



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0027078
(43) 공개일자 2017년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 1/6837 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0123544
(22) 출원일자 2015년09월01일
심사청구일자 2015년09월01일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이철구
서울특별시 성북구 낙산길 255, 104동 1304호 (보문동3가, e편한세상보문)
김승수
서울특별시 동대문구 안암로22길 35-4, 203호 (제기동)
(74) 대리인
김순웅

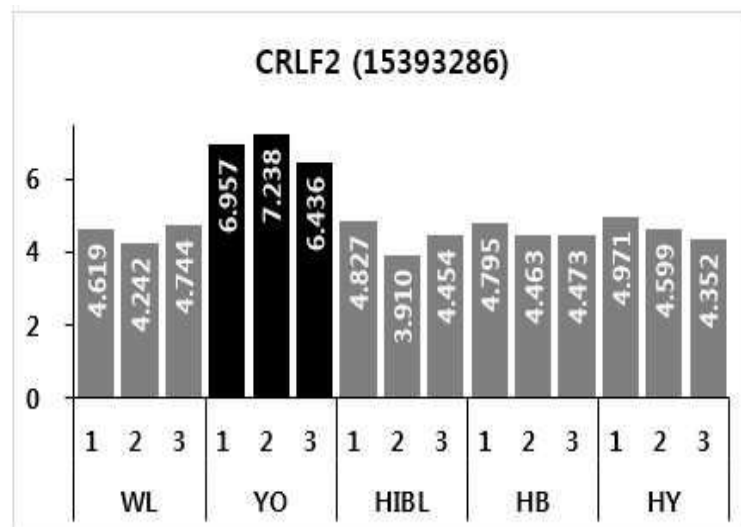
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 연산오계 판별용 조성물

(57) 요약

본 발명은 재래종 특이적인 유전자를 이용한 연산오계 판별용 조성물, 키트 및 이를 이용한 연산오계 판별방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 닭 품종 판별용 조성물, 키트 및 방법은 간편한 공정을 통해 천연기념물 재래닭 품종인 연산오계를 판별해 낼 수 있으므로, 연산오계의 품종 연구 및 보존, 잡종화된 재래닭 중 연산오계의 품종 구별 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)

C12Q 2600/124 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01053302

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 2014년 국가농업 알앤디 어젠다 연구개발사업

연구과제명 농가 보유 4계통 재래닭 분자유전학적 특성평가

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 이루어진 바이오 마커, 상기 유전자에 특이적인 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 닭 품종 판별용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 닭은 연산오계인, 닭 품종 판별용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자는 간 시료로부터 추출된 것을 특징으로 하는, 닭 품종 판별용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 닭 품종 판별용 키트.

청구항 5

서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자에 상보적인 핵산 서열이 집적된, 닭 품종 판별용 마이크로 어레이 칩.

청구항 6

1) 닭으로부터 유전자 시료를 얻는 단계;
2) 제1 단계의 시료에서 서열번호 4 내지 서열번호 8에서 선택되는 하나 이상의 유전자 발현 정도를 비교하는 단계; 를 포함하는 닭 품종 판별 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유전자 중 SNORA5(서열번호 4), CRLF2(서열번호 5), DETY01(서열번호 6), DETY02(서열번호 7)의 발현이 증가한 경우, 상기 닭을 연산오계인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는, 닭 품종 판별 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 유전자 중 MIR1803 (서열번호 8)의 발현이 감소한 경우, 상기 닭을 연산오계인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는, 닭 품종 판별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재래종 특이적인 유전자를 이용한 연산오계 판별용 조성물, 키트 및 이를 이용한 연산오계 판별방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계 각국에서는 유전자원으로서 재래가축에 대한 보존 및 활용의 가치를 인식하면서(Notter (1999) J. Anim. Sci. 77:61-69) 가축들의 품종 형성, 유전적 특성, 유전적 다양성, 타 품종간의 유연관계 등의 분석연구를 수행하여 왔다. 소의 품종집단에 대해서는 혈액단백질, 유단백질, 마이크로세텔라이트(microsatellites), 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA), 등 다양한 유전적 표지인자들을 활용한 연구들이 수행되어 왔다(MacHugh et al (1998) Anim. Genet. 29:333-340; Mannen et al (1998) Genetics 150:1169-1175; Edwards et al (2000) Anim.

Genet. 31:127-130; Troy et al (2001) Nature 410:1088-1091; Hanotte et al (2000) Molecular Ecology 9:387-396, (2002) Science 296:336-339).

[0003] 이러한 유전적 표지인자 중 마이크로새틀라이트(microsatellite)는 2 내지 6개 정도의 염기서열이 반복되는 DNA 군(repetitive DNA group)으로, 게놈 내에 골고루 분포하고 매우 높은 다형성을 나타내는 비암호화 DNA 서열(non-coding DNA sequence)이다(Zajc I and Sampson J (1999) J Hered 90: 104-107). 특정 좌위에서 반복단위의 반복수에 따라 개체간의 다양성이 인정되는데(Koreth J, O'Leary JJand McGee JO (1996) J Pathol 178: 239-248.), 반복수에 품종 간 다형이 있는 경우에 인접영역에 설계한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 행하면, PCR 산물 길이에 다형이 관찰되고 DNA 다형을 검출하는 것이 가능해진다. 또한, 마이크로새틀라이트는 다른 유전자들과 마찬가지로 멘델의 유전법칙에 따라 자식에게 전달되며 PCR을 이용하여 증폭할 수 있고, 전기영동을 할 경우 공우성(co-dominant)의 양상을 보인다. 특히, 마이크로새틀라이트는 크기가 작기 때문에 2개에서 최대 8개까지의 프라이머를 동시에 증폭할 수 있으므로(Chamberlain JS et al., (1988) Nucleic Acids Res 16: 11141-11156) 유전자의 다형성을 분석하는데 시간과 비용을 줄일 수 있으며 민감성과 정확성이 높은 결과를 얻을 수 있다. 따라서 이와 같은 마이크로새틀라이트는 가축의 분자유종분류에 이용가치가 대단히 높으며 근친교배에 의한 퇴화를 방지하는 데 유용할 뿐만 아니라 특정형질을 선택하는 것에도 이용될 수 있다고 한다.

[0004] 한편 닭은 우리나라의 대표적인 축산으로서, 다른 가축에 비하여 생산주기가 빠르고, 비교적 운반이 쉽기 때문에 경제적, 산업적으로 유리하다. 2011년 통계에 의하면 닭고기는 일인당 11.4 kg, 계란은 232개로 닭고기 및 계란의 소비량이 급격하게 증가하는 추세이다. 하지만 이러한 양계산업의 성장에 비하여, 재래닭의 비율은 국내 전체 시장의 약 10% 정도를 차지하는데 그친 실정이다.

[0005] 국내 재래가축 유전자원은 가축유전자원시험장과 관리기관에서 보존, 특성평가를 실시해 오고 있으나, 농기에서 오랜 세월 보존해온 일부 자원은 관련규정을 충족하지 못해 국가가 체계적으로 관리하고 있지 못한 실정이며 특히 연산오계, 현인흑계, 약닭, 황봉은 고문헌, 서화에 나타난 것으로 농가가 수집하여 20년 이상 계통 사육하면서 종 보존을 위한 노력을 하고 있다. 이와 관련하여 농촌진흥청에서는 2012년에 국제연합 식량농업기구(FAO)의 가축다양성정보시스템(Domestic Animal Diversity Information System)에 연산오계, 현인흑계, 약닭, 황봉을 비롯한 5축종 24품종을 추가 등재하였다.

[0006] 따라서 국내 재래닭의 새로운 품종을 개발할 뿐만 아니라 이를 유전적으로 보호하기 위한 필요성이 있다. 한편, 한국공개특허 제10-2007-0051594호는 한국 재래닭의 탈공역단백질 유전자 변이지역을 이용한 선발육종에 대한 것으로서, 한국 재래닭의 UCP 유전자 내의 염기변이 지역 10개를 검출하고 경제형질간의 연관성을 분석하였으나, 구체적으로 연산오계 등과 같은 국내의 특정 품종을 구별하기 위한 유전자 마커들을 다양하게 개시하고 있지 않다.

[0007] 즉 아직까지 재래종을 효과적으로 유전적으로 판별할 수 있는 유전자 마커에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았으며, 재래닭의 순수한 유전적 판별 및 이를 이용한 품종 보존을 위한 연구가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 재래닭 품종을 특이적으로 판별할 수 있는 유전자 마커에 대해 연구하던 중 연산오계 특이적으로 발현이 변화하는 총 5종의 유전자 마커를 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명은 연산오계를 판별하기 위한 닭 품종 판별용 조성물, 키트 및 이를 이용한 닭 품종 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 이루어진 바이오 마커, 상기 유전자에 특이적인 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 닭 품종 판별용 조성물을 제공한다.

- [0011] 또한 본 발명은 서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 이루어진 바이오 마커, 상기 유전자에 특이적인 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 닭 품종 판별용 키트를 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자에 상보적인 핵산 서열이 집적된, 닭 품종 판별용 마이크로 어레이 칩을 제공한다.
- [0013] 또한 1) 닭으로부터 유전자 시료를 얻는 단계; 2) 제1 단계의 시료에서 서열번호 4내지 서열번호 8에서 선택되는 하나 이상의 유전자 발현 정도를 비교하는 단계; 를 포함하는 닭 품종 판별 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 닭 품종 판별용 조성물, 키트 및 방법은 간편한 공정을 통해 천연기념물 재래닭 품종인 연산오계를 판별해 낼 수 있으므로, 연산오계의 품종 연구 및 보전, 잡종화된 재래닭 중 연산오계의 품종 구별 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 CRLF2(서열번호 5)의 연산오계 특이적 과발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다(WL: 화이트레그혼, YO: 연산오계, HIBL: 현인흑계, HB: 황봉, HY: 황성약닭).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 서열번호 4 내지 8 에서 선택되는 하나 이상의 유전자로 이루어진 바이오 마커, 상기 유전자에 특이적인 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드, 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 닭 품종 판별용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명에 있어서 상기 닭은 연산오계인 것이 바람직하다.
- [0018] 본 발명의 서열번호 4 내지 8에서 선택되는 하나 이상의 유전자는 연산오계에서 발현이 특이적으로 변화됨으로써, 화이트 레그혼과 같은 비 재래종과, 다른 재래종, 예컨대 황성약닭, 현인흑계, 황봉으로부터 천연기념물인 연산오계를 손쉽게 판별해 낼 수 있도록 한다.
- [0019] 상기 서열번호 4 내지 8에서 선택되는 하나 이상의 유전자들은 단독으로 사용하여 닭 품종 판별에 사용될 수 있으나, 이를 조합하여 사용하는 경우 닭 품종 판별의 정확도는 더욱 향상될 수 있다.
- [0020] 상기 유전자에 특이적인 핵산 또는 올리고 폴리뉴클레오타이드는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, DNA 및/또는 RNA 등의 유전자와 상보적인 서열을 갖거나, 혼성화가 가능하다.
- [0021] 상기 프라이머는 템플레이트(template)와 상보적으로 결합할 수 있고, 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 템플레이트의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 특정 유전자의 핵산 서열에 상보적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 갖는다. 상기 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 다른 염기 서열을 포함할 수도 있다. 프라이머는 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.
- [0022] 상기 프로브는 표적 핵산과 부분적으로 또는 완전히 상보적인 핵산 가닥으로서, 표적 핵산과 염기 특이적인 방식으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직하게는, 표적 핵산에 완전 상보적인 올리고뉴클레오타이드이다. 상기 프로브는 핵산뿐만 아니라, 펩티드 핵산을 포함한 상보적 결합을 할 수 있는 종래 알려진 임의의 핵산 유도체가 포함된다. 상기 프로브와 표적 핵산의 결합 (일반으로, 혼성화라고도 함)은, 서열 의존적으로 일어나는 것으로 다양한 조건에서 수행될 수 있다. 일반적으로 혼성화 반응은 특정한 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 T_m 보다 약 5℃ 낮은 온도에서 이루어진다. 상기 T_m 은 표적 서열에 상보적인 프로브의 50%가 표적 서열에 결합한 상태를 의미한다. 혼성화 반응 조건의 예는, pH 7.0 내지 8.3, 0.01 내지 1.0M Na⁺ 이온 농도일 수 있다. 또한, 표적 핵산과 프로브의 특이성을 높이기 위하여, 표적 핵산과 프로브의 결합을 불안정하게 하는

조건, 예를 들면, 높은 온도, 높은 농도의 불안정화제(예를 들면 포름아미드)의 존재 등을 피하여 수행될 수 있다. 상기 프로브의 길이는 표적 핵산과 서열 특이적으로 결합할 수 있는 것이며, 어떠한 길이의 폴리뉴클레오타이드도 포함된다. 예를 들면, 상기 프로브의 길이는, 10 내지 200 뉴클레오타이드, 10 내지 150 뉴클레오타이드, 10 내지 100 뉴클레오타이드, 10 내지 50 뉴클레오타이드, 또는 전장 유전자의 일 가닥의 길이일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 프로브는 검출가능한 표지로 표지된 것일 수 있다. 상기 검출 가능한 표지는 SYBR Green I 또는 각종 프로브(TaqMan Probe)의 5'-말단에는 형광물질인 FAM, 3'-말단에는 quencher인 TAMRA로 표지하고 이에 국한하지 않는다. Cy3 또는 Cy5와 같은 형광표지, 방사성 물질표지, 기질을 발색 물질로 전환시키는 효소 등이 포함되나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 프로브 또는 프로브 세트는 마이크로어레이에 고정화되어 있는 것일 수 있다.

[0024] 시료 중의 바이오마커는 상기 마이크로어레이 중의 상기 프로브와 혼성화되고, 그 혼성화 결과를 측정함으로써 그 존재 여부 및 농도가 측정될 수 있다. 혼성화 과정 중 상기 표적 핵산은 검출가능한 표지로 표지될 수 있다.

[0025] 상기 항체는 항원의 항원 결정기(epitope)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미하며, 다클론 항체, 단일 클론 항체 및 재조합 항체를 포함한다. 상기 항체는 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 다클론 항체는 본 발명의 마커 유전자가 코딩하는 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 다양한 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0026] 본 발명의 "연산오계 (Yeonsan Ogye)"는 일본의 오골계와는 구별되는 재래 품종이며 연산 화악리의 오계라는 명칭으로 천연기념물 제265호로 등재되어 있는 품종이다. 주로 충청남도 논산시 연산면 화악리에서 사육되고 있으며, 몸이 전체적으로 검으며, 뼈와 눈자위까지 모두 검은 색을 나타내는 특징이 있다.

[0027] 본 발명의 유전자는 유전자를 수득할 수 있는 다양한 생체 시료로부터 제한없이 수득할 수 있으나, 본 발명의 일 구현예에서는 간 시료로부터 추출될 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 또한 본 발명은 상기 닭 품종 판별용 조성물을 포함하는 닭 품종 판별용 키트를 제공한다.

[0029] 상기 키트는 핵산 또는 항체 이외에 유전자 발현량이나 발현 패턴의 분석 방법 또는 단백질 존재량이나 존재 패턴의 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트가 유전자의 발현량이나 발현 패턴을 검출하기 위한 키트인 경우에는, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 키트일 수 있으며, 이러한 RT-PCR 키트는 바이오마커 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 구체적인 실시 양상에 따라 예를 들어 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPCwater), 멸균수, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 키트가 단백질의 존재량이나 존재 패턴을 검출하기 위한 키트인 경우에는, 이 키트는 예를 들어 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 키트일 수 있으며, 이러한 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 성분들, 예를 들어 표지된 2차 항체, 발색단 (chromophores), 효소 (예를 들어, 항체와 접합된 효소) 및 그의 기질, 및 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체 등을 포함할 수 있다. 구체적인 실시 양상에 따라서는, 상기 키트는 DNA 마이크로어레이 또는 단백질 마이크로어레이를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 유전자 발현량 또는 발현패턴은 DNA 마이크로어레이 뿐 아니라 해당 유전자의 전사로 인해 생성된 mRNA 양이나 패턴을 확인하는 통상적인 생화학적 분석 방법으로 검출될 수 있다. 이러한 mRNA의 양이나 패턴을 확인하기 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay), 노던 블랏(Northern blot) 등이 있으며, 그 외에도 당업계에서 통상적으로 수행되는 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다.

[0031] 바람직하게는, 본 발명에서 유전자 바이오마커의 발현 패턴의 확인은 마이크로어레이법, 보다 바람직하게는 DNA 마이크로어레이법을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한 상기 기재된 하나 이상의 유전자로 이루어진 바이오마커의 핵산 서열; 그에 상보적인 핵산 서열이 집적된, 닭 품종 판별용 마이크로어레이 칩을 제공한다.

- [0033] 본 발명은 또한 1) 닭으로부터 유전자 시료를 얻는 단계; 2) 제1 단계의 시료에서 서열번호 4 내지 서열번호 8에서 선택 되는 하나 이상의 유전자 발현 정도를 비교하는 단계; 를 포함하는 닭 품종 판별 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 방법은 유전자 정보를 이용하여 닭의 품종을 높은 정확도를 가지고 분류할 수 있으며, 육안으로 분류가 어려운 닭의 품종 구별, 잡종 닭에서의 닭의 품종 구별에 있어서 매우 높은 정확도로 닭을 분류해 낼 수 있는 장점이 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 중 SNORA5(서열번호 4), CRLF2(서열번호 5), DETY01(서열번호 6), DETY02(서열번호 7)의 발현이 증가한 경우, 상기 닭을 연산오계인 것으로 판정할 수 있다.
- [0036] 또한 상기 유전자 중 MIR1803 (서열번호 8)의 발현이 감소한 경우, 상기 닭을 연산오계인 것으로 판정할 수 있다.
- [0037] 상기 언급된 서열번호 4 내지 8의 유전자 마커들은 단독으로 사용될 수 도 있으나, 2종 이상의 조합으로 사용되는 경우 보다 정확한 품종 판별능력을 제공하며, 다양한 품종의 닭들을 한번에 판별해 낼 수 있는 장점이 있다.
- [0038] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이하 본 발명을 실험예 및 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예로만 한정되는 것은 아니다.
- [0039] **실험예 1. 재래닭 유래 RNA 수득**
- [0040] 재래닭 4계통을 사육중인 농가로부터 재래닭인 연산오계, 황봉, 황성약닭, 현인흑계의 종란을 제공받아 인공 부화시켰으며, 서울대학교 농생명대학 부속실험목장의 표준 프로토콜에 따라 사육하였다. 사육된 재래닭 중 대사와 생장이 활발한 13주령 암탉을 대상으로 간조직을 채취하였으며, 채취된 간 조직을 -80℃에 보관하였다. 이후 TRIzol시약(Thermo Scientific)을 이용하여 제조사에서 권장하는 프로토콜에 따라 상기 채취한 간조직에서 전사체(total RNA)를 분리 및 정제하였다. 보다 구체적으로 전사체 분리 및 정제를 위하여 다음과 같은 공정을 거쳤다.
- [0041] 1단계는 조직분쇄(tissue homogenization) 단계으로써 조직균질기(tissue homogenizer)로 TRIzol 시약에 담긴 간조직을 물리적 힘으로 파쇄하여 수행하였다. 2단계는 층분리(phase separation) 단계로써, 파쇄된 간조직이 담긴 TRIzol 시약에 클로로포름(Chloroform)을 처리하고 원심분리하여 RNA층을 분리하였다. 3단계는 RNA 침전 및 수세 단계로 100% 이소프로판올을 처리하여 총 RNA를 침전시킴으로써 추출해내고 70%(v/v) 에탄올(EtOH)를 처리하여 불순물을 제거하였다.
- [0042] 상기 공정을 통해 추출된 전사체에 DNase I을 처리하여 잔여 DNA를 모두 제거하였고 다시 70%(v/v) 에탄올을 처리하여 불순물을 제거하였으며, 최종적으로 순수한 RNA 만을 정제 수득하였다.
- [0043] **실시예 1.**
- [0044] **1.1 RNA 전사체의 발현도 분석**
- [0045] 상기 실험예 1에서 얻어진 정제된 전사체는 Nanodrop(Thermo Scientific) 기기를 이용하여 260nm 파장의 흡광도를 측정함으로써 그 양과 순수도 수치를 얻어냈고, 이를 기반으로 500 ng을 포르말데하이드 아가로오스(formaldehyde agarose, FA) 겔에 전기영동 하여 그 양과 질을 확인하였다. 전사체를 Affymetrix® GeneChip® Chicken Gene 1.0 ST Array에 혼성화시켜 그 발현도를 측정하였고 프로토콜은 Affymetrix에서 제시하는 방법에 따라, Affymetrix® WT PLUS Reagent Kit를 이용하여 실시했다.
- [0046] 보다 구체적으로 순수 RNA로 이루어진 전사체 100 ng에 Affymetrix® WT PLUS Reagent Kit에서 제공하는 Poly-A RNA Control Diluant와 First-Strand Buffer Mix 및 First-Strand Enzyme Mix를 섞어서 25℃에서 1시간, 42℃에서 1시간, 4℃에서 2분간 방치하여 First-strand cDNA를 만든다. 그 후 Second-Strand Buffer Mix와 Second-Strand Enzyme Mix를 섞어 넣고 16℃에서 1시간, 65℃에서 10분, 4℃에서 2분간 방치하여 Second-strand cDNA를 만든다. 그 후 IVT Buffer Mix와 IVT Enzyme Mix를 섞어 넣고 40℃에서 16시간 방치하여 *in vitro* 전사 반응을 일으켜 cRNA를 증폭시켰다. 그 후 cRNA 샘플은 정제 비드에 처리하여 추출하였으며 80%(v/v) 에탄올에 수

세하여 순수 cRNA만을 수득하였다. 얻어진 순수 cRNA 15 μ g에 Second-Cycle 프라이머를 넣고 Second-Cycle ss-cDNA 완충액과 Second-Cycle ss-cDNA 효소를 섞어서 25℃에서 10분, 42℃에서 90분, 70℃에서 10분간 방치하여 Second-Cycle Single-Stranded cDNA를 제조하였다. 그 후 RNase H를 넣고 37℃에서 45분, 95℃에서 5분, 4℃에서 2분간 방치하여 cRNA 주형을 제거해주었다. Second-Cycle ss-cDNA는 정제 비드에 처리하고 100%(v/v) 에탄올을 섞어 넣어 추출하고 80% (v/v) 에탄올로 수세하여 순수 ss-cDNA만을 얻어냈다. 5.5 μ g의 ss-cDNA에 10X cDNA Fragmentation Buffer와 UDГ, APE1을 섞어서 37℃에서 60분, 93℃에서 2분, 4℃에서 2분 방치하여 ss-cDNA를 작은 조각으로 잘라낸다. 그 후 5X Tdt 완충액과 Tdt 효소, DNA 표지 시약을 섞어 준 후 37℃에서 60분, 70℃에서 10분, 4℃에서 2분간 방치하여 ss-cDNA의 3' 말단부분에 비오틴 표지를 하였다. 이렇게 완성된 타깃 중 3.5 μ g은 Control Oligo B2, 20X Hybridization Controls, 2X Hybridization Mix, DMSO와 함께 Affymetrix® GeneChip® Chicken Gene 1.0 ST Array에 주입되어 45℃에서 17시간 동안 혼성화 처리하였다.

[0047] 혼성화가 완료된 Array는 Affymetrix® GeneChip® Fluidics 450에서 Stain Cocktail 1, Stain Cocktail 2을 이용하여 염색시켰으며, 마지막으로 Array Holding 완충액에 안정화되어 GeneChip® Scanner 3000에서 어레이 이미지 스캔을 실시하였다. 혼성화 이후의 과정은 Affymetrix System을 통제하는 Affymetrix®GeneChip® Command Console (AGCC) Portal을 이용하여 수행하였다. 스캔이 완료된 어레이 이미지는 초기 DAT파일에서 자동 생성된 grid를 기준으로 CEL 파일로 변환시켰고 Affymetrix® GeneChip® Expression Console에서 robust multi array(RMA) 방식으로 Quantile normalization된 CHP파일을 생성하였다. 이 CHP파일을 이용하여 어레이 결과 평가를 수행하였다.

[0048] 어레이 결과평가는 CHP 파일의 신호로부터 pos vs neg auc 값이 0.8이상을 보이는지, RLE box plot의 median이 0에 위치하는지, 그리고 각 어레이 신호의 pm_mean, 양성 대조군, bacterial spikes, poly A spikes, mad_residual_mean, rle_mean 값 등이 일정한 분포를 보이는지를 통해 실시하였다.

[0049] 상기와 같은 혼성화 과정을 통해 전사체 발현도 데이터베이스를 구축하였으며, 구축된 데이터베이스에는 총 18,308개 유전자의 발현도가 포함된 것을 확인하였다.

[0050] 1.2 마커 유전자의 선별

[0051] 1.1에서 얻어진 전사체 발현도 데이터 베이스를 이용해 각 유전자의 ANOVA p -값을 얻었으며, 이의 FDR 값을 구하여 <0.05이하의 값을 가지는 유전자만을 선별하였다. 선별된 유전자 중 Tukey 방식의 사후검정 결과 연산오게, 황봉, 황성약담, 현인흑계 중 특정 하나의 계통에서만 다른 발현도를 보이는 유전자만을 다시 선별하였다. 상기와 같이 선별된 유전자를 이용하여 FC(Fold change) 계산을 수행하였으며, 그 절대값이 >1.5인 유전자들을 다시 선별하였다. 최종적으로 연산오게 마커 유전자로 사용할 수 있는 유전자를 재래종 선별 마커유전자로 도출하였다. 도출된 마커 유전자 및 대조군인 화이트레그혼 관련 유전자를 표 1에 나타내었다.

[0052] [표 1]

이름	설명	비고
MIR1719	microRNA mir-1719	서열번호 1
RNF144A	ring finger protein 144A	서열번호 2
DETWL1	Differentially expressed transcript white leghorn 1	서열번호 3
SNORA5	Small nucleolar RNA SNORA5	서열번호 4
CRLE2	cytokine receptor-like factor 2	서열번호 5
DETYO1	Differentially expressed transcript yeonsan ogye 1	서열번호 6
DETYO2	Differentially expressed transcript yeonsan ogye 2	서열번호 7
MIR1803	microRNA mir-1803	서열번호 8

[0053]

[0054] 1.3. 선별 마커를 이용한 연산오게 품종 구별

[0055] 상기 선별된 유전자 마커를 이용하는 경우 표준 대조군으로 사용될 수 있는 화이트 레그혼으로부터 재래닭 품종인 연산오계를 구별할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 각 유전자 마커들의 발현이 화이트 레그혼에서와 상이한 발현 특징을 나타내는지 여부를 확인하였다. 화이트 레그혼(WL)과 연산오계(YO) 품종에 속하는 총 3 마리의 개체에서 표 1의 8개 유전자 발현도 값을 비교 분석하였으며 그 결과를 표 2 및 표 3에 나타내었다. 표 2에 나

타넨 발현도 값은 log2 scale로 나타내었다. 표 3에서는 8개 마커 유전자의 FC 값, ANOVA p-값, FDR, Tukey 사후검정 값을 나타내었다.

[표 2]

이름	WL.1	WL.2	WL.3	YO.1	YO.2	YO.3
MIR1719	5.147	5.611	4.928	5.895	6.255	6.134
RNF144A	4.825	4.980	4.954	5.659	5.888	5.859
DETWL1	7.933	7.619	8.142	6.424	6.681	6.020
SNORA5	6.353	6.096	6.936	9.895	10.255	10.413
CRLF2	4.619	4.242	4.744	6.957	7.238	6.436
DETY01	9.063	9.329	9.309	10.396	10.215	10.119
DETY02	4.568	4.774	4.407	5.235	5.544	5.733
MIR1803	4.957	5.177	5.105	4.260	4.175	3.980

[표 3]

이름	품종	Fold change (FC)	ANOVA	FDR	Tukey's post hoc test				
		WL-YO			WL	YO	HIBL	HB	HY
MIR1719	WL	1.8	5.0E-04	0.048	b	a	a	a	a
RNF144A	WL	1.8	3.6E-04	0.043	b	a	a	a	a
DETWL1	-WL	-2.9	5.2E-05	0.019	b	a	a	a	a
SNORA5	YO	13.2	4.2E-06	0.007	a	b	a	a	a
CRLF2	YO	5.1	1.9E-05	0.012	a	b	a	a	a
DETY01	YO	2.0	5.2E-04	0.048	a	b	a	a	a
DETY02	YO	1.9	4.8E-04	0.047	a	b	a	a	a
MIR1803	-YO	-1.9	2.9E-05	0.015	a	b	a	a	a

상기 표 2 및 표 3에서 확인되는 바와 같이, RNA 발현이 각 연산오계 특이적으로 현저하게 증가하거나 감소하는 마커들이 확인되었으며 이를 통해 연산오계를 유전자 수준에서 정확하게 분리해낼 수 있음을 확인하였다. 보다 구체적으로 연산오계(YO)에서는 SNORA5 (서열번호 4), CRLF2 (서열번호 5), DETY01 (서열번호 6), DETY02 (서열번호 7) RNA 발현이 특이적으로 증가하였고, MIR1803 (서열번호 8)의 RNA 발현이 특이적으로 감소하였다.

이 중 CRLF2 유전자를 마커로 하여 이용하는 경우 화이트레그혼, 현인흑계, 황성약닭, 황봉으로부터 연산오계를 특이적으로 판별할 수 있는지 여부를 확인하였으며, 각 닭 품종에서의 CRLF2 유전자의 발현은 하기 표 4 및 도 1에 나타내었다.

[표 4]

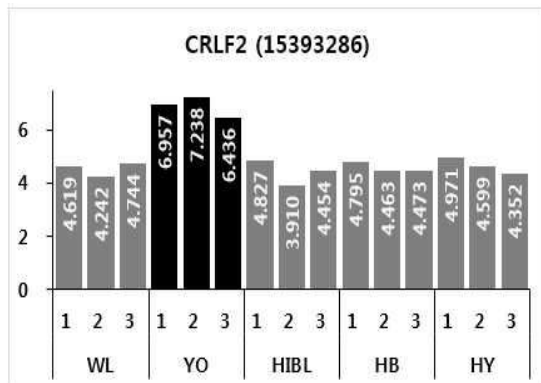
	화이트레그혼(WL)			연산오계(YO)			현인흑계(HIBL)			황봉(HB)			황성약닭(HY)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
CRLF2	4.619	4.242	4.744	6.957	7.238	6.436	4.827	3.91	4.454	4.795	4.463	4.473	4.971	4.599	4.352

표 4 및 도 1에 나타낸 바와 같이, CRLF2 유전자의 발현은 연산오계 특이적으로 과발현되었으므로, 이를 마커로 하여 다양한 외래종 및 재래종 닭으로부터 연산오계를 판별해 낼 수 있음을 확인하였다.

상기와 같이 다양한 연산오계에서 특이적으로 발현이 변화되는 마커들이 확인되었으므로 상기 유전자 마커의 증감을 확인하여 연산오계의 품종을 유전적으로 빠르게 구별할 수 있다.

도면

도면1



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition for discrimination of Yeonsan Ogye

<130> KOU1-56

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 88

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 1

ttgagaagta ctgttttga ccaaaagatg atgagttgct gatgtgcttt gtcgaggtaa 60

cgctgtttcc tgggtgcagt atcgttta 88

<210> 2

<211> 872

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 2

tggttgaat ctttgcagga tttgtcttc tacttttggg ggctccct ttccttttac 60

ttgtacacc attgttctg tgctgcaagt gcaaatgtaa taaaggagat gacgaccctc 120

tacctactta gatgactttc tctcataca ttatgacaaa ggaccttgct gaaataagct 180

gggacactcc agggcatctg ttatctggca cagaacacag tccatgttta aaatggaaga 240

agacgatgct ccaatcaagc gctgtccaaa gtgtaaagtt tacattgaac gagatgaggg 300

ttgtgcccag atgatgtgta agaactgcaa acatgccttt tgctgggtact gtctggaatc	360
tctcgatagt gcttttggat ccctgtcgga ctgggtgtcc atcctctact tgccaagcag	420
tttgccagct ccaggaatca agcccacaga accctcagct ggtccagtgc aaagcctgtg	480
acattgagtt ctgctctgtt tgcaaatcta attggcatcc aggtcaaggc tgtcaggaga	540
acatgccaat ctcttttctt ccaggagaaa caagttgagt gcatggttgc atcagaaatc	600
atgcagaggt ataagaaact acagtttgaa agaggcctaa aacagtatgt ggaacttttg	660
atcaaagaag gtctagaaac ggcaatcagc tgccctgatg ctgcctgtcc aaagcgaggt	720
catttgcaag aaaaatgagt actacagcaa gatataggcc tacctgggac ttggtacttg	780
acccttagt gtctgcaag ctctgccttg gtgaatatcc tgtggagcag atgacaacaa	840
tagcacaatg ccaatgcatc ttctgtactc tg	872
<210> 3	
<211> 916	
<212> DNA	
<213> Gallus gallus	
<400> 3	
tttgagctgc gaggtggagg ccaatgtgcg tacctgaatg gggacaggat cagctcagcc	60
ctatgccaca atgagaaatt ctgggtgtgc agcactgtg acagctacgt ccgctggaag	120
cagaaggcat taccagatta agcgatccca tcagcactga ggtcgttgca agtctgtctg	180
gcactgcaaa gccatcggt aatccttcca tctgcctctt tccagcactc ctgcacttgg	240
ctctgcata aaacacacag atctgtcctt cattaaactt ccggcacttc atctgttctt	300
ctgtgcctta aaggaggagg tctgtgagag tccttgaagg tcacagcccc acagaatgtt	360
cccacggtgc tgettactgc agccagacc gagggtaggg gtatttctgc tttcctttcg	420
ggctctgtgt gacatcgctg tgccacaaat gtgtcacatg aaggtagcgt cactccaatt	480
catgtgcgg taccggggcc cagcaaatg ttggattggg ctgcacaggg cagaagggga	540
cgagcactgg acatgggccc atggcagcgc cttaccaac tggtccagc gtccgtcgtg	600
ctcacctgc ccaccttct cccacgtgtg ccccaacacc tcaatcggtt tccaaggga	660
atgtattat ttctcgaca cggagagtga ttggaacagc agcaggagc actgccaccg	720
cctcggagct tccctggcta ccatagagac ggacgaggag atgtaggct ccagatgcag	780
tgagctgaga cagaacaggc gccgcgtgct ctgcgtggct ttgtgtgcag tgccgtgcat	840
ccttgtttgc gcgtggtgg ccgtgatagt cccgccccg agaggcgac acgcgcgaag	900
gagacaaaga acggca	916

<210> 4

<211> 137

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 4

gcagcccagt caaatcagct ctctgcctcc tccatggcga gcactggcca tccggtgcc 60

acagcaacat ctgtagtcca tgggccccac gtccccaccc atgggaccct ggggataaaa 120

tcgtgccaca gacactg 137

<210> 5

<211> 1049

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 5

aatggataga taaaactgat catgcagtgg tgcaaaccaa attagaatat gaagaacctg 60

aatgcatcat cgaggaagaa aaccagcaaa tagacaagaa aagtgacaat caggaacctg 120

gggaaaaaat cttcagcttt tcacaattaa ctggaaataa cagtcccaaa gcagctcaca 180

atgcctgcct ggtgccaaaca ttcaataata tggtttcttt tgctggcctc cagaatgtag 240

tgaatgatga cacgtatgtg atgttacttc aaaaatctgt catgcctact ataccagatc 300

caaaatatgt atttactgat ctcttcaaca atcataatgg aaacttccag ttcattgat 360

gatgaaataa aaaccagtc aaacacagta attcttttaa gttgtttgat gacactactt 420

ctaattggtat ttatcctctt gattcttctg tgtaaatggc agagccagaa cttctaagt 480

ttgcagagtt ggagagcaag gctttgatcc aaggaaatgc tattcttttc gggtcagact 540

gaagaggata gtacctctt gcaacgtagt tgattacagc agtgactggg aagcagaaac 600

atattggatg aatagcacat tattagaaag ccaatcgac cagaaaatgt gaccttcttc 660

tggaaggatg aactgttac tgttacatgt aataaaccag aaaaaggtgt gaagtgttg 720

agacttgagc ttcaatacaa aagcaaatat gacaaaggat ggcaatttga agaaggcaag 780

caaaaatctt ggaaaacatg tcccacatat ctactgacac aaggctataa tacaggatgt 840

ctttttaaga cagatggata cacccttgct ttctctatca tgaacaccaa tggaagtga 900

gagctttttt ctaaaagatt gaaatctgat ttctacagtc agaaagatgc catcaacacc 960

acaataatca atttcaataa tgagaaaatg cagatcacgt gggcaacaag caaactattc 1020

tctggcaaga atgtgtcatt ttattatac 1049

<210> 6

<211> 154
 <212> DNA
 <213> Gallus gallus
 <400> 6
 tacatccggt actcccagat ctgcgctcag gttgtcagag cggcgatgaa gcctcagtac 60

 aaagctgagg cggagagggc ggcaacggcg tccgtgaaga ttgtgaagac caagaaggag 120
 tagtggtggc gtactggcgg caggccggac tcag 154
 <210> 7
 <211> 566
 <212> DNA
 <213> Gallus gallus
 <400> 7
 atacatgagt atctgacaga taacctttga aatggaggca cagaagcadc ctggctctgac 60
 agctgcacca gcagaccagc cacttccaac ctcttctctt cagcctgcac agggtccttc 120
 agctctctgc caaagcagtg tggttcctcc acaggaacaa gcactgtctc aacctgtgta 180
 tctaaaagcc ctcacatcc cctgtacca gcctgtccag ccaggatgct ttcagccaag 240

 cagtcagcta gtggctggca ggagctgtgg aaacctggat agcagtaaca tacctctgat 300
 cctgaaccca ctgttctctt ccgaaggcac agatcagccg cagtcagtgt ttcagaaaca 360
 acttgggcaa actctaacat tgaacatagt gagcacttta ccagttttat catccccaaa 420
 ttcttctgcc aacgcaccca ttggaagccc aggaaaatca aaaaatgctg ggaaatatat 480
 ctgtaagcac tgcggtcgag actgtttgaa gccaaagtgc cttgagaaac atatccgctt 540
 ttgctgaaat gtgtgcctca ataaca 566
 <210> 8
 <211> 88
 <212> DNA

 <213> Gallus gallus
 <400> 8
 gacttagggc atgatccaga gcccatgtga gtcaatggga gtctttttcc attgaattca 60
 gcgggggtttg gatcaggcct ttacttcc 88