

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )

농축산물안전유통소비기술개발사업  
2021년도 최종 보고서

발간등록번호
11-1543000-003547-01

현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정  
시스템 개발

2021.05.27

주관연구기관 / 티엔에스(주)  
참여연구기관 / 충북대학교  
참여연구기관 / (주)노블바이오

농림축산식품부  
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "현장진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템 개발"(개발  
기간 : 2018. 04. ~ 2020 . 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021.05.21

주관연구기관명 : 티엔에스(주) (대표자) 김 봉 석  
협동연구기관명 : ㈜노블바이오 (대표자) 백 계 승  
협동연구기관명 : 충북대학교 (대표자) 김 관 석



주관연구책임자 : 김 봉 석  
협동연구책임자 : 백 계 승  
협동연구책임자 : 김 관 석

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	318015 -03	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26.~2 020.12.31	단 계 구 분	(1단계)/ (1단계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	축산물 안전생산유통 기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	현장진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템 개발			
연구책임자	김 봉 석	해당단계 참여연구원 수	총: 50 명 내부: 50 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 825,000 천원 민간: 221,690 천원 계: 1,046,690 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 50 명 내부: 50 명 외부: 0 명	총 연구개발 비	정부: 825,000 천원 민간: 221,690 천원 계: 1,046,690 천원
연구기관명 및 소속부서명	티엔에스(주)			참여기업명 (주)노블바이오 충북대학교	
국제공동연구 위탁연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	1	6	1								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

(요약)쇠고기를 채취·전처리하는 컬렉터와, 핵산추출부터 검출까지 일체화 된 필름기반 분자진단칩을 이용하여, 60분 내에 주요 품종(황우, 칩소, 흑우)을 판별하는 현장형 분자진단 통합시스템 플랫폼 개발	보고서 면수
--	--------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>쇠고기를 채취·전처리하는 컬렉터와, 핵산추출부터 검출까지 일체화된 필름기반 분자진단칩을 이용하여, 60분 내에 주요 품종(황우, 칩소, 흑우)을 판별하는 현장형 분자진단 통합시스템 플랫폼 개발</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>■티엔에스(주)                  - 한우, 흑우, 칩소 판별 키트 개발 완료                  - 현장진단형 한우 유전자 판별칩 개발 완료                  - 현장 진단형 신속 판별 시스템 개발 완료                  - 연구 기반 관련 기술 특허 출원</p> <p>■(주)노블바이오                  - 쇠고기의 검체 특성을 고려하여 현장에서 정량적 채취 Scraper swab을 개발                  - 제반 실험결과를 토대로 특허를 출원하였음.(출원번호 : 10-2019-0134124)                  - 한국유전자정보원의 검증을 토대로 Scraper swab과 신속하게 DNA를 추출할 수 있는 Lysis buffer를 활용하여 현장검증용(POCT) Kit를 제작 하였음.</p> <p>■충북대학교                  - 칩소간 교배에서의 후대 모색발현 차이와 한우와 제주흑우 교배에서 생산된 후대에서 모색발현 차이를 활용하여 한우와 칩소, 흑우의 모색을 결정하는 유전인자가 소 염색체 18번 MC1R 유전자 조절좌위라는 것을 밝혀냄                  - 한우, 칩소, 흑우의 모색을 결정하는 유전좌위를 간편하고 정확하게 확인할 수 있는 단일 유전자 마커를 개발함으로써, 현장진단의 판별기기 개발에 적용할 수 있도록 함</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; text-align: center;"> <p>검체 채취도구</p> <p>한우 판독 키트</p> <p>한우 판독 시스템</p> </div>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>(전처리기술)                  - 개발된 Scraper swab을 기타 육류의 검체 채취 도구로 응용 가능                  - 매출의 신장으로 인한 경제적 파급효과를 기대할 수 있음.</p> <p>(판독 키트)                  - PNA 기반 한우, 흑우, 칩소 판독 가능한 키트 개발로 한우 종자 보호 및 원산지 표시 위반 사례 검사 가능</p> <p>(판독 시스템)                  - 랩온어칩 기반 유전자 판독 시스템을 개발함으로써 비전문가도 판독이 가능함 (한우 마커 개발)                  - 한우, 흑우, 칩소에 대한 유전 마커를 개발함으로써 한우에 대한 우수성 홍보에 활용 가능</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>한우</p>	<p>유전물질</p>	<p>원산지</p>	<p>판별</p>	<p>혈통</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Hanwoo</p>	<p>DNA</p>	<p>Origin</p>	<p>Distinguish</p>	<p>Pedigree</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
1.1 연구개발 목적	
1.2 세부 목적	
1.3 연구개발 필요성	
1.4. 연구개발 대상의 국내·외 현황	
1.5 연구개발 범위	
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	26
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	125
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	139

<별첨> 연구개발보고서 초록, 주관연구기관의 자체평가의견서, 연구결과활용계획서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1.1. 연구개발 목적

- 쇠고기를 채취·전처리하는 컬렉터와, 핵산추출부터 검출까지 일체화된 필름기반 분자진단칩을 이용하여, 60분 내에 주요 품종(황우, 칩소, 흑우)을 판별하는 현장형 분자진단 통합시스템 플랫폼을 개발



그림 1. 쇠고기 품종판별을 위한 PNA기반 현장형 분자진단 플랫폼

## 1.2. 세부목표

- 미세유체기술을 이용하여 시료전처리와 핵산 증폭 및 판독 전 과정을 자동으로 진행하여 원산지 단속 현장에서 비전문가가 신속하게 쇠고기의 원산지를 판별하는 분자진단 자동화시스템 개발
  - 미세유체칩에서 핵산을 30분 이내에 추출하는 시료전처리기술 개발
  - 미세유체 제어기술을 통한 유전자 이송 기술 개발
  - 필름 기반 미세유체칩을 이용하여 1시간 이내에 완료되는 핵산증폭기술 개발
  - 형광검출기술을 이용한 쇠고기 유전자 검출기술 개발
  - 시료전처리와 핵산 증폭 및 판독 모듈을 통합으로 제어하는 프로그램 개발
  - 현장진단을 위하여 이동이 가능한 크기의 분자진단 통합시스템 개발

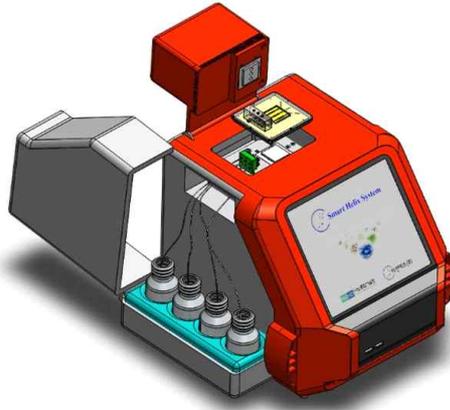


그림 2. 본 사업에서 개발하는 통합자동화 진단시스템 조감도

### 1.3. 연구개발의 필요성

#### ■ 쇠고기 원산지단속현장에서의 검체 채취 문제점

- 현장에서 쇠고기의 원산지 판별을 정확하게 하기 위해서는 적절한 검체 채취가 선행되어야 함. 검체를 부적절하게 채취하거나 오염이 발생하면 원산지 판별이 부정확하게 됨.
- 현장진단검사는 전문성이 없는 검체채취자가 시료를 채취함으로써 검체채취량, 교차오염 및 2차오염의 위험성을 가지고 있음.
- 현재는 상황에 맞추어 적당한 칼이나 집게, 혹은 핀셋을 사용하기도 하는데, 이들의 위생상태가 매우 불량할 뿐만 아니라 매사용시마다 소독 후 재사용해야 하는 번거로움이 있음.

#### ■ 검체채취용도구, 보관용기 및 보존용액 개발의 필요성

- 검체의 시료채취는 신속, 간편하고 안전하면서 위생적으로 이루어져야 함.
- 시료채취 시점이나 채취 후에 검체의 교차오염이나 2차 오염이 발생하면 안 됨.
- 정확한 현장진단검사를 위해서는 일정한 검체 채취량을 요구됨.
- 따라서, 쇠고기 원산지 판별을 위한 현장진단검사에서 정확한 결과를 도출해내기 위해서는 검사에 필요한 충분한 양의 검체 채취와 채취된 검체의 교차오염과 2차오염을 막기 위한 검체채취용도구와 채취된 검체를 보관할 수 있는 보관용기가 필요함.
- 이와 더불어 개발된 검체채취용도구, 보관용기 및 보존용액의 무균성을 확보하기 위해 감마선 멸균이 가능하여야 함.

#### ■ 기존 진단 플랫폼의 문제점

- (시료부패 가능성) 현재 품종 판별을 위해서는 시료를 수거하여 기관으로 송부하는 방식을 이용함에 따라 그 과정에서 시료가 부패하는 문제가 발생함.
- (전문인력 필요) 품종 판별을 위한 분자진단은 고가의 전문장비와 수작업이 가능한 전문인력이 필요하기 때문에 원산지 관리의 효율성이 저하됨.

\* 분석시간 (1일/점), 비용(10만원/점)

■ PNA기반 현장형 분자진단 플랫폼

- (새로운 현장형 분자진단의 필요성) 기존의 분자진단은 시료이동 및 시료전처리에서의 2차오염 가능성, 전문인력의 필요, 정확한 품종분석의 어려움 등 여러 한계점이 발생함에 따라, 이런 한계를 극복하는 새로운 현장형 분자진단 플랫폼이 필요함.
- (화학물질에 의한 오염 없는 일체형 분자진단칩) 국내 분자진단 제품은 시료전처리 및 핵산추출 단계를 제외한, 핵산증폭·검출·판독만을 일체형으로 구성하였으나, 본 연구는 핵산추출부터 판독까지 모두 통합한 일체형 분자진단칩을 개발하며, 화학물질에 의한 오염을 최소화 한 현장형 분자진단 플랫폼 기술임.
- (60분 이내의 현장형 분자진단 기술) 전문인력이 6~7시간 걸리는 기존 Tube PCR 분자진단에 비해, 본 연구는 필름기반 분자진단칩의 빠른 반응과 자동화를 구현하므로, 비전문가도 60분 이내 판별 가능한 현장형 플랫폼 기술임.
- (정확한 품종판별 가능) 2~3개 SNP<sup>1)</sup> 차이를 무시하고 반응하는 TaqMan 프로브와 달리, 본 연구는 PNA 프로브의 Tm<sup>2)</sup> 값의 변화로 정확한 품종 판별이 가능하므로, 현장에서 신속 정확하게 진단 가능한 분자진단 플랫폼 기술임

■ 미세유체 제어 분자진단 플랫폼 개발의 필요성

- 현재 분자진단법은 실시간 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 고해상도 용해점 분석법을 결합하거나, PCR과 bead hybridization 후 Luminex system 검출법을 결합한 형태가 주로 사용되고 있으나, PCR과 bead hybridization 방식의 경우 오염 문제와 검사시간이 긴 단점이 있음
- 시료로부터 핵산을 추출하기 위한 상용 lysis kit 프로토콜은 외기에 개방된 상태로 진행되기 때문에 시료에 포함된 위험물질이 외부로 유출될 가능성이 높음

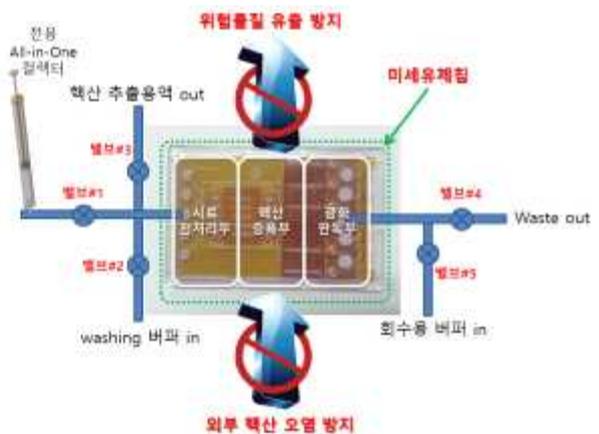


그림 3 외부 노출된 기존 시료전처리 키트(좌)와 미세유체 시료전처리 및 분자진단 개념도(우)

- 미세유체 제어기술을 이용한 시료전처리기술은 검체로부터 위험물질이 외기로 전혀

1) Single Nucleotide polymorphism, SNP) : 하나의 염기서열(A,T,G,C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이  
 2) Melting temperature (Tm) : 상보적인 염기가 서로 맞지 않는 경우의 Tm 값은 상호 완벽하게 맞는 PNA-DNA의 Tm 값보다 크게 낮기 때문에, 온도를 높여 서로 구분할 수가 있다

노출되지 않고, 외부로부터의 핵산 오염도 원천적으로 차단할 수 있는 신기술이며, 아직 국내에서 상용화된 자동화 제품이 없음

■ **현장형 자동화 분자진단 플랫폼 개발의 필요성**

- 현장진단(Point-of-Care, POC) 검사는 대형검사장비가 있는 전문기관으로 보내지 않고 현장에서 신속하게 진단하는 검사를 말하며, 기존의 대량의 검체를 빠르게 분석하는 진단기기와 설계개념이 다름
- 최근 관련기술의 발달과 사회적 요구의 증가로 POC 검사는, 의료관련 검사항목을 벗어나, 다양한 분야의 분자진단 현장에서 요구되고 있음
- 분자진단의 과정은 시료의 전처리와, 핵산 추출, 증폭, 판독의 각 단계를 거치며, 전체 과정에서 전문가의 개입이 필요하고 검사시간이 약 6~7시간이 소요되며, 현재 핵산증폭 과정만이 자동화 장비로 개발되어 있기 때문에, 현장에서의 진단에 어려움이 많은 실정임



그림 4 Bio-RAD사의 자동화 분자진단장비(시료전처리 및 핵산추출 기능은 없음)

- 따라서, 핵산의 추출과 판독까지 전 과정이 자동으로 진행되는 분자진단장비의 개발은 분석자의 실험오류를 최소화하여 결과의 신뢰도를 크게 향상시킬 수 있으며, 전문인력이 아닌 일반인에 의한 기기 운영을 가능하게 하여, 다수 시료의 동시 분석이 가능해지고, 신속한 진단을 통해 소비자에 한우를 안전하게 공급할 수 있게 됨으로써 농축산물의 신뢰성 강화에 직접적으로 기여할 수 있음



그림 5 본 사업에서 개발하는 전공정(시료전처리~핵산판독) 통합자동화 진단시스템  
조감도

- 본 기술은 개발 완료에 따라, 그 응용을 한우뿐만 아니라 다양한 농축산물 원산지 표시 위반 단속에도 확대 적용할 수 있는 확장성이 큰 기술임.

#### ■ 국내 최초 미세유체칩 기반 전 공정 자동화 분자진단 기술

- 미세유체칩 기반의 시료전처리 전자동화 기술은 기존의 튜브타입의 핵산증폭과 판독 플랫폼에 필요한 전문인력의 수작업을 탈피한 신개념 기술로, 시료전처리와 핵산증폭 및 판독을 하나의 칩에 모두 집적할 수 있음
- 전문인력의 수작업을 배제한 자동화된 시료전처리 기술이 상용화는 국내에서 시도된 적이 없으며, 개발제품은 농축산물 관리와 검역에 지대한 영향을 줄 것으로 예상하며, 고가 외국산 장비 위주의 분자진단 시장의 판도를 국내산 중소형 분자진단기기를 중심으로 변화시킬 수 있음

#### ■ PNA를 이용한 한우품종 판별 진단기술

- PNA는 peptide nucleic acids의 약자로 친화도(affinity)와 선택성(selectivity)이 매우 우수하며, 핵산분해효소에 대한 안정성이 높아 현존하는 제한효소(restriction enzyme)로 분해되지 않으며, 또한 열/화학적으로 물성 및 안정성이 높아 보관이 용이하고 쉽게 분해되지 않는 장점이 있음
- PNA-DNA 결합력은 DNA-DNA 결합력 보다 매우 우수하며, 이러한 결합력의 차이를 이용하여 질병의 진단, 검출, 염기의 변이를 검출할 수 있는 능력이 탁월하기 때문에 분자진단용 뿐만 아니라 다양한 산업에 적용할 수 있음

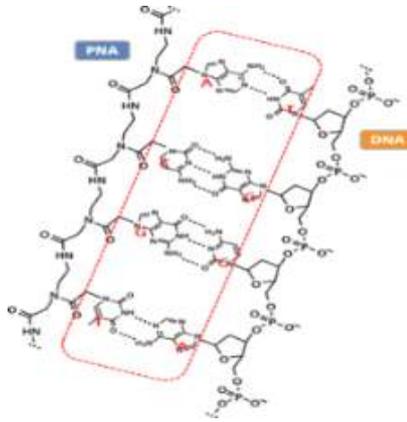


그림 6 PNA와 DNA의 결합 모식도

- PNA 프로브를 이용한 분자 진단 기술인 MeltingArray의 경우 실시간유전자 증폭장치에서 기존의 증폭곡선(amplification curve)만으로 결과를 도출하는 방법을 포함하여 용해곡선분석(melting peak)까지 분석이 가능함으로서 검사의 정확성을 높일 수 있음

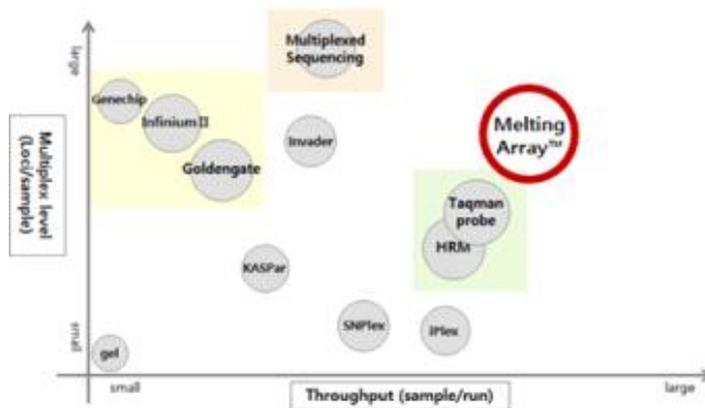
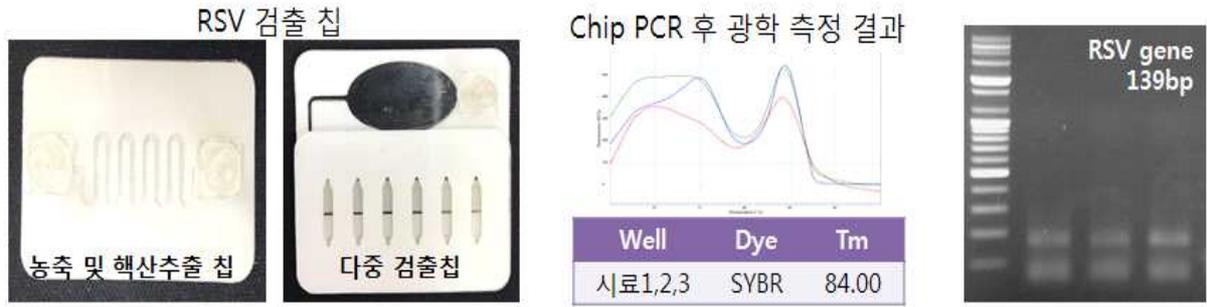


그림 7 대표적인 Genotyping 기술과 MeltingArray 기술의 성능 비교

- PNA 프로브를 이용한 MeltingArray의 경우, 기존 분자진단에 사용되었던 방법(PCR법, Real-time PCR법)의 다양하고 고정되었던 실험적 방법을 변경 없이 사용할 수 있어 개발의 속도와 정확성에서 큰 장점을 가짐
- 실시간유전자증폭장치(Real time PCR) 기반의 분자진단법으로는 intercalating method, hydrolysis method, hybridization method의 세 가지로 구분되며, hybridization method는 probe와 target의 Tm값을 이용하므로 다중분석·특이도 매우 유리
- PNA 프로브의 경우 hybridization method로서 결과 분석에 있어서 자주 발생하는 위 양성(false positive)이 발생되지 않으며, 하나의 프로브로 다양한 시료 및 염기서열의 변이의 구분이 가능하며, 검출 및 확인에 중요한 염기서열 변화에서도 그 결과를 도출할 수 있는 특징을 가지고 있음
- 필름칩의 우수한 열적 효율을 이용한 빠른 PCR 기법과 PNA의 특이성을 결합하여 신속 정확한 종관별 가능함



현재 핵산 증폭 120분 수준 → **히팅 블록·소자 개발, PCR 버퍼 조성, 온도제어 알고리즘 개발로 60분 목표 달성**  
 그림 8 랩온어칩 기반 필름칩을 이용한 초고소 PCR 실행 결과

#### 1.4. 연구개발 대상의 국내·외 현황

##### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

###### ○ 기술현황

###### ■ 현장형 자동화 분자진단 기술

- 현재 자동화 분자진단 제품은 대부분은 외국산으로 구비되어 있으므로, 이 분야의 국산화 개발이 매우 시급하지만, 정부 연구개발 사업에서 추진되고 있는 분자진단 기술 개발 사업은 대부분 핵산증폭·판독 시약제품 개발이거나 핵산증폭 과정만을 자동화하는 기기의 개발이고, 시료전처리를 포함한 분자진단 전 공정을 자동화한 진단시스템을 개발하는 사업은 없었음



그림 9 시판중인 핵산증폭 자동화 장비들 (좌-BIO-RAD사, 중-Eppendorf사, 우-Seegene사)

- 현장형 자동화 진단기기는 주로 면역반응 검사를 진행하는 자동화 진단기기가 대부분이며, 대부분 96-well plate를 기반으로 하는 의료용기기이고, 분자진단을 위한 전 공정 자동화 진단기기 상용제품은 Cepheid사의 GeneExpert 제품군이 유일하며, 국내 제품은 전무함



그림 10 Cepheid사의 GeneExpert-I(좌)와 GeneExpert Omni(우)

- 시료의 시료전처리와 핵산증폭 및 핵산판독의 전기능이 자동화된 분자진단장비는 시장에 출시된 적이 없기 때문에, 이러한 현장형 자동화 진단기기 제품이 개발된다면 시장과급력이 매우 높고, 현장에서 신속하게 대응이 가능하므로 광범위한 활용분야를 가질 것으로 보여짐
- 주관기관인 티엔에스(주)에서는 랩온어칩 기반 분자 진단 시스템 전문 기업으로, 랩온어칩 관련 3건의 기술이전과 다수의 지적 재산을 보유하고 있으며, 랩온어칩 전문 시약, 유전자 증폭 시스템, 미세유체제어를 이용한 분자진단 자동화 시스템을 개발 및 판매하고 있음

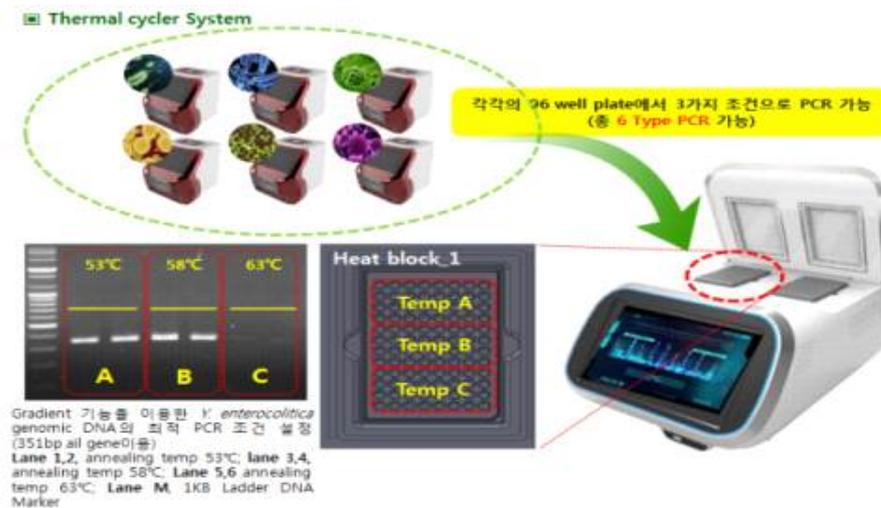


그림 11 티엔에스(주)가 판매 중인 멀티 컨디션이 가능한 핵산증폭 시스템

- 기존 전처리는 전문가가 진행할 경우 60분정도가 소요 되지만, 랩온어칩 전용 전처리 키트를 사용할 경우 비전문가가 10분으로 단축 가능함



그림 12 티엔에스(주)가 판매 중인 랩온어칩 전용 전처리 진단키트

### ■ 진단 시료전처리 기술

- 최근 현장형 진단 수요의 급격한 증가로 인하여, 전문가가 아닌 일반인이 현장에서 쉽고 빠르게 시료를 전처리하는 기술이 요구되고 있으며, 마이크로피펫을 이용한 수작업을 배제한 자동화 시료전처리 방식을 위주로 기술이 개발되고 있음
- 분자진단 관련 국내 선두그룹인 바이오니아는 16개의 시료를 동시에 전처리하여 핵산이나 단백질을 추출하는 기능을 자동화한 제품(ExiPrep™ 16 Plus) 라인업을 잇따라 선보이며 관련 사업을 확장하고 있음



그림 13 자동화된 전혈시료 국산 전처리 장비(바이오니아사 ExiPrep™ 16 Plus)

- 나노자성입자를 이용한 시료전처리 기술은 96-well 기반의 시료전처리 자동화 플랫폼으로 발전하였으며, Roche, Siemens, Inverness, Abbott, Qiagen, Cepheid, Beckman 등의 다국적 제약회사에 의해 제품화 되어 왔으나, 마이크로피펫을 사용하는 수작업만을 자동화한 수준일 뿐, 2차 오염의 위험성과 이동이 어려운 큰 부피 등 현장형 분자진단 기술로는 역부족한 상황임



그림 14 핵산추출 과정을 자동화한 글로벌 기업의 시료전처리 제품들

### ■ 초고속 핵산증폭 및 검출 기술

- 핵산을 증폭하는 방법은 증폭대상에 따라 핵산을 직접 증폭시키는 표적증폭법(target amplification), 핵산에 검출에 이용되는 탐침을 증폭시키는 탐침증폭법(probe amplification), 검출신호를 증폭시키는 신호증폭법(signal amplification)으로 나눌 수 있음
- 표적증폭법은 PCR기술(중합효소연쇄반응법)로도 불리며, 최근에는 형광표지 탐침을 primer에 연결하여 핵산증폭 결과를 광학으로 검출할 수 있음
- 형광표지 탐침은 민감성은 다소 낮지만 여러 개의 표적을 동시에 검출할 수 있는 장점을 가지며, 증폭반응과 동시에 실시간으로 검출을 확인할 수 있기 때문에 최근 핵산증폭 상용제품의 주류를 이루고 있음
- 최근에는 MEMS 기술과 미세유체 제어기술의 발달로, 랩온어칩 또는 미세종합분석시스템(micro total analysis system,  $\mu$ TAS)을 활용하여 핵산증폭 및 검출을 연구결과가 다수 발표되었으며, 이를 상용화하려는 시도가 보고됨
- 주관기관인 티엔에스(주)는 필름기반 핵산 증폭기술을 보유하고 있을 뿐만 아니라, Taqman probe 방식의 PCR에서 cycle이 증가할수록 Taqman probe가 hydrolysis되어 위양성·위음성 확률이 높아지는 문제를 PNA probe를 이용한 분석법으로 검증하는 기술을 보유하고 있음



그림 15 티엔에스(주)가 보유하고 있는 핵산 증폭 및 위양성 검증 기술

■ 한우유전체 분석을 이용한 대량 SNP 발굴

## 한우 유전정보 세계 최초 규명

충북대·영남대 공동연구팀  
유전체 염기서열 첫 해독  
세계특급저널 미국국립과학지 공인

**충북대와 영남대 교수진이 세계 최초로 한우의 '게놈(유전체) 해독'을 통해 전체 유전정보를 찾아내는 '첫'을 이뤘다.**

**충북대 융용생명환경학부 김내수(80)·김관석(40) 교수와 영남대 생명공학부 김중주 교수 및 울산대 생명·환경의과학은 미국 국립생물정보센터(NCBI)에 등록된 소의 표준서열과 비교해 92% 수준에 해당 하는 한우의 게놈 서열을 해독했다.**

이 같은 성과는 미국국립과학지(PNAS)에 실려 한우의 유전적 고

유전을 과학적으로 입증해 국제적 공인을 받았다.

PNAS는 전 세계 모든 과학 저널의 최상위 1% 안에 드는 특급 저널이다.

특히 지난해 5월부터 정부 지원을 받아 산학공동연구를 수행한 김내수 교수 등은 이와 함께 한우 게놈에서 310만개에 달하는 단일염기 변이(SNP)를 발굴했다.

이 중 78%는 기존의 실험연구를 통해 밝혀진 상태지만 나머지 22%의 단일염기변이는 김 교수 등이 새롭게 밝혀내 주목된다.

김내수 교수      김관석 교수

단일염기변이는 사람의 개별 특성을 결정하고 유전자 발현의 근간인 유전정보를 담고 있어 맞춤형 유전질환 치료 등의 연구에 필수적이다.

한우의 질병과 번식, 육포 연구, 품종관별, 생산이여제 실시 등을 위해선 한우 SNP 연구가 중요한 반면 그동안 한우 게놈에서 발굴된 SNP들이 크게 제한돼 연구활동에 성과를 거뒀다.

앞으로 2년여 동안 후속 연구를 계속하면 한우의 DNA 칩 개발도 매우 희망적이다. 이로써 종우량이나 구획의 같은 질병에 강한 한우는 물론 소비자들이 원하는 우수한 육질의 고급육 생산 등 관련 산업에 큰 발전이 있을 것으로 기대된다고 강조했다.

(김태환)

그림 16 한우유전체 분석 성과 관련 기사

- 2009년 5월부터 농림수산식품부의 지원을 받아 한우 10개체에 대한 유전체 서열 해독 및 소 유전체 전체 크기(3x109bp)의 17배에 해당되는 한우 유전체를 확보하였음
- 빠르고 정확한 SIMD 기술을 적용하여 NCBI에 등록된 소의 표준 서열에 정렬시켜 (reference assembly) 한우 유전체 서열의 정확성을 확인한 결과 92% 이상 완전 해독한 것을 확인 함

■ 한우 품종 판별 진단 기술

- 한우 품종 판별에는 주로 분자진단법이 이용되며, 진단이 가능한 전문시설로의 이동

및 전문 인력 등이 필요하며 결과를 얻기까지 수 일이 소요되기 때문에 원산지 단속 현장에서 사용하는데 한계가 있음

- 참여기관인 충북대학교에서는 한우품종과 관련한 유전체분석 연구를 통해 한우 품종에 특이적인 SNP 마커를 개발하였고, 또한 전세계 소 품종들에 대한 계통유전학적 분류 연구를 통해 국내 재래한우품종간 식별 가능한 대량 SNP 마커 데이터를 보유하고 있음
- 2014년 영남대학교 연구팀과 공동으로 한우 250두와 흑우 및 칩소 각각 18두의 시료를 수집하여 DNA를 추출하여 Affymetrix bovine 640K SNP array 분석을 통하여 각 SNP들의 구조, 즉 대립인자(allele) 고정/빈도의 차이 정도를 품종별로 비교 분석하였음.

2	3	num	SNP_ID	BTA	위치(bp)	SNP	Allele	대립인자빈도(Alelle Frequency)			대립인자빈도차이		
								칩소	흑우	한우	한우-칩소	한우-흑우	칩소-흑우
4	28326	AX-21315504	17	35,671,098	A/G	A	0.056	0.222	0.996	<b>0.940</b>	0.774	0.167	
5	12505	AX-26892321	7	28,223,951	/T/C	T	0.143	0.308	1.000	<b>0.857</b>	0.692	0.165	
6	1236	AX-18289050	1	76,489,706	A//G	A	0.000	0.318	0.728	<b>0.728</b>	0.410	0.318	
7	19290	AX-19003790	10	96,948,470	A/G	A	0.056	0.833	0.762	<b>0.707</b>	0.071	0.778	
8	39502	AX-24375033	27	21,137,214	T/G	T	0.194	0.722	0.899	<b>0.705</b>	0.177	0.528	
9	39501	AX-24375029	27	21,137,008	A/C	A	0.806	0.306	0.101	<b>0.705</b>	0.205	0.500	
10	40085	AX-24500097	28	5,168,078	A/G	A	0.088	0.944	0.783	<b>0.695</b>	0.162	0.856	
11	23271	AX-20032146	13	46,343,571	/A/G	A	0.722	0.000	0.032	<b>0.690</b>	0.032	0.722	
12	23884	AX-20187585	13	80,747,113	T/C	T	0.917	0.139	0.228	<b>0.689</b>	0.089	0.778	
13	295	AX-18060829	1	15,796,401	A/G	A	0.167	0.528	0.851	<b>0.684</b>	0.323	0.361	
14	894	AX-18203703	1	55,180,234	A/C	A	0.861	0.417	0.179	<b>0.682</b>	0.238	0.444	
15	8285	AX-25747724	4	96,827,065	T/G	T	0.167	0.850	0.848	<b>0.682</b>	0.002	0.683	
16	13638	AX-27136986	7	89,759,474	/A/G	A	0.917	0.000	0.238	<b>0.679</b>	0.238	0.917	
17	14515	AX-27272516	8	11,111,857	A/G	A	0.125	0.533	0.798	<b>0.673</b>	0.265	0.408	
18	34392	AX-23262572	22	32,020,919	A/G	A	0.833	0.063	0.161	<b>0.673</b>	0.098	0.771	
19	5317	AX-25048882	3	41,026,901	T/G	T	0.806	0.167	0.134	<b>0.672</b>	0.033	0.639	
20	16304	AX-27708338	9	10,425,327	T/G	T	0.861	0.639	0.191	<b>0.670</b>	0.448	0.222	
21	34302	AX-23246683	22	28,309,103	A/G	A	0.861	0.111	0.195	<b>0.666</b>	0.084	0.750	
22	14856	AX-27350081	8	31,248,813	C/G	C	0.194	0.917	0.859	<b>0.664</b>	0.058	0.722	
23	15713	AX-27582760	8	91,273,110	/C/G	C	0.306	1.000	0.970	<b>0.664</b>	0.030	0.694	
24	1347	AX-18310962	1	81,908,736	A/G	A	0.265	0.750	0.929	<b>0.664</b>	0.179	0.485	
25	13221	AX-27087114	7	76,615,793	T/C	T	0.813	0.344	0.149	<b>0.663</b>	0.195	0.469	
26	5949	AX-25156114	3	70,416,123	/T/C	T	0.222	1.000	0.885	<b>0.662</b>	0.115	0.778	
27	296	AX-18060831	1	15,796,955	T/G	T	0.824	0.500	0.166	<b>0.658</b>	0.334	0.324	
28	40175	AX-24512026	28	7,940,185	T/G	T	0.765	0.118	0.111	<b>0.654</b>	0.007	0.647	
29	13491	AX-27122829	7	85,856,948	T/G	T	0.167	0.583	0.821	<b>0.654</b>	0.237	0.417	
30	5948	AX-25156107	3	70,413,766	/A/G	A	0.235	1.000	0.889	<b>0.654</b>	0.111	0.765	
31	19769	AX-19112353	11	17,976,826	/T/C	T	0.844	0.000	0.193	<b>0.650</b>	0.193	0.844	
32	34387	AX-23262449	22	31,991,205	T/C	T	0.806	0.028	0.156	<b>0.650</b>	0.128	0.778	
33	13207	AX-27086319	7	76,369,621	T/C	T	0.235	0.722	0.882	<b>0.647</b>	0.160	0.487	
34	23023	AX-19966562	13	31,501,763	A/G	A	0.853	0.735	0.206	<b>0.646</b>	0.529	0.118	
35	14860	AX-27350180	8	31,275,578	T/C	T	0.861	0.194	0.216	<b>0.645</b>	0.021	0.667	
36	23103	AX-19984954	13	35,887,793	A/C	A	0.778	0.028	0.134	<b>0.644</b>	0.106	0.750	
37	404	AX-18095090	1	24,941,622	A/G	A	0.167	0.944	0.809	<b>0.642</b>	0.136	0.778	
38	13658	AX-27141137	7	90,804,586	A/C	A	0.944	0.500	0.302	<b>0.642</b>	0.198	0.444	
39	23878	AX-20187285	13	80,689,687	T/C	T	0.861	0.111	0.220	<b>0.642</b>	0.108	0.750	
40	40176	AX-24512034	28	7,940,937	T/C	T	0.250	0.889	0.891	<b>0.641</b>	0.002	0.639	
41	19771	AX-19112382	11	17,982,440	/T/C	T	0.167	1.000	0.805	<b>0.639</b>	0.195	0.833	
42	14513	AX-27272469	8	11,094,103	A/C	A	0.139	0.500	0.777	<b>0.638</b>	0.277	0.361	

- 분석 결과, 총 647,856개 SNP들 중에서 적어도 한우-칩소, 한우-흑우, 칩소-흑우 품종간에서 주어진 대립인자 빈도차이가 0.4이상인 SNP를 42,173개를 발굴하였고, 그 중

에서 대립인자 빈도차이가 0.5이상인 SNP 개수는 각각의 품종간 비교별로 1,143개, 2,518개 및 16,155개로 나타났다.

■ 사람의 조직 검체를 채취한 후 수송되는 과정 중에 검체의 lysis가 이루어지는 용액의 개발

- 사람의 질병을 진단하기 위해서는 조직 검체를 채취한 후 진단기관까지 검체의 손상 없이 수송이 이루어져야 함
- 사람의 질병을 진단하기 위해 유전자 증폭 기술이 적용되고 있음
- 유전자 증폭 기술을 사용하여 질병을 진단하기 위한 과정 중에서 시간적으로 가장 많이 소요되는 부분은 조직을 lysis 하는 과정으로 이 과정을 줄이기 위해 검체를 채취한 후 진단기관까지 수송되는 과정 중에 검체가 lysis 되어 핵산이 용액 속으로 노출되는 buffer가 개발되어 사용되고 있음

○ 시장현황

- 수입개방화로 인한 수입농산물이 대량으로 국내에 유입되면서 원산지에 대한 소비자의 관심이 증가하고 있으며, 그에 따른 원산지 허위표시의 위험성도 증가하고 있다. 특히 한우의 품종에 따른 소비자 가격차이가 발생함에 따라 원산지 위반사례도 지속적으로 발생하고 있음
- 쇠고기 원산지의 현장단속에 적용대상 범위는 위반비율이 높은 식육점과 일반음식점만도 전국 수만 개여서 대규모의 인력과 많은 비용이 발생함에 따라 과학적인 한우 육 식별법이 단속현장에서 적용된다면 국가예산 절감을 기대할 수 있음
- 국내산 소고기의 차별화된 마케팅을 위해서 재래품종으로 칙소와 흑우 품종을 활용한 새로운 브랜드에 대한 개발이 이루어지고 있으며, 이에 따라 기존의 한우품종과의 유전적 차이를 활용한 새로운 소고기 브랜드 개발에 칙소나 흑우가 활용될 수 있음. 품종식별에 따른 차별화된 시장구조가 자리를 잡기 위해서는 유전자 진단을 통한 품종식별이 필수적인 도구가 되어야 하기에, 품종식별과 이력제도에 활용될 수 있는 유전자 진단법의 수요는 증가할 것으로 전망함(그림 14. 참조)
- 또한 유전자진단 기술과 유전자 정보를 기반으로 새로운 마케팅전략을 수립할 수 있을 뿐만 아니라 이러한 기술을 활용한 장치나 키트 그리고 시약제품 등은 해외시장 진출에도 매우 유망한 제품임

< 음식점의 표시실태 현황 >

구 분	조사 대상 (음점수)	원산지 표시 관련 음식점수			100g당 가격 미표시 음식점수	표시미흡 음식점수
		거짓 표시	혼동 우려표시	미표시		
일반음식점	25	0	2	5	15	18
정육음식점	26	1	0	1	15	15
한우 무한 리필점	5	0	0	1	2	3
소셜커머스점	12	0	0	1	5	6
소계	68	1	2	8	37	42
총계		11 (16%)			37 (54%)	42(62%)

그림 17 원산지 허위표기 실태

○ 경쟁기관현황

- 현장진단에 대한 기술적 진보가 이루어짐에 따라 현장에서 유전자 진단을 적용하려는 다양한 시장이 형성되고 있으며 이에 대한 제품개발에 국내외 업체가 있음
- 쇠고기의 원산지를 판별할 수 있는 다양한 기술이 개발되어 있지만 현장에서 직접 분석을 수행할 수 있는 검사법은 없는 상태임
- 동물 유전자진단에는 전문기업이 거의 없으며, 학교 실험실이나 창업벤처 수준의 유전자 마커를 개발하고 있음
- 2014년 솔젬트에서 쇠고기의 유전자 분석을 통해 원산지를 식별하는 “한우검정키트”의 경우 본 연구참여자인 충북대 김관석 교수가 원천특허기술을 솔젬트에 이전하여 제품개발에 성공하였음.

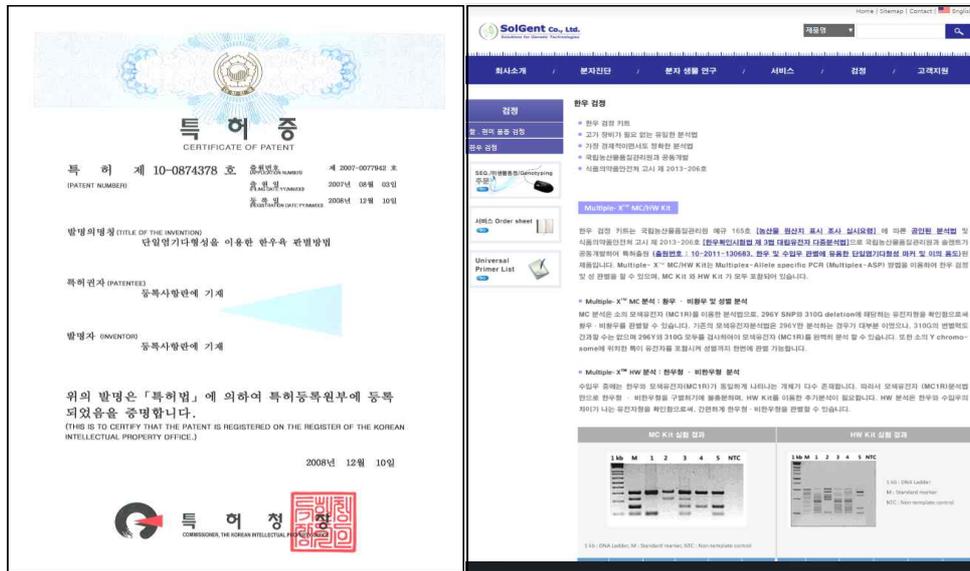


그림 18 관련 기술 특허.충북대 김관석 교수의 원천 특허(좌), 솔젬트의 한우식별 유전자 진단 제품(우).

○ 지식재산권현황

- 충북대학교 김관석 교수 연구팀에서는 동물분자마커기술을 이용한 고급축산물 생산 및 유통에 도움이 되는 지식재산권을 다수 보유하고 있으며, 그러한 기술개발 노하우는 본 과제의 수행을 통해 한우, 쇠소 및 흑우에서 고급축산물 생산 및 유통에 신뢰할 수 있는 유전자 정보기반 기술을 성공시키는데 기여할 것임



그림 19 충북대 김관석 교수의 보유 특허

- 충북대학교 김관석 교수 연구팀에서는 동물분자마커기술을 이용한 고급축산물 생산 및 유통에 도움이 되는 지식재산권을 다수 보유하고 있으며, 그러한 기술개발 노하우는 본 과제의 수행을 통해 한우, 쇠소 및 흑우에서 고급축산물 생산 및 유통에 신뢰할 수 있는 유전자 정보기반 기술을 성공시키는데 기여할 것임
- 티엔에스(주)는 램온어칩 관련 3건의 기술이전과 다수의 지적 재산권을 보유하고 있으며, 램온어칩 전문 시약, 유전자 증폭 시스템, 미세유체제어를 이용한 분자진단 자동화 시스템을 꾸준히 개발함
- 표준화현황
  - 대량의 유전자정보를 기반으로 가축 품종의 특징에 대한 유전적 요인을 발굴하는 것이 가능함. 하지만 대상 집단들 간에 고유한 특징이 존재하지 않는 경우 유전적 정보만을 기반으로 구분하는 것에는 어려움이 있음. 본 과제의 목적인 한우와 쇠소 그리고 흑우에 대한 유전적 다형성에 대한 선행연구결과에 따르면 이들 품종에 특이적인 유전자 마커들이 존재하는 것으로 예상되며, 본 과제 수행을 통해서 검증하여 품종별 식별에 필요한 표준화된 유전자 마커정보를 개발할 예정임
  - 부가적으로 생산이력정보와 혈통정보를 활용한 품종의 원산지 식별기술을 추가 적용

하여 완벽하게 품종구분과 원산지 식별이 현장에서 구현할 수 있도록 표준화된 유전자 분석체계를 완성할 수 있음

○ 기타현황

- 2011년 IPET 지원과제로 "한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발"이 한국과학기술원에서 수행된 적이 있으나 상용화되지는 못하였음

**국가R&D과제정보**

**사업** 2011 / 농림수산식품부 / 일반사업  
첨단생산기술개발 (조식농축산업용 · 첨단생산기술개발)

**과제** 한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발  
1545002350 / 한국과학기술원 / 주관과제 / 총 연구비 288.00 백만원  
과제기술포문 분류 1 : 생명과학 / 융합바이오 / 30%

본 과제에 참여한 연구자

연구책임자 서희성

참여연구원 양희성

---

**연구목적**

본 연구의 목표는 최근 사회적 이슈가 되고 있는 한우 소의 불법유종, 한우 소고기 의 품질 및 질병안전성 확인, 한우 소고기의 품질 관리를 위한 과학적 방법으로써, 현장에서 신속, 정확하게 판별 할 수 있는 한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템을 개발에 있다. 즉 한우 집단에서 높은 빈도로 출현하는 후위성체 DNA 및 SNP 표지를 선정하고 이를 유전자 분석표제에 마이크로 디바이스에서 분석, 비교함으로써 소비자가 현장에서 이 소고기가 한우임을 확인할 수 있는 휴대용 통합 시스템 개발을 목표로 한다.

**연구내용**

&#9658; 한우유 판별을 위한 후위성체 표지인자와 SNP 선별 및 최적화 (ST) &#9658; 현장에서 얻은 소고기 샘플로부터 유전자 추출을 위한 샘플 전처리 소자 개발 (ST) &#9658; 한우 유전자 규정을 위한 초소형 PCR 반응기 제작 및 DNA microarray 개발 (NT) &#9658; 샘플 전처리-PCR 및 DNA microarray-로세 전기 영동 채널이 통합된 마이크로디바이스 개발 (MEMS/NEMS) &#9658; 현장 유전자 진단을 위한 온인형 공조된 형광 개발 (Optics) &#9658; 한우 후위성체 및 SNP 유전자 규정을 위한 소프트웨어 개발 (IT) &#9658; 한우 유전자 profile #을 인터넷을 통해 현장에서 데이터베이스와 비교 분석 할 수 있는 시스템 구축 (IT) 소고기 판매장에서 소장의 소고기 샘플을 채취한 뒤, 마이크로 소자칩을 이용한 Genomic DNA 추출, 초소형 PCR 증폭기 또는 고속 고해상도 분석을 위한 마이크로 어레이 칩을 이용한 추출된 DNA의 유전자 분석, 현장 검증을 위한 소형화된 공조된 형광의 연구, 마지막으로 얻어진 DNA profile을 인터넷을 통해, 이미 원산지에서 분석되어 저장된 데이터베이스에 접속하여 한우임을 검증할 수 있는 IT체계를 구축하여 현장에서 소고기 샘플로부터 신속, 정확하게 한우임을 판별할 수 있는 통합 시스템 구축하고자 한다.

**기대효과**

샘플 전처리와 한우 후위성체 유전자 다중 PCR 및 DNA 마이크로 어레이 기술 그리고 후위성체 유전자 amplicon 분석을 위한 전기영동법, 온인형 공조된 형광 측정 시스템 과 데이터 분석이 통합된 시스템 한우 개체별 유전자 분석 디바이스는, 한우 소고기 현장 진단에 사용되어 원산지 추적이 가능하고 소고기의 품질관리를 지원할 수 있을 뿐만 아니라 소고기의 품질 안전성을 확보하고 유통의 투명성과 품질의 신뢰 구축에 크게 이바지할 것이다. 현장에서 얻어진 한우 소고기 샘플로부터 후위성체 및 SNP 유전자 분석과 해석이 가능한 마이크로 통합 유전자 분석시스템은 전 세계적으로 실행된 바가 없는, 본 연구팀에서 최초로 시도되는 창의적인 기술로서 현장에서 소 고기의 확인을 통해 한우 시장 보호에 큰 공과공과를 가져올 것이다. 또한 제안 된 초고속 통합 나노-마이크로 유전자 분석 시스템은 범죄자 및 전자 확인과 같은 인간 규명 유전자 분석 용에도 사용할 수 있을 뿐만 아니라 바이러스/박테리아 등 point-of-care 질병 유전자 분석, 암세포 및 세포의 표지를 감지할 수 있는 telomerase 활동성 측정 등 cancer 연구에도 이용할 수 있어 그 파급효과가 매우 큰 기술이라 판단된다. 무엇보다도 본 연구 과제의 최종 목표는 연구 개발 결과의 상 업화이다. 따라서 본 연구팀에 의해 개발된 유전자 분석 나노-마이크로 통합 디바이스는 한우 이력 추적 연구용 뿐만 아니라 실용적 산업계의 요구에 맞는 시스템으로 더욱 발전시켜 독창적으로 개발된 체계의 연구 결과가 상 업화 되는 좋은 선례를 남길 수 있을 것이다.

**한글 키워드** 한우 소의 이력추적체계 시스템, 휴대용 유전자 분석 통합 시스템, DNA 마이크로 어레이 칩, 통합 분석 연쇄반응-로세전기영동 통합 마이크로 디바이스

**영문 키워드** Korean cow, Cattle traceability system, integrated portable DNA analysis system, DNA microarray chip, integrated polymerase chain reaction and capillary electrophoresis microdevice

그림 20 관련과제 현황

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 해외 현장형 분자진단 시장은 의료진단기기 분야에 집중하고 있으며, 세계 3대 기업인 Roche, Hologic, Qiagen이 시장의 51.2%를 주도하고 있음
- Cepheid사의 GeneXpert는 시료전처리를 포함한 현장형 자동화 분자진단 기기를 제품화한 유일한 사례이며, 자동화 분자진단 분야에 독보적인 입지를 형성함
- 지적재산권과 기술장벽이 높기 때문에 분자진단 기기를 만드는 글로벌 기업의 수가 대략 20개 정도로 적은 편이며, 따라서 글로벌 시장진출을 위해서는 차세대 기술을 적용한 새로운 플랫폼을 채택하여 기술우위를 선점해야 함
- 현장진단검사는 빠른 검사결과가 필요한 검사종목들을 비롯해 숙련되지 않은 비전문 의료인이 수행해도 오류가 없도록 기술을 개발하여 다른 종목으로 확대되는 추세로 성장 중임

○ 시장현황

- 해외 현장형 분자진단 시장은 의료진단기기 분야에 집중하고 있으며, 세계 3대 기업인 Roche, Hologic, Qiagen이 시장의 51.2%를 주도하고 있음
- 경쟁기관현황
  - Cepheid사의 GeneXpert는 시료전처리를 포함한 현장형 자동화 분자진단 기기를 제품화한 유일한 사례이며, 자동화 분자진단 분야에 독보적인 입지를 형성함
- 지식재산권현황
  - 해당사항 없음
- 표준화현황
  - 현장진단검사는 빠른 검사결과가 필요한 검사종목들을 비롯해 숙련되지 않은 비전문 의료인이 수행해도 오류가 없도록 기술을 개발하여 다른 종목으로 확대되는 추세로 성장 중임
- 기타현황
  - 해당사항 없음

## 1.5. 연구개발 범위

### <1차년도>

- 연구개발 목표
  - 주관연구기관(티엔에스) :
    - 목표 : 쇠고기 품종 판별기기의 핵심 단위 기반 기술 및 모듈 개발
    - 품종별 쇠고기 품종 판별 진단기기 개발을 위한 핵심 기반 기술 및 모듈을 개발하고 성능 평가 진행
    - 전처리 모듈, 유전자 증폭 모듈, 유전자 검출 모듈, 미세유체 제어 모듈 개발
  - 참여기관 1 (충북대학교) :
    - 목표 : 대량 유전체 정보를 활용한 한우, 최소, 흑우 특이 유전자 마커 개발
    - 최소, 흑우의 공시 집단을 정의하고 대용량 유전체 SNP 분석 결과와 유전체 염기서열 해독를 기반으로 품종별 특이 정보 수집
    - 참조 집단을 정의하고 품종식별 유전자형 조합 설정 및 품종별 검증 (최소와 흑우 시료의 농가현장에서 수집)
  - 참여기관 2 (노블바이오) :
    - 목표 : 쇠고기에서 품종을 판별하기 위한 검체 채취 도구의 개발
    - 시장에 유통중인 쇠고기에서 검체를 채취하기 위한 도구 개발을 위한 도면 및 시제품 제작
    - 시제품으로 제작된 검체 채취용 도구를 이용하여 쇠고기에서 검체를 채취한 후 국립농산물품질관리원 시험연구소의 신속검사법 표준 프로토콜을 이용하여 검체 채취량 측정

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(티엔에스) :

■ 미세유체 제어 모듈 개발

- 전처리부터 판독까지 교차 오염에 의한 판독 오류를 최소화하기 위한 구조의 미세유체 제어 알고리즘을 개발
- 최소한의 시료만으로도 진단이 가능하도록 미세유체 기술을 이용하여 핵산 증폭부와 핵산 판독부가 모두 포함된 미세유체칩 제어모듈을 개발



그림 21 쇠고기 품종판별을 위한 핵심 모듈 개념도

■ 핵산추출 핵심 모듈 개발

- 미세유체 제어 모듈을 기반으로 쇠고기의 핵산을 추출하는 알고리즘 설계
- 설계된 알고리즘을 구현하는 필름기반의 핵산추출 모듈 디바이스를 제작하여 성능을 확인

■ PCR 혼합 핵심 모듈 개발

- 미세유체 제어 모듈을 기반으로 추출된 핵산을 포함하는 시료와 PCR mixture를 미세유체 방식으로 혼합하는 알고리즘 설계
- 설계된 알고리즘을 구현하는 필름기반의 PCR 혼합 모듈 디바이스를 제작하여 성능을 확인

■ 초고속 핵산증폭기술 및 모듈 개발

- 빠른 가열과 냉각이 가능한 필름 소재의 미세유체칩을 개발하고, 핵산 증폭 과정에 필요한 시료의 양을  $\mu\text{l}$  수준으로 최소화하는 기술을 개발
- 필름 기반 미세유체칩을 이용하여 thermal cycling 방식의 핵산 증폭시간을 1시간 이내로 단축하는 핵산증폭 모듈을 개발
- 펠티어를 이용한 단면 냉각/히팅 방식 도입으로 유전자 증폭 효율·시간 단축
- 방열되는 열의 효율적 방출을 위한 히트싱크 설계 및 제작
- 유전자 증폭을 제어하기 위한 제어 보드 설계 및 제작
- 유전자 증폭 동작 프로그램 개발

■ 쇠고기 품종 판별용 광학 모듈 개발

- 타겟 유전자를 검출하기 위한 형광 다이에 맞는 광학 모듈 개발
- 파장에 맞는 광원 선별과 형광 다이 발광을 위한 필터 개발
- 타겟 유전자로부터 발광된 형광을 검출하기 위한 emission 필터 개발

- 형광 시그널을 검출하기 위한 포토 디텍터 및 시그널 제어 보드 개발
- 광학모듈 제어를 위한 제어 보드 개발 및 광학 하우징 설계 및 제작

■ **현장형 쇠고기 품종 판별키트 개발**

- 쇠고기 품종 판별마커를 이용한 유전자 증폭용 프라이머 설계 및 제작
- 증폭된 타겟 유전자의 유무를 판독하는 PNA기반의 판별키트 개발(판별키트개발이 완료되면 Realtime PCR 전용 키트로 판매 가능)

- **참여기관 1 (충북대학교) :**

■ **현장형 쇠고기 품종 판별마커 개발 및 샘플 수집**

- 한우, 흑우, 칩소 품종 식별용 마커조합 설정  
: 칩소간에 교배에 의해서 생산된 자손에서 모색이 검정인 개체에 대해서 흑우로 판정할 것인가에 대한 고려가 필요하며, 이를 위해서는 칩소와 흑우와의 유전적인 차이에 대한 규명이 필요함 (칩소와 흑우에 대한 품종구분에 대한 명확한 기준을 설정할 것임)
- 유전자 진단 적용 대상 샘플 수집  
: 국립축산과학원과 지역별 가축유전자원 관리기관에 협조를 통해서 칩소와 흑우로 등록된 개체들에 대한 샘플을 확보할 예정이며, 최소 100두씩의 참조집단을 구성하여 연구를 수행할 계획임

- **참여기관 2 (노블바이오) :**

■ **검체 채취용 도구의 개발**

- 자사에서 특허를 보유하고 있는 대장암 진단을 위한 검체를 채취하는 도구를 일부 변형하여 쇠고기 검체를 채취할 수 있는 도구로의 개발
- 쇠고기 검체의 일관성 있는 정량 채취를 용이하게 하기 위한 검체 접촉 부위의 모양과 원재료의 변형
- 채취된 쇠고기 검체의 조직손상을 막기 위한 보관용기의 개발(그림 21. 참조)

■ **검체 채취의 방법과 채취량 측정방법의 확립**

- 쇠고기 유전자를 추출하기 위한 국립농산물품질관리원 시험연구소 신속검사법 표준 프로토콜 참조에 의한 검체 채취 방법의 확립
- 제작된 시제품을 사용하여 검체를 채취한 후 쇠고기에서 유전자를 추출하여 분광광도계로 정량

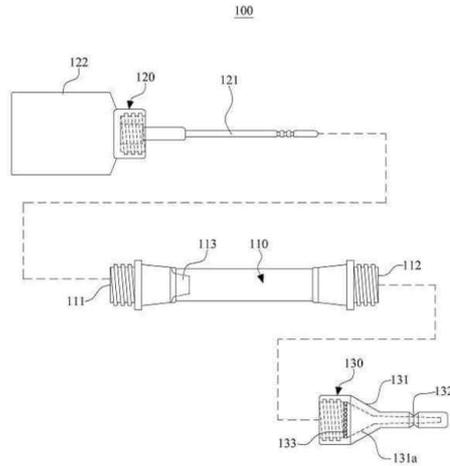


그림 22 자사에서 특허를 보유하고 있는 대장암 진단을 위한 검체 채취 도구 및 보관용기

<2차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(티엔에스) :

■ 목표 : 쇠고기 품종 판별기기 핵심 모듈 기술 개발 및 필름기반 통합형 핵심 모듈 개발

- PNA기반 한우 종판별 진단 조건 셋업 및 키트 개발
- 단위 기반 기술을 바탕으로 핵심 모듈 기술을 개발하고 성능 평가 진행
- 전처리 모듈, 유전자 증폭 모듈, 유전자 검출 모듈, 미세유체 제어 모듈 개발
- 시료전처리·PCR혼합·핵산증폭 기능이 통합된 필름기반 핵심 모듈칩 개발

- 참여기관 1 (충북대학교) :

■ 목표 : 유전자 마커 검증 및 응용 소프트웨어 개발

- 한우 공시 집단으로부터 품종식별 마커조합의 정확성 및 품종식별 시각화 소프트웨어 개발
- 축산물이력제 연계 시스템 설계

- 참여기관 2 (노블바이오) :

■ 목표 : 검체 조직의 lysis 효과를 극대화하기 위한 보관용기 및 검체보존용액의 개발

- 쇠고기 품종 판별을 위한 유전자를 분리해내기 위해서는 쇠고기를 lysis 시켜야 하며 이 과정의 효율성을 높이기 위해 lysis buffer가 포함되어 있는 보관용기에 조직의 파쇄를 위한 최적의 bead를 선별하여 넣어주고 튜브의 재질도 연결로 개발함
- 검체의 오염을 막고 분석전까지 조직이 안전하게 유지될 수 있는 보존용액의 개발

○ 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(티엔에스) :

■ 유전자 증폭과 광학검출이 기능 통합된 모듈 개발

- 개별 하드웨어로 제작된 유전자 증폭 및 광학 검출 모듈을 기능 통합화하여 제어 가능하도록 단위 시스템 설계 및 제작
- 최소한의 시료만으로도 진단이 가능하도록 미세유체 기술을 이용하여 핵산 증폭부와

핵산 판독부가 모두 포함된 미세유체칩 제어모듈을 개발

■ 초고속 핵산증폭 알고리즘 및 제어 프로그램 개발

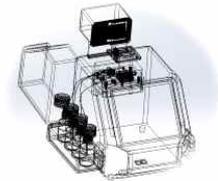
- 펠터어와 히트싱크의 동작 조건 최적화를 위한 알고리즘 개발
- 광학 측정과 연계하여 핵산 증폭을 제어 하는 프로그램 개발

■ 쇠고기 품종 판별 분석 프로그램 및 제어 보드 개발

- 유전자 검출을 위한 형광 시그널을 온도에 따라 측정하고, 측정된 데이터를 진단하기 위한 컷오프라인 설정
- 검출 민감도를 높이기 위한 알고리즘 개발
- 형광 시그널 검출 최적화를 위한 제어 프로그램 및 보드 개발
- 형광 검출 S/N ratio를 높이기 위한 모듈 개발 및 제작

■ 3대 핵심 기능이 통합된 필름기반 핵심 모듈 칩 설계 및 제작

- 3대 핵심 기능을 연결한 통합형 핵심 모듈칩을 설계하고, 각 모듈의 기능을 저해되지 않는 미세유체 유량·유속을 계산하여 통합 제어 알고리즘을 설계
- 설계된 알고리즘을 구현하는 통합형 핵심모듈칩을 필름기반으로 제작



전처리 및 핵심 모듈



유전자 판독 칩



분자진단자동화시스템

그림 23 쇠고기 품종 판별 자동화시스템 개념도

- 참여기관 1 (충북대학교) :

■ 현장진단을 위한 이동식 장비에 적합한 분석프로그램 개발

- 품종식별용 reference data입력과 대상 샘플의 검정결과의 자동 비교분석을 위한 on-site 프로그램 개발

: 한우와 칠포, 흑우에 대한 명확한 유전적 차이가 규명되지 않은 현재시점에서 각각의 품종에 고정된 마커정보들을 각각의 품종식별에 필요한 키트로 별개로 제작할 예정임 (한우용, 칠포용, 흑우용으로 구분을 할 수 있도록 할 예정이며, 사용될 마커의 갯수에 대해서는 1차년도 연구성과를 기반으로 결정할 예정임)

- 분석 raw data의 최종 판정을 위한 분석프로그램과 연동된 스마트 어플리케이션 개발
- 한우 및 비한우의 현장 진단용 프로그램을 개발하고 스마트폰과 연동할 수 있는 어플리케이션을 적용할 것임.



그림 24 현장 진단용 분석프로그램 개념도

: 한우, 칩소, 흑우에 대한 교잡을 관리를 위해서는 이력제 연동 프로그램과 유전자정보를 통해서 확인이 가능할 수 있는 결과가 도출될 것으로 예상함

- 참여기관 2 (노블바이오):

■ 쇠고기 품종 판별기에 적용되기 위한 보관용기의 개발

- o 쇠고기의 lysis를 용이하게 하기 위한 연질의 용기 개발
- o 조직을 파쇄시키기 위한 최적의 bead 선별
- o 쇠고기 품종 판별기에 적용하기 위해 보존용액 혹은 lysis buffer의 첨가량이 조절가능한 보관용기의 개발

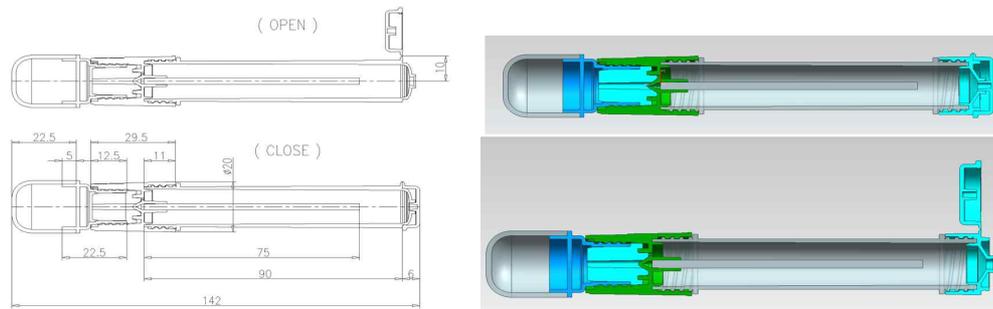


그림 25 Lysis buffer와 bead가 포함되어 있는 보관용기

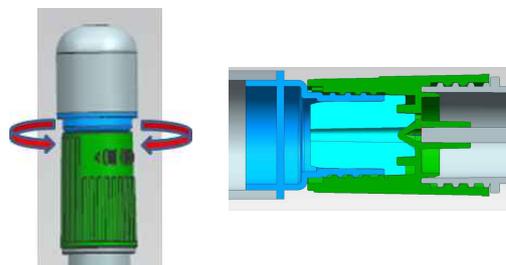


그림 26 Lysis buffer가 검체로 주입되기 위한 보관용기의 모식도

- o 새로이 개발된 보관용기를 적용하여 검체를 채취하여 성능평가 진행

<3차년도>

- o 연구개발 목표

- 주관연구기관(티엔에스) :

- 목표 : 쇠고기 품종 판별기기 및 필름기반 일체형 분자진단칩의 시제품 개발
  - 통합형 쇠고기 품종 판별기기의 개발 및 제작
  - 필름기반 일체형 분자진단칩의 시제품 개발
  - 공인기관으로부터 성능평가 수행

- 참여기관 1 (충북대학교) :

- 목표 : 유전자 정보기반 품종식별 기술의 축산물이력제 연계 시스템 개발
  - 쇠고기 품종 판별기기의 분석결과와 축산물이력제 정보 연계 서비스 구축
  - 한우, 쇠소, 흑우 3종의 품종식별키트의 통합 애플리케이션 완성

- 참여기관 2 (노블바이오) :

- 목표 : 개발된 검체 채취 및 보존용기의 쇠고기 품종 판별기의 적용과 제품화
  - 개발된 쇠고기 품종 판별기기에 자사에서 개발된 검체 채취 도구와 보관용기를 적용하여 성능시험 실시
  - 보존용액 및 lysis buffer의 감마선 멸균조건의 확립
  - 실검체를 이용한 컬렉터 현장 평가

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(티엔에스) :

■ 랩온어칩 기반 통합형 분자 진단 시스템 제작

- 쇠고기 품종 판별용 통합칩을 구동하기 위한 통합형 분자 진단 시스템 설계 및 제작
- 랩온어칩 기반의 쇠고기 품종 판별칩에 쇠고기 시료를 로딩하고, 시스템을 동작 시키면 시린지 모듈이 동작하여 시료 및 시약을 운반 및 믹싱하고 전처리부터 핵산 증폭, 검출까지 자동화가 가능하도록 기능 통합형 시스템(중량 30kg이하)을 개발

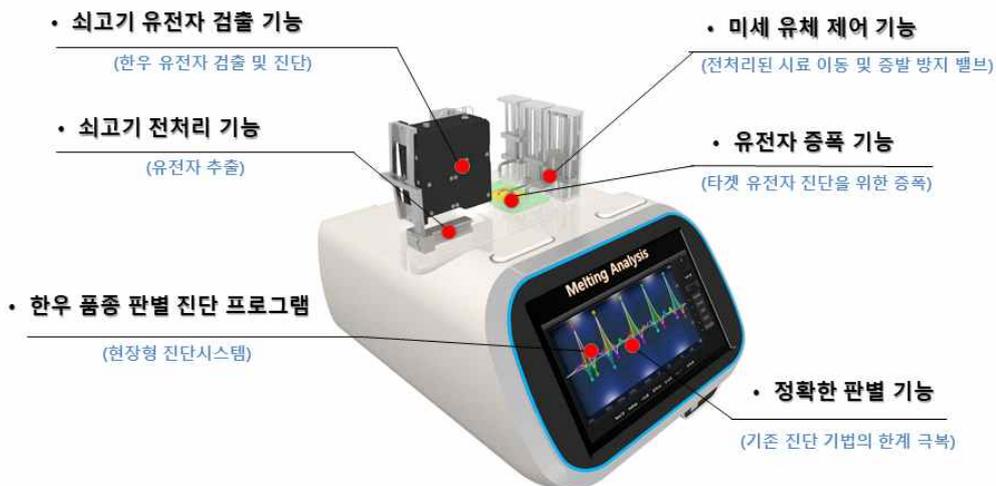


그림 27 쇠고기 품종 판별용 현장형 분자진단 통합 시스템(3차년도)

■ 쇠고기 품종 판별용 하드웨어 및 소프트웨어 제어 프로그램 개발

- 전처리 모듈, 유전자 증폭 모듈, 광학 검출 모듈 등 기능 통합형 하드웨어를 제어하기 위한 알고리즘 개발 및 제어 보드 제작
- 전처리부터 판독까지 자동화 프로토콜에 맞게 하드웨어를 제어하기 위한 프로그램 및

## UI 개발

- 쇠고기 품종 판별을 위한 진단 프로그램 개발

### ■ 쇠고기 품종 판별 조건 및 프로토콜 최적화

- 시료로부터 유전자 추출 효율을 높이기 위한 조건 최적화
- 초고속 유전자 증폭을 위한 PCR 조건 최적화
- LOD 향상을 위한 형광 시그널 검출 조건 최적화
- 현장 진단을 위한 쇠고기 품종 판별 자동화 프로토콜 최적화

### ■ 필름기반 일체형 분자진단칩의 개발

- 설계된 일체형 분자진단칩을 필름기반의 디바이스로 제작하고 미세유체의 연결성을 확인
- 시료전처리부터 판독까지 자동화 시스템으로 진행하여 일체형 분자진단칩의 성능 평가

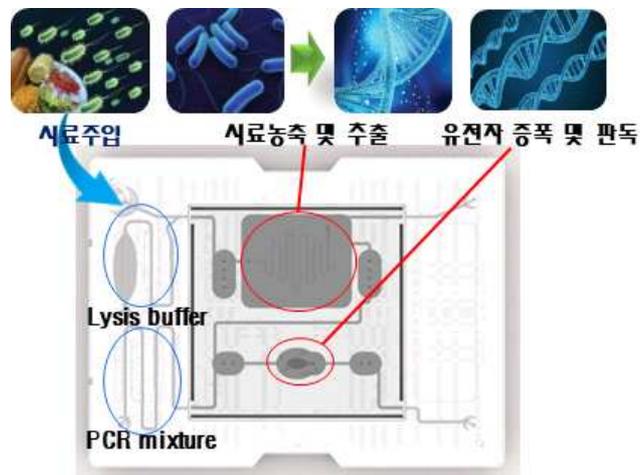


그림 28 쇠고기 품종 판별용 현장형 분자진단 통합칩

## - 참여기관 1 (충북대학교) :

### ■ 축산물 이력제 정보의 연계 정보처리 시스템 개발

- 품종식별결과에 따라 이력번호 조회기능을 추가하여 검사시료의 원산지 및 유통이력을 실시간 조회하여 소비자에게 전달하는 체계를 확립

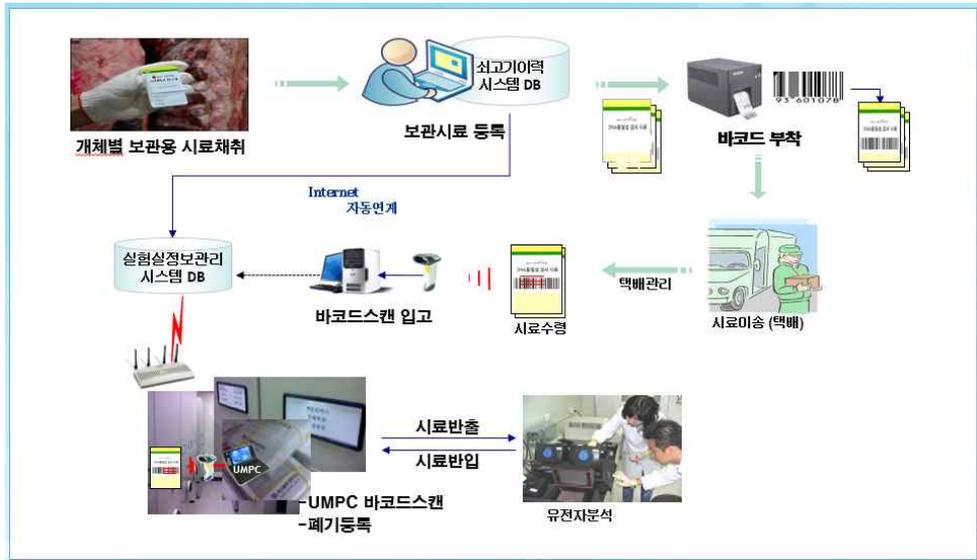


그림 29 현재 구축된 축산물시스템 체계

- 한우, 쇠소, 흑우 품종 식별 결과에 대한 간편 확인기능을 스마트기기에서 시각적으로 잘 구현되어 이를 품종별 브랜드 마케팅에 적용할 있는 차별화 요소 개발
- : 쇠소와 흑우 등록 및 개체식별을 위한 연구를 수행하면서 최종적으로는 유전자형 진단을 기반으로 100% 완벽한 한우, 흑우, 및 쇠소이력제의 구현을 목표로 본 연구를 완성할 수 있도록 할 예정임

- 참여기관 2 (노블바이오) :

- 개발된 검체 채취 및 보존용기의 쇠고기 품종 판별기의 적용과 제품화
  - 실용화를 위해 검체채취용도구 및 보존용기의 보완
  - 제품화를 위해 개발된 각 제품의 개별포장 및 포장박스 디자인 확립
  - 감마선 멸균 후의 보존용액, lysis buffer 및 용기의 성능시험

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### <연구개발 추진전략>

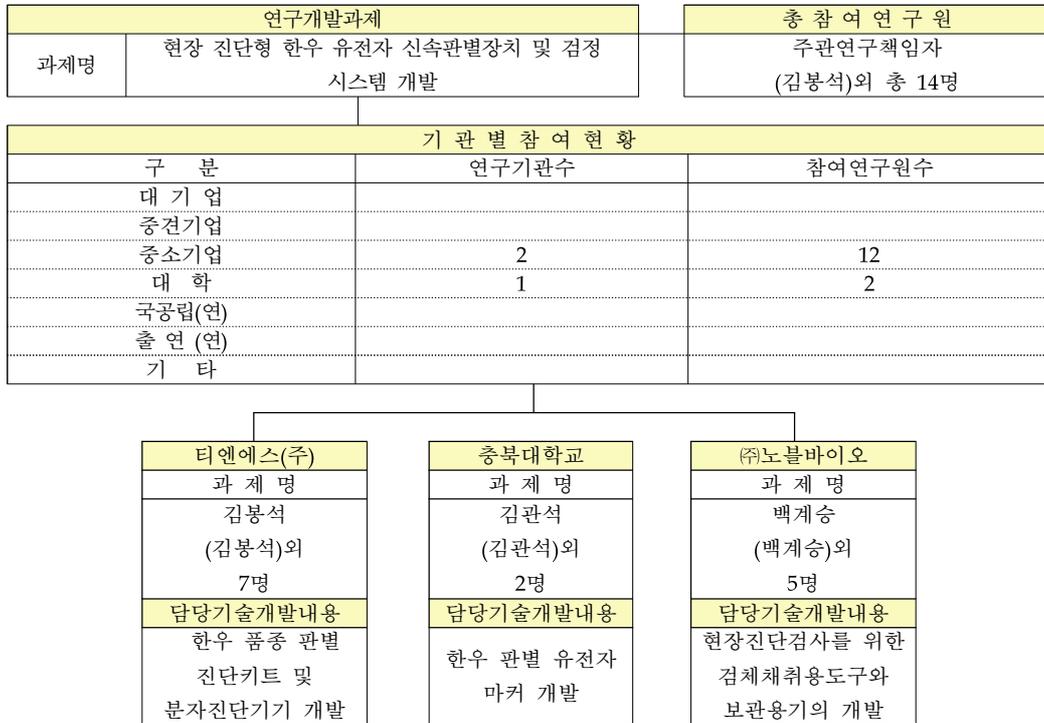
- 랩온어칩 기반의 한우 품종 판별용 현장형 분자진단 플랫폼 개발 추진
  - 티엔에스(주)는 한우 품종 판별시스템 핵심 모듈 기술 개발 담당
  - 충북대학교는 한우 품종 판별을 위한 유전자 마커 개발 담당
  - (주)노블바이오는 현장진단검사를 위한 검체채취용도와 보관용기의 개발 담당
- 본 연구수행을 위해서 농산물품질관리원, 국립축산과학원, 축산물품질평가원, 한국종축개량협회, 지역별 가축유전자원관리기관등과 협의체를 구성하여 본 연구 수행에 필요한 협조와 협의를 진행할 예정임 - 추후 연구결과에 대한 검증과 보완을 함께 진행할 것임

### <연구개발 협력 추진 체계도>



그림 30 연구개발 협력 추진 체계도

<연구개발 추진체계>



<추진일정>

일련번호	연구내용	1차년도												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)	
		월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	품종 판별 유전자 마커 개발													10,000	김관석 (충북대)	
2	검체 채취용도구의 설계도면 작성과 모델링													10,000	백계승 (노블바이오)	
3	검체 채취용도구의 시제품 제작													20,000	백계승 (노블바이오)	
4	검체의 채취량 측정을 위한 검사법 확립													3,000	백계승 (노블바이오)	
5	검체의 채취량 측정														2,000	백계승 (노블바이오)
6	PCR 혼합 모듈 개발													1,000	김봉석 (티엔에스)	
7	핵산증폭 모듈 개발													26,700	김봉석 (티엔에스)	
8	랩온어칩 기반 PCR 하드웨어 모듈 개발													20,000	김봉석 (티엔에스)	
9	핵산판독 모듈 개발													50,000	김봉석 (티엔에스)	
10	한우 품종 판별 키트 개발													20,000	김봉석 (티엔에스)	





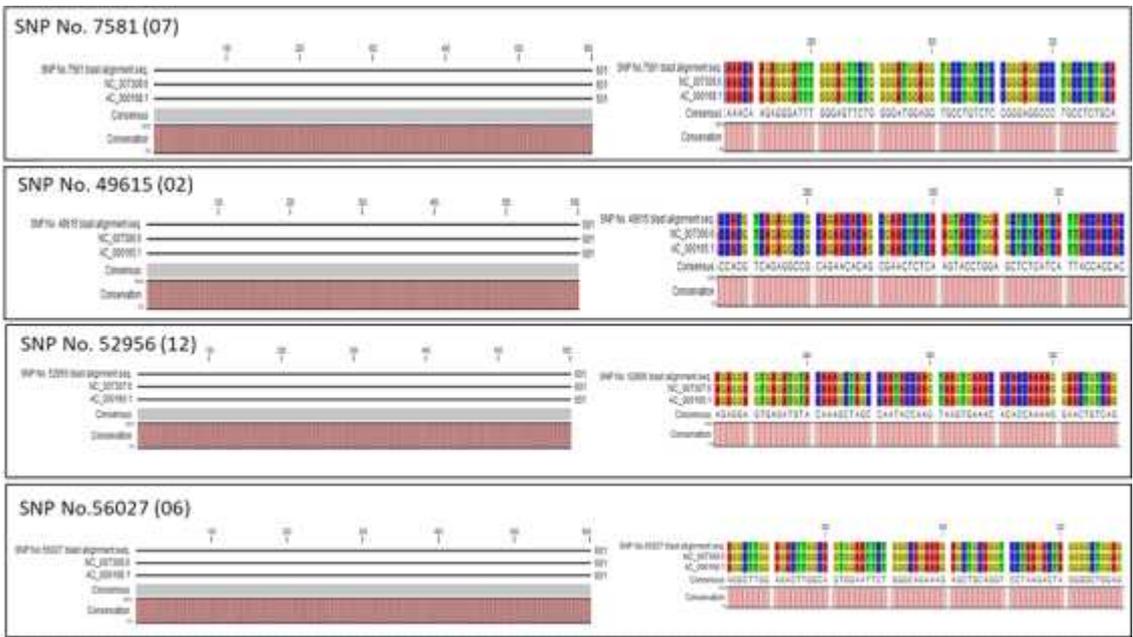


그림 32 유전자 DB 분석-1

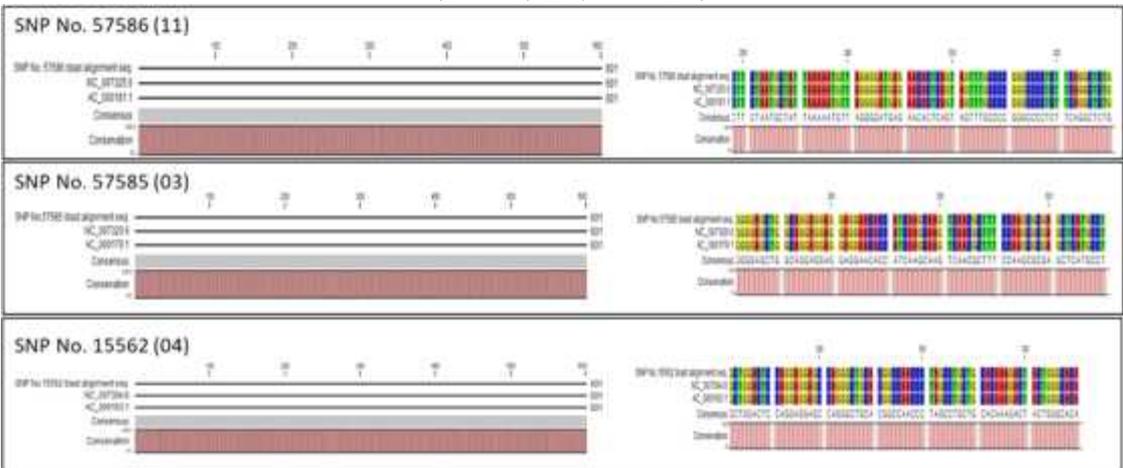


그림 33 유전자 DB 분석-3

-분석된 자료를 바탕으로 primer 디자인 진행

표1. primer 염기서열 정보

location	Ordername	Primer Sequence	TM	Ordername	Primer Sequence	TM
8	F_mk	TAC AGT GAG AAG CCC GTG TG	61	YR	tatttggctgcactgggcttg	62.1
7	YF	gtccttggcctctctgcttt	63.2	R_mk	GAT TTG GGA GTT CTG GGG ATG	61
3	F_mk	GGA GGA GGA ACA CCA TCA AGC	63	KR	gtttatgaaagataactggcccg	62
11	KF	cgtggaagcagaaaggaaaaaac	64	R_mk	atgttaggggatgagaactca	61
10	F_mk	ATCTCCGGAGTTTGCTCCT	60.5	R_mk	GGCCACTGTTTGCTTACAGAA	60.1
5	F_mk	atctggtttggggccccT	59.5	R_mk	CCA GTA GTC TTT GTG CAG CAG	61
4	F_mk	TGG TCC CGG CAG AAG CCT T	61	YR	ccagtagtcttggcagcagg	63
12	F_mk	cagttcctttggtgtttcAC	60	YR	cttcttggtgctcagataaag	62.9
9	F_mk	tcattgcctagtgtacaattctgC	63	YR	gtgctcggccttattatggtc	62.1
6	F_mk	GCA GTG GAA TTC TGG GCA GAA	61	KR	agaacaaaacccactcactcc	62
2	F_mk	TGGAATGATGAGAGCTCCAGG	62	YR	aagttcctcctgctcagttttc	62

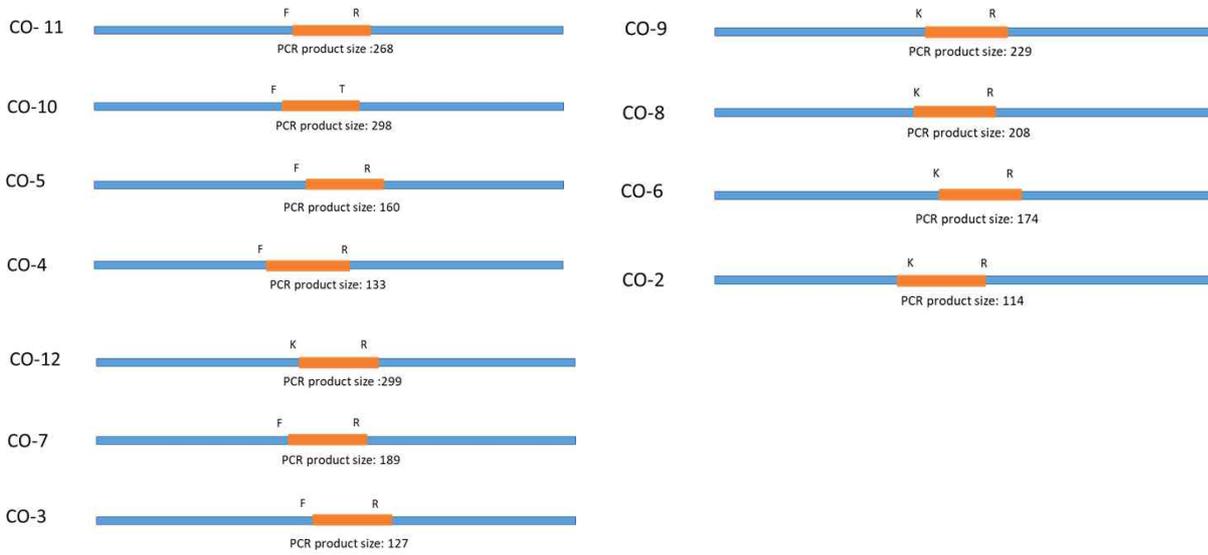


그림 34 primer 디자인 위치 및 size-1

-SYBR PCR을 통한 primer 검증 test

SET A primer test 결과

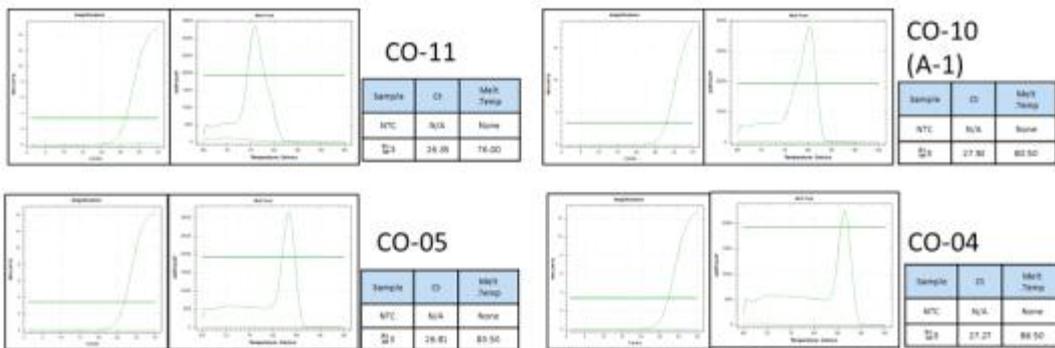


그림 47. primer set A 결과

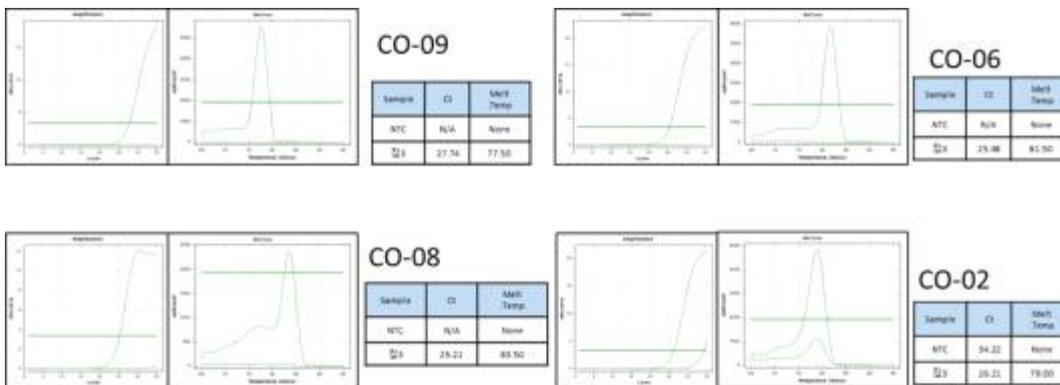
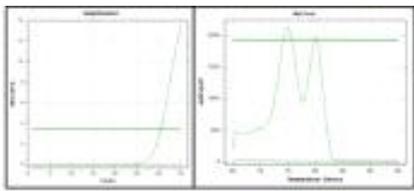
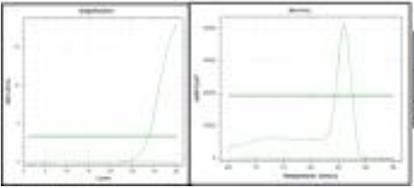


그림 35 primer set B 결과



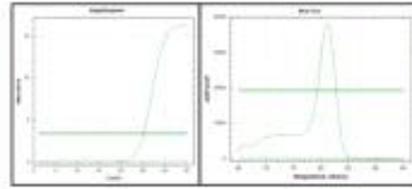
**CO-12**

Sample	CT	Melt Temp
NTC	N/A	None
21	28.48	75.00/80.00



**CO-07**

Sample	CT	Melt Temp
NTC	N/A	None
21	28.65	81.00



**CO-03**

Sample	CT	Melt Temp
NTC	N/A	None
21	25.16	81.00

그림 36 primer set C 결과

-디자인한 primer를 이용하여 SYBR PCR 한 결과 PCR product 확인

-유전자 분석 자료를 바탕으로 PNA probe를 디자인 진행

SET A, A-1					
NAME	CO-11	CO-10-1	CO-10-2	CO-05	CO-04
Primer No.	11	10	10	5	4
SNP. No	57586	7563(1)	7563(2)	23765	15562
Sequence	GGCAAACTACTGAGT	ATACTCTATTTTCTGA	GATACTCTATTTTCTGA	CCCTTGGGTTCA	CAACCTAGCCTGC
N Terminus Reporter	N: None	N: None	N: None	N: None	N: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0
C Terminus Reporter	C: None	C: None	C: None	C: None	C: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0
Tm	[1 μM] = 73 °C	[1 μM] = 63 °C	[1 μM] = 66 °C	[1 μM] = 69 °C	[1 μM] = 71 °C
	[1 nM] = 62 °C	[1 nM] = 53 °C	[1 nM] = 57 °C	[1 nM] = 56 °C	[1 nM] = 58 °C
	[1 pM] = 51 °C	[1 pM] = 44 °C	[1 pM] = 48 °C	[1 pM] = 44 °C	[1 pM] = 46 °C
Molecular Weight	4111.5	4811.4	5102.7	3754.2	3717.2
Length	Residues: 15	Residues: 18	Residues: 19	Residues: 14	Residues: 14
	Bases: 15	Bases: 18	Bases: 19	Bases: 14	Bases: 14
% Purine	60.00%	27.80%	31.60%	28.80%	35.70%
Purine Stretch	3	2	2	3	2
Complementarity	Low	Low	Low	High	Moderate
	GGCAAACTACTGAGT	ATACTCTATTTTCTGA	GATACTCTATTTTCTGA	CCCTTGGGTTCA	CAACCTAGCCTGC
Design Recommendations	Design Suitable	Design Suitable	Redesign Recommended Bases: > 18	Redesign Recommended Complementarity: High	Design Suitable
	fluorescence	Cy5	TxR	FAM	HEX

SET B					
NAME	CO-09	CO-09-sub	CO-08	CO-06	CO-02
Primer No.	9	9	8	6	2
SNP. No	49078	49078(sub)	20572	56027 (RC)	49615
Sequence	GCCCAAAATCAGA	CCCCAAATCAGA	GTGCCACAACTAG	CTGCAGCTCTTTCTGC	AGGTACTTGAGAGTT
N Terminus Reporter	N: None	N: None	N: None	N: None	N: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0
C Terminus Reporter	C: None	C: None	C: None	C: None	C: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0	Em: 0
Tm	[1 μM] = 73 °C	[1 μM] = 68 °C	[1 μM] = 68 °C	[1 μM] = 69 °C	[1 μM] = 71 °C
	[1 nM] = 61 °C	[1 nM] = 54 °C	[1 nM] = 55 °C	[1 nM] = 59 °C	[1 nM] = 59 °C
	[1 pM] = 49 °C	[1 pM] = 42 °C	[1 pM] = 43 °C	[1 pM] = 48 °C	[1 pM] = 48 °C
Molecular Weight	3774.2	3482.9	3529.9	4271.8	4157.5
Length	Residues: 14	Residues: 13	Residues: 13	Residues: 16	Residues: 15
	Bases: 14	Bases: 13	Bases: 13	Bases: 16	Bases: 15
% Purine	57.10%	53.80%	53.80%	25.00%	60.00%
Purine Stretch	4	4	2	2	5
Complementarity	Low	Low	Moderate	High	Moderate
	GCCCAAAATCAGA	CCCCAAATCAGA	GTGCCACAACTAG	CTGCAGCTCTTTCTGC	AGGTACTTGAGAGTT
Design Recommendations	Design Suitable	Design Suitable	Design Suitable	Redesign Recommended Complementarity: High	Redesign Recommended Purine Stretch: > 4
	fluorescence	Cy5	Cy5	TxR	FAM

SET C			
NAME	CO-12	CO-07	CO-03
Primer No.	12	7	3
SNP. No	52956	7581	57585
Sequence	GTTTCACTTACTTGGTA	ACAGGCACCTCCA	AGCAAGTCAACGC
N Terminus Reporter	N: None	N: None	N: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0
C Terminus Reporter	C: None	C: None	C: None
	Ex: 0	Ex: 0	Ex: 0
	Em: 0	Em: 0	Em: 0
Tm	[1 μM] = 66 °C	[1 μM] = 73 °C	[1 μM] = 73 °C
	[1 nM] = 56 °C	[1 nM] = 59 °C	[1 nM] = 61 °C
	[1 pM] = 47 °C	[1 pM] = 46 °C	[1 pM] = 49 °C
Molecular Weight	4601.1	3474.9	3538.9
Length	Residues: 17	Residues: 13	Residues: 13
	Bases: 17	Bases: 13	Bases: 13
% Purine	35.30%	46.20%	61.50%
Purine Stretch	2	3	3
Complementarity	Low	Moderate	Low
	GTTTCACTTACTTGGTA	ACAGGCACCTCCA	AGCAAGTCAACGC
Design Recommendations	Design Suitable	Design Suitable	Redesign Recommended % Purine Content: > 60%
	fluorescence	TxR	HEX

그림 37 PNA probe 디자인

-을 위한 PNA probe 형광 및 조합

SET	No.	Flour.
A	11	Cy5
	10	TxR
	5	FAM
	4	HEX
B	9	Cy5
	8	TxR
	6	FAM
	2	HEX
C	12	TxR
	7	HEX
	3	FAM

그림 38 Multiplex PNA probe 조합

-PNA probe 결과 확인 및 키트 test

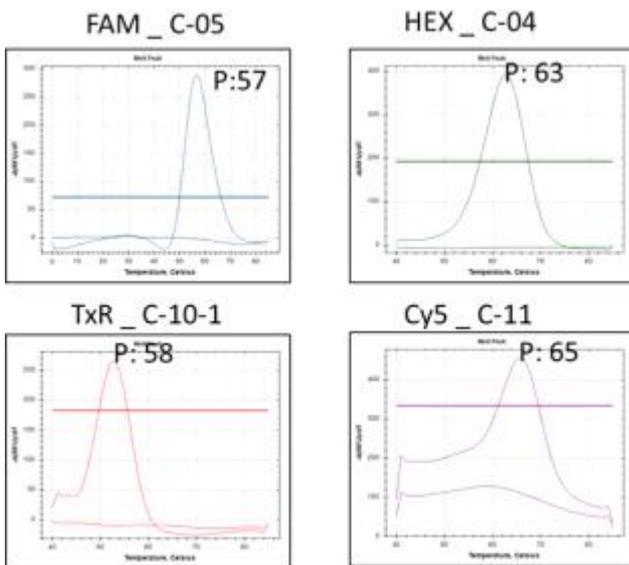


그림 39 set A PNA probe test 결과

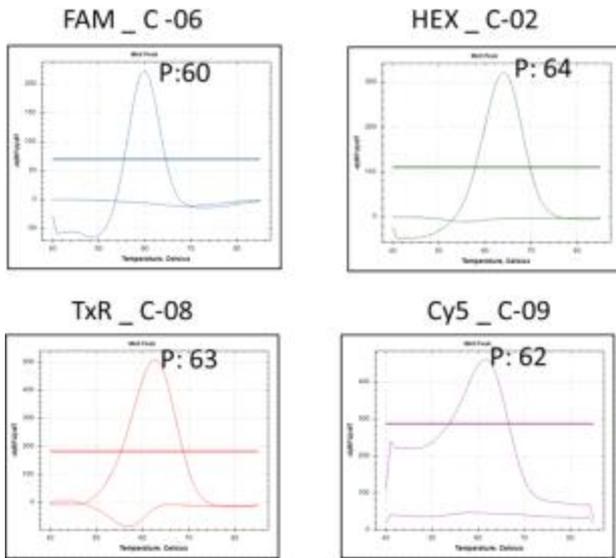


그림 40 set B PNA probe test 결과

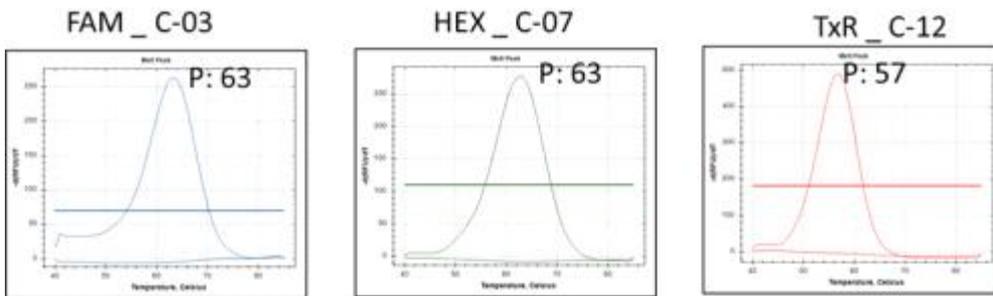


그림 41 set C PNA probe test 결과

1.2 분자 진단 기기

-PCR 혼합 모듈 개발

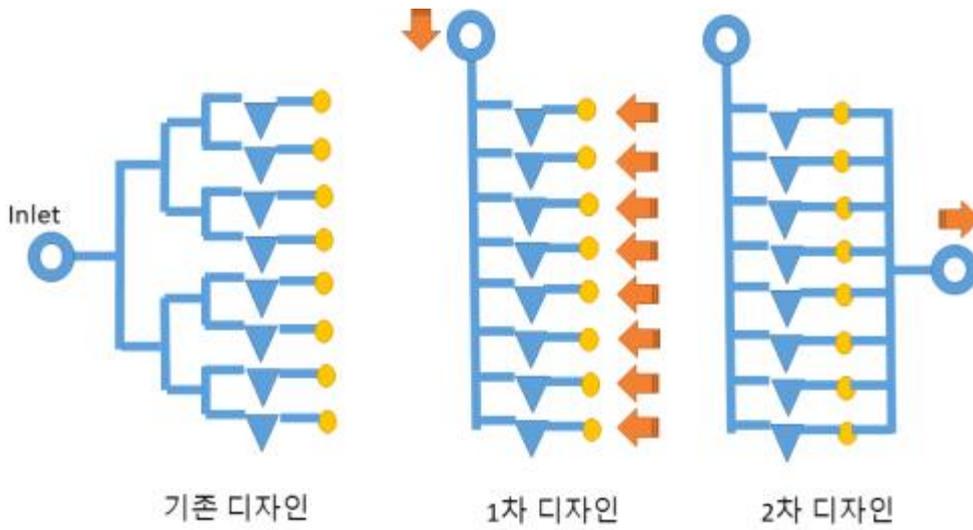


그림 42 PCR 시약 정량 분주칩 디자인 컨셉

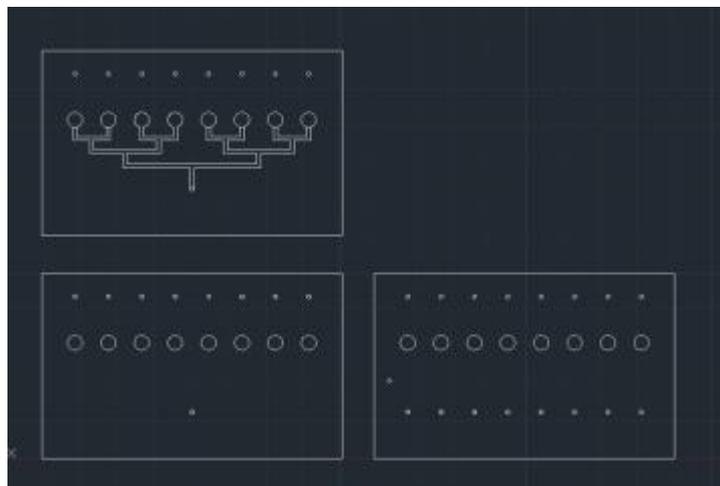


그림 43. 미세 유체칩 설계



그림 44 칩의 증발 테스트 셋업

실험 개요 : Lid를 장착하여 Validation Chip의 증발 Test

실험 목적 : Inlet/Outlet의 Valve 없이 Open되어 있는 상태에서 Lid 장착 후 30Cycle 진행 시  
Chip내의 시료가 증발되는지에 대한 유무 확인

실험 방법 : Lid의 Voltage 값을 24V로 하고 PCR 30Cycle Run 진행

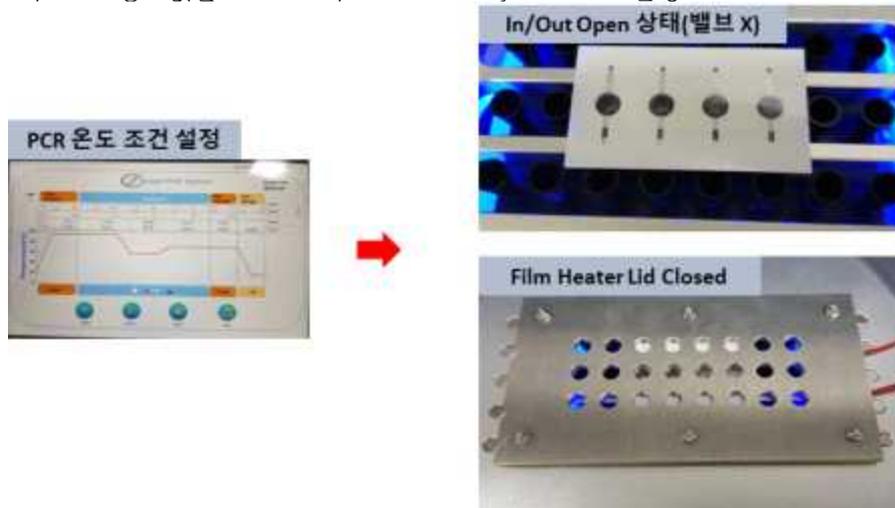


그림 45 칩의 시약 증발 테스트

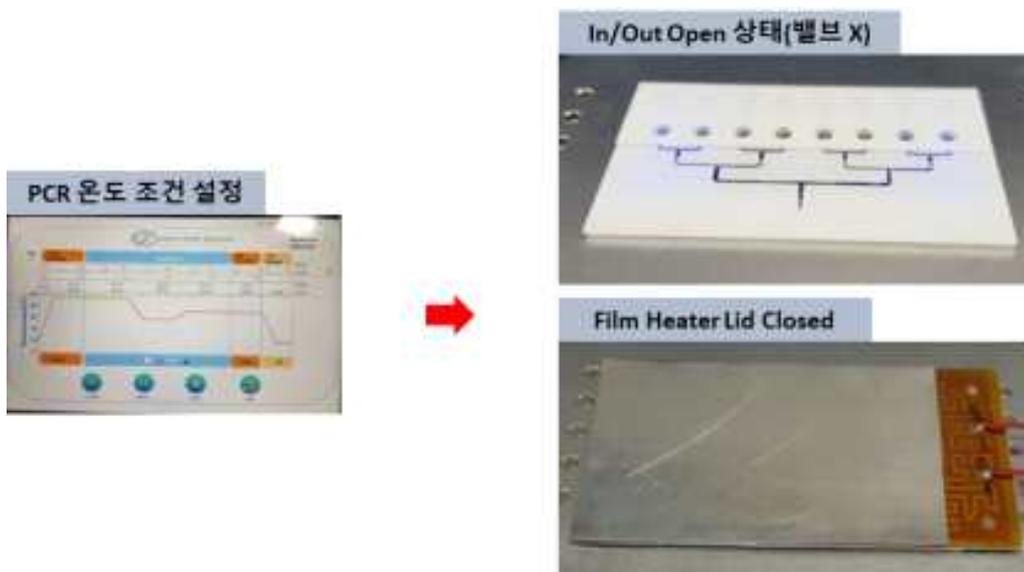


그림 46 정량 분주칩 테스트

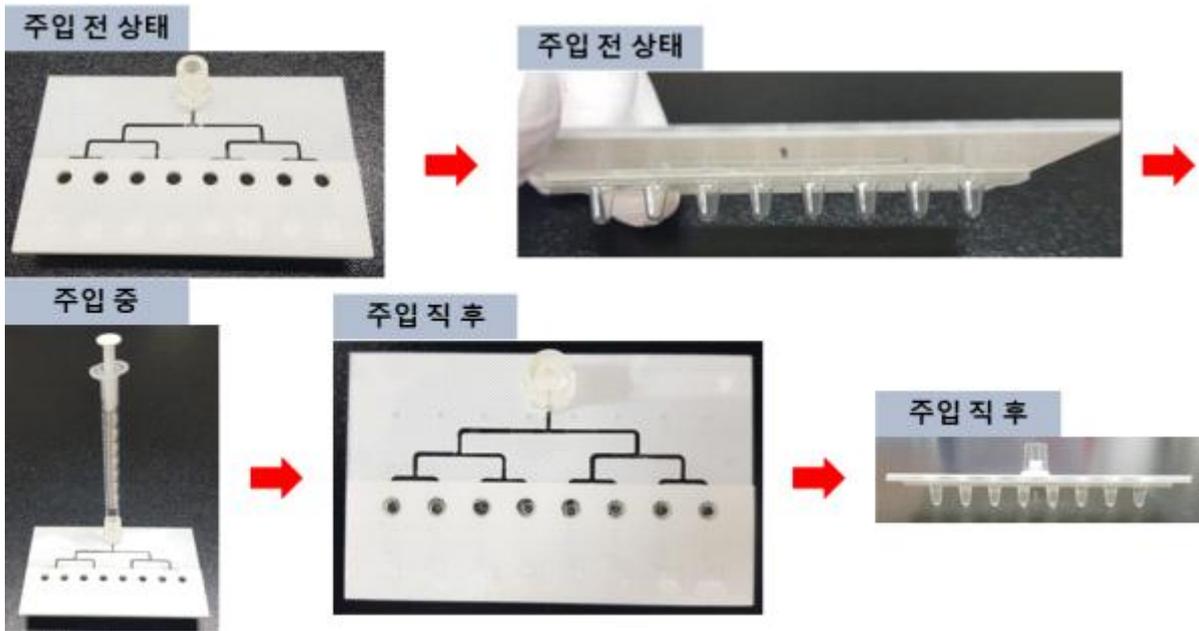


그림 47 정량분주칩 실험 결과

-핵산증폭 모듈 개발

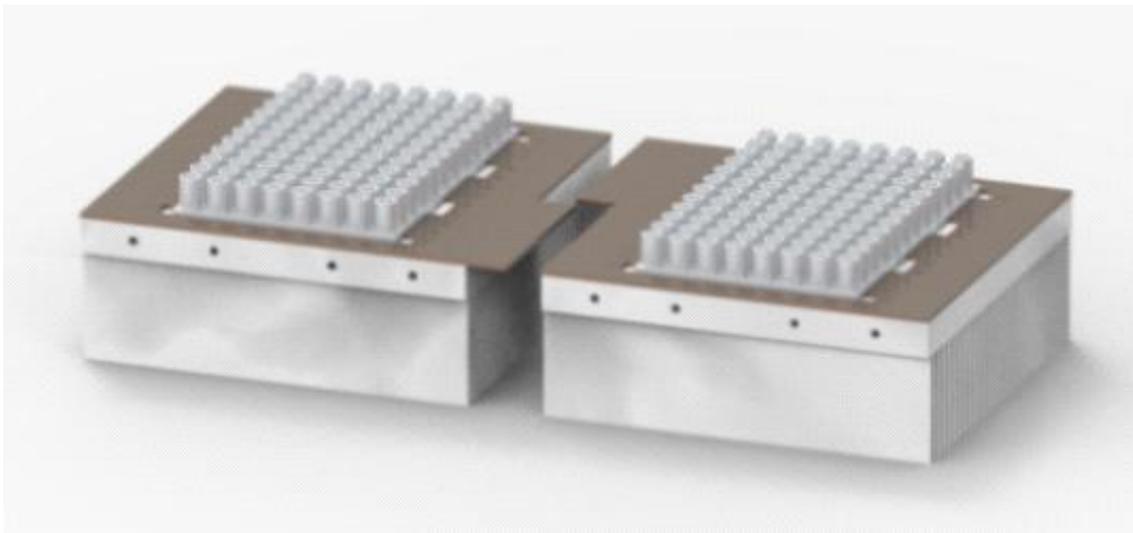


그림 48 펠티어 히팅 모듈 설계



그림 50 펠티어 히팅 모듈 제작

-랩온어칩 기반 PCR 하드웨어 개발

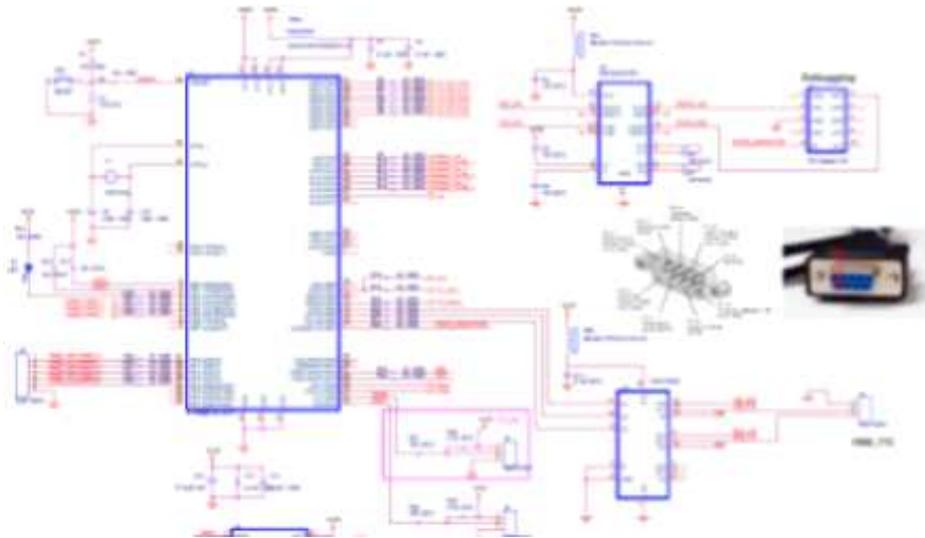
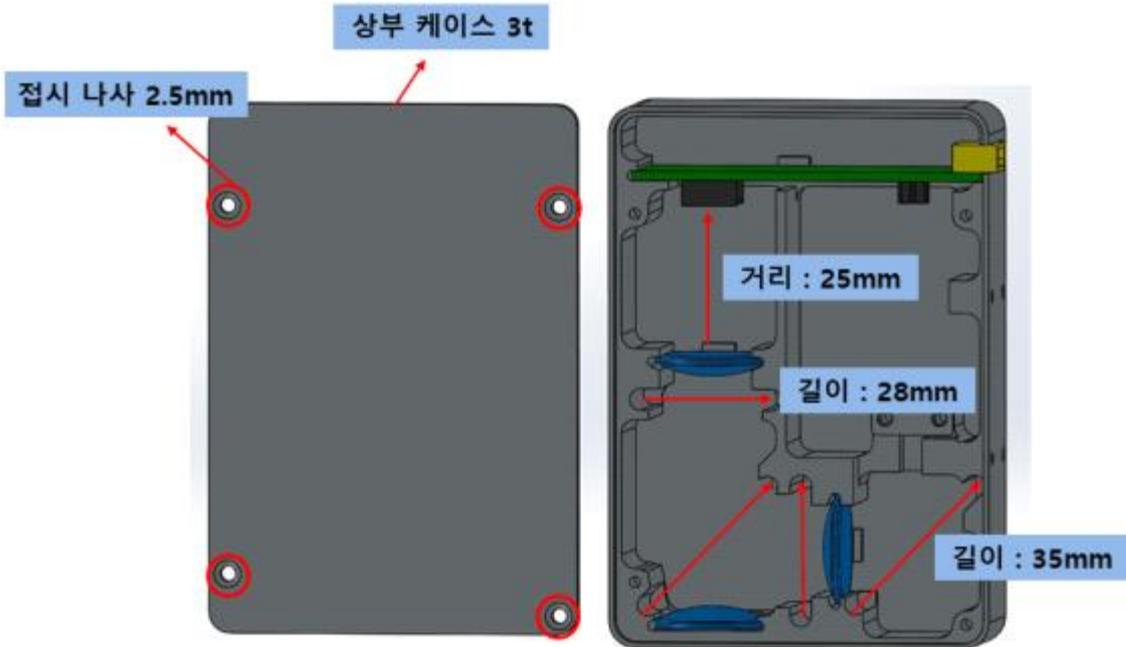


그림 51 펠티어 제어 회로 설계

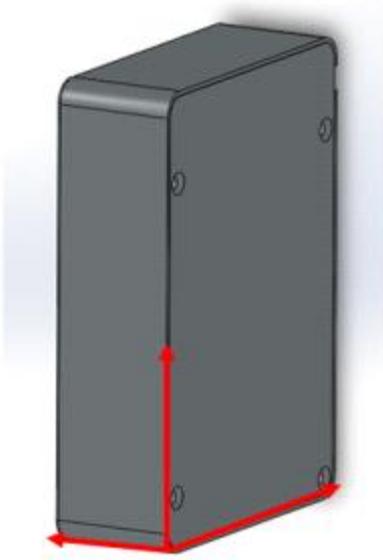
: 회로 설계를 기반으로 PCB 제작 중

-핵산 판독 모듈 개발

: FAM, Tex.R 용 단과장 핵산 판독 모듈 설계



**1Channel Type**



**W:27mm x D:70mm x H:100mm**

그림 52 핵산 판독 모듈 설계



그림 53 핵산 판독 모듈 제작

<2차년도>

진단키트

PCR 테스트

Single PNA method 조성

Components	Amount	Final conc.
gDNA	1 $\mu$ l	
Forward primer 10p	1 $\mu$ l	0.5p
Reverse primer 1p	1 $\mu$ l	0.05p
Anti HS Taq Premix without dye	10 $\mu$ l	1X
PNA Probe	0.5 $\mu$ l	0.25p
D.W	6.5 $\mu$ l	

Total 20 $\mu$ l

Multi PNA method 조성

Components	Amount	Final conc.
gDNA	1 $\mu$ l	
Forward primer 10p	Each marker 1 $\mu$ l	Each marker 0.5p
Reverse primer 1p	Each marker 1 $\mu$ l	Each marker 0.05p
Anti HS Taq Premix without dye	10 $\mu$ l	1X
PNA Probe	0.5 $\mu$ l	Each probe 0.0625p
D.W	Up to 20 $\mu$ l	

Total 20 $\mu$ l

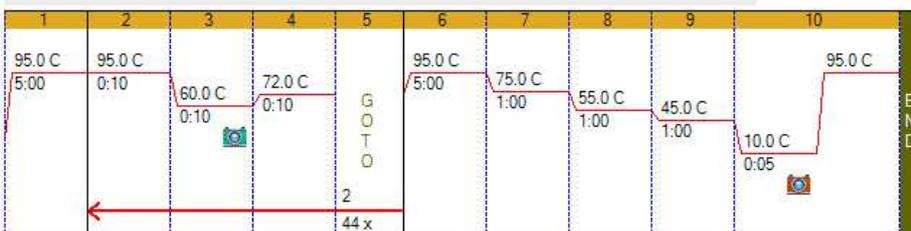
Normal PNA method condition \_ TNT premix using



Total : 2h 44min  
Amplification time : 2h 2min

Total 50min shorten

Fast PNA method condition 2 \_ TNT premix using



Total : 1h 54min  
Amplification time : 1h 12min

\* TNT Anti-HS taq premix (2X) without dye manual : Pre-denaturing 95°C 10min Fix

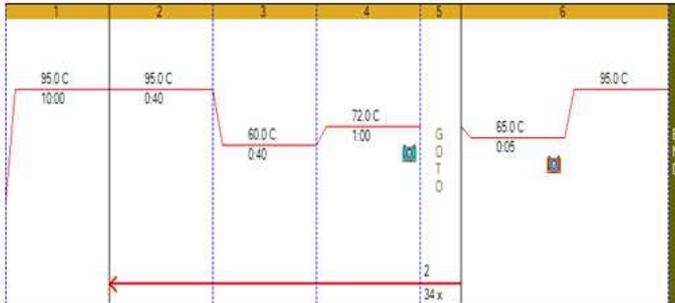
그림 54. PCR테스트

## 실험 목적

- 2차 design 한 Primer 조합들에 대한 성능 테스트  
: 고시안 Primer 참고 수정 design 한 Primer set

## 실험 조건

<Normal PCR condition>



<PCR composition>

Reagent	Volume
gDNA	1 $\mu$ l
Forward primer 10p	1 $\mu$ l
Reverse primer 10p	1 $\mu$ l
20x Evagreen	1 $\mu$ l
2X Topsimple premix-HOT	10 $\mu$ l
DW	6 $\mu$ l
total	20 $\mu$ l

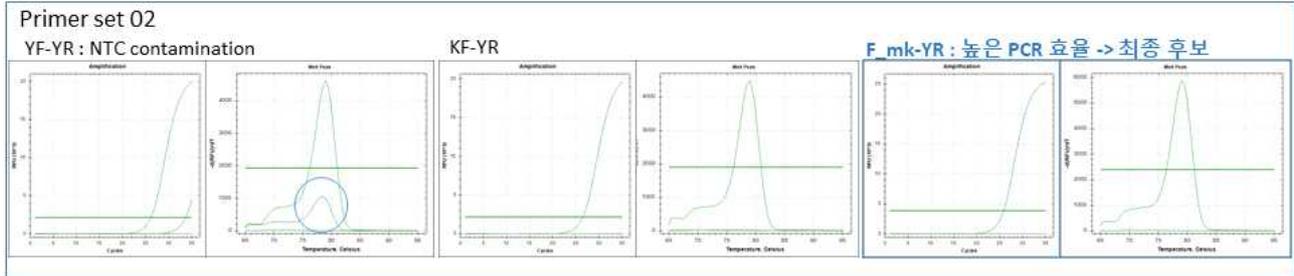
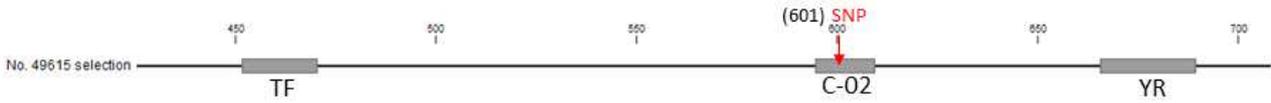


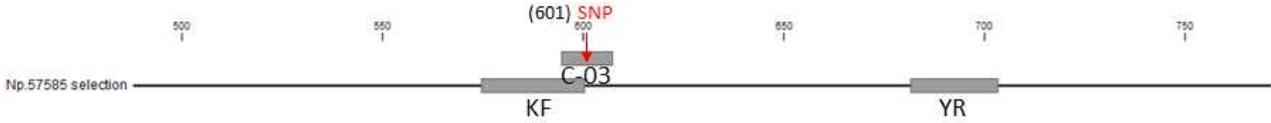
그림 55 PNA probe 디자인

Probe NAME	C-02	C-03	C-04	C-05
Primer NAME	CO-02	CO-03	CO-04	CO-05
SNP. No	49615	57585	15562	23765
Sequence	AGGTACTTGAGAGTT	AGCAAGTCAACGC	CAACCCTAGCCTGC	CCCTTTCGGGTTCA
N Terminus Reporter	N: None Ex: 0 Em: 0			
C Terminus Reporter	C: None Ex: 0 Em: 0			
Tm	[1 $\mu$ M] = 71 $^{\circ}$ C [1 nM] = 59 $^{\circ}$ C [1 pM] = 48 $^{\circ}$ C	[1 $\mu$ M] = 73 $^{\circ}$ C [1 nM] = 61 $^{\circ}$ C [1 pM] = 49 $^{\circ}$ C	[1 $\mu$ M] = 71 $^{\circ}$ C [1 nM] = 58 $^{\circ}$ C [1 pM] = 46 $^{\circ}$ C	[1 $\mu$ M] = 69 $^{\circ}$ C [1 nM] = 56 $^{\circ}$ C [1 pM] = 44 $^{\circ}$ C
Molecular Weight	4157.5	3538.9	3717.2	3754.2
Length	Residues: 15 Bases: 15	Residues: 13 Bases: 13	Residues: 14 Bases: 14	Residues: 14 Bases: 14
% Purine	60.00%	61.50%	35.70%	28.60%
Purine Stretch	5	3	2	3
Complementarity	Moderate AGGTACTTGAGAGTT	Low AGCAAGTCAACGC	Moderate CAACCCTAGCCTGC	High CCCTTTCGGGTTCA
Design Recommendations	Redesign Recommended Purine Stretch: > 4	Redesign Recommended % Purine Content: > 60%	Design Suitable	Redesign Recommended Complementarity: High
fluorescence	HEX	FAM	HEX	FAM

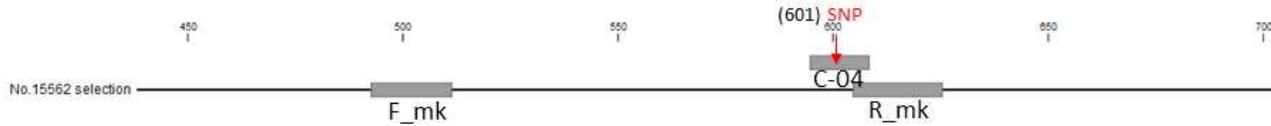
Marker No. 2



Marker No. 3



Marker No. 4



Marker No. 5



티엔에스 보유 수입우 한우 \_ 최종 판정 (PNA method + Sequencing)

Sample 명	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	판정
호주 앞다리	MM	MM	MM	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	PM	MM	HETERO	HETERO	수입우
미국 갈비살	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MM	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	수입우
미국 부채살	PM	HETERO	HETERO	MM	MM	HETERO	-	HETERO	HETERO	PM	HETERO	수입우
호주 큐브1-1	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	-	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	수입우
호주 큐브1-2	PM	PM	PM	HETERO	MM	HETERO	HETERO	PM	PM	HETERO	MM	수입우
호주 큐브1-3	MM	MM	PM	HETERO	MM	MM	MM	PM	MM	HETERO	HETERO	수입우
호주 큐브2-1	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	PM	PM	PM	HETERO	HETERO	PM	수입우
호주 큐브2-2	PM	PM	MM	HETERO	MM	PM	HETERO	PM	HETERO	HETERO	MM	수입우
호주 큐브2-3	HETERO	PM	HETERO	HETERO	PM	HETERO	MM	MM	(일수)	PM	HETERO	수입우
호주 큐브3-1	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MM	HETERO	-	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	수입우
호주 큐브3-2	MM	MM	PM	HETERO	MM	MM	MM	PM	MM	HETERO	HETERO	수입우
볼살1	MM	HETERO	HETERO	MM	MM	MM	HETERO	HETERO	MM	HETERO	MM	수입우
볼살2	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MM	MM	HETERO	PM/HETERO	PM	MM	수입우
볼살3	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	MM	MM	HETERO	PM/HETERO	PM	MM	수입우
볼살4	MM	MM	HETERO	PM	PM	HETERO	MM	MM	MM	HETERO	MM	수입우
등심	PM	HETERO	MM	PM	HETERO	HETERO	HETERO	PM	PM	MM	HETERO	수입우
등심와규	HETERO	HETERO	HETERO	MM	HETERO	HETERO	MM	HETERO	PM/HETERO	HETERO	HETERO	수입우
국거리	PM	HETERO	MM	PM	HETERO	PM	HETERO	MM	PM	PM	HETERO	수입우
집1(한우)	MM	MM	MM	한우								

판정	
수입우	Perfect match(+HETERO) 마커가 5개 이상
한우	Perfect match(+HETERO) 마커가 4개 이하

그림 56 수입우, 한우 판정표

-PNA probe 결과 확인 및 키트 test

## Oligo test – Probe working test

### Composition

#### Multi oligo test (4 oligomer and probe in 1 tube)

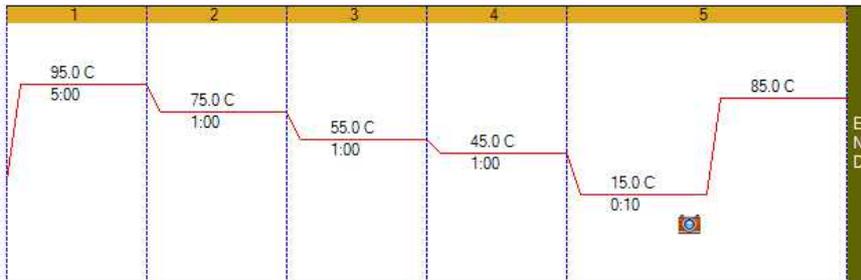
Components	Amount
*Oligomer mixture (each oligomer diluted at 2.5p)	4 $\mu$ l
2 X PCR premix	10 $\mu$ l
**PNA mixture (each PNA diluted at 2.5p in 80% DMSO)	0.5 $\mu$ l
D.W	5.5 $\mu$ l
Total 20 $\mu$ l	

#### Single oligo test

Components	Amount
Oligomer mixture (each oligomer diluted at 2.5p)	1 $\mu$ l
2 X PCR premix	10 $\mu$ l
PNA Probe (Diluted at 2.5p in 80% DMSO)	0.5 $\mu$ l
D.W	8.5 $\mu$ l
Total 20 $\mu$ l	

- \* 10 $\mu$ l Oligomers which separately diluted at 2.5p are mixed up in 1.5ml tube  
If 100p Oligomers use without separately dilution, each oligomer 10 $\mu$ l in 360 $\mu$ l 1X TE buffer. (Not recommended)
- \*\* each 1 $\mu$ l 100p PNA probe (total 4  $\mu$ l) in 36 $\mu$ l 80% DMSO (up to total 40 $\mu$ l)

### Condition



### Marker No. 2

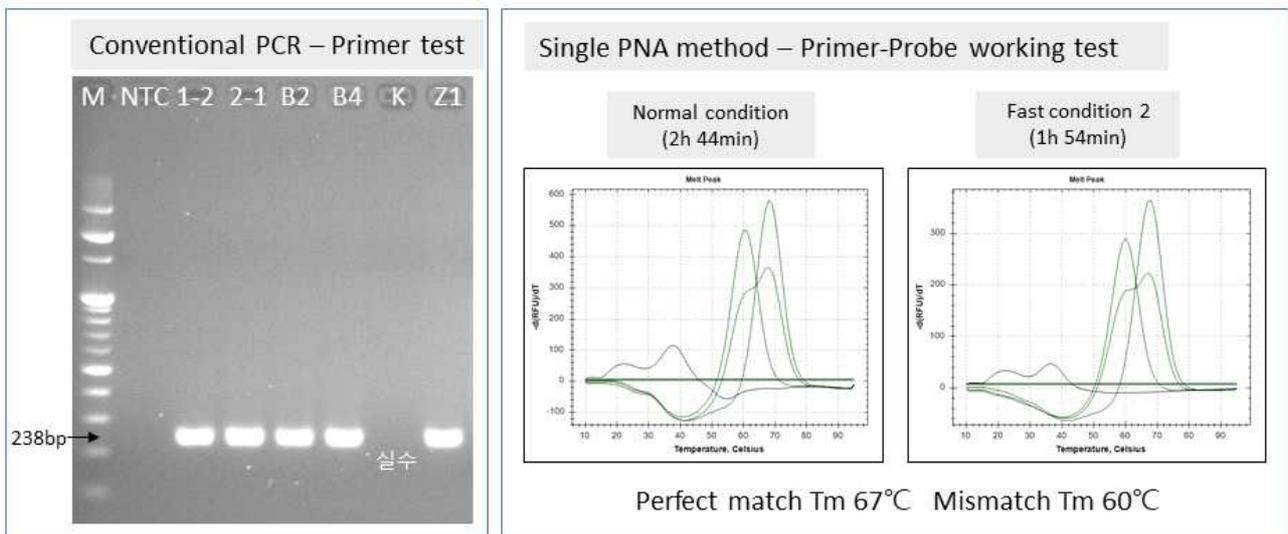
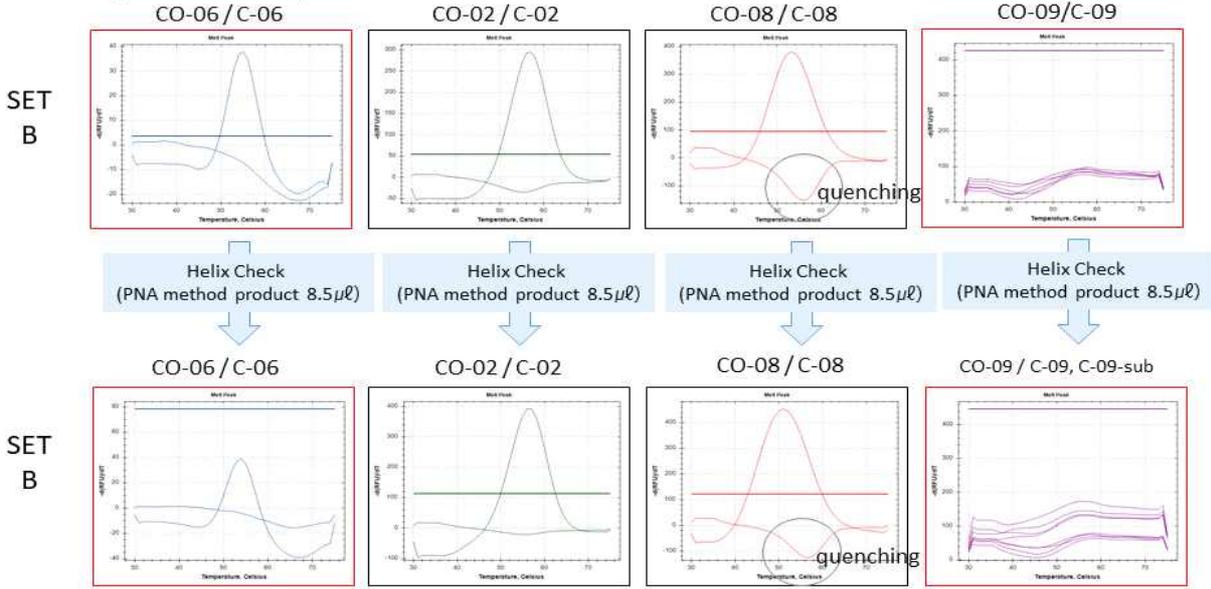


그림 57 올리고머 테스트

### Single PNA method test Trouble shooting (Multi probe)

- Single PNA Method product Helix check로 PCR 생성물 및 간섭 여부 1차 확인

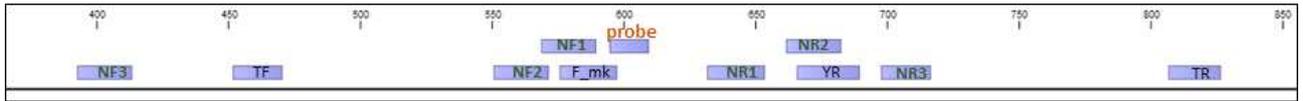


**CO-06** - PNA high complementarity에 의한 signal 저해 -> PNA 재 design or Primer 재 design, Asymmetric 농도 변경을 통한 PCR 효율 증대

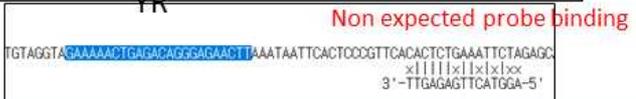
**CO-08** - PNA high complementarity에 의한 self quenching, Primer 개별 test (SYBR)시 꺾임 현상 있음 -> PNA 재 design, Primer 재 design 고려

**CO-09** - Asymmetric 산물 형성되지 않음 : Probe에 의한 저해 가능성, single helix check에서는 PNA working 확인

-> Primer Asymmetric 농도 조절 or 재 design 통한 효율 증대



YR 보다 바깥쪽 reverse primer 비특이적 signal 가능성 : NR1, NR2 후보



**TF\_TR single PNA method**

TF\_TR에서 비특이 peak  
-> TF\_TR 산물보다 바깥쪽 증폭은 지양 : NF3 후보 제외

0.5ul probe adding re-melting check

Probe 추가 melting 시 비특이 산물에 대한 signal 증가  
-> TF, TR 산물에 대한 효율 낮음  
: 새로 디자인한 primer에서 효율 테스트 진행 필요

**TF\_YR single PNA method**

- Probe와 Primer 간의 결합 해소로 PM signal 뚝  
-> Primer와 probe 거리 떨어진 NF1, NF2 후보 가능 확인 됨  
- Reverse 기종으로 사용시, TR에서 나타난 비특이 Peak 사라짐  
-> Reverse는 기존 primer 사용 무방 확인

2번 재 design primer\_probe scheme 정보-2

재 design primer binding status

```

ZNF1 GTGGTGGTAAATGATGAGA versus ZNF2 CCCTGCTCAGTTTTTCTACC
Matches = 11
Score = 6
GGTNGNAANNNGAGA
est. tm = less than zero
DeltaG 37 degrees = -0.98 kcal/mole
    3'-CCATCTTTTGACTCTGTCC-5'
      |||x|x| |xox| |||
    5'-GTGGTGGTAAATGATGAGA-3'
  
```

Primer dimer formation (NF1-NR2)

```

AGTTCCCTGCTCAGTTTTTCTACCACATATAAAGGGACATAAAGAGACCAAGTCAAGGGCCGAGAACACAGGAACTCTCAAGTACCTGGAGCTCTCATATTACACACACAGATCCCTT
      |||x|x| |xox| |||
    3'-AGAGTAGTAATGGTGGTGG-5'
  
```

Non expected primer binding (NF1)

```

AGTTCCCTGCTCAGTTTTTCTACCACATATAAAGGGACATAAAGAGACCAAGTCAAGGGCCGAGAACACAGGAACTCTCAAGTACCTGGAGCTCTCATATTACACACACAGATCCCTT
      |x|x|x| |||x|x| |||
    3'-AGAGTAGTAATGGTGGTGG-5'
  
```

Non expected primer binding (NF1)

```

AGTTCCCTGCTCAGTTTTTCTACCACATATAAAGGGACATAAAGAGACCAAGTCAAGGGCCGAGAACACAGGAACTCTCAAGTACCTGGAGCTCTCATATTACACACACAGATCCCTT
      |x|x|x| |||x|x| |||
    3'-AGAGTAGTAATGGTGGTGG-5'
  
```

Correct primer binding (NF1)

```

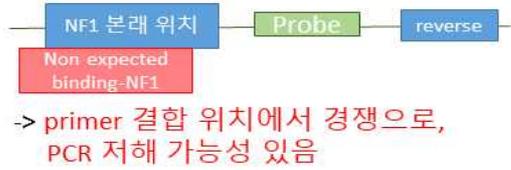
AGTTCCCTGCTCAGTTTTTCTACCACATATAAAGGGACATAAAGAGACCAAGTCAAGGGCCGAGAACACAGGAACTCTCAAGTACCTGGAGCTCTCATATTACACACACAGATCCCTT
      |||x|x| |xox| |||
    3'-AGAGTAGTAATGGTGGTGG-5'
  
```

Non expected primer binding (NF1)

```

AGTTCCCTGCTCAGTTTTTCTACCACATATAAAGGGACATAAAGAGACCAAGTCAAGGGCCGAGAACACAGGAACTCTCAAGTACCTGGAGCTCTCATATTACACACACAGATCCCTT
      |x|x|x| |||x|x| |||
    3'-AGAGTAGTAATGGTGGTGG-5'
  
```

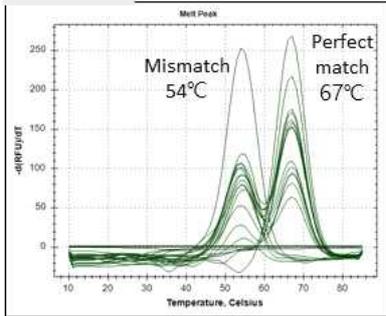
Non expected binding Tm이 낮아, PCR에 영향 줄 가능성은 적다고 추측 됨



- > 새로 디자인한 Primer는 비특이 결합 가능성 낮은 NF2-YR로 테스트 진행
- > TF-YR과 NF2-YR 두 후보로 SET B 5, 2, 12 에 적용

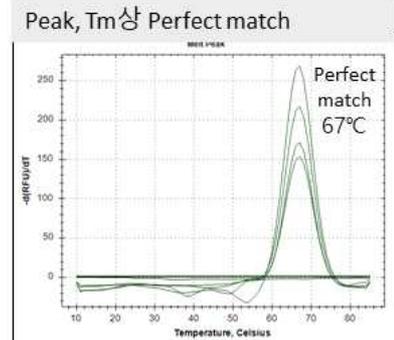
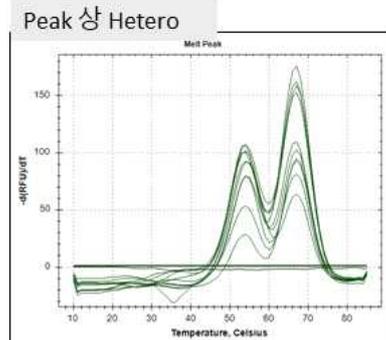
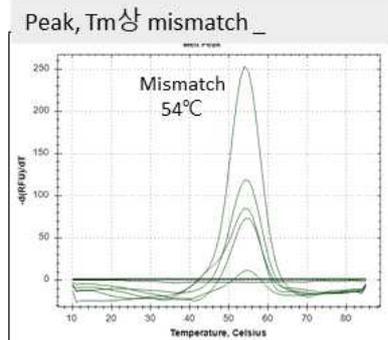
**04 - Single PNA Method** : PNA method 적용 가능성 확인 및 시료 seq. 상태 확인 위해 진행  
 수입우 18개 시료, 한우 1개 시료에 대해 실험 진행  
 Primer conc. Forward : Reverse = 1p : 10p  
 Probe DW dilution : DW 9µl + probe 1µl -> 0.5µl in master mix 20µl

전체 결과

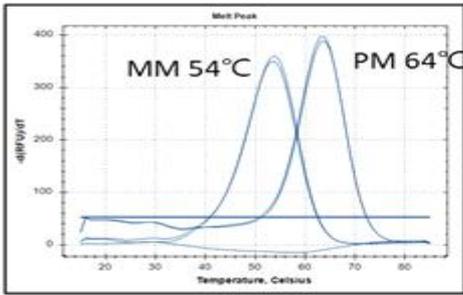


호주 알다리	미국 갈비살	미국 루채살	호주 큐브1-1	호주 큐브1-2	호주 큐브1-3	호주 큐브2-1	호주 큐브2-2	호주 큐브2-3	호주 큐브3-1	호주 큐브3-2	불살1	불살2	불살3	불살4	등심	등심 좌우	국거리	집1 (한우)	
Δ	MM	HETERO	HETERO	HETERO	PM	PM	HETERO	MM	HETERO	HETERO	PM	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	(일부)	HETERO	MM	MM

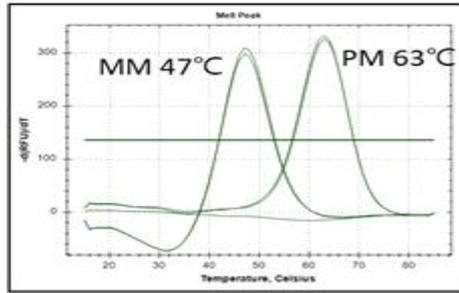
PM	Perfect match signal 가장 높음
PM	Perfect match signal 무관해로 높음
MM	Mismatch signal 가장 높음
HETERO	HETERO - Mismatch peak 가 더 높음
HETERO	HETERO 추정-signal 매우 낮음
PM/HETERO	HETERO 추정-Peak Tm상 Perfect match



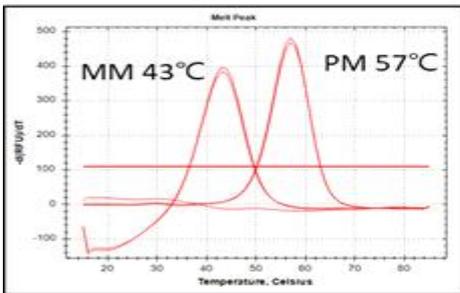
FAM



HEX



TxR



Cy5

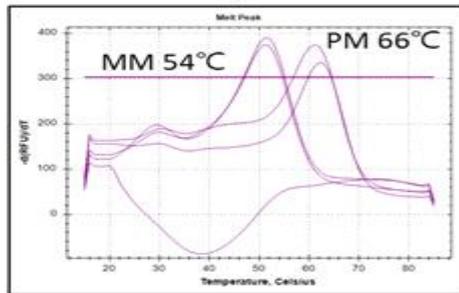
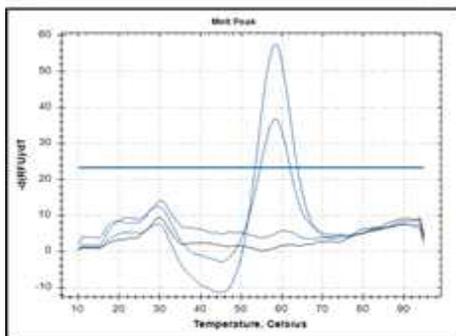
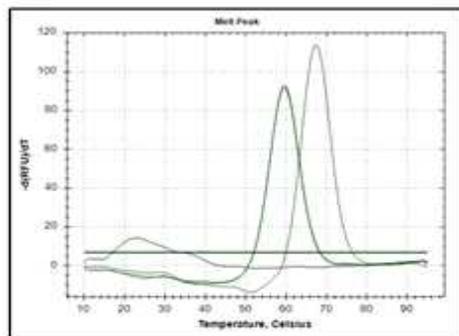


그림 58 래퍼런스 시료에 대한 PNA 키트 결과

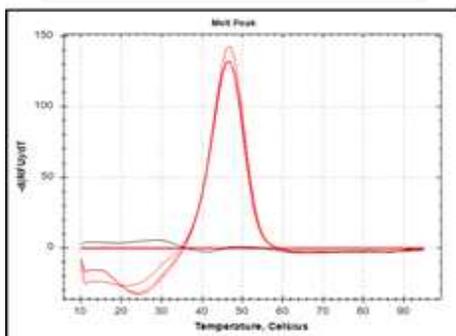
FAM



HEX



TxR



Cy5

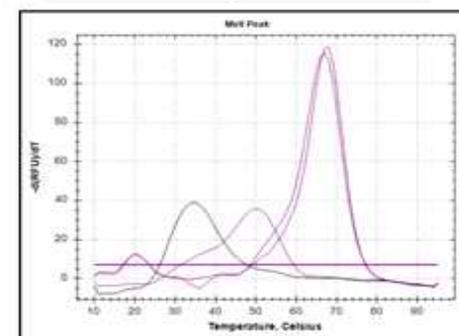


그림 59 한우 샘플에 대한 실험 결과

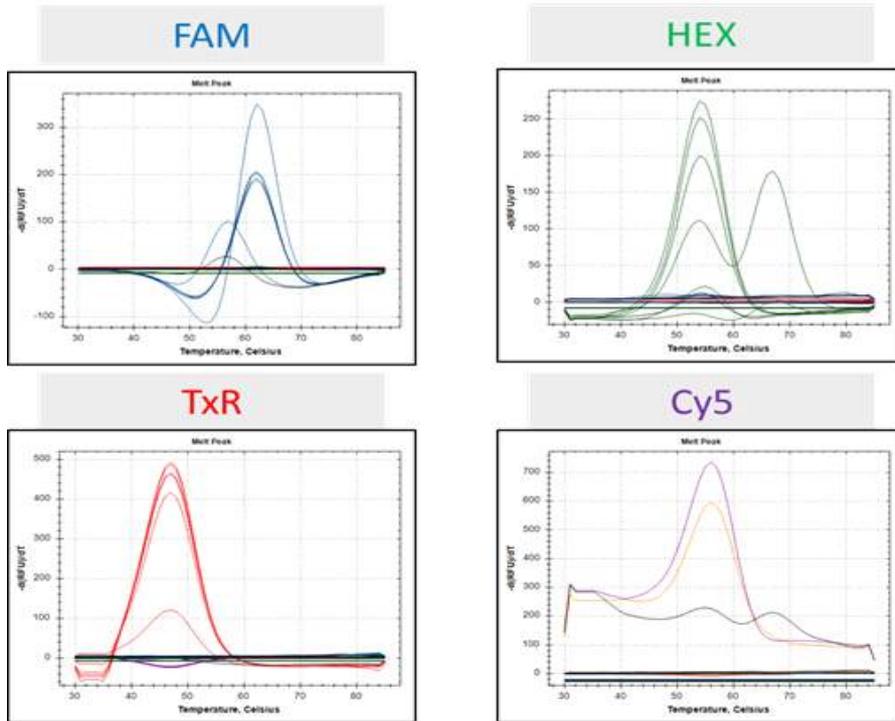


그림 60 최소 샘플에 대한 실험 결과 확인

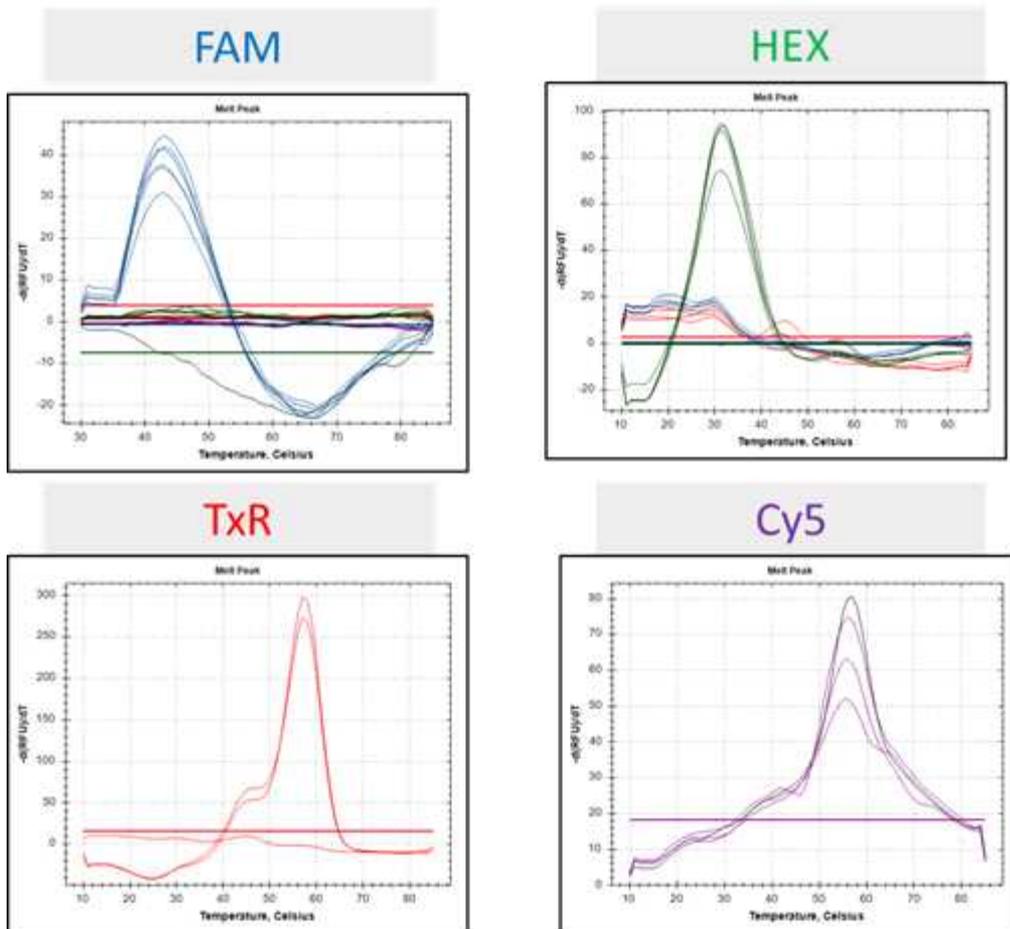


그림 61 흑우 샘플에서의 결과 확인

통합형 핵심 모듈칩 개발

- o 한우종판별을 위한 하이브리드 정량칩 개발
- 1:N Type의 다중검출이 가능한 하이브리드 Type의 Chip 형태 설계 및 디자인 진행

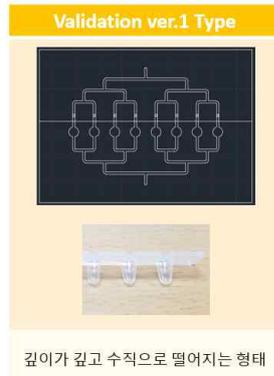


그림 62 Hybrid 1:N Type의 설계 도면

- 목적 : Suringe Pump, Mini Pump, Manual을 이용하여 Tube내에 일정한 양으로 분주되는 형태의 Chip Test 진행
- 방법 : 1. Syringe Pump Test : 속도를 50ul/min, 100ul/min으로 조정하여 Test
  - 시간에 상관없이 주입 속도를 낮춰서 상부 표면에 Stiction되지 않게 하기 위함
- 2. Mini Pump Test : 1.4V의 Voltage로 당기는 방식 Test
  - Mini Pump를 이용하여 당겼을 때 Tube 상부에 일정량 맺히는지에 대한 Test
- 3. Manual로 주입 후 Test
  - Manual로 주입 후 일정량 맺히는지 확인 및 Lid Heater를 이용하여 Tube내에 액체를 떨어트리는 방식 Test

\* Hybrid Type Chip Test.1

- 목적 : Syringe Pump를 이용하여 정량 분주 Test 진행
- 방법 : Syringe Pump의 속도 : 50ul/min , 주사기 용량 : 0.25ml
- 결론 : 속도를 낮춰도 표면장력에 의해 Tube내에 채우지 못함.

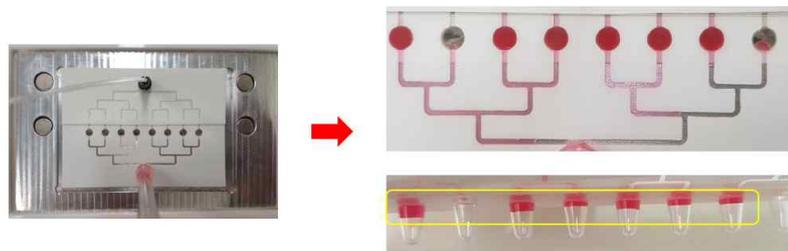


그림 63 Syringe Pump를 이용한 분주 Test

\* Hybrid Type Chip Test.2

- 목적 : Syringe Pump를 이용하여 정량 분주 Test 진행
- 방법 : Syringe Pump의 속도 : 100ul/min , 주사기 용량 : 0.25ml

- 결론 : 표면 장력에 의해 상판 Film에 걸쳐서 Tube내에 채우지 못함.

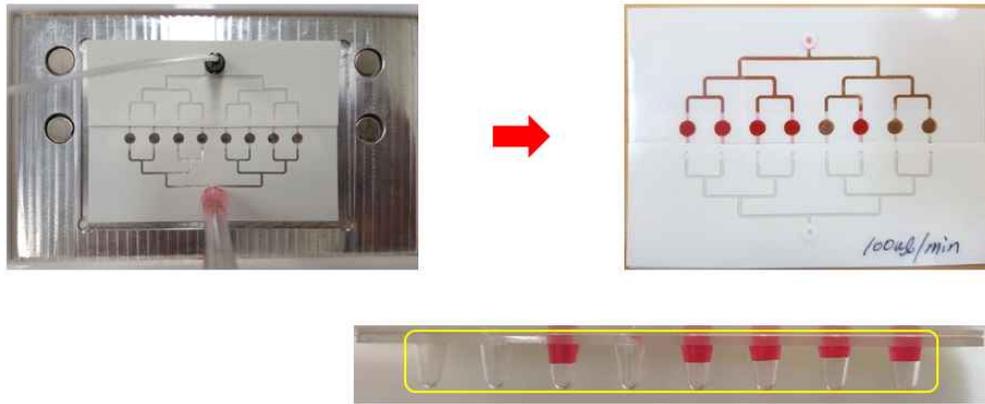


그림 64 Syringe Pump를 이용한 분주 Test.2

\* Hybrid Type Chip Test.3

- 목적 : Mini Pump를 이용하여 정량 분주 Test 진행
- 방법 : Mini Pump의 전압 : 1.4V , 주사기 용량 : 0.25ml
- 결론 : 골고루 분주 되어 맺혀있으나, 일부가 양이 일정하지 않음.

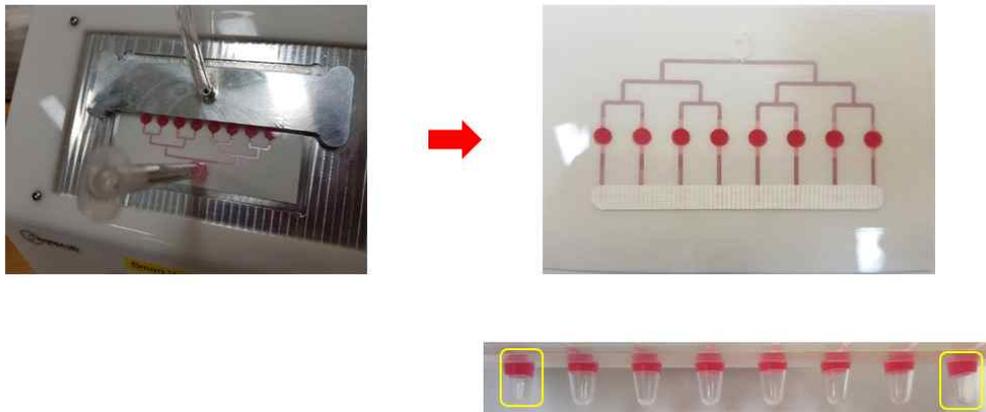


그림 65 Mini Pump를 이용한 분주 Test

\* Hybrid Type Chip Test.4

- 목적 : Manual을 이용하여 주입 후 Lid의 열을 이용한 분주 Test
- 방법 : 1회용 주사기에 0.4ml의 용량으로 Manual 주입
- 결론 : 주입과 동시에 열처리를 이용하여 주입 시 골고루 분주되어 맺혀있으나, 일부가 양이 일정하지 않음

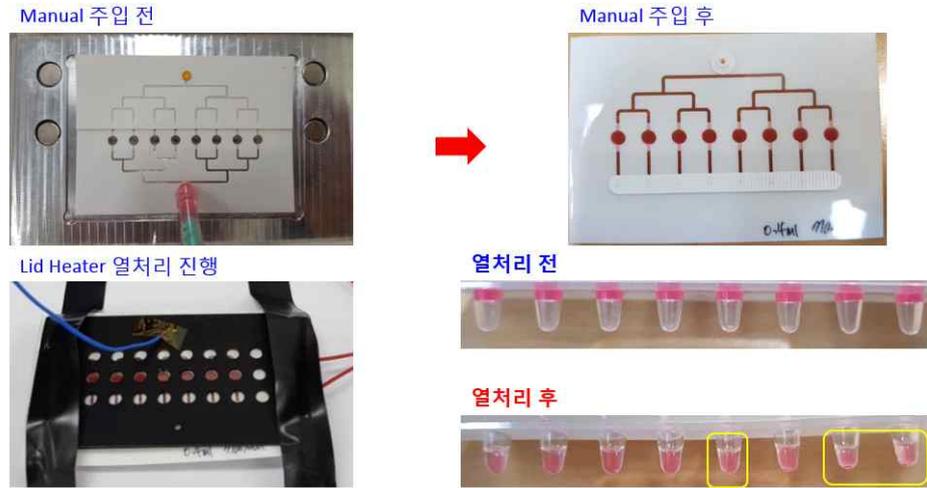


그림 66 Lid의 열처리를 이용한 Manual 분주 Test

\* Test 결론

- Syringe Pump Test

: Syringe Pump를 2가지 속도로 시간과 상관 없이 낮춰서 Test 하였으나, Tube에서는 앞 실험과 동일하게 표면 장력에 의해 상부에 맺힘

- Mini Pump Test

: 8-Strip중 일부를 제외하고 일정하게 맺혔으나, Syringe Pump와 동일하게 균일하게 분주되지 않음

- Manual Test+Lid Heater Test

: Tube에서 균일하게 채우고 열처리 후 균일하게 Tube내에 채워짐을 확인함.

\* Reference Chip을 이용한 Lid Test

- 목적 : 기준이 되는 Channel의 Chip에서 동일한 환경 조건에서 실무자와 제2의 실험자가 주입 시 일정량이 되는지 확인 및 용량 체크

- 전제 조건 : Tube는 ver.1 Type의 Mini Tube 사용

1회용 주사기를 이용하여 Manual 주입

Syringe Pump 및 Mini Pump 사용 무

- 방법 : Chip의 형태는 1:N 분주 Type의 Chip 디자인으로 하되, 실무자와 제2의 실험자가 평평한 Plate에서 주입한 것과 Test Bed(기울인 것)에서 주입한 Chip을 놓고 분주된 양과 Lid Heater 열처리 후 주입된 양을 비교

## Reference Chip-2가지 주입 방식

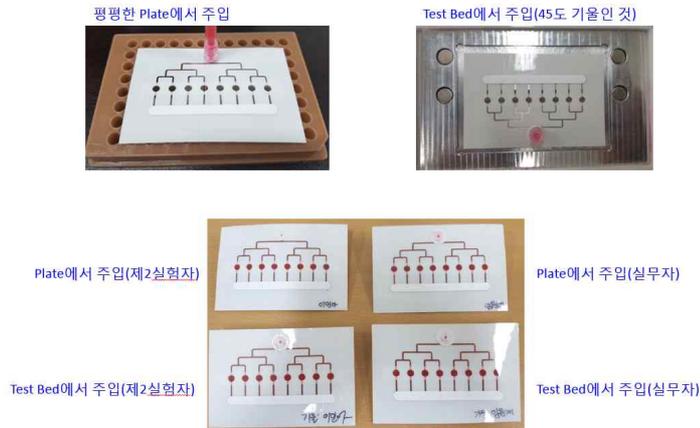
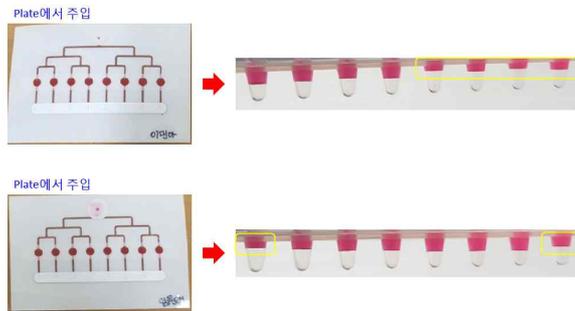


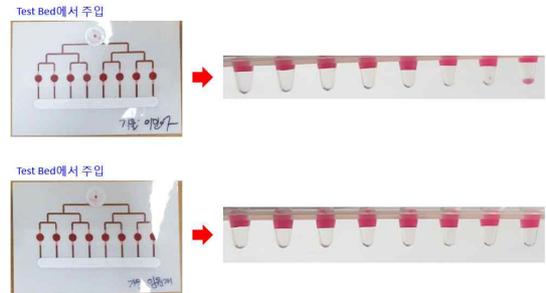
그림 67 1:N Reference Chip를 이용한 2가지 주입 방식

### Plate에서 주입



사용자마다 주입 속도가 달라서 일부 양이 다름

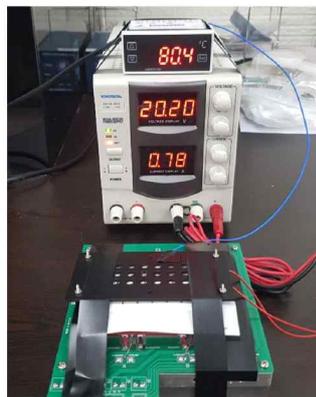
### Test Bed(기울인 상태)에서 주입



사용자마다 주입 속도가 달라서 일부 양이 다름

그림 68 2가지 주입 방식에서 Chip Jig의 형태에 따른 주입 방식 및 결과

## Lid Heater 열처리 진행



**\*\*열처리 셋팅 조건\*\***

- Power Supply : 20.2V
- 유지 : 80~82°C / 1min
- Heat block : Validation Heat block
- 부착 방법 : Chip과 Lid가 밀착되도록  
사이드에 테이핑 처리

그림 69 Lid Heater 열처리 진행 방법

## Lid Heater 열처리 진행 후 용량 체크



사용자마다 주입 속도가 달라서 일부 양이 다름

그림 70 열처리 진행 후 Tube내 용량 및 분주 상태

- \* 결론 : 사용자마다 주입 속도가 달라서 일부 용량이 고르지 못한 부분이 있음  
Test Bed(기울인 상태)에서 주입한 Tube에서 오차 허용 범위내의 용량
- \* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.5
  - 목적 : Lid 열을 이용하여 PCR Tube내에 정량 분주 및 Air gap 형성 확인
  - 개요 : PCR Premix를 이용하여 Channel의 용량과 Lid의 열을 이용하여 PCR Tube내에 정량 분주를 확인하기 위함.
  - 실험에 사용한 Chip 형태 및 원리

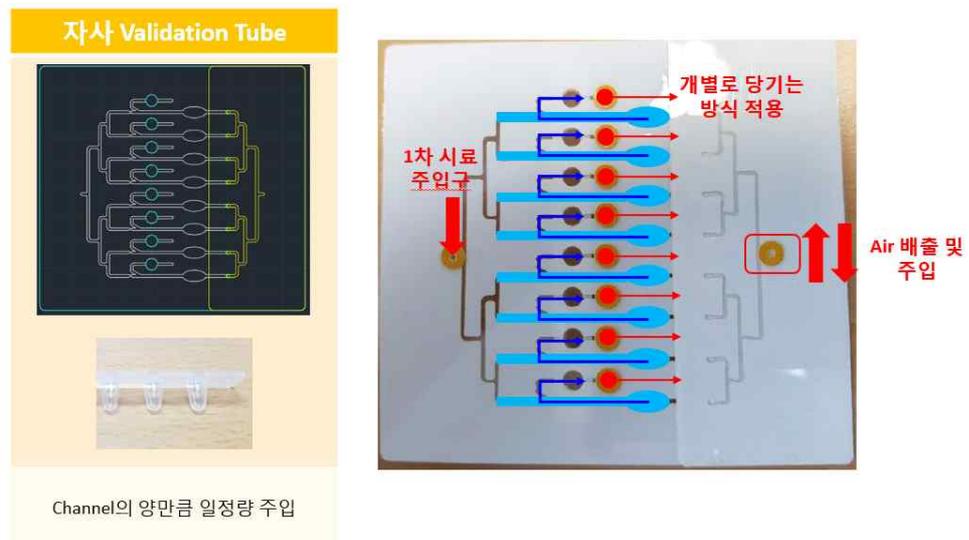


그림 71 Outlet에서 개별 제어하는 방식의 Chip 설계 디자인

- \* 목적 : Outlet에서 개별로 당겼을 때 각 Tube로 일정량 분주되는 지에 대한 Test
- \* 방법 : Manual 개별 제어 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid 없이 진행  
각 Channel마다 port 및 주사기를 장착하여 바로 당기도록 함
- \* 결론 : Lid 없이 Test한 결과 각 Tube마다 분주된 양이 각각 다르고 또한, 일부는 Tube내로 유입이 되었지만 5EA Tube는 Bubble gap 형성됨에 따라 Lid 장착과 Syringe Pump를 이용하여 일정한 압으로 당기는 Test 진행

Manual 개별 제어 중



그림 72 Outlet의 개별 제어를 이용한 분주 Test

- \* 목적 : 개별로 당겼을 때 Tube로 일정량 분주되는지에 대한 Test
- \* 방법 : Syringe Pump 개별 제어 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid 사용
- \* 결론 : Lid를 장착 후 Syringe Pump를 이용하여 개별 제어 했을 때 2EA 또는 4EA는 일정량 주입되지만 나머지 Tube에서는 분주가 안되었거나, 용량이 각각 달라서 당기는 방식의 개별 제어 시험은 재현성이 없는 것을 확인

\* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.6

- \* 논의 사항 : Inlet의 주입 시 골고루 주입되고 일정한 압력으로 주입되기 위해 분주 형태로 진행하되, Inlet에서 동시 주입이 되고, Air Inlet에서 동시 주입이 되는 형태로 압력 분배에 대한 이슈 최소화

• 실험에 사용한 Chip 형태 및 원리

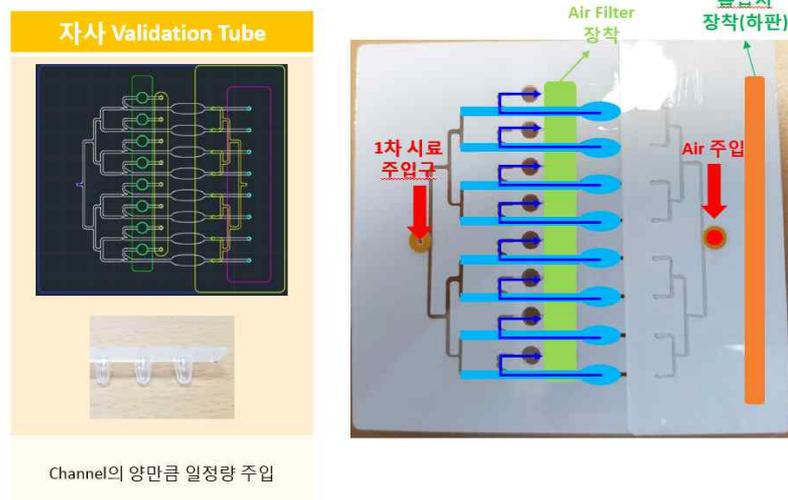


그림 73 Inlet의 분배 형태의 신규 Design Chip 형태

- \* 목적 : 동시에 밀어줌으로 용량만큼 일정량 분주되는지에 대한 Test
- \* 방법 : Manual로 주입 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid Heater 사용
- \* 결론 : 8EA 중 1EA의 Tube를 제외한 나머지 Tube에서는 일정량 분주되는 것을 확인  
마지막 Tube에서의 용량 차이는 흡습지 실링 중 흡습지가 눌러서,  
Lid Heater의 끝 단에 온도가 고르지 못하여 생긴 것으로 판단됨.  
반복 Test를 통해서 재현성 Test 진행 예정

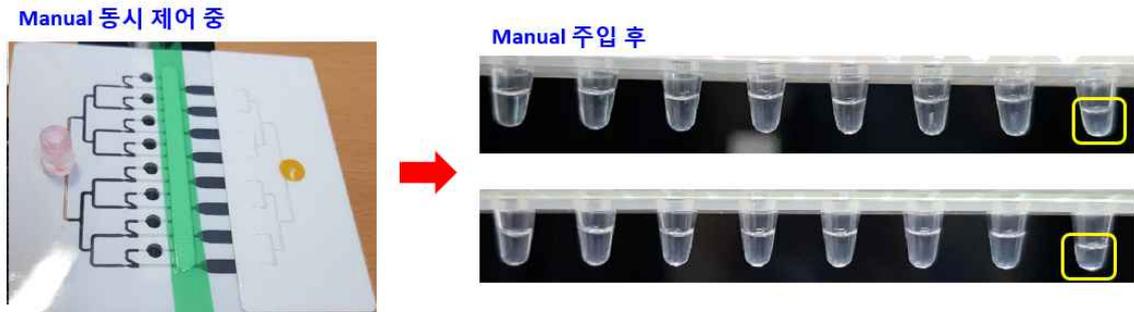


그림 74 Inlet과 Air Inlet의 동시제어 및 Lid 열을 이용한 분주 Test 결과

- \* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.7
- \* 목적 : Manual 동시 제어 시 Chip에 대한 재현성 Test 진행
- \* 방법 : Manual 동시 주입 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid Heater 사용  
실험 환경 동일(Heat block, Lid Heater, Heating 시간 등)
- \* 결론 : Chip 10EA를 제작하여 Manual 동시 제어 재현성 확인 결과 이미지처럼  
10EA 중 3~4EA가 Fail인 부분이 있고 나머지는 균일하게 채워진 것을 확인함.



그림 75 Manual 동시 제어 Chip 재현성 Test

- 재현성 Test 이후 수정 사항

1. 기존 용량 늘린 부분에서 타원형이 아닌, 폭을 좁혀서 1자의 긴 형태로 수정  
\* 타원형일 경우 동시 제어에서 Air의 직진성으로 시료 일부가 남아서 일부 Tube에서 용량이 불균일하기 때문에 수정 진행
2. Chip 하단에 외부에 부착된 흡습지를 Chip 내부로 매립  
\* 실링 Tape 부착 후 leak, 실링 시 눌러지는 압력으로 인한 역류 등 최소화

\* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.8

• 수정사항 논의 후 보완된 사항

1. 용량 Channel Zone의 형태를 타원형이 아닌, 1자 형태로 변경
2. Chip 하단의 흡습지를 Chip 내부로 매립 형태로 변경

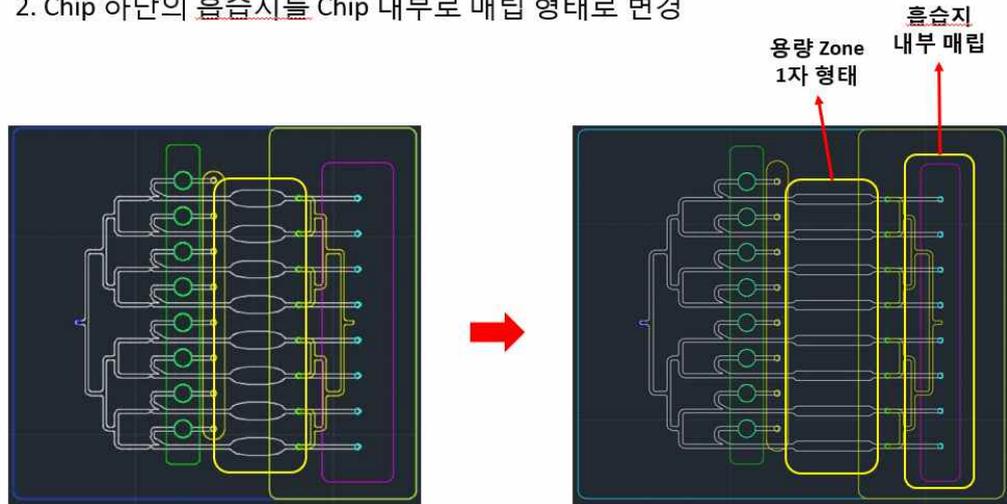


그림 76 용량 Zone의 1자 형태 변경 및 흡습지 내부 매립 설계

- \* 목적 : 수정 후 Test를 하여 보완된 사항 확인 Test
- \* 방법 : Manual로 주입 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid Heater 사용
- \* 결론 : 8-Strip 중 8EA 균일하게 분주됨을 확인하고, Inlet.1에서 동시 주입과 Air Inlet.2에서 동시에 균일하게 주입되며, Channel쪽에서 역류, 일부 잔량 되었던 부분은 보완됨을 확인함.



그림 77 Channel Design 수정 후 보완 적용 Test 결과

\* 수정 사항 논의

1. 용량 Channel이 되는 폭을 좁혀서 1자 형태로 용량 확인 결과 11ul
- \* 폭은 그대로 하되 Channel의 길이를 2배 늘려서 용량 확보
2. Air Inlet에서 Air 주입부 Channel 상단에 위치되어 있는 것을 별도로 Channel로 빼서 Air 주입 시 양쪽으로 밀어지는 것이 아니라, Tube 방향으로 직진성 극대화 시킴
3. Chip의 형태를 고려하여 Chip의 외관 형태 Design 수정 진행

- 수정사항 논의 후 보완된 사항
  1. 용량 Channel Zone의 길이를 2배 가까이 수정
  2. Air Inlet.2의 Channel 위치 변경
  3. Chip 외각을 직사각형태가 아닌, 나비칩 형태의 Design 변경(Aligner 추가)

용량 Zone 2배 늘리고 Air Inlet.2 위치 변경

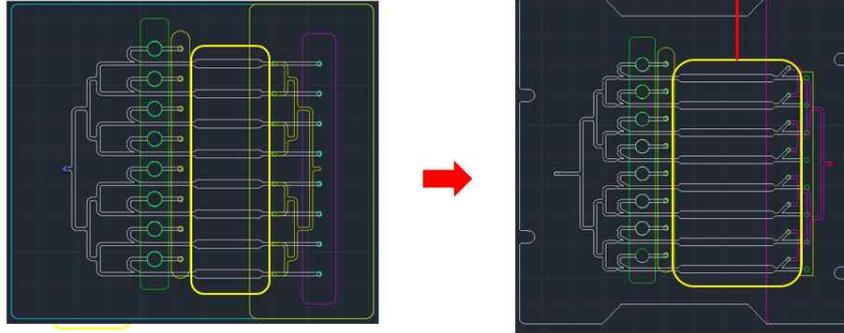


그림 78 수정 후 보완된 Chip의 Design 설계

## 최종 변경된 Chip Test 형태 및 설명

- 실험에 사용한 Chip 형태 및 원리

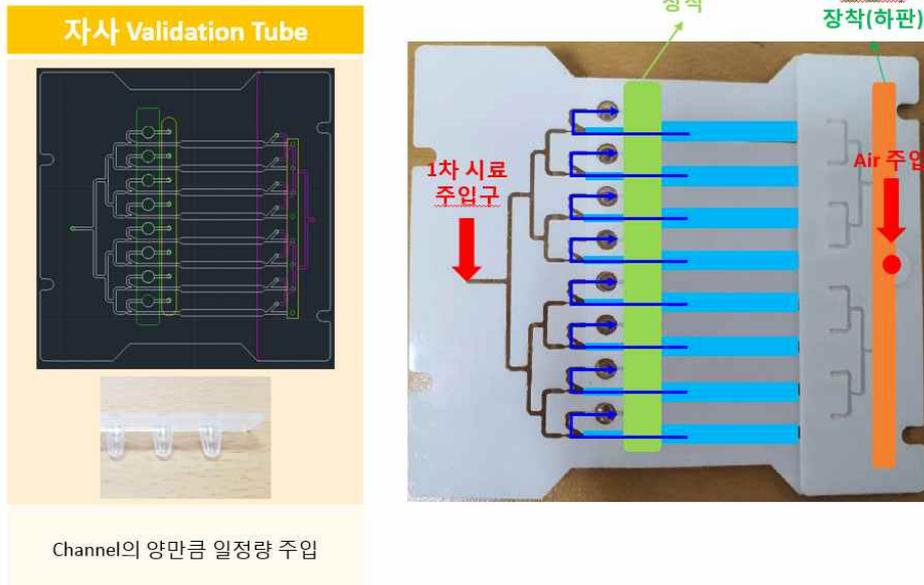


그림 79 최종 변경된 Chip Design 및 형태와 원리

- \* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.9
- \* 목적 : 수정된 Chip을 이용하여 1차 Manual 주입 후 용량 체크
- \* 방법 : Manual로 주입 / 주사기 용량 : 0.5ml / Lid Heater 사용
- \* 결론 : Lid 열을 이용하여 분주된 Tube에서 Pipette을 이용하여 8-strip 각각 용량 용량 체크 확인 결과 20ul(오차 10%이내)로 Channel에 대한 용량 확인 완료



그림 80 Channel에 대한 용량 체크 확인 결과

- \* Hybrid Chip을 이용한 분주 Test.9
- \* 목적 : Mini Pump를 이용한 동시 제어 시 Chip에 대한 재현성 Test
- \* 방법 : Mini Pump 1.3V , 주사기 용량 : 0.5ml , Lid Heater 사용
- \* 결론 : Chip 2EA 1.3V 동작 시 균일하게 분주 되고 유체 제어 속도 또한, 안정적으로 제어됨을 확인함.

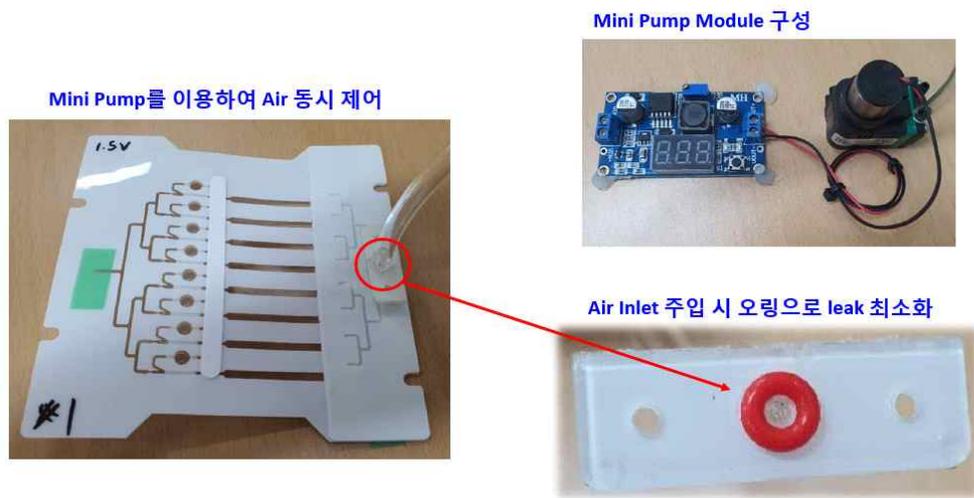
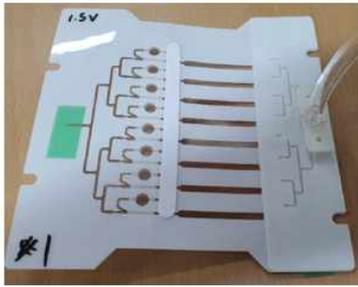


그림 81 Mini Pump를 이용한 분주 Test 진행

- \* O-ring을 이용하여 유체 제어 시 leak 최소화

Mini Pump 동작



1.3V Pump 동작

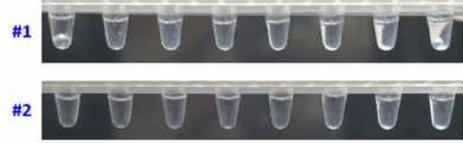


그림 82 Mini Pump를 이용한 정량 분주 Test 진행 결과

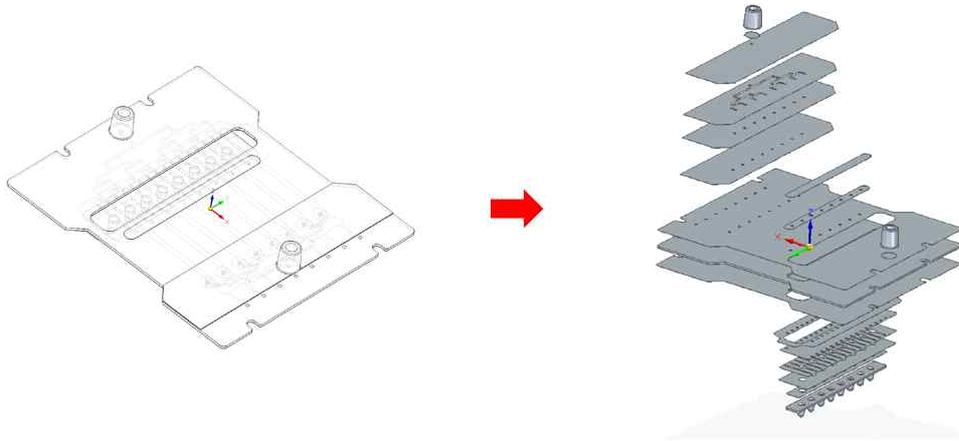


그림 83 최종 설계된 Chip 3D 형상화

### 1.3 유전자 증폭 및 검출 일체형 시스템 개발

- o 하이브리드 칩 적용이 가능한 일체형 시스템 설계 및 모듈 개발
- 유전자 검출 가능한 4ch 형태의 소형화 광학 모듈 3D 설계 진행

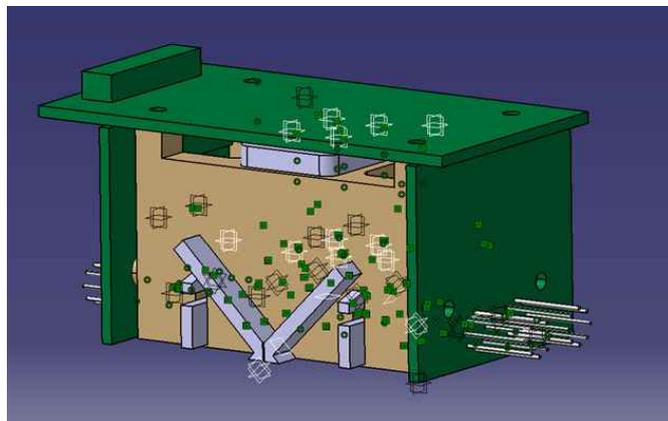


그림 84 유전자 증폭 후 검출 가능한 소형 광학 모듈 3D 모델링

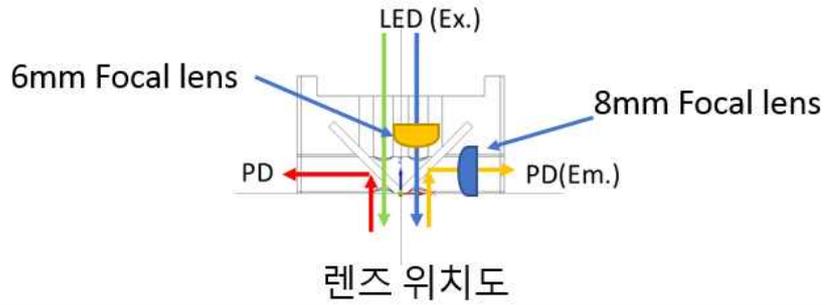
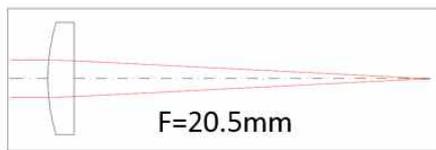
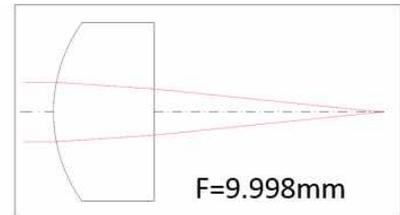


그림 85 소형 광학 모듈 측면도(부품별 위치)

- 기존 1ch 광학 모듈에서 4ch로 하나의 모듈에서 다중 채널 분석이 가능하도록 설계
- LED의 경로는 기존처럼 위에서 아래로 Focusing 되어 지고 Dichroic Filter를 통과 후 해당 파장 Wavelength의 영역만 필터링 하여 P.D(Photodetector)로 Detection 원리



LED 앞단에 위치하여 시료까지 Focusing 역할



PD 앞단에 위치하여 형광 신호 Focusing

그림 86 소형 하우징에 장착하기 위한 Lens 시뮬레이션

- LED로부터 Ex Filter를 통과 후 Dichroic Filter까지의 Focusing 거리와 시료 Detection 후 Di Filter를 통과하여 P.D까지의 Focusing 거리를 시뮬레이션을 통해서 Focusing 거리 확정

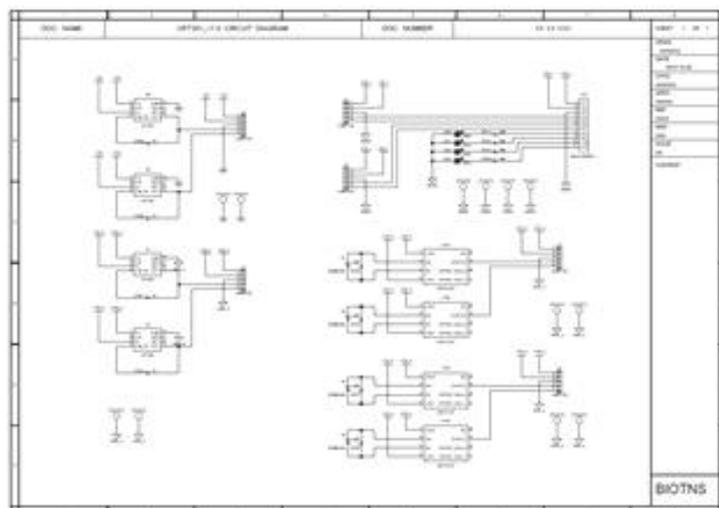
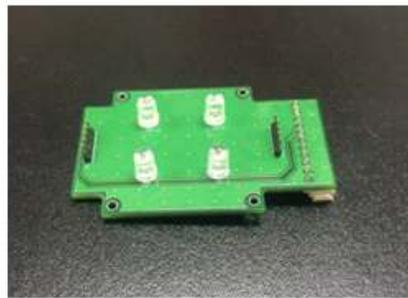
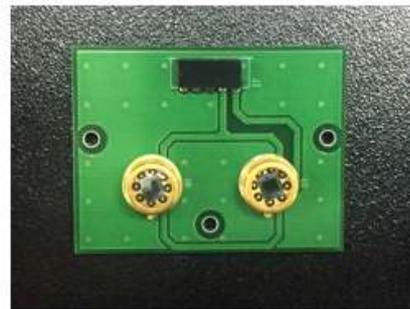


그림 87 LED 및 P.D를 제어하기 위한 PCB 회로 설계

- 기존 1ch 광학 모듈을 기반으로 4ch 동시 제어 및 Detection을 위해 LED PCB 회로 설계 및 P.D, 전원부 회로 설계 진행



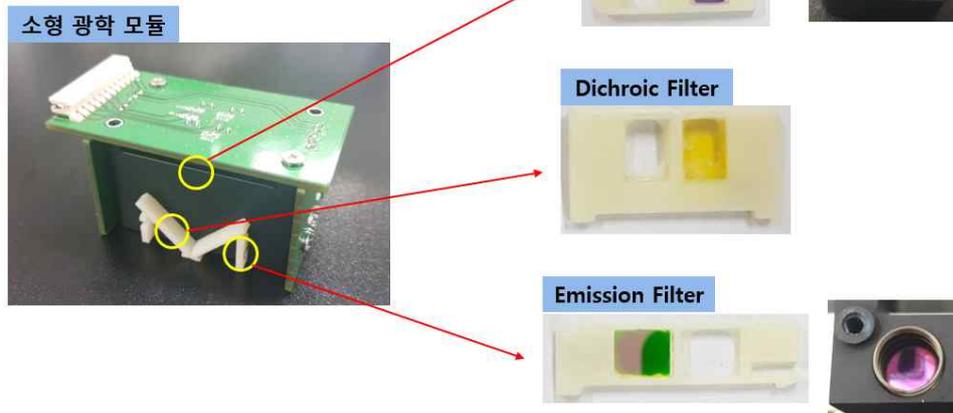
LED PCB



PD PCB

그림 88 회로 설계 후 제작된 LED 및 PD PCB

- 각 Part에 Filter, Lens 삽입 후 결합



- 각 Part별 Filter / Lens 삽입

그림 89 각 부품별 조립 및 장착된 소형 광학 모듈

- Ex Filter, Di Filter, Em Filter 각 파트별 Dicing된 Filter 장착, Lens에 Spring을 장착함으로 Lens의 유격을 잡아줄 수 있음
- 하우징은 AL으로 가공 후 흑색 무광 아노다이징을 처리함으로 외부 빛에 대한 Back Ground Noise 최소화
- Filter Jig를 Plastic으로 3D 프린팅 하여 1차적 Filter 장착 진행

▪ SMPS(12V) 연결 및 Stage 장착

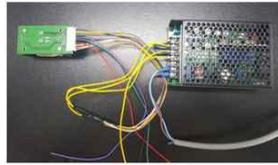


그림 90 SMPS 및 광학 모듈 Test Bed에 장착함으로 구동 확인 및 형광 측정 진행



그림 91 소형 광학 모듈 광학적 성능 Test

- 조립된 광학 모듈을 이용하여 흡광모드일 때와 반사모드 일 때의 Voltage 시그널 값을 확인하여 Back Ground대비 White에서 Signal 값이 4배 이상 변화로 측정되는 것을 확인함.

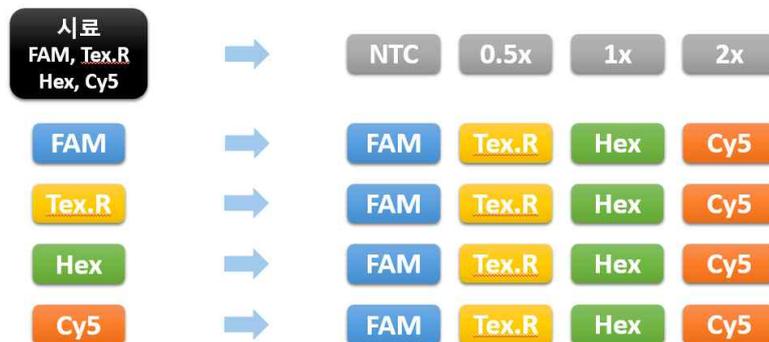


그림 92 파장별, 농도별 개별 측정 방법

- 4개의 파장에 대해서 NTC부터 2x의 농도까지 개별로 4파장 측정 진행
- 상용 장비인 CFX96에서의 광학 모듈과 자사 광학 모듈에서의 형광 측정 비교 Test

파장	Module	농도별 시그널 값			셋팅 조건	
FAM	Reference PCB.1	NTC	0.5x	1x	2x	(Detector부) Hex Em 장착 (LED 부) FAM Ex 장착 Blue LED
		49.6	77.0	133.4	196.2	
			55%	168%	295%	
		47.5	82.1	125.5	188.1	
		72%	164%	296%		
파장	Module	농도별 시그널 값			Tube	
Hex	Reference PCB.1	NTC	0.5x	1x	2x	(Detector부) Hex Em 장착 (LED부) 無 Green LED
		94.4	161.0	232.4	312.3	
			70%	146%	230%	
		85.6	153.1	220.4	263.1	
		78%	157%	207%		
파장	Module	농도별 시그널 값			Tube	
Tex.R	Reference PCB.1	NTC	0.5x	1x	2x	(Detector부) Hex Em 장착 (LED부) 無 Yellow LED
		25.2	57.1	96.4	150.1	
			126%	282%	495%	
		28.2	25.2	86.0	134.7	
		85%	204%	377%		
파장	Module	농도별 시그널 값			Tube	
Cy5	Reference PCB.1	NTC	0.5x	1x	2x	(Detector부) Cy5 Em 장착 (LED 부) Cy5 Ex 장착 Red LED
		116.5	126.7	203.8	331.9	
			8.7%	74%	184%	
		108.6	119.6	189.9	310.6	
		10%	74%	186%		

그림 93 자사 소형 광학 모듈 형광 측정 데이터

- 상용 장비 CFX96에서 측정한 형광 측정 변화율과 자사 광학 모듈에서 측정한 형광 측정 데이터를 변화율을 놓고 비교하였을 때 크게 차이가 없음을 확인함.

■ 목표 : 초고속 핵산증폭 모듈 개발

o 초고속 증폭이 가능한 펠티어 모듈 개발

- Heat block과 펠티어가 탑재되어 초고속 증폭 가능한 하나의 펠티어 모듈 개발 진행

- 개발 목표 : a) 히팅 및 쿨링 속도 : 3°C/sec이상

- b) 온도 균일도 : ±1°C 유지

\* 모듈에 필요한 주요 부품 목록

- Well Plate 3EA , Heat sink : 1EA , TEM 3EA, 방열팬 1EA, 제어보드 1EA, 커넥션 보드 1EA, 히트싱크 써미스터 1EA, 제어용 써미스터 1EA, 단열 블록 : 1EA

- 제어에서 필요한 모니터 상에서의 Lab View형태의 제어 및 컨트롤 구성 프로토콜

- 크게 통신영역 표시, 상태표시, 운용 설정 영역, 그래프 영역으로 프로세서 구성

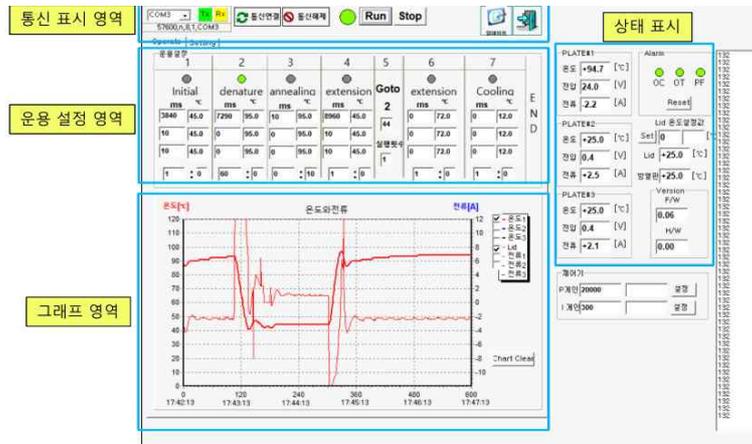


그림 94 온도 제어 및 컨트롤 구성 프로토콜

- 통신 표시 영역에서 제어보드와 PC간의 연결 상태를 표시 가능하도록 구성
- 운용 설정 영역은 유저의 온도 셋팅 및 영역을 지정할 수 있도록 구성
- 그래프 영역과 상태 표시 영역에서 실시간으로 전류에 따른 온도 컨트롤 모니터링 구성

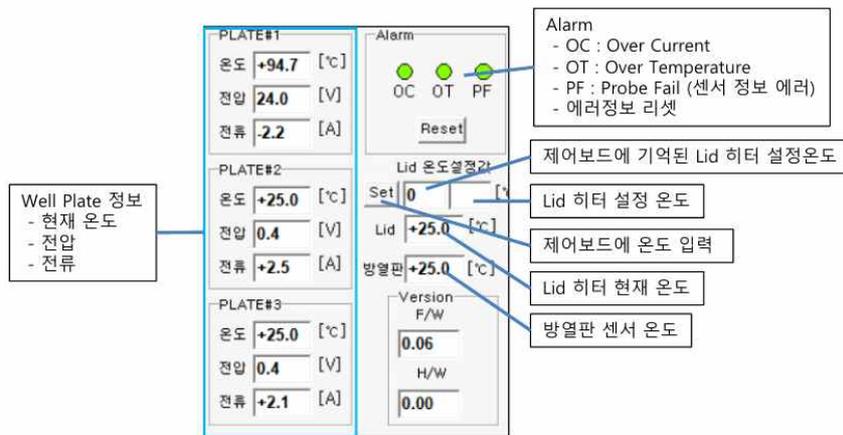


그림 95 Plate에 대한 3block 온도 셋팅 프로토콜

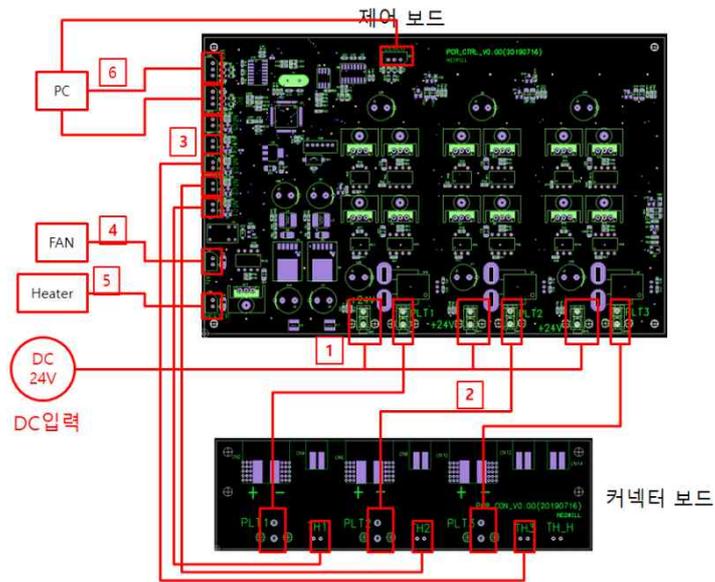


그림 96 제어 보드 및 커넥터 보드 회로 구성

- DC 24V 입력을 기반으로 제어보드와 PC의 연동으로 컨트롤 가능하도록 회로 구성 완료
- 커넥터 보드에서는 각 3plate에서 온도에 대한 컨트롤, 온도 인식에 대한 컨트롤 구성하여 프로토콜 구성 및 증폭 모듈 개발 완료



그림 97 초고속 증폭 모듈 3D 형상화 및 모델링

<3차년도>

진단키트

1. 충북대 제공 한우 종판별 marker 중 최종 선정 2개 marker에 대한 Primer, Probe design 및 working test를 통한 키트 개발 적합성 및 한우 품종 별 Tm 판정 활용성에 대한 확인

충북대에서 제공한 한우 종판별 marker들 중, 황우-흑우 major marker와 칩소-흑우 major marker 중 가장 frequency가 높고, 기 보유 한 품종 별 대표 sample을 활용한 pre-test 및 sequencing 결과 상에서 활용 가능성이 높다고 판단된 2개 marker (각각 충북대 제공 시의 loci no. 등의 labelling을 참고하여 1359, 3826 으로 칭함)를 선정하였다.

선정 된 마커에 2개 marker에 대해 품종 판별에 활용 할 수 있도록 특이 Primer 및 Probe를 design 하여 primer, Probe의 working test를 진행 하였다. Probe의 경우, Melting analysis를 통한 Tm차이에 따른 종 판별을 진행하는 PNA 기반의 키트 개발 특성에 따라, 본래 marker 위치에 Perfect match로 완벽히 일치하는 서열을 검출하는 경우와, marker 위치에 mismatch로 불일치하는 서열이 존재 할 때 검출되는 Tm을 확인하고자, Probe에 상황에 맞는 각각의 oligomer를 별도로 design하여, Oligo test를 통한 Tm확인을 같이 진행하였다.

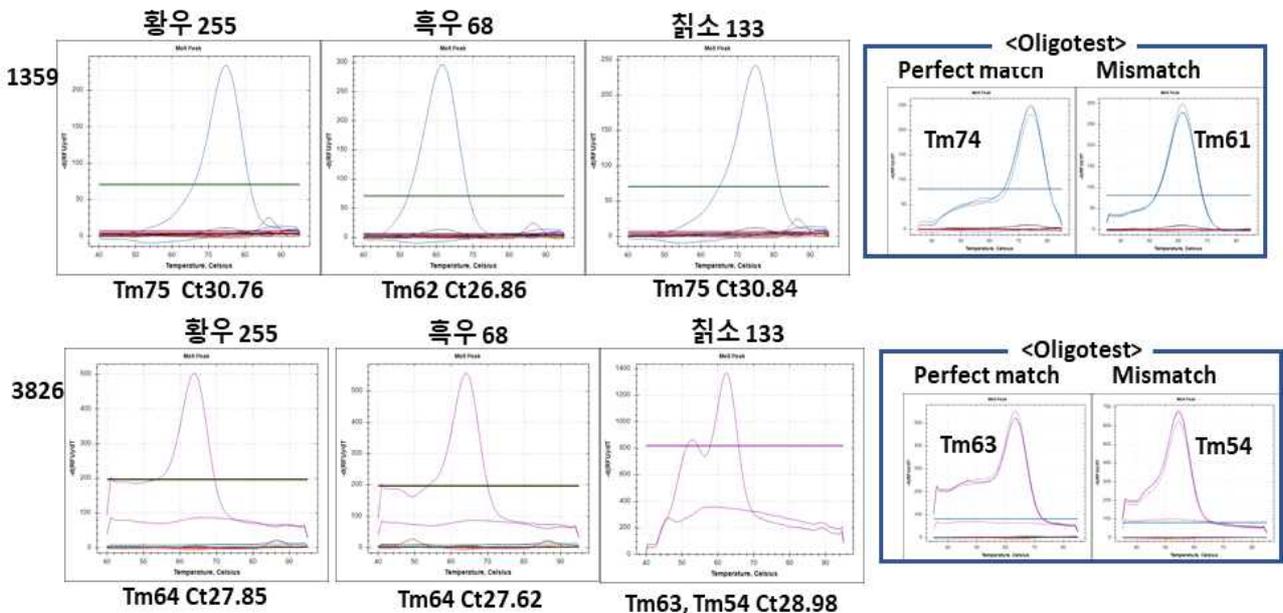


그림 98 한우 종 판별 oligo test 및 single PNA PCR

그림 98에서 보여지는 것과 같이 Oligo test 결과, 1359 marker에 대해 design된 FAM 형광의 PNA Probe는 Perfect match Tm (PM)이 74°C, Mismatch Tm(MM)이 61°C로 확인 되었고, 실제 샘플에서의 Primer, Probe working test 결과에서도, Primer로 PCR 증폭이 된 target 산물에 대한 Melting analysis에서 Melting peak가 확인됨에 따라, Primer의 유효성이 확인 되었고, 황우-칩소 major marker인 1359의 특성과 동일하게, 황우와 칩소 샘플에서는 oligo test 결과의 PM과 유사한 Tm이(75°C), 해당 marker에 대한 mismatch 염기를 포함하는 흑우 샘플에서는 MM과 유사한 Tm이 (61°C) 각각 확인 되어, 유효성이 확인 되었다.

황우-흑우 major marker인 3826 marker에 대한 Cy5 형광 PNA Probe에 대해서도, oligo test결과 PM 63°C, MM 54°C가 각각 확인 되었고, Sample을 이용한 working test에서 황우와 흑우는 Tm 63°C로 perfectmatch, 칩소는 mismatch와 perfectmatch에 대한 각각의 Tm이 모두 확인 되어, 각각의 염기서열을 모두 가지고 있는 Hetero 서열을 해당 marker 위치에 포함하고 있는 것을 확인 하였다. 이는 칩소 샘플의 sequencing 결과에서도 해당 marke 위치에서 hetero 서열이 확인 된 것과 일치하는 결과로, 유효성이 확인 된 결과로 결론 지을 수 있었다.

해당 결과들에 따라 2개 marker를 이용하여, 각각의 Tm 판정에 따라, 황우, 흑우, 칩소 3개 품종으로 한우 품종을 판별하는데 해당 Primer, Probe set가 적합함을 확인 하였다.

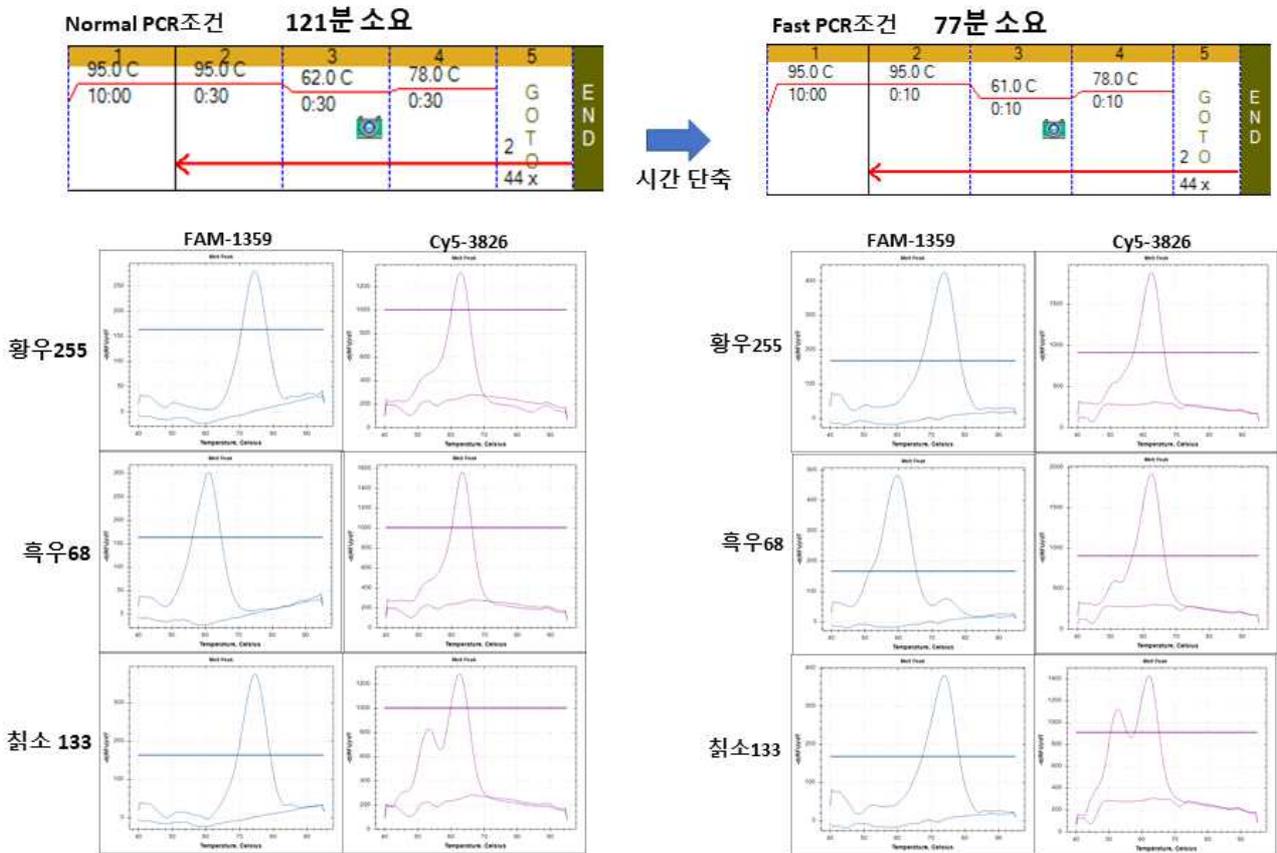


그림 99 한우 종 판별 키트의 normal PCR조건과 Fast PCR 조건 결과

현장 진단형 한우 종판별 키트의 개발 컨셉에 따라, 현장에서 짧은 시간 안에 종판별을 가능하게 하기 위해, PCR 조건을 조정하여 핵산 증폭 시간을 단축하여 FAST PCR 조건으로 PCR 조건 최적화를 진행하였다. 기존 일반 PCR 조건에서는 핵산 증폭에 소요되는 시간이 총 121분이었던 것에 반해, Fast PCR 조건으로 각 step의 시간을 단축, 조정한 최종 결과, 기존에 비해 45분 단축 된 77분 내에 핵산 증폭을 완료하여 Melting analysis까지 모두 진행 하여도 기존 핵산 증폭시간에 소요되는 시간보다 짧은 시간 내에 결과를 확인 할 수 있게 되었다. 일반 PCR 조건과 FSAT PCR 조건에서의 결과 값에 대한 비교 분석에서도, 한우 품종 각각에 대한

대표 샘플들에서 차이가 없음이 확인되어, 최종적으로 FAST PCR 조건으로 현장 진단형 한우 종판별 키트의 PCR 조건을 확립하였다.

개발한 현장진단형 한우 종판별 키트의 유효성 및 성능확인을 위해, 황우, 흑우, 칩소 3개 종 총 50개 이상의 실제 샘플에 대해 테스트를 진행 한 결과, 모두 각각의 품종에 맞게 품종 판별이 됨을 확인 하여, 개발한 종판별 키트의 유효성 및 적합성을 확인 하였다.

이와같이 다수의 sample에 대한 반복 검증에 따라 최종 검증된 현장진단형 한우 종판별 키트

품종	FAM	Cy5
황우	71-77	60-66
흑우	58-64	60-66
칩소	71-77	51-57, 60-66

그림 100 한우 종판별 판정표

의 Tm을 활용한 품종 판별 판정표는 아래 그림 41.과 같다.

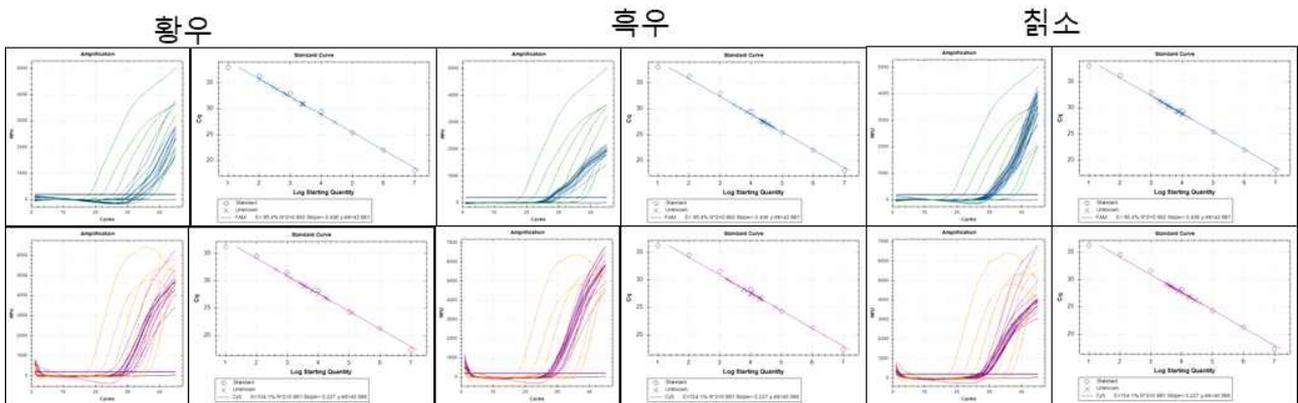


그림 101 한우 종 판별 키트를 이용한 각 종 샘플들의 민감도

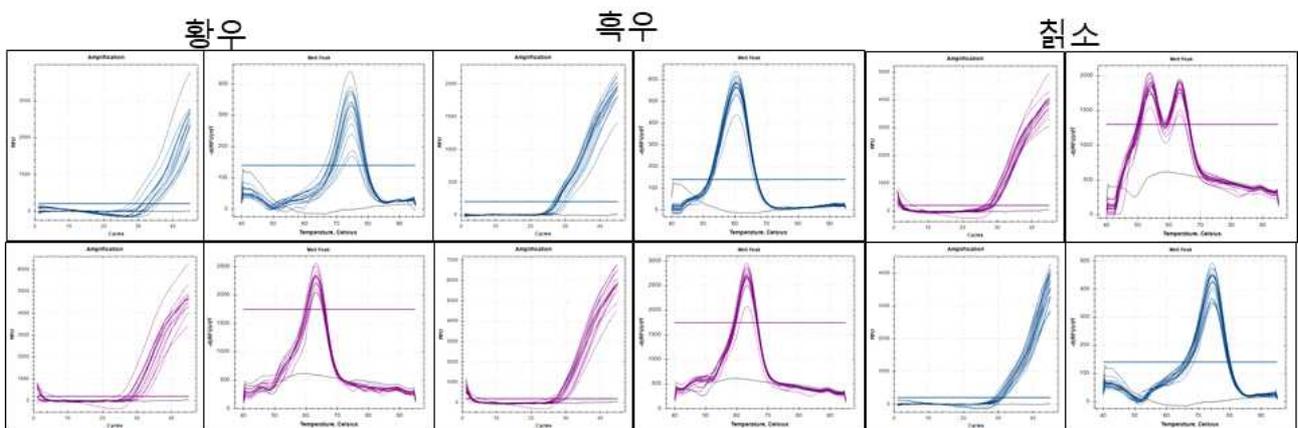


그림 102 한우 종 판별 키트를 이용한 50개 샘플의 특이도 테스트

정량적 목표 달성 및 실제 개발한 키트의 성능을 객관적으로 평가받고자 성능시험 평가를 진

행하였다. 민감도의 경우, 각 marker Probe 및 Primer 서열을 모두 포함한 양성 대조군 합성 DNA 서열을 design 하여, 단계희석을 통한 Standard curve를 얻음으로써, 해당 키트의 분석적 민감도가  $10^2$  copy 농도까지 충분히 검출가능한지를 기준으로 함과 동시에, 실제 한우에서 샘플링된 농도를 알 수 없는 한우 50개 샘플에 대해 테스트 시, Standard curve에 의한 상대정량 가능성 및, 분석적 민감도 범위 내에서 한우 종판별이 제대로 이뤄지는지를 확인하였다. 분석적 민감도 기준으로  $10^2$  copy 농도까지 검출 할 수 있음을 확인 하였고, 실제 샘플들에서도 해당 민감도 범위 내에서 모두 증폭 및 Melting anyalsis를 통한 종판별이 가능하여, 현장에서의 분석 활용에도 적합함을 확인하였다.

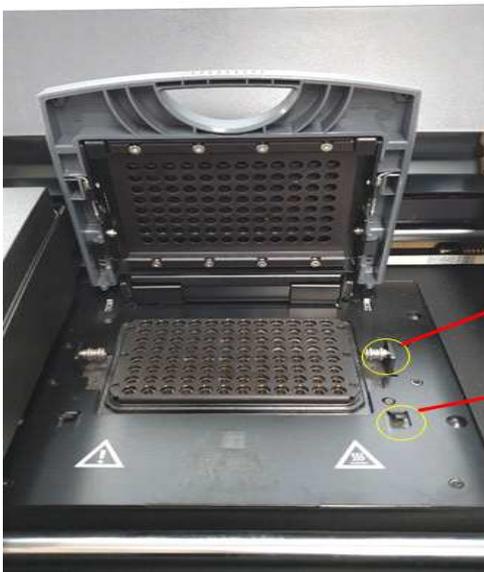
특이도의 경우는 황우, 흑우, 칩소 총 50개 샘플에 대해, 각각이 해당 종으로 판별이 되는지 여부를 확인 하였다. 테스트 결과 황우 샘플은 FAM과 Cy5 형광에서 판정표상의 Tm 범위와 동일하게 PM의 결과를 확인하여 최종 황우로 판별됨을 확인하였고, 흑우는 FAM에서 MM, Cy5에서 PM을 확인하여 흑우로 판별됨을 확인하였다. 칩소의 경우, FAM에서는 PM, 그리고 Cy5에서는 Hetero peak가 모두 확인되어 테스트한 한우 50개 샘플에서 모두 해당종으로 종판별이 됨을 확인하였다.

이로써 정량적 목표를 달성하고, 객관성 있는 성능시험 분석 결과로서도 개발한 현장진단형 한우 종판별 키트의 유효성 및 적합성이 입증되었다.

## 한우 종판별 시스템 개발

### ■ 리드히터 개발

-리드히터는 PCR과정에서 시약의 증발을 막는 매우 중요한 역할을 하고 있으며, 형광측정을 고려하며 높이의 제한이 있다. 따라서 적당한 필름 히터를 이용하여 높이를 낮추고, 필름히터의 히팅 용량을 높여 전체 PCR시간을 줄이는 방향으로 설계 되었다. 그러기 위해 먼저 상용장비들의 리드히터 구조를 분석하여 이를 기반으로 설계가 진행 되었다.



슬라이딩 락 고정부

슬라이딩 락 Stopper

그림103 Agilent사의 리드히터 주고 분석

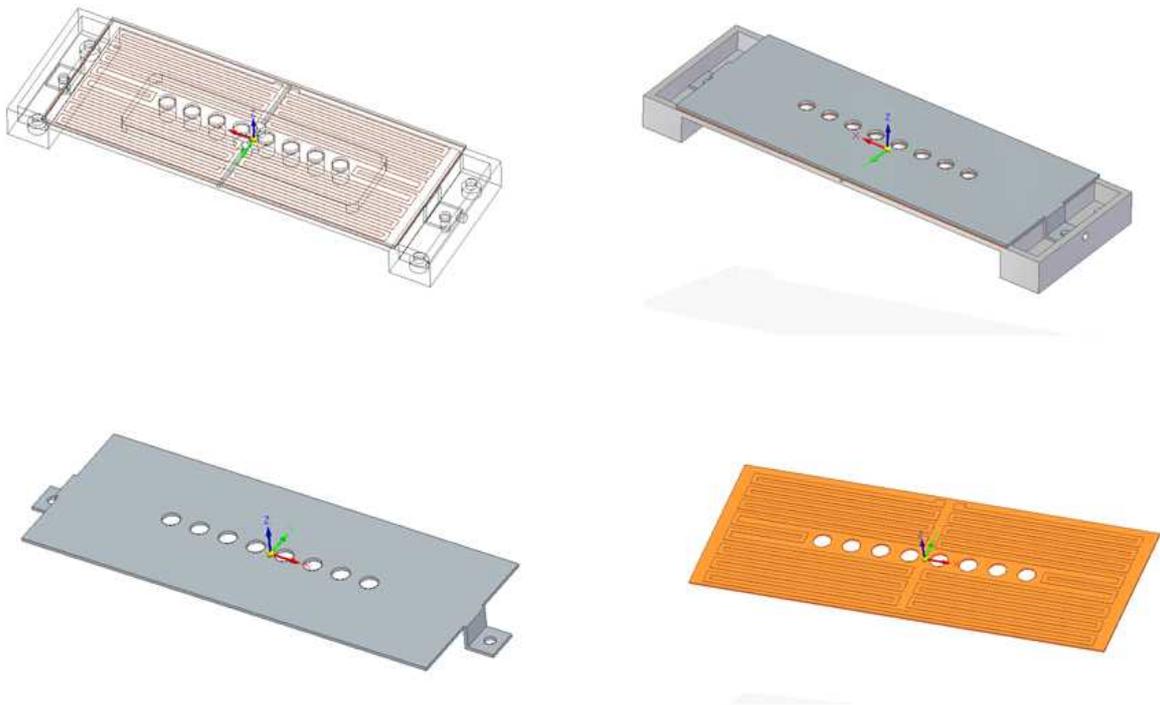


그림104 필름히터 및 모듈 설계

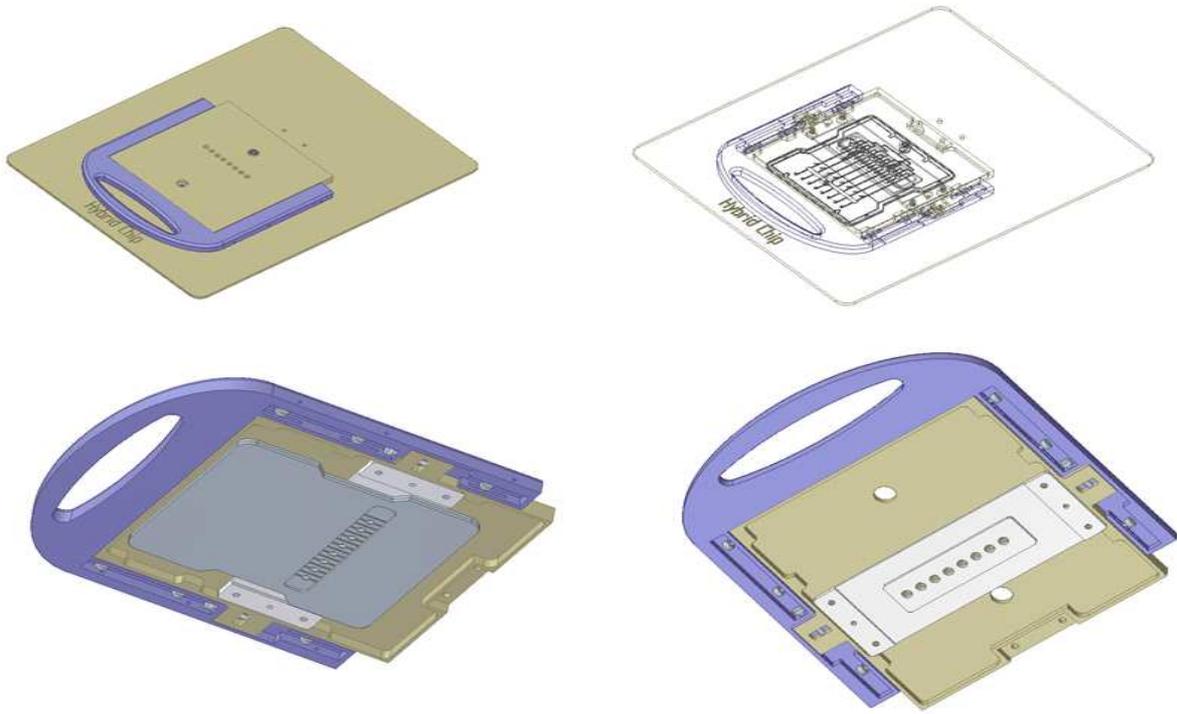


그림105 리드헤더 모듈 설계



그림106 리드헤더 제작

- 4채널 형광을 이용한 한우 종판별 시스템은 하이브리드칩 전용으로 설계 되었으며, 8개의 미니튜브로 구성 되어 있다.

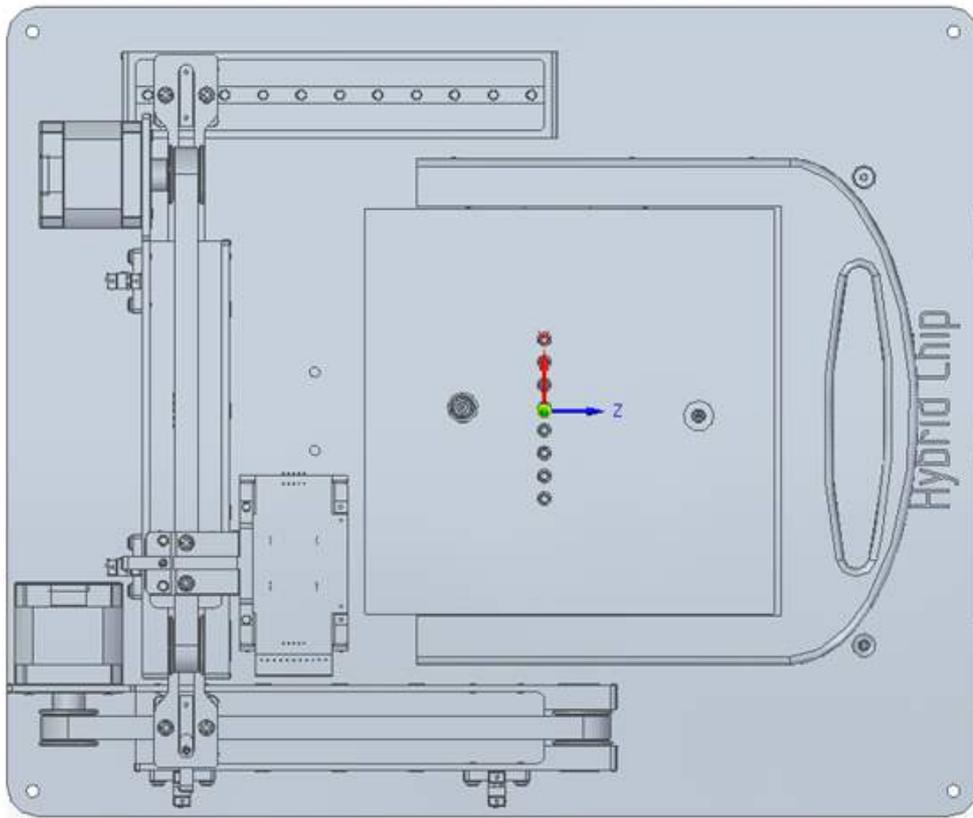
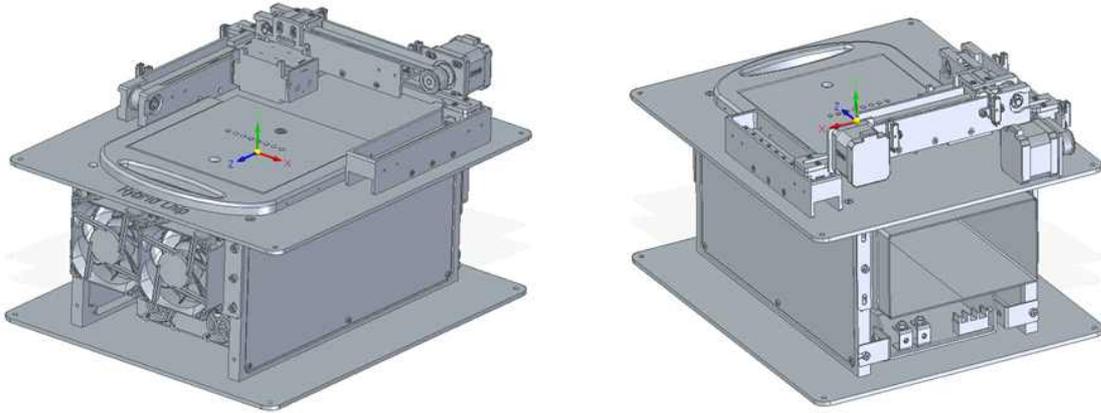


그림107 한우 종판별 시스템 설계

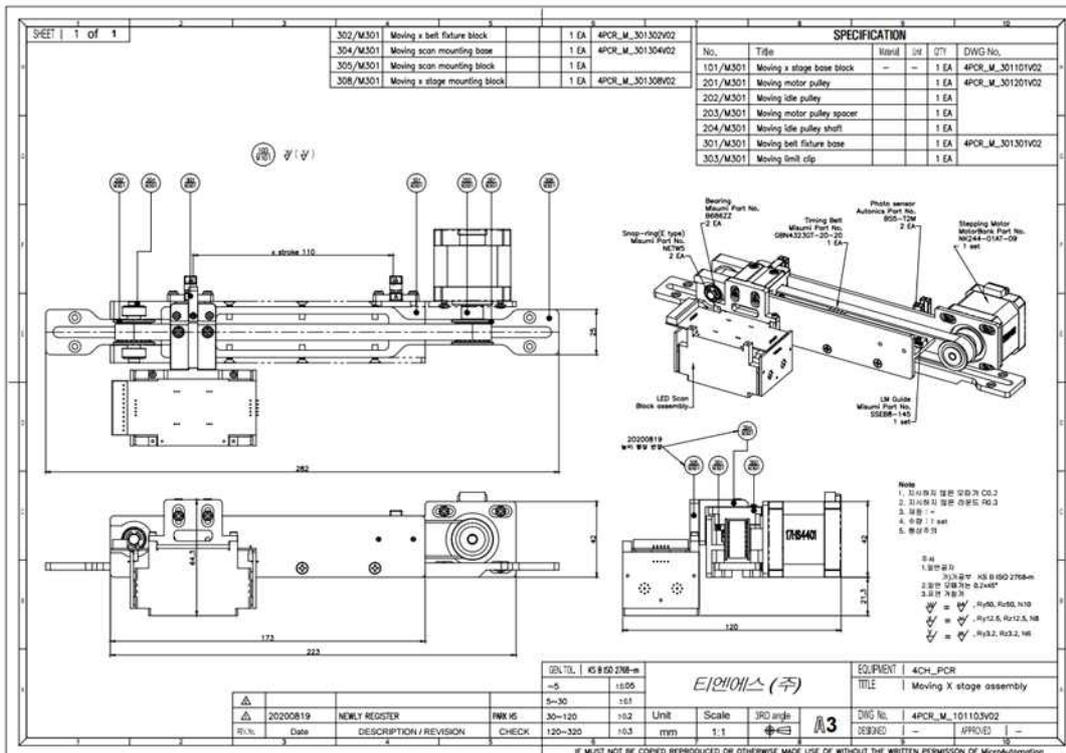
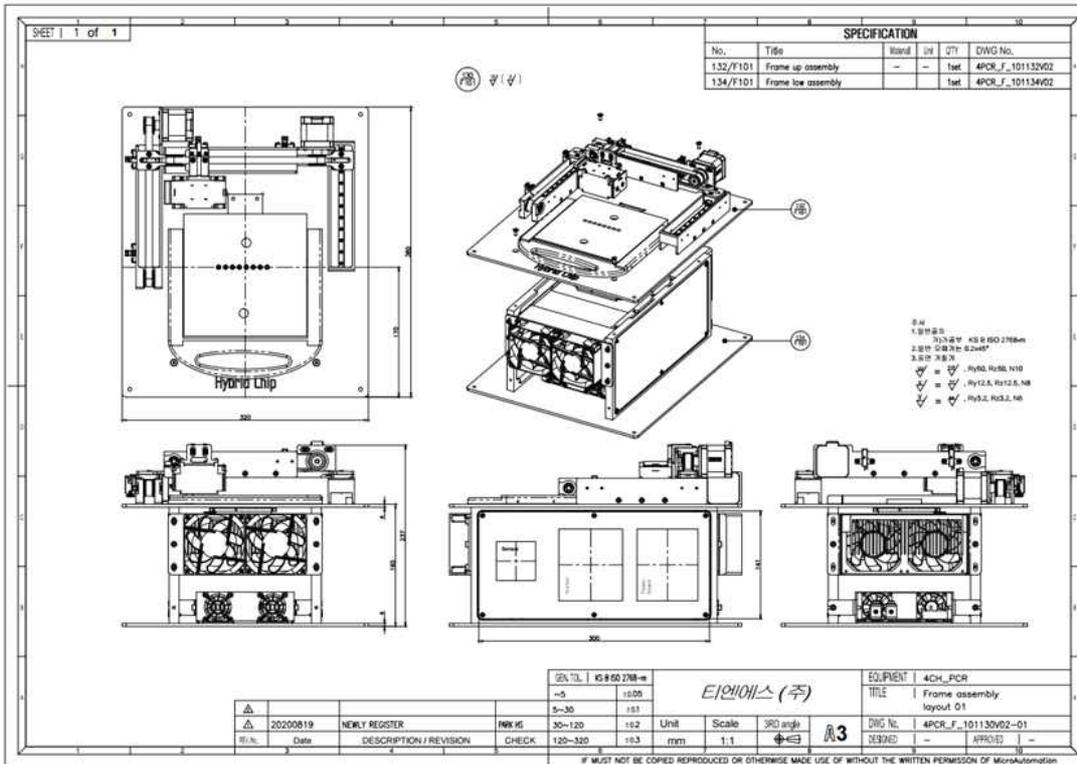


그림108 시스템 설계도면 제작안

- 설계 도면을 기반으로 부품을 가공 진행하고 조립하였음

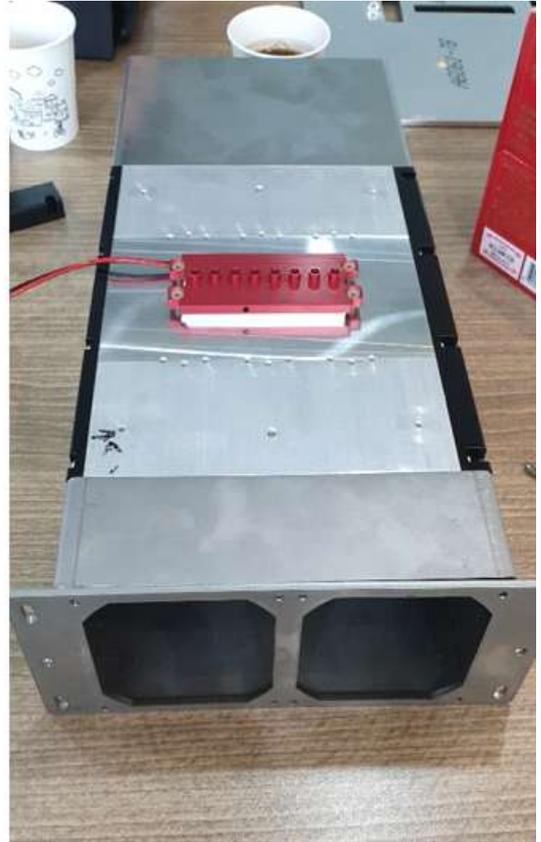


그림 109 시스템 부품(펠티어 모듈) 가공 및 조립

▪ System 전체 구성(핵심부품)

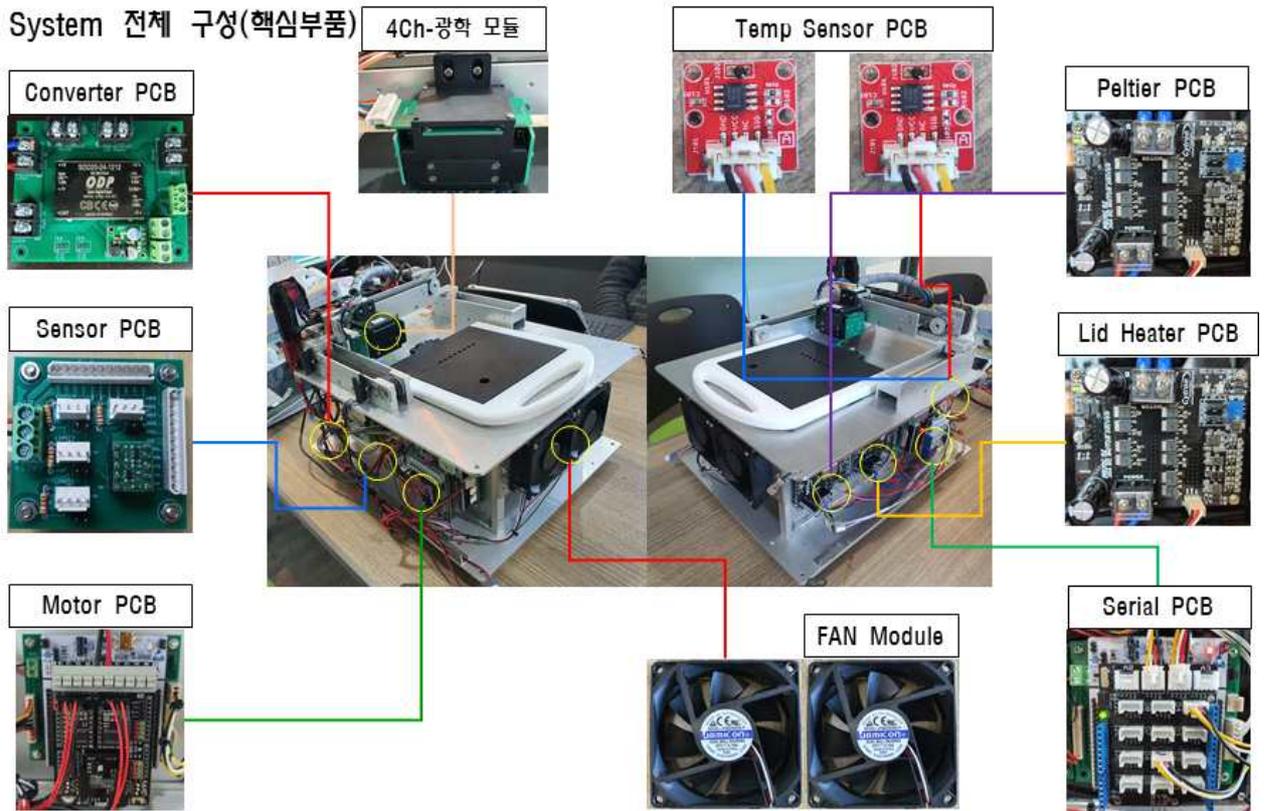


그림110 전체 시스템 구성도

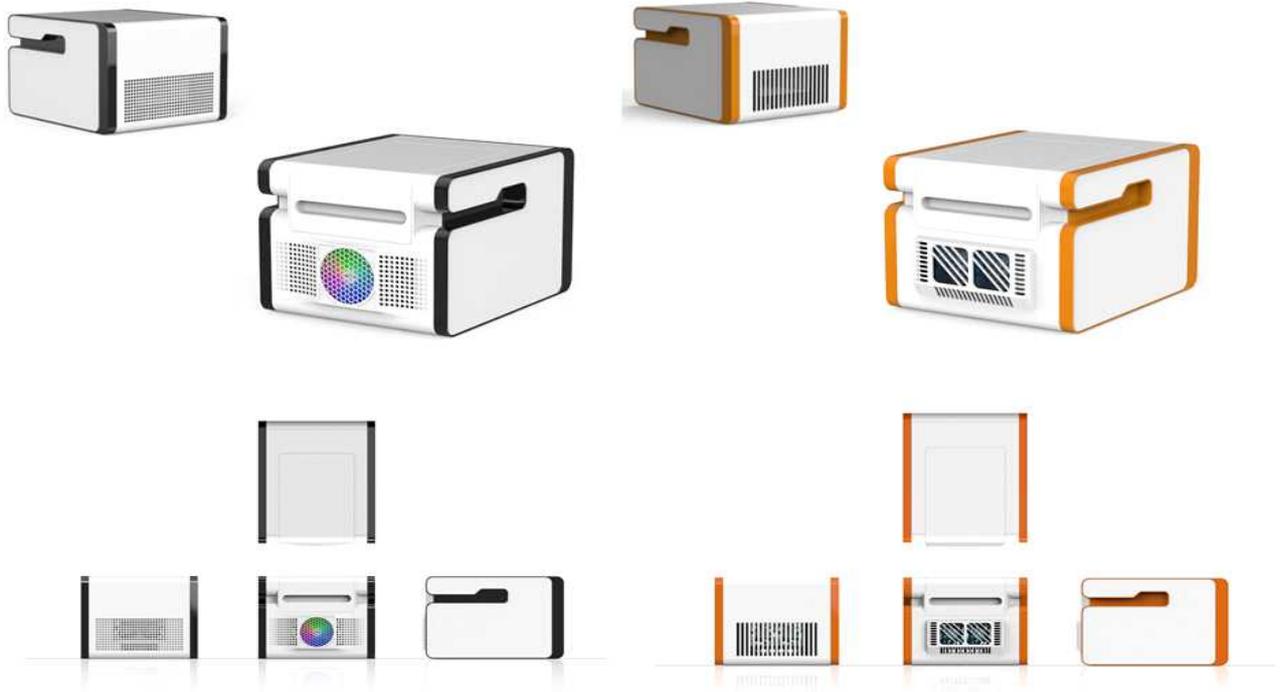


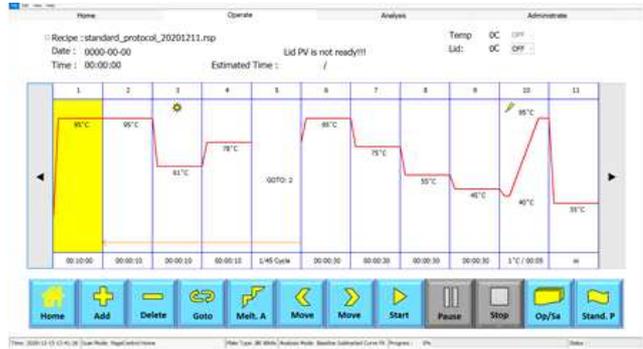
그림 101 시스템 디자인 도안



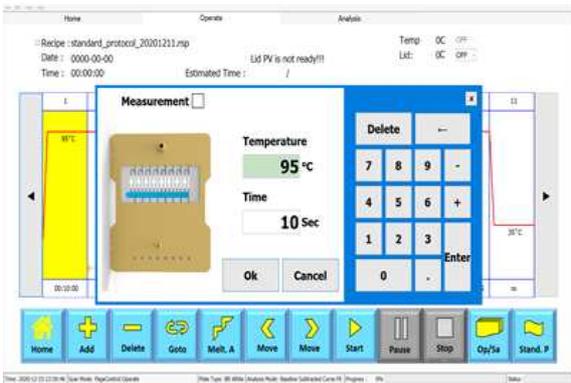
그림102 한우 종관별 시스템 케이스 조립



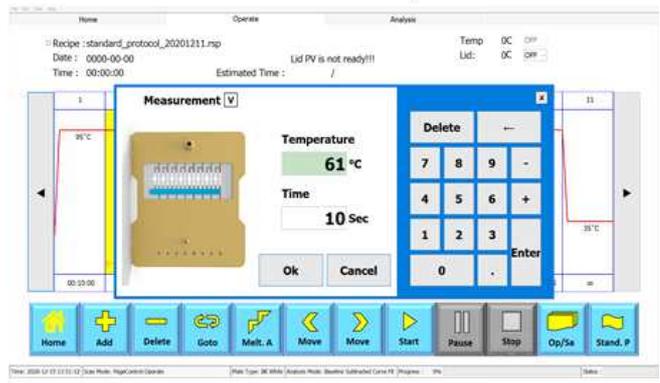
홈화면



프로토콜 화면



조건 설정 팝업창



형광측정 팝업창

그림103 현장형 한우 종판별 시스템 User Interface 개발

### Ct 측정 창

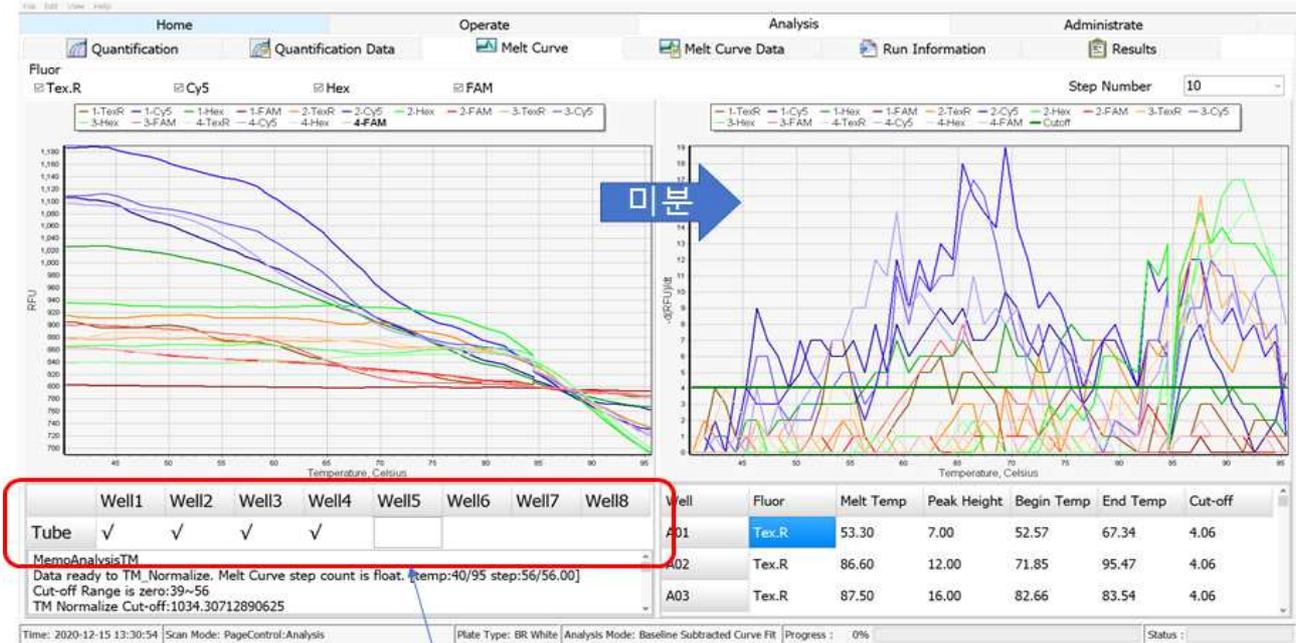
형광 선택



Tube 선택

그림104 한우 종판별 형광측정(CT) 창 개발

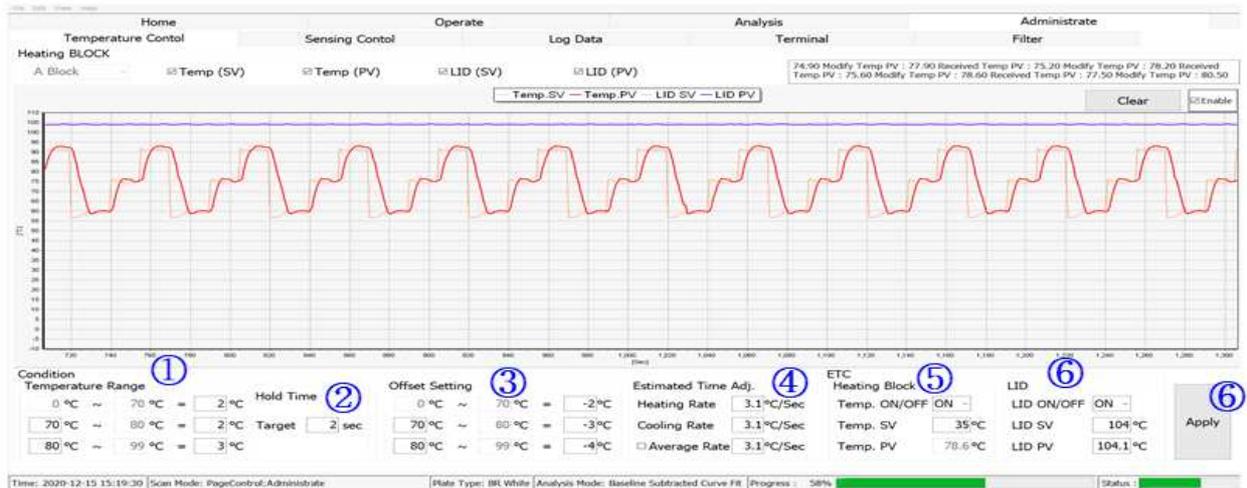
# Tm 측정창



Tube 선택

그림105 한우 종관별 형광측정(CT) 창 개발

# 온도 제어 파라미터



- ① Temperature Range : 타겟 온도로 인정 되는 범위
- ② Hold Time : 타겟 온도를 유지해야 하는 시간->만족하면 프로세스 시간 진행
- ③ Offset Setting(시약기준) : 시약과 히팅블럭내 온도 센서의 값 차이를 보정
- ④ Estimated Time Adj. : 히팅과 쿨링 속도를 기반으로 전체 프로세스 시간을 계산
- ⑤ Heating Block : Admin.에서 온도 제어 테스트를 위한 버튼
- ⑥ LID : Admin.에서 온도 제어 테스트를 위한 버튼
- ⑦ Apply : 변경된 파라미터 적용

그림 106 온도제어 창 개발

## 온도 상승 속도 측정

### Heating Rate 측정 실험

#### 조건

1. 약 400 ms 마다 온도를 기록한다.
2. 실험 구간 : 20~95°C
3. 측정 구간 : 40~80°C



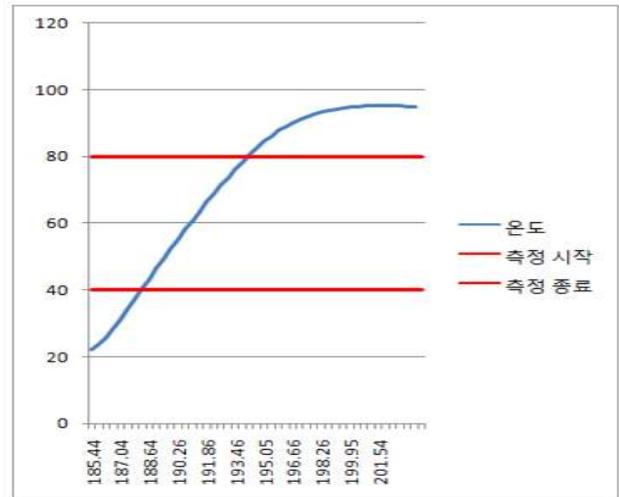
1. Heat Block의 온도를 20 °C에서 95 °C까지 상승시킨다.
2. 측정구간인 40 °C에서 80 °C사이(Δ Temp)의 변화 시간(Δ Time)을 측정하여 ΔTemp / ΔTime 값을 구한다.
3. 위 테스트를 5회 반복해서 평균값을 구해 최대 속도를 구한다.

## 온도 상승 속도 측정

### Heating Rate 측정 데이터

Time	Temp		
185.4388	20.9	195.0487	81.3
185.8358	21.3	195.4383	83.2
186.2383	22.7	195.8383	84.9
186.6432	24.9	196.2401	86.5
187.0393	27.4	196.6635	87.8
187.4383	30.2	197.0642	89
187.839	33.1	197.4606	90
188.2376	36.1	197.8634	90.9
188.6398	39.2	198.2641	91.7
189.0385	42.2	198.6657	92.3
189.4495	45.2	199.0651	92.8
189.8381	48.1	199.4625	93.3
190.2647	51.1	199.9499	93.7
190.6625	54.1	200.3378	94.2
191.0645	56.9	200.7401	94.4
191.4634	59.6	201.1438	94.5
191.8639	62.3	201.5388	94.7
192.264	64.9	201.9634	94.7
192.6667	67.5	202.3949	94.8
193.0625	69.9		
193.4643	72.3		
193.866	74.7		
194.2644	76.9		
194.6659	79.2		

Rate = 6.51 °C/S



### 5회 측정

1	2	3	4	5	평균
6.51	6.80	6.73	6.73	6.54	<b>6.66</b>

# 온도 하강 속도 측정

## Cooling Rate 측정 실험

### 조건

- ①. 약 400 ms 마다 온도를 기록한다.
- ②. 실험 구간 : 95~20°C
- ③. 측정 구간 : 80~40°C



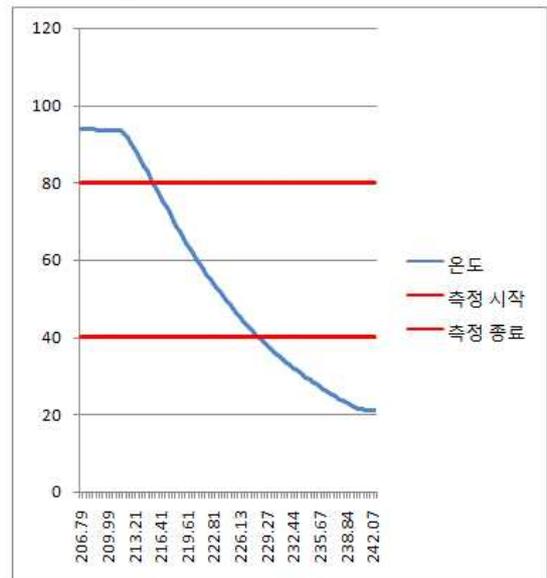
1. Heat Block의 온도를 95 °C에서 20 °C까지 하강시킨다.
2. 측정구간인 80 °C에서 40 °C사이(Δ Temp)의 변화 시간(Δ Time)을 측정하여 ΔTemp / ΔTime 값을 구한다.
3. 위 테스트를 5회 반복해서 평균값을 구해 최대 속도를 구한다.

# 온도 하강 속도 측정

## Cooling Rate 측정 데이터

Time	Temp				
206.7886	94.1	216.4115	76.3	226.1287	45.4
207.1872	94	216.7844	74.8	226.5115	44.2
207.5884	93.9	217.1673	73.3	226.9114	43.3
207.9892	93.8	217.5617	71.9	227.3138	42.4
208.3899	93.8	217.992	70.3	227.6884	41.5
208.7856	93.7	218.3855	68.8	228.0884	40.7
209.1889	93.7	218.8234	67.3	228.4896	39.8
209.589	93.7	219.2124	65.7	228.8653	39
209.989	93.6	219.6122	64.4	229.2692	38.2
210.3887	93.6	220.0152	63	229.6614	37.4
210.7883	93.6	220.4131	61.7	230.0641	36.6
211.2417	93.5	220.8136	60.3	230.4622	35.8
211.6342	93.4	221.2155	58.9	230.8654	35.1
212.0156	92.7	221.6379	57.7	231.26	34.3
212.4149	91.7	222.0133	56.4	231.6612	33.6
212.812	90.4	222.414	55.3	232.059	32.9
213.2141	89.1	222.8139	54.1	232.4397	32.2
213.6155	87.5	223.2149	52.9	232.8353	31.6
214.0211	85.9	223.6141	51.8	233.2386	31
214.4123	84.4	224.0174	50.7	233.6365	30.4
214.8122	82.8	224.4191	49.5	234.0491	29.7
215.2168	81.2	224.8095	48.5	234.4376	29.1
215.6129	79.5	225.2145	47.5	234.8356	28.5
216.0365	77.9	225.6396	46.5	235.2615	27.9

## Cooling Rate



## 5회 측정

Rate = 3.08 °C/S

1	2	3	4	5	평균
3.08	3.01	2.97	2.94	2.91	<b>2.99</b>

## 시약 기준 온도 보정

목적 : PCR 버퍼와 히팅블럭 온도센서간의 온도차이를 보정하여 시약 기준으로 동작 되도록 하기 위함

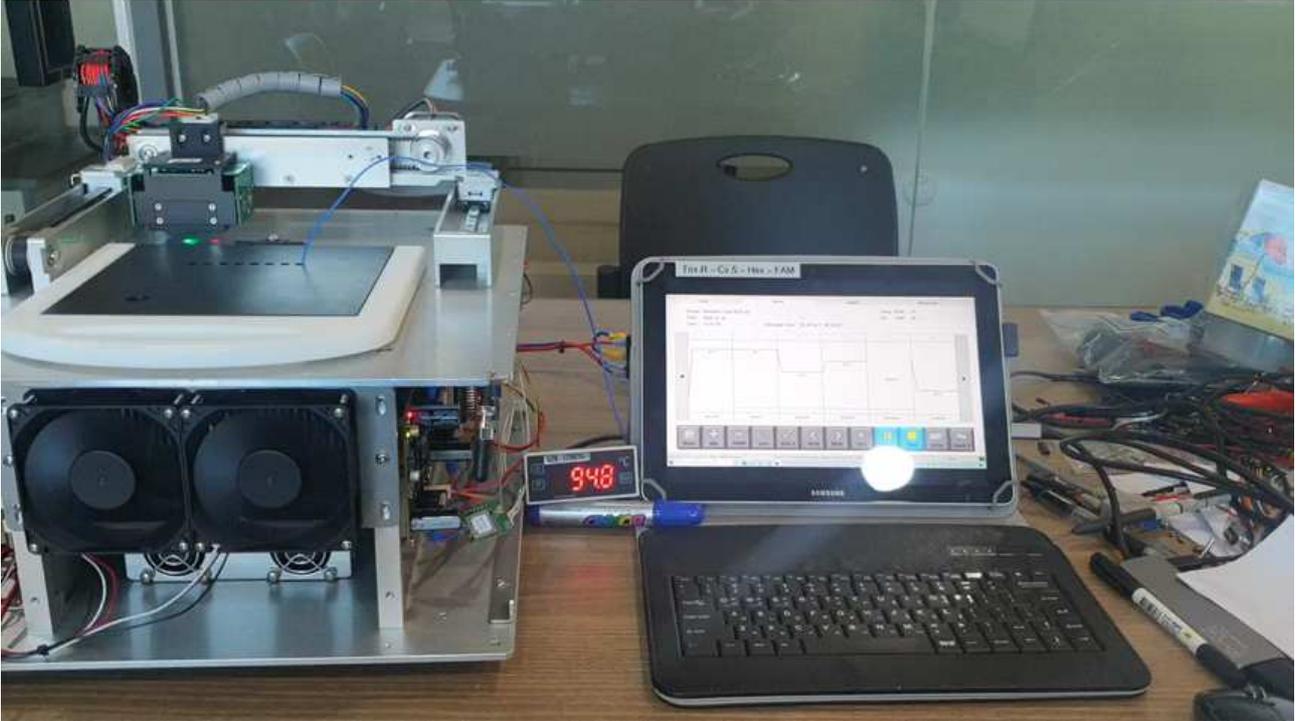


그림 107 한우 종관별 테스트

## 한우 종 판정표

품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
침소	#4	71-77	51-57, 60-66

CFX96에서 PCR한 data

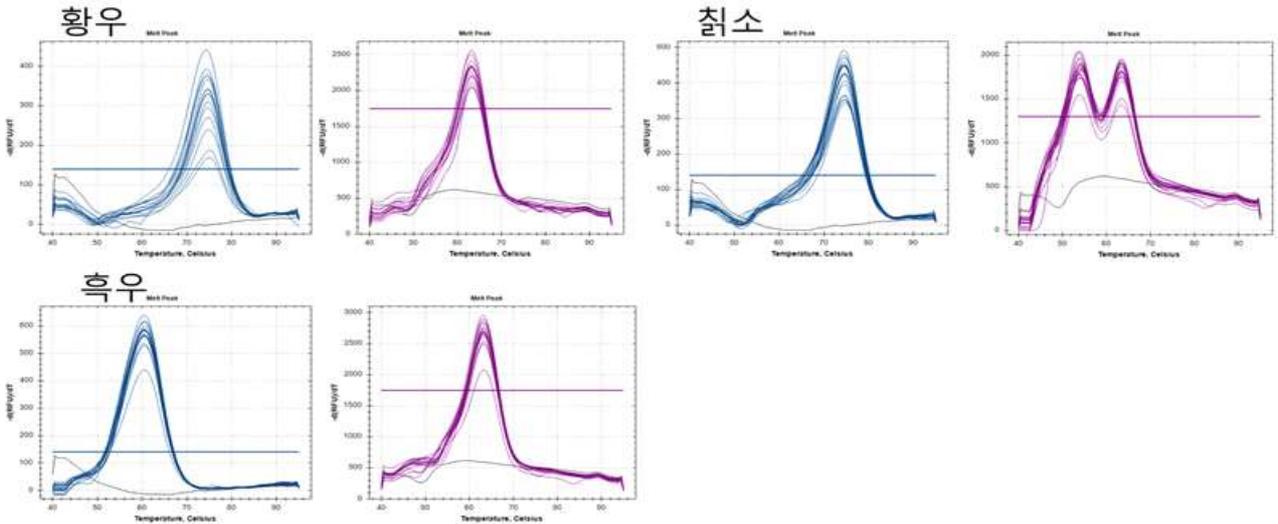


그림 108 CFX96을 이용한 한우 종 판별 테스트

## 형광 측정값 필터링

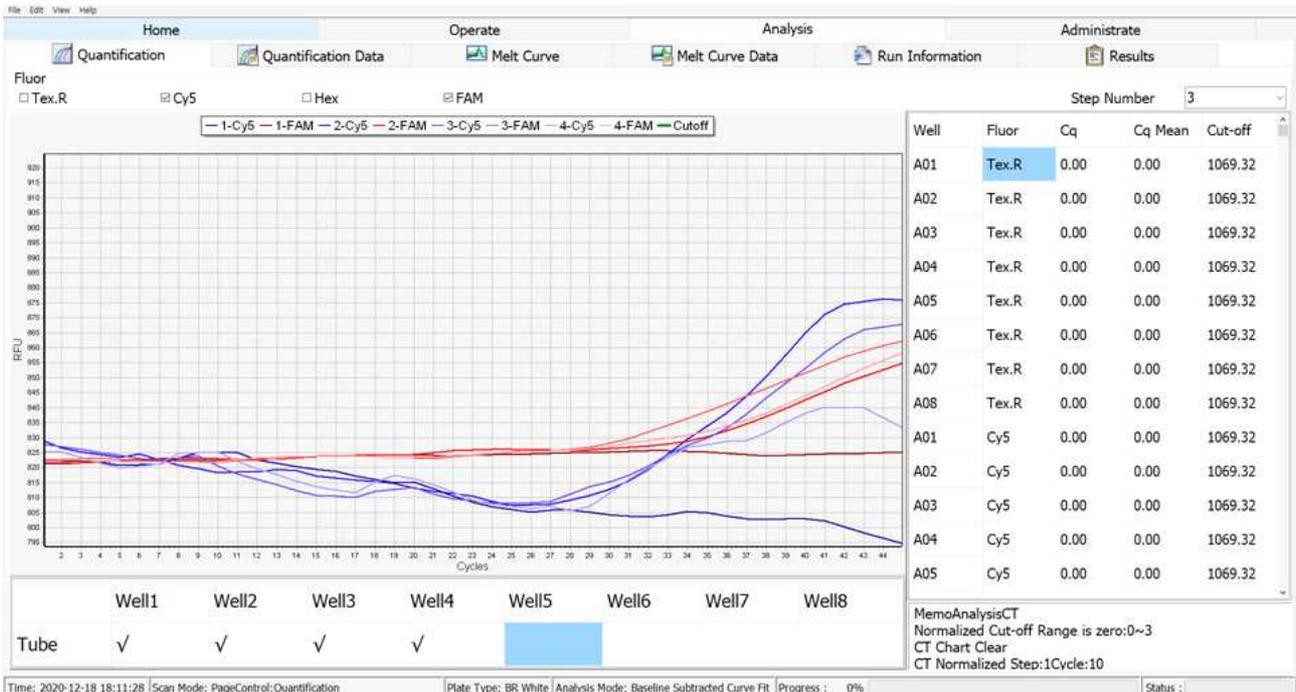
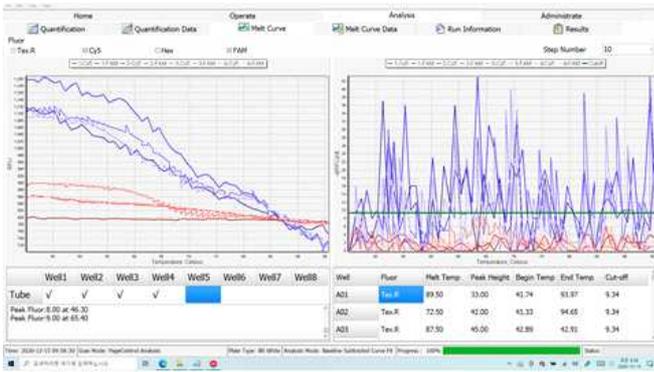
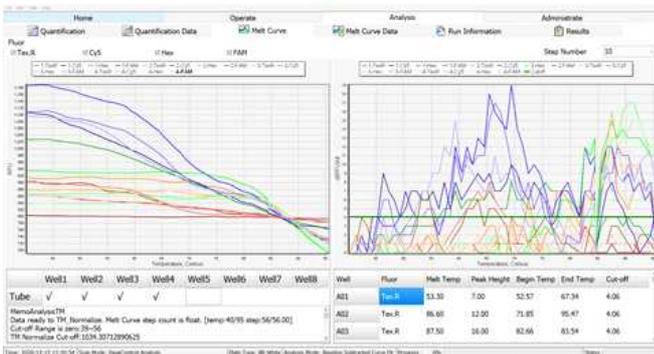


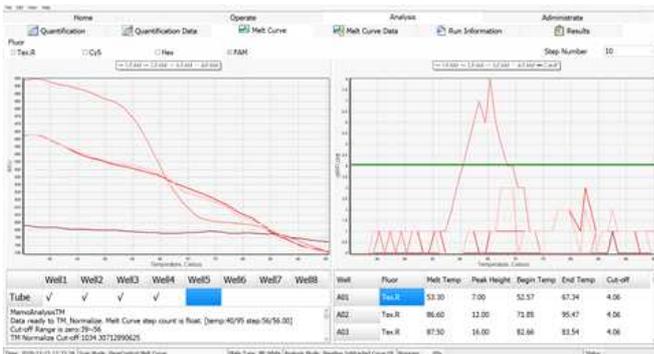
그림 109 한우 종판별 키트의 CT값 측정값 개발



Cut-off Factor  
 Ct: Cycle: 1 ~ 10, Tm: Tstart ~ 10°C, Etc Filter: Zero: Average: 1, LowPass: 1, Error: 100%  
 Ct: 30%, Tm: 30%  
 Logo1: PCR\_main\_고감염성, Logo2: 범부처조전생장.png, Key: 1234  
 Filter Subtracted Curve FR Progress: 100% Status:

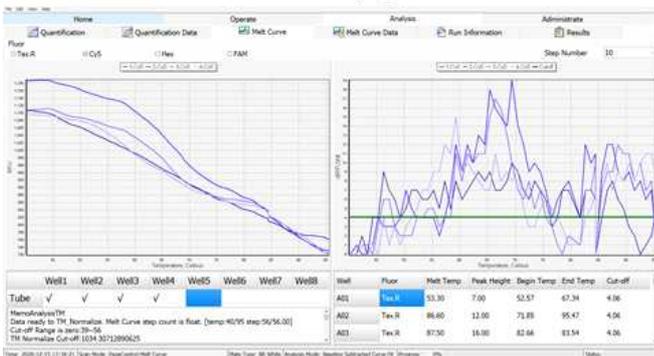


Cut-off Factor  
 Ct: Cycle: 1 ~ 10, Tm: Tstart ~ 10°C, Etc Filter: Zero: Average: 3, LowPass: 2, Error: 80%  
 Ct: 1%, Tm: 30%  
 Logo1: PCR\_main\_고감염성, Logo2: 범부처조전생장.png, Key: 1234  
 Filter Subtracted Curve FR Progress: 0% Status:



Cut-off Factor  
 Ct: Cycle: 1 ~ 10, Tm: Tstart ~ 10°C, Etc Filter: Zero: Average: 3, LowPass: 2, Error: 80%  
 Ct: 1%, Tm: 30%  
 Logo1: PCR\_main\_고감염성, Logo2: 범부처조전생장.png, Key: 1234  
 Filter Subtracted Curve FR Progress: 0% Status:

**FAM 파장**



Cut-off Factor  
 Ct: Cycle: 1 ~ 10, Tm: Tstart ~ 10°C, Etc Filter: Zero: Average: 3, LowPass: 2, Error: 80%  
 Ct: 1%, Tm: 30%  
 Logo1: PCR\_main\_고감염성, Logo2: 범부처조전생장.png, Key: 1234  
 Filter Subtracted Curve FR Progress: 0% Status:

**Cy5 파장**

품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
침소	#4	71-77	51-57, 60-66

그림 110 한우종판별 키트의 PNA Melting Analysis용 측정 창 개발(필터링 전과 후)

# 형광 측정값 필터링



Cy5 파장

품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
흰소	#4	71-77	51-57, 60-66

Cy5(A01~A04)

- 69.4
- 66.4
- 59.3

그림 111 한우 종판별 키트(Cy5)의 Melting analysis 측정 결과창



품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
흰소	#4	71-77	51-57, 60-66

Cy5(A01~A04)

- 69.4
- 66.4
- 59.3

그림 112 한우종판별 키트(Cy5)의 Tm data 확인 창

# FAM 파장



품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
흰스	#4	71-77	51-57, 60-66

FAM(A01~A04)  
 → 82.6 → 78  
 → 65.4  
 → 67.4

그림 113 한우 종판별 키트(FAM)의 Melting analysis 측정 결과창



품종	Tube	FAM	Cy5
NTC	#1	-	-
황우	#2	71-77	60-66
흑우	#3	58-64	60-66
흰스	#4	71-77	51-57, 60-66

FAM(A01~A04)  
 → 82.6  
 → 65.4  
 → 67.4

그림 114 한우종판별 키트(FAM)의 Tm data 확인 창

## ■ 연구결과

### - 한우종판별 키트

현장 진단형 한우 품종 판별 키트 개발 완료 및 최적화, 성능시험을 진행하여, 현장 진단형 한우 품종 판별 키트의 유효성을 최종적으로 검증, 정량적 목표치의 세부사항을 달성 할 수 있었다. 충북대에서 한우 종 판별 marker로 활용 가능한 후보를 최종적으로 전달받아, 해당 marker를 이용한 Primer, Probe의 최종 design 및 성능을 확인 하였고, 총 2개 marker를 활용하여, 황우, 흑우, 칙소 3가지 한우 품종을 1개 tube에서 판별 할 수 있는 Multiplex(다중진단) kit의 개발을 완료하였다. 또한, 현장에서의 빠른 확인이 가능 하도록 핵산 증폭에 소요되는 시간을 80분 이내로 단축하여, Fast PCR을 이용한 한우 종판별 키트의 조건 최적화를 완료 하였다. 키트의 한우 종판별 가능성 및 FAST PCR을 활용한 조건 최적화를 검증하기 위해, 충북대에서 제공받은 각 품종 샘플에 대해, 각 품종별 30개체 이상에 해당하는 샘플들에 대해 검증을 진행하여, 최종적인 성능 확인을 진행하였다. 최종적으로 황우, 흑우, 칙소 3개 품종의 한우 샘플 50개를 활용한 민감도 및 특이도 테스트 결과, 50개 sample 모두 해당 종으로 판별됨을 확인 하였고, 양성대조군 합성 유전자 샘플을 활용하였을 때,  $10^2$  copy의 농도까지 종판별을 할 수 있음을 확인하였으며, 실제 농도를 알지 못하는 샘플 50개에 대한 테스트에서도 모두 해당 민감도 범위 내에서 상대 정량이 확인 되어, 실제 현장에서의 활용에 적합함을 확인 하였다.

### - 한우종판별 시스템

현장에서 한우 종판별을 진행하기 위한 하이브리드칩 전용 시스템이 설계부터 테스트까지 모두 진행 되었으며, 테스트 결과를 기반으로 현장 종판별이 가능함을 확인하였다. 핵심이 되는 4채널 형광 모듈 및 하이브리드칩을 개발함으로써 현장 판독의 핵심 기술이 확보 되어 다양한 분야에 적용이 가능하다.



그림 115 한우 종판별용 판독키트, 하이브리드칩 및 시스템

- 참여기관 1 (충북대학교) :

■ 연구개발성과

<1차년도>

품종 판별 유전자 마커 개발

- 품종 판별 유전자 마커 개발: Affymetrix 640K SNP 데이터를 이용
  - o 한우, 칩소, 흑우 사이에 고정된 SNP 마커 발굴후 세 집단 사이에 0.4이상 빈도차이가 나는 20개 선별
  - o 통계적 분석방법을 이용하여 선발된 SNP 마커들의 검증력 확인
  - o 한우-칩소 사이에 차이가 나타나는 영역에 대한 유전자 탐색과 형질차이에 대한 연관성 확인
  - o 한우와 다른 모색을 지닌 칩소의 유전적 기작을 해석하기 위해서 한우와 차별화된 칩소 유전좌위에서의 유전자 기능을 분석하여 해당 유전자가 관여하고 있는 세포내 기작과 생리학적 영향을 분석하고 있음
  - o 칩소의 모색발현기작에 대한 유전적 요인과 분자적 기능을 통합적으로 분석하여 칩소특이 마커를 발굴하는데 활용하고 있는데, 이들 유전자들간의 상호작용으로 칩소 특이적인 모색발현에 대한 유전적 요인이 규명되어 학술지에 발표

Table 1. Indexes of genetic diversity and breed specific SNPs

Parameter	Hanwoo	Chikso	Heugu
$H_o$	0.36	0.32	0.32
$H_E$	0.35	0.29	0.29
$f$	-0.001	-0.094	-0.127
PI_HAT	0.168	0.168	0.245
Breed specific SNPs	15515	476	436
MAF Min	0.05	0.05	0.05
Max	0.41	0.42	0.42
Average	0.11	0.13	0.15

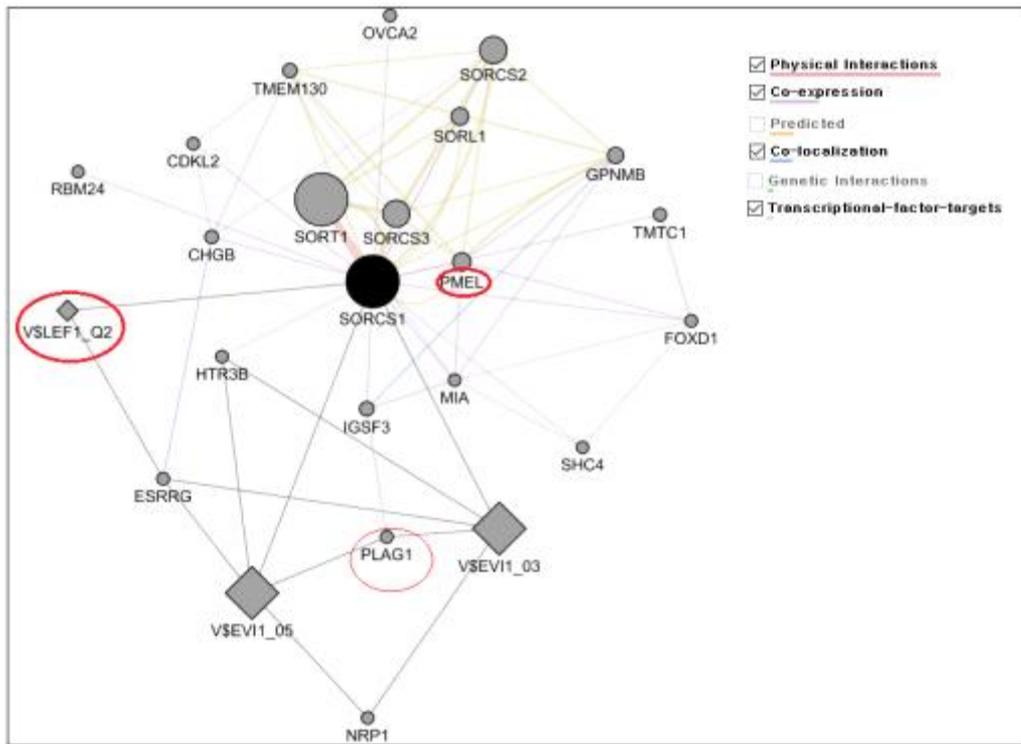


Figure: 한우와 칩소사이에 유전적 차이를 보이는 유전자 네트워크 분석

- 한우 Vs. 칩소와 흑우 판별 유전자형 기준 설정
  - o Illumina 70K 데이터를 이용한 한우 특이적인 SNP 마커 발굴 (주요한 육우 및 유우품종) 한우 고유품종식별 정확성 분석

- 품종식별을 위한 표준 시료 수집

구분	출처	두수
한우	지역별 한우농가	748
칩소	충북축산위생연구소	317
	경북축산연구소	40
	국립축산과학원 가축유전자원시험장	239
	강원축산연구소	53
	축산물품질평가원	50
	칩소전문정육식당(아침목장)	15
흑우	축산물품질평가원(제주흑우)	50
	충북축산위생연구소 (내륙흑우)	39

Table 2. Candidate genes detected in the Chikso-Hanwoo analysis

Chr	Position	Candidate genes	Function
1	20721975	<i>USP25</i>	Meat quality
1	65226899	<i>NR1I2</i>	Feed efficiency
1	81995813	<i>TRA2B</i>	Growth,
2	117838136	<i>PID1</i>	Meat quality and growth
4	9837443	<i>CDK6</i>	Associated with body length and heart girth in cattle
4	79562672	<i>GLI3</i>	Associated with growth traits in beef cattle
5	63619858	<i>ANKS1B</i>	Associated with body weight index and waist circumference in human
6	26386725	<i>MTTP</i>	Contains QTL for fatty acid composition in pigs and associated with lipid metabolism in Hanwoo
6	102610929	<i>ARHGAP24</i>	Related to growth traits in pigs
9	15582461	<i>SENP6</i>	Muscle lipid composition in <i>Bos taurus</i> cattle
11	16130458	<i>RASGRP3</i>	Associated with cell growth, fatty acid composition pig
12	2549494	<i>DIAPH3</i>	Associated with height, meat yield and longissimus dorsi in Korean cattle
12	11195490	<i>ELF1</i>	Growth and body composition traits in pigs, regulate intramuscular fat content (IMF)
13	82792074	<i>DOK5</i>	Potential roles in insulin and IGF-1 action
14	24306129	<i>XKR4</i>	Feed intake, average daily gain, birth weight, growth, muscle development, fat thickness in cattle
14	72494741	<i>CDH17</i>	Growth related in pigs
14	76053303	<i>DECRI</i>	Affects carcass quality traits in beef cattle
18	22191774	<i>FTO</i>	Associated with lean meat percentage in cattle
22	53457282	<i>LRRC2</i>	Associated with chest girth in pigs

1.

<2차년도>

- Affymetrix 640K SNP의 품종판별 유전자 마커 검증

- o 1차년도 한우, 칩소, 흑우 판별용 마커로 선발된 마커의 식별력을 검증하기 위하여 해당 SNP 좌위들에 대한 염기서열 분석을 한우, 흑우, 칩소의 추가 샘플에서 진행함
- o Affymetrix Chip의 칩소 데이터에서 고정된 염기서열로 발견된 4개의 A, T, G, C 변이들에 대한 염기서열을 PCR 반응으로 증폭하였고, 나타난 염기서열을 이용하여 IDT SNP 분석법을 제작하여 대량으로 한우-칩소-흑우에서의 유전자형을 결정하였음

Columns	Chrom:Position	Chikso																
AX-18023551	1 5684751	A,A																
AX-18124268	1 33191348	T,T																
AX-18124270	1 33192097	A,A																
AX-25142698	3 66867743	A,A	A,A	A,A	?,?	A,A	A,A	A,A	A,A	A,A	A,A	?,?	A,A	A,A	A,A	A,A	A,A	A,A
AX-25814137	4 1.13E+08	T,T																
AX-27148614	7 92744435	G,G	G,G	G,G	G,G	G,G	G,G	?,?	G,G	?,?	G,G							
AX-27788727	9 31394607	C,C																
AX-27788736	9 31396237	G,G																
AX-27946290	9 73467934	G,G	?,?	G,G														
AX-28016900	9 91454569	G,G																
AX-19444438	11 99149925	G,G																
AX-20003399	13 40027995	G,G	A,E	G,G	G,G	A,G	G,G	A,G	G,G	G,G	G,G	G,G	G,G	A,G	A,G	A,G	A,G	A,G
AX-20165026	13 76203226	T,T																
AX-20883010	16 5706380	G,G	G,G	G,G	G,G	?,?	G,G	?,?	G,G									
AX-21737927	18 63073797	C,C																
AX-21746064	18 64901743	A,A																
AX-21775933	19 8045650	T,T																
AX-23133947	22 1770744	C,C																
AX-24082267	26 2825306	G,G																
AX-24186174	26 28255698	T,T																
AX-24679261	29 1753321	C,C	C,C	C,C	?,?	C,C												

- o 칩소에서 고정된 유전자형으로 선발한 SNP에서 상용화된 칩소집단에서는 한우와 차이가 나타나지 않았음. 이는 칩소와 칩소간에 교배에서도 한우와 똑같은 모색으로 한우모색이 나타나기도 하기에 완전한 칩소에 해당하는 원인 유전요인을 연구하여야 함

- 칩소 개체별 모색 발현 양상을 수집과 대량유전자형 분석

- o IDT의 SNP 분석법을 활용하여 칩소-한우 개체들에 대한 SNP 검증에서 한우-칩소 식별이 실패한 원인을 분석하였고, 칩소 모색에 대한 원인 유전인자를 발굴하기 위한 연구를 수행하기 위하여 새로운 Chip 분석을 수행하였음

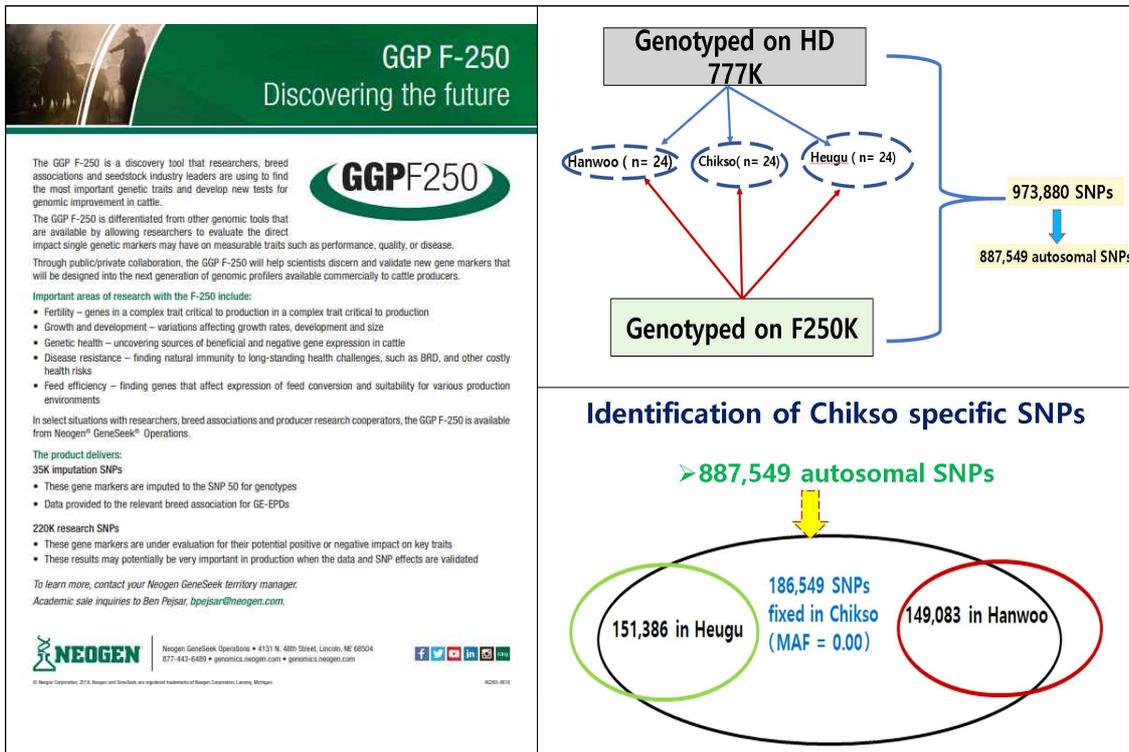
Chr	BTA9	BTA13	BTA18	BTA26	BTA29	Chr	BTA9	BTA13	BTA18	BTA26	BTA29
rsnumber	rs109735097	rs42055879	rs42813960	rs137179723	rs42495156	rsnumber	rs109735097	rs42055879	rs42813960	rs137179723	rs42495156
SNP	G/A	G/T	G/A	G/A	C/T	SNP	G/A	G/T	G/A	G/A	C/T
position	73467934	76203226	64901743	2825306	1753321	position	73467934	76203226	64901743	2825306	1753321
H1	AG	GT	AA	AG	TT	CH1	AG	GT	GG	AG	TT
H2	AG	GG	AA	AG	TT	CH2	AG	GT	GG	AA	TT
H3	AG	TT	GG	AA	CT	CH3	GG	GT	AG	AA	TT
H4	AA	GT	GG	AG	TT	CH4	AG	GG	GG	AG	TT
H5	AG	GT	AG	AG	CT	CH5	AG	GG	AG	AG	TT
H6	GG	GG	AG	AA	CC	CH6	AG	GT	AG	AA	TT
H7	AG	GG	GG	AG	CT	CH7	AG	GT	AG	AA	CT
H8	AG	TT	AA	AA	TT	CH8	AG	GT	GG	AA	CT
H9	AG	GT	AA	AG	TT	CH9	AA	GT	AG	AG	CT
H10	AG	GT	AA	AA	CT	CH10	AG	GT	AG	GG	CT
한우	A=0.5 G=0.5	G=0.55 T=0.45	A=0.6 G=0.4	A=0.7 G=0.3	T=0.7 C=0.3	칩소	A=0.5 G=0.5	G=0.6 T=0.4	G=0.7 A=0.3	A=0.7 G=0.3	T=0.8 C=0.2

- o 칩소에서 고정된 유전자형으로 선발한 SNP에서 상용화된 칩소집단에서는 한우와 차이가 나타나지 않았음. 이는 칩소와 칩소간에 교배에서도 한우와 똑같은 모색으로 한우모색이

나타나기도 하기에 완전한 최소에 해당하는 원인 유전요인을 연구하여야 함

- GGP-F250 일루미나 유전자칩을 이용한 한우-최소-흑우 분석

- o GGP-F250 일루미나 칩은 소 유전체내에 형질에 영향을 주는 원인유전인자들을 분석하기 위해서 디자인된 것으로 국내 한우계통 품종에서는 최초로 이용함
- o 한우, 흑우, 최소 품종간에 차이에 대해서 원인유전인자를 규명하는데 활용함.
- o 외국소품종에 결과에 따르면 원인유전인자를 중심으로 SNP들이 포함되어 있어서 MAF의 빈도가 낮은 편이며, 한우, 흑우, 최소의 유전적 특성에 활용되어온 Illumina Bovine HD SNP Chip을 동일한 개체들에 동시에 분석하여 품종별 imputation함 .



- o 왼쪽 그림에는 GGP-F250에 대한 소개와 오른쪽 위쪽 그림은 Illumina HD와 F250 SNP chip을 이용한 한우, 최소, 흑우 각각 24두에 대한 분석을 수행하여 총 973,880 SNP 마커에 대한 분석함
- o 1차년도 선행연구결과에서 최소로 부터 한우와 흑우의 분리가 되었기에, 최소의 유전자를 전통한우의 기준으로 하여 최소에서 특이적으로 고정된 인자와 한우, 흑우에서 고정된 인자로 각각 구분하여 분석함
- o 최소에서 MAF가 0인 고정마커 186,549개 가운데, 149,083은 황색한우에서 동일하게 고정되어 있으며, 151,386은 제주흑우에서 고정되어 있는 것으로 나타나, 이들은 한우계통의 특이적 고정인자로 활용함
- o Illumina HD와 F250 유전자형 데이터를 통합하여 최소에서 고정된 인자들에 대한 황색한우와 제주흑우에 대한 빈도의 차이를 각각 비교하였고, 한우와 흑우에서 MAF 0.4이상 차

이가 나는 마커 12와 514개를 찾아냄

➤ **186,009 SNPs fixed in Chikso (MAF = 0.00)**

Breed	MAF			
	0.00	≥ 0.20	≥ 0.30	≥ 0.40
<b>Hanwoo</b>	<b>149,083</b>	<b>808</b>	<b>84</b>	<b>12</b>
<b>Heugu</b>	<b>151,396</b>	<b>3966</b>	<b>1752</b>	<b>514</b>

- 한우와 칩소사이에 가장 빈도차이가 크게 나타나는 유전좌위의 데이터를 염색체별로 분류하고 후보유전자를 선발함

**SNP markers fixed in Chikso but polymorphic in Hanwoo selected based on MAF and LD**

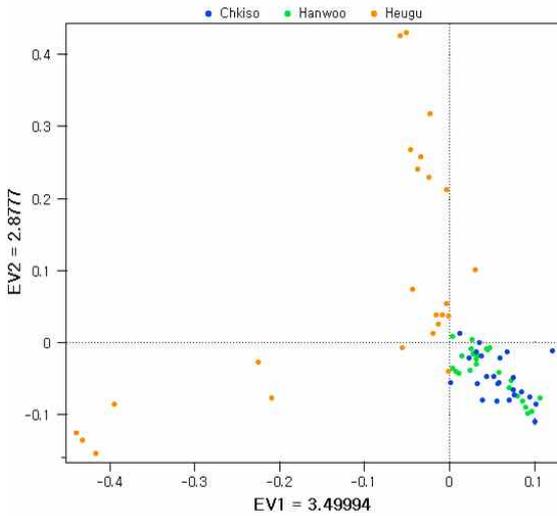
Marker	Chr	Position	rs number	MAF
2-47524551-A-T-rs208184773	2	47524551	rs208184773	0.33
BovineHD0300011390	3	36556207	rs137563246	0.33
3-58435656-T-G-rs209040244	3	58435656	rs209040244	0.34
ARS-BFGL-NGS-94913	3	92661872	rs110871230	0.38
BovineHD0400033436	4	115370355	rs43414926	0.33
6-42695692-G-T-rs208652228	6	42695692	rs208652228	0.34
BovineHD0600015451	6	56489365	rs135739267	0.39
BovineHD0700031745	7	108944703	rs136626663	0.33
ARS-BFGL-NGS-77068	8	42632804	rs109105505	0.35
BovineHD0900005601	9	20669671	rs136226199	0.48
BovineHD1200018460	12	67555753	rs109102819	0.40
BovineHD1400006946	14	23951602	rs137716324	0.41
BovineHD1500004036	15	16025452	rs110164148	0.33
BovineHD1500006835	15	25811563	rs41749980	0.40
BovineHD1500022890	15	78736532	rs134259326	0.35
BovineHD1800004597	18	14076102	rs137197159	0.48
19-48487453-T-C-rs133133176	19	48487453	rs133133176	0.35
BovineHD2100008860	21	30765482	rs41965499	0.35
BovineHD2800010153	28	37120482	rs134323308	0.40
BovineHD2900006642	29	23327063	rs42523858	0.40

- 대량 유전체 데이터를 활용한 한우-칩소-흑우의 유전적 특성 정밀 분석

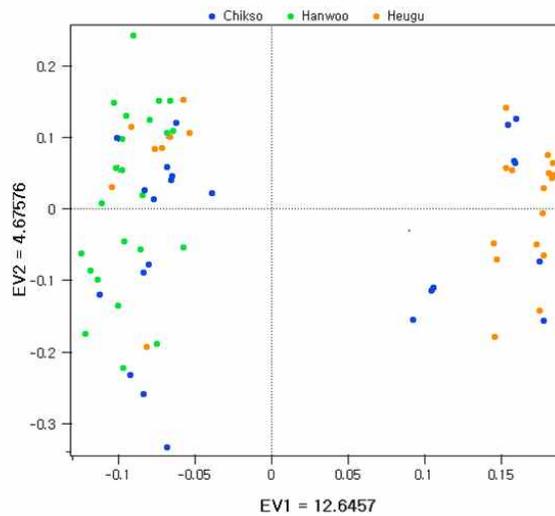
- 2차년도 대용량 SNP 데이터가운데 X와 Y 성염색체 유전자형 정보를 가지고 주성분 분산분석 (Principal component)을 수행하여, X염색체에서는 한우와 칩소가 거의 똑같은 cluster를 구성하고 있지만, 제주흑우는 약간의 유전적 차이가 관찰되었음

- o Y 염색체의 SNP 좌위에서는 흑우와 흰소 사이에 유사성이 높으며, 한우와 구분되는 개체들이 일부 관찰되었지만 한우와 흰소, 흑우 사이에 Y염색체에서의 확연한 차이가 나타나지는 않았음

### X-chromosome SNPs

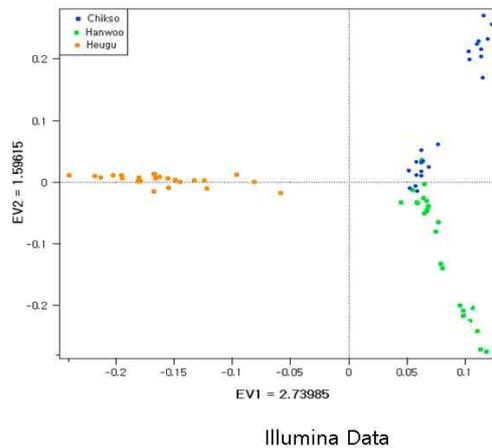
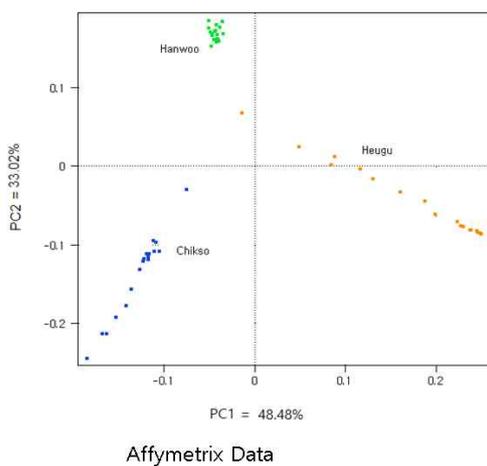


### Y-chromosome SNPs



- o 상염색체상에서의 유전정보로 인한 한우, 흰소, 흑우의 명확한 차이는 존재하지 않는다는 결론을 내릴 수 있었음
- o 본 연구에서의 선행연구결과와 다른 연구자들의 그동안의 한우, 흰소, 연구결과에 따르면 한우, 흰소, 흑우 사이에 존재하는 유전적 차이는 주로 상염색체상에 존재하는 차이라고 결론을 내릴 수 있으며, Affymatrix와 illumina chip 데이터에서 상염색체에서의 상당한 유전적 구분이 있다는 것을 확인함

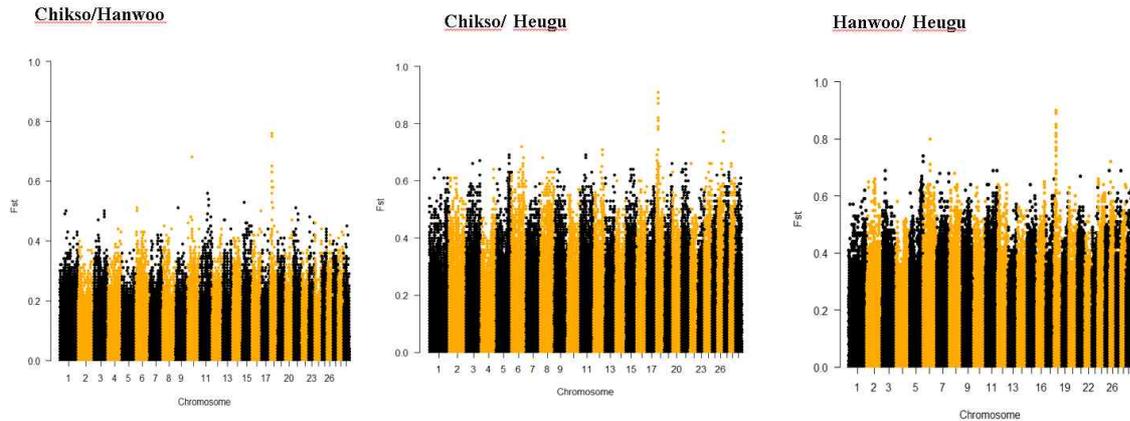
### Autosomal SNPs



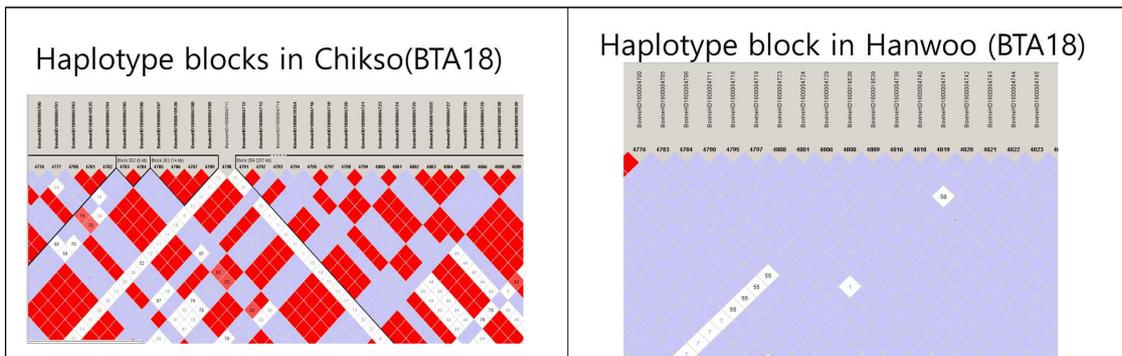
- o 황색한우와 흑우, 그리고 흰소사이에는 뚜렷히 구분되는 모색의 특징을 이용하여 Illumina HD와 GGP-F250 데이터를 정밀하게 재분석함.

- 한우-최소-흑우의 모색 발현 특이 유전자 마커의 발굴과 품종식별 확인
- o 최소-한우, 최소-흑우, 그리고 한우-흑우 비교에서 공통적으로 모색지배 유전자인 MC1R 유전자가 존재하는 부위에서 가장 유의적인 차이가 나타났음
- o 3품종의 가장 큰 차이인 모색에서의 발현양상에 MC1R 유전좌위가 중요한 작용을 한다는 것을 확인하는 결과임.

GGP2F250 and HD77K combined



- o 한우에서는 황색의 모색으로 강선발이 되어있고, 흑우는 검정색으로 강선발이 되었기에 이 좌위에서의 한우와 흑우의 반수체 구조는 고정되어 있는 반면에 최소는 고정되어 있지 않았다. 따라서 뚜렷한 최소모색 발현 반수체구조를 규명함.



- o 소 염색체 18번 MC1R 유전좌위를 포함한 영역에서 한우-흑우, 한우-최소, 최소-흑우간에 모두 차이가 나는 유전인자가 존재한다는 결과를 가지고 최소-흑우간에 차이를 나타내는 대립유전인자를 선별함.

- 한우품종 식별프로토콜 및 프로그램 개발

- o 한우와 흑우의 경우에는 뚜렷한 모색의 고정된 마커를 선별하였음
- o 최소의 경우에는 완전히 고정된 형태가 아니지만 뚜렷한 최소의 모색 발현을 나타내는 것을 기준으로 식별할 수 있는 마커 선별하였음

Chip	Gene	Shared	흑우		흰소		한우	
			Major Allel	Allele Frec	Major Allel	Allele Frec	Major Allel	Allele Frec
GGPF-250	Missense	Heugu_Hanwoo	T	0.90	C	1.00	C	1.00
GGPF-250		Heugu_Hanwoo	A	0.90	G	1.00	G	1.00
GGPF-250	3 primer_UTR	Heugu_Hanwoo	T	0.90	C	1.00	C	1.00
GGPF-250		Heugu_Hanwoo	G	0.90	A	0.98	A	1.00
GGPF-250		Chikso_Hanwoo	G	1.00	A	0.67	G	0.98
GGPF-250		Chikso_Hanwoo	T	1.00	G	0.54	T	1.00

1. 위쪽 첫번째 마커를 이용하였을 때 TT형이나오면 무조건 흑우.
  2. 위쪽 첫번째 마커가 C-형이고 아래쪽 첫번째 마커가 A-형이면 흰소로 판정.
  3. 위쪽 첫번째 마커가 C-형이고 아래쪽 첫번째 마커가 GG형이면 한우로 판정.
- 한우, 흑우, 흰소 판정에 사용하는 마커는 2개로 정확히 식별될 수 있도록 하였음

<3차년도>

- 유전자 정보기반 품종식별 검증

o Illumina HD777K와 F250K Chip으로 분석된 유전자형 빈도 데이터를 검증하기 위해서 흰소 내 모색발현 정도에 따라 나눈 개체들의 DNA 염기서열 분석을 수행하였음

표) 황우, 흑우, 흰소 GGP-F250K SNP 분석 결과

M	Ani	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	황우	GG																								
	흑우	AA	AG	AG	AA	AA	AG	AA	AG	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA									
	흰소	GG																								
2	황우	AA	AA	AA	AA	AA	AA	??	AA	AA	AA	AA	??	AA												
	흑우	GG	AG	AG	GG	GG	AG	GG	AG	GG	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG									
	흰소	AA	AG																							
3	황우	TT	??	TT																						
	흑우	TT																								
	흰소	GT	GT	GT	GT	GT	GT	TT	GT	TT	GT	TT	TT	GT	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GT	GT	GG	GT	GT	
4	황우	GG	GG	AG	GG																					
	흑우	GG																								
	흰소	AA	AA	AG	AG	AA	AA	AA	AA	AG	AG	AA	AG	GG	AA	AG	AG	AA	AG							
5	황우	DD	DD	??	DD	DD	DD	??	DD	??	??	DD	??	DD	??	??	DD									
	흑우		DI	DI			DI			DI							DI		DI							
	흰소			DI	DI					DI	DI		DI	??								DI		DI	DI	

M; markers, 1; rs135908235, 2; rs137310479, 3; rs382687181, 4; rs447850402, 5; rs110710422 (MC1R)

o 염기서열 분석결과는 Chip 데이터와 일치하는 것으로 나타났으며, 주변 서열들을 이용하여 SNP 유전자형을 Q-PCR 방법으로 분석할 수 있는 방법을 IDT rhAmp PCR 방법을 이

용하여 재디자인 하였음

표) 한우, 칩소, 흑우에 대한 염기서열 분석결과

Markers	SNP	Han1	Han2	Han3	Han4	Heu1	Heu2	Heu3	Heu4	Chik1	Chik2	Chik3
rs135908235	G/A	GG	GG	GG	GG	--	AG	AA	AA	GG	GG	GG
rs137310479	A/G	AA	AA	AA	AA	GG	AG	GG	GG	AA	AA	AA
rs382687181	T/G	TT	TG	TG	TG							
rs447850402	G/A	GG	AA	AA	AG							
rs110710422 (MC1R)	InDel	DD	DD	DD	DD	L	L	L	L	L	L	L

- o 염기서열분석결과와 IDT rhAmp PCR 분석 결과를 활용하여 유전자형들 간에 반수체 구조를 분석하였음. 특히 칩소 무늬를 결정하는 중요유전자로 알려진 MC1R과 ASIP 유전자형을 포함하여 BTA18번 반수체 구조가 모색결정에 어떻게 영향을 주게 되는지를 밝혀내고자 하였는데, 이를 모색에 따른 차이와 반수체 구조를 파악해야 했음

BTA 18번에 대한 반수체 구조를 칩소, 흑우, 황우 사이에서 분석한 결과는 다음과 같음

표) BTA18번 반수체 구조

Data type	Breed	rs382687181	rs135908235	rs447850402	rs137310479	Freq
Chip data	Black (24)	<u>T</u>	<b>A</b>	<u>G</u>	<b>G</b>	0.896
		<u>T</u>	<b>G</b>	<u>G</u>	<b>A</b>	0.104
	Brindle (22)	T	<u>G</u>	A	<u>A</u>	0.359
		G	<u>G</u>	G	<u>A</u>	0.200
		T	<u>G</u>	G	<u>A</u>	0.096
Hanwoo (12)	G	<u>G</u>	A	<u>A</u>	0.346	
	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	1.000	
Merged data	Black (32)	<u>T</u>	<b>A</b>	<u>G</u>	<b>G</b>	<b>0.891</b>
		<u>T</u>	<b>G</b>	<u>G</u>	<b>A</b>	<b>0.109</b>
	Brindle (39)	T	<u>G</u>	A	<u>A</u>	0.191
		G	<u>G</u>	G	<u>A</u>	0.062
		T	<u>G</u>	G	<u>A</u>	<b>0.386</b>
	Hanwoo (36)	G	<u>G</u>	A	<u>A</u>	0.361
<u>T</u>		<u>G</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<b>1.000</b>	

- o 황우는 TGGA형으로 고정이 되어 있음
- o 흑우는 TAGG형의 빈도가 높으며, 이것이 흑우 특이 반수체형이며 낮은 빈도로 TGGA를 가지고 있음 (제주흑우와 ETBIO 흑우 두종류의 흑우집단이 포함되어 있음)
- o 칩소의 경우에는 칩소 특이 반수체형으로 GGAA와 TGAA, GGGA가 나타났으며, 황우에서 고정된 TGGA도 나타남으로써 칩소의 경우 여러개의 반수체 구조가 조합되어 있음
- o 황우와 흑우의 경우 전신이 동일한 모색으로 강선발되어 왔기때문에 BTA18 반수체 구조가 거의 고정되어 있음. 따라서 황우와 흑우의 교배로 통해서 생산된 F1들의 모색형태를

조사하여 전신이 황우와 흑우, 뿐만아니라 다양한 칙소문양이 나타나는 것을 확인하였음



그림 제주흑우와 황우의 교배로 태어난 F1 자손의 모색양상과 ASIP 유전자형

- o 위의 결과는 전신이 한우와 흑우에 개체들이 보유하고 있는 유전자형에 조합에 따라서 칙소문양이 나타날 수 있다는 것을 확인하였으며 한우에서 고정되어 있는 TGGGA 반수체형은 다른 반수체과 이루는 조합에 따라 모색이 달라 질 수 있다는 근거가 되며, 추가적으로 ASIP 유전자형에 따라 칙소문양이나 짙은색 농도가 달라질 수 있었음
- o BTA18번 반수체 형태와 ASIP 유전자형외에 한우와 칙소, 흑우사이에서 다르게 나타난 CORIN 유전자형에 조합이 칙소 무늬 발현에 미치는 영향을 조사하였음.



50088\_이기호 TG GG AA AA II  
 AG\_50088\_이기호 A<sup>Br</sup>A<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



50238\_이기호 TT GG GG AG DD  
 AG\_50238\_이기호 A<sup>Br</sup>A<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



49900\_이기호 TT MS GG AA DD  
 AG\_49900\_이기호 A<sup>Br</sup>A<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



49573\_이기호 TT AG GG AG ID  
 GG\_49573\_이기호 A<sup>Br</sup>A<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



49532\_이기호 TT GG AG AA ID  
 AG\_49532\_이기호 AA<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



49160\_이기호 TT GG GG AA DD  
 AG\_49160\_이기호 AA<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e



50828\_이기호 TG GG AG AA II  
 AG\_50828\_이기호 AA<sup>Br</sup> E<sup>+</sup>/e

■ 연구결과(1,2,3차년도)

- 품종판별유전자 마커의 개발

- o 전신이 한우와 흑우의 경우에 적용하는 유전자형이 최소의 경우에는 교잡된 형태로 나타나며 최소의 다양한 발현정도에 영향을 미치는 것을 확인하였기에 최소는 한우와 흑우의 교잡으로 생겨나는 것이라는 것을 밝혀냄. 또한 최소발현 정도에 영향을 주는 유전자들의 조합형태를 추정할 수 있었음



GG\_50471\_김진수\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e  
50471\_김진수\_TG GG AG AG ID



GG\_2905\_박상옥\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e  
2905\_박상옥\_TG GG AG AG ID



59591\_최재남\_TT GG AG AA ID  
GG\_59591\_최재남\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e



GG\_00934\_박상옥\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e  
00934\_박상옥\_TG GG AG AA ID



GG\_59702\_최재남\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e  
59702\_최재남\_TT GG GG AA ID



GG\_55846\_남상대\_AA<sup>Br</sup>\_E<sup>+</sup>/e  
55846\_남상대\_TT AG GG AG ID

- o 최소, 황우나 흑우의 분석결과를 그림으로 나타내면 다음과 같이 쉽게 식별할 수 있는 유전자형을 발굴할 수 있었음

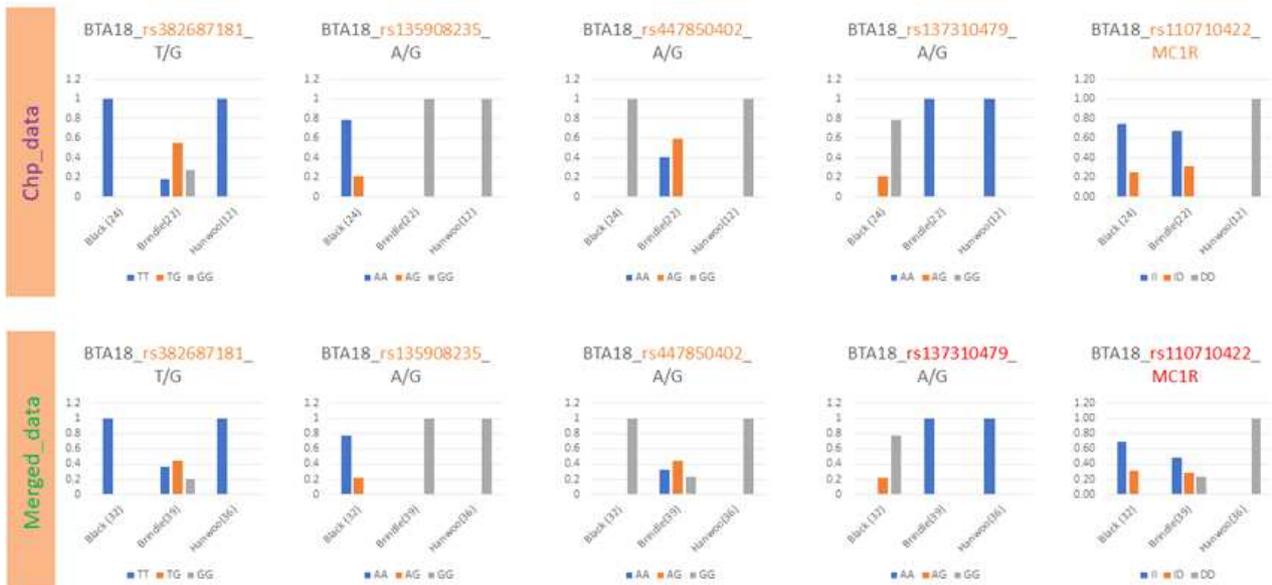
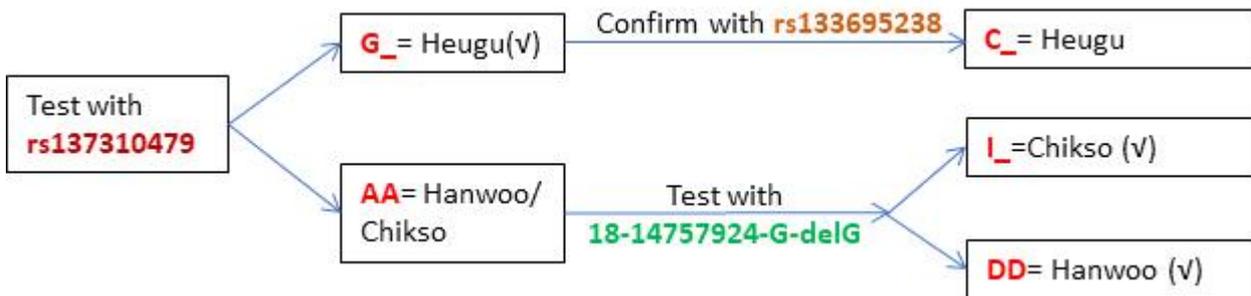
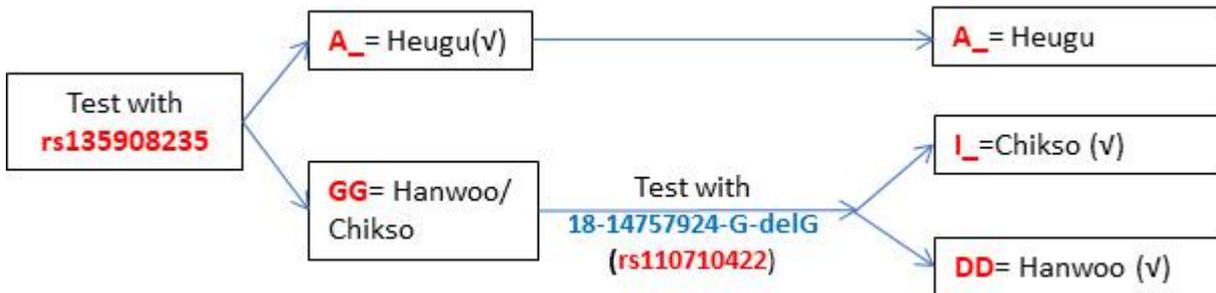
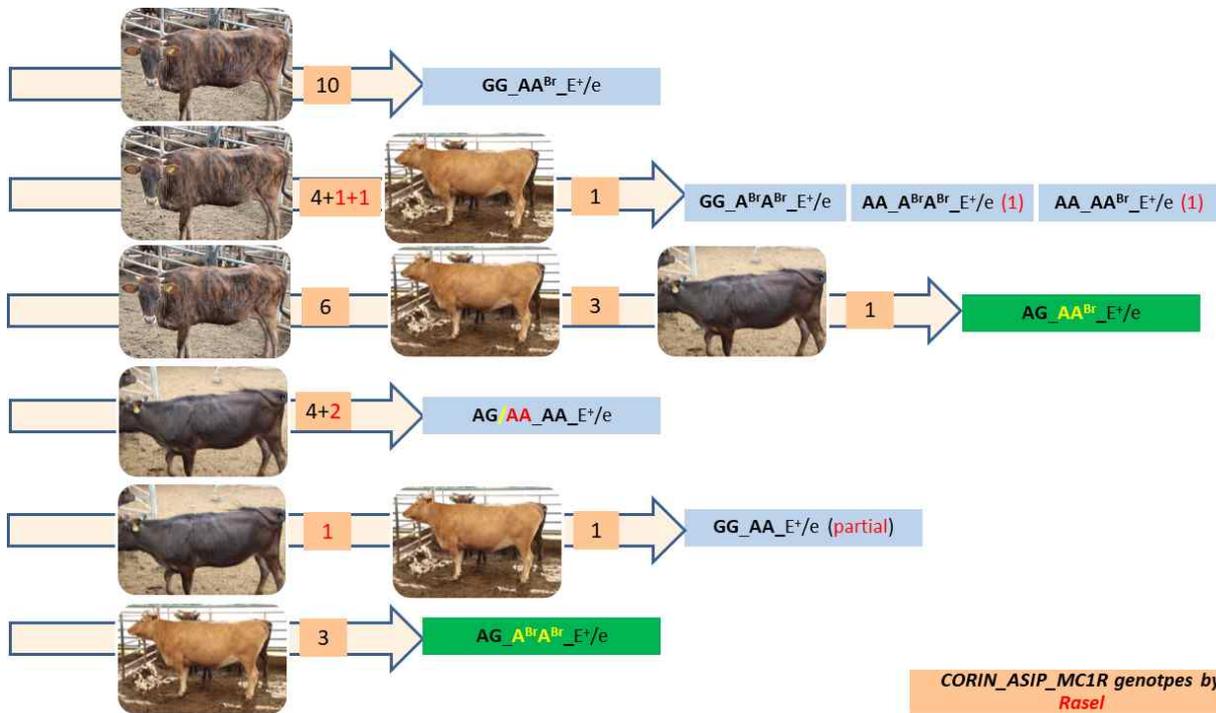


그림) 최소, 흑우, 황우에 대한 유전자형 빈도와 상대적인 분포도

o 황우와 흑우, 그리고 최소 문양 소의 구분을 위한 알고리즘은 다음과 같음



o 한우와 최소 흑우의 육량과 마블링을 구분할 수 있는 특징이 연구되어 있지 않음에 따라서 대량의 유전자형에서 세밀하게 구분될 수 있는 품종간 구분을 향후 원인유전인자가 명확하지 않았기에, 최소 모색결정에 대한 유전요인을 활용하여 별도의 프로그램을 활용하지 않고 간편한 유전자형만으로 최소 무늬를 판정할 수 있도록 고안하였음



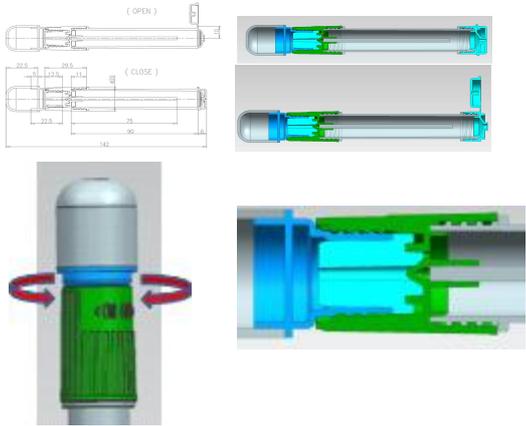
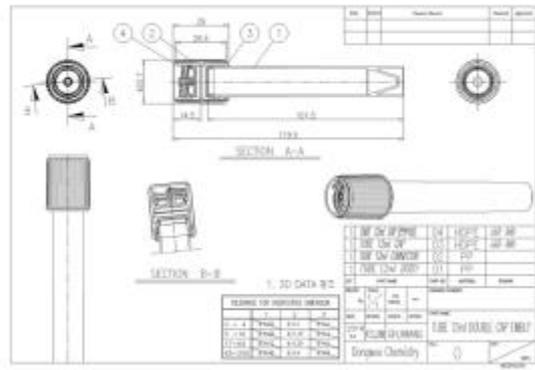
- 참여기관 2 (노블바이오) :

■ 연구개발성과

<1차년도>

- 쇠고기 품종 판별기기에 적용되기 위한 보관용기의 개발
  - o 쇠고기의 lysis를 용이하게 하기 위한 연질의 용기 개발
  - o 조직을 파쇄시키기 위한 최적의 bead 선별
  - o 쇠고기 품종 판별기기에 적용하기 위해 보존용액 혹은 lysis buffer의 첨가량이 조절가능한 보관용기의 개발
  - o 새로이 개발된 보관용기를 적용하여 검체를 채취하여 성능평가 진행

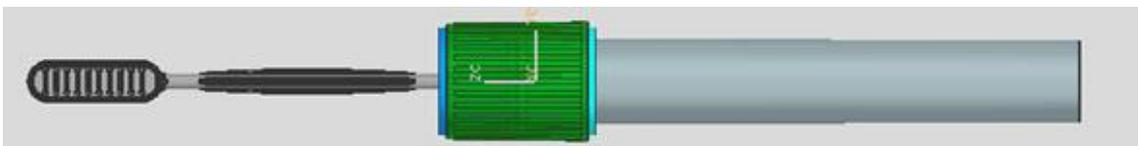
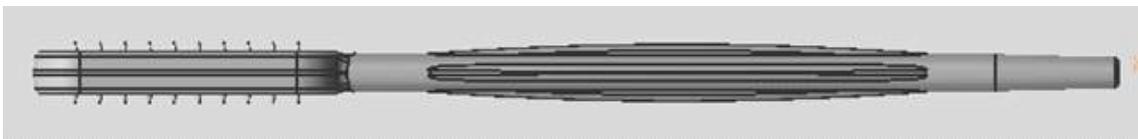
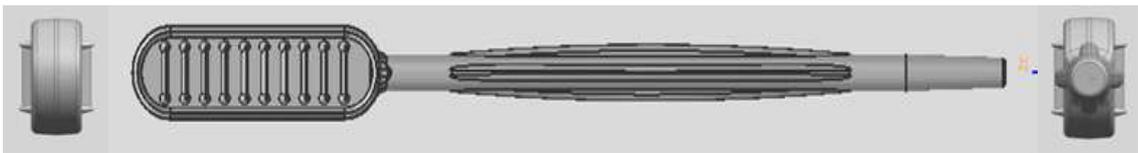
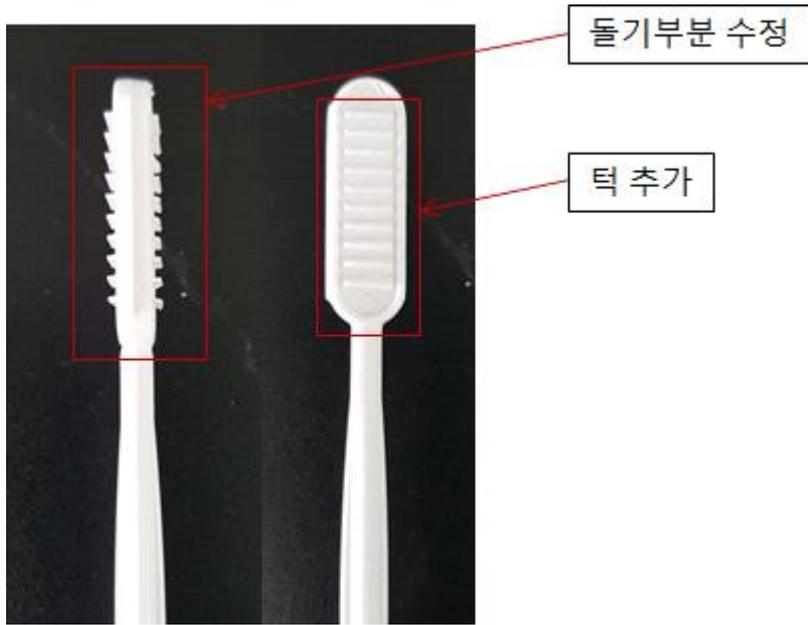
변경 사유 : 쇠고기 검체의 Lysis buffer 분리형 보관용기를 초기 단계에 개발하고자 하였으나 1년차 연구개발 성과로 인한 검체 채취용기에 돌기(빨래판 모형) 가 있는 Swab을 개발하여 사용이 편리하고 정량적인 검체채취 방법을 확립하게 되었으므로 변경하고자함.

변경 전	변경 후
<p>■ 쇠고기 품종 판별기기에 적용되기 위한 보관용기의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 쇠고기의 lysis를 용이하게 하기 위한 연질의 용기 개발</li> <li>○ 조직을 파쇄시키기 위한 최적의 bead 선별</li> <li>○ 쇠고기 품종 판별기기에 적용하기 위해 보존용액 혹은 lysis buffer의 첨가량이 조절가능한 보관용기의 개발</li> </ul>  <p>○ 새로이 개발된 보관용기를 적용하여 검체를 채취하여 성능평가 진행</p>	<p>■ 쇠고기 품종 판별기기에 적용되기 위한 보관용기의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1년차 연구 성과에 의한 검체 채취 용기의 사용 및 개선점 보완</li> <li>○ 쇠고기 검체를 용해시키기 위한 Lysis buffer 의 개발</li> <li>○ 조직을 파쇄시키기 위한 최적의 bead 선별</li> <li>○ 새로이 개발된 보관용기를 적용하여 검체를 채취하여 성능평가 진행</li> </ul>  <p>보관용기 도면</p>   <p>검체채취용 Swab의 도면</p>

<2차년도>

1. 1차년도 연구성과에 의한 검체 채취 용기의 사용 및 개선점 보완

- 쇠고기 검체 채취용 Scrape Swab의 개선 : Swab의 돌기 부분의 날을 수직형으로 개선 하였으며 바깥쪽에 턱을 추가하여 기존의 Scrape swab 보다 sampling이 용이하고 취급이 편함.(도면 삼입)



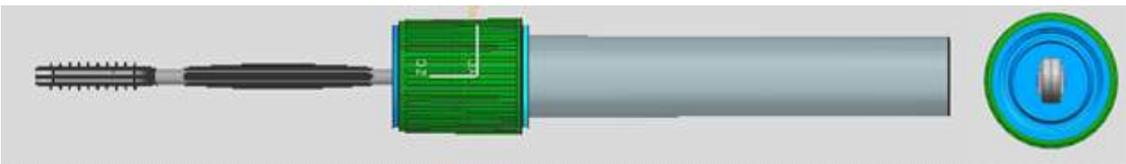
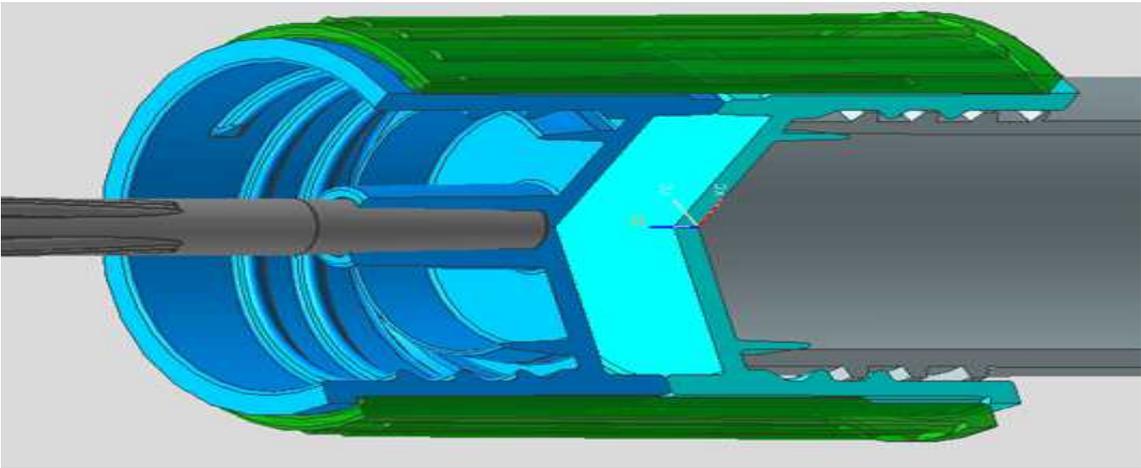
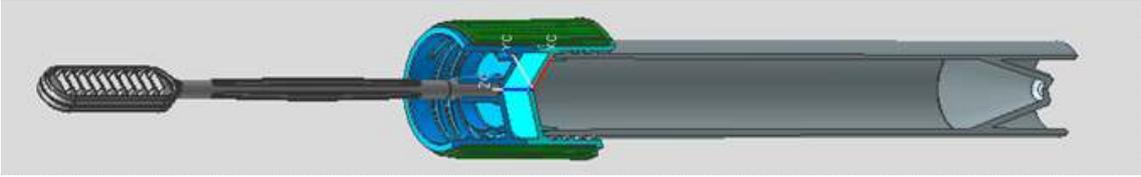
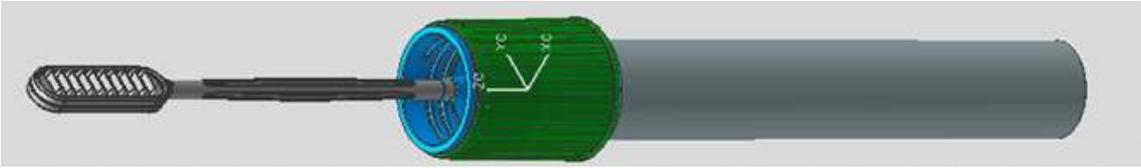
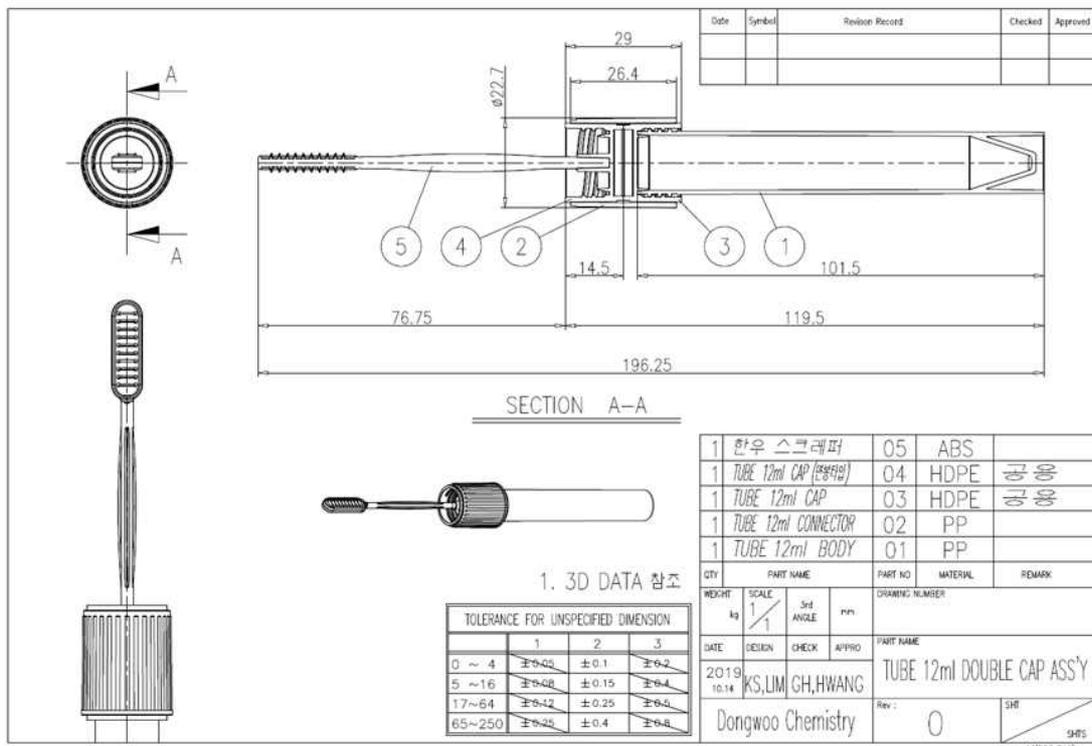




그림 129 검체 채취 용기의 사용 및 개선점 보완



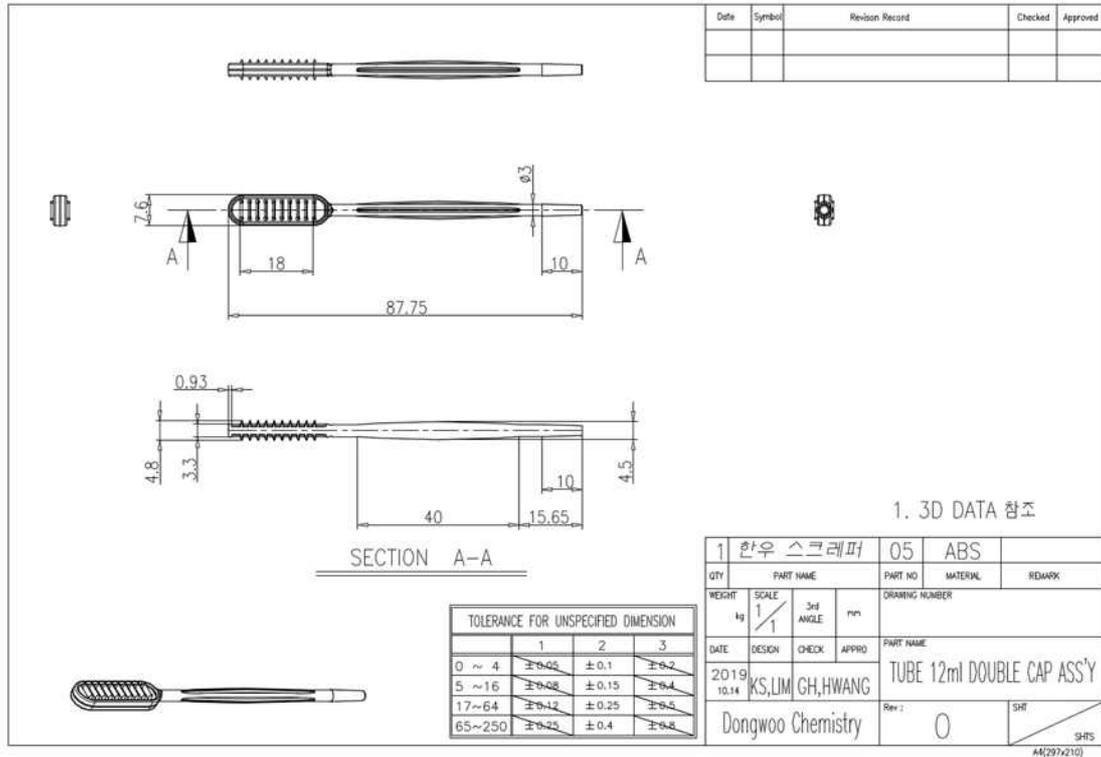


그림 130 검체 채취 용기의 사용 및 개선점 보완

## 2. 쇠고기 검체를 용해시키기 위한 Lysis Buffer의 개발

### - 최종 Lysis Buffer 조성

시약	Stock Conc.	Working Conc.	비고
EDTA	0.5M	0.02M	
Tris-HCl	1M	0.05M	
NaCl	-	1.1M	
CTAB	-	1%	
Tween-20	-	0.5%	
2-mercaptoethanol	-	0.2%	
pH 8.0			

### - 시험방법, Protocol

1. 한우 sample 준비
2. sampling한 검체를 12ml Tube에 넣고 60°C, 20 min Incubation 한다.
3. sample 과 Lysis buffer 가 혼합된 시료 중 500ul 를 e-tube 에 넣는다.
4. 12,000 rpm / 4°C / 5분의 조건으로 원심분리 한다.
5. 상층액 400ul 을 새로운 1.5ml tube 로 옮긴다.
6. 각각의 tube 에 isopropanol 을 300ul 넣고 30초간 vortexing 한다.
7. NB spin column 1개에 각각의 시료들을 700ul loading 한 후 12000rpm, 4°C, 1min

의 조건으로 원심분리 한다.

8. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.
9. Washing buffer 1 을 700ul 넣고 12000rpm, 4°C, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.
10. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.
11. Washing buffer 2 을 400ul 넣고 12000rpm, 4°C, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.
12. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.
13. 12000rpm, 4°C, 30sec 의 조건으로 원심분리 한다.
14. Collection tube 는 버리고 새로운 1.5ml tube 와 spin column 을 결합 후 Elution buffer (60°C 로 heating ) 30ul 를 loading 한다.
15. 실온에서 1분 동안 incubation 하고 12000rpm, 상온, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.

- Lysis Buffer를 이용한 쇠고기 검체의 gDNA 추출 성능 테스트

	1차 Prep					2차 Prep				
	DNA양	A260	A280	260/280	260/230	DNA양	A260	A280	260/280	260/230
NB Lysis Buffer	70.5	1.411	0.695	2.03	1.22	62.7	1.254	0.606	2.07	1.99
	74.9	1.497	0.75	2	0.96	53.4	1.068	0.535	2	1.95
	57.1	1.142	0.573	1.99	0.94	51.4	1.028	0.491	2.09	2.15
	47.1	1.143	0.588	1.94	0.85	28.1	0.562	0.276	2.03	1.7
	44.8	0.896	0.44	2.04	0.87	22	0.441	0.225	1.96	0.74
	87.7	1.755	0.865	2.03	1.03	25	0.5	0.229	2.19	1
	71	1.42	0.707	2.01	1.05	92.2	1.884	0.947	1.95	1.08
	53.3	1.066	0.523	2.04	0.99	41.3	0.826	0.417	1.98	1.04

\* Elution은 2번 진행하여 차이가 있는지 확인

- Proteinase K, RNase Test

	Proteinase K, RNase 처리				
	DNA양	A260	A280	260/280	260/230
NB Lysis Buffer	349.6	6.991	3.774	1.85	2.08
	453.4	9.068	4.892	1.85	2.12
	303.1	6.063	3.275	1.85	2.06

\* Proteinase K, RNase 처리시 DNA의 양과 Purity가 증가함을 확인(선택적 사용 가능)

○ 시험 결과

개선된 Scrape Swab을 이용하여 일정량의 쇠고기 검체를 채취할 수 있었으며 PCR을 수행할 수 있는 충분한 gDNA양을 확보 할 수 있었음.

3. 조직을 파쇄시키기 위한 최적의 Bead 선별

- Bead의 종류

Bead material	Diameter	Suggested Use
Glass beads	0.1 mm	Gram-positive, Gram-negative bacteria, fungal tissue, spores, etc.
	0.5 mm	Yeast, fungi, Cyanobacteria, phytoplankton, nematode, spores, Micro-algae, etc.
	1.0 mm	Yeast, fungi, mold, spores, filamentous algae, etc.
Zirconium Beads	0.1 mm	Gram-positive, Gram-negative bacteria, fungal tissue, spores, etc.
	1.4 mm	Soft tissue : brain, liver kidney, lung, spleen, plant leaves, roots, fruits, mammalian cells, etc.
	2.0 mm	Soft & hard tissue
	2.8 mm	Hard tissue : ear, lung, heart, spleen, tail, artery, arabidopsis, leaves, etc.
	6.8 mm	Rice grains, pepper grains, etc.
	1.4 mm + 2.8 mm	Ear, heart, tail, artery, brain, liver kidney, lung, spleen, plant leaves, roots, tumor, adipose tissue, etc.
	2.8 mm + 5.0 mm	Hard sample : hair, whole piece of mouse lung, heart, bone, etc.
Metal(SUS) Beads	2.8 mm	Hard sample : rice, hair, seeds, corn, bone, spincor, skin, muscle, etc.
	4.8 mm	Very hard sample



- Bead Test

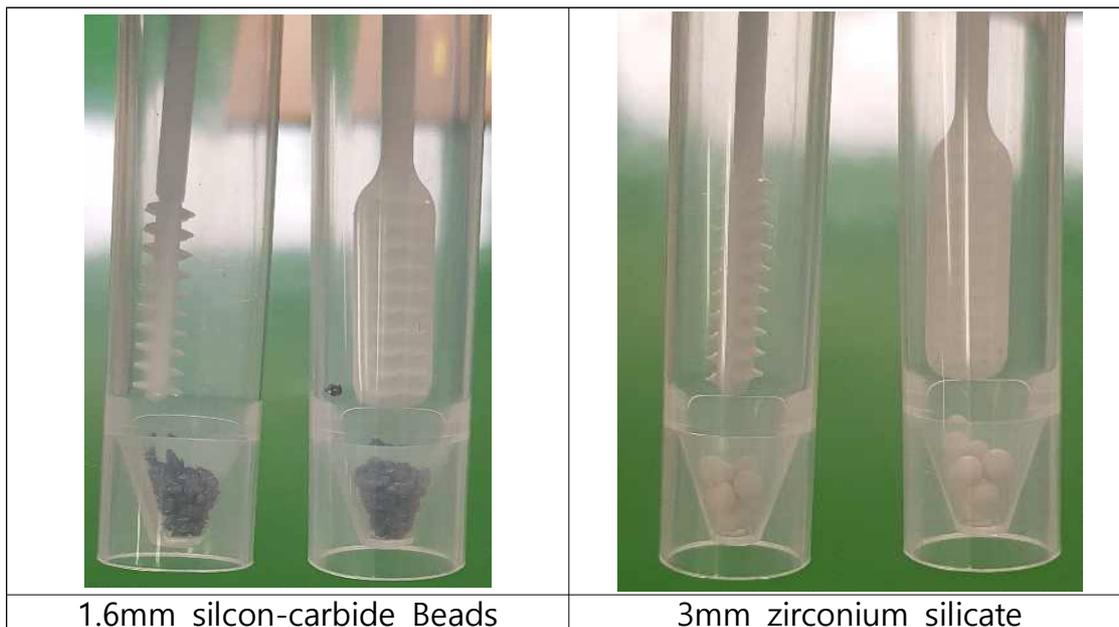


그림 131 조직 파쇄를 위한 Bead 테스트

- 조직을 파쇄하기 위해 Bead를 넣고 실험

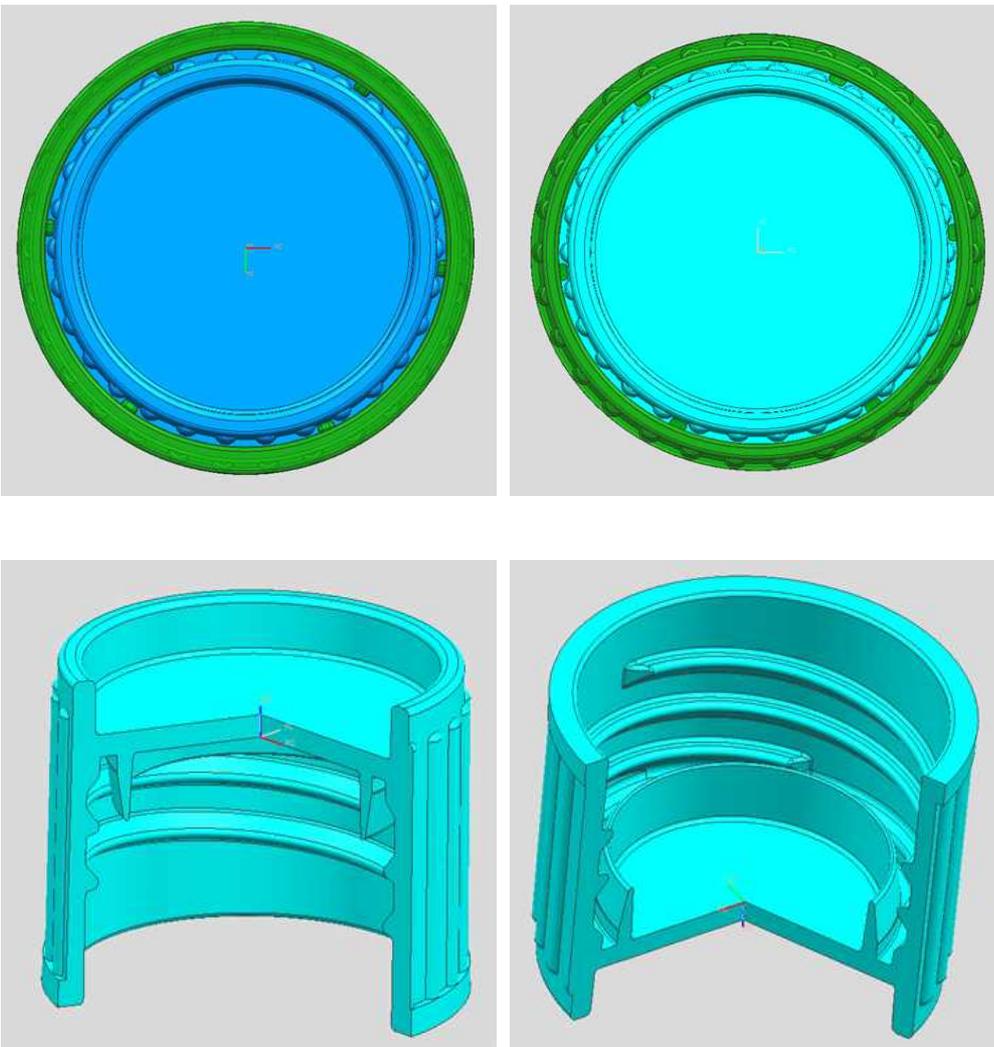
	Proteinase K, RNase 처리				
	DNA양	A260	A280	260/280	260/230
Control	57.7	1.155	0.576	2.00	0.88
	57	1.14	0.569	2	0.94
	60.1	1.202	0.639	1.88	0.83
Silcon-carbide bead	84.2	1.684	0.92	1.83	1.03
	94.3	1.887	0.948	1.99	1.19
	76.7	1.534	0.744	2.06	1.44
zirconium silicate	138.5	2.771	1.345	2.06	1.47
	68.8	1.375	0.719	1.91	1.15
	67.8	1.357	0.705	1.92	1.08

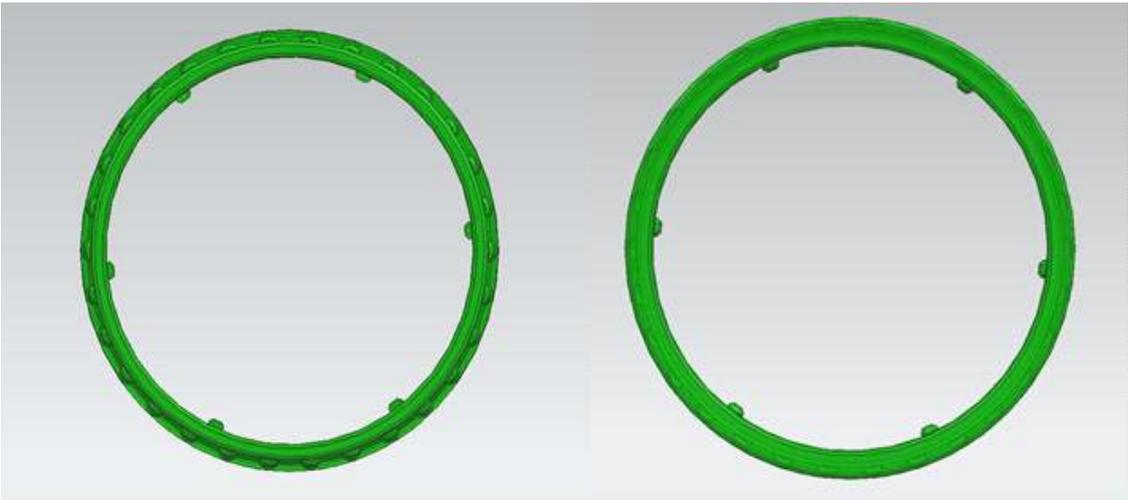
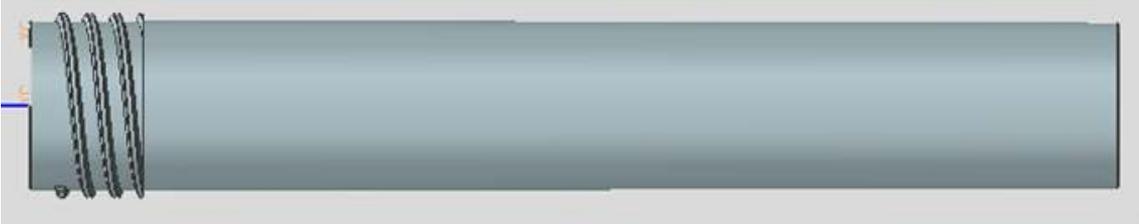
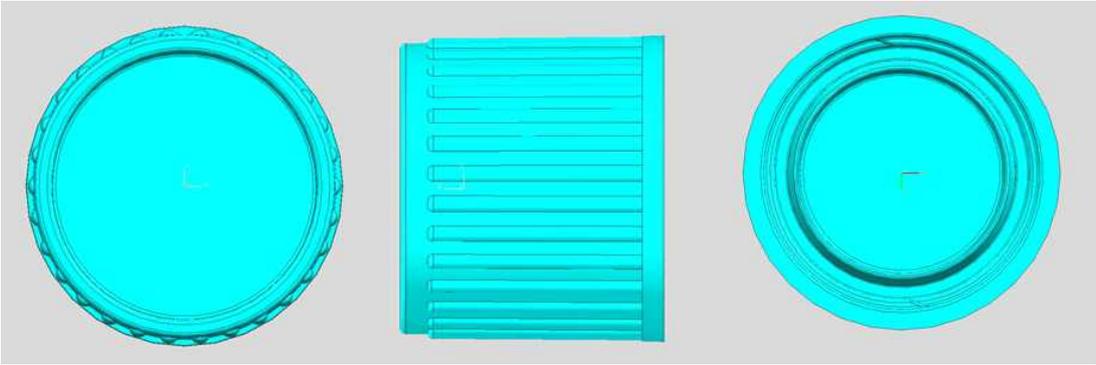
\* Bead를 넣고 Test 해 본 결과 DNA양은 약간 증가함.

\* 쇠고기 검체 채취용 Scrape Swab을 사용하여 sampling 후 Vortex 하였을 때 Bead를 넣은 Tube에서 조직들이 더 잘 떨어져 나옴

4. 새로이 개발된 보관용기를 적용하여 검체를 채취하여 성능 평가 진행

- 보관 용기 3D 도면





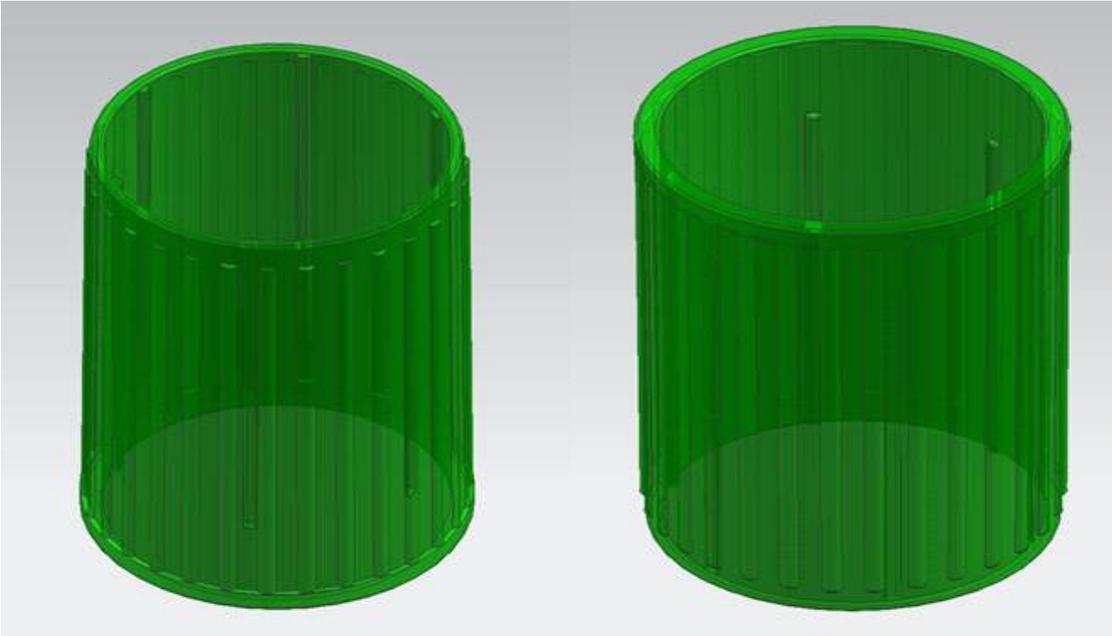


그림 132 보관 용기 3D 도면

<3차년도>

당해연도 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2020)	감마선 멸균 조건 확립	제품의 미생물 등에 의 한 오염을 제거하기 위 한 멸균 조건 확립	감마선을 이용한 시제 품 멸균처리	감마선을 이용하여 멸 균을 한 Swab에서는 미생물이 자라지 않았 음을 확인
	성능 시험을 통한 제품의 보완	Lysis buffer 성능개선	쇠고기 검체를 Lysis 시켜 적정 gDNA 추출 을 위한 최적의 Buffer 개발	쇠고기 검체의 Lysis에 적합한 Buffer의 개발 및 성능 시험 완료
		POCT용 DNA 추출 Kit 디자인	POCT용 DNA 추출 Kit 디자인	시간이 오래걸리는 기 존의 Column방식보다 더욱 신속하게 DNA를 추출할 수 있는 Kit 개 발
	제품화를 위 한 포장 방 법 및 디자 인 확립	포장 디자인 방법 확립	제품화를 위한 포장 방 법 및 Box 및 제품 디 자인	Scraper swab, Lysis buffer, 1ml syringe, Disk filter, Dilution buffer로 각 1ea씩 포장 으로 한 포장에 1ea의 샘플을 채취 할 수 있 는 개별 포장

1. 감마선 멸균 조건 확립

- 완제품에 대한 멸균 밸리데이션은 소야그린텍(경기도 화성시 향남읍 제약공단2길 34-26, EN ISO 11137, ISO 9001, ISO 13485)에서 수행하였고, 상호 계약에 의해 당사의 타 기타제품들과 함께 멸균 처리를 하고 있음. 감마선 조사의 강도 및 제반 조건은 ISO 표준에 의해서 수행되며 문서화 되고 있음.

# Certificate

## of gamma irradiation



Certificate No. : S 201103 4627  
 Customer : ㈜노블바이오  
 Irradiation Batch No. : 201102-40  
 Irradiation Container : 37 - -  
 Dosimetry Results : 10.51 - - kGy  
 Irradiated Date (Time) : 3-Nov-20 ( 8:20 AM )  
 Total exposure Time : 6:14 (h:min)

Item Specification	QTY(Box)	Lot No.	Specified Dose(kGy)	
			Dmin	Dmax
연구소	1	연구소201102	10	15
Total	1			

**\* Affirmation**

Date : 3-Nov-20

Approved : Wan Sik, Kim

(Q.M.R / Director)

*We hereby certify that the above specified goods have been duly irradiated by gamma-ray.*  
 (상기에 명시된 제품은 정히 조사되었음을 확인합니다.)



EN / ISO 13485  
 EN / ISO 11137-1  
 Certified



Registered :  
 Contract sterilizer



厚生労働省  
 Ministry of Health, Labour and Welfare



Technology for better life!

**SOYAGREENTEC**

Address : 34-26, Jeyakgongdan 2-gil, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 18622, Korea

TEL : +82-31-353-6999  
 FAX : +82-31-353-6979

(Form : PQ-101-10)

(Rev : 19.05.01.)

완제품 감마선 멸균 후 LB Broth Agar에 Streaking, spreading 하여 37°C Incubator에서 3일간 배양하여 멸균 유무 확인

	Scraper swab	Lysis buffer	Dilution buffer	
1				오염없음
2				오염없음
3				오염없음

2. 성능시험을 통한 제품의 보완

\* Lysis Buffer 성능개선

- 현장에서 짧은 시간내에 DNA를 추출할 수 있는 Lysis buffer로 개선

시약	Stock Conc.	Working Conc.	비고
EDTA	0.5M	0.02M	
Tris-HCl	1M	0.05M	
NaCl	-	1.1M	
CTAB	-	1%	
Tween-20	-	0.5%	
2-mercaptoethanol	-	0.2%	
pH 8.0			



시약	Stock Conc.	Working Conc.	비고
EDTA	0.5M	0.02M	
Tris-HCl	1M	0.1M	
Guanidine HCl	-	1.0 M	
NaCl	-	1.4M	
CTAB	-	2%	
Triton X-100	-	0.5%	
pH 8.0			

\* POCT용 DNA 추출 Kit 디자인

- 시간이 오래 걸리는 기존의 Column 추출 방식보다 더욱 신속하게 DNA를 추출할 수 있는 Kit의 추가 개발

## 기존 Protocol

 <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">Sample + Lysis buffer</p> <p style="margin-left: 20px;">Vortex(1 min) Incubation(60 °C, 20 min)</p> <p style="margin-left: 20px;">혼합된 시료 500ul를 새로운 1.5ml tube 옮김</p> <p style="margin-left: 20px;">Cf(12,000 rpm, 5 min)</p> <p style="margin-left: 20px;">상층액 400ul를 새로운 micro tube에 옮기기</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">+ Isopropanol 300ul Vortex 30 sec</p> <p style="margin-left: 20px;">Spin column을 2ml collection tube에 장착</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">+ 용액 모두 첨가(700 ul)</p> <p style="margin-left: 20px;">cgl 12,000 rpm, 1 min) 내려간 Solution 제거 Spin column 다시 장착</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">+ Washing buffer I 700 ul</p> <p style="margin-left: 20px;">Cf(12,000 rpm, 1 min) 내려간 Solution 제거</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">+Washing buffer II 400 ul</p> <p style="margin-left: 20px;">Cf(12,000 rpm, 1 min) 내려간 Solution 제거</p> <p style="margin-left: 20px;">Cf(12,000 rpm, 30 sec 공회전)</p> <p style="margin-left: 20px;">Spin column을 새로운 1.5 ml micro tube에 장착</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">+ Elution buffer 30 ul Incubation(상온, 1 min)</p> <p style="margin-left: 20px;">Cf(12,000 rpm, 1 min)</p> <p style="color: red; font-weight: bold; margin-left: 20px;">DNA Elution</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 한우 sample 준비</li> <li>2. sampling한 검체를 12ml Tube에 넣고 60°C, 20 min Incubation 한다.</li> <li>3. sample 과 Lysis buffer 가 혼합된 시료 중 500ul 를 e-tube 에 넣는다.</li> <li>4. 12,000 rpm / 4°C / 5분의 조건으로 원심분리 한다.</li> <li>5. 상층액 400ul 을 새로운 1.5ml tube 로 옮긴다.</li> <li>6. 각각의 tube 에 isopropanol 을 300ul 넣고 30초간 vortexing 한다.</li> <li>7. NB spin column 1개에 각각의 시료들을 700ul loading 한 후 12000rpm, 4°C, 1min의 조건으로 원심분리 한다.</li> <li>8. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.</li> <li>9. Washing buffer 1 을 700ul 넣고 12000rpm, 4°C, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.</li> <li>10. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.</li> <li>11. Washing buffer 2 을 400ul 넣고 12000rpm, 4°C, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.</li> <li>12. Collection tube 안에 있는 용액을 버리고 spin column 과 재결합한다.</li> <li>13. 12000rpm, 4°C, 30sec 의 조건으로 원심분리 한다.</li> <li>14. Collection tube 는 버리고 새로운 1.5ml tube 와 spin column 을 결합 후 Elution buffer (60°C 로 heating ) 30ul 를 loading 한다.</li> <li>15. 실온에서 1분 동안 incubation 하고 12000rpm, 상온, 1min 의 조건으로 원심분리 한다.</li> </ol>
--	---

\* 상기방식은 Noblebio Prep kit protocol 이며, QIAGEN Prep kit, Solgent Prep kit의 Protocol과 크게 차이가 나지 않음

POCT 쇠고기 검체 채취 및 DNA 추출 Protocol

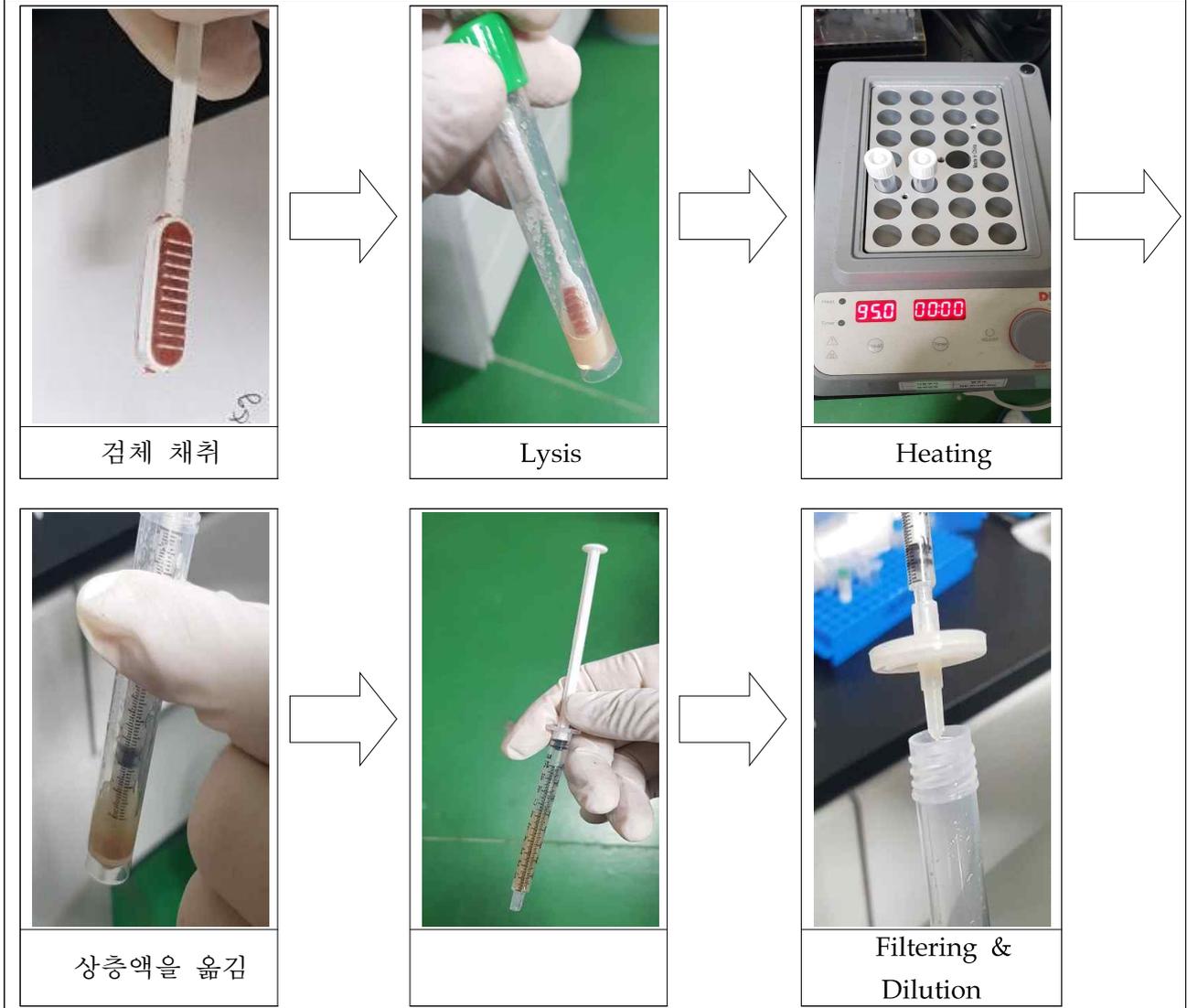


그림 133 POCT 쇠고기 검체 채취 및 DNA 추출 Protocol

1. 손을 깨끗이 씻은 후 Latex 멸균 장갑을 착용 한다.
2. 멸균된 Scraper swab을 이용하여 쇠고기 검체에서 sample을 채취한다
3. Sample 약 0.1g을 Lysis buffer 1ml이 들어있는 5 ml tube에 넣어준다.
4. 30초 동안 Vortex 후, Heating block 95℃에서 10분간 방치한다.
5. 5 ml tube내의 모든 용액을 1 ml 주사기로 옮겨준다.
6. 1 ml 주사기에 Disk filter를 장착 한 후 2~3방울 버려준다.
7. 나머지 용액들을 1.5 ml tube에 옮긴 후 Dilution buffer에 1방울 떨어뜨린 후 사용한다.

\* Nanodrop으로 DNA 농도/ 순도 측정

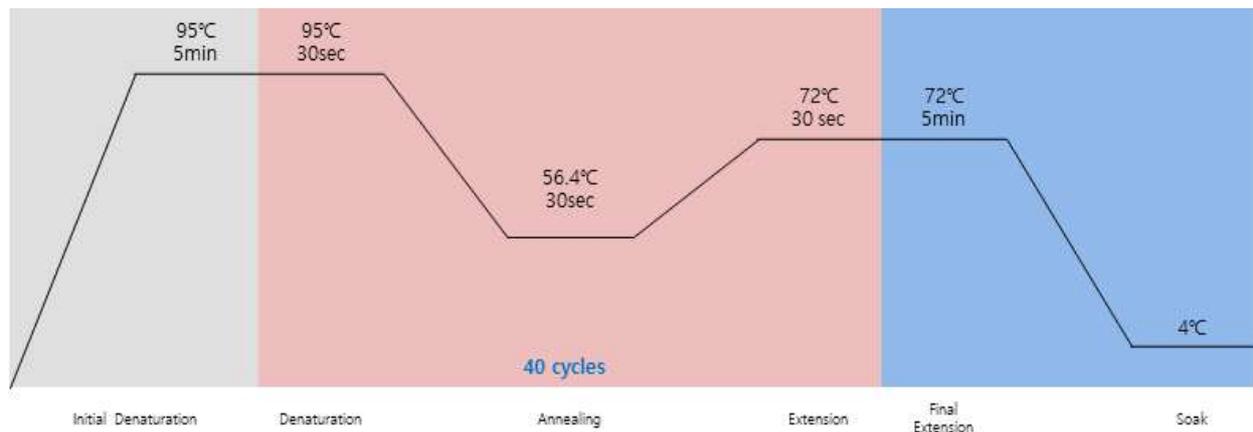
Sample	Nucleic acid (ng/ $\mu$ l)	260	280	260/280	260/230	
1	309	6.179	4.226	1.46	0.3	
2	340.4	6.808	3.843	1.77	0.37	
3	407.5	8.15	5.004	1.63	0.43	
4	432.5	8.65	3.786	2.28	0.48	
5	464	9.281	4.055	2.29	0.51	
6	346.7	6.935	2.91	2.38	0.43	
7	175.8	3.517	1.641	2.14	0.42	
8	194.1	3.883	1.728	2.25	0.45	
9	173.8	3.476	1.559	2.23	0.43	
10	189.3	3.786	2.22	1.71	0.33	

\* PCR

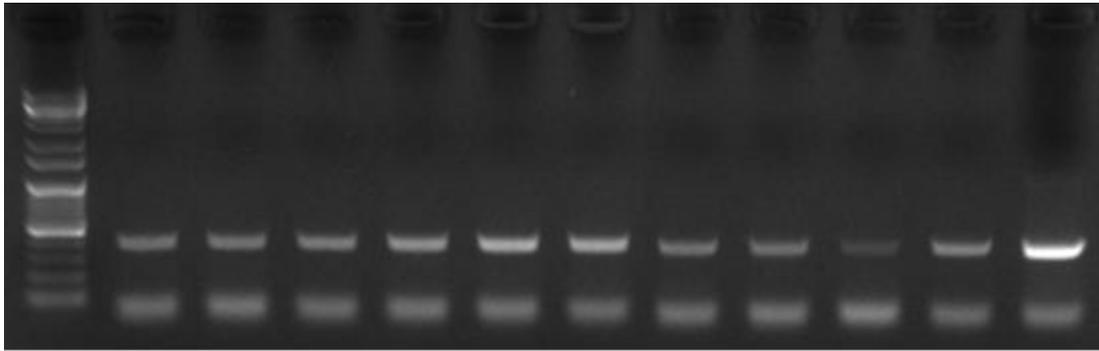
- Mixture

PCR Master mix	10 ul	
gDNA	2.5 ul	
Primer F	1 ul	rs207860446_F
Primer R	1ul	rs207860446_R
D.W	5.5 ul	
Total	20ul	

- Condition



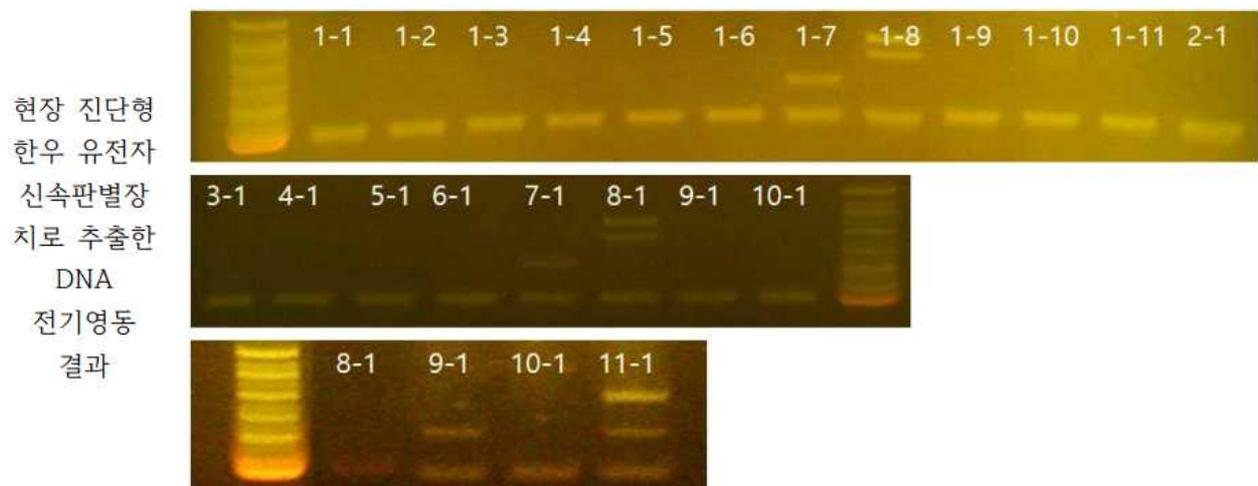
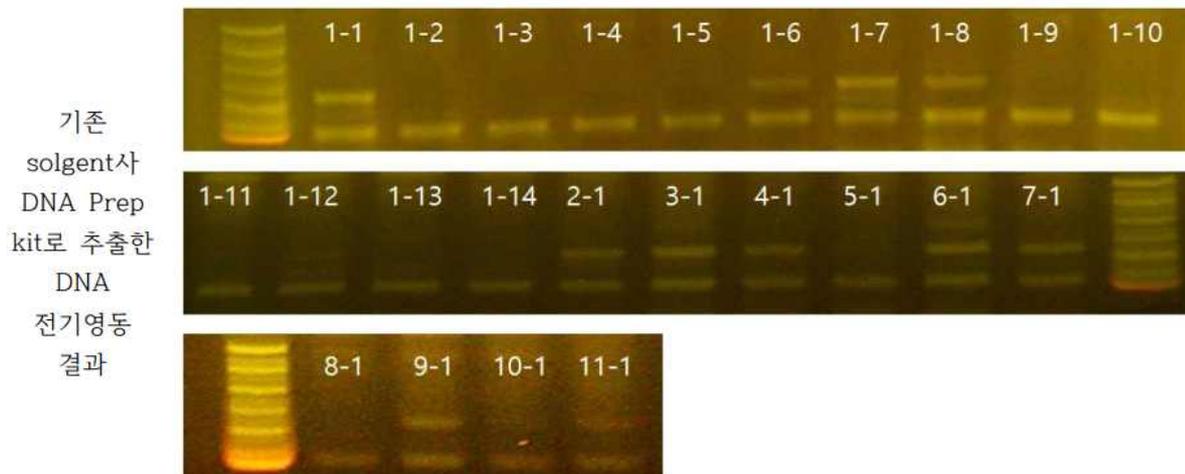
- Result



PCR 결과 기존 column 방식보다는 DNA의 농도와 순도가 조금 낮게 나타났지만 PCR 결과는 결과를 판독하기에는 무리가 없었음.

\*유전자 정보원 PCR 검증 결과

PCR 이용하여 증폭산물 전기영동으로 한우/비한우 판정 결과



#### IV. 성능평가 결과요약

Sample name	측정결과						성능평가 결과
	Nucleic acid (ng/μl)		260/280		한우/비한우 판정 결과		기존 vs 개발
	기존	개발	기존	개발	기존	개발	
1-1	81.23	598.08	1.86	2.34	한우	한우	일치
1-2	72.08	601.23	1.85	2.29	한우	한우	일치
1-3	65.46	640.99	1.86	2.34	한우	한우	일치
1-4	82.06	744.08	1.81	2.37	한우	한우	일치
1-5	65.22	693.15	1.87	2.36	한우	한우	일치
1-6	69.86	660.37	1.86	2.30	한우	한우	일치
1-7	75.79	704.52	1.86	2.33	한우	한우	일치
1-8	64.76	732.34	1.87	2.36	한우	한우	일치
1-9	50.97	726.99	1.88	2.37	한우	한우	일치
1-10	53.22	677.24	1.91	2.28	한우	한우	일치
1-11	88.02	724.1	1.87	2.42	한우	한우	일치
1-12	72.87	681.21	1.88	2.37	한우	한우	일치
1-13	58.47	725.03	1.84	2.37	한우	한우	일치
1-14	22.14	706.97	1.81	2.34	한우	한우	일치
2-1	46.19	592.25	1.76	2.13	한우	한우	일치
3-1	27.11	669.88	1.88	2.11	한우	한우	일치
4-1	33.63	604.63	1.84	2.26	한우	한우	일치
5-1	21.37	688.93	1.85	2.40	한우	한우	일치
6-1	49.64	562.83	1.88	2.34	한우	한우	일치
7-1	114.96	604.23	1.84	2.13	한우	한우	일치
8-1	43.39	538.87	1.88	2.31	한우	한우	일치
9-1	56.83	613.29	1.83	2.21	한우	한우	일치
10-1	42.77	631.26	1.93	2.34	한우	한우	일치
11-1	49.93	651.66	1.87	2.26	한우	한우	일치

## V. 성능평가 종합의견

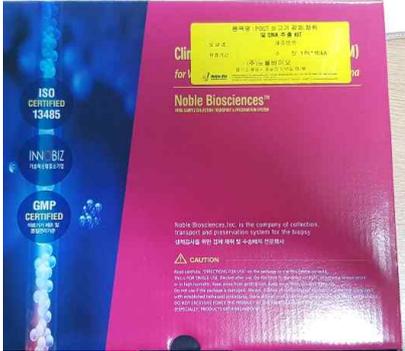
평가항목	종합 의견
검체 채취도구의 효율성	검체 채취 시 굽는 각도에 따라 정량적 채취가 가능한지 평가한 결과, 40도로 기울여 채취하였을 때 정량적 채취가 가능함
검체 보관용기의 밀폐성	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buffer가 들어있는 보관 용기를 vaccum dry oven에 넣어 감압한 후 용액의 leakage를 확인한 결과, leakage가 일어나지 않음을 확인함</li> <li>- Buffer가 들어있는 보관 용기를 Incubation(50°C)에 넣은 후 시간대별로 무게를 측정한 결과, 처음과 동일한 무게임을 확인함</li> </ul>
Lysis buffer의 DNA 추출 효율	전기영동으로 한우 판정 결과, 기존 Solgent사의 Solg™ Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)와 100% 동일하게 일치함
최종 판단	<p>(※)노블바이오에서 개발한 '현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템'에 대한 품질성능시험 평과 결과 검체 채취도구의 정량적 채취가 가능하며, 검체 보관용기의 밀폐성이 높고 Lysis buffer의 DNA 추출 효율도 기존방식 대비 100% 동일하므로 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치로서 적합하다고 판단됨.</p>

3. 제품화를 위한 포장 디자인 확립

품명	사진	비고
Scraper swab		
Lysis Buffer		5ml Tube/ 1ml lysis buffer
Dilution buffer		12ml tube/ 5ml dilution buffer
Syringe & Disk filter		1ml Syringe/ 0.45um disk filter

\* 포장 방법

- Scraper swab, Lysis buffer, 1ml syringe, Disk filter, Dilution buffer로 각 1ea씩 1pk 포장으로 알루미늄 파우치에 포장되어 있고, 1pk 당 1ea의 검체 채취 및 DNA를 추출할 수 있음
- 1 Box에는 10ea의 pk로 구성(추후 사용량에 따라 조절 가능)

품명	사진	비고
개별포장 (1pk)		Scraper swab : 1ea Lysis buffer : 1ea 1ml syringe : 1ea Disk filter : 1ea Dilution buffer : 1ea
Box 포장		수량 : 1pk /10ea

■ 연구결과(1,2,3차년도)

- 쇠고기 품종 판별기기에 적용되기 위한 보관용기의 개발
- 쇠고기의 검체 특성을 고려하여 현장에서 정량적 채취가 가능한 Scraper swab을 개발하였음. 실험결과를 토대로 특허를 출원(출원번호 : 10-2019-0134124)
- 감마선 멸균 조건 확립
- POCT용 Lysis buffer 및 쇠고기 유전자 신속판별장치 디자인
- 포장방법 확립 및 박스 디자인
- 한국유전자정보연구원에서 실험결과 검증(“현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템에 대한 성능평가 결과보고” 보고서 참조)
- 시제품 제작

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	32억원	
			향후 3년간 매출	100억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	50억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 5%	
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 10 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 2 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			5위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			3위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3		
	소요예산(백만원)		2000		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			32	100	200
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	5	10
		국외	5	10	15
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		유전자 진단키트 및 기기 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	10	50	
	수 출	32	50	100	

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

##### ○ 정량적 목표 항목

평가 항목 (주요성능)	단위	전체 항목 에서 차지 하는 비중 (%)	세계최고 수준 보유국/ 보유기업 ( / )	연구개발 전 국내수준	개발 목표치			달성결 과	달성 도(%)	평가 방법 <sup>5)</sup>
			성능수준	성능수준	1차 년도	2차 년도	3차 년도			
1. SNP 마커개발 관련	%	10	(미국/Neogen) 80	(국립 축산과학원) 40	20	30	40	100	100	유전자형 비교
2. 검체채취용도구의 효율	μg	10	(이탈리아/코판) 50	20	20	30	50	65.7	100	공인시험 성적서
3. 검체보관용기의 밀폐성	mmHg	10	(미국/코닝) 600	-	100	300	600	600	100	공인시험 성적서
4. 핵산 추출 효율	%	10	(미국/Qiagen) 90	(제놀루션) 70	50	70	90	100	100	공인시험 성적서
5. 핵산 증폭 시간	min	10	(미국/Cepheid) 90	(씨젠, LG화학) 300	120	80	60	74분 54초	80	공인시험 성적서
6. 민감도	%	20	(미국/Cepheid) 97	(씨젠, LG화학) 95	90	93	95	100	100	공인시험 성적서
7. 특이도	%	20	(미국/Cepheid) 99	(씨젠, LG화학) 95	90	93	95	100	100	공인시험 성적서
8. 앱관련 평가	건	20	-	(이원다이그노 믹스) 80	-	50	80	-	-	앱만족도

##### ○ 정량적 목표 항목의 평가방법

평가항목	평가방법
1. SNP 마커개발 관련	유전자형 조합에 따른 품종판정 정확도 비율평가
2. 검체채취용도구의 효율	국립농산물품질관리원 시험연구원의 검사법에 따라 DNA를 분리한 후 분광광도계로 농도를 측정
3. 보관용기의 밀폐성	보관용기에 용액을 주입한 후 vacuum chamber에 넣어 감압한 후 보관용기 내에 보관되어 있는 용액의 leakage를 시험
4. 핵산 추출 효율	상용화 된 DNA 추출 키트 대비 미세유체 칩을 이용하여 추출된 DNA 농도를 Nanodrop 장비를 이용하여 측정하여 추출 효율 평가
5. 핵산 증폭 시간	랩온어칩 기반 PCR 챔버에서 핵산이 증폭 되는 시간을 측정
6. 민감도	한우 쇠고기를 이용하여 검사하였을 때 품종판별이 되지 않을 비율 · 50개의 한우 쇠고기를 테스트 하였을 때 품종판별이 되는 비율을 측정
7. 특이도	한우가 아닌 쇠고기를 이용하여 검사하였을 때 품종판별이 되지 않을 비율 · 50개의 비한우 쇠고기를 테스트 하였을 때 품종판별이 되지 않는 비율을 측정
8. 앱관련 평가	앱사용자의 상대적인 만족도 조사 (설문)

### 3-2. 목표 달성여부

- 한우 종판별 기술 개발 관련 정량적 목표는 핵산 증폭시간만 제외하고 모두 100% 달성 하였음
- 정량적 성과는 공인시험을 통해 확인 하였으며, 아래에 공인시험성적서 첨부함.

현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및  
검정시스템에 대한 성능평가 결과보고

2020. 11. 30.

평가기관 : (주)한국유전자정보연구원

성능평가 결과보고서

과제번호	318015-03 (농축산물안전생산-유통관리기술개발사업)	
과제명	현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템 개발	
의뢰기관	기관명	소재지
	(주)노블바이오	경기도 화성시 정남면 신백길 13-50
평가기관	(주)한국유전자정보연구원	서울시 강서구 양천로 551-17 한화비즈메트로 1차 714호
평가기간	2020년 11월 1일 ~ 2020년 11월 30일	

노블바이오에서 개발한 "현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템"에 대해 제공된 시료와 키트의 매뉴얼에 따라 품질성능 평가한 결과는 다음과 같습니다.

2020년 11월 30일

평가기관 (주)한국유전자정보연구원  
평가자 이인영 (인영)  
평가책임자 홍승범 (승범)

(주)노블바이오 대표이사 귀하

- 2 -

목 차

I. 개 요	P4
II. 재료 및 방법	P4
1. 시료정보	P4
2. DNA 검사방법	P5
3. 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 구성 요소	P6
4. PCR 조성 및 조건	P6
5. 사용 장비 및 소프트웨어	P8
6. 시험 절차	P8
7. 평가내용 및 평가방법	P10
III. 성능평가 분석결과	P10
1. 검체 채취도구의 효율성	P10
2. 검체보관용기의 밀폐성	P13
3. Lysis buffer의 핵산 추출 효율	P16
IV. 성능평가 결과요약	P21
V. 성능평가 종합의견	P22

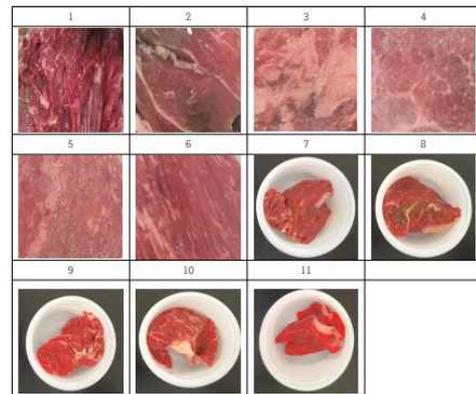
I. 개 요

(주)노블바이오에서 개발한 "현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템"에 대하여 상용화된 DNA 추출 키트와 개발한 검체 채취 도구의 효율 및 DNA 추출 효율에 대한 비교평가로 총 24개 시료를 대상으로 제공된 키트의 매뉴얼과 평가방법에 따라 성능을 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 시료 : 총 24개 샘플 (1번 샘플 14개 채취, 2-11번 1개씩 채취)

□ 시료 사진



- 4 -

2. DNA 검사방법 : PCR 기술 이용

□ 기존 vs 개발 방법 비교 내용

Protocol	기존 방법	개발 방법
<b>Sample</b>	1. Sample 10 ~ 100 μl (1.5 ml micro tube) 500 ~ 1000 μl (500 μl PCR tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 3. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)
<b>Extraction</b>	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)
<b>Extraction</b>	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)
<b>DNA Purification</b>	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)	1. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube) 2. 1000 μl (1.5 ml micro tube) 1000 μl (1.5 ml micro tube)

기존 DNA 검사 방법



개발한 현장 진단형 DNA 검사 방법

□ PCR 분석방법

- 추출된 DNA를 PCR 조성 및 조건에 맞추어 증폭시킨 후 전기영동으로 확인
- 소의 대립유전자 내 단일염기다형성(SNP)을 분석하여 한우와 비한우를 구분하여 판별한다.

3. 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 구성 요소



1. Scraper Swab
2. 1ml Lysis buffer(5ml Tube)
3. Disk filter(0.45um)
4. 1ml syringe
5. 5ml Dilution buffer(12ml tube)

WB-불바이오의 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 제품 구성	Solgent사의 Solg™ Genomic DNA Prep kit (SGD-45-C100)	Solgent사의 한우/비한우 판별 kit
-------------------------------------	--	-------------------------

4. PCR 조성 및 조건

□ 기존 PCR 조성

Reaction mixture	
2X Multiplex PCR smart mix	12.5 μl
Genomic DNA	1 μl
D.W	11.5 μl
Total vol.	25.0 μl

□ 기존 PCR 조건

PCR condition		
온도	시간	Cycle 수
95 °C	15 min	× 1
95 °C	20 sec	
64 °C	30 sec	× 30
72 °C	50 sec	
72 °C	3 min	× 1
10 °C	∞	

□ 개발한 현장 진단형 DNA 검사 PCR 조성

Reaction mixture	
2X Multiplex PCR smart mix	10 μl
Genomic DNA	2.5 μl
Primer F	1 μl
Primer R	1 μl
D.W	5.5 μl
Total vol.	20.0 μl

□ 개발한 현장 진단형 DNA 검사 PCR 조건

PCR condition		
온도	시간	Cycle 수
50 °C	2 min	× 1
95 °C	5 min	× 1
95 °C	30 sec	
56.4 °C	30 sec	× 40
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	× 1
10 °C	∞	

5. 사용 장비 및 소프트웨어



6. 시험결과

□ 개발된 검체 채취용 Swab을 이용한 쇠고기 검체 채취 방법

- 1) 손을 깨끗이 씻은 후 멸균된 powder free 고무장갑을 착용한다.
- 2) 쇠고기 조직 검체를 채취하기 위해 절단된 쇠고기를 오염되지 않은 깨끗한 투명 봉투에 넣어 둔다.
- 3) 감마(Gamma-ray) 멸균된 쇠고기 채취용 Scraper Swab을 이용하여 검체를 채취한다.
  - 3-1) Swab을 약 40도 정도 기울여 2회 굵어서 sampling 했을 때 몇 gram의 Sample이 채취되는 지 확인(10회 반복)
  - 3-2) Swab을 약 40도 정도 기울여 4회 굵어서 sampling 했을 때 몇 gram의 Sample이 채취되는 지 확인(10회 반복)
  - 3-3) Swab을 약 15도 정도 기울여 2회 굵어서 sampling 했을 때 몇 gram의 Sample이 채취되는 지 확인(10회 반복)
  - 3-4) Swab을 약 15도 정도 기울여 4회 굵어서 sampling 했을 때 몇 gram의 Sample이 채취되는 지 확인(10회 반복)
- 4) 검체 보관용 튜브의 Label에 날짜, 장소, 이름 등 필요한 정보를 상세히 기록한다.
- 5) 다른 쇠고기 검체를 채취할 때는 교차 오염을 방지하기 위해 고무장갑 등 모든 도구를 새것으로 교체하여 사용하도록 한다.

□ 보관용기의 밀폐성 시험 방법

- 보관용기에 용액을 주입한 후 Vacuum dry oven(Model:VO-64,Hysiclen)에 넣어 감압한 후 보관용기 내에 보관되어 있는 용액의 누출을 시험
- 1) 플라스티크 바구니에 키친타올을 깔아준다.
  - 2) 분주기 완료된 tube를 키친타올 위에 올려준다.

- 3) 플라스틱 바구니를 tube의 뚜껑 부분이 아래로 가게 15-20도 정도로 눕혀서 Vacuum dry oven에 넣어준다.
- 4) 밸브를 잠그고 압력 -0.08mpa으로 감압하여 1분동안 방치한다.
- 5) 플라스틱 바구니를 빼서 플라스틱 바구니에 키친타올의 젖은 유무로 밀폐성을 확인한다.
- 6) 이상이 없다면 튜브의 반대방향으로 돌려서 1회 더 실행한다.

□ 기존 상용화 된 DNA 추출 키트 방법

- 채취된 검체를 Solgent사의 Sole™ Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)을 이용하여 DNA 추출
- 1) Sample 0.1g을 1.5ml tube에 넣고 GD1 용액 200μ를 넣고 10초간 Vortex 해준 후 56°C에서 10min Incubation 해준다.
  - 2) GD2 용액 200μ를 첨가한 후 10초간 Vortex 후 70°C에서 10min 동안 Incubation 한다.
  - 3) 상층액 300μ를 새로운 1.5ml tube에 옮긴 후, GB 용액 200μ를 첨가한 후 10-20회 Inverting 한다.
  - 4) Spin column을 2ml Collection tube에 장착 한 후 step3의 용액 모두를 Spin column에 넣어 준다.
  - 5) 7,000rpm, 1min 동안 원심분의 한 후 내려간 용액은 모두 버리고 spin column은 다시 장착한다.
  - 6) Spin column에 WB 용액(80% Ethanol 첨가) 500μ를 넣고 13,000rpm 30sec 동안 원심분리 한 후 내려간 용액은 모두 버리고 Spin column은 다시 장착한다.
  - 7) 6번 과정을 한번 더 반복
  - 8) 남아있는 WB 용액을 완전히 제거하기 위해 Spin column에 아무것도 넣지 않고 13,000rpm 3min 동안 원심분리한다.
  - 9) Spin column을 새로운 1.5ml tube에 장착한다.
  - 10) DNA hydration solution 100μ를 첨가한 후 실온에서 1분간 방치 후 13,000rpm 3min 동안 원심분리한다.
  - 11) 추출된 용액을 NanoDrop One(Thermo Scientific™, ND-SNE-W4)을 이용하여 농도 및 순도를 측정한다.

□ 개발한 미세로직을 이용하여 DNA 추출 방법

- 1) Sample 0.1g을 Lysis buffer 1ml이 들어있는 5ml tube에 넣어준다.
- 2) 30초 동안 Vortex 후, Heating block 95°C에서 10분간 방치한다.
- 3) 5ml tube내의 모든 용액을 1ml 주사기로 옮겨준다.
- 4) 1ml 주사기에 Disk filter를 장착 한 후 2-3방울 버려준다.
- 5) 나머지 용액을 1.5ml tube에 옮긴 후 Nanodrop을 이용하여 농도 및 순도를 측정한다. (PCR 시, Dilution buffer에 1방울 떨어뜨린 후 사용)

7. 평가 내용 및 평가방법

평가 내용	시료수(개)	평가 방법
검체 채취도구의 효율성	10개	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Scraper Swab을 이용하여 최고 검체를 긁어서 sampling 하였을 때 정량적 채취가 가능하지 시험</li> <li>- 10개의 Swab을 사용하여 평균값 및 오차값을 확인</li> <li>- 채취된 검체를 유산출물질관리원 검사법에 따라 DNA 추출 후 농도 및 순도 측정</li> </ul>
검체 보관용기의 밀폐성	40개	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Tube에 Buffer를 분주한 후 뚜껑을 닫고 Vacuum dry oven(-0.08Mpa/5분)에 뒤집어서 넣은 후 Buffer가 새는지 확인</li> <li>● Tube에 Buffer를 분주한 후 뚜껑을 닫고 Incubator(50°C)에서 시간대별로 무게를 측정하여 Buffer의 증발량을 확인</li> </ul>
Lysis buffer의 핵산 추출 효율	24개	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Solgent 시의 Solgent™ Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)과 함께 DNA 추출 후 Nanodrop을 이용하여 DNA의 농도 및 순도 측정하여 효율 확인</li> </ul>

III. 성능평가 분석결과

1. 검체 채취도구의 효율성 평가결과

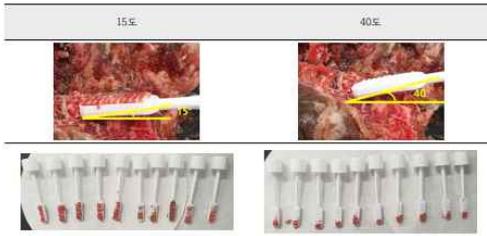
개발한 검체 채취도구는 평균된 1회용 Swab으로 간단하게 검체를 긁어서 sampling 가능하며, 정량적 채취가 가능한지 같은 각도에 따라 검체 채취 무게를 측정하여 성능평가 실시

□ 검체 채취도구의 효율성 평가방법

구분	평가방법	평가결과
검체 채취도구의 효율성	검체 채취 무게(g)의 합 전체 시료수(n=10)	검체 채취 무게 (g)의 표준편차

□ 검체 채취도구의 효율성 평가결과

같은 각도에 따라 검체 채취 무게를 확인한 결과, 40도로 채취하였을 때 정량적 채취가 가능함



Scraper Swab 검체 채취량 측정				
같은 각도	Swab 무게	2회	4회	양쪽(4회씩)
15도	2.0070	0.0331	0.0667	0.1231
	2.0007	0.1139	0.1559	0.2483
	2.0153	0.0628	0.1539	0.2343
	2.0232	0.0449	0.0970	0.1717
	2.0205	0.0499	0.0741	0.1122
	2.0083	0.0291	0.0631	0.1739
	2.0102	0.1095	0.1207	0.2218
	2.0063	0.0689	0.0876	0.1430
	2.0148	0.0732	0.1006	0.1509
	2.0125	0.0374	0.1252	0.1876
평균	2.0119	0.0623	0.1045	0.1767
표준편차	0.0068	0.0300	0.0337	0.0465
40도	2.0046	0.0224	0.0401	0.0682
	2.0023	0.0196	0.0339	0.0646
	2.0043	0.0405	0.0555	0.0926
	2.0114	0.0161	0.0354	0.0618
	1.9876	0.0259	0.0432	0.0936
	2.0066	0.0220	0.0275	0.0453
	1.9998	0.0303	0.0324	0.0561
	2.0012	0.0402	0.0731	0.0820
	1.9983	0.0202	0.0348	0.0813
	2.0033	0.0152	0.0574	0.0744
평균	2.0019	0.0252	0.0433	0.0720
표준편차	0.0062	0.009	0.0143	0.0157

2. 검체 보관용기의 밀폐성 평가결과

검체 보관용기에 Buffer가 들어있어 이동시 또는 보관시 밖으로 새어 나오지 않아야 한다. Vaccum dry oven(model:VO-64,Hycien)를 이용하여 감압하였을 때 Buffer가 새어 나오거나 Tube가 찌그러지는 현상이 있는지 확인 평가

□ 검체 보관용기의 밀폐성 평가방법

구분	평가방법	평가결과
검체 보관용기의 밀폐성	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Buffer가 들어있는 Tube를 Vaccum dry oven에 뒤집어서 넣은 후 Buffer가 새는지 확인</li> <li>● Buffer가 들어있는 Tube를 Incubation(50°C)에 넣은 후 시간대별로 무게를 측정하여 Buffer의 증발량 확인</li> </ul>	키친타올의 젖음 유무 시간별 평균 무게 비교

□ 검체 보관용기의 밀폐성 평가결과

**검체 보관용기의 밀폐성 평가 결과 키친타올의 젖음이 보이지 않았음을 확인함**

검체 보관용기의 밀폐성 평가 과정

샘플 준비

Dry oven 들어가기 전	Dry oven 들어간 후	키친타올의 젖음 확인
		

buffer가 들어있는 검체 보관용기를 Incubation(50°C)에 넣고 시간대별로 무게를 확인해 본 결과, 처음과 동일한 무게임을 확인함.

시간별 검체 보관용기의 밀폐성 평가 과정

처음	1시간 후	2시간 후	6시간 후
			

검체 보관용기 시간대별 증발량 확인 (n=20)				
	처음	1시간 후	2시간 후	6시간 후
	5.0637	5.0630	5.0627	5.0625
	5.1096	5.1091	5.1089	5.1084
	5.0715	5.0710	5.0707	5.0703
	5.0766	5.0759	5.0758	5.0756
	5.0446	5.0438	5.0436	5.0433
	5.0791	5.0783	5.0780	5.0776
	5.0491	5.0480	5.0478	5.0475
	5.0876	5.0867	5.0866	5.0857
	5.0744	5.0737	5.0735	5.0729
	5.0620	5.0615	5.0610	5.0607
Lysis buffer	5.0569	5.0563	5.0561	5.0556
	5.0751	5.0741	5.0740	5.0736
	5.0833	5.0828	5.0824	5.0816
	5.0511	5.0505	5.0502	5.0494
	5.0500	5.0493	5.0491	5.0486
	5.0946	5.0936	5.0934	5.0930
	5.0673	5.0664	5.0664	5.0661
	5.0832	5.0819	5.0822	5.0817
	5.1189	5.1181	5.1182	5.1178
	5.0996	5.0990	5.0987	5.0983
평균	5.0749	5.0742	5.0740	5.0735
표준편차	0.0204	0.0204	0.0204	0.0204

검체 보관용기 시간대별 증발량 확인 (n=20)				
	처음	1시간 후	2시간 후	6시간 후
	10.9260	10.9250	10.9247	10.9241
	10.8785	10.8777	10.8770	10.8765
	10.9425	10.9412	10.9406	10.9402
	10.9034	10.9025	10.9014	10.9006
	10.9320	10.9311	10.9305	10.9297
	10.9262	10.9248	10.9248	10.9243
	10.9822	10.9807	10.9809	10.9803
	10.9621	10.9607	10.9607	10.9598
	10.9187	10.9179	10.9174	10.9165
Dilution buffer	10.8946	10.8936	10.8931	10.8926
	10.8972	10.8964	10.8959	10.8953
	10.8748	10.8735	10.8732	10.8721
	10.9640	10.9628	10.9626	10.9621
	10.8825	10.8813	10.8811	10.8807
	10.9379	10.9372	10.9368	10.9361
	10.9428	10.9418	10.9415	10.9410
	10.9631	10.9622	10.9620	10.9614
	10.9119	10.9110	10.9109	10.9103
	10.9628	10.9620	10.9615	10.9609
	10.8965	10.8960	10.8957	10.8949
평균	10.9250	10.9240	10.9237	10.9215
표준편차	0.0320	0.0320	0.0321	0.0341

3. Lysis buffer의 DNA 추출 효율 평가결과

기존 Solgent사의 Solg<sup>TM</sup> Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)를 이용한 DNA 추출 방식과 개발한 DNA 추출 방식을 비교하기 위하여 추출된 DNA를 Nanodrop으로 DNA의 농도 및 순도를 측정하여 효율 확인. 추출한 DNA를 PCR 방법으로 증폭하여 전기영동으로 한우/비한우 판정으로 결과 비교.

□ Lysis buffer의 DNA 추출 효율 평가방법

구분	평가방법	평가결과
Lysis buffer의 DNA 추출 효율	제시한 protocol 대로 DNA 추출한 후 Nanodrop으로 DNA 농도 및 순도 확인	추출한 DNA를 PCR 방법으로 증폭하여 전기영동으로 한우 판정 결과 확인

결과 판정 기준



한우형 : 표준밴드(MDH2) 포함하여 5개 이하(1-5) 밴드가 나타난다.  
비한우형 : 표준밴드(MDH2) 포함하여 6개 이상 (6-12개) 밴드가 나타난다.  
#100bp의 MDH2의 PCR이 안되었을 경우, 결과 판정 불가

□ Lysis buffer의 DNA 추출 효율 평가결과

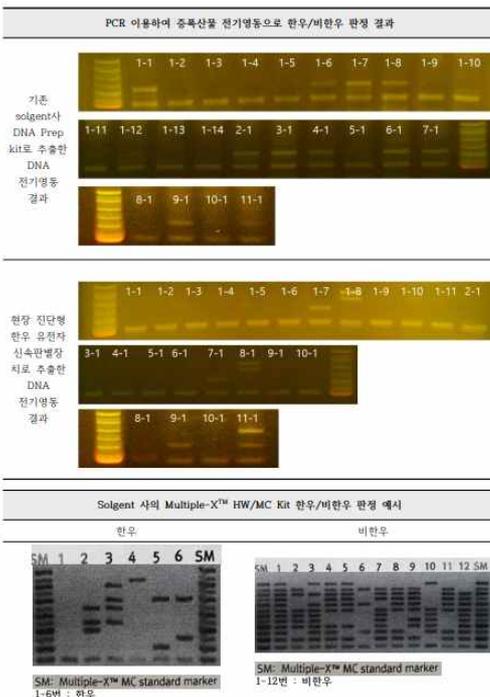
전기영동으로 한우/비한우 판정 결과, 기존 Solgent사의 Solg<sup>TM</sup> Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)와 (비노블바이오에서 개발한 방식과 동일하게) 결과가 나타남

기본 Solgent사의 Solg™ Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)로 추출한 DNA 농도 및 순도 (n=24)						
Sample name	Nucleic acid (ng/μl)	230(Abs)	250(Abs)	280(Abs)	260/280	260/230
1-1	81.23	3.38	1.62	0.87	1.86	0.48
1-2	72.08	0.93	1.44	0.77	1.85	1.55
1-3	65.46	1.62	1.30	0.70	1.86	0.80
1-4	82.06	3.16	1.64	0.90	1.81	0.52
1-5	65.22	2.02	1.31	0.69	1.87	0.64
1-6	69.86	0.74	1.39	0.75	1.86	1.89
1-7	75.79	0.89	1.51	0.81	1.86	1.70
1-8	64.76	0.98	1.29	0.69	1.87	1.32
1-9	50.97	0.56	1.01	0.54	1.88	1.83
1-10	53.22	0.59	1.06	0.55	1.91	1.80
1-11	88.02	0.97	1.76	0.93	1.87	1.80
1-12	72.87	1.42	1.45	0.77	1.88	1.02
1-13	58.47	0.59	1.17	0.63	1.84	1.99
1-14	22.14	0.45	0.44	0.24	1.81	0.99
2-1	46.19	0.74	0.92	0.52	1.76	1.25
3-1	27.11	0.30	0.54	0.28	1.88	1.81
4-1	33.63	1.09	0.67	0.36	1.84	0.61
5-1	21.37	0.37	0.42	0.23	1.85	1.16
6-1	49.64	1.38	0.99	0.52	1.88	0.72
7-1	114.96	1.42	2.29	1.24	1.84	1.62
8-1	43.39	1.97	0.86	0.46	1.88	0.44
9-1	56.83	0.63	1.13	0.62	1.83	1.80
10-1	42.77	1.02	0.85	0.44	1.93	0.84
11-1	49.93	3.92	0.99	0.53	1.87	0.25

- 17 -

'현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검증시스템'으로 추출한 DNA 농도 및 순도 (n=24)						
Sample name	Nucleic acid (ng/μl)	230(Abs)	250(Abs)	280(Abs)	260/280	260/230
1-1	598.08	28.28	11.96	5.11	2.34	0.42
1-2	601.23	28.03	12.03	5.26	2.29	0.43
1-3	640.99	29.40	12.82	5.46	2.34	0.43
1-4	744.08	32.21	14.88	6.27	2.37	0.46
1-5	693.15	30.60	13.86	5.86	2.36	0.45
1-6	660.37	30.22	13.20	5.73	2.30	0.43
1-7	704.52	31.59	14.09	6.02	2.33	0.44
1-8	732.34	31.98	14.64	6.18	2.36	0.45
1-9	726.99	32.17	14.54	6.11	2.37	0.45
1-10	677.24	31.00	13.54	5.92	2.28	0.43
1-11	724.1	31.55	14.48	5.98	2.42	0.45
1-12	681.21	30.75	13.62	5.73	2.37	0.44
1-13	725.03	31.46	14.50	6.11	2.37	0.46
1-14	706.97	31.49	14.13	6.03	2.34	0.44
2-1	592.25	25.81	11.84	5.54	2.13	0.45
3-1	669.88	28.33	13.39	6.33	2.11	0.47
4-1	604.63	27.48	12.09	5.33	2.26	0.44
5-1	688.93	30.15	13.77	5.72	2.40	0.45
6-1	562.83	25.02	11.25	4.81	2.34	0.45
7-1	604.23	27.16	12.08	5.65	2.13	0.44
8-1	538.87	24.38	10.77	4.65	2.31	0.44
9-1	613.29	27.56	12.26	5.53	2.21	0.44
10-1	631.26	29.29	12.62	5.39	2.34	0.43
11-1	651.66	30.67	13.03	5.76	2.26	0.42

- 18 -



- 19 -

한우 판정 결과		
Sample name	기본 Solgent사 DNA Prep 방법	개발한 (H)노블바이오 DNA Prep 방법
1-1	한우	한우
1-2	한우	한우
1-3	한우	한우
1-4	한우	한우
1-5	한우	한우
1-6	한우	한우
1-7	한우	한우
1-8	한우	한우
1-9	한우	한우
1-10	한우	한우
1-11	한우	한우
1-12	한우	한우
1-13	한우	한우
1-14	한우	한우
2-1	한우	한우
3-1	한우	한우
4-1	한우	한우
5-1	한우	한우
6-1	한우	한우
7-1	한우	한우
8-1	한우	한우
9-1	한우	한우
10-1	한우	한우
11-1	한우	한우

- 20 -

#### IV. 성능평가 결과 요약

Sample name	측정결과				성능평가 결과		
	Nucleic acid (ng/μl)		260/280		한우/비한우 판정 결과		기준 vs 개발
	기준	개발	기준	개발	기준	개발	
1-1	81.23	598.08	1.86	2.34	한우	한우	일치
1-2	72.08	601.23	1.85	2.29	한우	한우	일치
1-3	65.46	640.99	1.86	2.34	한우	한우	일치
1-4	82.06	744.08	1.81	2.37	한우	한우	일치
1-5	65.22	693.15	1.87	2.36	한우	한우	일치
1-6	69.86	660.37	1.86	2.30	한우	한우	일치
1-7	75.79	704.52	1.86	2.33	한우	한우	일치
1-8	64.76	732.34	1.87	2.36	한우	한우	일치
1-9	50.97	726.99	1.88	2.37	한우	한우	일치
1-10	53.22	677.24	1.91	2.28	한우	한우	일치
1-11	88.02	724.1	1.87	2.42	한우	한우	일치
1-12	72.87	681.21	1.88	2.37	한우	한우	일치
1-13	58.47	725.03	1.84	2.37	한우	한우	일치
1-14	22.14	706.97	1.81	2.34	한우	한우	일치
2-1	46.19	592.25	1.76	2.13	한우	한우	일치
3-1	27.11	669.88	1.88	2.11	한우	한우	일치
4-1	33.63	604.63	1.84	2.26	한우	한우	일치
5-1	21.37	688.93	1.85	2.40	한우	한우	일치
6-1	49.64	562.83	1.88	2.34	한우	한우	일치
7-1	114.96	604.23	1.84	2.13	한우	한우	일치
8-1	43.39	538.87	1.88	2.31	한우	한우	일치
9-1	56.83	613.29	1.83	2.21	한우	한우	일치
10-1	42.77	631.26	1.93	2.34	한우	한우	일치
11-1	49.93	651.66	1.87	2.26	한우	한우	일치

#### V. 성능평가 종합의견

평가항목	종합 의견
검체 채취도구의 효율성	검체 채취 시 굵는 각도에 따라 정량적 채취가 가능한지 평가한 결과, 40도로 기울여 채취하였을 때 정량적 채취가 가능함
검체 보관용기의 밀폐성	- Buffer가 들어있는 보관 용기를 vacuum dry oven에 넣어 감압한 후 용액의 leakage를 확인한 결과, leakage가 일어나지 않음을 확인함 - Buffer가 들어있는 보관 용기를 incubation(50°C)에 넣은 후 시간대별로 무게를 측정한 결과, 저용과 동일한 무게임을 확인함
Lysis buffer의 DNA 추출 효율	진기영용으로 한우 판정 결과, 기준 Solgent사의 Solg™ Genomic DNA Prep kit(SGD-45-C100)와 100% 동일하게 일치함
최종 판단	96노블바이오에서 개발한 '현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정시스템'에 대한 품질성능시험 결과 결과 검체 채취도구의 정량적 채취가 가능하며, 검체 보관 용기의 밀폐성이 높고 Lysis buffer의 DNA 추출 효율도 기존 방식 대비 100% 동일하므로 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치로서 적합하다고 판단됨.

GERI/구미전자정보기술원 접수 번호: 0-2012-04-7224  
 경북 구미시 신동로 401(가)호 11 TEL : 054-479-2027 FAX : 054-479-2099 Page 1 / 22 Pages

## 성 능 확 인 서

접수 번호: 0-2012-04-7224 시험 일자: 2012년 12월 12일  
 시험 기관: 인명테크(주)  
 주 소: 대전 유성구 대덕로79번길 15-12  
 과업 내용: 항우 생물(항우, 항우, 항소) 검증용 기법,  
 항우를 항우 생물 검증용 분자검출기기  
 확인 기간: 2012년 12월 12일  
 확인 장소: 인명테크 시험실

**확인 결과**

확인항목	확인방법	단위	확인결과	비고
민감도	양성자율률방법	%	100	
특이도	양성자율률방법	%	100	
확인 출력 시간	양성자율률방법	분	74분 54초	

특 정 : 유 상 금 : 기밀책임  
 명 : 홍 수 록 : 인 명 : 이 형 은

2012. 12. 23.

**구 미 전 자 정 보 기 술 원 장**

확인서 번호: 44(12)제 297 호  
 44(12)제 297 호

GERI/구미전자정보기술원 접수 번호: 0-2012-04-7224  
 경북 구미시 신동로 401(가)호 11 TEL : 054-479-2027 FAX : 054-479-2099 Page 2 / 22 Pages

## 확 인 결 과

### 1. 일반사항

가. 확인가검체 : 구미전자정보기술원  
 나. 확인일자 : 2012. 12. 17  
 다. 개발자명(회사명) :  
 - 제 목 명 : 항우 생물(항우, 항우, 항소) 검증용 기법,  
 항우를 항우 생물 검증 분자검출기기

### 2. 확인방법

가. 민감도

- 항우(항우, 항우, 항소) 표준 균주를 위한 5μl, Probe의 Perfect match 정제시료를 100μl에 copy number를 갖 수 있는 Positive control의 design, 10<sup>5</sup> copy/μl DNA 1/10씩 serial dilution (DNA 5 : DNA 1) 하여 10<sup>4</sup> copy까지 혼합
- 항우 50개좌로 부터 Sampling 된 조직에서 추출한 gDNA 혼합
- 항우 생물 관련 키트를 사용하여, 1개 샘플 테스트 시, total 25ul (샘플 5ul 포함) 시가 되도록 반응 시약을 제조
- PCR plate 혹은 tube에 제조된 반응 시약 및 Standard curve를 위한 10<sup>5</sup> copy/μl 10<sup>2</sup> copy까지 serial dilution 된 Positive control 및 샘플을 분주하여 50μl에 PCR start (Broad OFG6 system) 에 넣고 항우 표준 PCR 조건에 맞게 PCR을 수행, 이후, Positive control 에 대해서는 Standard curve analysis를 실시한다. Standard curve를 얻음
- Serial dilution한 Positive control의 Standard curve를 R<sup>2</sup>값이 0.99 이상으로 신뢰할 수 있는 결과임을 확인하고, Amplification curve에서 최소 검출한계 10<sup>4</sup> copy까지 다른 검출 방법을 확인
- Amplification curve에서 항우, 항소는 F<sub>act</sub> 채널에서, 항우는 Q5 채널에서 실시하여 대한 증폭곡선이 2.5값으로 검출함을 확인
- Standard curve Plot인 각 sample의 각 값들 통해 각 샘플의 농도가 상대검출량 통해 파악 할 수 있음을 확인
- 항우, 항우, 항소 실제 샘플에서도 Positive control에서 확인되는 분석적 민감도(항소 검출한계) 10<sup>4</sup> copy까지의 범위 내에서 검출, 검출 할 수 있으며, Melting peak에서

항우 생물 검증용 분자검출기기 위한 검증용 분자검출기기 성능 확인

- 확인 항목 시약의 조량 및 확인 출력 조건

■ 확인 항목 (가) 조량

시약명	조량
항우	1.0μl
항우 1000 copies	10.0μl
항우 100 copies	1.0μl
항우	1.0μl
항소	1.0μl

■ 확인 항목 (나) 조건

■ 항우 생물 검증용 분자검출기기

검출량	PCR Cycle	Q5 Cycle
항우	11.77	40.46
항소	19.44	40.99
항소	11.77	41.81, 40.46

■ 확인 항목 (다) 결과

항우	항소										
1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

항우 시료에서 각 실제 표준과 테스트 분량이 동일하게 판독되는 경우(간접법)와 실제 표준과 테스트 결과가 같아 혹은 판독되지 않는 경우(직접법)이므로 판독되는 경우를 증명하여 아래의 식과 같이 최종 민감도를 계산

민감도(%) = (총 테스트 결과 수) / (검출량 결과 검출수) / 총검출수 (간접법+직접법) \* 100

■ Amplification curve에서 C<sub>t</sub>가 43 이하이고, Melting Peak에서 테스트 시료와 Test result 상 각 target probe의 예상 T<sub>m</sub> 범위 내 확인시 검출된 것으로 판정

44(12)제 297 호

GERI/구미전자정보기술원 접수 번호: 0-2012-04-7224  
 경북 구미시 신동로 401(가)호 11 TEL : 054-479-2027 FAX : 054-479-2099 Page 4 / 22 Pages

## 확 인 결 과

### 나. 특이도

- 항우 50개좌로 부터 sampling 된 조직에서 추출한 gDNA를 사용하여 항우 생물 관련 키트를 사용하여, 항우, 항우, 항소 일 1개 샘플씩으로 반응 되는 비율을 판별 하지 않는 비율을 측정
- 항우 생물 관련 키트를 사용하여, 1개 샘플 테스트 시, total 25ul (샘플 5ul 포함) 시가 되도록 반응 시약을 제조
- PCR plate 혹은 tube에 제조된 반응 시약 및 샘플을 분주하여 50μl에 PCR start (Broad OFG6 system) 에 넣고 항우 표준 PCR 조건에 맞게 PCR을 수행
- PCR 판독 후, Melting Analysis를 통해 검출된 Melting Peak를 확인
- No Template Control (NTC)의 내부 표준 증폭되지 않았을 경우 Signal을 기준으로 Threshold를 설정하여, F<sub>act</sub>(Q5)와 Q5(항우)의 항우 signal의 Melting Peak의 T<sub>m</sub>를 항우 생물 관련 기준으로서 T<sub>m</sub>범위로 비교 하여, 각 샘플 별 T<sub>m</sub>범위에 0.5μl 및 10μl 해당 샘플에 대해 실제 항우, 항우, 항소 일 1개 샘플씩으로 샘플을 주어, 판독결과 판독 판독이 되지 않는 샘플은 최종 판독이 되지 않는 것으로 판정
- 항우 50개좌 중 최종 판독이 되는 비율 및 최종 판독이 되지 않는 비율을 여러 시료 같이 테스트하여, 최종 판독이 되는 비율이 100% 이상, 최종 판독이 되지 않는 비율이 0% 이하가 되면 확인

최종 판독이 되는 비율 = (항우/항우/항소 중, 최종 판독이 되는 샘플 개수) / (총 시료 항우 개수) \* 100%

최종 판독이 되지 않는 비율 = (항우/항우/항소 중, 최종 판독이 되지 않는 샘플 개수) / (총 시료 항우 개수) \* 100%

44(12)제 297 호

**GERI** 구미전자정보기술원    접수 번호: G-2012-GI-7204  
 경북 구미시 신원로 402(3동) 5호    TEL : 054-479-2002 FAX : 054-479-2000    Page 5 / 22 Pages

### 확 인 결 과

- 확산 온도 시험의 조성 및 확산 온도 조건

<확산 용액 시작 조성>

Component	Amount
DMF	1.0 μl
20 μM(20 μg/ml) Phosphate buffered saline (pH=7.4) (Sigma)	10.0 μl
DMF	2.0 μl
Total	13.0 μl



<확산 용액 - PCR 조건>



<반응 용액 혼합물 시작 조성표>

반응 용액	Start Time(초)	End Time(초)
반응 1	71-77	80-98
반응 2	138-84	80-98
반응 3	71-77	81-87, 88-89

시	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1	확산 1
2	확산 1											
3	확산 1											
4	확산 1											
5	확산 1											
6	확산 1											
7	확산 1											
8	확산 1											
9	확산 1											
10	확산 1											
11	확산 1											
12	확산 1											

※ Amplification curve에서 Ct가 43 이하이고, Melting Peak에서 템스트 시퀀스의 Tm이 target probe 상 각 target probe의 예상 Tm 범위 내 확산시 검출된 것으로 판정

M(210 mm × 297 mm)

**GERI** 구미전자정보기술원    접수 번호: G-2012-GI-7204  
 경북 구미시 신원로 402(3동) 5호    TEL : 054-479-2002 FAX : 054-479-2000    Page 6 / 22 Pages

### 확 인 결 과

다. 확산 종속시간

1. 클론어싱 기법의 활용되는 독과개발 한 미니칩의를 활용한 PCR chamber에서, PCR 용 수첨하여 확산 종속 대부분 확인
2. 반응 용액 혼합물용으로 개발된 현명한 분자진단 시작 및 반응 실시로부터 주출한 DNA를 활용하여 확산 종속 여부를 확인
3. 미니칩본에 PCR 조성물 맞게 제작된 확산 종속 확산용 반응시약을 넣고, 미니칩 본을 분자진단기기 시료작형에 넣고, 반응 용액들을 위한 확산 종속 PCR 조건을 분자진단기기에 셋팅 함
4. 분자진단기기 시료작형의 Lid를 닫고, Start 버튼을 눌러, 확산 종속의 수행을 시작 함. 시작과 동시에 이미터를 이용하여 PCR 조건이 모두 완료될 때 마지막 확산 종속 수행 시점을 측정함
5. PCR 조건에 제시된 순회 Cycle이 모두 끝난 후, 확산 종속 수행이 완료 된 시점과 각각의 시간을 확인, 기록함
  - 확산 종속 시작과 동시에 8초부터 9999 키보드 (T1), 90분에서 9999 키보드 (T2)로 키보드(2번)로 소요 시간 측정
  - 목표한 확산 종속 시간 80분 이내 확산 종속 cycle이 완료 될 확인
6. PCR 수행이 완료된 미니칩본을 분자진단기기 꺼내, 미니칩본 내의 반응물들 5ul 처 2% Agarose gel에 gel-loading를 수행하여, 염도로 증폭산정됨 확인 함
  - 확산 종속 시작의 조성 및 확산 온도 조건

<확산 용액 시작 조성>

Component	Amount
DMF	1.0 μl
20 μM(20 μg/ml) Phosphate buffered saline (pH=7.4) (Sigma)	10.0 μl
DMF	2.0 μl
Total	13.0 μl



M(210 mm × 297 mm)

**GERI** 구미전자정보기술원    접수 번호: G-2012-GI-7204  
 경북 구미시 신원로 402(3동) 5호    TEL : 054-479-2002 FAX : 054-479-2000    Page 7 / 22 Pages

### 확 인 결 과

<확산 용액 - PCR 조건>







M(210 mm × 297 mm)

**GERI** 구미전자정보기술원    접수 번호: G-2012-GI-7204  
 경북 구미시 신원로 402(3동) 5호    TEL : 054-479-2002 FAX : 054-479-2000    Page 8 / 22 Pages

### 확 인 결 과

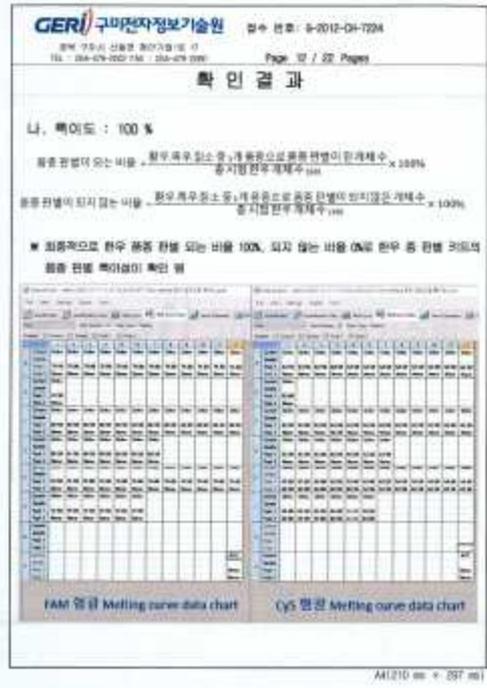
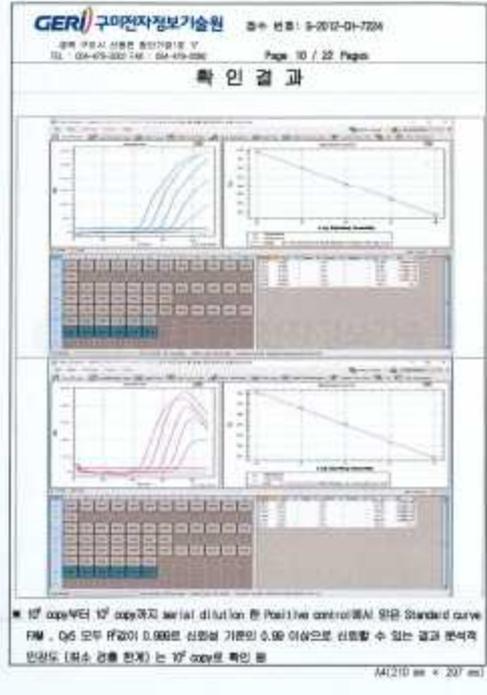
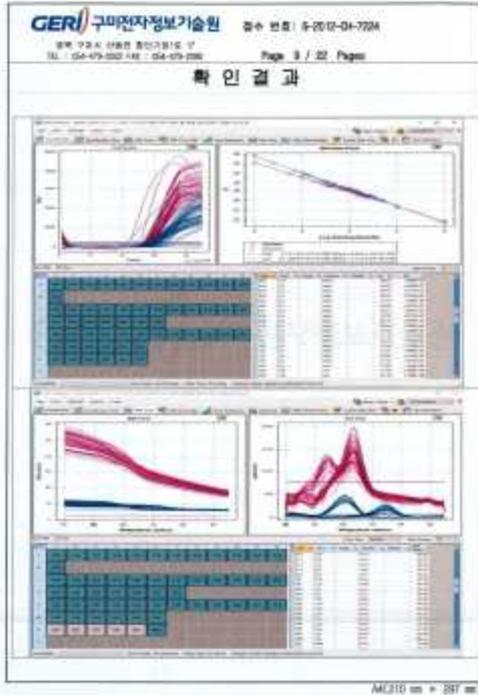
3. 확인결과

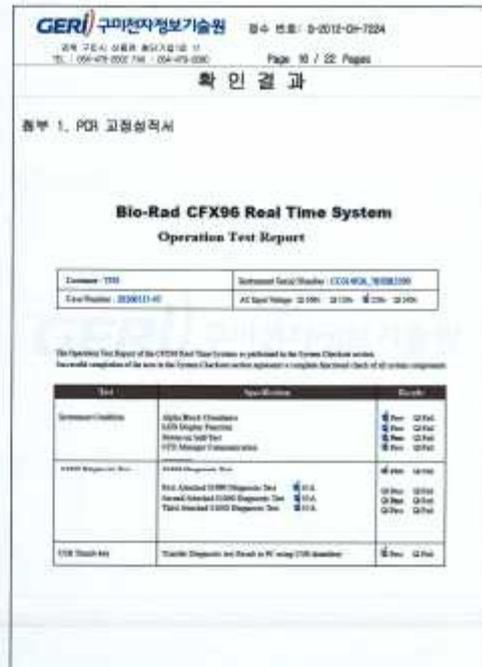
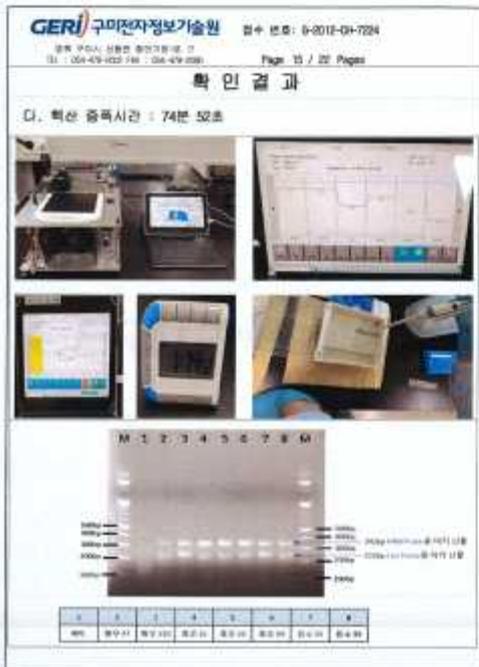
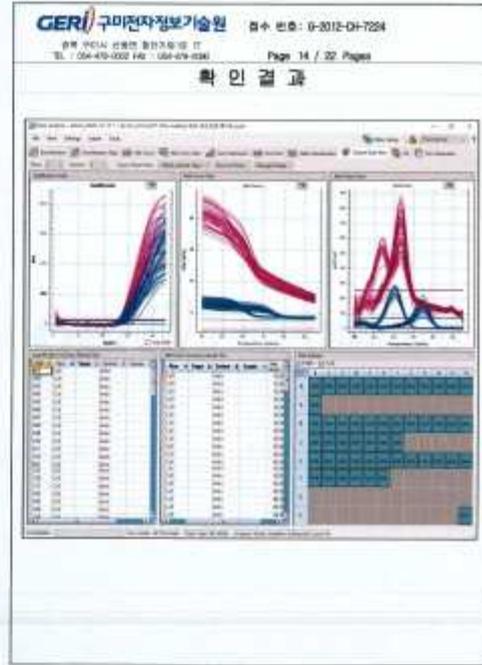
가. 민감도 : 100 % (분석적 민감도 - 최소 검출한계 : 10<sup>6</sup> copy )  
 민감도(%) = (총 테스트 결과 수) / (백분율 결과 검출수) / 총검출수 (민감도) × 100



각 샘플 반복 시 Perfect match Tm으로 형서 하는 경우 중심  
 - 경우는 FAM, Cy5 모두 Perfect Match나, FAM을 중심으로 하여  
 - 모든 실시로 샘플에서 상대 정량 가능하고, 최소 검출한계 10<sup>6</sup> copy 이상으로 확인 됨

M(210 mm × 297 mm)





**GERI** 귀미전자정보기술원 권수 번호: G-2012-04-7224  
 경북 구미시 산동면 동안가동 17 Tel. : 054-479-0200 / Fax : 054-479-0200 Page 17 / 22 Pages

### 확 인 결 과

LPC System Test	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
	Q93 System Test	합 Pass	Q3 Pass
Thermal Shock Test	Thermal Shock (Moisture Absorbent)	합 Pass	Applicable
	Thermal Shock (Moisture Absorbent)	합 Pass	Applicable
	Thermal Shock (Moisture Absorbent)	합 Pass	Applicable
	Thermal Shock (Moisture Absorbent)	합 Pass	Applicable

The above referenced document meets all performance specification requirements.

Date : 13 May 2002  
 Test & Report received by : E-Inspection  
 Bio Services  
 71 Seonri, 217 Yeongdeung-ro, Yeongdeung-gu, Seosan City, Chungang-do 48070, Republic of Korea  
 Tel. : +82 71 8382 8749 / Fax : +82 71 834 0788

44(212) mm x 297 mm

**GERI** 귀미전자정보기술원 권수 번호: G-2012-04-7224  
 경북 구미시 산동면 동안가동 17 Tel. : 054-479-0200 / Fax : 054-479-0200 Page 18 / 22 Pages

### 확 인 결 과

첨부 2. 온도측정 장비 교정성적서

첨부 2. 온도측정 장비 교정성적서

44(212) mm x 297 mm

**GERI** 귀미전자정보기술원 권수 번호: G-2012-04-7224  
 경북 구미시 산동면 동안가동 17 Tel. : 054-479-0200 / Fax : 054-479-0200 Page 19 / 22 Pages

### 확 인 결 과

첨부 3. 피벗 교정성적서

첨부 3. 피벗 교정성적서

44(212) mm x 297 mm

**GERI** 귀미전자정보기술원 권수 번호: G-2012-04-7224  
 경북 구미시 산동면 동안가동 17 Tel. : 054-479-0200 / Fax : 054-479-0200 Page 20 / 22 Pages

### 확 인 결 과

첨부 4. 피벗 교정성적서

첨부 4. 피벗 교정성적서

44(212) mm x 297 mm



3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 유전자 증폭 시간의 경우 Fast 시약 개발 및 유전자 증폭 시간 단축으로 100% 달성 예정임

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 황우, 칩소, 흑우에 대한 유전자정보를 발굴하여 이를 활용하는 원천기술이 확보될 수 있음
- 한우 품종 판별 마커 발굴을 통한 한우 유통의 정당성과 사육 농가의 보존에 기여할 수 있음
- 시장에서의 현장진단(Point of care test) 기술사업이 매우 증가하였으나 진단키트에 국한되었을 뿐 검체시료의 전처리, 시료의 이동 등에서 오는 2차 오염으로 정확한 품종 분석의 어려움이 발생함에 본 연구과제를 통하여 최적의 검체채취용도구, 시료의 보존 용액 및 보존용기를 개발하여 현장형 자동화 분자진단 플랫폼 개발에 적용하고자 함.
- 기존의 유전자진단 법을 보완하여 보다 정확하고 안정적인 한우확인시스템을 구축할 수 있음.
- 현장에서 빠른 단속으로 인한 시료의 은폐, 은닉을 방지하고 즉각적인 행정처분으로 인해 한우의 부정 유통을 방지할 수 있음
- 외국 시장으로부터 들어오는 축산물로부터 한우의 우수성을 통해 시장 경쟁력을 높이는 방법으로 사용 가능하여, 농산물 품질관리원 뿐만 아니라 한우 전문 식당의 한우확인으로 소비자 신뢰를 확보 가능, 민간 시장 유통 관리를 통해 매출 증대 예상
- 국내 시장의 경우 농산물 품질관리원과 개발 초기부터 협업하여 개발함으로써 국가 가이드라인으로 등록 유도 예정으로, 국내 시장 및 해외 시장 진출에도 매우 유리할 것으로 사료됨.

### 4-2. 기대성과 및 파급효과

- **기술적 측면** : 유전적 가치를 판단을 통해 국내 축산물 소비자 신뢰도 증대
  - 서비스 확대를 통해 국내 사육중인 보존가치가 높은 우량종 파악 가능
  - 수집한 샘플에 대한 추가적인 연구 및 기술개발이 가능
  - 재래한우 유전자원의 산업적 활용 및 우량축군 생산/보급 기대
- **경제적·산업적 측면** : 축산농가의 소득 향상 기대
  - 농가에 사육중인 축군에 대한 품종 및 원산지 정보를 기반으로 품질개량 방향을 설정하여 빠른 농가 소득 향상에 기여
  - 과학적이고 체계적인 축산업 관리체계 수립가능
- **정책적 측면** : FTA시장개방에 따른 국제적 축산물 경쟁력 확대
  - 쇠고기 수출 강국들과 자유무역협정(FTA)로 낮아질 수 있는 한우에 대한 입지개선 및 수출기대
- **바이오산업 기반 과학기술의 산업적 활용 기회를 창출하여 부가적인 기술개발 연계를 통한 해외진출**

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정 시스템 개발				
	(영문) Development of on-site verification system and device for Identifying Hanwoo beef				
주관연구기관	티엔에스(주)		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 티엔에스(주)	
참 여 기 업	충북대학교, (주)노블바이오			(성명) 김 봉 석	
총연구개발비  (1,046,690 천원)	계	1,046,690	총 연 구 기 간	2018.04~2020.12 .( 2년8 월)	
	정부출연 연구개발비	825,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	50
	기업부담금	221,690		내부인원	50
	연구기관부담금	0		외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 성과

연구개발 목표 : 쇠고기를 채취·전처리하는 컬렉터와, 핵산추출부터 검출까지 일체화된 필름기반 분자진단칩을 이용하여, 60분 내에 주요 품종(황우, 칠포, 흑우)을 판별하는 현장형 분자진단 통합시스템 플랫폼 개발

연구개발 성과 :

■티엔에스(주)

- 한우, 흑우, 칠포 판별 키트 개발 완료
- 현장진단형 한우 유전자 판별칩 개발 완료
- 현장 진단형 신속 판별 시스템 개발 완료
- 연구 기반 관련 기술 특허 출원

■(주)노블바이오

- 쇠고기의 검체 특성을 고려하여 현장에서 정량적 채취가 가능한 Scaper swab을 개발하였음.
- 제반 실험결과를 토대로 특허를 출원하였음.(출원번호 : 10-2019-0134124)
- 현장진단용 쇠고기 유전자 신속판별장치 디자인
- 한국유전자정보원의 검증을 토대로 Scaper swab과 신속하게 DNA를 추출할 수 있는 Lysis buffer를 활용하여 현장검증용(POCT) Kit를 제작 하였음.

■충북대학교

- 한우와 칠포, 그리고 흑우 집단에 대한 구분은 모색에서 나타나는 차이인데, 칠포, 흑우, 한우의 유전적 차이를 밝혀내기 위해서 모색 차이에 대한 유전좌위와 원인 유전인자를 밝혀냄
- 칠포간 교배에서의 후대 모색발현 차이와 한우와 제주흑우 교배에서 생산된 후대에서 모색발현 차이를 활용하여 한우와 칠포, 흑우의 모색을 결정하는 유전인자가 소 염색체 18번 MC1R 유전자 조절좌위라는 것을 밝혀냄
- 한우, 칠포, 흑우의 모색을 결정하는 유전좌위를 간편하고 정확하게 확인할 수 있는 단일 유전자

마커를 개발함으로써, 현장진단의 판별기기 개발에 적용할 수 있도록 함

○ 연구내용 및 결과

- 한우 검체 채취 도구, 한우판독키트 및 한우 판독 시스템 개발



검체 채취도구

한우 판독 키트

한우 판독 시스템

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 황우, 칩소, 흑우에 대한 유전자정보를 발굴하여 이를 활용하는 원천기술이 확보될 수 있음
- 한우 품종 판별 마커 발굴을 통한 한우 유통의 정당성과 사육 농가의 보존에 기여할 수 있음
- 시장에서의 현장진단(Point of care test) 기술사업이 매우 증가하였으나 진단키트에 국한되었을 뿐 검체시료의 전처리, 시료의 이동 등에서 오는 2차 오염으로 정확한 품종 분석의 어려움이 발생함에 본 연구과제를 통하여 최적의 검체채취용도구, 시료의 보존용액 및 보존용기를 개발하여 현장형 자동화 분자진단 플랫폼 개발에 적용하고자 함.
- 기존의 유전자진단 법을 보완하여 보다 정확하고 안정적인 한우확인시스템을 구축할 수 있음.
- 현장에서 빠른 단속으로 인한 시료의 은폐, 은닉을 방지하고 즉각적인 행정처분으로 인해 한우의 부정 유통을 방지할 수 있음
- 국내 시장의 경우 농산물 품질관리원과 개발 초기부터 협업하여 개발함으로써 국가 가이드라인으로 등록 유도 예정으로, 국내 시장 및 해외 시장 진출에도 매우 유리할 것으로 사료됨.

[별첨 2]

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

		과제번호	318015-03			
사업구분	농축산물안전생산유통관리기술개발사업					
연구분야	농축산물신뢰성강화		과제구분	단위		
사업명	농축산물신뢰성강화사업			주관		
총관과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음		
과제명	현상 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정 시스템 개발		과제유형	(개발)		
연구기관	티엔에스(주)		연구책임자	김봉석		
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계	
	1차연도	2018.4~2018.12	225,000	61,650	286,650	
	2차연도	2019.1.~2019.12.	300,000	80,020	380,020	
	3차연도	2020.01.~2020.12	300,000	80,020	380,020	
	계		825,000	221,690	1,046,690	
참여기업	충북대학교, ㈜노블바이오					
상대국		상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 01. 29

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
티엔에스(주)	대표이사	김 봉 석

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약



## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

한우 종관별 기술을 검체 채취부터 판독까지 현장형 기술로 개발함으로써, 안정적이고 신속한 한우관별시스템의 개발을 통하여 현장 단속원 및 일반 소비자도 손쉽게 한우확인이 가능하게 될 것임. 단속현장에서 검정용 시료를 실험실로 시료를 송부하지 않고 현장에서 원스톱으로 조사와 검정을 수행함으로써 원산지표시제 관리 등을 체계적이며 효율적으로 수행이 가능함

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

원산지 위반행위 단속현장에 바로 실험 및 분석이 가능한 신속하고 저비용의 정확한 검정시스템 개발로 국내 쇠고기 유통시장의 투명한 거래를 유도할 것이라 기대됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

현장형 한우 종관별 기술은 유전자 기반 판독 기술을 기반으로 하는 플랫폼 기술로서, 식품, 종자 등 다양한 현장 판독이 필요로 하는 분야에 활용 가능할 것으로 사료됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

참여기관이 맡은 바 연구 내용을 성실히 수행 하였으며, 그에 따른 결과물도 잘 개발 되었음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

개발된 성과물을 기반으로 특허 출원을 하였으며, 논문 게시를 통해 연구 개발 성과를 공유 하였음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. SNP 마커개발 관련	10	100	한우, 흑우, 칠포 등의 SNP 마커를 개발 완료 하였음
2. 검체채취용도구의 효율	10	100	실제 검체를 채취하여 유전자 증폭이 가능함을 확인함
3. 검체보관용기의 밀폐성	10	100	실제 검체 보관 용기의 우수한 밀폐성을 확인함
4. 핵산 추출 효율	10	100	채취된 검체로부터 핵산을 추출한 결과 유전자 증폭에 문제가 없음을 확인함
5. 핵산 증폭 시간	10	80	핵산증폭 시간은 60분을 맞추지 못했지만, 추가 개발을 통해 가능함을 확인함
6. 민감도	20	100	한우종판별 키트의 민감도 테스트 결과 우수함을 확인함
7. 특이도	20	100	한우종판별 키트의 특이도 테스트 결과 우수함을 확인함
8. 앱관련 평가	20	-	마커 개발 결과에 따라 앱 개발이 필요없다고 판단되어 진행 안함
합계	100점	97	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

원산지 위반행위 단속을 위한 한우 종판별 기술을 개발하였으며, 현장에서 검체 채취부터 판독까지 가능함을 확인 하였음. 다만, 이를 사업화 하기 위해서는 개발 된 기술의 현장 테스트 및 안정화 단계가 필요하다고 사료됨.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

현장형 랩온어칩 기반 유전자 판독칩 및 시스템을 개발함에 있어서 많은 어려움이 있었으며, 많은 검체 수를 확보하기 어려워 빠른 사업화를 위해 후속 연구가 필요함.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

현장형 한우 종관별 기술을 시장에 적용하기 위해서는 후속연구로 실증 테스트를 통한 제품 안정화가 필요하다고 사료됨

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

해당없음

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

해당없음

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	현장 진단형 한우 유전자 신속판별장치 및 검정 시스템 개발			
주관연구기관	티엔에스(주)		주관연구책임자	김 봉 석
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	825,000,000	221,690,000	0	1,046,690
연구개발기간	2018. 04. 01 ~2020. 12. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① SNP 마커 개발	한우 종판별을 위한 마커 개발 완료
② 검체채취용도구의 효율	검체채취용도구의 효율 100% 달성
③ 검체보관용기의 밀폐성	검체보관용기의 밀폐성 100% 달성
④ 핵산 추출 효율	핵산 추출 효율 100% 달성
⑤ 핵산 증폭 시간	핵산 증폭시간 74분 54초로 목표 대비 14분 54초 늦음
⑥ 민감도	한우 종판별 키트 민감도 100% 달성
⑦ 특이도	한우 종판별 키트 특이도 100% 달성
⑧ 애플리케이션 평가	마커 개발 결과에 따라 수행 안함

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						

단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건
가중치	5	5		5	5	35	20	5	5	5	2			3	2	2	1
최종목표	4	1		3	100	4	-	150	7	-	2	2	2	2	1	1	1
1차년도	2	0		1	10	1	50	0	2	0	0		1	1	1	1	
2차년도	2	0		1	20	2	200	50	2	-	1	1		1			
3차년도	0	1		1	70	1	500	100	3	-	1	1	1				
소 계							750	150	7	-	2						
종료 1차년도							-	50	5	500							
종료 2차년도							-	100	7	300							
종료 3차년도							-	200	10	300							
소 계							-										
합 계	4	1		3	100	4	-	3,650	29	-	1	2	2	2	1	1	1

#### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	한우종판별 마커
②	한우종판별 키트
③	한우종판별칩
④	한우종판별 시스템

#### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해	정책 자료	기타
①의 기술		V				V				
②의 기술		V				V				
③의 기술		V				V				
④의 기술		V				V				

#### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	한우 원산지 판별 단속을 통한 안전한 먹거리 확보
②의 기술	현장 단속에 활용하여 원산지 단속 가능
③의 기술	비전문가도 유전자 판별이 가능하여 다양한 분야에 활용 가능
④의 기술	하이브리드칩 전용 장비로 다양한 분야에 활용 가능

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균 IF			학술발표	정책 활용		홍보 전 시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	5	5		5	5	35	20	5	5	5	2			3	2	2	1			
최종목표	4	1		3	100	4	-	150	7	-	2	2	2	2	1	1	1			
연구기간내 달성실적	6	1				1	3,278	3,278	10		1	1		1.654	3	3	3	2	1	
연구종료후 성과창출 계획	1	2				1	5,000	5,000	5											

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.