



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월20일
(11) 등록번호 10-1235454
(24) 등록일자 2013년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01) A01K 67/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-7022420
(22) 출원일자(국제) 2009년03월04일
심사청구일자 2010년10월07일
(85) 번역문제출일자 2010년10월07일
(65) 공개번호 10-2010-0128324
(43) 공개일자 2010년12월07일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/054045
(87) 국제공개번호 WO 2009/125637
국제공개일자 2009년10월15일
(30) 우선권주장
JP-P-2008-100138 2008년04월08일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
The Japanese Society Zootechnical Science
Annual Meeting abstract. 2007.
전체 청구항 수 : 총 4 항

(73) 특허권자
도꾸리쯔교세이호징 가가꾸 기쥬쯔 신키 기꼬
일본 사이따마켄 가와구찌시 혼쇼 4쵸메 1방 8고
갓코 호진 긴키 다이가쿠
일본국 오사카, 히가시 오사카시, 코와카에,
3-4-1
(72) 발명자
마츠모토, 카즈야
일본 와카야마켄 6496255 이와테시 니시안조
311-8
모리모토, 코우이치
일본 오사카후 5900138 사카이시 미나미쿠 카모타
니다이 2-3-3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박보현, 김성완, 장수길
심사관 : 이미옥

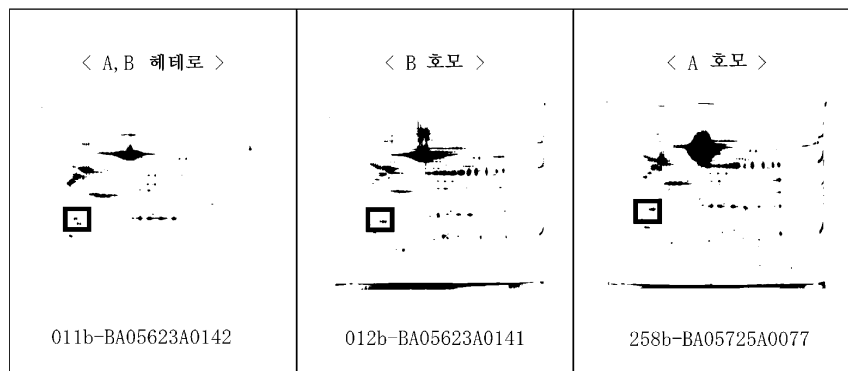
(54) 발명의 명칭 **소의 판별 방법, 판별된 소 및 소의 판별용 키트**

(57) 요약

본 발명은, 프로테옴 해석에 의해 육용우의 경제 형질에 관여하는 단백질을 동정하고, 이들 단백질을 바이오마커로서 유용한 경제 형질을 갖는 소 개체를 판별하는 소 개체의 판별 방법 및 이에 사용하는 소 개체의 판별용 키트를 제공한다.

본 발명의 소 개체의 판별 방법은, (1) 소로부터 체조직을 채취하는 채취 공정, (2) 채취한 체조직으로부터 전체 단백질을 추출하는 추출 공정, (3) 추출한 전체 단백질 중에 포함된 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 검출하는 검출 공정, (4) 검출한 아넥신 A5의 종류에 기초하여 소의 평균 지육 중량이 커지는지의 여부를 판별하는 판별 공정을 포함하는 방법이다. 또한, 아넥신 A5의 야생형 단백질, 그의 아이소폼 및 이들의 수식 단백질의 검출에는 이차원 전기 영동이나 항원 항체 반응을 이용한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이케가미, 하루카

일본 와카야마켄 6400341 와카야마시 소우자카 539

나카이, 쿄우헤이

일본 카나가와켄 2140035 카와사키시 타마쿠 나가
사와 2-3-5-303

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 소로부터 체조직을 채취하는 채취 공정,
- (2) 채취한 체조직으로부터 전체 단백질을 추출하는 추출 공정,
- (3) 추출한 전체 단백질 중에 포함된, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP33)인 아넥신 A5의 야생형 단백질, 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP37)인 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화 및 메틸화로부터 선택되는 화학 수식을 받은 상기 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 검출하는 검출 공정,
- (4) 검출 공정에서 아넥신 A5 단백질의 야생형 단백질, 그의 아이소폼 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 중 어느 한쪽만이 검출되었거나, A5 단백질의 야생형 단백질, 그의 아이소폼 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 양쪽이 검출되었는지를 판별하는 판별 공정을 포함하는 소의 판별 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 검출 공정에서 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP33)인 아넥신 A5의 야생형 단백질, 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP37)인 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화 및 메틸화로부터 선택되는 화학 수식을 받은 상기 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 전기 영동에 의해 검출하는 소의 판별 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 검출 공정에서 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP33)인 아넥신 A5의 야생형 단백질, 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP37)인 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화 및 메틸화로부터 선택되는 화학 수식을 받은 상기 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 항원 항체 반응에 의해 검출하는 소의 판별 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP33)인 아넥신 A5의 야생형 단백질 및 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화 및 메틸화로부터 선택되는 화학 수식을 받은 상기 아넥신 A5의 야생형 단백질의 수식 단백질 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 항체와,

서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되는 단백질(CaBP37)인 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼 및 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화 및 메틸화로부터 선택되는 화학 수식을 받은 상기 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼의 수식 단백질 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 소의 판별용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 지육(枝肉, carcass) 중량 등의 경제 형질이 우수한 소를 판별하는 소의 판별 방법, 판별된 소 및 이에 사용하는 소의 판별용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 육용우, 특히 일본 고유의 육용 전문종인 흑모화종우(黑毛和種牛)의 육종 개량은, 지금까지 축적된 표현형 정보와 혈통 정보에 기초한 통계 유전학적 해석을 기반으로 소의 유전적 능력을 추정하는 통계 유전학적 육종 개량 방법에 기초하여 행해지고 있다. 또한, 이 육종 개량 방법의 확립은, 흑모화종의 유전적 능력의 향상에 많은 공헌을 하고 있다.

[0003] 단, 이 통계 유전학적 육종 개량 방법은, 육용우 집단으로 갖는 우량 유전자형이 후대의 집단에 계승되는 확률을 추정하는 방법이며, 개개의 육용우가 갖는 지방 교잡, 지육 중량, 소갈비살 면적, 삼겹살 두께 등의 경제 형질에 대한 유전적 정보를 파악할 수는 없었다.

[0004] 또한, 경제 형질은 유전적 요인뿐만 아니라 환경의 영향을 받는 경우도 많기 때문에, 유전적 요인에 기초하여 우량한 개체를 엄격히 선발하는 것은 곤란하였다. 또한, 통계적 유전학적 방법에 기초한 육종 개량 방법은 소의 교배·비육 등의 프로세스를 필요로 하기 때문에, 육종에는 많은 비용과 시간이 걸렸다.

[0005] 따라서, 1980년대 후반부터 유전자를 이용한 육종 방법, 구체적으로는 육용우의 경제 형질 등의 양적 형질에 관여하는 유전자의 수나 이들의 연쇄 지도상에서의 위치를 밝히는 양적 형질 유전자좌(QTL) 해석이 행해지고 있다. 이 해석 방법은, 육용우의 경제 형질에 대한 책임 유전자의 동정에 획기적인 성과를 초래하는 것으로서 기대되고 있으며, 소 DNA 마커를 이용한 육종 방법의 개발을 목표로 한 연구가 진행되고 있다(비특허문헌 1 및 2를 참조).

[0006] 단, 이 방법은 클라우딘 16 결손증 등 열성 유전병의 원인 유전자의 동정에는 기여하고 있지만, 경제 형질에 관여하는 책임 유전자를 동정하고, 이것을 이용한 육용우의 육종 개량법의 확립에는 아직까지 이르지 못하였다.

[0007] 또한, 최근 경제 형질의 표현형에는 책임 유전자 뿐만아니라 그 유전자의 발현을 조절하는 유전자, DNA의 메틸화 등의 후성 유전학(epigenetics) 수식도 관여하고 있으며, 해석을 행할 때에는 이들에 대해서도 고려해야 한다고 생각되고 있다. 또한, QTL 해석은 적당한 교배친을 선택하는 것이 곤란하며, 가계 육성과 같은 프로세스를 필요로 하기 때문에, 육종에는 통계 유전학적 방법과 마찬가지로 많은 비용과 시간이 필요로 된다.

[0008] 한편, 현재 생명 과학 전체의 연구 흐름은, 계놈 연구 다음 단계의 연구(포스트 계놈 연구), 구체적으로는 트랜스크립톰 해석, 프로테오믹스 해석, 메타볼로믹스 해석 등의 해석 수법을 이용한 연구에 이목이 집중되고 있으며, 이 중에서도 망라적·계통적으로 단백질의 기능이나 그의 관련성을 분석하는 프로테오믹스 해석이 주목을 받아 연구 개발이 진행되고 있다.

[0009] 그 이유로서, 유전자의 최종 산물인 단백질은 직접 생리학적 기능을 발휘하는 분자이며, 그 발현량이나 분자 수식에 의해 변화된 단백질이 세포·조직·개체 레벨로 생리 기능에 직접적으로 관여하고 있다는 것을 들 수 있다. 또한, 별도의 이유로서, 프로테오믹스 해석에서는 교배·사육이나 가계 육성 등 시간과 비용이 드는 프로세스를 필요로 하지 않는다는 것을 들 수 있다.

[0010] 프로테오믹스 해석은 다양한 분야로 응용이 확대되고 있지만, 특히 의학 분야에서의 연구가 진행되고 있다. 예를 들면, 유전자의 변이와 병태의 인과 관계가 적은 유전자 질환 이외의 질환에서는, 세포 내 프로세스의 단백질 기능의 변화가 발증에 직접적인 원인이 된다고 생각되고 있기 때문에, 프로테오믹스 해석에 의해 질환에서 변화되는 단백질을 파악하여, 질환의 유무나 병태를 진단하기 위한 바이오마커의 동정과 개발이 활발히 행해지고 있다(특허문헌 1 내지 4 및 비특허문헌 3을 참조).

[0011] 그러나, 프로테오믹스 해석의 축산 분야로의 응용은 매우 지연되고 있으며, 육용우의 경제 형질에 관여하는 단백질의 동정이나, 이들 단백질을 이용하여 유용한 경제 형질을 갖는 소를 판별하는 것은 현재까지도 행해지고 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 일본 특허 공개 제2006-308533호 공보
- (특허문헌 0002) 일본 특허 공개 제2007-93597호 공보
- (특허문헌 0003) 일본 특허 공개 제2007-139742호 공보
- (특허문헌 0004) 일본 특허 공개 제2007-523346호 공보

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 동물 유전 연구소 연보(제11호), 사단 법인 축산 기술 협회 부속 동물 유전 연구소 발행, 2004년
- (비특허문헌 0002) 육용우 유전 자원 활용 체제 정비 사업 보고서, 사단 법인 축산 기술 협회 발행, 2005년
- (비특허문헌 0003) "질환 프로테오믹스의 최전선", (주)메디칼도 발행, 2005년

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 따라서, 본 발명은, 프로테오믹 해석에 의해 육용우의 경제 형질에 관여하는 단백질을 동정하고, 이들 단백질을 바이오마커로서 유용한 경제 형질을 갖는 소를 개별적으로 판별하는 방법, 이 방법에 의해 판별된 소 및 이에 사용하는 소의 판별용 키트를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 소의 경제 형질에 관계된 바이오마커로서 이용 가능한 단백질을 탐색하기 위해, 이차원 전기 영동, 질량 분석, 통계적 수법에 의한 데이터 해석을 병용하여, 소의 백색 지방 조직에 포함된 단백질과 그 소의 경제 형질의 상관을 망라적으로 조사하였다. 그 결과, 특정한 단백질의 발현과 지육 중량간에 유의한 상관성이 있다는 것을 발견하여, 본 발명을 완성시켰다.
- [0016] 즉, 본 발명의 제1항에 기재된 소의 판별 방법은 (1) 소로부터 체조직을 채취하는 채취 공정, (2) 채취한 체조직으로부터 전체 단백질을 추출하는 추출 공정, (3) 추출한 전체 단백질 중에 포함된 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 검출하는 검출 공정, (4) 검출 공정에서 아넥신 A5 단백질의 야생형 단백질, 그의 아이소폼 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 중 어느 한쪽만이 검출되었거나, A5 단백질의 야생형 단백질, 그의 아이소폼 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 양쪽이 검출되었는지에 기초하여, 체조직을 채취한 소의 평균 지육 중량이 큰지의 여부를 판별하는 판별 공정을 포함하는 방법이다.
- [0017] 여기서, 아넥신 A5(Annexin A5, Annexin V 또는 ANX5라고도 불림)란, 칼슘/인지질 결합 단백질인 아넥신 패밀리에 속하고, 세포 신전 촉진 작용, 성선 자극 호르몬 생산 촉진 작용, 아포토시스 억제 작용 등 다양한 생리 현상에 관계한다는 것이 이미 알려져 있는 단백질이다.
- [0018] 또한, 아넥신 A5의 야생형 단백질이란, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되어 있는 단백질(CaBP33)을 말한다. 또한, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼이란, 야생형 단백질과 기능이 전혀 동일하지 않고, 아미노산 서열도 조금 상이한, 구체적으로는 서열 번호 2에 기재된 아미노산 서열에 의해 구성되어 있는 단백질(CaBP37)을 말한다. 또한, 수식 단백질이란, 당쇄 수식, 인산화, 아세틸화, 메틸화 등의 화학 수식을 받은 단백질을 말한다.
- [0019] 본 발명의 제2항에 기재된 소의 판별 방법은 제1항에 기재된 소의 판별 방법이며, 검출 공정에서 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식 단백질을 전기 영동에 의해 검출하는 방법이다.
- [0020] 본 발명의 제3항에 기재된 소의 판별 방법은 제1항에 기재된 소의 판별 방법이며, 검출 공정에서 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 아넥신 A5의 야생형 단백질 또는 그의 아이소폼의 수식

단백질을 항원 항체 반응에 의해 검출한다.

[0021] 본 발명의 제4항에 기재된 소와 지육은, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 소의 판별 방법에 의해 판별된 소이다. 또한, 제5항에 기재된 소는, 제4항에 기재된 소의 자손 또는 그의 클론소이다. 또한, 제6항에 기재된 지육은, 제4항 또는 제5항에 기재된 소의 지육이다.

[0022] 본 발명의 제7항에 기재된 소의 판별용 키트는, 아넥신 A5의 야생형 단백질 및 그의 수식 단백질 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 항체와, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼 및 그의 수식 단백질 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 소의 판별 방법 및 판별용 키트를 이용함으로써, 지육 중량이 큰 소 개체를 용이하게 판별할 수 있었다. 이 소의 판별 방법에 의해 지육 중량이 큰 소와 작은 소간의 지육 중량의 차는 약 20 내지 36 kg이고, 지육의 단가를 평균 2000 엔/kg으로 했을 때 한 마리당 4만엔 내지 7만엔의 경제 효과가 발생하고, 일반적인 비육농가(50 내지 100 마리)에서 200 내지 700만엔의 경제 수입의 상승을 기대할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 이에 따라, 축산에 있어서의 생산성을 향상시키고, 종사 농가의 생활을 보다 향상·안정시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] [도 1] 소의 백색 지방 조직의 전체 단백질을 이차원 전기 영동한 결과를 나타낸 도면이다.

[도 2] 도 1의 부분 확대도이다.

[도 3] 소의 백색 지방 조직이 포함하는 아넥신 A5의 타입과 그 지육 중량의 관계를 나타낸 산포도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 1. 판별 방법

[0026] 본 발명의 소의 판별 방법은 (1) 소로부터 체조직을 채취하는 채취 공정, (2) 채취한 체조직으로부터 전체 단백질을 추출하는 추출 공정, (3) 추출한 전체 단백질 중에 포함된 아넥신 A5 관련 단백질을 검출하는 검출 공정, (4) 검출한 아넥신 A5의 종류에 기초하여 소의 평균 지육 중량이 커지는지의 여부를 판별하는 판별 공정을 포함하는 방법이다. 이하, 각 공정 등에 대하여 상세히 설명한다.

[0027] (1) 채취 공정

[0028] 채취 공정은 체조직을 채취하는 공정이며, 채취하는 체조직으로는 아넥신 A5를 발현하고 있는 체조직이면 상관없고, 구체적으로는 백색 지방 조직, 근육 조직, 피부 조직, 혈액 등을 들 수 있다. 이 중에서도, 재료 채취시에 검체로의 침습이 적은 혈청이 바람직하다.

[0029] 체조직의 채취 방법은, 공지된 방법이면 특별한 한정 없이 사용할 수 있다. 구체적으로는, 주사에 의한 흡인, 국소 마취하에서의 외과 수술, 지방 흡인법을 들 수 있다. 또한, 지방 흡인법이란, 미용 성형 외과 등에서 일반적으로 행해지고 있는 방법이며, 구체적으로는 초음파 지방 흡인, 캐놀러 등을 사용한 파워드 리포석션, 실린지 흡인 등에 의한 방법을 예시할 수 있다.

[0030] (2) 추출 공정

[0031] 추출 공정은 체조직으로부터 전체 단백질을 추출하는 공정이며, 후술하는 검출 공정에서 사용할 수 있는 양과 질의 전체 단백질을 추출할 수 있는 공지된 방법이면 특별한 한정 없이 사용할 수 있다. 구체적으로는 체조직을 적당한 pH를 갖는 완충액에 넣어 균질화기에 의해 조직, 세포를 파쇄하고, 원심 분리하여 상청을 얻는 방법 등을 들 수 있다. 또한, 필요에 따라 효소 처리나 유기 용매에 의한 처리를 행할 수도 있다.

[0032] (3) 검출 공정

[0033] 검출 공정은, 추출한 전체 단백질 중에 포함된 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 수식 단백질을, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼의 수식 단백질을 1) 전기 영동, 2) 항원 항체 반응 등을 사용하여 검출하는 공정이다. 이어서, 검출 공정에 대하여 상세히 설명한다.

- [0034] 1) 전기 영동에 의한 검출
- [0035] 전기 영동에 의한 검출은 단백질의 전하나 등전점의 차이를 이용하여 단백질을 분리한 후, 아넥신 A5의 야생형 단백질 등을 검출하는 공지된 방법인 것이 바람직하다. 구체적으로는, 하기의 (a) 일차원 전기 영동에 의한 검출 및 (b) 이차원 전기 영동에 의한 검출을 들 수 있다.
- [0036] (a) 일차원 전기 영동에 의한 검출
- [0037] 일차원 전기 영동에 의한 검출은, 예를 들면 네이티브 겔이나 SDS 폴리아크릴아미드 겔을 이용하는 전기 영동에 의해 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 니트로셀룰로오스막 등에 전사한 후, 항체를 사용하여 단백질을 검출하는 웨스턴블로팅법에 의해 행한다.
- [0038] 또한, 상기 항체로서는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 단일 가닥 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 2개의 에피토프를 동시에 인식할 수 있는 이기능성 항체 등을 예시할 수 있다. 또한, 이들 항체는 하이브리도마법의 관용의 프로토콜을 사용하여, 인간 이외의 동물에 아넥신 A5의 야생형 단백질, 그의 아이소폼, 그의 수식 단백질, 이들의 단편을 투여함으로써 생산할 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 항체는 FITC(플루오레세인이소시아네이트) 또는 테트라메틸로다민이소시아네이트 등의 형광 물질이나, ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³⁵S 또는 ³H 등의 라디오아이소토프나, 알칼리 포스파타아제, 피옥시다아제, β-갈락토시다아제 또는 피코에리트린 등의 효소로 표지할 수도 있고, 상기 항체와 그린 형광 단백질(GFP) 등의 형광 발광 단백질 등을 융합시킬 수도 있다.
- [0040] (b) 이차원 전기 영동에 의한 검출
- [0041] 이차원 전기 영동에 의한 검출은, 이차원 전기 영동과 그 영동상의 분석에 의해 행한다. 본 발명에서 사용하는 이차원 전기 영동법은, 등전점과 분자량이라는 단백질이 갖는 2개의 물성을 이용하여 분리하는 방법이면 특별한 제한 없이 공지된 방법을 이용할 수 있다. 구체적으로는 캐필러리 겔이나 스트립 겔 등을 사용하여 일차원제의 등전점 전기 영동을 행하고, 영동 후의 겔을 SDS-폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE) 또는 아가로오스 겔에 놓고, 등전점 전기 영동의 전개 방향에 대하여 직각의 방향으로 전기 영동함으로써 행하는 방법을 들 수 있다.
- [0042] 이차원 전기 영동상의 분석은, 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB), 사이프로 루비(SYPRO Ruby)(등록 상표), 은 염색법 등의 공지된 방법에 의해 염색하고, 염색한 겔의 화상을 스캐너나 CCD 카메라에 의해 컴퓨터에 저장하고, 저장한 화상의 노이즈의 감소나 백 그라운드의 보정을 행한 후, pH 4.0 내지 5.0, 분자량 30 내지 40 KDa 부근에 나타나는 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼 및 이들 단백질의 수식 단백질의 단백질 스폿을 검출함으로써 행한다.
- [0043] 2) 항원 항체 반응에 의한 검출
- [0044] 항원 항체 반응에 의한 검출은, 아넥신 A5의 야생형 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼 및 이들 단백질의 수식 단백질과 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 공지된 면역학적 검출 방법인 것이 바람직하다. 구체적으로는 엘리사(ELISA)법, RIA법, 형광 항체법, 면역 조직 화학법 등을 들 수 있다. 또한, 이들에 사용하는 항체는 상기 일차원 전기 영동에서 사용한 것과 동일하다.
- [0045] (4) 판별 공정
- [0046] 검출 공정에서 검출된 아넥신 A5의 종류에 기초하여 채취한 소의 경제 형질을 판별하는 공정이다. 구체적으로는 아넥신 A5의 야생형 단백질(CaBP33), 그의 아이소폼(CaBP37) 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 중 어느 한 쪽만이 검출된 경우(호모의 경우)에는 채취한 소의 평균 지육 중량이 커진 것으로 판별한다. 반대로, 아넥신 A5의 야생형 단백질 및 그의 아이소폼 양쪽, 및 이들에서 유래하는 수식 단백질 양쪽이 검출된 경우(헤테로의 경우)에는 소의 평균 지육 중량이 작아진 것으로 판별한다.
- [0047] 2. 소
- [0048] 본 발명의 소는 본 발명의 판별 방법에 의해 판별된 소, 그의 자손, 그의 클론소이다. 또한, 자손, 클론소는 유성 생식 및 무성 생식, 예를 들면 1개의 수정란을 2 내지 4 분할하고, 대리모 소에게 이식하여 소를 생산하는 "수정란을 분할하는 방법", 수정란이나 체세포의 핵을 미수정란에 이식하여 제조한 "클론란"을 대리모 소에 이식하여 소를 생산하는 "핵 이식에 의한 방법" 등의 공지된 방법에 의해 얻어진다.
- [0049] 3. 소의 지육

- [0050] 본 발명의 소의 지육은, 본 발명의 판별 방법에 의해 판별된 소, 그의 자손, 그의 클론소의 지육이다.
- [0051] 4. 판별용 키트
- [0052] 항원 항체 반응에 의한 아넥신 A5의 야생형 단백질, 아넥신 A5의 야생형 단백질의 아이소폼 및 이들 단백질의 수식 단백질의 검출에 필요한 항체나 완충액 등은, 시판된 것을 개별적으로 구입하여 사용할 수도 있다. 그러나, 이들을 조합하여 미리 키트로 해두면, 각 구성 요소를 개별적으로 구입하는 시간을 생략하여 항원 항체 반응에 의한 검출을 용이하게 행할 수 있다. 또한, 단백질의 추출에 필요한 완충액 등도 함께 키트화해두면, 소 개체의 경제 형질의 판별을 보다 용이하게 행할 수 있다.
- [0053] 이하, 본 발명에 대하여 실시예에 기초하여 보다 상세히 설명하지만, 이하의 실시예에 의해 본 발명의 특허 청구의 범위는 어떠한 의미에 있어서도 제한되지 않는다.
- [0054] 실시예 1
- [0055] 1. 바이오마커로서 이용 가능한 단백질의 탐색
- [0056] 혈통·육질을 이미 알고 있는 복수의 소 백색 지방 조직 샘플로부터 전체 단백질(프로테옴)을 추출하여, 각 개체의 육질 등의 형질과 프로테옴을 상관 분석함으로써 바이오마커로서 이용 가능한 단백질을 탐색하였다. 이하, 이에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 특별히 기재하지 않는 한, 이하의 %는 부피%를 의미한다.
- [0057] (1) 단백질 추출
- [0058] 소 백색 지방 조직 샘플에는 혈통, 지육 중량, 소갈비살 면적, 삼겹살의 두께 등의 경제 형질이 판명된 히다우 개체로부터 채취되며, 기후현 축산 시험장에 냉동 보존되어 있는 백색 지방 조직 샘플 약 150 검체를 사용하였다.
- [0059] 전체 단백질은 다음과 같이 하여 추출하였다. 우선, 지방 조직 1 g에 추출 용액(420 mg/ml 요소, 140.3 mg/ml 티오요소, 40 mg/ml CHAPS, 0.5 % IPG 완충액(IPG 버퍼 pH 3-11 NL, GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조), 0.05 % 트리부틸포스핀(이하, TBP로 생략함), 0.1 mg/ml 브로모페놀 블루(이하, BPB로 생략함)를 포함하는 용액에 단백질 분해 효소 저해제(킴플리트 미니(Complete Mini), 로슈(Roche)사 제조)를 판매원 설명서의 표기에 따라 첨가한 것) 1 ml를 첨가하여 균질화하였다.
- [0060] 이어서, 균질화한 현탁액을 원심 분리하여 침전을 제거하고, 그 상청을 회수하여 샘플로 하였다. 마지막으로, 프로틴 어세이(바이오래드사 제조)와 흡광 광도계(UV 미니(mini) 1240, 시마즈 세이사꾸쇼사 제조)를 사용하여, 브래드포드(Bradford)-HCl 변법(문헌 [Electrophoresis 1985, 6, 559-563.] 참조)에 의해 전체 단백질 농도를 측정하였다. 측정 결과 지방 조직 1 g으로부터 평균 3.5 mg의 단백질을 추출하였다는 것을 알 수 있었다. 또한, 측정에서는 표준 단백질로서 소 γ 글로블린을 사용하여 595 nm의 흡광도를 측정하였다.
- [0061] (2) 이차원 전기 영동
- [0062] 1) 일차원짜(등전점 전기 영동)
- [0063] (1)에서 얻은 샘플을 팽윤액(420 mg/ml 요소, 140.3 mg/ml 티오요소, 40 mg/ml CHAPS, 0.5 % IPG 완충액(IPG 버퍼 pH 3-11 NL(GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조), 0.05 % TBP, 0.1 mg/ml BPB를 포함함)에 단백질 농도가 0.375 mg/ml가 되도록 혼화·희석하였다. 샘플을 포함하는 팽윤액 400 μ l(단백질 150 μ g)를 팽윤 트레이(GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조)에 주입하고, 그 상측으로부터 드라이 스트립 겔(임모빌린 드라이 스트립(Immobiline DryStrip) pH 3-11 NL 18 cm, GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조)로 덮었다.
- [0064] 드라이 스트립의 건조를 방지하기 위해, 드라이 스트립 위에 미네랄 오일(임모빌린 드라이 스트립 커버 플루이드, GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조)을 중층함과 동시에, 팽윤 트레이에 커버하여 6 시간 이상 정치하고, 드라이 스트립을 팽윤시켰다. 드라이 스트립을 멀티포르(Multiphor) II(GE 헬스 케어 가부시끼가이샤 제조)에 세팅하고, 15 $^{\circ}$ C에서 26.8 kWh로 등전점 전기 영동하였다.
- [0065] 2) 이차원짜(SDS-PAGE)
- [0066] 등전점 전기 영동이 완료된 드라이 스트립을 SDS 평형화 완충액 (a)(6.057 mg/ml 트리스-HCl(pH 8.8), 360.4 mg/ml 요소, 30 % 글리세롤, 20 mg/ml SDS, 10 mg/ml DTT를 포함함)에 15분간 침투하고, SDS 평형화 완충액 (a)를 버리고 SDS 평형화 완충액 (b)(6.057 mg/ml 트리스-HCl(pH 8.8), 360.4 mg/ml 요소, 30 % 글리세롤, 20 mg/ml SDS, 25 mg/ml 요오도아세트아미드를 포함함)에 15분간 침투하여 평형화하였다. 평형화한 드라이 스트립

을 SDS-PAGE 겔(겔 농도 10 %)의 상부에 놓았다.

- [0067] 슬라브 전기 영동층 장치(테트라-200, 아나텍 가부시끼가이샤 제조)에 겔을 세팅하고, 영동 버퍼(3 mg/mg 트리스, 14.4 mg/ml 글리신, 1 mg/ml SDS)를 채워 겔 1매당 30 mA로 4 시간 동안 BPB 밴드가 겔 하단에 보일 때까지 영동하였다.
- [0068] 3) 염색
- [0069] 전기 영동이 완료된 겔을 플라스틱 용기에 옮기고, 겔이 충분히 잠기는 양의 고정액(10 % 메탄올, 7 % 아세트산 수용액)을 첨가하여 실온에서 약 30분간 조용히 진탕하였다. 고정액을 새로운 것으로 교환하고, 추가로 실온에서 약 30분간 조용히 진탕하였다.
- [0070] 플라스틱 용기로부터 고정액을 버리고 사이프로 루비 염색액(등록 상표, 몰레큘러 프로브즈(Molecular Probes)사 제조)을 첨가하며, 플라스틱 용기 전체를 차광하기 위해 알루미늄 호일로 덮었다. 플라스틱 용기를 실온에서 약 12 시간 동안 조용히 진탕하였다.
- [0071] 플라스틱 용기로부터 염색액을 제거하고 겔이 충분히 잠기는 양의 탈색액(10 % 에탄올)을 첨가하며, 플라스틱 용기 전체를 차광하기 위해 알루미늄 호일로 덮었다. 플라스틱 용기를 실온에서 약 30분간 조용히 진탕하고, 탈색액을 새로운 것으로 교환하였다. 또한, 염색한 겔은 후술하는 화상 해석에 사용할 때까지 탈색액 중에서 보존하였다.
- [0072] (3) 화상 해석
- [0073] 염색한 겔로부터 겔 화상 촬영 장치(알파 이미저, 알파 이노텍사 제조)를 사용하여 영동 화상을 저장하였다. 저장한 영동 화상의 일부를 도 1에 나타냄과 동시에, 도 1의 사각으로 둘러싸인 부분을 확대한 것을 도 2에 나타낸다. 또한, 영동 화상 아래에 기재한 영숫자는 각 개체의 식별 부호이다.
- [0074] 저장한 화상은 화상 해석 소프트웨어(프로게네시스(Progenesis) TT900, 퍼킨 엘머(PerkinElmer)사 제조)를 사용하여 화상의 왜곡을 보정하고, 다른 화상 해석 소프트웨어(프로게네시스 PG220, 퍼킨 엘머사 제조)를 사용하여 단백질 스폿의 검출, 겔 사이(개체 사이)에서의 단백질 스폿의 매칭, 각 스폿의 정량, 겔 사이에서의 정량값 비교를 행하였다.
- [0075] 실시예 2
- [0076] 2. 단백질의 동정
- [0077] 도 2의 원으로 둘러싼 단백질 스폿을 포함하는 복수의 단백질 스폿(약 350 스폿)에 대하여, 이차원 전기 영동하여 염색한 겔로부터 추출하고, 질량 분석법을 이용하여 동정하였다. 구체적으로는 이하의 절차로 행하였다.
- [0078] (1) 겔로부터의 추출
- [0079] 겔로부터 특정한 단백질 스폿을 포함하는 부분을 핀셋으로 잘라내고, 잘라낸 겔을 96 구멍 MTP 플레이트의 웰에 넣어 탈색액 A(메탄올과 100 mM 탄산수소암모늄 수용액을 등량 혼합한 액체) 0.1 ml 중에 20분간 3회 침지하였다. 탈색액 A를 제거하고, 100 % 아세토니트릴 0.1 ml 중에 5분간 침지하였다. 아세토니트릴을 증발시키고, 겔을 완전히 건조시켰다. 건조시킨 겔에 트립신 용액(0.83 µg/ml 트립신(시퀀싱 그레이트 트립신(Sequencing grade Trypsin), 프로메가(Promega)사 제조), 25 mM 탄산수소암모늄) 30 µl를 첨가하고, 30 °C에서 밤새 반응하여 추출액을 얻었다.
- [0080] (2) 탈염
- [0081] 마이크로 피펫의 선단에 짐팁(ZipTip) µ C18 피펫칩(등록 상표, 니혼 밀리포어사 제조)을 장착하고, 90 % 아세토니트릴 수용액을 수회 피펫팅하여 피펫칩을 세정한 후, 0.1 % 트리플루오로아세트산(이하, TFA로 생략함) 수용액을 수회 피펫팅하여 피펫칩을 평형화하였다. 세정·평형화한 피펫칩으로 추출액을 수회 피펫팅하여, 추출액에 포함된 단백질을 피펫칩 중의 수지에 결합시켰다. 이 피펫칩으로 세정액(0.1 % TFA 수용액)을 수회 피펫팅하여, 피펫칩에 남아 있는 염분을 세정 제거하였다. 마지막으로, 이 피펫칩으로부터 매트릭스 용액(2 mg/ml CHCA, 0.1 % TFA, 70 % 아세토니트릴을 포함하는 용액) 1 µl에서 단백질을 용출시켰다.
- [0082] (3) 질량 분석
- [0083] 단백질을 포함하는 용출액 1 µl를 MALDI-TOF/TOF형 질량 분석계(어플라이드 바이오시스템즈 4700 프로테오믹스 애널리라이저(Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer), 어플라이드 바이오시스템즈사 제조)의 타겟 플레

이트에 첨가하고, 상온에서 정치하여 결정화시켜 MS 스펙트럼과 MS/MS 스펙트럼을 측정하였다.

[0084] 실시예 3

[0085] 3. 데이터 분석

[0086] 이차원 전기 영동의 결과에 의해 얻어진 단백질 스폿의 정량값은, 프로테오믹 해석용 실험실 정보 관리 시스템(바이오프리즘(BIOPRISM), 니혼 덴끼 가부시끼가이샤 제조)으로 관리한 후, 각 형질 데이터(개체 데이터, 혈통 데이터 등 7개 항목, 육질 데이터 22개 항목)와 함께 데이터 베이스화하여 각 데이터간의 상관관계를 분석하였다.

[0087] 또한, 질량 분석에 의해 얻어진 MS 스펙트럼과 MS/MS 스펙트럼의 데이터를 MASCOT(매트릭스 사이언스(Matrix Science사)에 입력하고, 스위스 프로트(Swiss Prot)(<http://au.expasy.org/sprot/>)나 NCBIInr(<http://au.expasy.org/sprot/>) 등의 공공의 단백질 서열 데이터 베이스에 대하여 펩티드 매스 핑거프린트(PMF) 분석, MS/MS 이온 검색 분석하여 단백질의 동정을 시도하였다. 또한, 얻어진 결과를 상기 데이터 베이스에 입력하였다.

[0088] 데이터 베이스에 의한 데이터 분석의 결과, pH 4.0 내지 5.0, 분자량 30 내지 40 kDa 부근에 있는 단백질 스폿, 구체적으로는 도 2의 원으로 둘러싼 2개의 단백질 스폿 A, B를 포함하는 복수의 단백질 스폿이 유용 형질 중 하나인 지육 중량과 상관관계가 있다는 것을 알 수 있었다.

[0089] 또한, 상기 pH 4.0 내지 5.0, 분자량 30 내지 40 kDa 부근에 있는 단백질 스폿이 아넥신 A5의 야생형 단백질(CaBP33)과 그의 아이소폼(CaBP37)이라는 것을 알 수 있었다. 또한, 도 2의 원으로 둘러싼 단백질 스폿 중, 단백질 스폿 A가 아넥신 A5의 야생형 단백질(CaBP33)의 아이소폼(CaBP37)이고, 단백질 스폿 B가 야생형 단백질(CaBP33)이라는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에 기초하여, 아넥신 A5와 지육 중량의 상관관계에 대하여 표 1 및 도 3에 나타낸다.

표 1

아넥신 A5의 종류	A, B 헤테로	B 호모	A 호모	합계
거세 숫소와 암소의 혼합 (마릿수)	91	81	14	186
거세 숫소만 (마릿수)	70	69	11	150
거세 숫소의 평균 지육 중량 (kg)	421.47	441.08	457.96	438.17 (전체 평균)

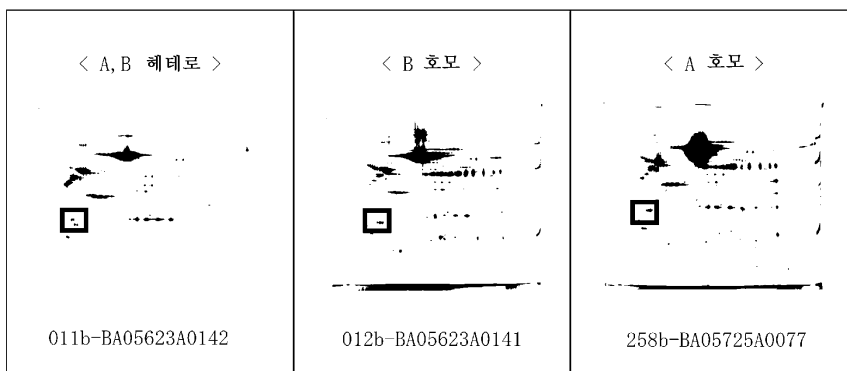
[0090]

[0091] 표 1 및 도 3으로부터, 아넥신 A5의 야생형(CaBP33: B)과 그의 아이소폼 A(CaBP37: A) 중 어느 하나만을 갖는 개체(표 1 중의 A 호모, B 호모)와, 야생형과 아이소폼을 모두 갖는 개체(표 1 중의 A, B 헤테로)를 비교하면, 거세 숫소의 평균 지육 중량에 약 20 내지 36 kg의 통계학적으로 유의한 차(t 검정, p<0.05)가 있었다.

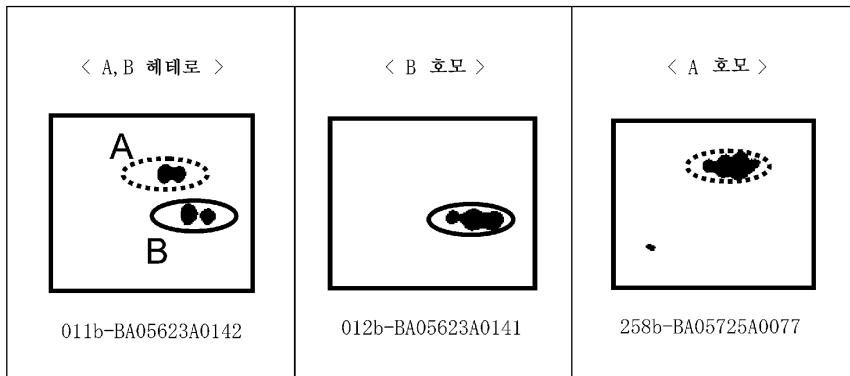
[0092] 이것은 지방 조직에 포함된 아넥신 A5의 종류를 조사함으로써, 소의 지육 중량을 검정할 수 있는 가능성을 나타내고 있다. 즉, 아넥신 A5는 소의 지육 중량을 검정할 때의 바이오마커로서 사용할 수 있는 가능성이 있다는 것을 나타내고 있다.

도면

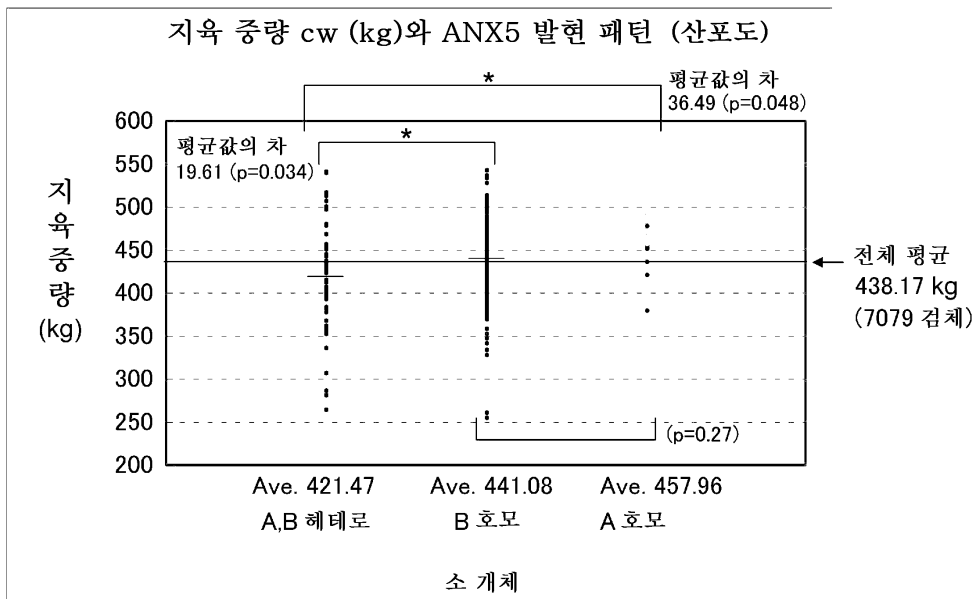
도면1



도면2



도면3



p --- 유의 확률 (P < 0.05에서 5% 수준으로 유의차 있음)
 * --- 5% 수준으로 유의차 있음

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Japan Science and Technology Agency
Kinki University
- <120> Method and kit for screening of cows, and screened cows
- <130> RJ009P38US(PCT)
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 320

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Ala Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu

1 5 10 15

Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr

20 25 30

Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln

35 40 45

Arg Gln Glu Ile Ala Val Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu

50 55 60

Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile

65 70 75 80

Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys

85 90 95

His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile

100 105 110

Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr

115 120 125

Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr

130 135 140

Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg

145 150 155 160

Asp Pro Asp Ala Arg Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln

165 170 175

Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys

180 185 190

Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg Val

195 200 205

Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile

210 215 220

Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val
 225 230 235 240
 Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr
 245 250 255
 Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Val
 260 265 270
 Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg
 275 280 285
 Lys Asn Phe Gly Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser
 290 295 300
 Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp
 305 310 315 320
 <210> 2
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 2
 Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Ala Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu
 1 5 10 15

 Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr
 20 25 30
 Asp Glu Glu Thr Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln
 35 40 45
 Arg Gln Glu Ile Ala Val Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu
 50 55 60
 Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile
 65 70 75 80

 Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys
 85 90 95
 His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile
 100 105 110
 Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Glu Gln Val Tyr

115	120	125			
Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr					
130	135	140			
Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg					
145	150	155	160		
Asp Pro Asp Ala Arg Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln					
	165	170	175		
Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys					
	180	185	190		
Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg Val					
195	200	205			
Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile					
210	215	220			
Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val					
225	230	235	240		
Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr					
	245	250	255		
Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Val					
	260	265	270		
Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Tyr Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg					
275	280	285			
Lys Asn Phe Gly Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser					
290	295	300			
Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Glu Asp Asp					
305	310	315	320		