

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2015-0011227 (43) 공개일자 2015년01월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2013-0086244	(72) 발명자 홍기창 경기 남양주시 별내면 청학로68번길 23, 주공아파트 304동 303호	
(22) 출원일자 2013년07월22일 심사청구일자 2013년07월22일	임규상 대전 서구 둔산로 223, 4동 1105호 (둔산동, 청솔아파트) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 김순웅	

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 근육 특이적 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP를 이용한 돼지의 육질 향상 확인용 DNA 표지인자

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 G 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 716개의 연속서열로 구성되는, 근섬유특성과 관련된 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용한 돼지 육질 향상 확인용 DNA 표지인자 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 근섬유 타입 I (muscle fiber type I) 비율 증가와 관련되어 있는 마이크로 RNA-208b 영역 주변의 새로운 SNP를 이용하여 보수력이 우수하여 유리육즙량(drip loss)이 적고, 명도(lightness)가 낮아 육색이 우수한 돼지를 조기에 선별할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1

마이크로RNA-208b 전구체주위 영역의 염기서열

(붉은색으로 표시된 부분이 마이크로RNA-208b 전구체의 서열)

```

1 GGATTGTGAG ATAGGGGAGA CCATGGGAGG ATGCTGAAAT TAGGATGAGA AGATGGGCAA
61 GAACTGGAGT TGCATCATGG GGAAACTGA GCCCACCCCC CTGTGCCCCC TCTCCTAGGC
121 AAAGAACGCC CTGGCCCATG CGCTGCAGTC GGCCCGGCAC GACTGCGACC TGCTTCGGGA
181 ACAGTATGAG GAGGAGACAG AGGCCAAGGC CGAGCTGCAG CGTGTGCTGT CCAAGGCCAA
241 CTCAGAAGTA GCCCAGTGGA GGACCAAATA CGAGACAGAT GCCATCCAGA GGACCGAGGA
301 GCTGGAGGAG GCCAAGTGAG TCCTGGGTGG CCTTCCTCTG GCTGAGGCCC CTATGTGGGC
361 AAGACACACC CCATGCCATT CCTCAGTAGA CTGGCACAGG AGATAGATGC TTAGCTAGGT
421 TTTGACAACA GAGGACCCTG CCCAGCCCC ACCTTCTCCT CTCAGGGAAG CTTTTTCTC
481 GCGTTATGTT TCTCATCCGA ATATAAGACG AACAAAAGGT TTGTCTGAGG GCAGAGTGCT
541 CCCACCTGGG GCAGGGTGCC GTGGCAGGGA AGATGGGGGG CTCAGAGTCC ATGTGTTCTC
601 CATGTCTGCA GCCTAGAGGC TGGCCCAG[G/A]G TCAGAGGGAT GCCACGGGGA AGGCCCTCCC
661 TGGGTTGTGG GTCCTCATAA CCTGCCACCC AGATCCTCTG CCTATCAGGT TCTTGG

```

(72) 발명자

이은아

서울 강서구 강서로 266, 123동 1502호 (화곡동,
우장산아이파크이편한세상)

강지훈

서울특별시 성북구 안암로7길 54

김준모

대전 유성구 엑스포로 501, 107동 401호 (전민동,
청구나래아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012009350

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자-기본

연구과제명 돼지 myomiR 분석을 통한 근섬유단백질아형 조절인자 구명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열에서 629번째 G 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 716개의 연속서열로 구성되는, 근섬유특성과 관련된 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용한 돼지 육질 향상 확인용 DNA 표지인자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DNA 표지인자는 돼지의 근육 내 근섬유 조성 중 타입 I의 비율을 증가시키고, 육질 관련 형질인 유리육즙량(drip loss) 또는 육색 명도(lightness)를 감소시킴으로써 육질을 향상시키는 것과 관련된 것임을 특징으로 하는 DNA 표지인자.

청구항 3

서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오티드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 확인용 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하기 위한 PCR용 프라이머쌍.

청구항 4

제3항 기재의 프라이머쌍과; 및

PCR 반응혼합물을 포함하는 돼지의 육질 향상 확인용 SNP 분석용 키트.

청구항 5

서열번호 1의 염기서열에서 629번째인, 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 관련 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용하여 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 근육 특이적 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용한 돼지의 육질 향상 확인용 DNA 표지인자에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 근섬유 타입 I (muscle fiber type I) 비율 증가와 관련되어 있는 마이크로 RNA-208b 영역 주변의 새로운 SNP를 이용한, 보수력이 우수하여 유리육즙량(drip loss)이 적고, 명도(lightness)가 낮아 육색이 우수한 돼지를 조기에 선발할 수 있는 DNA 표지인자 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

그동안 돼지의 개량은 적육생산능력 향상위주로 이루어졌으며(Brocks 등, 2000) 그 결과 생산량은 크게 증대된 반면, 스트레스에 민감한 돼지(Porcine stress syndrome 돼지, PSS돈)가 발생하여 폐사율이 증가하고 이상돈육(Pale, Soft, Exudative; PSE) 발생비율이 증가하는 등 육질저하로 인한 문제가 심각하다(Cameron, 1990). 또한, 국민의 경제능력향상에 따른 식생활개선이 이루어지면서, 식감까지 향상된 고품질의 돈육생산이 요구되고 있는 시점으로 양돈산업에 있어 육질향상은 매우 중요한 과제가 되었다.

[0003]

육용가축에 있어 골격근의 성장과 발달은 주요 개량목표인 적육생산량 및 육질 측면에서 중요한 의미를 가진다. 근섬유는 근육을 구성하고 있으며, 근섬유의 수와 크기는 적육생산량에 영향을 미친다. 또한, 근섬유는 ATPase 활성을 담당하는 근섬유단백질(myosin heavy chain 등) 아형의 조성에 따라서 크게 세 가지 형태(type I, type IIa, type IIb)로 구분되며, 이러한 근섬유타입조성은 육질과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(Ryu 등, 2005). 근섬유타입 I의 경우 느린 산화작용의 성질을 띠며, 반대로 타입IIb는 빠른 해당작용의 성질을 띠고 있다. 따라서, 타입I이 많을 경우 근육의 사후 대사속도를 지연시켜 육질에 좋은 영향을 미치는 반면, 타입IIb가 많을 경우 빠른 대사속도로 인해 육색이 창백하고, 호물거리며, 유리육즙이 많이 나오는 이상육(PSE)의 발생빈

도를 증가시키게 된다. 타입 IIa의 경우는 타입 I과 타입 IIb의 중간 성질을 갖는다. 돼지의 등심근은 대부분 백색근 계열로서 타입 IIb가 대부분(약 80%)을 차지하기 때문에, 육질 개선을 위해 근육 내 근섬유 수 조성 중 타입 I의 비율을 높이는 것이 필요하다.

[0004] 한편, 마이크로 RNA (micro RNA, miRNA)는 RNA 간섭현상(RNA interference)의 주요 구성요소로서, 동물의 경우 표적유전자(target gene)의 mRNA의 3'UTR에 부분적으로 염기서열접합을 이루어 mRNA들의 단백질번역을 저해하거나 절단을 유도하는 역할을 한다(Du 등, 2005; Bartel 등, 2004). 최근 연구를 통해 근육특이적으로 발현하여 근육의 분화 발달에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상되는 마이크로 RNA들이 보고(Huang 등, 2008; Nielsen 등 2009; Cho 등 2010; Xie 등, 2010) 되고 있는바, 근육특이적 마이크로 RNA는 돼지의 근섬유조성을 포함한 근육 특성을 결정할 수 있는 주요 인자로 판단된다.

[0005] 최근에는 소동물인 마우스에서 마이크로 RNA-208b (miR-208b)가 근섬유단백질 아형의 발현에 관여하여 최종적으로 근섬유타입 조성을 조절하는 것으로 보고되었다(Rooij et al., A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance (Dev Cell. (2009) 17(5): 662-673)).

[0006] 본 발명의 배경이 되는 기술로서 대한민국 특허공보 10-1253300(2013.04.12)에는 일차 마이크로 RNA 영역의 SNP를 포함하는 돼지의 육질 증가 여부 확인용 DNA 표지 인자가 개시되어 있고, 대한민국 공개공보 10-2013-0033903(2013.04.04)에는 근육 특이적 마이크로 RNA-206 영역의 SNP를 이용한 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 표지인자가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 공개공보 10-2013-0045113 (2013.05.03)에는 근육 특이적 마이크로 RNA-1 영역의 SNPs를 이용한 돼지의 육질 향상 여부 확인용 DNA 단편 표지인자에 대해 개시되어 있다.

[0007] 그러나, 현재까지 돼지 마이크로 RNA-208b 영역에서 SNP와 같은 염기다형성에 관한 보고나, 이를 통해 돼지의 근섬유조성 변화를 확인하고 돼지의 육질향상 여부를 확인할 수 있는 DNA 표지인자에 관해서는 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 10-1253300(2013.04.12)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개공보 10-2013-0033903 (2013.04.04)
(특허문헌 0003) 대한민국 공개공보 10-2013-0045113 (2013.05.03)

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Rooij et al., A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance (Dev Cell. (2009) 17(5): 662-673)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 돼지 마이크로 RNA-208b 영역 주변의 SNP를 신규로 발굴하여, 근섬유타입 조성 및 보수력과 육색으로 대표되는 육질에 미치는 효과를 확인하였고, 특히 근섬유 수의 조성 중 타입 I의 비율이 증가하여, 유리육즙과 명도가 감소하는 효과를 확인할 수 있었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 주된 목적은, 돼지의 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP를 이용하여, 근섬유타입조성과 함께 돈육 품질평가의 주요 척도가 되는 보수력 및 육색과 관련된 DNA 표지인자 및 이를 이용한 SNP 분석용 키트를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 DNA 표지인자를 이용한 돈육의 보수력 및 육색 등이 우수한 돼지를 판별할 수 있는 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공하는 데 있다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.
- 과제의 해결 수단**
- [0014] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 G 염기를 포함하는 서열번호 1 내의 15 내지 716개의 연속서열로 구성되는, 근섬유특성과 관련된 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용한 돼지 육질 향상 확인용 DNA 표지인자를 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 서열번호 1로 표시된 돼지 1차 마이크로 RNA-208b 중에서 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서 돼지의 육질 특성과 관련된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 찾아내고, 이러한 SNP에 따른 유전자형과 돼지 근섬유특성 및 육질 특성과의 연관성을 분석하였다. 상기 DNA 표지인자는 가축의 육질 관련 후보유전자로 알려져 있는 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역 서열 중 일부로서, 서열번호 1 염기서열에서, 629번째(G→A) 위치에서 염기가 치환된 SNP 부위를 포함한다.
- [0016] 본 발명은 돼지의 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서 육질의 향상과 관련된 것으로, 서열번호 1의 염기서열에서, 629번째 (G→A 치환) 부위를 발굴하고 이를 포함하는 DNA 단편의 “돼지의 육질 향상 여부를 확인하기 위한 DNA 표지인자”로서의 신규한 용도에 관한 것이다.
- [0017] 돼지의 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서 특정부위의 SNP를 이용하여 육질이 향상된 개체를 선별하는 방법은 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자들이 이러한 육질 향상 관련 SNP를 처음으로 밝혔다.
- [0018] 본 발명에서, 용어 “마이크로 RNA”는 여러 종에 걸쳐 게놈 상에 암호화되어있는 작은 RNA로, 1차 마이크로 RNA(primary miRNA), 전구체 마이크로 RNA(precursor miRNA), 및 성숙한 마이크로 RNA(mature miRNA)로 발생되어 기능을 하게 되며, 두 개의 서로 다른 RNase III 효소인 Drosha와 Dicer에 의해 핵과 세포질에서 연속적으로 절단(processing)되어 성숙됨으로써 최종적으로 생성된다. 따라서 상기 “1차 마이크로 RNA”란 마이크로 RNA-208b 유전자로부터 전사(transcription)된 미성숙의 1차 마이크로 RNA를 의미하고, 상기 “마이크로 RNA-208b 전구체”는 상기 1차 마이크로 RNA가 RNase III 효소인 Drosha에 의해 생성되는 전구체(precursor miRNA)를 의미한다.
- [0019] 또한 상기 용어 “마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역”은 돼지 게놈 DNA(genomic DNA) 상에서 상기 마이크로 RNA-208b 전구체를 중심으로 upstream과 downstream 방향으로 염기서열을 포함하는 영역을 의미하는 것으로, 마이크로 RNA 유전자의 전사에 필요한 cis-regulatory element(예: promoter)의 염기서열 변화, Drosha와 Dicer의 발생에 영향을 미칠 수 있는 염기서열 변화, 그리고 성숙한 마이크로 RNA에 해당하는 염기서열 변화는 그 마이크로 RNA에 의한 표적 유전자 발현기작에 모두 영향을 미칠 수 있으며, RNase III 효소에 의해 제거될 부위이나, 본 발명자들은 상기 주위 영역에서 SNP를 발견하였다.
- [0020] 본 발명에서 서열번호 1의 염기서열의 629번째 염기에 위치한 SNP는 마이크로 RNA-208b 전구체에서 downstream으로 103번째 염기이다(도 1 참조).
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 단편은 서열번호 1로 표시된 돼지 1차 마이크로 RNA-208b 중에서 돼지의 육질 특성과 관련한 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역의 새로운 유전적 변이 부위(SNP site)인 629번째 G 염기를 포함하는 DNA 표지인자이다. 이 유전적 변이 부위는 G→A로 염기가 치환되어 결과적으로 육질 향상에 영향을 미치게 된다. 상기 DNA 단편의 크기는 상기 SNP 부위 1 이상을 포함하는 어떤 단편 크기일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 수백 개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 내지 716개의 연속서열로 구성되는 염기일 수 있다. 특히 15 내지 30 염기의 경우는 상기 SNP를 탐지하기 위한 프로브(probe)나 프라이머로 이용될 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명에 있어서, 상기 DNA 표지인자는 돼지의 근육 내 근섬유 조성 중 타입 I의 비율을 증가시키고, 육질 관련 형질인 유리육즙량(drip loss) 또는 육색 명도(lightness)를 감소시킴으로써 육질을 향상시키는 것과 관련된 것임을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 실시예 4에서와 같이, 629번째 염기 위치 SNP에 따른 유전자형(AA, AG, GG)과 근섬유조성 및 육질특성의 연관성을 분석하여 AA 유전자형이 향상된 육질을 나타냄을 확인하였다.
- [0024] 본 발명에서, “육질의 향상”이란 SNP로 인한 개체별 유전자형(AA, GA, GG)에 따라, 근섬유조성 중 근섬유 타입 I의 비율이 증가하고 육질에 부정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있는 근섬유 타입 IIb의 비율이 감소하고,

돼지의 육질 관련 형질인 유리육즙량(drip loss) 또는 육색 명도(lightness)가 감소하는 것을 의미한다. 즉, AA 유전자형 개체가 GG 유전자형 개체와 비교하여 근섬유 타입 I의 비율 증가와 유리육즙량(drip loss) 또는 육색 명도(lightness)가 감소한 상태를 의미한다.

[0025]

본 발명에서, 돼지의 육질특성은 도축 45분 후 근육 pH ($\text{pH}_{45\text{min}}$), 유리육즙량 (drip loss), 육색 명도 (lightness) 등에 따라 측정될 수 있으며, 이 중 특히 유리육즙량(drip loss)과 육색 명도(lightness)는 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 진단하고 선별하여 육질이 향상된 고급육을 손쉽게 생산할 수 있다.

[0026]

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오타이드로 구성되는, 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 여부 관련 SNP를 탐색하기 위한 프라이머쌍을 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 대표적인 마이크로 RNA portal site (<http://www.mirbase.org/>)에 명시된 ssc-miR-208b (accession no. NR_038551.1)의 stem-loop의 염기서열에 근거하여 주변 게놈 DNA 염기서열을 확인하여 SNP를 탐색할 수 있는 프라이머쌍을 제작하였다. 본 발명의 프라이머쌍은 종래 밝혀지지 않은 SNP를 포함하는 유전자 단편을 증폭하기 위한 것으로, 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역의 유전자 서열 중 특정 부위 (서열번호 1에서 629번째 염기)에서 SNP를 포함하는 유전자 단편을 제조할 수 있게 해준다.

[0027]

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 프라이머쌍과 PCR 반응혼합물을 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명의 SNP 분석용 키트는 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역 유전자의 발현 조절 즉, 육질 특성에 관여하는 유전자의 다양한 발현을 분석하기 위한 것이다.

[0028]

상기 프라이머를 이용하여 제조된 유전자 단편의 염기서열의 결정은, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시 법에 의하여 직접적인 핵산의 뉴클레오타이드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나, SNP 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오타이드 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.

[0029]

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), 올리고뉴클레오타이드 결합 어세이법(oligonucleotide ligation assay), 크기 분석법(size analysis), 단일 가닥 배좌 다형성법(single-stranded conformation polymorphism) 등의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0030]

본 발명의 실시예 4에서는, 본 발명의 상기 변이 부위 (SNP site)인 서열번호 1의 염기서열에서의 629번째 (G→A 치환) 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분하였다. 예를 들어, 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성되는 프라이머쌍으로 증폭한 DNA 단편(716bp)을 이용하여 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 유전자형을 GG, GA, AA로 구분할 수 있었다(도 3 참조).

[0031]

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 상기 DNA 표지인자에 상보적으로 결합하는 프로브(probe)를 포함하는 돼지의 육질 향상 여부 관련 SNP 분석용 키트를 제공한다. 본 발명에서 프로브(probe)란 혼성화 프로브를 의미하는 것으로, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명의 상기 프로브는 SNP를 검출하기 위한 방법 등에 사용될 수 있다. 상기 검출 방법에는 서던 블롯팅 등과 같은 핵산의 혼성화에 근거한 검출방법들이 포함되며, 마이크로어레이를 이용한 방법에서 마이크로어레이의 기판에 미리 결합된 형태로 제공될 수도 있다.

- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 염기, 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 관련 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 이용하여 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 의한 상기 SNP는 근섬유 조성 중 타입 I의 비율, 유리육즙량(drip loss)과 육색 명도(lightness)를 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 직접서열분석법 등을 이용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서의 육질 향상 관련 SNP(Single nucleotide polymorphism)를 탐색하여 돼지의 육질 향상 여부를 확인하는 방법:
- [0035] a) 돼지로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;
- [0036] b) 상기 a)단계의 DNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 염기서열의 629번째 염기를 포함하는 특정 부위를 증폭시키는 단계;
- [0037] c) 상기 b)단계에서 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하는 단계; 및
- [0038] d) 상기 c)단계의 염기서열 분석 결과로부터 서열번호 1의 염기서열의 629번째 염기가 G염기에서 A 염기로 치환된 여부를 확인하는 단계.
- [0039] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 프라이머를 이용하여 증폭시키는 것을 특징으로 한다. 상기 b)단계의 DNA 증폭은 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역의 629번째 염기가 포함된 특정 부위를 증폭시킬 수 있는 어떤 프라이머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2와 서열번호 3으로 표시된 올리고뉴클레오타이드로 구성된 프라이머를 이용하여 증폭시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명의 방법에서, 상기 SNP 부위를 포함하는 DNA 단편을 제조하고 DNA 단편을 직접적인 서열분석법(sequencing)을 이용하여 SNP 부위의 염기서열을 결정하여 유전자형을 구분할 수 있다. 상기 방법에 따르면, 서열번호 2와 서열번호 3의 프라이머로 증폭한 DNA 단편에 존재하는 SNP 부위의 염기를 확인함으로써 서열번호 1의 염기서열에서 629번째 유전자형을 GG, GA, AA로 구분할 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 돼지 마이크로 RNA-208b 영역의 SNP는 돼지의 근섬유조성 중 근섬유 타입 I의 비율을 증가시킴으로써 근섬유타입조성에 영향을 주는 것으로 판단할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 의한 SNP는 근섬유 타입 I의 비율의 증가시킴으로써 육질 특성 중 보수력 및 육색을 향상시키는 효과가 있으며, 보다 구체적으로는 보수력관련 형질인 유리육즙(drip loss)과 육색 관련 형질인 명도(lightness)를 감소시킴으로써 육질을 향상시킬 수 있다.
- [0043] 본 발명의 유전적 변이(SNP)는 돼지 근섬유특성 및 육질특성관련 기능을 가지며, 이러한 특성을 통하여 돼지의 육질개량과 관련하여 보수력과 육색이 우수한 돼지 판별용 DNA 표지인자로서 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 발명에 의하면 육질이 향상된 개체를 조기에 진단하고 선별하여 육종 및 생산함으로써 품질이 향상된 고급육의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시된 돼지 마이크로 RNA-208b 중에서 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역의 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다. 629번째 염기(G→A 치환)가 새로 발견한 단일염기변이부위(SNP)이다. 붉은색으로 표시된 부분이 마이크로 RNA-208b 전구체의 서열이다.

도 2는 본 발명에 따른 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서 발견된 SNP의 위치를 나타내는 모식도이다.

도 3은 본 발명에 따른 SNP에 대한 PCR 및 직접염기서열분석(direct sequencing)을 실시하여 염기에 따른 peak의 차이를 이용하여 유전자형을 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예 1. 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역의 염기서열 분석 및 변이 탐색

돼지 마이크로 RNA-208b에 대한 정보를 miRBase 홈페이지 (<http://www.mirbase.org/>)와 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하여 확인하였다(표 1 및 도 1에서 붉게 표시된 영역). 돼지 마이크로 RNA-208b의 전구체(precursor)는 돼지 7번 염색체의 MYH7 유전자 내 인트론 30번 (intron 30)에 위치하고 있었으며, 그 주변 게놈DNA의 염기서열을 확인할 수 있었다.

표 1

표 1. 돼지 마이크로RNA-208b 전구체에 대한 정보

miRNA	Location		Length	precursor Sequence	Accession number	
	Chromosome	Gene			NCBI	miRbase
miR-208b	SSC7	MYH7_intron30	57 bp	5'-AAGCTTTTGTCTCGC GTTATGTTTCTCATCCG AATATAAGACGAACAA AAGGTTTGT-3'	NR_038551.1	MI0013129

품종간 및 품종내 염기서열 변이를 탐색하기 위해서 3개 품종 (Yorkshire, Landrace, Berkshire)의 실험축군에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. 확보된 염기서열을 바탕으로 Forward primer P1 (5'-GGATTGGAGATAGGGGAGA-3', 20mer; 서열번호 2)와 Reverse primer P2 (5'-CCAAGAACCTGATAGGCAGA-3', 20mer; 서열번호 3)를 특이제작하였으며(표 2), PCR을 통해(표 3 및 표 4) 돼지 마이크로 RNA-208b 전구체(57 nt)를 중심으로 upstream으로 467 bp의 염기가 추가되고, 또한 downstream으로 192 bp의 염기를 포함하는 716 bp의 앰플리콘(amplicon; 서열번호 1)에 대해 염기서열분석을 실시했다. 염기서열분석 결과를 통해 해당 마이크로 RNA의 전구체 서열로부터 downstream으로 103 bp 떨어진 곳(서열번호 1의 629번째 염기)에서 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNP)을 발견하였다 (도 1 및 도 2).

표 2

표 2. 앰플리콘 증폭에 사용된 프라이머

Primer	Length (nt)	Primer sequence	PCR product Size
P1	20	5'-GGATTGGAGATAGGGGAGA-3'	716 bp
P2	20	5'-CCAAGAACCTGATAGGCAGA-3'	

표 3

표 3. 앰플리콘 증폭 시 PCR 혼합물 조성

Reagent	Volume (μl)
10×Polymerase buffer	3.0
dNTP (2mM each)	3.0
DNA polymerase	0.3
Primer (10μM)	Forward
	Reverse
Distilled Water	19.2
Genomic DNA	1.5
Total volume	30.0

표 4

표 4. 앰플리콘 증폭 시 PCR 반응조건

PCR steps	Temperature (°C)	Time (minute)
Initial denaturation	94.0	10
Denaturation	94.0	1
Annealing	61.0	1
Extension	72.0	1
Final extension	72.0	10

실시예 2. 돼지의 게놈 DNA(genomic DNA) 추출

상기 유전자 다형성 분석을 위한 게놈 DNA의 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℃를 유지하여 실험실까지 운반하였다. 50 ml 원심분리용 튜브에 옮긴 후 1,300 g에서 15분간 원심분리하여 buffy coat을 모아 15 ml의 DNA 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 섞은 후 37℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다.

배양 후 Proteinase K (200 μg/ml, BRL)를 혼합하여 37℃ 항온수조에서 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 동량의 0.5M 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 cm 되는 피펫(pipet)으로 상등액을 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, 1% 아가로스 겔 전기영동을 시행하여 DNA의 분자량을 확인하였다.

실시예 3. PCR 및 직접염기서열분석을 통한 유전자형 분석

돼지 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에서 확인한 SNP(서열번호 1의 염기서열의 629번째 염기)를 특이적으로 인식할 수 있는 제한효소가 없으므로, 본 발명에서는 새로이 발견한 SNP를 포함하는 영역에 대한 PCR 및 직접염기서열분석(direct sequencing)을 통해 개체별 유전자형 분석을 실시하였다. 서열번호 2와 서열번호 3으로 구성된 프라이머쌍을 이용해 PCR을 실시하였다(표 3 및 표 4 참조). 이와 같이 확보된 PCR product를 직접염기서열분석을 통하여 분석대상 개체의 유전자형 진단을 할 수 있었다 (도 3 참조).

실시예 4. DNA 표지 유전자형별 근섬유특성 및 육질형질 확인

- [0059] 돼지 마이크로 RNA-208b는 근육에서 특이적으로 발현되는 마이크로 RNA 집단으로 근육의 분화 및 발달과정에 중요하게 작용할 것으로 판단되므로 본 발명에서는 공시된 438두의 근섬유특성과 육질형질을 분석하였으며, 유전자형과의 연관성분석을 실시를 통해 그 효과를 확인하였다.
- [0060] 1) 근섬유특성 분석
- [0061] 근섬유특성 분석을 위하여, 사후 45분이 지난 8번 흉추의 등심근의 근육샘플을 수집하였고, $0.5 \times 0.5 \times 1.0$ cm의 조각으로 자르고, 액체 질소로 재빠르게 얼리고, 분석 전까지는 -80°C 에서 보관되었다. 횡단부분($10\ \mu\text{m}$ thick)은 20°C 상에서 크라이오스태트(cryostat; CM1850, Leica, Germany) 기계로 준비되었고, 근섬유형 식별 분석을 위해 타입 I, IIa와 IIb 섬유를 프리인큐베이션(acid preincubation, pH 4.35)을 처리한 액토미오신(actomyosin) ATPase 방법으로 염색하여 분류하였다. 모든 샘플은 CCD 카메라(charge-coupled device color camera; IK-642K, Toshiba, Japan)와 이미지 분석 시스템(the image analysis system; Image-Pro Plus, Media Cybernetics, USA) 장치를 이용하여 근섬유 특성이 분석되었다.
- [0062] 2) 육질 분석
- [0063] 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 Honikel, K. O. (1989)에 의해 고안된 방법을 이용하였으며, 2°C 에서 48시간 동안 플라스틱 백에서 표면에 있는 근육 샘플의 양의 차이를 측정하는 방법으로 분석되었다. 결과는 하기 표 6에 나타내었다.
- [0064] 3) 유전자형과 형질과의 연관성 분석
- [0065] 공시된 438두에 대해 본 발명의 SNP에 따른 유전자형과 근섬유특성 및 육질형질과의 연관성분석을 실시했다. 통계분석 프로그램으로는 SAS 9.2 package에서 제공되는 SAS/GLM procedure를 이용하였고, 통계분석 모델에서 품종, 성별, 계절을 고정효과로 분석하였으며, 각 유전자형의 최소제곱평균(Least Squares Means)을 구하여 유의차를 평가하였다.
- [0066] 본 발명에서 Berkshire, Landrace, Yorkshire의 3개 품종으로 구성된 공시돈에 대한 유전자형 및 대립유전자 빈도는 하기 표 5와 같다. 세 품종 모두에서 AA 유전자형의 빈도가 다른 유전자형들보다 낮게 나타났다.
- [0067] 표 6의 결과에서, 근섬유특성 중 근섬유수 조성에서 유전자형간 차이가 나타났다. 근섬유수조성에서 AA 유전자형과 GA 유전자형은 GG 유전자형에 비해 Type I 비율이 높게 나타났다. ($P = 0.0158$). Type IIb의 경우, GA 유전자형이 GG 유전자형에 비해 높게 나타났으며($P = 0.0880$), AA 유전자형은 통계적으로 유의적이지는 않았지만 GG 유전자형보다 낮은 경향을 나타냈다.
- [0068] 또한 육질관련 형질에서 AA 유전자형은 다른 두 유전자형에 비해 유리육즙량(Drip loss, $P = 0.0112$)과 명도(Lightness, $P = 0.0880$)가 낮게 나타났으며, 이를 통해 보수력과 육색이 우수한 것으로 판단할 수 있다. 기존 연구에 따르면 근섬유특성 중 육질에 주요하게 영향을 미치는 것은 근섬유 수 및 면적의 조성으로 보고되었으며(Klont 등, 1998), 특히 호기적 대사를 하는 근섬유 Type I의 비율이 높을 경우 육질에 긍정적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서도 같은 결과를 확인하였으며, 이는 본 발명의 SNP에 따른 3가지 유전자형 중에서 AA 유전자형이 근섬유 Type I 조성이 높게 나타났고, 그 결과 향상된 육질특성을 나타나게 된 것임을 말한다. 본 발명에서 총근섬유수(total fiber number), 근섬유단면적크기(Mean CSA of fibers), 근섬유밀도(The density of total fibers)에서 10% 유의수준에서 유전자형간 차이를 보였지만, 상기 서술한 바와 같이 육질에 대한 효과는 근섬유타입 I의 증가에 의한 것으로 판단된다.
- [0069] 따라서, 마이크로 RNA-208b 전구체 주위 영역에 존재하는 본 발명의 SNP는 실제로 근섬유수 조성에 관여하고 있으며, 최종적으로 육질향상에 영향을 미치는 기능을 확인하였고, 관련 DNA 표지인자로서의 효용성을 검증하였다.

표 5

표 5. miR-208b SNP에 따른 유전자형 및 유전자빈도

Breed	N	Genotype			Gene	
		GG	GA	AA	G	A
B	151	0.49 (74) ¹	0.44 (66)	0.07 (11)	0.71	0.29
L	98	0.66 (65)	0.32 (31)	0.02 (2)	0.82	0.18
Y	189	0.71 (134)	0.18 (34)	0.11 (21)	0.80	0.20
Total	438	0.62 (273)	0.30 (131)	0.08 (34)	0.77	0.23

Abbreviations: B, Berkshire; L, Landrace; Y, Yorkshire

¹number of pigs

표 6

표 6. 돼지 miR208b 영역의 SNP가 돼지에서 근섬유특성 및 육질특성에 미치는 영향

Traits	Genotype			P - value
	GG (n=273)	GA (n=131)	AA (n=34)	
Muscle fiber characteristics				
Total fiber number ($\times 10^3$)	1,119 ^a (16.9) ¹	1,069 ^b (24.9)	1,035 ^b (44.9)	0.0843
Mean CSA ² iber (μm^2)	4,236 ^b (48.4)	4,381 ^a (71.4)	4,473 ^a (134.5)	0.0950
The density of total fibers (/mm ²)	242.5 ^a (2.57)	234.3 ^b (3.80)	228.1 ^b (7.15)	0.0580
Fiber number composition (%)				
Type I	8.86 ^b (0.28)	10.01 ^a (0.41)	10.65 ^a (0.78)	0.0158
Type IIa	11.50 (0.31)	12.17 (0.45)	11.55 (0.84)	0.4433
Type IIb	79.65 ^a (0.40)	77.82 ^b (0.59)	77.80 ^{ab} (1.11)	0.0202
Meat quality				
pH _{45min}	6.07 (0.02)	6.09 (0.03)	6.15 (0.05)	0.3031
Drip loss (%)	4.04 ^a (0.14)	3.67 ^a (0.21)	2.86 ^b (0.40)	0.0112
Lightness (<i>L</i> [*])	46.87 ^a (0.18)	46.80 ^a (0.26)	45.70 ^b (0.52)	0.0880

¹ Standard error of least square means.

² Cross sectional area.

^{a,b} Least square means with different superscripts in the same row differ.

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

마이크로RNA-208b 전구체주위 영역의 염기서열

(붉은색으로 표시된 부분이 마이크로RNA-208b 전구체의 서열)

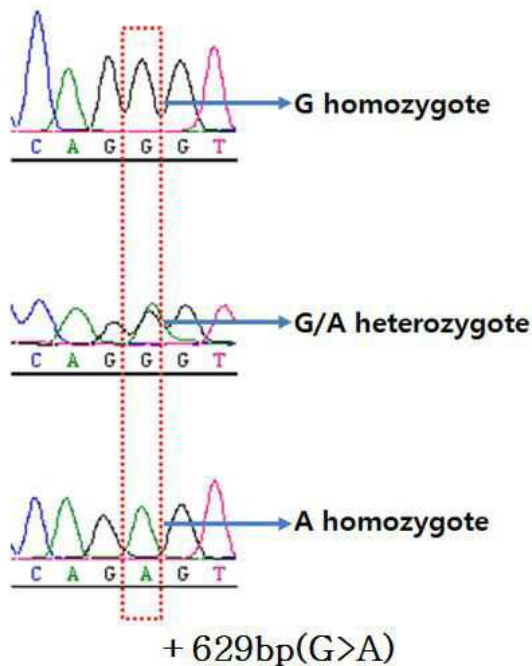
```

1 GGATTTGGAG ATAGGGGAGA CCATGGGAGG ATGCTGAAAT TAGGATGAGA AGATGGGCAA
61 GAACCTGGAGT TGCATCATGG GGAAAACTGA GCCCACCACC CTGTGCCCCC TCTCCTAGGC
121 AAAGAACGCC CTGGCCCATG CGCTGCAGTC GGCCCGGCAC GACTGCGACC TGCTTCGGGA
181 ACAGTATGAG GAGGAGACAG AGGCCAAGGC CGAGCTGCAG CGTGTGCTGT CCAAGGCCAA
241 CTCAGAAGTA GCCCAGTGGA GGACCAAATA CGAGACAGAT GCCATCCAGA GGACCGAGGA
301 GCTGGAGGAG GCCAAGTGAG TCCTGGGTGG CCTTCCTCTG GCTGAGGCCC CTATGTGGGC
361 AAGACACACC CCATGCCATT CCTCAGTAGA CTGGCACAGG AGATAGATGC TTAGCTAGGT
421 TTTGACAACA GAGGACCCTG CCCCAGCCCC ACCTTCTCCT CTCAGGGAAG CTTTTTGCTC
481 GCGTTATGTT TCTCATCCGA ATATAAGACG AACAAAAGGT TTGCTGAGG GCAGAGTGCT
541 CCCACCTGGG GCAGGGTGCC GTGGCAGGGA AGATGGGGGG CTCAGAGTCC ATGTGTTTCT
601 CATGTCTGCA GCCTAGAGGC TGGCCAG[G/A]G TCAGAGGGAT GCCACGGGGA AGGCCCTCCC
661 TGGGTTGTGG GTCTCATAA CCTGCCACCC AGATCCTCTG CCTATCAGGT TCTTGG
    
```

도면2



도면3



서열목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> DNA marker for detecting improvement of porcine meat quality
using SNPs in region of muscle specific microRNA-208b

<130> P11-130716-01

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 716

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 1

ggatttggag ataggggaga ccatgggagg atgctgaaat taggatgaga agatgggcaa 60
gaactggagt tgcacatgga ggaaaactga gccacacccc ctgtgcccc tctcctaggc 120
aaagaacgcc ctggcccatg cgctgcagtc ggcccggcac gactgcgacc tgcttcggga 180

acagtatgag gaggagacag aggccaaggc cgagctgcag cgtgtgctgt ccaaggccaa 240
ctcagaagta gccacatgga ggaccaaata cgagacagat gccatccaga ggaccgagga 300
gctggaggag gccaaagttag tcttgggtgg ccttcctctg gctgaggccc ctatgtgggc 360
aagacacacc ccatgccatt cctcagtaga ctggcacagg agatagatgc ttagctaggt 420
tttgacaaca gaggacctg cccagcccc accttctcct ctcaggaag ctttttctc 480
gcgttatgtt tctcatccga atataagacg aacaaaaggt ttgtctgagg gcagagtgt 540
cccacctggg gcagggtgcc gtggcaggga agatgggggg ctcagagtcc atgtgttctc 600

catgtctgca gcctagaggc tggcccaggc tcagagggat gccacgggga aggcctccc 660
tgggttgtgg gtcctcataa cctgccccc agatcctctg cctatcaggt tcttgg 716

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

ggatttggag ataggggaga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

ccaagaacct gataggcaga

20