



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0030975
(43) 공개일자 2017년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) C07K 14/57 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C07K 14/525 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0128580
(22) 출원일자 2015년09월10일
심사청구일자 2016년02월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
전태훈
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
최상필
서울특별시 동대문구 무학로44길 16, 201호 (용두동)
(74) 대리인
김순웅

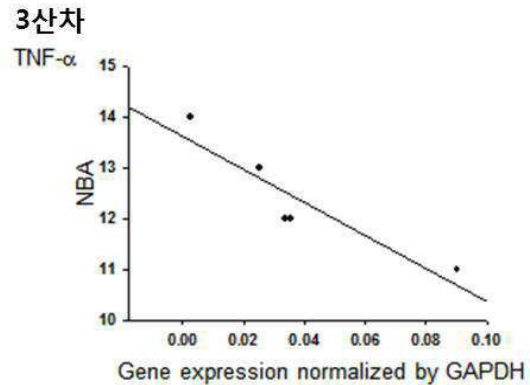
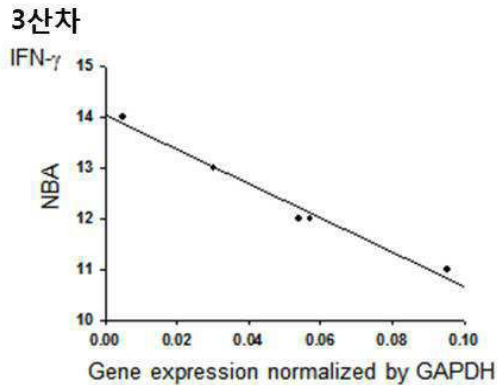
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물

(57) 요약

본 발명은 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법에 관한 것이다. 본 발명에 의한 모든의 산자 수 예측용 조성물 및 모든의 산자 수 예측방법에 따르면 임신한 모든의 혈액 시료를 통하여 조기에 산자 수가 높을 것으로 예상되는 모돈을 선발할 수 있으므로, 산차가 높은 모돈을 활용할 수 있는 지표 및 동일 산차의 모돈 중에서 산자 수가 높은 모돈을 선발할 수 있는 지표로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C07K 14/5406 (2013.01)

C07K 14/5428 (2013.01)

C07K 14/57 (2013.01)

C12Q 2600/124 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 114065-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 모돈 생애총생산성 향상을 위한 고산차모돈의 번식/면역능력 증대 및 조기선발지표 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.25 ~ 2017.09.24

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트; 또는

서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트;를 포함하는, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트는 IFN- γ 를 표적으로 하는 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트는 TNF- α 를 표적으로 하는 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 높은 산자수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트는 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함하는 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 포함하는, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 모든은 2차 이상 산자 수의 모든인 것을 특징으로 하는, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 포함하는, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 키트.

청구항 8

(a) 모든의 시료로부터 cDNA를 합성하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계;

를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (a)단계의 시료는 혈액 시료인 것을 특징으로 하는, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (b) 단계의 표적 서열을 증폭하는 단계는 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함하는 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 높은 산자 수를 갖는 모든은 Th₁ 형 사이토카인의 발현량이 낮은 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 높은 산자 수를 갖는 모든은 Th₁ 형/Th₂ 형 사이토카인 비율이 낮은 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 Th₁ 형 사이토카인은 IFN- γ 또는 TNF- α 이고 상기 Th₂ 형 사이토카인은 IL-4 또는 IL-10 인 것인, 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유류의 임신 및 수정 착상과정은 모체와 태아 간 면역계의 관용과 거부의 균형에 의존하게 되며 이런 면역반응은 부성의 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex, MHC)를 가진 배아 또는 태아에 의한 면역계의 자극을 모체가 인지함으로써 시작된다. 하지만 태아에 대한 모체의 면역반응은 면역관용(immune tolerance)이라는 자궁 특유의 면역학적 특징을 보인다. 인간의 경우 이러한 면역세포에 의한 면역관용은 자궁 내의 태아와 모체가 접촉하는 태아-모체 접촉면(feto-maternal interface)에 임신 특이의 조직학적 구조물인 DALT(decidual associated lymphoid tissue) 내에 존재하며 태아에 대한 모체의 면역관용을 획득하는데 중요한 역할을 하고, 착상 및 임신 유지에 수반되는 혈관생성 및 영양막(trophoblast)의 발달에 필수적인 무균성 염증반응(sterile inflammation)을 유발하는 것으로 알려졌다. 돼지의 경우 아직 DALT라는 구조물에 대한 연구가 되지 않았지만 태아-모체 접촉면인 자궁내막에 존재하는 면역세포들이 돼지의 임신초기 착상 등에 영향을 미친다는 연구가 진행되었다(TAYAD et al. 2007, KM Yang et al. 2009).

[0003] $CD4^+$ T 림프구는 사이토카인을 생산하는 주된 면역세포로 분비하는 사이토카인의 종류에 따라 Th_0 , Th_1 , Th_2 , 그리고 Th_{17} 림프구로 분류된다. Th_0 림프구는 Naive T 림프구로 Th_1 과 Th_2 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포로서 프로게스테론은 Th_0 세포를 Th_2 세포로 분화시키는 강력한 물질로 임신 중 고농도의 프로게스테론에 의해 IL-4, IL-5 등 Th_2 사이토카인의 분비를 촉진시켜 면역관용 환경을 조성한다. Th_1 림프구의 경우 일반적으로 IFN- γ , IL-2, TNF- α 및 TNF- β 를 생산, 분비하며 대식세포 매개에 의한 숙주방어에 주된 역할을 한다. 현재 돼지의 경우 산자 수와 사이토카인의 연관성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0004] 한편, 산자수는 1회 분만으로 출산한 새끼의 수를 말한다. 대한양돈협회에 따르면 국내 양돈농가들과 경쟁국들의 산자수가 최대 3두 이상 차이를 보이는 것으로 분석됐다. 국내 농가들의 경우 생산성 상위권이라고 할수 있는 전국 316개 전산농가들의 실산자수가 지난 2009년 10.5두(이유두수 9.5두)에 머무르는데 비해 덴마크는 14두(12.1두), 네덜란드 13.1두(11.4두), 미국은 11.5두(10.2두)에 달했다. 전세계적으로 돼지고기 소비량은 꾸준히 증가하고 있으며, 지속적인 사료비 상승에 따른 생산비용 증가로 전 세계 많은 농장들이 수익 창출에 어려움을 겪고 있다. 번식성적의 향상, 즉 복당 산자수의 증가는 양돈 경영에 있어서 생산비 절감을 유도할 수 있는 시급한 과제이며, 특히 돼지는 생리적 기능과 기전이 인간과 유사한 것으로 알려져 의약품 생산을 위한 biodirector로서의 가치가 높은 동물이므로, 모돈의 산자 수 향상을 위한 연구는 축산업의 차원을 넘어서 생물 관련 산업분야에 있어서도 향후 경제적 국제 경쟁력 확보를 위하여 필수적인 것으로 판단된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 모돈의 산자 수와 사이토카인의 발현 수준의 연관성에 대해 연구를 수행한 결과 사이토카인 발현 수준의 측정으로 높은 산자 수를 갖는 모돈을 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 조성물 및 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또다른 목적은 (a) 모돈의 시료로부터 cDNA를 합성하는 단계 및 (b) 상기 (a) 단계에서 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 모돈의 시료로부터 cDNA를 합성하는 단계 및 (b) 상기 (a) 단계에서 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 의한 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 조성물 및 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별방법에 따르면 임신한 모돈의 혈액 시료를 통하여 조기에 산자 수가 높을 것으로 예상되는 모돈을 선발할 수 있으므로, 산차가 높

은 모돈을 활용할 수 있는 지표 및 동일 산차의 모돈 중에서 산자 수가 높은 모돈을 선발할 수 있는 지표로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 모돈의 자궁내막조직에서 산차수에 따른 VEGF와 HIF-1 α 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 모돈의 자궁내막조직에서 산차수에 따른 Fas, FasL 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 모돈의 자궁내막조직에서 산차수에 따른 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 24시간 동안 세포의 자극 후 모돈의 혈액 시료에서 IFN- γ , TNF- α 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 24시간 동안 세포의 자극 후 모돈의 혈액 시료에서 IL-4, IL-10 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 72시간 동안 세포의 자극 후 모돈의 혈액 시료에서 IFN- γ , TNF- α 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 72시간 동안 세포의 자극 후 모돈의 혈액 시료에서 IL-4, IL-10 유전자의 발현 수준을 Realtime PCR로 비교한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8는 72시간 동안 세포의 자극 후 모돈의 혈액 시료에서 산차수에 따른 Th₁ 형 사이토카인과 Th₂ 형 사이토카인의 비율을 나타낸 도이다.
- 도 9는 3산차 모돈에서 이전 산차에서의 산자 수와 Th₁ 형 사이토카인 발현 수준의 연관성을 나타낸 도이다 (NBA: 산자 수).
- 도 10은 6산차 모돈에서 이전 산차에서의 산자 수와 Th₁ 형 사이토카인 발현 수준의 연관성을 나타낸 도이다.
- 도 11은 모돈의 생애 산자 수의 평균과 Th₁ 형 사이토카인 발현 수준의 연관성을 나타낸 도이다 (Mean of NBA: 산자 수의 평균).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모돈 판별용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0017] 본 발명에서 모돈은 번식에 이용되는 어미돼지를 의미한다. 상기 모돈은 산차수에 관계 없이 임신, 출산할 수 있는 어미돼지를 포함하는 개념이나, 2차 이상의 산차 수를 갖는 모돈인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명에서 산자 수는 1회 분만으로 출산한 새끼의 수를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트는 IFN- γ 를 표적으로 하여 증폭할 수 있으며, 서열번호 5는 정방향 프라이머, 서열번호 6은 역방향 프라이머이다.
- [0020] 본 발명의 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트는 TNF- α 를 표적으로 하여 증폭할 수 있으며, 서열번호 11은 정방향 프라이머, 서열번호 12는 역방향 프라이머이다.
- [0021] 상기 IFN- γ , TNF- α 는 Th₁ 형 사이토카인으로, 사이토카인은 면역, 감염병, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발현 및 성장에 중요한 기능을 하며 방어체계를 제어하고 자극하는 기능을 한다.
- [0022] 상기 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라

이며 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 프라이머 세트는 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함할 수 있다. 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트는 IL-4를 표적으로 하고, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트는 IL-10을 표적으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 프라이머 세트는 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 포함하며, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모든 판별용 키트를 제공한다.

[0026] 상기 키트는 핵산 또는 항체 이외에 유전자 발현량이나 유전자 발현량이나 발현 패턴의 분석 방법 또는 단백질 존재량이나 존재 패턴의 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키트가 유전자의 발현량이나 발현 패턴을 검출하기 위한 키트인 경우에는, RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 키트일 수 있으며, 이러한 RT-PCR 키트는 바이오마커 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 구체적인 실시 양상에 따라 예를 들어 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPCwater), 멸균수, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 세트 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 키트가 단백질의 존재량이나 존재 패턴을 검출하기 위한 키트인 경우에는, 이 키트는 예를 들어 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 키트일 수 있으며, 이러한 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 성분들, 예를 들어 표지된 2차 항체, 발색단 (chromophores), 효소 (예를 들어, 항체와 결합된 효소) 및 그의 기질, 및 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체 등을 포함할 수 있다. 구체적인 실시 양상에 따라서는, 상기 키트는 DNA 마이크로어레이 또는 단백질 마이크로어레이를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 프라이머 세트는 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 포함하며, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 (a) 모든의 시료로부터 cDNA를 합성하는 단계 및 (b) 상기 (a) 단계에서 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 모든의 산자 수 예측용 프라이머 세트 또는 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법을 제공한다.

[0029] 상기 (a) 단계의 시료는 모든에서 분리된 시료를 제한 없이 포함하나, 바람직하게는 모든의 혈액 시료를 포함한다.

[0030] 상기 (b) 단계의 표적 서열을 증폭하는 단계는 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트를 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 cDNA는 complementaryDNA를 의미하는 것으로, 모든의 혈액 시료로부터 분리된 RNA를 주형으로 역전사 연쇄 중합반응에 의해 합성할 수 있다.

[0032] 상기 표적 서열을 증폭하는 단계는 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 포함할 수 있으나, 본 발명의 일실시예에서는 qPCR을 이용하여 표적 서열을 증폭하였다. 본 발명에서 서열번호 5 및 서열번호 6으로 이루어진 프라이머 세트의 표적 서열은 IFN- γ 의 염기서열이고, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 프라이머 세트의 표적 서열은 TNF- α 의 염기서열이고, 서열번호 13 및 서열번호 14로 이루어진 프라이머 세트의 표적 서열은 IL-4의 염기서열이며, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 이루어진 프라이머 세트의 표적 서열은 IL-10의 염기서열이다.

[0033] 본 발명의 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법에 따르면, 높은 산자 수를 갖는 모든은 Th₁ 형 사이토카인의 발현량 또는 Th₁ 형 사이토카인/Th₂ 형 사이토카인이 낮은 것을 특징으로 한다. 상기 Th₁ 형 사이토카인은 IFN- γ ,

TNF- α 를 포함하며, 상기 Th₂ 형 사이토카인은 IL-4, IL-10을 포함한다.

[0034] 본 발명의 높은 산자 수를 갖는 모든 판별방법을 이용하면 높은 산차수를 갖는 동일 산차수의 모돈들 사이에서 산자 수가 높을 것으로 예상되는 모돈을 선발할 수 있는 효과가 있다.

[0035] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 표적 서열의 발현 정도가 모돈의 산자 수와 상관관계가 있으므로 이를 이용하면 모돈의 혈액 시료로부터 높은 산자 수를 갖는 모돈을 용이하고 정확하게 판별할 수 있는 효과가 있다.

[0036] 본 발명을 이하 실시 예를 통하여 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시 예는 오로지 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1: 산차별 모돈의 자궁내막 조직 유전자 발현비교

[0038] 본 발명을 위해 사용된 실험돈은 Yorkshire 품종으로 동일 농장에서 조성하였으며 실험용 모돈의 정보를 표 1에 나타내었다.

[0039] [표 1] 실험용 모돈 정보

개체번호	산차	임신 기간	이전 산차	모돈 생애
			실산자수	실산자수 평균
9803	1	28일	-	-
9899	1	29일	-	-
0091	1	29일	-	-
0224	1	28일	-	-
0141	1	28일	-	-
6836	3	27일	12	11
6901	3	27일	14	15
6911	3	29일	13	14
6869	3	28일	11	10.5
6797	3	28일	12	12.5
2169	6	27일	12	11.4
2746	6	27일	15	12.25
2559	6	27일	15	14.25
2074	6	27일	14	13
2493	6	27일	9	10

[0040] 상기 표 1의 산차별 모돈의 자궁내막에서 면역세포를 분석하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. 모돈의 자궁 내막 조직을 가로 세로 1cm 크기로 적출하여 80℃에 보관하였다. 이 후 조직에서 RNA를 분리하기 위하여 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml에 조직을 넣고 균질화(homogenization)시킨 후 2001의 클로로포름(Sigma)을 넣어 전체 RNA를 분리하였고, 이 때 추출한 5 μ g의 mRNA를 주형으로 Superscript (Invitrogen) 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 PCR에 의해 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 데이터베이스에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, SybrGreen realtime PCR을 이용하여 VEGF, HIF-1 α , Fas, FasL, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 유전자 발현을 측정하였다. 이 때 사용된 프라이머 세트를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0042] [표 2] Realtime PCR에 사용된 프라이머 세트

프라이머 서열	프로 덕트 크기 (bp)	GeneBank Access number	비고
<i>pVEGF</i> F: 5'-ACGAAGTGGTGAAGTTCATGGACG R: 5'-CTGCATGGTGATGTTGAACCTCCTC	203	JF831364	서열번호1,2
<i>pHIF-1α</i> F: 5'-GAGAAGCTCTAGAGATGCAGCCAG R: 5'-GGTAAGCCTCATAACAGAAGCCT	132	NM_001123124	서열번호3,4
<i>pIFN-γ</i> F: 5'-CTCAGATGTACCTAATGGTGGACCTC R: 5'-GTCCTTGCTTGATCACATCCATGCTC	172	NM_213948	서열번호5,6
<i>pFasL</i> F: 5'-ACCAACACTCCTGCCATCAAGACC R: 5'-TTGGCTGGCAGACTCTCTGAGTTC	99	NM_213806	서열번호7,8
<i>pFas</i> F: 5'-GATGGAGAACACGGCCCTAGAAG R: 5'-GCTGGTTGGTGTGCAATTCTCA	162	NM_213839	서열번호9,10
<i>pTNF-α</i> F: 5'-ATGAGCACTGAGAGCATGATCC R: 5'-GCCGATAACCTCGAAGTGCAGTAG	171	X57321	서열번호11,12
<i>pIL-4</i> F: 5'-CATGTACCAACCACTTCGTCCA R: 5'-TTCCTTCTCCGTCGTGTCTCT	155	NM_214123	서열번호13,14
<i>pIL-10</i> F: 5'-CTCTATTGCCTGATCTTCTCTGG R: 5'-CTGGATCATCTCTGACAAGGCT	234	NM_214041	서열번호15,16
<i>pGAPDH*</i> F: 5'-AAGCTCACTGGCATGGCCTT R: 5'-CACAACTGGTCTCAGTGTAG	168	NM_001206359	서열번호17,18

[0043]

[0044] p, porcine; F, 정방향 (sense); R, 역방향 (antisense) 프라이머; *하우스키핑 유전자

[0045] 상기 합성된 cDNA 1 μ l, 프라이머 300nM, 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe)에 D.W를 추가하여 최종부피가 15 μ l가 되도록 하였으며, 반응조건은 95℃에서 3분 반응한 후, '95℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 30초'를 한 사이클로 하여 총 40 사이클을 반복하였다. Realtime PCR 결과를 도 1 내지 도 3에 나타내었다.

[0046] 도 1에 나타낸 바와 같이, 모체 태아 접촉면에서 혈관형성에 관여하는 유전자인 VEGF와 HIF-1 α 의 발현을 비교했을 때, VEGF의 경우 1산차와 3산차에 비해 6산차에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, VEGF를 조절하는 HIF-1 α 의 경우 1산차에 비해 3산차에서 유의적으로 증가하고 3산차에 비해 6산차에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였다

[0047] 도 2에 나타낸 바와 같이, 세포자멸사(Apoptosis) 관련 유전자인 Fas, FasL의 발현이 산차에 따라 증가하는 경향을 보였으며 1산차에 비해 6산차에서의 발현이 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.

[0048] 도 3에 나타낸 바와 같이, 산차가 높아질수록 Th₁ 형 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 는 증가하는 경향을 나타내었다. 반면 Th₂ 형 사이토카인인 IL-4와 IL-10은 유의적인 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 즉 산차수가 증가할수록 IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 Th₁ 형의 사이토카인이 증가하게 되며, 이에 따라 모체가 태아를 비자기로 인지하여 공격하게 되며 이는 태아의 착상에 악영향을 미침을 알 수 있다.

[0049] 실시예 2: 산차별 혈액시료의 세포외 자극 후 사이토카인 발현 비교

[0050] 2.1 24시간 자극 후 사이토카인 발현 비교

[0051] 모든 산차 수와 사이토카인의 연관 관계를 구체적으로 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. 모든 혈액 시료로부터 Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare)를 이용하여 밀도구배원심분리(Density gradient centrifugation)를 시행하였다. 이 후 맨 위 층의 플라즈마와 Ficoll 층 사이의 PBMCs(Peripheral blood mononuclear cells)를 분리하였다. 분리한 PBMCs를 96 well 세포배양배지에 5×10^5 /well 농도로 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신과 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(Invitrogen) 배지에서 배양하였다. 이때 생체 외(In vitro) 자극 신호를 주기 위해서, PHA(Phytohaemagglutinin)를 10 μ g/ml의 농도로 각각 24시간

처리하여 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 RNA를 분리하기 위하여 트리졸(Trizol, Invitrogen) 1ml로 풀어준 후 200 μ l의 chloroform(Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였고, 이 때 추출한 2 μ g의 mRNA를 주형으로 Superscript (Invitrogen) 역전사 효소(Reverse transcriptase)를 이용하여 역전사 연쇄증합반응에 의해 cDNA를 합성하였다. 이 후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 데이터베이스에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, Sybr Green realtime PCR을 이용하여 Th₁ 형 사이토카인인 IFN- γ , TNF- α , Th₂ 형 사이토카인인 IL-4, IL-10 유전자 발현을 측정하였고, 이에 따른 Th₂ 형 사이토카인 대비 Th₁ 형 사이토카인의 비율을 측정하였다. 이 때 실시예 1의 표 2의 프라이머 세트를 사용하였다.

[0052] 본 실험을 위한 혼합물에는 각각 cDNA 1 μ l, 프라이머 300nM, 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe), D.W를 추가하여 최종부피가 15 μ l가 되도록 하였으며, 반응조건은 95℃에서 3분 반응한 후, '95℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 30'초를 한 사이클로 하여 총 40 사이클을 반복하였다. 실험 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0053] 도 4에 나타난 바와 같이, PHA로 24시간 동안 생체 외 자극신호를 준 결과 Th₁ 형 사이토카인인 IFN- γ 와 TNF- α 는 산차가 올라감에 따라 발현양이 증가하는 경향을 보였으며 1산차에 비해 6산차에서 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0054] 반면, 도 5에 나타난 바와 같이 Th₂ 형 사이토카인인 IL-4와 IL-10의 경우 유의적으로 차이가 없음을 확인하였다.

[0055] 2.2 72시간 자극 후 사이토카인 발현 비교

[0056] 상기 실시예 2와 같은 방법으로 PHA로 72시간 동안 생체 외 자극신호를 준 후 사이토카인의 발현을 비교한 결과를 도 6 내지 도 8에 나타내었다.

[0057] 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 24시간 처리 결과에 비해 Th₁ 형 사이토카인이 더욱 뚜렷한 증가경향을 보였으며 IFN- γ 와 TNF- α 모두 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가경향을 보였다. 반면 Th₂ 형 사이토카인인 IL-4와 IL-10은 유의적인 차이가 없었다.

[0058] 또한, 72시간 처리 그룹의 경우 도 8에 나타난 바와 같이 Th₁ 형 사이토카인과 Th₂ 형 사이토카인의 비율이 뚜렷하게 나타나는 것을 확인하였다. IL-4 대비 IFN- γ 의 경우 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가하였으며, IL-4 대비 TNF- α 의 경우에는 1산차에 비해 3산차, 6산차가 유의적으로 증가하였고, 3산차에 비해 6산차 또한 유의적인 증가를 확인하였다. 또한 IL-10 대비 IFN- γ 와 TNF- α 모두 산차가 높은 그룹에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.

[0059] 도 8에 나타난 Th₁ 형 사이토카인과 Th₂ 형 사이토카인의 비율을 하기의 표 3에 수치화 하였다.

[0060] [표 3] PHA로 자극을 준 PBMCs의 Th₁ 형/Th₂ 형 사이토카인 비율

사이토카인 비율	1	산차 3	6
72시간 배양			
IFN- γ : IL-4	31.40 $\pm$ 8.07	129.89 $\pm$ 39.29	351.30 $\pm$ 111.87
TNF- α : IL-4	21.31 $\pm$ 8.55	50.78 $\pm$ 11.96	121.56 $\pm$ 28.43
IFN- γ : IL-10	0.95 $\pm$ 0.21	3.43 $\pm$ 0.31	8.41 $\pm$ 0.81
TNF- α : IL-10	0.81 $\pm$ 0.21	2.18 $\pm$ 0.91	3.18 $\pm$ 0.94

[0061]

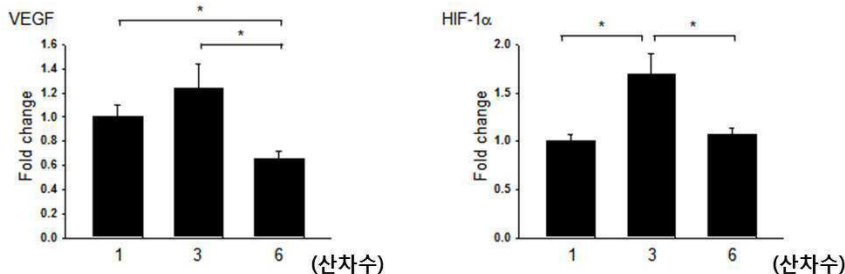
[0062] 결과적으로, 모든 산차가 증가할수록 Th₁ 형 사이토카인의 발현이 증가하는 경향을 보였으며, Th₁ 형/Th₂ 형 사이토카인 비율이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 산차에 따른 모든 산차 수 감소는 이러한 Th₁ 형 사이토카인이 활성화되어 태아의 착상시에 악영향을 주기 때문임을 확인할 수 있다.

[0063] 실시예 3: Th₁ 형 사이토카인과 산자 수의 연관성 분석

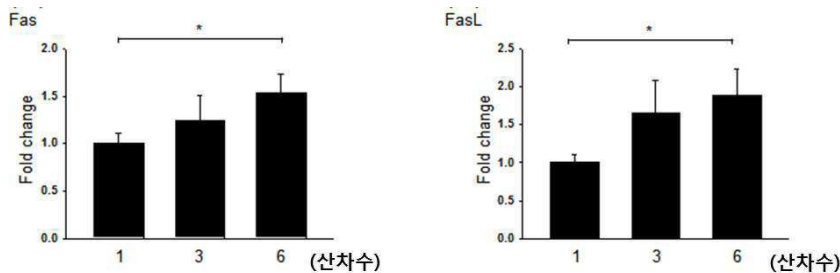
- [0064] Th₁ 형 사이토카인과 산자 수의 연관성을 분석하기 위하여, Th₁ 형 사이토카인 IFN- γ 와 TNF- α 의 발현정도를 GAPDH로 표준화시켜 3산차, 6산차의 모돈의 산자 수와의 연관성을 확인했으며, 3산차, 6산차의 모돈의 산자 수와의 연관성에 대한 결과를 도 9 및 도 10에 나타내었다.
- [0065] 도 9에 나타난 바와 같이, 3산차 모돈의 이전 산차에서 실산자수와의 연관성을 확인한 결과 자궁내막에서의 Th₁ 형의 사이토카인의 발현이 높은 개체들의 산자 수가 감소하는 경향을 확인하였다.
- [0066] 도 10에 나타난 바와 같이, 6산차에서도 마찬가지로 이전 산차의 산자 수와 임신 시 자궁내막의 Th₁ 형 사이토카인의 발현이 음성적으로 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.
- [0067] 또한 모돈의 생애 산자 수의 평균과 Th₁ 형 사이토카인의 발현과의 연관성을 확인한 결과를 도 11에 나타내었으며, 개체별로 Th₁ 형의 사이토카인의 발현이 높은 개체일수록 모돈의 생애 산자 수의 평균이 감소하는 경향을 나타냄을 확인하였다.
- [0068] 따라서 Th₁ 형 사이토카인의 발현 수준을 모돈간 비교함으로써 Th₁ 형 사이토카인의 발현이 상대적으로 낮은 개체를 높은 산자 수를 기대할 수 있는 모돈으로 분류할 수 있음을 확인하였다.
- [0069] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0070] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

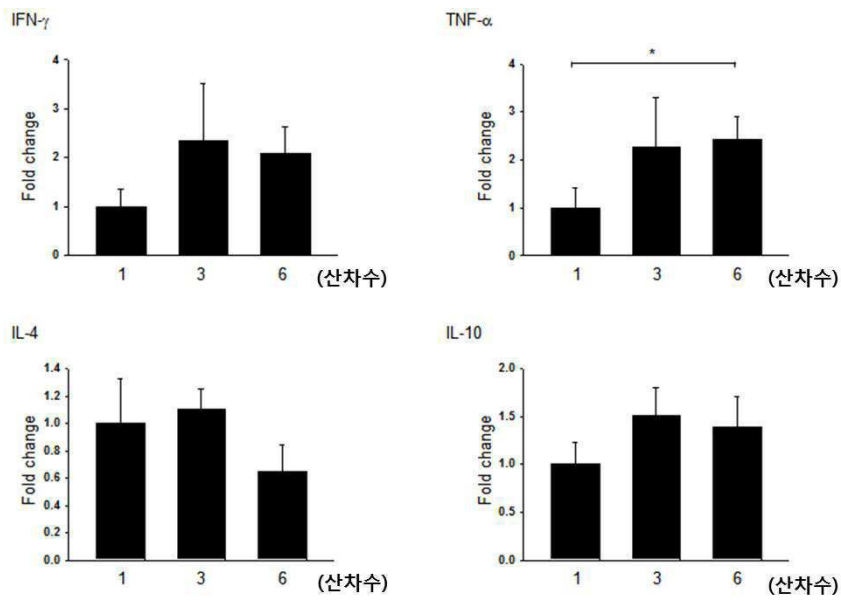
도면1



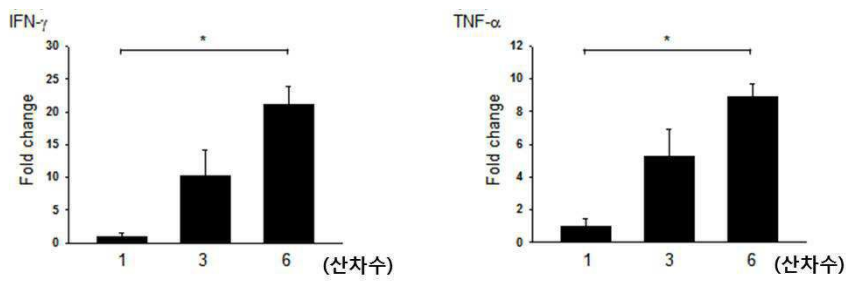
도면2



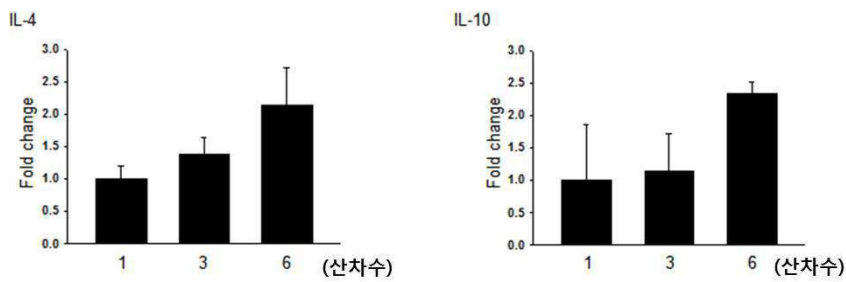
도면3



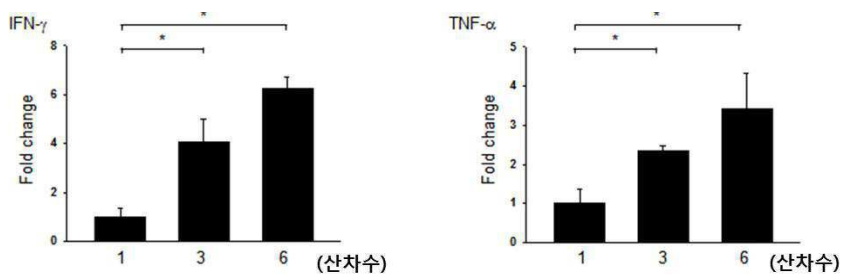
도면4



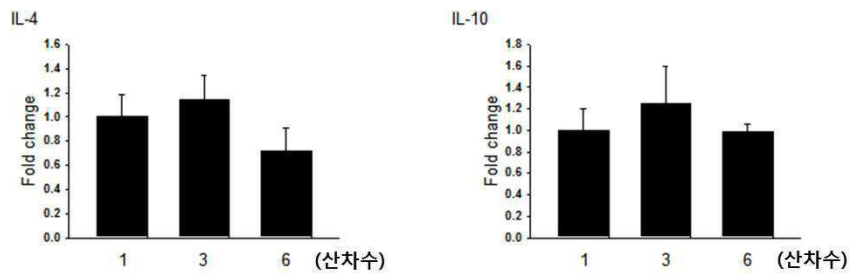
도면5



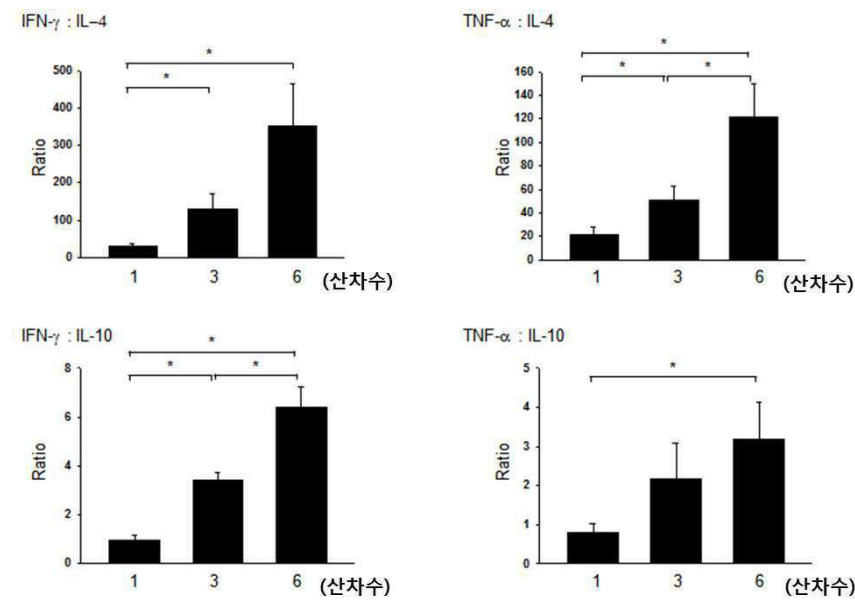
도면6



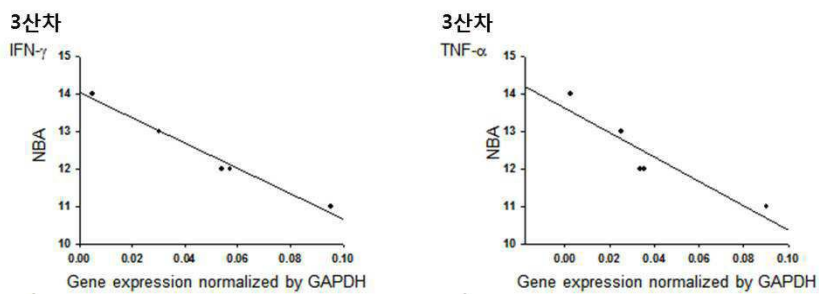
도면7



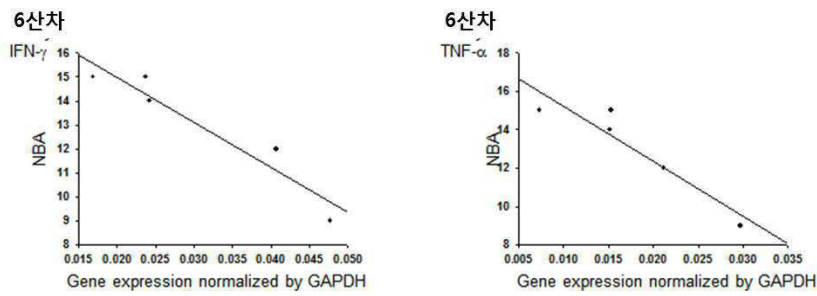
도면8



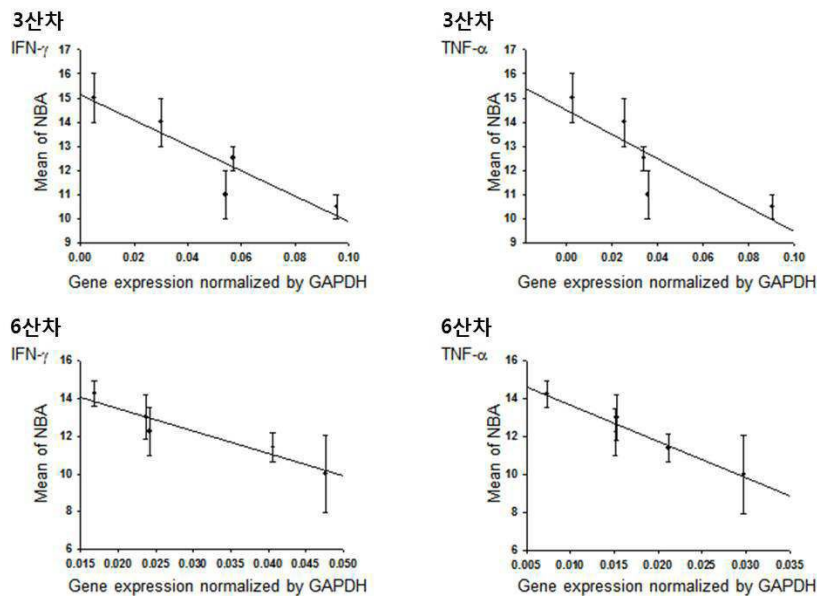
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Compositions for predicting sows having high number of piglet
- <130> 1_54P
- <160> 18
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> pVEFP forward primer
- <400> 1
- acgaagtggg gaagttcatg gacg
- <210> 2
- <211> 24

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pVEFP reverse primer	
<400>	2	
ctgcatgggtg atgttgaact cctc		24
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pHIF-1a forward primer	
<400>	3	
gagaagtcta gagatgcagc cag		23
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pHIF-1a reverse primer	
<400>	4	
ggtaagcctc ataacagaag cct		23
<210>	5	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pIFN-g forward primer	
<400>	5	
ctcagatgta cctaattgggtg gacctc		26
<210>	6	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pIFN-g reverse primer	
<400>	6	
gtcttgcttg atcacatcca tgctc		25

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pFasL forward primer
 <400> 7
 accaacactc ctgccatcaa gacc 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pFasL reverse primer
 <400> 8
 ttggctggca gactctctga gttc 24

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pFas forward primer
 <400> 9
 gatggagaac acggcctaga ag 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pFas reverse primer

<400> 10
 gctggttggt gtgcaattct ca 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pTNF-α forward primer

<400>	11	
atgagcactg agagcatgat cc		22
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pTNF-a reverse primer	
<400>	12	
gccgataacc tcgaagtga gtag		24
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pIL-4 forward primer	
<400>	13	
catgtaccag caacttcgtc ca		22
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pIL-4 reverse primer	
<400>	14	
ttccttctcc gtcgtgttct ct		22
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pIL-10 forward primer	
<400>	15	
ctctattgcc tgatcttcct gg		22
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> pIL-10 reverse primer

<400> 16

ctggatcatc tctgacaagg ct 22

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGAPDH forward primer

<400> 17

aagctcactg gcatggcctt 20

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGAPDH reverse primer

<400> 18

cacaacctgg tcctcagtgt ag 22