



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월27일
(11) 등록번호 10-1160794
(24) 등록일자 2012년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0138839
(22) 출원일자 2011년12월21일
심사청구일자 2011년12월21일
(56) 선행기술조사문헌
BMB Rep. 2008 Jan 31:41(1):29-34.

- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동,
충남대학교)
충청남도
대전광역시 중구 중앙로 101
- (72) 발명자
송석오
대전광역시 서구 괴정동 124-27
최종덕
대전광역시 중구 태평2동 파라곤아파트 304동
2302호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유병선

전체 청구항 수 : 총 5 항

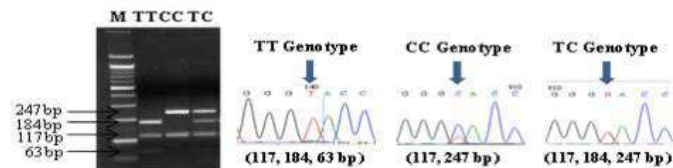
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **한우의 지방산 조성을 확인하기 위한 F A B P3 유전자의 마커 및 이를 이용한 한우의 선별 방법**

(57) 요약

본 발명은 한우의 지방산 조성을 확인하기 위한 유전자 마커 및 이를 이용한 한우의 선별 방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 서열 번호 1의 한우 FABP3 유전자 엑손 1의 21번째 염기에서의 단일염기다형을 마커로 하여 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하는 방법이 제공된다. 본 발명은 바람직한 지방산 조성을 가진 고품질 육질을 지닌 한우의 생산과 선별을 가능하게 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

유승희

대전광역시 서구 관저2동 관저리슈빌아파트 107동
301호

이정배

충청남도 홍성군 홍북면 상하리 373-3

이준현

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 103동 606
호

조철훈

대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 127동 803
호

디아마하라니

대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교

정우영

대전광역시 서구 내동 롯데아파트 103동 506호

특허청구의 범위

청구항 1

서열 번호 1의 한우 FABP(Fatty Acid Binding Protein)3 유전자 엑손 1의 21번째 염기에서 TT형, CC형 또는 TC형으로 나타나는 단일염기다형을 마커로 하여, 이 중 TT 유전자형일 때 불포화지방산 함량이 높은 한우로 판단하는 것을 포함하는, 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

- i) 한우의 게놈 DNA 샘플을 추출하는 단계;
- ii) 프라이머를 사용하여 21번째 염기에서 단일염기다형을 포함하는 서열 번호 1의 유전자 마커를 PCR 증폭시키는 단계;
- iii) PCR 증폭 산물을 제한효소로 분해하는 단계; 및
- iv) 제한효소 분해 산물을 전기영동하여 단편의 수 및 크기를 확인하여 서열 번호 1에 기재된 유전자 마커의 21번째 염기의 유전자형을 확인하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머는 서열 번호 3과 서열 번호 4의 프라이머이며, 상기 제한효소는 *RsaI*인 방법.

청구항 5

21번째 염기에서 TT형, CC형 또는 TC형으로 나타나는 단일염기다형을 포함하는 서열 번호 1의 유전자 마커를 증폭시키기 위한 프라이머를 포함하며, 상기 단일염기다형이 TT 유전자형일 때 불포화지방산 함량이 높은 한우로 판단하는, 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하기 위한 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 프라이머는 서열 번호 3과 4의 프라이머인 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 한우의 지방산 조성을 확인하기 위한 유전자 마커 및 확인 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 한국의 쇠고기 소비 동향은 고기의 양에서 고기의 질로 점차적으로 바뀌어가고 있다. 1992년에 발표된 쇠고기 등급 체계는 마블링(marbling), 육색, 지방색, 연도 그리고 성숙도를 고려하고 있다(Kie 1994년). 그 밖에 고기의 선택시 지방산(FA: Fatty Acid)의 구성은 건강을 생각하는 소비자에게 매우 중요한 요소로 작용을 하고 있다. 특히 소고기는 돼지고기와 닭고기에 비해 포화 지방산의 함량이 높아서 불포화 지방산을 선호하는 소비자의 관심을 끌지 못하고 있다.

[0003] 사람이 섭취하는 지방산은 그 종류에 따라 심장 혈관 질환, 콜레스테롤 상승 및 당뇨병과 같은 질병의 위험에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lichtenstein, 2006). 특히 라우르산(C12:0), 미리스트산(C14:0)과 팔미

트산(C16:0) 등과 같은 포화지방산(SFA: Saturated Fatty Acids)의 과다 섭취는 심장 혈관 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다(Keys et al., 1974). 이와 반대로 고도불포화지방산(PUFA: Polyunsaturated Fatty Acid) 및 단가불포화지방산(MUFA)의 많은 섭취는 간 저밀도 지단백질 (LDL) 수용체 활동을 증가시켜, LDL 콜레스테롤의 순환농도를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Woolett et al., 1992).

- [0004] 가축에서 지방산의 조성은 고기 품질을 좌우하는 가장 중요한 척도중 하나로 알려져 있으며, 지방산의 조성은 지방의 악취, 연도 및 풍미와 같은 특성에 영향을 미친다(Wood et al., 2008). 또한 MUFA는 쇠고기 풍미 향상 및 연도에 작용하는 것으로 알려져 있다(Melton et al., 1982; Smith et al., 2006). 한우에 있어서 지방산 조성의 추정 유전력은 0.35에서 0.85로 현저하게 높은 것으로 보고되어 있다(Park et al., 2002). 이러한 높은 유전력은 지방산 조성이 적절한 선발에 의해 개량될 수 있음을 의미하기도 한다. 따라서, 바람직한 지방산 조성을 포함한 고품질 육질을 지닌 가축의 생산과 선발은 생산자와 연구자들의 중요한 개량의 목적이 되어왔다.
- [0005] 한편, 지방산 결합 단백질 (Fatty Acid Binding Protein) 3(FABP3) 유전자는 소수성 리간드-결합 단백질의 슈퍼유전자(supergene) 계열에 속하며, 이 유전자는 세포막에서 세포내로 지질을 부착해서 운반하는 중요한 역할을 한다. 또한 이 유전자는 지방산 물질 대사의 항상성(생체 내의 균형을 유지)을 통제하는 것으로 알려져 있다(Veerkamp and Maatman 1995). 이러한 FABP3 유전자의 다형현상이 한우의 등지방 두께와 연관된다는 보고는 있으나(Cho et al., 2008), 아직 어느 연구에서도 한우의 지방산 조성과 FABP3 유전자의 관련성은 조사되지 않았다.
- [0006] [참고문헌]
- [0007] Chamarry, J.V., and Hurst, L.D. 2009. The price of silent mutation. Scientific American June, 46-53
- [0008] Cho, S., Park, T.S., Yoon, D.H., Cheong, H.S., Namgoong, S., Park, B.L., Lee, H.W., Han, C.S., Kim, E.M., Cheong, I.C., Kim, H., Shin, H.D., 2008. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. BMB Rep. 41, 29-34.
- [0009] Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- [0010] Keys A., Grande, F., Anderson, J.T., 1974. Bias and Misrepresentation revisite perspective in saturated fat. Am. J. Clin. Nutr. 27,188-212.
- [0011] Kie-Jun Na., 1994. The development of cattle production in Korea. Livestock Experiment Station, Rural Development Administration, Republic of Korea. Publication database of Food & Fertilizer Technology Center for The Asian and Pasific Region.
- [0012] Lichtenstein, A.H., 2006. Thematic review series: patient-oriented research. Dietary fat, carbohydrate, and protein: effects on plasma lipoprotein patterns. J. Lipid Res. 47, 1661-1667.
- [0013] Melton S.L., Amiri M., Davis G.W., and Backus W.R., 1982. Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass-, forage-, grain and grain-finished steers. J. Anim. Sci. 55, 7787.
- [0014] Park, N.H., Lee, S.S., Jeong, J., Lee, J.W., Won, Y.S., 2002. Effect of sire on the fatty acid composition of intramuscular fat in Hanwoo bulls. Proceedings of the 7th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August 2002, session 2, 0-3.
- [0015] Smith S.B., Lunt D.K., Chung K.Y., Choi C.B., Tume R.K., Zembayashi M., 2006. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. Anim. Sci. J. 77, 478486.
- [0016] Veerkamp, J.H., Maatman, R.G., 1995. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. Prog. Lipid Res. 34, 17-52.
- [0017] Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. Meat Sci. 78, 343-358.

- [0018] Woollett, L.A., Spady, D.K., and Dietchy, J.M., 1992. Saturated and unsaturated fatty acid independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. J. Lipid Res. 33, 77-88.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 본 발명자들은 한우의 지방산 조성과 관련된 유전자 마커를 찾기 위한 연구를 통해, FABP3 유전자의 엑손 1의 21 bp 위치에 단일염기다형(SNP:Single Nucleotide Polymorphism)이 존재하며 이 단일염기다형이 미리스트올레산(Myristoleic acid)(C14:1) 함량과 높은 연관성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 따라서, 본 발명은 한우의 지방산 조성을 확인하기 위한 유전자 마커의 제공을 목적으로 하며, 보다 구체적으로는 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하는 유전자 마커의 제공을 목적으로 한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 유전자 마커를 이용하여 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명에서는, 서열 번호 1의 한우 FABP(Fatty Acid Binding Protein)3 유전자 엑손 1의 21번째 염기(서열 번호 2의 PCR 생성물의 180번째 염기 위치에 해당)에서의 단일염기다형을 마커로 하여 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하는 방법이 제공된다.
- [0023] 본 발명자들은 “토바우” 상업용 한우 집단을 이용하여 한우의 지방산 조성과 관련된 유전자 마커를 찾기 위한 연구를 수행한 결과, 한우의 FABP3 유전자의 엑손 1의 21번째 염기 위치에 단일염기다형이 존재하며, 이 단일염기다형이 한우의 불포화지방산 함량과 상관관계를 가져 불포화지방산 함량이 높은 한우를 선별하기 위한 유전자 마커로서 이용가능함을 확인하였다.
- [0024] 상기 FABP3 유전자의 엑손 1의 21번째 위치의 단일염기다형은 개체에 따라 TT형, CC형 또는 TC형의 유전자형을 가지며, TT형을 가진 개체의 경우 미리스트올레산의 함량이 다른 유전자형에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 것으로 확인되었다.
- [0025] 이러한 결과를 토대로 본 발명에서는 서열 번호 1의 FABP3 유전자 엑손 1의 염기 서열에서 21번째 염기에서의 단일염기다형을 포함하는, 한우의 지방산 조성과 관련된 유전자 마커를 제공하며, 21번째 염기의 유전자형은 TT형, CC형 또는 TC형이다. 구체적으로 마커의 21번째 염기의 유전자형이 TT형일 경우 불포화지방산 함량이 높은 한우임을 나타내며, 유전자형이 CC형 또는 TC형일 경우 불포화지방산 함량이 낮은 한우임을 나타낸다.
- [0026] 또한, 본 발명에서는, 상기한 본 발명의 유전자 마커를 증폭시키기 위한, 서열 번호 3과 4의 염기서열을 갖는 프라이머 세트를 제공한다.
- [0027] F-5' GCCTGCTTAGGGCTTCCTAT 3' (서열 번호 3)
- [0028] R-5' ACCTTGACCAGGAGGGATG 3' (서열 번호 4)
- [0029] 본 발명의 방법은 i) 한우의 게놈 DNA 샘플을 추출하는 단계; ii) 프라이머를 사용하여 21번째 염기에서 단일염기다형을 포함하는 서열 번호 1의 유전자 마커를 PCR 증폭시키는 단계; iii) PCR 증폭 산물을 제한효소로 분해하는 단계; 및 iv) 제한효소 분해 산물을 전기영동하여 단편의 수 및 크기를 확인하여 서열 번호 1에 기재된 유전자 마커의 21번째 염기의 유전자형을 확인하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 프라이머는 서열 번호 3과 4로 이루어지며, 제한효소는 *RsaI*를 이용할 수 있다.
- [0030] 서열 번호 3과 4의 프라이머 세트를 이용하여 한우 FABP3 유전자 엑손 1을 PCR 증폭한 후 *RsaI* 제한효소를 이용하여 분해할 경우, 21번째 염기에서 TT 유전자형을 가진 개체의 경우, 63 bp, 117 bp와 184 bp의 3개 조각으로 절단되며, CC 유전자형을 가진 개체는 117 bp 및 247 bp의 2개 조각으로 절단되는 한편, TC형을 가진 개

체는 63 bp, 117 bp, 184 bp 및 247 bp의 4개 조각으로 절단된다(도 1). 따라서, PCR 증폭 산물의 제한효소 분해 산물의 전기영동에 의해 겔 상의 밴드의 수와 크기를 확인함으로써, DNA 샘플의 FABP3 유전자 엑손 1의 21번째 염기의 유전자형을 확인할 수 있으며 유전자형이 TT형으로 확인될 경우 이를 통해 불포화지방산 함량이 높은 한우임을 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 의해 확인된 한우의 FABP3 유전자의 엑손 1의 21번째 위치에 존재하는 단일염기다형은 한우의 불포화지방산 함량에 대한 지표 역할을 하여 우수한 지방 조성을 가진 한우를 쉽게 선별할 수 있도록 하며, 바람직한 지방산 조성을 가진 고품질 육질을 지닌 한우의 생산과 선발을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 한우의 FABP3 유전자 엑손 1에서 21번째 위치 염기의 유전자형에 따른 PCR 증폭 산물의 제한효소 분해 산물에 대한 겔 사진 및 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 실험예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 하기 실험예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐이며 본 발명을 실험예로 제한하고자 하는 것이 아님이 이해되어야 한다.

[0034] 실험예

[0035] 실험예 1. 한우의 지방산 분석

[0036] "토바우™"라고 불리는 충남 지역 한우 브랜드의 협조로 도살장으로부터 96개의 한우 등심 샘플을 수집하였다. 이들 가축은 전부 비육기간동안 동일 급이조건하에서 사육된 거세된 숫가축이었다. 이들 가축의 도살 일령은 약 30개월이고, 도살시까지 동일 사료를 먹었다. DNA 추출과 지방산 조성 분석을 위해 등심 샘플을 사용하였다.

[0037] 각 등심 샘플내의 총 지질은 클로로프름-메탄올을 이용하여 추출하였다(2:1, v/v) (Folch et al., 1957). FA 메틸 에스테르 (FAME)는 BF3 메탄올과 함께 추출된 지질로부터 준비하였다(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). FAME는 HP-6890N 가스크로마토그래프로 분리하였다(Hewlett-Packard, Palo Alto, USA).

[0038] 샘플을 오메가왁스(Omegawax) 320 30m x 0.25mm x 0.25μm 모세관 컬럼(capillary column)에 주사하기 위하여 균열 인렛(Split inlet) (균열비(split ratio), 50: 1)를 이용하였으며(Supelco, Bellefonte, USA), 램프(ramp) 오프의 온도는 다음과 같이 사용하였다: 150℃에서 3분 동안 유지시키고, 180℃에 이를 때까지 2.5℃/min으로 증가시키고, 5분 유지시키고, 다시 220℃에 이를 때까지 2.5℃/min으로 증가시키고, 그리고 25분 동안 유지시켰다. 인렛의 온도는 210℃였다. 공기는 운반기체로서 0.7 mL/min의 흐름을 유지했다.

[0039] 실험예 2. 유전자 분석 및 통계적 분석

[0040] 게놈 DNA 샘플을 등심 샘플에서 추출하였으며, 페놀추출에 의한 20 mg/ml 프로테이나제(proteinase) K 분해에 의해 추출하였다. FABP3 유전자 엑손 1은 소 FABP3 유전자의 염기 서열(GenBank Acc.No NC_007300)을 기초로 제작된 프라이머를 이용하여 게놈 DNA 샘플로부터 증폭시켰다. 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

[0041] F-5' GCCTGCTTAGGGCTTCCTAT 3' (서열 번호 3)

[0042] R-5' ACCTTGACCAGGAGGATG 3' (서열 번호 4)

[0043] PCR 혼합물은 50 ng의 게놈 DNA, 10X 버퍼혼합물 및 10 mM dNTP를 포함하였다(GenetBio, Korea). 증폭은 다음의 조건 하에서 실행하였다 : 94℃에서 10분, 35 사이클의 94℃ 30초 / 어닐링 온도인 58℃에서 30초/및

72℃에서 30초 그리고 최종 연장(final extension) 온도인 72℃에서 10분. 반응은 진앰프(GeneAmp) PCR 시스템 2700 (Applied Biosystems, US) 또는 C1000TM 썬멀 사이클러(Thermal Cycler) (BioRad, USA)를 사용하여 실행하였다. PCR 반응을 완료한 후에, 산물은 에티뮴 브로마이드 (GenetBio, Korea)로 염색한 1.5% 표준 아가로스 젤에서 관찰하였다. 각 PCR 산물은 아큐프렙(AccuPrep) PCR 정제 키트(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 자동화된 3730 XL DNA 시퀀서 (Applied Biosystems, US)에 PCR 반응과 동일한 프라이머를 사용하여서 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열은 바이오에디트(BioEdit) 프로그램 ver. 7.00으로 분석하였으며 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, California, USA), 단일염기다형(single nucleotide polymorphism)(SNP)은 전기영동다형 결과에 기초하여 확인하였다. 제한효소절편다형(RFLP)는 *Rsa*I 제한효소를 사용하여 FABP3 유전자의 유전자형 분석을 위해 사용하였다. 제한효소 절단은 PCR 산물 약 5 μ l와 각 제한효소 2 유닛이 포함된 20 μ l 반응 양에서 수행하였으며 절단된 산물은 3% 아가로스 젤에서 확인하였다.

[0044] 상기 서열 번호 3과 4의 프라이머 세트를 이용한 PCR에 의한 증폭 결과, 서열 번호 2의 서열을 갖는 364 bp의 PCR 산물이 얻어졌으며, 이 PCR 산물을 *Rsa* I 제한효소를 이용하여 절단한 결과, FABP3 유전자 엑손 1의 21번째 염기에서 TT 유전자형을 가진 개체는 63 bp, 117 bp와 184 bp 조각으로 절단되어 젤 상에서 3개의 밴드가 나타났고, CC 유전자형을 가진 개체는 117 bp 및 247 bp의 2개 밴드를 나타냈다. 한편, 이형접합체(heterozygote)(TC 유전자형)를 가진 개체는 63, 117, 184 및 247 bp의 4개 밴드를 나타냈다(도 1).

[0045] 상기와 같은 FABP3 유전자 엑손 1의 21번째 염기에서의 유전자형과 지방산 조성의 상관관계는 SPSS 버전 17.0 프로그램 (SPSS, USA)에서 GLM (일반적인 선형 모형)을 이용하여 시험하였다. 다음 통계 모형을 사용하여 유전자형과 지방산 조성의 연관성을 분석하였다:

$$Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_i$$

[0047] Y는 샘플 i의 표현형 데이터 (지방산 조성)이며, μ 는 전체 평균이며, G는 샘플 i의 유전자형이고 ε 는 오차이다. 유전자형간의 유의성은 Tukey's test로 수행하였다.

[0048] 이러한 통계 분석을 통하여 FABP3 유전자 엑손 1의 SNP g.21 T>C는 한우 TT 유전자형을 가진 개체에서 높은 미리스트올레산(C14:1; P=0.017)과 연관되어 있음을 확인할 수 있었으며, TT 유전자형의 미리스트올레산 값은 TC 유전자형과 CC유전자형의 값과 통계학적으로 유의하게 차이가 있었다(표 1).

표 1

지방산 조성에 관한 평균, 표준편차, FABP3 유전자형의 유의수준

지방산 조성	FABP3			P-값
	TT	TC	CC	
미리스틴산(Myristic acid) (C14:0)	3.102 ± 0.110	2.806 ± 0.103	3.297 ± 0.250	0.063
미리스틴올레산(Myristoleic acid) (C14:1)	0.786 ± 0.050 ^a	0.591 ± 0.047 ^b	0.755 ± 0.113 ^{ab}	0.017*
팔미트산(Palmitic acid) (C16:0)	25.786 ± 0.356	25.122 ± 0.333	26.669 ± 0.806	0.143
팔미트올레산(Palmitoleic acid) (C16:1)	4.184 ± 0.164	3.768 ± 0.153	3.986 ± 0.371	0.185
스테아르산(Stearic acid) (C18:0)	12.090 ± 0.357	12.501 ± 0.333	12.715 ± 0.807	0.626
올레산(Oleic acid) (C18:1)	49.698 ± 0.670	50.295 ± 0.626	48.949 ± 1.518	0.646
리놀레산(Linoleic acid) (C18:2)	3.611 ± 0.291	3.152 ± 0.272	2.948 ± 0.659	0.432
α 리놀렌산(Linolenic acid) (C18:3)	0.168 ± 0.021	0.141 ± 0.019	0.110 ± 0.047	0.432
아라키돈산(Arachidonic acid) (C20:4)	0.552 ± 0.053	0.537 ± 0.050	0.523 ± 0.121	0.964
SFA ¹	40.967 ± 0.650	40.428 ± 0.607	42.683 ± 1.472	0.360
PUFA ²	4.331 ± 0.334	3.830 ± 0.312	3.582 ± 0.756	0.458
MUFA ³	54.668 ± 0.731	54.654 ± 0.683	53.687 ± 1.655	0.853

평균 ± SE는 SFA, MUFA 및 PUFA를 제외한 지방산 조성의 백분율 단위이다.

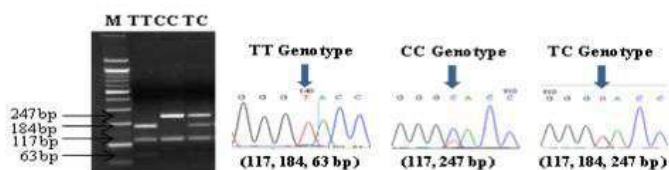
^{a, b} 동일한 열에서 상이한 위치를 가진 평균 값은 P<0.01 (Tukey's test)에서 유의하게 상이하다.

¹전체 포화 지방산; ² 전체 다가불포화 지방산; ³ 전체 고도불포화 지방산.

[0049]

도면

도면1



서열 목록

[서열목록 전자과일 첨부](#)