(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0091943
(43) 공개일자 2019년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G06T 7/00 (2017.01) *G01N 21/17* (2006.01)
G06K 9/00 (2006.01) *G06T 5/20* (2006.01)
G06T 7/10 (2017.01) *G06T 7/40* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G06T 7/0012 (2013.01)
G06K 9/00134 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0011116
(22) 출원일자 2018년01월30일
심사청구일자 2018년01월30일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
경기도 과천시 관문로 143 (중앙동, 래미안 에코팰리스아파트) 1110동 1004호
히락 마줌달
서울특별시 마포구 신수동 서강대학교 RA관 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
지현조

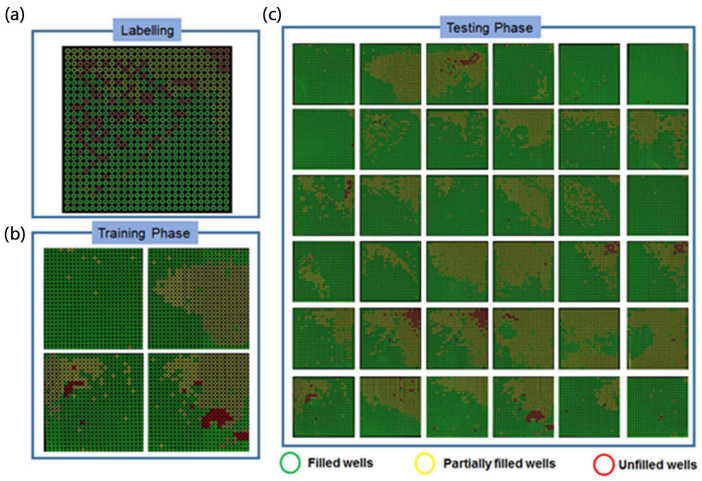
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석 알고리즘 형성방법**

(57) 요 약

형광물질에 의해서 표지된 대상물이 분주된 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법은, 마이크로웰 어레이의 웰들의 이미지를 획득하는 단계, 마이크로웰 어레이의 웰들을 채워진 웰, 부분적으로 채워진 웰 및 채워지지 않은 웰로 분류하는 라벨링 정보를 획득하는 단계, 획득된 이미지 및 라벨링 정보를 이용하여 마이크로웰 어레이의 웰들 중 일부 또는 전부를 채워진 웰, 부분적으로 채워진 웰 및 채워지지 않은 웰로 분류하는 제1차 분류 단계, 차분진화 알고리즘을 통해 부분적으로 채워진 웰을 채워진 웰 또는 채워지지 않은 웰로 분류하는 제2차 분류 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
G06T 5/20 (2013.01)
G06T 7/10 (2017.01)
G06T 7/40 (2013.01)
G01N 2021/1765 (2013.01)
G06T 2207/10064 (2013.01)
(72) 발명자
김태현
서울특별시 노원구 공릉동 567-12

이종민
서울특별시 은평구 역촌동 71-19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C3347
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 상용화 공통기반기술개발사업
연구과제명 기능성 마이크로기술을 이용한 세포의 균질화 및 약물 스크리닝 시스템 개발
기 여 율 4/10
주관기관 서강대학교
연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013K1A4A3055268
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관유치사업
연구과제명 서강-하버드 바이오물리 연구센터
기 여 율 3/10
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 3/10
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

형광물질에 의해서 표지된 대상물이 분주된 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에 있어서,

상기 마이크로웰 어레이의 웰들의 이미지를 획득하는 단계;

상기 마이크로웰 어레이의 웰들을 채워진 웰, 부분적으로 채워진 웰 및 채워지지 않은 웰로 분류하는 라벨링 정보를 획득하는 단계;

상기 획득된 이미지 및 상기 라벨링 정보를 이용하여 상기 마이크로웰 어레이의 웰들 중 일부 또는 전부를 상기 채워진 웰, 상기 부분적으로 채워진 웰 및 상기 채워지지 않은 웰로 분류하는 제1차 분류 단계;

차분진화 알고리즘을 통해 상기 부분적으로 채워진 웰을 채워진 웰 또는 채워지지 않은 웰로 분류하는 제2차 분류 단계;를 포함하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 라벨링 정보를 획득하는 단계에서, 상기 획득된 이미지로부터 각각의 웰들에 대한 형광 강도를 픽셀 단위로 특정하고, 상기 각각의 웰들에 대해 소정의 임계 강도를 갖는 픽셀의 비율이 상한 한도 이상이면 채워진 웰로 분류하고, 상기 임계 강도를 갖는 픽셀의 비율이 하한 한도 이하이면 채워지지 않은 웰로 분류하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 상한 한도는 70%~90%의 범위에서 선택되고, 상기 하한 한도는 10~30% 범위에서 선택되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 임계 강도는 상기 채워지지 않은 웰의 이미지 중 경계에 해당하는 픽셀에서의 형광 강도를 기준으로 결정되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계에서 지지 벡터 머신(Support Vector Machine; SVM)을 이용하여 상기 부분적으로 채워진 웰을 분석하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계에서 차분진화 알고리즘은 90~120회 반복된 후 중단되도록 정지되도록 설계된 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 복수개의 강도 및 텍스처 기능 또는 복수개의 Zernike 모멘트를 요소로

이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 복수개의 강도 및 텍스처 기능은 평균 강도, 평균 색조 채널, 표준편차, 평균 그레이 레벨, 평균 대조, 평활도, 3차 모멘트, 엔트로피 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 복수개의 강도 및 텍스처 기능은 평균 강도, 평균 색조 채널, 표준편차, 평균 그레이 레벨, 평균 대조, 평활도, 3차 모멘트, 엔트로피를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 적어도 2가지의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계는 부분적으로 채워진 웰로 분류된 웰들을 대상으로 하는 재분류 단계를 포함하며, 상기 재분류 단계는 상기 부분적으로 채워진 웰들에 가우시안 필터를 적용하고, 소정의 재분류 임계값에 따라 상기 부분적으로 채워진 웰들을 채워진 웰과 채워지지 않을 웰로 분류하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 12

대상물이 분주된 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에 있어서,

상기 마이크로웰 어레이의 웰들을 복수의 카테고리로 분류하는 라벨링 정보를 획득하는 단계;

상기 카테고리를 기준으로 상기 마이크로웰 어레이의 웰들을 분류하는 제1차 분류 단계; 및

상기 제1차 분류 단계에 의해 분류된 상기 카테고리 중 일 카테고리에 속한 웰들을 대상으로 학습 알고리즘을 수행하여, 상기 일 카테고리가 아닌 다른 카테고리로 분류하는 제2차 분류 단계;를 구비하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 카테고리는 적어도 3개 이상의 카테고리를 유지하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계에서 상기 학습 알고리즘으로 차분진화 알고리즘을 사용하며, 상기 차분진화 알고리즘은 90~120회 반복된 후 중단되도록 정지되도록 설계된 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계에서 지지 벡터 머신(Support Vector Machine; SVM)을 이용하여 상기 일 카테고리에 속한 웰들을 분석하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 복수개의 강도 및 텍스처 기능 또는 복수개의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 복수개의 강도 및 텍스처 기능은 평균 강도, 평균 색조 채널, 표준편차, 평균 그레이 레벨, 평균 대조, 평활도, 3차 모멘트, 엔트로피 중 적어도 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 적어도 2가지의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

청구항 19

제12항에 있어서,

상기 제2차 분류 단계는 상기 일 카테고리에 속하는 웰들을 대상으로 하는 재분류 단계를 포함하며, 상기 재분류 단계는 상기 일 카테고리에 속한 웰들에 가우시안 필터를 적용하고, 소정의 재분류 임계값에 따라 상기 일 카테고리에 속한 웰들을 상기 다른 카테고리로 분류하는 것을 특징으로 하는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이크로웰을 대상으로 하는 자동 이미지 분석에 관한 것으로서, 보다 자세하게는, 마이크로웰의 이미지 분석을 신속하고 안정적으로 수행할 수 있는 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석 알고리즘 형성 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 미세 크기를 대상물의 밀도는 현미경을 통해 이루어지며, 매우 노동 집약적으로 대상물을 수동으로 계산해야 하거나, 기존의 이미지 인식 프로그램을 사용하여 객체를 계산할 수 있다.

[0003] 그러나 기존의 방법은 잘 정의된 샘플 형태와 크기를 필요로 하는데 생물학적 샘플은 그 형태와 크기가 잘 정의가 되지 않는 경우가 많다. 사전에 정의된 모양에서 멀리 벗어난 경우에는 종래의 알고리즘에 의해서 계산되지 않는 경우가 많다.

[0004] 이를 해결하기 위해, 이미지 인식 프로그램의 허용 오차를 늘리면 이러한 문제가 부분적으로 해결되지만 입자의 잘못된 식별이 높아져 측정의 신뢰 구간이 크게 늘어나게 된다.

[0005] 마이크로 웰 어레이를 분석하기 위해서는 다음 기준들을 충족해야 한다. (1) 모든 웰의 크기가 동일해야 하고, (2) 웰 사이 간격이 일정해야 한다. 또한, (3) 웰은 배열의 행과 열에 명확하게 속해야 한다. (4) 웰은 원형인 것이 바람직하며, (5) 오염으로 인해 시료의 이미지 분석에 방해가 없어야 한다. 그러나, 모든 기준들이 충족된다 하더라도 2차원의 저차원 이미지로부터 3차원의 고차원 공간을 추출하는 것에는 여전히 어려움이 있다.

[0006] 종래에서 마이크로웰을 대상으로 이미지 분석을 하는 방법에서는 개별 웰의 형광 신호를 양성과 음성의 두 그룹으로 분류함으로써 샘플의 존재를 결정하며, 이를 바탕으로 샘플의 존재를 결정한다. 분류를 위해 나름의 방법을 통해 정해진 임계값을 설정하는데, 임계값에 가까운 마이크로 웰은 양성 또는 음성 그룹에 속하지 않는 경우가 있으며, 경우에 따라 양성 또는 음성 그룹에 속하는 경향도 뒤집힐 수가 있다. 이러한 웰들은 미분류 웰로 인식되며, 전체적인 웰 분류의 정확도를 떨어뜨리는 요인이 된다.

[0007] Compurterized Medical Imaging and Graphics 36 (2012) 저널에 실린 "FPGA based system for automatic cDNA microarray image processing" (Bogdan Belean 외)를 보면, DNA 마이크로 어레이의 자동 분석을 위해 shock filter를 이용해서 이미지의 픽셀 분석을 이용하는 내용이 개시되어 있다. 하지만, 이 역시 이미지의 밝기만 이용한다는 점에서 완벽하다고 할 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 임계값만 이용하는 종래의 이미지 분석방법은 임계값 근처에서 분류에 어려움이 있다는 점을 극복하기 위한 것으로서, 본 발명은 높은 정확도로 마이크로 웰 어레이를 자동으로 분류할 수 있는 분석 알고리즘 형성방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 본 발명의 목적들을 달성하기 위한 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 형광물질에 의해서 표지된 대상물이 분주된 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법은, 마이크로웰 어레이의 웰들의 이미지를 획득하는 단계, 마이크로웰 어레이의 웰들을 채워진 웰, 부분적으로 채워진 웰 및 채워지지 않은 웰로 분류하는 라벨링 정보를 획득하는 단계, 획득된 이미지 및 라벨링 정보를 이용하여 마이크로웰 어레이의 웰들 중 일부 또는 전부를 채워진 웰, 부분적으로 채워진 웰 및 채워지지 않은 웰로 분류하는 제1차 분류 단계, 차분진화 알고리즘을 통해 부분적으로 채워진 웰을 채워진 웰 또는 채워지지 않은 웰로 분류하는 제2차 분류 단계를 포함한다.

[0010] 라벨링 정보를 획득하는 단계에서, 획득된 이미지로부터 각각의 웰들에 대한 형광 강도를 픽셀 단위로 특정하고, 각각의 웰들에 대해 소정의 임계 강도를 갖는 픽셀의 비율이 상한 한도 이상이면 채워진 웰로 분류하고, 임계 강도를 갖는 픽셀의 비율이 하한 한도 이하이면 채워지지 않은 웰로 분류할 수 있다.

[0011] 상한 한도는 70%~90%의 범위, 바람직하게는 80% 정도에서 선택되고, 하한 한도는 10~30% 범위, 바람직하게는 20% 정도에서 선택될 수 있으며, 임계 강도는 채워지지 않은 웰의 이미지 중 경계에 해당하는 픽셀에서의 형광 강도를 기준으로 결정될 수 있다.

[0012] 제2차 분류 단계에서 지지 벡터 머신(Support Vector Machine; SVM)을 이용하여 부분적으로 채워진 웰을 분석할 수 있으며, SVM을 이용한 방법은 라벨링 획득 단계 또는 제1차 분류 단계에서도 적용될 수 있다.

[0013] 제2차 분류 단계에서 차분진화 알고리즘은 90~120회 반복된 후 중단되도록 정지되도록 설계될 수 있으며, 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 복수개의 강도 및 텍스처 기능 또는 복수개의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행될 수 있다.

[0014] 예를 들어, SVM을 이용한 방법에서 복수개의 강도 및 텍스처 기능은 평균 강도, 평균 색조 채널, 표준편차, 평균 그레이 레벨, 평균 대조, 평활도, 3차 모멘트, 엔트로피 중 적어도 하나를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 위 요소를 모두 포함한 경우에 좋은 결과를 제공할 수가 있다. 또한, SVM을 이용한 방법에서 적어도 2가지의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행될 수가 있다.

[0015] 제2차 분류 단계는 부분적으로 채워진 웰로 분류된 웰들을 대상으로 하는 재분류 단계를 포함할 수 있으며, 재분류 단계는 부분적으로 채워진 웰들에 가우시안 필터를 적용하고, 소정의 재분류 임계값에 따라 부분적으로 채워진 웰들을 채워진 웰과 채워지지 않을 웰로 분류할 수 있다.

[0016] 상술한 본 발명의 목적들을 달성하기 위한 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 대상물이 분주된 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법은, 마이크로웰 어레이의 웰들을 복수의 카테고리로 분류하는 라벨링 정보를 획득하는 단계, 카테고리를 기준으로 상기 마이크로웰 어레이의 웰들을 분류하는 제1차 분류 단계, 및 제1차 분류 단계에 의해 분류된 카테고리들 중 일 카테고리에 속한 웰들을 대상으로 학습 알고리즘을 수행하여, 그

일 카테고리가 아닌 주변의 다른 카테고리로 분류하는 제2차 분류 단계를 구비할 수 있다.

[0017] 본 실시예에 따르면, 형광 물질로 표지되지 않더라도 광학적으로나 화학적으로 특정할 수 있는 것과 같이 2개 이상의 카테고리를 구분될 수 있는 다른 대상물을 대상으로 할 수 있으며, 라벨링 정보는 마이크로웰 어레이 중 일부를 대상으로 실시간으로 획득되거나 이미 저장된 기준에 따라 구분될 수 있고, 제1차 분류 단계 등도 마이크로웰 어레이 중 일부 또는 전부에 대해 수행될 수 있다.

[0018] 또한, 본 명세서에서 카테고리는 2개 이상으로 구분되는 것을 목적으로 하나, 대신 본 실시예에서 사용되는 카테고리는 적어도 3개 이상의 카테고리를 유지하는 것이 바람직하다.

[0019] 제2차 분류 단계에서 학습 알고리즘으로 차분진화 알고리즘을 사용할 수 있으며, 차분진화 알고리즘은 90~120회 반복된 후 중단되도록 정지되도록 설계될 수 있다.

[0020] 제2차 분류 단계에서 지지 벡터 머신(Support Vector Machine; SVM)을 이용하여 일 카테고리에 속한 웰들을 분석할 수 있으며, 지지 벡터 머신을 이용한 분석은 복수개의 강도 및 텍스처 기능 또는 복수개의 Zernike 모멘트를 요소로 이용하여 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 분석방법에 따르면, 마이크로웰 어레이의 이미지로부터 정확하고 간단하며 빠른 분류를 위한 SVM 기반의 방법을 제시할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따르면, 제1차 분류 단계에서 마이크로웰 어레이의 웰들은 채워진 웰, 채워지지 않은 웰 뿐 아니라 부분적으로 채워진 웰과 같이 세 가지 카테고리로 분류하며, 제2차 분류 단계에서 부분적으로 채워진 웰은 채워지거나 채워지지 않은 특성을 갖는 경향에 따라 재분류될 수 있다.

[0023] 분류의 성능을 높이기 위해 17개의 기능을 사용했는데, 그 중 10가지 기능을 사용하여도 기계학습 접근법을 사용한 분류와 관련이 있다고 판별할 수 있다. 본 발명에서 제시한 방법은 특히 노이즈를 많이 포함한 마이크로웰 데이터를 분석할 때 특히 유용할 수 있으며, 다른 이미지 분석 방법에도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이를 설명하기 위한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이에 대상물을 도포하는 과정을 설명하기 위한 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이의 실물을 설명하기 위한 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이 분석장치를 설명하기 위한 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링 단계를 설명하기 위한 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 지지 벡터 머신을 이용하여 웰을 분석한 과정을 설명하기 위한 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 분류 단계를 설명하기 위한 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 차분진화 알고리즘을 설명하기 위한 도면이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 분류 단계에서의 마이크로웰 어레이를 설명하기 위한 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링에 의한 과정과 학습에 의한 과정에서 결과를 비교하기 위한 표 및 혼동 행렬을 설명하기 위한 도면이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 선택된 특징의 개수에 따른 정확도를 설명하기 위한 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 차분진화 알고리즘의 횟수에 따른 정확도를 설명하기 위한 그래프이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링 과정, 훈련 과정 및 분류 과정에서 웰의 개수를 설명하기 위한 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 재분류를 위한 가우시안 필터를 적용하여 픽셀 강도를 백분율에 따라 9단계로 분류한 그래프이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 부분적으로 채워진 웰에서 백분율에 따른 웰 개수 그래프이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 재분류에 따른 결과를 나타낸 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명하지만, 본 발명이 실시예에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 참고로, 본 설명에서 동일한 번호는 실질적으로 동일한 요소를 지칭하며, 이러한 규칙 하에서 다른 도면에 기재된 내용을 인용하여 설명할 수 있고, 당업자에게 자명하다고 판단되거나 반복되는 내용은 생략될 수 있다.

[0027] 준비과정

[0028] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이를 설명하기 위한 도면이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이에 대상물을 도포하는 과정을 설명하기 위한 도면이고, 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이의 실물을 설명하기 위한 도면이다. 또한, 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법을 설명하기 위한 마이크로웰 어레이 분석장치를 설명하기 위한 도면이다.

[0029] 도 1 내지 도 4를 참조하면, 본 실시예에 따른 마이크로웰 어레이(200)는 PDMS 소재를 이용하여 형성될 수 있으며, 소프트 리소그래피 공정을 통해서 제작될 수 있다.

[0030] 우선, 마이크로웰 어레이(200)를 제작하기 위해, 오토캐드와 같은 설계프로그램을 사용하여 디자인을 만들고, 설계된 디자인을 투명 필름 마스크로 옮길 수 있다.

[0031] 구체적으로, SU8-50을 실리콘 웨이퍼 위에 스핀 코팅한 다음 디자인이 표현된 필름 마스크를 통해 자외선(UV)을 조사한 후 실리콘 마스터는 SU-8 현상액을 사용하여 완성될 수 있다. 그리고, PDMS를 실리콘 마스터에 붓고 약 85℃의 오븐에서 약 1 시간 동안 경화시켰다. PDMS는 실리콘 마스터와 매스로 절단하여 분리된 개별 장치에서 조심스럽게 벗겨 냈다.

[0032] 마이크로웰 어레이(200)는 PDMS의 소수성을 감소시키기 위해 약 1 분 동안 산소 플라즈마에서 표면 처리될 수 있다.

[0033] 본 실시예에서, 26 x 26 웰(220)들, 즉 676개의 웰(220)이 하나의 패널(210)을 형성하며, 하나의 마이크로웰 어레이(200)에는 패널(210)들이 6 x 6으로 배열되어 총 36개가 형성되어 있어 총 24,336개의 웰(220)이 형성될 수 있다. 여기서 각 웰의 직경과 높이는 약 40㎛이고, 웰 사이 간격은 약 30㎛이며, 전체 마이크로웰 어레이 면적은 약 $1cm^2$이다.

[0034] 또한, 도 3에 도시된 바와 같이, FITC 형광 용액을 피펫팅한 유리 기판 위에 마이크로웰 어레이(200)를 올려두고 음압을 가해 고정시킬 수 있으며, 형광 용액은 각 웰 안으로 고립되며 현미경을 통해 형광 이미지를 획득할 수 있다. 경우에 따라서는 마이크로웰 어레이(200) 중 일부 웰에 갇힌 공기를 제거하기 위해 장치를 약 1 분 동

안 진공 챔버에 둘 수 있다. 이후 웰 배열은 현미경 슬라이드(230)를 사용하여 덮인 상태로 외부로부터 차단될 수 있다.

[0035] 본 실시예에서는 형광 표지된 대상물로서 FITC 형광 용액이 사용되지만, 경우에 따라서는 형광 표지된 폴리스티렌 미세 입자 또는 실리카 코팅 자성 미립자를 함유하는 용액이 사용될 수 있으며, 이 외에도 형광 표지 된 HeLa 세포의 배양물이 사용될 수도 있고, 형광이 아닌 특정 빛이나 광선에 반응하는 물질을 포함하는 것도 형광으로 표지된 것과 동일하게 이해될 수 있다.

[0036] 도 5를 보면, 본 실시예에 따른 분석 장치(100)는 마이크로웰 어레이의 원본 이미지를 획득하는 카메라(110), 카메라(110)로부터 획득된 원본 이미지로부터 대상물이 채워진 웰(FW), 부분적으로 채우진 웰(220) 및 채워지지 않은 웰(UW)로 분류하기 위한 마이크로웰 분류부(120)를 포함할 수 있다.

[0038] 라벨링 단계

[0039] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링 단계를 설명하기 위한 도면이다.

[0040] 도 6을 보면, 채워진 웰(FW), 부분적으로 채워진 웰(PW) 및 채워지지 않은 웰(UW)을 모두 포함하는 이미지를 이용할 수 있다. 여기서 부분적으로 채워진 웰(PW)은 채워진 영역과 채워지지 않은 영역을 동시에 가지는 웰을 의미할 수 있으며, 도면에서 부분적으로 채워진 웰(PW)은 노란색의 원형 경계로 표시되고, 채워진 웰(FW)은 녹색의 원형 경계로 표시되고, 채워지지 않은 웰(UW)은 적색의 원형 경계로 표시될 수 있다.

[0041] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 지지 벡터 머신을 이용하여 웰을 분석한 과정을 설명하기 위한 도면이다.

[0042] 도 7을 참조하면, 라벨링 정보를 획득하기 위해서 웰(220)을 채워진 웰(FW), 부분적으로 채워진 웰(PW) 및 채워지지 않은 웰(UW)에 대한 픽셀 강도의 입체적 분포(A-C), 웰의 픽셀 이미지에 대한 2D 그래프(D-F) 및 픽셀 강도를 나타내는 그래프(G-I)를 알 수 있다.

[0043] 분류 성능을 높이기 위해 SVM에 대해 다른 카테고리의 레이블을 지정하는 것이 매우 중요할 수 있다. 본 실시예의 경우, 제1차 분류 단계에서 채워진 웰(FW), 부분적으로 채워진 웰(PW), 채워지지 않은 웰(UW)과 같이 세 가지 클래스로 분류될 수 있다. 여기서 총 픽셀 수에 대한 미리 정의된 임계값을 초과하는 강도의 픽셀 수 비율로 정의될 수 있다. 이를 위해 3개의 카테고리가 모두 존재하는 이미지를 선정하였다.

[0044] 여기서 부분적으로 채워진 웰(PW)은 채워진 부분과 채워지지 않은 부분 사이에 경계를 가상으로 정의하고, 그 경계에서의 형광 강도를 관찰하여 임계 강도는 약 40으로 결정될 수 있다. 각 웰(220) 내의 픽셀의 약 80%이상이 임계 강도 40 이상일 때, 해당 웰(220)은 채워진 것으로 분류되며(FW), 임계 강도 40 이상인 픽셀이 20% 미만인 경우는 채워지지 않은 웰로 간주하였다(UW). 그 외의 나머지 웰들은 모두 부분적으로 채워진 웰(PW)로 분류되어, 제2차 분류 단계의 대상이 될 수 있다.

[0046] 분류단계

[0047] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 분류 단계를 설명하기 위한 도면이고, 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 차분진화 알고리즘을 설명하기 위한 도면이고, 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 분류 단계에서의 마이크로웰 어레이를 설명하기 위한 사진이다.

[0048] 도 8 내지 도 10을 참조하면, 본 실시예에 따른 분류 단계는 라벨링을 위한 이미지 획득, 제1차 분류 과정, 제2차 분류 과정, 분류의 평가 및 재분류 과정을 포함할 수 있다. 일단, 도 10에 도시된 바와 같이, 라벨링을 위해 패널의 이미지를 사용할 수 있으며, 그리고 4개의 패널 이미지를 이용하여 트레이닝 또는 학습 과정을 거칠 수 있고, 학습된 내용을 이용하여 어레이 전체에 대한 이미지를 이용하여 전체 웰에 대해 분류 과정을 수행할 수 있다.

[0049] 우선, 제1차 분류 단계에서 마이크로웰 어레이(200)의 웰(220)은 포함된 형광 용액에 채워진 정도에 따라 채워진 웰(FW), 부분적으로 채워진 웰(PW), 채워지지 않은 웰(UW)로 분류될 수 있다. 그리고, 부분적으로 채워진 웰

(PW)들을 대상으로 다시 새로운 기준에 따라 채워진 웰과 채워지지 않은 웰로 다시 분류하는 제2차 분류 단계를 수행할 수 잇다.

[0050] 이와 같은 제1차 및 제2차에 걸친 두 단계의 분류 방법은 종래기술보다 더 높은 정확성을 제공할 수 있으며, 다양한 바이오센서에서 형광 신호를 판단하는 데에 유용하게 사용될 수 있고, 생물학적으로 다양한 응용이 가능하다.

[0051] 구체적으로, 제2차 분류 단계에서 Matlab의 SVM(Support Vector Machine)을 사용하여 형광 이미지를 분석했고, 첫 번째 단계에서 9개의 강도 및 텍스쳐 기능을 추출할 수 있다. 또한, 모양에 관계된 기능인 Zernike 모멘트를 추출하여 우물의 모양과 크기를 짐작할 수 있게 하였다. Zernike 모멘트를 이용해 실제 웰의 직경보다 작은 직경의 원을 정의하고 원 내부의 데이터만 선택적으로 추출하여 웰의 경계에서 우세하게 발견되는 노이즈를 줄일 수 있다.

[0052] 도 9를 보면, 차분진화 알고리즘을 위해 Generation Gi 과정에서는 데이터 염색체를 만들고 평가(Evaluation)를 통해 정확도를 검색할 수 있다. 평가 결과에 따라 기준에 부합하면, 그 때의 데이터 염색체가 최적화된 조합이라고 생각할 수 있는데, 본 실시예에서는 약 100회 정도 반복을 기준으로 하고, 약 100회 반복 후에 알고리즘을 정지하고, 그 때의 염색체 알고리즘을 최적화된 조합이라고 정의할 수 있다.

[0053] 만약, 평과 결과에 따라 기준에 부합하지 않은 경우, Genetic operation에서 새로운 데이터 염색체를 다시 조합할 수 있다. 새로운 염색체를 오프스프링(Offspring)이라 정의하고 이를 generation Gi로 입력하여($G_{i+1}=O_i$) 다시 평가를 진행할 수 있다.

[0054] 도 10의 (c)를 보면, 2차 분류 단계에서 선택된 특징으로 바탕으로 SVM을 활용하여 전체 어레이를 분류할 수 있다. 구체적으로, 데이터 수집 단계에서 크기 n x 17의 배열이 생성될 수 있다. 여기서 n은 마이크로 웰의 수이고, 17은 각 웰을 특정하기 위한 총 기능의 개수로 9개의 강도 및 텍스쳐 기능과 8개의 Zernike 모멘트로 구성될 수 있다.

[0055] 그리고, 차분진화 알고리즘은 기능의 수와 계산 시간을 최적화하기 위해 사용될 수 있다. 차분진화 알고리즘(Differential Evolution Algorithm)은 유전 알고리즘의 한 일종으로 이를 위해 데이터 염색체와 알고리즘의 정지 기준을 설계할 필요가 있다.

[0056] 각 웰(220)의 특징을 나타내는 17개의 값으로 구성된 벡터를 데이터 염색체로 선정하고, 해당 알고리즘은 약 100회 반복한 후에 중단되도록 정지 기준을 설정할 수 있다.

[0057] 본 실시예에서 사용한 데이터 염색체는 값이 0 또는 1인 방식으로 변경될 수 있으며, 1은 해당 특성을 사용한다는 것이며, 0은 사용하지 않는다는 것을 의미할 수 있다. 차분진화 알고리즘을 이용한 평가는 모든 세대의 모든 데이터 염색체에 대해 반복되었다. 이 과정에서 4개의 이미지가 임의로 선정되어 총 2,704개의 웰(220)에 대하여 데이터 염색체를 추출하였다.

[0058] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링에 의한 과정과 학습에 의한 과정에서 결과를 비교하기 위한 표 및 혼동 행렬을 설명하기 위한 도면이고, 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 선택된 특징의 개수에 따른 정확도를 설명하기 위한 그래프이고, 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 차분진화 알고리즘의 횟수에 따른 정확도를 설명하기 위한 그래프이다.

[0059] 도 11을 참조하면, SVM은 각 카테고리를 미리 결정된 값으로 분류할 뿐만 아니라 라벨 이미지 기반에서 학습한 패턴 인식을 통해 분류되었다. 이는 웰의 형광 강도 값에 더하여 웰 분류를 위한 추가 파라미터를 인식하는 것으로 이어진다. 이러한 SVM의 성능은 실제 분류와 예측 결과를 제공하는 혼동 행렬로부터 정확도를 계산하여 평가된다. 혼동 행렬의 대각선 요소는 실제와 예측이 동일한 경우에 해당하며, 대각선에서 벗어난 요소는 예측이 실제와는 다른 경우이다. 따라서 정확도는 행렬의 대각 성분의 합을 전체 성분의 합으로 나눈 값으로 정의된다. 우리의 경우 정확도는 학습과정에서 99%, 실제 분류 과정에서 97.7%의 정확도를 가짐을 확인하였다.

[0060] 도 12를 참조하면, 총 17개의 특징 중 특징의 수를 증가시키면서 정확도를 확인하였다. 특징의 수가 증가하면서 대체적으로 정확도가 증가하지만, 대략 9~12개의 특징의 수를 이용할 때부터 정확도가 90% 이상의 정확도를 가지면서, 그 이상으로 증가하여도 정확도의 증가가 둔화될 수 있다.

[0061] 이전 단계에서 인식한 라벨 이미지 및 기능을 기반으로 어레이의 모든 마이크로 웰(220)을 3가지 카테고리로 분

류한 후, 분류 과정에서는 공정 시간을 줄이기 위해 차분진화 과정을 통해 최적화된 10개의 기능만 사용할 수가 있다. 일 예로, 사용된 10개의 기능은 평균 강도, 평균 색조 채널, 표준편차, 평균 그레이 레벨, 평균 대조, 평활도, 3차 모멘트, 엔트로피 및 두 가지의 Zernike 모멘트가 될 수 있다.

[0062] 도 13을 참조하면, 차분진화 알고리즘을 이용하여 특정회수 알고리즘을 반복하게 한 뒤, 정지하도록 기준을 설정하였다. 그 결과 차분진화 알고리즘의 반복 회수가 약 90~120회 정도 되었을 때, 정확도가 거의 포화되면서 그 둔화 속도가 현저하게 감소하였다.

[0063] 따라서, 본 실시예에서는 각 웰(220)의 특징을 나타내는 17개의 값으로 구성된 벡터를 데이터 염색체로 선정하고, 해당 알고리즘은 약 100회 반복한 후에 중단되도록 정지 기준을 설정할 수 있다. 각 웰(220)의 특징을 나타내는 17개의 값으로 구성된 벡터를 데이터 염색체로 선정하고, 해당 알고리즘은 약 100회 반복한 후에 중단되도록 정지 기준을 설정할 수 있다.

[0065] 재분류과정

[0066] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 라벨링 과정, 훈련 과정 및 분류 과정에서 웰의 개수를 설명하기 위한 그래프이고, 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 재분류를 위한 가우시안 필터를 적용하여 픽셀 강도를 백분율에 따라 9단계로 분류한 그래프이며, 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 부분적으로 채워진 웰에서 백분율에 따른 웰 개수 그래프이고, 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로웰 어레이의 이미지 분석을 위한 분석방법에서 재분류에 따른 결과를 나타낸 표이다.

[0067] 도 14 내지 도 17을 참조하면, 세가지 카테고리 중 부분적으로 채워진 웰을 채워진 웰과 채워지지 않은 웰처럼 보이는 경향에 따라 두 가지로 재분류할 수 있다. 마이크로 웰의 평균 형광 강도에 따라 각 카테고리의 마이크로 웰 개수를 나타낸 히스토그램에서 부분적으로 채워진 웰이 채워진 웰과 채워지지 않은 웰에 겹쳐지는 것을 발견할 수 있다(도 14 참조).

[0068] 도 16과 같이, 이를 다시 분류하기 위해 부분적으로 채워진 웰에 가우시안 필터를 적용하고 평균 강도 값에 따라 10개의 다른 그룹으로 나누고, 해당 형광 강도값에 따른 웰의 개수를 히스토그램으로 나타낼 수 있다. 여기서 재분류 임계값을 50%로 구분하면, 그 결과에서 나타난 바와 같이, 부분적으로 채워진 웰의 64%가 채워진 것으로 간주되며, 36%는 채워지지 않은 것으로 분류할 수 있다.

[0069] 본 발명은 마이크로 웰 어레이 데이터의 정확하고 간단하며 빠른 분류를 위한 SVM 기반의 방법을 제시한다. 이 방법은 첫 번째 단계로 채워진 웰, 채워지지 않은 웰 뿐 아니라 부분적으로 채워진 웰과 같이 세 가지 카테고리로 분류하며, 두 번째 단계에서 부분적으로 채워진 웰은 채워지거나 채워지지 않은 특성을 갖는 경향에 따라 재분류되었다. 분류의 성능을 높이기 위해 17개의 기능을 사용했는데, 그 중 10가지 기능이 기계학습 접근법을 사용한 분류와 관련이 있다고 판별했다. 본 발명에서 제시한 방법은 특히 노이즈를 많이 포함한 마이크로 웰 데이터를 분석할 때 특히 유용할 수 있으며, 다른 이미지 분석 방법에도 유용하게 사용될 수 있다.

[0070] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술분야의 숙련된 당업자라면 하기의 청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

부호의 설명

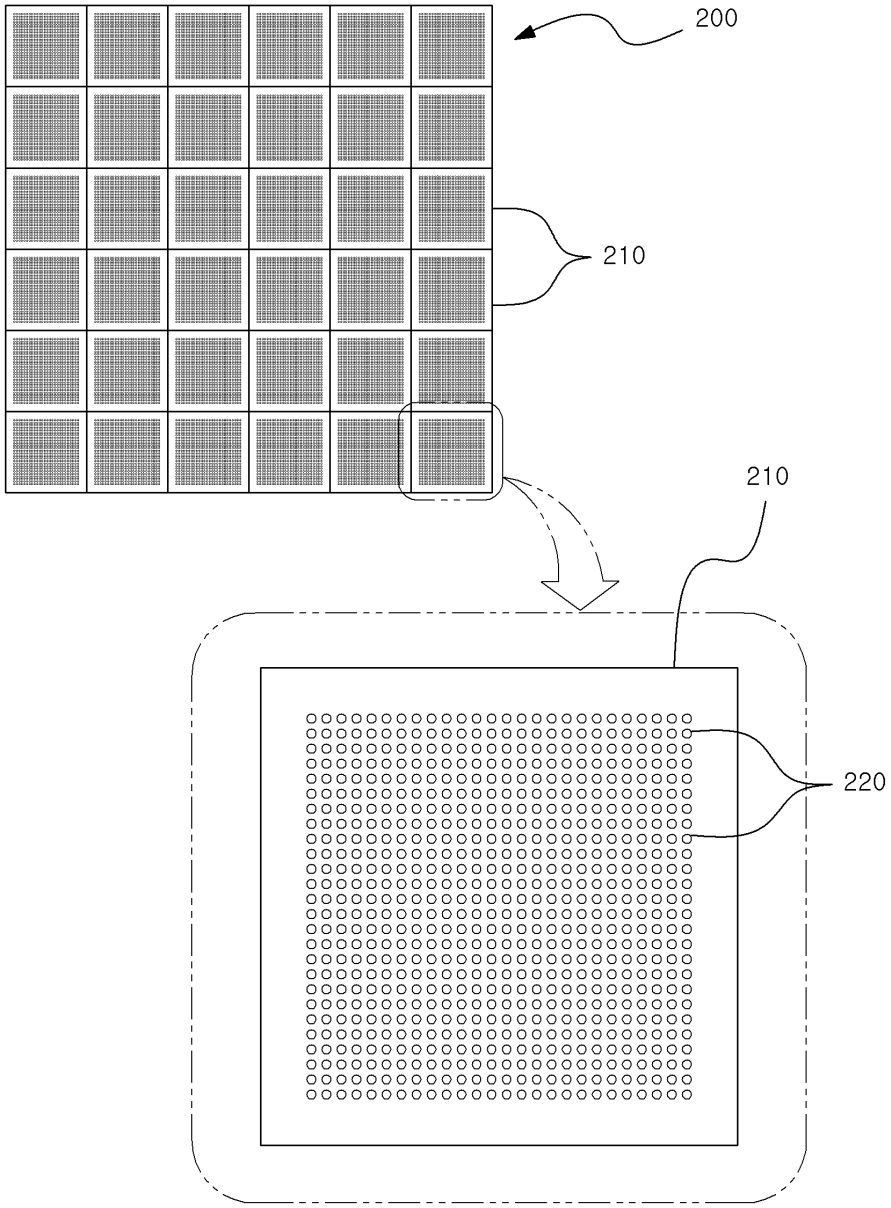
[0071] 100 : 분석 장치 110 : 카메라

120 : 마이크로웰 분류부 200 : 마이크로웰 어레이

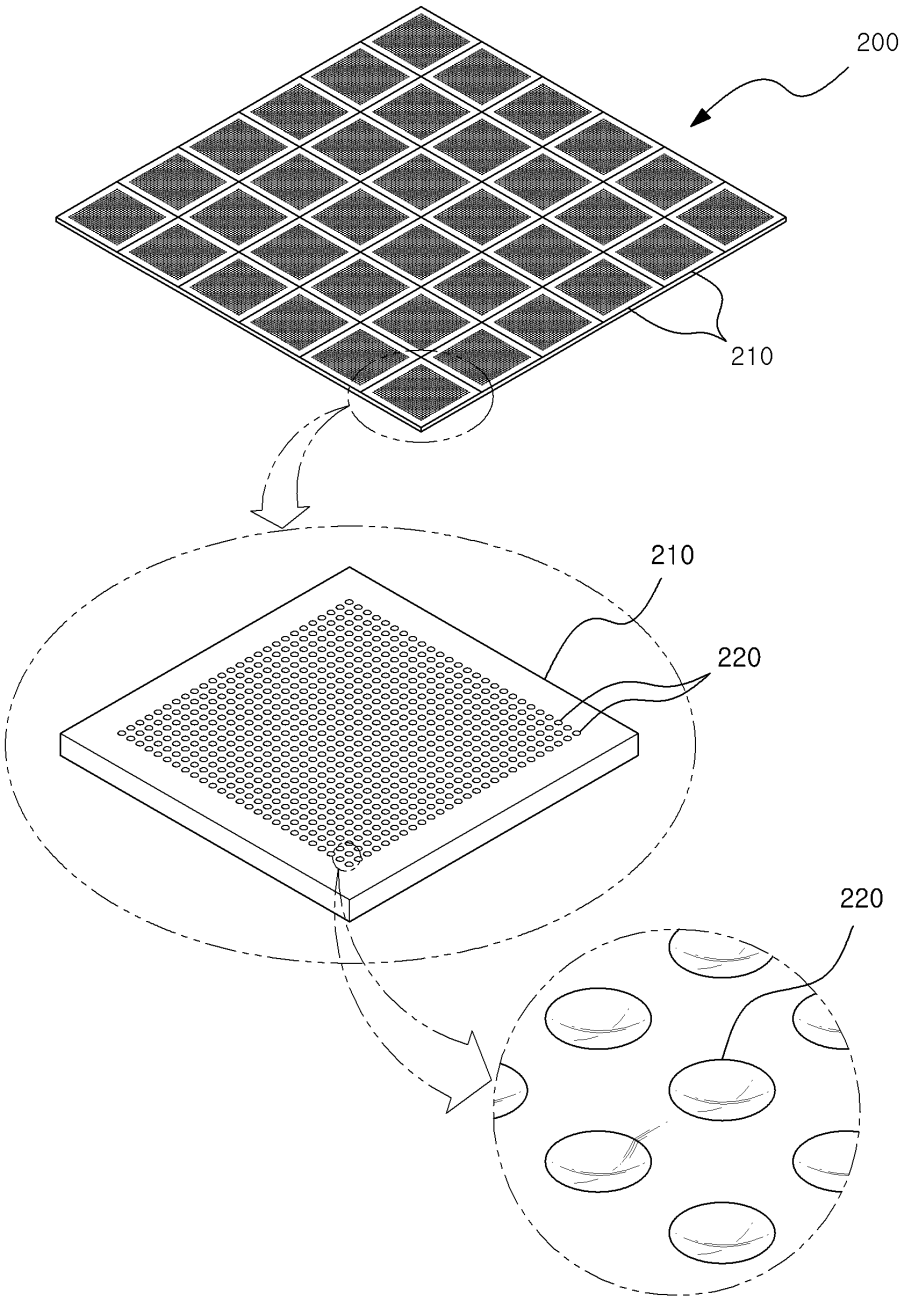
210 : 패널 220 : 웰

도면

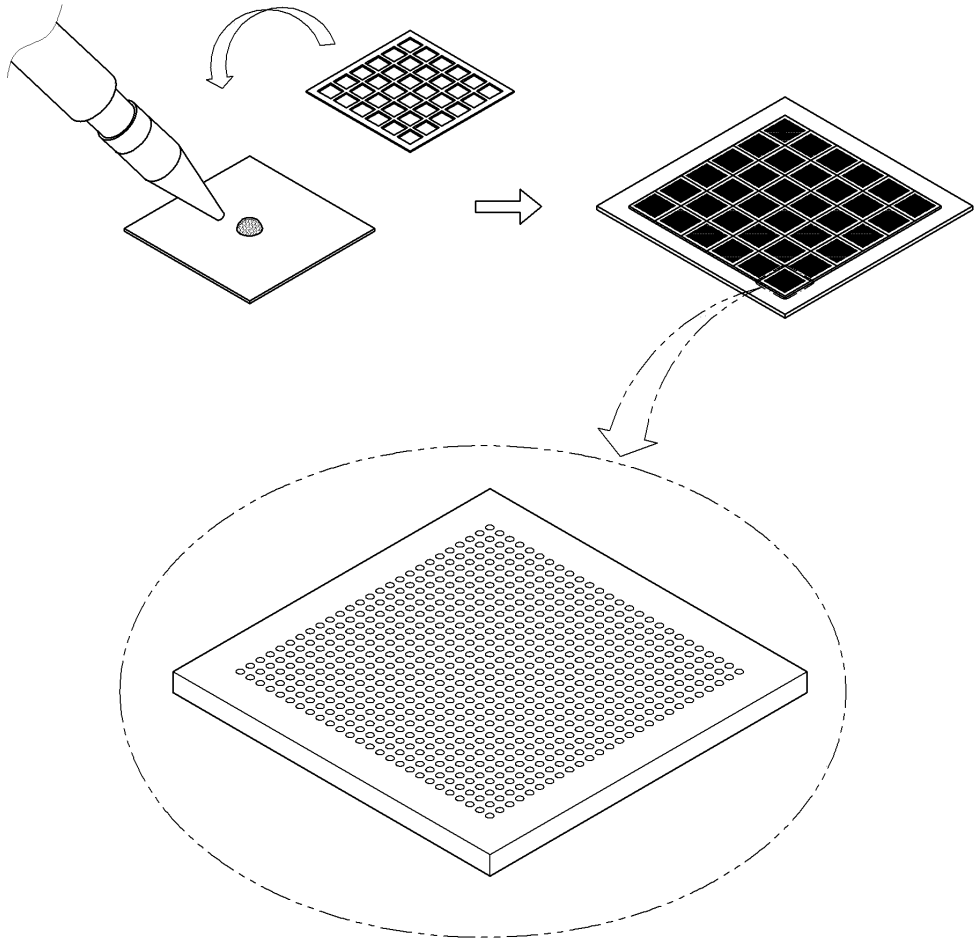
도면1



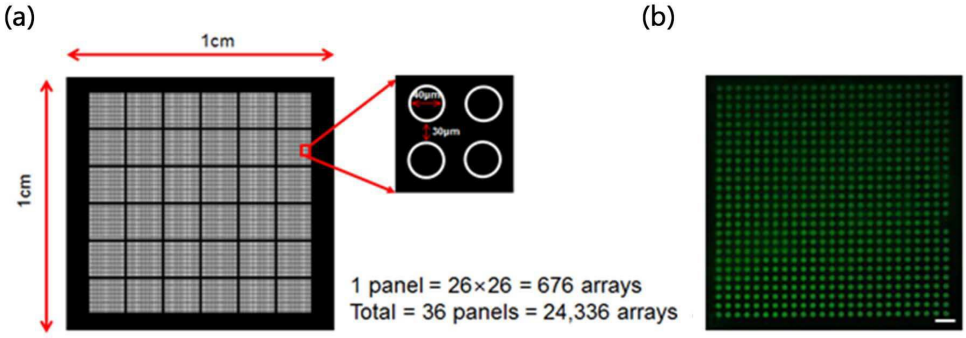
도면2



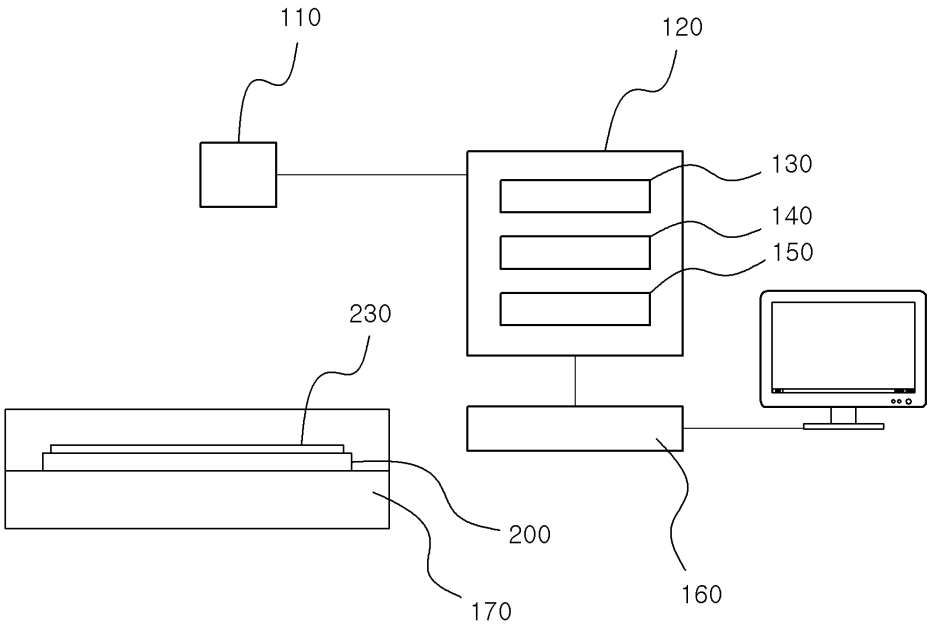
도면3



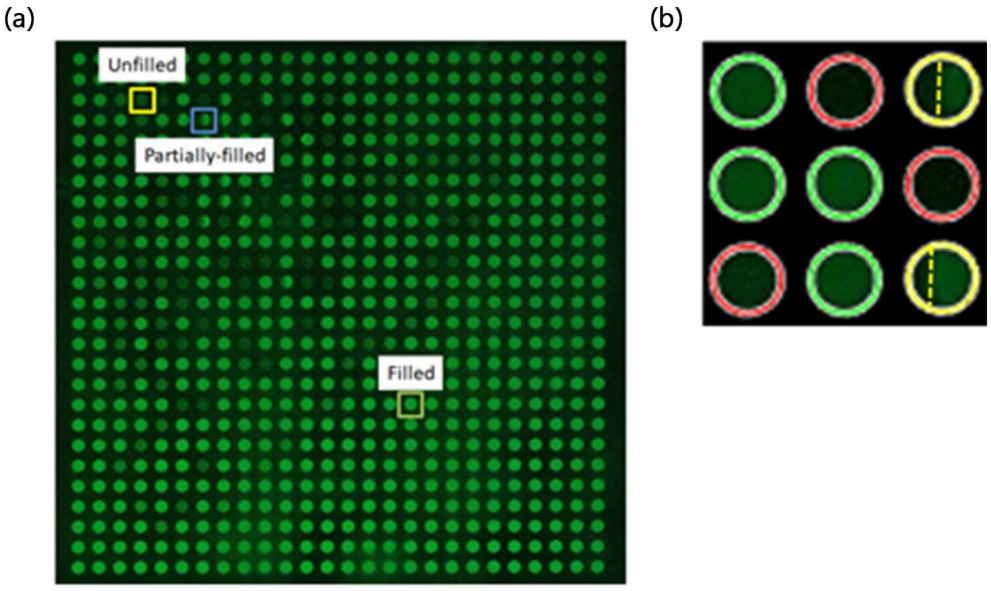
도면4


(a)
(b)
1cm
1cm
1 panel = 26×26 = 676 arrays
Total = 36 panels = 24,336 arrays

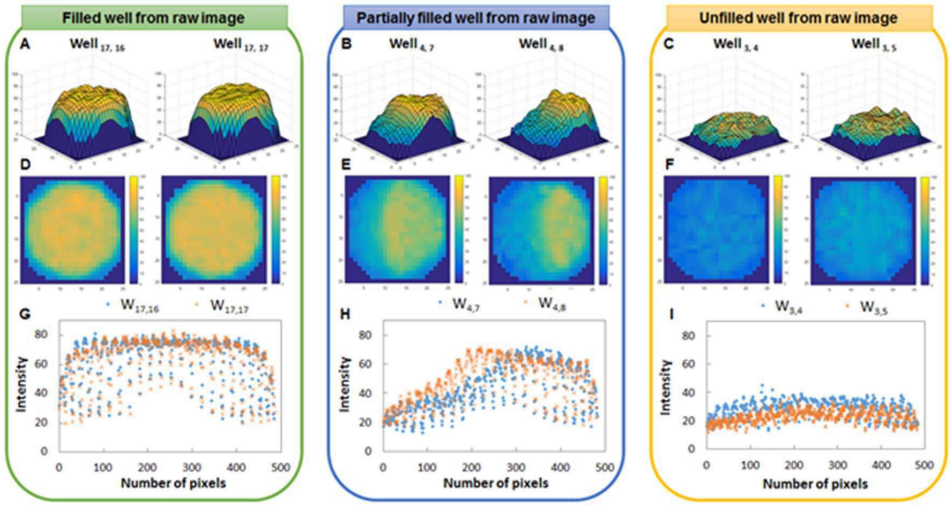
도면5


110
120
130
140
150
230
200
170
160

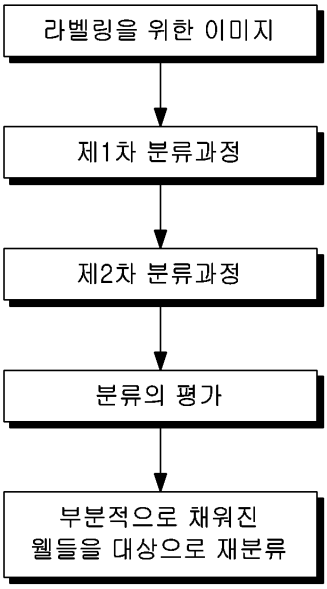
도면6


(a)
Unfilled
Partially-filled
Filled
(b)

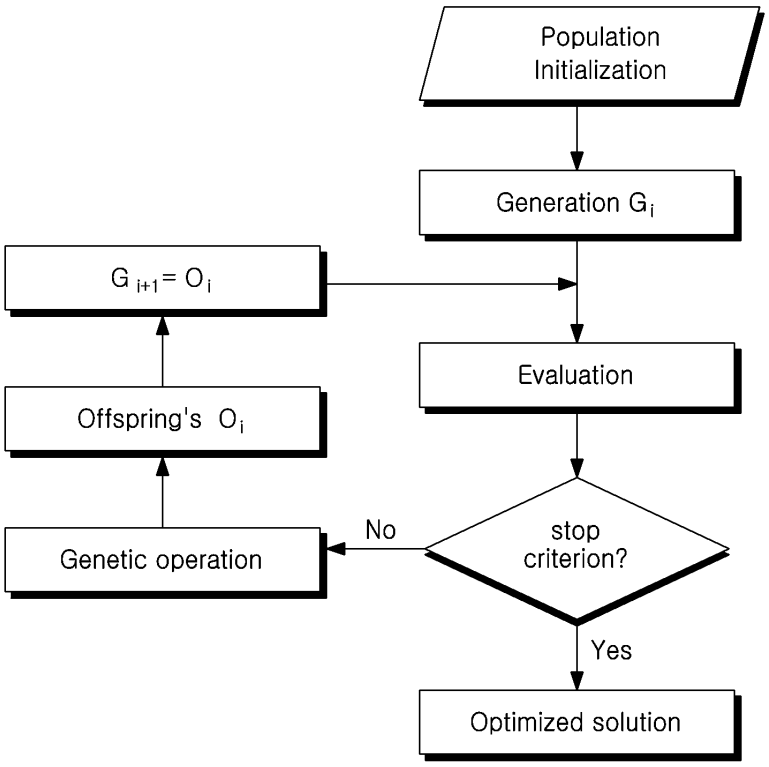
도면7


Filled well from raw image
Partially filled well from raw image
Unfilled well from raw image
A
B
C
D
E
F
G
H
I
Intensity
Number of pixels

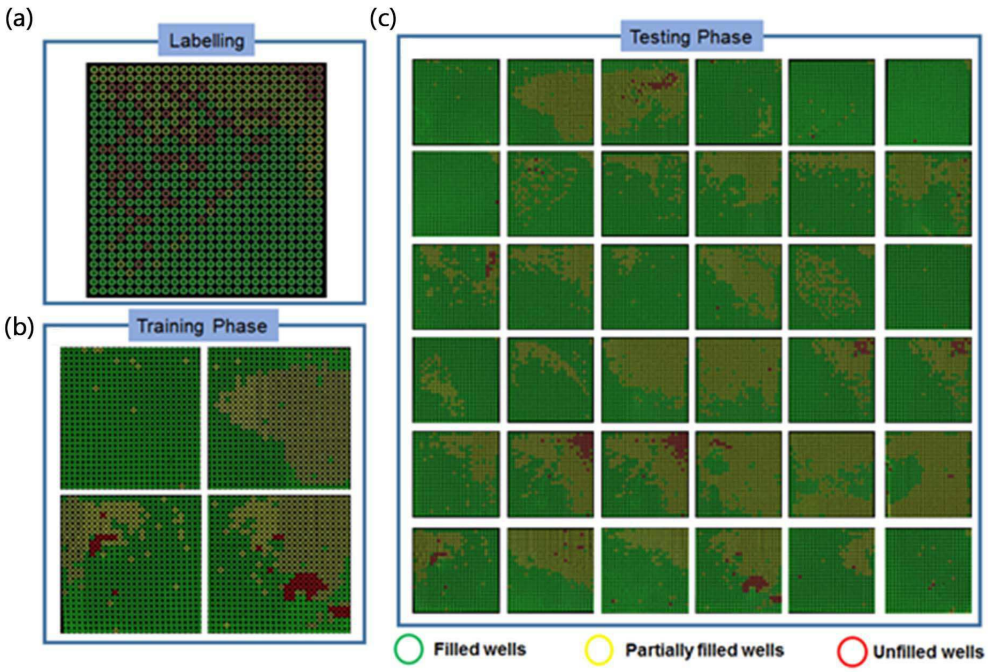
도면8


라벨링을 위한 이미지
제1차 분류과정
제2차 분류과정
분류의 평가
부분적으로 채워진
웰들을 대상으로 재분류

도면9


Population Initialization
Generation G_i
$G_{i+1} = O_i$
Evaluation
Offspring's O_i
Genetic operation
No
stop criterion?
Yes
Optimized solution

도면10

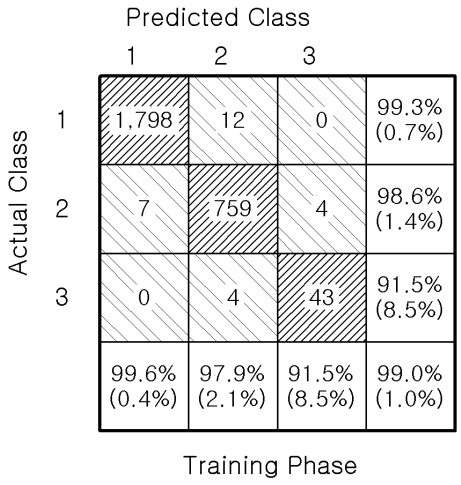

(a)
Labelling
(b)
Training Phase
(c)
Testing Phase
Filled wells
Partially filled wells
Unfilled wells

도면11

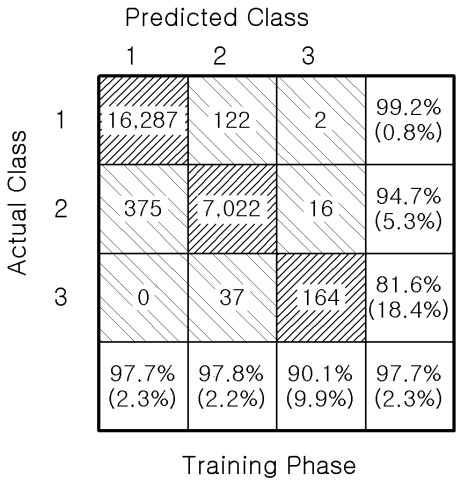
(a)

Class	Number (labelling)	Number (training)	Number (testing)
Filled	430	1,805	16,662
Partially filled	151	775	7,181
Unfilled	95	47	182
Miss-identified	-	77(2.8%)	311(1.3%)
Total	676	2,704	24,336

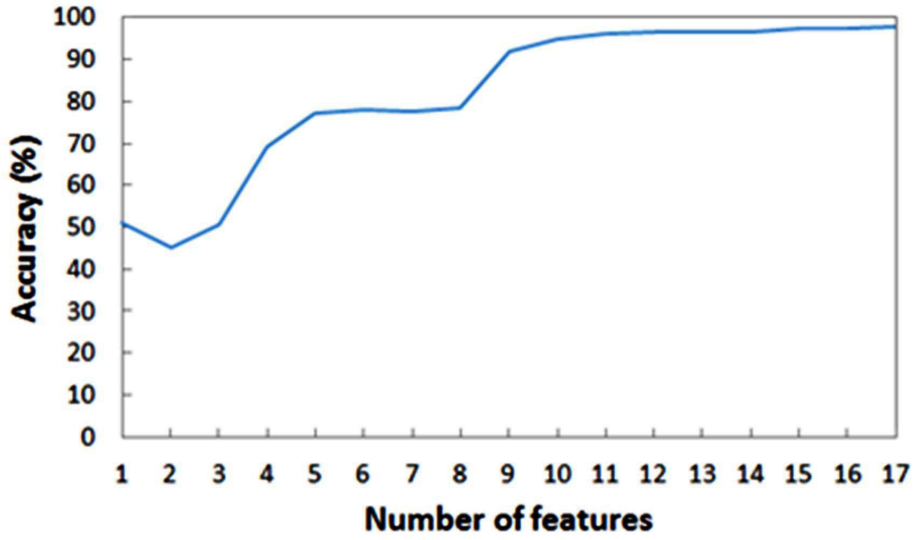
(b)



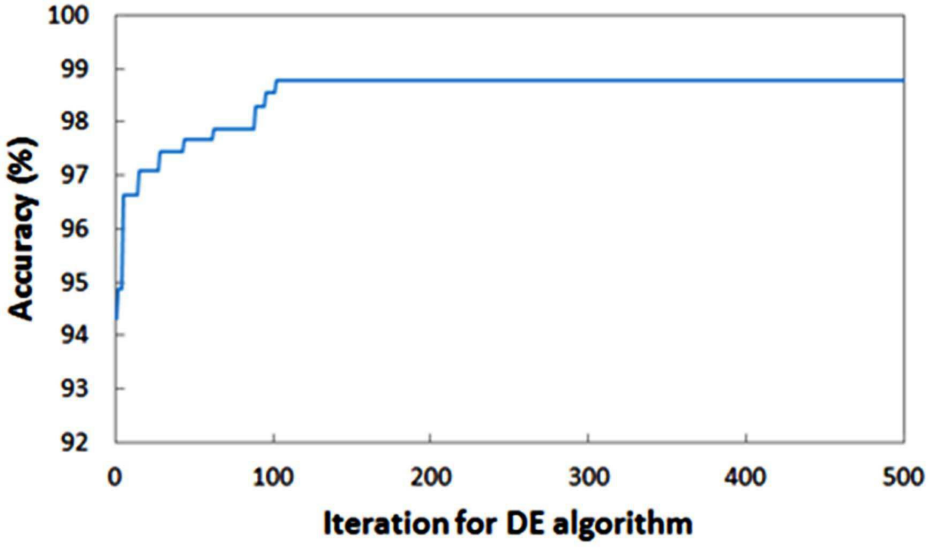
(c)



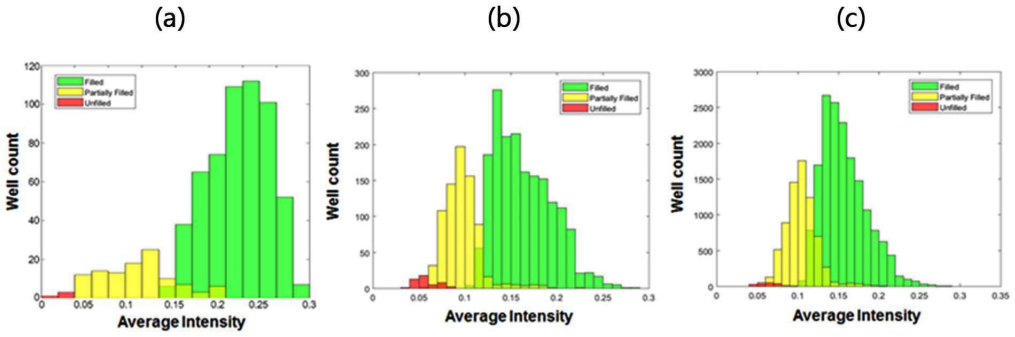
도면12


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Accuracy (%)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Number of features

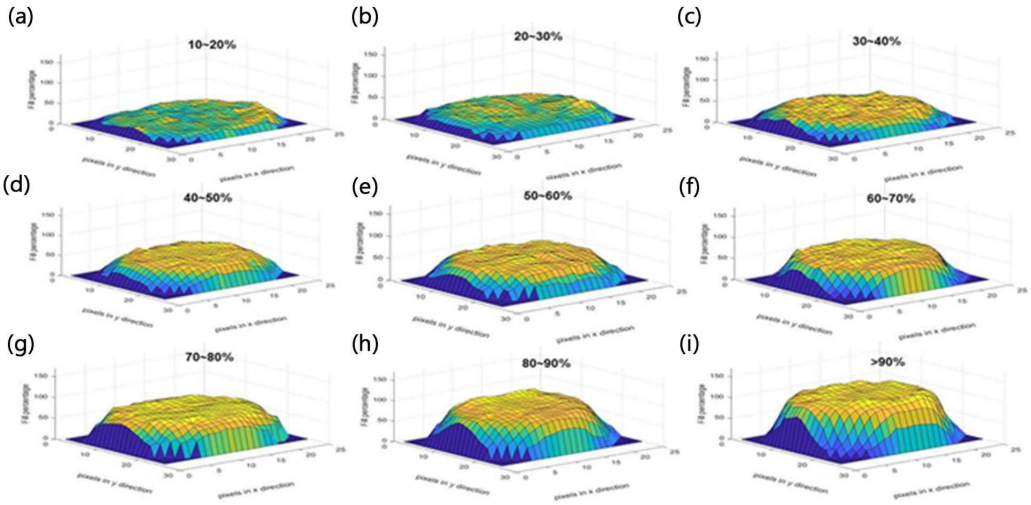
도면13


100
99
98
97
96
95
94
93
92
Accuracy (%)
0 100 200 300 400 500
Iteration for DE algorithm

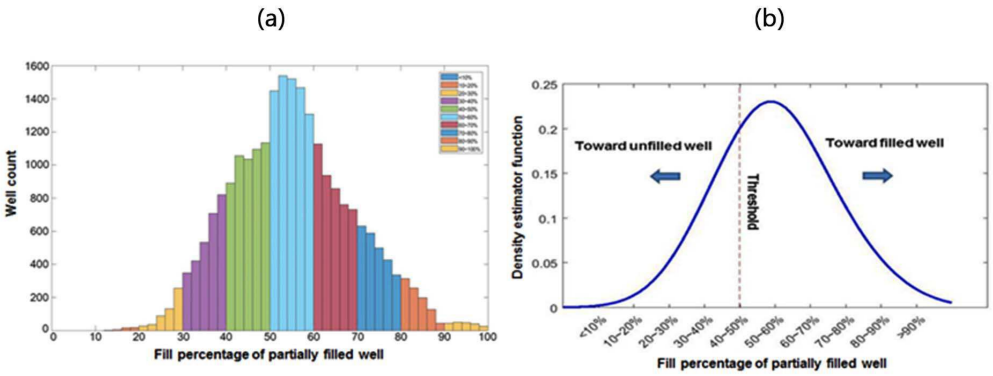
도면14



도면15



도면16



도면17

Class	Percentage	Number	Number (testing)	Number (total)
Tendency toward filled	64%	4,596	16,662	21,258
Tendency toward unfilled	36%	2,585	182	2,767
Total	100%	7,181	16,844	24,025