



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0124904
(43) 공개일자 2012년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/34 (2006.01) **C12Q 1/04** (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0042830

(22) 출원일자 2011년05월06일

심사청구일자 2011년05월06일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

강성호

경기도 수원시 영통구 청명북로 33, 청명삼성래미안아파트 431동 304호 (영통동)

이승아

전라북도 전주시 덕진구 호성2길 24 (호성동1가)

(74) 대리인

특허법인다나

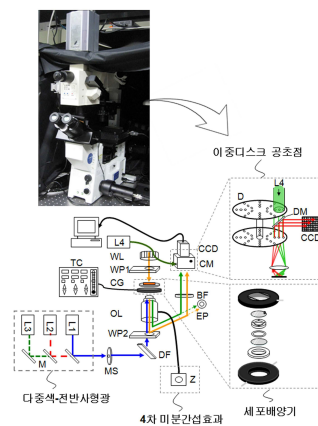
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **살아 있는 세포 내 단일분자 또는 나노입자의 실시간 검출을 위한 다기능 복합 이미지 검출장치**

(57) 요약

본 발명은 시료를 배양하는 세포배양기; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경; 및 상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하는 영상처리부;를 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

시료를 배양하는 세포배양기;

상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과 현미경;

상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경;

상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경; 및

상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하는 영상처리부;를 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기에 인접하게 설치되어 공초점 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 이중디스크 실시간 공초점 현미경을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 다기능 복합 이미지 검출장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 이중디스크 실시간 공초점 현미경과 형광 현미경은 영상처리부에 연결설치된 것을 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시료는 살아있는 세포의 단일분자 또는 나노입자인 다기능 복합 이미지 검출장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세포배양기는 시료인 세포를 배양하기 위한 장소를 제공하는 중공을 갖는 본체; 상기 본체의 일측면에 연결설치되어 세포 배양을 위한 적절한 온도를 제공하는 온도유지수단 및 가열수단; 상기 본체 상부의 일측에 연결설치되어 이산화탄소 및 공기의 혼합기체가 유입되는 유입구; 상기 온도유지수단의 일측에 연결설치되어 본체로 유입된 이산화탄소 및 공기의 혼합기체가 배출되는 배출구 및 상기 본체의 중공을 밀폐시키는 동시에 현미경 촬영을 위한 광이 투과할 수 있도록 하는 투명한 재질의 커버 글라스를 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치를 이용한 세포 내 단일분자의 검출방법.

명세서

기술분야

본 발명은 다기능 복합 이미지 검출장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 4차원 미분간섭 현미경, 다중색-

전반사형광 현미경, 형광 현미경 및/또는 실시간 공초점 현미경을 하나의 장치로 통합하여 구성한 후 마이크로 리터 수준의 시료를 세포 배양하는 것이 가능한 세포배양기와 연결함으로써, 시료의 이동으로 인한 세포 조직의 손상이나 변형 없이 살아있는 단일세포의 나노입자 또는 단일분자간 상호작용 및 동력학적 검출과 분석을 가능하도록 한 다기능 복합 이미지 검출장치에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 살아있는 단일세포 내에서 단일분자 분석 및 영상화의 장점은 동시 다발적으로 반응이 발생되지 않더라도 측정이 가능하다는 것이다. 이는 반응네트워크의 중간단계를 동시화하는 것이 불가능하며, 단백질 분자가 세포 내에서 다른 시간과 위치에서 반응하기 때문이다.
- [0003] 따라서 다중분자 측정기술을 사용하여 반응의 동력학적 또는 반응속도론적인 인자들을 얻기 위해서는 모든 분자의 반응에 있어 출발점을 일치시킬 수 있는 특별한 기술을 필요로 한다.
- [0004] 그러므로 복수의 기능 즉, 다기능을 통합한 이미지 검출방법, 바람직하게는 단일분자 이미지 검출방법은 전술한 문제점을 극복할 수 있도록 할 수 있을 뿐만 아니라, 동력학적 및 반응속도론적인 인자들의 파동이나 분포에 대한 다양한 정보를 제공할 수 있다.
- [0005] 이러한 동력학적 및 반응속도론적인 인자들의 파동이나 분포에 대한 다양한 정보의 제공은 단일분자 실험에서 리간드, 물질의 결합 또는 해리와 같은 입력(in-put)과 출력(out-put)을 개별적으로 각각 모니터링 할 수 있도록 하고, 세포 내에서의 반응단계를 이해할 수 있도록 모든 입력과 출력 사이의 관계를 제공한다.
- [0006] 따라서, 살아있는 세포 내의 실시간 나노입자나 단일분자의 검출과 분자간의 상호작용 및 동력학적 분석을 위해 시료의 이동 없이 실시간 나노입자 또는 단일분자의 영상화가 가능하도록 다양한 광학현미경 기술이 통합된 새로운 단일분자 이미징 검출시스템을 개발하는 것이 절실히 요구되고 있다.
- [0007] 최근 들어 생명과학, 의학, 생화학, 생물리학 및 나노바이오융합 등의 다양한 분야에서 용액 중 단일분자(single-molecule)의 조작과 영상화를 위한 연구가 크게 각광받고 있다.
- [0008] 특히, 생체 외(in vitro)에서 핵산 분자나 정제된 단백질의 기능과 구조적 동력학의 단일분자 분석에 대한 많은 연구결과가 발표되고 있지만, 살아있는 세포 내(in vivo) 단일분자나 나노입자의 실시간 분석은 세포 내 위치적 환경의 다양성과 구조적인 복잡성으로 인해 생체 외에서 세포의 조건을 재구성하는 것이 거의 불가능하다고 알려져 있으므로 "살아있는 세포 (live cell)" 내에서 단일분자의 실시간 측정 및 분석과 관련된 연구가 더디게 진행되고 있다.
- [0009] 나아가, 생물체나 인체 시스템에 대한 연구는 거시적인 관점에서 어느 표본 집단의 평균적인 특성(ensemble average)을 연구하는데 주력해 왔으나, 이는 개별 개체의 고유의 값을 평균화시킴으로써 개체 각각에 대한 정확한 데이터를 얻을 수 없다.
- [0010] 그러므로 최근 들어 원자나 분자 수준에서 더 정확한 질병의 진단 및 생체분자 상호간의 작용기작, 생체시스템의 원리를 규명하기 위한 단일분자검출(single-molecule detection, SMD) 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 시료, 예를 들면 마이크로-리터(μL , 10^{-6}L) 수준의 시료의 세포를 배양하는 것이 가능한 세포배양기에 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경 및/또는 실시간 공초점 현미경 등의 광학 현미경을 장착하여 하나의 장치로 구성함으로써, 시료의 이동으로 인한 세포조직의 손상이나 변형 없이, 살아있는 단일세포 내의 나노입자 또는 단일분자간의 상호작용 및 동력학적 검출과 분석을 가능하도록 하는 다기능 복합 이미지 검출장치를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은
- [0013] 시료를 배양하는 세포배양기;
- [0014] 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과 현미경;
- [0015] 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경;
- [0016] 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경; 및
- [0017] 상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하는 영상처리부;를 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치 및 이를 이용한 검출방법을 제공한다.
- [0018] 이때, 상기 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기에 인접하게 설치되어 공초점 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 이중디스크 실시간 공초점 현미경을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 시료의 이동 없이 살아있는 세포 내의 다양한 단일생체분자나 나노입자들의 실시간 검출 및 이미지 분석을 통해 단일세포 내 분자간의 상호작용 및 동력학적 연구를 가능하도록 할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 살아있는 세포를 단일분자 수준에서 개체 각각에 대한 정확한 데이터를 얻을 수 있기 때문에 생물체나 인체 시스템에 대한 정확한 이해는 물론, 정확한 병의 진단 및 생체분자 상호간의 작용기작, 생체시스템의 원리 규명에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명에 따른 도립형(inverted type) 다기능 복합 이미지 검출장치를 나타내는 그림 및 이의 모식도,
- 도 2는 본 발명에 따른 정립형(upright type) 다기능 복합 이미지 검출장치를 나타내는 구성도,
- 도 3은 본 발명에 따른 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 다중색-전반사형광 현미경과 Dual-View를 나타내는 그림 및 이의 모식도,
- 도 4는 본 발명에 따른 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 미분간섭효과 현미경과 도브프리즘형 전반사형광 현미경이 결합된 형태를 나타내는 그림 및 이의 모식도,
- 도 5는 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 세포배양기를 나타내는 구성도,
- 도 6은 단일-유전자분자들 간의 상호 결합반응을 나타내는 도,
- 도 7은 두 분자의 혼성화를 유리기질 위에서 서로 다른 들뜸 파장을 동시에 사용한 다중색-전반사형광검출에 의해 수집한 이미지를 나타낸 도,
- 도 8은 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 미분간섭효과 현미경을 이용한 다양한 기질 위에 놓인 살아있는 세포의 이미지를 나타내는 도,
- 도 9는 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 다중색-전반사형광 현미경과 4차원 미분간섭효과 현미경을 이용한 살아있는 HeLa 세포 중의 polyplexes 나노입자의 실시간 운동역학 이미지를 나타내는 도,
- 도 10은 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 대물렌즈형의 전반사형광 현미경 및 미분간섭효과 현미경을 이용하여 살아있는 쥐 심근세포 내 마그네슘이온의 동력학적 이미지 및 시간에 따른 마그네슘이온의 신호감응을 나타내는 도,
- 도 11은 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 실시간 공초점 현미경을 이용하여 단일유전자분자를

검출한 이미지를 나타내는 도,

도 12는 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치의 형광 현미경, 전반사형광 현미경, 공초점 현미경 및 미분간섭 효과 현미경을 이용한 나노입자 및 살아있는 세포의 복합된 이미지를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 한 가지 관점에서, 본 발명은 시료를 배양하는 세포배양기; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경; 및 상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하는 영상처리부를 포함하는 다기능 복합 이미지 검출장치를 제공한다.
- [0023] 다른 관점에서, 본 발명은 다기능 복합 이미지 검출장치를 이용한 세포 내 단일분자의 검출방법을 제공한다.
- [0024] 여기서, 상기 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기에 인접하게 설치되어 공초점 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 이중디스크 실시간 공초점 현미경을 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 시료, 예를 들면 세포 등의 시료 내의 단일분자 또는 나노입자의 실시간 검출 및 이미지화하는 것으로서, 이러한 목적을 갖는 검출장치라면 특별히 한정되지 않는다.
- [0026] 특히, 상기 다기능 복합 이미지 검출장치는 시료의 이동 없이 살아있는 세포 내 단일분자 또는 나노입자의 실시간 검출이 가능하다.
- [0027] 이때, 상기 세포 내 나노입자는 그 크기가 한정되는 것이 아니라, 상기 나노입자 보다 큰 입자, 즉 마이크로 입자 등을 포함할 수 있으며, 추천하기로는 다기능 복합 이미지 검출장치로 검출 가능한 크기라면 어떠한 크기라도 무방하다.
- [0028] 상기 다기능 복합 이미지 검출장치는 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과(4-dimensional differential interference contrast, 4D DIC) 현미경, 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경(multi-color total internal reflection fluorescence microscopy, MC-TIRFM), 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경(epi-fluorescence microscopy) 및/또는 공초점 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 이중디스크 실시간 공초점 현미경(dual-disk real-time confocal microscopy, DD RT-CM)이 결합되어 하나의 장치로 통합되도록 구성된다.
- [0029] 여기서, 상기 4차원 미분간섭효과 현미경은 단일세포나 비형광 나노입자의 3차원 이미지뿐만 아니라, z-모터를 장착하여 다양한 공간적 다중-이미지와 시간 개념이 포함된 4차원 이미지의 영상화를 구현할 수 있다.
- [0030] 이때, 상기 공간은 10nm의 간격일 수 있지만, 이에 특별하게 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 상기 다중색-전반사형광 현미경은 바탕의 형광잡음을 최소화하여 세포막과 단일세포 안의 시료에 대한 초고감도 검출법으로서, 세포 내 다수의 시료가 혼합되어 있어도 혼합시료에 존재하는 각각의 나노입자나 단일분자에 대해 실시간 검출이 가능하도록 한다.
- [0032] 또한, 이중디스크 실시간 공초점 현미경은 이중디스크 기술 및 다중점 스캐너(multi-point scanner)를 사용한 신속한 이미지의 수집과 높은 S/N비(signal to noise ratio)에 의해 개선된 고해상도, 적은 광표백, 광독성 효과에 의한 단일세포 시료내의 나노입자 및/또는 단일분자의 3차원적 실시간 이미지 및 위치 추적이 가능하도록 한다.
- [0033] 본 발명에 따른 형광 현미경은 당업계의 통상적인 형광 현미경이다. 이때, 상기 형광 현미경은 다기능 복합 이미지 검출장치의 베이스 현미경으로 제공되어 상기 형광 현미경의 재물대를 공유할 수 있도록 다른 기능을 갖는 구성요소, 예를 들면 4차원 미분간섭효과를 나타내는 구성요소(현미경), 다중색-전반사형광 효과를 나타내는 구성요소(현미경) 및/또는 이중디스크 실시간 공초점 효과를 나타내는 구성요소(현미경)가 결합되어 하나의 장치로 통합될 수 있다.
- [0034] 특히, 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 전술한 현미경들을 하나의 장치로 융합함으로써, 시료의 이동 없이 살아있는 단일세포 내의 단일분자 및/또는 나노입자의 실시간 운동역학, 특성평가, 분자간의 상

호작용, 나노독성 등을 검출할 수 있다.

- [0035] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다. 그러나 하기의 설명은 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로 하기 설명에 의해 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 도 1은 본 발명에 따른 도립형(inverted type) 다기능 복합 이미지 검출장치를 나타내는 그림 및 이의 모식도, 도 2는 본 발명에 따른 정립형(upright type) 다기능 복합 이미지 검출장치를 나타내는 구성도, 도 3은 본 발명에 따른 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 다중색-전반사형광 현미경과 Dual View를 나타내는 그림 및 이의 모식도, 도 4는 본 발명에 따른 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 미분간섭효과 현미경과 도브프리즘형 전반사형광 현미경이 결합된 형태를 나타내는 그림 및 이의 모식도, 도 5는 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치에 포함된 세포배양기를 나타내는 구성도로서 함께 설명한다.
- [0037] 도 1 내지 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 시료를 배양하는 세포배양기; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 미분간섭효과 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 4차원 미분간섭효과 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 시료의 전반사형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 다중색-전반사형광 현미경; 상기 세포배양기에 인접하게 설치되어 형광 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 형광 현미경; 및 상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경과 형광 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하는 영상처리부를 포함한다.
- [0038] 특정 양태로서, 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기에 인접하게 설치되어 공초점 현미경 기법을 이용하여 시료의 이미지를 획득하는 이중디스크 실시간 공초점 현미경을 더 포함할 수 있다.
- [0039] 이때, 상기 이중디스크 실시간 공초점 현미경은 영상처리부에 연결설치되어 실시간 공초점 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리할 수 있다.
- [0040] 한편, 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 재물대를 기준으로 대물렌즈의 위치에 따라 도립형 또는 정립형으로 분류될 수 있으며, 상기 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기의 하부방향에 대물렌즈가 위치하며, 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치는 세포배양기의 상부방향에 대물렌즈가 위치한다.
- [0041] 본 발명에 따른 세포배양기는 측정하고자 하는 시료, 예를 들면 세포가 배양되는 장소를 제공하기 위한 것으로서, 이러한 목적을 갖는 통상적인 세포배양기라면 특별히 한정되지 않는다.
- [0042] 특정 양태로서, 상기 세포배양기는 시료인 세포를 배양하기 위한 장소를 제공하는 중공을 갖는 본체(2); 상기 본체(2)의 일측, 예를 들면 본체(2)의 외주면에 연결설치되어 세포 배양을 위한 적절한 온도를 제공하는 온도유지수단(4) 및 가열수단(10); 상기 본체(2) 상부 일측에 연결설치되어 이산화탄소 및 공기의 혼합기체가 유입되는 유입구(6); 상기 온도유지수단(4)의 일측에 연결설치되어 본체(2)로 유입된 이산화탄소 및 공기의 혼합기체가 배출되는 배출구(12); 및 상기 본체(2)의 중공을 밀폐시키는 동시에 현미경 촬영을 위한 광이 투과할 수 있도록 하는 투명한 재질의 커버 글라스(8)를 포함할 수 있다.
- [0043] 이때, 상기 본체(2)의 상부에는 세포 배양을 위한 광을 제공하는 할로겐 램프가 더 구비될 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 본체(2)와 본체(2)의 하단에 연결 설치되는 커버 글라스(8) 사이에는 오링(14)이 구비되어 본체(2) 내부에서 배양되는 시료가 외부로 유출되는 것을 방지할 수 있다.
- [0045] 한편, 본 발명에 따른 세포배양기는 그 내부가 완전히 밀봉되는 것이 아니므로, 공기가 자유로이 세포배양기의 내부로 유입될 수 있으며, 상기 이산화탄소 배출구(12)를 통해 내부로 유입된 공기를 이산화탄소와 함께 배출할 수도 있다.
- [0046] 또한, 상기 세포배양기는 현미경의 재물대에 놓여진다.
- [0047] 본 발명에 따른 4차원 미분간섭효과 현미경은 시료, 예를 들면 세포배양기에서 배양되는 세포에 광, 예를 들면 레이저 광을 조사함으로써, 단일세포나 비형광 나노입자의 3차원 이미지뿐만 아니라, z-모터를 장착하여 다양한 공간적 다중-이미지와 시간 개념이 포함된 4차원 이미지의 영상화를 구현할 수 있도록 하는 것으로서, 이러한 목적을 갖는 현미경이라면 특별히 한정되지 않는다.

- [0048] 이때, 상기 공간은 약 10nm의 간격을 갖는 공간일 수 있으며, 이는 사용자의 선택에 따라 변경될 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 미분간섭효과는 측정 및 비교 빔 시스템이 서로 간섭한다는 점에서 통상의 간섭계와 유사하나, 그 차이점은 비교 빔도 물체를 통과한다는 점이다. 즉 시료 투과 후의 광 위상의 엇갈림을 제2의 광선과 간섭시킴으로써 간섭무늬 또는 간섭색의 변화로 이미지 등을 검출한다. 그러므로 상기 미분간섭효과 현미경에서는 지나가는 광로 차이에 의하여 시료, 예를 들면 단일세포 및/또는 나노입자의 이미지를 측정할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 다중색-전반사형광 현미경은 바탕의 형광잡음을 최소화하여 세포막과 단일세포 안의 시료에 대한 초고감도 검출법으로서, 세포 내 혼합시료에서도 각각의 나노입자나 단일분자에 대해 실시간 검출이 가능하도록 한다.
- [0051] 또한, 상기 전반사형광 현미경은 빛이 유리와 물 등과 같이 굴절률이 서로 다른 2개의 다른 매체를 지날 때, Snell의 공식에 의해 굴절과 산란이 일어나는 것을 이용한다.
- [0052] 특히, 상기 굴절과 산란이 일어날 때, 어느 특정한 입사각에서 빛이 더 밀도가 큰 매질 방향으로 전반사(total internal reflection, TIF)가 일어난다. 이때 유리 또는 고분자 물질 등과 같은 고체의 반대쪽 표면 위의 용액 내에 약 150nm의 EFL(evanescent field layer)가 발생하는데, 이 영역에서는 빛의 입사각에서 올 수 있는 방해 효과(노이즈)가 최소화되어 입사광의 세기를 적절히 증가시키면 신호-대-잡음 비인 S/N비를 효율적으로 극대화시켜 검출 감도를 단일분자의 검출이 가능한 단계까지 높일 수 있다.
- [0053] 그러나 이러한 장점에도 불구하고, 전반사형광 현미경 기술을 이용한 단일분자검출 방법은 고체/액체 경계면에서 약 350nm 내인 EFL에서만 단일생체분자를 측정할 수 있으므로, 예컨대, 유전자나 단백질과 같은 단일생체분자가 세포 내의 어느 영역에 분포되었는지를 측정하는 데에는 어려움이 있을 수 있다.
- [0054] 한편, 상기 다중색-전반사형광 현미경의 다중색은 적어도 두 개 이상의 색상이 다른 광원, 예를 들면 레이저를 지칭한다.
- [0055] 또한, 상기 다중색-전반사형광 현미경에 사용되는 기질은 도브프리즘, 직각삼각형 프리즘 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것이 아니며, 빛이 투과되며 굴절시킬 수 있는 프리즘이라면 어떠한 것을 사용하여도 무관하다.
- [0056] 본 발명에 따른 형광 현미경은 자외선에 의한 형광현상을 이용하는 현미경을 지칭하는 것으로서, 이러한 목적을 갖는 당업계의 통상적인 형광 현미경이라면 특별히 한정되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 따른 이중디스크 실시간 공초점 현미경은 이중디스크 기술 및 다중점 스캐너(multi-point scanner)를 사용한 신속한 이미지의 수집과 높은 S/N비(signal to noise ratio)에 의해 개선된 고해상도, 적은 광표백, 광독성 효과에 의한 단일세포 시료 내의 나노입자 및/또는 단일분자의 3차원적 실시간 이미지 및 위치추적이 가능하도록 한다.
- [0058] 상기 공초점은 광원이 되는 레이저에서 시료의 초점과 맞지 않는 광은 제거하고 초점과 일치하는 광만 사용한다는 의미이며, 상기 공초점 현미경은 레이저를 시료에 쏘아 일정한 파장의 광을 발생시켜 대물렌즈를 지나도록 한 다음, 초점이 정확하게 맞는 빛만을 검출기 조리개로 분리한 뒤 검출기로 받아 디지털 신호로 변환하여 관찰한다.
- [0059] 특히, 상기 광원인 레이저는 시료의 내부까지 깊이 침투할 수 있기 때문에 윗부분부터 아랫부분까지 단층 이미지를 촬영하면 살아 있는 세포를 3차원 입체 영상으로 관찰할 수 있도록 한다.
- [0060] 본 발명에 따른 영상처리부는 상기 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경 및/또는 이중디스크 실시간 공초점 현미경에 연결설치되어 각 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하여 수요자가 원하는 영상으로 출력하기 위한 것으로서, 이러한 목적을 갖는 당업계의 통상적인 영상처리부라면 특별히 한정되지 않는다.
- [0061] 이때, 상기 영상처리부는 영상을 처리하기 위해 프로그램화 되어 있는 컴퓨터 또는 마이크로프로세서 등인 것이 좋다.
- [0062] 이상과 같이, 본 발명에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치는 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경, 형광 현미경 및/또는 이중디스크 실시간 공초점 현미경이 서로 하나의 장치로 융합되어 구성됨으로써, 시료, 예를 들면 살아있는 단일세포 내에서 단일분자 분석 및 영상화가 이루어진다.
- [0063] 특히, 상기 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 4차원 미분간섭효과 현미경, 다중색-전반사형광 현미경,

형광 현미경 및/또는 이중디스크 실시간 공초점 현미경은 각각 독립적으로 해당 기능을 작동할 수도 있지만, 각 구성요소가 서로 조합되어 동시에 작동될 수도 있다.

[0064] 이러한 일례로서, 미분간섭효과 현미경 및 전반사형광 현미경을 이용한 검출기술이 서로 융합되어 미분간섭효과 현미경으로 시료, 예를 들면 세포의 윤곽이나 핵의 위치를 세포의 염색 없이 검출하는 동시에 형광염료가 결합된 나노입자의 세포 내 위치를 실시간으로 추적할 수 있다.

[0065] 한편, 상기 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성함에 있어서, 세포배양기는 기본 베이스를 제공하는 하나의 현미경, 예를 들면 형광 현미경의 재물대에 놓여지며, 기본 베이스로 제공되는 상기 형광 현미경을 기준으로 미분간섭효과, 다중색-전반사형광 효과 및/또는 이중디스크 실시간 공초점 효과를 제공할 수 있는 구성요소가 서로 연결설치되어 하나의 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성한다.

[0066] 이때, 상기 현미경 각각을 서로 연결설치하는 구성은 사용자의 선택에 따라 변경될 수 있다.

[0067] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하기로 한다. 그러나 하기의 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0068] <실시예 1>

[0069] 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 구성된 다중(이중)색-전반사형광 현미경을 이용한 단일-유전자분자들의 상호 결합반응의 실시간 검출

[0070] 가. 시료 준비

[0071] 단일가닥 유전자(ss DNA) 올리고뉴클레오타이드, HS-(CH₂)₆-5'-TTT TTT GGT GAG GAG G-3'-fluorescein(프로브유전자)는 Bioneer(Dajeon, Korea)사에서 구입하였다.

[0072] 상보적인 표적유전자(ss) 올리고뉴클레오타이드, 5'-Cy5-CAT CCT CAC CCC CCC CCC CAT GGG CCT CAG GTT CAT CCC CCT CCT CAC CAA AAA A-3'-Cy5 (표적유전자)는 Sigma-Proligo(Helio, Singapore)사에서 구입하였다. 이때, 모든 유전자는 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)에 의해 정제되었다.

[0073] 모든 유전자는 10mM Gly-Gly 완충용액으로 50fM(50 x 10⁻¹⁵M)로 희석하여 사용하였다.

[0074] 나. 커버글라스의 아민 코팅법

[0075] 가로x세로 22-mm인 커버글라스(Corning, NY)를 H₂SO₄와 H₂O₂를 2:1(v/v)비로 혼합하여 초음파 세척기를 이용하여 15분 동안 세척하였다.

[0076] 기질 표면은 정제된 3차 증류수(MilliQ/Milli-RO water, 18.2MΩ)로 세척하고, 질소가스를 이용하여 건조시켰다.

[0077] Poly-L-lysine(PLL, Sigma-Aldrich)-코팅 커버글라스는 0.1% PLL 용액에 10분 동안 담가 반응시킨 후 증류수로 세척하여 질소가스로 건조시켜 이용하였다.

[0078] 다. 유전자분자의 고정과 혼성화

[0079] 아민 작용기가 활성화된 PLL-코팅 커버글라스(기질)에 염기서열과 길이를 알고 있는 3' 말단에 플루오레세인(fluorescein)이 결합된 단일가닥 유전자 올리고머(50fM in 10mM Gly-Gly buffer, pH 8.2)를 5μl 떨어뜨린 후 UV램프(90mJ/cm²)로 30초 동안 상온에서 반응시킨 후 80℃에서 15분 동안 반응시켰다.

[0080] 블로킹(blocking) 용액은 0.171g의 succinic anhydride(Sigma-Aldrich), 9mL의 n-methyl-pyrrolidinone(Merck, Hohenbrunn, Germany), 1M의 sodium borate(pH 8.0, Sigma-Aldrich) 용액 1mL를 10mL

부피가 되도록 혼합하여 제조하였다.

- [0081] 프로브유전자(probe DNA)가 고정된 기질은 20분 동안 블로킹 용액에 담가 반응시키고, 10분 동안 증류수로 세척하였다. 95℃에서 2분 동안 증류수에 담가 다시 한번 세척하였고, 95% 에탄올에 2분 동안 담가 세척하였다.
- [0082] 세척이 끝나면 질소가스를 이용하여 건조시켰다.
- [0083] 염기서열과 길이를 알고 있는 상보적 또는 비상보적인 유전자를 포함하는 표적 단일가닥 유전자(target ssDNA: 5fM, 10fM, 50fM)를 기질에 고정된 프로브유전자 위에 떨어뜨렸다.
- [0084] 37℃에서 12시간 반응시켜 단일가닥 유전자들의 혼성화 반응을 시켰다.
- [0085] 반응이 끝난 기질은 saline sodium citrate(2x SSC, 0.1% SDS), 1x SSC, 0.2x SSC 용액 순으로 세척하고, 질소가스로 건조시켰다(도 6).
- [0086] 라. 프리즘형 이중색-전반사형광 현미경
- [0087] 도 2에 도시된 바와 같이, 정립형 Zeiss Axioskop2 현미경(Zeiss, Germany)은 Dual-View(Optical Insight, Tucson, AZ)를 장착하여 단일가닥 유전자분자들 간의 상호결합반응을 실시간 검출하는데 이용하였다.
- [0088] 대물렌즈는 Plan-Neofluar 100x/1.3 N.A.(Zeiss, Germany)을 이용하였으며, 검출장치로는 Pentamax 512-EFT/1EA intensified CCD(ICCD, Princeton Instruments, Princeton, NJ) 카메라를 이용하였다.
- [0089] Dual-View는 대물렌즈와 카메라 사이에 장착하였으며, 필터박스는 4종류의 거울(mirrors)과 선별필터(dichroic filter; 565dcxr, Chroma Technology, Rockingham, NC), 두 개의 대역여과기(band-pass filter; D680/35 and D535/40, Chroma Technology)로 구성되어있다.
- [0090] 광원으로는 아르곤이온-레이저(maximum output power 150mW at 488 nm; Melles Griot, Irvine, CA), 표적유전자 검출을 위한 다이오드-레이저 (maximum output power 100 mW at 635 nm; B&W TEKINC, Newark, DE)를 이용하였다.
- [0091] 광표백의 영향을 줄이기 위해 각각의 레이저 앞에 기계셔터를 장착하고, 데이터의 수집 시에만 셔터가 열리도록 하였다.
- [0092] 데이터의 수집은 WinView/32(Version 2.5.14.1, Downingtown, PA)과 MetaMorph 6.3(Universal Imaging Co., Downingtown) 소프트웨어를 이용하였다.
- [0093] 마. 결과
- [0094] 도 7은 50fM의 플루오레세인(fluorescein)이 결합된 16-mer 단일가닥 프로브유전자 분자와 50fM의 55-mer의 Cy5가 결합된 단일가닥 표적유전자를 488nm와 635nm 레이저를 이용하여 두 분자의 혼성화를 이중색-전반사형광검출에 의해 수집한 이미지를 나타낸다.
- [0095] 여기서, (A)는 플루오레세인이 결합된 16-mer 프로브-단일가닥 유전자분자(probe ssDNA, 녹색)이고, (B)는 Cy5가 결합된 55-mer 표적-단일가닥 유전자분자(target ssDNA, 적색)이고, (C) 단일가닥 유전자분자들 간의 상호결합반응을 검출한 이미지(노란색) 이다.
- [0096] 도 7에 나타낸 바와 같이, 서로 상보적인 단일가닥 유전자분자의 위치와 혼성화를 단일분자 수준에서 직접적으로 모니터링 할 수 있음을 보여주었다.
- [0097]
- [0098] <실시예 2>
- [0099] 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 미분간섭효과 현미경과 전반사형광 현미경을 이용한 살아있는 세포 내 나노입자의 실시간 검출
- [0100] 가. 시료 준비

- [0101] Polyamidoamine G4(PAMAM)와 FITC는 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.
- [0102] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), DPBS(Dulbecco's Buffered Saline), FBS(Fetal Bovine Serum), Trypsin-EDTA, 항생제로 사용한 Penicillin-streptomycin은 지브코(GIBCO, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)사로부터 구입하였다.
- [0103] DMEM은 순수한 3차 증류수 1L에 구입한 DMEM 1포를 녹여 제조하였다.
- [0104] 얼려있는 FBS는 실험하기 전에 55.7℃의 끓는 물에 30분 정도 중탕하여 녹인 후 DMEM의 10%, 항생제 1% 비율로 섞어 배양액을 제조하고, DPBS는 세포를 세척하는데 사용하였다.
- [0105] 세포에 닿을 만한 모든 실험 기구는 멸균하여 사용하였다.
- [0106] PAMAM 나노입자(PAMAM-FITC)와 plasmid 유전자는 다음과 같이 준비하였다: PAMAM-FITC과 1.0 μ g plasmid 유전자를 200 μ l의 FBS-free DMEM에 전하비가 6이 되도록 혼합하였다. 혼합용액은 30분 가량 상온에서 반응시켰다. 혼합용액은 이미지를 얻기 전에 세포에 주입하였다.
- [0107] 나. 세포 배양
- [0108] HEK 293 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)는 커버글라스(22 mm sq., No. 1. Dow Corning, Corning, NY, USA)에 75,000개 이하의 세포를 뿌려 37℃/5% CO₂ 세포배양기에서 배양되도록 하였다.
- [0109] 2시간 배양 후 커버글라스에 부착되어 자라는 세포 외 상태가 좋지 못한 세포나 죽은 세포 및 배양액을 제거하기 위해 PBS와 DPBS 용액으로 세척하였다.
- [0110] 세포가 자라는 커버글라스는 직각삼각형 프리즘(right angle prism)이나 모든 면에 빛이 투과되는 도브프리즘(all-side polished dove prism: BK7, 15 mm x 63 mm x 15 mm, $n = 1.522$, Korea Electro-Optics Co. LTD., Korea) 위에 올려놓고, 미분간섭효과 현미경을 이용하여 살아있는 세포의 이미지를 검출하였다.
- [0111] 또한, FITC가 결합된 나노입자를 세포와 반응시킨 후 전반사형광 현미경을 이용하여 세포 내 나노입자의 위치나 분포를 관찰하였다.
- [0112] 다. 미분간섭효과 현미경 및 도브프리즘형 전반사형광 현미경의 결합
- [0113] 도 4에 도시된 바와 같이, 전반사형광 현미경 검출장치(Digital Bio Technology Co, LTD., Korea)는 기질로서 모든 면에 빛이 투과되는 도브프리즘을 포함하며, 정립형 올림푸스현미경(Olympus BX51 microscope, Olympus Optical Co. LTD., Shinjuku-ku, Japan)을 기본으로 하였다.
- [0114] 여기서, 상기 기질인 도브프리즘은 커버글라스, 직각삼각형 프리즘으로 교체하여 장치를 구성한 후 각 장치에 대해 동일한 실시예를 수행하였다.
- [0115] 오일타입의 100x 대물렌즈(Olympus UPLFL 100x/1.3 N.A., W.D. 0.1)를 이용하였다.
- [0116] CCD카메라는 Cascade 512B(Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 이용하였으며, 노출시간은 100ms로 하였다.
- [0117] 광원으로는 488nm 레이저(532-LAP-431-220, Melles Griot, Irvin, USA)를 이용하였고, notch filter 488nm(Korea Electro Optics, Korea)를 장착하여 사용하였다.
- [0118] 광표백의 영향을 줄이기 위해 기계셔터를 장착하고, 데이터의 수집 시에만 열리도록 하였다. 데이터의 수집은 MetaMorph 6.3(Universal Imaging Co., Downing town, USA) 소프트웨어를 통해 이루어졌다.
- [0119] 라. 결과
- [0120] 도 8은 다양한 기질 위에 놓인 살아있는 세포의 미분간섭효과를 나타내는 이미지로서, (A)는 기질로서 커버글라스를 사용한 것이고, (B)는 기질로서 직각삼각형 프리즘을 사용한 것이고, (C)는 기질로서 모든 면에 광이 투과되는 도브프리즘을 사용한 것이다.
- [0121] 도 8에 나타난 바와 같이, 미분간섭효과 현미경과 전반사형광 현미경이 결합된 장치는 두 검출기술의 특성을

고려하여 미분간섭효과기술로 세포의 윤곽이나 핵의 위치를 세포의 염색 없이 검출이 가능하였으며, 형광염료가 결합된 나노입자의 세포 내 위치 추적을 실시간으로 동시에 검출 할 수 있는 장점을 가지고 있었다.

[0122] <실시예 3>

[0123] 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 구성된 4차원 미분간섭효과 현미경과 이중색-전반사형광 현미경을 이용한 유전자가 결합된 PAMAM-나노입자의 HeLa 세포 내의 실시간 운동역학의 측정

[0124]

[0125] 가. 시료 준비

[0126] 실시예 2와 동일한 방법으로 실시하되, PAMAM는 아미노산의 일종인 아르기닌과 리신을 합성하여 PAMAM-아르기닌(PAMAM-R)과 PAMAM-리신(PAMAM-K)의 세포 내 특성을 조사하였고, 각각의 나노입자는 Alexa 633(PAMAM-R-Alexa 633/DNA)과 Alexa 488(PAMAM-K-Alexa 488/DNA)의 형광염료를 결합시켜 이중색-전반사형광 현미경을 이용하여 동시 검출하였다.

[0127] 나. 세포 배양

[0128] 실시예 2와 동일한 방법으로 실시하되, 세포는 자궁경구 암 세포인 HeLa 세포를 사용하였다.

[0129] 다. 4차원 미분간섭효과 현미경/이중색-전반사형광 현미경 결합

[0130] 실시예 2와 동일한 방법으로 실시하되, 이중색-전반사형광 현미경 검출 장치에서 광원으로 488nm-아르곤이온 레이저뿐만 아니라, 633nm-반도레이저 (SNF-xxx-635-10-KB, Edmund Industrial Optics)를 동시에 사용하였다.

[0131] Dual-View(Photometrics)의 장착으로 다른 파장에서 발광하는 빛을 동시에 검출하였다. 이때, 필터 박스는 실시예 1과 동일하다.

[0132] 또한, 4차원 미분간섭효과 현미경의 작동을 위해 z-축을 10nm 간격으로 광학절편 할 수 있는 z-모터를 장착하였다.

[0133] 라. 결과

[0134] 도 9는 정립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 도브프리즘형 다중색-전반사형광 현미경과 4차원 미분간섭효과 현미경을 이용한 살아있는 HeLa 세포 중의 polyplices 나노입자의 실시간 운동역학 이미지를 나타내는 도이다.

[0135] 여기서, (A)는 PAMAM-K-Alexa488/DNA의 전반사형광(TIRF) 이미지, (B)는 PAMAM-R-Alexa633/DNA의 전반사형광(TIRF) 이미지, (C)는 미분간섭효과(DIC) 이미지, (D)는 4차원 미분간섭효과 현미경을 이용한 z-축 광학절편한 이미지를 나타낸다.

[0136] 또한, (E) 내지 (H)는 다기능 복합 이미지 검출장치를 이용하여 검출된 이미지를 3차원으로 재구성한 이미지를 나타낸다.

[0137] 도 9에 도시된 바와 같이, 하나의 살아있는 세포 안에서 특성이 다른 두 나노입자(PAMAM-R-Alexa 633/DNA 및 PAMAM-K-Alexa 488/DNA)의 동시적인 위치 추적이 가능함을 보였으며, z-축의 광학절편으로 인해 첫 초점면이 다른 세포에서 나노입자가 세포 밖이 아닌 안쪽에 존재한다는 것을 확인하였다.

[0138] 또한, 3차원 미분간섭효과 현미경의 이미지에 시간 요소를 더해 4차원 미분간섭효과 이미지를 얻을 수 있었다.

[0139] <실시예 4>

[0140] 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 구성된 미분간섭효과 현미경/전반사형광 현미경을 이용한 살아있는 세

포 내 이온채널의 신호전달 및 위치추적 실험

- [0141] 가. 시료 준비
- [0142] 쥐의 심근세포는 250 내지 350g의 생후 7주된 쥐를 경추탈골 시킨 후 심장을 적출하여 Krebs-Henseleit(K-H) 용액에 담근다.
- [0143] 심장은 작은 조각으로 잘라 칼슘이온이 없는 K-H 용액에 담가 배양하였다. 마지막으로 심근세포를 획득하여 칼슘-마그네슘 이온이 포함된 Tyrode 용액에 보관하였다.
- [0144] 세포배양접시에 추출한 심근세포를 넣고 마그네슘이온을 염색시키기 위해 5 μ M mag-fluo-4-AM을 추가한 후 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 조건에서 30분 동안 반응시켰다. 칼슘-마그네슘이온이 없는 타이로드(Tyrode)용액으로 심근세포를 세척하여 마그네슘이온과 반응하지 않은 mag-fluo-4-AM을 제거하였다.
- [0145] 커버글라스는 챔버웰을 부착하여 대물렌즈 위에 올려놓고, 챔버웰 가장자리의 작은 구멍(2mm 크기)에 mag-fluo-4-AM로 염색된 살아있는 심근세포와 BAPTA-AM 용액을 주입하였다.
- [0146] 심근세포는 미분간섭효과 이미지를 통해 세포의 상태와 위치를 확인하였고, 100 μ M Na⁺ATP 용액을 주입함과 동시에 마그네슘 이온의 전반사형광 이미지를 수집하였다.
- [0147] 나. 미분간섭효과 현미경/도립형 전반사형광 현미경의 결합
- [0148] 두 개의 미분간섭효과 슬라이더(U-DICTS과 IX2-AN, Olympus)가 장착된 올림푸스 IX71 도립형 현미경은 미분간섭효과/전반사형광 이미지를 얻기 위해 이용하였다.
- [0149] 높은 개구수(1.45)와 작동거리(0.13-0.19)를 가진 오일 타입의 전반사형광 현미경 전용 대물렌즈 plan Apo N 60x를 이용하였다.
- [0150] CCD 카메라는 Cascade 512B(Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 이용하며, 노출시간은 20ms으로 하였다.
- [0151] 광학필터박스는 사용되는 광원의 파장에 따라 notch-filter 488nm(Korea Electro Optics, Korea)를 장착하여 이용하였다. 광원으로는 488nm-레이저(532-LAP-431-220, Melles Griot, Irvin, USA)를 이용하였다. 광표백의 영향을 줄이기 위해 기계셔터를 장착하고, 데이터의 수집 시에만 열리도록 하였다. 데이터의 수집은 MetaMorph 7.0(Universal Imaging Co., Downing town, USA) 소프트웨어를 통해 이루어졌다.
- [0152] 다. 결과
- [0153] 도 10은 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 대물렌즈형의 전반사형광 현미경 및 미분간섭효과 현미경을 이용하여 살아있는 쥐 심근세포 내 마그네슘이온의 동력학적 이미지 및 세포 위치에 대해 시간에 따른 마그네슘이온의 신호감응을 나타내는 도이다.
- [0154] 도 10에 나타낸 바와 같이, 지금까지는 살아있는 심근세포 내 마그네슘의 이동 속도가 칼슘이온이나 다른 여러 이온들의 이동 속도에 비해 빠르고, 이로 인한 형광의 차이가 작아서 실시간 검출이 어려웠으나, 실시예 4에 따른 다기능 복합 이미지 검출장치를 이용하여 마그네슘이온의 실시간 위치추적이나 높은 시간적, 공간적 분해능을 갖는 살아있는 단일세포 안의 이온전달이나 이로 인한 스파크 현상을 실시간으로 직접 이미지화하고 관찰할 수 있었다.
- [0155] <실시예 5>
- [0156] 도립형 다기능 복합 이미지 검출장치에 구성된 실시간 공초점형광 현미경을 이용하여 단일유전자분자의 실시간 검출 실험
- [0157] 가. 시료 준비

- [0158] 유전자는 10mM Gly-Gly 완충용액을 이용하여 λ -DNA(48,502 bp)를 제조하였다.
- [0159] 200pM 농도의 유전자 시료를 삽입 염료 YOYO-1(Molecular Probes, Eugene, OR)로 5개의 염기쌍 당 하나의 염료 분자 비율로 표지하였다.
- [0160] YOYO-1로 표지된 유전자 샘플을 희석하여 사용하기 전에 5분간 반응하였다. 실험하기 직전에 유전자 시료를 100fM(100×10^{-15} M)로 희석하여 사용하였다.
- [0161] 나. 실시간 공초점형광 현미경
- [0162] 실시예 4와 동일한 방법으로 실시하되, 공초점형광 이미지를 검출하기 위해 독립형 현미경과 카메라 사이에 공초점 스캐너 모듈(CSU22, YOKOGAWA Electric Co., Japan)을 장착하였다.
- [0163] 광원으로는 488nm-레이저(532-LAP-431-220, Melles Griot, Irvin, USA)를 이용하고, 광학필터박스는 여기필터(excitation filter) 350-500nm, 발광필터(emission filter) 510nm 이상, 색선별필터(dichroic mirror) 500nm 이상 빛이 투과되는 것으로 구성하였다. 노출시간은 100ms으로 하였다.
- [0164] 다. 결과
- [0165] 도 11은 독립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 실시간 공초점형광 현미경을 이용하여 단일 유전자 분자를 검출한 이미지를 나타낸다.
- [0166] 여기서, 상기 검출한 이미지는 YOYO-1 형광염료와 유전자가 1:5비로 표지하여 검출한 것이다.
- [0167] 도 11에 나타난 바와 같이, 이미지로서 실시간으로 단일 유전자분자를 검출 할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0168] <실시예 6>
- [0169] 독립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 이용한 나노입자 및 살아있는 세포의 실시간 검출 실험
- [0170] 가. 시료 준비
- [0171] 형광염료인 이소티오시아네이트(fluorescein isothio-cyanate, FITC)이 실리카 겔에 싸인 나노입자를 에탄올에 희석하여 제조한다.
- [0172] 세포의 배양은 실시예 2과 동일한 방법으로 실시하되, 세포는 자궁경구 암 세포인 HeLa 세포를 사용하였다.
- [0173]
- [0174] 나. 미분간섭효과 현미경, 전반사형광 현미경, 형광 현미경 및 이중디스크 실시간 공초점 현미경의 복합시스템
- [0175] 각 시료의 검출 이미지 목적에 따라 실시예 4, 실시예 5와 동일하게 장치를 구성하였다.
- [0176]
- [0177] 다. 결과
- [0178] 도 12에 나타난 바와 같이, 독립형 다기능 복합 이미지 검출장치를 구성하는 형광 현미경, 전반사형광 현미경을 이중디스크 실시간 공초점 현미경의 조합이나 미분간섭효과 현미경의 조합으로 실시간으로 나노입자 및 살아있는 세포를 검출 할 수 있음을 보여준다.
- [0179] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가개념으로부터 도출되는 모두 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

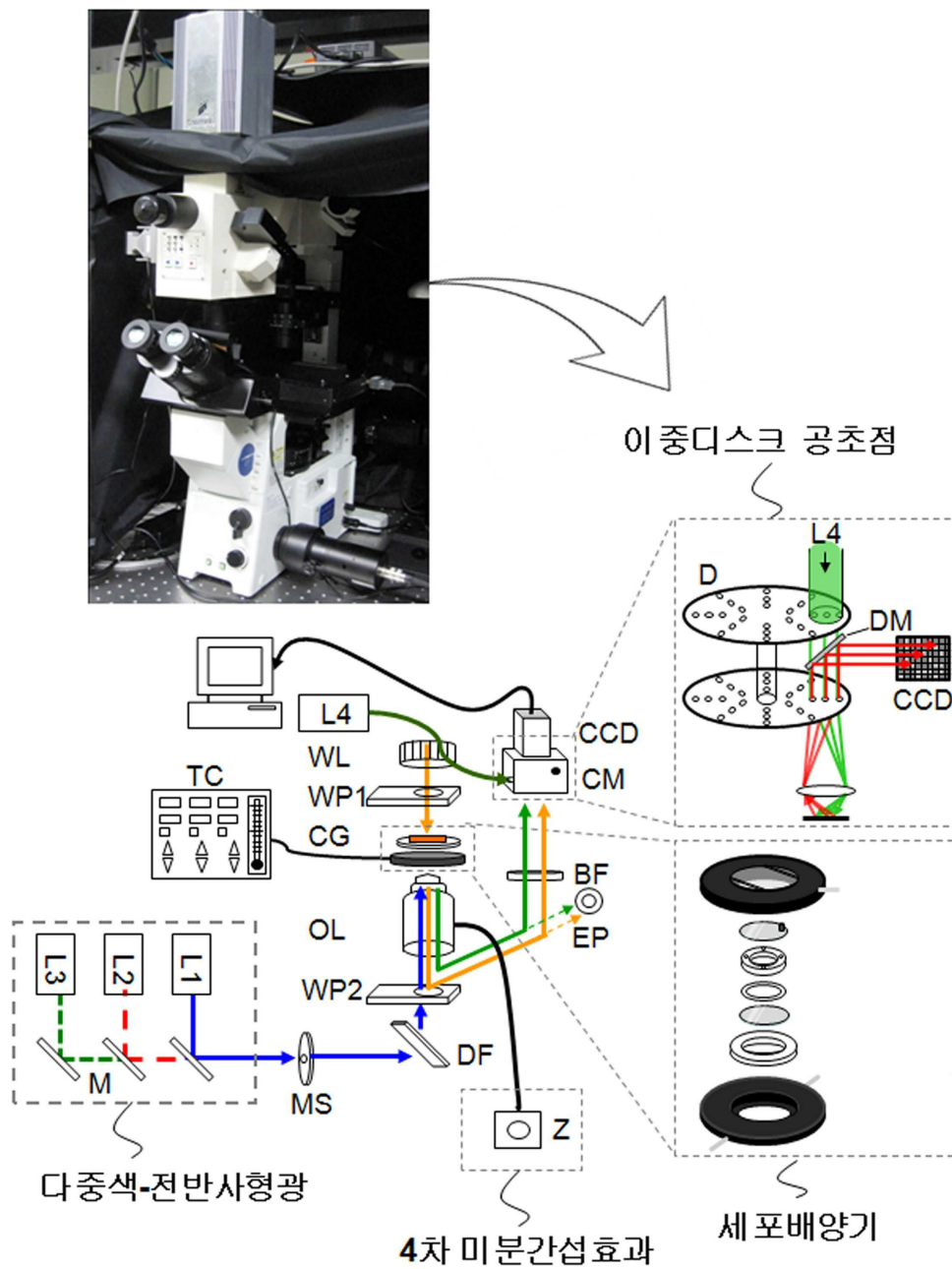
부호의 설명

[0180]

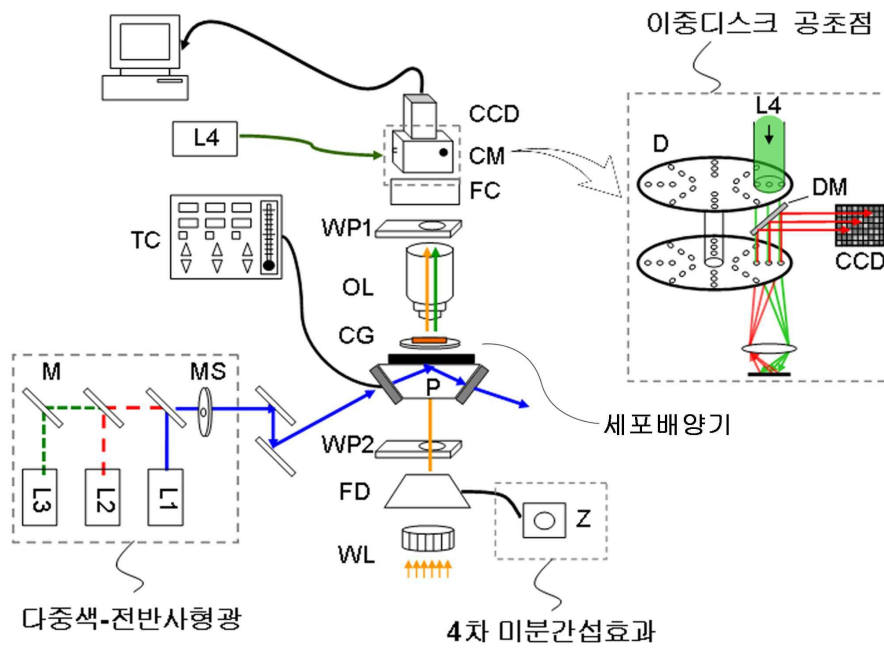
- | | |
|-----------|------------|
| 2 : 본체 | 4 : 온도유지수단 |
| 6 : 유입구 | 8 : 커버 글라스 |
| 10 : 가열수단 | 12 : 배출구 |
| 14 : 오링 | |

도면

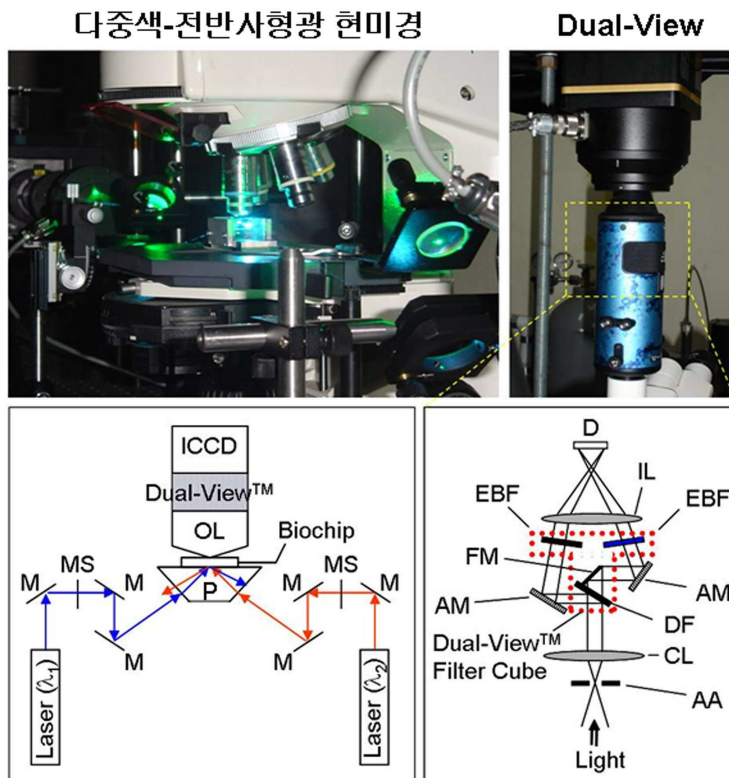
도면1



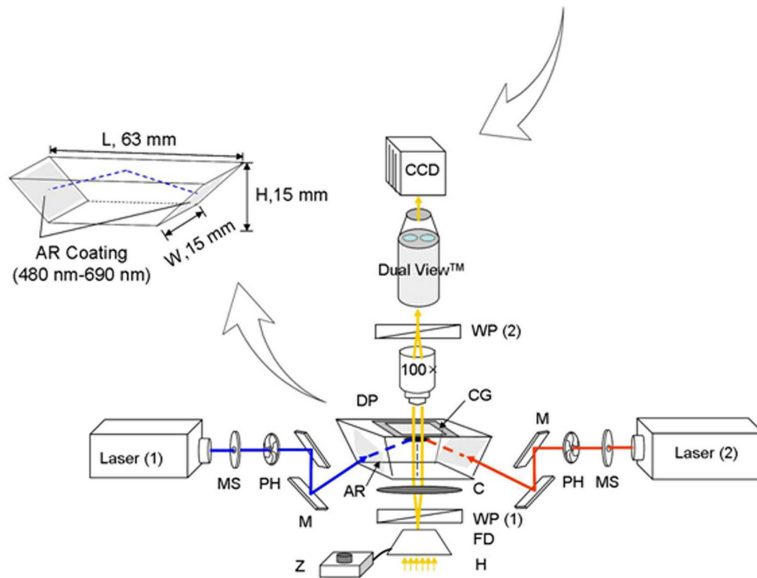
도면2



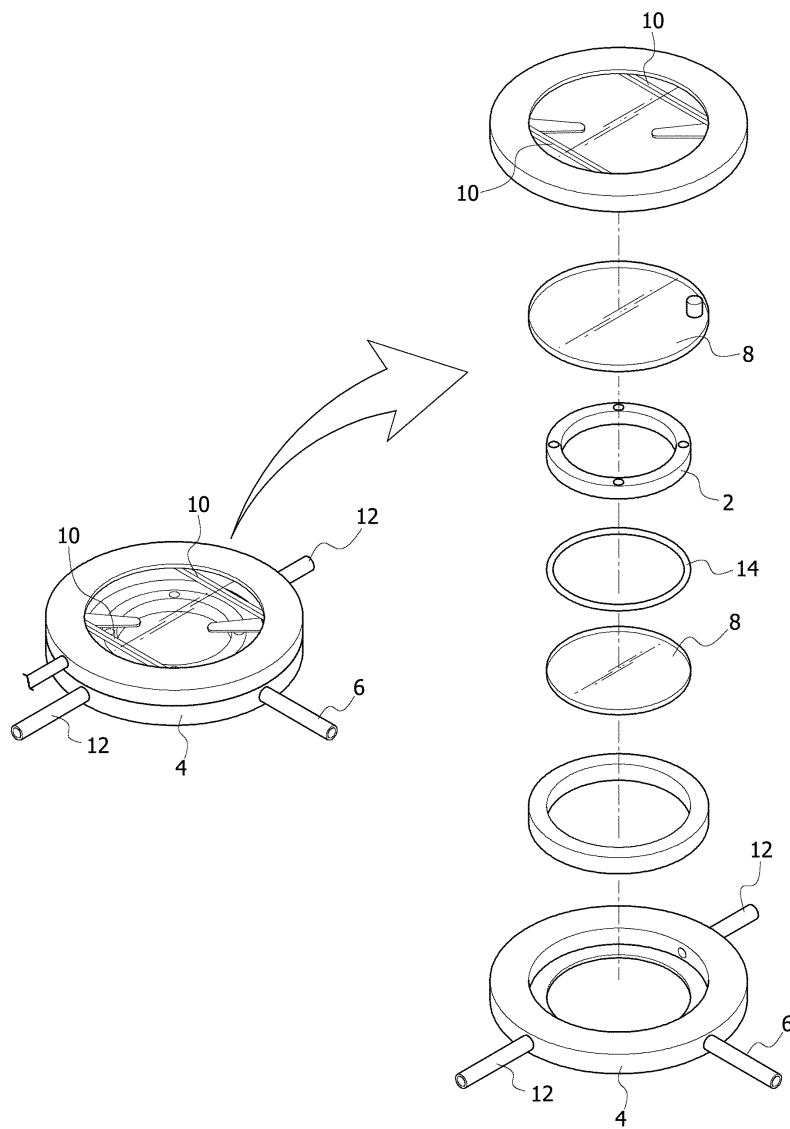
도면3



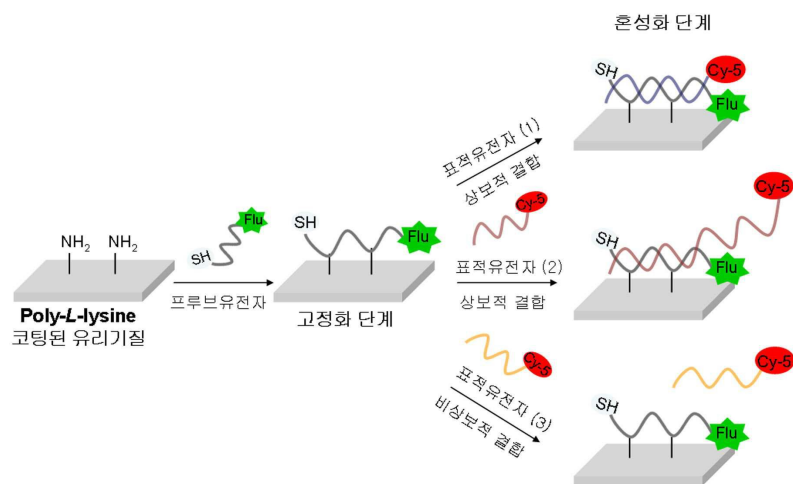
도면4



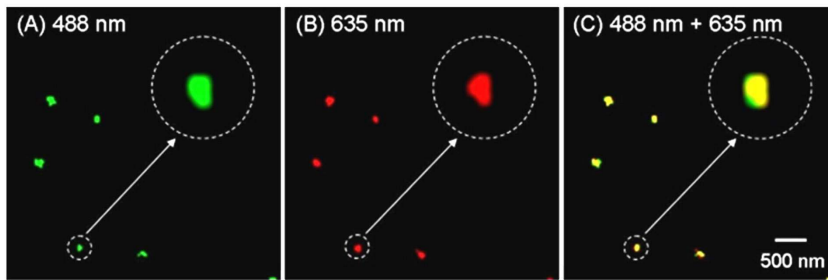
도면5



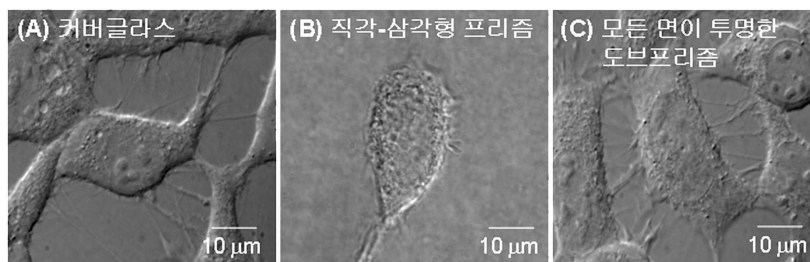
도면6



도면7

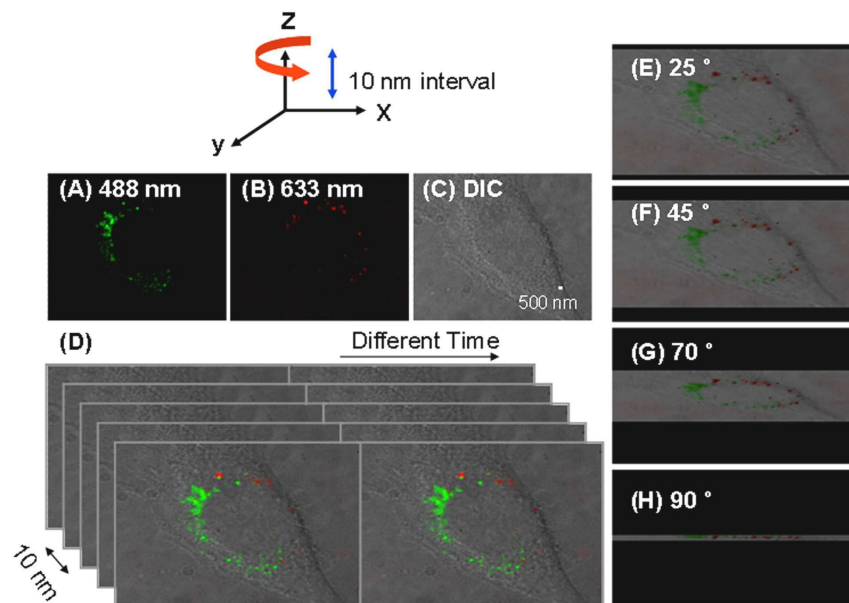


도면8

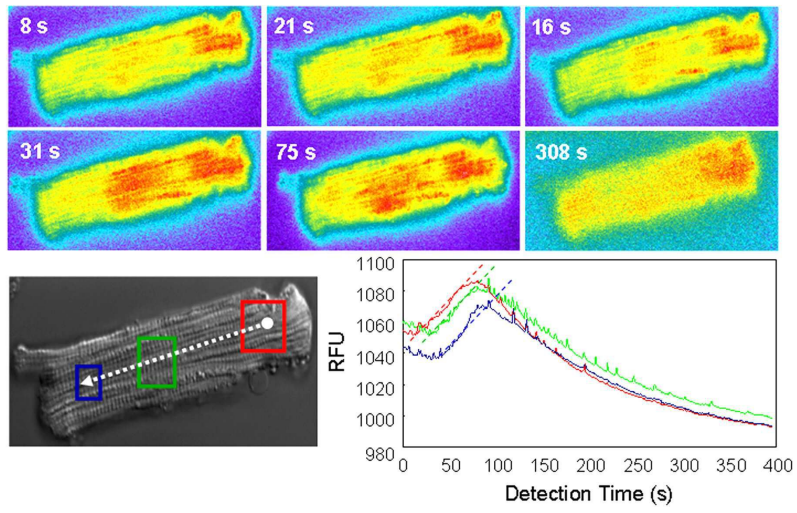


도면9

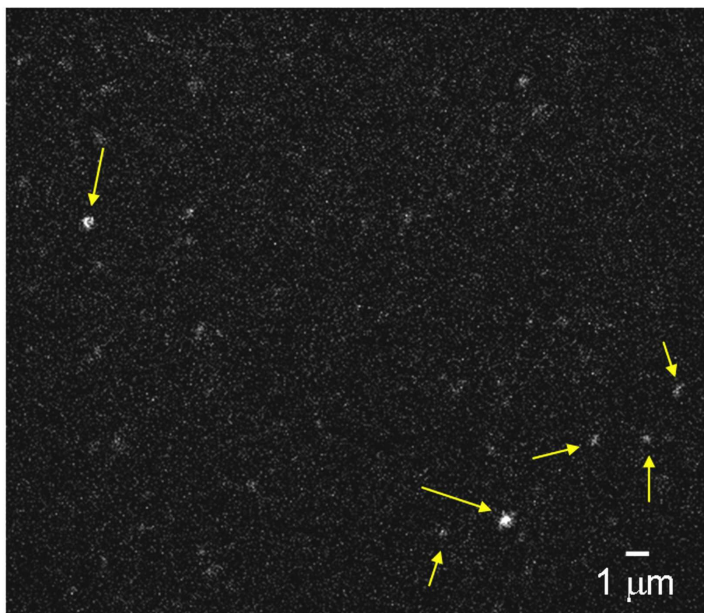
4차 미분간섭/다중색-전반사형광 현미경



도면10



도면11



도면12

(A) 나노입자 이미지



(B) 세포 이미지

