

콜로니 픽킹 로봇 시스템의 개발 (Ⅱ)

- 로봇 시스템의 성능실험 -

Development of Robot System for Colony Picking (Ⅱ)

- The Performance test of developed robot system -

이현동* 김기대* 김찬수* 나건영* 이영규* 임용표**
정희원 정희원 정희원

H. D. Lee K. D. Kim C. S. Kim K. Y. Na Y. K. Lee Y. P. Lim

1. 서 론

숙주세포가 분열될 때, 재조합 DNA 분자의 복제물이 자손에게 전달되며 거기서 벡터 복제가 일어난다. 수많은 세포 분열이 일어난 후, 동일한 숙주세포의 콜로니(colony), 혹은 클론(clone)이 생성된다.

이때 숙주세포의 분열은 배양액을 담은 용기에서 이루어진다. 박테리아 속의 배양된 콜로니에 재조합 DNA가 포함되어 있지 않으면 푸른색을 띠고, 재조합 DNA가 포함되어 있으면 흰색을 띠게 된다. 이 흰색의 콜로니만을 추출해 내는 것이 바로 콜로니 픽킹(picking)이라 한다.

일반적으로 콜로니 픽킹 작업을 자동화하기 위해서는 콜로니의 판별 및 위치 검출을 위해서 콜로니가 배양되어 있는 배양용기의 영상을 획득하는 영상처리장치 및 획득한 영상의 처리에 사용되는 영상처리 알고리즘 등이 필요하다. 또한 판별 및 위치가 검출된 콜로니의 픽킹을 위해 콜로니를 직접 찍어서 웰 플레이트에 이동시키는 픽킹 핀 및 핀의 상하 운동을 가능케 하는 픽킹 헤드가 필요하며 핀에 묻은 콜로니가 다른 콜로니 픽킹시 오염되지 않도록 하기 위해서 핀을 소독하는 핀 소독장치가 필요하다.

현재 우리나라에서 행해지고 있는 픽킹 작업은 실험실 작업의 경우 수작업에 의해 이루어지고 있으며, 사업단이나 전문 업체에서만 그나마 외국산 기계를 이용하고 있는 실정이다. 이는 생명공학 관련 사업 및 연구에서의 생산비를 높이게돼 국내외적으로 생명공학의 경쟁력을 떨어뜨리게 한다.

따라서, 본 연구는 현행 수작업 및 값비싼 외국기계에 의해 진행되는 콜로니 픽킹을 자동화 및 국산화하기 위해 핵심 기술인 콜로니 픽킹 헤드, 콜로니 판별 및 위치검출 영상처리 알고리즘 등을 포함한 콜로니 픽킹 로봇 시스템을 개발하는데 연구의 목적을 두었으며 그 구체적인 목적은 다음과 같다.

- 1) 로봇 시스템의 본체 및 픽킹 헤드, 소독장치 등을 설계, 제작하고,
- 2) 기 개발된 영상처리 알고리즘을 통한 콜로니의 판별 및 위치 검출결과를 이용하여,
- 3) 픽킹 성능실험을 실시하여 로봇 시스템의 성능을 제시한다.

* 충남대학교 농업생명과학대학 농업기계공학과

** 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

본 연구에 사용된 재료는 지부계 배추의 잎에서 추출한 배추 게노믹 DNA를 가지고 있는 BAC clone을 37°C 암상태에서 18시간동안 배양한 콜로니를 대상으로 실험을 실시하였다. 배양된 콜로니의 특징을 살펴보면, 형태면에서 대부분 원형을 유지하고 있지만 크기는 다양하다. 또한 다른 DNA를 가진 콜로니가 몇 개씩 무리를 이루며 연결되어 있는 현상도 있다. 그림 1에 실험에 사용된 콜로니를 나타내었다. 콜로니의 크기는 독립적인 것이 0.3 ~ 3mm의 직경을 나타내며, 콜로니 집락의 크기는 다양하다.

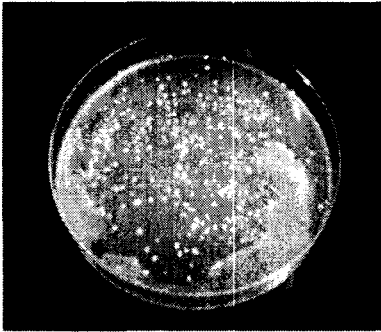


Fig. 1 The photo of cultivated colony used in performance test

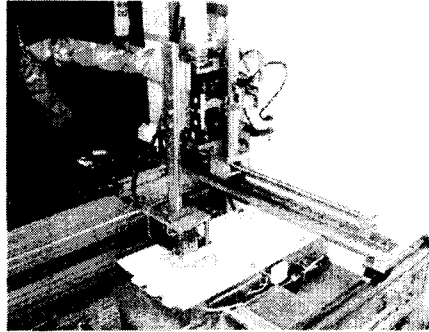


Fig. 2 The robot system developed for picking colony

나. 하드웨어 설계

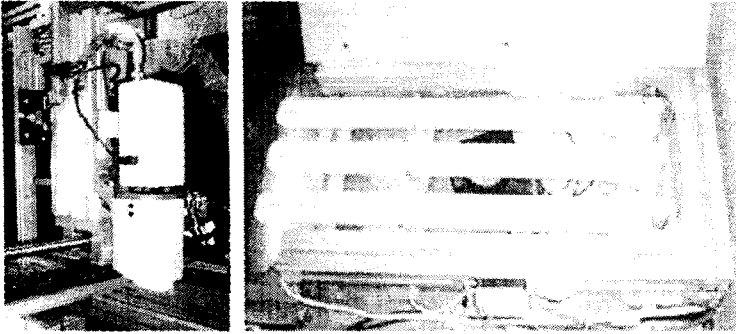
시스템의 하드웨어는 콜로니 픽킹시 배양된 콜로니의 영상정보를 입력받는 영상획득부, 영상을 획득할 때 대상체에 조명을 가하는 조명장치, 콜로니를 픽킹할 수 있는 픽킹 헤드, 픽킹 및 복제된 콜로니를 담은 웰 플레이트를 고정하는 웰 플레이트 고정배드, 콜로니가 묻어있는 핀을 소독하는 소독장치 등으로 구성되었다. 그림 2에 전체 시스템을 나타내었고, 표 1에 시스템의 재원을 나타내었다.

Table 1 The specification of system for colony picking

Item	specification
Camera	Color CCD, NTSC, S/N ratio : -48 dB, 768×494 pixels
Lens	Focal length : 8.568 mm, Optical back focal length : 11.69 mm Flange back focal length : 17.526 mm
Frame grabber	NTSC/PAL RGB, 640×480 pixels, 30 frames/sec,
Light source	3 wavelength fluorescent lamp, 36W, 220V
PC	Pentium IV
Solenoid	DC 24V, 32Ω, 98J
I/O board	16 I/O channel, DC 5-24V, Operate/Release Time : 5 msec

1) 영상획득부

배양된 콜로니의 판별 및 위치검출을 위한 영상 획득부는 저조도 Digital Color CCD 카메라 및 카메라 렌즈, 렌즈의 조리개 및 줌 기능을 제어하는 렌즈 컨트롤러, 영상정보를 PC에 전달하는 Frame grabber, 대상물체를 비추기 위한 조명장치 등으로 구성되었다. 그림 3에 영상획득부의 사진을 나타내었다.



(a) CCD camera (b) illuminator
Fig. 3 The picture of the CCD camera and the illuminator

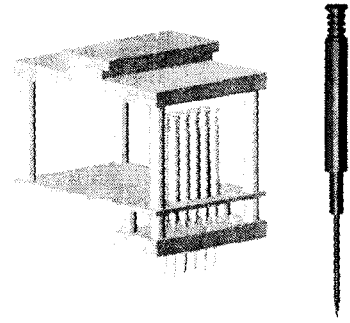


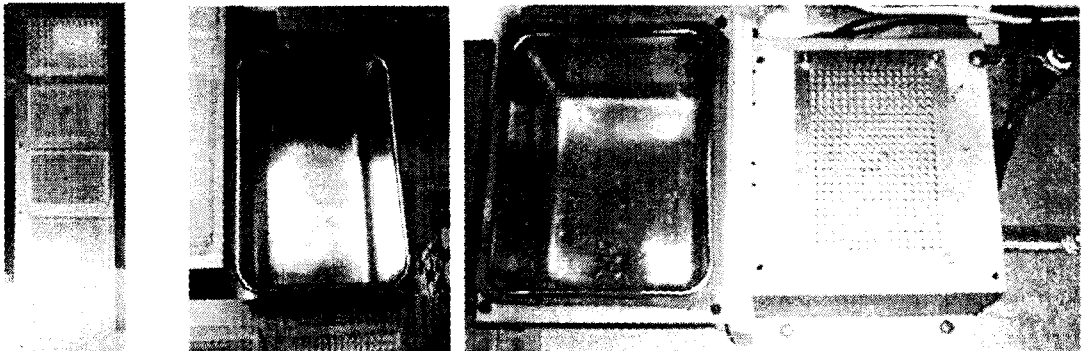
Fig. 4 Schematic diagram of picking head

2) 픽킹 헤드

픽킹 헤드는 상하운동을 하는 Z축에 연결하여 고정하기 위한 연결대와 연결대가 장착되어 있는 상부판, 픽킹 핀의 상하왕복 운동을 하는 슬레노이드가 장착된 하부판, 상부판과 하부판을 연결하는 지지대, 픽킹 핀, 그리고 픽킹 핀의 운동을 안내하는 핀 지그부로 구성되어 있다. 하부판에는 픽킹 핀이 부착된 슬레노이드를 최대 16개까지 장착할 수 있으며 한 열에 8개씩 2열로 배치할 수 있도록 하였다. 슬레노이드에 장착된 픽킹 핀은 32mm 길이의 직경 2mm 스테인리스 스틸 봉을 제작하여 사용하였으며, 콜로니를 찍는 핀 끝부분은 직경 0.5mm가 되도록 원추형으로 가공하여 사용하였다. 그림 4에 픽킹 헤드의 구성도를 나타내었다.

3) 웰 플레이트 고정배드

웰 플레이트를 고정시키는 고정배드는 총 5개의 웰 플레이트를 고정시킬 수 있게 하였으며, 일정한 간격(100 mm)을 갖도록 배치하였고 재질은 알루미늄을 사용하였다. 그림 5는 웰 플레이트 고정배드의 사진을 나타낸 것이다.



(a) alcohol vessel (b) sonicator & heater
Fig. 5 The bed for fixing well plates Fig. 6 The picture of the sterilization devices.

4) 소독장치

콜로니를 픽킹하여 웰 플레이트에 콜로니를 이식한 픽킹 핀에는 잔여 콜로니가 묻어 있으며 다시 콜로니를 픽킹 하기 위해서는 핀에 묻어 있는 콜로니를 제거해야 한다. 핀을 소독하기 위한 장치는 초음파 세척기, 알코올이 담겨진 용기, 가열기로 구성하였다. 소독 과정은 픽킹 핀에 묻어 있는 콜로니 및 배양액을 털어내기 위해 초음파 세척기를 사용하였고, 핀의 1차 멸균을 위해 알코올

이 담겨있는 용기에 핀을 담그도록 하였으며, 마지막으로 핀을 가열하여 균류가 멸균되도록 2차 멸균을 하도록 하였다. 그림 6에 소독장치의 사진을 나타내었다.

다. 소프트웨어 설계

본 연구에서 개발된 콜로니 픽킹 시스템 제어 프로그램은 window 상에서 구동되는 Microsoft社의 Visual Basic 6.0 프로그램 언어를 사용하여 개발되었다.

프로그램을 실행시키면 시스템은 초기화를 실시하여 원점에 위치한다. 카메라가 장착된 픽킹 헤드부는 배양용기가 위치한 곳으로 이동하여 배양된 콜로니의 영상을 획득한다. 그 후 획득된 각각의 영상에서 콜로니를 분리하여, 콜로니로 판명된 점들의 위치를 원점을 기준으로 절대 좌표로 환산하여 기억한다.

영상처리에 의해 콜로니의 좌표를 인식한 후 시스템은 픽킹 헤드의 핀을 소독하기 위하여 미리 설정해 놓은 시간동안 초음파 세척기, 알코올, 세라믹 히터를 거치며 소독작업을 수행한다. 초음파 세척은 핀에 묻어 있는 콜로니의 찌꺼기를 떨어내는 역할을 하며, 알코올은 핀에 묻어있는 콜로니의 멸균작용을, 세라믹 히터 역시 콜로니의 멸균작용을 수행한다. 핀의 소독이 종료되면 핀을 일정시간동안 식힌 후 영상처리에 의해 처리된 콜로니의 위치를 순서대로 찾아 배양용기 회피 알고리즘을 이용하며 콜로니를 픽킹한다. 8개의 콜로니 픽킹을 마치면 웰 플레이트에 픽킹된 콜로니를 이식한다. 이후 다시 핀을 소독한 후 계속해서 콜로니 픽킹 작업을 수행한다.

프로그램 내에서 시스템 속도, 소독 시간 등의 파라미터를 설정할 수 있도록 하였다. 메인 창에는 콜로니 영상과 픽킹되는 콜로니가 표시될 수 있도록 하였으며 웰 플레이트 고정배드에 위치시킨 웰 플레이트 5개가 모두 사용되면 메시지를 출력하여 웰 플레이트를 교환할 수 있도록 하였다. 그림 7에는 픽킹 작업의 흐름도를 나타내었다.

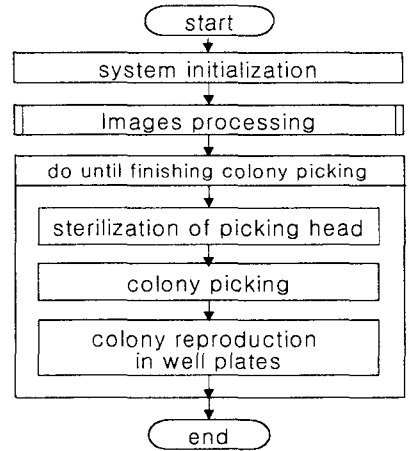


Fig. 7 The flow-chart of colony picking using the robot system

라. 성능실험

1) 픽킹 헤드 소독성능

픽킹 핀에 묻어 배양용기에서 웰 플레이트에 픽킹된 콜로니는 다른 콜로니를 픽킹하기 위해서 픽킹 핀으로부터 제거되어야 한다. 또한 복제 핀에 묻어 복제되는 콜로니도 다른 콜로니를 복제하기 위해서 핀으로부터 제거되어야 한다. 콜로니는 균 종류이기 때문에 멸균과정을 거쳐야 하므로 본 연구에서는 추⁶⁾ 등의 연구에서 실시한 초음파 세척, 알코올 소독, 세라믹 히터에 의한 멸균 과정을 이용하였다. 효율적인 핀의 소독을 위해 각 과정별 수행시간을 설정하였으며 콜로니 멸균을 위한 최소 시간을 선택하여 시스템에 적용하였다. 소독 성능실험 방법은 픽킹 핀에 콜로니를 묻힌 후 배양액만 들어있는 웰 플레이트에 임의로 이식을 실시하고 핀을 소독한 후 콜로니를 픽킹하지 않은 상태로 웰 플레이트에 픽킹작업을 수행하여 37°C 암상태에서 18시간동안 배양한 후 각 소독 과정별 시간에 따른 콜로니의 발생을 검사하여 소독 성능을 검증하였다. 그림 8에 소독과정을 나타내었다.

2) 콜로니 픽킹 성능

본 실험에서는 개발된 콜로니 픽킹 시스템을 이용하여 배추 게노믹 DNA를 가지고 있는 BAC 콜로니를 직접 픽킹하는 실험을 실시하였다. 배양용기에서 배양된 콜로니를 8개의 픽킹 핀으로 차

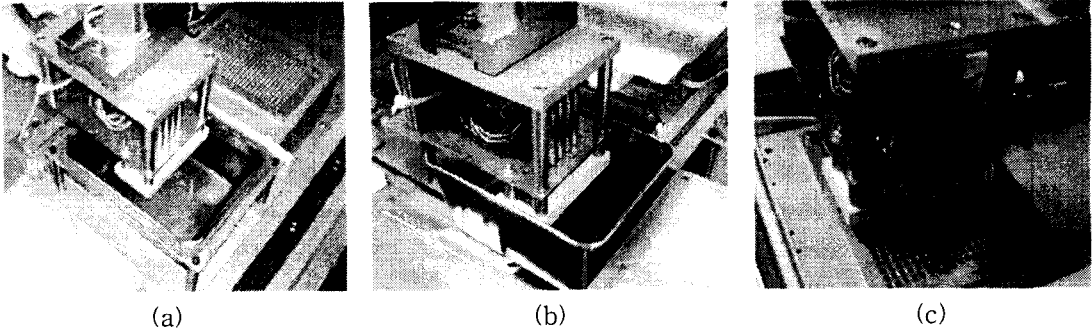


Fig. 8 The performance test for sterilization of picking and replication head.
 (a) washing colony and culture fluid from picking pin in sonicator
 (b) sterilization picking pin in alcohol
 (c) reesterilization picking pin above ceramic heater

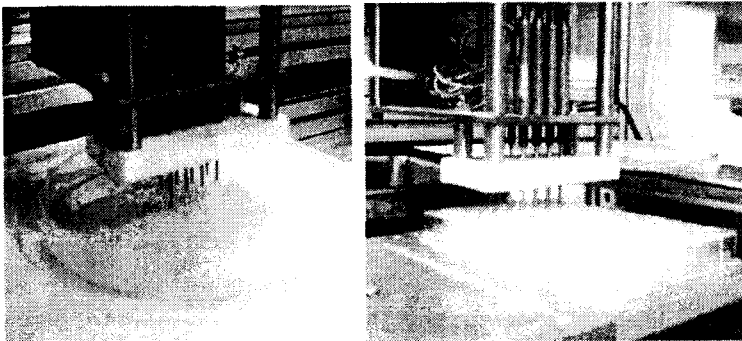


Fig. 9 The picture of colony picking robot system used in performance test.

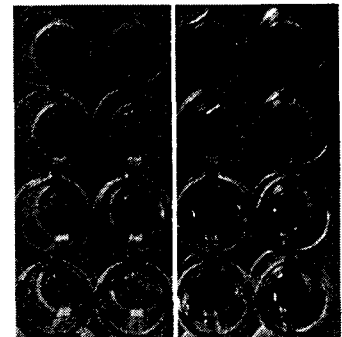


Fig. 10 The results of performance test for sterilizing colony picking pins.

레로 묻히고 배양액만 들어있는 웰 플레이트에 이식하게 하였다.

픽킹이 끝난 후 콜로니를 이식한 웰 플레이트에서 콜로니가 제대로 배양되는지 37°C 암상태에서 18 시간동안 배양한 후 검사하였고 그에 따라 픽킹 시스템의 성능을 검증하였다.

또한 시스템의 작업수행 시간을 수작업과 비교 분석하여 본 시스템의 사용이 적절한지의 타당성을 검토하였다. 그림 9는 픽킹 시스템의 성능실험을 하고 있는 모습이다.

3. 결과 및 고찰

가. 픽킹 헤드 소독성능 결과

실험결과 표 2와 같이 초음파 세척기를 이용하여 배양액을 털어낼 수 있는 최소의 시간은 10초로 설정하였으며, 균을 멸하기 위한 최소 시간으로는 균의 오염방지를 위한 안전을 고려하여 알코올에 담그는 시간을 10초, 세라믹 히터에 핀을 접촉하는 시간을 5초로 설정하였다.

그림 10은 핀 소독장치의 성능실험 결과를 나타낸 것이다. 그림은 콜로니를 픽킹한 웰 8개(왼쪽)와 본 실험결과에 의한 과정으로 소독한 핀을 8개(오른쪽)의 웰에 담근 후 37°C 암상태에서 18시간동안 배양한 후의 모습이다. 왼쪽 웰에는 콜로니가 배양되고 있는 모습이고, 오른쪽은 배양액만 그대로 있는 모습이다.

Table 2 The results of performance test for sterilizing colony picking pins;
 (a) sonicator operating time (b) alcohol and heater operating time

Sonicater operation time (sec)	Washing success (10 times)	Dipping time in alcohol (sec)	Heater operating time (sec)	Sterilizing success (10 times)										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
15	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○													
10	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	10	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7	○ × ○ ○ ○ ○ ○ ○ × ○ ○ ○	5	2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○ ○ × ○ × × ○ ○ × ×	3	2	×	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○
3	×	○	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
		1	2	○	×	○	○	×	×	○	×	○	×	×

○ : true, × : false

나. 콜로니 픽킹 성능 결과

성능실험 결과, 배양용기에서 배양된 콜로니를 픽킹하여 배양액만 들어있는 웰 플레이트에 이식시킨 후 웰 플레이트를 37℃ 암상태에서 18시간동안 배양해본 결과 웰 플레이트에서 콜로니가 배양되고 있는 것으로 나타났다.

표 3에 콜로니 픽킹 성능실험 결과를 나타내었다. 결과를 살펴보면 10개의 배양용기에서 배양된 콜로니를 픽킹한 결과 100%의 픽킹 성공률을 나타냈으며, 그림 11에서 보는 바와 같이 배양액만 들어있는 웰 플레이트의 경우 배양액이 맑은 색깔을 띠지만, 콜로니가 이식되어 배양된 배양액의 색깔은 뿌연 색깔을 띠게 된다.

또한, 핀 8개인 픽킹 헤드를 이용하여 핀 소독 및 콜로니 픽킹 작업을 수행할 경우 110초가 소요되었으며, 600개의 콜로니를 픽킹할 경우에는 2시간 18분이 소요되는 것으로 나타났다. 수작업의 경우는, 숙련된 작업자가 백금선이나 이쑤시개 등을 이용하여 픽킹 작업을 수행하고 있다. 백금선을 이용하는 경우는 하나의 콜로니를 픽킹한 후 알코올 램프에 백금선 끝을 달구어 균류를 멸균하고 식히는 과정이 첨가되어 시간적으로 콜로니 하나당 약 20초 정도의 시간이 소요되며 600개의 콜로니를 픽킹할 경우 3시간 20분이 소요된다. 또한 이쑤시개를 사용하는 경우에는 콜로니 하나 당 이쑤시개 하나를 사용하여 웰 플레이트에 이식하는 시간은 약 10초 내외이며 600개의 콜로니를 픽킹할 경우에는 1시간 40분이 소요되는 것으로 나타났다.

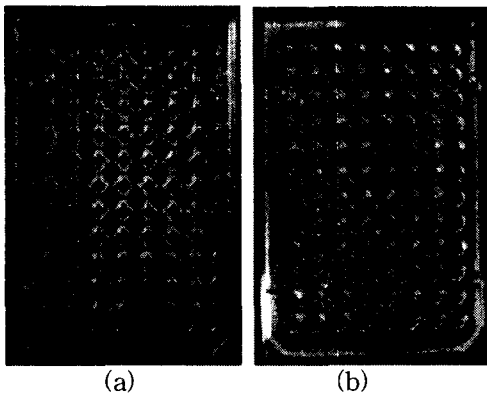


Fig. 11 The results of performance test picking colony ; (a) well plate containing only culture fluid, (b) well plate containing colony.

Item	No. of petri-dish										total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
No. of picked colony (EA)	568	595	641	558	657	639	511	539	621	567	5896
No. of cultured well (EA)	568	595	641	558	657	639	511	539	621	567	5896
No. of loss well (EA)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Success rate (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 3 The results of performance test picking colony

4. 요약 및 결론

현재, 우리나라에서 행해지고 있는 픽킹 작업은 실험실 작업의 경우 수작업에 의해 이루어지고 있으며, 사업단이나 전문 업체에서만 이나마 외국산 기계를 이용하고 있는 실정이다. 이는 생명공학 관련 사업 및 연구에서의 생산비를 높게돼 국내외적으로 생명공학의 경쟁력을 떨어뜨리게 한다.

따라서, 본 연구는 현행 수작업 및 값비싼 외국기계에 의해 진행되는 콜로니 픽킹 작업을 자동화 및 국산화하기 위해 콜로니 픽킹 시스템을 개발하였으며, 그 구체적인 연구 결과는 다음과 같다.

1. 본 연구에서는 콜로니 픽킹을 위한 시스템을 개발하였으며, 콜로니의 영상정보를 입력받는 영상획득부, 픽킹 헤드, 웰 플레이트 고정베드, 소독장치 등으로 구성하였다.
2. 8개의 슬레노이드에 장착된 픽킹 핀이 콜로니를 정확히 픽킹할 수 있도록 픽킹 헤드를 설계, 제작하였다.
3. 콜로니 픽킹 및 복제 헤드의 소독 작업 소요시간은 초음파 세척기에 10초, 알코올에 담그기 10초 그리고 히터에 근접시키기 5초 등으로 나타났다. 콜로니의 위치 검출을 통한 실제 픽킹 작업은 100%의 성공률을 나타냈다.
4. 콜로니 픽킹 공정에서 핀이 8개인 픽킹 헤드를 이용하여 핀 소독 및 콜로니 픽킹 작업에 소요되는 시간은 110초였으며, 600개의 콜로니를 픽킹할 경우에는 2시간 18분이 소요되었다. 이 작업 소요시간은 이쑤시개의 1시간 40분과 백금선의 3시간 20분의 중간 값으로 나타났다.

5. 참고 문헌

1. 이현동. 1998. 조직배양체 이식을 위한 소프트 그리퍼의 개발. 충남대학교 석사학위 논문
2. 이현동, 김기대, 김찬수, 김정필, 정 혁. 1999. 조직배양체 이식로봇 시스템의 개발(II) - 기계시각 시스템 -. 한국농업기계학회지. 24(1) : 41-50
3. 이현동, 김기대, 임용표, 김찬수. 2002. 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발(I) - 국내외 연구동향 -. 한국농업기계학회 2002 동계학술대회 논문집 7(1) : 407-412
4. 이현동, 김기대, 김찬수, 임용표. 2002. 유전자 검색을 위한 DNA chip 제작용 로봇 시스템의 개발(II) - 로봇 시스템의 성능실험 -. 한국농업기계학회 2002 하계학술대회 논문집 7(2) : 333-338
5. 이현동, 김기대, 김찬수, 나건영, 임용표. 2003. 콜로니 픽킹 로봇 시스템의 개발(I) - 콜로니 위치확인 영상처리 알고리즘 -. 한국농업기계학회 2003 동계학술대회 논문집 8(1) : 215-220
6. 최재완, 정광조, 문정기. 1997. 화상처리 기술에 의한 씨감자 조직배양 공정에서의 생육상태 모니터링. 한국농업기계학회 97 동계학술대회 논문집
7. 추창환. 2001. 유전체 연구용 그리딩 로봇 시스템 개발. 충남대학교 대학원
8. Su, C. L. 2000. Correct CCD Camera Lens Distortion by using XY Correction Coefficient. Proc. of SPIE Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial : 261-268