



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0079558
(43) 공개일자 2023년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 2600/156 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0166401

(22) 출원일자 2021년11월29일

심사청구일자 2021년11월29일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이준현

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

조은진

대전광역시 유성구 온천북로13번길 21, 1223호(봉명동)

김민준

대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 학생생활관 10동 313호(궁동)

(74) 대리인

최규환

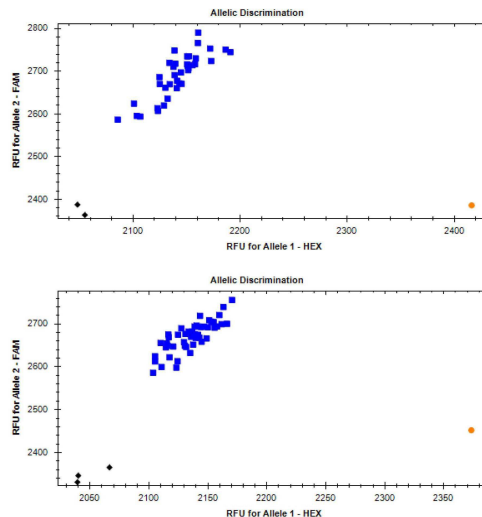
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 연산오계 알비노 개체 식별을 위한 분자마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 연산오계 알비노 개체 식별을 위한 분자마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 서열번호 1로 표시되는 님 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 629 및 630번째 염기에서의 결손 여부를 검출할 수 있는, 연산오계 알비노 개체 식별을 위한 프라이머 세트에 관한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711125954
과제번호	2020-0-01441-002
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	정보통신기획평가원
연구사업명	인공지능융합선도프로젝트(R&D)
연구과제명	인공지능융합연구센터지원(충남대학교)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 629 및 630번째 염기에서의 결손 여부를 검출할 수 있는, 연산오게 알비노 개체 식별을 위한 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 연산오게 알비노 개체 식별용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머레이즈, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 5

연산오게 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 연산오게 알비노 개체의 식별 방법.

청구항 6

서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 닭 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 돌연변이 분석용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 닭 *SLC45A2* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연산오게 알비노 개체 식별을 위한 분자마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연산오게(Yeonsan Ogye)는 한국 고유종 재래닭 품종 중 하나로, 깃털, 피부, 뼈 등과 같이 육안으로 확인 가능한 표현형이 모두 흑색으로 고정되어 있으며, 그 고유성을 인정받아 국내 천연기념물(No. 265)에 등재되었다. 현재까지 연산오게 집단 유지를 목적으로 표현형에 기반한 선발 및 교배가 진행되고 있으며, 각 세대별로 그 수가 많지는 않으나 정상적인 표현형과 상이한 다양한 피모색을 보유한 개체들이 종종 관찰되고 있다. 이러한 표현형을 가진 개체는 천연기념물 표현형 범주에서 제외되기 때문에 원인을 뚜렷하게 밝혀내지 못한 채 선발에서 제외되고 있는 실정이다. 이는 이모색을 발현시키는 유전 변이의 확인 없이 진행된 것이므로, 종계로부터 생산된 다음 세대 집단 내 이모색을 보유한 개체가 존재할 가능성이 있음을 의미한다.

[0003] 최근 연산오게 집단 내에서 발견된 한 마리의 알비노(albino) 개체는 황색의 부리 및 정강이, 백색의 깃털을 가

진 전형적인 백색증(albinism)의 양상을 보였다. 연산오계 집단 내에서 알비노 개체의 발생은 현재까지 보고된 바 없으며, 해당 개체에서 알비노 형질을 제외한 다른 표현형적 결함은 나타나지 않았다. 연산오계 집단은 흑색의 피모색을 품종 고유의 특징으로 선정하고 있으므로, 알비노 개체의 발생은 외부로부터 타 품종 유입의 가능성을 제시할 수 있어 해당 돌연변이의 발생 원인을 규명하는 것은 필수적이다. 원인 유전변이의 규명은 연산오계 집단 내에서 수행하는 기존의 표현형 기반 선발 체계를 보완할 수 있는 유전적 선발 체계를 도입하는데 도움이 될 수 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1701105호에는 '한국 토종오리의 피모색 구분을 위한 유전자 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1190614호에는 '한우 알비노 개체 선별을 위한 분자표지인자 및 유전자 분석 기법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '연산오계 알비노 개체 식별을 위한 분자마커 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 연산오계 알비노 개체와 정상 개체의 유전체를 분석하여 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자에서 다형성 변이를 확인하였고, 상기 다형성 정보에 기반하여 *SLC45A2* 돌연변이를 가진 연산오계 알비노 개체를 식별할 수 있는 분자마커를 개발하였다. 그 후, 상기 분자마커를 이용하여 연산오계 50수에 테스트한 결과, 본 발명의 분자마커가 정상 개체 및 열성 백모색(recessive white) 개체로부터 알비노 개체의 *SLC45A2* 유전형을 구분할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 님 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 629 및 630번째 염기에서의 결손 여부를 검출할 수 있는, 연산오계 알비노 개체 식별을 위한 프라이머 세트를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 연산오계 알비노 개체 식별용 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 연산오계 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 산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 연산오계 알비노 개체의 식별 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 님 *SLC45A2* 유전자의 돌연변이 분석용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 프라이머 세트는 연산오계 개체에서 백색증과 관련된 *SLC45A2* 유전자의 돌연변이를 효과적으로 검출할 수 있으므로, 종래 표현형 기반 선발 체계를 보완할 수 있는 유전적 선발 체계를 확립하는게 기여할 수 있다. 또한, 백모색을 가지는 타 품종의 유입 가능성을 확인하는 방법으로도 활용될 수 있으므로, 연산오계 집단의 유지 및 관련 농가의 소득 증대에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 연산오계 집단 내의 이모(異毛)색 개체의 모습을 보여주는 사진이다.

도 2는 Sanger sequencing을 통해 분석한 연산오계 정상 및 열성 백모색(recessive white) 개체와 알비노 개체의 *SLC45A2* 유전자 영역의 일부 염기서열 비교 결과이다.

도 3은 연산오계 정상 및 알비노 개체의 NGS re-sequencing 분석을 통해 발견한 *SLC45A2*의 c. 459_460delGA 돌연변이 포함 염기서열 일부의 아미노산 서열을 보여준다.

도 4는 본 발명의 KASP용 프라이머 세트를 이용한 연산오계 개체들의 유전형 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 629 및 630번째 염기에서의 결손 여부를 검출할 수 있는, 연산오게 알비노 개체 식별을 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 본 발명에 따른 서열번호 1의 염기서열은 게놈 DNA 서열이며, 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 염기는 *Gallus gallus* breed Red Jungle Fowl isolate RJF #256 chromosome Z, GRCg6a (NC_006127.5) 상의 10,344,377번째 위치 염기에 해당된다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 프라이머 세트는 KASP (Kompetitive Allele Specific PCR)용 프라이머 세트일 수 있다.
- [0015] 용어 "KASP"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. 이 방법에서 시료 DNA는 2개의 대립유전자 특이적 정방향 프라이머, 단일 역방향 프라이머 및 마스터 믹스에 의해 증폭되는데, 각 대립유전자 특이적 프라이머는 5' 말단에 마스터 믹스 내의 FRET 카세트에 상응하는 독특한 테일 서열을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 대립유전자 특이적 정방향 프라이머로서, 서열번호 5는 629 및 630번째 염기가 결손된 서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* 유전자에 특이적인 정방향 프라이머이며, 서열번호 4는 염기 결손이 없는 서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* 유전자 서열에 특이적인 정방향 프라이머이다.
- [0017] 연산오게 알비노 개체는 서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* 유전자에서 629 및 630번째 염기가 결손된 것이 특징으로, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 세트는 연산오게 알비노 개체를 식별하는데 활용될 수 있다.
- [0018] 용어, "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.
- [0019] 본 발명의 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 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 4의 프라이머(22개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 4, 5 및 6의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 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, ^{32}P), 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.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 연산오게 알비노 개체 식별용 키트를 제공한다.

- [0022] 본 발명의 키트에서 상기 프라이머 세트는 바람직하게는 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트, 전술한 것과 같다.
- [0023] 또한, 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머레이즈(polymerase), dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 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 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0024] 본 발명은 또한,
- [0025] 연산오게 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0026] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0027] 상기 증폭 단계의 산물을 분석하는 단계;를 포함하는, 연산오게 알비노 개체의 식별 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 방법은 연산오게 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 올리고뉴클레오티드 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.
- [0029] 상기 증폭 단계의 산물의 분석은, 증폭산물의 유전자형을 결정하는 것일 수 있으며, 상기 유전자형 결정 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 뉴클레오티드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나, 다형성 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 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응된 산물이 서열번호 1로 표시되는 닭 *SLC45A2* 유전자의 629 및 630번째 염기가 결손된 것으로 결정되면, 해당 시료의 연산오게는 알비노 개체로 판별될 수 있다.
- [0031] 본 발명은 또한, 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 닭 *SLC45A2* (Solute Carrier Family 45 Member 2) 유전자의 돌연변이 분석용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 닭 *SLC45A2* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 서열번호 4, 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 닭 *SLC45A2* 유전자의 629 및 630번째 염기가 결손되었는지 여부를 검출할 수 있어, 닭 *SLC45A2* 유전자의 돌연변이를 분석할 수 있는 것이다.
- [0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실시예 1. 실험 대상 개체 DNA 추출

[0037] 연산오게 알비노 개체 1수와 정상 개체 45수 및 열성 백모색(recessive white) 개체 4수를 포함하는 총 50수(지산농원, 충남 논산시)의 혈액을 익화정맥으로부터 확보하여 Genomic DNA Extraction Kit(GeNetBio, Korea)를 이용하여 게노믹 DNA (gDNA)를 추출하였다.

[0039] 실시예 2. 연산오게 알비노 발생 원인 유전자 *SLC45A2* 돌연변이 규명

[0040] 추출된 알비노 개체의 gDNA는 QC (Quality Control) 과정을 거친 후 NGS (Next Generation Sequencing) re-sequencing 분석에 사용되었다. Illumina NovaSeq6000 sequencing 기기를 통해 획득한 re-sequencing data는 QC 과정을 거쳐 원인 돌연변이 탐색을 위한 구체적인 분석에 사용되었다. Re-sequencing data는 BWA 소프트웨어를 통해 Chicken Reference Genome (*GRCg6a*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002315.5/)에 맵핑되었고, 이어서 GATK 소프트웨어의 Best Practices pipeline에 따라 변이(variants) 정보를 획득하였다. 이후 SnpEff 소프트웨어를 사용하여 annotation된 구체적인 유전체 변이 정보(Variant Call Format, VCF)를 획득하였고, 이를 10마리의 정상 연산오게 유전체 변이 정보와 비교 대조하여 최종적으로 *SLC45A2* 유전자에서 유의적인 돌연변이(c. 459_460delGA)를 선별하였다. *SLC45A2* 유전자는 안피부형백피증(Oculocutaneous Albinism)을 유발하는 원인 유전자의 하나로 알려져 있다.

[0042] 실시예 3. *SLC45A2* 돌연변이 확인을 위한 PCR 프라이머 제작 및 염기서열 분석

[0043] *SLC45A2* 유전자 변이 확인을 위해 Chicken *SLC45A2* 게노믹 서열(NC_006127.5:10345006-10343882, 서열번호 1)을 활용하여 하기 표 1과 같이 PCR 증폭용 프라이머를 고안하였다.

표 1

[0044] 연산오게 *SLC45A2* 유전자 변이 분석용 프라이머 서열

프라이머 이름	염기서열 (5'→3')	서열번호
SLC45A2_F	TCCAAGCAGGAAGGAAAAGA	2
SLC45A2_R	GCCAATCCTGATTGCCTAAA	3

[0045] 상기 프라이머를 통해 증폭된 PCR 산물은 Sanger sequencing 분석에 사용되었다. Automatic genetic analysis machine (ABI3730XL, Applied Biosystems, USA) 기기를 통해 분석된 연산오게 알비노 개체의 염기서열 결과를 연산오게 정상 개체 및 열성 백모색(recessive white) 개체의 염기서열과 함께 정렬하여 비교 및 대조하였다.

[0046] 그 결과, 도 2에서 보여주는 것과 같이 연산오게 정상 및 열성 백모색 개체는 모두 동일한 서열임을 확인할 수 있었고, 연산오게 알비노 개체의 경우 2 bp의 염기(GA)가 결손된 것을 확인하였다(서열번호 1의 염기서열에서 629-630번째 위치). 상기 gDNA 염기서열에서 확인한 2 bp 결손 변이를 cDNA 염기서열 상에서 확인한 결과, NGS re-sequencing 분석을 통해 발견한 c. 459_460delGA 돌연변이였음을 확인하였다.

[0047] 연산오게 정상 개체와 알비노 개체의 cDNA 염기서열을 이용하여 단백질 서열을 확인한 결과, 도 3에서와 같이 2 bp의 염기 결손으로 인해 *SLC45A2* 유전자의 엑손 2에서 구조이동돌연변이(frame shift mutation)가 유발되어 이후의 아미노산 서열이 모두 변형되는 것을 알 수 있었다.

[0049] 실시예 4. *SLC45A2* 돌연변이 확인을 위한 KASP assay용 마커 제작 및 유전형 분석

[0050] Sanger sequencing을 통해 확인한 돌연변이를 다수의 개체에서 용이하게 확인하기 위해 KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) assay용 마커를 표 2와 같이 제작하였다.

표 2

[0051] 연산오게 *SLC45A2* 유전자 변이 분석용 KASP용 프라이머 세트

프라이머 이름	염기서열 (5'→3')	서열번호
Primer Seq Allele X	AGCTTTCATCGGTGAGAGAGAG	4

Primer Seq Allele Y	GTAGCTTTTCATCGGTGAGAGAGAA	5
Primer Seq common	GGTAATGACTATTGCCCATGTCCGTT	6

[0052] 상기 표 2의 마커를 활용하여 총 50수의 연산오계 개체를 대상으로 KASP 실험을 진행하여 해당 돌연변이 보유 여부를 확인하였다.

[0053] 그 결과, 연산오계 알비노 개체(주황색)의 경우 정상 및 열성 백모색 개체(파란색)와 구분되어 클러스터를 이루는 것을 확인하였다(도 4).

도면

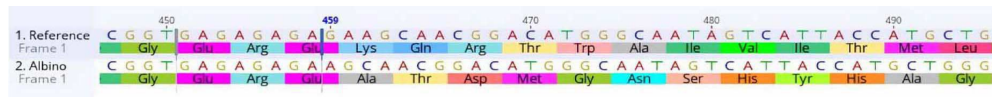
도면1



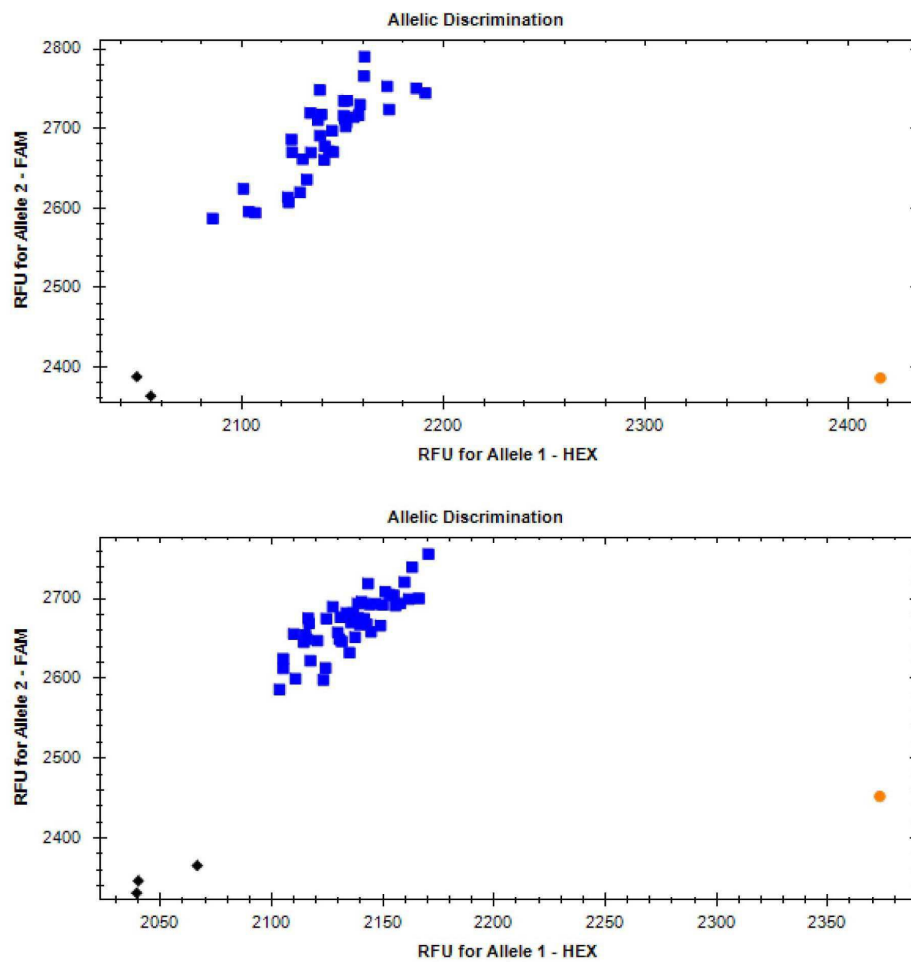
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Molecular marker for discriminating Yeonsan Ogye albino chicken
and uses thereof
- <130> PN21389
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1125
- <212> DNA
- <213> Gallus gallus
- <400> 1

cgatgcacct ggaatgtgca aatccaataa gactgacatc cctaggcact gttctagttc 60

agcttgagat gtaacttctc aaagacttgt tggaaaattg ttgctgtagt tgtgactggt 120

gcctcatcct caggaatgtg ttttcacaga ttgatttatt ctctgttcct ggatgtcatt	180
gctgttgcatt gtattttgtaa ttgttttagcc aggaagagat gttaggccaa tcttgattgc	240
ctaaaattgt agaagggtgg gacaaatgga atagaacaaa aatgtactcc aaacaacacg	300
tgtttttaggc tcacagagca tgcagtggaa gtgcaaagga gtaagaaaag gtgaatgatg	360
ttcttgactg tggagctggg gatactcaga gcttctgctg acctagggtc caaagtgaac	420
ctagcacagc tcagtgtctg acagtctcaa aatccagtta tcccacttct cagatgtcaa	480
tctggatatca ctggtccctc atgcataact aagcattgct tagatttgga ggattctgga	540
aagataaaat gaggttttgc gaaacatagc actattgctg tcacaatgag agtctttttg	600
gttttttagc ttcatcgggt gagagagaga agcaacggac atgggcaata gtcattacca	660
tgctgggagt agtgcttttt gatattgcag ctgactttat tgatggcccc atcaaagcat	720
atttatttga cgctgctct catgaagata aagagaaggg tctgcattat catgccctgt	780
ttacaggtac tcatatccct tcttttctt cctgcttga gggaggggaa ggaaattgca	840
tggattttgt aatcacctgt tactaatctt gaatgaactg atcatctgat tctgtgcttc	900
agtcacgggt ctgttgctgc tcggttttca ctgctaagag aactgcagct tgtggttgc	960
gctgcaagag ctctgctgca ggaggtgca ggcctaagca tctacagcaa aatagccatg	1020
gtcaattaa gaaaaattaa ctactttaaa aataaagtag cattatttca gtttattctg	1080
atcttcaagt ttcgatgaag ccaaagttag gggaagtaac ttgtt	1125
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
tccaagcagg aaggaaaaga	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
gccaatcctg attgcctaaa	20

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 agctttcatc ggtgagagag ag 22
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gtagctttca tcggtgagag agaa 24
 <210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ggtaatgact attgcccatg tccgtt 26