(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일
(11) 등록번호 10-2767442
(24) 등록일자 2025년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G06T 3/40 (2024.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G02B 21/00 (2022.01) *G02B 21/08* (2006.01)
G02B 21/14 (2006.01) *G02B 21/36* (2006.01)
G02B 27/60 (2022.01) *G06T 5/50* (2024.01)
(52) CPC특허분류
G06T 3/4069 (2024.01)
G01N 21/6458 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7013332
(22) 출원일자(국제) 2020년10월21일
심사청구일자 2023년10월10일
(85) 번역문제출일자 2022년04월20일
(65) 공개번호 10-2022-0085781
(43) 공개일자 2022년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/056718
(87) 국제공개번호 WO 2021/081129
국제공개일자 2021년04월29일
(30) 우선권주장
62/924,130 2019년10월21일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20190234911 A1
KR1020150134119 A

(73) 특허권자
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
(72) 발명자
랑글루아 로버트 에즈라
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
영 앤드류 제임스
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 이정은

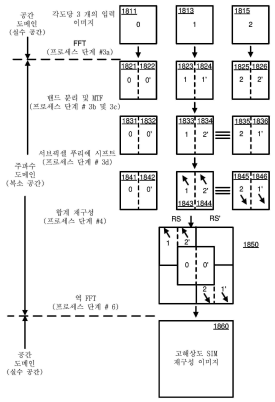
(54) 발명의 명칭 **구조화 조명 현미경법을 위한 향상된 계산 효율**

(57) 요 약

개시된 기술은 구조화 조명 현미경법(SIM: Structured Illumination Microscopy)에 관한 것이다. 특히, 개시된 기술은 큰 이미지 평면에 걸쳐 수많은 이미지 타일을 실시간으로 캡처 및 처리하고, 이들을 서브타일들로 분할하고, 서브타일들을 효율적으로 처리하고, 서브타일들로부터 향상된 해상도 이미지들을 생성하는 것에 관한

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도18



것이다. 향상된 해상도 이미지들은 향상된 이미지들로 조합될 수 있으며 후속의 분석 단계에서 사용될 수 있다. 개시된 기술은 표적의 구조화 조명으로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하는 데 필요한 컴퓨팅 리소스를 저감시키는 로직을 포함한다. 구조화 조명 하에서 캡처된 표적의 이미지로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하기 위한 방법이 기술된다. 이러한 방법은 비중복 데이터에 하나 이상의 변환을 적용한 다음 변환 후 비중복 데이터로부터 중복 데이터를 복구한다.

(52) CPC특허분류
G02B 21/0032 (2013.01)
G02B 21/008 (2013.01)
G02B 21/082 (2013.01)
G02B 21/14 (2013.01)
G02B 21/367 (2013.01)
G02B 27/60 (2022.01)
G06T 5/50 (2024.01)
G06T 2207/10056 (2013.01)
G06T 2207/20056 (2013.01)

(72) 발명자
헤이베르그 앤드류 닷지
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
루 보
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200

(30) 우선권주장
62/924,138 2019년10월21일 미국(US)
17/075,692 2020년10월21일 미국(US)
17/075,694 2020년10월21일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로세서에 의해 수행되는, 구조화 조명 하에서 캡처된 표적의 이미지로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하는 방법으로서,

공간 도메인의 센서에 의해 캡처된 상기 표적의 적어도 3개의 이미지를 하나의 각도를 따른 상기 구조화 조명의 적어도 3개의 위상 변위로부터 푸리에 도메인으로 변환하여 각각이 복소 계수의 제1 블록 및 상기 제1 블록에 대해 켤레인 중복되는 복소 계수의 제2 블록을 포함하는 적어도 3개의 주파수 도메인 행렬을 생성하는 단계;

추정된 재구성 파라미터를 사용하여, 상기 제1 블록에 역 혼합 행렬을 적용하여 상기 푸리에 도메인에서 시프트되지 않은 절반 행렬과 시프트된 절반 행렬인 적어도 3개의 위상 분리 절반 행렬을 생성하는 단계;

상기 위상 분리 절반 행렬에 대해 하나 이상의 중간 변환을 수행하는 단계 - 상기 하나 이상의 중간 변환을 수행하는 단계는,

상기 시프트된 절반 행렬을 상기 푸리에 도메인에서 상기 공간 도메인으로 변환하고, 상기 공간 도메인의 데이터에 병진 벡터를 적용하고, 상기 공간 도메인 데이터로부터 병진된 데이터를 다시 상기 푸리에 도메인으로 변환하여 재정렬 시프트된 절반 행렬을 생성함으로써 서브픽셀을 시프트하는 단계를 포함하고, 상기 병진 벡터를 적용하는 단계는 상기 이미지를 캡처한 상기 센서의 제한된 공간 해상도를 보상함 -;

상기 중간 변환 후, 상기 시프트되지 않은 절반 행렬과 상기 재정렬 시프트된 절반 행렬로부터 복소 계수를 켤레로서 각각의 제2 블록 위치에 복사하여 - 여기에는 복사된 복소 계수의 허수 부분의 부호를 변경하는 것이 포함됨 - 상기 절반 행렬로부터 시프트된 전체 행렬 및 시프트되지 않은 전체 행렬을 생성함으로써, 상기 푸리에 도메인에서 제2 블록의 복소 계수를 계산하여 상기 절반 행렬로부터 전체 행렬을 생성하는 단계;

상기 시프트되지 않은 전체 행렬 및 상기 시프트된 전체 행렬의 중첩 복소 계수를 정렬하고 합산하여 확장된 주파수 커버리지 행렬을 생성하는 단계; 및

상기 푸리에 도메인으로부터 상기 확장된 주파수 커버리지 행렬을 역변환하여 상기 공간 도메인에서 향상된 해상도 이미지를 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 향상된 해상도 이미지는 상기 표적의 핵산 시퀀싱의 하나 이상의 사이클에 대해 반복적으로 생성되는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 블록의 상기 복소 계수의 위치는, 코너 시프트된 행렬에 배열될 때, 상기 제1 블록의 상기 복소 계수의 위치로부터 180도 회전되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 중간 변환 동안, 1단계 또는 2단계 위너 필터링을 적용하여 노이즈를 저감시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 중간 변환 동안 아포디제이션 필터링을 적용하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 푸리에 도메인의 상기 위상 분리 행렬은 짝수의 행과 짝수의 열을 포함하고, 상기 방법은 상기 시프트된 행렬들 사이에 DC 복소 계수의 DC 열 및 다른 복소 계수의 중간 열을 동일하게 설정하는 단계를

더 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 푸리에 도메인의 상기 위상 분리 행렬 중 적어도 하나는 코너 시프트되고, DC 복소 계수는 상기 행렬의 상단 행 및 좌측 열에 나타나고, 상기 복소 계수 켤레는 상기 제1 블록의 배향으로부터 180도 회전된 제2 블록에 나타나는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 방법을 상기 표적의 상기 구조화 조명의 2개의 각도를 따른 위상 변위로부터 상기 공간 도메인의 센서에 의해 렌즈를 통해 캡처된 상기 표적의 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용하는 단계를 더 포함하고, 상기 표적은 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하고, 상기 구조화 조명의 상기 2개의 각도는 상기 규칙적으로 이격된 나노웰 중 사변형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따라 있는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 방법을 상기 표적의 상기 구조화 조명의 3개의 각도를 따른 위상 변위로부터 상기 공간 도메인의 센서에 의해 렌즈를 통해 캡처된 상기 표적의 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용하는 단계를 더 포함하고, 상기 표적은 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하고, 상기 3개의 각도는 상기 규칙적으로 이격된 나노웰 중 육각형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따라 있는, 방법.

청구항 10

메모리에 결합된 하나 이상의 프로세서를 포함하는 시스템으로서,

상기 메모리에는 구조화 조명 하에서 캡처된 표적의 이미지로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하게 하는 컴퓨터 명령어가 로딩되고, 상기 컴퓨터 명령어는, 상기 하나 이상의 프로세서에서 실행될 때,

공간 도메인의 센서에 의해 캡처된 상기 표적의 적어도 3개의 이미지를 하나의 각도를 따른 상기 구조화 조명의 적어도 3개의 위상 변위로부터 푸리에 도메인으로 변환하여 각각이 복소 계수의 제1 블록 및 상기 제1 블록에 대해 켤레인 중복되는 복소 계수의 제2 블록을 포함하는 적어도 3개의 주파수 도메인 행렬을 생성하는 단계;

추정된 재구성 파라미터를 사용하여, 상기 제1 블록에 역 혼합 행렬을 적용하여 상기 푸리에 도메인에서 시프트되지 않은 절반 행렬과 시프트된 절반 행렬인 적어도 3개의 위상 분리 절반 행렬을 생성하는 단계; 상기 위상 분리 절반 행렬에 대해 하나 이상의 중간 변환을 수행하는 단계 - 상기 하나 이상의 중간 변환을 수행하는 단계는,

상기 시프트된 절반 행렬을 상기 푸리에 도메인에서 상기 공간 도메인으로 변환하고, 상기 공간 도메인의 데이터에 병진 벡터를 적용하고, 상기 공간 도메인 데이터로부터 병진된 데이터를 다시 상기 푸리에 도메인으로 변환하여 재정렬 시프트된 절반 행렬을 생성함으로써 서브픽셀을 시프트하는 단계를 포함하고, 상기 병진 벡터를 적용하는 단계는 상기 이미지를 캡처한 상기 센서의 제한된 공간 해상도를 보상함 -;

상기 중간 변환 후, 상기 시프트되지 않은 절반 행렬과 상기 재정렬 시프트된 절반 행렬로부터 복소 계수를 켤레로서 각각의 제2 블록 위치에 복사하여 - 여기에는 복사된 복소 계수의 허수 부분의 부호를 변경하는 것이 포함됨 - 상기 절반 행렬로부터 시프트된 전체 행렬 및 시프트되지 않은 전체 행렬을 생성함으로써, 상기 푸리에 도메인에서 제2 블록의 복소 계수를 계산하여 상기 절반 행렬로부터 전체 행렬을 생성하는 단계;

상기 시프트되지 않은 전체 행렬 및 상기 시프트된 전체 행렬의 중첩 복소 계수를 정렬하고 합산하여 확장된 주파수 커버리지 행렬을 생성하는 단계; 및

상기 푸리에 도메인으로부터 상기 확장된 주파수 커버리지 행렬을 역변환하여 상기 공간 도메인에서 향상된 해상도 이미지를 생성하는 단계

를 포함하는 작업을 구현하는, 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 하나 이상의 프로세서에서 실행될 때 상기 컴퓨터 명령어에 의해, 향상된 해상도 이미지는 상기 표적의 핵산 시퀀싱의 하나 이상의 사이클에 대해 반복적으로 생성되는, 시스템.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 제2 블록의 상기 복소 계수의 위치는, 코너 시프트된 행렬에 배열될 때, 상기 제2 블록의 상기 복소 계수의 위치로부터 180도 회전되는, 시스템.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 컴퓨터 명령어는, 상기 하나 이상의 프로세서에서 실행될 때, 상기 중간 변환 동안 1단계 또는 2단계 위너 필터링을 적용하여 노이즈를 저감시키는 단계를 포함하는 작업을 더 구현하는, 시스템.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 컴퓨터 명령어는, 상기 하나 이상의 프로세서에서 실행될 때, 상기 중간 변환 동안 아포디제이션 필터링을 적용하는 단계를 포함하는 작업을 더 구현하는, 시스템.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 컴퓨터 명령어는, 상기 하나 이상의 프로세서에서 실행될 때, 해당 방법을 상기 표적의 상기 구조화 조명의 2개의 각도를 따른 위상 변위로부터 상기 공간 도메인의 센서에 의해 렌즈를 통해 캡처된 상기 표적의 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용하는 단계를 포함하는 작업을 더 구현하고, 상기 표적은 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하고, 상기 구조화 조명의 상기 2개의 각도는 상기 규칙적으로 이격된 나노웰 중 사변형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따라 있는, 시스템.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 우선권 출원

[0002] 본 출원은 발명의 명칭이 "Systems and Methods for Structured Illumination Microscopy"(대리인 사건 번호 ILLM 1012-1)이고 출원일이 2019년 10월 21일인 미국 특허 가출원 제62/924,130호 및 발명의 명칭이 "Increased Calculation Efficiency for Structured Illumination Microscopy"(대리인 사건 번호 ILLM 1022-1)이고 출원일이 2019년 10월 21일인 미국 특허 가출원 제62/924,138호의 이익을 주장하며 이들을 참고로 포함한다. 본 출원은 또한 발명의 명칭이 "Systems and Methods for Structured Illumination Microscopy"(대리인 사건 번호 ILLM 1012-2)이고 출원일이 2020년 10월 21일인 미국 정규 특허 출원 제17/075,692호 및 발명의 명칭이 "Increased Calculation Efficiency for Structured Illumination Microscopy"(대리인 사건 번호 ILLM 1022-2)이고 출원일이 2020년 10월 21일인 미국 정규 특허 출원 제17/075,694호 - 이들은 모두가 상술한 가출원의 이익을 주장하는 출원임 - 의 우선권을 주장하며 이들을 참고로 포함한다.

[0003] **참고 문헌**

[0004] 다음의 문헌들은 본원에 그 전체 내용이 기술된 것처럼 모든 목적을 위해 인용되어 포함된다: 발명의 명칭이 "Device for Luminescent Imaging"이고 출원일이 2018년 6월 29일인 미국 특허 가출원 제62/692,303호(미공개) 및 출원일이 2019년 6월 29일인 미국 정규 특허 출원 "Device for Luminescent Imaging"(대리인 사건 번호 IP-1683-US).

[0005] **개시된 기술의 분야**

[0006] 개시된 기술은 구조화 조명 현미경법(SIM: Structured Illumination Microscopy)에 관한 것이다. 특히, 개시된 기술은 큰 이미지 평면에 걸쳐 수많은 이미지 타일을 실시간으로 캡처 및 처리하고, 이들을 서브타일들로 분할하고, 서브타일들을 효율적으로 처리하고, 서브타일들로부터 향상된 해상도 이미지들을 생성하는 것에 관한 것이다. 향상된 해상도 이미지들은 향상된 이미지들로 조합될 수 있으며 후속의 분석 단계에서 사용될 수 있다.

[0007] 개시된 기술은 구조화 조명 현미경법에 관한 것이다. 특히, 개시된 기술은 큰 이미지 평면에 걸쳐 수많은 이미지 타일을 실시간으로 처리하는 데 필요한 계산을 줄이고, 이미지 타일/서브타일로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하는 것에 관한 것이다. 이와 다른 경우에서는 필요했던 곱셈과 나눗셈의 거의 절반이, SIM 처리 체인의 일부 중간 변환 동안, 기술되는 에르미트 대칭(Hermitian symmetry)의 특정 이용을 사용하는 룩업 동작으로 대체될 수 있다.

배 경 기 술

[0008] 본 항목에서 논의되는 주제는 단지 본 항목에서 언급된다는 결과만을 가지고 종래 기술이라고 가정되어서는 안 된다. 유사하게, 본 항목에서 언급되거나 배경 기술로서 제공되는 주제와 연관된 문제는 종래 기술에서 이전에 인식되었다고 가정되어서는 안 된다. 본 항목에서의 주제는 단지 상이한 접근 방식들을 표현하는 것일 뿐이고, 접근 방식들 자체도 또한 청구되는 기술의 구현예들에 해당할 수 있다.

[0009] 10년도 더 전에, 구조화 조명 현미경법의 선구자들은 노벨 물리학상을 받았다. 아베 회절(Abbe diffraction) 한계를 넘어선 이미지 해상도의 향상은 뛰어난 발전이었다.

[0010] 개별 세포의 일부와 같은 생물학적 샘플을 이미지화하는 데 2D 및 3D SIM 모두가 적용되어 왔다. 세포의 내부를

연구하려는 많은 노력이 들어갔고 그 노력의 결과로 많은 대안적인 기술적 변화가 생겨났다.

[0011] 이미지 평면에 걸쳐 펼쳐진 수백만 개의 소스를 영상 분해하는 것은 세포 내부를 들여다보는 것과는 아주 다른 문제를 나타낸다. 예컨대, 드러나 있는 새로운 접근 방식들 중 하나는 수많은 이미지를 정반사 조명(specular illumination)과 조합하여 대규모 계산 후에 향상된 해상도 이미지를 생성하는 것이다. 알맞은 리소스들을 이용한 큰 이미지 평면의 실시간 처리에는 이러한 최근에 취해지고 있는 노력과는 근본적으로 다른 접근 방식이 필요하다.

[0012] 따라서, 컴퓨팅 리소스에 대한 요구 사항들을 감소시키면서 큰 이미지 평면을 처리하도록 구성된 새로운 방법 및 시스템을 도입할 기회가 발생한다.

도면의 간단한 설명

[0013] 본 출원의 흑백 도면에 대응하는 우선권 출원의 컬러 도면은 USPTO로부터 PAIR에서 보충 콘텐츠(Supplemental Content) 탭을 통해 입수할 수 있다. 도면에서, 유사한 도면 부호는 일반적으로 상이한 도면들 전체에 걸쳐서 유사한 부분들을 지칭한다. 또한, 도면은 반드시 실척이 아니며, 그 대신에 일반적으로는 개시된 기술의 원리를 예시하는 데 중점을 둔다. 아래의 설명에서, 개시된 기술의 다양한 구현예가 아래의 도면을 참조하여 설명된다.

도 1a는 격자를 사용하여 1차원(1D) 변조로 형성된 모아레 프린지(Moiré fringe)를 도시한다.

도 1b는 2차원(2D) 구조화 조명 패턴에 의해 생성된 조명 강도의 그래픽 도해를 나타낸다.

도 1c는 나노웰(nanowell) 배열에 대한 예시적인 기하학적 패턴을 예시한다.

도 2는 샘플을 이미지화하기 위해 공간적으로 구조화된 여기 광을 활용할 수 있는 구조화 조명 현미경법 이미징 시스템을 예시한다.

도 3은 2-암(two-arm) SIM 이미징 시스템의 예시적인 광학 구성을 예시하는 광학 시스템 다이어그램이다.

도 4a 및 **도 4b**는 이중 광학 격자 슬라이드 SIM 이미징 시스템의 광학 구성을 예시하는 예시적인 개략도이다.

도 5a는 SIM 이미징 시스템에서 발생할 수 있는 간격 파라미터의 바람직하지 않은 변화를 예시한다.

도 5b는 SIM 이미징 시스템에서 발생할 수 있는 위상 파라미터의 바람직하지 않은 변화를 예시한다.

도 5c는 SIM 이미징 시스템에서 발생할 수 있는 배향 파라미터의 각도의 바람직하지 않은 변화를 예시한다.

도 6은 SIM 이미징 시스템의 수직 및 수평 격자에 의해 샘플의 평면에 투영될 수 있는 단순화된 조명 프린지 패턴을 예시한다.

도 7은 이중 광학 격자 슬라이드 SIM 이미징 시스템의 제1 및 제2 격자에 의해 평면에 투영될 수 있는 단순화된 조명 프린지 패턴을 예시한다.

도 8a는 확대하는 렌즈의 왜곡으로 인해 휘어진 평행 선들의 간략화된 도면이다.

도 8b 및 **도 8c**는 명목상으로 평행한 선들 사이의 간격을 예시한다.

도 8d는 전체 시야(FOV) 이미지의 서브타일들 또는 서브필드들의 일례를 도시한다.

도 9는 적색으로 표시된 관찰 데이터 지점들에 잘 피팅되는 컬러 코딩된 표면을 개략적으로 도시하는 것이다.

도 10a 및 **도 10b**는 중심 부근(near-center) 서브필드의 간격에 대한 측정 간격의 뒤집힌 사발 모양을 예시한다.

도 11a, **도 11b** 및 **도 11c**는 측정된 간격 왜곡을 2차 및 3차 표면 피팅과 비교한다.

도 12a는 곡선 피팅으로 평활화되지 않은 측정 데이터 지점들을 예시한다.

도 12b는 2차 피팅된 표면과 비교한 실제 데이터를 예시한다.

도 13a 내지 **도 13e**는 센서 경계를 따른 크롭에 의한 곡선 피팅의 개선을 예시한다.

도 14a는 상이한 수축 계수에서 평균 제곱 오차(MSE)의 감소를 그래픽으로 예시한다.

도 14b 내지 **도 14g**는 전체 FOV 이미지 데이터에 적용된 수축 계수를 점진적으로 증가시킴으로써 각도 왜곡 모

델에 대한 2차 피팅의 개선을 예시한다.

도 14h는 수축 계수의 값이 6일 때의 2차 표면 피팅의 약간의 개선을 예시하는 그래픽 플롯이다.

도 15a 및 **도 15b**는 전체 FOV 이미지 데이터에 걸쳐 프린지 간격 왜곡(A)과 프린지 각도 왜곡(B)을 피팅함으로써 얻은 응답 표면의 2차 피팅을 예시한다.

도 16a는 서브타일 좌표계로부터 전체 FOV 이미지 좌표계로의 서브타일 위상 오프셋의 병진(translation)을 예시한다.

도 16b는 서브타일 좌표계 및 전체 FOV 이미지 좌표계에 대한 서브타일 내 지점의 위치를 예시한다.

도 17은 전체 FOV 이미지의 서브타일에 대한 예시적인 위상 바이어스 룩업 테이블이다.

도 18은 비중복 서브타일 SIM 이미지 재구성 알고리즘에서 프로세스 단계의 상위 수준 개요이다.

도 19는 짝수 및 홀수의 행과 열을 갖는 행렬에 대한 푸리에 공간의 대칭을 예시한다.

도 20은 하나의 조명 피크 각도로 획득한 3개의 획득 이미지를 나타내는 주파수 도메인에서 전체 행렬의 비중복 및 중복 절반들을 예시한다.

도 21는 하나의 조명 피크 각도로 획득한 3개의 이미지를 나타내는 주파수 도메인에서 3개의 행렬의 비중복 절반들의 재구성을 예시한다.

도 22는 **도 21**의 재형성된 행렬과 역 밴드 분리 행렬의 곱에 의한 밴드 분리 프로세스를 예시한다.

도 23a는 행렬에 적용되는 (1, 1) 시프트 연산의 예를 예시한다.

도 23b 및 **도 23c**는 비중복 SIM 이미지 재구성에서 제1 및 중간 열의 평균화를 예시한다.

도 24는 개시된 기술을 구현하는데 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템의 단순화된 블록 다이어그램이다.

도 25a 및 **도 25b**는 SIM 이미지 재구성 알고리즘에서 업데이트로 필터(%PF) 메트릭을 통과하는 클러스터의 오류율 및 백분율의 개선을 보여준다.

도 26a 내지 **도 26c**는 시퀀싱 실행에서 다수의 사이클에 걸친 오류율의 개선에 대한 그래픽 예시를 보여준다.

도 26d는 기준(Baseline) SIM 알고리즘에서 위상 학습 및 스티치 조정(stitch fixing) 기법의 포함에 의한 오류율 개선의 그래픽 플롯을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 아래의 논의는 어느 당업자라도 개시된 기술을 제조하고 사용할 수 있게 하도록 제시되며, 특정의 응용 및 그의 요건과 관련하여 제공된다. 개시된 구현예에 대한 다양한 변형은 당업자에게 용이하게 명백할 것이며, 본원에서 정의된 일반적인 원리는 개시된 기술의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다른 구현예 및 응용에 적용될 수 있다. 따라서, 개시된 기술은 도시된 구현예로 제한되도록 의도된 것이 아니라, 본원에 개시된 원리 및 특징과 일치하는 가장 넓은 범주에 부합되어야 한다.

[0015] **서문**

[0016] 2차원 및 3차원의 구조화 조명 현미경법은 이미지 캡처 시스템의 해상도를 향상시키기 때문에 연구원들이 살아있는 세포의 내부 구조와 심지어 생물학적 물질의 분자 배열까지 조사하는 데 도움을 주었다. 예를 들어, 문헌[Sydor, Andrew & Czymmek, Kirk & Puchner, Elias & Mennella, Vito. (2015). Super-Resolution Microscopy: From Single Molecules to Supramolecular Assemblies. Trends in Cell Biology. 25. 10.1016/j.tcb.2015.10.004]; 또한 문헌[Lal et al. 2015, A., Shan, C., & Xi, P. (2015). Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 22(4), 50-63] 참조. SIM 처리에 대한 재교육을 원하는 독자를 위해, "Lal et al. 2015"는 사용된 수학식을 유도하는 것 외에도 예시 및 수학적 설명의 훌륭한 조합이다. 본 개시내용은 SIM 기술을 개별적으로 또는 조합되어 사용될 수 있는 몇몇의 기술로 플로우 셀의 이미지 처리로 확장한다.

[0017] SIM은 수백만 개의 샘플 지점으로부터의 형광 신호를 갖는 플로우 셀들로부터 조밀하게 가득찬 샘플들을 분리하는 가능성을 제공하여, 처리에 필요한 시약들을 줄이고 이미지 처리량을 증대시킬 수 있다. 비결은 SIM 기법을 사용하여 인접 광원을 분리하기 위한 아베 회절 한계보다도 더 가깝게 함께 밀집된 형광 샘플들을 분리하는 것

이다. 샘플들은 규칙적으로 간격을 둔 나노웰들에 있거나 무작위로 분포된 클러스터들일 수 있다. 이어지는 설명의 대부분은 패턴화된 나노웰들에 관한 것이지만 SIM 기술은 무작위로 분포된 클러스터들에도 적용된다.

[0018] 렌즈 왜곡 및 필요한 계산 리소스와 관련된 기술적 문제는 밀집된 소스들을 분리하는 데서 발생한다. 본 개시내용은 이러한 기술적 문제를 다룬다.

[0019] 구조화 조명은 보통의 조명보다 몇 배만큼 많이 분리된 조명원들을 갖는 이미지들을 생성할 수 있다. 정보는 간단히 생성되는 것이 아니다. 대신에, 구조화 조명의 다양한 각도 및 위상 변위를 갖는 다수의 이미지를 사용하여 밀접하게 이격되어 달리 분리할 수 없는 높은 공간 주파수 특성을 아베 회절 한계를 위반하지 않고 광학 시스템에 의해 감지될 수 있는 더 낮은 주파수 신호로 변환한다. 이러한 한계는 광 및 광학의 본질에 의해 이미징에 물리적으로 부과되며, 최종 대물 렌즈의 조명 파장 및 개구수(numerical aperture: NA)의 함수로서 표현된다. SIM 재구성을 적용하여, 다수의 이미지로부터의 정보가 공간 도메인으로부터 푸리에 도메인으로 변환되고, 조합 및 처리된 다음, 향상된 이미지로 재구성된다.

[0020] SIM에서는, 조명원과 샘플 사이에 격자를 사용하거나 간섭 패턴을 생성하여 사인 또는 코사인 함수에 따라 강도가 달라지는 패턴과 같은 조명 패턴을 생성한다. SIM과 관련해서, "격자"는 때로는, 구조화 조명 패턴을 생성하는 표면 외에, 투영된 구조화 조명 패턴을 지칭하는 데에도 사용된다. 구조화 조명 패턴은 대안적으로 분할 간섭성 빔의 부분들 사이의 간섭 패턴으로서 생성될 수 있다.

[0021] 예를 들어, 도 1에서 샘플 평면 상으로의 구조화 조명의 투영은 샘플의 형광성(또는 반사형) 소스와 조명 패턴을 혼합하여, 때때로 모아레 프린지 또는 에일리어싱(aliasing)이라고도 하는 새로운 신호를 유도한다. 새로운 신호는 높은 공간 주파수 정보를 아베 회절 한계를 위반하지 않고서 캡처할 수 있는 더 낮은 공간 주파수로 시프트한다. 도 1a에 도시된 바와 같이 1D 강도 변조 패턴으로 조명되거나 또는 도 1b에 도시된 바와 같이 2D 강도 변조 패턴으로 조명된 샘플의 이미지들을 캡처한 후, 일차 연립방정식을 풀어 모아레 프린지 또는 에일리어싱의 다수의 이미지로부터 더 높은 공간 주파수에서 더 낮은 공간 주파수로 시프트된 정보를 포함하는 새로운 신호의 부분들을 추출하는 데 사용된다. 상기 일차 연립방정식을 풀기 위해, 3개 이상의 이미지가 단계적으로 시프트되거나 변위된 구조화 조명 패턴으로 캡처된다. 종종 각도(1 내지 5개의 각도 포함)당 다양한 위상(3 내지 7 위상)의 이미지가 분석을 위해 캡처된 다음 푸리에 도메인 시프팅 및 재조합을 위해 밴드로 분리된다. 이미지의 수를 증가시키는 것은 신호 대 잡음비를 증가시킴으로써 재구성된 이미지의 품질을 개선할 수 있다. 그러나, 이는 또한 계산 시간을 증가시킬 수 있다. 밴드 분리된 이미지의 푸리에 표현은 시프트되고 합산되어 재구성된 합을 생성한다. 결국, 역 고속 푸리에 변환(FFT)은 재구성된 합으로부터 새로운 고해상도 이미지를 재구성한다.

[0022] 다중 이미지 및 시프팅 접근 방식의 적용은 1D 구조화 조명 패턴이 시프트하는 특정 방향의 이미지 정보만 향상시키므로, 구조화 조명 또는 격자 패턴은 회전되고 시프팅 절차는 반복된다. 1D 패턴의 45, 60, 90, 또는 120도와 같은 회전을 적용하여 3단계 세트로 6개 또는 9개의 이미지를 생성할 수 있다. 청색 및 녹색 컬러 레이저로 인한 플로우 셀 표면의 분자 손상, 플로우 셀 표면의 타일 기울기 등과 같은 환경 요인은 전체 시야(FOV) 이미지의 이미지 서브타일 또는 서브윈도우에 대한 위상 바이어스 추정에서 왜곡을 야기할 수 있다. 또한 기판에 걸쳐 타일 간의 차이를 야기할 수 있다. SIM 이미지 재구성 파라미터의 보다 빈번한 추정은 이러한 환경 요인을 보상하기 위해 수행될 수 있다. 예를 들어, 서브타일의 위상 바이어스는 이러한 오차를 최소화하기 위해 타일마다, 재구성 사이클마다 재추정될 수 있다. 각도 및 간격 파라미터는 위상 바이어스만큼 자주 변경되지 않으므로 추정 주파수의 증가는 불필요한 추가 계산을 초래할 수 있다. 그러나, 필요한 경우 각도 및 간격 파라미터는 더 자주 계산될 수 있다.

[0023] **플로우 셀 이미지 분석에 대한 SIM의 적용**

[0024] 수백만 개의 형광성 샘플로 플로우 셀을 이미지화하는 것은 살아있는 세포의 미세 구조를 연구하는 것보다는 망원경으로 공간을 스캐닝하는 것과 더 비슷하다. 경제적인 광학 장치로 플로우 셀을 스캐닝하는 것은 Mount Palomar Observatory의 적응 광학 장치를 사용하는 것보다는 instamatic 카메라로 이미지를 캡처하는 것과 더 비슷하다. 플로우 셀 또는 하늘의 스캐닝은 렌즈의 스위트 스팟에서 살아있는 세포를 이미지화하는 것과는 대조적으로 표적의 타일들을 망라하는 수많은 이미지를 포함한다. 임의의 표적을 망라하는 데 필요한 이미지의 수는 각 이미지 타일의 시야와 중첩의 정도에 따라 달라진다. 경제적인 렌즈는 시야의 가장자리에서의 왜곡을 악화시켜 향상된 이미지 생성을 복잡하게 한다.

[0025] SIM 재구성에 사용되는 계산은 렌즈 왜곡, 특정 이미지 세트의 패턴 정렬, 및 몇 시간이나 진행되는 이미징 사

이클에 걸친 패턴 정렬에 대한 열 효과에 민감하다. 중심에서의 스위트 스팟 대신에 렌즈의 대부분을 사용하는 시야의 증가는 렌즈의 수차들에 의해 유도되는 왜곡에 대해 SIM 이미지 재구성을 민감하게 한다. 코마와 같은 이러한 수차는 구조화 조명 패턴을 왜곡하고 조명 피크의 평행 선이 도 8a에 일반적으로 도시된 바와 같이 곡선으로 나타나게 하여, 패턴의 밝기 피크와 분명한 패턴 각도 사이의 거리를 변화시킨다.

[0026] 실용적인 기기는 한 타일의 서브타일들에 걸쳐 왜곡과 오프셋을 매핑하는 특성화를 필요로 한다. 사이클에 걸친 플로우 셀 이미징의 지속 시간으로 인해 일부 기기는 작동의 시작 시 또는 작동 중에도 업데이트된 특성화로부터 이점을 얻을 수 있다. 수백 사이클의 플로우 셀 이미징의 여러 시간 경과에 걸친 열 왜곡은 구조화 조명의 각도, 간격 및 위상(시프트)을 가끔씩 또는 정기적으로 재특성화하는 것을 유용하게 할 수 있다.

[0027] 투영된 구조화 조명 패턴의 각도(회전) 및 간격(스케일)은 기기가 특성화될 때 프린지 피크 추정에 의해 결정될 수 있다. 스테핑의 방향을 따라 반복 패턴의 추정된 위상 또는 변위는 0 내지 360도의 공간 시프트로 표현되거나 라디안으로 표현될 수 있다. 렌즈 전체에 걸친 왜곡은 파라미터 추정을 복잡하게 하여, 수많은 이미지로부터 계산 비용이 많이 드는 재구성의 제안을 초래한다. 예를 들어, 문헌[Ayuk et al. (2013) Structured illumination fluorescence microscopy with distorted excitations using a filtered blind-SIM algorithm. Optics letters. 38. 4723-6. 10.1364/OL.38.004723]; 및 문헌[Mudry et al. (2012) Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. Nature Photonics. 6. 312-315] 참조. 개시된 기술은 반복되는 파라미터 추정을 단순화하고 반복되는 추정 사이클에 필요한 계산을 줄인다.

[0028] SIM 재구성을 위한 실시간 파라미터 추정은 계산하는데 도전이 된다. SIM 재구성에 필요한 계산 능력은 이미지 필드 또는 서브필드의 픽셀의 수에 대한 3차 관계로 증가한다. 예를 들어, 너비가 M 픽셀이고 높이가 N 픽셀인 이미지의 경우 푸리에 변환은 k*M*N(log(M*N))의 계산 복잡도를 가질 수 있다. 그러므로 SIM 이미지 재구성을 위한 리소스의 차수는 이미지의 픽셀의 수가 증가함에 따라 2차 $O(N^2)$와 3차 $O(N^3)$ 사이에서 증가할 수 있다. 따라서, 예컨대 512x512에서 1024x1024로와 같은, 이미지 치수의 2배 증가는 결과적으로 계산 비용에서 최대 8배의 증가를 가져올 수 있다. 스캐닝이 진행되는 동안, 0.3초마다 한 번 완료된 재구성의 속도로 CPU 상에서 6개 또는 9개의 20 메가픽셀 이미지로부터 향상된 이미지를 재구성하는 것은 특히 도전이 된다. 실시간 처리는 저장 요구 사항을 줄이고 스캐닝 및 시퀀싱이 진행됨에 따라 여러 시간에 걸쳐 플로우 셀 처리의 품질을 추적하는 데 바람직하다. 개시된 기술은 푸리에 도메인 계수들의 행렬에서 대칭 및 근사 대칭을 사용하여 일부 코어 계산을 대략 1/2로 줄인다.

[0029] **렌즈 왜곡 해결**

[0030] 개시된 기술은 캡처된 이미지 타일을 서브타일로 세분화하고 중심 부근 서브타일을 다른 서브타일과 다르게 처리함으로써 경제적인 제조 허용 오차 내에서 광학 시스템에 대해 아주 심하지 않은 렌즈 왜곡을 해결한다. 광학 센서에 의해 캡처된 이미지를 타일이라고 지칭할 수 있다. 플로우 셀에 대한 이미징 사이클은 일부 중첩을 갖는 많은 이미지 타일을 캡처한다. 각 이미지 타일은 독립적으로 평가되는 서브타일로 분할된다. 서브타일들은 서로 독립적으로, 심지어 병렬로, 재구성될 수 있다. 향상된 서브타일의 재구성은 향상된 공간 해상도를 갖는 재구성된 타일을 생성하도록 함께 스티칭될 수 있다.

[0031] 중심 부근 서브타일에 대한 재구성 파라미터를 다른 서브타일에 관련시키기 위해 개시된 보간 기술은 조각별 근사로 2차 곡선과 같은 비선형 함수를 근사한다. 개시된 기술은 피크 선들이 서브타일 내에서 대략 균일하게 이격되도록 이미지 타일을 서브타일로 세분화하여 렌즈의 시야에 걸쳐 재구성된 서브타일로부터 더 나은 이미지 품질을 달성한다.

[0032] 프린지 왜곡을 완화하기 위한 이러한 서브타일링 접근 방식은 새로운 문제를 생성한다. 즉, 재구성 파라미터를 각 서브타일에 대해 추정해야 한다는 점이다. 파라미터 추정은 SIM 재구성에서 가장 비용이 많이 드는 설정이며 서브타일링은 파라미터 추정 실행 시간을 적어도 한 자릿수만큼 증가시켜, 예를 들어 5x5 서브타일로 분할된 이미지는 25배 느린 알고리즘을 생성한다. 8x11 서브타일로 분할된 타일에는 재구성 파라미터들의 세트를 단지 하나의 세트가 아닌 88개의 세트가 필요하다.

[0033] 개시된 기술은 왜곡을 매핑하여 반복되는 사이클에서 재계산을 줄이는 기능을 학습한다. 학습된 기능은 예를 들어 재정렬을 통해 광학 시스템이 변경될 때 변경되는 광학 시스템의 광학 특성을 매핑하기 때문에 전체 사이클 및 이미지 세트에 걸쳐 유효하다. 추정 사이클 동안, 기기 특성화 간에 비용이 많이 드는 파라미터 추정 계산은 중심 부근 단일 서브타일에 초점을 맞춘다. 각각의 서브타일에 대한 파라미터는 사이클들에서의 측정값을 중심 부근 기준 서브타일에서 다른 서브타일로 매핑한다.

[0034] 조명 피크 각도, 조명 피크 간격 및 위상 변위의 세 가지 파라미터가 서브타일에 대해 매핑된다. 조명 피크 각도는 또한 격자 각도로 지칭될 수 있다. 조명 피크 간격은 또한 격자 간격으로 지칭될 수 있다. 개시된 기술은 2차 표면 왜곡 모델을 사용하여 각도 및 간격을 매핑한다. 위상 변위 또는 단순히 위상은 샘플 평면에 투영된 구조화 조명 패턴 또는 격자의 시프트이다.

[0035] 재사용 가능한 간격 및 각도 왜곡 모델은 전체 FOV를 특성화하기 위해 서브타일링 접근 방식을 사용하여 선험적으로 계산된다. 윈도우 또는 서브타일 접근 방식은 타일을 중첩된 이미지의 윈도우 또는 서브타일로 분할하고 각각의 서브타일에 대해 SIM 파라미터 추정을 수행한다. 그 다음, 서브타일 파라미터 추정 결과는 왜곡의 2차 표면을 생성하는 최소 제곱 회귀에 입력된다. 그 다음, 수학식의 저장된 계수를 사용하여 서브타일 또는 전체 시야 이미지에서 임의의 위치의 파라미터를 외삽할 수 있다. 대안적인 구현예에서, 계수들은 저장되어 사용되거나, 중심 부근 서브타일을 다른 서브타일에 관련시키는 서브타일 룩업 테이블로 변환(translate)될 수 있다. 렌즈의 중심이 테두리보다 왜곡이 적기 때문에 중심 부근 서브타일이 기준으로 사용된다.

[0036] 서브타일들 간의 위상 관계의 경우, 아래에 나타낸 바와 같이 룩업 테이블이 곡선 피팅보다 더 잘 작동한다.

[0037] 여러 시간 연장되는 실행의 과정에서, 주기적인 재특성화를 적용하여 열적 불안정성과 그에 따른 드리프트를 방지할 수 있다. 외삽 계수가 재결정된 후, 프로세스는 외삽에 의해 그리고 다른 서브타일에 대한 비용이 많이 드는 파라미터 추정 없이 중심 부근 서브타일에 대한 파라미터 추정을 다른 서브타일로 외삽하는 과정을 재개한다.

[0038] **계산 비용을 줄이기 위한 대칭의 활용**

[0039] 단일 셀을 이미지화할 때, 수많은 이미지로부터의 SIM 재구성은 GPU, FPGA 또는 CGRA와 같은 특수한 하드웨어에서 수행되는 경우가 많다. 다량의 컴퓨팅 리소스를 사용하여, 재구성 알고리즘은 완전히 중복되는 중심 시프트된 푸리에 변환과 함께 작동한다. 그 대신 합리적인 가격의 CPU를 사용하면서, 푸리에 변환 이미지의 비중복 계수를 사용하는 SIM 재구성이 개시된다. 구현예를 코너 시프트된 푸리에 변환 공간에서 데이터의 대칭에 기초하여 설명한다. 특정 대칭을 사용하면 프로그램 복잡도가 증가하지만 거의 동일한 정확도를 유지하면서 계산들의 코어 세트에서 계산을 위한 데이터 양을 절반으로 줄이고 필요한 계산 횟수를 절반으로 줄일 수 있다. 또한 조합되고 있는 이미지의 푸리에 표현을 시프트하는 데 요구되는 계산을 줄인다.

[0040] **2D 조명 패턴에 대한 적응**

[0041] 1D 변조된 조명에 대한 표준 알고리즘은 2D 변조된 조명 패턴과 함께 사용될 때 수정이 필요하다. 이는 1D 대신 2D 밴드 분리를 필요로 하는 조명 피크 간격 및 조명 피크 각도 추정을 포함한다. 이는 또한 위상을 2차원으로 추정하기 위해 (1개 대신) 2개의 지점으로부터 작동해야 하는 위커 위상 추정(Wicker phase estimation)을 포함한다. 1D 간섭 패턴은 도 1a에 도시된 바와 같은 1차원 회절 격자에 의해 생성되거나 또는 2개의 빔의 간섭 패턴의 결과로 생성될 수 있다.

[0042] 도 1b는 2차원(2D) 회절 격자에 의해 생성되거나 또는 4개의 광 빔의 간섭에 의해 생성될 수 있는 강도 분포를 예시한다. 2개의 광 빔은 y축을 따라 강도 패턴(수평의 밝고 어두운 선들)을 생성하므로 y 쌍의 입사 빔들로 지칭된다. 추가의 2개의 광 빔들이 x축을 따라 강도 패턴(수직의 밝고 어두운 선들)을 생성하고, x 쌍의 입사 빔들로 지칭된다. x 쌍의 광 빔에 대한 y 쌍의 간섭은 2D 조명 패턴을 생성한다. 도 1b는 이러한 2D 조명 패턴의 강도 분포를 도시한다.

[0043] 도 1c는 장방형의 코너에 위치한 플로우 셀의 표면에서의 나노웰들의 배열을 예시한다. 1D 구조화 조명을 사용하는 경우, 조명 피크 각도는 장방형의 대각선으로 마주보는 코너들을 연결하는 선을 따라 이미지들을 취하도록 선택된다. 예를 들어, 두 세트의 3개 이미지(총 6개의 이미지)를 +45도 각도 및 -45도의 각도에서 취할 수 있다. 대각선의 거리가 장방형의 임의의 2개의 변 사이의 거리보다 크므로 더 높은 해상도의 이미지를 얻을 수 있다. 나노웰은 육각형과 같은 다른 기하학적 배열로 배열될 수 있다. 그 다음, 3개 이상의 이미지를 육각형의 3개의 대각선 각각을 따라 취하여, 예컨대 9개 또는 15개의 이미지를 생성할 수 있다.

[0044] 개시된 새로운 특화 기술은 다수의 사이클에 걸쳐 플로우 셀에 분포된 수백만 샘플의 형광을 검출하는 동시에 스캐닝 성능을 개선하기 위해 개별적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이어지는 항목에서는, 용어를 소개하고, 개시된 기술을 사용하여 개선할 수 있는 이미징 기기를 설명하고, 개별적으로 또는 조합하여 사용할 수 있는 새로운 이미지 향상 기술을 개시한다.

[0045] **용어**

[0046] 구조화 조명 파라미터를 지칭하기 위해 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "주파수"는 주파수 및 주기가 역의 관계에 있기 때문에 구조화 조명 패턴의 프린지들 또는 선들(예를 들어, 프린지 또는 그리드 패턴) 사이의 간격의 역수를 지칭하도록 의도된다. 예를 들어, 프린지들 사이에 더 큰 간격을 갖는 패턴은 프린지들 사이에 더 작은 간격을 갖는 패턴보다 더 낮은 주파수를 가질 것이다.

[0047] 구조화 조명 파라미터를 지칭하기 위해 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "위상"은 샘플을 조명하는 구조화 조명 패턴의 위상을 지칭하도록 의도된다. 예를 들어, 위상은 구조화 조명 패턴을 조명된 샘플에 대해 병진시킴으로써 변경될 수 있다.

[0048] 구조화 조명 파라미터를 지칭하기 위해 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "배향"은 구조화 조명 패턴(예를 들어, 프린지 또는 그리드 패턴)과 패턴에 의해 조명되는 샘플 사이의 상대적인 배향을 지칭하도록 한 것이다. 예를 들어, 배향은 조명된 샘플에 대해 구조화 조명 패턴을 회전시킴으로써 변경될 수 있다.

[0049] 구조화 조명 파라미터를 지칭하기 위해 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "예측하다" 또는 "예측하는 것"은 파라미터를 직접 측정하지 않고서 파라미터의 값(들)을 계산하는 것 또는 파라미터에 대응하는 캡처된 이미지로부터 파라미터를 추정하는 것을 의미하도록 의도된다. 예를 들어, 구조화 조명 패턴의 위상은 시간 t1에서, 시간 t2 및 시간 t3에서 (예를 들어, 캡처된 위상 이미지들로부터) 직접 측정되거나 추정된 위상 값들 사이의 보간에 의해 예측될 수 있으며, 여기서 t2 < t1 < t3이다. 또 다른 예로서, 구조화 조명 패턴의 주파수는 시간 t1에서, 시간 t2 및 t3에서 (예를 들어, 캡처된 위상 이미지들로부터) 직접 측정되거나 추정된 주파수 값들로부터의 외삽에 의해 예측될 수 있으며, 여기서 t2 < t3 < t1이다.

[0050] 회절 격자에 의해 회절되는 광을 지칭하기 위해 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "차(order)" 또는 "차수(order number)"는 보강 간섭을 위한 회절 격자의 인접한 슬릿 또는 구조체로부터의 광의 경로 길이 차이를 나타내는 정수 파장의 수를 의미하도록 의도된다. 반복되는 일련의 격자 구조체 또는 다른 빔 분할 구조체 상의 입사 광 빔의 상호작용은 광 빔의 일부를 원래의 빔으로부터 예측 가능한 각도 방향으로 재지향 또는 회절시킬 수 있다. 용어 "0차" 또는 "최대 0차"는 회절이 없는 회절 격자에 의해 방출되는 중심의 밝은 프린지를 지칭하도록 의도된다. 용어 "1차"는 0차 프린지의 양측으로 회절된 2개의 밝은 프린지를 지칭하도록 의도되며, 여기서 경로 길이 차이는 ±1 파장이다. 더 높은 차수는 원래의 빔으로부터 더 큰 각도로 회절된다. 격자의 속성은 다양한 차수로 지향되는 빔 강도의 정도를 제어하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 위상 격자는 ±1 차의 송신을 최대화하고 0차 빔의 송신을 최소화하도록 제작될 수 있다.

[0051] 본원에서 샘플을 지칭하기 위해 사용된 용어 "피처(feature)"는 상대적 위치에 따라 다른 지점들 또는 영역들과 구별될 수 있는 패턴의 지점 또는 영역을 의미하도록 의도된다. 개별적인 피처는 특정 유형의 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 피처는 특정 시퀀스를 갖는 단일 표적 핵산 분자를 포함할 수 있거나, 피처는 동일한 시퀀스(및/또는 이의 상보적 시퀀스)를 갖는 수 개의 핵산 분자를 포함할 수 있다.

[0052] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "xy 평면"은 직교 좌표계에서 직선 축들 x 및 y에 의해 정의되는 2차원 영역을 의미하도록 의도된다. 검출기 및 검출기에 의해 관찰되는 물체와 관련하여 사용되는 경우, 영역은 빔 축, 또는 검출기와 검출되고 있는 물체 사이의 관찰 방향에 직교하는 것으로서 추가로 명시될 수 있다.

[0053] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "z 좌표"는 xy 평면에 직교하는 축을 따른 지점, 선, 또는 영역의 위치를 명시하는 정보를 의미하도록 의도된다. 특정 구현예에서, z 축은 검출기에 의해 관찰되는 물체의 영역에 직교한다. 예를 들어, 광학 시스템에 대한 초점의 방향은 z 축을 따라 명시될 수 있다.

[0054] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "광학적으로 결합된"은 하나의 요소가 직접 또는 간접적으로 또 다른 요소에 광을 부여하도록 구성되는 것을 지칭하도록 의도된다.

[0055] **SIM 하드웨어**

[0056] 본 항목은 2018년 6월 29일에 출원된 미국 가출원 제62/692,303호(미공개)에서 출원인이 이전에 출원한 개시내용을 기반으로 한다. 구조화 조명 현미경법(SIM)은 공간적으로 구조화된(즉, 패턴화된) 광을 사용하여 샘플을 이미지화하여 현미경의 측면 해상도를 2배 이상으로 증가시킬 수 있는 기법을 설명한다. 도 1a는 격자를 사용하여 1D 변조로 형성된 모아레 프린지(또는 모아레 패턴)를 도시한다. 샘플을 포함하는 표면은 모아레 프린지 형성에 영향을 미치도록 일반적으로 사인파형의 구조화 광 강도 패턴에 의해 조명된다. 도 1a는 주파수 벡터들이 주파수 또는 역 공간에서 평행한 경우(a) 및 평행하지 않은 경우(b)의 2개의 사인파 패턴을 보여주고 있다. 도 1a는 고주파 공간 정보를, 광학적으로 검출될 수 있는 저주파로 시프트시키는 전형적인 예시이다. 새로운 신호

를 모아레 프린지 또는 에일리어싱으로 지칭될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플의 이미징 동안 샘플의 프린지 패턴의 3개의 이미지가 다양한 패턴 위상(예를 들어, 0°, 120° 및 240°)에서 획득되어 샘플 상의 각각의 위치가 일정 범위의 조명 강도에 노출되며, 광축을 중심으로 패턴 배향을 2개(예를 들어, 45°, 135°) 또는 3개(예를 들어, 0°, 60° 및 120°)의 분리된 각도로 회전시킴으로써 절차가 반복된다. 캡처된 이미지(예를 들어, 6개 또는 9개의 이미지)는 확장된 공간 주파수 대역폭을 갖는 단일 이미지로 조합될 수 있으며, 이는 실수 공간(real space)으로 재변환되어 종래의 현미경으로 캡처된 것보다 더 높은 해상도를 갖는 이미지를 생성할 수 있다.

[0057] SIM 시스템의 일부 구현예에서, 선형으로 편광된 광 빔은 광학 빔 스플리터를 통해 지향되고, 광학 빔 스플리터는 빔을 사인파 강도 변동을 갖는 간섭 프린지 패턴으로서 이미지화된 샘플에 조합 및 투영될 수 있는 2개 이상의 분리된 차수로 빔을 분할한다. 회절 격자는 높은 수준의 간섭성 및 안정된 전파 각도들을 갖는 빔들을 생성할 수 있는 빔 스플리터의 예이다. 이러한 2개의 빔이 조합되는 경우 이들 사이의 간섭은 균일하고 규칙적으로 반복되는 프린지 패턴을 생성할 수 있는데, 여기서 간격은 간섭하는 빔들 사이의 각도를 포함하는 요인에 의해 결정된다.

[0058] 도 1b는 2D 구조화 조명의 예를 나타낸다. 2D 구조화 조명은 서로 중첩되는 2개의 직교하는 1D 회절 격자에 의해 형성될 수 있다. 1D 구조화 조명 패턴의 경우와 같이, 2D 조명 패턴은 2D 회절 격자의 사용에 의해 또는 규칙적으로 반복되는 프린지 패턴을 생성하는 4개의 광 빔 사이의 간섭에 의해 생성될 수 있다.

[0059] 확장된 공간 주파수 대역폭을 갖는 단일 이미지로 이미지를 캡처 및/또는 후속 조립 또는 재구성하는 동안 다음과 같은 구조화 조명 파라미터 - 조명되는 샘플에 대한 조명 피크 각도라고도 하는 프린지 패턴의 배향 또는 각도, 조명 피크 간격이라고도 하는 인접한 프린지들 사이의 간격(즉, 프린지 패턴의 주파수), 구조화 조명 패턴의 위상 변위 - 를 고려할 필요가 있다. 기계적 불안정성 및 열 변화와 같은 요인의 영향을 받지 않는 이상적인 이미징 시스템에서, 이러한 각각의 파라미터는 시간의 경과에 따라 드리프트되지 않거나 달리 변경되지 않으며, 소정의 이미지 샘플과 연관된 정확한 SIM 주파수, 위상 및 배향 파라미터는 알게 될 수 있다. 그러나, 여기 빔 경로의 기계적 불안정성 및/또는 이미지화된 샘플의 열 팽창/수축과 같은 요인으로 인해 이러한 파라미터는 시간의 경과에 따라 드리프트되거나 달리 변경될 수 있다.

[0060] 이와 같이, SIM 이미징 시스템은 시간 경과에 따른 변동을 고려하기 위해 구조화 조명 파라미터를 추정할 필요가 있다. 많은 SIM 이미징 시스템이 실시간으로 SIM 이미지 처리를 수행하지 않기 때문에(예를 들어, 캡처된 이미지를 오프라인으로 처리), 이러한 SIM 시스템은 SIM 이미지를 처리하여 해당 이미지에 대한 구조화 조명 파라미터를 추정하는 데 상당한 양의 계산 시간을 소비할 수 있다.

[0061] 도 2 내지 도 4b는 3개의 이러한 예시적인 SIM 이미징 시스템을 예시한다. 이들 시스템들이 1D 조명 패턴을 생성하는 SIM 이미징 시스템과 관련해서 주로 설명되지만, 본원에 개시된 기술은 더 높은 차원의 조명 패턴(예를 들어, 2차원 그리드 패턴)을 생성하는 SIM 이미징 시스템으로 구현될 수 있다는 것에 유의해야 한다.

[0062] 도 2는 본원에 기술된 일부 구현예에 따른, 구조화 조명 파라미터 예측을 구현할 수 있는 SIM 이미징 시스템(100)을 예시한다. 예를 들어, 시스템(100)은 생물학적 샘플을 이미지화하기 위해 공간적으로 구조화된 여기 광을 이용하는 구조화 조명 형광 현미경법 시스템일 수 있다.

[0063] 도 2의 예에서, 광 방출기(150)는 광 빔을 출력하도록 구성되고 이는 시준 렌즈(151)에 의해 시준된다. 시준된 광은 광 구조화 광학 조립체(155)에 의해 구조화되고(패턴화되고), 이색성 미러(160)에 의해 대물 렌즈(142)를 통해, 이동 스테이지(170) 상에 위치되는 샘플 용기(110)의 샘플 상으로 지향된다. 형광 샘플의 경우에, 샘플은 구조화 여기 광에 응답하여 형광을 발하고, 생성된 광은 대물 렌즈(142)에 의해 집광되어 카메라 시스템(140)의 이미지 센서로 지향되어 형광을 검출한다.

[0064] 광 구조화 광학 조립체(155)는 샘플 용기(110)의 샘플들 상으로 투영되는 광의 패턴(예를 들어, 프린지, 일반적으로 사인파)을 생성하기 위해 하나 이상의 광학 회절 격자 또는 다른 빔 분할 요소(예를 들어, 빔 스플리터 큐브 또는 플레이트)를 포함한다. 회절 격자는 1차원 또는 2차원 투과형 또는 반사형 격자일 수 있다. 회절 격자는 사인파 진폭 격자 또는 사인파 위상 격자일 수 있다.

[0065] 일부 구현예에서, 회절 격자(들)는 구조화 조명 패턴의 배향을 변화시키기 위해 회전 스테이지를 이용하지 않을 수 있다. 다른 구현예에서, 회절 격자(들)는 회전 스테이지 상에 장착될 수 있다. 일부 구현예에서, 회절 격자는 이미징 시스템의 작동 중 고정될 수 있다(즉, 회전 또는 선형 이동을 필요로 하지 않을 수 있음). 예를 들어, 아래에 추가로 기술되는 특정 구현예에서, 회절 격자는 서로 수직으로 배향된 2개의 고정된 1차원 투과형

회절 격자(예를 들어, 수평 회절 격자 및 수직 회절 격자)를 포함할 수 있다.

[0066] 도 2의 예에 예시된 바와 같이, 광 구조화 광학 조립체(155)는 0차를 포함하는 모든 다른 차수를 차단 또는 최소화하면서 회절 광 빔의 제1 차수(예를 들어, m = ± 1차)를 출력한다. 그러나 대안적인 구현예에서, 추가 차수의 광이 샘플 상으로 투영될 수 있다.

[0067] 각각의 이미징 사이클 동안, 이미징 시스템(100)은 광 구조화 광학 조립체(155)를 이용하여, 변조 방향으로(예를 들어, xy 평면에서 그리고 프린지에 수직으로) 측면으로 변위되는 프린지 패턴으로 다양한 위상에서 복수의 이미지를 획득하며, 이러한 절차는 광축을 중심으로(즉, 샘플의 xy 평면에 대해) 패턴 배향을 회전시킴으로써 1회 이상 반복된다. 그 다음, 캡처된 이미지는 더 높은 해상도 이미지(예를 들어, 개별 이미지들의 측방향 공간 해상도의 약 2 배를 갖는 이미지)를 생성하도록 계산적으로 재구성될 수 있다.

[0068] 시스템(100)에서, 광 방출기(150)는 비간섭성 광 방출기(예를 들어, 하나 이상의 여기 다이오드에 의해 출력되는 광 빔을 방출함) 또는 하나 이상의 레이저 또는 레이저 다이오드에 의해 출력되는 광의 방출기와 같은 간섭성 광 방출기일 수 있다. 시스템(100)의 예에 예시된 바와 같이, 광 방출기(150)는 출력될 광학 빔을 안내하기 위한 광섬유(152)를 포함한다. 그러나, 다른 구성의 광 방출기(150)가 사용될 수 있다. 다중 채널 이미징 시스템(예를 들어, 다수의 파장의 광을 이용하는 다중 채널 형광 현미경)의 구조화 조명을 이용하는 구현예에서, 광섬유(152)는 복수의 상이한 광원(미도시)에 광학적으로 결합될 수 있으며, 각각의 광원은 상이한 파장의 광을 방출할 수 있다. 시스템(100)이 단일 광 방출기(150)를 갖는 것으로 예시되어 있지만, 일부 구현예에는 다수의 광 방출기(150)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 암(arm)을 이용하는 구조화 조명 이미징 시스템의 경우에 다수의 광 방출기를 포함할 수 있으며, 이는 아래에서 추가로 논의된다.

[0069] 일부 구현예에서, 시스템(100)은 구조화 빔 형상 및 경로를 조정하기 위해 z 축을 따라 맞물리는 렌즈 요소를 포함할 수 있는 튜브 렌즈(156)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 튜브 렌즈의 구성요소는 용기(110) 내의 샘플의 샘플 두께(예를 들어, 상이한 커버 유리 두께)의 범위를 고려하도록 맞물릴 수 있다.

[0070] 시스템(100)의 예에서, 유체 전달 모듈 또는 디바이스(190)는 시약들(예를 들어, 형광 표지 뉴클레오티드, 완충제, 효소, 절단 시약 등)의 유동을 샘플 용기(110) 및 폐기물 밸브(120)로 (그리고 이를 통해) 지향시킬 수 있다. 샘플 용기(110)는 샘플이 상부에 제공되는 하나 이상의 기재를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 상이한 핵산 시퀀스를 분석하기 위한 시스템의 경우, 샘플 용기(110)는 시퀀싱될 핵산이 결합, 부착 또는 회합되는 하나 이상의 기재를 포함할 수 있다. 기재는 예를 들어 유리 표면, 플라스틱 표면, 라텍스, 덱스트란, 폴리스티렌 표면, 폴리프로필렌 표면, 폴리아크릴아미드 겔, 금 표면, 및 실리콘 웨이퍼와 같은 핵산이 부착될 수 있는 임의의 불활성 기재 또는 매트릭스를 포함할 수 있다. 일부 애플리케이션에서, 기재는 샘플 용기(110)에 걸쳐 매트릭스 또는 어레이로 형성된 복수의 위치에서 채널 또는 다른 영역 내에 있다. 시스템(100)은 또한 샘플 용기(110) 내의 유체의 온도 상태를 선택적으로 조절할 수 있는 온도 스테이션 액추에이터(130) 및 히터/쿨러(135)를 포함할 수 있다.

[0071] 특정 구현예에서, 샘플 용기(110)는 반투명 커버 플레이트, 기재, 및 이들 사이에 수용된 액체를 포함하는 패턴화된 플로우 셀로서 구현될 수 있고, 생물학적 샘플은 반투명 커버 플레이트의 내부 표면 또는 기재의 내부 표면에 위치될 수 있다. 플로우 셀은 기재 내로 한정된 어레이(예를 들어, 육각형 어레이, 장방형 어레이 등)로 패턴화되는 다수(예를 들어, 수천, 수백만 또는 수십억 개)의 웰(나노웰이라고도 함) 또는 영역을 포함할 수 있다. 각각의 영역은 DNA, RNA, 또는 예를 들어 합성에 의한 시퀀싱을 사용하여 시퀀싱될 수 있는 다른 게놈 물질과 같은 생물학적 샘플의 클러스터(예를 들어, 단일클론 클러스터)를 형성할 수 있다. 플로우 셀은 다수의 이격된 레인(예를 들어, 8개의 레인)으로 더 분할될 수 있으며, 각각의 레인은 클러스터들의 육각형 어레이를 포함할 수 있다.

[0072] 샘플 용기(110)는 대물 렌즈(142)에 대한 샘플 용기(110)의 이동 및 정렬을 제공하기 위해 샘플 스테이지(170) 상에 장착될 수 있다. 샘플 스테이지는 3개의 차원 중 임의의 차원으로 이동할 수 있게 하는 하나 이상의 액추에이터를 가질 수 있다. 예를 들어, 직교 좌표계의 측면에서, 액추에이터는 스테이지가 대물 렌즈에 대해 X, Y 및 Z 방향으로 이동할 수 있도록 제공될 수 있다. 이는 샘플 용기(110) 상의 하나 이상의 샘플 위치가 대물 렌즈(142)와 광학 정렬로 위치되도록 할 수 있다. 대물 렌즈(142)에 대한 샘플 스테이지(170)의 이동은 샘플 스테이지 자체, 대물 렌즈, 이미징 시스템의 일부 다른 구성요소, 또는 전술한 것들의 임의의 조합을 이동함으로써 달성될 수 있다. 추가 구현예는 또한 고정 샘플에 걸쳐 전체 이미징 시스템을 이동시키는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 샘플 용기(110)는 이미징 동안 고정될 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 초점(z 축) 구성요소(175)가 초점 방향(일반적으로 z 축 또는 z 방향이라고 함)으로 샘플 용기(110)에 대한 광학 구성요소의 위치 결정을 제어하기 위해 포함될 수 있다. 초점 성분(175)은 광학 구성요소(예를 들어, 대물 렌즈(142))에 대해 샘플 스테이지(170) 상의 샘플 용기(110)를 이동시켜 이미징 작동을 위한 적절한 초점 조정을 제공하기 위해 광학 스테이지 또는 샘플 스테이지에, 또는 둘 다 모두에, 물리적으로 결합된 하나 이상의 액추에이터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 액추에이터는, 예컨대 기계식, 자기식, 유체식, 또는 기타 방식의 부착에 의해, 또는 스테이지에 직접 또는 간접적으로 접촉함으로써, 각 스테이지에 물리적으로 결합될 수 있다. 하나 이상의 액추에이터는 샘플 스테이지를 동일한 평면 내에 유지하면서(예를 들어, 광축에 수직인 레벨 또는 수평 자세를 유지하면서) 스테이지를 z 방향으로 이동시키도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 액추에이터는 또한 스테이지를 기울이도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 이는 샘플 용기(110)가 그의 표면의 임의의 기울기를 고려하여 동적으로 수평이 되도록 수행될 수 있다.

[0074] 이미지화되는 샘플 위치에서 시험 샘플로부터 나오는 구조화 광은 카메라 시스템(140)의 하나 이상의 검출기로 이색성 미러(160)를 통해 지향될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 방출 필터들을 갖는 필터 전환 조립체(165)가 포함될 수 있으며, 여기서 하나 이상의 방출 필터는 특정 방출 파장을 통과시키고 다른 방출 파장들을 차단(또는 반사)하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 방출 필터는 이미징 시스템의 상이한 채널들 사이에서 전환하는 데 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 방출 필터는 상이한 파장의 방출 광을 카메라 시스템(140)의 상이한 이미지 센서로 지향시키는 이색성 미러로서 구현될 수 있다.

[0075] 카메라 시스템(140)은 샘플 용기(110)의 이미징(예를 들어, 시퀀싱)을 모니터링하고 추적하기 위한 하나 이상의 이미지 센서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 카메라 시스템(140)은 CCD(charge-coupled device) 이미지 센서 카메라로서 구현될 수 있지만, 다른 이미지 센서 기술(예를 들어, 능동 픽셀 센서)이 사용될 수 있다.

[0076] 카메라 시스템(140)으로부터의 출력 데이터(예를 들어, 이미지)는, 하기에 추가로 기술되는 바와 같이, 더 높은 공간 해상도를 갖는 이미지를 생성하기 위해 각각의 이미징 사이클 동안 캡처된 이미지들을 재구성할 수 있는 소프트웨어 애플리케이션으로서 구현될 수 있는 실시간 SIM 이미징 구성요소(191)로 전달될 수 있다. 재구성된 이미지는 시간 경과에 따라 예측되는 구조화 조명 파라미터의 변화를 고려할 수 있다. 또한, SIM 이미징 구성요소(191)는 예측된 SIM 파라미터를 추적하고/하거나 사전에 추정되고/되거나 예측된 SIM 파라미터를 고려하여 SIM 파라미터의 예측을 행하는 데 사용될 수 있다.

[0077] 제어기(195)는 시스템(100)의 다양한 광학 구성요소를 동기화하는 것을 포함하여, 구조화 조명 이미징 시스템(100)의 작동을 제어하도록 제공될 수 있다. 제어기는 예를 들어 광 구조화 광학 조립체(155)의 구성(예를 들어, 회절 격자의 선택 및/또는 선형 병진), 튜브 렌즈(156)의 이동, 초점 조정, 스테이지 이동, 및 이미징 작동과 같은 시스템 작동의 양태들을 제어하도록 구현될 수 있다. 제어기는 또한 시간 경과에 따른 구조화 조명 파라미터의 변화를 보정하기 위해 시스템(100)의 하드웨어 요소를 제어하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 제어기는 시간 경과에 따른 구조화 조명 위상, 주파수, 및/또는 배향의 변화를 보정하거나 보상하기 위해 제어 신호를 광 구조화 광학 조립체(155), 이동 스테이지(170), 또는 시스템(100)의 일부 다른 요소의 구성을 제어하는 모터들 또는 다른 디바이스들에 송신하도록 구성될 수 있다. 구현예에서, 이러한 신호는 SIM 이미징 구성요소(191)를 사용하여 예측된 구조화 조명 파라미터에 따라 송신될 수 있다. 일부 구현예에서, 제어기(195)는 상이한 시간 및/또는 샘플 위치에 대응하는 예측되고/되거나 추정된 구조화 조명 파라미터를 저장하기 위한 메모리를 포함할 수 있다.

[0078] 다양한 구현예에서, 제어기(195)는 하드웨어, 알고리즘(예를 들어, 기계 실행가능 명령어), 또는 전술한 것들의 조합을 사용하여 구현될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서 제어기는 하나 이상의 CPU, GPU, 또는 연관된 메모리를 갖는 프로세서를 포함할 수 있다. 다른 예로서, 제어기는 컴퓨터 프로세서 및 기계 판독 가능 명령어가 저장된 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체와 같은 작동을 제어하기 위한 하드웨어 또는 다른 회로를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이 회로는 FPGA(Field Programmable Gate Array), ASIC(Application Specific Integrated Circuit), PLD(Programmable Logic Device), CPLD(Complex Programmable Logic Device), PLA(Programmable Logic Array), PAL(Programmable Array Logic) 및 기타 유사한 처리 디바이스 또는 회로 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 제어기는 이러한 회로와 하나 이상의 프로세서의 조합을 포함할 수 있다.

[0079] 도 3은 본원에 기술된 일부 구현예들에 따라 구조화 조명 파라미터 예측을 구현할 수 있는 2-암 SIM 이미징 시스템(200)의 예시적인 광학 구성을 예시하는 광학 다이어그램이다. 시스템(200)의 제1 암은 광 방출기(210A), 광 방출기(210A)에 의해 출력되는 광을 시준하기 위한 제1 광 시준기(220A), 광축에 대한 제1 배향의 회절 격자(230A), 회전 미러(240A), 및 제2 광 시준기(250A)를 포함한다. 시스템(200)의 제2 암은 광 방출기(210B), 광

방출기(210B)에 의해 출력된 광을 시준하기 위한 제1 광 시준기(220B), 광축에 대한 제2 배향의 회절 격자(230B), 회전 미러(240B), 및 제2 광 시준기(250B)를 포함한다. 이러한 예에서 회절 격자가 예시되어 있지만, 다른 구현예에서 빔 스플리터 큐브 또는 플레이트와 같은 다른 빔 분할 요소가 SIM 이미징 시스템(200)의 각각의 암에서 수신된 광을 분할하는 데 사용될 수 있다.

[0080] 각각의 광 방출기(210A-210B)는 비간섭성 광 방출기(예를 들어, 하나 이상의 여기 다이오드들에 의해 출력되는 광 빔을 방출함)일 수 있거나 또는 하나 이상의 레이저 또는 레이저 다이오드에 의해 출력되는 광의 방출기와 같은 간섭성 광 방출기일 수 있다. 시스템(200)의 예에서, 각각의 광 방출기(210A-210B)는 각각의 시준기(220A-220B)에 의해 시준되는 광 빔을 출력하는 광섬유이다.

[0081] 일부 구현예에서, 각각의 광섬유는 레이저와 같은 해당하는 광원(미도시)에 광학적으로 결합될 수 있다. 이미징 동안, 각각의 광섬유는 광섬유와 광원 사이의 광학 경로에 위치한 고속 셔터(미도시)를 사용하거나 이미징 동안 광섬유의 해당 광원을 사전 결정된 주파수로 펄스화함으로써 스위치 온 또는 스위치 오프할 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 광섬유는 동일한 광원에 광학적으로 결합될 수 있다. 이러한 구현예에서, 빔 스플리터 또는 다른 적합한 광학 요소는 광원으로부터의 광을 광섬유 각각으로 안내하는 데 사용될 수 있다. 이러한 예에서, 각각의 광섬유는 광섬유와 빔 스플리터 사이의 광학 경로에 위치한 고속 셔터(미도시)를 사용하여 스위치 온 또는 스위치 오프할 수 있다.

[0082] 예시적인 SIM 이미징 시스템(200)에서, 제1 암은 제1 배향(예를 들어, 수직 프린지 패턴)으로 구조화 조명 패턴 또는 격자 패턴을 샘플에 투영하는 고정 수직 격자(230A)를 포함하고, 제2 암은 제2 배향(예를 들어, 수평 프린지 패턴)으로 구조화 조명 패턴 또는 격자 패턴을 샘플(271)에 투영하는 고정 수평 격자(230B)를 포함한다. SIM 이미징 시스템(200)의 격자는 기계적으로 회전되거나 병진될 필요가 없으며, 이는 개선된 시스템 속도, 신뢰성 및 반복성을 제공할 수 있다.

[0083] 대안적인 구현예에서, 격자(230A 및 230B)는 격자(230A 및 230B)에 의해 방출된 광의 광학 경로 길이(및 그에 따른 위상)를 변경하도록 병진될 수 있는 각각의 선형 이동 스테이지 상에 장착될 수 있다. 스테이지의 선형 이동의 이동 축은 샘플(271)을 따라 격자 패턴의 병진을 실현하기 위해 각각의 격자의 배향으로부터 수직이거나 그렇지 않으면 오프셋될 수 있다.

[0084] 격자(230A-230B)는 유리 기판 또는 다른 적합한 표면에 형성된 복수의 회절 요소(예를 들어, 평행한 슬릿 또는 홈)를 포함하는 투과형 회절 격자일 수 있다. 격자는 격자 소재의 굴절률의 주기적 변화를 제공하는 위상 격자로서 구현될 수 있다. 홈 또는 피쳐 간격은 적합한 각도로 광을 회절시키도록 선택될 수 있고 SIM 이미징 시스템(200)의 작동을 위해 이미지화된 샘플의 분리 가능한 최소 피쳐 크기로 조정될 수 있다. 다른 구현예에서, 격자는 반사형 회절 격자일 수 있다.

[0085] SIM 이미징 시스템(200)의 예에서, 수직 및 수평 패턴은 약 90도만큼 오프셋된다. 다른 구현예에서, 격자의 다른 배향은 약 90도의 오프셋을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 격자는 샘플(271)의 x 또는 y 평면에서 ±45도 오프셋된 이미지를 투영하도록 배향될 수 있다. 예시적인 SIM 이미징 시스템(200)의 구성은 구조화 해상도 향상이 2개의 직각 격자(예를 들어, 수직 격자 및 수평 격자)만을 사용하여 달성될 수 있기 때문에 장방형 그리드 상의 피쳐를 갖는 규칙적으로 패턴화된 샘플(271)의 경우에 특히 유리할 수 있다.

[0086] 시스템(200)의 예에서, 격자(230A-230B)는 입력 빔을 다수의 차수(예를 들어, 0 차, ±1 차, ±2 차 등)로 회절시키도록 구성되며, 그 중 ±1차수가 샘플(271)에 투영될 수 있다. 이러한 예에 도시된 바와 같이, 수직 격자(230A)는 시준된 광 빔을 1차 회절 빔(±1 차)으로 회절하여 페이지의 평면 상에 제1 차수를 확산시키고, 수평 격자(230B)는 시준된 광 빔을 1차 회절 빔으로 회절하여 페이지 평면의 위 및 아래에(즉, 페이지에 수직인 평면에) 해당 차수를 확산시킨다. 시스템의 효율을 개선하기 위해 0차 빔 및 다른 모든 고차 빔(즉, ±2 차 이상)이 차단될 수 있다(즉, 샘플(271) 상에 투영된 조명 패턴으로부터 필터링됨). 예를 들어, 차수 필터와 같은 빔 차단 요소(미도시)는 0차 빔 및 고차 빔을 차단하기 위해 각각의 회절 격자 이후의 광학 경로에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 회절 격자(230A-230B)는 빔을 단지 제1 차수만으로 회절시키도록 구성될 수 있고, 0차(비회절 빔)는 일부 빔 차단 요소에 의해 차단될 수 있다.

[0087] 각각의 암은 각각의 격자(230)에 의해 출력되는 회절 광을 위상 시프트하는 광학 위상 변조기 또는 위상 시프터(240A-240B)를 포함한다. 예를 들어 구조화 이미징 동안, 각각의 회절 빔의 광학 위상은 구조화 패턴의 각각의 프린지의 피치(λ)의 일부 분율(예를 들어, 1/2, 1/3, 1/4 등)만큼 시프트될 수 있다. 도 3의 예에서, 위상 변조기(240A 및 240B)는 각각의 회절 빔의 광 경로 길이를 회전 및 변조하기 위해 검류계 또는 다른 회전 액추에

이터를 사용할 수 있는 회전 윈도우로서 구현된다. 예를 들어, 윈도우(240A)는 수직 축을 중심으로 회전하여 샘플(271)에 수직 격자(230A)에 의해 투영된 이미지를 좌측 또는 우측으로 시프트시킬 수 있고, 윈도우(240B)는 수평 축을 중심으로 회전하여 샘플(271)에 수평 격자(230B)에 의해 투영된 이미지를 상측 또는 하측으로 시프트시킬 수 있다.

[0088] 다른 구현예에서, 회절 광의 광학 경로 길이를 변경하는 다른 위상 변조기(예를 들어, 선형 병진 스테이지, 웨지 등)가 사용될 수 있다. 추가적으로, 광학 위상 변조기(240A-240B)가 격자(230A-230B) 이후에 배치되는 것으로 예시되어 있지만, 다른 구현예에서는 조명 시스템의 다른 위치에 배치될 수 있다.

[0089] 대안적인 구현예에서, 단일 위상 변조기는 상이한 프린지 패턴에 대해 2개의 상이한 방향으로 작동될 수 있거나, 단일 위상 변조기는 2개의 경로 길이를 조정하기 위해 단일 이동을 사용할 수 있다. 예를 들어, 큰 회전 광학 윈도우는 홀(261)이 있는 미러(260) 이후에 배치될 수 있다. 이 경우에, 수직 및 수평 회절 격자에 의해 출력되는 회절 빔들의 두 세트의 위상을 변조하기 위해 큰 윈도우가 윈도우(240A 및 240B) 대신에 사용될 수 있다. 격자들 중 하나의 광축에 대해 평행하는 대신에, 큰 회전 윈도우에 대한 회전 축은 수직 및 수평 격자 각각의 광축에서 45도 오프셋(또는 일부 다른 각도로 오프셋)되어 큰 윈도우의 하나의 공통 회전 축을 따라 양방향으로 위상 시프트를 허용할 수 있다. 일부 구현예에서, 큰 회전 윈도우는 명목상 빔 축을 중심으로 회전하는 쐐기형 광학 장치로 대체될 수 있다.

[0090] 예시적인 시스템(200)에서, 홀(261)을 갖는 미러(260)는 무손실 방식으로(예를 들어, 반사형 코팅에서의 적은 흡수 외에 광학 전력의 상당한 손실 없이) 2개의 암을 광학 경로로 결합한다. 미러(260)는 각각의 격자로부터의 회절된 차수가 공간적으로 분리되도록 위치되어 원치 않는 차수를 차단할 수 있다. 미러(260)는 홀(261)을 통해 제1 암에 의해 출력된 1차의 광을 통과시킨다. 미러(260)는 제2 암에 의해 출력된 1차의 광을 반사한다. 이와 같이, 구조화 조명 패턴은 광섬유 케이블을 통해 광원의 광을 지향시키는 광학 셔터를 개방 또는 폐쇄하여 각각의 방출기를 켜거나 또는 끔으로써 수직 배향(예를 들어, 격자(230A))에서 수평 배향(예를 들어, 격자(230B))으로 전환될 수 있다. 다른 구현예에서, 구조화 조명 패턴은 샘플을 조명하는 암을 변경하기 위해 광학 스위치를 사용함으로써 전환될 수 있다.

[0091] 또한 예시적인 이미징 시스템(200)에는 튜브 렌즈(265), 반반사 미러(280), 대물렌즈(270), 및 카메라(290)가 예시되어 있다. 예를 들어, 튜브 렌즈(265)는 구조화 빔 형상 및 경로를 조정하기 위해 z 축을 따라 맞물리도록 구현될 수 있다. 반반사 미러(280)는 샘플(271) 상으로의 투영을 위해 각각의 암에서 수신된 구조화 조명 광을 대물렌즈(270)로 하행 반사시키고, 샘플(271)에 의해 방출된 광(예를 들어, 여기(excitation)와는 다른 파장에서 방출되는 형광성 광)을 카메라(290) 상으로 통과시키는 이색성 미러일 수 있다.

[0092] 카메라(290)로부터의 출력 데이터(예를 들어, 이미지)는, 아래에 추가로 기술되는 바와 같이, 더 높은 공간 해상도를 갖는 이미지를 생성하기 위해 각각의 이미징 사이클 동안 캡처된 이미지를 재구성할 수 있는 소프트웨어 애플리케이션으로서 구현될 수 있는 실시간 SIM 이미징 구성요소(미도시)로 전달될 수 있다. 재구성된 이미지는 시간 경과에 따라 예측되는 구조화 조명 파라미터의 변화를 고려할 수 있다. 또한, 실시간 SIM 이미징 구성요소는 예측된 SIM 파라미터를 추적하고/하거나 사전에 추정되고/되거나 예측된 SIM 파라미터를 고려하여 SIM 파라미터의 예측을 행하는 데 사용될 수 있다.

[0093] 제어기(미도시)는 시스템(200)의 다양한 광학 구성요소를 동기화하는 것을 포함하여, 구조화 조명 이미징 시스템(200)의 작동을 제어하도록 제공될 수 있다. 제어기는 예를 들어 각각의 광학 암의 구성(예를 들어, 위상 이미지 캡처 동안 각각의 광학 암을 턴 온/턴 오프, 위상 변조기(240A-240B) 작동), 튜브 렌즈(265)의 이동, 샘플(271)의 스테이지 이동(임의의 스테이지가 사용되는 경우), 및 이미징 작업과 같은 시스템 작동의 양태들을 제어하도록 구현될 수 있다. 제어기는 또한 시간 경과에 따른 구조화 조명 파라미터의 변화를 보정하기 위해 시스템(200)의 하드웨어 요소를 제어하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 제어기는 시간 경과에 따른 구조화 조명 위상, 주파수, 및/또는 배향의 변화를 보정하거나 보상하기 위해 시스템(100)의 각각의 광학 암 또는 일부 다른 요소의 구성을 제어하는 디바이스(예를 들어, 위상 변조기(240A-240B))에 제어 신호를 송신하도록 구성될 수 있다. 또 다른 예로서, 격자(230A-230B)가 선형 이동 스테이지(예를 들어, 위상 변조기(240A-240B)를 사용하는 대신)에 장착되는 경우, 제어기는 위상 변화를 보정하거나 보상하기 위해 선형 이동 스테이지를 제어하도록 구성될 수 있다. 구현예에서, 이러한 신호는 SIM 이미징 구성요소를 사용하여 예측되는 구조화 조명 파라미터에 따라 송신될 수 있다. 일부 구현예에서, 제어기는 상이한 시간 및/또는 샘플 위치에 대응하는 예측되고/되거나 추정된 구조화 조명 파라미터를 저장하기 위한 메모리를 포함할 수 있다.

[0094] 단순화를 위해, SIM 이미징 시스템(200)의 광학 구성요소는 전술한 논의에서 생략될 수 있다는 점에 유의해야

한다. 추가적으로, 시스템(200)이 이 예에서 단일 채널 시스템으로 예시되어 있지만, 다른 구현예에서는 (예를 들어, 2개의 상이한 파장에서 방출하는 2개의 상이한 카메라 및 광원을 사용함으로써) 다중 채널 시스템으로 구현될 수 있다.

[0095] 시스템(200)이 2개의 상이한 각도로 배향된 2개의 격자를 포함하는 2-암 구조화 조명 이미징 시스템을 도시하지만, 다른 구현예에서 본원에 설명된 기술은 2개보다 많은 암을 사용하는 시스템으로 구현될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 장방형 그리드 상에 피쳐들을 갖는 규칙적으로 패턴화된 샘플의 경우, 위에 기재된 바와 같이 2개의 직각 각도(예를 들어, 수직 격자 및 수평 격자)로만 해상도 향상을 달성할 수 있다. 한편, 다른 샘플(예를 들어, 육각형으로 패턴화된 샘플)에 대한 모든 방향의 이미지 해상도 향상을 위해 3개의 조명 피크 각도를 사용할 수 있다. 예를 들어, 3-암 시스템은 3개의 광 방출기와 3개의 고정된 회절 격자(암당 하나씩)를 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 회절 격자는 시스템의 광축 주위로 배향되어 샘플(예를 들어, 0° 패턴, 120° 패턴 또는 240° 패턴) 상에서 각각의 패턴 배향을 투영한다. 이러한 시스템에서, 홀이 있는 추가 미러를 사용하여 추가 격자의 추가 이미지를 무손실 방식으로 시스템에 조합할 수 있다. 대안적으로, 이러한 시스템은 각각의 격자의 이미지를 조합하기 위해 하나 이상의 편광 빔 스플리터를 이용할 수 있다.

[0096] 도 4a 및 도 4b는 본원에 설명된 일부 구현예에 따라 구조화 조명 파라미터 예측을 구현할 수 있는 이중 광학 격자 슬라이드 SIM 이미징 시스템(500)의 예시적인 광학 구성을 예시하는 개략도이다. 예시적인 시스템(500)에서, 구조화 조명 패턴 또는 샘플(570) 상에 투영된 격자 패턴에 대한 모든 변경(예를 들어, 패턴 위상 시프트 또는 회전)은 격자(531 또는 532)를 선택(즉, 격자 배향을 선택)하거나 또는 격자(531-532) 중 하나를 위상 시프트하기 위해 이동 스테이지(530)를 단일 이동 축을 따라 직선으로 병진시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0097] 시스템(500)은 광 방출기(510)(예를 들어, 광원에 광학적으로 결합된 광섬유), 광 방출기(510)에 의해 출력된 광을 시준하기 위한 제1 광 시준기(520)(예를 들어, 시준 렌즈), 제1 회절 격자(531)(예를 들어, 수평 격자) 및 제2 회절 격자(532)(예를 들어, 수직 격자)가 장착된 선형 이동 스테이지(530), 튜브 렌즈(540), 반반사 미러(550)(예를 들어, 이색성 미러), 대물렌즈(560), 샘플(570), 및 카메라(580)를 포함한다. 단순화를 위해, SIM 이미징 시스템(500)의 광학 구성요소는 도 4a에서 생략될 수 있다. 추가적으로, 시스템(500)이 이 예에서 단일 채널 시스템으로 예시되어 있지만, 다른 구현예에서는 (예를 들어, 2개의 상이한 파장에서 방출하는 2개의 상이한 카메라 및 광원을 사용함으로써) 다중 채널 시스템으로 구현될 수 있다.

[0098] 도 4a에 의해 예시된 바와 같이, 격자(531)(예를 들어, 수평 회절 격자)는 시준된 광 빔을 (페이지의 평면 상에서) 1차 회절 광 빔으로 회절시킬 수 있다. 도 4b에 의해 예시된 바와 같이, 회절 격자(532)(예를 들어, 수직 회절 격자)는 빔을 제1 차수(페이지의 평면 위 및 아래)로 회절시킬 수 있다. 이러한 구성에서 단일 방출기(510)(예를 들어, 광섬유)와 단일 선형 이동 스테이지를 갖는 단일 광학 암만이 샘플(570)을 이미지화하는 데 필요하며, 이는 속도, 복잡도 및 비용을 개선하기 위해 이동하는 시스템 부품의 수를 줄이는 것과 같은 시스템 이점을 제공할 수 있다. 추가적으로, 시스템(500)에서 편광자의 부재는 앞서 언급된 높은 광학 효율의 이점을 제공할 수 있다. 예시적인 SIM 이미징 시스템(200)의 구성은 구조화 해상도 향상이 2개의 직각 격자(예를 들어, 수직 격자 및 수평 격자)만을 사용하여 달성될 수 있기 때문에 장방형 그리드 상의 피쳐를 갖는 규칙적으로 패턴화된 샘플(570)의 경우에 특히 유리할 수 있다.

[0099] 시스템의 효율을 개선하기 위해, 각각의 격자로부터 출력되는 0차 빔 및 다른 모든 고차 회절 빔(즉, ±2 차 이상)이 차단될 수 있다(즉, 샘플(570) 상에 투영된 조명 패턴으로부터 필터링됨). 예를 들어, 차수 필터와 같은 빔 차단 요소(미도시)가 이동 스테이지(530) 이후의 광학 경로에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 회절 격자(531-532)는 빔을 단지 제1 차수만으로 회절시키도록 구성될 수 있고, 제0 차수(비회절 빔)는 일부 빔 차단 요소에 의해 차단될 수 있다.

[0100] 시스템(500)의 예에서, 2개의 격자는 선형 이동의 단일 축을 따라 각 격자(531 및 532)에 대해 위상 시프트가 실현될 수 있도록 이동 축으로부터 약 ±45°(또는 약 40°/-50°, 약 30°/-60° 등과 같은, 이동 축으로부터의 일부 다른 각도의 오프셋)로 배열될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개의 격자는 하나의 물리적 광학 요소로 결합될 수 있다. 예를 들어, 물리적 광학 요소의 한 면은 제1 배향의 구조화 조명 패턴 또는 격자 패턴을 가질 수 있고, 물리적 광학 요소의 인접한 측면은 제1 배향에 직교하는 제2 배향의 구조화 조명 패턴 또는 격자 패턴을 가질 수 있다.

[0101] 단일 축 선형 이동 스테이지(530)는 샘플 평면에 대해 X 축을 따라 또는 샘플 평면에 대해 Y 축을 따라 이동하는 것을 허용하도록 하나 이상의 액추에이터를 포함할 수 있다. 작동 동안, 선형 이동 스테이지(530)는 효율적인 이미지 재구성을 위해 정확한 조명 패턴이 투영되도록 하기에 충분한 이동 거리(예를 들어, 약 12-15 ㎜) 및

정확도(예를 들어, 약 0.5 마이크로미터 미만의 반복재현성)를 제공할 수 있다. 이동 스테이지(530)가 형광 현미경과 같은 자동화된 이미징 시스템에서 이용되는 구현예에서, 고속 작동, 최소 진동 생성 및 긴 작동 수명을 제공하도록 구성될 수 있다. 구현예에서, 선형 이동 스테이지(530)는 교차 롤러 베어링, 선형 모터, 고정밀 선형 인코더, 및/또는 다른 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이동 스테이지(530)는 제어기를 사용하여 병진될 수 있는 고정밀 스테퍼 또는 피에조 이동 스테이지로서 구현될 수 있다.

[0102] 카메라(580)로부터의 출력 데이터(예를 들어, 이미지)는, 아래에 추가로 기술되는 바와 같이, 더 높은 공간 해상도를 갖는 이미지를 생성하기 위해 각각의 이미징 사이클 동안 캡처된 이미지를 재구성할 수 있는 소프트웨어 애플리케이션으로서 구현될 수 있는 실시간 SIM 이미징 구성요소(미도시)로 전달될 수 있다. 재구성된 이미지는 시간 경과에 따라 예측되는 구조화 조명 파라미터의 변화를 고려할 수 있다. 또한, 실시간 SIM 이미징 구성요소는 예측된 SIM 파라미터를 추적하고/하거나 사전에 추정되고/되거나 예측된 SIM 파라미터를 고려하여 SIM 파라미터의 예측을 행하는 데 사용될 수 있다.

[0103] 제어기(미도시)는 시스템(500)의 다양한 광학 구성요소를 동기화하는 것을 포함하여, 구조화 조명 이미징 시스템(500)의 작동을 제어하도록 제공될 수 있다. 제어기는 예를 들어 선형 이동 스테이지(530)의 병진, 튜브 렌즈(540)의 이동, 샘플(570)의 스테이지 이동(임의의 스테이지가 사용되는 경우), 및 이미징 작업과 같은 시스템 작동의 양태들을 제어하도록 구현될 수 있다. 제어기는 또한 시간 경과에 따른 구조화 조명 파라미터의 변화를 보정하기 위해 시스템(500)의 하드웨어 요소를 제어하도록 구현될 수 있다. 예를 들어, 제어기는 시간 경과에 따른 구조화 조명 위상, 주파수, 및/또는 배향의 변화를 보정하거나 보상하기 위해 제어 신호를 디바이스(예를 들어, 선형 이동 스테이지(530))로 전송하도록 구성될 수 있다. 구현예에서, 이러한 신호는 SIM 이미징 구성요소를 사용하여 예측되는 구조화 조명 파라미터에 따라 송신될 수 있다. 일부 구현예에서, 제어기는 상이한 시간 및/또는 샘플 위치에 대응하는 예측되고/되거나 추정된 구조화 조명 파라미터를 저장하기 위한 메모리를 포함할 수 있다.

[0104] 도 4a 및 도 4b의 예는 구조화 조명 파라미터 예측을 구현할 수 있는 이중 광학 격자 슬라이드 이미징 시스템을 도시하지만, 구조화 조명 파라미터 예측은 2개보다 많은 회절 격자가 장착된 선형 이동 액추에이터를 사용하는 SIM 이미징 시스템에서 구현될 수 있다.

[0105] **투영 파라미터 추정**

[0106] SIM 이미지 처리를 위한 파라미터 추정은 시간 경과에 따른 구조화 조명 파라미터의 바람직하지 않은 변경을 수정하는 데 필요할 수 있다. 예를 통해, 도 5a 내지 도 5c는 규칙적으로 패턴화된 샘플에 1차원 구조화 조명 패턴을 투영하는 SIM 이미징 시스템에서 시간의 경과에 따라 발생할 수 있는 주파수 또는 조명 피크 간격(도 5a), 위상 또는 위상 변위(도 5b), 및 배향 또는 조명 피크 각도(도 5c)의 바람직하지 않은 변화를 도시한다. 특히, 도 5a는 주파수 시프트 전후에 프린지(60)를 갖는 1차원 구조화 조명 패턴에 의해 조명된 피처(51)를 갖는 샘플(50)을 예시한다. 임의의 주파수 시프트 전에, 인접한 프린지(60)는 초기 주파수 f 에 대응하는 P의 피치 또는 중심간 간격을 갖는다. 시간의 경과에 따라, 시스템의 온도 변화에 따라서 피치 P가 증가하거나 감소할 수 있다. 예를 들어, 열팽창으로 인해 피치 P가 $P + \Delta P_1$로 증가할 수 있으며, 그에 상응하여 주파수 f는 $f - \Delta f_1$로 감소할 수 있다. 반대로, 열 수축으로 인해 피치 P가 $P - \Delta P_1$로 감소할 수 있으며, 그에 상응하여 주파수 f는 $f + \Delta f_2$로 증가할 수 있다.

[0107] 도 5b는 위상의 변화 전후에 프린지(60)를 갖는 1차원 구조화 조명 패턴에 의해 조명된 샘플(50)을 예시한다. 도시한 바와 같이, 위상 드리프트 전에 제1 위상 상태 Φ는 샘플(50)의 피처(51)의 제2 열마다 완전히 조명하는 프린지에 해당할 수 있다. 시간의 경과에 따라, 샘플(50)에 대한 프린지(60)의 위치가 시프트하여 모든 위상 이미지가 $\Delta\Phi$만큼 오프셋될 수 있다. 예를 들어, SIM 이미징 시스템의 기계적 진동(예를 들어, 여기 빔 경로), 격자 또는 샘플 스테이지에서 사용되는 병진 스테이지의 부정확성, 열 변동 및/또는 기타 요인으로 인해 위상에서 바람직하지 않은 드리프트가 발생할 수 있다. $\Delta\Phi$만큼 위상 드리프트 후, 제1 위상 상태는 $\Phi + \Delta\Phi$로 변경되고, 프린지는 더 이상 피처의 제2 열의 중앙에 위치하지 않는다.

[0108] 도 5c는 배향의 변경 전후에 프린지(60)를 갖는 1차원 구조화 조명 패턴에 의해 조명된 샘플(50)을 예시한다. 도시된 바와 같이, 배향의 변경 전에 샘플(50)에 대한 프린지의 배향은 완전히 수직이다. 시간의 경과에 따라, 배향은 여기 빔 경로의 변화, 샘플의 이동, 열 변화 및/또는 기타 요인과 같은 요인들로 인해 변경될 수 있다. 배향이 각도 $\Delta\Theta$만큼 회전한 후, 프린지는 더 이상 샘플에 대해 완전히 수직이 아니다.

[0109] 위에 기재된 바와 같이 구조화 조명 파라미터의 변화를 정확하게 고려하기 위한 SIM 이미징 프로세스 중 파라미

터 추정은 한 세트의 샘플링된 이미지로부터 이미지의 인위적 영향이 없는 정확한 재구성을 보장하는 데 도움이 된다. 그러나 이러한 프로세스는 계산 비용이 많이 들고 이미지 획득 후에 자주 수행된다. 이미지의 실시간 처리 및 재구성과, 이에 따른 주파수, 위상, 배향 및 변조 차수와 같은 파라미터의 실시간 추정을 포함하는 시간이 중요한 SIM 이미징 시스템의 경우, 이러한 계산 요구 사항으로 인해 데이터 처리량의 손실을 초래할 수 있다(예를 들어, 단위 시간당 더 적은 데이터가 처리될 수 있음). 이러한 시스템에서, 샘플이 이미지화되는 속도는 구조화 조명 파라미터가 샘플링된 이미지로부터 직접 추정될 수 있는 속도를 초과할 수 있다. 이와 같이, 복잡도가 낮고 처리 시간이 짧은 파라미터 추정치를 생성하는 방법이 필요하다.

[0110] 이를 위해, 본원에 개시된 기술의 구현예는 구조화 조명 시스템에 의해 캡처된 이미지로부터 획득된 구조화 조명 파라미터의 추정치를 사용하여 특정 시점, 공간, 및/또는 온도에 대한 구조화 조명 파라미터를 예측하는 것에 관한 것이다. 특정 구현예는 구조화 조명 주파수, 위상, 배향 및/또는 변조 차수 파라미터를 예측하는 것에 관한 것이다.

[0111] 일부 구현예에 따르면, 구조화 조명 파라미터는 이미지 캡처들로부터 구조화 조명 파라미터의 추정치를 보간함으로써 소정 시점, 공간, 및/또는 온도에 대해 예측될 수 있다. 예를 들어, 제1 주파수는 제1 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있고, 제2 주파수는 제2 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있으며, 제1 캡처 이미지와 제2 캡처 이미지 사이의 한 시점에 대응하는 주파수(예를 들어, 제1 이미지와 제2 이미지 사이에서 촬영된 이미지에 대한 주파수)는, 적어도, 제1 캡처 이미지와 제2 캡처 이미지 사이의 주파수의 결정된 변화율을, 사용하여 보간함으로써 예측될 수 있다.

[0112] 일부 구현예에 따르면, 구조화 조명 파라미터는 2개의 이미지 캡처로부터 얻은 구조화 조명 파라미터의 추정치를 사용하여 외삽에 의해 소정 시점, 공간, 및/또는 온도에 대해 예측될 수 있다. 예를 들어, 제1 배향은 제1 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있고, 제2 배향은 제2 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있으며, 제1 및 제2 캡처 이미지 이후의 시점에 대응하는 배향(예를 들어, 제1 및 제2 이미지 이후에 촬영된 제3 이미지에 대한 배향)은 적어도 제1 캡처 이미지로부터 제2 캡처 이미지로의 배향의 결정된 변화율을 사용하여 외삽에 의해 예측될 수 있다. 제2 예로서, 제1 배향은 제1 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있고, 제2 배향은 제2 샘플링 이미지로부터 추정될 수 있고, 제1 및 제2 캡처 이미지 이후의 시점에 대응하는 배향(예를 들어, 제1 및 제2 이미지 이후에 촬영된 제3 이미지에 대한 배향)은 제2 캡처 이미지로부터의 값을 유지함으로써 예측될 수 있다.

[0113] 구현예에서, 추정 및 예측된 구조화 조명 파라미터는 예측되는 다른 구조화 조명 파라미터에 대한 검색 공간을 좁히는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 시점, 공간, 및/또는 온도에 대한 구조화 조명 파라미터의 추정치가 주어지면, 제1 시점, 공간, 및/또는 온도에 가까운 제2 시점, 공간, 및/또는 온도에 대한 구조화 조명 파라미터의 값은 제1 시점, 공간, 및/또는 온도에서 예측 또는 추정된 값을 고려하여 예측될 수 있다.

[0114] 구현예에서, 추정 및 예측된 구조화 조명 파라미터는 시스템에 의해 나중에 사용하기 위해 구조화 조명 시스템의 메모리에 저장될 수 있다. 예컨대, 예측 및 추정된 파라미터는 룩업 테이블과 같은 이력 파일에 저장될 수 있다. 메모리에 저장되는 예측된 파라미터는 추정된 파라미터로부터 결정되거나, 구조화 조명 시스템의 물리적 특성에 기초하여 설정될 수 있다. 예를 들어, 구조화 조명 시스템의 명목상 그리드 간격이 저장될 수 있다. 저장된 파라미터는 이후에 보정된 이미지 재구성, 구조화 조명 파라미터의 변화를 수정하기 위해 하드웨어 구성요소에 피드백 제공, 및 추가 구조화 조명 파라미터를 예측할 때 검색 공간 축소와 같은 작업을 수행하기 위해 참조될 수 있다.

[0115] **조명 프린지 패턴**

[0116] 도 6은 구조화 광을 사용하여 고해상도 이미지를 생성하도록 하나의 이미징 사이클 동안 SIM 이미징 시스템(200)의 수직 격자(230A) 및 수평 격자(230B)에 의해 샘플(271)의 평면 상에 투영될 수 있는 단순화된 조명 프린지 패턴을 예시한다. 이러한 예에서, 수직 조명 배향을 갖는 3개의 위상 이미지는 수직 격자(230A)를 사용하여 캡처될 수 있고, 수평 조명 배향을 갖는 3개의 위상 이미지는 수평 격자(230B)를 사용하여 캡처될 수 있다. 각각의 배향에 대해, 투영된 프린지는 배향 패턴의 3개의 위상 이미지를 캡처하기 위해 (예를 들어, 위상 변조기(230A 또는 230B)를 3개의 상이한 위치로 설정함으로써) $1/3\lambda$의 단계의 위치에서 위상 시프트될 수 있다.

[0117] 각각의 위상 이미지를 캡처하는 동안, 샘플에서 방출되는 어떤 빛도 카메라(290)에 의해 캡처될 수 있다. 예컨대, 샘플(271)의 상이한 피처에 위치한 형광성 염료는 형광을 발할 수 있고 결과적인 광은 대물 렌즈(270)에 의해 집광되고 카메라(290)의 이미지 센서로 지향되어 형광을 검출한다. 캡처된 6개의 이미지는 전체 샘플 또는 더 큰 샘플의 위치를 이미지화하는 데 사용될 수 있다.

[0118] 모든 이미지가 이미징 사이클 동안 캡처되면(이 예에서는, 6개의 이미지), 캡처된 이미지로부터 고해상도 이미지를 구성할 수 있다. 예를 들어, 도 6에 도시된 6개의 이미지로부터 고해상도 이미지를 재구성할 수 있다. 적합한 알고리즘을 사용하여 이러한 다양한 이미지를 조합하여 임의의 개별 구성요소 이미지보다 훨씬 더 나은 공간 해상도로 샘플의 단일 이미지를 합성할 수 있다.

[0119] 고해상도 이미지의 구성 동안, 구조화 조명 파라미터(예를 들어, 각도, 간격 및 위상)의 바람직하지 않은 시프트 또는 변화는 본 개시내용에 따라 예측된 구조화 조명 파라미터(예를 들어, 각도, 간격 또는 위상의 예측된 변화)를 사용하여 알고리즘적으로 보상될 수 있다. 예를 들어, 수직 조명 이미지 및/또는 수평 조명 이미지의 위상, 각도 및/또는 간격의 오프셋이 보상될 수 있다.

[0120] 일부 구현예에서, SIM 이미징 시스템의 이러한 변경을 보상하기 위해 시스템(200)의 하나 이상의 하드웨어 요소를 제어함으로써 구조화 조명 파라미터의 바람직하지 않은 시프트 또는 변화가 이미지 캡처 이전에 보상될 수 있다. 예를 들어, 이미징 시퀀스 이전 및/또는 이미징 시퀀스의 이미지들의 캡처 사이에 위상 드리프트는 위상 시프팅 요소(예를 들어, 회전 미러, 선형 액추에이터 등)를 조정함으로써 각각의 광학 암에 대해 보상될 수 있다. 일부 구현예에서, 하드웨어 및 알고리즘 보상의 조합이 구현될 수 있다.

[0121] 도 6은 패턴화된 플로우 셀이 대칭적으로 패턴화된 나노웰을 포함하는 구현예를 예시한다. 일부 구현예에서, 나노웰은 비대칭적으로 패턴화될 수 있고, 예를 들어 나노웰은 세장형 구조를 형성하도록 형상으로 형상화되거나 구성될 수 있다. 세장형 구조는 제1 축을 따른 치수가 제2 축을 따른 치수보다 큰 형상을 나타낸다. 비대칭 형상의 나노웰은 타원형, 장방형 등일 수 있다. 이러한 구현예에서, 샘플은 더 긴 면의 방향 또는 축을 따라 분리될 수 있고 SIM은 더 짧은 면을 따라 해상도를 증가시키는 데 사용된다. 나노웰의 짧은 면이 x 축을 따르고 긴 면이 y 축을 따르는 경우, 비대칭으로 패턴화된 플로우 셀의 피치 Px는 좁거나 빽빽하여 해상도가 증가하는 반면 y 축을 따라 피치 Py는 더 커진다. 따라서, 플로우 셀의 나노웰 내에 포함된 샘플을 적절하게 분리하기 위해 x 축을 따라 해상도가 증가하고 3개의 이미지만 캡처된다.

[0122] 도 7은 구조화 조명 이미징 사이클에 대한 이미지 캡처 동안 이중 광학 격자 슬라이드 SIM 이미징 시스템(500)의 제1 회절 격자 및 제2 회절 격자에 의해 샘플(570)의 평면 상에 투영될 수 있는 단순화된 조명 프린지 패턴을 예시한다. 예를 들어, SIM 이미징 시스템(500)은 도 7에 도시된 조명 패턴을 생성하기 위해 제1 회절 격자(531) 및 제2 회절 격자(532)를 사용할 수 있다. 도 7의 예에 예시된 바와 같이, 2개의 격자는 샘플(570)의 표면에 직각의 프린지 패턴을 투영하며 선형 이동 스테이지(530)의 이동 축으로부터 약 ±45° 로 배열된다.

[0123] 예를 들어, 제1 격자(예를 들어, 격자(531))는 샘플(570)에 1차(first-order) 조명 프린지를 투영할 수 있다. 샘플에 의해 방출된 임의의 광은 카메라(580)에 의해 캡처될 수 있고 제1 패턴(예를 들어, 45° 패턴)의 제1 위상 이미지가 캡처되어 제1 위상 이미지를 생성할 수 있다. 추가 위상 시프트된 이미지를 캡처하기 위해, 격자에 의해 투영된 패턴은 선형 이동 스테이지를 병진시킴으로써 위상 시프트될 수 있다. 이러한 위상 시프트 이동은 도 7의 단계 1 및 2로 예시된다. 위상 시프트 이동은 격자에 투영된 프린지 패턴을 약간 시프트하기 위해 격자의 작은(예를 들어, 약 3 내지 5 마이크로미터 이하) 이동을 제공할 수 있다.

[0124] 회절 격자에 대한 모든 위상 시프트된 이미지의 캡처에 이어, 시스템(500)은 또 다른 회절 격자를 이미징 시스템의 광원에 광학적으로 결합하도록 선형 이동 스테이지(530)를 병진시킴으로써 회절 격자를 전환할 수 있다(예를 들어, 도 4a에서 도 4b로의 전이). 이러한 이동은 도 7의 예에서 단계 3으로 예시된다. 회절 격자 변경의 경우, 선형 이동 스테이지는 비교적 큰 병진을 제공할 수 있다(예를 들어, 12 내지 15 ㎜ 정도).

[0125] 그 다음, 다음 격자에 대해 일련의 위상 이미지를 캡처할 수 있다. 예컨대 도 7에 예시된 바와 같이, 제2 회절 격자는 샘플에 1차 조명 프린지를 투영할 수 있고, 투영된 프린지는 격자의 패턴의 3개의 위상 이미지를 캡처하기 위해 선형 이동 스테이지(530)를 병진시킴으로써 위치가 시프트될 수 있다(예를 들어, 도 7의 단계 4 및 5).

[0126] 모든 이미지가 이미징 사이클 동안 캡처되면(이 예에서는, 6개의 이미지), 캡처된 이미지로부터 고해상도 이미지를 구성할 수 있다. 예를 들어, 도 7에 도시된 6개의 이미지로부터 고해상도 이미지를 재구성할 수 있다. 적합한 알고리즘을 사용하여 이러한 다양한 이미지를 조합하여 임의의 개별 구성요소 이미지보다 훨씬 더 나은 공간 해상도로 샘플의 단일 이미지를 합성할 수 있다.

[0127] 고해상도 이미지의 구성 동안, 구조화 조명 파라미터(예를 들어, 각도, 간격 및 위상)의 바람직하지 않은 시프트 또는 변화는 본 개시내용에 따라 추정된 구조화 조명 파라미터(예를 들어, 각도, 간격 또는 위상의 예측된 변화)를 사용하여 알고리즘적으로 보상될 수 있다. 예를 들어, 수직 조명 이미지 및/또는 수평 조명 이미지의 위상, 각도 및/또는 간격의 오프셋이 보상될 수 있다. 일 구현예에서, 이미지의 위상, 각도 및/또는 간격의 오

프셋 중 하나 이상은 시퀀싱 실행의 제1 사이클에서와 같이 주기적으로 계산될 수 있다. 이러한 추정의 빈도는 프로세스의 안정성에 영향을 미치는 환경적 요인에 따라 증가하거나 감소할 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, SIM 이미징 시스템의 이러한 변경을 보상하기 위해 시스템(500)의 하나 이상의 하드웨어 요소를 제어함으로써 구조화 조명 파라미터의 바람직하지 않은 시프트 또는 변화가 이미지 캡처 이전에 보상될 수 있다. 예를 들어, 이미징 시퀀스 이전 및/또는 이미징 시퀀스의 이미지들의 캡처 사이에 위상 드리프트는 선형 이동 스테이지(530)를 병진시킴으로써 보상될 수 있다. 일부 구현예에서, 하드웨어 및 알고리즘 보상의 조합이 구현될 수 있다.

[0129] 본원에 설명된 구현예에 따르면, 구조화 조명 파라미터는 특정 시점 이전 및/또는 이후에 캡처된 이미지들로부터 얻은 구조화 조명 파라미터의 추정치를 사용하여 해당 시점에 대해 예측될 수 있다. 예를 들어, 계산 리소스 제한은 SIM 이미징 시스템(예를 들어, 시스템(100, 200 또는 500))이 캡처된 이미지로부터 위상, 주파수 및/또는 배향과 같은 구조화 조명 파라미터를 직접 추정할 수 있는 속도를 제한할 수 있다. 어떤 경우에는, SIM 이미징 시스템이 위상 이미지마다 구조화 조명 파라미터를 직접 추정하거나 측정할 수 있으며, 이 경우 구조화 조명 파라미터를 예측할 필요가 없을 수 있다. 그러나 다른 경우에, SIM 이미징 시스템은 이미징 사이클마다 한 번 또는 훨씬 더 적은 빈도로(예를 들어, 3, 5, 10, 50 또는 100 이미징 사이클마다) 이미징 사이클의 일부 위상 이미지에 대한 구조화 조명 파라미터를 직접 추정하거나 측정할 수 있다. 이러한 경우, 시스템의 이미지 샘플링 속도를 따라잡기 위해 특정 시점 및/또는 공간에 대해 얻은 구조화 조명 파라미터의 직접 추정을 활용하여 다른 시점 및/또는 공간에서의 구조화 조명 파라미터에 대한 예측을 하는 것이 유리할 수 있다.

[0130] 이러한 원리의 한 예를 수학적으로 예시하기 위하여, 기준에 대한 상관 관계는 구조화 조명 파라미터를 추정하는 한 가지 방법이다.

[0131] 상관 출력 $= \sum_r c(x)h(x-f)$ (1)

[0132] 여기서 h(x)는 알려지거나 이미지 데이터에서 유도될 수 있는 기준이고, c(x)는 기준과 상관되는 이미지 데이터에서 유도되며, f는 추정할 값(이 예에서는, 빈도)이다. 본 개시내용에 따라 다른 대안적 추정 기법을 이용할 수 있다는 점에 유의해야 한다.

[0133] 수학식 (1)의 예에서, f의 다수의 가상 값 각각에 대해 하나의 상관 출력이 생성될 수 있다 파라미터 추정치 f는 상관 관계의 크기를 최대화하는 f의 값으로 구할 수 있다. 그러나 많은 경우에, 많은 수의 f 가상 값이 상관 출력을 최대화하기 위해 시도해야 할 수도 있다. 큰 검색 공간은 계산 요구 사항을 증가시킬 수 있으며, 결과적으로 감소된 시스템 처리량(즉, 단위 시간당 처리되는 데이터 감소)을 야기할 수 있다.

[0134] **광학 감지(특히 렌즈) 왜곡**

[0135] 아래의 두 항목에서는 SIM 이미지 재구성을 위한 파라미터를 추정하는 기법을 제시한다. 개시된 기법 중 일부는 렌즈 결함으로 인해 왜곡되거나 휘어진 프린지 피크 선을 보상한다. 평행해야 하는 패턴 선들은 이미지의 중심 근처에서 해당 방식으로 시작되지만 렌즈의 가장자리 근처에서는 수렴하거나 평행하지 않게 되는 경향이 있다. 이는 조명 피크 각도 또는 배향, 조명 피크 간격, 및 위상 오프셋에 영향을 미친다. 도 8a에서는, 이미지 타일을 서브타일 또는 서브윈도우 또는 서브필드로 지칭되는 중첩 영역으로의 분할을 예시한다. 서브타일들은 전체 서브타일에 대한 만족스러운 재구성을 제공하는 파라미터를 설정할 수 있을 정도로 충분히 작다. 파라미터 추정은 2개의 단계로 수행될 수 있다. 첫째, 파라미터 추정이 이미지 중심 부근 서브타일에 대해 수행될 수 있다. 그 다음, 파라미터 추정이 다른 서브타일에 대해 수행될 수 있고, 중심 부근 서브타일에 대한 파라미터에 관한 왜곡 및 해당 왜곡에 대한 보정을 결정하기 위해 중심 부근 서브타일과 비교될 수 있다.

[0136] 이러한 기법의 구현을 예시하기 위해, "서브타일 각도 및 간격 매핑" 알고리즘(알고리즘 2A라고도 함) 및 "서브타일 위상 매핑" 알고리즘(알고리즘 2B라고도 함)에서 파라미터 추정을 위한 예시적인 의사 코드(pseudocode)를 제시한다. 또한 "최종 왜곡 보정 알고리즘"(알고리즘 1이라고도 함)에서 중심 부근(near-center) 서브타일과 비교할 때 비중심(non-center) 서브타일에 대한 추정된 파라미터의 왜곡에 대한 왜곡 및 보정을 결정하는 예시적인 의사 코드를 제시한다.

[0137] 도 8a 내지 도 8c는 전체 시야(FOV)의 물리적 양태들을 예시한다. 일 구현예에서, 5472 픽셀 x 3694 픽셀인 장방형 센서가 사용된다. 물론, 예를 들어 5472 x 5472 픽셀 또는 4800 x 4800 픽셀의 정방형 센서 또는 상이한

크기의 센서가 사용될 수 있다. 장방형 센서가 사용되는 경우, 왜곡은 렌즈의 가장자리에 가장 근접할 때 최대가 된다. 렌즈는 대부분 원형이므로, 장방형 센서는 짧은 면에서처럼 긴 면에서 렌즈의 가장자리에 근접하지 않는다.

[0138] 도 8a는 전체 시야(FOV)에 걸쳐 프린지 간격 왜곡을 나타내는 2개의 예시를 제시한다. 좌측의 도면(801)은 확대하는 렌즈의 왜곡으로 인한 휘어진 평행 선들의 단순화된 도시(801)이다. 도시된 선들은 이미지 평면에서 평행하도록 의도된다. 렌즈를 통해 볼 때, 이 선들은 중심에서의 간격에 대해 우측 및 좌측 단부에서 수렴하는 것으로 보인다. 우측의 도면(805)은 또 다른 과장된 예이다. 이 도면에서, 프린지 선들은 좌측 상부와 및 우측 하부 코너 사이에서 대각선으로 배향된다. 프린지 간격은 더 쉽게 보이도록 과장되어 있다. 프린지 선들은 중심에 대해 좌측 상부 및 우측 하부 코너에서 수렴한다. 특정 제조사의 렌즈의 경우, 프린지 패턴은 불균일할 수 있다.

[0139] 도 8b 및 도 8c는 녹색 및 청색 레이저 조명에 대해 이미지 평면 내의 명목상으로 평행한 프린지 피크들 사이의 이미지의 간격의 측정값을 도시한다. 컬러 스케일은 2.08 내지 2.22(센서 픽셀) 사이의 간격의 변화를 나타낸다. 이 두 도면 모두에서, 컬러 스케일은 평행한 선들 사이의 중심 간격이 대략 2.14 임을 나타낸다. 녹색 파장 조명 하의 불규칙성을 도 8b의 우측 상부 코너에서 볼 수 있다. 청색 파장 조명 하의 보다 상당한 불규칙성을 우측 가장자리 및 좌측 가장자리를 따라 도 8c에서 볼 수 있다. 이들 도면에서, 프린지 패턴은 도면의 좌측 상부에서 우측 하부까지 일련의 평행 선들이다. 따라서, 간격은 도 8c의 일반적인 화살표 방향에 수직으로 측정된다. 이들 도면은 렌즈에 의해 야기되는 왜곡의 보정을 유도한다. 렌즈들이 개별적으로 제조 및 장착되기 때문에, 조립 후에 개별 시스템의 교정 및 보정이 바람직하다.

[0140] 회색조로 그려진 도 8b는 좌측 상부에서 우측 하부까지 대각선을 따라 장축을 갖는 3개의 개념적인 등고선 타원을 포함한다. 등고선은 평행선 사이의 상이한 간격을 갖는 영역을 대략적으로 나타낸다. 색상 도면을 포함하는 우선권 가출원에서, 컬러 다이어그램은 예상 변동에 대해 더 판독 가능한 세부 정보를 제공한다. 프린지 패턴은 도면의 좌측 하단으로부터 우측 상단까지의 45° 각도의 일련의 평행 선이다. 평행 선들 사이의 간격은 더 밝은 회색 음영으로 예시된 것처럼 중심 영역에서 증가한다. 중심 영역에서 우측 상단 또는 좌측 하단 영역으로 이동함에 따라 프린지 선들 사이의 간격 왜곡이 감소한다. 3개의 등고선의 장축은 프린지 선의 방향에 대략 수직이다. 간격 왜곡은 중심 등고선의 영역에서 벗어날수록 감소한다. 도 8c의 회색조는 또한 등고선을 포함한다. 도 8c의 등고선은 위에 설명한 것과 동일한 의미를 가지며 간격 왜곡의 범위가 다른 영역을 나타낸다.

[0141] 도 8d는 이미지 타일의 전체 시야(FOV)의 서브타일 또는 서브필드를 도시한다. 이 도면에서, 예시된 서브타일은 512 픽셀 x 512 픽셀이다. 이들 서브타일은 도시된 바와 같이 시계(field of vision)를 세분화하거나 중첩될 수 있다. 서브타일은 더 많거나 혹은 적을 수 있다. 예컨대, 400x400 및 1024x1024 픽셀 서브타일이 작업 가능한 것으로 도시되었다. 도면은 5x7개의 서브타일을 예시한다. 위에 언급된 더 큰 센서는 8x11개의 서브타일을 가질 수 있다. 3x3, 5x5, 5x7, 9x9, 9x16과 같은 다른 구성의 서브타일이 사용될 수 있다. 더 큰 센서일수록 더 많은 수의 서브타일로 분할될 수 있다. 서브타일은 광학 센서의 적어도 2개의 픽셀만큼 중첩될 수 있다. 더 많은 수와 더 적은 수의 픽셀을 서브타일들 간의 중첩에 사용할 수 있다. 예를 들어, 512 픽셀 폭의 서브타일의 경우, 최대 256개의 픽셀 중첩이 사용될 수 있고, 1024 픽셀 폭의 서브타일의 경우, 최대 256개의 픽셀 중첩이 사용될 수 있다. 도 8b 및 도 8c의 도면과 일치하게, 홀수 x 홀수 서브타일 어레이의 중앙 서브타일을 포함하여, 렌즈의 스위트 스팟에는 모두, 여러 개의 중심 부근 후보 서브타일(803)이 있다. 본원에 사용되는 바와 같이, 중심 부근 서브타일은 센서의 중심 픽셀을 포함하거나 중심 픽셀을 포함하는 서브타일에 인접한다. 평평하고 작은 오차를 갖는 일부 광학 시스템에서는, 전반적인 왜곡 보정에 영향을 주지 않고 중심 서브타일에 인접한 하위 타일에서 더 멀리 떨어진 서브타일을 기준으로 사용할 수 있다.

[0142] 개시된 기술은 센서에 의해 캡처된 실질적으로 전체 시야에 걸쳐 측정된 왜곡을 매핑하는 것을 포함한다. 규칙적으로 구조화된 조명으로부터의 향상된 해상도 SIM 재구성이 의존하는 3개의 파라미터에는 프린지 패턴의 프린지 간격, 프린지 각도 및 위상 변위가 포함된다. 이들 변수는 또한 구조화 조명 또는 격자 패턴의 간격, 각도 및 위상 오프셋으로 지칭된다. 중심 타일 값의 간격 및 각도 편차는 다항식 표면을 사용하여 전체 시야에 걸쳐 피팅될 수 있다. 2차 표면 및 3차 표면 둘 모두가 연구되었다. 고차 다항식도 사용할 수 있다.

[0143] 이미지 타일에 걸친 프린지 간격 및 프린지 각도 둘 모두는 2차 표면에 의해 피팅될 수 있다. 감도 분석은 2차 표면이 3차 표면과 마찬가지로 거의 피팅되는 것을 보여준다. 2차 표면은 다음의 수학식에 피팅된다.

[0144] $$f(x,y) = c0 + (c1*x) + (c2*y) + (c3*x*y) + (c4*x^2) + (c5*y^2) \quad (2)$$

[0145] 이미징의 이후 사이클에서, 온도 변화로 인한 중심 서브타일에서 간격의 수축 또는 확장을 특성화하고 나머지

이미지에 동일한 편차 보정을 적용할 수 있다. 중심 부근의 서브타일의 수축 및 확장에 따라, 편차 보정이 그에 따라 조정되고 변환될 수 있다. 기준으로 사용되는 중심의 또는 중심 부근의 서브타일에 대해 서브타일의 상대 편차가 일정하다는 것을 관찰하였다.

[0146] 도 9는 적색으로 표시된 측정된 데이터 지점에 피팅된 컬러 코딩된 표면을 도시한다. 이 표면은 3 차원이므로 등고선을 이해하기 위해 도면의 컬러 버전을 참조하는 것이 권장된다. 회색조로 그려진 도 9의 어두운 음영 부분은 3차원 플롯의 상단과 하단의 어두운 색상을 나타낸다. 예를 들어, 도 9의 그래픽 플롯의 우측 상단의 어두운 음영 부분은 도면의 컬러 버전에서 암적색을 나타내고 하단의 어두운 음영 부분은 청색을 나타낸다. USPTO는 우선권 출원의 출원 시 컬러 버전을 PAIR 온라인 시스템의 추가 콘텐츠 탭에 저장했으며, 적절한 때에 공개적으로 이용 가능하게 되었다.

[0147] 실제로, 시야 전체에 걸친 간격 왜곡은 사발 또는 뒤집힌 사발 모양으로 나타낼 수 있는 반면 각도 왜곡은 특징적으로 안장(saddle) 모양을 취하는 것으로 관찰되었다. 도 10a 및 도 10b는 중심 부근 서브타일의 간격에 대한 측정 간격의 뒤집힌 사발 모양을 예시한다. 도 12a 및 도 12b는 중심 부근 서브타일에서 프린지 패턴 각도에 대한 측정된 각도의 안장 모양을 예시한다.

[0148] 도 10a 및 도 10b에서, x 축은 센서의 길이를 따른다. y 축은 센서의 너비를 따른다. x 축과 y 축의 라벨은 서브타일 인덱스이다. 수직 축 간격은 중심 부근 서브타일에서 보이는 규칙적인 간격의 프린지들 사이의 z 축에서 1.000개의 간격으로 정규화된다. 도 10a는 곡선 피팅에 의해 평활화되지 않은 측정된 데이터 지점을 도시한다. 이는 센서의 중심과 우측 하부 부분의 측정값 사이에 관찰된 프린지 간격의 대략 1.2% 변동을 보여준다. 도 10b에서, 청색으로 도시된 실제 데이터 지점은 2차 피팅된 표면과 비교된다. 다음 항목에서는, 중심 부근 서브타일과 비교하여 전체 FOV에 걸친 측정 간격 및 각도 왜곡을 제시한다. 도 10a 및 도 10b의 회색조 버전은 그래픽 플롯의 상단 및 하단에 어두운 음영 부분을 갖는다. 상단 부분의 어두운 음영은 적색을 나타내고 하단 부분의 어두운 음영은 청색을 나타낸다.

[0149] **<u>간격 및 각도 왜곡의 보정</u>**

[0150] 본 항목에서는 구조화 조명의 캡처에 적용된 센서에 걸쳐 전체 시야(FOV)를 보정하고 렌즈 왜곡으로 인한 비선형 효과에 피팅 기능을 제공하는 기법을 추가로 설명한다. 구조화 조명은 규칙적으로 간격을 두고 각진 패턴을 이미지 평면에 투영하는 것을 포함한다. 투영된 구조화 조명 패턴의 이미지 타일이 캡처된다. 전체 시야로부터 중심 부근 서브타일이 선택된다. 서브타일 내의 변동을 포함하여 서브타일 위의 패턴 간격 및 각도가 측정된다. 전체 시야에 걸쳐 다른 서브타일에 대한 간격과 패턴 각도를 추가로 결정한다. 중심 부근 서브타일의 간격 및 패턴 각도에 대해 전체 시야에 걸친 간격 및 패턴 각도를 나타낸다. 실질적으로 전체 시야에 걸쳐 간격과 패턴 각도에 다항식 표면을 반복적으로 피팅한다.

[0151] 도 11a, 도 11b 및 도 11c는 측정된 간격 왜곡을 2차 및 3차 표면 피팅과 비교한다. 3개의 도면 모두에서 시야에 걸친 간격의 변화가 2% 미만이기 때문에 3개의 도면에서 색상 변화가 미미하다. 이러한 도면의 시각적 분석 및 피팅 오류의 계산은 2차 다항식이 간격 왜곡에 대해 충분히 양호한 피팅을 제공한다는 것을 시사한다. 본 개시내용의 사상 및 교시는 2차 다항식보다 약간 더 좋거나 더 나쁜 결과를 생성할 수 있는 고차 다항식 및 대안적인 피팅 방식을 포함한다. 도 11a, 도 11b 및 도 11c의 회색조 버전은 암적색을 나타내는 중심 부분의 어두운 음영을 포함하고 우측 상단과 좌측 하단의 바깥 부분은 경계에 가까운 주황색과 황색으로 전이하는 명적색을 나타내는 밝은 회색 음영을 갖는다.

[0152] 도 12a 및 도 12b는 도 10a 및 도 10b와 x 및 y 축의 구성을 공유한다. 이들 도면의 세로축은 시야에 대해 관찰되는 프린지의 배향 각도를 나타낸다. 명목상으로, 각도는 45° 로 의도되었을 수 있다. 측정된 각도의 범위는 44.85도에서 45.15도까지이고, 이는 0.6%의 편차이다. 도 12a는 곡선 피팅에 의해 평활화되지 않은 측정된 데이터 지점들을 도시한다. 도 12b에서, 청색으로 도시된 실제 데이터 지점들은 2차 피팅된 표면과 비교된다. 도 12a 및 도 12b의 회색조 버전은 그래픽 플롯의 상단 및 하단에 어두운 음영 부분을 갖는다. 상단의 어두운 음영은 암적색을 나타내고 하단의 어두운 음영은 암청색을 나타낸다.

[0153] 도 13a 내지 도 13e 및 도 14b 내지 도 14h는 센서 경계를 따른 크롭이 센서에 대한 간격 및 프린지 각도에 대한 곡선 피팅을 개선할 수 있는 방법을 예시한다. 이들 도면에서 그래프의 x 및 y 축은 센서의 길이와 너비에 따른 픽셀 위치를 나타낸다. 도 8c를 참조하면, 크롭은 센서의 가장자리 근처의 경계로 표시된다. 도면은 이러한 크롭 또는 수축이 센서에 의해 캡처된 이미지의 가장자리 근처의 왜곡을 제거한다는 점을 예시한다. 다음 도면은 이러한 이미지의 수축을 통해 FOV 데이터를 표면 모델에 양호한 피팅을 가능하게 하는 방법을 예시한다.

수축 계수 또는 수축의 단위는 이미지를 하나의 슬라이딩 윈도우 스트라이드만큼 수축하는 것과 같을 수 있다. 스트라이드 값은 서브타일의 크기와 일치하도록 선택하거나 왜곡을 초래할 수 있는 센서 가장자리의 픽셀의 수에 기초하여 경험적으로 선택될 수 있다. 예를 들어, 스트라이드 값이 200 픽셀로 선택되면 하나의 수축 단위로 이미지의 모든 면에서 데이터 품질이 불량한 이미지 데이터의 외부 200 픽셀을 제거할 수 있다. 25, 50 또는 100 픽셀과 같이 200 픽셀보다 작거나 225, 250 또는 300 픽셀과 같이 200 픽셀보다 큰 스트라이드 값을 사용할 수 있다.

[0154] 도 13a는 청색 도트들에서 크롭 없이 전체 시야(FOV)에 대한 이미지 데이터에 피팅되는 간격 왜곡을 위한 2차 모델 표면을 도시한다. 이러한 전체 FOV 이미지 데이터에는 수축 계수가 적용되지 않는다. 즉, 수축 계수는 0이다. 도 13a에 예시된 바와 같이, 전체 FOV 데이터는 모델에 대한 양호한 피팅을 제공하지 않는다. 수축 계수가 1에서 4로 점진적으로 증가함에 따라(도 13b 내지 도 13e), 모델과 크롭되지 않은 데이터 지점들 사이의 피팅이 개선된다. 크롭이 외부 데이터 지점들을 제거함에 따라, z 축을 따라 축척이 수축되어 서브타일들 사이의 더 적은 변동을 나타낸다. 다시 도 8c를 참조하면, 이상치(outlier) 데이터 지점은 크롭이 적용된 센서의 가장자리를 따라 있음을 알 수 있다. 도 13c에서, 도 13d 및 도 13e에서보다 더 많은 수의 외곽 청색 데이터 지점이 분명하게 나타난다. 도 13e에서, MSE는 0.000001로 떨어졌고 z-스케일은 도 13d에서보다 약간 더 낮게 늘어났다. 도 13a 내지 도 13e, 도 14b 내지 도 14h, 및 도 15a 및 도 15b의 회색조 버전은 그래픽 플롯의 상단 및 하단에 어두운 음영 부분을 갖는다. 상단의 어두운 음영은 그래픽 플롯의 상단 및 하단에 있는 어두운 색상을 나타낸다. 이들 그래픽 플롯 중 일부는 그래픽 플롯 위 또는 가까이에 위치된 밝은 색과 어두운 색의 원을 갖는다. 원의 밝은 색과 어두운 색상은 이들 원의 어떤 차이를 나타내는 것은 아니다. 일부 원은 알아볼 수 있도록 어두운 색상으로 그려진다.

[0155] 도 14b 내지 도 14h는 전체 FOV 이미지 데이터에 적용된 수축 계수를 점진적으로 증가시킴으로써 각도 왜곡에 대한 2차 표면 피팅의 개선을 예시한다. 수축 계수가 증가함에 따라, z 축을 따라 축척이 다시 수축되어 데이터 지점들의 바디가 피팅된 표면에 가까워진다. 센서의 가장자리에서 외곽의 왜곡된 값을 제외하면 표면 피팅이 크게 개선된다. 도 14b 내지 도 14e에서, 왜곡은 피팅된 표면 아래의 평면 청색 데이터 지점들로부터 명백하다. 수축 계수가 "1"(도 14c)에서 "3"(도 14e)으로 증가하면 z 축을 따른 축척이 [-45, -20]에서 [-44, -40]으로 반으로 수축된다. 도 14f에서, 크롭은 마침내 데이터 지점들과 피팅된 표면을 더 가깝게 만드는 것으로 나타난다. 도 14f에서, MSE는 0.000033으로 떨어진다. 이제 각도 왜곡에 대한 2차 표면 모델이 청색 지점들로 도시된 측정 데이터와 일치한다. 도 14h에서, 수축 계수를 "6"으로 늘리면 약간의 개선이 이루어진다. 도면에서, 수축 계수 "4" 이상이 순서대로 나타난다. 백분율 또는 절대 MSE 개선에 기초한 임계값을 사용하여 수축 계수를 선택하거나 분해능에 대한 수축 계수의 영향을 결정할 수 있다. 수축 계수의 선택은 비율 또는 임계값 접근 방식을 사용하여 자동화할 수 있다.

[0156] 왜곡 표면의 피팅에 의한 이미징 시스템의 특성화는 때때로 중심 부근 서브타일의 간격과 패턴 각도를 다시 추정하고 외삽 계수를 사용하여 전체 시야에 걸쳐 간격과 패턴 각도를 결정함으로써 기기의 작동 전 및/또는 작동 중에 수행될 수 있다. 외삽 계수는 중심 부근 서브타일을 넘어 간격 및 패턴 각도를 추정하지 않고 적용될 수 있다. 전체 시야의 서브타일이 중첩될 수 있다. 보정하는 동안, 간격과 패턴 각도는 겹치는 서브타일에 대해 독립적으로 계산된다. 이러한 접근 방식은 2개의 각도가 나노웰의 장방형 또는 사변형 패턴의 대향 코너와 실질적으로 정렬되도록 구조화 조명 패턴에 대해 2개의 배향 각도를 사용할 수 있다.

[0157] 따라서, 개시된 기술은 한 타일의 서브타일들 간의 특성화된 변화에 대해 기기를 교정 및 재교정하는 것을 포함한다. 간격 및 각도의 특징적인 왜곡은 기기 작동 중 파라미터 추정의 필요성을 크게 줄이는 방식으로 캡처될 수 있다. 특성화/보정은 매핑 표면에 피팅되지 않을 정도로 왜곡된 센서 가장자리의 픽셀들을 크롭하고 피팅을 방해하는 픽셀들을 크롭함으로써 향상될 수 있다.

[0158] **보정된 간격 및 각도의 적용**

[0159] 개시된 기술은 실질적으로 전체 시야에 걸쳐 개선된 이미지를 효율적으로 재구성할 수 있다. 이러한 목적으로, 전체 시야를 적어도 9개의 서브타일 또는 서브타일 기반의 독립적인 재구성을 위한 서브타일로 분할한다. 중심 부근 서브타일에 대해 규칙적으로 간격을 두고 각진 구조화 조명 패턴을 보는 것으로부터 이미 추정된 간격 파라미터 및 패턴 각도 파라미터를 추정하거나 액세스할 수 있다. 외삽 요소를 적용하여 시야에 걸쳐 중심 부근 서브타일 파라미터를 다른 서브타일로 확장한다. 다수의 이미지로부터 향상된 이미지 재구성을 수행하기 위해 중심 부근 서브타일 추정 파라미터와 다른 서브타일의 외삽 파라미터를 사용한다. 구조화 조명 현미경법(SIM) 분석을 다수의 이미지에 적용함으로써 다수의 이미지를 다수의 패턴 각도 및 주기적으로 변위된 각 패턴 각도의

패턴 위상에서 볼 수 있다. 일 구현예에서, 위에 설명된 기술은 각각의 패턴 각도의 주기적으로 변위된 위상의 패턴을 추가로 추정할 수 있다. 위에 설명된 기술은 스티칭 경계를 따라 규칙적인 노이즈 패턴을 식별하고 노이즈를 완화함으로써 서브타일을 함께 스티칭하는 것으로 확장될 수 있다.

[0160] 도 15a 및 도 15b는 시퀀싱 기기로부터 수집된 실제 데이터로부터 피팅된 왜곡 모델의 예이다. 도 15a는 전체 시야(FOV)에 걸쳐 프린지 간격 왜곡을 피팅함으로써 얻어진 2차 피팅 응답 표면을 예시한다. 도 15b는 FOV에 걸쳐 프린지 각도 왜곡을 피팅함으로써 얻어진 2차 피팅 응답 표면을 예시한다.

[0161] **위상 변위의 추정**

[0162] 위상 변위는 SIM 이미지 재구성을 위한 나머지 제3 입력 파라미터이다. 본 항목에서는 위상 변위를 추정하기 위해 기존 기법을 적용한다. 개시된 기술은 서브타일에 대한 추정을 수행하므로 전체 FOV 타일에 대하여 서브타일에 걸쳐 추정된 위상 변위에 대한 공통 참조 기준(common frame of reference)을 설정하는 기법을 추가로 제시한다. 위상 추정의 하나의 구현예는 윅커(Wicker) 등의 "Phase optimisation for structured illumination microscopy"라는 제하의 2013년도 논문의 3절에 제안된 기법을 적용한다. 랄(Lal) 등의 "Structured illumination microscopy image reconstruction algorithm"이라는 제하의 2015년도 논문 및 윅커(Wicker) 등의 2013년도 논문의 수학식이 위커 위상 추정을 설명하는 데 도움이 된다.

[0163] 랄(Lal) 등의 2015년도 논문으로부터 취한 아래의 식 (3)은 획득한 이미지 $\tilde{D}_{\theta,\phi_1}(\mathbf{k}), \tilde{D}_{\theta,\phi_2}(\mathbf{k}), \tilde{D}_{\theta,\phi_3}(\mathbf{k})$로부터 주파수 성분의 세 가지 대역: $\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$을 분리한다. 혼합 행렬은 패턴 각도 또는 배향 Θ에 대응하는 사인파 조명 강도 패턴 $I_{\Theta,\Phi}(\mathbf{r})$을 사용하여 캡처된 이미지의 위상 ϕ_1, ϕ_2, 및 ϕ_3의 추정치를 사용한다. 윅커(Wicker) 등의 2013년도 논문은 ϕ_n과 같은 배향에서 n번째 이미지에 대한 위상을 언급한다. 위상을 충분히 정확하게 알 수 없는 경우, 혼합 해제 또는 밴드 분리 프로세스는 주파수 도메인에서 관찰된 이미지 $\tilde{D}_{\theta,\phi_1}(\mathbf{k}), \tilde{D}_{\theta,\phi_2}(\mathbf{k}), \tilde{D}_{\theta,\phi_3}(\mathbf{k})$로부터 공간 주파수 성분을 불완전하게 분리한다. 사실상, 세 가지 공간 주파수 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$는 노이즈 용어로 제시되는 바와 같이 다른 성분의 잔여 정보를 다소 포함한다.

[0164]
$$\begin{bmatrix}\tilde{D}_{\theta,\phi_1}(\mathbf{k})\\ \tilde{D}_{\theta,\phi_2}(\mathbf{k})\\ \tilde{D}_{\theta,\phi_3}(\mathbf{k})\end{bmatrix} = \frac{I_o}{2}\mathbf{M}\begin{bmatrix}\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})\\ \tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})\\ \tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})\end{bmatrix} + \begin{bmatrix}\tilde{N}_{\theta,\phi_1}(\mathbf{k})\\ \tilde{N}_{\theta,\phi_2}(\mathbf{k})\\ \tilde{N}_{\theta,\phi_3}(\mathbf{k})\end{bmatrix} \quad (3)$$

[0165]
$$\text{여기서 } \mathbf{M} = \begin{bmatrix}1 & -\frac{m}{2}e^{-i\phi_1} & -\frac{m}{2}e^{+i\phi_1}\\ 1 & -\frac{m}{2}e^{-i\phi_2} & -\frac{m}{2}e^{+i\phi_2}\\ 1 & -\frac{m}{2}e^{-i\phi_3} & -\frac{m}{2}e^{+i\phi_3}\end{bmatrix}$$

[0166] 3개의 성분을 갖는 이러한 공식은 사인 또는 코사인 조명에 대한 푸리에 변환을 따른 것이다. 상이한 조명 함수는 수학식을 변경시킬 수 있다.

[0167] 따라서, 조명하는 사인파 강도 패턴 위상에 대한 정확한 지식이 중요하다. 실험 환경에서 이들 위상을 정밀하게 제어하는 것이 항상 가능한 것은 아니기 때문에, 획득된 이미지 데이터로부터 조명 패턴 위상을 결정하는 것이 바람직하다. 윅커(Wicker) 등의 2013년도 논문은 선택된 주파수에서 간섭성 사인파 조명을 사용하여 획득된 SIM 데이터에 대한 위상 추정 기법을 제시한다. 간섭성 조명은 매우 작은 조명 피크 간격 's'를 갖는 미세 격자로부터의 양호한 패턴 콘트라스트를 생성하며, 이는 재구성된 해상도를 향상시킨다. 조명 패턴의 피크 주파수를 사용하여 n번째 이미지의 조명 패턴 위상을 검색한다. 조명 패턴의 피크 주파수는 또한 푸리에 피크로 지칭된다.

[0168] 윅커(Wicker) 등의 2013년도 논문으로부터 인용한 아래 수학식 (4)는 주파수 도메인에서 주파수 $\vec{k}$에 걸쳐 획득

된 이미지 $\tilde{D}_n(\vec{k})$로 수학식 (3)의 일반화된 형식을 제시한다. 각각의 이미지는 상이한 위상으로 중첩된 $\tilde{C}_{-1}(\vec{k})$, $\tilde{C}_0(\vec{k})$, $\tilde{C}_{+1}(\vec{k})$로 지칭되는 3개의 성분으로 구성되어 있다. 이러한 3개의 성분은 수학식 (4)의 $\tilde{S}(\mathbf{k})\ \tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)\ \tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)\ \tilde{H}(\mathbf{k})$와 같은 3개의 성분이라는 점에 유의한다.

$$\begin{aligned}\tilde{D}_n(\vec{k}) &= e^{-\iota\phi_n}\tilde{C}_{-1}(\vec{k}) + \tilde{C}_0(\vec{k}) + e^{\iota\phi_n}\tilde{C}_{+1}(\vec{k}) \\ &= \frac{c}{2}e^{-\iota\phi_n}\tilde{S}(\vec{k}+\vec{p})\tilde{h}(\vec{k}) + \tilde{S}(\vec{k})\tilde{h}(\vec{k}) + \frac{c}{2}e^{\iota\phi_n}\tilde{S}(\vec{k}-\vec{p})\tilde{h}(\vec{k})\end{aligned} \quad (4)$$

[0169]

[0170] 수학식 (4)의 'c'는 조명 패턴의 콘트라스트로 지칭된다는 점에 유의한다. 노이즈가 없는 경우, 'c'는 수학식 (3)의 혼합 행렬($\mathbf{M}$)에서 변조 계수 'm'과 동일하다. ϕ_n을 결정하기 위해, 수학식 (4)의 주파수 $\vec{k}$가 조명 패턴의 피크 주파수인 $\vec{p}$로 대체되어, 수학식 (5)가 생성된다.

$$\phi_n \approx \arg\{\tilde{D}_n(\vec{p})\} = \arg\left\{\frac{c}{2}e^{-\iota\phi_n}\tilde{S}(2\vec{p})\tilde{h}(\vec{p}) + \tilde{S}(\vec{p})\tilde{h}(\vec{p}) + \frac{c}{2}e^{\iota\phi_n}\tilde{S}(0)\tilde{h}(\vec{p})\right\} \quad (5)$$

[0171]

[0172] 수학식 (5)는 패턴 위상 ϕ_n이 주파수 $\vec{p}$에 걸쳐 획득된 이미지 $\tilde{D}_n(\vec{p})$의 위상과 대략적으로 동일하다는 것을 보여준다. 패턴 위상 ϕ_n의 이러한 대략적인 추정은 3개의 지침을 따를 때 양호한 결과를 산출한다. 첫째, 조명 패턴의 콘트라스트 c는 충분히 커야 한다. 둘째, 샘플 전력 스펙트럼은 주파수가 증가함에 따라 충분히 빠르게 감소되어야 한다. 이들 2개의 지침을 따르는 경우, 수학식 (5)는 마지막 항이 우세하게 되어, 아래와 같이 단순화될 수 있다.

$$\phi_n \approx \arg\{e^{\iota\phi_n}\tilde{S}(0)\tilde{h}(\vec{p})\} \quad (6)$$

[0173]

[0174] 임의의 실수 값의 샘플에 대해, 중심 주파수 $\tilde{S}(0)$는 실수 값이 될 것이다. 또한, 점 확산 함수(PSF) $h(\vec{r})$가 실수이고 대칭이면, 광학 전달 함수(OTF) $\tilde{h}(\vec{k})$는 실수가 될 것이다. OTF는 점 확산 함수(PSF)의 컨볼루션이다. 점 확산 함수는 이미징 시스템의 광학 전달 함수의 공간 도메인 버전이다. 명칭 "점 확산 함수"는 모든 물리적 광학 시스템들이 광의 한 지점을 어느 정도 블러링(확산)하는 것을 나타내며, 이때 블러링의 양은 광학 구성요소의 품질에 의해 결정된다. 이미징 시스템의 해상도는 PSF의 크기에 의해 제한된다. 비대칭 PSF의 경우, OTF의 위상을 고려해야 한다.

[0175] 셋째, 패턴 주파수 $\tilde{h}(\vec{p})$의 OTF는 노이즈를 극복할 수 있을 만큼 충분히 커야 한다. OTF가 너무 작으면, 획득된 이미지의 노이즈는 $\vec{p}$에서 측정된 위상을 현저하게 변경시킬 수 있다. 이러한 위상 추정 방법은 검출 OTF의 지원의 외부에 있는 패턴 주파수 $\vec{p}$에 대해 사용될 수 없다. 이러한 주파수들의 경우, $\tilde{h}(\vec{p}) = 0$이다.

[0176] 광학 시스템의 OTF는 실험적으로 결정될 수 있다. 예를 들어, Lal et al. 2015는 100 nm 형광 미소구체들이 희소하게 분포된 샘플의 몇몇 이미지를 얻음으로써 OTF를 계산한다. 그 다음, 100개보다 많은 미소구체에 해당하는 강도 분포를 중첩 및 평균하여 시스템 PSF에 대한 근사치를 얻었다. 이러한 PSF의 푸리에 변환은 시스템 OTF의 추정을 제공한다. 이러한 배경을 바탕으로, 서브타일에 대해 기술된 위상 추정 기법을 적용할 수 있다.

[0177] **서브타일 위상을 공통 참조 기준으로 변환**

[0178] 하나의 서브타일의 위상 측정을 타일에 걸쳐 다른 서브타일에 외삽할 수 있도록 전체 시야(FOV)에 대한 타일의 위상 변위를 추정하는 것이 유용하다. 전체 FOV에 대한 조명 피크 각도 및 조명 피크 간격은 위에 제시된 2차 모델을 사용하여 서브타일의 조명 피크 각도 및 조명 피크 간격으로부터 추정될 수 있다. 위상 변위는 서브타일의 픽셀 기하학적 구조에 의존하기 때문에 덜 규칙적일 수 있으며, 이는 평활 함수 대신 불규칙한 계단 함수를 생성할 수 있다. 각각의 위상 추정은 위상을 추정하는 데 사용되고 있는 이미지의 좌측 상단 코너에 고정된 "참

조 기준"을 갖는다. 결과적으로, 이미지에 걸쳐 기하학적으로 위상차를 보정하려는 경우 각각의 서브타일로부터 추정된 위상을 공통 참조 기준의 기준 위상(중심 추정 서브윈도우 또는 서브타일로부터의)과 비교해야 한다. 공통 참조 기준을 달성하기 위해 각각의 서브타일의 위상 추정치를 동일한 기하학적 위치로 변환한다. 위상의 변환은 각각의 서브타일의 프린지 각도와 간격을 정확한 추정을 필요로 한다. 프린지 각도와 간격은 왜곡 보정 프로세스의 결과로 보정된 2차 표면 왜곡 모델에서 얻을 수 있다.

[0179] 전체 FOV 이미지의 서브타일에 걸쳐 공통 참조 기준을 사용하여 위상 추정치를 나타낸다. 서브타일 좌표 공간은 전체 FOV 좌표 공간에 매핑된다. 본 항목에서는, 한 공간에서 다른 공간으로의 점 좌표의 변환을 설명한다. 도 16a는 전체 FOV 이미지 윈도우에서 서브타일 윈도우의 일반적인 설정 및 관련 변수 및 로컬 및 글로벌 기준 사이의 좌표를 변환하는 수정된 위상 오프셋 공식을 예시한다. 도 16a는 경계(1605)에 의해 도시된 서브타일을 포함하는 전체 시야를 나타내는 경계(1603)를 도시한다. 크롭(crop) 각도 α는 전체 FOV 윈도우(1603)의 좌측 상단 코너와 서브타일 윈도우(1605)의 좌측 상단 코너를 연결하는 선(1606)에 의해 정의된다. 선(1606)의 길이는 픽셀로 측정되며 "a"로 라벨링된다.

[0180] 조명 피크 각도 β는 센서의 상부 경계, 윈도우(1603), 및 서브타일 윈도우(1605)의 좌측 상단 코너에서 프린지 피크 선(1609)에 수직인 선(1607) 사이에 형성된다. 이러한 프린지 피크 선은 실제 프린지 피크와 평행하며 피크로부터 오프셋될 가능성이 높다. 1603의 좌측 상단 코너에서 1609까지의 선(1607)의 길이는 투영 거리 "b"이다. 타일(1603)과 서브타일(1605)의 좌측 상단 코너들 사이의 위상차 ϕ는 간격 s와 거리 b의 함수이다. 공식(7)에서, 조명 피크 간격은 픽셀 단위의 "s"로, 도 단위의 위상으로 표시된다.

[0181] $$\phi_o = ([b + (\phi_s / 360*s)] \% s)/s*360 \qquad (7)$$

[0182] 아래에 유도되고 설명된 이 공식은 서브타일 좌표에서 전체 FOV 좌표로 위상 오프셋을 변환하는 데 적용될 수 있다. 좌표계들 간의 변환은 이어지는 2개의 예에 예시된다.

[0183] SIM 재구성에서 1차원(1D) 격자는 다음과 같은 강도 함수로 설명될 수 있다.

[0184] $$I(\mathbf{x}) = M \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x}\rangle + \phi\right) \qquad (8)$$

[0185] 여기서 파라미터는 다음의 의미를 갖는다.

[0186] • M는 변조 깊이이다.

[0187] • s는 조명 위상 간격이다.

[0188] • $\mathbf{u} = \begin{pmatrix}\cos\beta \\ \sin\beta\end{pmatrix}$는 단위 벡터이다.

[0189] • β는 조명 피크 각도이다.

[0190] 수학식에서 볼드체의 **x**, **u**는 벡터를 나타낸다. **x**는 강도가 결정되는 이미지 공간의 위치를 나타내는 이미지 공간의 벡터이고, **u**는 단위 벡터이다. 사인파 조명의 강도 값은 +M(밝음)에서 -M(어두움)까지의 조정 범위에서 양수이다.

[0191] 서브타일들 간의 위상 변위 차이가 특성화되면, 다른 서브타일의 위상 변위는 중앙 부근의 서브타일로부터 외삽될 수 있기 때문에 중심 부근 서브타일의 위상 변위만 추정할 필요가 있다.

[0192] 다음의 계산은 위상 오프셋 ϕ의 추정과 관련이 있다. 전체 이미지(전체 FOV)의 데이터를 사용하여 위상 오프셋을 추정하는 대신, 이미지의 서브타일만의 데이터를 사용하는 것이 가능하다. 서브타일의 위상 오프셋은 전체 FOV의 위상 오프셋과 관련이 있지만 동일하지는 않다. 서브타일 위상 오프셋으로부터 전체 FOV의 위상 오프셋을 복구하기 위하여, 위상 오프셋이 공간 병진에서 어떻게 변환되는지 특성화할 필요가 있다. 아래의 수학적 모델은 서브타일로부터 전체 FOV로의 이러한 공간 병진을 나타낸다.

[0193] **<u>좌표 변환의 유도</u>**

[0194] 도 16a에 도시된 바와 같은 배향에서 격자 선을 생성하는 아래의 함수를 고려한다. 전체 FOV의 2차원(2D) 공간

은 도 16b에 도시된 바와 같이 좌표(x_1, x_2)를 갖는 좌표 공간 0_x로 제시된다. 0_x에 대하여 위치 (x_1, x_2)에 의한 지점(1611)을 나타내고 있다. 함수 $f(x_1, x_2)$는 수학식 (9)에 제시된 바와 같이 아래에 정의될 수 있다. 이 함수는 도 16a에 도시된 바와 같은 배향에서 조명 패턴 선을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0195] $$f(x_1, x_2) = \sin\left(\frac{x_1 - x_2}{\sqrt{2}}\right) \qquad (9)$$

[0196] 위의 함수 f의 1차원 주기성은 수학식 (10)의 함수로 제시된다. 도 16a를 참조하면, 이 함수는 조명 패턴 선에 직각인 도 16a의 선(1607)을 따라 이동할 때 조명 패턴 선의 반복을 나타낸다. 이 함수는 특정 강도 값이 반복되는 위치를 결정함으로써 2개의 선 사이의 간격 "s"를 결정할 수 있다. 수학식 (10)은 조명 패턴의 강도의 주기성을 보여준다. 수학식 (10)에서, 강도 피크에 수직인 선은 좌측 상단 코너에서부터 우측 아래로 연장되는 45도 각도이므로 지점(x_1, x_2)의 강도는 선(1607)을 따라 우측 아래로 연속적인 지점 $(x_1+\sqrt{2}\pi, x_2-\sqrt{2}\pi)$에서 반복된다.

[0197] $$f\left(x_1 + \sqrt{2}\pi, x_2 - \sqrt{2}\pi\right) = f(x_1, x_2) \qquad (10)$$

[0198] 위의 함수에 의해 정의된 조명 피크 간격 "s"는 수학식(11)에 제시된다. 편의상, 좌표계는 수학식 (11)에 제시된 바와 같이, 조명 패턴의 간격에 맞도록 조정될 수 있다.

[0199] $$s = \left\|\left(\sqrt{2}\pi, -\sqrt{2}\pi\right)\right\| = 2\pi \qquad (11)$$

[0200] 조명 피크 각도는 수학식 (12)에 의해 정의된다. 전체 FOV의 상단 경계(가로선)와 조명 패턴 선에 수직인 선 사이에는 도 16a에 도시된 바와 같이 조명 피크 각도가 형성된다. 수학식 (12)는 이 각도가 수학식 (9)의 1D 주기성 함수에 의해 생성된 구조화 조명 패턴에 대해 -45도임을 보여준다.

[0201] $$\beta = \arctan\left(\frac{\sqrt{2}\pi}{-\sqrt{2}\pi}\right) = \arctan(-1) = -\frac{\pi}{4} \qquad (12)$$

[0202] 수학식 (9)에 제시된 주기성 함수에 의해 형성되는 패턴 선들의 영점 세트는 선들의 합집합이며 수학식 (13)으로 제시된다.

[0203] $$Z(f) = \cup_{n\in\mathbb{Z}} L_n \qquad (13)$$
$$L_n = \left\{\mathbf{x} \in \mathbb{R}^2 : x_2 = x_1 + 2\sqrt{2}\pi n\right\}$$

[0204] 영점 세트는 서로 거리 "s"로 이격된 구조화 조명 패턴 선을 포함한다. 패턴 선은 수학식 (9)에서 1D 함수 $f(x_1, x_2)$의 값이 0인 점들에 의해 형성된다. 격자에 직교하는 단위 벡터는 수학식 (14)로 정의된다.

[0205] $$\mathbf{u} = (\cos\beta, \sin\beta) = \left(\frac{1}{\sqrt{2}}, -\frac{1}{\sqrt{2}}\right) \qquad (14)$$

[0206] 이제 좌표 (y_1, y_2)로 정의되는 서브타일 좌표 공간 0_y에서 전체 FOV 좌표 공간 0_x로 서브타일의 위상 오프셋을 변환하는 2개의 예를 제시한다. 도 16b는 서브타일 좌표에서 서브타일 윈도우(1605)의 좌측 상단 코너에서 비롯되는 벡터 $\vec{y}$로 나타낼 수 있는 점(1611)을 예시한다. 동일한 점(1611)은 전체 FOV 이미지에 대한 좌측 상단 윈도우(1603)에서 비롯되는 벡터 $\vec{x}$에 의해 전체 FOV 좌표로 나타낼 수 있다. 벡터 $\vec{a}$는 도 16b에 도시된 바와 같이 전체 FOV 이미지 윈도우(1603)의 좌측 상단 코너를 서브타일 윈도우(1605)에 연결한다. 아래의 항목에서는, 한 좌표계에서 또 다른 좌표계로 변환될 수 있는 점(1611)의 위치에 대한 예를 제시한다.

[0207] **제1 실시예**

[0208] $\mathbf{a} = (a, -a) \in \mathbb{R}^2$로 하여, 도 16b의 서브타일(1605)의 좌측 상단 코너를 나타내도록 한다. 이는 서브타일(1605)의 좌측 상단 코너가 전체 FOV 윈도우(1603)의 좌측 상단 코너로부터 수평 축 x_1를 따라 거리 'a'만큼 그리고 수직축 x_2를 따라 거리 '-a'만큼 변위되었음을 의미한다. 이제 전체 FOV 좌표 공간 0_x의 점 (x_1, x_2)을 서브타일 좌표 공간 0_y의 점 (y_1, y_2)으로 변환한다. 다음과 같이 주어진 좌표의 변화를 고려한다.

[0209] $$(y_1, y_2) = T(x_1, x_2) = (x_1 - a, x_2 + a) \qquad (15)$$

[0210] 이제 서브타일 좌표 공간 0_y에서 수학식 (10)의 1D 주기성 함수를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

[0211] $$g(y_1, y_2) = f(T^{-1}(y_1, y_2)) = f(y_1 + a, y_2 - a) = \sin\left(\frac{y_1 - y_2}{\sqrt{2}} + \sqrt{2}a\right) \quad (16)$$

[0212] 좌표의 변경으로 인해 초래된 위상 오프셋은 다음과 같이 주어지는 것을 볼 수 있다.

[0213] $$\phi_a = \sqrt{2}a = \|\mathbf{a}\| \qquad (17)$$

[0214] **제2 실시예**

[0215] 이제 전체 FOV 윈도우의 좌측 상단 코너에 대하여 서브타일의 또 다른 위치를 고려한다. $\mathbf{a} = (2a, -a) \in \mathbb{R}^2$로 두면, 이 경우 좌표의 변경은 다음과 같이 주어진다.

[0216] $$(y_1, y_2) = T(x_1, x_2) = (x_1 - 2a, x_2 + a) \qquad (18)$$

[0217] 수학식 (10)의 1D 주기성 함수는 이제 서브타일 좌표 공간 0_y에서 다음과 같이 나타낼 수 있다.

[0218] $$g(y_1, y_2) = f(T^{-1}(y_1, y_2)) = f(y_1 + 2a, y_2 - a) = \sin\left(\frac{y_1 - y_2}{\sqrt{2}} + \frac{3a}{\sqrt{2}}\right) \quad (19)$$

[0219] 이 경우, 좌표의 변경으로 인해 초래된 위상 오프셋은 다음과 같이 주어진다.

[0220] $$\phi_a = \frac{3a}{\sqrt{2}} = \langle \mathbf{u}, \mathbf{a} \rangle \qquad (20)$$

[0221] 반면 $\langle \mathbf{u}, \mathbf{a} \rangle$는 벡터 $\mathbf{u}$와 벡터 $\mathbf{a}$의 내적을 나타낸다. 내적은 두 벡터의 대응하는 성분들의 합으로 정의된다.

[0222] **일반적인 경우**

[0223] 정리 1.

[0224] $s > 0, \phi_0 \in \mathbb{R}$이고, $\mathbf{u} \in \mathbb{R}^2$는 단위 벡터로 한다. 다음의 함수를 고려한다.

[0225] $$f(\mathbf{x}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x} \rangle + \phi_0\right) \qquad (21)$$

[0226] a) f의 격자 간격은 s이다.

[0227] b) 임의의 $\mathbf{a} \in \mathbb{R}^2$에 대하여 다음을 만족하는 $\phi_a \in \mathbb{R}$가 존재한다.

[0228] $$f(\mathbf{x} - \mathbf{a}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x} \rangle + \phi_a\right) \qquad (22)$$

[0229] 수학식 (21)은 전체 FOV 좌표 공간 0x에 대하여 주기성 함수를 나타내며 위상 오프셋 ϕ_0을 갖는다. 수학식 (22)는 서브타일 좌표 공간에 대한 주기성 함수를 제시하며 위상 오프셋 ϕ_0을 갖는다.

[0230] c) 임의의 ϕ_a는 다음의 수학식을 충족한다.

[0231] $$\phi_0 \equiv \frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{a} \rangle + \phi_a \mod 2\pi. \qquad (23)$$

[0232] *증명*. (a) 조명 피크 간격은 f를 위한 기본 주기의 길이이다. 다음과 같은 이유로, 벡터 $s\mathbf{u}$는 길이 s의 기간이다.

$$f(\mathbf{x}+s\mathbf{u}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x}+s\mathbf{u}\rangle + \phi_0\right) \quad (24)$$

$$f(\mathbf{x}+s\mathbf{u}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x}\rangle + 2\pi\langle \mathbf{u}, \mathbf{u}\rangle + \phi_0\right) \quad (25)$$

[0233] $$f(\mathbf{x}+s\mathbf{u}) = f(\mathbf{x}) \quad (26)$$

[0234] 임의의 더 작은 기간은 sin의 2π 보다 짧은 기간을 의미한다.

[0235] (b) 한 가지 해결책은,

[0236] $$\phi_a = -\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{a}\rangle + \phi_0 \quad (27)$$

[0237] 왜냐하면,

$$f(\mathbf{x}-\mathbf{a}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x}-\mathbf{a}\rangle + \phi_0\right) \quad (28)$$

[0238] $$f(\mathbf{x}-\mathbf{a}) = \sin\left(\frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{x}\rangle - \frac{2\pi}{s}\langle \mathbf{u}, \mathbf{a}\rangle + \phi_0\right) \quad (29)$$

[0239] c) 모든 $t \in \mathbb{R}$ 에 대해 $\sin(t-a) = \sin(t-b)$ 이면, $a \equiv b \bmod 2\pi$ (30)

[0240] 위에서 도출된 관계는 서브타일과 전체 FOV 이미지 타일 사이와 같은 제1 좌표 공간에서 추정된 위상 변위를 제2 좌표 공간으로 변환하는 데 사용될 수 있다. 이는 위상 변위가 중심 부근 서브타일과 렌즈의 테두리 사이의 왜곡에 또한 영향을 받기 때문에 유용하다. 다음 항목에서는, 중심 서브타일에 대한 비중심 서브타일의 위상 변위 값들 간의 관계를 캡처할 수 있는 위상 바이어스 룩업 테이블을 제시한다.

[0241] **위상 바이어스의 추정**

[0242] 개시된 기술은 각각의 서브타일에 대한 위상을 추정한 다음 위상 오프셋을 전체 FOV 좌표로 변환하여 추정된 위상 변위 값이 공통 참조 기준에 표시되도록 하는 것을 포함한다. 조명 패턴의 각각의 각도에 대한 위상 바이어스 또는 위상차 룩업 테이블에 비중심 서브타일과 중심 부근 서브타일에 대한 위상 변위 값들 간의 차이를 저장한다. 어떤 경우에는, 환경 요인의 영향으로 시스템의 불안정성이 증가할 수 있다. 이러한 경우, 시스템 불안정성의 증가를 보상하기 위해 위상 바이어스 룩업 테이블이 더 자주 생성된다. 예를 들어, 위상 바이어스 테이블은 시퀀싱 실행마다 제1 사이클에서 생성될 수 있다. 위상 바이어스 룩업 테이블의 생성 빈도는 시스템의 안정성에 따라 증가하거나 감소할 수 있다.

[0243] 도 17은 0의 값을 갖는 (3, 5)에서의 중심 부근 서브타일로부터의 위상차의 컬러 코딩을 갖는 예시적인 위상 바이어스 룩업 테이블(1701)을 보여준다. 룩업 테이블(1701)은 전체 FOV 이미지 데이터의 서브타일의 수와 동일한 수의 셀을, 이 예의 서브타일에서는 7x9개의 셀을, 포함한다. 테이블(1701)에서 셀의 위치는 전체 FOV 이미지 데이터에서 서브타일의 위치에 해당할 수 있다. 위상 룩업 테이블은 중앙 윈도우 (3, 5) 추정 위상에 대한 각각의 서브타일 간의 위상 차이를 저장한다. 예시적인 테이블은 구조화 조명의 한 각도에 대한 위상 바이어스를 포함한다. 구조화 조명 패턴의 각각의 각도에 대해 유사한 위상 바이어스 테이블이 저장될 것이다. 위상 값은 다른 파라미터(각도 및 간격) 추정치의 누적 오류에 민감하다. 위상 값은 0도에서 360도까지 래핑된다는 점에 유의한다. 중심 서브타일의 위상은 예시적인 테이블에서 0도로 제시된다. 컬러 코딩은 중심 서브타일에 해당하는 서브타일의 위상차 정도를 나타낸다. 위상 바이어스의 추정은 프린지 각도, 간격, 중심 서브타일 또는 서브윈도우의 위상, 및 왜곡 모델(변화되지 않는다고 가정함)을 필요로 한다. 다음 항목에서는, 각도, 간격 및 위상 파라미터를 추정하기 위한 예시적인 알고리즘을 제시한다.

[0244] 위의 항목에서는, 전체 FOV 이미지에서 서브타일에 대한 파라미터를 추정하는 기법을 설명했다. 이어지는 의사코드에서는, 서브타일에 대한 각도, 간격 및 위상 파라미터를 추정하는 단계를 추가로 설명한다. 각도 및 간격 파라미터를 추정하기 위한 예시적인 의사코드가 아래에 제시되어 있으며 "서브타일 각도 및 간격 매핑"(알고리즘 2A라고도 함)으로 지칭된다. 2차 또는 3차 다항식 피팅을 사용하여 각도에 대한 왜곡 계수와 서브타일에 대한 간격 파라미터를 추정한다. 위상 추정 기법을 구현하는 예시적인 의사 코드는 아래에 제시되며 "서브타일 위상 매핑" 알고리즘(알고리즘 2B라고도 함)으로 지칭된다. 위상 오프셋의 추정치는 조명 패턴의 각각의 각도 또는 배향에 대한 위상 바이어스 룩업 테이블에 저장할 수 있다. 일 구현예에서, 플로우 셀 배향, 표면 결함 및 추정된 결과를 왜곡할 수 있는 기타 비이상성의 미세한 차이를 고려하기 위해 플로우 셀의 각각의 시퀀싱 타일에 대해 별도의 룩업 테이블이 사용될 수 있다. 최종 왜곡 보정을 위한 예시적인 알고리즘에 대한 의사 코드는

마지막으로 제시되며 "2차 피팅 및 룩업 테이블을 이용하는 최종 왜곡 보정"(알고리즘 1 및 알고리즘 2C라고도 함)으로 지칭된다.

[0245] **알고리즘 1: 2차 피팅을 이용하는 최종 왜곡 보정**

[0246] 제1 의사 코드에서는, 크롭을 적용하여 이미지 가장자리 근처의 왜곡을 제거할 수 있다. 이를 통해 보정/특성화 동안 각도 및 간격 추정을 위해 전체 FOV 데이터를 2차 표면 모델에 양호한 피팅을 가능하게 한다.

입력: 이미지의 수집(예를 들어, 2 개의 각도 및 각도당 3 개의 위상)
출력: 왜곡 모델 계수
알고리즘:

1. 다음의 이미지/필터를 구축함(서브영역과 일치하는 크기로)
   a. OTF
2. 크기는 동일하지만 중첩되는 서브영역으로, 예를 들어 슬라이딩 윈도우 방식을 사용하여 512x512으로, 이미지를 분할한다.
3. 예를 들어 512x512 윈도우를 사용하여 이미지의 중심에서 파라미터를 추정한다(아래의 서브타일 각도 및 간격 매핑 알고리즘 및 서브타일 위상 매핑 알고리즘 참조)
   a. 각각의 각도에 대해 조명 피크 각도 및 간격을 추정한다.
   b. 각각의 각도에 대해 변조를 추정한다.
   c. 각각의 이미지에 대해 위상을 추정한다.
4. 각각의 서브영역에 대해,
   a. 단계 3의 파라미터 추정을 수행한다.
   b. 위커 위상 추정의 서브타일 중심 x,y 좌표, 프린지 각도(각도당), 간격(각도당) 및 위상 0(각도당)을 어레이(2d 어레이)에 저장한다.
5. 프린지 간격 및 각도에 대해,
   a. 단계 4의 테이블 값에서 단계 3의 중심 윈도우 추정 값을 감산한다.
   b. 2차 표면의 최적 수축 추정을 수행한다.
      i. 단계 4에서 각각의 어레이(예를 들어, 각도 0에서 프린지 간격으로, Z라고 함)에 대해 함수 형식 $f(x,y) = a + b*x^2 + c*y^2 + d*xy + e*x + f*y$에 대한 최소 제곱 회귀를 통해 2차 표면을 피팅한다(서브영역 중심 x,y 좌표에 해당하는 동일한 입력 어레이 X 및 Y를 사용함)
      ii. 단계 i에서 결정된 R^2 계수를 평가한다.
      iii. X, Y, Z 어레이를 수축하고(외부 가장자리 요소 제거), N개의 수축이 수행될 때까지 단계 (i)를 반복한다(N = 3 내지 5이고 조정 가능한 파라미터임).
      iv. 어레이가 데이터의 중심 부분으로 수축됨에 따라 피팅 품질이 개선될 것이 예상되므로, 모델 피팅이 충분히 양호한 경우(현재 기준은 R^2 값에서 5% 미만의 상대적 개선으로 정의됨) 엘보우 포인트에서 계수를 선택한다(수축량을 최소화하면서 R^2도 최대화함).

      본원에서 사용할 수 있는 기타 허용 기준은 다음과 같다.
      - 피팅의 평균 제곱 오차에 대한 개선(평균 제곱 오차의 다음 반복은 일부 미리 정의된 임계값만큼 평균 제곱 오차의 현재 반복보다 작음)
      - 2차 표면의 최대 피팅 오차에 대한 개선(연속 개선이 정체되고 있음을 검출한 경우 각각의 연속 반복은 이러한 오차를 줄이고 피팅을 증가시켜야 함)
      - 이전 2개의 기준과 유사한 개선 임계값을 사용하여 MSE(평균 제곱 오차) 대신 MAE(평균 절대 오차)와 같은 정규화된 오차의 측정.

[0247] 6. 단계 5의 최적 계수는 최종 왜곡 보정 알고리즘의 출력이다.

[0248] **알고리즘 2A: 서브타일 각도 및 간격 매핑**

[0249] 위의 단계 3 및 4 및 작동 중에 사용되는 서브타일에 대한 조명 피크 각도 및 간격 추정을 구현하기 위한 의사 코드는 다음과 같다.

입력: 각각의 이미지의 위상이 0 도에서 360 도까지 고르게 확산되도록 동일한 각도에 대한 이미지의 수집

출력:

1. 푸리에 공간에서 피크의 위치(또는 격자의 간격 및 각도)
2. 푸리에 피크의 변조
3. 제1 이미지의 위상 오프셋

알고리즘:

1. 각각의 이미지의 고속 푸리에 변환
2. 밴드 분리 수행
3. 2개의 구성요소 이미지를 취함:
    a. 0(광시야) 및 +1(고해상도 부분)
    b. 중첩되지 않는 각각의 이미지(공통 영역이라고도 함)의 모든 푸리에 성분을 마스킹한다.
    c. DC 주변 및 추정된 프린지 피크 주위의 저주파 성분을 마스킹한다.
    d. 반전 OTF 적용
4. 시작점 주위의 더 미세한 그리드에 대해 반복
    a. 일부 범위를 고르게 샘플링하는 10x10 그리드의 각각의 점에 대해,
        i. 2개의 이미지 위상 중 하나에 위상 시프트 적용
        ii. 하나의 이미지를 다른 이미지의 컬레와 곱함
        iii. 결과 합계
        iv. 광시야 마스크 푸리에 이미지의 합에 대하여 정규화
        v. 정규화된 복소 상관 관계의 절대값의 최대값을 제공 하는 시프트 저장
            1. 이 숫자의 절대값은 변조임
            2. 이 복소수의 각도는 위상 오프셋임

[0250]

[0251] **알고리즘 2B: 서브타일 위상 매핑**

[0252] 서브타일에 대한 위상 시프트 추정의 예시적인 구현예에 대한 의사 코드는 다음과 같다. 개시된 기술은 이 매핑에 대한 간격 및 각도 파라미터 값의 가장 최근의 최상의 추정치를 사용할 수 있다. 시스템은 또한 왜곡 모델과 중심 서브윈도우 또는 서브타일 파라미터를 사용하여 추정된 간격 및 각도 파라미터 값을 얻을 수도 있다.

입력:

1. 단일 각도에 대한 이미지의 수집
2. 이전에 설명한 알고리즘에서 추정된 조명 피크 간격 및 각도

출력: 수집된 각각의 이미지에 대한 위상 오프셋

알고리즘:

1. 각각의 이미지의 고속 푸리에 변환(FFT) 수행
2. FFT 이미지 사본 생성
3. 각각의 이미지에 OTF 적용
4. 하나의 이미지 시프트
5. 각각의 복소수의 컬레 및 합 절대값을 사용하여 2개의 이미지를 곱함
6. 위상은 생성된 복소수의 각도이다.

[0253]

[0254] **알고리즘 2C: 위상 바이어스 룩업 러닝**

[0255] 위상 바이어스의 경우 시퀀싱 실행의 제1 사이클 이미징 동안 플로우 셀의 타일마다 다음 단계를 수행

입력: 알고리즘 1 의 보정된 왜곡 모델인 시퀀싱 플로우 셀의 각각의 타일에서 예를 들어 2 개의 각도 및 각도당 3 개의 위상에 대한 이미지의 수집
출력: 위상 바이어스 룩업 테이블
알고리즘:

- 각각의 시퀀싱 타일에 대해(SIM 재구성 서브타일과 혼동하지 말 것),
  - i. 알고리즘 1의 단계 3을 적용하여 타일의 중심 윈도우 SIM 파라미터(간격, 각도, 각각의 각도 채널 쌍의 위상)를 추정함
  - ii. 이미지를 서브타일로 분할하고, 각 서브타일에 대해,
    - a. 서브타일에 대한 서브타일 프린지 간격 및 각도를 구하기 위해 알고리즘 2A를 통해 왜곡 모델을 적용함
    - b. 단계 a에서 주어진 프린지 파라미터를 사용하여 로컬 서브타일에 대해 각각의 채널 각도 쌍의 제1 위상 이미지에서 위커 위상 추정을 수행함
    - c. 단계 iib에서 구한 위상과 단계 i 에서 구한 중심 윈도우 위상 0 간의 차이를 계산하고, 그 위상 바이어스를 위상 바이어스에 있어서의 대응하는 2d 어레이에 저장함
  - iii. 나중에 사용할 항목으로 타일 ID를 이용하여 완료된 위상 바이어스 룩업 테이블을 메모리에 저장함
- 전체 플로우 셀에서 만나는 다른 시퀀싱 타일마다 단계 1을 반복한다.

주목할 사항: 성능으로 인해, 시퀀싱 실행의 제1 사이클에서 각각의 타일에 대한 위상 바이어스 룩업을 추정하지만 안정성 문제가 있는 경우 학습 빈도를 조정하여 N 사이클마다 학습할 수도 있다.

[0256]

[0257] 이러한 의사 코드에서, 조명 피크 각도, 조명 피크 간격 및 위상 변위 파라미터를 추정하고 매핑하는 기법을 제시했다. 추정된 파라미터는 구조화 조명 현미경법(SIM) 이미지 재구성에 대한 입력으로 사용된다. 다음 항목에서는, 서브타일의 고해상도 이미지를 효율적으로 재구성한 다음 이러한 서브타일 이미지를 조합하여 전체 FOV의 고해상도 이미지를 재구성할 수 있는 제안된 SIM 이미지 재구성 알고리즘을 제시한다.

[0258] **SIM 이미지 재구성**

[0259] 개시된 SIM 이미지 재구성 기술은 고해상도 이미지를 재구성하기 위해 서브타일의 각도, 간격 및 위상 추정을 사용한다. 개시된 기술은 두 단계로 전체 FOV 고해상도 이미지를 구성할 수 있다. 먼저, 서브타일 파라미터를 이용하여 서브타일에 대한 고해상도 SIM 이미지를 재구성한다. 둘째, 서브타일에 대한 고해상도 이미지를 함께 스티칭하여 전체 FOV 이미지를 구성할 수 있다. 대안적으로, 고해상도 서브타일을 스티칭 없이 처리할 수 있다. 본 항목은 서브타일의 SIM 이미지 재구성을 위한 예시적인 의사 코드로 시작한다. 이를 "서브타일 재구성" 알고리즘이라고 지칭한다. 개시된 기술은 주파수 도메인에서 비중복 데이터를 사용함으로써 푸리에 공간에서 에르미트 대칭을 이용한다. 이는 일부 핵심 작업에 필요로 하는 계산을 거의 절반으로 줄이다. 본 항목은 또한 전체 이미지에 대한 고해상도 이미지를 재구성하기 위해 서브타일에 대한 SIM 이미지를 조합하는 예시적인 의사 코드를 제시한다. 이를 "전체 시야 재구성" 알고리즘이라고 지칭한다. 위에 개시된 파라미터 추정 기술은 기존의 중복 또는 개시된 비중복 SIM 이미지 재구성 기법과 함께 사용될 수 있다는 점에 유의한다.

[0260] **알고리즘 3: 서브타일 재구성**

[0261] 고해상도 구조화 조명 현미경법 이미지 서브타일을 재구성하는 일 구현예에 대한 의사 코드는 다음과 같다.

입력:
- a. 일부 격자 프로파일($I_{각도, 위상}$)을 갖는 샘플의 이미지의 수집. 각각의 각도에 대해, 0도에서 360도까지 균일하게 간격을 둔 적어도 3개의 위상 이미지가 필요함
- b. 파라미터:
  - i. 각도에 해당하는 이미지들의 그룹에 대한 조명 피크 간격 및 각도
  - ii. 각각의 이미지에 대한 위상

출력: 서브타일에 대한 하나의 고해상도 재구성 이미지
알고리즘:
1. 이미지 전처리(예를 들어, 고역 통과 필터)
2. 대용량 푸리에 이미지 버퍼를 생성하고(그 크기는 필요로 하는 최종 업샘플 계수에 따라 다름) 0으로 초기화함
3. 각각의 각도에 대해,
   - a. 주어진 각도에 대한 격자에 대해 고유한 위상을 가진 각각의 이미지들의 세트에 대해
     - i. 각각의 이미지에 대해 고속 푸리에 변환 수행함
   - b. 이미지의 수집에 대해 밴드 분리를 수행함(n>= 3개의 입력 이미지 → 3개의 출력 또는 구성요소 이미지)
     - i. 3개의 출력 이미지 중 2개는 더 높은 해상도 정보를 포함함
     - ii. 남은 이미지는 모든 표준 정보(원본 해상도 이미지)를 포함함.
     - iii. 각각의 이미지에 대한 위상과 전체 세트에 대한 변조를 알 필요가 있음
   - c. 각각의 구성요소 이미지에 MTF를 적용함
   - d. 밴드 분리로부터의 각각의 구성요소 이미지를 더 큰 용량의 푸리에 이미지 버퍼의 적절한 위치로 시프트하고 구성요소들을 합산함
4. 2D MTF 이미지를 큰 푸리에 이미지로 시프트하고 합산하여 입력 MTF로부터 위너(Wiener) 필터를 구축함
   - a. 각각의 각도에 대한 각각의 입력 이미지에 대해 이 작업을 수행함
   - b. 이는 각각의 재구성에 대해 수행할 필요가 없으며, 한 번 수행되어 입력 파라미터로 제공될 수 있음
5. 재구성된 이미지의 큰 푸리에 표현에 푸리에 공간의 위너 필터 및 아포디제이션(Apodization) 필터를 적용함
6. 고해상도 이미지를 얻기 위해 대용량 푸리에 이미지 버퍼에서 역 고속 푸리에 변환을 수행함

[0262]

[0263] 개시된 기술은 선행 기술을 참조하여 설명할 수 없기 때문에 이러한 비중복 서브타일 재구성 의사 코드에 대한 설명이 다른 의사 코드에 대한 설명보다 더 많이 제공된다. 개시된 기술은 푸리에 공간의 대칭성을 이용하여 SIM 이미지 재구성의 효율을 증가시키고 컴퓨팅 부하를 감소시킨다. 도 18은 비중복 서브타일 구성 기술에 대한 높은 수준의 개요를 나타낸다. 3개의 이미지(1811, 1813, 1815)는 바람직하게는 균일하게 이격된 위상으로 각도당 각각의 서브타일에 대해 획득된다. 공간 도메인(실수 공간)에서 주파수 도메인(복소 공간)으로 이미지 데이터를 변환하기 위해 이산 고속 푸리에 변환(FFT)을 적용한다. 주파수 도메인에서 3개의 이미지를 나타내는 데이터의 FFT 대칭을 이용한다. 주파수 도메인에서 이미지 데이터의 비중복 부분에 대해 연산을 수행함으로써 서브타일의 고해상도 SIM 이미지를 재구성하는 효율을 개선한다. 비중복 서브타일 재구성 알고리즘의 처리 단계의 자세한 내용이 아래에 제시된다.

[0264] **입력**

[0265] *1-a. 이미지의 수집*

[0266] 서브타일로 분할된 샘플의 이미지는 서브타일 재구성 알고리즘에 대한 입력으로 제공된다. 이미지는 사전 정의된 크기(예를 들어, 512x512 픽셀)의 서브타일 또는 서브윈도우 또는 서브영역으로 분할된다. 다른 크기의 서브타일을 사용할 수 있다.

[0267] 이미지 타일의 수집은 캡처 및 이미지 평면에 너무 많은 타일이 필요하기 때문에 이전 기술을 확장한다. 일 구현예에서, 이미지 타일은 사인파 조명 강도 패턴 $I_{\Theta,\Phi}(\mathbf{r})$을 생성하는 회절 격자로 획득된다. 2차원 공간 위치 벡터인 벡터 $\mathbf{r}$로 제시되는 위치(x, y)에 따라 강도가 달라진다. 비교를 위해, 랄(Lal) 등의 2015년도 논문은 "알고리즘 1 SIM-RA"라고 라벨링되는 기본 구조화 조명 현미경법 재구성 알고리즘을 제시한다. SIM 이미지 재구성 알고리즘의 단계를 설명하기 위해 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 수학적 공식을 사용했다. 랄(Lal) 등의 2015년도 논문이 제시한 재구성 알고리즘은 전체 이미지에 적용되는 반면, 당사의 서브타일 재구성 기술은 고해

상도 SIM 이미지 서브타일을 재구성한다는 점에 유의한다.

[0268] $I_{\Theta,\Phi}(\mathbf{r})$에 대한 수학 공식은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 수학식 (1)에 제시되어 있다. 사인파 조명 패턴 Θ의 각각의 배향에 대해, 3개의 다른 조명 위상에 해당하는 표본의 세 가지 SIM 이미지가 획득된다. 일 실시형태에서, 사인파 조명 패턴의 2개의 배향 각도, 즉 $\Theta_1 = 45^\circ$, 및 $\Theta_2 = 135^\circ$를 각각 사용하여 2 세트의 이미지들이 획득된다. 배향 각도 Θ는 또한 조명 피크 각도 β로 지칭된다. 이러한 실시형태에서, 나노웰은 정방형 또는 보다 일반적으로 장방형 또는 사변형의 코너에 위치할 수 있다. 배향 각도는 장방형의 대향 코너를 연결하는 선을 따라 이미지를 취하도록 선택된다. 이는 나노웰들 사이의 겉보기 거리를 증가시킨다.

[0269] 다른 구현예에서, 3개의 배향 각도에서, 예를 들어 $\Theta_1 = 0^\circ$, $\Theta_2 = 60^\circ$, $\Theta_3 = 120^\circ$ 또는 $\Theta_1 = 30^\circ$, $\Theta_2 = 90^\circ$, $\Theta_3 = 150^\circ$에서, 3개 세트의 이미지들을 취할 수 있다. 이 실시형태에서, 나노웰은 육각형의 대향 코너에 배열될 수 있다. 이미지는 육각형 기하학적 구조의 반대쪽 끝을 연결하는 선을 따라 취해진다. 일반적으로, 이미지들의 세트는 나노웰이 배열된 기하학적 구조의 반대쪽 끝을 연결하는 대각선의 수와 일치하도록 선택될 수 있다.

[0270] 각각의 배향 Θ에 대해, 0° 내지 360°의 간격을 둔 3개의 상이한 조명 위상 $\phi_1 = 0^\circ$, $\phi_2 = 120^\circ$, 및 $\phi_3 = 240^\circ$에 대응하는 적어도 3개의 이미지가 획득된다. 균일한 위상 간격이 바람직하다. 5, 6 또는 7과 같은 더 많은 수의 이미지는 더 적은 위상 단계를 사용하여 획득할 수 있다.

[0271] ***1-b (i) 구조화 조명 패턴 각도 및 간격 파라미터***

[0272] 격자의 주기성 또는 사인파 강도 패턴 $I_{\Theta,\Phi}(\mathbf{r})$의 조명을 정의하는 조명 피크 간격 's'도 입력으로 제공된다. 서브타일에 대한 조명 피크 간격 's' 및 조명 피크 각도 Θ는 위에 제시된 "서브타일 각도 및 간격 매핑" 알고리즘(알고리즘 2A라고도 함)을 사용하여 추정된다. "2차 피팅 및 룩업 테이블을 이용한 최종 왜곡 보정" 알고리즘(알고리즘 1이라고도 함)은 광학 감지 왜곡으로 인해 비중심 서브타일에 대한 각도 및 간격 파라미터 추정의 오류를 보정하기 위해 적용된다. "서브타일 각도 및 간격 매핑" 및 "2차 피팅 및 룩업 테이블을 이용한 최종 왜곡 보정" 알고리즘에 대한 예시적인 의사 코드가 위에 제시된다.

[0273] ***1-b (ii) 위상 변위 파라미터***

[0274] 구조화된 조도 패턴 $I_{\Theta,\Phi}(\mathbf{r})$에 대한 위상 변위 '$\phi$'(격자 위상이라고도 함)는 또한 입력으로 제공된다. 서브타일에 대한 위상 값은 "서브타일 위상 매핑" 알고리즘(알고리즘 2B라고도 함)을 사용하여 추정된다. "2차 피팅 및 룩업 테이블을 이용한 최종 왜곡 보정" 알고리즘(알고리즘 1이라고도 함)은 광학 감지 왜곡으로 인해 비중심 서브타일에 대한 위상 파라미터 추정의 오류를 보정하기 위해 적용된다. 각도별 비중심 서브타일과 중심 서브타일 사이의 위상차는 룩업 테이블에 저장된다. "서브타일 위상 매핑" 알고리즘에 대한 예시적인 의사 코드가 위에 제시된다. 설명된 이러한 입력과 함께, 처리에 대해 기술한다.

[0275] **처리 단계 1: 이미지 전처리(고역 통과 필터)**

[0276] 서브타일 재구성을 위한 처리는 이미지 전처리로 시작할 수 있다. 일반적으로 이러한 기재에 해당하는 의사 코드는 해당 설명을 따른다. 향상된 이미지의 재구성은 푸리에 공간에서 수행된다. 그러나 공간 도메인에서 주파수 도메인으로 이미지 데이터를 취하기 위해 푸리에 변환을 적용하기 전에, 아래에 설명된 바와 같이 이미지 타일에 전처리 단계를 적용할 수 있다. 이어지는 설명은 하나의 각도를 따라 위상 값이 서로 다른 3개의 이미지에 기초한다. 위에 기재된 바와 같이, 2개 이상의 배향이 사용될 것이다.

[0277] 획득한 이미지를 전처리하여 노이즈를 제거할 수 있다. 노이즈에는 많은 원인이 있다. 예를 들어, 강렬한 여기광에 노출되면 형광단의 방출 강도를 감소시키는 광표백을 생성할 수 있다. 획득한 SIM 이미지의 노이즈의 예시는 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 도 6에 도시되어 있다. (a)로 라벨링된 좌측 상단 이미지 도 6은 배경 형광 흐림 효과가 있는 원시 SIM 이미지를 보여준다. 이는 0 또는 DC 주파수 주위의 근방에 있는 원시 SIM 이미지의 주파수 성분에 큰 오차를 초래한다. 가우스 고역 통과 또는 버터워스 고역 통과 필터와 같은 고역통과 필터를 사용하여 원시 SIM 이미지를 전처리할 수 있다. (b)로 라벨링된 도 6의 제2 이미지는 배경 제거 후의 원시 SIM 이미지를 보여준다. 양쪽 이미지 (a) 및 (b)의 푸리에 스펙트럼은 도시된 바와 동일하다. 고역 통과 필터에 대한 상세한 설명에 대해, 독자는 곤잘레스(Gonzales)와 우즈(Woods) 2008년도 제3판 논문의 4장 "Digital Image Processing"을 참조한다. 4장에서, 곤잘레스(Gonzales)와 우즈(Woods)는 도 4.52의 예시를 제시하며, 이 예시

에는 이상적인, 버터워스 및 가우스 고역 통과 필터의 원근 플롯, 이미지 표현 및 단면을 포함된다.

[0278] **처리 단계 2: 대용량 푸리에 이미지 버퍼 생성**

[0279] 향상된 푸리에 이미지를 수신하기 위해 메모리의 버퍼를 예약하고 초기화할 수 있다. 메모리 버퍼의 크기는 업 샘플 계수, 향상 정도에 따라 다르다. SIM 이미지 재구성 기법은 이론적으로 3개의 이미지의 각각의 각도 또는 배향을 따라 향상된 해상도를 생성할 수 있으며, 배향을 따라 획득한 이미지의 최대 2배의 해상도를 갖는다. 3개의 이미지로 구성된 2개 또는 3개 세트의 경우, 업샘플 계수가 2인 고해상도 이미지를 저장하기 위해 버퍼를 예약할 수 있다.

[0280] **처리 단계 3: 각각의 각도 Θ에 대해 단계 3-a 내지 3-d의 반복**

[0281] 처리 단계 3-a 내지 3-d는 루프로 수행된다. 한 번의 반복에서, 각도당 획득한 서브타일의 3개의 이미지에 대한 처리 단계가 수행된다. 이제 루프의 처리 단계에 대한 세부 정보를 설명한다.

[0282] ***단계 3-a(고속 푸리에 변환):***

[0283] 동일한 각도 또는 배향 'Θ'로 획득한 한 세트의 이미지들에 이산 고속 푸리에 변환(FFT)이 적용된다. 위에 기재된 바와 같이, 각각의 배향에 따라 위상이 다른 적어도 3개의 이미지를 획득한다. 각각의 이미지는 공간 도메인에서 주파수 도메인으로 변환된다. NxN 이미지의 경우, 2-D 이산 푸리에 변환(DFT) 계산의 복잡도 차수는 $O(N^4)$이며, 이는 행에서 행으로, 열에서 열로 공통 부분식(common subexpression)을 이용함으로써 $O(N^3)$로 저감시킬 수 있다. N이 2의 거듭제곱이면 더 높은 속도를 달성할 수 있다. FFT(고속 푸리에 변환) 알고리즘은 N이 2의 거듭제곱인 경우 NxN 이미지에 대해 $O(N^2 \log_2 N)$의 복잡도 차수를 달성할 수 있다. 행과 열에서 공통 식을 이용하는 예는 "버터플라이 계산"을 사용하는 것이다. 상세한 내용은 http://www.cs.cmu.edu/afs/andrew/scs/cs/15-463/2001/pub/www/notes/fourier/fourier.pdf에서 입수할 수 있는 헤크베르트(Heckbert) 1995년도 논문, "Fourier Transforms and the Fast Fourier Transform(FFT) Algorithm"을 참조한다. 따라서 512 x 512 픽셀과 같은 서브타일 크기를 선택하면 증가된 계산 시간에 대해 주파수 해상도를 절충할 수 있다. 측면이 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096 또는 128 내지 4096 픽셀 범위에 있는 서브타일을 사용할 수 있다.

[0284] 공간 도메인의 이미지 데이터는 실수로 나타난다. 푸리에 변환을 수행하는 경우, 주파수 도메인의 결과적인 데이터는 복소수로 제시된다. 복소수 z는 $z = x + iy$로 제시될 수 있으며, 여기서 x 및 y는 그의 실수 부분과 허수 부분이다. 복소수 z의 켤레는 $z^* = x - iy$로 제시된다.

[0285] 2개의 예시적인 코너-시프트 푸리에 도메인 행렬이 도 19에 도시되며, 이는 푸리에 공간에서의 대칭을 설명하기 위해 N의 짝수(1910) 및 홀수(1920) 값을 갖는 행렬을 나타낸다. 주파수 도메인의 이들 이미지는 NxN 행렬로 제시된다. 두 행렬(1910 및 1920)의 상단 행 및 좌측 열은 0 또는 DC 주파수 성분에 대응하는 DC 행 및 DC 열로 지칭된다. 이러한 값의 코너-시프트된 행렬과는 대조적으로, 주파수 도메인의 플롯은 일반적으로 원의 중심에 0 또는 DC 주파수를 보여준다.

[0286] 도 19의 행렬은 푸리에 또는 주파수 도메인에서 에르미트 대칭을 나타낸다. 행렬(1910 및 1920)의 DC 행 및 DC 열은 좌우 및 상하 켤레 대칭을 갖는다. 짝수의 행과 열을 갖는 행렬(1910)은, 또한 상하 켤레 대칭을 갖는 한 중간 열을 갖는다. 상단 행 및 좌측 열(1910 및 1920에서)과 짝수 행렬에 있어서의 중간 열(1910에서)을 제외하고는, 각각의 행렬의 나머지 부분 또는 블록은 180도 회전 켤레 대칭을 갖는다. 2개의 행렬(1910 및 1920)의 이러한 부분은 굵은 선으로 표시되며, 때에 따라서는 제1 블록 및 제2 블록이라고 칭한다.

[0287] 주파수 도메인의 전체 행렬을 행과 열(들)을 따로 설정한 후 2개의 절반으로 나누면, 우측 절반이 생성되고 180도 회전 후 좌측 절반의 켤레가 된다. 도 19는 짝수 및 홀수 차원 행렬(1910, 1920)에 있어서의 절반 행렬(1911, 1912) 및 절반 행렬(1921, 1922)을 예시한다. 우측 절반에 대한 값은 좌측 절반에 대한 데이터에서 룩업할 수 있다. 이러한 룩업을 고려하면, 좌측 절반 행렬은 소위 비중복 데이터이고 우측 절반 행렬은 중복 데이터이다. 좌측 절반(절반보다 약간 큼)의 열의 수는 ((N/2) + 1)이고 우측 절반의 열의 수는 (N - (N/2) - 1)이다. 개시된 기술은 컴퓨팅 부하를 저감시키기 위해 대칭을 계속 추적한다.

[0288] SIM 이미지를 재구성하는 경우, 푸리에 공간에서 전체 이미지 행렬의 비중복 좌측 절반에 대해 작업한다. 이는 필요로 하는 계산 수를 상당히 저감시키므로 효율을 증가시킨다. 다음의 SIM 재구성 단계에서는, 푸리에 공간의 대칭이 어떻게 이용되는지에 대해 더 상세히 제시한다.

[0289] *단계 3-b(밴드 분리):*

[0290] 소스의 위치가 조명의 프린지 피크에 대해 무작위로 분포되기 때문에 시프트 및 시프트되지 않은 주파수 성분이 캡처된 각각의 이미지에 존재한다. 이 단계는 밴드 분리 행렬 $\mathbf{M}^{-1}$을 사용하여 획득한 이미지의 주파수 도메인 표현에서 시프트된 주파수 성분과 시프트되지 않은 주파수 성분을 분리한다. 밴드 분리 행렬은 또한 역 혼합 행렬(윅커(Wicker) 등의 2013년도 논문) 또는 재구성 행렬(랄(Lal) 등의 2015년도 논문)이라고 지칭된다. 구스타프손(Gustafsson) 등의 "Doubling the lateral resolution of wide-field fluorescence microscopy using structured illumination"라는 제하의 2000년도 논문은 이 논문의 도 5에서 밴드 분리 프로세스를 예시한다. 해당 도면은 관찰된 이미지로부터 분리된 주파수 성분을 예시한다. 밴드 분리는 랄(Lal) 등의 2015년도 논문으로부터 취한 아래 수학식 (31)에서 이해할 수 있다. 수학식은 3개의 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$이 수학식의 우측에 있는 3개의 관찰된 이미지에서 분리된다는 점을 보여준다. 3개의 이미지는 조명 패턴의 각도 Θ를 사용하여 획득된다.

[0291]
$$\begin{bmatrix} \tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k}) \\ \tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k}) \\ \tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k}) \end{bmatrix} = \mathbf{M}^{-1} \begin{bmatrix} \tilde{D}_{\theta,\phi_1}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{\theta,\phi_2}(\mathbf{k}) \\ \tilde{D}_{\theta,\phi_3}(\mathbf{k}) \end{bmatrix} \qquad (31)$$

[0292] 수학식 (31)에서 검색된 제1 성분은 소위 DC 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})$이다. 이는 시프트되지 않은 공간 주파수를 갖는 성분이다. 정확한 위상 및 변조 파라미터를 사용하여 분리하는 경우, 이 성분은 아베 회절 한계를 초과하는 고주파 성분을 포함하지 않는다. 제2 및 제3 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$은 아베 회절 한계의 대역 통과 영역으로 시프트된 고주파 성분을 포함한다.

[0293] 밴드 분리 단계는 도 20 내지 도 22에 도시된 바와 같이 개시된 비중복 SIM 이미지 재구성 기술을 이용한다. 푸리에 공간에서 각각의 서브타일 이미지의 전체 행렬이 도 20과 같이 512개의 행과 512개의 열을 갖는다고 가정한다. 위에 설명한 것처럼 하나의 각도에 대해 3개의 위상에서 획득한 3개의 이미지에 해당하는 3개의 주파수 도메인 행렬에서 행렬 위치를 비중복 및 중복 절반으로 분리한다. 각각의 비중복 절반 행렬은 512개의 행과 257개의 열을 가지며, 중복 절반 행렬에서 상보적 켤레 계수를 갖는 비중복 계수가 우세한 2개의 열과 하나의 행의 DC 성분을 포함한다. 각각의 비중복 좌측 절반 행렬을 벡터로 재형성하고 3개의 절반 행렬에 대한 3개의 벡터를 도 21에 도시된 바와 같이 3개의 행과 131,584개의 열을 갖는 행렬로 조합한다. 그 다음, 밴드 분리 행렬의 역 $\mathbf{M}^{-1}$와 조합 행렬을 곱하여 또한 3개의 행과 131,584개의 열을 갖는 동일한 크기의 생성된 성분 분리 행렬을 얻는다. 성분 분리 행렬은 수학식 (31)의 좌변에 해당한다. 그 다음, 생성된 행렬의 3개의 행을 재형성하여 3개의 주파수 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k})$에 해당하는 행렬의 비중복 좌측 절반을 얻는다. 3개의 비중복 행렬이 1831, 1833 및 1835로 도 22(및 도 18)에 예시되어 있다. 당사의 경우, 분리된 성분은 비중복 좌측 절반 행렬의 형태이다.

[0294] 이제 도 18을 참조하면, 프로세스 단계 3-b 이후에, 소위 DC 주파수 성분에 대한 전체 행렬은 비중복 절반 행렬(1831)(좌측 절반)과 중복 절반 행렬(1832)(우측 절반)을 조합한 정방형 행렬로 나타낼 수 있거나, 장방형 행렬일 수 있다. DC 주파수 행렬은 고주파 행렬과 동일한 시프팅을 거치지 않으므로 DC 절반은 계산상 불이익 없이 조기에 또는 나중에 조합될 수 있다. 2개의 고주파 성분에 대해, 대칭이 다르게 처리되어 계산 부하를 저감시킨다.

[0295] 프로세스 단계 3-b에 따라, 고주파 성분의 전체 행렬은, 제1 고주파 이미지로부터의 비중복 절반 행렬(1)(1843)과 제2 고주파 이미지로부터의 중복 절반 행렬(2′)(1844)과 같은, 2개의 대역 부분을 조합하도록 구성된다. 동등하게, 제2 고주파 성분으로부터의 비중복 절반 행렬(2)(1845)과 제1 고주파 성분으로부터의 중복 절반 행렬(1′)(1846)을 조합할 수 있다.

[0296] DC 및 고주파 성분에 대해 3개의 전체 행렬이 도 18에 예시되어 있지만, 단계 3b, 3c 및 3d의 작업은 대칭을 이용하여 처리될 수 있으며, 데이터의 절반을 사용함으로써 주파수 성분의 대역을 처리할 수 있다.

[0297] 유사한 프로세스는 각도를 따라 위상 단계를 가지며, 각도를 따라 주파수 성분 또는 더 많은 수의 이미지로 분

리되는, 1D 구조화 조명을 갖는 5개의 이미지에 적용될 수 있다. 사인 또는 코사인 변화 조명 이외의 기능을 사용할 수 있다. 개시된 기술은 2D 구조화 조명으로 생성된 이미지들의 세트에도 적용될 수 있다.

[0298] *단계 3-c(변조 전달 함수 적용):*

[0299] MTF(Modulation Transfer Function) 및/또는 OTF(Optical Transfer Function)를 적용하기 위한 2개의 대안 - 독립적인 MTF의 2단계 적용 후 노이즈 감소를 위한 위너 필터링 및 위너 필터에 내장된 MTF의 1단계 적용 - 을 설명한다. 이러한 대안은 모두 개시된 비중복 계산 기술을 활용할 수 있다.

[0300] 이러한 2단계 구현예에서, OTF(광학 전달 함수)의 진폭 또는 절대값인 (MTF)에 단계 3-b 이후에 구한 3개의 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\ \tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)\ \tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)\ \tilde{H}(\mathbf{k})$ 각각을 곱한다. MTF의 적용이 행렬의 대칭에 영향을 미치지 않기 때문에, 단계 3-b 및 3-c는 도 18에 도시된 바와 같이 병합된다는 점에 유의한다.

[0301] 렌즈의 변조 전달 함수는 특정 해상도의 콘트라스트를 물체에서 이미지로 전달하는 능력을 측정한 것이다. 즉, MTF는 단일 사양에 해상도와 콘트라스트를 통합하는 방식이다. 해상도는 물체의 세부 사항을 구별하는 이미징 시스템의 능력이다. 밀리미터당 선 쌍(lp/mm)으로 표현될 수 있으며, 여기서 선 쌍은 하나의 흑색 및 하나의 백색 선의 시퀀스이다. 밀리미터당 선 쌍의 측정을 또한 주파수라고 한다. 주파수의 역수는 2개의 분리된 선 사이의 간격을 밀리미터로 산출한다. 백색과 흑색의 바(bar)가 번갈아가며 일련의 균등한 간격을 갖는 바 표적(1951 USAF 표적 또는 Ronchi 룰링이라고도 함)이 종종 시스템 성능 테스트에 사용된다. 선 간격이 감소함에 따라(즉, 표적의 주파수가 증가하면) 렌즈가 이러한 콘트라스트의 감소를 효율적으로 전달하기가 점점 더 어려워지며 결과적으로 MTF가 감소한다.

[0302] 변조 전달 함수에 대한 더 상세한 내용에 대해, 독자는 https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/optics/introduction-to-modulation-transfer-function/에서 입수할 수 있는 "Introduction to Modulation Transfer Function"이라는 제목의 논문을 참조한다. 위 참조 논문의 도 5는 선의 공간 주파수가 증가함에 따라 이미지의 콘트라스트가 감소함을 보여준다. 이미지가 획정되어 나타나는 경우, 흑색은 완전한 흑색이어야 하고 백색은 완전한 백색이어야 하며, 그들 사이에 최소의 회색조가 있어야 한다. 이 논문의 도 6은 장방형 렌즈를 사용하여 수차가 없는 이미지의 MTF를 플로팅한다. MTF는 공간 해상도가 증가함에 따라 감소한다. 실제 시스템에 수차가 완전히 없는 것은 아니라는 점에 유의하는 것이 중요하다.

[0303] MTF 및 위너 필터링의 이러한 단계의 2단계 적용은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 SIM-RA 알고리즘 1의 단계 15에 제시된 단일 단계 접근 방식으로 대체될 수 있다. 다시 말하면, 단계 3-c는 알고리즘의 제1 부분으로 위너 필터링을 2개의 단계로 수행한다. 대안적으로, 이 단계는 SIM 재구성 이미지의 품질에 어떠한 영향도 미치지 않고 단계 3-d 이후에 수행될 수 있다.

[0304] 이러한 2단계 접근 방식(즉, 위너 필터링과 별도로 MTF를 적용)은 SIM 이미지 재구성 문헌에서 권장되었다. 예를 들어, 엠.지.엘. 구스타프손(M.G.L. Gustafsson)은 Journal of Microscopy, Vol. 198, Pt. 2, May 2000, pp-82-87에 게재된 "Surpassing the lateral resolution limit by factor of two using structured illumination microscopy"라는 제하의 논문에서 이러한 2단계 접근 방식을 권장했다. SIM 이미지 재구성을 위해, 이 논문에서는 3 가지 주파수 성분 각각에 현미경의 OTF를 곱할 것을 제안한다. 그런 다음, 중첩되는 부분에 해당 성분들을 더한다. 마지막으로, 성분들의 합을 OTF의 제곱과 적은 상수의 합으로 나눈다. 본 논문에서는 이러한 프로세스가 1단계 위너 필터링과 동등하다고 추가로 언급한다.

[0305] 아래에 제시된 바와 같이 수학식 32, 33 및 34의 3개의 성분의 위너 필터링(Lal et al. 2015에서 발췌함):

$$\tilde{S}_u(\mathbf{k}) = \left[\frac{\tilde{H}^*(\mathbf{k})}{|\tilde{H}(\mathbf{k})|^2 + \frac{\Psi_{o,\theta}}{\mathcal{A}^2|\mathbf{k}|^{-2\alpha}}}\right]\tilde{S}(\mathbf{k})\tilde{H}(\mathbf{k}) \tag{32}$$

$$\tilde{S}_u(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta) = \frac{1}{m}\left[\frac{\tilde{H}^*(\mathbf{k})}{|\tilde{H}(\mathbf{k})|^2 + \frac{\Psi_{p,\theta}}{m^2\mathcal{A}^2|\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta|^{-2\alpha}}}\right]\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k}) \tag{33}$$

[0306]

$$\tilde{S}_u(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)=\frac{1}{m}\left[\frac{\tilde{H}^*(\mathbf{k})}{|\tilde{H}(\mathbf{k})|^2+\frac{\Psi_{q,\theta}}{m^2\mathcal{A}^2|\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta|^{-2\alpha}}}\right]\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\tilde{H}(\mathbf{k}) \quad (34)$$

[0307]

[0308] 수학식 32, 33 및 34의 좌변에서 구한 3가지 주파수 성분 $\tilde{S}u(\mathbf{k})\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}u_{(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}u_{(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문에 의해 위너 필터링을 적용함으로써 노이즈 추정치 $\tilde{S}(\mathbf{k})\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$의 소위 무등급(ungraded) 추정치로 지칭된다. 용어 "무등급"은 유한 요소 분석의 무등급 메쉬에서 차용한 것으로 나타난다. 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 SIM-RA 알고리즘 1은 원시 SIM 이미지가 백색 노이즈에 의해 손상된다는 가정 하에 작동한다. 수학식 32, 33 및 34에서 대괄호 안의 식은 위너 필터로 지칭되며 m은 변조 계수이다.

[0309] 노이즈 추정치 $\tilde{S}(\mathbf{k})\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$는 곤잘레스(Gonzales)와 우즈(Woods)의 저서 "Digital Image Processing"의 351페이지 5.7절에 저하된 이미지로 지칭되어 있다. 곤잘레스(Gonzales)와 우즈(Woods)는 OTF $\tilde{H}(\mathbf{k})$를 저하 함수로 지칭한다. 노이즈가 없는 이상적인 시스템에서는 단순한 "역 필터"를 적용하여 저하되지 않은 이미지를 검색할 수 있다. 그러나, 대부분의 실제 시스템에서는 획득한 이미지에 노이즈가 있다. 따라서, 역 필터는 저하되지 않은 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})$, $\tilde{S}_{(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)}$, 및 $\tilde{S}_{(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)}$을 복구하는 데 사용할 수 없다. 위너 필터는 저하된 이미지와 등급화된 이미지 간의 평균 제곱 오차가 최소화되도록 등급화된 이미지를 복구한다. 따라서 위너 필터는 "최소 평균 제곱 오차" 필터라고도 한다. 위너 필터에 대한 자세한 내용은 곤잘레스(Gonzales)와 우즈(Woods)의 "Digital Image Processing"의 352페이지 5.8절에 나와 있다.

[0310] 위너 필터링 또는 구스타프손(Gustafsson)의 2단계 방법을 사용하면 위에 제시된 바와 같이 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 수학식 32, 33 및 34의 좌변에서 무등급 추정치로 지칭되는 무등급 성분의 근접한 근사값을 복구할 수 있다.

[0311] 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 수학식 32, 33 및 34의 또 다른 중요한 관찰은 수학식 32, 33 및 34의 분자가 OTF $\tilde{H}(\mathbf{k})$의 켤레라는 것이다. 광학 시스템의 점 확산 함수(PSF) $H(\mathbf{r})$가 실수이고 대칭이라면 그것은 OTF $\tilde{H}(\mathbf{k})$가 실수임을 의미한다. 실수 값의 경우, OTF는 그의 켤레와 같다. 즉, $\tilde{H}(\mathbf{k}) = \tilde{H}_*(\mathbf{k})$이다. 또한 OTF가 양수이면 MTF(OTF의 절대값)는 OTF와 동일하다. 즉, $|\tilde{H}(\mathbf{k})| = \tilde{H}(\mathbf{k})$. 이전의 관찰에서, 이는 추가로 $|\tilde{H}(\mathbf{k})| = \tilde{H}_*(\mathbf{k})$임을 의미한다. 이러한 관찰은 MTF가 수학식 32, 33, 34(OTF가 실수이고 양수일 때)에서 분자로 사용될 수 있음을 보여주며, 이 프로세스 단계 3-c는 수학식 32, 33 및 34의 분자에 3개의 수학식 32, 33 및 34의 3개의 무등급 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k})\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}_{(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\Theta)}\,\tilde{H}(\mathbf{k})$ 각각을 곱하는 것과 동등하다.

[0312] 비중복 SIM 서브타일 재구성 알고리즘에서, 밴드 분리 단계(단계 3-b) 이후에 구한 비중복 행렬(1831, 1833 및 1835)을 곱한다. 이는 요소별 스칼라 곱이며 생성된 비중복 행렬의 차원을 변경하지 않는다. 이 곱셈 이후, 도 18에 도시된 3개의 비중복 좌측 절반 행렬(1831, 1833 및 1835)을 구한다. OTF를 적용한 후, 밴드 분리 단계에서 설명한 대로 3개의 전체 행렬의 대칭이 유지된다.

[0313] *제1 및 중간 열 평균화*

[0314] 이제 비중복 SIM 이미지 재구성 알고리즘을 사용하여 재구성된 이미지의 품질을 향상시킬 수 있는 계산 기능을 제시한다. 도 23b에서, 2개의 고주파 이미지의 푸리에 공간 행렬을 예시한다. 비중복 알고리즘에서, 1843(좌측 절반 블록 1) 및 1845(좌측 절반 블록 2)로 라벨링된 두 행렬의 좌측 절반을 사용한다. 이들 좌측 절반은 때로는 복소수 계수의 제1 블록이라고 지칭된다. 이들 2개의 행렬은 도 23b의 상단 행에 분리된 우측 절반 행렬(1846(우측 블록 1') 및 1844(우측 절반 블록 2'))과 함께 도시되어 있다. 이들 우측 절반은 때로는 복소수 계수의 제2 블록이라고 지칭된다. 2개의 행렬의 좌측 및 우측 절반의 라벨링은 도 18(상단에서 제4 행)과 일관된 것이다. 비중복 알고리즘은 이미지 재구성 동안 2개의 고주파 행렬의 좌측 또는 제1 절반을 사용한다. 푸리에

공간 대칭으로 인해 우측 또는 제2 절반 행렬은 상대 좌측 절반 행렬의 룩업을 사용하여 재구성될 수 있다. 도 23b의 행렬의 두 번째 행은 이미지 재구성 동안 하나의 고주파 이미지의 좌측 절반 행렬을 제2 고주파 이미지의 우측 절반 행렬로 스티칭하는 것을 보여준다. 이러한 스티칭된 행렬은 도 18의 제3 및 제4 행에도 제시된다.

[0315] 이 구현예에서 2개의 고주파 이미지의 좌측 절반 행렬은 상대 우측 절반 행렬보다 2개 더 많은 열을 갖는다. 이들 2개의 열은 도 23b에서 빗금친 패턴으로 도시된 제1 및 중간 열이다. 1843과 1845의 제1 및 중간 열은 완벽한 기기와 측정으로 일치하게 될 DC 성분을 나타낸다. (상이한 위상에서) 이미지를 캡처하는 데 사용되는 기기에는 결함이 있고 이 프로세스에서 노이즈도 발생할 수 있으므로, 2개의 고주파 행렬은 제1 및 중간 열에서 상이한 값을 가질 수 있다. 1843과 1845의 제1 및 중간 열이 동일한 값을 갖도록 하여 재구성을 개선할 수 있다.

[0316] 2개의 고주파 성분에 대한 행렬의 비중복 성분의 제1 및 중간 열을 평균화하는 것은 1843 및 1845의 이들 열을 일치시켜 이들 열의 값에 대칭을 도입함으로써 재구성된 이미지의 품질을 개선하는 한 방법이다. 도 23c는 푸리에 공간에서 2개의 고주파 이미지의 좌측 절반 행렬의 제1 및 중간 열의 평균화를 나타낸 것이다. 2개의 행렬의 제1 및 중간 열의 평균 값은 생성된 행렬이 푸리에 공간 대칭을 충족하도록 한다. 평균화 후의 제1 열과 마지막 열은 도 23c에 크로스해치 패턴으로 도시되어 있다.

[0317] 다른 기법을 사용하여 1843 및 1845 열의 값을 일치시킬 수도 있다. 예를 들어, 제1 또는 제2 고주파 이미지의 제1 및 중간 열의 값을 사용하고 두 행렬(1843 및 1845) 모두에서 이들 값을 사용할 수 있다. 또는 2개의 고주파 이미지의 제1 및 중간 열 값의 가중치 조합을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 하나의 고주파 이미지의 값에 2/3의 가중치를 할당하고 다른 고주파 이미지의 값에 1/3의 가중치를 할당하여 값들을 조합하는 것이다. 대응하는 열의 값을 조합하기 위해 상이한 비교 가중치가 할당될 수 있음을 이해한다.

[0318] *단계 3-d(서브픽셀 시프팅):*

[0319] 이 단계에서 각각의 고주파 성분 $\tilde{S}(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\,\tilde{H}(\mathbf{k})$; $\tilde{S}(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\,\tilde{H}(\mathbf{k})$는 이산 고속 푸리에 변환의 양자화 효과를 극복하기 위해 시프트된다. 푸리에 공간 행렬의 픽셀 위치는 이산 주파수 빈에 해당하므로, 이를 서브픽셀 시프팅이라고 한다. 이를 설명하면서, Optics Communications에 게재된 "Successful Optimization of Reconstruction Parameters in Structured Illumination Microscopy - A practical guide"라는 2019년도 논문에서 카라스(Karras) 등은 구조화 조명 패턴이 사용되는 경우 고주파 성분이 OTF의 통과대역으로 시프트하는 것을 설명했다(카라스(Karras) 등의 2019년도 논문의 도 1 참조). 서브픽셀 시프팅 동안, 고주파 성분의 실제 위치는 주파수 도메인에서 주파수 $\mathbf{p}_\theta$ 및 $\mathbf{p}_\theta$ 각각의 중심에 있다. 수학식 35 및 36에 예시된 이러한 시프팅은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문에서 발췌된 것이다.

$$\mathcal{F}\left[\mathcal{F}^{-1}\left\{\tilde{S}_u(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta)\right\}\times e^{-i2\pi\mathbf{p}_\theta\cdot\mathbf{r}}\right]=\tilde{S}_s(\mathbf{k}-\mathbf{p}_\theta) \qquad (35)$$

$$\mathcal{F}\left[\mathcal{F}^{-1}\left\{\tilde{S}_u(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta)\right\}\times e^{+i2\pi\mathbf{p}_\theta\cdot\mathbf{r}}\right]=\tilde{S}_s(\mathbf{k}+\mathbf{p}_\theta) \qquad (36)$$

[0320]

[0321] 랄(Lal) 등의 2015년도 논문에 제시된 SIM-RA 알고리즘 1과 같은 선행 기술의 SIM 이미지 재구성 알고리즘에서, 수학식 35 및 36에 제시된 것처럼 고주파 성분을 올바른 위치로 시프트하기 위해 고주파 이미지당 2개의 푸리에 변환 작업이 수행된다. 푸리에 변환의 시프트 속성을 사용하면 신호를 시프트할 수 있다. 시프팅은 주파수 도메인에서 공간 도메인으로 정보를 가져온 다음 곱셈을 적용함으로써(병진 벡터(translation vector) 적용이라고도 함) 수행될 수 있다. 그 다음, 공간 도메인에서 이처럼 시프트된 신호에 푸리에 변환을 적용하여 주파수 도메인으로 다시 가져온다. 푸리에 변환의 시프트 속성에 대한 상세한 정보는 http://www.thefouriertransform.com/transform/properties.php에서 확인할 수 있다. 고주파 성분의 시프팅은 이산 푸리에 변환에서 병진 벡터를 전체 픽셀로 제한하지 않도록 무등급 이미지에 대해 역 푸리에 변환을 수행함으로써 실수 공간에서 실제로 수행된다. 따라서, 실수 공간에서 서브픽셀 시프팅을 달성할 수 있다. 그 다음, 시프트된 고주파 성분은 푸리에 변환을 적용함으로써 주파수 도메인으로 변환된다.

[0322] 푸리에 공간에서 대칭을 사용함으로써 SIM 이미지 재구성의 효율을 개선하고 필요로 하는 계산 리소스를 감소시킨다. 소위 DC 주파수 성분은 도 18에 예시된 바와 같이 기준 위치에 있는 그대로 서브픽셀 시프트될 필요는 없다. 고주파 성분 행렬은 DC 주파수 성분 행렬에 대해 시프트된다.

[0323] 개시된 비중복 알고리즘에서, 도 18에 도시된 고주파 성분의 상보적 위상 시프트된 행렬의 비중복 절반을 조합한 후에 고주파 성분의 하나의 행렬만을 시프트한다. 고주파 성분의 조합된 절반은 도 18의 제3 행의 중간 열에

제시된 좌측 절반(1833)과 우측 절반(1834) 또는 라벨링된 1|2' 행렬로 제시된다. 이 행렬은 종래 기술의 SIM 이미지 재구성 알고리즘에서 2개의 행렬 대신에 푸리에 도메인에서 공간 도메인으로 시프트되었다가 또 다시 시프트된다. 시프트된 행렬(1|2')은 좌측 상단 코너를 향해 대각선으로 위쪽을 가리키는 2개의 화살표와 함께 도 18의 제4 행의 중간 열에 제시된다. 이 행렬은 좌측 절반 행렬(1843)과 우측 절반 행렬(1844)로 구성된다. 좌측 절반 행렬(1845 및 1846)로 구성되거나 2|1'로 라벨링된 제2 시프트된 고주파 행렬은 푸리에 공간 대칭과 1|2' 행렬의 켤레를 사용하여 구한다. 1|2'로 시프트하는 것과 같은 양이지만 우측 하단 코너를 향해 대각선으로 가리키는 2개의 화살표로 표시된 반대 방향으로 시프트한다.

[0324] 프로세스 단계 3a 내지 3d는 조명 피크 각도에 걸쳐 루프로 반복된다. 이 예에서, 2개의 각도 또는 배향을 사용하므로 구조화 조명 패턴의 제2 배향으로 획득한 3개의 이미지들의 제2 세트에 대해 위의 단계를 수행한다.

[0325] **처리 단계 4: 합계 재구성 및 위너 필터 구축**

[0326] 위너 필터는 한 번 구축된 다음 파라미터가 변경되더라도 이미지를 필터링하도록 반복적으로 적용될 수 있다. Optics Communications에 게재된 "Successful Optimization of Reconstruction Parameters in Structured Illumination Microscopy - A practical guide"라는 제목의 카라스(Karras) 등의 2019년 논문에 대한 보충 자료는 수학식 32, 33 및 34에서 분모의 상수 부분인 위너 필터 파라미터(w)의 조정을 예시한다. 카라스(Karras) 등의 2019년도 논문에 대한 이 보충 자료의 도 S1은 검색된 이미지 스펙트럼에 대한 위너 필터 파라미터(w)의 상이한 값의 영향을 예시한다. 위너 필터 파라미터의 값이 낮으면 검색된 스펙트럼에 노이즈가 발생할 수 있다. 값이 너무 높으면 이미지 데이터가 손실될 수 있다. 위너 필터에 대한 파라미터 값은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문 및 카라스(Karras) 등의 2019년 보충 자료에서 논의된 것처럼 경험적으로 선택될 수 있다. 대안적으로 다른 유형의 푸리에 공간 저역 통과 필터를 사용하여 노이즈를 저감시킬 수 있다. 예를 들어, 가우스 저역 통과 필터, 버터워스 저역 통과 필터 또는 해밍 저역 통과 필터. 이들 필터에 대한 상세한 내용은 http://fourier.eng.hmc.edu/e101/lectures/Fourier_Analysis/node10.html에서 확인할 수 있다.

[0327] 고주파 성분을 포함하는 행렬의 일부만 소위 DC 주파수 행렬과 중첩된다. 다중 푸리에 도메인 주파수 행렬의 계수가 결합된 확장 행렬은 조합 전 개별 행렬보다 이미지 해상도 향상을 반영하는 업샘플 계수에 의해 그 너비와 높이가 더 증가한다. 업샘플 계수는 개별 행렬의 너비와 높이의 1.0 내지 2.0 사이에 있을 수 있다. 업샘플 계수가 1.0이면 이미지 해상도가 향상되지 않는다. 서로 중첩되는 배향을 따라 모든 위상에서 취한 고주파 성분과 이미지는 없다. 업샘플 계수가 2.0일 때, 고주파 성분의 시프트된 행렬은 시프트되지 않은 행렬의 중심에서 그들 가장자리(또는 경계)가 닿도록 서로 분리된다. 이는 고해상도 재구성 이미지의 너비와 높이가 개별 이미지 행렬의 너비와 높이보다 2배 증가함을 의미한다. 이 조합된 행렬은 도 18에서 대형 행렬(1850)로 예시된다. 행렬(1850)은 재구성된 이미지가 향상되었음을 보여주기 위해 1|2' 및 2|1'로 표시된 개별 행렬보다 그 너비와 높이가 2배 더 큰 것으로 예시된다. 이미지 해상도 향상을 위한 업샘플 계수가 1.0보다 크고 2.0보다 작을 때, 시프트된 행렬(1|2' 및 2|1')은 대형 행렬(1850)의 중심에서 더 가깝게 위치하고 서로 중첩된다.

[0328] 도 18에서, 제1 각도에서 3개의 이미지에 대한 행렬로부터 행렬(1850)을 구성하는 것을 예시한다. 제1 각도에 대한 DC 성분의 비중복 절반은 도 18에서 1841로 제시된다. 그 다음, 행렬(1850)의 좌측 상단 부분의 하나의 고주파 이미지 및 우측 하단 부분의 다른 고주파 이미지에 대해 서브픽셀 시프트된 계수를 배치한다. 1850을 완료하는 데 필요한 중복 켤레 성분은 상보적 비중복 성분에서 룩업될 수 있으며, 상보적 성분(계수)의 행렬 위치를 계속 추적하고 복사된 계수의 임의의 허수 부분에 변경된 부호를 적용할 수 있다.

[0329] 제2 직교 각도 및 3개 더 많은 이미지(미도시)를 추가하면 정방형을 채우게 된다. 행렬(1850)의 좌측 하단 부분에 제2 각도에 대한 하나의 고주파 성분 및 우측 상단 부분에 제2 고주파 성분에 대한 전체 행렬을 배치한다.

[0330] 9개의 이미지의 조합은 랄(Lal) 등의 2015년도 논문에 예시되어 있다. 중첩되는 행렬 위치의 계수는 행렬(1850)에서 조합된다. 이는 3개가 아닌 2개의 각도에 대한 6개 이미지의 변형이다.

[0331] 조합되는 행렬의 시각화는 계수가 중심이 시프트함에 따라 주파수 범위의 중간 값이 행렬 중앙에 표시될 때 가장 명확하지만, 계산은 가장 낮은 주파수 성분이 예컨대 좌측 상단 또는 우측 하단 코너에 표시될 때 코너 시프트된 행렬을 사용하여 실제로 수행될 수 있다. 향상된 해상도 이미지 행렬(1850)의 재구성은 중심에 저주파 성분을 배치하고 중심에서 멀리 고주파 성분을 배치함으로써 도 18에 예시된다. 이러한 주파수 성분의 배열은 중심 시프트된 스펙트럼으로 지칭된다. 공간 도메인의 이미지 데이터에 고속 푸리에 변환(FFT)을 적용하면 저주파 성분의 진폭이 푸리에 공간(또는 주파수 도메인)의 2차원 스펙트럼의 코너에서 끝나는 코너 시프트된 스펙트럼이 생성된다. 고주파 성분은 2차원 스펙트럼의 중심에 더 가깝게 위치한다. 이해의 편의를 위해, 저주파 성분은

중심에 가깝게 위치하고 고주파 성분은 중심에서 멀리 위치하는 중심 시프트된 스펙트럼으로 주파수 도메인의 주파수 성분을 시각화하는 것이 유용하다. 코너 시프트된 스펙트럼에서 사분면의 대칭은 사분면을 대각선으로 교체하여 저주파 성분을 중심에 더 가깝게 이동시킬 수 있다. 따라서, 코너 시프트된 스펙트럼은 간단한 방식으로 중심 시프트된 스펙트럼으로 변환될 수 있으며 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 켤레 대칭과 중복 영역은 코너 시프트된 스펙트럼과 중심 시프트된 스펙트럼 모두에서 유지된다. 도 18의 중심 시프트된 스펙트럼은 독자의 이해를 돕기 위해 제시된다.

[0332] 위너 필터는 단계 3-c에서 밴드 분리된 이미지에 대해 위에 제시된 1단계 기법(랄(Lal) 등의 2015년도 논문) 또는 2단계 기법(구스타프손(Gustafsson)의 2000년도 논문)을 사용하여 조합된 이미지에 대해 구축할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서 위너 필터는 OTF(광학 전달 함수)의 진폭 또는 절대값인 MTF(변조 전달 함수)를 사용하여 구축될 수 있다. 이 구현예에서, 위너 필터에서 중첩 주파수 정보를 계산적으로 시뮬레이션하기 위해 재구성 프로세스를 수행한다. 밴드 분리된 이미지에 대한 위너 필터 가중치를 조합된 이미지의 OTF에 적용하여 결합 이미지에 대한 위너 필터를 구축한다. 위너 필터는 다음 단계에서 조합된 이미지에 적용된다.

[0333] **처리 단계 5: 위너 필터 및 아포디제이션 필터 적용**

[0334] 이 단계에서, 푸리에 공간에서 조합된 이미지에 이전 단계에서 구축한 위너 필터 또는 대체 필터를 적용한다. 단계 3-c에서, 독립적인 MTF를 적용함으로써 위너 필터링을 두 단계로 분리했다. 단계 3-c의 수학식 32, 33 및 34를 참조한다. 2단계 필터링 프로세스로서, 이 단계에는 푸리에 공간에서 조합된 이미지에 위너 필터의 나머지 부분(수학식 32, 33 및 34에 제시됨)을 적용하는 것이 포함된다. 대안적인 실시형태에서, 각도당 3개의 주파수 성분의 푸리에 공간 표현에 대해 그들을 조합하기 전에 위너 필터를 적용하여 조합된 이미지를 형성할 수 있다. 초기에 적용하면, 밴드 분리된 주파수 성분에 대한 행렬의 비중복 절반에만 위너 필터를 적용할 수 있다.

[0335] 위너 필터를 적용하면 신호가 향상되지만 이미지의 노이즈도 증가할 수 있다. 적절하게 설계된 아포디제이션 필터는 고주파 성분으로 인해 도입된 이미지에 하드 가장자리가 발생하는 것을 방지할 수 있다. 아포디제이션 필터는 푸리에 공간에서 사전에 정의된 반경 밖의 주파수 성분을 제거하는 저역 통과 필터이다. 아포디제이션 필터는 위너 필터로 인해 발생하는 오류를 줄인다. 실수 공간 해밍 저역 통과 필터 또는 가우스 저역 통과 필터와 같은 다른 저역 통과 필터도 위너 필터에 의해 발생하는 오류를 줄이기 위해 적용될 수 있다. 아포디제이션 필터는 선택 사항이며 랄(Lal) 등의 2015년도 논문의 SIM-RA 알고리즘 1과 같은 일부 SIM 재구성 알고리즘에서는 사용되지 않는다는 점에 유의한다. 대안적으로, 아포디제이션 필터는 파이프라인의 앞부분에 있는 3개의 주파수 성분에 대한 행렬의 비중복 절반에만 적용될 수 있다.

[0336] **처리 단계 6: 역 FFT 수행**

[0337] 이 단계에서 주파수 도메인의 전체 이미지에 대한 행렬(1850)에 역 푸리에 변환을 적용한다. 역 고속 푸리에 변환(IFFT)을 적용하면 푸리에 도메인의 행렬 성분이 공간 도메인(실수 공간)의 이미지로 변환된다. 생성된 행렬(1860)은 고해상도 SIM 재구성 이미지이다. 서브타일이 사용되는 경우, 이는 더 큰 타일의 일부이다.

[0338] **전체 FOV 이미지를 위한 SIM 이미지 재구성**

[0339] 고해상도 SIM 이미지의 서브타일을 조합하여 전체 FOV의 고해상도 이미지를 재구성할 수 있다. 다수의 서브타일 이미지로부터 고해상도 전체 시야 이미지를 재구성하기 위해 개시된 기술의 일 구현예에 대한 의사 코드가 아래에 제시된다. 아래에 제시된 알고리즘은 "전체 시야 재구성" 알고리즘(알고리즘 4라고도 함)으로 지칭된다. 이는 서브타일 재구성을 위해 알고리즘 3을 확장한 것이다. 획득한 이미지와 추정 파라미터에 대한 왜곡 계수를 입력으로 취한다. 각도 및 간격 파라미터(입력 2) 및 위상 바이어스 룩업 테이블(입력 3)에 대한 왜곡 계수의 추정이 위에 제시된다. 이 알고리즘은 전체 FOV 이미지를 동일한 크기 영역의 서브타일로 분할한다. SIM 이미지는 위의 알고리즘 3에 제시된 바와 같이 서브타일에 대해 재구성된다. 마지막으로, 서브타일의 고해상도 SIM 이미지를 조합하여 전체 FOV 데이터의 고해상도 SIM 이미지를 재구성한다(알고리즘 단계 4b).

[0340] **알고리즘 4: 전체 시야 재구성**

입력:
1. 이미지의 수집(예를 들어, 2개의 각도 및 각도당 3개의 위상)
2. 각도/간격에 대한 왜곡 계수(2차 피팅 및 룩업 테이블 알고리즘을 이용한 최종 왜곡 보정 참조)
3. 위상에 대한 왜곡 룩업 테이블(2차 피팅 및 룩업 테이블 알고리즘을 이용한 최종 왜곡 보정 참조)
4. 위너 필터 및 아포디제이션 파라미터

출력: 재구성된 출력

알고리즘

1. 다음의 이미지/필터를 구축함(서브영역과 일치하는 크기로)
   a. OTF
   b. 위너
   c. 아포디제이션
2. 이미지를 동일한 크기의 서브영역(예를 들어, 512x512)으로 분할한다.
   a. 우측 가장자리 또는 하부에서 이미지를 서브영역 크기로 균등하게 나눌 수 없는 경우, 서브영역을 좌측(또는 상측)으로 시프프하여 이미지에 맞도록 한다.
   b. 비중첩 부분만 우측 또는 하단 가장자리 서브영역에 복사되도록 경계 서브영역에 대한 설정 장부(setup book)를 유지한다.
3. 예를 들어 512x512 윈도우를 사용하여 이미지의 중심에서 파라미터를 추정한다(서브타일 각도, 간격 매핑 알고리즘 및 서브타일 위상 매핑 알고리즘 참조).
   a. 각각의 각도에 대해 조명 피크 각도 및 간격을 추정한다.
   b. 각각의 각도에 대해 변조를 추정한다.
   c. 각각의 이미지에 대해 위상을 추정한다.
4. 각각의 서브영역에 대해,
   a. 서브타일 재구성 알고리즘을 사용하여 더 높은 해상도 서브영역을 재구성한다.
      i. 단계 3에서 확인된 격자와 각도, 주어진 왜곡 계수를 사용하여 로컬 격자 및 각도를 추정한다.
      ii. 단계 3에서 확인된 위상과 주어진 왜곡 룩업 테이블을 사용하여 적절한 위상을 추정한다.
      iii. 이전에 구축된 OTF가 주어지면, 서브영역에 대한 위너 및 아포디제이션
   b. (a)의 출력을 대형 이미지로 복사한다.
      i. 경계 서브영역인 경우, 누락된 데이터만 복사한다.

[0341]

[0342] 이전 설명과 관련해서, 본 의사 코드는 설명을 필요로 하지 않는다.

[0343] **SIM 이미지 재구성 알고리즘에 대한 가능한 개선**

[0344] 발명의 명칭이 "SYSTEMS AND METHODS FOR STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY"(대리인 사건 번호 ILLM 1012-1)인 미국 특허 가출원 제62/924,130호 및 발명의 명칭이 "INCREASED CALCULATION EFFICIENCY FOR STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY"인 미국 특허 가출원 제62/924,138호(대리인 사건 번호 ILLM 1022-1)에 개시된 SIM 이미지 재구성 알고리즘(SIR)에 대한 가능한 개선을 제시한다. 2개의 가출원은 모두 2019년 10월 21일에 출원되었다.

[0345] 첫 번째의 가능한 개선은 위상 바이어스 룩업 테이블과 관련이 있다. 기준 SIR 알고리즘은 정적 위상 바이어스 룩업 테이블을 사용한다. 기준 모델의 가정은 위상 바이어스와 왜곡이 한 번 학습되고 룩업 테이블에 저장될 수 있다는 것이다. 룩업 테이블의 값은 안정적이고 다수의 시퀀싱 실행에 적용 가능하다고 가정한다. 기준 SIR 알고리즘은 위상 바이어스 룩업 테이블(LUT)이 공간 도메인에서 안정적으로 유지된다고 가정한다. 이는 플로우 셀의 타일에 걸쳐 동일한 룩업 테이블이 적용될 수 있음을 의미한다. 기준 알고리즘의 두 번째 가정은 LUT가 다수의 시퀀싱 실행에 걸쳐 안정적으로 유지된다는 것이다. 실험은 이들 가정이 모든 플로우 셀 및 시퀀싱 실행에 대해 사실이 아닐 수 있음을 보여주었다. 플로우 셀의 타일은 상이한 기울기 또는 기타 왜곡을 가질 수 있다. 룩업 테이블의 값은 다수의 시퀀싱 실행에 걸쳐 변화되는 다양한 환경 요인의 영향을 받을 수 있다.

[0346] 따라서, "올인" SIM 알고리즘은 새로운 플로우 셀이 시퀀서에 로드되고 시퀀싱 실행이 개시될 때 타일당 시퀀싱 실행마다 위상 바이어스 룩업 테이블의 학습을 포함한다. 이는 시퀀싱 실행의 제1 사이클에 필요한 처리 시간을 증가시킬 수 있다. 그러나, 필터(또는 %PF) 메트릭을 통과하는 클러스터의 오류율과 백분율에서 상당한 개선이 다음 단락에 예시된 것처럼 관찰된다.

[0347] 두 번째의 가능한 개선은 평행 선이 휘거나 달리 왜곡되게 하는 기하학적 왜곡과 관련이 있다. 기하학적 왜곡은 이미징 또는 광학 경로와 플로우 셀의 왜곡을 초래할 수 있다. 경우에 따라, 플로우 셀의 타일 전체 또는 일부가 기울어져 평평하지 않을 수 있다. 이로 인해 기하학적 왜곡이 발생할 수 있다. 타일마다 플로우 셀이 다를 수 있으므로 플로우 셀의 모든 타일을 특성화하는 것이 바람직하다. 보정의 초기 버전에서는 기하학적 왜곡이 한 번 학습되고 다수의 시퀀싱 실행에 걸쳐 사용될 수 있다고 가정했다. 실험은 이러한 가정이 모든 시퀀싱 실행에 대해 사실이 아닐 수 있음을 보여주었다. 따라서, "올인" 알고리즘에는 시퀀싱 실행의 제1 사이클에서 플로우 셀의 타일마다 기하학적 왜곡을 학습하는 것이 포함된다.

[0348] 세 번째의 가능한 개선은 전체 시야(FOV) 이미지를 형성하기 위해 서브타일 이미지를 스티칭하는 것과 관련이 있다. 기준 SIM 알고리즘에서, 주파수 도메인의 서브타일에 역 고속 푸리에 변환(IFFT)을 적용하면 서브타일의 가장자리가 공간 도메인에서 분명하게 나타난다. 따라서, 전체 시야에서 스티칭된 서브타일은 서브타일의 가장자리에 스티치 선을 보여준다. 스티치 선 문제로 인해 서브타일의 경계를 따라 어두운 아티팩트가 나타난다. 올인(All-In) SIM 알고리즘은 서브타일들 간의 중첩을 사용함으로써 스티치 선 문제를 해결한다. 예를 들어, 서브타일은 5 내지 15 픽셀의 중첩을 가질 수 있다. 일 구현예에서, 서브타일은 경계를 따라 8 픽셀의 중첩을 갖는다. 전체 시야(FOV) 이미지를 재구성할 때, "올인" 알고리즘은 서브타일에 대해 외부 8픽셀을 폐기하고 내부 영역을 사용하여 공간 도메인에서 전체 FOV 이미지를 재구성할 수 있다. 이 구현예에서, 서브타일의 크기는 각 측면에 경계 픽셀(예를 들어, 8 픽셀)을 추가하여 512 x 512 픽셀보다 클 수 있다. 또 다른 구현예에서, 서브타일의 경계 픽셀은 경계 픽셀을 폐기하는 대신 평균화될 수 있다.

[0349] 네 번째의 가능한 개선은 아포디제이션 및 위너 필터의 최적화와 관련이 있다. 필터 파라미터는 업샘플링에 따라 다르다. 기준 SIM 알고리즘은 부분 픽셀을 삭제(shave off)할 수 있는 1.2배 업샘플링을 사용한다. 서브타일 이미지가 공간 도메인에서 함께 스티칭되면, 이미지의 시프팅 및 정렬 문제가 발생할 수 있다. 픽셀의 삭제는 정수가 아닌 픽셀의 수를 생성하는 업샘플링 계수(즉, 1.2)로 인한 것이다. 올인 SIM 알고리즘은 1.5배 업샘플링을 사용하여 정수의 픽셀 수를 생성하는 업샘플링 계수를 사용함으로써 부분 픽셀 삭제 문제를 극복한다. 따라서, 함께 스티칭하기 위한 더 깨끗한 서브타일 이미지를 제공한다. 다른 구현예에서, 1.25배 업샘플링과 같은 다른 업샘플링 계수 값이 사용될 수 있으며, 이는 또한 정수의 픽셀 수를 생성할 수 있다.

[0350] 일부 구현예에서, 개시된 기술은 시퀀싱 실행에서 노출 사이클에 의해 초래된 뉴클레오티드에 대한 손상을 보상하기 위해 용량 램핑(dose ramping)을 사용할 수 있다. 용량 램핑에서 청색 및 녹색 채널 레이저의 레이저 출력이 증가한다.

[0351] **성능 비교 결과**

[0352] 기준 SIM 알고리즘과 올인 SIM 알고리즘의 성능을 비교했다. 이들 두 가지 알고리즘은 필터를 통과하는 클러스터의 오류율 및 백분율(%PF)로 표시되는 시퀀싱 결과의 품질을 사용하여 비교된다. 오류율 메트릭은 시퀀싱 프로세스에서 알려진 참조 게놈과 비교하여 오류가 있는 베이스콜(basecall)의 백분율을 측정한다. 필터를 통과하는 클러스터 또는 %PF 메트릭은 플로우 셀에 있는 분자들의 클러스터 각각의 신호 품질의 표시이다. 낮은 오류율과 높은 %PF 값은 고품질 베이스콜을 갖는 우수한 시퀀싱 출력을 나타내므로 바람직하다. 플로우 셀의 100개 초과의 타일 중에서, 알고리즘을 비교하기 위해 시퀀싱 실행당 최상의 타일에 대한 결과를 선택했다. 플로우 셀의 타일은 평탄도, 기울기, 표면 연마 및 기타 환경 요인의 측면에서 가변성을 가질 수 있다. 100개가 넘는 타일 중에서 비교를 위해 최상의 타일을 선택하는 이유는 통계적 집계를 통해 이러한 다른 외부 요인으로 인해 초래되는 변동성을 줄이는 것이다.

[0353] 도 25a는 A, B 및 C로 라벨링된 3개의 시퀀싱 실행에 대한 기준 및 올인 알고리즘에 대한 오류율을 나타낸다. 각 시퀀싱 실행에 대해 최상의 타일에 대한 오류율이 두 가지 알고리즘에 대해 제시된다. 상단 바는 올인 알고리즘에서 최상의 타일에 대한 오류율을 나타내고 하단 바는 각각의 시퀀싱 실행에 대한 기준 알고리즘에서 최상의 타일에 대한 오류율을 나타낸다. 그래프 하단의 표는 올인 알고리즘을 사용할 때 최상의 타일의 오류율의 정량적 개선을 표로 나타낸 것이다. 예를 들어, 시퀀싱 실행 A에 대한 최상의 타일 오류율은 기준 알고리즘을 사용하는 경우 1.85%이다. 시퀀싱 실행 A에 대한 최상의 타일 오류율은 올인 알고리즘을 사용할 때 1.18%로 오류율이 낮은 고품질 시퀀싱 프로세스를 나타낸다. 올인 알고리즘을 사용할 때 시퀀싱 실행 B 및 C에서 오류율을 낮추는 것과 유사한 개선이 관찰되었다.

[0354] 도 25b는 2개의 알고리즘에 대한 3개의 시퀀싱 실행에서 최상의 타일에 대해 필터를 통과하는 클러스터(또는 %PF) 결과를 제시한다. 하단 표는 두 가지 알고리즘에 대한 각각의 시퀀싱 실행에서 최상의 타일에 대한 %PF 값을 나타낸다. 올인 알고리즘은 모든 시퀀싱 실행에 대해 더 높은 %PF 값을 생성한다. 특히, 시퀀싱 실행 A에서 최상의 타일에 대한 %PF 값은 82.7로 플로우 셀 타일에 대한 클러스터 중 82.7%가 베이스콜 정보를 생성하기에 양호한 품질의 클러스터로 간주됨을 나타낸다. 시퀀싱 실행에서 최상의 타일에 대한 %PF 값은 70.1에 불과하다. %PF 값이 높을수록 필터를 통과하는 클러스터가 많아져 시퀀싱 처리량이 증가한다. 패턴화된 플로우 셀은 분자들의 클러스터가 형성될 수 있는 나노웰의 수와 동일한 클러스터의 수에 대한 이론적인 최대 한계를 가질 수 있다. 도 25a 및 도 25b의 결과는 올인 알고리즘이 기준 알고리즘과 비교하여 더 낮은 오류율 및 더 높은 처리량(더 높은 %PF 값으로 인해)을 생성한다는 것을 보여준다.

[0355] 도 26a, 도 26b 및 도 26c는 각각 시퀀싱 실행 A, B 및 C에서 사이클에 대한 최상의 타일 오류율을 나타낸다.

기준 및 올인 알고리즘에 대해 시퀀싱 실행에서 별도의 시계열 오류율이 제시된다. 도 26a 내지 도 26c의 결과는 올인 알고리즘이 시퀀싱 실행에서 오류율을 줄이는 것을 예시한다. 최상의 타일에 대해 올인 알고리즘을 사용한 오류율의 개선은 사이클마다 다를 수 있다. 도 26a에 도시된 바와 같이, 초기 25개의 사이클 동안 기준 및 올인 알고리즘의 오류율은 거의 동일하지만 시퀀싱 실행이 진행됨에 따라 올인 알고리즘의 오류율은 기준 알고리즘의 오류율에 비해 줄어든다. 도 26b는 올인 알고리즘에 대한 오류율이 초기 사이클에서 약간 더 우수함을 보여준다. 시퀀싱 실행의 나중 사이클에서, 올인 알고리즘은 기준 알고리즘보다 더 양호하게 수행된다. 도 26c는 2개의 알고리즘에 대한 시퀀싱 실행 C에서 사이클에 대한 최상의 타일 오류율을 예시한다. 올인 알고리즘의 성능은 대부분의 사이클에 대해 기준 알고리즘보다 상당히 우수하다. 그래프는 또한 올인 알고리즘이 더 높은 오류율을 갖는 특정 사이클을 예시한다. 이러한 결과는 기술자 또는 연구원이 특정 사이클에 대한 오류율을 증가시키는 품질 문제에 집중하는 데 도움이 될 수 있다.

[0356] 도 26d는 기준 알고리즘과 비교하여 올인 알고리즘에 대한 특정 업데이트에 의해 달성된 오류율의 개선을 나타낸다. 예를 들어, 좌측 플롯은 위상 학습 및 스티치 조정을 하나씩 포함함으로써 시퀀싱 실행 A의 오류율이 개선되었음을 나타낸다. 위상 학습은 중심 서브타일에 대한 비중심 서브타일의 위상 변위 값들 간의 관계를 캡처할 수 있는 위상 바이어스의 추정을 말한다. 별도의 위상 바이어스 룩업 테이블이 플로우 셀의 타일별로 생성 및 저장된다. 시퀀싱 실행 A에 대한 기준 알고리즘의 오류율은 도 24a의 표의 제1 열에 도시된 바와 같이 1.85이다. 기준 알고리즘에 위상 학습이 포함될 때의 오류율 개선은 0.65 또는 32%이고 기준 모델에 스티치 조정이 포함될 때 기준 알고리즘의 오류율 개선은 0.19 또는 10%이다. 그래프는 또한 기준 알고리즘에서 각각 오류율을 0.65만큼 낮추는 위상 학습과 오류율을 0.19만큼 낮추는 스티치 조정으로 해석할 수 있다. 두 가지 기법을 포함시킨 후의 잔여 오류율은 1.18이다.

[0357] 도 26d의 우측에 있는 그래픽 플롯은 시퀀싱 실행 B를 위한 위상 학습 및 스티치 조정 기법으로 인한 오류율의 개선을 나타낸다. 기준 알고리즘에 위상 학습을 포함하면 오류율이 0.227 또는 33%만큼 줄어든다. 기준 알고리즘에 스티치 조정을 포함하면 오류율이 0.039 또는 6%만큼 줄어든다. 두 가지 기법을 모두 포함한 후의 잔여 오류율은 0.414이다. 이제, 개시된 SIM 파라미터 추정 및 이미지 재구성 기술이 시퀀싱 실행으로부터 이미지를 처리하기 위해 적용되는 경우에 있어서의 개시된 기술의 영향에 대한 논의를 제시한다.

[0358] **개시된 기술의 영향**

[0359] 개시된 기술이 다수의 사이클 및 여러 시간 동안 플로우 셀에 걸쳐 구조화 조명 이미지 향상을 위한 계산 리소스 요구 사항을 어떻게 저감시킬 수 있는지 예시하기 위해 단순화된 예가 제시된다. 기계 성능은 가변적이므로 예시적인 계산을 따라하기 쉽도록 반올림한 수를 선택했다. 개시된 기술은 단독으로 또는 조합하여 독립적으로 적용될 수 있다는 점을 유의해야 한다. 일부 구현예에서, 파라미터는 환경 요인으로 인한 시스템 불안정성을 보상하기 위해 더 자주 추정될 수 있다. 예를 들어, 위에서 설명한 것처럼 "올인" SIM 알고리즘은 시퀀싱 실행마다 제1 사이클에서 위상 바이어스 룩업 테이블을 추정한다. 이렇게 하면 제1 사이클의 지속 시간을 최대 30%까지 증가시킬 수 있다. 그러나, 오류율 및 %PF 메트릭에서 상당한 성능 향상을 달성할 수 있다.

[0360] 시퀀싱 실행에 사이클당 6분의 속도로 2개의 조명 주파수를 갖는 150회의 분석 사이클이 포함된다고 가정한다. 150개의 사이클의 기본 이미지 타일 캡처에는 15시간이 소요된다. 각각의 사이클에서 각도당 3개의 이미지를 갖는 구조화 조명에 대해 2개의 각도(+/-45도)가 사용된다고 가정한다. 150개의 사이클 동안 타일당 이미지의 수는 1800개이다. 7x10 그리드에 70개의 서브타일이 있다고 가정한다. 처리 요구 사항은 900분 동안 126,000개의 서브타일이다.

[0361] 제1 구현예에서, 시스템이 실행 전에 보정되었고 간격, 각도 및 위상 차이에 대해 생성된 2차 피팅과 룩업 테이블이 실행 전반에 걸쳐 사용될 수 있다고 가정한다. 이 구현예에서, 중심 부근 서브타일은 1800번의 프린지 피크 추정의 대상이 될 것이다. 이는 플로우 셀 위치 또는 조명 레이저 소스 또는 투영된 구조화 조명 위상이 변경된 횟수이다.

[0362] 이러한 제1 예에서, 시스템은 70회 중 69회의 프린지 피크 추정을 회피할 것이다. 124,200개의 이미지 서브타일의 경우, 다른 서브타일은 중심 부근 서브타일과 사전 계산된 관계를 사용하여 재구성 파라미터를 결정할 것이다. 재구성 파라미터의 추정은 실제 재구성보다 계산 비용이 더 많이 소요된다. 따라서 계산 요구 사항이 절반 초과하여 감소한다. 대칭에 대한 개요 의존도를 사용하여 추가 감소를 달성할 수 있다.

[0363] 대칭을 적용하면 FFT 및 기타 방법으로 계산하는 대신 켤레 쌍 값을 룩업할 수 있다. 우세한 180도 회전 및 부호 변경 작업 대칭 대신 대칭을 반영한 서브타일 섹션에 특별한 주의를 기울일 필요가 있다. 코너 시프트된 푸

리에 변환 공간에 짝수의 행과 열을 이용하여, 회전 대칭이 아닌 반사로 인해 상단 행과 좌측 및 중간+1 열이 다르게 처리된다. 도 19를 참조한다. 코너 시프트된 푸리에 변환 공간에 홀수의 행과 열을 이용하여, 회전 대칭이 아닌 반사로 인해 상단 행과 좌측 열이 다르게 처리된다. 도 19 및 도 23a를 참조한다. 다른 대칭은 중심 시프트된 푸리에 변환 공간에 적용될 수 있다.

[0364] 도 18의 중심 열은 비중복 데이터에 초점을 맞춤으로써 다양한 단계에서 주파수 도메인에서 계산의 절반을 회피할 수 있는 방법을 예시한다. 1850, 1860에서 전체 이미지를 재구성할 때까지 이들 단계에서 계산이 40% 감소하고 이미지 계수 저장이 50% 감소한다고 가정한다. 켤레 쌍에 대한 값이 1850, 1860에서 필요할 때 값 룩업이 적용될 수 있기 때문에, 켤레 쌍은 단계 3b 내지 3d 동안 계산에 포함될 필요가 없다.

[0365] 따라서, 개시된 하나의 기술은 필요로 하는 계산 리소스의 50 퍼센트를 절약할 수 있고 다른 기술은 40 퍼센트를 절약할 수 있다. 누적적으로, SIM 재구성의 계산 비용은 2/3를 초과하여 감소될 수 있다.

[0366] 제2 구현예에서, 시스템이 2차 피팅과 룩업 테이블을 업데이트하기 위해 실행 시작 시와 중간 지점에서 다시 보정된다고 가정한다. 이러한 보정에는 70개의 모든 서브타일에 대한 프린지 피크 추정 후 피팅 및 룩업 테이블 생성이 포함되기 때문에 8분이 소요된다고 가정한다. 이러한 추정은 실행 시간을 15시간에서 15시간 16분으로 연장한다. 개시된 기술을 적용하는 대신 서브타일 및 노출 빈도마다 추정을 수행하고 이미지 트리오마다 한 번씩 총 300번의 파라미터 추정을 수행하면 실행 시간이 3배를 초과하게 될 것이다.

[0367] 제2 구현예에서는, 대칭 적용의 영향이 변경되지 않을 것이다.

[0368] 개시된 기술의 조합된 효과는 시스템에 GPU, FPGA 또는 CGRA를 추가하지 않고도 CPU를 사용하여 이미지 타일의 실시간 처리를 수행할 수 있게 하는 것이 기대된다. 대안적으로, GPU, FPGA 또는 CGRA 구현이 선택되더라도 더 단순한 컴퓨팅 리소스를 사용할 수 있다. 이를 통해 시스템 복잡도를 저감시키고 기존 기계의 폼 팩터를 쉽게 유지하면서 실시간 처리 기능을 증가시킬 수 있다.

[0369] **특정 구현예들**

[0370] **센서에 의해 캡처된 전체 시야의 서브타일**

[0371] 개시된 서브타일링 기술은 교정 및/또는 교정된 스캐너를 사용하는 생성의 관점에서 설명될 수 있다.

[0372] 개시된 기술의 일 교정 구현예에서, 다수의 사이클 동안 수집된 이미지에서 플로우 셀 또는 보다 일반적으로 이미징 평면에 걸쳐 분포된 수백만 개의 샘플의 형광을 검출하는 스캐너의 교정 또는 특성화를 위한 방법이 설명된다. 구조화 조명은 광학 해상도에 대한 아베 회절 한계보다 더 가깝게 위치한 형광성 샘플들 간의 해상도를 개선하는 데 사용된다. 렌즈에 의해 스캐너의 광학 센서 상으로 투영된 전체 시야를 실질적으로 사용하도록 스캐너를 보정하는 이러한 방법은 구조화 조명의 다중 각도 및 위상 변위에서 구조화 조명 하에서 이미지 타일을 캡처하는 단계를 포함한다. 방법에 대한 변형으로 2D 구조화 조명 및 다른 위상 변위 스테핑 패턴을 사용할 수 있다. 방법은 이미지 타일에 걸쳐 광학 왜곡을 계산하는 단계를 수반하며, 중심 부근 서브타일을 포함하는 이미지 타일의 적어도 9개의 서브타일에서 강도 피크들 사이의 간격과 강도 피크들의 각도를 측정하고, 측정된 간격 및 각도에 대해 간격 표면 및 각도 표면을 각각 피팅하는 단계를 포함한다. 물론, 3x3, 5x5, 5x7, 9x9, 8x11, 9x16 서브타일과 같이 이미지 타일을 분할하는 다른 배열을 사용할 수도 있다. 더 큰 센서로 캡처한 이미지는 열거된 서브타일 어레이에 제한되지 않고 더 많은 서브타일로 분할된다. 피팅 간격 표면 및 피팅 각도 표면은 이미지 타일의 서브타일에 걸친 왜곡 보정을 나타낸다. 강도 피크의 간격과 적어도 9개의 서브타일에 걸친 강도 피크의 각도를 중앙 부근의 서브타일에 관련시키는 피팅 결과를 포함하여 생성된 피팅 계수가 저장된다. 보정하는 단계는 서브필드 내의 다수의 각도 및 위상 변위에서 구조화 조명의 위상 변위를 측정하고 이미지 타일의 중심 부근 서브타일의 위상 변위와 다른 서브타일의 위상 변위 간의 차이를 나타내는 룩업 테이블을 저장하는 단계를 더 포함한다. 이러한 보정은 다수의 사이클 동안 수집된 이미지에서 플로우 셀 또는 이미징 평면에 걸쳐 분포된 수백만 개의 샘플의 형광을 분석하기 위한 생성용 스캐너를 준비한다.

[0373] 생성 구현예에서, 방법은 다수의 사이클 동안 수집된 이미지에서 플로우 셀 또는 이미징 평면에 걸쳐 분산된 수백만 개의 샘플의 향상된 형광 이미지를 생성한다. 이는 플로우 셀에 걸친 위치를 포함하는 캡처된 이미지 타일 - 다수의 사이클 동안 구조화 조명의 다수의 각도 및 위상 변위에서 캡처된 이미지 타일 - 을 처리하는 단계를 포함한다. 이러한 처리는 각각의 이미지 타일의 서브타일에 관한 것이다. 이는 저장된 추정 피팅 결과에 액세스하거나 중심 부근 서브타일과 다른 서브타일 간의 간격 및 각도 왜곡 관계를 나타내는 추정 피팅 결과를 생성하는 단계를 포함한다. 피팅 결과는 다항식 표면 피팅의 계수 또는 룩업 테이블의 값일 수 있다. 이 방법은 또한 저장된 룩업 테이블에 액세스하거나 중심 부근 서브타일과 다른 서브타일 간의 위상 변위 차이를 나타내는 룩업

테이블을 생성하는 단계를 포함한다. 피팅 결과 및 룩업 테이블은 강도 피크들 사이의 간격의 각각 캡처된 이미지 타일의 중심 부근 타일, 구조화 조명의 강도 피크의 각도 및 위상 변위에 대한 측정값과 조합된다. 재구성 파라미터는 캡처된 각 이미지 타일에 대해 서브타일별로 결정된 다음 SIM 재구성에 적용된다. 이러한 방법은 아베 회절 한계보다 더 나은 분해능으로 다수의 사이클 동안 플로우 셀 또는 이미징 평면에 걸친 위치에서 서브타일에 대한 향상된 해상도 이미지를 생성한다.

[0374] 예를 들어, 9개의 서브타일로 분할된 이미지 타일에 대해, 방법은 중심 부근 서브타일에 추가하여 이미지 타일의 적어도 8개의 추가 서브타일에 대해 추정된 재구성 파라미터를 유도하는 단계를 포함한다. 추가 서브타일에 대해 추정된 간격 및 각도 재구성 파라미터는 적어도 8개의 추가 서브타일에 걸친 간격 파라미터 및 각도 파라미터를 중심 부근 서브타일에 관련시키는 저장된 피팅 결과와 중심 부근 서브타일에 대한 액세스되거나 추정된 파라미터를 조합함으로써 유도된다. 추가 서브타일에 대해 추정된 위상 변위 재구성 파라미터는 중심 부근 서브타일에 대해 액세스되거나 추정된 파라미터를 중심 부근 서브타일에 관한 적어도 8개의 추가 서브타일에 걸친 위상 변위 측정을 위한 저장된 룩업 테이블과 조합함으로써 유도된다. 위에 기재된 바와 같이, 이미지 타일을 분할하기 위한 다른 구성이 위에 설명된 파라미터 추정 프로세스에 영향을 미치지 않고 사용될 수 있다.

[0375] 향상된 해상도 이미지를 사용하여, 다수의 사이클 동안 샘플들을 시퀀싱하거나, 또는 달리 수십, 수백 또는 수천 개의 이미지 타일로 캡처한 이미지 평면에서 형광을 조사할 수 있다.

[0376] 조합된 교정 및 생성 구현예에서, 위에 설명한 작업이 조합되므로, 스캐너는 교정된 다음 생성에 사용된다. 개시된 기술은 다수의 사이클 동안 수집된 이미지에서 플로우 셀에 걸쳐 분포된 수백만 개 샘플의 형광을 검출하는 스캐너의 성능을 개선하는 방법 구현을 포함한다. 구조화 조명은 광학 해상도에 대한 아베 회절 한계보다 더 가깝게 위치한 형광성 샘플들 간의 해상도를 개선하는 데 사용된다. 이러한 기술을 적용하여, 렌즈에 의해 스캐너의 광학 센서 상으로 투영된 전체 시야를 실질적으로 사용하여 스캐너를 보정하는 단계는 구조화 조명의 다중 각도 및 위상 변위에서 구조화 조명 하에서 이미지 타일을 캡처하는 단계를 포함한다. 이는 이미지 타일에 걸쳐 광학 왜곡을 계산하는 단계를 수반하며, 중심 부근 서브타일을 포함하는 이미지 타일의 적어도 9개의 서브타일에서 강도 피크들 사이의 간격과 강도 피크들의 각도를 측정하고, 측정된 간격 및 각도에 대해 간격 표면 및 각도 표면을 각각 피팅하는 단계를 포함한다. 물론, 이미지 타일은 위에 기재된 바와 같이 더 많은 수의 서브타일로 분할될 수 있다. 피팅 간격 표면 및 각도 표면은 이미지 타일의 서브타일에 걸친 왜곡 보정을 나타낸다. 피팅의 생성된 계수는 저장된다. 보정하는 단계는 서브필드 내의 다수의 각도 및 위상 변위에서 구조화 조명의 위상 변위를 측정하고 이미지 타일의 중심 부근 서브타일의 위상 변위와 다른 서브타일의 위상 변위 간의 차이를 나타내는 룩업 테이블을 저장하는 단계를 더 포함한다.

[0377] 방법은 플로우 셀에 걸친 위치를 포함하는 캡처된 이미지 타일 - 다수의 사이클 동안 구조화 조명의 다수의 각도 및 위상 변위에서 캡처된 이미지 타일 - 을 처리하는 단계로 진행한다. 이러한 작업은 저장된 피팅 결과와 저장된 룩업 테이블을 중심 부근 타일에서 강도 피크들 사이의 간격과, 강도 피크들의 각도와, 구조화 조명의 위상 변위들의 각각의 캡처된 이미지 타일에 대한 측정값과 조합하여 각각의 캡처된 이미지 타일에 대한 재구성 파라미터를 서브타일 당 기준으로 결정하는 단계를 포함한다. 이는 아베 회절 한계보다 우수한 분해능을 이용하여 다수의 사이클 동안 플로우 셀에 걸친 위치에서 서브타일에 대한 향상된 해상도 이미지를 생성하고, 향상된 해상도 이미지를 사용하여 다수의 사이클 동안 샘플을 시퀀싱하는 단계를 더 포함한다.

[0378] 위에 제시된 조합된 교정 및 생성 구현의 각각의 구현예는 별도의 유틸리티를 갖는다. 예컨대, 제1 엔티티는 제2 엔티티가 사용할 스캐너를 전달하고 보정할 수 있다. 제1 엔티티는 각기 다른 보정 접근 방식을 사용하여 중심 부근 서브타일과 다른 서브타일 간의 간격과 각도 왜곡 관계 및 위상 변위 차이를 결정하고 나타낼 수 있으며, 설명된 생성 기술을 계속 사용할 수 있다. 설명된 보정 기술을 사용할 수 있으며, 제2 엔티티는 보정된 스캐너를 다른 방식으로 사용할 수 있다. 따라서, 개시된 기술은 교정 및/또는 생성 구현예를 포함한다.

[0379] 본 방법 및 개시된 기술의 다른 구현예는 각각 다음의 피처 및/또는 개시된 추가 방법과 관련하여 설명된 피처 중 하나 이상을 선택적으로 포함할 수 있다. 간결함을 위해, 본 출원에 개시된 피처들의 조합은 개별적으로 열거되지 않고 피처들의 각각의 기본 세트로 반복되지 않는다. 독자는 본 항목에서 식별된 피처가 구현예로 식별된 기본 피처들의 세트들과 어떻게 쉽게 조합될 수 있는지를 이해할 것이다.

[0380] 이미징 평면이 플로우 셀인 경우, 샘플은 플로우 셀에 걸쳐 수백만 개의 나노웰에 분포될 수 있다. 나노웰의 적어도 일부 인접 쌍은 광학 해상도에 대한 아베 회절 한계보다 더 가깝게 위치할 수 있다. 구조화 조명은 이러한 근접 위치 결정을 허용한다. 대안적으로, 샘플들을 플로우 셀에 걸쳐 무작위로 분포시킬 수 있다.

[0381] 서브타일 각각은 광학 센서의 적어도 512 x 512 픽셀을 포함한다. 256, 400, 1024, 2048 및 4096 또는 256 내지 4096 픽셀의 범위를 포함하여 더 많거나 혹은 적은 수를 사용할 수 있다. 서브타일 차원이 2의 거듭제곱일 때 성능이 향상될 수 있으며, 잘 작동하는 것으로 확인된 실제 범위는 512 및 1024픽셀이다.

[0382] 서브타일은 광학 센서의 적어도 2개의 픽셀만큼 중첩될 수 있다. 더 많거나 혹은 적은 수를 사용할 수 있다. 예를 들어, 너비가 512 픽셀인 윈도우의 경우 최대 256 픽셀의 중첩을 사용할 수 있고, 너비가 1024픽셀인 경우 최대 512개의 중첩을 사용할 수 있다.

[0383] 간격 표면과 각도 표면을 피팅한 결과는 2차, 3차 또는 고차 표면의 계수로 저장되거나 간격 및 각도 표면의 다항식 피팅으로부터 계산된 룩업 테이블에 저장될 수 있다.

[0384] 일부 구현예에서, 서브타일에서 강도 피크들 사이의 간격과 강도 피크들의 각도를 재측정하고, 간격 표면 및 각도 표면을 재피팅하고, 후속하여 캡처된 이미지 타일을 처리하는 데 사용하기 위해 재피팅 결과를 저장하는 단계가 시퀀싱 실행 동안 한 번 이상 수행될 수 있다. 이는 예컨대 적어도 100회의 사이클 중에서 50번째 사이클 또는 그후의 사이클과 같은 중간 사이클에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 재측정은 예를 들어 시퀀싱 실행의 종료 부분에서 또는 다음 판독을 위해 화학 단계가 수행될 때 2개의 판독 사이의 시간 동안처럼 컴퓨팅 리소스를 이용할 수 있을 때 수행될 수 있다.

[0385] 나노웰은 규칙적인 반복 패턴으로 배열될 수 있다. 장방형 패턴의 경우, 2개의 구조화 조명 각도가 실질적으로 패턴에서 장방형의 대향 코너를 연결하는 2개의 대각선을 따라 사용될 수 있으므로, 구조화 조명의 강도 피크가 2개의 대각선에 실질적으로 수직으로 배향된다. 패턴 내의 육각형의 대향 코너를 연결하는 3개의 대각선을 갖는 나노웰의 반복되는 육각형 패턴의 경우, 3개의 구조화 조명 각도가 3개의 대각선에 실질적으로 수직으로 배향되는 강도 피크와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 샘플은 나노웰 없이 이미징 평면 위로 무작위로 분포될 수 있다. 또는, 샘플은 나노웰 이외의 다른 수단에 의해 이미징 평면 위로 규칙적으로 배열될 수 있다.

[0386] 방법은 서브타일에 대한 향상된 해상도 이미지를 타일에 대한 향상된 해상도 이미지로 집계하고 추가 분석을 위해 향상된 해상도 이미지 타일을 사용하는 단계를 더 포함할 수 있다. 추가 분석은 사이클당 하나의 위치에서 샘플을 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다.

[0387] 표면을 피팅하는 것에 대한 개선으로서, 방법은 측정된 간격 및 각도에 간격 표면 및 각도 표면을 피팅하기 전에 고려 사항으로부터 센서의 가장자리 주위의 픽셀을 계산에서 제거하기 위해 크롭 마진을 결정하고 크롭 마진을 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다. 마진은 센서의 가장자리 주위에서 균일하거나 가장자리에 따라 다를 수 있는데, 예컨대 긴 가장자리를 따라서보다는 장방형 센서 종단에서 더 넓다.

[0388] 방법은 이미지 타일의 적어도 8×11개의 서브타일에 걸쳐 강도 피크들 간의 간격 및 강도 피크들의 각도를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이미지 타일을 서브타일로 분할하기 위한 다른 구성은 위에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0389] 개시된 서브타일링 기술은 구조화 조명 하에서 캡처된 표적의 이미지로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하는 데 사용될 수 있다. 개시된 기술의 하나의 이미지 재구성 구현예에서, 광학 센서에 의해 캡처된 표적의 캡처된 이미지를 9개 이상의 서브타일로 분할하고 9개 이상의 서브타일 각각에 대해 독립적으로 동작하는 방법이 설명된다. 위에 기재된 바와 같이, 캡처된 이미지를 세분화하는 데 더 많은 서브타일을 사용할 수 있다. 방법은 각각의 서브타일에서 표적의 적어도 3개의 이미지를 푸리에 도메인으로 변환하여 각각의 서브타일의 적어도 3개의 주파수 도메인 행렬을 생성하는 단계를 포함한다. 이미지는 하나의 각도를 따라 구조화 조명의 적어도 3개의 위상 변위를 적용하면서 공간 도메인의 센서에 의해 캡처된다. 역 혼합 행렬은 추정된 재구성 파라미터를 사용하여 계산된다. 역행렬은 주파수 도메인 행렬에 적용되어 푸리에 도메인에서 시프트되지 않은 행렬과 시프트된 행렬인 적어도 3개의 위상 분리 행렬을 생성한다. 적어도 하나의 시프트된 행렬에 대한 서브픽셀 시프팅이 수행된다. 서브픽셀 시프팅은 시프트된 행렬을 푸리에 도메인에서 공간 도메인으로 변환하는 단계, 공간 도메인의 데이터에 병진 벡터를 적용하는 단계, 공간 도메인 데이터로부터 병진 데이터(translated data)를 변환하는 단계를 포함한다. 서브픽셀 시프팅은 푸리에 도메인에서 2개 이상의 재정렬 시프트된 행렬을 생성한다. 방법은 확장된 주파수 커버리지 행렬을 생성하기 위해 시프트되지 않은 행렬과 재정렬 시프트된 행렬의 중첩 값을 정렬하고 합산하는 단계를 포함한다. 확장된 주파수 커버리지 행렬은 공간 도메인에서 향상된 해상도 서브타일을 생성하기 위해 푸리에 도메인에서 역으로 변환된다. 선택적으로, 표적의 향상된 해상도 이미지는 9개 이상의 서브타일에 대한 향상된 해상도 서브타일을 병합함으로써 생성될 수 있다.

[0390] 본 방법 및 개시된 기술의 다른 구현예는 각각 다음의 피쳐 및/또는 개시된 추가 방법과 관련하여 설명된 피쳐

중 하나 이상을 선택적으로 포함할 수 있다. 간결함을 위해, 본 출원에 개시된 피처들의 조합은 개별적으로 열거되지 않고 피처들의 각각의 기본 세트로 반복되지 않는다. 독자는 본 항목에서 식별된 피처가 구현예로 식별된 기본 피처들의 세트들과 어떻게 쉽게 조합될 수 있는지를 이해할 것이다.

[0391] 방법의 프로세스 단계를 반복적으로 적용하여 향상된 해상도 이미지의 시퀀스를 생성할 수 있다. 향상된 해상도 이미지의 시퀀스는 다수의 사이클 동안 센서에 의해 이미지화된 샘플을 시퀀싱하는 데 사용할 수 있다.

[0392] 서브타일 각각은 광학 센서의 적어도 512 x 512 픽셀을 포함한다. 256, 1024, 2048 및 4096, 또는 256 내지 4096 픽셀의 범위를 포함하여 더 많거나 혹은 적은 수를 사용할 수 있다. 서브타일 차원이 2의 거듭제곱일 때 성능이 향상될 수 있으며, 잘 작동하는 것으로 확인된 실제 범위는 512 및 1024픽셀이다.

[0393] 서브타일은 광학 센서의 적어도 2개의 픽셀만큼 중첩될 수 있다. 더 많거나 혹은 적은 수를 사용할 수 있으며, 예를 들어 512개의 경우 256개 픽셀의 중첩이 적절하고 1024개의 경우 512개의 중첩이 적절할 것이다.

[0394] 방법은 서브타일에 대한 향상된 해상도 이미지를 향상된 해상도 집계 이미지로 집계하고 향상된 해상도 집계를 사용하여 다수의 사이클에 걸쳐 샘플을 시퀀싱하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0395] 방법은 플로우 셀에 걸쳐 분포된 수백만 개의 샘플의 형광을 캡처하는 플로우 셀에 걸친 위치에 있는 이미지 타일에 추가로 적용될 수 있다. 방법의 이러한 적용은 플로우 셀의 향상된 이미지를 생성한다.

[0396] 이미징 평면이 플로우 셀인 경우, 샘플은 플로우 셀에 걸쳐 수백만 개의 나노웰에 분포될 수 있다. 나노웰의 적어도 일부 인접 쌍은 광학 해상도에 대한 아베 회절 한계보다 더 가깝게 위치할 수 있다. 구조화 조명은 이러한 근접 위치 결정을 허용한다. 대안적으로, 샘플들을 플로우 셀에 걸쳐 무작위로 분포시킬 수 있다. 이러한 구현예에서, 방법은 플로우 셀에 대한 향상된 이미지의 시퀀스를 생성하고 샘플의 시퀀스를 호출하기 위해 향상된 이미지의 시퀀스를 사용하는 단계를 더 포함한다.

[0397] 위에서 설명한 컴퓨터 구현 방법은 컴퓨터 하드웨어를 포함하는 시스템에서 실행될 수 있다. 컴퓨터 구현 시스템은 위에 설명된 방법 중 하나 이상을 실행할 수 있다. 컴퓨터 구현 시스템은 시스템에 의해 구현된 방법에 적용되는 바로 위에 또는 본 출원 전체에 걸쳐 설명된 방법의 임의의 특징을 통합할 수 있다. 간결함을 위해, 시스템 기능의 대안적 조합은 개별적으로 열거되지 않는다. 시스템, 방법 및 제조 물품에 적용 가능한 피처는 기본 피처들 각각의 법정 클래스 세트에 대해 반복되지 않는다. 독자는 본 항목에서 식별된 피처가 다른 법정 클래스의 기본 피처와 어떻게 쉽게 조합될 수 있는지 이해할 것이다.

[0398] 방법이라기 보다는 제조 물품으로서, 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체(CRM)에는 프로세서에 의해 실행가능한 프로그램 명령어가 로딩될 수 있다. 프로그램 명령어는 실행될 때, 위에 기술된 컴퓨터 구현 방법들 중 하나 이상을 구현한다. 대안적으로, 프로그램 명령어는 비일시적 CRM 상에 로딩될 수 있고, 적절한 하드웨어와 조합될 때, 개시된 방법을 실시하는 하나 이상의 컴퓨터 구현 시스템의 구성요소가 될 수 있다.

[0399] 방법 구현예에 대한 본 특정 구현 항목에서 논의된 각각의 피처는 CRM 및 시스템 구현예에 동일하게 적용된다. 위에 나타낸 바와 같이, 모든 방법 피처는 간결함을 위해 본원에 반복되지 않으며 참조로 반복되는 것으로 간주되어야 한다.

[0400] **비중복 SIM 이미지 재구성 애플리케이션**

[0401] 개시된 기술은 표적의 구조화 조명으로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하는 데 필요한 컴퓨팅 리소스를 저감시키는 것에 관한 것이다.

[0402] 개시된 기술의 일 구현예에서, 구조화 조명 하에서 캡처된 표적의 이미지로부터 향상된 해상도 이미지를 생성하기 위한 방법이 설명된다. 이러한 방법은 비중복 데이터에 하나 이상의 변환을 적용한 다음 변환 후 비중복 데이터로부터 중복 데이터를 복구한다.

[0403] 방법은 공간 도메인에서 센서에 의해 캡처된 표적의 적어도 3개의 이미지를 변환하는 단계를 포함한다. 이러한 센서는 하나의 각도를 따라 구조화 조명의 적어도 3 위상 변위로부터 이미지를 캡처한다. 공간 도메인에서 캡처된 3개의 이미지는 푸리에 도메인으로 변환되어 3개 이상의 주파수 도메인 행렬을 생성한다. 이들 주파수 도메인 행렬에는 최소한 비중복 성분과 중복 켤레 성분이 포함된다. 중복 켤레 성분은 상보적 행렬 위치에 있는 비중복 성분의 켤레이다. 방법은 역 혼합 행렬을 생성하기 위해 추정된 재구성 파라미터를 사용하는 단계 및 역 혼합 행렬을 적어도 비중복 성분에 적용하는 단계를 더 포함한다. 이는 푸리에 도메인에서 시프트되지 않은 행렬과 시프트된 행렬인 적어도 3개의 위상 분리 행렬을 생성한다. 이들 행렬은 역 혼합 행렬을 주파수 도메인 행

렬의 비중복 성분에 적용함으로써 유도된 비중복의 시프트되지 않은 성분 및 비중복의 시프트된 공간 주파수 성분을 포함한다.

[0404] 방법은 또한 위상 분리 행렬의 적어도 비중복 성분에 대해 하나 이상의 중간 변환을 수행하는 단계를 포함한다. 하나의 중간 작업은 서브픽셀 시프팅이다. 이는 적어도 시프트된 행렬의 비중복 시프트된 공간 주파수 성분을 푸리에 도메인에서 공간 도메인으로 변환하는 단계를 포함한다. 그 다음, 공간 도메인의 데이터에 병진 벡터를 적용하고 공간 도메인 데이터로부터의 병진 데이터를 푸리에 도메인에서 다시 하나 이상의 재정렬 시프트된 행렬로 변환하는 단계를 포함한다. 병진 벡터를 적용하게 되면, 푸리에 도메인에서의 시프트된 행렬의 중첩 값들이, 이산 푸리에 변환의 전체 행렬 위치보다 더 정확하게, 시프트되지 않은 행렬로 효과적으로 재정렬된다. 중복 켤레 성분은 중간 변환 후, 변환된 값을 비중복 성분으로부터 중복 켤레 성분의 상보적 행렬 위치로 복사하고 복사된 값의 허수 부분의 부호를 변경하여 변환된 중복 켤레 성분을 생성함으로써, 비중복 성분으로부터 복구될 수 있다. 이렇게 하면 중간 변환 중에 필요로 하는 리소스가 저감된다. 향상된 해상도 이미지를 구성하는 단계는 시프트되지 않은 행렬과 시프트된 행렬의 중첩 값을 정렬하고 합산하여 확장된 주파수 커버리지 행렬을 생성한 다음, 푸리에 도메인에서 확장된 주파수 커버리지 행렬을 역변환하여 공간 도메인에서 향상된 해상도 이미지를 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0405] 일부 구현예에서, 전술한 작업을 반복적으로 적용함으로써 일련의 향상된 해상도 이미지가 생성된다. 선택적으로, 예컨대 합성에 의한 시퀀싱에서, 개시된 기술은 일련의 향상된 해상도 이미지를 사용하여 다수의 사이클 동안 센서에 의해 이미지화된 샘플을 시퀀싱하는 데 적용될 수 있다.

[0406] 본 방법 및 개시된 기술의 다른 구현예는 각각 다음의 피쳐 및/또는 개시된 추가 방법과 관련하여 설명된 피쳐 중 하나 이상을 선택적으로 포함할 수 있다. 간결함을 위해, 본 출원에 개시된 피쳐들의 조합은 개별적으로 열거되지 않고 피쳐들의 각각의 기본 세트로 반복되지 않는다. 독자는 본 항목에서 식별된 피쳐가 구현예로 식별된 기본 피쳐들의 세트들과 어떻게 쉽게 조합될 수 있는지를 이해할 것이다.

[0407] 개시된 기술은 코너 시프트된 행렬에 배열된 성분에 적용될 수 있으며, 중복 켤레 성분의 상보적 행렬 위치는 비중복 성분의 행렬 위치로부터 180도 회전된다.

[0408] 방법은 중간 작업 동안 노이즈를 줄이기 위해 1단계 또는 2단계 위너 필터링을 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다. 2단계 위너 필터링이 적용될 때, 독립 변조 전달 함수는 공간 주파수가 증가함에 따라 콘트라스트를 전달하는 능력이 감소하는 대물 렌즈에 의한 콘트라스트의 광학적 전달을 보상하기 위해 중간 변환으로 위상 분리 행렬에 적용될 수 있다. 위너 필터링의 노이즈 제거 성분은 나중에 별도로 적용할 수 있다. 중간 작업은 아포디제이션 필터링을 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0409] 일부 구현예에서, 푸리에 도메인의 위상 분리 행렬은 짝수의 행과 짝수의 열을 포함한다. 이들 짝수 차원 행렬의 경우, 열 평균화를 중간 연산으로 적용하여 짝수 차원 행렬의 중심에서 한 열을 넘어 중간 열을 이용하여 DC 성분의 DC 열을 평균화 수 있다. 이러한 열 평균화는 서브픽셀 시프팅에 선행할 수 있다.

[0410] 일부 구현예에서, 푸리에 도메인의 위상 분리 행렬은 코너 시프트된다. 그 다음, DC 성분은 행렬의 상단 행 또는 하단 행과 좌측 열 또는 우측 열에 나타나고 중복 켤레 성분은 비중복 성분의 배향으로부터 180도 회전된 블록에 나타난다.

[0411] 일부 구현예에서, 푸리에 도메인의 위상 분리 행렬은 비중복 성분과 중복 켤레 성분의 블록들 사이에 열이 없는 홀수의 행 및 홀수의 열을 포함한다. 홀수 행렬에서, 중복 켤레 성분은 비중복 성분의 배향으로부터 180도 회전된 블록에도 나타난다.

[0412] 표적이 장방형 패턴으로 배열된 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하는 구현예에서, 방법은 표적의 구조화 조명의 2개의 각도를 따라 - 2개의 각도는 장방형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따름 - 위상 변위로부터 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용될 수 있다. 대안적으로, 표적이 육각형 패턴으로 배열된 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하는 구현예에서, 방법은 표적의 구조화 조명의 3개의 각도 - 이 3개의 각도는 육각형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따름 - 를 따라 위상 변위로부터 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용될 수 있다.

[0413] 방법은 2개의 단계의 중간 작업 동안 위너 필터링을 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다. 2개의 단계로 수행될 때 위상 분리 행렬에 독립적인 변조 전달 함수를 적용하여 구조화 조명 하에서 표적을 센서로 전달하는 대물 렌즈에 의해 공간 주파수가 증가함에 따라 감소하는 콘트라스트의 광학 전달을 보상하는 단계를 포함한다. 이는 위너 필터링 또는 또 다른 동등한 필터의 노이즈 제거 성분을 적용하는 단계를 더 포함한다.

[0414] 방법은 중간 작업 동안 아포디제이션 필터를 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0415] 푸리에 도메인에서 위상 분리 행렬은 짝수의 행과 짝수의 열을 포함할 수 있다. 이러한 짝수 행렬에 대해, 방법은 비중복 성분과 중복 켤레 성분의 블록들 사이에서 중간 열을 갖는 DC 성분의 DC 열을 평균화하기 위해 중간 연산 동안 열 평균화를 적용하는 단계를 더 포함할 수 있다. 열 평균화는 서브픽셀 시프팅에 선행할 수 있다.

[0416] 푸리에 도메인에서 위상 분리 행렬이 좌측 상단 코너로 시프트되면, DC 성분은 행렬의 상단 행과 좌측 열에 나타날 수 있으며 중복 켤레 성분은 배향으로부터 180도 회전된 블록에 비중복 성분으로 나타난다. 대안적으로, 위상 분리 행렬을 우측 하단 코너로 시프트할 수 있다.

[0417] 푸리에 도메인의 위상 분리 행렬은 대안적으로 홀수의 행과 홀수의 열을 포함할 수 있다. 이러한 홀수 행렬은 비중복 성분과 중복 켤레 성분의 블록들 사이의 중간 열을 포함하지 않는다.

[0418] 방법은 또한 표적의 구조화 조명의 2개의 각도를 따른 위상 변위로부터 공간 도메인의 센서에 의해 렌즈를 통해 캡처된 표적의 적어도 3개의 이미지들의 세트에 적용될 수 있다. 표적이 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함하는 경우, 2개의 각도는 실질적으로 규칙적으로 이격된 나노웰 중 사변형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따라 배향될 수 있다. 이들 사변형은 정방형일 수 있고 2개의 각은 1 내지 3도 내에서 실질적으로 직교할 수 있다. 대안적으로, 방법은 표적의 구조화 조명의 3개의 각도를 따라 위상 변위로부터 이미지들의 세트에 적용될 수 있다. 이는 표적이 육각형 패턴으로 규칙적으로 이격된 나노웰을 포함할 때 유용하다. 이 패턴을 이용하면, 3개의 각이 패턴에서 육각형의 대향 코너들 사이의 대각선을 따라 있을 수 있다.

[0419] 위에서 설명한 컴퓨터 구현 방법은 컴퓨터 하드웨어를 포함하는 시스템에서 실행될 수 있다. 컴퓨터 구현 시스템은 위에 설명된 방법 중 하나 이상을 실행할 수 있다. 컴퓨터 구현 시스템은 시스템에 의해 구현된 방법에 적용되는 바로 위에 또는 본 출원 전체에 걸쳐 설명된 방법의 임의의 특징을 통합할 수 있다. 간결함을 위해, 시스템 기능의 대안적 조합은 개별적으로 열거되지 않는다. 시스템, 방법 및 제조 물품에 적용 가능한 피처는 기본 피처들 각각의 법정 클래스 세트에 대해 반복되지 않는다. 독자는 본 항목에서 식별된 피처가 다른 법정 클래스의 기본 피처와 어떻게 쉽게 조합될 수 있는지 이해할 것이다.

[0420] 방법이라기 보다는 제조 물품으로서, 비일시적 컴퓨터 판독 가능 매체(CRM)에는 프로세서에 의해 실행가능한 프로그램 명령어가 로딩될 수 있다. 프로그램 명령어는 실행될 때, 위에 기술된 컴퓨터 구현 방법들 중 하나 이상을 구현한다. 대안적으로, 프로그램 명령어는 비일시적 CRM 상에 로딩될 수 있고, 적절한 하드웨어와 조합될 때, 개시된 방법을 실시하는 하나 이상의 컴퓨터 구현 시스템의 구성요소가 될 수 있다.

[0421] 방법 구현예에 대한 본 특정 구현 항목에서 논의된 각각의 피처는 CRM 및 시스템 구현예에 동일하게 적용된다. 위에 나타낸 바와 같이, 모든 방법 피처는 간결함을 위해 본원에 반복되지 않으며 참조로 반복되는 것으로 간주되어야 한다.

[0422] 전술한 설명은 개시된 기술의 제작 및 사용을 가능하게 하기 위해 제시된다. 개시된 구현예에 대한 다양한 변형예는 명백할 것이며, 본원에서 정의된 일반적인 원리는 개시된 기술의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다른 구현예 및 애플리케이션에 적용될 수 있다. 따라서, 개시된 기술은 도시된 구현예로 제한되도록 의도된 것이 아니라, 본원에 개시된 원리 및 특징과 일치하는 가장 넓은 범주에 부합되어야 한다. 개시된 기술의 범위는 첨부된 청구범위에 의해 정의된다.

[0423] **컴퓨터 시스템**

[0424] **도 24**는 개시된 기술을 구현하는데 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템의 단순화된 블록 다이어그램이다. 컴퓨터 시스템은 버스 서브시스템을 통해 다수의 주변 디바이스와 통신하는 적어도 하나의 프로세서를 일반적으로 포함한다. 이러한 주변 디바이스는, 예를 들어 메모리 디바이스 및 파일 저장 서브시스템을 포함하는 저장 서브시스템, 사용자 인터페이스 입력 디바이스, 사용자 인터페이스 출력 디바이스, 및 네트워크 인터페이스 서브시스템을 포함할 수 있다. 입력 및 출력 디바이스는 컴퓨터 시스템과의 사용자 상호작용을 허용한다. 네트워크 인터페이스 서브시스템은 인터페이스를 다른 컴퓨터 시스템의 대응하는 인터페이스 디바이스에 대한 인터페이스를 포함하는 외부 네트워크에 제공한다.

[0425] 일 구현예에서, 3개의 파라미터(각도, 간격 및 위상 오프셋)를 추정하기 위한 파라미터 추정기(2401)는 저장 서브시스템 및 사용자 인터페이스 입력 디바이스에 통신 가능하게 연결된다.

[0426] 사용자 인터페이스 입력 디바이스는 키보드; 마우스, 트랙볼, 터치패드 또는 그래픽 태블릿과 같은 포인팅 디바이스; 스캐너; 디스플레이에 통합된 터치 스크린; 음성 인식 시스템 및 마이크와 같은 오디오 입력 디바이스;

및 기타 유형의 입력 디바이스를 포함할 수 있다. 일반적으로, 용어 "입력 디바이스"의 사용은 정보를 컴퓨터 시스템에 입력하기 위한 모든 가능한 유형의 디바이스 및 방식을 포함하도록 의도된다.

[0427] 사용자 인터페이스 출력 디바이스는 디스플레이 서브시스템, 프린터, 팩스 기계, 또는 오디오 출력 디바이스와 같은 비시각적 디스플레이를 포함할 수 있다. 디스플레이 서브시스템은 음극선관(CRT), 액정 디스플레이(LCD)와 같은 평면 디바이스, 프로젝션 디바이스, 또는 가시적인 이미지를 생성하기 위한 일부 다른 메커니즘을 포함할 수 있다. 디스플레이 서브시스템은 또한 오디오 출력 디바이스와 같은 비시각적 디스플레이를 제공할 수 있다. 대체적으로, "출력 디바이스"라는 용어의 사용은 정보를 컴퓨터 시스템으로부터 사용자에게 또는 다른 기계 또는 컴퓨터 시스템에 출력하기 위한 모든 가능한 유형들의 디바이스들 및 방식들을 포함하도록 의도된다.

[0428] 저장 서브시스템은 본원에 기술된 모듈들 및 방법들 중 일부 또는 전부의 기능을 제공하는 프로그래밍 및 데이터 구성을 저장한다. 이들 소프트웨어 모듈은 일반적으로 프로세서에 의해 단독으로 또는 다른 프로세서와 조합으로 실행된다.

[0429] 저장 서브시스템에 사용되는 메모리는 프로그램 실행 동안 명령어 및 데이터의 저장을 위한 메인 랜덤 액세스 메모리(RAM) 및 고정 명령어가 저장되는 판독 전용 메모리(ROM)를 포함하는 다수의 메모리를 포함할 수 있다. 파일 저장 서브시스템은 프로그램 및 데이터 파일을 위한 영구 저장소를 제공할 수 있고, 하드 디스크 드라이브, 연관된 착탈 가능 매체와 함께 플로피 디스크 드라이브, CD-ROM 드라이브, 광학 드라이브, 또는 착탈 가능 매체 카트리지를 포함할 수 있다. 소정 구현예의 기능을 구현하는 모듈은 저장 서브시스템 내의 파일 저장 서브시스템 또는 프로세서에 의해 액세스 가능한 다른 기계에 저장될 수 있다.

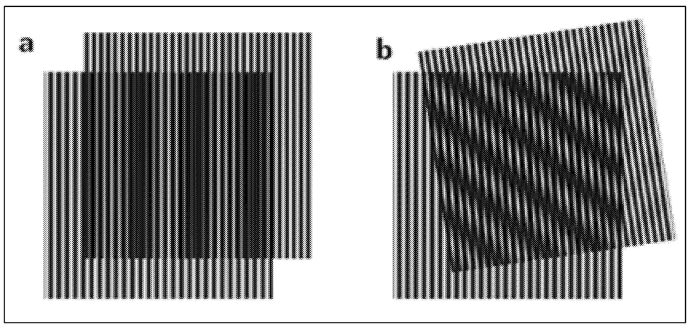
[0430] 버스 서브시스템은 컴퓨터 시스템의 다양한 컴포넌트 및 서브시스템이 의도된 대로 서로 통신하게 하기 위한 메커니즘을 제공한다. 버스 서브시스템이 개략적으로 단일 버스로서 도시되어 있지만, 버스 서브시스템의 대안적 구현예는 다수의 버스를 사용할 수 있다.

[0431] 컴퓨터 시스템 자체는 개인용 컴퓨터, 휴대용 컴퓨터, 워크스테이션, 컴퓨터 단말기, 네트워크 컴퓨터, 텔레비전, 메인프레임, 서버 팜, 느슨하게 네트워킹된 컴퓨터들의 광범위하게 분포된 세트, 또는 임의의 다른 데이터 프로세싱 시스템 또는 사용자 디바이스를 포함한 다양한 유형이 될 수 있다. 끊임없이 변화하는 컴퓨터와 네트워크의 특성으로 인해, **도 24**에 도시된 컴퓨터 시스템의 설명은 개시된 기술을 예시하기 위한 특정 예로서만 의도된다. **도 24**에 도시된 컴퓨터 시스템보다 더 많은 또는 더 적은 수의 구성요소를 갖는 컴퓨터 시스템의 많은 다른 구성이 가능하다.

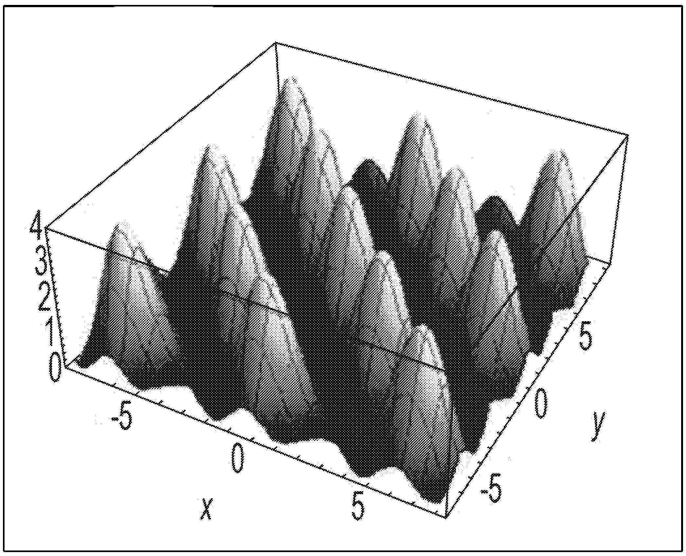
[0432] 딥 러닝 프로세서는 GPU 또는 FPGA일 수 있으며 Google Cloud Platform, Xilinx 및 Cirrascale과 같은 딥 러닝 클라우드 플랫폼에서 호스팅할 수 있다. 딥 러닝 프로세서의 예는 Google의 Tensor Processing Unit(TPU), GX4 Rackmount 시리즈, GX8 Rackmount 시리즈, NVIDIA DGX-1, Microsoft의 Stratix V FPGA, Graphcore의 IPU(Intelligent Processor Unit), Qualcomm의 Zeroth 플랫폼과 Snapdragon 프로세서, NVIDIA의 Volta, NVIDIA의 DRIVE PX, NVIDIA의 JETSON TX1/TX2 MODULE, Intel의 Nirvana, Movidius VPU, Fujitsu DPI, ARM의 DynamicIQ, IBM TrueNorth와 같은 랙마운트 솔루션 등을 포함한다.

도면

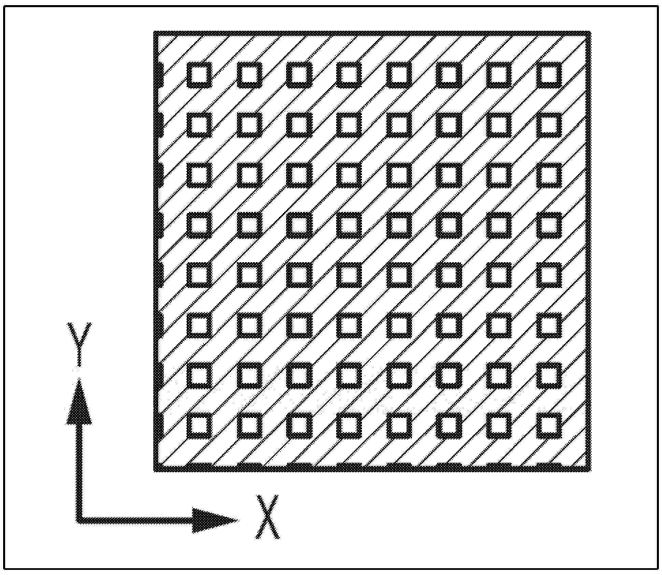
도면1a



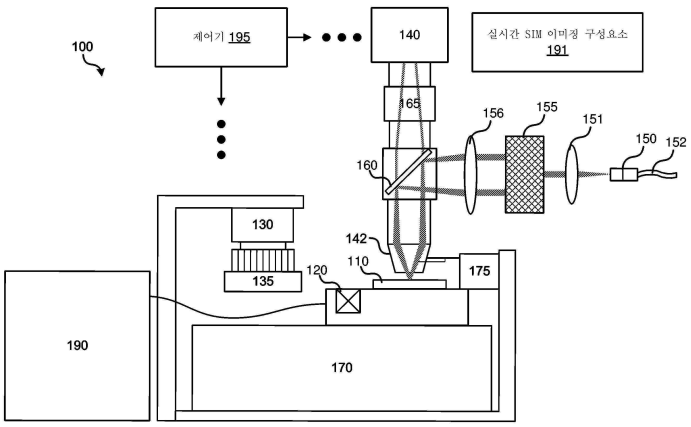
도면1b



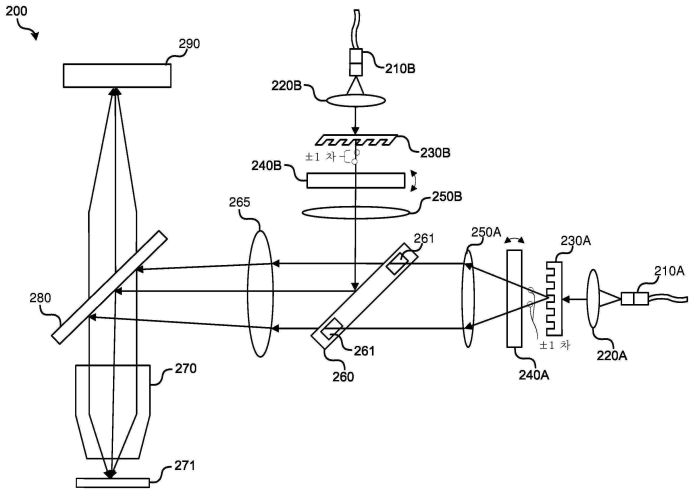
도면1c



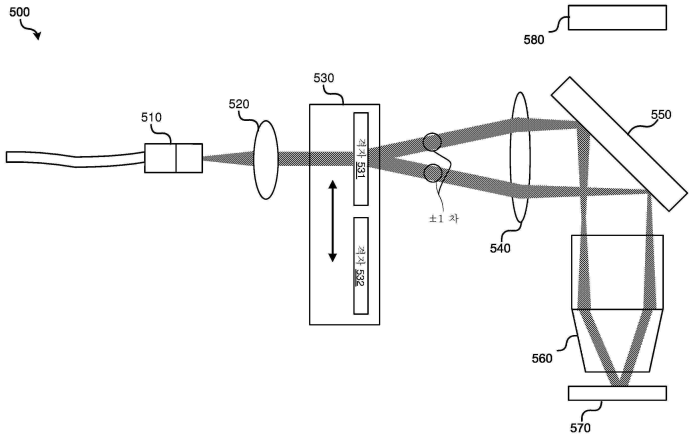
도면2



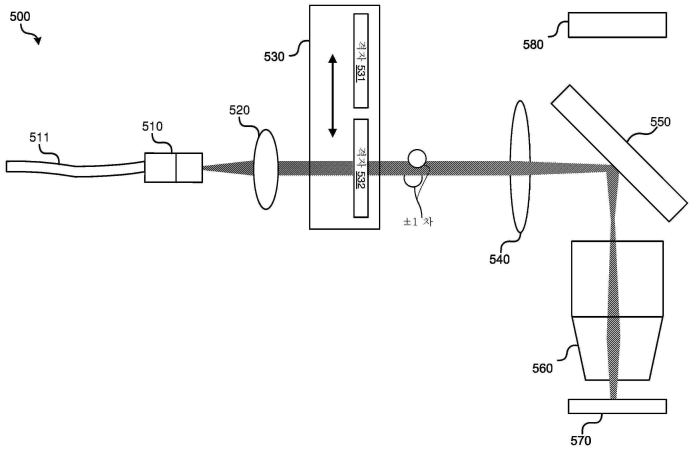
도면3



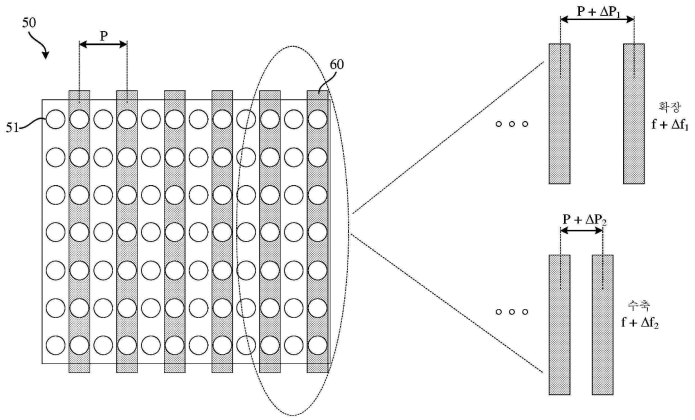
도면4a



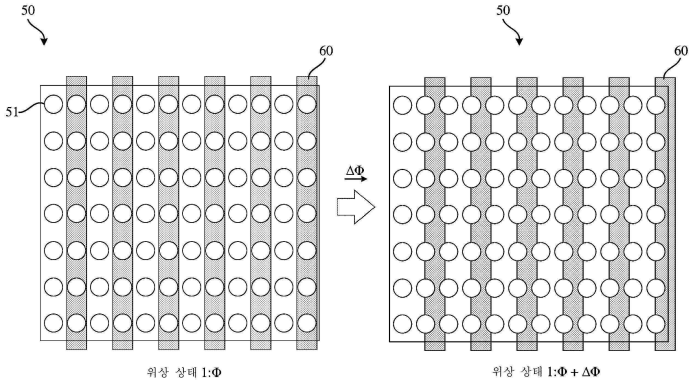
도면4b



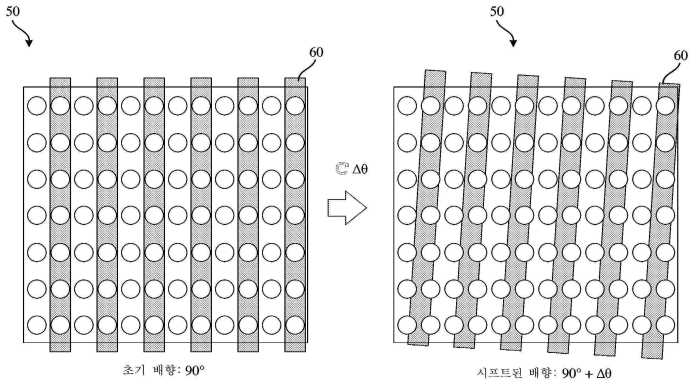
도면5a



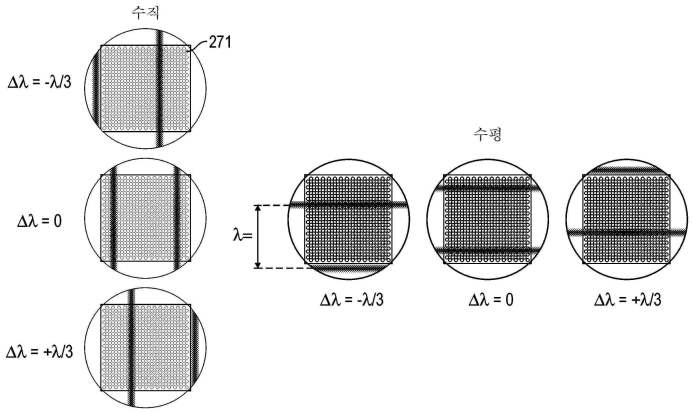
도면5b



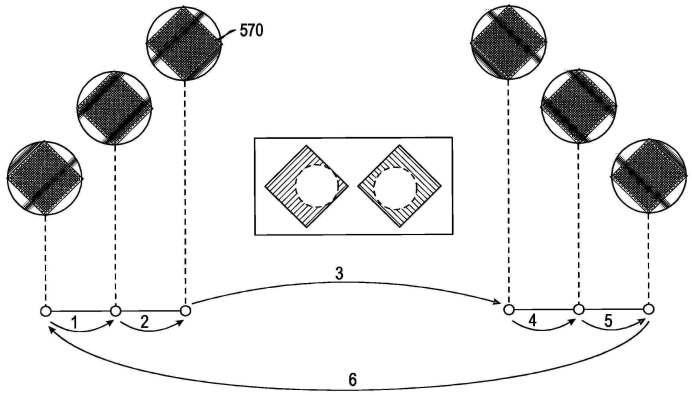
도면5c



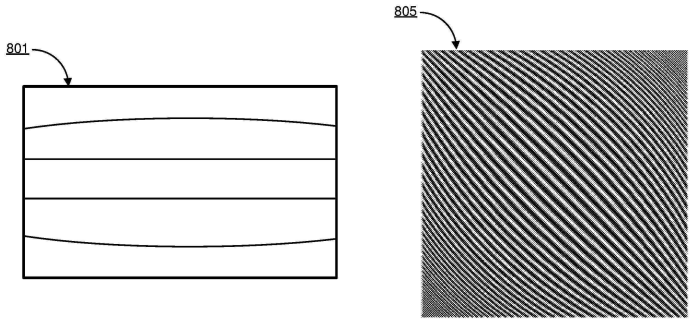
도면6



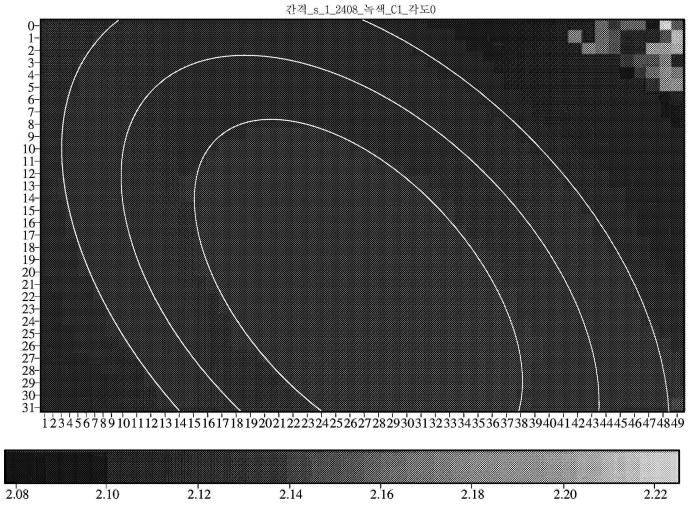
도면7



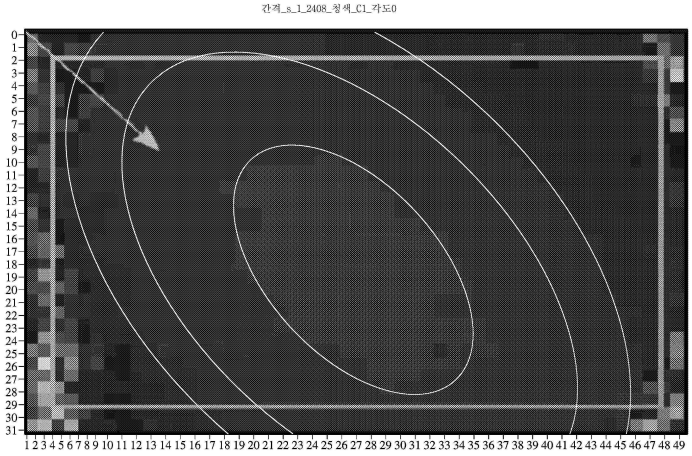
도면8a



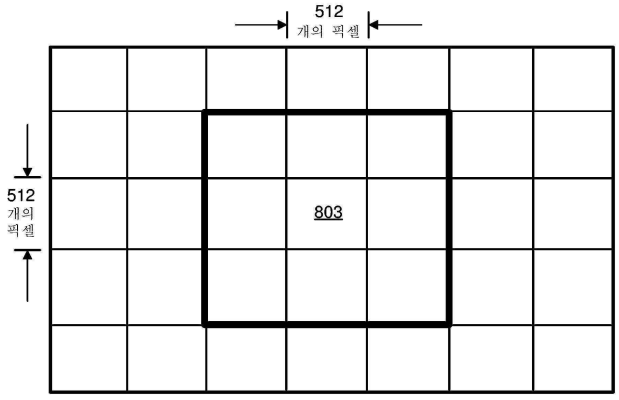
도면8b



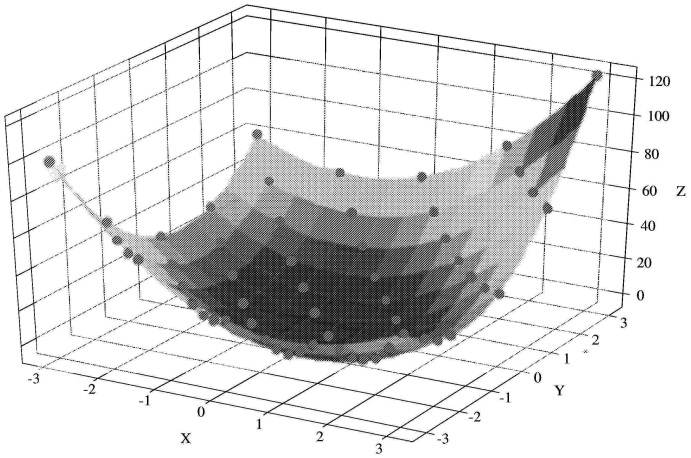
도면8c



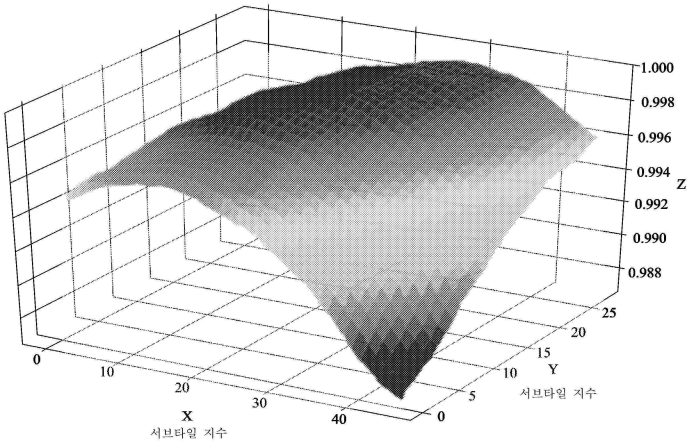
도면8d



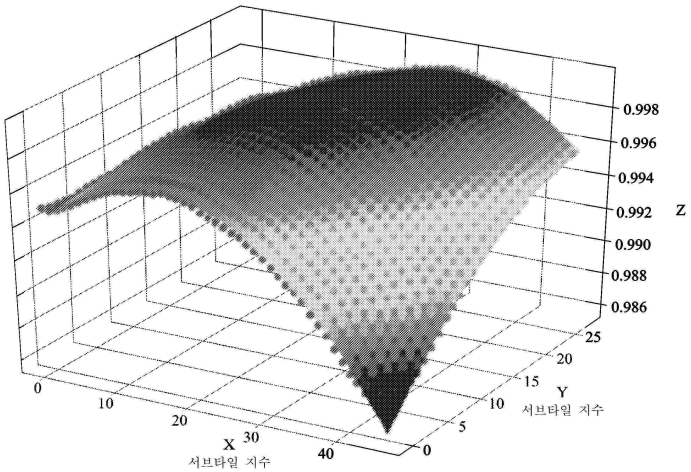
도면9



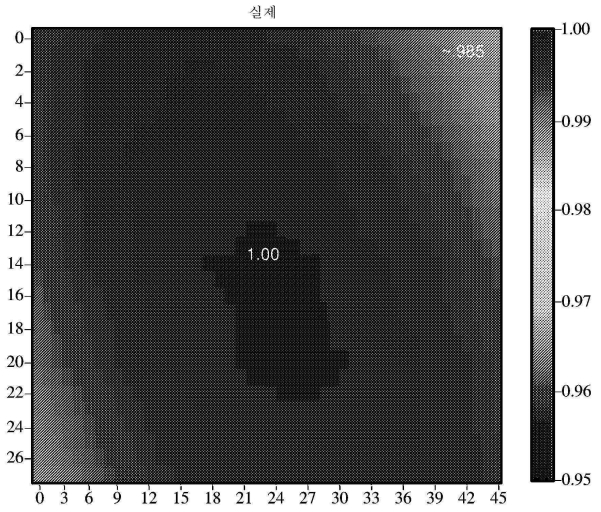
도면10a



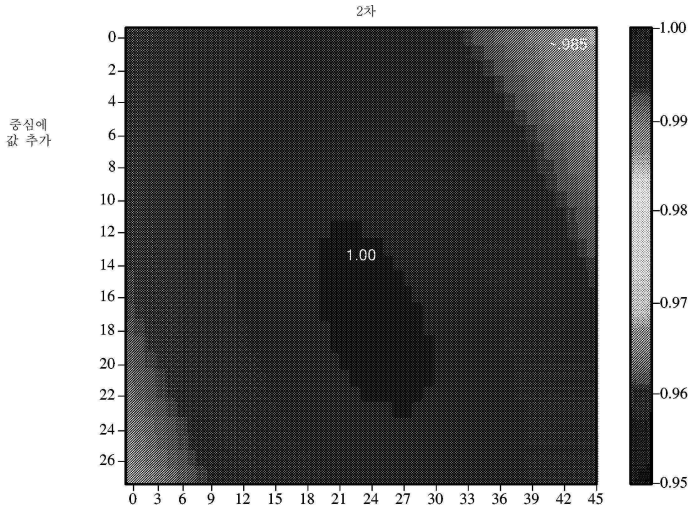
도면10b



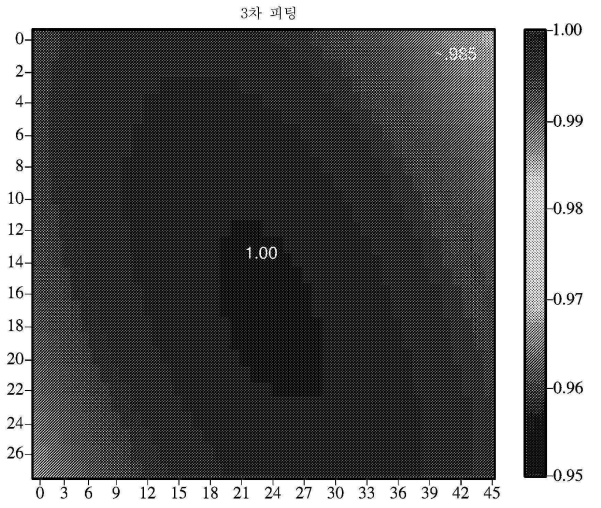
도면11a



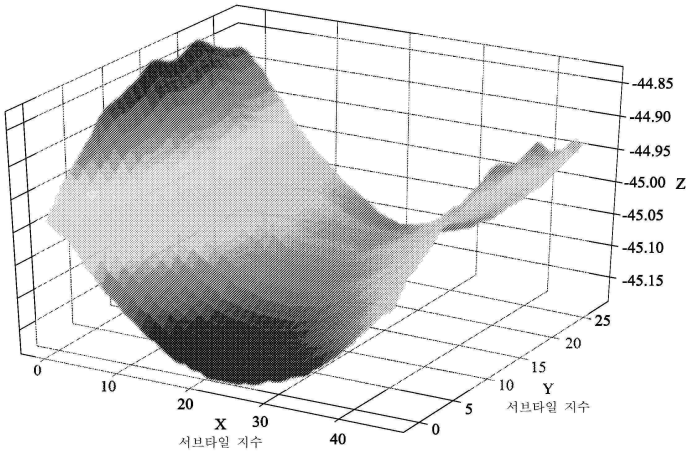
도면11b



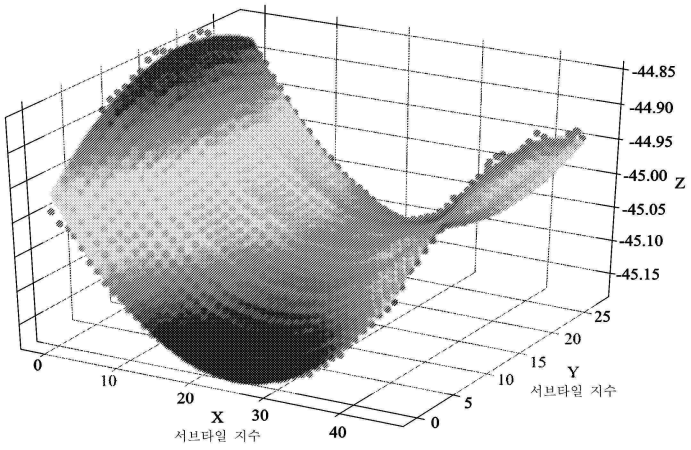
도면11c



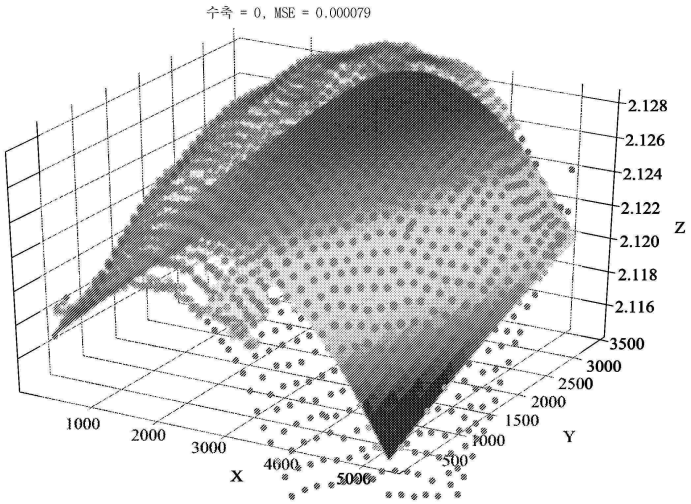
도면12a



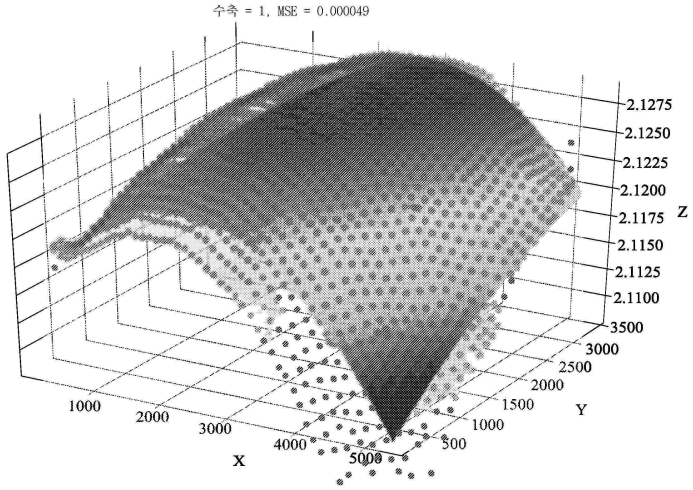
도면12b



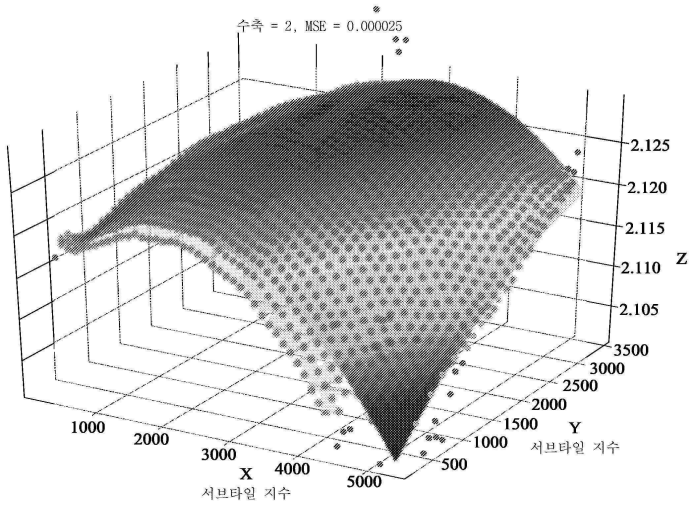
도면13a



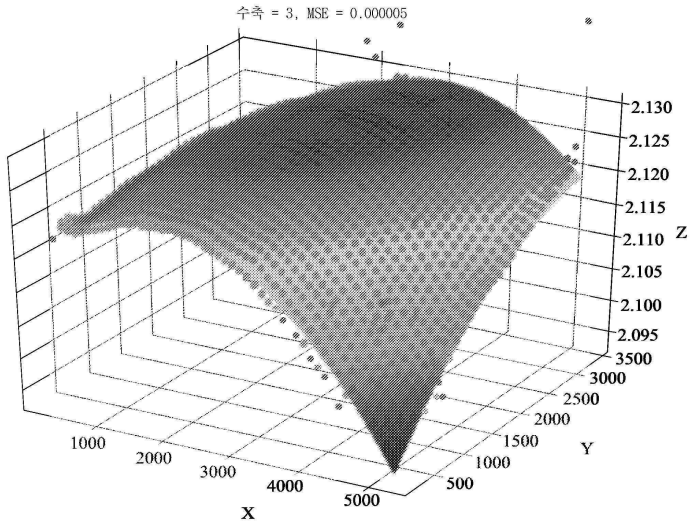
도면13b



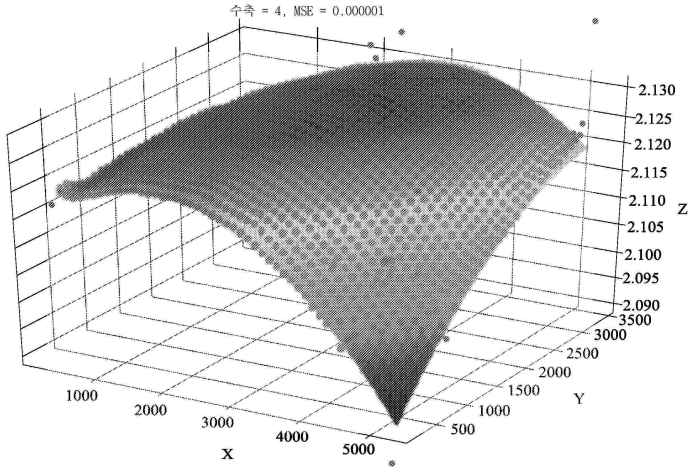
도면13c



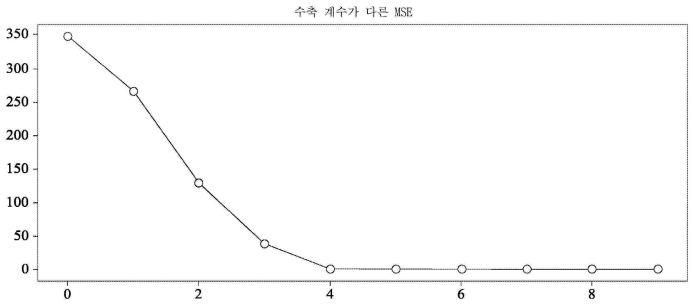
도면13d



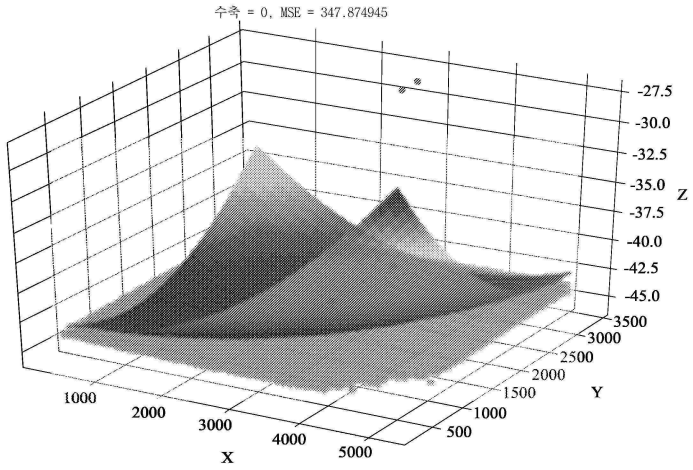
도면13e



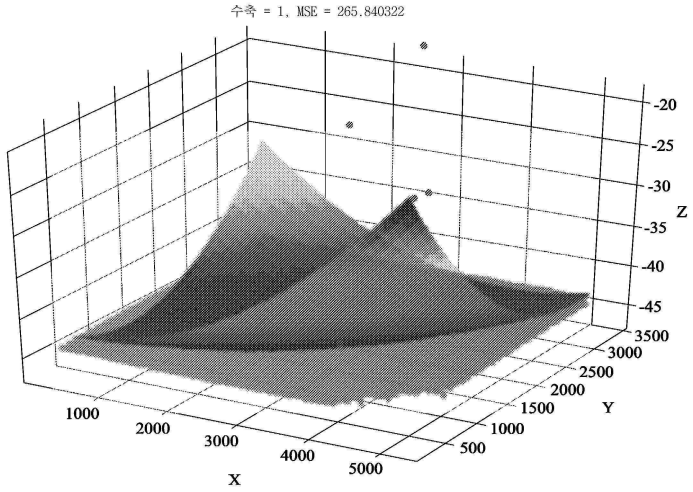
도면14a



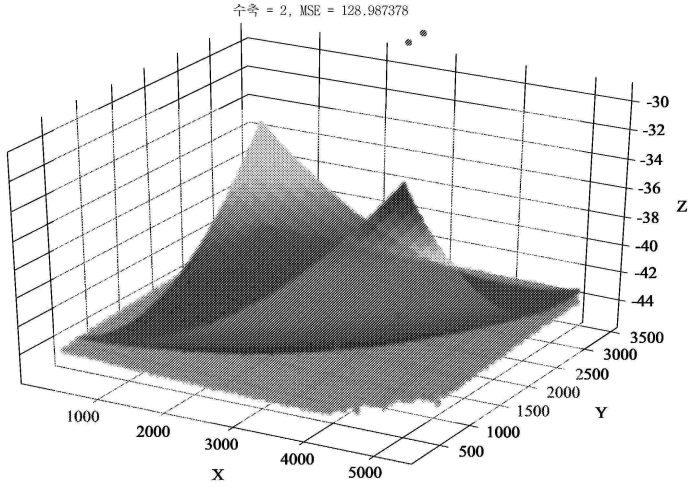
도면14b



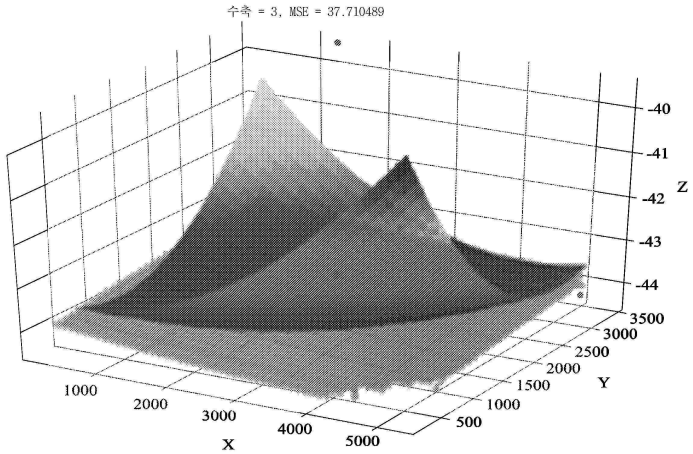
도면14c



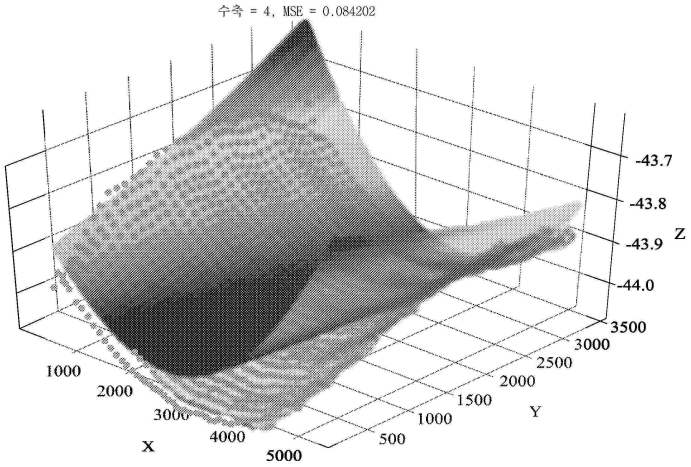
도면14d



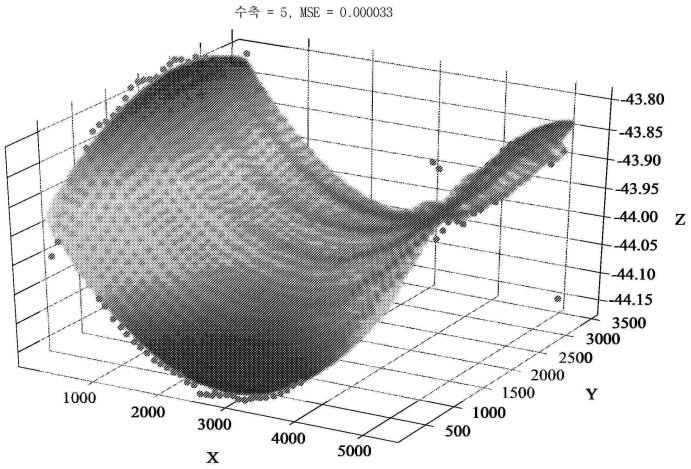
도면14e



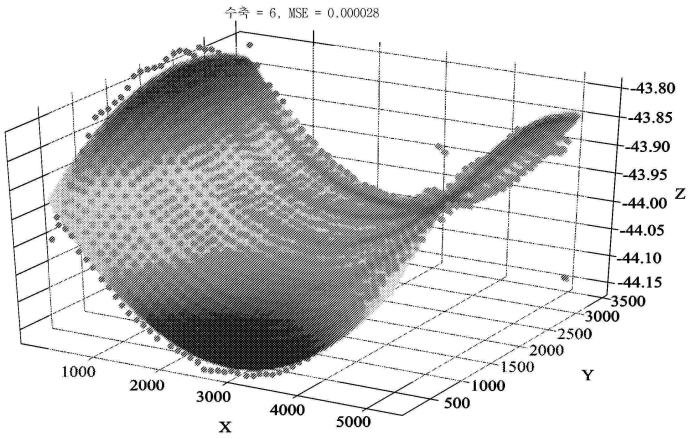
도면14f



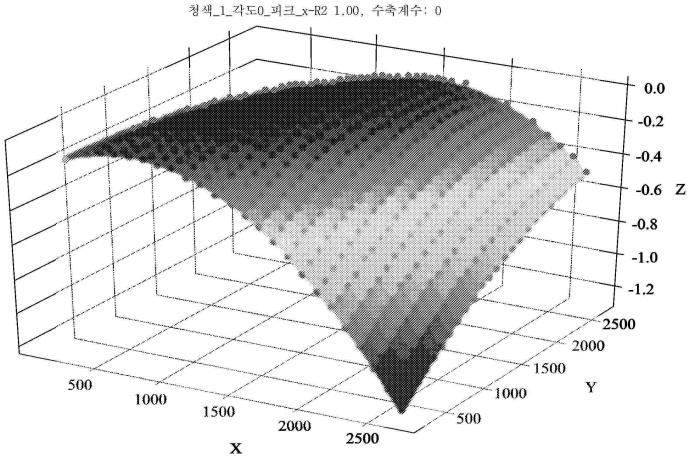
도면14g



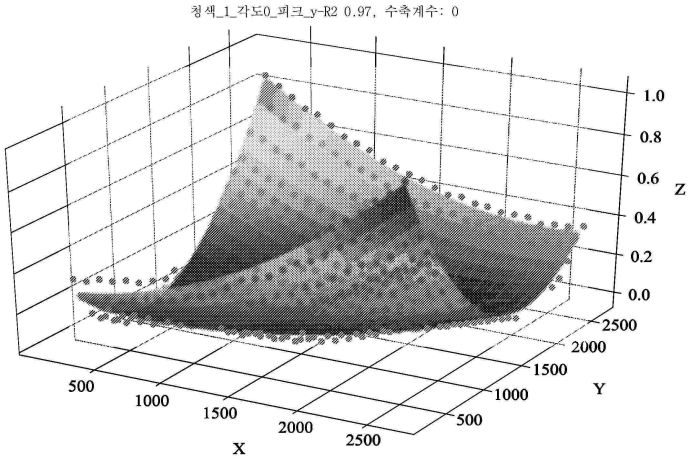
도면14h



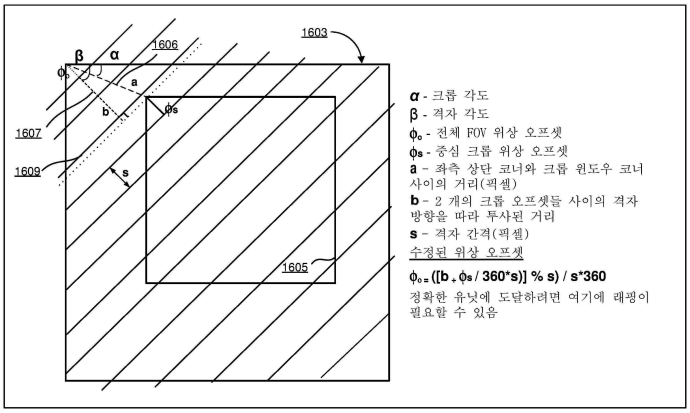
도면15a



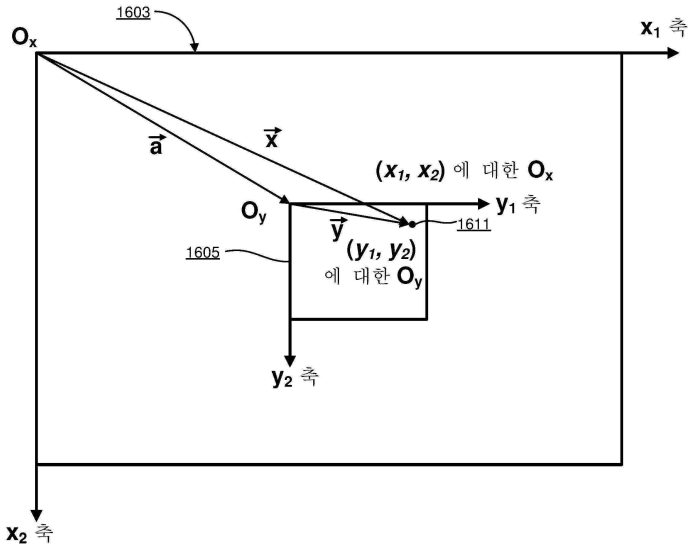
도면15b



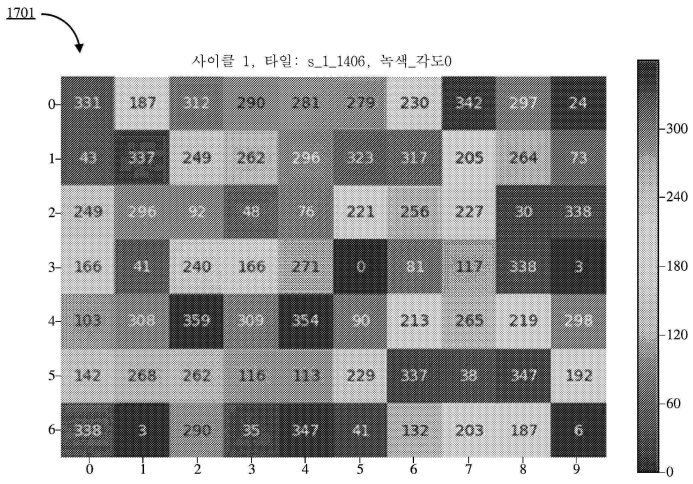
도면16a



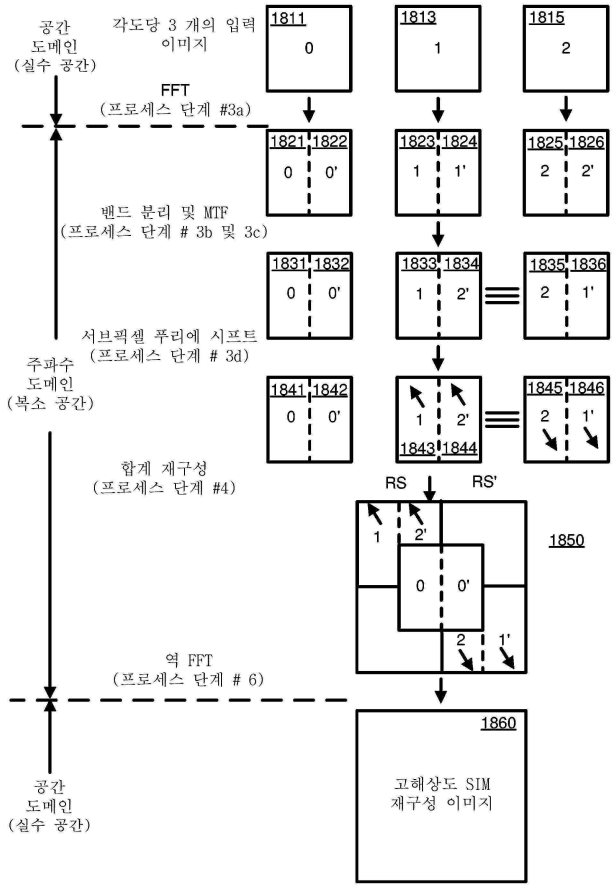
도면16b


1603
O_x
x_1 축
$\vec{a}$
$\vec{x}$
(x_1, x_2) 에 대한 O_x
O_y
y_1 축
$\vec{y}$
1611
(y_1, y_2)
에 대한 O_y
1605
y_2 축
x_2 축

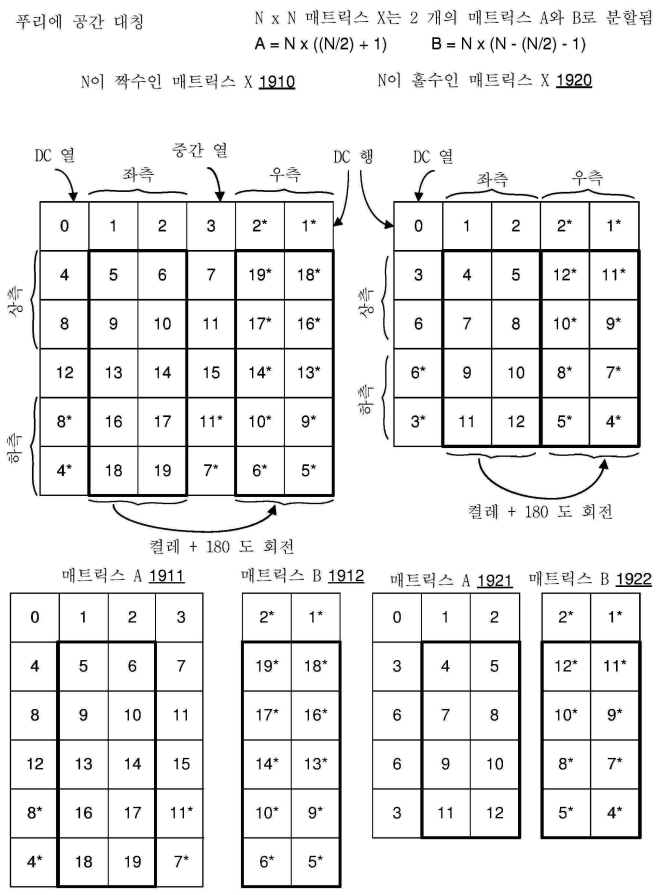
도면17


1701
사이클 1, 타일: s_1_1406, 녹색_각도0
0 331 187 312 290 281 279 230 342 297 24
1 43 337 249 262 296 323 317 205 264 73
2 249 296 92 48 76 221 256 227 30 338
3 166 41 240 166 271 0 81 117 338 3
4 103 308 359 309 354 90 213 265 219 298
5 142 268 262 116 113 229 337 38 347 192
6 338 3 290 35 347 41 132 203 187 6
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
300
240
180
120
60
0

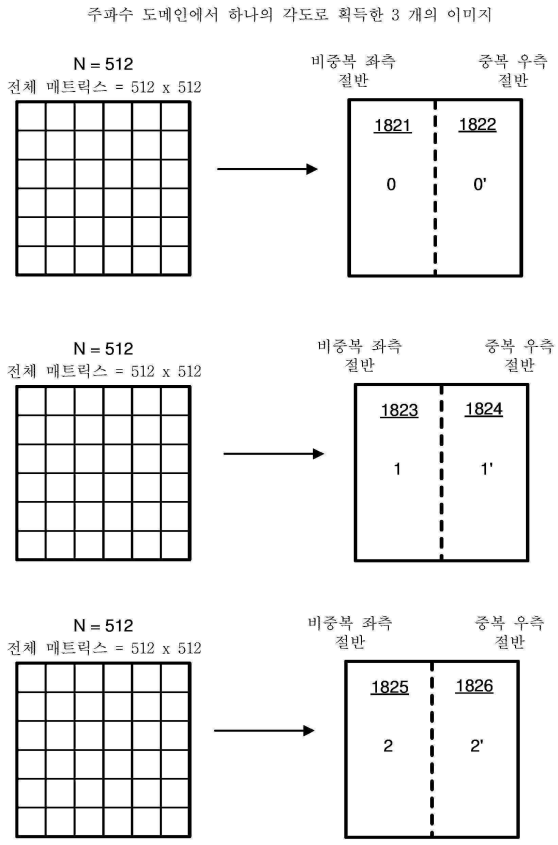
도면18


공간
도메인
(실수 공간)
각도당 3 개의 입력
이미지
1811
0
1813
1
1815
2
FFT
(프로세스 단계 #3a)
1821 1822
0 0'
1823 1824
1 1'
1825 1826
2 2'
밴드 분리 및 MTF
(프로세스 단계 # 3b 및 3c)
1831 1832
0 0'
1833 1834
1 2'
1835 1836
2 1'
서브픽셀 푸리에 시프트
(프로세스 단계 # 3d)
주파수
도메인
(복소 공간)
1841 1842
0 0'
1 2'
1843 1844
1845 1846
2 1'
합계 재구성
(프로세스 단계 #4)
RS
RS'
1
2'
0
0'
2
1'
1850
역 FFT
(프로세스 단계 # 6)
1860
고해상도 SIM
재구성 이미지
공간
도메인
(실수 공간)

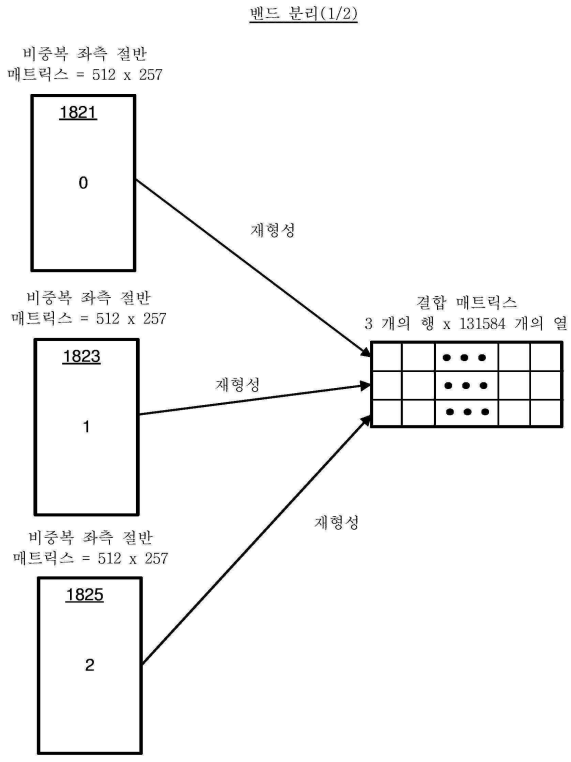
도면19


푸리에 공간 대칭
N x N 매트릭스 X는 2 개의 매트릭스 A와 B로 분할됨
A = N x ((N/2) + 1)
B = N x (N - (N/2) - 1)
N이 짝수인 매트릭스 X 1910
N이 홀수인 매트릭스 X 1920
DC 열
중간 열
좌측
우측
DC 행
상측
하측
컬레 + 180 도 회전
매트릭스 A 1911
매트릭스 B 1912
매트릭스 A 1921
매트릭스 B 1922

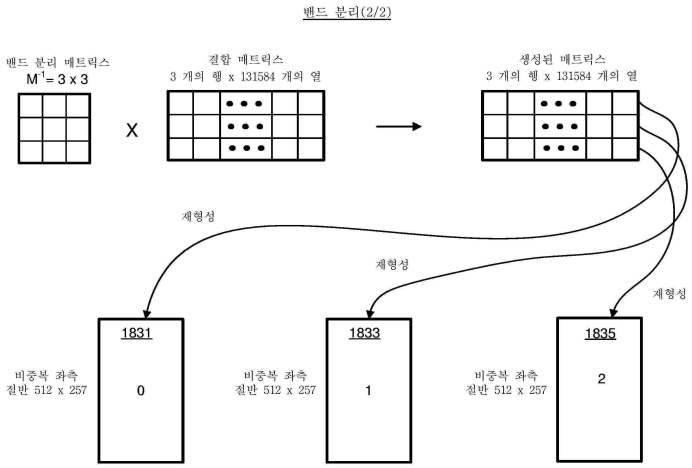
도면20


주파수 도메인에서 하나의 각도로 획득한 3 개의 이미지
N = 512
전체 매트릭스 = 512 x 512
비중복 좌측 절반
중복 우측 절반
1821
1822
0
0'
N = 512
전체 매트릭스 = 512 x 512
비중복 좌측 절반
중복 우측 절반
1823
1824
1
1'
N = 512
전체 매트릭스 = 512 x 512
비중복 좌측 절반
중복 우측 절반
1825
1826
2
2'

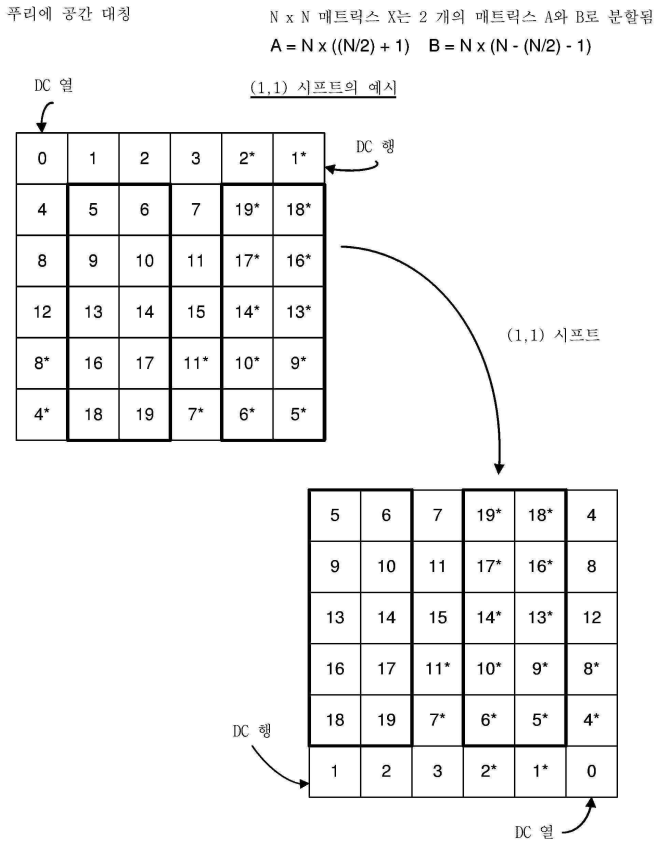
도면21


밴드 분리(1/2)
비중복 좌측 절반
매트릭스 = 512 x 257
1821
0
재형성
비중복 좌측 절반
매트릭스 = 512 x 257
1823
1
재형성
결합 매트릭스
3 개의 행 x 131584 개의 열
재형성
비중복 좌측 절반
매트릭스 = 512 x 257
1825
2

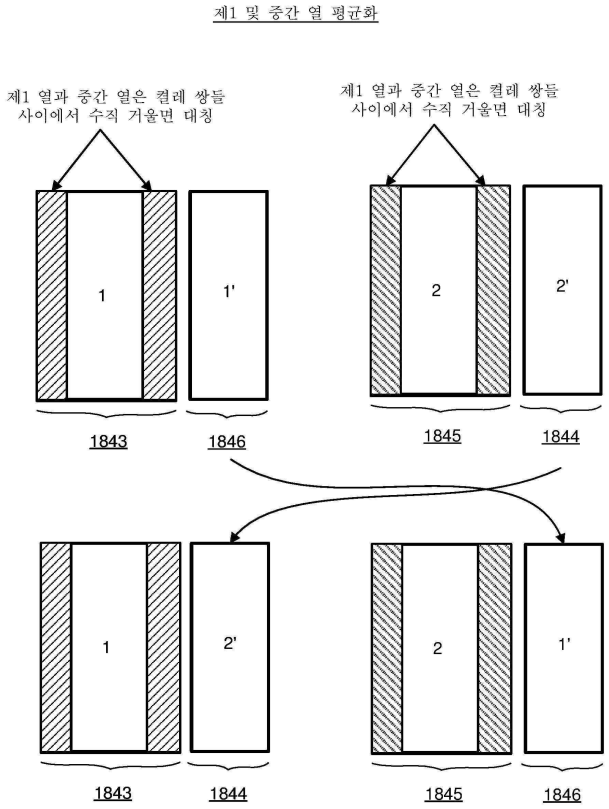
도면22


밴드 분리(2/2)
밴드 분리 매트릭스
M^{-1} = 3 x 3
결합 매트릭스
3 개의 행 x 131584 개의 열
생성된 매트릭스
3 개의 행 x 131584 개의 열
X
재형성
재형성
재형성
1831
0
1833
1
1835
2
비중복 좌측
절반 512 x 257
비중복 좌측
절반 512 x 257
비중복 좌측
절반 512 x 257

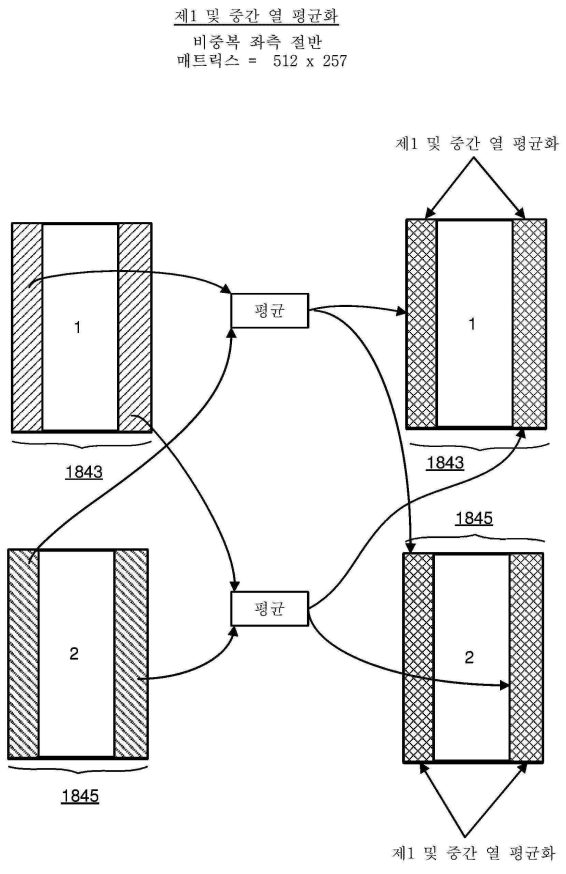
도면23a


푸리에 공간 대칭
N x N 매트릭스 X는 2 개의 매트릭스 A와 B로 분할됨
A = N x ((N/2) + 1) B = N x (N - (N/2) - 1)
DC 열
(1,1) 시프트의 예시
DC 행
(1,1) 시프트
DC 행
DC 열

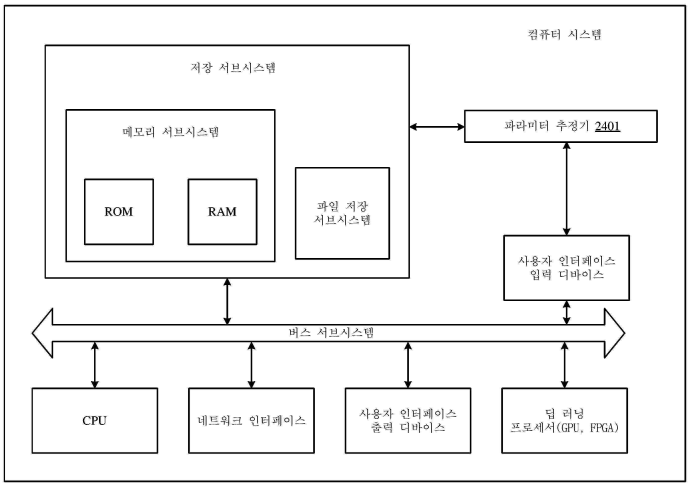
도면23b


제1 및 중간 열 평균화
제1 열과 중간 열은 컬레 쌍들 사이에서 수직 거울면 대칭
제1 열과 중간 열은 컬레 쌍들 사이에서 수직 거울면 대칭
1
1'
2
2'
1843
1846
1845
1844
1
2'
2
1'
1843
1844
1845
1846

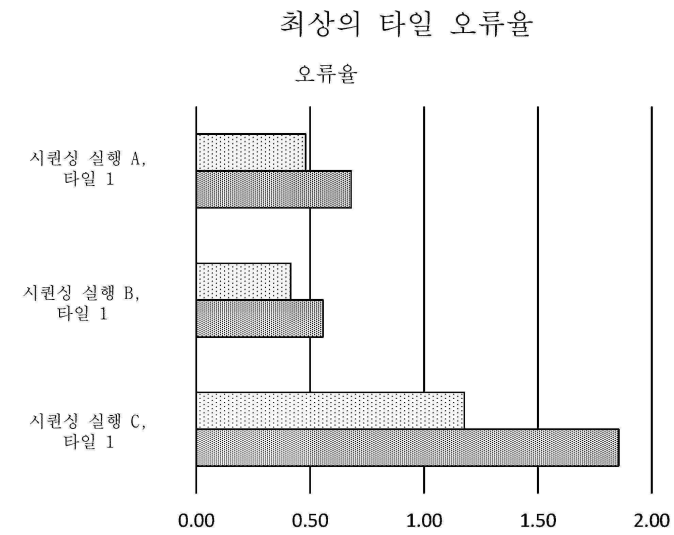
도면23c


제1 및 중간 열 평균화
비중복 좌측 절반
매트릭스 = 512 x 257
제1 및 중간 열 평균화
1
평균
1
1843
1843
1845
평균
2
2
1845
제1 및 중간 열 평균화

도면24

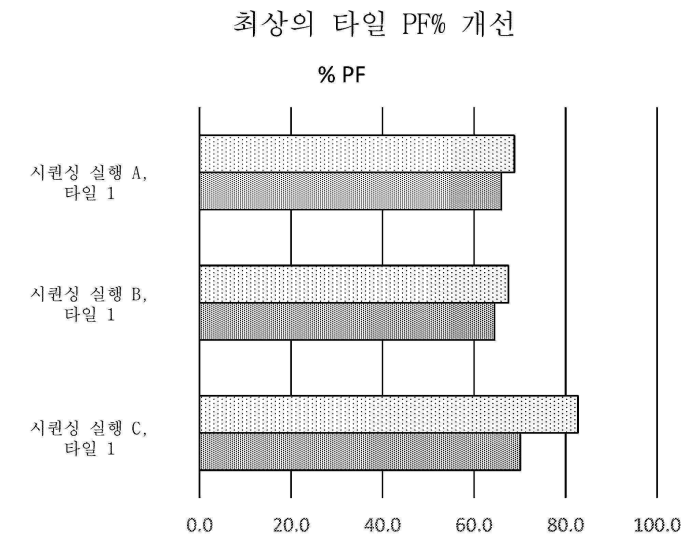


도면25a



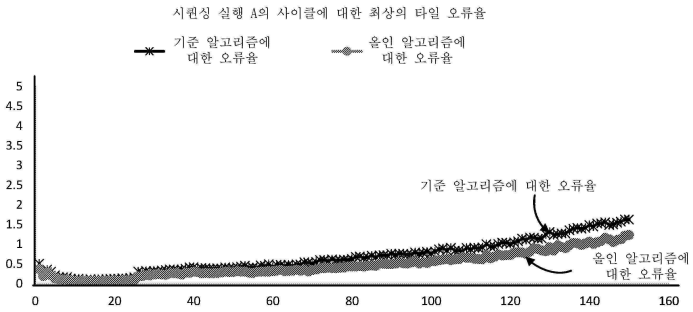
	시퀀싱 실행 A, 타일 1	시퀀싱 실행 B, 타일 1	시퀀싱 실행 C, 타일 1
오류율 올인(All In)	1.18	0.41	0.48
오류율 기준(Baseline)	1.85	0.56	0.68

도면25b

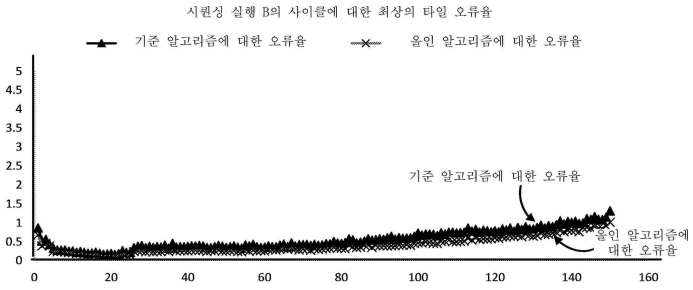


	시퀀싱 실행 A, 타일 1	시퀀싱 실행 B, 타일 1	시퀀싱 실행 C, 타일 1
PF 올인	82.7	67.5	68.8
PF 기준	70.1	64.5	65.9

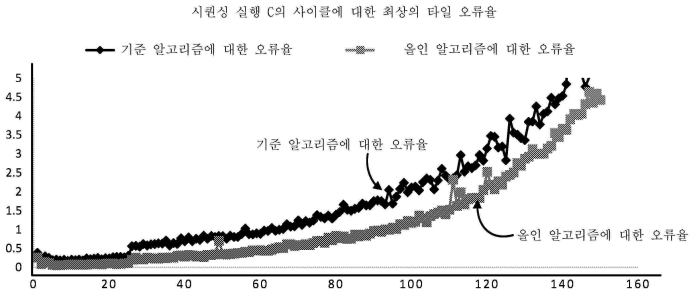
도면26a



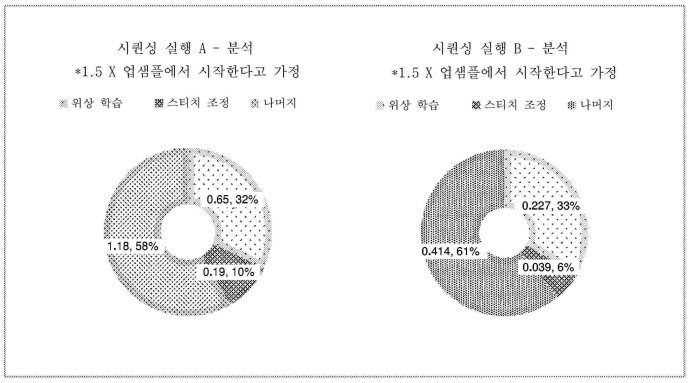
도면26b



도면26c


시퀀싱 실행 C의 사이클에 대한 최상의 타일 오류율
기준 알고리즘에 대한 오류율
올인 알고리즘에 대한 오류율
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
기준 알고리즘에 대한 오류율
올인 알고리즘에 대한 오류율

도면26d


시퀀싱 실행 A - 분석
*1.5 X 업샘플에서 시작한다고 가정
위상 학습
스티치 조정
나머지
0.65, 32%
1.18, 58%
0.19, 10%
시퀀싱 실행 B - 분석
*1.5 X 업샘플에서 시작한다고 가정
위상 학습
스티치 조정
나머지
0.227, 33%
0.414, 61%
0.039, 6%