

유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발(I)

- 국내외 연구동향 -

Development of microarrayer for manufacturing DNA chip used in genome project (I)

- A summary of research trend in-and-out of state -

이현동*	김기대*	임용표**	김찬수***
정희원	정희원		정희원
H. D. Lee	K. D. Kim	Y. P. Yim	C. S. Kim

1. 서론

인간 게놈 프로젝트가 지속적으로 진행됨에 따라 계속적으로 대량의 유전체 정보가 밝혀지고 있으며, 이미 밝혀진 유전체의 염기서열을 바탕으로 다양한 생물의 전체 유전자의 기능을 효율적으로 해석하는 기술의 개발이 요구되고 있다. 식물 게놈 프로젝트 또한 식량확보라는 단순하면서도 전략적인 차원에서 가장 절실히 요구되는 기본 과학기술 연구분야이다.

최근 이러한 생명공학 연구에서 두 가지의 주된 원인에 의해 커다란 변화가 일고 있다. 그 하나는 DNA sequence(유전자 암호 해독기술) 정보의 양이 증가했다는 것과 다른 하나는 이를 이용하는 기술이 발전하고 있다는 것이다. 지금 세계는 post-genome 시대에 접어들고 있다. 하루에도 수백개 이상 밝혀지는 새로운 유전정보들이나 모든 유전암호가 밝혀진 생물들을 기존의 방법들로 연구한다는 것은 너무나 많은 시간을 요구하기 때문이다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 아주 최근에 개발된 방법중의 하나가 바로 DNA chip을 이용한 유전자 검색 방법이다. DNA chip은 기존의 분자 생물학적 지식에 현대에 엄청난 발전을 한 기계 및 전자공학의 기술을 접목해서 만들어졌다. 기계 자동화와 전자 제어 기술 등을 이용하여 적게는 수백개부터 많게는 수십만개의 DNA를 아주 작은 공간에 집어넣을 수 있게 만든 것이다. 즉 DNA chip이란 유전자 검색용으로서 엄청나게 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다. DNA chip에 DNA를 붙이는 방법에는 여러 가지가 있는데, 본 연구에서는 그중 증폭된 유전자를 poly-L-lysine 처리된 slide glass에 고정화하기 위하여 micro scale로 spotting이 가능한 DNA chip 제작용 로봇 시스템(microarrayer)에 관하여 연구를 수행하고자 한다.

따라서, 본 연구는 유전체 연구에 필수적인 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 microarrayer를 개발하기 위한 전단계 연구로서 국내외 microarrayer의 연구동향을 분석하여 앞으로 연구할 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발 연구에 필요한 기초자료를 제공하고자 하였으며, 그 구체적인 내용은 다음과 같다.

- 1) DNA chip에 관련된 자료를 조사·분석하고,
- 2) 국내외 DNA chip 및 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 연구동향을 조사·분석하여,
- 3) 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템 개발의 연구방향을 제시한다.

* 충남대학교 농업생명과학대학 농업기계공학과

** 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

*** (주) 엔에스티

2. DNA chip의 종류

DNA chip은 크게 cDNA chip과 oligonucleotide chip으로 구분할 수 있다. cDNA chip은 염기 자체가 크기 때문에 전반적인 유전자 발현연구에 쓰이는데 문제가 없지만, 하나의 염기 변화에 의한 단일염기 다형성에 대한 연구(SNPs, single nucleotide polymorphisms)를 볼 수는 없으나 두 가지의 다른 환경에서 유전자의 발현정도를 비교하는데 유리하다. oligonucleotide chip은 정확한 염기서열을 알고있기 때문에 SNPs도 가능하나 유전자의 어느 부분을 선택하여 실험하느냐가 문제가 될 수 있다.

DNA chip은 또한 제작방법에 따라 구분할 수 있는데, Pin DNA chip, Inkjet DNA chip, Photholithograph chip 그리고 Electronic DNA chip 등 4종류로 나누어 볼 수 있다. 본 연구에서는 chip의 종류를 제작방법에 따라 알아보았다.

가. Pin DNA chip (cDNA chip)

1995년 Stanford 대학에서 처음 개발되었다. slide glass에 고밀도로 유전자를 spotting하여 만드는 chip이다. 따라서, 이를 이용하면 수천 개 이상의 유전자 발현 변이를 단 한번의 실험으로 관찰할 수 있다.

poly-L-lysine으로 처리된 slide glass에 핀으로 유전자를 spotting 한다. pin 타입에는 여러가지가 있는데, 첫째 solid 핀의 경우는 필터에 점적하는 것이 유리하고, quill 핀(핀이 스프릿되어 있음)의 경우는 슬라이드 글라스에 점적할때 유리하다. 그러나 후자의 경우 멸균시 초음파와 멸균(sonication)을 할 수가 없어서 물에 의한 여러번의 세척을 해주어야하기 때문에 불편하지만, 전자의 경우는 초음파 멸균에 의한 세척이 가능하기 때문에 편리하다. 그림 1은 quill핀 타입의 개략도이다.

나. Inkjet DNA chip (cDNA chip)

Pin DNA chip과 비슷한데 pin 대신에 inkjet printer처럼 cartridge를 쓴다. 각 cartridge에 유전자가 들어 있어서 전기적인 힘으로 유전자를 고형체 위에 분사하게 한다. inkjet은 열을 이용해 분사하는 thermal 방식, 압력을 이용하는 solenoid 방식 그리고 압전현상을 이용해 분사하는 piezoelectric 방식이 있다. 그림 2는 micro-solenoid 방식의 개략도이다. Syringe pump를 이용해서 유체의 정량을 대체함으로써 분사한다. 이로 인해 단혀있는 micro-solenoid valve가 순간적으로 작동하게 된다. 가해진 압력은 tip에 있는 orifice를 통해 나가는데 압력에 속도가 비례하게 되며, 속도가 용액의 표면장력보다 커지면 drop이 tip에서 분사하게 된다. Inkjet 방식의 장점은 유전자를 chip 표면에 닿지 않고 분사할 수 있어서 nanoliter 수준으로 정량의 유전자를 붙일 수 있고 분사량의 dynamic range도 크다는데 있다. 그러나, 많은 종류의 다른 유전자를 붙이기 위해서 cartridge 안의 유전물질 교환과 같은 기술적 문제가 남아있다.

다. Photholithograph chip (oligonucleotide chip)

미국 Affymetrix社에서 oligonucleotide chip을 만드는 방법으로 oligonucleotide를 glass 위에서 바로 합성한다. 각각의 oligonucleotide들은 15 ~ 25개의 염기로 이루어져 있다. oligonucleotide가 합성되는 유

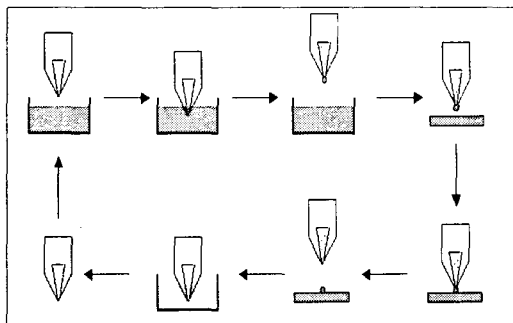


Fig. 1. The schematic diagram of pin type microarrayer

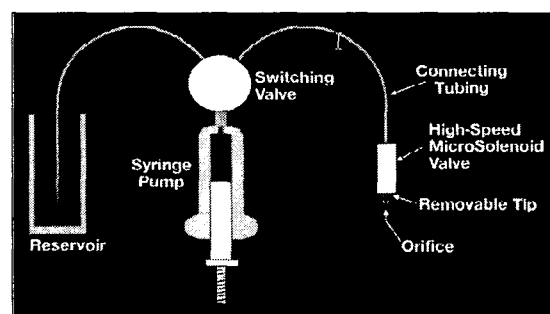


Fig. 2. The schematic diagram of micro-solenoid type microarrayer

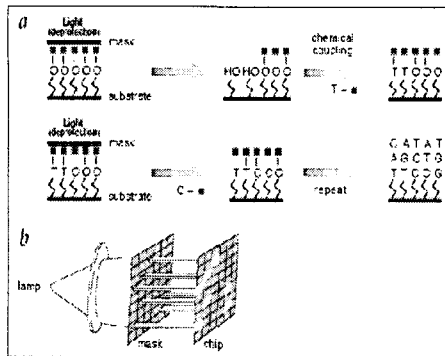


Fig. 3. The schematic diagram of manufacturing Photolithograph chip

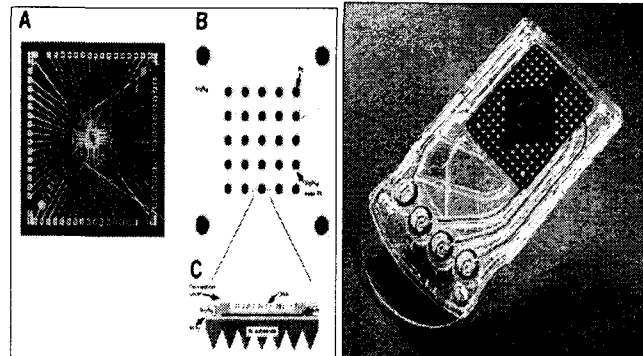


Fig. 4. The example of electronic chip

리의 표면은 각각의 염기들이 합성할 수 있게 보조체가 붙어 있다. 하지만 이들 보조체는 평소에 빛에 민감한 화학 물질로 덮여 있어 염기들이 합성될 수 없다. 이러한 성질을 이용하여 특별히 설계된 photomask를 위에 놓고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질들을 제거한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한가지 염기가 있는 곳에 넣으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. 물론 각각의 염기들도 빛에 민감한 화학물질로 덮여 있어 한 개씩밖에 합성이 안된다. 이러한 chip을 씻은 다음 다시 다르게 설계된 photomask를 이용하여 빛을 쏘여 주면 그곳에 있는 보조체나 염기들이 활성화되어 다음 염기들과 합성할 수 있게 되는 것이다. 이와 같은 반복적인 과정을 통하여 chip을 만든다. 그림 3은 Photolithograph chip 제작의 개략도이다.

라. Electronic DNA chip (oligonucleotide chip)

DNA가 (-) 전하를 띠는 성질을 이용하여 chip의 표면에 있는 특정 위치에 (+) 전기를 넣어서 그 위치에 원하는 유전자를 붙게 만드는 방법이다. 이와 같은 원리를 이용한 chip이 미국의 Nanogen에서 개발되었고 지금은 10,000개의 DNA를 이러한 방법으로 붙일 수 있는 chip이 개발되어 있다. 이 기술의 장점은 이와 같은 electronic addressing 뿐만 아니라 전기를 이용하여 target DNA를 원하는 특정 위치에 끌어드림으로서 결합 시간을 단축할 수 있다는 것이다. 또한 전기적인 힘을 이용하여 정상 DNA와 하나

Table 1. The list of application fields

cDNA chip	oligonucleotide chip
인체 유전자 기능분석 연구	암관련 유전자 돌연변이 검색진단
산업용 유전자 재조합 동식물 및 미생물 연구	유전병관련 유전자 돌연변이 검색진단
실험용 동식물 모델연구	약제내성 검색진단
암 및 질병관련 유전자 진단	DNA 염기서열 분석
유전자 치료	유전자 변이 가계도 작성
임상병리학	장기 이식가능 조직검사
동식물 검역	병원성 미생물 동정
환경변화에 따른 생태학 연구	법의학(용의자, 친자 확인 등)
식품안정성 검사	DNA 고고학
신약개발	

의 염기가 다른 DNA를 떨어뜨릴 수 있는 장점이 있다. 아직까지 Nanogen chip의 검색은 형광 물질을 이용하고 있지만 Clinical Micro Sensors라는 회사에서는 아주 획기적으로 검색과정도 전기 신호로서 측정하는 기술을 개발하였다. 그러므로 고가의 laser scanner 대신 손으로 들고 다닐 수 있는 저가의 측정장비를 사용하게 만들었다. 이러한 DNA chip은 앞으로 더욱더 폭 넓게 여러 가지 영역에서 쓰여지리라 예상되고 있다. 그림 4는 electronic DNA chip의 예이다.

3. DNA chip의 응용분야

DNA chip의 주된 응용분야는 유전자발현 profiling으로써, 이는 게놈 프로젝트로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 DNA chip을 제작하고 이용하여 세포내의 작용 메카니즘 및 생리 기작, 그리고 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하려는 시도에 응용되고 있다. 돌연변이와 다형성의 확인, 표현형 분석에도 이용될 수 있으며, 신약개발 실험에 이용될 경우, 전체 신약개발 비용뿐만 아니라 개발비용도 크게 절감할 수 있다. 표 1에 DNA chip의 활용가능 분야를 나열하였다.

4. 국내의 DNA chip 및 microarrayer 연구동향

가. 국외

DNA chip 제작용 microarrayer는 미국과 유럽, 그리고 몇몇 일본 회사들이 주축이 되어 이끌어가고 있다. 가장 먼저 microarrayer를 제작한 곳은 1995년 미국 stanford 대학 생화학과에서 처음 개발되었으며, 약 2~3천개의 유전자를 약 1cm² 안에 붙일 수 있다. 미국의 silicon valley에 있는 Affymetrix라는 회사는 computer 산업계에서 computer chip을 만들기 위해서 쓰는 photolithography라는 기술을 사용하여 수만개의 다른 염기 (nucleotide)들을 하나의 유리 위에 직접 합성하는 방법을 사용하여, 현재 1cm²당 400,000개의 서로 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있다. 또한 미국의 Nanogen社는 DNA가 (-) 전하를 띠는 성질을 이용하여 chip의 표면에 있는 특정 위치에 (+) 전기를 넣어서 그 위치에 원하는

Table 2. Research trend out of state of microarrayer

Maker	Specification	Nation
Stanford Univ.	32pin type, 50~200 μ m spot size	USA
GENPAK	1~48pin type, 50~150 μ m spot size, Accurate within 1 μ m, 120,000 spot/slide,	USA, UK
GENETIX Qbot	16pin type, Accurate within 1 μ m,	USA
BioRobotics	48pin type, spotting density 10 μ m steps	USA-Cambridge UK-Boston
Nippopn Laser & Electronics Lab	16pin type, 100~250 μ m spot size, 145~430 μ m spot pitch, 12,800spot/slide	Japan
AECOM	12pin type, Accurate within 11 μ m	USA
AFFYMETRIX	- 8pin type, Accurate within 10 μ m, spot size 180 μ m - a number of 400,000 per 1cm ²	USA
GeneMachies	48pin type, 100,000spot/slide, spot size 100 μ m,	USA
Spotbot	4pin type, Accurate within 10 μ m, 50,400spot/slide	USA
RoboDesign	64pin type, Accurate within 2.5 μ m	USA
Virtek Biotechnology	4~48pin type, 140 μ m spot pitch, 90 μ m spot size	USA

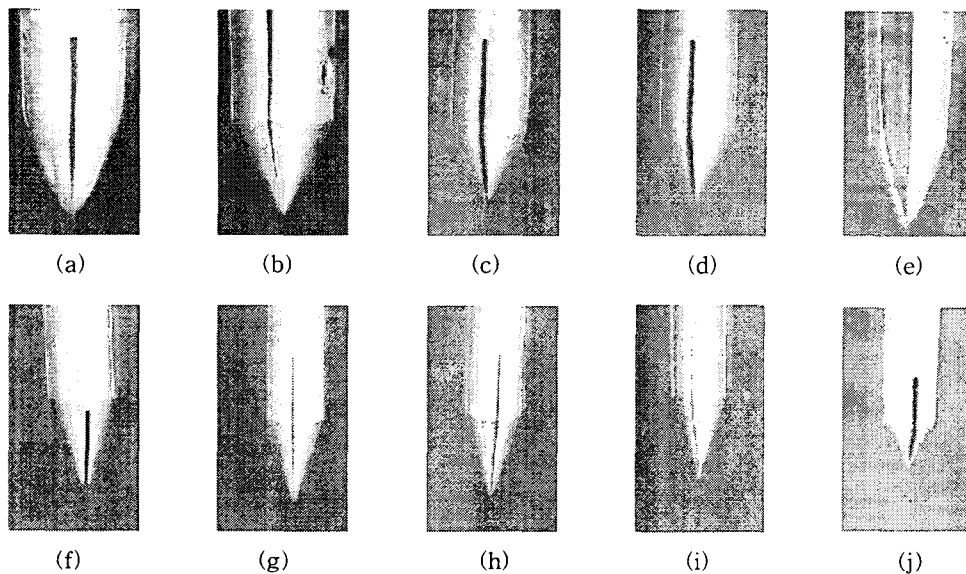


Fig. 5. The pictures of various tip

(a) $100\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$, (b) $100\mu\text{m} - 250\mu\text{m}$, (c) big, (d),(e),(f) Unpredictable, (g) $50\mu\text{m} - 120\mu\text{m}$, (h) $50\mu\text{m} - 120\mu\text{m}$, (i) really small, (j) $150\mu\text{m} - 200\mu\text{m}$

유전자를 붙게 만드는 방법으로 10,000개의 DNA가 붙은 chip을 생산한다. 그러나, 미국 및 그 외의 대부분의 microarrayer 제작회사들은 pin 타입의 산업용, 연구용 microarrayer를 개발하여, DNA를 고밀도로 붙이는 방법을 사용하고 있는 실정이다. 또한 로봇 본체는 대부분 XYZ 직교좌표형의 메티플레이터를 사용하고 있다. 표 2에 미국 및 유럽, 일본 등의 연구기관과 microarrayer의 타입 및 제원을 나타내었다. 그림 5는 지금까지 개발되어온 microarrayer에 사용되는 pin의 모양을 보여주고 있다.

나. 국내

국내에서는 현재 약 2대의 microarrayer가 개발되어 있는데, 하나는 (주) 바이오니아에서 자동 시료 미세배열 장치라는 이름으로 특허가 나있는 상태이다. 이 장치는 XYZ 직교좌표형 메티플레이터에 웰 플레이트가 착탈 가능한 랙 시스템과 스팟팅 기구, 스팟팅 기구를 세척하기 위한 세척 수단, 기판이 배열되는 지지대 등을 포함하여 개발하였다. 스팟팅 기구부분은 긴 관과 긴 관의 끝에 삽입된 모세관, 모세관이 삽입된 관 안의 끝 부분에 형성된 구멍으로 이루어졌다. 관은 1~36를 포함할 수 있고, 모세관의 내경이 $2\mu\text{m}$ 내지 $700\mu\text{m}$, 외경이 $90\mu\text{m}$ 내지 $850\mu\text{m}$ 이다. 또 다른 하나는 한국과학기술원(KAIST) 화학공학과에서 자체 제작한 microarrayer가 그것이다. 이 장치는 XYZ 직교좌표형 메티플레이터에 pin 타입 스팟팅 기구, 스팟팅 기구를 세척하기 위한 세척 수단 등을 포함하고 있다. 스팟 간격은 $150\mu\text{m}$ 이며, 스팟 크기는 $80\mu\text{m}$, 그리고 1cm^2 당 약 5,000개의 DNA를 스팟팅할 수 있다.

4. 연구방향 설정

microarrayer는 생명공학, 기계공학, 전자공학이 집대성된 장치이다. 위치 및 속도를 제어할 수 있는 정밀 서보모터 제어기술, 백래쉬 등에 의한 오차를 최소화할 수 있고, 구동시 진동의 최소화 등을 위한 정밀 Linear System 및 가공기술, 그리고 최적 시스템 제어 알고리즘 개발이 필수적이다.

상기 국내의 연구동향 분석 및 문헌연구를 통하여 향후 개발될 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 방향을 다음과 같이 설정하였다.

- 1) 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템 (microarrayer)을 pin 타입으로 설정한다.
- 2) 정밀도 향상을 위하여 로봇 시스템의 구동은 XYZ 직교좌표형으로 설정한다.
- 3) 1cm^2 당 5,000개 정도의 DNA를 붙일 수 있도록 한다.

5. 요약 및 결론

세계는 지금 post-genome 시대에 접어들고 있고, 하루에도 수백개 이상 밝혀지는 새로운 유전정보들이나 모든 유전암호가 밝혀진 생물들을 기존의 방법들로 연구한다는 것은 너무나 많은 시간을 요구한다. 즉, 인간 게놈 프로젝트 뿐만 아니라, 식물 게놈 프로젝트 등 다양한 분야에서 DNA chip의 필요성이 인식되고 있다. 그러나 우리나라는 DNA chip의 생산에 있어서 chip 제작에 필수적인 DNA chip 제작용 microarray를 고가를 들여 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이는 DNA chip 생산비를 높이고, 더 나아가 우리나라 생명공학분야 연구의 발전에 악영향을 미치는 결과를 초래할 수 있다. 몇몇 국내 생산업체가 있지만, 아직 그 필요성을 입증하지 못하였고, 대부분의 chip 공급업체는 아직 수입품을 사용하고 있는 상태이다. 이에 본 연구에서는 microarray의 국산화를 통해 안정적 DNA chip 및 microarray의 공급을 위해 microarray의 개발에 관해 수행하는 연구이며, 앞으로의 연구방향을 다음과 같이 설정하였다.

- 1) 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템 (microarray)을 pin 타입으로 설정한다.
- 2) 정밀도 향상을 위하여 로봇 시스템의 구동은 XYZ 직교좌표형으로 설정한다.
- 3) 1cm²당 5,000개 정도의 DNA를 붙일 수 있도록 한다.

6. 참고문헌

1. 김도균, 최용성, 권영수. 2001. 소수성 상호작용을 이용한 고집적 DNA chip 마이크로어레이의 개발. 한국전기전자재료학회 하계학술대회논문집 : 757-760
2. 박종훈. 2000. DNA chip. 대한내분비학회지. Vol. 14(4·5) : 463-467
3. 이상엽, 임근배, 최종길. 2000. DNA Chip 기술 현황과 활용분야. 공업화학전망. Vol.3(3) : 18-23
4. 이상엽, 윤성호, 임근배, 조운경. 2000. Genomics와 DNA chip. News & Information for chemical engineerings. Vol.18(3) : 307-311
5. 이성우. 2000. DNA 칩의 최근동향. 공학교육과 기술. Vol. 7(3) : 53-56
6. 정용재. 2001. 생물학용어사전. 대광문화사
7. Brown, T. A. 1987. Gene Cloning. Chapman & hall
8. Brown, P. O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Gen.* 21 : 33-37
9. Cheung, V. G., M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati and G. Childs. 1999. Making and reading microarrays. *Nat. Gen.* 21 : 15-19
10. Yoon, S.H., J.G. Choi and S.Y. Lee. 2000. Development of DNA chip microarrayer. *J. Microbiol. Biotechnol.* Vol.10(1) : 21-26