

(옆면)

(앞면)

819026-01-  
1-SB010

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

**농식품기술개발사업 2020년도 최종보고서**

**발간등록번호**

**11-1543000-0032  
64-01**

**Fen  
DEL  
기반  
품종  
검사  
제품  
용실  
시간  
유전  
자분  
분석  
기술  
개발**

**FenDEL 기반 품종검사 제품용 실시간 유전자 분석기술  
개발**

**최  
종  
보  
고  
서**

**2020.09.04**

**2020**

**주관연구기관 / (주) 제노텍**

**농  
림  
축  
산  
식  
품  
부**

**농  
림  
식  
품  
기  
술  
기  
획  
평  
가  
원**

**농 립 축 산 식 품 부  
(전문기관)      농림식품기술기획평가원**



<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “FenDEL 기반 품종검사 제품용 실시간 유전자 분석기술 개발”(개발기간 : 2019. 05. 10 - 2020. 05. 09)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 05. 25.

주관연구기관명 : (대표자) 김재중  
협동연구기관명 : (대표자)  
참여기관명 : (대표자)



주관연구책임자 : 임시규  
협동연구책임자 :  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.



<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	819026-01-1-SB010	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.05.10. -2020.05.09	단 계 구 분	(1)/ (1)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	연구성과후속지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	FenDEL 기반 품종검사 제품용 실시간 유전자 분석기술 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 11 명 내부: 11 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:172,000천원 민간:70,000천원 계:242,000천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 11 명 내부: 11 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:172,000천원 민간:70,000천원 계:242,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주) 제노텍 기술연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:(해당 없음)			상대국 연구기관명:(해당 없음)	
위탁연구	연구기관명:(해당 없음)			연구책임자:(해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	(해당 없음)
-------------------------	---------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고 서 원문	연구 시설 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		(10-2020-0064838) (10-2020-0052320)									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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



<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 분자진단 핵심기술로FenDEL qPCR을 적용하여 다수의 SNPs를 동시에 분석 가능한 기술로 발전시켜 보편적인 multiplex qPCR 진단 기술로 개발하고자 함.</li> <li>• 핵심기술에 적합한 DNA 중합효소로 개발하고 독창적이고 사용자 편리성이 보장되는 분석용 프로그램을 구현하여 쌀 등의 품종검사 제품에 적용하고자 함.</li> <li>• 개발제품에 적합한 경제적인 시료의 전처리과정, 제품의 보관, 유통 등에 관련된 제품화 기술을 확보하고 이를 대단위로 검증하고자 함.</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대립유전자 (allele) 및 돌연변이 (SNP) 특이 검출을 위한 구분성 증대 내열성 DNA 중합효소의 개발</li> <li>• family A DNA polymerase의 primer binding 영역 (loop)을 확인함 (세계최초)</li> <li>• 확보한 영역을 집중 변이하여 구분성 증대 변이주 (<math>\Delta Ct</math> 12이상, <math>\Delta\Delta Ct</math> 6이상) 다수 창출</li> <li>• Multiplex 다중 real time PCR 분석 및 viewer 프로그램 개발</li> <li>• 사용자 편리성, 가시성이 높은 viewer program</li> <li>• AI 원리가 적용된 판독 프로그램을 통해 자동화 판정이 가능</li> <li>• 분석에서 판정, 인증서 발급까지 일원화 프로그램 구현</li> <li>• FenDEL®벼(쌀) 품종 판별 키트 (FenDEL® Rice 22SNP Real-time PCR Kit 및 gDNA prep kit) 제품 출시</li> <li>• 특허 기술 (FenDEL) 적용 품종 판별 키트 완성</li> <li>• 적합성 평가에서 100% 정확도 확인</li> <li>• 경제적 정제기술 및 3건의 특허 기술을 적용하여 완성함</li> <li>• 정성 및 정량용 kit (약 450 품종이상 가능)</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개발 qPCR 핵심 특허 및 신규 확보 특허 (프로그램 및 효소)로 구축된 기술 pipeline은 품종판별, 가축이력 추적 등의 농축산 산업분야 제품 개발에 활용</li> <li>• 암과 같은 질병의 조기진단 예후진단 및 동반진단과 같은 고감도 기술이 요구되는 보건의료 제품 개발로 확대될 수 있음</li> <li>• 개발기술 및 제품은 FTA와 UR, 나고야 의정서와 같은 다양한 국가 간의 협정에 대비하여 해외 농축산물 수입, 원산지의 판별, 이력추적, 품종검사에 활용할 수 있어 국가적 활용도가 매우 높은 기술</li> <li>• 개발 제품(쌀 품종검사 kit)의 시장 직접 판매로 25억원/년, 부가가치 창출 60억원/년을 기대할 수 있으며, 개발 기술의 다양한 제품군으로 확장할 계획임</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>정량중합효소연쇄반응</p>	<p>단일염기다형성</p>	<p>Taq DNA 중합효소</p>	<p>품종검사</p>	<p>쌀</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Quantitative PCR</p>	<p>Single Nucleotide Polymorphism</p>	<p>Taq DNA Polymerase</p>	<p>cultivar variety identification</p>	<p>rice</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)



< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 1 절 연구개발 대상 및 기술·제품의 개요 .....	9
1. 연구개발 목적 .....	9
2. 연구개발 범위 .....	9
가. 핵심 기술 개발 .....	9
나. 개발 기술의 성능 .....	9
다. 개발 제품의 기능 .....	10
3. 기술·제품의 개요 .....	10
가. 핵심기술 구성 .....	10
나. 개발 기술·제품의 개요 .....	10
다. 핵심 특허 real time PCR (FenDEL) 기술의 도입 .....	11
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	12
1. 기술적 측면 .....	12
2. 경제적·산업적 측면 .....	12
3. 사회적 측면 .....	13
제 3 절 국내외 연구 동향 .....	13
1. 연구개발 대상의 국내·외 현황 .....	13
가. 국내 기술 수준 및 시장 현황 .....	13
나. 국외 기술 수준 및 시장 현황 .....	21
제 2 장 연구수행 내용 및 결과 .....	30
제 1 절 SNP 구분성을 높이는 DNA polymerase 개발 .....	30
1. 효소 개량 목표 및 전략 .....	30
가. 효소 개량 목표 .....	30
나. 기술 개발 전략 .....	31
다. 효소 개발/생산과 활성 평가 방법 .....	34
(1) Site directed mutagenesis와 Taq DNA polymerase 돌연변이체 제작 .....	34
(2) Taq DNA polymerase의 발현을 위한 배양 .....	37
(3) Taq DNA polymerase의 조정제 시료 제조 .....	37
(4) Taq DNA polymerase의 고순도 정제 .....	37
(5) 변이체 Taq DNA polymerase 활성의 비교 .....	38
(6) 구별성 확인을 위한 Real time PCR .....	39
라. Taq DNA polymerase의 primer 결합 영역의 규명 .....	40

(1) 대장균 발현 모균주에 따른 Taq DNA polymerase의 분해 .....	40
(2) 높은 농도의 KCl에 의한 Taq DNA polymerase의 분해 억제 .....	41
(3) DNA에 의한 Taq DNA polymerase의 분해 억제 .....	41
(4) Taq DNA polymerase의 분해 위치의 결정 .....	43
(5) Taq DNA polymerase의 구조와 분해 부위 .....	46
마. Taq DNA polymerase 변이체의 활성 검증 .....	49
(1) K511A 변이체 및 R512A 변이체의 활성 검증 .....	49
(2) K511A 변이체의 matched와 mismatched PCR 구분성 확인 .....	49
(3) Loop 내 영역의 charged amino acid 돌연변이체 제작 및 그 활성 .....	50
(4) Taq DNA polymerase 변이체의 real time PCR의 구분성 비교 .....	52
바. 개발효소의 변이 활성 특성과 구별성에 관한 고찰 .....	54
사. 개발효소의 응용성의 확장에 대한 고찰 .....	56
아. 개발 효소의 대량 정제 및 특성 평가 .....	58
(1) 개발효소의 대량 배양 및 정제 (SOP구축) .....	58
(2) 개발효소의 특성 평가 .....	60
(3) 개발 효소의 쌀 품종 판별 kit (제품) 적용 평가 .....	61
제 2 절 Multiplex real-time PCR 결과 분석용 프로그램 개발 .....	62
1. 분석 프로그램 개발의 배경 방향 (목표) .....	62
가. 개발 배경 .....	62
나. 개발 방향 (목표) .....	63
2. 개발 프로그램의 구성 및 흐름도 .....	63
3. 분석 프로그램의 PCR viewer의 구성요소 및 항목 .....	66
4. 분석 프로그램의 쌀 품종 분석 적용 시험 결과 .....	67
가. real time PCR 수행 및 결과 분석 .....	67
나. 판정 기준점의 Rn (RFU) 및 Ct (Cq) 값의 조정 .....	68
다. AI algorithm의 적용 .....	70
라. Quantity normalizing 의 적용 .....	71
4. 프로그램의 실시예 따른 표현 및 성적서 발행 .....	72
제 3 절 특허 기술 적용 쌀 품종 구분 kit의 구성 .....	73
1. SNP의 구분성 향상을 위한 특허 기술의 적용 .....	73
2. 시료의 확보 및 관리 .....	74
3. SNP 마커 선정 및 primer probe set 구성 .....	75
4. DNA 시료의 확보 및 추출 방법 개량 .....	76
5. FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit의 구성 .....	82
가. 주요 개발 내용 .....	82
나. 제품 구성 특징 .....	82
다. 키트 (FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit) 구성과 보관 .....	83

라. OligoMix 특성표 .....	83
마. Real time PCR 의 조건 .....	83
바. Real-Time PCR 분석 결과 판정 .....	83
<b>제 4 절 벼(쌀) 품종 검정 키트 제품의 안정성 및 성능 평가 .....</b>	<b>85</b>
1. 개발 제품 .....	85
가. 개발 제품 2종 .....	85
나. 개발 제품 홍보 자료 .....	85
2. 검정 키트의 안정성 시험 .....	88
3. 기타 시험 .....	89
4. 개발 제품의 성능 평가 .....	89
가. 자체평가 .....	89
나. 개발 kit의 외부 시험 1 .....	92
(1) 농산물 품질 관리원 시험연구소 방문 및 협의 .....	92
(2) 검정 기관 (농업기술센터)을 방문하여 제품 설명 및 시연 .....	92
(3) 농산물 품질관리원 벼(쌀) 품종 검정기관 지정 .....	94
다. 개발 kit의 외부 시험 2 .....	97
<b>제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....</b>	<b>99</b>
<b>제 4 장 연구결과의 활용 계획 등 .....</b>	<b>101</b>
<b>붙임. 참고 문헌 .....</b>	<b>102</b>
첨부 1. 시험 자료 (반복시험 평가) .....	106
첨부 2. 시험 자료 (외부 시험 자료) .....	114
첨부 3. 특허 출원서 (출원번호: 10-2020-0064838) .....	126
첨부 4. 특허 출원서 (출원번호: 10-2020-0052320) .....	127
첨부 5. 학회 발표 (한국생물공학회) .....	128
[별첨 1] 연구개발보고서 초록 .....	129
[별첨 2] 자체평가의견서 .....	131
[별첨 3] 연구성과 활용계획서 .....	135

<그림 차례>

그림 1. 개발기술 제품구성 및 분석프로그램 (농축산물 품종검사용 kit) .....	10
그림 2. qPCR 기반 주요 기술의 개발 연대기 .....	22
그림 3. TaqMan probe assay의 원리 .....	25
그림 4. 세계시장 규모 분자 진단 시장 규모 (Marketsandmarkets, 2018) .....	27
그림 5. Taq DNA polymerase 개발 주안점 .....	31
그림 6. Taq 변이체 활성비교 (시험예) .....	39
그림 7. Taq DNA polymerase의 SDS-PAGE 사진 .....	42
그림 8. Taq DNA polymerase의 분해 산물의 SDS-PAGE 사진 .....	44
그림 9. 33 kDa fragment의 N-말단 amino acid 서열 분석 결과 (GC 결과- redrawing) .....	44
그림 10. Taq DNA polymerase amino acids 서열과 분해 위치 .....	45
그림 11. 분해부위의 주위영역의 PI 값 .....	45
그림 12. Taq DNA polymerase의 절단의 위치 (cleavage site) 및 OmpT 인식 부위 (P) .....	46
그림 13. Primer와 결합을 하는 amino acids가 집중된 DNA 중합효소의 영역 .....	47
그림 14. Taq DNA polymerase의 loop 구조와 DNA와의 밀접 구조 .....	48
그림 15. K511A Taq와 wild type Taq을 사용한 Real time PCR 결과 .....	50
그림 16. 각 부위의 대표적인 변이 Taq 들의 구분성 확인을 위한 real time PCR 결과 .....	53
그림 17. Taq DNA polymerase 생산 공정도 .....	59
그림 18. Taq DNA polymerase 정제 chromatography 및 정제품 .....	59
그림 19. 돌연변이 Taq (K511A Taq) 과 FenDEL 기술의 쌀 구별 kit의 적용 .....	61
그림 20. Mutiplex real time PCR Viewer Program의 구성 및 흐름도 .....	64
그림 21. Multiplex real time PCR Viewer의 주요 구성요소 및 표현 .....	67
그림 22. Ct 혹은 signal value (Rn) 의 조정에 따른 분석의 정확도 개선 .....	69
그림 23. AI Algorithm의 적용에 따른 분석의 정확도 개선 .....	70
그림 24. Quantity normalizing의 적용에 따른 분석의 정확도 개선 .....	71
그림 25. 쌀 품종 분석 프로그램 구현의 주요 항목의 예 .....	72
그림 26. 개량된 FenDEL 기술 및 구분성 증대 .....	73
그림 27. 쌀 DNA 추출 방법 (DNAid-Rice gDNA prep kit) 와 기존 방법(NucleoSpin)의 비교 .....	77
그림 28. Color 미의 Solution C 처리 genomic DNA 정제효과 .....	78
그림 29. 색도제거 공정용 소재 선별 시험 .....	79
그림 30. color 흡착제 종류별 시험 결과 .....	80
그림 31. SolC 처리 용량별 쌀 품종 검사 증진 효과 .....	81
그림 32. 개발 정제 kit의 품종 구분 반복 평가 .....	81
그림 33. 개발된 제품 사진 .....	85
그림 34. 개발제품 사용 매뉴얼 .....	86
그림 35. 개발제품 홍보용 팜플릿 .....	87
그림 36. AFA 첨가 및 효소 첨가에 따라 장기 보관후 qRT-PCR 시험 결과 .....	88
그림 37. 외부기관의 제품 사용 및 평가 (시연) .....	93
그림 38. 벼 품종 검정을 위한 qRT-PCR 결과 비교 .....	94

<표 차례>

표 1. 주관기업 보유기술 FenDEL® qPCR과 기존기술의 비교 .....	15
표 2. 국내 주요 유전자 분자 진단 진출 기업 .....	16
표 3. 쌀, 벼 품종 분석 관련 국내 주요 특허 목록 .....	18
표 4. DNA polymerase 개발 관련 주요 국내 주요 특허 목록 .....	19
표 5. 분자진단검사 기술의 구분 및 관련 기술 소유 기업 .....	28
표 6. 일본 쌀 품종 분석 연구 및 분석기관 .....	28
표 7. 일본의 쌀 품종 검사 방법관련 지식 재산권 .....	29
표 8. Taq DNA polymerase 변이부위 및 응용 .....	32
표 9. 돌연변이 부위와 제작에 사용된 primer set .....	35
표 10. 과제를 통해 제조된 Taq 변이체와 그 활성 .....	51
표 11. K511A Taq DNA polymerase의 활성과 구분성에 대한 KCl과 betaine의 영향 .....	60
표 12. 품종 구분을 위한 주요 쌀 품종명 .....	74
표 13. 최종 구성된 쌀 품종 구분 markers 및 primers/probe sets .....	75
표 14. 개발한 쌀 genomic DNA preparation 방법에 따른 추출시 DNA 농도 및 순도 .....	78
표 15. OligoMix 및 특성 .....	84
표 16. FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit 의 PCR 조건 .....	84



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적 및 기술·제품의 개요

### 1. 연구개발 목적

- 분자진단 핵심기술로 개발 보유기술인 FenDEL qPCR을 다수변이의 동시분석 기술이 적용되는 보편적인 multiplex qPCR로 개발하고자 함.
- 이에 기술에 적합한 효소를 개량하고 독창적이고 사용자 편리성이 보장되는 분석용 프로그램을 구현하고 지적재산권으로 확보함.
- 예시적 제품으로 쌀 품종검사 제품 개발에 적용하고자 함.
- 이를 위해 경제적인 핵산 추출 제품의 보관, 유통 등에 관련된 상품화 기술을 확보하여 쌀 품종검사 제품을 개발하고 이를 대단위로 검증함.
- 이를 통해 FenDEL 기술 적용 multiplex qPCR 검사 기반을 확립하고자 함.

### 2. 연구개발 범위

#### 가. 핵심 기술 개발

- 핵심 qPCR (FenDEL) 기술의 확장: 핵심 기술로 주관기관 보유 국제 특허 기술인 FenDEL PCR Technology 심화 발전 (세계 최초 특허 qPCR 기술) (지적재산권 확보)
- FenDEL 기술 적용 특허 DNA Polymerase의 개발: FenDEL 기술의 효율적 적용이 가능한 FEN 활성 개선 DNA polymerase로 세계 최초 개량 (지적재산권 확보)
- Multiplex real-time PCR 결과 분석용 프로그램 개발: 분석용 프로그램은 3가지 목표, 사용자 사용의 편리성, 분석결과 값 판정의 용이성, 분석 data의 시험자 판정 합리성이 담보될 수 있는 신규 프로그램 및 viewer (프로그램 등록 혹은 특허화)

#### 나. 개발 기술의 성능

- SNP detection 특이도 (specificity) 정밀도 (precision) 성능 98% 이상 달성
- allele 구분성 기존 기술 비교 획기적 개선 ( $\Delta Cq$  6 이상 증진)

#### 다. 개발 제품의 기능

- 쌀을 대표하는 농산물 품종 검사 kit
- 500 품종 이상을 구별 할 수 있는 품종 검사 kit
- multiplex PCR plot를 하나의 viewer로 확인하고 동시에 정밀 판정할 수 있는 kit
- 정제, 효소, PCR kit (primer probe 등), 판정 프로그램 까지 구성된 total package 제품

### 3. 기술 · 제품의 개요

#### 가. 핵심기술 구성

- Primer set, probe set (discrimination & signaling), enzymes, 각종 reagents 류로 구성된 kit 및 DNA preparation kit, 그리고 전용 program 으로 구성됨
- 새로운 qPCR format 구성을 통한 분석의 특이도, 신뢰도, 민감도가 분석적 성능검사에서 100%가 구현되도록 개발함
- qPCR format 개발, format 적합한 효소 및 주변기술 개발, multiplex PCR results 판독 program 개발
- 주관기관의 정부지원 개발 확보기술 (FenDEL)을 활용한 제품 개발

#### 나. 개발 기술 · 제품의 개요

- 다수의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 동시 분석을 위한 qPCR analysis format의 개발 및 분석용 프로그램의 개발 및 제품화
- 복잡한 농축산물, 한약제 및 건강식품 원재 등의 품종 및 이력 검사 가능 분석 제품 (구현 예, 쌀 품종 분석 제품)



그림 1. 개발기술 제품구성 및 분석프로그램 (농축산물 품종검사용 kit)

다. 핵심 특허 real time PCR (FenDEL) 기술의 도입

- 핵심 기술로 주관기관 보유 특허 기술인 FenDEL PCR Technology을 다양한 format 과 probe를 적용하여 활용성을 확장하도록 개발 함
- 핵심 기술로 주관기관 보유 특허 기술인FenDEL 기술의 특성은 아래와 같음
- TaqMan probe 등을 사용하는 qPCR은 일반적으로 빠르고, 민감도와 특이도가 높으며, 분석 비용이 저렴하고, 자동화가 용이하다는 장점이 있으나, SNP를 구분하기 위해 특정 온도에서 allele-specific probe의 상보적 결합을 기본적 원리로 사용하고 있어, 상보 결합력의 차이를 극대화하기 위한 MGB 변형, PNA 등 사용으로 분석비용이 높음.
- 다종의 SNP를 동시에 분석할 경우 온도에 따른 변이 구분은 모든 종류 프로브의 특이성을 보장하지 못하는 단점이 있음
- 당사가 개발하여 특허출원한 5'-플랩 엔도뉴클레아제 활성이 억제된 DNA 폴리머레이즈를 이용한 유전자 돌연변이 검사방법 (Novel SNP Typing System, 상표 등록명-FenDEL)은 Taq DNA polymerase가 가지고 있는 5'-Flap endonuclease(FEN) 활성의 특성을 이용한 새로운 개념의 유전자 변이검사 방법임
- 기존 유전자 변이 검사법이 적용하고 있는 온도에 의한 유전형질 구분성의 한계를 효소의 특이성에 의한 구분으로 전환함으로써 유전자 변이검사의 특이성(판별력)이 높고 동시 다중 분석에 유리하며 기존 기술 대비 저 비용이라는 장점이 있는 검사방법 임
- FenDEL 기술은 대립 유전자 부위 서열에 따라 match 혹은 mismatch nucleotide 의 서열이 구성되도록 하여 5'-flap structure를 공여하게 되는 probe 즉,FenDEL probe에 의해 allele 의 genotype이 명확하게 구별되는 기술임
- FenDEL 기술은 locus specific 인 forward (F) Primer (종종 allele specific으로 구성 가능) 와 그 pair 인 reverse (R) primer, 증폭산물의 특이 검출이 가능한 Signaling (S) probe (dual labeled hydrolysis probe, TaqMan probe) 그리고 allele 에 따라 Flap 구조 형성이 가능한 5'-flap structure formative discrimination probe (FenDel Probe)로 구성됨.
- target의 증폭과 구별, 신호 방출을 위하여 5'-nuclease (5' Flap endonuclease와 5'->3' exonuclease) 활성이 동시에 요구되며, polymerase 활성을 가진 효소가 요구되고 현재 Taq polymerase 가 최적의 효소임
- 개발 기술을 더욱 심화 발전시킬 수 있도록 다양한 format 과 probe 로FenDEL PCR Technology의 활용성을 확장하도록 개발 함 (예, 다양한 signaling probe format (Ying Yang probe, hydrolysis probe, hybridization probe etc) 에 대한 시험, AS specific primer 의 도입을 통한 방법, FEN1 활성을 이용한 기술 효용성 증대 등)
- 상기 핵심 qPCR format에 따라 적합한 primers/probes 등을 개발하고자 함
- Primer와 probes set design의 개발 및 시험 절차를 체계화 하여 다수의 유전자를 대상으로

체계적 개발을 할 수 있도록 개발 과정을 시스템화 하고자 함.

- 3 SNPs / well \* 96 well system으로 구성하도록 multiplex PCR이 가능하도록 SNPs 판별 set을 조합 함.
- 각 target에 적합한 set을 찾기 위해 여러 개의 forward primer & reverse primer set 을 design 하여 개발 시험 평가
- signaling probe 개발 (specificity를 보장 할 수 있도록)
- 22종의 이상의 SNPs가 적용이 가능하도록 하며 1 tube에 내부표지인자를 포함하여 4가지 형광이 검출 가능하도록 구상 함.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 본 과제지원 핵심 qPCR 기술 및 제반 기술 (분석프로그램, 개량효소 등)은 다양한 분야의 분자진단기술로 보편적으로 활용 가능함
- 본 과제를 통해 개발되어 질 수 있는 DNA 증폭효소 및 DNA 추출 기술, 보관 유통에 관련된 기술요소는 향후 다른 농.수산물, 한약제, 건강기능 식품 등의 품종, 품질 평가에 사용 될 수 있는 중요한 기술임.
- 개발기술은 높은 감도의 기술로 농축산 산업분야 뿐만 아니라, 인간 유전질환 진단, 약물 유전체학 및 암과 같은 질병의 조기진단 예후진단 및 동반진단과 같은 고감도 기술 요구 제품의 개발로 확대될 수 있음
- 다수의 SNPs 분석 기술 및 판별 기술로 panel 형태의 품종 판별제품 혹은 가축이력추적 제품에 활용성 높은 기술 임
- 개발 기술은 qPCR을 이용하는 SNP 분석방법은 민감도와 특이도가 높으며, 분석 비용이 저렴하고, 또한 쉽게 자동화가 가능하다는 장점이 있음 .
- 본 개발 과제의 적용 기술은 당사가 보유한 원천 기술이며 보건복지부로부터 신기술 인증을 받은 FenDEL 기반 고감도 유전자 변이 분자진단 기술 (인증번호 제 127호; 2016.12/ 특허등록 제 10-1598398호) 임

### 2. 경제적 · 산업적 측면

- 본 지원과제를 통해 확보 될 수 있는FenDEL 기반 multiplex real time PCR 기술 및 제반 기술 (분석프로그램, 개량 효소 등)은 유전병, 대사질환, 암 진단을 위한 분자 진단 기술과 같은 보건 산업분야, 개발대상 제품인 쌀 품종검사 제품을 포함하여 보리, 깨, 콩 등의 곡물, 오미자, 구기자, 인삼과 같은 건강기능식품용 작물 품종 및 원산지 판별 제품, 소, 돼지

와 같은 축산물 이력추적 검사제품과 같은 매우 다양한 산업분야에 적용될 수 있음

- 본 기술 과제에서 구현할 제품은 쌀 분야에는 유엔 식량농업기구(FAO)의 '식량 전망'(Food Outlook) 보고서에 따르면 세계 시장은 약 5억 톤 이상이며 그중 한국은 연간 약 420만t을 생산하는 전세계에서 15위 생산국 (중국 1위, 인도 2위) 이며
- 1994년 우루과이라운드 이후로 매년 쌀 수입량이 증대되고 있으며 우리나라 2017년 쌀의 무 수입량은 40만t 이상으로 약 국내 생산량의 10%에 달하며 매년 2만t 이상 증가되고 있으며, 향후 완전 개방에 이를 경우 국내 쌀 산업기반이 붕괴될 위험성을 가지고 있음.
- 쌀 수입개방 등에 대비하여 쌀 품종의 우수화, 다변화를 통해 시장 경쟁력을 높일 필요가 있으며, 이에 따라 품종의 명확한 유통관리, 판별 기술이 요구되어 이 분야의 시장이 확대될 것임.

### 3. 사회적 측면

- 한우판별 및 축산물 생산이력체계 뿐 아니라, 특용작물관리시스템과 같은 유전자 자원 분석에도 이용될 수 있고, 동식물 병충해 안전관리 및 식품 원인균 감염 검색 등에서도 범용적인 유전자 진단 도구로 이용이 가능함.
- 농축산물 분자진단시장은 식량 주권의 보호라는 측면에서 품종검사 기법의 개발은 국가적 활용도가 매우 높은 기술이며 특히 쌀 품종 판별 유전자 기술은 국내 기술이 가장 앞서 있는 것으로 평가될 수 있어 이를 발전시킬 경우 글로벌 기술로 안착 할 수 있음
- 양곡 표시제에 따른 법적 근거를 뒷받침 할 우수하고 경제적 판정기술이 필요함으로 본 개발 기술 과제는 국가사회의 기술 요구에 부합함.
- FTA와 UR 과 같은 협정으로 해외 농축산물 수입에서 국가 간의 장벽이 무너지고 있어, 열악한 국내 농업기반의 현실을 고려할 때 원산지 판정기술은 국산 품종의 보호, 유통질서의 확립, 국민의 안전한 먹거리 정보의 제공에 있어서 필수적인 기술임

## 제 3 절 국내외 연구 동향

### 1. 연구개발 대상의 국내·외 현황

#### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

##### (1) 기술현황

- 농·수·축산 분야에서의 분자진단 수요가 급격히 증가하고 있음, 그 대상 분야는 농수산 축산물의 품종 개량, 품종의 유통질서 확립을 위한 품종검사분야, 감염병진단 분야, 원산지 및

생산 이력 추적을 위한 검사 분야 등 매우 포괄적임

- 다양한 분자진단 기술이 개발되어 왔지만, 여전히 충분한 민감도와 특이성을 가지는 분자진단 기술의 개발이 요구됨
- 유전자 변이를 효과적으로 검사하기 위한 많은 방법들이 활용되고 있으나 검사 시간, 비용, 특이도, 민감도 및 다중 동시 검사 등에 시료, 사용자 편의성, 관련제도 등이 다양하여 그 제품 개발에 필요한 기술 방법 개발과 적용, 평가가 필요함
- 국내에서는 씨젠의 DPO (dual-priming oligonucleotide), 파나진의 PNA (peptide nucleic acid) clamping 기술이 독자적 개발과 상품화를 통해 높은 기술 수준을 확보하고 있음. 이들 기술은 특수한 변형 oligonucleotides를 사용하여 변이 구별 능력이 비교적 우수하나, 그 재료가 고가로, 수십개의 multiplexing PCR에 적합하게 사용하기에는 경제성이 낮음
- 상기 대표적 기업 이외에 농산품 품질 구별용 제품은 대부분 AS (allele specific) primer 사용 qPCR 기반의 기술 혹은 전통적인 PCR 기술 등을 활용하고 있어 기술적 우위성과 확장성을 확보하지 못하고 있음
- 쌀 품종은 500개 이상의 다수의 품종의 구별이 필요하여 매우 높은 기술수준의 품종 판별 기술이 요구되며, 다중 분자진단 기술구현의 좋은 모델이 될 수 있음
- 즉, 최소 수십개의 SNP를 동시에 판정하여야 하는 기술적으로 어려움이 존재하여 필연적으로 multiplex (다중) PCR 기술이 요구됨
- 현재 주로 사용하는 기술은 다양한 분석시료를 PCR후 전기영동 후에 gel image 분석법은 많은 노동력, 분석시간이 필요하며 판정시 인위적 요소가 가미 될 수 있어 분석의 부정확성의 원인으로 작용함, 그러므로 PCR 과정시 동시 분석이 가능한 qPCR 기술 및 적합 판정 program이 요구되는 실정임
- 고도의 분석기술은 대부분 인체시료를 대상으로 한 감염병 진단, 유전병진단, 암과 같은 돌연변이 진단 등에 활용하기 위한 기술 개발이 주류를 이루고 있어 상대적으로 농림수산제품 분석용 진단기술은 그 수준이 낮음
- 유전자 변이를 효과적으로 검사하기 위한 다수의 방법들이 개발 활용되고 있으나 검사 시간, 비용, 특이도, 민감도 및 다중 동시 검사 등에서 개선되어야 할 기술적 요소가 상존함
- 국내 개발 기술 중 당사의 기술은 민감도, 특이도가 높고 특히 다중검사에 활용도가 높은 새로운 분자진단 기술인FenDEL 기술을 개발하여 지식재산권으로 확보하고 있음
- FenDEL 기술은 기존 유전자 변이(SNPs) 검사법이 적용하고 있는 온도에 의한 유전형질 구분성의 한계를 효소의 특이성 (Taq polymerase의 FEN1 활성화)에 의한 구분으로 전환함으로써 유전자 변이검사의 특이성(판별력)이 높고 동시 다중 분석에 유리하며 경쟁 기술 대비 저 비용이라는 장점이 있는 방법임.
- FenDel 기술은 2015년 당사가 개발을 완료한 기술로 Taq polymerase의 FEN1 활성화의 제어를 통해 SNP등의 돌연변이를 구분하는 기술로 그 정확성이 매우 높은 기술임.
- FenDEL은 기존 방법에서 이용하는 Probe의 Tm 값 차이가 아닌 Probe의 비특이 결합을 인식하는 효소의 특이성을 이용함으로써 분석결과의 정확성, 재현성을 획기적으로 향상 시켜 주는 특성을 지닌 기술 임.
- FenDEL 기술은 다중 실시간 유전자 증폭 (multiplex real time PCR) 기술을 적용하여 수십 개 이상의 다수의 유전자변이 (특히 SNPs)를 구분할 수 있는 기술 적용이 매우 용이한 기술임

표 1. 주관기업 보유기술 FenDEL® qPCR과 기존기술의 비교

구 분		기 술 (방 법)					
		Allele specific PCR	MGB-TaqMan qPCR	PNA Clamping qPCR	NGS	dPCR	FenDEL® qPCR
특 성	민 감 도	낮음	낮음	보통	높음	높음	아주 높음
	정 확 도	낮음	보통	보통	높음	높음	아주 높음
	분석비용	저비용	고비용	고비용	고비용	고비용	저비용
적 용 분 야	SNPs	제한적 적용 (Multiplex PCR)	적용가능	제한적 적용 (Multiplex Melting)	적용가능	-	적용가능
	Somatic mutation	제한적 적용	제한적 적용	제한적 적용	적용가능	적용가능	적용가능

(2) 시장현황

- 본 지원과제를 통해 확보 될 수 있는FenDEL 기반 multiplex qPCR 기술 및 제반 기술 (분석프로그램, 개량 효소 등)은 유전병, 대사질환, 암 진단을 위한 분자 진단 기술과 같은 보건 산업분야, 개발대상 및 시스템 구현 모델제품인 쌀품종검사 제품을 포함하여 보리, 깨, 콩 등의 곡물, 오미자, 구기자, 인삼과 같은 건강기능식품용 작물 품종 및 원산지 판별 제품, 소, 돼지와 같은 축산물 이력추적 검사제품과 같은 매우 다양한 산업분야에 적용될 수 있음
- 기술이 상기와 같이 다양한 산업 분야에 적용될 수 가 있으나, 시장현황은 본 기술의 구현 모델 제품인 쌀 제품 관련 시장 현황만을 제시함
- 유엔 식량농업기구(FAO)의 '식량 전망'(Food Outlook) 보고서에 따르면 쌀의 세계 시장은 약 5억톤 이상 이며 그중 한국은 연간 약 420만t을 생산하는 전세계에서 15위 생산국 (중국 1위, 인도 2위)의 위치에 있음
- 쌀 품종은 전세계에 6만여종 이상으로 보고되어 있으며 국내에 유통되는 품종은 수입품종을 포함하여 약 500종을 상회하는 다양성이 매우 높음
- 1994년 우리과이라운드 이후로 매년 쌀수입량이 증대되고 있으며 우리나라 2017년 쌀 의 무 수입량(MMA)은 40만t 이상으로 약 국내 생산량의 10%에 달하며 매년 2만t 이상 증가되고 있으며, 향후 완전 개방에 이를 경우 국내 쌀 산업기반이 붕괴될 위험성을 가지고 있음.
- 쌀 수입개방 등에 대비하여 쌀 품종의 우수화, 다변화를 통해 시장 경쟁력을 높일 필요가 있으며, 이에 따라 품종의 명확한 유통관리, 판별이 필요함. 따라서, 본 개발과제와 같은 우수한 쌀 현미의 품종의 정량 정성적 판정기술의 개발이 요구됨

- 국내의 정확한 분자진단 시장규모는 정확한 통계 보고는 없으며 관련 해외시장 동향을 통해 유추해 볼수 있음. 우리나라를 포함하는 아시아 체외진단 시장규모 109억 \$/2016 연평균 성장률 7.8%로 2021년 약 160억\$에 이를 것으로 전망됨 (체외진단 시장, 연구개발 특구 기술 글로벌 시장동향 보고서 2017.9, 연구개발 특구진흥재단)
- 구현제품(예) 인 쌀 판별검사 서비스 시장 규모는 아래와 같이 유추 될 수 있음  
 쌀 판별검사 서비스 시장 규모: 50억원/년 규모 (추정)  
 (시장에서 형성된 가격)  
 정성 검사 : 100,000원/건  
 정량 검사 : 300,000원/건  
 (년 간 검사 건 수)  
 15,000 ~ 20,000 건으로 예상  
 민간 기관 : 검사 건수 정확한 통계 부존  
 \* 민간 검정기관 지정 현황 (2017년 현재 38 기관)

### (3) 경쟁기관현황

- 국내의 분자 진단 기업은 아래 표와 같은 기업들이 있으며, 이들은 대부분 감염병 진단 및 유전병 진단등의 인체 질환진단에 특화 되어 있으며, 코젠 바이오 와 쏠젠트 등은 대표적인 쌀 과 같은 농산물 품질 검사 시장에 진출해 있는 기업임
- 자체 qPCR 개발 기술을 기반으로 한 기업은 파나진과 씨젠으로 이들 기업은 주로 인체질환 진단 등에 주력하는 기업임
- 농수산물 시장은 주요시장의 역할 뿐만 아니라, 임상결과가 수반되어 제품개발과 인허가가 어려운 인체를 대상으로 한 진단기술의 testbed의 역할을 수행할 수 있어 기업의 관심이 높아지고 있음

표 2. 국내 주요 유전자 분자 진단 진출 기업

기업	시장		기반 기술	주요 제품 및 서비스	비 고 (원천 기술)
	감염	변이 진단			
씨젠	√		Multiplex PCR	호흡기질환 바이러스 검사키트 성매개 감염 원인균 검사키트	DPO primer
바이오니아	√		Multiplex PCR	결핵 등 감염성 진단 키트	
파나진		√	PNA Clamping	EGFR등 암 진단 키트	PNA 생산기반
바이오코아	√	√	RT PCR/ NGS	태아산전 기형아검사 각종 유전질환 진단 검사	
쏠젠트	√	√	Multiplex PCR	결핵 등 감염성 진단 키트 농축산물 검정키트	
코젠바이오텍	√	√	Multiplex PCR	농축산물 검정키트	

젠큐릭스		✓	NGS/ ddPCR	유방암 예후진단 검사, EGFR	
(당사)		✓	FenDEL	유전자 변이 진단 암진단, 동반진단 키트 개발	FenDEL 원 천 특허

#### (4) 지식재산권현황

##### ■ 주관기관이 보유한 과제관련 지식재산권 등 현황

- **특허 등록:** (제10-1598398호)[PCT/KR2015/00167] 특허명; 5'-플랩 엔도뉴클레이즈 활성이 억제된 DNA 폴리머레이즈를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응으로 돌연변이 유전자를 검사하는 방법 (원천특허) /대한민국, 캐나다, 중국, 미국, 인도, 싱가포르, 멕시코, 말레이시아, 유럽 (영국, 프랑스 등), 러시아, 인도네시아, 브라질 출원 및 호주 일본 등록
- **특허 등록:** (제10-1772866호) 특허명; 증폭신호가 강화된 실시간 중합효소 연쇄반응으로 돌연변이유전자를 검사하는 방법/대한민국
- **특허 등록:** (제10-1775953호) 특허명; 돌연변이 유전자 검사 방법 및 키트 대한민국
- **특허 등록:** (제10-1845715호) 특허명; 동결방지제/ 조성물 대한민국
- **특허 출원:** (제10-2018-0024573) 특허명; 정성적 또는 정량적 돌연변이 유전형 분석방법 및 이 방법을 수행하기 위한 실시간 PCR키트/ 대한민국
- **상표권:** FenDEL (등록번호 : 4500687080000) GenCot (등록번호 : 4500711490000)
- **보건복지부 신기술 인증:** FenDEL 기반 고감도 유전자 변이 분자진단 기술 (인증번호 제 127호) 2016.12

##### ■ 국내기관(기업), 지식재산권 현황

(쌀품종 분자진단 기술 관련 지식재산권)

- KIPRIS에서 쌀\*품종\*검사-육종의 검색 조건으로 국내 특허를 조사한 결과 112건의 특허가 검색되었으며, 그 중에 (쌀\*품종\*검사 -육종)\*유전자검사\*PCR 61건이 특허실용신안이 검색됨, 이중에서 본 과제와 직접관련이 있는 특허는 qPCR 기술이 적용된 특허는 12건 검색 되었으며 주로 출원인은 국립농산물품질관리원과 코젠바이오텍임
- 기술 범위와 범주는 주로 국립농산물 품질관리원에서 고도된 검증 방법에 연관된 기술로 SNP 마커와 사용을 통한 쌀 품종 검사에 관한 방법임
- 주요 특허 내용은
- 10-2014-0156832 (국립농산물 품질 관리원/ 벼 또는 쌀 품종 판별용 프라이머 세트, 이를 이용한 벼 또는 쌀 품종 판별방법 및 이를 포함하는 키트는 SNP 마커를 이용하여 국내산 벼 또는 쌀 품종 판별을 위한 유전자 set의 구성과 대립유전자 특이 중합효소연쇄반응 (allele sepecific-PCR) 에 관한 것이며,
- 10-2007-0100535 (국립농산물 품질 관리원 코젠바이오텍 공동/품종 식별용 프라이머 조합 및 이를 이용

한 식별 방법) 벼 품종 식별용 10쌍의 프라이머 조합 및 이를 이용한 벼 품종 식별 방법에 관한 것으로, 단일 PCR 반응물에 10쌍의 프라이머를 동시에 사용하여 벼 품종 특이적인 SNP를 각 프라이머 쌍에 대한 PCR 증폭 여부로 확인함으로써 벼 품종을 구별하는 방법에 관한 것이며

- 10-2007-0100514 (국립농산물 품질 관리원 코젠바이오텍 공동/벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법) 국내외산 벼의 품종 구분이 가능한 벼 품종 식별용 마커 세트 및 실시간 다중 PCR을 이용한 벼 품종의 식별 방법에 관한 것으로, 국내에서 생산되는 주요 재배 품종 35종을 식별에 관한 것임
- 10-2010-0140451 (코젠바이오/벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법) 국내외산 벼의 품종 구분이 가능한 벼 품종 식별용 마커 세트 및 실시간 다중 PCR을 이용한 벼 품종의 식별 방법에 관한 것으로, 국내외에서 생산되는 151 종을 식별하는 방법에 관한 것 .
- 10-2010-0140415 (코젠바이오/벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법) 국내외산 벼의 품종 구분이 가능한 벼 품종 식별용 마커 세트 및 실시간 다중 PCR을 이용한 벼 품종의 식별 방법에 관한 것으로, 국내에서 생산되는 주요 재배 품종 67종을 식별하는 방법에 관한 것

(소재 (Taq Polymerase) 개발 관련 국내 지식재산권)

- 국내특허는 34000여건이 검색되나 이는 대부분 DNA polymerase를 사용한 진단, 단순 유전자기술에 사용되어진 것이 포함된 것이다. 본 과제와 관련된 주요 특허는 아래표와 같다. 성균관대학교 권석태 그룹과 국내 기업으로 제넷바이오, 엔지노믹스, (주) 바이오니아, 솔젠트 등이 DNA polymerase의 개발을 실시함
- 주로 제조방법 (세균 유래 DNA의 혼입방지, 수율증가)에 관련된 방법과 신규한 균주 유래에서 Taq DNA polymerase와 유사한 중합효소 개발, 또는 열안정성의 증대, hot start PCR이 가능한 효소, long PCR이 가능한 효소의 개발에 관련한 특허임.

표 3. 쌀, 벼 품종 분석 관련 국내 주요 특허 목록

출원번호	출원일자	발명의명칭	출원인
1020140156832	2014.11.12	벼 또는 쌀 품종 판별용 프라이머 세트, 이를 이용한 벼 또는 쌀 품종 판별방법 및 이를 포함하는 키트	국립농산물품질관리원장
1020100140451	2010.12.31	벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법	코젠바이오텍
1020100140415	2010.12.31	벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법	코젠바이오텍
1020090010299	2009.02.09	자포니카 쌀의 식미평가용 마커 및 그의 용도	서울대학교산학협력단
1020090008483	2009.02.03	벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도	(주)케엔유라이스밀
1020080120274	2008.12.01	벼 품종을 구분하기 위한 특이 프라이머 및 이의 용도	경상북도(농업기술원)
1020070100514	2007.10.05	벼 품종을 식별하기 위한 다중 실시간 PCR 방법	국립농산물품질관리원장 코젠 바이오텍
1020070100535	2007.10.05	벼 품종 식별용 프라이머 조합 및 이를 이용한 식별 방법	국립농산물품질관리원장 코젠 바이오텍
1020060134838	2006.12.27	국내 및 일본 자포니카 벼 품종판별용 마이크로새틀라이트마커조합 및 이의 코드	농촌진흥청장 다인바이오 주식회사

표 4. DNA polymerase 개발 관련 주요 국내 주요 특허 목록

출원번호	출원일자	발명의명칭	출원인
1020160049832	2016.04.25	Taq DNA 중합효소에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 및 그 용도	주식회사 엔지노믹스 한국과학기술원
1020140160764	2014.11.18	Taq DNA 중합효소의 신규한 제조방법	주식회사 제넷바이오
1020140059783	2014.05.19	내열성 DNA 중합효소를 이용한 유전자 변이 검출 방법	다이아텍코리아 주식회사 건국대학교 산학협력단
1020130147812	2013.11.29	나노아케움 이퀴탄스 유래의 Neq HS DNA 중합효소의 돌연변이체 제조 및 이를 이용한 hot-start PCR 응용	성균관대학교산학협력단
1020130129854	2013.10.30	열 안정성 DNA 중합효소의 제조방법 및 이에 의해 제조된 DNA 중합효소	(주)진스랩 가천대학교 산학협력단
1020147021867	2013.01.03	개선된 DNA 중합효소 활성 분석 및 생육성 미생물의 검출을 가능하게 하는 방법	제우스 사이언티픽, 아이엔씨.
1020120076876	2012.07.13	중합효소 연쇄반응을 이용한 분자진단검사용 중합효소 및 보조효소의 DNA 오염 제거를 위한 정제 방법	솔젠트 (주)
1020120035330	2012.04.05	썬모코커스 파시피쿠스 균주 유래의 DNA 중합효소 유전자 변이체들 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020110117309	2011.11.11	썬모코커스 와이오타푸엔시스 균주 유래의 DNA 중합효소 변이체들 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020127032975	2011.06.17	3'-미스매치 구별이 증가된 DNA 중합효소	에프. 호프만-라 로슈 아게
1020110012680	2011.02.14	썬모코커스 쉐러리크레센스 균주 유래의 DNA 중합효소 및 돌연변이 썬모코커스 쉐러리크레센스 A752K/N213D DNA 중합효소와 이들의 이용	성균관대학교산학협력단
1020100119895	2010.11.29	나노아케움 이퀴탄스 DNA 중합효소의 단백질 트랜스 스플라이싱을 기반으로 한 핫-스타트 PCR 수행방법	성균관대학교산학협력단
1020137000005	2010.05.14	롱 PCR이 가능한 DNA 중합효소 및 이의 유전자들	한국해양과학기술원
1020100022965	2010.03.15	썬모코커스 래디오투러런스 균주 유래의 내열성 DNA 중합효소 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020147002648	2010.01.15	내열성 DNA 폴리머라제를 포함하는 효소 조제물 및 그 제조 방법, 및 검출 대상생물의 검출 방법	훗카이도 미쓰이가가쿠 가부시킴가이사 서국립대학 법인 도야마 다이가쿠
1020117016538	2010.01.15	내열성 DNA 폴리머라제를 포함하는 효소 조제물 및 그 제조 방법, 및 검출 대상생물의 검출 방법	훗카이도 미쓰이가가쿠 가부시킴가이사 서국립대학 법인 도야마 다이가쿠
1020090097261	2009.10.13	돌연변이 나노아케움 이퀴탄스 A523R DNA 중합효소 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020090026203	2009.03.27	썬모코커스 쉐러 균주 유래의 내열성 DNA 중합효소 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020080123299	2008.12.05	썬모코커스 마리너스 균주 유래의 내열성 DNA 중합효소 및 이의 이용	성균관대학교산학협력단
1020080118823	2008.11.27	신규한 내열성 DNA 중합효소	한국해양연구원
1020080052676	2008.06.04	나노아케움 이퀴탄스 플러스 DNA 중합효소, 이의 제조방법 및 데옥시유티피 (dUTP)와 우라실-DNA 글리코실라제 (UDG)를 이용한 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법	성균관대학교산학협력단
1020080031585	2008.04.04	썬모코커스 구아이마센시스 균주 유래 내열성 DNA 중합효소 및 이를 이용한 중합효소 연쇄반응 방법	성균관대학교산학협력단
1020097015161	2007.12.18	열안정성 DNA 중합효소 및 음이온 또는 양쪽성이온 세제의 안정화된 조성물	시그마-알드리치 컴퍼니., 엘엘씨
1020070085103	2007.08.23	DNA 칩 및 그 DNA 칩을 구비하는 PCR장치	한화에어로스페이스 주식회사
1020060119612	2006.11.30	썬모코커스 유래 돌연변이 DNA 중합효소들 및 그의 유전자들	한국해양연구원
1020060097450	2006.10.02	돌연변이 DNA 중합효소들 및 그의 유전자들	한국해양연구원
1020050109371	2005.11.15	활성형 나노아케움 이퀴탄스 DNA 중합효소의 제조방법 및 이의 방법으로 제조된 활성형 DNA 중합효소	성균관대학교산학협력단
1020050094644	2005.10.08	고호열성 DNA 중합효소 및 이의 제조방법	한국해양연구원
1020097023787	2005.05.12	DNA 폴리머라아제 활성을 갖는 폴리펩티드	다카라 바이오 가부시킴가이사
1020097023784	2005.05.12	DNA 폴리머라아제 활성을 갖는 폴리펩티드	다카라 바이오 가부시킴가이사
1020067027770	2005.05.12	DNA 폴리머라아제 활성을 갖는 폴리펩티드	다카라 바이오 가부시킴가이사

1020040063603	2004.08.12	열안정성 TAQ 폴리머라제 절편	에프. 호프만-라 로슈 아게
1020040037864	2004.05.27	화학변형 열안정성 DNA 중합효소	바이오켄스트(주)고마바 이오텍(주)
1020037004398	2001.09.29	고정화된 DNA 중합효소	아람 바이오시스템 주식회사
1020010033049	2001.06.12	신규한 DNA 중합효소의 DNA 서열 및 그로부터 유래된 단백질	김유삼
1020000022697	2000.04.28	썬머스 아쿠아티커스 디엔에이 중합효소 유전자 절편을 대장균에서 발현 및 정제하는 방법	광주과학기술원 엄수현
1020000022696	2000.04.28	대장균에서 티7 디엔에이 중합효소 단편과 썬머스아쿠아티커스 디엔에이 중합효소 단편을 라이게이션시킨키메라 중합 효소의 제조 방법	광주과학기술원 엄수현
1019980013408	1998.04.15	썬머스 필리포미스로부터 분리된 내열성 DNA 중합효소의 유전자 및 그로부터 유추되는 아미노산 서열	(주)바이오니아
1019980704961	1996.12.26	신규 DNA 폴리머라제	다카라 바이오 가부시키가이샤
1019960705428	1995.03.30	바실러스 스테아로썬모필루스로 부터 정제된 DNA 폴리머라제	젠-프로브 인코포레이티드
1019930004947	1993.03.29	내열성티씨에이디엔에이(TCADNA)중합효소및그의 제조방법	한국과학기술연구원
1019910018801	1991.10.25	이.콜라이에서썬머스아쿠아티커스DNA폴리머라제의 생산을증가시키는방법	이스트만 케미칼 컴파니
1019870009197	1987.08.22	썬머스아쿠아티커스로부터의정제된열안정성DNA폴리머라제효소,이를압축화하는DNA서열및이를사용한 핵산서열의증폭,검출및클로닝방법	에프. 호프만-라 로슈 아게

#### (5) 표준화현황

- 농축수산물 및 한의약제에 대한 진단방법의 도입이 현재 활발하게 진행되고 있으며, 이는 국가적으로도 무역자유화에 대한 대비, 식량주권 확보, 식품안전 유통, 고유품종의 보호 등의 차원으로 지속적인 투자가 필요함
- 특히, 쌀은 우리나라 사람의 주곡이며, 우리 국민은 쌀을 식량 주권의 핵심 곡물로 여기고 있음
- 일본의 농산물품종의 유통관리를 통한 쌀 등의 농산물의 고급화 및 종자의 관리를 국가적 차원으로 실시하고 있으며 이는 무역 장벽 기술로 활용하고 있음
- 우리나라도 2007년 포장양곡 표시제의 전면 시행 이후 품종의 지속적 관리가 이루어지고 있음 그러나, 해외 의무수입물량의 도입과 지속적 품종 개량 등에 따라 국내 유통 쌀 품종의 수는 520종 (국내산 191종 해외 329종 (중국 104, 미국 12, 일본 10, 호주 10, MMA 193))으로 확대가 필요함
- 포장양곡 표시제는 소비자의 알권리 및 투명한 거래 질서 확립, 우수한 품종 양성, 품질의 고급화 유도를 목적으로 실시하고 있으며 위반 시 강력한 법적 처벌이 이루어지고 있음
- 이에 따라 쌀 품종 검사는 법적분쟁의 요소가 될 수 있으며, 국내 쌀 유통 질서의 교란과 외국산 수입쌀의 혼입 등에 대한 대비가 어려워져 국내 쌀 시장의 안정화와 국내산 쌀 시장의 보호를 위해서도 보다 정확하고 경제적인 쌀품종 검사 방법이 확립되어야 함.
- 확립된 쌀·현미 품종 검정 방법은 국내의 쌀·현미 품종 검정기관 (38개소)(2017년) 에 기술의 보급 및 방법의 구축은 국가 쌀 경쟁력 확보에 매우 중요한 기반이 될 수 있을 것임.

- 신속, 간편, 정확하며 경제적인 쌀. 현미 품종 검사 기법 개발되어 보급될 수 있으므로 국내 쌀 유통질서를 선진화하고 품종과 원산지의 소비자의 알권리를 보장에 기여 할 수 있음

## 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### (1) 기술현황

- 인간 등의 여러 생명체의 형질, 약물대사, 면역학적 반응, 유전병과 암과 같은 질환 등에 관여하는 유전적 변이 즉, 단일염기다형성, 부가-결실 등의 유전적 변이를 확인하는 것은 치료의 예측, 치료 방법의 결정, 치료 예후 및 재발의 관찰 등 정밀의료 구현에 있어서 매우 중요함. (Auton, Brooks et al. 2015). (Zhang, Qin et al. 2004). (Poste 2001) (Nakagawa and Fujita 2018) (Martincorena and Campbell 2015).
- 또한, 이러한 유전적 변이 확인 또는 구별은 농·식품 분야에서 종의 육종 및 선별, 원산지 및 품종의 판별 등에 있어서 매우 유용함.
- 유전적 변이는 생명체에게 태생적으로 존재하거나 혹은 성장과정 중에 환경적인 또는 내생적인 원인으로 발생할 수 있음. 인체 등의 유전적 변이 형태 중 가장 흔한 것은 단일 염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)임
- 인간을 포함하는 생명체가 지닌 SNPs의 판별에 사용되는 기술 방법 중 가장 보편적이며 경제적이고 간편한 방법은 중합효소를 활용한 유전자 증폭기술 즉, PCR (polymerase chain reaction) 기술이며, 특히 PCR 과정에서 실시간으로 그 변이 양을 측정할 수 있는 정량적 실시간 PCR (quantitative real time PCR; qPCR 또는 실시간 PCR)임.
- 핵산의 정량적인 정성 및 정량적인 검출 기법인 실시간 PCR은 보건, 농업, 식품, 환경 등의 다양한 분야에서 응용되고 있음. 1990년 초 개발된 실시간 PCR은 지속적으로 기술적 한계점을 개선하여 좀 더 정확하고 정밀한 기법으로 발전해 오고 있음.
- 특히, 실시간 PCR을 이용한 유전자 판별 키트 개발에 있어서 비특이적 신호의 발생, 그리고 돌연변이와 야생형 유전자 서열의 낮은 구분성은 실시간 PCR의 가장 대표적인 기술적 한계로 여겨짐.
- 특히 암, 감염원인 병원체 검출 등의 진단기술로서 실시간 PCR 기술의 개발을 위해서는 비특이적 신호의 제어가 필수적임. 비특이적 신호로 인하여 위양성이 나타나는 경우 검사의 신뢰도가 저하가 되며, 특히 극소량의 검출이 필요한 비침습성 혹은 최소침습성 액체생검 (liquid biopsy)과 같은 진단 기술에서는 소량의 표적 변이를 정확하게 진단하기 위하여 PCR 효율성의 증대와 특이성 (specificity)을 높이는 기술이 매우 필요함.
- PCR의 효율성과 특이성을 높이기 위해 PCR 용액에 첨가하는 조성물을 개발하거나, 특별한 프로브 (probes) 또는 프라이머 (primers)를 고안하거나, 효소를 개량하는 방법이 모색되어 오고 있음.
- 본 과제와 관련된 유전자 증폭 관련 기술은 1984년 유전자 증폭기술의 개발과 더불어 시작된 기술 진보는 기기의 발전과 효소와 생화학적 응용기술의 발전이 서로 이끌며 병행하며 매우 빠른 속도로 발전하고 있음

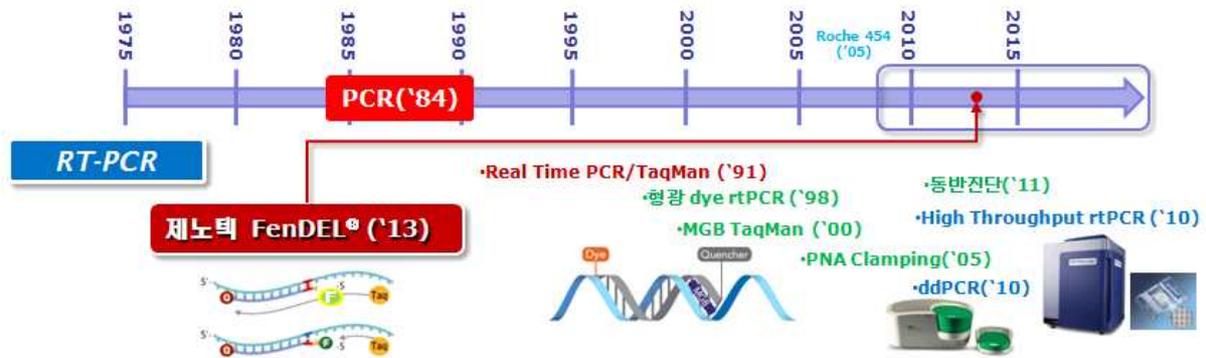


그림 2. qPCR 기반 주요 기술의 개발 연대기.

- 1990년 초에 개발된 qPCR은 보건, 농업, 식품, 환경 등의 다양한 분야에서 응용되고 있다. 핵산의 정량적인 정성 및 정략적인 검출 기법인 qPCR은 수많은 다양한 기법이 개발되어 오고 있음.
- qPCR 특히 주요 3가지 기술적인 문제 (온도의존성, 비특이성, 소량시료 특이 검출)의 극복하기 위해 기술 개발이 수행되어 오고 있음
- 즉, 온도 의존성의 탈피를 통한 환경적 요소 및 장비적 제약, 특히 PCR reaction volume의 극복을 이루려고 하였으며, DNA 이중나선 구조에 결합하는 형광물질의 사용으로 생기는 비 특이적 검출 문제로 인한 신뢰도 저하의 문제의 극복, 그리고 소량의 목적변이를 정확하게 진단하기 위한 specificity 증진이라고 할 수 있음
- PCR 용액에 첨가하는 조성물로는 주로 PCR의 반응성을 높이거나 프라이머 다이머 (primer dimers)의 생성, 또는 사용하는 프라이머가 비특이적 표적에 결합하여 생성되는 비 특이적 PCR 산물의 생성, 또는 높은 GC 비율 및 특이 고차구조 형성에 등에 의한 PCR 효율의 감소를 해소하는 용도의 첨가 조성물이 연구됨.
- 이러한 조성물로는 DMSO (dimethylsulfoxide), 베타인 (betaine) 등이 있다. 그리고, 일명 “HotStart PCR” 을 위해 낮은 온도에서 진행되는 반응을 차단하고 고온에서 PCR이 진행 되도록 하여 비특이적 증폭을 막는 방법이 다수 보고됨.
- 그중 “HotStart PCR” 방법으로는 DNA 중합효소 (DNA polymerase, DNAP) 특이적 단일클론 항체를 첨가하는 방법 [Biotechniques (1994) 16(6):1134-1137], DNA 중합효소의 활성을 억제하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드인 일명 “애포타머 (aptamer)” 를 첨가하는 방법 [US/005693502A (1997) (Gold and Jayasena 1997); J. Mol. Biol. 271:100-111 (1997) (Lin and Jayasena 1997); Nucleic Acids Research Supplement No.3: 309-310 (2003) (Ikebukuro and Noma 2003)], 또는 DNA 중합효소와 낮은 온도에서 결합능력을 지니며, DNA 중합효소의 활성을 억제하나, 특정온도 이상의 PCR 조건에서는 이중나선을 형성하지 아니하여 DNA 중합효소 활성을 억제하지 않는 이중 가닥 뉴클레오타이드를 사용하여 비 특이적 DNA 합성을 억제하는 방법 [J. Mol Biol. 264(2):268-278 (1996) (Dang and Jayasena 1996); US 8,043,816 B2 (2011) (Astatke, Chatterjee et al. 2011) ]이 보고됨
- 특별한 프로브와 프라이머는 증폭된 표적 산물을 특이적으로 검출하기 위한 것으로, 특이도가 높은 프로브를 사용하는 방법이 개발되고 있음.
- SYBR green I 또는 SYTO9와 같은 DNA 결합 형광체를 실시간 PCR에 사용하면 증폭된 산

물 전체가 검출되므로 비특이적 신호가 종종 발생하는 문제점이 있음. 이러한 문제를 해결하기 위해 표적 서열 특이적 프로브 (target sequence specific probes)가 개발됨. 개발된 프로브는 종류에 따라 TaqMan 프로브 (dual labelled signaling hydrolysis probe) [P Natl Acad Sci USA 88, 7276-280 (1991) (Holland, Abramson et al. 1991)]와 분자 비콘 (molecular beacons) [Methods. 25, 463-71 (2001) (Mhlanga and Malmberg 2001)], 스콜피온 프로브 (scorpion probes) [Nat Biotechnol. 17, 804-07 (1999) (Baner, Nilsson et al. 1998)], LUX (light upon extension) 프라이머 [Nucleic acids research. 30, e37 (2002) (Nazarenko, Lowe et al. 2002)], 앰플리플루오르 프라이머 (Amplifluor primers) [BioTechniques. 26, 552-58 (1999) (Uehara, Nardone et al. 1999)] 등이 있음.

- 또한, 표적 변이 유전자를 선택적으로 증폭하기 위한 특이도가 높은 프라이머 또는 특수 올리고뉴클레오타이드 블로커 (oligonucleotides blocker)를 사용하는 방법 등이 개발됨.
- 특이도가 높은 프라이머를 사용하는 방법으로는 3' 말단 하나의 염기 차이에 의해 구분이 되는 AS-PCR (allele specific PCR)을 중심으로 3' 말단에 변이 서열 하나 외에 추가의 인위적인 변이 서열을 첨가하는 ARMS-PCR (amplification refractory mutation system PCR)과 같은 방법 [Mol Cell Probes. 18, 349-352 (2004) (Jarry, Masson et al. 2004); Nucleic Acids Res 17, 2503-2516 (1989) (Newton, Graham et al. 1989); Nat Biotechnol. 17, 804-807 (1999) (Whitcombe, Theaker et al. 1999); Cytokine 71, 278-282 (2015) (Bergallo, Gambarino et al. 2015)]이 있으며,
- 최근에는 어닐링의 안정성을 높이면서도 미스매치 구별을 유지하도록 두 개의 부분으로 분리된 프라이머를 사용하는 방법인 SeeGene 사의 DPO (dual-priming oligonucleotide) [J. Am. Chem. Soc. 126, 4550-4556 (2004) (Sherrill, Marshall et al. 2004); Biomol. Detect. Quantif. 1 3-7 (2014) (Reddington, Tuite et al. 2014); J. Clin. Microbiol. 49, 3154-3162 (2011) (Higgins, Beniprashad et al. 2011)]와 Swift Biosciences의 myT 프라이머 (<http://www.swiftbiosci.com/technology/myt-primers>)가 개발됨.
- 온도 의존성의 탈피를 위해서 등온(isothermal) PCR 법의 개발이 되었으며, 그 예로는 loop mediated isothermal amplification (LAMP) <Nucleic acids research. 28, e63 (2000). Analytical chemistry. 83, 1883 - 1889 (2011)>, rolling circle amplification (RCA) <Proc Natl Acad Sci USA 92, 4641 - 4645 (1995), Nucleic acids research. 26, 5073 - 5078 (1998)>, recombinase polymerase amplification (RPA) <Plos Biol. 4, 1115 - 1121 (2006)> 그리고 specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) <Science. 356, 438 - 442 (2017)>이 있으나, primer의 design 혹은 관련 효소의 불안정성 및 증폭효율이 안정하지 못하여 높은 활용성을 보이지 못하고 있음
- 이와 더불어, 목적 변이 유전자만을 증폭하기 위해서는 야생유전자의 증폭은 억제되고, 변이 유전자가 주로 증폭될 수 있는 방법으로 primer 혹은 특수 oligonucleotides blocker를 design하거나 사용하는 방법 등이 개발 진화되어 오고 있음
- 상기의 여러 방식도 기본적인 AS 혹은 ARMS PCR의 기술 원리를 크게 벗어나진 못함
- 또 다른 방법으로 allele specific blocking oligonucleotides를 사용하는 방법으로 allele-specific blocker PCR (asbPCR) <Mutat. Res .517 .209 - 220 (2002), Am. J. Clin. Pathol. 127, 977 - 981 (2007)>,과 competitive allele-specific Taqman PCR (castPCR) assays <Exp. Mol. Pathol. 92, 275 - 280 (2012), LifeTechnologies. (2014)>방법이 개발됨.

- 이들 기술에서 사용되는 blocking oligonucleotides는 wild-type 서열과 완전히 hybridization이 가능한 서열로 구성되어 allele specific primer와 경쟁을 통해 wild type 핵산의 증폭을 막아 background signal을 감소시켜 돌연변이 서열의 검출을 크게 향상시키는 기술임.
- 이와 더불어 AS primer를 사용하지 않으면서 다수의 wild type의 증폭을 억제하여 돌연변이체의 검출을 용이하게 하는 방법으로 peptide nucleic acid (PNA) clamping <Nucleic Acids Res. 21. 5332 - 5336 (1993), Cancer Res. 65. 7276 - 7282 (2005)>, DiaCarta's xeno-nucleicacids (XNA), (<https://diacarta.com>), 5' -phosphorothioate-modified DNA blockers를 사용하는 Biocept사의 CEEselector assay <Cancer Res .72. 3198 (2012)>를 사용하는 방법이 제시됨.
- 또한 복잡한 온도를 조정하여 blockers의 wild type 주형에 hybridization 하는 선호도를 조절하는 방법으로 구별하는 co-amplification at lowered denaturation temperature PCR (COLD-PCR) (Nat. Med. 14. 579 - 584 (2008), Expert. Rev. Mol. Diagn. 11. 159 - 169 (2011)>와 ICE COLD-PCR assay <PLoS One 6. e25191 (2011), Nucleic Acids Res. 39. e2-e2 (2011)>가 있음.
- 그 외의 신규의 방법으로 RNA oligonucleotids를 primer로 사용하는 Integrated DNA Technologies 사의 RNase H-dependent PCR (rhPCR) (BMC Biotechnol. 11. 80 (2011)>이 개발됨.
- 상기의 다양한 방법의 제시 중에 가장 이종 가장 널리 사용되는 형광검출법은 hydrolysis signaling probes (TaqMan) 이며 가장 널리 사용되는 AS primer는 ARMS primer임.
- 실제 Qiagen 사의 theascreen <PLoS One 7. e43842 (2012),>과 Roche사의 cobas (Br. J. Cancer 107. 345 - 351 (2012)>와 같이 임상적으로도 가장 널리 개발된 방법임.
- 그러나 많은 경우 ARMS는 SNP 검출에는 충분한 감도를 가지나, 암 진단과 같은 Somatic mutation 검출에는 아직 한계를 가지고 있음.
- 최근에는 임상시료 특히 liquid biopsy를 위한 blood 시료 내에 존재하는 극소량의 circulationg tumor (ct) DNA가 많은 양의 wild type cell free (cf) DNA 속에 혼재되어 있어 이를 검출 하는 방법은 매우 어려운 기술적 장애 요소가 있음.
- SNP 검출은 0 또는 50% 혼입을 측정함으로 기술적 감도는 큰 제약이 되지 않으나, multiplex로 수행하는 기술적 수요가 있음.
- 현재까지 개발된 주요 기술 방법 중 가장 보편적으로 사용하는 가수분해 프로브 방법 (Hydrolysis Probes)를 사용하는 방법으로 가장 보편적인 TaqMan probe를 사용하는 PCR assay 임

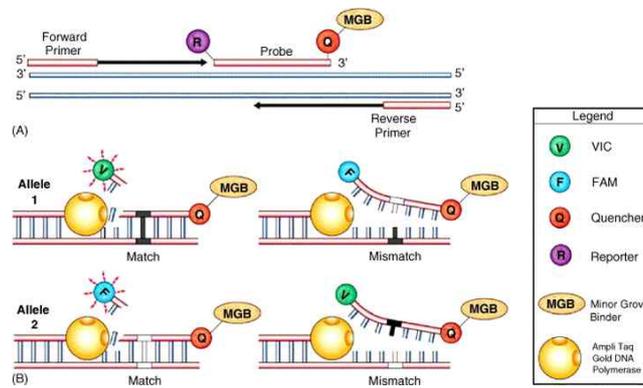


그림 3. TaqMan probe assay의 원리

- TaqMan 분석방법은 PCR 반응시 프라이머와 함께 양 말단에 리포터 (reporter)와 퀀처 (quencher)가 결합된 프로브를 사용하며, 형광 공명 에너지 전달 원리를 이용함 <Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88. 7276-7280(1991)>. 즉, 리포터와 퀀처가 인접되어 있을 경우 리포터로부터 방출된 에너지가 인접한 퀀처로 에너지 전이가 일어나 형광이 검출되지 않다가, PCR 증폭 산물이 증가되면서 표적 유전자에 결합된 프로브가 Taq DNA 폴리머레이즈의 5' → 3' 뉴클레아제 활성에 의해 분해되면서 리포터의 형광이 발산되는 원리임.
- TaqMan™ 프로브는 형광물질을 다양하게 사용하여 SNP 검출 또는 돌연변이 분석이 가능한 장점이 있으나 이 방법에서는 프로브의 특이도를 부여하기 위해서 짧은 프로브를 사용하여야 하며, 이로 인해 Tm 값이 필연적으로 낮아지게 되어 안정한 어닐링 상태 유지가 어려워짐. 이를 극복하기 위해 고가의 MGB (Minor Groove Binder) 프로브 또는 LNA (Locked Nucleic Acid) 프로브를 사용하여야 하는 단점이 있음 <Mol. Cell Probes, 17. 307-311 (2003), Nucleic Acids Res., 28. 655-661 (2000)>
- qRT-PCR에 사용하기 위한 다양한 돌연변이 효소의 개발에 대한 연구가 효소활성의 증대, 기질에 대한 유용성의 증대, 그리고 SNP와 같은 돌연변이 유전자에 대한 구분성 증대변이체 개발 보고가 다수 있음
- 예로 효소 활성이 증가된 돌연변이체 (Ignatov, Miroshnikov et al. 1998), Hot start PCR에 이용이 가능한 저온에서 활성이 약한 (cold sensitive) 변이체 (Kermekchiev, Tzekov et al. 2003) (Wu, Walsh et al. 2015) (Modeste, Mawby et al. 2019), reverse transcription PCR, bisulfite PCR, error prone PCR 등에 이용 가능하도록 rNTP, hydrophobic base analogues 등의 다양한 기질에 대한 이용성이 확장된 변이체 (Suzuki, Yoshida et al. 2000) (Ong, Loakes et al. 2006) ) (Strerath, Gloeckner et al. 2007) (Loakes, Gallego et al. 2009) (Schultz, Gochi et al. 2015) (Fa, Radeghieri et al. 2004) (Loakes, Gallego et al. 2009) [US 9267130B2 (2016) (Martin, Simpson et al. 2016)] US2012/0258501 A1 (Bauer, Myers et al. 2012). Elongation 능력이 증가된 변이체 (Yamagami, Ishino et al. 2014), 혈액, 토양 등 다양한 시료에 포함된 성분에 의한 PCR 억제에 대해 내성을 나타내는 변이체 (Kermekchiev, Kirilova et al. 2009)가 개발 되어 있음
- 이들과 더불어 대립형질 혹은 돌연변이 특이 프라이머의 3' 말단 서열의 일치와 불일치를 구별하는 능력이 증대된 중합효소가 보고됨 [PLos One. 9(5):e96640 (2014) (Drum, Kranaster et al. 2014) (Raghunathan and Marx 2019) ; KR 10-2017-0088373 (2017) (이병철

2017); US 0034879A1 (2013) (Skiragaila, Tubeleviciute et al. 2013); WO 082449A2 (2015) (Marx, drum et al. 2015); US 9,267,120 B2 (2016) (Reichert, Bauer et al. 2016); US 8,759,061 B1 (Marx, Summerer et al. 2014) *Chembiochem* 8 (4) 395-401 (2007) (Strerath, Gloeckner et al. 2007).

- 이들 연구에서 보고된 변이 대상 amino acid residues는 primer와 template, 그리고 incoming nucleotides와 구조상 결합이 되는 것으로 추정되는 amino acids residues 대상으로 집중적으로 변이를 확보하고자 했고 놀랄 만한 성과를 확보했음. 특히, K508W, R536K, R587K, R660V 돌연변이체(Drum, Kranaster et al. 2014) 와 Mut\_ADL 변이체 (변이부위 N483K, E507K, S515N, K540G, A570E, D578G, V586G, I614M) (Raghunathan and Marx 2019) 등은 높은 구분성을 보였고, 또한 활성도 비교적 wild type Taq과 비견할 만한 활성을 가지고 있음.
- 그러나 이들 연구를 제외하고는 polymerase에 대한 돌연변이체 개발이 20년 이상 진행되어 왔으나, 높은 구분성을 가지는 효소 개발에는 성공적이지 못함. 효율적인 library를 구축할 수 있는 전략 (CSR, spCSR, phage display) 과 direct evolution 과 같은 매우 용이한 변이체 제작 및 선별 시스템 등이 개발되었지만 선별에서 inhibitor의 첨가를 통한 내성이 높은 효소의 선별, 혹은 noncanonical substrates 등을 이용할 수 있는 효소의 선별과 같은 선택압 (selection pressure) 혹은 screening system의 설정이 구분성이 높은 효소의 선별에는 별로 용이하지 않았기 때문임
- 그러므로 정확한 target을 기반으로 한 변이를 통해 효소를 선별하는 것이 구분성이 높은 효소 선별의 가능성을 높이는데 매우 중요하며 구분성과 연관된 olymerase의 구조 영역의 발굴은 구분성이 높은 효소개발을 담보할 수 있을 것임.

## (2) 시장현황

- 농축산물 분석 해외 시장 분석 자료는 매우 제한적 이어서 그 규모의 예상이 어려움.
- 단지, 일본의 경우 쌀 품종 분석을 중심으로 한 농산물 품종 분석 제품개발이 있으나, 그 규모는 정확한 통계가 형성되어 있지 않음
- 해외 분자진단시장 규모는 7,710 million \$ (약 8조5천억원)의 매우 큰 시장을 형성하고 있으며 특히 PCR 기술 기반 분자 시장은 2837 million\$ (약 3조 1천억원) 으로 연 평균 성장률(CAGR) 9.1%로 전체 시장의 37%의 시장 지배력을 가지고 있는 것으로 보고되고 있음 (Molecular Diagnostics Market by Application (Infectious Disease (Hepatitis, HIV), Oncology, Genetic Testing), Technology (PCR, DNA Sequencing & NGS), End User (Hospital/Academic Laboratory), Product & Service (Reagent, Software): Global Forecast to 2023 Marketsandmarkets, 2018, 05)

➤ Application

(단위 : USM\$, %)

	2018 (E)	2023 (E)	CAGR
Infectious Diseases	4,231.4 (55%)	5,947.4 (52%)	7.0%
Oncology	1,789.9 (23%)	3,146.4 (27%)	11.9%
Genetic Test	1,066.6 (14%)	1,659.5 (14%)	9.2%
Other Application	625.3 (8%)	789.9 (7%)	4.8%

➤ Technology

(단위 : USM\$, %)

	2018 (E)	2023 (E)	CAGR
PCR	2,837.2 (37%)	4,393.4 (38%)	9.1%
INAAT	1,584.2 (21%)	2,391.7 (21%)	8.6%
DNA Sequencing & NGS	1,251.5 (16%)	2,098.3 (18%)	10.9%
In Situ Hybridization	602.8 (8%)	822.1 (7%)	6.4%
DNA Microarray	544.7 (7%)	788.0 (7%)	7.7%
Other Technology	892.7 (12%)	1,049.8 (9%)	3.3%

INAAT : Isothermal Nucleic Acid Amplification Technology

➤ Product & Service

(단위 : USM\$, %)

	2018 (E)	2023 (E)	CAGR
Reagents & Kits	4,968.5 (64%)	7,640.2 (66%)	9.0%
Instruments	2,327.5 (30%)	3,323.6 (29%)	7.4%
Service & Software	417.1 (6%)	579.4 (5%)	6.8%

Marketsandmarkets (2018년 05월)

그림 4. 세계시장 규모 분자 진단 시장 규모 (Marketsandmarkets, 2018).

(3) 경쟁기관현황

- 분자 진단 분야 원천기술을 보유하고 있는 기업은 Roche Molecular System, Qiagen , Third Wave Molecular Diagnostics, Gen-Probe 등임
- 이들 기업은 세계적인 기술 기업으로 진단시장을 석권하는 글로벌 기업임 단, 이들 기업들의 최근 신규 기술 개발 현황은 뚜렷하지 않음. 이는 기술 수준이 일정 부분 포화된 양상으로 보임 이에 따라 본 과제 기술은 새로운 국제 경쟁기술로의 위치에 다가 갈 수 있는 기회가 될 것임
- 해외 싼 분석 제품의 개발 기관은 일본농림수산성이 대표적이며 다수의 일본의 민간 기업이 분석제품을 개발하여 출시하고 있음.
- 일본은 육안 검사의 한계를 인식하여 DNA 유전자가 검사를 실시하여 수행하며, 주로 SSR 마커를 활용한 방법을 통해 민간 서비스 등을 실시하고 있음.
- 민간 기업으로는 VisionBio사 뷰로베리타스 등 다수이며 이들의 방법은 우리나라의 SNP 분석에 기초하여 하나의 미립에서 DNA를 추출하여 검사하는 방법과 달리 약 50g (약 2,300 미) 검체시료를 분쇄 후, 분쇄 한 샘플의 일부에서 DNA를 추출 분석 하는 방법을 사용함.
- 일본은 농림수산성/종묘관리센터/농업식품산업기술연합기구. 중국은 북경옥수수 연구소/국립벼연구소 등의 연구기관이 있음.

표 5. 분자진단검사 기술의 구분 및 관련 기술 소유 기업

분류	기술	기술소유 기업
Target amplification	Polymerase Chain Reaction (PCR)	Roche Molecular System
	Transcription Mediated Amplification (TMA)	Gen-Probe Inc.
	Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)	BioMerieux(organon Tekrika)
	Strand Displacement Amplification (SDA)	Becton Dickinson Corp.
	Rolling Circle Amplification (RCA)	Qiagen (Molecular Staging Inc.)
Probe amplification	Ligase Chain Reaction (LCR)	Abbot Laboratories
	Cycling Probe Technology (CPT)	ID Biomedical Corp.
	Invader Assay	Third Wave Molecular Diagnostics
Signal amplification	branched DNA (bDNA)Technology	Bayer Diagnostic(Chiron)
	Hybrid Capture (HC) Assay	Digene Corp.
	Hybridization Protein Assay (HPA)	Gen-Probe Inc

자료 : 바이오산업분석(우리투자증권, 2012)

표 6. 일본 쌀 품종 분석 연구 및 분석기관

기관		내용	활용
연구기관	일본 농림수산성	시료 50g을 채취해서 분쇄하여 검사 하는 방법 다른 품종의 혼입 유무를 검사 판정 다른 품종혼입 여부(5%)를 검사	마커개발 SSR-PCR법
분석기관	일본 VisionBio	-약 200여종 벼 품종 식별용 SSR 마커개발	일본 업계 1위 벼 품종 검사 기관 Rice variety identification test
분석기관	일본 뷰로베리타스 재팬주식회사	-멥쌀, 찰쌀 등 259 품종	정성/ 정량 검사 품종특정검사 알 수 없는 품종 판별검사 코시히카리/히카리 니가타 BL 쌀 품종판별검사

#### (4) 지식재산권현황

(쌀 품종 검사 관련 기술 해외 지식재산권)

- 일본이 쌀 품종의 구별에 관한 지식 재산권이 등재되어 있으나, 기타 해외국의 동향은 미진하여 그 방법에 관련한 기술 동향이 거의 전무함.
- 일본의 경우 주로 SSR 마커를 활용한 지식재산권으로 국내의 SNPs 활용을 통한 지식재산권 확보는 거의 없음.

표 7. 일본의 쌀 품종 검사 방법관련 지식 재산권

출원번호	출원일자	발명의 명칭	출원인	
26015547	2014015547	2014.01.30	벼과 식물의 품종 식별법	NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION
20189985	2008189985	2008.07.23	쌀의 품종식별방법	NATIONAL AGRICULTURE; FOOD RESEARCH ORGANIZATION
19106001	2007106001	2007.04.13	쌀 품종 판별용 프라이머(primer) 및 그것을 이용한 쌀 품종 판별방법	TAKARA BIO INC
09040226	1997040226	1997.02.25	벼 품종 식별용 마이크로 새틀라이트 마커 (microsatellite) 및 식물종자의 순도 검사 방법	JAPAN TOBACCO INC GENETIC ID KK MITSUI PETROCHEM IND LTD

(진단 소재 (Taq Polymerase) 개발 관련 해외 지식재산권)

- 해외 특허는 Taq Polymerase 관련특허는 현대 생명공학 기술에 가장 중요한 소재답게 그 정보량이 너무 방대하므로, 본 과제와 관련된 주요 Taqpolymerase 개량에 관련된 특허를 인위적으로 선별 분류함.
- 국내에 등재된 바와 같이 주로 재조방법 (세균 유래 DNA의 혼입방지, 수율증가)과 신규의 Taq DNA polymerase와 유사한 중합효소 개발, 또는 열안정성의 증대, hot start PCR이 가능한 효소, long PCR이 가능한 효소, 임상시료 성분에 대한 내성이 증대된 효소의 개발에 관한 특허가 많았음.
- 관련기관은 생명공학자들이 주로 애용하는 taq polymerase 의 공급 기관인 thermo Fisher, Life Technology, Roche molecular system, Applied bio system등의 서구 회사에서 주로 출원함.
- 주로 미국을 중심으로 한 회사의 지식 재산권 확보가 주를 이루었으나, 2015년 이후로는 신규 특허의 출원이 감소되는 추세임.

(5) 표준화현황

- 쌀은 다양한 품종과 수확량은 중국이 제일 높음 그러나, 중국은 품종의 관리를 위한 법적근거가 없어 유전자 활용 품종구분에 대한 제도가 정비되어 있지 않은 것으로 보임.
- 일본은 쌀 선진국답게 다양한 쌀을 이용한 제품이 개발되고 있으며, 국가적으로 우수한 품종개발과 관리를 위한 제도와 기술 개발을 국가 차원에서 실시하고 있음
- 일본은 벼 계놈 프로젝트의 주도국으로 방대한 벼 유전체 정보를 확보하여 그 정보를 기반으로 일본 농림수산성에 품종 검정법으로 SSR 마커를 이용한 표준방법을 고시한바 있음
- 일본은 표준 거래 및 농축산물의 생산공정 이력 (JAS) 법에 따른 쌀의 품종 등을 표시 함
- 표시 근거로 농산물 검사법에 따라 농산물 검사원의 검사 증명 후에 산지, 품종및 생산년 등의 정보를 표시

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 SNP 구분성을 높이는 DNA polymerase 개발

#### 1. 효소 개량 목표 및 전략

##### 가. 효소 개량 목표

- 본 과제 중심 기술은 qRT-PCR (real time PCR)이다. qRT-PCR은 signalling probe로 hydrolysis dual labeled probes (일명 TaqMan probe)를 사용함으로써 5'→3' exonuclease 활성이 필요하다.
- qRT-PCR 에서 형광 probe의 분해를 위해 5→3' exonuclease 활성이 요구되며, 이러한 활성은 Taq polymerase와 같은 family A에 속하는 PolI 계열의 효소에 존재한다.
- 대립유전자의 구분을 위한 qRT-PCR을 위해, 3' 말단이 비상보적인 AS (allele specific) 프라이머 또는 ARMS (amplification refractory mutation system) 프라이머를 사용하는 PCR 수행이 가장 보편적이며 효율적이다. 이 경우 프라이머 3' 염기 (base)의 매치 또는 미스매치에 따라 돌연변이와 야생형 또는 두 대립 유전자의 증폭 효율이 결정되며 다른 기술에 비해 비교적 좋은 구분성을 나타낸다. 단, 이러한 구별성을 주는 primer를 사용할 경우 구분성을 주는 primer의 분해가 일어나지 않도록 3'→5' exonuclease가 활성이 없어야 한다.
- 상기의 조건에 가장 알맞은 qRT-PCR용 효소는 Taq DNA polymerase와 같은 family A 계열의 효소군이다.
- Taq Polymerase은 3'→5' exonuclease 활성이 존재하지 않음으로 3' mismatched ARMS 혹은 AS PCR primer의 제거가 없으며 또한 Pfu polymerase와 달리 strand displacement 활성이 없고, 대신 nick translation 활성 (5'→3' exonuclease 활성) 이 있다.
- 많은 qRT-PCR에 기술이 개발되었으며 이에 다양한 내열성 Taq DNA polymerase가 개발되어 사용되고 있다.
- 그러나, 수많은 Taq DNA polymerase 의 구조 및 활성 등의 연구와 효소의 개발에도 불구하고 대립유전자의 구별에 용이하게 사용할 수 있는 내열성 DNA polymerase 의 개발은 매우 미진하며, 상용화된 효소가 거의 없다.
- 그러므로 대립유전자 (allele) (또는 SNP, 돌연변이)를 정확하게 구분할 수 있는 높은 구별능력을 가지는 독창적인 효소의 개발이 매우 중요하다.
- 이를 위해 본 과제를 통해  $\Delta Cq$  혹은  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct \text{ of mismatched primer} - Ct \text{ of matched primer}$ )가 6 이상을 나타내는 효소,  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ of mutant Taq} - \Delta Ct \text{ of wild type Taq}$ )가 3 이상을 나타내는 고도의 구분성을 나타내는 효소 확보를 목표로 하였다.

## 나. 기술 개발 전략

- 종종 높은 구별성을 나타내지만 낮은 활성을 가지는 경우 적절한 산업용 효소로 개발하기 어렵다. 그러므로 본 과제에서는 wild type Taq DNA polymerase와 비견할 만한 효소 활성을 가지는 개량 효소 개발하고자 하였다.
- 또한 개발효소를 다면적으로 평가하여 제품에 직접적용이 가능한 가치 높은 산업적 효소를 발굴을 목표로 하였다.

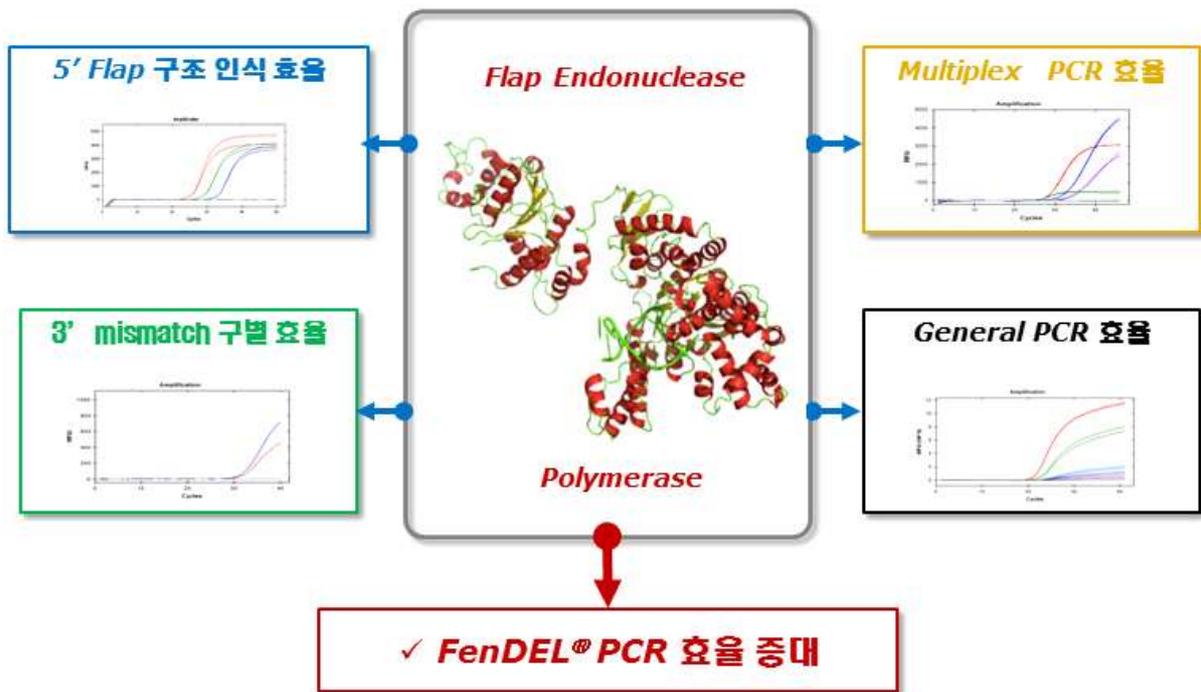


그림 5. Taq DNA polymerase 개발 주안점

- Taq DNA polymerase는 small fragment인 5' nuclease domain (1-288 aa) 과 large fragment인 polymerase domain (289-832) (Stoffel fragment 혹은 KlenTaq)으로 나누어지고, polymerase domain에는 Palm, Finger, Thumb sub-domains이 인간의 오른손 모양의 구조를 형성하여 DNA 이중나선구조와 잘 결합할 수 있는 구조를 형성하고 있다(Ollis, Brick et al. 1985) (Kim, Eom et al. 1995) (Eom, Wang et al. 1996).
- 본 과제에서 효소개발 목표를 달성하기 위해, 상기의 다양한 구조에 관련된 문헌 (논문 및 특허)를 탐색하고, 상기의 구조와 활성과 관련된 영역에 관련된 많은 변이체 정보를 수집하였다.
- 다수의 Polymerase I 구조의 crystal structure 연구를 통해 primer, probe, NTP, 및 Mg<sup>++</sup> 등의 결합과 active site의 위치를 고려한 다양한 amino acid 잔기에 대한 변이 연구가 있었다.

- 주요하게 탐색된 영역으로 motif A (residues 605 - 617)영역 (Patel and Loeb 2000) (Suzuki, Yoshida et al. 2000), O-helix (residues 659 - 671) 영역 (Suzuki, Yoshida et al. 2000), finger domain 의 P α-helix residues (residues 704-707) 영역 (Kermekchiev, Tzekov et al. 2003), nucleotide binding pocket (residues 611-617) 과 stearic gate 관련 amino acid residues (615) 및 Palm domain 의 third β- sheet (residues 597-609) 영역 (Ong, Loakes et al. 2006), Motif C 영역 (Strerath, Gloeckner et al. 2007) 그리고 P' domain (residues 704 - 717) 영역 (Kermekchiev, Kirilova et al. 2009) 이 있다 (표 8).
- 이러한 정보를 토대로 이전까지 탐색이 되지 않은 영역, 예로 FEN domain, 알려지지 않은 중합효소의 primer binding 영역등. 핵심 amino acids target을 발굴하여 주요 engineering target으로 선정하여 개발하고자 하였다.

표 8. Taq DNA polymerase 변이부위 및 응용

mutation point (Important position remarked)	sub-domian or motif	application	references
S543N	Thumb (Klentag)	Circumvent template regions with a complex structure	{Ignatov, 1999 #231} {Ignatov, 1998 #243}
I614K;(mutant53) A608S,I614N;(mutant94) I614N,L614I;(mutant265) A608D,E615D(mutant346)	MotifA (605-617)	incorporatedribonucleotidesatefficiency(10 <sup>3</sup> fold)	{Patel, 2000 #60}
MofifA	MotifA (605-617)		{Patel, 2000 #148}
F73S,R205K,K219E,M236T,E434D,A608V,(T8) K540,D578,N583,M747(H15)		11foldlongerhalf-lifeat97.5°C increasingresistance to acetoinhibitors (Heparin)	{Ghadessy, 2001 #237}
I614K(mutant53) I614M(mutant75) A608D,E615D(mutant346) L605R,L606M,V607K,A608S, L609I,S612R(Mutant212) I614N,L616D(mutant265)	MofifA	high error rate (>20-fold)	{Patel, 2001 #96}
T664P (S, N, I ,R) A597T,E615G,W604G(R),I614T(SFRs)	O-helix (659-671)	higherrorrate(>20-fold) low fidelity (RNAP activity)	{Tosaka, 2001 #95} {Xia, 2002 #227}
W706R,I707L,E708D, E626K,I638F,M658I,V810G,M807L,E681G,Q690R,	codons543-824	Cold sensitive (hot strat PCR)	{Modeste, 2019 #22} {Wu, 2015 #17} {Kermekchiev, 2003 #27} {Davalieva, 2009 #120}
E602V,A608V,I614M,E615G(AA40)	611-617: nucleotide binding pocket/the steric gate residue E615. 597-609:third β-sheet of the polymerase palm	enzymatic synthesis of antisense and RNAi porbes	{Ong, 2006 #224}

Q782L,H784L (LVL)	QVH in Motif C (Q782,V783, H784)	mismatch discrimination (15-fold)	{Strerath, 2007 #102}
E708N (I, Q)	Pdomain	Resistance to PCR inhibitors (blood and curde soil samples)	{Kermekchiev, 2009 #24}
R660V(T), R487H, R536K, R587K, K508Y, R660T, R587I (K), R487V	the amino acid of interest with the phosphate of the primer backbone	applications in allele- and methylation-specific amplification	{Drum, 2014 #32}
E742R(A,E,K,Q,H), A743 (R, A, K, Y, H) combination	N-end of motif 6 in finger domain	elongation ability	{Yamagami, 2014 #36}
A597T,W604R,L605Q,I614T, E615G:SFR3 I614T: AA40, I614E,E615G:SFM19			{Schultz, 2015 #210} {Fa, 2004 #246} {Xia, 2002 #227} {Ong, 2006 #224}
I614Y(E),E615G(A) (SFM30, SFM01, SFM18, SFM01, SFM18, SFM19) I614E,E615G:SFM19 I614T,E615G:SFM01 I614E,E615A:SFM30	IEFYNQ:I614,E615,F667,Y671,N750,G754, RMQVHE:R573,M747,Q754,V783, H784,E786.  template strand: R728,R746,M747,Q754(finger),A570,D578(palm), N483, (thumb) primer strand: V586,(palm), E507, S515, K540, (thumb) incoming nucleoside-5'-O-triphosphate: I614,H639,F667,K663,R659(finger). inproximity to primer strand: V783,H784(palm) both primer and template strand R573(palm)	for incorporation of modified substrates	{Fa,2004#246}
19 positions N483K, E507K, S515N, K540G, A570E, D578G, V586G, I614M (Mut ADL) N483K,E507K,I614K,K540Y,V586G(MutRT)		increased mismatch discrimination and reverse transcriptase activity	{Ragunathan, 2019 #20}
V62I, Y78H, T88S, P114Q, P264S, E303V, G389V, E424G, E432G, E602G, A608V, I614M, M761T, M775T)		HBSs	{Loakes, 2009 #235}

- Taq DNA polymerase는 family A 효소군 유전자의 비교, 필요한 유전자서열의 확보 및 rational design (합리적 설계), 인공유전자 합성 또는 target specific mutation을 실시하여 Taq polymerase를 정제하여 비교 검증하고자 하였다
- PCR 증폭곡선의 Ct (혹은 Cq)와  $\Delta Rn$  (혹은 RFU) 값의 비교, 혹은 사용 효소의 안정성 등에 대한 비교를 수행하여 개량 효소의 성능평가를 수행하고 개발된 개량효소를 multiplex real-time PCR 통해 비교 평가하여 산업적 응용성을 제고하고자 하였다.
- FEN domain linker, O helix, motif A와 같은 지역을 modulation 하여 집중적인 돌연변이를

통해 활성이 변경된 polymerase를 선별하고자 시도하거나, 기존에 보고된 변이영역을 중심으로 한 변이체를 만들어 시험하고자 하였다.

- 필요시 error prone PCR과 같은 random mutation을 수행한 후 compartmentalized self replication (CSR), RACHITT, Domain exchange 와 같은 방법을 통해 engineering 하고자 하였다.
- 그러나 이러한 무작위적인 다수의 변이체 library 확보 및 선별 전략은 구분성을 높은 효소의 선별에 적합하지 않은 전략으로 확인되었으며, 기 보고된 위치의 707, 708, 660, 507, 536 변이 Taq DNA polymerase는 다소 우수한 활성을 보유하고 있으나, 이를 활용할 경우 고유의 기술 사업화시 지적재산권 침해요인이 발생할 수 있고, 또한 변이체의 활성이 보고와 달리 높은 구분성을 보이지 아니하였다 (data 미제시).
- 또한 몇 domain 부위에 대한 random mutagenesis를 집중적으로 수행하고 구분성이 높은 변이체를 선별하고자 하였다. 그러나 이러한 전략은 매우 비효율적이었으며 우수한 신규의 변이체를 확보할 수 없었다. 그 이유는 변이체 선별에 대한 적절한 선택압 (selection pressure)이 없어 대부분의 변이체의 경우 활성이 없거나, 있을 경우도 구분성이 높지 아니 하였다.
- 따라서 신규의 Taq DNA polymerase 개발이 요구되어 이에 집중하고 개발된 Taq DNA polymerase는 지적재산권으로 확보하고자 하였다.
- 이러한 노력을 통해 **본 기술 개발과정을 통해 새롭게 확인한 primer binding site를 집중 변이**하여 우수한 변이체를 다수 선별하고자 하였으며 주 변이방법으로 확보한 target 영역을 목적지향적인 site directed mutagenesis를 수행하여 체계적이고 효율적으로 변이체를 선별하고자 하였다.

다. 효소 개발/생산과 활성 평가 방법

#### (1) Site directed mutagenesis와 Taq DNA polymerase 돌연변이체 제작

- Taq DNA polymerase 유전자를 plasmid pUC18 내의 lac promoter 하류에 위치시켜 단백질이 발현하도록 구축한 vector (pJR-Taq)을 사용하였다. 각 version의 돌연변이체는 구축된 vector pJR-Taq을 template로 하여 site directed mutagenesis로 구축하거나, pET-28a 발현 vector에 구축 하였다.
- 변이를 위한 아미노산에 primers (표 8)을 사용하여 Site directed mutagenesis를 통해 하기와 같이 다양한 돌연변이 Taq를 제작하였다 (**100 여개 돌연변이체를 제작**하여 시험 평가함).

표 9. 돌연변이 부위와 제작에 사용된 primer set

부위	변이체	Oligo Name	Sequence(5'-3')	서열번호
G499	G499R	G499R-F	tttgacgagctaagacttcccgccatcggc	8
		G499R-R	gccgatggcgggaagtcttagctcgtcaaa	9
K505	K505A	K505A-F	cccgccatcggcgctacggagaagaccggc	10
		K505A-R	gccggtcttctccgtagcggcatggcggg	11
	K505E	K505E-F	cccgccatcggcgaaacggagaagaccggc	12
		K505E-R	gccggtcttctccgtttcggcatggcggg	13
	K505S	K505S-F	cccgccatcgggctctacggagaagaccggc	14
		K505S-R	gccggtcttctccgtagaccgatggcggg	15
	K505G	K505G-F	cccgccatcggcggtacggagaagaccggc	16
		K505G-R	gccggtcttctccgtaccggcatggcggg	17
	K505R	K505R-F	cccgccatcggcagaacggagaagaccggc	18
		K505R-R	gccggtcttctccgttctgccgatggcggg	19
	K505F	K505F-F	cccgccatcgggttcacggagaagaccggc	20
		K505F-R	gccggtcttctccgtaagccgatggcggg	21
	K505I	K505I-F	cccgccatcggcattacggagaagaccggc	22
		K505I-R	gccggtcttctccgtaatgccgatggcggg	23
	K505L	K505L-F	cccgccatcggccttacggagaagaccggc	24
		K505L-R	gccggtcttctccgtaaggccgatggcggg	25
	K505M	K505M-F	cccgccatcggcatgacggagaagaccggc	26
		K505M-R	gccggtcttctccgtcatgccgatggcggg	27
	K505W	K505W-F	cccgccatcgggtggacggagaagaccggc	28
		K505W-R	gccggtcttctccgtccagccgatggcggg	29
E507	E507A	E507A-F	atcggcaagacggctaagaccggcaagcgc	30
		E507A-R	gcgcttgcgggtcttagccgttgcggat	31
	E507K	E507K-F	atcggcaagacgaagaagaccggcaagcgc	32
		E507K-R	gcgcttgcgggtcttcttgcgttgcggat	33
	E507S	E507S-F	atcggcaagacgtctaagaccggcaagcgc	34
		E507S-R	gcgcttgcgggtcttagacgttgcggat	35
	E507G	E507G-F	atcggcaagacgggtaagaccggcaagcgc	36
		E507G-R	gcgcttgcgggtcttaccgttgcggat	37
	E507Q	E507Q-F	atcggcaagacgcagaagaccggcaagcgc	38
		E507Q-R	gcgcttgcgggtcttctgcgttgcggat	39
K511	K511A	K511A-F	gagaagaccggcgctcgtccaccagcgcc	40
		K511A-R	ggcgctggtggagcgagcgccggtcttctc	41
	K511R	K511R-F	gagaagaccggcagacgtccaccagcgcc	42
		K511R-R	ggcgctggtggagcgtctgccggtcttctc	43
	K511E	K511E-F	gagaagaccggcgaacgtccaccagcgcc	44
		K511E-R	ggcgctggtggagcgttcgccggtcttctc	45
	K511S	K511S-F	gagaagaccggctctcgtccaccagcgcc	46
		K511S-R	ggcgctggtggagcgagaccggtcttctc	47
	K511G	K511G-F	gagaagaccggcggtcgtccaccagcgcc	48
		K511G-R	ggcgctggtggagcaccgccggtcttctc	49
	K511V	K511V-F	gagaagaccggcgctcgtccaccagcgcc	50
		K511V-R	ggcgctggtggagcgaaccgccggtcttctc	51
	K511I	K511I-F	gagaagaccggcattcgtccaccagcgcc	52
		K511I-R	ggcgctggtggagcgaatgccggtcttctc	53

	K511L	K511L-F	gagaagaccggccttcgctccaccagcgcc	54	
		K511L-R	ggcgctggtggagcgaagccggtcttctc	55	
	K511M	K511M-F	gagaagaccggcatgcgctccaccagcgcc	56	
		K511M-R	ggcgctggtggagcgcgcatgccggtcttctc	57	
	K511F	K511F-F	gagaagaccggcttccgctccaccagcgcc	58	
		K511F-R	ggcgctggtggagcgaagccggtcttctc	59	
	K511Y	K511Y-F	gagaagaccggctatcgctccaccagcgcc	60	
		K511Y-R	ggcgctggtggagcgatagccggtcttctc	61	
	K511W	K511W-F	gagaagaccggctggcgctccaccagcgcc	62	
		K511W-R	ggcgctggtggagcgccagccggtcttctc	63	
	R512	R512A	R512A-F	aagaccggcaaggcctccaccagcgccgcc	64
			R512A-R	ggcggcgctggtggagccttgccggtctt	65
R512E		R512E-F	aagaccggcaaggaatccaccagcgccgcc	66	
		R512E-R	ggcggcgctggtggattccttgccggtctt	67	
R512S		R512S-F	aagaccggcaagtcttccaccagcgccgcc	68	
		R512S-R	ggcggcgctggtggaagacttgccggtctt	69	
R512G		R512G-F	aagaccggcaagggttccaccagcgccgcc	70	
		R512G-R	ggcggcgctggtggaaccttgccggtctt	71	
R512K		R512K-F	aagaccggcaagaagtccaccagcgccgcc	72	
		R512K-R	ggcggcgctggtggacttcttgccggtctt	73	
R512F		R512F-F	aagaccggcaagtcttccaccagcgccgcc	74	
		R512F-R	ggcggcgctggtggagaacttgccggtctt	75	
R512I		R512I-F	aagaccggcaagatttccaccagcgccgcc	76	
		R512I-R	ggcggcgctggtggaatcttgccggtctt	77	
R512L		R512L-F	aagaccggcaagcttccaccagcgccgcc	78	
		R512L-R	ggcggcgctggtggaagcttgccggtctt	79	
R512M		R512M-F	aagaccggcaagatgtccaccagcgccgcc	80	
		R512M-R	ggcggcgctggtggacatcttgccggtctt	81	
R512V		R512V-F	aagaccggcaaggttccaccagcgccgcc	82	
		R512V-R	ggcggcgctggtggaaccttgccggtctt	83	
R512W		R512W-F	aagaccggcaagtgttccaccagcgccgcc	84	
		R512W-R	ggcggcgctggtggaccacttgccggtctt	85	
R512Y		R512Y-F	aagaccggcaagtattccaccagcgccgcc	86	
		R512Y-R	ggcggcgctggtggaatacttgccggtctt	87	
R512H		R512H-F	aagaccggcaagcactccaccagcgccgcc	88	
		R512H-R	ggcggcgctggtggagtgttgccggtctt	89	

- Pfu DNA polymerase로 (Enzynomics, Korea) PCR 수행한 후 제한효소 *DpnI* (Enzynomics, Korea)구매 회사)을 처리하여 변이되지 않은 template DNA를 제거하고 변이된 plasmid를 *E. coli* DH5a 에 형질 전환하여 변이 plasmid를 확보하였다.
- 확보된 plasmid의 목적 서열 부위의 염기서열 변이를 염기서열 분석 (sequencing)하여 확인하였다. Vector의 Taq 유전자이의 다른 부위의 서열 변이를 최소화하기 위해 확보한 각각의 변이 plasmid를 *KpnI/BamHI* 으로 절단하여 약 1.3 kb의 단편을 얻고, 이를 *KpnI/BamHI* 으로 pJR-Taq을 절단하여 1.3 kb 가 제거된 단편 3.8 kb 와 ligation하여 *E. coli* DH5a 에 형질 전환하여 각각의 변이체를 발현용 vector를 제작하였다.

## (2) Taq DNA polymerase의 발현을 위한 배양

- Taq DNA polymerase 발현을 위한 vector 들은 *E. coli* MV1184 (*ompT+*) 혹은 *E. coli* DH5a (DE3) (*ompT-*)에 도입하여 사용하였다. Taq의 단백질 발현을 위해 *E. coli*을 LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 배지에서 37 °C에서 8시간 전배양을 하여 2X YT 배지 (1.6% tryptone, 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl)에 전배양액 1% 접종하여 37 °C에서 본배양을 수행하였다. 배양액의 O.D. 600 값이 0.4 ~ 0.6 이 되었을 때, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 약 4시간 배양하였다.
- 배양이 완료된 배양액을 얼음물에 담그어 냉각후에 원심분리 (10,000 x g, 10 min, 4 °C) 하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 배양액의 1/10의 완충액 A [50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]로 현탁후 원심분리 후 회수하는 방법으로 2회 반복하여 배지성분을 제거한 후, 배양액의 1/20~1/40의 완충액 A에 재현탁하여 준비하였다.

## (3) Taq DNA polymerase의 조정제 시료 제조

- 배양액 100 ml에서 확보된 균체 현탁액 (실험예2)로부터 Taq DNA polymerase를 조정제한 다. 균체 현탁액을 초음파파쇄기를 이용하여 (2 mm tip, amplitude 25 %, 9.9 s/3 s (on/off), 5 min) 균체를 파쇄한 후 원심분리(10,000 x g, 10 min, 4 °C) 하여 상등액을 회수한다. 상등액에 RNase를 50 μg/ml 되도록 첨가하여 37 °C에서 30분 반응 후, 75 °C에서 20분간 열처리한 후 원심분리(10000 x g, 10 min, 4 °C) 하여 상등액 (4.0 ml)을 회수하여 조정제 시료를 확보한다. 이 시료를 단백질 정량후 Taq DNA polymerase 활성 비교 실험에 사용한다.

## (4) Taq DNA polymerase의 고순도 정제

- 4.5 L 배양액에서 확보된 균체 현탁액으로부터 Taq DNA polymerase를 고순도로 정제하였다. 균체 현탁액 (100 ml)을 초음파파쇄기를 이용하여 (13 mm tip, amplitude 90 %, 5.5 s/9.9 s (on/off), 1 h) 균체를 파쇄한 후 원심분리(10,000 x g, 10 min, 4 °C) 하여 상등액을 회수하였다. 여기에 5%가 되게 streptomycin sulfate를 첨가하여 30분 동안 교반후 원심분리 (10,000 x g, 10 min, 4 °C) 하여 상등액을 회수하였다.
- 이 액을 75 °C에서 20분간 열처리하고 다시 시료를 원심분리 (10,000 x g, 10 min, 4 °C)하여 얻어진 상등액을 0.45 μm syringe filter(sartorius)로 여과하였다. 여과 용액에 단백질 석출을 위해 포화도 65% 가 되도록 ammonium sulfate를 첨가하여 4°C에서 한 시간 지난후 침전물을 원심분리 (10,000 x g, 10 min, 4 °C)하여 회수하여 10 ml의 완충액 A로 현탁하였다.

- 현탁액을 투석막 (dialysis membrane, Spectra/Por, MWCO: 12-14 KDa)에 넣고, 4 L의 완충액 A에서 하룻밤 투석을 하여 염을 제거하였다. 제염된 용액을 0.45  $\mu$ m syringe filter(sartorius)로 여과하여 FPLC [AKTA, UPC-900]로 정제하였다.
- 컬럼 크로마토그래피는 DEAE sephacel (30 ml in XK26/20 column, GE healthcare), SP sepharose (20 ml in XK16/20 column, GE healthcare), heparin sepharose (10 ml in HR16 column, GE healthcare)의 순으로 진행하였다.
- 이때 컬럼의 평형화를 위해서는 완충액 A (DEAE sephacel 과 heparin sepharose 컬럼)와 완충액 B [20 mM HEPES(pH 6.9), 1 mM EDTA, 1  $\mu$ M PMSF] (Q sepharose 컬럼)을 사용하고, 용리는 1 M KCl이 든 A와 B 완충액을 사용하여 농도구배로 단백질을 용리하였다. 각 컬럼 단계에서의 Taq DNA polymerase 가 포함된 용리 분획을 회수하여 VIVASPIN20 (MW:50,000)으로 여과공정을 수행을 하였다.
- 이 여과공정은 제염 또는 활성시험을 위한 세척과 농축을 위해 수행하였으며, 각 컬럼공정에서 회수한 분획을 VIVASPIN20 (MW:50,000)으로 농축 후 다음 단계의 완충액 완충액 A 혹은 B 약 15 ml로 2회 반복하여 세척여과 하였다.
- 다음 단계 컬럼을 위해서는 10 내지 20 ml의 동일 완충액으로 용해하여 다음 컬럼에 적용하거나, 시험에 따라 적절한 용액으로 용해하여 시험하였다. 또 얻어진 각 정제단계 혹은 최종 정제된 Taq DNA polymerase는 SDS-PAGE (12% polyacryl amide gel electrophoresis) 와 Bradford assay reagent (Sigma사)을 사용하여 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 정량하여 비교하였다.
- 조정제 혹은 정제된 Taq DNA polymerase는 최종농도 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 1  $\mu$ M PMSF, 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMDTT, 50% glycerol 저장 완충액으로 혼합하여 -70°C에 보관하면서 시험에 사용하였다.

#### (5) 변이체 Taq DNA polymerase 활성의 비교

- 정량된 단백질량을 일정하게 맞추어 아래의 일반 PCR (conventional PCR)방법으로 수행한 후 전기영동하여 변이 Taq DNA polymerase와 wild type Taq DNA polymerase의 활성을 비교 측정하였다 (그림 6).
- Lambda phage DNA (10 pg, 바이오니아)를 template로 사용하며, 각 10 pmol의 lambda-F (5'-GGTGCTTTATGACTCTGCCGC)과 lambda-R (5'- AGCGCCCTTCCTGGTATGC)를 primer로 사용하고, PCR buffer [10 mM Tris-Cl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM KCl, 0.6 M Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 0.03% tween20, 3 mM dNTP]에서 94°C (5분) 후, 94°C(30초)-55°C (30초)-72°C (30초)를 30 회 반복 반응하고 72°C (7 분) 반응 후 종료하여 DNA 증폭 산물(500 bp)의 생성을 전기영동으로 확인하였다.

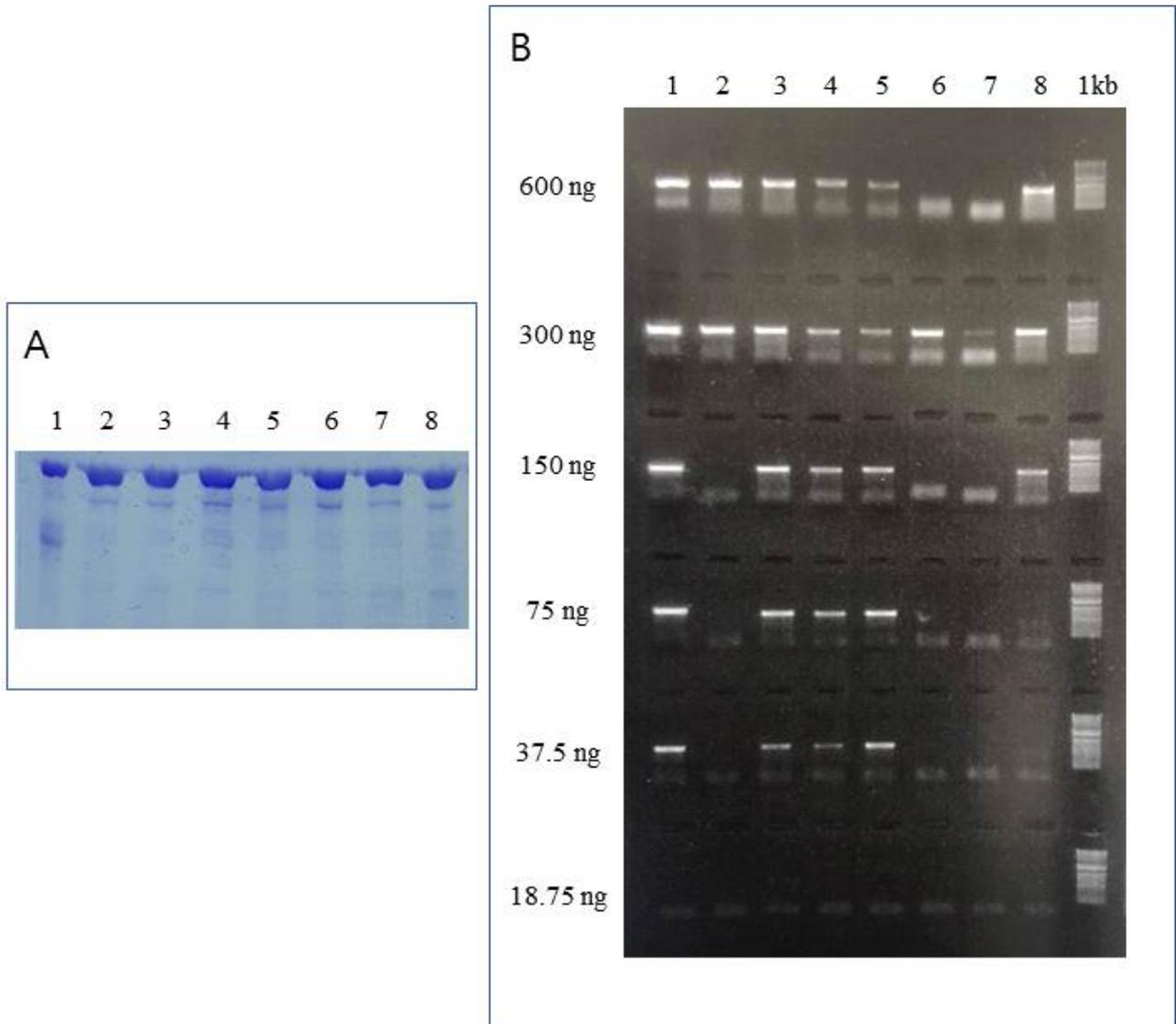


그림 6. Taq 변이체 활성비교 (시험예)

A. Taq 변이체별 조정제 단백질 시료의 SDS-PAGE

B. Taq 변이체별 단백질양에 따른 활성의 비교 확인

#### (6) 구별성 확인을 위한 Real time PCR

- 구별성을 평가하기 위한 target (서열 미기입)은 주로 암에서 발견되는 변이유전자이며 이를 통한 평가는 보편적인 대립유전자 구분에 효과적인 것일 것으로 판단되었다. 별도의 언급이 없을 경우 본 연구개발 과제에 사용한 PCR의 조성물 및 조건은 아래와 같다.
- PCR에 사용한 주형 (template) DNA는 각 목적 검출 유전자 BRAF c.1799 rc. A>T (p.V600E) (이하 BRAF-V600E)의 정상 혹은 돌연변이 서열 및 EGFR c.2369 C>T (p.T790M)

(이하 BRAF-T790M) 정상 혹은 돌연변이 서열의 DNA를 인공 합성하여 pTOP Blunt V2 (Enzynomics, Korea) 에 삽입하여 제작하여 대장균에 형질전환후, 배양하여 정제된 plasmid DNA를 제한효소로 절단, 정제후 정량하여  $2 \times 10^7$  copy/reaction이 되도록 하여 사용하였다.

- BRAF-V600E 변이의 구분성을 확인하기 위해서 전방 프라이머 5'-GGGACCCACTCCATCGAGATTTCT-3'; 후방 프라이머 5'-AACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAG-3'; 시그널 프로브 5'-FAM - CTGTGAGGTCTTCATGAAG - BHQ1-3' 를 셋을 사용하고. EGFR- T790M 변이 구분성을 확인하기 위해서는 전방 프라이머 5'-AGCCGAAGGGCATGAGCTGCA-3'; 후방 프라이머 5'-AGTGTGGACAACCCCCACGTGTGC-3'; 시그널 프로브 5'-FAM-CGGTGGAGGTGAGGCAGATG-BHQ1-3'를 사용하였다. 특히 전방 프라이머는 각 목적 검출 유전자 BRAF-T790M 과 BRAF-V600E 돌연변이의 변이 검출을 위해 최종 3' 말단 염기가 변이유전자와 맞게 (matched) 되나, 정상 유전자와 1 base가 틀리도록 (mismatched) 설계된 AS (allele specific) primers이다. 각 프라이머는 10 pmol/reaction 프로브는 20 pmol/reaction을 사용하였다.
- BRAF-V600E 구분을 위한 PCR은 95°C(5분) 후, 95°C, 30초 - 55°C(1분)로 50회 반복하여 수행하며, EGFR-T790M 구분을 위한 PCR은 95°C(5분) 후, 95°C(30초) - 55°C(40초)로 50회 반복하여 수행 하였다.
- PCR 수행시 완충용액은 10 mM Tris, pH 9.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM dNTPs, 60mM KCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이 되도록 하여 전체 부피 20 μl 가 되도록하여 CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 PCR을 수행한다. 단지 실험에 따라 KCl의 농도를 달리하거나 betaine 등을 첨가하거나, 효소의 종류 (wild type 혹은 돌연변이체 Taq DNA polymerase)나 그 양을 달리하여 사용하였다. 개발된 DNA polymerase의 Matched와 mismatched의 구분성은  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct \text{ of mutant template} - Ct \text{ of wild type template}$ ) 혹은  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ of mutant Taq} - \Delta Ct \text{ of wild type Taq}$ )를 구하여 평가하였다.

라. Taq DNA polymerase의 primer 결합 영역의 규명

(1) 대장균 발현 모균주에 따른 Taq DNA polymerase의 분해

- 배양 및 발현된 Taq DNA polymerase를 DEAE 컬럼 크로마토그래피 정제단계에서 Taq DNA polymerase를 분획을 완충용액 A로 VIVASPIN20 (MW:50,000)으로 여과공정을 수행하고 이를 SDS-PAGE 로 단백질을 확인하였다.
- 이 과정 중에 OmpT 변이주인 *E. coli* BL21 (DE3)(*ompT*-)에서 발현한 Taq DNA

polymerase의 분해가 일어나지 아니하였으나, OmpT 변이주가 아닌 *E. coli* MV1184 (*ompT+*)에서 발현한 wild type Taq DNA polymerase가 정제 중에 일부 분해가 일어남을 확인하였다 (그림 7 A).

- 동일한 과정 수행시, 특히 *E. coli* MV1184 (*ompT+*)에서 발현된 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerases의 정제 과정 중에 더욱 많은 분해가 일어남을 확인하였다 (그림 7 B).
- 즉 정제 과정에서의 Taq DNA polymerase의 분해는 발현 모균주에 따라 명백히 다른 양태를 보였으며, E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerases에서 더욱 확연하게 일어났다.

### (2) 높은 농도의 KCl에 의한 Taq DNA polymerase의 분해 억제

- 상기에서 관찰된 Taq DNA polymerase의 분해는 정제과정 중, 즉 DEAE 컬럼 크로마토그래피에서 수득한 Taq DNA polymerase를 완충액 A를 사용하여 VIVASPIN20 (MW:50,000)으로 여과를 하는 세척과정 중에서 급격하게 일어났다.
- 이러한 taq DNA polymerase의 분해 현상에 대한 면밀한 관찰을 위해 배양, 정제된 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE sephacel 크로마토그래피 정제단계의 분해를 확보하였다. 이 분획 시료 50  $\mu$ l (약 4  $\mu$ g protein / $\mu$ l) 을 완충액 A 만을 사용하는 것 (0 M KCl)과 완충액 A 에 100, 300, 500 mM의 KCl이 든 완충액A를 사용하여 VIVASPIN20 (MW:50,000, 50 ml 용량)으로 여과공정을 수행한 후에 각 여과 시험구와 동일한 농도의 KCl이 든 완충액 A로 각각 용해하여 수득하였다.
- 각 시험구의 용해 Taq DNA polymerase를 SDS-PAGE로 확인한 결과 0 mM KCl의 경우 분해되어 약 33 KDa 와 약 60 KDa 의 단백질 단편이 새로이 관찰되었고, 원래의 DNA polymerase가 매우 감소하였다.
- 그러나, 100 mM 이상의 KCl이 포함된 완충액 A를 사용한 여과의 경우는 미 처리구와 차이가 없었다. 이로 보아 Taq DNA polymerase 분해가 고농도 KCl에 의해 억제되는 것을 알 수 있었다(그림 7B).

### (3) DNA에 의한 Taq DNA polymerase의 분해 억제

- E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE sephacel 크로마토그래피 정제단계의 분해를 확보하였다.
- 이 분획 시료 약 50  $\mu$ l (약 4  $\mu$ g protein / $\mu$ l)의 시료에 DEAE 컬럼크로마토 그래피에서 Taq DNA polymerase가 용리된 후에 나오는 수득한 분획 (BP)을 2배 부피 (100  $\mu$ l) 로 혼합한 후 여과공정을 수행하였다. 완충액 A로 VIVASPIN20 (MW:50,000)을 사용하여 여과공정 수행한후 완충액 A 250 ul로 녹여 회수한 시료를 SDS - PAGE로 단백질의 분해를 확인하였다.

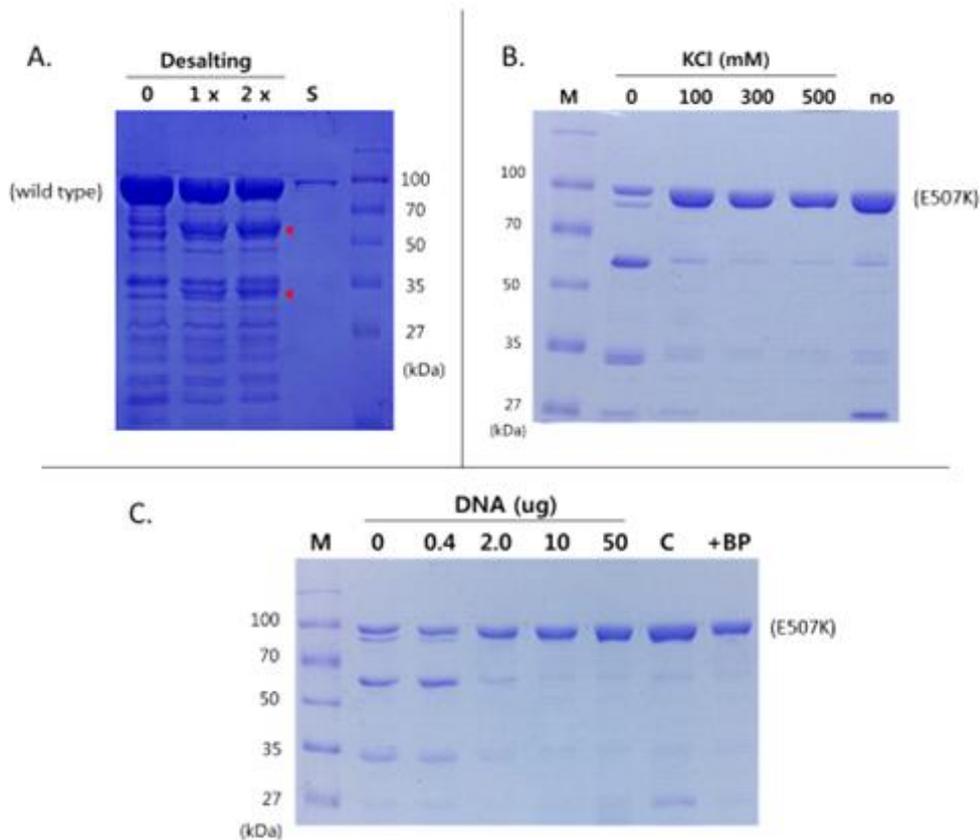


그림 7. Taq DNA polymerase의 SDS-PAGE 사진.

*E. coli* MV1184 에서 발현한 wild type Taq DNA polymerase의 분해 (붉은색 화살표, 분해되어 생긴 단백질 띠(protein band), 세척은 DEAE 컬럼 크로마토그래피 정제품에서 KCl을 제거하기 위해 완충액A를 사용함, S는 wild type Taq 정제품 표준 (0, 여과시험 미실시; 1x, 1회 여과; 2x, 2회 여과; S 표준 Taq DNA polymerase)

*E. coli* MV1184 에서 발현한 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE 컬럼 크로마토그래피 정제품을 KCl 농도가 각 0, 100, 300, 500 mM이 포함된 완충액 A를 사용하여 여과(치환) 한 시료의 SDS-PAGE 사진

*E. coli* MV1184 에서 발현한 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE 컬럼 크로마토그래피 정제품에 salmon sperm DNA를 0, 0.4, 2.0, 10, 50, ug을 혼합하거나 DEAE 컬럼 크로마토그래피 에서 Taq이 용리된 이후의 분획들의 모음(BP)을 혼합 한 후 완충액 A를 사용하여 여과(치환)한 시료의 SDS-PAGE 사진, M, protein size marker; C, 무처리 시험구; BP, BP를 혼합한 시료

- 그 결과 놀랍게도 BP를 미혼합 한 시료는 Taq DNA polymerase의 분해가 일어났으나, BP를 혼합한 시료는 분해가 일어나지 아니 하였다 (그림 7 C).
- 이때 사용한 BP는 Bradford 측정과 SDS PAGE 상에서 단백질이 거의 포함되어 있지 않았으나, 핵산 (~50 ng/ $\mu$ l)이 다량 포함되어 있었다. 이로 유추해 볼 때 분해의 억제인자는 미지의 단백질이기 보다 DNA와 같은 핵산으로 추정이 되었다.
- 이러한 결과에 따라, 상기의 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE sephacel 크로마토그래피 정제단계의 분획 50 ul에 각 0.4, 2.0, 10. 또는 50  $\mu$ g DNA (salmon sperm nucleic acid, Sigma)를 혼합하여 준비한 시료로 상기와 동일한 여과공정을 완충액 A로 수행하였다.
- 그 결과 2.0  $\mu$ g 이상의 DNA를 처리한 시험구에는 Taq DNA polymerase 가 BP처리 시험구와 같이 Taq DNA polymerase가 분해되지 아니하였다(그림 7 C).
- 이는 명백히 단백질 분해효소 (OmpT protease 추정되는)에 의한 Taq DNA polymerase의 분해를 핵산 (DNA) 이 막는 것이다.
- 즉 흥미롭게도 Taq DNA polymerase의 분해부위가 DNA와의 결합에 중요한 부위 또는 DNA와 결합하는 부위와 연관되어 있음을 의미하는 매우 중요한 결과이다.

#### (4) Taq DNA polymerase의 분해 위치의 결정

- 배양, 정제된 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase의 DEAE 컬럼크로마토그래피 단계에서 수득한 시료(순도 96% 이상)를 완충액 A를 사용하는 여과공정으로 세척한후, 완충액 A로 회수하여 ~10 $^{\circ}$ C에서 완전히 분해가 일어나도록 하였다 (그림 8).
- 분해된 산물을 SDS-PAGE로 확인하였을 때 큰 절편(large fragment)이 약 60 KDa와 작은 절편(small fragment)이 33 KDa 크기였다 (그림 8).
- 두개의 절편이 전기영동된 gel을 잘라 각 단편을 회수하여 아미노산 서열의 분석하였다. 그 결과, 명확한 절단의 위치는 특정하지 못했으나 60 KDa 단편이 Taq polymerase의 N-terminal 단편으로 33 KDa 단편이 C-terminal 쪽으로 확인되었으며 (서열 분석 결과 미첨부),

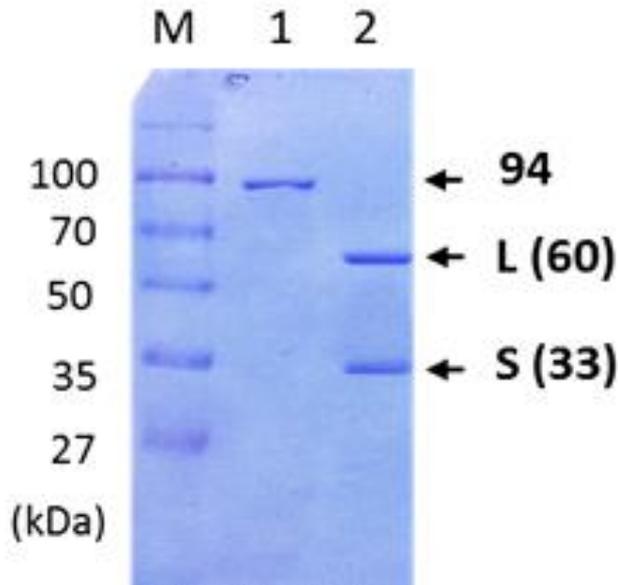


그림 8. Taq DNA polymerase의 분해 산물의 SDS-PAGE 사진

1, 미처리구; 2. 분해처리구; M, size marker

L, large fragment; S, small fragment

- 이를 토대로 보다 정확한 절단위치를 확인하고자 33 KDa의 amino (N) 말단의 서열을 분석하였다 그 결과 33 KDa 단편의 N 말단의 서열이 R-S-T-S-A 임을 확인하였다(그림 9).

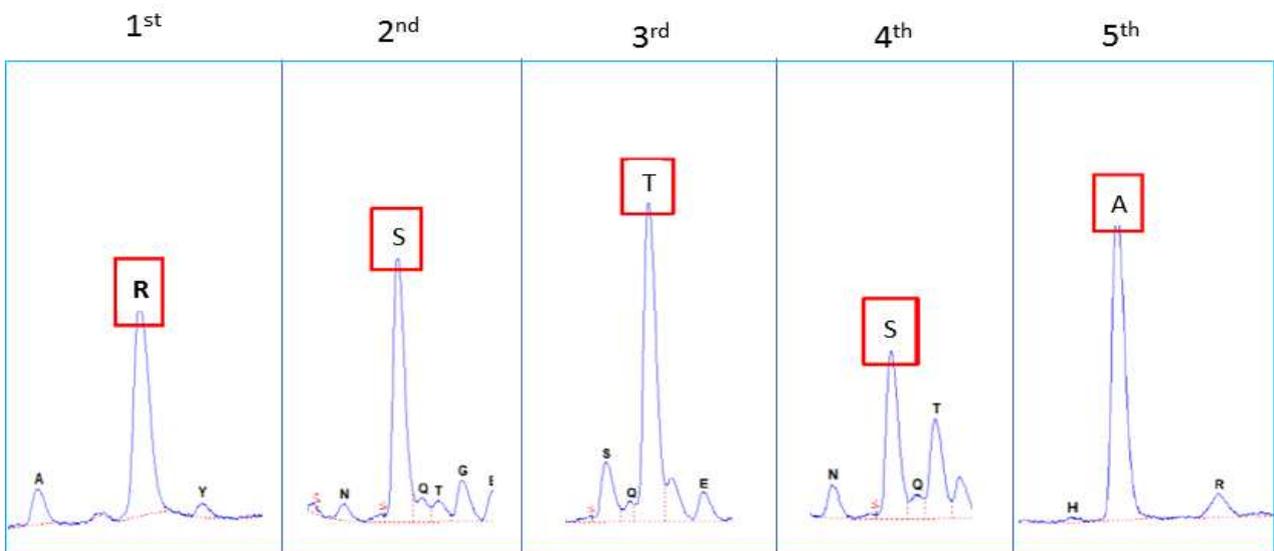


그림 9. 33 kDa fragment의 N-말단 amino acid 서열 분석 결과 (GC 결과- redrawing)

- 이에 상응하는 Taq DNA polymerase 상의 서열은 R512-S513,-T514-S515 이며 이에 따라 절단부위가 K511 과 R512 사이로 결정되었다 (그림 10).

```

MRGMLPLFEP KGRVLLVDGH HLAYRTFHAL KGLTTSRGEP VQAVYGFSAK
LLKALKEDGD AVIVVFDKA PSFRHEAYGG YKAGRAPTPE DFPRQLALIK
ELVDLLGLAR LEVPGYBADD VLASLAKKAE KEGYEVRIIT ADKDLYQLLS
DRIHVLHPEG YLITPAWLWE KYGLRPDQWA DYRALTGDDES DNLPGVKIGIG
EKTARKLLEE WGSLEALLKN LDRLKPAIRE KILAHMDDLK LSWDLAKVRT
DLPLEVDFAK RREPDRERLR AFLERLEFGS LLHEFGLLS PKALEEAPWP
PPEGAFVGFV LSRKEPMWAD LLALAAARGG RVHRAPEPYK ALRDLKEARG
LLAKDLSVLA LREGLGLPPG DDPMLLAYLL DPSNTTPEGV ARRYGGEWTE
EAGERAAALSE RLFANLWGR L EGBERLLWLY REVERPLSAV LAHMEATGVR
LDVAYLRALS LEVABEIALR BAEVFRLAGH PFNLNSRDQL ERVLFDELGL
PAIGKTEKTG KRSTSAAVLE ALREAHPIVE KILQYRELTK LKSTYIDPLP
DLIHPRTGRL HTRFNQTATA TGRSSSDPN LQNIPTVTP L GQRIRRAFIA
EEGWLLVALD YSQIELRVLA HLSGDNLR V FQEGRDIHT ETASWMPGVP
REAVDPLMR AAKTINFGVL YGMSAHRISQ ELAIPYEEAQ AFIERYFQSF
PKVRAWIEKT LEEGRRRGYV ETLFGRRRYV PDLEARVKS V REAAERMAFN
MPVQGTAADL MKLAMVKLFP RLEEMGARM L QVHDELVLE APKERAEAVA
RLAKEVMEGV YPLAVPLEVE VGIGEDWLSA KE

```

Theoretical  
 pI / Mw:  
 5.68 / 57326.94

PI MW  
 7.26 / 36601.24

그림 10. Taq DNA polymerase amino acids 서열과 분해 위치

- Taq의 이론적인 전체 PI 값은 약 6.0 이나, 특이하게도 small fragment는 PI 값이 상대적으로 높은 PI 7.26높고 계산된 분자량보다 SDS-PAGE 상에서 낮게 분자량이 측정되었으며, 반대로 large fragment 는 SDS-PAGE상에서 높게 측정되었다.
- 흥미롭게도 분해위치인 K511과 R512는 연속되는 두개의 positive charged amino acids로 구성되어있으며, 이들 주위 아미노산은 positive charged가 다수 존재하여 높은 PI값을 보였다 (그림 11).

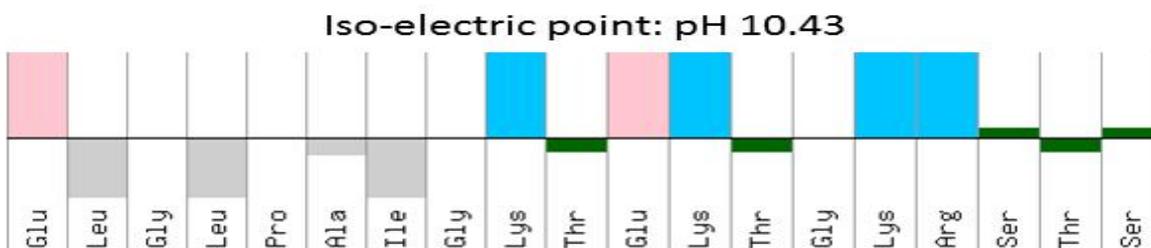


그림 11. 분해부위의 주위영역의 PI 값.

- 이러한 연속되는 positive charged amino acids는 대장균의 막성 protease인 OmpT의 선호하는 절단부위로 잘 알려져 있다.
- OmpT의 절단부위 양 옆에 있는 수개의 amino acids residue에 (P6에서 P'6) negative charged amino acid가 존재할 경우 protein이 OmpT에 의한 절단이 현저하게 억제됨이 보고되어 있다 (Hritonenko and Stathopoulos 2007, Schechter and Berger 2012).

- Wild type Taq DNA polymerase 보다 E507K 변이가 포함된 Taq DNA polymerase가 더욱 잘 분해되었는데 (그림 7 B 와 C), 이는 OmpT protease의 기질 인식 부위 P5 위치에 해당하는 Taq DNA polymerase의 E507이 negative charged amino acid (glutamic acid, E) 에서 positive charged amino acid (lysine, K) 로 바뀌었기 때문으로 여겨진다.
- 즉 E507K 변이체 Taq 단백질이 wild type Taq 단백질보다 E507K로의 변이에 의해서 OmpT에 대한 기질 친화력이 커져 인접한 연속되는 positive charged amino acids residues 인 K511 과 R512 [P1(K) - P1'(R)]의 peptide bond가 쉽게 OmpT protease에 의해 절단된 것으로 설명이 된다 (그림 12).

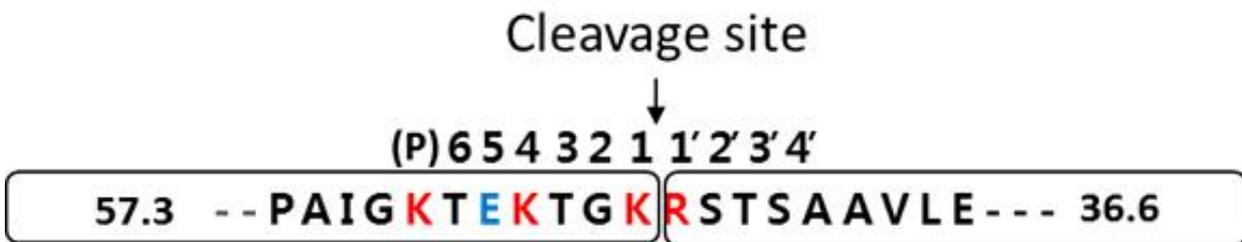


그림 12. Taq DNA polymerase의 절단의 위치 (cleavage site) 및 OmpT 인식 부위 (P).

- 높은 농도의 KCl에서의 Taq DNA polymerase 분해 억제는 KCl에 의한 OmpT protease의 분해활성의 저해로 추정된다.
- 또한 DNA에 의해 Taq DNA polymerase의 분해가 억제되었는데 (그림 7 C) 이로 볼 때 OmpT가 인식(interaction) 혹은 절단하는 DNA polymerase 부위는 DNA와 결합하는 영역임을 알 수 있으며,
- 그러므로 명백히 Taq DNA polymerase 절단부위 (511 및 512) 및 그 주변부위는 DNA와 결합하는 영역임을 알 수 있다.

#### (5) Taq DNA polymerase의 구조와 분해 부위

- 분해가 일어나는 K511-R512의 부위는 Taq DNA polymerase의 Thumb domain의 Tip에 해당하는 작은  $\alpha$ -helix 구조를 가지는 Ha(487-496) 와 Hb(515-521) 사이의 loop 영역 (497~514) 안에 존재 한다 (그림 13 및 그림 14).

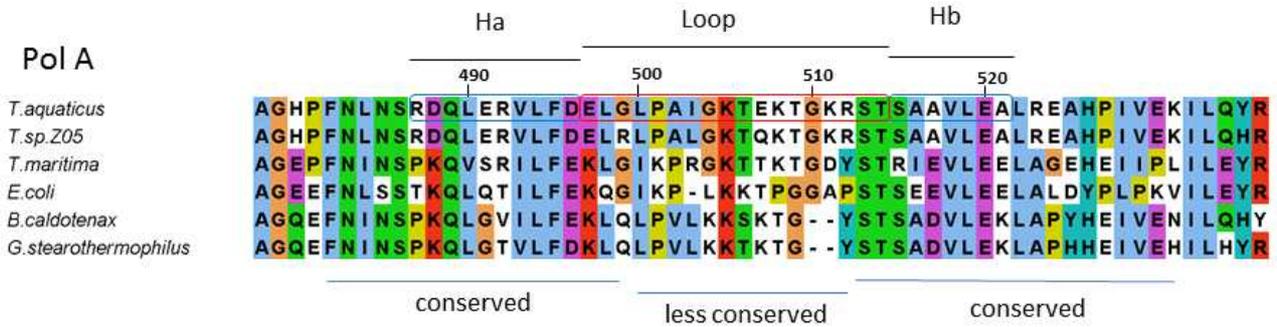


그림 13. Primer와 결합을 하는 amino acids가 집중된 DNA 중합효소의 영역

*T. aquaticus*, *T. sp. Z05*, *T. maritima*, *E. coli*, *B. caldotenax*, *G. stearothermophilus* 의 DNA 중합효소의 영역 중에 Taq DNA 중합효소의 loop 영역 (497~514)과 그 인근 영역의 비교

- Ha 및 Hb는 family A DNA polymerase들 간에 높은 유사성(homology)을 가지는 보존된 (conserved) 영역이며, 이에 비해 loop 영역은 이들보다 상대적으로 낮은 보존 (less conserved) 영역으로 구성되어 있다.
- 매우 흥미롭게도 이 영역에는 negative amino acid가 거의 없고 positive charged amino acids는 다수가 포함되어 있는 특징이 있었다.
- Taq DNA polymerase의 Thumb subdomain에 존재하는 Ha(487-496) 와 Hb(515-521) 사이의 loop 구조는 primer의 영역 근처에 존재하는 것으로 예측하였으나 (Kim, Eom et al. 1995), 이 영역의 중요성에 대해 본 과제에서의 연구이전에는 알려지지 않았다.
- 그 이유는 이 영역이 결정구조 형성시 높은 비정형성 (highly disordered state)을 보여 정확한 primer와 같은 기질과의 구조적 연관성을 명확히 규명하지 못했기 때문이다.
- 이 부위의 구조를 protein data base (PDB, <https://www.rcsb.org/>)에 있는 Taq DNA polymerase와 DNA의 결합의 결정구조 DB인 3KTQ 정보를 사용하여 PyMOL (<https://pymol.org/2/>) 프로그램으로 면밀히 살펴보았다.
- 그 결과 이 loop 구조가 primer의 backbone 부위를 감싸고 있는 것으로 확인하였다 (그림 14).
- 이는 본 발명의 DNA에 의한 Taq DNA polymerase의 분해 억제와 연관되어 있음을 잘 보여주는 것이다.
- 이러한 구조적 특성과 Taq DNA polymerase의 분해의 특성으로 볼 때, 이 loop 영역이 DNA (primer)결합과 밀접한 연관성이 있음이 확인되었다.
- Primer 와 interaction하는 Taq DNA polymerase의 이 loop 부위는 PCR의 효율성을 높이거나, 구분성을 증대하는 효소 변이체의 개발에 매우 중요한 부위가 될 수 있다.
- 이 loop 영역의 아미노산은 중요한 변형 (engineering) 대상 영역이 될 수 있으며, 특히 이들 영역에 존재하는 charged amino acid가 1 차적인 변형 대상으로 선택할 수 있다.

- 그 이유로 특히 positive charged amino acid는 primer의 backbone의 phosphate의 negative charge와 정전기적 결합 (electrostatic interaction)이 가능함으로 이들의 변이는 Taq DNA polymerase의 활성 변화, 특히 구분성을 나타내는 polymerase의 특성의 변화를 기대할 수 있을 것으로 추론 되었다.

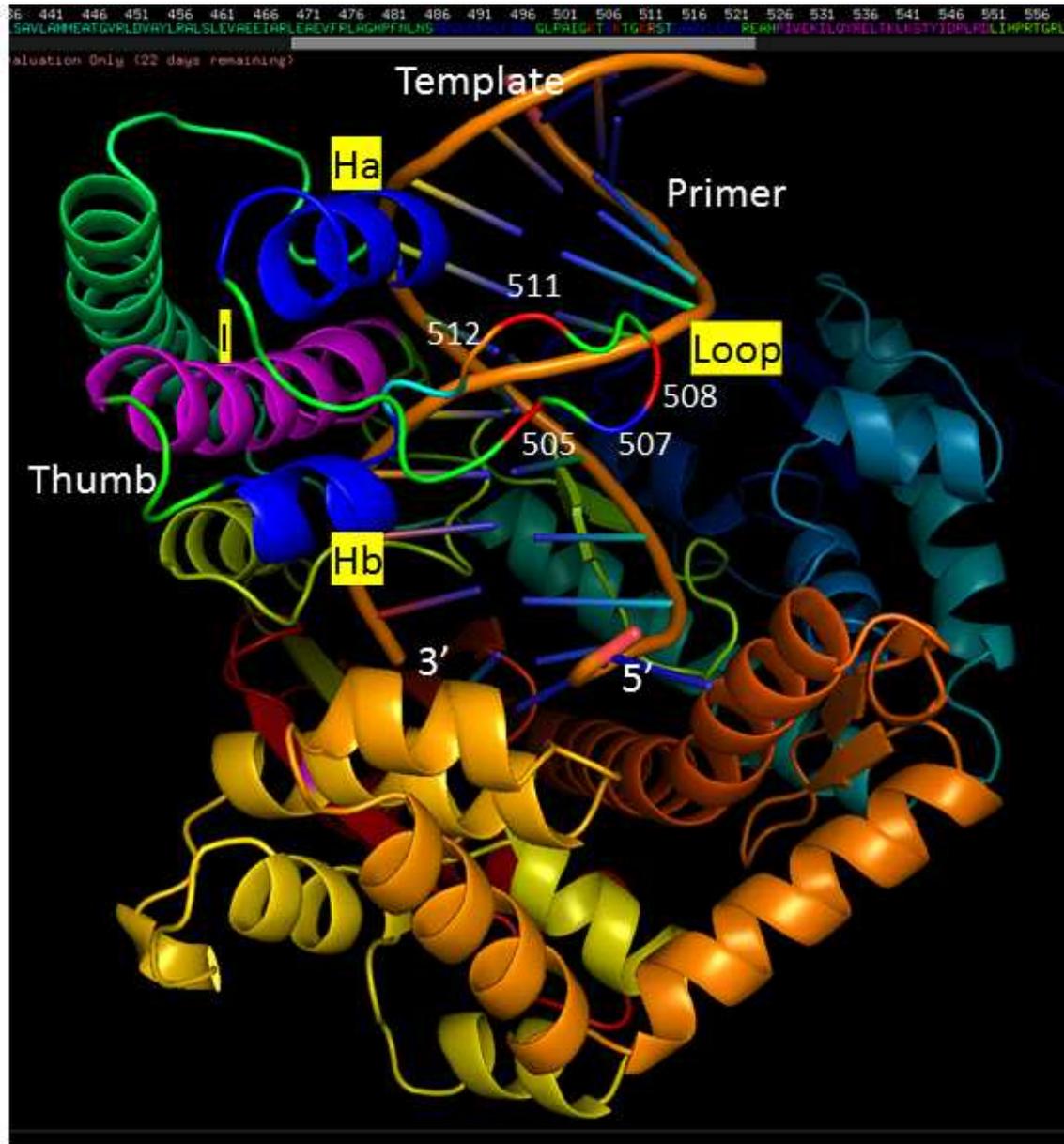


그림 14. Taq DNA polymerase의 loop 구조와 DNA와의 밀접 구조.

Taq DNA polymerase의 Thumb subdomain에 존재하는  $\alpha$ -helix Ha(487-496, 푸른색영역)  $\alpha$ -helix, Hb(515-521, 푸른색 영역)  $\alpha$ -helix I (527-552, 자주색 영역) 와 Loop (497~514, 두 푸른색 영역의 사이, 녹색은 non charged amino acid 잔기) 영역, 숫자는 Taq DNA polymerase의 아미노산 잔기 위치

## 마. Taq DNA polymerase 변이체의 활성 검증

### (1) K511A 변이체 및 R512A 변이체의 활성 검증

- 상기의 추론에 따라서 loop영역 내에 존재하는 여러 아미노산 중에 우선 절단 영역인 positive charged amino acid로 구성된 K511과 R512를 변형하여 본 개발과제의 주요 목적인 구분성과 연관된 변이주의 선별이 가능함을 확인하고자 하였다.
- K511과 R512를 Site directed mutagenesis 방법으로 대표적인 non charged amino acid인 alanine (A)로 변경하여 K511A 및 R512A Taq DNA polymerase 변이체를 제작하였다.
- 이 변이체를 *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현하고 각 변이 Taq DNA polymerase를 조정제하여 활성을 PCR로 활성을 측정한 결과 K511A 변이주의 경우 wild type Taq과 비교 될 만한 높은 활성을 가지고 있었으나, R512A 변이주의 경우 Taq의 활성이 나타나지 않았다.
- 이로 볼 때 K511보다 R512 위치의 positive charged amino acid인 arginine이 primer와의 결합에 매우 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추정되었다.

### (2) K511A 변이체의 matched 와 mismatched PCR 구분성 확인

- 제작한 K511A Taq DNA polymerase를 배양하여 (SDS-PAGE에서 95% 이상의 순도)로 정제하여 matched 와 mismatched PCR을 수행하였다.
- 수행된 PCR 조건에서 K511A Taq DNA polymerase은 wild type Taq에 비해 현저히 높은 구분성을 보였다.
- BRAF-V600E [A와 T 염기 구분] , EGFR-790M [C 와 T 염기 구분]을 대상으로 K511A 변이체의 3'-미스매치 구분성을 확인하였다.
- 그 결과 K511A Taq DNA polymerase를 사용한 real time PCR에서 matched 와 mismatched에서 높은 구분성을 나타내었다 (그림 15).

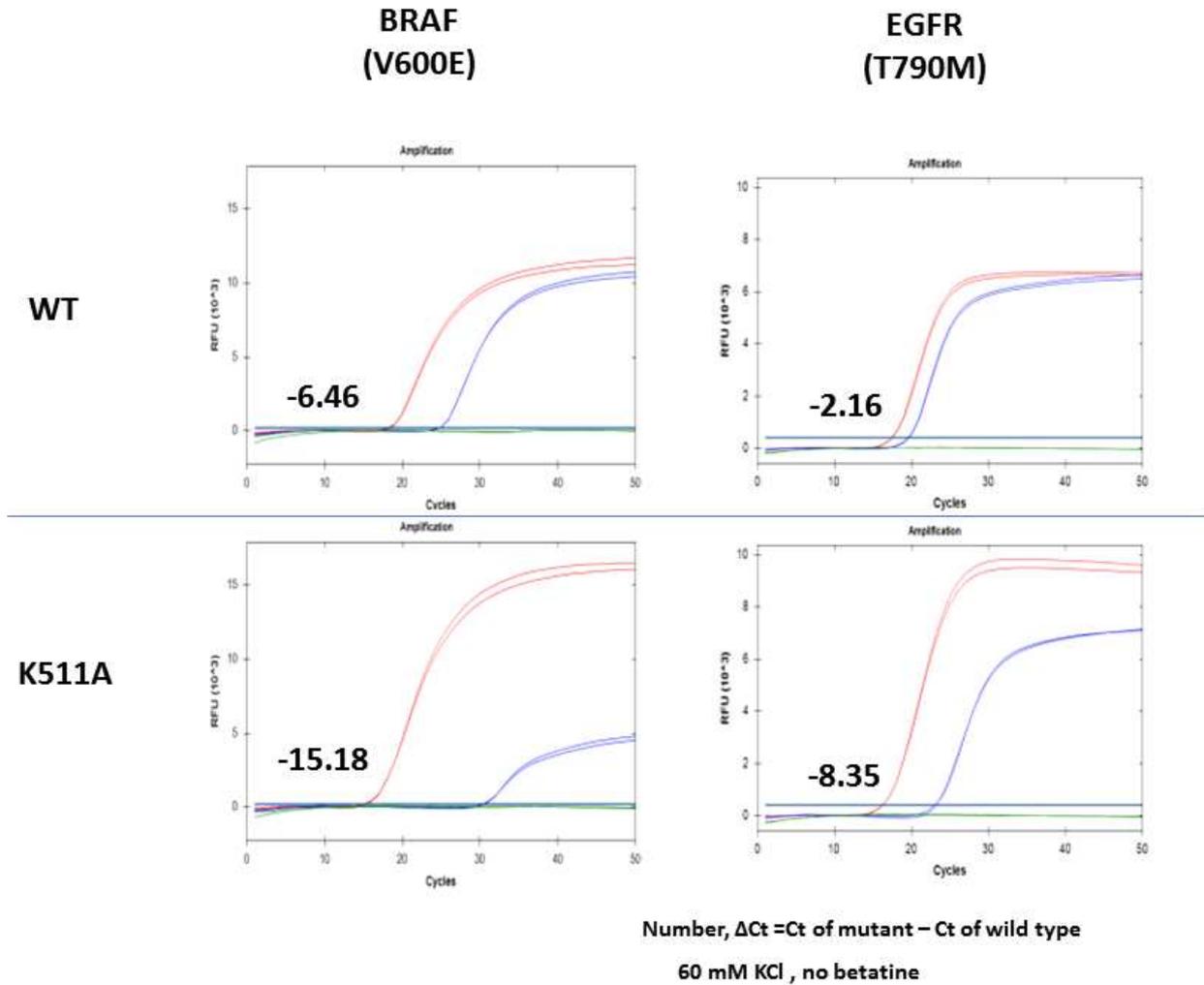


그림 15. K511A Taq와 wild type Taq를 사용한 Real time PCR 결과.

Template는 BRAF-V600E 및 EGFR-T790M의 정상 DNA 및 변이 DNA를 사용함. 숫자는 정상 DNA를 사용한 real time PCR의 Ct 값에서 변이 DNA를 사용한 real time PCR의 Ct 값을 뺀 값임. WT, wild type Taq DNA polymerase를 사용함. K511A, K511A 변이 Taq DNA polymerase를 사용 함.

(3) Loop 내 영역의 charged amino acid 돌연변이체 제작 및 그 활성

- 이 loop 내의 영역 중 charged amino acid인 G499, K505, E507, K508, K511, R512를 선택하여 20개의 amino acids인 대표적인 amino acid 몇 종류 [A, G, S, K(orR), E]를 포함하여 다수의 변이체를 만들어 그 활성과 변이 구분성의 정도를 확인하였다.
- 각 변이체는 각 primer set을 사용하여 site directed mutagenesis 로 제작 하였다.
- 변이체는 *E. coli* BL21(DE3)를 모균주료하여 배양하고 조정제하였으며, 이 조정제 시료를 사용하여 활성을 시험하였다. 조정제된 각 Taq DNA 시료를 Bradford assay로 정량하여 약 600 ng의 단백질을 시작으로 2배 (300 ng), 4배 (150 ng), 16배(75 ng) 32배 (37.5 ng) 희석하여 PCR 반응을 수행하여 평가하였다 (표 10).

- 그 결과 K505, K508, K511, R512의 positive charged amino acid를 negative charged 인 glutamic acid로 바꾸었을 때 (K505E, K508E, K511E, R512E) polymerase 활성이 나타나지 않았다. 그러나 같은 positive charged amino acid로 바꾸었을 때 Polymerase 활성이 여전히 매우 높았다.
- 이로 볼 때, positive charged amino acid인 lysine (K)과 arginine(R)이 활성에 매우 중요한 영역임을 확인할 수 있었다.
- 이러한 활성의 소실은 positive charged amino acid가 negative charged amino acid로 바뀌어 이 loop 부위가 DNA (primer)의 backbone의 phosphate와의 결합이 약화됨으로 나타난 것으로 추정된다.
- 이와 반대로 이 loop 내의 유일한 negative charged amino acid인 glutamic acid (E507) 가 lysine(K)으로 변경된 변이체는 오히려 활성의 감소가 없거나 오히려 활성을 높이는 것으로 확인이 되었다.
- 또한 non charged amino acid인 G499를 positive charged amino acid인 arginine (R) 로 변경시 활성의 감소 없이 높은 활성을 나타내었다.

표 10. 과제를 통해 제조된 Taq 변이체와 그 활성

Polymerase	희석배수						활성*	구분성**
	1	2	4	8	16	32		
WT	0	0	0	0	0	0	+++	nd
G499R	0	0	0	0	0	0	+++	-
K505A	X						-	nd
<b>K505G</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>				<b>+</b>	<b>+++</b>
K505S	X						-	nd
K505R	?						?	nd
K505E	X						-	nd
<b>K505I</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>			<b>+++</b>	<b>+++</b>
<b>K505L</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>			<b>+++</b>	<b>+++</b>
<b>K505M</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>			<b>+++</b>	<b>+++</b>
K505W	0	X					+	nd
<b>K505F</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>		<b>+++</b>	<b>+++</b>
E507A	0	0	0	0	0	X	+++	nd
E507G	0	0	0	0	0	X	+++	+
E507S	0	0	0	0	0	X	+++	nd
E507K	0	0	0	0	0	0	+++	-
E507Q	0	0	0	0	0	0	+++	-
<b>K508A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>				<b>+</b>	<b>+++</b>
K508G	0	0	0	X			++	nd
<b>K508S</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>X</b>				<b>++</b>	<b>+++</b>

K508R	O	O	O	O	O	X	+++	+
K508E	X						-	nd
<b>K511A</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>X</b>			<b>++</b>	<b>+++</b>
K511G	X						-	nd
K511S	O	X					+	nd
<b>K511R</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>X</b>		<b>+++</b>	<b>++</b>
K511F	X						-	nd
K511I	X						-	nd
K511L	X						-	nd
K511M	O	X					+	nd
K511Y	X						-	nd
K511V	?						-	nd
K511W	?						-	nd
R512A	X						-	nd
R512G	X						-	nd
R512S	X						-	nd
<b>R512K</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>X</b>		<b>+++</b>	<b>++</b>
R512E	X						-	nd
R512F	O	X					+	nd
R512I	O	X					+	nd
R512L	O	X					+	nd
R512M	?						?	nd
R512V	X						-	nd
<b>R512W</b>	<b>O</b>	<b>X</b>					<b>+</b>	<b>+++</b>
R512Y	O	X					+	nd
R512H	X						-	nd

\*활성은 1/8 이상 희석에서 활성이 나타난 경우, +++; 1/2 이상 1/8 미만 희석에서 활성이 나타난 경우, ++; 1/2 미만에서만 활성이 나타난 경우, +; 원액에서 활성이 검출되지 아니한 경우, - 로 표시함.

\*\*구분성은  $\Delta\Delta Ct$  를 구하여 그 정도를 나타냄.  $\Delta\Delta Ct = \text{wild type (WT) Taq을 사용한 } \Delta Ct (\Delta Ct = Ct \text{ of mutant template} - Ct \text{ of wild type template}) - \text{돌연변이 Taq 을 사용한 } \Delta Ct$ . 시험은 BRAF-V600E의 변이 구분성으로 평가함. 그  $\Delta\Delta Ct$  가 1미만일 경우, -; 1이상 - 3미만일 경우 +; 3이상- 6미만일 경우, ++; 6 이상일 경우, +++로 표시하였다. nd는 시험이 되지 아니 함.

#### (4) Taq DNA polymerase 변이체의 real time PCR의 구분성 비교

- 조정제된 여러 변이 Taq DNA polymerase 중에 활성이 ++ 이상인 변이 단백질 Taq DNA polymerase 조정제 시료를 구분성의 능력정도를 확인을 위한 real time PCR을 수행하였다.

그 결과를 표 10의 구분성에 표시하였다. 구분성은  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ WT Taq} - Ct \text{ of mutant Taq}$ ,  $\Delta Ct = Ct \text{ of mutant template} - Ct \text{ of wild type template}$ ) 를 구하여 그 정도를 표시하였다.

- 시험 변이체들 중에 구분성이 없거나 약한 변이체 (- or +) 는 G499R, E507G, E507K, E507Q 변이체들 이었다.
- 비교적 높은 구분성이 있는 변이체 (++)는 K511R, R512K 이었다.
- 또한 매우 높은 구분성을 나타내는 변이체(+++)는 K505G, K505I, K505L, K505M, K505F, K508S, K508R, K511A, R512W 이었다.

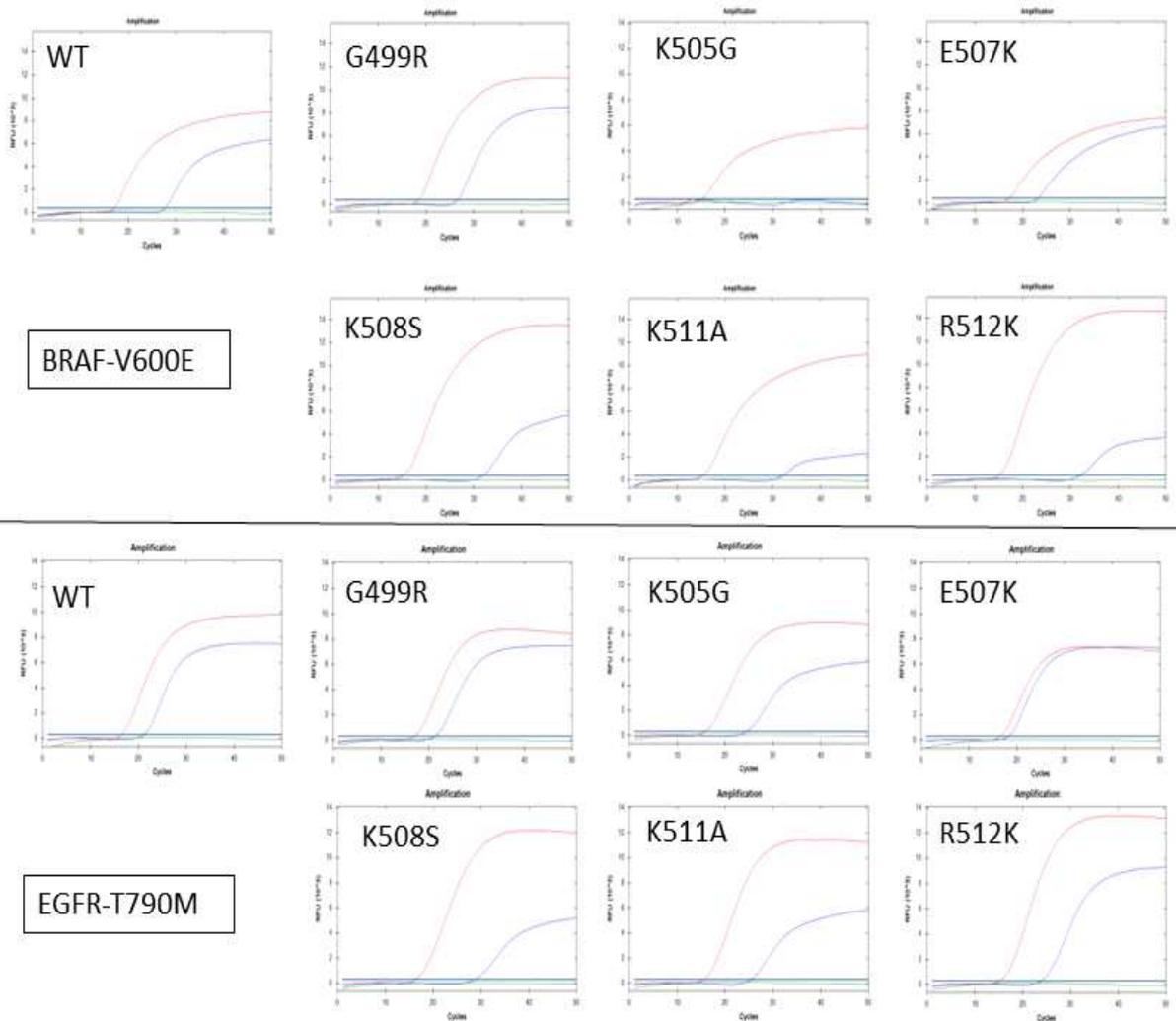


그림 16. 각 부위의 대표적인 변이 Taq 들의 구분성 확인을 위한 real time PCR 결과.

각 변이 단백질이 발현된 *E. coli* BL21(DE3) 균주로부터 조정제한 시료로 시험함. BRAR-V600E 변이 구분성을 시험함. WT, wild type Taq DNA polymeras를 사용; G499R, K505G, E507K, K508S, K511A, R512K 는 해당하는 변이 Taq DNA polymerase를 사용; Template는 BRAF-V600E 및 EGFR-T790M의 정상 DNA 및 변이 DNA를 사용함.

- 결과를 종합적으로 볼때 negative charged amino acid의 도입한 변이체들 (K505E, K508E, K511E, R512E)은 polymerase 활성이 크게 감소하였으며, 이와 유사하게 negative charged amino acid의 제거시 (E507G, E507K, E507Q) 활성은 비교적 높으나 구분성은 높아 지지 아니하거나 오히려 줄어 들었다.
- 흥미롭게도 positive charged amino acid인 K와 R을 상호 변경할 경우 (K511R, R512K) 대부분 활성이 유지되었으며, 이들이 일부 구분성도 증가되었다.
- 각 변이체중에서 높은 구분성을 보이는 변이체(K505G, K505I, K505L, K505M, K505F, K508S, K511A, R512W) 는 non charged amino acid로 바뀌어 있는 것 들이었다.
- 이러한 결과로 유추해 볼 때, 본 발명의 집중 변이 영역인 loop 내에 negative amino acid의 존재는 DNA backbone (primer)의 phosphate와 loop와의 결합이 방해하여 활성의 감소를 초래하는 것으로 추론되고, 이 loop 내에 positive charged amino acid의 존재는 단백질과 primer의 견고한 결합을 유도하여 안정적인 활성의 유지에 도움을 줄 것으로 판단된다
- 결과적으로 이 loop 내에 존재하는 positive charged amino acid를 non-charged amino acid로 변경시 활성의 소실은 최소한으로 하면서 높은 구분성을 보이는데 도움을 주는 것으로 확인되었다.

#### 바. 개발효소의 변이 활성 특성과 구별성에 관한 고찰

- 본 개발 과제를 통해 놀랄 만한 수준의 변이 구분성을 보이는 효소와 그러한 효소를 개발하기 위한 매우 효율성이 높은 탐색영역을 확보하였다. 이영역의 탐색과 구조와 활성과의 관계를 확인한 연구 결과는 본 과제에서 밝힌 것이 첫 보고이다. .
- 본 개발 과제에서 밝힌 영역은 Thumb domain의 Tip에 해당하는 (Ha(487-496) Hb(515-521) (Kim, Eom et al. 1995) (Li, Korolev et al. 1998)사이의 loop 영역 (497~514) (이하 루프(loop) 영역) (그림 13 및 그림 14)에 속하는 부위이다.
- 이 loop 영역은 negative charged amino acids는 거의 없으며, positive charged amino acids가 다수 있어 높은 iso-electric point 값을 나타내는 영역의 특성을 가진다.
- 또한 이 영역은 matched와 mismatched의 구별성이 높은 효소로 알려진 *T. sp.* Z05 (서열 번호 2) DNA polymerase (Z05)의 경우 loop 영역이 Taq과 단지 세 개의 amino acids (R501, L505 와 Q509) 차이가 있다.
- Taq DNA polymerase의  $\alpha$ -helix Ha 와 Hb 영역은 polymerase family A 에서 매우 보존되어 있으나 상대적으로 loop 영역은 보존되어 있지는 않지만 특이하게도 K, R 과 같은 positive charged amino acid가 많이 존재한다.
- 그러므로 이들 영역이 DNA 특히 primer와 결합이 매우 용이하도록 진화된 영역으로 생각된다.
- 즉 이 영역은 DNA polymerase가 DNA가 포함된 상태에서는 분해가 되지 아니 하는 것과

높은 KCl (200 mM) 이상에서는 분해가 되지 아니 하는 것은 이들 영역이 DNA 와 결합하는 매우 중요한 영역임을 제시하는 것이다.

- 이러한 특성은 이들 영역의 집중적 변이는 primer와 DNA polymerase의 결합력의 변화로 인한 여러 가지 활성, 예로 matched primer와 mismatched primer의 구별성, methylation, fidelity등의 효소특성이 변화 될 수 있을 것이다.
- 특히, 본 과제에 목적인 구별성이 증대된 효소 개발에 있어 획기적인 발견 영역이며, 이 부위의 변이에 의해 창출된 변이체 Taq (일례로 K511A)이 3' matched 와 mismatched PCR의 구분성을 높인 것은 이 영역이 primer 결합과 연관된 영역임을 알게 하였다.
- 이 영역은 본 개발과제 연구 이전까지 primer 결합과 관계된 DNA polymerase 영역으로 보고된 적이 없으며 또한 변이체 제작과 활성 탐색이 된 적이 없는 영역이다.
- 변이에 의해 기질의 특이성을 높이면 3' matched primer에서 mismatched primer 보다 PCR이 더 효율적으로 진행되고, nucleotide가 template와 상보되게 정확히 첨가되어 합성의 error 율이 낮아지게 되며, 기질의 특이성을 낮추면 반대로 정상적인 기질인 dNTPs 이외에 rNTP, hydrophobic base analogues 등의 유사기질 혹은 변형기질의 사용이 용이해지는 것, 혹은 error 율이 높아지게 된다.
- 이 루프 영역을 구성하고 있는 원래의 아미노산에서 다른 아미노산으로의 변경, 특히 이 루프영역의 극성 amino acid (residue)을 다른 아미노산으로 변경시 높은 활성의 변화가 이루어 질 것으로 예상할 수 있다.
- 양극성을 띠는 아미노산 (잔기) arginine (Arg 또는 R), histidine (His 또는 H), lysine (Lys 또는 K), 또는 음극성을 띠는 아미노산 (잔기) aspartic acid (Asp 또는 D), glutamic acid (Glu 또는 E) 는 중요한 변이 대상 영역이다.
- 이들 극성의 아미노산은 프라이머 (핵산)의 phosphate backbone (주로 양극성을 띠는 아미노산) 염기 (음극성을 띠는 아미노산)과 결합함으로 이의 변경은 primer 결합능력의 변화를 야기 하게 될 것이다.
- 즉, Taq DNA polymerase에서는 K505, E507, K508, K511, R512에서 선택되어진 아미노산의 변경을 우선적으로 수행 하였다.
- family A의 DNA polymerase에서도 Taq DNA polymerase의 이 루프 영역에 상응하는 영역에서 예로 Z05 를 선택할 경우 (499~517) 영역에서 charged amino acid 인 R501, K507, K510, K513, R515 또한 그 대상이 될 수 있다.
- 본 과제에서 확보한 다양한 변이주 중 특히 주목할 변이주는 G499R, K505G, K505I, K505L, K505M, K505F, E507G, E507K, E507Q, K508A, K508S, K508R, K511A, K511R, R512K, R512W 이며 이들 중 변이의 구분성이 높은 변이주는 positive charged amino acid가 다른 amino acid로 변이된 K505G, K505I, K505L, K505M, K505F, K508A, K508S, K508R, K511A, K511R, R512K, R512W 변이 Taq이다.
- 이러한 변이가 구별성을 높인 이유는 아래와 같이 추론할 수 있을 것이다.

- 이 loop의 내의 변이체의 활성과 구조와의 관계, DNA(primer) 와 loop 내의 amino acid의 정전기적 결합 (electrostatic interaction) 연관성과 이러한 구분성이 연관되어 있을 것이다.
- 이 영역이 DNA binding 영역임을 확인한 것은 본 발명의 일예에서 설명한 *E. coli* 유래의 protease(OmpT)에 의해 절단되어 지는 영역이 이 loop 영역이며, 이 영역은 DNA에 의해 절단이 억제되어 짐을 확인하여 DNA 결합영역임을 확인하였다.
- 이영역은 놀랍게도 DNA polymerase의 변형을 위해 기존에 집중적으로 탐색이 이루어지지 않는 Thumb domain의 Tip에 해당하는 Ha(487-496) 와 Hb(515-521) (Kim, Eom et al. 1995) (Li, Korolev et al. 1998) 사이의 loop 영역 (497~514) 에 속하는 부위이며 (도 1), 이 부위는 아마도 primer 영역의 backbone phosphate 와 결합하는 것으로 예측되는 부위이다.
- DNA 중합을 위한 primers의 결합 영역은 3' matched 와 mismatched를 구분하는 효소를 개발하기 위한 돌연변이의 주요 대상이 될 수 있다.
- 본 연구개발 과제에서 확보한 이영역은 새로운 (3' matched 와 mismatched PCR) 구별성이 증가된 효소의 개발에 매우 중요한 길을 제공할 것이다.
- 이 영역에 있는 charged 잔기 들은 DNA 특히 primer와 DNA polymerase의 결합력을 결정하는 데 매우 중요하게 역할을 하며, 그러므로 이들의 변이는 DNA, 특히 primer의 효소와의 결합력이 변화됨으로 구분성이 증가되거나 혹은 PCR의 증폭활성이 높아지거나, 기질의 특이성이 변화될 수 있는 부위가 되어 향후 Taq engineering의 주요 target이 될 것이 틀림 없다.

#### 사. 개발효소의 응용성의 확장에 대한 고찰

- 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism) 또는 체세포 돌연변이 (somatic mutation)와 같은 소수 대립유전자를 검출하기 위한 중합효소 연쇄반응의 특이도를 높인 대립유전자 검출에 Family A에 속하는 일련의 내열성 DNA polymerases 사용하는 중합효소 연쇄반응 (DNA polymerase chain reaction, PCR) 적합효소의 개발이 필요하다.
- 본 과제에서는 상기 결과들에서 확인 할 수 있듯이, 대립유전자 혹은 SNP의 구별능력이 극대화된 특별한 Taq DNA polymerase 변이체를 다량 확보하는데 성공하였다.
- 개발된 변이체 Taq DNA polymerases(예 K511A)는 프라이머 3' 말단의 염기가 주형과 상보적 (3'-matched)일 때는 중합 (polymerization)이 원활하게 일어나며, 비상보적 (3'-mismatched)일 때는 중합이 어려워 두 경우의 구별 (discrimination)이 극대화된 특별한 효소이다.
- 이 개발된 구분성이 높은 효소는 단일염기변이 유전자형 분석 (SNP genotyping) 및 체세포 돌연변이 검출 (somatic mutation detection) 기술의 응용제품 (예, 품종구별, 개량, 원산지 판별등과 특히 암, 유전병등의 조기. 예후 진단) 개발에 적용 가능하다.
- 암 진단 등을 위한 임상시료 중 생체 조직, 혈액, 분변, 타액 등의 검체 내 변이 유전자의

검출에는 극소량의 변이 DNA 외에 다수의 야생형 DNA가 혼입되어 있어 돌연변이 DNA를 특이적으로 검출하는 방법은 매우 어렵다. 다수의 야생형에 혼입되어 1% 이하의 극미량으로 존재하는 변이를 검출할 수 있는 특이도 (specificity)를 보장할 수 있어야 하며, 임상적 적용을 위해서는 높은 견고성 (robustness)이 있어야 한다.

- 특히, 야생형 서열에 대한 낮은 위양성 및 돌연변이 서열에 대한 높은 특이도를 보여야 한다. 그러한 이유로, 암진단 등의 고감도 진단에 적합하도록, PCR 효율성과 특이성을 높이기 위해 PCR 용액 첨가 조성물을 개발하거나, 특별한 프로브 및/또는 프라이머를 고안하거나, 효소를 개량하는 방법이 모색되어 왔다.
- 개발된 효소들은 상기의 특성을 만족하는 암진단과 같은 영역에 이용될 수 있는 매우 가치 있는 자원이 될 것이다.
- DMSO, 베타인 등의 증폭효율 증대를 위한 시약, DNA 중합효소 억제용 단일클론 항체, 실온과 같은 낮은 온도에서 DNA 중합효소 활성을 억제하는 올리고핵산, 일명 앵타머의 첨가는 종종 DNA 증폭 효율을 증대하고, 비특이적 PCR 산물 증폭이나 프라이머 다이머 (dimer) 형성을 억제한다. 그러나 이들을 첨가했을 때 대립 유전자의 구분성을 증대시키는 것은 어려우나, 이 효소를 사용하여 구분성을 높이고 상기의 여러 첨가물을 사용하는 것도 가능함으로 매우 높은 시너지를 나타낼 것으로 보인다.
- allele 구분을 위해 특이 primer와 probe 등의 사용하는 것으로 문제를 해결하고자 하는 여러 시도가 있었으나, 이들은 기술이 상업화에 성공한 예는 매우 드물다. 이유는 기술적으로 어려우며, 보편적 적용에 한계가 존재하며, 또한 특이 probe나 primer design에 많은 노력과 비용이 요구되었기 때문이다.
- 현재까지 비용과 primer 선택 등을 고려한 가장 접근이 쉽고 효율적인 방법은 대립 유전자의 변이 서열에 따른 3' 미스매치 유무를 통해 대립 유전자를 구분할 수 있도록 AS 프라이머 또는 ARMS 프라이머를 사용할 경우 대립 유전자의 구분성이 향상되므로 이를 많이 채택하고 있다.
- 하나의 염기가 미스매치되는 AS 프라이머를 사용하는 경우 높은 PCR 효율에 비해 종종 대립 유전자의 구분성이 낮으며, 두 개 이상의 염기가 미스매치된 ARMS 프라이머의 경우 AS 프라이머 사용에 비해 대립 유전자의 구분성은 좋아지지만 PCR 증폭 효율이 낮아지므로 빈번하게 검출한계 (LOD; limit of detection)가 저하된다.
- 그러므로 3' 미스매치와 매치의 구분성을 높인 돌연변이 DNA 중합효소를 사용하여 돌연변이 서열의 검출 특이도를 높이고자 그 변이체를 확보하는 노력을 하고 있으며, 본 개발 효소는 이러한 영역의 PCR에 적용이 매우 쉽다.
- 많은 선별을 위한 노력에도 불구하고 지금까지는 그렇게 성공적인 변이체 확보가 이루어지지 않았다. 이러한 구분성을 높이는데 필요한 DNA 중합효소의 구조상의 위치나 영역 혹은 아미노산을 특정하기 어려워 비효율적인 random mutagenesis를 수행하였다.
- 또한 구분성이 높은 돌연변이체 선별을 위한 적절한 선별방법 혹은 선택압을 확립하기가

어려워 효과적인 변이체를 확보하기가 어려웠다.

- 종종 library에서 선별된 돌연변이 DNA 중합효소는 빈번하게 효소 활성이 저하되고 이에 따라 검출 감도도 크게 저하되어 상업적 이용이 높지 않았다.
- 그러므로, 적절한 구분성이 높은 DNA 중합효소의 변이체를 확보하기 위해서는 정확한 효소의 변이 target (영역, 부위, amino acids)을 확보하고, 이 부위에 대해 집중적으로 다양한 변이체를 제작하여 탐색하는 것이 우수한 돌연변이체 확보 성공 가능성을 높이는 것은 당연하다.
- 본 개발 과제에서 확보한 loop 영역은 바로 이러한 문제를 한꺼번에 해결할 수 있는 핵심 영역이다.
- 본 과제에서 확보한 loop 영역에 존재하는 하나 이상의 아미노산의 변이를 통해 기질의 특이성을 높이거나, 기질의 특이성을 좁히는 것이 가능할 것이다.
- 그러므로 다양한 생명공학 분야의 응용에 필요한, 일 예로 reverse transcription 활성을 가지게 하는 것, 증폭 저해요소를 극복하는 것, 특이 기질을 사용한 polymerase 활성을 이용하는 것, 활성을 증대시키는 것 또한 더욱 구체적으로 mismatched 와 matched 의 구별성을 높이는 것 (methylation 을 구분하는 것) 이 가능한 효소를 확보할 수 있는 토대를 마련하였다.

#### 아. 개발 효소의 대량 정제 및 특성 평가

##### (1) 개발효소의 대량 배양 및 정제 (SOP구축)

- 검정 kit은 96 well 단위로 구성되는 제품군으로 효소와 기타 프라이머/프로브 set 등이 다량으로 요구된다.
- 이에 따라 제품생산을 위해 Taq DNA polymerase의 대량 생산, 분리, 정제를 위한 system 이 필요하다. 1회에 4 ~ 6 L 발효 배양하여 이를 회수하여, 몇 단계의 정제 작업을 거쳐 고순도의 제품화 가능한 효소 생산 공정의 확보를 하고자 하였다 (향후 10배 이상의 scale up이 가능함).
- 이에 따라 배양, 조정제, 컬럼크로마토그래피 및 QC 등에 관한 작업 표준서 (SOP 및 단계별 품질요소 및 관리기준) 및 품질 관리 체계(단백질 농도, 순도, 효소활성 등)를 확립하였다.
- 약 20회 이상의 돌연변이체와 wild type Taq DNA polymerase 정제를 통해 시험에 필요한 효소를 공급하여 연구 개발과 제품화에 사용하였다.
- 한 번에 실험종 검정제품 최소 500 kit 이상 제조에 필요한 효소 (~10만 unit/1회) 생산능력을 확보하였다.
- 고순도 및 대량 정제는 그림 17 의 절차에 따라 수행하였다.

- 정제품의 순도는 SDS PAGE로 약 90% 이상을 유지하였다 (그림 18).

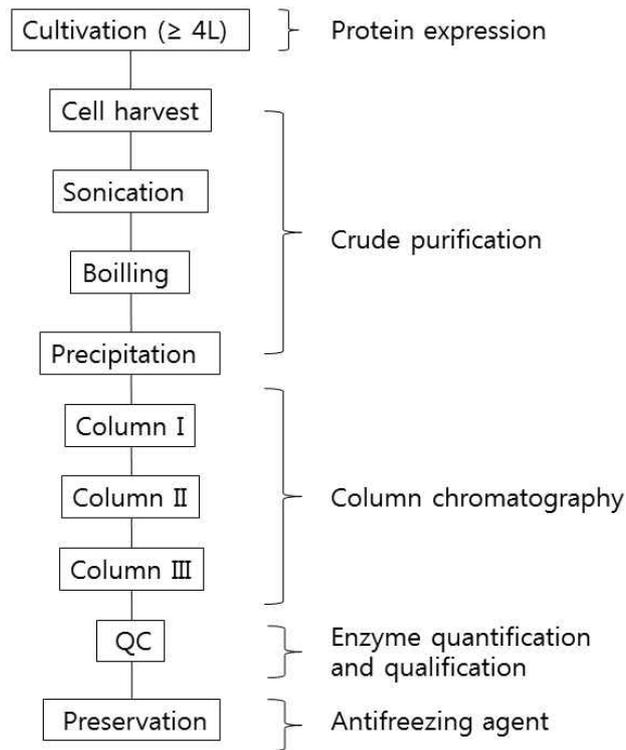


그림 17. Taq DNA polymerase 생산 공정도.

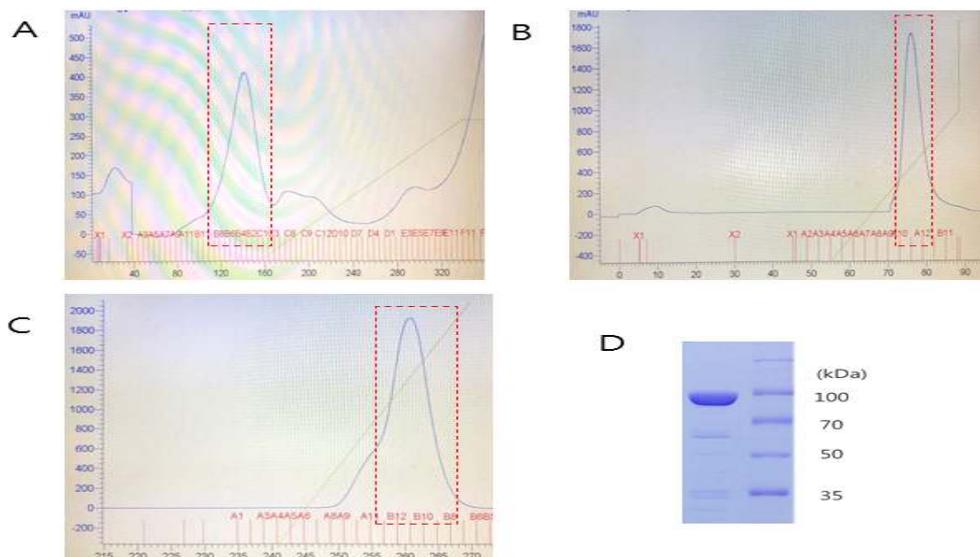


그림 18. Taq DNA polymerase 정제 chromatography 및 정제품.

A. DEAE sephacel column chromatography; B, SP sepharose column chromatography; C, Heparin sepharose column chromatography. D. SDS PAGE of purified Taq DNA polymerase.

(2) 개발효소의 특성 평가

- 개발효소 (K511A)의 산업적 이용성을 확인하기 위해 몇가지의 기본적인 특성을 확인하였다.
- 대량, 고순도 정제한 K511A Taq DNA polymerase를 0 에서 180 mM 까지 KCl의 농도를 점차적으로 증가하면서 K511A의 활성 변화를 wild type Taq과 비교하면서 확인하였다 (표 11).
- Wild type Taq의 경우 높은 KCl 농도에서도 비교적 높은 활성을 유지하였으며, 농도의 증가에 의해 matched와 mismatched의 구별 (discrimination)이 증대되는 경향이 있었다.
- 특히 돌연변이체 K511A의 경우 활성유지를 위한 KCl 농도 범위가 BRAF-V600E 검출의 경우 약 80 mM 까지 EGFR-T790M의 경우 100 mM 까지 유지가 되었으며, 두 경우 모두 농도가 높을수록 구분성이 커지고 낮을수록 구분성이 줄어들었다.
- 또한 betaine (1.25 M) 이 첨가된 조건에서는 K511A의 활성이 조금 더 강해지며, KCl의 농도 범위가 더 확장되어 BRAF-V600E 검출의 경우 약 100 mM 이상까지 EGFR-T790M의 경우 120 mM 이상까지 에서도 높은 활성을 나타내었다.
- 이러한 결과로 볼 때 K511A 돌연변이체를 사용한 matched와 mismatched PCR의 최적의 구분성을 위한 적절한 KCl 및 betaine의 농도 범위는 target 과 primer 혹은 PCR의 조건에 따라 달라질 수 있을 것이다.

표 11. K511A Taq DNA polymerase의 활성과 구분성에 대한 KCl과 betaine의 영향

	polymerase	Ct value	betaine (-)			Add betaine (1.25 M)		
			KCl (mM)			KCl (mM)		
			60	80	100	60	80	100
BRAF (V600E)	wild type Taq	Ct of Mt	18.38	18	16.3	17.7	17.56	17.04
		Ct of Wt	25.54	26.62	28.57	22.68	22.97	23.92
		ΔCt	7.16	8.62	12.27	4.98	5.41	6.88
	K511A Taq	Ct of Mt	15.25	14.84	no signal	16.41	15.78	16.57
		Ct of Wt	31.52	33.36	no signal	29.64	30.68	no signal
		ΔCt	16.27	18.52	nd	13.23	14.9	>16.57
EGFR (T790M)	wild type Taq	Ct value	KCl (mM)			KCl (mM)		
			80	100	120	80	100	120
		Ct of Mt	16.91	16.14	15.82	16.98	16.66	16.98
	K511A Taq	Ct of Wt	19.9	20.64	21.14	18.03	18.34	18.71
		ΔCt	2.99	4.5	5.32	1.05	1.68	1.73
		Ct of Mt	15.6	18.58	no signal	16.19	16.02	16.08
K511A Taq	Ct of Wt	23.96	40.08	no signal	22.48	23.94	25.78	
	ΔCt	8.36	21.5	nd	6.29	7.92	9.7	

(3) 개발 효소의 쌀 품종 판별 kit (제품) 적용 평가

- 상기 개발된 다양한 변이 효소 중에서 구별성도 높고 활성도 높은 K511A를 선별하여 쌀 품종 구별 kit에 적용하여 그 유용성을 시험 하였다. 또한 쌀 품종 판별 kit에 적용한 특허 기술 인 FenDEL 기술에 직접 적용하여 그 유용성을 확인하고자 하였다.

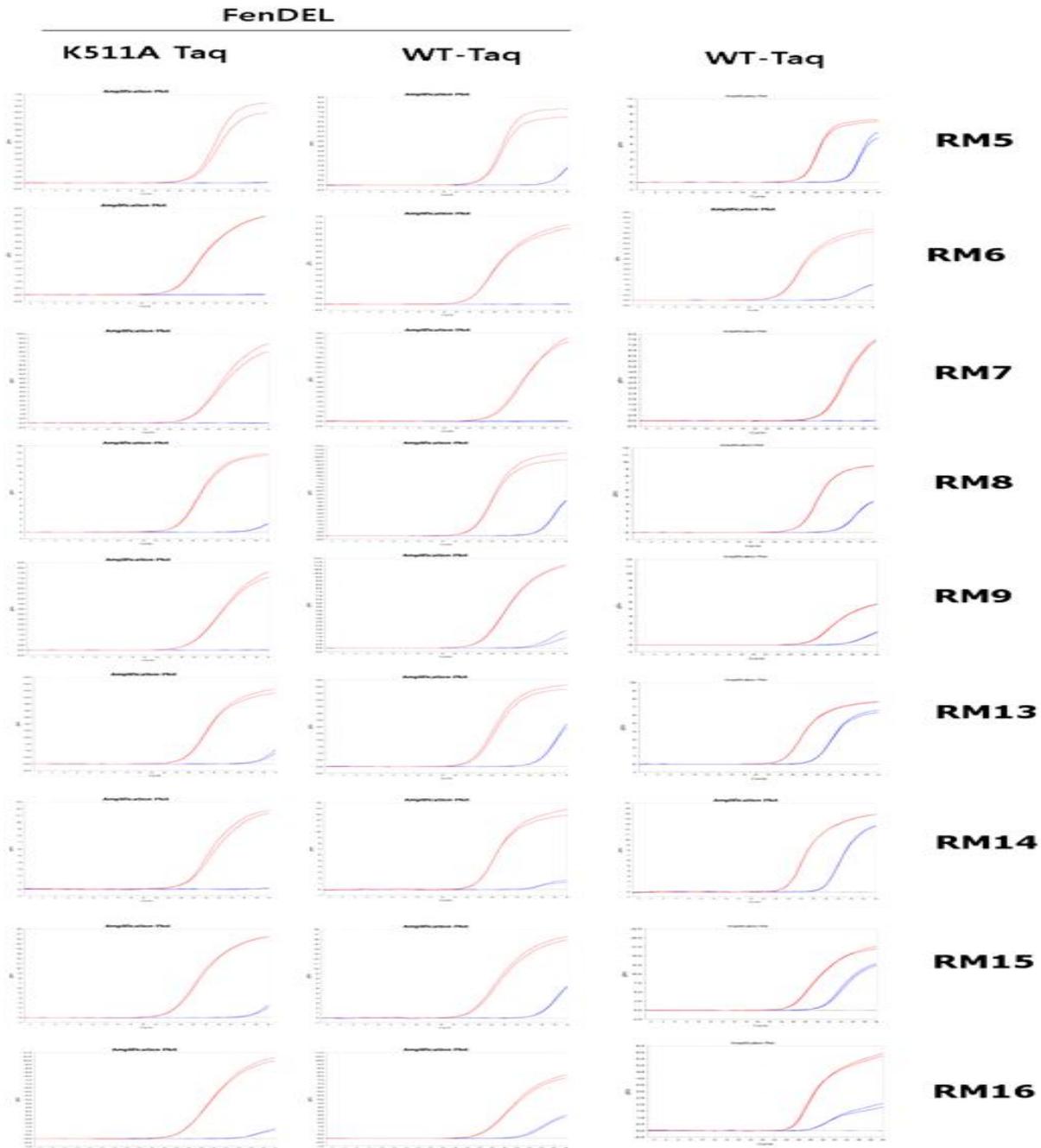


그림 19. 돌연변이 Taq (K511A Taq) 과 FenDEL 기술의 쌀 구별 kit의 적용.

WT-Taq, wild type Taq DNA polymerase; K511A Taq, K511A mutant version of Taq DNA polymerase, 각 3 unit 를 사용함, 쌀 품종 구분용 marker (RM),를 대상으로 각 마커에 대한 표준 genomic DNA를 사용하여 비교함

- 대량 정제하여 확보한 K511A Taq을 wild type Taq 과 비교하여 보았다. 쌀 품종판별을 위한 대표적 마커인 RM5, RM6, RM7 부위의 구별의 정도를 확인하였다 (그림 19).
- wild type Taq만 사용할 경우 구별이 매우 약하였으며, FenDEL 기술을 적용할 경우 크게 구별성이 향상되었다. 그러나 일부의 경우로 완벽하게 대립유전자 검출이 억제되지 아니하였다.
- 그러나 K511A Taq을 사용하고, FenDEL 기술을 적용할 경우 대립유전자 검출이 일어나지 않아 구별성이 크게 증대 되었다 (그림 19).
- 고순도로 정제한 K511A Taq을 사용하여 8개의 품종을 대상으로 (코시히카리, 새일미, 골든퀸 3, 밀키퀸, 백진주, 삼광, 진상, 하이아미)에 대해 각 12미 (알)을 반복하여 시험 한 결과 [검증조건 (35 cycles,  $\Delta Rn$  값 0.3 이상)] 100% (96/96) 일치하게 판정하였다 (첨부 시험자료 1).

## 제 2절 Multiplex real-time PCR 결과 분석용 프로그램 개발

### 1. 분석 프로그램 개발의 배경 방향 (목표)

#### 가. 개발 배경

- 정량적 실시간 PCR (qPCR 또는 real-time PCR) 결과의 표현은 판매 기기의 종류에 의존적으로 표현되며 결과는 통상하나의 결과를 하나의 도식으로 표현한다.
- 그러므로 다수 및 다중(multiplex)의 real-time PCR 결과를 분석자가 일일이 육안으로 확인하는 데에 어려움이 초래된다.
- 여러 개의 PCR 결과를 일목요연하게 볼 수 있으면서도 직관적인 결과의 비교 및 판별이 가능하며, 또한 객관적 수치를 활용한 판별이 병행 될 수 있는 viewer panel 및 tool을 가진 프로그램이 필요하다.
- real-time PCR 분석의 end point의 결과 값만을 활용한 판정의 경우 오염, 핵산 주형(template)의 정량 오류 (핵산 template가 적정 유효 범위를 벗어나 많거나 적거나 할 경우), 시료 내에 존재하는 PCR의 inhibitor (예, 단백질, 저분자 물질, 지질 등)의 존재 등으로 증폭신호 (signal) 값이 크게 변할 수 있다.
- 그러므로 PCR의 curve pattern을 직접 확인하지 않은 단순한 증폭 cycle 값 (Quantification cycle, Cq 또는 cycle threshold, Ct), 또는 증폭 형광 signal 값 (Rn 또는 RFU) 만으로 판정시 판정의 오류가 발생할 가능성이 높다.
- 이에 따라 신뢰도가 높은 판정값을 얻기 위해서는 PCR 수행 전 과정 동안의 monitoring이 가능한 PCR 증폭곡선을 분석자가 확인하여 정상적인 PCR의 진행 여부를 판단해야 할 필요가 있다.
- 다수를 동시에 분석하는 전형적인 상용 real-time PCR system은 다수의 PCR 증폭곡선을 분할된 화면에 동시에 구현해주는 서비스가 없다.

- 그러므로 다수 시료의 PCR 결과를 동시에 모니터에 적절히 보여주는 것이 매우 유효 할 수 있다.
- 분석자가 다수의 real-time PCR 결과로부터 각각 추출하여 결과 값 (예, Ct) 만을 표현, 계산하는 기존의 방식은 오류의 발생 위험과 노동력이 필요하다.
- 또한, PCR 수행에서 발생하는 비특이적 PCR curve 및 비정상적인 PCR curve 및 시료의 종류 및 분석자의 숙련도에 따른 DNA 시료량의 편차에서 발생하는 real time PCR의 결과 값을 보정하여 분석정확도를 높일 필요가 있다.
- 그러므로, 상기의 문제요인을 고려하여 정량적 real-time PCR 결과를 다면적으로 평가하고 비교하여 최상의 판정 값을 도출할 수 있는 사용자의 편리성이 담보되는 다수 및 다중의 real time PCR 분석 프로그램이 필요하다.

#### 나. 개발 방향 (목표)

- 분석용 프로그램은 사용자 편의성, 분석결과 값 판정의 용이성, 분석 data의 시험자 판정 합리성이 담보될 수 있도록 개발하고자 하였다.
- On-line 기반 혹은 stand-alone으로 가동이 될 수 있는 분석 및 viewer 시스템으로 개발하고자 하였다.
- $\Delta Rn$ , Ct value를 다면적으로 비교하여 결과 값을 도출 할 수 있는 data analysis program 을 개발하고자 하였다.
- On line analysis program 혹은 stand-alone으로 가동이 될 수 있는 시스템으로 개발하고자 하였으며, qPCR machines으로 부터 data의 자동 취합 및 분석과 분석결과의 상세한 확인 이 쉬운 program 및 PCR plot의 viewer를 장착한 package system으로 개발 하고자 하였다.
- 분석용 프로그램은 향후 복잡한 signal에 대한 자동 판정이 가능하도록 PCR 결과 값 (Ct,  $\Delta Rn$ )을 내부표준과 비교하여 판정할 수 있도록 개발하였다.
- 분석용 프로그램은 4개의 probe의 형광 값을 구별하여 표시할 수 있도록 구성하고자 하였 으며, 즉 PCR curve를 확인 가능하도록 개발하고자 하였다.
- 최적화되고 사용자 편리성이 매우 높은 매뉴얼을 개발하고 제작하고자 하였다.
- 분석용 프로그램은 향후 기타 농산물, 축산물의 원산지, 품종구별, 이력추적과, 암진단, 대사 질환진단 등의 분자진단에 활용이 가능하도록 확장성이 높은 프로그램으로 개발 하였다.
- qPCR plot 수는 30개 (internal control 8개 + 22 개 marker) 임으로 96 well plat 기준으로 264개의 real time PCR plot이 발생되어 이를 일목용여하게 볼 수있도록 개발하였다.
- qPCR은 well variation, DNA quality 및 content, multiplex set에 따른 상호 PCR 간섭 및 background signal 발생함 이를 자동으로 보정하여 결과를 판정할 수 있는 분석용 프로그램으로 개발하고자 하였다.

#### 2. 개발 프로그램의 구성 및 흐름도

- 형광신호의 검출 임계 시점과 형광량 등의 정보를 토대로 유전자 서열 변이 및 그 함량을

관독할 수 있도록 일련의 자동화 분석 프로그램으로 구축하였다.

- 본 과제에서 개발한 프로그램은 다수 및 다중의 real time PCR 증폭 곡선을 확인하고 그 결과를 분석하기 용이한 프로그램 (Mutiplex real time PCR Viewer Program) 으로 분석프로그램의 구성과 data 처리의 흐름은 그림 20과 같다.

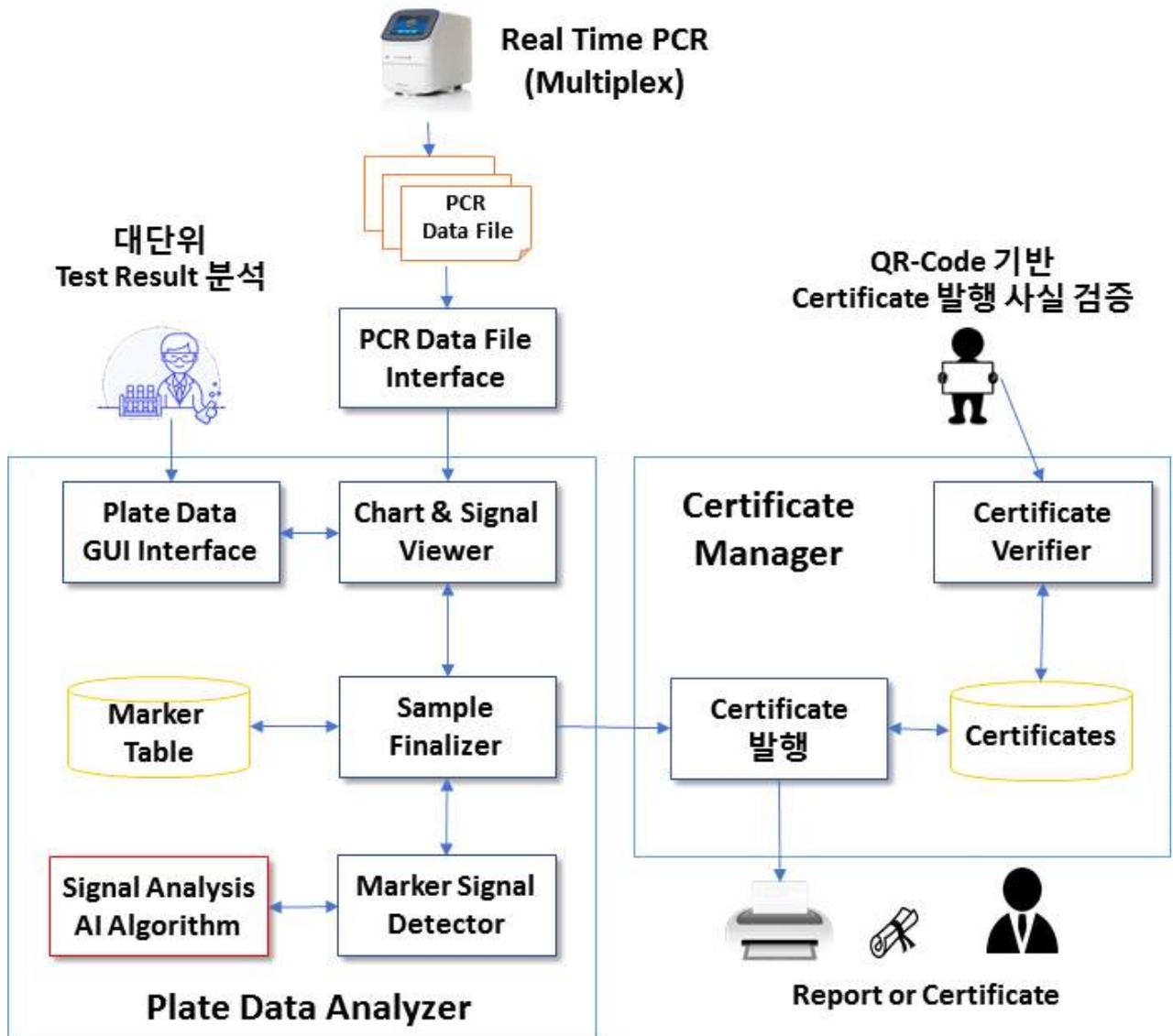


그림 20. Mutiplex real time PCR Viewer Program의 구성 및 흐름도.

- 개발한 프로그램(Mutiplex real time PCR Viewer Program)은 높은 판정 만족도를 확보하기 위해 각각의 real-time PCR 판정을 위한 정보 신호의 크기 및 임계값 입력, AI algorithm, quantity normalizing, 및 판정 기준표 등의 선택 항목 등을 화면에 동시 구현함으로써 판정을 용이하게 수행하도록 할 수 있으며 결과 분석에서 인증서 발행까지의 대단위

real time PCR 수행 결과를 일관된 시스템하에서 처리 할 수 있다.

- 대표적인 곡물인 쌀 품종 판별에 사용되는 유전자 marker를 활용하여 multiplex PCR을 수행하고 이를 분석하는 프로그램 (Mutiplex real time PCR Viewer Program)으로 구현하였다.
- 이 프로그램은 본 과제에서 적용한 쌀 판정 분석프로그램으로 뿐만 아니라 다양한 분야에 서 적용 가능한 보편적 프로그램으로 변형이 가능 할 것이다.
- 개발된 Mutiplex real time PCR Viewer Program은 그림 20 과 같은 SW (Softwear) 모듈 로 구성하였다.
- 상기(그림 20)에 대한 각각의 SW 모듈은 PCR Data File Interface, Plate Data Analyzer, Certificate Manger 등 3개의 블록으로 구분된다.
- PCR Data File Interface는 Real Time PCR 장비의 시험 결과 데이터 파일(Excel 형)을 분석 하여 해당 PCR 장비에 대한 데이터 포맷에 따라 시험 데이터를 Viewer 시스템에 입력하기 위한 인터페이스 모듈이다.
- 실험 장비 종류 판별 : Excel 파일의 포맷 정보를 이용해 ABI, CFX 등 Real Time PCR 장 비의 종류를 판별하는 기능을 부여한다.
- Well별 Signal Data Read : PCR 장비의 종류별 Data 포맷에 따라 특정 Well에 대한 시험 Data를 읽어 PCR Viewer 시스템 내부 형태로 전환한다.
- Plate Data Analyzer 블록은 Plate 단위의 시험 데이터에 대한 화면 표시 및 최종 Signal 판 정을 위한 사용자 Interaction 방법 제공 및 최종 판정 결과를 DB에 저장하는 PCR Viewer 시스템의 핵심 SW 모듈이다.
- PCR Data File Interface에 의해 Viewer 시스템으로 입력된 하나의 Plate 단위 시험 데이터 에 포함된 96개 Well 전체에 대한 Signal Chart와 Signal 판정 결과 화면을 제시함으로써 Web 브라우저 한 화면에 전체 Plate 시험결과 및 Sample 별 품종 판정 결과를 확인할 수 있는 화면을 제공한다.
- Plate Data GUI Interface : Chart & Signal Viewer에 의해 표시된 각 Well에 대한 Signal Chart를 육안으로 확인하고 Marker 검출 유무 판정을 수정할 수 있는 사용자 Interaction 기능을 제공한다.
- Rice Sample Finalizer : 정해진 Rice Marker 검출 판정 프로그램과 사용자의 수정 결과를 즉시 반영하여 검출된 Rice Marker Set과 Rice Marker Table에 등록된 품종 목록과 대조하 여 일치하는 품종에 대한 판정을 하고 해당 품종을 화면에 표시해준다.
- Rice Marker Table : 각각의 쌀 품종별 정해진 Rice Marker에 대한 Table로서 각 품종의 Rice Marker는 동일하지 않도록 DB화 되어있음
- Marker Signal Detector : 특정 Well의 특정 Dye에 대한 시험 데이터를 분석하여 Rice Marker 검출 여부를 판정하는 SW 모듈이다.
- Signal Analysis AI Algorithm : Well의 위치, 시료의 반응 속도 차이, Dye의 특성 등을 고 려하여 Rice Marker Signal 판정에 AI 기술을 적용하여 단순한 판정과 차별화 가능하도록 함으로써 Rice Marker 검출 여부 판정의 정확도를 향상하기 위한 SW 모듈이다.
- Certificate Manager 블록은 여러 PCR Data File로부터 고객이 의뢰한 시험 최종 결과를 시 험성적서 혹은 Certificate를 발급하고 Certificate 발행 여부를 확인할 수 있는 기능 블록이 다.

- Certificate 발행 : 세부 시험 성적서 혹은 시험성적서 기반 Certificate를 발행하는 모듈로서, 여러개의 시험 Data 파일로부터 하나의 시험 성적서 및 Certificate를 발행할 수 있다. 발행된 Certificate는 DB에 등록되고, QR 코드가 함께 인쇄된다.
- Certificate Verifier : 스마트폰 등을 이용하여 본 시스템에서 발행된 Certificate의 QR 코드를 스캔하면 자동으로 본 서비스 시스템에 연결되어 해당 Certificate 발행 여부 즉석에서 확인할 수 있다.

### 3. 분석 프로그램의 PCR viewer의 구성요소 및 항목

- 개발된 PCR Viewer는 다음 같은 주요 항목을 분석프로그램으로 구현하였다(그림 21).
- 그림 21을 중심으로 본 과제에서 개발한 프로그램을 상세하게 설명하면 하기의 설명과 같다.
- real-time PCR 증폭곡선을 하나의 화면에 다수를 동시에 구현 (multi-panel view, 그림 21-①)함으로 사용자 또는 시험자의 판별의 직관성을 크게 향상 시킬 수 있다. 또한 real-time PCR 증폭곡선을 하나의 panel 안에 2개 이상 표시함(multi-channel signal, 그림 21-②)으로 증폭곡선의 비교가 매우 용이하다.
- 형광과 분석 marker 유전자 code 값 (markers) 그리고 판정결과를 panel 안에 적시함(marker 별 판정표, 그림 21-③)으로 증폭곡선과 판정결과 값을 동시에 시험자가 확인할 수 있어 결과 판정의 신뢰도를 크게 향상 시킬 수 있다. 다양한 markers (구현 예는 3\* 96= 288 개 marker)를 동시에 판별이 가능 하도록 구현이 가능하다.
- 또한 판정결과 값을 간단한 표식 (예 0, 1, 2 혹은 -1, -2와 같은) 수로 표현(Results, 그림 21-④) 함으로 결과 값을 분석자가 용이하게 판정할 수 있다.
- 다양한 시료를 동시에 판정하거나, 혹은 다양한 마커를 동시에 분석할 경우 모두를 시각화할 수 있다.
- cycle 수 (Ct) 값 (Ct value, 그림 21-⑤) 과 signal (Rn or RFU value, 그림 21-⑥) 값을 시험자가 적절히 조정 가능하게 함으로 적용능력과 판정의 능력을 향상시킬 수 있다.
- 다양한 원인에 의해 발생하는 비특이적 signal에 의한 판정오류를 최소화 할 수 있는 인공지능 알고리즘 (AI algorithm, 그림 21-⑦)을 적용함으로 판정의 유효성을 증대 할 수 있다.
- 정량의 오류 혹은 다양한 정량의 범위에서 판정이 이루어 질 수 있도록 정량오류수정(quantity normalizing, 그림 21-⑧) 을 적용함으로 판정의 유효성을 증대 할 수 있다.
- real time PCR 기기에서 분석한 정보를 엑셀 파일로 정보화 (calling) 하고 이를 통합 저장 관리할 수 있도록 하고 필요시 정보를 시각화 분석프로그램으로 분석할 수 있도록 구성하였으며, 확보한 정보는 필요에 따라 정보 분석 data 판정 marker table 정보를 토대로 분석 결과 값을 도출 할 수 있도록 구성 하였으며, 여러 개의 panel를 하나의 컴퓨터 화면에 구현함으로 여러 개의 다중 PCR 결과를 확인하고 비교하기에 매우 용이하도록 구현 하였다.

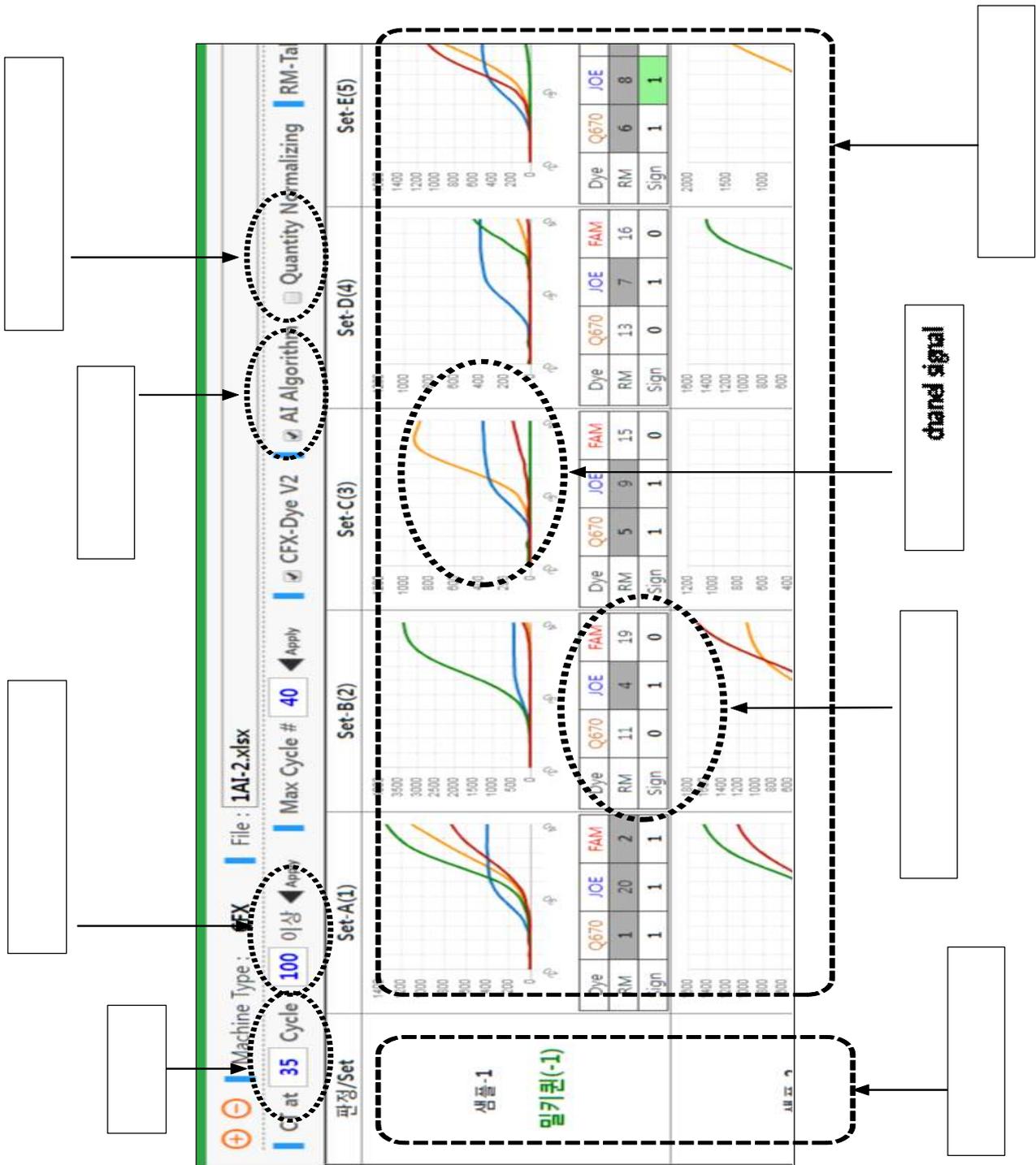


그림 21. Multiplex real time PCR Viewer의 주요 구성요소 및 표현

#### 4. 분석 프로그램의 쌀 품종 분석 적용 시험 결과

##### 가. real time PCR 수행 및 결과 분석

- 벼(쌀) 품종을 판별하기 위한 real-time PCR 분석용 kit으로 본 과제를 통해 개발한

FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit을 사용하였다. 사용한 kit은 국립농산물품질관리원 벼(쌀) 품종 검정 매뉴얼 (2019 개정) 의 22개 SNP marker (RM, rice marker)를 활용하는 real-time PCR kit이다. 분석에 사용되는 쌀 시료는 벼(쌀) 핵산 추출 전용 키트 (GenoAid™ Rice Genomic DNA Purification Kit) 을 제공하는 프로토콜에 따라 DNA를 정제하여 사용하였다.

- 분석용 real-time PCR 분석 system 은 CFX-96 또는 ABI7500을 사용하였으며, 각 분석기기에 적합한 kit을 사용하였다.
- 하나의 시료에 8개 PCR tube (well)에 PCR이 수행되는 방식의 kit 으로 내부 표준 (internal control, IC) 을 포함해 30개 (22개의 SNP marker + 8개의 IC) 의 PCR 증폭곡선이 하나의 시료에 대한 시험으로 생성된다. 12개의 시료를 동시 분석할 경우 96 well PCR system으로 동시 수행될 수 있으며 360 개의 PCR 증폭곡선이 생성되게 된다. 도 20과 같이 PCR 수행과 분석용 프로그램을 이용한 data 확보, 처리, 이를 이용한 분석을 실시하였다.

#### 나. 판정 기준점의 Rn (RFU) 및 Ct (Cq) 값의 조정

- 프로그램은 개발 kit을 사용한 multiplex real time PCR 수행에 사용하는 기기의 종류와 그에 따른 detection signal의 차이 및 시료에서 DNA 추출, 연구자의 숙련도 등에 따른 다양한 PCR 과정에서의 편차의 발생에 대한 유연한 대처가 가능할수록 판정이 용이하게 이루어져야 한다.
- 이에 따라 분석자가 PCR의 결과판정 기준 값의 유연한 조정은 판정을 오류 감소에 중요하다. 본 개발 프로그램은 Rn 및 Ct의 값의 자유로운 조정이 가능하도록 구성되어 있다.
- 예로 낮은 기준의 Rn에 의해 정확한 판정이 이루어 지지 않은 시험구 (그림 22 A. signal value 조정전)를 Rn의 0.1 이상에서 0.2 이상으로 변경시 청호, 계화, 단미로 각각 판정이 정확히 이루어 짐을 확인 할 수 있었다 (그림 22 B. signal value 조정후).

## A. Signal value 조정 전

## B. Signal value 조정 후



그림 22. Ct 혹은 signal value (Rn) 의 조정에 따른 분석의 정확도 개선

## 다. AI algorithm의 적용

- 다양한 원인의 PCR 비특이 시그널 및 비 정상 시그널 들을 AI algorithm 을 통해 분석하여 정상시그널과 구별하여 판정의 특이도를 높이도록 개발하고자 하였다.
- 이를 위해 개발 분석프로그램에 AI algorithm을 적용 유무를 선택할 수 있도록 제시하였다. 실제 AI algorithm을 적용하지 않은 경우 정확한 품종 판별이 이루어 지지 않았지만 (그림 23 A. AI algorithm 미적용), AI algorithm을 적용할 경우 원래 정상적으로 판정된 진상의 경우 변화되지 않았지만, 판정 오류의 시험구가 일품, 오래로 정확히 판정 되었다 (그림 23 B. AI algorithm 적용).

### A. AI Algorithm 미적용

### B. AI Algorithm 적용

그림 23. AI Algorithm의 적용에 따른 분석의 정확도 개선

## 라. Quantity normalizing의 적용

- 품종과 시료의 상태 및 분석자의 숙련도 등에 따라 DNA 추출시 DNA량의 편차가 발생 할 수 있다. DNA 시료량의 편차는 정확한 분석 결과를 도출에 방해를 준다.
- 시료량에 따른 값의 편차를 보정하여 판정 오류를 최소화 하기위한 algorithm 적용이 가능 하도록 프로그램을 구현하였다.

### A. Quantity normalizing 미적용

### B. Quantity normalizing 적용

그림 24. Quantity normalizing의 적용에 따른 분석의 정확도 개선.

대야 품종의 쌀 genomic DNA를 미희석 시료(샘플-1) 및 1/3(샘플-2), 1/10 (샘플-3), 1/30(샘플-4) 희석 시료를 사용하여 시험 함

- 다양한 쌀의 genomic DNA의 양 (미희석 및 1/3, 1/10, 1/30희석한 genomic DNA 시료)을 사용한 시험 한 결과 Quantity normalizing을 미적용시에는 미희석 및 1/3 희석한 genomic DNA를 사용한 시험구에서는 대야로 판별하였으나, 1/10, 1/30의 희석한 genomic DNA를 사용한 시험구에서는 정확히 판정하지 못하였다 (그림 24 A. Quantity normalizing 미적용).

- 그러나 Quantity normalizing을 적용시에 1/10, 1/30의 희석한 genomic DNA를 사용한 시험구에서도 대야로 정확히 판별할 수 있음을 확인하였다 (그림 24 B. Quantity normalizing 적용).

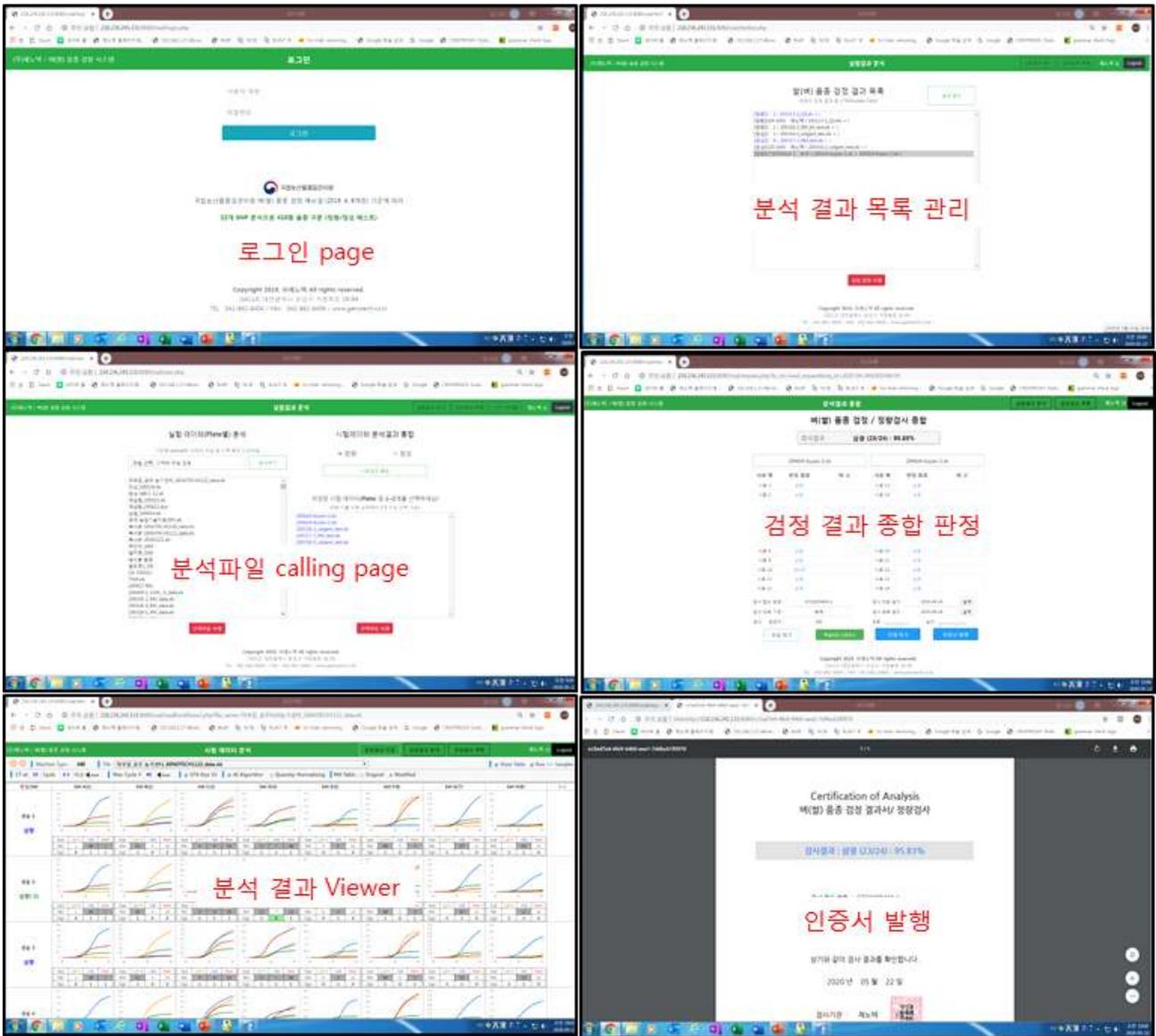


그림 25. 쌀 품종 분석 프로그램 구현의 주요 항목의 예.

#### 4. 프로그램의 운용특징 및 성적서 발행

- 분석된 결과를 각 기관에서 독립적으로 관리하도록 구성하였다.
- 정량 및 정성 분석 결과 등을 통합 관리하도록 구성하였다.
- 분석파일을 판정자 관리자가 쉽게 선택 및 삭제 가능하도록 구성하였다.
- 각 시험별 분석 결과를 종합 판정하여 확인할 수 있다.
- 분석 결과 또한 저장하여 관리 할 수 있다.
- 또한 판정한 결과를 각 실시 기관에 인증서를 쉽게 발행할 수 있도록 구성하였다 (그림 25).

### 제 3 절 특허 기술 적용 쌀 품종 구분 kit의 구성

#### 1. SNP의 구분성 향상을 위한 특허 기술의 적용

- 본 기술 개발 과제는 기 개발된 특허 기술을 연계하여 사업화 하고자 하는 과제임으로 본 과제를 통해 확보한 특허 qRT-PCR 기술(특허등록 제10-1598398호{FenDEL기술}) 및 그 보완 기술인 STexS 기술(특허 출원: 제 10-2019-0164776)을 활용하여 제품 개발에 적용하였다.
- 본 과제에서 상기 핵심 특허 기술에 본 과제를 통해 개발된 구분성 높은 DNA polymerase (특허:10-2020-0064838), multiplex qRT-PCR 판정 프로그램 (특허: 10-2020-0052320) 과 쌀 (벼) genomic DNA정제, 및 제품 보존(특허:제10-018457150000)를 적용하여 쌀(벼) 품종 구별용 제품 개발에 적용하였다.
- 제품에 적용한 기술인 qRT-PCR 기술은 보편적인 PCR 방법을 사용하여 대립형질 유전형을 쉽고, 간편하고 정확하게 분석 가능한 기술이다.
- DNA polymerase에 친화도가 있는 물질을 첨가하여 mismatched target에 대한 K-1을 증가시켜 Kcat을 감소시킴으로써 mismatched target PCR 증폭을 최대한 억제함으로 대립형질의 구분성: 200 ~ 10,000배 이상 증대시키는 최초의 기술이다.
- 물질의 첨가량에 따라 대립형질 구분성을 적절하게 조절이 가능하여 기술의 확장성이 높은 기술이며 3' mismatch 구분성을 증가시킨 변이 Taq Polymerase 사용시 추가적인 높은 구분성을 담보할 수 있는 매우 우수한 기술이다.
- 본 과제의 쌀의 유전적 다형성(SNP) 검사 및 다양한 작물 및 암 등의 유전자 변이의 보편적 검사법으로 사용 가능 하며 TaqMan probe, EvaGreen, EtBR 등 다양한 conventional PCR 및 Realtime PCR에 적용이 가능하여 확장성이 우수한 기술이다.

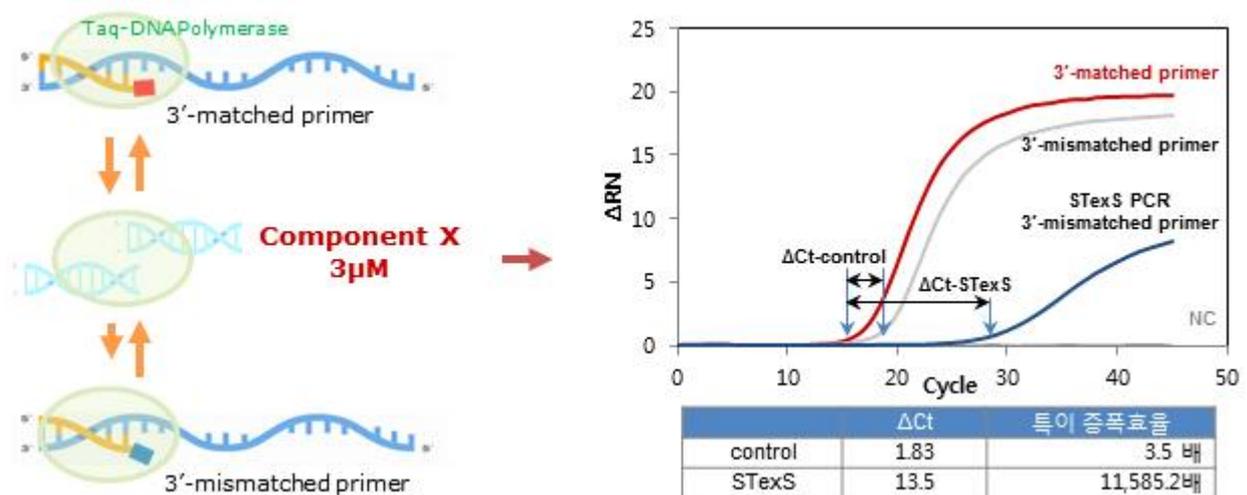


그림 26. 개량된 FenDEL 기술 및 구분성 증대.

## 2. 시료의 확보 및 관리

- 제품의 개발과 평가를 위해서는 표준물질로 사용할 수 있는 정확한 품종과 그 유래의 genomic DNA 확보가 필요하다.
- 이에 따라 국립농산물품질관리원 시험연구소와 농업기술센터 등으로부터 품종이 검증된 품종(국내외 250 품종)에 대한 서열 정보를 확보하고 이를 토대로 정보화하였다 (표 11).
- 상기 확보한 품종 및 정보를 이용하여 쌀 품종 정성 및 정량 검정용 제품의 개발을 위한 primer 및 probe set을 구성에 이용하였다.
- 또한 필요시 시중에서 유통되고 있는 쌀, 현미 등의 시료를 구매하여 직접 유전자를 확보하였다.

표 12. 품종 구분을 위한 주요 쌀 품종명

간척	남원	영호진미	흑진주	친들	금오	보석찰	해평	진부울	미품
남강	농안	일미	한들	청 풍 후 향찰	강백	백옥찰	한마음	조생흑찰	밀양95
남평	녹립나1	아랑향찰	황금누리	청담	가와지찰	보석흑찰	화랑	주남	만안
대야	남일	운광	화성	청백찰	그루	백진주1	화신	진부찰	보람찬
동안	대청	오대1	흑수정	청풍흑찰	고향찰	백설찰	해품	진미	보석
동진1	대찬	아세미	Hltomebo re	청남	고아미	신토흑미	화왕	진백	봉광
만풍	다산1	탐진	오봉	청청진미	가향찰1	수안	황금보라	진보	삼평
미향	다산2	태봉	영해	친농	금성	수진	향남	조운	상옥
산들진미	동해	태성	온누리	청아	계화	신동진	효원5	조은흑미	상산
새누리	동진찰	중산	온다미	청해진미	금오1	신선찰	향드림찰	조광	소비
신운봉	다청	평원	영안	만금	금오2	설향찰	한강찰1	조령	새상주
영남	드래찬	풍미1	오륜	만나	금오3	신농흑찰	화삼	적진주	서명
운미	대산	평안	월백	만미	골든퀸2	신보	화봉	조안	수광
주안	대보	풍생골드	안산	만월	골든퀸3	신명흑찰	호평	진품	서진
중화	동진	홍진주	일품	만중	건강홍미	상주찰	하성1	진상	석정
풍미	단미	흑남	아름	만주	금안	상남발	흑설	진상2	산호
해찬물결	다미	화안	운장	만호	광안	신백	화신1	종남	설백
호진	대평	흑광	인월	말그미	고운	세계화	한아름2	진부	새추청
호품	도담쌀	호안	오래	목우	금남	수라	화동	장안	새고아미
황금노들	대진	화선찰	안다	문장	고품	삼광	해오르미	조아미	소백
밀키퀸	대립1	화중	조평	미광	Koshihika ri	신운봉1	화남	청운	새오대
백진주	둔내	하이아미	진봉	미면	녹양	원황	흑향찰1	철보	상주
농호	오대	해평찰	청명	서간	눈보라	양조	향미1	추청	삼덕
남천	안성	호능	풍안	새일미	눈큰흑찰	운봉	향미2	청안	소다미
내풍	안중	현품	천지향1세	설레미	낙동	운두	흑향	청호	상미

### 3. SNP 마커 선정 및 primer probe set 구성

- 국립농산물품질관리원의 품종구별용 22개의 SNPs를 중심으로 벼 염기서열 정보 및 SNP 정보를 활용하여 마커를 선정하였다. 이는 최소 450 품종이상의 구별이 가능하다.
- 국립농산물품질관리원의 품종 구별을 제공하는 22개의 SNPs를 중심으로 필요시 벼게놈프로젝트 (international rice genome project, IRGSP, <https://rgp.dna.affrc.go.jp/>)에서 확보한 벼 염기서열 정보 및 SNP 정보를 활용하여 마커를 선정하고자 하였다.
- 본 기관이 최종확정한 품종구별 방법은 22개의 국립농산물 품종관리원 제공 SNPs 이며 이를 중심으로 수행하였다.
- 제품에 적용한 Primer/probes의 set을 3개의 SNP를 1 tube에서 이루어지는 multiplex PCR test구로 하여 8 test 가 하나로 구성된 형태의 kit 으로 구성하였으며 약 500 품종이상의 구별이 가능하다.
- 다수의 예비 시험을 통해, 시료와 품종에 따라 primer/probe set을 변경하고 최상의 조합으로 구성하였으며, 최종 확정된 대상 markers 및 primer/probes set은 하기 표 13과 같다 (probe 정보는 미제시함).

표 13. 최종 구성된 쌀 품종 구분 markers 및 primers/probe sets

Markers	Primer/probes	Sequence
GAPDH	GAPDH-F	AAGGCAGCTATCAAGTAAGTGT
	GAPDH-R	GTTTCCCCTCAGACTCCTCC
RM1	RM1-F	CGAAGCAGCCTCATGGAG
	RM1-R1	AACTCTGGGCACCATCAGTATT
RM2	RM2-F2	CTACAAACACTCCTAAGATGCCACATG
	RM2-R2-4	ATGAGAGTTGCATCCTATAGGAGAG
RM3	RM3-F	CTGGCCTGGGATGTTGAAC
	RM3-R1	CCACATTGGTTGTGGAAGGTTAAG
RM4	RM4-F	GCATGTGTTGGTTGTGAGTTGAT
	RM4-R1	CATATCGTATCCATCTTATACTCTGA
RM5	RM5-F	CACATTTTCGGTTATTGCAGGTGAT
	RM5-R	GCAACATCGGACTGAAAGGT
RM6	RM6-F2	GAAGCTTCATCTTACATTTGGTTTCACTG
	RM6-R4	AACAGTATGCTAATAACTCACTAAT
RM7	RM7-F	GAGTAGTATCGGAGTATTAGCCGAT
	RM7-R1	TCGGTCATCATGCCGAGATAG
	RM7-P1-3	TCgTGTATCGGCTAATACTCCGATAC
RM8	RM8-F6	GAAAGTTATTTTCATGTACAATTTGGA
	RM8-R7	TAATTAGATATCATTAATCCAAACTC
RM9	RM9-F1	GAAAGTAAAATAGAGGAGGACATGAA
	RM9-R2	CTCTTCTGATGATGGAGATCCATC
RM10	RM10-F	GTTATGTGTCTTGTGACATACTTTGA
	RM10-R1	AGGCAAAGATAGCTTGAATGACCA
RM11	RM11-F3	TGTATGTGAAACTGATATGTAGGTCTCA
	RM11-R3	AGTACATATGAGATCCCTTAGTGGT
RM12	RM12-F12	AGCGATCGATCGATtGATGCGCA
	RM12-R4	GAGAAGACGAAGCAATGGAGG
RM13	RM13-F	CTTTAGATGCTTGCAAGAGGGGA
	RM13-R1	CCACCTGCTGTCAACAATTGTC
RM14	RM14-F	AGCAGCTAATATGTACTCCATCTG
	RM14-R1	GCTTCAGGTAAGACGTTTTAACTTTAGTC
RM15	RM15-F3	GGCTCGACGTCATAGCAACAACA

	RM15-R1	TTTGATCACATCTAGTCAGAAGGTG
RM16	RM16-F	GAGACGTTCCGGTTCGCC
	RM16-R4	CTCGGTCTCACGCTGGTC
RM17	RM17-F	TATATTGCATAATGGAAATGCAGTTAT
	RM17-R1	GTCAGAGAAATCTGGTTGCTATGA
RM18	RM18-F2-3	GGAGGCCACCACCGAGGTTA
	RM18-R2	AGGTCATGGCCTCAAGTAAGA
RM19	RM19-F2	CCTAAATAGGATAGGACATAACCTATAAC
	RM19-R2	CGCTACTGCGTTTTCTTCTTCTC
RM20	RM20-F	AACAGCACTAGAATATGGAACCCT
	RM20-R1	CATGATGCAAAGCCTGTTAGTACTC
RM21	RM21-F1	GGGTGAGTTTTTCCATTGCTAC
	RM21-R1	TAAGCTCAGTCCAAGTAAATG
RM22	RM22-F3	CATCGTCTTTGCTTGCCCATG
	RM22-R1	CGATGACTGCAAATACTTTCGACATT

#### 4. DNA 시료의 확보 및 추출 방법 개량

- 제품의 개발을 위해서는 제품에 적합한 경제적인 시료의 확보 또한 제품 경쟁력을 확보를 위해 중요하다. 이에 따라, 쌀 (벼)에 특화된 간편하고도 경제적인 (기존 대비 원가 50%이하) DNA 시료 정제방법을 개발 하였다 (그림 27).
- 개발한 방법 (DNAid-Rice DNA prep kit) 은 일반적인 방법에 비해 매우 간편한 제공되는 3개의 solution을 간편하게 처리하는 매우 간편한 방법이다.

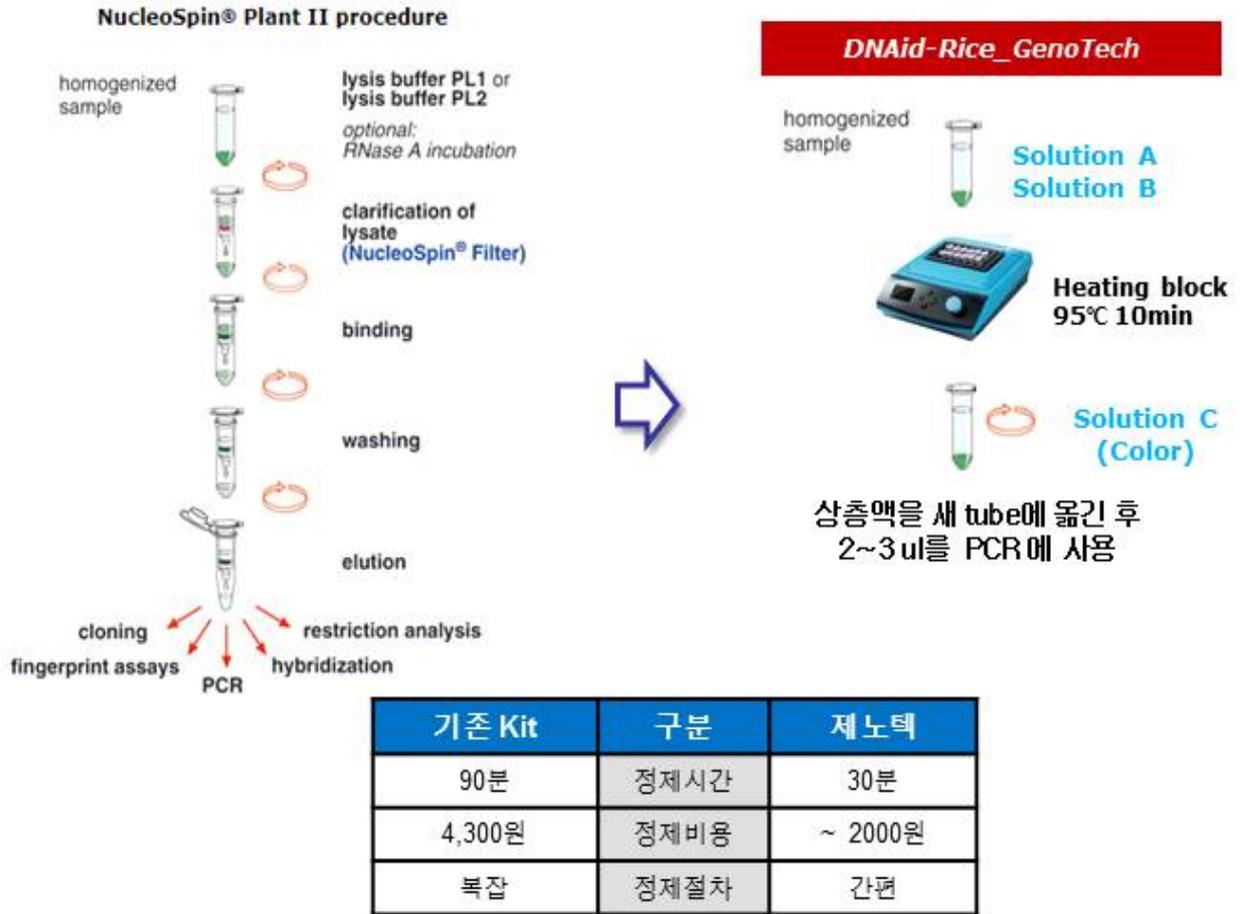


그림 27. 쌀 DNA 추출 방법 (DNAid-Rice gDNA prep kit) 와 기존 방법(NucleoSpin)의 비교

- 정확한 판정을 위하여 추출한 DNA의 농도, 순도가 매우 중요한 요인 중 하나이다. 불량한 DNA 추출 과정은 정확한 판정을 담보할 수 없기 때문이다. 그러므로 genomic DNA 정제는 국립농산물품질관리원이 고시한 DNA시료 품질 규정에 적합하도록 개발하고자 하였다.
- 최종 확보된 DNAid-Rice DNA prep kit을 이용하여 일반미(삼광, 백진주)와 color 미 (홍진주, 흑찰미)의 genomic DNA를 추출하여 순도 및 추출량을 평가 하였다. 그 결과 품종검정에 적합한 DNA 시료 (순도 (O.D. 260/280 1.5 이상) 와 량 (1 ng/ul 이상))이 확보될 수 있음을 확인하였다 (표 14).
- 현재 벼 genome DNA 추출에는 식물 DNA 추출 kit를 사용하는 것이 보편적이며 이는 매우 고가이다. 그래서 분석 kit의 구성에는 DNA 추출비용 (2,000~5,000원/prep kit)이 원가에서 차지하는 비중이 매우 높다. 따라서 DNA 시료의 품질을 보장하면서도 쌀에 특화된 간편하고도 경제적인 추출 방법 개발이 필요하다.
- 본 과제에서 쌀, 현미, 벼에 특화된 real-time PCR이 가능한 간편하고 경제적인 DNA 추출법을 개발하였다 (modified CTAB 법). 개발한 DNA 추출 방법은 기존 방법 대비 원가가 최소 50%이상 감소된 (2000원이하/prep) 방법이다.

표 14. 개발한 쌀 genomic DNA preparation 방법에 따른 추출시 DNA 농도 및 순도

Number	Rice Cultivars	SolC treatment	Concentration (ng/uL)	O.D. (260/280)
1	삼광	-	109.389	1.73
2		+	41.645	1.71
3	백진주	-	137.656	1.71
4		+	60.932	1.66
5	홍진주	-	394.883	1.18
6		+	46.863	1.56
7	청풍흑찰	-	432.851	1.56
8		+	84.705	1.62

- 이 방법의 개발에 핵심적인 공정은 Solution C (Sol C)의 첨가 공정이다. 다양한 품종의 벼에 대한 시험과정 중에서 color 미의 색도가 포함될 경우 DNA 순도가 낮고 PCR의 저해가 일어남을 확인하였다 (표 14 SolC 미처리구). 그러므로 이러한 문제점을 개선하여 색도 물질을 제거하여 원활한 PCR 가능한 순도를 보장할 수 있는 간편한 방법이 필요하였다.

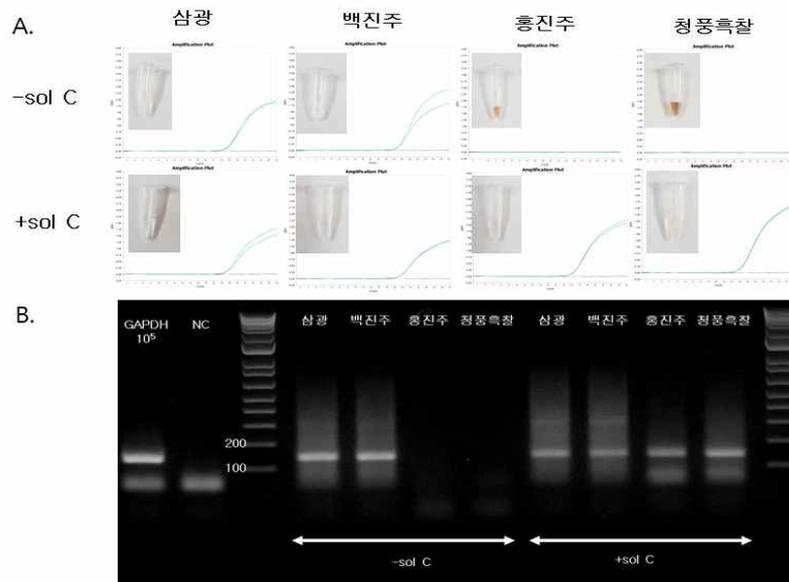


그림 28. Color 미의 Solution C 처리 genomic DNA 정제 효과

A. 시료의 색도 및 real time PCR 결과

B. Sol C 처리에 따른 PCR 저해 유무 확인 결과

- 특히, color 미의 경우 간편한 DNA prep 법으로 정제한 시료에 color substance가 존재하고 또한 PCR 저해를 야기함으로써 이의 해소가 필수적 이었다 (그림 28, Sol C 미처리구). 따라서 적절한 color substance 및 PCR 억제 물질의 제거하는 방법을 탐색하였다.
- 이를 위해 10여종의 이상의 다양한 color 흡착제를 대상 (cation or anion exchanger, active carbon,

polymers 등)으로 시험하여 최적의 효과를 발휘하는 소재를 확인하였다 (그림 29 및 30).

- 결과 색도 물질의 제거와 PCR의 억제를 해소하여 정확히 판별하게 할 수 있는 소재를 선별할 수 있었다 (그림 30).
- 시험한 소재 중에 가장 효과적이면서도 경제적인 소재를 대상으로 그 사용량 [20% (W/V)] 등을 확정하였다 (그림 31).

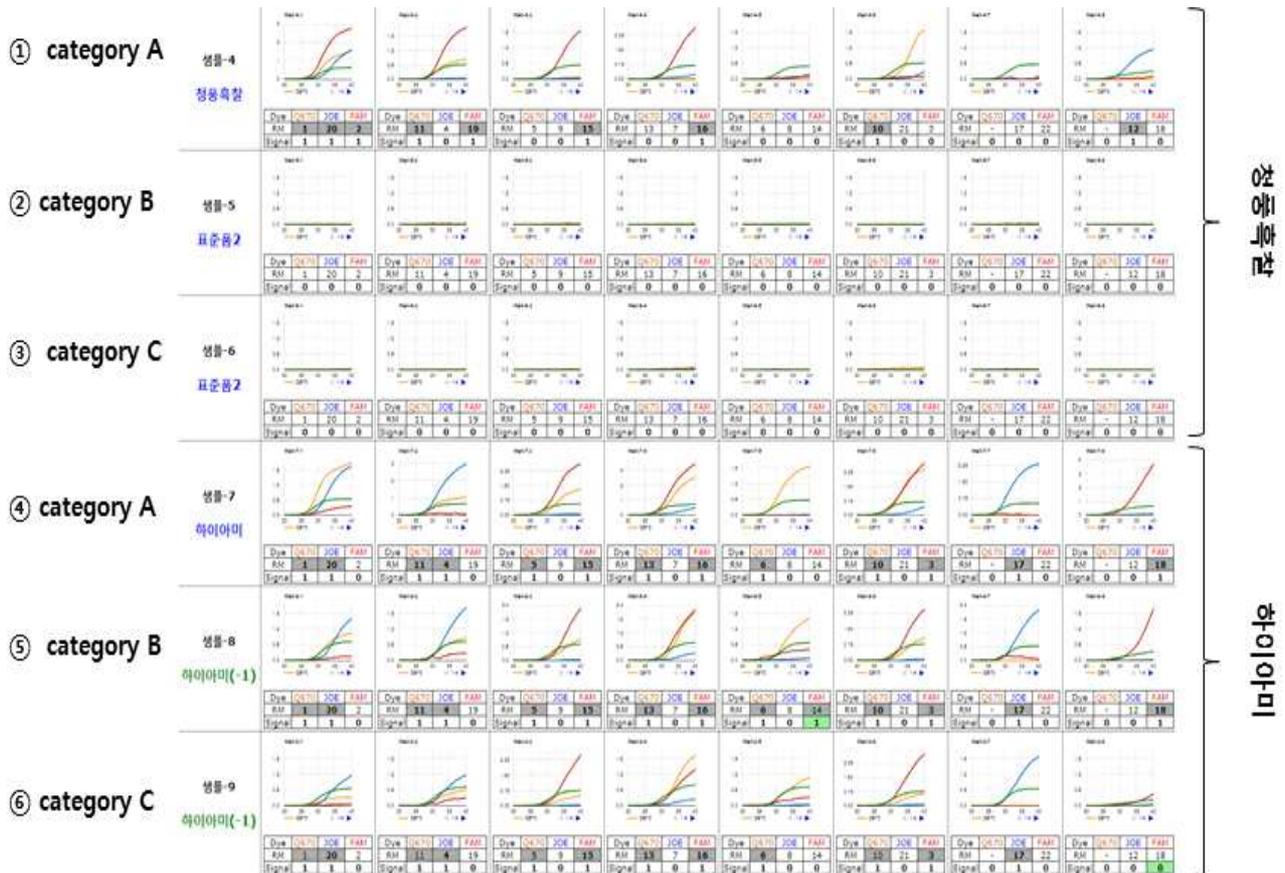


그림 29. 색도제거 공정용 소재 선별 시험.

물질의 종류에 따라 A, B, C로 분류하여 대표적인 소재를 사용하여 평가함. 쌀을 color 미로 청풍흑찰, 일반미로 하이아미를 사용함, 개발된 kit을 사용하여 비교 평가함.

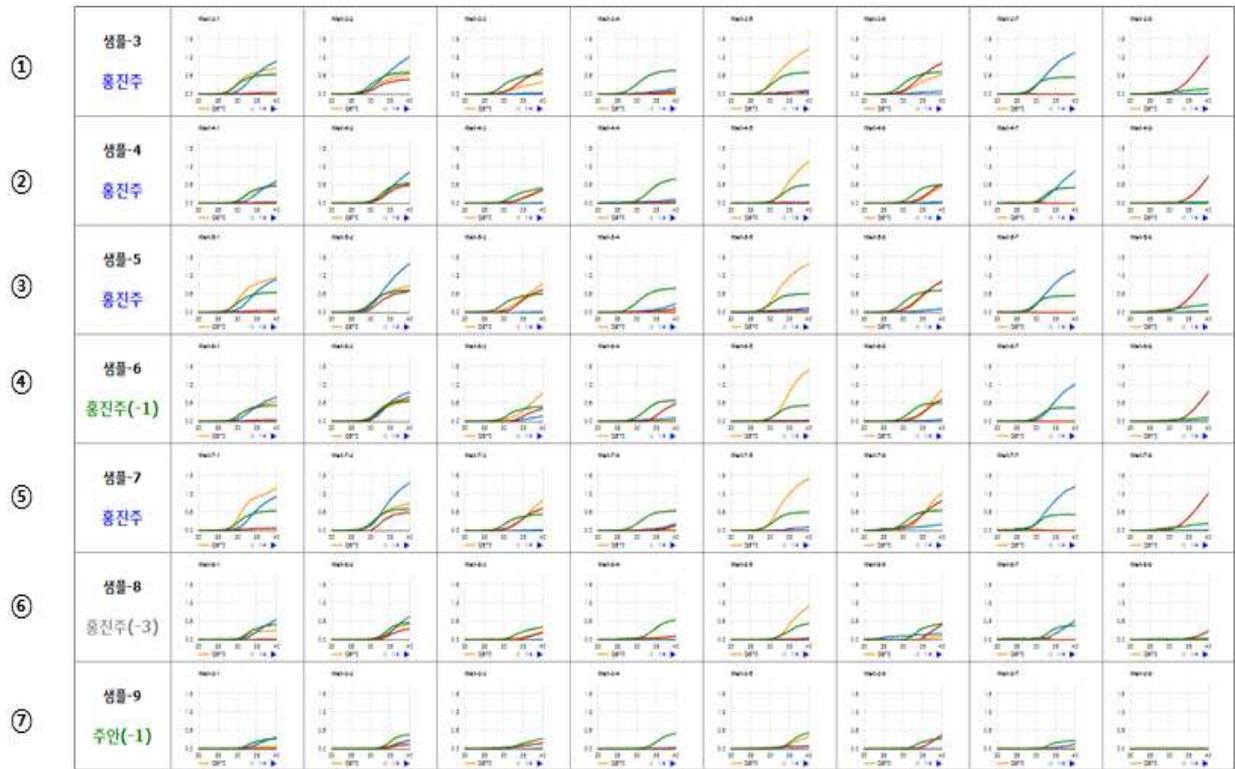


그림 30. color 흡착제 종류별 시험 결과.

①~⑦, color 흡착제 종류(category A 물질의 brand 및 성상 별), 쌀은 색도미인 홍진주를 사용함. 각 시험 1미에서 반복적으로 평가함, 벼 품종 판별 kit을 사용하여 검정능력을 평가함

- 추출된 DNA의 보관안정성, PCR 억제요인 분석, 농도 및 순도를 검사하고, 반복평가, 실험자에 의한 편차, 시료에 따른 편차를 확인하여 개발된 방법의 신뢰성을 확보는 제품의 개발에서 중요한 요소이다. 그러므로 개발 과정동안 다양한 평가를 통해 안정적인 DNA preparation 이 가능함을 확인하고자 하였다.
- 품종별 반복평가에서도 100%의 재현성을 나타냄 우수한 색도제거 및 안정적 DNA 추출 공정을 확립할 수 있었다 (그림 32 등).
- 본 기술개발과제의 수행을 통해 반복평가 수행결과 재현성이 높고, 품질이 안정적인 기존의 고비용 prep kit을 대신할 수 있는 경제적인 DNA 추출 kit을 개발 할 수 있었다.

**Solution C**

**10%**  
**15%**  
**20%**  
  
**10%**  
**15%**  
**20%**

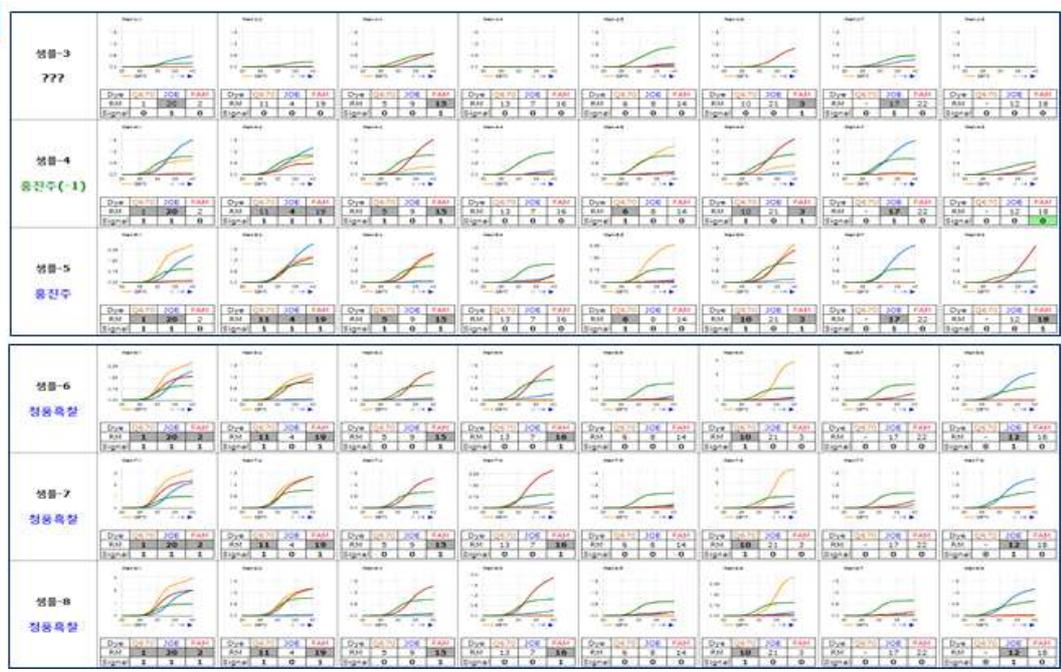


그림 31. SolC 처리 용량별 쌀 품종 검사 증진 효과.  
쌀 시료: 홍진주와 청풍흑찰, 개발 kit을 사용한 검증 수행,

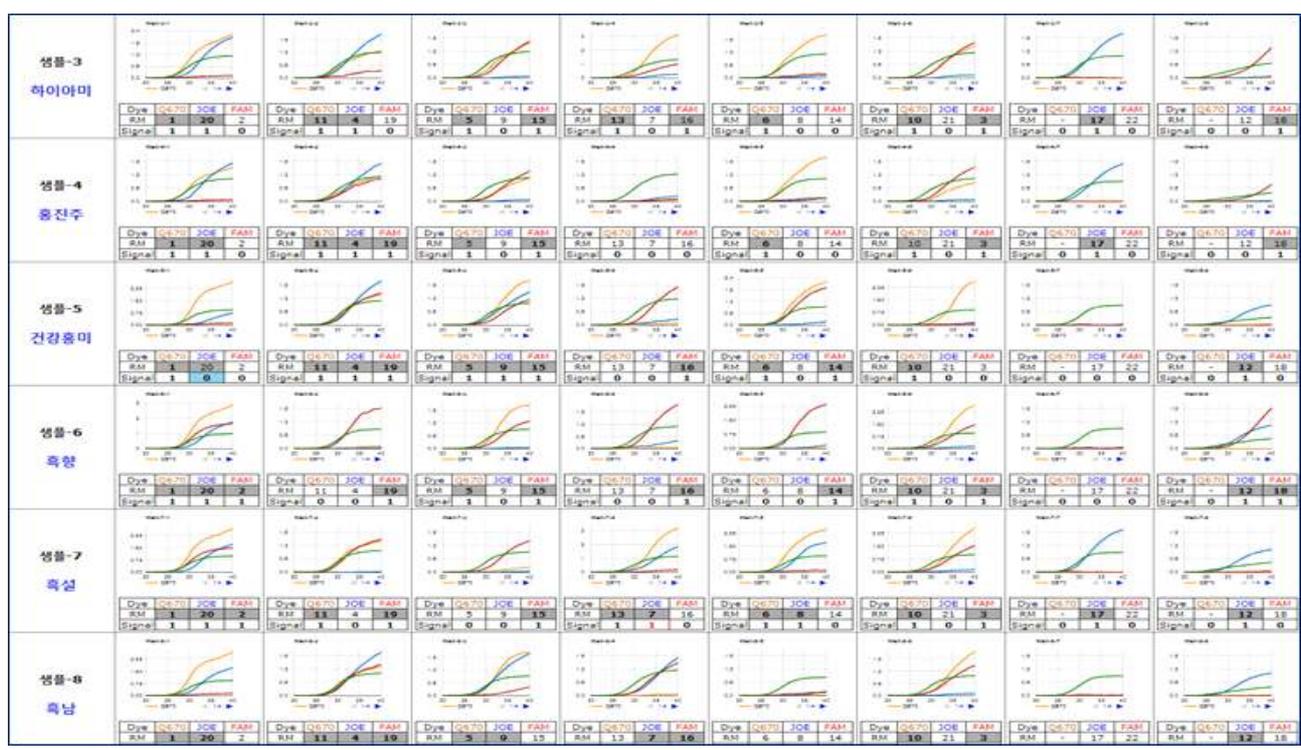


그림 32. 개발 정제 kit의 품종 구분 반복 평가.  
백미 (하이아미) 및 홍미 (홍진주, 건강홍미), 흑미(흑향, 흑설, 흑남)을 사용하여 구분성을 시험함

## 5. FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit의 구성

### 가. 주요 개발 내용

- 쌀 품종 검증용 정성 및 정량이 가능한 제품을 개발하고자 하였다. 이의 제품화는 다른 농축수산물의 품종검사 원산지 검사 제품화의 최상의 모델 제품이 될 수 있을 것이다.
- 제품화를 위해 다양한 기술을 접목하여 최종적으로 완성하였다. 적용 기술은 핵심 qRT-PCR 기술인 FenDEL 기반 기술과 본 기술 개발 과제를 통해 확보한 높은 대립유전자 구분능력이 있는 효소 (특허출원: 10-2020-0064838), 게놈 DNA preparation 기술 및 상품의 보존 기술 (등록번호: 제 1018457150000) 및 multi plex qRT-PCR 분석 program (특허출원: 10-2020-0052320) 기술이다.
- 제품 구성을 위해, 양성 표준물질 확보, primer set의 구성 적합한 probe의 design 및 확보, 효소의 안정적 생산 및 보존, dNTP 및 buffer 조성을 확립하였다 (제품 manual에 포함 됨- 결과 미제시) .
- 22종 이상의 SNPs를 구별 할 수 있는 최적의 primer probe set을 구성하기 위해 다양한 조합의 multiplex PCR의 및 세부 조건을 시험하여 최종 제품 구성을 확립 하였다.
- Primer와 Probes 의 농도, 효소 사용량 등 제품의 구성 조건 확립하였으며, 특히 개량된 효소를 사용할 경우 효소의 품질 조건을 명확히 규정하여 안정적인 결과 값 도출이 이루어지도록 하였다.

### 나. 제품 구성 특징

- FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit는 벼(쌀) 품종을 판별하기 위한 실시간 PCR 분석용 시약을 포함하고 있다.
- 22개 SNP 마커를 이용한 정량 및 정성 테스트 제품이다.
- 국가기관(국립농산물품질관리원)에서 개발, 검증한 신뢰할 수 있는 SNP 마커를 사용하여 신뢰도가 높다.
- 특허 및 신기술로 인증된 유전자변이 정밀분석 기술인 FenDEL® 기술을 중심으로 다양한 특허를 적용하였다.
- Real-time PCR에 필요한 모든 시약 포함하여 추가 필요 시약이 없다.
- 경제적이고 효율적이면 간편한 벼(쌀) 핵산 추출 전용 키트(GenoAid™ Rice Genomic DNA Purification Kit)를 제공함으로 추가비용 발생이 매우 적다.
- 쉽고 빠르게 벼(쌀) 품종 판정이 가능한 자동화된 품종 판정 프로그램 제공함으로 사용자의 편리성과 판정의 신뢰도가 높다.
- 96 well의 PCR 증폭곡선 및 판정결과를 동시에 보여줌으로 판정 해석의 쉽고 오류를 최소화 할 수 있다.
- Real-time PCR 기종별 최적 분석 변수 조정 가능하여 확장성이 높다.
- 22-plex qPCR 증폭데이터 자동분석 및 품종 판정 결과를 간편하게 확인할 수 있다.
- 분석결과의 저장 및 DB 관리, 시험성적서 발행 통합관리체계가 있어 시험자 및 관리자의 업무 효율성이 높다.

#### 다. 키트 (FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit) 구성과 보관

- 하기의 kit 내용물로 구성되어 있다. (24립 판정 제품 기준임)
  - 24립 검사 기준으로 kit 구성,
  - 5 x qPCRMix (600 ul) - 냉동보관,
  - 8개의 OligoMix set (A~H) 각 250 ul, 각 set을 다른 color로 표시함
  - 멸균수 \*2 로 구성됨
  - 96 well PCR plate

#### 라. OligoMix 특성표

- 각각의 OligoMix는 IC(internal control)와 2 또는 3종의 SNP 마커를 동시에 분석할 수 있도록 고안됨.
- 프라이머와 프로브가 혼합되어 있으며, 분석에 이용되는 real-time PCR 분석 기종에 따라서 프로브는 다른 종류의 형광물질로 표시되어 있음.
- 반복시험을 통해 안정적인 결과를 보이는 multiplex set (OligoMix)으로 구성(표 14).

#### 마. Real time PCR 의 조건

- 총 30 $\mu$ l의 반응액이 준비된 96 well plate를 사용하여 real-time PCR을 수행한다.
- 분석 기기의 종류별 'Target' 메뉴를 설정
- ABI7500 분석기를 사용하는 경우  
Target 1 - FAM, Target 2 - JOE, Target 3 - TAMRA, Target 4 - Cy5, Quencher는 None으로 선택
- CFX96 분석기를 사용하는 경우  
FAM, JOE, Cal Red610, Quastr670
- 확립된 PCR 반응 조건은 표15와 같음

#### 바. Real-Time PCR 분석 결과 판정

- 웹 기반으로 구축된 『(주)제노텍 :: 벼(쌀) 품종 검정 시스템』에 접속하여 Real-Time PCR 기기에서 내려받은 .xls 또는 .xlsx 형식의 파일을 분석함으로써 벼(쌀) 품종 판별 결과를 손쉽게 얻을 수 있도록 구성함
- 『(주)제노텍 :: 벼(쌀) 품종 검정 시스템』은 real-time PCR 기기에서 xls 또는 xlsx 형식의 파일을 내려받은 후 간편한 작업에 의해 품종 판별 결과를 확인할 수 있음
- 과제를 통해 개발된 프로그램을 적용함

표 15. OligoMix 및 특성

A	OligoMix	RM1	Quasar670	Quasar670
		RM20	JOE	JOE
		RM2	FAM	FAM
B	OligoMix	RM11	Quasar670	Quasar670
		RM4	JOE	JOE
		RM19	FAM	FAM
C	OligoMix	RM5	Quasar670	Quasar670
		RM9	JOE	JOE
		RM15	FAM	FAM
D	OligoMix	RM13	Quasar670	Quasar670
		RM7	JOE	JOE
		RM16	FAM	FAM
E	OligoMix	RM6	Quasar670	Quasar670
		RM8	JOE	JOE
		RM14	FAM	FAM
F	OligoMix	RM10	Quasar670	Quasar670
		RM21	JOE	JOE
		RM3	FAM	FAM
G	OligoMix	RM17	JOE	JOE
		RM22	FAM	FAM
H	OligoMix	RM12	JOE	JOE
		RM18	FAM	FAM

표 16. FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit 의 PCR 조건

Cycle step	Temp	Time	Cycles
Initial Denaturation	95°C	5 minutes	1
Denaturation	95°C	30 seconds	40
Annealing/Extension*	55°C	40 seconds	

\* Data Collection

# 제 4 절 벼(쌀) 품종 검정 키트 제품의 안정성 및 성능 평가

## 1. 개발 제품

### 가. 개발 제품 2종

- 아래 그림과 같이 2종 제품 (벼(쌀) genomic DNA preparation kit 및 FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit)을 개발하였다 (그림 33).



그림 33. 개발된 제품 사진

A. 벼(쌀) genomic DNA preparation kit 및 FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit

### 나. 개발 제품 매뉴얼 및 홍보 자료

- 제품의 매뉴얼 (총 27 page) 완성 (그림 34)
- 홍보용 팜플릿 완성 (그림 35)

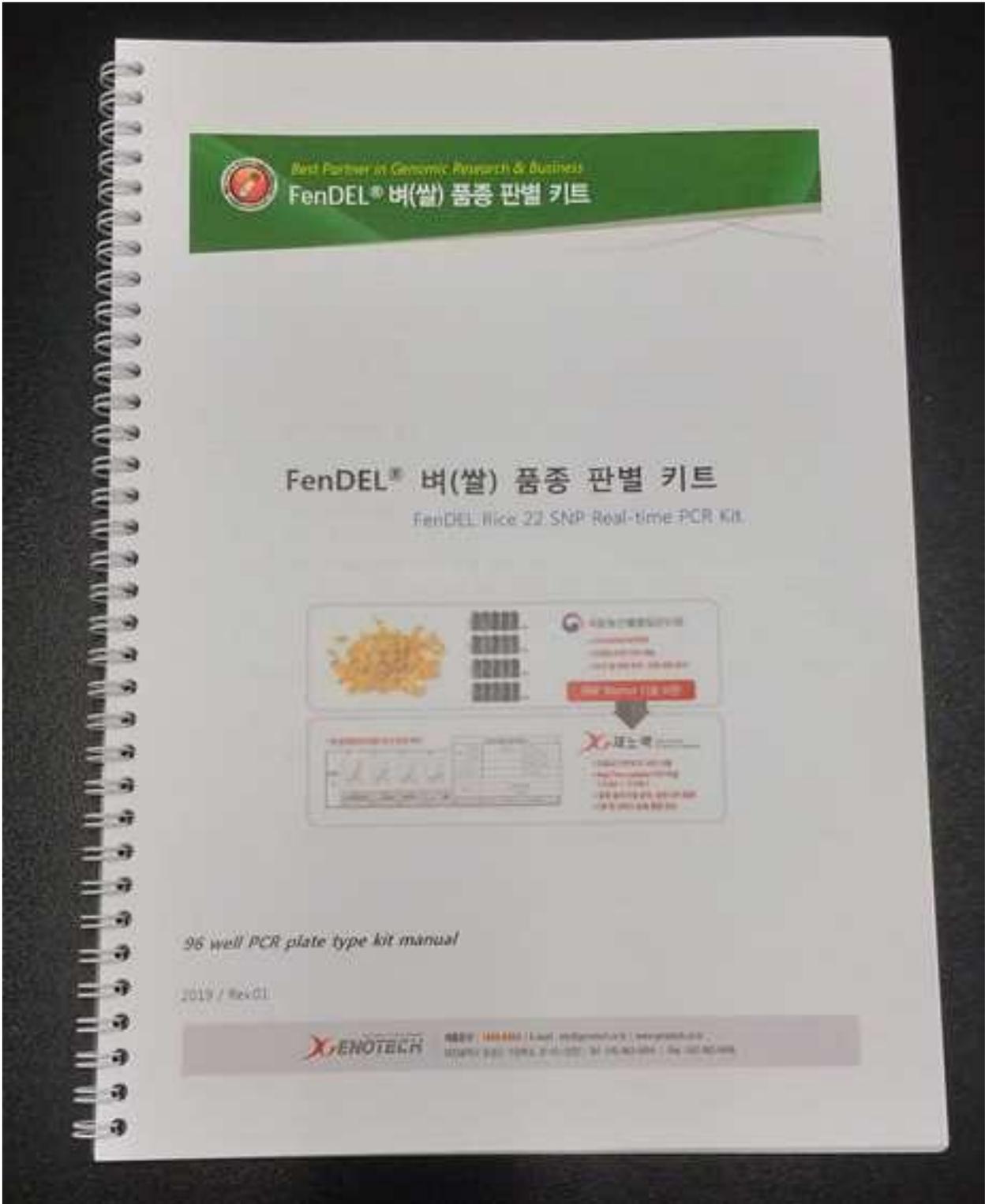


그림 34. 개발제품 사용 매뉴얼.



## 2. 검정 키트의 안정성 시험

- 개발 검정키트의 구성에 효소를 포함한 primer probe 등이 포함되어 있어 유통 및 보관시의 안정성 확보가 품질의 유지에 매우 중요하다. 이에 따라 본 기관의 보유 특허 (특허 등록번호:10-18457150000) 인 Antifreezing agent (AFA)를 정량 첨가하여 장기 보관 유통할 수 있도록 제품을 구성하였다.
- AFA 첨가와 효소 혼합 첨가시 저온에서의 보관 안정성을 시험하였다
- 각 시험구를 보관후 매 1개월이 지난 후에 (총 12개월-현재 10개월 평가) qRT PCR을 수행하여 최초(0 개월)와 비교하여 평가하였다. 시험구는 평가를 위해 하기와 같은 set (GAPDH/RM1/RM20/RM2)를 구성하여 실시하였다.

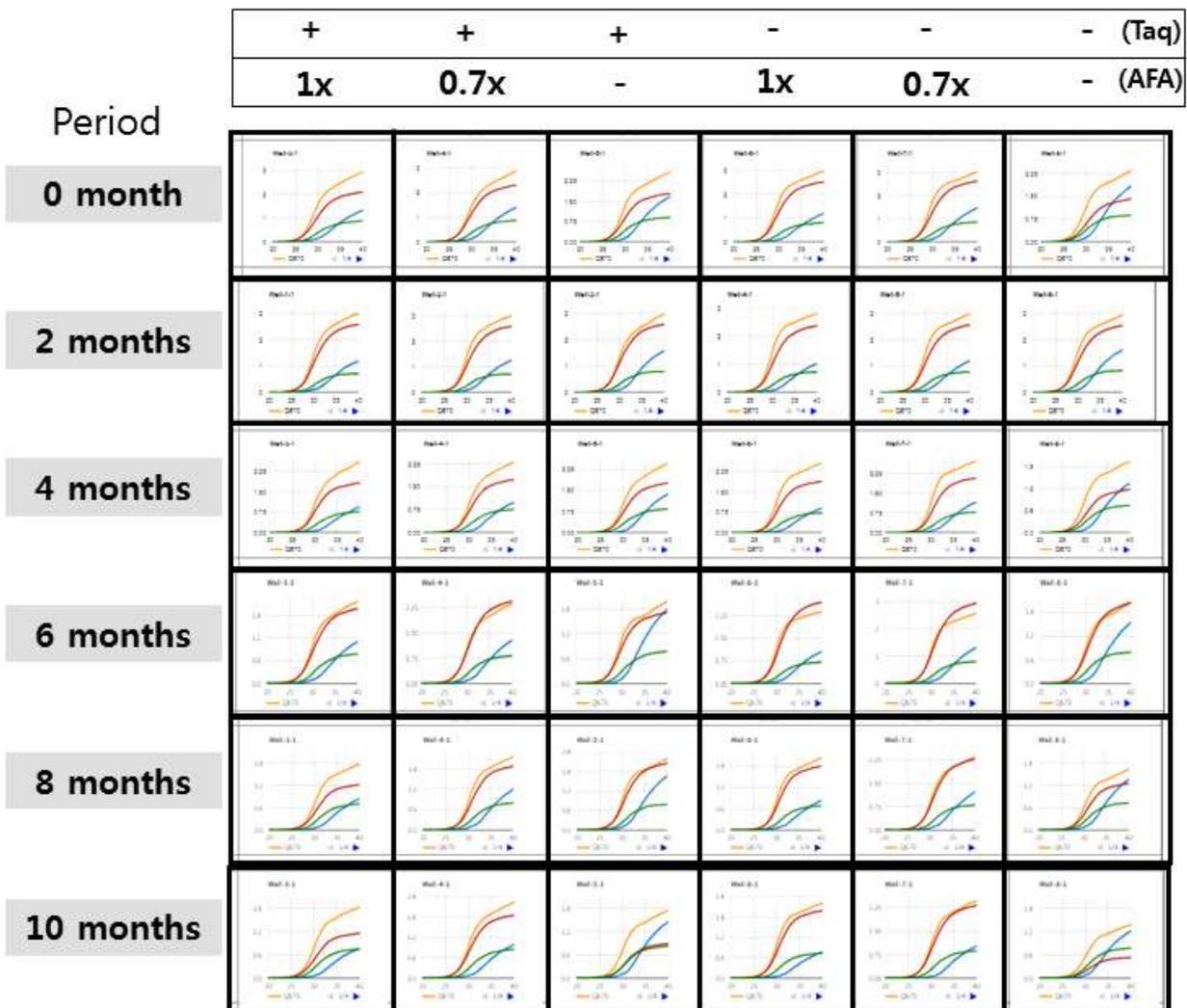


그림 36. AFA 첨가 및 효소 첨가에 따라 장기 보관후 qRT-PCR 시험 결과.

보관은 효소 포함시 -70℃ (+Taq) 또는 -20℃(-Taq)에서 장기 (12 개월 동안) 보관 시험함 (현재 10개월)

- 시험 구성 set 은 AFA 미포함 시험구와 AFA 포함시 (1x 및 0.7x) 그리고 효소 미포함과 효소 포함 제품구성시의 안정성을 평가하였다. 그 결과 Taq enzyme 포함관계 없이 AFA가 0.7x 이상 포함되었을 경우 안정적으로 유통 보관 (-20℃)에서 10개월 이상 안정적으로 보관 가능 함을 확인하였다 (그림 36).

### 3. 기타 시험

- 다양한 Real-time PCR 기기 중에 multiplex PCR 수행시 다수의 표지 형광 signal을 검출할 수 있으며 국내에 많이 보급된 기종을 대상으로 시험 평가 하고자하였으며, 기기에 따른 최적화 및 평가, 정밀도, 유효성을 평가하였다(프로그램 보정 기능 추가).
- 기기에 따라 온도 control 방법, 형광 검출 방법이 다르므로 이를 반영한 최적 조건 및 probes의 형광 dye의 종류 등의 세부적인 조건을 검토하였다.
- 1차적으로 시험을 위한 장비는 Applied biosystem 사의 7500 Real-Time PCR System, Qunatastudio 5 와 BioRad 사의 CFX96 real-time PCR system에 적합하도록 하였다.

### 4. 개발 제품의 성능 평가

- 자체 반복평가를 실시하였다.
- 자체 평가후 완성된 kit을 활용하여 외부평가를 실시하였다.
- 외부평가는 기제품과의 비교를 통해 평가 하였다.
- 또한 실 구매 기관에게 시연 및 납품 평가를 하였다.

#### 가. 자체 평가

- 개발효소를 이용하여 8개의 품종을 대상으로 (코시히카리, 새일미, 골든퀸 3, 밀키퀸, 백진주, 삼광, 진상, 하이아미)에 대해 각 12미 (알)을 반복하여 시험 한 결과 [검증조건 (35 cycles,  $\Delta Rn$  값 0.3 이상)] 100% (96/96) 일치하게 판정하였다 (첨부 시험 자료 1).
- 임의로 100 종에 대한 평가를 수행 모두 정확하게 판정함 결과표를 제시함
- 농산물 품질관리원에서 품종이 확인된 쌀(벼) 품종을 제공 받아 시험함
- 시험은 맹검법으로 수행하여 평가 함
- 정성평가 52립 및 정량 48립으로 수행함
- 정성평가 (52립) 및 정량 평가 (48립) 100% 정확하게 판정함
- 그 결과는 하기와 같음

○ 정성 평가

번호	표준 품종	재출 답안	일치 여부	비고
1	간척	간척	일치	
2	수진	수진	일치	
3	대진	대진	일치	
4	흑향	흑향	일치	
5	고품	고품	일치	
6	화삼	화삼	일치	
7	청안	청안	일치	
8	보석찰	보석찰	일치	
9	소다미	소다미	일치	
10	삼평	삼평	일치	
11	내풍	내풍	일치	
12	안산	안산	일치	
13	아세미	아세미	일치	
14	흑향찰1	흑향찰1	일치	
15	운봉	운봉	일치	
16	만월	만월	일치	
17	조광	조광	일치	
18	밀키권	밀키권	일치	
19	서간	서간	일치	
20	봉광	봉광	일치	
21	상주찰	상주찰	일치	
22	문장	문장	일치	
23	화랑	화랑	일치	
24	중안	중안	일치	
25	건강홍미	건강홍미	일치	
26	조운	조운	일치	

번호	표준 품종	재출 답안	일치 여부	비고
27	만금	만금	일치	
28	해평	해평	일치	
29	고운	고운	일치	
30	화선찰	화선찰	일치	
31	화신	화신	일치	
32	오래	오래	일치	
33	향남	향남	일치	
34	세계화	세계화	일치	
35	주남조생	주남조생	일치	
36	오봉	오봉	일치	
37	신운봉1	신운봉1	일치	
38	청호	청호	일치	
39	계화	계화	일치	
40	단미	단미	일치	
41	청아	청아	일치	
42	장안	장안	일치	
43	주안	주안	일치	
44	풍미	풍미	일치	
45	화남	화남	일치	
46	골든퀀2	골든퀀2	일치	
47	설향찰	설향찰	일치	
48	만추	만추	일치	
49	미광	미광	일치	
50	대야	대야	일치	
51	조평	조평	일치	
52	금안	금안	일치	

○ 정량 평가

- 품종 별 혼입비율

번호	표준품종		제출답안		일치 여부
	품종명	립수	품종명	립수	
1	만풍	2	만풍	2	일치
2	금성	3	금성	3	일치
3	증산	1	증산	1	일치
4	하성1	2	하성1	2	일치
5	청안	1	청안	1	일치
6	고아미	2	고아미	2	일치
7	동진1	3	동진1	3	일치
8	운봉	2	운봉	2	일치
9	주남	2	주남	2	일치
10	대립1	3	대립1	3	일치
11	다청	2	다청	2	일치
12	진품	1	진품	1	일치

번호	표준품종		제출답안		일치 여부
	품종명	립수	품종명	립수	
13	건강홍미	3	건강홍미	3	일치
14	문장	3	문장	3	일치
15	신운봉	2	신운봉	2	일치
16	설백	1	설백	1	일치
17	상미	2	상미	2	일치
18	전남1	3	전남1	3	일치
19	청호	2	청호	2	일치
20	향남	2	향남	2	일치
21	보석	1	보석	1	일치
22	오래	2	오래	2	일치
23	산들진미	1	산들진미	1	일치
24	새고아미	2	새고아미	2	일치

- 시료 별 품종 명

번호	표준 품종	제출 답안	일치 여부	비고
1	만풍	만풍	일치	
2	금성	금성	일치	
3	증산	증산	일치	
4	하성1	하성1	일치	
5	청안	청안	일치	
6	고아미	고아미	일치	
7	동진1	동진1	일치	
8	운봉	운봉	일치	
9	주남	주남	일치	
10	대립1	대립1	일치	
11	다청	다청	일치	
12	진품	진품	일치	
13	건강홍미	건강홍미	일치	
14	문장	문장	일치	
15	신운봉	신운봉	일치	
16	설백	설백	일치	
17	상미	상미	일치	
18	전남1	전남1	일치	
19	청호	청호	일치	
20	향남	향남	일치	
21	보석	보석	일치	
22	오래	오래	일치	
23	산들진미	산들진미	일치	
24	새고아미	새고아미	일치	

번호	표준 품종	제출 답안	일치 여부	비고
25	금성	금성	일치	
26	전남1	전남1	일치	
27	건강홍미	건강홍미	일치	
28	동진1	동진1	일치	
29	만풍	만풍	일치	
30	상미	상미	일치	
31	문장	문장	일치	
32	전남1	전남1	일치	
33	주남	주남	일치	
34	건강홍미	건강홍미	일치	
35	고아미	고아미	일치	
36	다청	다청	일치	
37	문장	문장	일치	
38	하성1	하성1	일치	
39	청호	청호	일치	
40	오래	오래	일치	
41	동진1	동진1	일치	
42	향남	향남	일치	
43	운봉	운봉	일치	
44	신운봉	신운봉	일치	
45	금성	금성	일치	
46	대립1	대립1	일치	
47	새고아미	새고아미	일치	
48	대립1	대립1	일치	

## 나. 개발 kit의 외부 시험 1

### (1). 농산물 품질 관리원 시험연구소 방문 및 협의

- 국내 농산물의 품질 관리에 최고 기관인 농산물 품질 관리원을 방문하고 관계자와 기술 검토를 지속적으로 수행하였다. 이는 본 제품개발 과제 수행 이전부터 지속적으로 협의하면서 제품 개발을 수행하였다.
- 제품 개발과 관련하여 품질관리원에서 사용한 표준 방법인 판정표 (엑셀) 도입이 필요할 것으로 조언을 받았다. 농산물 품질 관리원 산하 기관(본원 및 지역 지원)에서 수행한 분석결과는 품종 확인 및 기 구축 운용하고 있으며, 또한 이 엑셀 판정표 값은 데이터베이스 시스템에 입력하기 위한 형식이므로 농산물 품질 관리원등에서는 필수 요소로 현재 운용하고 있기 때문이다.
- 이에 따라, 엑셀표 판정이 가능하도록 개발 판정 시스템에 도입하였다. 이는 본 기관이 개발한 진보적 평가에 따르면 필수적 요소가 아니라고 판단하지만, 현재의 평가 환경에 준할 경우 이에 따른 판정이 요구되어 시장 진입을 위해 도입하였다.

### (2) 검정 기관 (농업기술센터)을 방문하여 제품 설명 및 시연

- 코로나 19 로 인해 검정기관 방문 등의 대면 활동의 제약이 있었으나, 다행히 2개 기관의 협조로 개발 제품을 시연하고 그 결과를 확인 할 수 있었다.
- 외부 기관 (충남 B시 농업기술지원센터 유전자분석실) 시연과 직접실시를 병행하여 결과를 확인 비교 하였다 (그림 38).
- FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit를 사용하여 시험한 결과는 본 기관의 Server 시스템에서on-line을 통해 결과 판정 viewer program을 이용하여 확인하였다.
- 시연 결과 : 분석을 통해 100% (각기관 12/12; 총 24/24) 품종을 정확히 판정하였다 (그림 39).
- 분석결과 확인: 벼(쌀) 품종 판정 프로그램(<http://rice.genotech.co.kr>) 접속 확인 결과
  - 분석 방법: 24립 정량분석
  - 분석 결과: 24립 모두 '평안' 품종

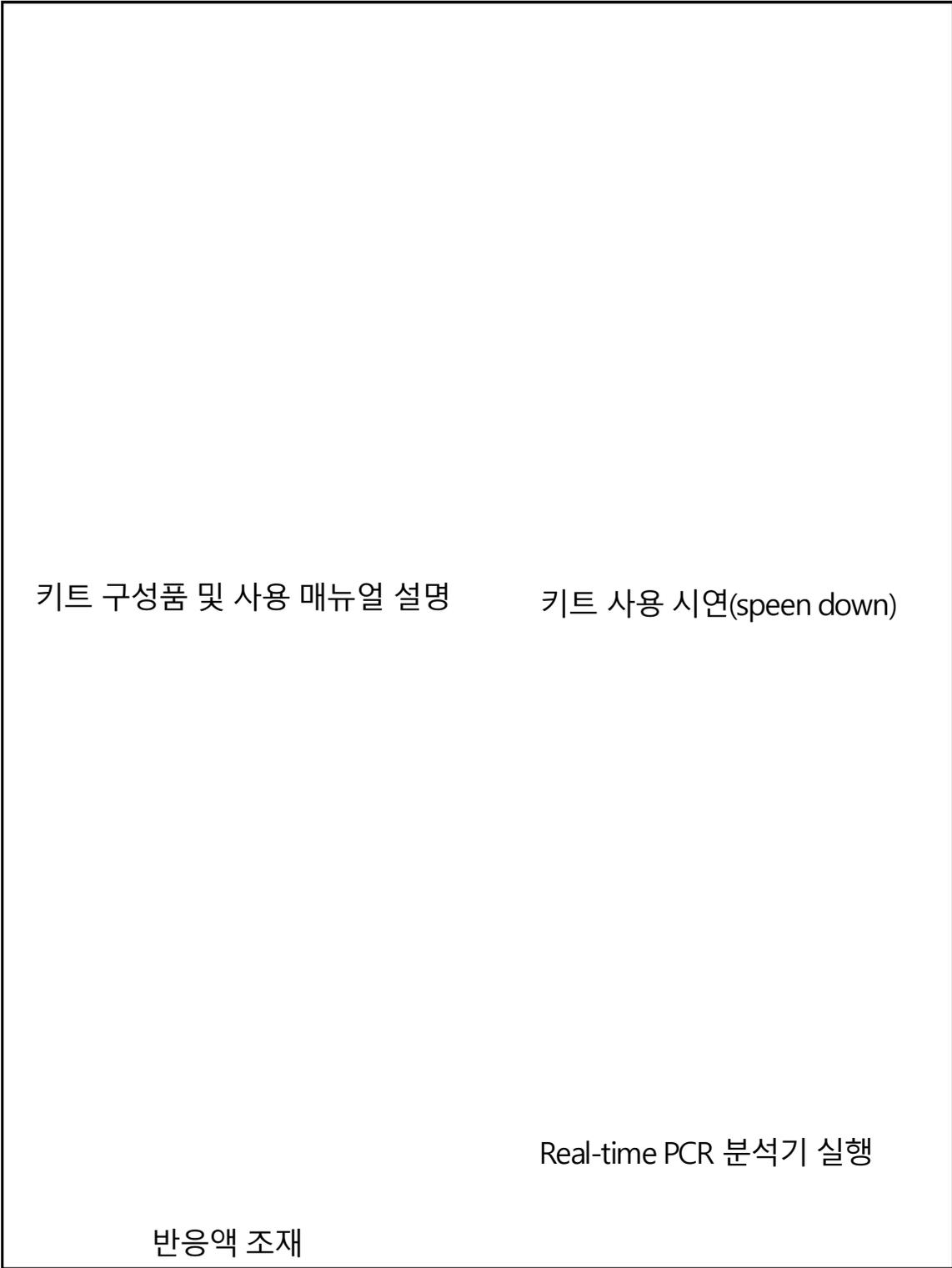


그림 37. 외부기관의 제품 사용 및 평가 (시연)  
충남 B시 농업기술지원센터 유전자분석실에서 시험  
FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit 및 벼(쌀) 품종 판정 프로그램  
(<http://rice.genotech.co.kr>)를 사용한 시험

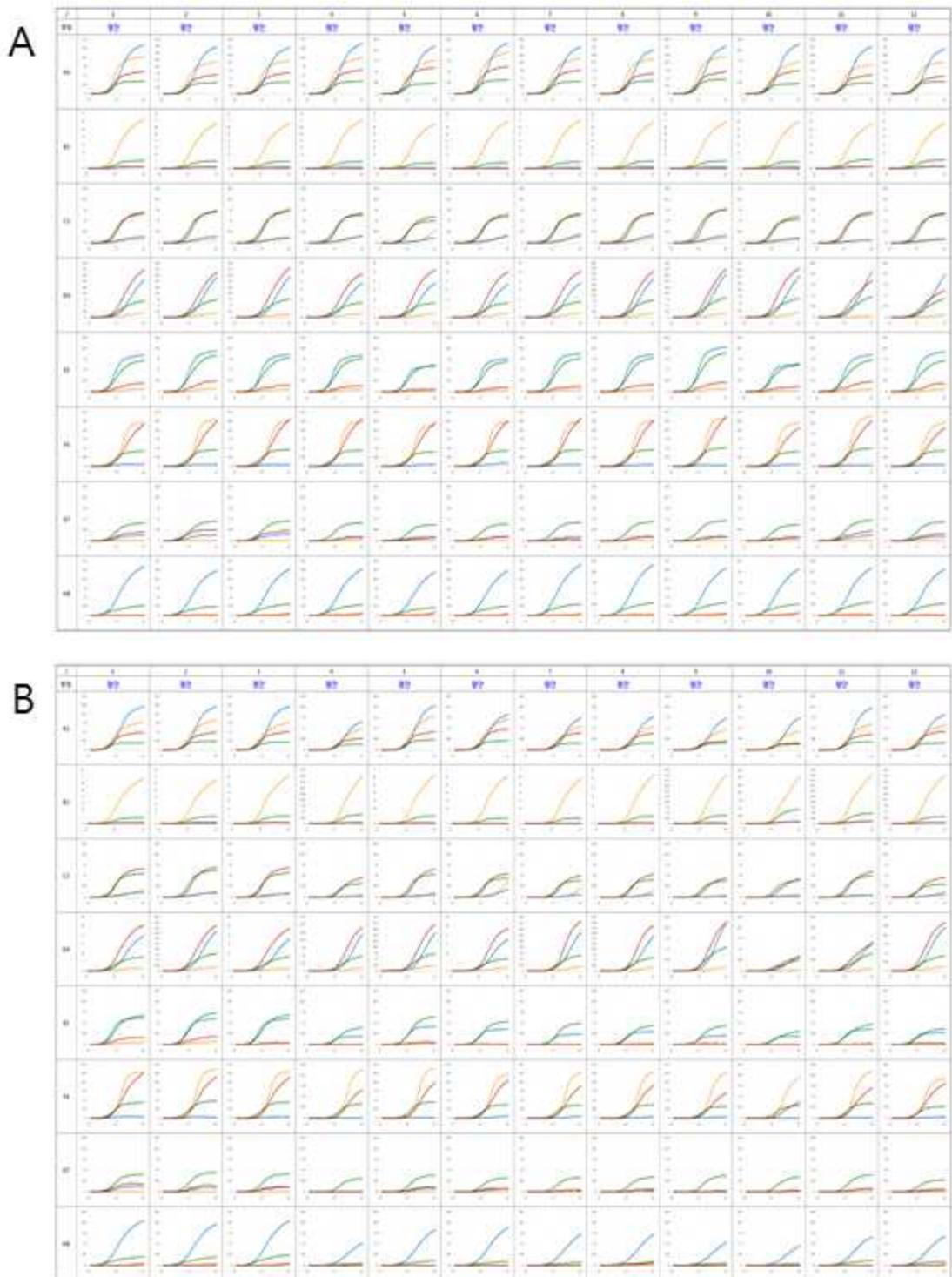
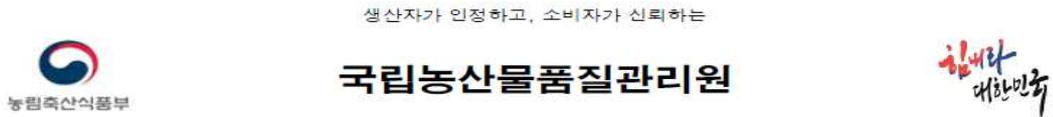


그림 38. 벼 품종 검정을 위한 qRT-PCR 결과 비교.

A. 제노텍 기술지원(시연) 분석 결과 B. 충남 B시 기술센터 담당자 분석 결과  
 FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit를 사용, 쌀 (평균)을 24립 사용하여  
 평가함

(3) 농산물 품질관리원 벼(쌀) 품종 검정기관 지정

- 개발 kit을 활용한 벼(쌀) 품종 검정 시장을 개척하기 위해 농산물 품질관리원에 검정기관 지정을 신청함
- 현장 심사를 진행하였으며, 특히 직접 개발 kit을 사용하여 blind test를 실시함.
- 정량분석용 벼 48립, 정성분석용 24립에 대해 개발 제품으로 품종을 분석하여 검정결과를 제시함.
- 제시결과 품종을 정확히(100%) 맞추어 현장심사 결과가 서류에 '적정'으로만 표기함.



생산자가 인정하고, 소비자가 신뢰하는

수신 (주)제노텍 대표  
(경유)

제목 검정기관 지정 신청서 접수 및 심사 계획 알림

1. 관련: 「농수산물품질관리법」 제99조(검정기관의 지정 등), 「농산물등의 검정기관 지정 세부절차 및 운영 요령」(농관원고시 제2020-11호), 검정기관 지정신청서((주)제노텍)
2. 위와 관련하여 귀 기관이 신청한 검정기관 지정신청서의 접수 및 심사 계획을 아래와 같이 알려드리니 업무에 참고하시기 바랍니다.

- 가. 접수일자: 2020.06.30.(화)
- 나. 심사일정: 2020.07.07.(화) ~ 07.08.(수)  
\* 세부계획 '붙임' 참조
- 다. 처리기한: 2020.09.21.(월)

붙임 검정기관 지정 심사 계획 1부. 끝.



주무관	오희인	서기관	최남근	품질검사과장	전결 2020.7.1. 서문교
협조자					
시행	품질검사과-2112	(2020. 7. 1.)	접수		
우	39660	경상북도 김천시 용전로 141 (율곡동)	/ http://www.naqs.go.kr		
전화번호	054-429-4120	팩스번호	054-429-4128	/ ohi8105@korea.kr	/ 비공개(5)

기회는 공정하게! 희망은 다같이!

## 검정기관 지정 현장심사 결과

□ 신청기관: (주)제노텍

항목	현장심사 결과		비고
검정 인력	· 신청 분야의 검정인력 자격 및 인원수	적정	
시설·장비·인력 등 일반사항	· 검정에 필요한 시설 및 배치 · 필수 장비 보유 · 검정실 안전 시설 등	보완필요 적정 적정	평가보고서(1/3)
검정에 대한 이론적 지식	· 분석과정, 분석이론 등 · 시료 균분에 대한 이해도 미숙 · 법령에 대한 이해도	적정 보완필요 보완필요	평가보고서(2/3)
품질관리기준	· 관련 부서 및 검정원의 독립된 업무보장 등 · 검정인력의 기술적 능력 평가 · 교육훈련 계획 수립 등	적정 보완필요 보완필요	평가보고서(3/3)
검정능력평가	(현장입회시험)  농산물 및 농산가공품    품종	  적정	

2020. 7. 8.

다. 개발 kit의 외부 시험 2

- 벼(쌀) 품종 검정 전문기관에 의뢰하여 (주)제노텍 제품[FenDEL 벼(쌀) 품종 판별 키트]의 성능을 평가 함
- 외부의뢰 평가 기관 : 쌀 품종 검정 전문기관 : 솔젠트(주) (지정번호: 2007-3)
- 평가 기간 : 2020년 3월 18일 ~ 2020년 3월 27일
- 평가 방법 및 전략
  - 분석내용: 정성분석 - 8점(6립/점)
  - 분석방법: 시료준비 및 방법을 상호 기관간의 교차하여 평가함

A) 평가기간에서 준비된 DNA시료 4점을 대상으로 솔젠트와 제노텍 제품으로 각각 품종 판별

B) 제노텍에서 준비된 DNA시료 4점을 대상으로 솔젠트와 제노텍 제품으로 각각 품종 판별

구분	DNA 준비	PCR 방법	etc
A	솔젠트	솔젠트 (multiplex PCR)	데이터
		제노텍 (real-time PCR)	
B	제노텍	솔젠트 (multiplex PCR)	분석+데이터
		제노텍 (real-time PCR)	

□ 평가 착안점

- 분석방법 간 품종 판별 결과 일치 여부
- 제노텍 방법으로 준비된 DNA의 다른 분석법 적용 가능 여부 평가
- 솔젠트 방법으로 준비된 DNA의 제노텍 qPCR 분석법 적용 가능 여부 평가

평가 결과 :

개발 Kit FenDEL 22 SNP Real-time PCR Kit 과 Multiplex-X Rice Kit의 품종 판별 결과 일치함을 확인함  
(첨부 자료 2)

- 사업화성과 및 매출실적
  - 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.03 억원*	
			향후 3년간 매출	25 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	20 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : 10%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 5%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			1위

\* 제품을 출시함

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)*		3		
	소요예산(백만원)*		1000		
	예상 매출규모** (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	28	40
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	50	60
		국외	0	10	20
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 한약 자원 품종 검정 제품 - 건강식품 자원 품종 검정 제품 - 암 분자 진단 제품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0	0	0
	수 출		0	0	0

\* 개발과제에서 제시한 제품은 출시함, 추가 제품 생산소요시간

\*\* 예상 매출규모는 현 출시 제품에 대한 예상

## 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

### 3-1. 목표

- 분자진단 핵심기술로 개발된 FenDEL qPCR을 다수변이의 동시분석 기술이 적용되는 보편적인 multiplex qPCR로 개발하고자 함. 이에 기술에 적합한 효소를 개량하고 독창적이고 사용자 편리성이 보장되는 분석용 프로그램을 구현하고 지적재산권으로 확보함. 예시적 제품으로 쌀 품종검사 (500품종 이상 판별가능) 제품 개발에 적용하고자 함. 이를 위해 경제적인 핵산 추출 (50% 이상 비용절감), 제품의 보관, 유통 등에 관련된 상품화 기술을 확보하여 쌀 품종검사 제품을 개발하고 이를 대단위(250시료 이상 시험)로 검증함. 이를 통해 FenDEL 기술 적용 multiplex qPCR 검사 기반을 확립하고자 함.

### 3-2. 목표 달성여부

개발목표 (쌀검정 제품 개발 및 제품을 위한 기술 확보) 달성함,

즉 쌀 검정 제품 및 관련한 지적재산권등의 기술을 확보함 (100% 자가 기술 체계 확립)

#### ■ 특허 1 : (첨부3)

<발명의 명칭> 유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체

<발명의 요약> 본발명은 패밀리 A에 속하는 DNA 중합효소 변이체 및 그 이용에 관한 것으로서, 프라이머 3' 말단의 염기가 주형과 상보적일 때는 중합이 원활하게 일어나며, 비상보적일 때는 중합이 억제되어 두 경우의 구별 (discrimination)이 용이하게 되는 DNA 중합효소 변이체, 이 변이체를 이용한 PCR 방법 및 이 변이체를 포함하는 PCR 키트에 관한 것이다. 본 발명은 단일염기다형성 분석 (SNP genotyping) 및 체세포 돌연변이 검출 (somatic mutation detection) 등에 유용하다.

<출원번호> 10-2020-0064838

<출원일자> 2020.05.29

<면수> 109 page

<과제 기여율> 1/1

#### ■ 특허 2 : (첨부 4)

<발명의 명칭> 다중 실시간 PCR 뷰어 시스템

<발명의 요약> 본 발명은 다중 실시간 PCR 뷰어 시스템에 관한 것으로서, 좀 더 자세히는 종래 실시간 PCR 분석기기들의 결과 표시의 문제점을 극복하고, 분석자가 다수 및/또는 다중의 실시간 PCR 결과를 일목요연하게 파악하고 분석할 수 있도록 하는 새로운 뷰어 시스템에 관한 것이다.

<출원번호> 10-2020-0052320

<출원일자> 2020.04.29

<면수> 24 page

<과제 기여율> 1/1

■ 개발 제품 1

<제품명> 벼(쌀) gDNA prep Kit

<제품특성> 벼(쌀), 현미 등의 품종검정 qRT-PCR에 적합한 genomic DNA 조제 kit

<제품사진> 그림 33 A

<기타사항> 경제성을 고려한 간편 kit, color미 등에 적용가능한 보편적 제품

<판매실적> 432,000(원)

■ 개발 제품 2

<제품명> FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit

<제품특성> 쌀(벼) 품종 검정 용 Kit (정량 및 정성용)

<제품사진> 그림 33 B

<기타사항> 과제개발특허 2건 및 보유 특허 3건의 기술을 접목한 첨단제품임

<판매실적> 2,160,000 (원)

■ 논문

개발 기술의 지적재산권을 먼저 확보(국제 특허 출원) 후 논문으로 발표할 예정임.

■ 학회 발표

생물공학회 2020. 6. 24 일 예정

(코로나 19로 인한 학회 연기) - 초록 제출 (첨부 5)

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

없음

## 제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

본 개발과제를 통해 크게 3가지의 범주의 기술을 확보하였다.

이에따라 연구결과의 활용계획을 적시하고자 한다.

### ■ 기술 1: 다중 실시간 PCR 뷰어 시스템 (특허 10-2020-0052320)

- 상기 기술은 multiplex PCR 수행시 효율적인 관리가 가능한 PCR 결과 판정 및 통합 관리 시스템이다.
- 이 기술은 농림. 수산 관련 제품 (예, 품종구별, 원산지 구별 및 추적, 품종개발 등)에 적용 가능하다.
- 기술 보유 기업인 당사는 이 기술이 적용된 한약제 등의 품종구별 기술 적용 제품에 적용을 추진 중이며, 또한 농수산물 수입시 검역분야에 적용이 가능성을 우선 검토하고 있다 (1-2년 후).
- 또한 이 시스템은 정밀의료진단을 위한 multiplex PCR 제품 및 암, 유전, 대사질환의 임상 연구에 활용하고자 한다 (2-3년 후).

### ■ 기술 2: 유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체(특허 10-2020-0064838)

- 상기 기술은 SNP 및 체세포 돌연변이와 같은 대립유전자의 구분에 매우 유용한 Taq polymerase 유래의 내열성 효소변이체이다.
- 이들 변이체 개발에 관한 상기 연구결과는 세계 최초의 결과로 매우 고무적인 것이다.
- 최초로 규명한 하나의 영역 (loop) 와 3개의 변이 site와 10여개의 변이체는 향후 지적재산권의 배타적 활용이 가능함으로 그 가치가 매우 높다.
- 이의 변이체 및 개발에 관련된 기술은
- 변이 구분용 특화 효소로 직접 판매하는 것, 그리고 국내외의 유수의 진단 기업과 협력을 통해 임상시험 및 관련제품을 개발하는 것, 및 기술의 직접 수출 등이 가능하다.
- 먼저 이 효소를 이용하여 암의 액체생검 (비침습성 검사)과 같은 정밀의료 제품 구현에 활용하고자 한다 (2-3년 후).
- 또한 이 효소는 농림. 수산 관련 제품 (예, 품종구별, 원산지 구별 및 추적, 품종개발 등)에 적용도 고려할 것이다 (1-2년 후).

### ■ 기술 3: 제품화 기술

- 본 과제의 수행으로 유전자 구분용 제품개발에 필요한 모든 기술 pipeline을 구축하였다.
- 본 기업은 개발과제를 통해 신규 확보 2건의 특허 기술 효소 (10-2020-0052320) 및 프로그램 (10-2020-0064838)을 추가하여 기존의 보유 기술인 qPCR 핵심 특허 기술 (제 10-1598398호 및 제10-2019-0164776) 및 신제품보관기술 (10-18457150000)을 포함한 제품화 핵심 기술 pipeline을 완전히 구축하였다.
- 이를 기술 pipeline을 활용하여 품종판별, 가축이력 추적 등의 농축산 산업 분야 및 암과 같은 질병의 조기진단 예후진단 및 동반진단과 같은 고감도 기술이 요구되는 보건의료 제품 개발 등으로 활용할 것이다.

## 붙임. 참고문헌

- Astatke, M., D. K. Chatterjee and G. F. Gerard (2011). "Compositions and methods for temperature-dependent nucleic acid synthesis." United States Patent US 8,043,816 B2.
- Auton, A., L. D. Brooks, R. M. Durbin, E. P. Garrison, H. M. Kang, J. O. Korbel, J. L. Marchini, S. McCarthy, G. A. McVean and G. R. Abecasis (2015). "A global reference for human genetic variation." *Nature* 526(7571): 68-74.
- Baner, J., M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig and U. Landegren (1998). "Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication." *Nucleic Acids Res* 26(22): 5073-5078.
- Bauer, K., T. Myers, F. Reichert, J. S. Fillippo, R. Shahinian and S. Suko (2012). "DNA polymerases with improved activity." US2012/0258501 A1.
- Bergallo, M., S. Gambarino, E. Loiacono, L. Vergano, I. Galliano, P. Montanari, S. Astegiano, P. Tavormina and P. A. Tovo (2015). "Evaluation of IFN-gamma polymorphism+874 T/A in patients with recurrent tonsillitis by PCR real time mismatch amplification mutation assay (MAMA real time PCR)." *Cytokine* 71(2): 278-282.
- Dang, C. and S. D. Jayasena (1996). "Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR." *J Mol Biol* 264(2): 268-278.
- Drum, M., R. Kranaster, C. Ewald, R. Blasczyk and A. Marx (2014). "Variants of a *Thermus aquaticus* DNA polymerase with increased selectivity for applications in allele- and methylation-specific amplification." *PLoS One* 9(5): e96640.
- Eom, S. H., J. Wang and T. A. Steitz (1996). "Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site." *Nature* 382(6588): 278-281.
- Fa, M., A. Radeghieri, A. A. Henry and F. E. Romesberg (2004). "Expanding the substrate repertoire of a DNA polymerase by directed evolution." *J Am Chem Soc* 126(6): 1748-1754.
- Gold, L. and S. D. Jayasena (1997). "Nucleic acid ligand inhibitors to DNA polymerase." US patent US-005,693,502.
- Higgins, R. R., M. Beniprashad, M. Cardona, S. Masney, D. E. Low and J. B. Gubbay (2011). "Evaluation and verification of the Seplex Diarrhea-V ACE assay for simultaneous detection of adenovirus, rotavirus, and norovirus genogroups I and II in clinical stool specimens." *J Clin Microbiol* 49(9): 3154-3162.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7276-7280.
- Hritonenko, V. and C. Stathopoulos (2007). "OmpT proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae." *Mol Membr Biol* 24(5-6): 395-406.
- Ignatov, K. B., A. I. Miroshnikov and V. M. Kramarov (1998). "Substitution of Asn for Ser

543 in the large fragment of Taq DNA polymerase increases the efficiency of synthesis of long DNA molecules." *FEBS Lett* 425(2): 249-250.

Ikebukuro, K. and T. Noma (2003). "Screening of DNA aptamers inhibiting Taq DNA polymerase using algorithm mimicking evolution." *Nucleic Acids Res Suppl*(3): 309-310.

Jarry, A., D. Masson, E. Cassagnau, S. Parois, C. Laboisie and M. G. Denis (2004). "Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E." *Mol Cell Probes* 18(5): 349-352.

Kermekchiev, M. B., L. I. Kirilova, E. E. Vail and W. M. Barnes (2009). "Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples." *Nucleic Acids Res* 37(5): e40.

Kermekchiev, M. B., A. Tzekov and W. M. Barnes (2003). "Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR." *Nucleic Acids Res* 31(21): 6139-6147.

Kim, Y., S. H. Eom, J. Wang, D. S. Lee, S. W. Suh and T. A. Steitz (1995). "Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Nature* 376(6541): 612-616.

Li, Y., S. Korolev and G. Waksman (1998). "Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation." *Embo j* 17(24): 7514-7525.

Lin, Y. and S. D. Jayasena (1997). "Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer." *J Mol Biol* 271(1): 100-111.

Loakes, D., J. Gallego, V. B. Pinheiro, E. T. Kool and P. Holliger (2009). "Evolving a polymerase for hydrophobic base analogues." *J Am Chem Soc* 131(41): 14827-14837.

Martin, P. K., D. A. Simpson and C. D. Hardy (2016). "POLYPEPTIDES HAVING NUCLEIC ACID BINDING ACTIVITY AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION." US patent US 9,267,130 B2.

Martincorena, I. and P. J. Campbell (2015). "Somatic mutation in cancer and normal cells." *Science* 349(6255): 1483-1489.

Marx, A., M. drum and R. Kranaster (2015). "Mutated DNA polymerase with high selectivity and activity." World Intellectual Property Organization WO 2015/082449.

Marx, A., D. Summerer and U. N. Z. (2014). "Mutated DNA polymerases with increased mismatching discrimination." US 8,759,061 B1.

Mhlanga, M. M. and L. Malmberg (2001). "Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR." *Methods* 25(4): 463-471.

Modeste, E., L. Mawby, B. Miller, 3rd, E. Wu and C. A. Parish (2019). "A Molecular Dynamics Investigation of the Thermostability of Cold-Sensitive I707L KlenTaq1 DNA Polymerase and Its Wild-Type Counterpart." *J Chem Inf Model* 59(5): 2423-2431.

Nakagawa, H. and M. Fujita (2018). "Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine." *Cancer Sci* 109(3): 513-522.

Nazarenko, I., B. Lowe, M. Darfler, P. Ikonomi, D. Schuster and A. Rashtchian (2002). "Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore." *Nucleic Acids Res* 30(9): e37.

Newton, C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith and A. F. Markham (1989). "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)." *Nucleic Acids Res* 17(7): 2503-2516.

Ollis, D. L., P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong and T. A. Steitz (1985). "Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP." *Nature* 313(6005): 762-766.

Ong, J. L., D. Loakes, S. Jaroslowski, K. Too and P. Holliger (2006). "Directed evolution of DNA polymerase, RNA polymerase and reverse transcriptase activity in a single polypeptide." *J Mol Biol* 361(3): 537-550.

Patel, P. H. and L. A. Loeb (2000). "DNA polymerase active site is highly mutable: evolutionary consequences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(10): 5095-5100.

Poste, G. (2001). "Molecular diagnostics: a powerful new component of the healthcare value chain." *Expert Rev Mol Diagn* 1(1): 1-5.

Raghunathan, G. and A. Marx (2019). "Identification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase variants with increased mismatch discrimination and reverse transcriptase activity from a smart enzyme mutant library." *Sci Rep* 9(1): 590.

Reddington, K., N. Tuite, E. Minogue and T. Barry (2014). "A current overview of commercially available nucleic acid diagnostics approaches to detect and identify human gastroenteritis pathogens." *Biomol Detect Quantif* 1(1): 3-7.

Reichert, F., K. Bauer and T. W. Myers (2016). "DNA polymerases with increased 3'-mismatch discrimination." US patent US 9,267,120 B2.

Schechter, I. and A. Berger (2012). "On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967." *Biochem Biophys Res Commun* 425(3): 497-502.

Schultz, H. J., A. M. Gochi, H. E. Chia, A. L. Ogonowsky, S. Chiang, N. Filipovic, A. G. Weiden, E. E. Hadley, S. E. Gabriel and A. M. Leconte (2015). "Taq DNA Polymerase Mutants and 2'-Modified Sugar Recognition." *Biochemistry* 54(38): 5999-6008.

Sherrill, C. B., D. J. Marshall, M. J. Moser, C. A. Larsen, L. Daude-Snow, S. Jurczyk, G. S. Shapiro and J. R. Prudent (2004). "Nucleic acid analysis using an expanded genetic alphabet to quench fluorescence." *J Am Chem Soc* 126(14): 4550-4556.

Skiragaila, R., A. Tubeleviciute, R. Rimseliene and S. Burinskas (2013). "DNA POLYMERASES." United States Patent US 2013/0034879 A1.

Strerath, M., C. Gloeckner, D. Liu, A. Schnur and A. Marx (2007). "Directed DNA polymerase evolution: effects of mutations in motif C on the mismatch-extension selectivity of *thermus aquaticus* DNA polymerase." *Chembiochem* 8(4): 395-401.

Suzuki, M., S. Yoshida, E. T. Adman, A. Blank and L. A. Loeb (2000). "Thermus aquaticus DNA polymerase I mutants with altered fidelity. Interacting mutations in the O-helix." *J Biol Chem* 275(42): 32728-32735.

Uehara, H., G. Nardone, I. Nazarenko and R. J. Hohman (1999). "Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection." *Biotechniques* 26(3): 552-558.

Whitcombe, D., J. Theaker, S. P. Guy, T. Brown and S. Little (1999). "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence." *Nat Biotechnol* 17(8): 804-807.

Wu, E. Y., A. R. Walsh, E. C. Materne, E. P. Hiltner, B. Zielinski, B. R. Miller, 3rd, L. Mawby, E. Modeste, C. A. Parish, W. M. Barnes and M. B. Kermekchiev (2015). "A conservative isoleucine to leucine mutation causes major rearrangements and cold sensitivity in KlenTaq1 DNA polymerase." *Biochemistry* 54(3): 881-889.

Yamagami, T., S. Ishino, Y. Kawarabayasi and Y. Ishino (2014). "Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering." *Front Microbiol* 5: 461.

Zhang, K., Z. S. Qin, J. S. Liu, T. Chen, M. S. Waterman and F. Sun (2004). "Haplotype block partitioning and tag SNP selection using genotype data and their applications to association studies." *Genome Res* 14(5): 908-916.

이병철, 박., 이휘호 (2017). "유전자 변이 특이적 증폭 효율이 증가된 DNA 중합효소." 대한민국특허 10-2017-0088373.

첨부1. 시험 자료 (반복시험 평가)

Koshihikari ① 12개 확인



## 새잎미 ② 12알 확인

/	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
판정	새잎미	새잎미	새잎미(-)	새잎미	새잎미(-)	새잎미	수령(-)	새잎미	미음(-)	새잎미(-)	새잎미(-)	새잎미(-)
A1												
B2												
C3												
D4												
E5												
F6												
G7												
H8												

골든퀵3 ③ 12알 확인

일	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
반영	새팅(나)	골든퀵3										
A1	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
B2	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
C3	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
D4	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
E5	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
F6	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
G7	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122
H8	RM111	RM112	RM113	RM114	RM115	RM116	RM117	RM118	RM119	RM120	RM121	RM122

민기권 ㉔ 12살 학인

월	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
평형	민기권											
A1												
A2												
C1												
D1												
E1												
F1												
G1												
H1												

백진주 © 12안 확인

/	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
판형	백진주	백진주(사)	백진주	백진주(사)	백진주(사)							
A1												
B2												
C3												
D4												
E5												
F6												
G7												
H8												

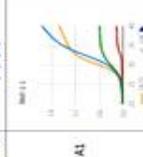
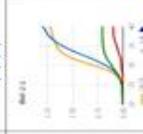
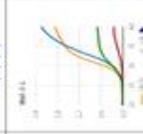
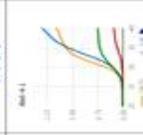
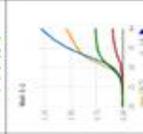
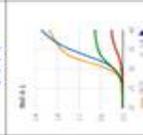
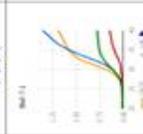
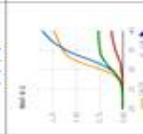
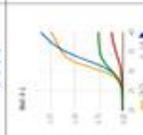
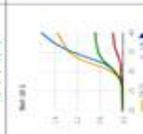
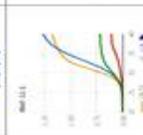
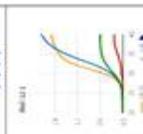
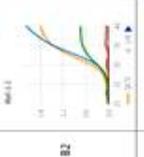
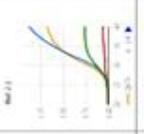
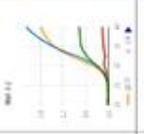
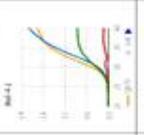
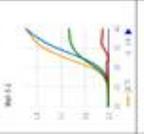
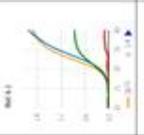
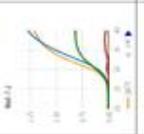
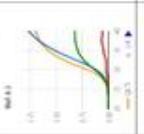
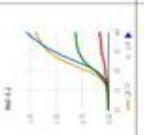
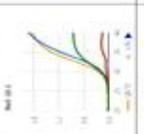
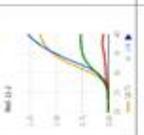
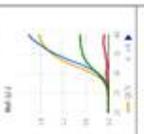
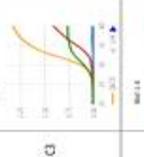
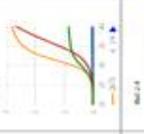
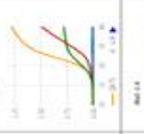
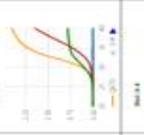
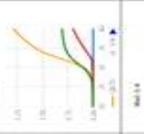
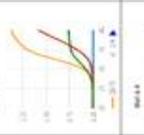
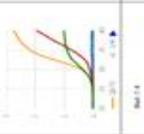
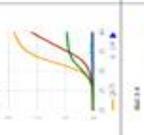
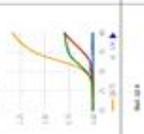
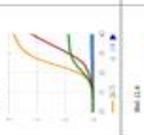
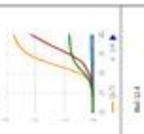
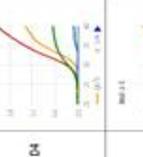
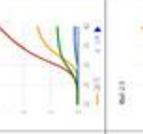
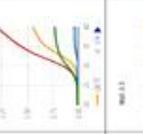
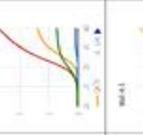
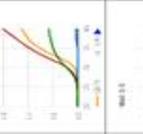
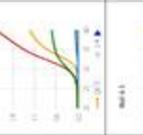
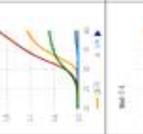
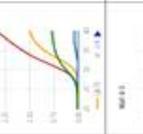
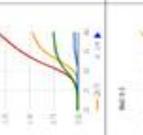
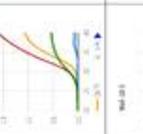
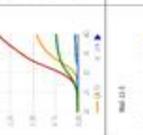
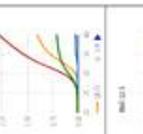
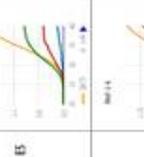
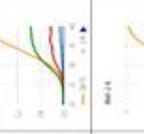
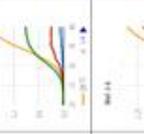
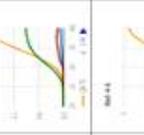
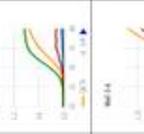
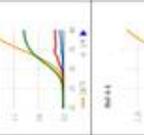
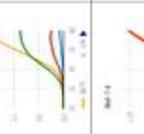
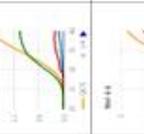
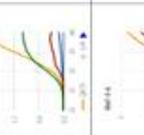
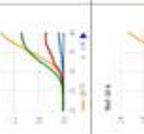
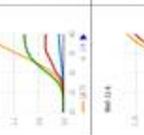
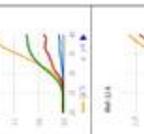
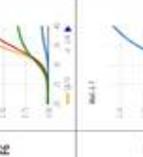
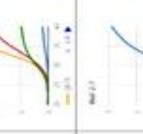
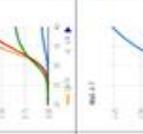
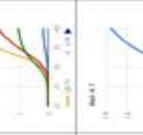
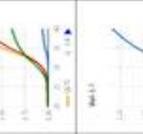
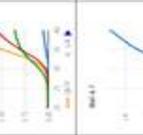
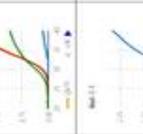
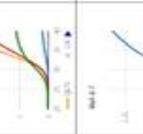
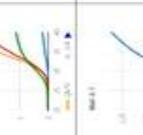
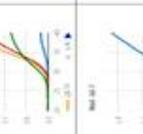
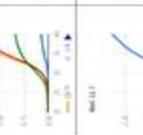
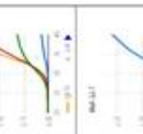
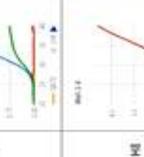
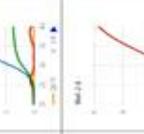
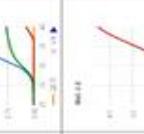
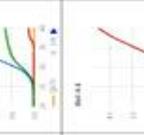
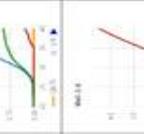
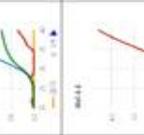
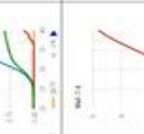
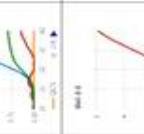
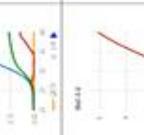
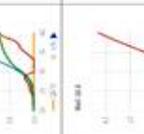
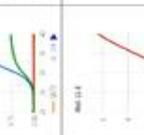
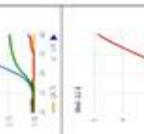
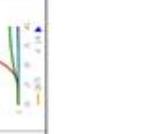
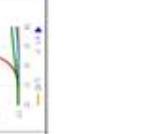
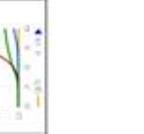
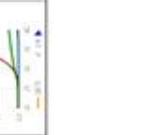
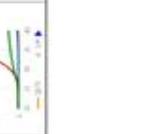
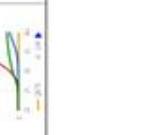
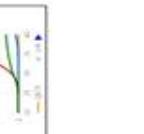
진상 ⑧ 12월 확인

구분	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
구분	진상											
A1												
B1												
C1												
D1												
E1												
F1												
G1												
H1												

삼관 ⑦ 12일 확인

월	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
관공	삼관	삼관	삼관	삼관	삼관(+)	삼관	삼관	삼관(+)	삼관(-)	삼관	삼관(+)	삼관
A1												
B2												
C3												
D4												
E5												
F6												
G7												
H8												

# 하이아미 © 12살 확인

월령	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A1												
B2												
C3												
D4												
E5												
F6												
G7												
H8												

## 첨부 2. 시험 자료 (외부 시험 자료)



**SolGent Customized Research Service**  
**CRS Report**  
 Your Solution for Genetic Technologies

www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

  
**SolGent**  
 www.SolGent.com

### 일반사항

의뢰자 정보				담당자 정보			
소속	㈜제노텍	의뢰자명	차선호	담당부서	연구지원팀		
전화번호	042-862-8404	휴대폰	010-6476-9411	책임자	차미정	연락처	mjcha@solgent.com Directed070-7805-7366
E-mail	69sun@genotech.co.kr			담당자	이현우	연락처	hwlee@solgent.com Directed070-7893-7834
주소	(34113) 대전광역시 유성구 가정북로 26-69						

서비스 정보	
접수번호(용역번호)	20200312-001
의뢰내용 및 실험 방법	벼(쌀) 품종 검정 키트 성능 평가(정성검사) -샘플정보: 4품종 8점 [삼광-2점(12립), 영호진미-2점(12립), 신동진-2점(12립), 새일미-2점(12립)] -평가 대상 키트: GenoAid Rice Genomic DNA Purification Kit, FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR Kit (기준 키트: Multiple-X™ Rice Kit setI / setII)
평가 세부 결과	자료 참조
평가결과	<b>- FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR Kit 와 Multiple-X™ Rice Kit 의 품종 판별 결과 일치함.</b> - GenoAid Rice genomic DNA Purification Kit로 준비된 DNA의 품질은 Multiplex-X Rice Kit를 이용한 분석이 가능하나 일부 시료의 DNA 상태는 판정이 제한되는 경우 있음. - SGD45로 준비된 DNA의 양은 FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR Kit을 이용한 분석이 가능하나 일부 판정이 제한되는 경우 있음. 그러나 프로그램의 보정 기능으로 판정 가능함. - 시험 kit에서 권장하는 DNA purification 방법 적용시 판정결과 더욱 양호함
완수보고일	2020.03.27

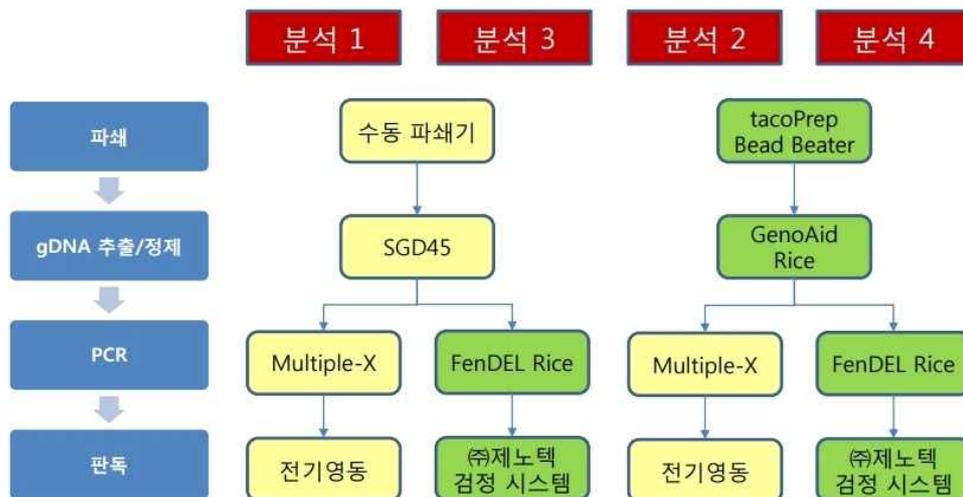
# 실험 내용

각 샘플을 아래의 4가지 분석방법으로 벼 품종 정성검사를 실시하였음.

	분석 1	분석 3	분석 2	분석 4
파쇄	수동 파쇄기		tacoPrep Bead Beater	
gDNA 추출/정제	SGD45		GenoAid Rice Genomic DNA Purification Kit	
PCR	Multiple-X™ Rice Kit setI / setII	FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR Kit	Multiple-X™ Rice Kit setI / setII	FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR Kit
판독	3% agarose gel	(주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템	3% agarose gel	(주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

파쇄, gDNA 추출 및 정제, PCR, 판독 등 각 절차 별 세부 방법은 각 제품의 매뉴얼에 따름.

# 실험 방법 - workflow



## 실험 방법 – PCR conditions

### Multiple-X™ Rice Kit PCR condition

PCR Reagent			
2X Multiplex PCR smart mix		12.5 $\mu$ l	
Primer mix		3.0 $\mu$ l	
Template(gDNA)		5.0 $\mu$ l	
D.W		To 25.0 $\mu$ l	
PCR condition			
95 °C	15 min	X 1	
95 °C	20 sec		
60 °C	40 sec	X 32	
72 °C	1 min		
72 °C	3 min	X 1	
10 °C	$\infty$	X 1	

### FenDEL Rice 22 SNP Real-time PCR condition

PCR Reagent			
5X qPCRMix		6.0 $\mu$ l	
OligoMix(8종)		10.0 $\mu$ l	
Template(gDNA)		3.0 $\mu$ l	
D.W		To 30.0 $\mu$ l	
PCR condition			
95 °C	2 min	X 1	
95 °C	30 sec		
55 °C	40 sec	X 40	
4 °C	$\infty$	X 1	

## 분석결과 – gDNA 추출 및 정제 결과

### SGD45 이용 gDNA QC – (분석 1 & 3)

Sample Number	Sample Name	Concentration (ng/uL)	Ratio (260/280)	Sample Number	Sample Name	Concentration (ng/uL)	Ratio (260/280)
1	삼광01	8.555	1.5	13	신동진01	60.461	2.08
2	삼광02	20.394	2.3	14	신동진02	87.446	2.11
3	삼광03	23.373	2.13	15	신동진03	74.752	2.13
4	삼광04	82.487	2.12	16	신동진04	61.608	2.1
5	삼광05	51.867	2.05	17	신동진05	92.667	1.86
6	삼광06	35.681	2.06	18	신동진06	81.708	2.12
7	영호진미01	26.293	1.93	19	새일미01	100.451	2.11
8	영호진미02	33.396	2.17	20	새일미02	101.156	2.12
9	영호진미03	20.048	1.71	21	새일미03	98.782	2.12
10	영호진미04	16.61	1.8	22	새일미04	83.58	2.06
11	영호진미05	38.208	1.96	23	새일미05	111.014	2.16
12	영호진미06	10.839	2.7	24	새일미06	96.355	2.11

# 분석결과 - gDNA 추출 및 정제 결과

## GenoAid Rice Genomic DNA Purification Kit 이용 gDNA QC - (분석 2 & 4)

Sample Number	Sample Name	Concentration (ng/uL)	Ratio (260/280)	Sample Number	Sample Name	Concentration (ng/uL)	Ratio (260/280)
1	삼광01	302.738	1.54	13	신동진01	361.16	1.57
2	삼광02	285.052	1.55	14	신동진02	358.969	1.59
3	삼광03	263.307	1.53	15	신동진03	337.547	1.5
4	삼광04	287.381	1.56	16	신동진04	368.663	1.53
5	삼광05	279.758	1.57	17	신동진05	334.697	1.56
6	삼광06	291.409	1.56	18	신동진06	317.173	1.57
7	영호진미01	331.421	1.46	19	새일미01	298.304	1.53
8	영호진미02	325.894	1.5	20	새일미02	262.504	1.47
9	영호진미03	311.568	1.51	21	새일미03	315.51	1.54
10	영호진미04	320.563	1.52	22	새일미04	294.911	1.58
11	영호진미05	313.58	1.5	23	새일미05	316.104	1.53
12	영호진미06	333.464	1.5	24	새일미06	323.282	1.55



7

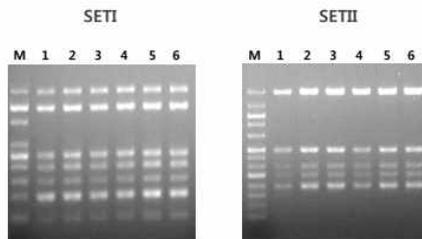
# 분석 1 결과 - PCR 확인

## [SGD45+Multiplex]

### 신동진

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용

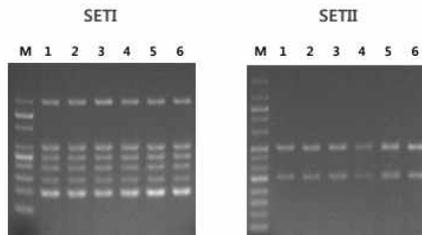


	SETI	SETII	품명
1	1256789	AFHD	신동진
2	1256789	AFHD	신동진
3	1256789	AFHD	신동진
4	1256789	AFHD	신동진
5	1256789	AFHD	신동진
6	1256789	AFHD	신동진

### 새일미

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



	SETI	SETII	품명
1	145678	FI	새일미
2	145678	FI	새일미
3	145678	FI	새일미
4	145678	FI	새일미
5	145678	FI	새일미
6	145678	FI	새일미



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

8

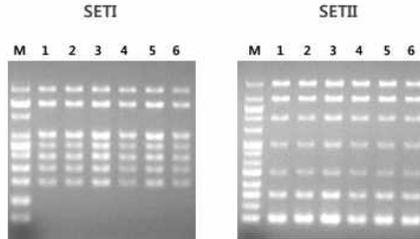
# 분석 1 결과 - PCR 확인

## [SGD45+Multiplex]

### 삼광

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용

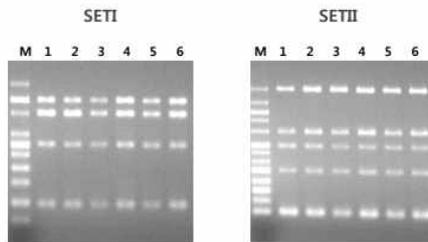


	SETI	SETII	품명
1	1245678	ABDFIKM	삼광
2	1245678	ABDFIKM	삼광
3	1245678	ABDFIKM	삼광
4	1245678	ABDFIKM	삼광
5	1245678	ABDFIKM	삼광
6	1245678	ABDFIKM	삼광

### 영호진미

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



	SETI	SETII	품명
1	2359	AEFIM	영호진미
2	2359	AEFIM	영호진미
3	2359	AEFIM	영호진미
4	2359	AEFIM	영호진미
5	2359	AEFIM	영호진미
6	2359	AEFIM	영호진미



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

9

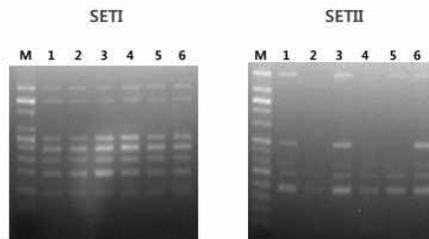
# 분석 2 결과 - PCR 확인

## [GenoAid+Multiplex]

### 신동진

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용

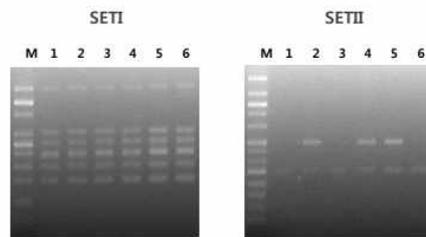


	SETI	SETII	품명
1	1256789	AFHD	신동진
2	1256789	AFHD	신동진
3	1256789	AFHD	신동진
4	1256789	AFHD	신동진
5	1256789	AFHD	신동진
6	1256789	AFHD	신동진

### 새일미

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



	SETI	SETII	품명
1	145678	FI	새일미
2	145678	FI	새일미
3	145678	FI	새일미
4	145678	FI	새일미
5	145678	FI	새일미
6	145678	FI	새일미



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

10

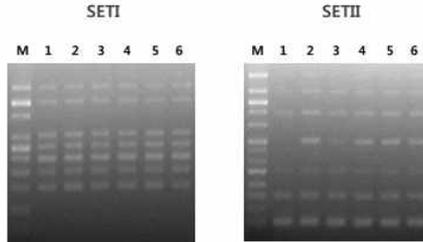
## 분석 2 결과 - PCR 확인

### [GenoAid+Multiplex]

#### 삼광

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용

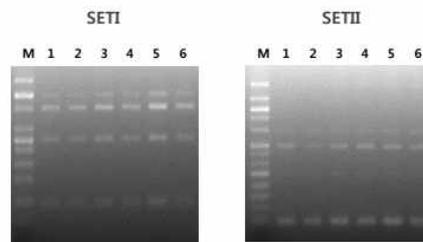


	SETI	SETII	품명
1	1245678	ABDFIKM	삼광
2	1245678	ABDFIKM	삼광
3	1245678	ABDFIKM	삼광
4	1245678	ABDFIKM	삼광
5	1245678	ABDFIKM	삼광
6	1245678	ABDFIKM	삼광

#### 영호진미

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



	SETI	SETII	품명
1	2359	AEFIM	영호진미
2	2359	AEFIM	영호진미
3	2359	AEFIM	영호진미
4	2359	AEFIM	영호진미
5	2359	AEFIM	영호진미
6	2359	AEFIM	영호진미



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

11

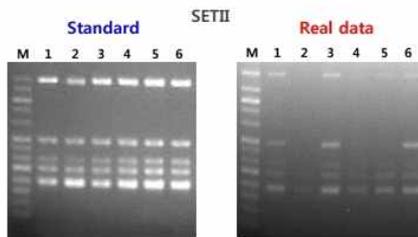
## 분석 2 결과 - PCR 확인 (Standard와 real data 비교)

### [GenoAid+Multiplex]

#### 신동진

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



표준 전기영동 상과 차이  
있으나 품종 판별 가능  
(#2, #5 제한)



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

12

## 분석 2 결과 - PCR 확인 (Standard와 real data 비교)

[GenoAid+Multiplex]



새일미

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



표준 전기영동 상과 차이가  
있으나 품종 판별 가능  
(#1, #3, #6 제한)



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

13

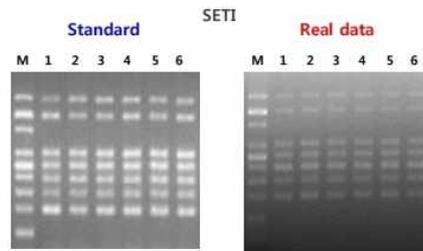
## 분석 2 결과 - PCR 확인 (Standard와 real data 비교)

[GenoAid+Multiplex]

삼광

3% agarose gel  
5µl loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



표준 전기영동 상과 차이가  
있으나 품종 판별 가능



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

14

## 분석 2 결과 - PCR 확인 (Standard와 real data 비교)

[GenoAid+Multiplex]



영호진미

3% agarose gel  
5μℓ loading 확인

M : Multiple-X™ Rice Kit setI / setII  
Marker 사용



표준 전기영동 상과 차이가  
있으나 품종 판별 가능



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

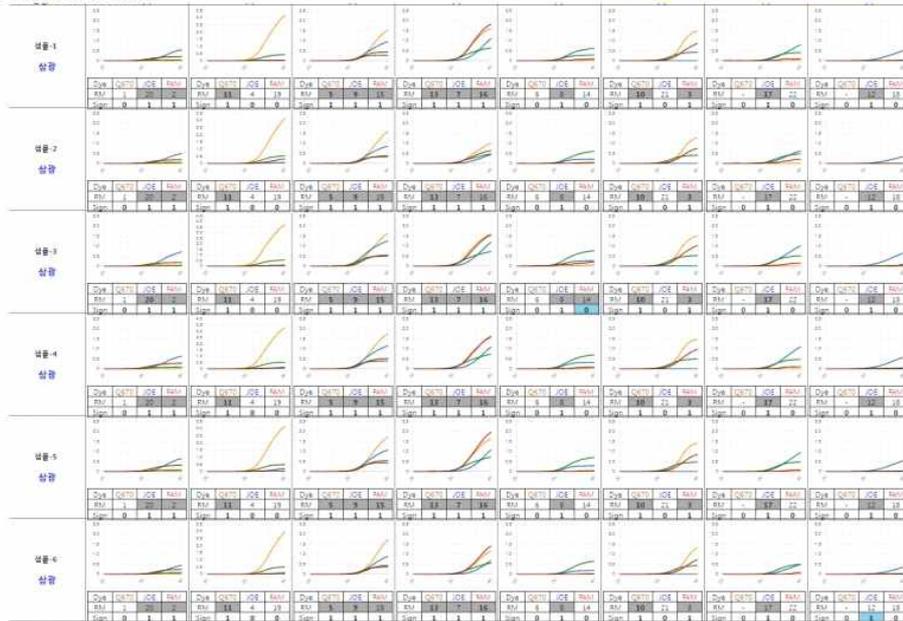
15

## 분석 3 결과 - (주)제노텍::베(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
Id: solgent  
PW:12345

[SGD45+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-3\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

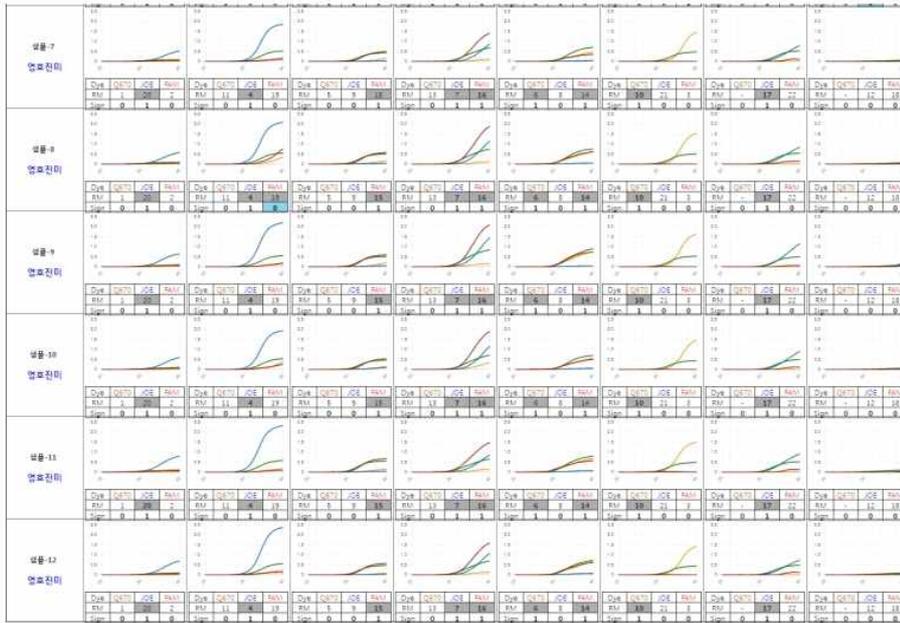
16

# 분석 3 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[SGD45+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-3\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

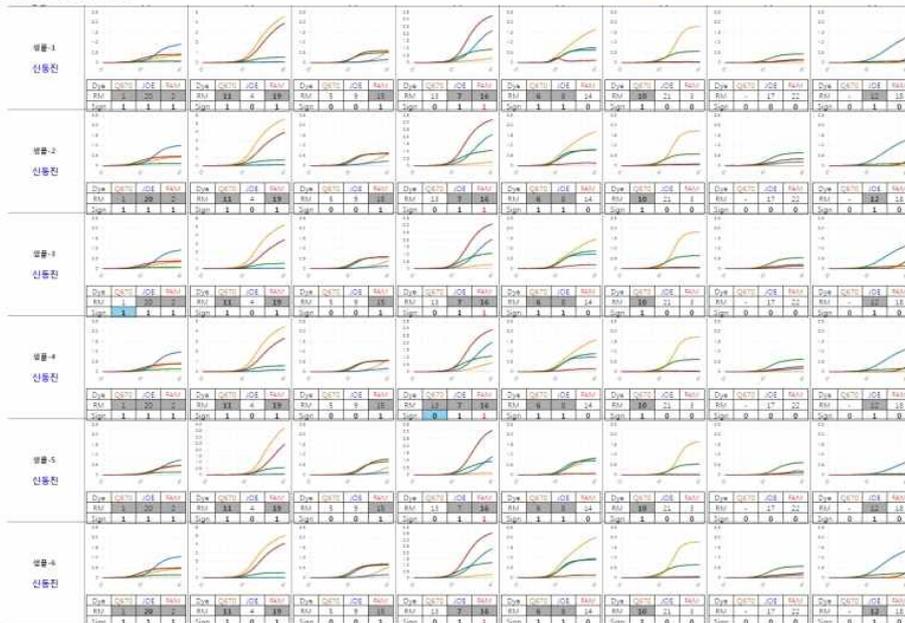
17

# 분석 3 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[SGD45+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-4\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

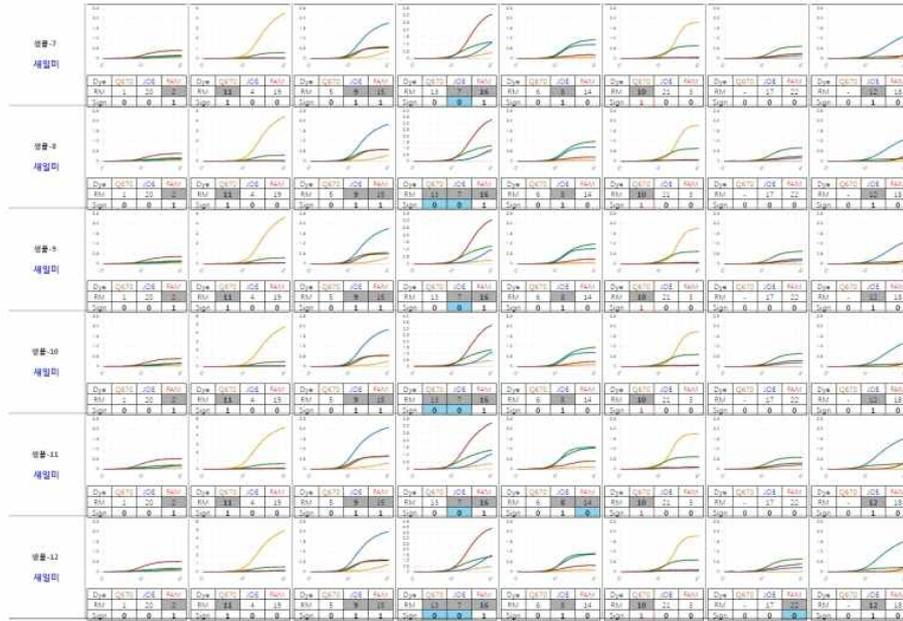
18

# 분석 3 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[SGD45+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-4\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

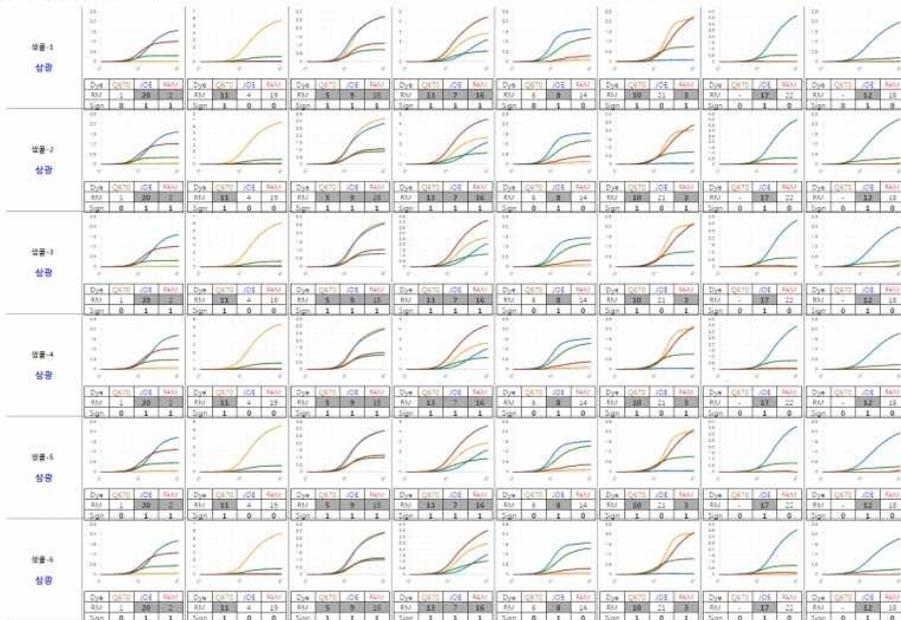
19

# 분석 4 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[GenoAid+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-1\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

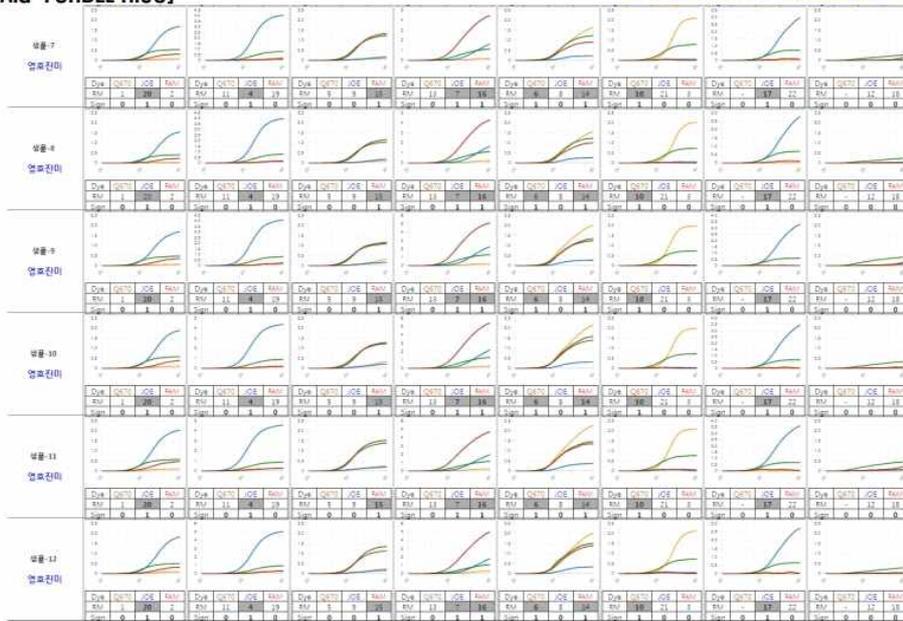
20

# 분석 4 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[GenoAid+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-1\_solgent\_test.xls



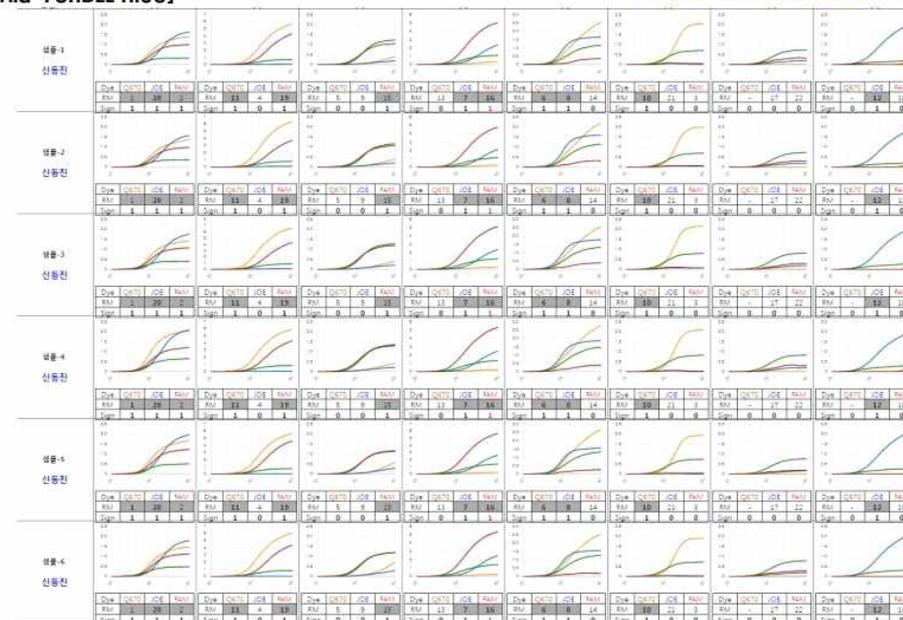
www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

# 분석 4 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW:12345

[GenoAid+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-2\_solgent\_test.xls



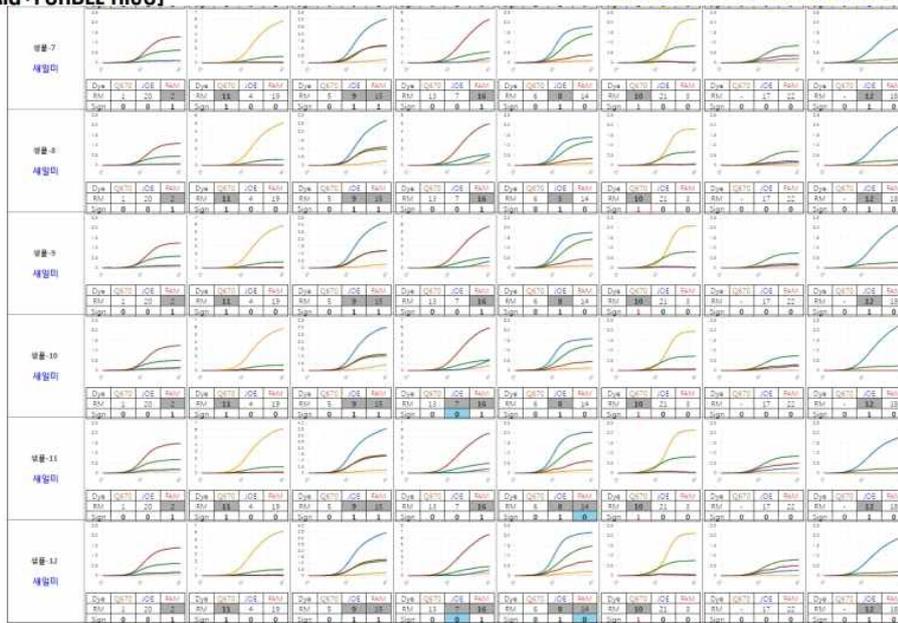
www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

# 분석 4 결과 - (주)제노텍::벼(쌀) 품종 검정 시스템

분석결과: <http://rice.genotech.co.kr/>  
 id: solgent  
 PW: 12345

[GenoAid+FenDEL Rice]

분석결과: 200318-2\_solgent\_test.xls



www.SolGent.com  
 대전광역시 유성구 테크노 6로32, 3층  
 Tel) +82-42-864-5695 Fax) +82-42-864-5690

첨부 3. 특허 출원서 (출원번호 10-2020-0064838)

첨부 4. 특허 출원서 (출원번호: 10-2020-0052320)

**【주소】** 대전광역시 중구 대동로24번길 21-9 빌라)

**【발명자】**

**【성명】** 박인경

**【성명의 영문표기】** Park, In-Kyoung

**【주민등록번호】** 861120-200000X

**【우편번호】** 34061

**【주소】** 대전광역시 유성구 노은로 353; 301 빌라빌3단지)

**【출원언어】** 국어

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** R19026-01

**【과제번호】** 없음

**【부처명】** 산업통상자원부

**【과제관리(전문)기관명】** 농림식품기술기획평가원

**【연구사업명】** 농식품연구성과후속지원

**【연구과제명】** FerdiE 기반 품종경사 재분류 실시간 유전자 분석기술 개발

**【기여율】** 1/1

**【과제수행기관명】** (주)제노텍

**【연구기간】** 2019.05.30 - 2020.05.09

관인생략

**출원번호통지서**

출 원 일 자 2020.04.29  
 특 기 사 항 심사분류(특) 공개신청(특)  
 출 원 번 호 10-2020-0052320(출원번호 1:1-2020-0444742-23)  
 출 원 인 명 (주) 제노텍(1-1998-105093-8)  
 대 리 인 명 김보희(9-1998-009126-5)  
 발 명 자 명 김재훈, 임희규, 임시규, 차성호, 김미영, 박인경  
 발 명 의 명 다중 실시간 PCR뷰어 시스템

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

1. 무효의 출원권 귀속 길이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호로 정확히 확인할 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입일수에 맞춰 납부자번호 통보 기재 한도 이하로 유체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
 \* 납부자번호 : 4431(유체국) - 출수번호
3. 위항의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고려번호 정보변경(경정), 경정신청서]를 작성하여 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
 \* 특허청(gene.go.kr) 검색 - 등록서(사)등록번호 - 특허법 시행규칙 별지 제13호 서식
4. 특허(출원심판종류)출원안 양제시 또는 도면의 변경이 필요한 경우, 등록청장 미전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 양제시 또는 도면에 기재된 사항의 범위 내에서 변경할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허 출원심판)나 마드리드 제도(실용)를 이용할 수 있습니다. 국내 출원일로부터 외국에서 입장하고자 하는 경우에는 국내 출원일로부터 출원한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
 \* 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허/마드리드/PCT> 스토리온  
 \* 국제출원심판권 : 특허 출원심판권 12개월, 실용 디자인출원 6개월 이내  
 \* 국제특허출원청의 선택을 그 선택을 우선시하며 우선특우출원특 시, 선택을 이의할 수 있는 기간 : 우선특우출원 특 개할 수 없는 국제특허출원청에 [특허청 등록번호(270-58-39)]를 제출한 경우 국내 출원번호 출원사유를 제출할 수 없습니다.
6. 본 출원서 제출을 위하여 표기하고자 하는 경우의는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 적절할 경우 관련 법령에 따라 처벌될 수 있습니다.  
 \* 특허출원 10-2019-0000000; 4 등록번호 48-2019-0000000
7. 출원인이 허위수행요청에 서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 공개하고자 할 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허허가결정결정거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

첨부 5. 학회 발표 (한국생물공학회)

2020 한국생물공학회 춘계학술 | ksbb.or.kr/abstract/2020\_spring/groov/abs\_confirm.html?num=7517

JOIN LOGOUT kbback

한국생물공학회  
The Korean Society for  
Biotechnology and Bioengineering

Overview Registration Submission Program Sponsor Useful Information

Submission Abstract Confirmation

### Abstract Confirmation

\*Program: Poster Presentations (Participant only)

\*Categories: Protein and Enzyme Engineering

\*Title: Positive charged amino acid at P5 position of substrate have preference for degradation of OmpT protease.

Authors & Affiliations:

Affiliation No.	Affiliation
1	GenTech Corporation, 26-60, Cajeongbuk-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34113, Republic of Korea.

Presenting Author	No.	First name(이름)	Last name(성)	Affiliation
0	1	Jung Hyun	Rhyi	1
	2	Bo Mi	Lee	1
	3	Seo Ji	Kim	1
	4	Si Kyu	Lim	1

\*Corresponding Author Email: shin@gentech.co.kr

\*Abstract:  
OmpT is an outer membrane protease expressed from *E. coli*, which belongs to a family of serpins such as HgtI, Pta, and Sqa from Gram-negative bacteria. It cleaves two consecutive basic amino acids of protein at alkaline pH. The family is related in pathogenicity of many infectious bacteria like *S. typhimurium* (HgtI), *E. coli* (Pta), *S. flexner* (SopA) and *E. coli* (OmpT). The protease family degrade the basic antimicrobial peptide like protamine that excreted from epithelial cell of urinary tract. We developed a new substrate of OmpT which is a mutant version (Glu-Lys) of protein that have not yet known for its substrate. The mutant protein highly specifically degraded to large and small fragment. The degradation occurred only when use *E. coli* MG136, (ompT+) but did not *E. coli* BL21 (ompT-) strain as an expression host. The exact degradation site is between Lys and Arg that is elucidated by amino acid fragments. At P5 position, the changing of negative charged residue (Glu) to positive charged residue (Lys) through out dramatic degradation. It supports that preference of recognition residue of OmpT substrate for degradation of peptide bond is positive charged amino acid and not permit the negative charged amino acid residue at P5 position also. Our finding would be useful to elucidate the mechanism of OmpT and development of protein or peptide having antibacterial activity etc.

\*keyword(s): OmpT protease outer membrane

References

File

Modify

[별첨 1]

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) FenDEL 기반 품종검사 제품용 실시간 유전자 분석기술 개발				
	(영문) Development of real time PCR technology based on FenDEL for cultivar varieties identification				
주관연구기관	(주)제노텍		주 관 연 구 책 입 자	(소속) 기술연구소	
참 여 기 업	(주)제노텍			(성명) 임시규	
총연구개발비  (천원)	계	242,000	총 연구 기간	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09 (12개월)	
	정부출연 연구개발비	172,000	총 참 여 연구 원 수	총 인 원	11
	기업부담금	70,000		내부인원	11
	연구기관부담 금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 핵심 qRT-PCR (FenDEL)을 특허 기술을 보편적인 multiplex qRT-PCR 진단 기술로 개발하고자 함 =&gt; 기술을 적용하여 쌀 품종 구별 kit 제품화 완료</li> <li>• 핵심기술에 적합한 DNA 중합효소 개발 =&gt; 대립유전자 구분성이 증대된 특화 내열성 DNA polymerase를 개발 함</li> <li>• 독창적이고 사용자 편리성이 보장되는 분석용 프로그램을 구현=&gt; 쌀 등의 품종검사 제품에 적합한 multiplex PCR 뷰어 프로그램 개발 및 제품에 적용함</li> <li>• 개발제품에 적합한 경제적인 시료의 전처리과정, 제품의 보관, 유통 등에 관련된 제품화 기술을 확보 및 검증 =&gt; 경제적 쌀 (벼) 게놈 DNA prep kit을 완성하고 품종검정 완성 제품의 대용량 시험 및 외부평가로 품질의 안정성 입증함</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 대립유전자 (allele) 및 돌연변이 (SNP) 특이 검출을 위한 구분성 증대 내열성 DNA 중합효소의 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허 출원: (10-2020-0064838)</li> <li>- 특허명: 유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체</li> <li>- family A DNA polymerase의 primer binding 영역 (loop)을 확인함 (세계최초)</li> <li>- 확보한 영역을 집중 변이하여 구분성 증대 변이주 (<math>\Delta Ct</math> 12이상, <math>\Delta\Delta Ct</math> 6이상) 다수 창출</li> </ul> </li> <li>• Multiplex 다중 real time PCR 분석 및 viewer 프로그램 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허 출원: (10-2020-0052320)</li> <li>- 특허명: 다중 실시간 PCR 뷰어 시스템</li> <li>- 사용자 편의성, 가시성이 높은 viewer program</li> <li>- AI 원리가 적용된 판독 프로그램을 통해 자동화 판정이 가능</li> <li>- 분석에서 판정, 인증서 발급까지 일원화 프로그램 구현</li> </ul> </li> </ul>					

- FenDEL®벼(쌀) 품종 판별 키트 (FenDEL® Rice 22SNP Real-time PCR Kit) 제품 출시
  - 특허 기술 (FenDEL) 적용 품종 판별 키트 완성
  - 경제적 정제기술 및 3건의 특허 기술을 적용하여 완성함
  - 국립농산물품질관리원의 「상용화 제품 적합성 평가」에서 100% 정확도 확인
  - 정성 및 정량용 kit (약 450 품종이상 가능)
- 연구성과 활용실적 및 계획
- 제품화 2 건 (FenDEL® Rice 22 SNP Real-Time PCR Kit 및 벼 gDNA prep kit) 출시 및 판매 개시함
- 개발 제품(쌀 품종 검사 kit) 및 기술은 농축산물의 품종의 명확한 유통관리가 가능하게 됨으로 쌀과 같은 국내의 농축산물의 품종의 우수화, 다변화 및 국민의 안전한 먹거리 보장에 기여 할 수 있음
- 개발 제품(쌀 품종검사 kit)의 시장 직접 판매로 25억원/년, 부가가치 창출 60억원/년을 기대할 수 있으며, 개발 기술의 다양한 제품군으로 확장할 계획임
- 특허 2 건개발 qPCR 핵심 특허 기술 (보건의료 신기술 인증번호 제 127호; 2016.12/ 특허 등록 제10-1598398호 및 출원 제10-2019-0164776) 및 신규 확보 2건의 특허 기술 (분석프로그램, 10-2020-0052320 및 효소, 10-2020-0064838) 등은 품종판별, 가축이력 추적 등의 농축산 산업분야등 다양한 제품군 개발에 활용 가능
- 암과 같은 질병의 조기진단 예후진단 및 동반진단과 같은 고감도 기술이 요구되는 보건의료 제품 개발로 확대될 수 있음
- 개발기술 및 제품은 FTA와 UR, 나고야 의정서와 같은 다양한 국가 간의 협정에 대비하여 해외 농축산물 수입, 원산지의 판별, 이력추적, 품종검사에 활용할 수 있어 국가적 활용도가 매우 높은 기술이 될 것임

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	819026-01-1-SB010		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	농축산물 품질 및 안전성 관리 기술 개발		과제구분	단위	
사업명	2019년도 농식품연구성과후속지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	FenDEL 기반 품종검사 체품용 실시간 유전자 분석기술 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관			연구책임자	임시규	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09	172,000	70,000	242,000
	2차연도				
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09	172,000	70,000	242,000
참여기업	(주)제노텍				
상대국	해당없음	상대국연구기관	해당없음		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

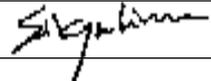
2. 평가일 : 2020. 5. 29

3. 평가자(연구책임자) : 임시규

소속	직위	성명
(주) 제노텍 기술연구소	연구소장	임시규

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	---

## 1. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 특허 기술을 활용한 사업화 제품 2건 개발 완료
2. 구분성 증대를 위한 변이 target 및 원리 세계 최초규명
3. 구분성이 매우 우수한 real time PCR 용 내열성 중합효소의 최초개발

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 개발 기술의 농립수산 품종 구분 이력 추적제품에 적용 가능
2. 암 진단 등의 보건의료 제품으로 개발 가능
3. 강력한 돌연변이 혹은 대립유전자의 구분성으로 관련제품 적용 매우 많음

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 대립유전자 혹은 변이 유전자의 구분에 본 과제에서 독창적으로 개발한 효소의 광범위한 적용이 가능함
2. 대립유전자 구분 검정 및 진단 제품에 관련된 기술을 독자적으로 완성함으로 이의 활용 가능성이 매우 큼
3. multiplex PCR 등 다수의 시료 검증을 위한 program을 개발하여 지적재산권으로 확보함으로 이의 활용시 시장에서의 유용성이 크게 증대될 것임

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

1. 짧은 연구개발 (단년과제)에도 불구하고 제품개발을 완료할 정도로 매우 광범위하고 집중적인 노력을 함
2. 집중적이고 효율적인 연구진행을 통해 효소개발 및 제품개발을 완료하고 지적재산권을 확보하는 등의 사업화제품 개발의 필수적 요소를 완성함
3. 다양한 시험을 통해 안정적 제품 생산을 위한 기술 개발을 완성함

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

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

특허 1. 유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체(특허 10-2020-0064838)  
 과제기여율: 1/1 (p109)  
 특허 2. 다중 실시간 PCR 뷰어 시스템 (특허 10-2020-0052320)  
 과제기여율: 1/1 (p24)  
 학회 발표. 1회 (생물공학회- 20. 06. 24; corona 19로 인한 연기),  
 제품 설명회. 2회 수행  
 논문. 지적재산권 (해외특허: 목표 삼극 특허)의 확보 이후에 SCI급 저널에 발표할 것임

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
적합형 효소 개발 및 생산	30	>100	세계 최초/ 매우우수 (특허 1건)
판정 프로그램 개발	20	>100	사용자 편의성 및 독창적 (특허 1건)
제품개발 및 평가	20	>100	제품 2건 개발 안정성 확보/외부평가 완료
상업화 관련 기술 개발	20	>100	경제성 확보/ 100% 자체 기술
지적재산권 확보	10	>100	2건 출원
합계	100점	>100	100% 이상 달성함

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

• 연구개발 목표를 이루기 위해 연구개발을 성실히 수행하였으며, 제품화에 필요한 기술을 개발하고 이를 지적재산권화하고 적용한 제품을 개발함으로써 과제의 목표를 충분히 달성하였다고 생각합니다.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

• 기업의 지적재산권의 확보 및 그 기술적 가치에 대해 평가시 고려해 주시기 바랍니다.  
 • 보고서의 공개는 지적재산권(해외 출원) 확보 절차가 완료 (약 2년 예상)된 이후로 해 주시기 바랍니다.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 코로나 19의 종료후 개발 제품의 홍보를 통한 지속적 매출의 확대를 추진할 것입니다.
- 개발시 사용한 기술을 다른 농수산물 검정 제품 개발을 추진 할 것입니다.
- 특히, 본 과제에서 개발한 효소 및 프로그램 등의 기술은 농업, 보건의료 제품 등에 연계하여 새로운 제품 (예 암진단 kit 등)을 개발할 것입니다.
- 또한 관련기술을 활용하여 국내 진단 기업 등과의 공동개발 및 필요시 기술이전 등을 추진할 것입니다.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

과제에서 밝힌 변이 site 및 영역은 기 보고되지 않은 부위로 이를 지적재산권 및 논문 발표 후 공개되기를 희망 함.

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

지적재산권이 완성된 후에 보고서 공개가 이루어 질 수 있도록 조치가 필요함 (2년 소요 예상)

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	FenDEL 기반 품종검사 제품용 실시간 유전자 분석기술 개발			
주관연구기관	(주) 제노텍		주관연구책임자	임시규
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	172,000	70,000	0	242,000
연구개발기간	2019. 05. 10 - 2020. 05. 09			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화)			
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____ )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 제품 개발	2개 제품개발 완성 - 제품 출시 및 판매 개시
② 효소개량	세계 최초 고도 구분성 효소 개발 - 특허 출원
③ 프로그램 개발	multiplex Real time PCR 특화용 프로그램 개발 - 특허 출원

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (자체)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	20			40		40														
최종목표	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	3.0	1	0	0	0	1	1	
연구기간내 달성실적	2	0	0	1	0	2	2.8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	
달성율(%)	200			100		100														

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체
②	다중 실시간 PCR 뷰어 시스템
③	
·	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	V	V				V	V			
②의 기술	V	V				V	V			
③의 기술										
·										
·										

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 품종 및 원산지 검정, 암 조기 및 예후 진단 기술 제품에 적용</li> <li>• 타 기관과의 협력을 통한 다양한 제품군에 적용함</li> <li>• 특히, 농수산물 원산지, 품종, 이력추적 등에 적용</li> <li>• 암, 유전병 등의 고감도 진단, 특히 액체생검 적용 제품개발에 연계할 계획</li> </ul>
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiplex real time PCR 모니터링 제품 적용</li> <li>• 한약제 등의 품종 구별제품에 적용하고자 함</li> <li>• 농수산물 검역용 제품에 적용을 추진할 것임</li> <li>• 다수의 유전자검사 판넬 구성 제품에 용이함</li> <li>• 특히 약물대사 예측 유전자 검사 등의 제품 개발에 연계 계획임</li> </ul>
①+②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 한약제 및 농산물 품질관리 제품군으로 개발하여 매출을 확대하고 자함</li> <li>• 생균제 (미생물제) 등의 제품 생산 및 품질 관리 시스템 제품을 개발하여 매출을 다변화하고자 함.</li> <li>• 기술이전을 통한 매출이 가능하도록 추진함</li> </ul>
⋮	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균IF	
단위	건	건	건	건	백만원	2건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치																				
최종목표																				
연구기간내 달성실적	2						2.8							1				2		
연구종료후 성과창출 계획		2					11 30 0					1	1							

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	유전자 변이에 대한 구분성이 향상된 DNA 중합효소 변이체 (특허 10-2020-0064838)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	2,000 백만원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(전략적 제휴기관과 협의 )		
이전소요기간	3 년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2023
기술 이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	공동 개발 - 임상 시험		

핵심기술명 <sup>1)</sup>	다중 실시간 PCR 뷰어 시스템 (특허 10-2020-0052320)		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	없음
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체실시)		
이전소요기간	3 년	실용화예상시기 <sup>3)</sup>	2021
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>	자체 실시 - 제품화		