



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0051803
(43) 공개일자 2009년05월25일

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0118206
(22) 출원일자 2007년11월20일
심사청구일자 2008년05월27일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
전진태
서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호
김재환
제주 남제주군 성산읍 신흥리 812-1번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 돼지 구조적합성 복합체 제 3 영역에 위치하는염기변이의 동정

(57) 요약

본 발명은 조식이식의 장기대체 동물모델인 돼지의 구조적합성복합체인 SLA (swine leukocyte antigen) class III 영역 내에 존재하는 유전자들로부터 나타나는 미스센스 돌연변이에 관한 것이다.

보다 구체적으로, SLA class III 영역 내에 존재하는 55 개의 유전자들의 mRNA 서열을 분석하고, 이를 이용하여 게놈 상에서의 정확한 코딩영역을 결정하여, 이 결과를 바탕으로 코딩 영역을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작 및 증폭함으로써 다이렉트 시퀀싱 (direct sequencing)을 실시하여 아미노산 치환의 원인이 되는 미스센스돌연변이 (missense mutation)의 동정에 관한 것이다.

본 발명에 의하여 돼지의 유전형질 동질화를 위한 SLA class III 영역 내 유전자들의 단상형 (haplotype) 분석 및 사람의 질병과 관련하여 사람과 돼지의 연관성을 분석함에 있어서 중요한 자료로서의 활용을 기대할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임현대

울산 중구 약사동 800-33번지

서보영

경남 진주시 옥봉동 670-2번지

이상호

경남 산청군 신안면 외송리 239번지

이재봉

경남 함양군 안의면 월림리 720-1번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070401034009

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린 21 바이오장기연구

연구과제명 장기생산용 미니돼지 SLA class III 영역의 genome 서열해독과 유전정보 분석

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2007년 4월 1일~ 2007년12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

<표3>으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 돼지 SLA class III (swine leukocyte antigen class III) 영역 내 유전자 코딩 서열의 SNP 위치 염기가 치환된 미스센스돌연변이 유전자

<표3>

번호	유전자 (GenBank 등록번호)	미스센스 돌연변이의 위치 및 염기	번호	유전자 (GenBank 등록번호)	미스센스 돌연변이의 위치 및 염기
1	NFKBIL1 (AK235366)	A779G	36	EHMT2 (EU282363)	A484G
2	NFKBIL1 (AK235366)	C817T	37	CFB (EU282359)	C13T
3	BAT2 (EU076593)	C1094G	38	CFB (EU282359)	A119G
4	BAT2 (EU076593)	C1832T	39	CFB (EU282359)	A1696G
5	BAT2 (EU076593)	A2059G	40	CFB (EU282359)	A2015C
6	BAT2 (EU076593)	C3762G	41	RDBP (AK233579)	A76G
7	BAT2 (EU076593)	G3804T	42	RDBP (AK233579)	A530G
8	BAT2 (EU076593)	G3825T	43	SKIV2L (EU282370)	A277G
9	BAT2 (EU076593)	C3905T	44	SKIV2L (EU282370)	C2108G
10	BAT2 (EU076593)	A5131G	45	SKIV2L (EU282370)	C2669T
11	BAT2 (EU076593)	C5206T	46	STK19 (EU282371)	A104T
12	BAT2 (EU076593)	A5581G	47	C4B (EU076594)	G17T
13	BAT3 (EU282341)	G1260T	48	C4B (EU076594)	C316T
14	BAT4 (EU282342)	C169T	49	C4B (EU076594)	C791T
15	LY6G5C (EU282352)	G79T	50	C4B (EU076594)	A1556G
16	C6orf21 (EU282344)	A590G	51	C4B (EU076594)	C1814T
17	LY6G6D (EU282353)	C353T	52	C4B (EU076594)	C1928T
18	C6orf25 (EU282345)	C574T	53	C4B (EU076594)	A3601G
19	MSH5 (EU282354)	A2212G	54	C4B (EU076594)	A4239C
20	C6orf27 (EU282346)	A376G	55	C4B (EU076594)	C4327G
21	C6orf27 (EU282346)	A947G	56	TNXB (EU275239)	C152T

22	C6orf27 (EU282346)	A1220G	57	TNXB (EU275239)	C185G
23	C6orf27 (EU282346)	A1558G	58	TNXB (EU275239)	A1385G
24	C6orf27 (EU282346)	A1694G	59	CREBL1 (EU282360)	C232T
25	C6orf27 (EU282346)	A1768C	60	CREBL1 (EU282360)	A892G
26	C6orf27 (EU282346)	A1949C	61	CREBL1 (EU282360)	A1684G
27	C6orf27 (EU282346)	A1958G	62	EGFL8 (EU282362)	A169G
28	VARS (EU282356)	A1496G	63	AGPAT1 (EU282358)	A788G
29	VARS (EU282356)	G2339T	64	AGER (EU282357)	G1179T
30	VARS (EU282356)	C3667T	65	AGER (EU282357)	C1208G
31	HSPA1A (AY466608)	G1747T	66	NOTCH4 (EU282368)	C479T
32	HSPA1B (M69100)	G1747T	67	NOTCH4 (EU282368)	C542T
33	NEU1 (EU282367)	A1199G	68	NOTCH4 (EU282368)	A1453G
34	C2 (AK233128)	G91T	69	NOTCH4 (EU282368)	C2749T
35	C2 (AK233128)	A1963G			

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 조직이식의 장기대체 동물모델인 돼지의 주조직적합성복합체인 SLA (swine leukocyte antigen) class III 영역 내에 존재하는 유전자들로부터 나타나는 미스센스 돌연변이의 동정에 관한 것이다.

배경기술

<2> 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex; MHC)는 세포 상호작용 및 자신과 비자신의 구별에 중요한 역할을 하는 연관된 유전자들의 집합으로서, 항원을 이식하는 T-세포의 면역반응에 있어서 매우 중요하게 작용한다(Rothbard와 Geffer, 1991; Ierino 등, 1999). 즉, MHC 내에는 조직이식을 받아주는 성질을 결정하는 여러 개의 주조직적합 유전자들이 복합적으로 위치하고 있고, 항원제시세포 (antigen presenting cell; APC)는 항원의 일부를 주조직적합체와 결합시킨 후 MHC-항원 peptide 복합체를 T-세포에 제시함으로써 T-세포가 항원을 인식하게 하여 면역반응을 유도한다. 따라서 MHC는 T-세포의 면역반응에서 매우 중요하며 결과적으로 생체의 전체 면역반응에서도 매우 중요하다.

<3> 최근 세계적으로 의학 분야에서 인공장기의 필요성이 제기되어 인간의 장기를 대체하기 위한 적당한 동물로서 돼지의 중요성이 높아지고 있다. 특히, 미니돼지를 대상으로 무균돼지의 생산과 더불어 돼지의 면역시스템에 대한 연구가 초미의 관심사가 되고 있다(Sachs, 1994; Chen 등, 2004). 돼지를 이용한 중간장기이식 기술의 상용화를 위해서는 장기이식에 사용할 동물의 체계적인 육종이 필요하다. 장기이식용 동물의 기준은 이식을 했을 경우 균일한 결과를 예상할 수 있어야 하는데 이를 위해서는 이식용 동물의 유전형질 동질화가 필요하다. 유전적 동질화 시스템이 잘 발달된 inbred 마우스의 연구는 MHC 연구를 통하여 출발하였으며, 돼지에서도 장기이식용

동물을 생산하기 위해서는 MHC에 해당하는 SLA (swine leukocyte antigen) 시스템에 대한 체계적 분석 및 분석 기술의 개발이 필요하다. 또한 장기이식용 동물의 국제적 인정 및 실제적 사용을 위해서는 SLA를 바탕으로 한 장기이식용 동물의 육종 계획 및 계통 조성이 이루어져야 한다.

- <4> 상기한 바와 같이 돼지 백혈구 항원(SLA;swine leukocyte antigen)은 포유류를 포함하는 여러 척추동물 중의 면역반응을 조절하는 주된 요소 군인 돼지의 MHC 분자이다. MHC 분자는 질병 조절 또는 세포 또는 조직 이식에서 주요한 역할을 하므로 MHC 유전자들의 뉴클레오타이드 변이 및 다른 분자들과의 분자적 상호작용을 이해하기 위한 많은 노력들이 있었다(Fleckenstein et al.,(1999) Quantitative analysis of peptide-MHC class II interaction. *Semin Immunol.* 11: 405-16).
- <5> 특히, 돼지의 SLA에 의한 면역반응의 이해와 철저한 육종체계에 의한 동일한 유전형질을 갖는 순종 혈통을 구축하기 위해서는 SLA 영역에 대한 세부적인 연구가 필요하며, 이와 관련하여 많은 연구들이 진행되어 왔다(Sachs 등, 1976; Wu 등, 2004; Lee 등, 2005; O' Connell 등, 2005). 이 영역 내부에 존재하는 유전자들 각각에 대한 다형성 및 haplotype 분석은 이종장기의 이식을 위한 순종혈통을 구축하는데 있어서 가장 필수적인 과정이다 (Cascalho와 Platt, 2001; Martens 등, 2003).
- <6> 또한 돼지 SLA 유전자는 돼지 7번 염색체 내에 class I, II, III가 존재하며, 특히 class III은 p arm의 centromere 부위에 위치하고 있다(Geffrotin 등, 1984; Smith 등, 2005). 이 영역은 약 700 kb 정도로 확장되어 있으며 다양한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 약 50여 개의 유전자가 존재하고 있다(Renard 등, 2006). 또한 사람과 마우스의 class III 영역의 비교 결과 매우 유사한 구조를 갖는 것으로 확인되어 진화과정에서 매우 잘 보존되어 있는 영역으로 알려져 있다(Chardon 등, 1999). 비록 현재까지 사람의 질병에 대해서 class I 및 II 영역 내에 존재하는 유전자들에 대한 연구가 많이 진행되었지만, 최근 들어 class III 영역 역시 질병과의 연관성에 대한 연구가 보고되면서 이 영역에 대한 관심이 점점 높아지고 있다(Schroeder 등, 1998; Okamoto 등, 2003; Shichi 등, 2005).
- <7> 하지만 사람과 마우스를 제외하면 돼지를 포함한 다른 포유류에서는 MHC 영역에 대한 연구가 폭넓게 이루어지지 않았으며, 특히 class III 영역에 관한 연구는 더더욱 미비한 실정이다.
- <8> 따라서 본 발명의 목적은 이종장기 대체모델로서 돼지의 유전형질의 동질화 및 면역 거부반응의 제어를 위해 필수적으로 분석되어야 할 SLA class III 영역 내에 존재하는 유전자들로부터 아미노산의 치환에 영향을 주는 미스센스 돌연변이를 동정함으로써, SLA의 단상형 분석 및 사람의 질병연관 유전자들의 분석에 있어서 중요한 기초 자료의 작성에 있다.
- <9> <참고문헌>
- <10> 1.Cascalho, M. and Platt, J. L. 2001. The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity* 14:437-446.
- <11> 2.Chardon, P., Renard, C. and Vaiman, M. 1999. The major histocompatibility complex in swine. *Immunol. Rev.* 167:179-192.
- <12> 3.Chen, F., Xie, J., Xhou, Y., Li, N. and Chou, K. Y. 2004. Novel SLA-DR alleles of three Chinese pig strains and the related function in human T cell response, *Cell. Mol. Immunol.* 1:212-21.
- <13> 4.Geffrotin, C., Popescu, C. P., Cribiu, E. P., Boscher, J., Renard, C., Chardon, P. and Vaiman, M. 1984. Assignment of MHC in swine to chromosome 7 by in situ hybridization and serological typing. *Ann. Genet.* 27-213-219.
- <14> 5.Ierino, F. L., Gojo, S., Banerjee, P. T., Giovino, M., Xu, Y., Gere, J., Kaynor, C., Awwad, M., Monroy, R., Rembert, J., Hatch, T., Foley, A., Kozlowski, T., Yamada, K., Neethling, F. A., Fishman, J., Bailin, M., Spitzer, T. R., Cooper, D. K., Cosimi, A. B., LeGeurn, C. and Sachs, D. H. 1999. Transfer of swine major histocompatibility complex class II genes into autologous bone marrow cells of baboons for the induction of tolerance across xenogeneic barriers. *Transplantation.* 67:1119-1128.
- <15> 6.Lee, J. H., Simond, D., Hawthorne, W. J., Walters, S. N., Patel, A. T., Smith, D. M., O'Connell, P. J. and Moran, C. 2005. Characterization of the swine major histocompatibility complex alleles at eight loci in Westran pigs. *Xenotransplantation* 12:303-307.

- <16> 7.Martens, G. W., Lunney, J. K., Baker, J. E. and Smith, D. M. 2003. Rapid assignment of swine leukocyte antigen haplotypes in pedigreed herds using a polymerase chain reaction-based assay. Immunogenetics 55:395-401.
- <17> 8.O'Connell, P. J., Hawthorne, W. J., Simond, D., Chapman, J. R., Chen, Y., Patel, A. T., Welters, S. N., Burgess, J., Weston, L., Stokes, R. A., Moran, C. and Allen, R. 2005. Genetic and functional evaluation of the level of inbreeding of the Westran pig; a herd with potential for use in xenotransplantation. Xenotransplantation. 12:308- 315.
- <18> 9.Okamoto, K., Makino, S., Yoshikawa, Y., Takaki, A., Nagatsuka, Y., Ota, M., Tamiya, G., Kimura, A., Bahram, S. and Inoko, H. 2003. Identification of IkBL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. Am. J. Hum. Genet. 72:303-312.
- <19> 10.Renard, C., Hart, E., Sehra, H., Beasley, H., Coggill, P., Howe, K., Harrow, J., Gilbert, J., Sims, S., Rogers, J., Ando, A., Shigenari, A., Shiina, T., Inoko, H., Chardon, P. and Beck, S. 2006. The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. Genomics 88:96-110.
- <20> 11.Rothbard, J. B. and Geftter, M. L. 1991. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. Annu. Rev. Immunol. 9:527-565.
- <21> 12.Sachs, D. H. 1994. The pig as a potential xenograft donor. pathol. Biol. 42:185-191.
- <22> 13.Sachs, D. H., Leight, G., Cone, J., Schwarz, S., Stuart, L. and Rosenberg, S. 1976. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. Transplantation. 22: 559-567.
- <23> 14.Schroeder, H. W., Zhu, Z. B., March, R. E., Campbell, R. D., Berney, S. M., Nedospasov, S. A., Turetskaya, R. L., Atkinson, T. P., Go, R. C., Cooper, M. D. and Volanakis, J. E. 1998. Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA- DR3-B8-A1 haplotype. Mol. Med. 4:72-86.
- <24> 15.Shichi, D., Kikkawa, E. F., Ota, M., Katsuyama, Y., Kimura, A., Matsumori, A., Kulski, J. K., Naruse, T. K. and Inoko, H. 2005. The haplotype block, NFKBIL1-ATP6V1G2-BAT1-MICB- MICA, within the class III class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. Tissue Antigens 66:200- 208.
- <25> 16.Smith, D. M., Lunney, J. K., Martens, G. W., Ando, A., Lee, J. H., Ho, C. S., Schook, L., Renard, C. and Chardon, P. 2005. Nomenclature for factors of the SLA class-I system, 2004. Tissue Antigens 65:136-149.
- <26> 17.Wu, Q., Xiong, P., Liu, J. Y., Feng, S. T., Gong, F. L. and Chen, S. 2004. The study of new SLA classical molecules in inbreeding Chinese Wuzhishan pig. Transplant. P. 36:2483-2484.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <27> 본 발명은 장기이식용 모델동물인 돼지 SLA의 단상형 분석 및 사람의 질병관련 유전자의 분석에 있어 중요한 기초 자료의 분석을 위하여, 돼지 SLA class III 영역에 위치하고 있는 유전자들을 대상으로 단백질의 기능에 영향을 미치는 아미노산 치환의 원인이 되는 미스센스 돌연변이를 동정함을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <28> 상기와 같은 본 발명의 목적을 위하여, 본 발명은 돼지 SLA class III (swine leukocyte antigen class III) 영역 내 유전자 코딩 서열의 SNP 위치 염기가 치환된 미스센스돌연변이 유전자를 제공한다.
- <29> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <30> 먼저, Database로부터 기존에 보도되어 있는 돼지 SLA class III 영역 내 존재하는 유전자들을 대상으로 mRNA, EST, 부분적인 genome 서열 등 염기서열 정보를 수집하고 분석한다.

- <31> 다음으로, 돼지 조직으로부터 전체 RNA 추출 및 cDNA 합성한 뒤, RT-PCR 및 RACE-PCR 기법을 사용하여 유전자들의 mRNA 서열을 분석한다.
- <32> 본 발명에서는 돼지의 10개 조직 (표1 참고)으로부터 전체 RNA를 추출하였다.
- <33> 본 발명에 있어, 상기 RT-PCR은 사람과 마우스에서 보고된 각 유전자들의 mRNA 서열을 정렬하여 코딩 서열 중 상동성이 높은 서열을 바탕으로 제작된 프라이머들과 상기 준비된 조직별 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.
- <34> 본 발명에서, 상기 RT-PCR 및 RACE-PCR의 결과 증폭된 산물은 gel 정제 후 이를 주형으로 다이렉트 시퀀싱 혹은 클로닝 과정을 거쳐 시퀀싱을 실시하여 염기서열을 분석하였고, 최종 분석된 각 유전자의 mRNA 서열은 표1과 같다.
- <35> 다음으로 돼지 6 품종 (Landrace, Large White, Duroc, Berkshire, Korean native pig (KNP), 미니돼지)으로부터 genomic DNA를 추출하고, 돼지 SLA class III 영역 내 유전자들의 코딩 지역의 서열분석을 위한 프라이머 제작 및 증폭한다.
- <36> 본 발명에서는, 상기 과정에서 분석된 각 유전자의 mRNA 서열과 현재 보고되어 있는 SLA class III 영역을 포함하는 genome 서열을 비교하여 정확한 엑손 영역을 구분하고, 구분된 각각의 엑손을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작한 후 돼지 6품종의 genomic DNA를 사용하여 증폭하였다.
- <37> 마지막으로, PCR 산물의 정제 및 전기영동한 후, 전기영동 결과를 분석하여 돌연변이를 동정한다.
- <38> 본 발명에서 결정된 염기서열은 Sequencher™ version 4.0 (Gene Codes, USA)로 다중비교하여 품종간에 나타나는 돌연변이를 확인하였고, 확인결과 총 199개의 돌연변이가 확인되었으며, 이들 중 아미노산 치환의 원인이 되는 미스센스 돌연변이 (missense mutation)는 27개의 유전자 (표1 참고)로부터 69개가 동정되었다. (표2)

효 과

- <39> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 인간의 장기를 대체하기 위한 가장 적합한 동물인 돼지를 대상으로 SLA class III 영역 내에 존재하는 55개의 유전자들로부터 돌연변이를 확인하고 총 27개의 유전자로부터 아미노산 치환의 원인이 되는 69개의 미스센스 돌연변이를 동정하였으며, 이는 이종장기 개발을 위해 필수적인 과정인 단상형 분석 및 사람의 질병연관 유전자의 분석에 매우 유용하게 활용 가능할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <40> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

Database로부터 돼지 SLA class III 영역 내 유전자들의 염기서열 정보 수집 및 분석

- <43> GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) database, EMBL database (<http://ebi.ac.uk>) 내에서 기존에 보고되어 있는 돼지 SLA class III 영역 내 존재하는 유전자들을 대상으로 mRNA, EST, 부분적인 genome 서열 등 염기서열 정보를 수집하고 분석하였다.

<실시예 2>

돼지 조직으로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성

- <46> 돼지의 10개 조직 (표1 참고)으로부터 Trizol (Gibco BRL, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였으며, Smart™ RACE cDNA 증폭 키트 (Smart™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 -20℃에 보관하였다.

<실시예 3>

RT-PCR 및 RACE-PCR 기법을 사용하여 유전자들의 mRNA 서열을 분석

- <49> 사람과 마우스에서 보고된 각 유전자들의 mRNA 서열을 정렬하여 coding 서열 중 상동성이 높은 서열을 바탕으로

제작된 프라이머들과 상기 실시예2에서 준비한 조직별 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

<50> cDNA를 사용한 PCR 반응에서 *Taq* polymerase 1.5 unit (Genet Bio, Korea), 10×buffer 2.5 μl, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primer 각각 1.5 μl, genomic DNA 2 μl 그리고 증류수 13.7 μl를 첨가하여 최종 25 μl로 반응하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 2분간 변성시킨 후 94℃에서 30초, 55-65℃에서 45초, 72℃에서 60초를 1 cycle로 하여 35회 반복수행하였으며, 72℃에서 5분간 신장시킨 후 4℃에서 종료하였다.

<51> 모든 반응은 PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, USA)에서 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 GELase Agarose Gel-Digesting Preparation (Epicentre, USA)을 이용하여 겔 정제 (gel purification)를 실시하였으며, 이를 주형으로 direct sequencing 혹은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning 과정을 거쳐 sequencing하여 염기서열 분석을 분석하였다. DNA 시퀀싱은 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. 분석된 염기서열을 토대로 primer를 제작하였으며, 5' 및 3' untranslated region (UTR)의 서열을 분석하기 위하여 RACE-PCR을 수행하였다. SmartTM RACE cDNA 증폭 키트 (SmartTM RACE cDNA Amplification Kit, Clontech, USA)를 사용하여 1차 및 nested-PCR 등 2회의 PCR 반응을 실시하였으며, 이 결과로 증폭된 산물은 겔 정제 후 이를 주형으로 direct sequencing 혹은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 이용하여 cloning 과정을 거쳐 sequencing을 실시하여 염기서열을 분석하였다. 최종 분석된 각 유전자의 mRNA 서열은 GenBank database에 등록하였다. (표1)

표 1

<52> mRNA 서열이 분석된 유전자명과 GenBank database의 등록번호

유전자	GenBank 등록번호	발현조직	CDS 길이 (bp)	사람과의 상동성 (%) (염기/아미노산)
<i>BAT1</i>	EU282340	ovary, muscle	1287	96/99
<i>ATP6V1G2</i>	EU282339	heart, ovary	357	93/97
<i>NFKBIL1</i>	AK235366		1143	92/95
<i>LTA</i>	EU282349	ovary	615	83/72
<i>TNF</i>	NM_214022		699	86/86
<i>LTB</i>	EU282350	liver, ovary	741	86/84
<i>LST1</i>	EU282348	heart, liver ovary	120	32/7
<i>NCR3</i>	EU282355	heart, liver	414	55/40
<i>AIF1</i>	EU282338	brain	444	90/93
<i>BAT2</i>	EU076593	testis, skin, muscle	6501	88/90
<i>BAT3</i>	EU282341	brain, skin, muscle	3387	91/91
<i>APOM</i>	NM_001040640		567	91/90
<i>C6orf47</i>	AK237470		894	85/79
<i>BAT4</i>	EU282342	heart, liver	1050	84/81
<i>CSNK2B</i>	EU282347	skin, small intestine	648	94/100
<i>LY6G5B</i>	EU282351	brain, liver	501	83/76
<i>LY6G5C</i>	EU282352	heart, testis	102	43/32
<i>BAT5</i>	EU282343	liver, skin, kidney	1677	93/96
<i>C6orf21</i>	EU282344	testis, lung	900	83/75
<i>LY6G6D</i>	EU282353	brain, liver, muscle	426	75/50
<i>LY6G6E</i>	AK240326		402	78/53
<i>LY6G6C</i>	AY609600		378	88/84
<i>C6orf25</i>	EU282345	liver, testis	531	81/75
<i>DDAH2</i>	AK235171		858	91/98
<i>CLIC1</i>	AY609786		726	91/98
<i>MSH5</i>	EU282354	heart, liver, kidney	2508	91/84
<i>C6orf27</i>	EU282346	brain	2595	81/68

<i>VAR5</i>	EU282356	liver, testis, skin	3798	89/93
<i>LSM2</i>	AK233908		288	95/100
<i>HSPA1L</i>	EU282366	brain, liver, lung	1926	90/96
<i>HSPA1A</i>	AY466608		1926	92/97
<i>HSPA1B</i>	M69100		1926	92/97
<i>NEU1</i>	EU282367	brain, skin, kidney	1251	86/86
<i>EHMT2</i>	EU282363	heart, lung, muscle	1500	84/83
<i>SLC44A4</i>	AK237999		2124	86/86
<i>C2</i>	AK233128		2259	85/83
<i>ZBTB12</i>	EU282372	testis	1329	92/98
<i>CFB</i>	EU282359	ovary, skin	2298	87/79
<i>RDBP</i>	AK233579		1137	91/95
<i>SKIV2L</i>	EU282370	heart, testis, skin	3741	90/94
<i>DOM3Z</i>	EU282361	brain, testis	1194	89/90
<i>STK19</i>	EU282371	liver, Ovary	477	35/19
<i>C4B</i>	EU076594	liver, skin, muscle	5226	84/80
<i>CYP21A2</i>	NM_214433		1479	84/78
<i>TNXB</i>	EU275239	ovary, testis	1407	88/88
<i>CREBL1</i>	EU282360	liver, muscle	2106	90/87
<i>FKBP1</i>	EU282364	brain, muscle	1050	89/85
<i>PPT2</i>	AK235067		930	92/93
<i>EGFL8</i>	EU282362	heart, testis, lung	888	86/87
<i>AGPAT1</i>	EU282358	heart, testis	864	94/98
<i>RNF5</i>	AY610466		543	94/99
<i>AGER</i>	EU282357	liver	1185	87/83
<i>PBX2</i>	EU282369	ovary, spleen, lung	1113	93/99
<i>GPSM3</i>	EU282365	liver, ovary	483	90/87
<i>NOTCH4</i>	EU282368	liver, ovary, muscle	4050	88/88

<53> <실시예 4>

<54> 돼지 6 품종으로부터 genomic DNA 추출

<55> 돼지 6 품종 (Landrace, Large White, Duroc, Berkshire, Korean native pig (KNP), 미니돼지)으로부터 혈액을 채취하여 EDTA가 처리된 튜브에 넣어서 응고되지 않도록 잘 섞어준 후 약 300 μ l를 이용하여 Genomic DNA 추출 키트 (Promega, USA)로 DNA를 추출하였으며, 4°C에 보관하였다.

<56> <실시예 5>

<57> 돼지 SLA class III 영역 내 유전자들의 코딩 지역의 서열분석을 위한 프라이머 제작 및 증폭

<58> 상기 과정에서 분석된 각 유전자의 mRNA 서열과 현재 보고되어 있는 SLA class III 영역을 포함하는 게놈 서열을 비교하여 정확한 엑손 영역을 구분하였다. 이렇게 구분된 각각의 엑손을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작한 후 돼지 6품종의 genomic DNA를 사용하여 증폭하였다.

<59> PCR 반응은 Taq polymerase 1.5 unit (Genet Bio, Korea), 10 \times buffer 2.5 μ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primer 각각 1.5 μ l, genomic DNA 2 μ l 그리고 증류수 13.7 μ l를 첨가하여 최종 25 μ l로 반응하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 55-65°C에서 45초, 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 35회 반복수행하였으며, 72°C에서 5분간 신장시킨 후 4°C에서 종료하였다.

<60> 모든 반응은 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, USA)에서 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 반응유무를 확인하였다.

<61> <실시예 6>

<62> **PCR 산물의 정제 및 ABI3130 sequencer를 이용한 전기영동**

<63> PCR 산물은 GELase Agarose Gel-Digesting Preparation (Epicentre, USA)을 이용하여 겔 정제를 실시하였으며, 다이렉트 시퀀싱을 위한 주형으로 사용하였다. DNA 시퀀싱은 Applied Biosystems 3130 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하였다.

<64> <실시예 7>

<65> **전기영동 결과를 분석하여 돌연변이를 동정**

<66> 결정된 염기서열은 Sequencher™ 버전 4.0 (Gene Codes, USA)으로 다중비교하여 품종간에 나타나는 돌연변이를 확인하였다. 확인결과 총 199개의 돌연변이가 확인되었으며, 이들 중 아미노산 치환의 원인이 되는 미스센스 돌연변이는 27개의 유전자로부터 69개가 동정되었다.

표 2

<67> 동정된 nsSNP의 유전자별 위치 및 염기/아미노산의 변화 양상

유전자	번호	위치 및 서열변화		유전자	번호	위치 및 서열변화		
		염기	아미노산			염기	아미노산	
NFKBIL1	1	A779G	Q260R	EHMT2	36	A484G	T162A	
	2	C817T	P273S		CFB	37	C13T	R5C
BAT2	3	C1094G	A365G	RDBP		38	A119G	E40G
	4	C1832T	P611L		SKIV2L	39	A1696G	T566A
	5	A2059G	M687V	STK19		40	A2015C	K672T
	6	C3762G	H1254Q		C4B	41	A76G	N39S
	7	G3804T	E1268D	C4B		42	A530G	H177R
	8	G3825T	E1275D		C4B	43	A277G	T93A
	9	C3905T	P1302L	C4B		44	C2108G	P703R
	10	A5131G	K1711E		C4B	45	C2669T	P890L
	11	C5206T	P1736S	C4B		46	A104T	Q35L
	12	A5581G	T1861A		C4B	47	G17T	G6V
	BAT3	13	G1260T	E420D		C4B	48	C316T
	BAT4	14	C169T	P57S	C4B		49	C791T
LY6G5C	15	G79T	V27L	C4B		50	A1556G	Q516R
C6orf21	16	A590G	Q197R		C4B	51	C1814T	T605M
LY6G6D	17	C353T	S118L	C4B		52	C1928T	T643I
C6orf25	18	C574T	H192Y		C4B	53	A3601G	R1201G
MSH5	19	A2212G	738D	C4B		54	A4239C	E1413D
C6orf27	20	A376G	A126D		TNXB	55	C4327G	R1443G
	21	A947G	Q316R	TNXB		56	C152T	S51F
	22	A1220G	Q407R		CREBL1	57	C185G	T62S
	23	A1558G	I520V	CREBL1		58	A1385G	Q462R
	24	A1694G	H565R		CREBL1	59	C232T	P78S
	25	A1768C	T590P	EGFL8		60	A892G	T298A
	26	A1949C	H650R		EGFL8	61	A1684G	T561A
	27	A1958G	Q653R	EGFL8		62	A169G	I57Y
VARS	28	A1496G	H499R	AGPAT1	63	A788G	Q263R	
	29	G2339T	S780I	AGER	64	G1179T	E393D	
	30	C3667T	R1223C	AGER	65	C1208G	A403G	
HSPA1A	31	G1747T	A583S	NOTCH4	66	C479T	A160Y	
HSPA1B	32	G1747T	A583S		67	C542T	P181L	
NEU1	33	A1199G	Q400R	NOTCH4	68	A1453G	S484G	
C2	34	G91T	A31S	NOTCH4	69	C2749T	P917S	
	35	A1963G	N655D	NOTCH4				

- <68> * L: Landrace,
- <69> * Y: Yorkshire
- <70> * D: Duroc
- <71> * B: Berkshire
- <72> * K: Korean native pig
- <73> * M: Miniature pig.

도면의 간단한 설명

<74> 도 1은 본 발명에서 동정한 mutation의 예로서, TNXB (tenascin XB) 유전자의 coding sequence 내에서 발견된 3개의 미스센스 돌연변이 (position 152, 185, 1385)을 확인할 수 있다.

도면

도면1

