



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086954
(43) 공개일자 2024년06월19일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6881 (2018.01) C12Q 1/6827 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6881 (2018.05)
C12Q 1/6827 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0172033</p> <p>(22) 출원일자 2022년12월09일
심사청구일자 2022년12월09일</p> | <p>(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
차지혜
전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산과학원
진대혁
전라북도 완주군 이서면 콩쥐팥쥐로 1500 국립축산과학원
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
이원희</p> |
|---|--|

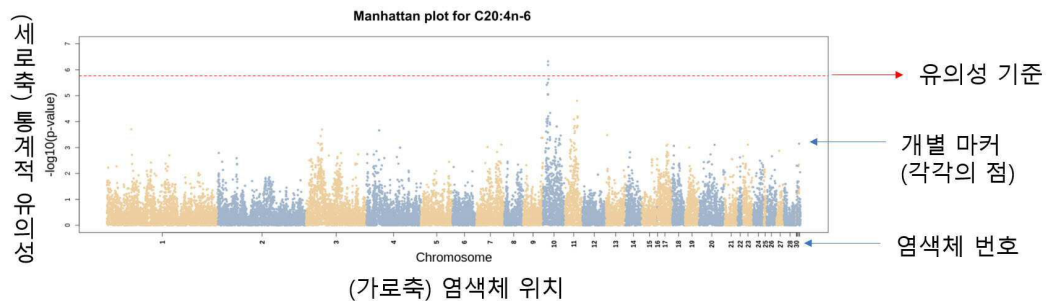
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량 판단을 위한 SNP 마커

(57) 요약

본 발명은 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량 판단을 위한 SNP 마커 및 이를 이용하여 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량을 판단하는 방법에 관한 것으로, 닭에서 가슴근육 내 아라키돈산 함량과 연관된 SNP 유전자형을 확인 함으로써 육안으로 구별되지 않는 닭 가슴근육의 아라키돈산의 함량을 객관적으로 평가할 수 있는 수단으로 활용 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

이준현

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교

조은진

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교

김민준

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395071778

과제번호 PJ015785012022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발

연구과제명 오계와 백색레그혼 교배집단 표현형 정보 활용 육질관련 소재 발굴 (1주관)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국립축산과학원

연구기간 2021.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 T 또는 C인 SNP; 또는
서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 C 또는 A인 SNP;를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 지방산은 아라키돈산(arachidonic acid)인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 닭은 토종닭인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 토종닭은 연산 오계인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물.

청구항 6

제1항의 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 키트.

청구항 7

제1항의 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 마이크로어레이.

청구항 8

1) 닭으로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의

상보적인 폴리뉴클레오타이드의 SNP를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계; 및

2) 상기 증폭된 SNP를 포함하는 부위에서 SNP의 염기 종류를 결정하는 단계를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 지방산은 아라키돈산인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 닭으로부터 분리된 시료는 닭 가슴근육인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오타이드에서 101번째 염기가 C/C인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 높고, T/T인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 낮고, T/C인 경우, 가슴근육의 지방산이 중간인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오타이드에서 101번째 염기가 A/A인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 높고, C/C인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 낮고, A/C인 경우, 가슴근육의 지방산이 중간인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 닭은 연산 오계인 것을 특징으로 하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량 판단을 위한 SNP 마커 및 이를 이용하여 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량을 판단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 가금육은 쇠고기 및 돼지고기와 더불어 단백질의 주요 공급원이다. 경제협력개발기구(OECD)와 식량농업기구(FAO)에 따르면 가금육은 2030년에 세계 육류 공급의 41%를 차지할 것으로 예상된다. 이는 가금육이 다른 육류

에 비해 가격이 저렴하고, 건강식품으로 인식되는 백색육에 대한 선호도가 높아졌기 때문이라고 할 수 있다.

- [0004] 현재 국내의 닭고기 소비 취향은 다양화되고 있으며, 고품질 식품 및 웰빙 트렌드에 따라 닭고기에 대한 수요가 증가하고 있다. 특히 토종닭은 시중의 육계에 비해 식감과 맛이 독특하여 소비자들의 호응을 얻고 있다. 따라서 소비자가 요구하는 품질과 기능성을 겸비한 가금육 제품의 개발이 필요하다.
- [0005] 육류의 품질과 풍미는 육류에 포함된 지방산에 의해 영향을 받기 때문에 지방산은 고기 맛에 기여하는 중요한 요소가 된다. 요리 과정에서 지질 산화에 의해 분해되는 휘발성 지방산에 의해 다양한 풍미가 생성되기 때문이다. 육류에 포함된 여러 지방산 중 아라키돈산은 고기의 풍미에 큰 영향을 미치며 건강 유지 및 면역 작용에 중요한 기능을 한다고 알려진 필수지방산이다.
- [0006] 육류 내 지방산 함량 관련 유전자 마커에 관한 선행연구로는 한국등록특허 제10-1273333호 "육용계의 지방산 조성을 확인하기 위한 신규 프라이머 세트 및 이를 이용한 육용계의 선별 방법"에는 닭의 SCD(Stearoyl-CoA desaturase) 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 동형접합체 유전자형인지 여부를 확인하여 닭의 SCD 유전자의 2번 엑손의 단일염기다형이 이형접합체 유전자형을 갖는 닭보다 불포화지방산 함량이 높은 닭을 선별하는 방법이 개시되어 있다.
- [0007] 또한 한국등록특허 제10-1929383호 "돼지의 오메가 지방산 조성판별용 유전자 마커 및 이를 이용한"에는 MYH3 유래 폴리뉴클레오티드에서 엑손 3에 있는 개시코돈 ATG 개시코돈으로부터 3' → 5' 방향으로 1806번째 내지 1815번째 염기가 GACAGCAGGA 또는 AGGAGGACTG를 포함하는 5 내지 1000개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자를 이용하여, 상기 폴리뉴클레오티드에서 엑손 3에 있는 개시코돈 ATG로부터 3' → 5' 방향으로 1806번째 내지 1815번째 염기의 대립유전자가 GACAGCAGGA인 경우, 돼지의 오메가 지방산의 조성 중 오메가 3 지방산의 함량이 오메가 6 지방산 함량보다 많은 것으로 판별하는 방법이 개시되어 있다.
- [0008] 상기와 같이 소와 돼지에서 고기 내의 지방산 함량에 연관된 유전 마커는 많이 밝혀져 있으나, 닭고기의 경우는 관련된 연구가 비교적 적은 것으로 알려져 있다. 특히 닭 가슴근육에 포함된 지방산 함량과 연관된 유전 마커를 전장 유전체에서 탐색하는 시도는 없었다.
- [0009] 이에, 본 발명자들은 토종닭 품종을 포함하여, 서로 반대의 표현형을 지니는 두 닭 품종 간의 교배를 통해 조성된 집단을 대상으로 가슴근육 내의 아라키돈산 함량을 표현형으로써 측정하고 고밀도 유전자 칩을 활용하여 전장 유전체에 위치한 유전자 마커와 표현형의 연관성을 분석하여, 가슴근육 내의 아라키돈산 함량 조절과 연관된 SNP 마커를 발굴함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량 판단을 위한 SNP 마커 및 이를 이용하여 닭의 가슴근육 내 아라키돈산 함량을 판단하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0014] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 T 또는 C인 SNP; 또는
- [0015] 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 C 또는 A인 SNP;를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 키트를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 1) 닭으로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레

오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드의 SNP를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계; 및

2) 상기 증폭된 SNP를 포함하는 부위에서 SNP의 염기 종류를 결정하는 단계를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 SNP 마커는 닭 가슴근육 아라키돈산 함량 형질과 높은 연관성을 띠고 있으므로, 본 발명의 SNP 마커들을 이용하면 육안으로 구별되지 않는 닭 가슴근육의 아라키돈산 함량을 객관적으로 평가할 수 있어, 함량이 높은 닭을 선별하여 닭 집단을 육종하는 데 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 본 발명의 아라키돈산 함량 판단 방법을 이용하면 닭을 육종하는 농가와 기관에서 가슴근육에 아라키돈산이 많이 함유되어있는 닭을 선별함으로써 가슴근육내 아라키돈산이 더 많이 함유된 닭의 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 767수 닭 집단의 가슴근육의 아라키돈산 함량과 유전체 SNP chip 유전자형 정보 간의 GWAS 결과를 Manhattan plot으로 도식화한 것이다.

각 점은 개별 마커를 의미, x축은 염색체의 위치를 의미, y축은 통계적 유의성을 나타내는 p-value를 음의 상용로그 값을 취한 후 표시하였다. 그래프 상의 점이 y축에서 높은 수치일수록 마커가 형질과 연관된 유의성이 높다는 것을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 T 또는 C인 SNP; 또는

서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 C 또는 A인 SNP;를 검출 또는 증폭할 수 있는 재제를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 제공한다.

상기 지방산(fatty acid)은 불포화지방산(unsaturated fatty acid)일 수 있으며, 바람직하게는 아라키돈산(arachidonic acid)일 수 있다.

본 발명의 용어 "지방산"은 생화학에서 포화 또는 불포화된 긴 지방족 사슬을 가지고 있는 카복실산이다. 자연적으로 생성되는 대부분의 지방산들은 4~28개 까지의 짝수 개의 탄소 원자들로 구성된 가지가 없는 사슬을 가지고 있다. 지방산은 일반적으로 생물에서 단독으로 존재하기 보다는 트라이글리세라이드, 인지질, 콜레스테릴 에스터의 3가지 주요 부류의 에스터의 형태로 주로 존재한다. 이러한 에스터 형태에서 지방산은 동물에서 중요한 에너지원이며, 세포에서 중요한 구조적 구성 성분이다.

본 발명의 용어 "불포화 지방산"은 지방산 사슬 내에 한 개 이상의 이중 결합을 가지고 있는 지방산이다. 불포화 지방산으로 구성된 지방을 불포화 지방(unsaturated fat)이라고 한다. 지방산 사슬은 한 개의 이중 결합을 포함하고 있을 경우 단일불포화되며, 두 개 이상의 이중 결합을 포함하고 있을 경우 다불포화된다. 이중 결합이 형성되는 곳에서 수소 원자는 탄소 사슬에서 배제된다. 따라서 포화 지방산에는 이중 결합이 없고, 탄소에 결합된 최대 수의 수소를 가지므로 수소 원자로 "포화"된다. 세포 대사에서, 불포화 지방 분자는 동등한 양의 포화 지방보다 다소 적은 에너지를 함유하고 있다. 지방산의 불포화도가 커질수록(지방산의 이중 결합이 많을수록) 지질 과산화(산패)에 더 취약해진다. 항산화제는 지질 과산화로부터 불포화 지방을 보호할 수 있다.

본 발명의 용어 "아라키돈산"은 20:4 ω -6 또는 20:4(5,8,11,14)로 표기되는 다불포화 지방산 및 오메가-6 지방산이다. 아라키돈산은 쿠파아수 버터에서 발견되는 포화 지방산인 아라키드산과 구조적으로 관련되어 있다. 아라키돈산은 불포화 오메가-6 지방산으로 20개의 탄소로 구성되어 있으며 탄소 사이에 4개의 cis 이중결합을 가진 지방산으로 고도 불포화지방산 중 하나이다. 또한 인산지질에 존재하는 불포화지방산으로 세포의 막을 구성하며, 특히 동물의 세포막을 만드는 중요한 지방산으로 뇌, 모유, 간, 혈액 등에 풍부하게 함유되어 있다. 대부분 포유동물에서 아라키돈산을 필요로 하나 사람의 체내에서 합성할 수 없어 식품으로 섭취해야 하는 필수지방

산의 하나로서 성장과 다양한 생리활성을 갖는 에이코사노이드로 변환된다. 그러나 에이코사노이드의 과잉이나 불균형한 생산은 염증과 관련한 질환의 원인이 되는 것으로 알려졌다.

- [0032] 또한 아라키돈산은 식품의 풍미를 향상시키는 것으로 알려진 다불포화 지방산(polyunsaturated fatty acid)에 포함되는 지방산이며, 고기 내에 존재하는 아라키돈산은 고기의 풍미에 큰 영향을 미치며 건강 유지 및 면역 작용에 중요한 기능을 하는 필수지방산이다.
- [0033] 본 발명의 닭은 오계(*Gallus gallus* var. *domesticus*)일 수 있고, 바람직하게는 연산 오계일 수 있다.
- [0034] 상기 오계는 천연기념물 265호로 지정된 순수 토종닭으로, 유엔식량농업기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)에 등재된 우리나라 대표 고유 유전자원으로 모색과 근막이 모두 검은 색소로 침착되어 있는 것이 특징이다.
- [0035] "SNP 마커"란, 개체 또는 종을 식별하기 위해 이용되는 DNA 서열 상의 단일 염기 다형성 대립유전자 염기쌍을 의미한다. SNP는 비교적 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 분포되어 있고 이에 의하여 개체의 유전적 다양성이 발생하므로, SNP 마커는 개체 간의 유전적 근접성을 알려주는 지표의 역할을 할 수 있다. SNP 마커는 일반적으로 단일 염기 다형성에 수반되는 표현형의 변화를 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 프라이머 또는 프로브일 수 있고, 구체적으로는 상기 SNP가 포함된 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브, 상기 SNP가 포함된 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.
- [0037] 상기 프라이머는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0038] 이러한 프라이머는 상기 SNP가 포함된 부위를 검출할 수 있는 효과를 나타내는 한, 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.
- [0039] 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다.
- [0040] 핵산은 하나 이상의 추가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입체(예를 들어, 아크리딘, 프로탈렌 등), 킬레이트화제(예를 들어, 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제를 함유할 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다.
- [0042] 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스레디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ³²P), 형광성 분자 및 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로브"는 DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수백 내지 수백 개의 염기에 해당하는 핵산 단편을 의미하며, 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브 또는 RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0044] 상기 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0045] 이러한 프로브는 상기 SNP가 포함된 부위를 검출할 수 있는 효과를 나타내는 한, 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.
- [0046] 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오티드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오티드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예를 들어, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다.
- [0047] 핵산은 하나 이상의 추가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입체(예를 들어, 아크리딘, 프로탈렌 등), 킬레이트화제(예를 들어, 금속, 방

상성 금속, 철, 산화성 금속 등) 및 알킬화제를 함유할 수 있다.

[0048] 상기 프로브는 이의 5' 말단에 리포터가 추가로 더 접합될 수 있다.

[0049] 상기 리포터는 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-X-Rhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이외에 당업계에서 리포터로 사용될수 있는 물질이라고 알려진 것이라면 모두 사용할 수 있다.

[0050] 상기 프로브는 이의 3' 말단에 소광자가 추가로 더 접합될 수 있다.

[0051] 상기 소광자는 TAMRA, BHQ(black hole quencher) 1, BHQ2, BHQ3, NFQ(nonfluorescent quencher), 담실(dabcyl), Eclipse, DDQ(deep dark quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), 아이오와 블랙(Iowa black)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이외에 당업계에서 소광자로 사용될 수 있는 물질이라고 알려진 것이라면 모두 사용할 수 있다.

[0052] 상기 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제에는 역전사 중합효소, DNA 중합효소, Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP가 포함될 수 있다.

[0053] 역전사된 cDNA를 증폭하기 위하여 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, DNA 중합효소의 예로 Ecoli DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 또는 박테리오파지 T7 DNA 중합효소가 있다. 중합효소는 박테리아 그 자체로부터 분리하거나 상업적으로 구입하거나 중합효소를 암호화하는 클로닝 유전자의 높은 레벨을 발현하는 세포로부터 수득할 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명은 상기 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 키트를 제공한다.

[0056] 상기 조성물은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.

[0057] 일례로, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 T 또는 C인 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP); 또는

[0058] 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 C 또는 A인 SNP;를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제는 프라이머 또는 프로브일 수 있고, 구체적으로는 상기 SNP가 포함된 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브, 상기 SNP가 포함된 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머일 수 있다.

[0060] 상기 키트는 PCR 키트, DNA 분석용 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 이용하여 본 발명에서 제공하는 SNP 마커의 유전자형을 증폭을 통해 확인하거나, 또는 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 닭의 가슴근육 내 지방산 함량을 예측할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 제공하는 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다.

[0063] 예를 들어, RT-PCR 키트는, 상기 SNP가 포함된 부위를 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드에 대한 특이적인 프라이머 쌍 이외에도 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase 억제제, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0064] 한편, 키트에 포함되는 성분들은 액상 형태로 제조될 수도 있고, 포함 성분들의 자유도를 낮추어 제품의 안정성을 제고하기 위해 건조된 형태로 제조될 수도 있다.

- [0065] 이러한 건조된 형태로의 제조를 위해서는 건조 단계의 적용이 필요하고, 이때 가온건조, 자연건조, 감압건조, 동결건조 또는 이들의 복합 공정이 사용될 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은 상기 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 조성물을 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0068] 본 발명에 있어 마이크로어레이란 기관상에 폴리뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이를 의미한다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 1) 닭으로부터 분리된 시료의 DNA로부터 서열번호 1 또는 2의 염기서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드의 SNP를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계; 및
- [0071] 2) 상기 증폭된 SNP를 포함하는 부위에서 SNP의 염기 종류를 결정하는 단계를 포함하는, 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법을 제공한다.
- [0072] 상기 단계 1)의 SNP를 포함하는 부위를 증폭시키는 단계는 당업자에게 알려진 어떠한 방법이든 사용 가능하다.
- [0073] 예를 들면, 표적 핵산을 PCR을 통하여 증폭하고 이를 정제하여 얻을 수 있다.
- [0074] 그 외 리가제 연쇄 반응(LCR)(Wu 및 Wallace, Genomics 4, 560(1989), Landegren 등, Science 241, 1077(1988)), 전사증폭(transcription amplification)(Kwoh 등, ProcNatI Acad Sci USA 86, 1173(1989)), 자가유지 서열 복제(Guatelli 등, ProcNatI Acad Sci USA 87, 1874(1990)) 및 핵산에 근거한 서열 증폭(NASBA)이 사용될 수 있다.
- [0075] 상기 단계 2)의 증폭된 SNP를 포함하는 부위에서 SNP의 염기 종류를 결정하는 단계는 서열분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이내믹 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(minisequencing) 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, 이에 제한되지는 않는다.
- [0076] 상기 지방산(fatty acid)은 불포화지방산(unsaturated fatty acid)일 수 있으며, 바람직하게는 아라키돈산(arachidonic acid)일 수 있다.
- [0077] 상기 닭으로부터 분리된 시료는 닭 가슴근육일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명의 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법에 있어서, 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 T/C인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 높고, T/T인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 낮고, C/C인 경우, 가슴근육의 지방산이 중간인 것으로 판단할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 닭의 가슴근육 내 지방산 함량 예측 방법에 있어서, 상기 서열번호 2로 표시되는 폴리뉴클레오티드에서 101번째 염기가 A/C인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 높고, C/C인 경우, 가슴근육의 지방산 함량이 낮고, A/A인 경우, 가슴근육의 지방산이 중간인 것으로 판단할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 닭은 오계(Gallus gallus var. domesticus)일 수 있고, 바람직하게는 연산 오계일 수 있다.
- [0082] 본 발명자들은 닭 가슴근육의 지방산 조성에 연관된 유전 마커를 전장 유전체에서 찾기 위하여, 전장 유전체 연관성 분석법을 이용하였다.
- [0083] 유전적으로 닭 가슴근육의 아라키돈산 함량을 조절하여 더 풍미 있는 닭 가슴근육을 생산하는 방법을 제시하기 위해 발명을 수행하였다. 구체적으로 연산오계와 백색레그혼의 교차 교배로 생산된 767마리의 F2 닭 집단을 10 주령까지 동일한 환경에서 사육하고 도계하였고, 도체의 가슴근육에 포함된 아라키돈산 함량을 고기 내의 지방산 조성을 분석하여 측정하였다. 동일한 닭에게서 60k SNP chip 유전자형 자료를 수집하였다. 측정값과 유전자

형 자료를 활용한 전장 유전체 연관성 분석을 GCTA 프로그램의 mlma command를 이용해 수행하였다. 닭 가슴근육의 아라키돈산 함량 형질과 유전자 칩 정보 간에 전장 유전체 연관 분석(Genome-Wide Association Study; GWAS)을 수행하여, 형질과 유의적으로 연관된 단일염기다형(Single nucleotide polymorphism, SNP) 마커 2종을 발굴하였다. 또한 발굴된 유전자 마커들은 닭 염색체 10번에 분포하며, 지방산 이화작용을 수행하는 효소를 암호화하는 유전자 및 지방산 산화와 지방산 transduction 기능을 수행하는 유전자와 인접한 영역에 위치함을 확인함으로써 (도 1), 본 발명을 완성하였다.

[0086] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0087] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것이며, 본 발명의 권리 범위는 이에 한정되는 것은 아니고 청구 범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리 범위에 속하는 것이다.

[0089] <실시예 1> 공시 재료

[0090] 본 연구에서는 국립축산과학원 가축유전자원센터에서 보유 중인 연산오계와 백색레그혼을 교차 교배하여 조성된 2세대 자손 집단 767수가 공시되었다.

[0091] 한국 토종닭의 한 품종인 연산오계는 검은 깃털, 피부, 뼈를 가지며 독특한 고기 맛을 가지는 것이 특징이다. 반면 백색레그혼은 연산오계와 반대되는 표현형을 가지는 산란계 품종이다.

[0092] 두 품종 간의 교차 교배하여 조성한 집단은 연산오계 수컷 1마리와 백색레그혼 암컷 5마리를 교배하여 생산된 2세대 자손 집단인 L계통과 백색레그혼 수컷 1마리와 연산오계 암컷 5마리를 교배하여 생산된 2세대 자손 집단인 B계통을 합쳐서 조성된 집단이다.

[0093] 모든 개체는 국립축산과학원 가축유전자원센터의 농장에서 동일한 환경 조건으로 사육되었다.

[0095] <실시예 2> 표현형 정보 수집 및 정규화

[0096] 10주령에 도축된 각 개체의 가슴근육을 대상으로 지방산 분석을 수행하였다. 닭 도체 시료는 도축 직후 -35° C에서 급속 냉동된 다음 -20° C에서 6주간 보관되었다. 이후 샘플을 4° C에서 20시간 동안 해동시킨 후 발골 및 가슴근육 분리가 수행되었다. 가슴근육에서 지질을 추출하고, 가스크로마토그래피 방법을 이용하여 지방산 정량 분석을 수행하였다.

[0097] 총 30개의 지방산(%)의 함량을 분석하였고, 분석 결과는 다음의 그룹으로 분류되었다.

[0098] 총 포화 지방산(Saturated fatty acid, SFA), 총 단일 불포화 지방산(Monounsaturated fatty acid, MUFA), 총 오메가-3(ω -3), 총 오메가-6(ω -6). 다양한 지방산 그룹의 함량은 다음과 같이 계산되었다:

[0099] $SFA = C10:0 + C12:0 + C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0$; $MUFA = C14:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1t + C18:1n-7 + C18:1n-9 + C20:1 + C22:1n-9 + C24:1n-9$; $PUFA = C18:2t + C18:2n-6 + C18:3t + C18:3n-3 + C18:3n-6 + C20:2 + C20:3n-3 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C20:5n-3 + C22:2n-6 + C22:5n-3 + C22:6n-3$; ω -3 = $C18:3n-3 + C20:3n-3 + C20:5n-3 + C22:5n-3 + C22:6n-3$; ω -6 = $C18:2n-6 + C18:3n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:2n-6$; P/S ratio: PUFA와 SFA 간의 비율; ω -6/ ω -3 ratio: ω -6 와 ω -3 간의 비율.

[0100] 전장 유전체 연관성 분석을 수행하기 전, 지방산 정량분석을 통해 생산된 모든 표현형 자료는 Shapiro-Wilk 검정법을 활용한 정규성 검정을 수행하여, p-value < 0.5 데이터는 정규성을 얻기 위해 변환(transfrom)되었다. 변환 방법은 각 데이터에 로그, 제곱근, sign함수, 제곱, 세제곱 변환을 수행하고, 정규성 검정의 p-value가 가장 높은 데이터를 연관성 분석에 사용하였다.

[0101] 767수의 닭 가슴근육의 지방산 정량분석 결과에 대한 기초 통계량은 표1에 나타내었다. 아라키돈산(C20:4n-6)의 닭 가슴근육 내 평균 함량은 30종의 지방산 중 세 번째로 많은 주요 지방산으로 관찰되었다.

표 1

지방산	최댓값	최솟값	평균	표준편차	지방산	최댓값	최솟값	평균	표준편차
C10:0	0.99	0	0.10	0.11	C20:3n-3	0.15	0	0.01	0.02
C12:0	0.74	0	0.08	0.05	C20:3n-6	1.77	0	1.03	0.23
C14:0	0.95	0.03	0.28	0.10	C20:4n-6	31.62	0.21	17.87	5.03
C14:1	0.15	0	0.04	0.03	C22:0	1.19	0	0.42	0.18
C16:0	25.77	12.63	19.85	1.93	C20:5n-3	1.09	0	0.12	0.07
C16:1	5.58	0.08	1.27	0.74	C22:1n-9	1.03	0	0.10	0.05
C17:1	0.25	0	0.02	0.05	C22:2n-6	0.54	0	0.01	0.02
C18:0	20.68	9.02	13.57	1.66	C22:5n-3	3.19	0.01	1.25	0.33
C18:1t	4.15	0	0.27	0.17	C22:6n-3	5.4	0.52	2.92	0.79
C18:1n-7	5.22	0.25	2.66	0.39	C24:0	1.05	0.05	0.28	0.12
C18:1n-9	38.13	10.2	21.96	4.99	C24:1n-9	3.95	0.01	0.43	0.19
C18:2t	0.71	0	0.13	0.05	SFA	52.17	21.85	34.81	1.48
C18:2n-6	26.28	0.05	13.09	1.82	MUFA	60.05	10.62	27.02	5.75
C18:3t	4.54	0	0.79	0.72	PUFA	83.83	0.83	37.97	5.75
C18:3n-3	5.86	0	0.26	0.28	ω -3	15.69	0.53	4.57	1.06
C18:3n-6	0.97	0	0.08	0.06	ω -6	61.18	0.26	32.07	4.75
C20:0	0.8	0.12	0.23	0.07	P/S ratio	1.87	0.56	1.09	0.18
C20:1	1.59	0.08	0.26	0.10	ω -6/ ω -3 ratio	18.27	3.56	7.29	1.46
C20:2	1.71	0.04	0.41	0.12					

<실시예 3> 대용량 유전체 정보(SNP chip) 생산 및 품질 관리(Quality Control)

공시된 닭 집단의 각 개체에서 8주령에 채취한 혈액 시료를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, DNA 추출을 위해 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 이용하였다. 추출된 DNA로부터 57,636개의 SNP 마커 정보가 포함되어있는 Illumina chicken 60K BeadChip을 이용하여 SNP 유전자형 자료를 생산하였다.

생산된 유전자형 자료는 PLINK1.9 소프트웨어를 사용하여 SNP filtering을 수행하였다. 마커 정보 중에서 각 마커의 개체에 대한 유전자형 정보의 missing rate가 10% 이상인 마커와 집단 내 대립유전자 빈도(minor allele frequency, MAF)가 1% 이하인 마커 및 Hardy-Weinberg equilibrium 검정의 p-value가 10^{-6} 이하인 마커는 제거하였다. 따라서, 총 29,175개의 SNP들이 선별되어 GWAS에 사용되었다. 연관성 분석에 앞서, 선별된 SNP들을 이용한 주성분 분석으로 개체들의 근친 정도가 양호함과 잠재적인 집단 계층화가 없음을 확인하였다.

<실시예 4> 전장유전체 연관분석(Genome-Wide Association Study; GWAS)

QC를 거친 모든 SNP와 아라키돈산 함량에 대해 GWAS가 수행되었고, 통계 모델은 성별, 계통, 체중 및 주성분 분석결과인 PC1, PC2가 공변량으로 사용된 혼합선형모델(Mixed linear model; MLM)이 채택되었다. 모든 분석은 다음 모델 방정식을 기반으로 하는 GCTA 소프트웨어에서 제공하는 MLM leaving-one-chromosome-out (MLMA-LOCO) 분석 옵션을 사용하여 수행되었다.

하기 식 1에 기재한 바와 같이, y 는 표현형인 아라키돈산의 함량이고, X 와 Z 는 파라미터 b 와 μ 에 대한 incidence matrices다. b 는 공변량을 포함한 고정 효과 벡터이며, μ 는 SNP 효과 벡터이다. $g^{\wedge}$ 는 검정 중인 SNP가 포함된 염색체의 축적된 SNP 효과 값이고, e 는 잔차 효과이다.

[0112] [식 1]

[0113]

[0114] GWAS 분석 결과, $\alpha = 0.05$ 가 적용된 본페로니 검정 기준(bonferroni correction method)으로 유의한 SNP들을 선별하였다. 연관성 분석 결과 관측된 표현형과의 유의한 연관성에 관여할 수 있는 유전자는 유의한 SNP를 중심으로 1Mb 길이의 유전체 상의 지역에 포함된 유전자 중에서 탐색되었다. 유전자 주석달기 과정은 닭 참조서열 GRCg6a를 기반으로 Ensembl (<https://asia.ensembl.org>)과 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 데이터베이스에서의 검색을 통해 수행되었다.

[0115] 767수 닭 집단에 대하여 대용량 SNP chip 유전체 자료를 생산하고 10주령에 도계한 가슴근육의 아라키돈산 함량에 대한 GWAS를 수행한 결과, 형질과 유의한 연관성을 보인 SNP 마커 2개를 발견하였다(도 1, 표 2).

표 2

[0117]

SNP ID	염색체	위치(bp)	A1*	A2*	대립유전자 빈도	p-value	SNP effect	후보유전자
GGaluGA067637	10	6215383	T	C	0.29	4.75 × 10 ⁻⁷	-1.44	<i>MCEE</i> , <i>TRPM1</i> , <i>APBA2</i> , <i>FAN1</i> , <i>MTMR10</i> , <i>KLF13</i>
Gga_rs14003114	10	6141939	C	A	0.29	6.59 × 10 ⁻⁷	-1.42	

[0118]

* A1; Allele 1, A2; Allele 2

[0120]

아라키돈산에 연관된 후보유전자 중에서 *MCEE* 유전자는 지방산 이화작용에 관여하는 methylmalonyl-CoA epimerase를 암호화한다. 또한, *TRPM1* 유전자는 transient receptor potential (TRP) 양이온 채널을 구성하는 단백질을 형성하는 유전자로, 이는 지방산 산화 및 지방산 transduction pathway에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 지방산 대사에서 생성되는 휘발성 화합물의 양은 지방산 대사 과정에서 작용하는 효소 활성화에 의해 만들어진 생성물에 의해 증가한다. 따라서 GWAS 결과에서 확인된 두 후보유전자는 지방산 대사에 기여하고, 이에 따라 닭고기의 육질과 풍미를 결정하는 휘발성 화합물의 생성에 영향을 미쳤다고 설명할 수 있다.

[0121]

발굴한 SNP 정보는 표 3에 기재하였다.

표 3

[0122]

SNP ID	유전자형	분석 수	아라키돈산 함량의 평균 및 표준편차(%)
GGaluGA067637	CC	390	18.56 ± 4.71 ^a
	TC	299	17.30 ± 5.40 ^b
	TT	77	16.42 ± 5.19 ^b
rs14003114	AA	390	18.56 ± 4.71 ^a
	AC	301	17.29 ± 5.38 ^b
	CC	76	16.45 ± 5.22 ^b

[0123]

^{a, b} 는 해당 유전자형에 따른 아라키돈산 함량이 유의적으로 차이가 남을 의미함(p<0.05).

[0125] 상기 표 3에서 보듯이, SNP 마커 GGaluga067637와 rs14003114의 유전자형이 각각 CC와 AA인 경우는 가슴근육의 아라키돈산 함량이 상대적으로 가장 높은 수준을 나타내었고, 유전자형이 각각 TT와 CC인 경우는 가슴근육의 아라키돈산 함량이 상대적으로 가장 낮은 수준을 나타내었으며, 유전자형이 TC와 AC인 경우는 가슴근육의 아라키돈산 함량이 중간 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0127] 닭 가슴근육의 아라키돈산 함량 연관 유전 마커의 염기서열 정보는 표 4에 기재하였다.

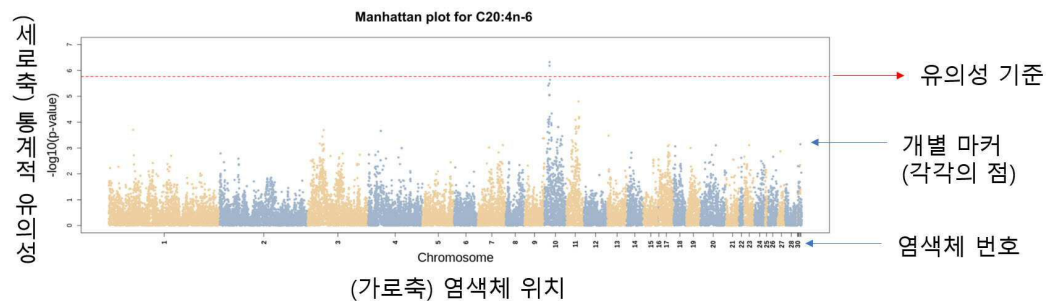
표 4

[0128]

SNP ID	염기서열변이영역
GGaluGA067637	TGATGATACTGTACGACAGTGCAGTATCTCTTTGTTTGGCACTTTCCTTTTCAACTGTCCGCATCAACGAGTAAAGGAAA GCACTGTGAGTATGAAGTG[C/T]TACACCCCTTTTCAAGTACAGCTGGTTGTTCCGGAATATCATCATCTAAACCGAA TGGTACTCCTTTGTGTTTTCCAAAATGTCCCACTTCTTGTTTG
rs14003114	CCTGTAGTGATTTGTGATGGTAGTGGACGAGCATCTGATATTCTGTCATTTGCACACAAGTATTCAGAAGAAGGAGGGTAA GACTGTGAGACTTTCACTA[C/A]TGCTGTGTCTTGCTCAAGGAAGACAATGAGGGATTATGTCCTTGTTCCTTGAAACA AAGCTCAGAGACAGAATGTTCTAACAGAGGTATTCTGCTGTC

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.