



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0051171
(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0149678
(22) 출원일자 2014년10월30일
심사청구일자 2014년10월30일
(30) 우선권주장
1020130130054 2013년10월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이준현
대전광역시 유성구 어은로 57, 103동 606호 (어은동, 한빛아파트)
무하마드, 카야디
대전광역시 유성구 대학로 99, 10동 312호 (궁동, 충남대학교 기숙사)
서동원
대전광역시 동구 홍도로39번길 5, 2층 (홍도동)
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 18 항

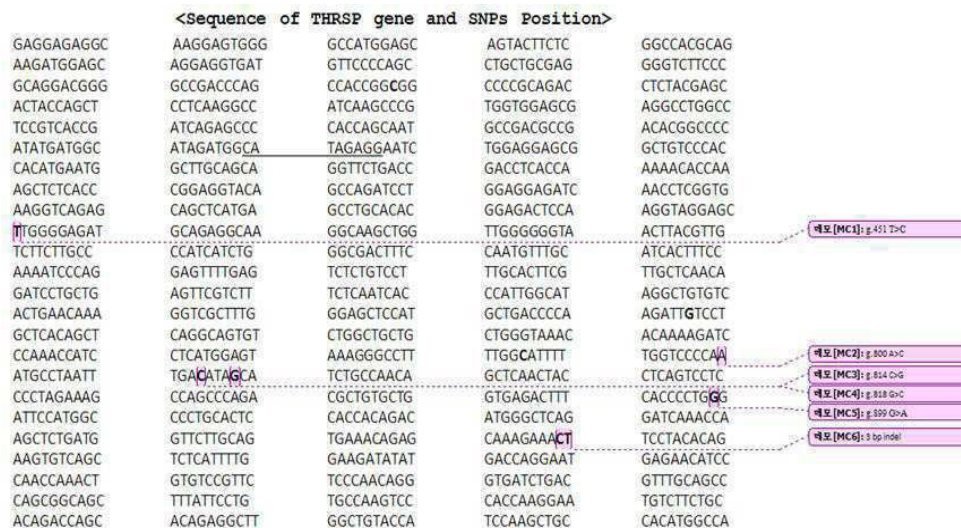
(54) 발명의 명칭 신규한 DNA 표지인자 및 이를 이용한 선별방법

(57) 요약

본 발명은 한국산 재래닭의 일당 증체량 증가에 관여하는 DNA 표지인자 개발에 관한 것으로서, 한국산 재래닭의 일당 증체량에 대한 유전능력을 조기에 예측하고 식별할 수 있는 DNA 표지인자를 개발하여 한국산 재래닭의 경제형질개선 또는 육종개량 프로그램에 이용하는 데 있다.

본 발명의 DNA 표지인자를 일일 성장속도가 빠르고, 증체량이 높은 한국산 재래닭의 조기 선발도구로 활용하는 경우, 한국산 재래닭의 육종개량은 보다 효율적이고 경제적으로 추진할 수 있으며, 이를 통하여 재래닭 사육농가의 소득증대 및 경영개선에 이바지할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 P J 008133

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 동물유전체육종사업단

연구사업명 차세대 바이오그린 21 사업

연구과제명 고급육질형 종계 육성을 위한 유전체 선발 기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 상기 814번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 염기가 A또는 C이고, 상기 800번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 818번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드이고, 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭 또는 한국산 재래닭의 평균 증체량에 비하여 증체량이 더 높은 한국산 재래닭을 확인할 수 있는 것을 특징으로 하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 DNA 표지인자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 상기 814번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이며, 상기 DNA 표지인자는 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 마커인 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 DNA 표지인자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 염기가 A또는 C이고, 상기 800번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이며, 상기 DNA 표지인자는 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 마커인 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 DNA 표지인자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 818번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이며, 상기 DNA 표지인자는 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 마커인 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 DNA 표지인자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이고, 상기 DNA 표지인자는 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 마커인 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 DNA 표지인자.

청구항 6

제1항의 닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이며, 상기 증체량이 높은 닭 선별용 조성물은 증체량이 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭 또는 한국산 재래닭의 평균 증체량에 비하여 더 높은 한국산 재래닭을 확인용 조성물인 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물.

청구항 8

제6항의 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물을 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 증체량이 높은 닭 판별용 키트는 DNA 칩 키트 또는 PCT 키트인 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트.

청구항 10

제8항에 있어서,

제6항의 증체량이 높은 닭 선별용 조성물은 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이고, 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형 마커인 닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는 증체량이 높은 닭 선별용 조성물인 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 증체량이 높은 닭 판별용 키트는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형이고, 800번째 유전자형이 CG의 이형접합체 유전자형이며, 818번째 유전자형이 GG의 동형접합체 유전자형인 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는 증체량이 높은 닭 선별용 조성물을 포함하는 키트인 증체량이 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트.

청구항 12

제1항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 마이크로어레이.

청구항 13

개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 제1항의 DNA 표지인자의 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 포함하는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위를 증폭시키는 단계;

상기 증폭된 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계; 및

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기를 확인하는 단계

를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

청구항 14

개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 제1항의 DNA 표지인자의 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 포함하는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계; 및

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 염기, 814번째 염기 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 확인하는 단계

를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 염기를 확인하는 단계는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 염기를 확인하는 단계는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 염기를 확인하는 단계는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 분석된 염기서열의 결과로부터 염기를 확인하는 단계는 상기 분석된 염기서열의 결과로부터 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형이고, 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형이며, 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 신규한 DNA 표지인자 및 이를 이용한 선별방법, 구체적으로 증체량이 우수한 닭, 더욱 구체적으로 증체량이 우수한 한국산 재래닭 중 증체량이 우수한 닭을 선별할 수 있는 신규한 DNA 표지인자 또는 유전자마커 및 이를 이용한 닭의 선별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근까지 동물유전자원의 보존에 관한 다양한 노력들이 계속되고 있다. 특히, 국제연합 식량농업기구(United Nations Food And Agriculture Organization, FAO)에서 운영하는 가축다양성 정보시스템(DAD-IS)을 중심으로, 전 세계의 동물유전자원이 문서화 되고 있다. 우리나라에서는 국립축산과학원을 중심으로 가축유전자원의 보존이 이루어지고 있으며, 닭과 관련해서는 1992년부터 전국에 산재되어 있는 재래닭을 수집하는 과정을 시작으로,

1994년 대한양계협회와 함께 고품질 재래닭 육용화 사업이 시작되어 15년간 경제형질을 기초로 재래닭의 선발이 이루어졌다. 그 결과, 5개의 한국 재래닭 라인이 구축되어 백색재래종, 흑색재래종, 회갈색재래종, 황갈색재래종 및 적갈색재래종의 이름으로 DAD-IS에 등재되었다.

[0003] 상기 한국 재래닭 라인으로 선정된 재래닭은 '우리맛 닭'과 같은 실용계로 생산되어 소비되고 있으며, 우리맛닭이 다른 실용계 브로일러와 비교했을 때, 영양학적으로 우수하고 독특한 풍미와 질감으로 소비자들에게 인식되고 있다고 보고되었다.

[0004] 상기한 바와 같이, 우리나라 고유한 동물유전자원인 한국 재래닭은 영양학적으로 우수하고, 독특한 풍미와 질감이 있는 장점이 있으나, 현재는 증체량이나 사료이용율과 같은 경제적 관점에서 유리한 효과를 갖는 외래종의 수입으로 인해 한국 재래닭의 분포가 제한되고 있는 실정이다. 따라서, 한국 재래닭의 경쟁력 확보 차원에서 한국 재래닭의 체중 또는 육량에 영향을 미치는 일당 증체량에 대한 능력개량이 요구된다.

[0005] 이와 관련하여, 유전적 개량을 위한 전통적인 방법 즉, 반복적인 선발과 교배체계를 이용하는 유전적 개량방법은 많은 비용과 오랜 시간이 소요되고, 개량 효과도 미비한 단점이 있다. 따라서, 계속해서 발전되고 있는 생명공학 및 분자유전학적 기술을 이용하여 육종개발 특히, 증체량 개선과 관련된 육종개발에 유전체 정보를 직접 이용하고자 하는 연구가 시도되고 있다.

[0006] 일 예로, 유전체 정보를 이용한 증체량이 높은 동물들의 선발 및 육종을 위한 방법으로, 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 방법으로 마커도움선발법(marker-assisted selection, MAS)이 제공되고 있다. 구체적으로, 상기 마커도움선발법은 증체량에 영향을 미치는 유전자 보유 여부에 따라 증체량이 높은 동물을 직접적으로 선발하도록 함으로써 육종산업에서 응용되어 왔다.

[0007] 그러나, 상기 마커도움선발법과 같은 유전체 정보를 이용한 방법은 주로 소 또는 돼지와 관련되어 연구되고 있으며, 닭 특히, 한국 재래닭 중에서 증체량이 높은 한국 재래닭을 선발하기 위한 유전체 정보를 이용하는 방법이나 해당 관련 유전체 또는 DNA 표지인자에 대한 연구는 제한적이며, 닭의 특정 유전자 특히, THRSP의 특정 유전자형 또는 유전자 다형성과 닭의 증체량 사이의 연관관계에 대한 연구는 거의 진행되어 있지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-1270091 B

(특허문헌 0002) KR 10-0784166 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기한 바와 같이, 다른 유전자형에 비하여 증체량이 높은 한국 재래닭을 선별하여 기존 한국 재래닭 생산 농가를 포함한 육용계 생산 농가의 문제점을 해결하기 위하여, 증체량이 높은, 구체적으로 다른 유전자형에 비하여 증체량이 높은 한국 재래닭을 신속하고 정확하게 판별하기 위한 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표지인자를 이용하여 증체량이 높은 닭을 선별하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 증체량이 높은 닭을 선별할 수 있는 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 증체량이 높은 닭을 선별할 수 있는 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는 증체량이 높은 닭 선별용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 증체량이 높은 닭 선별용 조성물을 포함하는 증체량이 높은 닭 판별용 키트를 제공한다.

- [0014] 또한, 본 발명은 증체량이 높은 닭을 선별할 수 있는 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 포함하는 증체량이 높은 닭 판별용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 증체량이 높은 닭 판별 방법, 구체적으로 증체량이 높은 닭을 선별할 수 있는 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 이용하는 증체량이 높은 닭 판별 방법을 제공한다.
- [0016]
- [0017] 본 발명의 발명자들은 한국 재래닭 또는 한국 토종닭이라고 불리우는 닭의 품종 개량과 관련된 연구를 진행하던 중, 한국 재래닭의 경제성 향상 및 사육농가의 수익향상을 위해 우선적으로 요구되는 증체량과 관련된 유전자 마커, 구체적으로 DNA 표지인자를 찾기 위한 연구를 진행하였다.
- [0018] 본 발명의 발명자들은 이에 대하여 심혈을 기울여 연구한 결과, 닭에 대한 가축유전자원의 보존 작업을 통하여 구축된 5종의 한국 재래닭의 유전체 분석을 통해 재래닭의 개체 별로 가지고 있는 DNA 염기서열의 변이를 탐색하였다. 특히, 한국 재래닭의 THRSP(Thyroid Hormone Responsive Spot 14) 유전자에 7개의 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)이 존재하고, 이 중 3개의 단일염기다형, 구체적으로 상기 THRSP 유전자의 인트론(Intron) 영역에 위치한 3개의 단일염기다형, 더욱 구체적으로 상기 THRSP 유전자의 800번째 염기서열(A>C), 814 번째 염기서열(C>G) 및 818 번째 염기서열(G>C) 부위의 단일염기다형이 닭의 전체 생활 주기(life cycle)를 통해서 체중의 높고 낮음 또는 증체량과 높은 연관성이 있음을 확인하였으며, 이로부터 상기 3개의 한국 재래닭의 THRSP 유전자의 단일염기다형이 한국 재래닭의 증체량 여부 또는 한국 재래닭의 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높는지 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자로서 사용될 수 있음을 본 연구를 통하여 처음 확인하였으며, 이로부터 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명에 있어서, "THRSP(Thyroid Hormone Responsive Spot 14) 유전자"는 지방합성효소(lipogenic enzyme)를 조절하는 전사조절인자(transcription factor)로 작용하는 SMAP(small acidic protein)를 암호화한다. 상기 THRSP 유전자는 비만(obesity)과 관련된 염색체 부위에 위치하며, 갑상성 호르몬(Thyroid Hormone)이나 탄수화물의 소화대사 또는 지방조직(adipose tissue)의 분화 등에 의해 발현이 유도된다.
- [0020] 상기 THRSP 유전자는 481 bp와 603 bp의 2개의 exon으로 구성되고, 이 중 크기가 작은 exon 유전자만이 아미노산으로 번역되며, 상기 THRSP 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로서, 한국 재래닭의 THRSP 유전자는 GenBank Accession No. KF574271 내지 KF574275로 표시되는 유전자가 될 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, "다형성(polymorphism)"이란 같은 종의 생물이라도 모습이나 고유한 특징이 다양하게 나타나는 것 또는 하나의 유전자 좌위(locus)에 두 가지 이상의 대립유전자(allele)가 존재하는 경우를 의미한다.
- [0022] 상기 다형성 부위 중에서 개체에 따라 단일 염기만이 다른 것 즉, 단일염기의 변이로 인한 형질의 차이를 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이라 한다. 다양한 동물의 품종을 판단하기 위해 상기 단일 유전자 변이에 의한 단일염기다형성이 널리 이용되고 있으며, 우리나라 고유 유전자원에 대한 연구와 유전자원의 보존을 위해 단일염기다형성을 이용한 SNP DNA 분석법을 이용한 다양한 연구가 수행되고 있으나, 이는 소 즉, 한우와 관련된 것에 집중되어 있고, 최근 돼지에 대한 연구도 증가하고 있는 추세이나, 한국산 재래닭 또는 토종닭과 관련된 연구는 제한적으로 진행되고 있다.
- [0023] 상기 다형성을 확인하기 위한 다형성 마커는 선택된 집단에서 1% 이상, 바람직하게는 5% 이상 또는 10% 이상의 발생빈도를 나타내는 두 가지 이상의 대립유전자를 가지는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, "대립유전자(allele)"란 상동염색체의 동일한 유전자좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 타입을 의미한다. 상기 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, 단일염기 다형성은 두 종류의 대립인자(biallele)를 갖는다.
- [0025] 본 발명에 있어서, "프라이머(primer)"란 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있는 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소 등의 효소와 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트에 의하여 중합반응 즉, 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)이 진행될 수 있는 서열을 의미한다. 상기 중합효소 연쇄 반응에서

PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이 등은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형될 수 있다.

- [0026] 본 발명에 있어서, "개체"란 증량(체중) 또는 증체량을 확인하고자 하는 대상인 닭, 구체적으로 한국산 재래닭을 의미하며, 상기 한국산 재래닭으로부터 얻어진 검체를 이용하여, 상기 SNP 마커의 유전자형을 분석함으로써 상기 한국산 재래닭의 증체량의 우수함 즉, 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭이나 한국산 재래닭의 평균에 비하여 해당 검체를 제공한 한국산 재래닭의 증체량이 높고 낮음을 판단할 수 있다. 상기 검체로는 털, 뇨, 혈액, 각종 체액, 분리된 조직, 분리된 세포 또는 타액과 같은 시료 등이 될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.
- [0027] 본 발명에 있어서, "DNA 칩"이란, 수십만 개의 DNA의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이의 하나를 의미한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, "증체량 여부 또는 증체량이 높은지 여부"란 상기 THRSP 유전자, 구체적으로 서열번호 1의 유전자 서열의 단일염기다형(SNP), 더욱 구체적으로 서열번호 1의 유전자 서열의 800번째 SNP로 인한 개체별 유전자형(AA, AC, CC), 814 번째 SNP로 인한 개체별 유전자형(CC, CG, GG) 또는 818 번째 SNP로 인한 개체별 유전자형(GG, GC, CC)에 따라 한국산 재래닭의 증체량이 높게 나타나는 것을 의미한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명의 일 측면에 있어서, 본 발명은 닭, 구체적으로 한국산 재래닭 또는 한국산 토종닭의 체중 증가 여부 확인용 유전자 마커 또는 DNA 표지인자에 관한 것이다.
- [0031] 상기 한국산 토종닭의 체중 증가 여부 확인용 유전자 마커 즉, DNA 표지인자는 바람직하게는 한국산 토종닭의 증체량이 높은지 여부를 확인 또는 판단할 수 있는 단일염기다형(Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 마커를 제공한다.
- [0032] 상기 마커는 바람직하게는 THRSP 유전자의 SNP 부위를 포함하는 전체 또는 일부 폴리뉴클레오타이드일 수 있고, 보다 바람직하게는 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 전체 또는 일부 폴리뉴클레오타이드일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 단일염기다형(SNP) 위치인 800 번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 5 내지 500개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 한국산 토종닭의 증체량이 높은 것을 판단할 수 있는 DNA 표지인자일 수 있다.
- [0033] 이러한 측면에서, 상기 DNA 표지인자는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C 또는 G이고, 상기 814번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 염기가 A또는 C이고, 상기 800번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 818번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드이고, 닭의 증체량이 높은 것을 특징으로 하는 한국산 재래닭의 증체 여부 즉, 일정 시점부터 일정 기간이 경과된 후 체중 증가 여부 및 체중 증가 정도가 한국산 재래닭의 평균 증체량 또는 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭의 증체량 보다 높은지 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자일 수 있다.
- [0034] 상기 DNA 표지인자는 증체량이 한국산 재래닭의 평균 증체량 또는 한국산 재래닭 중 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭에 비하여 체중 또는 체중의 증가 정도 즉, 증체량이 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커일 수 있다.
- [0035] 상기 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커의 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 상기 814번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커의 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 염기가 A또는 C이고, 상기 800번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드

타이드일 수 있다.

[0037] 또한, 상기 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커의 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 818번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0038] 바람직하게는, 상기 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커의 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0039] 또한, 상기 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형(SNP) 마커는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형인지 여부, 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형인지 여부 및/또는 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자일 수 있다. 상기 DNA 표지인자는 상기 유전자형을 확인하여, 증체량이 높은 한국산 재래닭을 판별할 수 있는 DNA 표지인자일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 부화 후 측정된 토종닭 즉, 병아리부터 생후 20주까지 한국산 재래닭의 591마리의 닭의 도체를 대상으로 THRSP 유전자의 단일염기다형 및 체중과 증체량을 분석한 결과, 한국산 재래닭은 총 7종의 단일염기다형을 확인하였고(도 1), 이 중 산란 이후 증체량과 관련된 5종의 단일염기다형을 확인하였으며, 상기 확인된 결과에 의하면 3종의 단일염기다형, 구체적으로 THRSP 유전자의 800번째 염기, 814번째 염기 및 818번째 염기는 부화시점부터 부화 후 20주가 경과하여 도살된 시점까지의 증체량 즉, 생활주기(life cycle) 전 반에서의 증체 능력이 밀접하게 관련이 있으며, 상기 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형인지 여부, 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형인지 여부 및/또는 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인지 여부에 따라 증체량이 달라짐을 확인하였다(표 1).

[0041] 따라서, 본 발명의 THRSP 유전자의 800번째 염기의 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형인지 여부, 814번째 염기의 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형인지 여부 및 818번째 염기의 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인지 여부를 검출하거나 상기 유전자형을 확인할 수 있는 프라이머를 이용하면, 한국산 토종닭의 증체량 즉, 한국산 토종닭의 증체 능력을 정확하게 판별할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 한국산 토종닭의 증체 능력과 관련된 상기 단일염기다형(g.800 A>C SNP; g.814 C>G SNP; g.818 G>C SNP)의 변이는 본 발명자들에 의해 최초로 확인되었다.

[0042] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭의 선별용 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 선별용 조성물은 증체량이 높은 닭, 구체적으로 한국산 재래닭 중 증체량이 높은 닭을 선별할 수 있는 조성물, 바람직하게는 한국산 재래닭의 평균 증체량 또는 한국산 재래닭 중 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭에 비하여 체중 또는 체중의 증가 정도 즉, 증체량이 높은 한국산 재래닭을 선별 또는 확인할 수 있는 조성물일 수 있다.

[0044] 상기 DNA 표지인자, 구체적으로 한국산 재래닭 중 다른 유전자형을 갖는 한국산 재래닭에 비하여 체중 증가 여부 또는 증체량이 높은지 여부를 확인할 수 있는 DNA 표지인자인 폴리뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

[0045] 상기 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 유전자의 다형성 부위의 검출 또는 증폭을 통해 확인하여, 한국 재래닭의 증체량 정도 또는 증체량 수준 즉, 다른 유전자형을 갖는 한국 재래닭 또는 한국 재래닭의 평균을 기준으로 증체량의 높고 낮음을 판단할 수 있는 조성물일 수 있다. 구체적으로, 상기 단일염기다형성 마커 즉, SNP 마커의 폴리뉴클레오타이드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.

[0046] 상기 SNP 마커 증폭에 사용되는 프라이머는 적절한 버퍼를 이용하여, 적절한 조건 및 적당한 온도 변화하에서

주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

- [0047] 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 또한, 상기 프라이머 서열은 상기 SNP 마커와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 상기 SNP 마커와 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0048] 따라서, 상기 프라이머는 다른 유전자형을 갖는 한국 재래닭 또는 한국 재래닭의 평균을 기준으로 증체량의 높고 낮음을 판단하여 증체량이 높은 한국산 재래닭을 선별할 수 있는 것이다. 상기 프라이머는 상기 유전자 마커, 구체적으로 한국산 재래닭의 THRSP 유전자, 바람직하게는 서열번호 1의 THRSP 유전자의 단일염기다형을 확인할 수 있는 것일 수 있다.
- [0049] 상기 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 상기 프라이머의 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등과 같은 하전되지 않은 연결체 또는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등과 같은 하전된 연결체의 변형이 있다.
- [0050] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물을 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트에 관한 것이다.
- [0051] 상기 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물을 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 800번째 염기가 A또는 C이며, 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 800번째, 814번째 및 818번째 염기를 포함하는 20개 내지 300개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드이고, 증체량이 다른 유전자형에 비하여 높은 한국산 재래닭 확인용 단일염기다형 마커인 닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 선별용 조성물을 포함하는 키트일 수 있다.
- [0052] 상기 증체량이 높은 닭 판별용 키트는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형이고, 800번째 유전자형이 CG의 이형접합체 유전자형이며, 818번째 유전자형이 GG의 동형접합체 유전자형인 DNA 표지인자를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 키트일 수 있다.
- [0053] 상기 증체량이 높은 닭 판별용 키트는 상기 DNA 표지인자 또는 유전자 마커의 존재 여부를 확인하거나, 상기 DNA 표지인자의 증폭 정도 또는 DNA 표지인자의 발현 수준을 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써, 증체량이 높은 지 여부를 판단할 수 있다.
- [0054] 이러한 측면에서, 상기 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 키트는 DNA 분석용 키트 또는 PCT 키트일 수 있다. 상기 DNA 분석용 키트는 일 예로 DNA 칩일 수 있고, 상기 PCT 키트는 일 예로 RT-PCR 키트일 수 있다.
- [0055] 상기 DNA 분석용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 DNA 칩 키트일 수 있다. 상기 DNA 칩이란, 수십만 개의 DNA의 각 염기를 한번에 확인할 수 있는 DNA 마이크로어레이 중 하나를 의미한다. 일 예로, 상기 DNA 칩 키트는 편평한 고체 지지판, 구체적으로 현미경용 슬라이드보다 크기 않은 유리 표면에 핵산종을 격자형 배열(grided array)로 부착한 칩을 포함할 수 있으며, 상기 DNA 칩 키트는 상기 DNA 칩 표면에 핵산이 일정하게 배열되어, DNA 칩 상의 핵산과 칩 표면에 처리된 용액 내에 포함된 상보적인 핵산 간에 다중 혼성화(hybridization) 반응을 통하여 짧은 시간 내에 DNA와 관련된 대량 병렬 분석이 가능한 장점이 있다.
- [0056] 상기 RT-PCR 키트는 상기 한국산 재래닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트로, 통상적인 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 RT-PCR 키트는 상기 DNA 표지인자의 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머쌍을 포함할 수 있으며, 추가로, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 더욱 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0057]
- [0058] 또 다른 양태로서, 본 발명은 한국산 재래닭의 체중 증가 여부 확인용 DNA 표지인자, 바람직하게는 서열번호 1

로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 814번째 염기가 C또는 G이고, 상기 814번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 염기가 A또는 C이고, 상기 800번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 염기가 G 또는 C이고, 상기 818번째 염기를 포함하는 5개 내지 500개의 연속적인 염기로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별용 마이크로어레이에 관한 것이다.

[0059] 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 프로브 폴리뉴클레오타이드에 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이로 이루어진다.

[0060] 상기 프로브 폴리뉴클레오타이드를 기관상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있는 방법으로 수행될 수 있다.

[0061] *상기 프로브 폴리뉴클레오타이드는 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립유전자 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 이 경우 혼성화 조건은 대립유전자간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여, 대립유전자 중 하나에만 혼성화 하도록 충분히 엄격해야 한다. 이렇게 함으로써 다른 대립유전자 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 본 발명의 상기 프로브는 대립유전자를 검출하여 한국산 토종닭의 체중 증가 여부 또는 증체량이 다른 유전자형을 갖는 한국산 토종닭에 비하여 높은지 여부를 판단하기 위해 사용될 수 있다.

[0062] 상기 판단방법에는 서던 블롯트 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, DNA 칩을 이용한 방법에서 DNA 칩의 기관에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다. 상기 혼성화란 엄격한 조건, 예를 들면 1M 이하의 염 농도 및 25 °C 이상의 온도 하에서 보통 수행될 수 있다. 예를 들면, 5x SSPE(750 mM NaCl, 50 mM Na Phosphate, 5 mM EDTA, Ph 7.4) 및 25°C 내지 30°C의 조건이 대립유전자 특이적 프로브 혼성화에 적합할 수 있다.

[0063] 본 발명의 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 또는 판단과 연관된 프로브 폴리뉴클레오타이드를 기관상에 고정화하는 과정도 또한 이러한 종래 기술을 사용하여 용이하게 수행할 수 있다. 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화결과의 검출은 당업계에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 예를 들면, 핵산 시료를 형광 물질 예를 들면 Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지 물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지 물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.

[0064] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법에 관한 것이다.

[0065] 상기 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법은 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 제1항의 DNA 표지인자의 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 포함하는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위를 증폭시키는 단계; 상기 증폭된 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계; 및 상기 분석된 염기서열의 결과로부터 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기를 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0066] 또한, 상기 증체량이 높은 한국산 재래닭 판별 방법은 개체로부터 분리된 시료의 DNA로부터 제1항의 DNA 표지인자의 800번째 염기, 814번째 염기, 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 포함하는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계; 및 상기 분석된 염기서열의 결과로부터 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 염기, 814번째 염기 및 818번째 염기로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기를 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 상기 분석된 염기서열의 결과로부터 염기를 확인하는 단계는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에

서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하거나, 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형인 것을 확인하거나 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에서 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 상기 분석된 염기서열의 결과로부터 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 유전자형(Genotype)이 CG의 이형접합체 유전자형이고, 염기서열에서 814번째 유전자형(Genotype)이 AA의 동형접합체 유전자형이며, 818번째 유전자형(Genotype)이 GG의 동형접합체 유전자형인 것을 확인하는 방법으로 수행할 수 있다.

- [0068] 상기 선별 방법은 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 마커도움선발법(marker-assisted selection, MAS), 구체적으로, 한국 재래닭의 THRSP 유전자의 SNP 부위와 관련된 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 마커도움선발법일 수 있다.
- [0069] 상기 개체로부터 분리된 DNA 시료는 상기 닭, 바람직하게는 검색대상이 되는 한국산 재래닭으로부터 채취한 게놈 DNA(genome DNA)일 수 있고, 더 구체적으로는 상기 게놈 DNA로부터 분리한 닭의 THRSP 유전자 또는 상기 THRSP 유전자에 해당하는 부위일 수 있다.
- [0070] 상기 DNA 시료는 닭, 구체적으로 한국산 재래닭으로부터 채취한 DNA 시료일 수 있고, 보다 구체적으로, 한국산 재래닭의 혈액, 정액, 육즙 또는 계육의 조직으로부터 얻은 게놈 DNA(genomic DNA)일 수 있다.
- [0071] 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자는 폴리뉴클레오티드 서열 중에 단일염기다형(SNP)을 포함하는 다형성 부위(polymorphic site)를 포함하는 서열일 수 있으며, 바람직하게는 800번째 염기, 814번째 염기 및 818번째 염기에 단일염기다형을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA가 될 수 있다.
- [0072] 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계는 유전자형을 조사할 수 있는 마커 또는 프라이머 세트를 이용한 방법으로 마커도움선발법으로 수행할 수 있다.
- [0073] 상기 마커도움선발법은 상기 닭의 DNA 시료를 주형(template)으로 하여, 상기 특정부위를 포함하는 서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR 반응을 수행하고, 상기 PCR반응산물을 시퀀싱하여 염기서열을 확인하거나, 상기 PCR 반응산물을 제한효소로 처리한 후, 아가로스 겔(agarose gel)과 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동한 후에, 상기 전기영동의 결과인 DNA 밴드(DNA band)를 확인하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0074] 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위를 증폭시키는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다. 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다. 그 외 리가제 연쇄 반응(LCR), 전사증폭, 자가유지 서열 복제 및 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA)이 사용될 수 있다.
- [0075] 상기 증폭된 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열 또는 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 분석하는 단계는 서열 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이나믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allelespecific hybridization, DASH), PCR 연장 분석, PCR-SSCP, PCR-RFLP 분석 또는 TaqMan 기법, SNPlex 플랫폼(Applied Biosystems), 질량 분석법(예를 들면, Sequenom의 MassARRAY 시스템), 미니-시퀀싱(mini-sequencing) 방법, Bio-Plex 시스템(BioRad), CEQ and SNPstream 시스템(Beckman), Molecular Inversion Probe 어레이 기술(예를 들면, Affymetrix GeneChip), 및 BeadArray Technologies(예를 들면, Illumina GoldenGate 및 Infinium 분석법) 등을 이용하여 수행될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0076] 상기 방법들 또는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 이용 가능한 다른 방법에 의해, 상기 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 포함하는 DNA 표지인자에서의 하나 이상의 대립유전자를 확인할 수 있다. 이와 같은 상기 증폭된 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열 또는 상기 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 결정하는 것은 바람직하게는 DNA 칩을 통해 수행할 수 있다.
- [0077] 일 예로, 상기 TaqMan 방법은 분석대상인 DNA 단편, 일 예로 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 탐침을 설계 및 제작하는 단계; 서로 다른 대립유전자의 탐침을 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지(Applied Biosystems)하는 단계; 상기 DNA를 주형으로 하고, 상기의 프라이머 및 탐침을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 핵산 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 상기 분석결과로부터 분석대상인 DNA 단편의 폴리뉴클레오

티들의 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 방법으로 수행할 수 있다.

- [0078] 상기 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다. 또한, 대립유전자 특이적 PCR은 상기 SNP 또는 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 특정부위의 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트와 상기 SNP 또는 THRSP 유전자의 특정부위가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다.

발명의 효과

- [0079] 본 발명의 DNA 표지인자는 한국산 재래닭 중 증체량이 우수한 재래닭을 확인할 수 있는 특이적 SNP 마커로서, 상기 DNA 표지인자를 이용하는 경우 일일 성장속도가 빠르고, 증체량이 높은 한국산 재래닭을 신속하게 간편하게 확인할 수 있고, 사육대상인 한국산 재래닭의 증체량에 대한 유전능력을 조기에 예측하고 식별할 수 있다. 따라서, 본 발명의 DNA 표지인자를 이용할 경우, 한국산 재래닭의 경제 형질개선 또는 육종개량 프로그램에 이용하여, 한국산 재래닭의 육종개량을 보다 효율적이고 경제적으로 추진할 수 있으며, 이를 통하여 재래닭 사육농가의 소득증대 및 FTA 등 통상조약에 의해 국제적 경쟁력이 요구되는 사육농가의 경쟁력 향상과 능률 향상에 도움이 되어, 육용계 특히, 한국산 재래닭을 사육하는 농가의 수익성 향상 및 매출 증대에 이바지할 수 있을 것으로 평가된다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 염기서열에 관한 것으로, 상기 굵은 글씨체(Bold type)로 표시된 부위는 THRSP 유전자의 유전자형 분석을 수행하여 확인된 주요 SNP 변이를 검출한 결과를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0081] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나, 하기 제조예 및 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것을 뿐, 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 예들에 한정되는 것은 아니다.

[0082] 실시예

[0083] 실시예 1. DNA 시료 채취

- [0084] 대한민국 국립축산과학원(NIAS)에서 동일한 조건 및 동일한 사료로 사육한 5계통의 한국산 재래닭(Korean native chicken) 591 마리, 구체적으로 90수의 흑색계통, 110수의 회갈색계통, 134수의 적갈색계통, 125수의 백색계통 및 131수의 황갈색계통을 실험에 이용하였다.

- [0085] 상기 실험에 이용한 한국산 재래닭은 부화되어 태어난 때부터 22주령에 희생시킬 때까지 2주마다 체중을 측정하였다.

- [0086] 상기 한국산 재래닭 개체의 DNA 시료는 다음과 같은 방법으로 수득하였다.

- [0087] 우선, 상기 22주령에 한국산 재래닭의 닭 날개에 위치한 익정맥으로부터 EDTA가 포함된 vacutainer 튜브를 이용하여 혈액 샘플을 확보하였으며, 상기 혈액 샘플로부터 manual extraction 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다.

- [0088] 구체적으로, manual extraction은 다음과 같이 수행하였다. 우선, 상기 혈액 샘플 5mL당 버퍼A(0.32M Sucrose, 1 mM TrisHCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, dH₂O)를 4배 부피(volume)으로 희석한 후, spin down 하여 상징액을 조심스럽게 제거하는 과정을 3회 반복하여, 상징액을 제거하였다. 상기 상징액이 제거된 혈액 샘플에 Buffer B(400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, dH₂O) 2.25mL와 Buffer C(5% SDS, 2mg/mL Proteinase K, 2.6 mL) 250μL를 첨가한 후, 혼합 (inverting)해주고, 50°C shaking incubator에서 24시간 동안 침지시켰다. 상기 침지 후, 포화상태의 6M NaCl 675μL를 첨가하고, 15초 동안 강하게 흔들어진 후 원심분리기에서 3000 rpm으로 15분간 원심분리 후 상징액을 새 튜브(tube)로 옮겨주었다. 상기 상징액을 옮긴 튜브에 2배 부피(volume)의 99% 에탄올(EtOH) 수용액을 첨가하여, DNA를 침전시키고, 99% 에탄올 수용액을 제거하였다. 상기 99% 에탄올 수용액을 제거한 침전물을 70% 에탄올 수용액으로 세척한 후에, pipette-tip-hook 방법으로 DNA를 수득하고, 새 튜브(microtube)에 옮겨 담았다.

- [0089] 수득된 DNA 펠렛에 TE 버퍼(TE buffer) 500 μ l를 넣어, DNA를 녹여 최종 DNA 시료를 수득하였다
- [0090] 실시예 2. THRSP 유전자의 SNP 확인
- [0091] 상기 실시예 1의 DNA 시료로부터 얻은 DNA 풀(DNA Pool)은 한국산 재래닭의 THRSP 유전자의 단일염기다형(SNP)을 스크리닝(screening)하기 위하여 사용하였다. 상기 단일염기다형(SNP)을 확인하기 위해서, PCR-RFLP, Fluidigm® 192.24 SNPtype™ (Genotyping Technology, Fluidigm, USA) 및 Agilent DNA 1000 Technology(Agilent Technologies, Inc., 독일)을 사용하였다.
- [0092] 상기 단일염기다형(SNP)을 스크리닝 과정에서 확인된 5종류의 THRSP 유전자의 서열(GenBank accession number: KF574271 내지 KF574275)로부터 THRSP 유전자 전체에 분포된 총 30개의 차이가 확인되었다. 특히, 5'-flanking region에 3개의 SNP가 확인되었고, 3'-flanking region에 1개의 SNP가 확인되었으며, 5'-UTR에 2개의 SNP가 확인되었고, 3'-UTR 부위에 5개의 SNP와 indel 확인되었으며, 엑손(exon) 부위에 3개의 SNP와 indel 확인되었으며, 인트론(intron) 부위에 13개의 SNP와 indel이 확인되었다. 상기 차이 중, 4개의 염기다형이 PCR-RFLP를 통해 확인되었고, 엑손 부위의 9 bp 크기의 indel은 상기 Agilent DNA 1000 Technology을 통해 확인되었으며, 13개의 다른 SNP는 Fluidigm® 192.24 SNPtype™을 통해 확인되었다.
- [0093] 실시예 3. THRSP 유전자의 SNP와 증체량의 관계
- [0094] 상기 실시예 2에서 확인된 30개의 유전적 차이 중, 단일염기다형으로 이용가능한 18개의 유전자형이 확인되었으며, 이 중 기존에 알려진 엑손 부위의 9 bp 크기의 indel을 제외한 17개의 신규한 단일염기다형과 한국산 재래닭의 증체량과의 관계를 확인하였다.
- [0095] 즉, 591 마리의 한국산 재래닭의 부화시점부터 회생시점까지 실시예 1에서 측정한 체중에 의한 증체량과 실시예 2에서 확인된 각 한국산 재래닭의 THRSP 유전자의 SNP와의 관계를 확인하였다.
- [0096] 측정된 결과는 미니탭 14.0을 이용하여 정규분포테스트를 실시하여 유의성 분석에 사용할 수 있는지를 확인하였다. 변이분석모델은 일반선형분석모델(general linear model, GLM)을 사용하여 개체간 또는 계통간의 유의성 테스트를 실시하였다. 상기 THRSP 유전자의 SNP에 의한 증체량에 대한 효과는 한국산 재래닭 5개 계통의 591 마리 모두에 적용되어 계산하였다. 상기 일반선형분석은 다음과 같은 모델을 이용하여 분석되었다.
- [0097] [계산식]
- [0098]
$$Y_{ijklmno} = \mu + G_i + S_j + B_k + L_l + F_{m(l)} + M_{n(lm)} + \square_{ijklmno}$$
- [0099] 상기 계산식 1에서, $Y_{ijklmno}$ 는 개체의 표현형, μ 는 집단의 평균, G_i 는 고정된 유전자형, S_j 는 고정된 성별, B_k 는 고정된 집단, L_l 는 고정된 계통, $F_{m(l)}$ 는 첫 번째 계통에 속한 부계의 임의효과, $M_{n(lm)}$ 는 첫 번째 계통과 부계와의 교배한 집단에 속한 모계의 임의효과, $\square_{ijklmno}$ 는 부모세대 집단과의 연관성 분석의 잔차로 사용되었다. 이러한 유전자형의 구분은 Tukey뮐 test를 이용하였다.
- [0100] 상기 분석결과, 실시예 2에서 확인된 신규한 17개의 염기다형 중에서 증체량과 유의적으로 관련이 있는 염기다형은 7개로 확인되었으며, 이 중 관련도가 높은 5개에 대해 분석한 결과(표 1), 생활주기 전반에 있어서, 증체량과 밀접하게 관련이 있는 염기다형은 g.800 A>C SNP, g.814 C>G SNP 및 g.818 G>C SNP으로 확인되었다.

표 1

Variation(Location)	Traits	Genotype (n)			P-value
g.451T>C (Intron)	BW12	TT (382)	TC (142)	CC (66)	0.006
		994.30±10.95 ^a	918.60±19.84 ^b	895.80±25.94 ^b	
g.800A>C (Intron)	BW6	AA (543)	AC (13)	CC (34)	0.022
	BW12	417.80±3.01 ^a	397.50±18.45 ^{ab}	385.30±11.73 ^b	0.009
	BW14	976.20±7.69 ^a	880.30±47.09 ^{ab}	897.10±29.93 ^b	0.030
	BW16	1163.50±8.62 ^a	1108.80±52.73 ^{ab}	1074.30±33.52 ^b	0.012
	BW18	1359.0±9.99 ^a	1251.6±61.19 ^{ab}	1252.9±38.89 ^b	0.029
	BW18	1570.80±10.56 ^a	1501.00±64.65 ^{ab}	1461.50±41.10 ^b	
g.814C>G (Intron)	BW12	CC (341)	CG (195)	GG (54)	0.030
	BW14	968.5±10.60 ^{ab}	984.2±13.48 ^a	917.1±24.80 ^b	0.041
	BW16	1162.2±11.85 ^{ab}	1164.5±15.07 ^a	1092.6±27.72 ^b	0.019
	BW18	1355.2±13.76 ^{ab}	1362.6±17.49 ^a	1269.4±32.18 ^b	0.017
	BW20	1567.0±14.51 ^{ab}	1578.0±18.45 ^a	1477.6±33.93 ^b	0.022
	SW	1761.8±15.12 ^{ab}	1778.9±19.24 ^a	1678.3±35.38 ^b	0.039
	SW	1669.7±15.07 ^{ab}	1696.4±19.16 ^a	1606.2±35.25 ^b	
g.818G>C (Intron)	BW10	GG (365)	GC (171)	CC (52)	0.010
	BW12	756.0±8.14 ^a	731.3±11.41 ^{ab}	687.6±20.77 ^b	0.024
	BW14	976.6±9.59 ^a	972.0±13.45 ^a	904.4±24.48 ^b	0.010
	BW16	1172.2±10.71 ^a	1146.6±15.01 ^a	1079.9±27.32 ^b	0.003
	BW18	1369.2±12.42 ^a	1338.9±17.41 ^a	1250.1±31.69 ^b	0.010
	BW20	1577.0±13.14 ^a	1561.7±18.41 ^a	1463.6±33.51 ^b	0.014
	SW	1775.0±13.71 ^a	1757.3±19.21 ^a	1661.8±34.97 ^b	0.037
g.899G>A (Intron)	BW12	GG (425)	GA (116)	AA (49)	0.026
	BW12	981.4±9.61 ^a	944.8±20.79 ^{ab}	891.1±29.40 ^b	

상기 표 1에서, BW는 부화 후 기간된 경과를 의미하며, 일 예로 BW10은 부화 후 10주가 경과된 것을 의미하며, 해당 수치는 10주가 경과된 후 측정된 한국산 재래닭의 유전자형에 따른 평균 체중을 의미하며, SW는 희생한 시점에서 측정된 한국산 재래닭의 유전자형에 따른 평균 체중을 의미한다.

상기 표 1에 나타난 바와 같이, g.800 A>C SNP, g.814 C>G SNP 및 g.818 G>C SNP와 한국산 재래닭의 증체량이 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었으며, 특히, 서열번호 1로 표시되는 THRSP 유전자의 800번째 유전자형(Genotype)의 경우, CG의 이형접합체 유전자형, 814번째 유전자형(Genotype)의 경우, AA의 동형접합체 유전자형, 818번째 유전자형(Genotype)의 경우, GG의 동형접합체 유전자형인 경우 증체량이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

한편, 기존 중국 재래닭으로부터 확인된 THRSP 유전자의 엑손 부위의 9 bp indel은 중국 재래닭에서 증체량 및 지방함량 등과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었으나, 한국산 재래닭에서는 증체량과 유의적인 관계가 없는 것으로 확인되었으며, 상기 결과로부터 한국산 재래닭은 기존 보고된 다른 국가 또는 지역 유래 닭의 유전자형과 다른 유전자형에 의해 형질이 영향을 받는 것으로 확인되었다.

이러한 측면에서, 본 발명에서 최초로 확인된 3개의 SNP, 즉, g.800 A>C SNP, g.814 C>G SNP 및 g.818 G>C SNP는 한국산 재래닭의 증체량과 체중 증가 등의 경제 형질 개선과 관련하여 유용하게 사용될 수 있을 것으로 평가되었다.

도면

도면1

<Sequence of THRSP gene and SNPs Position>				
GAGGAGAGGC	AAGGAGTGGG	GCCATGGAGC	AGTACTTCTC	GGCCACGCAG
AAGATGGAGC	AGGAGGTGAT	GTTCCCCAGC	CTGCTGCGAG	GGGTCTTCCC
GCAGGACGGG	GCCGACCCAG	CCACCGGCGG	CCCCGCAGAC	CTCTACGAGC
ACTACCAGCT	CCTCAAGGCC	ATCAAGCCCG	TGGTGGAGCG	AGGCCTGGCC
TCCGTCACCG	ATCAGAGCCC	CACCAGCAAT	GCCGACGCCG	ACACGGCCCC
ATATGATGGC	ATAGATGGCA	TAGAGGAATC	TGGAGGAGCG	GCTGTCCAC
CACATGAATG	GCTTGACGCA	GGTTCTGACC	GACCTACCA	AAAACACCAA
AGCTCTACCC	CGGAGGTACA	GCCAGATCCT	GGAGGAGATC	AACCTCGGTG
AAGGTCAGAG	CAGCTCATGA	GCCTGCACAC	GGAGACTCCA	AGGTAGGAGC
TTGGGGAGAT	GCAGAGGCAA	GGCAAGCTGG	TTGGGGGGTA	ACTTACGTTG
TCTTCTTGCC	CCATCATCTG	GGCGACTTTC	CAATGTTTGC	ATCATTTC
AAAATCCAG	GAGTTTTGAG	TCTCTGTCCT	TTGCACTTCG	TTGCTCAACA
GATCCTGCTG	AGTTGCTT	TCTCAATCAC	CCATTGGCAT	AGGCTGTGTC
ACTGAACAAA	GGTCGCTTTG	GGAGTCCAT	GCTGACCCCA	AGATTGTCCT
GCTCACAGCT	CAGGCAAGT	CTGGCTGCTG	CTGGGTAAAC	ACAAAAGATC
CCAAACATC	CTCATGGAGT	AAAGGCTT	TTGGCATTTC	TGGTCCCCA
ATGCCATAAT	TGACATGCA	TCTGCCAACA	GCTCAACTAC	CTCAGTCCTC
CCCTAGAAAG	CCAGCCAGAG	CGCTGTGCTG	GTGAGACTTT	CACCCCTGGG
ATTCATGGC	CCCTGCACTC	CACCACAGAC	ATGGGCTCAG	GATCAAACCA
AGCTCTGATG	GTTCTTGAG	TGAAACAGAG	CAAAGAACT	TCCTACACAG
AAGTGTCAGC	TCTCATTTTG	GAAGATATAT	GACCAGGAAT	GAGAACATCC
CAACCAAACT	GTGTCGGTTC	TCCCAACAGG	GTGATCTGAC	GTTTGACGCC
CAGCGGCAGC	TTTATCTCTG	TGCCAAGTCC	CACCAAGGAA	TGTCTTCTGC
ACAGACCAGC	ACAGAGGCTT	GGCTGTACCA	TCCAAGCTGC	CACATGGCCA

변이 [MC1]: g.451 T>C

변이 [MC2]: g.800 A>C

변이 [MC3]: g.814 C>G

변이 [MC4]: g.818 G>C

변이 [MC5]: g.899 G>A

변이 [MC6]: 3 bp indel

서열 목록

- <110> Foundation of University-Industry Research Collaboration
- <120> A NEW DNA MARKER AND A DETECTING METHOD OF USING THE SAME
- <130> DP20130472
- <150> 2013/0130321
- <151> 2013-10-30
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1430
- <212> DNA
- <213> THRSP gene Sequence
- <400> 1

```

gaggagaggc aaggagtggg gccatggagc agtacttctc ggccacgcag aagatggagc      60
aggaggtgat gttccccagc ctgctgagcagg ggttcttccc gcaggacggg gccgaccagc      120
ccaccggcgg ccccgagac ctctacgagc actaccagct cctcaaggcc atcaagcccg      180

tggtggagcg aggcttgcc tccgtcaccg atcagagccc caccagcaat gccgacgccg      240
acacggcccc atatgatggc atagatggca tagaggaatc tggaggagcg gctgtccac      300
cacatgaatg gcttgacgca ggttctgacc gacctacca aaaacaccaa agctctcacc      360
  
```

cggaggtaca gccagatcct ggaggagatc aacctcggtg aaggtcagag cagctcatga	420
gcctgcacac ggagactcca aggtaggagc ttggggagat gcagaggcaa ggcaagctgg	480
ttggggggta acttacgttg tcttcttgcc ccatcatctg ggcgactttc caatgtttgc	540
atcacittcc aaaatcccag gagttttgag tctctgtcct ttgcacttcg ttgctcaaca	600
gacctgctg agttcgtctt tctcaatcac ccattggcat aggtctgtgc actgaacaaa	660
ggtcgctttg ggagctccat gctgacccca agattgtcct gtcacagct caggcagtgt	720
ctggctgctg ctgggtaaac aaaaagatc ccaaaccatc ctcatggagt aaaggcctt	780
ttggcatttt tggccccaa atgcctaatt tgacatagca tctgccaaca gtcactac	840
ctcagtctc ccctagaaag ccagcccaga cgctgtgctg gtgagacttt caccctggg	900
attccatggc cctgcactc caccacagac atgggctcag gatcaaacca agctctgatg	960
gttcttgtag tgaacagag caaagaaact tcctacacag aagtgtcagc tctcattttg	1020
gaagatatat gaccaggaat gagaacatcc caaccaaact gtgtccgttc tccaacagg	1080
gtgatctgac gtttcagacc cagcggcagc ttatttctg tgccaagtcc caccaaggaa	1140
tgtcttctgc acagaccagc acagaggctt ggctgtacca tccaagctgc cacatggcca	1200
atcctcccg caaacctcac tgccttgttt cacctccatt cccggggatt gccttgcat	1260
aggcagggca gaaatgagcg ttcgtgttta ttgcttcta gaaggcatct gtaaccttga	1320
aacaatgctt ttgttctgca tgtgcctaca ccacctccc actagtttct ttgataatgt	1380
caccagttcc cagagtcaat gatctgaaat aaaatgcaat aataaaatga	1430