

# 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발(II)

- 로봇 시스템의 성능실험 -

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

- The performance test of developed robot system -

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

### 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.

게놈 프로젝트(genome project)라 함은 유전자들을 포함하고 있는 염색체의 유전자 지도 작성 및 유전자 배열을 결정하고 궁극적으로는 유전자의 기능을 밝히는 연구다. 최근 여기서 나타난 것이 바로 DNA chip 기술이다. DNA chip이란 유전자 검색용으로서 엄청나게 많은 종류의 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것을 말한다. DNA chip의 이용방법으로는 두 개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 mRNA를 추출하여 이들 mRNA를 역전사(reverse transcription)시킬 때 각각 다른 색깔의 형광 물질을 띤 염기를 집어넣어 빨간 색(Cy5)이나 녹색(Cy3)을 띤 cDNA를 합성한 후, 두 개의 cDNA를 똑 같은 양으로 섞어서 DNA chip에 결합시킨다. 결합이 안된 유전자들을 씻어낸 chip은 laser fluorescence scanner에 의하여 읽혀진다. 각각 유전자의 형광 정도는 그 유전자의 발현정도를 알려주는 것으로 이들 정보는 computer에 의하여 분석되고, 이렇게 하여 한번에 많은 양의 유전정보를 검색할 수 있는 것이다.

따라서, 본 연구는 유전체 연구에 필수적인 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 pin 타입 microarrayer를 개발하기 위한 전단계 연구로서 microarrayer의 시작기를 제작하여 그 시작기의 성능 실험을 통한 문제점을 분석하고 향후 발전방향을 제시하는데 본 연구의 목적이 있으며, 그 구체적인 내용은 다음과 같다.

- 1) DNA chip 제작용 로봇 시스템의 시작기를 설계, 제작하고,
- 2) 로봇 시스템 제어용 소프트웨어를 개발하여,
- 3) 성능 실험을 통한 향후 문제점 분석 및 향후 발전방향을 제시한다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 공시재료

본 연구에서 로봇 시스템의 성능실험에 사용된 DNA 시료는 종묘회사에서 사용하는 inbred 라인증 부계 배추의 잎과리에서 추출한 DNA로 cDNA library를 제작하여 그중 한 크론의 plasmid DNA를 추출해서 사용하였다. DNA chip용 slide glass는 aldehyde가 코팅된 76×25 크기의 silylated slide를 사용하였다. 그림 1에 DNA 시료 및 silylated slide를 나타내었다.

---

\* 충남대학교 농업생명과학대학 농업기계공학과

\*\* (주) 엔에스티

\*\*\* 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

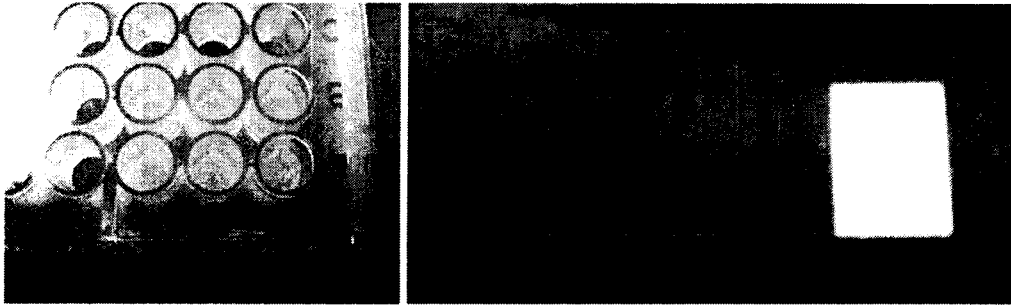


Fig. 1 The photo of DNA sample and silylated slide

## 나. 하드웨어 설계

### ① 로봇 본체

본 연구에서는 silylated slide에 DNA를 고밀도로 집합시키기 위하여 3축 자유도의 직교좌표형 로봇을 설계, 제작하였다. X, Y축은 위치정밀도를  $100\mu\text{m} \pm 10$  까지 제어할 수 있도록 AC 서보모터와 1405 전조 볼 스크류 및 LM 가이드 등을 사용하였고, Z축은 VS DC모터 및 볼트 스크류, LM 가이드 등을 사용하여 핀부분의 상하 왕복운동을 할 수 있게 하였다. Z축이 하강할 때 핀 부분이 slide glass에 닿을 때 자중만이 가해지도록 Z축에 슬라이딩을 주었다. 그림 2는 설계, 제작된 3축 직교좌표형 로봇 본체를, 그림 3에는 로봇 시스템의 컨트롤러를 나타내었고, 표 1에 로봇 시스템 및 제어장치의 제원을 나타내었다.

### ② 핀 부분

본 연구에서는 DNA chip을 제작하기 위해 slide glass에 DNA를 직접 점착할 수 있는 핀 부분으로 제도용 펜을 사용하였다. 제도용펜은 펜 끝이 두 부분으로 갈라져 있어 DNA가 녹아있는 시료를 머금고 있기에 알맞고 재질도 스프링강 이어서 내구성에 있어서도 특별히 문제될 것 없다고 사료되었기에 본 연구에 사용하였다. 제도용펜의 펜 끝은  $1\mu\text{m}$ 정밀도의 공구현미경으로 측정해본 결과 slide glass 접촉부의 가로 길이가 각각  $50\mu\text{m}$ , 세로 길이가  $50\mu\text{m}$ 이고, 갈라진 사이의 간격이  $5\mu\text{m}$ 이었다. 또한 제도용펜을 Z축에 부착할 수 있도록 핀 지그를 제작하여 펜을 지그에 낀 후 지그를 Z축에 장착하였다. 핀 지그는 웰 플레이트의 종류(96/384)에 따라 호환될 수 있도록 테프론을 드릴 가공하여 펜이 착탈될 수 있도록 제작하였으며, 한번에 여러 점을 찍을 수 있도록 하였다. 그림 4에 제도용펜의 모습과 확대모습을 나타내었고, 그림 5에 핀 지그와 제도용펜을 나타내었다.

### ③ 칩 고정판

본 연구에서는 웰 플레이트와 slide glass를 고정할 수 있도록 칩 고정판을 제작하였다. 96/384 웰 플레이트 2개와 slide glass 12개를 고정할 수 있도록  $300 \times 300 \times 15\text{mm}$  두랄루민판을 가공하여 로봇 본체에 부착하였다. 웰 플레이트의 고정개수와 한번에 제작할 수 있는 chip의 개수가 곧 로봇 본체의 크기와 직결되기 때문에 웰 플레이트를 가로로 2개 배열하고  $4 \times 3$ 으로 12개의 slide glass를 배열하였다. 그림 6에 칩 고정판을 나타내었다.

### ④ 세척 및 드라이 장치

DNA chip을 제작할 때 핀에 묻혀 한번 사용된 DNA는 다른 DNA를 묻히기 위해서 핀으로부터 제거해야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 핀에 증류수를 분사하며 진동 브러쉬로 DNA를 세척하는 장치를 개발하였다. 증류수를 분사하는 장치는 수증모터를 사용하였으며, 분사된 증류수가 핀을 세척하며 머무를 수 있도록 용기에 턱을 지게 제작하였다. 핀 드라이 장치는 용기에 흡을 내어 핀이 입출할 수 있도록 하고 콤프레샤에 의해 진공을 만들어 DNA를 씻고 핀에 묻은 증류수를 제거할 수 있게 하였다. 그림 7에 세척 및 드라이 장치를 나타내었다.

Table 1 The specification of robot system

Item	specification	model	maker
AC servo motor & motor driver	200W, 100V. 400W, 100V.	MSMO21A1A MSMO41A1E	Panasonic
Motor controller	2 axes controll I/O 8 channels	STP-2M(PC)	CONTEC
DC motor	rated voltage : 7.2V precision : +1mm	CA-32	CYLINOID
Water motor	a rating time : continuous AC 220V	HP-30	MEDO
Vibration brush	4W	BT-850	SB system
Compressor	0.2kW, 1.4A, 3400rpm a rated pressure : 8.5kg <sub>f</sub> /cm <sup>2</sup>	ACP-25LT	ACE techno
PC	CPU 1.9GHz	Pentium IV	Samsung

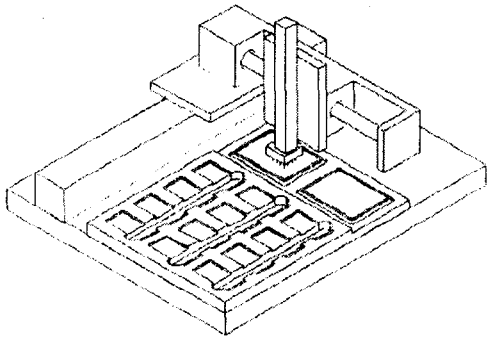


Fig. 2 The schematic diagram of robot system

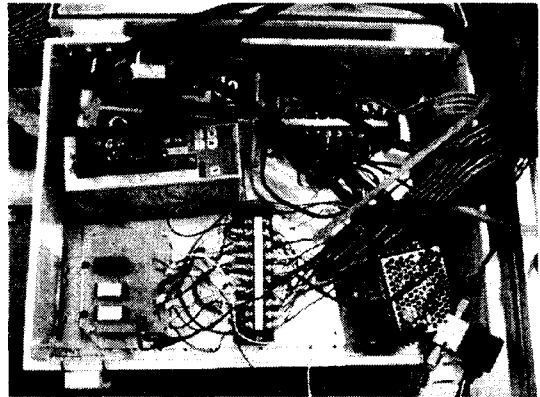


Fig. 3 The control box of robot system

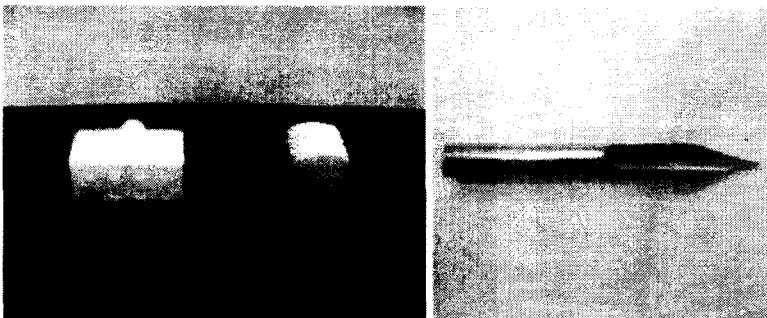


Fig. 4 The photo of pin zig and drawing pen

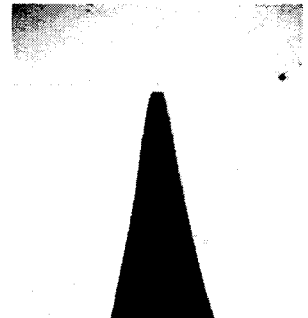


Fig. 5 The photo of shape and zoom of drawing pen

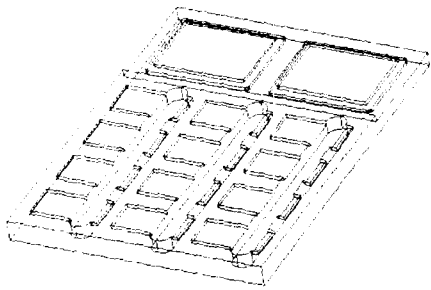


Fig. 6 The schematic diagram of plate for fixing well-plates and slide glasses

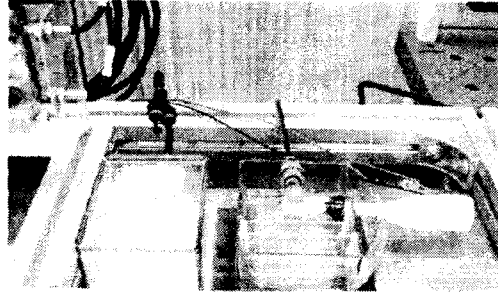


Fig. 7 The photo of device for washing and drying the pin

#### 다. 소프트웨어 설계

본 연구의 소프트웨어는 Microsoft社의 Windows용 언어인 Visual Basic 6.0으로 개발되었고, 모터 구동부와 I/O 변환과 관련된 입출력 포트는 Visual C++에서 DLL 파일로 작성하여 Visual Basic에서 사용할 수 있도록 하였다.

먼저 시스템을 초기화하여 원점을 잡은 후 핀부분을 세척 및 드라이시킨다. 세척시에는 증류수를 분사시키며 진동 브러쉬로 핀부를 세척하는데 이때 핀부를 왕복 이동시키며 브러쉬에 의해 DNA가 세척될 수 있도록 한다. 세척된 핀부를 드라이시키기 위해서 진공을 이용했다. 핀부가 드라이되면 웰 플레이트에 핀을 가져가 DNA를 핀에 머금은 후 slide glass에 순서대로 점착한다. 12개의 slide glass에 전부 점착이 완료되면 처음으로 돌아가 세척을 하고 그 다음 DNA를 slide glass에 점착한다. 점착 위치는 전에 점착된 DNA와 간격을 두고 점착한다. 그림 8은 로봇 시스템의 구동 및 제어 프로그램의 흐름도를 나타낸 것이다.

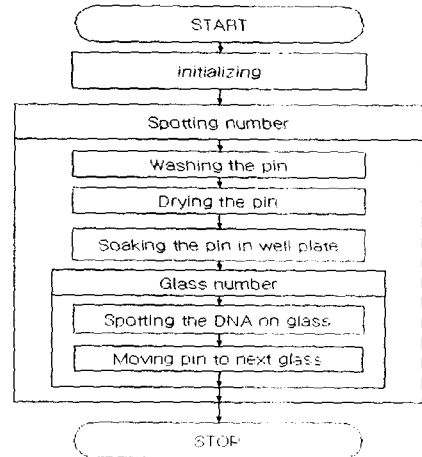


Fig. 8 Flow-chart of the developed control program

#### 라. 성능실험

##### ① 로봇 시스템 동작 실험

본 연구에서는 시스템의 초기화 없이 가로 세로 100mm의 정방형 가상 공간을 움직여 10회, 20회, 30회씩 CW, CCW 방향으로 회전하며 왕복하는 실험을 하였고, 그때의 위치 정밀도를 X, Y축 방향에서 측정하였다. 각각의 반복 측정시에 오차의 평균은 양수와 음수가 모두 발생할 수 있기 때문에 산술평가를 사용하지 않고, 편차평가를 이용하여 구하였다. 반복 정밀도 측정을 위한 실험장치로는 1 $\mu$ m까지 측정할 수 있는 Anritsu(Japan)社에서 제작한 모델명이 KL135A인 레이저 스캐너를 사용한다.

##### ② DNA chip 제작 실험

본 연구에서 직접 제작한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 시작기를 이용하여 직접 DNA chip을 제작하였다. 점 간격 가로 세로 1mm로 설정하였으며, 총 16번의 반복작업을 실시하였다. 또한 웰 플레이트에서 핀으로 DNA를 머금은 후 slide glass에 DNA를 점착시킬 때 핀을 slide glass에 접촉하는 시간을 1sec로 설정하였다. 그림 9는 성능시험을 실시하고 있는 로봇 시스템을 나타낸 것이다.

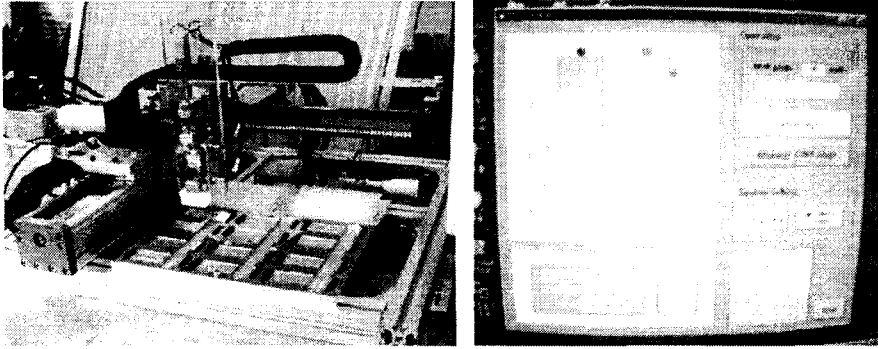


Fig. 9 The photo of performance test

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 로봇 시스템 동작 실험결과

로봇 시스템의 반복정밀도를 측정한 결과는 표 2와 같다. 각 측정위치에서의 반복에 의한 편차는 전 구간에서 0.02mm (20 $\mu$ m) 이내로 나타났고, 시스템의 이동 방향이 CW일 경우에는 Y축 측정방향에서 30회 회전왕복 운동하였을 때가 최대 편차 20 $\mu$ m를 나타냈으며 이동방향이 CCW일 경우에는 Y축 측정방향에서 30회 회전왕복 운동하였을 때가 최대 편차 19 $\mu$ m를 나타냈다. 결과적으로 반복 횟수의 누적에 따른 누적오차가 증가하는 것으로 나타났으나, 이 오차의 범위는 DNA가 slide glass에 점착된 크기보다 작은값의 편차가 발생하므로 DNA chip 제작용 로봇 시스템으로 적절하다고 사료된다.

Table 1. Result of repeatability test of the system

Moving direct	Measuring direct	repeat No.	Repeatability error ( $\mu$ m)
CW	X	10	1
		20	4
		30	10
	Y	10	13
		20	18
		30	20
CCW	X	10	1
		20	3
		30	11
	Y	10	11
		20	14
		30	19

#### 나. DNA chip 제작 실험결과

그림 10에 DNA를 slide glass에 점착한 것을 나타냈다. 1 $\mu$ m 정밀도의 공구현미경으로 결과를 측정하였다. 결과를 살펴보면 점들의 간격을 1mm로 설정하여 나타낸 결과  $\pm 10\mu$ m의 오차를 내어 시스템이 정확하게 slide glass 위치에 점착하였음을 나타내었다. 또한 aldehyde로 표면처리한 slide glass에 핀을 접촉한 시간을 1sec로 설정한 결과 점의 크기는 250~300 $\mu$ m로 나타났다. 이는 핀을 slide glass에 접촉하고 있을 때 표면으로 DNA 시료가 빨려나오는 현상이 나타났다. 따라서 slide glass에 핀이 접촉하는 시간을 단축시킨다면 점의 크기를 줄일수 있을것이라 판단된다. 핀의 slide glass 접촉부 형상이 타원형인데 반해 점착된 점의 형상은 원형으로 나타났는데 이는 물방울이 원형이 되려는 성질 때문인 것으로 나타났다.

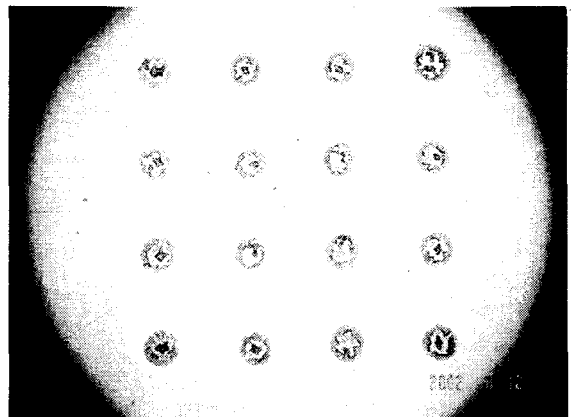


Fig. 10 The result of performance test

#### 4. 요약 및 결론

본 연구는 유전체 연구에 필수적인 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 pin 타입 microarrayer를 개발하기 위한 전단계 연구로서 microarrayer의 시작기를 제작하여 그 시작기의 성능 실험을 통한 문제점을 분석하고 향후 발전방향을 제시하는데 본 연구의 목적이 있으며, 본 연구의 구체적인 연구결과는 다음과 같다.

- 1) 본 시스템은 3축자유도를 가진 직교좌표형 로봇 본체, 웰 플레이트의 종류에 따라 호환이 가능한 핀 부분, 2개의 웰 플레이트와 12개의 slide glass를 고정시킬 수 있는 칩 고정판, DNA 시료가 묻어있는 핀을 세척하고 드라이 할 수 있는 세척 및 드라이 장치, 로봇 시스템 제어용 콘트롤러 등으로 구성하였다.
- 2) 로봇 시스템을 구동시킬 수 있는 소프트웨어는 Microsoft사의 Windows용 언어인 Visual Basic 6.0으로 개발되었고, 모터 구동부와 I/O변환과 관련된 입출력 포트는 Visual C++에서 DLL 파일로 작성하여 Visual Basic에서 사용할 수 있도록 하였다.
- 3) 로봇 시스템의 동작 성능 실험으로 1 $\mu$ m까지 측정할 수 있는 Anritsu(Japan)사에서 제작한 모델명이 KL135A인 레이저 스캐너를 사용하여 반복정밀도를 측정한 결과 편차가 전구간에서 20 $\mu$ m 이내로 나타났고, slide glass에 핀을 접촉한 시간을 1sec로 설정한 결과 점의 크기는 250~300 $\mu$ m로 나타났다. 향후 slide glass에 핀을 접촉한 시간을 달리하여 DNA의 점착 크기를 조절하고, 점착 크기를 축소하여 더욱 조밀한 간격으로 점착한다면 15,000점 정도를 점착할 수 있을것이라 사료된다. 또한 핀 세척 및 드라이 장치의 성능시험을 실시하여 DNA가 핀에서 완전히 제거될 수 있도록 시스템을 보완해야한다.

#### 5. 참고문헌

1. 이상엽, 윤성호, 임근배, 조윤경. 2000. Genomics와 DNA chip. News & Information for chemical engineerings. Vol.18(3) : 307-311
2. 이성우. 2000. DNA 칩의 최근동향. 공학교육과 기술. Vol. 7(3) : 53-56
3. 이현동, 김기대, 임용표, 김찬수. 2002. 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발(I) -국내외 연구동향-. 한국농업기계학회 2002년 동계학술대회 논문집 Vol.7(1) : 407-412
4. 정용재. 2001. 생물학용어사전. 대광문화사
5. Brown, T. A. 1987. Gene Clonning. Chapman & hall
6. Cheung, V. G., M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati and G. Childs. 1999. Making and reading microarrays. Nat. Gen. 21 : 15-19
7. Yoon, S.H., J.G. Choi and S.Y. Lee. 2000. Development of DNA chip microarrayer. J. Microbiol. Biotechnol. Vol.10(1) : 21-26