DNA Chip 제작을 위한 Microarrayer의 개발

김석열†·정남수*·임재성**·김상봉***

Development of Microarrayer for DNA Chips

Suk-Yoel KIM, Nam-Su Jung, Jae-Sung Im and Sang-Bong KIM

Key Words: 3-Axis Robot(3축 로봇), Bio Chip(바이오 칩), DNA Chip(DNA 칩)
Microarrayer(마이크로어레이어), Microarray(마이크로어레이)

Abstract

Microarrayer makes DNA chip and microarray that contain hundreds to thousands of immobilized DNA probes on surface of a microscope slide. This paper shows the development results for a printing type of microarrayer. It realizes a typical, low-cost and efficient microarrayer for generating low density microarray. The microarrayer is developed by using a robot of three-axes perpendicular type. It is composed of a computer-controlled three-axes robot and a pen tip assembly. The key component of the arrayer is the print-head containing the tips to immobilize cDNA, genomic DNA or similar biological material on glass surface. The robot is designed to automatically collect probes from two 96-well plates with up to 32 tips at the same time. To prove the performance of the developed microarrayer, the general water types of inks such as black, blue and red. The inks are distributed at proper positions of 96 well plates and the three color inks are immobilized on the slide glass under the operation procedure. As the result of the test, it can be shown that it has sufficient performance for the production of low integrated DNA chip consisted of 96 spots within 1 cm^2 area.

1. 서 론

최근의 모든 생물학적 연구의 기반은 유전자의 발견에 따른 DNA(Deoxyribonucleic acid) 수준의 여러 연구방법에 의해 괄목할만한 성장을 하였으며, 그 적용범위 또한 광범위해지고 있다. 특히 DNA의 물리화학적인 안정성, 높은 정밀도와 정확도, 미소한 양의 시료만으로도 분석이 가능하다는 점에서 유전자 분석법 은 동정분야에 혁신을 일으키고 있다.

또한 유전자 분석법은 그 동정 기법으로서의 유용성뿐만 아니라, 효소나 단백질과 같은 인체 내 분자들의 진화, 구조, 기능 등의 여러 특징들을 이해하는데 매우 중요한 위치를 점하고 있다. 기존에 널리 이용되는 유전자 분석방법으로는 southern blotting과 Northern blotting, PCR등의 대표적인 방법이 있다[(1)]. 그러나 이들 방법으로는 한번에 수십 개 이상의 유전자들을 검색하기가 어려워 질병 진단과 같이 즉각적인 분석 결과가 필요한 경우 시간 소요와 인력 소요가 불가피할 수 밖에 없다. 따라서, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에 미국과 영국을 선두로 선진 각국에서는 microarray를 이용한 DNA chip개발을 위한 연구가 활발하다[(2)-(6)].

DNA Chip은 Fig. 1와 같이 형광 물질 또는 방

† 부경대학교 지능기계공학과 대학원
E-mail : suguri@dreamwiz.com
TEL : (051)620-1606 FAX : (051)621-1411
* 부경대학교 메카트로닉스협동과정 대학원
** 부경대학교 메카트로닉스공학과
*** 부경대학교 메카트로닉스공학과

사성 동위원소로 레이블링(labeling)한 probe DNA나 RNA를 slide glass와 같은 일정 공간 안에 집적시켜놓은 형태로서 target DNA와 교잡반응(hybridization)후 관찰하면 염기 서열의 일치도에 따른 명암을 가지는 영상을 얻을 수 있으며, 이 영상을 분석하여 DNA의 발현 여부를 확정할 수 있다. DNA chip은 유전자의 기초연구는 물론 암·유전자병·당뇨병·고혈압 등 각종 질환의 유전자적 진단, 세균·바이러스 등 병원체의 신속한 검출, 개인의 유전적 형태에 따른 최적 약제의 선택 등에 널리 응용될 수 있는 새로운 차원의 분석 시스템이다. 조작이 단순하고 자동화하기에 적합하며 크기가 작아서 시약량이 적어도 되는 등 유전자 발현 검출의 대량화·고속화·저비용화에도 크게 기여할 것으로 기대되므로 선진각국에서는 여러가지 방법과 형태로 제품화에 성공하였다.

이러한 DNA Chip 시스템을 만드는 대표적인 회사로는 Telechem, Hyseq, Affymatrix, Genetic Micro 사를 들 수 있고, 이들 회사에서 만든 제품들이 2010년에는 전세계적으로 400억 달러에 이를 것으로 예상되는 세계 시장을 장악하고 있다.

하지만 국내에서는 직접 DNA Chip 시스템을 만드는 회사가 아직 없으며, 시스템 개발보다는 DNA Chip을 만들어서 판매하는 실정으로, 약 450개의 바이오벤처 회사 중 상당수가 스스로 개발한 DNA chip을 취급품목으로 내걸고 있으며, DNA chip 시스템을 개발한 사례는 없고, 현재 10여개 회사가 이를 개발중인 것으로 알려져 있다.

DNA chip을 제작하는 시스템은 microarrayer만 약 1억인 고가이고, 국내에서는 개발된 사례가 아직 없어 수입에 의존하고 있다. 따라서 본 논문에서는 microarryer를 직접 개발함으로서 DNA chip system의 국산화를 시도하고자 한다. 또한 저집적 DNA chip 개발을 우선 목표로 하여 중소기업체 및 연구소 등에 저가로 보급할 수 있는 system을 구성하고자 한다.

본 논문에서는 아직 국내에서는 개발된 사례가 없는 DNA chip system의 개발을 위해 3축 직교로봇과 스테핑 모터를 이용, 저집적 microarray를 위한 효율적면서 저가인 Microarrayer를 제시한다.

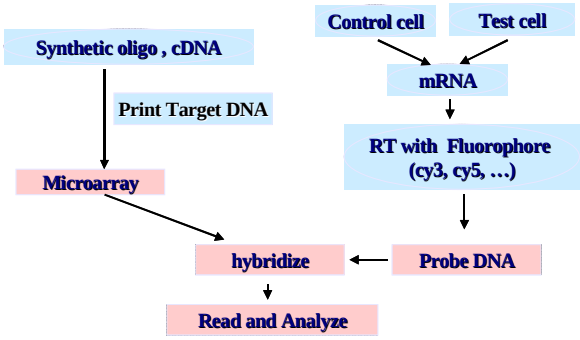

Fig. 1. Microarraying procedure for DNA chips.

2. 시스템의 구성

2.1 전체적인 시스템의 구성

Microarrayer는 Fig. 2,3과 같이 직교형태의 삼축로봇과 펜 형태의 tip의 구성물을 제어할수 있는 DSP(Digital Signal Processor), 그리고 컴퓨터로 구성되어진다. tip의 머리부분은 일정한 양의 probe DNA를 흡수할 수 있도록 구성되어져야 하고, tip의 끝은 동일한 크기의 spot들을 슬라이드 글라스의 표면에 병열로 배열한다. Z축의 움직임에서 슬라이드 글라스와 부딪히는 힘을 감소하는 방법은 중력을 이용하는데 tip의 윗부분의 크기를 크게 함으로서 중력에 의한 원위치 이동을 한다. 물세척과 건조부는 팁의 세척에 맞도록 설계되었다. 건조부는 팁의 끝을 건조시키기 위해 사용되어지는데 컴프레셔를 이용하여 팁 주변의 물기를 제거하고, 건조시킨다. Probe를 담고 있는 96 well plate는 두개가 놓여지고, 총 192개의 probe를 찍어낼 수 있도록 설계되었으며, 총 6장의 슬라이드 글라스를 제작할 수 있도록 구성이 되어 있다.

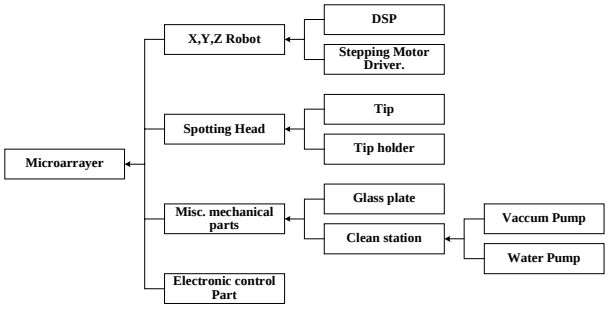

Fig. 2. Hardware configuration of the developed microarrayer.

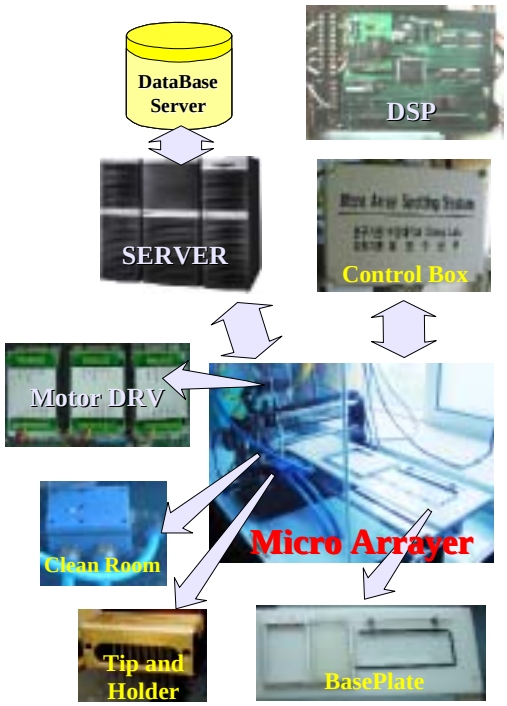

Fig. 3. General view of microarrayer system.

2.2 제어알고리즘 및 신호처리

신호와 데이터의 흐름에 기초하여 제어 알고리즘은 설계되어진다. Fig. 4에서 왼쪽 부분은 PC에서의 연산을 그리고 오른쪽은 DSP에서의 연산 알고리즘을 보여주고 있다. 처음 모니터링 PC와 DSP가 연결된 이후 파라메터들은 DSP내의 SRAM으로 보내진다. DSP는 자신이 가지고 있는 데이터들을 연산해서 구동을 위한 파라메터들을 만들고 이 정보들을 모터 드라이버에 보내면서 microarray는 구동을 하게 된다.

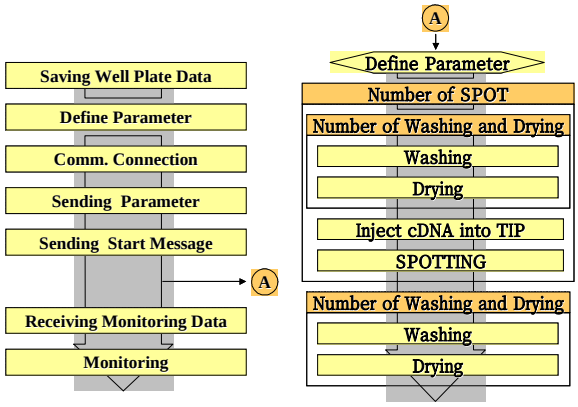

Fig. 4. The flowchart of microarraying procedure.

2.3 신호처리용 TMS320C32의 개발

본 연구에서 사용할 신호처리기의 메인 프로세서는 고성능 32비트 부동소수점 방식의 범용 DSP 마이크로프로세서 소자인 TMS320C32를 이용한다. 본 DSP는 디지털 신호처리 분야에서 실시간으로 매우 빠른 연산을 수행할 수 있도록 개발된 마이크로프로세서이다.TMS320C32의 내부에는 2개의 DMA(Direct Memory Access) 제어기, 2개의 32비트 타이머, 1개의 직렬통신 포트, 3개의 버스 제어 레지스터(bus control register) 등의 내부 주변 장치가 위치한다. 그러나 본 시스템에서는 온도와 습도센서에서 아날로그 신호를 입력받아 디지털 신호로 변환할 수 있는 기능과, 또한 RS-232C 통신, stepping motor를 제어할 신호출력, 각종 부가장치를 구동이 가능하도록 전용 신호처리기를 개발해야 하므로 주변 회로를 직접 설계할 필요가 있다.

Microarrayer는 독립적으로 모니터링 PC에서 벗어나서 DSP로 인하여 움직여져야 하기 때문에 DSP내에는 microarrayer를 구동하기 위한 많은 정보들을 저장해야 하므로 큰 메모리가 필요하다. 또 정밀한 위치 컨트롤과 실시간 모니터링을 위해서 본 시스템에서는 DSP를 사용하였다.

Fig. 5. DSP(Digital Signal Processor) board

Fig.5.와 Table 1.은 본 시스템에 사용되어진 DSP의 모습과, DSP포트의 사용을 보여주고 있다.

Table 1. The signals of input/output port

Input		Output	
Contents	No.	Contents	No
Limit switch	6	Control signal for stepping motor	9
Photo sensor	3		
Power switch	1		
Reset switch	1	Water pump	1
Pause switch	1	Vacuum pump	1
Distance sensor	1	Buzzer	1

2.4 구동장치

Microarrayer의 주 구동장치로서 스테핑 모터는 사용된다. 스테핑모터는 제어가 용이하고 정밀성 등의 많은 장점을 가지고 있다. Table 3.에서는 microarrayer에 사용된 스테핑 모터와 모터 드라이버의 사양을 보여주고 있다.

Microarrayer의 구동의 특징으로 한 작업에 찍어야하는 점의 수가 많은 관계로 시간이 많이 지연된다. 따라서 구간마다 속도의 차이를 두고 spotting을 하지 않는 구간에서는 최대 속도로 이동을 하여야한다. 따라서 드라이버에서의 입력주파수를 크게 설계 하여야한다. 또한 고속 주행시 토크의 부족과 정지시에 일어나는 슬립으로 정밀제어를 하는 어레이어에서 큰 오차가 발생된다. 따라서 가속구간과 등속구간을 주어서 슬립을 최소화 시켜야한다. Fig.6.은 본 시스템에서 이용되는주기의 변화와 속도간의 관계에 대하여 보여주고있다.

Table 3. The specification of stepping motor and motor driver

Stepping motor	
Contents	Units
Number of phases	2phase
Step angle	1.8°
Input Voltage	12V
Current	0.4A
Holding torque	3.2kgf ▪ ㎝
Stepping motor driver	
Maximum input frequency	40kHz
Maximum voltage	46V
Maximum current	6A

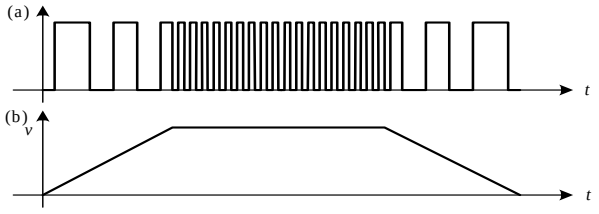

Fig.6. The relation between frequency and velocity

2.5 3축 직교 로봇

Microarrayer는 3축 직교형태의 로봇으로 개발한다. 직교로봇 이외에 tip, 세척부, base plate 등 요소들을 결합한 형태는 Fig. 7.와 같다.

로봇의 각축에는 초기위치를 잡을 포토 센서가 설치되어있다. 초기 위치 설정은 3번의 감속 단계를 가짐으로서 정확한 위치를 잡는다. Base plate에는 2개의 96well-plate가 장착되어서 총 192개의 spot를 할 수 있고, 테스트용 슬라이드글라스를 포함 총 7개의 슬라이드글라스가 놓여진다.

3축 직교 로봇은 스크류를 이용하여 X,Y,Z축상으로 위치하고 stepping motor로 구동이 되어진다.

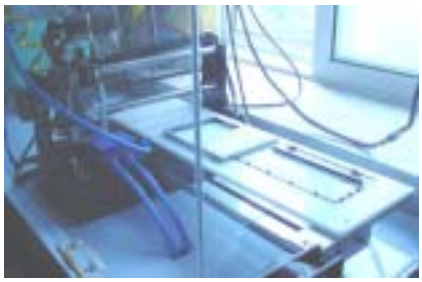

Fig. 7. The developed microarrayer

2.6 Tip과 Tip holder

Tip 과 Tip holder는 microarrayer의 핵심기술중의 하나로서 실제 유리막에 probe를 고정시키는 역할을 하며, 설계시 안정된 spot의 크기와 상태를 얻고, 액체 상태의 probe 용액에 잠겨있는 시간에 상관없이 일정한 양을 흡수할 수 있도록 해야 한다. Fig. 8은 pin type tip의 모식도로서, tip이 원추형이므로 그 끝의 강도를 유지할 수 있는 재질을 이용해야 한다.

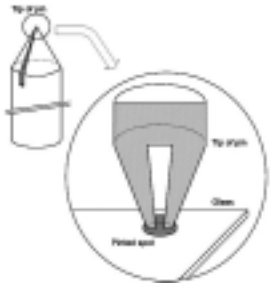

Fig. 8. Schematic representation of spotting tip

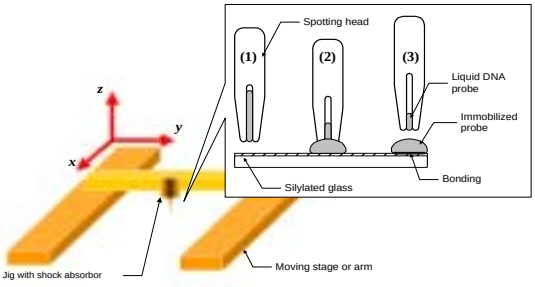

Fig. 9. Spotting mechanism using the tip.

Fig. 9는 spotting의 원리를 나타낸 것으로, 이때 고려해야 할 기계적인 설계 조건으로 상태(1)에서 상태(2)로 천이되는 순간에 Z축 이송기구의 충격이 흡수되어야 한다. 또한 상태(2)에서 상태(3)으로 옮겨갈 때는 곧바로 압력이 해제되면 Z축 운동에 의한 진동이 전달되므로 어느 정도의 압력을 가해야만 한다.

DNA probe를 균일한 양으로 흡수할 수 있도록 tip의 머리부분을 Fig.10.과 같이 구성되어야하고, 일정한 spot의 상태를 얻기 위해서 그 끝을 glass 표면과 평행이 되도록 하였다. Tip의 끝이 표면에 접촉하는 순간에 Z축 이송기구의 충격이 흡수할 수 있도록 Tip의 머리부분을 크게 하고 Tip과 Tip holder를 정밀 가공하여 중력에 의한 슬라이딩이 이루어지는 간단한 감쇄기효과를 가질 수 있다. 이는 동시에 spotting직후 진동억제를 위한 가압작용을 한다.

Fig. 10. The tip for test

2.7 각종 기계 및 전기장치

Fig. 11에서 세척장치와 건조기는 microarrayer에 있어서 필수적이며, 본 연구에서는 하나의 모듈로 통합하여 구성함으로서 제작과 작업시간을 단축시킬 수 있었다. Silylated glass와 액체 DNA probe를 저장할 96well을 base plate 고정시킬 장치와 tip 끝에 남아있는 DNA probe나 이물질을 제거할 세척 장치와 이에 연결된 진공 펌프와 유체 펌프를 제어할 전장부가 필요하다. 깨끗한 세척을 위하여 사용자가 세척의 횟수를 파라메터로 넣을 수 있고, 이를 통해 세척이 가능하다. 강화플라스틱으로 제작하여 사용상의 편리함과 견고함을 동시에 만족시키고 설계 변경에도 용이하도록 한다. Fig. 12.에서 Slide glass와 96-well plate는 간단한 스프링 압력 기구에 의해 편리하게 착탈이 가능하다.

Probe를 고정시키는데에는 시스템이 있는 룸의 온도와 습도가 아주 중요한 역할을 한다. 따라서 온습도 센서를 부착하고 그 데이터를 획득해서 가습기와 히터를 구동시킨다.

Photo 7. The shape of clean station

Photo 8. The shape of base plate

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 염료를 이용한 동작실험

본 논문을 통해 개발된 microarrayer 시제품의 성능을 시험하기 위해 먼저 값싸고 가시적으로 확인이 간편한 염료(일반 수성 잉크)를 이용하였다. 즉, 96 well plate에 잉크를 넣고, 모든 작동을 시험하였다. Photo. 9는 실제 spotting한 microarray의 한 예로서 총 spot의 개수는 96(12×8)개이다.

Fig. 11. An example of microarray printed by tip

3.2 실험 결과 분석 및 고찰

획득된 영상을 축소를 하고 2진화를 거친후 그 픽셀의 수를 연산하고, 이를 히스토그램으로 표현하면 Fig. 12.와 같다.

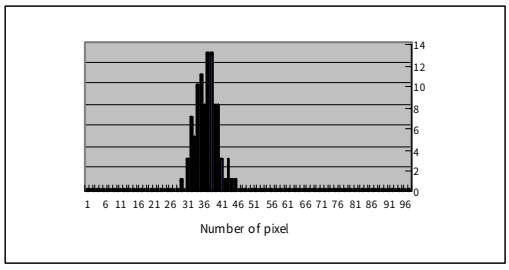

Fig. 12. The histogram.

또한 정규분포를 spot 크기의 과정을 모형화 하

고, 랜덤 표본의 평균값들의 변동성을 나타낸다. 정규밀도함수는 곡선 아래 면적은 총 1이고 곡선 아래 면적의부분이 확률로 해석이 된다.

정규밀도함수 $f(x)=\frac{1}{\sqrt{2\phi\sigma}}e^{-\frac{(x-m)^2}{2\sigma^2}}$ (1)

확률변수 Z 가 a, b 구간에 속할 확률

$$P(a\le Z\le b)=\int_a^b f(x)dx \quad (2)$$

이다. 이 확률은 a, b 구간에서의 면적과 같다.

Spot 크기의 분석은 먼저 Spot 크기의 표준 크기와 최대 그리고 최소크기를 구하고 픽셀수와의 비율로서 판단하고자 한다.

영상 판독에서는 크기의 비율로서 spot 크기가 균등한지를 판단한다. 따라서 본 실험에서 사용한 ChipMaker4를 기준으로 하여 판단하면, 표준 지름과 최대, 최소 지름은 아래와 같다.

$S_{ave}=125\mu m$ (3), $S_{\max}=130\mu m$ (4)

$S_{\min}=120\mu m$ (5)

도수분포에서 픽셀수 Q_{ave}가 37과 38인 경우가 가장 높은 빈도를 보이므로, 최소픽셀수 $Q_{\min}$를 구할 때에는 37을 최대픽셀수 $Q_{\max}$를 구할 때에는 38을 사용하면 (6), (7), (8)식과 같다.

$$\frac{\pi\left(\frac{S_{ave}}{2}\right)^2}{Q_{ave}}=\frac{\pi\left(\frac{S_{\min}}{2}\right)^2}{Q_{\min}}=\frac{\pi\left(\frac{S_{\max}}{2}\right)^2}{Q_{\max}} \quad (6)$$

$$Q_{\min}=\frac{Q_{ave}\pi\left(\frac{S_{\min}}{2}\right)^2}{\pi\left(\frac{S_{ave}}{2}\right)^2}=34.0992\approx 34 \quad (7)$$

$$Q_{\max}=\frac{Q_{ave}\pi\left(\frac{S_{\max}}{2}\right)^2}{\pi\left(\frac{S_{ave}}{2}\right)^2}=41.1008\approx 41 \quad (8)$$

식 (2)에서 $Q_{\min}, Q_{\max}$ 사이에서의 누적 확률은

$$P(Q_{\min}\le Z\le Q_{\max})=0.704922 \quad (9)$$

식(9)의 결과는 최대/ 최소크기의 spot 들이 전 영역의 70% 안에 들어간다는 것이다.

이 실험에서 획득된 영상을 처리하는 동안 슬라이드 두께로 인한 노이즈와 detector에 있는 렌즈의 구면, 그리고 조명의 영향과 픽셀수를 줄이기 위한 영상 축소로 인해서 데이터가 많이 변질되었다는 것을 고려한다면 70%라는 결과는 시스템의 유효성을 충분히 검증한다고 판단된다.

실험결과 현재 1㎠ 내에 96개의 spot을 구성하는 저집적 DNA chip을 제작하는 용도로써는 충분한 성능을 가짐을 알 수 있다.

참고문헌

(1) Purves, W. K., G. H. Origans, H. C. Heller and D. Sadava. 1998. Life, "The Science of Biology, 5ed.", Sinauer associated, Inc.

(2) Lim, Y. S., B. Y. Kang, E. J. Kim, S. H. Kim, S. Y. Hwang and T. S. Kim. 1998. "Th1 immune responses by multiple DNA vaccination with an ovalbumin/interferon-hybrid construct. Immunol.", Potentiation of antigen-specific, 94, 135~141.

(3) Lashkari, D. A., J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown and R. W. Davis. 1997. "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis." Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 94, 13057 ~ 13062.

(4) Kim, T. S., S. Y. Hwang and G. S. Yoo. 1997. "Covalent linkage of IL-12 and ovalbumin confines the effects of IL-12 to ovalbuminspecific immune responses.", Arch. Pharm. Res., 20, 396~403.

(5) Owczarek, C. M., S. Y. Hwang, K. A. Holland, L. M. Gulluyan, M. Tavaria,B. Weaver, N. C. Reich, I. Kola and P. J. Hertzog. 1997. "Cloning and characterization of soluble and transmembrane isoforms of a novel component of the murine type I interferon receptor", IFNAR 2. J. Biol. Chemi., 272, 23865 ~ 23870.

(6) Holland, K. A., C. M. Owczarek, S. Y. Hwang, M. J. Tymms, S. N. Constantinescu, L. M. Pfeffer, I. Kola and P. J. Hertzog. 1997. "A type I interferonsignaling factor, ISF21, encoded on chromosome 21 is distinct from receptor components and their down-regulation and is necessary for transcriptional activation of inteferon-regulated genes.", J. Biol. Chem., 272, 21045 ~ 21051.