(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0011636
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.[9]
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0075426
(22) 출원일자 2007년07월27일
심사청구일자 2007년07월27일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
전진태
서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호
이정규
경남 진주시 이현동 235-1 덕산아파트 407호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 21 항

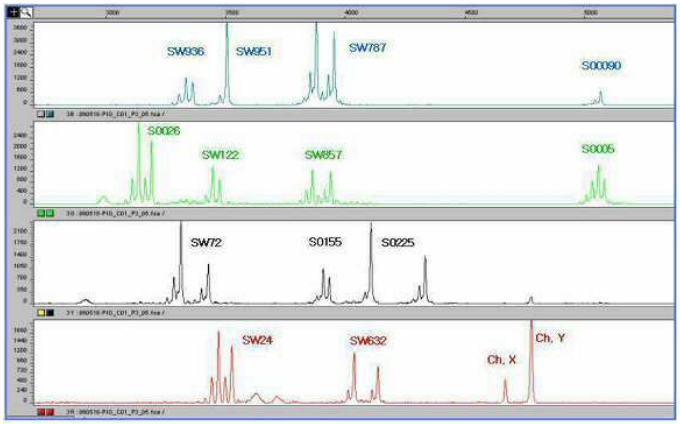
(54) 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 돼지의 개체식별 및브랜드육 식별 방법

(57) 요 약

본 발명은 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 돼지의 개체식별 및 브랜드육 식별 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 돼지의 개체식별 및 브랜드육의 식별을 위해 선발된 마이크로새틀라이트 마커 조합에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 돼지의 개체식별 및 브랜드육 식별 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법은 신속하고 효과적으로 돼지 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 친자감별이 가능하다. 따라서, 이러한 방법을 브랜드육의 식별에 적용함으로써 유통상에 발생하는 부정행위를 제어할 수 있으며, 브랜드에 대한 소비자의 신뢰도를 상승시켜 생산농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

임현태

울산 중구 약사동 800-33번지

김재환

제주 남제주군 성산읍 신풍리 812-1번지

서보영

경남 진주시 옥봉동 670-2번지

이상호

경남 산청군 신안면 외송리 239번지

이재봉

경남 함양군 안의면 월림리 720-1번지

김효선

충남 천안시 성환읍 송덕리 55-12번지 영흥아파트 가동 405호

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 SW240, S0005, SW911, SW857, SW936, S0090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, S0301, SW122, S0225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 13개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR 증폭하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자를(allele) 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 돼지 개체의 식별 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커가 S0005, SW857, SW936, S00090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, SW122, S0225 및 SW787임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커는 성감별 마커 PIG_X 및 PIG_Y가 추가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머가 서열번호 1 내지 서열번호 34로 표시되는 염기서열로 이루어진 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머가 서열번호 3 및 4, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20, 서열번호 21 및 22, 서열번호 23 및 24, 서열번호 27 및 28, 서열번호 29 및 30, 서열번호 33 및 34로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 서열번호 35 및 서열번호 36, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

SW240, S0005, SW911, SW857, SW936, S0090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, S0301, SW122, S0225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 13개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 돼지 개체식별용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커가 S0005, SW857, SW936, S00090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, SW122, S0225 및 SW787임을 특징으로 키트.

청구항 10

제8항에 있어서, 2개의 성감별 마커 PIG_X와 PIG_Y가 추가되는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에

GTTTCT 염기가 추가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머가 서열번호 1 내지 서열번호 34로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머가 서열번호 3 및 4, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20, 서열번호 21 및 22, 서열번호 23 및 24, 서열번호 27 및 28, 서열번호 29 및 30, 서열번호 33 및 34로 표시되는 염기서열로 이루어진 것임을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

제8항에 있어서, 서열번호 35 및 서열번호 36, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 15

SW240, SO005, SW911, SW857, SW936, SO090, SO155, SW72, SW24, SW951, SO026, SW632, SO301, SW122, SO225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 마이크로새틀라이트 마커에 특이적이며 5'말단에 GTTCT 염기가 추가된 역방향 프라이머 서열.

청구항 16

제15항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32 및 서열번호 34로 이루어진 군 중에서 선택되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 프라이머 서열.

청구항 17

돼지의 성감별 마커 PIG_X 및 PIG_Y에 특이적인 프라이머 서열.

청구항 18

제17항에 있어서, 서열번호 35 내지 서열번호 38로 이루어진 군 중에서 선택되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 프라이머 서열.

청구항 19

(a) 부돈 및 모돈의 DNA의 대립유전자형을 분석하고 이를 데이터베이스로 구축하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 부돈 및 모돈으로부터 계통출하된 자돈의 DNA를 소비단계에서 샘플링하는 단계;

(c) 상기 (b) 단계에서 수득한 자돈의 DNA 대립유전자형을 분석하는 단계; 및

(d) 상기 (a) 단계의 부돈 및 모돈의 DNA 데이터베이스와 상기 (b) 단계의 자돈의 대립유전자형을 기초로 하여 친자감별을 수행하는 단계를 포함하는 돈육의 식별방법.

청구항 20

(a) 생산단계에서 계통출하돈의 DNA 대립유전자형을 분석하고 이를 데이터베이스로 구축하는 단계;

(b) 도축단계, 유통단계 및 소비단계로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 단계에서 자돈의 DNA를 샘플링하여 대립유전자형을 분석하는 단계; 및

(c) 상기 (a) 단계의 계통출하돈의 DNA 대립유전자형과 상기 (b) 단계의 자돈의 DNA 대립유전자형을 비교하여 동일성여부를 검증하는 단계를 포함하는 돈육의 식별방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 대립유전자형의 분석은 제8항의 키트를 이용하여 멀티플렉스 PCR 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 돼지의 개체식별 및 브랜드육식별 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 돼지의 개체식별 및 브랜드육 식별을 위해 선발된 마이크로새틀라이트 마커 조합에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 돼지의 개체식별 및 브랜드육 식별 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 돼지는 세계적으로 사람이 필요로 하는 단백질 섭취를 위한 가장 기본적인 가축으로 각각의 시대와 상황 및 사람들의 기호에 따라 사육되어 왔으며, 우리나라의 경우 돼지고기 중 특정부위만을 선호하는 경향을 가지고 있다.

<3> 현재 돼지고기의 경우 특정부위를 포함해 수입이 되고 있는 상황이고 또한 국내에서 생산되는 돼지고기는 수많은 브랜드가 만들어져 브랜드육으로 판매되고 있다. 하지만 돼지고기는 육안적 식별이 불가능하다는 점을 악용하여 일부 부도덕한 유통업자들이 수입육(냉장 및 냉동육) 및 비 브랜드육 등을 브랜드육으로 둔갑 유통시키는 사례가 빈번히 발생하고 있으나 둔갑유통을 방지하기 위한 과학적인 감식기법이 전무한 상황으로 과학적 감식기법 개발을 통한 건전한 유통문화 정착이 절실히 요구되는 실정이다.

<4> 쇠고기의 경우 2007년 생산이력제 시범사업의 일환으로 DNA 마커를 이용한 개체판별 사업이 진행될 예정이나 아직 돼지고기 생산이력에 관련된 연구 등이 국내에서 미비하여 산업에 직접 활용 가능한 기술이 개발되지 못하고 있어 브랜드육의 신뢰성을 높이고 정확한 부정육 식별을 위하여 돼지에 적합한 DNA 마커 개발이 필요하다.

<5> 마이크로새틀라이트들은 1990년경부터 동물의 계통분류, 유전적 유연관계 분석 연구에 있어 가장 효율적인 분자마커로 활용되고 있으며, 2000년 이후 개, 고양이등 애완동물과 연어등 어류에서는 마이크로새틀라이트를 이용하여 특정 개체의 품종식별에 사용하고 있다. 최근에는 특정 개체의 품종식별을 위하여 마이크로새틀라이트의 실험결과를 활용한 다양한 통계분석기법(Bayseian, Frequency, Dc genetic distance활용기법)들이 제안되었으며, 가축의 경우 국제동물유전학회(http://www.isag.org.uk/02_PVpanels_LPCGH.doc), Rosline 연구소(http://www. projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html) 등에서 권장하는 40 여종의 마이크로새틀라이트를 사용하여 대립유전자의 다형성이 과다하게 편귀되어 있지 않은 특성을 이용하여 생산이력제, 친자감별과 계통유전학등에 광범위하게 활용되고 있다.

<6> 이에 본 발명자들은 마아크로새틀라이트 마커를 이용한 돼지의 개체식별 및 브랜드육 식별 방법을 연구하던 중, 다형성지수가 높은 마이크로새틀라이트 마커를 선발하고 이에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하면 신속하고 효과적으로 돼지 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 친자감별 및 브랜드육 식별에도 매우 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 따라서 본 발명의 목적은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 돼지 개체의 식별방법을 제공하는 것이다.

<8> 또한, 본 발명의 목적은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 돼지 개체 식별용 키트를 제공하는 것이다.

<9> 또한, 본 발명의 목적은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 세트를 제공하는

것이다.

<10> 또한, 본 발명의 목적은 상기 키트를 이용한 브랜드육의 식별방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<11> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 돼지 개체의 식별방법을 제공한다.

<12> 또한, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 돼지 개체 식별용 키트를 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

<14> 또한, 본 발명은 상기 키트를 이용한 브랜드육의 식별방법을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

<16> 본 발명에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트(Microsatellites)"란 진핵세포(eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 모노-, 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열을 의미한다. 일반적으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복 (tandem repeat)된 형태로 존재한다.

<17> 본 발명에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트 마커"란 마이크로새틀라이트를 이용한 DNA 다형검출 마커를 말한다.

<18> 본 발명에서 사용된 용어 "DNA 다형(Polymorphism)"이란 동일종간 생물개체의 특이적 DNA 구조의 다양성을 말한다.

<19> 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 본 발명에서 선발한 마이크로새틀라이트의 핵산서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucle tide)를 의미한다. 본 발명에서는 본 발명에서 선발한 마이크로새틀라이트 마커의 핵산서열을 증폭할 수 있는 것이라면 당업자가 디자인할 수 있는 모든 프라이머가 본 발명의 프라이머 범위에 포함된다.

<20> 본 발명에서 사용된 용어 "PCR 반응 혼합물"은 DNA 폴리머라제 및 완충용액을 포함하여 PCR를 수행하기 위해 사용되는 분자생물학적 시약(molecular biological reagent)을 의미한다.

<21> 본 발명에서 사용된 용어 "브랜드육"이란 품질 및 위생·안전성을 보증할 수 있고, 사업주체가 명확하며, 상표등록이 되어 있는 돈육을 일컫는다.

<22> 본 발명의 돼지 개체의 식별방법은 돼지의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 한다.

<23> 상기 돼지의 다형성 분석용 마커로는 SW240, S0005, SW911, SW857, SW936, S0090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, S0301, SW122, S0225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 13개 이상을 사용할 수 있다

<24> 가장 바람직하게는, 돼지의 다형성 분석용 마커로는 S0005, SW857, SW936, S00090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, SW122, S0225 및 SW787로 이루어진 13개의 마커를 사용할 수 있다.

<25> 또한, 돼지의 다형성 분석용 마커로는 성감별 마커 PIG_X 및 PIG_Y를 추가로 포함할 수 있다.

<26> 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머로는 마이크로새틀라이트 DNA의 3' 및 5' 부위에 인접한 50 내지 300 bp 부위에 위치한 10 내지 50 bp의 연속된 각 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

<27> 바람직하게는, 특히 본 발명의 역방향 프라이머는 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적이면서 5' 말단에 특정 서열이 추가된 것일 수 있다. 상기 역방향 프라이머의 5' 말단에 특정 서열의 추가는 스터터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 돼지 개체를 식별할 수 있도록 해준다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 역방향 프라이머는 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된 것일 수 있다.

<28> 본 발명자들은 돼지를 신속하고 효과적으로 식별할 수 있도록 하기 위해 다형성지수가 높은 마이크로새틀라이트 마커를 선발하였다.

<29> 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 17개의 돼지의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트에 특이적인 프라이머

를 각각 제조하고(실시예 2 참조), 이를 이용하여 돼지로부터 유래된 DNA 시료(실시예 1 참조)를 멀티플렉스 PCR에 의해 증폭한 다음(실시예 3 참조), 이들의 다형성 지수를 계산하였다(실시예 4 참조). 그 다음 17개의 마이크로새틀라이트 중 *He* 추정치를 근거로 하여 다형성지수가 높은 13개의 마이크로새틀라이트를 선발하였으며, 상기에서 선발한 마이크로새틀라이트에 성감별 마이크로새틀라이트를 추가하여 15개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 PCR 증폭을 수행하고 이들의 동일개체 출현확률 및 친자감별확률을 계산하였다(실시예 6 참조). 그 결과, 다형성지수가 높은 13개의 마이크로새틀라이트를 이용하여도 개체식별 및 친자감정이 가능한 추정치를 나타내였으므로 경제적인 면을 고려한다면 13개의 마이크로새틀라이트를 이용하는 것이 유용함을 알 수 있었다(표 4 참조).

<30> 따라서, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 돼지 개체의 식별방법을 제공한다.

<31> 바람직하게는, 본 발명에 따른 돼지 개체의 식별방법은 (a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 SW240, S0005, SW911, SW857, SW936, S0090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, S0301, SW122, S0225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 13개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR 증폭하는 단계; 및

<32> (b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자를(allele) 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함한다.

<33> 상기 (a) 단계에서 분석하고자 하는 핵산 시료는 생물학적 시료로부터 분리될 수 있다. 상기 생물학적 시료로는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 샘플, 생검 표본, 모근, 조직 배양과 같은 고형 조직 샘플 또는 이로부터 유래된 세포 및 그 자손이 포함된다. 또한, 상기 샘플들은 시약처리, 가용화된 샘플 또는 배양세포, 세포 상등액 및 세포 용해물도 포함한다.

<34> 상술한 생물학적 시료로부터 핵산의 분리는 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 돼지의 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하여 사용하였다(실시예 1 참조).

<35> 상기 (a) 단계에서 마이크로새틀라이트 마커는 가장 바람직하게는, S0005, SW857, SW936, S00090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, SW122, S0225 및 SW787로 이루어진 13개의 마커를 사용할 수 있다.

<36> 또한, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커는 성감별 마커 PIG_X 및 PIG_Y를 추가로 포함할 수 있다.

<37> 한편, 멀티플렉스 PCR의 경우 PCR 증폭시 여러 개의 프라이머가 사용되므로 각각의 프라이머가 증폭될 때 서로 간에 간섭이 발생하여 각각의 프라이머가 완전하게 아데노신을 합성할 수 없게 하여 완전한 스터터 밴드를 제거한 증폭산물을 획득하기가 어렵다. 이는 개체식별을 위한 유전자형의 결정이 단계에서 오류가 발생할 수 있으며, 이 단계에서 오류는 개체식별의 의미를 퇴색시키는 결과를 가져오게 된다. 이에 본 발명자들은 이러한 오류를 최소화하기 위해 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 중 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기를 추가하였다.

<38> 따라서 바람직하게는 본 발명에서 사용되는 역방향 프라이머는 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 프라이머로는 서열번호 1 내지 서열번호 34로 표시되는 염기서열을 가진 것일 수 있다.

<39> 가장 바람직하게는, 본 발명의 프라이머로는 서열번호 3 및 4, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20, 서열번호 21 및 22, 서열번호 23 및 24, 서열번호 27 및 28, 서열번호 29 및 30, 서열번호 33 및 34로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

<40> 또한, 본 발명의 프라이머로는 서열번호 35 및 서열번호 36, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 추가로 포함할 수 있다.

<41> 상기 프라이머의 염기서열의 일부를 다른 염기로 치환, 삭제하거나 일부 염기서열의 위치와 방향이 바뀐 염기서열도 본 발명에 따른 프라이머의 범위에 속한다.

<42> 또한, 본 발명의 프라이머는 형광물질로 표지될 수 있다. 형광물질로는 특별히 제한되지 않으나, 예를

들면, FAM, VIC, NED, PET 등이 있다.

<43> 상기 (a) 단계에서 멀티플렉스 PCR은 당업계에 공지된 방법에 따라 각 유전자를 증폭하기에 적합한 조건으로 수행될 수 있다. 바람직하게는 멀티플렉스 PCR은 어닐링(Annealing) 온도, 증폭산물의 크기 등을 고려하여 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 DNA 6.6㎍, 각각의 프라이머 쌍 8.25㎕, Hot starte Taq DNA 중합효소 1.8 unit((주)바이오니아), 10×완충용액 1.5㎕, dNTP 1.5㎕의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 15㎕로 하였으며, PCR 조건은 95℃에서 15분간 처리한 후 94℃에서 60초, 55℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94℃에서 60초, 54℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후 94℃에서 60초, 53℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복하고 65℃에서 30분간 신장(extension) 후 4℃에서 종료하였다.

<44> (b) 단계에서 증폭된 PCR 산물의 크기 분석은 증폭된 산물을 자동 유전자 분석장비를 이용하여 분리하고, 각 좌위별 대립유전자(allele)의 크기를 분석함으로써 수행할 수 있다. 예를 들면, 증폭 산물의 크기는 통상의 방법, 예컨대 아가로즈 젤 또는 아크릴아마이드 젤을 이용한 전기영동으로 실시한 후, 전개된 DNA 단편을 형광 염색 등을 통하여 확인가능하다. 바람직하게는, 염기서열분석장치(Applied Biosystems사)에 대립유전자분석 모드를 이용하여 전기영동을 실시해 프라이머의 형광물질 및 PCR 산물의 크기별로 분류하는 방법을 통하여 확인할 수 있다. 상기 단계에서의 PCR 산물의 크기 분석 방법은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 모두 실시가능하며, 상기 일예로 설명한 방법이외 통상의 모든 방법을 포함할 수 있다.

<45> 다른 관점으로서, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 돼지 개체 식별용 키트를 제공한다. 상기 본 발명에 따른 키트는 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 및 PCR 반응 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 키트는 프라이머, dNTP, Taq DNA 폴리머라아제 등으로 구성될 수 있다. 바람직하게는, 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된 것일 수 있다.

<46> 또한, 본 발명은 돼지의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 서열을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 서열은 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된 것이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 서열은 SW240, SO005, SW911, SW857, SW936, SO090, SO155, SW72, SW24, SW951, SO026, SW632, SO301, SW122, SO225, SW769 및 SW787로 이루어진 군 중에서 선택된 마이크로새틀라이트 마커에 특이적이며 5'말단에 GTTCT 염기가 추가된 것일 수 있다. 가장 바람직하게는 본 발명의 프라이머 서열은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32 및 서열번호 34로 이루어진 군 중에서 선택되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

<47> 또한, 본 발명은 돼지의 성감별 마커 PIG_X 및 PIG_Y에 특이적인 프라이머 서열을 제공한다. 바람직하게는 상기 프라이머 서열은 서열번호 35 내지 서열번호 38로 이루어진 군 중에서 선택되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

<48> 한편, 본 발명에 따른 돼지 개체 식별 방법 및 키트는 브랜드육 유통 감시에 적용될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 본 발명에서 선발한 13종의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 실제로 출하되고 있는 브랜드육의 대립유전자형을 분석하고 친자감별을 실시한 결과, 100% 부모를 찾을 수 있는 결과를 나타었다(표 5 참조).

<49> 따라서, 본 발명은 (a) 부돈 및 모돈의 DNA의 대립유전자형을 분석하고 이를 데이터베이스로 구축하는 단계;

<50> (b) 상기 (a) 단계의 부돈 및 모돈으로부터 계통출하된 자돈의 DNA를 소비단계에서 샘플링하는 단계;

<51> (c) 상기 (b) 단계에서 수득한 자돈의 DNA 대립유전자형을 분석하는 단계;

<52> (d) 상기 (a) 단계의 부돈 및 모돈의 DNA 데이터베이스와 상기 (b) 단계의 자돈의 대립유전자형을 기초로 하여 친자감별을 수행하는 단계를 포함하는 브랜드육의 식별방법을 제공한다. 이에 대한 흐름도는 도 2에 나타낸 바와 같다.

<53> 상기 (a) 및 (c) 단계에서 대립유전자형의 분석은 본 발명에 따른 돼지 개체 식별용 키트를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하고 수득된 PCR 산물을 염기서열분석장치(Applied Biosystems사)에서 대립유전자분석 모드를 이용하여 전기영동을 실시하여 프라이머의 형광물질 및 PCR 산물의 크기별로 분류하는 방법으로 수행할 수 있다.

측정된 대립유전자형에 대한 정보 및 부돈 및 모돈에 대한 정보는 데이터베이스화한다.

<54> 상기 (b) 단계에서 출하된 자돈의 DNA 샘플링은 유통업체를 통한 판매, 식당판매 및 정육점 판매 등의 유통망을 통한 소비 단계에서 소비자가 브랜드육 관리자에서 의뢰함으로써 수행될 수 있다. DNA 샘플링 방법은 식당이나 정육점에서 판매되는 고기를 구입한 소비자가 의뢰를 하거나 브랜드육 관리자가 판매점의 판매처에서 샘플링하여 분석기관 등에 샘플링한 조직을 의뢰하면 당업계에 공지된 방법을 사용하여 DNA를 추출 할 수 있다. 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 SPK 버퍼(27% sucrose, 1x SSC, 1mM EDTA, 1% SDS, add ddH2O) 2ml에 조직 2g을 첨가한 후 균질화기(homogenizer)를 이용하여 조직을 잘게 분쇄하고 37℃ 배양기에 하룻밤(overnight) 동안 처리한다(최초 2시간동안 30분 간격으로 인버팅). 상기 용액에 RNase(10mg/ml) 2ul 첨가 후 37℃에서 2시간 동안 배양하고, 이후 ProteinaseK(25mg/ml) 5ul 첨가 후 37℃에서 2시간 동안 배양시킨다. 배양된 용액을 상온에 꺼내어 식힌 후 배양된 용액의 2배의 페놀(25 : 24: 1 = phenol : Chloroform: Isoamyl Alcohol)을 첨가하고, 두 층이 잘 섞이도록 교반시킨 후 13,000rpm에서 15분간 원심분리 한다. 원심분리 후 분리된 두 층에서 상층액 만을 취하여 새로운 용기로 옮기고, 새로운 용기로 옮긴 시료의 양과 동일한 양의 에탄올(100%)을 첨가한 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리 한다. 원심분리 후 에탄올(100%)을 제거하고, 새로운 에탄올(70%)을 첨가하여 침전된 DNA를 세척한 다음 에탄올(70%)을 조심스럽게 제거하고 상온에서 에탄올이 없어질 때까지 건조시킨 후 TE 버퍼(pH 8.0)에 DNA를 녹이는 방법으로 샘플링한 시료로부터 DNA시료를 채취할 수 있다.

<55> 상기 (d) 단계에서 친자감별은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 부모돈들의 대립유전자형의 정보가 저장되어 있는 데이터베이스의 자료와 친자감별 대상 샘플(자돈으로 생각되는 개체)의 대립유전자형을 일반적인 친자감별 프로그램(예, PAPA 2.0, GeneClass 2)에 적용하여 부모들의 대립유전자형 중 비교대상개체의 대립유전자형과 가장 높은 동일성을 가진 부모돈을 찾는 방법에 의해 수행될 수 있다.

<56> 또한, 본 발명은 (a) 생산단계에서 계통출하돈의 DNA 대립유전자형을 분석하고 이를 데이터베이스로 구축하는 단계;

<57> (b) 도축단계, 유통단계 및 소비단계로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 단계에서 자돈의 DNA를 샘플링하여 대립유전자형을 분석하는 단계; 및

<58> (c) 상기 (a) 단계의 계통출하돈의 DNA 대립유전자형과 상기 (b) 단계의 자돈의 DNA 대립유전자형을 비교하여 동일성여부를 검증하는 단계를 포함하는 브랜드육의 식별방법을 제공한다. 이에 대한 흐름도는 도 3에 나타낸 바와 같다.

<59> 상기 (a) 단계는 농가에서 출하전에 돼지의 모근 및 조직으로부터 DNA를 채취하여 대립유전자형을 분석하는 단계이다. DNA의 채취는 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.

<60> 상기 (a) 및 (b) 단계에서 대립유전자형의 분석은 본 발명에 따른 돼지 개체 식별용 키트를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하고 수득된 PCR 산물을 염기서열분석장치(Applied Biosystems사)에서 대립유전자분석 모드를 이용하여 전기영동을 실시해 프라이머의 형광물질 및 PCR 산물의 크기별로 분류하는 방법으로 수행할 수 있다. 측정된 대립유전자형에 대한 정보와 생산정보 등은 데이터베이스화한다.

<61> 상기 (b) 단계는 도축장에서 출하된 돼지의 혈액 및 조직을 이용하여 DNA 검사를 수행하고 DNA 검사 결과 및 도축정보를 데이터베이스화한다.

<62> 또한, 유통가공업체 및 매장을 통한 유통단계에서 돈육을 샘플링하여 DNA 검사를 수행하고 DNA 검사 결과 및 유통정보를 데이터베이스화한다.

<63> 또한, 식당 및 가정을 통한 소비단계에서 소비자 또는 유통단속기간 등의 의뢰를 통해 돈육을 샘플링하여 DNA 검사를 수행하고 DNA 검사 결과 및 소비정보를 데이터베이스화한다.

<64> 상기 (c) 단계는 상기 (a) 단계에서 수집한 DNA 정보 및 생산정보와 상기 (b) 단계에서 수집한 정보를 비교하고 동일성을 검증한다.

<65> 본 발명에 따른 돈육의 식별 방법은 부정육 유통을 근절시킬 수 있고 유통업자들의 부정행위를 사전에 방지할 수 있는 장점이 있다.

효 과

<66> 이상, 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 따른 방법은 돼지에 특이적인 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여

멀티플렉스 PCR을 수행함으로써 신속하고 효과적으로 돼지 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 친자감별이 가능하다. 따라서, 이러한 방법을 브랜드육의 식별에 적용함으로써 유통상에 발생하는 부정행위를 제어할 수 있으며, 브랜드에 대한 소비자의 신뢰도를 상승시켜 생산농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<67> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<68> **<실시예 1>**

<69> **공시동물 및 DNA 시료**

<70> 경상남도의 돼지농가에서 330두의 혈액을 채취하여 공시재료로 사용하였다. 돼지의 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA의 분리하였다.

<71> **<실시예 2>**

<72> **프라이머의 제작**

<73> 돼지 개체 식별 및 친자감별에 효과적으로 사용될 수 있는 마이크로새틀라이트 마커를 선발하기 위해, 국제동물유전학회에서 제안한 돼지의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트(17개)에 특이적인 프라이머를 (주)진켐에 의뢰하여 주문 제작하였다. 또한, 성판별을 위해 성감별 프라이머를 X 염색체 및 Y 염색체 내의 특이 유전자를 기초로 하여 디자인하였다. 최종 멀티플렉스 PCR 세트의 제작은 ABI(Applied Biosystems, USA)에서 주문 제작하였으며, 한 쌍의 프라이머 중 정방향 프라이머 한쪽에 FAM, VIC, NED, PET으로 이루어진 형광물질로 표지(Label)하였다. 마이크로새틀라이트의 명칭, 표지 형광물질 및 프라이머 염기서열은 상기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

<74> 돼지의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트에 특이적인 프라이머

위치	크로모좀	표지	프라이머 서열		서열번호
SW240	2	FAM	F	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	1
			R	GTTTCTAAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	2
S0005	5	VIC	F	TCTTCCCTCCTGGTAACTA	3
			R	GTTTCTGCACTTCCTGATTCTGGGTA	4
SW911	9	FAM	F	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC	5
			R	GTTTCTCATCTGTGGAAAAAAAAAGCC	6
SW857	14	VIC	F	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	7
			R	GTTTCTGATCCTCCTCCAAATCCCAT	8
SW936	15	FAM	F	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC	9
			R	GTTTCTGTGCAAGTACACATGCAGGG	10
S0090	12	FAM	F	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA	11
			R	GTTTCTGCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	12
S0155	1	NED	F	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG	13
			R	GTTTCTAAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	14
SW72	3	NED	F	ATCAGAACAGTGCGCCGT	15
			R	GTTTCTTTTGAAAATGGGGTGTTTCC	16
SW24	17	PET	F	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC	17
			R	GTTTCTATCCAAATGCTGCAAGCG	18
SW951	10	FAM	F	TTTCACAACTCTGGCACCAG	19
			R	GTTTCTGATCGTGCCCAAATGGAC	20
S0026	16	VIC	F	AACCTTCCCTTCCCAATCAC	21
			R	GTTTCTCACAGACTGCTTTTTACTCC	22
SW632	7	PET	F	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA	23
			R	GTTTCTGGAGTCAGTACTTTGGCTTGA	24

SO301	4	NED	F	CCGTCTTACTTAGGATGTTT	25
			R	GTTTCTTGATGTGTTTATGTGTTTGA	26
SW122	6	VIC	F	TTGTCTTTTTATTTTGCTTTTGG	27
			R	GTTTCTCAAAAAAGGCAAAAGATTGACA	28
SO225	8	NED	F	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	29
			R	GTTTCTCAGGTGGAAAGAATGGAATGAA	30
SW769	13	NED	F	GGTATGACCAAAAGTCCTGGG	31
			R	GTTTCTTCTGCTATGTGGGAAGAATGC	32
SW787	18	FAM	F	CTGGAGCAGGAGAAAGTAAGTTC	33
			R	GTTTCTGGACAGTTACAGACAGAAGAAGG	34
PIG_X	X	PET	F	TACCAGTACACTGTAAGGGT	35
			R	GTTTCTATGGATTCCCTTGCTGTCTC	36
PIG_Y	Y	PET	F	GCCCACAACAAGTTCCTAAG	37
			R	GTTTCTGTTCCACCTAGCAAGGAAGA	38

<75> **<실시예 3>**

<76> **PCR 증폭**

<77> 상기 실시예 1의 DNA 시료를 주형으로 하고, 실시예 2에서 제작한 각 프라이머를 사용하여 PCR을 다음의 조건으로 수행하였다.

<78> 주형 DNA 3.3㎍, 프라이머 2㎕, Taq DNA 중합효소 0.5 unit((주)솔젠트), 10×완충용액 1.5㎕, dNTP 1.2㎕의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 15㎕로 하였다. PCR 조건은 94℃에서 15분간 처리한 후 95℃에서 50초, 55℃에서 70초, 72℃에서 70초를 1 사이클로 하여 32회 반복하였다. 그 후 65℃에서 1시간, 25℃에서 2시간 신장시킨 후 4℃에서 종료하였다. PCR 산물은 ABI-310 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneScan version 2.1(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

<79> **<실시예 4>**

<80> **마이크로새틀라이트의 다형성 지수 분석**

<81> 실시예 3의 결과로부터 각각의 마이크로새틀라이트 다형성지수인 이형접합률(He, Heterozygosity) 및 다형정보지수(PIC, polymorphic Infomation Content)를 Cervus version 2.0을 이용하여 계산하였다(Marshall et al(1998) *Mol. Ecol.* 7: 639-655).

<82> 그 결과, 각 마이크로새틀라이트의 다형성지수는 표 2에 나타낸 바와 같다. 본 발명자들은 각 마이크로새틀라이트 중 이형접합률이 높은 순서와 증폭산물의 크기, 분석시 발생하는 경제적 비용 등을 고려하여 17개 중 13개의 마이크로새틀라이트(SO005, SW857, SW936, SO0090, SO155, SW72, SW24, SW951, SO026, SW632, SW122, SO225, SW787)를 선발하여 하나의 멀티플렉스 PCR 세트로 확립하였고, 예비 세트로서 나머지 4개의 마이크로새틀라이트를 하나의 멀티플렉스 PCR 세트로 확립하였다.

표 2

<83> 각 마이크로새틀라이트의 다형성지수

위치	대립 유전자 수	N	크기 범위(bp)	*He*	*PIC*
SO005	17	321	203 ~ 243	0.869	0.908
SW24	11	324	96 ~ 121	0.725	0.822
SW787	8	323	150 ~ 165	0.724	0.798
SW122	9	320	110 ~ 122	0.716	0.785
SW240	10	316	90 ~ 130	0.706	0.746
SW857	8	324	144 ~ 160	0.667	0.807
SW72	6	326	101 ~ 115	0.666	0.714

SW632	10	325	159 ~ 180	0.655	0.774
S0026	7	323	92 ~ 106	0.650	0.712
SW911	7	315	140 ~ 185	0.610	0.710
S0155	6	325	150 ~ 166	0.585	0.725
S00090	7	301	240 ~ 253	0.568	0.703
S0301	5	316	240 ~ 280	0.535	0.679
SW936	8	326	80 ~ 117	0.518	0.665
S0225	5	325	170 ~ 196	0.477	0.573
SW769	5	316	90 ~ 150	0.37	0.419
SW951	6	323	125 ~ 133	0.316	0.365

<84> **<실시예 5>**

<85> **통계분석**

<86> 실시예 3의 결과를 다음의 방법으로 통계분석하였다. Weir와 Hill(2002, Annu. Rev. Genet. 36:721-750) 추정법에 의한 *F*-통계량(F_{st}, F_{it}, F_{is} 및 농장간 pairwise-F_{st})은 FSTAT version 2.9.3(Goudet (2001) Available from http://www.unil.ch/izea/softwere/fatat.html)과 GENEPOP version 3.4(Raymond와 Rousset (1995) J. Heredity 86:248-249)를 사용하여 계산하였다.

<87> *F*-통계량 추정치에 대한 유의성 검정은 Goudet(2001)이 제안한 방법에 의하여 PT(permutation test)를 실시하여 얻었으며, 마터의 다형성지수인 이형접합률(*He*), 다형정보지수(*PIC*) 및 배제력(exclusion probability, *PE*)은 Cervus version 2.0(Marshall 등, 1998)을 이용하였다. 또한 추정된 F_{st}와 F_{is}값에 근거하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단에서의 동일개체 출현가능확률은 API-CALC version 1.0(Ayres와 Overall (2004) Molecular Ecology Notes 4:315-318)을 사용하여 계산하였다.

<88> 추정된 F-통계량을 이용하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단을 가정하여 MS 유전자형의 동일한 개체 출현확률(probability of identity; *PI*와 probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$)과 친자감정확률(probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed; *PEpu*와 probability of paternity exclusion; *PE*)을 API-CALC version 1.0과 Cervus version 2.0을 이용하여 추정하였다. 또한 친자감별을 위해 PAPA 2.0 을 이용하여 친자를 감별하였다.

<89> 그 결과, 전체의 MS를 사용할 경우 무작위 교배집단에서 1.04×10^{-17} 반형매 교배집단에서는 1.09×10^{-13}으로 나타났다(표 3). 이러한 추정치의 의미는 국내에서 하나의 돼지고기 브랜드육으로 개통 출하를 하는 농가들의 경우 일부 한정된 보증종모돈을 사용하기 때문에 이들의 절대적인 유전적 기여에 의한 거대한 반형매 교배집단으로 가정하고 하나의 브랜드를 만들어내기 위한 적정 사육두수를 감안하더라도 동일개체가 출현할 확률이 없는 것으로 보아도 무방할 것으로 사료된다. 또한 17개의 마이크로새틀라이트를 친자감정에 사용할 경우 부 또는 모의 교배기록과 유전자형이 파악된 경우에는 100% 친자감정이 가능함을 알 수 있었다.

표 3

<90> 17종의 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 개체 출현확률 및 친자감별확률

Selected by	*PI*	$PI_{half-sibs}$	PI_{sibs}	PE_{pu}	*PE*
Total	1.09×10^{-17}	1.09×10^{-13}	1.09×10^{-7}	0.99974	1.00000

<91> **<실시예 6>**

<92> **멀티플렉스 PCR**

<93> 상기 실시예 4에서 이형접합률(*He*)이 높은 순서와 증폭산물의 크기, 분석 시 발생하는 경제적 비용 등을 고려하여 선발된 13개의 마이크로새틀라이트(S0005, SW857, SW936, S00090, S0155, SW72, SW24, SW951, S0026, SW632, SW122, S0225, SW787)에 특이적인 프라이머 쌍(서열번호 3 및 4, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20,

서열번호 21 및 22, 서열번호 23 및 24, 서열번호 27 및 28, 서열번호 29 및 30, 서열번호 33 및 34)에 성감별 프라이머 두쌍(PIG_X 및 PIG_Y, 서열번호 35 및 36, 서열번호 37 및 38)을 추가하여 멀티플렉스 PCR을 다음의 방법으로 수행하였다

<94> 실시예 1에서 준비한 주형 DNA 6.6㎍, 각각의 프라이머 쌍 8.25㎕, Hot starte Taq DNA 중합효소 1.8 unit((주)바이오니아), 10×완충용액 1.5㎕, dNTP 1.5㎕의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 15㎕로 하였으며, PCR 조건은 95℃에서 15분간 처리한 후 94℃에서 60초, 55℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94℃에서 60초, 54℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후 94℃에서 60초, 53℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65℃에서 30분간 신장(extension) 후 4℃에서 종료하였다. 멀티플렉스 PCR 산물은 ABI-3130 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneMapper version 4.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

<95> 상기에서 취합된 자료를 기초로 하여 무작위교배집단, 반형매교배집단, 전형매교배집단으로 각각 가정한 후 이들의 동일개체 출현확률 및 친자감별확률을 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 계산하였다.

<96>

<97> 그 결과, 13개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 무작위교배집단으로 가정하여 분석한 추정치의 경우 1.09×10^{-13}, 반형매교배집단으로 가정하여 분석한 추정치의 경우 1.09×10^{-10}, 전형매교배집단으로 가정하여 분석한 추정치의 경우 1.09×10^{-6}으로 나타났으며 친자 감자감정 능력도 99.999%로 13개의 마이크로새틀라이트를 이용하여도 개체식별 및 친자감정이 가능한 추정치를 나타내었으므로 경제적인 면을 고려한다면 13개의 마이크로새틀라이트를 이용하는 것이 유용함을 알 수 있었다(표 4).

표 4

<98> 13종의 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 개체 출현확률 및 친자감별확률

Selected by	*PI*	$PI_{half-sibs}$	PI_{sibs}	PE_{pu}	*PE*
13MS	1.09×10^{-13}	1.09×10^{-10}	1.09×10^{-6}	0.99893	0.99999

<99> **<실시예 7>**

<100> **본 발명의 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 브랜드육의 친자감별**

<101> 본 발명에서 선발한 13종의 마이크로새틀라이트 마커의 친자감별 효과를 확인하기 위해 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머쌍을 이용하여 실제 경남의 K시에서 생산되는 P 브랜드의 돼지 부돈 11두와 모돈 3두에서 출생한 자돈 2두를 대상으로 대립유전자형을 분석하였다. 보다 구체적으로, 자돈 2두로부터 혈액을 채취하여 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하는 방법으로 수득하고, 이를 주형으로 하여 실시예 6과 동일한 방법으로 멀티플렉스 PCR을 수행한 다음 멀티플렉스 PCR 산물은 ABI-3130 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneMapper version 4.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다. 취합된 자료를 기초로 하여 대립유전자형을 분석하고 PAPA 2.0 프로그램을 이용하여 친자감별을 실시하여 교배 조합표와 비교하였다.

<102> 그 결과 100% 부모를 찾을 수 있는 결과를 나타었다(표 5).

【표 5】

친자감별 결과

감별대상	J1694	100,112	125,125	157,159	103,113	163,163	188,190	116,122	167,185	100,104	120,124	153,157	234,244
친자감별결과													
부	M1119	112,112	125,125	159,159	103,111	163,163	190,190	116,122	175,185	098,104	120,124	153,155	236,244
모	FM1694	100,114	125,127	157,157	111,113	163,163	190,190	116,118	167,177	100,104	120,130	145,157	234,240
감별대상	J2866	112,112	125,125	155,159	103,103	161,163	182,190	116,118	167,175	098,098	116,124	153,157	244,248
친자감별결과													
부	M1119	112,112	125,125	159,159	103,111	163,163	190,190	116,122	175,185	098,104	120,124	153,155	236,244
모	FM8521	112,112	125,125	155,155	103,111	161,163	182,190	122,122	175,177	098,104	120,124	145,157	240,250

<103>

도면의 간단한 설명

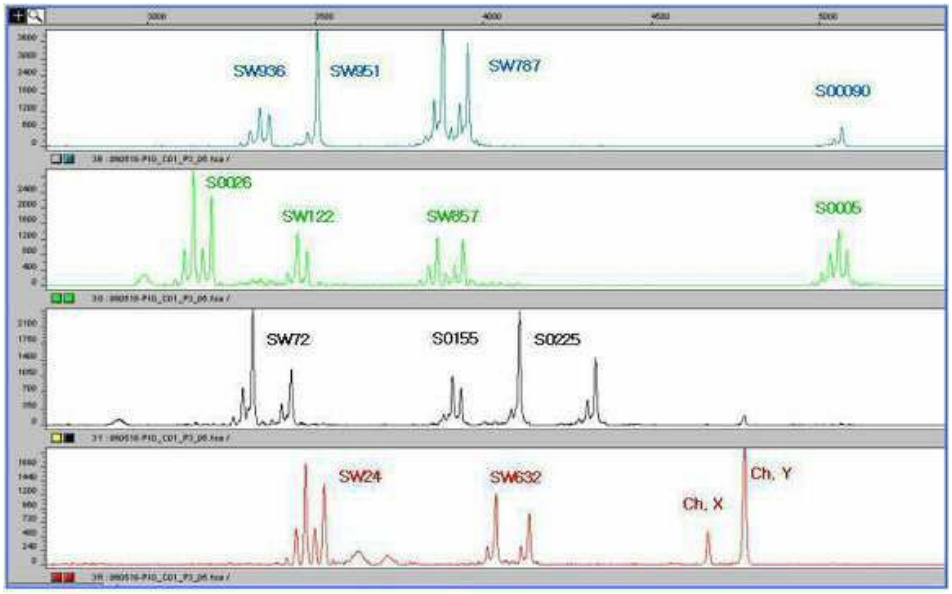
<104> 도 1은 13개의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머와 2개의 성감별 프라이머를 이용하여 수득한 멀티플렉스 PCR 세트 산물의 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

<105> 도 2는 친자감별을 토대로 브랜드 유통 적용 시 생물학적 개체관리 시스템의 흐름도를 나타낸다.

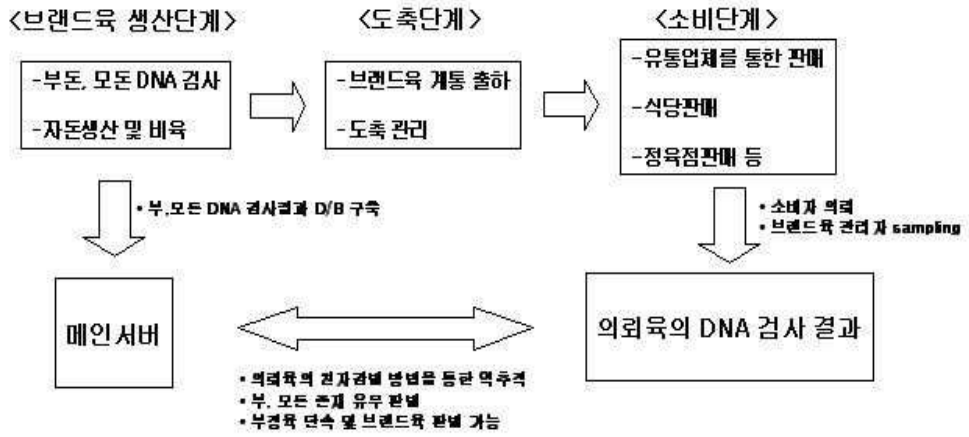
<106> 도 3은 식육의 생산에서 소비까지 각 단계별 생물학적 개체식별 검사를 통한 개체관리 시스템의 흐름도를 나타낸다.

도면

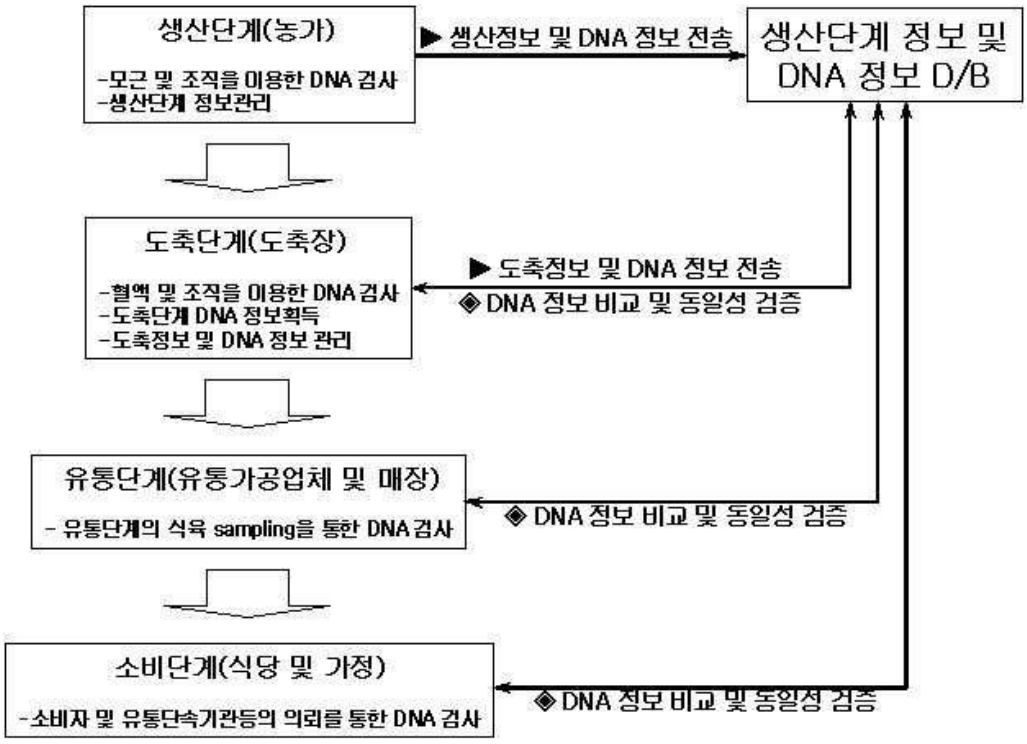
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for individualization and brand discrimination test in pig uising microsatellite marker

<160> 38

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW240 forward primer

<400> 1
agaaattagt gcctcaaatt gg 22

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW240 reverse primer

<400> 2
gtttctaaac cattaagtcc ctagcaaa 28

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0005 forward primer

<400> 3
tcttccctcc tggtaacta 19

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> S0005 reverse primer

<400> 4
gtttctgcac ttcctgattc tgggta 26

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW911 forward primer

<400> 5
ctcagttctt tgggactgaa cc 22

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW911 reverse primer

<400> 6
gtttctcatc tgtggaaaaa aaaagcc 27

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW857 forward primer

<400> 7
tgagaggtca gttacagaag acc 23

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW857 reverse primer

<400> 8
gtttctgatc ctcctccaaa tcccat 26

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW936 forward primer

<400> 9
tctggagcta gcataagtgc c 21

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW936 reverse primer

<400> 10
gtttctgtgc aagtacacat gcaggg 26

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0090 forward primer

<400> 11
ccaagactgc cttgtaggtg aata 24

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0090 reverse primer

<400> 12
gtttctgcta tcaagtattg taccattagg 30

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0155 forward primer

<400> 13
tgttctctgt ttctcctctg tttg 24

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0155 reverse primer

<400> 14
gtttctaaag tggaaagagt caatggctat 30

<210> 15

<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW72 forward primer

<400> 15
atcagaacag tgcgccgt 18

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW72 reverse primer

<400> 16
gtttcttttg aaaatggggt gtttcc 26

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW24 forward primer

<400> 17
ctttgggtgg agtgtgtgc 19

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW24 reverse primer

<400> 18
gtttctatcc aaatgctgca agcg 24

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW951 forward primer

<400> 19
tttcacaact ctggcaccag 20

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW951 reverse primer

<400> 20
gtttctgatc gtgcccaaat ggac 24

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0026 forward primer

<400> 21
aaccttccct tcccaatcac 20

<210> 22
<211> 26

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0026 reverse primer

<400> 22
gtttctcaca gactgctttt tactcc 26

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW632 forward primer

<400> 23
tgggttgaaa gatttcccaa 20

<210> 24
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW632 reverse primer

<400> 24
gtttctggag tcagtacttt ggcttga 27

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0301 forward primer

<400> 25
ccgtcttact taggatgttt 20

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> S0301 reverse primer

<400> 26
gtttcttgat gtgtttatgt gtttga 26

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW122 forward primer

<400> 27
ttgtcttttt attttgcttt tgg 23

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW122 reverse primer

<400> 28
gtttctcaaa aaaggcaaaa gattgaca 28

<210> 29
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SO225 forward primer

<400> 29
gctaatgcca gagaaatgca ga 22

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SO225 reverse primer

<400> 30
gtttctcagg tggaaagaat ggaatgaa 28

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW769 forward primer

<400> 31
ggtatgacca aaagtcctgg g 21

<210> 32
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW769 reverse primer

<400> 32

gtttcttctg ctatgtggga agaatgc 27

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW787 forward primer

<400> 33
ctggagcagg agaaagtaag ttc 23

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SW787 reverse primer

<400> 34
gtttctggac agttacagac agaagaagg 29

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PIG_X forward primer

<400> 35
taccagtaca ctgtaagggt 20

<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PIG_X reverse primer

<400> 36
gtttctatgg attcccttgc tgtctc 26

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PIG_Y forward primer

<400> 37
gcccacaaca agttcctaag 20

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PIG_Y reverse primer

<400> 38
gtttctgttc cacctagcaa ggaaga 26