

제브라피쉬 실험용 자동화장치 및 최적환경 기반연구

A Study on Zebrafish Breeding Automation System and Optimized Environment

*,#김동훈¹, 송준엽², 유재호³

*.#D. H. Kim(kdh680@kimm.re.kr)¹, J. Y. Song², J. H. Ryu³

^{1,2} 한국기계연구원, ³치노믹디자인(주)

Key words : Z-Fish, Breeding, Automation, Optimized Environment

1. 서론

본 연구는 최근 생체실험용 쥐를 대체할 수 있는 모델로 각광받고 있는 제브라피쉬의 사육 및 실험환경을 위한 장치구현과 효과적인 운용 실험환경의 최적조건 도출을 위한 최적환경 제어와 감시를 자동화하여 경쟁력 있는 제품 및 기반기술 확보를 하고자 함에 있어서 이의 사전 기반연구를 수행함에 목적이 있다. 제브라피쉬 (zebrafish, 학명: *Danio rerio*)는 최근 인간게놈연구의 완성과 함께 대량유전체 기 능분석을 위하여 세계적으로 활발히 도입되고 있는 새로운 실험동물로서 인간과 유전체 구성이 비슷하면서도 초파리와 같은 유전학적 연구가 가능하다.

국내의 경우도 좀 늦은 감이 있기는 대학 및 정부출연연구소를 중심으로 zebrafish를 연구소재로 하는 경우가 점차로 증가추세에 있다. 하지만 zebrafish를 이용한 유전학적, 분자생물학적 연구를 하기 위해서 기본적으로 zebrafish를 안정적으로 사육할 수 있는 기본시설이 있어야 하나 아직 국내에서는 이를 제공해줄 수 있는 전문업체가 전무한 실정이다. 즉, 사육 등에 영향을 끼치는 질산/암모니아, pH농도, 물의 순환 양, 빛 밝기 조절, 수온변화 문제 등 최적환경 항목/조건 도출 및 모니터링 등 관리가 필요한 시설이 요구되며 이에 관련된 많은 연구가 필요하다.

그러나 현 실정은 대부분의 연구실이 시중의 일반수족관의 어항을 이용하거나 수작업으로 자체 제작한 임시방편의 설비로 어려움을 겪고 있는 실정이다. 빠른 시일내 급증이 예상되는 연구 규모에 따라 대단위의 실험동물 사육장치가 절실히 필요하다. 최종 개발하고자 하는 Zebrafish Auto System의 경우, 제브라피쉬 사육실험용 장치의 하드웨어 제작 및 각 기능별 Switch를 통해서 단위별 조절이 가능하며 PLC를 통한 조건별 자동 조절이 가능하도록 하며(Heater, Filter, Pump, Drain valve 등), 수온, pH농도 및 순환에 필요한 물량 등의 효율적인 통제가 가능한 제브라피쉬 실험설비용 장치구축 및 최적환경 제어모니터링시스템이 궁극적인 목적이다.

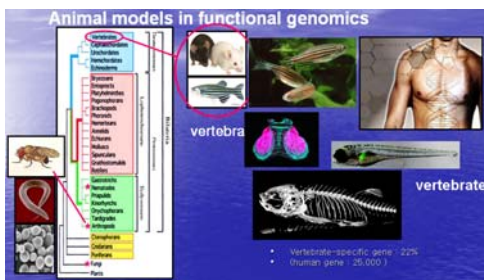


Fig. 1 Zebrafish

2. 국내외 기술 현황

국내에서는 전문적으로 zebrafish 생물모델 사육·실험장치를 제공하는 업체가 전무하며, 일부 연구실이 시중의 일반수족관의 어항을 이용하는 경우가 많다. 최근 수작업으로 자체 제작하나 임시방편의 설비로 어려움을 겪고 있는 실정이다. 아직까지 그러한 인프라가 안 되어 있는 가장 큰 이유는 국내 실험이 기준 쥐, 초파리 등을 주로 이용하여 왔기에 이에 대한 기득권을 포기하고 새로운 생물 모델을 가지고 처음부터 시작하는 어려움 등이 있고 여러 보수적인 사고가 한국 등 아시아 권에서 유럽 및

미국에 비하면 뒤떨어져 보급이 늦은 큰 이유라 볼 수 있다. 하지만 급변하는 연구 Trend와 시장규모에 따라 제브라피쉬의 대단위 실험동물 사육장치가 절실히 필요하게 되었으며, 최근 소수의 벤처기업 등이 zebrafish auto system의 국내 연구수요를 선도적으로 지원하겠다는 슬로건하에 활발한 연구를 수행하기에 이르렀다.

국의 현황으로는 독일중심의 large-scale chemical mutagenesis를 시작으로 유럽, 미국, 일본, 싱가포르 등 세계 각국에서 zebrafish를 이용한 연구팀이 증가하고 있는 실정이다. 제브라피쉬 국제학회는 7번째로 2006년 International Conference on Zebrafish Development & Genetics가 있었으며 이는 2년 주기로 짝수년에 미국에서 개최하고 있으며 현재는 University of Wisconsin-Madison으로 장소를 정하였다. 이와는 별도로 홀수년에는 유럽을 중심으로 European Zebrafish Genetics and Development Meeting이 5회째로 2007년 7월에 개최되었다. 그리고 최근 아시아, 오세아니아에서도 Asia-Oceania Zebrafish Meeting이 개최되었다.

3. 자동화장치 개요

본 연구에서 Target으로 하는 장치는 최근 생체실험용 쥐를 대체할 수 있는 모델로 각광받고 있는 제브라피쉬의 사육을 위한 모듈형 장치로서 배란 등 사육 실험에 있어서 온도, 농도 등 최적의 환경조건 도출 및 제어·감시가 가능한 경쟁력 있는 시스템으로 디자인 하고자 한다. 개발내용 및 범위를 정의하면 다음과 같다.

○ 제브라피쉬 사육실험용 장치의 하드웨어 제작 및 각 기능별 Switch를 통해서 단위별 조절이 가능하며 PLC를 통한 조건별 자동 조절이 가능하도록 함

- 금형으로 특수제작 사출 Cage를 제작하여 치어부터 성어까지 한 장치내에서 배양 및 유전변형 실험 등을 가능하게 관리함 (먹이구/입수구 분리 및 사이즈별 매쉬 교체가능하도록 설계)

- 분리 및 해체가 가능하도록 입/배수 배관 모듈설계 및 실험장치 제어기능 구현 등

- . controlling the heater by temperature sensor
- . warning filter life time by pressure sensor
- . controlling pump operation by time
- . warning the UV lamp life time
- . controlling drain valve
- . controlling the feeding pump by level sensor
- . warning the feeding time.
- . display for temperature, pressure, pH, conductivity

○ OP(Operational Panel)를 통한 제브라피쉬 실험장치용 자동화장치의 최적환경 제어 및 모니터링이 가능하도록 함

- . 장치 테스트를 통한 수온 25C ~ 29C내에서 최적온도 도출
- . 최적 pH 농도 도출
- . Cage별 총량 최적조건 도출 (하루 몇회 정도 갈수 있는 유속이 필요한 지 등)
- . 수질의 갑작스런 변화를 막기위한 Water quality 방안
- . Light 조절 최적조건 도출 및 산란 최적환경 도출 (빛에 따른 시간 및 보관단위 산란알 수, 보관방법 등)

구체적인 설명을 위하여 Fig. 2와 다음 절차를 일례로 들고자 한다.

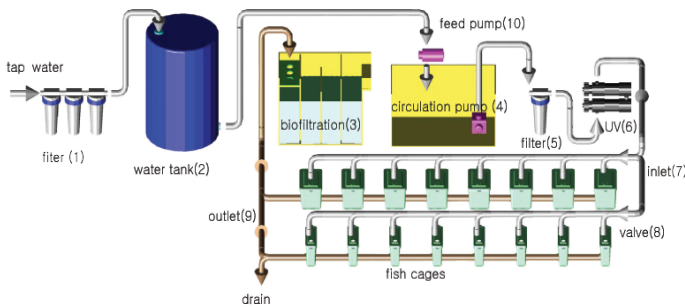


Fig. 2 Conceptual design of Zebra Auto System

- 급수는 3단 필터(1)를 통과한 후 원수탱크(2)에 저장하게 된다. 이어서 feeding pump (11)를 통하여 수조에 물을 공급하게 되는데 수조에 설치된 level sensor에 의해서 자동으로 물을 공급하도록 함.

- 이물은 prefilter(5)를 통해서 1차적으로 이물질을 걸러내고 UV살균기(6)를 통 과하게 된다. 그리고 각각의 선반에 설치된 입수 라인을 통해서 물이 각각의 cage에 전달하게 되며 각각의 cage에 설치되어있는 조절밸브(10)에 의해서 실제로 cage에 들어 가는 물의 양이 조절되도록 함.

- cage에 넘쳐 나오는 물은 배수라인(9)을 통해서 한곳으로 모여지며 이것은 다시 여과조(3)로 흘러들어가도록 하며 이물은 다시 생물학적필터를 통과 하면서 물고기에서 배출된 암모니아를 무해한 질산염으로 바꾸고 다시 수조로 들어가도록 함.

- Zebrafish는 열대어이기 때문에 수조안에는 자동으로 온도를 감지하며 물의 온 도 외에도 농도, 수압 등을 센서를 통하여 모니터링하여 항상 일정하게 제어하도록 하며, 향후 원거리에서 도 효율적인 통제가 가능하도록 기반기술을 확보 계획.

4. 최적환경을 위한 영향인자 도출 및 방안분석

제브라피쉬 사육 실험용 자동화장치의 최적으로 운용하기 위해서는 최적환경 영향인자를 분석하여야 한다. 본 연구를 통하여 도출된 영향인자는 온도제어, 아질산 농도제어, 질산중도 제어문제 등이며, 이외 원격제어 기술 및 장치 패키징 기술이 영향을 미친다.

1. 온도제어 : 최적온도 유지

- 필요성 : zebrafish의 성장에 필요한 최적의 온도를 유지하여야 하며 이를 위한 온도 제어 장치가 필요함
- 현기술 : 메인 수조에 설치되어 있는 온도 센서에 의해서 온도를 감지하고 이를 제어부에서 히터를 가동하여 메인 수조의 온도를 일정한 온도로 유지
- 문제점 : 메인수조는 각각의 실험동물(zebrafish)이 담겨져 있는 cage에서 나온 물을 일괄적으로 담고 있는 수조로 이곳의 온도와 각각의 cage의 온도는 다르다. 현재 시스템상에서 온도계로 측정된 결과 1~1.5C의 한차가 나고 있다. 이유는 순환되는 물의 온도는 순환되는 속도와 주위 환경에 따라 온도의 손실이 나타나기 때문
- 연구방향 : 메인수조에 있는 heater를 이용하여 실제 cage의 온도를 일정 하게 유지할수 있는 방법을 찾는 것으로 temperature sensor를 각각의 cage에 모두 장착하거나 그 외 cage의 온도를 가장 효과적으로 확인할수 있는 방법을 찾아야 함

2. 아질산 농도 제어 : zebrafish의 최적농도(≤0.3mg/L) 유지

- 필요성 : 어류 사육에 있어서 아질산의 최적 농도 유지는 필수적이다. 일반적으로 아질산은 어류의 먹이 및 배설물에서 발생하는 유독한 암모니아가 아질산박테리아에 의해서 아질산으로 변환된다. 여기서 암모니아가 증가한다면 바로 아질산도 증가하게 된다. 즉 일정한 아질산을 유지한다는 것은 일정한 암모니아를 유지하기 위한
- 현기술 : 아질산박테리아를 수조내에서 성장유지하기 위해서는 biofilter가 사용되고 있으며 각각의 시스템에 적당한 biofilter의 양을 확인된것은 없다. 단지 과량의 biofilter를 사용하고 사용후에 아질산의 농도를 측정하여 적당한 양을 확인하는 방법밖에 없었다
- 문제점 : 사용후 확인이라 함은 실제적으로 실험동물모델을 사육시에 하는 방법으로 중요한 실험동물 사육함에 있어서 최적의 biofilter양을 확인하기 위해서 실험동물(zebrafish)을 위한 환경에 노출시켜야 하는 문제점 있음
- 연구방향 : 연구실에서 사용되고 있는 사육시스템에 대한 적당한 biofilter 양을 측정하기 위하여 아질산 농도 연속 측정 장치의 개발이 필수적이며 또한 biofilter양과 사육시설의 크기에 따른 아질산농도의 상관관계를 측정

3. 질산 농도 제어 : zebrafish의 최적 농도(≤25mg/L) 유지

- 필요성 : 실험모델(zebrafish)사육에 있어서 질산염의 발생은 피할수 없는 상황이나 일반적으로 암모니아나 아질산에 비해서는 무해한 물질이다. 하지만 과량의 농도는 생장에 대한 저해요인으로 작용한다. 즉 질산염이 시스템 상해서 쌓이는것을 막기위한 장치가 필요
- 현기술 : 일정한 시간이 따라 질산염의 농도를 측정하여 물을 환수하는 방법을 쓰고 있음
- 문제점 : 일정한 간격으로 질산염이 쌓이는 것이 아니라 먹이의 과량 주입 또는 실험동물(zebrafish)의 사육량에 따라 질산염의 농축시기가 달라진다. 즉 항상 연구원들이 측정해야 하는 번거로이 있음
- 연구방향 : 시스템상에서 쌓이는 질산염을 없애는 방법은 환수를 통하여 없애는 것이 방법이다. 이를 위하여 일정한 양을 물을 자동적으로 환수하기 위한 부가 장치가 필요하며 이를 위하여 일정한 제어장치의 개발이 필요함. 물의 소모에 따른 질산염의 농도 상관관계를 확인하여 효율적인 환수제어 방식을 구현하여야 함

4. 원격제어기술

- 필요성 : 연구실과 떨어져 설치되는 시스템의 제어변수를 원거리에서 확인할수 있어야 한다.
- 현기술 : 시스템이 설치되어 있는 온도 및 수위에 대하여는 alarm장치가 부착 가능
- 문제점 : 연구실과 시스템이 설치되어 있는 장소와는 거리가 있어서 즉시 alarm에 의한 반응을 바로 할수 없음
- 연구방향 : 시스템에서 발생할수 있는 모든 변수를 확인하고 이를 원거리 무선/유선 전송할수 있는 원격 제어 장치의 개발이 필수적임

5. 장치/Packaging 기술 : 모듈형 부품(Cage,배관/Pipe 등)설계제작기술, 전자제어설계기술, OP Control Panel제작기술, PCB/Firmware기술 등

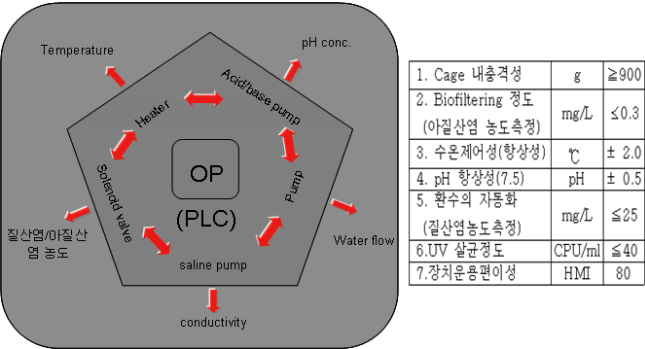


Fig. 3 Key factor for optimized environment

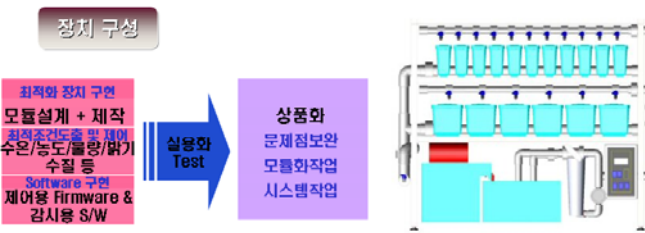


Fig. 4 System configuration

5. 결론

제브라피쉬 실험설비의 경우 새로운 생물실험 모델을 배양하고 실험할 수 있는 신 분야 장비산업으로서 사전 기반 연구가 성공적으로 수행되면 본 시스템 관련 모듈형 기구부 설계 및 자동화 장치 제작기술을 국내자체기술로 최초 확보함으로써 모든 부품 및 cage를 자체생산 및 조달이 가능하다. 이에 관련하여 최적조건 도출 및 제어 및 모니터링 등 자동화시스템 기술의 기반기술 확보 및 이를 바탕으로 향후에는 원격운용의 기반 확보를 통하여 보다 경쟁력 있는 장치의 개발을 하고자 한다.

참고문헌

1. Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. Pigment Cell Res. 2007 Apr;20(2):120-7.
2. 그 외 다수