

발간등록번호

과제번호 20090394

11-1541000-001396-01

**한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용  
유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발**

(Development of an Integrated Portable DNA Analysis  
Microsystem for On-site Verification of Korean  
Cow Originality)

한국과학기술원

농림수산물자료실



0003412

농림수산물부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 23 일

주관연구기관명 : 한국과학기술원

주관연구책임자 : 서 태 석

세부연구책임자 : 서 태 석

협동연구기관명 : 광주과학기술원

협동연구책임자 : 김 민 곤

협동연구기관명 : 솔젠트(주)

협동연구책임자 : 김 광 규

협동연구기관명 : 나노스코프시스템즈(주)

협동연구책임자 : 전 병 선

# 요 약 문

## I. 제 목

한우 이력 추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목표는 현장에서 한우 및 수입우를 판별할 수 있는 한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 통합 마이크로디바이스 개발에 있다. 한우 표지 인자 DNA를 발굴하고 이를 현장에서 분석함으로써 정확하고 신속하게 한우, 수입우 판별이 가능하다. 이를 통해, 한우 소의 불법 유통, 한우 소고기의 품질 및 질병 안전성 확인, 광우병과 같은 인수공통전염병으로부터의 안전한 육우 확보 및 한우 쇠고기의 둔갑 판매 등을 사전에 예방함으로써 국민에게 안전하고 믿을 수 있는 한우를 공급하는 데에 그 목적이 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

- ▶ 한우육 판별을 위한 SNP 표지인자 선별 및 최적화 (BT)
- ▶ 마이크로어레이 칩 상에서 한우 SNP 유전자 해석을 위한 소프트웨어 개발 (IT)
- ▶ 현장에서 얻은 쇠고기 샘플로부터 유전자 추출을 위한 샘플 전처리 소자 개발 (MEMS)
- ▶ 한우 유전자 규명을 위한 초소형 PCR 반응기 제작 및 DNA microarray 개발 (NT)
- ▶ 샘플 전처리-PCR-DNA microarray가 통합된 마이크로디바이스 개발 (MEMS)
- ▶ 현장 유전자 진단을 위한 운반형 소형 형광 검출 시스템 개발 (Optics)

위 연구 내용을 바탕으로, genomic DNA 추출을 위한 마이크로 소자, 초소형 PCR 증폭기, 고효율 SNP 분석을 위한 마이크로 어레이 소자가 모두 통합된 유전자 분석 칩과 운반형 소형 형광 검출 시스템을 결합하여, 쇠고기 판매점에서 얻어진 소량의 쇠고기 샘플로부터 신속 정확한 원산지 및 한우 판별을 현장에서 수행할 수 있는 유전자 통합 시스템을 구축하고자 한다.

## IV. 연구개발결과

- ▶ 한우판별용 11개 마커 발굴 (한우 정확도 99.6%, 수입우 정확도 97.7%)
- ▶ 유전자 분리를 위한 Micro CE chip 개발
- ▶ 유전자 증폭, 분리 및 검출 기능이 통합된 PCR-CE chip 개발
- ▶ 유전자 증폭, 분리 및 검출 기능이 통합된 PCR-Microarray chip 개발
- ▶ 샘플전처리를 위한 회전형 유전자 추출칩 개발
- ▶ 유전자의 형광신호 분석을 위한 휴대용 형광신호검출기 개발
- ▶ PCR-CE (Microarray) 구동용 소형 유전자 분석기기 개발
- ▶ PCR-CE (Microarray) 형광신호검출 전과정의 자동화 및 분석을 위한 S/W 개발
- ▶ PCR-CE (Microarray) chip과 이를 구동하기 위한 소형 유전자 분석기기 및 휴대용 형광신호검출기가 통합된 유전자 분석 통합 마이크로시스템 개발
- ▶ 유전자 분석 통합 마이크로시스템에서의 한우/비한우 판별 시험평가 완료

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제에서 개발된 유전자 분석 통합 마이크로시스템은 유전자 분석시간을 80분 이내로 줄였으며 (기존 1~3일), 수마이크로리터의 샘플용량만으로 검출이 가능하므로 저비용 고효율 분석이 가능하다. 더불어, 구동을 위한 chip 주변장치와 형광검출기를 모두 소형화에 성공함으로써, 이동형 유전자 분석장치로서 개발을 완료하였다. 또한 기존 40~70개에 달하던 한우판별용 마커를 더 높은 정확도를 가지는 11개 마커로 줄였으며, 이를 유전자 분석 통합 마이크로시스템에서 성공적으로 검출하였다.

- ▶ 관련 특허 출원 5건
- ▶ 논문 게재: SCI급 7편, 비SCI급 1편
- ▶ 상품화: 1건 (한우/비한우 판별 Kit)
- ▶ 기술실시: 2건 (휴대용 형광스캐너, 이동형 유전자 분석장치)
- ▶ 타연구활용: 인간 SNP/STR 분석 및 호흡기 감염질환 진단용 유전자 분석 기기



# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title of research project

Development of an integrated Portable DNA analysis microsystem for on-site verification of Korean cow originality

### II. Objective of research project

The ultimate goal of this research is the development of an integrated portable DNA analysis microsystem for on-site verification of Korean cow (HANWOO) originality. This microsystem enables the HANWOO verification from imported beef cattle with high speed and accuracy in manner of portability by excavating the HANWOO-specific DNA markers. Based on this system, it can be achieved that the illegal distribution of HANWOO market and zoonosis epidemic such as BSE (bovine spongiform encephalopathy) is prevented in advance, and safety and quality of beef cattle is assured, providing the public with qualified HANWOO beef cattle.

### III. Contents and scope of research project

- ▶ The selection of HANWOO-specific DNA markers and its optimization
- ▶ The development of a sample pre-treatment microdevice for DNA extraction from HANWOO
- ▶ The development of a software for analysis of HANWOO SNP profiles on a microarray platform
- ▶ The manufacture of the micro PCR reactor and DNA microarray chip for verification of HANWOO
- ▶ The development of an integrated microsystem including the sample pre-treatment, PCR, and DNA microarray
- ▶ The development of the portable fluorescence detection system for on-site genetic analysis

Based on above contents and scope, the fully integrated microsystem which consists of a sample pre-treatment microdevice for DNA extraction, a micro PCR reactor for DNA amplification, a DNA microarray chip for SNP analysis, and a miniaturized optics for fluorescence detection can be achieved, offering the portable genetic analysis microsystem platform, which can be applied to the application of HANWOO verification from imported beef cattle.

### IV. Results of research project

- ▶ Development of eleven HANWOO-specific DNA markers (99.6% fidelity for HANWOO verification, 97.7% fidelity for imported beef cattle verification)

- ▶ Development of the micro CE chip for DNA separation
- ▶ Development of the integrated PCR-CE chip for DNA amplification, separation, and detection
- ▶ Development of the integrated PCR-microarray chip for DNA amplification, separation, and detection
- ▶ Development of the rotary DNA extraction chip
- ▶ Development of the portable fluorescence scanner for DNA detection
- ▶ Development of the miniaturized genetic analyzer for operation of the PCR-CE (microarray) chips
- ▶ Development of the S/W for automation and detection of the PCR-CE (microarray) chips
- ▶ Development of the fully integrated microsystem for genetic analysis consisting of the portable genetic analyzer, the portable fluorescence scanner, and the PCR-CE (microarray) chips
- ▶ Evaluation of the integrated microsystem with genotyping of HANWOO/imported beef cattle samples

#### V. Product of research project and plans for practical use

The integrated microsystem developed in this project provides the fast and accurate analysis tools for beef cattle verification with high speed and efficiency (a few microliter of samples, and 80 min of process time). Moreover, the peripheral instrumentation and detection optics for operation of the microdevice were miniaturized to enhance the portability. In addition, the eleven HANWOO-specific DNA markers are developed, decreasing the number of conventional ones (40~70 markers). As a result, successful genotyping of HANWOO/imported beef cattle samples was performed on a fully integrated portable microsystem.

- ▶ Patent pending: 5 cases
- ▶ Paper published: 7 cases of SCI, 1 case of non-SCI
- ▶ Commercialization: 1 case (HANWOO/imported beef cattle verification kit)
- ▶ Technical implementation: 2 cases (a portable genetic analyzer and a portable fluorescence scanner)
- ▶ Application to other research projects: development of an integrated microsystem for human SNP/STR genotyping and respiratory infection diagnosis

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

- Chapter 1. Outline of research project
  - 1. Background
  - 2. Need of research project
  - 3. Goal of research project
  
- Chapter 2. The state of art in domestic and foreign research field
  - 1. The state of art in domestic field
  - 2. The state of art in foreign field
  
- Chapter 3. The results and contents of research project
  - 1. The outline of research contents
  - 2. The results of each project task
  
- Chapter 4. Attainment of the research goal and its contribution to research field
  - 1. The attainment of the annual research goal
  - 2. The contribution to research field
  
- Chapter 5. Product of research project and plans for practical use
  - 1. The product of research project
  - 2. Plans for practical use
  
- Chapter 6. The information of collected foreign science and technology
  - 1. Academic investigation
  - 2. Patent investigation and commercialization
  
- Chapter 7. References

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
  - 제 1 절 연구개발의 배경
  - 제 2 절 연구개발의 필요성
  - 제 3 절 연구개발의 목표
  
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
  - 제 1 절 국내 기술개발 현황
  - 제 2 절 국외 기술개발 현황
  
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
  - 제 1 절 연구개발 내용 개요
  - 제 2 절 과제별 (세부 및 협동) 연구개발 내용 및 결과
  
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
  - 제 1 절 연차별 목표달성도
  - 제 2 절 관련분야에의 기여도
  
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
  - 제 1 절 연구개발 성과
  - 제 2 절 연구성과 활용 계획
  
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
  - 제 1 절 학술정보
  - 제 2 절 특허정보 및 주요 상품화
  
- 제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 배경

### 1. 쇠고기 이력제 수행

2007년 12월 21일 소 및 쇠고기 이력추적에 관한 법률이 제정된 후, 2009년 6월 22일 축산물 생산이력추적제가 시행되고 있다. 이를 통해, 위생, 안전체계의 구축과 유통 투명성을 확보하고, 국내 소 산업의 경쟁력을 강화하는 계기가 되었다. 또한, 소의 질병 및 쇠고기의 안전에 문제가 발생시 그 이력을 추적하여 회수, 폐기 등 신속하게 조치할 수 있으며, 원산지, 사육자, 소의 종류, 등급 등의 정보를 일반 소비자에게 제공할 수 있게 되었고, 소의 혈통, 사양정보 등을 이력제와 통합 관리하여 가축개량, 경영개선 등에 기여할 수 있을 것으로 기대하고 있다 [1].

### 2. 쇠고기 판별 시스템

이러한 한우 이력추적 체계가 보편화됨에 따라, 한우 판매점에서도 손쉽게 한우의 원산지를 확인 할 수 있게 되었다. 이러한 한우 판별은 육우단계에서부터 한우 DNA의 표지인자를 검출하여 분석함으로써 이루어진다. 식약청에서는 70개 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 마커를 선별하여 분석하고 있으며, 농진청의 경우 45개의 SNP 마커를 선별하여 이용하고 있다. 이러한 분석은 소로부터의 DNA 추출, DNA 정제, DNA 증폭, 분리 및 분석이라는 여러 단계를 거치게 되고, 결과를 얻는데 까지 1~3일까지 소요 되며, 이에 따른 비용도 샘플당 10만원에서 20만원으로 다량 샘플을 빠른 시간에 분석하기에는 시간과 비용이 많이 소요되는 단점을 가지고 있다. 더불어, 광우병 및 질병에 노출된 수입우의 유통을 막고, 한우 둔갑 판매 등을 사전에 방지하기 위해, 현장에서의 빠르고 정확한 한우 판별 시스템이 필요로 되고 있다.

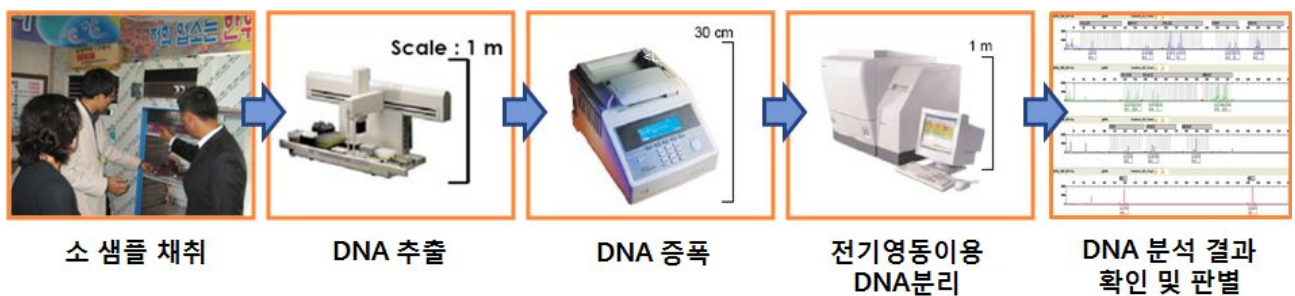


그림 1. 기존 한우 유전자 분석 시스템

## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 한우 표지 인자의 발굴

기존 한우 표지 인자는 45개에서 70개로서 매우 많은 마커를 이용하여 분석을 하고 있다. 이

는 한우와 수입우의 판별 정확도를 높이기 위해 불가결한 선택이지만, 한우만 가질 수 있는 형질특이적 DNA 마커가 발굴된다면, 그 개수를 줄이면서도 정확한 분석이 가능하다. 따라서, 정확하고, 빠른 한우 판별을 위해서는 표지인자의 개수를 줄여야 하며, 그러면서도 정확도를 유지할 수 있는 마커 발굴이 필요로 된다. DNA 추출에서 분석까지 동일한 분석과정을 거친다고 해도, 마커수를 15개 이하로 줄인다면, 샘플당 분석비용을 5만원까지 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

비교항목	한우 판별용 SNP 마커조합 (식약청, SNP Genetics)	Multiplex-PCR 에 의한 한우와 수입우의 판별방법 및 이에 사용되는 primer (농진청, 경상대)
마커형태	SNP	SNP+MS
마커수	70	45
분석장치	Illumina's GoldenGate Assay	PCR 기기, ABI3730 series
분석방법	Chip	PCR 증폭, 모세관 전기영동
분석정확성	동일할 것으로 판단됨	
분석시간 (DNA 정제 후)	3일	1~2일
결과분석	자동화된 분석프로그램	분석결과의 확인 후 분석 프로그램

표 1. 현재 고시된 한우육 판별법 비교

## 2. 이동형 유전자 분석 통합 마이크로시스템

국내 농축산물의 유전적 특징을 발굴하고 생물자원을 보호하는 데 있어서 유전적 분석은 앞으로 더욱 활발히 진행될 것으로 예상된다. 특히 DNA의 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)은 그 차이에 의해 유전적 특성을 나타낸다고 알려져 있어 수많은 SNP 규명에 많은 연구가 진행되고 있다 [2]. 현재의 SNP 분석 방법은 샘플로부터의 DNA 추출과 정제 후 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 에 의한 SNP 유전자 증폭과 전기영동법을 이용한 유전자 분리 및 확인으로 이루어진다. 이러한 현재 기술은 고가의 분석장비와 다량의 값비싼 시료를 사용하기 때문에 비용이 많이 들고 장시간의 분석시간을 요하게 된다. 또한 분석 장비의 크기로 인해 각 생물반응 단계의 통합이 어려워 샘플 전처리 과정에 샘플오염의 가능성을 항상 내포하고 있으며 현장진단에 필요한 분석장비의 소형화에도 어려움이 있다. 따라서, 이러한 단점을 극복하고 현장에서 유전자 진단이 가능한 고효율, 고감도의 새로운 SNP 유전자 분석 미세 통합 시스템이 요구되고 있으며 랩온어칩 (Lab-on-a-chip) 또는 미세종합분석시스템 (micro total analysis system,  $\mu$ TAS)은 이러한 요구의 해법으로 기대를 받고 있다 [3]. 하나의 예로 microfabrication 기술을 이용한 소형 PCR 반응기는 값비싼 효소 등 PCR 반응에 이용되는 시료량을 현격히 줄여 비용을 절감시킬 뿐만 아니라 나노리터 규모의 thermal mass에 의해 빠른 열 사이클을 가능하게 하여 고속 PCR을 수행할 수 있게 해준다. 또한 집적화된 마이크로 채널에서의 모세관전기영동법은 기존의 전기영동법보다 획기적으로 시간을 단축시킬 수 있다. 또한 모세관전기영동법 대신 이용이 가능한 마이크로어레이

(microarray) 기술은 여러개의 SNP를 동시에 검출해 낼 수 있는 효과를 가진다. 하지만 시료의 전처리, 분리, 농축, 혼합, 생화학반응, 검출 등을 모두 통합한 랩온어칩 기술은 현재 진행중에 있으며 미세중합분석 시스템의 작동 최적화 및 재현성, 그리고 정확한 유체 및 바이오품질의 미세조절 등은 해결해야 할 숙제로 남아 있다. 또한 그동안 bulk하게만 여겨오던 광학 측정 시스템도 최근에는 nano-laser의 대두 등 그 규모와 성능에 있어 초소형화로 진행되고 있다. 따라서, 여러 반응단계의 통합화, 소형화, 직접화, 그리고 분석의 고효율화를 이룰 수 있는 미세중합분석시스템을 휴대용 광학 측정 시스템과 통합한다면 다양한 유전자 현장 진단 분야에 매우 커다란 파급효과를 가져올 수 있을 것이다.

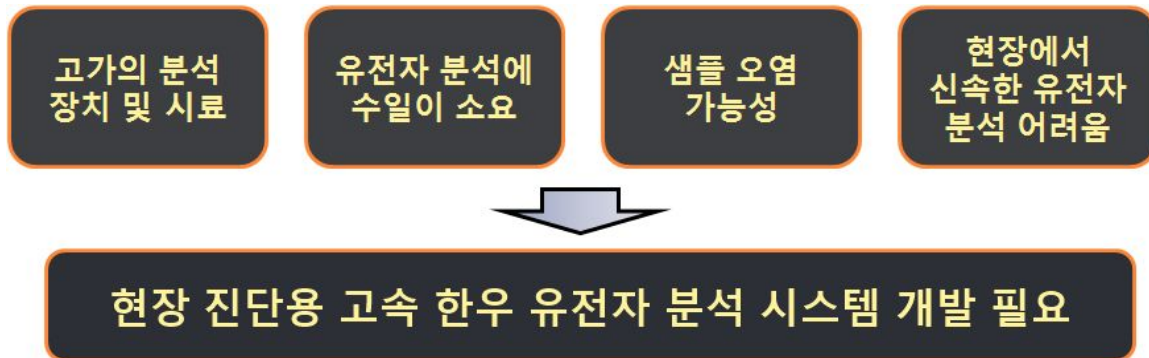


그림 2. 기존 한우 유전자 분석 시스템의 문제점

### 제3절 연구개발의 목표

1. 최종 연구목표: 한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 개발을 목표로 하며, 한우 집단에서 높은 빈도로 출현하는 중요한 SNP 표지를 선정하고, 이를 유전자 분석 마이크로 디바이스에서 분석, 비교함으로써 소비자가 현장에서 이 소고기가 한우임을 확인할 수 있는 휴대용 통합 시스템 개발을 목표로 한다. 한우 현장 감별 시스템은 아래의 그림 3과 같다. 쇠고기 판매점에서 소량의 쇠고기 샘플을 채취한 뒤, genomic DNA를 추출하고 이를 휴대용 유전자 분석 마이크로 통합 디바이스에 적용하여 현장에서 한우 DNA 포획, 유전자 증폭 및 분석 과정을 수행한다. Microarray 분석 과정에서 얻어진 DNA의 SNP typing profile을 비교 분석함으로써 쇠고기 판매점에서 취급하는 소의 원산지 및 한우육임을 현장에서 판단한다.

- (1) 바이오 콘텐츠 확보 (BT): 한우육 판별을 위한 SNP 표지인자 선별 및 최적화
  - ▶ 소의 유전자 상에서 개체 식별이 가능한 도메인은 소의 품종에 따라 다양하게 나타나기 때문에, 한우의 개체 식별을 위해서 한우의 특이적인 유전양상에 근거한 표지 유전자 선정
  - ▶ 축산과학원 및 기존 연구팀에서 개발한 특허로부터 한우육을 판별할 수 있고 정확도가 높은 SNP 표지인자 키트 개발
  - ▶ 한우 품종 식별의 변별력을 높이기 위한 최적의 SNP 표지인자 조합과 이들의 다중 PCR 조건 최적화
- (2) 마이크로 통합 디바이스 개발 (NT/MEMS) : 쇠고기 샘플 전처리 소자-나노리터 스케일의

유전자 증폭 소자-DNA 마이크로어레이 소자 통합 디바이스 개발

- ▶ 쇠고기 샘플로부터 효율적인 세포 추출 및 세포 분해법 개발
  - ▶ 분해된 세포로부터 추출되는 DNA를 마이크로 플루이딕 상에서 선택적으로 분리하는 DNA capture 시스템 개발
  - ▶ 나노리터 스케일의 PCR 반응기와 DNA microarray가 통합된 마이크로 칩 제작 및 작동의 최적화
  - ▶ 샘플 전처리-다중 SNP 표지인자 PCR-DNA microarray가 통합된 마이크로 디바이스 개발
- (3) 운반형 형광 검출 시스템 개발 (Optics/IT) : 현장 진단용 형광 검출 시스템 구축 및 DNA 유전자 분석 마이크로 통합 시스템 응용
- ▶ 현장 분석 응용을 위한 초소형 형광 검출 시스템 개발 및 통합 디바이스의 패키징 연구
  - ▶ 마이크로어레이 SNP 정보 해석을 위한 소프트웨어 개발
  - ▶ 농산물 품질 관리원 및 축산물 등급 판정소에서 제공될 체계적인 검체 (지역별 거세우, 암소, 숫소) 등을 확보하고 이를 통합디바이스를 이용하여 실제 샘플로부터 SNP유전자 분석수행

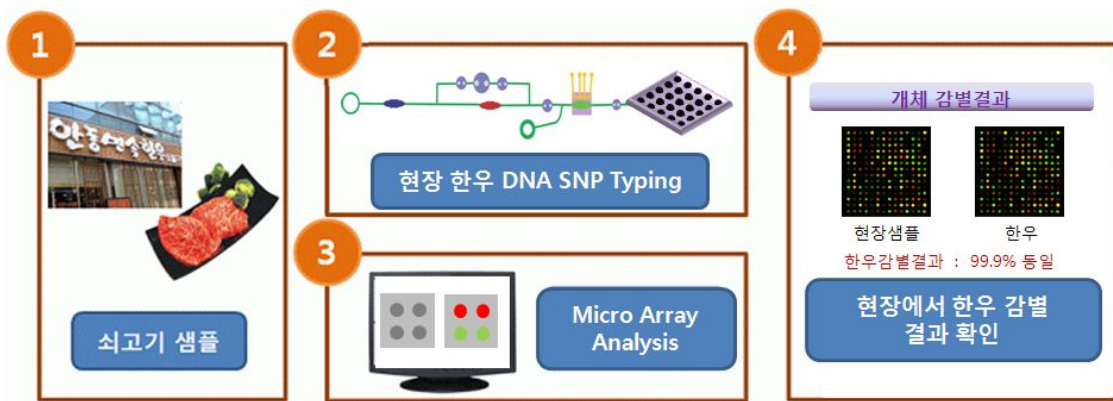


그림 3. 현장 검증 위한 휴대용 한우 유전자 분석 시스템 개략도

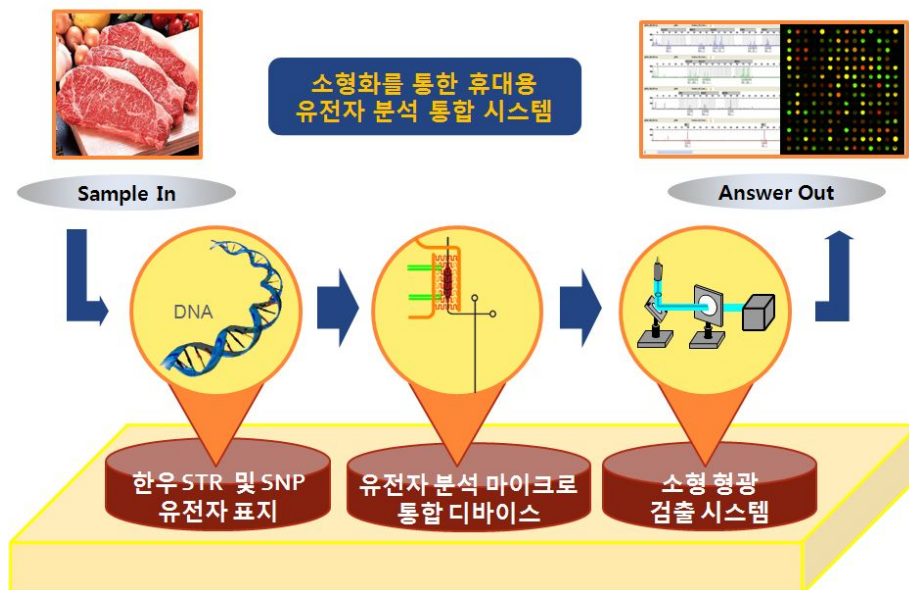


그림 4. 한우 현장 검증을 위한 통합 시스템



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 기술개발 현황

#### 1. 한우 판별용 유전적 마커의 발굴

Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) 기법을 이용하여 국내에서 소비되는 저가의 젓소, 수입소와 고가의 한우를 감별할 수 있는 방법으로 개발된 한우 특이적인 표지인자가 보고되었다 [4]. 한우, 수입우, 젓소 (Holstein)로부터 genomic DNA를 추출하여, 총 50 여 종류의 random primer를 이용하여, RAPD를 수행하였으며 이 중에서 6 종류의 Random primer에서 한우와 다른 소를 감별할 수 있는 band가 관찰되었다. Random primer #1, #2, #3에 의해서 한우와 수입소를 감별할 수 있으며, random primer #5, #6에 의해서 한우와 젓소를 감별할 수 있다. 또한 두 종류 이상의 random primer를 이용할 경우 품종 감별에 있어서 그 신뢰도가 더욱 높아질 수 있음을 시사하였다.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 유전자 지문 분석법을 이용하여 한우 판별법이 제시되었다 [5]. 한우 유전자 지문을 분석하였으며, 품종 집단 내 유전적 변이성과 품종 특이적인 DNA 마커를 개발하고 중국 연변 황우 및 개량종 (Holstein, Angus, Charolais, 및 Hereford)과의 품종 간 유전적 근연 관계를 분석하였다. 한우의 AFLP 유전자 지문은 한우의 친자 감별과 가계 분석은 물론, 한우 집단의 유전적인 변이성 및 타 품종과의 근연 관계 분석 나아가 경제 형질과 연관된 DNA marker 개발에 유용한 DNA 표지인자로 활용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

PCR-SSCP법을 이용하여 소의 모색 관련 유전자인 MC1R을 바탕으로 한우를 판별하는 기술을 보고되었다 [5]. 점돌연변이의 단일염기 치환에 의한 염기서열 변화로 발생된 DNA 단일 가닥의 형태 또는 구조 변경에 따른 전기영동상의 이동능력 차이로 기인된 유전자 다형성을 검출하는 방법이다. 이 연구는 한우와 Holstein 젓소, 그리고 수입우인 Angus, Hereford, Charolais를 대상으로 MC1R 유전자내의 SSCP 유전자형을 분석하였다. 개발된 PCR-SSCP marker는 PCR-RFLP marker에 비하여 보다 신속 정확하고 간편하며 경제적인 한우 고기 판별 기법으로서 한우를 젓소 및 수입우와 식별하는데 이용될 수 있음을 제시하였다.

2004년 소의 MC1R 유전자의 SNP를 이용한 새로운 감별법을 보고하였다 [6]. 한우와 젓소인 Holstein 및 수입소인 Black angus에 대한 감별법의 신속성, 편리성, 경제성 등의 단점을 보완할 수 있는 방법이라고 제시하였다. 이 연구에 따르면, 소의 MC1R 유전자 중 594번째 염기인 Guanine이 한우에서는 결실된 점을 이용하여 한우에서만 나타나는 marker를 개발하여 신속, 정확, 편리하게 한우의 감별에 대한 가능성을 시사하였다.

광주광역시 보건환경연구원에서 2005년에 소의 모색관련 melanocortin 1 receptor (MC1R) 유전자를 이용하여 한우와 홀스타인 품종을 구분할 수 있는 allele-specific multiplex PCR 기법을 보고하였다 [7]. Allele-specific primer와 universal primer를 이용하여 소의 MC1R 유전자 염기서열 상에 존재하는 단일 염기 다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)을 확인하는 방법으로 한우와 젓소를 식별할 수 있는 있음을 제시하였다.

#### 2. 유전자 진단용 마이크로 시스템 개발

국내에서의 유전자 진단용 마이크로 시스템 연구는 대학교와 국가연구소를 중심으로 활발히 이루어지고 있는 상태이지만, 상업용 시제품으로 개발된 건은 매우 소수로서 모두 개념증명단계의 연구결과이거나 기술개발단계에 머물고 있다.

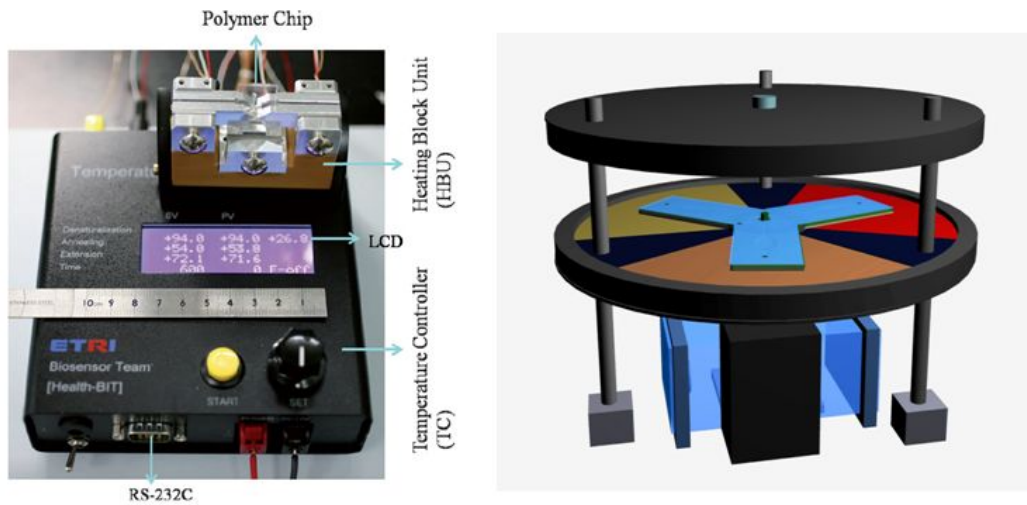


그림 5. (왼쪽) 한국전자통신연구원 (ETRI), 소형 Thermosyphon PCR 시스템. (오른쪽) KAIST 서태석 교수, 소형 Rotary PCR 시스템.

대표적으로, 한국전자통신 연구원 (ETRI)에서 2010년 발표한 일회용 폴리머칩과 thermosiphon 현상을 이용한 고속 PCR 시스템이 있다 [8]. thermosiphon 현상을 이용하여 20분 만에 PCR을 마치는 소형 마이크로디바이스이지만, 여전히 증폭된 PCR 산물은 칩이 아닌 외부에서 기존의 전기영동 시스템을 이용하여 분석함으로써 여전히 휴대용 유전자 분석장치로는 한계를 가지고 있다. 더불어, KAIST 서태석 교수 연구팀에서 개발한 회전형 소형 PCR 시스템은 일회용 플라스틱칩을 이용하여 열블럭을 나누어 회전에 의해 PCR 반응을 수행하는 장치로서 소형 LED 레이저를 이용하여 real-time으로 분석하는 시스템이다 [9].

## 제2절 국외 기술개발 현황

### 1. 외국의 축산 이력체계

FTA라는 국제적 흐름과 연계된 각 국의 축산물 수출입 급증에 의해 인수공통전염병인 광우병 (BSE, bovine spongiform encephalopathy) 등 축산물에 대한 보다 정확한 이력추적체계가 요구되고 있다. 광우병이 많이 발생했던 EU 국가를 비롯한 여러 나라에서는 과학적 기술이나 관리체계의 차이는 있지만 소의 이력추적체계를 적용하여 소비자들로부터 신뢰받는 기본체계로 활용하고 있다. 미국은 2003년 광우병이 처음 발생하여 미국의 중요한 쇠고기 수입국인 일본과 한국시장에 쇠고기를 수출하지 못해 수출산업의 엄청난 손실을 가져왔기 때문에 NAIS (National Animal Identification System)라는 동물식별체계를 국가정책으로 하여 전자 chip, DNA typing, 눈의 망막검사 등을 활용한 개체표식을 2009년부터 의무화하고 있다. 공통적으로 한국과 같이 육우 종에 대한 표지인자를 선별하여 DNA typing을 통한 정확한 개체감별을 하

고 있지만, 휴대용 유전자 진단 도구를 이용한 감별은 아직 이루어지지 않고 있다.

## 2. 유전자 진단용 마이크로시스템 개발

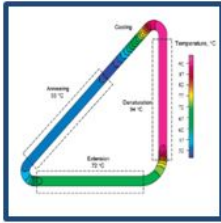
외국의 유전자 진단용 마이크로시스템은 개인 맞춤형 의학시대를 맞아 의료서비스에 대한 수요급증과 바이오산업의 발전과 맞물려 급성장하고 있는 시장이다. 고속, 고효율의 소형 유전자 진단용 마이크로 시스템의 개발이 지속적으로 이루어지고 있으며, 시장에서의 소형 유전자 분석장치가 차지하는 비중도 점차 커지고 있는 실정이다. 대표적인 소형 유전자 분석 장치로서 ROCHE의 Light Cycler Real Time PCR 기기, Caliper LifeSciences의 LabChip Systems, Applied Biosystems의 StepOnePlus Real-Time PCR 기기, Cepheid의 GeneXpert System 등이 있다.



그림 6. 외국에서 시판중인 유전자 분석용 마이크로시스템

이러한 소형 기기들은 수십분 이내에 PCR 반응을 수행하고 real-time 으로 분석할 수 있는 기기들이지만, 형광표지를 기본으로 하는 real-time 분석 시스템으로서 여러 개의 타겟을 동시에 분석하기에는 어렵다는 단점을 가지고 있다.

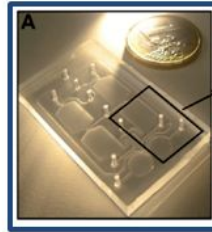
**Convection-based PCR system**  
The *Bau* group of Univ. of Pennsylvania



- 각 cycling step에 대한 정확한 시간컨트롤이 어려움
- Multiplex PCR이 불가
- 특허 : US20080176292

KR102007012199

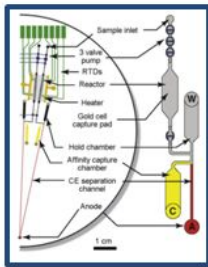
**Real-time NASBA device**  
The *Luke Lee* group at UC Berkeley



- 세 종류의 값비싼 Enzyme이 필요함
- 소비량이 많아 고가 공정임
- 특허 : US6379929B1

US 2001/0034048A1

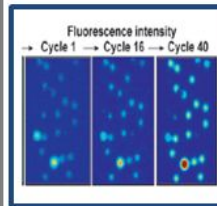
**Miniaturized PCR-CE system**  
The *Mathies* group at UC Berkeley



- 값비싼 전극 제작 및 웨이퍼 사용에 따른 고가 프로세스
- 구동 시스템의 소형화 필요
- 특허 : US06261431

WO2008154036A1

**Droplet-based PCR system**  
The *Colston* group at Univ. of California, Davis



- Droplet 내의 생화학 반응 모니터링을 위한 고감도 측정 시스템 필요
- 특허 : US 20090263870A1

WO2009003184A1

그림 7. 외국의 유전자 분석용 마이크로 시스템 개발 현황

이와 더불어, 대학교를 중심으로 새로운 개념의 유전자 진단 칩 도구들이 개발되고 있으며, 대표적으로 Bau 그룹 (Univ. of Pennsylvania)의 대류기반형 PCR 시스템 [10], Luke Lee (UC Berkeley)그룹의 Real-time NASBA [11], Mahties 그룹 (UC Berkeley)의 소형 PCR-CE 시스템 등이 있다 [12]. 그러나 기존의 각 시스템들도 시간과 비용을 줄이고 소형화 한다는 공통적인 목적으로 연구가 진행되고 있지만, 그림 7과 같은 문제점들도 가지고 있다. 특히 PCR 시스템의 소형화와 더불어, 이를 분석하기 위한 광학 시스템의 소형화 및 샘플 전처리 시스템의 소형화가 동시에 이루어져야 하며, 이러한 각 기능부의 효과적인 통합이 이루어져야만 휴대용 통합 유전자분석시스템으로서의 의미를 가질 수 있을 것으로 예상된다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절 연구개발 내용 개요

본 연구 과제에서는 KAIST 서태석 교수팀 (제1세부 주관), 광주과학기술원 김민곤 교수팀 (제1협동), 솔젠트(주) 김광규 박사팀 (제2협동), 나노스코프시스템즈(주) 전병선 박사팀 (제3협동) 의 산학연 협동 연구를 통해 한우 이력추적 현장 검증을 위한 휴대용 SNP 유전자 분석 마이크로 통합 시스템을 개발하고자 한다. 연구 책임자인 KAIST 서태석 교수팀은 샘플 전처리-PCR-마이크로어레이 통합 디바이스 개발과 초소형 고감도 형광 검출 시스템 개발을, 광주과학기술원에서는 한우 SNP 유전자 분석을 위한 DNA microarray 디바이스 개발을, 솔젠트(주)에서는 한우육 판별을 위한 SNP 표지인자 선별 및 PCR 최적화를, 그리고 나노스코프시스템즈(주)에서는 초소형 고감도 형광 검출 시스템 상용화 연구를 수행한다.

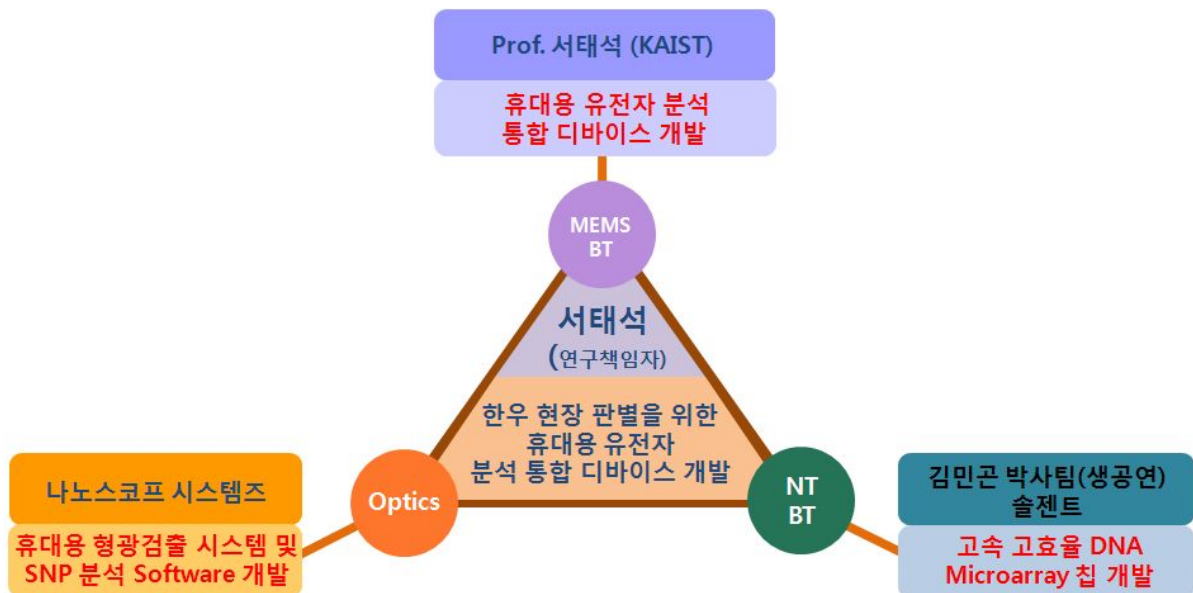


그림 8. 세부 연구 개발 협동 체계

1. 주관연구기관 (제1세부): KAIST 서태석 교수팀 - 휴대용 유전자 분석 통합 디바이스 개발 및 마이크로어레이 칩 측정을 위한 고감도 소형 형광 영상 시스템 개발
  - ▶ 소량의 쇠고기 샘플에서 세포 및 DNA 추출을 위한 샘플 전처리 소자 개발
  - ▶ 나노리터 스케일의 PCR 반응기와 마이크로어레이 통합 및 작동의 최적화
  - ▶ 샘플에서 유전자분석까지 현장에서 분석 가능한 통합 디바이스 개발
  - ▶ SNP 신호 획득을 위한 광학계 및 고감도, 고효율 검출기 개발
  - ▶ 미세한 형광 신호를 높은 SNR로 획득하기 위한 data acquisition electronics 개발
  - ▶ 고분해능 마이크로어레이 칩 영상획득을 위한 최적 설계
  - ▶ 소형 광학계 설계를 통한 마이크로어레이 측정 시스템 개발

2. 협동연구기관(제1협동) : 광주과학기술원 - 초정밀 한우 판별 위한 DNA 마이크로어레이 칩 개발

- ▶ 포토리소그래피 패턴칩에 기반한 재현성과 정확성이 높은 DNA 마이크로어레이 제작
- ▶ 마이크로 어레이 칩에서 한우 특정 SNP 유전자 검출을 위한 프로브 개발
- ▶ 혼성화 효율을 높이기 위한 3차원 DNA 마이크로어레이 표면 기술 개발
- ▶ 나노리터 스케일의 PCR 반응기와 DNA microarray 통합 디바이스 개발

3. 협동연구기관(제2협동) : 솔젠트(주) 참여 기업 - 한우 개체 및 품종 구별을 위한 다중 표지 인자 개발

- ▶ 한우의 개체 식별 및 품종구별을 위해서 한우/수입우의 특이적인 유전양상에 근거한 유전자 표지 개발
- ▶ DNA microarray 분석을 위해 선별된 SNP 유전자 표지들의 다중 PCR 조건 최적화 및 프로브 시스템 개발
- ▶ 농산물 품질 관리원 및 축산물 등급 판정소에서 제공될 체계적인 검체 (지역별 거세우, 암소, 숫소) 등을 확보

4. 협동연구기관(제3협동) : 나노스코프시스템즈(주) 기업 - 휴대용 마이크로어레이 칩 측정 시스템 상용화 기술 개발

- ▶ 마이크로어레이 칩 영상화 및 분석을 위한 신호 처리 소프트웨어 개발
- ▶ 고분해능의 대면적 마이크로어레이 칩 영상획득을 위한 광학계 및 검출기 최적 설계 및 개발
- ▶ 제품화를 위한 시스템의 안정성 평가
- ▶ 현장 샘플 이용한 실질적 환경을 반영한 성능 보완 기술 개발
- ▶ 사용자 친화적 인터페이스 구축

## 제2절 과제별 (세부 및 협동) 연구개발 내용 및 결과

1. 주관연구기관 (제1세부) KAIST 서태석 교수팀

- ▶ 최종목표: 휴대용 유전자 분석 통합 마이크로디바이스 개발 및 마이크로어레이 칩 측정을 위한 고감도 소형 형광 영상 시스템 개발

가. 1차년도 세부 연구내용

(1) 마이크로플루이드 칩 제작을 위한 fabrication 과정 최적화 및 prototype의 DNA 증폭 및 분리소자 개발

DNA 전처리, 증폭 및 분리, 분석을 위한 통합칩 제작을 위해 기본이 되는 microfluidic chip 제작 공정을 최적화하였다. 4 in. borofloat 웨이퍼를 이용하였으며, 마이크로 채널을 다양한 형태로 디자인하였다. 제작 공장은 아래 그림 9와 같다. 먼저 마이크로채널 웨이퍼 제작을 위해 4인치 유리 웨이퍼에 비결정질 실리콘 (amorphous silicon, a-Si)을 200 nm 두께로 화학증기증착법(CVD, chemical vapour deposition)을 이용해 증착한다. 이 후, 포토레지



스트를 스핀 코팅하고, 마이크로 패턴이 있는 마스크 올려, UV를 노광하여 포토레지스트를 패터닝한다. 이 후 UV에 노광된 포토레지스트를 녹여내고, 노출된 a-Si 패턴을 RIE (reactive ion etching) 법을 이용하여 깎아낸다. 이 후 노출된 유리 패턴을 불산(HF)을 이용하여 적절한 높이의 마이크로 채널로 식각한 후 나머지 a-Si 층을 RIE 로 다시 없애준다. 전극 집적을 위한 면은 sputtering 법을 이용해 20 nm Ti과 200 nm Pt 으로 순차적으로 증착한다. 이 후 동일한 방법으로 포토레지스트를 패터닝 하고, 왕수 (Aquaesia)를 이용하여 노출된 Pt 면을 녹여내어 패터닝한다. 마지막으로 마이크로 채널 웨이퍼와 전극 웨이퍼를 glass-glass fusion bonding 법을 이용하여 vacuum furnace 내에서 붙여, 칩 제작을 마무리 한다.

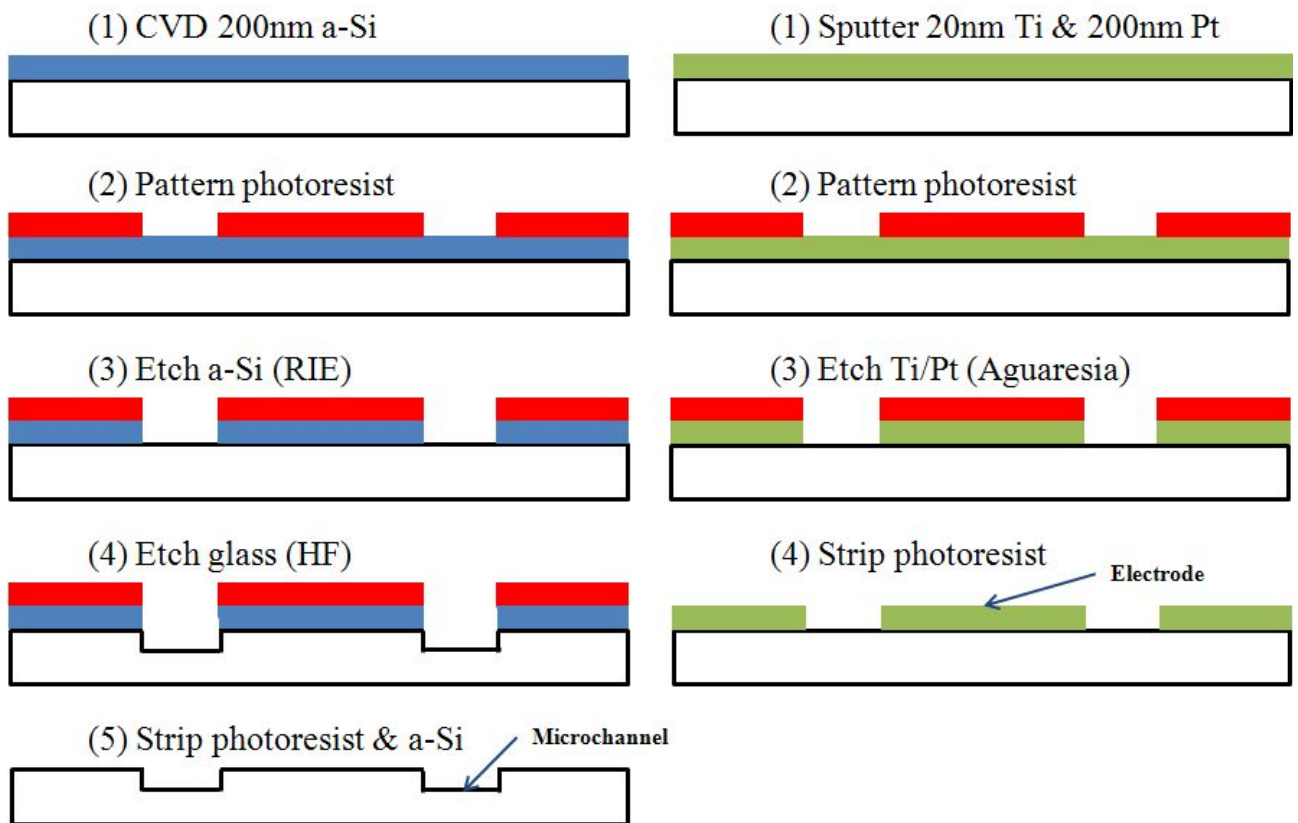


그림 9. 전극 및 마이크로 채널이 통합된 microfluidic chip FAB 공정

아래 그림 11은 이렇게 제작된 Prototype의 microfluidic chip을 보여준다. 나노스케일의 PCR 소자, 증폭된 유전자 분리를 위한 micro-CE (마이크로 전기영동, micro capillary electrophoresis) 등이 지름 4 in, wafer 위에 모두 통합되어 있는 모습을 볼 수 있다. PCR 반응의 온도 센싱을 위해 RTD (resistance temperature detection) 전극이 붙어 있으며, 이 위에 필름형 heater를 집적하여, PCR 반응을 수행한다. RTD 전극은 4침 타입 (four-probe type) 으로서 가운데 2개의 전극으로는 4 mA 의 일정한 전류를 흘려주고 양 끝의 2개의 전극으로는 온도에 따른 저항변화에 의한 전압을 측정함으로써, 정확한 온도 센싱이 가능하다. RTD 전극영역과 PCR 반응기 영역을 덮도록 필름형 히터를 부착해 줌으로써 PCR 반응기의 온도 변화를 LabVIEW시스템으로 자동 측정하도록 하였다. 집적된 PCR 칩의 정확성을 나타내는 온도그래프 및 thermocycling 거동을 아래 그림 11에 나타내었다. 일반적인

상업용 PCR 기계의 경우 온도 ramping rate가 3°C/s 인 것에 비해, 집적된 PCR-CE chip은 가열에 대해 8°C/s, 냉각에 대해 5°C/s 의 매우 빠른 거동을 보여줌으로서 고속의 DNA 분석이 가능하도록 하였다.

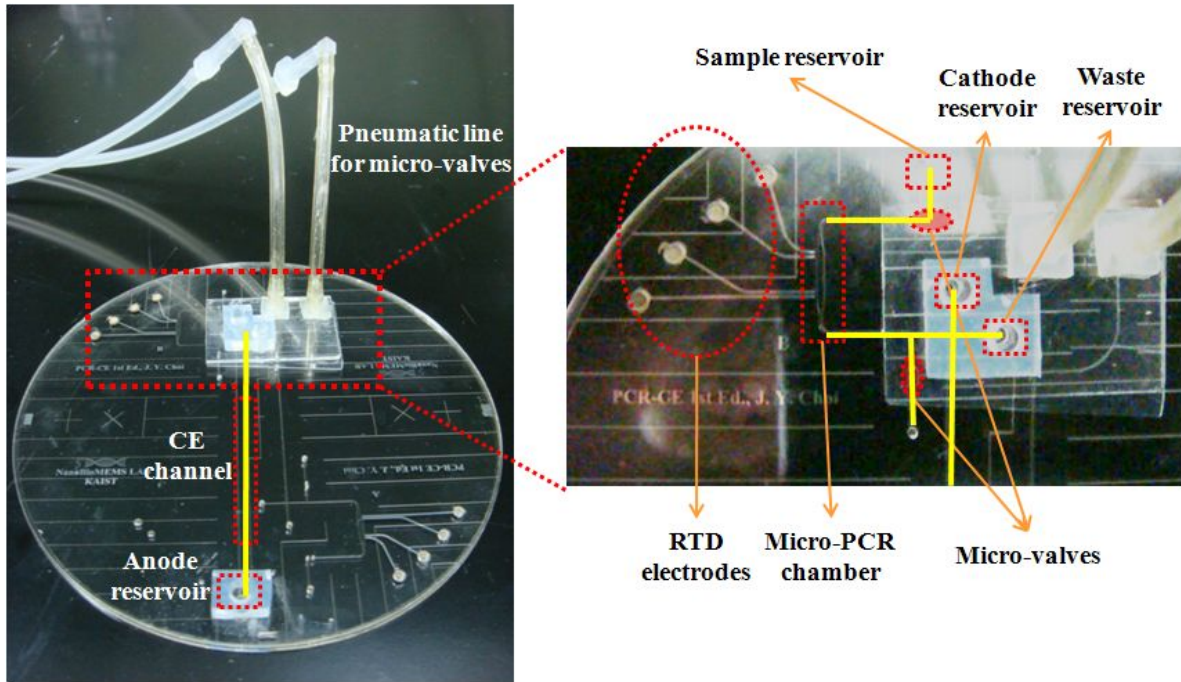


그림 10. Prototype의 PCR-CE 마이크로 디바이스

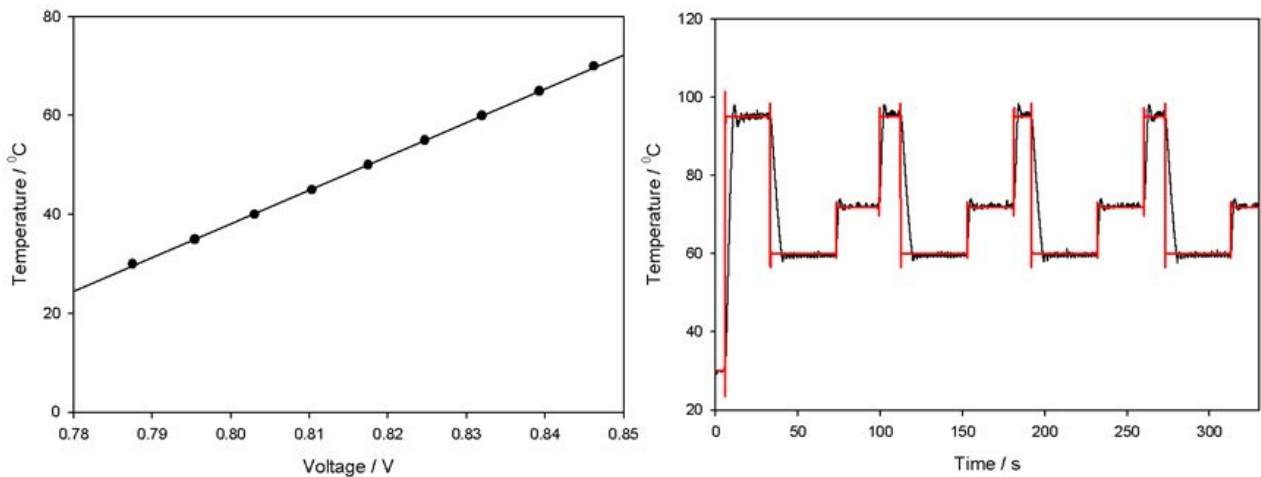


그림 11. RTD 전극의 전압변화에 따른 온도 변화 및 micro-PCR 의 thermalcycling 거동

이와 더불어, 채널에서의 유체흐름 조절을 위한 microvalve 시스템이 칩에 동시에 집적되어야 한다. PDMS(polydimethylsiloxane) membrane을 이용하여 진공이 걸릴 경우 membrane이 위로 구부러져 유체채널이 열리고, 압력이 걸릴 경우 PDMS membrane이 펴져서 채널이 막히는 원리를 이용해 micro-valve system을 구축하였다. 또한 진공 및 압력



상태를 LabVIEW 프로그래밍을 통해 자동화 하였다. 또한 칩에서의 2개 이상의 micro-valve를 운영하기 위해 최대 16개까지 사용이 가능한 솔레노이드 밸브 시스템을 구축하였으며, 이를 아래 그림 12에 나타내었다.

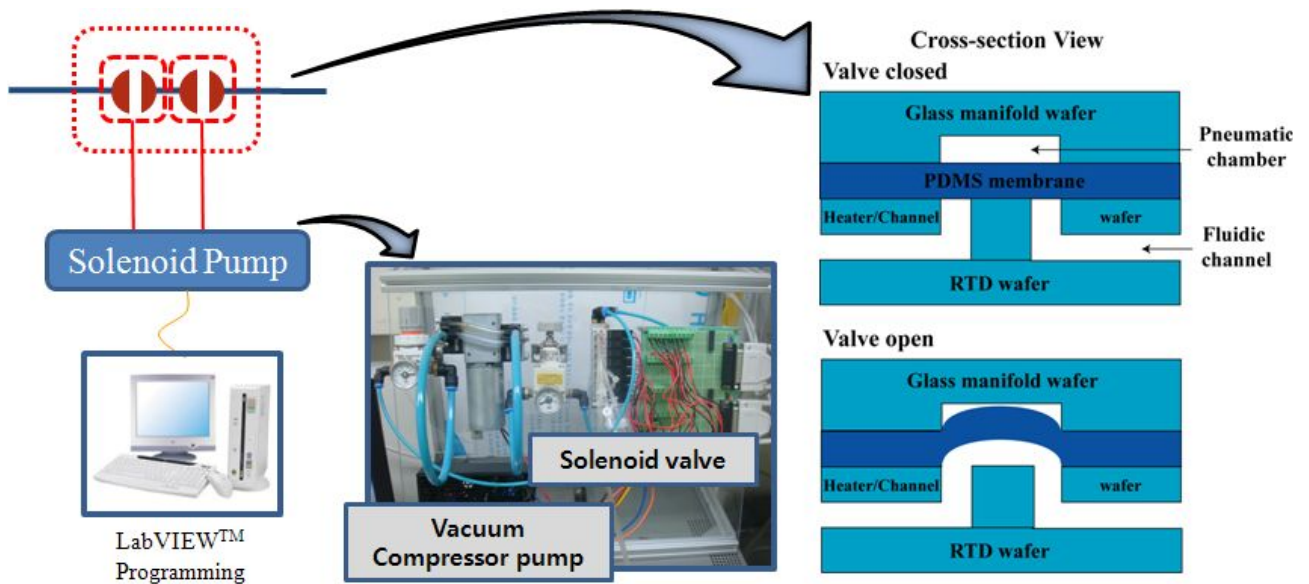


그림 12. Microfluidic device에 이용되는 Micro-valve 시스템 구성도

위와 같이 집적된 Protyppte의 PCR-CE 마이크로 디바이스를 이용하여 솔젠트(주)에서 1차적으로 제공된 한우 표지인자 7개를 사용하여 분리가 일어나는지 분석하였다. Micro PCR 반응의 세부 변수를 조절하기 위해, 먼저 CE 부분만 이용하여, 증폭된 한우와 비한우 산물이 효과적으로 칩에서 분리되는지 분석하였다. 아래 그림 13과 같이 1차적으로 선별된 한우 SNP 인자는 7-plex allele-specific PCR을 통한 product로 분석하였으며, MDH2는 PCR 반응의 control peak 이며, SRY 는 암수 구별 (수소에서만 생성), 그리고 SNP1, 8, 3, 6, 7 peak은 수입우에서 발현빈도가 매우 높은 표지인자이다. 따라서 한우에서는 5개의 peak이 매우 낮은 빈도로 발생하여야 하며, 수입우에서는 높은 빈도로 peak이 발생되어야 한다. 아래 그림 13과 같이 한우 암소에서 control peak 만 나오며 수소에서는 male임을 나타내는 SRY peak 이 더 나오게 된다. 하지만 SNP1, 8, 3, 6, 7 모두 product가 없음을 확인함으로써 한우 샘플임을 알 수 있었다. 반대로, 수입우에서는 SNP product에서 4~5 개의 높은 빈도의 peak을 보임으로서 한우와 구별되는 profile을 얻을 수가 있었다.

결과적으로, 1차년도에 설계된 micro PCR-CE chip과 이에 필요한 microvalve 시스템 및 분리능이 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있다. 특히 Micro CE의 경우 기존 CE 기기로는 수십분 걸리는 분석시간을 6분 이내로 줄임으로서 칩에서의 CE 분석이 정확도와 더불어 고속으로 분석이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

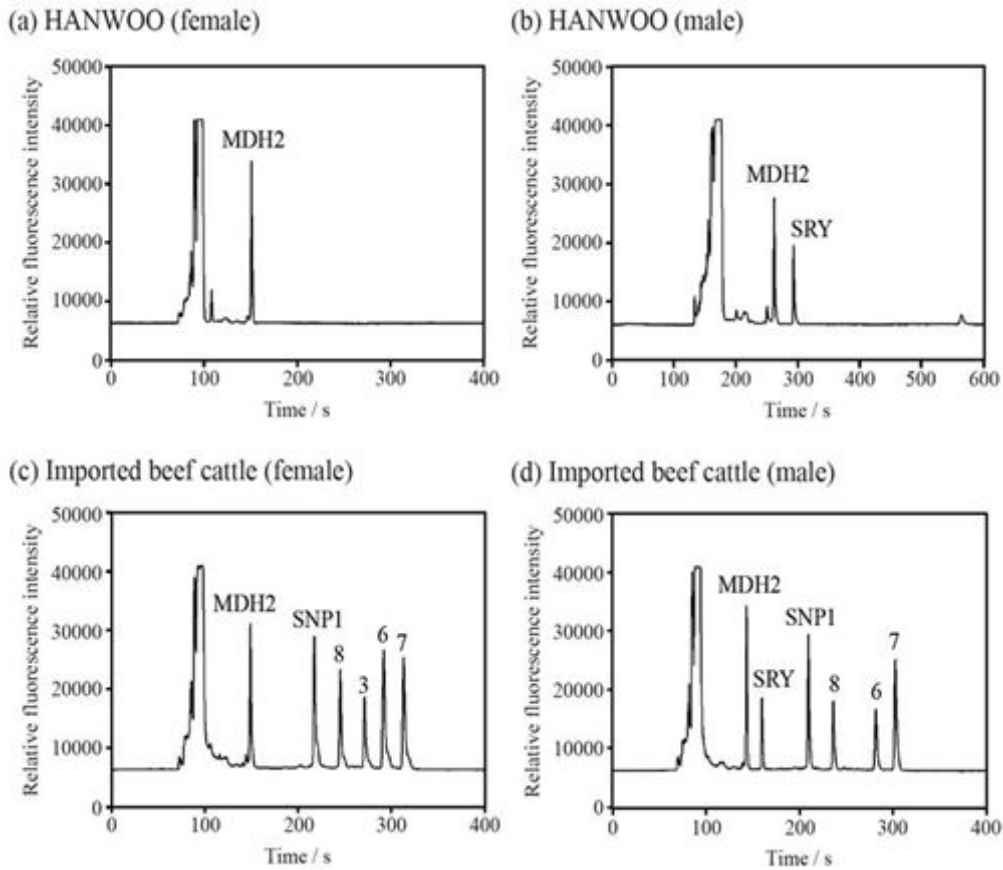


그림 13. 마이크로 전기영동 칩 (Micro-CE) 에서의 한우 표지인자 7개에 대한 샘플 분석 결과

## (2) 형광검출시스템 개념 설계 및 광학계 설계

시스템을 개발하기에 앞서 상용 형광스캐너에 대한 사전 조사가 있었다. 당시 형광 스캐너로 널리 사용되고 있는 제품은 Molecular Device 사에서 개발된 Genepix 4200이다. Genepix 4200의 장점은 넓은 스캔영역과 우수한 형광 영상을 제공한다는 점이며, 단점은 시스템의 크기가 커서 휴대하기는 용이하지 않다는 점이다. 또한 본 연구에서 요구되는 spec에 비해서 over-spec되어있는 제품이다.

CCD를 기반으로 한 Wide-field 형광 현미경의 경우 영상 획득 속도가 빠르고 시스템의 구성이 간단한 반면, 검출기의 감도가 떨어져서 미세한 형광 신호 즉, 마이크로 어레이에서 들어오는 형광신호를 검출하기에 적합하지 않다고 판단되었다. 감도가 높은 검출기인 PMT를 사용하기 위해서는 Laser를 기반으로 한 빔을 스캐닝 해주는 절차가 반드시 필요하다. Stage scan 방식은 광원에서 시편까지 중계광학계가 들어가지 않고 stage의 stroke이 클수록 스캔영역이 넓다는 장점이 있지만 시스템의 제어를 위해 필요한 장비(driver, encoder 등)들의 부피가 커서 소형화가 어렵다는 단점이 있다. Beam scan 방식은 빠르고 소형화가 가능하다는 장점이 있지만, 스캔영역을 수 십 um로 확장시키기가 어렵고 중계광학계의 설계가 어렵다는 단점이 있다. 본 연구의 스캔영역 최대 3mm x 3mm로 측정영역의 최대값을 설정하고 beam scan 방식의 가능성을 1차년도에 타진해보기로 하였다.

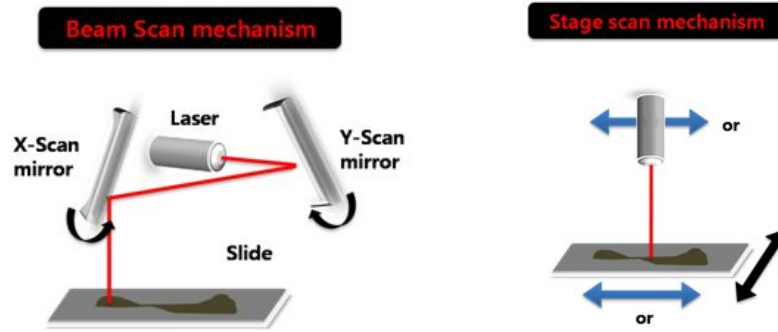


그림 14. Beam scan mechanism 과 Stage scan mechanism

시스템의 개념도는 아래와 같다. Laser 파장은 투과시키는 dichroic mirror를 지나 2축 scanner를 통하여 beam 스캔하게 된다. 스캔된 beam은 중계광학계(Relay optics)를 통하여 그 배율만큼 확대되고, 대물렌즈에 입사하게 된다. 방출되는 형광은 대물렌즈와 중계광학계 그리고 2축 scanner를 거치면서 역스캔이 된다. 형광 파장은 반사시키는 dichroic mirror를 맞고 반사된 형광은 collecting lens를 통하여 pinhole을 거쳐서 검출기로 들어오게 된다. 여기서 pinhole은 초점평면외에서 들어오는 잡광을 제거해주는 역할을 하여서 noise 절감효과를 가지고 오고, 공초점 효과를 통해서 우수한 광축방향 분해능을 가지게 된다.

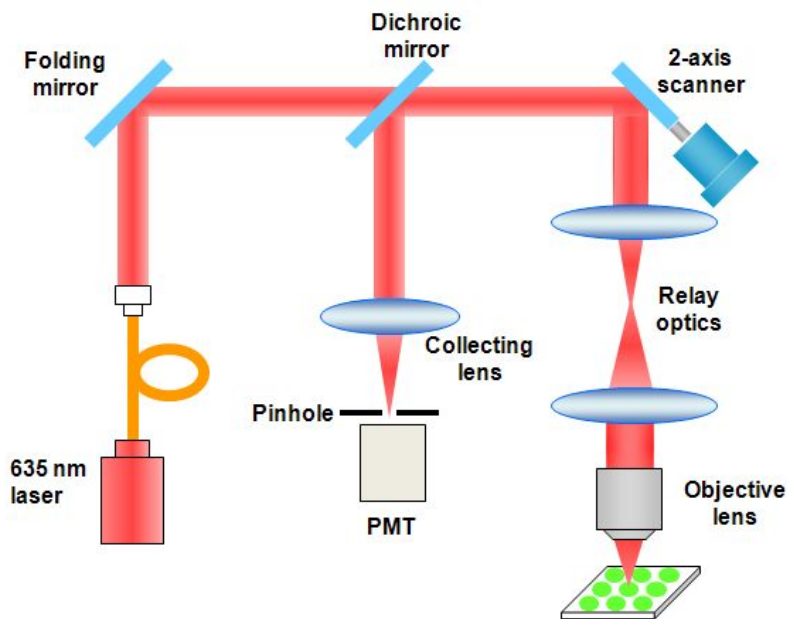


그림 15. 본 연구과제를 위한 형광검출 장치의 시스템 개념도

형광 dye가 Cy5 (absorption : 620 ~ 640nm / emission : 650 ~ 670nm)로 결정되었으므로, 광원의 조건은 635nm를 중심파장으로 가지고 출력이 4mW 이상인 laser로 결정되었다. 집적화 및 소형화를 고려하여 Blue Sky Research 사의 635nm diode laser(103mm×24mm×15mm)가 적합한 소형 광원으로 선정되었으며, 이는 상용 gas laser의 크기의 1/100 수준의 크기로 매우

작다고 볼 수 있다. 또한 Control voltage를 이용하여 laser 출력을 0~20mW까지 조절가능하며, fiber-coupled 방식으로 공간 활용의 유연성을 높여주는 장점을 가지고 있다.

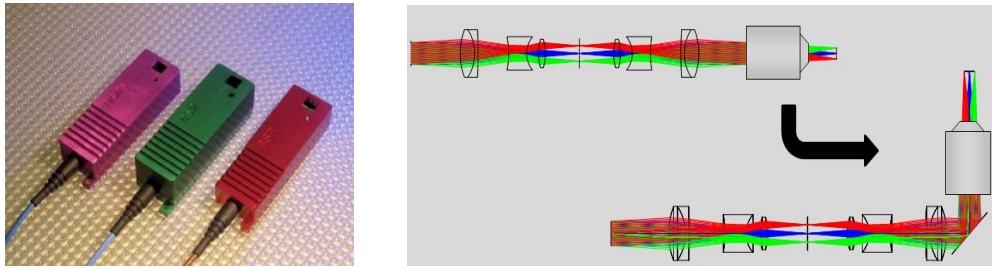


그림 16. 635 nm Fiber-coupled laser module (좌) 과 중계 광학계 설계 (우)

Beam scan 방식에서 필수적인 부분이 바로 scan lens와 tube lens가 결합된 중계광학계이다. 또한 소형화를 위한 가장 필수적인 과정은 중계광학계(Relay optics)의 길이를 최대한 짧게 설계하는 것이다. 이를 위해서는 중계광학계의 배율을 낮추어야 한다. 전체 시스템의 길이를 350mm 이내로 설계하기 위해서 중계광학계의 길이는 최대 200mm이하로 결정하였다. 본 연구에서는  $\pm 3^\circ$  scan angle을 성능 목표로 정하였다. Inverted type으로 설계를 하여야 하므로 tube lens끝에서 대물렌즈 사이의 거리가 최소 30mm 이상되도록 설계하여야 한다. ZEMAX라는 상용 광학렌즈설계 S/W를 이용하여 전체 길이가 150mm인 1:1 배율을 가진 diffraction limit을 만족하는 중계광학계 설계를 완료하였다. 일반적인 상용 Tube lens의 tube length 만 180mm인 점을 보았을 때 중계광학계가 매우 짧게 설계가 되었다는 것을 알 수 있다.

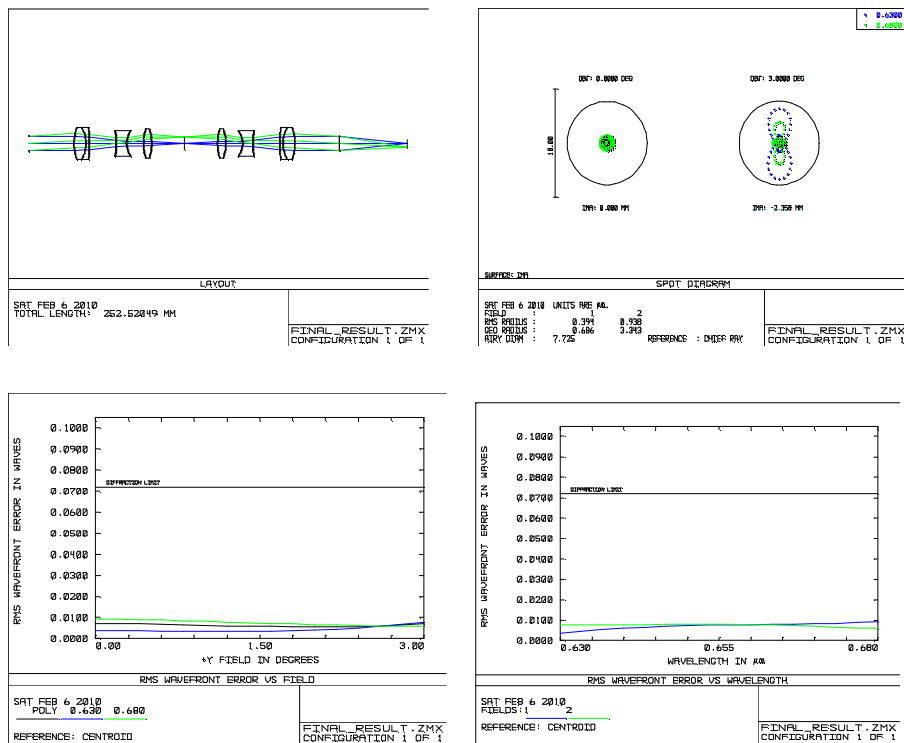


그림 17. 중계 광학계 설계도 및 성능 분석

1:1의 비율로 설계된 증계광학계로 인해서 Scanning mirror의 사이즈는 9mm이상의 폭을 가져야 한다. Scanning mirror의 사이즈가 클수록 scanning 속도가 떨어지게 된다. 하지만 본 연구의 목표는 대면적(3mm x 3mm)의 미세한 형광 영상을 획득하는 것이므로 최소 0.1 frame/sec 정도의 속도만 만족하는 scanning mirror를 선정하였다. 이에 GSI 사의 6230H 모델을 선정하였으며, mirror 폭이 12mm이고 200Hz의 scanning 속도를 가지므로 본 연구에 적합하다고 할 수 있다.

Cy5를 사용하기 때문에 excitation 파장인 635nm는 반사시키고 emission 파장인 650~670nm는 투과시키는 Dichroic mirror를 선정하여야 한다. excitation 파장대역 620~640nm와 형광 emission 파장대역 650 ~ 670nm를 따로 검출하기 위한 excitation filter와 emission filter 역시 사용하여야 한다. 본 연구에 가장 적합한 Semrock 사의 LF635 - Laser fluorescence filter set을 선정하였다.

#### 나. 2차년도 세부 연구내용

(1) 나노리터 수준에서 PCR 하기 위한 PCR 반응기 제작 및 LabVIEW S/W 자동화 프로그램 개발과 마이크로플루이딕 상에서 DNA를 포획할 수 있는 포획디바이스 개발

1차년도에서 개발된 prototype의 PCR-CE chip으로부터 PCR 반응을 효율적으로 제어하기 위해 마이크로 채널의 dimension 과 길이 등을 고려하여 실제 PCR-CE 통합반응을 고속으로 시킬 수 있는 chip을 재설계하고 제작하였다. 기존 PCR-CE chip의 경우 CE 채널에 DNA 분리를 위해 채워넣은 LPA (linear polyacrylamide) gel이 PCR chamber의 열변화에 반응하여 제대로 DNA를 분리시키지 못하는 단점들이 발견되었다. 따라서 새로이 설계된 PCR-CE chip의 경우 CE channel과 PCR chamber 사이의 간격을 두고, 채널의 dimension 은 더 좁게 설계하고 제작하였다. 새롭게 설계된 PCR-CE chip의 경우 micro PCR chamber의 용량이 960 nL로서 1  $\mu$ L가 채 되지 않는다. 이는 기존의 PCR 반응이 20  $\mu$ L에서 100  $\mu$ L 사이의 부피를 가진다는 것을 감안할 때 분석비용면에서 획기적인 감축이 가능할 것이며, 더불어 작은 thermal mass로 인해 고속으로 DNA typing 이 가능할 것으로 보인다.

그림 18에 보이는 것과 같이 DNA 증폭을 위한 PCR chamber가 있으며, 반응 동안의 고립조건을 주기 위한 PDMS micro valve가 집적되어 있다. 또한 RTD 온도센싱을 위한 전극과 증폭된 유전자를 분리하기 위한 CE separation channel로 구성되어 있다. 이렇게 집적된 마이크로 디바이스는 chip holder 에 위치하고, pneumatic line을 통해 micro valve를 작동시키게 되고, RTD probe를 이용해 전자구동회로와 연결된다. 새로이 집적된 PCR 반응의 thermal cycling profile과 CE 채널에서의 분리 과정을 그림 19에 나타내었다.

이와 더불어, 그림 20과 같이 기존에 분리되어 있던 LabVIEW를 이용한 자동화 S/W가 마이크로펌프, PCR 반응, CE 분리 과정을 한 번에 처리할 수 있는 통합 프로그램으로 개발되었다.

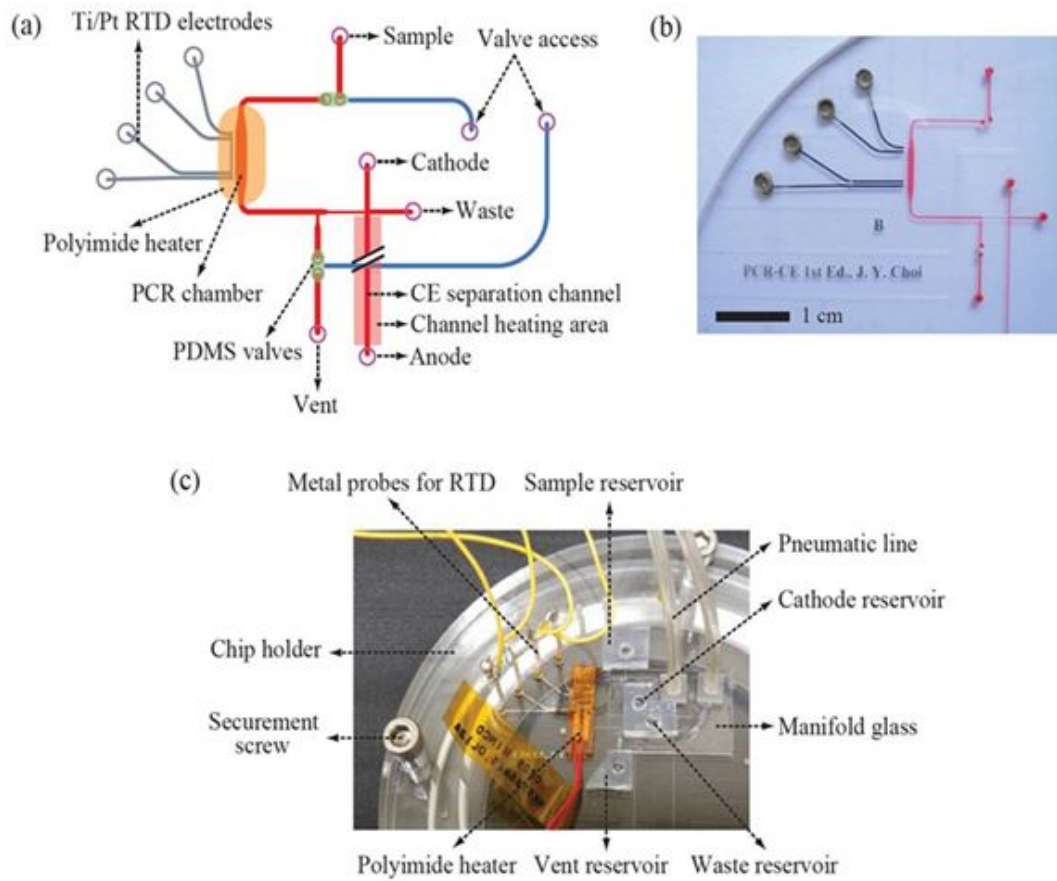


그림 18. 1st PCR-CE microdevice. (a) PCR-CE 칩 기능별 모식도, (b) 마이크로 채널이 염색된 PCR-CE 칩 사진

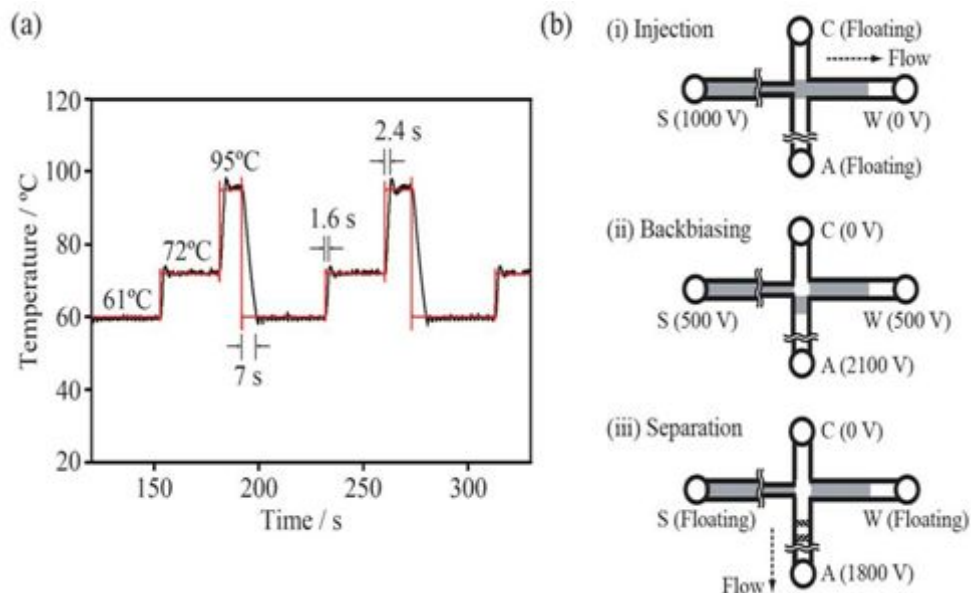


그림 19. (a) Micro PCR-CE 디바이스의 PCR thermal cycling profile, (b) 증폭된 DNA 분리를 위한 Micro CE 채널에서의 전기영동 단계



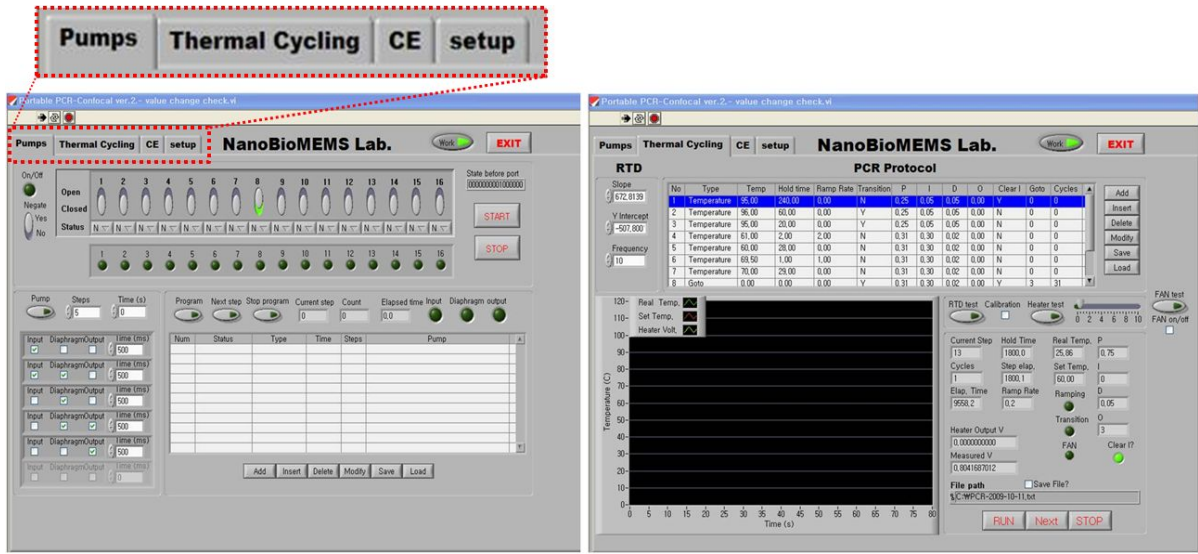


그림 20. Micro pump, PCR, CE 반응의 자동화를 위한 LabVIEW S/W 개발

PCR-CE 마이크로칩의 제작과 자동화 operation S/W 개발로 칩에서의 한우 DNA 증폭과 분리가 가능해졌지만, DNA 증폭 전단계인 DNA 포획과 정제를 위한 마이크로디바이스가 또한 통합이 되어야 한다. 이를 위해, DNA 포획과 정제용 마이크로디바이스를 제작하고 실제 DNA 샘플을 이용해 테스트 하였다. 고상추출법을 이용한 DNA 전처리 방법을 이용하였으며, DNA 포획효율을 높이기 위해, 마이크로 펌프시스템을 이용하여, 유체 흐름을 앞 뒤로 조절하여, 단일 flow로 흐르는 것보다 최대 70% 이상의 농축효율을 가지도록 하였다. 또한 다량의 샘플 용액을 위한 실리카 비드 층의 전처리 수용과정을 측정된 결과 시간당 1.95 mL 의 높은 처리능력을 보여주었다.

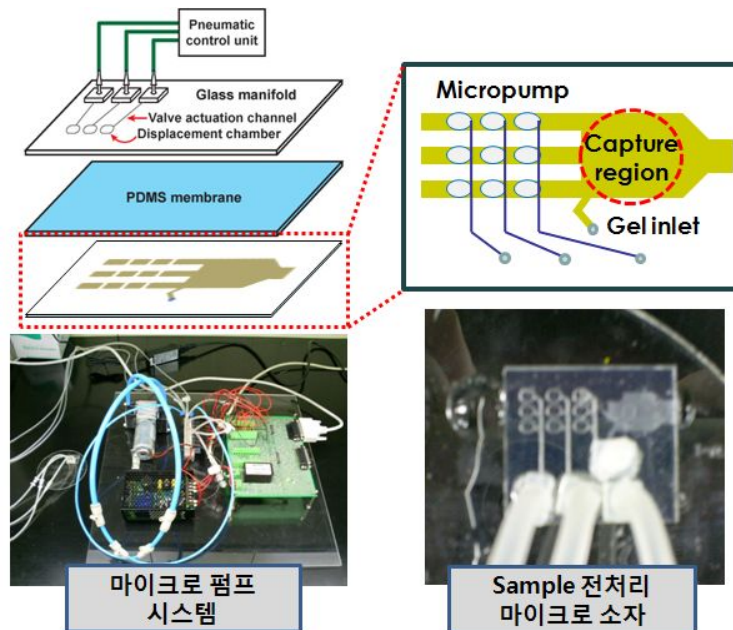


그림 21. DNA 포획을 위한 마이크로 펌프 시스템 구성 및 DNA 전처리 마이크로 소자

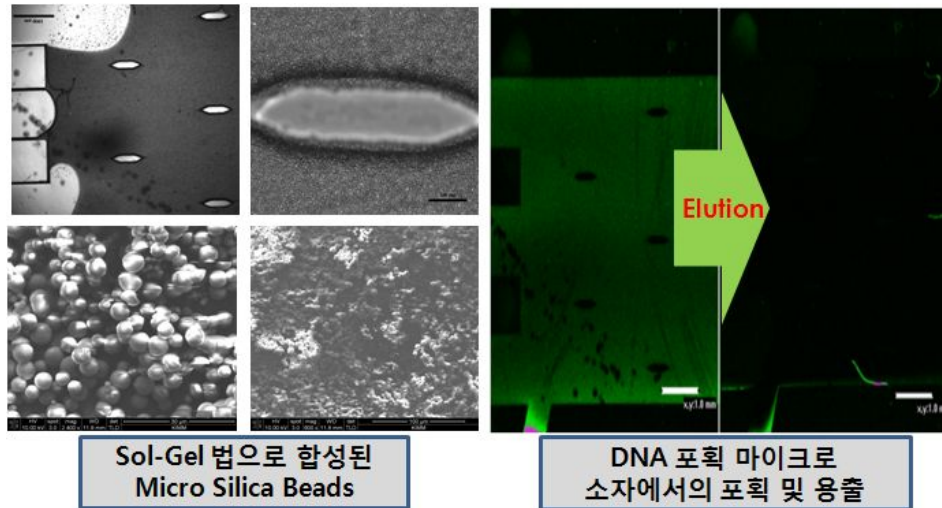


그림 22. Sol-gel 법으로 합성된 마이크로채널 내 실리카비드 및 이를 이용한 DNA 포획 및 용출

### (2) 시스템 Jig 설계 및 제작

1차년도에 설계된 형광 스캐너를 위한 Jig를 제작하고 기초적인 성능을 테스트 할 수 있는 frame 설계 및 제작을 완료하였다.



그림 23. 시스템 jig 설계 및 제작

### (3) Dye 수 확장에 따른 채널의 분할 및 결합과 분광 시스템 제작

#### (가) 광원 선정, 분광 시스템 설계 및 검출기 설계

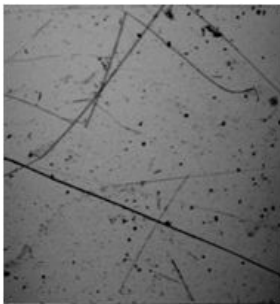
전체 회의 결과를 통해 1차년도에 사용이 확정되었던 형광 Dye인 Cy5 (absorption : 620 ~ 640nm / emission : 650 ~ 670nm) 외에 추가적인 dye의 사용은 없을 것으로 결론지어졌다. 판별도가 높은 probe의 개발로 사용되는 dye의 수가 1개 이므로 광원은 Cy5의 excitation을 위한 635nm의 fiber-coupled laser module 만을 사용하기로 결정하였다. 분광 시스템의 경우



excitation 파장인 635nm는 반사시키고 emission 파장인 650~670nm는 투과시키는 Dichroic mirror를 사용하였고, 형광 emission 파장대역 650 ~ 670nm을 따로 검출하기 위한 Semrock사의 LF635 - Laser fluorescence filter set을 선정하였다.

(나) Diode laser로 인한 반사영상 제거

본 시스템은 형광 스캐너이기 때문에 반사 영상을 획득이 되지 않아야 하는데도 불구하고, 그림 24 왼쪽과 같이 mirror를 찍어보니 반사영상이 획득됨을 알 수 있었다. 일반적으로 laser를 사용하는 광학 현미경의 경우 laser의 파장 스펙트럼이 중심파장을 기준으로  $\pm 2\text{nm}$  수준으로 상당히 sharp 하기 때문에 백색광원을 사용하는 widefield 현미경에 사용되는 excitation filter를 사용하지 않는다. 그런데 반사영상이 측정된다는 것은 mirror 반사된 laser 빔이 검출된다는 것이므로, diode laser의 파장 스펙트럼이 broad 해서 emission filter를 지나 검출된다는 것으로 생각할 수 있다. diode laser의 파장 스펙트럼을 측정해본 결과 595~660nm로 emission filter 투과 스펙트럼인 650 ~ 670nm를 침범한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 excitation filter를 설치하여서 그림 24 오른쪽과 같이 반사영상을 완벽하게 제거하였다.



- Mirror
- Laser : 16mW
- Gain : 0.5



- Mirror
- Laser : 16mW
- Gain : 0.5

그림 24. Excitation filter 가 없을 때 (왼) 획득한 영상과 excitation filter 가 있을 때 획득한 영상 (오)

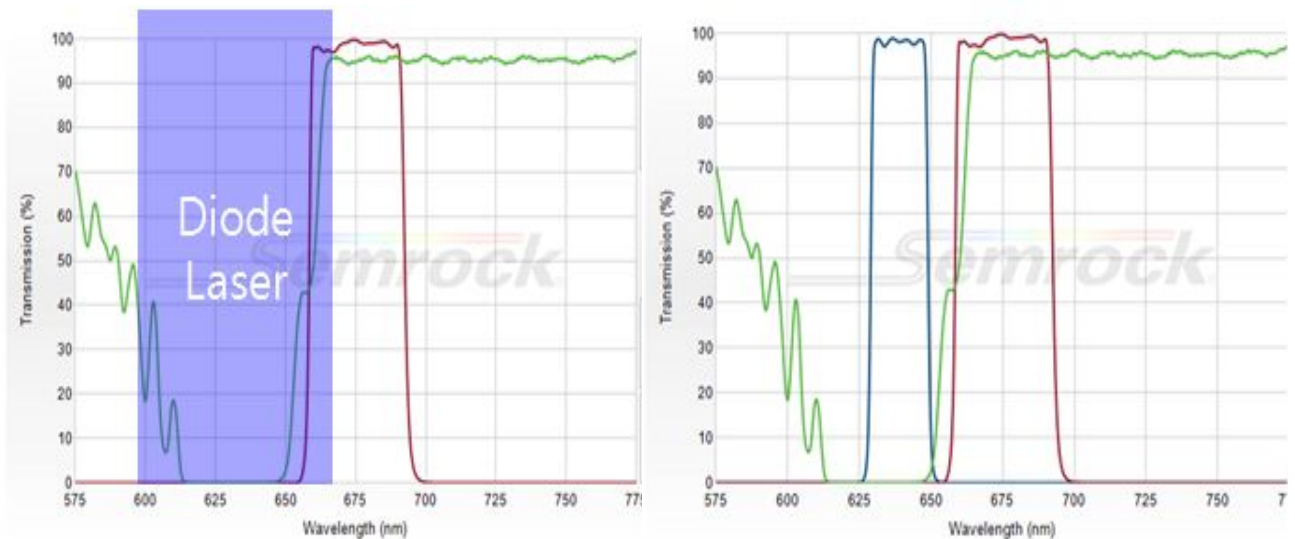


그림 25. Diode laser 파장 스펙트럼 측정을 통한 반사영상 제거 결과

(4) 신호의 SNR을 높이기 위한 data acquisition electronics 및 S/W 개발

(가) 핀홀 (pinhole) 적용에 따른 형광 신호 비교

공초점 현미경에서는 광검출기 앞에 핀홀이라고 부르는 공간 필터를 설치하여 광학 절편 효과를 가지게 된다. 이런 광학 절편 특성으로 3차원 영상을 획득할 수 있다. 본 연구에서는 3차원 영상 획득을 목표로 하지 않는다. 오직 2차원 영상만을 획득하면 된다. 하지만 핀홀을 설치하게 되면 외부 잡광을 차단하는 효과를 가질 수 있기 때문에 휴대용 스캐너로서 외부에서 실험을 진행할 경우 강한 외부 잡광을 차단해줄 수 있다는 장점이 있다. 따라서 핀홀의 사용 유무에 대한 비교 실험을 진행하였다. 광검출기 앞에 위치한 집광렌즈의 수치구경과 형광의 파장을 고려했을 때 5 $\mu\text{m}$ 의 작은 핀홀을 설치해야 하지만 본 연구에서 핀홀의 역할은 잡광 차단이 목적이 있기 때문에 75 $\mu\text{m}$ 의 핀홀을 사용하였다. 그림 26 오른쪽과 같이 75 $\mu\text{m}$ 의 핀홀도 충분한 잡광차단의 역할을 수행함을 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 잡광 차단 목적으로 75 $\mu\text{m}$ 의 핀홀을 사용하기로 하였다.

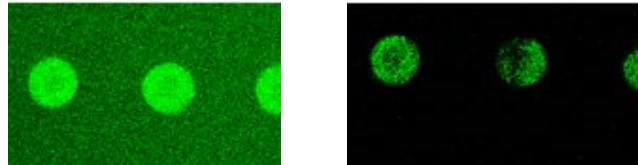


그림 26. 핀홀을 사용하지 않은 영상 (왼) 과 75 $\mu\text{m}$ 의 핀홀을 사용한 영상 (오)

(나) S/W 작성

광주과학기술원에서 공급해준 시편의 영상을 획득해본 결과 추가적인 모드가 필요하다고 판단하였다. 우선 영상의 contrast를 좋게 하기 위해서 average 방법을 추가하였고, 또한 형광 신호가 약한 시편의 경우 충분한 시간을 가지고 획득된 영상을 누적하여 디스플레이 하는 방법 또한 추가적인 기능으로 보완하였다.

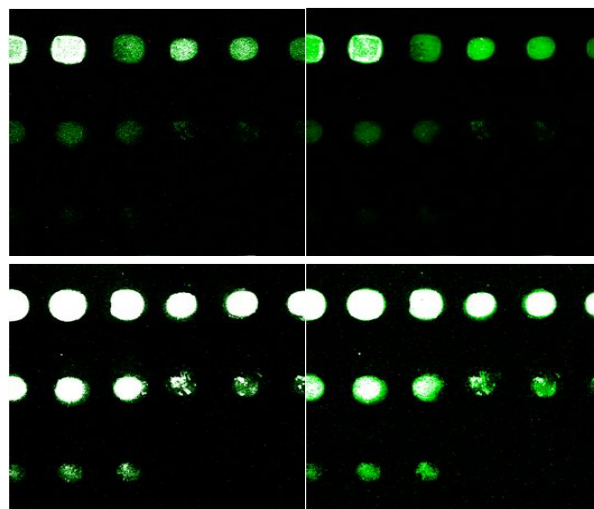


그림 27. 1장의 영상 (왼쪽 위), 10장을 average 한 영상 (오른쪽 위), 10장을 누적한 영상 (왼쪽 아래), 10장을 누적하여 average 한 영상 (오른쪽 아래)

다. 3차년도 세부 연구내용

(1) 샘플 전처리 디바이스를 이용한 한우 샘플 처리 (그림 28, 29 포함시킬 것)

2차년도의 샘플 전처리 디바이스의 경우 마이크로펌프를 이용하여 유체흐름을 앞 뒤로 조절함으로써 DNA 포획효율을 높일 수 있었다. 그러나 PCR-CE 또는 PCR-Microarray device 와 연계하기 위해서 필요한 자동화 개념의 microdevice로 개발이 불가피하였다. 더불어, 기존에는 micropump의 이용으로 기존 PCR-Microarray 의 micropump와 동시 집적이 어렵다는 문제점을 가지고 있었다. 따라서 고체추출법 (SPE)을 이용한 DNA 정제시 DNA 포획, DNA 세척, DNA 용출의 과정을 모두 자동화하여, micropump를 없애는 방향으로 새로운 개념의 샘플전처리 디바이스를 개발하였다.

아래 그림 28과 같이 샘플 reservoir ( $R_s$ ), 세척 용액을 담은  $R_w$  reservoir, 용출 용액을 담은  $R_e$  reservoir를 가지고 있다. 각 reservoir에 연결되어 있는 microchannel은 폭과 높이가 모두 다르다. 이 칩의 Shaft 에 회전력을 줄 수 있는 motor에 연결시켜 회전형 전처리 마이크로디바이스를 구현하였다. 회전이 1600RPM 에 도달하면  $R_s$ 로부터 DNA 샘플이 흘러나오고 sol-gel chamber에 포획된다. 하지만, 1600RPM으로  $R_w$ 와  $R_e$ 에 담긴 용액을 흘러나오게 하기는 채널의 저항 때문에 나오기가 힘들다. 2000 RPM에 도달하면  $R_w$ 에 있는 세척용액이 흘러나와 sol-gel chamber를 지나가면서 DNA외의 다른 불순물들을 제거해준다. 2500 RPM에 도달하면  $R_e$  에 있는 용출용액이 흘러나와 sol-gel chamber에 붙어있던 DNA를 용출시켜주면서 밖으로 나오게 된다. 이와 같이 추출된 한우/비한우 DNA를 이용하여 PCR-CE 법으로 분석한 결과 그림 29와 같이 성공적인 typing 이 가능하다는 것을 증명할 수 있었다. 이 방법은 회전력을 이용하여 샘플을 전처리함으로써 마이크로밸브 및 펌프가 모두 필요없으며 RPM 만 S/W로 조절하여 자동으로 샘플을 전처리하게 할 수 있는 시스템이다. 그러나 회전력을 주어야 한다는 점에서 기존 PCR-CE 및 PCR-Microarray device와 통합이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 현재 회전력을 이용한 샘플 DNA 전처리-PCR 통합 장치에 대해 연구가 진행 중에 있으며, 샘플 전처리 과정의 통합을 제외한 PCR-CE 및 PCR-microarray 의 통합과 휴대용 유전자 분석장치로서의 개발은 3차년도에 완료되었고, 성공적인 한우/비한우 분석이 가능하다는 증명하였다. (3차년도 결과 (2) 참조)

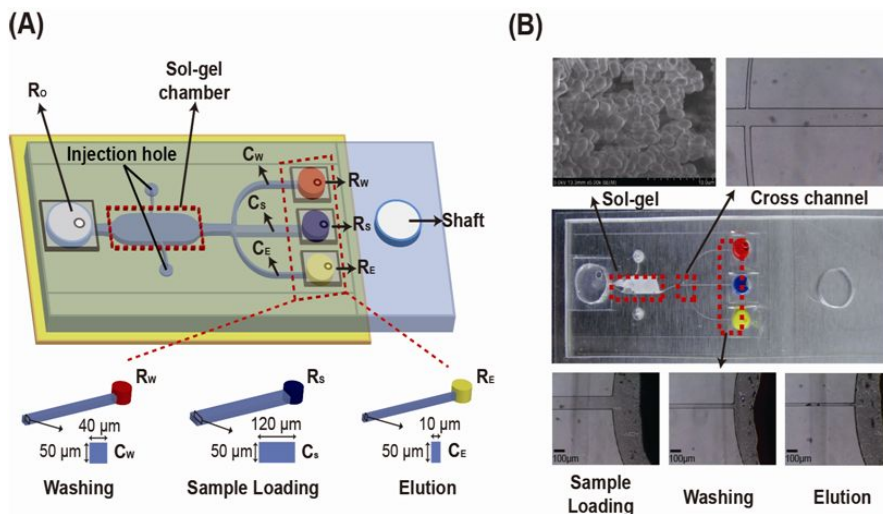


그림 28. DNA 샘플 전처리를 위한 마이크로디바이스

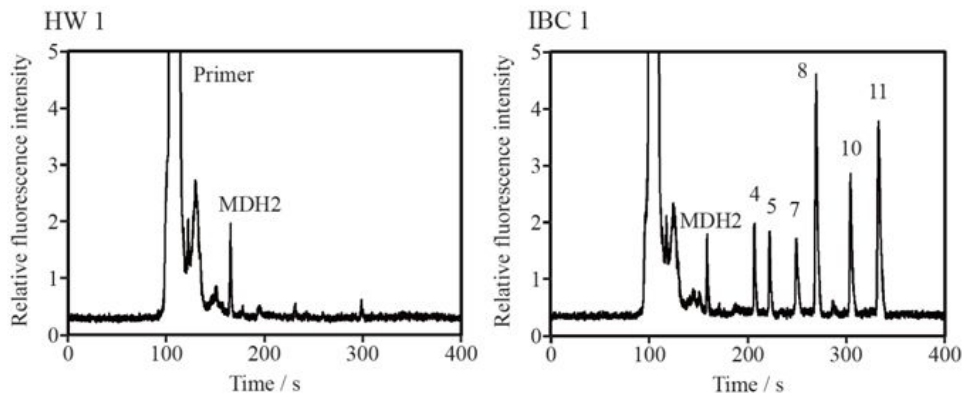


그림 29. DNA 전처리 마이크로디바이스로부터 추출한 한우(좌)/비한우(우) PCR-CE 결과

(2) 이동형 유전자 분석을 위한 PCR-CE Microdevice와 통합시스템과의 연계

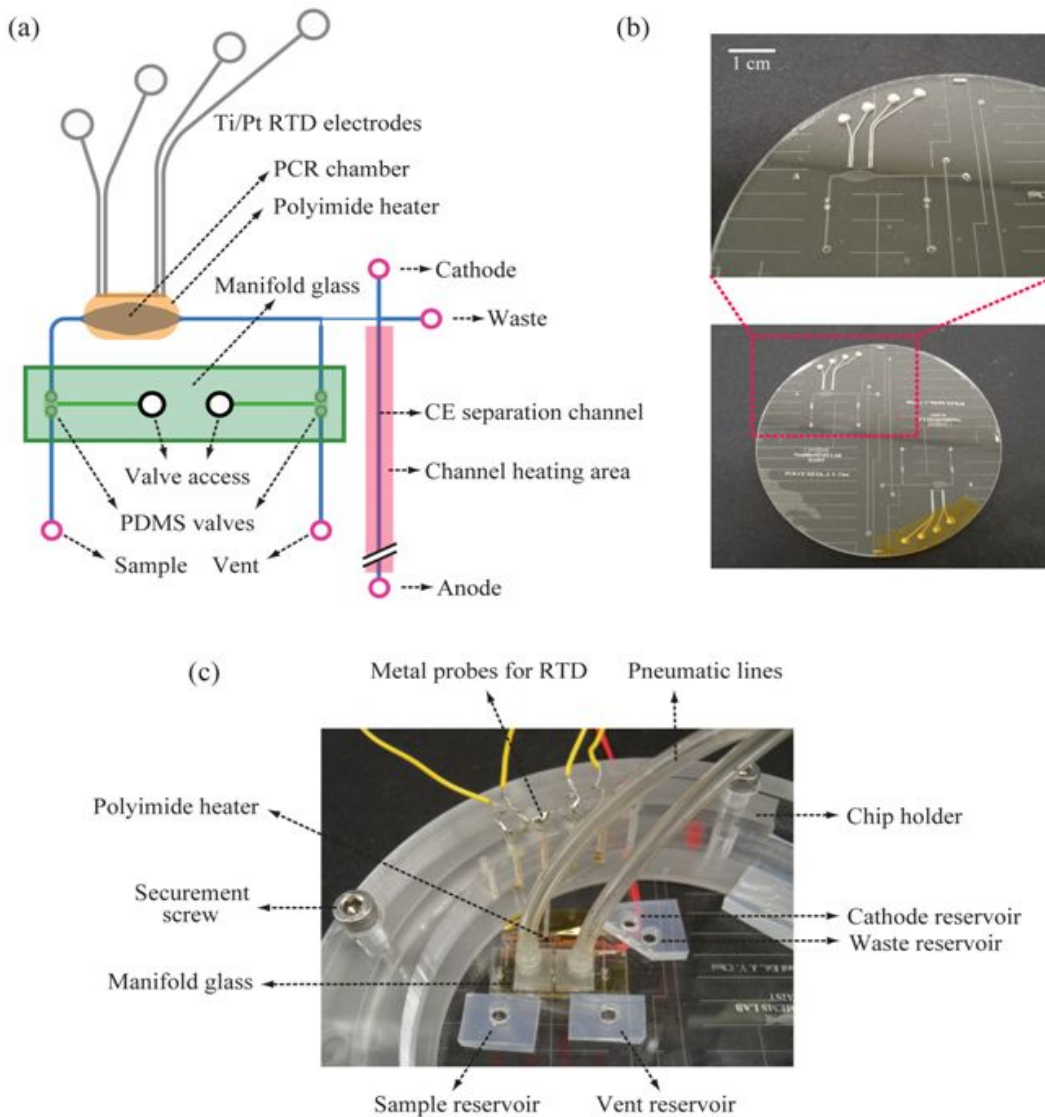


그림 30. (a) 2nd PCR-CE microdevice 개념도, (b) 통합용으로 제작된 PCR-CE microdevice, (c) portable genetic analyzer와의 연계를 위한 chip assemble 모습



2차년도에서 제작된 PCR-CE chip을 통합시스템과 연계시키기 위해, PCR chamber와 micro valve 의 위치를 수정한 2nd PCR-CE chip을 개발하였다. 이를 나노스코프시스템즈(주)에서 개발한 portable genetic analyzer 와 연결시키기 위해, RTD metal probe가 달려있는 Chip holder에 부착시키고, 이를 portable genetic analyzer의 냉각팬 아래에 위치시켰다. PCR chamber의 가열은 필름형 히터를 이용하였으며, thermal cycling 반응 (가열 및 냉각), microvalve 조절, CE 분리 과정 등 모두 portable genetic analyzer와 통신하는 laptop 컴퓨터의 LabVIEW S/W로 자동화되었다. 육우로부터 추출된 DNA는 PCR 반응액과 섞어, PCR 챔버에 채워주며, 양 끝의 마이크로밸브를 닫아주고, static 상태에서 온도 사이클링을 가능하게 하였다. 필름형 히터와 냉각팬에 의해 온도사이클링이 이루어지면서 DNA의 증폭이 일어나게 된다. PCR 반응 후에는 마이크로밸브를 열어주고, sample reservoir와 waste reservoir에 전극을 걸어, electrophoretic force를 이용해 증폭된 DNA를 CE 채널로 이동시키며, anode와 cathode 에도 전극을 걸어주어, separation 채널을 따라 DNA 가 이동하면서 채워져있던 polyacrylamide gel에 의해 크기에 따른 분리가 일어나도록 하였다. 마지막으로 separation 채널의 끝에서 소형 형광 검출기를 이용하여 분리된 DNA가 지나가면서 나오는 형광시그널을 얻게 되어, 분석이 가능하게 된다. 즉 PCR-CE 의 과정은 제작된 칩 위에서 수행되며, 이의 조작을 위한 전자회로, solenoid pump, high voltage supply 등은 모두 genetic analyzer에 통합되어 칩과 연계함으로써 소형화 및 자동화의 목표를 달성하였다.

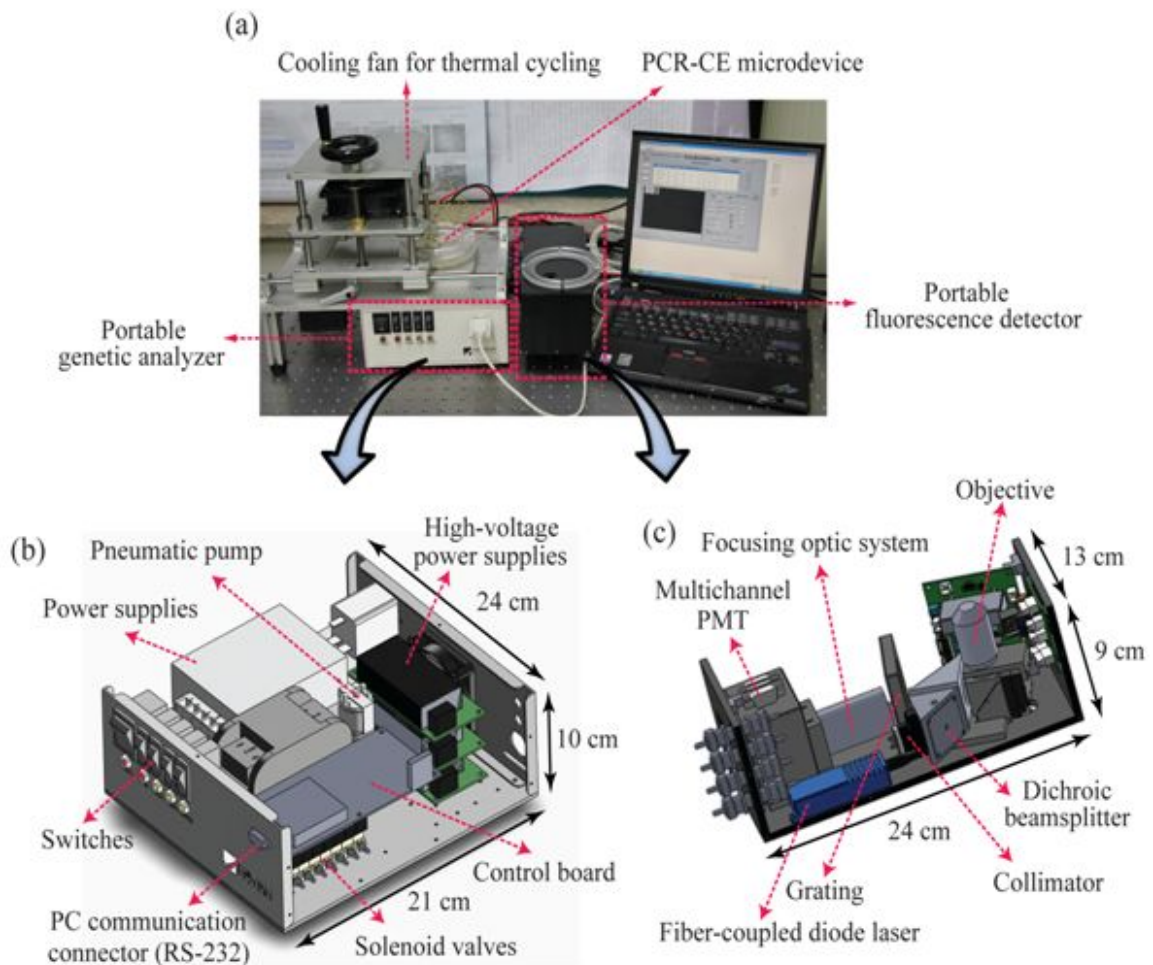


그림 31. (a) 이동형 유전자 분석 통합시스템 모습 (Portable genetic analyzer에 부착된

PCR-CE microdevice와 이동형 형광 검출기 및 laptop) (b) (주) 나노스코프 시스템즈에서 개발한 이동형 유전자 분석장치 (c) 소형화에 성공한 이동형 형광 검출기

그림 31의 (a)에서와 같이 각 세부에서 개발된 portable genetic analyzer와 이동형 형광 검출기 및 PCR-CE microdevice가 함께 통합되었다. PCR 반응은 portable genetic analyzer를 이용하여 수행하고, 이를 이동형 형광 검출기로 옮긴 후 CE를 통해 분석을 하게 된다. 솔젠트(주)에서 제공된 최종 선별된 11개의 SNP 표지인자를 실제 한우 및 수입우 DNA 샘플을 이용하여 통합시스템에서 분석하였다. 결과는 그림 32와 같다.

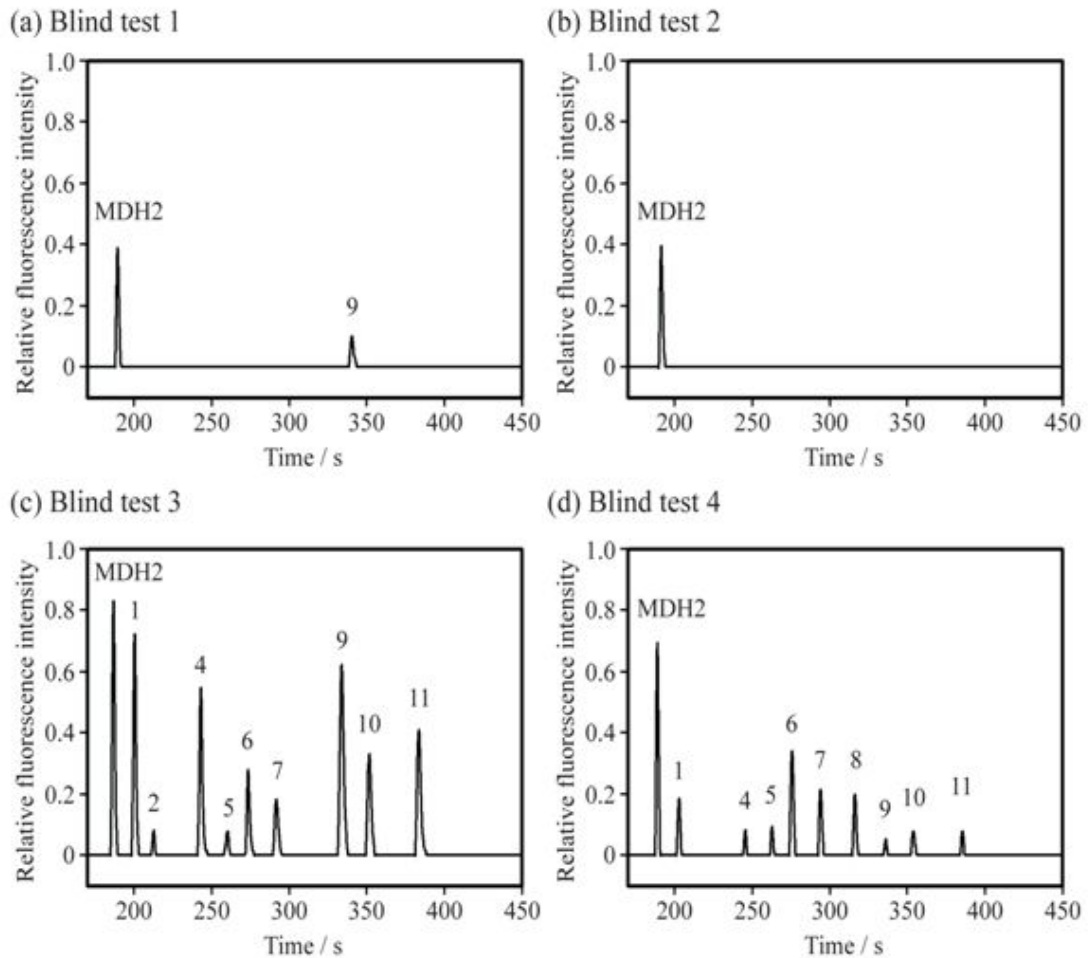


그림 32. 통합 유전자 분석 마이크로시스템을 이용한 Blind test 결과 (a) 한우, (b) 한우, (c) 수입우, (d) 수입우

솔젠트(주)로부터 제공된 최종 SNP 11개 선별인자와 control peak (MDH2) 의 12-plex multiplex allele-specific PCR CE 법을 이용하여 통합시스템에서 blind test를 수행한 결과 한우에서는 낮은 빈도로 SNP product이 나오는 것을 볼 수 있으며, 수입우에서는 상대적으로 많은 개수의 peak 이 분석되는 것을 볼 수 있다. 한우/수입우 판별 기준은 5개 이하로 나오면 한우, 5개 이상으로 나오면 수입우로 판명되며, 솔젠트(주)에서 한우 1,427두, 수입우 450두를 대상으로 분석한 결과 한우에 대해 99.5%, 수입우에 대해 97.1% 라는 정확한 판별도를 가지는

표지인자이다 (SNP인자에 대한 내용은 제2세부 내용 참고). 이와 더불어, 기존의 PCR 기기를 이용하면 100분 이상의 반응시간을 보이지만, 통합시스템에서는 70분으로 줄일 수 있었으며, 수 시간 걸리는 분리 및 검출 과정은 그림 32와 같이 7분 이내에 분석되었다. 결과적으로 80분 이내에 PCR-CE 가 모두 수행됨을 알 수 있었으며, 고속으로 정확한 분석이 가능할뿐더러, 수 마이크로리터의 샘플과 분석시약이 필요함으로 비용면에서 기존 방법에 비해 획기적인 감소가 이루어질 것으로 예상된다. 또한 PCR-CE 와 연계된 operation 장치들인 portable genetic analyzer와 형광 검출기 또한 소형화에 성공함으로써 이동형 유전자 분석장치로서의 플랫폼을 제시하고 있다고 사료된다.

(3) 이동형 유전자 분석을 위한 PCR-Microarray microdevice와 통합시스템과의 연계

Micro PCR 후 분석방법을 CE 법이 아닌 Microarray를 이용한 통합 디바이스 또한 구축하였다. Microarray 칩은 솔젠트(주)에서 최종 선별한 11개 SNP 마커와 1개의 control 에 대한 상보 시퀀스로 광주과학기술원에서 최종 디자인하였으며, 제작된 microarray chip은 PCR-Microarray 의 검출부 채널 아래에 PDMS를 이용하여 부착하게 된다.

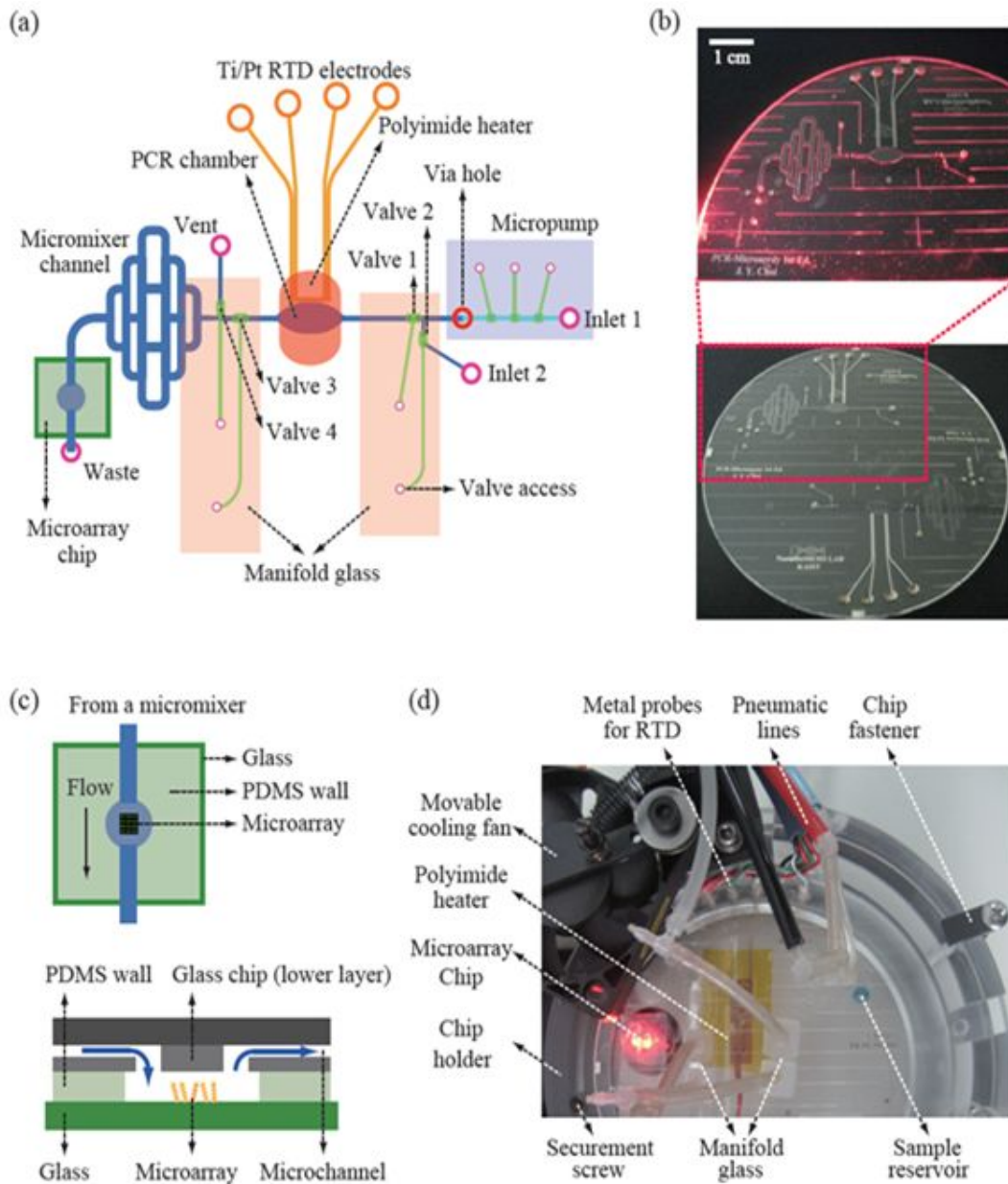


그림 33. (a) 통합 시스템과 연계하기 위한 PCR-Microarray 개념도, (b) PCR-Microarray chip 사진, (c) Microarray 기판의 칩과의 연계 부분, (d) 통합시스템과 연계하기 위한 Chip assemble

그림 33(a)와 같이 유체조절을 위한 Micropump와 Microvalve, PCR chamber, 온도센싱을 위한 RTD 전극부, PCR 후 PCR product와 hybridization buffer를 주입하여 mixing 하기 위한 micromixer, 그리고 mixing된 sample의 분석을 위한 microarray 부분으로 구성된다. 먼저 욕우로부터 추출된 DNA는 PCR 반응액과 섞어 PCR chamber에 채워준다. 이 후 양 끝단의 microvalve를 닫아주어, static 조건에서의 온도 사이클링이 일어나게 해준다. 필름형 히터와 쿨링팬을 이용해 가열 및 냉각이 지속적으로 반복되도록 자동화하였다. PCR 후에는 밸브를 열어주고, Inlet 1에서 혼성화 용액을 채워넣은 후, micropump를 이용하여 이를



PCR 챔버쪽으로 주입시켜준다. 혼성화 용액과 증폭된 DNA는 micromixer 채널에서 완전히 섞이게 되며, 지속적인 micropumping으로 microarray 까지 도달하게 된다. 30분에서 1시간 동안 microarray와 증폭된 DNA의 혼성화 반응을 시키며, 이 후 세척 용액을 같은 방식으로 흘려준 후, 소형 형광스캐너를 이용해 microarray의 형광신호를 얻게 되는 방식을 구축하였다. cooler와 heater, RTD metal probe, pneumatic line과의 연결을 위해 assemble하고 (assemble한 chip holder는 전기적으로 portable genetic analyzer와 연결) 이렇게 assemble 된 chip holder는 이동형 형광스캐너의 레이저부 위에 고정된다 (그림 34(a)). 이렇게 함으로써, 이동이나 일련의 조작 없이 LabVIEW S/W 로만 조작이 가능한 자동화 시스템을 구축할 수 있었다.

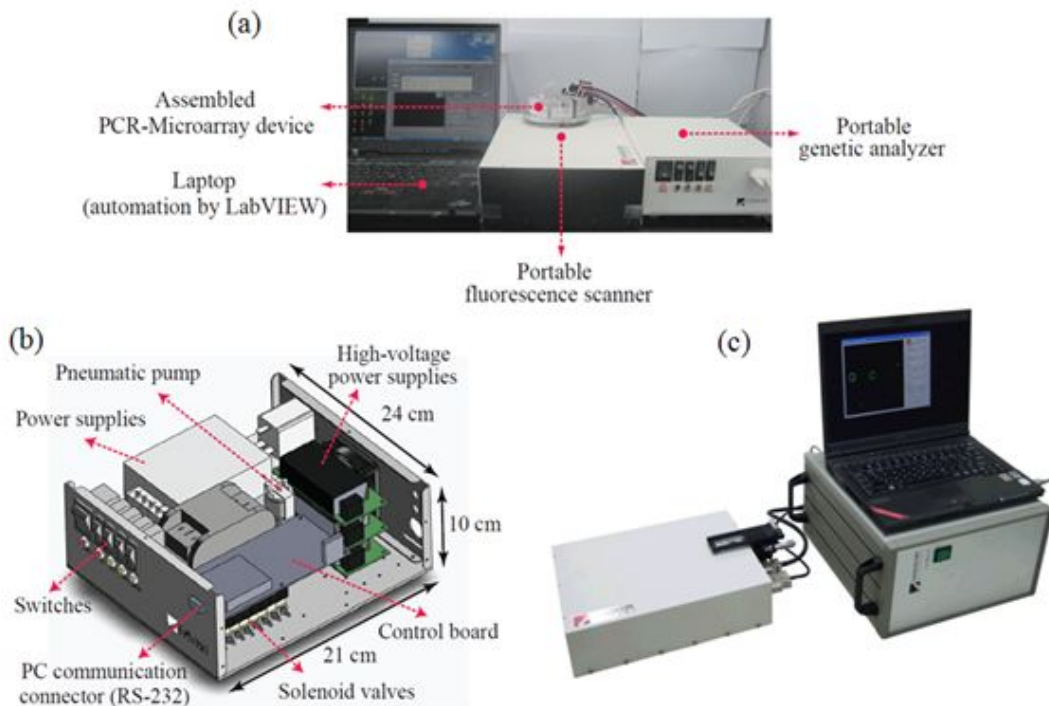


그림 34. (a) PCR-Microarray 통합시스템 그림. laptop과 이동형 유전자 분석시스템 및 이동형 형광스캐너로 이루어진다. (b) (주) 나노스코프 시스템즈에서 개발한 이동형 유전자 분석장치, (c) (주) 나노스코프 시스템즈에서 개발한 이동형 형광 스캐너 장치

그림 34의 통합시스템 구축으로 PCR-CE 뿐만 아니라 PCR-Microarray 분석 또한 이동형 통합 유전자 분석시스템으로 발전시킬 수 있었다. 통합 시스템을 이용하여 한우/비한우 샘플 분석결과는 그림 35와 같다.

한우에서는 MDH2 control signal과 4개의 SNP 마커가 분석된다. 하지만, 수입우에서는 10개의 SNP에서 모두 signal 이 관찰된다. PCR-CE 결과와 마찬가지로 5개이하의 SNP 개수에서는 한우, 이상에서는 수입우로 판별할 수 있다. 역시 기존의 PCR 분석기기를 이용하고 전기영동시스템을 이용한 분석시간보다 빠르게 분석이 가능하지만, PCR-CE 마이크로디바이스에 비해, microarray에서는 혼성화단계에 한시간정도의 시간이 더 걸리게 된다. 또한 PCR-CE 마이크로디바이스에 발견되지 않았던, non-specific signal 문제가 있다. SNP3의 경우 probe design이 현재 재검토중에 있어 SNP3 의 probe는 제외한 결과를 그림 35에 나

타내었다. SNP3에 대한 probe 디자인이 수정과 non-specific signal을 없애기 위한 실험 조건 최적화가 수행중에 있으며, 이를 통해 PCR-CE 통합 마이크로디바이스와 같이 PCR-microarray 에서도 동일한 포맷으로 한우/비한우 타이핑이 가능할 것으로 사료된다.

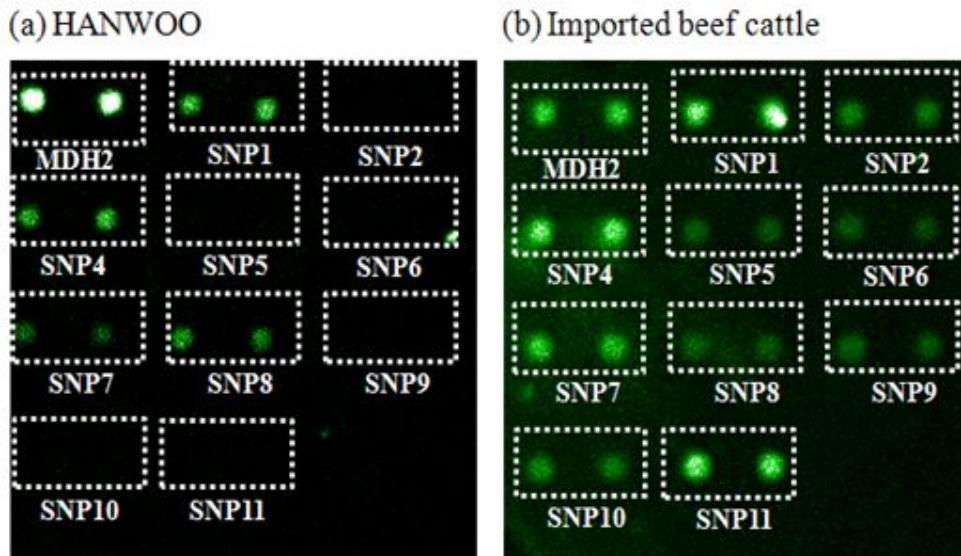


그림 35. 통합유전자분석 마이크로시스템을 이용한 SNP typing 결과 (a) 한우, (b) 수입우

결론적으로, 한우/비한우 마커 11개와 control 1개 마커에 대한 유전자 분석을 위해 본 연구팀에서는 PCR-CE 방법과 PCR-microarray 방법을 모두 이용하였으며, 각 시스템에 맞는 Microdevice 와 이의 구동을 위한 주변장치 및 광학장치를 모두 소형화하는데에 성공하였으며, 실제 한우/비한우 샘플을 이용한 분석에서도 기존시스템에 비교하여 고속, 고효율, 저비용으로 분석이 가능하다는 것을 증명하였다. 기존 시스템에서 1~3일 정도 소요되는 분석 시간을 PCR-CE 장치 기준 80분 이내로 줄였으며, 수마이크로리터의 샘플용량만으로도 분석이 가능하므로 저비용 고효율로 분석이 가능하다. 더불어, 마이크로플루이딕 기반의 Lab-on-a-chip과 주변 구동장치 및 광학장치의 소형화로 이동형 통합유전자 분석장치로서의 플랫폼을 제공하리라 사료된다.

2. (제1협동) 광주과학기술원 김민곤 교수팀

▶ 최종목표: 초정밀 한우 판별을 위한 DNA 마이크로 어레이 칩 개발

가. 1차년도 세부 연구내용

(1) PCR-DNA 마이크로어레이 시스템을 이용, SNP 유전자 표지 분석을 위한 조건 확립

제2협동 솔젠트(주)가 이미 확보한 쌀 원산지 SNP 마커를 이용하여 DNA칩 제작 및 분석을 수행하였다. 확립된 쌀 품종 판별 SNP 유전자 표지를 이용하여 샘플을 확보하고 SNP 분석을 위한 프로브 개발에 이용하였다. PCR product는 SNP 식별 기술을 바탕으로 쌀 품종으로부터 솔젠트(주)에서 확립한 multiplex PCR 기법을 통해 증폭하였다. 기존의 방법은 쌀 품종 구별을 위해 10개 SNP를 PCR로 증폭하고 이를 분석하기 위해 그림 36처럼 전기영동을 통해 분석하였으므로 여러 품종을 한 번에 확인하기에 오랜 시간이 걸리고 경제적이지 않음을 알 수 있었다. PCR로 증폭된 시료에 형광을 표지하여 마이크로 어레이 칩 상에서 여러 품종을 빠르고 정

확하게 분석하기 위해서는 정제 과정이 필요하다. 따라서 현장진단을 목표로 반응시간 단축을 위해 정제 과정을 배제하기 위한 테스트를 수행하였으며, 정제하지 않은 샘플의 혼성화 실험을 수행한 결과 정제 샘플과의 비교에서 background의 차이가 없고 형광 signal에서도 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 진행될 실험에서는 PCR product의 정제과정을 배제한 원액을 이용하여 혼성화 실험을 수행하였으며 이러한 결과는 향후 현장 진단용 DNA 유전자 분석에서 단시간에 분석 가능한 DNA 마이크로 어레이 칩 개발이 가능할 것임을 시사한다고 할 수 있다.

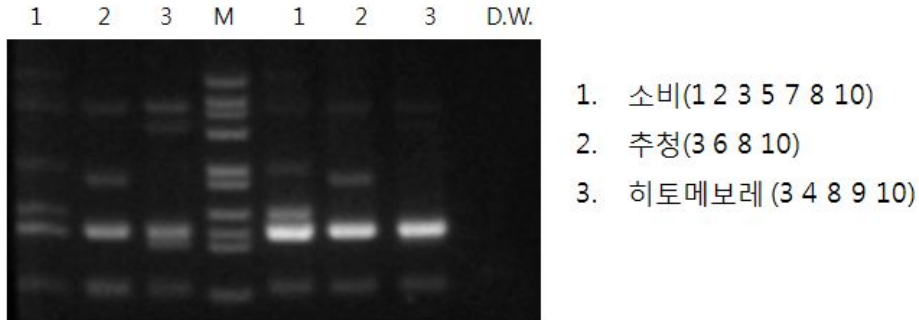


그림 36. Multiplex PCR을 이용한 쌀 품종의 SNP 서열 증폭

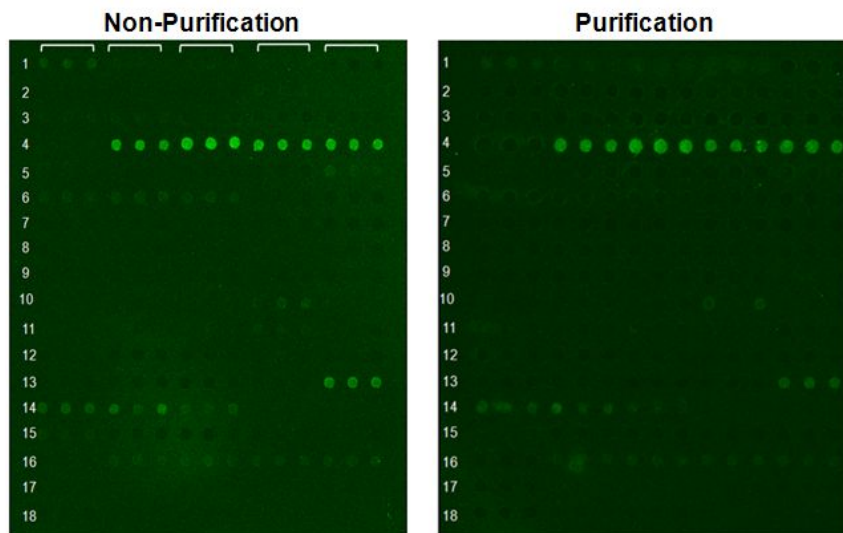


그림 37. 마이크로 어레이 칩 상에서 정제하지 않은 샘플과 정제한 샘플의 혼성화 후 분석

마이크로 어레이 칩을 이용한 SNP 유전자 표지 분석을 위해 칩 표면 개발을 위한 기초 실험을 진행하였다. PCR product와 칩 표면에 고정된 프로브와의 혼성화 효율을 높이기 위해 칩 표면 조건을 최적화 하고자 하였다. DNA의 고정이 용이하고 낮은 background signal을 갖는 amine표면이나 aldehyde 표면은 DNA 칩 표면으로 많이 사용되고 있으며, 따라서 본 연구에서도 aldehyde 표면과 streptavidin 표면을 이용하여 마이크로 어레이 칩을 제작하였다. 5'-amine과 5'-biotin으로 수식된 프로브를 칩 표면에 고정하고 Cy-5 형광이 표지된 PCR product를 정제 과정을 거치지 않고 원액을 이용하여 60°C에서 혼성화 반응을 수행하였으며 SNP 분석을 위해 쌀 품종인 추청으로부터 PCR로 증폭된 시료와 혼성화하고 프로브들의 spot 형광으로 SNP 분석을 할 수 있었다. 그림 37에서 2(17-1), 4(560), 7(2401), 9(ccs)번째 spot 형광을 통해

확인 할 수 있다. Streptavidin과 biotin의 강한 affinity를 이용하여 background를 줄이고 고정화 효율을 높이고자 하였으나 17-1, 2401 프로브의 형광은 aldehyde 표면의 signal 보다 낮음을 알 수 있었다.

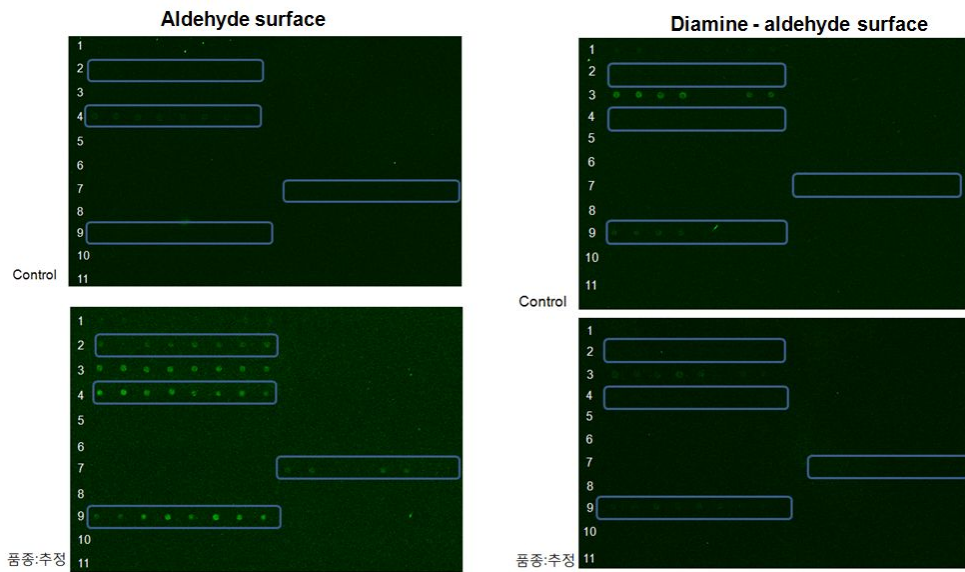


그림 38. 표면에 따른 혼성화 효율

고정될 프로브의 amine기의 밀도와 표면 morphology에 따라 표면에 붙을 수 있는 프로브의 양이 달라지며 DNA chip으로서의 성능에 차이가 난다. 따라서 aldehyde로 표면을 개질하기 전에 HF 수용액을 처리하여 유리 슬라이드 표면을 침식시켜 불균일한 표면을 만들어 주었으며, 불균일한 표면에 고정된 프로브는 flat한 표면보다 고정된 프로브의 농도도 높고 공간적으로 형광이 표지된 시료와의 혼성화 확률이 높기 때문에 형광 signal의 증가를 기대하였으나 농도에 따른 불균일 정도가 다른 표면과 HF 수용액을 처리하지 않은 표면과의 형광 signal 차이는 보이지 않음을 알 수 있었다.



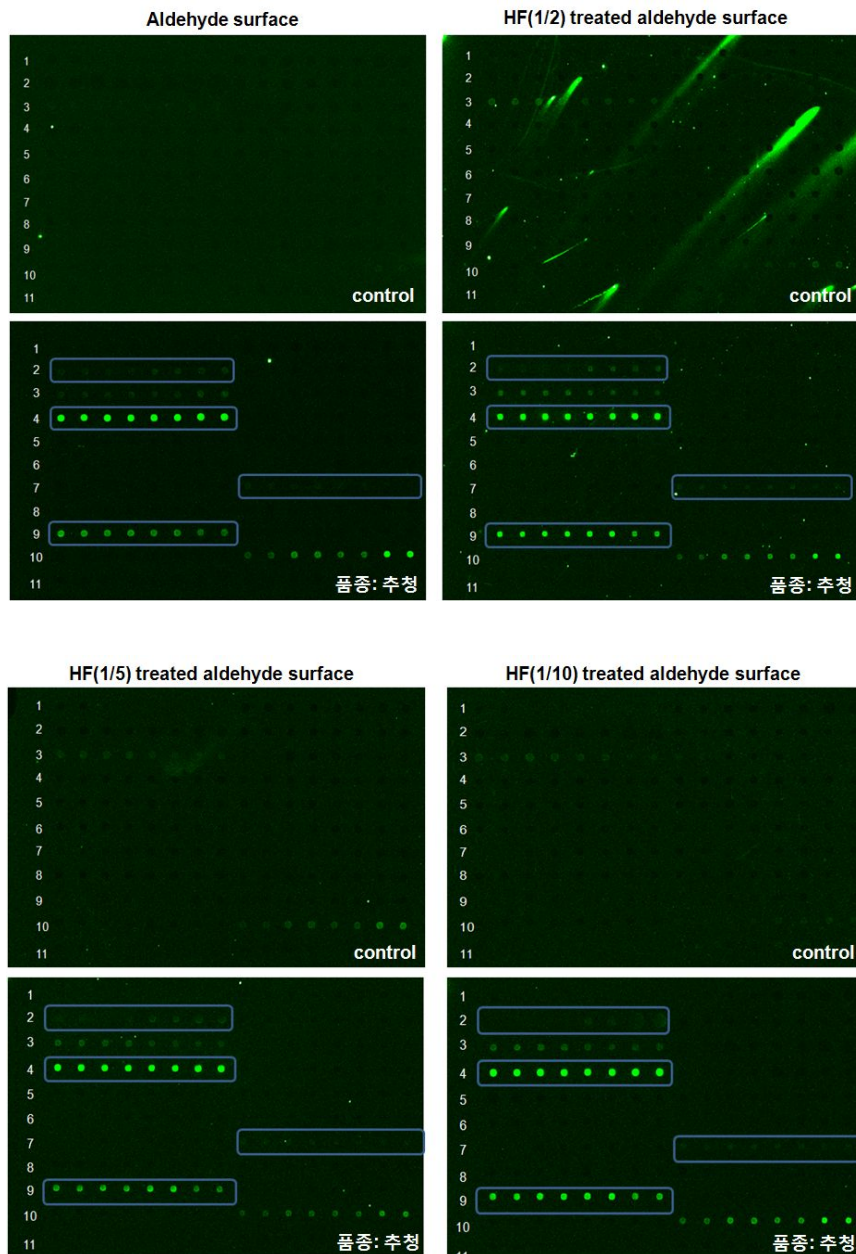


그림 39. HF 수용액이 처리된 침식된 표면에서 혼성화 효율 비교

(2) PCR product 와 프로브의 혼성화 조건 확립

앞서 확립된 최적화된 표면에 고정된 프로브와 형광이 표지된 시료의 혼성화 조건 및 온도에 따른 혼성화 효율을 테스트하였다. PCR product를 열처리 하여 이중가닥을 단일 가닥으로 변성시키고 온도를 낮추어 적절한 혼성화 온도를 찾고자 25°C, 37°C, 60°C에서 반응한 결과 60°C에서 non-specific binding도 줄어들면서 혼성화 효율도 높음을 알 수 있었다. 25°C와 37°C에서 혼성화 반응은 주형이 없는 상태에서 PCR을 수행한 control 시료에서 비선택적 결합이 보여 혼성화 온도에 적합하지 않음을 알 수 있었다.

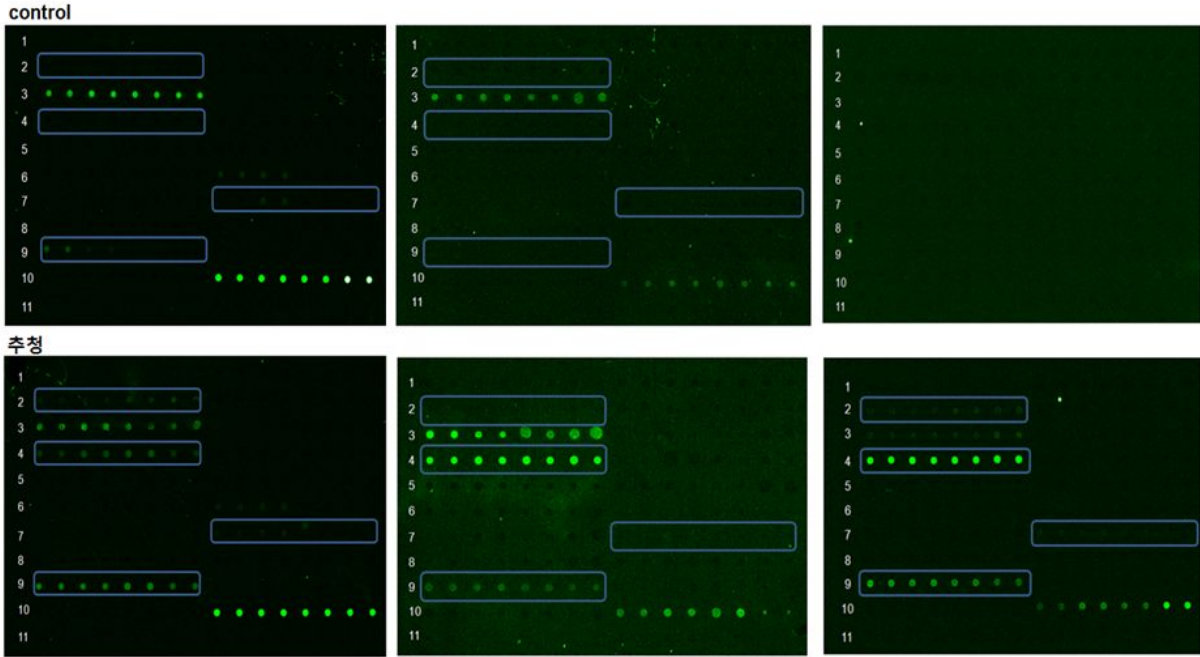


그림 40. 온도에 따른 혼성화 효율 (1열: 25°C, 2열: 37°C, 3열: 60°C)

DNA 마이크로 어레이 칩 분석 과정에서 aldehyde 표면에 5'-amine 프로브를 어레이하고 background signal을 줄이기 위해 프로브가 고정된 표면을 blocking 하였다. 선행 실험에서 60°C에서 혼성화 효율이 가장 높았으나 비선택적 결합을 줄이고 목적하는 프로브의 형광 signal을 높이하고자 blocking 버퍼 테스트를 수행하였다. 프로브가 고정된 표면은 0.02% SDS로 세척을 하고 2 mg/ml sodium borohydride, 1M ethanol amine, 1M glycine을 15분간 처리하였다. DW 세척 후 건조된 칩 표면에 베타 품종인 소비로부터 PCR 증폭된 시료를 준비하고 60°C에서 혼성화 반응을 실시하였다. 세 종류 버퍼에서 모두 비선택적 결합은 보이지 않았으나, 혼성화 효율이 가장 높은 sodium borohydride를 선정하여 이후 실험들을 진행하였다.

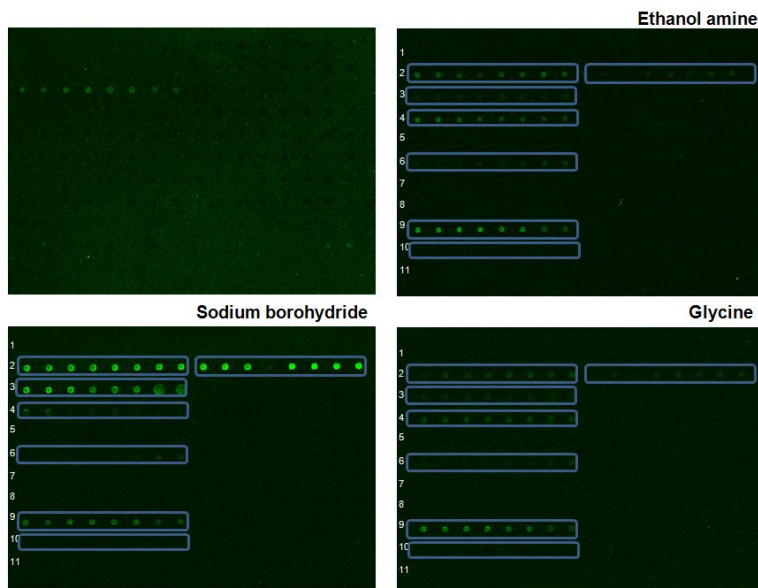


그림 41. 비 선택적 결합을 줄이고 형광 signal 증가를 위한 blocking buffer 테스트

형광 signal을 높이고자 PCR로 증폭된 시료와 프로브가 결합되는 서열에서 5'쪽으로 5번째 서열부터 20개 nucleotide에 상보적인 서열을 이용하여 혼성화 되는 서열 주위의 PCR product의 이중가닥을 단일가닥으로 만들어 혼성화 효율을 높이고자 하였다. 상보적인 서열의 프로브는 이중가닥의 PCR product에서 고정된 프로브와 결합하지 않는 다른 한가닥에 상보적으로 결합하여 PCR product를 단일가닥으로 만들어 줌으로써 고정된 프로브에 SNP 서열이 혼성화가 잘 되도록 유도하였다. signal이 낮은 560번 프로브의 경우 상보적인 probe의 첨가 결과 형광 signal의 증가를 보임을 알 수 있었으며(RFU 2530→3242), CCS 는 Positive control 이다.

선행 실험을 통해 확립된 조건을 이용하여 3개의 쌀 품종간의 식별을 마이크로 어레이 상에서 구현하였으며, SNP 분석에 적합한 슬라이드 표면을 최적화 하고 PCR product와 프로브의 혼성화 조건을 확립하였다.

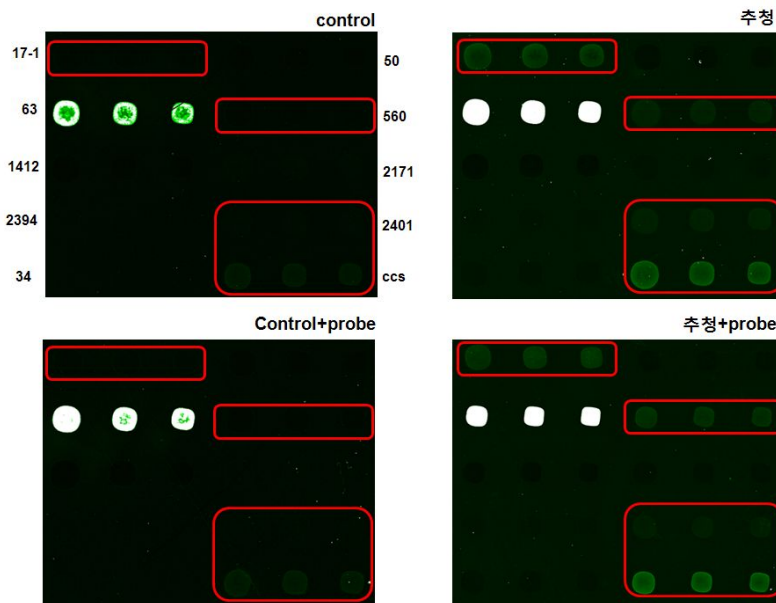


그림 42. 상보적인 프로브의 첨가로 PCR product와 고정된 프로브의 혼성화 효율 증가

### (3) 패턴 칩 기반 재현성과 정확성 높은 SNP 분석용 DNA 마이크로 어레이 칩 표면 제작 및 분석

슬라이드 표면을 광 폴리머로 코팅하고 UV의 노출 시간을 조절하여 마이크로 수준의 패턴 칩을 제작하였다. 노출 시간에 따른 패턴의 재현성과 정확성을 테스트하기 위해 노출 시간과 패턴닝 조건의 optimization 실험을 수행하였다.

Biotin으로 개질된 슬라이드 표면을 광 polymer로 스핀 코팅하고 건조된 표면은 100um 패턴 마스크로 코팅된 부분을 가리고 365nm 파장의 UV에 노출시키면 노출된 부분이 선택적으로 제거가 되고 biotin 표면이 드러나게 된다. 패턴 된 부분의 biotin에 형광이 표지된 streptavidin을 반응시켜 패턴 유무를 확인하였으며, 광 폴리머가 UV에 노출되고 적절한 pH 조건의 버퍼에서 녹는 것을 이용해 dry 상태와 PBS solution 조건에서 패턴닝을 수행하였다. 패턴닝 한 후 PBS로 세척하고 N<sub>2</sub> 가스로 말린 다음 streptavidin -Cy5를 반응하여 형광 스캐너로 확인하였

다. Dry 조건과 PBS 조건 모두 UV 노출 시간을 5분으로 고정하고 패터닝을 형광으로 확인하고 PBS 버퍼가 있는 상태에서 UV에 노출시켜 streptavidin-Cy5가 결합된 부분을 제외한 나머지 부분을 제거하는 develop을 수행하였으며 그 결과 전체적인 background signal이 낮아짐을 알 수 있었다.

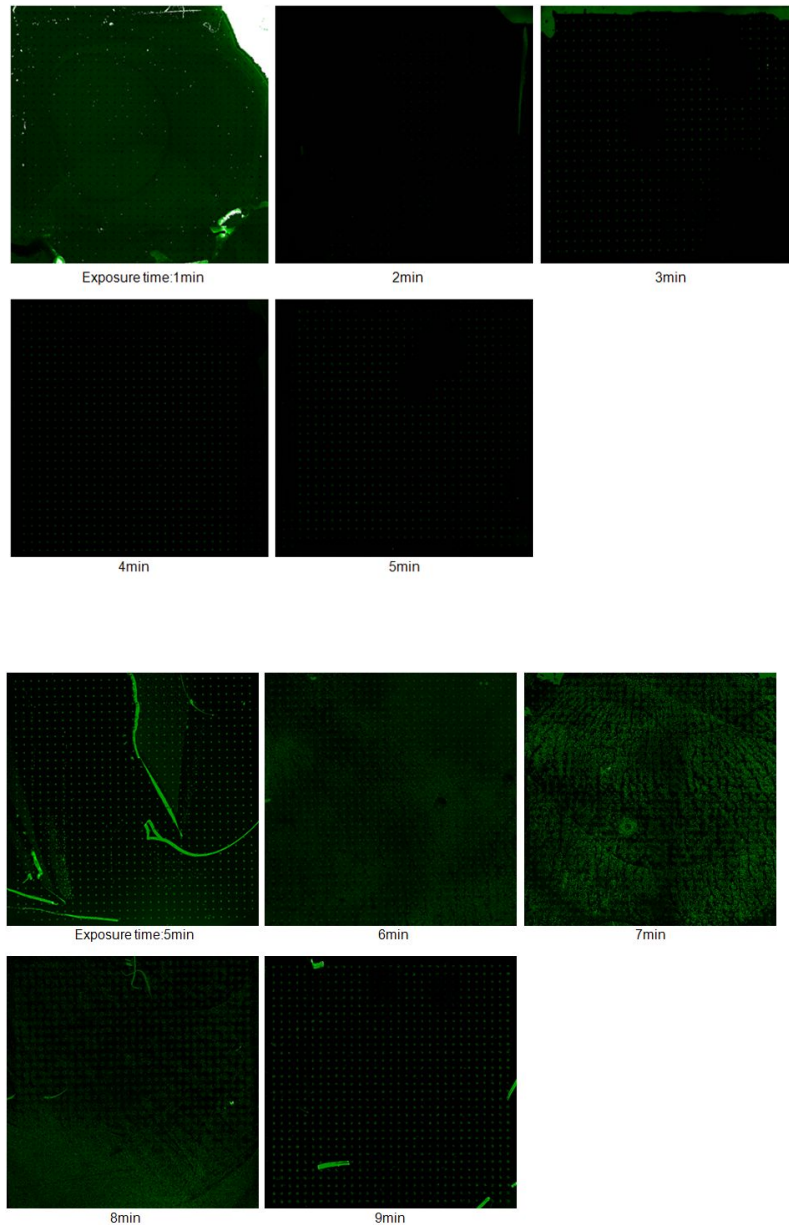
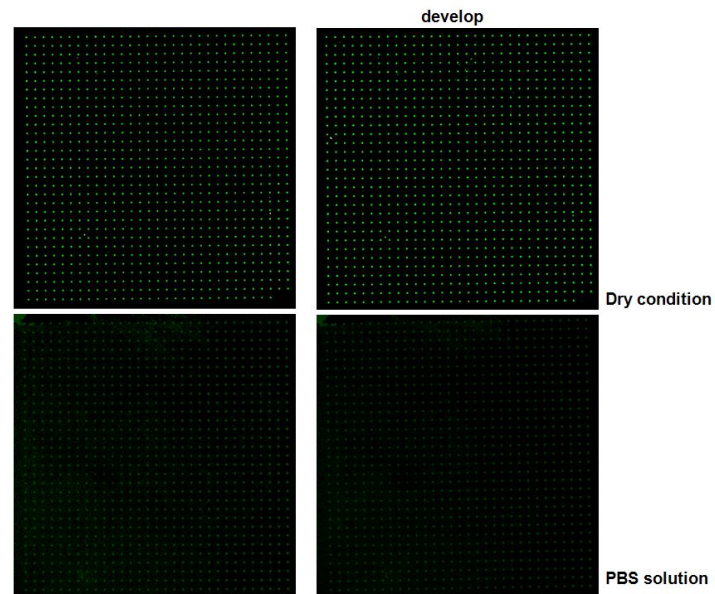


그림 43. Dry 상태와 버퍼상태에서 노출 시간에 따른 광 패터닝, 위: PBS 조건, 아래 : dry 조건

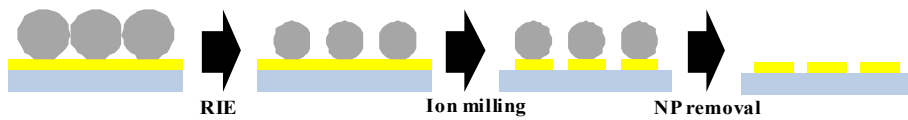
Streptavidin 표면을 광 폴리머로 코팅하고 biotinylation된 antibody가 들어있는 PBS 조건에서 UV에 노출 시켜 biotin-antibody가 고정되는 효율을 확인하였다. 그 결과 develop 후에 biotin-antibody가 streptavidin 표면에 고정됨을 확인할 수 있었고 develop을 통해 background



signal도 줄일 수 있었다. 이 같은 결과는 향후 SNP 분석을 위한 패턴 칩에 biotin 프로브를 고정하기 위해 streptavidin 표면을 이용할 수 있으리라 판단되며, 패턴 칩 기반의 재현성 높은 SNP 분석이 가능하리라 예상할 수 있다.

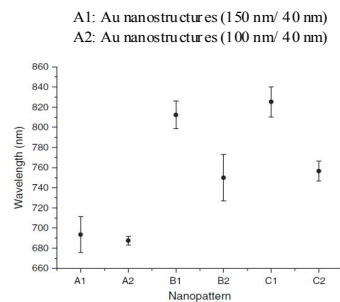
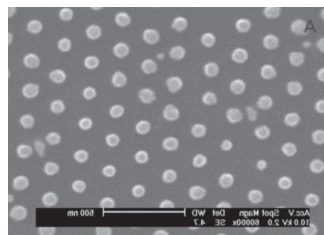


**Real-time monitoring of rolling circle amplification (RCA) using plasmonic structure**



**Target**

1. 100 nm diameter
2. 50 nm thickness
3. 220 nm lattice constant



*J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 1374 (2009)

그림 44. Biotin 표면을 패터닝 하고 streptavidin-Cy5로 분석 후 developing

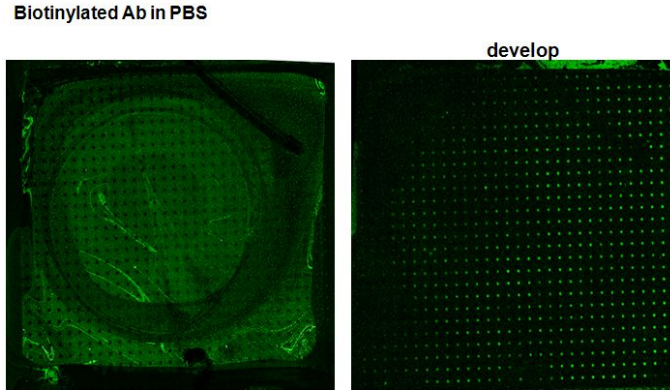


그림 45. 광패터닝을 이용한 Streptavidin 표면 Biotin-Antibody 고정

나. 2차년도 세부 연구내용

- (1) SNP 선택적인 PCR product와 프로브의 혼성화 최적화 및 SNP 마이크로 어레이 칩 응용  
 선행 연구에서는 SNP 분석에 적합한 슬라이드 표면을 최적화 하고 PCR product와 프로브의 혼성화 조건을 이용하여 3개의 짝 품종간의 식별을 마이크로 어레이 상에서 구현 하였다. 이와 같이 확립된 DNA 칩 분석 기술을 이용하여 한우 샘플의 높은 검출 효율을 위한 실험을 진행하였다. 형광 검출 효율을 높이기 위해서는 non-specific binding을 줄이고 목적 프로브에 선택성이 높은 조건을 확립하고 재현성을 높이는 것이 필요하다. 그러나 선행 연구에서 수행된 DNA 칩 혼성화 반응 조건은 여전히 비선택적인 결합과 낮은 시그널의 문제점을 보였다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 혼성화 온도를 재정립하고 시그널 증폭을 위한 연구를 수행하였다.
- (가) 혼성화 온도 최적화 및 고감도 프로브 선택

온도별 혼성화 테스트는 5'-amine기가 수식화된 프로브가 고정된 aldehyde 표면에 쌀 샘플 (추청) 원액을 이용하여 상온, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C에서 2시간동안 수행하였다. 그 결과 상온 반응의 경우 63, 2171 프로브의 비특이적 결합으로 spot이 확인 되었고 혼성화 온도가 높아질수록 비특이적 결합의 2171 프로브의 spot 세기가 줄어들을 알 수 있었다 (그림 46). 55°C 이상에서는 목적 프로브 spot의 형광이 줄어들어 혼성화 반응 최적 온도는 50°C로 선정하였다. 3개의 짝 품종에 대한 50°C 혼성화 반응 재현 실험 결과 선택적인 결합이나 형광 세기 면에서 최적의 혼성화 효율을 보였다 (그림 47). Control 반응은 multiplex PCR 수행 시 template의 첨가 없이 진행된 샘플로 63 프로브의 비특이적 반응이 확인 되었다. 이는 프로브 서열의 교체를 통해 보완 될 수 있으리라 예상된다.

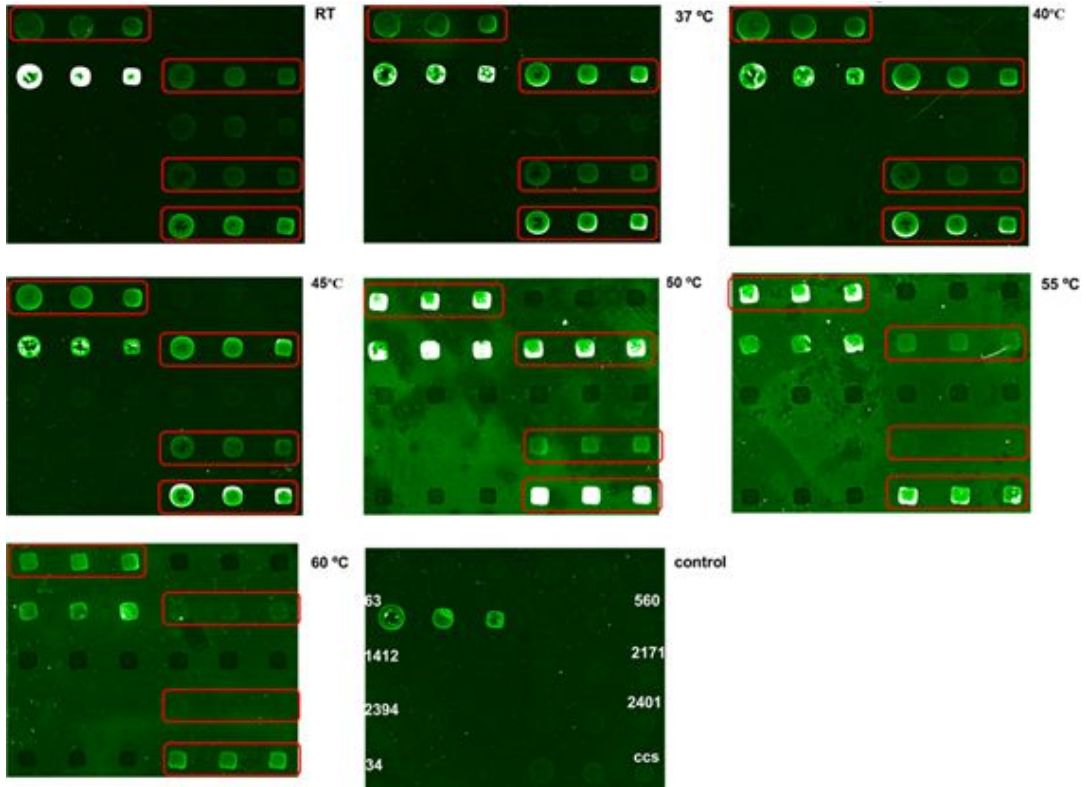


그림 46. 추정 샘플을 이용한 온도별 혼성화 테스트

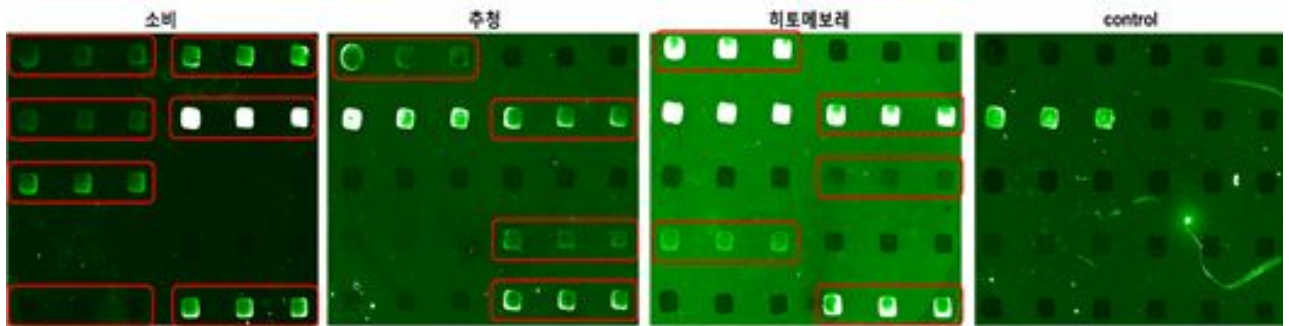


그림 47. 3개의 쌀 품종에 대한 50°C 혼성화 반응

#### (나) 고감도 프로브 선택

Multiplex PCR을 할 경우 single PCR과 달리 여러 개의 목적 유전자 증폭이 동일하게 일어나지 않으므로 각각의 프로브와 single PCR product간의 혼성화 반응을 통해 고감도의 프로브를 선정하고자 하였다. 선정된 프로브를 DNA 마이크로 칩에 고정하여 multiplex PCR product에 도입한다면 고효율의 형광 검출 결과를 얻을 수 있으리라 예상했다. 쌀 품종 구별을 위해 제작된 10개의 SNP 마커를 single PCR로 증폭하고 이를 마이크로 어레이 상에 고정된 임의로 디자인된 목적 프로브들과 반응하여 고감도로 형광이 검출되는 프로브만을 선택하였다.

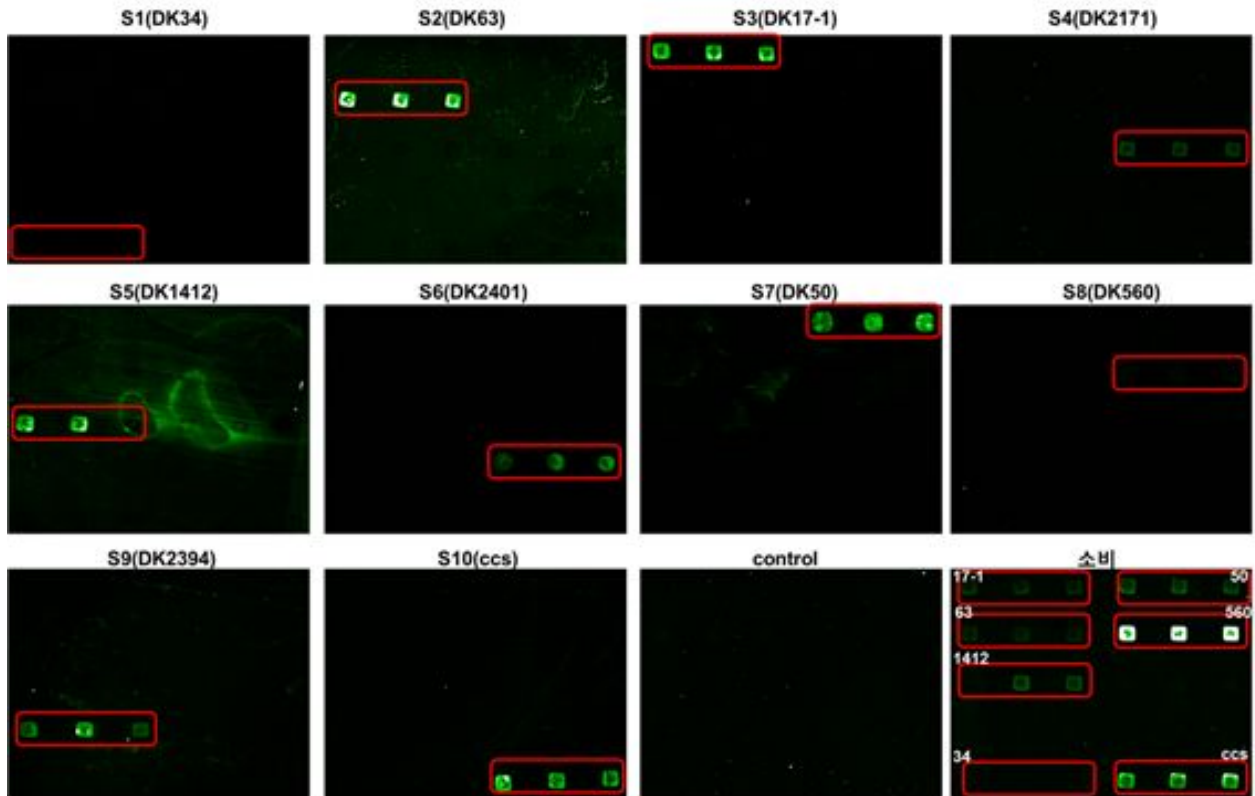


그림 48. single PCR product를 이용한 고감도 프로브 선택

(다) 형광 시그널 증폭

본 연구 과제의 최종 목표인 PCR 칩-마이크로 어레이 칩이 통합된 마이크로 디바이스에서는 DNA 전처리, PCR 증폭 후 얻어진 샘플은 수백 나노리터 수준으로 마이크로 플루이딕 칩 채널을 통해 DNA 마이크로어레이 칩으로 이동하고 3mmX3mm 크기의 측정 영역을 갖는 DNA 마이크로 칩에서 반응을 하기 위해서 증폭된 PCR product의 희석이 필수적이다. 따라서 원액을 사용한 혼성화 온도 조건을 기반으로 희석된 샘플의 형광 시그널 증폭에 대한 연구를 수행하였다. 혼성화 버퍼에 샘플을 1/10로 희석하고 원액 샘플과의 비교 결과 형광 신호는 3배 이상 감소하였다 (그림 49). 샘플의 희석으로 형광 시그널이 줄어들음을 확인하고, 이를 증강시키기 위해 혼성화 반응 후 추가적인 형광 labeling 반응을 통해 신호를 증폭하고자 하였다.

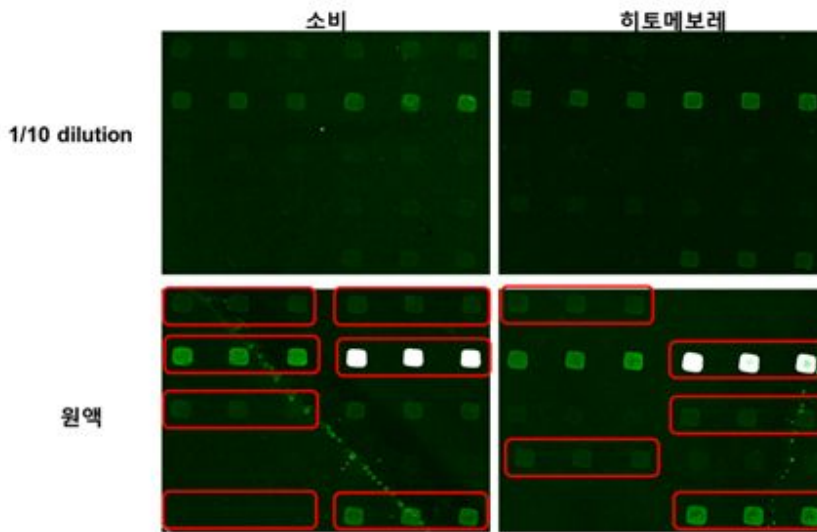


그림 49. 원액과 희석된 샘플의 형광 시그널 비교

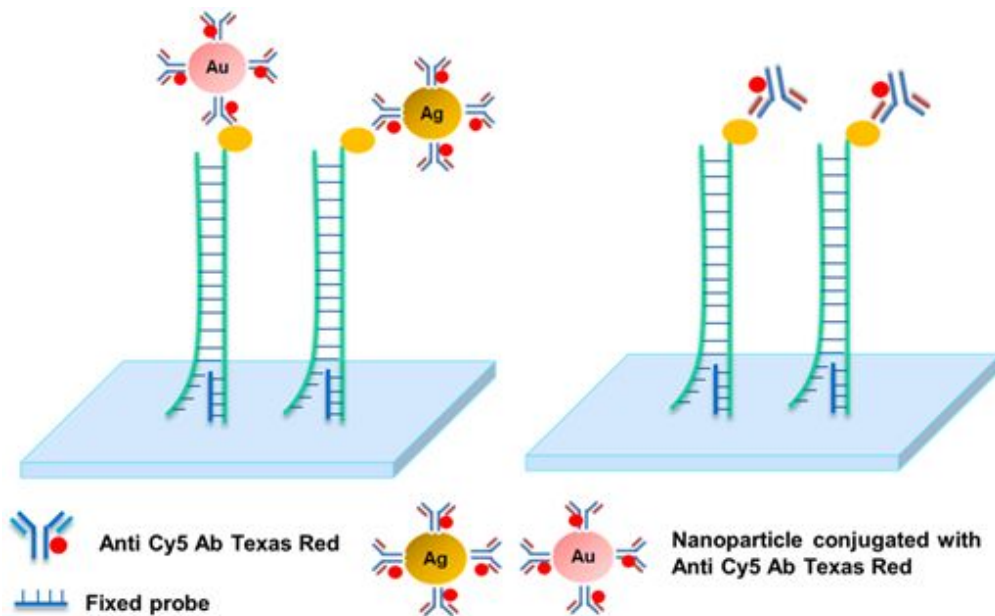


그림 50. 형광 시그널 증폭을 위한 나노입자 Cy5-항체 접합체 첨가 반응 모식도

DNA 마이크로 어레이 제작은 aldehyde로 개질된 표면에 5'-amine기가 수식된 프로브를 고정한다. 프로브의 5'말단 amine기가 슬라이드 표면에 고정이 되므로 3'말단이 표면으로부터 상단으로 향하게 된다. PCR 증폭된 시료는 혼성화 반응을 하기 전 열처리를 하여 단일가닥으로 변성시킨다. 단일가닥의 3' 말단이 표면으로 향하여 고정된 프로브와 결합하고 프로브와 결합된 PCR product만이 5'말단의 Cy5에 의해 형광 검출이 이루어지게 된다. 프로브와 선택성이 낮은 PCR product나 multiplex PCR 후 얻어진 시료내에 증폭량이 낮을 경우 감도는 떨어지게 된다. 따라서 혼성화 반응 후 이미 결합한 Cy5-PCR product-프로브를 형광이 labeling된 항체나 나노입자 접합체를 이용하여 신호 증폭을 하고자 하였다 (그림 50).



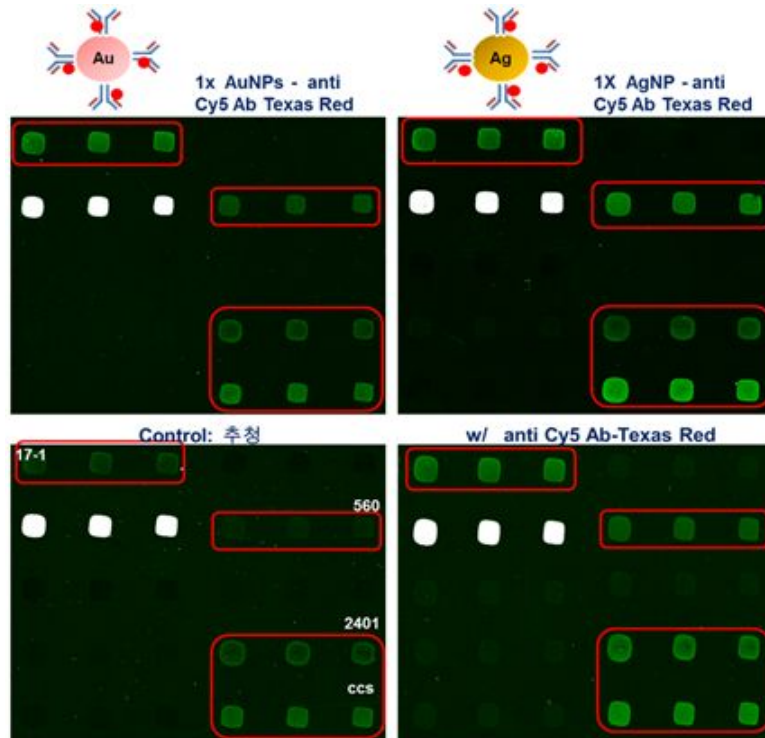


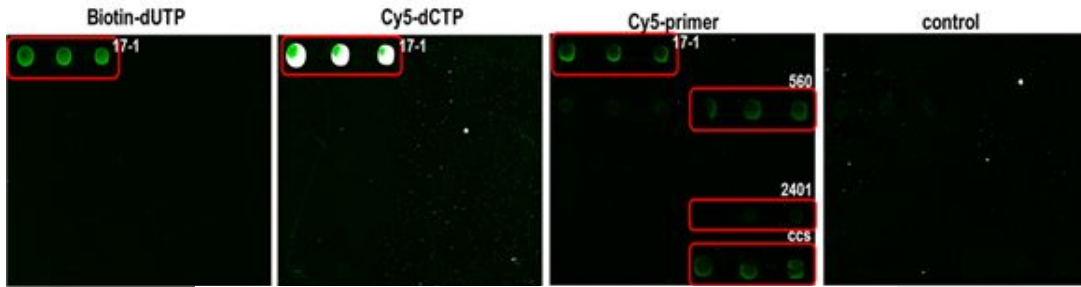
그림 51. anti Cy5 Ab-Texas Red, 나노입자-anti Cy5-Texas Red conjugate 첨가를 통한 형광 신호 증강

나노입자 콜로이드 용액(20 nm, AgNP, AuNP)과 anti Cy5 항체-Texas Red를 반응 하여 나노입자-anti Cy5 Ab-Texas Red 접합체를 만들어 혼성화 반응 후 프로브와 결합한 PCR product의 Cy5를 detection하여 시그널이 증가됨을 확인하였다. control 반응 대비 anti Cy5 항체-Texas Red를 첨가한 경우 목적 프로브의 전체적인 시그널 증가를 보였지만, 목적하지 않은 프로브 spot의 형광 시그널이 검출 되었다. 금 나노입자와 은 나노입자에 anti Cy5 항체-Texas Red 접합체를 처리한 경우 비특이적 결합 없이 전체적인 목적 프로브의 형광 시그널이 증가함을 확인 할 수 있었고, 그 중에서 은 나노입자 접합체의 경우 비 처리 반응에 비해 목적 프로브의 시그널이 2배~4배가량 증가하였다.

형광 신호 증강을 위한 또 다른 방법으로 PCR 수행 시 dUTP-Cy5와 dCTP-biotin을 첨가하여 biotin과 Cy5가 random하게 labeling된 PCR product를 얻었다. Cy5 random labeling된 시료의 경우 혼성화 반응 후 추가 반응이 필요한 나노입자 접합체와 달리 추가 반응이 필요하지 않고 PCR 수행 후 얻어진 PCR product는 이미 증폭된 형광 시그널을 보유하고 있어 기존의 primer-Cy5를 이용하여 증폭한 PCR product와 비교하여 4배가량 증가하였다 (그림 52). dUTP-Cy5를 이용하여 multiplex PCR을 수행하고 혼성화 반응을 수행한 결과 background 수준의 형광 시그널이 모든 프로브에서 검출 되었다. 이는 사용한 dUTP-Cy5의 농도 문제일 것으로 판단되고 농도 optimization을 통해 시그널 증폭을 위한 또 다른 방법으로 채택 될 수 있으리라 예상된다. Biotin이 labeling된 PCR product는 혼성화 반응 후 streptavidin-Cy5와 반응을 하여 형광 신호를 검출하게 되는데 probe에 백백하게 결합한 PCR product의 사이로 파고 들어 backbone에 labeling되어 있는 biotin에 크기가 큰 streptavidin이 결합하기가 용이하지 않을 것으로 보였다. Single PCR product의 결과와 달리 multiplex PCR product를 사용하여 혼



정확한 결과 기존 방법과 비교하여 시그널과 차이가 없었고 재현성이 떨어지는 문제점이 있었다.



(spot 별 intensity 비교)

	Cy5 primer		Cy5-dUTP		biotin-dCTP	
	sample	control	sample	control	sample	control
17-1	12085	14.67	51895	156	18839	53

그림 52. Biotin, Cy5가 random하게 labeling된 PCR product를 이용한 혼성화 반응 분석

DNA 염색 시약인 Propidium iodide (PI), POPO-3를 이용하여 이중가닥의 혼성화된 프로브만을 선택적으로 검출하고자 하였다. 이들은 일반적으로 DNA 형광 staining에 사용되고 있는 시약으로 염기 4~5당 하나의 dye가 결합을 하고 DNA에 결합하게 되면 형광 시그널이 20~30배 증가한다고 한다. PI(ex/em 488/570nm)와 POPO-3(ex/em 534/570nm)을 이용하여 혼성화 반응 후 staining 과정을 거쳐 형광 검출을 시도 하였다. POPO-3의 경우 모든 프로브에서 형광 시그널이 높게 나왔고 PI의 경우 목적 프로브에 선택적으로 염색이 되나 기존의 방법에 비해 형광 신호는 낮음을 확인하였다. PI를 이용하여 형광 labeling을 하지 않은 PCR product 검출에 용이 하리라 예상된다.

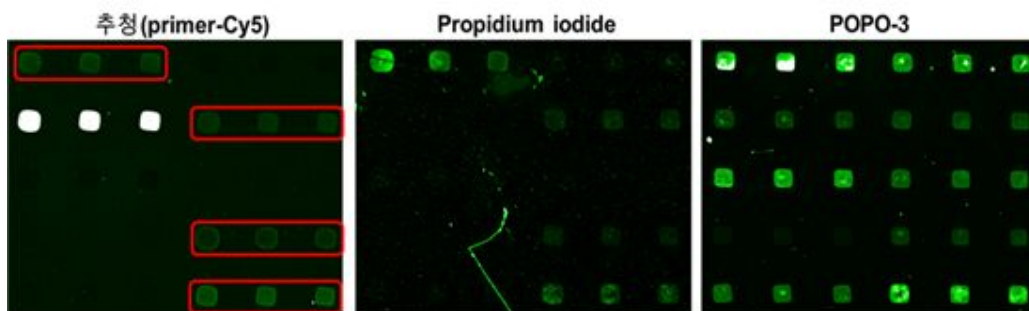


그림 53. 혼성화 반응 후 DNA 이중 가닥에 특이적으로 결합하는 형광 dye staining

(2) 증폭된 DNA를 단시간에 분석 가능한 DNA 마이크로어레이 칩 개발

현장 분석용 휴대용 시스템을 구축하기 위해서는 고속 고효율의 초소형 고감도 시스템으로 현장에서 빠르고 정확한 분석이 요구된다. 이를 위해서는 샘플로부터 SNP 유전자 분석의 형광 분석이 빠른 시간에 이루어져야 하므로 반응 과정에서 시간이 가장 긴 혼성화 반응 시간의 단축이 필요하다. 따라서 혼성화 반응 시간을 기존의 2시간에서 1시간으로 단축하고 불필요한 전처리 과정들을 배제할 수 있는 방법을 모색하였다. 혼성화 반응 단계전에 전처리 과정은 이중가닥의 DNA를 열처리를 통해 단일 가닥으로 변성시키고 온도를 급격히 낮추어 단일 가닥 상태에서 혼성화 반응을 수행하여 혼성화 반응이 용이하게 되도록 도와주게 된다. 기존의 마이크

로 어레이 칩 분석 과정에서는 PCR product를 boiling하여 단일 가닥으로 변성시키고 ice에 5분 이상 방치하여 단일 가닥 상태에서 혼성화 반응을 진행한다. 이러한 혼성화 반응 단계 전에 거치는 전처리 과정들은 마이크로 사이즈의 칩 상에서는 구현하기에는 문제가 있을 것이다. 따라서 혼성화 반응 시간 단축 및 불필요한 전처리 과정들을 배제시키고 혼성화 온도를 상온으로 낮춤으로써 단시간에 분석 가능한 DNA 마이크로 어레이 칩을 개발하고자 하였다.

(가) Urea 첨가를 통한 상온 혼성화 반응 최적화

상온에서 혼성화 반응을 수행하기 위해 DNA의 Tm값을 낮추고 denaturation을 돕는 Urea, formamide를 농도별로 첨가하여 최적의 반응 농도를 선정하였다. 샘플을 urea와 formamide 농도별 버퍼에 1/10으로 희석하여 boiling하지 않고 상온에서 혼성화 반응을 수행하였다. 실험 결과 formamide는 spot의 번짐과 농도에 따른 목적 프로브에 대한 선택성이 확인되지 않아 적합하지 않다고 판단되었고, Urea를 이용하여 상온에서 혼성화 반응을 하고자 하였다. Urea의 농도가 높아 질수록 비특이적 결합이 줄어들고 형광 세기도 증가 하였다. 그 중 6M Urea의 경우 비특이적 결합이 나타나지 않았고, spot의 형광 시그널도 높게 측정 되었다.

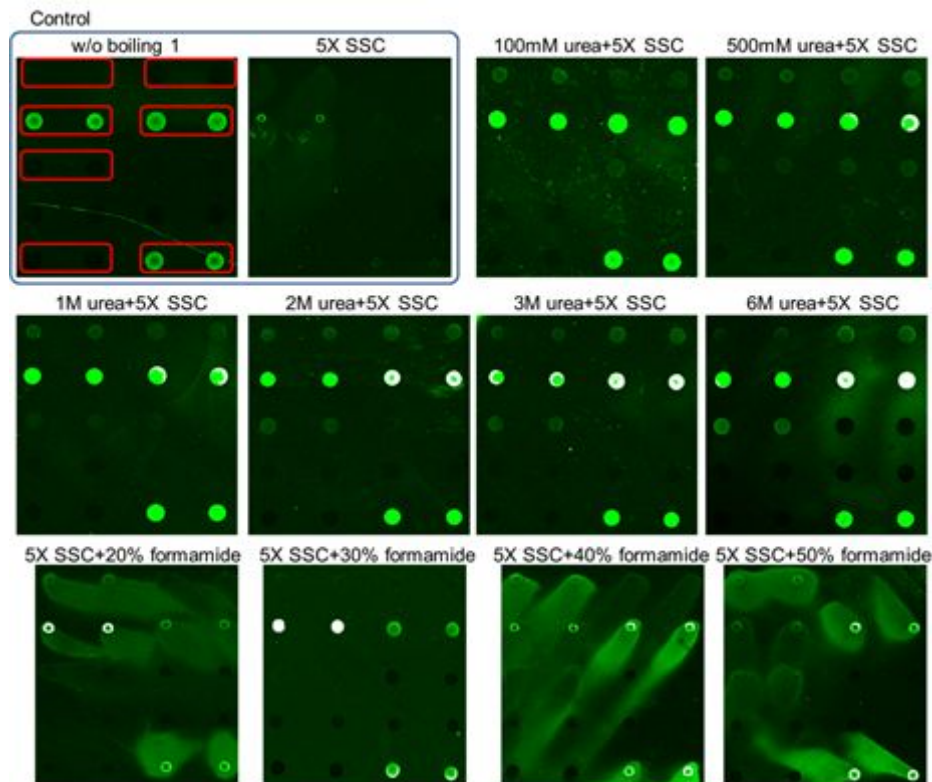


그림 54. 상온 혼성화 반응을 위한 Urea와 formamide 농도별 테스트

(나) 한우 샘플 SNP 검출 실험

쌀 품종 샘플을 이용하여 최적화된 DNA 혼성 조건을 바탕으로 실제 한우 샘플 SNP 검출 실험을 수행하였다. 확립된 DNA 마이크로 어레이 조건은 표 2와 같다.

DNA 마이크로 어레이 칩 조건	
표면	Aldehyde surface
Blocking solution	Sodium borohydride
샘플 처리	전처리 없음
혼성화용 희석 버퍼	6M Urea(5X SSC) 버퍼 이용 1/10 희석
혼성화 반응 온도	상온
혼성화 반응 시간	1hr

표 2. 쌀 품종을 이용하여 확립된 DNA 마이크로 어레이 칩 조건

고감도 프로브 선정: 한우/비한우 판별을 위해서 필요한 12개의 마커 중에서 1번 마커만 확인될 경우 한우, 12개의 마커가 모두 확인될 경우 비한우로 구분된다. 하나의 마커 당 3개의 프로브를 디자인하고 마커 각각의 single PCR product (그림 55)와 Multiplex PCR product (그림 56)를 이용하여 한우/비한우 판별에 적합한 프로브를 선택하였다. 한우의 경우 제작한 3개의 프로브가 모두 확인이 되었고 비한우의 경우에도 12개의 마커에서 프로브별 형광을 확인할 수 있었다.

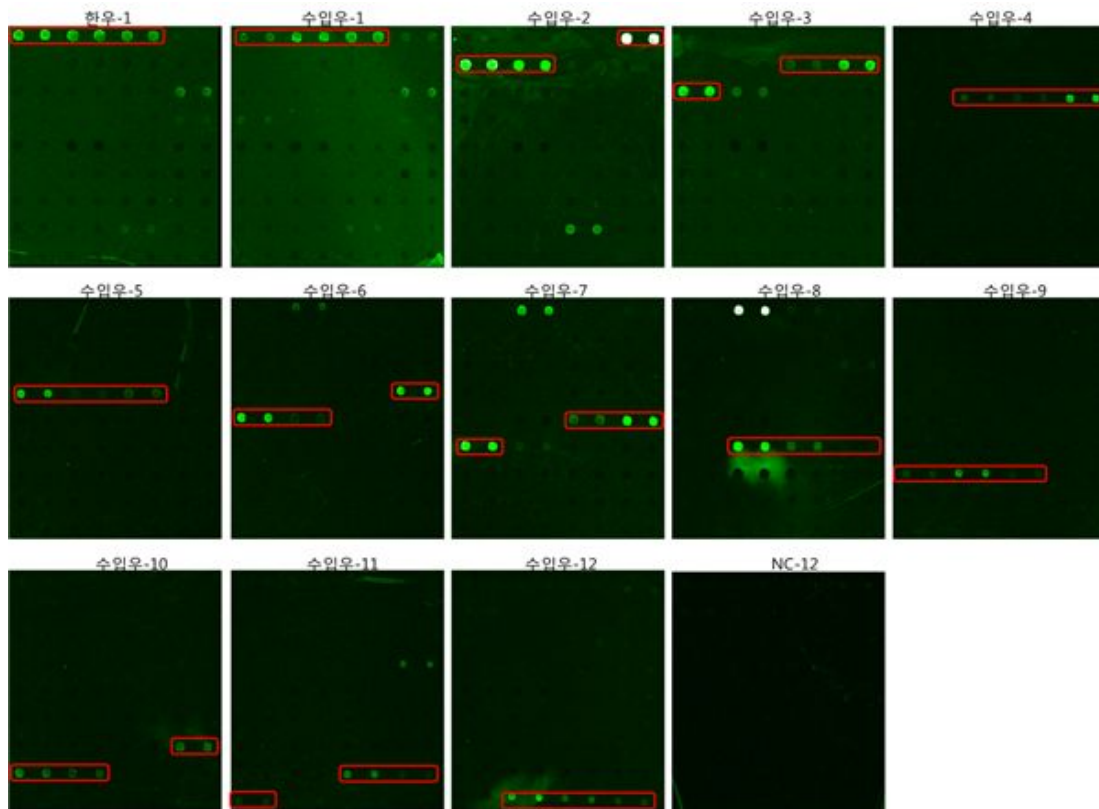


그림 55. single PCR product를 이용한 고감도 프로브 선정

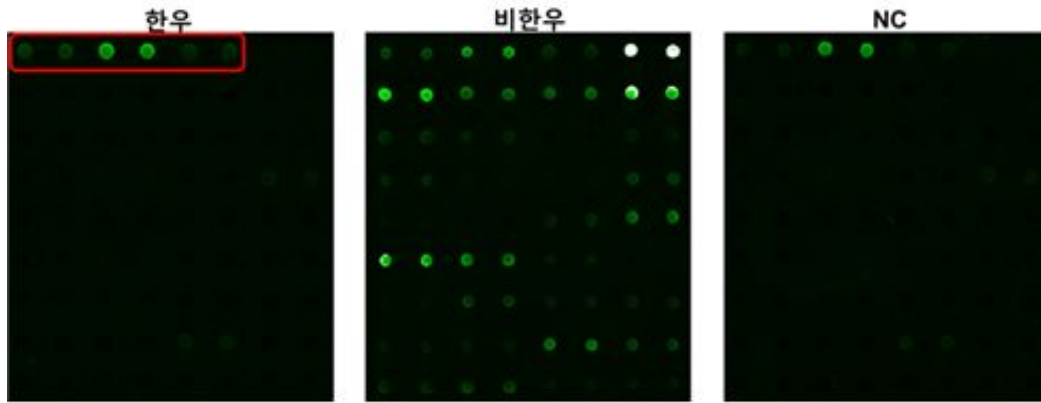


그림 56. Multiplex PCR product로부터 고감도 프로브 선정

이로써 제작된 프로브가 한우 판별에 적합한 프로브로 판단되었고, 그중에서 NC(negative control)과 비교하여 비특이적 반응을 보이는 spot과 낮은 형광 시그널을 보이는 프로브들을 제외하고 마커 당 하나의 프로브를 선택하여 최종적으로 마이크로 어레이 칩에 고정될 프로브를 선정하였다.

한우 샘플에 대한 Urea 농도별 혼성화 반응: 선택된 프로브를 이용하여 urea 농도별로 샘플을 1/10로 희석하고 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 낮은 urea 농도에서는 비특이적 반응으로 한우에서 1번외에 7번, 9번, 12번에서 spot이 확인되었으나 urea 농도가 높아질수록 비특이적 반응 spot들의 형광세기가 줄어들고 목적 프로브 spot의 형광 시그널이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 비한우의 경우 12개의 프로브에서 spot이 확인되어야 하나, 6M의 urea에서도 4번 spot은 확인 할 수 없었다. 이는 향후 프로브 서열의 교체를 통해 해결 될 수 있으리라 예상된다 (그림 57).

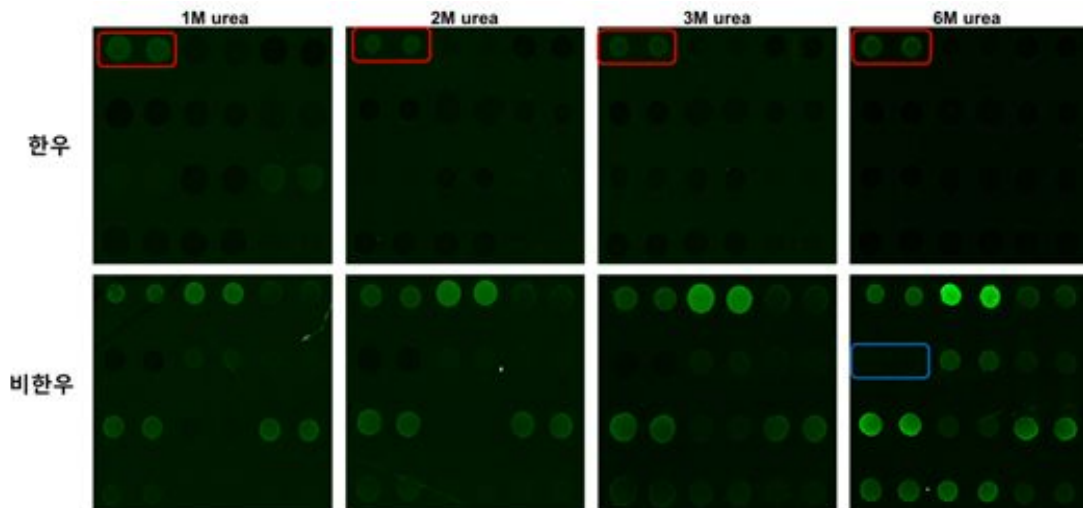


그림 57. 선정된 프로브를 이용하여 한우 샘플의 urea 농도별 혼성화 테스트

휴대용 형광 측정 장치를 이용한 형광 측정: 기존의 형광 스캐너들은 칩을 건조한 상태에서 측정하도록 하고 있다. 실험한 칩들도 Genepix 4200 상용 형광 스캐너를 이용하여 건조된 칩 표면의 형광을 검출하였다. 본 과제 최종 목표인 앞으로 제작될 마이크로 어레이 칩-마이크로 플루이딕 통합

디바이스에서는 적합한 형광 시그널 검출을 휴대용 형광 스캐너를 이용하여 DNA 마이크로 어레이 칩을 용액 상태에서 측정 하도록 제작 될 것이므로 용액 상태에서 형광 측정이 필요하다. 따라서 제3협동 기관인 (주)나노스코프시스템즈에서 제작한 휴대용 형광 스캐너를 이용하여 형광 시그널을 용액 상태에서 측정하고자 하였다. 그림 58은 Genepix4200 형광 스캐너와 제작된 휴대용 형광 스캐너 간의 이미지 비교이다. 같은 건조된 조건에서 시그널 차이는 크게 나지 않은 것으로 보이나 용액 상태에서 측정한 경우 형광 시그널이 감소됨을 확인하였다. 용액 상태에서 측정으로 형광 신호가 감소되었으나 쌀 품종을 이용한 선행된 신호 증폭 실험을 토대로 충분히 신호 증강이 가능하리라 예상된다.

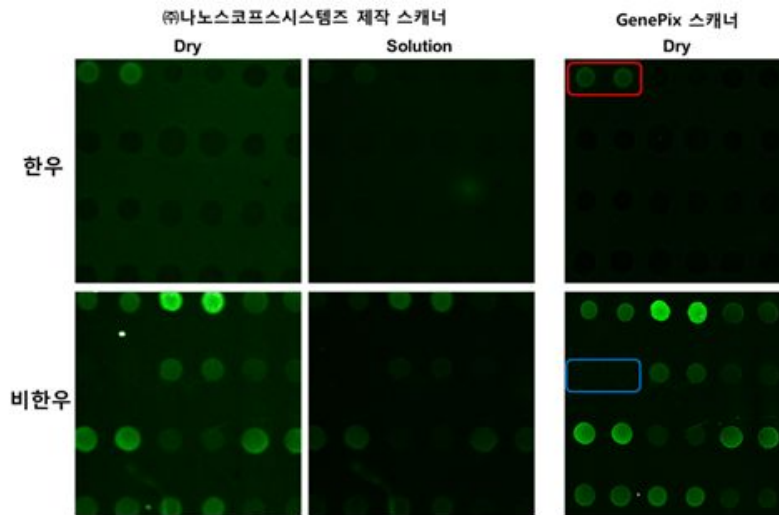


그림 58. Dry상태와 solution상태 칩 표면의 형광 검출 비교

다. 3차년도 세부 연구 내용

(1) 혼성화 효율을 높이기 위한 DNA 마이크로어레이 표면 제작 및 이를 통한 분석시간 단축

앞서 확립한 마이크로 어레이 표면 제작 및 혼성화 반응 조건을 기반으로 한우 판별을 위한 고효율 SNP 분석용 DNA 마이크로 어레이를 제작 하고자 하였다. 선행 연구를 통해 PCR product의 전처리 과정 배제 및 상온 혼성화 반응으로 현장 분석용 휴대용 시스템에 적합한 조건을 확립하였으나 고속 고효율의 초소형 고감도 시스템에 맞는 한우 유전자 분석을 위한 혼성화 반응 조건의 재정립이 필요하였다. 따라서 이를 이용해 고효율의 PCR 소자-DNA 마이크로 어레이 통합 디바이스에 적합한 DNA 마이크로 어레이칩을 제작하고자 하였다.

(가) 혼성화 반응 조건 정립

반응 volume 및 샘플 희석 비율 확립: 선행 실험에서 확립된 혼성화 반응 조건은 샘플의 전처리 과정 없이 6M의 urea가 첨가된 hybridization buffer로 샘플을 1/10로 희석하여 20ul 혼성화 반응 용액을 상온에서 반응하였다. 그러나 통합 마이크로 디바이스에서 얻어질 PCR product의 volume 및 반응 공간의 제약(3mm X3mm)으로 최종 반응 volume 및 희석 비율 선정이 필요하였다. 반응 volume을 20ul, 10ul, 2ul가 되도록 hybridization buffer로 샘플을 1/10 희석하여 상온에서 1시간동안 반응하였다. 형광 시그널이 낮았던 spot의 시그널은 반응 volume이 2ul일 때 시그널이 줄어들었으며, 2ul의 volume은 칩 표면을 덮어주기에 부족하였다. 10ul에서 전반적으로 형광 시그널의 감소 없이 반응에도 무리가 없었으므로 반응 volume은 10ul로 선정하였다. 통합 디바이스로부터 얻어진 PCR product의 volume이 2ul이고 디바이



스 수용 반응 volume이 10ul로 기존의 1/10 희석 비율은 1/5로 확정하고 이에 맞는 urea농도 및 반응 조건을 재정립 하고자 하였다.

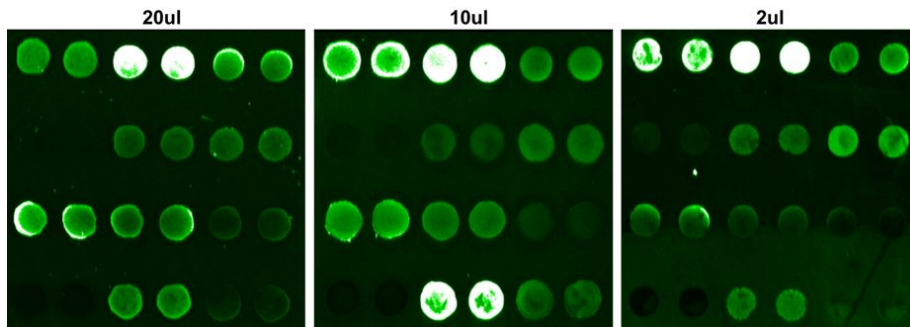


그림 59. 반응 volume에 따른 혼성화 효율

반응 시간 확립: 혼성화 반응은 PCR 반응과 함께 휴대용 통합 디바이스 시스템에서 반응 시간이 많이 소요가 된다. 현장 분석용 시스템에 맞는 고속 분석을 하기 위해서는 이 단계에서의 시간 단축이 필요하다고 판단하였다. 반응 시간에 따른 혼성화 효율 테스트는 비한우 샘플을 이용하여 hybridization buffer로 1/5로 희석하고 반응 volume 10ul로 1h, 50min, 30min 20min 동안 상온에서 혼성화 반응을 수행하였다. 그 결과 반응 시간이 줄어들수록 혼성화 효율이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 30min 미만으로 반응 할 경우 형광 시그널이 낮은 spot은 형광을 확인 할 수가 없었다 (그림 60). 기존의 2시간 혼성화 반응에서 1시간 반응으로 단축하였으나, 1시간 미만 반응 시간에서는 형광시그널이 감소 및 재현성의 문제로 혼성화 반응 시간은 1시간이 적합하다고 판단하였다.

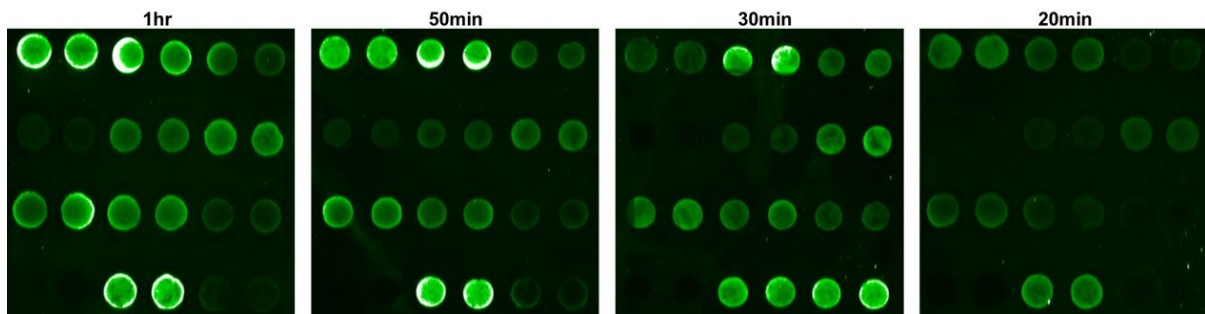


그림 60. 반응시간에 따른 혼성화 효율

Probe 농도 확립: 마이크로 어레이 표면에 고정될 probe 농도가 높아질수록 혼성화 효율이 증가 할 것으로 예상하고 probe 농도에 따른 혼성화 반응을 수행하였다. 5'-amine기가 수식화된 probe는 100uM, 50uM, 10uM의 농도별로 aldehyde 표면에 고정하고 한우, 비한우 샘플에 대한 혼성화 효율을 비교하였다. 실험 결과 probe 농도가 가장 높은 100uM의 경우 형광 시그널이 가장 낮았고, 50uM과 10uM에서 비슷한 형광 시그널을 보였으나, 50uM의 경우 한우 샘플에서 MDH2에서 형광 시그널이 가장 높게 나왔고 재현 실험에서 50uM의 재현성이 높아 표면에 고정될 probe 농도는 50uM로 선정하였다.



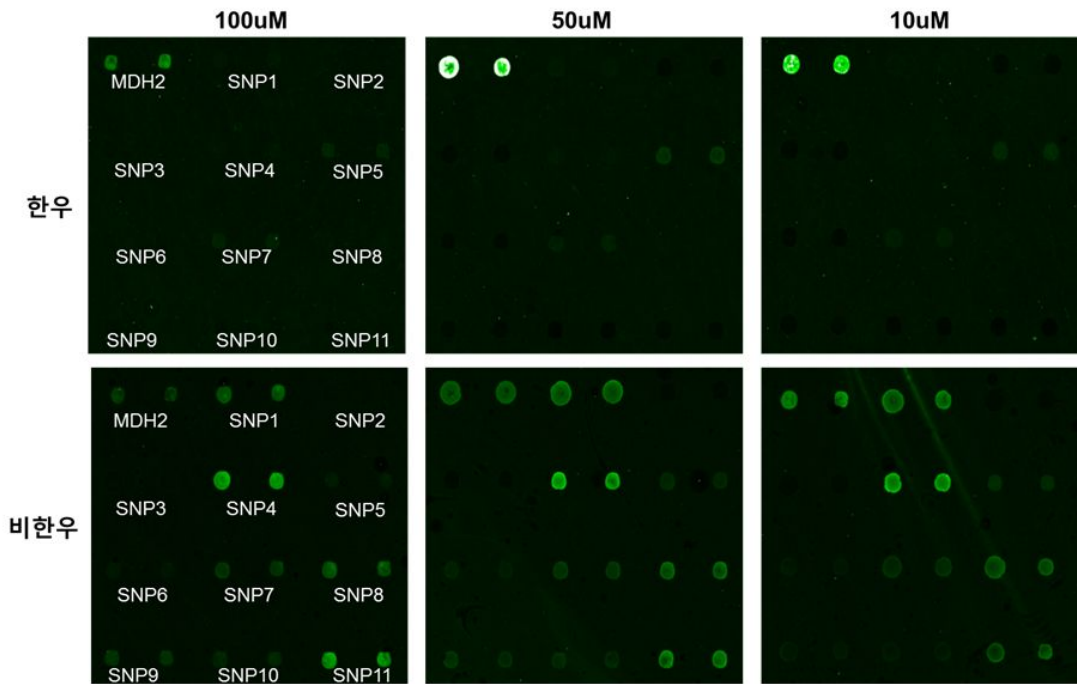


그림 61. probe 농도에 따른 혼성화 효율

Urea 농도 확립 및 probe 최적화: 한우/비한우 판별을 위해서 필요한 12개의 마커 중에서 1번 마커만 확인될 경우 한우, 12개의 마커가 모두 확인될 경우 비한우로 구분된다. 하나의 마커 당 3개에서 7개 프로브를 디자인하고 Multiplex PCR product를 이용하여 한우/비한우 판별에 적합한 프로브를 선택하고자 하였다. urea 농도에 따른 probe의 한우와 비한우 샘플 비교를 통해 비특이적 반응을 보이는 spot과 낮은 형광 시그널을 보이는 프로브들을 제외하고 마커 당 하나의 프로브를 선택하여 최종적으로 마이크로 어레이 칩에 고정될 프로브를 선정하였다.

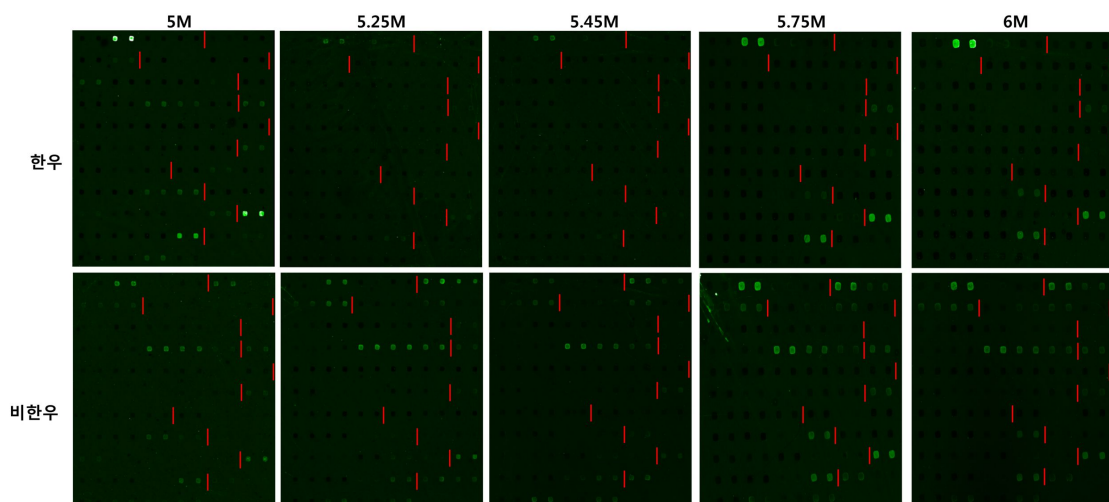


그림 62. urea 농도에 따른 최적의 probe 선택

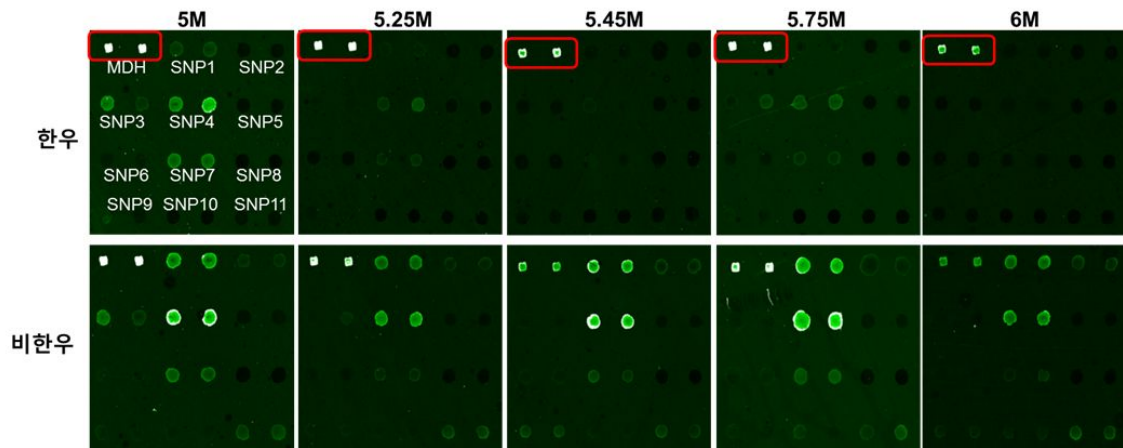


그림 63. 선택된 probe에 대한 urea 농도별 혼성화 테스트

선행된 실험에서 urea 농도는 6M로 확정을 하였으나, 희석 비율 및 반응 volume의 조건 변화로 urea 농도 재정립이 필요하였다. 상온에서 혼성화 반응을 수행하기 위해 DNA의 Tm값을 낮추고 denaturation을 돕는 urea를 혼성화 버퍼에 첨가하여 상온 반응에 적합한 농도를 찾고자 urea 농도별 실험을 수행하였다. 선택된 probe에 대해 5M, 5.25M, 5.45M, 5.75M 과 6M urea 농도를 갖도록 hybridization buffer로 1/5로 희석하고 상온에서 1시간동안 반응하였다. urea 농도가 증가 할수록 한우 샘플에서 비선택적 반응이 줄어들음을 확인할 수 있었으나, 비한우 샘플에서도 감도가 낮은 spot의 형광 시그널이 동시에 감소함을 확인 할 수 있었다. 한우 샘플의 비선택적 반응이 없고, 비한우 샘플에서 형광 시그널이 가장 높은 5.45M urea농도를 선정하여 실험을 진행하였다.

(나) 형광시그널 증폭

최적의 혼성화 조건에서도 Genepix 4200 상용 형광 스캐너를 이용하여 건조된 칩 표면의 형광 검출과 비교하여 휴대용 형광 스캐너를 이용한 경우 형광 시그널의 감소를 보여 선행된 연구에서 수행한 항체-나노입자 접합체를 이용한 형광 시그널 증폭을 하고자 하였다. 나노입자 콜로이드 용액(20 nm, AgNP, AuNP)과 anti Cy5 항체를 반응 하여 나노입자-anti Cy5 Ab 접합체를 만들어 재정립된 혼성화 조건으로 혼성화 반응 후 프로브와 결합한 PCR product의 Cy5를 detection하여 시그널이 증가됨을 확인하였다. Control 반응 대비 anti Cy5 항체-Texas Red와 나노입자-anti Cy5 Ab 접합체를 첨가한 경우 비특이적 결합없이 목적 프로브의 전체적인 시그널 증가를 보였다. 이는 향후 휴대용 장치에서 신호 감도 증폭을 위해 사용될 수 있으리라 예상된다.

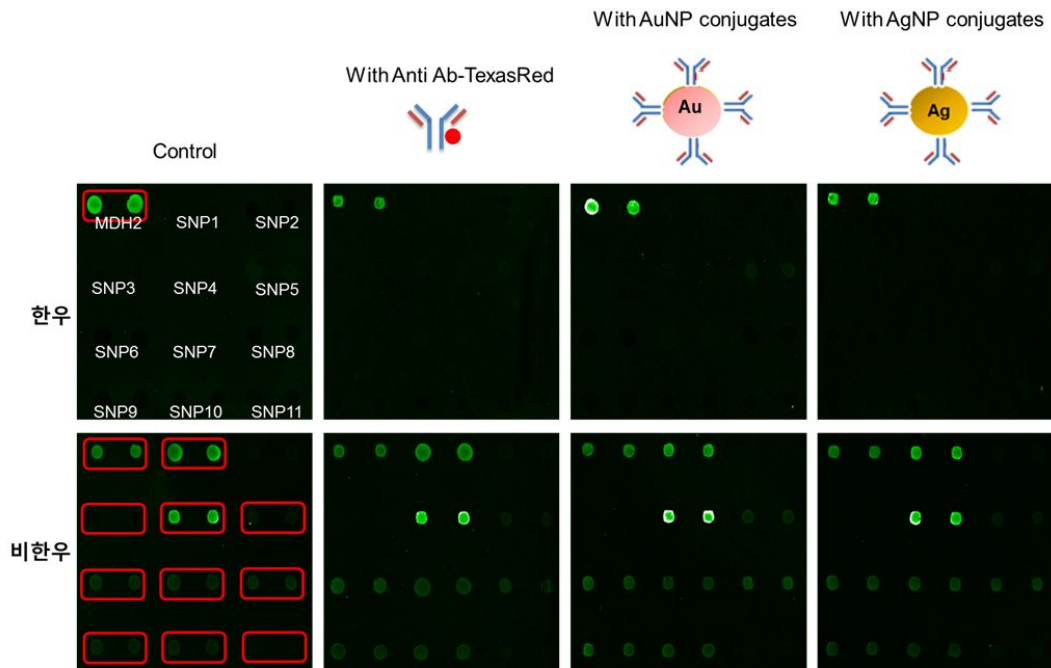


그림 64. 형광 시그널 증폭을 위한 Cy5-항체 및 나노입자 Cy5-항체 접합체 첨가

(2) 최적화된 DNA 마이크로어레이 기반 통합디바이스를 이용하여 다중 SNP 유전자 표지분석 한우/비한우 샘플을 이용하여 최적화된 DNA 혼성화 조건으로 한우 샘플 SNP 검출 실험을 수행하였다. 재정립된 DNA 마이크로 어레이 조건은 표 3과 같다.

DNA 마이크로 어레이 칩 조건	
표면	Aldehyde surface
Blocking solution	Sodium borohydride
Probe 농도	10uM probe
샘플 처리	전처리 없음
혼성화용 희석 버퍼	5.5M urea(5X SSC) buffer 1/5 희석
샘플 반응 volume	10ul
혼성화 반응 온도	상온
혼성화 반응 시간	1hr

표 3. 한우판별을 위한 DNA 마이크로 어레이 칩 조건

확립된 혼성화 반응 조건을 기반으로 한우 샘플의 마이크로 어레이 결과와 제1세부의 micro CE 칩 결과를 비교 분석 하였다. 확립된 마이크로 어레이 조건 및 혼성화 반응 조건을 토대로 한우/비한우 SNP 유전자 표지 분석을 실시하였다. micro CE칩 결과 한우에서 MDH2에서 peak이 확인되었고, 비한우에서는 MDH2, SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP6, SNP7, SNP9, SNP10, SNP11에서 peak이 나타났다. DNA 마이크로 어레이와 비교해 본 결과, 한우에서는 MDH2의 spot만이 확인되었고, 비한우 샘플에서는 SNP3, SNP5, SNP8을 제외한 나머지 spot에서 형광이 확인되었다. micro CE 칩 결과에 상응하는 DNA 마이크로 어레이 결과를 얻을 수 있었다 (그림 65).

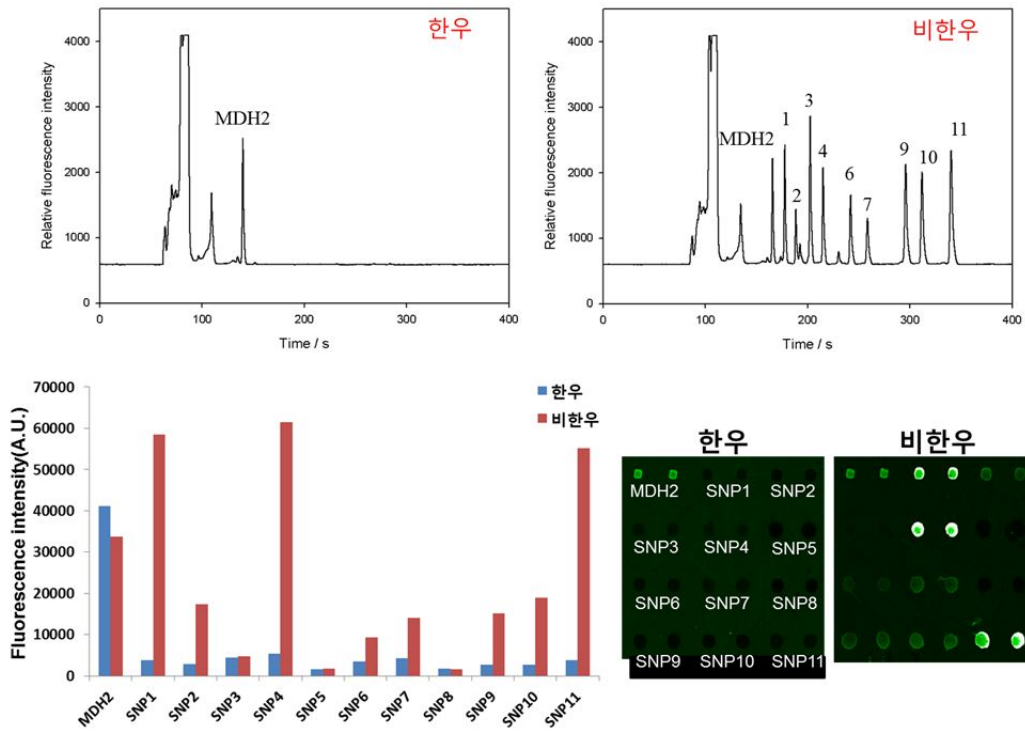


그림 65. 한우 비한우 샘플간의 CE 결과와 마이크로 어레이 결과 비교

SNP3의 경우 재현실험 및 probe 재정립에도 불구하고 spot을 확인 할 수 없었다. SNP3은 probe의 서열 교체가 필요할 것으로 판단되어 이를 제외한 나머지 11개 probe를 이용하여 여러 한우/비한우 판별을 위한 DNA 마이크로 어레이 실험을 진행하였다. 한우 샘플로 HW3, HW6, 비한우 샘플로는 IBC11, IBC61를 이용하여 여러 샘플에 대해 제작된 DNA 마이크로 어레이 칩과 확립된 혼성화 반응 조건의 재현성 및 정확성을 확인하였다.

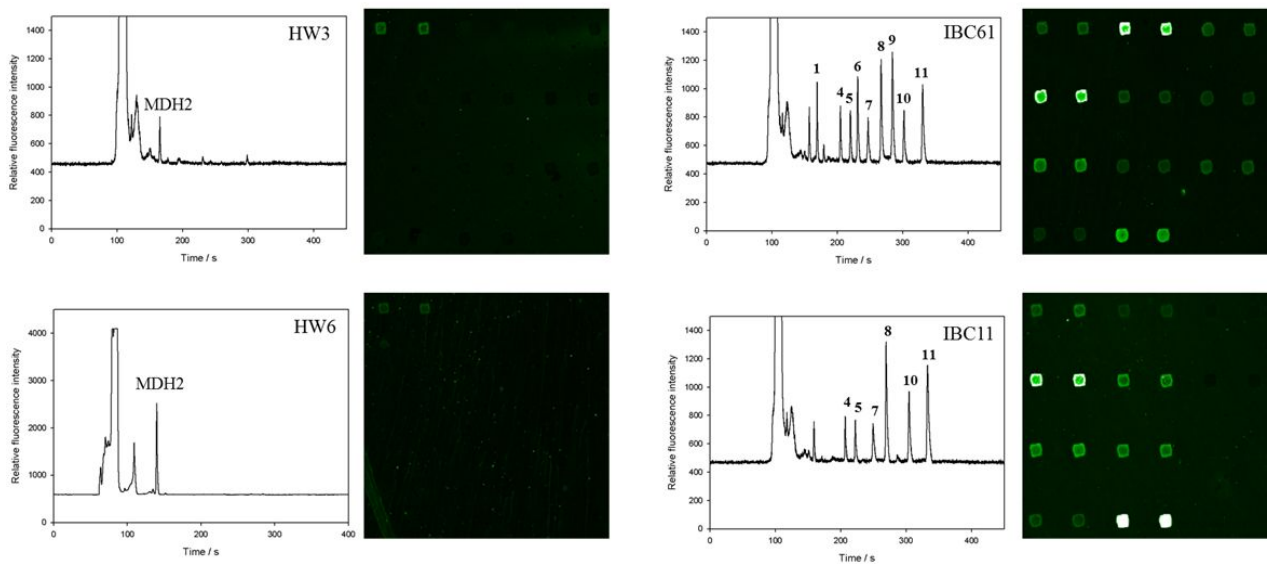


그림 66. 한우/비한우(HW/IBC) 샘플의 microCE 결과와 DNA 마이크로 어레이 결과 비교

Probe	Sequence
MDH2	TTTTTTTTTTTTTTTTCACCAACGGGCTGTTCTTCA
SNP1	TTTTTTTTTTTTTTTTCAGAACACAGCGAACTCTCA
SNP2	TTTTTTTTTTTTTTTGGATGGTAAAGCTTGTTATTAA
SNP3	TTTTTTTTTTTTTTTGACCCAGCCCCTGATGAACC
SNP4	TTTTTTTTTTTTTTTAGAGCTGCTCCAGCCCCTAG
SNP5	TTTTTTTTTTTTTTTACCCCAGGTGCAGAGGCA
SNP6	TTTTTTTTTTTTTTTGTGCCGGGCCTCCTCTAG
SNP7	TTTTTTTTTTTTTTTGGAGACTGTTTCAGTACAATAC
SNP8	TTTTTTTTTTTTTTTTCCTTCCAGTGAATATCCAGGA
SNP9	TTTTTTTTTTTTTTTTCAGAGCCTGAAGAGGGGC
SNP10	TTTTTTTTTTTTTTTGTACAAAGCTAGCCAATACCA

표 4. 한우판별 DNA 마이크로 어레이 칩을 위한 probe 서열

Micro CE 결과 비교에서도 CE 결과 peak에 대응하는 spot 위치가 마이크로 어레이 칩에서 나타남을 확인할 수 있었다. 이로써 최적화된 11개 probe를 확정하고 DNA 마이크로 어레이 칩 조건을 확립할 수 있었다.

(3) 고효율 한우 유전자 분석을 위한 샘플 PCR소자-DNA microarray 통합 디바이스 제작 (제1세부 연계)

최적화된 DNA 마이크로어레이 칩 제작 및 혼성화 조건을 이용하여 제1세부와 연계한 PCR 소자-DNA 마이크로 어레이 통합 디바이스에 적용하기 위해 칩을 제공하였다. 통합 디바이스의 PCR 소자에서 수행하여 얻어진 PCR product(on-chip PCR product)를 이용하여 제공된 칩 상에서 혼성화 반응을 수행하고 반응 결과는 휴대용 형광 스캐너로 분석함으로써 분석 시간 단축 및 고감도 SNP 측정을 시도하였다.

3. (제2세부) 솔젠트(주) 김광규 박사팀

▶ 최종목표: 한우 개체 및 품종 구별을 위한 다중표지인자 개발

가. 1차년도 세부 연구내용

(1) 후보 SNP marker의 선별

(가) 충북대 김관석 교수님이 발굴한 소 품종식별을 위한 SNP 마커 정보

Baylor College of Medicine (BCM)의 Human Genome Sequencing Centerdptjms 2004년 9월27일 3X bovine genome sequence를 공개하였는데, bovine sequencing에 사용된 Hereford 암소의 염기서열을 template (reference)로 하여 Holstein, Angus, Brahman, Limousin과 Jersey 품종 염기서열과 비교하였을 때 15,267개의 SNP를 발굴하였다 (표 5).



Breed	No. Reads sequenced and tested	No. Reads that hit the reference genome	No. Reads that passed map criteria	No. Q20 bases in the passed map criteria reads	No. high quality SNPs
Holstein	164,832	99,773	28,368	25,443,574	11,945
Angus	30,912	16,828	5,619	4,935,230	2,499
Brahman	2,304	1,177	253	224,035	320
Limousin	3,840	2,552	940	840,176	503
Jersey	1920	794		0	0

표 5. BCM의 결과로부터 발굴된 SNP

Brahman과 Limousin 염기서열을 Hereford 것과 비교하였을 때 나타난 823개 SNP 좌위 염기서열을 이용하여 primer 쌍을 제작한 것 가운데, PCR 증폭산물의 크기가 > 200 base인 104개 primer를 선정하여 확보된 한우 보증종모우 24두와 Hereford 및 Limousin 24두에 대하여 증폭된 PCR산물을 direct sequencing 하여 확인하였다. Hereford와 한우 24두에서 총 길이 7.7kb의 SNP를 가진 염기서열을 비교하였을 때 보고된 30개의 SNP 외에 부가적으로 39개의 SNP가 발굴되었으며, 발굴된 SNP 가운데 대립유전자의 빈도가 > 30% 차이가 나타난 10개 좌위에 대하여 추가적인 ABI SNaPSHOP 분석을 위하여 선별되었다. Limousin과 한우 KNP 각각 24두에 대하여 74개 다른 종류의 PCR 증폭산물을 염기서열 분석을 수행하여 204개의 SNP들이 발견되었다.

(나) 후보 SNP marker의 선별

충북대학교 김관석 교수님으로부터 받은 14개의 SNP marker중에서 한우와 비한우 사이의 Allele frequency가 높은 ‘후보 SNP marker’의 선별을 위하여 한우와 비한우 각각 10두를 대상으로 1차 genotyping을 실시하였다. Primer sequence (표 6) 와 PCR 조건 (표 7) 은 아래와 같다.

Forward Primer	Sequence	Reverse Primer	Sequence
1-F	ttgtgtggctctggtgcacag	1-R	tcgactctttgtgaccccatgc
2-F	caggcaaccactgcaaatgatg	2-R	cccactctaggccggaagcat
3-F	ctcgctaccctttgcttctgc	3-R	cctgcatagaaatgcagaggct
4-F	tggcaaccactccactgttct	4-R	aggagtgccacctccaccta
5-F	gggagtatttgccttctagagg	5-R	tcgcgaagagtcggacacgac
6-F	cgaatgtacgggtgactgtg	6-R	tgggttcctccacactactg
7-F	acctctgactggtgtctccac	7-R	cagtatttcagagatgtctcagt
8-F	tgccctctagtactagacattc	8-R	tcctctgaagatagaaatgtgaac
9-F	ccgccgattgttttgttttcac	9-R	actggaggacgttgggtcctta
10-F	attgctttctggaggcatctc	10-R	atgacagaaccgggacacata
11-F	gattgggctggtcgattctttg	11-R	gtggtcaatggactggaagagg
12-F	gcaagagccaacatccgttcta	12-R	agatgtgtatctgaccgtgac
13-F	ttgtggcctctgttatgttgagg	13-R	tgagtttgaagtgtctcctca
14-F	ataattgcctgccactgtcacc	14-R	gggaggtgggtcttagctct

표 6. 후보 SNP marker 선별용 PCR primer sequence



95°C 15 min		2X Multiplex premix	12.5 $\mu$ l
95°C 20 sec		Genomic DNA	2.0 $\mu$ l
61°C 40 sec	X 35 cycles	Primer F (10 pmole/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
72°C 1 min		Primer R (10 pmole/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
72°C 3 min		DW	8.5 $\mu$ l
10°C $\infty$		Total	25.0 $\mu$ l

표 7. PCR 조건 및 조성

Genotyping 결과, 12개의 SNP marker중에서 1, 2, 3, 6, 7, 8, SNP marker의 allele frequency가 한우와 비한우에서 0.50 이상으로 차이를 보이는 것이 확인되었다 (표 8).

SNPs	No. of Animal	Genotype			Allele frequency		SNPs	No. of Animal	Genotype			Allele frequency	
		C/C	C/T	T/T	C	T			C/C	C/T	T/T	C	T
SNP 1	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 7	한우 10 두	10	0	0	1.00	0
	비한우 10 두	0	2	8	0.10	0.90		비한우 10 두	0	1	9	0.05	0.95
SNP 2	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 8	한우 10 두	10	0	0	1.00	0
	비한우 10 두	0	2	8	0.10	0.90		비한우 10 두	1	0	9	0.10	0.90
SNP 3	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 9	한우 10 두	3	0	7	0.30	0.70
	비한우 10 두	0	5	5	0.25	0.75		비한우 10 두	0	5	5	0.25	0.75
SNP 4	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 10	한우 10 두	10	0	0	1.00	0
	비한우 10 두	6	3	1	0.75	0.25		비한우 10 두	7	3	0	0.85	0.15
SNP 5	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 11	한우 10 두	10	0	0	1.00	0
	비한우 10 두	9	0	1	0.90	0.10		비한우 10 두	9	0	1	0.90	0.10
SNP 6	한우 10 두	10	0	0	1.00	0	SNP 12	한우 10 두	10	0	0	1.00	0
	비한우 10 두	0	4	6	0.20	0.80		비한우 10 두	7	3	0	0.85	0.15

표 8. 후보 SNP marker 선별을 위한 1차 genotyping 결과 정리  
(Genotype과 allele frequency)

(2) 후보 SNP marker의 2차 genotyping

후보 SNP marker 6개에 대해서, 한우 40두, 수입우 40두 (뉴질랜드산 8두, 호주산 8두, 미국산 [목살] 8두, 미국산 [갈비] 8두, 미국산 [차돌양지] 8두)를 대상으로 2차 genotyping을 실시하였다. Genotyping 결과에서 6가지 SNP marker의 allele frequency가 한우와 비한우에서 '0.69' (SNP 3)이상의 차이를 보임을 확인하였다 (표 9, 10)

1		2		3		6		7		8	
한우	비한우	한우	비한우	한우	비한우	한우	비한우	한우	비한우	한우	비한우
1	C/C	T/T	1	G/G	A/A	1	C/C	T/T	1	T/T	G/G
2	C/C	T/T	2	G/G	A/A	2	G/G	A/A	2	C/C	T/T
3	C/C	T/T	3	G/G	A/A	3	C/C	T/T	3	T/T	G/G
4	C/C	T/T	4	G/G	A/A	4	C/C	T/T	4	C/C	T/T
5	C/C	C/T	5	G/G	A/G	5	C/C	C/T	5	C/C	C/T
6	C/C	C/T	6	G/G	A/G	6	C/C	C/T	6	C/C	C/T
7	C/C	T/T	7	G/G	A/A	7	C/C	T/T	7	C/C	T/T
8	C/C	T/T	8	G/G	A/A	8	C/C	T/T	8	C/C	T/T
9	C/C	C/T	9	G/G	A/G	9	C/C	T/T	9	C/C	T/T
10	C/C	T/T	10	G/G	A/A	10	C/C	T/T	10	C/C	T/T
11	C/C	T/T	11	G/G	A/A	11	C/C	T/T	11	C/C	T/T
12	C/C	T/T	12	G/G	A/A	12	G/G	A/A	12	C/C	T/T
13	C/C	C/T	13	G/G	A/G	13	C/C	C/T	13	C/C	C/T
14	C/C	T/T	14	G/G	A/A	14	C/C	T/T	14	C/C	T/T
15	C/C	T/T	15	G/G	A/A	15	C/C	T/T	15	C/C	T/T
16	C/C	T/T	16	G/G	A/A	16	G/G	A/A	16	C/C	T/T
17	C/C	C/T	17	G/G	A/G	17	C/C	C/T	17	C/C	T/T
18	C/C	T/T	18	G/G	A/A	18	G/G	A/A	18	C/C	T/T
19	C/C	T/T	19	G/G	A/A	19	C/C	T/T	19	C/C	C/C
20	C/C	T/T	20	G/G	A/A	20	C/C	C/T	20	C/C	T/T
21	C/C	C/T	21	G/G	A/G	21	C/C	C/C	21	C/C	T/T
22	C/C	T/T	22	G/G	A/A	22	C/C	T/T	22	C/C	T/T
23	C/C	T/T	23	G/G	A/A	23	C/C	T/T	23	C/C	T/T
24	C/C	T/T	24	G/G	A/A	24	C/C	T/T	24	C/C	T/T
25	C/C	C/T	25	G/G	A/G	25	C/C	T/T	25	C/C	T/T
26	C/C	T/T	26	G/G	A/A	26	C/C	T/T	26	C/C	T/T
27	C/C	T/T	27	G/G	A/A	27	C/C	T/T	27	C/C	T/T
28	C/C	C/T	28	G/G	A/G	28	C/C	C/T	28	C/C	T/T
29	C/C	T/T	29	G/G	A/A	29	C/C	T/T	29	C/C	T/T
30	C/C	T/T	30	G/G	A/A	30	C/C	C/T	30	C/C	T/T
31	C/C	T/T	31	G/G	A/A	31	C/C	C/T	31	C/C	C/T
32	C/C	T/T	32	G/G	A/A	32	C/C	T/T	32	C/C	C/T
33	C/C	T/T	33	G/G	A/A	33	C/C	C/T	33	C/C	C/T
34	C/C	T/T	34	G/G	A/A	34	C/C	C/C	34	C/C	T/T
35	C/C	T/T	35	G/G	A/A	35	C/C	T/T	35	C/C	T/T
36	C/C	C/T	36	G/G	A/G	36	G/G	A/G	36	C/C	C/T
37	C/C	C/T	37	G/G	A/G	37	C/C	C/T	37	C/C	C/T
38	C/C	T/T	38	G/G	A/A	38	G/G	A/A	38	C/C	C/T
39	C/C	C/T	39	G/G	A/G	39	C/C	T/T	39	C/C	T/T
40	C/C	T/T	40	G/G	A/A	40	C/C	C/T	40	C/C	T/T

한우

뉴질랜드

호주

미국

미국

표 9. 2차 genotyping 결과 (원산지별 분류)

SNPs	No. of Animal	Genotype			Allele frequency	
		C/C	C/T	T/T	C	T
SNP 1	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	0	11	29	0.14	0.86
SNP 2	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	0	11	29	0.14	0.86
SNP 3	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	4	17	19	0.31	0.69
SNP 6	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	1	11	28	0.16	0.84
SNP 7	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	1	9	30	0.14	0.86
SNP 8	한우 40 두	40	0	0	1.00	0
	비한우 40 두	6	10	24	0.27	0.73

표 10. Genotype과 allele frequency



(3) 후보 SNP marker의 BLAST 검색

선별된 SNP marker들의 homology search를 실시하기 위하여 SNP 를 포함한 총 601 basepair의 유전자 염기서열을 대상으로 미국 국립생물정보 센터 (NCBI)에서 제공되는 BLAST 검색을 수행하였다. 그 결과, SNP marker '1'과 '2'가 8번 chromosome에 위치하고 있는 'astroactin 2'와 높은 homology를 가지고 있다는 결론이 나왔고, SNP marker '1'과 '2'가 서로 link되어 있을 가능성이 높기 때문에 SNP marker '2'를 '최종 SNP marker'에서 제외시켰다. SNP marker '6'과 '8'의 경우, 모두 3번 chromosome에 위치하고 있지만 서로 다른 유전자와 homology를 나타냈기 때문에 '최종 SNP marker'로 선별하게 되었다 (표 11)

: 최종 선별된 SNP marker

SNPs	Sequences producing significant alignments:	Features flanking this part of subject sequence:
1	Bos taurus chromosome 8 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">similar to astrotactin 2</a>
2	Bos taurus chromosome 8 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">similar to astrotactin 2</a>
3	Bos taurus chromosome 25 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">881750 bp at 5' side: similar to UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylglactosaminylt...</a>
6	Bos taurus chromosome 3 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">289805 bp at 5' side: ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide</a> <a href="#">34187 bp at 3' side: similar to Uncharacterized protein C1orf161 homolog</a>
7	Bos taurus chromosome 14 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">85357 bp at 5' side: proenkephalin</a>
8	Bos taurus chromosome 3 genomic contig, reference assembly (based on Btau_4.0)	<a href="#">262900 bp at 5' side: similar to endonuclease reverse transcriptase</a> <a href="#">311449 bp at 3' side: similar to endonuclease reverse transcriptase</a>

표 11. 최종 선별된 한우 SNP marker의 BLAST 검색 결과

최종 SNP marker를 선별을 위해 한우 및 수입우 총 80두를 이용하였으나, 다소 적은 경향이 있어 차후 한우의 판별력의 정확성을 높이기 위해 190두로 늘려 분석하려고 한다. 또한, 유전적 다형성이 높은 한우의 정확한 판별력을 높이기 위하여 추가적인 특이적인 SNP 유전자 표지 개발도 진행할 예정이다.

나. 2차년도 세부 연구내용

(1) 선별된 5개의 SNP marker를 이용한 PCR 조건 최적화

(가) 최종 SNP marker의 allele specific PCR (AS PCR)

최종 선별된 5개의 SNP marker를 이용하여 한우와 수입우를 판별하기 위하여, 수입우에서만 특이적으로 반응하는 allele specific primer를 디자인 하였다. 한우에서 특이적으로 반응하는 allele specific primer를 디자인할 경우에는, heterozygote한 genotype을 가지고 있는 수입우에서도 판별되기 때문에 사용하지 않았다. 예를 들어 '1' SNP marker에서 수입우 특이적인 'T' allele specific primer의 경우에는 수입우에서만 PCR 산물이 나타나지만, 한우 특이적인 'C' allele specific primer의 경우에는 한우 40두 이외에도 수입우 11두 (heterozygote)에서 PCR 산물이 나타나기 때문에 한우만을 특이적으로 판별하는데 어려움이 있다. 같은 방법으로 나머지 4개의 SNP marker에 대한 수입우 특이 allele specific primer를 디자인 하였다 (표

11).

▶ Allele specific PCR의 조건은 1차년도 genotyping시에 사용한 조건과 동일하다. ASP에 사용한 template는 한우 3두와 수입우 3두의 genomic DNA이며 negative control로는 증류수를 사용하였다. 다양한 조합의 primer들을 사용하여 multiplex PCR 조건을 최적화하였다. 실험 결과 수입우에서만 특이적으로 PCR 산물이 보였으며, 한우에서는 PCR 산물이 보이지 않았다 (그림 67).

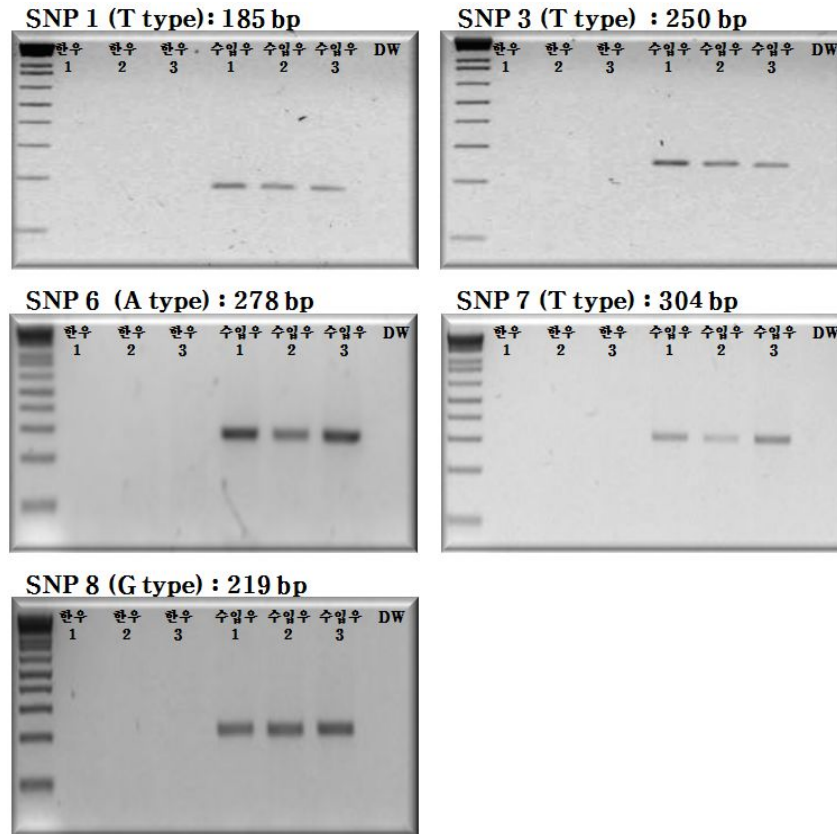


그림 67. 각 SNP marker들의 ASP 결과. Lane 1: Molecular size marker 1000 bp ladder (Solgent, Korea), lane 2~7: PCR products, lane 8: negative control

(나) Sex determination gene 과 house keeping gene의 PCR

본 키트에서는 Y chromosome 특이 유전자인 SRY (Sex-determining Region Y)를 이용하여 소의 성별까지 판별해 낼 수 있도록 디자인 되었다. SRY의 primer 염기서열은 논문을 참조하였다. 또한 PCR의 성공 여부를 알기 위하여 housekeeping 유전자 (Malate dehydrogenase 2, MDH2)를 control band로 사용하였다. Primer의 염기서열은 미국 국립생물정보 센터 (NCBI)에 등재되어 있는 Malate dehydrogenase 2 염기서열을 기초로 100 basepair로 설계하였으며 (표 12), PCR 조건은 1차년도 genotyping시와 동일하다. SRY에 대한 실험을 진행한 결과 테스트를 진행한 한우는 모두 암소인 것으로 나타났다. 수입우의 경우 3두중 1두는 암소, 2두는 수소로 나타났다. 또한 MDH2에 대한 실험도 한우, 수입우 모두 예상 크기에서 PCR 산물이 확인되었다 (그림 68).

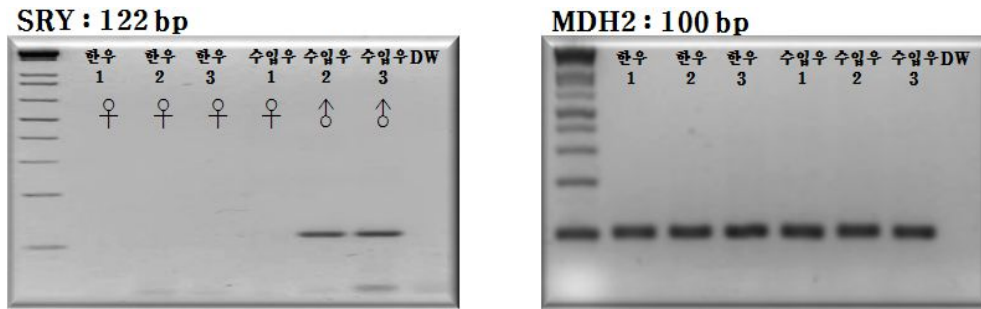


그림 68. Sex determination gene 과 house keeping gene의 PCR 결과. SRY (원), MDH2 (오). Lane 1: Molecular size marker 1000 bp ladder (Solgent, Korea), lane 2~7: PCR products, lane 8: negative control

size	SNP	Forword primer		Reverse primer	
		Name	Sequence (5' -3' )	Name	Sequence (5' -3' )
304	7	7_F_304	gggtgggcacactttacaccaa	7_R(T)_3	tgactccctgaggactggataagt A*
278	6	6_F(A)_3	ccatggttactcttcttccccA	6_R_278	Tgggtgccttccacactctg
250	3	3_F_250	tggtattcaatggacactgggt	3_R(T)_2	ttcctattatgaacaagggtttttggtA
219	8	8_F(G)_1	cagatatatatgaaatacagatatattccG	8_R-219	Agagaataagatggagacaggaag
185	1	1_F_185	gcctgatcctgtggacactg	1_R(T)_1	ccttttgcttataaaaatgatactcatA
size	gene	Forword primer(5' -3' )		Reverse primer(5' -3' )	
		Name	Sequence	Name	Sequence
122	SRY	SRY_1F	Cgaagacgaaagktggctct**	SRY_1R	tgtgcctctcaagaatgg
100	MDH2	MDH2_F_1	ggggcctctggaggaattgg	MDH2_R_1	ctccgggcgtgtgagcgata

표 12. Primer sequence (Yellow color: Allele specific primer). \* upper-case letter A, T, G: SNP point. \*\* k: G or T

(다) SNP marker의 multiplex-PCR

Single PCR로 확인한 5개 SNP marker, SRY 그리고 MDH2를 포함하는 multiplex-PCR을 수행하였다. Multiplex-PCR의 결과는 genotyping 결과와 일치함을 확인 하였다. Genotyping한 결과와 같이 한우에서는 SNP marker에 대한 PCR 산물은 보이지 않은 반면, 수입우에서는 PCR 산물이 관찰되었다. 또한, sex determination 유전자인 SRY와 house keeping 유전자인 MDH2도 예상되는 크기에서 PCR 산물을 확인 할 수 있었다. 실험결과는 그림 69로 나타내었 으며, 실험 조건은 표 13에 정리 하였다.

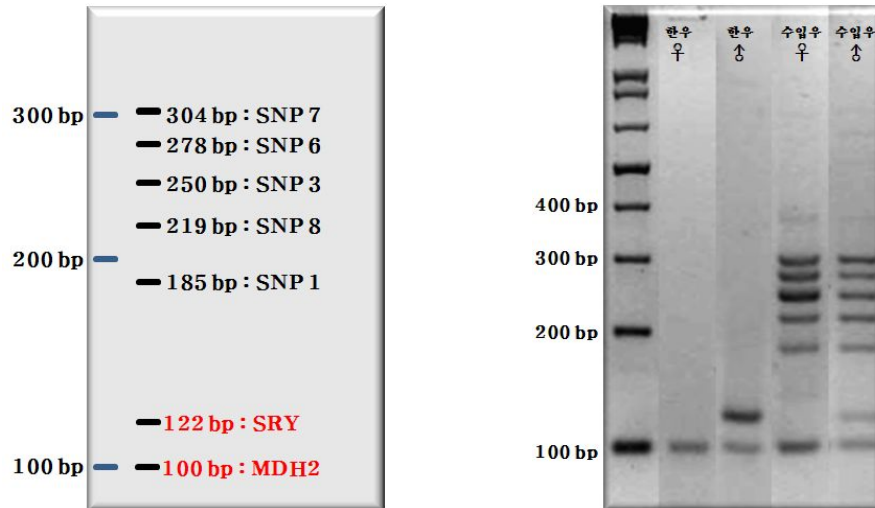


그림 69. Multiplex-PCR의 예상 크기와 실험 결과. 예상 PCR product (왼), multiplex PCR 결과 (오). Lane 1: Molecular size marker 1000 bp ladder (Solgent, Korea), lane 2: 암소 한우, lane 3: 수소 한우, lane 4: 암소 수입우, lane 5: 수소 수입우

95°C 15 min	2X Multiplex premix	12.5 $\mu$ l
95°C 20 sec	Genomic DNA	2.0 $\mu$ l
61°C 40 sec	X 38 cycles	Primer mix
72°C 1 min		
72°C 3 min	D.W.	7.5 $\mu$ l
10°C $\infty$	Total	25.0 $\mu$ l

Primer name	Vol. (100 pmole/ $\mu$ l)
7_F_304	15 $\mu$ l
6_F(A)_3	2 $\mu$ l
3_F_250	20 $\mu$ l
8_F(G)_1	20 $\mu$ l
1_F_185	15 $\mu$ l
SRY_1F	2 $\mu$ l
MDH2_F_1	1 $\mu$ l
7_R(T)_3	15 $\mu$ l
6_R_278	2 $\mu$ l
3_R(T)_2	20 $\mu$ l
8_R_219	20 $\mu$ l
1_R(T)_1	15 $\mu$ l
SRY_1R	2 $\mu$ l
MDH2_R_1	1 $\mu$ l
DW	150 $\mu$ l

표 13. 최적화된 Multiplex PCR 조건과 조성

#### (라) 판별율 확인

다수의 개체를 이용하여 실험하였을 때, 수입우의 경우 94.3% (968/1,026두)의 수입우 판별율을 나타내었고 한우의 경우 85.9% (661/769두)의 한우 판별율을 가지고 있었다 (표 14). 원인은 처음 개발 단계에서 사용되었던 한우 template가 종모우, 씨숫소의 것이어서 시중에 유통되고 있는 한우에서는 높은 변별력을 갖기 어려운 것으로 보여진다.

결국, 선별된 5개의 마커로는 한우 및 수입우 판별력이 다소 떨어져서 특이적 SNP 마커 수를 5개 이상으로 늘려 더 많은 수의 개체를 이용하여 판별력을 높이고자 하였다.



	plate	MC1R				HW				판정 결과					
		한우	비한우	보류		한우 (0~2)	비한우 (4~5)	보류 (3)	재분석	한우 판정	수입우 판정	보류	재분석		
수입우 (968/1026) <b>94.3%</b>	1	2	65	23	90	6	82	2		90	0	88	2		90
	2	19	68	3	90	6	73	11		90	3	84	3		90
	3	24	66	0	90	6	80	4		90	1	88	1		90
	4	22	68	0	90	2	82	6		90	1	87	2		90
	5	25	64	1	90	3	80	7		90	2	86	2		90
	6	23	67	0	90	4	80	6		90	2	86	2		90
	7	22	68	0	90	8	74	8		90	3	84	3		90
	8	18	70	2	90	13	68	6	3	90	3	83	1	3	90
	9	35	54	0	89	7	75	7		89	2	82	5		89
	10	39	50	0	89	6	70	9	4	89	1	82	6		89
	11	30	60	0	90	6	79	5		90	5	82	3		90
	12	11	26	1	38	2	33	3		38	1	36	1		38
한우 (661/769) <b>85.9%</b>	13	90	0	0	90	79	1	10		90	79	1	10		90
	14	89	1	0	90	80	1	8	1	90	80	2	8	1	90
	15	90	0	0	90	78	4	8		90	78	4	8		90
	16	90	0	0	90	74	0	6	10	90	74	0	6	10	90
	17	88	2	0	90	76	3	2	9	90	76	4	1	9	90
	18	88	2	0	90	85	0	4	1	90	84	2	4		90
	19	88	0	0	88	82	1	6		89	81	1	6	2	90
	20	88	2	0	90	70	6	4	10	90	70	6	4	10	80
	21	51	8	0	59	41	9	6	3	59	39	11	6	3	59

표 14. 한우 및 수입우 판별 실험 결과

(2) 선별된 5개의 SNP marker를 이용한 PCR 조건 최적화

(가) SNP marker의 1차 선별

영남대학교 김종주 교수님, 충북대학교 김관석 교수님께서 제공해 주신 한우 558두에 대한 Bovine SNP 50K chip의 data를 바탕으로, 총 52,677개의 SNP marker중에서 수입우 특이적인 marker를 선별하였다. SNP의 빈도(frequency)가 한우에서는 낮고 수입우에서는 높은 15개의 marker를 선별 하였다 (표 15). SNP를 기준으로 5'쪽과 3'쪽으로 각각 300 base pair의 유전자 염기서열을 받았다.

SNP_ NAME	SNP_ NAME_2	BTA	Position	Frequency						
				Hanwoo (106)	Angus (100)	Hereford (101)	Limousin (102)	Charolais (103)	Simmental (104)	Holstein (200)
23765	BFGL-NGS-111691	11	46688491	0.02	0.79	0.76	0.75	0.54	0.61	0.76
56027	Hapmap57340-rs29010501	11	46636484	0.02	0.42	0.74	0.48	0.41	0.51	0.74
57586	UA-IFASA-4800	24	32277266	0.03	0.44	0.83	0.44	0.59	0.34	0.83
15562	ARS-BFGL-NGS-53620	6	119003189	0.09	0.86	0.66	0.47	0.77	0.73	0.66
57585	UA-IFASA-4798	22	61257679	0.03	0.61	0.83	0.23	0.60	0.55	0.83
10079	ARS-BFGL-NGS-2860	20	38740662	0.07	0.53	0.92	0.36	0.46	0.61	0.92
50369	Hapmap42200-BTA-40314	16	17949859	0.05	0.55	0.83	0.56	0.53	0.53	0.83
7581	ARS-BFGL-NGS-20015	11	95778997	0.06	0.68	0.70	0.76	0.56	0.74	0.70
20572	ARS-BFGL-NGS-84649	12	76510730	0.02	0.33	0.88	0.33	0.51		0.88
52956	Hapmap48920-BTA-84063	9	70378982	0.01	0.74	0.64	0.50	0.51	0.46	0.64
7563	ARS-BFGL-NGS-19963	8	111309164	0.03	0.66	0.94	0.72	0.53	0.68	0.94
49078	Hapmap39562-BTA-40351	16	18630076	0.06	0.49	0.79	0.68	0.49	0.67	0.79
50378	Hapmap42218-BTA-45703	19	8071050	0.03	0.22	0.78	0.53	0.53		0.78
14561	ARS-BFGL-NGS-44006	19	58653826	0.04	0.62	0.85	0.36	0.57	0.56	0.85
49615	Hapmap40677-BTA-121871	8	111423182	0.05	0.66	0.93	0.74	0.59	0.68	0.93

표 15. 1차 선별 SNP marekr

(나) 2차 SNP marker의 선별 및 확정

15개의 1차 선별 marker를 대상으로 한우와 수입우의 SNP frequency를 알아보기 위하여, 농산물 품질관리원으로부터 받은 한우 48두, 수입우 384두를 대상으로 Mass Array를 진행하였다. 1차 한우 SNP typing결과와 Mass Array 결과를 바탕으로 15개의 marker중에서 수입우에서 특이적으로 높은 frequency를 나타내지만, 한우에서는 낮은 frequency를 보이는 11개를

marker로 확정하였다 (52956, 57585, 7563, 49078, 20572, 7581, 56027, 23765, 15562, 57585, 49615) (표 16). 게다가, PCR의 성공 여부를 확인하기 위하여 house keeping gene인 MDH2 (Malate DeHydrogenase 2)을 positive control로 추가하였다. 총 12개의 marker를 대상으로 한 우/수입우 식별 시스템을 개발하고자 하였다.

SNP_ NAME	SNP_ NAME.2	BTA	Position	Frequency		
				Existing research results	Mass Array results	Imported cattle (384)
23765	BFGL-NGS-111691	11	46688491	Hanwoo (558) 0.04	Mass Array results Hanwoo (48) 0.04	Imported cattle (384) 0.76
56027	Hapmap57340-rs29010501	11	46636484	0.04	0.06	0.62
57586	UA-IFASA-4800	24	32277266	0.04	0.10	0.75
15562	ARS-BFGL-NGS-53620	6	119003189	0.04	0.19	0.86
57585	UA-IFASA-4798	22	61257679	0.07	0.02	0.71
10079	ARS-BFGL-NGS-2860	20	38740662	0.07	0.04	0.57
50869	Hapmap42200-BTA-40314	16	17949859	0.08	0.10	0.45
7581	ARS-BFGL-NGS-20015	11	95778897	0.09	0.15	0.71
20572	ARS-BFGL-NGS-84649	12	76510730	0.09	0.04	0.61
52956	Hapmap48920-BTA-84063	9	70378982	0.09	0.08	0.63
7563	ARS-BFGL-NGS-19963	8	111309164	0.09	0.00	0.82
49078	Hapmap39562-BTA-40351	16	18630076	0.09	0.06	0.66
50878	Hapmap42218-BTA-45703	19	8071050	0.09	0.17	0.42
14561	ARS-BFGL-NGS-44006	19	58653826	0.10	0.21	0.63
49615	Hapmap40677-BTA-121871	8	111423182	0.10	0.10	0.78

표 16. 확정된 11개 marker의 기존 한우 결과와 Mass Array 결과

(다) 판별 시스템의 기준값 설정

총 12개의 marker를 대상으로 한우와 수입우를 구분할 수 있는 기준은 기존의 한우 typing 결과와 mass array 결과를 함께 통계 분석하여 설정 하였다 (표 17).

PCR product 개수 (총 12개)	한우 (%) (601두)	수입우 (%) (384두)
12	0.0	14.3
11	0.0	23.4
10	0.0	21.4
9	0.0	15.4
8	0.0	7.0
7	0.0	8.6
6	0.0	4.7
5	0.2	2.6
4	4.5	1.0
3	14.9	1.0
2	37.0	0.5
1	43.5	0.0

표 17. 기존 결과와 mass array 결과의 통계 분석

기준값을 12개의 marker 중에서 '5'로 설정하여, 5개 이하의 PCR 산물이 나타는 경우에는 한우로 판별하게 되며, 6개 이상으로 나올 경우에는 수입우로 판별하게 된다. 이렇게 될 경우 한우는 99.8%의 한우 판별율을 가지게 되고, 수입우는 94.8%의 수입우 판별율을 가지게 된다. 수입우의 경우, 자사에서 개발한 MC kit (소의 모색을 확인 할 수 있는 제품으로, 황우와 비황우를 구별해 낼 수 있는 제품)와 같이 실험을 진행 하면 수입우 판별율이 97.4%로 높아지는 것을 확인하였다.

(라) 최종 SNP marker의 multiple allele specific PCR primer 디자인

최종 선별된 SNP marker를 이용하여 한우와 수입우를 판별하기 위하여, 수입우에서만 특이적으로 반응하는 allele specific primer를 디자인 하였다. 예를 들어 '52956' SNP marker에서 수입우 특이적인 'A' allele specific primer의 경우에는 수입우 76%에서 PCR 산물이 나타나지만, 한우에서는 4%에서만 PCR 산물이 나타나게 된다 (표 17). 같은 방법으로 나머지 10개의 SNP marker에 대한 수입우 특이 allele specific primer를 디자인하였다. 총 12개의 marker에 대한 primer들은 100 ~ 300 bp (basepair) 사이에 PCR 산물들이 만들어지도록 제작하였다 (표 18). 디자인한 allele specific PCR primer들의 경우 PCR product의 intensity를 고려하여 반응당 primer의 농도를 조절하였다.

Size (bp)	SNP No.	Order name	seq.	Conc. (pmole/rxn)
300	52956	12-F *(A)	tgacagttccttttgggtgtttcGAttA	10
		12-R	cttccttgggtggctcagataaag	
270	57586	11-F	atgttaggggatgagaacactcaAtA	20
		11-R (A)	cgtggaagcagaaaggaaaaaac	
250	7563	10-F (A)	gccactgtttgcttatcagaaaGaT	20
		10-R	ccggagtttgcctctggagc	
230	49078	09-F (A)	tcattgtcctagtgtacaattctgAAccA	20
		09-R	gtgctcggccttatttatggtc	
210	20572	08-F (A)	actacagtgagaagcccgtgtgAcA	3
		08-R	tatttggctgcactgggtcttg	
190	7581	07-F	gtccttggcctctctgcctt	5
		07-R (A)	ggatttgggagtctctggggatgACggT	
175	56027	06-F (A)	ggcagtggaattctgggcagaaCgA	3
		06-R	agaacaaaacccaactcacttcc	
160	23765	05-F (A)	atctggttttggggccccAtT	10
		05-R	gaagatacccaactgcacgcag	
145	15562	04-F	acgcccctggcctgggtccc	2
		04-R (A)	ccagtagtctttgtgcagcaggAtA	
130	57585	03-F (A)	gaggaggaggaacaccatcaagACagT	5
		03-R	gttttatgaagaataactggcccc	
115	49615	02-F (A)	tggtaatgatgagagctccaggtGcT	7
		02-R	aagttctcctgtctcagtttttc	
100	MDH <sub>2</sub>	01-F	ggggcctctggaggaattgg	2
		01-R	ctccgggctgtgagcgata	

표 18. Multiple allele specific PCR primer

(마) 최종 SNP marker에 대한 PCR 조건 최적화

Single PCR을 통해서 얻어진 각각의 primer를 일정 비율로 혼합하여 Multiplex PCR을 진행하였다.

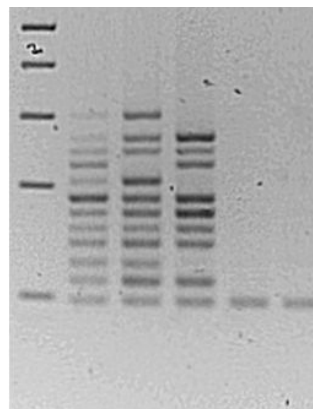


그림 70. Mutiple allele specific PCR 결과. M: 1 kb ladder, 1: 미국산 수입우, 2: 호주산 수입우 1, 3: 호주산 수입우 2, 4: 한우 1, 5: 한우 2, 6: 한우 3, 7: NTC (non template control)

수입우 3두 (미국산 1두, 호주산 2두)와 한우 3두를 대상으로 multiple allele specific PCR을 진행하여 3% agarose gel상에서 확인하였다 (그림 70). 최종적으로 선별된 SNP marker들을 2,000두 이상의 한우 및 수입우를 사용하여 높은 변별력을 확인하고자 한다. 동시에, 국립농산물품질관리원에서 upgrade 된 SNP marker를 이용하여 evaluation을 진행하고 있다. 본 연구로 개발된 한우/수입우 식별 검사법이 한우/수입우 판별에 있어 표준 검사법이 될 수 있도록 진행하고자 한다.

(바) 선별된 SNP 유전자 marker들의 프로브 제작

선별된 12개 SNP marker들에 대한 형광이 표지된 프로브를 제작하였다. 이것을 이용하여 제1협동연구기관에서 시스템 개발중에 있다.

다. 3차년도 세부 연구내용

(1) 한우/수입우 판별력 확인

(가) 최적화된 multiplex PCR 조건을 이용한 12개 SNP marker의 변별력 확인

2차년도 수행 연구로 한우/수입우 판별에 특이적인 12개의 SNP marker를 최종 선별하여 multiple PCR 조건을 최적화하여 한우/수입우 판별을 확인하였다. 다음 단계로 높은 한우 판별력을 확인하고자 하였다. 수입우의 경우 미국산 및 호주산으로 앵거스, 홀스타인, 리무진 종이 포함되어 있다. 국립농산물품질관리원으로부터 한우 1,427두, 수입우 450두 샘플을 받아 12개의 SNP marker로 최적화된 multiple allele specific PCR 조건을 이용하여 확인하였다.

한우 시료			수입우 시료		
판별결과	한우	비한우	판별결과	한우	비한우
판별두 수	1,420	7	판별두 수	13	437
판별 %	99.5%	0.5%	판별 %	2.9%	97.1%

표 19. 한우와 수입우의 판별율 결과

재현성을 확인하기 위하여, 추가로 농협축산물연구소에서 한우 1,037두 genomic DNA로 수 국립농산물품질관리원에서 수입우 1,112두 소고기 시료를 받았으며, 이들을 대상으로 multiple allele specific PCR을 진행하여 3% agarose gel상에서 확인하였다. 2차년도 연구수행으로 12개의 marker 중에서 기준값은 '5'로 설정되었으며, 5개 이하의 PCR 산물이 나타는 경우에는 한우로 판별하게 되며, 6개 이상으로 나올 경우에는 수입우로 판별하게 된다 (표 19, 표20, 그림 71).

한우 시료			수입우 시료		
판별결과	한우	비한우	판별결과	한우	비한우
판별두 수	1,033	4	판별두 수	19	1,093
판별 %	99.6%	0.4%	판별 %	1.7%	98.3%

표 20. 한우와 수입우의 판별율 결과



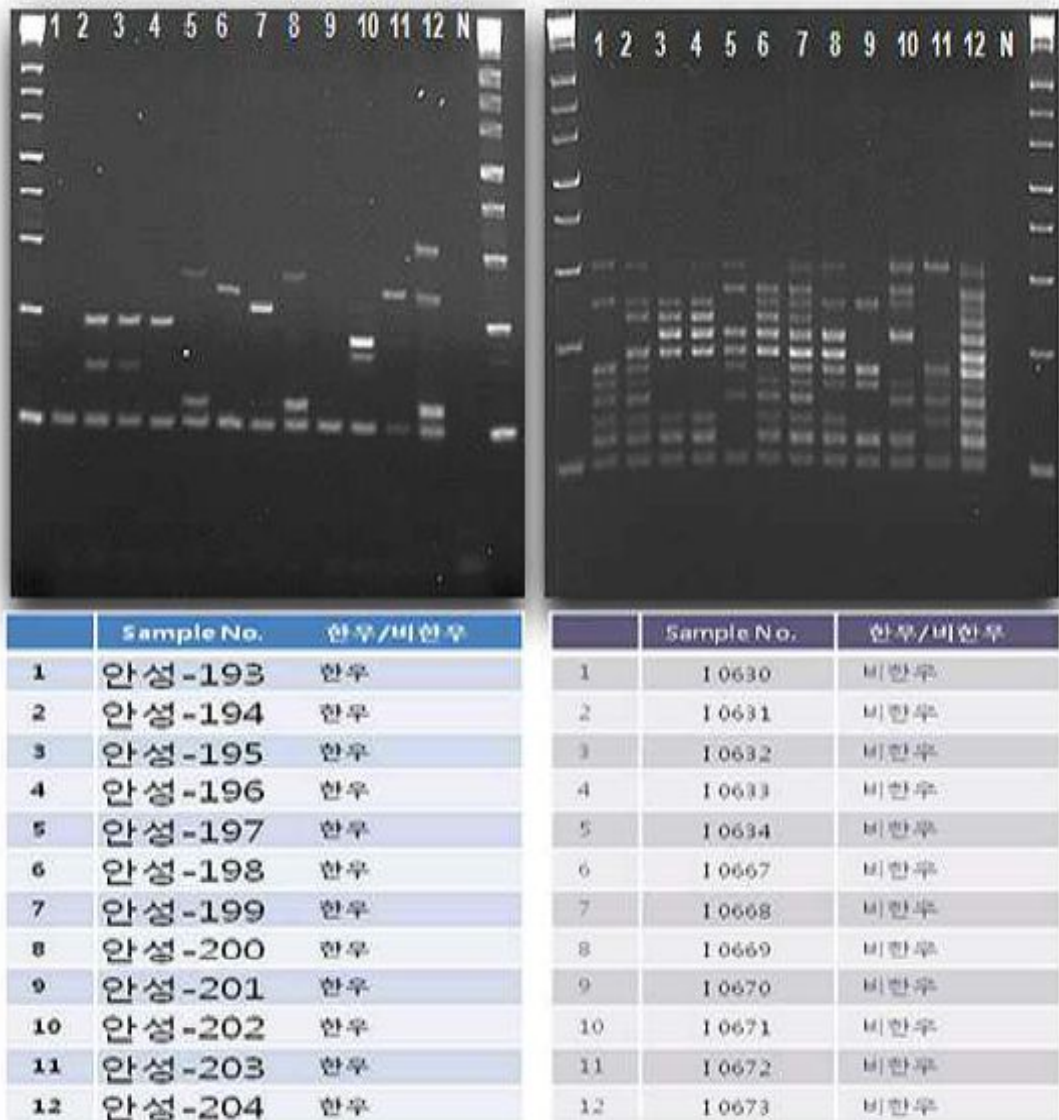


그림 71. Mutiple allele specific PCR 결과. (원) 한우시료, (오) 수입우시료

이와 같이 한우 2,464두 및 수입우 1,562두를 이용하여 분석한 결과, 한우 시료의 경우 한우 판별률이 99.6%이고 수입우 시료의 경우 비한우 판별률이 97.7%로 높은 판별률을 확인하였다.

(나) 다양한 종에서 비교 분석

높은 변별력을 확인하기 위하여, 다양한 종을 충북대학교 김관석 교수님으로부터 한우 종류인 황우 10두, 칠푼우 9두 및 흑우 10두와 젓소인 국내산 홀스타인 5두에 대한 genomic DNA를 얻었다. 확립된 12개의 marker를 이용하여 multiple allele specific PCR 방법으로 비교 분석하였다 (그림 72).

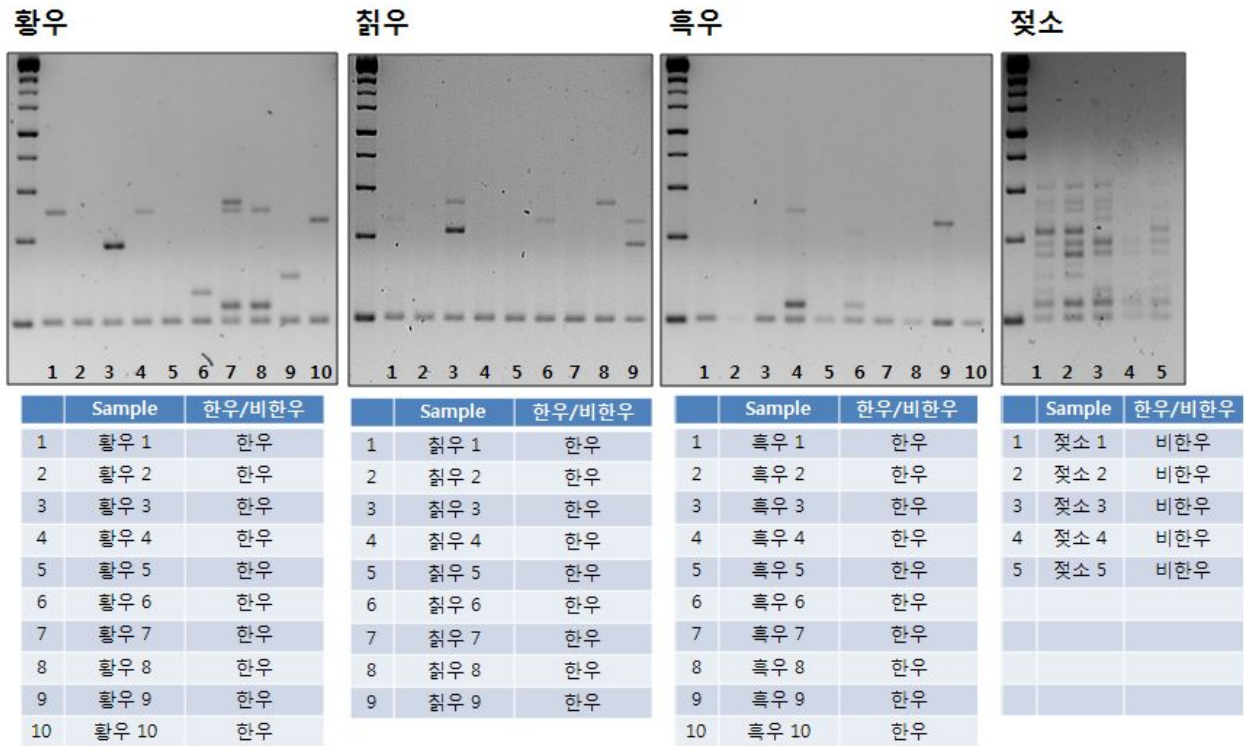


그림 72. 한우류 및 홀스타인에 대한 Mutiple allele specific PCR 결과

한우 종류인 흑우 및 침우의 경우, MC1R 유전자에  $E^D/E^D$ ,  $E^D/E^+$ ,  $E^D/e$  및  $E^+/E^+$  genotype이 존재한다. 반면 한우의 MC1R 유전자 경우에는  $E^+/e$  및  $e/e$ 의 genotype을 가지고 있기 때문에, 모색 유전자만을 확인하였을 때에는 흑우와 침우가 “비한우”로 판별될 수 있다. 하지만 12개의 marker로 실험한 결과를 보았을 때, 한우형의 유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다 [13] (표 21).

Breed	No. of animals	Genotype						Allele		
		$E^D/E^D$	$E^D/E^+$	$E^D/e$	$E^+/E^+$	$E^+/e$	$e/e$	$E^D$	$E^+$	$e$
Hanwoo	235	-	-	-	-	20	215	0.000	0.043	0.957
Jeju Black cattle	201	-	43	12	68	78	-	0.137	0.639	0.224
Korean Brindle cattle	17	-	-	-	4	13	-	0.000	0.618	0.382
Holstein	110	105	1	1	-	1*	2*	0.964	0.009	0.027
Angus	10	10	-	-	-	-	-	1.000	0.000	0.000
Hanwoo×Holstein F <sub>1</sub>	48	-	-	48	-	-	-	0.500	0.000	0.500
Hanwoo×Angus F <sub>1</sub>	4	-	-	4	-	-	-	0.500	0.000	0.500

Numbers in parentheses indicate the numbers of allele or animal detected.

\* showed red coat color with white spots but not black hairs.

표 21. 소 품종들에서 MC1R 유전자의 유전자형 (genotype) 및 대립유전자 (allele) 빈도

모색에 관련된 유전자에서는 한우와 다른 유전형질을 가지고 있지만, 12개 marker로 확인한 결과, 한우와 매우 유사한 유전자형질을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 하지만 검체의 수가 너무 적어 정확한 결과를 예측 하는 데에는 문제가 있었다. 칩우 및 흑우 검체의 경우 검체 확보에 어려움이 있었다.

본 과제에서 개발된 한우 비한우 SNP 선발은 3년 동안의 개발과정동안 선별된 SNP의 정확도를 높이기 위해, 지속적인 스크리닝을 통한 새로운 마커 확립 및 선별성이 떨어지는 마커의 제외 등의 과정을 거쳤으며, 결과적으로 우리나라에 수입되는 종 (앵거스, 리무진, 홀스타인종)에 대한 높은 선별도를 보이는 것으로 확인되었다. 특히 수입우로부터의 한우 검별 정확도에 있어서는 99.71%의 높은 선별성을 보여줌으로서 현재 국립농산물품질관리원으로부터 작년 12월 고시되어 민간 및 정부 분야에 납품이 되고 있다. 하지만, 향후 우리나라에 수입될 수 있는 잠재적인 수입우 종들에 대한 검별작업도 동시에 수행해야 할 것으로 보인다. 이러한 정책변화에 따라 본 제품의 선별도를 높이기 위한 연구개발 작업도 지속적으로 진행할 것이다.

## (2) 검체 확보

현재 국립농산물품질관리원, 농협축산물연구소, 및 충북대학교에서 한우 2,000두 및 수입우 (앵거스, 홀스타인, 리무진) 1,000두 이상 검체를 확보하고 있으며, 한우 종류인 흑우 및 칩우의 경우도 10두 및 9두 검체를 확보한 상태이다.

## (3) 통합 디바이스를 이용하여 확보된 샘플로부터 SNP 유전자 분석

주관기관에서 수행하여 개발된 통합 디바이스에서 확인된 샘플 100개를 확보하여 교차 검정을 하고자 분석하였다. 받은 샘플들을 이용하여 12개의 SNP marker로 multiple allele specific PCR을 수행하여 확인하였으며, 또한 염기서열분석을 통해 재확인 하였고, 모든 샘플에 있어 양기관의 결과가 일치함을 확인하였다.

## 4. (제3세부) 나노스코프시스템즈(주)

▶ 최종목표: 휴대용 마이크로어레이 칩 측정 시스템 상용화 기술 개발

가. 1차년도 세부 연구내용

### (1) 형광 검출 시스템의 구동 및 제어를 위한 S/W 개발

제 1세부에서 개발한 형광 검출 시스템의 모듈들을 DAQ(Data Acquisition) Board와 S/W를 이용하여 구동 및 제어를 완료하였다. S/W 상에서 control voltage 가변적으로 조절할 수 있도록 하여 laser의 output power를 조절할 수 있도록 구현하였다. 형광 영상의 세기 및 노출 시간 등에 따라 검출기(PMT)의 gain을 조절할 가능성이 있으므로 S/W상에서 가능하도록 구현하였다.



그림 73. 형광 검출시스템 구동 제어 S/W 및 outpower 조절 모듈

본 연구에서 scanning mirror로 사용한 galvano-mirror의 경우 200Hz 이상의 고속 스캔에서 선형 입력에 대해서 비선형적인 동특성을 보임을 확인할 수 있었다. 비선형적인 동특성은 영상 디스플레이시 실제 영상의 왜곡을 가져온다. 따라서 영상 복원을 위하여 다양한 알고리즘을 개발하여 시도하였다. Galvano-mirror의 실제 위치정보를 받아들여서 driver-board를 통해 영상을 복원하는 알고리즘을 개발하였다. 고속 스캔에서 입력신호를 추정하지 못하는 galvano-mirror를 over-scan하는 과정을 통하여 스캔 영역을 얻어내고 획득된 영상을 nonlinear-sampling하는 과정을 통하여 영상을 복원하는 알고리즘을 개발하였다.

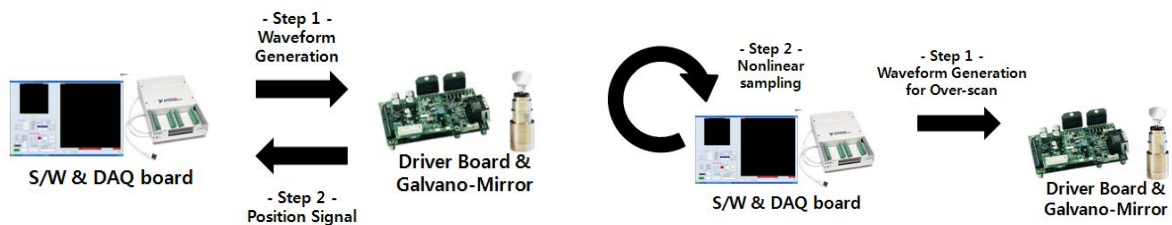


그림 74. 위치 정보 획득 후 영상 복원 방식 (좌), Over-scan 후 nonlinear sampling 영상 복원 (우)

위치정보를 받아들이는 방식은 실제 galvano-mirror의 실제 위치정보를 driver-board로부터 제공 받을 수 있으므로 특정영역을 스캔하고자 할 때, 즉 ROI(Region Of Interest)스캔 시에 적용 가능한 것이 장점이다. 하지만 추가적으로 A/I (analogue input) channel을 사용해야 한다는 단점이 있다. Over-scan 후 nonlinear-sampling을 하는 방식은 추가적인 channel이 필요하지 않으며 간단하다는 장점이 있지만 이 방식은 복원시에 실제 위치정보를 활용하는 것이 아니라 초기 왜곡 이미지를 통해서 nonlinear-sampling을 위한 복원 함수를 유도하여 이용하는 것이므로 측정영역이 가변적인 경우 사용할 수 없는 방식이다. 따라서 활용도가 제한적이라는 것이 큰 단점이 될 수 있지만 본 연구의 경우 측정하고자 하는 영역이 3mm x 3mm로 측정영역이 가변적이지 않아서 간단한 알고리즘인 nonlinear-sampling 방식을 적용하였다.

## (2) 칩 영상화 및 분석을 위한 S/W 개발

S/W 개발의 목표는 형광 검출 시스템뿐만 아니라 범용적으로 사용가능하도록 만드는 것이다. 범용 S/W를 구성하게 되면 2차년도, 3차년도에 시스템에서 추가 될 것으로 예상되는 다른 module들에 대해서도 추가적인 S/W 개발없이 바로 사용될 수 있다는 장점이 있다. Laser control 패널의 경우 현재 선정된 635nm laser 뿐만 아니라 2차년도에 고려되고 있는 dye 추가로 인해 시스템에 laser가 추가될 경우 바로 사용할 수 있도록 추가적인 laser control이 가능하도록 작성하였다. 추가적인 Dye에 따른 emission filter를 motorized filter wheel을 이용하여 교체가능 하도록 작성하였다. Serial 통신을 이용한 motorized filter wheel의 구동을 test해 보았다. 휴대용 시스템을 목표로 형광 검출 시스템을 제작할 것이므로 이동시, 충격을 받을 경우 혹은 특정 시편의 경우에 초기에 설정된 초점평면이 변경될 수가 있다. 이때는 초점 평면의 위치를 변경해 주어야 하며 이를 PZT stage를 이용하여 정밀하게 맞추어 주어야 한다. 따라서 PZT stage의 control 패널을 작성하였으며, PZT stage 구동결과를 보았을 때 원하는 성능을 만족한다는 것을 알 수 있었다.



그림 75. Serial 통신을 이용한 motorized filter wheel의 구동 test

최근 들어 CCD 성능의 향상으로 wide-field 형광 현미경의 성능이 향상되고 있다. 물론 PMT를 기반으로 한 공초점 형광 현미경 보다는 감도가 떨어진다. 하지만 CCD를 사용하는 wide-field의 경우 속도가 빠르고 시스템 구성이 간편하다는 등 많은 장점을 가지고 있다. 제작될 형광 시편의 형광 방출량에 따라서 CCD를 기반으로 한 형광 검출 시스템에 대한 가능성 타진도 함께 수행이 되어야 할 것이다. 따라서 CCD image Grab이 가능한 패널을 작성하였으며, CCD와 frame grabber를 이용하여 S/W의 실행여부를 성공적으로 test하였다. Galvano-mirror를 이용한 스캔 방식은 크게 Uni scan과 Bi scan으로 나뉠 수 있다. Uni scan은 x축 galvano-mirror가 왕복을 할 때 x가 증가하는 방향 혹은, x가 감소하는 방향에서 한 쪽 방향에서만 영상을 획득하는 방식이다. Bi scan의 경우 왕복을 할 때 x가 증가하는 방향뿐만 아니라 x가 감소하여 원래 자리로 돌아오는 방향에서도 영상을 획득하는 방식이다. Bi scan의 경우 빠른 영상획득이 가능하지만 홀수줄은 x가 증가하는 방향에서, 짝수줄은 x가 감소하는 방향에서 획득된 영상이므로 x축 galvano-mirror의 동특성이나 알고리즘의 처리속도에 따라서 서로 center가 맞지 않을 수 있어서 초기 조율 과정이 필요하다. 반면에 Uni scan의 경우 홀수줄과 짝수줄 모두 한 방향에서 획득된 영상이므로 초기 조율 과정은 필요하지 않다. 하



지만 Bi scan에 비해 한 방향만 사용하는 것이므로 속도가 느리다는 단점이 있다. 본 S/W에서는 모드 변경을 통하여 Uni Scan과 Bi Scan이 가능하도록 작성하였다. 동일한 스캔영역을 관찰하더라도 영상의 pixel 수를 증가시키게 되면 영상의 해상도를 향상시킬 수 있게 된다. 물론 pixel의 수가 증가되면 영상 획득 속도는 느려지게 된다. 2차년도에 형광 검출 장치가 꾸며지고 형광 sample이 결정되면 pixel수에 따른 영상획득 후 최적의 pixel 수를 결정하게 된다. 따라서 pixel 수를 결정짓기 위하여 pixel 수에 따른 모드 변경이 가능하도록 작성하였다. 영상의 contrast를 조절하기 위해서 white level과 black level을 설정할 수 있는 패널을 마련하였다. black level이 white level을 넘을 수 없도록 알고리즘을 구현하였으며, 대물렌즈 배율에 따른 영상화 및 광학 줌 기능을 구현하였다. 1차년도에는 3mm x 3mm로 측정영역이 결정되었지만 microchip 기술 및 한우 판별 probe의 발전으로 그 측정영역이 줄어들 수도 있기 때문에 가능성을 모두 반영하여 S/W를 작성하였다. 영상의 noise 절감을 위하여 동일 측정영역에 대해 얻어진 여러장의 영상을 average 하는 기능을 추가하였다. 이외에도 공초점 현미경의 장점인 3D imaging이 가능하도록 optical sectioning 패널도 작성하였다.

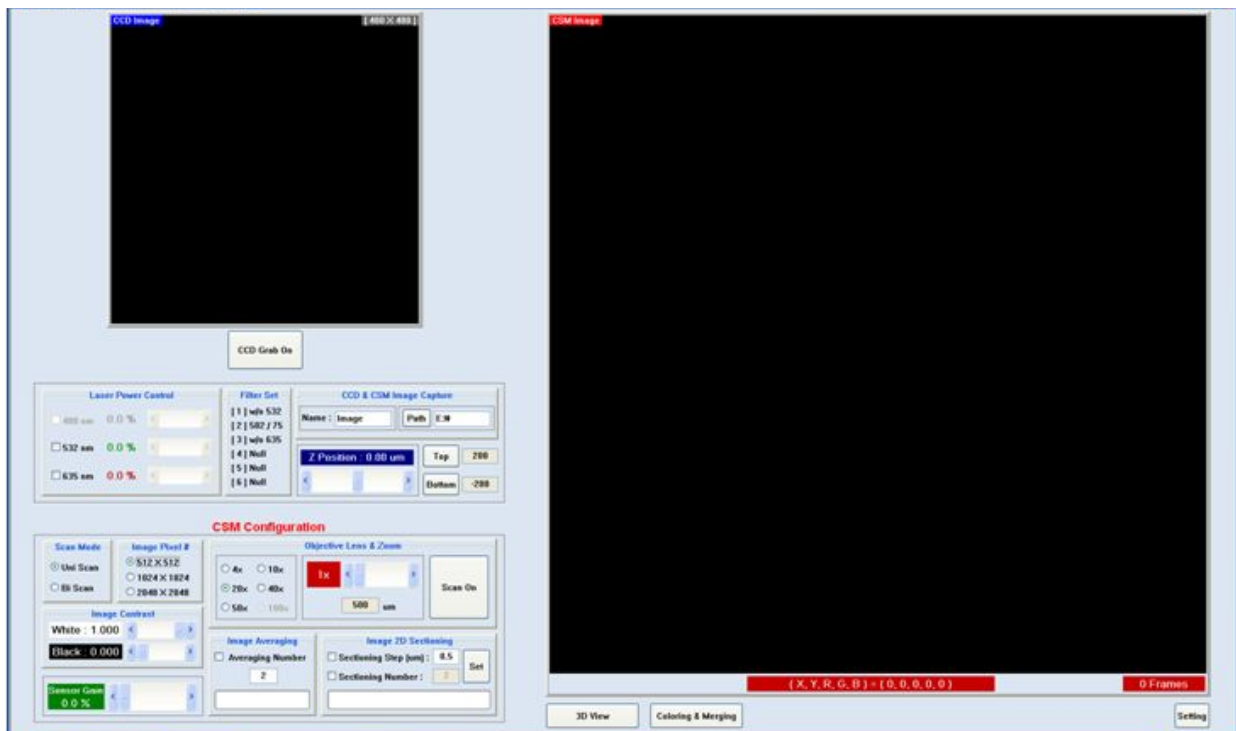


그림 76. 1차년도 공초점 현미경 Spec 에 따른 S/W 패널

나. 2차년도 세부 연구내용

(1) 고분해능 대면적 마이크로어레이 칩 영상획득을 위한 광학계 및 시스템 최적화

(가) 중계 광학계 최적화

제1세부에서 1차년도에 설계된 중계광학계의 경우 수mm의 측정영역을 달성하고, 휴대성을 고려하여 최대한 광학계의 길이가 짧게 설계되었다. 전체 회의를 거쳐서 측정영역은 3mm x 3mm, 분해능은 5um, 사용 파장은 635nm~670nm로 결정되었다. 이에 맞추어서 최적설계를 수행하였다. 최적설계된 중계광학계는 아래와 같다.



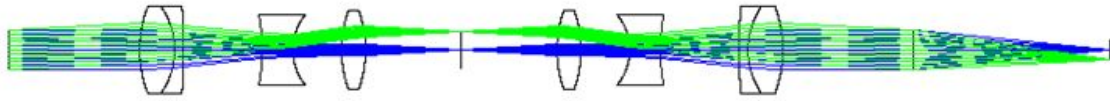


그림 77. 최적설계된 중계광학계

설계된 중계광학계를 제작하여 시스템에 적용시킨 결과 아래와 같이 3mm x 3mm의 측정영역을 얻을 수 있었다. 또한 650nm~670nm의 형광 영상도 획득됨을 알 수 있다.

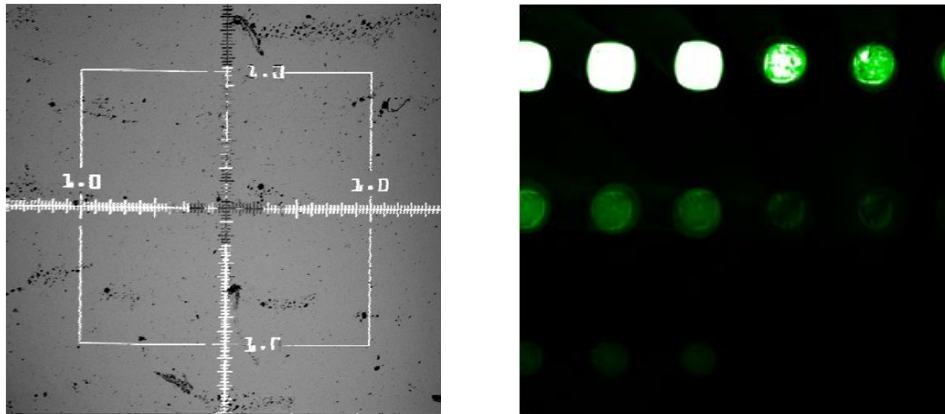


그림 78. 최적설계된 중계광학계에서의 측정영역 및 형광영상

#### (나) 영상획득 속도 향상 및 영상 보정

본 연구에서 개발된 시스템은 Galvano-meter를 이용하여 빔을 고속으로 스캔시켜 주기 때문에 고속으로 고효율의 형광영상획득이 가능하다. Galvano-meter의 경우 입력 신호에 따라서 최대 스캔 속도가 달라지게 된다. 삼각파를 입력시켜줄 경우, 선형적인 스캔 각을 가지게 되므로 영상을 복원하는 과정이 매우 간편하다는 장점이 있다. 하지만 반면에 고속 스캔을 수행할 경우 입력신호가 증가하는 구간에서 급격하게 다시 감소하는 구간으로 변하기 때문에 galvano-meter에 부담을 주게 된다. 결국 고속 스캔이 어렵게 된다는 단점을 가지게 된다. 반면에 사인파를 입력시켜줄 경우, 비선형적인 스캔 각을 가지게 되므로 영상을 복원하는 과정이 매우 어렵다는 단점이 있다. 하지만 기계적인 부담을 덜어주게 되어서 고속 스캔이 가능하다는 장점을 가진다.

본 연구에서는 average 영상과 누적 영상을 이용할 것이기 때문에 여러 장의 영상을 획득하기 위해서 고속 스캔이 가능해야한다. 따라서 사인파를 galvano-meter에 입력시켜주고 영상을 보정하는 방식을 적용하였다. 사인파를 적용하게 되면 그림 79 왼쪽과 같이 비선형 구간이 생기게 된다. 따라서 512 x 512 pixel 영상을 얻기 위해서는 700 x 512 pixel 영상을 획득한 후에 비선형적 샘플링을 통해서 512 x 512 pixel 영상을 구현하게 된다. 영상 획득 속도는 1 frame / sec 이다.

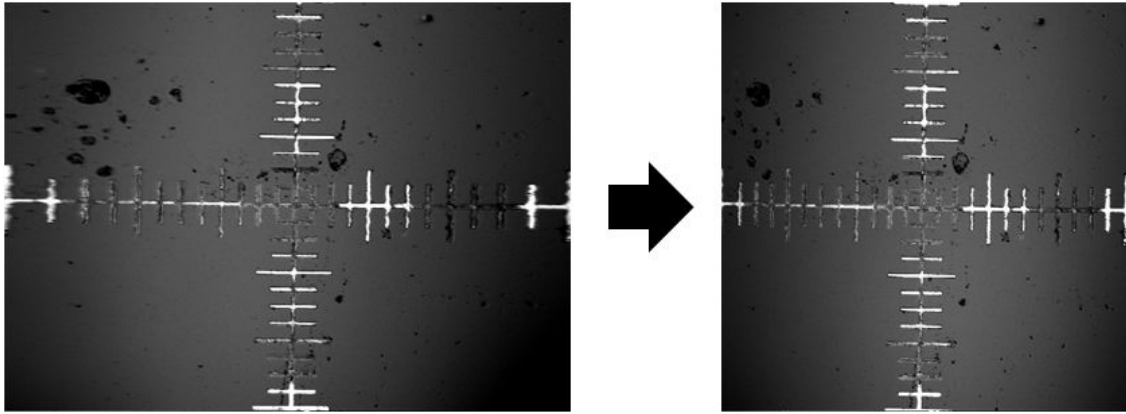


그림 79. 비선형샘플링을 통한 영상 구현

(다) S/W 작성

측정 영역은 3mm x 3mm, 디스플레이 영상은 512 x 512 pixel, average 영상 획득, 누적 영상 획득 등 시스템의 스펙 및 필요한 모드가 구체적으로 결정이 되었기 때문에, 1차년도에 작성한 복잡한 프로그램을 사용자의 편의에 맞추어서 간편하게 수정하였다.

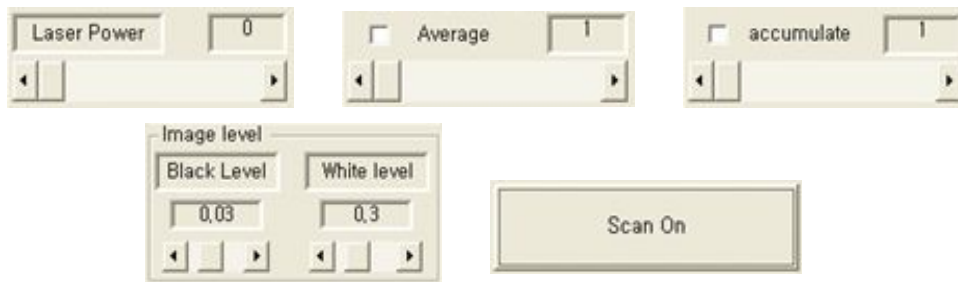


그림 80. 사용자 편의에 맞춘 프로그램 구현

Laser power를 조절하는 슬라이드 바로서, 시편의 특성에 따라 파워를 조절할 수 있다. 측정시에 여러장의 이미지를 획득한 후 그 평균 이미지를 계산할 수 있다. Average 기능을 사용하면 background 노이즈 감소에 매우 효과적이다. 측정시에 여러장의 이미지를 획득한 후 그 합산 이미지를 얻을 수 있다. Accumulation 기능을 사용하면 신호가 약한 경우 신호를 키울 수 있다. 하지만 background 노이즈가 같이 증폭된다. 측정된 이미지 또는 불러온 이미지의 contrast를 조절하는 기능이다. 슬라이드바를 조절하거나 화살표를 클릭하여 black 또는 white level을 조절하면 이미지의 background noise를 차단하거나 saturation level을 조절해서 선명한 이미지를 만들 수 있다. 측정 on/off 버튼으로, 만약 측정중에 버튼을 클릭하면 해당 측정이 끝난다음에 측정이 멈춥니다. Display panel에서는 측정된 이미지를 보여주는데 현재 이미지를 Bitmap 형식의 이미지로 저장 및 불러오기가 가능하다. Display panel 상에서 오른쪽 마우스를 클릭하면 그림 81과 같이 메뉴가 생성된다.

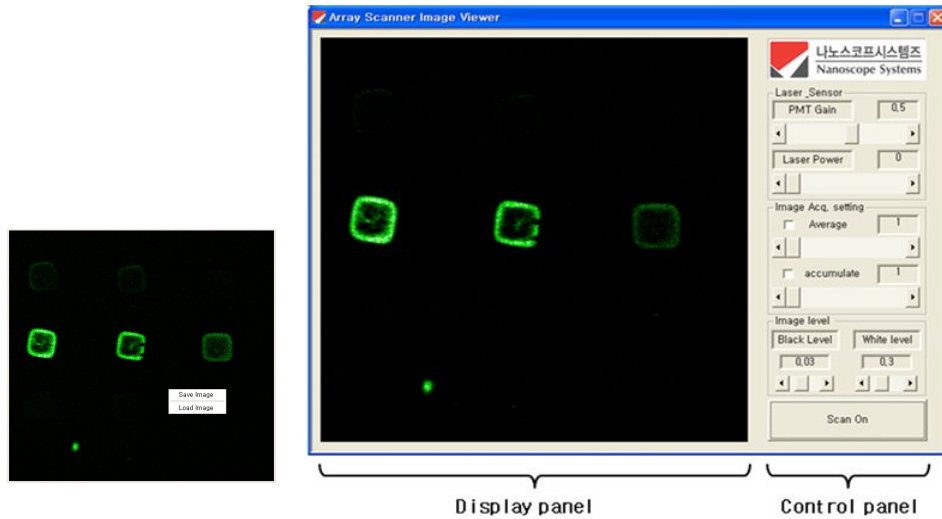


그림 81. 측정된 이미지의 저장 및 불러오기 기능

## (2) 고감도 검출기 개발 및 컨트롤 보드 제작

가시광선 영역에서 감도가 좋은 Hamamatsu 사의 PMT (photomultiplier tube)를 이용하여 DC~150MHz의 bandwidth를 가지고, 38db의 gain값을 가지는 PMT amplifier를 제작하였다. 레이저의 파워를 조절, Galvano-meter의 사인파 전압 입력, PMT의 gain을 조절, 각각의 모듈에 구동전압을 인가해주는 control 보드를 제작하였다. 3차년도에 제작될 휴대용 power supply와 휴대용 DAQ와 연동하게 되면 휴대용 형광 영상 획득 장비가 될 수 있을 것이다.

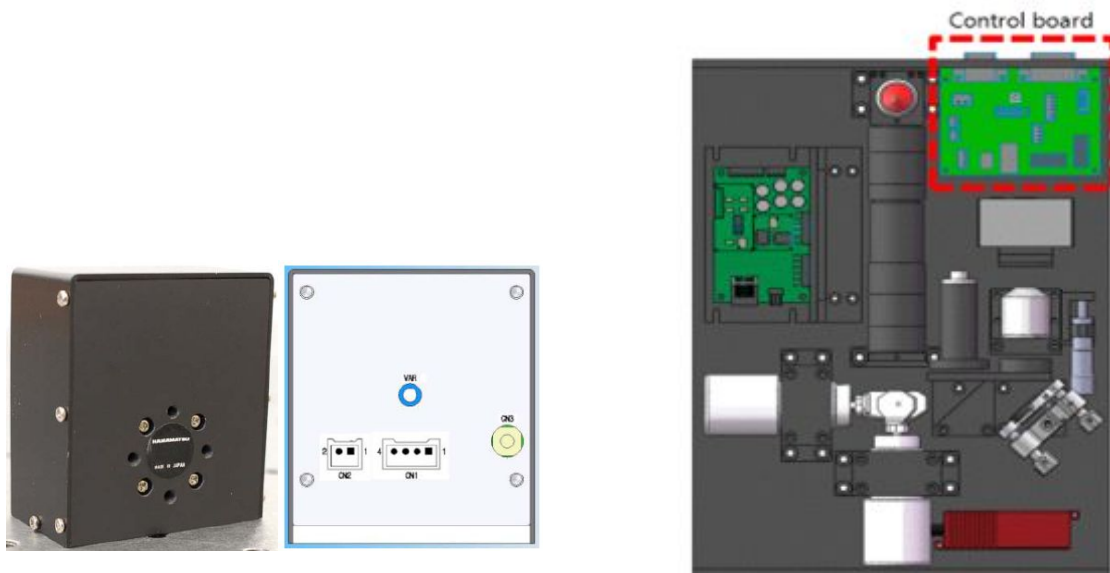


그림 82. PMT amp 및 Control 보드 제작

다. 3차년도 세부 연구내용 (제1세부와 연계)

(1) 형광 검출 시스템의 휴대성을 위한 전원 공급 장치 및 DAQ board 개발

1차년도에 설계되고 2차년도에 제작된 형광 스캐너는 크기가 A4용지 정도로 휴대가 가능하다. 하지만 전원 공급 장치를 제외한 크기이므로 전체 시스템의 휴대성을 위해서는 전원 공급 장치의 소형화가 매우 중요하다. 또한 DAQ board 역시 휴대가 가능하도록 제작되어야 한다. 이 DAQ board는 휴대용 디스플레이 장비인 노트북과 연계가 가능하도록 제작되어야 한다.

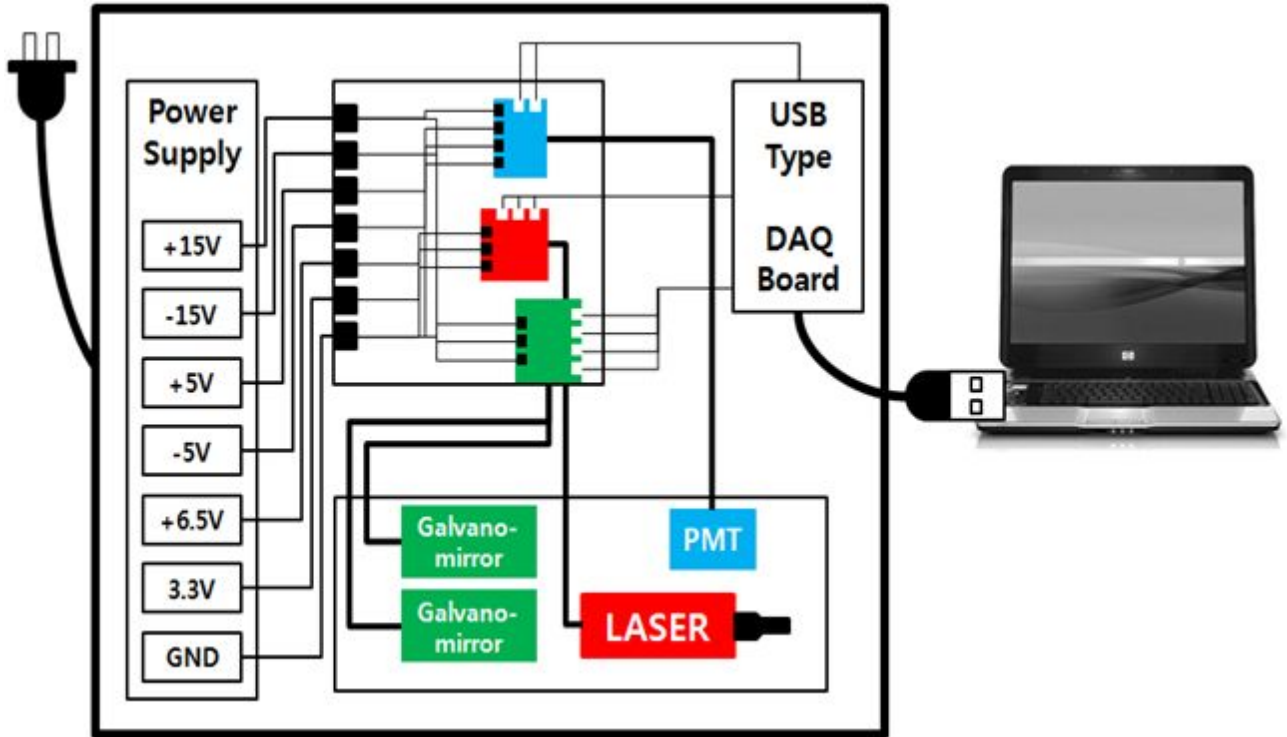


그림 83. 휴대용 형광 스캐너 개념도

형광 스캐너 구동에 필요한 전압은  $\pm 15V$ ,  $\pm 5V$ ,  $+6.5V$ ,  $+3.3V$ 로 총 6개이다. 이들은 220V 전원을 끌어와서 정류기를 사용해서 각각의 해당 전압을 만들어낸다. 일반적으로 사용하는 power supply를 이용해도 되지만, 각각의 power supply는 기본적으로 무겁고, 각각 만들어줄 수 있는 전압의 개수가 2개 이므로 최소 3개의 power supply를 사용해야한다는 결론이 나온다. Power supply 3개의 무게는 일반적으로 휴대하기 편리하다고 볼 수 없기 때문에, 정류기를 이용하여 직접 power supply를 제작하였다. 또한 디스플레이 장비인 노트북과 연계가 가능한 DAQ board 역시 휴대용 전원 공급 장치에 내장시켜야 한다. NI사의 usb를 지원하는 DAQ board를 사용하고 형광스캐너 내의 control board와 연계할 수 있는 내장 회로와 pin-out을 설계하고 제작하였다. 최종적으로 제작된 휴대용 전원 공급 장치의 역할은 다음과 같다. 형광 스캐너에 구동 전압을 공급하고, 노트북에서 입력된 신호를 받아 형광 스캐너의 control 보드에 전송시켜준다. 또한 형광 스캐너로 획득된 영상 신호를 받아들여서 다시 노트북에 전송해준다. 형광 스캐너는 외부로의 잡광을 차단하기 위한 케이스를 제작하였고, 또한 시편을 정확히 대물 렌즈 초점평면에 위치시키기 위한 시편 스테이지도 제작하였다. 최종적으로 휴대용 형광 스캐너 시스템을 구동시켜본 결과 동일 시편에 대한 동일한 영상을 획득할 수 있었다.

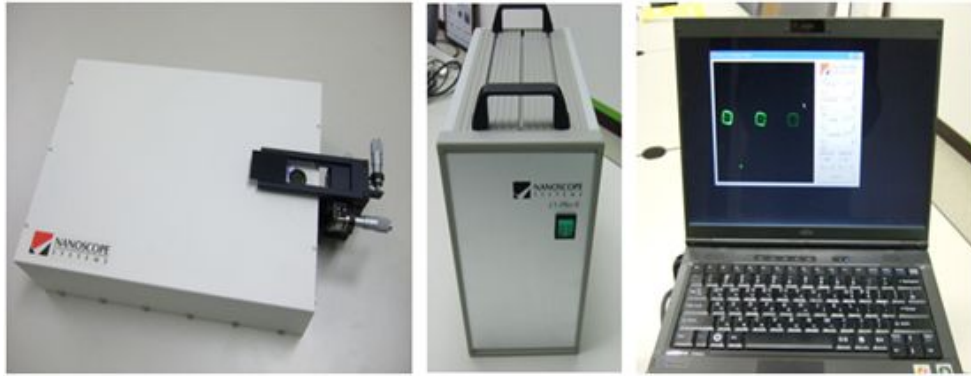


그림 84. 형광스캐너, 휴대용 전원공급 장치 그리고 디스플레이 장비

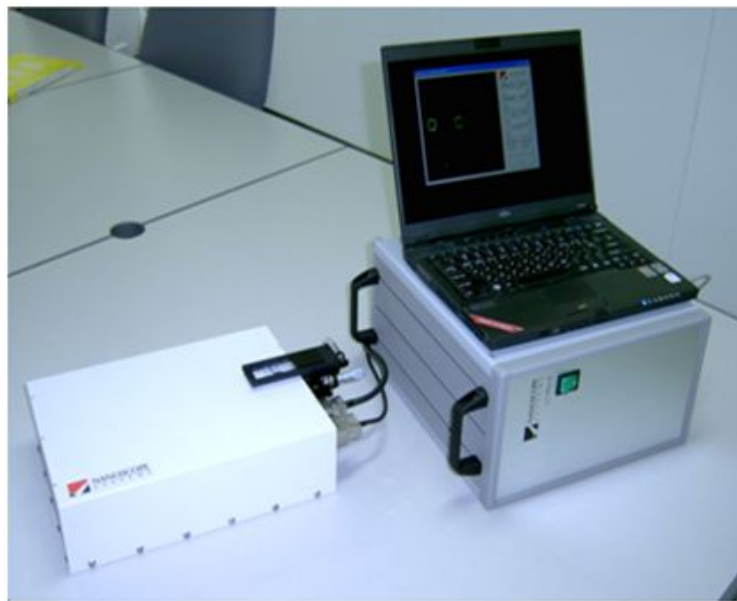


그림 85. 통합된 휴대용 형광 스캐너

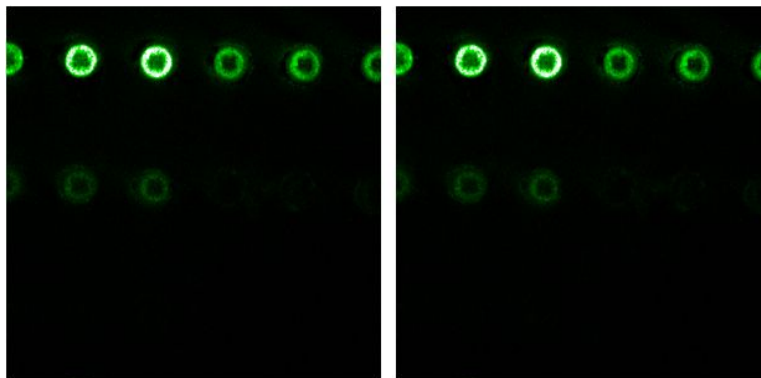


그림 86. Power supply 와 Desktop computer를 이용한 형광 영상 (좌), 휴대용 형광 스캐너 시스템을 이용한 형광 영상 (우)



(2) 휴대용 형광 검출 시스템과 유전자 분석 디바이스와의 통합 (제1세부 연계)

개발된 휴대용 형광검출시스템은 제1세부의 PCR-CE 및 PCR-microarray chip과 통합되어 아래와 같은 통합 유전자 진단 시스템으로 개발되었다 (통합시스템 유전자 진단 결과 등 제1세부 결과내용 참조). 형광 검출시스템의 검출부에는 PCR-Microarray chip을 고정시키고 반응을 시행할 수 있는 chip holder plate를 제작하였다. 통합시스템에서는 일련의 조작 없이, laptop의 S/W 만으로 반응 및 검출이 가능하도록 자동화 설계되었다.

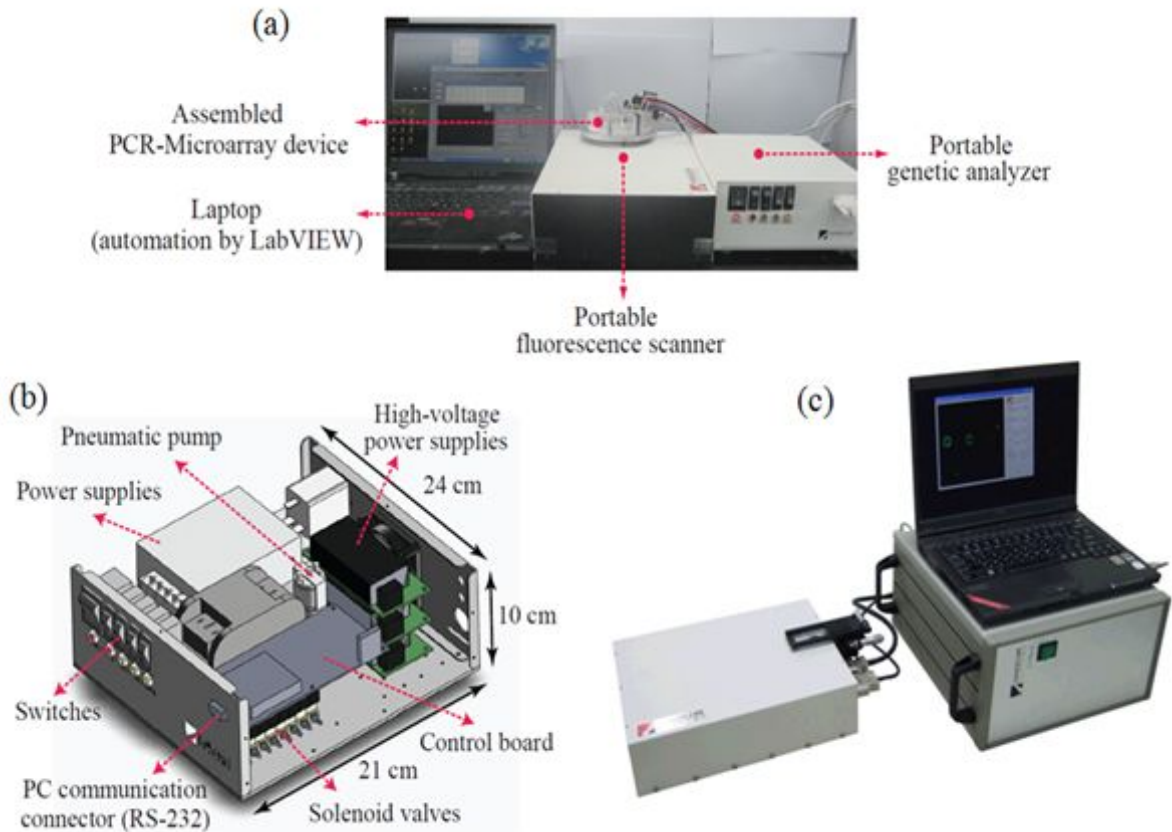


그림 87. PCR-Microarray 와 휴대용 유전자 진단기 및 형광검출기의 통합시스템 구현도

(3) 휴대용 형광 검출 시스템 장치 성능 및 동작 정보

본 연구과제에서 개발된 휴대용 유전자 분석 통합 마이크로시스템은 고속 고효율 이동형 유전자 분석을 위한 기본 플랫폼으로서 지속적인 연구 개발을 통해 더욱 소형 고효율화 및 사용자 친화적 인터페이스를 구축할 수 있으리라 예상된다. 기존 시스템과 비교한 마이크로 통합시스템의 성능 지표는 다음과 같다.



지표	기존 시스템	통합형 마이크로시스템	비고
중합효소연쇄반응 (PCR) 용량	수십 $\mu\text{L}$	1~2 $\mu\text{L}$	소형화, 적은 시료 이용
PCR 기기 크기	20x30x25 cm	10 cm wafer	소형화 및 분리 및 분석기능 까지 통합
PCR 반응 시간	100 분 이상	60~70 분	적은 시료 이용에 따른 빠른 thermal cycling
다중 PCR	12개 product	12개 product	동일한 다중 PCR이 칩에서도 가능
모세관 전기영동 (CE) 크기	100x150x60 cm	길이 6 cm, 깊이 120 $\mu\text{m}$	소형화 및 PCR 과 통합
CE 분석 시간	수십 분	6분 이내	고속 분석
마이크로어레이 (microarray) 분석 시간	1.5~2 시간	0.5 시간	마이크로펌프를 이용한 어레이 고속 분석 가능
휴대용 형광 검출 시스템 (CE) 크기	100x150x150 cm (공초점 형광 현미경)	24x9x13 cm	다중 PMT 형식의 소형 형광 검출 시스템 구축 성공
휴대용 형광 스캐너	80x70x75 cm	32x9x24 cm	고감도 대면적 (3x3 mm) 형광 스캐너의 소형화 성공
유전자 분석 시간	수시간~하루	80분~100분 이내	고속 분석

표 22. 통합 유전자 분석 시스템의 성능 지표

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제1절 연차별 목표달성도

### 1. 1차년도 목표달성도 및 관련분야 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	제1세부 KAIST  휴대용 유전자 분석 통합 디바이스 개발 및 마이크로어레이 칩 측정을 위한 고감도 소형 형광 영상 시스템 개발	마이크로 플루이딕 상에 DNA 포획 소자, 나노 스케일의 DNA 증폭 소자, 모세 전기영동 소자, DNA 마이크로어레이 소자 개발을 위한 디자인 및 fabrication process 정립	100%	▶한우분석용 마이크로칩 제작을 위한 공정 조건 확립 및 DNA 증폭, 분리 소자가 통합 된 prototype의 마이크로디바이스 제작, 이를 이용한 실제 한우 샘플의 성공적 분석 ▶마이크로칩 운영을 위한 마이크로컴프 시 스템 및 thermocycling 자동화를 위한 LabVIEW programming 구축 ▶DNA 포획소자의 디자인 및 Prototype 칩 개발, 이를 통한 포획효율 측정
		형광 검출 시스템 개념 설계	100%	▶상용 형광 스캐너 사진 조사 ▶Scanning mechanism 결정 ▶시스템 개념설계
		형광 조명 및 검출을 위한 광학계 설계	100%	▶광원 선정 및 증계광학계 설계 ▶경통설계 ▶Scanning mirror 선정 및 광학 필터 선정
	제1협동 광주과학기술원  조정밀 한우 판별 위한 DNA 마이크로어레이 칩 개발	PCR-DNA 마이크로어레이 시스템을 이용해 SNP 유전자 표지 분석을 위한 프로브 개발	100%	▶어레이 표면 개질 및 온도 변화, 상보적 프 로브 첨가 등으로 효과적인 DNA와 프로브 의 효과적인 혼성화 조건 확립
		포토리소그래피 패터닝 기반 재현성과 정확성이 높은 한우 SNP 분석용 DNA 마이크로어레이 제작 및 분석	95%	▶광 패터닝 및 streptavidin-biotin 결합을 이 용한 패터닝 칩 기반 마이크로 어레이 칩 제작 및 분석
	제2협동 솔젠트(주)  한우 개체 및 품종 구별을 위한 다중 표지인자 개발	소 개체 실벽을 위한 10개 이상의 초위성체 유전자 표지 선정	100%	보고된 특허로부터 한우육을 판별할 수 있고 정확도가 높은 초위성체/SNP 표지인자 식별
		초위성체 유전자 표지의 단일 PCR 조건 최적화	100%	한우 품종 식별의 변별력을 높이기 위한 최 적의 초위성체/SNP 표지인자들의 PCR 조건 최적화
		한우소/수입소 특이 SNP 유전자 표지 개발	100%	원산지 검증의 유효성을 높일 수 있으며 한 우소/수입소 구별을 위한 SNP 표지인자 탐 색
		소 개체식별용 SNP 유전자 표지 개발	100%	다양한 개체의 품종을 확인 할 수 있으며 유효 성이 높은 SNP 표지인자 탐색
	제3협동 나노스코프시스템즈(주)	마이크로 어레이 칩 영상화 분석을 위한 신호 처리 소프트웨어 개발	100%	▶형광 검출 시스템의 구동 및 제어를 위한 S/W 개발 ▶칩 영상화 분석을 위한 S/W 개발

	어레이 칩 영상화 및 신호 처리 인터페이스 개발			
--	----------------------------------	--	--	--

2. 2차년도 연구개발 수행내용 및 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
2차 연도 (2010)	제1세부 KAIST  휴대용 유전자 분석 통합 디바이스 개발 및 마이크로어레이 칩 측정을 위한 고감도 소형 형광 영상 시스템 개발	마이크로플루이딕 상에서의 DNA 포획 디바이스 개발	70%	▶Silica bead와 Solid phase extraction (SPE)를 이용한 마이크로플루이딕 상에서의 DNA 추출 및 포획 디바이스 개발 ▶DNA 추출 및 포획 효율 증가 및 조건 최적화 필요 ▶PCR 디바이스와의 통합을 위해 최적화 및 수정 디자인 필요	
		나노리터 수준에서 PCR하기 위한 PCR반응기 제작 및 thermal cycling을 위한 마이크로 히터 및 온도 센서 개발	100%	▶260nL 수준에서의 PCR 을 위한 micro PCR 칩 개발 ▶PCR chamber 의 온도센싱을 위한 RTD 전극의 칩 내 집적화	
		LabView 프로그램을 통한 PCR 자동화를 위한 소프트웨어 및 하드웨어 개발	100%	▶LabVIEW 프로그래밍을 통한 PCR 자동화 시스템 구축 ▶Portable 시스템으로의 구축을 위한 하드웨어 개발 완료	
		1차년도에 설계된 형광 검출 시스템 제작	100%	▶시스템 jig 설계 및 제작	
		Dye수 확장에 따른 채널의 분할 및 결합과 분광 시스템 제작	100%	▶Dye 선정에 따른 광원 선정 ▶Dye 선정에 따른 분광시스템 설계 ▶Dye 선정에 따른 검출기 설계	
		신호의 SNR을 높이기 위한 data acquisition electronics or s/w 개발	100%	▶시스템 형광 효율 분석 ▶Spatial filter size에 따른 분석 및 최적화 ▶Noise filtering에 관한 연구 및 noise 절감을 위한 electronics or s/w 개발	
	제1협동 광주과학기술원  초정밀 한우 판별 위한 DNA 마이크로어레이 칩 개발	증폭된 DNA를 단시간에 분석 가능한 DNA 마이크로어레이 칩 개발	100%	▶1차년도의 최적화된 DNA 혼성 조건을 바탕으로 실제 한우 샘플 SNP를 이용한 최적화 실험 및 고효율의 마이크로 어레이 칩으로 발전	
		SNP 선택적인 PCR 최적화 및 SNP marker 마이크로 어레이 칩에 응용	100%	▶한우 샘플의 높은 검출 효율을 위해 SNP에 최적화 된 PCR 조건 확립 및 마이크로 어레이칩 최적화	
	제2협동 솔젠트(주)	한우 개체 및 품종 구별을 위한 다중 표지인자 개발	SNP 선택적인 PCR을 통한 SNP marker 개발	100%	▶DNA microarray 분석을 위해 선별된SNP 유전자 표지들의 다중 PCR 조건 최적화 ▶다수의 개체들을 이용하여 유효성이 높은 표지인자들 upgrade ▶DNA microarray 분석을 위해 선별된SNP 유전자 표지들의 프로브 제작
	제3협동 나노스코프시스템즈(주)	고분해능의 대면적 마이크로어레이 칩 영상 획득을 위한 광학계 및		100%	▶중계 광학계 최적 설계 수행 ▶영상 획득 속도 향상 ▶사용자 친화적 s/w 작성

어레이 칩 영상화 및 신호 처리 인터페이스 개발	검출기 최적 설계 및 개발	100%	▶검출기(PMT) 모듈의 개발 ▶컨트롤 보드 개발
	형광 dye에 따른 고감도 검출기 및 컨트롤 보드 개발		

### 3. 3차년도 연구개발 수행내용 및 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	제1세부 KAIST 현장 진단용 DNA 유전자 분석 마이크로 통합 디바이스 개발과 소형 형광 검출기 연계	고효율 한우 유전자 분석을 위한 PCR 소자-CE 통합 디바이스 제작 (제1협동 연계)	100%	▶통합형 PCR-CE 마이크로디바이스와 이동형 유전자분석기 및 이동형 소형 형광검출장치의 통합 ▶Laptop 의 LabVIEW S/W를 이용한 자동화 ▶1~3일 소요의 분석시간은 80분 이내로 줄임 ▶11개 한우/비한우 표지인자의 정확한typing 가능
		고효율 한우 유전자 분석을 위한 PCR 소자-DNA microarray 통합 디바이스 제작 (제1협동 연계)	95%	▶통합형 PCR-microarray 와 이동형 유전자분석기 및 이동형 소형 형광스캐너장치의 통합 ▶Laptop 의 LabVIEW S/W를 이용한 자동화 ▶분석시간을 150분 이내로 줄임 ▶10개 한우/비한우 표지인자의 정확한typing 가능 ▶Non-specific signal을 줄이기 위한 조건최적화 수행중
		통합 디바이스 작동의 최적화	100%	▶통합연계모듈의 정상작동 (LabVIEW S/W) ▶PCR-CE 통합마이크로디바이스에서 1개 표지인자 성공적 typing ▶PCR-microarray 통합마이크로디바이스에서 10개 표지인자 성공적 typing
		샘플 전처리 소자의 통합	70%	▶고효율의 샘플전처리 소자 개발 ▶제작된 PCR-CE 또는 PCR-microarray 부분과의 통합시 용량처리문제를 해결한 후 ,통합을 위한 시스템 재점검 필요
		형광 검출시스템의 휴대성을 위한 전원 공급장치 및 DAQ board개발 (제3협동 연계)	100%	▶32.5 x 24 x 8.5 cm 크기의 휴대용 형광검출시스템 개발 ▶3 x 3 mm 대면적 스캐닝 ▶초당 1 frame 분석 가능
		휴대용 형광검출시스템과 유전자 분석 디바이스의 통합	100%	▶PCR-Microarray chip 과의 연계 시스템제작 ▶통합형 유전자진단 마이크로디바이스 제작으로 한우/비한우 표지인자 분석 완료
	제1협동 생명공학연구원  3차원 DNA 마이크로어레이 제작 및 다중 SNP 유전자 표지 분석	PCR-Microarray 통합 디바이스 제작 (제1세부 연계)	100%	▶통합형 유전자 진단 마이크로 디바이스 제작 완료 및 시험 테스트 완료
		혼성화 효율을 높이기 위한 어레이 표면 제작 및 분석시간 단축	100%	▶표면 제작 및 실험조건 확립으로 분석시간 1시간으로 단축 완료
		최적화된 DNA microarray 기반 다중 SNP 표지 인자 분석	95%	▶최종선별된 11개 다중 SNP 인자의 통합디바이스에서의 성공적 테스트 완료 ▶non-specific signal 및 SNP3 에 대한 수정 조건 수행중
	제2협동 솔젠트(주)  체계적 검체 확보 및	다양한 종에서 marker 판별 결과 비교 분석	100%	▶선별된 마커를 이용하여 황우 10두, 칠푼우 9두, 및 흑우 10두에 대해서도 분석 완료 ▶최종적으로 선별된 한우 마커의 경우 99.6%

디바이스에 응용	체계적 검체 확보	100%	의 정확도를 가지는 것으로 판별 ▶각기관과 연계하여 한우 2,000두 수입우 1,000 두의 검체를 확보 ▶한우의 다른 종류인 흑우, 칠푼우의 경우도 10두와 9두씩 검체 확보 완료
	통합 디바이스를 이용하여 확보된 샘플로부터 SNP 유전자 분석	100%	▶1세부에서 최종 개발된 유전자 통합 디바이스를 이용하여 확보된 샘플을 이용한 SNP 유전자 분석 ▶기존 test 결과와 상호 동일한 결과를 보임
제3협동 나노스코프시스템즈(주)	휴대용 형광검출 시스템과 유전자 분석 디바이스의 통합	100%	▶PCR-Microarray chip 과의 연계 시스템제작 ▶통합형 유전자진단 마이크로디바이스 제작으로 한우/비한우 표지인자 분석 완료
현장 분석을 위한 고감도 형광 검출 시스템 소형화	제품화를 위한 시스템의 안정성 및 견고함 평가 및 수정 보완	100%	▶제1세부와 연계, 안정성 평가 완료 ▶제1세부와 연계, 견고성 평가 완료

## 제2절 관련분야에의 기여도

### 1. 관련분야 기여도

#### (1) 한우 특이적 유전 마커의 발굴

본 연구과제에서 최종 발굴한 한우 특이적 유전 마커는 기존 마커 40~70개에 비해 11개로서 적은 비용으로 빠른 분석이 가능하게 하였으며, 정확도에서도 한우 2,464두 및 수입우 1,562두를 이용하여 분석한 결과, 한우 시료의 경우 한우 판별률이 99.6%이고 수입우 시료의 경우 비한우 판별률이 97.7%로 매우 높은 정확도를 보여주고 있다. 정확하고 저비용의 DNA 마커발굴로 인해, 현재 시행중인 한우이력체계를 통해 믿을 수 있는 한우를 소비자에게 제공할 수 있게 할뿐더러, 소의 질병 및 쇠고기 안전에 문제가 발생시 신속한 이력추적으로 회수, 폐기가 가능하게 함으로서 안전한 먹거리 문화개선에 크게 기여할 것으로 사료된다. 분석시간 및 비용 감축으로 민간분야 포함 연간 16억원의 절감효과가 있을것으로 판단되며 가축개량사업 등에서도 축산학적으로도 보다 정확한 한우 마커로 이용이 가능할 것이다.

#### (2) 유전자 분석 마이크로시스템의 개발

본 연구과제에서 개발한 유전자 분석 통합 마이크로시스템은 한우/비한우 마커를 판별할 수 있을 뿐만 아니라, 범용 유전자 분석장비로서 개발되었으므로 다양한 DNA 분석툴로서 이용이 가능할 것이다. 기존의 DNA 분석장비들은 DNA 추출, 정제, 증폭, 분리, 분석이라는 일련의 과정을 거치며, 고가의 다량 시약을 소비하고 있으므로, 본 연구과제의 마이크로시스템 이용시 시간과 비용면에서 획기적인 감축이 가능할 것이라 사료된다. 또한 인간 질병의 유전적 요인인 단일염기다형성 (SNP) 과 인간 ID 규명에 이용되는 단염기반복구간 (STR) 을 동일한 방식으로 분석이 가능하므로, 법의학 및 개인맞춤형 의학분야에 큰 파급효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 축산물 생산이력체계 뿐 아니라, 특용작물관리시스템과 같은 유전자 자원 분석에도 이용될 수 있으며, 동식물 병충해 안전관리 및 식품 원인균 감염 검색 등에서도 범용적인 유전자 진단 도구로 이용이 가능하다. 더불어, 미래 휴대용 유전자 진단 도구로서 발전하기 위한 기본 플랫폼으로서 본 연구과제의 마이크로시스템이 기여할 것으로 사료된다.

# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제1절 연구개발 성과

### 1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입판 매신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1	0					2	1	
	달성	1	0					2	1	
2차년도	목표	2	0					4	1	
	달성	1	0					2	0	
3차년도	목표	2	1					5	1	
	달성	3	0					4	0	
계	목표	5	1					11	3	
	달성	5	0					8	1	

### 2. 연구개발 성과

#### 가. 특허

과제 연차	출원/ 등록 여부	출원/ 등록일	특허명	출원/ 등록인	출원/ 등록국	출원/ 등록 번호
1차 년도	출원	2010. 03.30	회전 PCR칩, 회전 RNA 전처리 칩 및 이를 이용한 RNA 전처리 방법, 이들을 포함하는 회전 RT-PCR 칩, 이를 이용한 회전 PCR 방법	서태석, 최중영, 최석진	대한민국	10-2010- 0028294
2차 년도	출원	2010. 08.17	Rotational PCR equipment, PCR chip for the same and PCR method using the same	서태석 정재환 최석진	미국	10-2010- 0079474
3차 년도	출원	2011. 11.30	중합효소연쇄반응을 이용하지 않는 미소부수체 (minisatellite) 유전자형 분석	서태석	대한민국	10-2011- 0127291
3차 년도	출원	2011. 12.08	한우 및 수입우 판별에 유용한 단일염기다형성 마커 및 이의 용도	국립농산 품질관리원장, 슬젼트(주)	대한민국	10-2011- 0130683
3차 년도	출원	2012. 01.17	PCR 전처리 장치, 칩 및 이를 이용한 시료 전처리 방법	서태석 정재환 최석진	대한민국	10-2012- 0005179



나. 논문게재

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	An integrated microdevice for high-performance short tandem repeat genotyping	J.Y. Choi	T.S. Seo	-	Biotechnol. J.	4	국외	비 SCI
2010	Triblock copolymer matrix-based capillary electrophoretic microdevice for high-resolution multiplex pathogen detection	S.J. Kim	T.S. Seo	G.W. Shin, S.J. Choi, H.S. Hwang, G.Y. Jung	Electro- phoresis	31	국외	SCI
2010	Microchip-based capillary electrophoresis analysis of telomerase activity for cancer diagnosis	S.J. Kim	T.S. Seo	S.J. Choi, R. Neelamegam	Biochip J.	4	국내	SCI
2010	Sample stacking capillary electrophoresis microdevice for highly sensitive mini Y short tandem repeat genotyping	Y. Chen	T.S. Seo	J.Y. Choi, S.J. Choi	Electro- phoresis	31	국외	SCI
2010	Development of in vivo confocal microscope combined with reflection and fluorescence imaging modes	M.K. Ahn	M.K. Ahn	Y.-D. Kim, C. Song, D.-G. Gweon	International Journal of Optomecha- tronics	4	국외	SCIE
2011	PCR-free digital minisatellite tandem repeat genotyping	Y. Chen	T.S. Seo	-	Electro- phoresis	32	국외	SCI
2011	Sequential patterning of two fluorescent streptavidins assisted by photoactivatable biotin on an aminodextran-coated surface	J. Ahn	M.-G. Kim	Y.-B. Shin, W.-S. Chang	Colloids and Surfaces B	87	국외	SCI
2012	An integrated microdevice of polymerase chain reaction and an immunochromatographic strip for colorimetric detection of influenza A H1N1 virus	Y.T. Kim	T.S. Seo	Y. Chen J.Y. Choi W.-J. Kim H.-M. Dae J. Jung	Biosensors & Bioelectronics	33	국외	SCI
2012	Integrated allele-specific polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for single nucleotide polymorphism genotyping	J.Y. Choi	T.S. Seo	Y.T. Kim J. Ahn K.S. Kim D.-G. Gweon	Biosensors & Bioelectronics	2012 accepted	국외	SCI

다. 학술발표

발표 연도	발표명	저자			학회명
		주저자	교신저자	공동저자	
2009	Triblock copolymer matrix based capillary electrophoretic microdevice for high-resolving single-stranded conformation	S.J. Kim	T.S. Seo	S.J. Choi G.W. Shim, H.S. Hwang, G.Y. Jung	추계 한국바이오칩학회
2010	Microchip-Based Capillary Electrophoretic Analysis of Telomerase Activity for Cancer Diagnostics	S.J. Choi	T.S. Seo	S.J. Kim J.Y. Choi Y. Chen	춘계 한국바이오칩학회
2010	Capillary Electrophoretic Microdevice for HANWOO Genotyping	J.Y. Choi	T.S. Seo	S.J. Choi Y. Chen H.W. Kim S.A. You H.-K. Myeong	춘계 한국바이오칩학회
2010	Sample Stacked Capillary Electrophoretic Microdevice for Highly Sensitive Mini Y Short Tandem Repeat Genotyping	Y. Chen	T.S. Seo	J.Y. Choi S.J. Choi	춘계 한국바이오칩학회
2010	Sample Stacking Capillary Electrophoretic Microdevice for Highly Sensitive Mini Y Short Tandem Repeat Genotyping	Y. Chen	T.S. Seo	J.Y. Choi S.J. Choi	The international $\mu$ TAS 2010 conference
2010	Integrated polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for HANWOO allele-specific genotyping	J.Y. Choi	T.S. Seo	S.J. Choi Y. Chen H.W. Kim S.A. You H.-K. Myeong	The international $\mu$ TAS 2010 conference
2010	PCR-free variable number tandem repeat genotyping	Y. Chen	T.S. Seo	S.J. Choi J.Y. Choi	추계 한국바이오칩학회
2010	PCR-free variable number tandem repeat genotyping with sample stacking capillary electrophoresis	Y. Chen	T.S. Seo	S.J. Choi J.Y. Choi	The International 10th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis
2011	Integrated RT-PCR-ROSGENE strip device for Influenza H1N1 virus detection	Y. Chen	T.S. Seo	Y.T. Kim J.Y. Choi	The International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2011) in conjunction with KBCS Spring Meeting
2011	RT-PCR microdevice integrated with a ROSGENE strip for colorimetric detection of Influenza H1N1 virus	Y.T. Kim	T.S. Seo	Y. Chen J.Y. Choi	The international $\mu$ TAS 2011 conference
2011	An integrated diagnostic microdevice of polymerase chain reaction and immunochromatographic strip for colorimetric influenza	Y.T. Kim	T.S. Seo	T. Chen J.Y. Choi	ASIASENSE 2011
2011	Integrated polymerase chain reaction and capillary electrophoresis microchip for multiplex mini Y short tandem repeat genotyping	Y.T. Kim	T.S. Seo	J.Y. Choi	추계 한국바이오칩학회
2011	Integrated Allele-Specific Polymerase Chain	J.Y. Choi	T.S. Seo	Y.T. Kim	PowerMEMS 2011

	Reaction-Capillary Electrophoresis Microdevice for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping			J. Ahn Y. Chen I. Song H.W. Kim S.A. You H.-K. Myeong B.S. Chun D.-G. Gweon	
2012	An Integrated Polymerase Chain Reaction-Capillary Electrophoresis Microdevice for 11-plex Single Nucleotide Polymorphism Genotyping	J.Y. Choi	T.S. Seo	Y.T. Kim J. Ahn K.S. Kim D.-G. Gweon	MSB2012

라. 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
68	21	30	17	0	52	16		68	

## 제2절 연구성과 활용 계획

### 1. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	1			5	
	달성	2	1			0	

### 2. 기술실시(이전)

#### 가. 상품화 (솔젼트)

솔젼트(주)에서 개발한 한우/비한우 마커 11에 대해 상품화에 성공하였다. Multiplex-X™ HW kit으로서 기존보다 분석시간 및 비용을 50% 감축하면서도 한우에 대해 99.71%의 정확한 판별력을 가지는 kit로 개발되었다. 이에 따라 분석시간 및 비용감축으로 민간분야 포함 연간 16억원 정도의 절감효과가 있을것으로 기대되며, 한미 FTA 등 개방확대에 대응하여 한우농가 보호 및 소비자 선택권 제고에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 개발된 kit는 육포, 사골, 뼈, 익힌고기 등 가공되거나 시료에서도 분석이 가능하여 음식점 등에서의 쇠고기 가공품에 대한 원산지표시제 활성화에 크게 기여할 것이다.

## Multiple-X™ HW Kit (한우 · 비한우)

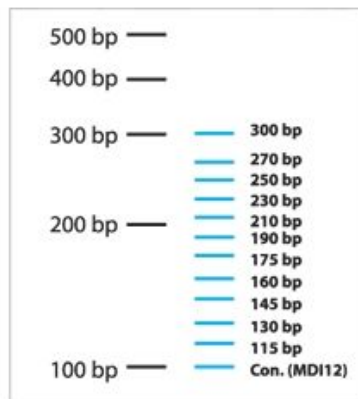


Multiple-X™ HW Kit, Cat. No. SCM75-K096

### 구성품목 (Contents)

- ▶ 2X Multiple-X™ PCR Smart mix
- ▶ Primer mix (freezing-dried)
- ▶ Multiple-X™ HW standard marker
- ▶ EcoDye™ DNA Staining Solution

### Multiple-X™ HW Kit 분석 방법



총 12개의 PCR band 중에서  
6개 band 이상이면 비한우형,  
5개 band 이하이면 한우형 유전자  
보유로 판별합니다.

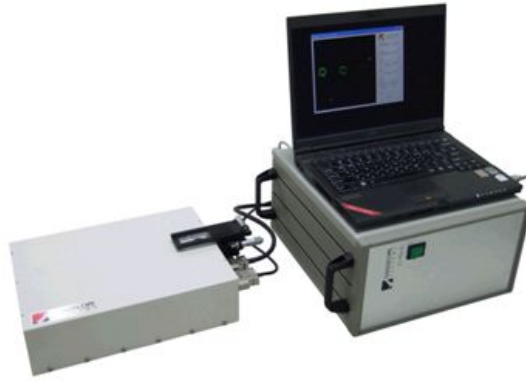
그림 88. 개발된 한우/비한우 마커의 상품화. 슬젬트(주)

### 나. 기술실시(이전)

#### (1) 이동형 형광스캐너 (나노스코프시스템즈(주))

한우 DNA 분석용 PCR-Microarray 통합디바이스에서 microarray의 형광검출 및 분석에 이용되는 소형 형광스캐너 기술을 나노스코프시스템즈(주)에서 개발하였다. 이와 더불어, 스캐너의 형광시그널 분석 S/W 또한 동시에 기술실시가 가능하다.

Diode laser (635 nm)를 사용하며 사용목적에 맞게 다른 파장의 laser로 교체가 가능하다. 3 x 3 mm 의 대면적 스캐닝으로, 고효율 microarray 다중분석이 가능하다. 더불어, 32.5 x 24 x 8.5 cm 의 신발박스정도의 크기로 소형화에 성공함으로써, laptop에 연결하여 어디서든 현장 분석이 간편하도록 만든 특징을 가지고 있다. microarray 분석 뿐 아니라, 형광검출이 이용되는 다양한 bioassay에 이용이 가능하므로, 지속적인 수요증가가 예측됨으로 기술실시가 충분히 가능할 것으로 사료된다.



Description	Specification
Laser wavelength	635nm (Customizable)
Emission wavelength	650~670nm (Customizable)
Field of view	3 x 3 mm
Frame rate	1 frame/sec

그림 89. 소형화된 형광스캐너

(2) 이동형 유전자 분석장치 (나노스코프시스템즈(주))

PCR-microarray chip의 구동을 위해서는 micropump를 위한 pump 및 solenoid valve, thermal cycling을 위한 온도센싱 circuit 및 heating, cooling 장치 등이 필요하다. 더불어, PCR-CE 도 가능하게 하기 위해, 전기영동을 위한 high-voltage powersupply 가 필요하다. 이러한 모든 장치가 21 x 10 x 24 cm 크기로 소형화된 이동형 유전자 분석 장치가 개발되었다. 기존 PCR-CE 또는 PCR-microarray 타입의 유전자 분석시스템은 DNA 추출 정제, 증폭, 분리, 검출 등 여러 단계가 필요해 1~3일간의 긴 분석기간이 필요하며, 비용적으로도 다량 시약을 이용함으로써 비경제적이었다. 더불어, 여러 단계를 거치는 동안의 오염문제가 발생할 수 있다. 하지만, 본 연구과제에서 개발된 이동형 유전자 분석장치와 PCR-microarray chip을 이용하면, 각 단계 간 인위적인 조작없이 LabVIEW S/W로 자동화되므로 누구나 쉽게 한번의 조작으로 분석이 가능하며, 오염문제 또한 배제시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.

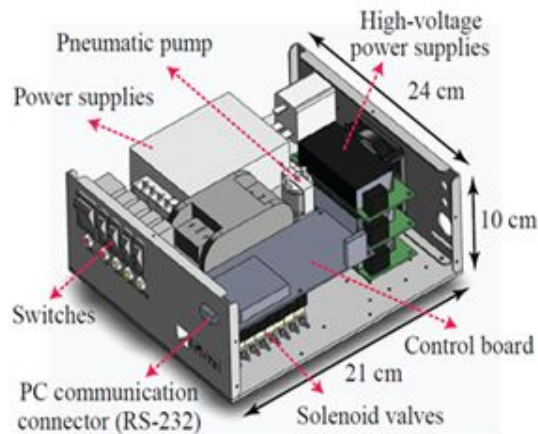


그림 90. 소형화된 이동형 유전자 분석장치

## (2) 통합형 유전자 분석 마이크로시스템

본 연구과제 개발된 마이크로시스템은 소형화 및 고속 분석이 가능한 이동형 유전자 분석 장치이다. 하지만, 실제 제품화를 위해서는 칩 운용에 있어서의 사용자 친화적인 단순하고 간략한 인터페이스가 필요할 것이라 사료된다. 이를 위해 칩 시스템의 단순화 및 자동화 프로그램의 개발이 필요할 것이다. 이와 더불어, 마이크로칩, 운영장치, 광학장치로 나누어져 있는 본 소형 시스템을 궁극적으로는 하나의 소형 시스템으로 통합 및 패키징 하는 기술이 필요할 것으로 사료된다. 이러한 제품화로서의 사용자 친화적인 인터페이스 개발 및 소형 패키징화는 본 마이크로시스템의 유전자 진단시장에서의 막대한 파급효과를 볼 때 반드시 기존 연구개발시스템과 동반되어 이루어져야 할 사항으로 사료된다.

## 3. 타연구에 활용 계획

### 가. 인간 단일염기다형성 (SNP) 및 단연쇄 반복유전자 (STR) 분석

본 연구과제에서 개발된 유전자 분석을 위한 통합 마이크로시스템은 한우/비한우 DNA분석 뿐만 아니라, 범용 유전자 진단 도구로 개발되었으므로 다양한 DNA 분석에 이용될 수 있다. 대표적으로, 인간 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP) 과 단연쇄반복유전자 (short tandem repeat) 분석에 이용할 수 있다. 인간게놈프로젝트 이후 인간 유전자 분석 진단에 관한 연구가 더욱 활발히 진행되어 오고 있으며 그 시장 규모는 향후 더욱 확대되리라 예상되고 있다. 특히 단연쇄반복유전자 유전자는 여러 STR marker를 동시에 분석함으로써 높은 변별력을 제공한다는 점에서 범죄자 신원 확인과 같은 인간 규명에 가장 많이 사용되고 있으며 단일 염기 다형성 (Single nucleotide polymorphism, SNP)은 그 차이에 의해 인종, 피부색, 체질 뿐만 아니라 질병 등의 유전적 특성을 나타낸다고 알려져 있어 수많은 SNP 규명에 많은 연구가 진행되고 있다. 현재의 STR 분석법은 2-3시간의 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)에 의한 STR 유전자 증폭과 모세전기영동 (Capillary Electrophoresis, CE)에 의한 분리를, SNP의 경우에는 PCR에 의한 타겟 유전자 증폭, 대립 유전자 분별을 위한 single-base extension (SBE), 마지막으로 전기영동 채널에서 분리 과정을 거치게 된다. 이러한 현재 기술은 고가의 분석 장비와 다량의 값비싼 시료를 사용하기 때문에 비용이 많이 들고 장시간의 분석 시간을 요하게 된다. 또한 분석 장비의 bulkiness로 인해 각 생물반응 단계의 통합이 어려워 샘플 전처리 과정에 샘플오염의 가능성을 항상 내포하고 있으며 또한 범죄 현장에서 얻어진 샘플로부터의 신속한 범죄자 신원 확인 또는 질병 관련 유전자 현장 진단 (Point-of-care testing, POCT) 등에도 한계를 보이고 있다. 따라서, 이러한 단점을 극복하고 현장에서 유전자 진단이 가능한 고효율, 고감도의 새로운 STR/SNP 유전자 분석 미세 통합 시스템이 요구되고 있으며 랩온어칩 (Lab-on-a-chip) 또는 미세종합분석시스템 (micro total analysis system)은 이러한 요구의 해법으로 기대를 받고 있다. 따라서 본 연구과제에서 개발한 microfabrication 기술을 이용한 소형 PCR 반응기는 값비싼 효소 등 PCR 반응에 이용되는 시료량을 현격히 줄여 비용을 절감시킬 뿐만 아니라 나노 리터 규모의 thermal mass에 의해 빠른 열 사이클을 가능하게 하여 고속 PCR을 수행할 수 있게 해 준다. 또한 집적화된 마이크로 채널에서의 모세관 전기영동법은 획기적으로 분리 시간을 단축시킬 수 있다. 따라서, 이동형 유전자 분석 통합마이크로디바이스를 이용한다면, 범죄현장에서 바로 DNA 채취 및 STR 분석을 통해 용의자의 확보가 가능하다. 이와 더불어, 언제 어디서나 SNP 분석을 할 수 있는 유전자 분석도구 발전시킨다면, 미래 개인맞춤형 의학시대에 Point-of-Care (POC) 진단 도구



로 이용될 수 있는 플랫폼을 제공하리라 예상된다.

#### 나. 호흡기 감염질환 진단용 유전자 진단 기기 개발

최근 전세계적으로 사회적 이슈가 되고 있는 호흡기 감염질환 (인플루엔자 A 바이러스, 조류 인플루엔자, SARS) 의 예방과 진단을 위해 신속 정확하게 현장 진단할 수 있는 유전자 진단 기기 개발의 필요성이 대두되고 있다. 이에 랩온어칩 기술을 기반으로 하여 저가의 일회용 플라스틱 칩에서 인플루엔자 바이러스 RNA 유전자를 초고속으로 증폭하면서 실시간 감지가 가능한 초소형 실시간 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 칩으로 본 연구과제의 성과를 발전시킬 수 있으리라 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제1절 학술정보

#### 1. DNA를 이용한 육우 품종구분

- ▶ 품종 구분은 DNA 수준에서 유전적인 변이를 분석하여 품종 구별의 기준으로 사용하고 있다. 소의 털색의 다양성에 관여하는 유전자는 몇 가지가 알려져 있고, extension (E)-locus가 털색의 다양성에 매우 중요한 유전자좌위로 알려져 있다. 이 좌위는 melanocyte에서 검정색 (eumelanin) 또는 붉은색 (Pheomelanin)으로 털색을 나타내는 것으로 알려져 있다.
- ▶ Mountjoy 연구팀 Robbins 연구팀은 E-locus에 모색결정에 관여하는 melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1-R) 유전자가 존재한다는 것을 증명하였다 [14].
- ▶ Kriegesmann 연구팀은 이 E-locus에 존재하는 MC1-R 유전자의 SNP를 이용하여 Brown Swiss종과 Saller 품종을 구별하는 연구를 보고하였다 [15].

#### 2. 유전자 진단 마이크로 분석시스템

- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 소형화된 PCR-CE microchip을 이용하여 법의학 샘플을 다중으로 분석 [16]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 소형화된 PCR-CE microchip 에 대해 보고하였으며, Plug gel을 이용한 PCR product의 정제과정이 집적된 것이 특징 [12]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 sigle base resolution 으로 PCR 후 DNA sequencing 이 가능한 통합 마이크로디바이스를 개발 [17]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 병원균의 포획, 정제, PCR, 분리까지 하나의 칩에서 가능한 microsystem에 대한 보고 [18]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 단일세포 수준에서 PCR 이 가능한 emulsion droplet 기능이 통합된 시스템에 대해 보고 [19]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 인간 호흡기감염 병원균의 다중 진단을 위한 마이크로시스템에 대해 보고 [20]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 단일세포수준에서 유전자 검출 및 분석이 가능한 통합시스템에 대해 보고 [21]

- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 법의학 샘플의 정제, PCR, 분리까지 가능한 통합시스템에 대한 보고 [22]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Mathies group에서 Hydrogel microarray를 이용한 단일염기다형성 (SNP) 의 분석에 대한 보고 [23]
- ▶ UC Berkeley (미국) 의 Luke Lee group에서 등온 PCR 법을 microchip에 적용하여 real-time으로 분석이 가능한 플랫폼을 개발 [24]
- ▶ University of Virginia (미국) 의 Landers group에서 피 샘플로부터 DNA profile 이 분석이 가능한 통합형 마이크로디바이스를 개발 [25]
- ▶ University of Virginia (미국) 의 Landers group에서 폴리머 마이크로칩을 이용한 DNA 추출과 PCR 용 시스템에 대한 보고 [26]
- ▶ University of Virginia (미국) 의 Landers group에서 마이크로벨프없이 DNA 추출과 PCR 을 통해 단일염기반복구간 분석이 가능한 마이크로시스템에 대한 보고 [27]
- ▶ University of Virginia (미국) 의 Landers group에서 병원균 분석을 위한 샘플 정제 및 연 전사 PCR 이 가능한 마이크로시스템에 대한 보고 [28]
- ▶ Royal Institute of Technology (스웨덴) 의 Helene group에서 microwell에서 세포성장과 동시에 PCR이 가능한 microdevice에 대해 보고 [29]
- ▶ California Institute of Technology (미국) 의 Ismagilov group에서 digital PCR 이 가능한 고효율 microchip 에 대해 보고 [30]
- ▶ California Institute of Technology (미국) 의 Ismagilov group에서 digital PCR을 이용하여 고효율 다중 bioassay 에 대해 보고 [31]

## 제2절 특허정보 및 주요 상품화

- ▶ 대류현상을 이용한 고속 DNA 증폭을 위한 microsystem에 대한 특허 (Texas A & M University System) [32]
- ▶ Nanoliter size의 droplet을 PCR reactor로 사용한 고효율 PCR 마이크로시스템 (Digital Biosystems™) [33]
- ▶ 마이크로히터 및 RTD 온도제어소자의 소형화로 DNA 증폭 및 분리 시스템 (Affymetrix™) [34]
- ▶ 샘플전처리 및 등온 PCR을 이용한 DNA 증폭, 검출시스템에 대한 마이크로시스템 (University of Michigan) [35]
- ▶ Glass capillary 내에서의 고속 PCR 반응기기  
(제품명 Light Cycler Real Time PCR, 회사 ROCHE (미국))
- ▶ 수십~수백개의 Microwell에서의 digital PCR  
(제품명 LabChip® Systems, 회사 Caliper LifeSciences (미국))
- ▶ 96 well-plate 플랫폼 및 4-color system에서의 다중 PCR 분석  
(제품명 StepOnePlus™ Real-time PCR, 회사 Applied Biosystems (미국))
- ▶ 최대 6가지 유전자 target 검출가능하며, 일회용 카트리지를 이용  
(제품명 GeneXpert® System, 회사 Cepheid (미국))

## 제 7 장   참고문헌

- [1] <http://www.mtrace.go.kr/>
- [2] Butler, J. M., Forensic DNA Typing, Academic Press, New York (2001)
- [3] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M. Sensors and Actuators B1, 244 (1990)
- [4] 민병록, Korean Journal of Animal Science 37, 651 (1995)
- [5] 정의룡, 동물 자원지 42, 391-406 (2000)
- [6] 김태중, Journal of Animal Science and Technology 46, 897 (2004)
- [7] 고바라다, Korean Journal of Veterinary Research 45, 315 (2005)
- [8] K.H. Chung, S.H. Park, Y.H. Choi, Lab on a Chip 10, 202-210 (2010)
- [9] J.H. Jung, S.J. Choi, B.H. Park, Y.K. Choi, T.S. Seo, Lab on a Chip (2012 Accepted)
- [10] Z. Chen, S. Qain, W.R. Abrams, D. Malamud, H.H. Bau, Analytical Chemistry 76, 3707-3715 (2004)
- [11] I.K. Dimov, J.L. Garcia-Cordero, J. O'Grady, C.R. Poulsen, C. Viguier, *et al.*, Lab on a chip 8, 2071-2078 (2008)
- [12] N. Thaitrong, N.M. Toriello, N. Del Bueno, R.A. Mathies, Analytical Chemistry 81, 1371-1377 (2009)
- [13] 한상현, 한국동물자원과학회지 50, 633-640 (2008)
- [14] K.G. Mountjoy, L.S. Robbins, M.T. Mortrud, R.D. Cone, Science 257, 1248-1251 (1992)
- [15] B. Kriegesmann, B. Dierkes, T. Leeb, S. Jansen, B. Brenig, Journal of Dairy Science 84, 1768-1771 (2001)
- [16] P. Liu, T.S. Seo, N. Beyor, K.-J. Shin, J.R. Scherer, R.A. Mathies, Analytical Chemistry 79, 1881-1889 (2007)
- [17] R.G. Blazej, P. Kumaresan, R.A. Mathies, Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of America 103, 7240-7245 (2006)
- [18] N. Beyor, L. Yi, T.S. Seo, R.A. Mathies, Analytical Chemistry 81, 3523-3528 (2009)
- [19] T. Le Goff, E. Champarnaud, F. Fardus, Analytical Chemistry 82, 3183-3190 (2010)
- [20] N. Thaitrong, P. Liu, T. Briese, W.I. Lipkin, T.N. Chiesl, *et al.*, Analytical Chemistry 82, 10102-10109 (2010)

- [21] R. Novak, Y. Zeng, J. Shuga, G. Venugopalan, D.A. Fletcher, *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* 50, 390–395 (2011)
- [22] P. Liu, X.-J. Li, S.A. Greenspoon, J.R. Scherer, R.A. Mathies, *Lab on a chip* 11, 1041–1048 (2011)
- [23] A. Bromberg, E.C. Jensen, J. Kim, Y.K. Jung, R.A. Mathies, *Analytical Chemistry* 84, 963–970 (2012)
- [24] I.K. Dimov, J.L. Gaarcia-Cordero, J. O’Grady, C.R. Poulsen, C. Viguiet, *et al.*, *Lab on a Chip* 8, 2071–2078 (2008)
- [25] C.J. Easley, J.M. Karlinsey, J.M. Bienvenue, L.A. Legendre, M.G. Roper, *et al.*, *Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of America* 103, 19272–19277 (2006)
- [26] G.R.M. Duarte, C.W. Price, B.H. Augustine, E. Carriho, J.P. Landers, *Analytical Chemistry* 83, 5182–5189 (2011)
- [27] K.A. Hagan, C.R. Reedy, J.M. Bienvenue, A.H. Dewald, J.P. Landers, *Analyst* 136, 1928–1937 (2011)
- [28] K.A. Hagan, C.R. Reedy, M.L. Uchimoto, D. Basu, D.A. Engel, *et al.*, *Lab on a Chip* 11, 957–961 (2011)
- [29] S. Lindstroem, M. Hammond, H. Brismar, H. Andersson-Svahn, A. Ahmadian, *Lab on a Chip* 9, 3465–3471 (2009)
- [30] F. Shen, W. Du, J.E. Kreutz, A. Fok, R.F. Ismagilov, *Lab on a Chip* 10, 2666–2672 (2010)
- [31] J.E. Kreutz, T. Munson, T. Huynh, F. Shen, W. Du, *et al.*, *Analytical Chemistry* 83, 8158–8168 (2011)
- [32] V.M. Ugaz, N. Agrawal, US20080176292 (2008)
- [33] C. Wu, WO2009003184A1 (2008)
- [34] R.A. Mathies, P.C. Simpson, S.J. Williams, US06261431 (2000)
- [35] M. Burns, J.D. Denuzzio, D.T. Burke, B.N. Johnson, US6379929B1 (1998)