

CCD를 이용한 바이오 스캐너 개발

The development of CCD bio-scanner for DNA chip

김용민, 이성운, 구기현, 이종삼, 최광일, 김진용, 이병돈

스타 브이-레이 주식회사

ymkim@starvray.com

2002년 2월 human genome project의 완성이후 Biochip (DNA chip, protein chip, cell chip, lab-on-a-chip) 은 human genome을 연구하는데 있어서 없어서는 안될 필수적인 tool로 인식되고 있다. 그 중에 다양한 DNA chip (cDNA chip, oligonucleotide chip, BAC chip) 은 하나의 array-slide 위에 수 만개의 다른 DNA spot을 찍을 수가 있기 때문에 하나의 DNA chip으로 수만 가지의 유전자 기능을 연구할 수 있다. 이것은 연구자들이 수년간에 걸쳐 연구해야 하는 많은 작업을 단지 몇 주 안에 할 수 있는 장점을 가진다.

Biochip technology의 발전은 칩뿐만 아니라 분석할 수 있는 주변기기 시스템의 발전이 함께 있어야만 가능하다. Biochip을 분석할 수 있는 시스템은 bio-scanner와 같은 하드웨어적인 부분과 bio-scanner 운영 / 분석 소프트웨어와 같은 소프트웨어적인 부분으로 나눈다. 현재 DNA chip 실험은 형광 염료를 이용하여 유전자 발현량을 측정하는 방법이 보편적으로 사용되고 있으며 측정을 위해 레이저와 PMT를 이용한 방법과 백색광과 CCD를 이용한 타입의 bio-scanner가 있다.

일반적으로 bio-scanner는 DNA 칩을 염색한 염료를 여기(excitation) 시키는 방법에 따라 레이저 타입과 백색광원 타입으로 분류된다. Laser를 사용하는 방법은 발열량이 적고 정확한 파장의 빛을 쪼일 수 있다는 장점이 있지만 강한 intensity의 빛을 넓은 면적에 쬐 수 없기 때문에 PMT (photo-multiplier tube)와 함께 점광원으로 scan하는 방식을 사용한다. 이러한 방법은 S/N ratio가 좋아서 좋은 영상을 얻을 수 있지만 전체 DNA chip을 scan하는데 많은 시간이 필요하고 가격이 비싸지며, 레이저 파장의 제한으로 응용성이 떨어지는 단점이 있다. 백색광원 방식은 강력한 intensity의 백색광을 filter를 이용하여 원하는 파장을 골라내는 방법으로 저렴한 가격으로 신뢰성 있는 시스템을 꾸밀 수 있고 넓은 영역을 비출 수 있기 때문에 빠른 scan이 가능하다는 장점이 있지만 많은 열이 나기 때문에 이 열을 효율적으로 식히는 cooler가 필요하므로 시스템의 부피가 커지게 된다.

연구된 bio-scanner는 DNA Chip을 loader에 의해 광원과 CCD 센서가 있는 부분으로 이동시키고, 백색광인 metal halide lamp에 Cy3, Cy5 염료를 들뜨게 하는 532nm, 635nm 파장의 빛을 골라내는 filter를 거쳐서 나온 빛이 DNA Chip 에 비추어 진다. DNA chip에서 발현된 형광은 집속도가 높은 광학계를 통하여 모아지며, 고효율 CCD 센서는 DNA Chip에서 나오는 형광 빛을 검출하여 영상을 만든다. 이 형광 빛은 매우 미약하고 민감하며, DNA Chip마다 약간의 차이가 있기 때문에 적응형 Q/C알고리즘을 개발할 필요가 있으며, background subtraction, grid correction등의 영상 전처리 과정(pre-processing)을 거쳐서 분석 소프트웨어에 전달되고 분석 소프트웨어는 DNA 검사를 하게 된다.

바이오 스캐너에 사용될 광학계는 ORA사의 설계 프로그램인 CODE V를 이용하여 설계하였다. DNA chip에 빛을 쬐어 주어야 하므로, 이를 위한 공간 확보 때문에 object 거리를 30mm 이상이 되도록 했

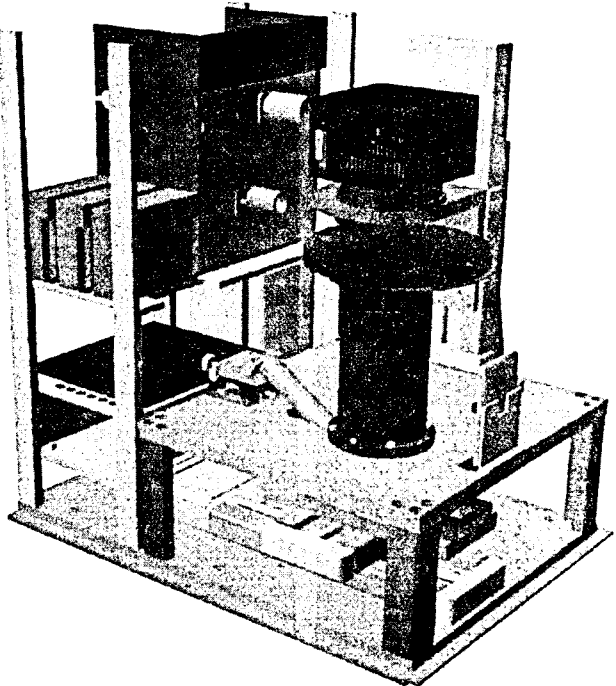
다. 광학계의 배율이 3.33 정도이고 현미경류에 해당한다. 현미경 광학계의 특성상 object 거리가 작아야 NA(numerical aperture)를 크게 할 수 있는데, 광원 쪽 제한 조건 때문에 NA를 더 크게 하기가 어려웠다. 또한 렌즈 경통이 너무 길어지면 가공 및 공차를 맞추는데 어려움이 있으므로, 렌즈가 들어가는 부분의 길이도 190mm 이상 되지 않도록 제한하였다. 색수차를 줄이기 위하여 높은 굴절률을 갖는 재질이 많이 사용되었다.

여기 광원(excitation light)에 비하여 형광 빛(fluorescent light)의 세기가 1/10000 정도로 작으므로, 가능한 많은 빛을 모을 수 있도록 f-number를 작게 하는데 신경을 썼다. 시스템에 필요한 분해능은 6um로 두고 설계하였다. 전체 시스템의 부피가 지나치게 커지지 않도록, 광학계의 전체 길이도 250mm 보다 길어지지 않도록 하였다. 이러한 제한 조건 때문에 f-number를 4.2 이하로 하기는 어려웠다. 디자인한 광학계의 f-number는 4.22이다. Fluorescent beam만 받아들이고, excitation beam은 차단하기 위해 filter가 필요한데, 이 emission filter와 CCD의 효과적인 cooling에 필요한 sealing window를 광학계 디자인에 포함시켜 simulation 하였다.

여기 광원으로 사용할 백색광으로는 일반적으로 사용되는 램프에 비해 광전환 효율이 우수하고 발광 특성이 바이오 스캐너에 적당한 metal halide lamp를 사용하였다. 광원에서 발생된 빛은 여기 필터를 거쳐 optical fiber보다 광투과 특성이 우수한 liquid light guide를 통해 DNA chip에 조사된다. 여기 광원으로 사용되는 램프의 발열량이 많기 때문에 광원부는 cooling부를 필요로 하는데, 본 연구에서는 효율을 낮지만 사용과 전기적 안정성이 우수한 공냉식을 채택하였다.

본 연구에서는 미약한 형광을 검출하기 위하여 고감도 CCD를 개발하였다. 개발된 카메라는 실시간 영상 처리 등을 위해 고속 프로세싱이 가능하여야 하기 때문에 별도의 프로세서를 내장하고 있다. 카메라는 열적 노이즈를 줄이기 위하여 별도의 냉각장치를 가지고 있다. 본 연구에서는 카메라의 크기를 고려하여 peltier를 이용한 전기적 방법을 사용하였다. 이를 위하여서는 CCD 면에 습기가 차는 것을 방지하기 위하여 외부의 공기를 차단하는 별도의 공간을 만들기 위해 구동 전자회로를 분리하고 기계적 shielding 처리를 하였다.

Bio-scanner에는 카메라를 포함하여 스테이지 컨트롤 드라이브, 광원 컨트롤러, 바코드 리더, 필터 휠 컨트롤러 등의 많은 모듈을 포함하고 있는데, 이들은 PC에 내장된 PCI 카드를 통해서 사용자의 명령에 의해 조정되게 된다. 또한 실시간 고속 프로세서를 내장하고 있기 때문에 외부와의 통신을 위해 별도의 communication 방식을 개발하였다. 이렇게 개발된 통신 방법을 채택하게 됨으로써 외부와의 통신은 HDB25 connector만으로 이루어지게 되었다. 외부에서 전달된 신호는 main controller에 전달되고 각 동작 모드에 대한 신호를 발생시킨다. 이러한 신호를 받은 각각의 모듈은 timing generator에서 발생된 clock signal에 의해 동작된다. 촬영된 영상은 내부 프로세서를 거쳐 실시간으로 PC로 전송되며 이를 받은 PC에서는 별도의 소프트웨어적인 처리를 하게 된다.



F
E

※본 연구는 산업자원부 차세대 산업기술 개발사업의 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.