTC TGA TGA GGC TTC CAC CT-3', 20mer; 서열번호 5), 서열번호 1의 염기서열에서 632번째 염기를 위해 제작된 Foward primer (5'-AGT GGA CGG CTT GTC CTC TG-3', 20mer; 서열번호 7)와 Reverse primer (5'-AGA CTG CTT TGC CTC TGA GC-3', 20mer; 서열번호 8)를 사용하였다 (표 5). 유전자형을 분석하기 위한 PCR을 실시하는데 있어 프라이머는 각 2.0 μ l (10 μ M)씩 첨가하고, 그 외 반응 첨가물은 10X PCR reaction buffer (100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl) 5.0 μ l, dNTP (2 mM each) 5.0 μ l, Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l, Enzynomics) 0.5 μ l, Template (genomic) DNA 2.0 μ l (약 100 ng)와 ddH₂O 33.5 μ l를 섞어 최종적으로 50.0 μ l를 반응시켰다. 반응조건은 94℃에서 10분간 initial denaturation을 실시한 후, 94℃에서 1분간 denaturation, 64.4℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 한 cycle로 30 cycle을 반복한 후, 72℃에서 final extension을 실시한 후 PCR 반응을 종료하였다 (표 6 및 표 7).

표 5

434 bp 및 268 bp의 앰플리콘 증폭에 사용된 프라이머

Primer	Length (nt)	Product size (nt)	Primer sequences
서열번호 4	18	434	TCCGAGGTCAGAGGGACA
서열번호 5	20		GTCTGATGAGGCTTCCACCT
서열번호 7	20	268	AGTGGACGGCTTGTCCTCTG
서열번호 8	20		AGACTGCTTTGCCTCTGAGC

표 6

434 bp 및 268 bp의 앰플리콘 증폭 시 PCR 혼합물 조성

		서열번호 1번에서 434번째 (C/T, 434bp)	서열번호 1번에서 632번째 (G/A, 268bp)
Reagent		Volume (ul)	Volume (ul)
10x Polymerase buffer		5.0	5.0
dNTP (2mM each)		5.0	5.0
DNA polymerase		0.5	0.5
Distilled Water		33.5	33.5
Primer (10uM)	Forward	2.0	2.0
	Reverse	2.0	2.0
Genomic DNA		2.0	2.0
Total volume		50.0	50.0

[0070]

표 7

434 bp 및 268 bp의 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응 조건

		서열번호 1번에서 434번째 (C/T, 434bp)		서열번호 1번에서 632번째 (G/A, 268bp)	
PCR steps		Temperature (℃)	Time (minute)	Temperature (℃)	Time (minute)
Initial denaturation		94.0	10	94.0	10
Denaturation	30 cycle	94.0	1	94.0	1
Annealing		68.4	1	65.5	1
Extension		72.0	1	72.0	1
Final extension		72.0	10	72.0	10
Hold		4.0	∞	4.0	∞

[0071]

[0072] 이와 같이 확보된 PCR product (434 bp; 서열번호 6 / 268bp; 서열번호 9)를 이용하여 서열번호 1의 염기서열에서 434번째 염기와 632번째 염기에 대한 유전자형 분석을 위해 제한효소를 처리하였다. 제한효소 *FauI* 처리 첨가물은 *FauI* 효소 0.5 μ l (2.5 unit/ μ l, Enzynomics), 10X reaction buffer (20 mM Tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 1 mM dithiothreitol (DTT)) 1.0 μ l, ddH₂O 3.5 μ l, PCR product 5.0 μ l를 섞어 최종적으로 10.0 μ l를 반응시켰다 (표 8). 이 혼합물을 55°C에서 1시간 30분 동안 반응시키고, 2% 아가로스 겔에서 100V로 20분간 전기영동(electrophoresis)하여 나타나는 밴드의 양상을 확인하였다. 서열번호 1의 염기서열에서 434번째 염기는 제한효소 *FauI*이 인식하여 절단(digestion)할 수 있는 대립유전자는 C allele, 절단할 수 없는 대립유전자는 T allele로 나타내었다. 또한 위와 같은 방법으로 서열번호 1의 염기서열에서 632번째 염기는 제한효소 *FauI*가 인식하여 절단(digestion)할 수 있는 대립유전자는 G allele, 절단할 수 없는 대립유전자는 A allele로 나타내었다.

표 8

PCR-RFLP에서 제한효소 처리의 혼합물 조성

Reagent	Volume (ul)
10x Reaction buffer	1.0
Restriction enzyme (<i>Fau</i> I)	0.5
Distilled Water	3.5
PCR product	5.0
Total volume	10.0

[0073]

[0074]

도 3은 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에 위치한 *Fau*I site에 대한 PCR-RFLP 판단을 나타낸다. DNA 사이즈 마커는 1kb plus DNA marker ((주)제네피아)를 이용하였다. 서열번호 1번에서 434번째 염기에 대한 제한효소 *Fau*I를 사용하였을 때 TT 유전자형의 경우 229bp, 140 bp, 45 bp, 20 bp가 나타나고, CC 유전자형의 경우에는 140 bp가 *Fau*I 제한효소에 의해 절단된 229 bp, 114 bp, 45 bp, 26 bp, 20 bp가 나타나며, CT 이형 접합체의 경우에는 229 bp, 140 bp, 114 bp, 45 bp, 26 bp, 20 bp가 모두 나타난다. 45 bp, 26 bp, 20 bp는 눈으로 구별할 수 없기 때문에, allele 구별은 229 bp, 140 bp, 114 bp로 할 수 있다. 또한 서열번호 1번에서 632번째 염기에 대한 제한효소 *Fau*I를 사용하였을 때 AA 유전자형의 경우 226 bp, 42 bp가 나타나고, GG 유전자형의 경우에는 226 bp가 *Fau*I 제한효소에 의해 절단된 155 bp, 71 bp, 42 bp가 나타나며, GA이형 접합체의 경우에는 226 bp, 155 bp, 71 bp, 42 bp가 모두 나타난다 (도 3). allele 구별은 226 bp, 155 bp, 71 bp로 할 수 있다.

[0075]

실시예 4. PCR 및 직접염기서열분석을 통한 유전자형 분석

[0076]

돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 확인한 SNP, 서열번호 1의 염기서열에서, 434째 C 염기 혹은 632번째 G 염기의 유전자형 분석을 위하여, PCR 및 직접염기서열분석(direct sequencing)을 통해 개체별 유전자형 분석을 실시하였다. PCR 반응과 직접염기서열분석을 위해, Forward primer (5'-CCT GGG TCC TTT CTT GTG TC-3', 20mer; 서열번호 2)와 Reverse primer (5'-AGA CTG CTT TGC CTC TGA GC-3', 20mer; 서열번호 3)를 이용하였다 (표 2). 유전자형을 분석하기 위한 PCR을 실시하는데 있어 프라이머는 각 2.0 μ l (10 μ M)씩 첨가하고, 그 외 반응 첨가물은 10X PCR reaction buffer (100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl) 5.0 μ l, dNTP (2 mM each) 5.0 μ l, Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l, Enzynomics) 0.5 μ l, Template (genomic) DNA 2.0 μ l (약 100 ng)와 ddH₂O 33.5 μ l를 섞어 최종적으로 50.0 μ l를 반응시켰다. 반응조건은 94℃에서 10분간 initial denaturation을 실시한 후, 94℃에서 1분간 denaturation, 62.7℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 한 cycle로 30 cycle을 반복한 후, 72℃에서 final extension을 10분 실시한 후 PCR 반응을 종료하였다 (표 3 및 표 4 참조).

[0077]

이와 같이 확보 확보된 PCR product (735 bp; 서열번호 1; 도 1 참조)를 직접염기서열분석을 통하여 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 혹은 632번째 위치의 염기 구성을 알 수 있었다.

[0078]

도 6은 돼지 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에서 서열번호 1의 염기서열에서, 434번째 혹은 632번째 위치의 염기 구성을 나타낸다. 434번째 염기서열에서, CC 유전자형 (C homozygote)과 TT 유전자형 (T homozygote)의 경우 염기의 peak가 하나로 나타나고 있지만, CT 유전자형 (C/T heterozygote)의 경우 peak가 2개로 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 632번째 염기서열도 동일하게 GG 유전자형 (GG homozygote)과 AA 유전자형 (A homozygote)의 경우 염기의 peak가 하나로 나타나고 있지만, GA 유전자형 (G/A heterozygote)의 경우 peak가 2개로 나타남을 확인할 수 있었다. 추가적으로 서열번호 1의 염기서열에서, 434째, 632번째는 유전자형에 따른 peak를 확인할 수 있었다(도 6).

[0079]

실시예 5. 표지유전자형 별 근접유조성 및 육질차이 확인

- [0080] 돼지 마이크로 RNA-1은 근육에서 특이적으로 발현되는 마이크로 RNA 집단으로 근육의 분화 및 발달과정에 중요하게 작용할 것으로 판단되므로 본 발명에서는 공시돈 451두의 근섬유특성과 육질형질을 분석하였으며, 유전자형과의 연관성분석을 실시를 통해 그 효과를 확인하였다.
- [0081] 1) 근섬유특성 분석
- [0082] 근섬유특성 분석을 위하여, 사후 45분이 지난 8번 흉추의 등심근의 근육샘플을 수집하였고, $0.5 \times 0.5 \times 1.0$ cm의 조각으로 자르고, 액체 질소로 재빠르게 얼리고, 분석 전까지는 -80°C 에서 보관되었다. 횡단부분($10\ \mu\text{m}$ thick)은 20°C 상에서 크라이오스테트(cryostat; CM1850, Leica, Germany) 기계로 준비되었고, 근섬유형 식별 분석을 위해 타입 I, IIa와 IIb 섬유를 프리인큐베이션(acid preincubation, pH 4.35)을 처리한 액토미오신(actomyosin) ATPase 방법으로 염색하여 분류하였다. 모든 샘플은 CCD 카메라(charge-coupled device color camera; IK-642K, Toshiba, Japan)와 이미지 분석 시스템(the image analysis system; Image-Pro Plus, Media Cybernetics, USA) 장치를 이용하여 근섬유 특성이 분석되었다.
- [0083] 2) 육질 분석
- [0084] 근육의 pH는 사후 45분에 스피어-형 전극(spear-type electrode)의 사용으로 등뼈 13번/14번 부분에서 측정되었다. 육색 명도(lightness)는 색도계(chromameter; CR-300, Minolta Camera Co., Japan)를 사용하여 등심근의 사후 45분경에 측정하였다. 유리육즙량(drip loss)은 2°C 에서 48시간 동안 플라스틱 백에서 표면에 있는 근육 샘플의 양의 차이를 측정하는 방법으로 분석되었다 (Honikel, K. O. (1987). Martinus Nijhoff, In P. V. Tarrant, G. Eikelenboom, & G. Monin (Eds.): 129-142). 결과는 하기 표 10 및 표 11에 나타내었다.
- [0085] 3) 유전자형과 형질과의 연관성 분석
- [0086] 공시돈 451두에 대해 본 발명의 SNP에 따른 유전자형과 근섬유특성 및 육질형질과의 연관성 분석을 실시했다. 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.2 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 통계분석 모델에서 품종, 성별, 계절 및 품종-유전자형 상호작용을 고정효과로 분석하였으며, 각 유전자형의 최소제곱평균(Least Squares Means)을 구하여 유의차를 평가하였다.
- [0087] 본 발명에서 Berkshire, Landrace, Yorkshire의 3개 품종으로 구성된 공시돈에 대해 SNP의 유전자형이 451두가 분석되었으며, 유전자형 및 대립유전자 빈도는 하기 표 9와 같다. 434번째 염기위치 SNP에서 CT 유전자형을 가진 개체가 높게 나타났으며(49%), 유전자 빈도에서는 C allele이 높게 분포하고 있었다. 632번째 염기위치 SNP에서 CC 유전자형을 가진 개체가 가장 적게 나타났으며 (11%), CT 유전자형과 TT 유전자형을 가진 개체는 비슷한 빈도를 나타냈다 (각각 40%, 49%). 대립유전자빈도에서는 T allele(69%)이 C allele(31%)에 비해 높게 나타났다.

표 9

miR-1 SNP에 따른 유전자형 및 유전자빈도

Breed	n	434번째 염기위치 SNP					632번째 염기위치 SNP				
		Genotype			Gene		Genotype			Gene	
		CC	CT	TT	C	T	CC	CT	TT	C	T
Berkshire	153	0.31 (48) ¹	0.47 (71)	0.22 (34)	0.55	0.45	0.17 (26)	0.39 (60)	0.44 (67)	0.37	0.63
Landrace	125	0.33 (41)	0.62 (78)	0.05 (6)	0.64	0.36	0.09 (11)	0.31 (39)	0.60 (75)	0.24	0.76
Yorkshire	173	0.40 (69)	0.40 (70)	0.20 (34)	0.60	0.40	0.08 (14)	0.47 (81)	0.45 (78)	0.32	0.68
Total	451	0.35 (158)	0.49 (219)	0.16 (74)	0.59	0.41	0.11 (51)	0.40 (180)	0.49 (220)	0.31	0.69

¹number of pigs

표 10

서열번호 1의 434번째 염기위치 SNP의 유전자형과 대상형질과의 연관성분석

	434번째 염기위치 SNP			
Traits	CC (n=158)	CT (n=219)	TT (n=74)	P-value
Muscle fiber characteristics				
Total fiber number ($\times 10^3$)	1,125 (20.8) ¹	1,128 (18.9)	1,106 (47.3)	0.9099
Mean CSA ² of fibers (μm^2)	4,276 (85.3)	4,301 (57.8)	4,533 (123.8)	0.1672
The density of total fibers (/mm ²)	240.4 (3.45)	237.9 (3.06)	228.3 (6.55)	0.2571
Fiber number composition (%)				
Type I	8.97 (0.38)	9.48 (0.34)	10.17 (0.73)	0.2918
Type IIa	11.78 (0.40)	11.51 (0.36)	11.21 (0.77)	0.7695
Type IIb	79.26 (0.53)	79.04 (0.48)	78.62 (1.01)	0.8648
Fiber area composition (%)				
Type I	6.77 (0.27)	6.98 (0.24)	7.38 (0.51)	0.5470
Type IIa	7.46 (0.27)	7.11 (0.24)	7.19 (0.52)	0.5995
Type IIb	85.77 (0.38)	85.92 (0.34)	85.43 (0.72)	0.8169
Meat quality				
pH _{45min}	6.14 ^a (0.03)	6.04 ^b (0.02)	6.15 ^a (0.05)	0.0040
Drip loss (%)	3.84 ^a (0.19)	4.58 ^a (0.17)	3.17 ^b (0.37)	0.0041
Lightness (<i>L</i> [*])	46.84 (0.23)	47.28 (0.20)	46.84 (0.45)	0.2822

¹ Standard error of least square means.

² Cross sectional area.

^{a,b} Least square means with different superscripts in the same row differ.

표 11

서열번호 1의 632번째 염기위치 SNP의 유전자형과 대상형질과의 연관성 분석

	632번째 염기위치 SNP			
Traits	AA (n=51)	GA (n=180)	GG (n=220)	P-value
Muscle fiber characteristics				
Total fiber number ($\times 10^3$)	1,130 (45.0) ¹	1,112 (24.7)	1,133 (17.4)	0.7798
Mean CSA ² of fibers (μm^2)	4,381 (115.9)	4,408 (67.8)	4,241 (54.7)	0.1126
The density of total fibers (/mm ²)	236.5 (6.15)	232.5 (3.60)	241.7 (2.90)	0.1090
Fiber number composition (%)				
Type I	10.54 ^a (0.67)	9.74 ^a (0.39)	8.69 ^b (0.32)	0.0116
Type IIa	10.37 (0.71)	11.86 (0.42)	11.60 (0.34)	0.1769
Type IIb	79.08 (0.92)	78.40 (0.54)	79.73 (0.44)	0.1380
Fiber area composition (%)				
Type I	7.60 ^a (0.48)	7.19 ^{ab} (0.28)	6.57 ^b (0.23)	0.0557
Type IIa	6.52 (0.48)	7.49 (0.28)	7.24 (0.23)	0.2034
Type IIb	85.88 (0.66)	85.32 (0.39)	86.19 (0.31)	0.1886
Meat quality				
pH _{45min}	6.09 (0.05)	6.09 (0.03)	6.11 (0.02)	0.7414
Drip loss (%)	4.33 (0.36)	4.46 (0.20)	4.02 (0.16)	0.1869
Lightness (<i>L</i> [*])	46.76 (0.43)	46.87 (0.23)	47.29 (0.20)	0.2576

¹ Standard error of least square means.

² Cross sectional area.

^{a,b} Least square means with different superscripts in the same row differ.

[0090]

[0091] 표 10 및 표 11은 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에 존재하는 SNP에 따른 유전자형과 근섬유특성 및 육질형질과의 연관성을 분석한 결과이다.

[0092] 상기 표 10의 결과에서, 서열번호 1의 434번째 염기위치 SNP에 따른 유전자형간에는 총근섬유수(Total fiber number), 근섬유단면적(Mean CSA of fibers), 근섬유밀도(The density of total fibers), 근섬유타입별 수조성(Fiber number composition) 및 단면적조성(Fibers area composition)으로 나타내어지는 근섬유특성에 대해서는 유전자형에 따른 유의한 차이가 나타나지 않았다. 육질형질에서는 CC 유전자형과 TT 유전자형이 CT 유전자형에 비해 pH_{45min} ($P = 0.0040$)가 높게 나타나고, Drip loss($P = 0.0041$)가 낮게 나타났으며, 이를 통해 CC 유전자형과 TT 유전자형이 CT 유전자형에 비해 육질이 우수한 것으로 판단할 수 있다. 반면, 서열번호 1의 632번째 염기위치 SNP의 유전자형에 따라 육질형질에서는 유의적 차이가 없었지만 근섬유타입 I 수조성(Fiber number composition, $P = 0.0116$) 및 단면적조성(Fibers area composition, $P = 0.0116$)이 유의적인 차이를 나타냈다(상기 표 11). 따라서 서열번호 1의 434번째 염기 및 632번째 염기위치의 SNP들은 각각 육질과 근섬유특성에 영향을 주는 것을 알 수 있다.

[0093] 근육 특이적으로 발현하여, 근육분화 및 발달에 주요한 역할을 하는 마이크로 RNA-1 전구체 주위 영역에 존재하는 본 발명의 SNP가 육질향상 및 근섬유특성에 영향을 미치는 기능을 확인하였으며, 육질 관련 DNA 단편 표지인 자로서의 효용성을 검증하였다.

[0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

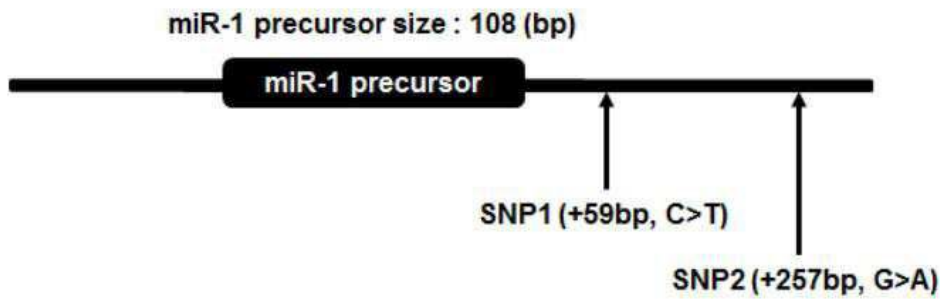
도면

도면1

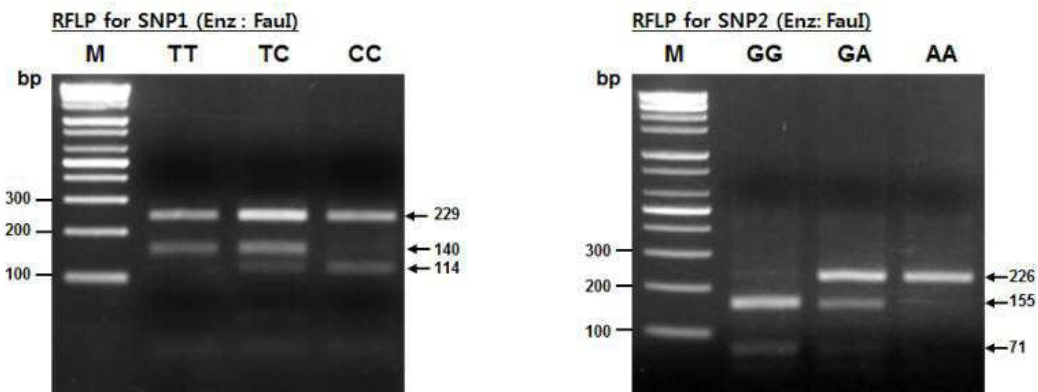
```

1 CCTGGGTCCT TTCTGTGTC ACTGATGCAA AACTAACCCA GCGTGGGGGG GTCAGAGGGG
61 TTCCTGGGAC TTTCTGGAGT GCGCTGCCTG CTGTGTGGTG GGGGGCTCCG AGGTCAGAGG
121 GACAGGGGGC CGAGGACCCC AGGCGACGGT CAGAGCTGCG GGGGTGGGGG GCGCGCTCTG
181 AGCACAAGGA GGGCTCCCGG GTGGATCCGT GGAAAAGCCG GGCTCTGTG CAGGCTTCTT
241 GGGGCCCTC CCCGAGCCAC GACTGGGCCG GTTGACGTAC CTGCTTGGGG GACATACTTC
301 TTTATGTGCC CATATGGACC TGCTAAGCTA TGGAAATGTA AGAAGTATGT ATTCAGGCT
361 GGGAACTCTC ACCGGAAGAA GGGGCAGCGG GCCCGCGGGG CCGCCCGGGG GACAGACAGA
421 CAGGCAGCGG TGG[C/T]GGGCAG GCCTGGGTGG CAGGCTGCCT GGGCGTCAGT GGACGGCTTG
481 TCCTCTGCCG GTATTGTTCT GTCACTTTGC CTGTGTCAGC AGGTGGAAGC CTCATCAGAC
541 ATTAAATATT CAACGTGCTG ACTGCGGCAG AGGGAAGGCA GCCTGTGGCA GGCATGGGGT
601 CCGCTGGGGG GCGTGCAGGG GCTGGGGTGC G[G/A]GGCCTCAG CAGGGGGACA GGGCCGTGTG
661 GTTCTGGGCT GTCATTGTT GCCACCCGCG AAAGGGACGT TTGCTGGCAG AGAATGCTCA
721 GAGGCAAAGC AGTCT
    
```

도면2



도면3



도면4

```

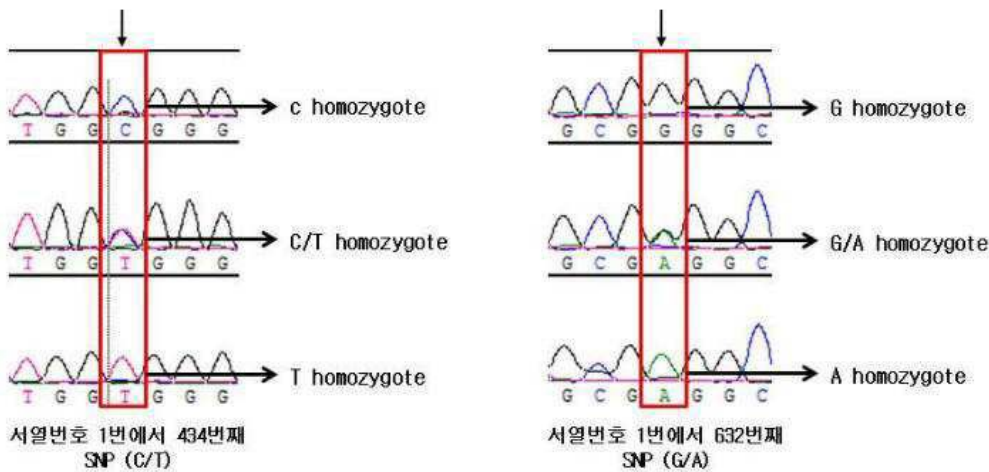
1 TCCGAGGTCA GAGGGACAGG GGGCCGAGGA CCCAGGCGA CGGTCAGAGC TCGGGGGTG
61 GGGGGCGCGC TCTGAGCACA AGGAGGGCTC CCGGTGGAT CCGTGAAAA GCCGGCCTC
121 TGTGCAGGCT TCTTGGGGCC CCTCCCCGAG CCACGACTGG GCGGTTGAC GTACCTGCTT
181 GGGGGACATA CTTCTTTATG TGCCCATATG GACCTGCTAA GCTATGGAAT GTAAAGAAGT
241 ATGTATTTC A GGCTGGGAAC TCTACCGGA AGAAGGGCA GCGGGCCCGC GGGGCCGCC
301 GGGGGACAGA CAGACAGGCA GCGGTGG[C/T]GG GCAGGCCTGG GTGGCAGGCT GCCTGGGCGT
361 CAGTGGACGG CTTGTCCTCT GCCGGTATTG TTCTGTCACT TTGCCTGTGT CAGCAGGTGG
421 AAGCCTCATC AGAC
    
```

도면5

```

1 AGTGGACGGC TTGTCCTCTG CCGGTATTGT TCTGTCACTT TGCCTGTGTC AGCAGGTGGA
61 AGCCTCATCA GACATTAAAT ATTCAACGTG CTGACTGCGG CAGAGGGAAG GCAGCCTGTG
121 GCAGGCATGG GGTCCGCTGG GGGGCGTGCA GGGGCTGGGG TCGG[G/A]GGCCT CAGCAGGGGG
181 ACAGGGCCGT GTGGTTCTGG GCTGTCACTT GTTGCCACCC GCGAAAGGA CGTTTGCTGG
241 CAGAGAATGC TCAGAGGCAA AGCAGTCT
    
```

도면6



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> DNA fragment markers for detecting improvement of porcine meat
quality using SNPs in region of muscle specific microRNA-1
- <130> P11-110927-01
- <160> 9
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 735

<212> DNA

<213> sus scrofa

<400> 1

cctgggtcct ttcttgtgtc actgatgcaa aactaaccca gcgtgggggg gtcagagggg 60

ttcttgggac ttcttggagt gcgtgcctg ctgtgtggtg gggggctccg aggtcagagg 120

gacagggggc cgaggacccc aggcgacggt cagagctgcg ggggtggggg gcgcgctctg 180

agcacaagga gggctcccgg gtggatccgt ggaaaagccg ggcctctgtg caggcttctt 240

ggggcccttc cccgagccac gactgggccc gttgacgtac ctgcttgggg gacatacttc 300

tttatgtgcc catatggacc tgctaagcta tggaatgtaa agaagtatgt atttcaggct 360

gggaactctc accggaagaa ggggcagcgg gcccgcgggg cggcccgggg gacagacaga 420

caggcagcgg tggcgggcag gcctgggtgg caggctgcct gggcgtcagt ggacggcttg 480

tcctctgccg gtattgttct gtcactttgc ctgtgtcagc aggtggaagc ctcacagac 540

attaaatatt caacgtgctg actgcggcag aggggaaggca gcctgtggca ggcatggggt 600

ccgctggggg gcgtgcaggg gctgggggtgc ggggcctcag cagggggaca gggccgtgtg 660

gttctgggct gtcacttgtt gccacccgcg aaaggacgt ttgctggcag agaatgctca 720

gaggcaaagc agtct 735

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for PCR

<400> 2

cctgggtcct ttcttgtgtc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> primer for PCR

<400> 3

agactgcttt gcctctgagc 20

<210> 4

<211> 18

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for PCR	
<400>	4	
tccgaggtca gagggaca		18
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for PCR	
<400>	5	
gtctgatgag gcttccacct		20
<210>	6	
<211>	434	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DNA marker	
<400>	6	
tccgaggtca gagggacagg gggccgagga cccagggca cggtcagagc tgcgggggtg		60
ggggggcgcgc tctgagcaca aggagggctc ccgggtggat ccgtggaaaa gccgggcctc		120
tgtgcagget tcttggggcc cctccccgag ccacgactgg gccggttgac gtacctgctt		180
gggggacata cttctttatg tgcccatatg gacctgctaa gctatggaat gtaaagaagt		240
atgtatttca ggctgggaac tctcaccgga agaaggggca gcggggccgc ggggccgccc		300
gggggacaga cagacaggca gcggtggcgg gcaggcctgg gtggcaggct gcctgggcgt		360
cagtggacgg cttgtcctct gccggtattg ttctgtcact ttgcctgtgt cagcagggtg		420
aagcctcacc agac		434
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer for PCR	
<400>	7	
agtggacggc ttgtcctctg		20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for PCR

<400> 8

agactgcttt gcctctgagc 20

<210> 9

<211> 268

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA marker

<400> 9

agtggacggc ttgtcctctg ccggtattgt tctgtcactt tgctgtgtc agcaggtgga 60

agcctcatca gacattaaat attcaacgtg ctgactgcgg cagaggggaag gcagcctgtg 120

gcaggcatgg ggtccgctgg ggggcgtgca ggggctgggg tgcggggcct cagcaggggg 180

acagggccgt gtggttctgg gctgtcactt gttgccaccc gcgaaaggga cgtttgctgg 240

cagagaatgc tcagaggcaa agcagtct 268