



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0042679
(43) 공개일자 2013년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0106123
(22) 출원일자 2011년10월17일
심사청구일자 2011년10월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
홍기창
경기도 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 주공@304-303
김병철
경기도 성남시 분당구 궁내로40번길 11, 106동 302호 (궁내동, 중앙하이츠빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김선애

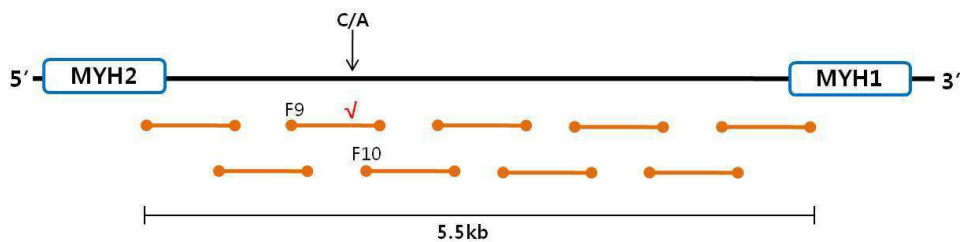
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자

(57) 요약

본 발명은 돼지의 근섬유 단백질 아형 중 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform, MHC slow isoform) 함량을 예측하고 육질 향상 여부를 확인할 수 있는 DNA 단편 표지인자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 1의 염기서열에서 535번째 T 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열, 또는 서열번호 4의 염기서열에서 136번째 C 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자를 제공한다. 본 발명은 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가, 또는 pH와 보수력을 나타내는 여과지흡수량 등 육질 향상과 관련된 MYH2 유전자의 새로운 SNP 부위를 발견하고 이러한 SNP를 이용한 표지인자를 제공하여, DNA수준에서의 육질예측방안으로서 돼지 육종 산업에 매우 유용한 기술로 활용될 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김준모

서울특별시 성북구 보문로 66 (보문동4가)

임규상

대전광역시 서구 둔산3동 청솔아파트 4동 1105호

남용석

경기도 안양시 만안구 안양로 275, 2동 1103호 (안양동, 벽산)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 108090-03-1-CG000

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [주관,2세부] 근섬유단백질 특성을 이용한 돈육질예측기법 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.25 ~ 2011.06.24

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서 535번째 T 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열로 구성되는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자.

청구항 2

서열번호 4의 염기서열에서 136번째 C 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열로 구성되는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자.

청구항 3

서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상과 관련된 돼지 *MYH2* 유전자의 SNP를 탐색하기 위한 프라이머 세트.

청구항 4

서열번호 5과 서열번호 6으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상과 관련된 돼지 *MYH2* 유전자의 SNP를 탐색하기 위한 프라이머 세트.

청구항 5

제3항의 프라이머 세트와, PCR 반응혼합물, 및 RFLP 분석용 제한효소인 *Pst*I를 포함하는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트.

청구항 6

제4항의 프라이머 세트와, PCR 반응혼합물, 및 RFLP 분석용 제한효소인 *HpyCH4V*를 포함하는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트.

청구항 7

서열번호 1의 535번째 및 서열번호 4의 136번째 염기 중 하나 이상의 염기의 SNP를 확인하여 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법.

청구항 8

하기 단계들을 포함하는, 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법:

- a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 *MYH2* 유전자 5'upstream 영역의 서열번호 1의 535번째 염기 또는 *MYH2* 유전자 3'downstream 영역의 서열번호 4의 136번째 염기를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계;
- c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *Pst*I 또는 *HpyCH4V*로 처리하는 단계; 및
- d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에서 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain(MHC) slow isoform, 이하, MHC 슬로우 아형

과 혼용함) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 돼지의 근섬유단백질 아형을 코딩하는 유전자의 SNP를 발굴하여 이를 이용하여 육질이 향상된 개체를 조기에 선발할 수 있는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자 및 상기 표지인자를 이용하여 돼지 육질 향상 여부를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 종돈개량 분야에서는 기존의 통계유전학적 방법과 분자유전학적 기법을 결합함으로써 전반적인 선발 효과를 높이는 한편 유전자형을 이용한 개체선발을 통해 과거에는 개량이 어렵거나 불가능했던 육질과 같은 도체 형질의 개량도 실현할 수 있게 되었다. 특히, DNA 표지인자를 이용한 선발은 선발의 정확도를 높여 선발의 효과를 높일 뿐만 아니라, 개량기간을 단축할 수 있어 종돈 개량의 획기적인 기술로 부각되고 있다.

[0003] 기존의 육종방법으로 육질을 개량하는 것은 그 특성상 과정이 매우 복잡하며, 개량의 효과를 확인하기까지 긴 시간을 필요로 한다. 또한 육질과 같은 복합적인 형질을 개선하는데 한계점이 있으며, 근내지방도나 등지방 두께 등 제한된 특정형질에만 국한되어 개량이 진행되고 있다. 그러나 육질은 광범위하고 복잡한 기작에 의해 결정되므로 정확성과 효율성 측면에서 다소 부족함이 있다. 따라서, 육질을 정확하고 빠르게 예측할 수 있는 새로운 기법의 개발과 이와 관련한 DNA 표지인자의 개발이 절실히 요구된다.

[0004] 골격근의 성장과 발달을 이해하는 것은 육용가축의 적육생산량과 육질적 측면에서 매우 중요한 의미를 지니고 있다 (Karlsson 등, 1993). 근육은 사후에 진행되는 복잡한 요인들에 영향받아 생화학, 물리, 구조적인 변화를 거치면서 식육으로 전환되며, 소비자가 접하는 최종 육질 형성은 사후에 진행되는 근육의 대사에 의해 결정되어진다. 이러한 근육의 생화학적 반응에 가장 많은 영향을 미치는 요인은 근육을 구성하는 근섬유와 근원섬유 단백질의 특성이며, 근원섬유 단백질의 구성과 특성이 최종 육질을 결정하는 주요소이다.

[0005] 마이오신(Myosin)은 근육 및 근육세포 특성에 가장 큰 영향을 주는 근원섬유 단백질로, 근육단백질의 25%, 근원섬유 단백질의 45% 차지하고 있다. 하나의 마이오신은 두 개의 heavy chain(MHC)와 4개의 light chain(MLC)로 구성되어 있으며, MHC와 MLC는 각각 단백질 아형(isoform)이 존재한다.

[0006] 그중에서도 마이오신 중쇄(Myosin heavy chain; 이하, MHC와 혼용함)는 근섬유 특성에 영향을 가장 많은 영향을 미치는 인자로서, 성숙의 골격근에서 발현되는 MHC 아형은 I, IIA, IIX, IIB가 있으며, 각각 근원섬유 유형 I, IIa, IIx, IIb를 구성하고 있다(Borttinelli, 2001). MHC(Choi 등, 2006)의 생화학적 능력 차이는 사후 대사능력 및 대사속도에 영향을 미치게 되며 단백질 변성정도(Choi 등, 2007) 및 최종 육질에 영향을 주게 된다(Choi 등 2006). 따라서 MHC 아형은 사후 대사속도 및 육질 변이를 대변할 수 있다(Gil 등, 2003; Bowker 등, 2005; Choi 등, 2007).

[0007] 근원섬유 단백질(myofibrillar protein) 형성에 관여하는 유전자는 40여 가지로 탐색되어지며, 그중에서도 마이오신을 구성하는 MHC와 MLC의 아형을 코딩하는 유전자는 각각 9개 정도로 분석되어진다. MHC 유전자 발현의 과정을 보면 MHC 아형 1(isoform 1)에서 2A, 2X, 2B로 전환되면서, 근섬유(muscle fiber)의 형태가 슬로우 타입(slow type)에서 패스트 타입(fast type)으로 전환된다고 알려져 있다(Schiaffino 등, 1994). 이를 통해서 슬로우 타입(slow type) 위주의 근섬유가 패스트 타입(fast type)으로 전환될 때, MHC 아형 1(isoform 1)의 발현이 조절되어 패스트 아형(fast isoform)으로 전환됨을 유추해 볼 수 있으며, 또한 2A, 2X, 2B의 MHC 패스트 아형(fast isoform)들을 코딩하는 각각의 유전자가 돼지염색체 12번의 q-arm영역에 매우 가깝게 위치하고 있어 linear한 발현조절 패턴을 가질 수 있으므로, MHC 패스트 아형(fast isoform)의 사이 영역도 발현비율에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

[0008] 이와 같이 근섬유 특성 및 마이오신(myosin) 아형은 생체 가축 고유의 특성이며, 근섬유 특성을 이용하여 육질 예측이 가능하다고 사료된다(Ryu 등, 2005). 현재까지 근원섬유의 단백질인 마이오신(myosin) 아형과 관련된 DNA 마커를 분석하여 육질을 예측하는 방법은 도입된 사례가 없다.

[0009] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 특허공보 제10-0784166호(2007.12.04)의 Myogenin 유전자 관련 돼지 근세포수 증가 확인용 DNA 표지인자 및 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0067941호(2011.06.22)의 PPARGC1A 유전자 관련 돼지의 근육 내 근섬유 타입 I 증가 확인용 DNA 표지인자가 공개되어 있으나, 돼지 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인할 수 있는 SNP와 관련된 DNA 표지인자에 대해서는 전혀 언급되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0784166호(2007.12.04)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0067941호(2011.06.22)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 4개의 돼지 주요품종(Berkshire, Duroc, Landrace, Yorkshire)을 대상으로 실제 마이오신(myosin) 아형과 육질 형질을 측정하고, 근섬유 단백질 아형을 결정하는 주요유전자 중 하나인 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역내 서열번호 1의 535번째 영역을 포함하는 다형성좌위와, 동일유전자의 3'downstream 영역내 서열번호 4의 136번째 영역을 포함하는 다형성좌위에서의 유전자형 분석결과를 토대로 각각 연관성 분석을 실시하였다. 이를 통해서 본 발명의 유전자의 해당좌위에서 유전자형과 근섬유단백질아형 및 육질관련 형질들의 연관성을 구명하였고, 마이오신 중쇄 슬로우 아형(MHC slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 표지인자에 대한 효용성을 검증하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 주된 목적은, 돼지의 근섬유단백질 아형을 코딩하는 유전자 중 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역과 동일유전자의 3'downstream 영역의 SNP들을 이용하여 마이오신 중쇄 슬로우 아형(MHC slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부를 확인할 수 있는 DNA 단편 표지인자 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 육질 향상 관련 DNA 단편 표지인자를 이용한 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서 535번째 T 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열, 또는 서열번호 4의 염기서열에서 136번째 C염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열로 구성되는, 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자를 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역과 서열번호 4로 표시된 동일유전자의 3'downstream 영역에서 근섬유 단백질 아형과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 근섬유 단백질 아형 및 육질 관련 형질들의 연관성분석을 실시하였다. 상기 DNA 단편 표지인자는 마이오신 중쇄 슬로우 아형(myosin heavy chain(MHC) isoform)을 코딩하는 구조유전자의 서열 중 일부로서, 서열번호 1의 염기서열에서 535번째 (T→C) 위치에서 염기가 치환된 SNP부위, 또는 서열번호 4의 염기서열에서 136번째 (C→A)를 포함한다. 상기 SNP들은 *MYH2* 유전자의 5' upstream 영역과 동일 유전자의 3' downstream 영역에 각각 위치한다(도 1, 도 2, 도 4 및 도 5 참조).
- [0017] 본 발명은 *MYH2* 유전자의 전체 서열 중에서 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가 및 육질향상에 영향을 주는 SNP (T→C 치환, C→A치환) 부위 두 곳을 밝혀내고 이를 포함하는 DNA 단편의 “돼지의 근육 내 마이오신 중쇄 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자”로서의 신규한 용도에 관한 것이다.
- [0018] 상기 *MYH2* 유전자는 마이오신 중쇄 아형(myosin heavy chain(MHC) isoform)을 코딩하는 구조유전자 중 하나로, 돼지의 골격근에는 4개의 MHC 아형이 존재하며, 이들은 근육수축속도에 따라서 슬로우 형태(Slow form)와 패스트 형태(Fast form)로 크게 구분이 된다. 슬로우 형태(Slow form)는 β -MHC 아형 하나가 존재하고, 패스트 형태(Fast form)는 MHC 2a, 2x 그리고 2b의 3가지 아형이 존재하며 각각 *MYH7*, *MYH2*, *MYH1*, *MYH4* 유전자에 의해 발현된다. 그러나, 이들 구조유전자에서 특정 부위의 SNP를 이용하여 돼지의 근육 내 MHC 슬로우 아형 함량차이와

육질향상 여부 확인까지의 활용사례는 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 이러한 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 SNP를 처음으로 밝혔다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편은 돼지 MHC 아형을 코딩하는 *MYH2* 유전자의 새로운 유전적 변이 부위(SNP site)인 5'upstream 영역 내 새로운 유전적 변이 부위(SNP site)로서 서열번호 1의 염기서열에서 535번째 T염기를 포함하는 표지인자와 3' downstream 영역 내 새로운 유전적 변이부위 (SNP site)로서 서열번호 4의 136번째 C염기를 표기하는 표지인자이다. 이 유전적 변이 부위는 서열번호 1 내의 SNP는 T→C로, 서열번호 4 내의 SNP는 C→A로 염기가 치환되어 유전자의 발현에 차이를 주게 되어 MHC 슬로우 아형 비율에 영향을 주고, 최종적으로 서열번호 1 내의 SNP는 pH에, 서열번호 4 내의 SNP는 육질함목 중 보수력의 지표인 여과지 흡수량(Filter-paper fluid uptake, FFU)에 영향을 미친다.

[0020] 상기 DNA 단편의 크기는 전체 유전자의 전장(full length)이 아닌 상기 SNP 부위를 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 1000 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있으며, 그 이상의 크기를 갖는 염기의 경우는 본 발명의 실시예 4에서와 같이, PCR-RFLP 방법으로 탐지하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 1과 같이, 상기 SNP 부위를 포함하는 750 bp 크기의 DNA 단편을 DNA 표지인자로 이용하였고, 서열번호 4와 같이, 상기 SNP 부위를 포함하는 279 bp 크기의 DNA 단편을 DNA 표지인자로 이용하였다.

[0021] 또한 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편 표지인자는 육질 관련 형질인 도축 45분 후 근육 pH(pH_{45min})를 증가시키거나 보수력의 지표인 여과지 흡수량을 줄임으로써 육질을 향상시키는 것과 관련된 것임을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예 4에서와 같이, SNP에 따른 유전자형(서열번호 1에서는 TT, CT, CC, 서열번호 4에서는 CC, CA, AA)과 MHC 아형 조성 및 육질의 연관성 분석을 실시하여 서열번호 1 내의 SNP에서는 TT 유전자형이, 서열번호 4 내의 SNP에서는 AC 유전자형이 향상된 육질을 나타냄을 확인하였다.

[0022] 본 발명에서, “육질의 향상”이란 SNP로 인한 개체별 유전자형(서열번호 1에서는 TT, CT, CC, 서열번호 4에서는 CC, CA, AA)에 따라 서열번호 1 내의 SNP에서는 돼지의 육질 관련 형질인 pH가 높게, 서열번호 4 내의 SNP에서는 보수력의 지표인 여과지 흡수량이 적게 나타나는 것을 의미한다. 즉, 서열번호 1 내의 SNP에서 TT 유전자형 개체가 CT와 CC 유전자형 개체와 비교하여 pH_{45min}가 증가된 상태를, 서열번호 4 내의 SNP에서 AC 유전자형 개체가 AA 유전자형 개체와 비교하여 보수력이 향상된 상태를 의미한다.

[0023] 본 발명에 사용된 “PCR-RFLP” 방법은 가축의 유전적 특성이나 능력개량을 위한 다양한 DNA 분석기술 중, PCR(Polymerase Chain Reaction)기술을 이용한 유전자 단편들의 다형성(Restriction Fragment length polymorphism)을 분석하는 기법으로, 특정 점 돌연변이(point mutation) 부위에 제한효소 인지부위가 존재할 경우, 각 개체의 유전자형 차이에 따라 제한효소에 의해 절단되어 생기는 절편의 길이가 다양하게 나타나는 DNA의 다형성을 비교하여 각 개체의 바람직한 유전자형을 보다 신속하고 정확하게 판정하는 방법이다.

[0024] 본 발명에서, 돼지의 육질특성은 도축 45분 후 근육 pH (pH_{45min}), 유리육즙량 (drip loss), 육색 명도 (Lightness), 여과지 흡수량(Filter-paper fluid uptake, FFU) 등에 따라 측정될 수 있으며, 이 중 특히 pH와 보수력의 지표인 FFU는 돼지의 육질특성을 나타내는데 중요한 판별 기준이 된다. 최근 돼지고기의 가격이 급등하고 있기 때문에 육질이 우수한 돼지를 선발하고 육종 및 생산함으로써 품질이 향상된 고급육의 개발이 중요하다. 따라서 본 발명의 DNA 표지인자를 이용하면 육질이 향상된 개체를 조기에 선발하고 육질이 향상된 고급육을 손쉽게 선별할 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서, 535번째 T 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 상기 연속서열을 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 돼지 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 조성물을 제공한다.

[0026] 또한 본 발명은 서열번호 4의 염기서열에서 136번째 C 염기를 포함하는 15 내지 1000개의 연속서열에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 상기 연속서열을 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 돼지 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 돼지 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부 확인용 조성물에서, 상기 “프라이머”란 중합효소에 의한 뉴클레오타이드의 중합반응에서, 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥의 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 예를

들면, 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 (즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소의 존재) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일 가닥의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0028] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 상기 프라이머는 상기한 연속서열 자체뿐만 아니라, 상기한 연속서열에 특이적으로 혼성화하는 서열로서 중합반응에서 개시점으로 작용할 수 있는 것도 포함된다. 예를 들면, 서열번호 1의 폴리뉴클레오타이드에 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 상보성을 갖는 서열일 수 있다. 또한 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드에 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 상보성을 갖는 서열일 수 있다.

[0029] 상기 폴리뉴클레오타이드가 PCR 프라이머로서 사용되는 경우, 상기 폴리뉴클레오타이드에 더하여, 그의 상보적 가닥에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 사용된 용어 “프로브”란 상기 DNA 단편 표지인자에 특이적으로 결합하는 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 단일가닥 형태일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 또한, 상보적 뉴클레오타이드에 수소 결합에 의하여 혼성화될 수 있는 성질을 갖는 것이면, 천연 뉴클레오타이드로 구성된 것뿐만 아니라, 천연 뉴클레오타이드, 천연 뉴클레오타이드의 유사체, 천연 뉴클레오타이드의 당, 염기 또는 인산 부위가 변형되어 있는 뉴클레오타이드 및 이들 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 PNA(Peptide Nucleic Acid)를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오타이드는 예를 들면, 분석 반응에서 상기 폴리뉴클레오타이드 또는 그가 결합되어 있는 복합체의 검출의 편이를 위하여, 검출가능한 표지 (예, Cy3, Cy5 형광성 물질)가 부착, 예를 들면, 3'말단 또는 5'말단에 부착되어 있는 것일 수 있다.

[0031] 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 단편 표지인자에 완전 상보적인 서열일 수 있다. 또한, 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대한 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 상보적인 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 프로브는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대한 특이적 혼성화를 손상되지 않는 범위 내에서, 변형된 뉴클레오타이드를 갖는 것일 수 있다. 상기 프로브의 예는, SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 완전 상보적인 서열로 이루어진 완전 매치 프로브(perfect probe) 및 SNP 부위를 포함하는 상기 DNA 표지인자에 대하여, 상기 SNP 부위를 제외한 모든 서열에 대하여 완전 상보적인 서열을 갖는 미스매치(mismatch probe)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 프라이머 및 프로브를 사용하여 SNP 부위에 특정한 대립인자를 가진 뉴클레오타이드 서열을 증폭하거나 그 존재를 확인할 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오타이드, 또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시된 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, 근육 내 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 육질 향상 여부 확인용 지표로서 돼지 *MYH2* 유전자의 SNP를 탐색하기 위한 프라이머 세트를 제공한다. Genebank에는 mRNA 염기서열(NM_214136)만 알려져 있었기 때문에, 본 발명의 실시예에서는 다른 biological database인 ‘Ensemble genome browser’를 이용하여 *MYH2* 유전자의 5'upstream과 3'downstream 영역의 서열을 탐색하고, 이 서열에 기초하여 본 발명의 *MYH2* 유전자에 존재하는 SNP를 탐색할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 본 발명의 프라이머는 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, 돼지 *MYH2* 유전자 서열 중 특정 부위(서열번호 1에서 535번째 염기, 또는 서열번호 4에서 136번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다. 바람직하게 상기 유전자 단편은 서열번호 1 또는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 구성된다 (도 2 및 5 참조).

[0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머 세트와, PCR 반응혼합물, 및 RFLP 분석용 제한효소인 *Pst*I, 또는 *Hpy*CH4V를 포함하는 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP 분석용 키트는 PCR-RFLP 기법을 이용하는 것으로, *MYH2* 유전자의 발현 조절 즉, MHC 아형의 다양한 발현을 분석하기 위하여 특정한 제한효소인 *Pst*I 또는 *Hpy*CH4V를 포함한다. 이러한 특정 제한효소는 본 발명자들이 근섬유 조성의 변화를 일으키는 SNP를 밝혀내고 이 SNP에 기초하여 선택된 것이다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 상기 서열번호 1 내의 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *Pst*I

의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머로 증폭하였을 경우 유전자형은 TT, TC, CC로 나타나며, T allele는 750 bp로, C allele는 539 bp, 211 bp 로 밴드가 나타남을 확인하였다 (도 3 참조). 또한 본 발명의 상기 서열번호 4번 내의 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *HpyCH4V*의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 5와 서열번호 6의 프라이머로 증폭하였을 경우 유전자형은 CC, CA, AA로 나타나며, A allele는 168+57+54 bp로, C allele는 135+57+54+33 bp로 밴드가 나타남을 확인하였다 (도 6 참조)

[0035] 상기 프라이머를 이용하여 제조된 유전자 단편의 염기서열의 결정은, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 법에 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, 그외 전기적 신호 검출방법 등이 사용될 수 있다.

[0036] 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.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 1의 535번째, 또는 서열번호 4의 136번째 염기 중 하나 이상의 염기의 SNP를 확인하여 돼지의 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에 의한 상기 SNP는 MHC 슬로우 아형(MHC slow isoform) 증가, pH 및 보수력 지표인 FFU를 포함하여 돼지의 육질특성과 관련이 있으므로, 상기 SNP의 변이를 확인함으로써 돼지의 육질 향상 여부를 용이하게 확인할 수 있다. 상기 SNP의 변이는 공지된 다양한 방법에 의해 확인할 수 있으며, 예를 들어 PCR-RFLP 분석법 및 직접 서열분석법 등을 이용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 마이오신 중쇄 슬로우 아형(Myosin heavy chain slow isoform) 증가 및 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다:

[0040] a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

[0041] b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 *MYH2* 유전자 5'upstream 영역의 서열번호 1의 535번째 염기 또는 *MYH2* 유전자 3'downstream 영역의 서열번호 4의 136번째 염기를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계;

[0042] c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA를 제한효소 *PstI* 또는 *HpyCH4V*로 처리하는 단계; 및

[0043] d) 상기 c)단계에서 얻어진 유전자 단편들에서 다형성(RFLP; restriction fragment length polymorphism)을 비교하는 단계.

[0044] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3로 표시되는 프라이머 세트, 또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시된 염기서열로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 *MYH2* 유전자 5'upstream 영역의 *PstI* site, 또는 3'downstream 영역의 *HpyCH4V* site가 포함된 특정부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2와 서열번호 3으로, 또는 서열번호 5와 서열번호 6으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성된 프라이머 세트를 이용하여 증폭시킬 수 있다.

[0045] 본 발명의 방법에서, 상기 유전자 단편들의 다형성은 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 어떠한 제한효소로도 처리하는 것이 가능하나, 바람직하게는 서열번호 1내의 SNP를 포함하는 경우 제한효소 *PstI*으로, 서열번호 4 내의 SNP를 포함하는 경우 제한효소 *HpyCH4V* 로 처리하는 것이 적당하다. 본 발명은 상기 SNP 부위 인식에서 표지유전자를 한 번의 PCR 반응과 효소처리로서 탐색하고 진단해 낼 수 있는 가장 효율적인 방법의 하나로 PCR-RFLP 방법을 이용한 탐색기법을 개발하였다. 구체적으로, 본 발명의 상기 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소인 *PstI*와 *HpyCH4V*의 처리에 따라 다르게 나타나는 밴드 패턴을 파악하여 유전자형을 구분하였다.

발명의 효과

- [0046] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 *MYH2* 유전자에 존재하는 유전적 변이(SNP)는 돼지 근섬유단백질 아형 함량에 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있으며, 이러한 MHC 슬로우 아형 함량의 증가가 육질 형질 중 하나인 사후 45분 pH와 보수력의 지표인 여과지 흡수량에 차이를 나게 하여 돼지고기 육질에 영향을 주게 된다. 따라서 본 발명의 SNP는 돼지 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질 향상 여부를 확인할 수 있는 DNA 표지인자로 사용될 수 있으며, 본 발명을 통해 이러한 SNP를 손쉽게 탐지할 수 있는 분석기법이 제공된다. 이러한 표지인자를 선발기법은 DNA 수준에서의 육질예측방안으로서 돼지 육종기술에 매우 유용하게 적용될 수 있다. 즉, 본 발명은 육질이 향상된 개체를 조기에 선발하여 육종 및 생산함으로써 품질이 향상된 고급육의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 돼지의 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 발견한 SNP 위치를 나타낸 모식도이다. 염기서열 분석에서는 여섯 개의 프라이머 세트(primer set)로 증폭된 6개의 앰플리콘(amplicon)이 이용되었으며, 하나의 SNP가 발견되었다.
- 도 2는 서열번호 1로 표시된 돼지 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과로서, 서열번호 1의 535번째 염기(T→C 치환)는 새로 발견된 단일염기변이부위(SNP)이다.
- 도 3은 돼지 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역에 위치한 서열번호 1의 535번째 염기서열을 포함한 DNA 단편에 대한 PCR-RFLP를 실시한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 돼지의 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과 발견한 SNP 위치를 나타낸 모식도이다. 염기서열 분석에서는 아홉 개의 프라이머 세트로 증폭된 앰플리콘 내 서열이 이용되었으며, 서열번호 4가 포함하고 있는 SNP는 F9에 위치하고 있다.
- 도 5는 서열번호 4로 표시된 돼지 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과로서, 서열번호 4의 136번째 염기(C→A 치환)는 새로 발견된 단일염기변이부위(SNP)이다.
- 도 6은 돼지 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역에 위치한 서열번호 4의 136번째 염기서열을 포함한 DNA 단편에 대한 PCR-RFLP를 실시한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0049] 실시예 1. 돼지 *MYH2* 유전자 5' upstream 영역 탐색
- [0050] *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역을 포함하는 염기서열 분석을 위해, 최근에 보고된 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역 3.2kb에 대해 염기서열분석 및 다형성 탐색을 실시했다. Genbank에는 mRNA염기서열(NM_214136)만 알려져 있었기 때문에 Ensemble genome browser를 이용하여 기초염기서열을 탐색하였다. 이것을 토대로 6개의 앰플리콘(amplicon)을 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작하였다(표 1).

표 1

[표 1]

Primer	Sequence (5' → 3')	Size (bp)	Ann ¹ (°C)
F1	F : GCAGTCTACTGGGCAGGTTTA	667	60
	R : AATAGCGAGGGGTCTAGGGTA		
F2	F : CAGGTTCTTTTCTGCTGCAC	686	60
	R : TGGGCATTTTCTCTGTGCT		
F3	F : GAGTGAGGCTTTGCCTTTTC	713	60
	R : CTTCCACTCTGAGCTGTTTCC		
F4	F : ACATGCTGAGTGGAACCAAG	799	60
	R : TATATGAAGGCCACGGTGAG		
F5	F : TGTGTGCCCTTCTTCATCA	750	60
	R : AAGGAAGGTTTCAGGCTGGT		
F6	F : AGCCAGGAGGAATTTGTGAG	721	60
	R : TCTCCAGCACCTTTCCTGA		

¹Annealing temperature

[0051]

[0052]

유전자 구조분석과 동시에 품종 간 및 품종 내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 4개 품종(Yorkshire, Landrace, Berkshire, Duroc)의 순종 돼지의 DNA를 각 품종별로 10두씩 혼합하여 3개 샘플을 염기서열 분석에 이용하였다. 표 1에 개시된 특이 프라이머와 혼합된 DNA 샘플을 이용하여 PCR 방법을 통해서 6개의 앰플리콘 (amplicon 1 ~ amplicon 6)을 증폭시켰으며, 이를 ABI PRISM[®]

BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM[®]

3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 돼지 *MYH2* 유전자의 전장 염기서열 분석 결과를 기존의 클론 서열(clone sequence)과 비교(alignment)하여 품종 간 및 품종 내 변이를 탐색하였다.

[0053]

그 결과, 단 1개의 단일염기변이(Single nucleotide polymorphism, SNP)를 발견하였다(도 1). 본 발명의 SNP는 앰플리콘 5에서 발견되었으며 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역에서 전사개시부위로부터 -702에 위치한다.

[0054]

실시예 2. 돼지 *MYH2* 유전자 3' downstream 영역 탐색

[0055]

MYH2 유전자의 3'downstream 영역을 포함하는 염기서열 분석을 위해, *MYH2* 유전자와 *MYH1* 유전자 사이 5kb 영역에 대해 염기서열분석 및 다형성 탐색을 실시했다. Genebank에는 mRNA염기서열(NM_214136과 NM_001104951)만 알려져 있었기 때문에 Ensemble genome browser를 이용하여 기초염기서열을 탐색하였다. 이것을 토대로 9개의 앰플리콘(amplicon)을 증폭할 수 있는 특이 프라이머를 제작하였다(표 2).

표 2

[표 2]

Primer	Sequence (5' → 3')	Size (bp)	Ann. ¹ (°C)
F7	F : ACAGTCATCATCTCCCAGCA R : AATTCTTAGCGGCAGGTCAC	721	60
F8	F : CGGGAGGTTTCACACAAAAG R : TCTGAGGTTGGGGATCAAAT	770	60
F9	F : CAGTGGAAACGAACCCAAC R : TCCTGAAGCCAGTGTGATGT	781	60
F10	F : AAATGGCCCTGTGAGAGAAC R : AATGGAAATAGGCTGCCTTG	668	60
F11	F : CCAGGTGATCAAGGTCAAGA R : TTTGCTCCTTACCGGAGACT	777	60
F12	F : TCAGTCTGTCTTTGGCTGCT R : CAGGATGTGTGGCATGTGT	630	60
F13	F : ACACATGCCACACATCCTG R : CAGGAAACTCAAAGCACTCG	798	60
F14	F : CCTGCATGTTGCTCCATACT R : GATGCTTCTCCAACGCTTTT	712	60
F15	F : GAAGGATGCTGCAGAAGGA R : GTCAAAGTCTGGGAGACAGGA	766	60

¹Annealing temperature

[0056]

[0057]

유전자 구조분석과 동시에 품종 간 및 품종 내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 4개 품종(Yorkshire, Landrace, Berkshire, Duroc)의 순종 돼지의 DNA를 각 품종별로 10두씩 혼합하여 3개 샘플을 염기서열 분석에 이용하였다. 표 2에 개시된 특이 프라이머와 혼합된 DNA 샘플을 이용하여 PCR 방법을 통해서 9개의 앰플리콘(F7 ~ F15)을 증폭시켰으며, 이를 ABI PRISM[®]

BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)와 ABI PRISM[®]

3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 돼지 *MYH2* 유전자의 전장 염기서열 분석 결과를 기존의 클론 서열(clone sequence)과 비교(alignment)하여 품종 간 및 품종 내 변이를 탐색하였다.

[0058]

그 결과, F9에서 단일염기변이(Single nucleotide polymorphism, SNP)변이를 발견하였다(도 4).

[0059]

실시예 2. 돼지의 게놈 DNA(genomic DNA) 추출

[0060]

본 실험을 위해서 실험축군(resource population)으로 국내에서 주요하게 이용되고 있는 Berkshire, Duroc, Landrace, Yorkshire의 4개 품종으로 조성되었으며, 암돼지 159두와 거세수돼지 72두로 총 231두를 대상으로 실시하였다. 실험군 돼지의 경정맥으로부터 혈액을 채취하여, DNA 추출에 이용하였다.

[0061]

유전자 다형성 분석을 위한 게놈 DNA(genomic DNA)의 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 돼지의 경정맥에서 10 ml의 혈액을 채취한 후, 응고를 방지하기 위해서 ACD 용액 (citric acid 0.48 g, sodium citrate 1.32 g, glucose 1.47 g to H₂O 100 ml) 2 ml를 첨가하여 4°C 유지하여 실험실까지 운반하였다. 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1,300 g에서 15분간 원심분리하여 백혈구원층(buffy coat)을 모아 15 ml의 DNA 추출 버퍼(extraction buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 0.1 M EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS; 20% µg/ml)를 넣고 잘 섞

은 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 Proteinase K (200 µg/ml, BRL)를 혼합하여 37℃ 항온수조에서 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 동량의 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0)으로 준비된 페놀(Phenol)에 넣고 30분 동안 섞어 추출한 후 실온에서 15분간 5,000 g로 원심분리하여 층이 생기도록 하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 직경이 0.3 cm되는 피펫(pipet)으로 상층액을 취하여 50 ml Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0) 4L에서 18시간 동안 4℃에서 투석하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 분리된 DNA 순도는 spectrophotometer (Beckman, USA)를 이용하여 흡광도 A260과 A280의 비율로 측정하였으며, 0.8% 아가로스 겔 전기영동을 시행하여 DNA의 분자량을 확인하였다.

[0062] 실시예 3. PCR-RFLP 분석

[0063] DNA 표지 유전자를 한 번의 PCR 반응과 효소 처리로 탐색하고 진단해 낼 수 있는 가장 효율적인 방법의 하나로 PCR-RFLP 방법을 이용하여 탐색기법을 개발하였다. Restriction mapper software program(<http://www.restrictionmapper.org/>)을 이용해서 목표한 SNP 부위를 인식할 수 있는 제한효소 (Restriction enzyme)를 각각 찾았고, 그렇게 찾아낸 제한효소인 *PstI* 과 *HpyCH4V*의 처리에 따라서 다르게 나타나는 밴드(band) 형태를 파악하여 유전자형을 구분할 수 있었다.

[0064] 5' upstream 영역내 SNP부위의 유전자형을 판단하기 위한 PCR 반응시 프라이머는 Forward (5' - TGT GTG CCC TTC TTC ATC A - 3', 19mer)(서열번호 2)와 Reverse (5'- AAG GAA GGT TCA GGC TGG T- 3', 19mer)(서열번호 3)로 제작하여 각각 1 µl(5 pmol/µl)씩 첨가하였고, 그 외의 반응 첨가물은 10×PCR buffer(100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl) 2 µl, 10×dNTP mix(each 25 mM) 2 µl, Taq DNA polymerase(5 unit/µl; Intron bio.) 0.2 µl과 ddH₂O 12.8 µl, Template DNA 1 µl(약 100 ng)이었다. PCR 반응에는 Mastercycler(Eppendorf Co., Germany) 기기를 사용하였고, PCR 반응조건은 94℃에서 10분간 pre-denaturation 한 후, 94℃에서 denaturation 1분, 60℃에서 annealing 1분, 72℃에서 extension 1분을 한 cycle로 하여 30 cycle을 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 10분으로 PCR 반응을 종료하였다.

[0065] 이렇게 확보된 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역의 일부를 포함하는 PCR product(750 bp)를 restriction mapper software program을 이용해서 찾아낸 *PstI* 제한효소로 처리하였다. *PstI* enzyme 처리 첨가물은 *PstI* enzyme 0.3 µl(5 unit/µl, NEB(New England BioLabs)), 10× Enzyme buffer 0.8 µl, 10× BSA 0.8 µl, ddH₂O 3.1 µl, PCR product 3 µl로 총 volume이 8 µl이었다. 이 혼합물을 37℃ 인큐베이터에서 약 4시간 동안 반응시키고, 2% 아가로스 겔에 100V로 20분 동안 전기영동(electrophoresis)하여 그 밴드 패턴을 확인하였다 (도 3 참조).

[0066] 도 3은 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역 서열번호 1의 염기서열에서 535번째 위치한 SNP(도 2 참조)에 대한 PCR-RFLP 단편을 나타낸다. 사이즈 마커는 1Kb plus DNA ladder (invitrogen)를 이용하였다. 750 bp의 PCR product(서열번호 1, 도 2 참조)는 제한효소 *PstI* 에 의해 CC 유전자형에서 539bp와 211bp의 두 단편으로 절단된다. 반면 TT 유전자형에서는 절단되지 않고 그대로 750bp가 나오며, 이형접합체인 CT 유전자형의 경우 세가지 단편(750, 539, 211)이 모두 나타난다.

[0067] 또한, 3' downstream 영역내 SNP부위의 유전자형을 보다 효율적으로 진단하기 위한 PCR 반응시 프라이머는 Forward (5' - GCC TAT GCT TCC AGG TCT TC - 3', 20mer)(서열번호 5)와 Reverse (5'- GCA GTC ACC ATT CAG TTT TCC - 3', 21mer)(서열번호 6)로 새로이 제작하여 각각 1 µl(5 pmol/µl)씩 첨가하였고, 그 외의 반응 첨가물은 10×PCR buffer(100 mM Tris-Cl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM Mg₂Cl) 2 µl, 10×dNTP mix(each 25 mM) 2 µl, Taq DNA polymerase(5 unit/µl; Intron bio.) 0.2 µl과 ddH₂O 12.8 µl, Template DNA 1 µl(약 100 ng)이었다. PCR 반응에는 Mastercycler(Eppendorf Co., Germany) 기기를 사용하였고, PCR 반응조건은 94℃에서 10분간 pre-denaturation 한 후, 94℃에서 denaturation 1분, 62℃에서 annealing 1분, 72℃에서 extension 1분을 한 cycle로 하여 30 cycle을 반복한 후, 마지막으로 72℃에서 10분으로 PCR 반응을 종료하였다.

[0068] 이렇게 확보된 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역의 일부를 포함하는 PCR product(279 bp)를 restriction mapper software program을 이용해서 찾아낸 *HpyCH4V* 제한효소로 처리하였다. *HpyCH4V* enzyme 처리 첨가물은 *HpyCH4V* enzyme 0.5 µl(5 unit/µl, NEB(New England BioLabs)), 10× Enzyme buffer 1 µl, ddH₂O 5.5 µl, PCR product 3 µl로 총 volume이 10 µl이었다. 이 혼합물을 37℃ 인큐베이터에서 약 3시간 동안 반응시키고, 3% 아가로스 겔에 100V로 40분 동안 전기영동(electrophoresis)하여 그 밴드 패턴을 확인하였다 (도 6 참조).

[0069] 도 6은 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역 서열번호 4의 염기서열에서 136번째 위치한 SNP(도 5 참조)에 대한 PCR-RFLP 단편을 나타낸다. 사이즈 마커는 50bp plus DNA ladder (invitrogen)를 이용하였다. 279 bp의 PCR product(서열번호 1 내에 존재)는 제한효소 *HpyCH4V* 에 의해 유전자형에 관계없이 모두 나타나는 57bp, 54bp 두 절편을 제외하고 CC 유전자형에서 135bp와 33bp 의 단편으로 절단된다. 반면 AA 유전자형에서는 절단되지 않고 그대로 168bp가 나오며, 이형접합체인 CA 유전자형의 경우 세 가지 단편(33, 135, 168)이 모두 나타난다.

[0070] 실시예 5. 유전자형과 MHC 아형(MHC isoform) 조성 및 육질의 연관성 분석

[0071] 1) MHC 아형 조성 및 육질분석

[0072] 출하체중에 도달한 실험군은 MHC 아형 분석을 위한 시료를 확보하고, 도축 후 사후대사 특성을 분석하고 육질을 측정하였다. Talmage와 Roy(1993)의 단백질 전기영동 방법을 수정한 실험방법(Choi 등, 2006)을 이용하여 분석 MHC 아형과 MLC 아형의 경우 각각 I, IIA, IIX, IIB과 1s, 1f, 3f, 2s, 2f을 정성, 정량적인 분석방법으로 분석하였다.

[0073] 근육의 pH는 사후 45분에 스피어-형 전극(spear-type electrode)의 사용으로 등뼈 13번/14번 부분에서 측정되었다. 육색 명도(Lightness)는 색도계(chromameter; CR-300, Minolta Camera Co., Japan)를 사용하여 등심근의 사후 45분경에 측정하였다. 유리육즙량(drip loss)은 2℃에서 48시간 동안 플라스틱 백에서 표면에 있는 근육 샘플의 양의 차이를 측정하는 방법으로 분석되었다 (Honikel 1987). 육색점수 및 근내지방도는 NPPC(USA, National Pork Product Council, 2002) 기준에 의해서 점수를 평가했다.

[0074] 2) 유전자형과 형질과의 연관성 분석

[0075] 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.13 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 최소제곱평균 (Least Squares Means)을 구하여 유의차를 평가하고 연관성을 분석하였다. 통계분석 모델은 다음과 같다.

수학식 1

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + B_j + S_k + e_{ijkl}$$

[0076]

[0077] y_{ijkl} = 관측치

[0078] μ = 전체평균

[0079] G_i = 유전자형효과

[0080] B_j = 품종에 따른 고정효과

[0081] S_k = 성별에 따른 고정효과

[0082] e_{ijkl} = 잔차

[0083] 하기 표 3은 공시돈 231두(Berkshire 120두, Duroc 30두, Landrace 44두, Yorkshire 37두)에서 *MYH2* 유전자의 5'upstream 영역의 *Pst*I site 다형성과 MHC 아형 함량 및 육질 특성간의 상관관계를 분석한 결과이다.

표 3

[표 3]

Traits	Genotype			P-value
	CC (n=19)	TC (n=76)	TT (n=136)	
Myosin heavy chain				
Slow isoform (%)	4.11 ^b (0.52) ¹	5.83 ^a (0.35)	5.83 ^a (0.41)	0.0406
Meat quality traits				
pH _{45min}	6.00 ^b (0.08)	6.07 ^b (0.05)	6.22 ^a (0.03)	0.0071
Drip loss (%)	3.23 (0.47)	3.47 (0.30)	3.28 (0.16)	0.7725
Lightness (<i>L</i> [*])	46.44 (0.83)	46.49 (0.54)	46.82 (0.28)	0.8471
FFU (mg)	34.78(5.53)	35.14(3.58)	34.14(1.89)	0.9686

Abbreviation: FFU, Filter-paper fluid uptake.

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Different superscripts indicate significance levels within rows of each SNP locus.

[0084]

[0085]

표 3에서 보는 바와 같이, *MYH2* 유전자의 5'upstream region내 서열번호 1에서 535번째 위치한 SNP에서는 MHC 슬로우 아형 함량에서 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$). CC 유전자형이 4.11%로 TC (5.83%), TT (5.83%) 유전자형보다 낮은 MHC 슬로우 아형 함량을 보였다. 또한 CC 유전자형과 TC 유전자형은 pH_{45min}가 TT 유전자형보다 낮게 나타났다($P < 0.01$). pH_{45min}는 사후 초기대사속도를 가늠할 수 있는 지표로서 수치가 낮을수록 사후대사 속도가 빠르고 단백질변성이 급속도로 일어남을 의미한다. 따라서 CC 유전자형과 TC 유전자형에 비해 TT유전자형이 육질이 우수하다고 할 수 있다. pH_{45min}를 제외한 다른 육질항목에서는 유전자형간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 특이할만한 점은 TT 유전자형과 함께 MHC 슬로우 아형이 높게 나타난 TC 유전자형이 CC 유전자형과 함께 pH_{45min}가 낮게 나왔다는 점이다. 이를 통해 유추해볼 수 있는 것은 MHC 슬로우 아형 함량이 높다고 항상 육질이 우수하지 않으며, 반대로 일정수준 이하의 MHC 슬로우 아형 함량은 육질저하의 척도가 될 수 있다는 점이다.

[0086]

하기 표 4는 공시돈 231두(Berkshire 120두, Duroc 30두, Landrace 44두, Yorkshire 37두)에서 *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역의 *HpyCH4V* site 다형성과 MHC 아형 함량 및 육질 특성간의 상관관계를 분석한 결과이다.

표 4

[표 4]

Traits	Genotype			P-value
	AA (n=41)	AC (n=63)	CC (n=127)	
Myosin heavy chain				
Slow isoform (%)	4.59 ^b (0.52) ¹	5.87 ^a (0.35)	6.46 ^a (0.41)	0.0366
Meat quality traits				
pH _{45min}	6.27 (0.05)	6.17 (0.04)	6.16 (0.04)	0.2518
Drip loss (%)	3.25 (0.33)	3.40 (0.22)	3.26 (0.25)	0.8659
Lightness (<i>L</i> [*])	46.60 (0.58)	46.52 (0.39)	47.06 (0.45)	0.6535
FFU (mg)	40.25 ^a (3.81)	30.61 ^b (2.54)	34.43 ^{ab} (2.95)	0.0682

Abbreviation: FFU, Filter-paper fluid uptake.

¹Standard error of least-square means

^{a,b}Different superscripts indicate significance levels within rows of each SNP locus.

[0087]

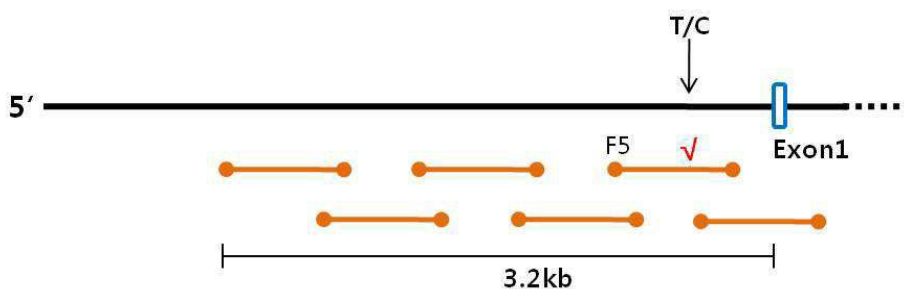
[0088] 표 4에서 보는 바와 같이, *MYH2* 유전자의 3'downstream 영역내 서열번호 4에서 136번째 위치한 SNP에서는 MHC 슬로우 아형 함량에서 유의적인 차이가 나타났다($P < 0.05$). AA 유전자형이 4.59%로 집단평균(5.90%)보다 현저히 낮은 MHC 슬로우 아형 함량을 보였다. 또한 보수력을 나타내는 여과지흡수량에 있어서 AA유전자형이 다른 유전자형에 비해 높게 나타났다. 이는 육질이 상대적으로 낮음을 의미한다.

[0089] SNP에 따른 유전자형과 형질에 대한 연관성 분석결과를 종합해보면 MHC 슬로우 아형 함량이 낮게 나타난 유전자형들이 육질도 낮게 나타났다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 돼지 *MYH2* 유전자의 5'upstream region내 *Pst*I 좌위의 SNP와 3'downstream region내 *Hpy*CH4V 좌위가 육질관련형질에 영향을 미친다는 것을 보였고, 돼지의 근육 내 MHC 슬로우 아형 증가 및 육질향상 확인용 DNA 표지인자로서 사용될 수 있음을 증명하였다.

[0090] 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

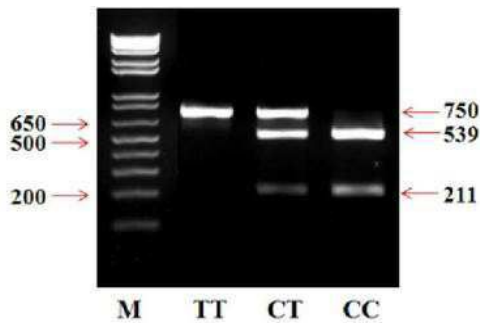


도면2

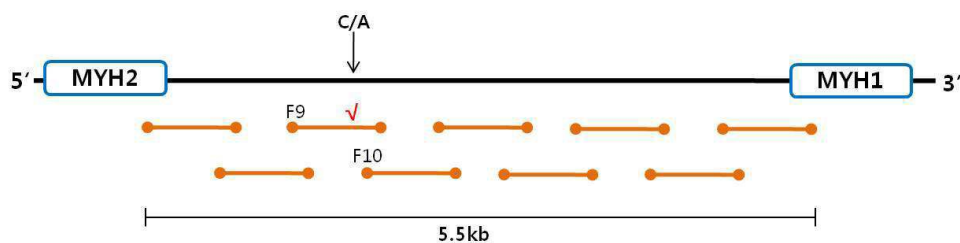
```

1  TGTGTGCCCT TCTTCATCAG GAAATGTGTC CTTACTTCAA GTATAAAGCC AAGTAAACAA
61  GTTTTATTTA TGCCATCTAG CAGAAGTGTC TCCTTAAAGG TTAAAAAAT ATATTATTG
121 GAAGTTTGGG ATACATTCAG TACTTAATAC TTCTCTAAAT GCTATGTATA TTATATTAT
181 TGTGTTTATA TCAGAAAAAG AAATATAAAG ACGCGTTCTC ACGTGGOCT TCATATACGA
241 AACGAAATCA CATCCCCATT ATTCTAAGCG CACTCCACAA ACGTTATCGG TTTTCTTG
301 GTGTGCTGAC ATGAAAAATG TTGGGAAGTA CTCCCTAAGA GCACCTTAA ATCTTCAGCC
361 TTTCTTTCCA CGGGCAAGTC AAATGAGTAG GTGGACGGGG AATAGTGTGC TGTGGGAGGA
421 CCAGCGTGGG CAAAAGCAAA ACAAGGAGAG AGTAAGGTA GCCTGAAAC TATCAGAATA
481 TTGGAACAAA GAGAGAACTG TCTTTTAA TGGTGAAGA CACATAGCTT AATT[T/C]TGCAG
541 AGCTGGAAGA CTCAACAGGT GAAAATTAAC CCTGGCAAAA TAAAATAAA TATCTGTATT
601 TTATTTCTAT CATTTAATCT GTTAAATATG AAAAGTGATG CAAGACAAGC CCGAAAGGCA
661 TGCCAGCAG AGCCAGGAGG AATTGTGAG AGAAGCAGG TATTCTGGCT GCCAGCCAC
721 TGCCTTTATC CACCAGCCTG AACCTTCCTT
    
```

도면3



도면4



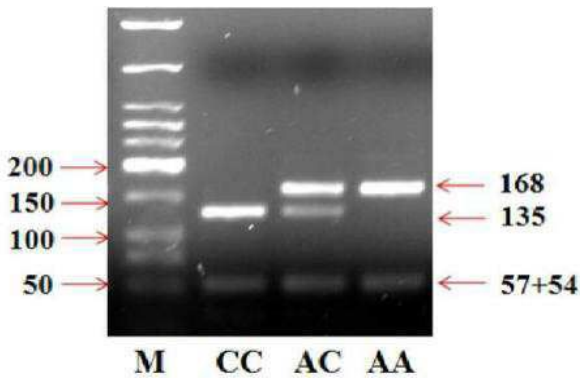
도면5

```

1 GCCTATGCTT CCAGGTCCTC TGTAATTATG TAAAGAGCCA AAACAAATTA TAAAAGTGT
61 CAATAAAATA TGAATCCCCA AATAAATTGT CCAAAGATAT AATGAACACA CATAACAGTA
121 AGTATGAATT TGGTG[C/A]AAAA ACTAGATGTA GCGGAAATCC AAATTCTGCA GAGAAGTTTC
181 CTGAGAGAAT TAATATATTT TAAACTGGAT TCAGTTGCGA TGCATAGCTA AAAACATAAA
241 CTTTGTGGGT AGCATAAAGG AAAACTGAAT GGTGACTGC

```

도면6



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> DNA fragment markers for detecting increase of porcine Myosin heavy chain slow isoform and improvement on pork quality

<130> P11-111007-01

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 750

<212> DNA

<213> Sus scrofa domesticus

<400> 1

```

tgtgtgccct tcttcacag gaaatgtgtc cttacttcaa gtataaagcc aagtaaacia      60
gttttattta tgccatctag cagaagtgtc tccttaaagg tttaaaaaat atattatttg      120

gaagttttgg atacattcag tacttaatac ttctctaat gctatgtata ttatatttat      180
tgtgtttata tcagaaaaag aaatataaag acgcgttctc accgtggcct tcatatacga      240
aacgaaatca catccccatt attctaagcg cactccacaa acgttatccg ttttttcttg      300
gtgtgctgac atgaaaaatg ttgggaagta ctccctaaga gcacctttaa atcttcagcc      360
tttctttcca cgggcaagtc aaatgagtag gtggacgggg aatagtgtgc tgtgggagga      420

```

ccagcgtggg caaaagcaaa acaaggagag agtaagggtg gcctcgaaac tatcagaata 480
 ttggaacaaa gagagaactg tctttttaa ttgggaaga cacatagctt aattttgcag 540

agctggaaga ctcaacaggt gaaaattaac cctggcaaaa ttaaaataaa tatctgtatt 600
 ttatttctat catttaatct gttaaataatg aaaagtgatg caagacaagc ccgaaaggca 660
 tgcccagcag agccaggagg aatttgtgag agaagccagg tattctggct gcccagccac 720
 tgcctttatc caccagcctg aaccttcctt 750

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for PCR
 <400> 2
 tgtgtgccct tcttcatca 19

<
 210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer for PCR
 <400> 3
 aaggaaggtt caggctggt 19

<210> 4
 <211> 279
 <212> DNA
 <213> Sus scrofa domesticus
 <400> 4
 gcctatgctt ccaggtcttc tgtaattatg taaagagcca aaacaaatta ttaaaagtgt 60
 caataaaata tgaatcccca aataaattgt ccaaagatat aatgaacaca cataacagta 120
 agtatgaatt tgggtcaaaa actagatgta gcggaaatcc aaattctgca gagaagtttc 180

ctgagagaat taatatattt taaactggat tcagttgcga tgcatagcta aaaacataaa 240
 ctttgtgggt agcataaagg aaaactgaat ggtgactgc 279

<210> 5
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for PCR

<400> 5

gcctatgctt ccaggtcttc

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer for PCR

<400> 6

gcagtcacca ttcagttttc c

21