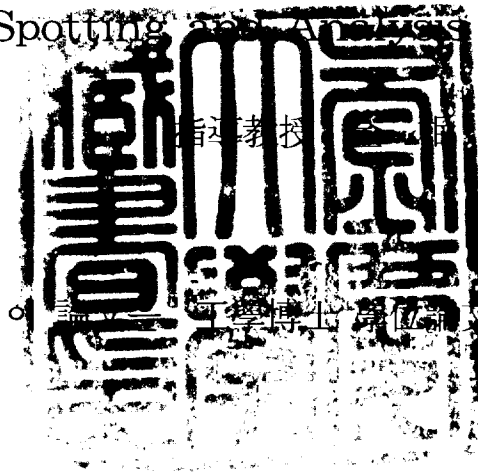


工學博士 學位論文

DNA Chip의 제작과 분석을 위한 Micro-Arrayer 및 Scanner 개발

Development of Micro-Arrayer and Scanner
for Spotting and Analysis of DNA Chips



指導教授 김기현 奉

○ 學位論文으로 提出함

2005年 2月

釜慶大學校 大學院

메카트로닉스공학 협동과정

鄭 南 洙

鄭南洙의 工學博士 學位論文을 認准함

2005 年 2 月 25 日

主 審：工學博士 安 斗 星

副 審：工學博士 金 煥 成

委 員：工學博士 吳 明 錫

委 員：工學博士 徐 振 瑚

委 員：工學博士 金 相 奉



목 차

Abstract	1
List of Figures	4
List of Tables	8
List of Photos	9
제 1 장 서론	10
1.1 연구배경 및 필요성	10
1.2 연구내용 및 목적	16
제 2 장 DNA Chip Micro-Arrayer 개발	18
2.1 서언	18
2.2 Micro-Arrayer 시스템의 기본원리 및 구성	26
2.3 제어계 및 제어 알고리즘 설계	31
2.4 DNA Chip Micro-Arrayer 시스템의 설계 및 해석	34
2.5 DNA Chip Micro-Arrayer 시스템의 통합 관리 프로그램의 개발	45
2.6 실험 및 검증	48
2.7 결론	61

제 3 장 DNA Chip 분석을 위한 영상처리	
알고리즘 개발	63
3.1 서언	63
3.2 영상처리 기본원리 및 알고리즘 구성	65
3.3 개발되어진 영상처리 알고리즘의 검증	86
3.4 결론	91
 제 4 장 DNA Chip Scanner 개발	 92
4.1 서언	92
4.2 시스템의 원리	96
4.3 DNA Chip Scanner 시스템 구성	99
4.4 제어 알고리즘 설계	116
4.5 카메라 보정(calibration) 알고리즘 설계	118
4.6 실험 및 검증	120
4.7 결론	130
 제 5 장 결론	 131
5.1 결론	131
5.2 추후과제	133
 참고문헌	 134
 Publication and Conference	 143
 감사의 글	

Development of Micro-Arrayer and Scanner for Spotting and Analysis of DNA Chips

Nam Soo Jeong

*Department of Mechatronics Engineering, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Biological science is being revolutionized by an availability of much information in regards to a complete genome sequence for many different organisms. Much effort is being devoted to determine the sequences of many other organisms including humans. To have these enormous amounts of data with the recently developed advanced technology allows us to analyze thousands of genes in parallel.

Especially, the researches of DNA(Deoxyribonucleic acid) have been extensively increased. There are southern blotting using connection between DNA and DNA, northern blotting using connection between RNA(Ribonucleic acid) and DNA and PCR in conventional gene analysis methods. However, by these methods, because it is difficult to detect tens of genes at a time, works for instant analysis such as disease diagnosis is time-consuming and demand much human effort. To solve this problem, the development

of DNA chip system using micro-arrayer and DNA scanner is deeply needed.

First, a micro-arrayer system developed in this thesis mainly for manufacturing DNA includes three axis manipulator, pin , wash/dry stage, well plate and slide glass, etc. The three-axis manipulator is designed to automatically collect samples from 96 or 192 well plates using up to 16 simultaneously moving pins and to deposit them on a surface-modified slide glass. Moreover, this system is followed by a wash/dry operation in a clean stage. The cycle is also repeated with a new set of samples. The developed system can deposit cDNA or oligonucleotides with spot intervals of $150\mu m$ and the spot size of $120\mu m$, respectively.

Secondly, when the slides through micro-arrayer system are hybridized with a probe containing two labeled tissue samples, the development of DNA scanner system is required. A scanner system developed in this thesis can digitize the excitation levels at the characteristic wavelengths of two associate labels, respectively. Moreover, the image processing algorithm for analysis of DNA chip is also proposed in order to develop DNA scanner system in advance. The developed DNA scanner system consists of two axis manipulator, detection part and optical parts and is based on laser fluorescent expression method. By the experimental results, our development goal is that the developed micro-arrayer can manufacture low-integrated DNA chip with 192 oligonucleotides/ cm^2 . Moreover, the developed micro-arrayer can manufacture oligonucleotides about ten times as large as our development goal.

The developed scanner system obtains a degree of expression of fluorescent light of probe on DNA chip after hybridization with CCD camera and analyze the information of the expression using image processing algorithm. The effectiveness of the developed scanner system is proven through the experiments using slide glasses without and with microorganism.

List of Figures

- Fig. 2.1 The schematic diagram of quill pin type micro-arrayer
- Fig. 2.2 The schematic diagram of micro-solenoid type micro-arrayer
- Fig. 2.3 The schematic diagram of manufacturing photolithograph chip
- Fig. 2.4 The example of electronic DNA chip
- Fig. 2.5 Procedures of DNA typing using DNA chip
- Fig. 2.6 Schematic representation of the micro-arrayer
- Fig. 2.7 cDNA micro-array's shape
- Fig. 2.8 Developed system configuration of micro-arrayer
- Fig. 2.9 Flow chart of signals and data
- Fig. 2.10 Flow chart of micro-arraying procedure
- Fig. 2.11 Schematic configuration of spotting pin and its tip
- Fig. 2.12 Spotting mechanism using the pen tip
- Fig. 2.13 Login screen of integrated management software for micro-arrayer
- Fig. 2.14 The loading and saving screen of parameters
- Fig. 2.15 Login screen of integrated management software
- Fig. 2.16 The function of transcription informatics
- Fig. 2.17 Histogram result
- Fig. 2.18 Formality distribution curve
- Fig. 2.19 Test that attach Rhabdo virus of flatfish to slide glass that coat by Poly-L-lysine
- Fig. 2.20 Poly-L-lysine coating slide grass

- Fig. 2.21 Aminosilane coating slide glass
- Fig. 3.1 Color image and gray image
- Fig. 3.2 Histogram
- Fig. 3.3 General form of histogram
- Fig. 3.4 Original image(Cup)
- Fig. 3.5 Threshold 100
- Fig. 3.6 Threshold 127
- Fig. 3.7 Threshold 200
- Fig. 3.8 Statistical meanings of bi-model histograms
- Fig. 3.9 Binary image using auto threshold method
- Fig. 3.10 Display screen of binary images
- Fig. 3.11 Structuring systems
- Fig. 3.12 Mask for erosion operation
- Fig. 3.13 The compared images between binary and erosion images
- Fig. 3.14 Mask for dilation operation
- Fig. 3.15 The compared images between binary and dilation images
- Fig. 3.16 Image before closing operation
- Fig. 3.17 Image after closing operation
- Fig. 3.18 Binary image and labeling image
- Fig. 3.19 Range labeling steps
- Fig. 3.20 Image after labeling operation
- Fig. 3.21 Information grid for observation points
- Fig. 3.22 Schematic description of inertia moment
- Fig. 3.23 Test measure model

- Fig. 3.24 The recognition procedure of variation of observation points in experimental apparatus
- Fig. 3.25 An initial data and comparison data
- Fig. 3.26 Pixel accuracy graph
- Fig. 4.1 The system principle of laser induced fluorescences
- Fig. 4.2 Schematic configuration of developed DNA chip scanner
- Fig. 4.3 The composition elements of DNA chip scanner
- Fig. 4.4 Schematic diagram of DNA chip scanner
- Fig. 4.5 Acquired images without optical filter
- Fig. 4.6 Acquired images with optical filter
- Fig. 4.7 Pin diagram of PIC16F877
- Fig. 4.8 Motor driver circuit
- Fig. 4.9 Display screen of DNA scanner software
- Fig. 4.10 Function buttons for image processing
- Fig. 4.11 Display screen of position and ares for spot estimation signal
- Fig. 4.12 Part of initial data set
- Fig. 4.13 Control buttons of nonautomatic slide
- Fig. 4.14 Flowchart of developed DNA chip scanner
- Fig. 4.15 Procedure of scanning algorithm
- Fig. 4.16 Coordinate system
- Fig. 4.17 Configuration of an imitated slide
- Fig. 4.18 Display screen of an acquisition image using developed DNA chip scanner
- Fig. 4.19 Binary image of an acquired image
- Fig. 4.20 Erosion image of an acquired image

- Fig. 4.21 Dilation image of an acquired image
- Fig. 4.22 Labeling image of an acquired image
- Fig. 4.23 The elimination image of space noises
- Fig. 4.24 The elimination image of length noises
- Fig. 4.25 An acquired initial image
- Fig. 4.26 An image after labeling
- Fig. 4.27 An image display screen after eliminating noises

List of Tables

Table 2.1	Main characteristics of 80C196KC
Table 2.2	Signal connection state of I/O port
Table 2.3	Specifications of stepping motor and motor driver
Table 2.4	The specification of ChipMaker 4
Table 2.5	Spotting specs of the developed micro-arrayer
Table 2.6	The number of pixels at each spot
Table 2.7	Frequency distribution
Table 2.8	The results of interval probability
Table 3.1	Pixel accuracy
Table 4.1	Performances and characteristics of the open market products
Table 4.2	Specification of developed DNA scanner
Table 4.3	System configuration of vision devices
Table 4.4	Specification of laser module
Table 4.5	PIC16F877 specification

List of Photos

- | | |
|------------|---|
| Photo 2.1 | Developed 80C196KC micro controller board |
| Photo 2.2 | Developed PCB board of stepping motor driver |
| Photo 2.3 | Installed stepping motor driver in micro-arrayer |
| Photo 2.4 | The developed micro-arrayer |
| Photo 2.5 | The shape of ChipMaker 4 in the micro-arrayer |
| Photo 2.6 | Shape of tip holder in micro-arrayer |
| Photo 2.7 | The shape of clean station |
| Photo 2.8 | The shape of base plate |
| Photo 2.9 | Example of micro-arrayer printed by developed arrayer |
| Photo 2.10 | Developed testing tip |
| Photo 2.11 | Example of micro-arrayer printed by testing tip |
| Photo 2.12 | The shape of an image after processing |
| Photo 3.1 | The configuration of measurement system |
| Photo 4.1 | Developed DNA chip scanner system |
| Photo 4.2 | CCD camera and optical filter |
| Photo 4.3 | Frame grabber board |
| Photo 4.4 | Laser diode module |
| Photo 4.5 | PCB controlled board using PIC16F877 |
| Photo 4.6 | Slide glass for calibration |

제 1 장

서 론

1.1 연구배경 및 필요성

20세기 후반에 들어서면서 모든 생물학적 연구의 기반은 유전자의 발견에 따른 DNA(Deoxyribonucleic acid) 수준의 여러 연구방법에 의해 괄목할만한 성장을 하였으며, 그 적용범위 또한 광범위해지고 있다. 특히 DNA의 물리화화적인 안정성, 높은 정밀도와 정확도, 미소한 양의 시료만으로도 분석이 가능하다는 점에서 유전자 분석법은 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 DNA와 DNA 사이의 결합을 이용한 southern blotting과 RNA(Ribonucleic acid)와 DNA 사이에 결합을 이용한 northern blotting 그리고 PCR등의 대표적인 방법이 있다 [11]. 그러나 이들 방법으로는 한 번에 수십 개 이상의 유전자들을 검색하기가 어려워 질병 진단과 같이 즉각적인 분석 결과가 필요한 경우 시간 및 인력 소요가 불가피할 수밖에 없다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 미국과 영국을 선두로 선진 각국에서는 micro-arrayer를 이용한 DNA chip 개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다 [6][7][15]. 그러므로 본 연구의 중요한 연구배경이라 할 수 있는 DNA chip에 관한 기본적인 개념을 간략히 기술하면 다음과 같다.

1) DNA chip이란?

Human genome project를 포함한 많은 유기체의 genome project가 수행되어 수많은 유전정보가 쏟아져 나오에 따라, 이를 어떻게 해석하고 서로 연관 지을 수 있는가에 대해 많은 관심과 연구가 이루어지고 있다. 즉 현대의 유전학과 분자생물학 분야의 연구방향이 과거의 DNA의 구조적 해석에서 기능적 해석과 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 방향으로 연구 방향이 바뀌고 있는 것이다. 최근에 개발된 DNA chip은 여러 genome project로부터 축적된 방대한 양의 유전정보를 이용하여 시료를 효율적으로 분석할 수 있는 가장 주목받고 있는 방법이다. 특히 이 기술은 유전자 발현, 변이나 다형성(SNP)등을 단시간에 대량으로 고속처리검색(HTS)함으로써 유전자의 기능을 밝히는 데 매우 유용한 것으로 판명되고 있다. 이는 DNA chip이 짧은 시간에 많은 양의 정보를 분석할 수 있으며 자동화가 용이하기 때문이다.

Biochip은 전자공학에서 사용하는 실리콘 반도체 칩에 비유될 수 있는데, 좁은 면적 위에 고밀도로 집적된 DNA나 단백질을 이용하여 생물학적 검색이나 정보 처리의 속도를 높이하고자 하는 방법이다. 즉, DNA chip은 엄청나게 발전하는 분자 생물학적 지식과 기계 전자 기술이 접목돼 적게는 수백 개 많게는 수십만 개의 DNA를 반도체와 같이 작은 공간에 집어넣는 기술이다. DNA 칩의 기본 개념은 1989년 유고슬라비아의 Dermaryak R 등이 DNA 염기서열을 올리고염기와 이중결합하는 방식(SBH)을 처음 고안한 데서 출발한다. DNA는 A-T, G-C 간의 강하고 선택적인 결합으로 인해 이중나선을 이루는 고유한 특징을 가지고 있는데, DNA chip은 바로 그 상보적인(complementary) 서열을 인지하고 선택적으로 결합하는 DNA의 성질을 활용한 칩이다. 즉, chip 위에는 한 가닥의 DNA 분자가 탐침으로 미리 붙어있고, 검색하고자 하는 DNA 시료를 chip 위에 뿌려주면, 상보적인 서열을 가진 것들만

탐침 서열에 가서 달라붙게 되는 것이다. DNA chip 위에는 수천에서 수십만 종류에 달하는 탐침 DNA를 심을 수 있고, 검색하는 시료에 포함된 DNA 숫자에는 제한이 없으므로, 엄청난 속도의 검색이 가능하다. 탐침 DNA는 붙어있는 자리에 따라, 어떤 서열을 가지고 있는지 미리 알고 있으므로, 검색하려는 DNA가 공간적으로 어느 위치에 결합했는지를 규명하는 것이 중요하다. 탐침 및 시료 DNA간의 결합을 정량적으로 검출하기 위해서는, 시료 DNA를 형광 표시해서 처리하고, chip 위에 펼쳐진 형광 강도를 스캐너로 판독하는 것이 일반적인 방법이다. 형광이 강하면 해당 탐침의 상보적인 DNA가 시료 속에 많이 들어있는 것으로 판정하는 것이다. 최근에는 형광보다 더 감도가 우수한 전자적 검출법도 개발되고 있는데, 아직 일반화되지는 않았다.

첫 “DNA micro arrayer chip”은 1995년 미국의 스탠포드 대학 (Stanford Univ)에서 탄생되었다 [10]. 당시 스탠포드대학은 자체 제작한 DNA chip arrayer를 이용, DNA를 약 1.8cm^2 의 유리판 위에 고정시킨 다음, 형광물질을 이용해 유전자 발현 정도를 한 번에 측정할 수 있게 만들었다. 곧 이어 실리콘밸리 소재 Affymetrix사도 ‘oligo chip’을 개발했다. Affymetrix사는 컴퓨터 칩 제작에 사용되는 ‘photolithography’ 기술을 응용, 40만개의 올리고염기들을 1.28cm^2 의 유리 기판 위에서 직접 합성해 칩을 제작했다. DNA chip은 격자 모양으로 촘촘한 구멍이 있는 칩 위에, 여러 종류의 유전자 염기서열을 격자에 하나씩 집어넣은 것으로 여기서 얻은 data를 micro array data라고 하며, DNA chip 혹은 gene chip이라고도 한다. 이것은 시료를 DNA chip 위에 떨어뜨려, 시료 안에 존재하는 유전자들을 분석하거나 발현 정도를 측정하는 것을 목적으로 한다.

DNA chip의 원리는 DNA 이중 나선이 아데닌-티민(A-T), 구아닌-시토신(G-C)과 같이 코드가 특별하게 맞을 경우 달라붙는 성질이다.

예를 들어, DNA 칩의 각 격자를 X-Y 좌표로 표현할 때, 격자 (1,1) 위치에는 AAACCC, 격자 (1,2) 위치에는 GGGCCC 가닥이 심어져 있고, 조사하고자 하는 시료가 TTTGGG 염기 서열을 갖고 있다고 하자. 이 시료를 적색 형광물질 등으로 염색한 후, DNA 칩 위에 투여한다. 그러면, 이 시료의 염기 서열은 (1,1) 격자에는 꼭 달라붙지만, (1,2)에는 붙지 않는다. 다음에 DNA 칩을 물로 씻어 내면, (1,1)위치에만 DNA가 달라붙어서, 형광물질의 색깔인 붉은 색을 띄게 된다. 따라서 시료 안에 존재하는 염기 서열과 상보적 결합을 할 수 있는 격자들만 적색을 띄고, 결합이 되지 않는 격자들은 검은색을 띄기 때문에, 시료 안에 존재하는 유전자를 시각적으로 검출할 수 있다. 다음 단계에서는 scanner로 DNA chip의 영상을 입력받아, 어느 격자가 어느 색깔을 갖는지와 얼마나 색깔이 진한지를 판별하여, micro-arrayer data로 유전자들의 일치 정도와 발현 정도를 수치화할 수 있다.

Chip에 포함되는 DNA 분자는 대상유기체의 DNA sequencing으로부터 얻어진 염기서열로부터 결정된다. DNA chip은 재조합 유전자기술과 PCR에 비견될 만큼 다양한 응용분야와 기존기술을 능가하는 장점을 가지고 있다. DNA chip은 그 이용방법에 따라 그 적용대상이 매우 넓기 때문에 응용분야 또한 광범위하다. 현재 DNA chip의 주 응용분야는 gene expression monitoring으로서, 이는 여러 genome project로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 chip을 제작, 이용하여 cell 내의 metabolism과 physiology 그리고 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하려는 시도이다. DNA chip은 mutation과 polymorphism의 확인, phenotype 분석에도 이용될 수 있다. 그리고 신약개발 실험에 이용될 경우, 전체 신약개발 비용뿐 아니라 개발비용도 크게 절감할 수 있다. 추후에 DNA chip의 가장 큰 응용분야는 유전 병리학과 접목한 의약품 개발과 유전자 질병을 진단하는데 이용될 것으로 보이는데, 이 분야에

는 수십 조 달러이상의 시장이 예상되고 있다.

DNA chip 기술은 방대한 유전정보(genome)를 하나의 칩에 담은, 반도체 칩의 DNA 버전으로써 분자학적 지식에 기계 및 전자공학의 기술을 접목시킨 것이다. 이 기술은 다수의 DNA 단편이나 올리고(즉, 짧은 DNA 가닥)염기를 기판 위에 고밀도로 정렬하는 장치제작기술, 이들을 DNA 염기와 접합시키는 기술 등을 필요로 한다. 그러나 무엇보다도 chip 기술에 의한 데이터를 해석하려면 고부가가치의 데이터베이스 및 고급 정보 분석 소프트웨어와 연결되어야 하는 것이 필수불가결하다.

2) DNA chip의 중요성

유전정보 프로젝트(Genome project)로부터 가속화되고 있는 생명체들의 유용한 정보를 이용하는 산업분야는 생명체 기원에 대한 정보를 얻게 하고 나아가 인간을 질병으로부터 해방시킬 수 있는 가장 유력한 방법으로 제시되어지고 있다. 이러한 엄청난 과학적·경제적 잠재력을 지닌 유전자산업은 현재 미국 전체의 가장 큰 시장을 형성하고 있는 보건 의료산업 뿐만 아니라, 농업, 식품, 환경 및 화학 산업의 분야에서 원천 기술을 개발 할 수 있게 하여 새로운 경제시장을 형성시키고 있다.

DNA chip은 또한 지금까지 알지 못했던 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 실험적 수단으로 최근에 개발된 유전정보를 분석할 수 있는 여러 방법 중 가장 주목받고 있는 방법이다. 특히 개인 간, 인종 간, 개체 간 또는 건강인과 환자 간의 유전자 구조의 차이를 밝힘으로 암이나 유전병을 일으키는 돌연변이를 찾을 수 있고 장기이식 전 조직 적합성 검사, 약제내성연구, 결핵이나 인유두종 바이러스 등의 병원성 미생물 바이러스의 동정, 친자 확인, 유전자 변이 가계도의 작성, 법의학, 고고학 등 광범위한 부분의 발전에 기여할 것이다. 이는 당뇨병, 심혈관 질환, 비만, 골다공증, 암 등의 만성 질환이나 불치병에서 발현되는 돌연

변이의 탐색 또는 이들 질병의 소인이 되는 유전자들의 구조의 차이점을 밝힘으로 신약개발과 궁극적으로는 유전자 치료 영역에서 획기적인 발전에 기여하리라 예측되며, 생명과학의 연구뿐만 아니라, 환경보존, 농업, 식품, 법의학 및 군사부분 등에 광범위하게 이용될 것으로 예측되고 있다.

그 시장규모도 2005년경 50억 달러에 달할 정도로 막대하여 미국, 유럽, 일본 등에서 벤처기업들과 거대 제약회사(Big Pharma)들을 중심으로 많은 예산을 투입하여 개발 중에 있다. DNA chip의 세계시장은 매년 35% 가량 증가, 2010년 100억 달러 이상의 규모로 확대될 전망이다. 이에 따라 국내외 바이오 업체들의 기술·시장 선점경쟁이 치열하게 전개되고 있다. 창업투자회사 Kleiner Perkins Caufield & Byers의 Brook Byers씨는 이 분야 기업들 중 시장가치가 50억 달러를 초과하는 업체가 2005년경 탄생할 것이며, 2010년에는 시장가치 4백억 달러에 이르는 기업이 생겨날 것이라고 예상했다. 캘리포니아주 Mountain View에 있는 마케팅 컨설팅 업체 Frost & Sullivan은 수억 달러의 시장을 창조할 수 있는 잠재력을 가지고 있는 DNA 칩 및 시장에 관한 보고서 "A Strategic Assessment of the DNA Microchip Market"을 발간했다. 이번 보고서에서는 Genomics, 임상적 진단, 질병 관리를 포함하여 DNA 칩 기술의 활용 면을 검토하고 있는데, 이 보고서에 따르면, 현재로서는 Genomics 분야가 재정적으로 가장 성공적인 DNA 칩 활용분야이지만, HIV Genotyping을 위해 Affymetrix가 최근에 발표한 "GeneChip"의 출현을 계기로 앞으로 4-5년 후에는 임상적 진단을 위한 많은 DNA 칩 제품이 등장하게 될 것이며, 시장규모 또한 급속히 확대될 것으로 전망되고 있다.

1.2 연구내용 및 목적

본 논문에서는 아직 국내에서는 개발된 사례가 없는 DNA chip system의 개발을 위해 3축 직교 매니플레이터와 스테핑 모터를 이용한 저집적 micro-arrayer와 CCD 카메라를 이용한 DNA scanner 개발을 위한 효율적이면서 저가인 DNA chip system을 제시한다.

본 논문의 구성은 다음과 같이 이루어진다.

제 1 장

서론 부분에서는 유전자 분석법에 대한 종래의 연구결과와 연구동향을 살핌으로서 DNA chip 관련 연구를 위한 연구배경과 연구의 필요성을 기술하였다. 또한 DNA chip의 의미와 중요성을 간략하게 서술함으로서 본 연구개발의 필요성은 물론 현재 국내외 연구동향을 분석함으로서 본 연구개발의 타당성을 언급하였다.

제 2 장

이 단원에서는 DNA chip micro-arrayer의 개발을 목표로 하고 있으며, 시스템 개발을 위하여 요구되어지는 DNA chip micro-arrayer 시스템의 원리 및 구성, 제어 알고리즘과 시스템 설계 및 해석을 통한 개발 시스템의 유효성과 타당성을 기술한다.

제 3 장

DNA chip scanner의 개발에 있어서 가장 중요한 요소라고 할 수 있는 영상처리 알고리즘(image processing algorithm)을 개발하기 위한 단원으로서, 개발되어진 영상처리 알고리즘을 실제 시스템에

적용하기 전에 일반적인 응용 시스템의 적용사례를 통해 개발 알고리즘의 해석과 검증을 통하여 실제 제작되어질 DNA chip scanner 시스템에 적용할 수 있는 사전연구를 수행하고자 한다. 본 단원에서 개발되어진 영상처리 알고리즘은 다음 단원의 scanner 시스템에 적용하여 실제 개발되어진 알고리즘의 유효성을 검증할 수 있을 것이다.

제 4 장

4장에서는 앞선 단원에서 언급되어진 영상처리 알고리즘을 적용한 실제 DNA chip scanner 시스템 제작을 통하여 영상처리 알고리즘의 실제 타당성을 확인 할 수 있다. 또한 개발되어진 DNA chip scanner를 실제 생명공학 관련 연구 분야에 직접 적용한 실험결과를 나타낸다.

제 5 장

마지막으로 앞선 단원들에서 제안되어졌던 관련 연구들에 대한 DNA chip 연구결과를 간략하게 기술하고 추후에 연구되어져야할 내용들을 기술하고자 한다.

제 2 장

DNA Chip Micro-Arrayer 개발

2.1 서 언

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

최근 이러한 생명공학 연구에서 두 가지의 주된 원인에 의해 커다란 변화가 일고 있다. 그 하나는 유전자 암호 해독기술(DNA sequence) 정보의 양이 증가했다는 것과 다른 하나는 이를 이용하는 기술이 발전하고 있다는 것이다. 지금 세계는 POST-GENOME 시대에 접어들고 있다. 하루에도 수백 개 이상 밝혀지는 새로운 유전정보들이나 모든 유전 암호가 밝혀진 생물들을 기존의 방법들로 연구한다는 것은 너무나 많은 시간을 요구하기 때문에, 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 아주 최근에 개발된 방법 중의 하나가 바로 DNA chip을 이용한 유전자 검색 방법이다. DNA chip은 기존의 분자 생물학적 지식에 최근 엄청난 발전을 한 기계 및 전자공학의 기술을 접목해서 만들어졌다. 기계 자동화와 전자 제어 기술 등을 이용하여 적게는 수백 개부터 많게는 수십만 개의 DNA를 아주 작은 공간에 집어넣을 수 있게 만든 것이다. DNA chip에 DNA를 붙이는 방법에는 여러 가지가 있는데, 그중 증폭된 유전자를 poly-L-lysine 처리된 slide glass에 고정화하기 위하여 micro scale로 spotting이 가능한 DNA chip 제작용 매니퓰레이터 시스템

(micro-arrayer)에 관하여 연구를 수행하였다.

따라서 본 논문에서는 유전체 연구에 필수적인 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 micro-arrayer를 개발하기 위한 전 단계 연구로서 국내외 micro-arrayer의 연구동향을 분석하여 앞으로 연구할 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 매니플레이터 시스템의 개발 연구에 필요한 기초 자료를 제공하고자 하며 구체적인 내용은 다음과 같다.

1) DNA chip의 종류

DNA chip은 크게 cDNA chip과 oligonucleotide chip으로 구분할 수 있다.

먼저, cDNA chip은 염기 자체가 크기 때문에 전반적인 유전자 발현 연구에 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 알고 있기 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, Photolithograph chip 그리고 Electronic DNA chip 등과 같이 4종류로 나누어 볼 수 있으며, 각 종류에 대한 것들을 요약하면 아래와 같이 기술할 수 있다.

가. Pin DNA chip (cDNA chip)

1995년 Stanford 대학에서 처음 개발되었다. Slide glass에 고밀도로 유전자를 spotting하여 만드는 chip이다. 따라서 이를 이용하면 수 천개 이상의 유전자 발현 변이를 단 한 번의 실험으로 관찰할 수 있다.

Poly-L-lysine으로 처리된 slide glass에 핀으로 유전자를 spotting 한다. Pin 타입에는 여러 가지가 있는데, solid 핀의 경우는 필터에 점적하는 것이 유리하고, quill 핀(핀이 스플릿 되어 있음)의 경우는 슬라이드 글라스에 점적할 때 유리하다. 그러나 후자의 경우 멸균 시 초음파와 멸균(sonication)을 할 수가 없어서 물에 의한 여러 번의 세척을 해주어야 하기 때문에 불편하지만, 전자의 경우는 초음파와 멸균에 의한 세척이 가능하기 때문에 편리하다. Fig. 2.1은 quill 핀 타입의 개략도이다.

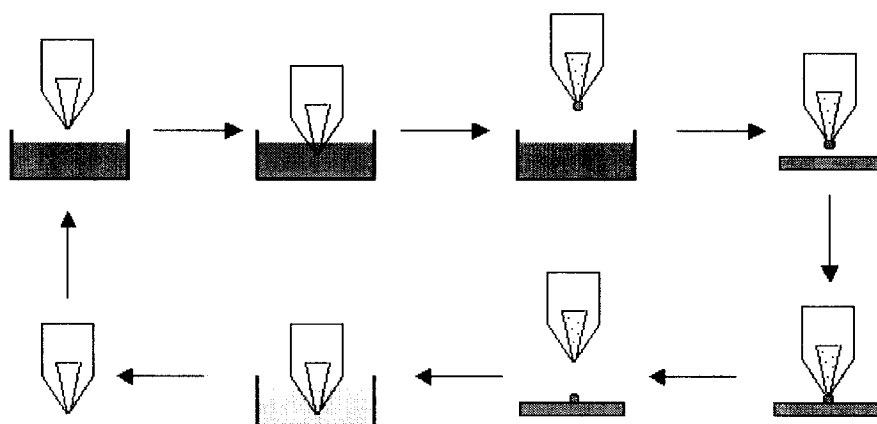


Fig. 2.1 The schematic diagram of quill pin type micro-arrayer

나. Inkjet DAN chip (cDNA chip)

Pin DNA chip과 비슷한데 pin 대신에 inkjet printer처럼 cartridge를 쓴다. 각 cartridge에 유전자가 들어 있어서 전기적인 힘으로 유전자를 고형체 위에 분사 하게 한다. Inkjet은 열을 이용해 분사하는 thermal 방식, 압력을 이용하는 solenoid 방식 그리고 압전 현상을 이용해 분사하는 piezoelectric 방식이 있다. Fig. 2.2는 micro-solenoid 방식의 개략도이다. Syringe pump를 이용해서 유체의 정량을 대체함으로 분사한다. 이로 인해 닫혀있는 micro-solenoid valve가 순간적으로 작동하게

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.

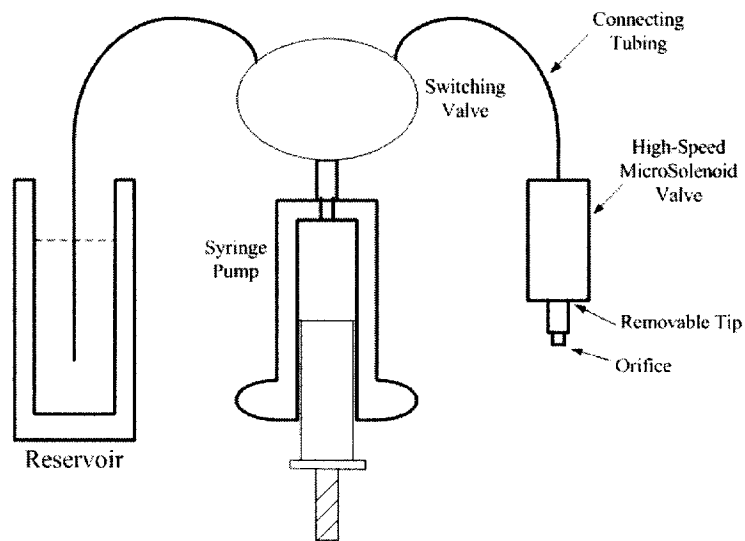


Fig. 2.2 The schematic diagram of micro-solenoid type micro-arrayer

다. Photholithograph chip (oligonucleotide chip)

미국 Affymetrix사에서 oligonucleotide chip을 만드는 방법으로 oligonucleotide를 glass 위에서 바로 합성한다. 각각의 oligonucleotide들은 15-25개의 염기로 이루어져 있다. Oligonucleotide가 합성되는 유리의 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 놓

고 빛을 쏘이면 구멍이 나있는 곳으로 빛이 들어가 그곳에 있는 보조체의 화학물질을 제거 한다. 이렇게 화학물질이 제거된 보조체들을 가진 chip을 한 가지 염기가 있는 곳에 놓으면 모든 활성화된 보조체들에 염기가 가서 합성된다. 물론 각각의 염기들도 빛에 민감한 화학물질로 덮여있어 한 개씩밖에 합성이 되지 않는다. 이러한 chip을 씻은 다음 다시 다르게 설계된 photomask를 이용하여 빛을 쏘여 주면 그곳에 있는 보조체나 염기들이 활성화 되어 다음 염기들과 합성할 수 있게 되는 것이다. 이와 같은 반복적인 과정을 통하여 chip을 만든다. Fig. 2.3은 photolithograph chip 제작의 개략도 이다.

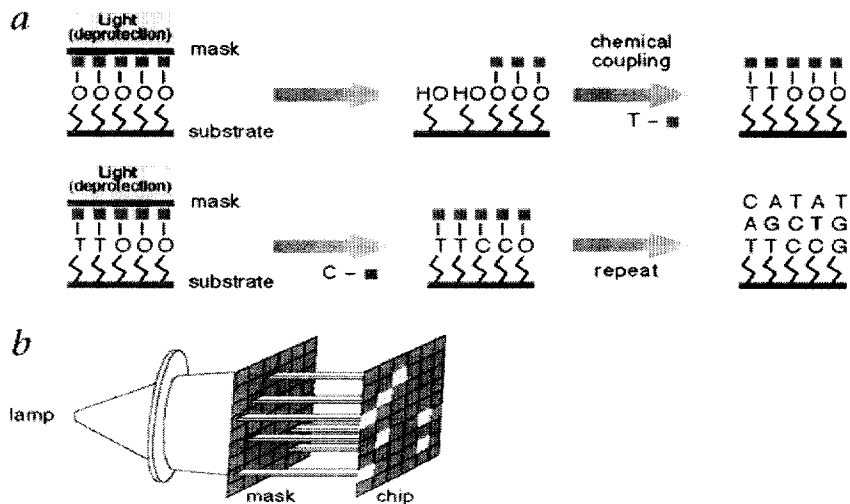


Fig. 2.3 The schematic diagram of manufacturing photolithograph chip

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 Nanogen사에서 개발

되었고 지금은 10,000개의 DNA를 이러한 방법으로 붙일 수 있는 chip이 개발되어 있다. 이 기술의 장점은 이와 같은 electronic addressing뿐만 아니라 전기를 이용하여 target DNA를 원하는 특정 위치에 끌어들이므로써 결합 시간을 단축할 수 있다는 것이다. 또한 전기적인 힘을 이용하여 정상 DNA와 하나의 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. 따라서 고가의 레이저 스캐너(laser scanner) 대신 손으로 들고 다닐 수 있는 저가의 측정 장비를 사용하게 만들었다. 이러한 DNA chip은 앞으로 더욱더 폭넓게 여러 가지 영역에서 사용되어지리라 예상되고 있으며, electronic DNA chip의 예제를 Fig. 2.4에서 보여진다.

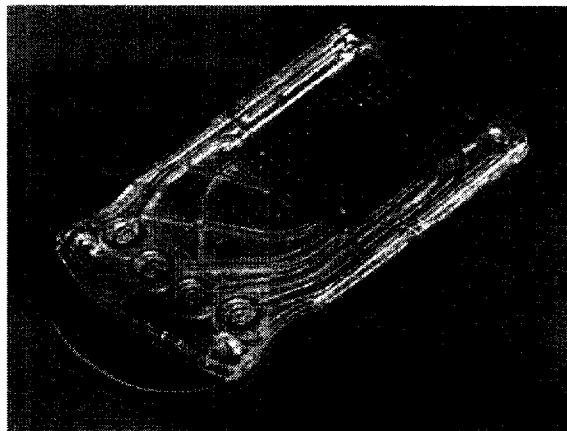


Fig. 2.4 The example of electronic DNA chip

2) DNA chip의 응용 분야

DNA chip의 주된 응용분야는 유전자발현 profiling으로써, 이는 게놈 프로젝트로부터 밝혀진 DNA 염기서열을 바탕으로 하여 DNA chip을

제작하고 이용하여 세포내의 작용 메카니즘 및 각 유전자간의 상호 연관성을 규명하려는 시도에서 응용되고 있다. 돌연변이와 다형성의 확인, 표현형 분석에도 이용될 수 있으며, 신약개발 실험에 이용될 경우, 전체 신약개발 비용뿐만 아니라 개발비용도 크게 절감할 수 있다.

3) 국내외 DNA chip 및 micro-arrayer 연구 동향

가. 국외 연구동향

DNA chip 제작용 micro-arrayer는 미국과 유럽 그리고 몇몇 일본 회사들이 주축이 되어 이끌어가고 있다. 가장 먼저 micro-arrayer를 제작한 곳은 1995년 미국 stanford 대학 생화학과에서 처음 개발되었으며, 약 2-3천개의 유전자를 약 1cm^2 안에 붙일 수 있다. 미국의 silicon valley에 있는 Affymetrix사는 computer 산업계에서 DNA chip을 만들기 위해서 쓰이는 photolithography라는 기술을 사용하여 수 만개의 다른 염기들을 하나의 유리 위에 직접 합성하는 방법을 사용하여, 현재 1cm^2 당 400,000개의 서로 다른 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있다. 또한 미국의 Nanogen사는 DNA가 (-)전하를 띠는 성질을 이용하여 chip의 표면에 있는 특정 위치에서 (+)전기를 넣어서 그 위치에 원하는 유전자를 붙게 만드는 방법으로 10,000개의 DNA가 붙은 chip을 생산했다. 그러나 미국 및 그 외 micro arrayer 제작회사들은 pin 타입의 산업용, 연구용 micro-arrayer를 개발하여, DNA를 고밀도로 붙이는 방법을 사용하고 있는 실정이다. 또한 매니퓰레이터 본체는 대부분 XYZ-직교좌표형의 매니퓰레이터를 사용하고 있다.

나. 국내 연구동향

국내에서는 현재 2대의 micro-arrayer가 개발되어 있는데, 하나는 바이오니아(주)에서 자동 시료 미세배열 장치라는 이름으로 특허가 나 있는 상태이다. 이 장치는 XYZ-직교좌표형 매니퓰레이터에 well-plate가

착탈 가능한 랙 시스템과 spotting 기구 그리고 spotting 기구를 세척하기 위한 세척 수단, 기관이 배열되는 지지대 등을 포함하여 개발하였다. Spotting 기구부분은 긴 관과 긴 관의 끝에 삽입된 모세관 그리고 모세관이 삽입된 관의 끝 부분에 형성된 구멍으로 이루어졌다. 모세관의 내경은 $2\mu\text{m}$ 이고 1cm^2 당 약 5,000개의 DNA를 spotting할 수 있다.

4) 본 단원의 연구 내용 및 범위

Micro-arrayer는 생명공학, 기계공학, 전자공학이 집대성된 장치이다. 위치 및 속도를 제어할 수 있는 정밀한 서보모터(servo motor) 제어기술, 백래쉬(backlash) 등에 의한 오차를 최소화할 수 있고, 구동 시 진동의 최소화 등을 위한 정밀 선형시스템 및 가공기술 그리고 최적 시스템 제어 알고리즘 개발이 필수적이다.

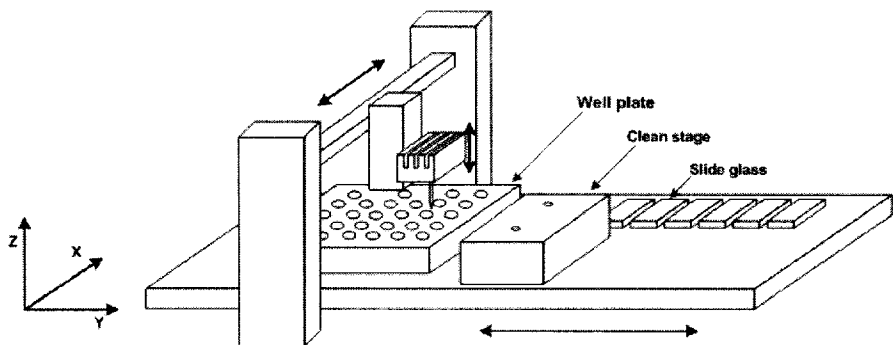
본 연구에서는 국내외 연구동향 분석 및 문헌연구를 통하여 개발한 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 매니플레이터 시스템의 방향을 다음과 같이 설정하였다.

- (1) 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 매니플레이터 시스템 (micro-arrayer)을 pin 타입으로 설정한다.
- (2) 정밀도 향상을 위하여 매니플레이터 시스템의 구동은 XYZ-직교 좌표형으로 설정한다.

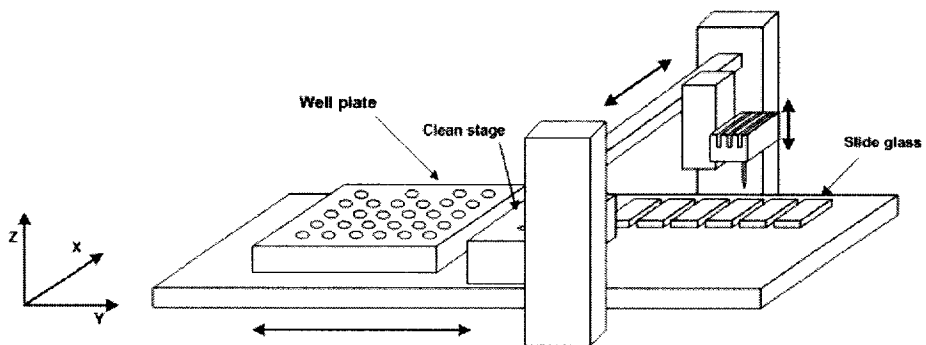
2.2 Micro-Arrayer 시스템의 기본원리 및 구성

1) Micro-arrayer 시스템의 기본원리

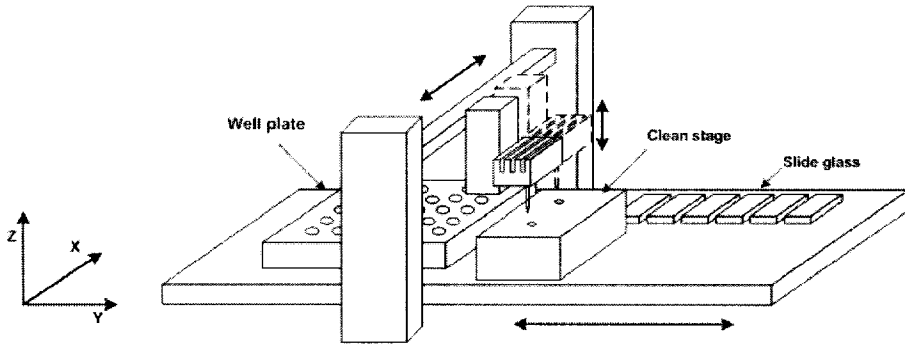
DNA chip의 제작과정은 Fig. 2.5와 같이 크게 세 부분으로 나누어서 구성할 수 있다.



(a) Well plate에서 probe 추출



(b) Probe를 slide glass에 고정



(c) Pin 세척과정

Fig. 2.5 Procedures of DNA typing using DNA chip

- (1) Fig. 2.5 (a)와 같이 먼저 micro-arrayer의 pin을 이용하여 정제된 cDNA 또는 oligonucleotide probe는 형광물질이나 방사선 동위원소를 이용하여 labelling된 probe가 담겨 있는 well plate 에서 probe를 추출한다.
- (2) 두 번째로 well plate에서 추출한 probe를 Fig. 2.5 (b)와 같이 slide glass에 고정한다.
- (3) 마지막으로 Fig. 2.5 (c)와 같이 pin을 세척한다. Pin 세척 시에는 진공 세척, 물 세척의 2가지 과정을 3번 반복 시행하도록 하여 pin을 완전히 세척하도록 한다. 이러한 과정을 반복 시행하여 slide glass에 많은 양의 DNA 정보를 chip형태로 찍어 내도록 한다.

Probe를 고정시키기 위한 이상적인 지지물은 probe를 지지물 표면에 효과적으로 결합시키고, 검체와 probe간의 확실한 교잡반응을 보장한다 [6]. 보통 사용되는 membrane 형태의 지지물은 nitrocellulose와 charged nylon이지만, micro-array 제작에 있어서 고유 형광성(inherent fluorescence)이 적은 유리를 이용하는 것이 대부분이다 [8].

기존의 cDNA chip과 본 연구에서 시도한 oligonucleotide chip의 가

장 큰 차이점은 chip에 완전한 유전자(full-length ORF) 대신에 17-35mer를 심은 것이다. cDNA chip에는 길이가 긴 ds-DNA(평균 1.0 kb)의 phosphate group이 poly-L-lysine과 결합하여 유리막 위에 붙는다. 대부분의 ds-DNA는 일부분만 유리막 위에 붙기 때문에 나머지 부분들이 자유롭게 probe와 결합할 수 있는 것이다. 하지만 single-stranded oligonucleotide는 전체적으로 poly-L-lysine과 결합할 가능성이 높으므로 probe가 붙을 수 있는 상보적인 sequence가 없게 된다. 이와 같은 문제점을 해결하여 oligonucleotide들을 자유롭게 probe와 결합할 수 있게 기존의 poly-L-lysine이 coating된 유리 slide가 효과가 없어서 silylated된 유리 slide를 사용하였다. 이 기술은 Fig. 2.6과 같이 silylate된 유리 slide에 aldehyde group이 있어서 amine group을 인위적으로 붙인 DNA와 쉽게 imine bond를 형성하는 원리를 이용한 것이다.

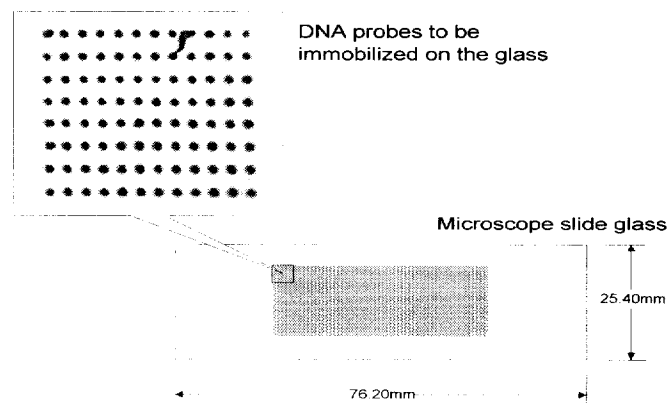


Fig. 2.6 Schematic representation of the micro-arrayer

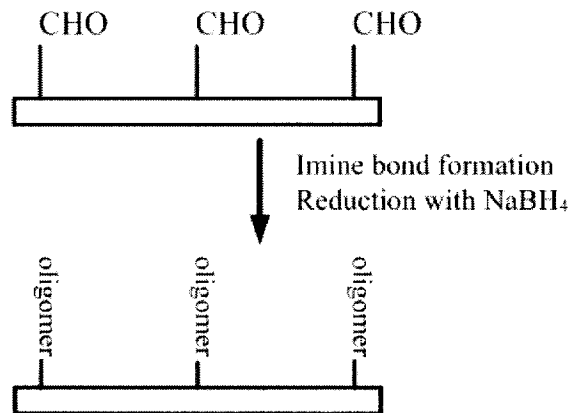


Fig. 2.7 cDNA micro-array's shape

Fig. 2.7은 현미경용 slide glass를 이용한 cDNA micro-array의 형상을 보인다. 유리표면에 미세 배열기에 의해 spotting 된 cDNA probe는 Fig. 2.5 수순에 의해 검체의 DNA나 RNA와 결합하게 된다.

2) 시스템의 구성

Micro-arrayer는 Fig. 2.8과 같이 직교형태의 3축 매니플레이터와 pan 형태의 tip의 구성물을 제어 할 수 있는 80C196KC(micro controller) 그리고 컴퓨터로 구성되어진다. Tip의 머리 부분은 일정한 양의 probe DNA를 흡수할 수 있도록 구성되어야 하고, tip의 끝은 동일한 크기의 spot들을 슬라이드 글라스의 표면에 병렬로 배열한다. Z축의 움직임에서 슬라이드 글라스와 부딪히는 힘을 감소하는 방법은 중력을 이용하는데 tip의 윗부분의 크기를 크게 함으로서 중력에 의한 원위치 이동을 한다. 물 세척과 진공세척 부는 팁의 세척에 맞도록 설계되었다. 건조부는 팁의 끝을 건조시키기 위해 사용되어지는데 컴프레서를 이용하여 팁 주변의 물기를 제거하고, 건조시킨다. Probe를 담고 있는 96-well plate는 두개가 놓여지고, 총 192개의 probe를 찍어낼 수 있다

록 설계되었으며, 총 6장의 슬라이드 글라스를 제작할 수 있도록 구성
이 되어 있다.

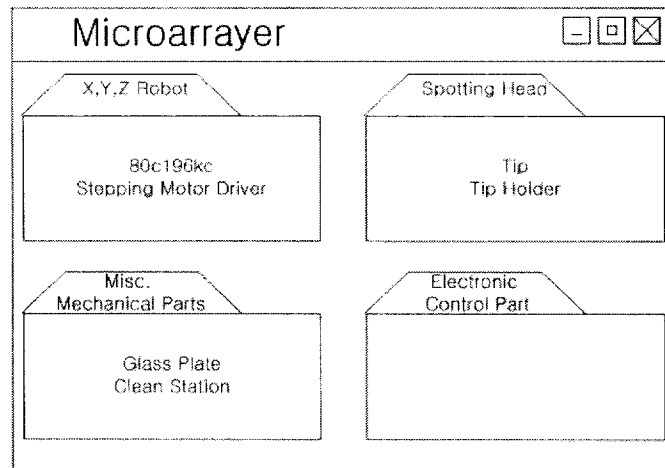


Fig. 2.8 Developed system configuration of micro-arrayer

2.3 제어계 및 제어 알고리즘 설계

Fig. 2.9는 cDNA 정보 데이터, 3축 매니플레이터의 구동 데이터 그리고 모니터링 데이터 이렇게 세 가지 신호의 흐름을 보여주고 있다. 먼저, 시스템이 운전되기 전에 96-well plate의 cDNA 데이터는 기존에 저장되어진 데이터에 의해 읽어지거나 입력 후 저장이 된다. 그리고 이 데이터는 동일한 작업을 반복 수행을 하거나 동일한 실험을 다시 수행할 경우와 hybridization 이후 분석을 하는데 사용되어진다. 사용자가 운전 파라미터들을 결정한 이후에 운전 신호(파라미터, 시작 신호)는 80C196KC로 전달되어진다. 80C196KC는 파라미터를 이용한 운전 알고리즘에 따라서 위치, 속도, 가속도, 펄스, 정역회전, 물/진공 펌프용 계전기구 등의 신호를 연산한다.

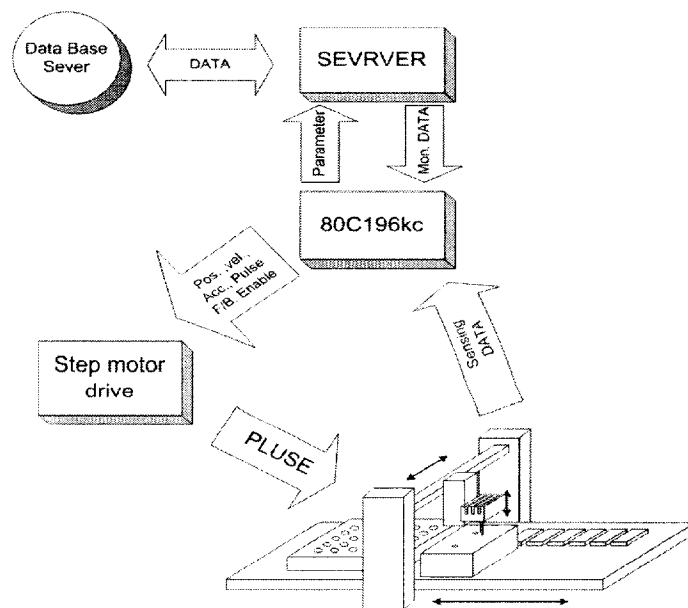


Fig. 2.9 Flow chart of signals and data

Fig. 2.9에서, 동작을 하는 동안 micro-arrayer는 동작위치 한계점과 Z축의 위치, 비상스위치, 초기화스위치 그리고 초기위치용 포토센서의 값들을 받아들인다. 이 데이터들은 80C196KC로 보내지고 80C196KC는 이 데이터들을 모니터링 PC로 보내어 현재 시스템의 상태를 모니터링 한다.

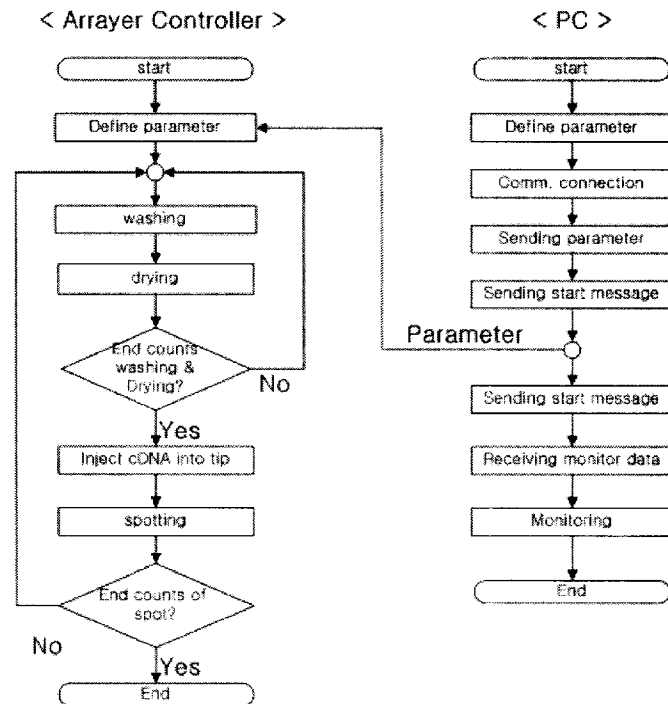


Fig. 2.10 Flowchart of micro-arraying procedure

신호와 데이터의 흐름에 기초하여 제어 알고리즘은 설계되어진다. Fig. 2.10에서 오른쪽 부분은 PC에서의 연산을 그리고 왼쪽 부분은 80C196KC에서의 연산 알고리즘을 보여주고 있다. 처음 모니터링 PC와 80C196KC에 연결된 이후 파라미터들은 80C196KC내의 SRAM으로 보내진다. 80C196KC는 자신이 가지고 있는 데이터들을 연산해서 구동을

위한 파라미터들을 만들고 이 정보들을 모터 드라이버에 보내면서 micro-arrayer는 구동을 하게 된다.

2.4 DNA Chip Micro-Arrayer 시스템의 설계 및 해석

1) 신호처리용 80C196KC의 하드웨어 및 소프트웨어 개발

본 논문에서 사용되어지는 제어기의 메인 프로세서는 80C196KC를 이용한다. 본 논문에서 사용한 Intel사의 80C196KC는 제어용 시스템을 원칙에 전부 내장한 집적도가 높은 microprocessor이다. 마이크로 프로세서 80C196KC를 가지고 구현한 장치의 특징은 16비트 버스 폭과 통신 포트를 활용하여 data 통신이 가능하며, 다섯 개의 I/O와 고속 입력 장치, 고속 출력 장치 등을 통해서 hardware를 control할 수 있어 본 논문에서 필요로 하는 정확성과 빠른 응답 속도를 처리할 수 있어 응용이 가능하다.

Table 2.1 Main characteristics of 80C196KC

Index	Functions and features
Intel 80C196KC	· 8/16비트 데이터 전송 및 5개의 I/O · 8비트 연산 및 16×16비트 연산 · 20개의 인터럽트 소스 · 16비트 워치도그 타이머(Watchdog Timer) · 네 개의 16비트 소프트웨어 타이머 (Software Timer) · 두 개의 16비트 타이머-카운터(Timer1, Timer2) · 최대64K 바이트 메모리 · 고속 입출력 기능(HSI/HSO) · 내부의 232바이트 레지스터 파일 · 수평 및 수직 윈도우

Intel 80C196KC는 MCS-96의 하나로서 제어용시스템을 원칩에 전부 내장한 집적도가 높은 원칩 마이크로 프로세서이며, Table 2.1에서 본 연구에서 사용되어진 Intel 80C196KC의 주요특징을 간략히 나타내고 있다. 본 시스템에서는 온도와 습도센서에서 아날로그 신호를 입력받아 디지털 신호로 변환할 수 있는 기능과 또한 RS-232C 및 RS-485 통신, Ethernet 통신이 가능하도록 하는 컨트롤러를 개발해야 하므로 주변 회로를 직접 설계할 필요가 있었다.

Micro-arrayer는 독립적으로 모니터링 PC에서 벗어나서 80C196KC로 인하여 움직여져야 하기 때문에 80C196KC내에는 micro-arrayer를 구동하기 위한 많은 정보들을 저장해야 하므로 큰 메모리가 필요하다. 또한 정밀한 위치 컨트롤이 필요하고 실시간적인 모니터링을 위해서 본 시스템에서는 80C196KC를 사용하였다. Photo 2.1은 자체 제작한 12bit A/D컨버터, RS232C 시리얼 포트 그리고 두 대의 8255APPI와 외부메모리 4SRAM(4Mbyte)을 탑재하고 있는 80C196KC보드를 보여준다. Table 2.2에서는 I/O 포트의 신호 연결 상태를 보여준다.

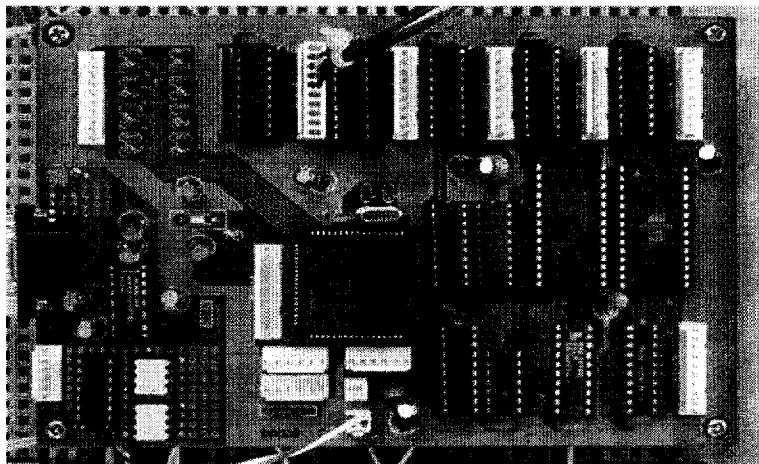


Photo 2.1. Developed 80C196KC micro controller board

Table 2.2 Signal connection state of I/O port

Description	Address
External Memory or I/O	0FFFH
	06000H
Internal ROM/OTPROM or External Memory(Determined by EA)	5FFFH
	2080H
Reserved. Must contain FFH.(Note 5)	207FH
	205EH
PTS Vectors	205DH
	2040H
Upper Interrupt Vectors	203FH
	2030H
ROM/OTPROM Security Key	202FH
	2020H
Reserved. Must contain FFH.(Note 5)	201FH
	201AH
Reserved. Must contain 20H.(Note 5)	2019H
CCB	2018H
Reserved. Must contain FFH.(Note 5)	2017H
	2014H
Lower Interrupt Vectors	2013H
	2000H
Port3 and Port4	1FFFH
	1FFEH
External Memory	1FFDH
	0200H
488 Bytes Register RAM(Note 1)	01FFH
	0018H
CPU SFR's(Notes 1, 3, 4)	0017H
	0000H

2) 스텝핑 모터(Stepping motor) 드라이브

Micro-arrayer의 주 구동장치로서 스텝핑 모터가 사용된다. 스텝핑모터는 제어가 용이하고 정밀성 등의 많은 장점을 가지고 있다. 특히 이러한 스텝핑 모터는 펄스로서 일정한 각도를 움직일 수 있으며, Table 2.3은 본 연구에서 개발되어진 micro-arrayer에 사용된 스텝핑 모터와 모터 드라이버의 사양을 보여주고 있다.

Table 2.3 Specifications of stepping motor and motor driver

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

특히, 스텝핑 모터 드라이버의 회로는 스텝핑 모터 드라이버 (L297)와 dual bridge driver(L298), 보호회로(PC847, diod), 기준전압회로로 구성되며, 본 시스템에서 개발되어진 PCB board는 Photo 2.2에서 보여진다. 또한 micro-arrayer에 부착된 스텝핑 모터 드라이버는 Photo 2.3에서 보여진다.

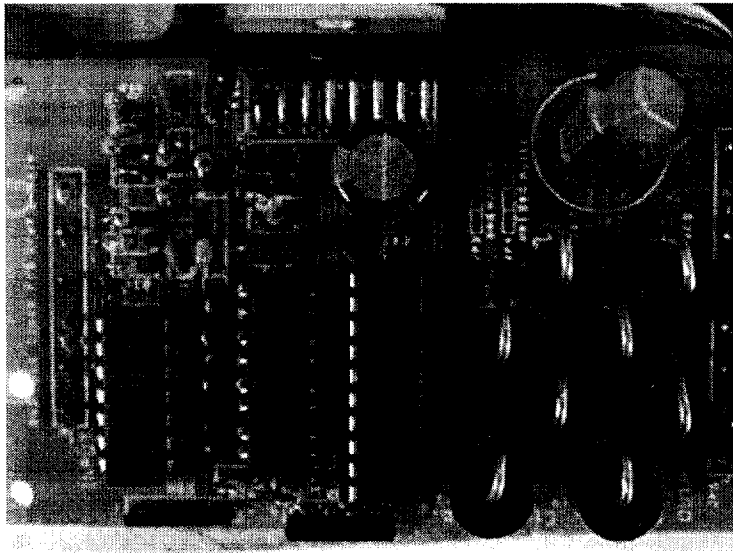


Photo 2.2 Developed PCB board of stepping motor driver

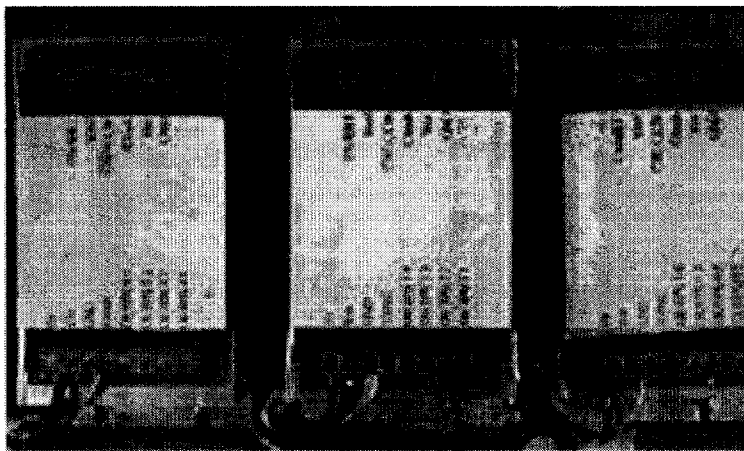


Photo 2.3 Installed stepping motor driver in micro-arrayer

3) 3축 직교 매니플레이터

Micro-arrayer는 3축 직교 매니플레이터 형태로서 개발되어진다. 본 연구에서 개발되어진 모든 요소들을 결합한 형태가 Photo 2.4이다.

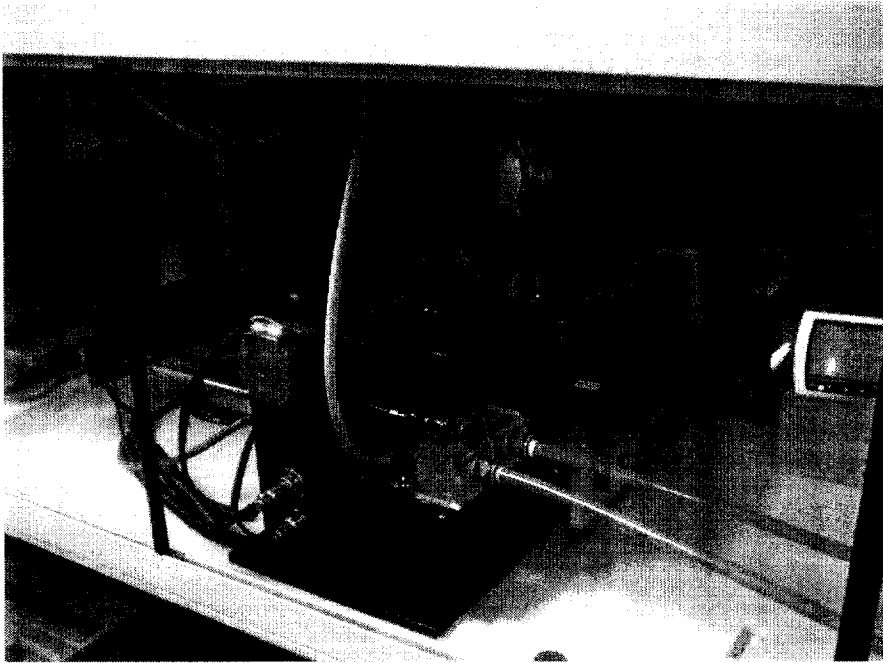


Photo 2.4 The developed micro-arrayer

Photo 2.4에서, 개발되어진 micro-arrayer 시스템은 각 축에 초기위치를 설정할 포토 센서가 설치되어있다. 초기 위치 설정은 3번의 감속 단계를 가짐으로서 정확한 위치를 잡는다. Base plate에는 2개의 96 well plate가 장착되어서 총 192개의 spot를 할 수 있고, 테스트용 슬라이드 글라스를 포함 총 7개의 슬라이드 글라스가 놓여진다. 이는 소규모 연구소에서 사용하기에 용이하도록 구성되었다.

4) Tip과 Tip holder

Tip과 tip holder는 micro-arrayer 시스템의 개발에 있어서 핵심 기술 중의 하나라고 할 수 있다. 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 2.11은 pin type tip의 모식도로서, tip이 원추형이므로 그 끝의 강도를 유지할 수 있는 재질을 이용해야 한다. 또한 대칭형의 spot을 얻기 위해서는 각 tip들의 높이가 평행하게 유지되어야 한다.

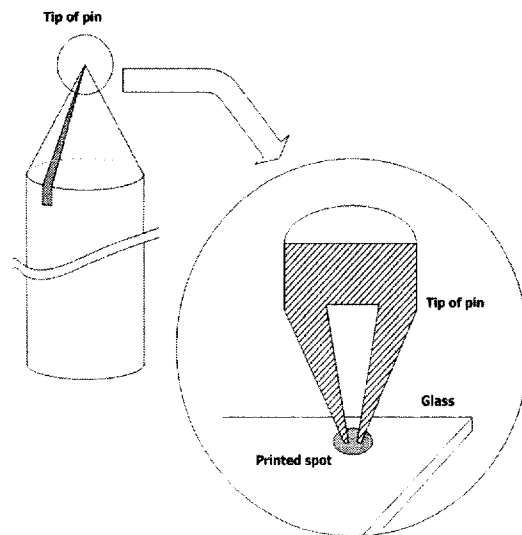


Fig. 2.11 Schematic configuration of spotting pin and its tip

아래의 Fig 2.12는 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 전달

되므로 어느 정도의 압력을 가해야만 한다. 그리고 실용적으로 볼 때 1개의 tip으로 chip을 제작한다면 생산성이 떨어지므로 다수개의 tip을 동시에 spotting할 수 있어야 하며, 이때 각각의 tip의 성능이 동일해야 한다.

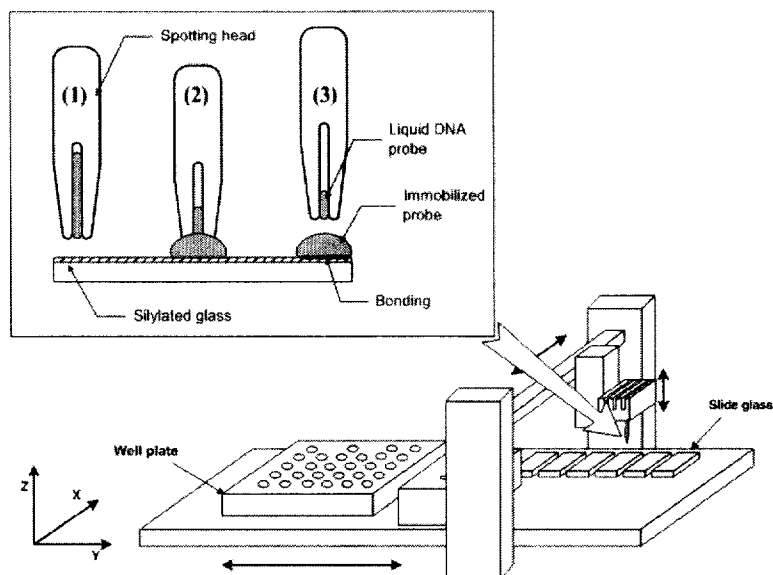


Fig. 2.12 Spotting mechanism using the pen tip

DNA probe를 균일한 양으로 흡수할 수 있도록 tip의 머리 부분은 Fig. 2.12와 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 머리 부분을 크게 하고 tip과 tip holder를 정밀 가공하여 중력에 의한 슬라이딩이 이루어지는 간단한 감쇄기효과를 가질 수 있다. 이는 동시에 spotting 직후 진동억제를 위한 가압작용을 한다. Tip의 끝 간격과 끝단 면적이 가장 큰 영향을 미치는데 본 연구에서 사용한 tip은 Arrayit사의

ChipMaker 4를 사용하며 이것은 Photo 2.5에서 나타내어지고, Table 2.4에서 ChipMaker 4의 특성을 간략하게 나타낸다.

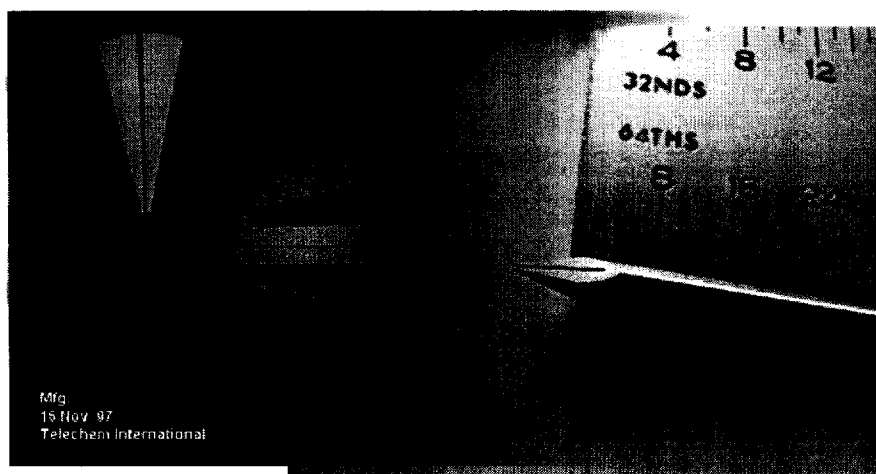


Photo 2.5 The shape of ChipMaker 4 in the micro-arrayer

Table 2.4 The specification of ChipMaker 4

Contents	Units
Catalog number	CMP2
Spot diameter(μm)	120-130
Uptake volume(μl)	0.25
Minimum spot spacing(μm)	120
Delivery volume(n ℓ)	0.6
Maximum subgrid per pin(spots)	36 $\times$ 36
Density(spots./ cm^2)	6,350
Maximum number of spots(18mm $\times$ 72mm)	82,944

또한 Photo 2.6에서 tip holder는 총 32개의 tip을 탑재할 수 있고, 정밀 가공으로 슬라이딩 효과에 용이하도록 하여야 하고, tip이 임의로 회전하지 못하도록 만들어져야 한다.



Photo 2.6 Shape of tip holder in micro-arrayer

5) 각종 기계장치 및 전기장치

Photo 2.7에서, 개발되어진 micro-arrayer 시스템에서 반드시 요구되어지는 주변장치인 세척장치 및 건조기를 나타내고 있다.

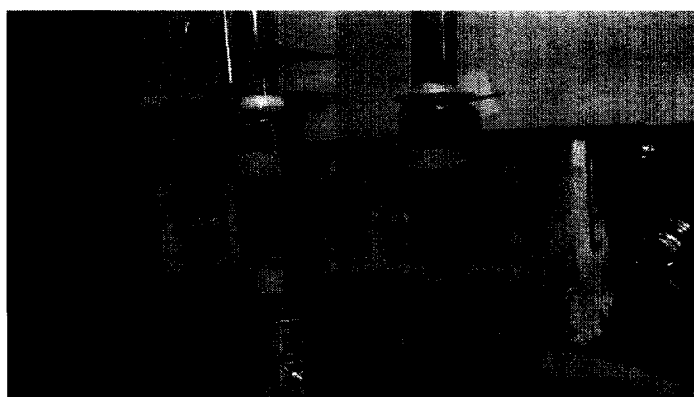


Photo 2.7 The shape of clean station

특히, 본 연구에서는 통합된 하나의 모듈로 구성함으로써 제작과 작업시간을 단축시킬 수 있도록 하였다. 따라서 silylated glass와 액체 DNA probe를 저장할 96-well을 plate 고정시킬 장치와 tip 끝에 남아 있는 DNA probe나 이물질을 제거할 세척 장치와 이에 연결된 진공 펌프와 유체 펌프를 제어할 전장부가 필요하다. 깨끗한 세척을 위하여 사용자가 세척의 횟수를 파라미터로 넣을 수 있고, 이를 통해 세척이 가능하다. 강화 플라스틱으로 제작하여 사용상의 편리함과 견고함을 동시에 만족시키고 설계 변경에도 용이하도록 한다.

Photo 2.8에서 slide glass와 96-well plate는 간단한 스프링 압력 기구에 의해 편리하게 착탈이 가능하다. Probe를 고정시키는 데에는 시스템이 있는 룬의 온도와 습도가 아주 중요한 역할을 한다. 따라서 온습도 센서를 부착하고 그 데이터를 획득해서 가습기와 히터를 구동시킨다.



Photo 2.8 The shape of base plate

2.5 DNA Chip Micro-Arrayer 시스템의 통합 관리

프로그램의 개발

개발되어진 DNA chip micro-arrayer 시스템을 통합 관리하기 위한 프로그램은 컨트롤적인 요소와 모니터링 요소 두 가지로 크게 구분 되어질 수 있다. 컨트롤적인 요소는 micro-arrayer가 구동될 때 구동에 필요한 파라미터들을 저장하고 전송하는 기능을 가지고 있으며, 모니터링 요소는 현재 구동되고 있는 상태를 모니터링하고, 진행시간과 남은 작업시간, 그리고 시스템의 온도/습도를 디스플레이 한다.

따라서 본 연구에서 개발되어진 통합 관리 프로그램은 Fig. 2.13에서 보여지는 바와 같이, 프로그램이 시작되면 작업의 보안을 위해서 로그인 창이 뜬다. 로그인 창에서는 인가받은 사람만이 프로그램을 사용할 수 있다. 프로그램은 DNA chip의 시작부터 끝까지 모두 관리할 수 있도록 통합프로그램으로 구성되고 첫 화면에서 어떠한 작업을 할 것인지를 선택하는 창이 뜬다.

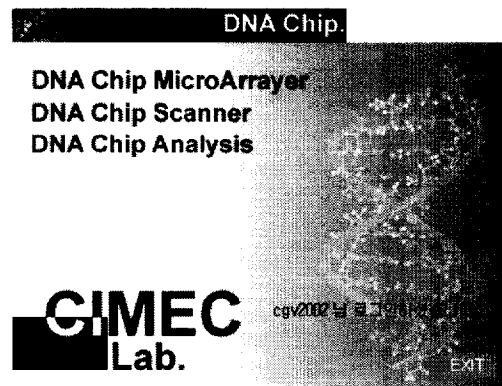


Fig. 2.13 Login screen of integrated management software for micro-arrayer

Fig. 2.14에서, 사용자가 요청하는 작업이 시작되면 하고자 하는 작업을 생성하고, 작업하고자 하는 probe의 정보와 micro-arrayer를 작동하는 파라미터들을 전송한다. 또한 작동이 시작되면 현재의 상태를 모니터링하고 작업이 종료가 되면 사용자에게 알려주기 위한 통합 프로그램을 Fig. 2.15와 같이 표현되어진다.

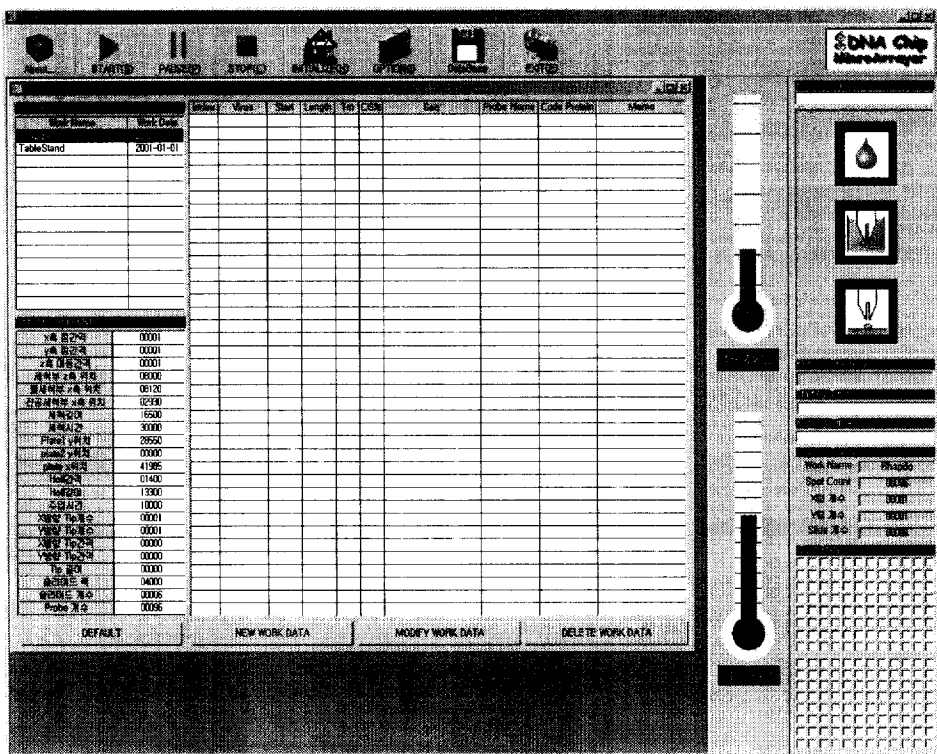


Fig. 2.14 The loading and saving screen of parameter

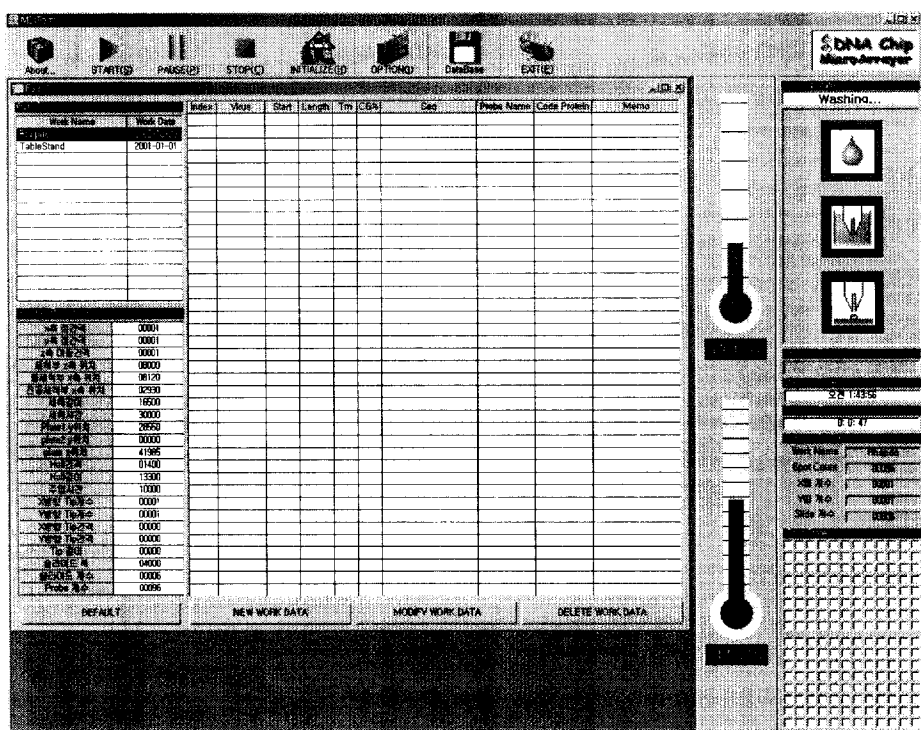


Fig. 2.15 Login screen of integrated management software

2.6 실험 및 검증

1) 염료를 이용한 동작 실험

DeRisi 등과 micro-arrayer 연구로 유명한 Stanford 대학의 Brown 관계자들은 그들이 개발한 micro-arrayer가 너무 고가가 되는 것을 안타까워하며 스스로 연구자가 arrayer를 만들 수 있도록 그 제작법을 전용의 software ArrayMaker까지 포함해서 Web 페이지 상에 완전공개하고 있다 [10]. 그것이 **MGuide**라고 불리는 것이다. 또한 같은 그룹에서는 arrayer를 완성시킨 후의 실험에 필요한 일련의 software도 함께 공개하고 있는데, 그것은 화상분석용 software ScanAlyze(Stanford Univ, M.Eisen 제작), database software AMAD(Another Microarray Database, Eisen 제작), 데이터 해석 software Cluster Tree View (Eisen 제작: soft 명은 변경될 예정)이다. 이것들을 토대로, 우선 전체의 흐름을 종합해 보면 Fig. 2.16과 같다. 또한 본 단원에서 보여지는 해석 및 분석방법은 DNA scanning 이후에 받아들여진 정보를 분석하는 일련의 과정이다. 따라서 본 연구에서는 micro-arrayer의 제작과 실험에 관련한 연구이므로 해석 및 분석에 대해서는 소개만 하고, 이 논문에서의 실험결과는 획득된 화상의 픽셀수를 판단, spot의 크기를 산출하고 유효성을 분석하고자 한다.

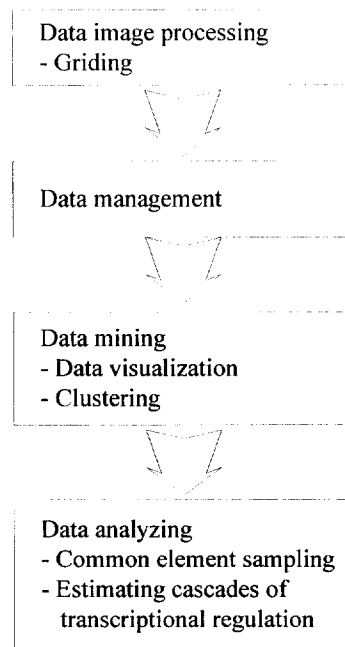


Fig. 2.16 The function of transcription informatics

데이터의 화상처리(image processing) 기법

우선, transcription 실험에서는 한 번에 수 천 개의 spot data를 얻기 때문에 이것들을 가능한 한 자동적으로 발현강도의 데이터로 변환하는 기능이 필요하다. 대량의 spot이 도중에 다르게 인식되지 않도록 spot 강도가 약해지거나 spot의 위치와 상태가 아주 작게라도 바뀌어지거나 뒤틀려 있다 할지라도 자동적으로 조절해서 인식해준다면 대단히 효과적일 것이라고 판단된다.

본 논문을 통해 개발된 micro-arrayer 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 2.9는 실제 spotting한 micro-array의 한 예로서 총 spot의 개수는 10개이다. Tip과 3축 매니퓰레이터의 특성상 지금의 결과 이상의 고

집적을 만들 수는 있으나 램도 바이러스(Rhabdo virus)의 DNA chip을 만드는 것을 목적으로 실험을 하였다. 램도 바이러스를 실험한 결과 총 96개의 oligonucleotide로 정제되었다. 따라서 본 실험에서는 10개의 저 집적 DNA chip을 실험하였으며, 또한 Table 2.5는 실제 spotting의 결과로 보이는 재원을 나타낸다.

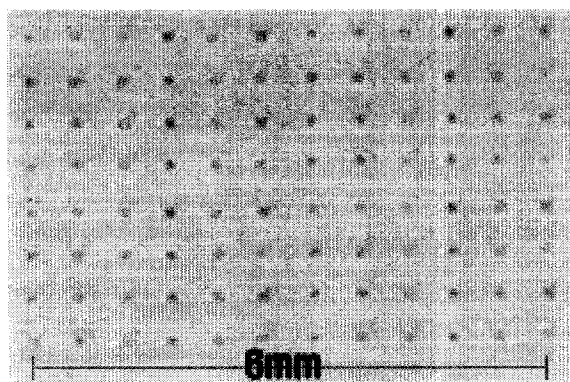


Photo 2.9 Example of micro-array printed
by developed arrayer

Table 2.5 Spotting specs of the developed micro-arrayer

Contents		Units
Spotting	Size [mm^2]	0.01304
	Pitch [μm]	500
	Velocity [spot/sec]	11
	Integration ratio [EA/cm^2]	1,536

이러한 실험결과에서, 영상 처리를 통하여 점의 크기를 식별하려 하

였지만 점의 크기가 너무 작아서 육안으로도 식별하기 힘들고, 슬라이드 글라스에 의한 빛의 굴절로 인하여 잔상과 잉크의 분리가 힘들었다. 이러한 이유로 인하여, Photo 2.10에서 보여지는 것처럼 직접 제작한 테스트용 Tip을 사용하였고 테스트용 Tip을 사용하여 얻어진 결과는 Photo 2.11에서 나타내어진다.

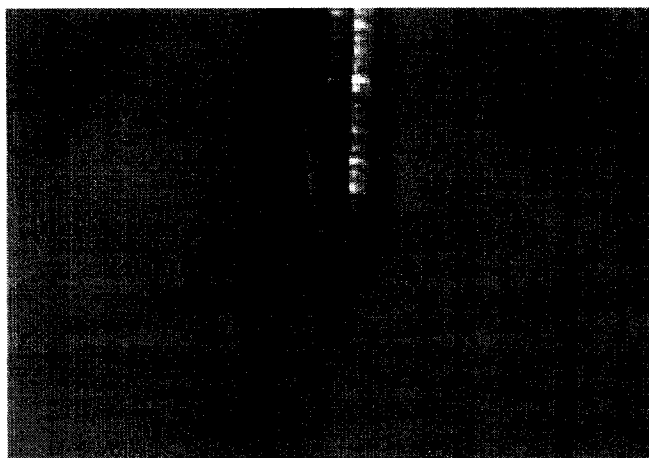


Photo 2.10 Developed testing tip

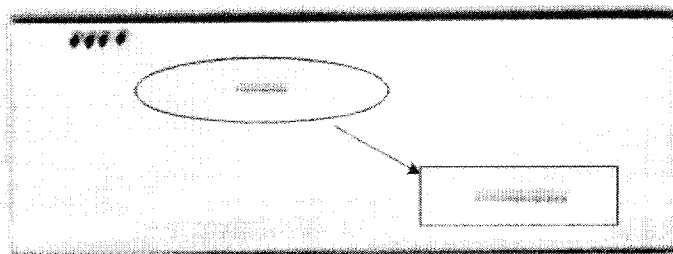


Photo 2.11 Example of micro-arrayer printed by testing tip

특히 Photo 2.11에서 잉크가 찍힌 부분을 gray level 로 변환하고 이

진화 한 후의 결과이며 이러한 것을 확대한 것이 Photo 2.12이다.

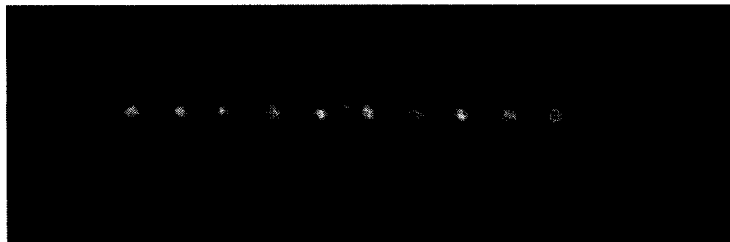


Photo 2.12 The shape of an image after processing

여기서 얻어진 각 점들의 픽셀 크기는 Table 2.6과 같이 나타내어진 다. 얻어진 픽셀의 값들에 대하여 분석을 위해서는 통계적인 연산이 필요하다. 이미지를 분석하기 위해서 먼저 기본통계의 결과로 평균, 표준 편차 분산, 최빈값, 중앙값, 최소값, 최대값 등의 데이터를 획득한다.

Table 2.6 The number of pixels at each spot

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	36	40	38	36	42	40	35	39	40	34

Table 2.7 Frequency distribution

pixel No.	Frequency	pixel No.	Frequency
29	1	32	2
30	1	33	1
31	4	35	1

데이터를 통해서 도수분포와 히스토그램을 구할 수 있고, 이를 통해서 가장 빈도수가 높은 수를 구할 수 있으며 픽셀수의 분포를 알 수 있다. 이러한 결과들은 Table 2.7과 Fig. 2.17에서 알 수 있는 것처럼 도수분포표에서 가장 높은 빈도를 차지하는 픽셀은 31임을 알 수 있다.

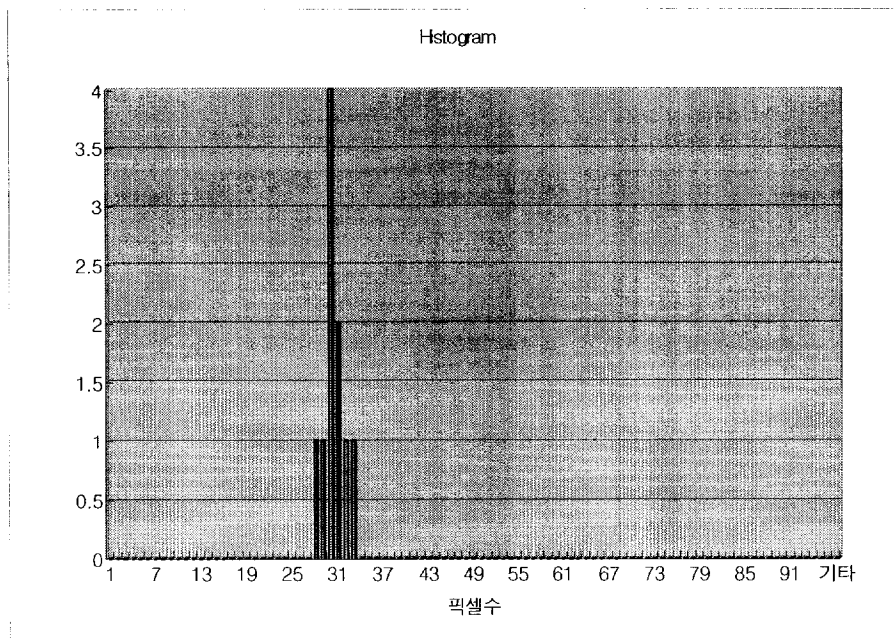


Fig. 2.17 Histogram result

또한 정규분포를 spot 크기의 과정을 모형화 하고, 랜덤 표본의 평균값들의 변동성을 나타낸다. 정규밀도함수는 곡선 아래 면적은 총 1이고 곡선 아래 면적부분이 확률로 해석이 된다. 따라서 정규밀도함수 $f(x)$ 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.1)$$

확률변수 Z 가 a, b 구간에 속할 확률 $P(a \leq Z \leq b)$ 은 다음과 같다.

$$P(a \leq Z \leq b) = \int_a^b f(x) dx \quad (2.2)$$

이 확률은 a, b 구간에서의 면적과 같다. 본 실험에서의 식 (2.1)을 이용한 정규분포 곡선은 Fig 2.18과 같다.

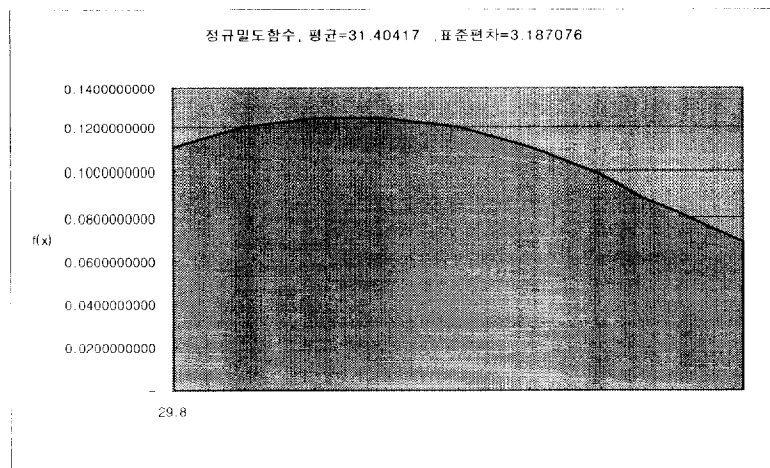


Fig. 2.18 Formality distribution curve

Spot 크기의 분석은 먼저 spot 크기의 표준 크기와 최대 그리고 최소 크기를 구하고 픽셀수와의 비율로서 판단하고자 한다. 영상 판독에서는 크기의 비율로서 spot 크기가 균등한지를 판단한다. 따라서 본 실험에서 사용한 ChipMaker 4를 기준으로 하여 판단하면 표준 지름과 최대, 최소 지름은 식 (2.3)-(2.5)에서 나타내어진다.

$$S_{ave}=125\mu m \quad (2.3)$$

$$S_{max}=130\mu m \quad (2.4)$$

$$S_{min}=120\mu m \quad (2.5)$$

도수분포에서 평균 픽셀수 Q_{ave} 가 31인 경우가 가장 높은 빈도를 보이므로, 최소 픽셀수 Q_{min} 을 구할 때에는 31을 최대 픽셀수 Q_{max} 을 구할 때에는 32를 사용하면 식(2.6)과 같다.

$$\frac{\pi\left(\frac{S_{ave}}{2}\right)^2}{Q_{ave}} = \frac{\pi\left(\frac{S_{min}}{2}\right)^2}{Q_{min}} = \frac{\pi\left(\frac{S_{max}}{2}\right)^2}{Q_{max}} \quad (2.6)$$

식 (2.6)에서 Q_{min}, Q_{max} 를 구하면

$$\begin{aligned} Q_{min} &= \frac{Q_{ave}\pi\left(\frac{S_{min}}{2}\right)^2}{\pi\left(\frac{S_{ave}}{2}\right)^2} = \frac{Q_{ave}S_{min}^2}{S_{ave}^2} \\ &= \frac{31 \times 120^2}{125^2} = 28.5696 \approx 28 \end{aligned} \quad (2.7)$$

$$\begin{aligned}
 Q_{\max} &= \frac{Q_{ave} \pi \left(\frac{S_{\max}}{2} \right)^2}{\pi \left(\frac{S_{ave}}{2} \right)^2} = \frac{Q_{ave} S_{\max}^2}{S_{ave}^2} \\
 &= \frac{32 \times 130^2}{125^2} = 34.6112 \doteq 34
 \end{aligned} \tag{2.8}$$

식(2.2)에서 a, b의 구간을 $Q_{\min}, Q_{\max}$ 로 두고 확률을 구하면

$$P(Q_{\min} \leq Z \leq Q_{\max}) = \int_{Q_{\min}}^{Q_{\max}} f(x) dx \tag{2.9}$$

식 (2.9)은 구간 $Q_{\min}, Q_{\max}$ 사이에서의 누적 확률과 동일하다. 이를 Excel의 누적확률을 구해주는 함수 Normdist를 사용하면 다음과 같이 구해진다.

$$P(Q_{\min} \leq Z \leq Q_{\max}) = 0.704922 \tag{2.10}$$

지금까지의 연산들을 종합하고, Excel 2000을 이용한 결과를 정리하면 Table 2.8과 같다.

Table 2.8 The results of interval probability

Minimum diameter S_{ave}	120
Maximum diameter S_{max}	130
Standard diameter S_{min}	125
Maximum frequency pixel Q_{ave}	31,32
Minimum pixel Q_{min}	28.5696
Maximum pixel Q_{max}	34.6112
$P(\min. \leq X \leq \max.)$	0.70492

식(2.10)의 결과는 통계적인 계산으로 볼 때 최대 최소구간의 spot 들이 전 영역의 70% 안에 들어간다는 것이다. 이 실험에서는 실험을 하는 tip 영상이 아닌 임의로 가공된 tip을 사용하였다는 점과 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 1cm² 내에 96개의 spot을 구성하는 저집적 DNA chip을 제작하는 용도로써는 충분한 성능을 가짐을 알 수 있다.

2) 실제 랩도 바이러스를 이용한 DNA chip 제작 실험

본 논문에서 제작 되어진 micro-arrayer를 부경대학교 수산과학대학 일반 미생물학과에서 어류 랩도 바이러스의 진단용 DNA chip 제작 최적 조건을 찾는 연구를 위하여 사용하였다 [41]. 실험은 개발되어진 micro-arrayer를 이용하여 poly-L-lysine로 코팅된 slide glass에 넘치

의 랩도 바이러스(HIRRV)를 부착을 시키는 테스트를 했다. 습도 조건은 60-65%, 65-70%의 두 경우로 실험 하였으며, 이러한 결과를 BMS에 scan 의뢰를 하여 DNA chip 제작 상태를 확인 하였다.

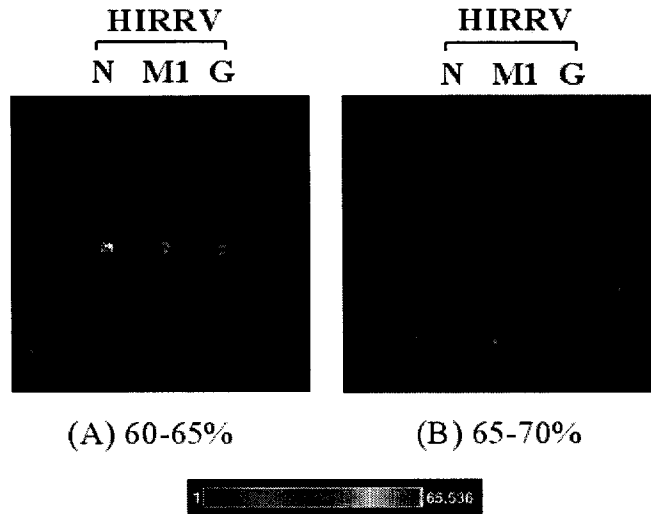


Fig. 2.19 Test that attach Rhabdo virus of flatfish to slide glass that coat by Poly-L-lysine

Fig. 2.19과 같이 습도 조건은 60-65%일 때 부착이 잘 되는 것을 확인할 수 있으며, micro-arrayer의 동작 상태는 전체적으로 양호한 것을 알 수 있다. 더구나, Fig. 2.20와 Fig. 2.21은 poly-L-lysine로 코팅된 slide glass와 aminosilane 코팅된 slide glass에 각각 IHNV, VHSV, HIRRV 그리고 β -actin을 부착한 테스트 결과이다.

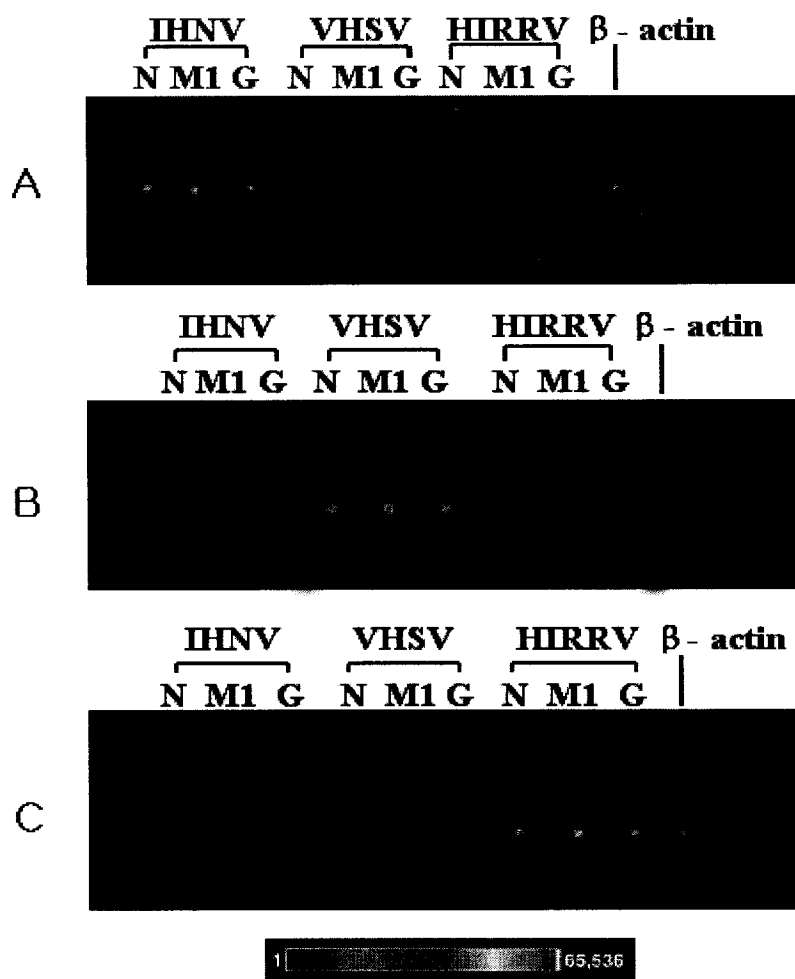


Fig. 2.20 Poly-L-lysine coating slide glass

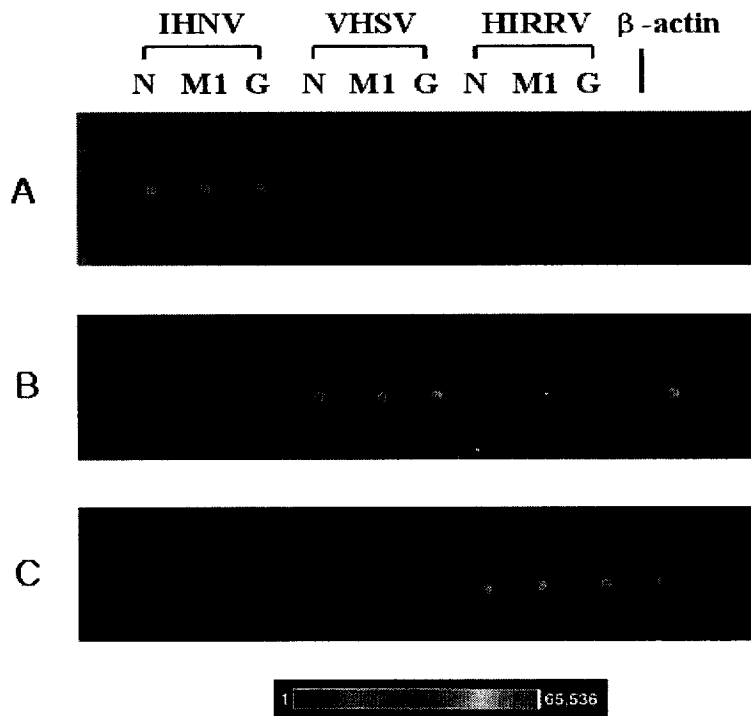


Fig. 2.21 Aminosilane coating slide glass

2.7 결 언

본 단원에서는 저가형 DNA chip을 설계, 제작하기 위한 micro-arrayer의 하드웨어 및 소프트웨어의 개발결과를 기술하였다. 개발되어진 micro-arrayer는 유전자 정보를 해석하기 위한 중요한 도구인 만큼 정밀도와 집적도가 중요한 요인이라고 할 수 있을 것이다. 따라서 이러한 요인들을 충족시키기 위해서는 정밀 가공된 tip과 tip holder, 스테핑 모터 그리고 80C196KC를 이용하여 3축 직교 매니플레이터를 제어하는 시스템 개발이 요구되어진다. 또한 DNA chip을 제작하기 위해서 반드시 요구되어지는 요소라고 할 수 있는 clean station 및 base plate를 설계 및 제작하였다.

본 논문에서 개발되어진 DNA chip micro-arrayer 시스템에서 실제 실험 중에 고려하지 못했던 환경적인 요인, 즉, 온도, 습도, 농도 등으로 인하여 많은 실패를 경험했으나 관련 연구문헌과 직접 제품을 생산하는 관련 기업을 통한 연구정보를 통하여 저가형 제품개발을 위한 적정조건을 고려할 수 있었다.

더구나 개발되어진 micro-arrayer를 이용한 실험결과를 통하여 1cm²안에 192개의 oligonucleotide을 찍을 수 있는 저집적 DNA chip 제작용 micro-arrayer 개발 목표달성은 물론이고, 실험 결과의 검증과정에서 약 10배의 oligonucleotide를 찍을 수 있는 성능 결과를 가짐을 보여주었다. 따라서 본 연구에서 개발되어진 DNA chip micro-arrayer 시스템은 중소 규모의 연구소를 포함한 국내 대학연구실에서 실험목적으로 사용하기에는 상당히 유용한 시스템임을 확인할 수 있었다. 또한 DNA chip system은 micro-arrayer뿐만 아니라 실험된 데이터를 판독하고 해석할 DNA scanner와 해석 프로그램의 개발도 아주 중요하므로, 다음 단

원에서는 DNA chip scanner 개발을 위하여 반드시 요구되어지는 영상 처리 알고리즘을 개발하고 이 영상처리 결과를 DNA chip scanner 시스템에 적용함으로써 본 연구를 마무리 할 수 있을 것이다.

제 3 장

DNA Chip 분석을 위한 영상처리 알고리즘 개발

3.1 서 언

본 단원에서는 개발되어질 DNA chip scanner 시스템을 구성하기 위한 기본적인 원리라고 할 수 있는 영상처리 알고리즘(image processing algorithm)을 구성하고자 한다. 특히, 본 단원에서는 DNA chip scanner 시스템이 DNA chip 영상을 획득한 후에 영상을 처리하는 부분에 관하여 구체적으로 기술할 것이다. DNA chip scanner의 영상은 그리드(grid) 내의 반점들의 배열로 이루어져 있으며, 이미지 내의 모든 그리드는 같은 수의 행과 열의 반점수를 가진다. 다시 말하면, 하나의 이미지는 여러 개의 그리드로 이루어져 있고 각각의 그리드를 서브 그리드라고 한다. 이상적인 상태의 micro-array 이미지는 다음과 같은 특성을 가진다고 할 수 있다.

- (1) 모든 서브그리드(sub-grid)의 크기는 같다.
- (2) 서브그리드사이의 간격은 일정하다.
- (3) 반점(spot)들의 중심은 행과 열의 교차점위에 위치한다.
- (4) 반점들의 모양은 기하학적인 원형이고, 모든 반점들의 크기는 일정하다.

그러나 영상의 획득과정과 hybridization 및 세척을 포함하는 후 처리 과정에서 발생하는 잡음으로 인해 정확한 hybridization을 판단하는데 어려움을 겪게 되며, 대부분의 경우에는 이상적인 상태(ideal state)의

영상이 아니기 때문에 DNA chip의 분석에 있어서 자동적으로 영상처리 하기 위한 기술은 매우 어려운 것이 현실이다. 더구나 전문가에 의한 수동식 판별작업은 많은 비용과 시간을 필요로 하게 되므로, 현재까지 많은 DNA chip 분석 시스템이 연구되어지고 있음에도 불구하고 반자동 처리 시스템인 ScanAlyze와 완전 자동처리 시스템인 AutoGene이 대표적이라고 할 수 있다 [13]. 특히 ScanAlyze는 사용자가 손으로 모든 행과 열의 반점수를 입력해야한다는 단점을 가지고 있다.

그러므로 본 논문에서는, DNA chip 영상에서 잡음을 제거하고 발현된 probe들을 찾기 위한 영상처리 방법(image processing technique)을 제안하고자 한다.

3.2 영상처리 기본원리 및 알고리즘 구성

디지털 영상처리를 위해서는 먼저 디지털 형태로 표현된 영상데이터를 얻어야한다. 디지털 영상데이터를 얻기 위해서는 photo를 스캔하거나, 디지털 카메라나 캠코더를 이용하여 영상을 찍은 후 컴퓨터로 전송하거나, 아날로그 카메라를 통해 입력된 영상 데이터를 A/D변환 보드를 통해 컴퓨터로 전송해야 한다. 또한 전송되어진 영상 데이터는 영상데이터용 A/D 변환기(frame grabber)로서 Meteor사에 생산한 Meteor-II 프레임 그레버를 사용하여 영상데이터를 획득할 수 있도록 구성되어진다.

1) 그레이화(Gray)

그레이 데이터(gray data)는 흑백카메라로 찍은 흑백영상을 생각하면 쉽게 이해할 것이고 색상은 없으며 명암의 농도만으로 입체를 표현하고 주로 영상처리에 많이 이용된다. 컬러영상에서의 각각의 픽셀은 RGB(R:Red, G:Green, B:Blue)성분으로 구성된다. RGB 모형은 컴퓨터 그래픽 시스템의 설계를 간단히 하지만, 모든 어플리케이션에 이상적이지는 않다. 빨강, 초록, 파랑의 컬러 요소들은 상호관계가 너무 크다. 이러한 이유로 몇몇 영상처리 알고리즘들을 적용하기에는 어렵기 때문에 컬러영상을 명암으로만 표현되는 그레이영상으로 전환한다. 그레이영상을 영상 처리하는 방법에는 히스토그램을 주로 이용하는데 예를 들어 히스토그램 평활화와 같은 많은 영상 처리 기술들은 영상의 명암도 요소만으로 진행된다. 영상을 RGB 컬러에서 명암도 등급으로 변환하기 위해서는 다음과 같은 수식을 사용한다 [7].

$$\text{명암도} = 0.299R + 0.587G + 0.114B \quad (3.1)$$

R, G, B는 메모리상에 1바이트(byte)씩 할당되며 각각 256등급을 가진다. 위 식을 보면 R과 B성분보다 G성분에 상대적으로 높은 값을 곱하는 것을 볼 수 있는데 이것은 인간의 눈이 G성분에 더욱 민감하기 때문이다. 이렇게 계산된 명암도를 R, G, B성분 메모리에 각각 동일하게 삽입하면 명암도를 나타내게 된다. Fig 3.1은 이러한 식들을 실제 영상에 적용한 결과를 나타낸다.

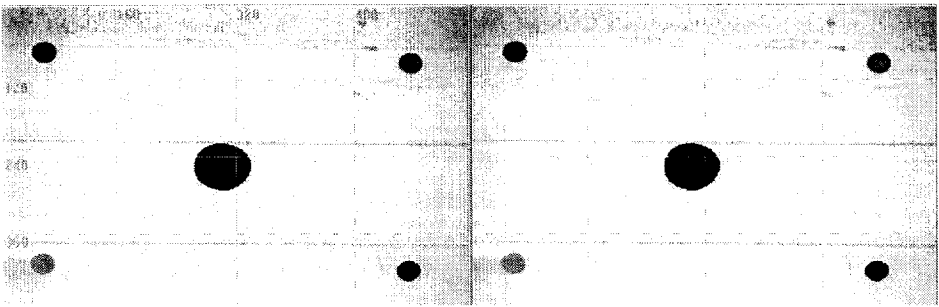


Fig. 3.1 Color image and gray image

2) 이진화(Binary)

이진화란 그레이 영상을 경계값(threshold)에 따라 흑과 백으로 구성된 두 가지 색으로만 영상을 나타내는 것을 말한다. 입력 영상의 각 화소에 대해서 명도가 있는 일정한 값 이상의 경우에 대응하는 출력영상의 화소값을 1로 하고 그 외의 경우는 0으로 하는데 여기서 말한 일정한 값을 경계값이라고 한다. 경계값 처리를 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & f(x, y) \geq t \\ 0 & f(x, y) < t \end{cases} \quad (3.2)$$

여기에서 $f(x, y)$, $g(x, y)$ 는 각각 영상처리 후의 (x, y) 에 있는 화소의 농담값을 나타내고, t 는 경계값(threshold)을 나타낸다. 이것을 다음 식과 같이 반대로 표현 할 수도 있는데 이것은 시스템 개발자의 선택에 의해 결정된다.

$$g(x, y) = \begin{cases} 1 & f(x, y) \leq t \\ 0 & f(x, y) > t \end{cases} \quad (3.3)$$

영상처리에서 배경과 물체를 구분하는 것은 매우 중요하다. 사람은 학습을 통해서 한 영상을 보고 물체와 배경을 쉽게 구분하지만, 컴퓨터 입장에서 배경과 물체의 구분은 상당히 어려운 부분이다. 이 부분을 해결하기 위한 하나의 방법이 경계값을 이용하는 것이다.

본 시스템에서는 경계값을 어떻게 설정하고, 경계값을 기준으로 어떻게 영상데이터를 처리하는가에 대해서 알아보도록 한다. 그레이 영상을 이진화하는 방법에는 두 가지 방법으로 histogram에 의한 경계값 설정법[3]과 최대 분산을 이용한 경계값 설정법을 사용하였다 [4][5].

가. histogram에 의한 경계값 설정법

시스템의 사용자가 임의로 경계값을 결정할 수 있게 하였다. 경계값을 결정하는 몇 가지 방법 중에 일반적으로 히스토그램을 이용한다. 히스토그램 영상 명암값의 분포를 보여주기 위해 사용되는 아주 유용한 도구이다. 이 히스토그램을 사용하여 영상의 구성 즉, 명암 대비 및 명암값 분포에 대해 자세히 알 수 있다. 히스토그램은 단지 화소가 가진 명암값들을 막대그래프로 표현한 것이다. x 축은 화소가 가질 수 있는 명암값을 나타내고 y 축은 각 명암값이 가진 빈도수를 나타낸다. 예를 들어 Fig 3.2는 4×4 픽셀영상을 나타낸 것이다.

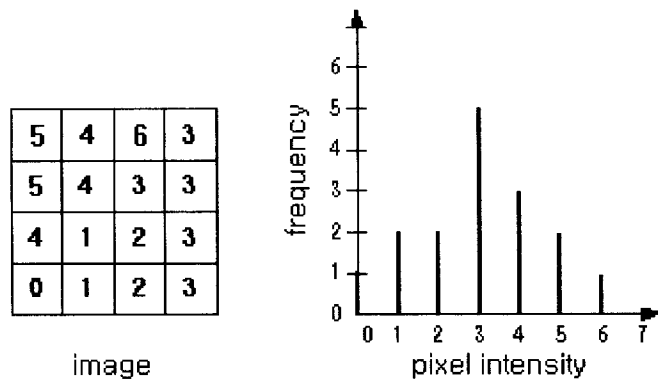


Fig. 3.2 Histogram

Fig 3.2에서도 알 수 있듯이 '3'값을 가진 픽셀의 수가 가장 많은 것을 알 수 있다. 보통 영상의 히스토그램은 Fig 3.3의 형태를 갖는다.

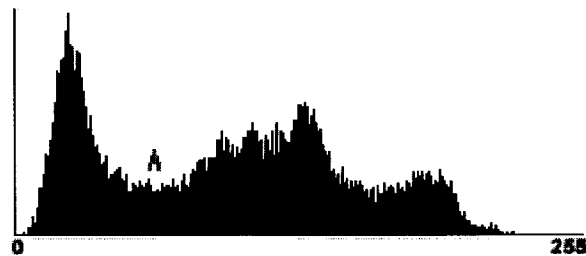


Fig. 3.3 General form of histogram

히스토그램에서 경계값을 선택하는 방법은 일반적으로 골짜기 부분이 깊숙이 나타나는 부분을 선택한다. 보통 Fig 3.3에서 'A'라고 표시되어 있는 부분이다. 따라서 수동 입력방법은 실제 관측영상을 여러 번 이진화해서 히스토그램을 분석한 후 사용자가 알맞은 값을 선택한다. Fig. 3.4-3.7은 여러 가지 경계값을 적용한 결과를 나타낸다.

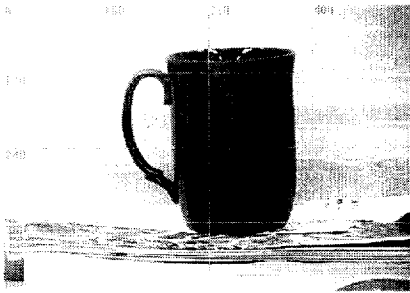


Fig. 3.4 Original image(Cup)

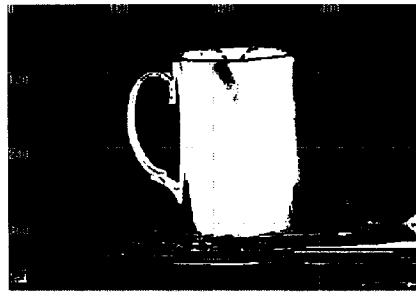


Fig. 3.5 Threshold 100

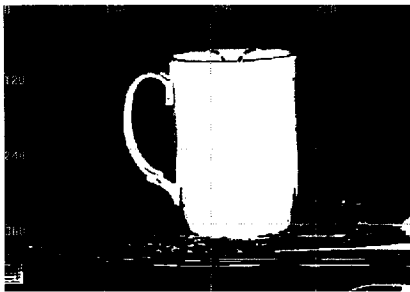


Fig. 3.6 Threshold 127

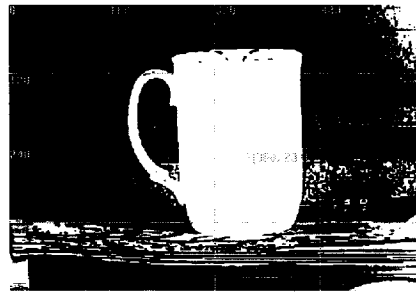


Fig. 3.7 Threshold 200

나. 최대 분산을 이용한 경계값 설정법

자동으로 경계값을 결정하는 방법에는 여러 가지가 있다. 그 중에서도 본 논문에서는 최대 분산을 이용하는 방법을 사용하였다. 예를 들어 Fig. 3.8은 두 개의 계층을 가지는 히스토그램을 나타내고 있다.

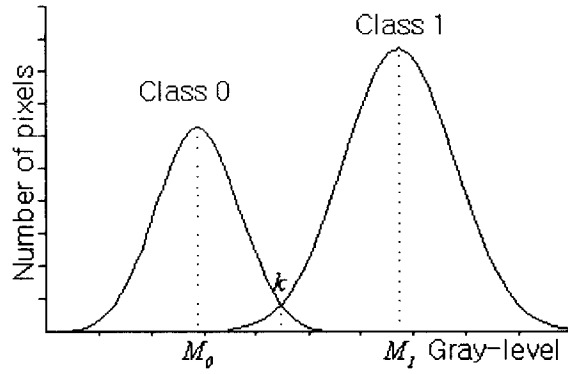


Fig. 3.8 Statistical meanings of biomodel histogram

이러한 Fig. 3.8에서 나타난 히스토그램을 이용하여 아래에 열거된 수식을 적용하면 Fig에서 k 부분이 경계값으로 선택되게 된다.

$$\text{전체 픽셀 수 : } N = \sum_{i=1}^m n_i \quad (3.4)$$

$$\text{각 그레이레벨의 확률 : } p_i = \frac{n_i}{N} \quad (3.5)$$

$$\text{Class0이 일어날 확률 : } \omega_0 = \sum_{i=0}^k p_i = \omega(k) \quad (3.6)$$

$$\text{Class1이 일어날 확률 : } \omega_1 = \sum_{i=k+1}^m p_i = 1 - \omega(k) = 1 - \omega_0 \quad (3.7)$$

$$\text{Class0의 평균값 : } M_0 = \sum_{i=1}^k i p(i/C_0) = \sum_{i=k+1}^m \frac{ip_i}{\omega_0} = \frac{M(k)}{\omega(k)} \quad (3.8)$$

$$\text{Class1의 평균값 : } M_1 = \sum_{i=k+1}^m i p(i/C_1) = \sum_{i=k+1}^m \frac{ip_i}{\omega_1} = \frac{M - M(k)}{1 - \omega(k)} \quad (3.9)$$

$$M = \sum_{i=1}^m ip_i \quad (3.10)$$

$$M(k) = \sum_{i=1}^k ip_i : \text{전체 샘플링값의 평균값} \quad (3.11)$$

$$M = \omega_0 M_0 + \omega_1 M_1 \quad (3.12)$$

두 클래스(class)간의 분산은 다음과 같이 나타내어지고

$$\begin{aligned} \sigma_B^2 = \sigma^2(k) &= \omega_0(M_0 - M)^2 + \omega_1(M_1 - M)^2 \\ &= \omega_0 \omega_1 (M_1 - M_0)^2 \\ &= \frac{[M\omega(k) - M(k)]^2}{\omega(k)[1 - \omega(k)]} \end{aligned} \quad (3.13)$$

또한 클래스내의 전체분산은 다음과 같이 나타내어진다.

$$\sigma_T^2 = \sum_{i=1}^m (i - M)^2 p_i = \omega_0 \sigma_0^2 + \omega_1 \sigma_1^2 \quad (3.14)$$

최적 경계값은 η 을 다음과 같이 최대화하고

$$\eta = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_T^2} \quad (3.15)$$

이때의 경계값 (k)는 최적의 경계값이 된다.

다음에 나타내어진 것처럼, Fig. 3.9는 Fig. 3.4을 최대 분산을 이용한 경계값 설정법을 적용한 결과를 나타내고 있다.



Fig. 3.9 Binary image using auto threshold method

본 시스템에서는 histogram에 의한 경계값 설정법과 최대 분산을 이용한 경계값 설정법의 결과영상을 분석하여 실제 실험환경에서 좋은 실험결과를 나타내는 조건을 선택하였다. 따라서 실제 실험환경에 따라 관리자의 적절한 선택이 중요하다. 또한 Fig. 3.10은 본 시스템에서 사용한 영상의 이진화 영상 결과를 나타내고 있다.

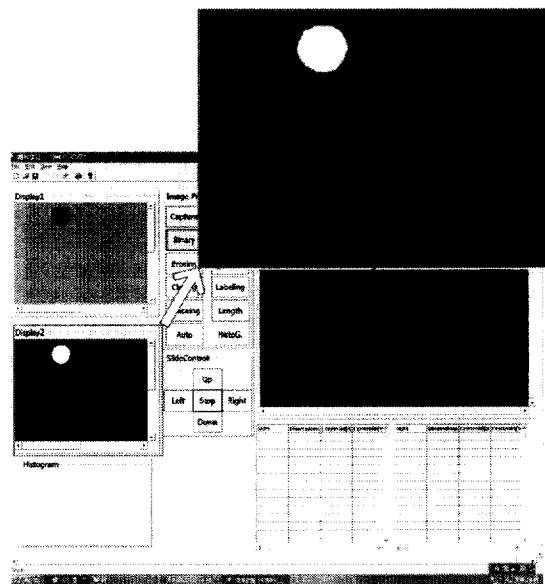


Fig. 3.10 Display screen of binary images

3) 영상 축소(Erosion)

이진화 단계를 거친 이진영상은 많은 노이즈를 가지고 있다. 이러한 상태에서 관측점 인식단계를 적용하면 불필요한 노이즈에 대한 정보도 함께 얻어지게 되므로 미리 영상의 잡음을 제거하는 일은 중요하다. 이 과정을 전처리라고 부르며, 이 단계는 이후의 영상처리를 쉽게 하기 위해 미리 영상처리를 행하는 것을 말한다. 그러나 전처리를 수행한 후의 출력 2진 영상에 노이즈가 있을 경우, 후처리로서 노이즈를 제거하지 않으면 안 된다. 후처리 과정은 영상 채움에서 다루도록 한다.

모폴로지는 집합 이론에 기반을 두고 있는 것으로, 영상 축소(erosion)는 모폴로지의 기본 연산 중 하나이다. 이러한 연산은 집합 A와 B가 주어졌을 때 B가 A에 완전히 포함되도록 하는 B의 변위에 대한 집합으로 정의될 수 있으며, 이러한 의미는 식 (3.16)과 같은 수식으로 나타내어질 수 있다.

$$\begin{aligned} A \ominus B &= \{x \mid x+b \in A, \quad b \in B\} \\ &= \{x \mid B_x \subseteq A\} \end{aligned} \quad (3.16)$$

일반적으로 집합 A라 하면 모폴로지가 적용될 원래 영상을 지칭하고, 집합 B는 구조요소(structuring element)를 지칭한다. 흔히 모폴로지 연산에 사용되는 구조요소로는 Fig. 3.11과 같은 것들이 있으며, 본 논문에서 사용되어진 시스템의 구조요소는 Fig. 3.11(a)이다.

1	1	1
1	1	1
1	1	1

(a)

	1	
1	1	1
	1	

(b)

1	1	
1	0	
1		0

(c)

		1	1	1		
	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	
		1	1	1		

(d)

1	1	1
1	10	1
1	1	1

(e)

Fig. 3.11 Structuring elements

또한, 본 시스템에서 사용한 영상 축소 필터링을 수식으로 나타내면 다음과 같이 나타내어진다.

$$x(i,j)=\min[x(i+n, j+m)-S(i+n, j+m)] \quad (3.17)$$

단, S는 구조요소이고 $n, m = -1, 0, 1$ 이다.

축소연산은 물체의 외각 픽셀을 축소하는 기능을 하여 물체는 작아지고 배경은 커지는 효과를 얻는다. 이것을 영상내의 비교적 작은 입자들, 즉 노이즈라고 판단이 되는 것은 제거하는 역할을 한다. 본 논문에서는 축소연산을 위해 Fig. 3.12과 같은 마스크를 사용하였다.

255	255	255
255	255	255
255	255	255

Fig. 3.12 Mask for erosion operation

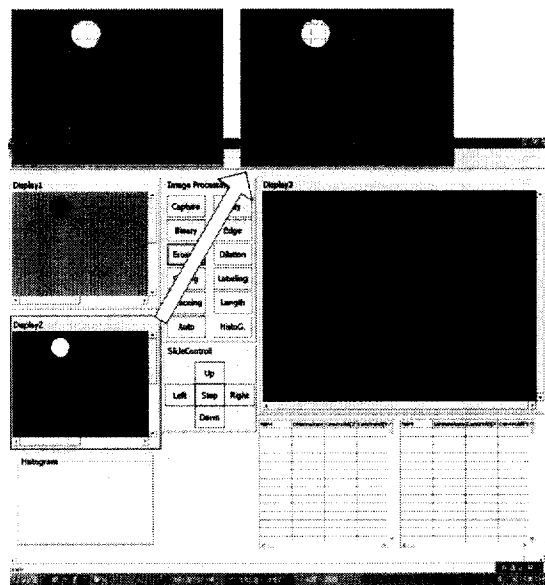


Fig. 3.13 The compared images between binary and erosion images

또한 Fig. 3.13는 이진영상과 영상 축소한 결과를 서로 비교할 수 있도록 합쳐놓은 영상이다. 위의 Fig 3.13에서 확대된 2개의 Display창에서 왼쪽에 있는 점이 이진영상의 점이고 오른쪽에 있는 점이 영상 축소를 적용한 점이다. 각각의 두 점을 비교해보면 외각이 축소되면서 테두리에 있는 노이즈들이 제거된 것을 알 수 있다.

4) 영상 팽창(Dilation)

팽창연산은 축소연산과는 반대로 물체의 외각 픽셀을 확대하는 기능을 하여 물체는 커지고 배경은 작아지는 효과를 나타낸다. 이 알고리즘을 적용한 이유는 관측점내의 구멍과 같이 비어있는 공간을 채우고 축소연산에 의해서 작아진 외곽을 원래의 크기로 복원하기 위해서이다.

본 논문에서는 팽창연산을 위해 Fig. 3.14과 같은 마스크를 사용하였다.

0	0	0
0	0	0
0	0	0

Fig. 3.14 Mask for dilation operation

Fig. 3.15는 Fig. 3.13의 팽창연산을 적용한 결과를 나타낸 것으로 이진화 된 점과 팽창을 적용한 점을 겹쳐서 나타내어 서로를 비교할 수 있도록 나타내었다. 여기에서 축소연산의 결과인 Fig. 3.13와 마찬가지로 확대된 2개의 display 창 왼쪽에 있는 점이 축소영상의 점이고 오른쪽에 있는 점이 영상 팽창을 적용한 점이다. 각각의 두 점을 비교해보면 외각이 확대되면서 테두리에 있는 노이즈들과 점들 내에 존재하는 빈공간이 채워지는 것을 알 수 있다.

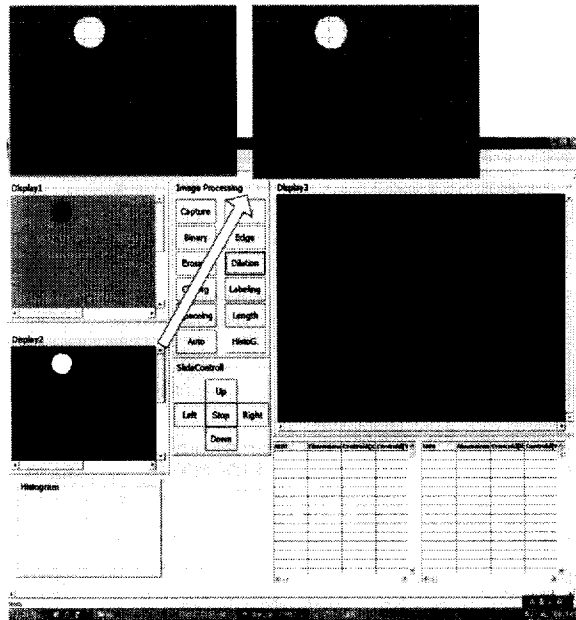


Fig. 3.15 The compared images between binary and dilation images

5) 영상 채움(Closing)

영상 팽창과 영상 축소를 사용하면 노이즈를 제거할 수 있다는 것을 앞에서 살펴보았다. 하지만 이것은 미세한 노이즈에 대해서만 적용되며 어느 정도의 크기를 가지는 점들은 여전히 남아있을 가능성이 있다. 이런 불필요한 점들은 데이터를 처리하는데 시간을 느려지게 할 뿐만 아니라 정확한 정보를 얻는데 방해가 된다. 그래서 점들 중에 사용자가 지정한 픽셀면적이하의 점들은 노이즈로 판단하여 제거하는 방법이 필요하다.

본 논문에서는 spot의 내부에 구멍이 존재하면 채우는 역할과 사용자가 설정한 spot 최소면적에 미달되는 점들에 대해 노이즈(먼지)로 판단하여 제거하는 알고리즘을 개발하였다. 이전의 Fig. 3.15에서 보여진 것처럼, 영상 팽창과 영상 축소를 적용하고 난 후 이전영상을 나타낸

것이다. 대상 spot을 표시할 때 spot의 크기를 관리자가 미리 알고 있기 때문에, 소프트웨어에서 spot의 최대·최소면적을 설정해 놓으면 조건에 만족하지 않는 점들은 노이즈로 판단하고 채워버린다.

Fig 3.16는 임의의 노이즈가 있는 영상을 보인 것이다. 그림에서 보듯이 우측 상단에 약간의 노이즈가 있는 것을 알 수가 있으며, 이러한 영상을 영상 축소, 팽창, 채움을 적용해 보도록 했다.

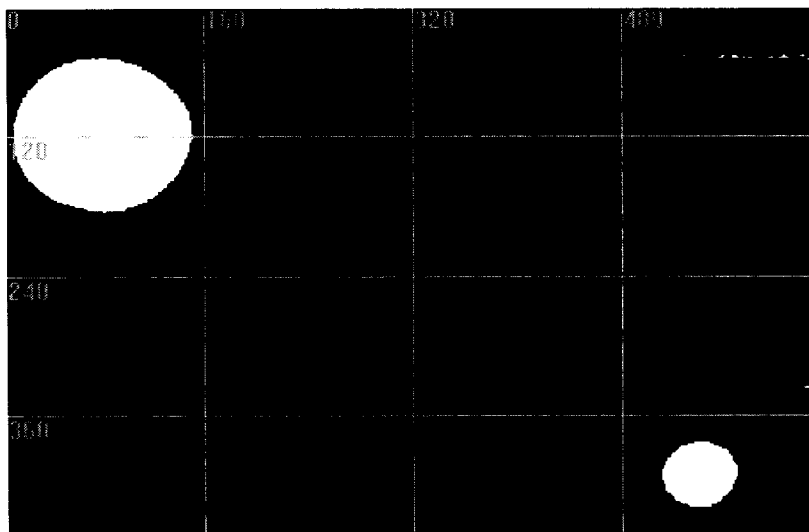


Fig. 3.16 Image before closing operation

또한 Fig. 3.17은 Fig. 3.16에 채움 연산을 적용한 결과를 나타내고 있으며 우측상단의 점들이 제거된 것을 알 수 있다.

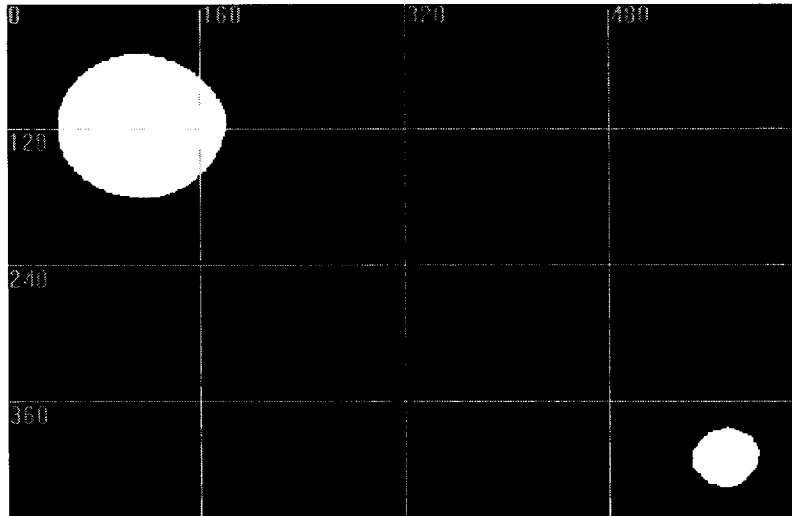


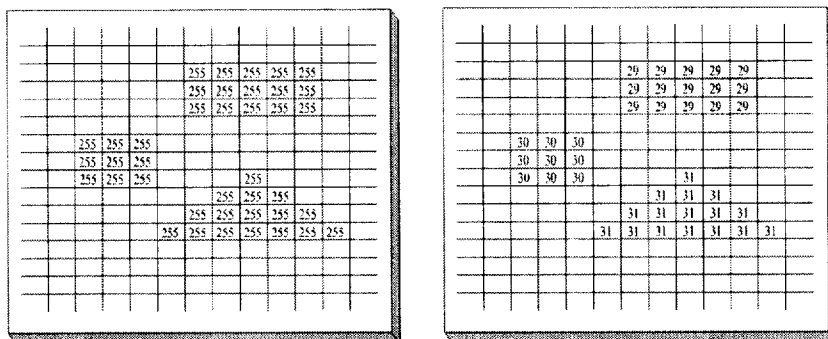
Fig. 3.17 Image after closing operation

6) 라벨링(Labeling)

본 시스템의 최종목표는 spot의 크기, 모양 그리고 spot들과의 거리를 이용하는 하는 것이라고 할 수 있다. 라벨링은 이러한 spot들의 정보를 얻는 핵심적인 단계이다 [22][24][29].

앞서 이진화 된 영상에서 물체 영역을 라벨링이라는 과정을 통해 각각의 물체를 구성하는 개개의 픽셀들을 하나의 영역으로 묶어내고, 라벨링 되어진 각각의 영역에 대해 크기나 구멍의 수, 경계 형상 등의 특징을 조사하여 인식하기 위한 자료로 사용한다.

이진화 된 영상이 라벨링 된 후에는 서로 연결된 인접화소 영역은 픽셀들의 값이 동일한 하나의 번호로 라벨링 되어 나타나며 다른 인접영역 성분은 또 다른 번호로 나타나게 된다. 라벨링 된 영상을 이용하면 물체를 쉽게 인식할 수 있다. 임의의 한 라벨을 가진 화소만 추출하면 이것은 원 입력 영상에서 8개의 물체 영역 중 하나만을 배경에서 분리할 수 있게 되는 것이 된다.



(a) Binary image

(b) Labeling image

Fig. 3.18 Binary image and labeling image

Fig. 3.18은 임의의 샘플 영상에 대한 라벨링 처리 전후를 보여준다. 먼저 Fig. 3.18 (a)는 이진화 된 영상으로 구성 픽셀의 화소값이 0이 아니면 255인 화소값으로 이루어진 영상이다. 이진화 영상을 라벨링하면 인접하여 연결된 영역들은 서로 다른 번호가 각각 붙여져서 영역을 구별할 수 있도록 재구성되어진다. 그러므로 라벨링 된 영상에서 임의의 번호를 가진 영역만 추출하면 영역 분리가 이루어지게 되며 특별한 영역에 대해서만 크기, 중심 좌표, 원주길이 등을 추출해 내는 것이 가능하게 된다. 라벨링의 단계는 이진화 된 영상을 탐색하다가 밝기가 255인 화소값을 만나면 라벨링을 수행하고 이 라벨링 점을 8근방의 중심으로 이동 후 다시 인접화소의 미방문 255 화소값을 라벨링하는 방식으로 반복한다.

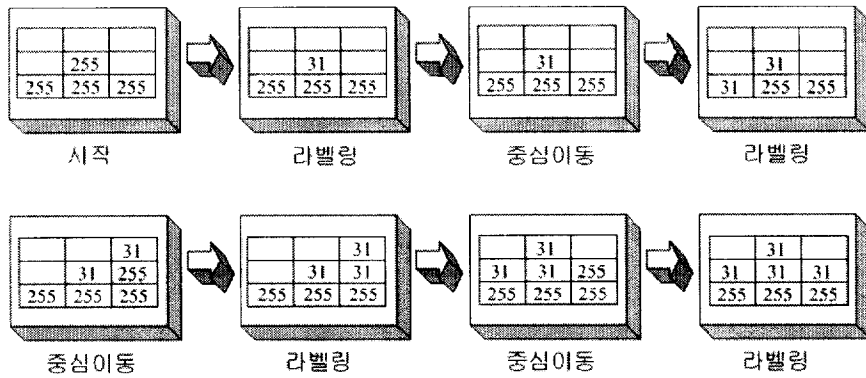


Fig. 3.19 Range labeling steps

Fig. 3.18의 삼각형 꼭지부분을 라벨링하면 Fig. 3.19의 단계로 라벨링이 수행되어진다. 따라서 본 논문에서는 grassfire 알고리즘을 사용하였다. Grassfire 알고리즘은 마른 잔디(grass)에서 불(fire)이 번져나가는 모양과 비슷하게 화소를 라벨링하기 때문에 붙여진 이름이다. 이 방법은 자기호출(recursive call)을 이용하여 모든 인접요소가 라벨링 될 때까지 현재 관심화소의 주변 인접화소를 차례로 검사하면서 라벨링하는 방법이다.

이 알고리즘은 spot의 개수를 파악하는 역할과 각각의 spot들의 면적, 도심에 관한 정보를 획득하는 역할을 한다. 여기서 가장 중요한 것이 도심 정보인데 이것을 이용하여 면적 및 spot과의 거리를 판단하는 것이다. Fig. 3.20는 Fig. 3.15에 라벨링을 적용한 영상이다. 특히 Fig. 3.20에서 spot이 4개인 것은 전체 영역을 결합했을 때의 영상이기 때문이다.

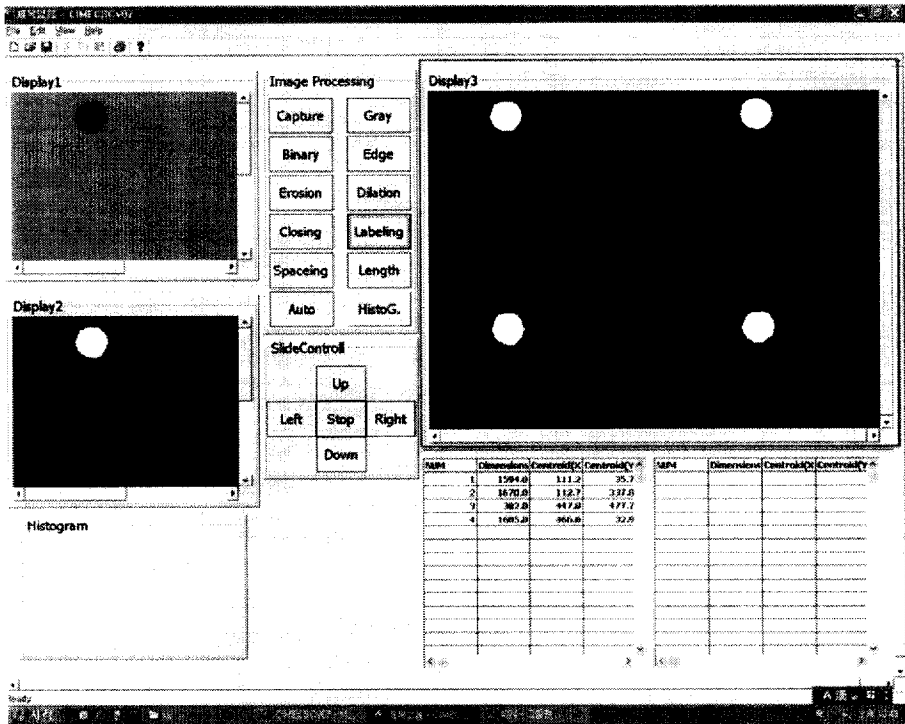


Fig. 3.20 Image after labeling operation

위에서 기술되어진 Fig. 3.20를 통해 4개의 spot에 대한 번호와 도심의 좌표를 알 수 있다. 또한 앞 단원에서 소개되어졌던 것처럼, 프로그램의 오른쪽 하단에 있는 그리드에 저장되어 Fig. 3.21과 같이 나타난다.

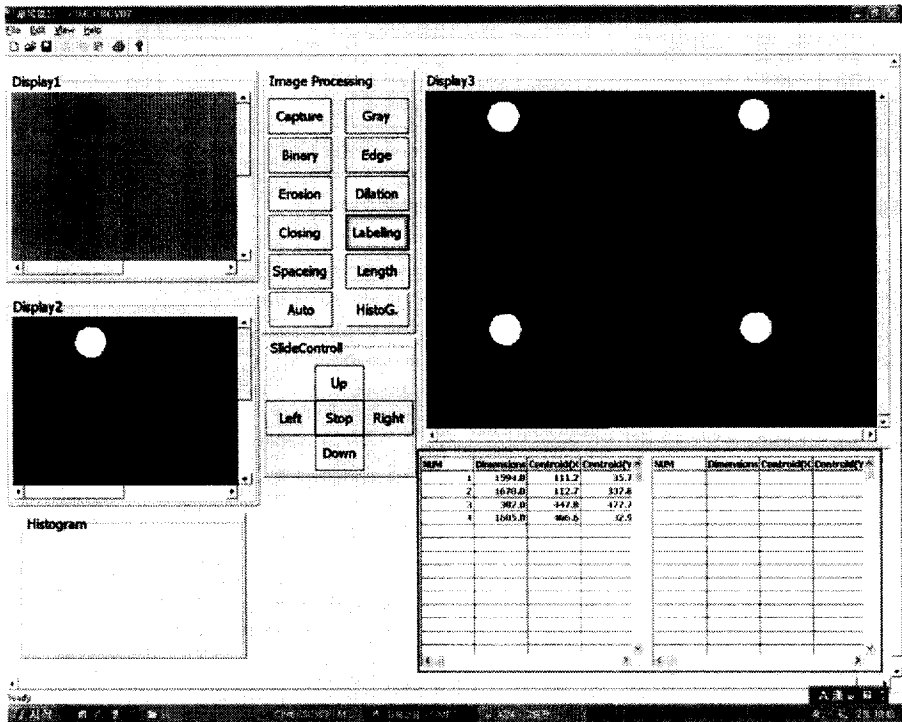


Fig. 3.21 Information grid for observation points

7) 관측점 도심계산법

본 논문에서는 spot의 면적 및 spot과의 거리를 측정하는데 도심을 사용하였다. 관측점에 대한 초기데이터의 도심과 실시간으로 측정되는 도심 간의 픽셀차이를 실제거리로 환산하여 변위를 측정하였다. 관측점의 도심을 구하기 위해서 관성 모멘트법을 적용하였다. Fig. 3.22과 아래의 식은 관성모멘트에 대해서 언급하고 있다.

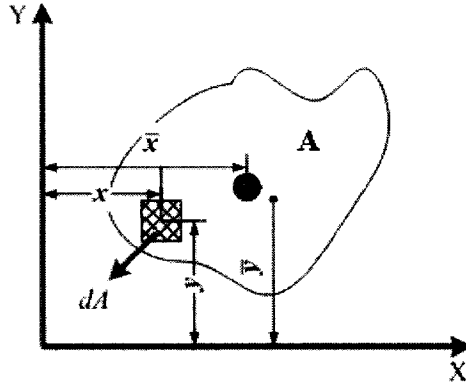


Fig. 3.22 Schematic description of inertia moment

여기서, M_x 와 M_y 는 x 축방향과 y 축방향으로 면적 A 에 대한 각각의 면적1차모우멘트를 나타내며 다음 식과 같이 표현된다.

$$\left. \begin{aligned} M_x &= \int_A x dA = \bar{x} A \\ M_y &= \int_A y dA = \bar{y} A \end{aligned} \right\} \quad (3.18)$$

위 식에서 $\bar{x}$, $\bar{y}$ 는 전체면적의 도심좌표를 나타내며 식(3.18)를 다시 표현하면 다음과 같은 식이 된다.

$$\left. \begin{aligned} \bar{x} &= \frac{1}{A} \int_A x dA = \frac{\int_A x dA}{\int_A dA} \\ \bar{y} &= \frac{1}{A} \int_A y dA = \frac{\int_A y dA}{\int_A dA} \end{aligned} \right\} \quad (3.19)$$

위 식에서 알 수 있듯이 도심을 구하기 위해서는 물체의 총면적을 구해야 한다. 식(3.19)을 영상인식과정인 라벨링 알고리즘 내에 적용하여 관측점들의 면적을 구하고 픽셀좌표를 이용하여 도심을 구해낸다.

3.3 개발되어진 영상처리 알고리즘의 검증

본 단원에서는, 개발되어진 영상처리 알고리즘의 유효성을 검증하고자, DNA chip scanner 시스템에 적용하기 위한 전단계로서 USB 카메라를 이용하여 아래의 Fig. 3.23같은 시험용 계측 모형을 이용하여 시험을 실행하였다.

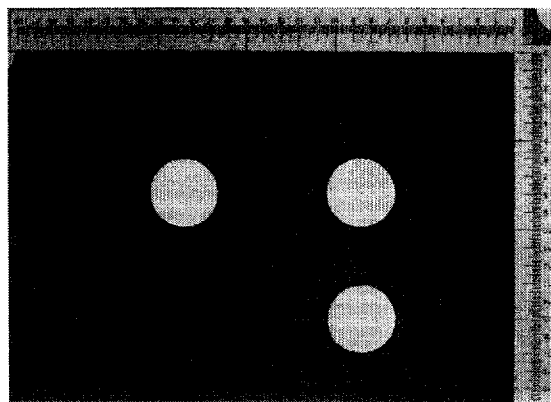


Fig. 3.23 Test measure model

위의 Fig. 3.23에서, 우리는 관측점과 기준점이 일정한 간격으로 배치되어 있는 것으로 볼 수 있다. 특히 오른쪽과 위쪽에 자를 부착하여 정확한 크기와 위치를 구할 수가 있도록 하였다. 따라서 본 실험을 통하여 제안되어진 영상처리 알고리즘의 유효성이 어느 정도인지 판단할 수 있을 것이다. 실험을 위하여 비교적 가격이 싸고 간단한 USB카메라를 사용하였으며 실험을 위한 구성은 Photo 3.1과 같이 구성 되어진다. 여기에서 사용되어진 USB 카메라와 계측모형 사이의 거리는 0.5m로 설정되어졌다.

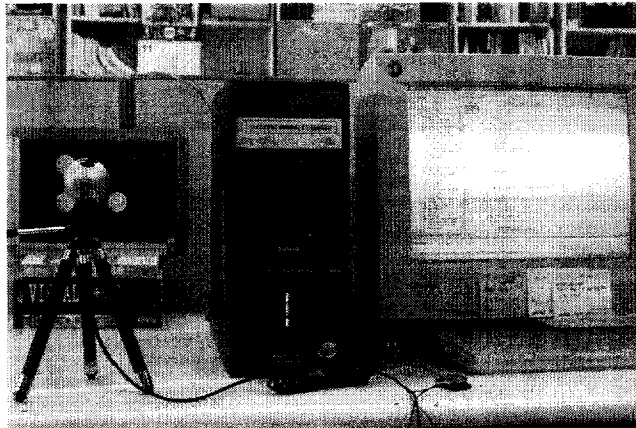
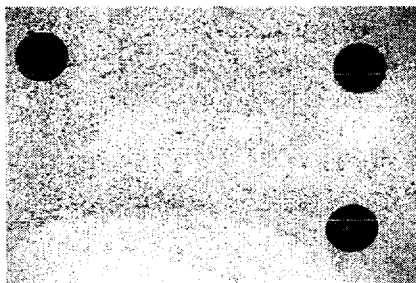


Photo 3.1 The configuration of measurement system

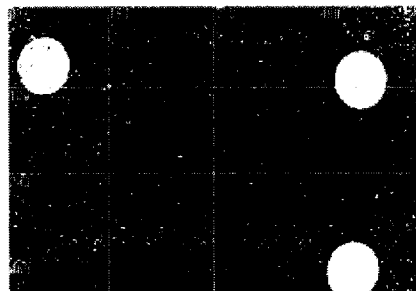
이러한 실제 시스템에 대한 실험결과는 Fig. 3.24에서 나타내어진 것처럼, 본 연구에서 개발되어진 영상처리기법을 이용한 관측점 인식과정을 순서적으로 나타내고 있다.



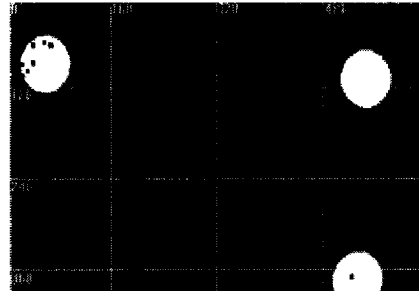
(a) Installed observation points



(b) Gray image



(c) Binary image



(d) Erosion image

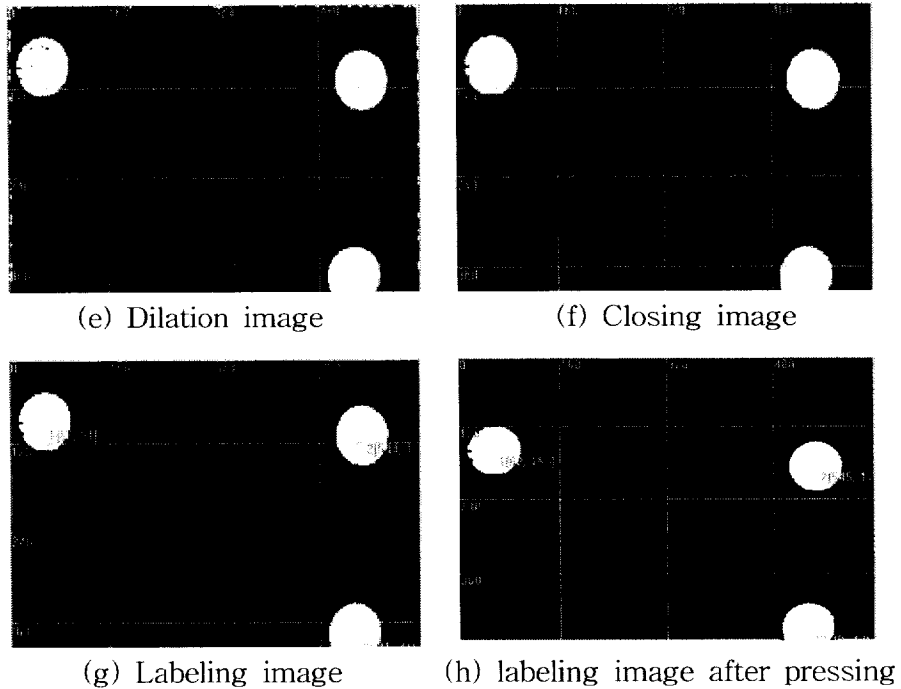


Fig. 3.24 The recognition procedure of variation of observation points in experimental apparatus

특히, Fig. 3.24 (g)는 세 개의 물체가 인식되었다는 사실을 알 수 있고, (h)에서는 모형에 압축을 가한 후에 관측점을 인식한 결과를 나타내고 있다. 또한 관측점들의 초기데이터와 변위가 발생한 뒤의 비교데이터의 값들은 Fig. 3.25와 같이 나타내어진다.

Initial Data				Comparison Data			
Num	Dimensions	Centroid	▲	Num	Dimensions	Centroid	▲
1	5063	(62, 91)		1	5066	(62, 150)	
2	5153	(544, 111)		2	5150	(545, 171)	
3	5005	(531, 375)		3	5005	(530, 436)	

Fig. 3.25 An initial data and comparison data

Fig. 3.25로부터 각각의 관측점들은 y 축 방향을 60픽셀씩 움직인 것을 알 수 있다. 관측점들의 면적이 약 5000픽셀이므로 Table 3.1을 참고하면 약 0.6cm씩 이동한 것을 알 수 있다. 즉, Table 3.1은 면적에 대한 1mm당 픽셀 수를 나타낸 것이다.

Table 3.1 Pixel accuracy

Pixel numbers	mm accuracy per pixel
1000	0.25
1500	0.2
2100	0.1667
2700	0.143
3100	0.136
3500	0.125
4000	0.119
4500	0.114
5000	0.111
over 6500	approximately 0.1

Table 3.1에서 알 수 있듯이 화면상에서 관측점의 픽셀면적(pixel area)을 크게 하면 할수록 정밀도는 좋아지는 것을 알 수 있으며, Fig. 3.26는 이러한 결과를 막대그래프로서 간단하게 표현할 결과이다.

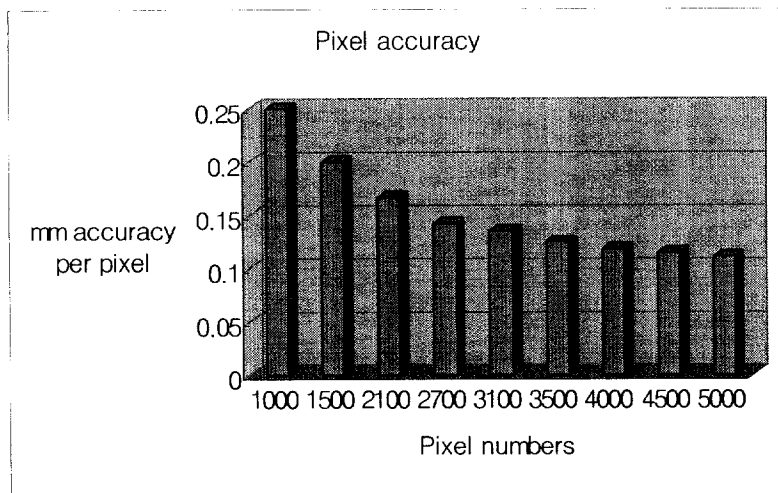


Fig. 3.26 Pixel accuracy graph

이러한 실험결과를 통하여 본 논문에서 사용한 영상처리 알고리즘의 정밀도가 약 0.12mm까지 가능한 것을 알 수 있다. 또한 위 실험에서 사용된 모든 관측점을 측정하는데 걸린 시간은 30초 이내의 시간이 소요되었다.

이와 같은 실험결과를 통하여 줌 카메라를 이용함으로써 거리에 많은 제약을 받지 않으면서 영상처리를 동시에 실시간으로 움직이는 물체에 대한 계측이 가능하도록 설계되어진 영상처리 알고리즘의 유효성을 검증할 수 있었다. 또한 계속적인 반복 실험을 통하여 카메라의 성능과 이미지 그레이보드의 성능이 시스템의 정밀도에 많은 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었으며, 실제로 DNA chip scanner 개발을 위하여 요구되어지는 영상처리 알고리즘을 검증할 수 있었다.

3.4 결 언

본 단원에서 제안되어진 영상처리 알고리즘은, USB 카메라를 이용하여 Fig. 3.23와 같은 시험용 계측 모형을 이용하여 시험을 실행한 결과로서 추후에 개발되어질 DNA chip scanner를 위한 영상처리 알고리즘의 유효성을 검증하기 위한 연구 결과이다. 본 단원에서 우리는 제안되어진 영상처리 알고리즘이 실시간적으로 움직이는 다수의 물체들을 동시에 검출할 수 있음을 확인하였다.

또한 실제 실험결과를 통하여 약 0.12mm의 정밀도를 구현 하였으며 화면상에 나타나는 관측점의 픽셀면적을 크게 할수록 정밀하다는 것을 알 수 있었고 본 실험에서는 언급하지 않았지만 이상적인 실험환경에서는 0.0256mm까지의 정밀도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 다음 장에서 소개되어질 DNA scanner 시스템은 줌 카메라를 사용하고 있으므로 정밀도 구현에 줌이 가능한 범위내의 모든 대상물을 관측할 수 있어 아주 정밀하게 계측하는데 효과적이라고 할 수 있다. 본 단원에서 개발되어진 영상처리 알고리즘을 DNA chip scanner 개발에서 가장 중요한 요소라고 할 수 있는 영상처리 부분에 적용한 결과를 다음 단원에서 도출하도록 한다.

제 4 장

DNA Chip Scanner 개발

4.1 서 언

먼저 DNA chip을 제작하기 위한 첫 번째 단계로서 micro-arrayer 시스템을 개발한 연구결과를 2장에서 기술하였고, 3장에서는 DNA chip scanner 시스템을 제작하기 위한 중요한 연구단계인 영상처리 알고리즘 개발에 대한 연구결과를 함께 서술하였다. 이러한 연구결과들을 바탕으로 하여, 본 단원에서는 DNA chip을 분석하는 중요한 장치인 DNA chip scanner 시스템의 원리 및 설계 결과를 기술하고자 한다. 특히 앞서서 언급 되어진 것처럼, DNA chip 혹은 DNA micro-arrayer 시스템은 기계 자동화와 전자 제어 기술 등을 이용하여 적게는 수백 개부터 많게는 수십만 개의 DNA를 유리 박편에 매트릭스 형태로 심어 놓는 것을 의미하므로, 이때 고정된 DNA들의 발현정도를 측정하기 위해 특정한 염기에 레벨링(labelling)한다고 정의되어졌다. DNA micro-array chip은 독성물질이나 질병에 오염된 염기와 정상적인 염기를 다르게 레벨링하여 대조군과 측정군 사이의 양을 측정하게 된다.

레벨링은 두개의 다른 환경에서 얻은 세포들로부터 mRNA를 추출하여 이들을 역전사(reverse transcription)시킬 때 각각 다른 색깔의 형광 물질을 띤 염기를 투입하여 빨간색(Cy5)이나 녹색(Cy3)을 띤 cDNA를 합성한다. 이와 같이 합성된 두개의 cDNA를 혼합하여 hybridization한다. 특히 각각의 형광정도는 그 유전자의 발현 정도를 알려주는 것으로 형광의 양과 상대적인 비율을 산출하여 유전자의 발현의 증감을 정하고, 다수의 유전자를 동시에 분석하여 다음의 발현 패턴을 도출할 수

있다. 그리고 형광량으로 표현되는 발현정도를 받아들이고 이들 정보를 분석하는 것이 DNA chip scanner 시스템이다. DNA chip scanner 시스템은 모든 독성물질과 질병에 대하여 수천 개 이상의 유전자 발현변이를 단지 한 번의 실험으로 검색하고 DB 시스템으로 서로 다른 발현 패턴을 대응시킬 수 있다. 이때 DNA chip scanner 시스템은 사실상 DNA micro-array chip을 하나의 이미지로 처리하는데 보통 2백만 이상의 픽셀(pixel)을 가져, 그 용량이 방대하므로 정확한 발현 정도 측정을 위해서 효율적인 이미지 처리(image processing) 방법이 필요하게 된다.

또한 DNA chip의 유전자의 발현을 검출위한 방법으로는 전기화학적인 검출 방법과 레이저 유발 형광법(laser induced fluorescence) 등이 있다. 이러한 방법 중에서, 현재 가장 많이 쓰이는 DNA chip검출방법은 레이저 유발 형광법이다. 이 방법은 형광에 의한 검출한계가 낮고 비교적 배경(background)에 의한 잡음(noise)도 작다는 장점이 있기 때문에 가장 많이 이용되어지고 있는 방법이다. 그리고 형광물질 사용의 매력은 pad-material의 호환성과 한 번에 여러 대상을 검색할 수 있다는 장점도 함께 가지고 있다.

또한 최근 BMS사에서 white light source를 이용한 형광 유발법을 이용하여 DNA chip을 검출하는 제품을 개발하였다. 원래 white light source를 이용한 형광 유발법은 형광현미경에서 사용되는 방식으로 neroband 필터 설계의 까다로움으로 인하여 형광의 밴드를 맞추기가 어렵거나 필터의 가격이 올라가는 단점이 있어 형광량이 적은 DNA chip 검출방법에는 잘 사용이 되지 않는 방법이다. 또한 현재 국내에서는 90% 이상의 투과율과 원하는 밴드대만 선택할 수 있는 필터를 제작하기는 어려운 것으로 판단되어진다.

아래에서 기술한 Table 4.1은 현재 시중에 사용되고 있는 제품들에

대한 성능 및 특성을 간략하게 비교 분석 한 것이다.

Table 4.1 Performances and characteristics of the open market products

형광 Detection 방식	PMT 방식	Virtek DNA ChipReader™ Genepix 4000B(AXON) FMBIO III
	CCD 방식	CRBIO IIe ArrayWoRx
Excitation source의 종류	Laser	Virtek DNA ChipReader™ Genepix 4000B(AXON) FMBIO III CRBIO IIe
	White Light	ArrayWoRx
Dye의 교체 가능 유/무	유	ArrayWoRx CRBIO IIe Genepix 4000B(AXON)
	무	Virtek DNA ChipReader™ FMBIO III
광표백 현상 고려 유/무	유	ArrayWoRx Virtek DNA ChipReader™ Genepix 4000B(AXON)
	무	FMBIO III CRBIO IIe

위에서 기술되어진 기존제품의 여러 가지 성능 및 특징을 분석하여, 본 논문에서는 Table 4.2와 같은 성능을 가지는 제품개발을 목표로, 일반적인 연구관련 실험실에서 쉽게 사용할 수 있는 저가형 DNA scanner

개발을 목표로 한다.

Table 4.2 Specification of developed DNA scanner

형광 Detection 방식	CCD 방식	- PMT의 단점인 background artifact를 없애기 위해 CCD방식을 채택 - 줌 렌즈와 2축 매니퓰레이터를 이용하여 panel 단위 스캔 방식을 채택하여 resolution을 높임
Excitation source의 종류	Laser	- White light source를 이용하기 위해서는 neroband 필터가 필요하나, 현재 국내에서 제작이 어려운 것으로 판단됨 - 따라서 532nm와 635nm의 두 파장대의 레이저 및 고역통과필터를 사용함
Dye의 교체 가능 유/무	유	- Cy3, Cy5 2개의 Dye를 사용 가능

4.2 시스템의 원리

DNA chip은 하나의 chip으로 가능한 많은 정보를 다루기 위해 좁은 면적에 고밀도로 여러 probe들이 놓여있다. 또한 DNA sequence 정보가 늘어남에 따라 그 집적도가 더욱 높아질 추세다. 따라서 이를 정량적으로 빠르고 정확하게 검출하는 새로운 방법이 요구되어진다.

현재 이러한 검출방법은 주로 레이저 유발 형광법(laser induced fluorescence)이 사용 이용되고 있으며, 또 다른 방법으로는 전기 화학적 검출 방법으로서 CMS(Clinical Micro Sensors)에서 개발한 이 방법은 전이금속착물을 이용한 것으로 probe나 target에 별도의 fluor tag 없이 검출이 가능하다.

1) 전기신호를 이용한 방법

CMS에서 개발한 이 방법은 형광이 아닌 전기신호를 이용하여 hybridization을 검출한다. 여기서는 capture probe나 target probe에 fluor tag를 미리 붙이는 과정이 필요 없고, 전이금속착물 같은 산화환원 활성물질들을 특정위치에 선택적으로 붙인다. 즉, electron donor와 electron acceptor moiety를 RNA의 미리 정한 특정위치에 공유 결합시킨다. 여기에 target sequence가 hybridization되었을 때와 그렇지 않았을 때의 전자전달 속도를 측정하여 hybridization을 검출한다. 또한 이 방법으로 SBPM(Single Base Pair Mismatch)도 구분할 수 있을 것으로 기대되는데, 완벽한 상보적인 결합을 이룬 것과 중간에 mismatch가 있는 것과는 전자전달속도가 다를 것이기 때문이다. 이렇게 전자전달속도가 다른 이유는 dsDNA(double stranded DNA)의 경우 base pairs들이 stacking 되어 π -orbitals을 통해 전자들이 잘 이동할 수 있다는데 있다고 한다. 전자전달속도에 영향을 주는 요인으로는 electron donor와

acceptor 사이의 거리, 반응의 자유에너지, 재조직에너지, 방해물질의 영향, donor와 acceptor의 배향과 전기적 짝지음 정도 그리고 base 간의 수소결합을 들 수 있다.

2) 레이저 유발 형광법(Laser induced fluorescence)

현재 가장 많이 사용되고 있는 방법이 레이저 유발 형광법을 이용한 검출 방법이다. 이러한 형광방법이 주로 많이 이용되는 이유는 형광에 의한 검출한계가 낮고, 비교적 배경에 의한 잡음도 작다는 이점이 있기 때문이다. 그리고 형광물질 사용의 매력은 pad-material의 호환성과 한 번에 여러 대상을 검색할 수 있다는 것이다. 보통은 dye로 Cy3나 Cy5를 사용하며, 이런 형광 물질들을 excitation 시키기 위해 주로 YHeNe(543nm), RHeNe(633nm) laser를 사용한다. Cy3의 흡수파장은 550nm이고 fluorescence emission 파장은 570nm이며, Cy5의 경우는 흡수가 649nm, 방출이 670nm이다. Detection에는 confocal laser scanning system이나 CCD 등이 쓰이고 각각을 이용한 scanner들이 GSI Lumonics, Axon, Virtek 등의 회사에서 많이 나와 있다. 그러나 target probe에 fluor. tag를 붙이는 과정이 필요하고, scanner들이 PMT 혹은 고가의 CCD 카메라를 사용하여 상대적으로 고가이기 때문에 단점이 되고 있다. Fig. 4.1은 레이저 형광 유발법을 사용한 시스템의 원리도이다.

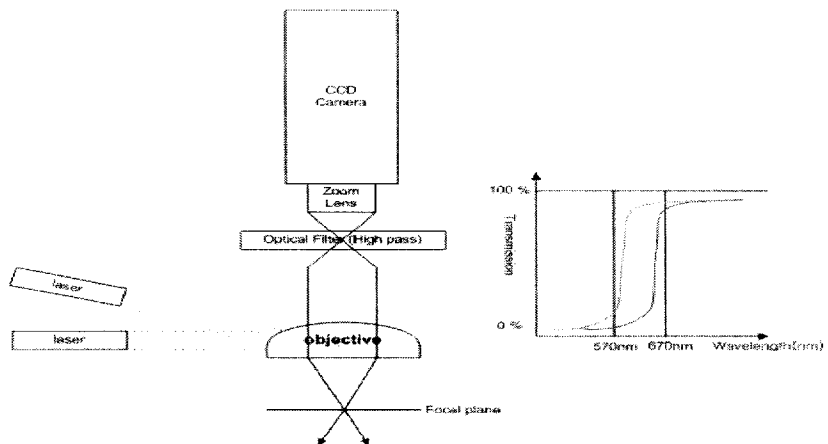


Fig. 4.1 The system principle of laser induced fluorescence

4.3 DNA Chip Scanner 시스템 구성

본 연구에서 개발되어질 DNA chip scanner 시스템의 구성은 크게 다음과 같은 두 가지로 구성되어진다.

- (1) 영상처리 부분을 담당하는 소프트웨어 부분
- (2) DNA chip의 영상을 획득하여 처리하는 하드웨어 부분

여기에서 영상을 획득하기 위하여 구성되어진 하드웨어 부분은 직교 형태의 2축 매니플레이터와 영상을 검출하기 위한 CCD camera, 레이저 다이오드(laser diode), 광학 필터(optical filter) 등으로 구성되어진 시스템을 제어할 수 있는 PIC16F877 마이크로 컨트롤러(micro controller) 및 CCD camera로 받아들여진 정보를 처리, 저장 및 데이터베이스(database)화하는 메인 컨트롤러로 구성되어진다. Fig. 4.2와 Fig. 4.3에서 개발되어질 DNA chip scanner의 개략도 및 구성도를 표시한다.

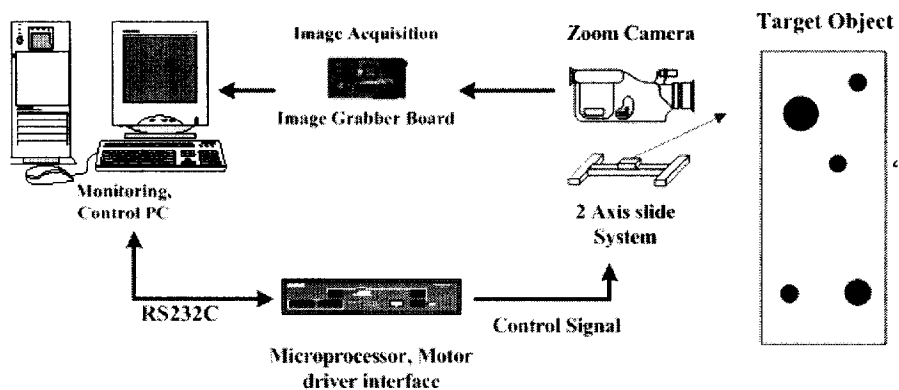


Fig. 4.2 Schematic configuration of developed DNA chip scanner

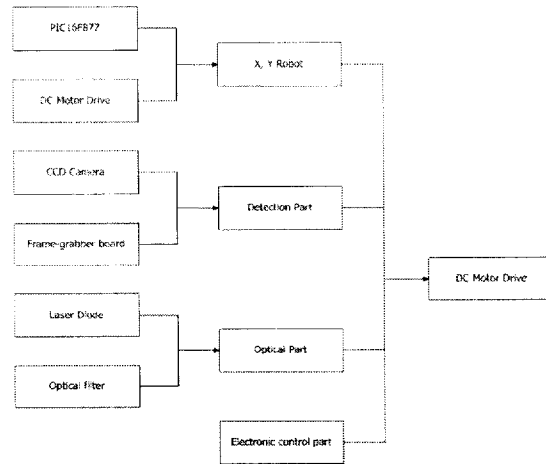


Fig. 4.3 The composition elements of DNA chip scanner

1) 시스템이 기구학적 구성

Fig. 4.4는 개발되어질 DNA chip scanner 시스템의 기구학적 구성을 나타낸다.

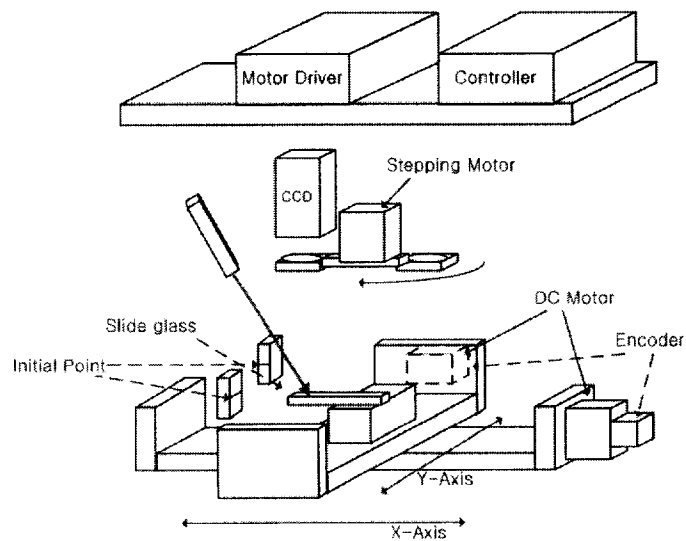


Fig. 4.4 Schematic diagram of DNA chip scanner

또한 본 연구에서 개발되어진 실제 DNA chip scanner 시스템을 Photo 4.1에서 보여준다. 특히 개발되어진 시스템은 실제 실험현장에 적용할 수 있도록 하기 위하여 컨트롤러 부분을 구동 시스템 위에 설치하였다. 또한 개발 시스템의 부피를 최대한 작게 설계하기 위하여 메인 프로세서는 원칩 마이크로 프로세서를 이용함으로써 개발제품의 부피를 최소화하였다.

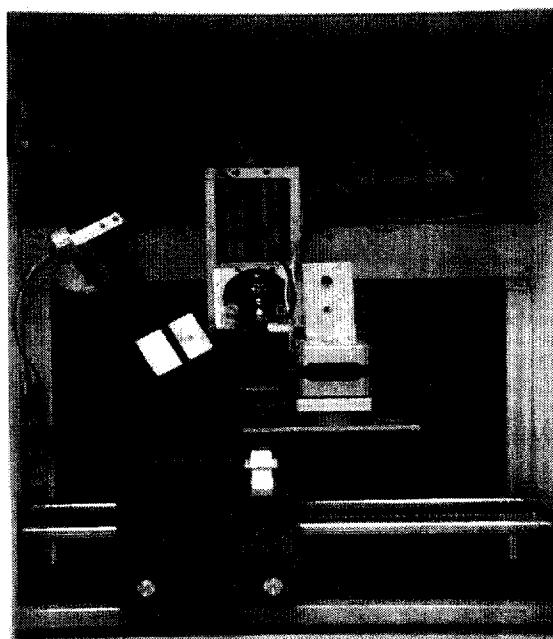


Photo 4.1 Developed DNA chip scanner system

더불어서 레이저 유발 형광법에 따라 형광물질을 발현시키기 위해 laser diode를 사용하였다. 이때 형광물질을 자극시키기 위한 laser로 YHeNe(543nm), RHeNe(633nm) laser를 사용하였으며, 발현되어진 형광을 검출하는 과정에서 오차와 백그라운드 노이즈를 줄이기 위해서 광학필터를 사용하였다. 사용되어진 광학필터는 각각 670nm, 570nm를 통

과 시키는 2개의 고역통과 필터로서, 두 개의 필터는 각각의 색상에 대한 파장을 통과시키며 다른 파장을 차단시킨다. 형광물질의 종류에 따라 광학 필터를 교체 시켜야 하므로 스테핑 모터를 사용하여 DNA chip에 사용된 형광물질의 종류들(Cy3, Cy5)에 따라 자동으로 교체가 가능하도록 하였다.

이러한 광학필터를 통해 걸러진 이미지는 CCD 카메라를 이용하여 획득한다. CCD 카메라는 이미지 센서를 통해 빛의 양을 아날로그 신호로 전환하는 소자이다. 그러나 CCD 카메라는 착상 소자의 해상도 한계를 가지고 있고 DNA chip의 피사체는 상대적으로 너무 작으므로, 이때 영상의 해상도를 높이기 위해 줌 렌즈를 장착하여 슬라이드의 영상을 좁은 영역으로 나누어 획득하도록 구성하였다.

분할되어 있는 DNA chip 영상의 전체를 획득하기 위해 2축 매니플레이터를 설계하였다. 이때 카메라의 초점은 일정하게 유지하기 위해 고정시키고 슬라이드 글라스를 취부 시키는 부분에 2축 매니플레이터를 장착하였다. 2축 매니플레이터는 DNA chip의 슬라이드 글라스를 움직여 CCD 카메라의 촬영 위치를 결정하고, DC모터와 엔코더의 값을 통해 제어되어지며 마이크로 컨트롤러의 제어 알고리즘으로 일부가 촬영되는 DNA chip을 체계적으로 움직여 CCD 카메라가 전체적으로 촬영할 수 있도록 구성하였다. 이렇게 획득한 각각의 영상 전체 DNA chip의 영상으로 재구성되어지며, 재구성된 영상을 영상처리를 위한 소프트웨어를 통하여 분석하는 이미지 프로세싱 소프트웨어(image processing software)로 구성되어 있다. 마지막으로, 이러한 각각의 영상을 획득 하고 통합하였을 때 영상의 정보를 보정(calibration)하는 작업이 필요하다.

가. 2축 직교 매니플레이터

CCD 카메라의 해상도는 CCD 카메라가 표현하는 이미지의 정밀도로써 표현 가능한 픽셀(pixel)의 양이다. 개발되어진 scanner 시스템에 사용되어진 CCD 카메라는 640*480의 해상도(resolution)를 가진다. CCD 카메라를 통하여 획득되어진 영상은 가로 12.55mm, 세로 9.4mm의 크기를 가지므로, 시스템의 1 픽셀의 크기는 0.02mm의 크기를 가진다. Line scanning 과정에서, 검출되어진 영상의 정밀조합을 위하여 2축 구동 매니플레이터도 그에 상응하는 정밀도를 유지할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구에서 사용되어진 2축 구동 매니플레이터의 pitch 간격은 5mm(P), 매니플레이터를 구동하기 위한 DC 모터 감속기의 감속비 1/10(R), 엔코드(encoder)의 펄스량 1800 pulse(P)이므로 2축 구동 매니플레이터의 최대정밀도는 1/3600mm이다. 그러므로 본 연구에서는 영상 최소단위인 1픽셀의 크기에 맞추어 0.02mm의 정밀도로 시스템을 제어할 수 있도록 구성되어졌다.

나. CCD 카메라와 레이저 시스템

영상 검출을 위하여 필요한 하드웨어 구성은 Photo 4.2와 Photo 4.3과 같다. 여기에서, 아날로그 영상 신호를 받아들이는 CCD 카메라와 대상물체의 관측점을 확대하여 더 정확하고 정밀하게 얻기 위한 줌 렌즈, 아날로그 신호를 디지털로 바꾸는 이미지 그래버 보드(image grabber board)로 구성되어진다.

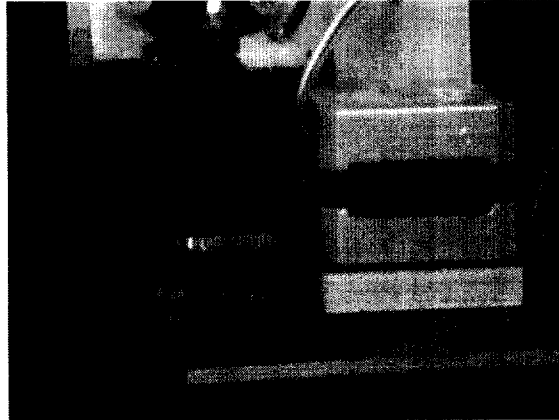


Photo 4.2 CCD camera and optical filter

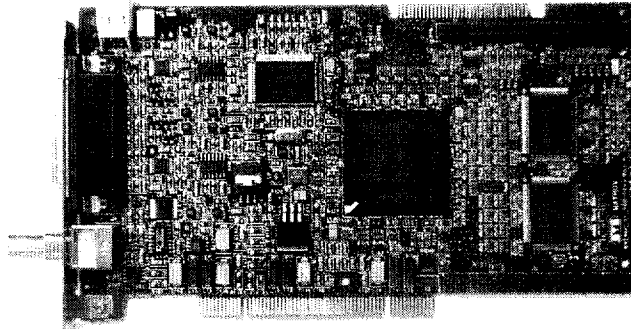


Photo 4.3 Frame grabber board

Table 4.3은 본 시스템에서 사용된 영상장치(CCD 카메라, 그래버 보드)들의 시스템 사양들을 구체적으로 기술하고 있다. 이러한 영상처리를 일반 시스템들은 다음과 같은 특징들을 고려하여 선택되어졌다.

- (1) 일반적으로 CCD 카메라는 컬러가 지원되며 노이즈(noise)가 많지 않는 제품으로 선택하는 것이 좋으며 줌 렌즈는 광학 줌이 많이 되는 것이 좋지만 적용할 구조물에 맞는 것을 고르는 것이 무엇보다도 중요하다.

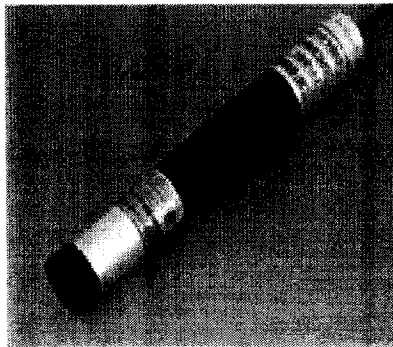
(2) 이미지 그레버 보드는 컬러를 지원하면서 프레임메모리가 많으며 처리속도가 빠른 것을 선택하는 것이 바람직하다.

Table 4.3 System configuration of vision devices

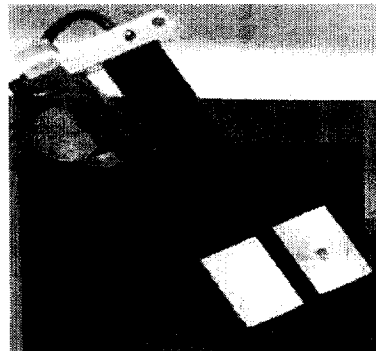
Item	Model	Specification
CCD camera	VQ33C-CM	▪ Imager : 1/3 " IT DSP color CCD ▪ Horizontal resolution 380TV lines ▪ Sensitivity: 0.5 lux at F1.4 ▪ Video output: 1Vp-p 75ohm composite ▪ S/N ratio(AGC off): More than 50dB ▪ Auto exposure: 1/50, 1/60~1/100,000esc ▪ Smear effect 0.005% ▪ AWB: Aouto. 2800°K~8200°K
Frame-grabber board	Meteor-II	▪ Analog composite(CVBS) or Y/C NTSC/PAL ▪ Analog composite RS-170/CCIR ▪ Supports VCRs ▪ Square pixel or CCIR-601 digitization ▪ Pixel jitter : 4~5ns ▪ Programmable gamma correction table ▪ RGB 8:8:8 or YUV 4:2:2 pixel formats

본 논문에서는 Cy5를 사용한 DNA chip을 제작하여 사용하였으며 추 후에 연구 영역의 확대를 위하여 Cy3에 대한 시스템을 병행하여 구성 하였다. 이런 dye들을 여기 시키기 위해 주로 YHeNe(543nm), RHeNe(633nm) 레이저를 사용하였다. 여기에서, Cy3의 흡수파장은 550nm이고 fluorescence emission 파장은 570nm이며, Cy5의 경우는 흡 수가 649nm, 방출이 670nm이다. Photo 4.4 (a)와 (b)는 개발되어진

scanner 시스템의 레이저 다이오드 모듈(laser diode module)이고, Table 4.4는 본 연구에서 개발되어진 시스템에서 사용된 레이저 다이오드 제품사양을 나타내고 있다.



(a) 633nm laser module



(b) Installed laser module

Photo 4.4 Laser diode module

Table 4.4 Specification of laser module

Model	3LTIM-310 (3-Laser Ltd.)	LM-6315GH (Raynixs Ltd.)
Optical Power	-3mW	-10mW
Wavelength	532±5nm	635±5nm
Beam Diameter	1mm	5×2mm
Beam Divergence	2mrad	0.5mrad
Dimension	Φ12×58mm	Φ16×100mm
Input Voltage	DC 5V	DC 24V
Operating Teperature	20-25℃	-10-45℃
Housing Material	Aluminum	Aluminum
Remark	Green Laser	Red Laser

다. Laser의 최적 위치 선정

DNA scanner 시스템 설계에 있어서 가장 중요한 요소 중의 하나는, DNA chip상의 레이저 유발 형광법에 따라 형광물질을 발현시키기 위하여 실제 사용되어질 레이저의 적절한 위치 선정이 무엇보다도 중요한 요소이며 이러한 위치 선정에 대한 제한 요소들은 다음과 같이 요약되어질 수 있다.

- (1) 레이저 빛의 반사 현상
- (2) 레이저 빛의 투과 현상
- (3) 레이저 빛의 산란 현상

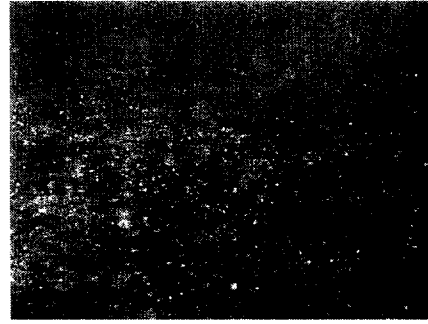
특히, 본 연구에서 레이저 형광법은 위에서 기술되어진 현상들을 통하여 발생하는 배경잡음(background noise)들을 제거하기 위하여 레이저 위치의 최적화가 요구되어진다. 따라서 본 연구에서 개발하고자 하는 DNA scanner 시스템에서 레이저의 최적 위치를 선정하기 위하여 아래와 같은 두 가지 형태의 연구를 수행하였다.

■ 광학필터를 이용하지 않은 경우

Fig. 4.5는 광학 필터를 사용하지 않고 개발되어진 DNA scanner 시스템에서 레이저의 위치별 획득 영상에 대한 실험결과이다. 특히 본 실험을 통하여, 우리는 영상획득을 위한 최적의 레이저 위치를 선정할 수 있다. 또한 레이저의 최적 위치는 본 논문에서 개발되어진 2축 직교 매니퓰레이터와 0°을 이루도록 구성함으로써 배경잡음을 최소로 제거할 수 있게 되었다.



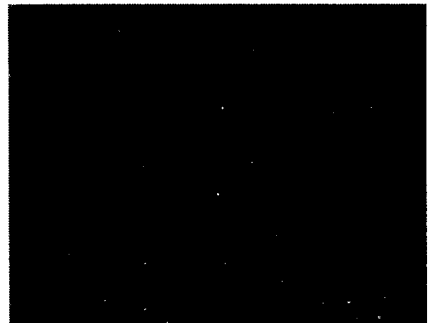
(a) 60°



(b) 45°



(c) 30°



(d) 0°

Fig 4.5 Acquired images without optical filter

■ 광학필터를 사용한 경우

위의 Fig. 4.5에서 언급되어진 것처럼, 광학필터를 사용하지 않고서도 레이저의 최적 위치를 선정함으로서 배경잡음을 제거할 수 있음을 보였다. 그러나 이러한 결과만으로는 개발하고자 하는 DNA scanner 시스템의 성능을 만족시키기에는 불충분하다. 그러므로 개발하고자 하는 시스템의 성능을 향상시키기 위하여, 본 연구에서는 광학 필터를 부착한 DNA scanner 시스템에서 레이저의 위치별 획득 영상에 대한 실험을 수행하였다. 이러한 실험 결과들은 Fig. 4.6에서 보여지고, 이러한 실험 결과를 통해서도 레이저의 최적 위치는 2축 직교 매니퓰레이터와 0° 을

이루도록 구성함으로서 배경잡음을 최소화 할 수 있음을 알 수 있었다. 더구나 광학 필터를 사용한 실험결과에서는, 광학 필터를 사용하지 않은 경우와 비교하여 배경 잡음을 대부분 제거할 수 있으므로 DNA chip 해석을 위한 영상처리 알고리즘 개발을 위한 중요한 요소로서 작용되어질 수 있다.

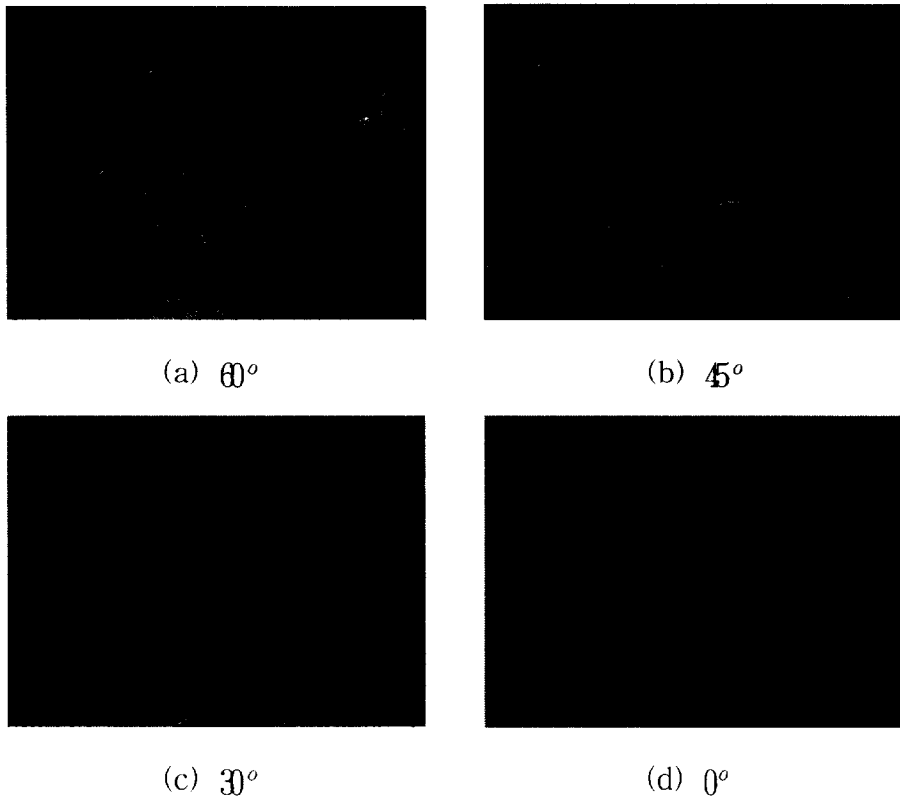


Fig 4.6 Acquired images with optical filter

2) 제어계 구성

PIC16F877 칩셋은 미국 마이크로칩 테크놀로지사(Microchip Technology Co.)에서 개발한 소형이면서 주위에 전원과 크리스털 발진자만 접속하면 입출력포트를 개별로 프로그램 제어가 가능하며, 최고 20MHz로 고속이며 전지 구

동도 가능한 저소비 전력형이다. 또한 $8K \times 14$ words 의 플래쉬 메모리를 가지고 있으며 368×8 bytes의 램과, 256×8 bytes의 EEPROM 데이터 메모리를 갖고 있다. 16비트 카운터는 1개, 8비트 카운터 2개로 총 3개의 카운터를 가지고 있고 RA-RE까지 모두 5개의 포트를 제공하고 있다. Photo 4.5는 본 연구에서 사용되어진 PIC16F877로 구성한 Controller Board를 나타내며, 여기에서 표시되어진 주요부분은 다음과 같이 간략하게 요약되어질 수 있다.

- ① Controller part(PIC16F877)
- ② Motor drive part(LMD18200)

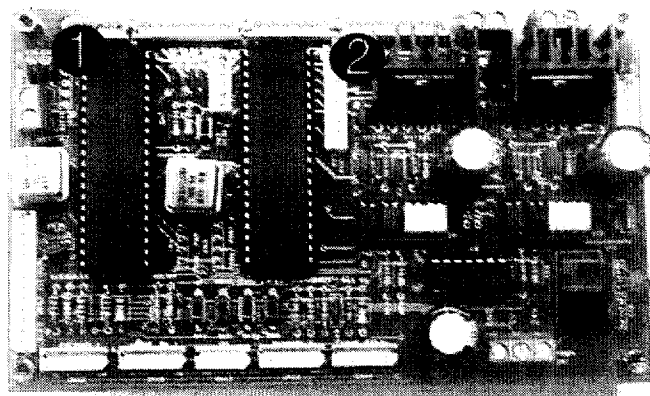


Photo 4.5 PCB controlled board using PIC16F877

컨트롤러 보드는 2축 구동 매니퓰레이터의 회전 동력원으로 DC 모터를 사용하였으므로 DC 모터의 속도와 방향을 제어하기 위하여 LMD18200(National Semiconductor Ltd.) 모터 드라이브 모듈을 포함하고 있다. LMD18200은 DC 모터를 구동하기 위한 모터 드라이브 구성이 간단하고 3A, 55V까지 적용이 가능하여 본 연구과제에 적합한 모듈이라 판단하여 적용하였다. Fig. 4.7과 Fig. 4.8은 본 논문에서 개발하여 사용되어진 PIC16F877의 pin 다이어그램 및 컨트

롤러 보드의 모터 드라이브 구성을 나타낸다. 또한 Table 4.5는 PIC16F877의 사양을 간략하게 기술하였다.

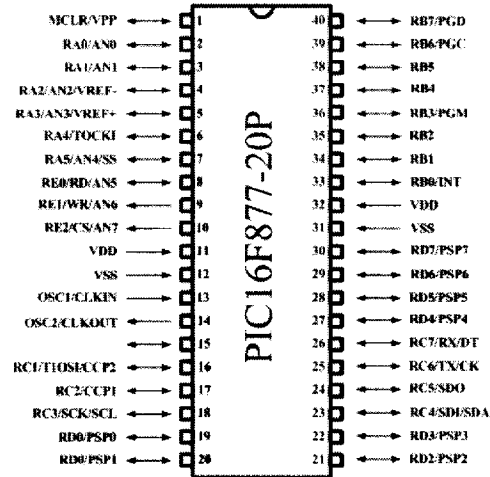


Fig. 4.7 Pin diagram of PIC16F877

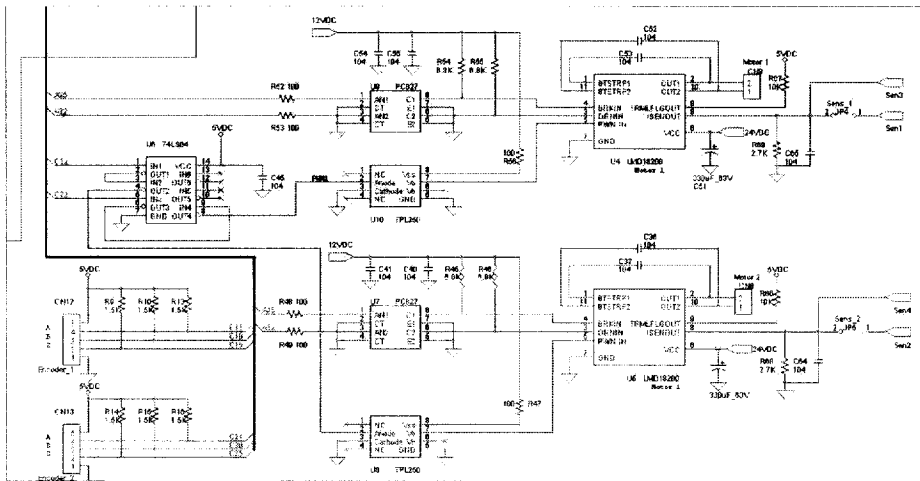


Fig. 4.8 Motor driver circuit

Table 4.5 PIC16F877 specification

Index	Functions and features
PIC16F877	· 고성능 RISK CPU · 8비트 데이터 전송 및 5개의 I/O · 동작 전압 2.2V~ 5V · 워치도그 타이머(Watchdog Timer) · 세 개의 16비트 소프트웨어 타이머 (Software Timer) · 두 개의 16비트 타이머(Timer1, Timer2) · 최대 368K 바이트 메모리 · 16bit 캡처/ 카운터/ 10 bit PWM(CCP) · 256K 바이트 EEPROM · 통신 모듈(USART, I2C, SPI)

3) 모니터링 및 컨트롤 PC 시스템

모니터링 및 컨트롤 PC는 이미지 그레이버 보드로부터의 디지털 영상 데이터를 프로그램 화면상으로 사용자에게 보여줌과 동시에 여러 가지 영상 처리 알고리즘을 통해서 영상 데이터를 분석하는 역할을 한다. 또한 해상도를 높이기 위해 RS232C를 이용하여 컨트롤 박스로 특정한 신호를 보내어 2축 구동 매니플레이터를 제어하도록 하였고, 분석 데이터는 데이터베이스에 저장되어지도록 구성하였다.

4) 소프트웨어 구성

DNA scanner의 소프트웨어는 획득한 영상을 분석하여 spot들에 대한 정보를 획득하고 저장하는 부분과 분석결과를 확인할 수 있게 하는 디스플레이 부분, 임의로 2축 구동 매니플레이터를 구동할 수 있게 하는 구동 부분으로 구성

되어진다. Fig. 4.9은 DNA scanner의 소프트웨어의 실행화면을 나타내고 있으며 각각의 기능에 대해서는 번호를 표시하여 각각의 기능을 설명하였다.

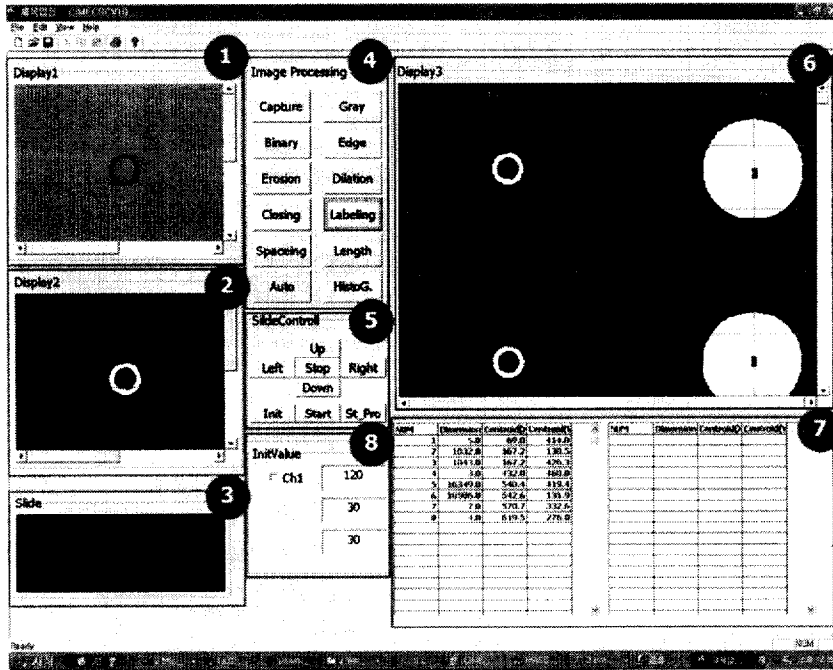


Fig. 4.9 Display screen of DNA scanner software

- ① No. 1은 시스템이 동작하는 동안 실시간으로 획득한 영상을 나타내는 영역이다.
- ② No. 2는 No. 1에서 보이는 실시간 영상을 획득하여 여러 가지 영상처리를 수행한 후에 결과 영상을 보여주며 No. 4는 여러 가지 영상처리를 수행하는 실행버튼들로 구성된다. Fig 4.10은 No. 4의 영상처리 기능버튼을 확대하여 각각의 기능을 나타낸 것이다. 또한 각각의 상세한 영상처리 기능은 다음 단원에서 상세하게 설명하도록 한다. No. 6은 자동 영상처리가 완료된 영상이 나타나는 영역이다.

본 소프트웨어에서는 초기데이터를 설정하는데 사용되는 부분과 환경설정부분들로 구성된다. Fig. 4.12은 초기데이터 설정 부분을 나타낸 것이다.

InitValue	
Ch1	120
	30
	30

Fig. 4.12 Part of initial data set

좌측의 1개의 체크 박스는 spot의 데이터를 설정하는 박스이고 우측의 3개의 텍스트 박스는 환경을 설정하는 박스이다. spot의 데이터를 설정하는 박스는 spot사이의 거리, spot의 면적을 입력하게 되어있으며, 이러한 정보를 이용하여 최대·최소면적이 설정 된다. 이러한 정보를 입력하는 이유는 영상처리 결과에서 최소면적과 spot과의 최소거리에 미달하는 spot과 최대면적 및 최대거리에 미달하는 spot을 노이즈(noise)로 판단하기 위한 것이다.

- ④ No. 5는 Fig. 4.13에서 보듯이 수동으로 모터를 X-Y로 움직이게 하는 버튼들로 구성되어 있으며 이것은 초기데이터를 얻을 때 사용하게 된다.

SlideControl		
	Up	
Left	Stop	Right
	Down	
Init	Start	St_Pro

Fig. 4.13 Control buttons of nonautomatic slide

4.4 제어 알고리즘 설계

본 논문에서는 신호와 데이터의 흐름에 기초하여 제어 알고리즘은 설계된다. Fig. 4.14는 개발되어진 DNA chip scanner 시스템의 제어 흐름도로서, 왼쪽 부분은 PIC16F877에서의 제어 알고리즘을 그리고 오른쪽은 PC에서의 제어 알고리즘을 보여주고 있다.

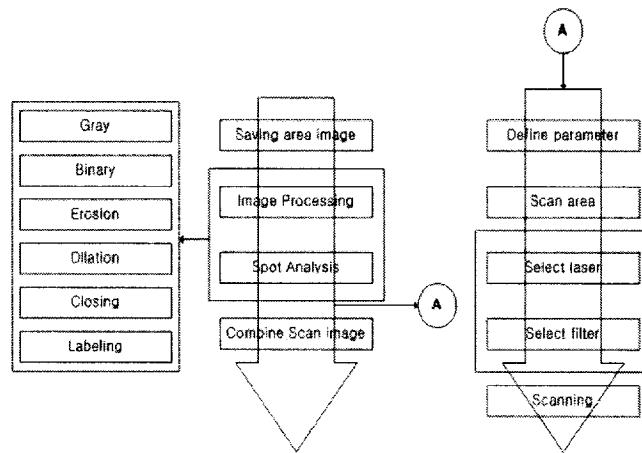


Fig. 4.14 Flowchart of developed DNA chip scanner

Fig. 4.14에서, PC와 PIC가 연결된 이후 파라미터들은 PIC내의 SRAM으로 보내진다. PIC는 자신이 가지고 있는 데이터들을 연산해서 구동을 위한 파라미터들을 만들고 이러한 정보를 모터 드라이버에 보내어 2축 구동매니플레이터와 각각의 레이저 및 필터를 작동하게 된다. 2축 구동매니플레이터의 이동 위치제어는 DC모터 제어 이론을 사용한다.

또한 본 논문에서는 Fig. 4.15와 같이 영상 취득의 해상도를 높이기 위하여 일정 영역의 영상을 취득하고, 대상을 이동시켜 반복 취득 후

전체 취득 영상을 합성하여 한 영상으로 취합하는 알고리즘을 사용하고 있다.

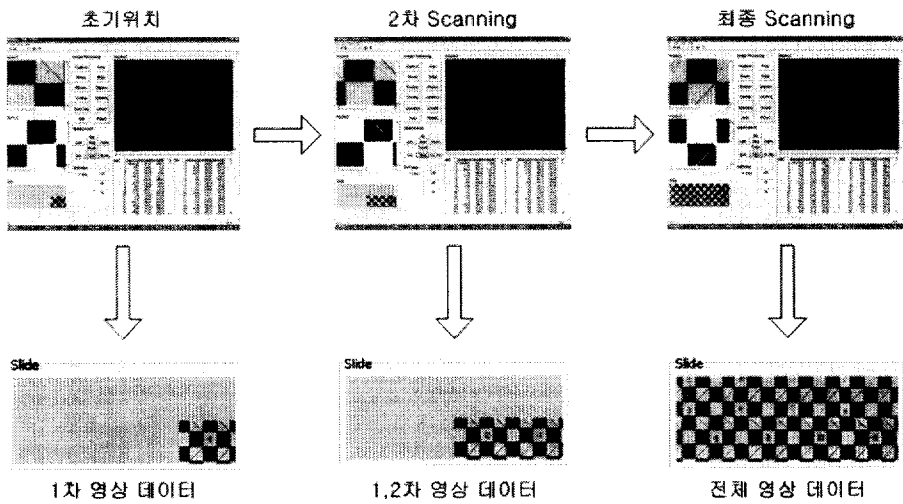


Fig. 4.15 Procedure of scanning algorithm

4.5 카메라 보정(Calibration) 알고리즘 설계

CCD 카메라의 곡률 보정(calibration)에 의해 오차 보정을 수행하는 일차적인 목적은 카메라를 통하여 입력된 대상물에 대한 영상의 컴퓨터 2차원 영상좌표계와 실제 물체가 존재하고 있는 물체 좌표계와 관계를 설정하기 위한 것으로서 영상처리기법을 이용하여 길이나 깊이 등의 정량적 측정이 필요할 때 필수적으로 요구되는 과정이다.

이러한 과정이 요구되어지는 이유는, CCD 카메라 오차 보정 과정이 수행되지 않으면 영상 좌표계상의 값과 물체 좌표계 값이 서로 일치하지 않는 결과를 초래하여 영상처리 기법을 사용하여 정량적인 측정시 그 결과와 그 물체의 실제 측정치와 차이가 발생하기 때문이다.

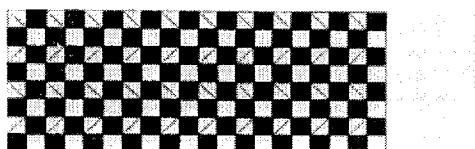


Photo 4.6 Slide glass for calibration

Photo 4.6에서 보여지는 바와 같이, 미리 작성된 그리드 이미지를 통해 곡률을 가진 영상을 입력받아 그리드의 각점을 이미 알고 있는 실제 좌표계로 재배치함으로써 곡률이 보정된 이미지를 얻어내게 된다. Fig. 4.16의 왼쪽에 있는 좌표계는 작성된 그리드 영상에 대한 카메라의 입력 영상이며, 이 좌표계상의 곡률을 가진 각 점의 좌표는 elevation 방향 및 lateral 방향의 곡률반경을 따라 FOV(field of view)의 중심점으로부터 멀어질수록 각 점의 좌표 간격은 넓어지게 배치되게 된다. 이때

각 점의 좌표는 미리 작성된 그리드를 통해 이미 알고 있으므로 이 점들을 원래의 위치로 차례대로 옮겨놓으면서 오른쪽의 실제 좌표계로 각각 재배치시켜 설계된 그리드의 모양으로 되돌려 놓음으로써 카메라를 정밀하게 위치시키지 않더라도 어떤 위치에서나 그리드의 입력 이미지만으로 카메라의 렌즈에 의한 곡률을 보정할 수 있다. 이러한 곡률 보정에 대한 프로세스의 과정은 실제 물체의 입력된 영상에 대해 설계된 그리드의 보정 패턴을 마스크 처리하여 얻어내게 된다. 입력 영상으로는 그림과 같이 그동안 문헌에서 많이 다루어진 동일한 평면위에 있는 사각 그리드로서, 본 연구에서는 실제좌표 값을 미리 알고 있는 그리드를 이용하였다. 그리고 기준 그리드들의 크기와 모양이 같고 기준점들 간의 간격은 일정한 픽셀로 구성하였다. 실험은 곡률이 보정된 이미지로부터 그 패턴을 추출해내어 입력된 영상에 그 패턴만을 적용시킴으로써 보정된 이미지를 추출해 내었다.

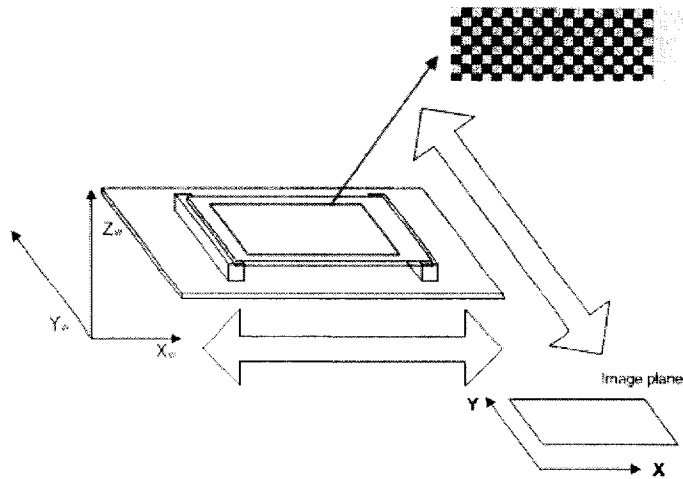


Fig. 4.16 Coordinate system

4.6 실험 및 검증

1) 모의 슬라이드 글라스를 이용한 동작 실험 구현

본 연구를 통해 개발하고자 하는 DNA chip scanner 시스템의 시제품에 대한 성능을 시험하기 위하여, 먼저 가시적으로 연구결과를 확인할 수 있는 모의 슬라이드를 Fig. 4.17 와 같이 구성하여 제작되어진 시스템의 동작구현 실험을 실행한다.

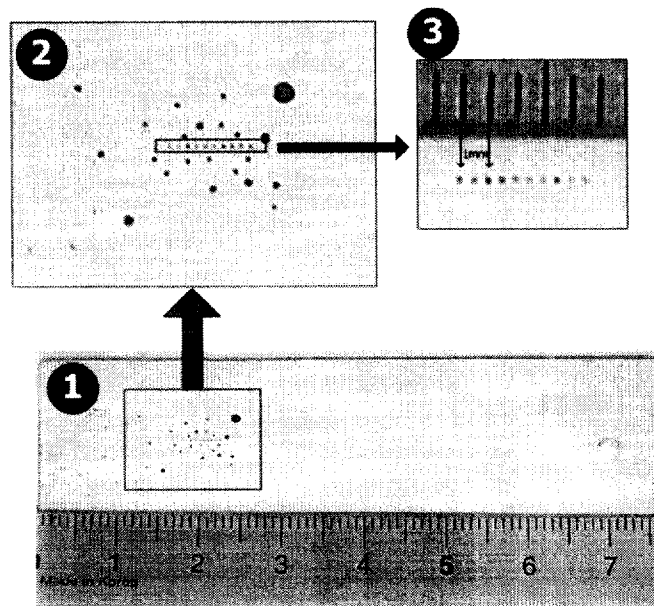


Fig. 4.17 Configuration of an imitated slide

Fig. 4.17에서 표시되어진 모의 슬라이드에 대한 구체적인 화면은 확대하여 나타내었고, 이러한 확대표현에 대한 구체적인 설명은 다음과 같다.

1. ①은 실험하고자 하는 전체 모의 슬라이드 글라스이다.

2. ②는 전체 모의 슬라이드 글라스인 ①에서 표시되어진 부분을 확대한 것으로서 본 연구에서 수행되어질 영상부분을 의미한다. 여기에서는, 실제로 영상을 획득 하였을 때 생기는 노이즈 성분을 감안하여 획득해야할 spot과 제거해야할 노이즈를 나타내었다. 노이즈는 지름이 0.12mm에서 1mm정도 크기의 원형 점을 산발적으로 분산 시켜 놓았다.
3. ③에서는 실제로 획득해야할 spot을 확대하여 표시하였으며, 이러한 spot은 앞서 개발되어진 DNA chip micro-arrayer를 이용하여 DNA chip을 제작하였을 때와 동일하게 spot의 지름은 0.12mm, spot과 spot사이의 간격은 0.5mm로 하여 구성되었다.

이러한 모의 슬라이드 글라스에 본 연구에서 개발되어진 DNA chip scanner 시스템을 이용하여 획득한 영상은 Fig 4.18과 같이 나타내어지고, 더불어서 획득되어진 영상에 실제 spot과 잡음(noise)을 구분하기 위하여 영상을 이진화한 결과는 Fig. 4.19와 같이 나타내어진다.

이렇게 이진화한 영상은 3장의 영상처리 알고리즘에서 제안되어졌던 것처럼, 영상축소(erosion)와 영상팽창(dilation)을 실행함으로써 Fig. 4.20 및 Fig. 4.21와 같은 결과를 얻을 수 있다.

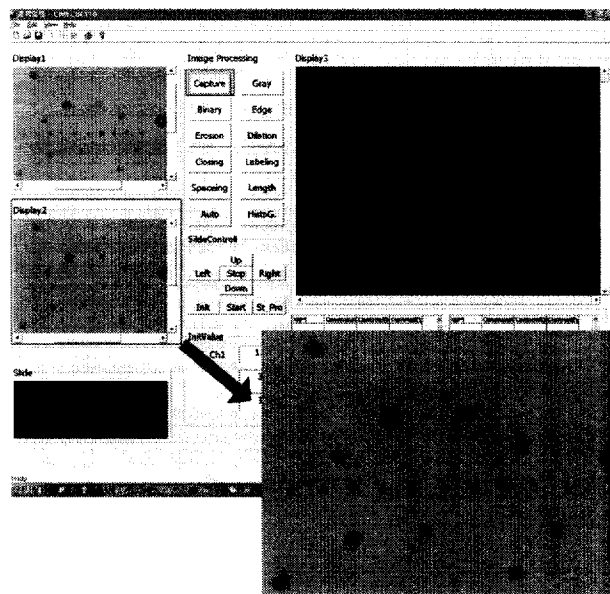


Fig. 4.18 Display screen of an acquisition image using developed DNA chip scanner

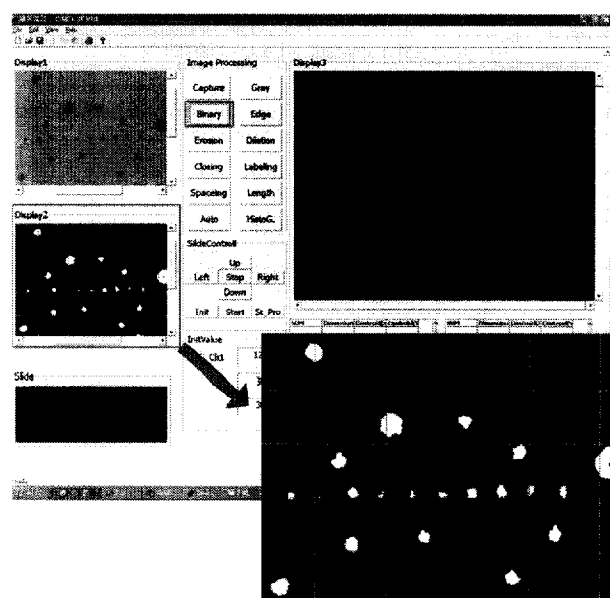


Fig. 4.19 Binary image of an acquired image

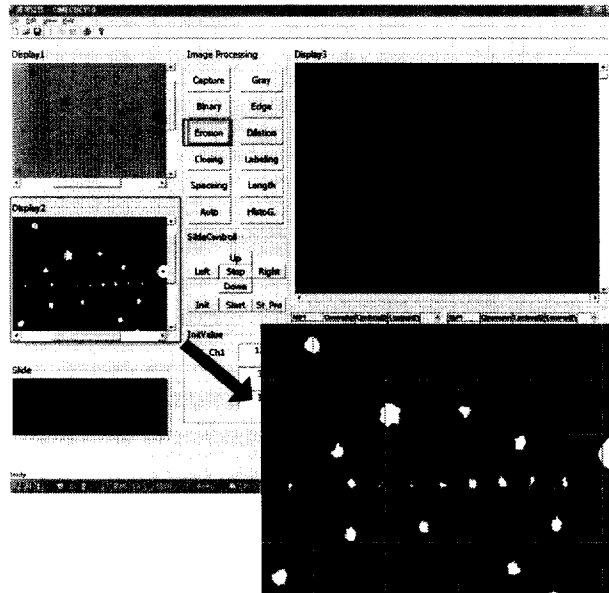


Fig. 4.20 Erosion image of an acquired image

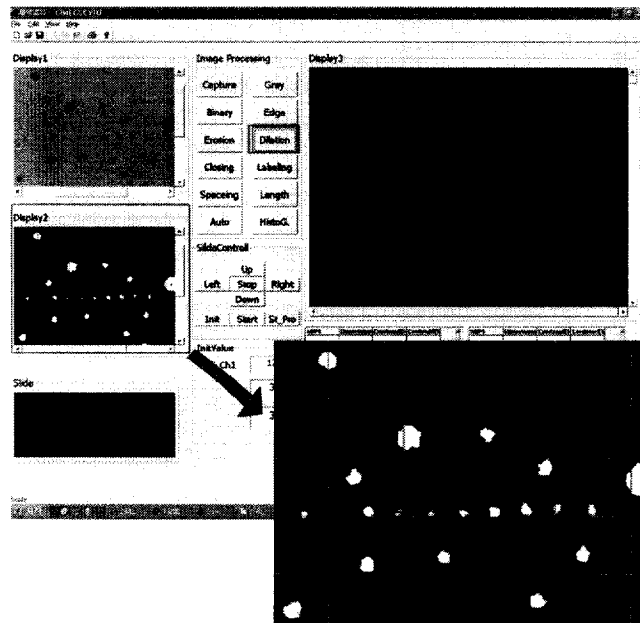


Fig. 4.21 Dilation image of an acquired image

Fig. 4.20과 Fig. 4.21의 영상축소와 영상팽창 단계를 실행한 후에, 주어진 영상을 라벨링(labeling)한 결과는 Fig 4.22와 같다. 또한 Fig 4.22에서 보여지는 것처럼, 영상에서는 각각의 spot(실제 spot 및 잡음 spot)들에 대하여 라벨링이 실행되었으며 좌표와 면적은 실행화면에서 표시되어진 것처럼 그리드에 표시하도록 설계하였다.

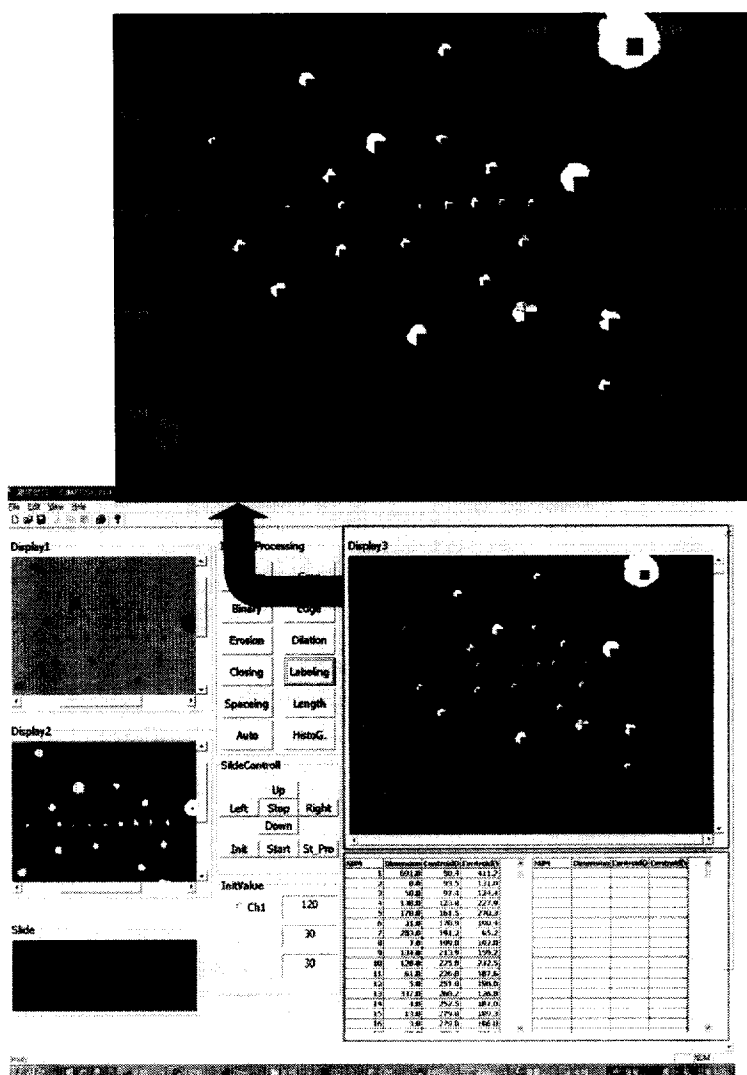


Fig. 4.22 Labeling image of an acquired image

본 논문에서는, 이러한 좌표와 면적을 이용함으로써 실제 spot을 찾을 수 있도록 설계되었다. 더구나 앞서 조건에서 spot의 지름은 0.12mm이라고 정의한 것을 이용함으로써 면적을 구할 수 있으며, 이러한 면적과 유사한 spot들을 찾고, 그렇지 않은 spot은 제거 하도록 설계되어졌다. 그 이후의 실행순서는 spot과 spot 사이의 거리가 0.5mm인 것을 이용하여 거리가 일치하지 못한 spot을 제거 하도록 하였다. 이러한 실행과정은 거침으로서 나타내어진 영상결과를 Fig. 4.23과 Fig. 4.24에서 나타내었다.

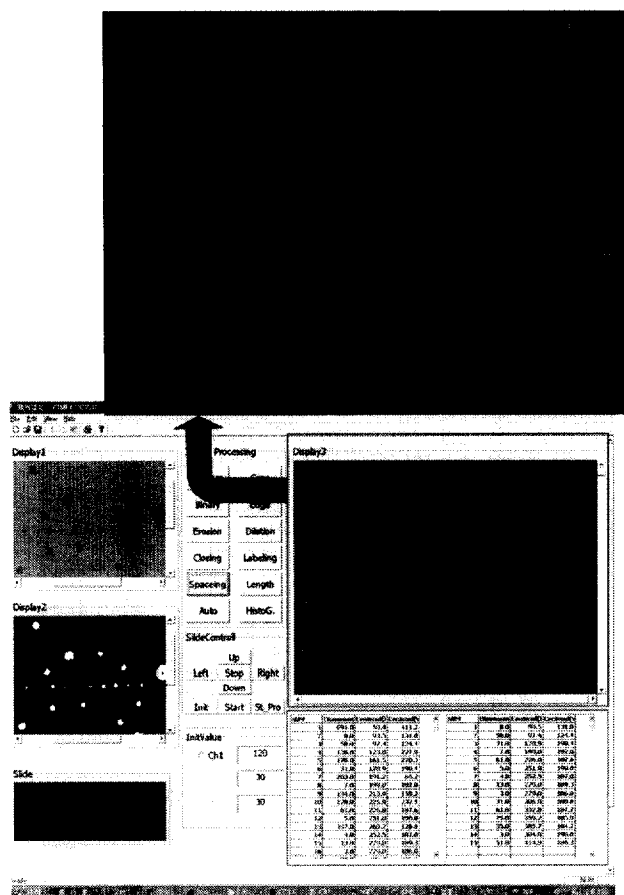


Fig. 4.23 The elimination image of space noises

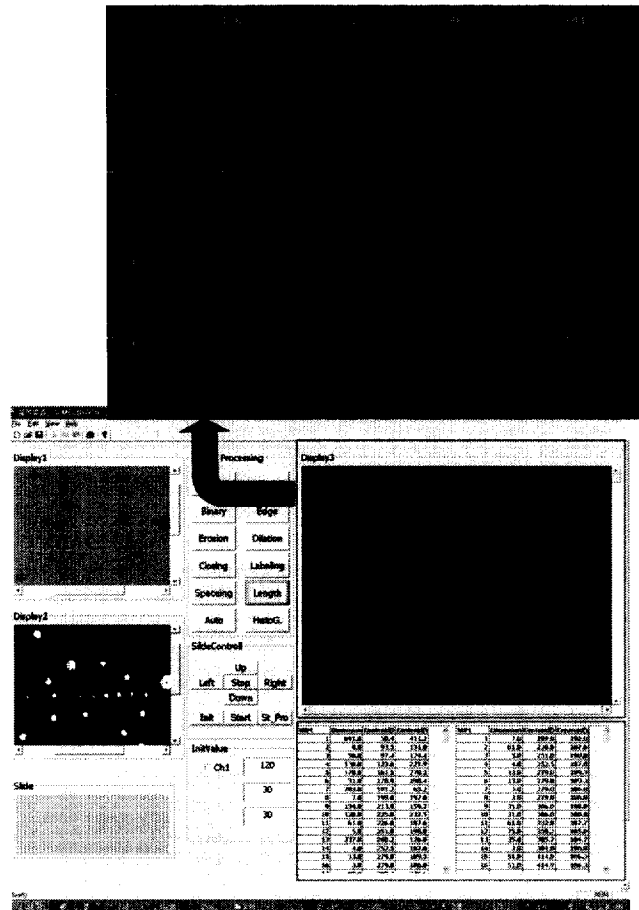


Fig. 4.24 The elimination image of length noises

2) β -actin 이용한 실제 동작 실험 구현

본 연구에서 개발되어진 DNA chip scanner 시스템의 실제 실험을 위하여 부경대학교 수산과학대학 일반 미생물학과에 의뢰하여 실험을 수행하였다. 먼저, 본 연구의 2장에서 언급되어졌던 것처럼 실제 제작되어진 DNA chip micro-arrayer 시스템을 이용하여 poly-L-lysine로 코팅된 slide glass에 β -actin을 습도 조건 65-70%에 0.5mm 간격으로 부착시켰다. 이러한 DNA chip을 본 연구에서 개발되어진 scanner 시스템을 이용하여 동작 실험을 구현하였다.

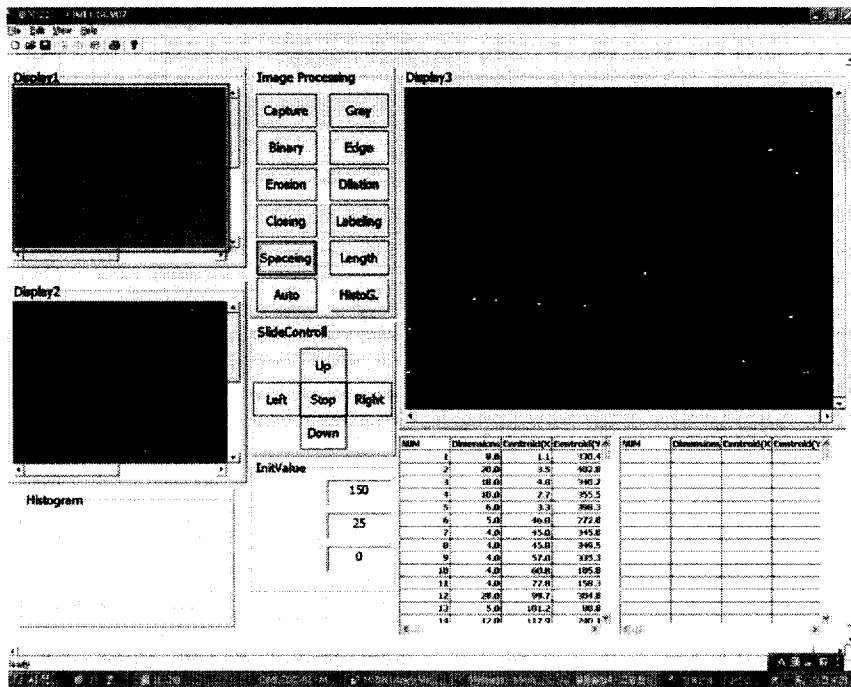


Fig. 4.25 An acquired initial image

제작되어진 DNA chip에서 획득한 초기 영상은 Fig. 4.25에서 표시하였으며, 앞장의 모의 슬라이드 실험에서 시행되어졌던 일련의 동일한 과정을 실행함으로서 구해지는 영상은 Fig. 4.26과 같이 나타내었다. Fig. 4.26에서 표시되어진 (1)의 클래스(class)는 잡음 클래스로 예상되어지는 것들이다. 따라서 주어진 영상에서 면적과 거리를 고려하여 잡음 클래스를 제거한 영상 결과는 Fig. 4.26과 같이 나타내어진다.

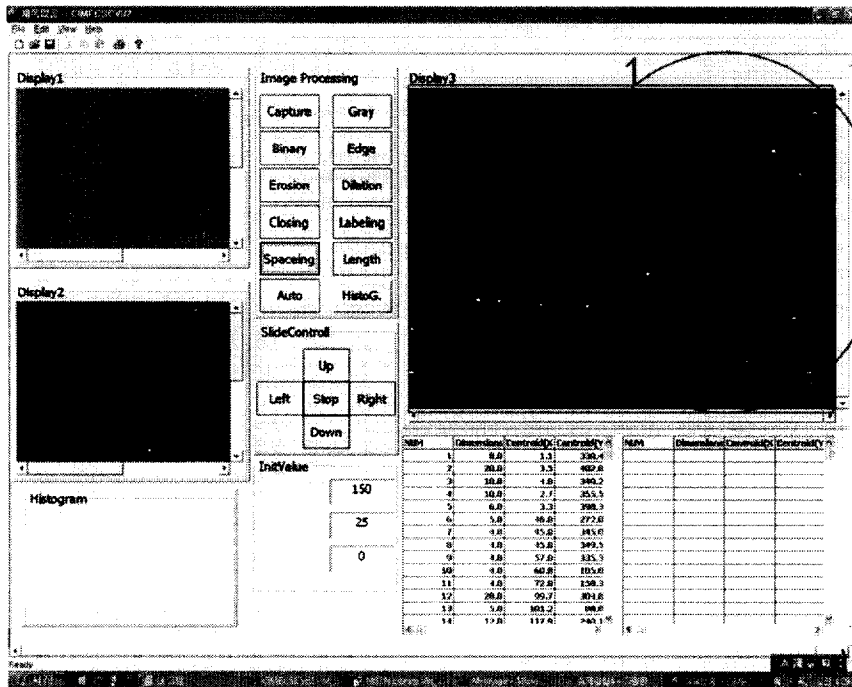


Fig. 4.26 An image after labeling

더불어서 Fig. 4.27에서 보여지는 결과는 잡음이 제거되어짐으로서 spot들이 표시되고 있으나 실제 실험을 위한 주위 환경조건과 Fig. 4.26에서 표시되어진 잡음 클래스와의 거리가 거의 유사한 관계로 spot으로 구분되는 경우가 발생하였다. 따라서 이러한 문제점을 고려한 재연성을 위해서 앞으로 더욱더 많은 실험을 해야 할 것으로 판단되어진다.

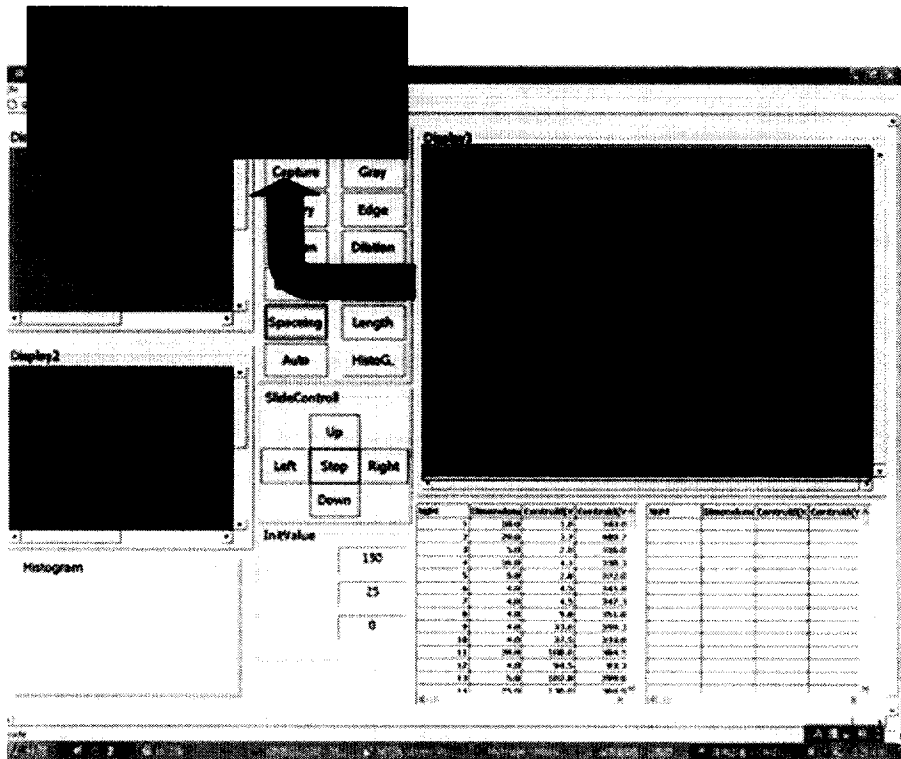


Fig. 4.27 An image display screen after eliminating noises

4.7 결 언

DNA chip scanner 시스템은 hybridization을 마친 DNA chip위의 probe의 형광량으로 표현되는 발현정도를 받아들이고 이들 정보를 분석하는 시스템이다. 더구나 DNA chip scanner 시스템은 모든 독성물질과 질병에 대하여 수천 개 이상의 유전자 발현변이를 단지 한 번의 실험으로 검색하는 데이터베이스 시스템으로서 서로 다른 발현 패턴을 대응시킬 수 있다. 그러므로 DNA chip scanner 시스템은 사실상 DNA micro-arrayer chip을 하나의 이미지로 처리하는데 보통 2백만 이상의 픽셀(pixel)을 가져야 하므로, 그 용량이 방대하므로 정확한 발현 정도 측정을 위해서 효율적인 영상처리 알고리즘이 요구되어진다.

이러한 문제점들을 해결하고자, 본 연구에서는 앞선 단원에서 제안되어진 영상처리 알고리즘을 적용하기 위한 DNA chip scanner 시스템을 설계 및 제작하였고, 개발되어진 scanner 시스템의 유효성을 보여주기 위하여 모의 슬라이드 글라스를 통한 실험 및 실제 미생물을 이용한 실험에 적용하여 제작되어진 DNA chip scanner 시스템의 성능을 검증하였다.

제 5 장

결 론

5.1 결론

본 논문에서는 아직 국내에서는 개발된 사례가 없는 DNA chip 제작을 위한 micro-arrayer 및 scanner 시스템을 개발하기 위한 연구를 수행하였다. 또한 scanner 시스템 설계 및 개발을 위하여 요구되어지는 영상처리 알고리즘을 개발하여 적용하였고 실제로 본 시스템을 적용한 연구결과를 통하여 개발 제품의 유효성을 나타내었다.

본 연구에서 개발되어진 시스템들에 대한 구체적인 연구결과는 다음과 같이 간략하게 요약되어질 수 있다.

제 2 장

이 단원에서는, 저가형 DNA chip micro-arrayer 시스템을 설계 및 제작하기 위한 하드웨어 및 소프트웨어의 개발 결과를 기술하였다. 개발되어진 Micro-arrayer 시스템은 정밀 가공된 Tip과 Tip holder, 스테핑 모터 그리고 80C196KC를 이용하여 3축 직교로봇을 제어할 수 있도록 개발되었다. 더불어서 DNA chip을 제작하기 위하여 반드시 요구되어지는 요소라고 할 수 있는 clean station 및 base plate도 설계 및 제작하였다.

본 단원에서 개발되어진 micro-arrayer 시스템은 관련 문헌과 제품을 생산하는 관련 기업을 통한 연구정보를 통하여 저가형 제품개발을 위한 적정조건을 고려함으로써, 본 연구에서 개발되어진 micro-arrayer 시스템의 실험결과를 통

하여 1cm²안에 192개의 oligonucleotide을 찍을 수 있는 저집적 DNA chip 제작용 micro-arrayer를 개발할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발되어진 DNA chip micro-arrayer 시스템은 중소 규모의 연구소를 포함한 국내 대학연구실에서 실험목적으로 사용하기에는 상당히 유용한 시스템임을 확인할 수 있었다.

제 3 장

본 단원에서 제안되어진 영상처리 알고리즘은, 영상처리와 마이크로컨트롤러기술, PC응용기술을 이용하여 다수의 물체를 계측하는 실시간 무인자동화 시스템에 대하여 실험되어진 결과로서 DNA chip scanner 시스템을 개발하기 위한 영상처리 알고리즘의 유효성을 제안하고 검증한 연구결과이다.

본 단원에서, 우리는 다수의 물체들을 동시에 검출하고 제어하기 위한 영상처리 알고리즘을 개발함으로써, 실제 실험결과를 통하여 약 0.12mm의 정밀도를 구현을 하였으며 화면상에 나타나는 관측점의 픽셀면적을 크게 할수록 정밀하다는 것을 확인할 수 있었다. 더구나 이러한 영상처리 알고리즘은 DNA chip scanner 개발에서 가장 중요한 요소라고 할 수 있는 영상처리 부분에 적용한 결과로서 제안되어진 알고리즘의 유효성을 검증할 수 있었다.

제 4 장

4장에서는 앞선 단원에서 언급되어진 영상처리 알고리즘을 적용한 실제 DNA chip scanner 시스템 제작을 통하여 영상처리 알고리즘의 실제 타당성을 확인 할 수 있었다. 또한 개발되어진 DNA chip scanner 시스템을 실제 생명공학 관련 연구 분야에 직접 적용한 실험결과를 통하여 개발 시스템의 유효성을 검증하였다.

5.2 추후과제

DNA chip 제작을 위하여 요구되어지는 micro-arrayer 및 scanner 시스템 개발에 있어서 무엇보다도 요구되어지는 것이 scanner의 분석 소프트웨어 설계이며, 이러한 소프트웨어의 정확성이 scanner 시스템의 정밀도를 더욱더 높임으로서 고부과 가치의 연구개발이 될 수 있는 요소라고 할 수 있을 것이다. 따라서 분석된 데이터는 데이터베이스에 저장하여 전국의 소규모 실험실에서 공유 할 수 있도록 시스템을 설계, 제작하여야 할 것이고 더욱이 본 연구에서 설계 및 제작되어진 micro-arrayer 시스템도 더욱 저가이면서 고집적이 가능한 시스템이 될 수 있도록 더욱 발전된 개발 제품으로 업그레이드하는 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

- [1] R. O. Duda and P. E. Hart, *Pattern Classification and Scene Analysis*, John Wiley & Sons Inc., pp. 1-39, 1973.
- [2] N. Otsu, "A thresholding selection method from gray-level histogram", *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, SMC-9, pp. 62-66, 1979.
- [3] L. Jianzhuang, L. Wenqing and T. Yupeng, "Automatic thresholding of gray-level pictures using two-dimensional ostu method", *Proceedings of International Conference on Circuits and Systems*, Vol. 1, pp. 325-327, 1991.
- [4] M. H. Chowdhury and W. D. Little, "Image thersholding techniques", *Proceeding of IEEE Pacific Rim Conference on Communications, Computers and Signal Processing*, pp. 585-589, 1995.
- [5] E. A. Barnard, Anne C. Bloomer, Kay E. Davise, S. P. Hunt, R. J. Keynes, T. H. Rabbitts, P. H. Rubery, M. F. Tutte, C. Watts, Sir David J. Weatherall and R. A. H. White, *The encyclopedia of molecular biology*, Blackwell Science, Germany, 1995.
- [6] D. Shalon, "A DNA microarray system for analyzing complex

- DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization", *Genome Research*, Vol. 6, No. 7, pp. 639-645, 1996.
- [7] K. R. Castleman, *Digital Image Processing*, Prentice Hall Inc., 1996.
- [8] M. Chee, R. Yang, et. al., "Accessing genetic information with high-density DNA arrays", *Science* 274, pp. 610-614, 1996.
- [9] T. S. Kim, S. Y. Hwang and G. S. Yoo, "Covalent linkage of IL-12 and ovalbumin confines the effects of IL-12 to ovalbumin-specific immune responses", *Arch. Pharmacy Research*, Vol. 20, pp. 396-403, 1997.
- [10] D. A. Lashkari, J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown and R. W. Davis, "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis", *Proceedings of National Academy Science*, Vol. 94, pp. 13057-13062, 1997.
- [11] Y. Chen, E. R. Dougherty and M. L. Bittner, "Ration-based decisions and the quantitative analysis of cDNA micro-array images", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 2, No. 4, pp. 364-374, 1997.
- [12] C. M. Owczarek, S. Y. Hwang, K. A. Holland, L. M. Gulluyan,

- M. Tavaría, B. Weaver, N. C. Reich, I. Kola and P. J. Hertzog. "Cloning and characterization of soluble and transmembrane isoforms of a novel component of the murine type I interferon receptor", *Journal of Biomedical Chemistry*, Vol. 272, pp. 23865-23870, 1997.
- [13] Y. Chen, E. R. Dougherty and M. L. Bittner, "Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 2, No. 4, pp. 364-374, 1997.
- [14] W. K. Purves, G. H. Origans, H. C. Heller and D. Sadava, *The Science of Biology*, 5th Edition, Life Sinauer Associated Inc., 1998.
- [15] J. Khan, "Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays", *Cancer Research*, Vol. 58, No. 22, pp. 5009-5013, 1998.
- [16] 조한승, 박성섭 외 5명, "염색체자동분석기-Chromosys 시스템의 개발 및 임상적 이용", *대한임상검사정도관리협회지(Journal of Clinical Pathology and Quality Control)*, 제 20 권, 제 2 호, pp. 309-314, 1998.
- [17] O. Ermolaeva, "Data management and analysis for gene expression arrays", *Nat Genet.*, Vol. 20, No. 1, pp. 19-23, 1998.

- [18] J. J. Chen, "Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection", *Genomics*, Vol. 51, No. 3, pp. 313-324, 1998.
- [19] Y. S. Lim, B. Y. Kang, E. J. Kim, S. H. Kim, S. Y. Hwang and T. S. Kim. "The immune responses by multiple DNA vaccination with an ovalbumin/interferon-hybrid construct. Immunol", *Potentiation of antigen-specific*, Vol. 94, pp. 135-141, 1998.
- [20] V. G. Cheung, M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapti and G. Childs. "Making and reading microarrays", *Nature genetics*, Vol. 21, pp. 15-19, 1999.
- [21] J. C. Russ, *The image processing handbook*, CRC Press, 1999.
- [22] D. J. Duggan, M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer and J. M. Trent. "Expression profiling using cDNA micro-arrays", *Nature genetics*, Vol. 21, pp. 10-14, 1999.
- [23] D. E. Bassett, M. B. Eisen, and M. S. Boguski, "Gene expression informatics", *Nature genetics*, Vol. 21, pp. 51-55, 1999.
- [24] S. J. Brignac, R. Gangadharan, M. McMahon, J. Denman, R.

- Gonzales, L. G. Mendoza and M. Eggers, "A proximal CCD imaging system for high-throughput detection of microarray-based assays", *IEEE Engineering of Medical Bio. Magazine*, Vol. 12, No. 2, pp. 120-122, 1999.
- [25] R. Ekins and F. W. Chu, "Microarrays: their original and applications", *Trends in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 217-218, 1999.
- [26] M. Sonka, V. Hlavac and R. Boyles, *Image Processing Analysis and Machine*, PSW Publishing, 1999.
- [27] S. J. Brignac, "A proximal CCD imaging system for high-throughput detection of microarray-based assays-". *IEEE Engineering of Medical Bio. Magazine*, Vol. 18, No. 2, pp. 120-122, 1999.
- [28] M. A. Behr, M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane and P. M. Small, "Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray", *Science*, Vol. 284, pp. 1520-1523, 1999.
- [29] H. K. Kim, B. C. Kang, J. H. Park, J. H. Suh and S. B. Kim, "Development of semi-automatic karyotyping system using image processing", *Journal of Control, Automation and Systems Engineering*, Vol. 1, No. 1, 1999.

- [30] M. Schena, *Microarray biochip technology*, Eaton Publishing, 2000.
- [31] J. Wang, "Survey and summary from DNA bio-sensors to gene chips". *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, pp. 3011-3016, 2000.
- [32] D. Schonfeld, "On the relation of order-statistics filters and template matching: optimal morphological pattern recognition", *IEEE Transactions on Image processing*, Vol. 9, pp. 945-949, 2000.
- [33] I. Pitas, *Digital image processing algorithms and application*, Jonh Wiely & Sons Inc., 2000.
- [34] H. Hasegawa, H. Aoki, F. Yamazaki, M. Matsuoka and I. Sekimoto, "Automated detection of damaged buildings using aerial HDTV images", *Proceedings of IEEE International Conference on Image Processing*, Vol. 1, pp. 310-312, 2000.
- [35] M. K. Kerr, M. Martin and G. A. Churchill, "Analysis of variance for gene expression microarray data", *Journal of Computational Biology*, Vol. 7, pp. 819-837, 2000.
- [36] D. Schonfeld, "On the relation of order statistics morphological pattern recognition", *Transactions on IEEE Image processing*, Vol. 9, pp. 945-949, 2000.

- [37] N. Braendle, H. Bischof and H. Lapp, "A generic and robust approach for the analysis of spot array images", *Proceedings of Biomedical Optics Symposium*, Vol. 4266-2, pp. 20-26, 2001.
- [38] Z. Zhou, J. Stein and Q. Ji, "GLEAMA: A novel approach to high throughput generic micro-array image capture and analysis", *Proceedings of Biomedical Optics Symposium*, Vol. 4266-3, pp. 20-26, 2001.
- [39] L. Kegelmeyer, L. Tomascik-Cheeseman, M. Burnett, P. Van Hummelen and A. Wyrobek, "A groundtruth approach to accurate quantitation of fluorescence microarrays", *Proceedings of Biomedical Optics Symposium*, Vol. 4266-6, pp. 20-26, 2001.
- [40] T. Bergemann, F. Quiaoit, J. Delrow and L. Zhao, "Statistical issues in signal extraction from microarrays", *Proceedings of SPIE*, Vol. 4266-4, 20-26, 2001.
- [41] Y. J. Kim, "Optimum conditions for preparation of diagnostic fish rhabdovirus DNA chip", M. D. Thesis of Pukyong National University, Busan, Korea, August, 2004.
- [42] Bioarray News, "The global weekly of biochips and microarrays", Vol. 1, No. 1, 2001.
- [43] M. Cuzin, "DNA chips: A new tool for genetic analysis and

- diagnostics", *Transfus Clin. Bio.*, Vol. 8, pp. 291-6, 2001.
- [44] G. Delenstarr, H. Cattell, C. Chen, A. Dorsel, R. Kincaid, K. Nguyen, N. Sampas, S. Schidel, K. Shannon, A. Tu and P. Wolber, "Estimation of the confidence limits of oligonucleotide array-based measurements of differential expression", *Proceedings of SPIE*, Vol. 4266-17, pp. 20-26, 2001.
- [45] R. Nadon, P. Shi, A. Skandalis, E. Woody, H. Hubschle, E. Susko, N. Rghei and P. Ramm, "Statistical inference methods for gene expression arrays", *Proceedings of Biomedical Optics Symposium*, Vol. 6266-7, pp. 20-26, 2001.
- [46] W. K. Purves, G. H. Orians, H. C. Heller and D. Sadava, *Life: The science of biology*, Sinauer Associates, Inc., pp. 205-206, 2001.
- [47] W. Liu, R. Mei, D. Bartell, X. Di, T. Webster and T. Ryder, "Rank-based algorithms for analysis of microarrays", *Proceedings of Biomedical Optics Symposium*, Vol. 4266-8, pp. 20-26, 2001.
- [48] H. K. Kim, S. H. Lee, M. S. Lee and S. B. Kim, "A segmentation method for counting microbial cells in microscopic image", *Transactions on Control, Automation and Systems Engineering*, Vol. 4, No. 3, pp. 224-230, 2002.

- [49] S. Chakravarthy, R. Sharma, R. Kasturi, "Noncontact level sensing technique using computer vision -Instrumentation and Measurement-", *Transactions on IEEE Image Processing*, Vol. 51, pp. 353-361, 2002.
- [50] J. D. Kim, S. H. Yeon, Y. U. Lee and J. W. Kim, "HPV DNA 칩의 영상처리 알고리즘 구현", *한국통신학회논문지*, Vol. 28, No. 8, pp. 803-810, 2003.
- [51] N. C. Cho, H. J. An, J. K. Jeong, S. Kang, J. W. Kim and T. K. Park, "Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA chip in Korean women: Comparison with cytologic diagnosis", *American Journal of Obstet. Gynecol.*, Vol. 188, No. 1, pp. 56-62, 2003.

Publication and Conference

A. Publications

- [1] H. K. Kim, D. K. Kim, N. S. Jeong, M. S. Lee and S. B. Kim, "Reconstruction and elimination of optical microscopic background using surface fitting method", *Journal of Fisheries Science and Technology*, Vol. 4, No. 1, pp. 10-17, 2001.
- [2] H. K. Kim, N. S. Jeong, S. B. Kim and M. S. Lee, "Morphological feature extraction of microorganisms using image processing", *Journal of Fisheries Science and Technology*, Vol. 4, No. 1, pp. 1-9, 2001.
- [3] S. B. Kim, N. S. Jeong, S. Y. Kim and M. S. Lee, "Development of a microarrayer for DNA chips", *Journal of Fisheries Science and Technology*, Vol. 5, No. 1, pp. 36-42, 2002.
- [4] H. K. Kim, T. T. Nguyen, N. S. Jeong and S. B. Kim, "Nonlinear adaptive control of fermentation process in stirred tank bioreactor", *Transactions on Control, Automation and System Engineering*, Vol. 4, No. 4, pp. 277-282, 2002.
- [5] H. S. Kim, H. K. Kim, N. S. Jeong and S. B. Kim, "Behavior analysis method for fishes in a water tank using image

processing technology", *International Journal of Control, Automation and Systems*, Vol. 1, No. 1, pp. 111-118, 2003.

[6] N. S. Jeong, J. S. Im, J. H. Suh and S. B. Kim, "Implementation of Low-cost/High-integrated DNA chip scanner system", *International Journal of the Korean Society of Precision Engineering*, November, 2004. (*To be submitted*)

[7] 정남수, 임재성, 서진호, 김상봉, "저가형/고집적 DNA chip 스캐너 시스템의 구현", 대한기계학회지, November, 2004. (*To be submitted*)

2. Proceedings and Conferences

- [1] H. K. Kim, T. T. N-uyen, N. S. Jeong and S. B. Kim, "Nonlinear adaptive control of fermentation process in stirred tank bioreactor", *Proceedings of International Conference on Control, Automation and Systems*, pp. 1939-1942, 2001.
- [2] S. W. Kim, Y. B. Jeon, N. S. Jeong and S. B. Kim, "Real-time displacement measurement system for multiple moving objects based on image processing technique", *Proceeding of the 8th Conference on Science and Technology, Control and Automation*, pp. 107-112, Vietnam National University, Vietnam, 2002.
- [3] H. K. Kim, D. K. Kim, N. S. Jeong, M. S. Lee and S. B. Kim, "Reconstruction and elimination of optical microscopic background using surface fitting method", *Proceedings of Asian Symposium on Industrial Automation and Robotics*, pp. 176-181, 2001.
- [4] 이영환, 김석열, 김성욱, 정남수, 김상봉, "DB를 연동한 저가형 디지털 내시경의 개발", 제어·자동화·시스템공학회 합동학술대회논문집, pp. 1935-1938, 2001.
- [5] 김석열, 정남수, 임재성, 김상봉, "DNA Chip 제작을 위한 Microarrayer의 개발", 2003년도 춘계학술대회논문집, 대한기계학회, pp. 899-904, 2003.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 격려로써 학문의 길을 이끌어 주신 김상봉 지도교수님께 무한한 감사의 말씀과 보살피 주신 은혜에 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 언제나 어렵고 힘들 때 다정하게 격려해주시고 용기와 희망을 아낌없이 주신 사모님께도 깊은 감사의 말씀을 전해드립니다.

본 논문의 심사위원장을 맡아서 처음부터 마지막 순간까지 따뜻한 충고와 조언을 아끼지 않으시고 지도하여 주신 안두성 교수님, 공학도로서의 올바른 학문적 자세를 강조해주신 오명석 교수님, 한국해양대학에서 바쁘신 중에 귀중한 시간을 내어 논문의 방향을 제시하여 주신 김환성 교수님, 본 논문의 알파에서 오메가까지 세심히 지도해주신 서진호 박사님께 진심으로 머리숙여 감사드립니다.

본 논문의 심사위원은 아니시지만 보다 많은 조언을 주시고 실험을 뒷받침해주신 이형기 교수님, 최연욱 교수님, 이명숙 교수님, 오세준 교수님, 김영복 교수님, 정영석 교수님, 손정현 교수님, 김학경 박사님께도 감사를 드립니다.

1982년, 새내기 때부터 오늘의 제가 있도록 초석이 되어주신 오세규 교수님, 임우조 교수님, 이규용 교수님, 양보석 교수님, 권오봉 교수님께도 고개 숙여 감사의 인사를 드립니다.

1997년부터 교육현장에서 학생들을 가르칠 수 있도록 기회를 주신 양산대학 조병선 학장님, 메카트로닉스 엄상오 교수님, 신민생 교수님, 신상운 교수님, 이충환 교수님 그리고 한국해양수산연구원 김종윤 교수님과 새신부 김미희님께 깊은 감사의 마음을 전합니다.

공학도의 길을 갈수 있도록 터를 놓아주신 동명문화학원의 강정남 이사장님, 최성환 박사님, 정성철 선생님, 문홍도 선생님께도 고개 숙여 감사의 인사를 드립니다. 그리고 어려운 시기를 함께 했던 노운택님, 이윤

백 신부님, 이무철님, 심규환님, 박성오님, 손보곤님께 감사드립니다.

2002년부터 CIMEC 연구실에서 연구과제 세미나와 실험을 통하여 본 논문이 원활하게 진행될 수 있도록 처음부터 끝까지 무한 도움을 주신 임재성님, 본인의 석사논문 준비와 현장업무의 바쁜 와중에도 세심한 부분까지 챙겨준 김영규님, 박성재님에게도 감사를 드립니다. 그리고 함께 학위과정을 진행한 김광주 선생님, Tung 선생님, 김성민 선생님, 김성봉 선생님에게도 감사와 축하를 드립니다. 즐거운 시간이었습니다.

그리고 졸업 후에도 많은 도움을 주신 이진우 박사님, 안휘웅 교수님, 박순실 선생님, 유휘룡 박사님, 강호원님, 김민수님, Phuc 선생님, 한정만 선생님, 김인규 박사님, 김진호님, 김제윤님, 감병호 박사님, 강병철 교수님, 김동규 박사님, 이근유 박사님, 여태경 박사님, 이재동님, 박홍수님, 김진철님, 박진선님, 배경수님, 이성호님, 전봉환님, 지명석님, 김성욱님, 이원기님, 차민재님, 전양배님, 신승목님, 김석렬님, 정상권님 그리고 미생물 자료를 준비해준 박준형님에게 감사의 마음을 전합니다. 본 논문이 완성되기까지 자신의 일처럼 도와준 CIMEC 연구실의 모든 부원에게 감사의 마음을 전합니다. - 방장 마성진, 카르스마 김상찬, 만만디 김병용, 깊이있는 남자 박영욱, 배둘레햄 정준호, 짱어 이학철, 초보운전 윤석민, 맥가이버 이도경, 장롱면허 조민건, 예쁜 살림꾼 강경희, 베트남에서 유학온 학구파 Lam 선생님, 멋쟁이 Dung 선생님, 엘비스 Kim 선생님.....

본 논문이 완성되기까지 든든한 후원자역할을 해주신 (주)영도상사 박영근 사장님, 최기엽 사모님, 최기영 부장님, 정도수산 박문도 사장님, 부일수산 젊은 CEO 김덕필 남동희님, 객원 박해숙 사장님과 전우채님, (주)동경F&B 이규진 대표이사님과 김기옥 이사님, (주)사라콤의 김재관 이사님께 감사드립니다. 그리고 언제나 부모님처럼 바른 길잡이가 되어주시는 (주)위성안테나 안두열 사장님 가족분과 (주)코마상사 박홍일 사장님 가족분들께도 진심으로 감사드립니다.

I would like to express my best gratitude to Director Bjarne V.

Sorensen, Villy Hedegaard of PROCOM A/S for his enthusiastic support during the past five years.

I am also grateful to every members of my danish supporting group - the danish dynamite: Irene Nielsen(Nurse)+Mogens Moller Nielsen(Teacher and System Developer), Anna-Lise Drake(Teacher)+Niels Drake(Engineer), Margit Bonnesen (Secretary)+Svend Bonnesen(Teacher), Lillian Hansen(Secretary of the Danish Criminal Record)+Niels Krisensen(System Developer-TDC), Jens Jorgensen(Key Acc. Manager of PROCOM A/S)+Sun Jeong Jorgensen(Market Analyst of KOTRA Copenhagen), Kathrine and Rikkle.

오늘날 집사람과 만남의 다리를 놓아주신 최안나님과 캐빈, 최로사님과 박한님 그리고 안나님 어머님께 진심으로 감사의 인사를 올립니다. 사랑합니다.^언제나 밝은 모습으로 만학에 매진하고 있는 이수정님의 꿈이 이루어지길 기원합니다

되돌아보면 참으로 긴 날들이었지만 성실한 자세로 하루하루를 생활 할 수 있도록 정성스레 보살펴주신 큰누님 내외분, 둘째누님, 막내누나 내외분, 형님 그리고 유갑영님 가족과 유성자님 가족께도 감사드립니다. <이미 고인이 되신 부모님과 장인, 장모님, 둘째 자형의 영전에 이 논문을 바칩니다.>

그리고 무엇보다도 오늘이 있기까지 항상 웃는 모습으로 정성을 다하여 내조해준 사랑하는 아내와 아들 진형이, 딸 주언이에게 이 영광을 드립니다. 사랑합니다. ^^

2004년 12월 정 남 수