

116065-03

전기식 바이오센서를 이용한
가축의 임신진단법 개발 및 상용화

최종보고서

2018

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개(), 발간등록번호(○)
첨단생산기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002529-01

전기식 바이오센서를 이용한 가축의 임신진단법 개발 및 상용화

최종보고서

2019. 03. 20.

주관연구기관 / 미라클스코프(주)
협동연구기관 / 전자부품연구원
한국농수산대학 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “전기식 바이오센서를 이용한 가축의 임신진단법 개발 및 상용화” (개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 20.

주관연구기관명 : 미라클스코프(주)

(대표자) 이 계 한

제1협동연구기관명 : 전자부품연구원

(대표자) 김 영 삼

제2협동연구기관명 : 한국농수산대학 산학협력단 (단장) 오 대 근

주관연구책임자 : 이 계 한

제1협동연구책임자 : 이 국 녕

제2협동연구책임자 : 박 용 수



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116065-03	해 당 단 계 연 구 기 간	3차년도	단 계 구 분	(3)/(3)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	전기식 바이오센서를 이용한 가축의 임신진단법 개발 및 상용화			
연구책임자	이계한	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 16명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 16명 외부: 1명	총 연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 234,000천원 계: 934,000천원
연구기관명 및 소속부서명	미라클스코프(주)			참여기업명: 전자부품연구원 한국농수산대학 산학협력단	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (주)디에스테크원			연구책임자: 이영욱	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반				

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											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

- 바이오센서 기반의 임신진단 키트 개발 및 상용화 달성
- 새로운 기술을 융합하여 원천기술 확보 및 실제 데이터를 통하여 국내외 기술 및 시장을 선점하여 국가 기술 경쟁력을 확보할 수 있음.
- 새로운 대체 약물의 개발 및 평가가 가능하여 여러 질병 발현에 대한 새로운 치료 지침을 제공할 수 있는 정책 수립이 가능함.
- 신시장 개척 및 원천 기술 상용화를 통하여 새로운 진단 시약 시장을 창출할 수 있고 새로운 진단기술을 적용한 시스템으로 활용이 가능해 짐에 따라 경제적 파급효과 도출함.

보고서 면수

210

〈요약문〉

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 바이오센서를 이용한 가축 체액중 PAGs(Pregnancy Associated Glycoproteins), 프로그스테론의 적정 농도를 진단, 이를 바탕으로 가축(소)의 조기임신 과 태아 생존 검사를 농가 단위에서 할 수 있는 POCT(현장진단형) 진단 기기 개발 및 상용화 ○ 축종(말, 돼지, 개등) 및 질병과 식품을 비롯한 농업 전 분야에 맞춤형 진단 시스템 개발 및 사용화로 발전 가능 하도록 연구 추진, 사물인터넷(IoT)연계 축사 및 개체관리 자동화를 위한 기반 확보 <p>2. 연구내용</p> <ul style="list-style-type: none"> 한우에서 임신관련 단백질의 적성 및 분석을 통한 현장 응용기술 개발 ○ 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석 ○ 한우 임신관련 특이전이 변이 단백질 발굴 및 항체 제작 ○ 한우 임신기간 중의 PAG또는 특이 단백질의 농도 조사 ○ 전기식바이오센서의 효능 검증 ○ 임신진단용 바이오센서 카트리지 및 휴대용 디지털 센서 플랫폼 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<p>□ 바이오센서 기반의 임신진단 키트 개발 및 상용화</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 호르몬에 맞는 바이오센서 전극과 회로 설계 및 제작 ○ 호르몬 단독 및 복합 진단 시스템의 설계 ○ 발정기 및 임신기간 호르몬 진단 시스템 설계 ○ 센서 안정화를 위한 단백질 고정화 및 표면처리 ○ 측정 보드, 회로 및 알고리즘 개발 : 시스템 모니터링 SW 개발 ○ 사용자 인터페이스 SW 개발 ○ 시스템 통합 및 설계 테스트 -> 시제품 제작 및 상용화 ○ 임신진단기의 대량 생산 시스템 구축 ○ 임신진단 카트리지 및 플랫폼 개발과 개발된 시작품에 대한 구조 특허 확보 ○ 시작품 성능에 대한 효능성 검증과 실제 데이터 분석에 대한 논문 게재 ○ 시작품 적용을 위한 특이 항체 개발 및 최적화 작업 ○ 본 과제 전담을 위한 신규 인력 양성 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 새로운 기술을 융합하여 원천기술 확보 및 실제 데이터를 통하여 국내외 기술 및 시장을 선점하여 국가 기술 경쟁력을 확보할 수 있음 ○ 새로운 대체 약물의 개발 및 평가가 가능하여 여러 질병 발현에 대한 새로운 치료 지침을 제공할 수 있는 정책 수립이 가능함 ○ 신시장 개척 및 원천 기술 상용화를 통하여 새로운 진단 시약 시장을 창출할 수 있고 새로운 진단기술을 적용한 시스템으로 활용이 가능해 집에 따라 경제적 파급효과 도출함 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	전기식 바이오센서	측정용 카트리지	고감도센서플랫폼	PGA단백질계	현장검사
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Electric Biosensor	Measurement Cartridge	High Sensitivity Sensor Platform	PGA Protein System	Field Inspection

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	1
제 1 절. 연구개발의 필요성	1
제 2 절. 연구개발의 중요성 및 차별성	6
제 2 장. 국내·외 기술개발 현황	11
제 1 절. 국내·외 논문 및 특허 분석	11
제 2 절. 국내·외 기술개발 현황	13
제 3 절. 국내·외 제품 및 시장 현황	17
제 3 장. 연구수행 내용 및 결과	19
제 1 절. 연구개발 목표	19
제 2 절. 연구개발 성과목표 및 평가방법	31
제 3 절. 연구개발의 추진전략·방법	32
제 4 절. 연구개발 내용 및 결과	33
제 4 장. 목표 달성도 및 관련분야 기여도	204
제 1 절. 목표 달성도	204
제 2 절. 관련분야 기여도	205
제 5 장. 연구결과의 활용 계획	206
제 1 절. 연구개발 결과의 활용방안	206
제 2 절. 사업화 계획	206
제 6 장. 연구개발결과의 보안등급	209
제 7 장. 국가과학기술종합시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	209
제 8 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	209
제 9 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	210

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 필요성

코드번호	B-04-01
------	---------

1. 연구개발 개요

- 가축에서 혈액 또는 체액 중 ‘PAGs(Pregnancy Associated Glycoproteins)’, ‘프로게스테론’의 적정 농도 진단 기술과 전기식 바이오센서를 이용한 진단시스템 개발.
- 이를 바탕으로 가축(소)의 조기임신과 태아 생존 검사를 농가 단위에서 할 수 있는 POCT(현장진단형) 진단기기개발 및 상용화.
 - ☞ 향후 질병과 식품을 비롯한 농업 전 분야에 맞춤형 진단시스템 개발 및 사용화로 발전 가능 하도록 연구 추진, 사물인터넷(IoT)연계로 축사 및 개체 관리 자동화를 위한 기반 확보
- 현장진단형 전기식 바이오센서를 이용한 임신진단기 개념도
 - 한우에서 임신관련 단백질의 정성 및 정량 분석을 통한 현장 응용기술 개발
 - 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석
 - 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작
 - 한우 임신기간 중의 PAG 또는 특이 단백질의 농도 조사
 - 전기식 바이오센서의 효능 검증



그림 2. 진단기술 특장점 비교

☞ 기존 임신진단 키트는 정확도는 높으나 실험실 수준에서만 가능하여 농가 활용이 불가

능. 하지만 본 연구의 최종 결과물인 PAGs를 이용한 전기식 바이오센서 임신진단기는 농가에서 한번에 임신진단이 가능함.

2. 핵심기술

- 한우에서 임신관련 단백질의 정성 및 정량 분석을 통한 현장 응용기술 개발
- 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석
- 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작
 - 임신 및 비임신 한우의 태반 또는 혈액을 이용한 전체 유전체 서열 비교 분석 비교 분석을 통한 특이적인 변이 단백질 발굴 및 바이오 마커 개발
- 한우 임신기간 중의 PAG 또는 특이 단백질의 농도 조사
 - 임신한우 10두에서 1주단위(3개월 이전) 및 2주단위(3개월 이후) 혈액을 확보.
 - 혈액의 단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석
- 전기식바이오센서의 효능 검증
 - 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교
- 단독(PAG) 또는 변이 단백질들의 다중 검출을 위한 단독 또는 복합 전기식 바이오전극센서 회로 설계

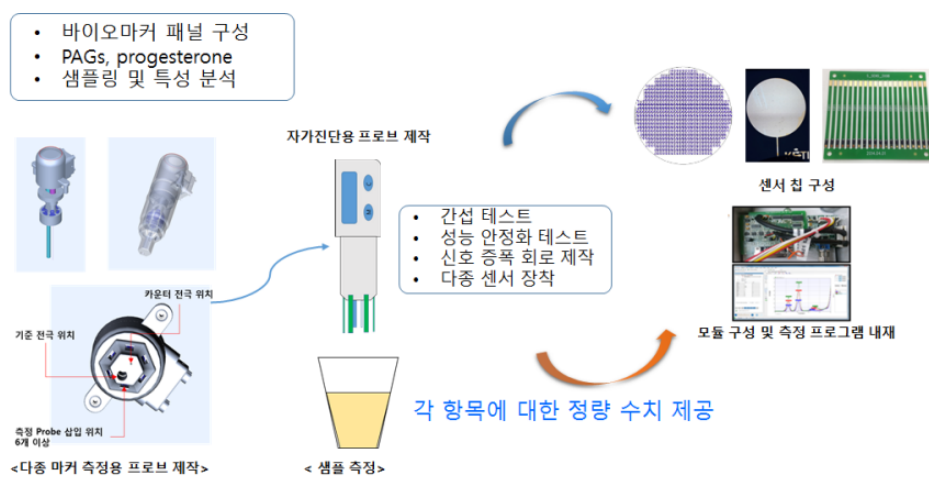


그림 3. 바이오센서 개발 모식도.

- 전기식 바이오센서를 기반으로한 현장 진단형 임신진단기 개발.



그림 4. 바이오전극 센서 개발 모식도

3. 가축에서 조기 임신 진단의 필요성

○ 경제적 중요성

- 한우에서 공태기를 30일 줄이면 10마리당 1마리의 송아지 추가 생산이 가능하며 ‘17년 예상 가임암소가 80만두로 급감하고 있는 상황에 연간 8만두 이상의 송아지 추가 생산이 가능하며,
- 한우 가격 안정과 생산 기반 확보에 반드시 필요한 기술로서 송아지 생산액으로 약 2,400억원의 경제적 효과가 있다. (참고: 2000년 가임암소 두수가 80만두로 감수되었다가 회복하는데 10년 이상 소요)
- 현재, 임신진단은 전문 의사에 의해 실시되지만 본 기기 개발 시 연간 30억 이상의 경제효과를 가진 기업을 창출 할 수 있음.
 - ☞ 향후, 외국으로 수출 할 경우 추가적인 경제효과가 발생할 것으로 생각됨.
- 한우 임신 미확인으로 인한 발정 1주기(21일) 임신 지연에 따른 손실은 241,878원(‘18년 농림업농계자료 송아지생산비)으로 가임암소 120만두(‘18년)에서 1회차 임신을 40% - 60%로 보고하고 있음(박 등, 2010; 김 등, 2014)
- 기존 직장검사(60일)에 비하여 본 기기를 이용하여 30일 경에 임신 확인을 한다면 1개월 이상 빨리 임신검사가 가능하여 다음회 인공수정을 1주기 정도 단축 시킨다면 현재 가임암소 중에서 30% 암소에서 2차 수정이 들어간다면 연간 870억의 경제적 이익 발생 가능함.
- 혈액을 이용한 간편한 임신진단이 체계화 된다면 농가 생산성 향상에 크게 기여 할 것으로 판단됨.

○ 산업적인 중요성

- 본 과제에 적용하는 전기식 바이오센서는 이미 당뇨병 검사기기로 개발이 완료된 기술로서, 향후 각종 질병과 식품 오염 진단에 활용되는 기술로서 산업적 기여도가 아주 높은 기술임.

- 향후 농업분야에 적용 가능한 아주 중요한 원천 기술로서 활용은 매우 무궁무진함.

○ 학문적인 중요성

- 국외에서는 가축 임신진단을 위한 호르몬 검사법에 대한 연구는 많으나, 국내에서는 한우에서 임신관련당단백질(PAGs; Pregnancy Associated Glycoproteins)에 대한 연구 및 기술 개발에 대한 연구는 없는 실정임.
- 최근 연구 보고에서 소의 조기 임신진단에서 PAGs가 유효성이 높은 것으로 보고되고 있는 실정으로 한우에 대한 PAGs의 분포와 임신진단을 위한 기준 농도의 설정이 반드시 필요함.

○ 기술적인 중요성

- PAG-1을 이용한 ELISA 법은 개발되어 키트화되어 이용이 되고 있으나, 실험실에서 실시하여야 하며, 전문적인 교육을 받아야 하는 등의 사용상 어려움이 있음.
☞ 하지만, 본 전기식 바이오센서법은 이미 당뇨병 진단에 간편하게 이용되고 있으므로 가축에서도 손쉽게 활용이 가능하며 특히, 다른 분야로의 확산이 기대되는 기술임.
- 전기식 바이오센서법의 필요성과 장점
☞ 기존의 기술과는 다르게 분석 시간이 매우 빠르며(2분) 효용성(재현성)이 인정되는 방법으로, 현장에서 간편하게 사용 가능하고, 안정성 또한 매우 높은 기술임.

5. 연구개발의 필요성

▷ 농촌 신규 산업으로 ICT 기반 6차산업의 개발 필요

- 가축산업은 생산(1차산업)에서부터 육성·조련(2차산업), 레저(3차산업)까지 연계된 친환경적인 복합 산업으로 정부의 농업 ICT 기반 6차 산업 개발에 집중하고 있음.
- 현재 국내 축산은 각종 해외악성 전염병(구제역, 조류인플루엔자 등) 발생으로 축산 환경 급변으로 인한 생산 환경 열악 및 소비자의 소비 위축으로 성장에 제한
☞ 생산성향상 기술 개발 및 산업화 연구가 매우 절실히 필요한 실정임.
- 가축의 생산성 향상을 위하여 다음과 같은 기술개발이 절실함
 - ① 소, 말 등 가축의 번식에 발정기간은 길고 배란 시점 확인이 어려움
 - ② 조기임신진단은 한우 번식우 및 젖소 농가에서 생산성을 향상에 반드시 필요
☞ 공태기간이 지나치게 길어진 개체는 대개의 경우 도태시켜야 하므로 이에 따른 추가 손실이 발생한다. 따라서, 번식우의 정확하고 신속한 임신진단 또는 발정관찰이 농가 소득과 직결된다고 할 수 있음.
 - ③ 대기축의 전문 번식 수의사의 수가 적고 원거리에서 왕진을 해야 하므로 시공간적 제한이 있음
☞ 소 산업에서 조기임신진단은 한우에서 분만간격 단축을 통한 송아지 생산 증가, 공태기간

단축 및 적정 번식율을 보유하고 도태 하므로 농가의 생산성과 직결.

- ☞ 젖소에서 조기임신진단은 수입의 대부분을 차지하는 우유 생산량의 증가와 공태기간 단축 가능(1회 임신 실패는 \$640의 손실; Thurmond 등, 1990)
- ☞ 국내 말 산업의 육성과 저변 확대를 위한 생산성 증대를 위해서는 상기에서 제시한 배란검사, 임신진단 및 태아 생사 확인이 가능한 기기 개발이 반드시 필요한 실정임

- 임신진단을 위한 연구에서 소 및 돼지에서 P4 및 EIS의 검출로 임신 및 비임신 진단키트에 관한 연구가 있었으나 가격, 정확성 등의 문제로 상업화 되지 못함



그림 5. 전기식 바이오센서 응용분야

▷ 경제적 필요성

- 제품개발 및 판매 등을 통한 기대효과 : 165억의 매출 기대
 - ① 키트 개발 및 국내외 판매
 - ☞ 바이오센서 기기 판매 : 2,000천원 × 1천대 = 20억
 - ☞ 검사 키트 판매 : 5천원 × 100천세트 = 50억
 - ② 유럽 및 미국 등 수출 : 2,000천원 × 5천대 = 100억
 - ③ 기타 가축의 현장진단형 임신기 개발 및 판매 : 50억/년
 - ④ 본 기술개발은 동물의 임신여부 및 주수를 확인할 수 있는 현장 적용형 바이오센서 및 이를 판독할 수 있는 분석기기로서 임신여부 및 주수를 확인할 수 있는 바이오센서와 이를 판독할 수 있는 분석기기로 나뉘어져 있음.
 - ⑤ 임신을 비롯한 진단기기 분야에서는 세계적으로 다른 분야에 비하여 바이오센서를 바탕으로 한 분야의 제외진단 규모가 2009년에 비하여 2014년 14%로 다른 분야(면역진단, 혈액진단) 보다 성장률이 높을 것으로 예측 되고 있어(Kalorama information, 2010), 이 분야에 대한 연구와 산업적 적용이 필요함

- 가축의 임신진단 등 활용으로 연간 경제적 이익 및 매출액 400억 이상 가능 (기술개발 3년 후)

제 2 절. 연구개발의 중요성 및 차별성

코드번호

B-04-03

□ 가축에서 임신진단 중요성

○ 가축의 생산성 향상을 위해서는 기본적으로 조기임신진단 등의 기술개발이 절실함

- 소, 말 등 가축의 번식에 발정기간은 길고 배란 시점 확인이 어려움
- 조기임신진단은 한우 번식우 및 젖소 농가에서 생산성을 향상에 반드시 필요 :
 - ▷ 공태기간이 지나치게 길어진 개체는 대개의 경우 도태시켜야 하므로 이에 따른 추가손실이 발생한다. 따라서, 번식우의 정확하고 신속한 임신진단 또는 발정관찰이 농가소득과 직결된다고 할 수 있다.
- 대가축의 전문 번식 수의사의 수가 적고 원거리에서 왕진을 해야 하므로 시공간적 제한이 있음
 - ▷ 산업에서 조기임신진단은 한우에서 분만간격 단축을 통한 송아지 생산 증가, 공태기간 단축 및 적정 번식우를 보유하고 도태 하므로 농가의 생산성과 직결.
 - ▷ 젖소에서 조기임신진단은 수입의 대부분을 차지하는 우유 생산량의 증가와 공태기간 단축 가능(1회 임신 실패는 \$640의 손실; Thurmond 등, 1990)
 - ▷ 국내 말 산업의 육성과 저변 확대를 위한 생산성 증대를 위해서는 상기에서 제시한 배란검사, 임신진단 및 태아 생사 확인이 가능한 기기 개발이 반드시 필요한 실정임

○ 소에서 조기 임신진단 방법으로는 초음파검사와 PAG 검사법이 가능하지만 초음파검사는 장비 가격 및 수의사이외에는 사용할 수 없고, PAG 검사법은 국내에 개발되어 있지 않음.

진단법종류	축종	시기	활용	참고
직장검사	소, 말	수정 후 40일 이후	수의사	30천원/두
초음파검사	소, 말	수정 후 30일 이후	수의사	30천원/두, 장비 15백만원
도플러법	돼지	수정 후 30일 이후	농장, 수의사	장비 2-3백만원
호르몬(프로게스테론)	소, 말	수정 후 30일경	미활용	녹십자, 축과원('99-'00)
호르몬(EIS)	돼지	수정 후 20일경	미활용	한동대('07-'09)
Marepreg. test	말	수정 후 110-300일	판매(미국)	\$37, 98% 정확도
PAG 검사	소	수정후 30일 경	판매(미국)	IDEXX 사

□ 한우에서 PAGs 진단 기술 및 임신기간 중 수준 확립 중요성

○ PAGs(Pregnancy Associated Glycoproteins) 란?

- 포유동물의 태반에서 분비되는 아스파르트릭 펩티다아제의 다중유전자군으로서 임신기간 중에 다양하게 분비된다(Batler et al., 1982). 소에서는 PAG gene은 22개의 유전자가 보고되고 있다(PAG-1 ~ PAG-22).
- PAG-1 유전자는 다양한 포유동물의 태반에서 분비되는 trophoblastic 단백질이다. 이 유전자는 placetogenesis, 태아-모체 연결 재구성과 착상에 중요한 역할을 한다(Jerome et al., 2011). 특히 수정후 3-4주경에 모체에서 검출이 가능하다(Zoli et al., 1992), 즉 태아 존재의 중용한 인식 신호로서 간주 된다(Garbayo et al., 2008).
- PAG-1은 착상 단계인 임신 25일째부터 모체의 혈액 내에서 검출이 가능하다. 이후 농도가 서서히 상승하여 분만 직전에 최고치로 상승한다. bPAG-1 농도는 임신 암소의 혈액에서 임신 15-35일 상승을 시작하며 임신 26-30일 경의 농도는 임신으로 확인이 가능한 수준에 도달한다(Zoli et al., 1992).
- bPAG-1의 농도 분석은 RIA 또는 ELISA 법으로 가능하며, bPAG-1 단클론항체를 사용할 경우는 민감도를 높일 수 있다. 이들 단클론 항체는 binucleate trophoblast 세포에서 분비되어 수정 후 28일 후에 검출 된다.
- 특히, bPAG-1 단클론항체는 반감기가 평균 4.3일로 짧아서 배아사 또는 태아사에 대한 측정과 태아 생존 검사에도 활용이 가능하다. 즉, 수정후 35일째 bPAG-1의 농도는 태아사에 대한 예측 모델로 활용 가능하다(Lopez 등, 2007).
- 따라서, 한우에서 bPAG-1의 임신주기에 따른 적정 농도를 확립한다면 향후 조기임신 진단 뿐만 아니라 태아의 유산, 사산 등에 대한 빠른 판정으로 생산성 향상에 많은 기여를 할 것으로 기대된다.

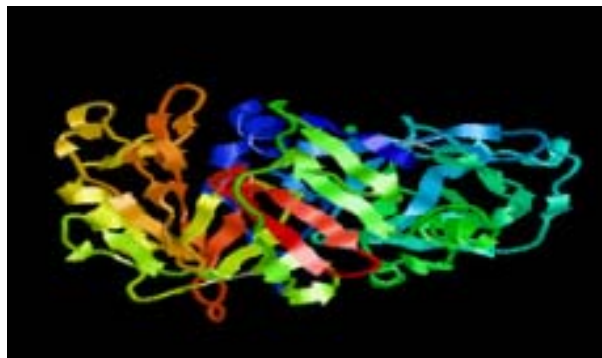


그림 6. Bovine PAG-1 구조>

□ 기존 임신진단 키트 대비 개발하고자 하는 최종 기기의 효율성

○ 기존의 임신진단 키트는

- 기존 기술은 대부분 스트립 (lateral flow assay) 방식의 면역 분석으로 저농도에서 정확도, 신뢰도가 낮고 고농도에서 역시 한계치 이상 진단이 되지 않는 장점이 있으므로 측정 영역의 확대를 위하여 주로 ELISA 방식을 주로 사용함.
- ELISA 방식은 항체 고정화, 검사 항체 효소 고정화, 세척 및 흡광도 측정 등 다수의 노동력과 장비가 필요하며 전문가에 의한 검진만이 가능함으로 높은 정확도에 비해 현장 검사에 어려움이 존재함.
- 형광 방식의 assay 역시 샘플 전처리의 어려움과 고가의 광학 측정 장비가 필요한 단점.
- 본 기술의 특징은 시료가 전개되면서 전기적, 자동적으로 면역반응이 일어나도록 고안하므로 전문가의 도움 없이 현장에서 결과를 도출할 수 있는 이동 가능한 진단 플랫폼의 형태로 개발될 것이며, 향후 타가축의 임신진단 기기 개발에 기본 바탕으로 활용 가능

□ 산업적 중요성

○ 대가축의 조기 임신/비임신 진단의 중요성

- 교배 또는 인공수정 후 임신진단을 빨리 진단하면 할수록 생산성 향상으로 소득과 직결.
- 기존에는 초음파 검사를 하고 있으나 초음파 장비의 가격이 비싸고, 전문교육을 받은 전문가들이 활용 가능하므로, 농가에서 임신 여부를 판단하기는 어려움.
- 말 및 소의 번식 전문 수의사의 부족에 따른 관리 부재로 생산효율이 낮아 질 수 있음

○ 임신을 비롯한 진단기기 분야에서는 세계적으로 다른 분야에 비하여 바이오센서를 바탕으로 한분야의 체외진단 규모가 2009년에 비하여 2014년 14%로 다른 분야(면역진단, 혈액진단) 보다 성장률이 높을 것으로 예측 되고 있어(Kalorama information, 2010), 이 분야에 대한 연구와 산업적 적용이 필요함.

□ 전기식 바이오센서 개발 현황

○ 기술현황 및 제품

- 전기화학 기반의 면역 센서로는 최초로 Abbott I STAT 제품이 시장에 출시되어 다양한 형태의 카트리지 제품이 동시에 출시됨.
- 이는 카트리지 형태의 전기화학 센서로 구성되어 있으며 hand held type 의 전기화학 플랫폼 러디기로 구성되어 있는 것이 특징임.
- 하지만 대부분 혈액가스, 심혈관 질환용 타겟 마커가 주를 이루고 있으며 가축 임신 진단용 칩과 플랫폼은 개발된 사례가 없음.



그림 7. Abbott I STAT 제품과 카트리지 모습 및 측정 타겟 마커

□ 연구개발 기술의 혁신성

- 전기화학 기반의 면역 센서로는 최초로 Abbott I STAT 제품이 시장에 출시되어 다양한 형태의 카트리지 제품이 동시에 출시됨 이는 카트리지 형태의 전기화학 센서로 구성되어 있으며 hand held type 의 전기화학 플랫폼 러디기로 구성되어 있는 것이 특징임 하지만 대부분 혈액가스, 심혈관 질환용 타겟 마커가 주를 이루고 있으며 가축 임신 진단용 칩과 플랫폼은 개발된 사례가 없음.
- 현재 플랫폼 및 카트리지에 대한 지식재산권은 전자부품연구원에서 출원·등록한 것이 유일하며 이는 타겟 단백질 측정 장치 및 방법 (1016119780000), 요당 감지기판 (1020150073782), 불순물 차단 구조의 당 검출용 전극체 및 이를 적용한 당 검출 센서 (101472990000) 등이 대표적임.
- 주로 기질과 효소와의 반응성을 고려한 용액 상의 반응 관련 특허가 주를 이루고 있으며 대표적으로는 단백질 분해효소 검출센서 (1016334730000), 전자전달매개체의 산화환원 순환을 이용한 바이오센서 (1020150118894), 산화환원 순환을 이용한 바이오센서 (1014334730000), 형광 공명 에너지 전이면역 분석법을 이용한 항원 검출 방법 (1014739540000) 등이 있음.
- 고감도 측정을 위하여 PMT 광학계를 이용한 전기화학 발광 방식의 면역 플랫폼 개발 및 구조 특허가 상당 수 존재하지만 본 과제 개발과는 연관성이 다소 부족함

□ 기존 기술과의 차별성

- Lateral flow assay 방식의 면역 분석법
 - ☞ 저농도에서 정확도, 신뢰도가 낮고 고농도에서 역시 한계치 이상 진단이 되지 않는 단점
- ELISA 방식
 - ☞ 항체 고정화, 검사 항체 효소 고정화, 세척 및 흡광도 측정 등 다수의 노동력과 장비가 필요.
 - ☞ 전문가에 의한 검진만이 가능함.
 - ☞ 높은 정확도에 비해 현장 검사에 어려움
- 형광 방식의 assay
 - ☞ 샘플 전처리의 어려움과 고가의 광학 측정 장비가 필요
- 바이오전극센서
 - ☞ 현장진단기술은 도입기로서 면역분석법 등에 비하여 성장률이 높고 향후 질병 및 진단 분야의 주요 자리 잡을 것으로 판단
 - ☞ 현장 진단 기술은 다양한 질병 진단 분야에서 시도되고 있으며 현재 전세계적으로 도입기에서 성장기로 진출하고 있음
 - ☞ 반도체 재작 기술의 발달로 국내 생산이 용이
 - ☞ 반복 재사용이 가능하므로 경제적

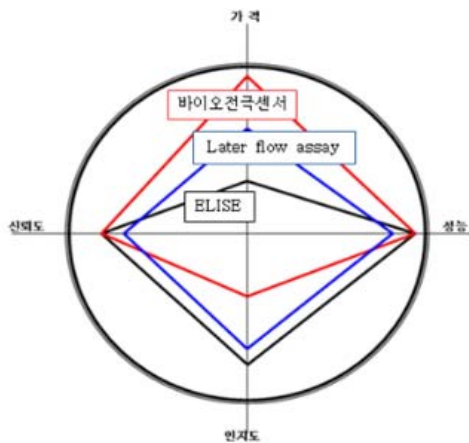


그림 7. 기존 진단장비 비교

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 논문 및 특허분석

1. 특허분석

가. 분석범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	전기식 바이오센서를 이용한 가축의 임신진단법 개발 및 상용화	
Keyword	소, 임신, 단백질	
검색건수	255	
유효특허건수	17	
핵심특허 및 관련성	특허명	Early pregnancy diagnosis using PAGs
	보유국	유럽
	등록년도	2012
	관련성 (%)	40
	유사점	소에서 임신관련 당단백질인 PAGs를 이용한 조기임신진단법, PAG를 검출하기 위한 면역학적기술 개발
	차이점	검출 기술 측면에서 본 연구는 전기적 방법으로 이전 연구의 면역학적 방법과는 차이가 크다

2. 논문분석

가. 분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		임신단백질 분석
Keyword		Pregnancy, PAG, placenta, bovine
검색건수		54
유효논문건수		13
핵심논문 및 관련성	논문명	The establishment of ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins(PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers
	학술지명	Theriogenology
	저자	Green et al.
	게재년도	2005
	관련성(%)	40
	유사점	임신 암소 및 초임우의 혈청에서 임신관련당단백질(PAG)를 검출 및 농도 확인을 위하여 ELISA 기법을 확립
	차이점	본 논문은 단순히 소에서 임신확인을 위한 면역항체법을 시험한 것으로, 본 연구에서 추진하고자하는 PAG 항체 생산과 이를 이용한 전기적 바이오 센서와는 차이가 있으며, 따라서 본 연구의 기초 연구와는 유사점이 있음

제 2 절. 국내·외 기술개발 현황

코드번호

B-04-02

1. 임신진단 기술

○ 가축의 임신진단 방법 및 활용 현황

진단법종류	축종	시기	활용	참고
직장검사	소,말	수정 후 40일 이후	수의사	30천원/두
초음파검사	소,말	수정 후 20일 이후	수의사	30천원/두, 장비 15백만원
도플러법	돼지	수정 후 30일 이후	농장, 수의사	장비 2-3백만원
프로게스테론	소,말	수정 후 30일경	미활용	녹십자, 축과원, (' 99-' 00)
호르몬(EIS)	돼지	수정 후 20일경	미활용	한동대('07-' 09)
Marepreg. test	말	수정 후 110-300일	판매(미국)	\$37, 98% 정확도
PAG 검사	소	수정후 30일 경	판매(미국)	IDEXX 사

○ 기타 호르몬 검사법을 활용한 임신진단 시약 및 기기가 판매

- IDEXX PAG-1을 이용한 소 임신진단 서비스(Elisa 법)
- 분석 전문 회사에서 혈액 분석을 통한 임신진단 서비스(Vststream 사)
- PMSG 검출을 통한 자가 임신진단 키트(PregnaMare)
- 말의 태아 생존 여부 검사 키트(Wee foal checker)

○ 임신진단법 국내 개발 수준

- 소 임신진단 : 혈중 프로게스테론 정량법을 이용하여 한동대(김종배교수)와 두산이 공동 연구하여 녹십자에서 진단용 키트 개발 하였으나 현재 중단된 상태
- 돼지 임신진단 : 뇨에서 EIS 검출 및 키트화 연구를 본 연구 협동연구책임자(박용수교수)가 참여한 한동대 연구팀에서 개발 하였으나, 제품 생산 단가와 적용이 불편하여 중단된 상태
- 가축의 혈액내에 임신관련 호르몬 검출법은 일부 실험실에서 RIA 또는 ELISA 법으로 정량 연구를 하였으나 현재는 중단된 상태 한우에서 PAGs 의 수준에 관한 연구는 없었음

○ 국내 개발된 임신진단 키트 (좌; 제네디아프로테스트, 우; 한동대 개발 뇨의 EIS 검출 키트)



그림 8. 임신진단키트 제품현황

❖ 기술의 단점 및 사용하지 않는 이유

기존 항원항체 테스트기는 연구에서 키트 개발 단계까지는 발전 하였으나, 사용하기 어렵고 제품생산 가격 등의 원인으로 현재 생산 및 활용 되지 않고 있는 상황임

○ 경쟁기관(전문기관 및 연구기관)

- 한동대 : 뇨중 대사산물을 이용한 임신진단 돼지 분야 연구를 하였으나 중단
- 축과원 : 비임신진단 키트로서 프로게스테론을 이용한 면역학적 진단기를 개발 하였으나 연구 중단
 - ☞ 태반단백질 키트를 이용하여 한우와 젃소의 조기 임신진단 연구(류 등, 2015)를 발표 하였으나, 본 연구는 실험실 수준에서 초음파 임신진단과 비교 하였으며, 임신 2.532-3.532ng/ml의 수치를 보고하였다.

2. PAGs 분석 및 연구 분야

- bovine PAG는 PSP-B(Pregnancy-specific protein B), PSP-60(Pregnancy serum protein 60), PAG를 모두 포함하는 것으로 각각의 아미노산기의 종말 시퀀스가 유사하여 통칭한다. 1982년 Butler 등이 PSP-B, 1994년 Mialon 등이 PSP-60, 1991년 Zoil등이 PAG에 대하여 보고하였음.
- 임신 번식우와 초임우에서 임신기간 중의 혈중 PAGs 농도 보고(Green 등, 2005)
- PAG-1의 염기서열 분석(Ozoje 등)
- PAGs를 이용한 임신진단 키트 개발 및 판매(IDEXX 사 등)

3. 지식재산권현황

- 현재 플랫폼 및 카트리지에 대한 지식재산권은 전자부품연구원에서 출원·등록한 것이 유일하며 이는 타겟 단백질 측정 장치 및 방법 (1016119780000), 요당 감지기판

(1020150073782), 불순물 차단 구조의 당 검출용 전극체 및 이를 적용한 당 검출 센서 (101472990000) 등이 대표적임

- 주로 기질과 효소와의 반응성을 고려한 용액 상의 반응 관련 특허가 주를 이루고 있으며 대표적으로는 단백질 분해효소 검출센서 (1016334730000), 전자전달매개체의 산화환원 순환을 이용한 바이오센서 (1020150118894), 산화환원 순환을 이용한 바이오센서 (1014334730000), 형광 공명 에너지 전이 면역 분석법을 이용한 항원 검출 방법 (1014739540000) 등이 있음
- 고감도 측정을 위하여 PMT 광학계를 이용한 전기화학 발광 방식의 면역 플랫폼 개발 및 구조 특허가 상당 수 존재하지만 본 과제 개발과는 연관성이 다소 부족함
- 본 연구관련 유사한 지식재산권은 한동대, 축과원등이 있으나, 바이오센서를 이용한 단백질 특허권을 본 연구에서 출원하여 원천기술 확보하여 지적재산권 확보할 예정임.

4. 전기식 바이오센서 개발 현황

- 기술현황 및 제품
 - 전자부품연구원에서는 전기식 센서 기반의 반복 측정 가능한 디지털 노당계를 개발하여 기술이전 및 상용화를 위한 식약처 등록을 수행하였으며 상용화를 위한 추가 최적화 작업을 수행하고 있음.
 - 전기식 노당 센서와 더불어 케톤 센서 개발을 위한 연구 개발을 수행하고 있으며 이를 위한 복합 센서 개발을 구상 중에 있음.



그림 9. 휴대용 전기식 바이오센서 플랫폼

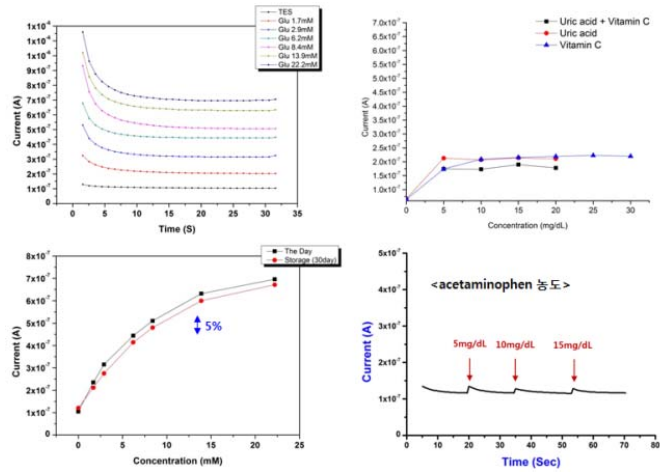


그림 10. 전기식 바이오센서 플랫폼 재현성

제 3 절. 국내 · 외 제품 및 시장 현황

코드번호	B-04-02
------	---------

1. 제품 현황

1) 국내 제품 현황

○ 없음

2) 국외 제품 현황

○ IDEXX사에서 실험실 차원의 임신진단기 개발 및 판매(IDEXX사 홈페이지)

- ✓ 키트 1샘플에 \$399로서 약 50만원 약90두 검사가 가능하여 약5천원으로 임신진단이 가능하지만 실험실로 혈액을 운반해야 하는 문제점이 있음.



✓ FASSISI사에서 농가 단위 임신진단기 개발 및 판매(FASSISI사 홈페이지, 독일)



2. 시장 현황

○ 국내 시장 현황

- 임신진단 관련하여 현재는 전문 수의사들이 시장을 장악하고 있으나, 수의학과 졸업생의 관련 분야로의 진출 기피 등으로 양질의 수의진료 서비스를 받기 어려워지는 상황에서 생산 농가 단위에서의 1차적인 자가 임신진단의 필요성이 증가하고 있음
- 국내 적용 가능한 기술은 초음파 기기는 사용이 가능하나 가격이 비싸고 전문적인 교육을 받아야 하고, 국내 개발 활용 되고 있는 키트는 없는 상황임.

○ 소의 경우 유럽을 중심으로 ELISA를 이용한 키트를 사용하고 있음.

- IDEXX 사의 소 임신진단 키트(IDEXX Bovine pregnancy Test)

대상 축종 : 소, 염소, 양, 버팔로

방법 : 혈액 또는 우유 내의 bovine PAG 검사

검사 시기 및 정확도 : 소(28일, 99%), 양(35일, 98%), 염소(28일, 100%), 버팔로(30일, 100%)

문제점 : 실험실 수준에서 검사(2시간 이내에 결과 통보)

Fassisi bovipreg(독일)

축종 : 소

방법 : 혈액의 bPAG 검출

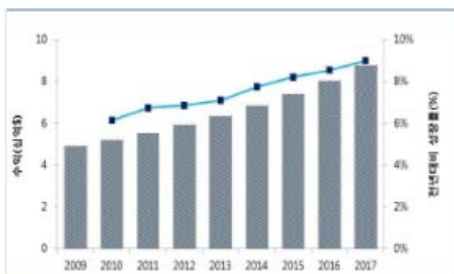
시기 : 수정후 30일, 정확도 99%



○ 경쟁기관

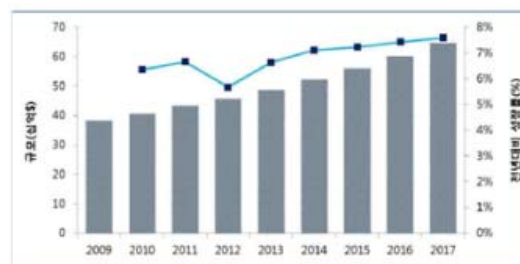
- IDEXX 사 : 임신진단용 실험실 ELISA 키트 판매
- FASSISI 사 : PAG 이용 임신진단 키트 판매

○ 시장규모



※ 출처 : Frost&Sullivan, Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market(2013)

- 재택검사형진단(POCT) 전체 IVD 시장의 13%를 차지하며 59.2억 달러 규모를 형성하고 있음. (680,800,000천원)
- 2017년까지 87.4억 달러 8.1%의 성장률을 보일 것으로 전망됨
- 한국 POCT 진단 시장규모는 전세계의 2%를 차지하고 있으며 (국내 시장규모 약 2400억~2013년도)
- 2017년도 예상 성장률 (약 2,400억원)
- 2017년도 예상 성장률 10%점유를 목표로 연구개발 투자 및 사업확대를 계획하고 있음. (POCT 진단분야)
- Top 3 업체 Alere, Roche, Siemens 비에 작은 시장 규모로 시장매력도가 낮은 상황으로 기술선점을 통한 시장진출이 가능함



※ 출처 : Frost&Sullivan, Analysis of the Global In Vitro Diagnostics Market(2013)

- 세계 체외진단시장은 2012년 456.8억 달러 규모에서 2017년 646.5억 달러 규모로 성장할 전망 (CAGR : 7.2%)
- 면역화학적진단(Immunochemistry) 시장이 전체 IVD 시장의 41.1%, 187.6억 달러 규모를 형성하고 있으며 2017년도에는 264.7억 달러 규모로 성장할 것으로 예상됨.
- 이에 본 기술개발을 통해 POCT 진단뿐만 아니라 면역화학적진단분야로 진출을 확대해 시장확대 및 매출증대를 이룰 수 있을 것으로 예상됨.
- 농업분야의 질병, 병충해 및 식품분야의 오염, 독극물 검사 등으로 진단범위 확대 가능

그림 11. 시장규모

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발 목표

1. 최종목표

구분	내용	코드번호	B-05-01
최종목표	전기식 바이오센서를 이용한 가축의 임신진단법 개발 및 상용화		
세부목표	<p>□ 전기식 바이오센서 설계</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ PAG 종류에 따른 전기식 바이오센서 전극과 회로 설계 ▪ PAG 농도 검출 시스템 설계 및 센서 개발 ▪ 전기식 바이오 전극센서 회로 설계에 필요한 항체 제작 ▪ 센서 안정화를 위한 단백질 고정화 및 표면처리 ▪ 상용화를 위한 시스템 설계 및 플랫폼 제작 ▪ 프로게스테론 및 PMSG 등의 진단 센서 설계 ▪ PAGs, 프로게스테론, PMSG 및 에스트로겐 등 호르몬과의 복합 진단 회로 설계 <p>□ 현장진단형 기기 설계, 개발 및 상용화</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 전기식 회로를 바탕으로한 진단기 설계 ▪ 측정 보드, 회로 및 알고리즘 개발 : 시스템 모니터링 SW 개발 ▪ 사용자 인터페이스 SW 개발 ▪ 시스템 integration 및 설계 테스트 -> 시제품 제작 및 상용화 ▪ 다양한 종류의 호르몬을 종합 검출 가능한 기기 설계 ▪ 임신진단기의 대량 생산 시스템 구축상용화 모델 개발 <p>□ 한우에서 임신관련 단백질의 정성 및 정량 분석을 통한 현장 응용기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석 <ul style="list-style-type: none"> - 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작 - 임신 및 비임신 한우의 태반 또는 혈액을 이용한 전체 유전체 서열 비교 분석 - 비교 분석을 통한 특이적인 변이 단백질 발굴 및 바이오 마커 개발 ▪ 한우 임신기간 중의 PAG 또는 특이 단백질의 농도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 임신한우에서 1주단위(3개월 이전) 및 2주단위(3개월 이후) 혈액을 확보 - 임신 혈액 확보 : 30두 * 20주 (1-2주 단위/임신기간) = 600샘플 이상 - 혈액의 단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석 - 전기식바이오센서의 실험실 단계의 효능 검증 ▪ 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교 <ul style="list-style-type: none"> - 기기의 현장 실증시험(200두 이상) 		

2. 연차별 개발목표 및 내용

코드번호	B-05-02
가) 1차년도	
1) 개발 목표	
(1) 주관연구기관(미라클스코프(주))	
<u>소신호 고정밀 신호측정용 회로 및 알고리즘 개발 및 평가용 지그 제작</u>	
<ul style="list-style-type: none">▪ 경쟁사 제품 조사 및 개발사양▪ 제품 개념 설계▪ 소신호 고정밀 신호측정용 회로 설계▪ 바이오센서 센서 평가용 지그 제작	
(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)	
<u>측정에 필요한 진단 카트리지 개발 및 다중 바이오센서 진단용 디바이스의 회로 제작</u>	
<ul style="list-style-type: none">▪ 사용자 인터페이스 및 S/W 제작▪ 휴대용 및 고정형 디바이스 시제품 설계▪ 1차 시제품 생산(1종 분석형)특성 평가▪ 반응성을 고려한 전극 설계 및 제작▪ 효소-기질 간 반응 최적화를 위한 효소-기질 복합체 선정▪ 표준 물질을 통한 기본 테스트 수행	
(3) 참여기관 2 (국립한국농수산물대학)	
<u>임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발</u>	
<ul style="list-style-type: none">▪ 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석▪ 혈액의 태반단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석▪ 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작▪ 임신 및 비임신 한우의 태반 또는 혈액을 이용한 전체 유전체 서열 비교 분석	
2) 개발 내용 및 범위	
(1) 주관연구기관(미라클스코프(주))	

소신호 고정밀 신호측정용 회로 및 알고리즘 개발 및 평가용 지그 제작

- 경쟁사 제품 조사 및 개발사양 확정
- 제품 개념설계
- 소신호 고정밀 신호측정용 회로 설계
- 신호측정용 알고리즘 구현
- 바이오센서 센서 평가용 지그 설계 및 제작

(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)

측정에 필요한 진단 카트리지 개발 및 특성 평가

- 반응성을 고려한 전극 설계 및 제작
 - 1채널 PCB 칩 제작 및 고정화 영역 확인 (diameter 2mm 선정)
 - 전처리 공정 셋업 및 공정 별 반응성 확인
- 효소-기질 간 반응 최적화를 위한 효소-기질 복합체 선정
 - 최적 전압-전류 비 및 농도별 증감 곡선 확인
 - 효소-기질 간 반응성 확인 및 최적 조합 선정
- 표준 물질을 통한 기본 테스트 수행
 - 간섭 물질 영향성 확인 및 단백 마커 정량치 조건 확보
 - 표준 물질을 통한 전압 및 전류 레벨 평가

(3) 참여기관 2 (국립한국농수산물대학)

임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발

- 임신 한우 태반 및 혈액에서 PAG family의 정량 및 정성분석
태반단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석
 - 목적 : 임신 한우에서 PAGs 존재 확인 및 유전자 동정
 - 재료 : 임신 한우 태반 및 혈액 확보
 - 임신 30일령 태반 확보 : 임신 확인 후 조기 유산 유도
 - 임신 25일 - 40일령 1일간격 임신 한우의 혈액 확보
 - 방법 : Telugo 등(2009) 의 방법을 준용하여 시험
 - 확보된 시료는 PAG 정량 및 변이 단백질 발굴 등에 사용
 - 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴
- ① 임신 및 비임신 한우의 태반 또는 혈액을 이용한 전체 유전체 서열 비교 분석

- 정성분석

- ✓ 흡광도 측정과 전기영동패턴 이용을 기준
- ✓ 흡광도 260/280 ratio가 1.7~2.0 , 260/230 ratio가 1.5 이상
- ✓ 전기영동패턴은 1% agarose gel에 100 ng 시료와 1Kb 마커를 함께 로딩한 후, 겔도큐멘테이션 시스템을 사용하여 10Kb 이상 밴드가 뚜렷하게 보이는 시료를 선택함.

- 정량분석

- ✓ 형광농도를 측정함. 형광농도 측정은 double-strand DNA와 RNA의 농도를 측정하는 방법으로 형광농도 50ng/이상, 총량 10 ug이상을 적용할 예정.

② TruSeq Synthetic Long-Read DNA Library(TSLR) 기법을 이용한 라이브러리 제작

- 목적 및 장점 : TSLR기법을 이용할 경우 시퀀싱으로 도출된 리드의 길이가 길어 맵핑되지 않는 서열의 필터링이 줄고 서로간의 어셈블리도 용이하고, 긴 리드가 함께 생산됨으로써 유전자, 이동성 유전인자의 양측 서열의 정보를 포함하고 있어 정확한 맵핑이 가능함.

- 방법 :

- ✓ 선별된 시료를 원하는 사이즈로 절단, 정제한 후 Bioanalyzer high sensitivity kit(Agilent)으로 크기를 확인 TruSeq library sample prep kit(Illumina)을 이용하여 end repair, 3' overhang, adaptor ligation 처리 QIAQuick PCR purification kit으로 정제함.
- ✓ 전기영동을 통해 원하는 크기의 밴드를 잘라내어 정제
- ✓ PCR 증폭을 통해 라이브러리를 제작
- ✓ Bioanalyzer, qPCR 방법을 이용하여 라이브러리의 더욱 정확한 몰농도를 측정
- ✓ Illumina HiSeq2000/2500을 이용하여 시퀀싱을 진행
- ✓

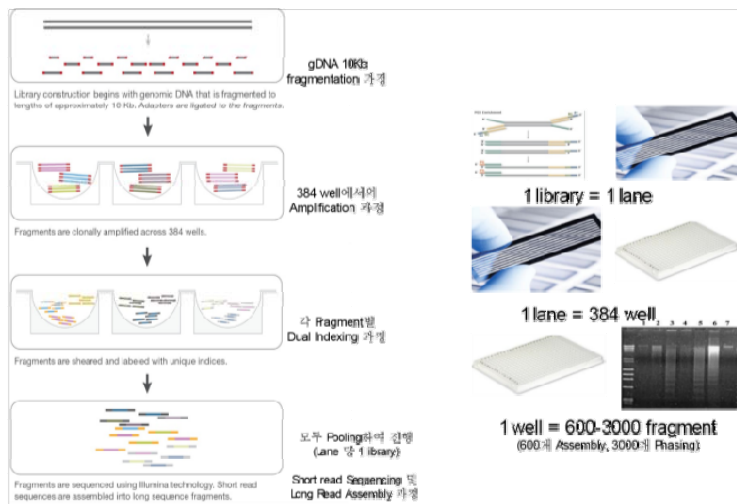


그림 12. TSLR 기법을 이용한 전유전체 서열 방법의 개요

③ 전체 유전체 서열 분석 (TSLR sequencing data 포함)

- 본 연구에서는 한우의 임신 여부에 따른 전유전체 시퀀싱을 TSLR 3X로 진행할 예정
- 정확한 한우 선도계놈을 구축하기 위해 아래의 표와 같이 다양한 사이즈의 라이브러리를 구축함.
- 단일 사이즈의 라이브러리가 아닌 다양한 사이즈의 라이브러리 구축을 통해 기존 re-sequencing의 낮은 정확성의 단점을 보완하고 염기서열 분석이 발생하는 Gap을 최소화하여 최대한 견고한 선도 계놈을 구축함.

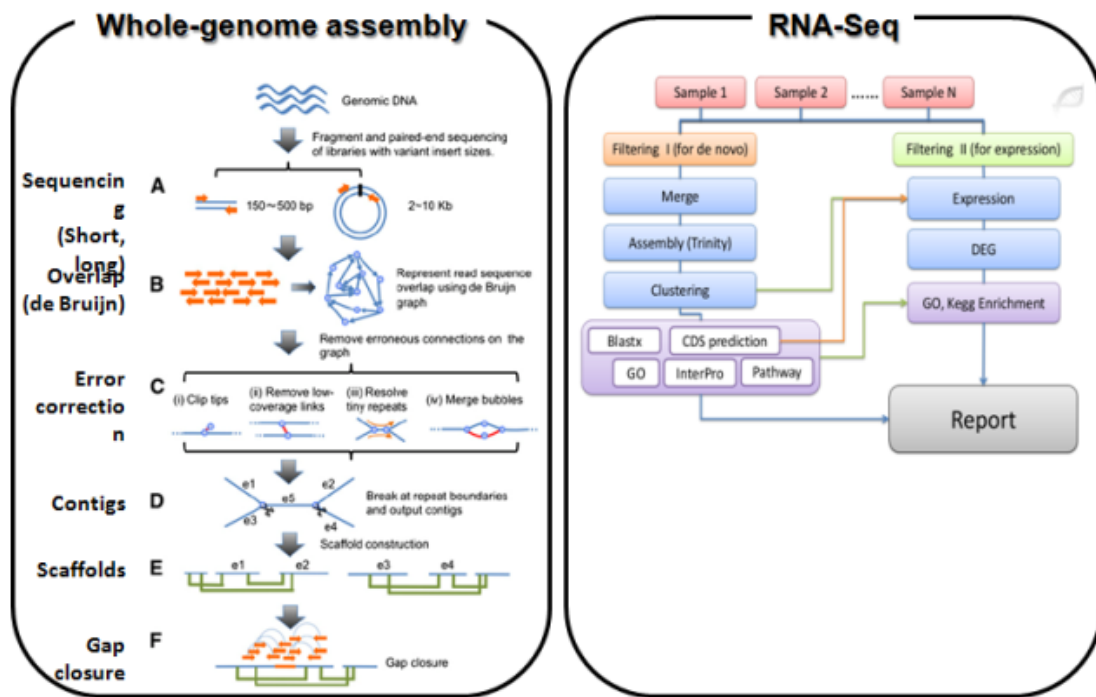


그림 13. 전체 유전체 서열 분석 라이브러리 조합

- 전기식 바이오센서 검출에 필요한 항체 확보
 - 1차 항체는 공개된 PAG-1 항체 구입 활용
 - 한우에 적합한 항체 확보를 위해서 한우에서 정제된 PAG를 확보하여 제작(2차년)

나) 2차년도

1) 개발 목표

(1) 주관연구기관(미라클스코프(주))

1종 분석형 1차 시제품 제작

- 바이오센서 진단용 디바이스의 회로 제작

- 사용자 인터페이스 및 S/W 제작
- 휴대용 및 고정형 디바이스 시제품 설계
- 1종 분석형 1차 시제품 제작

(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)

측정에 필요한 진단 카트리지를 개발 및 특성 평가

- 반응성을 고려한 전극 설계 및 제작
- 효소-기질 간 반응 최적화를 위한 효소-기질 복합체 선정
- 표준 물질을 통한 기본 테스트 수행

(3) 참여기관 2 (국립한국농수산대학)

임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발

- 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작
 - 임신 및 비임신 한우의 태반 또는 혈액을 이용한 전체 유전체 서열 비교 분석
 - 비교 분석을 통한 특이적인 변이 단백질 발굴 및 바이오 마커 개발
- 한우 임신기간 중의 PAG 또는 특이 단백질의 농도 조사
 - 임신한우에서 1주단위(3개월 이전) 및 2주단위(3개월 이후) 혈액을 확보
 - 혈액의 단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석
- 전기식바이오센서의 효능 검증
 - 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교

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

(1) 주관연구기관(미라클스코프(주))

1종 분석형 1차 시제품 제작

- 호르몬 단독 및 복합 진단 시스템의 설계
- 임신기간 호르몬 진단 디바이스 설계 및 디자인
- M/B 회로 및 PCB 제작 및 기구설계
- 측정 보드, 회로 및 알고리즘 개발 : 시스템 모니터링 SW 개발
- 사용자 인터페이스 SW 개발

- 1종 분석형 제품 디자인 및 기구설계
- 1종 분석형 1차 시제품 제작

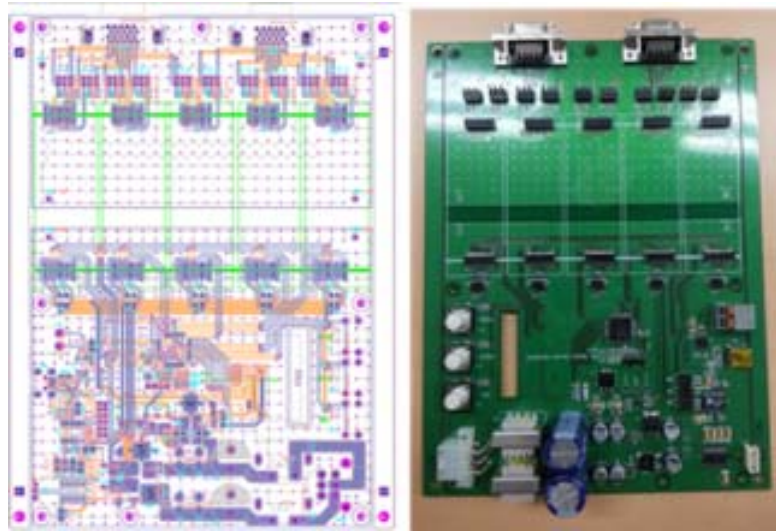


그림 14. 전기식 기관 회로도

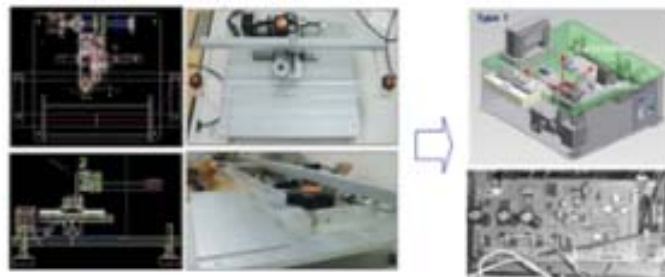


그림 15. 회로 및 디자인 설계 알고리즘

(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)

측정에 필요한 진단 카트리지 개발 및 특성 평가

- 반응성을 고려한 전극 설계 및 제작
 - 1채널 PCB 칩 제작 및 고정화 영역 확인 (diameter 2mm 선정)
 - 전처리 공정 셋업 및 공정 별 반응성 확인
- 효소-기질 간 반응 최적화를 위한 효소-기질 복합체 선정
 - 최적 전압-전류 비 및 농도별 증감 곡선 확인
 - 효소-기질 간 반응성 확인 및 최적 조합 선정
- 표준 물질을 통한 기본 테스트 수행
 - 간섭 물질 영향성 확인 및 단백질 마커 정량치 조건 확보

- 표준 물질을 통한 전압 및 전류 레벨 평가

(3) 참여기관 2 (국립한국농수산물대학)

임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발

- 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴 및 항체 제작

① 비교 분석을 통한 특이적인 변이 단백질 발굴 및 PAG 항체 개발

- 재료 : 1차년도 분리 동정한 한우 임신관련 PAG 또는 PAG-1

- 방법 : 항체 제작과정은 Green 등(2005)의 방법에 준하여 실시

② 한우 임신 및 비임신 개체 비교 분석을 통한 변이 단백질 발굴

- RepeatMasker program (<http://www.repeatmasker.org/>)을 이용하여 annotation을 완성

- Sequence들을 UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/index.html>)에 BLAT tool을 이용하여 참조 유전체의 Ortholog를 찾아서 비교함.

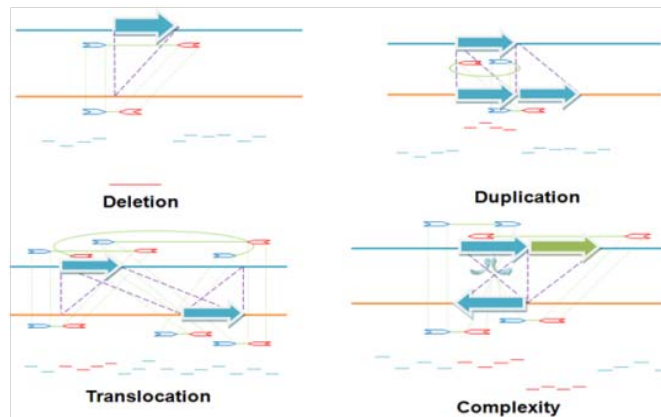


그림 16. 다양한 구조변이 분석

- 한우 임신기간 중의 PAG 또는 특이 단백질의 농도 조사

- 1차년도 확보된 임신한우의 혈액과 태반을 이용하여 임신기간 중의 PAG 또는 변이 단백질 농도 조사

- 혈액의 단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석

- 임신한우 혈액 샘플 확보

임신우 30두 * 20개(3개월 이전 10개, 3개월 이후 10개) = 600 샘플 이상

- 전기식바이오센서의 효능 검증

- 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교

- 재료 : 임신 기간별 혈액

- 방법 : 1차 - 임신 한우 혈액의 PAG 농도 분석 방법에 따른 정량 결과 분석

- 전기식 바이오센서 농도와 ELISA 또는 단백질 정량 결과와 비교
- 2차 - 한우 임신에 대한 유효 농도 결정 (PAG 5ng 미만 검출 기준 설정)
- 3차 - 임신 한우 PAG 적정 검출 시기 결정(30일 미만)

다) 3차년도

1) 개발 목표

(1) 주관연구기관(미라클스코프(주)) :

1종 분석형 시제품 제품 인증 및 다중 분석형 시제품 제작 및 평가

- 1종 분석형 최종 시제품 제작 평가
- 1종 분석형 시제품 기술문서 작성
- 1종 분석형 시제품 인허가 및 양산준비
- 다중 분석형 시제품제작 및 평가

(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)

플랫폼 시스템 시제품 제작 및 실험 수행

- 검출 프로토콜 확립 및 최적화, 예비 실험 수행
- 다채널 어레이 칩 제작 및 성능 평가 수행
- 시제품 제작 및 시험 수행

(3) 참여기관 2 (국립한국농수산대학)

임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발

- 전기식바이오센서의 효능 검증
 - 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교
- 기타 가축 임신진단을 위한 바이오센서 제작을 위한 항체 확보
 - 소(프로게스테론), 말(PMSG) 등

2) 개발 내용 및 범위

(1) 주관연구기관(미라클스코프(주))

1종 분석형 시제품 제품 인증 및 다중 분석형 시제품 제작 및 평가

- 1종 분석형 최종 시제품 제작 평가
- 1종 분석형 시제품 기술문서 작성
- 1종 분석형 시제품 인허가 및 양산준비
- 다중 분석형 시제품제작 및 평가-
 - 다중분석형호르몬 단독 및 복합 진단 시스템의 설계
 - 다중분석형임신기간 호르몬 진단 디바이스 설계 및 디자인
 - 다중분석형M/B 회로 및 PCB 제작 및 기구설계
 - 다중분석형 측정 보드, 회로 및 알고리즘 개발 : 시스템 모니터링 SW 개발
 - 다중분석형사용자 인터페이스 SW 개발
- 휴대용 임신진단기의 대량 생산 시스템 구축

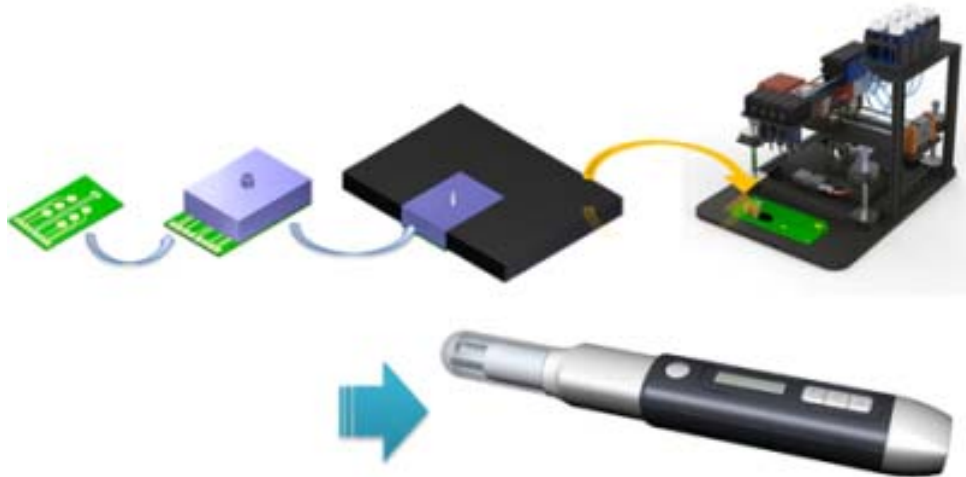


그림 17. 바이오센서 구성, 카트리지 제작, 다중분석 가능한 시스템 개발 모식도

(2) 참여기관 1 (전자부품연구원)

플랫폼 시스템 시제품 제작 및 실험 수행

- 검출 프로토콜 확립 및 최적화, 예비 실험 수행
 - 다중 마커에 대한 최적 고정화
 - 고정화 프로토콜 확보 및 측정 최적화 작업 수행
 - 표준 검사법과의 비교 테스트 수행
- 다채널 어레이 칩 제작 및 성능 평가 수행
 - 어레이 칩 제작 및 성능평가 수행

- 민감도, 재현성, 교차 반응 수행
- 프로토콜 최적화 작업 수행

- 시제품 제작 및 시험 수행, 감도 테스트, cut-off 근처에서 민감도 테스트 수행
 - 시제품 제작 및 각 세부 요소 기술별 통합 플랫폼 설계

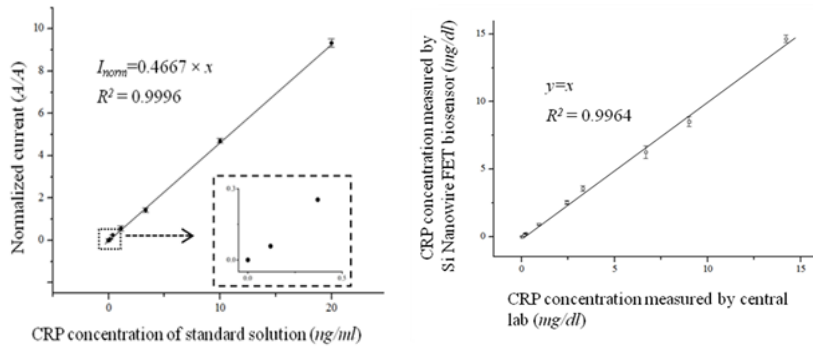


그림 18. 측정 치 직선성 확인 및 상관성 분석 예시

(3) 참여기관 2 (국립한국농수산물대학)

임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발

- 전기식 바이오센서의 효능 검증
 - 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교
 - 재료 : 임신 기간별 혈액 및 임신한우
 - 임신한우 혈액 샘플 확보: 임신우 20두 * 20개 = 400 샘플
 - 현장 시험 농장 : 10개소(20두 씩; 총 200두)
 - 방법 : 1차 - 임신 한우 혈액의 PAG 농도 분석 방법에 따른 정량 결과 분석
 - 전기식 바이오센서 농도와 ELISA 또는 단백질 정량 결과와 비교
 - 2차 - 한우 임신에 대한 유효 농도 결정 (PAG 5ng 미만 검출 기준 설정)
 - 3차 - 임신 한우 PAG 적정 검출 시기 결정(30일 미만)
 - 4차 - PAG 농도에 따른 임신 정확도 비교
 - (초음파 또는 직장검사 결과와 비교 95% 이상의 정확도)
 - 5차 - 농장 현장에서 다양한 연령 및 개체에 대한 임신진단 적용 시험
 - 6차 - 임신진단기의 디자인 및 효율적인 활용 체계 시험
- 한우 임신관련 단백질의 유전적 결함 여부 변이 검증
 - 다양한 한우 샘플에 대한 임신/비임신 한우 유전체 데이터를 검증

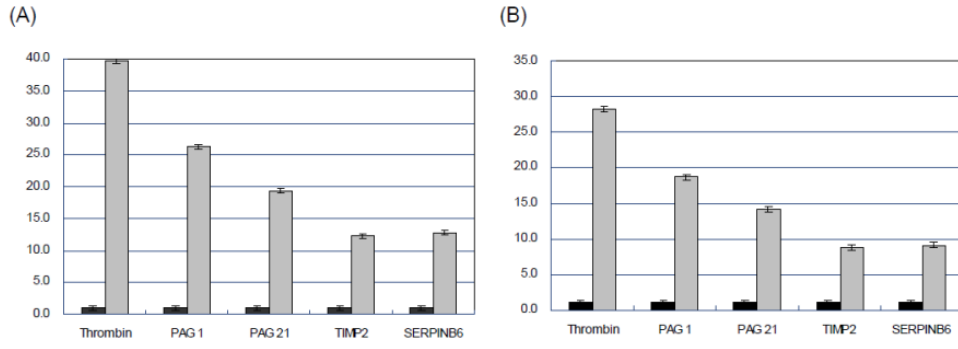


그림 19. 한우 임신 연관 유전자 발현량 조사

제 2 절. 연구개발 성과목표 및 평가방법

코드번호 B-05-03

○ 정량적 평가항목

평가항목 (주요성능 Spec.)	단위	세계최고수준	연구 개발 전 국내수준	개발 목표치			평가방법
		성능수준	성능수준	1차년도	2차년도	3차년도	
PAG-1	ng	-	-	제작	>5		전기적분석 유무
검출시기	30일	30일 이상	-	제작	30일 기준		98% 이상
측정시간	min	480	-	제작	10분 이내		실측확인
정확도	%	98%	-	-	-	98% 이상	초음파비교

(단위 : 백만원, 건수)

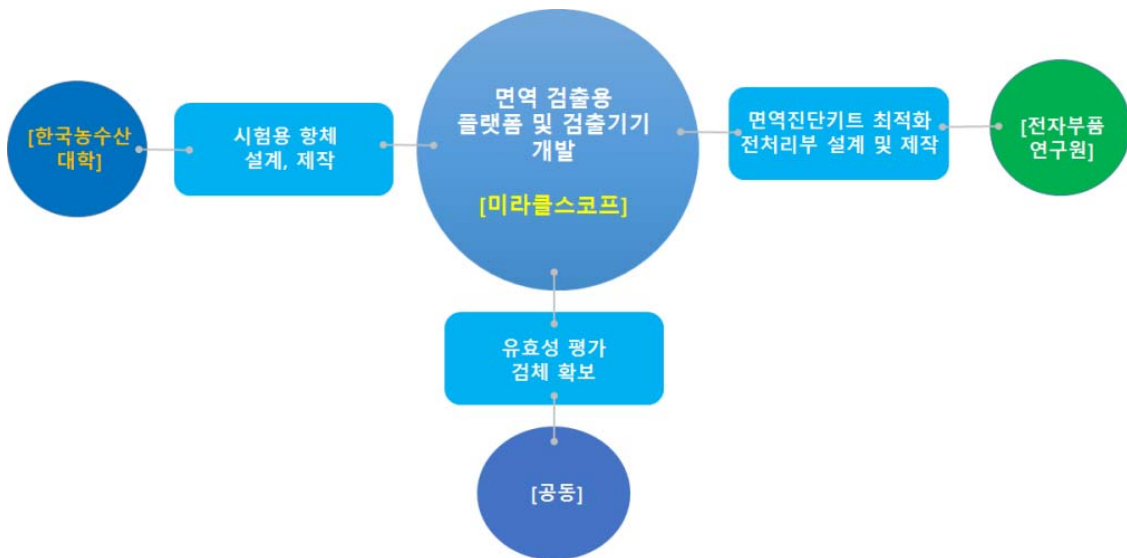
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	3	3			1	1		3			1	2	6			2			
1차년도	1							1				1	2						
2차년도	1							1				1	2			1			
3차년도	1	1			1			1			1		2			1			
소 계	3	1			1			3			1	2	6			2			
종료 1차년도		1																	
종료 2차년도		1				1													
종료 3차년도																			
소 계		2				1													
합 계	3	3			1	1		3			1	2	6			2			

제 3 절. 연구개발의 추진전략 · 방법

코드번호	B-06-01
------	---------

○ 참여기관별 역할

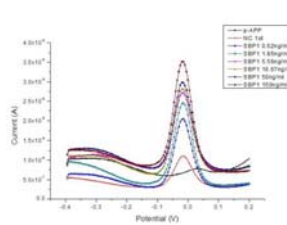
- 본 과제는 가축 임신 여부를 간편하게 측정하기 위하여 전기화학기반의 진단키트를 개발함과 동시에 정량을 위한 진단 플랫폼과 면역 검출용 항체 개발을 목표로 하고 있음. 이와 같은 진단기와 진단시약을 개발하기 위해 주관기관인 미라클스코프를 중심으로 센서 플랫폼을 개발하고 참여기관인 한국농수산대학이 면역 검출용 항체를 제작하고 항체를 탑재할 면역진단키트는 전자부품연구원에서 설계 · 제작함.
- 실험 수행 및 한우 번식 농가 2개소, 축산기술연구소에 테스트 베드 구축, 시범서비스를 통한 상용화 추진, 기술홍보를 위한 전시회 참관 및 기술 소개함.
- 본 제안기술은 전기식 진단 키트로 면역 부분에서는 전기화학식 센서를 기반으로 하여 목표 달성을 위해 주관기관 및 참여기관의 형태와 세부기술 구성 및 연계 연구를 수행함.





제 4 절. 연구개발 내용 및 결과

1. 연차별 연구개발 내용 및 결과

가. 1차년도

			코드번호	C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	소신호 고정밀 신호측정용 회로 개발 및 평가용 지그 제작	소신호 고정밀 신호 측정용 회로 설계 및 모듈 제작	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오 센서 구동 및 측정 원리 분석 • 소신호 고정밀 신호 측정용 측정 회로 설계 • 소신호 고정밀 신호 측정용 모듈 제작 • 측정 프로그램 및 알고리즘 구현 • 다채널 제어용 회로 설계 • 다채널 제어용 보드 제작 • 다채널 제어용 보드 프로그램 개발 • 통신 프로토콜 설계 및 프로그램 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오 센서 구동 및 측정 원리 기술 확보 • 소신호 측정 보드 확보 • 다채널 제어용 보드 확보
		평가용 지그 설계 및 시스템 제작	<ul style="list-style-type: none"> • 평가용 시스템 모델링 및 기구 설계 • 평가용 시스템 제작 • 평가용 시스템 UI(User Interface) 프로그램 개발 • 평가용 지그 제작 • 평가용 지그 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 평가용 시스템 확보 • 시스템 UI(User Interface) 확보 • 평가용 지그 확보
	카트리지 개발 및 회로 제작	카트리지 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 전극설계 및 제작 • 1차 시제품 특성 분석 • 디바이스 시제품 제작 • 효소-기질 복합체 선정 (AAP-PnPP) • 면역반응 프로토콜 확보로 전극내 고정화 공정 확보 • 표준 물질 테스트 • SBP-1 에 대한 배뇨 중 표준그래프 실험 및 결과 확보 (농도범위: 0.62 ~ 150 ng/mL) • 배뇨 중 저 농도에서 고 농도까지 전류신호 검출 가능여부 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> • 전극설계 완료 및 구성 • 시제품 제작 및 특성 분석 • 효소-기질 복합체 확보 • 항원-항체 반응을 통한 표준 그래프 확보 
회로 제작	<ul style="list-style-type: none"> • 사용자 인터페이스 및 SW 구성 	<ul style="list-style-type: none"> • 디스플레이 구성 및 		

			<ul style="list-style-type: none"> 전기화학 반응을 유도할 수 있는 회로 설계 및 제작 (Cyclic voltammetry 구성을 위한 회로 구성 및 모듈 제작) 	<p>imbedded SW 완성 및 마운팅</p> <ul style="list-style-type: none"> 시제품 구성을 위한 모듈 확보 																																																																																																																																		
시제품 제작	시제품 제작		<ul style="list-style-type: none"> 성능 최적화를 위한 1차 시제품 제작 																																																																																																																																			
임신관련 단백질 분석	분석용 샘플 확보	<ul style="list-style-type: none"> 임신 한우 및 비임신 한우의 혈액 확보 분만직전 4두, 임신 4개월 4두, 미임신 4두 확보 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>계제 번호</th> <th>성별</th> <th>생년 월일</th> <th>몸무게</th> <th>비교군</th> <th>신체</th> <th>배 종 분만일</th> <th>인 공 수검일</th> <th>임신 여부</th> <th>분 만 예정일</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>13-130</td> <td>암</td> <td>13/11/28</td> <td>34.4</td> <td>0003073002</td> <td>1</td> <td>16/04/04</td> <td>16/08/20</td> <td>임신</td> <td>17/4/12</td> </tr> <tr> <td>13-055</td> <td>암</td> <td>13/9/12</td> <td>30.0</td> <td>0003030043</td> <td>1</td> <td>16/02/14</td> <td>16/07/05</td> <td>임신</td> <td>17/4/17</td> </tr> <tr> <td>구-368</td> <td>암</td> <td>11/7/28</td> <td>68.4</td> <td>0003440500</td> <td>2</td> <td>16/02/10</td> <td>16/08/27</td> <td>임신</td> <td>17/4/9</td> </tr> <tr> <td>구-245</td> <td>암</td> <td>10/7/28</td> <td>74.7</td> <td>205378131</td> <td>3</td> <td>16/02/23</td> <td>16/08/27</td> <td>임신</td> <td>17/4/9</td> </tr> <tr> <td>구-323</td> <td>암</td> <td>10/0/1</td> <td>74.4</td> <td>0003715673</td> <td>3</td> <td>16/02/21</td> <td></td> <td>비임신</td> <td></td> </tr> <tr> <td>구-218</td> <td>암</td> <td>08/11/28</td> <td>94.7</td> <td>0002016947</td> <td>5</td> <td>16/04/08</td> <td></td> <td>비임신</td> <td></td> </tr> <tr> <td>구-287</td> <td>암</td> <td>10/11/28</td> <td>70.7</td> <td>0003020203</td> <td>4</td> <td>16/04/15</td> <td></td> <td>비임신</td> <td></td> </tr> <tr> <td>11-042</td> <td>암</td> <td>11/6/71</td> <td>65.2</td> <td>0003688047</td> <td>2</td> <td>16/04/08</td> <td></td> <td>비임신</td> <td></td> </tr> <tr> <td>13-67</td> <td>암</td> <td>13/9/22</td> <td>37.7</td> <td>0003098802</td> <td>1</td> <td>16/06/29</td> <td>16/09/28</td> <td>임신</td> <td>16/10/9</td> </tr> <tr> <td>13-81</td> <td>암</td> <td>13/9/28</td> <td>36.5</td> <td>0003098511</td> <td>1</td> <td>16/06/02</td> <td>16/09/25</td> <td>임신</td> <td>16/10/0</td> </tr> <tr> <td>14-075</td> <td>암</td> <td>14/9/24</td> <td>25.6</td> <td>0003075024</td> <td></td> <td></td> <td>16/09/07</td> <td>임신</td> <td>16/10/18</td> </tr> <tr> <td>구-255</td> <td>암</td> <td>07/7/24</td> <td>116.6</td> <td>00019871495</td> <td>6</td> <td>16/02/09</td> <td>16/12/01</td> <td>임신</td> <td>16/10/12</td> </tr> </tbody> </table>	계제 번호	성별	생년 월일	몸무게	비교군	신체	배 종 분만일	인 공 수검일	임신 여부	분 만 예정일	13-130	암	13/11/28	34.4	0003073002	1	16/04/04	16/08/20	임신	17/4/12	13-055	암	13/9/12	30.0	0003030043	1	16/02/14	16/07/05	임신	17/4/17	구-368	암	11/7/28	68.4	0003440500	2	16/02/10	16/08/27	임신	17/4/9	구-245	암	10/7/28	74.7	205378131	3	16/02/23	16/08/27	임신	17/4/9	구-323	암	10/0/1	74.4	0003715673	3	16/02/21		비임신		구-218	암	08/11/28	94.7	0002016947	5	16/04/08		비임신		구-287	암	10/11/28	70.7	0003020203	4	16/04/15		비임신		11-042	암	11/6/71	65.2	0003688047	2	16/04/08		비임신		13-67	암	13/9/22	37.7	0003098802	1	16/06/29	16/09/28	임신	16/10/9	13-81	암	13/9/28	36.5	0003098511	1	16/06/02	16/09/25	임신	16/10/0	14-075	암	14/9/24	25.6	0003075024			16/09/07	임신	16/10/18	구-255	암	07/7/24	116.6	00019871495	6	16/02/09	16/12/01	임신	16/10/12	<ul style="list-style-type: none"> 10kb이상의 밴드가 뚜렷한 시료를 선택 형광농도 50ng 이상, 총량 10ug이상 적용 발현분석그림) 
	계제 번호	성별	생년 월일	몸무게	비교군	신체	배 종 분만일	인 공 수검일	임신 여부	분 만 예정일																																																																																																																												
13-130	암	13/11/28	34.4	0003073002	1	16/04/04	16/08/20	임신	17/4/12																																																																																																																													
13-055	암	13/9/12	30.0	0003030043	1	16/02/14	16/07/05	임신	17/4/17																																																																																																																													
구-368	암	11/7/28	68.4	0003440500	2	16/02/10	16/08/27	임신	17/4/9																																																																																																																													
구-245	암	10/7/28	74.7	205378131	3	16/02/23	16/08/27	임신	17/4/9																																																																																																																													
구-323	암	10/0/1	74.4	0003715673	3	16/02/21		비임신																																																																																																																														
구-218	암	08/11/28	94.7	0002016947	5	16/04/08		비임신																																																																																																																														
구-287	암	10/11/28	70.7	0003020203	4	16/04/15		비임신																																																																																																																														
11-042	암	11/6/71	65.2	0003688047	2	16/04/08		비임신																																																																																																																														
13-67	암	13/9/22	37.7	0003098802	1	16/06/29	16/09/28	임신	16/10/9																																																																																																																													
13-81	암	13/9/28	36.5	0003098511	1	16/06/02	16/09/25	임신	16/10/0																																																																																																																													
14-075	암	14/9/24	25.6	0003075024			16/09/07	임신	16/10/18																																																																																																																													
구-255	암	07/7/24	116.6	00019871495	6	16/02/09	16/12/01	임신	16/10/12																																																																																																																													
	혈액을 이용한 전체 유전체 서열 분석	<ul style="list-style-type: none"> 정성분석 흡광도 측정과 전기영동 패턴을 기준 정량분석 형광분석 double-strand DNA와 RNA농도를 측정 																																																																																																																																				

(1) 소신호 고정밀 신호 측정용 회로 설계

- 소신호 전류측정용 모듈 확보
 - . 전류측정용 모듈은 전압구동부와 전류측정부로 구성됨
 - . 전류측정부는 IV Converter, 증폭기, LPF(Low Pass Filter), Offset 조절부, 24bit ADC(Analog-to-Digital Converter)로 구성됨
 - . 전압구동부는 Vd(Drain), Vg(Gate) 등으로 구성됨.
 - . 구동전압의 사양은 Vd(-3V~3V), Vg(-10V~+10V)임
 - . 소신호 전류측정은 1nA임
 - . 측정 방법은 -1V~1V cycle을 5회 반복하면서 전류값을 측정함
 - . 측정 알고리즘은 0.6V근처의 최대 전류의 평균임.

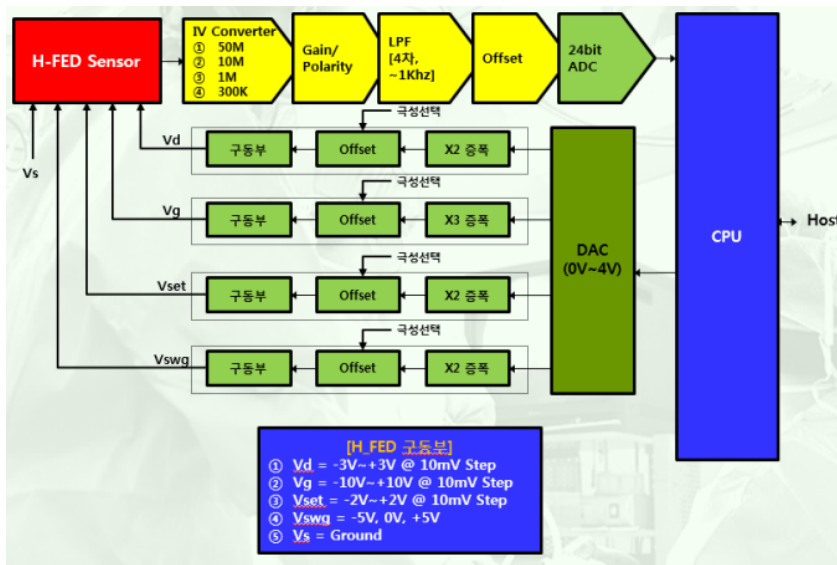


그림 20. 평가용 측정 모듈 Layout

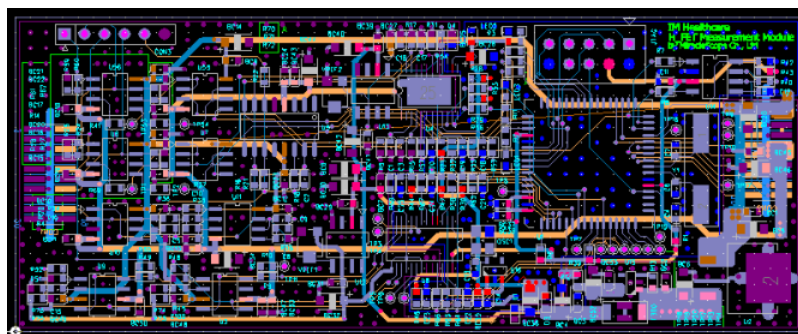


그림 21. 소신호 전류 측정용 모듈보드 PCB

- 다채널 제어용 메인보드 확보

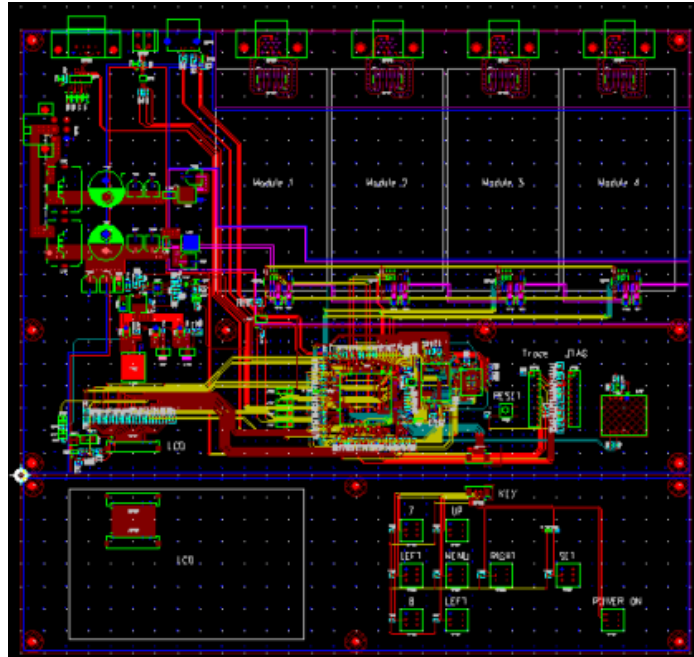


그림 22. 5채널 제어용 메인보드 PCB

(2) 평가용 지그 설계 및 시스템 제작

- 평가용 시스템 확보
 - 전원공급장치, 소신호 전류 측정용 모듈, 메인제어보드 및 UI 장치들에 대한 시스템 Layout를 설계함.

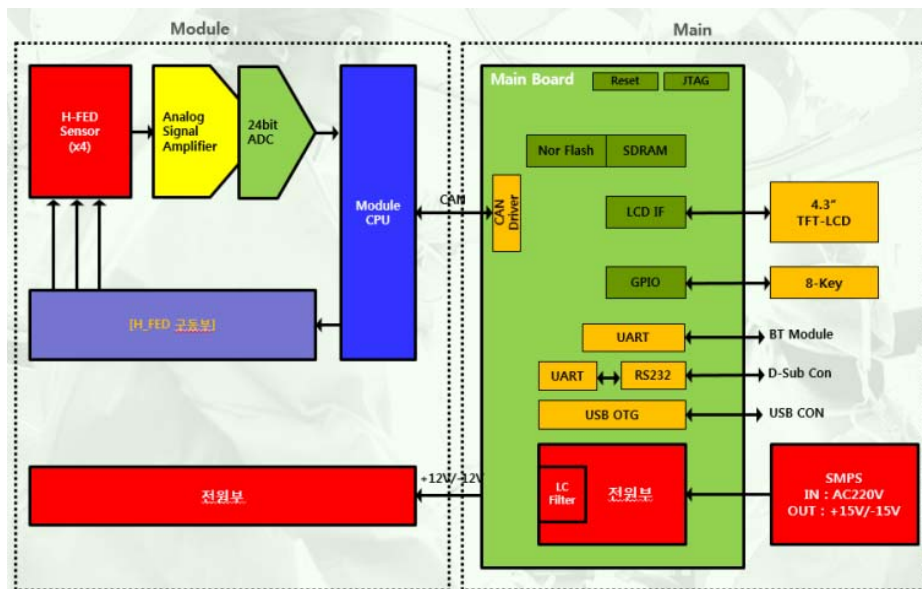


그림 23. 평가용 측정시스템 Layout



그림 24. 평가용 측정시스템

. 시스템 각 블록별 인터페이스 및 통신 프로토콜을 정의하고 구현함.

통신용 프로토콜 정의 (CAN 패킷)

1. START

- ① Main Board에서 Can Module에 Start 패킷 전송 시
첫 번째 Byte에 'S'
- ② Can Module에서 Start 패킷 수신 시
첫 번째 Byte를 읽어 'S'를 Check 하여 'S'면 I(nA)값을 전송 한다.

1st Byte	2nd Byte	3rd Byte	4th Byte	5th Byte
'S'	X	X	X	X

2. STOP

- ① Main Board에서 Can Module에 Stop 패킷 전송 시
첫 번째 Byte에 'E'
- ② Can Module에서 Start 패킷 수신 시
첫 번째 Byte를 읽어 'E'를 Check 하여 'E'면 I(nA)값 전송을 중지 한다.

1st Byte	2nd Byte	3rd Byte	4th Byte	5th Byte
'E'	X	X	X	X

3. V(Vg, Vs, Vset, Vswing)

- ① Main Board에서 Can Module에 V 패킷 전송 시
OFF(stop)상태에서 V값이 변경하고 ON(start)를 하면 각각의 Can Moudle에 V값을 먼저 전송하고 마지막으로 'S'를 전송한다.
- ② Can Module에서 V 패킷 수신 시
Main Board에서 'S'가 오기전에 V값이 먼저 전송 되므로 V값이 들어오면 각 센서에 해당되는 값을 SET한후 마지막 'S'가 들어오면 I(nA)를 전송한다.

1st Byte	2nd Byte	3rd Byte	4th Byte	5th Byte
Data Type	+, -	Data 1	Data 2	Data 3

- Data Type(소문자) : a, b, c, d, e, f
(Vs, Vg, Vset, Vswing, Rsvd, I(nA))
- +, - : '+', '-'
- Data1 : 정수부(0~9)
- Data2 : 1 번째 소수부(0~9)
- Data3 : 2,3번째 소수부(0~99)

4. ID

CELL1	0x711	Main Board	0x701
CELL2	0x712		0x702
CELL3	0x713		0x703
CELL4	0x714		0x704

5. Delay = 100ms

▪ 평가용 시스템 확보

- . 다채널 측정을 위한 전압 설정 방법 및 화면 디스플레이를 위한 UI(User Interface)를 설계하고 구현함.
- . 평가용 시스템 사용방법은 다음표와 같음.

1. 전원 켜기/ 끄기

① 전원 켜기

System 후면의 Main S/W를 켜 후 Power Key를 누르면 IM HEALTHCARE LOGO가 Display되면서 동작 준비상태가 된다.

② 전원 끄기

Power Key를 눌러 System을 종료 시킨후 Main S/W를 끈다.

2. KEY Interface

① Up, Down, Left, Right key : Cursor를 상, 하, 좌, 우로 이동 및 전압값 설정

② Set key : Cursor의 현재 위치(각 CELL의 전압 및 ON/OFF) 선택 및 해제



선택전



선택후

③ Menu key : Main과 Graph GUI를 변환

④ Power key : Main System의 전원 On/ Off

3. MAIN GUI

MiracleScope					ON/OFF
CELL	Driving Voltage (V)				I
	Vd	Vg	V	Vswing	(nA)
CELL1	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	0.000
CELL2	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	0.000
CELL3	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	0.000
CELL4	+1.000	+1.000	+1.000	+1.000	0.000

②

① ON/ OFF

Cursor의 위치가 On/ Off에서 Set Key를 누르면 설정된 전압(Vd, Vg, Vset, Vswing)값으로 센서를 동작시키며 센서로부터의 I(nA)값을 Display한다.

* Cursor가 활성화 되면 Menu Key를 통해 Graph GUI로 변환이 가능하다.

② CELL

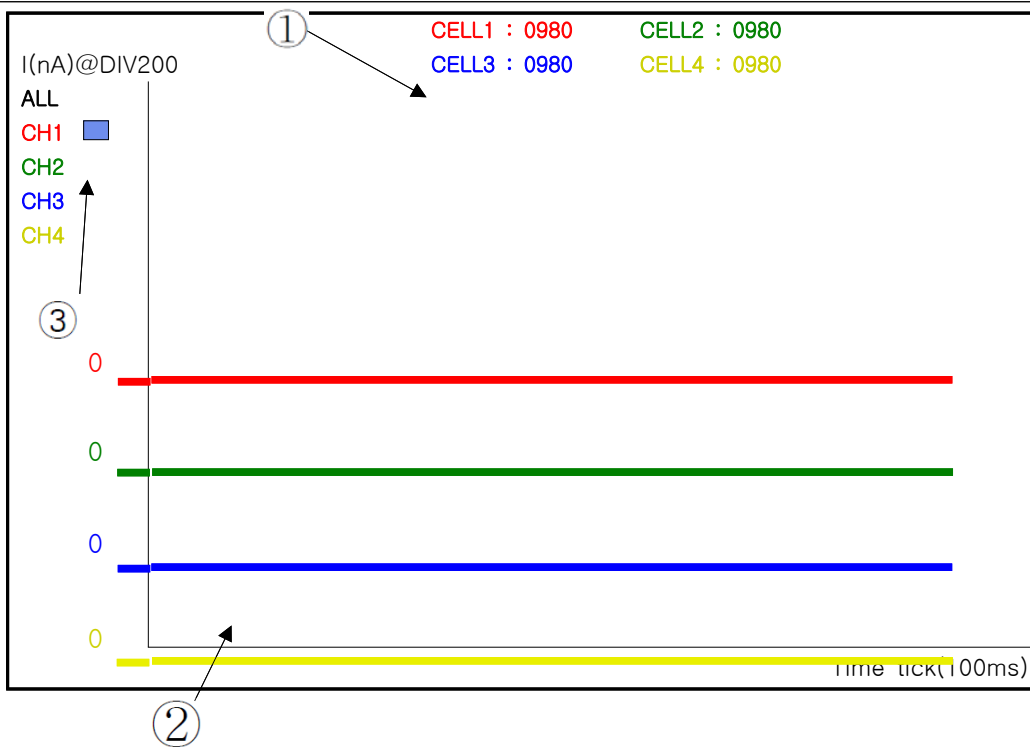
Sensor Number

③ Vd, Vg, Vset, Vswing

Sensor를 동작시키기 위한 전압 Setting창으로 Cursor를 이동시킨 후 Set key를 눌러 활성화하여 전압 값을 변경 할수 있다. 변경을 완료하면 Set Key를 다시 한번 눌러 선택 해제한다.

④ I(nA) : 각각의 Sensor로부터 수신된 I(nA)값을 Display

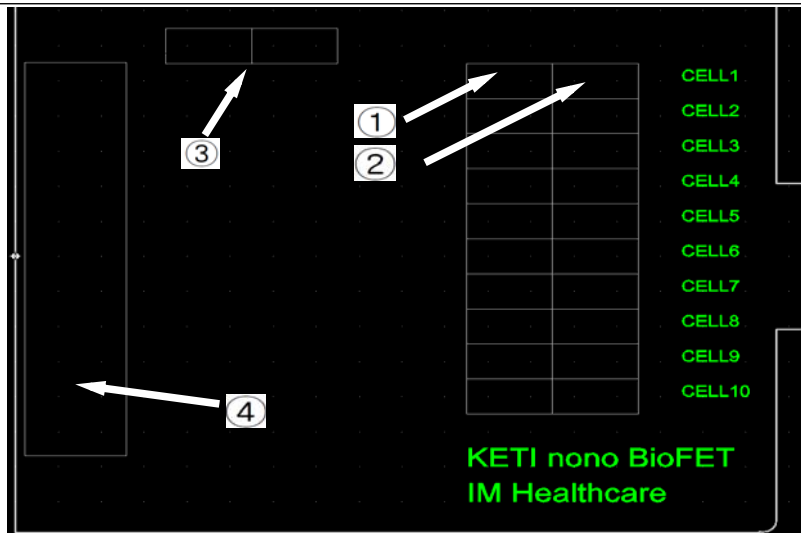
4. GRAPH GUI



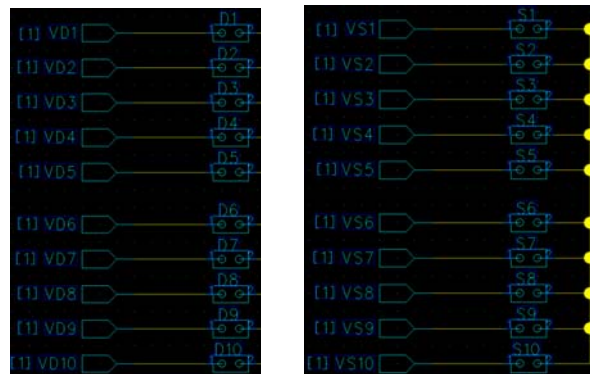
- ① Sensor로부터 수신된 I(nA)값을 숫자로 Display
- ② Sensor로부터 수신된 I(nA)값을 Graph로 Display
- ③ Up, Down Key로 Graph menu를 선택하고 Set Key를 통해 선택한 Channel로 이동한다.
(선택한 Channel에서는 단일 Channel로만 Graph가 Display된다.)
- ⑤ Graph Mode(All, 단일 Channel)에서 언제든지 Menu Key를 통해 Main UI로 이동할수 있다.

5. SENSOR 지그

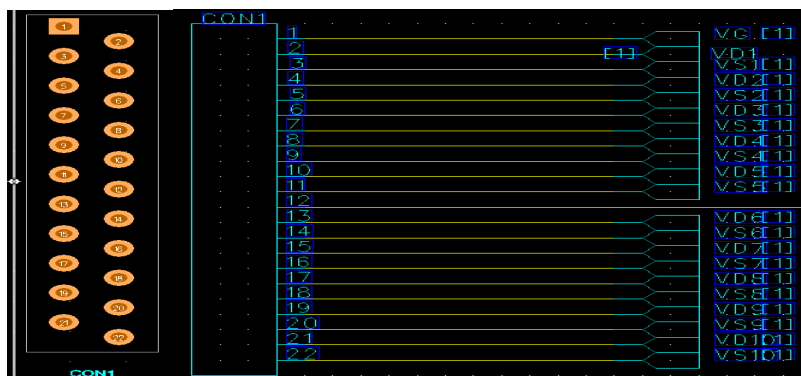
- ① D1 ~ D10까지의 VD Cell을 셋팅 가능
- ② S1 ~ S10까지의 VS Cell을 셋팅 가능
- ③ VSET, VSGW을 셋팅 가능(좌측이 VSET)
- ④ Sensor 연결부



⑤ VD(D1 ~ D10), VS(S1 ~ S10) Pin Number



⑥ Sensor 연결부 Pin Number



(3) 연구개체 선별 및 전사체 추출

- 출산이 임박한 만삭 소 4두, 임신 3-4 개월 차 소 4두 그리고 비임신 소 4두 총 12 두에서 혈액을 채취하였음 (그림 25).

개체 번호	성별	생년 월일	혈령	바코드	산차	최종 분만일	인공 수정일	임신여부	분만 예정일
13-130	암	13/11/29	34.4	002088792062	1	16/04/04	16/06/30	임신	17/4/12
13-055	암	13/8/12	38.0	002306030043	1	16/03/14	16/07/05	임신	17/4/17
구-366	암	11/1/28	68.4	002063443590	2	16/03/10	16/06/27	임신	17/4/9
구-245	암	10/7/20	74.7	2056785131	3	16/03/20	16/06/27	임신	17/4/9
구-323	암	10/8/1	74.4	002057153679	3	16/03/21		비임신	
구-219	암	08/11/20	94.7	002028165947	5	16/04/08		비임신	
구-297	암	10/11/20	70.7	002060203209	4	16/04/15		비임신	
11-042	암	11/5/7	65.2	002068088247	2	16/04/08		비임신	
13-67	암	13/8/22	37.7	002087860812	1	15/08/28	16/01/28	임신	16/11/9
13-81	암	13/9/28	36.5	002087865111	1	15/08/02	16/01/29	임신	16/11/10
14-075	암	14/8/24	25.6	002092758294			16/01/07	임신	16/10/19
구-255	암	07/1/24	116.6	000199712456	6	15/02/09	15/12/31	임신	16/10/12

그림 25. 연구개체 선별

○ 일반적으로, 혈액에서 충분한 양의 전사체를 추출하는 것은 비교적 쉽지가 않은데 그 이유는 혈액의 대다수를 차지하는 혈장과 적혈구에 전사체가 존재하지 않기 때문임. 혈액을 원심분리하여 혈장과 적혈구 경계의 혈소판과 백혈구로 형성된 얇은 층의 Buffy coat영역을 물리적으로 선별하는 것이 필요함.

○ 하지만, 본 연구에서는 재연성이 있어야함. 쉽게 분해되는 전사체를 보존하고 정확한 데이터를 얻기 위하여 Qiagen사의 PAXgene Blood RNA kit를 이용하기로 결정하였음. 이 키트는 자연발생하는 전사체의 분해속도를 최소화 시켜주고 혈액을 상온에서 최대 4일간 안정화 시키며 분리 정제 및 재연성이 매우 높은 것으로 알려져 있음.

○ 채취한 혈액을 PAXgene tube의 RNA stabilization reagent와 혼합하여 보관함 (전사체 안정화 물질은 공개가 되어 있지 않음.). 이후 단백질을 제거하고 유전물질 (DNA)를 제거한 후 전사체만 전통적인 방식인 Column (+ charge)에 부착시켜 분리 동정하는 과정을 거쳐 최종적으로 높은 순도의 전사체만 분리 동정함 (그림 26.).

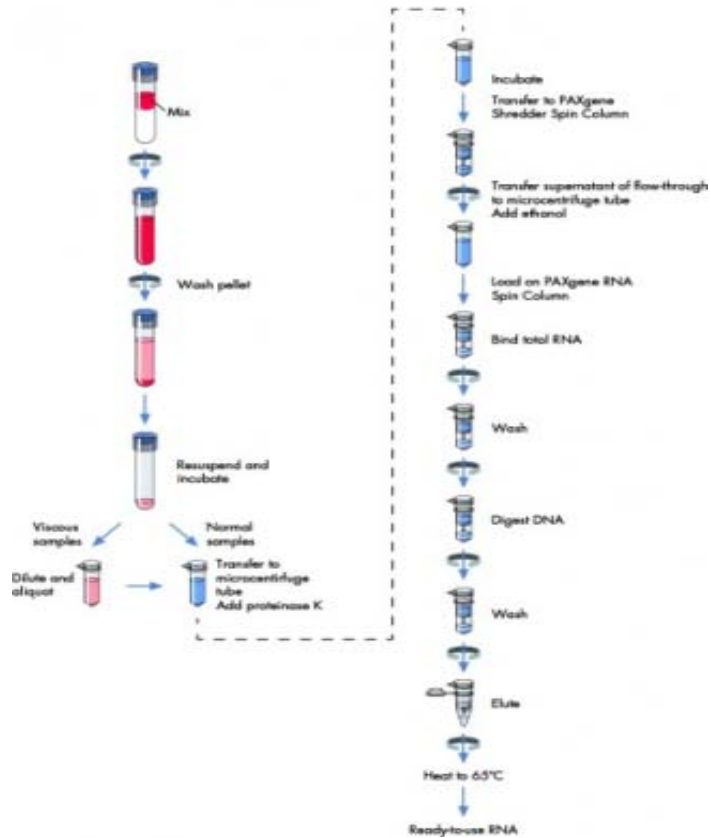


그림 26. Paxgene 전사체 추출 모식도

○ 일반적으로 전사체의 높은 순도라 함은 흡광도 230 (전사체), 260 (유전물질), 280 (단백질) 을 측정하게 되는데 보통 260/280 비율과 260/230 비율이 1.6 ~ 2.0 사이일 때 높은 순도라고 보이며 동물세포 기준으로 전사체의 Integrity number (RIN)을 추가적으로 측정하여 전사체의 분해도가 높음/낮음을 통하여 전사체가 얼마나 보존되어 있는지 알 수 있음.

○ 최종적으로 전사체 염기서열 해독에 필요한 개체의 선정은 만삭 3두, 임신 3-4개월 3두 그리고 비임신 1두 총 7두를 선택함. 따라서 총 12 개체의 전사체를 BioAnalyzer 2100의 RNA pattern 분석을 실시하여 28S/18S 비율을 통하여 RIN 값이 7 이상이고 260/280, 260/230 비율이 1.6 이상인 순도가 높고 전사체의 보존이 잘되어 있으며 농도가 높은 7 개체의 전사체를 선별 하여 이후 진행되는 전사체 library 구축에 저해되는 요소가 있는지 확인함 (그림 3).

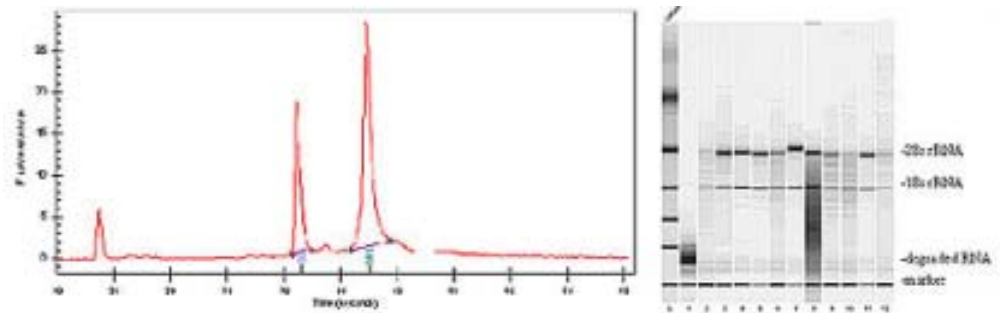


그림 27. BioAnalyzer RNA pattern 분석

(가) 샘플 입고 정보

- ① 샘플 의뢰일 : 2016년 10월 11일
- ② 샘플 수량 : 36개
- ③ 샘플 종류 : RNA
- ④ 배송 상태 : tube에 담겨 입고
- ⑤ 샘플 QC 진행일 : 2016년 10월 13일

(나) 실험 정보

① Bioanalyzer QC

- RIN(RNA Integrity Number) : RNA의 degradation 정도를 나타내는 값.
RIN 10이면 분해 없음, RIN 0이면 완전분해.
RIN 7 ≥ Pass입니다.
- 28s/18s ratio : human과 mouse를 기준으로 측정하여
28s/18s ratio 1.0 ≥ Pass 입니다.

따라서, 갑각류, 절지류, 곤충류들은 ratio가 1미만 or 0이 나오는 경우가 있습니다.

② Sequencing의 종류에 따라 요구되는 Total Amount의 양은 다를 수 있습니다.

③ 샘플의 상황에 따라 Purify 진행 할 수 있습니다.

- Purify :miRNeasykit(DNase처리)를 사용.
Purify 진행 시 Total amount가 약 3~6배 정도 감소 할 수 있음.

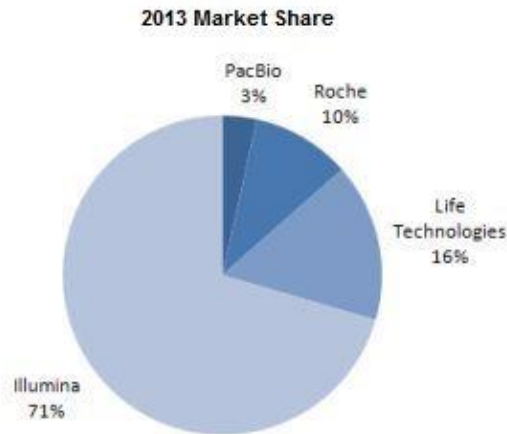
(다) 실험 결과

NO	Sample ID	Results	Concentration (ng/μL)		Volume (ul)	Quantity (μg)		Purity		RNA-seq
			Bio Analyz er	Nano Drop		Bio Analyz er	Nano Drop	RIN	28s/18s	
1	TN1610R0431	pass	135	145.81	33	4.455	4.812	9	1.6	
2	TN1610R0432	pass	214	216.22	34	7.276	7.351	8.8	1.6	P4_1
3	TN1610R0433	pass	109	95.78	35	3.815	3.352	8.6	1.6	
4	TN1610R0434	pass	201	193.13	34	6.834	6.566	8.9	1.6	P4_2
5	TN1610R0435	pass	140	129.79	35	4.9	4.543	8.9	1.6	
6	TN1610R0436	pass	152	136.14	34	5.168	4.629	8.8	1.7	
7	TN1610R0437	pass	70	68.02	34	2.38	2.313	8.8	1.7	
8	TN1610R0438	pass	82	76.23	35	2.87	2.668	8.8	1.7	
9	TN1610R0439	pass	102	80.7	35	3.57	2.825	8.8	1.7	P4_3
10	TN1610R0440	hold	55	51.9	35	1.925	1.816	8.6	1.9	
11	TN1610R0441	hold	67	60.84	36	2.412	2.19	8.6	1.8	
12	TN1610R0442	hold	42	36.4	35	1.47	1.274	8.6	1.8	

13	TN1610R0443	hold	55	47.22	35	1.925	1.653	8.7	1.7	
14	TN1610R0444	hold	20	25.58	34	0.68	0.87	8.6	1.7	
15	TN1610R0445	hold	65	61.15	35	2.275	2.14	8.7	1.6	
16	TN1610R0446	hold	51	56.78	33	1.683	1.874	8	1.5	
17	TN1610R0447	hold	29	36.82	34	0.986	1.252	8.5	1.9	
18	TN1610R0448	hold	47	54.39	34	1.598	1.849	8.7	1.8	
19	TN1610R0449	pass	97	88.3	34	3.298	3.002	8.6	1.6	
20	TN1610R0450	pass	66	69.37	35	2.31	2.428	8.7	1.8	
21	TN1610R0451	pass	78	84.66	33	2.574	2.794	8.7	1.7	
22	TN1610R0452	hold	71	63.02	34	2.414	2.143	8.3	1.6	Control
23	TN1610R0453	hold	53	52.52	34	1.802	1.786	8.2	1.6	
24	TN1610R0454	hold	64	61.88	34	2.176	2.104	8.6	1.7	
25	TN1610R0455	pass	196	157.66	34	6.664	5.361	8.9	1.8	
26	TN1610R0456	pass	247	200.62	34	8.398	6.821	8.9	1.8	P10_1
27	TN1610R0457	pass	160	141.23	35	5.6	4.943	8.8	1.9	
28	TN1610R0458	pass	112	94.85	35	3.92	3.32	8.9	2	
29	TN1610R0459	pass	120	104	34	4.08	3.536	8.6	1.5	
30	TN1610R0460	pass	220	135.41	34	7.48	4.604	8.9	1.6	P10_2
31	TN1610R0461	pass	173	200.62	34	5.882	6.821	8.5	1.6	
32	TN1610R0462	pass	162	133.22	35	5.67	4.663	8.8	1.7	
33	TN1610R0463	pass	225	205.92	34	7.65	7.001	8.5	1.6	P10_3
34	TN1610R0464	pass	92	91.62	34	3.128	3.115	8.4	1.6	
35	TN1610R0465	pass	124	119.81	34	4.216	4.073	7.9	1.5	
36	TN1610R0466	pass	183	163.49	33	6.039	5.395	8.3	1.5	

(4) 전사체를 바탕으로 하는 Library 구축 및 염기서열 해독

- 현존하는 차세대 염기서열 해독 및 분석 기법 (Next-Generation Sequencing, NGS)는 현재 보편적이고 가격적으로 합리적으로 알려져 있으나 시장의 대부분은 Illumina사의 염기서열 해독 시스템 점유 (약 70%)하고 있음. 그 이유는 한 번에 많은 데이터를 수집할 수 있고 해독 시간이 가장 빠르며 (데이터 생산량 대비) Sequencing Quality 즉, 오류 확률이 1/1000을 논할 정도로 high quality를 보장하기 때문임 (그림 28.).



Source: Mizuho Securities and GenomeWeb survey. Number of respondents = 103.

그림 28. NGS platform 세계시장 점유율

- 따라서 본 연구는 Illumina사의 염기서열 해독 시스템에 적용이 가능한 전체 mRNA-sequencing library를 구축해야함.
- 전사체를 기반으로 하는 library를 구축하기 위해 Illumina사에서 제공하는 TruSeq mRNA sample prep kit v2를 사용하였음. 준비된 전사체 시료에 Oligo dT를 표면에 부착하고 있는 자기성을 띄고 있는 beads를 통하여 A-based RNA (mRNA)만 분리한 후 1차, 2차 complementary DNA합성을 실시함.
- 합성된 cDNA를 가지고 Covaris S2 system의 Aquatic wave를 통하여 물리적으로 250 bp 최적의 유전물질 단편조각으로 조각낸 후 양 끝단에 Illumina사 platform 염기서열분석이 진행될 수 있는 올리고 서열을 붙여 준 후 분자생물학적 방법임 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭하여 library를 구축함 (그림 29.).

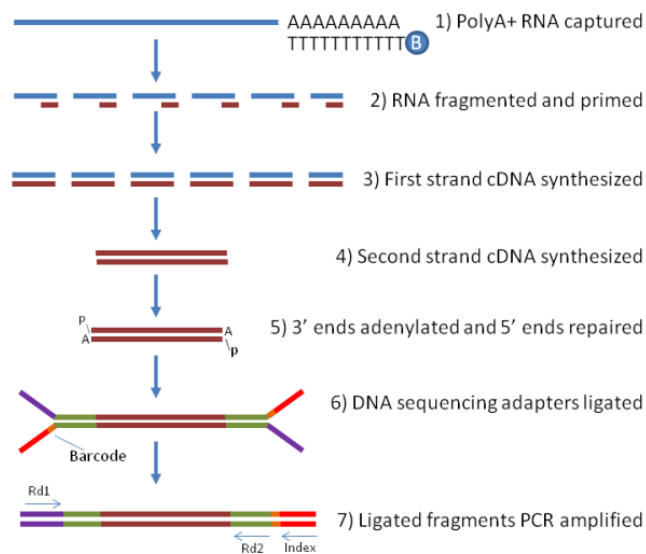


그림 29. TruSeq mRNA library 구축 요약도

- 구축된 mRNA-based library를 Illumina사의 HiSeq2500 Rapid mode를 통하여 염기서열 해독을 실시함. Bridge 증폭방식을 통하여 형성된 library cluster를 한 개씩 염기서열을 합성하면서 나오는 형광물질을 검출하는 방식으로 진행함 (그림 30).

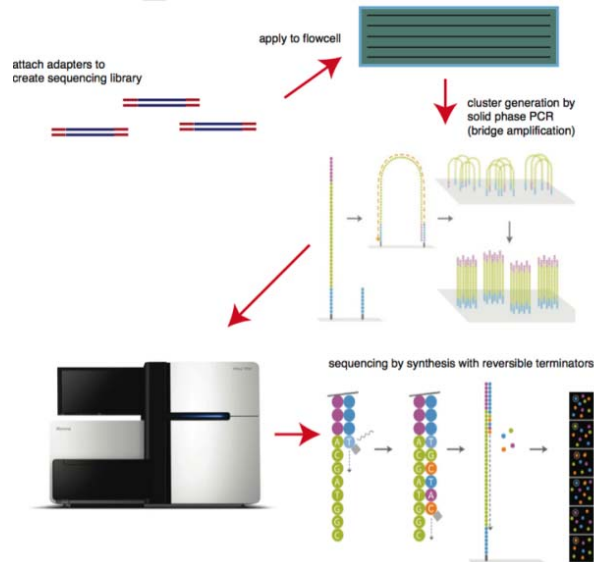


그림 30. Illumina 방식의 염기서열 해독

- mRNA 염기서열 분석을 실시하기 위해서는 High-Quality 염기서열 분석이 필요하므로 총 전사체 정보에서 충분한 생산량이 필요하므로 1개 샘플당 최소 6 Gbp의 데이터 생산량을 목표로 진행함.

○ 생물정보학적 데이터 분석

- Illumina사의 염기서열 해독 시스템에서는 Real-time Analysis가 기본적으로 탑재되어 있어서 1 bp를 읽을 때마다 데이터 Quality를 확인 할 수 있으며 해독이 끝나면 Bcl 이라고 하는 이미지 파일을 CASAVA라는 2차 분석 장비를 통하여 초기 데이터 (Raw data)를 분석이 가능한 FASTQ 파일로 초기 데이터를 획득함 (그림 31).

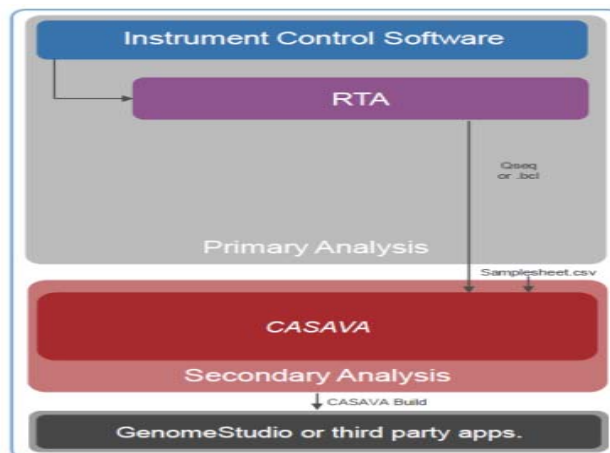


그림 31. 초기 데이터 분석 모식도

- 얻어진 초기 데이터에서 Illumina platform에 적용하기 위해 유전정보 양 끝단에 달았던 adaptor 올리고 서열을 Cutadapt 혹은 Sickle라는 프로그램을 이용하여 trimming을 실시한 후 생성된 data reads에 FastQC tool 프로그램을 이용하여 염기서열 Quality를 확인함.
- 생성된 Raw data에서 Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR)라는 프로그램을 이용하여 기존에 공개되어 있는 소 참조 유전체 (Bos taurus, bosTau8 (UMD 3.1.1) 2014)과 2015년에 본 기관에서 실시하고 얻은 한우 전체 유전체 (Hanwoo, de novo assembly)를 바탕으로 전사체 mapping을 실시함.
- 이미 한우 전체 유전체 (de novo assembly)가 높은 Quality가 있는 참조 유전체가 존재하고 있으므로 전사체의 발현 양 정량 및 분석 및 Alternative Splicing, novel transcriptome, gene annotation 등 분석할 수 있는 범위가 넓어지며 기대되는 결과를 얻을 수 있음 (그림 8.).

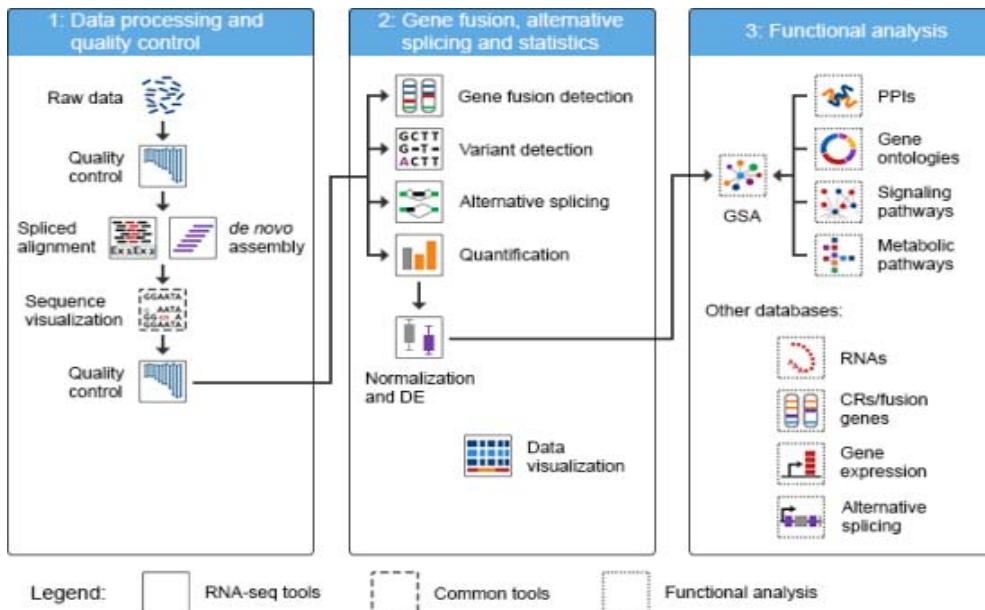


그림 32. 전사체 분석의 기본 순서도

- 유전자 발현 정량을 위해서 Cufflinks, edgeR, DESeq과 같은 프로그램을 사용하여 유전자의 상대적인 정량이 가능하며 Expression Analysis를 할 수 있음. 이는 발현하는 유전자의 차이를 확인할 수 있는 확실한 방법임 (그림 33.).

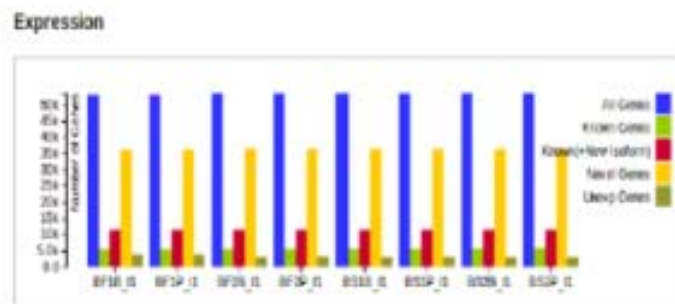


그림 33. 발현 분석

- Correlation Analysis는 시간별로 유전자 발현의 차이를 보는 것임. 본 연구의 개체는 임신 개월에 따라 전사체를 추출하였기 때문에 본 분석에도 유효값이 확인 될 것이라 예측함. 또 Differential Expression Gene (DEG) Analysis을 실시하여 특정 유전자 사이에 발현의 차이를 확실히 볼 수 있었음 (case-control comparative investigations)
- Gene Ontology Analysis는 DAVID, GeneMANIA 그리고 WEBGESTALT라는 프로그램을 이용하여 실시할 수 있음. 이들 프로그램은 다양한 데이터베이스를 기반으로 유전자의 상관 관계를 통계학적으로 분석하여 유전자의 주요 기능을 예측하며 통계학적으로 유의한 결과를 도출할 것으로 예측됨.
- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)은 이미 정의된 다양한 Category의 유전자 set과 비교하여 입력된 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 어떠한 유전자 set이 통계적으로 유의미하게 연관되었는지 분석하는 기법임.
- Gene Structure Profiling을 통하여 전사체 구조의 변화형태를 알 수 있고 이와 동시에 transcript variants의 발현양의 변화를 통하여 소의 임신에 따른 패턴변화를 확인하고자 함.

○ 적용

- 데이터 분석 결과 소의 비임신/임신 판단과 임신 개월에 따른 전사체 변화를 찾아낸 바 이를 진단검사학적 방법을 통하여 제품화를 할 수 있고 특정 유전자 영역의 발현 변화를 특허로 등록하여 한국 고유의 지적재산권을 획득할 수 있음.
- 소의 임신에 따른 특정 유전자의 변화를 혈액에서 진단검사학적인 방법으로 실시하여 기존의 사람의 물리적인 방법으로 실시하던 방식의 단점을 커버할 수 있으며 확실하고 경제적으로 유용한 진단검사 kit를 제품화 할 수 있음. 특정 유전자를 선별하여 탐침자 set을 등록하고 이를 이용한 분자생물학적 진단 기법인 Real-time PCR을 통하여 빠르고 확실하게 소의 임신 판단과 주차를 확인 할 수 있을 것이라 기대됨 (그림 34).

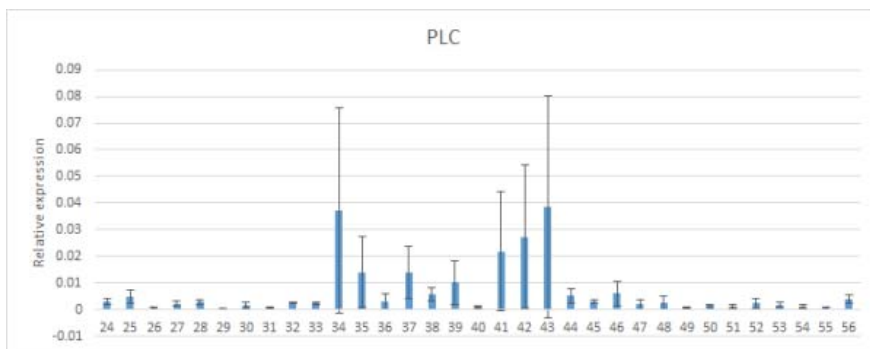
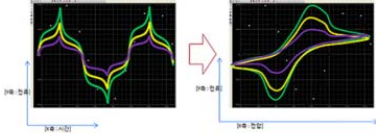


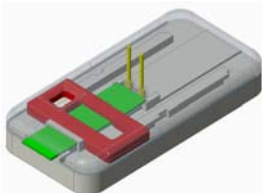



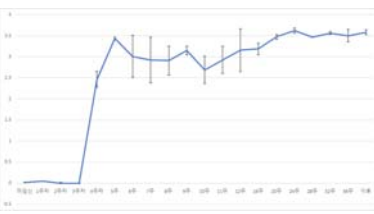
그림 34. qPCR을 통한 유전자 발현 변화를 바탕으로 진단검사

- 결론적으로, 소의 비임신/임신을 구분 짓는 확실한 유전자 변화를 발견하였고 이를 통하여 한국 고유의 지적재산권을 획득함과 동시에 제품화를 실시하여 소 사육 농가의 조기 임신판단 검사를 통하여 사육 방향 및 준비를 선택할 수 있는 경제적 이득을 취할 수 있을 것으로 예측됨.

나. 2차년도

				코드번호	C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
2차 년도 (2017)	바이오센서 진단용 디바이스 회로 제작 (주관기관)	기존 장비인 Potentionstat (정전위기)의 분석	<ul style="list-style-type: none"> 바이오 센서의 항원-항체의 반응에 의한 소신호를 측정하는 Potentionstat system의 원리를 분석함 	<ul style="list-style-type: none"> 3전극 바이오센서 측정 원리 파악 : CE전극에 정전압을 인가하여 WE 전극의 전류를 측정함. 이때 RE 전위를 feedback하여 WE-RE 사이의 전위차를 일정하게 유지함. potentiostat을 이용하여 용액의 저항에 따른 voltametry 형상 원리 파악함. 	
		전용 IC를 사용한 보드 제작	<ul style="list-style-type: none"> 3전극 바이오센서의 전용 IC인 LMP91000IC를 사용하여 보드를 제작하고 평가함. 	<ul style="list-style-type: none"> 전용 IC을 이용하여 회로를 설계하고, PCB를 제작하고 SMT를 제작함. 제어용 CPU는 8-bit CPU인 atmega328를 사용하며 인터페이스는 SPI를 사용함. 개발된 보드의 문제점은 측정전류가 100nA이상으로 크고 측정 시간이 100ms이상을 큼 따라서 소신호 및 고속 측정이 가능한 보드 개발이 필요함. 	
		범용 IC를 사용한 보드 제작	<ul style="list-style-type: none"> 범용 IC인 opamp, DAC, ADC 칩을 사용하여 보드와 프로그램, 알고리즘을 개발함. 	<ul style="list-style-type: none"> 소신호, 고속 측정이 가능하게 하기 위해서 고성능의 범용 IC를 적용하여 보드를 개발함. opamp는 노이즈 특성이 우수하고 증폭율이 높은 AD8642AR, DAC는 16-bit resolution의 AD5754, ADC는 16-bit resolution, 250ksps 샘플 rate의 AD161을 적용함 또한, CPU는 floating을 고속으로 연산이 가능한 32-bit 250MHz의 PIC32MZ series CPU를 적용함. 	
	1종 분석형 1차	일회용 카트리지	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 센서에 적합한 일회용 	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 센서에 최적화된 일회용 카트리지를 제작함. 	

시제품 제작 (주관기관)	시제품 제작	카트리지를 시제품을 제작함.	<ul style="list-style-type: none"> 카트리지는 센서 삽입부, 용액 투입구, 전극부로 구성되며, 본 과제에서 3D 모델링, 기구설계 및 목업제작 및 평가를 수행함. 
	1종 분석형 1차 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> 1종 분석형 1차 시제품 제작을 위해 기구설계와 목업을 제작하고, 보드와 프로그램을 개발함 	<ul style="list-style-type: none"> 1종 분석형 시제품을 제작함. 본 과제에서 제품 디자인, 기구설계, 목업제작을 수행함. 시제품은 4인치 TFT-LCD, 터치 및 BLE4.0로 구성되어 있음. 
측정에 필요한 진단 카트리지를 개발 및 특성 평가 (전자부품 연구원)	반응성을 고 려한 전극 설 계 및 제작	<ul style="list-style-type: none"> ITO 작업전극을 이용한 ALP효소의 전기화학신호 측정 	<ul style="list-style-type: none"> ITO 전극과 glass fiber/하이드로겔로 이루어진 전기화학센서 및 유리섬유 멤브레인을 반응셀로 구성하여 소임신진단용 카트리지를 개념 설계 및 정립
	효소-기질 간 반응 최적화 를 위한 효소- 기질 복합체 선정	<ul style="list-style-type: none"> PAG 항원 검출을 위한 전기화학센서 구성을 위한 시약 선정 및 기초 테스트 실험에 적용 	<p>PAG1 antibody - C-terminal region(avivasystemsbiology #ARP63792_P050) Host:Rabbit Clonality: Polyclonal Species Reactivity: Cow, Dog, Guinea Pig, Horse, Human, Mouse, Pig, Rabbit, Rat</p> <p>② Pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG1) Recombinant Protein (mybiosource #MBS1314844 또는 biorbyt #orb383460) Species: Bos taurus (Bovine) Purity >90%</p> <p>③ PAG1 Antibody (PAG-C1) (NOVUS Biologicals #NB500-487) Species: Human, Mouse, Rat, Bovine Host: Mouse Isotype: IgG2b</p> <p>④ Alkaline Phosphate conjugation kit (abcam #ab102850), Ab에 직접 라벨링</p>
	표준물질을 통한 기본 테 스트 수행	<ul style="list-style-type: none"> 전기화학센서의 신호물질인 ALP 효소의 농도별, 기질반응시간별 전기화학신호 평가 항원의 농도별 전기화학신호 측정 (정량 검출성 평가) 	<ul style="list-style-type: none"> ALP 효소농도별 전기화학신호 측정 PAG 면역진단 단백질 시약을 이용한 농도별 전기화학센서 신호 측정 및 분석
임신관련 단백질 분석을 통한 현 장 응용기술 개	-한우 임신관 련 특이적인 변이 단백질을 발굴 및 항체	-임신 및 비임신 한 우의 태반 또는 혈액 을 이용한 전체 유전 체 서열 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> 임신/비임신 구분 가능한 유전자 변화 확인 - RNA 정량/정성분석 완료 - 시퀀싱 라이브러리 확보 - 생물정보학적 분석 완료

발 (한국농수산물)	제작	- 비교 분석을 통한 특이적인 변이 단백질 발굴 및 바이오마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 특이변이 바이오마커 확인 - 임신3개월차 : 265개 특이 유전자 발견 - 미임신한우 대비 3개월차에서 28개 특이적 낮은 발현량 - 임신 10개월차 : 169개 높은 발현량 유전자 - 임신10개월차 대비 미임신한우에서 39개 유전자 특이 낮은 발현량 확인
	-한우 임신기간 중의 PAG family의 정량 및 정성분석	- 임신한우에서 1주 단위(3개월 이전) 및 2주단위(3개월 이후) 혈액을 확보 - 혈액의 단백질 농도 조사 : ELISA 또는 단백질 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 임신주별 샘플 확보 - 인공수정 후 주별 샘플 수정당시, 1주단 및 2주단위 샘플 300건 이상 확보 • 혈액 PAG 분석(ELISA 법) - 임신 : 2.135 ± 0.132 - 미임신 : 0.05 ± 0.019
	-전기식 바이오센서의 효능 검증	- 다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신진단법과 비교 - PAG-1 의 임신기간별 농도 결정을 통한 진단기기의 진단 기준 설정구	<ul style="list-style-type: none"> • 임신기간별 PAG 농도 분석  <ul style="list-style-type: none"> • 진단기준 설정용 샘플 인계 <p>임신/미임신 4주차 샘플 20건씩 제1협동기관에 인계</p>

□ 바이오센서 진단용 디바이스 회로 개발 및 보드 제작

(1) 바이오 센서 측정 회로 및 원리 분석

- 바이오 센서는 전기화학의 원리를 이용하며, 전기화학이란 화학에너지와 전기에너지의 변환을 의미함.
- 바이오 센서의 측정장비는 Potentiostat(정전위기)라 부르며, Potentiostat(정전위기)는 일정한 전압을 유지시켜주는 회로임. 여기서 일정한 전압을 유지한다는 것은 항상 일정한 전압만 유지하다는 의미가 아니고 사용자가 입력한 전압에 비례한 일정한 전압을 유지한 회로를 의미함. 이를 위해서는 feedback이 존재해함.
 - 아래 그림은 Potentiostat의 원리로서, WE(Working Electrode) 전극과 RE(Reference Electrode, 기준전극)전극 사이의 전위차가 유지되도록 WE(Working Electrode) 전극과 CE(Counter Electrode) 전극 사이 전압을 제어한 상태에서 WE(Working Electrode) 전극의 전류를 측정하여 전기화학 반응을 평가함.

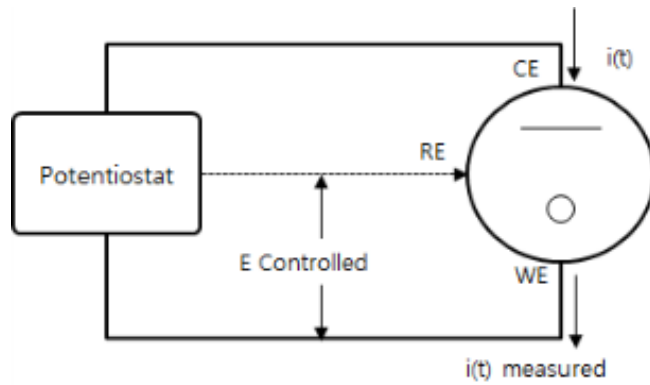


그림 35. Potentiostat 원리.

○ 아래 그림은 정전위기 기본회로로서 동작 원리는 다음과 같음.

- 하늘색은 용액이고 정전위기(Potentiostat)에서 전압이 입력되면 녹색라인과 같이 전압에 비례하여 전류가 흐름
- 주전류는 녹색라인이며, 보라색은 정전위를 유지시켜주기 위한 feedback 전류임.

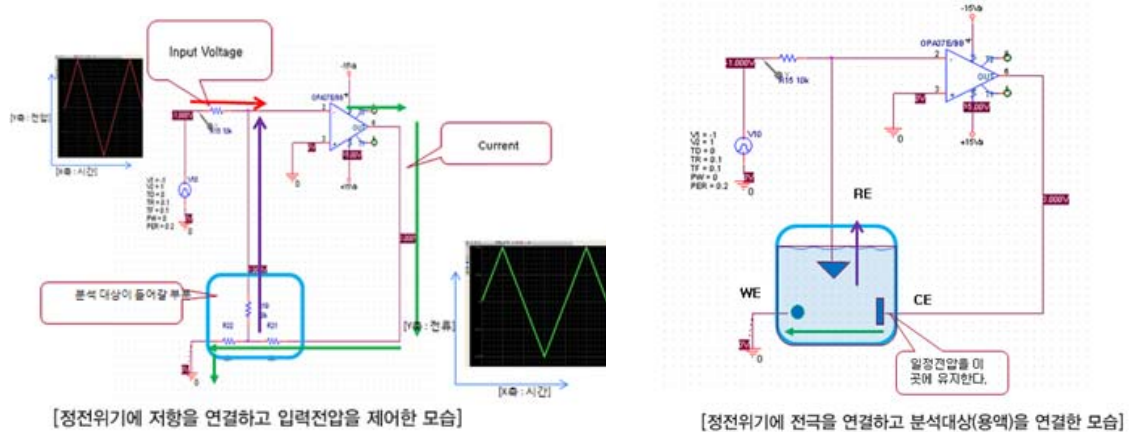


그림 36. 정전위기 기본 회로

- 저항을 연결되었을 때는 전압에 비례한 전류가 흐르지만 용액을 연결할 경우에는 반응물질에 따라 여러 형태의 그래프가 나옴.
- 즉 전압에 꼭 비례하는 전류곡선이 나오는 것이 아니라 분석대상에 따라 그 성향이 달라짐.

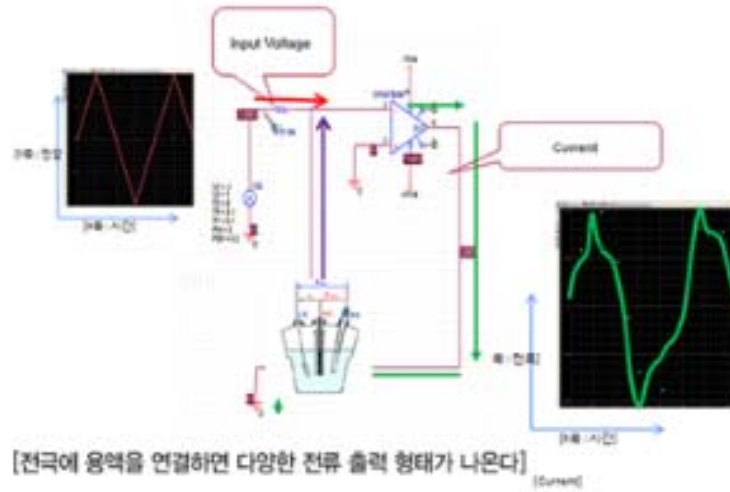


그림 37. 용액에 연결시 정전위기 동작.

- X-축을 시간축에서 전압축으로 변환하여 나타내면 아래 그림과 같은 CV(Cyclic Voltametry) 곡선이 나타남.

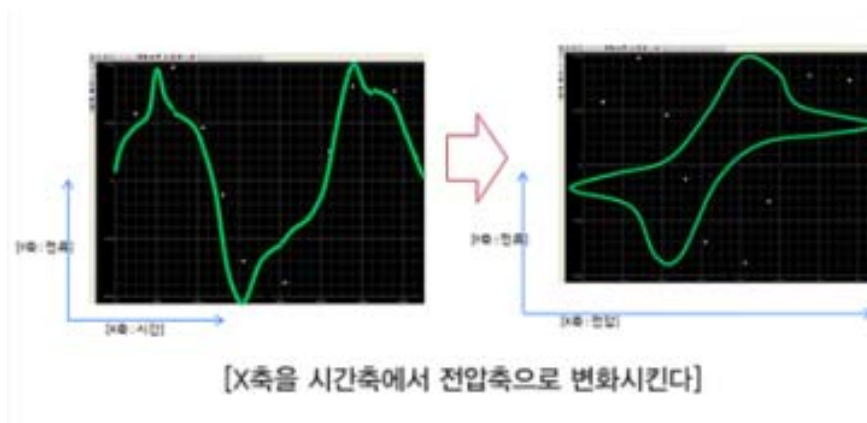


그림 38. 시간축에 따른 CV(Cyclic Voltametry) 곡선

- 용액의 농도에 따른 CV(Cyclic Voltametry) 곡선은 아래 그림과 같이 나타남.

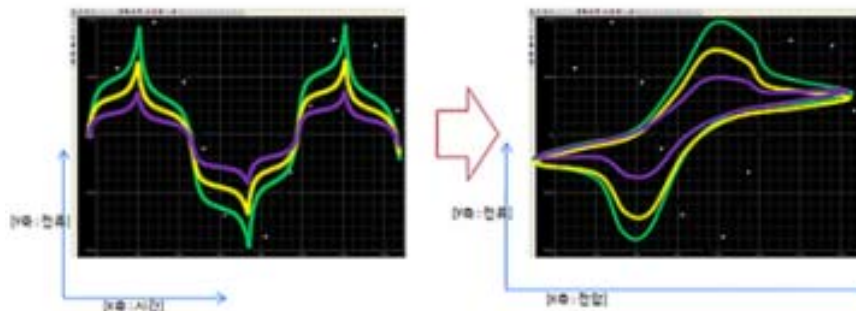


그림 39. 용액의 저항(농도) 따른 CV(Cyclic Voltametry) 그림의 형상변화.

(2) 3전극 바이오 센서의 전극표면의 전위변화를 측정하기 위한 Potentiostat(전위차기) 보드 제작

- 바이오 센서의 전극표면의 전위변화는 매우 소신호로서 정밀한 측정을 요구함.
- 본 과제에서는 측정 방식에 따른 회로들을 비교하고 평가를 위해, 여러 가지 형태의 회로들을 제작함.
- 본 과제에서 제작되는 3가지 회로도에는 다음과 같음.
 - 전용 측정 IC로 구성된 회로도
 - 범용 IC로 구성하며 CE(Count Electrode) 전극에 전압을 인가하고 WE(Working Electrode)전극의 전류를 측정하는 회로도
 - 범용 IC로 구성하며 RE(Reference Electrode)전극에 전압을 인가하고 CE(Counter Electrode)의 전류를 측정하는 회로도 이때 WE(Working Electrode)는 그라운드에 연결

① 전용 IC(LMP91000)로 구성된 Potentiostat Potentiostat보드 제작

- LMP91000 Potentiostat 보드 구성
 - 바이오 센서의 전극 표면의 전위변화를 측정하는 대표적인 전용 IC에는 TI사의 LMP91000이 있으며, 이 IC의 특징은 다음과 같음.
 - 구동 전압 : 2.7V ~ 5.25V
 - Reference Electrode Bias Current : max 900pA
 - Cell Bias 전압 : 프로그램 가능
 - 증폭 이득 : 프로그램 가능 (2.75Kohm ~ 350kohm)
 - 인터페이스 : I2C
 - 적용분야 : Electrochemical Blood Glucose Meter
 - LMP9100 내부 구성도

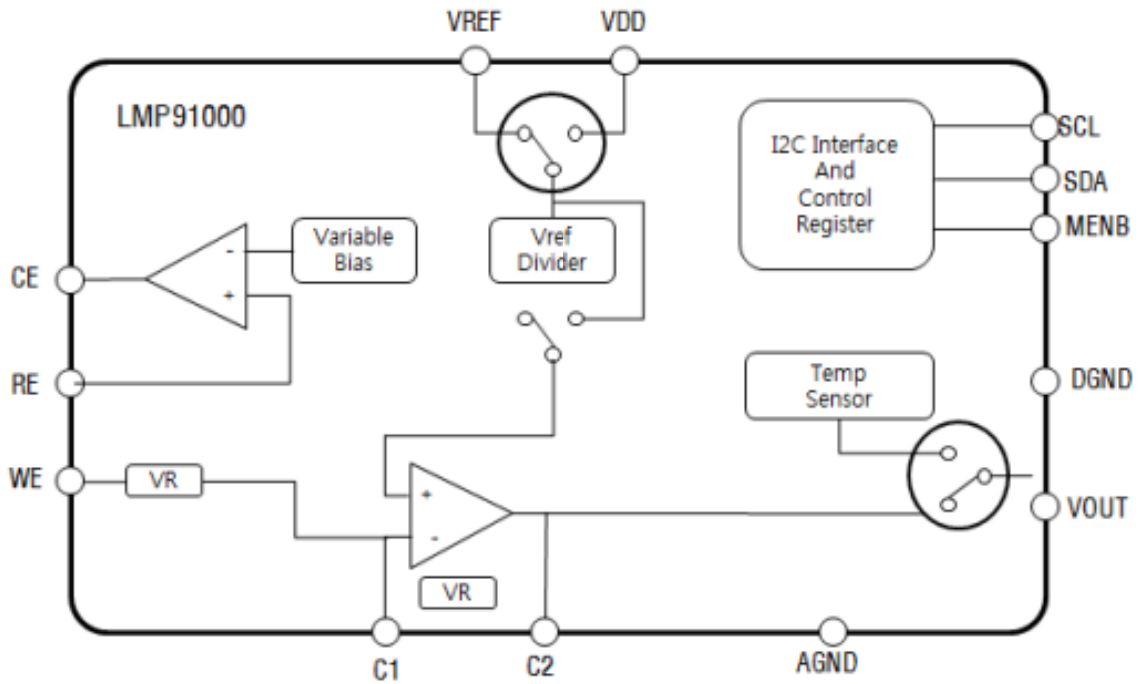


그림 40. LMP91000 내부 구성도

- 보드 구성도

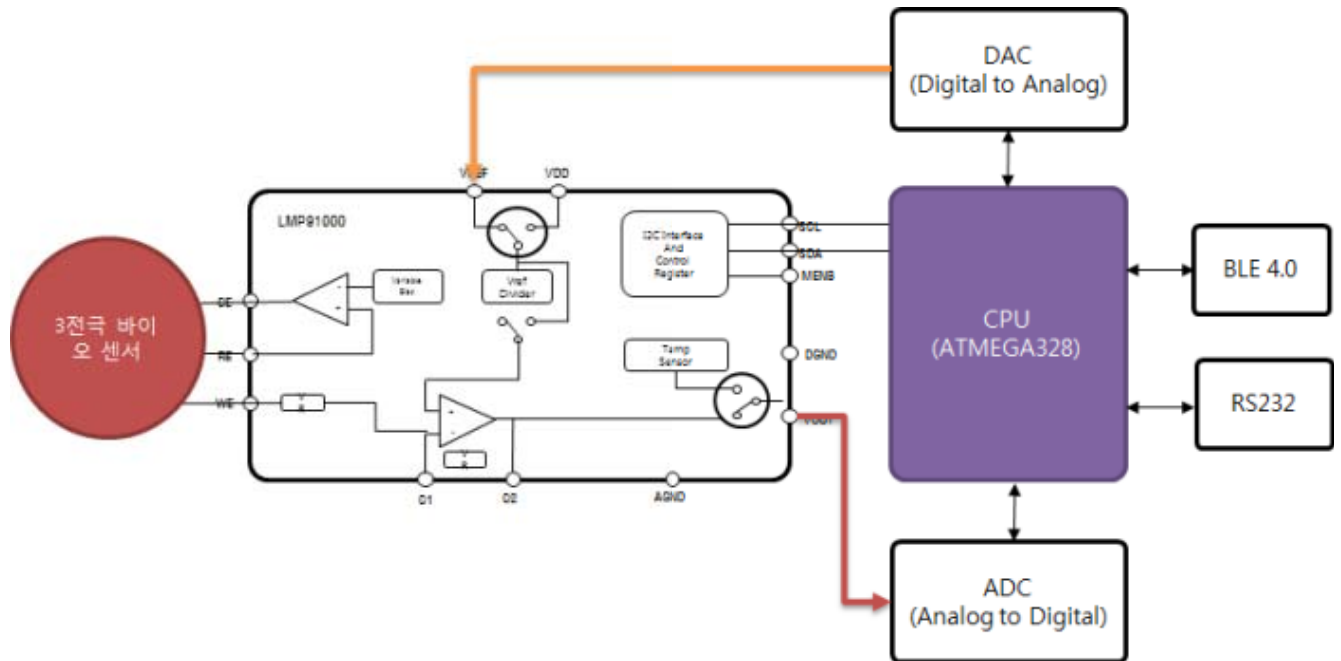


그림 41. LMP91000을 적용한 보드 구성도.

○ LMP91000 Potentiostat 보드 Layout

- 아래 그림은 LMP91000 Potentiostat 보드의 Top면과 Bottom 면의 layout과 실제 제작된 보드임.

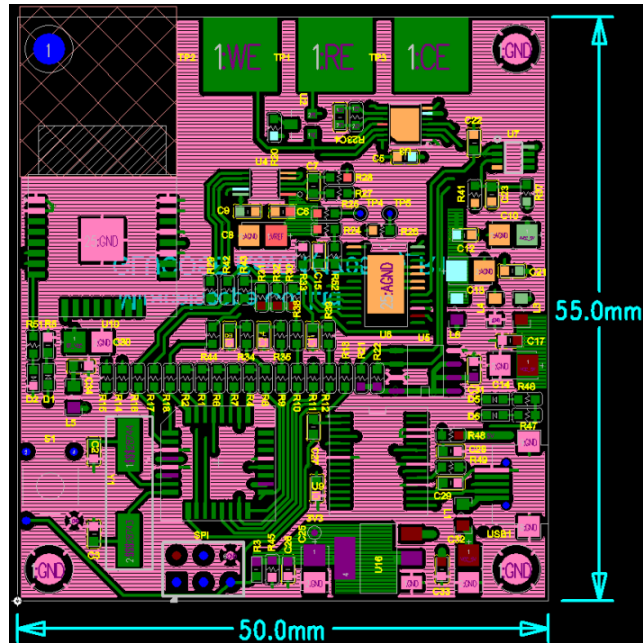


그림 42. Top Layer Routing

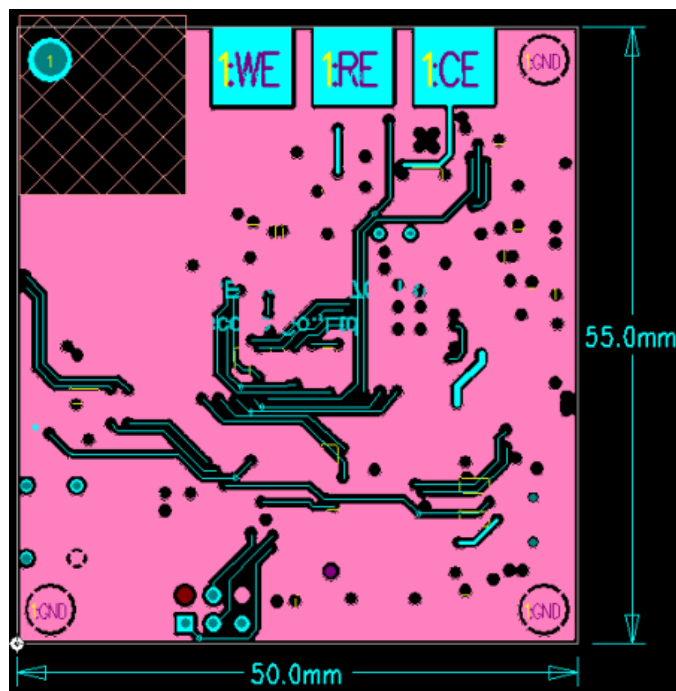


그림 43. Bottom Layer Routing

○ LMP91000 Potentiostat 보드 회로도

- 회로도는 아래 그림과 같이 보드 제어를 위한 CPU/전원 회로부, 바이오 센서 측정을 위한 전용 IC(LMP91000)/ADC(Analog to Digital Converter) 회로부, 신호 공급을 위한 DAC(Digital to Analog Converter)회로부, 및 통신 회로부 등 4부분으로 구성되어 있음.
- CPU는 ATMEL사의 ATMEGA328 8bit Microcontroller를 사용하였으며, 통신은 BLE 4.0 통신과 RS232 직렬 통신을 지원함.

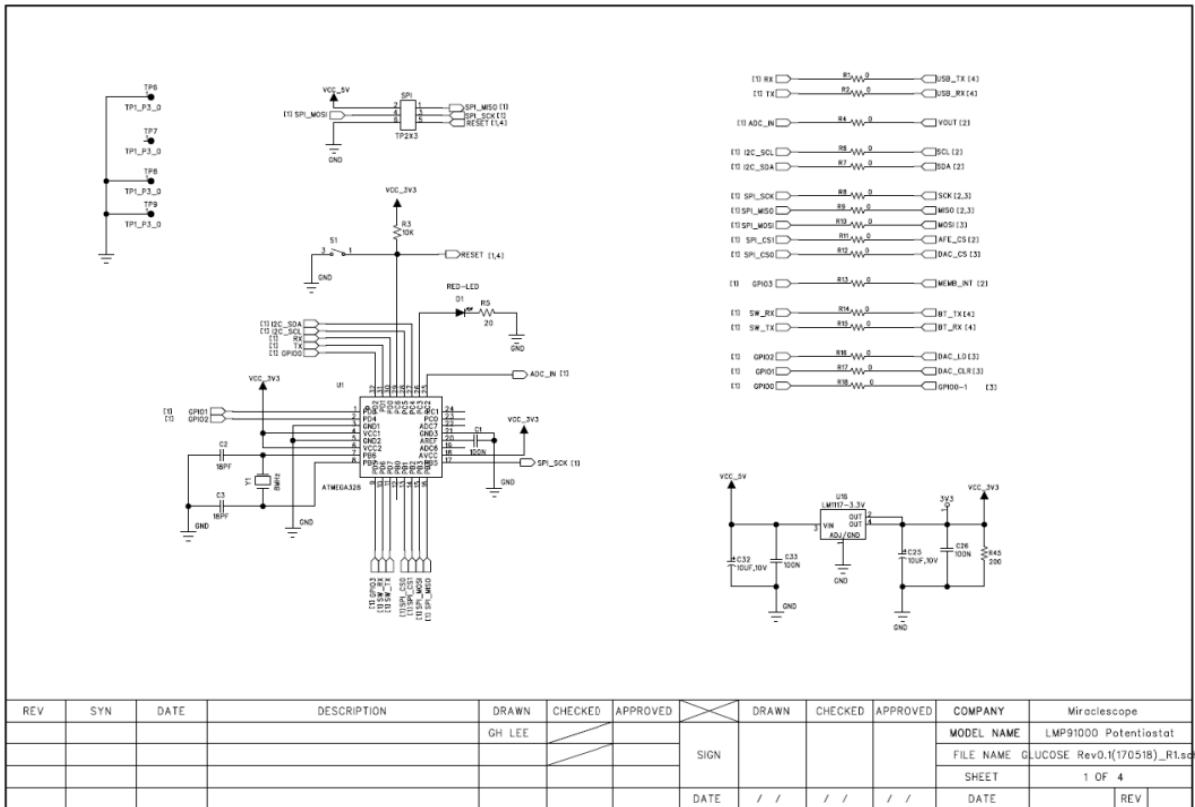


그림 44. LMP91000 Potentiostat 보드 회로도 : CPU 및 전원 회로부 설계 및 제작.

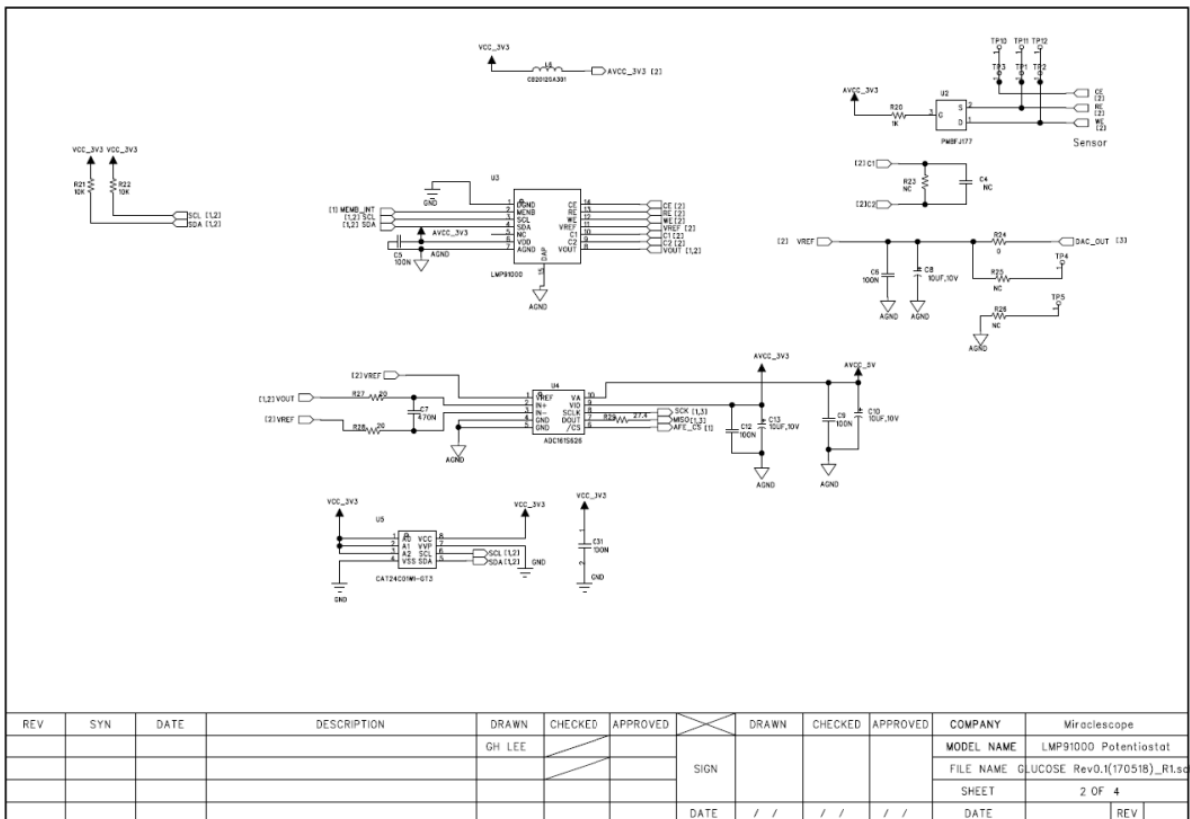


그림 45. LMP91000 Potentiostat 보드 회로도 : LPMP9100 회로부 설계 및 제작.

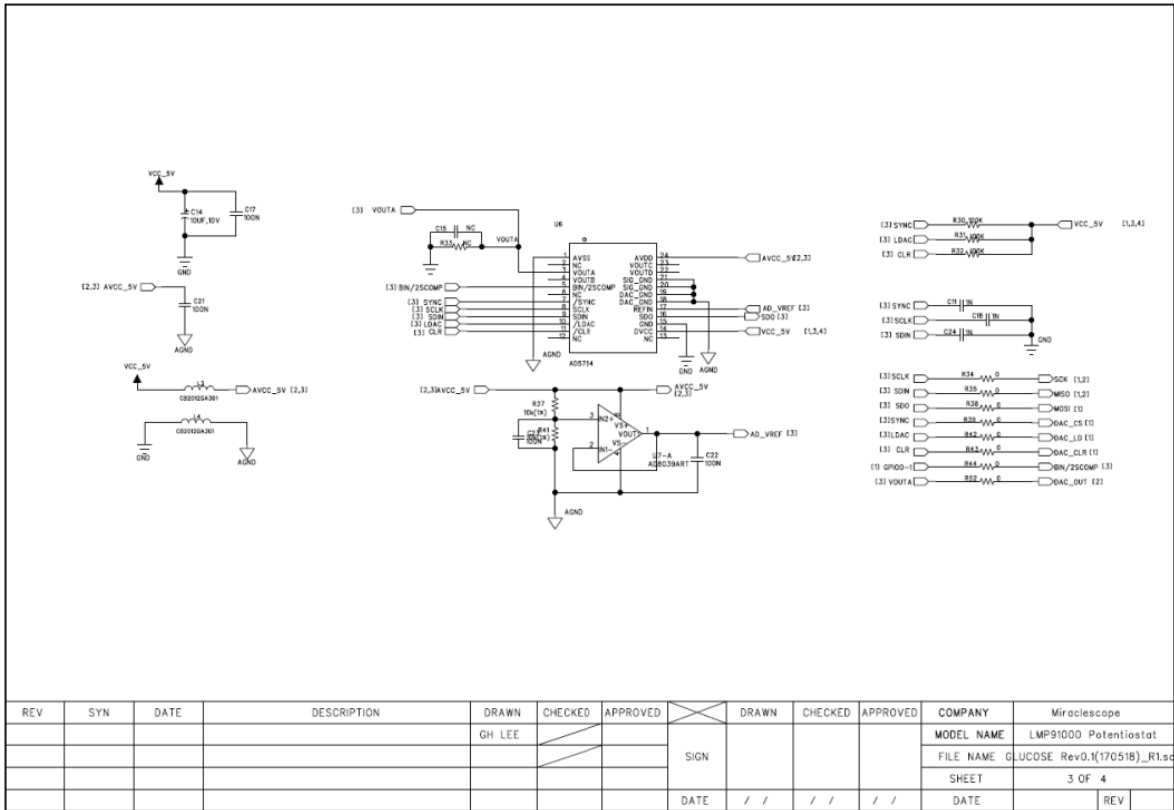


그림 46. LMP91000 Potentiostat 보드 회로도 : DAC(Digital to Analog Converter)회로부 설계 및 제작

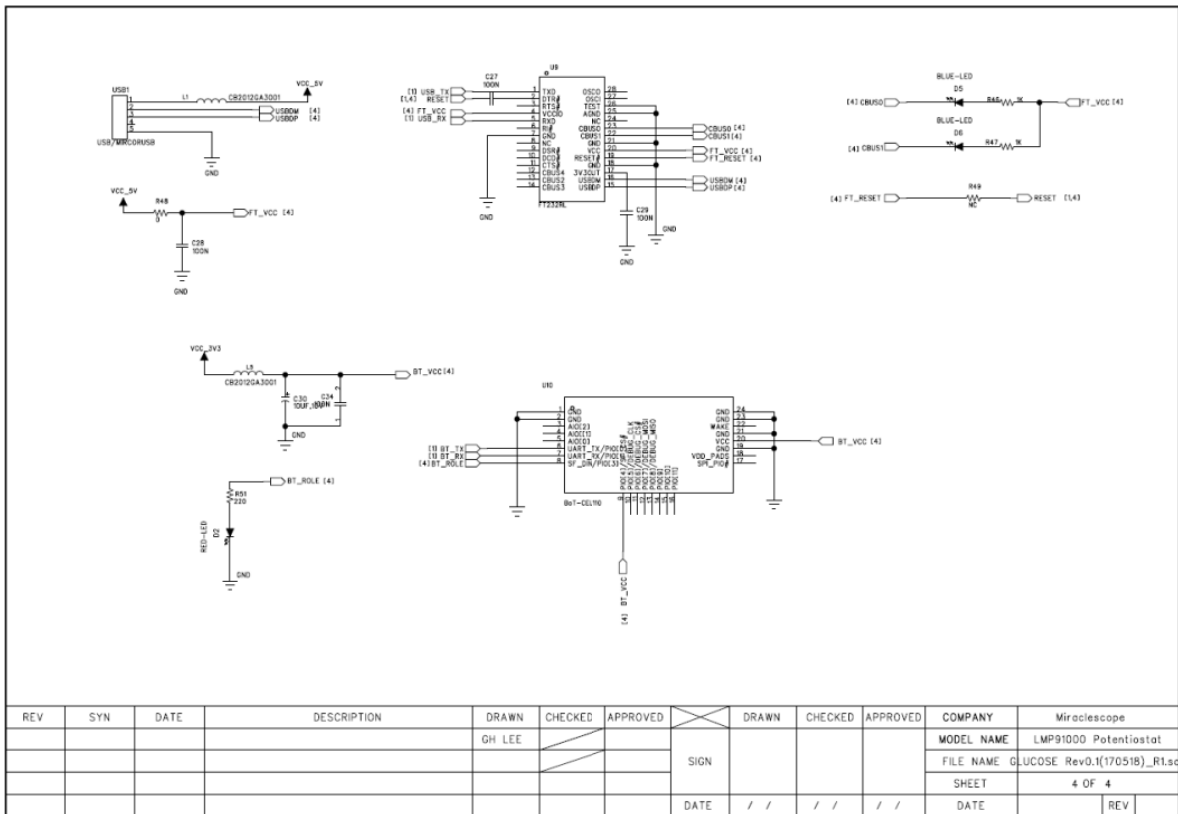


그림 47. LMP91000 Potentiostat 보드 회로도 : 통신 회로부 설계 및 제작

○ LMP91000 Potentiostat 보드 제작

- 아래 그림은 LMP91000 전용 IC를 사용하여 제작된 보드의 Top Layer와 Bottom Layer 임.

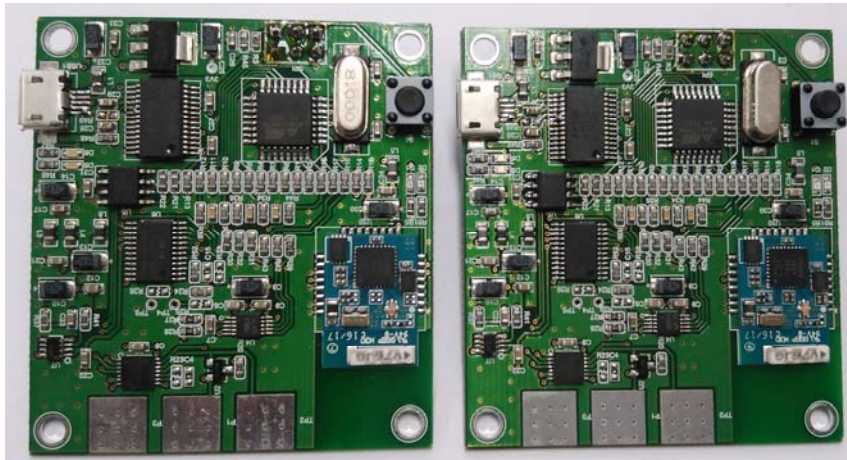


그림 48. 전용 IC를 사용하여 제작된 보드의 Top Layer PCB



그림 49. 전용 IC를 사용하여 제작된 보드의 Bottom Layer PCB

② 범용 IC로 구성된 Potentiostat(정전위기) 보드 제작

○ 범용 IC인 Op-Amp등을 사용하여 다음과 같은 2가지 형태의 CV(Constant Voltage)을 측정하는 보드를 제작함

- [Type 1] CE(Count Electrode)에 전압을 인가하고 WE(Working Electrode)에서 전류를 측정하는 보드
- [Type 2] RE(Reference Electrode)에 전압을 인가하고 CE(Counter Electrode)에서 전류를 측정하는 보드

○ 범용 IC를 사용하는 보드 구성도

- 개발된 보드는 위의 [Type 1]과 [Type 2]를 모두 측정할 수 있도록 제작됨.
- 아래 그림은 CE(Counter Electrode) 전극에 일정한 전압을 인가하고 WE(Working Electrode) 전극의 전류를 측정하는 방법.
- RE(Reference Electrode) 전극의 전위는 CE전극으로 Feedback되어 CE전극의 전위가 정전위를 유지하도록 함.
- WE의 전류는 I-to-V회로부, Gain이 높은 Op-Amp회로부 및 5차 LPF(Low Pass Filter) 회로부를 통과하면서 노이즈 감소되고 신호레벨이 증폭된 아날로그 신호가 생성됨.
- 아날로그 신호는 ADC(Analog-to-Digital)회로에서 디지털로 변환되어 고속의 CPU로 입력됨.

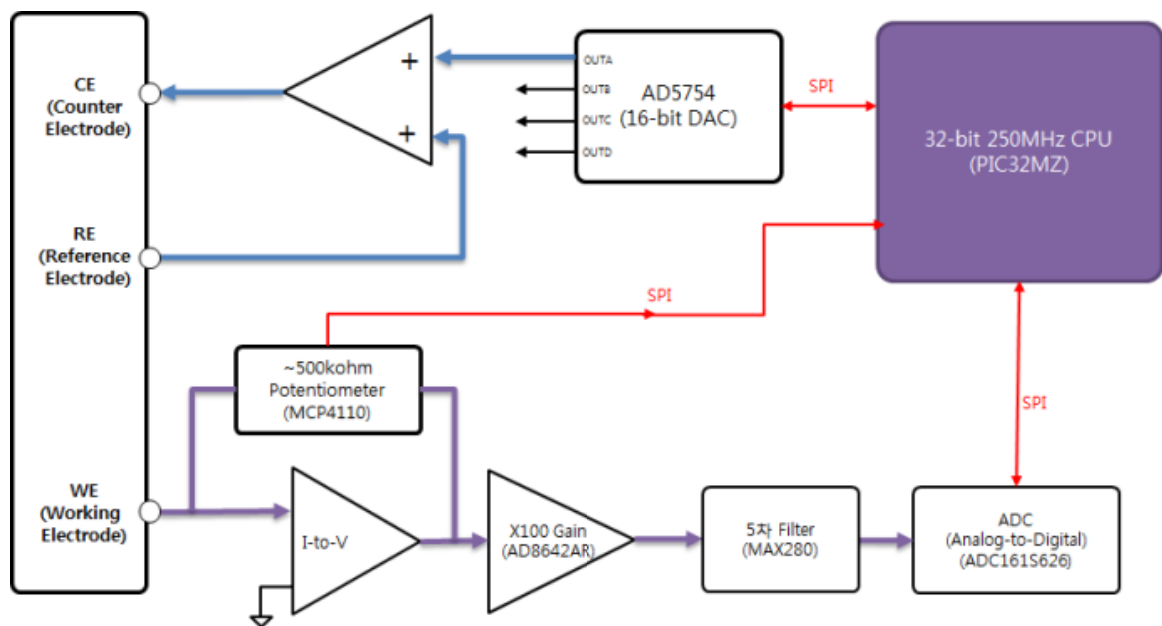


그림 50. [Type 1] CE(Count Electrode)에 전압을 인가하고 WE(Working Electrode)에서 전류를 측정하는 보드 구성도.

- 아래 그림은 RE(Reference Electrode) 전극에 일정한 전압을 인가하고 CE(Counter Electrode)전극의 전류를 측정하는 방법.

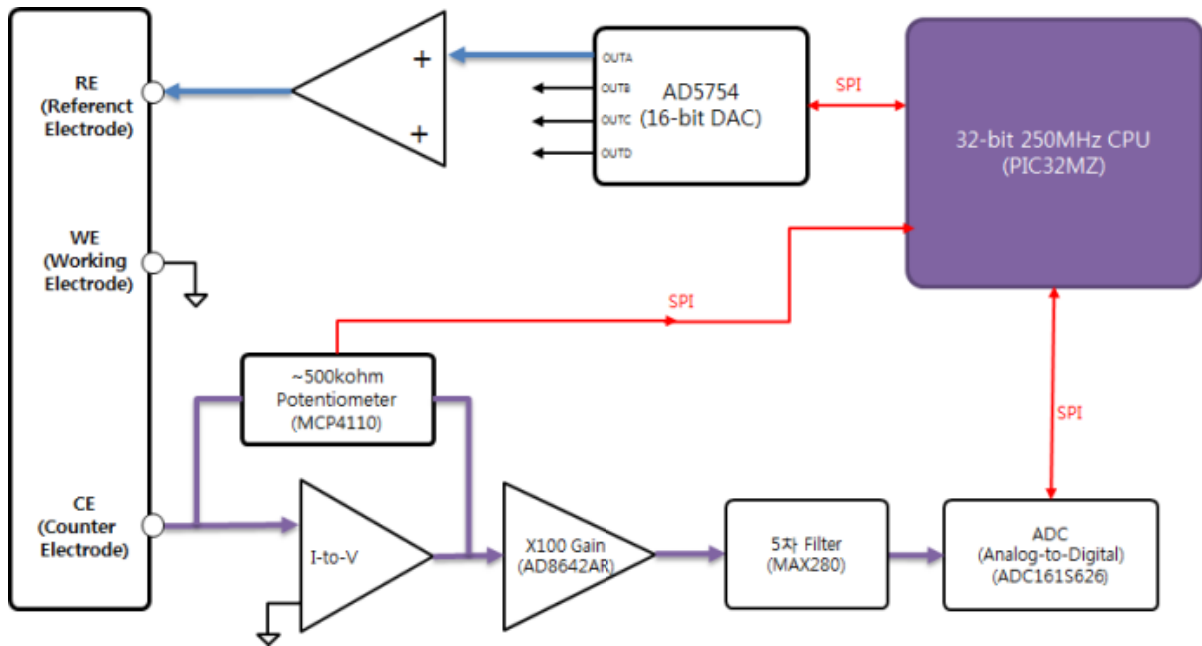


그림 51. [Type 2] RE(Reference Electrode)에 전압을 인가하고 CE(Counter Electrode)에서 전류를 측정하는 보드 구성도.

○ 범용 IC를 사용하는 보드 Layout

- 개발된 보드의 크기는 205x115mm 이며 주요 사양은 다음과 같음
 - 무연처리
 - PCB Layer : 2-Layer
 - 동박/재질 : 금도금 / FR-4

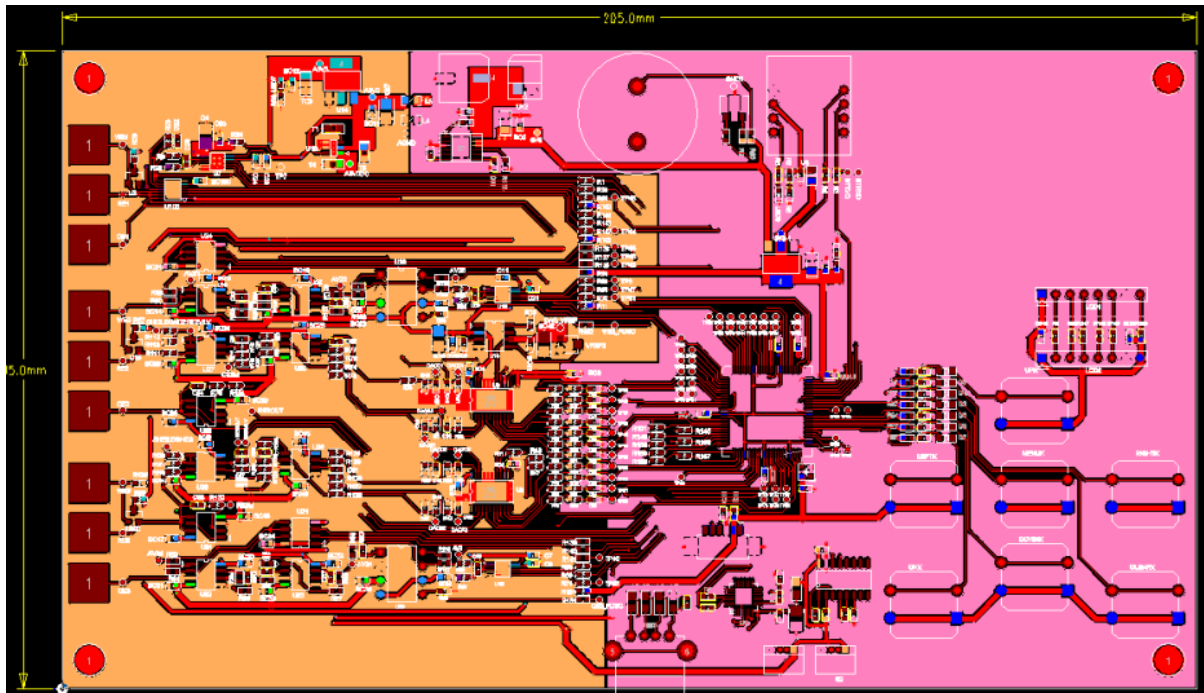


그림 52. 범용 IC를 사용하는 보드의 Top Layer Routing.

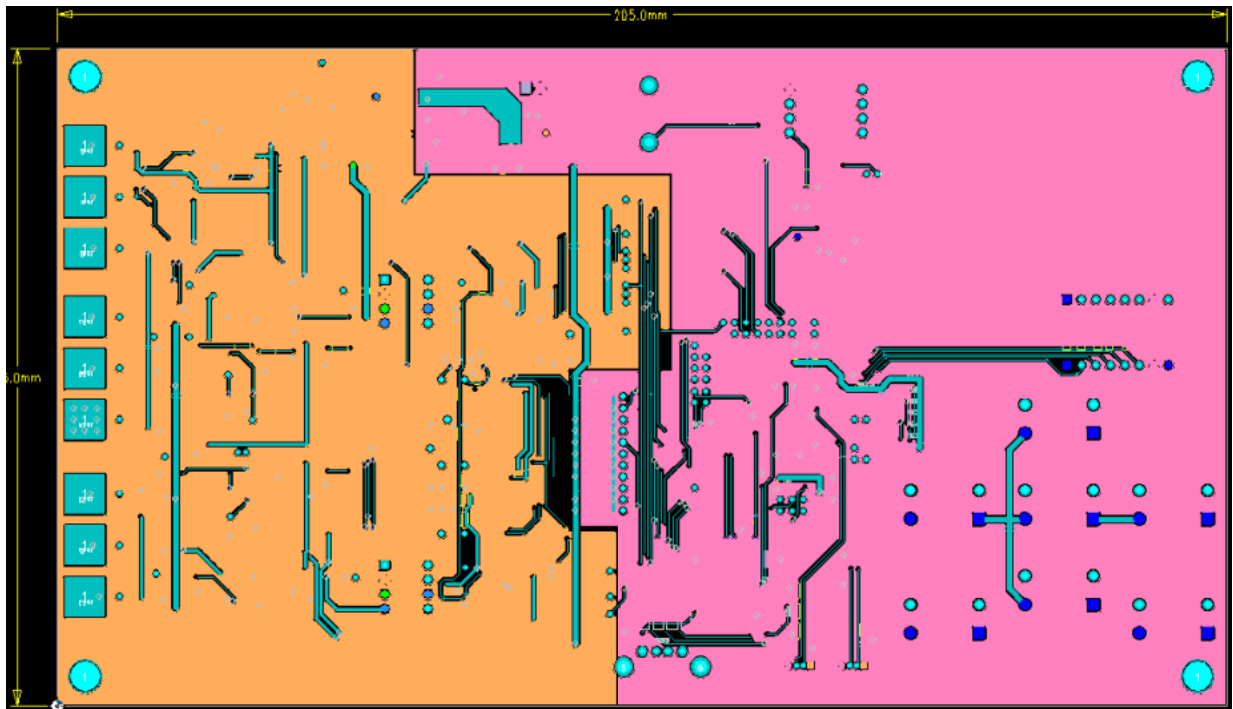


그림 53. 범용 IC를 사용하는 보드의 Bottom Layer Routing.

○ 범용 IC를 사용하는 보드 회로 개발

- 전원부 회로도에는 12V를 입력받아 DC-DC IC를 사용하여 디지털 5V, 디지털 3.3V와 아날로그 5V를 출력함.
- 디지털 5V의 신호명은 VCC_5V0, 디지털 3.3V의 신호명은 VCC_3V3이고 아날로그 5V의 신호명은 AVCC_5V0임.
- 또한 측정신호의 전원노이즈를 최소화하기 위해 아날로그 그라운드는 디지털그라운드와 분리하였음.

- 개발된 보드는 BT 통신으로 스마트폰 및 주변기기와 통신이 가능함.
- BT 통신용 모듈은 BLE 4.0 프로토콜을 지원하는 펌테크사의 FBL780BC 모듈을 사용함

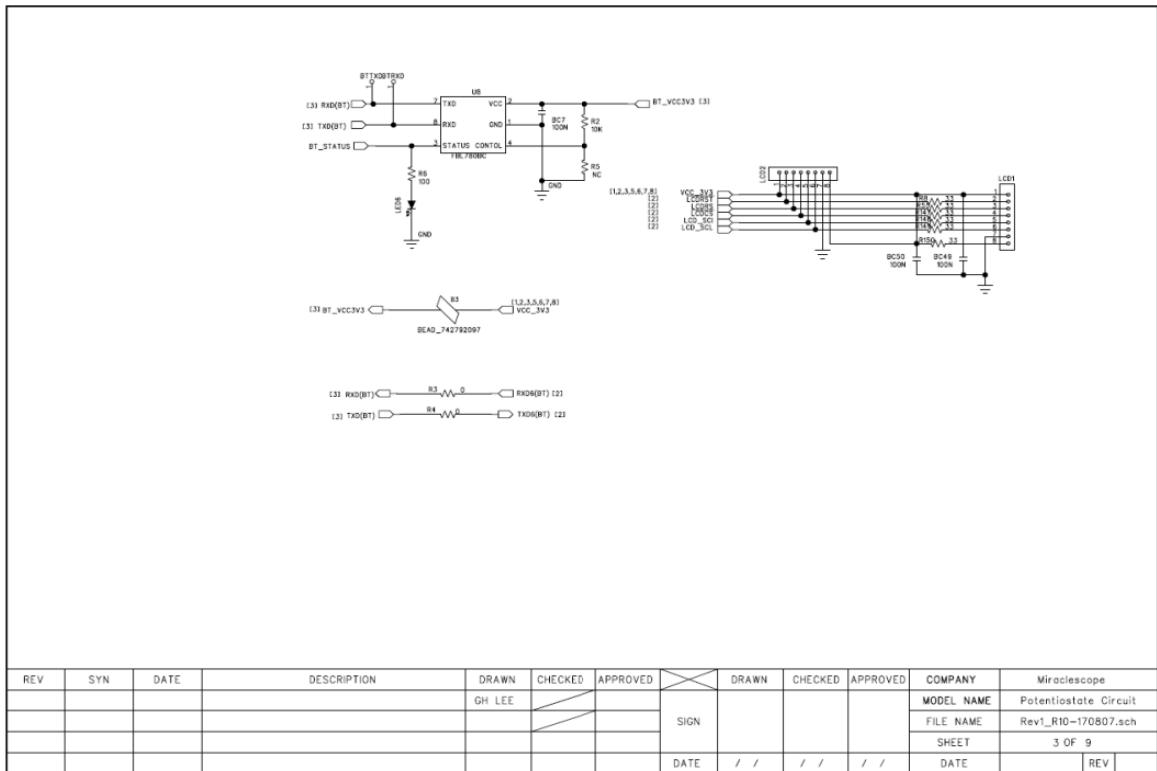


그림 56. 범용 IC를 사용하는 보드 BLE 통신부 회로도.

- WE 측정모드 회로도는 [Type 1]의 CE 전극에 일정한 전압을 인가하고 WE전극에서 전류는 측정하는 회로도임.

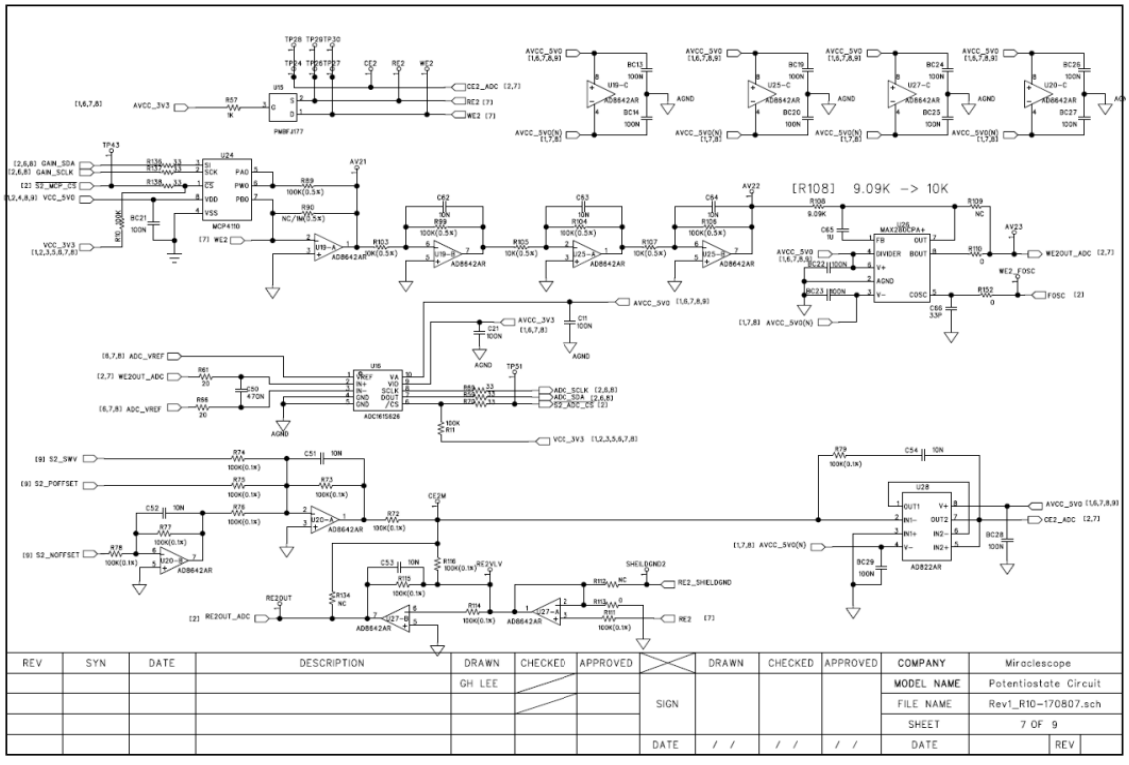


그림 57. 범용 IC를 사용하는 보드 WE 측정모드 회로도.

- CE 측정모드 회로도는 [Type 2]의 RE 전극에 일정한 전압을 인가하고 CE전극에서 전류는 측정하는 회로도임. 이때 WE 전극은 그라운드와 연결됨.

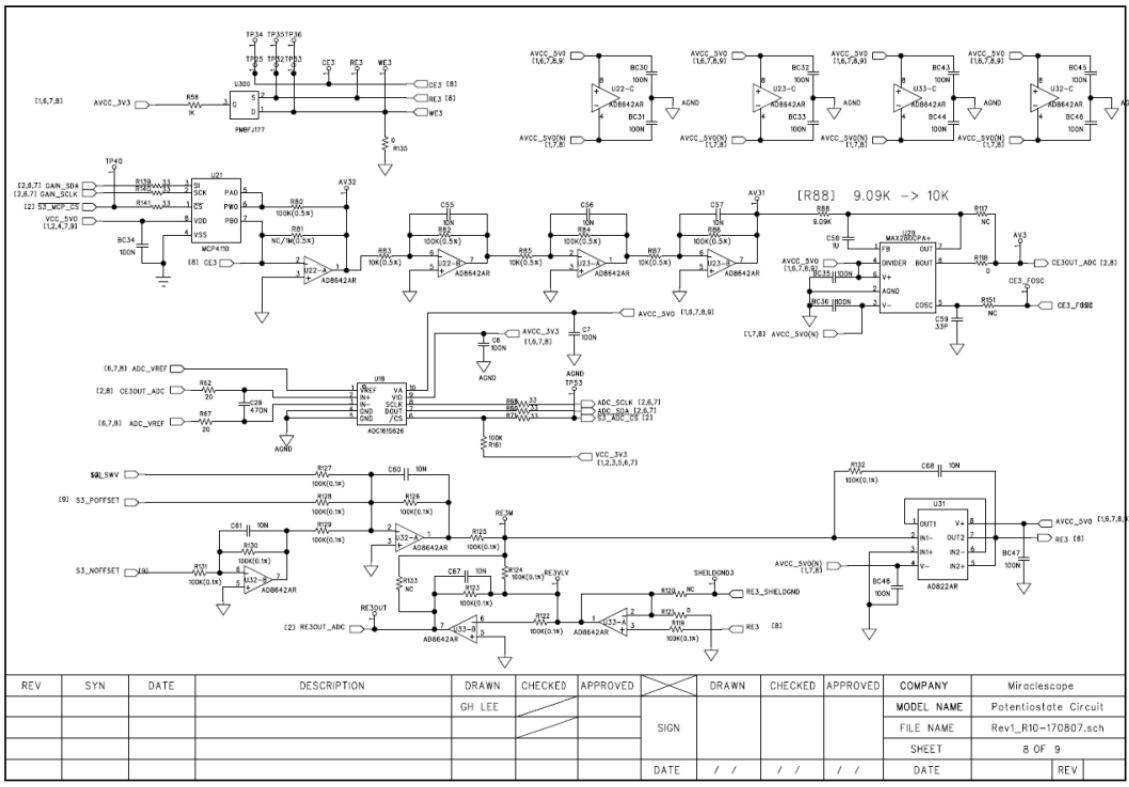


그림 58. 범용 IC를 사용하는 보드 CE 측정모드 회로도.

- 인가전압을 발생하는 DAC(Digital-to-Analog) IC는 Analog Device사의 AD5754를 사용함.
- AD5754는 특징은 다음과 같음.
 - Bit : 12-/14-/16-bit Digital-to-Analog Converter
 - Software Programmable Output Range : +5V, +10V, +/-5V, +/-10V
 - 본 과제에 Output Range는 +/-5V임

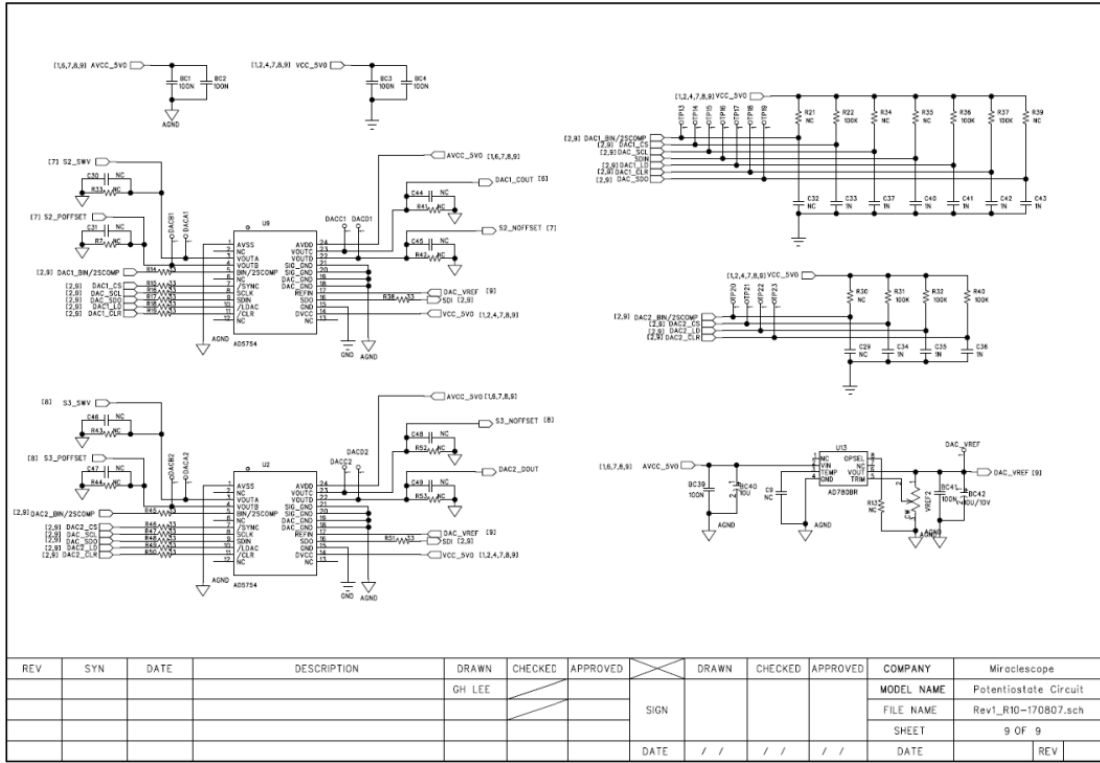


그림 59. 범용 IC를 사용하는 보드 DAC부 회로도.

- 외부와 통신을 위한 통신회로부는 RS-232통신과 USB통신을 지원함.

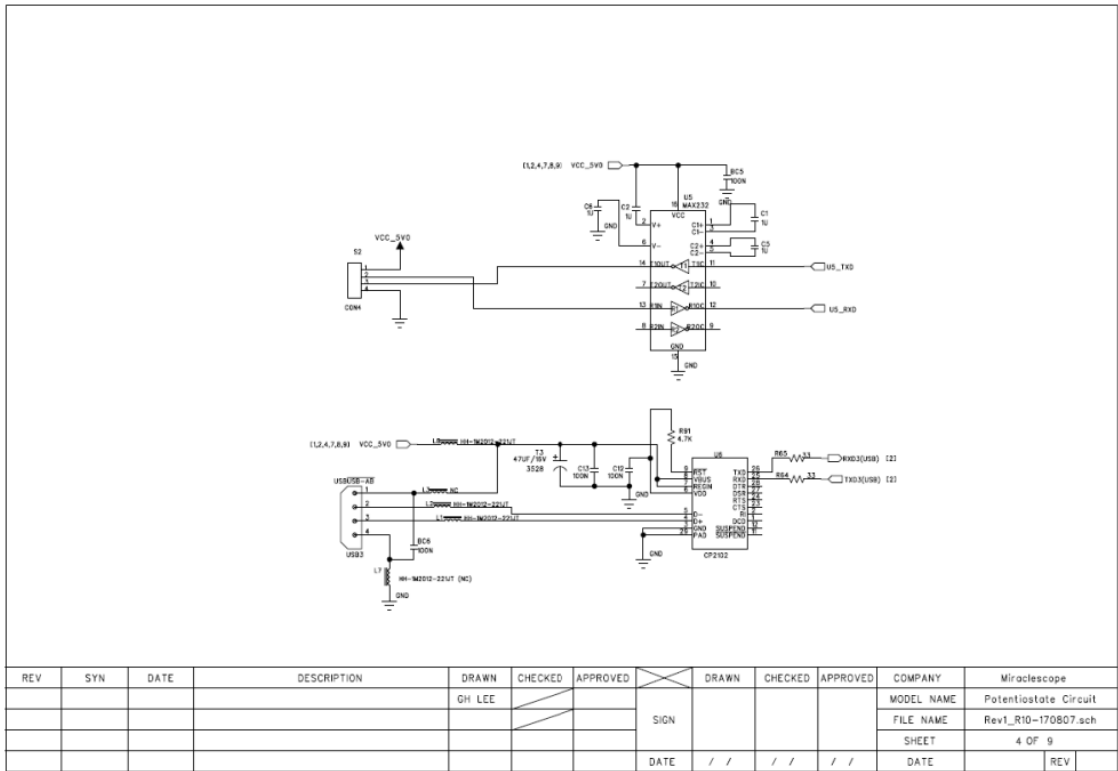


그림 60. 범용 IC를 사용하는 보드 통신부 회로도.

- Keypad Matrix는 Up, Down, Left, Right, Clear, OK, Menu Key 등 7개의 Key로 구성됨.

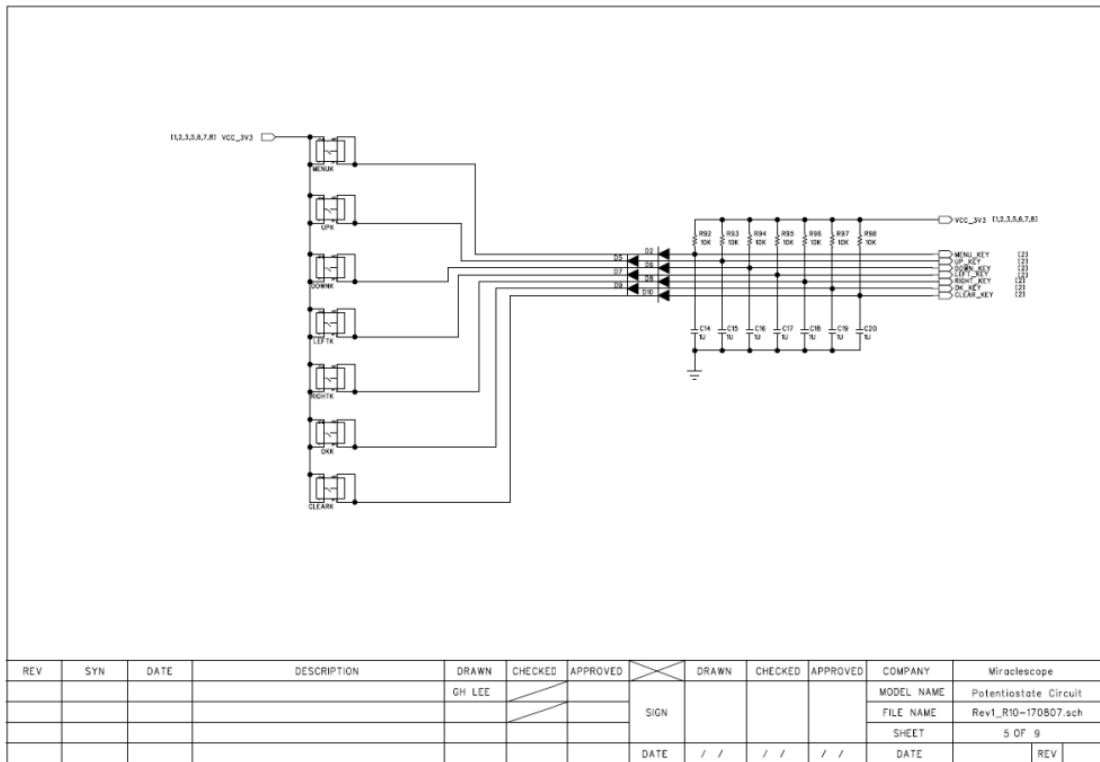


그림 61. 범용 IC를 사용하는 보드 Keypad부 회로도.

○ 범용 IC를 사용하여 제작된 보드

- 본 과제에서는 아래 그림과 같이 범용 IC를 사용하여 보드를 제작함.

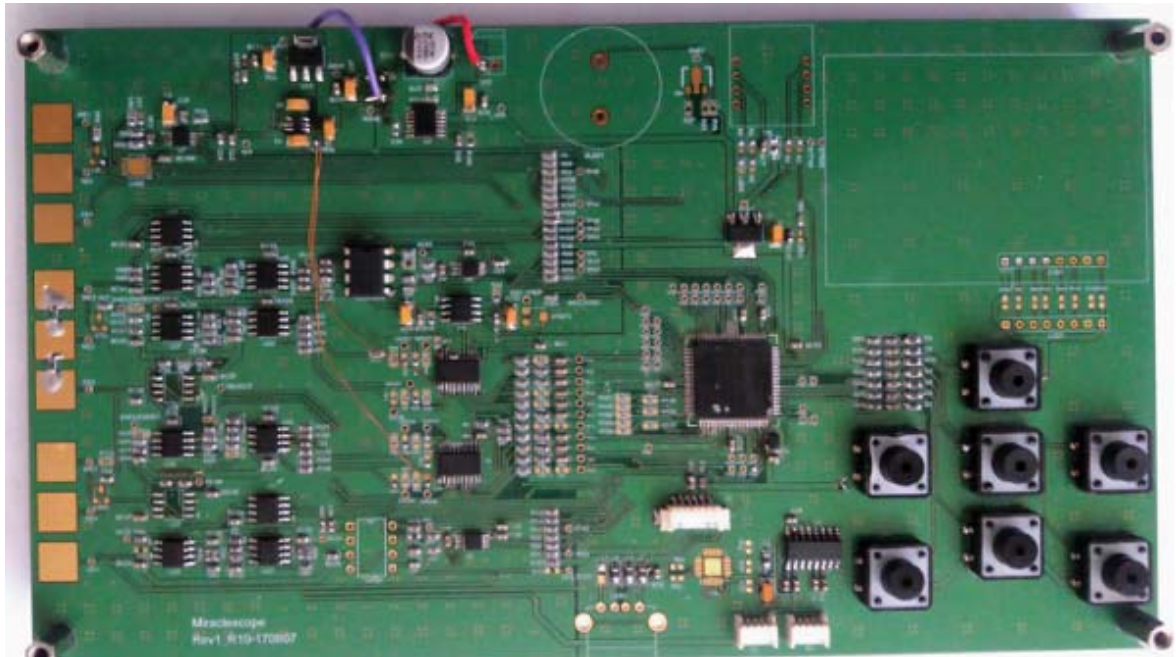


그림 62. 범용 IC를 사용하여 제작된 보드 Top Layer

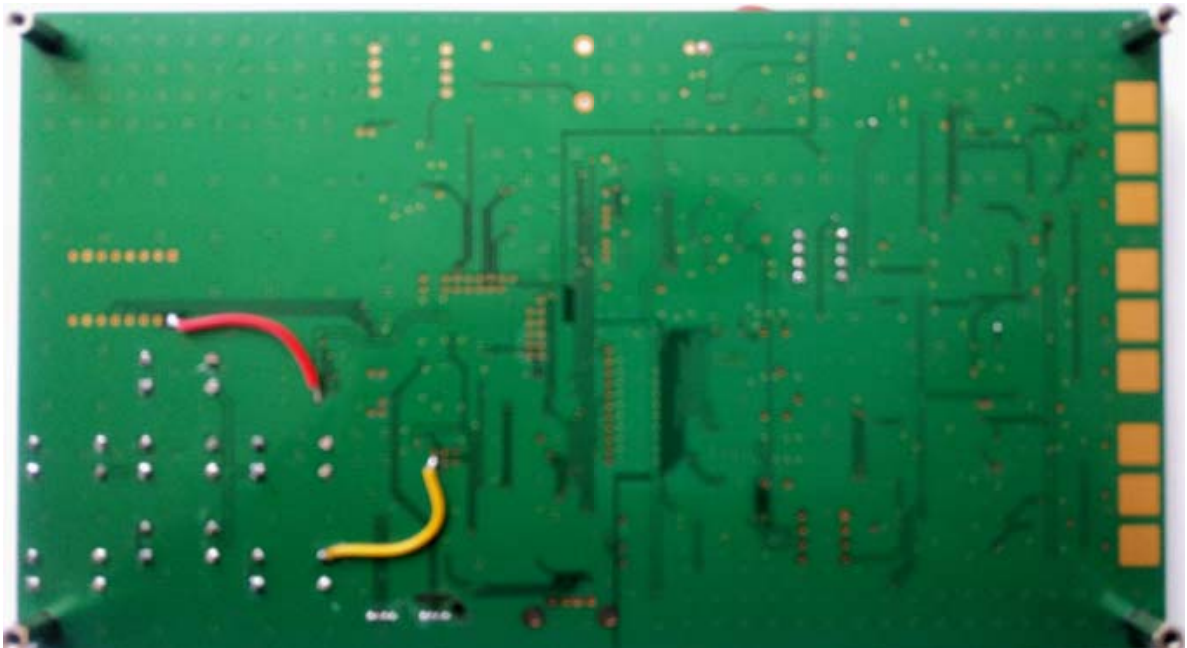


그림 63.. 범용 IC를 사용하여 제작된 보드 Bottom Layer

(3) 바이오 진단기기 보드 프로그램 개발 및 특성 평가

- 본 과제에서 제작된 Potentiostat(정전위기) 보드에 대해 프로그램을 개발하고 개별 특성

을 평가하고 통합함.

○ 본 과제에서 제작된 Potentiostat(정전위기) 보드의 각 부분의 동작은 아래 같음

- (1) CPU 회로부 : 시스템 통합 관리 및 측정 알고리즘 구현
- (2) 키패드 회로부 : 시스템 통합 관리를 위한 키 입력
- (3) 정전압 구동 회로부 : 바이오 센서의 전극에 정전압에 인가하고 전위차를 일정하게 유지하는 회로부
- (4) 전류 측정 회로부 : 바이오 센서로부터 측정된 전류를 전압으로 변환하고, 증폭 및 필터링하는 회로. 또한 아날로그 신호를 디지털신호로 변환하는 회로부

① CPU 회로부 프로그램 개발 및 특성 평가

○ CPU 회로부 프로그램 개발을 위한 개발 환경을 구축함.

- 본 과제에서 프로그램 개발을 위한 개발 환경 및 커파일러는 Microchip 사가 제공하는 Harmony 통합 개발 틀을 사용함.

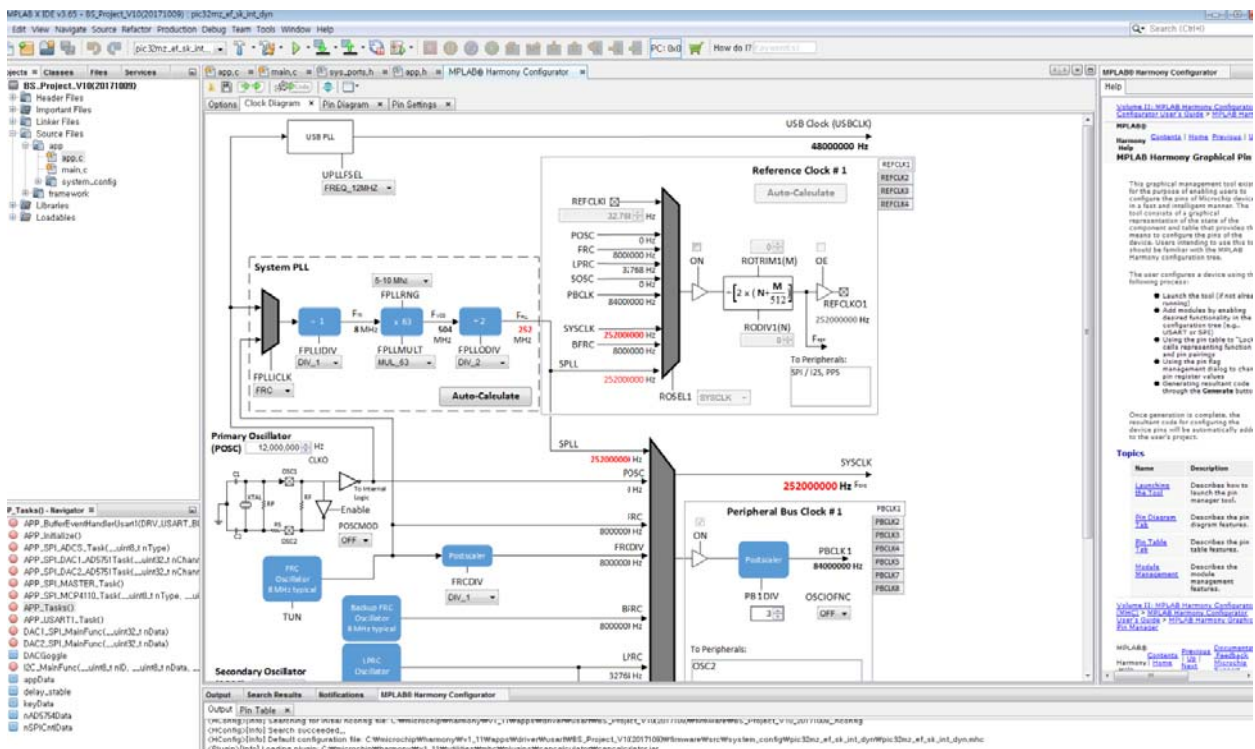


그림 64. 프로그램 개발 환경



그림 65. 프로그램 개발 및 보드 디버깅을 위한 장비 Setup

○ CPU 회로부의 구성 및 주요 부품 사양.

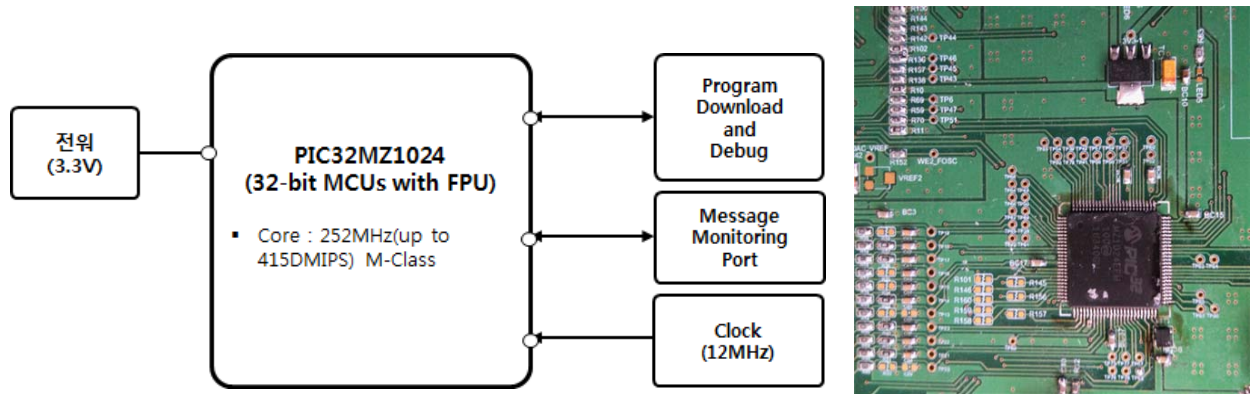


그림 66. 본 과제에서 제작된 바이오 진단기기 : CPU 회로부 구성도 및 PCB Block

○ CPU 회로부 주요 프로그램

표 1. 메인 루틴 프로그램 및 시스템 초기화 프로그램

<pre> Main Routine Program int main (void) { /* Initialize all MPLAB Harmony modules, including application(s). */ SYS_Initialize (NULL); while (true) { /* Maintain state machines of all polled MPLAB Harmony modules. */ SYS_Tasks (); } /* Execution should not come here during normal operation */ return (EXIT_FAILURE); } </pre>
<pre> 시스템 초기화 Program void SYS_Initialize (void* data) { /* Core Processor Initialization */ SYS_CLK_Initialize(NULL); sysObj.sysDevcon = SYS_DEVCON_Initialize(SYS_DEVCON_INDEX_0, (SYS_MODULE_INIT*)&sysDevconInit); SYS_DEVCON_PerformanceConfig(SYS_CLK_SystemFrequencyGet()); SYS_PORTS_Initialize(); /* Initialize Drivers */ /*Initialize TMR0 */ DRV_TMR0_Initialize(); sysObj.drivUsart0 = DRV_USART_Initialize(DRV_USART_INDEX_0, (SYS_MODULE_INIT *)&drivUsart0InitData); SYS_INT_VectorPrioritySet(INT_VECTOR_UART2_TX, INT_PRIORITY_LEVEL4); SYS_INT_VectorSubprioritySet(INT_VECTOR_UART2_TX, INT_SUBPRIORITY_LEVEL0); SYS_INT_VectorPrioritySet(INT_VECTOR_UART2_RX, INT_PRIORITY_LEVEL4); SYS_INT_VectorSubprioritySet(INT_VECTOR_UART2_RX, INT_SUBPRIORITY_LEVEL0); } </pre>

```

SYS_INT_VectorPrioritySet(INT_VECTOR_UART2_FAULT, INT_PRIORITY_LEVEL4);
SYS_INT_VectorSubprioritySet(INT_VECTOR_UART2_FAULT, INT_SUBPRIORITY_LEVEL0);

/* Initialize System Services */
sysObj.sysConsole0 = SYS_CONSOLE_Initialize(SYS_CONSOLE_INDEX_0, (SYS_MODULE_INIT
*)&consUsartInit0);

/** Debug Service Initialization Code */
sysObj.sysDebug = SYS_DEBUG_Initialize(SYS_DEBUG_INDEX_0, (SYS_MODULE_INIT*)&debugInit);

/** Interrupt Service Initialization Code */
SYS_INT_Initialize();

/* Initialize Middleware */

/* Enable Global Interrupts */
SYS_INT_Enable();

/* Initialize the Application */
APP_Initialize();
}

```

② 키패드 회로부 주요 프로그램

- 키패드 회로부는 시스템을 제어하고 관리하기 위한 키 입력 회로도.
- 본 과제에서 개발된 키패드 회로부의 구성은 아래 그림과 같음.

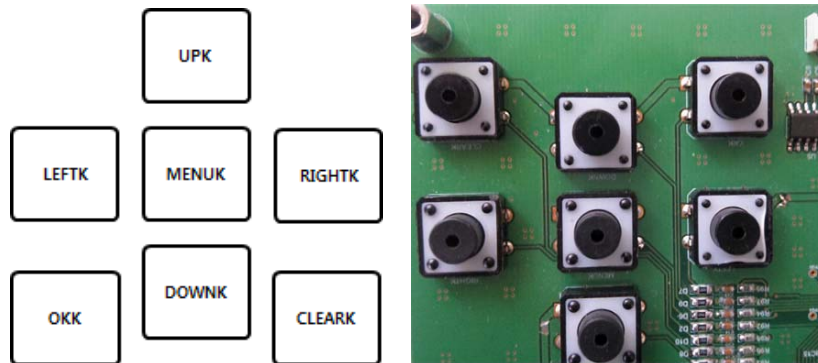


그림 67. 본 과제에서 제작된 바이오 진단기기 : 키패드 회로부 구성도

- 본 과제에서 개발된 키패드는 실시간 키처리를 위해 외부인터럽트 포트를 이용하여 노이즈를 최소화하기 위해 저항과 캐패시터를 직렬로 연결함.

표 2. 외부 인터럽트를 이용한 키패드 프로그램

```

키패드 프로그램
void __ISR_CHANGE_NOTICE_A_VECTOR, ipl6AUTO) _IntHandlerChangeNotification_PortA(void)
{
    if(SYS_PORTS_PinRead(PORTS_ID_0,PORT_CHANNEL_A ,PORTS_BIT_POS_2) == 0) // DOWN_K (RA2)
    {

```

```

        if(keyData.bDown_k == OFF) {
            keyData.bDown_k = ON;
            if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Down Key Pressed \r\n");
        }
    }
else if(keyData.bDown_k)
{
    keyData.bDown_k = OFF;
    if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Down Key Release \r\n");
}

if(SYS_PORTS_PinRead(PORTS_ID_0,PORT_CHANNEL_A ,PORTS_BIT_POS_3) == 0) // LEFT_K (RA3)
{
    if(keyData.bLeft_k == OFF) {
        keyData.bLeft_k = ON;
        if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Left Key Pressed \r\n");
    }
}
else if(keyData.bLeft_k)
{
    keyData.bLeft_k = OFF;
    if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Left Key Release \r\n");
}

if(SYS_PORTS_PinRead(PORTS_ID_0,PORT_CHANNEL_A ,PORTS_BIT_POS_4) == 0) // RIGHT_K (RA4)
{
    if(keyData.bRight_k == OFF) {
        keyData.bRight_k = ON;
        if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Right Key Pressed \r\n");
    }
}
else if(keyData.bRight_k)
{
    keyData.bRight_k = OFF;
    if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Right Key Release \r\n");
}

if(SYS_PORTS_PinRead(PORTS_ID_0,PORT_CHANNEL_A ,PORTS_BIT_POS_14) == 0) // CLEAR_K (RA14)
{
    if(keyData.bClear_k == OFF) {
        keyData.bClear_k = ON;
        nSPICntlData.nMode1_LMP91000_On = OFF;
        if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Clear Key Pressed \r\n");
    }
}
else if(keyData.bClear_k)
{
    keyData.bClear_k = OFF;
    if(MESSAGEON) SYS_DEBUG_Print("Clear Key Release \r\n");
}

    PLIB_INT_SourceFlagClear(INT_ID_0,INT_SOURCE_CHANGE_NOTICE_A);
}

```

③ 정전압 구동 회로부 프로그램 및 특성 평가

- 본 과제에서 개발되는 정전압 구동 회로부는 바이오 센서의 CE(Counter Electrode)전극에 정전압에 인가.
- 또한 RE(Reference Electrode) 전극과 WE(Working Electrode) 전극 사이의 전위차를 일정하게 유지하는 회로부임.
- 정전압 구동회로는 DAC(Digital-to-Analog) IC와 Op-Amp 등으로 구성됨. DAC (Digital-to-Analog) IC는 SPI인터페이스로 CPU와 통신함.

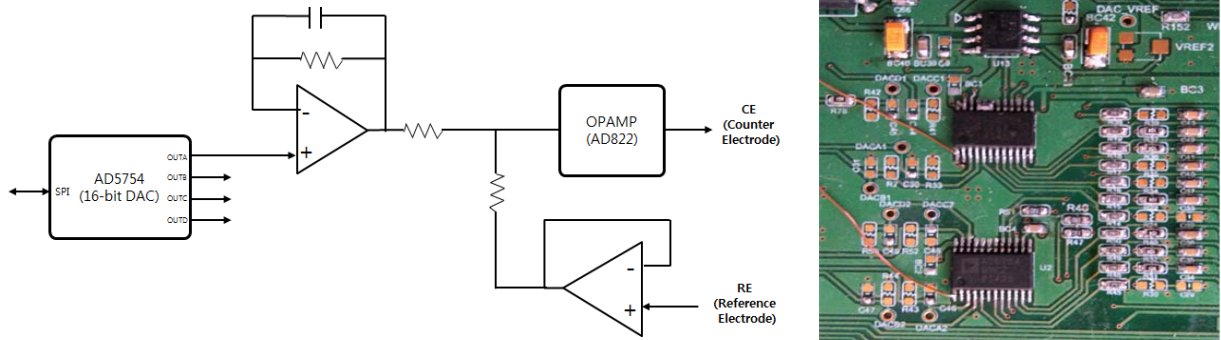


그림 68. 정전압 구동 회로 구성도 및 PCB Block

- DAC(Digital-to-Analog) IC는 Analog Device사의 AD5754 IC를 사용하며, 그 특징은 다음과 같음.
 - 채널 : 4-채널
 - 정밀도 : 16-bit 고정밀도
 - Error Rate : Max 0.1% FSR
 - Setting Time : 10us Typical
- 정전압 구동 회로부 프로그램

표 3. 정전압 제어를 위한 프로그램

정전압 제어를 위한 메인 프로그램 /***** Function: void APP_SPI_DAC1_AD5751Task(void) Parameters nChannel - DAC Channel 선택 nVolSet - 설정전압의 mV값 bPol- 설정전압의 극성

```

*
*/
void APP_SPI_DAC1_AD5751Task(uint32_t nChannel, uint32_t nVolSet, bool bPol)
{
    uint32_t nVolBinary = 0;

    if(bPol) nVolBinary = (nVolSet*32768)/5000 + 32767;
    else nVolBinary = 32767 - (nVolSet*32768)/5000;

    SYS_DEBUG_Print("DAC1 = 0x%x \r\n", nVolBinary);

    DAC1_SPI_MainFunc(nChannel + nVolBinary);
}

```

정정압 제어를 위한 서브 프로그램

```

Function:
void DAC1_SPI_MainFunc ( void )

Remarks:
See prototype in app.h.
*/
void DAC1_SPI_MainFunc(uint32_t nData) {
    uint8_t i;
    SYS_DEBUG_Print("DAC1 Set = 0x%x\r\n", nData);
    // CS Low
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_LD_PORT, DAC1_LD_BIT, 1);
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_CS_PORT, DAC1_CS_BIT, 0);

    for(i = 0; i<24; i++) { // Falling Edge : CH - D - CL
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC_SCL_PORT, DAC_SCL_BIT, 1);
        if(nData & 0x800000) {
            SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC_SDO_PORT, DAC_SDO_BIT, 1);
        }
        else {
            SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC_SDO_PORT, DAC_SDO_BIT, 0);
        }
        nData = nData << 1;
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC_SCL_PORT, DAC_SCL_BIT, 0);
    }
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S1_ADC_CS_PORT, S1_ADC_CS_BIT, 1);




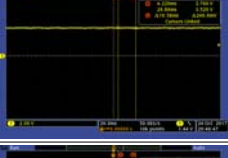




    // CS High
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_CS_PORT, DAC1_CS_BIT, 1);


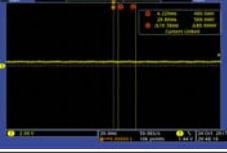


    // LATCH
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_LD_PORT, DAC1_LD_BIT, 1);
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_LD_PORT, DAC1_LD_BIT, 0);
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, DAC1_LD_PORT, DAC1_LD_BIT, 1);
}

```

○ Binary Code 형태의 디지털 입력에 따른 아날로그 출력의 계산값과 측정값은 다음 표와 같음. 측정값은 실제보드에서 오실로스코프를 이용하여 측정함.

- 측정 조건 : (Vref = 2.5V, Output Range : +/- 5V)
- 정전위 발생회로부는 설정전압에 따라 측정전압이 유사하여 정상동작을 하고 있음.
- 설정전압과 측정전압의 차이 오차는 20mV ~ 80mV 정도로 발생하였으며, 오차의 원인은 전원노이즈로 판단됨

입력값		측정결과		
설정전압 (mV)	디지털 입력 (Hex Code)	출력전압 (mV)	오차 (mV)	측정이미지
5000	0xFFFF	5040	40	
4500	0xF332	4560	60	
4000	0xE665	4080	80	
3500	0xD998	3520	20	
3000	0xCCCC	3040	40	
2500	0xC003	2560	60	
2000	0xB332	2080	80	
1500	0xA665	1520	20	

1000	0x9998	1040	40	
500	0x8CCB	560	60	
0	0x7FFF	80	80	
-500	0x7333	-440	60	

④ 전류 측정회로부 프로그램 및 특성 평가

○ 전류 측정 회로부는 바이오 센서로부터 측정된 전류를 전압으로 변화하고 opamp에서 전압을 증폭하여 ADC(Analog-to-Digital Converter)로 입력함. 아래 그림은 전류 측정회로도의 구성도임.

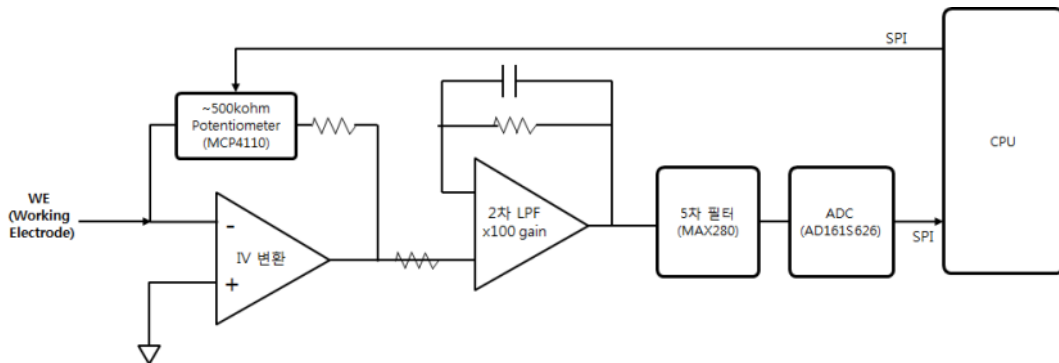


그림 69. 본 과제에서 제작된 바이오 진단기기 : 센서 전류 측정 회로부 구성도

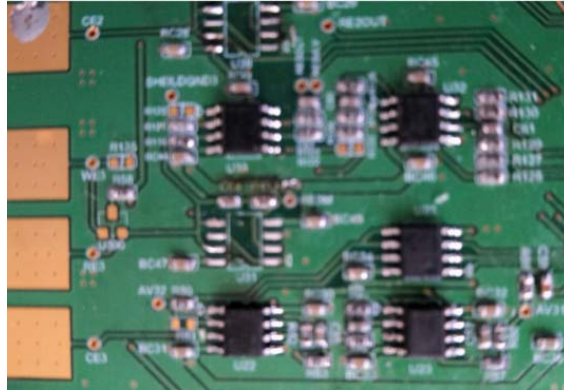


그림 70. 본 과제에서 제작된 바이오 진단기기 : 센서 전류 측정 회로부

- 전류측정부 제어용 프로그램
 - Potentiometer IC 제어 프로그램

표 4. Potentiometer IC 제어를 위한 프로그램

Potentiometer IC 제어 메인 프로그램
<pre> /***** Function: void APP_SPI_ADCS1_Task(void) Remarks: See prototype in app.h. */ void APP_SPI_MCP4110_Task(uint8_t nType, uint8_t nCommand, uint8_t nPMType, uint8_t nSetData) { uint8_t i = 0; uint32_t nData = 0; nData = (uint32_t) (nCommand + nPMType); nData = ((nData) << 8) + nSetData; SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SCLK_PORT, GAIN_SCLK_BIT, 0); // CS Low switch(nType) { case SPI_MCP4110_1: SYS_DEBUG_Print("MCP4110 1 value 0x%x \r\n", nData); SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S2_MCP_CS_PORT, S2_MCP_CS_BIT, 0); break; case SPI_MCP4110_2: SYS_DEBUG_Print("MCP4110 2 value 0x%x \r\n", nData); SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S3_MCP_CS_PORT, S3_MCP_CS_BIT, 0); break; } } </pre>

```

for(i = 0; i<16; i++) {
    if(nData & 0x8000) {
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SDA_PORT, GAIN_SDA_BIT, 1);
    }
    else {
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SDA_PORT, GAIN_SDA_BIT, 0);
    }
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SCLK_PORT, GAIN_SCLK_BIT, 1);
    nData = nData << 1;
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SCLK_PORT, GAIN_SCLK_BIT, 0);
}
// CS High
switch(nType) {
    case SPI_MCP4110_1:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S2_MCP_CS_PORT, S2_MCP_CS_BIT, 1);

        break;

    case SPI_MCP4110_2:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S3_MCP_CS_PORT, S3_MCP_CS_BIT, 1);
        break;
}

SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, GAIN_SCLK_PORT, GAIN_SCLK_BIT, 1);
}

```

- ADC(Analog-to-Digital) 제어 프로그램

표 5. ADC(Analog-to-Digital) 제어를 위한 프로그램

ADC(Analog-to-Digital) 제어 메인 프로그램
<pre> /***** Function: void APP_SPI_ADCS_Task(uint8_t nType) Remarks: See prototype in app.h. * */ void APP_SPI_ADCS_Task(uint8_t nType) { uint8_t i = 0; uint32_t nData = 0; // CS Low switch(nType) { case SPI_ADCS1: SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S1_ADC_CS_PORT, S1_ADC_CS_BIT, 0); </pre>

```

        break;

    case SPI_ADCS2:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S2_ADC_CS_PORT, S2_ADC_CS_BIT, 0);
        break;

    case SPI_ADCS3:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S3_ADC_CS_PORT, S3_ADC_CS_BIT, 0);
        break;
}

for(i = 0; i<18; i++) {
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, ADC_CLK_PORT, ADC_CLK_BIT, 0);
    nData = nData << 1;
    if(SYS_PORTS_PinRead(PORTS_ID_0, ADC_SDA_PORT, ADC_SDA_BIT)) {
        ++nData;
    }
    SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, ADC_CLK_PORT, ADC_CLK_BIT, 1);
}
// CS High
switch(nType) {
    case SPI_ADCS1:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S1_ADC_CS_PORT, S1_ADC_CS_BIT, 1);
        SYS_DEBUG_Print("SDA1 value 0x%x \r\n", nData);
        break;

    case SPI_ADCS2:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S2_ADC_CS_PORT, S2_ADC_CS_BIT, 1);
        SYS_DEBUG_Print("SDA2 value 0x%x \r\n", nData);
        break;

    case SPI_ADCS3:
        SYS_PORTS_PinWrite(PORTS_ID_0, S3_ADC_CS_PORT, S3_ADC_CS_BIT, 1);
        SYS_DEBUG_Print("SDA3 value 0x%x \r\n", nData);
        break;
}
}
}

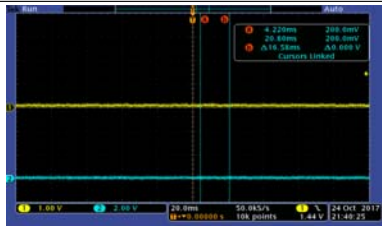
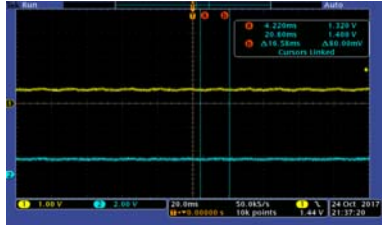
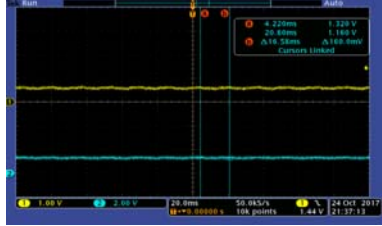
```

○ 전류 측정부 특성 평가

- 용액 대신에 등가저항(10Mohm)를 사용하여 전류 측정부의 특성을 평가함
- 회로 각 부의 gain과 레벨은 아래 표와 같음

인가전압 (V)	저항	전류 (A)	IV Gain	전압 (V)	LPF Opamp Gain (x100)	5차 LPF Opamp gain (x2.7)	출력전압 (V)
0	10000000	0	100000	0	0	2.7	0
0.5	10000000	5E-08	100000	0.005	0.5	2.7	1.35
1	10000000	1E-07	100000	0.01	1	2.7	2.7

- 아래표는 실제 측정값으로 계산값과 동일함을 알 수 있음.

입력값		측정결과		
CE 전극 인가전압(V)		예상출력전압 (mV)	측정전압 (mV)	측정이미지
0.000			0000	
0.500			1350	
0.100			2700	

□ 일회용 스트립 제작

- 본 과제에서 사용이 편리하고 정밀한 측정이 가능한 일회용 스트립을 제작하였음.
- 일회용 스트립은 센서삽입부, 센서홀더, 용액투입구 및 전극으로 구성되며, 일회용의 특성에 맞게 가격이 저렴한 구조로 제작함.
- 아래 그림은 일회용 스트립 3D 모델링 및 기구 설계도임.

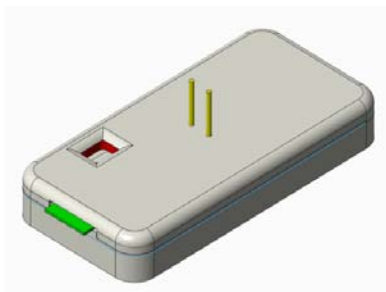


그림 71. 일회용 스트립 전체 도면

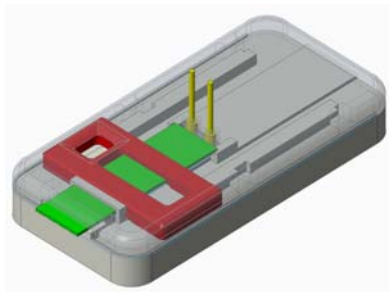


그림 72. 일회용 스트립 내부 구조

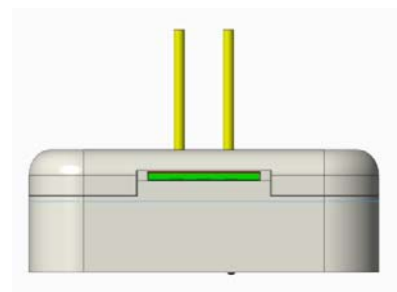


그림 73. 일회용 스트립 측면도

- 아래 그림은 본 과제에서 제작된 일회용 스트립 시제품임.

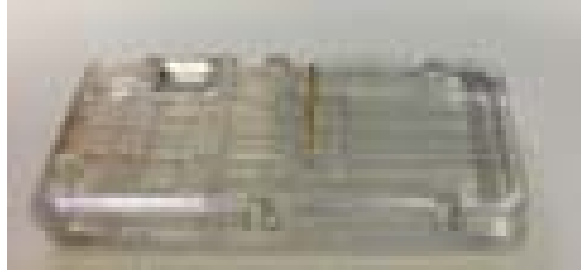


그림 74. 카트리지 시제품

□ 1종 분석이 가능한 바이오 진단기기 시제품 제작

- 본 과제에서 1종 분석이 가능한 바이오 진단기기 시제품을 제작함. 제작된 시제품에 대한 디자인, 기구도면, 시제품 이미지는 아래와 같음..

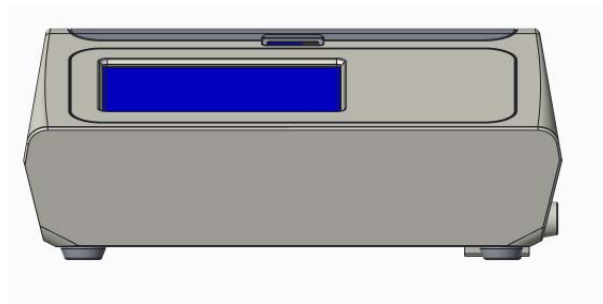


그림 75. 본 과제에서 제작된 시제품 기구 도면.

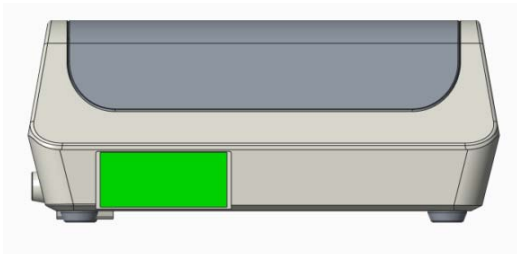


그림 76. 본 과제에서 제작된 시제품의 측면 기구 도면.

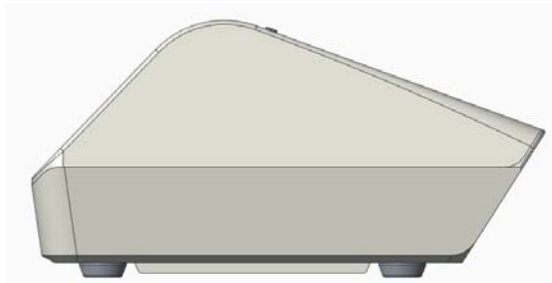


그림 77. 본 과제에서 제작된 시제품의 옆면 기구 도면.

- 아래 그림은 본 과제에서 제작된 1종 분석이 가능한 바이오 진단기기 시제품임.



그림 78. 본 과제에서 제작된 바이오 진단기기 시제품

(1) PAG 진단용 전기식 센서의 전극 제작

- 전기화학센서의 전극으로 Au, Pt, ITO, carbon 등 다양한 소재의 전극이 있으므로 PAG 검출을 위한 최적의 전극을 선정하였음. 반도체 공정으로 제작하는 Au, Pt 전극은 WE, CE 등의 전극 패턴 제작이 필요하므로 센서의 단가가 비싸고 센서 실험시 기질-효소 반응 산물에 의한 신호 측정시 안정적으로 효소의 농도에 비례해 생산되는 산물의 농도에만 반응하는 전극을 선정하는 것이 중요함. 저렴한 가격으로 구성할 수 있는 일회용 센서 모듈이 가능하도록 하는 ITO 전극과 Carbon 전극 스트립을 이용하여 ALP 효소 반응 실험을 진행하여 기질 용액에는 반응하지 않고 산물의 농도에 비례해 전기신호를 출력하는 결과를 통해 ITO 전극을 사용하여 임신진단 센서를 제작하기로 함.

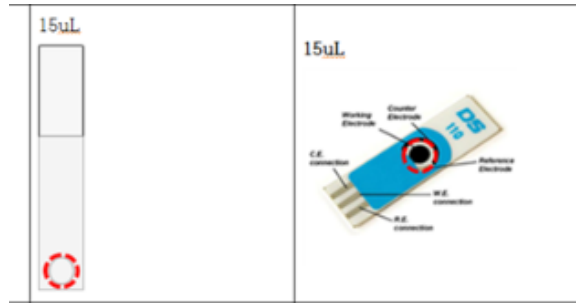


그림 79. 일회용으로 적용 가능한 PAG 검출을 위한 전기화학 센서 전극

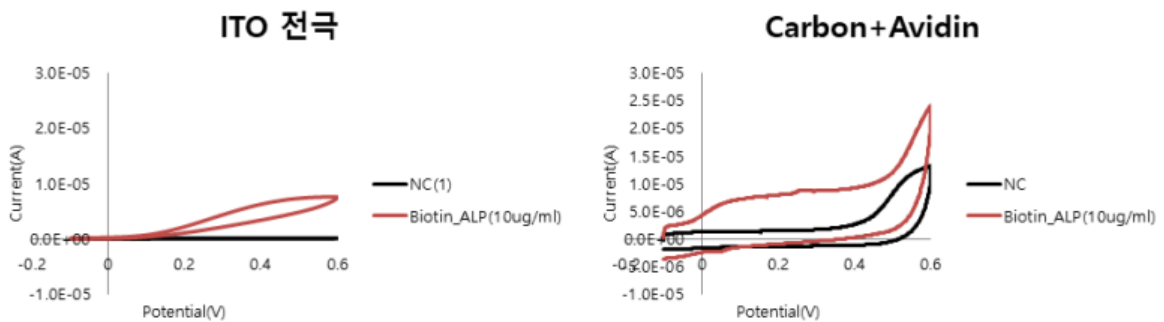


그림 80. 신호물질인 ALP 효소 반응에 의한 전기화학신호 특성-cyclic voltametry 측정, ITO 전극이 신호가 매우 안정적이고 NC의 값이 낮아 우수함

- 전기화학전극으로 ITO를 적용할 경우 또다른 장점은 ITO 전극 유리 기판은 디스플레이 산업에서 투명 전극으로 활용되어 양산이 되므로 가격이 저렴함. 전기화학센서는 작업전극(WE), 카운터전극(CE), 기준전극(RE)인 3전극으로 구성이 되므로 이를 통합하는 전극 제작 방법이 필요함. 전기화학센서에 적용하는 작업전극은 면적이 일정해야 전기신호의 크기로 타겟 물질의 농도를 측정할 수 있으므로 동일한 전극 면적을 갖도록 제작해야함. 매우 간단하고 저렴한 방법으로 ITO 작업 전극을 제작하는 방법으로 본 연구에서는 다이싱 공정과 내화학성 특성이 우수한 테플론 테이프를 이용하여 동일한 면적을 갖는 ITO 전극을 대량으로 제작하는 방법을 고안하였음.
- 먼저, Dicing saw 장비로 동일한 폭 간격을 갖는 ITO 전극을 제작함. 이를 지그 형태의 틀에 고정시킨 후 테플론 테이프로 동일한 면적만 노출되도록 제작함. 테플론 테이프는 내화학성이 우수하고 시료 용액내에서 전극을 절연시키는 역할을 하게 되므로 매우 간단하고 저렴하게 WE과 CE 전극을 대량으로 제작할 수 있음. RE 전극은 ITO 전극 상부에 추가로 Ag/AgCl paste를 코팅하여 제작하며 이렇게 제작된 WE, CE, RE를 하나의 모듈로 묶으면 면역진단을 위한 전기식 센서로 활용할 수 있음.

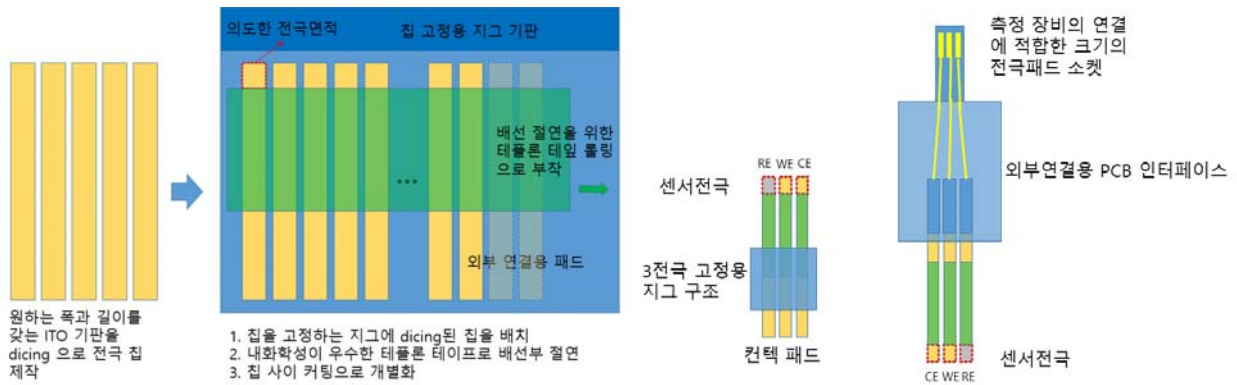


그림 81. 간단하고 저렴하게 대량제작 가능한 일회용 ITO 전기화학 센서 제조 방법 및 구성도.

(2) 전기식 센서용 일회용 카트리지 설계 및 기초 실험

- ITO 전극을 이용한 면역진단용 일회용 카트리지는 WE, CE로 구성되어야 할 적어도 2개의 ITO 전극과 Ag/AgCl 로 제작된 RE 전극으로 구성되어야 함. 이를 고정시키고 검사 시료를 간단하게 적용하고 측정하는 진단용 카트리지 구조를 설계하고 제작함. 일회용 진단 카트리지는 저렴해야 하므로 플라스틱 사출이 가능한 구조로 하였으며, ITO 전극을 외부로 연결시키기 용이하도록 포그 핀 구조를 케이스에 장착하였음. WE과 CE 용 ITO 전극은 하단에, RE 전극 기판은 마주보도록 상단에 케이스에 의해 고정될 수 있도록 하였고, 검사 시약이나 반응 용액 등을 머금고 있도록 하는 반응셀을 위해 멤브레인을 활용한 구조임. 멤브레인이 머금고 있는 용액양에 의해 체임버 구조가 형성되며 신호측정 시 기질 용액의 부피를 고려하여 멤브레인의 두께를 조절할 수 있음. 또한 멤브레인은 투입구와 배출구로 연결되어 용액을 흘려주는 flow channel 역할도 가능함.
- 이러한 센서 카트리지 구조안에서 전기화학측정이 가능한지 여부를 확인하기 위해 멤브레인에 ALP 효소를 고정시키고 체임버 멤브레인에 기질 용액을 투입하고 기질 반응 시간별 Cyclic voltametry 측정을 진행하였음.

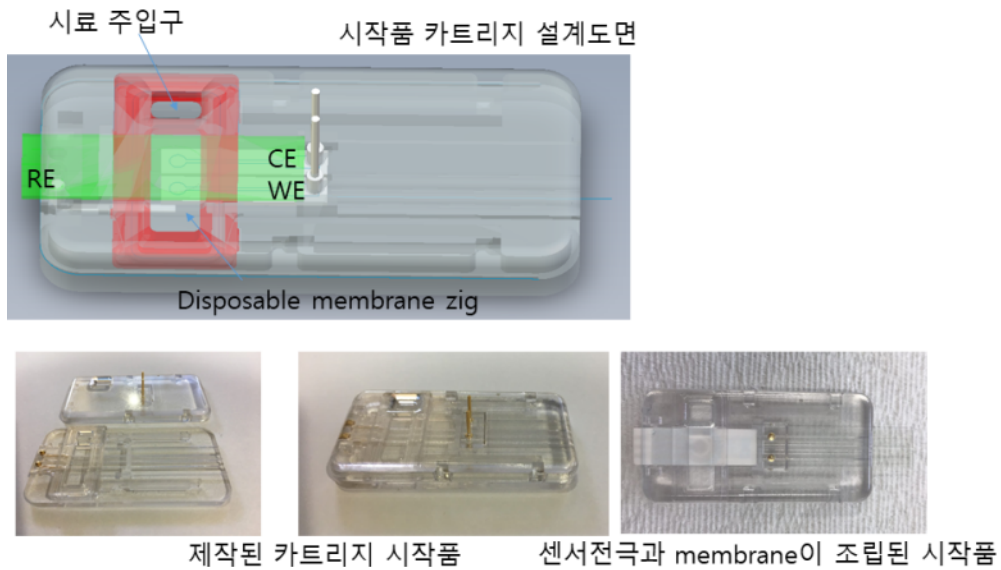


그림 82. ITO 전극을 이용한 면역진단용 전기화학센서 카트리지 설계도 및 제작 결과물

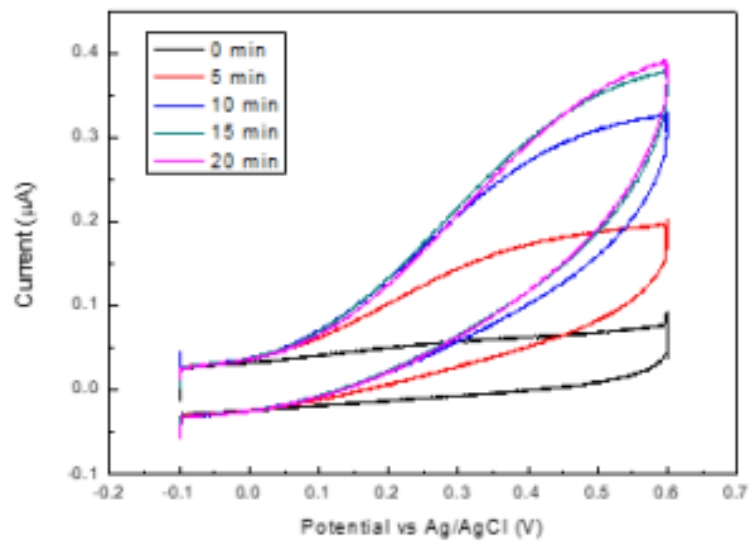


그림 83. 카트리지 구조에서 멤브레인을 기질용액 체임버로 활용하여 측정된 CV 특성 결과

○ 기질 용액의 반응이 10분이 경과하면 충분히 큰 전기화학신호를 측정할 수 있음을 확인할 수 있었으며 이는 면역진단에 의해 효소가 멤브레인내에 고정되어 카트리지 내에서 측정이 가능할 수 있음을 보여주는 결과임.

○ 카트리지에 면역진단 실험을 적용하기 위해서는 멤브레인에 PGA 항체를 검출할 수 있는

항체 고정화 조건의 확립과 검출 프로토콜 정립을 위한 기초실험 및 분석이 필요하여 이를 확인하기 위해 실험을 설계하고 진행하였음.

(3) PAG 면역진단 전기식 센서 적용 실험

- 전기식 센서로 bovine PAG1(pregnancy associated glycoprotein1)을 검출하기 위한 면역진단 항체 시약으로 샌드위치 ELISA를 설계하고 필요한 항원-항체를 선정하였음. 전기화학식 면역진단센서는 검출 타겟인 PAG1 항원의 농도에 비례하여 전기신호가 발생되도록 하여 ALP 효소반응에 의한 신호측정방식을 채택하였음. 작업전극(WE) 표면 등의 고체상 표면에 항체를 고정함. 이로 인해 타겟 항원이 존재하면 센서 표면에 특이적으로 흡착되고 흡착된 항원에 의해 다시 신호를 발생시키는 ALP가 라벨된 항체가 특이적으로 고정됨. 항원의 농도에 비례해 전기화학센서 신호발생물질인 ALP 효소의 농도가 증가하게 되므로 전기신호의 크기가 커지게 됨. 전기신호와 항원의 농도 상관관계인 정량곡선을 도출하면 전기식 센서로 PAG를 검출할 수 있게 됨.
- 샌드위치 ELISA에 적용 가능한 항체 시약을 선정하였음.

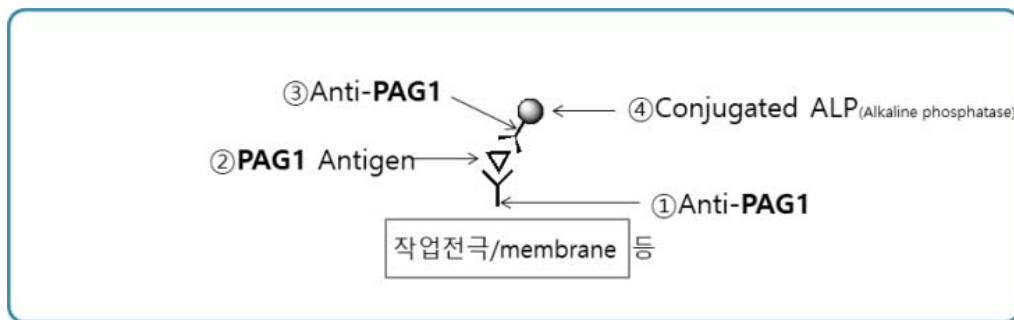


그림 84. 전기식센서에 적용하는 PAG 면역검출 방식.

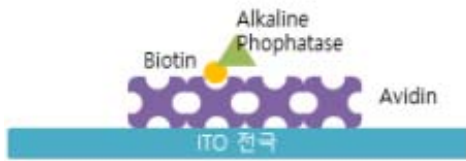
- ① **PAG1 antibody - C-terminal region**(avivasystemsbiology #ARP63792_P050)
Host:Rabbit
Clonality: Polyclonal
Application: WB
Species Reactivity: Cow, Dog, Guinea Pig, Horse, Human, Mouse, Pig, Rabbit, Rat
- ② **Pregnancy-associated glycoprotein 1 (PAG1) Recombinant Protein**
(mybiosource #MBS1314844 또는 biorbyt #orb383460)
Species: Bos taurus (Bovine)
Purity >90%
- ③ **PAG1 Antibody (PAG-C1)** (NOVUS Biologicals #NB500-487)
Species: Human, Mouse, Rat, Bovine
Host: Mouse
Isotype: IgG2b
Applications: Western Blot, Immunohistochemistry, Immunohistochemistry-Paraffin, Immunoprecipitation
- ④ **Alkaline Phosphate conjugation kit** (abcam #ab102850)
-3번에 직접 라벨링

그림 85. PAG 검출 실험을 위한 항원-항체 선정.

- 샌드위치 ELISA를 이용하여 ITO 전극으로 PAG 검출 실험을 진행하기 전에 ITO 전극의

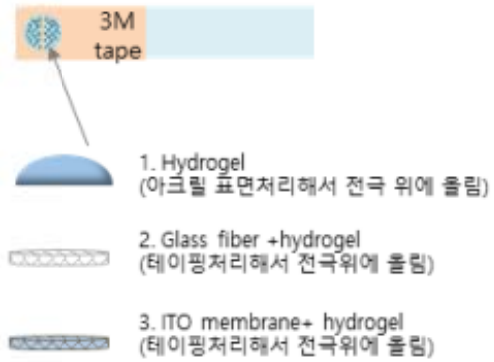
구조를 다양한 형태로 변경하여 ALP 효소반응의 전기신호가 잘 측정되는지를 확인함. 면역반응에 의한 신호는 캡처 항체의 고정화, 항원과 캡처항체의 결합, 항원과 ALP가 라벨된 2차 항체의 결합이 모두 완벽하게 특이적으로 결합되고 비특이 반응에 의한 잡음 신호가 낮아야 측정이 가능함. 이를 확인하기 위한 다양한 확인 실험을 진행하였음.

- 우선 PAG assay에서 신호물질인 ALP 효소를 직접 ITO 전극에 고정하여 NC 대비 ALP 효소 반응 전기신호를 측정하였음. PAG assay에서 모든 절차가 종료된 후 센서 전극에는 ALP 효소가 항원의 양에 비례해 고정되므로 ALP에 의한 전기신호의 크기는 항원의 농도를 의미함. PAG assay를 간소하게 하고 PAG 면역진단 센서 제조 공정을 간단하게 할 수 있으며 카트리지에 적용하기 용이하려면 ITO 전극 표면에 직접 캡처 항체를 고정하는 방법에 비해 제2의 멤브레인에 캡처 항체를 고정하거나 ITO 멤브레인에 캡처 항체를 고정하여 PAG assay가 가능한 방법을 확인하는 것이 의미가 있음.
- WE인 ITO 전극에 ALP 효소를 avidin-biotin 결합을 이용하여 고정화함. ITO 전극은 6mm 직경을 갖도록 3M 테이프나 테플론 테이프를 펀칭하여 ITO 기판에 고정하여 동일한 전극 면적을 갖는 WE 전극을 제작함. WE은 hydrogel, glass fiber+hydrogel, ITO membrane+hydrogel 구조로 이루어진 3가지 유형으로 ALP를 고정하는 방법을 달리함.
- 즉, 하이드로젤에 avidin 단백질을 혼합하여 형성시키고 여기에 ALP를 넣어주고 avidin-biotin 결합에 의한 ALP의 고정화를 진행하고 ALP에 의한 전기화학신호의 크기를 측정함.
- 하이드로젤을 이용할 경우, 캡처 항체를 고정하기가 매우 쉽고, 표면적이 큰 하이드로젤의 다공성을 이용할 수 있으므로 면역반응신호의 감도를 향상시킬 가능성이 크며, 면역진단 센서의 대량 제작이 용이하다는 장점이 있음. ITO 멤브레인과 하이드로젤을 혼용해서 사용할 경우 멤브레인이 하이드로젤을 기계적으로 지탱하여 안정성이 향상되고, 멤브레인 형태의 ITO 전극의 표면적이 매우 크므로 전기화학신호의 크기가 커질 것으로 예상하고 이를 확인하는 실험을 진행하였음.
- 하이드로젤에 혼용하는 단백질을 avidin 대신에 캡처 항체로 바꿔주면 제작을 위한 공정 조건은 동일하므로 본 실험 결과를 활용하여 면역진단 센서의 다양한 적용 방식을 검토해 볼 수 있음.



	Only hydrogel	Glass fiber membrane +hydrogel	Ito membrane +hydrogel
Membrane	X	Glass fiber	ITO membrane
Gel (Avidin)	○	○	○
Biotin_ALP	○	○	○

▪ 실험에 더 최적화된 조건 확인 test (3type)



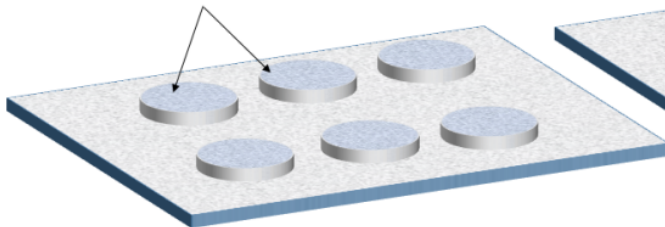
▪ Hydrogel이 전기화학센서에 적합하지 확인
 ▪ → avidin-biotin_ALP signal 나오는지 확인 실험 진행 (assay를 바로 진행x)

그림 86. ITO 작업전극에 항체를 고정하는 3가지 방식에 대한 전기신호측정 비교.

1. Hydrophilic glass fiber membranes : 6mm dia., punched-out



2. Placing them on the handle membrane 1 by 1



Handle membrane : hydrophobic,
 - liquid solution not immersed

1. Dropping hydrogel solution mixed with Ab
 2. UV exposure, 15 sec

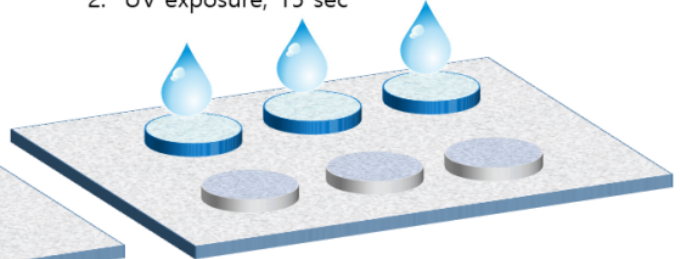


그림 87. 하이드로젤을 이용한 캡처 항체 고정화 방법, 간단하여 대량 제작이 용이함.

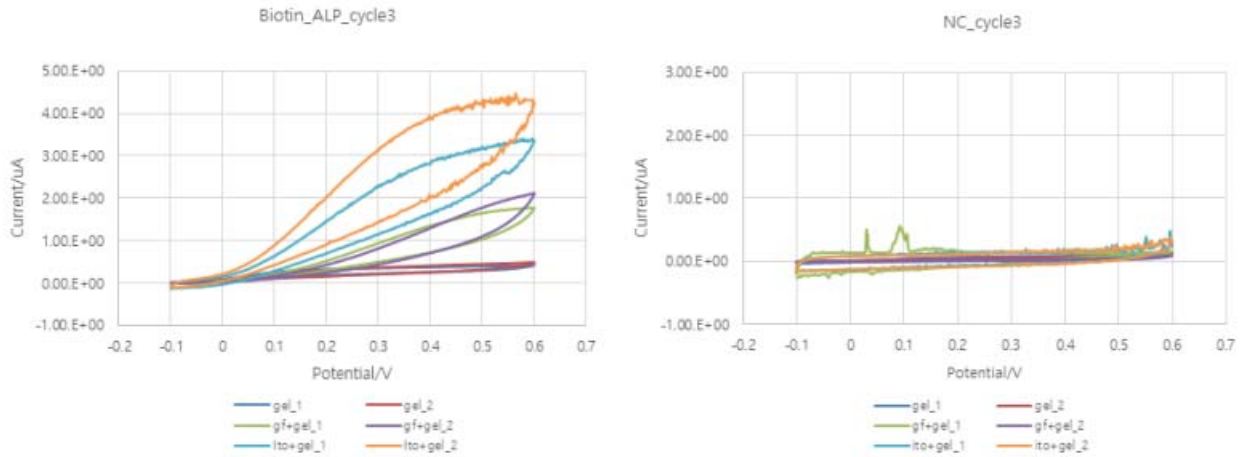


그림 88. 하이드로젤 멤브레인의 종류에 따른 ALP 신호의 특성-CV 측정.

- 하이드로젤을 이용하여 avidin 단백질을 고정화하고 ALP 효소를 avidin-biotin 결합으로 고정화한 후 효소반응에 의한 전기신호를 측정된 결과를 보면, ITO 멤브레인에 하이드로젤이 혼재된 전극 조건에서 예상했던 대로 가장 높은 ALP 반응 신호가 측정됨. ITO 멤브레인은 바닥의 기판 ITO 전극 면적에 더해 ITO 멤브레인 표면적만큼 더 크므로 더 큰 신호가 측정되는 것이 가능함을 보여준 것임. 또한 하이드로젤을 glass fiber와 혼재해 적용한 조건이 하이드로젤만 사용한 것보다 전기신호가 높는데 이는 glass fiber 멤브레인에 의해 하이드로젤 구조가 3차원적으로 매우 크게 형성된 데 기인하는 것으로 분석되며 더 많은 ALP 효소 반응 산물이 ITO 전극 표면에 도달할 수 있음을 보인 것임.
- 하이드로젤과 ITO 멤브레인을 혼용하여 ITO WE 전극에 캡처 항체를 도입하는 PGA assay 방법으로 PAG 검출 실험을 진행해 보았음.

(4) PAG 면역진단 실험 및 결과 분석

- ITO WE 상부에 ITO 멤브레인과 하이드로젤을 이용하여 PAG assay 실험을 수행함. 캡처 항체는 ITO 멤브레인내 하이드로젤과 혼합하여 고정화하여음. 30분간 항원과 결합한 후 washing-out을 진행하고, ALP 2차 항체를 다시 30분간 반응시키고 washing-out을 진행하였음. 기질 용액을 넣은 후 10분간 효소반응을 시키고 CC 측정법으로 PGA 농도별 전기신호를 측정하였음. 항원이 없는 조건인 negative control (NC)에 비해 항원의 농도가 0.1 ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml 조건에서 항원 농도가 커질수록 CC의 신호의 크기가 더욱 크게 측정되는 것을 확인할 수 있었으며 항원 검출이 가능하다는 것을 보임.
- 2회의 반복 실험 모두 PGA 항원의 농도 증가시 CC 신호의 크기가 커지는 의도한 결과로 측정이 이루어짐.
- 다만, 반복 실험시 0.1ng/ml 조건과 1ng/ml 조건에서 신호의 편차가 크게 나타나 서로 겹

치는 부분이 있으므로 측정 편차를 줄일 수 있는 조건 확립 실험을 추가적으로 수행할 필요가 있음.

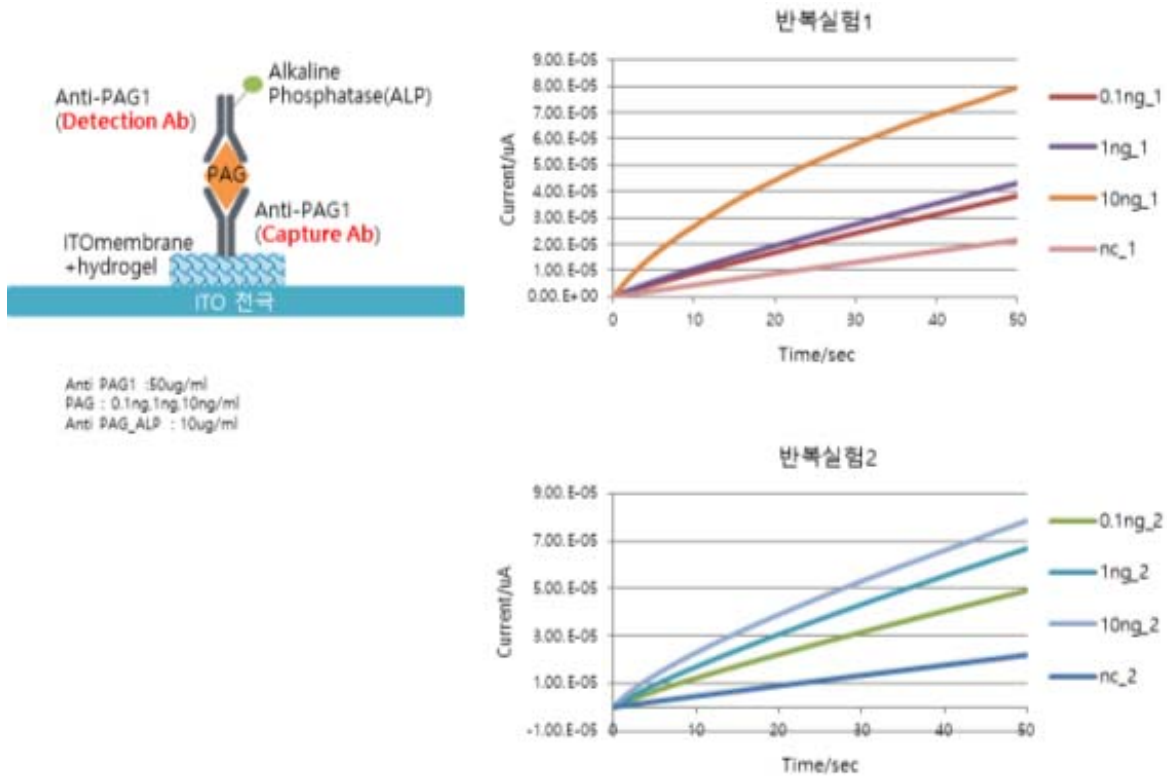


그림 89. 하이드로젤 멤브레인을 적용한 PAG의 농도별 측정 결과-ChronoCoulometry(CC)법으로 측정

- 또한, 하이드로젤을 적용한 ITO 멤브레인 방식이외에 ITO 전극표면에 capture 항체를 직접 고정하고 PAG 표준시료를 이용하여 정량 검출 실험을 수행함. ITO WE 전극에 캡처 항체를 직접 고정화하는 방법은 측정 재현성 확보가 멤브레인을 적용하는 것에 비해 용이함. 멤브레인을 이용하는 방식은 표면적이 커 신호의 크기가 클 수 있고, 캡처 항체를 고정하기 쉬운 장점이 부각되지만, 멤브레인 하이드로젤의 표면적 편차가 상대적으로 큰 특성이 있으므로 측정 편차가 커질 우려가 있음.
- 그래서, ITO 작업 전극 표면에 바로 캡처 항체를 고정하는 방식의 assay 방식을 실험함. ITO 전극에 물리 흡착한 avidin 단백질에 avidin-biotin 반응을 이용하여 센서의 작업전극 (WE)에 고정함. PAG 1ng/ml 농도와 10ng/ml 농도가 negative control(NC) 신호에 비해 농도에 비례하는 정량 검출 특성을 보였으며 2회의 측정에서 편차가 크지않게 나타났음. 이 방법의 구조로도 ITO 전기식 센서로 임신진단에 적용 가능함을 알 수 있음.

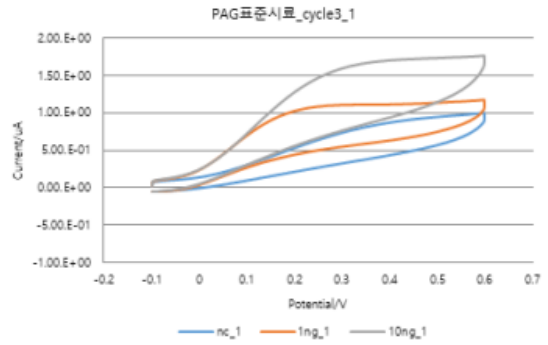
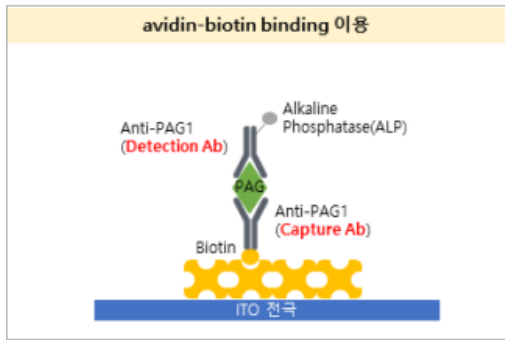
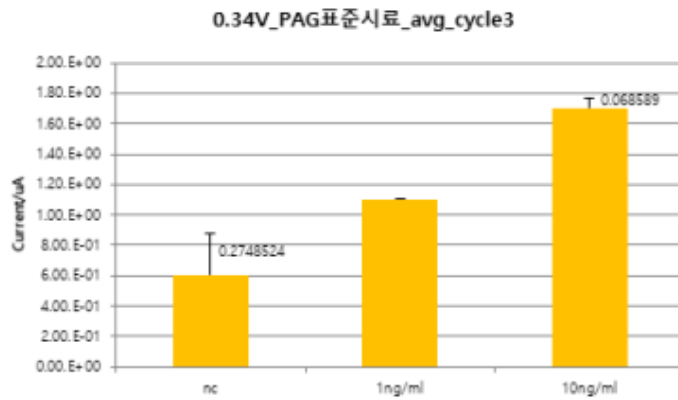


그림 90. PAG assay위한 ITO 전극표면 직접 고정화 방법 및 PGA 농도별 CV 측정결과



	nc	1ng/ml	10ng/ml
PAG_1 (0.34V)	8.01.E-01	1.10.E+00	1.66.E+00
PAG_2 (0.34V)	4.13.E-01	1.10.E+00	1.75.E+00
avg	6.07.E-01	1.10.E+00	1.70.E+00
stdev	0.2748524	0	0.068589

그림 91. ITO 전극표면 직접 고정화에 의한 PAG 정량 검출 결과

○ 결론적으로 ITO 작업전극으로 PGA assay의 가능성을 확인하는 실험을 통해 정량 검출 가능함을 실험으로 확인하였고, 성능 개선을 위한 몇가지 개선 사항을 도출하였음. 비특이 흡착의 방지와 측정 편차를 향상시키기 위한 원인 분석 및 편차의 개선으로 ITO 전극을 이용한 PAG 진단 전기식 센서의 시제품 개발을 성공적으로 진행할 수 있을 것으로 판단 함.

1. 한우 임신관련 특이적인 변이 단백질 발굴

(1) 한우 혈액 시료 채취(Sampling)

- 선정된 한우 혈액 샘플링은 비임신 한우 1두, 임신 3-4개월 3두, 임신 10개월 한우 3두 즉 총 7 한우 개체의 정맥으로부터 50cc정도의 혈액을 채취하였음.
- 임신 한우의 발정과 인공수정은 축기연의 기본적인 방법과 순서에 의하여 수행하였고, 임신확인은 직장검사로 확인 하였다.
- 채취된 혈액으로부터 보존된 리보핵산(RNA)를 확보하기 위해 Qiagen사의 PAXgene Blood RNA kit를 사용하여 자연 발생하는 전사체의 분해속도를 최소화 시켜주고 혈액을 상온에서 RNA 안정화 시켜 분리 정제 및 재연성이 높은 RNA를 확보.

(2) RNA 정량 정성 분석(QC)

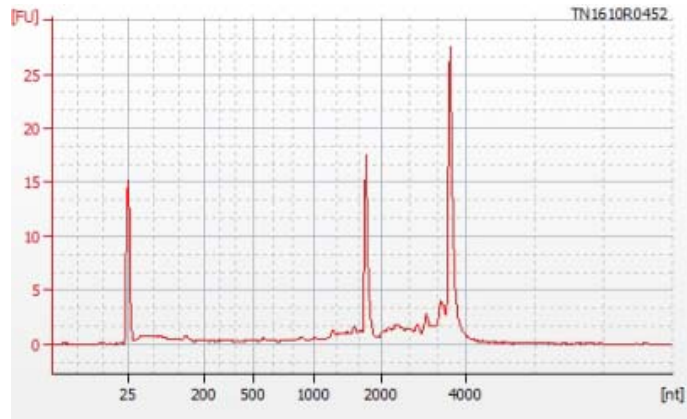
- 가. RNA sample QC report

표 6. Sequencing을 위한 RNA sample QC 결과

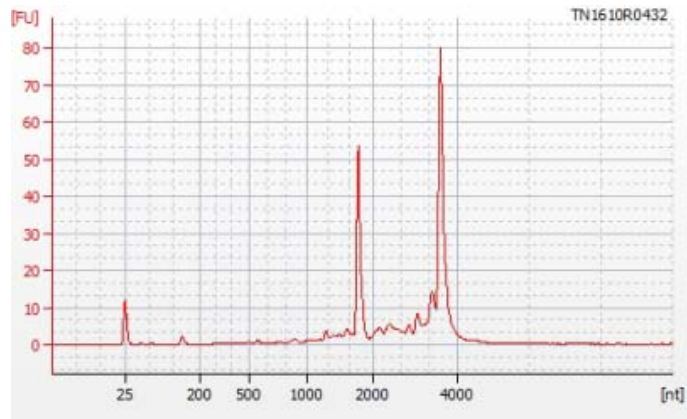
Sample 번호	임신유무	개 제 번 호	명호	성별	생년 월일	산차	년생	Concentration (ng/μL)		Volume (ul)	Quantity (μg)		Purity		RNA-seq
								BioAnalyzer	NanoDrop		BioAnalyzer	NanoDrop	RIN	28s/18s	
1	임신 3-4개월	13-130	경북축기13-05-0130	암	13/11/29	1	3	214	21622	34	7276	7351	8.8	1.6	P4_1
2		13-055	경북축기13-04-0055	암	13/8/12	1	3	201	193.13	34	6834	6566	8.9	1.6	P4_2
3		군-366	관양11-03-4359	암	11/1/28	2	5	102	80.7	35	3.57	2.825	8.8	1.7	P4_3
4	비임신	11-042	경북축기11-04-0042	암	11/5/7	2	5	71	63.02	34	2414	2.143	8.3	1.6	Control
5	임신 10개월	13-67	경북축기13-03-0067	암	13/8/22	1	3	247	200.62	34	8398	6.821	8.9	1.8	P10_1
6		13-81	경북축기13-05-0081	암	13/9/28	1	3	220	135.41	34	7.48	4.604	8.9	1.6	P10_2
7		14-075	경북축기14-05-0075	암	14/8/24		2	225	205.92	34	7.65	7.001	8.5	1.6	P10_3

- RNA Sample 또한 Agilent사의 2100 BioAnalyzer를 이용하여 세 가지 판단 기준에 기초하여(BAConcentration(ng/ul), RIN value, 28s/18s ratio) 품질을 평가함.
- RNA seq을 진행한 7두의 한우 sample의 정량 정성 분석을 진행한 결과 비교적 적정 수준인 평균 8.3의 시료를 사용하여 sequencing을 진행하였음(그림 92).

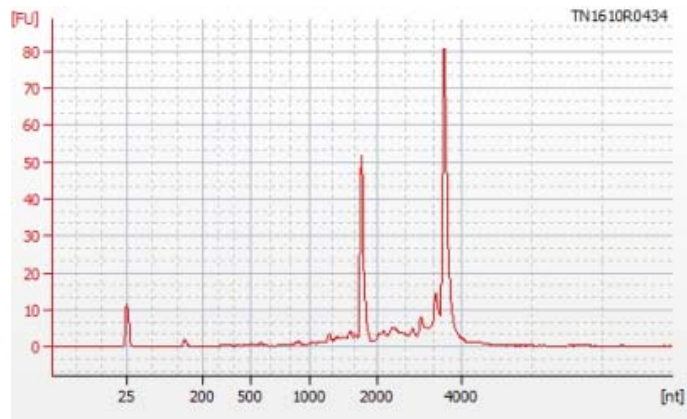
① 비임신(11-042)



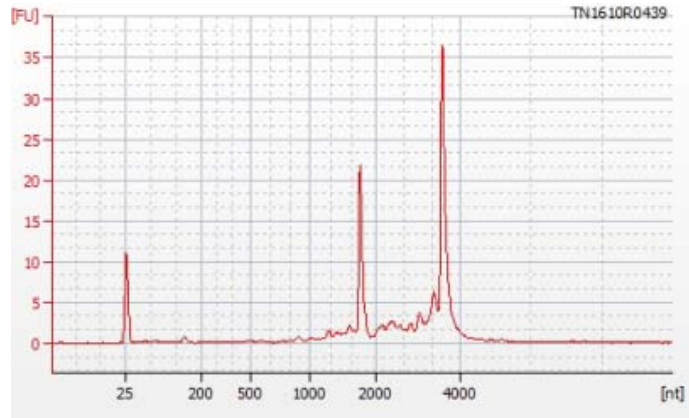
② 임신 3개월(13-130)



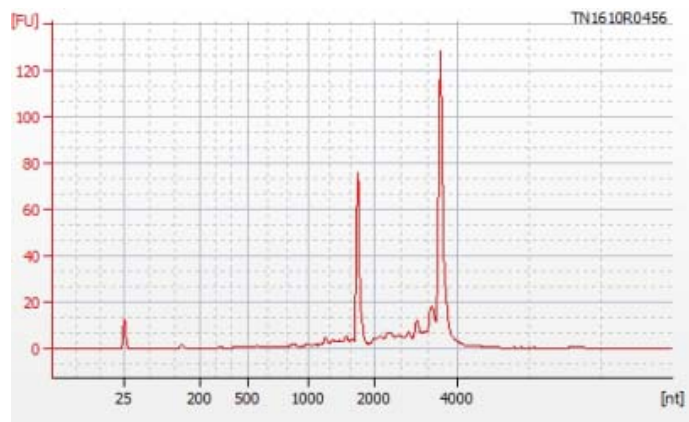
③ 임신 3개월(13-055)



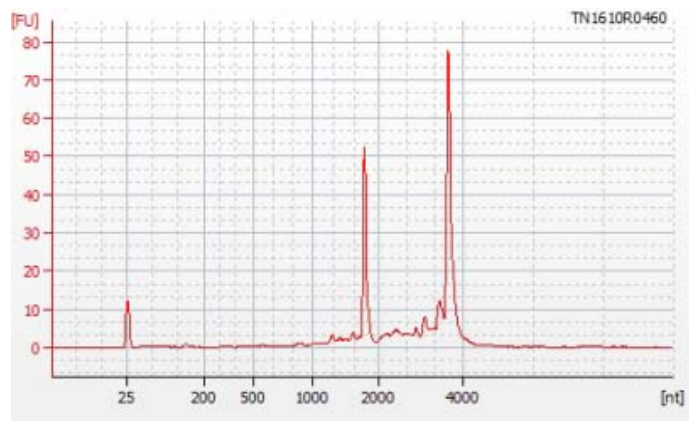
④ 임신 3개월(구-366)



⑤ 임신 10개월(13-67)



⑥ 임신 10개월(13-81)



⑦ 임신 10개월(14-75)

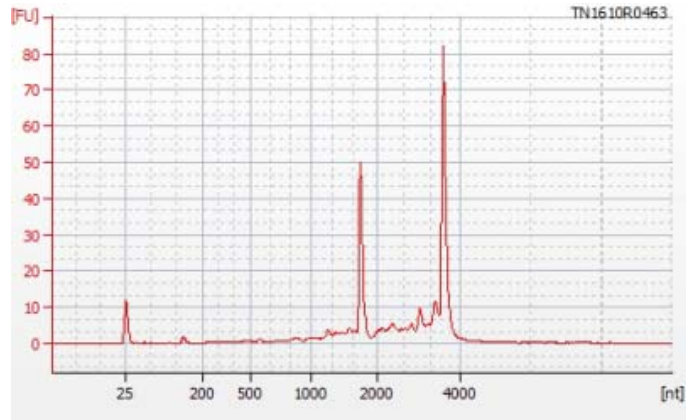


그림 92. RNA Purification 정량정성 분석 결과.

(3) Sequencing Library 제작 결과

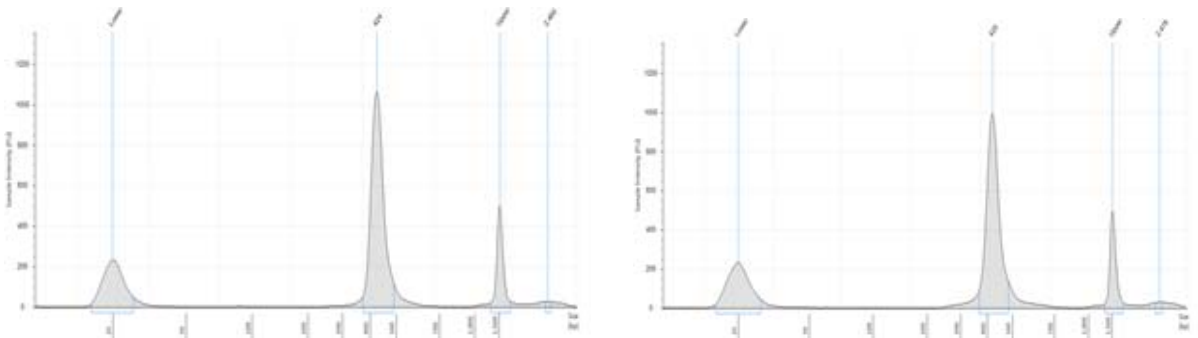


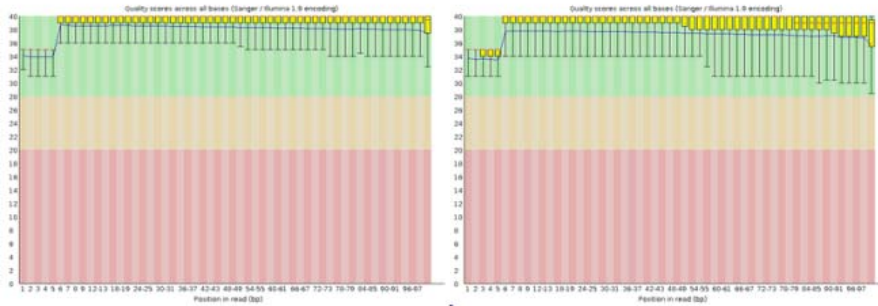
그림 93. RNA Sequencing library TapeStation 이미지 예

- Bioanalyzer와 tape station을 이용하여 adaptor-ligated library의 정량을 확인 하였으며 sequencing에 적합한 농도의 library를 구축하였음.
- Tape을 이용한 구축된 RNA Sequencing Library DNA pattern 확인한 결과 400-500 bp 범위 확인함.(그림 93)

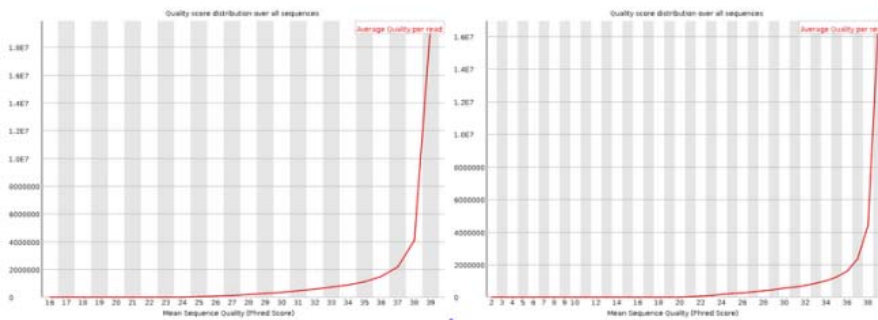
(4) 시퀀싱 데이터 생물정보학적 정량 정성 분석

① (11-042) 비임신

Base Sequence Quality

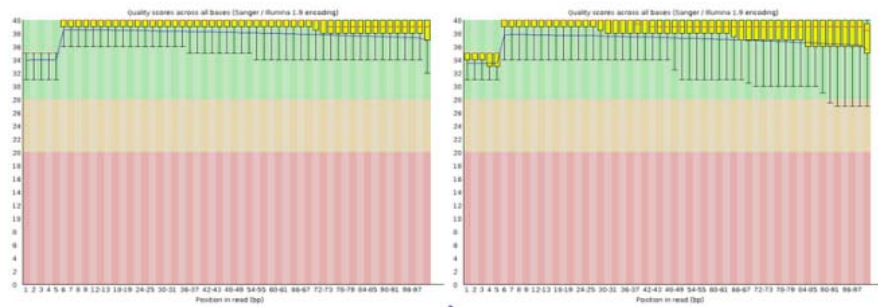


Sequence Quality Scores

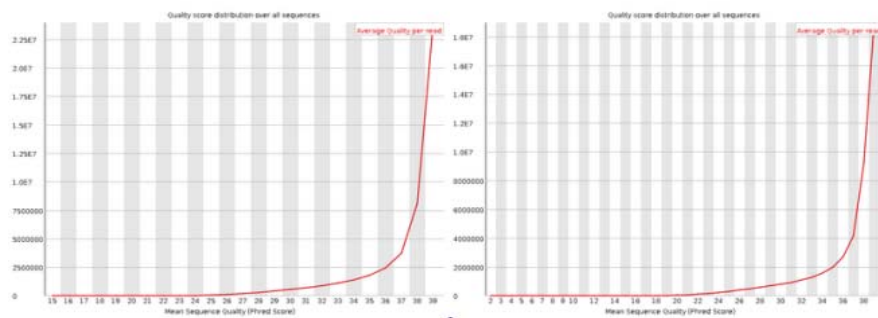


② (13-130) 임신 3개월

Base Sequence Quality

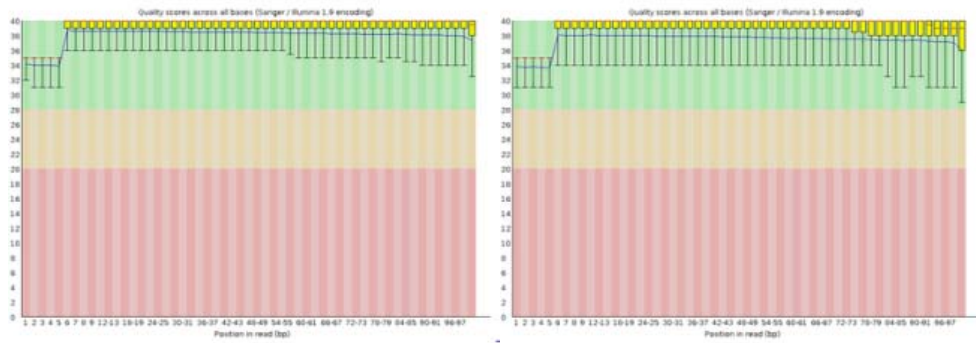


Sequence Quality Scores

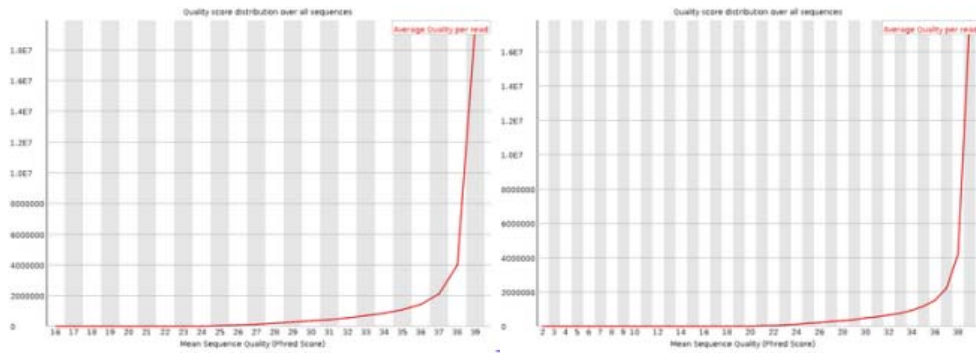


③ (13-055) 임신 3개월

Base Sequence Quality

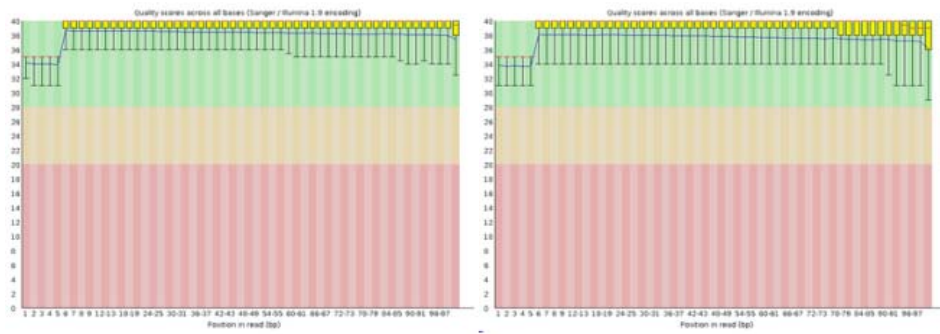


Sequence Quality Scores

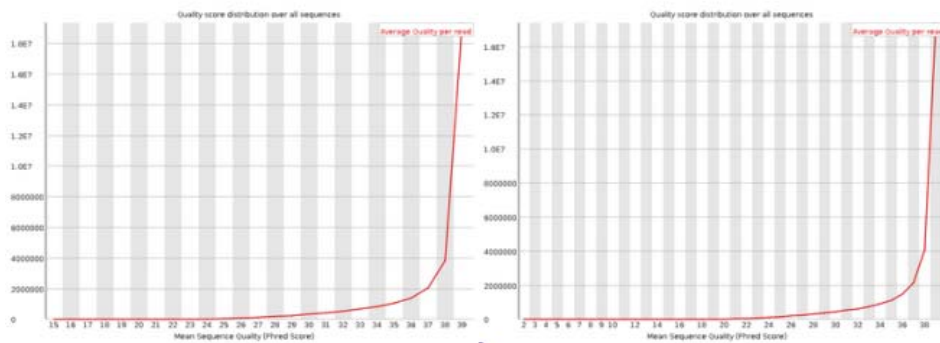


④ (구-366) 임신 3개월

Base Sequence Quality

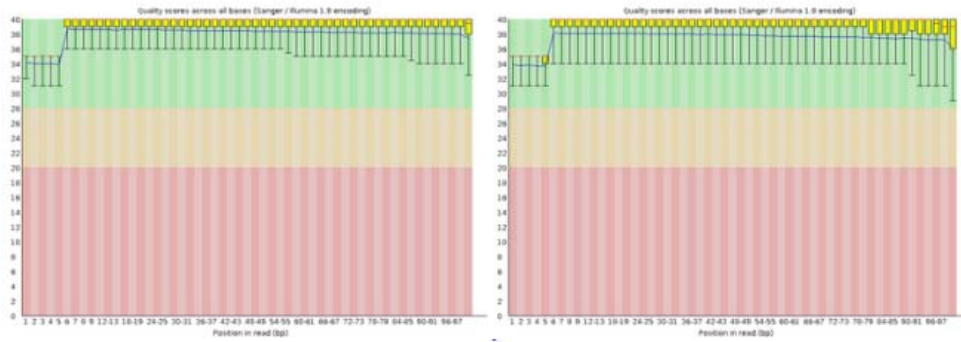


Sequence Quality Scores

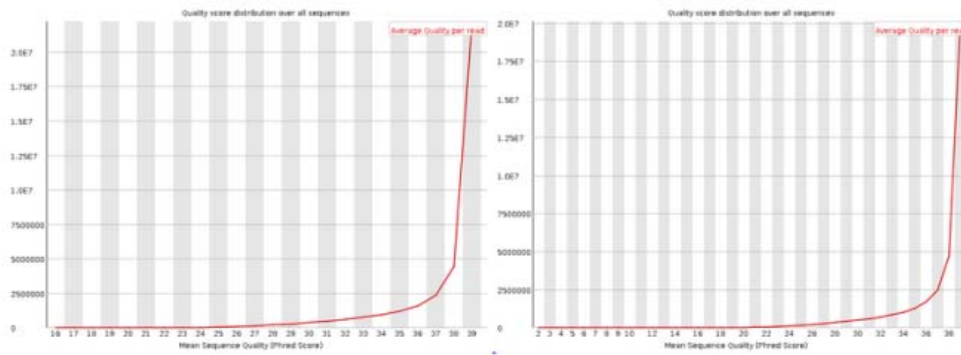


⑤ (13-67) 임신 10개월

Base Sequence Quality

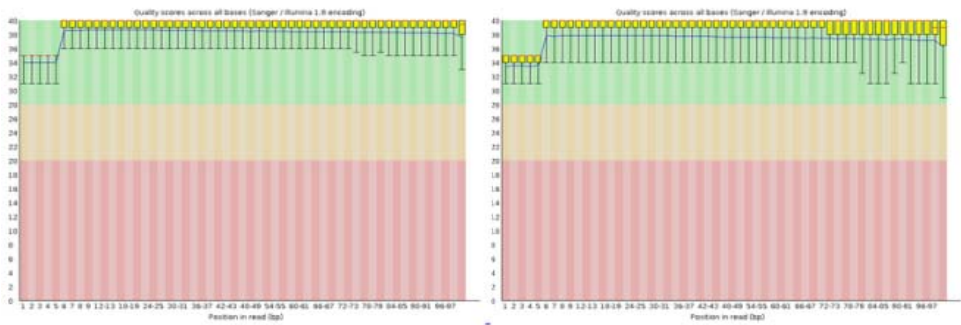


Sequence Quality Scores

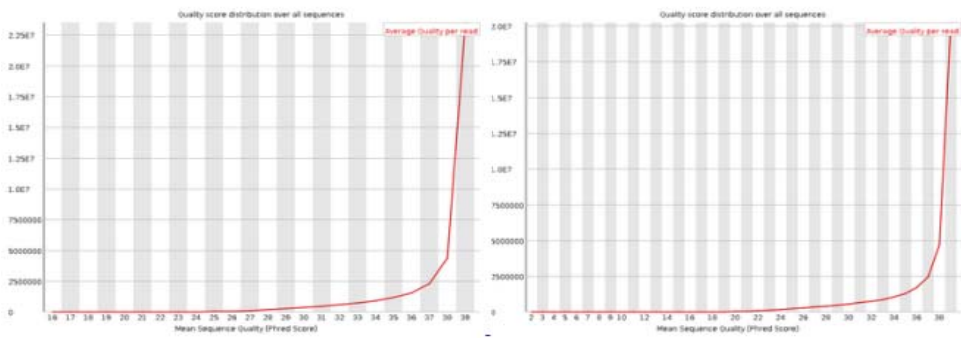


⑥ (13-81) 임신 10개월

Base Sequence Quality

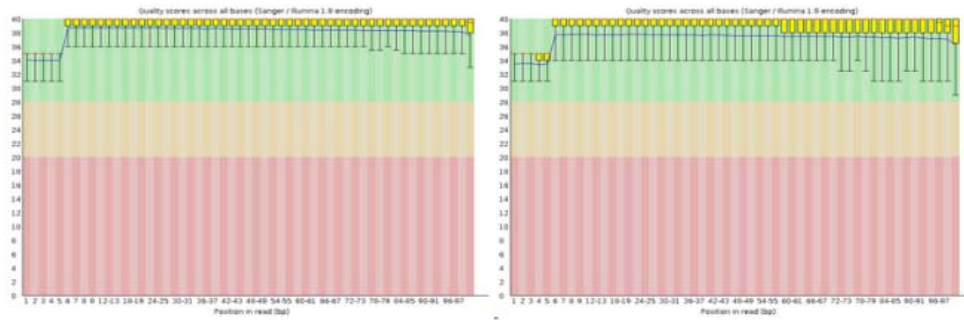


Sequence Quality Scores



⑦ (14-75) 임신 10개월

Base Sequence Quality



Sequence Quality Scores

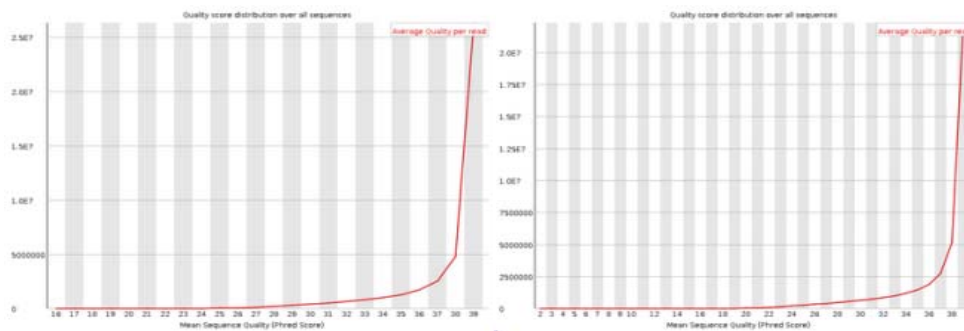


그림 94. 생산된 염기서열 데이터의 정량 및 정성 분석 결과

○ 생산된 염기서열 데이터를 Fastqc 과정을 통해 N을 포함하거나 정해진 read quality에 적합한지 정량 정성 분석을 진행하였음(그림 94).

■ Data 필터 기준은 아래와 같음

- (1) Trim 5', 3' terminal bases with extreme high GC fraction.
- (2) N constitutes 가 2% 이상인 reads와 polyA 구조의 reads 필터.
- (3) 낮은 퀄리티의 reads 필터. large insert-size 라이브러리 내에 quality score 7 이하의 bases가 60% 이상인 read 삭제. short insert-size 라이브러리 내에 quality score 7 이하인 bases가 40% 이상인 read 삭제.
- (4) adapter contamination된 reads 삭제. 10bp align 했을 때 3bp 이상 mismatch 된 read 삭제.
- (5) read1과 read2를 overlapped 했을 때 10bp 이상 mismatch 된 reads 삭제.
- (6) PCR duplicate 삭제.

(5) 시퀀싱 데이터 생산 및 생물 정보학적 분석

○ 생산된 서열 데이터 요약

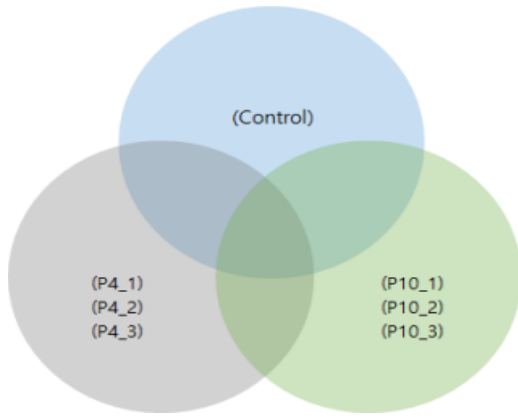
표 7. RNA sequencing thumbnail

No	Name	Raw	Clean	Mapped	Uniquely Mapped	READ 1	Strand(+)	Splice
						/	/	
						READ 2	Strand(-)	
1	13_130_2	92,101,686	90,252,524	82,543,463	80,650,957	40,624,191	40,336,004	26,419,021
			-98.00%	-91.50%	-89.40%	40,026,766	40,314,953	-29.30%
2	13_055_1	64,551,668	63,477,892	57,380,064	56,166,619	28,204,814	28,089,388	18,861,058
			-98.30%	-90.40%	-88.50%	27,961,805	28,077,231	-29.70%
3	Gu_366_3	62,476,796	61,470,812	55,717,251	54,560,519	27,389,798	27,264,713	18,588,209
			-98.40%	-90.60%	-88.80%	27,170,721	27,295,806	-30.20%
4	11_042_1	65,420,134	64,010,890	57,581,881	56,362,348	28,334,281	28,155,634	20,261,624
			-97.80%	-90.00%	-88.10%	28,028,067	28,206,714	-31.70%
5	13_67_2	71,945,084	70,819,010	63,712,223	62,515,580	31,384,387	31,240,585	22,540,980
			-98.40%	-90.00%	-88.30%	31,131,193	31,274,995	-31.80%
6	14_075_3	81,952,992	80,108,550	72,703,623	70,829,807	35,615,165	35,418,625	23,769,529
			-97.70%	-90.80%	-88.40%	35,214,642	35,411,182	-29.70%
7	13_81_3	73,690,778	72,176,832	64,954,973	63,297,892	31,821,254	31,636,104	22,798,028
			-97.90%	-90.00%	-87.70%	31,476,638	31,661,788	-31.60%

- RNA-seq 데이터를 초기 분석을 진행한 결과 7두의 한우 sample에서 동일한 수준의 데이터가 생산되었으며 평균 7.3 Gb의 방대한 양의 RNA seq data를 생산함(참고 문헌 8. Pan, et al. 2015).
- 정량 정성 분석(Read QC)를 통해 평균 약 98%의 sequencing data를 얻을 수 있었음.
- 전체 정성 분석된 데이터는 7.1 Gb data를 얻을 수 있었음(표 2).

○ 비임신과 임신 한우의 비교유전학적 분석 및 발현량 측정

- 생산된 RNA seq 데이터를 기반으로 각 Sample별 전사체의 발현량을 분석하기 위해 비임신 한우와 임신 3-4개월과 10개월 차 한우의 그룹별로 비교유전체학적 분석을 진행함(그림 129).



DEG 분석	Based on	UMD 3.1
(Control)	VS	(P4_1)
		(P4_2)
		(P4_3)
(Control)	VS	(P10_1)
		(P10_2)
		(P10_3)
(P4_1)	VS	(P10_1)
(P4_2)		(P10_2)
(P4_3)		(P10_3)

그림 95. 비임신과 임신 한우의 유전자 발현량 및 차이 분석

표 8. 한우 샘플별 발현 유전자 및 전사체 분석 Cluster

Name	Gene					Transcript			
	SUM	KNOWN	Novel	MOD	UNEXP	SUM	KNOWN	Novel	UNEXP
13_130_2	25,058	3,625	10,775	10,658	5,624	66,390	16,180	50,210	6,628
13_055_1	24,310	3,311	10,361	10,638	6,372	65,594	15,864	49,730	7,424
Gu_366_3	23,959	3,244	10,090	10,625	6,723	65,224	15,767	49,457	7,794
11_042_1	23,643	3,230	9,785	10,628	7,039	64,828	15,702	49,126	8,190
13_67_2	24,086	3,360	10,094	10,632	6,596	65,315	15,881	49,434	7,703
14_075_3	24,769	3,841	10,264	10,664	5,913	66,059	16,395	49,664	6,959
13_81_3	24,376	3,632	10,096	10,648	6,306	65,673	16,185	49,488	7,345

- 표 8과 같이 평균 2만4천개의 발현 유전자와 6만5천개의 발현된 transcript를 비교 분석하여 평균 9만 개 이상의 발현되는 유전자와 전사체를 분류함(그림 96).

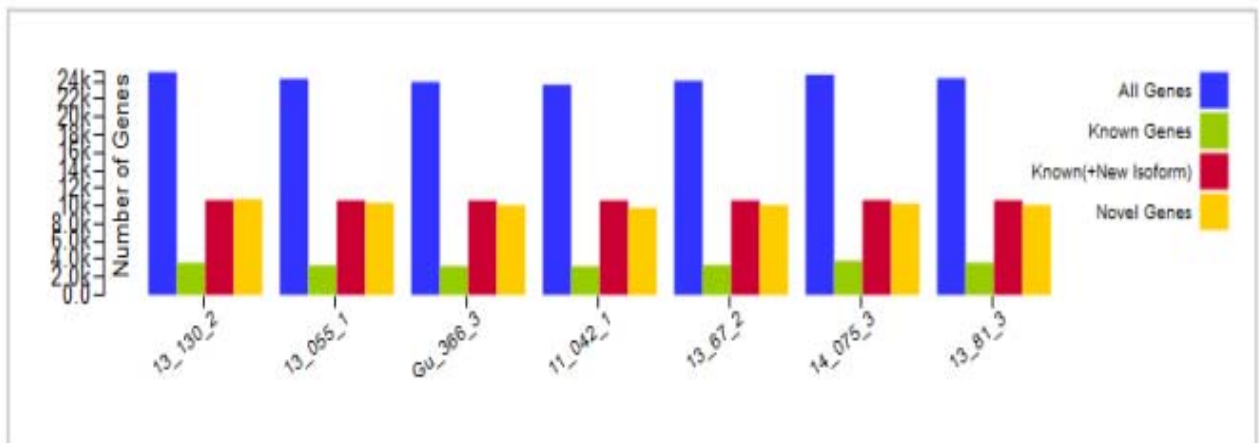


그림 96. 발현되는 Total transcripts와 Known transcripts의 분포

(6). Differentially expressed gene (DEG) 분석을 통한 임신 특이적 유전자 발현 조사

- DEG 분석을 통한 한우 비임신 & 임신 그룹별 발현량 조사를 통해 임신 한우에서만 특이적으로 발현하고 있는 유전자 군을 동정하였음.
- 비임신 한우(11_042_1)와 3-4개월 임신 한우(13_130_2, 13_055_1, Gu_366_3) 유전자 발현차이를 비교한 결과 총 429개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 265개의 유전자가 3-4개월 차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 28개의 유전자가 비임신 한우에서 특이적으로 낮은 발현량을 보였음.
- 또한, 비임신 한우(11_042_1)와 10개월 차 만삭 한우(13_67_2, 14_075_3, 13_81_3) 유전자 발현차이를 비교한 결과 총 442개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 169개의 유전자가 10개월 차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 39개의 유전자가 비임신 한우에서 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었음.

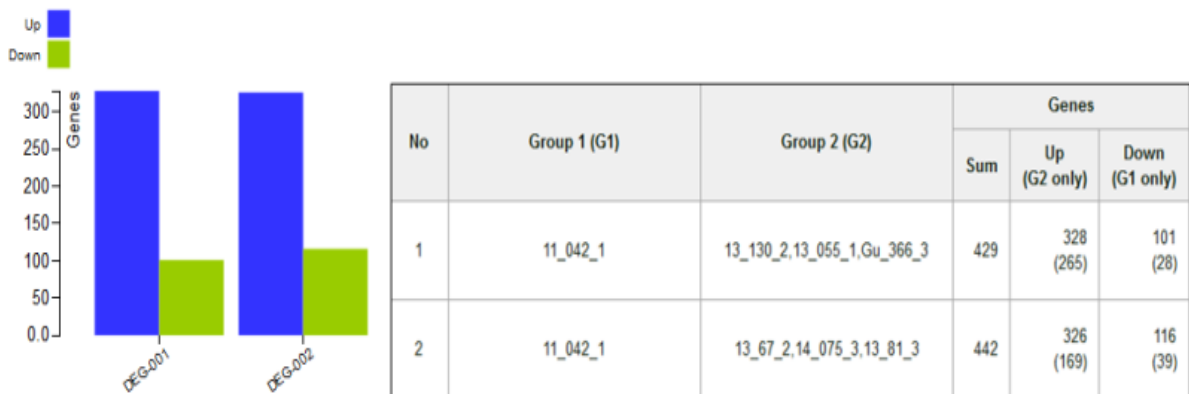


그림 97. 비임신 한우와 3-4개월, 10개월 한우의 DEG 분석

- 샘플간의 유사성을 비교분석하기 위해 Correlation분석과 MDS plot을 이용한 통계적 분석을 통해 유사성을 조사하였음. 조사한 결과 임신 3-4개월과 10개월 그룹간에 유효한 관계성을 가지는 것을 확인함(그림 98, 99).
- 분현된 유전자 정보를 기반으로 샘플사이의 유사성에 대한 점검이 필요함.
- 특히 Replication 이나 Time Series Data 의 경우 예상과 같은 결과를 가지고 있는지 확인 필요함

Pearson Correlation

Correlation Ranges	1.0~0.92 (The ENCODE Guideline)	0.92~0.80	0.80~0.70	0.70~0.00
--------------------	------------------------------------	-----------	-----------	-----------

- Pearson correlation coefficient between FPKM of genes of samples
- Pearson correlation coefficient between log2(FPKM) of genes of samples
- Number of genes expressed in both the samples.

	13_130_2 (TN1010R0432)	13_055_1 (TN1010R0434)	Gu_366_3 (TN1010R0439)	11_042_1 (TN1010R0452)	13_67_2 (TN1010R0450)	14_075_3 (TN1010R0400)	13_81_3 (TN1010R0403)
13_130_2	13_130_2 23,470	0.747 0.973 23,470	0.667 0.975 23,201	0.716 0.975 22,884	0.769 0.969 23,229	0.547 0.975 23,497	0.599 0.970 23,289
13_055_1	0.747 0.973 23,470	13_055_1 22,939	0.746 0.976 22,939	0.851 0.981 22,688	0.762 0.978 22,985	0.844 0.980 23,207	0.815 0.978 23,020
Gu_366_3	0.667 0.975 23,201	0.746 0.976 22,939	Gu_366_3 22,510	0.845 0.981 22,510	0.782 0.977 22,787	0.829 0.977 22,983	0.766 0.977 22,842
11_042_1	0.716 0.975 22,884	0.851 0.981 22,688	0.845 0.981 22,510	11_042_1 22,547	0.803 0.984 22,547	0.765 0.982 22,722	0.864 0.985 22,639
13_67_2	0.769 0.969 23,229	0.762 0.978 22,985	0.782 0.977 22,787	0.803 0.984 22,547	13_67_2 23,064	0.898 0.983 23,064	0.786 0.988 22,946
14_075_3	0.547 0.975 23,497	0.844 0.980 23,207	0.829 0.977 22,983	0.765 0.982 22,722	0.898 0.983 23,064	14_075_3 23,160	0.875 0.985 23,160
13_81_3	0.599 0.970 23,289	0.815 0.978 23,020	0.766 0.977 22,842	0.864 0.985 22,639	0.786 0.988 22,946	0.875 0.985 23,160	13_81_3

그림 98. Pearson Correlation 분석 결과

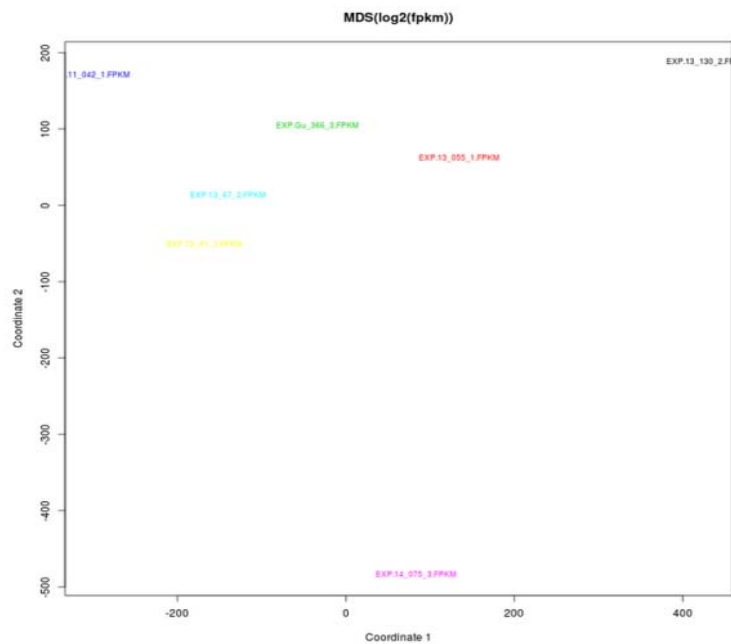


그림 99. MDS plot 분석 결과

- 비임신 한우(11_042_1)와 3-4개월 임신 한우(13_130_2, 13_055_1, Gu_366_3)의 유전자 발현 차이를 통계학적 분석 방법을 통해 발현차이를 비교한 결과 임신 한우에서 비임신 한우에 비해 발현 패턴의 변화가 있음을 확인함(그림 99, 100).

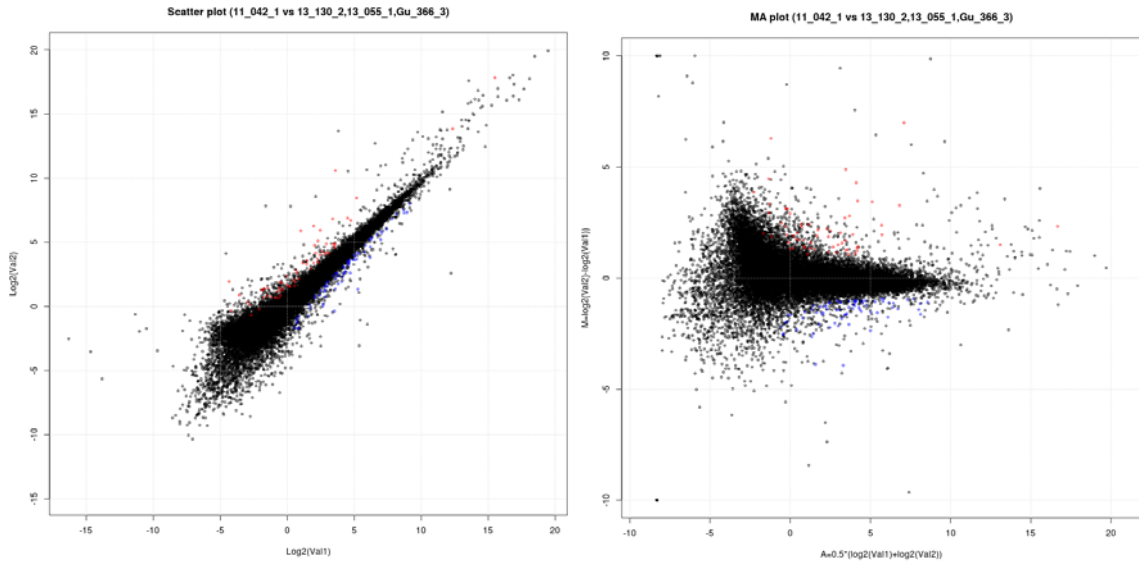


그림 100. 비임신과 3-4개월 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

- 그림 101에서 보는 것과 같이 Y축에 Plating된 3-4개월 임신 한우의 유전자 발현 패턴이 비임신 한우에 비해 높은 발현 정도를 보이는 것을 알 수 있었음.

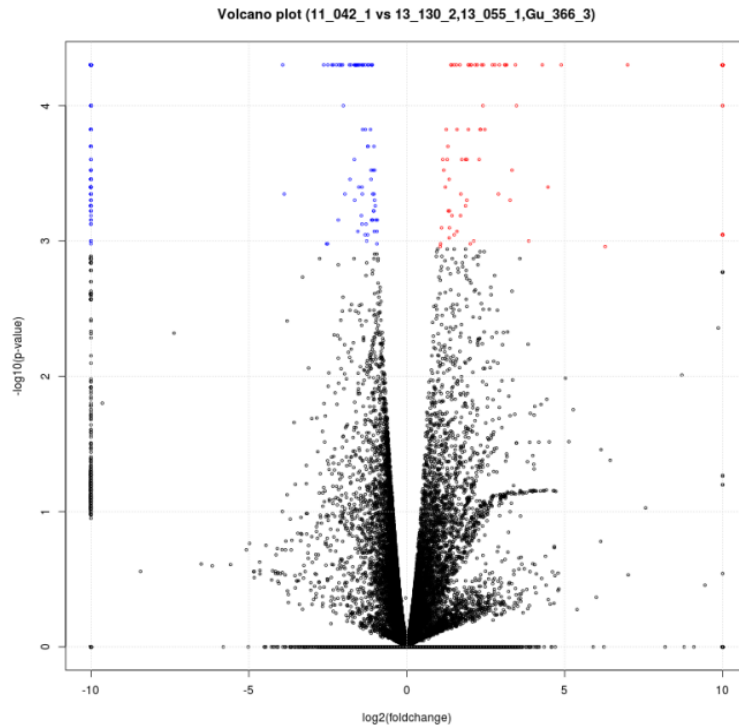


그림 101. Volcano plot 분석 결과 임신 3-4개월

- 비임신과 차이를 보이는 유전자 발현을 \log_2 지수와 P -value에 기초하여 Plotting을 한 결과 265개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 28개의 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음.

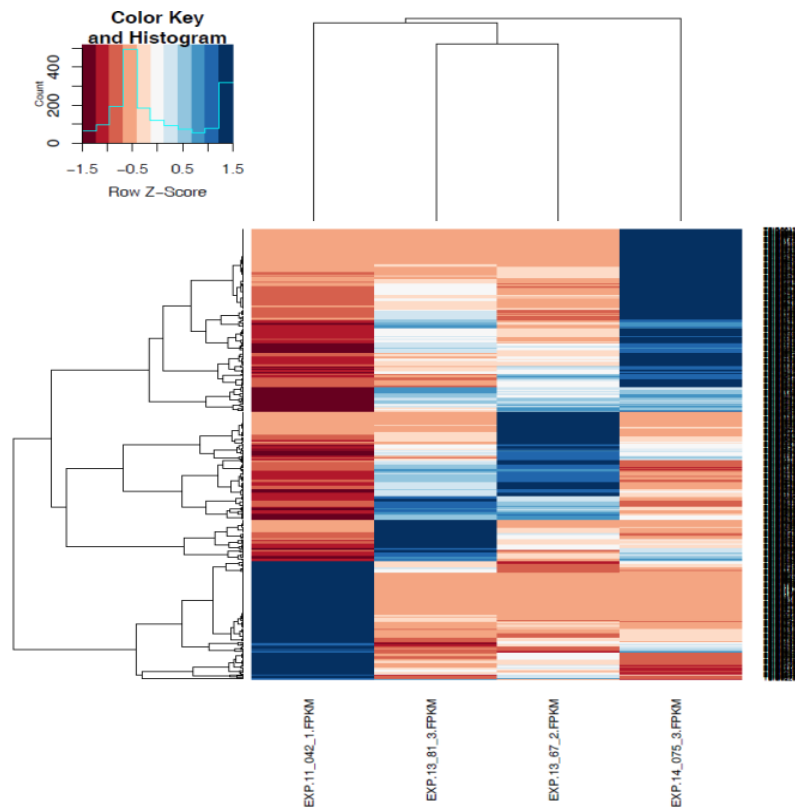


그림 102. Heat map 분석 결과 임신 3-4개월

- 총 429개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 3-4개월 임신 한우의 유전자 발현이 비 임신 한우와 비교해 볼 때 유전적 차이를 보임을 확인함(그림 102).
- 위의 과정과 동일하게 비임신 한우와 임신 10개월 차 한우의 유전자 발현 정도를 비교 분석 함으로써 임신 10개월 한우의 유전자 발현 패턴을 조사하였음. 조사한 결과비임신 한우(11_042_1)와 10개월 차 만삭 한우(13_67_2, 14_075_3, 13_81_3) 유전자 발현차이가 3-4 개월 임신 한우의 발현 차이에 비해 약간의 차이를 보였지만 임신한우에서 높게 발현하고 있는 유전적 패턴을 확인 할 수 있었음(그림 103).

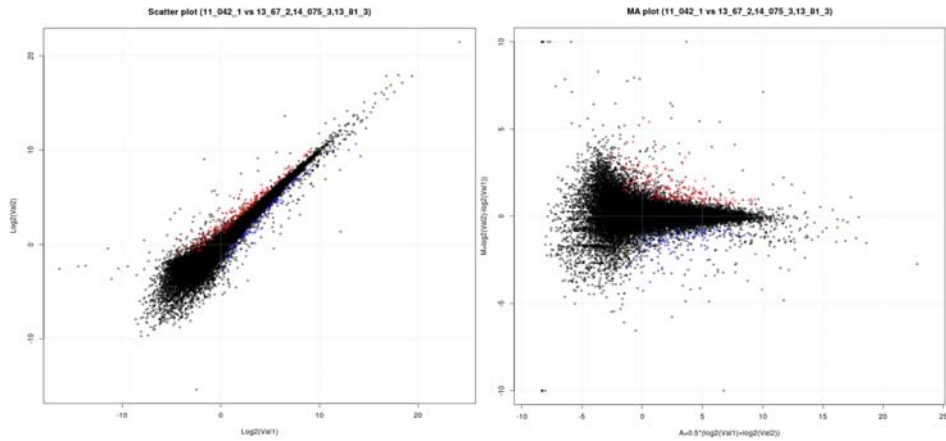


그림 103. 비임신과 10개월 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

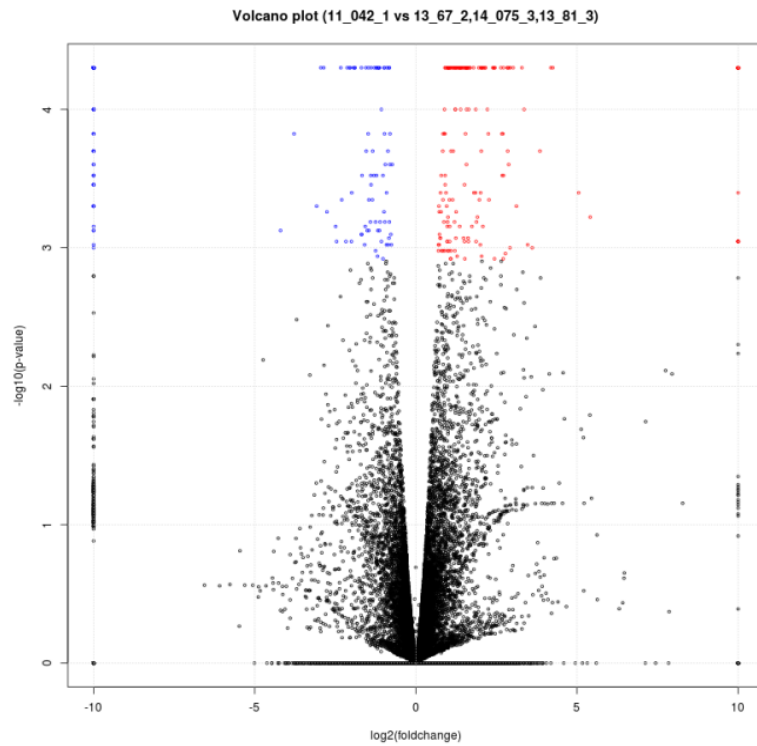


그림 104. Volcano plot 분석 결과 임신 10 개월.

- 이 같은 차이를 생물 통계적인 유의성에 기초하여 Plotting을 한 결과 10개월 임신한우 전사체 데이터로 부터 326개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 16개의 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음(그림 104).

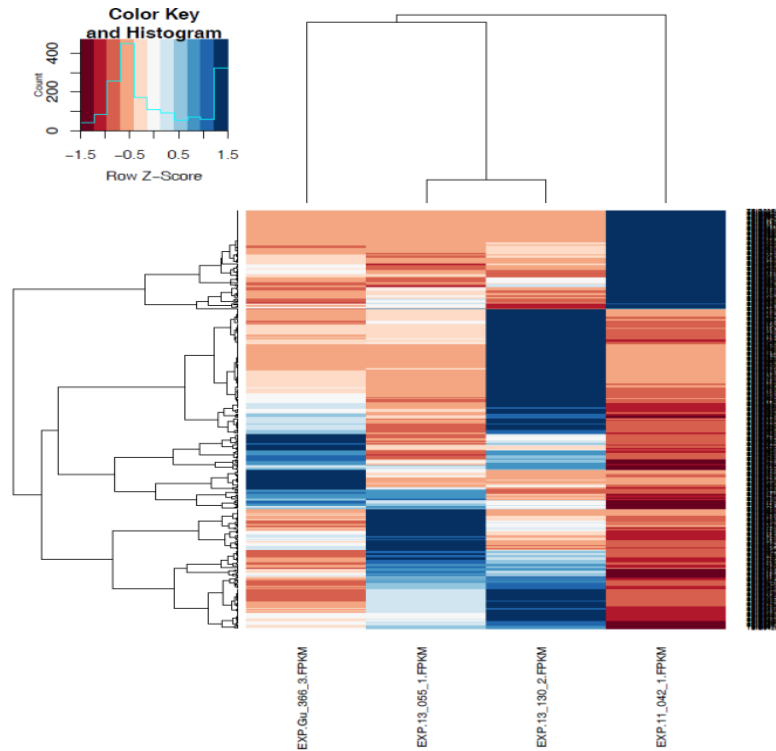


그림 105. Heat map 분석 결과 임신 10 개월

○ 총 442개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 3-4개월 임신 한우의 유전자 발현이 비 임신 한우와 비교해 볼 때 유전적 차이를 보임을 확인함(그림 105).

○ 본 DEG분석 결과를 기초로 하여 임신 관련 유전자 스크리닝을 통해 특이적으로 발현하는 유전자 중 발현량 상위 유전자 및 한우 임신 진단에 적합한 유전적 바이오 마커를 선별하고 유전자에 특이적인 Primer를 디자인하여 RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용하여 재검증하는 단계를 최종적으로 진행할 예정이다.

2. 한우 임신기간 중의 PAG family의 정량 및 정성분석

(1) 임신 및 미임신 한우 혈액 샘플 확보

- 임신한우에서 1주단위(3개월 이전) 및 2주단위(3개월 이후) 혈액을 확보
- 시험농장 : 하늘채목장(경북 경산 소재)
경북축산기술연구소(경북 영주 소재)

- 혈액 채취 방법
- 시험축 임신 : 발정확인 및 인공수정

시험축의 발정확인인 오전 및 오후 매일 2차례씩 임상증상을 관찰하여 확인 하였다. 인공수정은 지정된 인공수정사에 의하여 발정 확인 후 8-10시간 이후에 실시하였다.

- 혈액 채취 :
대상축 :인공수정 후 1주, 2주, 3주, 4주, 이후 1개월 간격 혈액 채취
혈액채취 : 경정맥에서 10ml 채취 직후 혈액튜브 Vacutainer에 보관
- 혈액 운반 : 4℃ 상태로 운반
- 혈장 분리 : 1500rpm, 10분간 원심분리
- 혈장 보관 : -40℃ 이하에서 냉동보관
- 혈액 샘플 : 307개

(2) 한우 임신/미임신 샘플 리스트

번호	번호(바코드)	수정일	샘플채취일	임신예상일령
15-53(0522)	2097905224	2017-05-11	2017-05-11	0
15-53(0522)	2097905224	2017-05-11	2017-05-18	7
15-53(0522)	2097905224	2017-05-11	2017-05-25	14
15-53(0522)	2097905224	2017-05-11	2017-06-01	21
15-53(0522)	2097905224	2017-05-11	2017-06-08	28
	2097905224			0
11-45(8827)	2068088271	2017-05-30	2017-05-30	0
11-45(8827)	2068088271	2017-05-30	17/6/13	14
11-45(8827)	2068088271	2017-05-30	2017-06-20	21
11-45(8827)	2068088271	2017-05-30	2017-06-27	28
구-325(3883)	2058338831	2017-05-30	2017-05-30	0
구-325(3883)	2058338831	2017-05-30	17/6/13	14
구-325(3883)	2058338831	2017-05-30	2017-06-20	21
구-325(3883)	2058338831	2017-05-30	2017-06-27	28
11-38(5270)	2065152707	2017-05-30	2017-05-30	0
11-38(5270)	2065152707	2017-05-30	17/6/13	14
11-38(5270)	2065152707	2017-05-30	2017-06-20	21
11-38(5270)	2065152707	2017-05-30	2017-06-27	28
15-43(0522)	2096639166	2017-05-11	2017-05-11	0
15-43(0522)	2096639166	2017-05-11	2017-05-25	14
15-43(0522)	2096639166	2017-05-11	2017-06-01	21
15-43(0522)	2096639166	2017-05-11	2017-06-08	28
구-377(2980)	176329806	2017-05-11	2017-05-11	0
구-377(2980)	176329806	2017-05-11	2017-05-25	14
구-377(2980)	176329806	2017-05-11	2017-06-01	21
구-377(2980)	176329806	2017-05-11	2017-06-08	28
15-45(3918)	2096636182	2017-05-29	2017-05-29	0
15-45(3918)	2096636182	2017-05-29	2017-06-12	14
15-45(3918)	2096636182	2017-05-29	2017-06-19	21
15-45(3918)	2096636182	2017-05-29	2017-06-26	28
구-217(1029)	2018510296	2017-05-30	2017-05-30	0
구-217(1029)	2018510296	2017-05-30	2017-06-13	14
구-217(1029)	2018510296	2017-05-30	2017-06-20	21
구-217(1029)	2018510296	2017-05-30	2017-06-27	28
15-64(0530)	2097905304	2017-05-11	2017-05-11	0
15-64(0530)	2097905304	2017-05-11	2017-05-25	14
15-64(0530)	2097905304	2017-05-11	2017-06-01	21
15-64(0530)	2097905304	2017-05-11	2017-06-08	28
14-26(0789)	2308307891	2017-05-12	2017-05-12	0
14-26(0789)	2308307891	2017-05-12	2017-05-19	7
14-26(0789)	2308307891	2017-05-12	2017-05-26	14
14-26(0789)	2308307891	2017-05-12	2017-06-02	21
14-26(0789)	2308307891	2017-05-12	2017-06-09	28
구-391(8898)	2098988988	2017-05-12	2017-05-12	0

ㄱ-391(8898)	2098988988	2017-05-12	2017-05-19	7
ㄱ-391(8898)	2098988988	2017-05-12	2017-05-26	14
ㄱ-391(8898)	2098988988	2017-05-12	2017-06-02	21
ㄱ-391(8898)	2098988988	2017-05-12	2017-06-09	28
14-16(5206)	2307352061	2017-06-02	2017-06-02	0
14-16(5206)	2307352061	2017-06-02	2017-06-16	14
14-16(5206)	2307352061	2017-06-02	2017-06-23	21
14-16(5206)	2307352061	2017-06-02	2017-06-30	28
15-52(4312)	2096643126	2017-05-12	2017-05-12	0
15-52(4312)	2096643126	2017-05-12	2017-05-26	14
15-52(4312)	2096643126	2017-05-12	2017-06-01	20
15-52(4312)	2096643126	2017-05-12	2017-06-09	28
ㄱ-344(9938)	2062699388	2017-05-12	2017-05-12	0
ㄱ-344(9938)	2062699388	2017-05-12	2017-05-26	14
ㄱ-344(9938)	2062699388	2017-05-12	2017-06-01	20
ㄱ-344(9938)	2062699388	2017-05-12	2017-06-09	28
ㄱ-215(4187)	2031241870	2017-05-12	2017-05-12	0
ㄱ-215(4187)	2031241870	2017-05-12	2017-05-26	14
ㄱ-215(4187)	2031241870	2017-05-12	2017-06-01	20
ㄱ-215(4187)	2031241870	2017-05-12	2017-06-09	28
14-51(7690)	2090176905	2017-05-12	2017-05-12	0
14-51(7690)	2090176905	2017-05-12	2017-05-26	14
14-51(7690)	2090176905	2017-05-12	2017-06-01	20
14-51(7690)	2090176905	2017-05-12	2017-06-09	28
ㄱ-214(6016)	2002960168	2017-06-02	2017-06-02	0
ㄱ-214(6016)	2002960168	2017-06-02	2017-06-16	14
ㄱ-214(6016)	2002960168	2017-06-02	2017-06-23	21
ㄱ-214(6016)	2002960168	2017-06-02	2017-06-30	28
ㄱ-248(8006)	2056580063	2017-06-02	2017-06-02	0
ㄱ-248(8006)	2056580063	2017-06-02	2017-06-16	14
ㄱ-248(8006)	2056580063	2017-06-02	2017-06-23	21
ㄱ-248(8006)	2056580063	2017-06-02	2017-06-30	28
15-37(3910)	2096639107	2017-06-02	2017-06-02	0
15-37(3910)	2096639107	2017-06-02	2017-06-16	14
15-37(3910)	2096639107	2017-06-02	2017-06-23	21
15-37(3910)	2096639107	2017-06-02	2017-06-30	28
ㄱ-393(8471)	2098984715	2017-05-12	2017-05-12	0
ㄱ-393(8471)	2098984715	2017-05-12	2017-05-26	14
ㄱ-393(8471)	2098984715	2017-05-12	2017-06-02	21
ㄱ-393(8471)	2098984715	2017-05-12	2017-06-09	28
12-60(6269)	2301262691	2017-05-15	2017-05-15	0
12-60(6269)	2301262691	2017-05-15	2017-05-22	7
12-60(6269)	2301262691	2017-05-15	2017-05-29	14
12-60(6269)	2301262691	2017-05-15	2017-06-05	21
12-60(6269)	2301262691	2017-05-15	2017-06-12	28
14-15(5205)	2307352053	2017-05-15	2017-05-15	0
14-15(5205)	2307352053	2017-05-15	2017-05-22	7
14-15(5205)	2307352053	2017-05-15	2017-05-29	14
14-15(5205)	2307352053	2017-05-15	2017-06-05	21
14-15(5205)	2307352053	2017-05-15	2017-06-12	28
15-78(4589)	2103845894	2017-05-25	2017-05-25	0
15-78(4589)	2103845894	2017-05-25	17/6/8	14
15-78(4589)	2103845894	2017-05-25	2017-06-15	21
15-78(4589)	2103845894	2017-05-25	2017-06-22	28
ㄱ-176(7702)	2005877027	2017-05-15	2017-05-15	0
ㄱ-176(7702)	2005877027	2017-05-15	2017-05-22	7
ㄱ-176(7702)	2005877027	2017-05-15	2017-05-29	14
ㄱ-176(7702)	2005877027	2017-05-15	2017-06-05	21

ㄱ-176(7702)	2005877027	2017-05-15	2017-06-12	28
14-53(7692)	2090176921	2017-05-15	2017-05-15	0
14-53(7692)	2090176921	2017-05-15	2017-05-22	7
14-53(7692)	2090176921	2017-05-15	2017-05-29	14
14-53(7692)	2090176921	2017-05-15	2017-06-05	21
14-53(7692)	2090176921	2017-05-15	2017-06-12	28
14-113(5673)	2093756735	2017-05-15	2017-05-15	0
14-113(5673)	2093756735	2017-05-15	2017-05-22	7
14-113(5673)	2093756735	2017-05-15	2017-05-29	14
14-113(5673)	2093756735	2017-05-15	2017-06-05	21
14-113(5673)	2093756735	2017-05-15	2017-06-12	28
ㄱ-265(0007)	2005900077	2017-05-15	2017-05-15	0
ㄱ-265(0007)	2005900077	2017-05-15	2017-05-22	7
ㄱ-265(0007)	2005900077	2017-05-15	2017-05-29	14
ㄱ-265(0007)	2005900077	2017-05-15	2017-06-05	21
ㄱ-265(0007)	2005900077	2017-05-15	2017-06-12	28
13-61(3009)	2306030094	2017-05-15	2017-05-15	0
13-61(3009)	2306030094	2017-05-15	2017-05-22	7
13-61(3009)	2306030094	2017-05-15	2017-05-29	14
13-61(3009)	2306030094	2017-05-15	2017-06-05	21
13-61(3009)	2306030094	2017-05-15	2017-06-12	28
ㄱ-383(6017)	2008360174	2017-05-15	2017-05-15	0
ㄱ-383(6017)	2008360174	2017-05-15	2017-05-22	7
ㄱ-383(6017)	2008360174	2017-05-15	2017-05-29	14
ㄱ-383(6017)	2008360174	2017-05-15	2017-06-05	21
ㄱ-383(6017)	2008360174	2017-05-15	2017-06-12	28
11-70(3867)	2072338671	2017-05-15	2017-05-15	0
11-70(3867)	2072338671	2017-05-15	2017-05-22	7
11-70(3867)	2072338671	2017-05-15	2017-05-29	14
11-70(3867)	2072338671	2017-05-15	2017-06-05	21
11-70(3867)	2072338671	2017-05-15	2017-06-12	28
ㄱ-403(8516)	2100585162	2017-05-15	2017-05-15	0
ㄱ-403(8516)	2100585162	2017-05-15	2017-05-22	7
ㄱ-403(8516)	2100585162	2017-05-15	2017-05-29	14
ㄱ-403(8516)	2100585162	2017-05-15	2017-06-05	21
ㄱ-403(8516)	2100585162	2017-05-15	2017-06-12	28
ㄱ-245(8513)	2056785131	2017-06-02	2017-06-02	0
ㄱ-245(8513)	2056785131	2017-06-02	2017-06-16	14
ㄱ-245(8513)	2056785131	2017-06-02	2017-06-23	21
ㄱ-245(8513)	2056785131	2017-06-02	2017-06-30	28
14-58(4327)	2093743273	2017-06-02	2017-06-02	0
14-58(4327)	2093743273	2017-06-02	2017-06-16	14
14-58(4327)	2093743273	2017-06-02	2017-06-23	21
14-58(4327)	2093743273	2017-06-02	2017-06-30	28
15-65(0531)	2097905312	2017-06-02	2017-06-02	0
15-65(0531)	2097905312	2017-06-02	2017-06-16	14
15-65(0531)	2097905312	2017-06-02	2017-06-23	21
15-65(0531)	2097905312	2017-06-02	2017-06-30	28
14-29(0792)	2308307922	2017-06-02	2017-06-02	0
14-29(0792)	2308307922	2017-06-02	2017-06-16	14
14-29(0792)	2308307922	2017-06-02	2017-06-23	21
14-29(0792)	2308307922	2017-06-02	2017-06-30	28
ㄱ-392(8897)	2098988970	2017-06-02	2017-06-02	0
ㄱ-392(8897)	2098988970	2017-06-02	2017-06-16	14
ㄱ-392(8897)	2098988970	2017-06-02	2017-06-23	21
ㄱ-392(8897)	2098988970	2017-06-02	2017-06-30	28
15-1(7957)	2096479578	2017-06-02	2017-06-02	0
15-1(7957)	2096479578	2017-06-02	2017-06-16	14

15-1(7957)	2096479578	2017-06-02	2017-06-23	21
15-1(7957)	2096479578	2017-06-02	2017-06-30	28
15-56(0460)	2097904607	2017-06-02	2017-06-02	0
15-56(0460)	2097904607	2017-06-02	2017-06-16	14
15-56(0460)	2097904607	2017-06-02	2017-06-23	21
15-56(0460)	2097904607	2017-06-02	2017-06-30	28
15-57(0523)	2097905232	2017-06-02	2017-06-02	0
15-57(0523)	2097905232	2017-06-02	2017-06-16	14
15-57(0523)	2097905232	2017-06-02	2017-06-23	21
15-57(0523)	2097905232	2017-06-02	2017-06-30	28
13-55(3004)	2306030043	2017-06-02	2017-06-02	0
13-55(3004)	2306030043	2017-06-02	2017-06-16	14
13-55(3004)	2306030043	2017-06-02	2017-06-23	21
13-55(3004)	2306030043	2017-06-02	2017-06-30	28
14-47(7685)	2090176850	2017-06-02	2017-06-02	0
14-47(7685)	2090176850	2017-06-02	2017-06-16	14
14-47(7685)	2090176850	2017-06-02	2017-06-23	21
14-47(7685)	2090176850	2017-06-02	2017-06-30	28
0385.2	0385.2	2016-09-14	2016-02-20	207
0093.4	0093.4	2016-07-22	2016-02-20	153
8376.5	8376.5	2016-06-12	2016-02-20	113
0565.8	0565.8	2016-09-14	2016-02-20	207
1053.2	1053.2	2016-07-03	2016-02-20	134
8629.2	8629.2	2016-05-18	2016-02-20	88
6347.6	6347.6	2016-09-10	2016-02-20	203
0900.0	0900.0	2016-09-24	2016-02-20	217
8527.3	8527.3	2016-05-26	2016-02-20	96
1266.7	1266.7	2016-07-10	2016-02-20	141
6346.8	6346.8	2016-06-22	2016-02-20	123
1266.7	1266.7	2016-07-10	2017-02-20	225
2718.7	2718.7	2016-10-15	2016-02-20	238
6701.2	6701.2	2016-08-25	2016-02-20	187
7815.4	7815.4	2016-10-21	2016-02-20	244
1448.6	1448.6	2017-02-02	2016-02-20	348
0899.6	0899.6	2016-07-01	2016-02-20	132
9785.1	9785.1	2016-07-21	2016-02-20	152
2597.4	2597.4	2016-09-18	2016-02-20	211
1947.1	1947.1			0
1035.8	1035.8	2016-12-04	2016-02-20	288
6701.2	6701.2	2016-08-25	2017-02-20	179
0385.2	0385.2	2016-09-14	2017-02-20	159
5191.5	5191.5	2016-07-10	2016-02-20	141
9948.0	9948.0	2016-09-09	2016-02-20	202
1420.5	1420.5	2016-12-14	2016-02-20	298
5768.4	5768.4	2016-08-26	2016-02-20	188
4599.4	4599.4	2016-05-18	2016-02-20	88
0077.3	0077.3	2016-07-01	2016-02-20	132
6639.3	6639.3	2016-06-29	2016-02-20	130
8848.5	8848.5	2016-08-29	2016-02-20	191
6701.2	6701.2	2016-08-25	2017-02-20	179
8675.0	8675.0	2016-05-21	2016-02-20	91
6230.6	6230.6	2016-05-18	2016-02-20	88
0094.2	0094.2	2016-11-12	2016-02-20	266
1448.6	1448.6			
5648.7	5648.7	2016-02-16	2017-03-21	399
1581.9	1581.9	2016-11-18	2017-03-21	123
6592.2	6592.2	2016-10-06	2017-03-21	166
4434.5	4434.5	2016-10-21	2017-03-21	151

5899.7	5899.7	2016-10-07	2017-03-21	165
4587.1	4587.1	2016-07-12	2017-03-21	252
2506.8	2506.8	2016-09-06	2017-03-21	196
7088.8	7088.8	2016-08-30	2017-03-21	203
0090.0	0090.0	2016-09-24	2017-03-21	178
0094.2	0094.2	2016-11-12	2017-03-21	129
9785.1	9785.1	2016-07-21	2017-03-21	243
1053.2	1053.2	2016-07-03	2017-03-21	261
6639.3	6639.3	2016-06-29	2017-03-21	265
0093.4	0093.4	2016-07-22	2017-03-21	242
2718.7	2718.7	2016-10-15	2017-03-21	157
2640.7	2640.7	2016-09-21	2017-03-21	181
6346.8	6346.8	2016-06-22	2017-03-21	272
0565.8	0565.8	2016-09-14	2017-03-21	188
1448.6	1448.6	2017-02-02	2017-03-21	47
1035.8	1035.8	2016-12-04	2017-03-21	107
6347.6	6347.6	2016-09-10	2017-03-21	192
0899.6	0899.6	2016-07-01	2017-03-21	263
5191.5	5191.5	2016-07-10	2017-03-21	254
3278.3	3278.3	2017-02-04	2017-03-21	45
0385.2	0385.2	2016-09-14	2017-03-21	188
2597.4	2597.4	2016-09-18	2017-03-21	184
6701.2	6701.2	2016-08-25	2017-03-21	208
8376.5	8376.5	2016-06-12	2017-03-21	282
5557.8	5557.8			0
1426.5	1426.5			
2640.7	2640.7		2017-04-25	
0093.4	0093.4	2016-07-22	2017-04-25	277
0385.2	0385.2	2016-09-14	2017-04-25	223
4587.1	4587.1	2016-07-12	2017-04-25	287
6347.6	6347.6	2016-09-10	2017-04-25	227
2718.7	2718.7	2016-10-15	2017-04-25	192
0900.0	0900.0	2016-11-12	2017-04-25	164
1035.8	1035.8	2016-12-04	2017-04-25	142
1581.9	1581.9		2017-04-25	
0094.2	0094.2	2016-11-12	2017-04-25	164
9785.1	9785.1	2016-07-21	2017-04-25	278
1420.5	1420.5	2016-12-14	2017-04-25	132
1448.6	1448.6	2017-02-02	2017-04-25	82
4434.5	4434.5	2016-10-06	2017-04-25	201
2597.4	2597.4	2016-12-14	2017-04-25	132
6701.2	6701.2	2016-08-25	2017-04-25	243
5899.7	5899.7	2016-10-07	2017-04-25	200
5648.7	5648.7	2017-02-16	2017-04-25	68
0565.8	0565.8	2016-09-14	2017-04-25	223
6592.2	6592.2	2016-10-06	2017-04-25	201
7088.8	7088.8	2016-08-30	2017-04-25	238
2506.8	2506.8	2016-09-06	2017-04-25	231
5648.7	5648.7	2017-02-16	2017-06-23	127
4434.5	4434.5	2016-10-21	2017-06-23	245
5899.7	5899.7	2016-10-07	2017-06-23	259
6592.2	6592.2	2016-10-21	2017-06-23	245
2640.7	2640.7	2017-04-17	2017-06-23	67
0094.2	0094.2	2016-11-12	2017-06-23	223
0565.8	0565.8	2016-09-14	2017-06-23	282
1448.6	1448.6	2017-02-02	2017-06-23	141
1035.8	1035.8	2016-12-04	2017-06-23	201
9296.3	9296.3	2017-05-21	2017-06-23	33

9947.1	9947.1	2017-05-23	2017-06-23	31
0385.2	0385.2	2016-09-14	2017-06-23	282
1420.5	1420.5	2016-12-14	2017-06-23	191
0899.6	0899.6	2017-05-31	2017-06-23	23
5557.8	5557.8	2017-04-25	2017-06-23	59
3278.3	3278.3	2017-04-10	2017-06-23	74
7304	7304	2017-02-11	2017-07-04	143
8835	8835	2017-03-23	2017-07-04	103
2721	2721	2017-05-23	2017-07-04	42
1690	1690	2017-05-27	2017-07-04	38
2640.7	2640.7	2017-04-17	2017-07-25	99
3278.3	3278.3	2017-04-10	2017-07-25	106
1420.5	1420.5	2016-12-14	2017-07-25	223
1448.6	1448.6	2016-10-21	2017-07-25	277
5557.8	5557.8	2017-04-25	2017-07-25	91
9947.1	9947.1	2017-05-23	2017-07-25	63
6701.2	6701.2	2017-05-25	2017-07-25	61
899.6	899.6	2017-05-31	2017-07-25	55
6639.3	6639.3	2017-06-11	2017-07-25	44
9785.1	9785.1	2017-06-20	2017-07-25	35
9296.3	9296.3	2017-05-21	2017-07-25	65
3459.9	3459.9	2016-09-24	2017-07-25	304
8332.5	8332.5	2017-03-30	2017-07-25	117
3116	3116	2017-05-27	2017-07-25	59
5134.2	5134.2	2017-05-06	2017-07-25	80
9665.2	9665.2	2017-05-12	2017-07-25	74
6346.8	6346.8		2017-07-25	42941
5892.9	5892.9	2017-06-24	2017-07-25	31
1611.9	1611.9	2017-01-13	2017-07-25	193

3. PAG 농도 조사(ELISA법을 이용한 PAG 정량 분석)

재료 및 방법

- 시료: Serum, EADTA plasma
- 재료 : Anti PAG Antibody coated plate,
Positive and negative control
Conjugate
Sample diluent
TMB substrate N.12
Stop solution N.3
Wash concentrate (10X)
Detector solution

(1) 시약준비

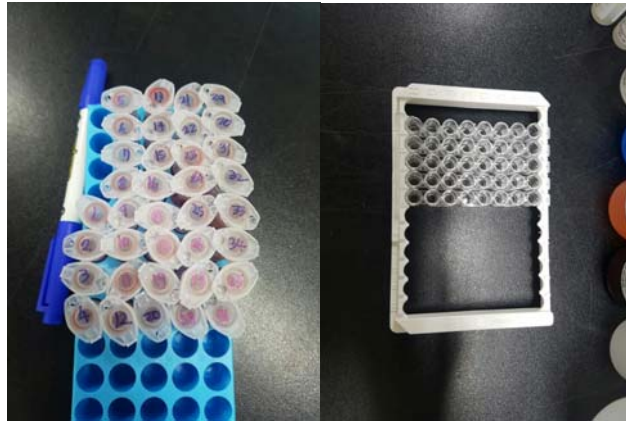
- 시약 등의 온도가 실온 (18~26° C)이 되게 한다. (모든 시약& 검사시료가 실온이 되었을 때 반응결과가 가장 좋음)

○ 시약준비: 세척액(X10): 1:10 희석



(2) 검사 과정

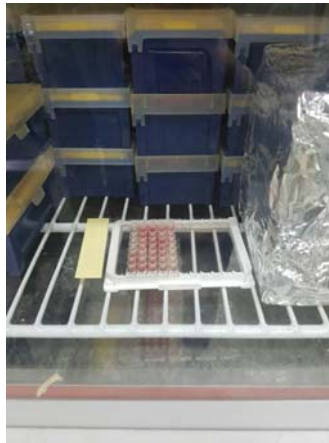
① 샘플 희석액 분주- 25u Sample Diluent 분주



- ② 시료 분주-100u sample, negative control(NC) & positive control(PC) 플레이트에 분주



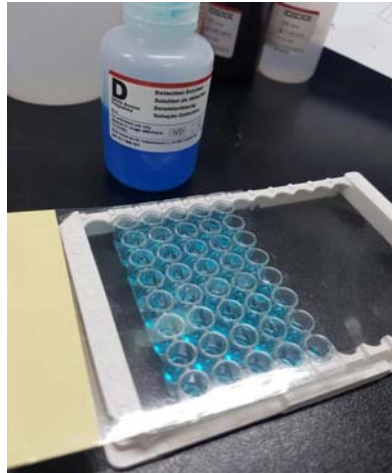
- ③ Sealing cover 사용, 37° C 60분 반응



- ④ 세척- 300u, 4회



⑤ Detector sol 분주- 100u Detector 분주 with cover, 실온 30분 반응



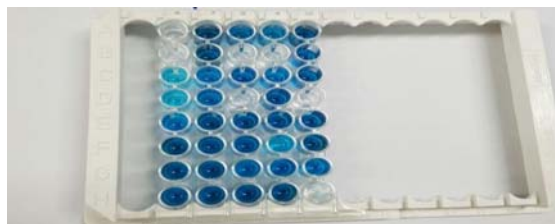
⑥ 세척- 300u, 5회

⑦ 컨쥬게이트 분주- 100u 컨쥬게이트 분주 with cover, 실온 30분 반응



⑧ 세척- 300u, 6회

⑨ TMB 분주- 100u TMB를 분주, 실온 15분 반응(어두운 곳)



⑩ 정지액- 100u Stop액 분주, TMB 분주순서와 동일한 순서로 분주



⑪ 측정과 기록 : 주파장 450nm, 부파장 650nm



(3) 분석

- 유효성: $NC \times OD \leq 0.15$, $PC \times OD \geq 0.3$
- 계산법: $S-N = \text{Sample A}(450-REF) - NC \times$

(4) 결과해석:

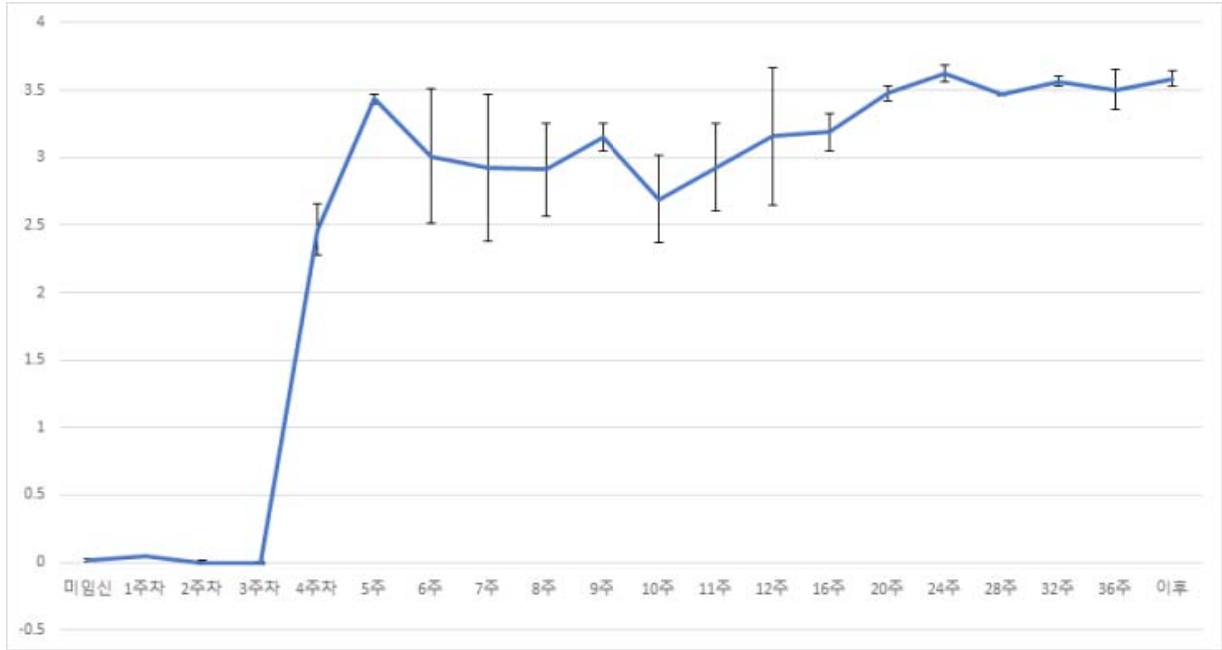
- 음성 $S-N < 0.3$, 양성 $S-N \geq 0.3$
- 선택적 재검사 $0.3 \leq S-N < 1.0$ (1st 검사 후 7-10일 이후 재검사)

(5) 결과

① 임신기간 중의 PAG 농도

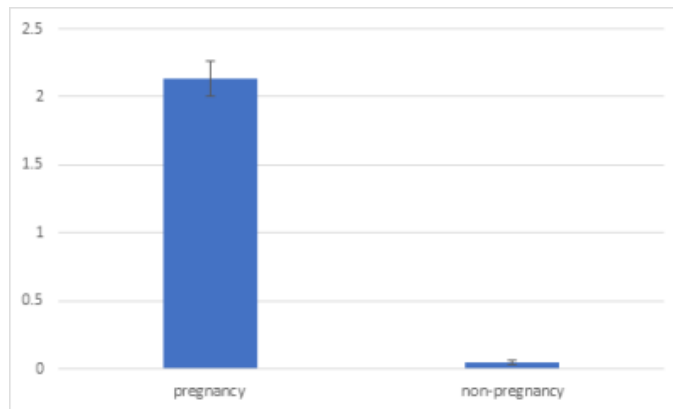
- 본 표와 그래프는 임신이 확인된 한우의 인공수정 후 1주차부터 혈액내의 PAG농도를 분석한 결과로서 인공수정부터 3주차까지는 PAG농도의 변화가 없었으나, 4주차(수정 후 28일 경)에는 PAG농도가 급격히 증가하는 경향으로 혈액내의 PAG분석으로는 인공수정 4주차 이후부터 임신진단이 가능한 것으로 판단됨

임신주	AI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	16	20	24	28	32	36	이후
평균	0.018	0.033	0.018	0.019	1.968	3.435	3.009	2.926	2.910	3.150	2.692	2.929	3.158	3.188	3.477	3.621	3.471	3.567	3.505	3.586
SE	0.008	0.007	0.014	0.010	0.192	0.036	0.498	0.544	0.347	0.106	0.323	0.327	0.507	0.136	0.055	0.062	0.009	0.033	0.151	0.057



② 임신과 임신 한우의 기간 중의 분석 결과

○ 인공수정 후 4주차의 임신 한우와 미임신 한우의 PAG 농도를 조사한 결과 임신에서는 2.135 ± 0.132 로서 미임신 한우의 0.05 ± 0.019 에 비하여 현저하게 높았다.



③ 개체별 PAG농도 검사 결과(참고 예)

○ 개체별 한우에 대한 임신결과에 대하여 일부 검사 결과를 첨부하였다. 확인된 흡과도와 계산식을 이용하여 PAG농도를 구한 결과는 S-N으로서 결과는 0.3 이상은 임신으로 0.3미만은 미임신으로

판정하였으나, 피크가 정확하지 않은 0.3-0.8 사이는 재검사로 분류하였다. 향후 추가 실험을 진행할 계획이다. 결과에서 pregnancy는 임신, open은 미임신으로 표시하였다. pregnant - recheck는 농도 상으로는 임신이 예상되나 피크가 약하여 추가 검사가 필요한 개체 리스트이다. 하지만 이들 개체는 모두 4주차에 임신으로 확인되어 수정 후 특정한 기간에 PAG농도의 변화를 다시 한번 조사되어야 할 것으로 판단된다.

분석 범위	흡광도 O.D.	실험순서 Tube #	개체번호 Animal ID1	결과	
				S-N	판정
Neg	0.015				
Neg	0.011				
Pos	0.657				
Pos	0.665				
임신확인 1주차	0.038	1	1-3	0.025	Open!
임신확인 1주차	0.047	2	1-4	0.034	Open!
임신확인 1주차	0.016	3	1-8	0.003	Open!
임신확인 1주차	0.036	4	1-9	0.023	Open!
임신확인 1주차	0.024	5	1-11	0.011	Open!
임신확인 1주차	0.037	6	1-13	0.024	Open!
임신확인 1주차	0.057	7	1-14	0.044	Open!
임신확인 1주차	0.043	8	1-15	0.03	Open!
임신확인 1주차	0.028	9	1-16	0.015	Open!
임신확인 1주차	0.06	10	1-21	0.047	Open!
임신확인 1주차	0.052	11	1-22	0.039	Open!
임신확인 1주차	0.061	12	1-23	0.048	Open!
임신확인 1주차	0.02	13	1-25	0.007	Open!
임신확인 1주차	0.011	14	1-28	-0.002	Open!
임신확인 1주차	0.012	15	1-30	-0.001	Open!
임신확인 1주차	0.018	16	1-31	0.005	Open!
임신확인 1주차	0.78	17	1-34	0.767	Pregnant - Recheck
임신확인 1주차	0.074	18	1-36	0.061	Open!
임신확인 2주차	0.01	1	2-3	-0.003	Open!
임신확인 2주차	0.006	2	2-4	-0.007	Open!
임신확인 2주차	0.021	3	2-8	0.008	Open!
임신확인 2주차	0.02	4	2-9	0.007	Open!
임신확인 2주차	0.014	5	2-11	0.001	Open!
임신확인 2주차	0.017	6	2-13	0.004	Open!
임신확인 2주차	0.013	7	2-14	0	Open!
임신확인 2주차	0.074	8	2-15	0.061	Open!
임신확인 2주차	0.015	9	2-16	0.002	Open!
임신확인 2주차	0.014	10	2-21	0.001	Open!
임신확인 2주차	0.021	11	2-22	0.008	Open!
임신확인 2주차	0.069	12	2-23	0.056	Open!
임신확인 2주차	0.396	13	2-25	0.383	Pregnant - Recheck
임신확인 2주차	0.029	14	2-28	0.016	Open!
임신확인 2주차	0.009	15	2-30	-0.004	Open!
임신확인 2주차	0.053	16	2-31	0.04	Open!
임신확인 2주차	0.074	17	2-34	0.061	Open!
임신확인 2주차	0.015	18	2-36	0.002	Open!
임신확인 3주차	0.017	1	3-3	0.004	Open!
임신확인 3주차	0.102	2	3-4	0.089	Open!

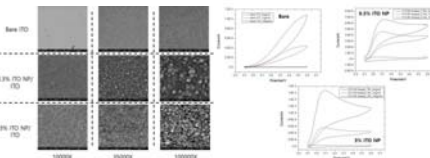
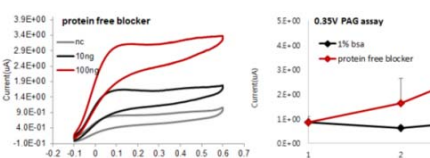
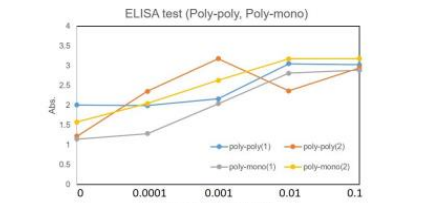
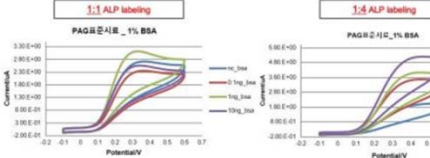
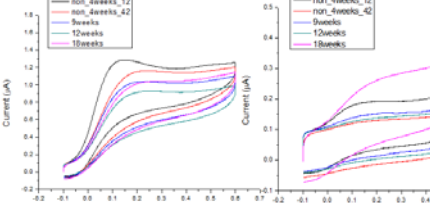
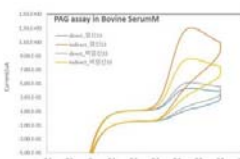
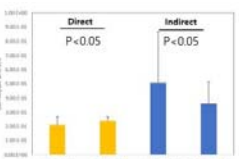
임신험인 3주차	0.029	3	3-8	0.016	Open!
임신험인 3주차	0.014	4	3-9	0.001	Open!
임신험인 3주차	0.012	5	3-11	-0.001	Open!
임신험인 3주차	0.047	6	3-13	0.034	Open!
임신험인 3주차	0.01	7	3-14	-0.003	Open!
임신험인 3주차	0.06	8	3-15	0.047	Open!
임신험인 3주차	0.027	9	3-16	0.014	Open!
임신험인 3주차	0.017	10	3-21	0.004	Open!
임신험인 3주차	0.022	11	3-22	0.009	Open!
임신험인 3주차	0.33	12	3-23	0.317	Pregnant - Recheck
임신험인 3주차	2.543	13	3-25	2.53	Pregnant
임신험인 3주차	0.082	14	3-28	0.069	Open!
임신험인 3주차	0.084	15	3-30	0.071	Open!
임신험인 3주차	0.013	16	3-31	0	Open!
임신험인 3주차	0.104	17	3-34	0.091	Open!
임신험인 3주차	0.114	18	3-36	0.101	Open!
임신험인 4주차	2.367	1	4-3	2.354	Pregnant
임신험인 4주차	2.665	2	4-4	2.652	Pregnant
임신험인 4주차	1.695	3	4-8	1.682	Pregnant
임신험인 4주차	1.317	4	4-9	1.304	Pregnant
임신험인 4주차	0.007	5	4-11		Open!
임신험인 4주차	0.012	6	4-13		Open!
임신험인 4주차	1.764	7	4-14	1.751	Pregnant
임신험인 4주차	2.414	8	4-15	2.401	Pregnant
임신험인 4주차	1.739	9	4-16	1.726	Pregnant
임신험인 4주차	1.976	10	4-21	1.963	Pregnant
임신험인 4주차	0.011	11	4-22		Open!
임신험인 4주차	2.478	12	4-23	2.465	Pregnant
임신험인 4주차	1.783	13	4-25	1.77	Pregnant
임신험인 4주차	1.677	14	4-28	1.664	Pregnant
임신험인 4주차	2.535	15	4-30	2.522	Pregnant
임신험인 4주차	1.928	16	4-31	1.915	Pregnant
임신험인 4주차	2.693	17	4-34	2.68	Pregnant
임신험인 4주차	3.182	18	4-36	3.169	Pregnant
Neg	0.01				
Neg	0.01				
Pos	0.79				
Pos	0.767				
임신험외분 1주차	0.028	1	1-1	0.018	Open!
임신험외분 1주차	0.055	2	1-5	0.045	Open!
임신험외분 1주차	0.016	3	1-6	0.006	Open!
임신험외분 1주차	0.014	4	1-7	0.004	Open!
임신험외분 1주차	0.026	5	1-12	0.016	Open!
임신험외분 1주차	0.026	6	1-17	0.016	Open!
임신험외분 1주차	0.067	7	1-18	0.057	Open!
임신험외분 1주차	0.028	8	1-19	0.018	Open!
임신험외분 1주차	0.025	9	1-20	0.015	Open!
임신험외분 1주차	0.01	10	1-24	0	Open!
임신험외분 1주차	0.006	11	1-26	-0.004	Open!
임신험외분 1주차	0.013	12	1-27	0.003	Open!
임신험외분 1주차	0.011	13	1-29	0.001	Open!
임신험외분 1주차	0.009	14	1-32	-0.001	Open!
임신험외분 1주차	0.012	15	1-33	0.002	Open!

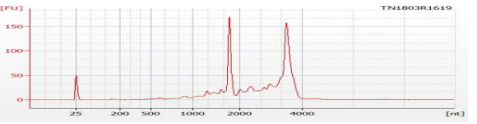
임신제외분 1주차	0.154	16	1-35	0.144	Open!
임신제외분 1주차	0.103	17	1-37	0.093	Open!
임신제외분 1주차	0.307	18	1-39	0.297	Open!
임신제외분 1주차	0.179	19	1-40	0.169	Open!
임신제외분 1주차	0.183	20	1-41	0.173	Open!
임신제외분 1주차	0.113	21	1-42	0.103	Open!
임신제외분 1주차	1.571	22	1-43	1.561	Pregnant
임신제외분 1주차	0.552	23	1-44	0.542	Pregnant - Recheck
임신제외분 2주차	0.018	1	2-1	0.008	Open!
임신제외분 2주차	0.01	2	2-5	0	Open!
임신제외분 2주차	0.011	3	2-6	0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.009	4	2-7	-0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.013	5	2-12	0.003	Open!
임신제외분 2주차	0.011	6	2-17	0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.021	7	2-18	0.011	Open!
임신제외분 2주차	0.015	8	2-19	0.005	Open!
임신제외분 2주차	0.008	9	2-20	-0.002	Open!
임신제외분 2주차	0.011	10	2-24	0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.007	11	2-26	-0.003	Open!
임신제외분 2주차	0.013	12	2-27	0.003	Open!
임신제외분 2주차	0.006	13	2-29	-0.004	Open!
임신제외분 2주차	0.009	14	2-32	-0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.011	15	2-33	0.001	Open!
임신제외분 2주차	0.029	16	2-35	0.019	Open!
임신제외분 2주차	0.025	17	2-37	0.015	Open!
임신제외분 2주차	0.179	18	2-39	0.169	Open!
임신제외분 2주차	0.029	19	2-40	0.019	Open!
임신제외분 2주차	0.032	20	2-41	0.022	Open!
임신제외분 2주차	0.027	21	2-41	0.017	Open!
임신제외분 2주차	0.317	22	2-43	0.307	Pregnant - Recheck
임신제외분 2주차	0.094	23	2-44	0.084	Open!
임신제외분 3주차	0.02	1	3-1	0.01	Open!
임신제외분 3주차	0.01	2	3-5	0	Open!
임신제외분 3주차	0.011	3	3-6	0.001	Open!
임신제외분 3주차	0.007	4	3-7	-0.003	Open!
임신제외분 3주차	0.018	5	3-12	0.008	Open!
임신제외분 3주차	0.008	6	3-17	-0.002	Open!
임신제외분 3주차	0.018	7	3-18	0.008	Open!
임신제외분 3주차	0.018	8	3-19	0.008	Open!
임신제외분 3주차	0.008	9	3-20	-0.002	Open!
임신제외분 3주차	0.008	10	3-24	-0.002	Open!
임신제외분 3주차	0.02	11	3-26	0.01	Open!
임신제외분 3주차	0.013	12	3-27	0.003	Open!
임신제외분 3주차	0.008	13	3-29	-0.002	Open!
임신제외분 3주차	0.008	14	3-32	-0.002	Open!
임신제외분 3주차	0.054	15	3-33	0.044	Open!
임신제외분 3주차	0.021	16	3-35	0.011	Open!
임신제외분 3주차	0.025	17	3-37	0.015	Open!
임신제외분 3주차	0.035	18	3-39	0.025	Open!
임신제외분 3주차	0.023	19	3-40	0.013	Open!
임신제외분 3주차	0.022	20	3-41	0.012	Open!

임신제외분 3주차	0.016	21	3-42	0.006	Open!
임신제외분 3주차	0.169	22	3-43	0.159	Open!
임신제외분 3주차	0.044	23	3-44	0.034	Open!
임신제외분 4주차	0.017	1	4-1	0.007	Open!
임신제외분 4주차	0.008	2	4-5	-0.002	Open!
임신제외분 4주차	0.011	3	4-6	0.001	Open!
임신제외분 4주차	0.008	4	4-7	-0.002	Open!
임신제외분 4주차	0.014	5	4-12	0.004	Open!
임신제외분 4주차	0.01	6	4-17	0	Open!
임신제외분 4주차	0.013	7	4-18	0.003	Open!
임신제외분 4주차	0.021	8	4-19	0.011	Open!
임신제외분 4주차	0.012	9	4-20	0.002	Open!
임신제외분 4주차	0.01	10	4-24	0	Open!
임신제외분 4주차	0.154	11	4-26	0.144	Open!
임신제외분 4주차	0.013	12	4-27	0.003	Open!
임신제외분 4주차	0.014	13	4-29	0.004	Open!
임신제외분 4주차	0.009	14	4-32	-0.001	Open!
임신제외분 4주차	2.007	15	4-33	1.997	Pregnant
임신제외분 4주차	0.016	16	4-35	0.006	Open!
임신제외분 4주차	0.016	17	4-37	0.006	Open!
임신제외분 4주차	0.02	18	4-39	0.01	Open!
임신제외분 4주차	0.013	19	4-40	0.003	Open!
임신제외분 4주차	0.016	20	4-41	0.006	Open!
임신제외분 4주차	0.014	21	4-42	0.004	Open!
임신제외분 4주차	0.028	22	4-44	0.018	Open!

다. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	코드번호																								
				연구결과																								
3차 년도 (2018)	최종 시제품 (다중 & 단일종) 제작 및 평가 (주관기관)	최종 시제품 제작	-보드설계 및 제작 -프로그램 개발 -기구설계 및 제작 -시제품 제작	<p>-보드설계 및 제작</p>  <p>-프로그램 개발 -기구설계 및 제작</p>  <p>-시제품 제작</p> 																								
		최종 시제품 평가	-전극 구동 전압 동작 평가 -측정전류 동작 평가	<table border="1"> <thead> <tr> <th>채널</th> <th>등가 회로</th> <th>계산전류</th> <th>측정전류</th> <th>동작</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ch 1</td> <td>R1 = 200K R2 = 100K R3 = 200K</td> <td>2.25uA</td> <td>2.278uA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ch 2</td> <td>R1 = 200K R2 = 1M R3 = 200K</td> <td>450nA</td> <td>463nA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ch 3</td> <td>R1 = 200K R2 = 5M R3 = 200K</td> <td>90nA</td> <td>87nAA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ch 4 (Open)</td> <td>R1 = 200K Open</td> <td>0.0nA</td> <td>0.0nA</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	채널	등가 회로	계산전류	측정전류	동작	Ch 1	R1 = 200K R2 = 100K R3 = 200K	2.25uA	2.278uA		Ch 2	R1 = 200K R2 = 1M R3 = 200K	450nA	463nA		Ch 3	R1 = 200K R2 = 5M R3 = 200K	90nA	87nAA		Ch 4 (Open)	R1 = 200K Open	0.0nA	0.0nA
	채널	등가 회로	계산전류	측정전류	동작																							
Ch 1	R1 = 200K R2 = 100K R3 = 200K	2.25uA	2.278uA																									
Ch 2	R1 = 200K R2 = 1M R3 = 200K	450nA	463nA																									
Ch 3	R1 = 200K R2 = 5M R3 = 200K	90nA	87nAA																									
Ch 4 (Open)	R1 = 200K Open	0.0nA	0.0nA																									
전기식 센서 개발 및 특성 분석 (전자부품 연구원)	소임신 진단 전극센서 제작 및 성능 평가 수행	- PAG 검출용 전극표면 개발 - 고감도 작업전극 표 면개발	<p>- 센서 표면상에 항체 고정방법 연구 :물리적 흡착방법으로 센서와 항체 고정</p>  <p>- 센서 전극표면에 ITO 나노 입자 코팅을 통 한 검출 특성 개선</p>																									

				 <p>- Signal를 높이고 noise를 줄일 수 있는 방법 연구</p>  <p>- PAG 검출을 위한 샌드위치 ELISA 항원-항체 최적화</p>  <p>- Detection 항체의 ALP레이블링 비율 최적화</p>  <p>-소혈청에서 PAG 검출을 위한 assay 최적화</p> 
	<p>검출 프로토콜 확보 및 최적화</p>	<p>전극 센서에 적합한 프로토콜 정립 및 성능평가</p>	<p>전극 센서의 유효성 평가</p>	<p>-전기화학식 기반 플랫폼 적용을 위한 PAG Assay 개발</p>   <p>-임신 시료 판정 : 활용 가능한 PAG 검출 항체의 성능 한계로 센서의 재현성을 확보하는데 어려움이 있었음. 최적 조건인 indirect assay 프로토콜에서 고농도 PAG 항원이 존재하는 소 혈청에서 임신 판정이 가능하였음.</p>
<p>임신관련 단백질 분석을 통한 현장 응용기술 개발 (한국농수산대)</p>	<p>-전기식 바이오센서의 효능 검증</p>	<p>-다양한 임신기간별 시료를 확보하여 센서의 검출 능력을 기존 임신 진단법과 비교 -재료 : 임신 기간별 혈</p>	<p>- 임신 및 미임신 한우 샘플 확보 : 리스트 본문 참조(400샘플 이상 확보) - PAG 농도 분석(기존 ELISA와 전기식 센서 결과 비교) - 임신과 미임신 샘플에서 전기식센서</p>	

			<p>액 및 임신한우 .임신/미임신 한우 혈액 샘플 확보: 400 샘플(2차년 포함) .현장 시험 : 10개소(총 100두 이상)</p>	<p>효능검증(미임신 < 0uA, 임신 > 0uA) 및 기준 설정 - 전혈(whole blood)에서도 PAG 검출 - 임신 3주차에서 PAG 검출 성공(기준 진단법대비 2주 단축 가능)</p>																																																																																																																																																									
	<p>-한우 임신관련 단백질의 유전적 결합 여부 변이 검증</p>		<p>-다양한 한우 샘플에 대한 임신/미임신 한우 유전체 데이터를 검증 -임신기간별 특이 유전체 발현량 조사 -특이 유전체의 검증</p>	<p>- 임신 0/2주/4주/4개월/10개월 각 3두씩에 대한 RNA sequencing</p> <table border="1" data-bbox="917 515 1396 705"> <thead> <tr> <th>Case</th> <th>Sample</th> <th>Concentration (ng/ul)</th> <th>NanoDrop</th> <th>Volume (ul)</th> <th>Purity</th> <th>28S/18S</th> <th>Total Conc(ng)</th> <th>NanoDrop</th> </tr> <tr> <th colspan="2"></th> <th>BioRad/ster</th> <th></th> <th></th> <th>88%</th> <th>bioRad/ster</th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0주차</td><td>00W_25</td><td>47</td><td>64.96</td><td>92</td><td>8.10</td><td>2.00</td><td>4.32</td><td>5.98</td></tr> <tr><td></td><td>00W_31</td><td>36</td><td>59.36</td><td>92</td><td>8.60</td><td>2.10</td><td>3.31</td><td>5.46</td></tr> <tr><td></td><td>00W_38</td><td>65</td><td>76.16</td><td>87</td><td>7.10</td><td>1.90</td><td>5.66</td><td>6.61</td></tr> <tr><td>2주차</td><td>20W_25</td><td>40</td><td>57.76</td><td>86</td><td>7.20</td><td>1.60</td><td>3.46</td><td>4.97</td></tr> <tr><td></td><td>20W_31</td><td>34</td><td>63.52</td><td>95</td><td>8.20</td><td>1.90</td><td>3.23</td><td>6.03</td></tr> <tr><td></td><td>20W_38</td><td>49</td><td>90.96</td><td>91</td><td>7.20</td><td>1.70</td><td>4.46</td><td>6.28</td></tr> <tr><td>4주차</td><td>40W_25</td><td>110</td><td>110.56</td><td>95</td><td>6.90</td><td>1.80</td><td>10.45</td><td>10.50</td></tr> <tr><td></td><td>40W_31</td><td>31</td><td>66.80</td><td>93</td><td>7.00</td><td>1.70</td><td>2.88</td><td>6.21</td></tr> <tr><td></td><td>40W_38</td><td>65</td><td>72.72</td><td>90</td><td>7.10</td><td>1.90</td><td>3.95</td><td>6.55</td></tr> <tr><td>4개월</td><td>13-130</td><td>214</td><td>216.22</td><td>34</td><td>7.28</td><td>7.35</td><td>8.80</td><td>1.60</td></tr> <tr><td></td><td>13-055</td><td>201</td><td>193.18</td><td>34</td><td>6.83</td><td>6.57</td><td>8.90</td><td>1.60</td></tr> <tr><td></td><td>3-366</td><td>102</td><td>80.70</td><td>35</td><td>3.57</td><td>2.83</td><td>8.80</td><td>1.70</td></tr> <tr><td>10개월</td><td>13-67</td><td>247</td><td>200.62</td><td>34</td><td>8.40</td><td>6.82</td><td>8.90</td><td>1.80</td></tr> <tr><td></td><td>13-81</td><td>220</td><td>130.41</td><td>34</td><td>7.48</td><td>4.60</td><td>8.90</td><td>1.60</td></tr> <tr><td></td><td>14-075</td><td>225</td><td>205.92</td><td>34</td><td>7.65</td><td>7.00</td><td>8.5</td><td>1.6</td></tr> </tbody> </table> <p>- 임신/미임신 유전체 데이터 검증(미임신 예)</p>  <p>- 특이 유전체 검증 - 비임신과 임신 2주차 비교 : 총 393개의 유전자에서 유효한 발현차이, 120개의 유전자가 2주차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량 나타냄 - 비임신과 임신 4주차 비교 : 총 1200개의 유전자에서 유효한 발현차이, 559개의 유전자가 4주차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량, 641개의 유전자가 비임신 한우에 비해 특이적으로 낮은 발현량 - 비임신과 3-4개월 임신 비교 : 총 7446개의 유전자에서 유효한 발현차이, 4,064개의 유전자가 3-4개월 차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량, 3,382개의 유전자가 낮은 발현량 - 비임신과 임신 10개월 비교 : 총 6035개의 유전자에서 유효한 발현차이, 3,518개의 유전자가 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량, 2,517개의 유전자가 낮은 발현량</p>	Case	Sample	Concentration (ng/ul)	NanoDrop	Volume (ul)	Purity	28S/18S	Total Conc(ng)	NanoDrop			BioRad/ster			88%	bioRad/ster			0주차	00W_25	47	64.96	92	8.10	2.00	4.32	5.98		00W_31	36	59.36	92	8.60	2.10	3.31	5.46		00W_38	65	76.16	87	7.10	1.90	5.66	6.61	2주차	20W_25	40	57.76	86	7.20	1.60	3.46	4.97		20W_31	34	63.52	95	8.20	1.90	3.23	6.03		20W_38	49	90.96	91	7.20	1.70	4.46	6.28	4주차	40W_25	110	110.56	95	6.90	1.80	10.45	10.50		40W_31	31	66.80	93	7.00	1.70	2.88	6.21		40W_38	65	72.72	90	7.10	1.90	3.95	6.55	4개월	13-130	214	216.22	34	7.28	7.35	8.80	1.60		13-055	201	193.18	34	6.83	6.57	8.90	1.60		3-366	102	80.70	35	3.57	2.83	8.80	1.70	10개월	13-67	247	200.62	34	8.40	6.82	8.90	1.80		13-81	220	130.41	34	7.48	4.60	8.90	1.60		14-075	225	205.92	34	7.65	7.00	8.5	1.6
Case	Sample	Concentration (ng/ul)	NanoDrop	Volume (ul)	Purity	28S/18S	Total Conc(ng)	NanoDrop																																																																																																																																																					
		BioRad/ster			88%	bioRad/ster																																																																																																																																																							
0주차	00W_25	47	64.96	92	8.10	2.00	4.32	5.98																																																																																																																																																					
	00W_31	36	59.36	92	8.60	2.10	3.31	5.46																																																																																																																																																					
	00W_38	65	76.16	87	7.10	1.90	5.66	6.61																																																																																																																																																					
2주차	20W_25	40	57.76	86	7.20	1.60	3.46	4.97																																																																																																																																																					
	20W_31	34	63.52	95	8.20	1.90	3.23	6.03																																																																																																																																																					
	20W_38	49	90.96	91	7.20	1.70	4.46	6.28																																																																																																																																																					
4주차	40W_25	110	110.56	95	6.90	1.80	10.45	10.50																																																																																																																																																					
	40W_31	31	66.80	93	7.00	1.70	2.88	6.21																																																																																																																																																					
	40W_38	65	72.72	90	7.10	1.90	3.95	6.55																																																																																																																																																					
4개월	13-130	214	216.22	34	7.28	7.35	8.80	1.60																																																																																																																																																					
	13-055	201	193.18	34	6.83	6.57	8.90	1.60																																																																																																																																																					
	3-366	102	80.70	35	3.57	2.83	8.80	1.70																																																																																																																																																					
10개월	13-67	247	200.62	34	8.40	6.82	8.90	1.80																																																																																																																																																					
	13-81	220	130.41	34	7.48	4.60	8.90	1.60																																																																																																																																																					
	14-075	225	205.92	34	7.65	7.00	8.5	1.6																																																																																																																																																					

<주관기관-미라클스코프>

(1) 측정 원리 및 회로 분석

- 바이오 센서는 전기화학의 원리를 이용하며, 전기화학이란 화학에너지와 전기에너지의 변환을 의미함.

- 바이오 센서의 측정장비는 Potentiostat(정전위기)라 부르며, Potentiostat(정전위기)는 일정한 전압을 유지시켜주는 회로임. 여기서 일정한 전압을 유지한다는 것은 항상 일정한 전압만 유지하다는 의미가 아니고 사용자가 입력한 전압에 비례한 일정한 전압을 유지한 회로를 의미함. 이를 위해서는 feedback이 존재해함.
- 아래 그림은 Potentiostat의 원리로서, WE(Working Electrode) 전극과 RE(Reference Electrode, 기준전극)전극 사이의 전위차가 유지되도록 WE(Working Electrode) 전극과 CE(Counter Electrode) 전극 사이 전압을 제어한 상태에서 WE(Working Electrode) 전극의 전류를 측정하여 전기화학 반응을 평가함.

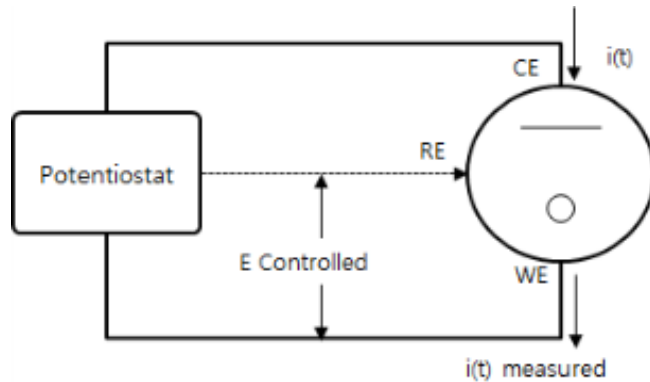


그림 106. Potentiostat 원리.

- 아래 그림은 정전위기 기본회로로서 동작 원리는 다음과 같음.
- 하늘색은 용액이고 정전위기(Potentiostat)에서 전압이 입력되면 녹색라인과 같이 전압에 비례하여 전류가 흐름
- 주전류는 녹색라인이며, 보라색은 정전위를 유지시켜주기 위한 feedback 전류임.

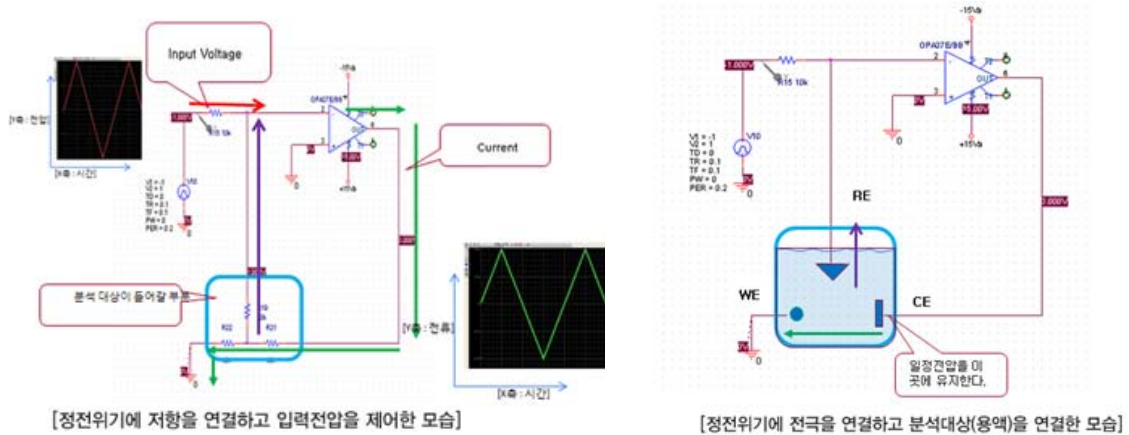


그림 107. 정전위기 기본 회로

- 저항을 연결되었을 때는 전압에 비례한 전류가 흐르지만 용액을 연결할 경우에는 반응 물질에 따라 여러 형태의 그래프가 나옴.
- 즉 전압에 꼭 비례하는 전류곡선이 나오는 것이 아니라 분석대상에 따라 그 성향이 달라

짐.

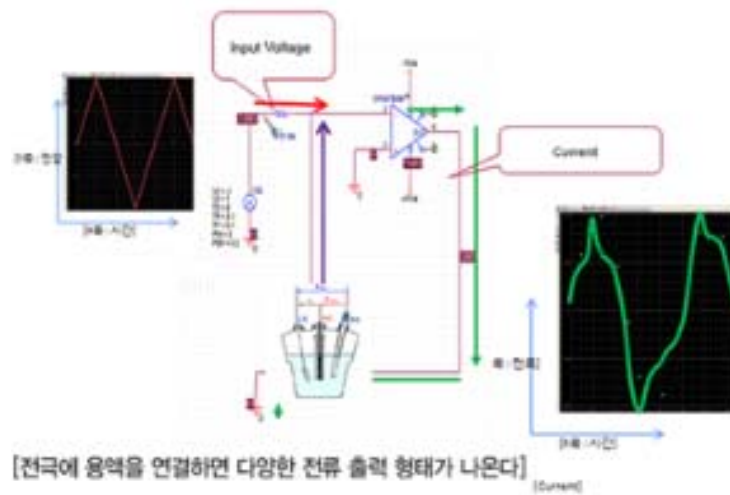


그림 108. 용액에 연결시 정전위기 동작.

○ X-축을 시간축에서 전압축으로 변환하여 나타내면 아래 그림과 같은 CV(Cyclic Voltametry) 곡선이 나타남.

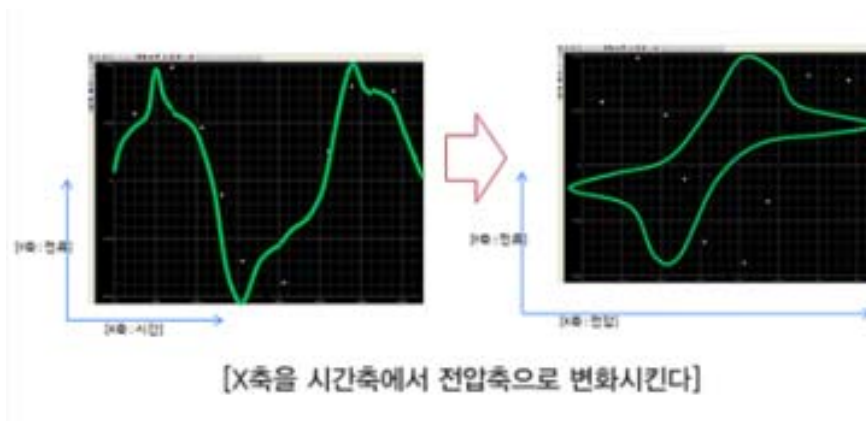


그림 109. 시간축에 따른 CV(Cyclic Voltametry) 곡선

○ 용액의 농도에 따른 CV(Cyclic Voltametry) 곡선은 아래 그림과 같이 나타남.

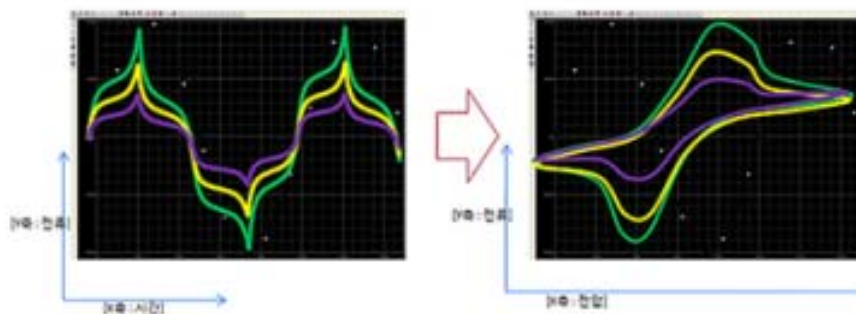


그림 110. 용액의 저항(농도) 따른 CV(Cyclic Voltametry) 그림의 형상변화.

(2) 측정 보드 제작

① 측정 보드 구성도

- 본 과제에서 개발된 측정보드는 제어보드, 인터페이스보드, 센서구동보드 등 3개의 보드로 구성되며, 구성도는 그림과 같다.
- 제어보드는 시제품의 동작을 제어하는 보드이고, 인터페이스보드는 시제품과 전극을 연결하는 보드임.
- 센서구동보드는 센서의 Counter 전극 전압과 Reference 전극 전압을 제어하고 알고리즘에 따라 Working 전극의 전류를 측정하는 보드임.

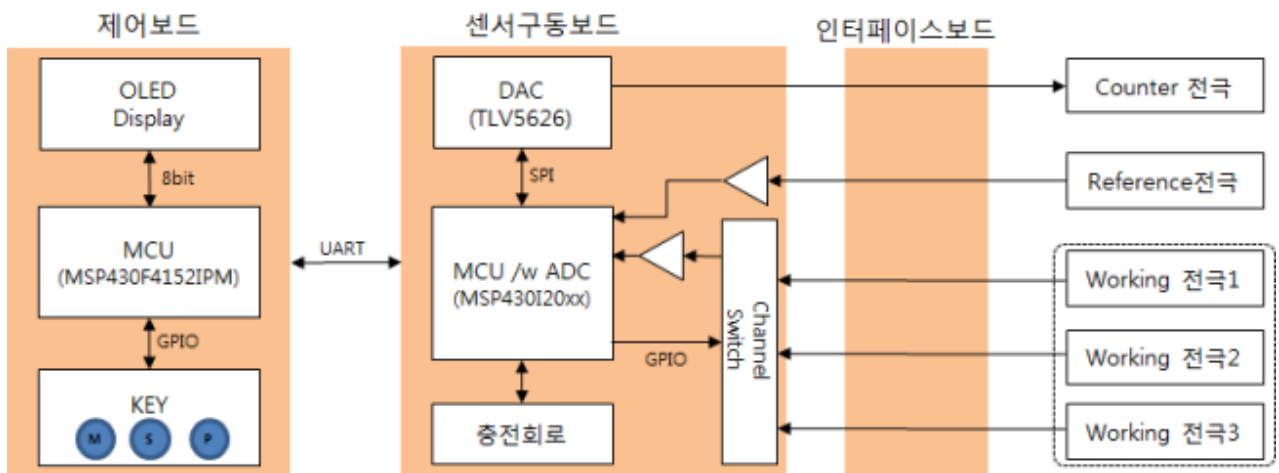


그림 111. 다중(3채널) 측정보드 구성도.

② 측정 보드 회로도

- 제어보드 회로도는 (a) MCU회로, (b) 전원 및 키패드 회로 및 (c) OLED 디스플레이 회로 등으로 구성됨
- 제어보드의 MCU는 TI사의 16bit MSP430F4152IPM를 사용하였으며, 특징은 아래와 같다.
 - Ultralow Power Consumption : Active (220uA) at 1MHz / Standby Mode (0.9 uA)
 - 16-Bit RISC Architecture
 - 16-Bit Timer A with Five Capture / Compare Registers
 - Two-Universal Serial Communication Interface 지원 : UART, I2C or Synchronous SPI
 - 10-Bit 200-ksps Analog-to-Digital (A/D) Converter
 - Memory : 16KB+256B Flash Memory / 512RAM

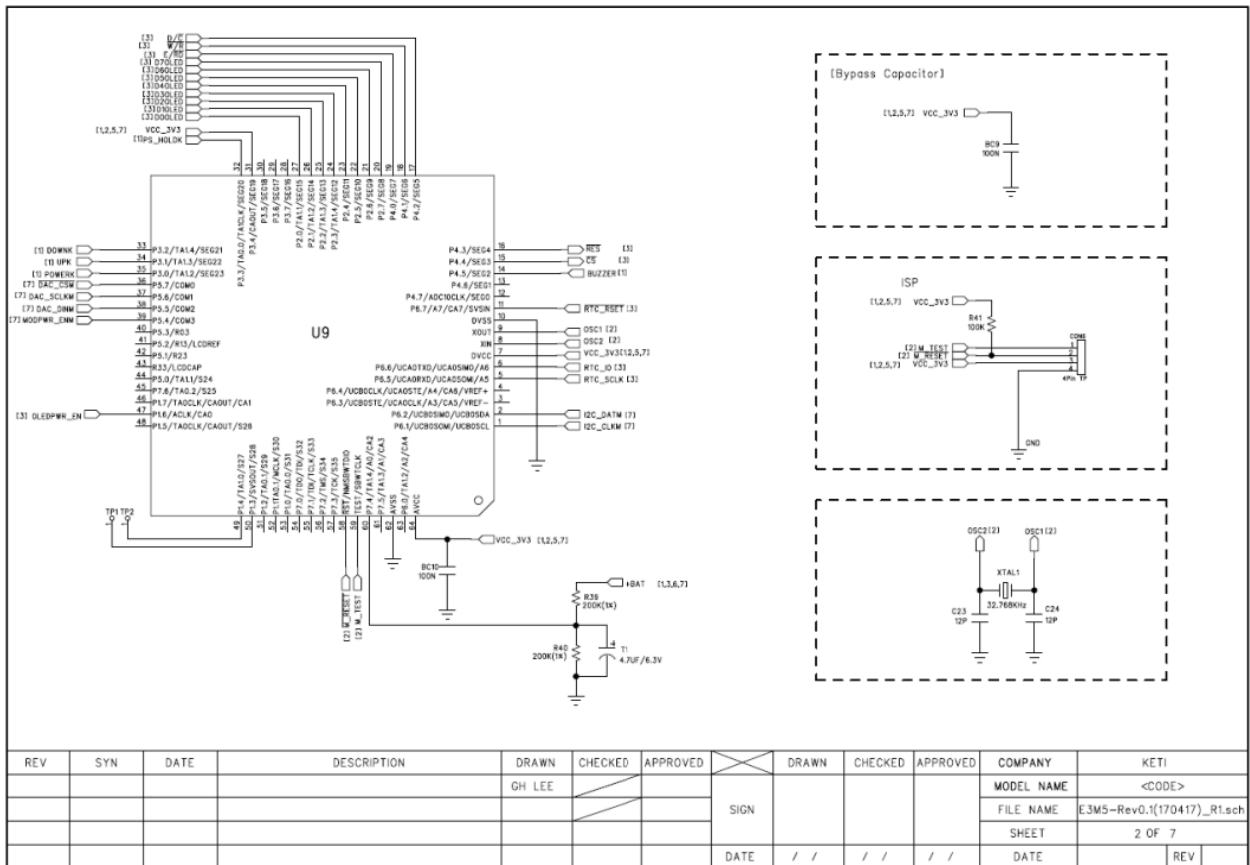


그림 112. 제어보드 회로도. (a) MCU 회로

○ 키패드는 Menu Key, Start/Stop Key, Power Key 등 3개의 Key로 구성되어 있음

- Menu Key : 채널, 측정 시간 등 메뉴 선택
- Start/Stop Key : 측정 시작 및 정지
- Power Key : 전원 On/Off

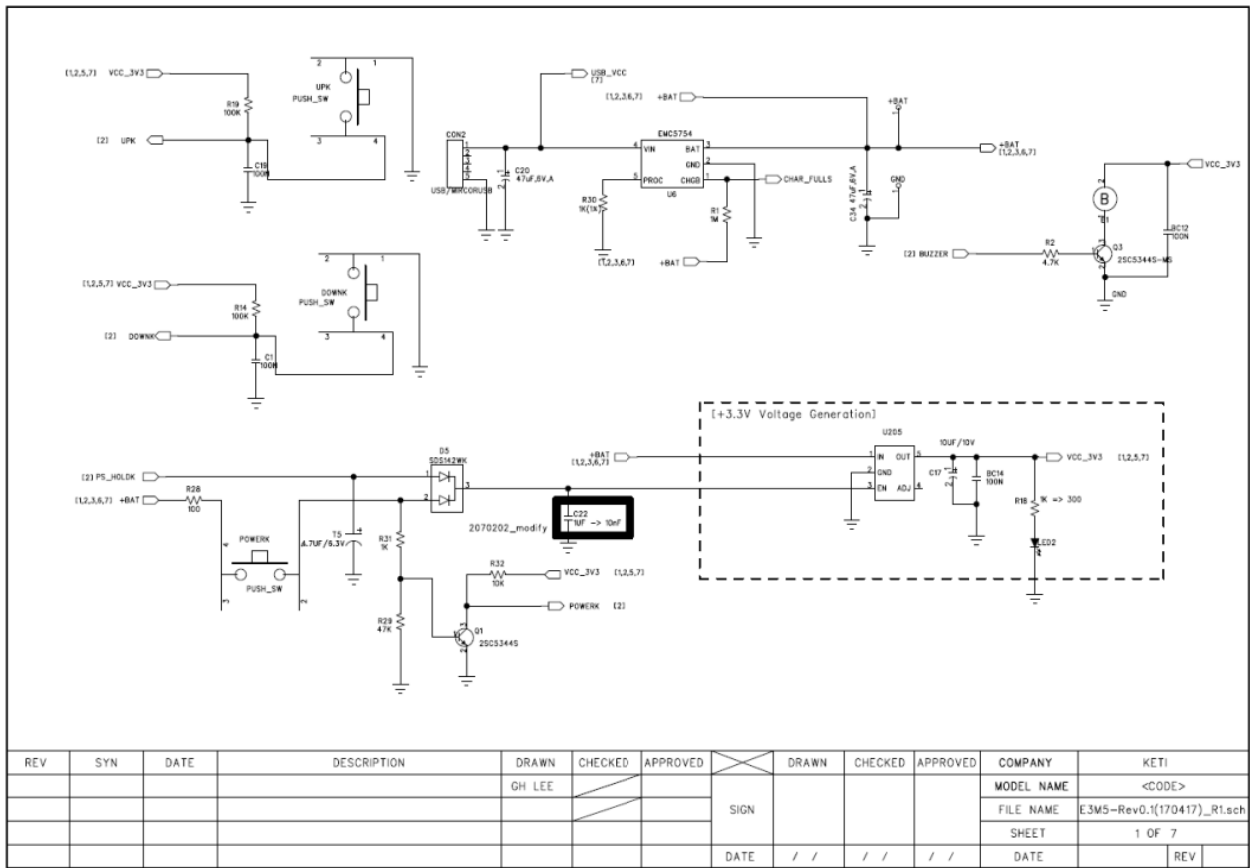


그림 113. 제어보드 회로도. (b) 전원 및 키패드 회로.

- 아래 그림은 OLED Display의 구동회로로서, OLED 구동전원은 Step Up 전원회로를 이용하여 외부에서 공급하고, 구동신호는 8-Bit 인터페이스를 사용함.

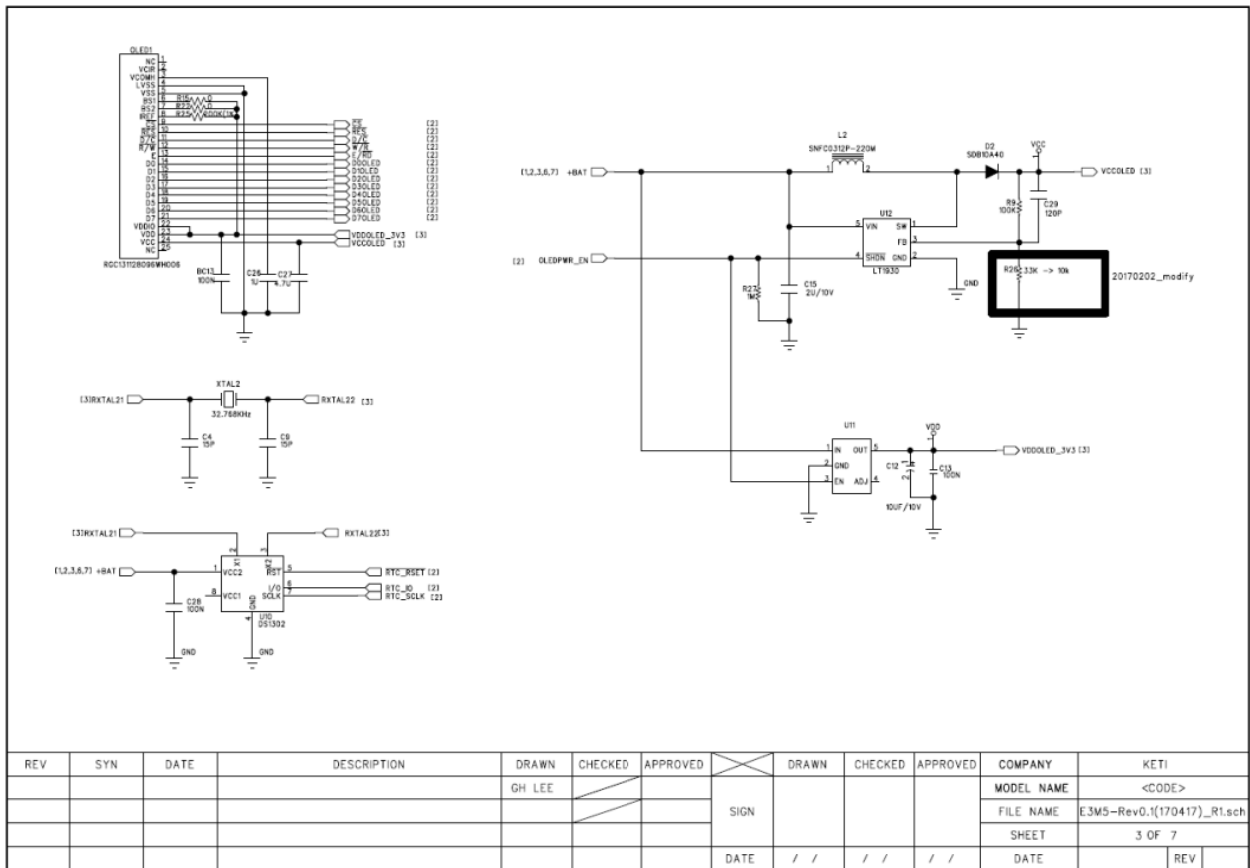


그림 114. 제어보드 회로도. (c) 전원회로.

○ 센서구동보드의 회로도는 (a) 제어를 위한 MCU회로, (b) 센서 구동 및 측정을 위한 구동 회로, (c) 2차전지 충전을 위한 충전회로 등으로 구성됨

○ MCU는 TI사의 16bit MSP430I2xx CPU를 사용하였으며, 특징은 다음과 같다.

- Ultralow Power Consumption : Active (275uA/1MHz) / Standby Mode (210 uA)
- 16-Bit RISC Architecture
- 16-Bit Timer A with Three Capture / Compare Registers
- Universal Serial Communication Interface 지원 : UART, I2C, IrDAa or Synchronous SPI
- Up to Four 24-Bit Sigma-Delta Analog-to-Digital (A/D) Converter with Differential PGA Inputs.

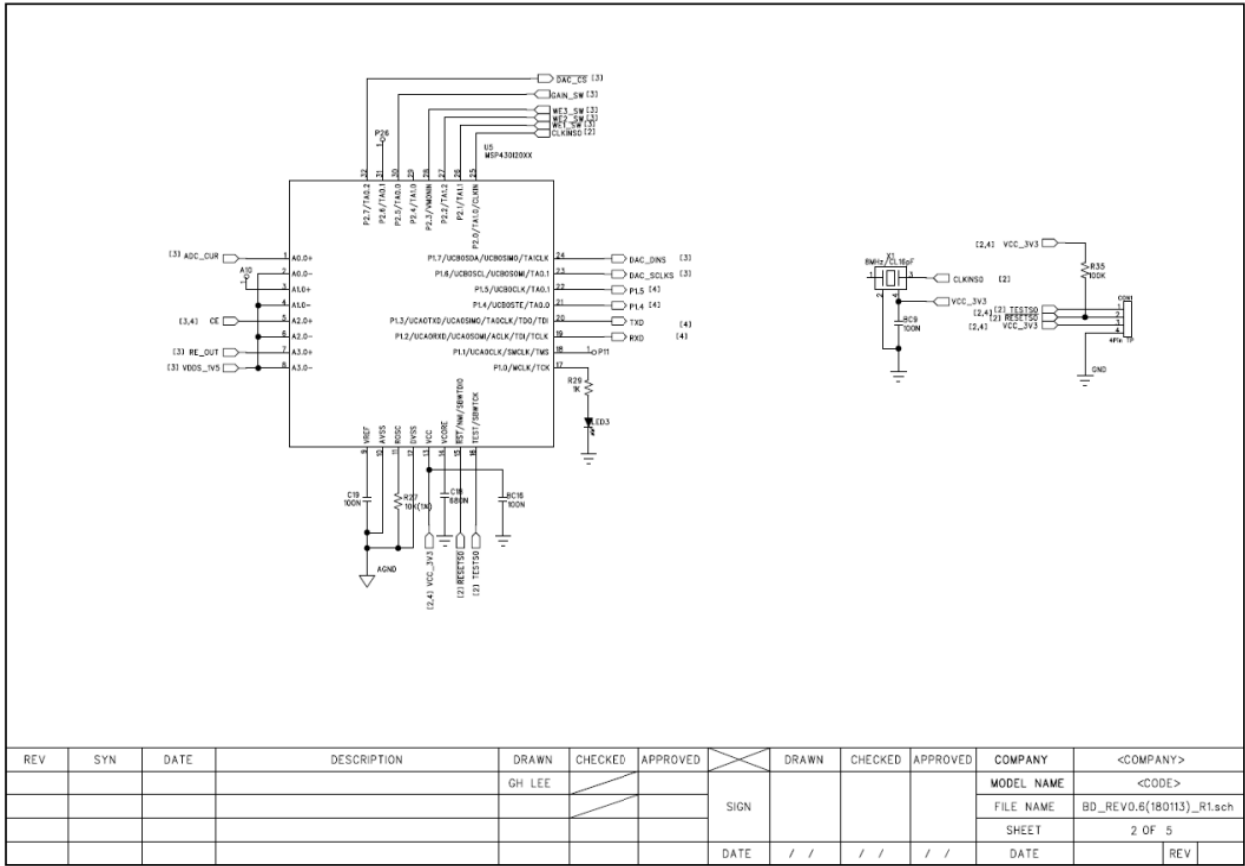
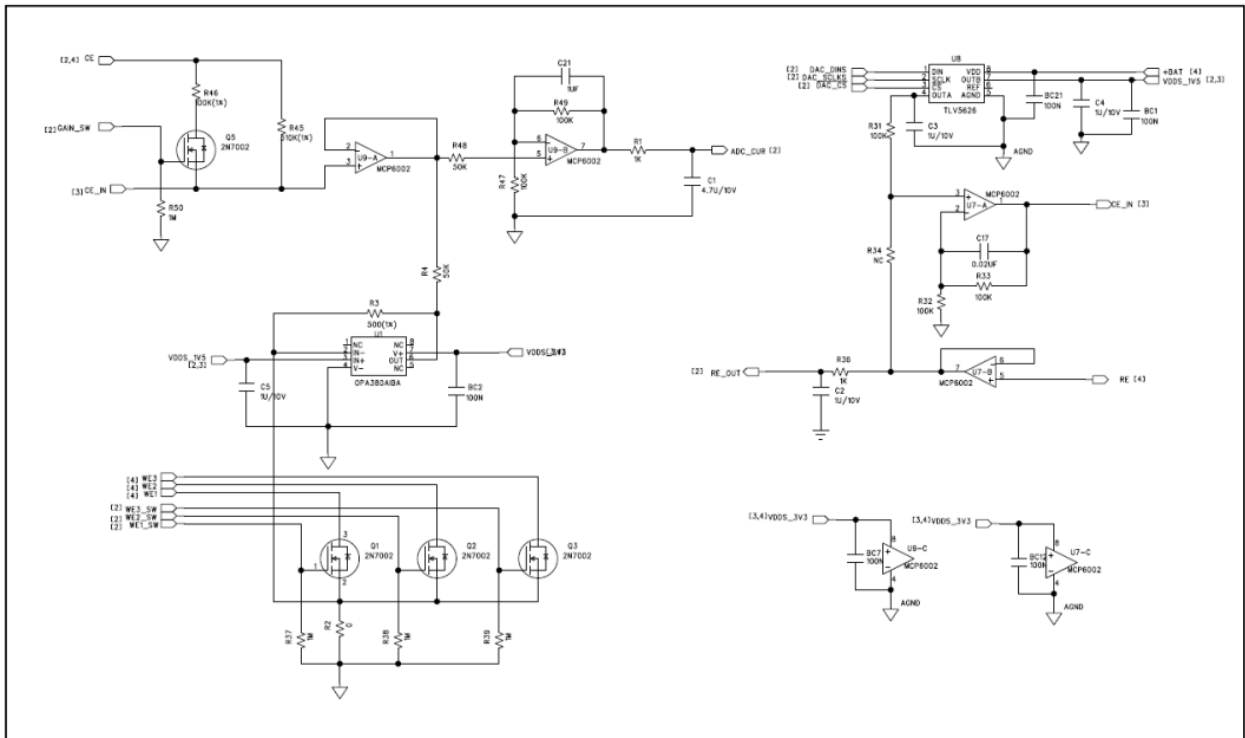


그림 115. 측정회로부 : (a) MCU 회로

- 아래 회로도에는 전류측정회로도 및 전류 공급을 위한 DAC 회로부임.
- 전류 측정 방식은 CE(Counter Electrode)에 직렬로 저항을 연결하고, 직렬저항의 전압을 Read하여 전류로 환산하는 방식을 사용함.
- 전류환산 공식은 다음과 같다.
 - 전류환산공식 = $(VCE - VCEIN) / R$
 - (예) $I = (0.56V - 0.32V) / 200K = 1.2\mu A$
- 기준전압과 CE 전압은 DAC IC를 사용하여 공급하며, 사용된 DAC IC는 TLV5626이며 특징은 다음과 같다.
 - Dual 8-Bit Voltage Output DAC
 - Programmable Internal Reference
 - Programmable Settle Time :
 - 0.8us in Fast Mode
 - 2.8us in Slow Mode
 - Interface : SPI Serial Ports
 - Monotonic over Temperature



REV	SYN	DATE	DESCRIPTION	DRAWN	CHECKED	APPROVED	DRAWN	CHECKED	APPROVED	COMPANY	<COMPANY>
				GH LEE						MODEL NAME	<CODE>
										FILE NAME	BD_REV0.6(180113)_R1.sch
										SHEET	3 OF 5
										DATE	REV

그림 116. 센서구동회로부 : (b) 센서 구동 및 전류 측정회로

○ 전원은 2차 리튬폴리머를 사용하며, 충전은 USB 2.0 Port를 사용하며, 충전 IC는 EMP사의 EMC5754를 사용하며 특징은 다음과 같다.

- Programmable charge current up to 1A
- Preset 4.2V charge voltage with 1% accuracy

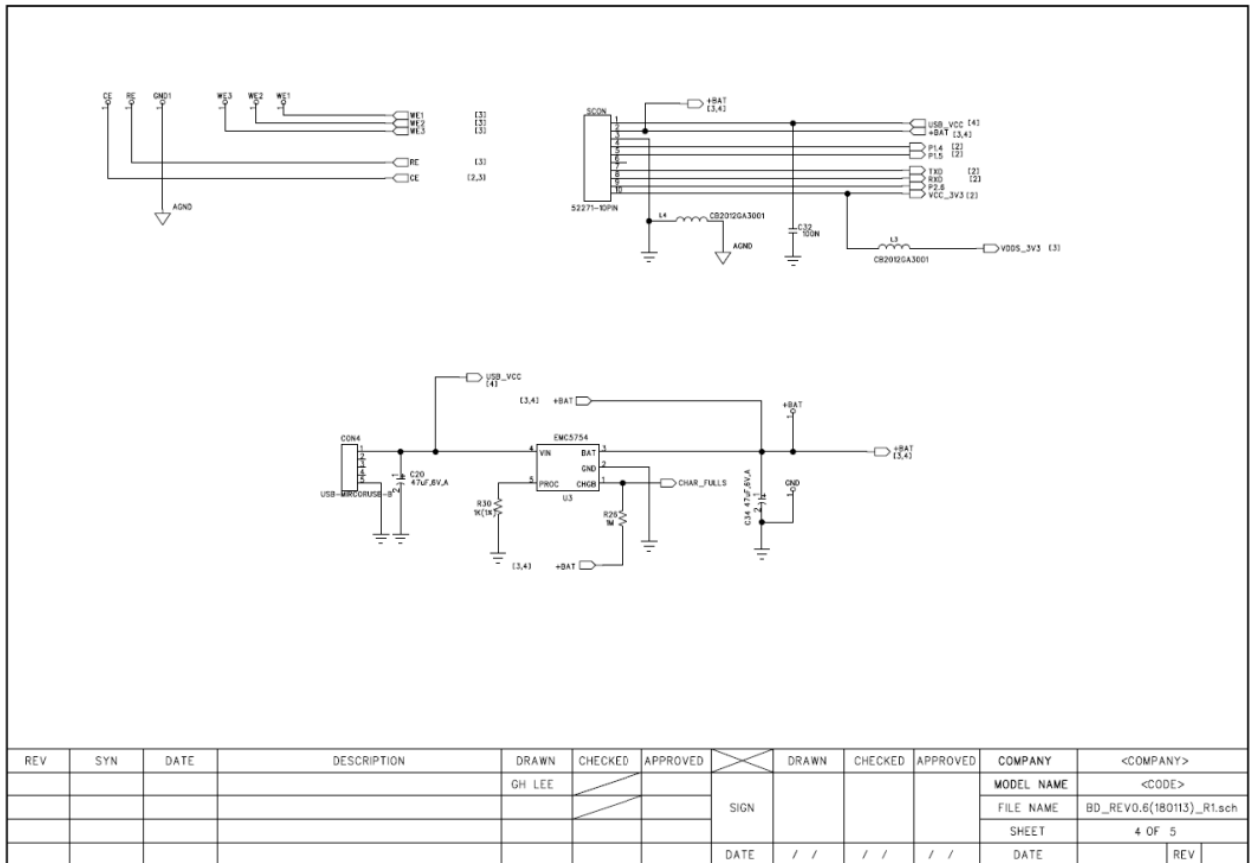


그림 117. 센서구동회로부 : (c) 충전회로

③ 측정보드 설계 및 제작

㉞ 다중(3채널) 측정보드

○ 제어보드 설계 및 제작

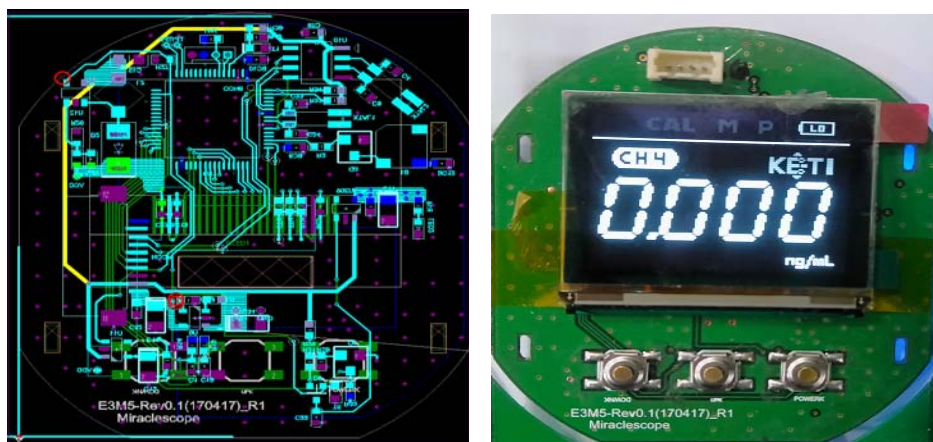


그림 118. 제어보드 설계 및 제작

○ 센서구동보드 설계 및 제작

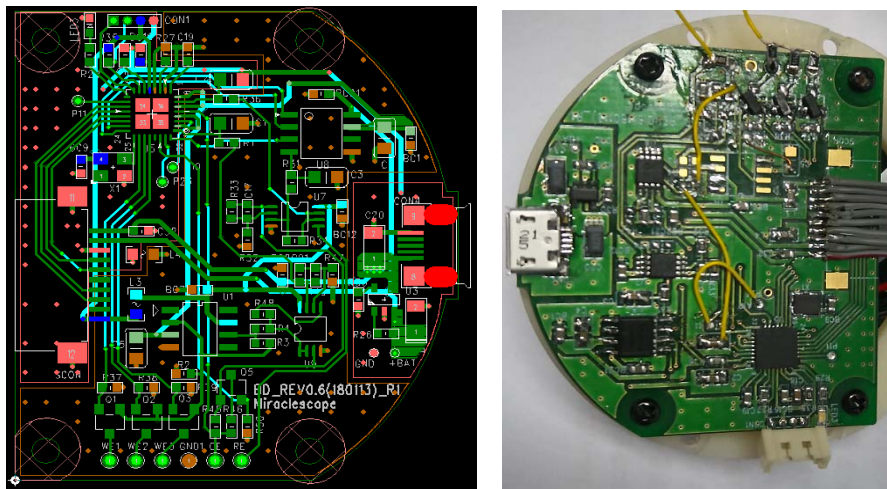


그림 119. 센서구동보드 설계 및 제작

○ 인터페이스 보드 설계 및 제작

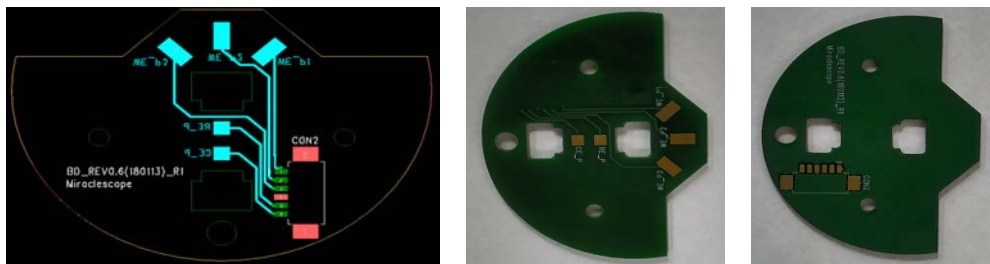


그림 120. 인터페이스 보드 설계 및 제작.

㉞ 단일종(1채널) 측정보드

○ 제어 및 센서 구동보드 설계 및 제작

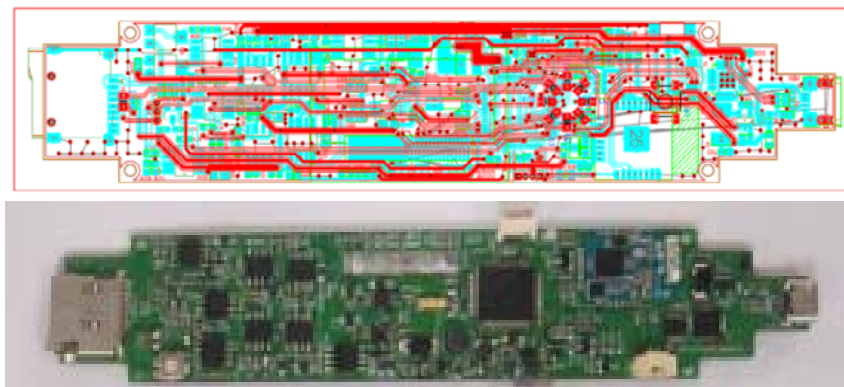


그림 121. 제어 및 센서 구동 보드 설계 및 제작.

(3) 프로그램 개발

① 개발 환경

- 프로그램 개발 환경은 TI사에서 제공하는 IAR Embedded Workbench V6.5를 사용함.
- IAR Embedded Workbench V6.5는 프로그램 Editor, 컴파일러 및 프로그램 다운로더로 구성된 통합 개발 툴임.

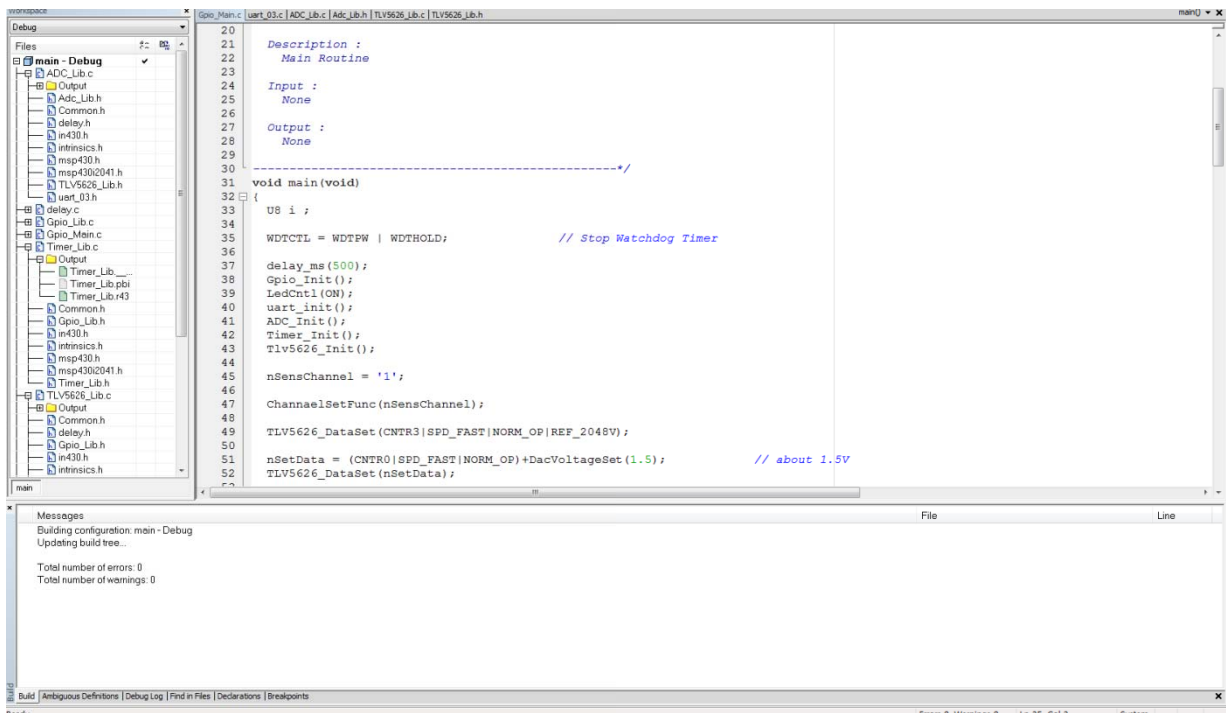


그림 122. IAR Embedded Workbench V6.5 개발 환경

② 제어보드 프로그램

- 제어보드 프로그램은 메인루틴 프로그램, UART 통신 프로그램, Keypad 프로그램, OLED Display 프로그램 등으로 구성됨.
- 메인 루틴 프로그램
 - 메인 루틴 프로그램은 디바이스 초기화를 위한 루틴과 Event 대기 위한 메인루틴으로 구성됨
 - 디바이스 초기화 루틴은 Clock 초기화, Timer 초기화, GPIO 초기화, UART 초기화 및 OLED Display 초기화함

```
// Stop WDT
```

```

WDTCTL = WDTPW + WDTHOLD;

// Clock Set
SCFIO != FN_4; // x2 DCO freq, 8MHz nominal D6CO
SCFQCTL = 121; // (121+1) x 32768 x 2 = 7.99 Mhz
FLL_CTL0 != DCOPLUS + XCAP11PF; // DCO+ set so freq= xtal x D x N+1

delay_ms(20);

do
{
    IFG1 &= ~OFIFG; // Clear osc fault flag
    delay_ms(10); // Delay for osc to stabilize
} while(IFG1 & OFIFG); // Check to see if osc flag is set

delay_ms(100);

// 1. Initialize a Timer0 for TimerTick
Timer_Init();

// 2. Initialize a Gpio Task
Gpio_Init();

// 3. Initialize a OLED Display
OLEDGpio_Init();
SSD1329_Init();

// 4. Initialize a Global Variables
GlobalVar_Init();

// 5. Display a Initial Display
Image(0, 1, 0, 0x01);

do
{
}while((KEYPORT3_IN&POWER_K) == 0x00);
KEYPORT3_OUT != PSHOLD_K;
for(i=1; i<=0x0F; i++)
{
    Image(0, 1, 0, i);
    delay_ms(300);
}

// 6. Initialize a Timer
Timer0_Enable(TRUE);

// 7. Initialize a Uart 0
Uart0_Init();

// 8. Enable a Global Interrupt
__bis_SR_register(GIE);

```

```

CleanDDR();
Image(1, 2, 0, 0x0F); // Image(U8 nImageSel, U8 nChannel, U32 nData, U8 nMask)

for(i=0; i<20; i++)
{
    Image(3, 1, i, 0x0F);
}

// 9. Communicate to Sub
nCommStruct.nChannel = CHALL + nNvStructData.nChannelNum;
nCommStruct.nCommand = CHSET_CMD;
UartData_Send(&nCommStruct, CMD_Type);

```

○ UART 통신을 위한 초기화 프로그램

```

void Uart0_Init(void)
{
    U8 i;

    P6SEL != BIT5+BIT6; // P6.5,6 = USCI_A0 RXD/TXD
    UCA0CTL1 != UCSSEL_2; // SMCLK
    UCA0BR0 = 0x45; // 1MHz 115200
    UCA0BR1 = 0x00; // 1MHz 115200
    UCA0MCTL = 0x02; // Modulation
    UCA0CTL1 &= ~UCSWRST; // **Initialize USCI state machine**
    IE2 != UCA0RXIE; // Enable USCI_A0 RX interrupt

    nCommStruct.nHead = START_HEAD;
    nCommStruct.nChannel = CHALL;
    nCommStruct.nCommand = NONE_CMD;
    nCommStruct.nLength = 0x00;
    //nCommStruct.nUnit = NANOUNIT_CMD;
    nCommStruct.nResponse = ACK_CMD;
    nCommStruct.nTail = END_HEAD;

    for(i=0; i<5; i++)
    {
        nCommStruct.nData[i] = 0x55;
        //nCommStruct.nFracData[i] = 0xAA;
    }

    nRxDataPtr = 0;
    nRxDataComp = OFF;
    for(i=0; i<20; i++)
    {
        nRxData[i] = 0x00;
    }
}

```

○ UART 데이터 수신 프로그램

```
#pragma vector=USCIAB0RX_VECTOR
__interrupt void USCI0RX_ISR(void)
{
    U8 nUartData;

    while(!(IFG2&UCA0TXIFG));
    nUartData = UCA0RXBUF;                // TX -> RXed character

    switch(nUartData)
    {
    case START_HEAD:
        nRxDataPtr = 0;
        nRxDataComp = OFF;
        nRxData[nRxDataPtr++] = nUartData;
        break;

    case END_HEAD:
        nRxData[nRxDataPtr++] = nUartData;

        UartRxInterrupt_Disable();
        if(nRxData[9] == 'D') {
            nRxDataPtr = 0;
            nRxDataComp = ON;
        }
        else {
            nRxDataPtr = 0;
            nRxDataComp = ON;
        }
        UartHandle();
        UartRxInterrupt_Enable();
        break;

    default:
        nRxDataComp = OFF;
        nRxData[nRxDataPtr++] = nUartData;
        break;
    }
}
```

○ OLED Display 구동 프로그램

```
U8 Image(U8 nImageSel, U8 nChannel, U32 nData, U8 nMask)
{
    U8 nCalData;

    switch(nImageSel)
    {
    case 0: // Keti Screen
        OLED_DrawChar(bPositionXY[0][0], bPositionXY[0][2], bPositionXY[0][1],
            bPositionXY[0][3], kETILOGOBitmaps, nMask);
        break;
    }
```



```

case 1: // All Screen
    OLED_DrawChar(bPositionXY[1][0], bPositionXY[1][2], bPositionXY[1][1],
                  bPositionXY[1][3], calBitmaps, 0x04);
    OLED_DrawChar(bPositionXY[2][0], bPositionXY[2][2], bPositionXY[2][1],
                  bPositionXY[2][3], mBitmaps, 0x04);
    OLED_DrawChar(bPositionXY[3][0], bPositionXY[3][2], bPositionXY[3][1],
                  bPositionXY[3][3], pBitmaps, 0x04);

    BatLvlDisp_Func(0x04, 0x0F);

    OLED_DrawChar(bPositionXY[5][0], bPositionXY[5][2], bPositionXY[5][1],
                  bPositionXY[5][3], lineBitmaps, 0xF);

    // ChannelDisp_Func(2, 0xF);

    //-----
    OLED_DrawChar(bPositionXY[8][0], bPositionXY[8][2], bPositionXY[8][1],
                  bPositionXY[8][3], ketichBitmaps, 0x04);

    CleanChannelNum();
    ResultDisp_Func(OP_RESULT, nNvStructData.nChannelNum, nData, 0x0F);

    UnitDisp_Func(0x00, 0xF);

    break;

case 2: // Test Result;
    CleanChannelNum();
    ResultDisp_Func(nNvStructData.nOpMode, nChannel, nData, nMask);
    break;

case 3: // Battery Level;
    if(nData < nADCTable[0])
    {
        nCalData = 0;
    }
    else if(nData < nADCTable[1])
    {
        nCalData = 1;
    }
    else if(nData < nADCTable[2])
    {
        nCalData = 2;
    }
    else if(nData < nADCTable[3])
    {
        nCalData = 3;
    }
    else if(nData < nADCTable[4])
    {
        nCalData = 4;
    }
}

```

```

else if(nData < nADCTable[5])
{
    nCalData = 5;
}
else if(nData < nADCTable[6])
{
    nCalData = 6;
}
else if(nData < nADCTable[7])
{
    nCalData = 7;
}
else
{
    nCalData = 8;
}

nCalData = 8-nCalData;

BatLvlDisp_Func((U8)nCalData, nMask);
break;
}

return 0;
}

```

③ 센서 구동보드 프로그램

○ 센서 구동보드 프로그램은 메인루틴 프로그램, UART 통신 프로그램, ADC 프로그램, DAC 프로그램 등으로 구성됨.

○ 메인루틴 프로그램 개발

```

WDTCTL = WDTPW ! WDTXOLD; // Stop Watchdog Timer

delay_ms(500);
Gpio_Init();
LedCntl(ON);
uart_init();
ADC_Init();
Timer_Init();
Tlv5626_Init();

nSensChannel = '1';

ChannaelSetFunc(nSensChannel);

TLV5626_DataSet(CNTR3!SPD_FAST!NORM_OP!REF_2048V);

nSetData = (CNTR0!SPD_FAST!NORM_OP)+DacVoltageSet(1.5); // about 1.5V

```

```

TLV5626_DataSet(nSetData);

fCeSetVoltage = (1.5)/2; // about 1.5V
nSetData = (CNTR2!SPD_FAST!NORM_OP) + DacVoltageSet(fCeSetVoltage);
TLV5626_DataSet(nSetData);

__bis_SR_register(GIE); // Enter LPM0 w/ interrupts

while (1)
{
}

```

○ UART통신 프로그램 개발

```

// Echo back RXed character, confirm TX buffer is ready first
#pragma vector=USCI_A0_VECTOR
__interrupt void USCI_A0_ISR(void)
{
    U8 nData;

    while (!(UCA0IFG&UCTXIFG)); // USCI_A0 TX buffer ready?
    nData = UCA0RXBUF; // TX -> RXed character

    switch(nData)
    {
    case START_HEAD:
        nRxDataPtr = 0;
        nRxDataComp = OFF;
        nRxData[nRxDataPtr++] = nData;
        break;

    case END_HEAD:
        nRxData[nRxDataPtr++] = nData;
        LedCntl(TGL);
        if(nRxData[2] == 'C')
        {
            ChannaelSetFunc(nRxData[1]);
        }

        nRxDataPtr = 0;
        nRxDataComp = ON;
        break;

    default:
        nRxDataComp = OFF;
        nRxData[nRxDataPtr++] = nData;
        break;
    }
}
}

```

○ DAC 프로그램 개발

```

void TLV5626_DataSet(U16 nData)
{
    U8 i;

    DACCS_SET;
    for(i=0; i<16; i++)
    {
        DACLK_H;
        if(nData&0x8000)
        {
            DATA_H;
        }
        else
        {
            DATA_L;
        }
        DACLK_L;
        nData <<= 1;
    }
    DACCS_CLR;
}

```

○ 전류 환산 프로그램 개발

```

float CurrentCal(float fCeV, float fCeInV, U8 nTxOn)
{
    float fCurrentData;
    U32 nData32, nData32a;

    if(fCeV <= 0.2)
    {
        fCurrentData = 0.0;
    }
    else if(fCeV > fCeInV)
    {
        fCurrentData = 1000000./200.0;
        fCurrentData = fCurrentData*(fCeV-fCeInV);
    }
    else
    {
        fCurrentData = 0;
    }

    if(nTxOn) {
        nData32 = (U16) fCurrentData;
        nData32a = nData32/10000;
        nTxData[4] = nData32a + '0';
        nData32 = nData32%10000;
        nData32a = nData32/1000;
        nTxData[5] = nData32a + '0';
        nData32 = nData32%1000;
        nData32a = nData32/100;
        nTxData[6] = nData32a + '0';
    }
}

```

```

nData32 = nData32%100;
nData32a = nData32/10;
nTxData[7] = nData32a + '0';
nData32a = nData32%10;
nTxData[8] = nData32a + '0';
nTxData[9] = DATA_CMD;
nTxData[10] = END_HEAD;
}

return fCurrentData;
}

```

(4) 보드 동작 및 평가

① 전극 구동 전압 동작 평가

○ 아래표와 같이 설정전압과 측정전압의 차이는 약 0.02V 이하이며, 오차의 원인은 계측기의 편차로 판단됨.

설정전압	측정전압	프로그램	파형
0.0V	0.02V	$f_{CeSetVoltage} = (0.0)/2;$	
0.25V	0.240V	$f_{CeSetVoltage} = (0.5)/2;$	
0.5V	0.5V	$f_{CeSetVoltage} = (0.5)/2;$	
0.75V	0.76V	$f_{CeSetVoltage} = (1.5)/2;$	

② 측정 전류 동작 평가

- 등가 저항을 각 전극에 연결하고 채널 선택이 정상인지와 측정 전류가 정상인지를 평가함.
- 평가 방법은 아래 그림과 같이 등가저항을 전극에 연결하여 평가함. WE와 RE 전극 사이의 전압을 0.45V로 유지하면서 R1 양단을 전압을 측정하여 전류로 환산함.

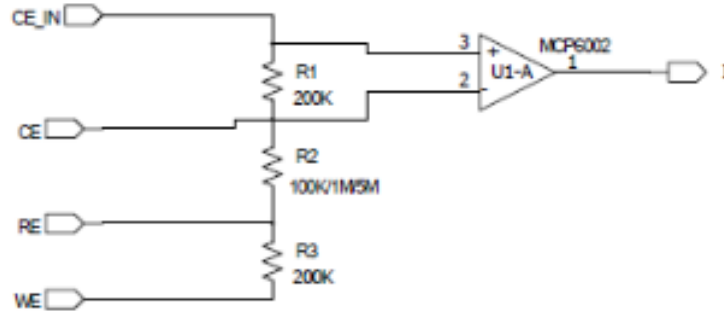


그림 123. 보드 평가를 위한 등가회로



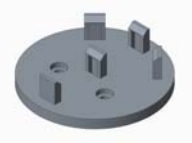
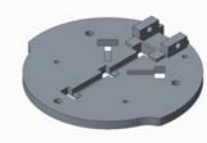



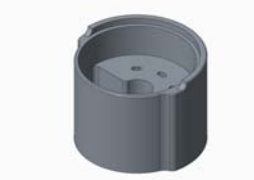

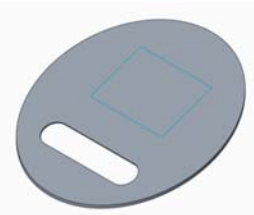

- 동작 순서는 Menu Key로 채널을 선택하고, Start/Stop Key를 사용하여 전류를 측정함
- 평가는 아래표와 같다. 표에서 알 수 있듯이 계산된 전류값과 측정된 전류값이 거의 일치함을 알 수 있음.

채널	등가 회로	계산전류	측정전류	동작
Ch 1	R1 = 200K R2 = 100K R3 = 200K	2.25uA	2.278uA	
Ch 2	R1 = 200K R2 = 1M R3 = 200K	450nA	463nA	
Ch 3	R1 = 200K R2 = 5M R3 = 200K	90nA	87nAA	
Ch 4 (Open)	R1 = 200K Open	0.0nA	0.0nA	

(5) 시제품 제작

① 3D 모델링 및 기구 설계

㉔ 다중(3채널) 측정기기용 기구물

모델명	기구설계	모델명	기구설계
Main Body Bracket		Main PCB Bracket	
Main Sensor Guide A		Main Sensor Guide	
Main Bode Guide		Main Bode	
Main Sensor B		Main Sensor C	
Main Top		Main Window	
전체 모델링			

㉔ 단일종(1채널) 측정기기용 기구물

모델명	기구설계	모델명	기구설계
SENSOR_TOP_CASE		SENSOR_BOTTOM_CASE	
TOP_CASE		BOTTOM_CASE	
DECO		REAR_CAP	
POWER_BUTTON		LED_COVER_1	
LED_COVER_2		WINDOW	
CAP		DECO_RING & DECO_LINE	
전체 모델링			

② 시제품 제작

모델명	시제품 실물 사진		
<p>다중(3채널) 시제품</p>			
<p>단일종(1채널) 시제품</p>			

<제1협동연구기관-전자부품연구원>

(1) PAG 진단용 전극 표면 개발

○ 전극에 항체를 고정하는 방법 연구 진행

소 임신 진단을 위해 발굴된 항체를 이용해 다양한 프로토콜 연구를 진행함. 항체를 직접적으로 센서에 흡착하는 방법과 간접적으로 항체가 센서에 고정 될 수 있게 하는 방법으로 사용하여 최적의 조건을 찾음.

○ PAG 항체를 직접 전극에 흡착하는 방법은 항체를 직접적으로 전극에 고정하는 실험이고 PAG1을 간접적으로 전극에 고정하는 방법은 아비딘을 전극에 흡착하여 아비딘과 바이오틴의 결합력을 이용하는 방법으로 아비딘을 센서 표면에 흡착된 아비딘이 비공유 결합된 사슬이 호모 테트라민 복합체를 형성하는데 각 사슬은 한 분자의 바이오틴과 매우 강하고 특정한 비 공유 결합을 형성하는 것이 특징이 있음. 각각의 실험에 대한 모식도는 아래 그림과 같음.

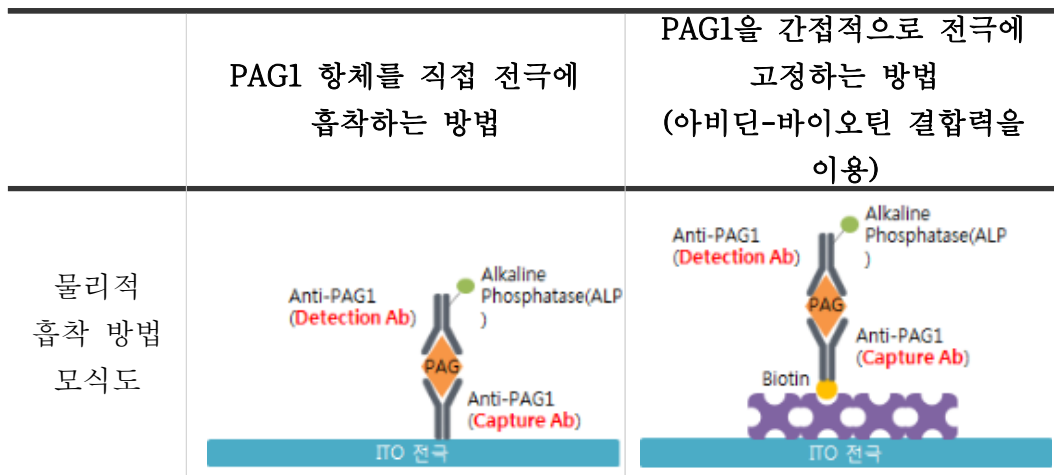


그림 124. 물리적 흡착 방법 모식도.

○ PAG1 항체를 직접 전극에 흡착하는 방법은 포스페이트 버퍼와 알칼리의 카보네이트 버퍼를 사용하여 흡착하였고 이후 모식도와 같이 면역반응을 진행함. 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정한 결과는 다음과 같음.

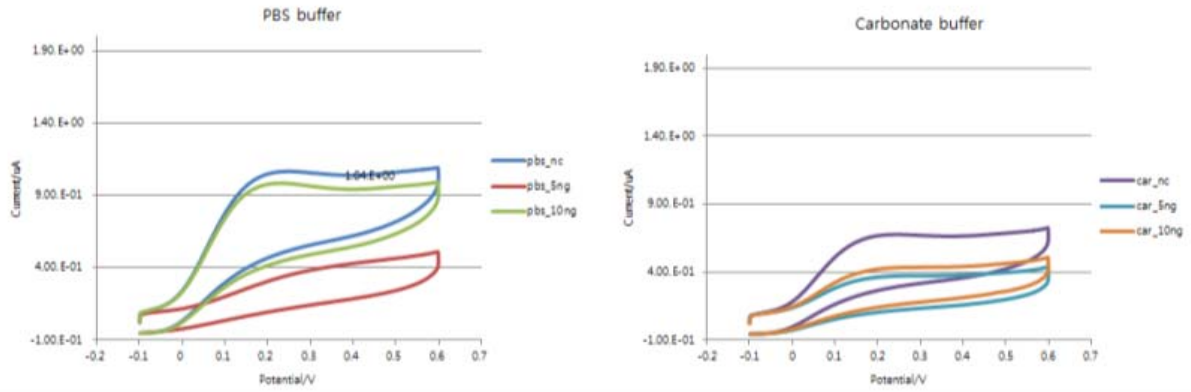


그림 125. PAG1 항체를 직접 전극에 흡착하는 방법의 면역반응을 포스페이트 버퍼(PBS)와 카보네이트 버퍼(Carbonate)를 이용했을 때 순환전압전류법.

- PAG1 항체를 간접적으로 전극에 고정하는 방법은 일반적인 방법대로 카보네이트 버퍼를 이용하여 흡착하고 모식도와 같이 면역반응을 진행함. 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정한 결과는 다음과 같음.

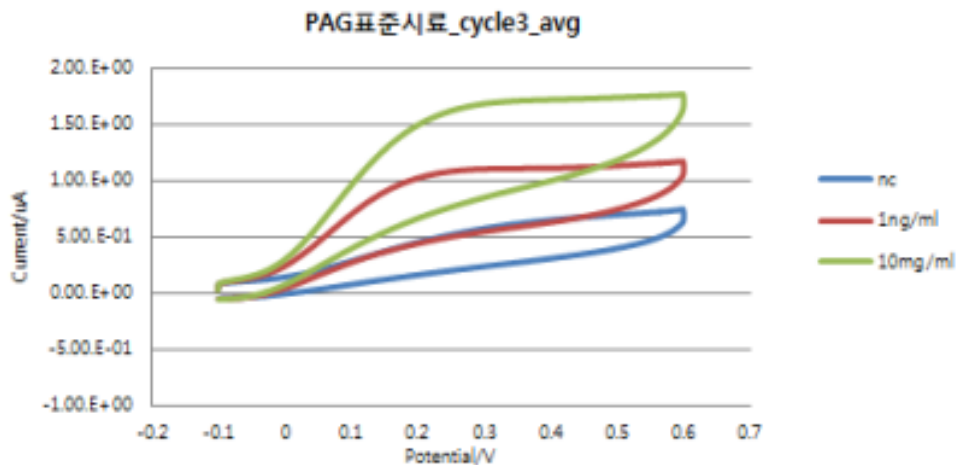


그림 126. PAG1 항체를 법의 면역반응을 포스페이트 버퍼(PBS)와 카보네이트 버퍼(Carbonate)를 이용했을 때 순환전압전류법.

- 실험 결과 PAG1 항체를 간접적으로 전극에 고정하는 방법은 전극 표면의 아비딘이 항체가 전극과 일정한 방향을 이루므로 적용해야 되는 바이오센서의 물리적인 흡착방법에 최적화 되었다고 판단.
- ITO 전극에 avidin 흡착에 대한 연구 진행.
모식도는 아래와 같음

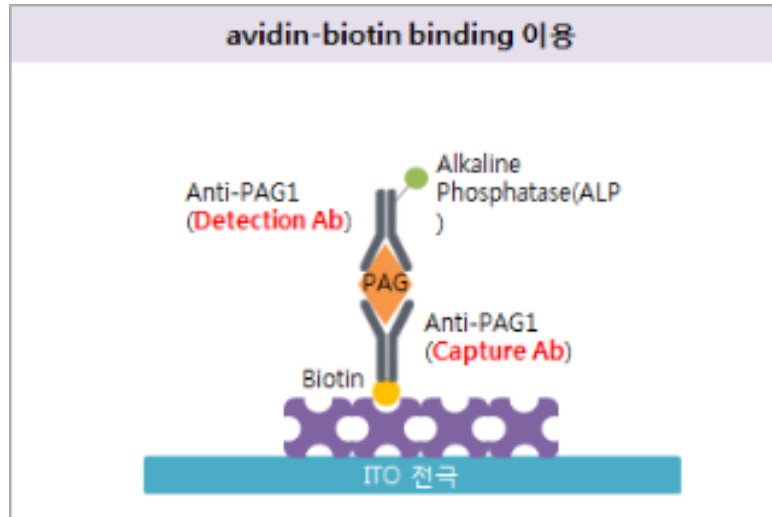


그림 127. 아비딘 흡착에 대한 연구 모식도.

- ITO 전극에 avidin 흡착 후 biotin_anti PAG1를 결합시켜 Sandwich elisa 기법을 전극 위에서 실행함.

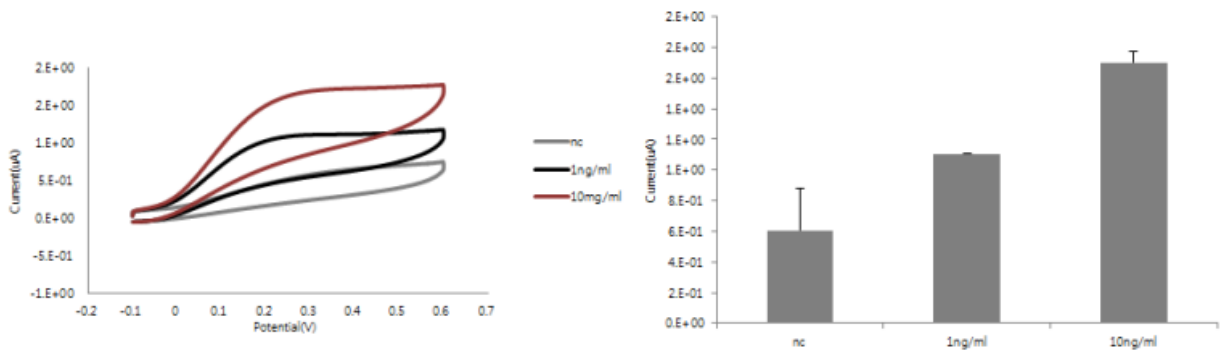


그림128. 샌드위치 ELISA 기법 결과.

- 위와 같은 방법으로 assay를 한 후, 전위조사법을 시행한 결과 PAG1 표준 시료가 없는 것보다 표준 시료가 있는 샘플이 0.34v에서 전류 값이 증가하였고, 표준시료 1ng/ml보다 10ng/ml에서 전류 값이 더 증가됨이 관찰 이것으로 보아 농도별 측정이 가능 할 것으로 예상함.

○ PAG1 표준시료 농도 별 전위조사법과 시간 차 전하량법 측정

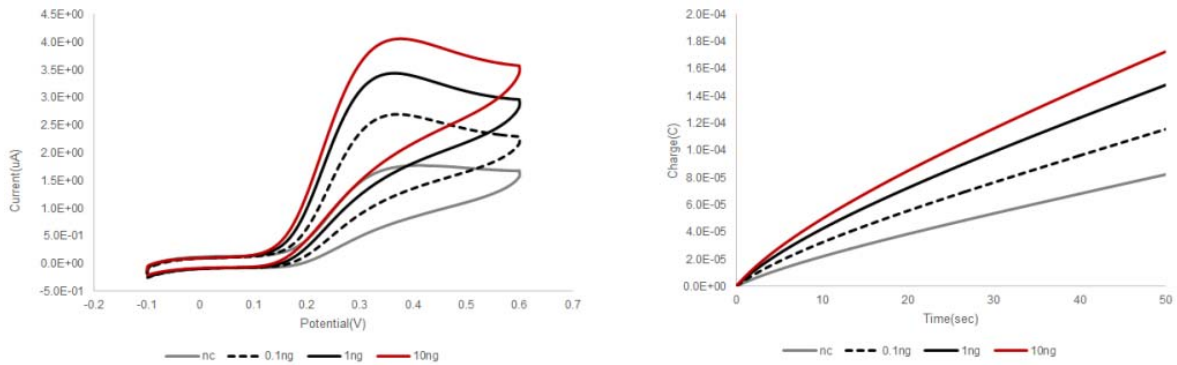


그림 129. PAG1 표준시료 농도별 결과.

○ ITO 전극 위에서 Sandwich elisa 기법으로 PAG1 표준시료 농도 별로 assay를 진행한 후 전위조사법과 시간 차 전하량법을 수행한 결과 PAG1 표준시료 농도가 증가함에 따라 전류 값 과 전하값이 증가 됨.

○ Blocking 용액 protein free blocker로 교체

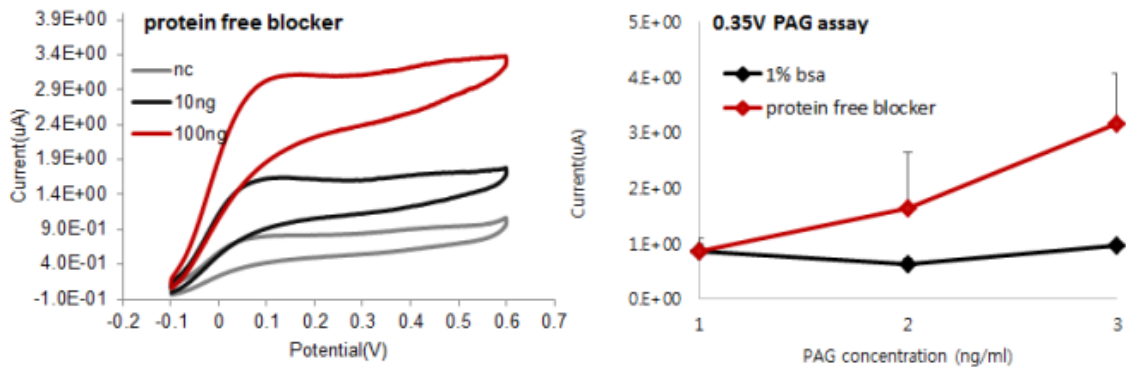


그림 130. Blocking 용액 protein free blocker로 교체 결과 그래프.

○ Anti bovine 항체를 사용하는데 blocking 용액을 BSA(Bovine serum albumin)을 이용하게 되면 nonspecific binding이 높아 질 것으로 예상되어 bsa 용액 대신 protein free blocker로 교체하여 assay를 진행한 결과 신호 값이 더 증가 됨.

○ ITO glass 전극에의 ITO 나노입자 코팅을 적용하여 고감도 작업전극 표면을 개발 전기화학적 신호 측정 시, 노이즈가 적고 저전압에서도 높은 전류 값을 갖는 피크를 측정할 수 있는 바이오센서용 작업 전극을 제조함.

○ 기질-효소 반응 산물에 의한 신호 측정시 안정적으로 효소의 농도에 비례해 생산되는 산물의 농도에만 반응하는 전극을 선정하는 것이 중요함. 개발된 작업전극에 바이오물질을 표면에 고정화하여, ALP 효소 반응 실험을 진행함. 기질 용액에는 반응하지 않고 산물의 농도

에 비례해 전기신호를 출력하는 결과를 통해 임신진단 센서에 적용 가능성을 보임. 추가 연구로 면역진단 표면 구축을 진행하여 성능을 검증할 계획임.

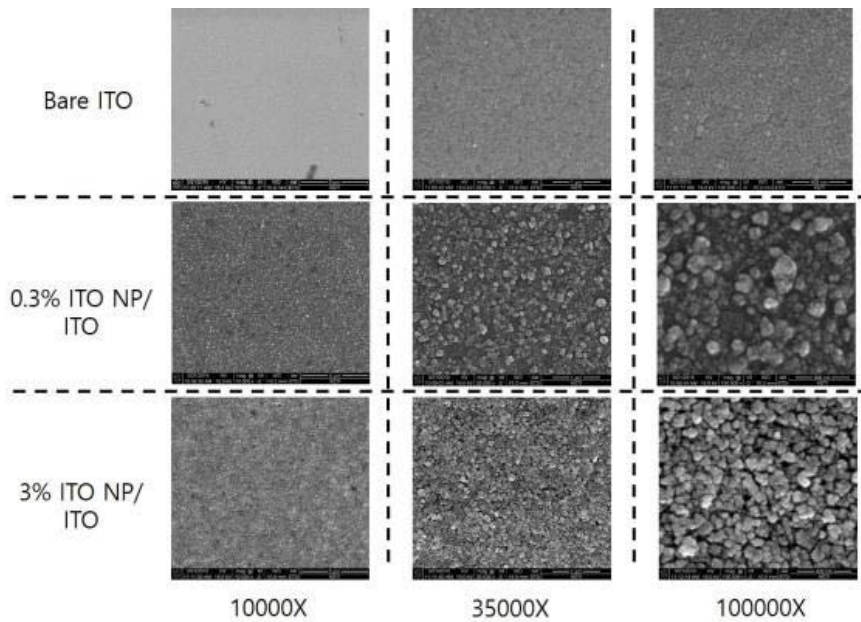


그림 131. ITO NP/ITO electrode 표면처리 조건 확립 (ITO NP 표면 처리 조건에 따른 SEM 결과).

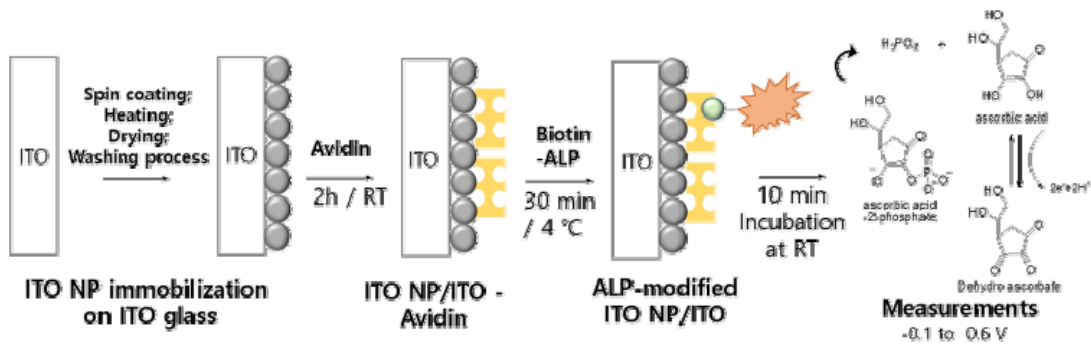


그림 132. 바이오펜질 표면처리 조건 확립 및 ITO NP/ITO electrode 표면 전기화학특성 검증 프로토콜.

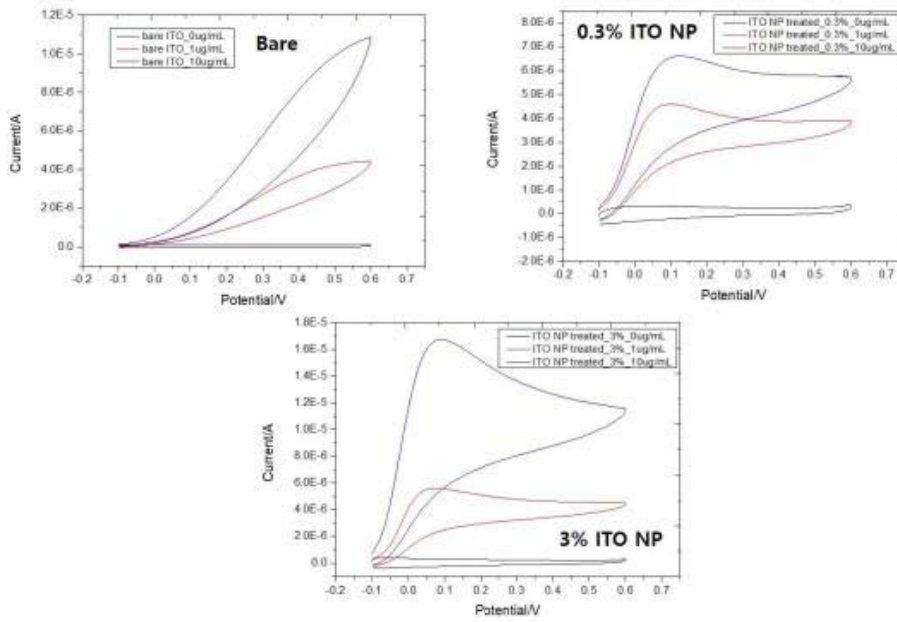


그림 133. 바이오표면처리 조건 확립 및 이를 이용한 ITO NP 농도에 따른 Electrocatalytic activity 검증.

○ ITO NP 처리 농도가 증가함에 따라 바이오표면 조건에서 Ascorbic Acid (AA) 산화 Peak의 Shift가 일어남. 이는 ITO NP 농도 증가에 따라 전기화학적 촉매작용이 증가함을 나타냄. 그러므로 ITO NP를 이용하였을 경우 상대적 저전압에서 AA의 산화가 바이오표면 조건에서 이루어짐을 검증함. 추후 이루어질 연구에서 바이오 어세이의 전기화학적 신호 검출이 저전압에서 이루어질 수 있는 가능성을 보임.

(2) PAG 검출을 위한 샌드위치 ELISA 항원-항체 최적화

○ Polyclonal 와 Monoclonal 항체의 다양한 조합을 통해 적절한 antibody assay pair를 선정하고자 하였음. polyclonal은 하나의 표적물체에 대해 binding motif가 하나이상 존재하는 경우이며, monoclonal은 하나의 표적물체에 대해 binding motif가 하나 존재하는 경우를 의미함. 아래 결과와 같이 poly-poly 조합 보다 poly-mono 항체 조합의 경우가 신호 variation이 적음을 볼 수 있었음. poly-mono의 조합으로 sandwich ELISA에 적용하기로 함.

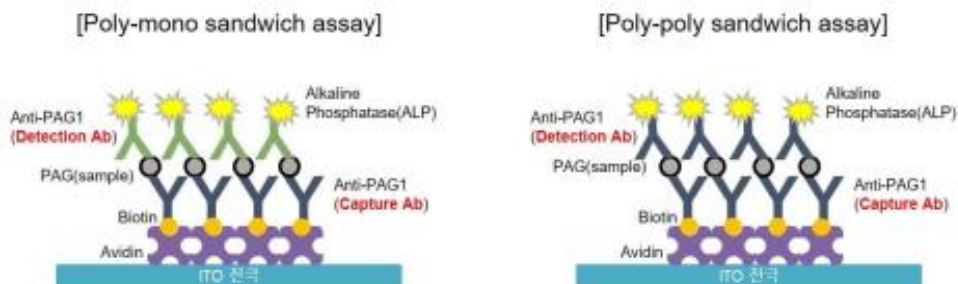


그림 134. poly-mono, poly-poly antibody 조합의 sandwich assay scheme.

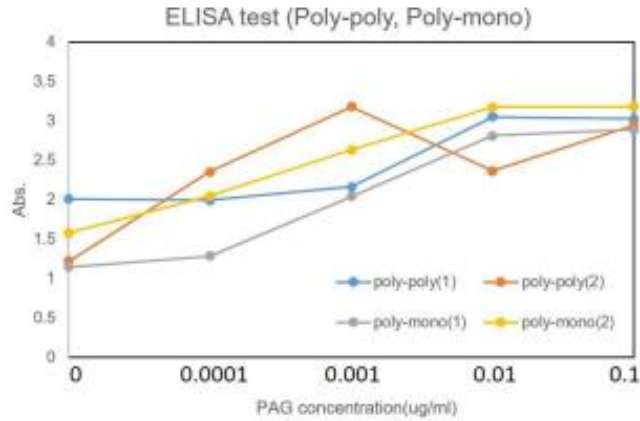


그림 135. 흡광도법 기반 ELISA법을 통한 poly-poly, poly-mono antibody combination 테스트

(3) PAG 검출을 위한 간접 ELISA 최적화

○ 실험 A는 PAG1 항체에 결합 물질이 없는 형태의 항체를 이용한 실험으로 PAG1 항체와 반응하는 2차 항체를 Mouse-IgG 항체에 염기성인산분해효소(Alkaline Phosphatase)가 결합된 항체를 사용한 실험이고 실험 B는 PAG1 항체에 바이오틴이 결합된 형태의 항체를 사용하여 2차 항체로는 스트렙타아비딘과 염기성인산분해효소(Alkaline Phosphatase)가 결합된 단백질을 사용도록 구성됨. 스트렙타아비딘은 비 공유 결합된 사슬이 호모 테트라민 복합체를 형성하는데 각 사슬은 한 분자의 바이오틴과 매우 강하고 특정한 비 공유 결합을 형성하는 것이 특징이 있음. 실험 A와 B에 대한 모식도는 아래 그림과 같음.

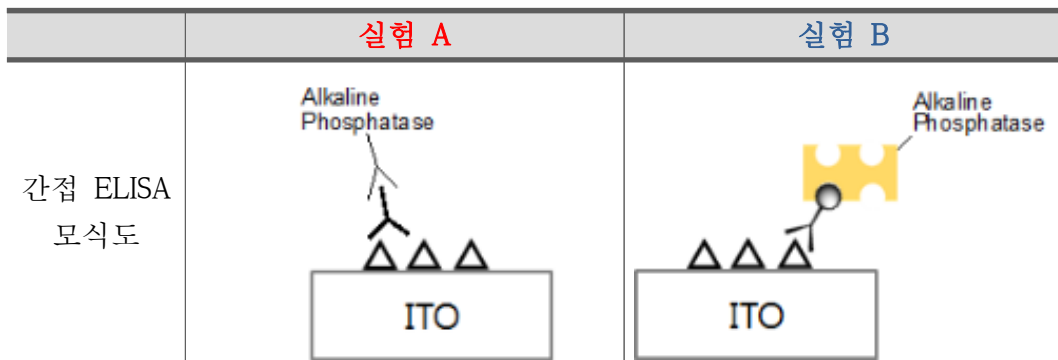


그림 136. 간접 ELISA 모식도.

○ 전극의 제작은 실제 시료를 사용하여 진행함. 비 임신 시료 2개(구별 번호 12, 42)와 임신 시료 3개(임신 판정 9주,12주,18주)를 선택하였고 4oC, 1000rpm 조건에서 15분 동안 원심분리 과정을 거쳐 시료를 준비함. 실험에서 알칼리의 pH 9.6 카보네이트 용액을 이용하면 전극 표면의 흡착률을 높일 수 있어 분리한 시료를 4배 희석하여 ITO전극 표면에 25oC에서 2시간 흡착시키고 흡착하지 않은 잔여물을 제거하여 전극 표면에 각 각의 항원을 준비함.

- 실험 A는 위와 같이 전극을 5개를 준비한 후 PAG1 1차 항체와의 항원-항체 반응은 25°C에서 1시간 진행하고 반응하지 않은 잔여물은 세척 용액으로 제거함. 이후 Mouse-IgG 항체와 염기성인산분해효소가 결합한 2차 항체를 이용하여 1시간 반응 후 잔여물을 제거하여 측정 전극을 준비함. 준비된 바이오센서를 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정한 결과는 다음과 같음.

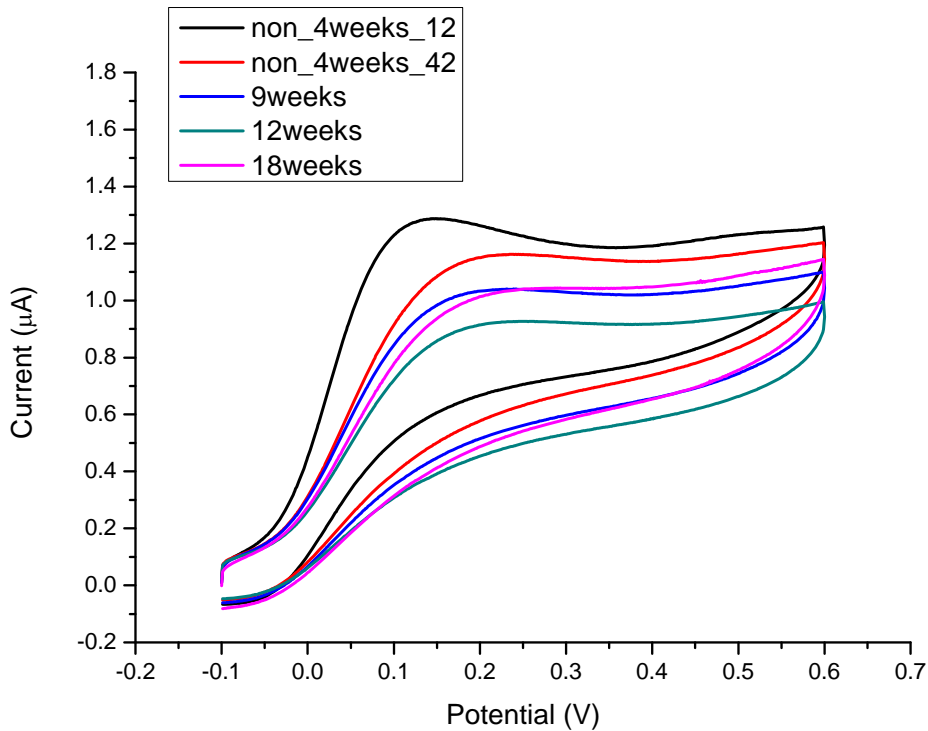


그림 137. 실험 A의 순환전압전류법 그래프.

- 실험 B는 실험 A와 같이 전극을 5개를 준비한 후 PAG1와 바이오틴이 결합된 1차 항체와의 항원-항체 반응은 25°C에서 1시간 진행 후 반응하지 않은 잔여물은 세척 용액으로 제거함. 이후 스트렙타아비딘과 염기성인산분해효소가 결합된 단백질을 이용하여 1시간 반응 후 잔여물을 제거하고 측정 전극을 준비함. 준비된 바이오센서를 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정한 결과는 다음과 같음.

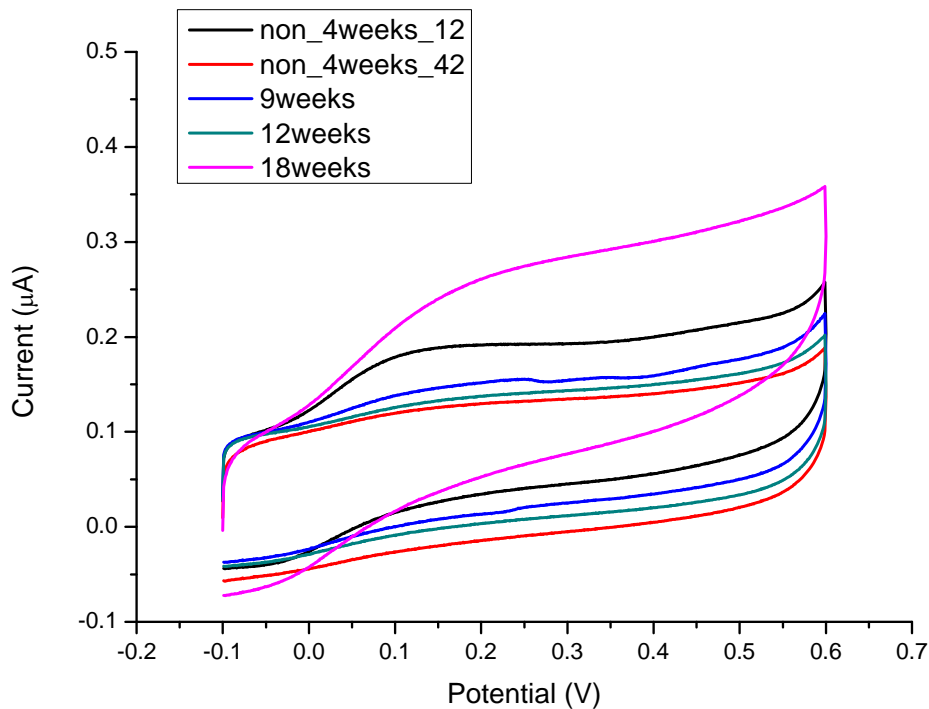


그림 138. 실험 B의 순환전압전류법 그래프.

- 실험 결과 실험 B는 실험 A에 비해 신호가 적으나 임신 판정 18주차의 시료에서는 유효한 값이 나와 항원의 유무에 따라 바이오센서의 구분이 가능한 신호를 나타내므로 다음 항체를 이용하여 추가 연구를 진행.
- 앞선 실험에서 바이오틴이 결합된 항체와 스트렙타아비딘과 염기성인산분해효소가 결합된 간접 ELISA를 선택하여 다음 연구를 진행함. 실험에서 우선적으로 비 임신 판정 시료들을 사용하여 평균값과 표준편차를 구하여 유효한 신호 수준을 계산해본 후 임신 판정 기준을 정함.
- 실험 시 사용한 전극 제작은 비 임신 판정 시료 4개 (구별 번호 : 12, 42, P13, N33)을 40°C, 1000rpm 조건에서 15분 동안 원심분리를 하여 시료를 얻음. 선행연구와 같이 알칼리의 pH 9.6 카보네이트 용액을 이용하여 센서 표면의 흡착률을 높이기 위해 준비한 시료를 4배로 희석하여 ITO 전극 표면에 25°C에서 2시간 흡착시키고 흡착하지 않은 잔여물을 세척용액으로 처리하는 방법으로 전극 표면에 각각의 항원을 준비함. 이후 선행 연구와 같이 면역 반응을 진행 후 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정된 결과와 0.15 V에서의 전류 값은 다음과 같음.

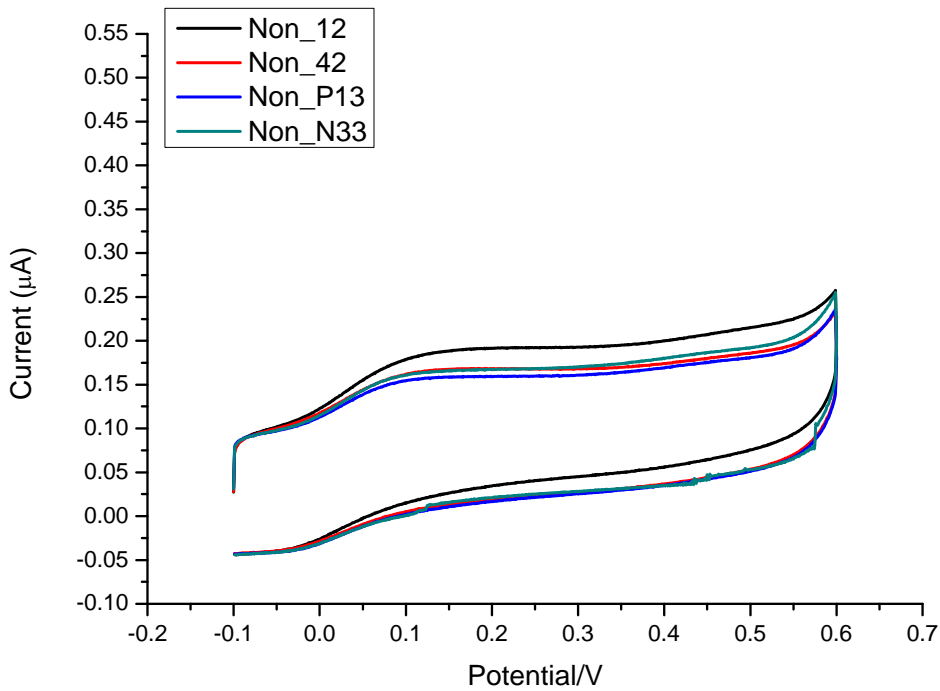


그림 139. 실험 B의 순환전압전류법 그래프 - 비임신 4주 소의 혈청을 이용한 간접 ELISA의 순환전압전류법.

	Non_12	Non_14	Non_P13	Non_N33	평균값	표준편차
uA	0.19	0.17	0.16	0.17	0.17	0.01284

표 9. 비 임신 4주 소의 혈청을 이용한 간접 ELISA의 순환전압전류그래프에서 0.15 V에서의 전류 값, 평균값, 그리고 표준편차.

(4) 최적화 된 간접 ELISA 의 임신 시료 판정

- 다음 실험에서는 임신 판정 시료들을 사용하여 유효한 신호 값 이상을 보이는지 확인함. 실험 전극 제작은 임신 판정 시료 6개 (구별번호 : 16주차 0,2,4,13,14 와 18주차)를 40C, 1000rpm 조건에서 15분 동안 원심분리를 하여 시료를 얻음. 이전 연구와 같이 알칼리의 pH 9.6 카보네이트 용액을 이용하여 전극 표면의 흡착물을 높이기 위해 준비한 시료를 4배로 희석하여 ITO 전극 표면에 25oC에서 2시간 흡착하고 흡착하지 않은 잔여물을 세척용액으로 제거한 후 전극 표면에 각각의 항원을 준비함. 이후 선행 연구와 같이 면역 반응을 진행 후 1mM AAP의 기질 용액을 이용하여 순환전압전류법으로 측정된 결과와 0.15 V에서의 전류 값은 다음과 같음.

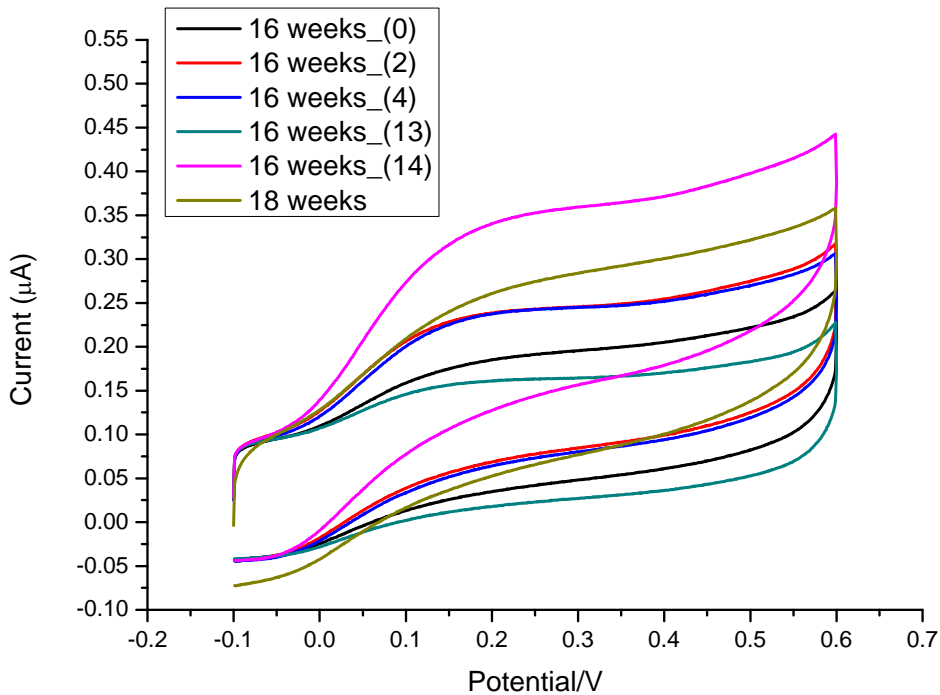


그림 140. 실험 B의 순환전압전류법 그래프임신 16~18주 시료를 이용한 간접 ELISA의 순환전압전류법.

	16주차_(0)	16주차_(2)	16주차_(4)	16주차_(13)	16주차_(14)	18주
uA	0.17	0.23	0.23	0.16	0.32	0.24

표 10. 임신 16~18주 시료를 이용한 간접 ELISA의 순환전압전류그래프에서 0.15 V에서의 전류 값.

- 실험 결과는 순환전압전류법 그래프를 보면 면역반응의 끝단에 달려있는 염기성인산분해효소반응에 의해 아스코르빈산이 생성되어 0.15 V에서 최대 산화 피크를 보이며 16주차_(2,4,14)과 18주차의 시료는 비 임신 시료를 통해 얻은 임신과 비 임신 구분의 기준 값인 0.208 uA보다 높게 나옴. 시료 중에서 16주차_(0,13)은 PAG1 항원이 시료에 많지 않았던 소로 보임. 이와 같이 시료에 PAG1의 농도가 낮을 것이라고 예상되는 경우에는 임신 판정 기준보다 낮은 경우에는 구분이 어렵지만 PAG1의 농도가 충분할 경우 그래프와 같이 유효한 값을 보임.

(5) 전기화학식 기반 플랫폼 적용을 위한 PAG Assay 개발

- 기선정된 Capture/Detection PAG1 antibody를 이용하여 표적물질 PAG1 protein에 대한 sandwich assay에 적용될 ALP enzyme labeling 조건을 최적화함. 1:4 의 antibody:ALP ratio

를 이용하였을 경우, PAG assay 결과가 PAG 농도 증가 트렌드에 부합하는 시그널을 얻을 수 있었음.

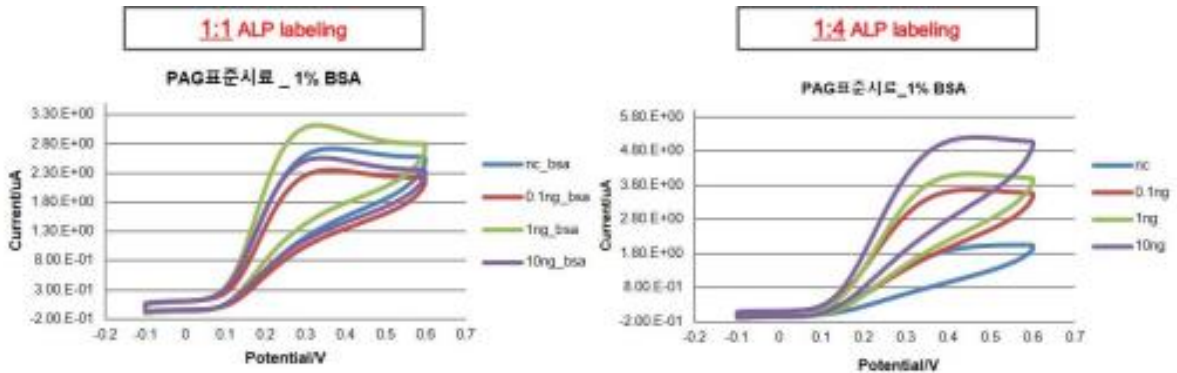


그림 141. Detection 항체의 ALP 레이블링 비율에 따른 PAG assay 결과.

- 기 선정된 Capture/Detection PAG1 antibody를 이용하고, ALP 레이블이 최적화된 Ab를 사용하여 아래와 같은 전극 표면위에 표적 물질인 PAG1 protein에 대한 sandwich assay를 설계하였음. PAG1 농도가 증가함에 따라 전류값이 증가함을 보임. PAG1 검출 가능한 항원-항체 assay를 전기화학적방식에 적용 가능성을 보임.

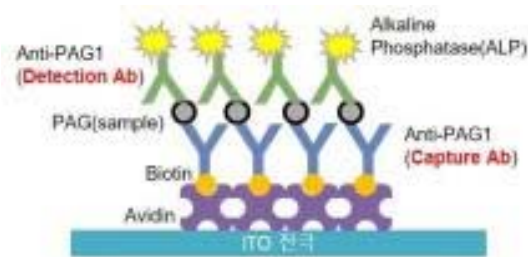


그림 142. 전극 동작 확인을 위한 ALP 효소 이용 PAG1-Antibody 반응 기초 정량 테스트 PAG assay 플랫폼 (Direct method).

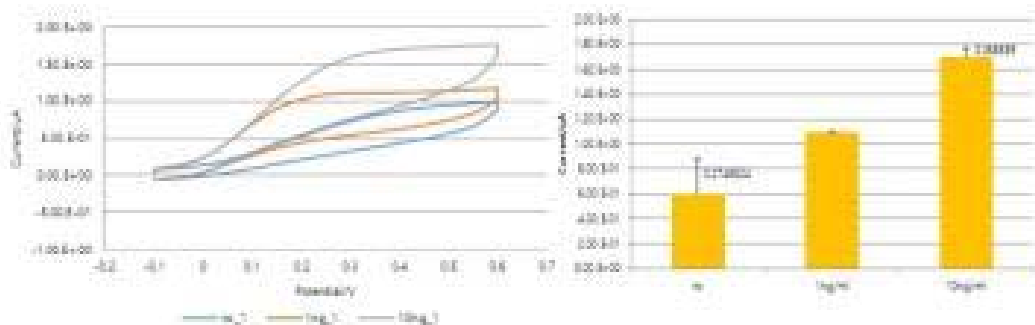


그림 143. PAG1 농도에 따른 Assay 플랫폼에서의 Cyclic Voltammetry 결과 및 0.35V에서의 Current Peak 결과.

- 위 설계된 전기화학적 PAG1 assay에 대한 표적물질 농도에 따른 검정곡선을 정립함. PAG1 농도 1 ng/mL 이상에서 변동계수 (CV%) 8% 이하의 높은 재현성을 나타냄.

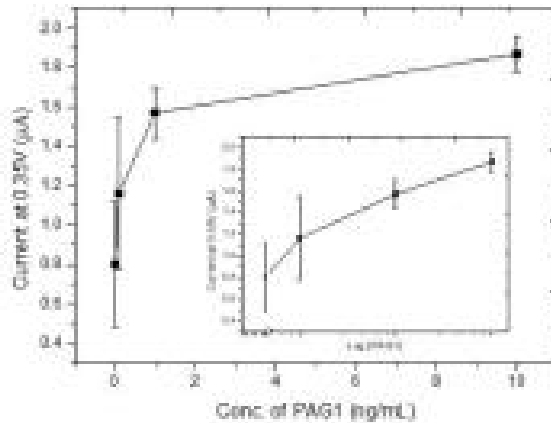


그림 144. PBS buffer 조건에서 PAG1 표준시료를 통한 정량 곡선 도출 CV peak values at 0.35V (n=3)

- 추가적인 Assay 플랫폼으로 Indirect method 기반 assay를 구축함. Anti-mouse IgG Ab를 추가하여 indirect detection method assay를 설계함. 이에 따른 PAG 농도에 따른 전기화학적 시그널을 얻고 이를 기존 direct 법의 결과와 비교함. 시그널 증폭 효과가 최소 2배 이상 나타남. 이는 Detection antibody에서 anti-mouse IgG ab가 binding 할 수 있는 두 개의 binding motif를 가지고 있음으로 binding 된 Signaling molecule 수가 증가 할 수 있음. 이에 따른 영향으로 LOD 값이 1 ng/mL (direct 법)에서 0.1 ng/mL (indirect 법)으로 개선됨. 따라서 추가적으로 개선된 어세이법인 indirect법이 기존에 알려진 cut-off 0.922 ng/mL of PAG1 에 적합한 성능을 가지고 있음.

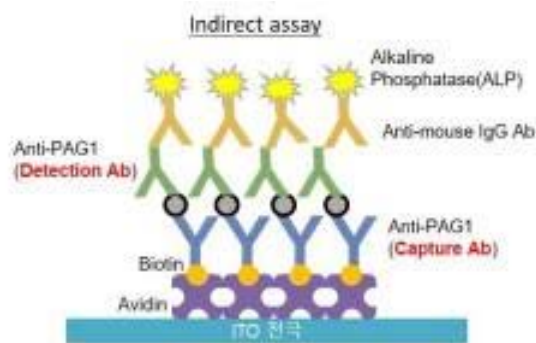


그림 145. Indirect assay platform 구축.

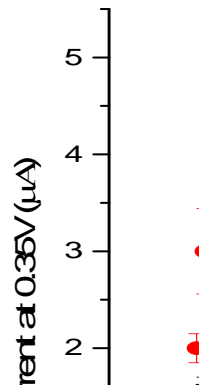


그림 146. PAG1 검정곡선에 대한 Indirect vs. direct method 경우 비교. Indirect 경우 Direct법 보다 전류 시그널 증폭 경향을 보임.

- 위 개발된 두 전기화학적 샌드위치 ELISA법 이용하여 실제 소 혈청에서 PAG 검출 실험을 진행함. 4주차 소임신 혈청에서 Direct와 Indirect 법의 경우 모두 P value 0.05 이하의 유의미한 시그널 차이를 보이며, 소임신을 구분함. Indirect 법의 경우 Direct 법 보다 두배 이상의 시그널을 나타내는 것을 볼 수 있음. 추가적 소혈청 테스트를 통해 정밀도 및 재현성 테스트를 할 필요성이 있음.

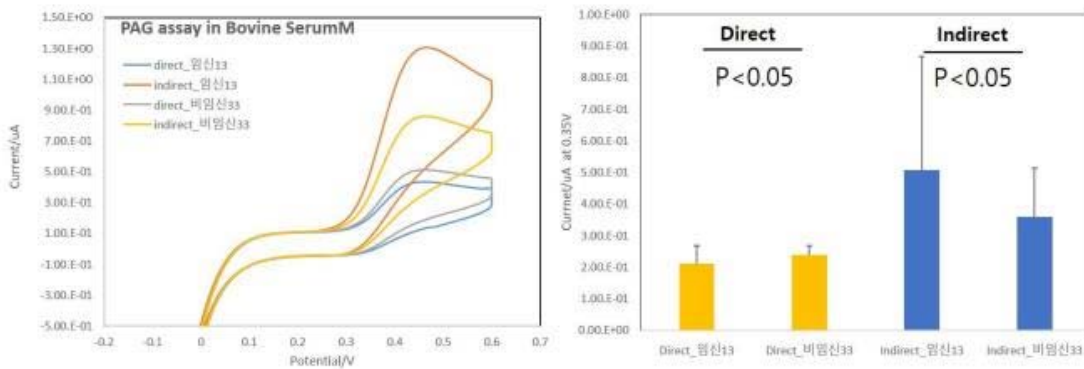


그림 147. Direct 와 Indirect 법 assay 에서의 소혈청 PAG1 assay test.

(6) 전기화학 바이오센서 측정 조건 개선

- 지금까지 연구에서 Cyclic voltammetry (CV) 법을 이용하여 수 분내 측정값을 이용하였지만, Chronocoulometry (CC)법을 적용하여 수 십초 내에 측정값을 이용하여, PAG1 농도를 구분할 수 있도록 전기화학 측정 조건을 개선함. CC법은 시간에 따른 전류값을 적분하여 전하량으로 시그널을 표시하는 방법으로 적분법에 의해 시그널 크기가 증폭하는 효과를 얻을 수 있음. 따라서 10-50s 이내에서 농도에 따른 구배가 분명하게 이루어짐을 볼 수 있음.

- 한편, 센서의 데이터 필터 기준과 정량적 판별기준은 시스템 및 센서의 고유특성에 따라 달라질 수 있으므로 출하 시, 공장모드의 기준 데이터로 설정하여 사용자가 임의로 변경할 수 없도록 함.

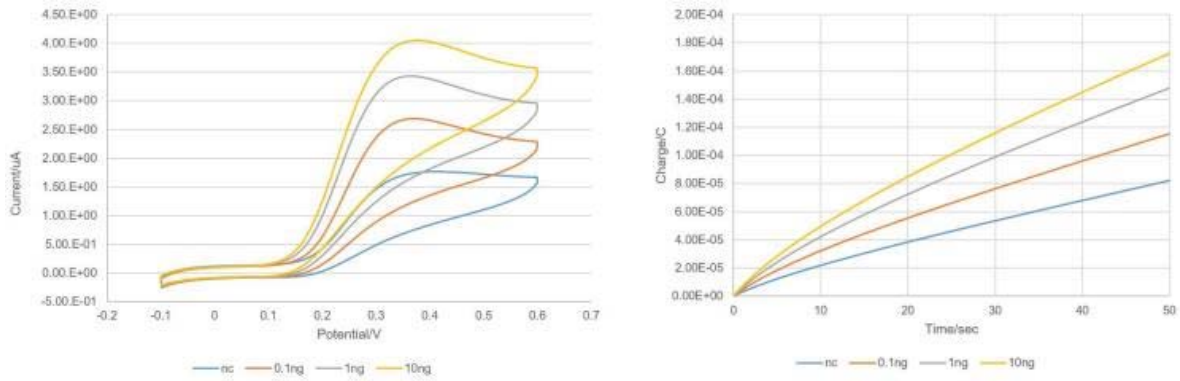


그림 148. Cyclic voltammetry (CV) 법 vs. Chronocoulometry (CC) 법을 이용한 PAG1 단백질 농도에 따른 전기 화학 시그널 결과.

<제2협동연구기관-한국농수산대학>

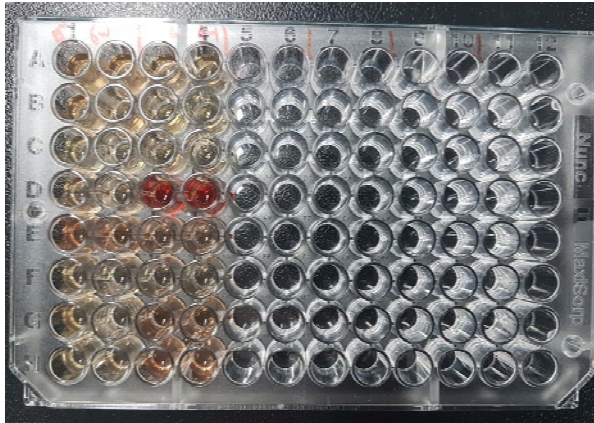
1. 전기식 바이오센서의 효능 검증

○ 연구방법

- 전기식 바이오센서(주관기관 제작)



- 실험샘플 :
 - 혈장 : 임신단계별 월별 각 5두씩 분석(3주 - 36주/15단계)
 - 전혈 : 20두분
 - 미임신 : 20두분
- 분석 방법
 1. 항원-항체 반응 플레이트 제작(제2협동기관; 전자부품연구원)
 2. 샘플 로딩(임신, 미임신, 전혈 등)



3. 분석



4. 결과 처리

positive sample - background control sample = result

pregnancy : result > 0

non pregnancy : result < 0

○ 결과

- PAG 분석 결과(개체별)

• 샘플 : 전혈(whole blood)

No.	type	1st	2nd	3rd	EC measurement	Pregnancy diagnosis
0558.9	P.S	302.430	264.542	262.105		
	B.C	290.96	259.709	239.925		
	reslut	11.47	4.833	22.18	12.82767	Pregnancy
5982.8	P.S	426.839	349.166	310.145		
	B.C	380.414	319.066	293.686		
	reslut	46.425	30.1	16.459	30.99467	Pregnancy

• 샘플 : serum

No.	type	1st	2nd	3rd	EC measurement	Pregnancy diagnosis
1448.6	P.S	120.715	115.970	113.691		
	B.C	197.578	184.825	187.772		
	reslut	-76.863	-68.855	-74.081	-73.2663	N.P
6701.2	P.S	183.813	172.930	163.383		
	B.C	174.178	153.237	147.508		
	reslut	9.635	19.693	15.875	15.06767	P
6693.3	P.S	162.109	142.782	135.829		
	B.C	145.442	134.939	134.787		
	reslut	16.667	7.843	1.042	8.517333	P
8848.5	P.S	161.285	143.023	1320140		
	B.C	141.899	126.567	120.994		
	reslut	19.386	16.456	1320019	440018.3	P
94.2	P.S	145.066	130.337	124.109		
	B.C	139.039	126.819	122.765		
	reslut	6.027	3.518	1.344	3.629667	P
77.3	P.S	143.236	129.438	121.504		
	B.C	106.801	95.34	90.504		
	reslut	36.435	34.098	31	33.84433	P
5768.4	P.S	118.389	107.669	104.303		
	B.C	107.555	97.379	93.275		
	reslut	10.834	10.29	11.028	10.71733	P
1420.5	P.S	59.057	60.868	52.726		
	B.C	56.963	48.645	46.519		
	reslut	2.094	12.223	6.207	6.841333	P
385.2	P.S	65.233	58.384	53.776		
	B.C	60.986	54.851	52.532		
	reslut	4.247	3.533	1.244	3.008	P
2597.4	P.S	70.625	63.479	60.079		
	B.C	115.120	114.891	102.901		
	reslut	-44.495	-51.412	-42.822	-46.243	N.P
1935.8	P.S	73.275	66.873	62.852		
	B.C	96.147	87.904	87.494		
	reslut	-22.872	-21.031	-24.642	-22.8483	N.P
9785.1	P.S	104.280	92.485	88.440		
	B.C	114.905	101.545	100.824		
	reslut	-10.625	-9.06	-12.384	-10.6897	N.P
5191.5	P.S	109.194	103.393	98.027		
	B.C	69.176	54.938	52.923		
	reslut	40.018	48.455	45.104	44.52567	P
4599.4	P.S	52.174	56.250	53.055		
	B.C	53.158	49.677	50.290		
	reslut	-0.984	6.573	2.765	2.784667	P
899.6	P.S	40.590	37.841	37.290		
	B.C	56.677	53.931	51.385		
	reslut	-16.087	-16.09	-14.095	-15.424	N.P
7815.4	P.S	52.843	49.042	45.964		
	B.C	51.722	48.772	46.929		

	reslut	1.121	0.27	-0.965	0.142	P
2718.7	P.S	69.474	82.345	86.102		
	B.C	97.524	99.317	97.896		
	reslut	-28.05	-16.972	-11.794	-18.9387	N.P
1448.6	P.S	78.765	70.765	66.291		
	B.C	85.582	79.714	76.341		
	reslut	-6.817	-8.949	-10.05	-8.60533	N.P
1266.7	P.S	104.186	103.907	90.663		
	B.C	59.050	52.468	49.080		
	reslut	45.136	51.439	41.583	46.05267	P
25③	P.S	226.043	183.614	168.637		
	B.C	260.230	252.779	201.201		
	reslut	-34.187	-69.165	-32.564	-45.3053	N.P
21③	P.S	223.267	184.638	166.542		
	B.C	225.412	197.360	192.636		
	reslut	-2.145	-12.722	-26.094	-13.6537	N.P
14③	P.S	261.075	231.167	204.494		
	B.C	241.344	213.661	201.147		
	reslut	19.731	17.506	3.347	13.528	P
39③	P.S	982.457	308.009	284.302		
	B.C	948.125	276.058	261.854		
	reslut	34.332	31.951	22.448	29.577	P
35③	P.S	308.491	239.908	224.084		
	B.C	292.113	244.665	222.479		
	reslut	16.378	-4.757	1.605	4.408667	P
5③	P.S	302.172	243.392	229.511		
	B.C	330.714	302.171	266.483		
	reslut	-28.542	-58.779	-36.972	-41.431	N.P
34④	P.S	270.608	228.080	206.725		
	B.C	225.098	219.177	201.802		
	reslut	45.51	8.903	4.923	19.77867	P
15④	P.S	260.801	233.954	214.926		
	B.C	242.490	213.680	201.986		
	reslut	18.311	20.274	12.94	17.175	P
8④	P.S	331.063	287.494	248.743		
	B.C	330.387	259.805	207.978		
	reslut	0.676	27.689	40.765	23.04333	P
6701.2	P.S	261.788	255.648	219.115		
	B.C	252.914	228.045	228.352		
	reslut	8.874	27.603	-9.237	9.08	P

- 임신 개월령에 따른 PAG 농도 분석 결과

구분	PAG 농도	비교
whole blood	5.243-46.435	
non-pregnancy	-18.394	
3week	3.164	
5week	6.027	
6week	9.088	
9week	16.667	
10week	2.094	
16week	6.887	
28week	15.114	
36week	36.435	

- 기존 임신 방법과 비교

Method	Rectal exam.	Ultrasound	ELISA	EC Measurment
3 week	×	×	×	○
4 week	×	○	○	○
6 week	○	○	○	○
2 months	○	○	○	○
4 months	○	○	○	○
6 months	×(오진 가능)	○	○	○
8 months	×(오진 가능)	○	○	○
10 months	○	○	○	○

○ 결론

- 임상 시료 분석에서도 안정적인 결과가 발현되었음
- 임신 3주차에서도 PAG 검출로 임신진단이 가능함
- 전혈에서도 PAG 분석이 가능
(타 분석법(혈청만 가능)에 비하여 비교 우위를 확인)

2. 한우 임신관련 단백질의 유전적 변이 검증

- 기존 소의 임신 판단은 물리적으로 배경지식이 있는 사람이 직접 확인하는 방법을 통하여

비임신/임신을 결정하는 바 그 시간적 및 경제적 손실이 발생하고 인적오류가 발생할 가능성이 있음.

- 따라서, 위에 언급된 문제점을 극복하기 위하여 소의 임신/비임신 나아가 임신 주차별에 특정 유전자의 발현의 변화패턴을 확인 및 검증을 통하여 시간적 및 경제적 손실을 줄이고자 본 연구가 설계됨.
- 본 연구의 핵심은 임신한 소에서 ‘특정 유전자의 발현변화’를 확인하는 것이 목표임.

■ 연구개체 선별 및 전사체 추출

- 경상북도 축산기술연구소에서는 우수 종축 보급, 축산 관련 정보 제공 및 신기술 개발을 목적으로 설립된 국가 기관으로 혈통이 확인된 소의 종과 임신 여부가 확실한 개체를 보유 및 사육하고 있음.
- 따라서, 위 기관에서 보유하고 있는 출산이 임박한 만삭(10개월) 소 3두, 임신 3-4 개월차 소 3두, 임신 4주차 3두, 임신 2주차 3두 그리고 비임신 소 3두 총 15 두에서 혈액을 채취 하였음 (그림 149).

표 11. 연구개체 선별

번호	센서(관리 번호)	인공수정일	2주차	3주차	4주차	16주차	40주차
25	15-78(4589)	2017-05-25	2017-06-08 (목)	2017-06-15 (목)	2017-06-22 (목)		
31	구-383(6017)	2017-05-15	2017-05-29 (월)	2017-06-05 (월)	2017-06-12 (월)		
36	15-65(0531)	2017-06-02	2017-06-16 (금)	2017-06-23 (금)	2017-06-30 (금)		
13-130	13-05-0130	2016-06-30				2016-10-10	
13-055	13-04-0055	2016-07-05				2016-10-10	
구-366	11-03-4359	2016-06-27				2016-10-10	
13-67	13-03-0067	2016-01-28					2016-10-10
13-81	13-05-0081	2016-01-29					2016-10-10
14-075	14-05-0075	2016-01-07					2016-10-10

- 일반적으로, 혈액에서 충분한 양의 전사체를 추출하는 것은 비교적 쉽지가 않은데 그 이유는 혈액의 대다수를 차지하는 혈장과 적혈구에 전사체가 존재하지 않기 때문임. 혈액을 원심분리하여 혈장과 적혈구 경계의 혈소판과 백혈구로 형성된 얇은 층의 Buffy coat영역을 물리적으로 선별하는 것이 필요함.
- 하지만, 본 연구에서는 재연성이 있어야함. 쉽게 분해되는 전사체를 보존하고 정확한 데이터를 얻기 위하여 Qiagen사의 PAXgene Blood RNA kit를 이용하기로 결정하였음. 이 키트는 자연발생하는 전사체의 분해속도를 최소화 시켜주고 혈액을 상온에서 최대 4일간 안정화 시키며 분리 정제 및 재연성이 매우 높은 것으로 알려져 있음.

- 채취한 혈액을 PAXgene tube의 RNA stabilization reagent와 혼합하여 보관함 (전사체 안정화 물질은 공개가 되어 있지 않음.). 이후 단백질을 제거하고 유전물질 (DNA)를 제거한 후 전사체만 전통적인 방식인 Column (+ charge)에 부착시켜 분리 동정하는 과정을 거쳐 최종적으로 높은 순도의 전사체만 분리 동정함 (그림 149).

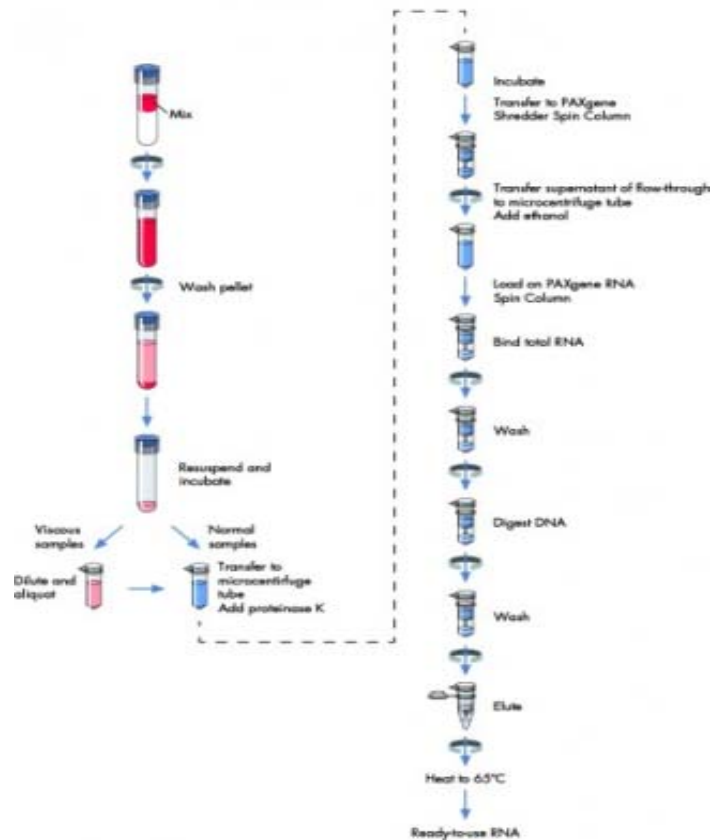


그림 149. Paxgene 전사체 추출 모식도

- 일반적으로 전사체의 높은 순도라 함은 흡광도 230 (전사체), 260 (유전물질), 280 (단백질)을 측정하게 되는데 보통 260/280 비율과 260/230 비율이 1.6 ~ 2.0 사이일 때 높은 순도라고 보이며 동물세포 기준으로 전사체의 Integrity number (RIN)을 추가적으로 측정하여 전사체의 분해도가 높음/낮음을 통하여 전사체가 얼마나 보존되어 있는지 알 수 있음.

(1) RNA 샘플 정량 및 정성 분석

가. 추출된 RNA는 Agilent사의 2100 BioAnalyzer를 이용하여 분석함. RNA 시료의 정도 측정은 2100 BioAnalyzer는 RNA의 샘플의 품질을 평가하는 3가지 결과값 (BAConcentration(ng/ul), RIN value, 28s/18s ratio)을 이용하여 품질을 평가함.

나. RIN(RNA Integrity Number) 값은 RNA의 degradation을 나타내는 값으로 1~10의 값을 가지며, 10의 경우 완전하게 보존된 RNA를 나타내고, 1의 경우 degradation이 아주 심한 상

태를 나타낸다. 일반적으로 RIN값 7이상을 권장하여 사용함(Agilent, 2002).



그림 150. RNA 시료 정량 정성 분석을 위한 장비

- 최종적으로 전사체 염기서열 해독에 필요한 개체의 선정은 만삭 3두, 임신 3-4개월 3두 그리고 비임신 1두 총 7두를 선택함. 따라서 총 12 개체의 전사체를 BioAnalyzer 2100의 RNA pattern 분석을 실시하여 28S/18S 비율을 통하여 RIN 값이 7 이상이고 260/280, 260/230 비율이 1.6 이상인 순도가 높고 전사체의 보존이 잘되어 있으며 농도가 높은 7 개체의 전사체를 선별하여 이후 진행되는 전사체 library 구축에 저해되는 요소가 있는지 확인함 (그림 151).

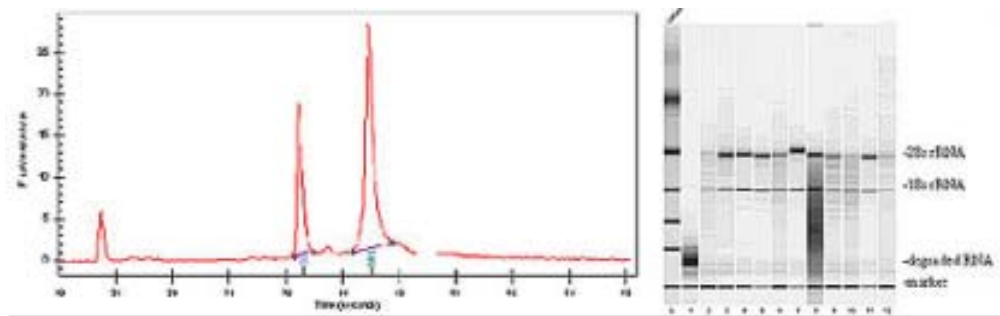
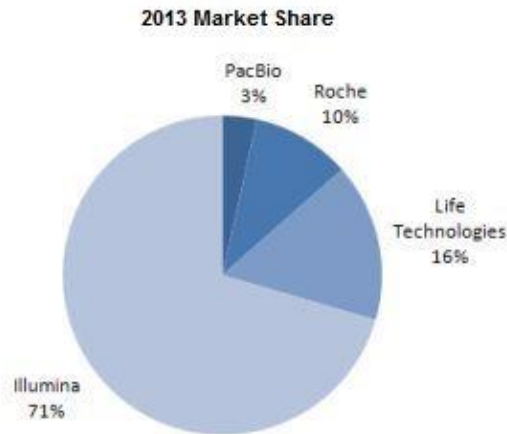


그림 151. BioAnalyzer RNA pattern 분석

■ 전사체를 바탕으로 하는 Library 구축 및 염기서열 해독

- 현존하는 차세대 염기서열 해독 및 분석 기법 (Next-Generation Sequencing, NGS)는 현재 보편적이고 가격적으로 합리적으로 알려져 있으나 시장의 대부분은 Illumina사의 염기서열 해독 시스템 점유 (약 70%)하고 있음. 그 이유는 한 번에 많은 데이터를 수집할 수 있고 해독 시간이 가장 빠르며 (데이터 생산량 대비) Sequencing Quality 즉, 오류 확률이 1/1000을 논할 정도로 high quality를 보장하기 때문임 (그림 152).



Source: Mizuho Securities and GenomeWeb survey. Number of respondents = 103.

그림 152. NGS platform 세계시장 점유율

- 따라서 본 연구는 Illumina사의 염기서열 해독 시스템에 적용이 가능한 전체 mRNA-sequencing library를 구축해야함.
- 전사체를 기반으로 하는 library를 구축하기 위해 Illumina사에서 제공하는 TruSeq mRNA sample prep kit v2를 사용하였음. 준비된 전사체 시료에 Oligo dT를 표면에 부착하고 있는 자기성을 띄고 있는 beads를 통하여 A-based RNA (mRNA)만 분리한 후 1차, 2차 complementary DNA합성을 실시함.
- 합성된 cDNA를 가지고 Covaris S2 system의 Aquatic wave를 통하여 물리적으로 250 bp 최적의 유전물질 단편조각으로 조각낸 후 양 끝단에 Illumina사 platform 염기서열분석이 진행될 수 있는 올리고 서열을 붙여 준 후 분자생물학적 방법임 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭하여 library를 구축함 (그림 153).
- 최종 산물은 2100 BioAnalyzer를 이용하여 확인하며 만들어진 library는 KAPA library quantification kit을 이용하여 정량한 후 cluster generation하여 Hiseq 2500을 이용하여 서열해독을 진행함.

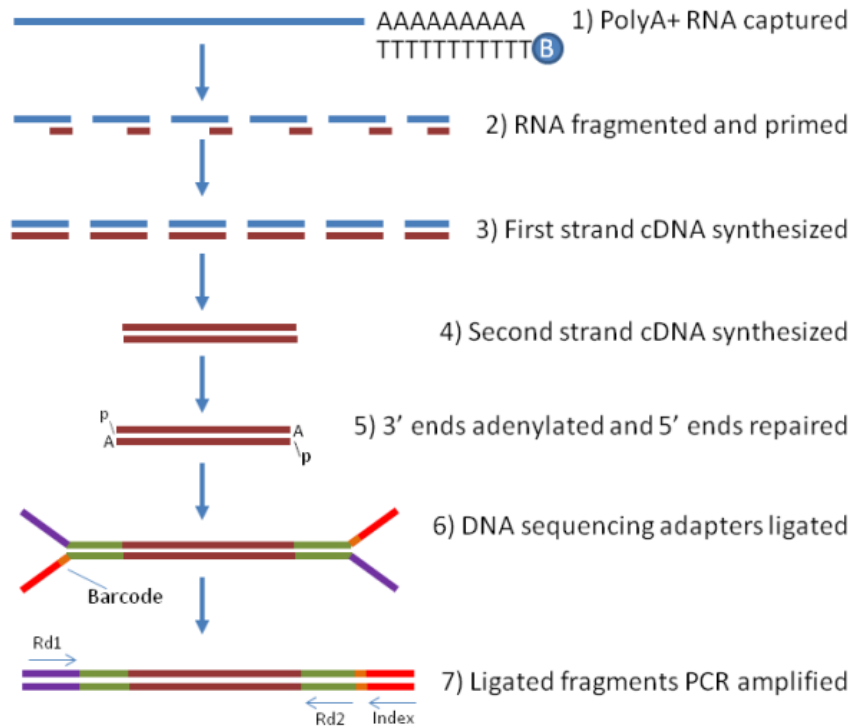
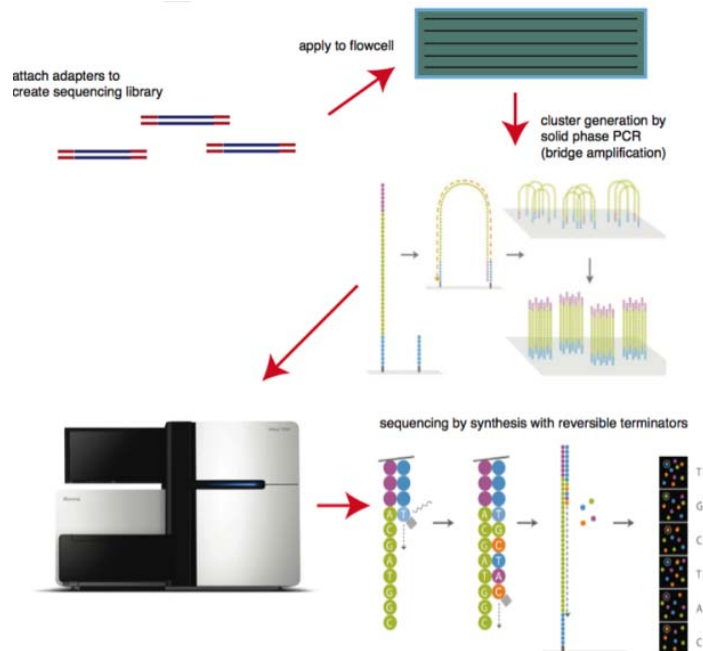


그림 153. TruSeq mRNA library 구축 요약도

- 구축된 mRNA-based library를 Illumina사의 Hiseq2500 Rapid mode를 통하여 염기서열 해독을 실시함. Bridge 증폭방식을 통하여 형성된 library cluster를 한 개씩 염기서열을 합성하면서 나오는 형광물질을 검출하는 방식으로 진행함 (그림 154).



<그림 154. Illumina 방식의 염기서열 해독>

- mRNA 염기서열 분석을 실시하기 위해서는 High-Quality 염기서열 분석이 필요하므로 총

전사체 정보에서 충분한 생산량이 필요하므로 1개 샘플당 최소 6 Gbp의 데이터 생산량을 목표로 진행함.

■ 생물정보학적 데이터 분석

- Illumina사의 염기서열 해독 시스템에서는 Real-time Analysis가 기본적으로 탑재되어 있어서 1 bp를 읽을 때마다 데이터 Quality를 확인 할 수 있으며 해독이 끝나면 Bcl 이라고 하는 이미지 파일을 CASAVA라는 2차 분석 장비를 통하여 초기 데이터 (Raw data)를 분석이 가능한 FASTQ 파일로 초기 데이터를 획득함 (그림 155).

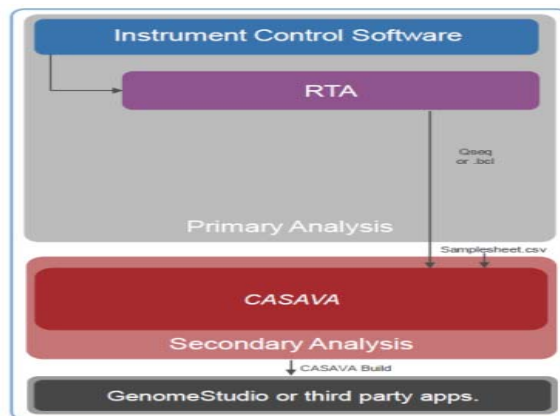


그림 155. 초기 데이터 분석 모식도

- 얻어진 초기 데이터에서 Illumina platform에 적용하기 위해 유전정보 양 끝단에 달았던 adaptor 올리고 서열을 Cutadapt 혹은 Sickle라는 프로그램을 이용하여 trimming을 실시한 후 생성된 data reads에 FastQC tool 프로그램을 이용하여 염기서열 Quality를 확인함.
- (1) 전사체 서열을 얻기 위한 조립과정에 앞서 서열 필터링 작업을 진행하였음. 서열필터링 작업은 서열 해독과정에서 생긴 잘못된 서열을 가진 리드(Read)나 혹은 어댑터 서열을 제거하고, 낮은 품질의 서열로 인한 조립 오류를 줄이기 위한 사전 작업으로 서열 조립 전 반드시 진행되어야함.
 - (2) 낮은 품질의 서열을 제거하기 위해서 서열 정보 중 N으로 나타난 염기의 비율이 전체 서열의 10% 이상 포함되어 있거나, Q20 미만의 염기가 20%이상인 리드가 제거되었으며, 평균 품질이 Q20 이하인 리드 역시 제거함.
- 생성된 Raw data에서 Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR)라는 프로그램을 이용하여 기존에 공개되어 있는 소 참조 유전체 (Bos taurus, bosTau8 (UMD 3.1.1) 2014)를 바탕으로 전사체 mapping을 실시함 (그림 156).

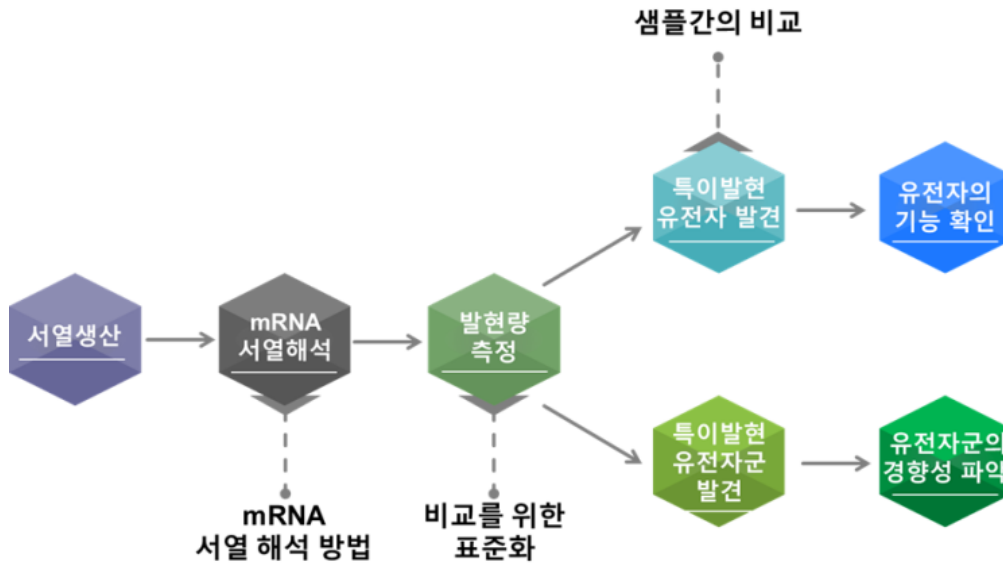


그림 156. RNA Sequencing 분석 개요

- 이미 한우 전체 유전체 (de novo assembly)가 높은 Quality가 있는 참조 유전체가 존재하고 있으므로 전사체의 발현 양 정량 및 분석 및 Alternative Splicing, novel transcriptome, gene annotation 등 분석할 수 있는 범위가 넓어지며 기대되는 결과를 얻을 수 있음 (그림 157).

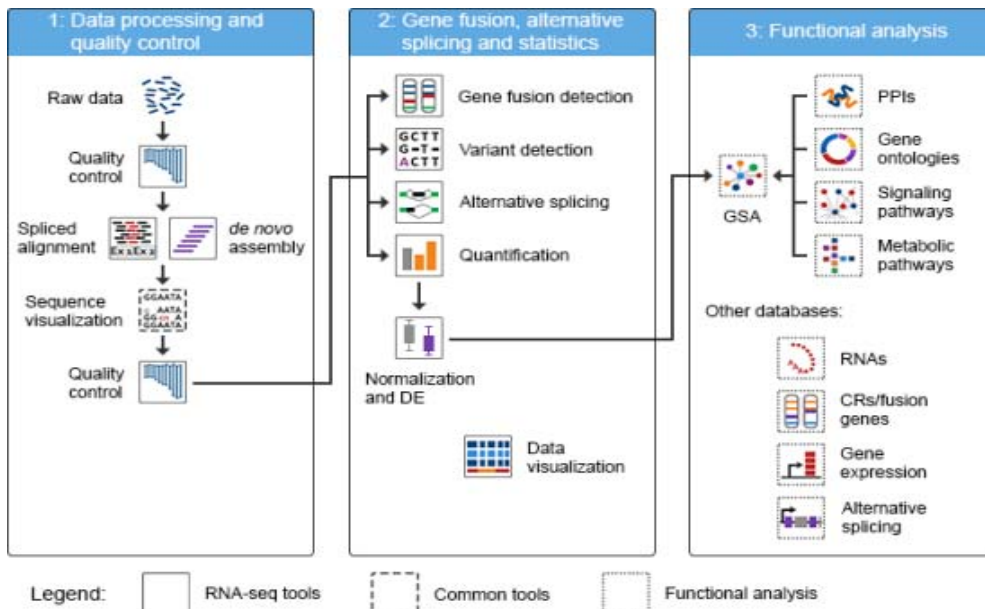


그림 157. 전사체 분석의 기본 순서도

- 유전자 발현 정량을 위해서 Cufflinks, edgeR, DESeq과 같은 프로그램을 사용하여 유전자의 상대적인 정량이 가능하며 Expression Analysis를 할 수 있음. 이는 발현하는 유전자의 차이를 확인할 수 있는 확실한 방법임 (그림 158).

Expression

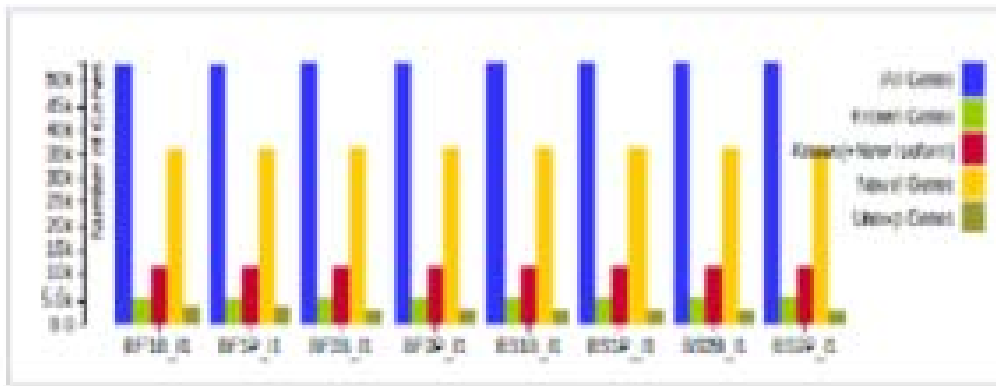


그림 158. 발현 분석

- Correlation Analysis는 시간별로 유전자 발현의 차이를 보는 것임. 본 연구의 개체는 임신 개월에 따라 전사체를 추출하였기 때문에 본 분석에도 유효값이 확인 될 것이라 예측함. 또 Differential Expression Gene (DEG) Analysis을 실시하여 특정 유전자 사이에 발현의 차이를 확실히 볼 수 있음(case-control comparative investigations)(그림 155).
- Gene Ontology Analysis는 DAVID, GeneMANIA 그리고 WEBGESTALT라는 프로그램을 이용하여 실시할 수 있음. 이들 프로그램은 다양한 데이터베이스를 기반으로 유전자의 상관관계를 통계학적으로 분석하여 유전자의 주요 기능을 예측하며 통계학적으로 유의한 결과를 도출할 것으로 예측됨.
- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)은 이미 정의된 다양한 Category의 유전자 set과 비교하여 입력된 유전자의 발현 패턴을 분석함으로써 어떠한 유전자 set이 통계적으로 유의미하게 연관되었는지 분석하는 기법임.
- Gene Structure Profiling을 통하여 전사체 구조의 변화형태를 알수 있고 이와 동시에 transcript variants의 발현양의 변화를 통하여 소의 임신에 따른 패턴변화를 확인하고자 함.

■ 적용

- 데이터 분석 결과 소의 비임신/임신 판단과 임신 개월에 따른 전사체 변화를 찾아낸 바 이를 진단검사학적 방법을 통하여 제품화를 할 수 있고 특정 유전자 영역의 발현 변화를 특허로 등록하여 한국 고유의 지적재산권을 획득할 수 있음.
- 소의 임신에 따른 특정 유전자의 변화를 혈액에서 진단검사학적인 방법으로 실시하여 기존의 사람의 물리적인 방법으로 실시하던 방식의 단점을 커버할 수 있으며 확실하고 경제적으로 유용한 진단검사 kit를 제품화 할 수 있음. 특정 유전자를 선별하여 탐침자 set을 등록하고 이를 이용한 분자생물학적 진단 기법인 Real-time PCR을 통하여 빠르고 확실하게 소의 임신 판단과 주차를 확인 할 수 있을 것이라 기대됨 (그림 159).

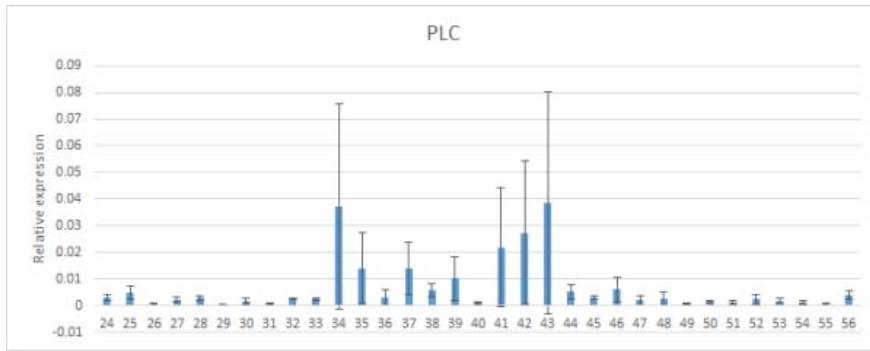


그림 159. qPCR을 통한 유전자 발현 변화를 바탕으로 진단검사

- 결론적으로, 소의 비임신/임신을 구분 짓는 확실한 유전자 변화를 발견하였고 이를 통하여 한국 고유의 지적재산권을 획득함과 동시에 제품화를 실시하여 소 사육 농가의 조기 임신 판단 검사를 통하여 사육 방향 및 준비를 선택할 수 있는 경제적 이득을 취할 수 있을 것으로 예측됨.

■ 연구개발 내용 및 결과

1. 한우 혈액 시료 채취(Sampling)

가. 선정된 한우 혈액 샘플링은 2016년 10월 10일(월) 경북 축산과학 기술연구소 예하의 축사에서 이루어 졌으며 비임신 한우 1두, 임신 3-4개월 3두, 임신 10개월 한우 3두 즉 총 7 한우 개체의 정맥으로부터 50cc정도의 혈액을 채취하였음.

나. 채취된 혈액으로부터 보존된 리보핵산(RNA)를 확보하기 위해 Qiagen사의 PAXgene Blood RNA kit를 사용하여 자연 발생하는 전사체의 분해속도를 최소화 시켜주고 혈액을 상온에서 RNA 안정화 시켜 분리 정제 및 재연성이 높은 RNA를 확보함.

- (1) Qiagen사의 PAXgene Blood RNA kit를 사용하여 분리된 혈액을 1.5ml 튜브에 넣고 Trizol(invitrogen) 500 μ l를 넣어 잘 섞은 후 13,200rpm에서 12분간 원심 분리함(참고 문헌 4 Shean, et al. 2011).
- (2) 상층액을 새로운 1.5ml 튜브에 옮긴 후 Chloroform 200 μ l를 넣고 즉시 inverting 한 후 5분간 상온에서 반응함.
- (3) 4 $^{\circ}$ C의 14,000rpm에서 10분간 원심 분리 후 상층액만 새로운 튜브에 옮김.
- (4) isoprophyl alchole을 200 μ l 넣은 후 inverting 한 후 10분간 상온에서 반응함.
- (5) 4 $^{\circ}$ C의 14,000rpm에서 12분간 원심 분리 후 상층액 제거함.
- (6) 80% 에탄올 400 μ l를 사용하여 남아있는 pellet을 washing한 후 14,000rpm에서 5분간 원심 분리함.

- (7) 남아있는 에탄올을 완전히 제거한 후 pellet을 건조시킨 후 RNase free H₂O 50 μ l를 넣어 완전히 녹임.
- (8) 추출한 RNA에 Qiagen RNase-free DNase kit의 DNase 2.5 μ l와 RDD buffer 10 μ l를 사용하여 남아있는 DNA를 분해함.
- (9) DNase처리한 RNA는 100% 에탄올 250 μ l을 넣어 잘 섞어준 후 Qiagen RNeasy mini kit의 컬럼에 넣고 14,000rpm에서 30초간 원심 분리 함.
- (10) 원심 분리한 컬럼은 새로운 collection 튜브에 넣고 RPE buffer 500 μ l를 넣고 14,000rpm에서 30초간 원심 분리함.
- (11) 원심 분리한 컬럼은 새로운 collection 튜브에 넣고 RPE buffer 500 μ l를 넣고 14,000rpm에서 2분간 한 번 더 원심 분리함.
- (12) 새로운 1.5ml tube에 컬럼을 넣고 컬럼의 막을 건조시킨 후 RNase free H₂O 50 μ l를 넣고 2분간 상온에서 반응 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리함.
- (13) 추출된 RNA는 -80 $^{\circ}$ C에서 보관함.

2. RNA 정량 정성 분석(QC)

가. RNA sample QC report

표 12. Sequencing을 위한 RNA sample QC 결과

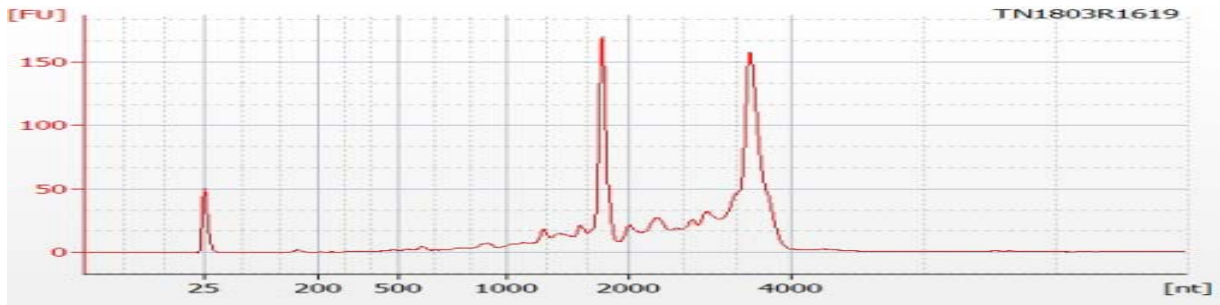
Case	Sample	Concentration (ng/ μ l)		NanoDrop	Volume (μ l)	Purity	28s/18s	Total Conc(ug)	
		BioAnalyzer						BioAnalyzer	
0주차	0W_25	47		64.96	92	8.10	2.00	4.32	5.98
	0W_31	36		59.36	92	8.60	2.10	3.31	5.46
	0W_36	65		76.16	87	7.10	1.90	5.66	6.63
2주차	2W_25	40		57.76	86	7.20	1.60	3.46	4.97
	2W_31	34		63.52	95	8.20	1.90	3.23	6.03
	2W_36	49		90.96	91	7.20	1.70	4.46	8.28
4주차	4W_25	110		110.56	95	6.90	1.80	10.45	10.50
	4W_31	31		66.80	93	7.00	1.70	2.88	6.21
	4W_36	65		72.72	90	7.10	1.90	5.85	6.55
4개월	13-130	214		216.22	34	7.28	7.35	8.80	1.60
	13-055	201		193.13	34	6.83	6.57	8.90	1.60
	구-366	102		80.70	35	3.57	2.83	8.80	1.70
10개월	13-67	247		200.62	34	8.40	6.82	8.90	1.80
	13-81	220		135.41	34	7.48	4.60	8.90	1.60
	14-075	225		205.92	34	7.65	7.00	8.5	1.6

나. RNA Sample 또한 Agilent사의 2100 BioAnalyzer를 이용하여 세 가지 판단 기준에 기초하여 (BAConcentration(ng/ul), RIN value, 28s/18s ratio) 품질을 평가함.

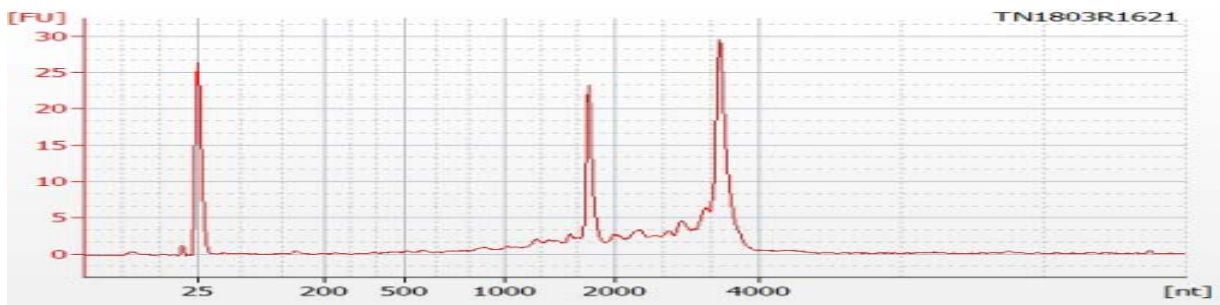
다. RNA seq을 진행한 7두의 한우 sample의 정량 정성 분석을 진행한 결과 비교적 적정 수준

인 평균 8.3의 시료를 사용하여 sequencing을 진행하였음(그림 160).

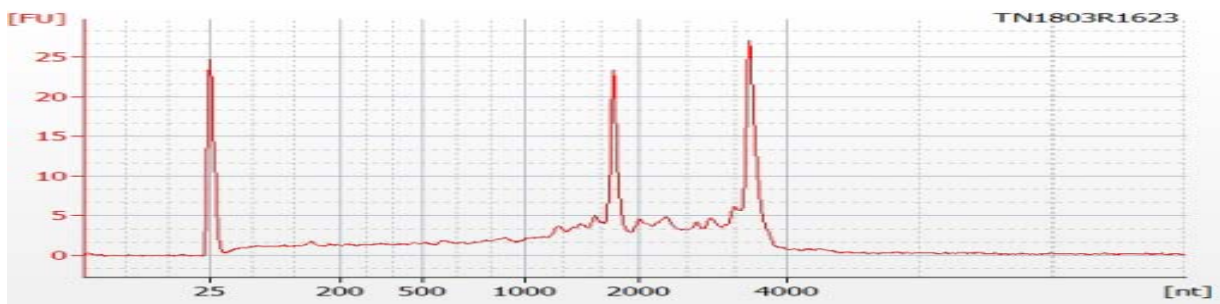
① 15-78(4589) 0주차_0W_25



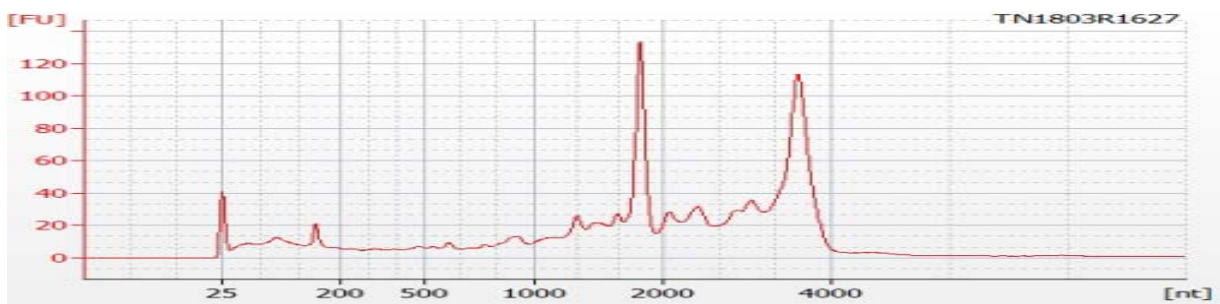
② 구-383(6017) 0주차_0W_31



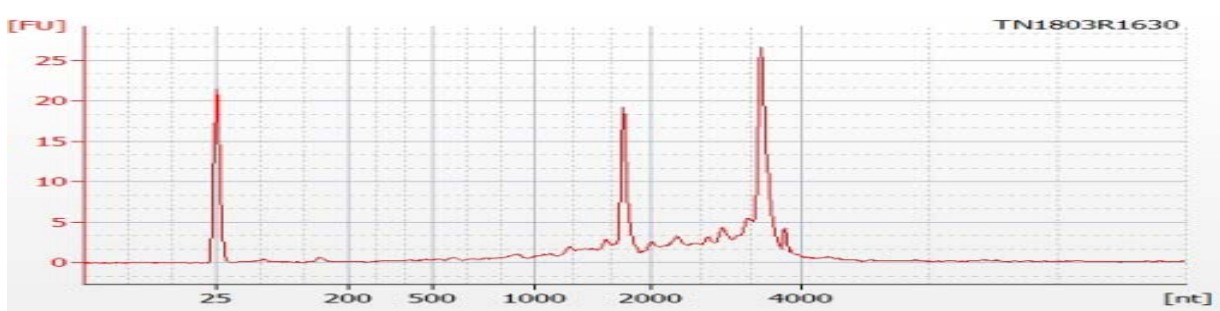
③ 15-65(0531) 0주차_0W_36



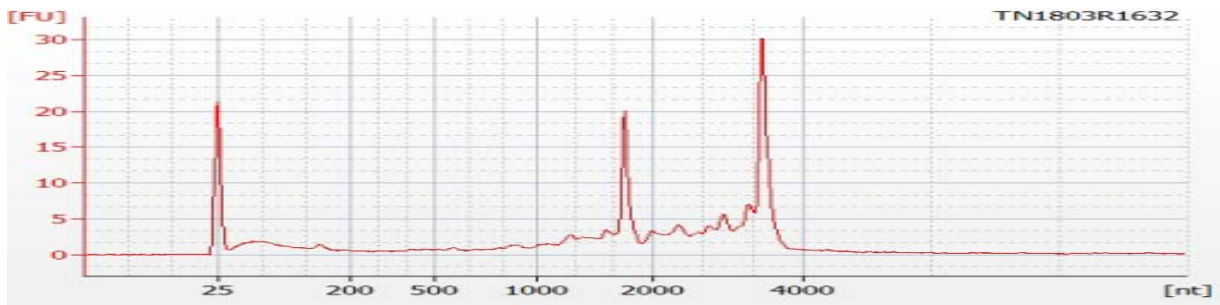
④ 15-78(4589) 2주차_2W_25



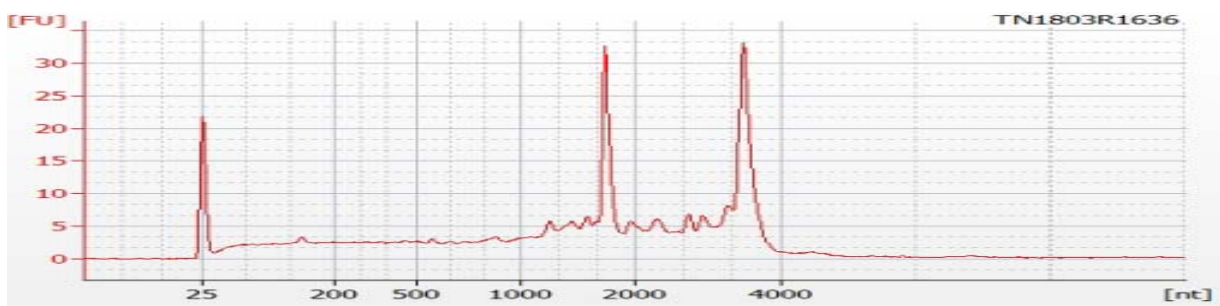
⑤ 구-383(6017) 2주차_2W_31



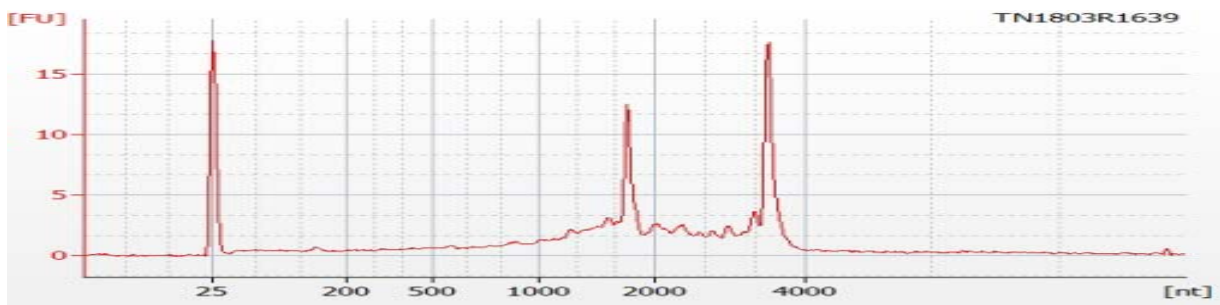
⑥ 15-65(0531) 2주차_2W_36



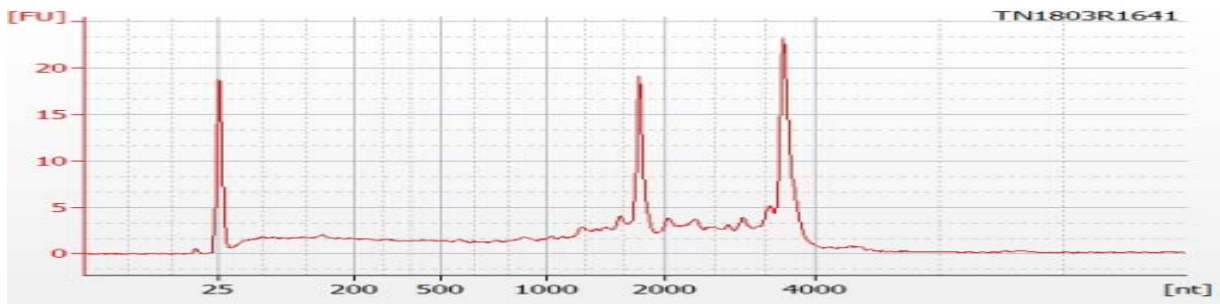
⑦ 15-78(4589) 4주차_4W_25



⑧ 구-383(6017) 4주차_4W_31



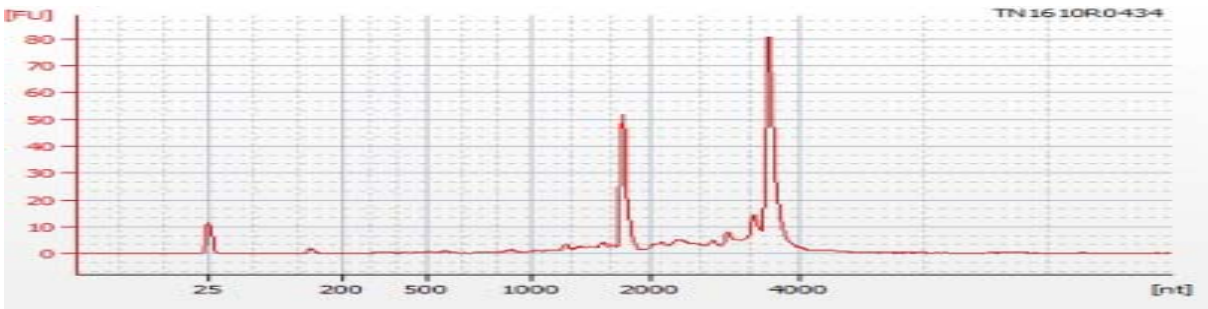
⑨ 15-65(0531) 4주차_4W_36



⑩ 경북 축기 13-05-0130 (13-130) 임신 3개월



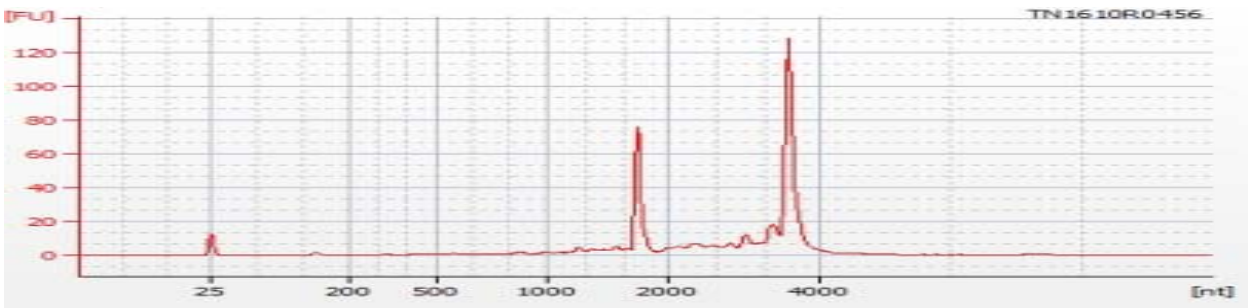
⑪ 경북 축기 경북축기13-04-0055 (13-055) 임신 3개월



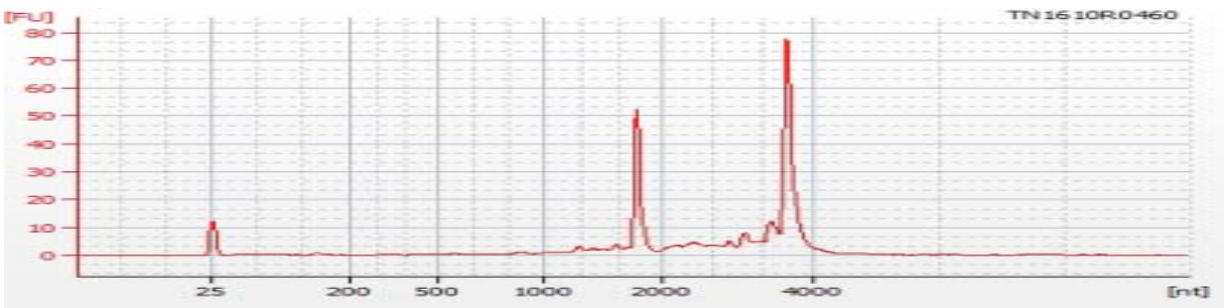
⑫ 곤양11-03-4359 (구-366) 임신 3개월



⑬ 경북축기13-03-0067 (13-67) 임신 10개월



⑭ 경북축기13-05-0081 (13-81) 임신 10개월



⑮ 경북축기14-05-0075 (14-75) 임신 10개월

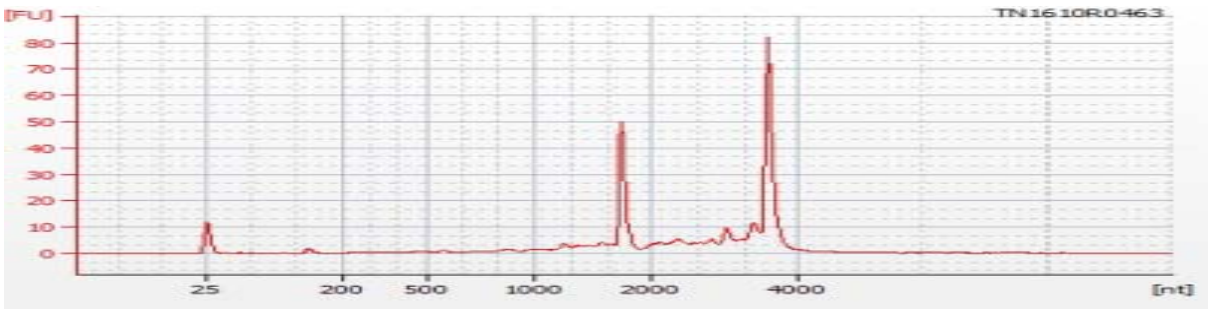


그림 160. RNA Purification 정량정성 분석 결과

3. Sequencing Library 제작 결과

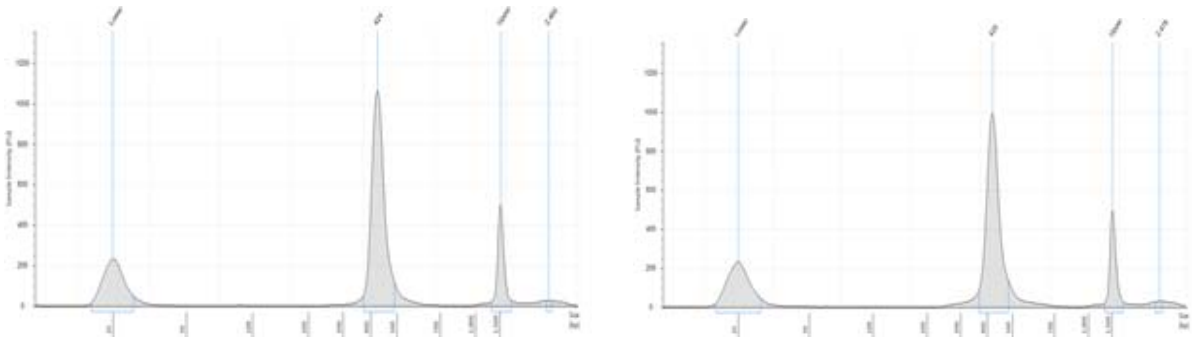


그림 161. RNA Sequencing library TapeStation 이미지 예

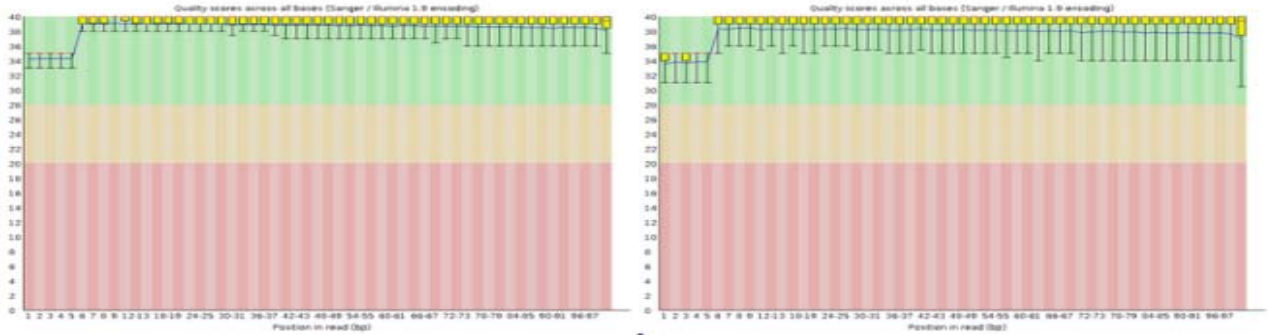
가. Bioanalyzer와 tape station을 이용하여 adaptor-ligated library의 정량을 확인 하였으며 sequencing에 적합한 농도의 library를 구축하였음.

나. Tape를 이용한 구축된 RNA Sequencing Library DNA pattern 확인한 결과 400-500 bp 범위 확인함(그림 161).

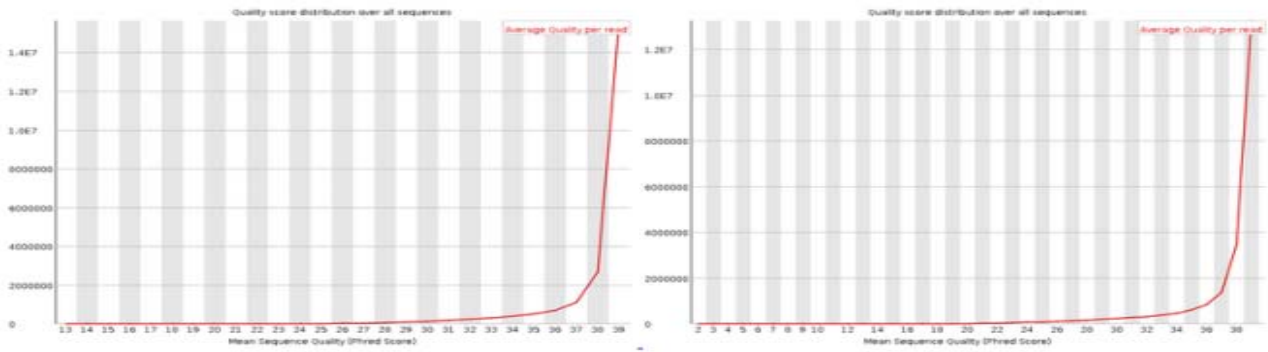
4. 시퀀싱 데이터 생물정보학적 정량 정성 분석

① 15-78(4589) 0주차_0W_25

Base Sequence Quality

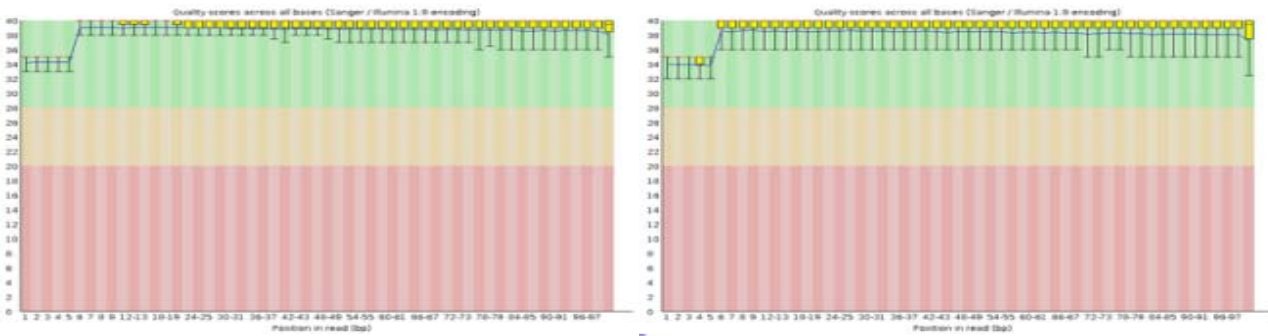


Sequence Quality Scores

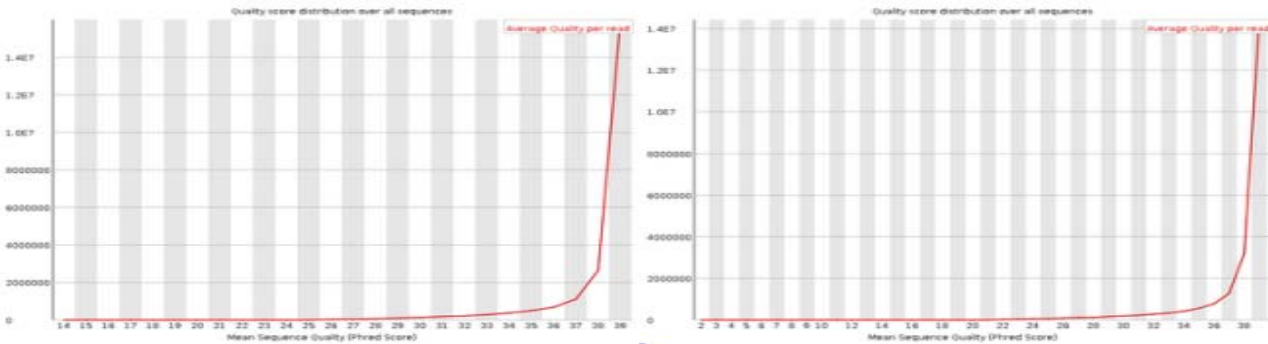


② 구-383(6017) 0주차_0W_31

Base Sequence Quality

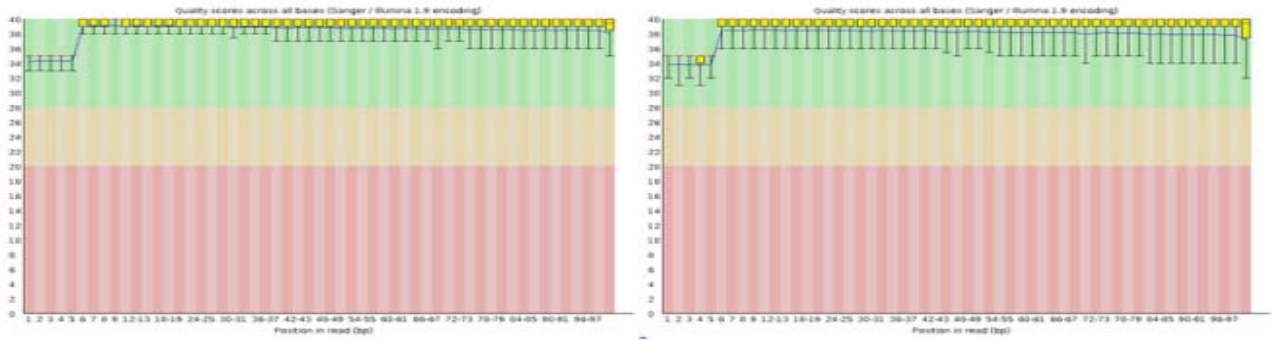


Sequence Quality Scores

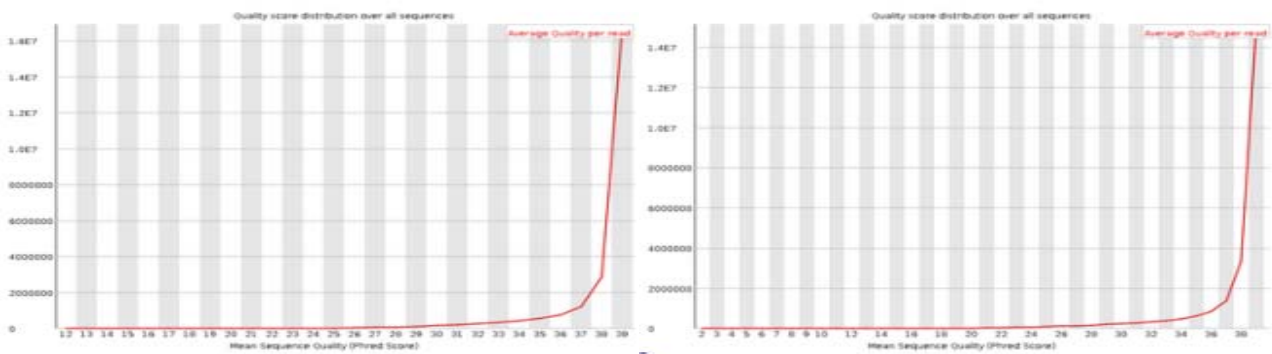


③ 15-65(0531) 0주차_0W_36

Base Sequence Quality

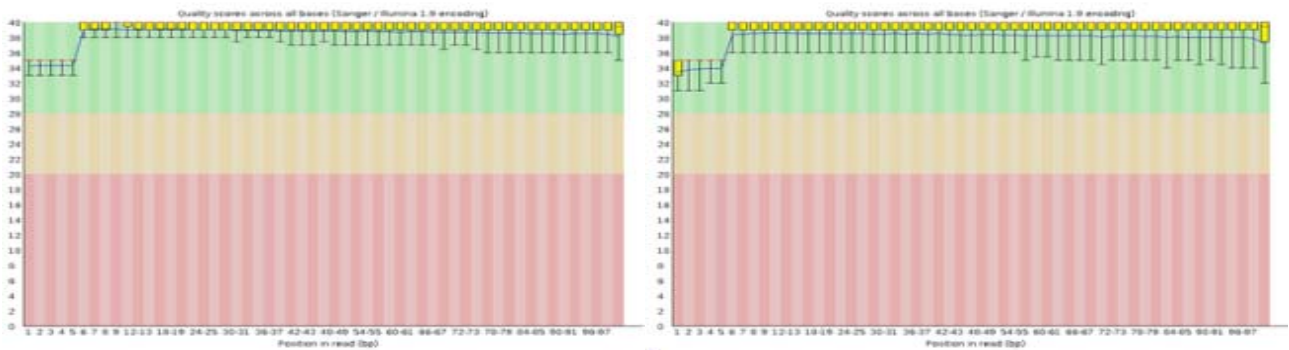


Sequence Quality Scores

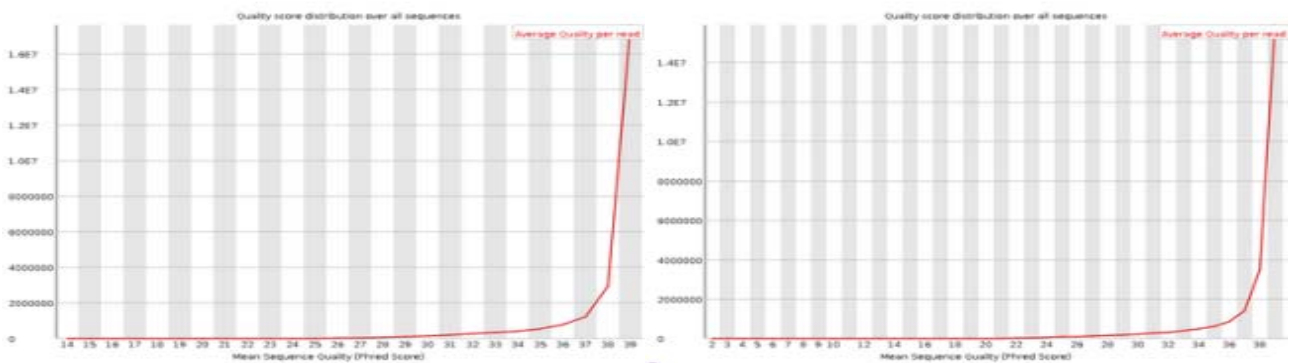


④ 15-78(4589) 2주차_2W_25

Base Sequence Quality

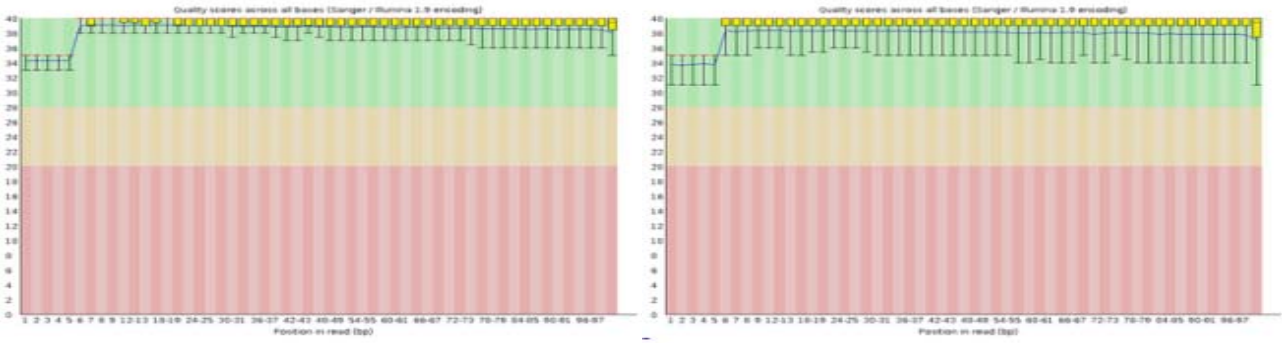


Sequence Quality Scores

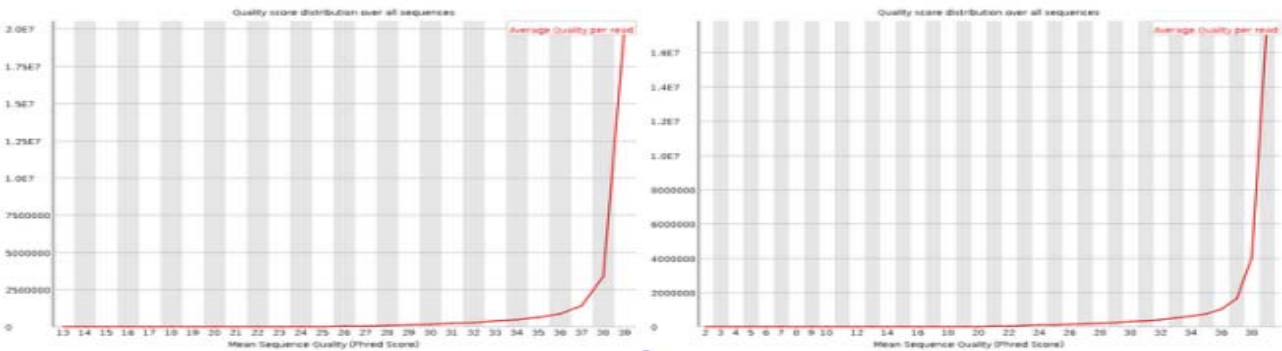


⑤ 구-383(6017) 2주차_2W_31

Base Sequence Quality

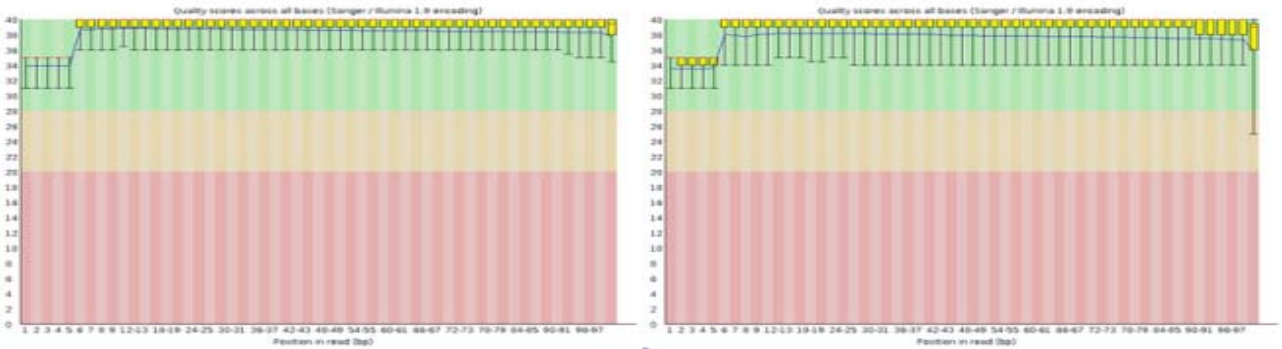


Sequence Quality Scores

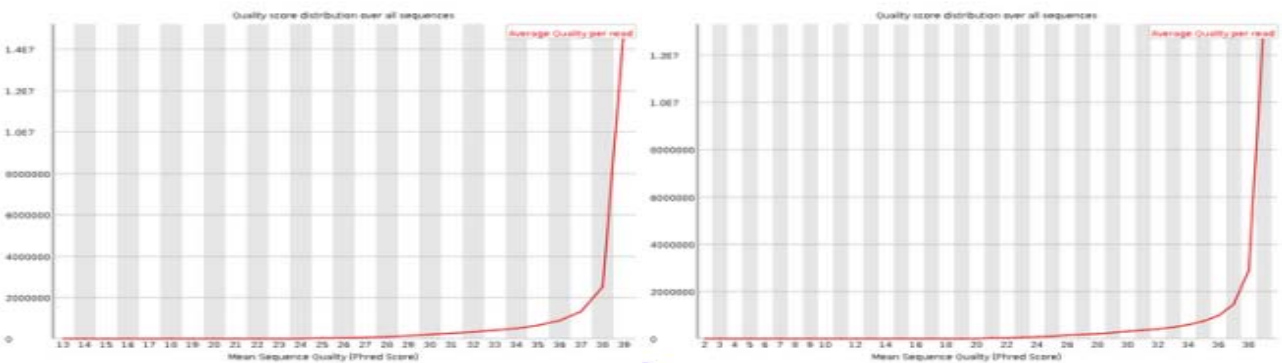


⑥ 15-65(0531) 2주차_2W_36

Base Sequence Quality

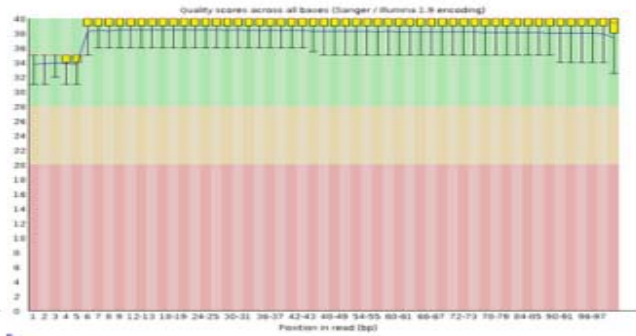
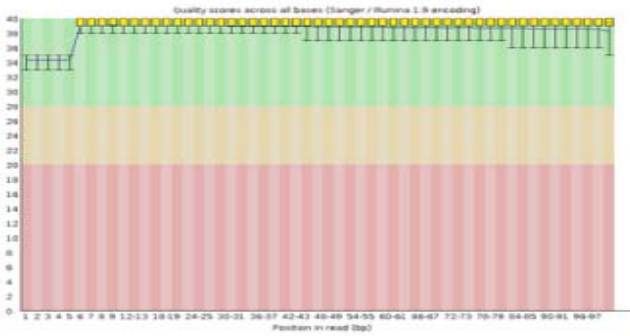


Sequence Quality Scores

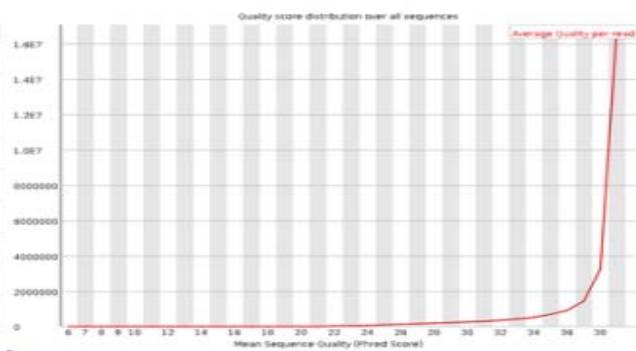
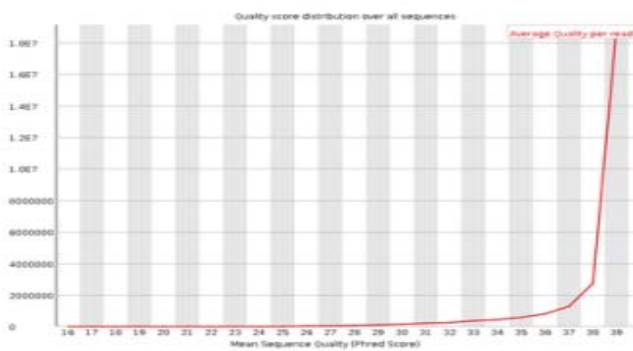


⑦ 15-78(4589) 4주차_4W_25

Base Sequence Quality

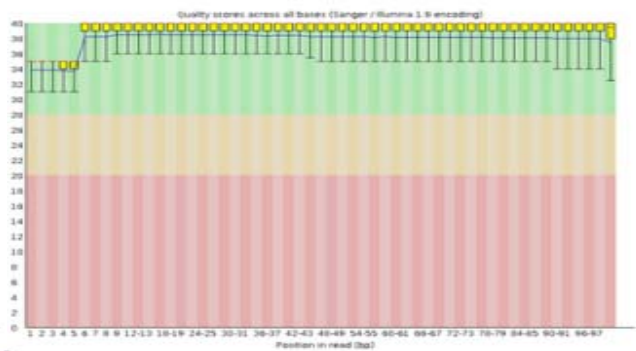
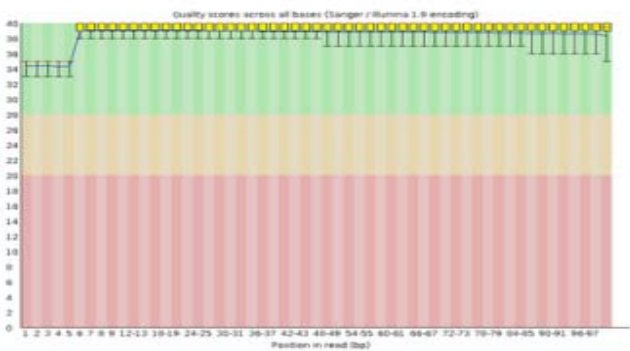


Sequence Quality Scores

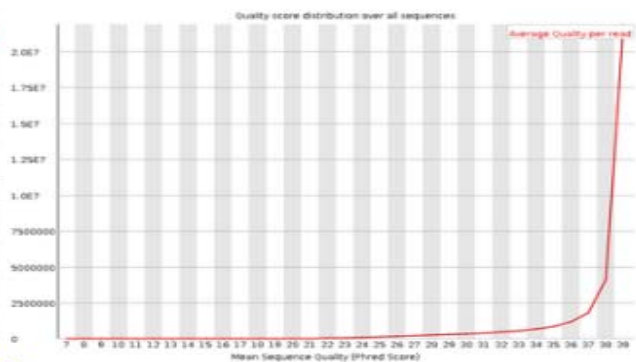
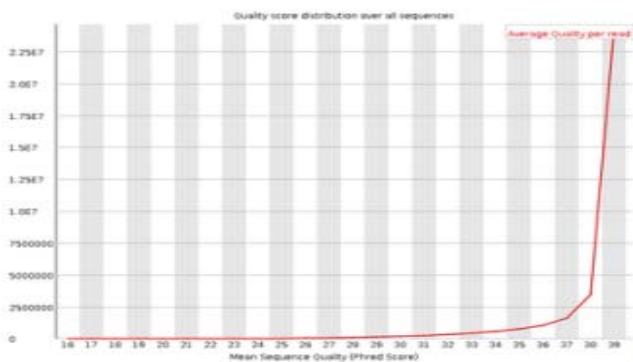


⑧ 구-383(6017) 4주차_4W_31

Base Sequence Quality

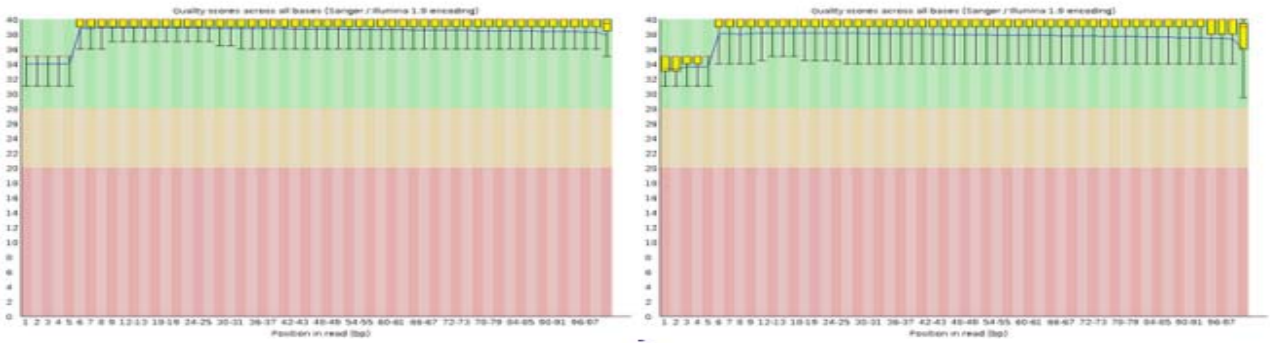


Sequence Quality Scores

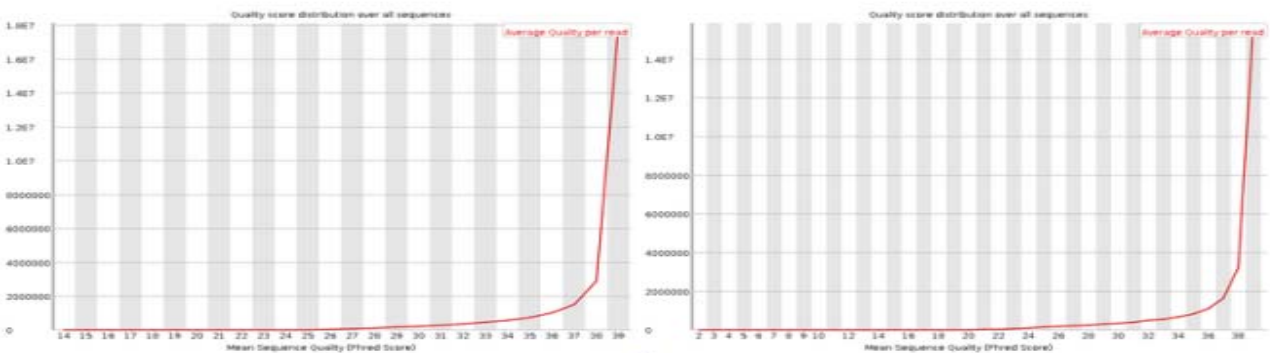


© 15-65(0531) 4주차_4W_36

Base Sequence Quality

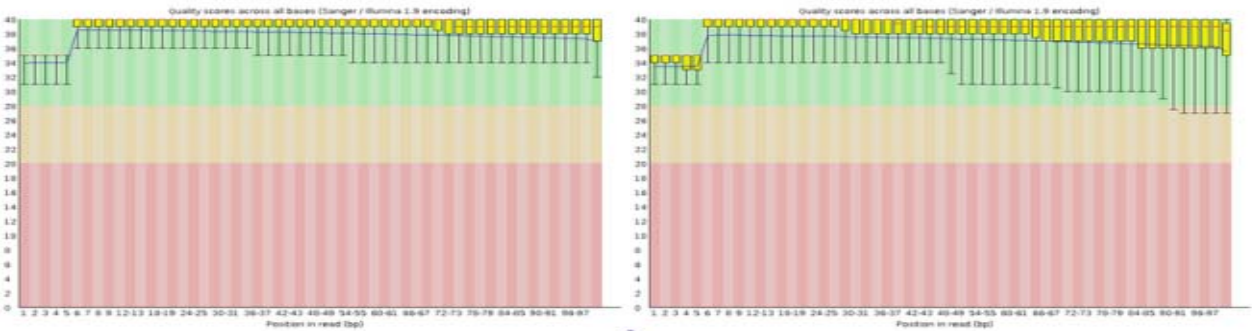


Sequence Quality Scores

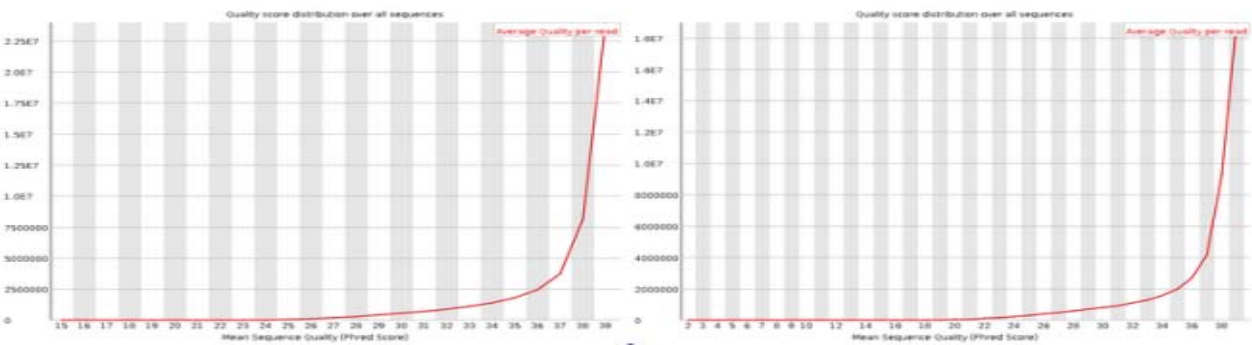


⑩ 경북 측기 13-05-0130 (13-130) 임신 3개월

Base Sequence Quality

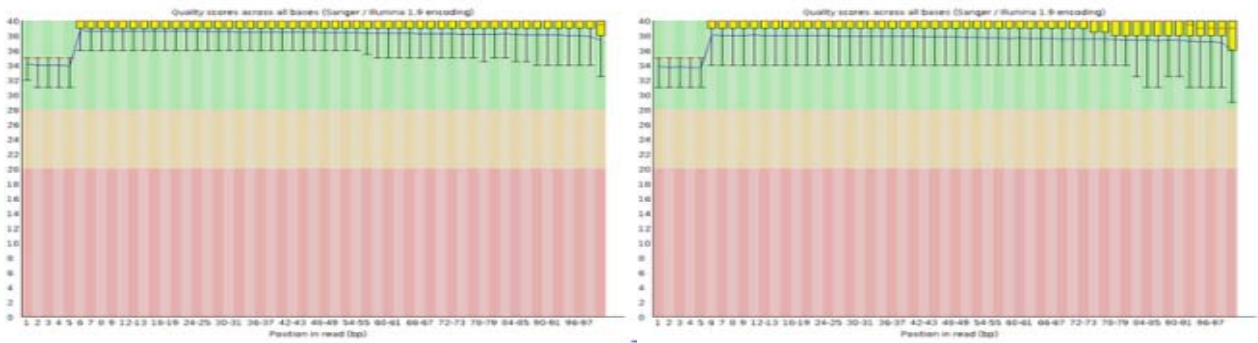


Sequence Quality Scores

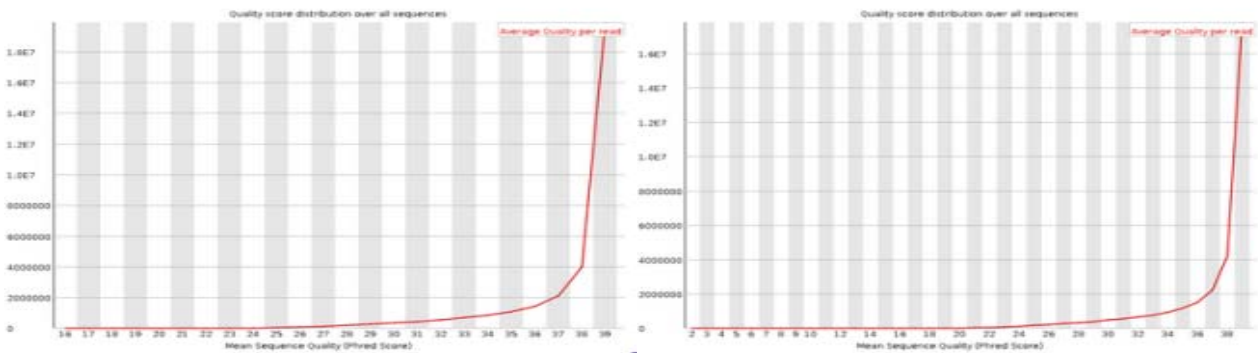


① 경북 측기 경북측기13-04-0055 (13-055) 임신 3개월

Base Sequence Quality

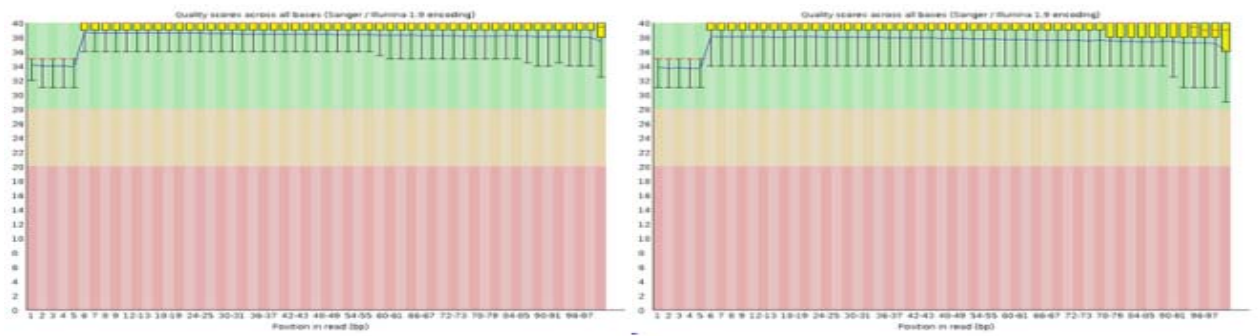


Sequence Quality Scores

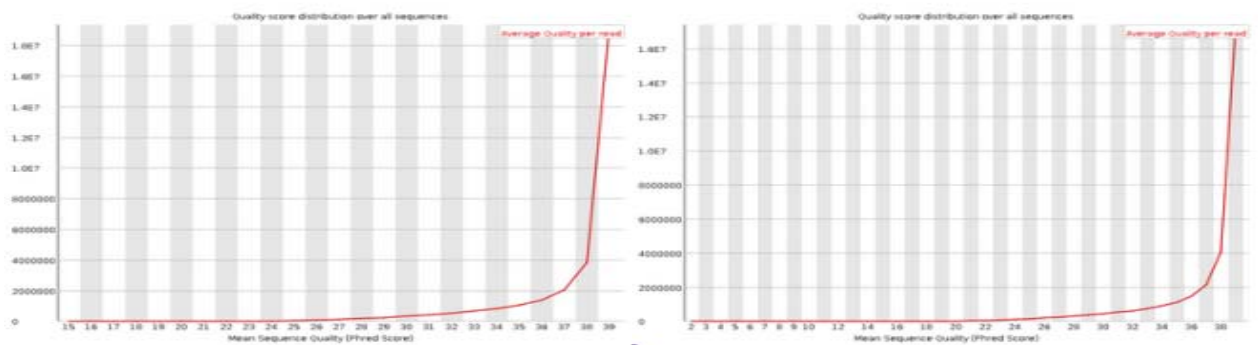


② 곤양11-03-4359 (구-366) 임신 3개월

Base Sequence Quality

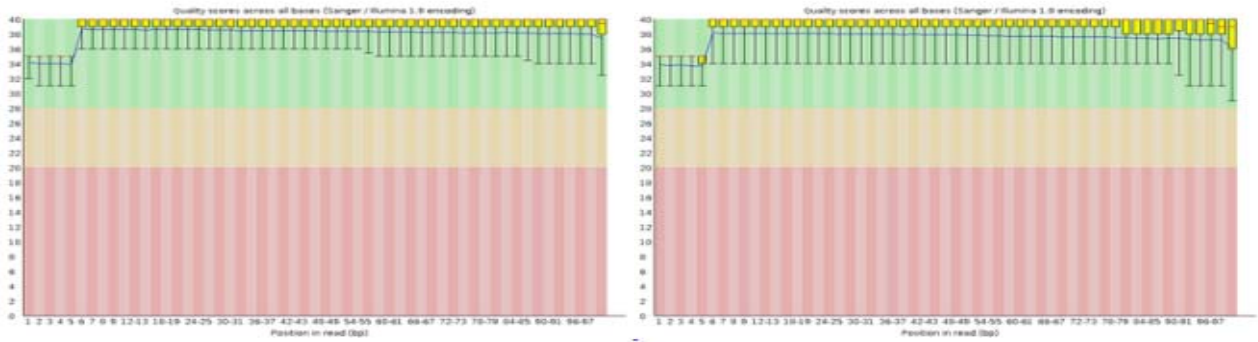


Sequence Quality Scores

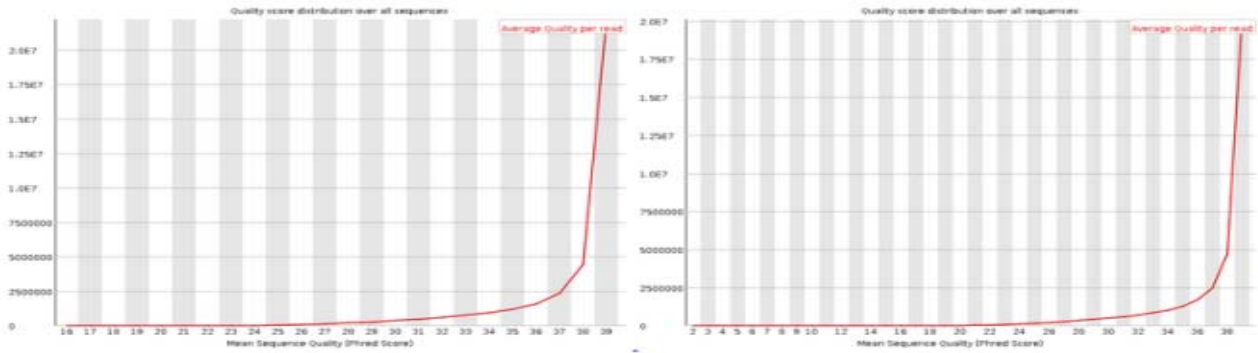


⑬ 경북축기13-03-0067 (13-67) 임신 10개월

Base Sequence Quality

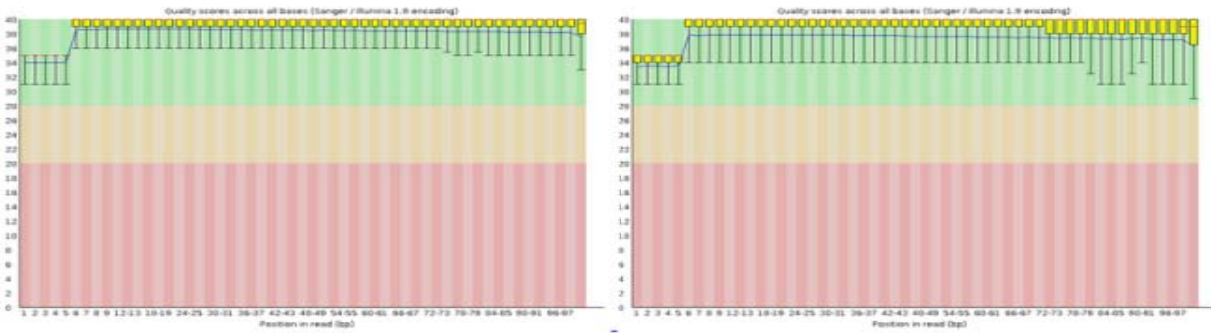


Sequence Quality Scores

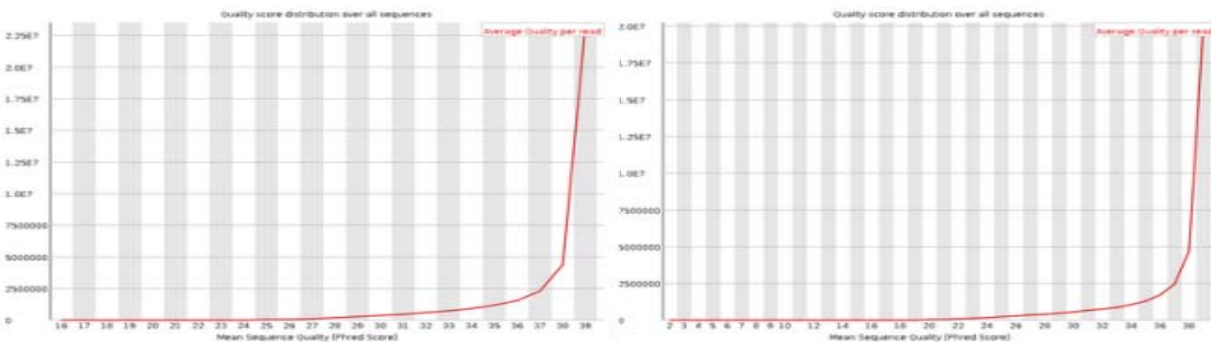


⑭ 경북축기13-05-0081 (13-81) 임신 10개월

Base Sequence Quality

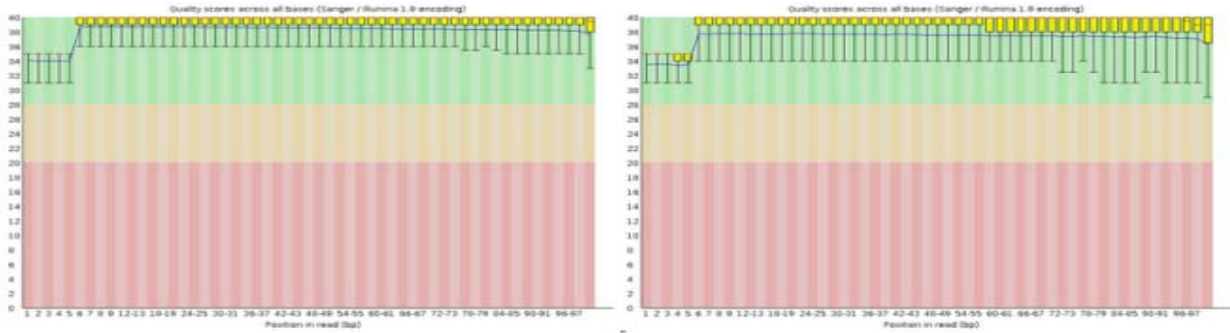


Sequence Quality Scores



⑮ 경북축기14-05-0075 (14-75) 임신 10개월

Base Sequence Quality



Sequence Quality Scores

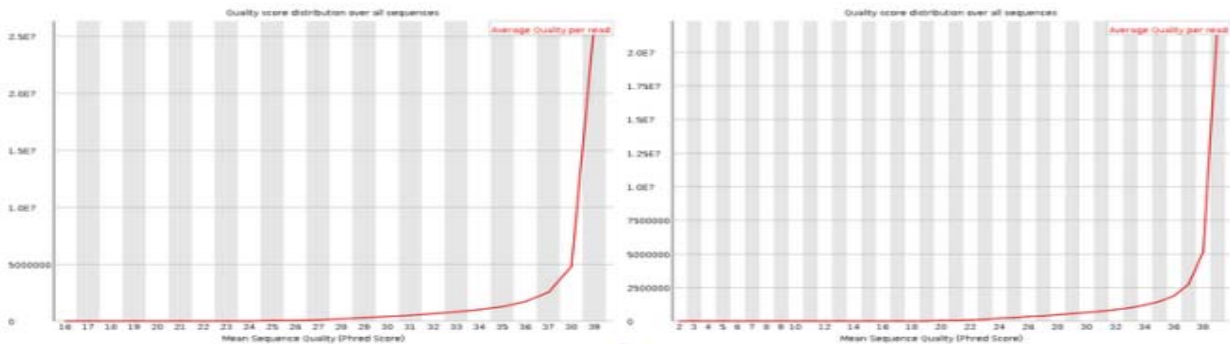


그림 162. 생산된 염기서열 데이터의 정량 및 정성 분석 결과

(가) Base quality

- ① 왼쪽은 Read 1, 오른쪽은 Read 2를 나타냄.
- ② X축 - Reads에서 position (bp), Y축 - Base들의 quality score (QS).
- ③ $QS \geq 30$ 이상이면 시퀀싱 에러율 0.1% 이하를 의미함.

(나) Base quality score

- ① 왼쪽은 Read 1, 오른쪽은 Read 2를 나타냄.
- ② X축 - Base quality score (QS), Y축 - Base들의 수.
- ③ 그래프에서 가장 peak를 보이는 지점이 read의 평균 quality score.

가. 생산된 염기서열 데이터를 Fastqc 과정을 통해 N을 포함하거나 정해진 read quality에 적합한지 정량 정성 분석을 진행하였음(그림 161).

- Data 필터 기준은 아래와 같음

- (1) Trim 5', 3' terminal bases with extreme high GC fraction.
- (2) N constitutes 가 2% 이상인 reads와 polyA 구조의 reads 필터.
- (3) 낮은 퀄리티의 reads 필터. large insert-size 라이브러리 내에 quality score 7 이하의 bases가 60% 이상인 read 삭제. short insert-size 라이브러리 내에 quality score 7 이하인 bases가 40% 이상인 read 삭제.
- (4) adapter contamination된 reads 삭제. 10bp align 했을 때 3bp 이상 mismatch 된 read 삭제.
- (5) read1과 read2를 overlapped 했을 때 10bp 이상 mismatch 된 reads 삭제.
- (6) PCR duplicates 삭제.

5. 시퀀싱 데이터 생산 및 생물 정보학적 분석

(1) 생산된 서열 데이터 요약

표 13. RNA sequencing thumbnail

No	Name	Raw reads	Mapped reads		Uniquely Mapped reads		Genes	
							Expressed genes	Unexpressed genes
1	Control_1	44,601,774	40,636,357	92.40%	28,302,655	64.30%	13,450	4,240
2	Control_2	44,999,134	41,415,307	92.90%	26,598,297	59.70%	13,961	3,729
3	Control_3	48,229,432	43,594,121	91.60%	35,579,407	74.80%	14,119	3,571
4	2 Week_1	50,000,720	45,622,361	92.30%	34,039,018	68.90%	14,266	3,424
5	2 Week_2	57,992,726	53,124,293	93.00%	34,018,128	59.50%	14,021	3,669
6	2 Week_3	45,635,876	41,124,251	91.70%	35,239,975	78.60%	13,719	3,971
7	4 Week_1	53,054,928	48,824,169	93.20%	39,842,795	76.00%	13,367	4,323
8	4 Week_2	67,681,756	61,565,015	92.10%	52,831,314	79.00%	13,518	4,172
9	4 Week_3	53,519,120	48,417,421	92.00%	41,858,467	79.60%	13,495	4,195
10	16 Week_1	92,101,686	82,543,464	91.50%	80,650,958	89.40%	15,039	2,651
11	16 Week_2	64,551,668	57,380,064	90.40%	56,160,297	88.50%	14,693	2,997
12	16 Week_3	62,476,796	55,717,252	90.60%	54,556,576	88.80%	14,576	3,114
13	40 Week_1	71,945,084	63,712,225	90.00%	62,515,398	88.30%	14,736	2,954
14	40 Week_2	81,952,992	72,703,623	90.80%	70,825,033	88.40%	15,279	2,411
15	40 Week_3	73,690,778	64,954,973	90.00%	63,296,578	87.70%	15,049	2,641

가. RNA-seq 데이터를 초기 분석을 진행한 결과 15두의 한우 sample에서 동일한 수준의 데이터가 생산되었으며 평균 6.08 Gb의 방대한 양의 RNA seq data를 생산함(참고 문헌 8. Pan, et al. 2015).

나. 정량 정성 분석(Read QC)를 통해 평균 약 91.36%의 sequencing data를 얻을 수 있었음.

다. 전체 정성 분석된 데이터는 4.77 Gb data를 얻을 수 있었음(표 13).

(2) 비임신과 임신 한우의 비교유전학적 분석 및 발현량 측정

가. 생산된 RNA seq 데이터를 기반으로 각 Sample별 전사체의 발현량을 분석하기 위해 비임신 한우와 2, 4주차 그리고 임신 3-4개월과 10개월 차 한우의 그룹별로 비교유전체학적 분석을 진행함(그림 162).

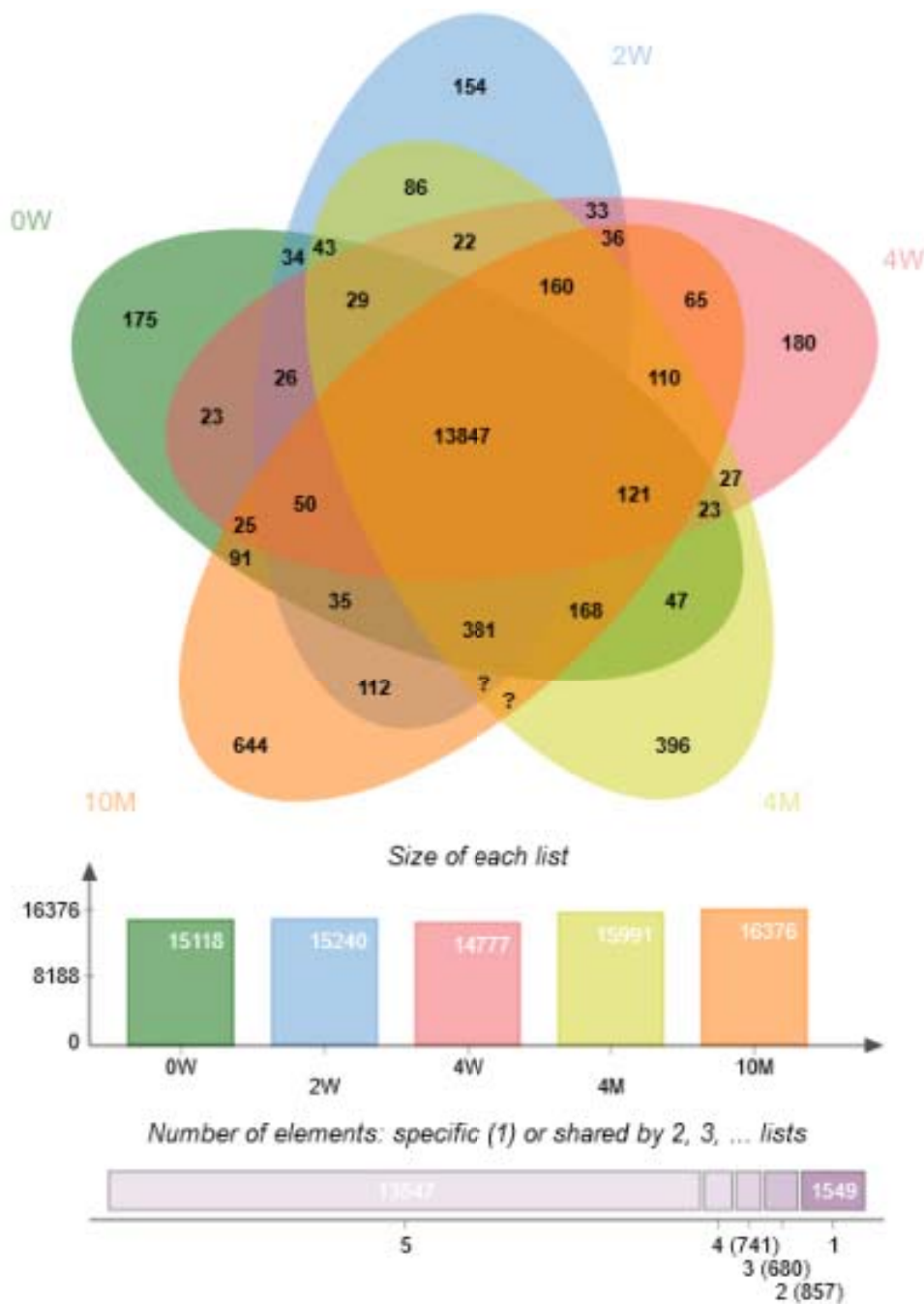


그림 162. 비임신/임신 한우 15두 혈액 내 발현 유전자



그림 163. 비임신과 임신 한우의 유전자 발현량 및 차이 분석 개요

표 14. RNA DEG분석 비교 set

	DEG 분석	Based on	UMD 3.1		DEG 분석	Based on	UMD 3.1
I	0W_25	VS	2W_25	VI	2W_25	VS	P4_1
	0W_31		2W_31		2W_31		P4_2
	0W_36		2W_36		2W_36		P4_3
II	0W_25	VS	4W_25	VII	2W_25	VS	P10_1
	0W_31		4W_31		2W_31		P10_2
	0W_36		4W_36		2W_36		P10_3
III	0W_25	VS	P4_1	VIII	4W_25	VS	P4_1
	0W_31		P4_2		4W_31		P4_2
	0W_36		P4_3		4W_36		P4_3
IV	0W_25	VS	P10_1	VIII	4W_25	VS	P10_1
	0W_31		P10_2		4W_31		P10_2
	0W_36		P10_3		4W_36		P10_3
V	2W_25	VS	4W_25	X	P4_1	VS	P10_1
	2W_31		4W_31		P4_2		P10_2
	2W_36		4W_36		P4_3		P10_3

표 15. 한우 샘플별 발현 유전자 및 전사체 분석 Cluster

Name	Gene					Transcript			
	SUM	KNOWN	Novel	MOD	UNEXP	SUM	KNOWN	Novel	UNEXP
0W_25	13,450	13,450	0	0	4,240	14,866	14,866	0	4,644
0W_31	13,961	13,961	0	0	3,729	15,437	15,437	0	4,073
0W_36	14,119	14,119	0	0	3,571	15,612	15,612	0	3,898
2W_25	14,266	14,266	0	0	3,424	15,754	15,754	0	3,756
2W_31	14,021	14,021	0	0	3,669	15,507	15,507	0	4,003
2W_36	13,719	13,719	0	0	3,971	15,174	15,174	0	4,336
4W_25	13,367	13,367	0	0	4,323	14,780	14,780	0	4,730
4W_31	13,518	13,518	0	0	4,172	14,932	14,932	0	4,578
4W_36	13,495	13,495	0	0	4,195	14,927	14,927	0	4,583
P4_1	15,039	15,039	0	0	2,651	16,623	16,623	0	2,887
P4_2	14,693	14,693	0	0	2,997	16,262	16,262	0	3,248
P4_3	14,576	14,576	0	0	3,114	16,147	16,147	0	3,363
P10_1	14,736	14,736	0	0	2,954	16,299	16,299	0	3,211
P10_2	15,279	15,279	0	0	2,411	16,877	16,877	0	2,633
P10_3	15,049	15,049	0	0	2,641	16,632	16,632	0	2,878

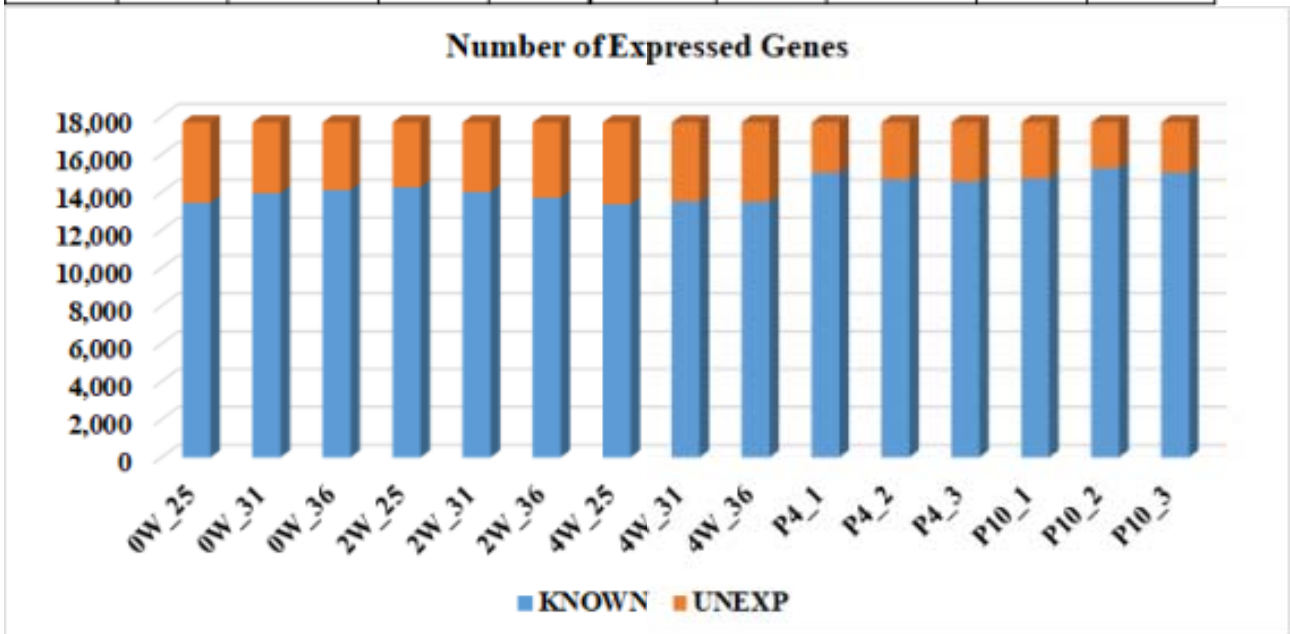


그림 164. 발현되는 Total transcripts와 Known transcripts의 분포

나. [표15]와 같이 평균 1만7천개의 발현 유전자와 1만9천개의 발현된 transcript를 비교 분석하여 평균 1만 8천개 이상의 발현되는 유전자와 전사체를 분류함(그림 163).

6. Differentially expressed gene (DEG) 분석을 통한 임신 특이적 유전자 발현 조사

- 가. DEG 분석을 통한 한우 비임신 & 임신 그룹별 발현량 조사를 통해 임신 한우에서만 특이적으로 발현하고 있는 유전자 군을 동정하였음.
- 나. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 2주차 임신 한우(2W_25, 2W_31, 2W_36) 유전자 발현 차이를 비교한 결과 총 393개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 120개의 유전자가 2주차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 273개의 유전자가 비임신 한우에 비해 특이적으로 낮은 발현량을 보였음.
- 다. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 4주차 임신 한우(4W_25, 4W_31, 4W_36) 유전자 발현 차이를 비교한 결과 총 1200개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 559개의 유전자가 4주차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 641개의 유전자가 비임신 한우에 비해 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었음.
- 라. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 3-4개월 임신 한우(P4_1, P4_2, P4_3) 유전자 발현차이를 비교한 결과 총 7446개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 4064개의 유전자가 3-4개월 차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 3382개의 유전자가 비임신 한우에 비해 특이적으로 낮은 발현량을 보였음
- 마. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 10개월 차 만삭 한우(P10_1, P10_2, P10_3) 유전자 발현차이를 비교한 결과 총 6035개의 유전자에서 유효한 발현차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 이 중 3518개의 유전자가 10개월 차 임신 한우에서 특이적으로 높은 발현량을 보였으며 2517개의 유전자가 비임신 한우에 비해 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었음.
- 라. 샘플간의 유사성을 비교분석하기 위해 Correlation분석과 MDS plot을 이용한 통계적 분석을 통해 유사성을 조사하였음. 조사한 결과 다른 2주차 4주차의 임신한우 보다 임신 3-4개월과 10개월 그룹 간에 유효한 관계성을 가지는 것을 확인함(그림 165, 166).
- 분현된 유전자 정보를 기반으로 샘플사이의 유사성에 대한 점검이 필요함.
 - 특히 Replication 이나 Time Series Data 의 경우 예상과 같은 결과를 가지고 있는 지 확인 필요함

Pearson Correlation

Correlation Ranges	1.0-0.90 (The Stronger the Correlation)	0.90-0.80	0.80-0.70	0.70-0.60
--------------------	--	-----------	-----------	-----------

- Pearson correlation coefficient between PFDs of genes of samples
- Pearson correlation coefficient between log2(PFDs) of genes of samples
- Number of genes expressed in both the samples

	DW_25 (PFDs/Log2-PFDs)	DW_21 (PFDs/Log2-PFDs)	DW_28 (PFDs/Log2-PFDs)	DW_26 (PFDs/Log2-PFDs)	DW_31 (PFDs/Log2-PFDs)	DW_38 (PFDs/Log2-PFDs)	4W_25 (PFDs/Log2-PFDs)	4W_31 (PFDs/Log2-PFDs)	4W_38 (PFDs/Log2-PFDs)	PA_1 (PFDs/Log2-PFDs)	PA_2 (PFDs/Log2-PFDs)	PA_3 (PFDs/Log2-PFDs)	DW (PFDs/Log2-PFDs)	PI0_1 (PFDs/Log2-PFDs)	PI0_2 (PFDs/Log2-PFDs)	PI0_3 (PFDs/Log2-PFDs)
DW_25	0.888 12,393	0.835 12,393	0.879 12,393	0.796 12,393	0.865 12,393	0.861 12,767	0.799 11,603	0.863 12,637	0.860 12,861	0.820 13,148	0.892 13,038	0.895 13,087	0.920 13,088	0.918 13,084	0.931 13,131	0.928 13,062
DW_21	0.868 12,393	0.875 13,211	0.833 13,211	0.879 13,211	0.868 13,211	0.879 13,211	0.865 13,211	0.867 13,211	0.872 13,211	0.866 13,211	0.893 13,211	0.899 13,211	0.907 13,211	0.907 13,211	0.902 13,211	0.901 13,211
DW_28	0.828 12,393	0.875 12,393	0.868 12,393	0.842 12,393	0.868 12,393	0.842 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393	0.828 12,393
DW_26	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393	0.879 12,393
DW_31	0.796 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393
DW_38	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393	0.868 12,393
4W_25	0.799 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603	0.865 12,603
4W_31	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603	0.871 12,603
4W_38	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881	0.824 12,881
PA_1	0.848 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148	0.899 13,148
PA_2	0.767 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038	0.820 13,038
PA_3	0.768 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087	0.818 13,087
DW	0.920 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088	0.907 13,088
PI0_1	0.751 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084	0.812 13,084
PI0_2	0.808 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131	0.871 13,131
PI0_3	0.765 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062	0.821 13,062

그림 165. Pearson Correlation 분석 결과

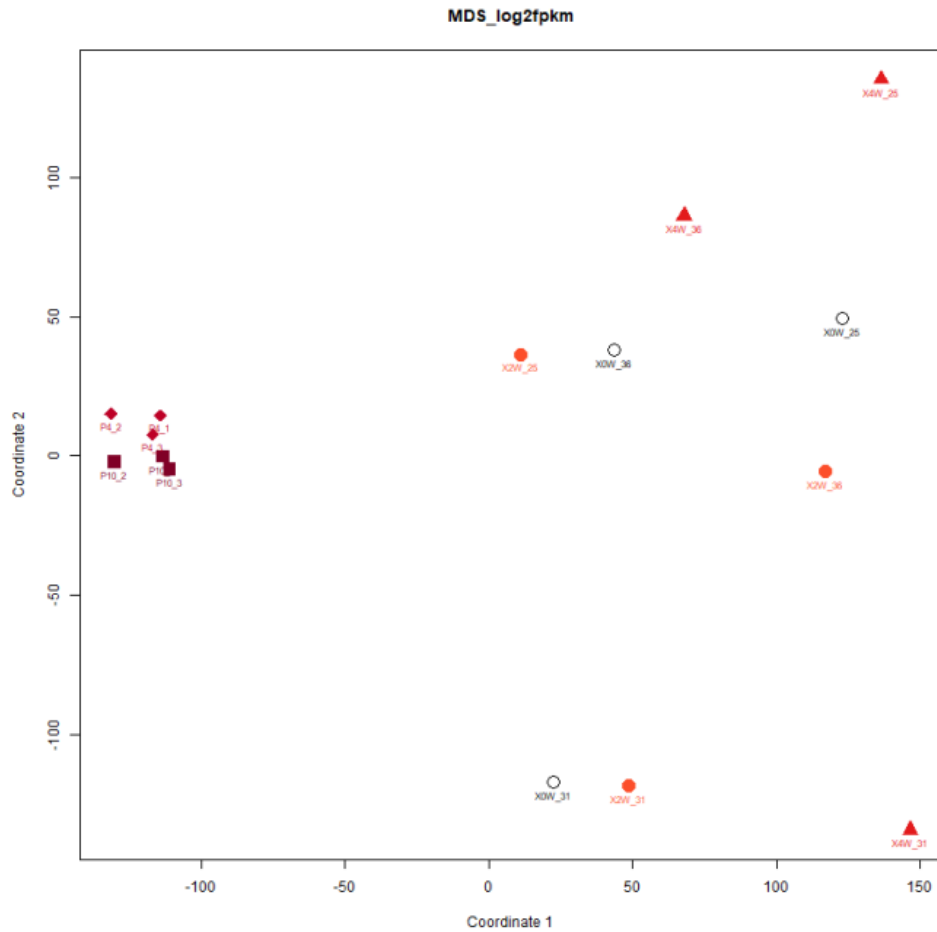


그림 166. MDS plot 분석 결과

7. Differentially expressed gene (DEG) 통계 분석 결과

가. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 2주차 임신 한우(2W_25, 2W_31, 2W_36)의 유전자 발현 차이를 통계학적 분석 방법을 통해 발현차이를 비교한 결과 임신 한우에서 비임신 한우에 비해 발현 패턴의 변화가 있음을 확인함(그림 167).

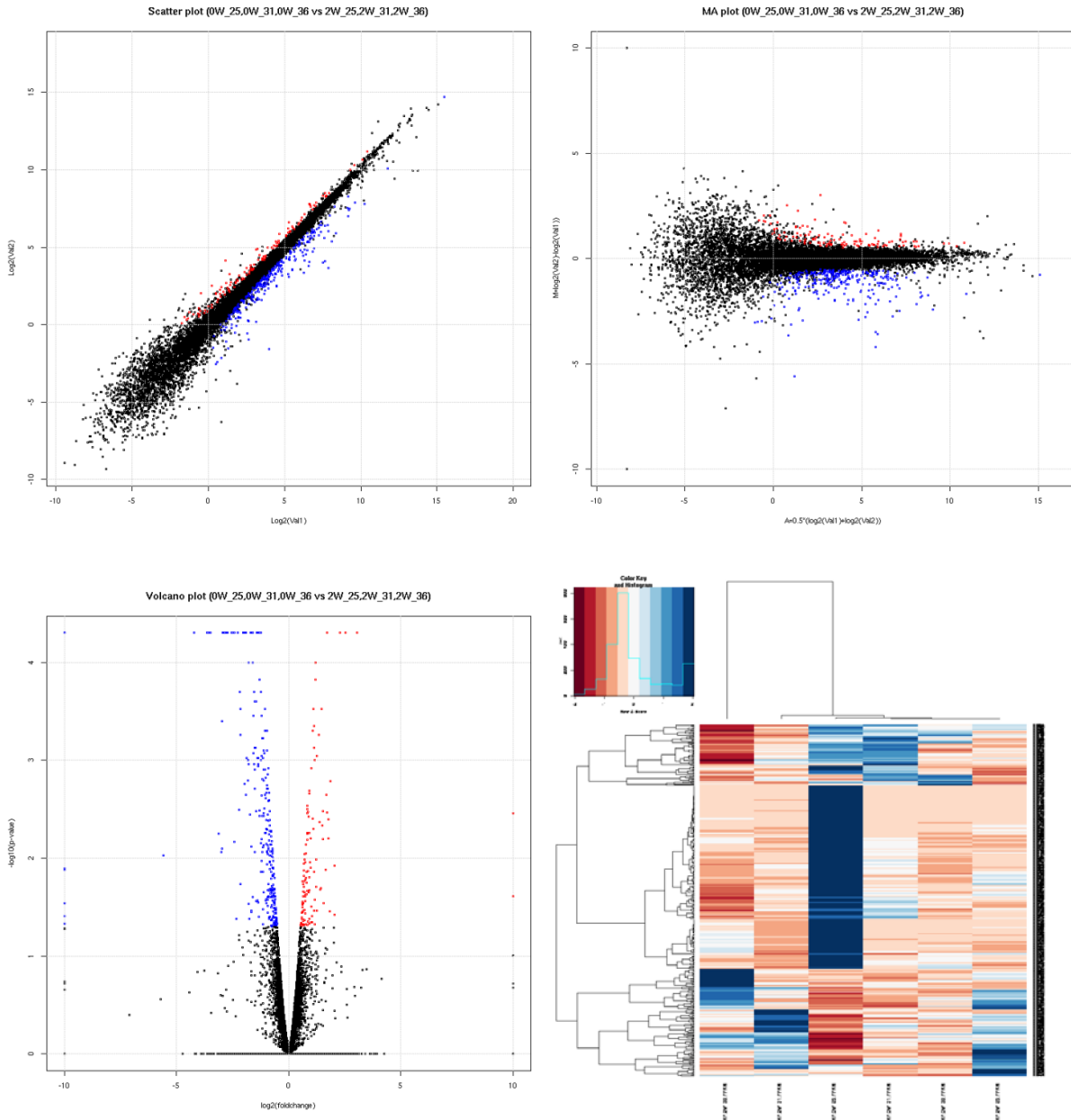


그림 167. 비임신과 2주차 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

- ▶ 그림 167에서 보는 것과 같이 Y축에 Plating된 2주차 임신 한우의 유전자 발현 패턴이 비임신 한우에 비해 낮은 발현 정도를 보이는 것을 알 수 있었음.
- ▶ 비임신과 차이를 보이는 유전자 발현을 \log_2 (FoldChnage)지수와 P -value에 기초하여 Ploting을 한 결과 120개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 273개의 특이적으로

낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음.

▶ 총 393개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 2주차 임신 한우의 유전자 발현이 비임신 한우와 비교해 볼 때 특정 유전적 차이를 보임을 확인함(그림 167).

나. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 4주차 임신 한우(4W_25, 4W_31, 4W_36)의 유전자 발현 차이를 통계학적 분석 방법을 통해 발현차이를 비교한 결과 임신 한우에서 비임신 한우에 비해 발현 패턴의 변화가 있음을 확인함(그림 168).

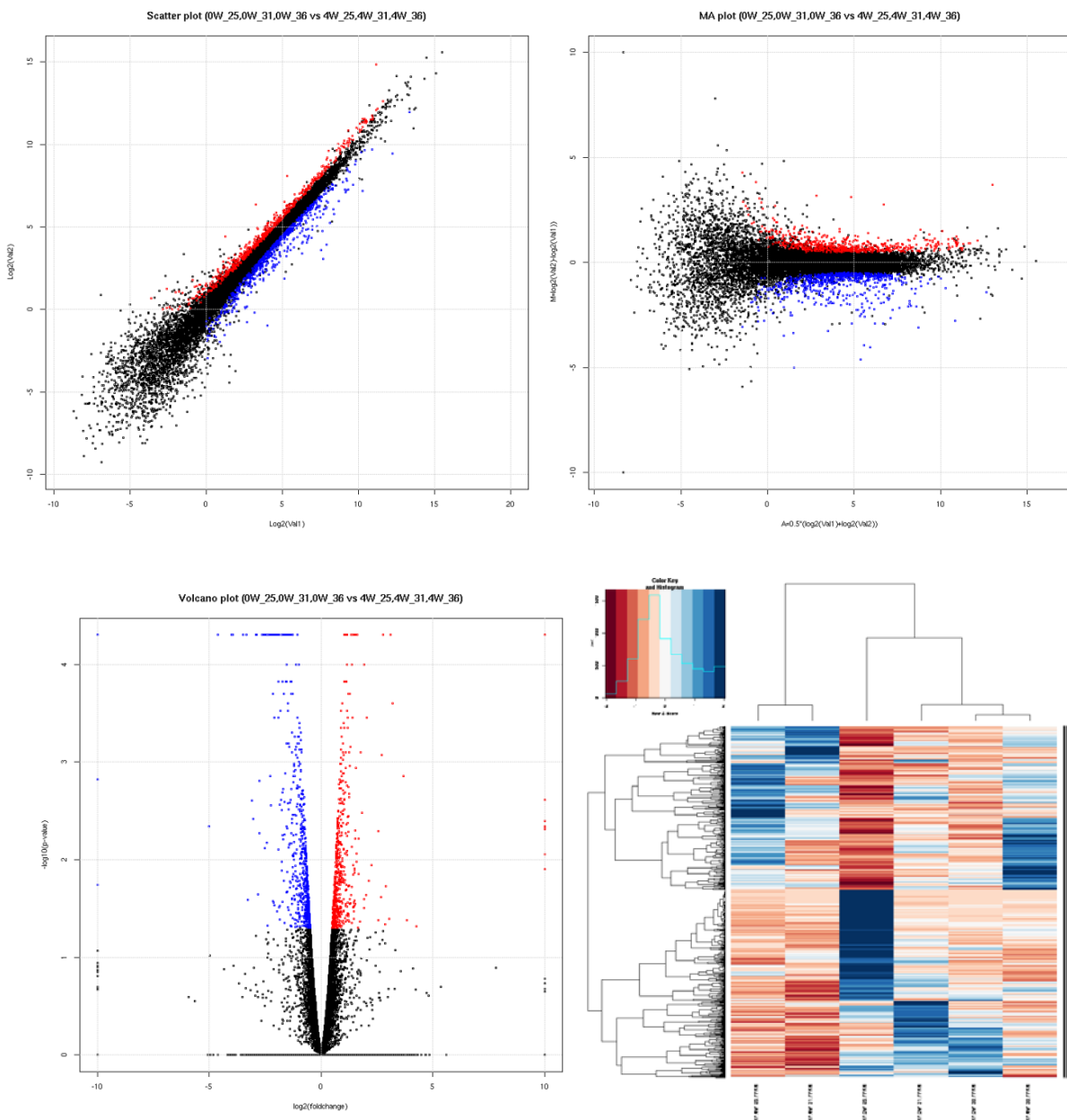


그림 168. 비임신과 4주차 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

▶ 그림 168에서 보는 것과 같이 Y축에 Plating된 4주차 임신 한우의 유전자 발현 패턴이 2주차 임신 한우군에 비해 구분가능한 유전자 발현차이를 보였음.

- ▶ 비임신과 차이를 보이는 유전자 발현을 \log_2 (FoldChange)지수와 P -value에 기초하여 Plotting을 한 결과 559개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 641개의 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음.
- ▶ 총 1200개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 2주차 임신 한우의 유전자 발현이 비임신 한우와 비교해 볼 때 특정 유전적 차이를 보임을 확인함(그림 168).

다. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 3-4개월 임신 한우(P4_1, P4_2, P4_3)의 유전자 발현 차이를 통계학적 분석 방법을 통해 발현차이를 비교한 결과 임신 한우에서 비임신 한우에 비해 눈에 띄는 발현 패턴의 변화가 있음을 확인함(그림 169).

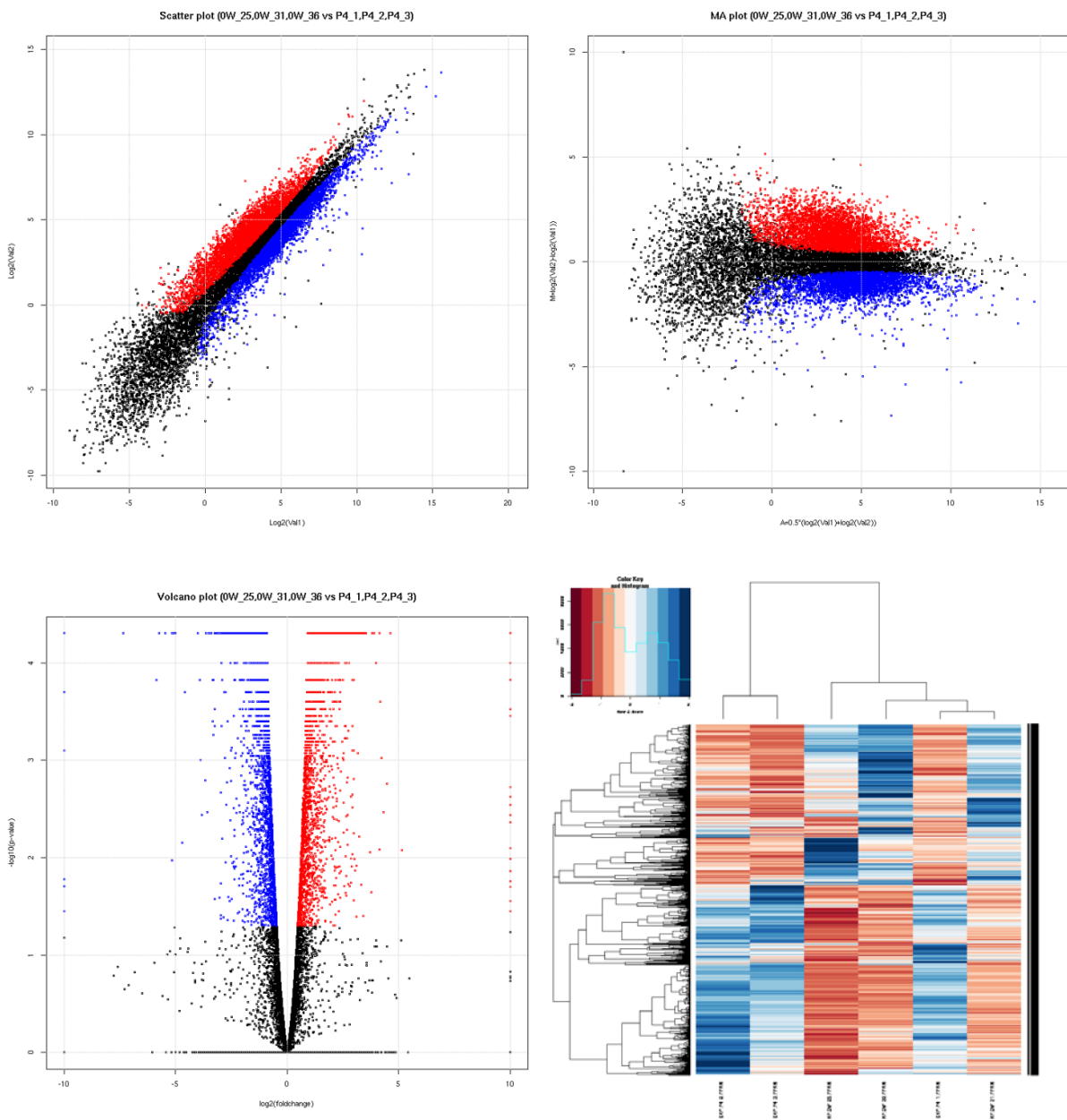


그림 169. 비임신과 3-4개월 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

▶ **그림 169**에서 보는 것과 같이 Y축에 Plating된 3-4개월차 임신 한우의 유전자 발현 패턴이 임신초기 한우군에 비해 훨씬 더 많은 유전자 발현차이를 보였음.

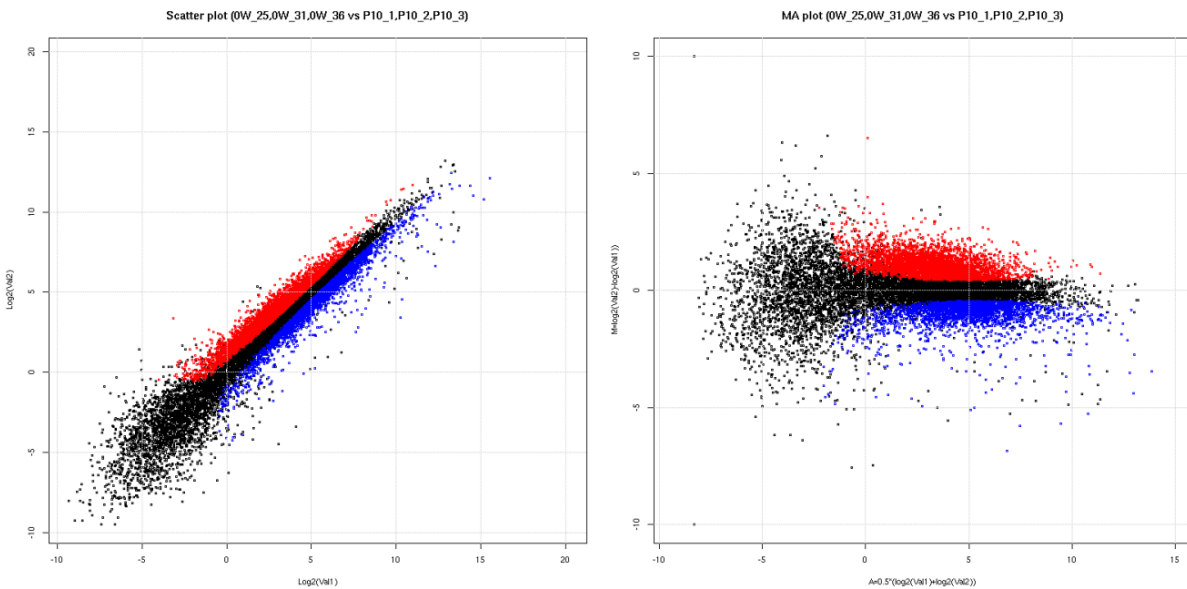
▶ 비임신과 차이를 보이는 유전자 발현을 \log_2 (FoldChnage)지수와 *P-value*에 기초하여 Ploting을 한 결과 4064개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 3382개의 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음.

▶ 총 7446개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 3-4개월차 임신 한우의 유전자 발현이 비 임신 한우와 비교해 볼 때 유의한 유전적 발현 차이를 보임을 확인함(**그림 169**).

라. 비임신 한우(0W_25, 0W_31, 0W_36)와 10개월 만삭 임신 한우(P10_1, P10_2, P10_3)의 유전자 발현 차이를 통계학적 분석 방법을 통해 발현차이를 비교한 결과 임신 한우에서 비임신 한우에 비해 눈에 띄는 발현 패턴의 변화가 있음을 확인함(**그림 170**).

▶ **그림 170**에서 보는 것과 같이 Y축에 Plating된 10개월차 임신 한우의 유전자 발현 패턴이 임신초기 한우군에 비해 훨씬 더 많은 유전자 발현차이를 보였음.

▶ 비임신과 차이를 보이는 유전자 발현을 \log_2 (FoldChnage)지수와 *P-value*에 기초하여 Ploting을 한 결과 3518개의 특이적으로 높은 발현량을 보이는 유전자와 2517개의 특이적으로 낮은 발현량을 보이는 유전자를 검출하였음.



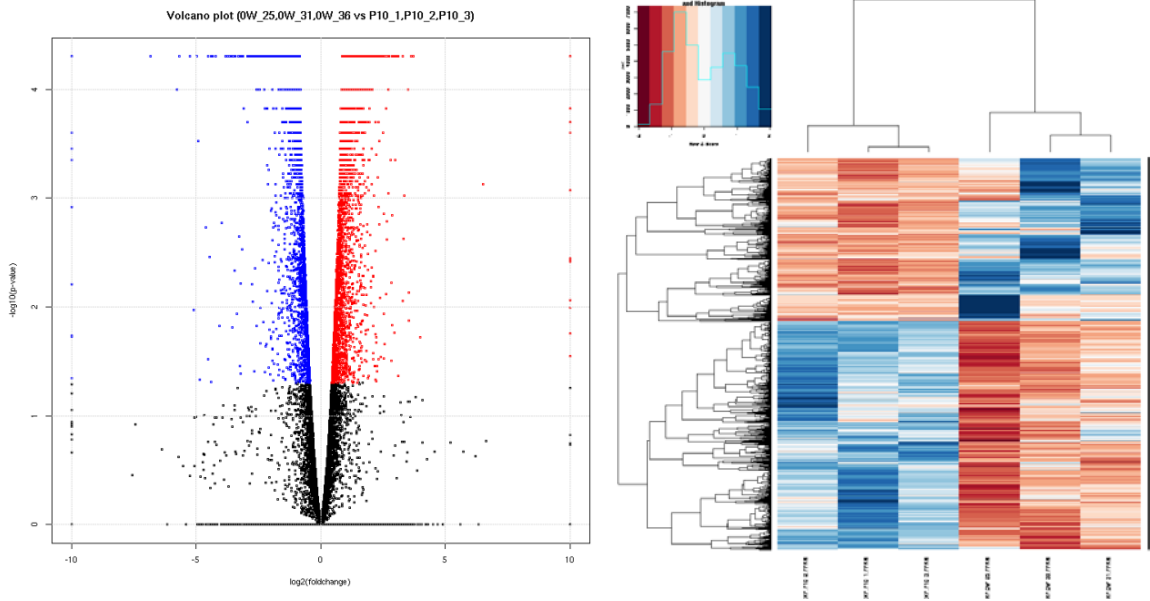


그림 170. 비임신과 10개월 만삭 임신 한우의 유전자 발현 정도 비교 분석

- ▶ 총 6035개의 유전적 차이를 보이는 유전자 발현의 정도를 생물정보학적 분석방법인 R-Package를 이용하여 Heat map을 분석한 결과 10개월차 임신 한우의 유전자 발현이 비임신 한우와 비교해 볼 때 유의한 유전적 발현 차이를 보임을 확인함(그림 170).

제 4 장. 목표 달성도 및 관련분야 기여도

제 1 절. 목표 달성도

1. 정량적 평가 항목

평가항목 (주요성능 Spec.)	단위	세계최고수준	연구 개발 전 국내수준	최종 목표치	최종 달성치	달성도 (%)	비 고
		성능수준	성능수준				
PAG-1	ng/mL	-	-	>5	>1	100	전기적 분석 유무
검출시기	30일	30일 이상	-	30일 기준	28일	100	98% 이상
측정시간	min	480	-	10분 이내	1분 이내	100	실측확인
정확도	%	98%	-	98% 이상	99%	100	초음파비교

2. 연구 성과 지표

(단위: 백만원, 건)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI						
가중치 (%)	10	5		20		30			10			5	5	5			10		
최종목표	3	3		1		1		3				1	2	6			3		
1차 년 도	목표	1						1											
	실적	1						1											
2차 년 도	목표	1						1					1	3			1		
	실적	1						1					1	2			1		
3차 년 도	목표	1	1		1			1				1	1	3			1		
	실적	3	1		1			2				1		3			2		
소 계	목표	3	1		1			3				1	2	6			2		
	실적	5	1		1			4				1	1	5			3		
종료 1차년도	0	1		0		0		1				0	0	0			0		
종료 2차년도	0	1		0		0	1	1				0	0	0			1		
소 계	0	2		0		0	1	2				0	0	0			1		
합 계	3	3		1		1	1	5				1	2	6			3		

제 2 절. 관련분야 기여도

- 현재 연구에서는 소의 임신진단을 위한 기술 개발 이지만, 전기식 바이오센서를 이용한다면 향후 타 축종으로 파급효과가 크고, 각종 항체만 개발 된다면 질병 진단 및 식품의 오염도 측정 등에 다양하게 적용 가능성이 큰 분야임.

기술적 파급효과

- 본 제안 기술은 전기화학식 검출 방법으로 어느 나라에서도 시도된 적이 없음
- 해외 선진 업체와 경쟁에서 기술적 선점을 할 수 있으며 지속적인 연구개발을 통한 시장의 추가 확대가 가능함
- 이종간 플랫폼 및 질병진단 플랫폼 개발을 통한 시장확대가 매우 용이

수의학적 파급효과

- 소, 및 말의 발정 및 임신기 호르몬 농도 설정으로 인한 생산성 향상
- 가축의 임신 및 발정과 호르몬 농도 와 관련성 분석.
- 소와 말뿐만 아니라 기타 동물 (돼지,개)에 맞는 진단 시스템 개발 및 상용화 초석 마련
- 현장에서 질병을 진단할 수 있는 1차 스크리닝 장비로 활용

경제·산업적 파급효과

- 본 연구 개발의 결과물을 통해 빠른 임신결과 확인을 통한 체계적인 개체관리 용이 및 생산성 향상
- 가축과 더불어 반려동물 시장에 적용이 가능하고 더 나아가 인체용에도 적용이 가능함.
- 임신진단뿐만 아니라 질병진단 시장진출이 매우 용이함.

제 5 장. 연구결과의 활용계획

제 1 절. 연구개발 결과의 활용방안

○ 특허 등

- 한우의 임신관련 특이 단백질 특허 출원
- 임신 한우에서 PAG 검출 방법 특허 출원
- 가축의 단백질을 바탕으로 한 바이오센서 회로 및 생산 체계 등 특허 출원

○ 연구논문

- 한우 임신 진단을 위한 단백질 정량 및 정성 발표
- 임신기간 동안의 PAG 농도 변화 발표
- 단백질 동정을 통한 한우의 임신관련 특이 유전자 개발 발표

제 2 절. 사업화 계획

1. 사업화 5개년 계획

- 동물 및 가축의 호르몬 기준 정립 및 이를 바탕으로 한 진단기기 개발
- 동물 및 가축 분야의 바이오센서 이용 현장진단기기 개발 및 산업화
- 기술 확대를 통한 경쟁사 기술 우위성 확보 및 시장 확대를 통한 매출증대

구분	완료 후 (1차년)	완료 후 (2차년)	완료 후 (3차년)	완료 후 (4차년)	완료 후 (5차년)
연도별 응용기술 개발 및 판매 전력	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다품종 현장 진단형 임신 진단 플랫폼 개발 ▪ 다품종 임신진단 바이오 서항체 개발(말, 소, 돼지, 개 등) ▪ 동물용 의료기기 인증 ▪ 국내 시장 판매 및 홍보 ▪ 해외시장 홍보 및 판로개척 (기존 판로 활용 및 확대) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다품종 현장 진단형 가축용 임신진단기기 판매 ▪ 가축질병 항체 개발 시작(구제역, 브루셀라, 백혈병, 요내병, IBR) ▪ 동물병원용으로 시장 확대 ▪ 인체용 플랫폼 개발 ▪ 중국등 Asia-pacific 아태평양 시장 진출 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 중앙립 진단과는 별개로 진행될 수 있는 조기 질병 1차 스크리닝 시스템 개발 ▪ 가축 질병진단 분야 항체 개발 ▪ 인체용 플랫폼 개발 (국내인증 및 해외인증) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 인체용 현장진단형 임신진단기 판매 ▪ 인체용으로 시장 확대 (혈당, 크레아티닌, 레지오넬라, 1차병원용 스크리닝 등) ▪ 산업체 현장 세균진단 플랫폼 개발 (식중독, 살모넬라 등) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 자가혈당 측정 면역화학적진단 분자진단, 혈액진단 임상미생물학진단 지혈진단 시장진출 ▪ 국내시장 20% 점유 목표

2. 사업화 추진 전략 (제품홍보, 판로확보, 판매전략 등)

① 판매전략

- 전국 동물병원 판매 - 임신진단 시장 선점(말, 개 등) : 전국 동물병원 2,600곳 중 50% 시장 점유율 진입 목표
- 유제품 생산회사 판매 협업 : 서울우유협동조합, 남양유업, 매일유업 (상위 Top 3)
- 축산 기자재 취급 회사 판매 협업 : 동진BLS, 서울양행, (주)송강, 중앙진테크
- 전국 축산업협동조합 및 AI 센터 (40곳- 양돈), 서산한우개량사업소, 횡성축협

② 해외 판매망을 통한 판매

- SCHILLER, MMS, Verathone
- ODM 판매 : 드라발, Bella Ag, SmaXtec, Wellcow, Nedap
- 병의원 거래선을 통한 홍보 : 종합병원을 포함한 1,100곳

③ 국내 동물용 의료기기 취급점을 통한 판매

- 동강의료기, 메디아나, 케어사이트코리아, 아트라임, 우리헬스케어, 베트컴

④ 국내외 박람회 및 전시회를 통한 판매 확대

- VIA Asia 축산전시회, SIMA 축산전시회, 독일 하노버 축산박람회 참가

⑤ 인체용 개발을 통한 시장 확대

- 국내 : 기존 거래병원 1100여곳, 해외거래업체 : 100여곳

3. 제품개발 및 판매 등을 통한 기대효과 : 165억의 매출 기대

- 키트 개발 및 국내외 판매
 - > 바이오센서 기기 판매 : 2,000천원 × 1천대 = 20억
 - > 검사 키트 판매 : 5천원 × 100천세트 = 50억
- 유럽 및 미국 등 수출 : 2,000천원 × 5천대 = 100억
- 기타 가축의 현장진단형 임신기 개발 및 판매 : 50억/년
- 본 기술개발은 동물의 임신여부 및 주수를 확인할 수 있는 현장 적용형 바이오센서 및 이를 판독할 수 있는 분석기기로서 임신여부 및 주수를 확인할 수 있는 바이오센서와 이를 판독할 수 있는 분석기기로 나뉘어져 있음.
- 임신을 비롯한 진단기기 분야에서는 세계적으로 다른 분야에 비하여 바이오센서를 바탕으로 한 분야의 체외진단 규모가 2009년에 비하여 2014년 14%로 다른 분야(면역진단, 액진단) 보다 성장률이 높을 것으로 예측 되고 있어(Kalorama information, 2010), 이 분야에

대한 연구와 산업적 적용이 필요함.

4. R&D 및 양산투자 계획(완료 후)

구분	내용	1차년	2차년	3차년	4차년	5차년
R&D 투자계획	항체개발	100,000	150,000	200,000	300,000	250,000
양산투자계획		-	330,000	480,000	1,000,000	480,000
계 (천원)		100,000	480,000	680,000	1,300,000	730,000

5. 인력확보 계획(완료 후)

구분	1차년	2차년	3차년
확보인력 (명)	1	2	1
부문	품질	영업, 생산	개발

6. 품질확보 계획(완료 후)

구분	1차년	2차년	3차년
품질인증	동물용 의료기기 인증	-	인체용 의료기기 인증

7. 예상매출액(완료 후)

구분	1차년	2차년	3차년	4차년	5차년
내 용	휴대용 임신진단기기 개발	가축 및 반려동물 확대	POCT 분야 확대 질병진단	POCT진단 확대 (인체)	면역화학적진단 확대
매출금액 (천원)	300,000	1,200,000	2,000,000	10,000,000	20,000,000

제 6 장. 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	
보안등급 분류	보안		일반
			○
결정 사유	해당사항 없음.		

제 7 장. 국가과학기술종합시스템에 등록된 연구시설·장비현황

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

제 8 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	
<p>○ 안전관리대책</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 소방시설 설치 유지 및 안전관리에 관한 법류, 산업안전 보건법, 연구실 안전환경조성에 관한 법 및 고압가스안전관리법 등 안전관계법령에서 정하는 바에 따라 안전사고 방지를 위한 안전보건관리요령을 내규로 규정하여 연구시설 및 장비에 관한 안전 조치를 이행 중에 있음. ▪ 분야별 안전관리자를 지정하고, 해당 안전관리자는 내규에 의거하여 분야별 안전 내역을 검토하도록 정하고 있음. ▪ 해당 내규에 의거하여 안전 및 보건 교육훈련계획을 수립하고 정기적인 교육 훈련을 시행하고 있음. ▪ 위해방지를 위한 안전점검으로 점검일지를 기록, 관리하고 있음. ▪ 내규는 실험실 안전환경을 정의하고 있으며 이는 일상점검, 정기점검, 특별 안전 점검 등으로 구분된 안전점검 활동을 명문화하고, 각 참여 연구원 및 연구 책임자는 이에 의거한 안전점검 활동을 시행 중임. 		

제 9 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게제 지/특허등 록국가	코드번호		사사여부 (단독사 사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟 수 등)
						Impact Factor	논문게제 일 /특허등록 일		
1	논문	Build the nomogram by risk factors of chronic obstructive pulmonary disease(COPD).	한국농수산대학	연구책임자	The Korean journal of Applied statistics		2017.08.31	단독	
2	논문	Investigation of Hanwoo-specific structural variations using wholegenome sequencing data	한국농수산대학	연구책임자	Genes & Genomics	0.68	2019.02.	중복	SCI
2	특허	형광 검출을 위한 광학헤드	미라클스코프(주)	연구책임자	대한민국		2018.08.17	단독	
3	학술발표	Electrochemical Biosensor Platform for Detection of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Urine as a Bladder Cancer Biomarker	전자부품연구원	연구책임자, 참여연구원	한국전기화학회		2017.11.03	중복	
4	학술발표	Lateral Flow Assay-Based Hydrogel Biosensor Platform for Rapid Detection of Nitrite Ions in Urine	전자부품연구원	연구책임자, 참여연구원	한국전기화학회		2017.11.10	중복	
5	학술발표	Electrochemical Biosensor for Point-of-Care Testing (POCT) Detection of Apolipoprotein-A4 (Apo-A4) in Urine as a Bladder Cancer Biomarker	전자부품연구원	연구책임자, 참여연구원	한국바이오칩학회		2018.05.18	중복	
6	학술발표	An electrochemical pregnancy-associated glycoprotein (PAG) immunoassay for pregnancy diagnosis in cows	전자부품연구원	연구책임자, 참여연구원	한국바이오칩학회		2018.05.18	단독	
7	학술발표	Fabrication and High Electro-catalytic Active Indium Tin Oxide Nanoparticle(ITO-NP) Modified ITO Electrode for Bioassay Applications	전자부품연구원	연구책임자, 참여연구원	한국바이오칩학회		2018.11.07	단독	

주 의

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