



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월02일

(11) 등록번호 10-2235340

(24) 등록일자 2021년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6888 (2018.05)

C12Q 2600/124 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0134496

(22) 출원일자 2019년10월28일

심사청구일자 2019년10월28일

(56) 선행기술조사문헌

NCBI REFERENCE SEQUENCE: NM_001267573
(2013.08.27.)*

Yan Wang et al, Gene, 547, p.288-294, 2014.*

KR101118355 B1

KR1020090054024 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이준현

대전광역시 유성구 어은로 57, 103동 606호(어은동, 한빛아파트)

프라부따

대전광역시 유성구 대학로179번길 7-10, 203호(궁동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 SNP 마커 세트 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 *TBC1D1* 유전자 내 SNP(single nucleotide polymorphism) 다형성에 기반한 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR)용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용하면, 토종닭의 체중, 증체량 및 도체중과 같은 경제성과 관련한 성장 형질을 조기에 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

서동원

세종특별자치시 다정중앙로 19, 414동 1202호(다정동, 가운마을4단지)

조성현

경기도 시흥시 은행로 93-1, 411동 1103호(은행동, 시흥은행 대우 푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545019481(세부과제번호: 213010053SB250)

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 GoldenSeed프로젝트(R&D)(농림부)

연구과제명 토종닭 개체 및 집단식별 분자표지 개발과 검증체계 구축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2 및 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR)용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 또는 서열번호 4 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 토종닭의 우수한 성장 형질을 예측할 수 있는 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 성장 형질은 체중(body weight), 증체량(weight gain) 또는 도체중(car cass weight)인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 6

토종닭 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물의 유전자형을 결정하는 단계;를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 SNP 마커 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 가축의 경제 형질을 향상시키기 위해 후보 유전자내 유전자 마커의 이용은 여러 연구에서 보고된 바 있다. 현재에는 마커 도움 선발(marker associated selection, MAS)을 통한 가축의 선발이 가축 육종 프로그램에서 보편화된 방법 중 하나이다. 이는 게놈 정보를 사용하면 개체 선발의 정확성과 속도를 높일 수 있기 때문이다. van der Beek와 van Arendonk의 연구(1996, *Anim Sci.* 62(1):171-180)에 따르면 5세대 동안 QTL(quantitative trait locus)과 연관된 마커를 이용하여 MAS를 실시하였을 경우 약 6 내지 13%의 개선된 유전적 개량량을 얻을 수 있을 것이라고 추정되었다. 더욱이 가금류를 포함한 가축의 생산 특성의 큰 변화를 설명하는 인과성 돌연변이 및 유전자를 확인하기 위한 전장유전체연관분석(genome-wide association study)이 상용화된 국내 교배종에서 보고되었다. 특히, 닭 성장과 도체 특성에 큰 영향을 미치는 QTL 영역에 대한 보고 중 육계-레그혼 교잡종을 이용한 연구에서 GGA(Gallus gallus chromosome) 1, 2 및 4 영역이 확인이 되었으며, 햄프셔-레그혼 교잡종을 이용한 연구에서는 GGA1, 2, 4 및 10, 한국 재래 닭을 이용한 연구에서는 GGA3, 4, 19 및 20 영역에서 확인되었

다.

[0003] GGA4 염색체에서 보고된 QTL 영역의 전장유전체분석 결과, *TBC1D1*(TBC1 domain family, member 1) 유전자는 포유류 및 닭을 포함한 가축 동물의 성장과 비만에 연관되어 있는 기능적 후보 유전자 중 하나로 확인되었다. 닭은 육계와 산란계로서의 가축화 과정에서 성장과 연관된 특정 유전자가 고정되었다. 최근 전장유전체의 re-sequencing 연구에 따르면 실용 브로일러 집단에서 *TBC1D1* 유전자가 고정된 성장 유전자 중 하나로 확인되었다. Rab-GTPase-activating protein TBC1D1은 닭의 비만 세포 라이브러리의 스크린에서 세포 분화 및 성장을 조절하는 단백질로 먼저 밝혀졌다. TBC1D1은 골격근에서 포도당 흡수에 대한 생물학적 신호를 전달하는 Rab-GAP 단백질 패밀리에 속한다. *TBC1D1* 유전자의 변이는 돼지의 살코기 및 지방 침착과 에너지 항상성과 관련이 있다고 보고되었다. 유사하게, 토끼 *TBC1D1*의 엑손 1 영역의 변이(c.214G>A)는 35 일령 및 56 일령의 체중과 유의미한 연관이 있었다. 또 다른 여러 연구에서, *TBC1D1* 유전자의 변이는 마우스의 비만 특성 및 인간의 체질량 지수와 관련이 있었다. Wang 등(2014, *Gene* 547(2):288-294)의 연구에 따르면 이와 비슷한 기능적 연관성이 닭에서도 보고되었다. 닭에서 *TBC1D1* 유전자의 기능적 관여는, 햄프셔-레그혼 교잡종의 5 내지 20 주령 성장에 영향을 미치는 중요한 영역이 *TBC1D1* 유전자의 153 내지 159 cM (61.5 내지 88.4 Mb size)의 GGA4 영역에서 기록되었다(Nassar et al., 2015 *Anim Genet.* 46(4):441-446).

[0004] 이에 본 발명자는 한국 재래닭에서 *TBC1D1* 유전자의 성장 특성(0 내지 20 주령, 0-2 주 증체량 ~ 18-20 주 증체량), 체중, 도체중(carass weight)과 관련된 SNP(single nucleotide polymorphism) 변이를 분석하고자 하였다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2017-0087429호에는 '닭의 산란 형질 관련 유전자 마커 및 이를 이용하여 닭의 산란 형질을 분별하는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1686446호에는 '연산 오계 닭 품종 판단용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 SNP 마커 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 토종닭의 *TBC1D1* 유전자 내 2개의 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커를 도출하고, 각 SNP 염기에 기반한 KSAP(kompetitive allele specific PCR)용 프라이머 세트를 제작하였다. 그 후, 상기 프라이머 세트를 이용하여 재래닭의 유전자형을 분석한 결과, 상기 2개의 SNP 마커가 유전자형에 따라 체중, 증체량 및 도체중의 형질에 유의적인 관계가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1, 2 및 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR)용 프라이머 세트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 토종닭 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물의 유전자형을 결정하는 단계;를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 SNP 마커 기반 KASP용 프라이머 세트를 이용하면, 토종닭의 체중, 증체량 및 도체중과 같은 경제성과 관련한 성장 형질을 조기에 예측할 수 있으므로, 가금 생산 농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1, 2 및 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 KASP(kompetitive allele specific PCR)용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 용어 "KASP(kompetitive allele specific PCR)"는 PCR 기반의 분석 방법 중 하나로, 상동(homogenous) 그리고 형광(fluorescence) 기반의 유전형 분석 기술이다. KASP는 대립유전자(allele)-특이적 올리고 연장(extension) 및 신호생성을 위한 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer)를 기반으로 하는 기술이다.
- [0013] 본 발명의 상기 KASP용 프라이머 세트는 토종닭에서 성장 형질과 관련있는 *TBC1D1* 유전자의 SNP(single nucleotide polymorphism) 다형성을 검출할 수 있는 프라이머 세트이다(표 1).
- [0014] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 성장 형질은 체중(body weight), 증체량(weight gain) 및 도체중(carcass weight)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 상기 KASP용 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1, 2 및 3; 및 서열번호 4, 5 및 6; 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(29개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상의 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1, 2 및 3; 및 서열번호 4, 5 및 6;의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, HRP (horse radish peroxidase), 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 비오틴) 등이 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로 사용한다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 KASP용 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 토종닭의 *TBC1D1* 유전자 내 rs80645709 위치에서 A 타입의 대립유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트이고, 서열번호 2 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 rs80645709 위치에서 G 타입의 대립유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트이다. 또한, 상기 서열번호 4 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 토종닭의 *TBC1D1* 유전자 내 rs14742436 위치에서 C 타입의 대립유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트이며, 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 토종닭의 *TBC1D1* 유전자 내 rs14742436 위치에서 T 타입의 대립유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트이다. 상기 4개의 프라이머 세트 중, 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 및 서열번호 4 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 토종닭의 우수한 성장 형질과 관련된 염기타입을 증폭할 수 있는 프라이머 세트이다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 키트를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있

다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 진단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

- [0021] 본 발명은 또한,
- [0022] 토종닭 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0023] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 상기 KASP용 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0024] 상기 증폭 단계의 산물의 유전자형을 결정하는 단계;를 포함하는, 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 방법은 토종닭 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료는 이에 한정하지 않으나, 근육, 표피, 혈액 또는 털 등일 수 있다. 상기 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다. 본 발명에 있어서, DNA란 DNA 뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함한다.
- [0026] 상기 증폭 단계 산물의 유전자형을 결정하는 방법은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, DNA 칩, 모세관 전기영동 등을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 디데옥시법에 의한 직접적인 핵산의 뉴클레오타이드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나, SNP(single nucleotide polymorphism) 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예에 따른 토종닭의 성장 형질을 예측하기 위한 방법에 있어서, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응된 산물의 유전자형이 토종닭의 *TBC1D1* 유전자 내 rs80645709 및 rs14742436 위치에서 각각 AA 및 CC 유전자형으로 결정되면, 해당 시료의 토종닭은 우수한 성장 형질을 가지는 것으로 예측될 수 있다.
- [0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] **재료 및 방법**
- [0030] 한국 재래 닭 88 마리(F₀) 부모 (15 수컷 및 73 암컷)에서 생성한 총 597 마리의 F₁ 세대 닭을 실험에 이용하였고, 총 597 마리 중 Gray-Brown(G = 110), Black (L = 88), Red-Brown(R = 135), White(W = 121) 및 Yellow-Brown(Y = 130)의 584 마리를 사용하였다. 모든 개체는 NIAS(National Institute of Animal Science)에서 제공한 기준(2012-C037)에 맞추어 동일한 사료 및 환경 조건으로 사육되었다. 성장 특성 중 체중(body weight, BW)은 0~20 주령까지 측정되었고, 도축시 체중(공복 시간 후 기록)을 기록하였다. 증체량(Weight gain, GR)의 경우 2주 간격으로 계산하였다.
- [0031] 표준 매뉴얼에 따라 전혈 샘플로부터 게놈 DNA를 분리하고 NanoDrop[®] 2000C 분광 광도계(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 농도를 측정하였다. *TBC1D1* 유전자는 여러 연구에서 확인된 QTL 영역에서 기능적 후보 유전자로 선택되었으며, 본 발명에 기술된 SNP 변이는 한국 재래닭 전체 게놈 SNP 주식 정보(Gallus gallus 5.0; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002315.3/)를 필터링함으로써 획득되었다. 하기 표 1의 rs80645709 및 rs14742436 위치는 각각 GGA4의 g.70179137A>G 및 g.70175861T>C이다. 표적 SNP의 확인을 위해

KASP(kompetitive allele specific PCR) 프라이머 세트를 제작하였다(표 1). 부모(F₀) 및 자손(F₁) 샘플 두가지 모두 유전자형 분석을 실시하였고, 자손(F₁) 샘플의 경우 부모(F₀) 샘플의 유전자형 정보와의 대조를 통해 한번 더 유전자형 분석결과를 확인하였다.

표 1

Primer information for SNP genotyping for chicken TBC1D1 gene by KASP genotyping assay						
Gene	Marker	rs_number	Mutation type	Forward Primer X, Y (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Fluorescent color (wild/mutant)
TBC1D1 gene	Primer1	rs80645709	Intron var	CAAAATTATGGTCAGAGGCAATAAACACA (서열번호 1)/	GATCTCTGACGGAATCGTTTGAAAGTATT (서열번호 3)	A / G (FAM/HEX)
				AAATTATGGTCAGAGGCAATAAACACG (서열번호 2)		
	Primer2	rs14742436	Missense	GGTCACTGGAAAGATCACCCAC (서열번호 4)/	GAGAATGCTGTCAAGAGCAGTGGAT (서열번호 6)	C / T (FAM/HEX)
				GGGTCACCTGGAAAGATCACCCAT (서열번호 5)		

유전자형 데이터 및 정량적 데이터는 엑셀 및 R 소프트웨어를 통해 정리하였다. 표현형 데이터에 대한 기술 통계량은 MINITAB 버전 14 (MINITAB Inc., USA)를 사용하여 얻었다. R로 구현된 집단 유전학 패키지 "genetics"을 사용하여 집단의 각 SNP에 대한 유전자 빈도를 결정하였다. 육질 특성과 유전자형 사이의 연관성에 대한 통계적 분석은 MINITAB 버전 14에서 일반 선형 모델(General Liner Model, GLM)을 사용하여 자손의 평균 조정된 표현형에 기초하여 수행되었다.

$$Y_{ijkmn} = \mu + S_i + L_j + B_k + Sire_m (line) + Dam_n (line, Sire) + M_m + e_{ijkmn}$$

Y_{ijkmn} 은 각 개체에 대해 측정된 표현형 데이터이며, μ 는 전체 관측 평균, S_i 는 성별 효과, L_j 는 계통 효과, B_k 는 K 번째 batch에 따른 고정 효과, $Sire_m$ (계통)은 j 번째 계통에 중첩된 m 번째 아버지의 고정 효과다. Dam_n (계통, 아버지)는 모집단에서 j 번째 라인 및 m 번째 사이에 중첩된 n 번째 어미의 효과였으며 M_m 은 m 번째 유전자형의 고정 효과다. e_{ijkmn} 은 임의의 잔차이다.

실시예 1. TBC1D1 유전자 내 SNP와 토종닭의 성장 형질간의 관련도 분석

한국 재래닭 SNP 주석 데이터로부터 2개의 선택된 SNP(g.70179137A>G 및 g.70175861T>C)를 평가하였다. 표 2는 각 SNP의 유전자형 및 대립유전자 빈도를 보여준다. SNP1 (A/G)의 경우, A 대립유전자가 0.54의 가장 높은 대립유전자 빈도를 가지며, SNP2 (T/C)의 경우, C 대립유전자가 가장 높은 대립유전자 빈도(0.56)를 보여주었다. 특히, SNP2는 메티오닌(ATG)에서 발린(GTG)으로의 아미노산 변화를 유도하는 과오 돌연변이(missense mutation)인 것으로 확인되었다(<https://asia.ensembl.org/>). 본 발명자는 상기 두 SNPs에 대해 중간 정도의 다형성(PIC) 값(각각 0.374 및 0.372)을 확인하였다.

표 2

Genotype and allele frequencies for SNPs in TBC1D1 gene						
SNP marker	Type	Genotype frequency			Allele frequency	
		AA	AG	GG	A	G
g.70179137A>G rs80645709	Intron var.	181(0.31)	261(0.45)	139(0.24)	623(0.54)	539(0.46)
g.70175861T>C rs14742436	Missense. (ATG/GTG)	206(0.35)	235(0.40)	140(0.24)	647(0.56)	515(0.44)

¹PIC: Polymorphic information content.

[0039] *TBC1D1*은 잠재적인 QTL 영역임에도 불구하고, *TBC1D1* 유전자 다형성 및 닭에서의 성장 특성과의 잠재적 연관성을 논의한 연구는 거의 없다. 따라서 본 발명의 목적은 선택된 두 가지 SNPs의 성장 특성 효과를 평가하는 것이다. 이를 위해 본 발명자는 0 주령에서 20 주령 사이의 체중(BW) 데이터와 2주 간격으로 계산된 증체량(GR) 정보를 사용하였다. 또한 도축시 중량(weight at slaughter, SLW) 및 도체 중량(carccass weight, CW)에 대한 분석을 표 3에 정리하였다.

표 3

Descriptive statistics for growth traits in Korean native chicken

Trait (g) ¹	N	Mean	±SE of mean
BW00	581	38.39	0.21
BW02	574	143.76	1.03
BW04	579	265.52	2.91
BW06	581	426.47	5.42
BW08	579	607.09	8.08
BW10	580	767.40	9.17
BW12	579	991.30	11.50
BW14	580	1,179.40	12.30
BW16	581	1,383.00	13.90
BW18	581	1,587.80	14.30
BW20	581	1,780.20	15.30
SLW	581	1,694.30	15.10
CW	577	998.95	9.94
GR0-2	574	105.41	0.98
GR2-4	580	123.01	2.03
GR4-6	580	161.46	2.75
GR6-8	579	180.73	2.98
GR8-10	577	160.44	2.88
GR10-12	578	223.54	3.89
GR12-14	578	188.25	3.76
GR14-16	572	209.24	3.22
GR16-18	578	205.99	4.56
GR18-20	579	190.98	3.04

¹body weight from zero weeks to 20 weeks (g), SLW: weight at slaughter (g), CW: Carccass weight (g), GR0-2~GR18-20: weight gain (g).

[0040]

[0041] 모든 고정 효과를 보정 후, 성장 특성을 평가한 결과 SNP1이 BW00, BW20, GR14-16 및 CW에 대해 유의한 것으로 나타났다($P < 0.05$) (표 4). 본 발명의 연구 집단에서, BW20, GR14-16, GR18-20 및 CW에 대한 SNP1의 유전자형 AA는 각각의 형질에서 더 높은 값을 갖는다. 반면, GG 유전자형은 상기 각 형질에서 낮은 값을 보여주었다. 또한, AG 유전자형은 이러한 특성에 대한 평균값을 나타냈다. 이를 종합하면, A 유전자형의 대립유전자가 확인된 5개의 성장 특성에 유리한 영향을 미친다는 것을 유추할 수 있었다. 각각 A 타입 대립유전자를 가지는 경우 G 타입 대립유전자를 가진 개체보다 BW20 (:20 주령 시 체중), GR14-16 (:14 내지 16 주령 사이의 증체량), GR18-20 (:18 내지 20 주령 사이의 증체량) 및 CW (:도체중)에서 각각 $39.284 \pm 13.285(g)$, $10.001 \pm 4.21(g)$,

8.669±4.228(g), 및 33.107±8.833(g) 가량 높은 것으로 확인되었다(표 4).

표 4

Least square means for growth traits in Korean native chicken						
¹ Trait	² Least square mean (±SE)			P-value	Allele substitution effect	
rs80645709 (SNP1)	AA	AG	GG		Additive	Dominant
BW00	38.40±0.2265 ^b	38.48±0.1769 ^b	39.25±0.266 ^a	0.025	-0.862±0.277	-0.92±0.462
BW20	1,797±18.43 ^a	1,776±14.39 ^a	1,719±21.69 ^b	0.027	-39.284±13.285	-57.804±22.097
GR14-16	226.8±6.37 ^a	206.7±5.06 ^b	192.5±7.64 ^b	0.004	-10.001±4.21	-10.851±7.017
GR18-20	204.4±6.56	190.6±5.10	179.3±7.688	0.06	-8.669±4.228	-12.965±7.014
CW	1,011.8±12.45 ^a	989.9±9.72 ^{ab}	959.4±14.62 ^b	0.036	-33.107±8.833	-44.182±14.737
rs14742436 (SNP2)	CC	TC	TT		Additive	Dominant
BW20	1,795±16.90 ^a	1,773±15.37 ^{ab}	1,724±21.44 ^b	0.039	-39.284±13.285	-0.92±0.462
GR14-16	218.4±5.90	210.5±5.41	196.6±7.54	0.08	-10.001±4.21	-57.804±22.097
CW	1,009.7±11.41 ^a	987.4±10.39 ^{ab}	962.7±14.45 ^b	0.048	-33.107±8.833	-10.851±7.017

¹ BW00: body weight at zero weeks (g), BW20: body weight at 20 weeks (g), CW: carcass weight (g), GR14-16: weight gain from 14weeks to 16 weeks (g), GR18-20: weight gain from 18 weeks to 20 weeks (g).

² Least square means for growth traits adjusted for fixed effect.

^{ab} Means within a row with no common superscript differ significantly (*P*<0.05).

[0042]

[0043]

한편, SNP2의 CC 유전자형은 BW20, GR14-16 및 CW에서 더 높은 값을 나타냈다. 또한, TT 유전자형은 가장 낮은 값을 보여주었고, TC 유전자형은 중간 정도의 성장 특성을 나타냈다. 따라서, C 대립유전자가 재래닭의 F₁ 자손의 확인된 3개의 성장 형질에 유리한 영향을 줄 수 있음을 유추할 수 있었다. 3개의 형질은 각각 C 타입 대립유전자를 가지는 경우 T 타입 대립유전자를 가진 개체보다 BW20 (:20 주령 시 체중), GR14-16 (:14 내지 16 주령 사이의 증체량) 및 CW (:도체중)에서 각각 39.284±13.285(g), 10.001±4.21(g), 33.107±8.833(g) 가량 증가하였음을 알 수 있었다(표 4).

서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> SNP marker set for predicting growth traits of Korean native chicken and uses thereof

<130> PN19343

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

caaaattatg gtcagaggca ataaacaca

29

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <
 220><223> primer
 <400> 2
 aaattatggt cagaggcaat aaacacg 27
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 gatctctgac ggaatcggtt gaaagtatt 29
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ggtcactgga aagatcaccc ac 22
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gggtcactgg aaagatcacc cat 23
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 gagaatgctg tcaagagcag tggat 25