



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0082019
(43) 공개일자 2015년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0002097
(22) 출원일자 2014년01월07일
심사청구일자 2014년01월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
홍기창
경기도 남양주시 별내면 청학로68번길 23 주공아
파트 304-303
전태훈
서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아
파트 236동 1802호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 돼지 DNAJC6 유전자의 SNP를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커

(57) 요약

본 발명은 돼지의 DNAJC6 유전자 내에 존재하는 SNP를 이용하는 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의하면, 살아있는 돼지의 혈액시료만으로 PCV2 증식에 저항성이 있는 우수한 형질의 돼지를 용이하게 선발할 수 있다.

대표도 - 도3

DNAJC6 의 SNP를 포함하는 PCR 산물의 염기서열 및 SNP (T>C)의 위치

```

1 ATCCTGTGTT GCCTCAATGT GCAGTGTAGG TCACAGACAC AGCTCGGATC TGGCATTGCT
61 GTGGCTGTGG CATAGGCTGG CAGATGCGGC TCTGATTTGA CCCCTAGCCT GGGAACTCT
121 AAATGCCGCA GGGGCGGCTG TGAAAGAAAA AAGAATAAAA GAAAAACCAC TTAAGTCTAC
181 TTAAGTCTAC TATGAGCAGC TTCCATCTAT CATCTTATGT AATTTTGTGA ATAGTCA[T/C]GT
241 GAGCTAGGTG CTGTTGATTT TTTTCCCAT CTCGCTGTGG AGAAAACCAA GGCACAGAGA
301 AATAAAGTAA CTTTCTCTGT GTGACGGAGC CAGTAAGTAG CAGAGAAGGG ATTCAAATC
361 CGGCTGCTTC TAGAGGTCTT GCTGTTCAAC CCACACTACA CTGCCTCTCA GATGCTTGAC
421 AGACGGTAGT GGCCGTGTGA GGTGAAATAC CTCCCGTGTT TCATTGCTAA GGGTCTAAAA
481 GCACTGATTT TTTTTTTTTT TTTTCAGGCT GCTCCTTCTC TCTTTCTGAA GTTATGTGCA
541 TAGATGCTAA CAAAAGGCAG ATGTTTTTGG CTCTCACTA ACTGTGTCCT GGCATATTGG
601 TCTTCCTTAG ATCAGAAATC AGAGAAATCC TTCTGCGAGG AGGACCATGC TGCCCTAGTG
661 AATCAGGAAA GTGAGCAGTC GGATGATGAA CTTCTGACGC TGTCCAGTC
    
```

(72) 발명자

임규상

대전광역시 서구 둔산로 223 청솔아파트 4동 1105호

이은아

서울특별시 강서구 강서로 266 우장산아이파크이편
한세상아파트 123동 1502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00808902

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 [세부2] 돼지 유전체분석을 통한 PCV2증식억제관련 DNA 마커개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서, 238번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 709개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커.

청구항 2

서열번호 2와 서열번호 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, 돼지 *DNAJC6* 유전자의 인트론(intron) 11 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)을 포함하는 영역에 대한 PCR을 위한 프라이머 세트.

청구항 3

제2항 기재의 프라이머 세트;

PCR 반응혼합물; 및

RFLP 분석용 제한효소 *Nla* III을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트.

청구항 4

a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;

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

d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 238번째 염기가 C염기에서 T염기로 치환되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법.

청구항 5

a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계;

c) 상기 증폭된 DNA를 제한효소 *Nla* III으로 처리하는 단계; 및

d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에 대해 RFLP 분석을 수행하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 저항성 여부 판별 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 돼지 *DNAJC6* 유전자의 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism, 이하 SNP라고 함)를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 돼지의 *DNAJC6* 유전자 내에 존재하는 SNP를 이용하여 PCV2의 증식에 미치는 효과를 확인함으로써 PCV2 증식에 저항성이 우수한 돼지를 용이하게 선발할 수 있는 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

현재 국내 대부분의 양돈농가는 다양한 질병들에 의한 피해로 생산비가 급증하여 생산성 저하로 이어지는 악순환이 계속되고 있다. 이는 가축분뇨처리비와 사료가격의 상승 및 미국, 유럽연합, 칠레 등 다른 국가와의 자유무역협정 체결과 같은 국내외 실정과 맞물려 양돈농가의 어려움이 가중되고 있다.

- [0003] 질병으로 인한 양돈산업의 피해액은 연간 6,953억 원에서 11,840억 원에 이르는 것으로 추산되며, 추가적인 질병치료비로 연간 2,256억 원에서 2,852억 원이 지출되고 있는 것으로 추산되고 있다(한국농촌경제연구원, 2006). 이에 따른 생산성 감소로 인해 양돈생산성의 주요한 지표인 연간 출하두수(MSY, pigs marketed/sow/year)는 외국과 비교하여 현저하게 낮은 수준을 보이고 있다. 덴마크의 경우 우리나라와 비슷한 양돈 사육 환경을 가지고 있으며 모돈의 두당 연간 산자수(PSY, pigs/sow/year)도 거의 비슷한 수준이지만, 2007년 기준 MSY는 24.46두인데 반해 우리나라의 경우 13.4두로 매우 낮게 나타나고 있다. 또한 2010년 양돈경영실태 조사에서도 사육두수 감소의 가장 큰 요인은 소모성 질병 등 방역위생문제였다는 점에서 돼지질병에 대한 해결방안 마련이 시급하다.
- [0004] 한편, 돼지 이유후 전신소모성 질환(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)은 1991년 캐나다에서 처음 보고된 이래(Harding, 1997; Clark, 1997), 전 세계적으로 양돈농가에 피해를 주고 있는 대표적인 질병이다. PMWS는 갑작스런 위축이나 설사 및 황달 등의 임상적 증상과, 림프절 비대증 및 림프구 소실 등의 병리학적 증상을 특징으로 하며, 다양한 원인에 의해 발병한다(Allan and Ellis, 2000; Segales et al., 2005). PMWS의 주요 병인은 돼지 쉼코바이러스 2형(PCV2)으로 보고되었다(Chae, 2005; Segales et al., 2005; Opriessnig et al., 2007).
- [0005] PMWS는 우리나라 양돈농가에서 가장 많은 피해를 주고 있는 질병 중 하나로 8~12주령의 이유자돈에서 주요하게 발병한다. 우리나라에서는 1998년 처음 PMWS가 보고된 이래, 2000년 전후 전국으로 확산되었으며, 현재는 거의 대부분의 양돈장에 PCV2가 감염되어 있는 것으로 추정되고 있다. 2009년 농식품부와 양돈협회가 공동조사한 질병실태조사보고서에 따르면 조사대상 양돈장 모돈의 약 95%가 PCV2에 대한 항체를 가지고 있으며, 약 80%의 양돈장에서 PCV2 감염이 진행되고 있다고 보고된 바 있다. 따라서, 일부를 제외한 국내 대부분 양돈장이 PCV2에 감염되어 있다고 판단된다(박, 2008).
- [0006] PMWS는 호흡기질환 등의 임상증상과, 림프구 소실 등의 조직병리학적 소견, 및 병변 내 PCV2 검출의 3가지 기준이 모두 충족되어야 최종 진단되기 때문에 부검이 없이는 진단할 수 없는 어려움이 있다(도 1 참조). 따라서, 부검 없이도 용이하게 PCV2 증식에 저항성이 우수한 돼지를 선발할 수 있는 방법이 필요한 실정이다.
- [0007] PMWS는 도 2와 같이 돼지 쉼코바이러스 2형(Porcine circovirus type 2; PCV2)의 과다증식이 직접적인 원인으로 작용하게 되어, 림프구를 파괴함으로써 면역기능저하를 유발한다. 이에 따라 면역력이 현저히 낮아진 PMWS 발병 개체에 대한 2차 세균 및 바이러스 등의 복합감염으로 질병이 악화되고 또 다른 질병을 촉발시키는 심각성을 가지고 있다(reviewed by Opriessnig et al., 2007, 도 2). 따라서, PCV2증식수준은 PMWS 발병과 관련하여 중요한 지표로 판단된다.
- [0008] PCV2 감염시 PCV2 바이러스 DNA (PCV2 viral DNA)는 돼지의 림프절에서만 검출되는 것이 아니고 바이러스혈증(viremia)에 의해 혈액에서 검출되며, 각 개체별로 다양하게 양적인 변화를 나타내고 있음이 보고된바 있다(Olvera 등, 2004). 또한 혈액 내 PCV2 게놈 DNA양은 PMWS의 발병 여부 및 임상증상의 정도와 관련되어 있음도 보고되었다(Segales 등, 2005).
- [0009] 돼지 쉼코바이러스는 포유류에서 자가증식할 수 있는 가장 작은 바이러스로서(Mankertz et al, 1997), 환형 단일가닥 DNA의 유전체를 가지고 있고, 3개의 ORF(open reading frame)을 가지고 있다(Todd et al, 1991; Studdert, 1993; Mankertz et al, 1997). PMWS 발병 혹은 PCV2 과다증식 기전과 관련하여 PCV2는 부착 리셉터(attachment receptor)로 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycans)을 이용하며(Misinzo 등, 2006), 숙주세포 내 효소들을 이용하여 DNA를 복제하고, 증식에 필요한 단백질을 합성하는 기작은 보고된 바 있으나 이들이 어떻게 다시 조합되어 세포 밖으로 나가는지는 알려져 있지 않다. 현재까지 PCV2의 3개 ORF 단백질들과 상호작용하는 돼지 단백질들이 16여 개가 보고되었다(Finsterbusch 등, 2009; Liu 등, 2007; Timmusk 등, 2006).
- [0010] 이 중 Hsp40은 yeast two-hybrid 방법을 통해 PCV2의 ORF2에 의해 발현되는 Cap 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Finsterbusch 등, 2009). Hsp40은 단백질의 응축(aggregation)이나 미스폴딩(misfolding)을 막아주는 역할을 하는 샤페론(chaperone)이다. 이 단백질은 돼지 염색체 6번에 위치하고 있는 *DNAJC6* 유전자에 의해 코딩된다. *DNAJC6* 유전자는 총 19개의 엑손(Exon)으로 구성되어 있으며, 923개의 아미노산을 코딩하는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 Olvera et al (2004)이 PCV2의 ORF2영역에 대한 프라이머/프로브 세트를 이용한 혈액 내 PCV2 DNA 분석방법을 공개한바 있으나, 국내 돼지에서 얻은 혈액시료에 대해 검출 민감도가 낮았다. 또한, 대한민국 특허공보 제10-0806868호(2008.02.22)에는 PCV의 ORF1(open reading frame 1) 유전자 증폭용

프라이머 세트를 포함하는, PRV, PCMV 및 PCV에 특이적인 다중 PCR 프라이머 세트 및 그를 이용하여 표적 서열을 검출하는 방법 및 키트에 관해 기재되어 있으나 PCV2 ORF1 증폭용 프라이머 세트로 PCV 정성분석에 관한 것이다. 한편, 현재까지 돼지의 *DNAJC6* 유전자에서 특정부위의 SNP를 이용하여 PCV2 증식에 대한 저항성 개체를 선별하는 방법은 확인된 바는 없다.

- [0012] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0806868호(2008.02.22)

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) Olvera et al., Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs, J Virol Methods. 2004 Apr;117(1):75-80.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명자들은 PCV2 과다증식과 관련하여 돼지의 *DNAJC6* 유전자를 주요한 후보유전자로 판단하고, 돼지의 *DNAJC6* 유전자의 유전체서열에서 인트론 11번(Intron 11)에 위치한 신규 SNP를 발굴하여, 발굴된 SNP에 대한 유전자형 진단기법을 개발하였으며 PCV2 백신을 접종하지 않은 자연감염집단을 조성하고 PCV2 증식과 관련된 SNP의 신규 용도를 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 돼지의 *DNAJC6* 유전자의 SNP를 이용한 PCV2 증식 관련 DNA 마커 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 PCV2 증식 관련 DNA 마커를 이용한 PCV2 저항성 여부를 판별하여 PCV2 저항성이 우수한 돼지를 선별하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 238번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 709개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, 돼지 *DNAJC6* 유전자의 인트론(intron) 11 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)을 포함하는 영역에 대한 PCR을 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머 세트; PCR 반응혼합물; 및 RFLP 분석용 제한효소 *Nla* III을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기

a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 238번째 염기가 C염기에서 T염기로 치환되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 증폭된 DNA를 제한효소 *Nla* III으로 처리하는 단계; 및 d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에 대해 RFLP 분석을 수행하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 저항성 여부 판별 방법을 제공한다.

[0024] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0025] 돼지의 *DNAJC6* 유전자에서 특정부위의 SNP를 이용하여 PCV2 증식에 대한 저항성 개체를 선별하는 방법은 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 PCV2 증식에 대한 저항성 관련 *DNAJC6* 유전자의 SNP의 용도를 처음으로 밝혔다.

[0026] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 238번째 T 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 709개의 연속서열로 구성되는, PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 DNA 마커를 제공한다.

[0027] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 *DNAJC6* 유전자 중에서 인트론 11 영역 내에서 PCV2 증식에 대한 저항성 특성과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 PCV2 증식 저항성 특성과의 연관성을 확인하였다. 상기 DNA 마커는 PCV2의 ORF 단백질과 상호작용하는 *DNAJC6* 유전자의 인트론 11 영역 중 일부로서, 서열번호 1의 염기서열에서, 238번째(C→T) 위치에서 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다.

[0028] 본 발명에 있어, 상기 DNA 마커의 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 709개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 마커는 PCV2 증식 억제와 관련된 것임을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예 5에서와 같이, 서열번호 1의 238번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형 (TT, TC, CC)과 PCV2 증식 억제의 연관성을 분석하여 TT 유전자형이 향상된 PCV2 증식에 대한 저항성을 나타냄을 확인하였다.

[0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2과 서열번호 3으로 표시되는 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 *DNAJC6* 유전자의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 프라이머 세트는 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, *DNAJC6* 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1에서 238번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머 세트와; 및 PCR 반응혼합물을 포함하는 PCV2 증식에 대한 저항성 돼지 판별용 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP 분석용 키트는 *DNAJC6* 유전자의 발현 조절 즉, PCV2 증식에 대한 저항성 특성에 관여하는 유전자의 다양한 발현을 분석하기 위한 것이다.

[0032] 본 발명의 보다 구체적인 양태에 따르면, 상기 키트는 RFLP 분석용 제한효소 *Nla* III을 포함하는 것을 특징으로 한다. 이런 구성에 의하면 RFLP 분석에 의하여 PCV2 증식 억제의 연관성이 있는 서열번호 1의 238번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형 (TT, TC, CC)을 확인할 수 있다.

[0033] 상기 프라이머를 이용하여 제조된 유전자 단편의 염기서열의 결정은, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이

루어질 수 있다. 예를 들면, 디테옥시법에 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, 그의 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 염기서열에서의 238번째 (C→T 치환) 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성되는 프라이머 세트와 증폭한 DNA 단편(709bp)을 이용하여 서열번호 1의 염기서열에서 238번째 유전자형을 진단할 수 있었다(도 3 참조)

[0036] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *DNAJC6* 유전자의 인트론 영역인 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및 d) 상기 c)단계의 염기서열 결과로부터 서열번호 1의 238번째 염기의 C염기에서 T로 치환 여부를 확인하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 저항성 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 방법에서, 상기 a) 단계에서 돼지 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 상기 혈청으로부터 게놈 DNA를 분리한다. 본 발명에서 돼지 혈액으로 DNA를 분리 및 정제하는 것은 당업계에 공지된 통상적인 방법을 이용할 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual(2001) 등).

[0038] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 *DNAJC6* 유전자의 인트론 11 영역인 서열번호 1의 238번째가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.

[0039] 본 발명에 의한 상기 SNP는 돼지 PCV2 증식 저항성 특성과 관련이 있으므로, 상기 SNP의 변이를 확인함으로써 돼지 PCV2 증식 저항성 여부를 용이하게 확인할 수 있다. 상기 SNP의 변이는 공지된 다양한 방법에 의해 확인할 수 있으며, 예를 들어 직접서열분석법 등을 이용할 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.

[0040] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계; b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 돼지 *DNAJC6* 유전자의 인트론 영역인 서열번호 1의 238번째 염기를 포함하는 특정부위를 증폭시키는 단계; c) 상기 증폭된 DNA를 제한효소 *Nla* III으로 처리하는 단계; 및 d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에 대해 RFLP 분석을 수행하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 238번째 염기의 SNP를 확인하여 돼지 PCV2 저항성 여부 판별 방법을 제공한다.

[0041] 상기 구성에 의하면 RFLP 분석에 의하여 PCV2 증식 억제와의 연관성이 있는 서열번호 1의 238번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형 (TT, TC, CC)을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 의하면 제한효소인 *Nla* III의 처리에 따라 전기영동 시 아가로스 겔(agarose gel) 상에서 다른 크기로 나타나는 밴드 (band)의 형태를 파악하여 유전자형을 구분할 수 있다.

[0042] 상기 방법에서 RFLP 분석 시 60pb, 239bp 및 410bp 마커를 갖는 개체들을 PCV2 저항성 돼지로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 마커들은 TT 유전자형의 특징으로 이 마커들을 갖는 개체는 PCV2 저항성 돼지로 용이하게 판별된다(도 4 참조).

[0043] 상술한 바와 같이, 본 발명의 마커는 양돈현장에서 주요하게 문제를 일으키고 있는 PCV2에 대한 것으로, 실제 농장에 대한 현장적용의 용이성을 높이기 위해 SNP 분석용 키트를 제공한다. 분석용 키트는 이유자돈의 PCV2 증식과 관련된 DNA 마커를 이용하여 유전자형 진단을 할 수 있는 키트로서 양돈질병관리에 용이하게 활용될 수 있다.

[0044] 기존 육종방법의 한계성 및 후대검정을 통한 선발의 어려움을 보완하기 위해 나날이 발전하고 있는 분자유전학적 기술이 양돈연구에 활용되고 있다. DNA를 기반으로 한 축종 혹은 개체 식별기술, 유전적인 소질, 경제형질과 관련된 유전적 표지(Genetic Marker)를 통해 가축의 육종 프로그램에 적용함으로써 가축의 유전적 능력 개량에 이용되고 있는 것이 국제적 추세이다. 따라서 본 발명에 의한 DNA 마커 및 이를 포함한 SNP 분석용 키트를 통해 분자유전학적 기법을 가축의 능력개량에 활용할 수 있으며 축산업계에 용이하게 보급가능하다.

발명의 효과

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 이유자돈의 PCV2 증식 억제에 영향을 주는 돼지 *DNAJC6* 유전자의 SNP를 이용한 DNA 마커 및 이를 포함하는 SNP 분석용 키트를 제공한다. 따라서 본 발명에 의한 DNA 마커를 이용하여 살아있는 돼지의 혈액시료만으로 PCV2 증식에 저항성이 있는 우수한 형질의 돼지를 용이하게 선발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 종래 기술에 의한 PMWS의 진단기준을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 PMWS 발병기작을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명에 의한 *DNAJC6* 유전자의 SNP를 포함하는 PCR 산물의 염기서열 및 SNP (T > C) 위치를 보여주는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 *DNAJC6* 유전자의 PCR-RELP에 따른 밴드패턴을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] 돼지 *DNAJC6* 유전자 인트론 영역 내 SNP 탐색 및 유전자형 진단기법의 개발

[0049] NCBI 데이터베이스를 이용하여 돼지 염색체 6번에 위치하고 있는 *DNAJC6* 유전자의 서열 및 구조를 확인했다 (Accession number: NC_010448.3). 돼지 *DNAJC6* 유전자의 크기는 214,261 bp이며, 총 19개의 Exon으로 구성되어 있다. 본 발명에서 PCV2증식 억제 관련 신규 용도가 확인된 SNP(T>C)는 *DNAJC6* 유전자의 인트론 11에 위치하고 있다(도 3).

[0050] 상기 SNP에 대한 효율적인 유전자형 분석을 위해 PCR(polymerase chain reaction) 및 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 방법을 이용한 유전자형 진단기법을 새롭게 개발했다. 상기 SNP를 특이적으로 인식하는 제한효소(restriction enzyme)인 *Nla* III를 'An on-line tool for SNP-RFLP analysis' 프로그램을 이용하여 탐색하였다. 탐색된 제한효소인 *Nla* III의 처리에 따라 전기영동시 아가로스 겔(agarose gel) 상에서 다른 크기로 나타나는 밴드 (band)의 형태를 파악하여 유전자형을 구분할 수 있었다.

[0051] SNP를 포함하는 영역에 대한 PCR을 위해 Forward primer (5'-ATC CTG TGT TGC CTC AAT GT-3', 20mer; 서열번호 2)와 Reverse primer (5'-GAC TGG ACA GCG TCA GAA GT-3', 20mer; 서열번호 3)로 구성된 프라이머 세트를 제작하였다 (표 1) PCR을 실시하는 데 있어 프라이머는 각 2.0 μ l (10 uM)씩 첨가하고, 그 외 반응 첨가물은 10X PCR reaction buffer (100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg2Cl) 2.0 ul, dNTP (2 mM each) 2.0 ul, Taq DNA polymerase 0.2 ul, Template (genomic) DNA 1.0 ul (약 100 ng)와 ddH2O 10.8 ul를 섞어 최종적으로

20.0 μ l를 반응시켰다. 반응조건은 94℃에서 15분간 초기 변성(initial denaturation)을 실시한 후, 94℃에서 30초간 변성(denaturation), 60℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72℃에서 1분간 신장(extension)을 한 사이클로 30 사이클을 반복한 후, 72℃에서 5분간 최종 신장(final extension)을 실시한 후 PCR 반응을 종료하였다 (표 2 및 표 3).

[0052]

PCR 반응으로 얻어진 709bp의 PCR산물 3 μ l에 제한효소 *Nla* III 0.3 μ l를 처리하여 37℃조건에서 약 2시간 배양(incubation)을 실시한 후 2% 아가로오스 겔에서 100V, 20분의 조건으로 전기영동을 실시하여 유전자형별 밴드 패턴을 확인했다. 공통적으로 60bp에서 밴드가 나타나며, 공통으로 나타나는 밴드 외에 TT 유전자형은 239bp, 410bp의 두 밴드가 나타나고, CC 유전자형은 649bp 밴드가 나타난다. TC 유전자형은 649bp, 239bp, 410bp의 세 밴드가 모두 나타난다 (도 4).

표 1

표 1. PCR 사용된 프라이머 및 반응조건

Primer	Length (nt)	Primer sequence	PCR size
서열번호2	20	5'-ATCCTGTGTTGCCTCAATGT-3'	709bp
서열번호3	20	5'-GACTGGACAGCGTCAGAAGT-3'	

[0053]

표 2

표 2. 앰플리콘 증폭 시 PCR 혼합물 조성

Reagent		Volume (μ L)
10x Polymerase buffer		2.0
dNTP (2mM each)		2.0
LPS Hot start polymerase		0.2
Nuclease-free Water		10.8
Primer	Forward	2.0
	Reverse	2.0
Genomic DNA		1.0
Total volume		20.0

[0054]

표 3

표 3. 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응 조건

PCR steps		Temperature	Time
Initial denaturation		94.0 °C	15 min
Denaturation	30 cycle	94.0 °C	30 s
Annealing		60.0 °C	30 s
Extension		72.0 °C	1 min
Final extension		72.0 °C	5 min

[0055]

[0056]

[실시예 2] 돼지 DNA 및 바이러스 DNA 추출

[0057]

본 발명에서 SNP의 PCV2 증식억제 관련 효과 확인을 위해 총 142두(거세수컷 66, 암컷 78)의 요크셔(Yorkshire) 품종의 돼지가 사용되었다. 본 돼지들은 같은 농장에서 태어났고 PCV2 백신을 접종하지 않았으며, 4주령에 이후 10주령까지 4개의 배치에서 동일한 환경조건으로 사육되었다. 4주 및 10주령 시기에 각각 돼지의 경정맥에서

혈액을 채취하였다. 돼지의 DNA는 EDTA를 처리한 혈액표본에서 Sambrook 등(1989)의 방법 또는 상용 DNA 추출 키트(commercial DNA extraction kit, Intronbio)를 통해 추출하였다. 또한 혈액응고 후 원심분리를 3000 rpm의 속도로 10분간 실시하여 혈청을 분리하여 -80℃에 보관하였으며, 분리된 혈청 300 μ l로부터 상용 바이러스 DNA 키트(commercial viral DNA kit, Qiagen)를 이용하여 전체 바이러스 DNA(total viral DNA)를 추출했다.

[실시예 3] 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)을 통한 혈액 내 PCV2 DNA 정량

동일 개체에서 4주와 10주 때 2차례에 걸쳐 혈액을 채취하여 PCV2 viral load를 분석하였으며, 이를 통해 4주에서 10주 사이에 PCV2가 증식된 양을 분석하였다.

1) PCV2 특이 프라이머 세트 및 프로브 제작

돼지 혈청내 PCV2 DNA 정량분석에는 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)을 이용하였으며, 이를 위해 프라이머 세트를 다음과 같이 Forward Primer 5'-TCG ATC TCA AGG ACA ACG GAG T-3' (22 mer; 서열번호 4), Reverse Primer 5'-TTG GTC TTC CAA TCA CGC TTC TGC-3' (24 mer; 서열번호 5)로 제작하였다. 또한 Probe 5'-FAM-CAG AGC AGC ACC CTG TAA CGT TTG TCA-TAMRA-3' (27 mer; 서열번호 6)로 제작되었으며 형광물질은 5' 말단에는 FAMTM (6-carboxyfluorescein)을 3' 말단에는 TAMRATM (6-carboxytetramethylrhodamine)를 표지하였다.

2) 표준곡선 제작(Standard curve construction)을 위한 pPCV2 제작 및 희석

돼지 혈액내 PCV2 DNA의 정량에 이용되는 태크맨 프로브 리얼타임 PCR (TaqMan probe realtime PCR)에 대한 표준곡선 제작(standard curve construction)을 위해 플라스미드 PCV2 DNA (pPCV2)를 제작하였다. pPCV2 제작을 위하여 실시예 1에서 분리한 PCV2 게놈(genome) 중 314 bp 크기 ORF3 영역의 cDNA를 PCR을 이용하여 클로닝(cloning)하였으며, *Xho*I과 *Not*I site를 이용하여 T-easy vector (Promega)에 삽입하였다. 이렇게 제작된 플라스미드를 PCV2의 숙주세포인 PK-15 (ATCC)에서 증식시킨 후 상용 플라스미드 DNA 키트(commercial plasmid DNA kit, Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, 분광광도계(spectrophotometer, Thermo Scientific)를 이용하여 DNA의 농도를 확인하였다. 이후 2.5 μ l 샘플당 10^{11} ~ 10^1 플라스미드(plasmids)의 농도로 연속 희석(serial dilution)을 실시하였다.

3) 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR) 반응

각각 돼지의 혈청에서 분리된 바이러스 DNA(viral DNA)를 이용하여 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR)을 실시했다. 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 프라이머 500 nM (서열번호 4과 서열번호 5), 프로브 250 nM (서열번호 6), 2X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 25 μ l 그리고 바이러스 DNA 2.5 μ l가 포함되며 최종부피 50 μ l이 되도록 Nuclease-free water를 추가하여 반응시켰다. 태크맨 프로브 리얼타임 PCR(TaqMan probe realtime PCR) 반응에는 CFX connect (Bio-rad)를 사용하였으며, 반응조건은 50 °C 2분, 95 °C에서 10분 반응하고, '95°C에서 15초 58°C에서 1분'을 한 사이클로 하여 총 45 사이클을 반복하였다.

4) 혈액 내 PCV2 DNA 정량 분석을 위한 표준곡선 제작

플라스미드 PCV2 DNA 3 set (농도: 10^{11} ~ 10^1 plasmids per 2.5 μ l sample, 3반복)에 대해 상기 혼합물조성 및 반응조건으로 태크맨 프로브 리얼타임 PCR를 실시하였다. 이를 바탕으로 cycle threshold 값과 plasmid copy 농도의 log값 사이의 관계그래프를 통해 추세선을 구함으로써 표준곡선을 제작했다.

[실시예 4] 직접염기서열분석 및 PCR-RFLP를 통한 유전자형 분석

공시돈 142두에 대해 직접염기서열분석(direct sequencing) 및 PCR-RFLP를 통해 개체별 유전자형 분석을 실시하였다. 서열번호 2 및 3의 프라이머를 이용하여 PCR을 실시하였다(표 1 ~ 표 3). 이와 같이 확보된 PCR 산물(PCR

product)에 대해 직접염기서열분석방법 또는 제한효소 *Nla* III 처리방법을 통해 분석대상 개체의 유전자형 진단을 할 수 있었다(도 3 및 도 4).

[실시예 5] 유전자형과 PCV2 viral load와의 연관성 분석

공시돈 142두에 대해 본 발명의 SNP에 따른 유전자형과 4-10주령 PCV2 증식수준(혈액내 viral load)과의 연관성 분석을 실시했다. 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.3 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 통계분석모델에서 Genotype, Sex, Batch를 고정효과로 분석하였으며, 각 유전자형의 최소제곱평균(Least Square Means)을 구하여 유의차를 평가하였다.

본 발명에서 공시돈에 대한 유전자형 및 대립유전자 빈도는 하기 표 4와 같다. 본 발명의 공시돈에서 CC 유전자형이 나타나지 않았으며, TT 유전자형과 TC 유전자형 빈도는 각각 0.31, 0.69로 이형접합체형이 더 높게 나타났다. 대립유전자 빈도에서는 T allele (0.65)이 C allele (0.35) 보다 높게 나타났다.

표 4

표 4. *DNAJC6* 유전자의 SNP에 대한 유전자형 및 대립유전자 빈도

Number of animals	Genotype			Gene	
	TT	TC	CC	T	C
142	0.31 (44) ¹	0.69 (98)	0 (0)	0.65	0.35

¹ number of animals

유전자형과 PCV2 증식수준과의 연관성 분석 결과는 표 5와 같다. TT 유전자형을 가진 개체들은 TC 유전자형을 가진 개체들보다 4-10주 혈액 내 PCV2 DNA 증가수준이 낮게 나타났다($P = 0.040$).

돼지는 이유후 군사가 이루어지기 때문에 돈사 혹은 같은 배치안에서 PCV2 감염돈이 발생했을 때, 상호접촉에 의해 PCV2 감염이 전파된다(Albina 등, 2001; Bolin 등, 2001). 따라서, 다른 동기군 개체들과 다르게 4-10주 혈액 내 PCV2 증식수준량이 낮은 것은 PCV2 증식에 저항성이 있다고 할 수 있다. 따라서, *DNAJC6*의 인트론 11에 위치한 SNP의 TT 유전자형을 가진 개체가 PCV2 증식관련 저항성이 우수하다고 판단할 수 있으며, 본 발명의 SNP는 PCV2 증식에 대한 저항성 여부를 판단할 수 있는 DNA 마커로서 사용될 수 있음을 증명하였다.

표 5

표 5. *DNAJC6* 유전자의 SNP1 유전자형과 형질과의 연관성 분석

Trait	Genotype		P-value
	CT (n=98)	TT (n=44)	
Viral load ¹ (log PCV2 copies/ml)	3.42 ^a (0.19) ²	2.71 ^b (0.29)	0.040

¹ The level of proliferation of PCV2 viral load from 4 weeks to 10 weeks old pig

² Least square means and standard error

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



도면2



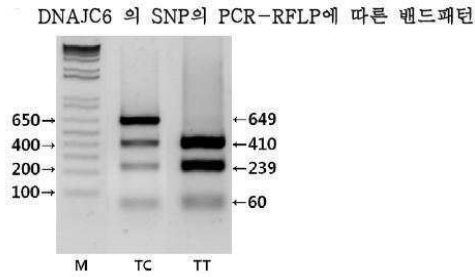
도면3

DNAJC6 의 SNP를 포함하는 PCR 산물의 염기서열 및 SNP (T>C)의 위치

```

1  ATCCTGTGTT GCCTCAATGT GCAGTGTAGG TCACAGACAC AGCTCGGATC TGGCATTGCT
61  GTGGCTGTGG CATAGGCTGG CAGATGCGGC TCTGATTTGA CCCCTAGCCT GGAACCTCT
121 AAATGCCGCA GGGGCGGCTG TGAAGAAGAA AAGAATAAAA GAAAAACCA TTAAGTCTAC
181 TTAAGTGTGA TATGAGCAGC TTCCATCTAT CATCTTATGT AATTTTGGCA ATAGTCA[T/C]GT
241 GAGCTAGGTG CTGTTGATTT TTTTCCCAT CTCGCTGTGG AGAAAACCAA GGCACAGAGA
301 AATAAAGTAA CTTTCTCTGT GTGACGGAGC CAGTAAGTAG CAGAGAAGGG ATTCAAACTC
361 CGGCTGCTTC TAGAGGTCTT GCTGTTCCAC CCACACTACA CTGCCTCTCA GATGCTTGAC
421 AGACGGTAGT GGCCTGTGTA GGTGAATAC CTCCCGTGT TCATTGCTAA GGTCTTAAAA
481 GCACTGATTT TTTTTTTTTT TTTTCAGGCT GCTCCTTCTC TCTTTCTGAA GTTATGTGCA
541 TAGATGCTAA CAAAAGGCAG ATGTTTTTGG CTCTCTACTA ACTGTGTCTT GGCATATTGG
601 TCTTCCTTAG ATCAGAAATC AGAGAAATCC TTCTGCGAGG AGGACCATGC TGCCCTAGTG
661 AATCAGGAAA GTGAGCAGTC GGATGATGAA CTTCTGACGC TGTCCAGTC
    
```

도면4



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> DNA markers associated with the proliferation of PCV2 in pigs
using a SNPs in porcine DNAJC6 gene

<130> P11-131125-04

<160> 6

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 709

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 1

atcctgtgtt gcctcaatgt gcagtgtagg tcacagacac agctcggatc tggcattgct 60

gtggctgtgg cataggctgg cagatgcggc tctgatttga cccctagcct gggaacctct 120

aaatgccgca ggggcggctg tgaagaaaa aagaataaaa gaaaaaccac ttaagtctac 180

ttactgttga tatgagcagc ttccatctat catcttatgt aatttttgca atagtcattg 240

gagctagggtg ctgttgattt tttttcccat ctgcctgtgg agaaaaccaa ggcacagaga 300

aataaagtaa ctttctctgt gtgacggagc cagtaagtag cagagaaggg attcaaactc 360

cggctgcttc tagaggctctt gctgttcacc ccacactaca ctgcctctca gatgcttgac 420

agacggtagt ggccgtgtga ggtgaaatac ctcccgtgtt tcattgctaa gggctctaaa 480

gcactgattt tttttttttt ttttcaggct gctccttctc tctttctgaa gttatgtgca 540

tagatgctaa caaaaggcag atgtttttgg cttctcacta actgtgtcct ggcatattgg 600

ttttccttag atcagaaaac agagaaatcc ttctgcgagg aggaccatgc tgccttagtg 660

aatcaggaaa gtgagcagtc ggaatgatgaa cttctgacgc tgtccagtc 709

<210> 2

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	2	
	atcctgtgtt gcctcaatgt	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	3	
	gactggacag cgtcagaagt	20
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	4	
	tcgatctcaa ggacaacgga gt	22
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	5	
	ttggtcttcc aatcacgctt ctgc	24
<210>	6	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR probe	
<400>	6	
	cagagcagca ccctgtaacg ttgtca	27