



등록특허 10-2440808



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월07일

(11) 등록번호 10-2440808

(24) 등록일자 2022년09월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/552 (2014.01) B82B 3/00 (2017.01)

C09C 3/08 (2006.01) G01N 21/47 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01) G01N 21/59 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01) G02B 21/00 (2022.01)

G02B 27/09 (2006.01) G02B 27/28 (2020.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/554 (2013.01)

B82B 3/0085 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0068268

(22) 출원일자 2021년05월27일

심사청구일자 2021년05월27일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180024719 A

KR1020170089234 A

KR1020160019581 A

KR101410090 B1

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

강성호

경기도 수원시 영통구 매영로 366, 725동 1901호 (영통동, 현대아파트)

카오잉잉

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732(서천동)

이승아

경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 14, 105동 401호(서천동, 서그내마을 서천아이파크)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 장일석

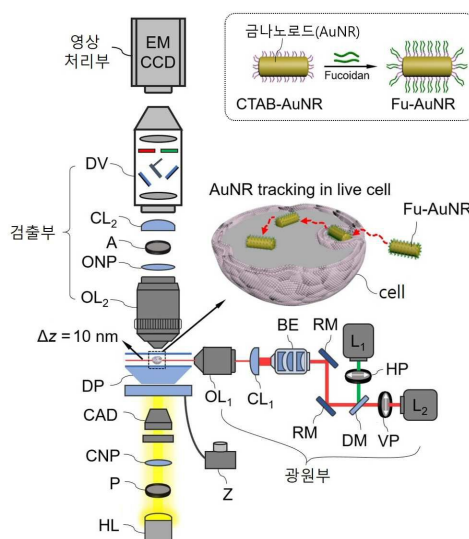
(54) 발명의 명칭 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 그것을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법

(57) 요약

본 발명은 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 그것을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법은 비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플을 도브 프리즘 위에 준비하는 단계, 서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



의 제2 빔이 혼합된 빔시트를 샘플로 제공하는 동시에 샘플을 z축 방향으로 이동시키면서, 샘플의 표면에 발생되는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출부를 통해 검출하는 단계, 및 상기 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x, y, z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계를 포함한다.

본 발명에 따르면, 나노로드와 같은 비대칭 나노입자의 위치를 식별하는데 유용함은 물론, 높은 정밀성 및 정확도를 제공할 수 있기 때문에 3차원 공간에서 부회절 한계 분해능을 갖는 나노입자의 위치를 공간 분해(x, y, z,

ϕ , θ) 및 추적(v) 하는데 효과적으로 적용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C09C 3/08 (2013.01)
G01N 21/47 (2013.01)
G01N 33/48 (2019.01)
G02B 21/0072 (2013.01)
G02B 27/0972 (2013.01)
G02B 27/28 (2013.01)
G01N 2021/4792 (2013.01)
G01N 2021/555 (2013.01)
G01N 2021/5903 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112948
과제번호	2019R1A2C2002556
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	새로운 초고분해능 이미징 기술을 이용한 올인원 복합 4차원 다면 빔시트 나노경 시스템 및 질병 진단 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다기능 빔시트 나노 현미경 시스템을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법에 있어서,
비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플을 도브 프리즘 위에 준비하는 단계;

서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 빔시트(light-sheet)를 상기 샘플로 제공하는 동시에 샘플을 z축 방향으로 이동시키면서, 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출부를 통해 검출하는 단계; 및

상기 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x, y, z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계를 포함하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 샘플은 자유 용액 또는 살아 있는 세포이며,

상기 비등방성 플라즈몬 나노입자는,

순수 금나노로드(AuNR) 또는 후코이단이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)인 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

광원으로 사용된 상기 제1 및 제2 빔은,

각각 편광 렌즈를 통해 방향성을 띄며 360도 회전 가능하도록 구현된 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

아래 수학적식으로 표현되는 2차원 타원형 가우시안 함수를 이용하여 상기 나노입자의 x 및 y 좌표를 획득하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법:

$$I(x, y) = I_0 + A \exp \left[-\frac{1}{2} \left[\frac{(x - x_0)^2}{w_x^2} + \frac{(y - y_0)^2}{w_y^2} \right] \right]$$

여기서, I_0 는 바탕잡음(background noise)으로부터 기인하는 상수항(constant term), A 는 신호의 진폭(amplitude), x_0 및 y_0 는 중심점의 좌표, w_x , w_y 는 각각 상기 2차원 타원형 가우시안 함수 내의 타원 이미지의 x, y 방향의 너비를 나타낸다.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

상기 나노입자에 대한 기 설정된 기준 이미지 너비 $w_{x,cal}$, $w_{y,cal}$ 을 이용하여 정의된 z 값에 따른 w_x 및 w_y 변화인 w_x 및 w_y 표준 검정 곡선과, 상기 w_x , w_y 값을 이용하여 복수의 z 값 별로 아래 수학식의 D 값을 도출한 다음, 최소 D 값을 도출하는 z 값을 상기 나노입자의 z 좌표로 결정하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

$$D = \sqrt{(w_x^{1/2} - w_{x,cal}^{1/2})^2 + (w_y^{1/2} - w_{y,cal}^{1/2})^2}$$

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 이미지 데이터는 상기 검출부 내의 듀얼 뷰 기능을 통하여 서로 다른 두 가지 파장 대역의 데이터로 분할 검출되는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

상기 분할 검출되는 제1 파장 대역의 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도로부터 상기 나노입자의 방위각 및 고도각을 각각 도출하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

상기 이미지 데이터에서 분석된 단파장 수평 편광의 제1 빔에 대응된 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR)의 산란 감도 및 장파장 수직 편광의 제2 빔에 대응된 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도를 기초로 각각 아래 수학식을 통해 상기 나노입자의 방위각(φ) 및 고도각(θ)을 결정하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법:

$$I_{Nor.TSPR} = \cos^2 \varphi$$

$$I_{Nor.LSPR} = \sin^2 \theta$$

여기서, $I_{Nor.TSPR}$ 및 $I_{Nor.LSPR}$ 은 각각 바탕잡음 보정 후 나노입자에 대한 TSPR 및 LSPR 신호의 정규화된 산란 감도를 나타낸다.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

t 번째와 $t+1$ 번째 프레임에서 각각 관측된 3차원 좌표인 (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 간의 유클리디안 거리(d_t) 및 프레임 간 시간 간격(Δt)을 다음의 수학식에 적용하여 상기 나노입자의 이동 속도(v_t)를 획득하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

$$v_t = \frac{d_t}{\Delta t}$$

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템은,

미분간섭대비(DIC) 검출, 암시야 검출, 전반사 형광 및 산란 검출 기능을 포함하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

청구항 11

비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보를 추적하기 위한 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템에 있어서,

비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플이 놓이는 도브 프리즘;

서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 광을 입사받아 설정 두께의 빔시트(light-sheet)로 변환하여 상기 샘플의 측방에서 조사하는 제1 원기둥 렌즈를 구비한 광원부;

상기 나노입자의 3차원 정보 획득을 위해 도브 프리즘을 z축 방향으로 이동시키는 z-스테이지 조절기;

상기 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출하는 검출부; 및

상기 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x, y, z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적하는 영상 처리부를 포함한 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 샘플은 자유 용액 또는 살아 있는 세포이며,

상기 비등방성 플라즈몬 나노입자는,

순수 금나노로드(AuNR) 또는 후코이단이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)인 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 검출부는,

상기 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출하되, 제1 파장 대역의 데이터인 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 데이터로 분할 검출하는 듀얼 뷰 장치를 포함하는 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 검출부는,

상기 샘플의 상부에 위치한 검출용 대물렌즈, 및 상기 대물렌즈와 상기 듀얼 뷰 장치 사이에 위치하고 상기 샘플의 PSF 모양을 수집하는 제2 원기둥 렌즈를 더 포함하는 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템.

청구항 15

청구항 11에 있어서,

상기 영상 처리부는,

상기 나노입자의 6차원 특징 정보를 추적한 결과를 시간 흐름 별로 시각화하여 제공하는 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 그것을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법에 관한 것으로서, 금나노로드와 같은 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 특징을 실시간 추적할 수 있는 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 그것을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 실시간 단일 입자 추적(single-particle tracking, SPT)은 생물학적 분야에서 널리 적용되며 약제의 흡수 및 수송, 바이러스-세포 상호 작용 및 운동 단백질의 작동 메커니즘과 같은 복잡한 세포 내 동적 과정을 이해하는 데 도움이 된다. 복잡한 세포 환경에서 표적 대상을 추적하기 위해 안정적인 광학 방사 신호가 있는 특정한 표지물질(label probe)을 표적물과 결합시킨다.

[0003] 지금까지 유기염료, 형광분자가 SPT에 라벨 물질로 광범위하게 사용되어 왔지만, 오랜시간 실시간 관찰/추적에는 불안한 광안정성 및 고유 광표백현상의 한계를 가지고 있다. 양자점(quantum dot, Qdot)은 깜박임 현상으로 인해 추적과정에 제한이 있으며, 생물학적 조직에 세포 독성을 나타내어 장시간 이미징을 위해 살아있는 세포에 제한적으로 적용된다.

[0004] 플라즈몬(plasmonic) 나노입자의 한 예로 금나노로드(AuNRs)는 우수한 광-안정성과 생체-적합성을 가진다. 특히 이방성 산란 특성은 병진운동 뿐만 아니라 방향 및 회전 추적에서도 유용하게 이용되고 있다. 표면 처리된 AuNR 및 SPT 기술을 결합하여 암시야 현미경, 미분간섭대비 현미경, 내부전반사 산란 현미경, 빔시트 현미경을 시스템을 통해 공학 환경 및 살아있는 세포에서 동적 추적을 위해 여러 광학 구현이 개발되어왔다.

[0005] 그러나 추적 표지물질로 사용되는 이러한 AuNR은 크기와 무게 때문에 일반적으로 복잡한 세포 환경에 적합하지 않으며 표적 분자의 역학을 교란시킬 수 있다. 최근에는 합성기술의 발전으로 다양한 크기와 종횡비의 AuNR을 합성할 수 있으므로, 살아있는 세포에서 작은 크기의 AuNR 동적 추적은 SPT 분야에서 많은 관심을 받고 있다.

[0006] 살아있는 세포는 운동 단백질에 의한 세포 내/외 이입 및 분자수송과 같은 많은 생물학적 과정을 보여준다. 이러한 과정은 일반적으로 병진 및 회전 운동을 동반한다. 따라서 SPT를 통해 가능한 한 자세한 정보를 수집하는 것이 바람직하다.

[0007] 암시야 현미경은 3D에서 펄사이드 변형된 금 나노입자의 막 횡단 과정을 추적하고 세포 측면에서 개별 AuNR의 회전 및 방향 역학을 포착하는 데 사용되었다. 하지만 세포 소기관의 간섭으로 인한 혼잡한 세포 환경에서 플라즈몬 나노입자의 세포 내 수송의 추적에는 어려움이 많다. 대안으로, 미분간섭대비 현미경법은 살아있는 세포에서 AuNR의 2D 국부화 궤적과 회전을 동시에 추적할 수 있으며, 최근 시차-DIC 현미경법은 살아있는 세포에서 단일 AuNR는 분자의 세포 내 수송 역학의 연구가 가능하게 하였다. 그러나 DIC 현미경으로는 매우 작은 나노입자의 검출이 어려워 SPT에 사용할 수 없다.

[0008] 광열-이미징 기법은 작은 플라즈몬 나노입자의 큰 흡광단면의 장점으로, 살아있는 세포에서 항체결합된 5 nm 금 나노입자를 추적할 수 있다. 그러나 광열-이미징에 사용되는 고출력 레이저 빔과 나노입자에서 비롯된 열은 생물학적 표본을 방해할 수 있어 이 방법은 세포 응용에 문제가 있다.

[0009] 기존의 광학 현미경과 비교할 때, 빔시트 현미경법은 얇은 레이저-시트로 생물학적 시료를 비추고 더 나은 광학 단면과 더 적은 광손상 및 광표백, 높은 신호-대-잡음비 등의 이점을 제공한다. 하지만 이러한 연구는 형광 표지물질(형광염료)을 사용하며, 추적 과정에서 회전 역학을 해결하지 않고 형광 프로브의 2D 또는 3D 병진 이동 정보만 제공한다.

[0010] 따라서, 빔시트 현미경으로 살아있는 세포에서 분자의 병진 및 회전 역학을 동시에 추적할 수 있는 기술이 요구된다.

[0011] 본 발명의 배경이 되는 기술은 한국등록특허 제10-1768750호(2017.08.18 공고)에 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 자유 용액 또는 세포에서 이동하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 특징을 실시간 추적할 수 있는 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 그것을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법을 제공

하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은, 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법에 있어서, 비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플을 도브 프리즘 위에 준비하는 단계와, 서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 빔시트(light-sheet)를 상기 샘플로 제공하는 동시에 샘플을 z축 방향으로 이동시키면서, 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출부를 통해 검출하는 단계, 및 상기 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x, y, z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계를 포함하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 상기 비등방성 플라즈몬 나노입자는, 순수 금나노로드(AuNR) 또는 후코이단이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)일 수 있다.

[0015] 또한, 광원으로 사용된 상기 제1 및 제2 빔은, 각각 편광 렌즈를 통해 방향성을 띄며 360도 회전 가능하도록 구현될 수 있다.

[0016] 또한, 상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는, 아래 수학식으로 표현되는 2차원 타원형 가우시안 함수를 이용하여 상기 나노입자의 x 및 y 좌표를 획득할 수 있다.

$$I(x, y) = I_0 + A \exp \left[-\frac{1}{2} \left[\frac{(x - x_0)^2}{w_x^2} + \frac{(y - y_0)^2}{w_y^2} \right] \right]$$

[0017] 여기서, I_0 는 바탕잡음(background noise)으로부터 기인하는 상수항(constant term), A는 신호의 진폭(amplitude), x_0 및 y_0 는 중심점의 좌표, w_x , w_y 는 각각 상기 2차원 타원형 가우시안 함수 내의 타원 이미지의 x, y 방향의 너비를 나타낸다.

[0019] 또한, 상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는, 상기 나노입자에 대한 기 설정된 기준 이미지 너비 $w_{x,cal}$, $w_{y,cal}$ 을 이용하여 정의된 z 값에 따른 w_x 및 w_y 변화인 w_x 및 w_y 표준 검정 곡선과, 상기 w_x , w_y 값을 이용하여 복수의 z 값 별로 아래 수학식의 D 값을 도출한 다음, 최소 D 값을 도출하는 z 값을 상기 나노입자의 z 좌표로 결정할 수 있다.

$$D = \sqrt{(w_x^{1/2} - w_{x,cal}^{1/2})^2 + (w_y^{1/2} - w_{y,cal}^{1/2})^2}$$

[0020] 또한, 상기 이미지 데이터는 상기 검출부 내의 듀얼 뷰 기능을 통하여 서로 다른 두 가지 파장 대역의 데이터로 분할 검출될 수 있다.

[0022] 또한, 상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는, 상기 분할 검출되는 제1 파장 대역의 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도로부터 상기 나노입자의 방위각 및 고도각을 각각 도출할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는, 상기 이미지 데이터에서 분석된 단파장 수평 편광의 제1 빔에 대응된 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR)의 산란 감도 및 장파장 수직 편광의 제2 빔에 대응된 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도를 기초로 각각 아래 수학식을 통해 상기 나노입자의 방위각(φ) 및 고도각(θ)을 결정할 수 있다.

$$I_{Nor.TSPR} = \cos^2 \varphi$$

$$I_{Nor.LSPR} = \sin^2 \theta$$

[0024] 여기서, $I_{Nor.TSPR}$ 및 $I_{Nor.LSPR}$ 은 각각 바탕잡음 보정 후 나노입자에 대한 TSPR 및 LSPR 신호의 정규화된 산란 감도를 나타낸다.

[0025]

[0026] 또한, 상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는, t 번째와 $t+1$ 번째 프레임에서 각각 관측된 3차원 좌표인 (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 간의 유클리디안 거리(d_t) 및 프레임 간 시간 간격(Δt)을 다음의 수학식에 적용하여 상기 나노입자의 이동 속도(v_t)를 획득할 수 있다.

$$v_t = \frac{d_t}{\Delta t}$$

[0028] 또한, 상기 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템은, 미분간섭대비(DIC) 검출, 암시야 검출, 전반사 형광 및 산란 검출 기능을 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은, 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보를 추적하기 위한 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템에 있어서, 비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플이 놓이는 도브 프리즘과, 서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 광을 입사받아 설정 두께의 빔시트(light-sheet)로 변환하여 상기 샘플의 측방에서 조사하는 제1 원기둥 렌즈를 구비한 광원부와, 상기 나노입자의 3차원 정보 획득을 위해 도브 프리즘을 z 축 방향으로 이동시키는 z -스테이지 조절기와, 상기 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터베이스를 검출하는 검출부, 및 상기 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x , y , z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적하는 영상 처리부를 포함한 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템을 제공한다.

[0030] 또한, 상기 샘플은 자유 용액 또는 살아 있는 세포이며, 상기 비등방성 플라즈몬 나노입자는, 순수 금나노로드(AuNR) 또는 후코이단이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)일 수 있다.

[0031] 또한, 상기 검출부는, 상기 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출하되, 제1 파장 대역의 데이터인 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 데이터로 분할 검출하는 듀얼 뷰 장치를 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 상기 검출부는, 상기 샘플의 상부에 위치한 검출용 대물렌즈, 및 상기 대물렌즈와 상기 듀얼 뷰 장치 사이에 위치하고 상기 샘플의 PSF 모양을 수집하는 제2 원기둥 렌즈를 더 포함할 수 있다.

[0033] 또한, 상기 영상 처리부는, 상기 나노입자의 6차원 특징 정보를 추적한 결과를 시간 흐름 별로 시각화하여 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따르면, 나노로드(nanorod)와 같은 비대칭 나노입자의 위치(특히, 중심 위치)를 특정(식별)하는데 유용할 뿐만 아니라, 높은 정밀성 및 정확도를 제공할 수 있기 때문에 3차원 공간에서 부회절 한계 분해능을 갖는 나노입자의 위치를 공간 분해(x , y , z , Φ , Θ) 및 추적(v) 하는데 효과적으로 적용 가능하다.

[0035] 나아가, 본 발명에 따르면, 종래의 형광 표지 기반의 기술과 달리 비형광 나노입자를 사용하기 때문에 형광 표지의 사용으로 인하여 발생하는 다양한 문제점 및 부수적 단점(시료 또는 시료 전처리에 따른 시간 소모, 표지 시료 또는 시료의 오염 등)을 극복할 수 있는 장점을 갖는다.

[0036] 따라서, 장시간 광원에 노출이 필요한 추적 연구(예: 약물 전달)와 같은 광범위한 연구에 적용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템의 구성을 나타낸 도면이다.

도 2는 도 1에 의해 검출되는 나노로드의 6차원 특징을 설명하는 도면이다.

도 3은 도 1을 이용한 나노입자의 실시간 6차원 정보 추적 방법을 설명한 도면이다.

도 4는 광경로 상의 원기둥 렌즈에 의해 수집된 z 축 변화에 따른 나노로드의 PSF 모양 변화 및 나노로드의 PSF x, y 너비의 표준 검정 곡선을 나타낸 도면이다.

도 5는 순수 AuNR, CTAB-AuNR 및 Fu-AuNR의 TEM 이미지, UV-vis 흡수스펙트럼, FT-IR 스펙트럼 및 제타 전위를 보여주는 도면이다.

도 6은 100% 글리세롤에서 Fu-AuNR(직경 5 nm × 길이 15 nm)의 추적 정보를 보여주는 도면이다.

도 7은 100% 글리세롤에서 순수 AuNR(직경 5 nm × 길이 15 nm)의 추적 정보를 보여주는 도면이다.

도 8은 살아있는 단일 A549 암세포에서 이동하는 Fu-AuNR의 DIC 이미지, 3D 추적궤적, 속도 변화, 회전각도 변화, 초고분해능 3차원 영상을 나타낸 도면이다.

도 9는 살아있는 단일 A549 암세포에서 이동하는 AuNR의 DIC 이미지, 3D 추적궤적, 속도 변화, 회전각도 변화, 초고분해능 3차원 영상을 나타낸 도면이다.

도 10은 A549 암세포에서 이동하는 Fu-AuNR의 6차원 특징을 실시간 획득한 결과를 보여주는 도면이다.

도 11은 도 8의 추적궤적 R1 내지 R3 에서의 Fu-AuNR의 각도 변화 및 해당하는 산란 이미지를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 그러면 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 실시 예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시 예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0039] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0040] 본 발명은 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템 및 이를 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 기법을 제안한다.
- [0041] 이러한 본 발명은 일반 용액뿐만 아니라 살아있는 세포에서 개별 이방성 나노입자의 6차원[6D = 공간 궤적(x, y, z 좌표), 회전 역학(방위각 Φ , 고도각 Θ), 순간속도 (v)] 정보를 실시간 추적하고 초국부화 할 수 있는 영상 이미지 획득 기법 및 이를 위한 통합된 다기능 빔시트 나노경 시스템(이하, 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템)을 제안한다.
- [0042] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템의 구성을 나타낸 도면이다.
- [0043] 도 1에 나타난 것과 같이, 본 발명의 실시예에 따른 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템은 도브 프리즘(DP), 광원부, z-스테이지 조절기(Z), 검출부 및 영상 처리부(EM CCD)를 포함한다.
- [0044] 도브 프리즘(DP)은 시료를 올려 놓을 수 있는 재물대 역할을 하며, 본 발명에서는 비등방성 플라즈몬 나노입자가 포함된 샘플이 올려진다.
- [0045] 물론 도브 프리즘(DP)은 하부에서 조사되는 할로겐 램프 및 측면에서 조사되는 레이저가 모두 투과 가능하다. 하측의 할로겐 램프(HL)는 현미경의 미분 간섭(Differential Interference Contrast, DIC) 관찰 기능을 위한 것으로, 샘플에 대한 미분간섭효과 영상(DIC 이미지) 수집을 위해 사용되는 광원이다.
- [0046] 도브 프리즘(DP)은 측면에서 들어오는 광원부의 광을 전반사 산란시켜 표면에 소산장(evanescent field)을 형성하고 상면에 놓인 샘플에 공명 산란광을 발생시킬 수 있다. 또한, 샘플의 3차원 스캔이 가능하도록 도브 프리즘(DP)은 z-스테이지 조절기(Z)를 통해 상하 승강 가능하게 구현된다.
- [0047] 본 발명의 실시예에서 샘플(시료)은 자유 용액 또는 살아 있는 세포(cell)일 수 있고, 샘플에 포함된 비등방성 플라즈몬 나노입자는 순수 금나노로드(AuNR)이거나 후코이단(fucoidan)이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)일 수 있다. 도 1은 본 발명의 대표 예시로서 세포 내 이동하는 후코이단-금나노로드(Fu-AuNR)의 거동을 실시간 추적 및 모니터링하는 것을 나타낸 것이다.
- [0048] 후코이단-금나노로드(Fu-AuNR)는 도 1의 상단 그림과 같이 순수 금나노로드(AuNR)에 후코이단을 접합하여 얻은 것으로, 접합 과정에서 표면 처리제로 CTAB가 사용된다. 후코이단은 황산화 다당류의 일종으로 항암, 항바이러스, 항종양, 항염증 및 항산화 특성을 포함한 다양한 생물학적 효과를 나타낸다. Fu-AuNR은 약물 운반체로 사용

되어 암세포의 내재화 과정 동안 그들의 행동을 탐색하는데 사용된다.

- [0049] 본 발명은 나노로드(AuNR 또는 Fu-AuNR)의 세포막 횡단 및 세포 내 수송 과정 동안 나노로드의 3D 공간 궤적, 속도, 방위각, 고도각을 포함한 6차원 특징을 동시 추적하는 통합된 다기능 빔시트 나노경 시스템(integrated multifunctional light-sheet nanoscopy, iMLSNS)을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 실시예에 따른 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템은 미분간섭대비(DIC) 검출, 암시야 검출, 전반사 형광 및 산란 검출 기능을 포함하여 구성될 수 있다. 따라서 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템은 하나의 현미경에서 빔시트 뿐만 아니라 증진된 암시야, 전반사 형광/산란 검출, 미분간섭대비 검출을 모두 포함한 다양한 감지 기술을 포함하여 구성될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 기법은 자유 용액뿐만 아니라 복잡한 세포 내/외에서 순수 AuNR(AuNR) 또는 후코이단-AuNR(Fu-AuNR)과 같은 나노로드의 공간 이동 궤적(x, y, z 좌표), 회전 역학(방위각, 고도각) 및 속도를 실시간 획득하고 모니터링할 수 있다. 따라서 다양한 살아있는 단일 세포에서 개별적인 Fu-AuNR의 특징적인 움직임과 회전 역학을 연구하는 데 활용될 수 있으며, 세포막 횡단 과정에서 나노로드의 회전 특성과 세포 내 이입 속도에 대한 자세한 동적 정보를 수집할 수 있다.
- [0052] z -스테이지 조절기(Z)는 나노입자의 3차원 정보 획득을 위해 도브 프리즘(DP)을 z 축 방향으로 이동시킬 수 있다. 여기서, z -스테이지 조절기(Z)는 재물대 즉, 도브 프리즘(DP)을 10nm 간격 단위로 단계적으로 이동시킬 수 있다. 이러한 z -스테이지 조절기(Z)는 도브 프리즘(DP)이 놓이는 플레이트 및 플레이트의 z 축 위치를 조절하는 컨트롤러(제어기)를 포함하여 구현될 수 있다.
- [0053] 광원부는 도브 프리즘(DP)의 측방에 위치하고 샘플로 광을 조사한다. 이때 광원부는 제1 원기둥 렌즈(CL1)를 이용하여 시트 형태의 빔 즉, 빔시트(light-sheet)를 샘플의 측방에서 샘플을 향해 제공한다. 여기서, 빔 시트는 설정 두께(예: 2 μ m 이내의 두께)로 제공될 수 있다.
- [0054] 재물대 위에 놓인 샘플은 빔시트에 의해 스캔되는데, 이때 재물대는 z 축으로 이동 가능하므로 샘플의 3차원 스캔이 이루어질 수 있다. 또한 그 과정에서 실시간 수집되는 광학 이미지를 분석하면 샘플에서 이동하는 나노로드의 3차원 이동 좌표(x, y, x 좌표), 회전 정보(방위각, 고도각), 그리고 이동 속도(순간 속도)를 획득할 수 있다.
- [0055] 여기서, 광원부는 서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 광을 입사받아 설정 두께의 빔시트로 변환하여 샘플의 측면에 조사한다. 광원으로 사용된 레이저 빔은 편광 렌즈를 통해 빔의 방향성을 띄도록 하며, 비등방성 플라즈몬 나노입자의 방향각 측정을 위하여 360도 회전하도록 구성될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 실시예에서 광원부는 도 1과 같이, 제1 광원(L1), 제2 광원(L2), 수평 편광판(HP), 수직 편광판(VP), 이색성 거울(DM), 반사 거울(RM), 빔 확장기(BE), 제1 원기둥 렌즈(CL1), 그리고 조사용 대물렌즈(OL1)을 포함한다.
- [0057] 제1 광원(L1) 및 제2 광원(L2)은 서로 다른 파장의 레이저를 각각 발생한다. 본 발명의 실시예의 경우 조정 가능한 532 nm 연속파 레이저 및 698 nm 연속파 레이저가 여기 소스로 사용되었다. 이에 따라, 제1 광원(L1)은 532 nm의 제1 빔을 제공하고 제2 광원(L2)은 698 nm의 제2 빔을 제공한다. 제1 빔은 수평 편광판(HP)으로 입사되고 제2 빔은 수직 편광판(VP)로 입사된다.
- [0058] 수평 편광판(HP) 및 수직 편광판(VP)은 레이저 빔의 편광 방향을 변환한다. 수평 편광판(HP)은 수평으로 편광된 빔은 통과시키고 수직으로 편광된 빔은 완전히 차단하며, 수직 편광판(VP)은 수직으로 편광된 빔은 통과시키고 수평으로 편광된 빔은 완전히 차단한다.
- [0059] 이에 따라, 수평 편광판(HP)은 수평 편광된 제1 빔을 출력하고 수직 편광판(VP)은 수직 편광된 제2 빔을 출력한다. 여기서 물론, 수평 편광판(HP)은 532 nm 레이저용 수직 편광판에 해당하고 수직 편광판(VP)은 698 nm 레이저용 수직 편광판에 해당할 수 있다.
- [0060] 이색성 거울(DM)은 파장에 따라 선별적으로 빛을 투과/반사하도록 설계된 거울로, 두 광원(L1,L2)의 중심 파장을 기준으로 투과/반사시키는 역할을 한다.
- [0061] 도 1에서 이색성 거울(DM)은 수평 편광판(HP)을 통과한 532 nm 파장의 제1 빔은 반사하고, 수직 편광판(VP)을 통과한 698 nm 파장의 제2 빔은 투과하여, 각 빔을 동일한 광 경로로 출력한다.
- [0062] 반사 거울(RM)은 이색성 거울(DM)에서 동일한 광 경로 상에서 출력되는 각 파장의 제1 빔과 제2 빔을 전반사하

는 역할을 한다. 반사 거울(RM)은 하나 또는 그 이상 구비될 수 있으며, 도 1의 경우 두 개의 반사 거울(RM)이 사용된 것을 예시하고 있다.

- [0063] 빔 확장기(BE; Beam Expander)는 광의 직경을 확장시켜 제1 원기둥 렌즈(CL1)로 제공한다. 제1 원기둥 렌즈(CL1)는 입사된 빔을 설정 두께의 빔시트로 변환하여 제공한다.
- [0064] 제1 원기둥 렌즈(CL1)($f=500\text{mm}$)는 입사된 빔의 모양을 얇게 퍼주는 역할을 하며 이를 통해 설정 두께($<2\mu\text{m}$) 이내로 가공된 빔시트를 제공한다. 조사용 대물 렌즈(OL1)는 제1 원기둥 렌즈(CL1)로부터 출력되는 얇게 퍼진 빔시트를 샘플로 직접 조사한다. 예를 들어, 광 경로에서 빔 확장기(BE) 및 원기둥 렌즈(CL1)(초점 거리 = 500mm)를 사용하여 얇은 빔시트를 제공하며, $10\times$ 대물렌즈(OL1)(개구수 $\text{NA} = 0.3$, Olympus)에 의해 샘플 챔버에 초점이 맞춰진다.
- [0065] 본 발명의 실시예에서 검출부는 빔시트 조사에 따라 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광을 검출한다. 구체적으로, 검출부는 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF; Point Spread Function)를 갖는 이미지 데이터를 검출한다.
- [0066] 이때, 검출부는 듀얼 뷰(Dual view) 장치(DV)를 통하여 제1 파장 대역(장파장)의 데이터인 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역(장파장)의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 데이터를 분할 검출할 수 있다. 여기서 제1 및 제2 파장 대역은 제1 빔의 파장 및 제2 빔의 파장과 관련된다. 파장에 따라 검출된 두 가지 데이터는 추후 나노로드의 방위각 및 고도각을 도출하는데 활용된다.
- [0067] 본 발명의 실시예에서 검출부는 구체적으로 검출용 대물렌즈(OL2), 듀얼 뷰 장치(DV), 그리고 제2 원기둥 렌즈(CL2)를 포함하여 구성된다.
- [0068] 검출용 대물렌즈(OL2)는 시료에서 오는 신호를 수집한다. 듀얼 뷰 장치(DV)는 수집 및 검출된 신호를 두 가지 파장의 신호로 분리하여 동시 출력한다. 이에 따르면 추후 한 대의 CCD 카메라에서 두 가지 파장의 신호를 동시 획득할 수 있다.
- [0069] 제2 원기둥 렌즈(CL2)는 검출용 대물렌즈(OL2), 듀얼 뷰 장치(DV) 사이에 위치하며 샘플의 PSF 모양을 수집한다. 제2 원기둥 렌즈(CL2)($f=1000\text{mm}$)는 z-축의 이동에 따른 샘플 시료의 변화하는 PSF(점상강도분포함수) 모양을 수집하는 역할을 하고 이를 통해 3차원 난시 이미징을 가능하게 한다. 따라서 본 발명은 이미징 경로에 제2 원기둥 렌즈(CL2)를 삽입하고 난시 이미징 방법을 사용하여 점상강도분포함수를 피팅하여 나노로드의 x,y,z 좌표를 얻을 수 있다.
- [0070] 듀얼 뷰 장치(DV)는 검출용 대물렌즈(OL2)의 상측에 배치되어 시료로부터 수집되는 신호를 금속으로부터 기인하는 종단면 플라즈몬 공명(LSPR) 산란 신호 및 횡단면 플라즈몬 공명(TSPR) 산란 신호로 분할한다.
- [0071] 듀얼 뷰 장치(DV)는 두 개의 슬롯을 가지며 각 슬롯에는 서로 다른 파장 대역의 신호를 통과하는 대역 통과 필터가 삽입된다. 예를 들어, 단파장 슬롯에 장착되는 필터는 제1 빔의 파장 대역을 통과하고, 장파장 슬롯에 장착되는 필터는 제2 빔의 파장 대역을 통과하도록 구성된다. 본 실시예의 경우 단파장 슬롯 및 장파장 슬롯에 각각 $520/15\text{ nm}$ 필터 및 $680/13\text{ nm}$ 필터가 사용되었으나, 필요 파장 대역에 맞게 세부 조정 및 변경 가능하다.
- [0072] 여기서, 제1 및 제2 빔 중 단파장(532nm)의 수평 편광 레이저(수평 편광된 제1 빔)의 조사에 따라 발생된 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR)는 단파장 슬롯을 통해 필터링되고, 장파장(698nm)의 수직 편광 레이저(수직 편광된 제2 빔)의 조사에 따라 발생된 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)는 장파장 슬롯을 통해 필터링된다.
- [0073] 단파장 수평편광(s-pol) 레이저 및 장파장 수직편광(p-pol) 레이저는 나노로드(AuNR)의 횡단면 플라즈몬 공명(TSPR) 및 종단면 플라즈몬 공명(LSPR)에 대응되는 것을 알 수 있다. 또한 이는 나노로드(AuNR)의 가로 축 방향 및 세로 축 방향과 해당 여기 레이저의 편광 방향 사이의 편광 특성을 이용하여, 평면 내 및 평면 외 나노로드(AuNR)의 회전 역학 정보(방위각, 고도각)를 추적할 수 있도록 한다.
- [0074] 실제로 AuNR가 평면에서 회전하면 AuNR의 횡단면 플라즈몬 공명(TSPR) 및 종단면 플라즈몬 공명(LSPR)의 산란강도가 주기적으로 변경되고, 이에 대응하여 듀얼 뷰 장치(DV)를 통한 두 공명 신호(TSPR, LSPR)의 산란강도의 변화가 EMCCD 카메라로 동시에 기록된다. AuNR의 TSPR 및 LSPR에서 기록된 산란 강도를 기반으로 AuNR의 운동 궤도뿐만 아니라 평면 내/외 회전 역학을 해결할 수 있다.
- [0075] 도 1의 현미경 시스템에서, 도브 프리즘(DP)을 기준으로 하측에 위치한 할로겐 램프(HL), 편광판(P), 콘텐서 노마스키 프리즘(CNP), 콘텐서 조리개 다이어그램(CAD)과, 도브 프리즘(DP)의 상측에 위치한 대물렌즈 노마스키

프리즘(ONP) 및 분석기(A)는, 현미경의 DIC(미분간섭대비) 기능을 위한 구성요소에 해당한다.

- [0076] 할로겐 램프(HL)는 미분간섭효과 영상 수집에 이용되는 광원이며, 편광판(P)은 할로겐 광원의 빔을 편광시켜 투과 방위각에 배치시킨다. 콘덴서 노마스키(Nomarski) 프리즘(CNP)은 입사되는 편광 빔을 직교하는 수직 방향과 수평 방향의 편광으로 분리하여 정렬하고 이를 전달한다. 분리된 두 개의 빛은 콘덴서 렌즈를 통과한다. 콘덴서 조리개 다이어그램(CAD)은 할로겐 램프의 빛을 모아주는 역할을 한다. 모아진 빛은 도브 프리즘(DP)으로 전달한다.
- [0077] 대물렌즈 노마스키 프리즘(ONP) 및 분석기(A)는 검출용 대물렌즈(OP2)와 듀얼 뷰 장치(DV) 사이에 차례로 위치한다. 대물렌즈 노마스키 프리즘(ONP)은 바이어스(bias) 지연을 위한 장치이고 앞서 분리된 두 빛이 간섭된다. 분석기(A)는 편광판(P)에 대해 90도 각도로 배향된 투과 방위각을 가지는 선형 편광판에 해당한다. 이러한 구성요소들을 통하여 도 1의 현미경은 미분 간섭 대비(DIC) 기능을 제공하고 샘플에 대한 미분간섭효과 영상을 수집할 수 있다.
- [0078] 검출부 상부에 위치한 영상 처리부(EM-CCM)는 검출부에서 검출되는 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내에서 이동하는 나노입자(이하, 나노로드)의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x , y , z 좌표, 방위각(Φ), 고도각(Θ) 및 이동 속도(v)를 포함하는 6차원 특징(x , y , z , Φ , Θ , v)을 실시간 추적하고 초국부화 과정을 수행한다.
- [0079] 구체적으로, 영상 처리부(EM-CCM)는 검출된 PSF 이미지 데이터를 분석하여 샘플 내 이동하는 나노로드의 3차원 위치 좌표(x , y , z)를 매 시간(프레임) 검출할 수 있다. 또한, 인접한 두 프레임 간 측정된 나노로드의 이동 거리 및 프레임 간 시간 간격을 이용하여 매 시간마다 나노로드의 순간 이동 속도(v)를 획득할 수 있다.
- [0080] 또한, 영상 처리부(EMCCM)는 검출부로부터 분할 검출되는 제1 파장 대역의 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도를 이용하여 샘플 내 이동하는 나노로드의 방위각 및 고도각을 실시간으로 도출할 수 있다.
- [0081] 이러한 방법으로 영상 처리부(EMCCD)는 세포 내에서 이동하는 나노로드의 6차원 특징을 매 시간 별로 획득 및 추적하고, 추적 정보를 제공할 수 있다.
- [0082] 도 2는 도 1에 의해 검출되는 나노로드의 6차원 특징을 설명하는 도면이다.
- [0083] 도 2에서 a는 서로 다른 파장 및 편광 방향의 두 빔이 혼합된 빔시트를 샘플로 제공하는 동시에 샘플을 z 축 방향으로 이동시키면서 샘플 내 나노로드의 실시간 3차원 궤적(위치)을 수집하는 모습을 나타낸다. 이러한 도 2의 a는 세포 내 나노로드의 3D 이미지 처리를 위한 난시법을 설명하고 있다.
- [0084] 도 2에서 b는 듀얼 뷰 장치(DV)의 두 채널을 통해 분할 검출되는 TSPR 및 LSPR 신호를 통하여 나노로드의 회전각(방위각(Φ), 고도각(Θ))을 수집하는 모습을 나타내며, c는 시간에 따른 나노로드의 3차원 위치로부터 나노로드의 순간 이동 속도(v)를 시간 별로 수집하는 모습을 나타낸다.
- [0085] 영상 처리부(EMCCD)는 이와 같이 실시간 수집되는 나노입자의 6차원 특징 정보(x, y, z, Φ, Θ, v)를 추적한 결과를 소정 형태(예: 이미지, 테이블, 텍스트 중 적어도 하나의 조합)로 가공하여 시간 흐름에 따른 데이터로 시각화하여 제공할 수 있다. 또한 영상 처리부(EMCCD)는 가우스 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보를 이미지화하여 제공할 수 있다.
- [0086] 영상 처리부(EMCCD)는 EMCCD 카메라 및 분석 장치를 포함하여 구성될 수 있다. 여기서 분석 장치는 EMCCD 카메라에 내장될 수도 있다. 분석 장치는 EMCCD 카메라에서 획득되는 정보를 처리, 분석, 출력할 수 있으며, 컴퓨터와 같이 입/출력 인터페이스, 프로세서, 메모리, 디스플레이 등을 포함하여 이미지 처리, 분석, 정보 연산, 가공, 출력 등을 수행할 수 있다.
- [0087] 다음은 본 발명의 실시예에 따른 통합된 다기능 빔시트 나노 현미경 시스템을 이용한 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법을 설명한다.
- [0088] 도 3은 도 1을 이용한 나노입자의 실시간 6차원 정보 추적 방법을 설명한 도면이다.
- [0089] 우선, 적어도 1종의 비등방성 플라즈몬 나노입자(예: AuNR, Fu-AuNR)를 포함하는 샘플을 도브 프리즘(DP) 위에 준비한다(S310). 이하에서는 나노입자는 순수 금나노로드 또는 후코이단-금나노로드이고, 샘플은 자유 용액 또

는 세포인 것을 가정한다. 이를 통해, 자유 용액 또는 세포에서 이동하는 AuNR 또는 Fu-AuNR와 같은 나노로드의 거동과 관련되는 6차원의 특징 정보를 획득할 수 있다.

[0090] 다음, 현미경 시스템의 광원부를 통해 서로 다른 파장을 갖는 수평 편광의 제1 빔과 수직 편광의 제2 빔이 혼합된 빔시트를 도브 프리즘 위에 준비된 샘플로 제공하는 동시에, z-스테이지 조절기를 통해 샘플을 z축 방향으로 이동시키면서, 샘플의 표면에 발생하는 공명 산란광에 대한 3차원 점상강도분포함수(PSF)를 갖는 이미지 데이터를 검출부를 통해 검출한다(S320).

[0091] 여기서, 샘플에 2 um 이내의 두께를 조사할 수 있는 빔시트를 제공하면서 시료로부터 유래하는 공명 산란광에 대한 3차원 PSF를 갖는 이미지 데이터를 검출한다. 이때, 검출되는 이미지 데이터는 검출부 내의 듀얼 뷰 장치(DV)의 듀얼뷰 기능을 통하여 서로 다른 두 가지 파장 대역의 데이터로 분할 검출될 수 있다

[0092] 이후에는 검출된 이미지 데이터에 대한 3차원 점상강도분포함수에 가우시안 피팅을 적용하여, 샘플 내 이동하는 상기 나노입자의 3차원 공간 궤적에 대응하는 x, y, z 좌표, 방위각, 고도각 및 이동 속도를 포함하는 6차원 특징을 실시간 추적한다(S330). 6D 추적 단계는 현미경 시스템의 영상 처리부를 통해 수행된다.

[0093] 이때, 대물렌즈(OL2) 후방의 원기둥리얼 렌즈(CL2)에 의해 비등방성 나노로드의 움직임이 난시(astigmatism) 이미지로 수집하고 이미지에 점상강도분포함수(PSF)를 피팅하여 나노로드의 x,y,z 좌표를 해결한다.

[0094] 여기서, 영상 처리부는 아래 수학적 식 1로 표현되는 2D 타원형 가우시안 함수를 이용하여 나노입자의 x 및 y 좌표를 획득할 수 있다.

수학적 식 1

$$I(x, y) = I_0 + A \exp \left[-\frac{1}{2} \left[\frac{(x - x_0)^2}{w_x^2} + \frac{(y - y_0)^2}{w_y^2} \right] \right]$$

[0095]

[0096] 여기서, I_0 는 바탕잡음(background noise)으로부터 기인하는 상수항(constant term), A는 신호의 진폭(amplitude), x_0 및 y_0 는 중심점의 좌표, w_x , w_y 는 각각 2차원 타원형 가우시안 함수 내의 타원 이미지의 x,y 방향의 너비를 나타낸다.

[0097] 또한, 영상 처리부는 나노입자(AuNR)에 대한 기 설정된 기준 이미지 너비 $w_{x,cal}$, $w_{y,cal}$ 을 이용하여 정의된 z 값에 따른 w_x 및 w_y 변화인 w_x 및 w_y 표준 검정 곡선과, 현재 검출된 w_x , w_y 값을 이용하여, 복수의 z 값 별로 아래 수학적 식 2의 D 값을 도출한 다음, 최소 D 값을 도출하는 z 값을 나노입자의 z 좌표로 결정한다.

수학적 식 2

$$D = \sqrt{(w_x^{1/2} - w_{x,cal}^{1/2})^2 + (w_y^{1/2} - w_{y,cal}^{1/2})^2}$$

[0098]

[0099] 도 4는 광경로 상의 원기둥 렌즈에 의해 수집된 z축 변화에 따른 나노로드의 PSF 모양 변화 및 나노로드의 PSF x,y 너비의 표준 검정 곡선을 나타낸 도면이다.

[0100] 도 4와 같이 표준검정 곡선은 나노입자(AuNR)에 대한 미리 알고 있는 기준 이미지 너비($w_{x,cal}$, $w_{y,cal}$)를 바탕으로 정의되는 z 값에 따른 w_x 및 w_y 변화 곡선에 해당한다.

[0101] 이때, 검정 곡선 상의 모든 z 값을 대상으로, 수학적 식 2를 사용하여, 현재 검출된 나노로드의 PSF 타원 이미지에 대한 x,y 너비 값과 검정 곡선 상의 z 값에 대응한 x,y 너비 값 간의 거리(D)를 수학적 식 1을 통해 모두 구한 다음, 그 중에서 최소 거리값을 도출하는 z 값을 현재 나노로드의 z 좌표로 결정한다.

[0102] 그리고, 영상 처리부는 앞서 검출 단계에서 분할 검출되는 제1 파장 대역의 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR) 및 제2 파장 대역의 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도로부터 나노입자의 방위각 및 고도각을 각각

도출한다.

[0103] 이를 위해, 나노로드의 TSPR 및 LSPR의 산란감도는 각각 정규화되고 아래 수학적 식 3에 적용된다.

[0104] 즉, 영상 처리부는 검출부에서 검출된 이미지 데이터에서 분석된 단파장 수평 편광의 제1 빔에 대응된 횡단면 플라즈몬 공명 신호(TSPR)의 산란 감도 및 장파장 수직 편광의 제2 빔에 대응된 종단면 플라즈몬 공명 신호(LSPR)의 산란 감도를 기초로 아래 수학적 식 3을 통해 나노입자의 방위각(φ) 및 고도각(θ)을 결정한다.

수학적 식 3

$$I_{\text{Nor.TSPR}} = \cos^2 \varphi$$

$$I_{\text{Nor.LSPR}} = \sin^2 \theta$$

[0106] 여기서, $I_{\text{Nor.TSPR}}$ 및 $I_{\text{Nor.LSPR}}$ 은 각각 바탕잡음 보정 후 나노입자에 대한 TSPR 및 LSPR 신호의 정규화된 산란 감도를 나타낸다.

[0107] 즉, 수학적 식 3에 산란 감도 값을 각각 대입하면 나노입자의 방위각(φ) 및 고도각(θ)을 역산할 수 있다. 이와 같이 TSPR과 LSPR에서 기록된 산란 감도를 기반으로 나노로드의 운동 궤도 뿐만 아니라 회전 역학을 해결할 수 있다.

[0108] 또한, 영상 처리부는 t 번째와 $t+1$ 번째 프레임에서 각각 관측된 나노로드의 3차원 좌표인 (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 간의 유클리디안 거리(d_t) 및 프레임 간 시간 간격(Δt)을 수학적 식 4에 적용함으로써 나노로드의 이동 속도(v_t)를 획득할 수 있다.

수학적 식 4

$$v_t = \frac{d_t}{\Delta t}$$

[0110] 여기서, (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 은 나노로드의 단일 입자 추적 궤적의 두 연속된 좌표를 나타내며, 그 유클리디안 거리는 다음의 수학적 식 5와 같이 정의된다.

수학적 식 5

$$d_t = \sqrt{(x_{t+1} - x_t)^2 + (y_{t+1} - y_t)^2 + (z_{t+1} - z_t)^2}$$

[0112] 이러한 방법으로 나노로드의 순간 운동 속도를 획득할 수 있다. 즉, 앞서 도 2의 c와 같이 재구성된 3D 공간 궤적을 사용하여 전체 추적 프로세스 내에서 나노로드의 순간 속도를 계산할 수 있고, 이는 AuNR-세포 상호 작용에서 AuNR의 동작 모드를 이해하는 기반이 될 수 있다.

[0113] 본 발명은 이러한 검출 기술을 사용하여 막 횡단 및 세포 내 수송 과정에서 이방성 플라즈몬 AuNR의 공간 궤적(x, y, z 좌표), 순간 속도(v) 및 회전 동작(방위각 ϕ 및 고도각 θ)을 동시에 추적할 수 있다. S330 단계 이후 현미경 시스템은 실시간 6차원 추적 정보를 시각화 제공한다(S340).

[0114] 이러한 본 발명에 따르면, 통합된 다기능 빔시트 나노경 하에서 비대칭성 플라즈몬 나노로드 입자의 실시간 용리거동을 6차원적으로 제공할 수 있고, 플라즈몬 나노입자로서 금나노로드의 자유용액 뿐만 아니라 복잡한 세포 내/외에서의 공간이동(x, y, z 좌표), 회전(방위각 및 고도각) 및 추적(순간이동 속도)의 정보를 동시에 획득할 수 있다. 이러한 본 발명의 기술은 세포 내 약물전달 시스템 개발의 원천 기술이라 할 수 있다.

- [0115] 또한, 본 발명은 생체외(in vitro) 및/또는 생체내(in vivo)에서, 크기가 작은 비대칭 나노입자, 특히 나노-로드와 같은 위치(구체적으로 중심 위치 또는 좌표)를 높은 정밀성 및 정확도로 용이하게 측정(분해)할 수 있다. 또한, 후술하는 구체적인 실시예와 같이, 통합된 다기능 빔시트 현미경 검출에 기반하여 나노로드의 일반 자유 용액 뿐만 아니라 세포 내/외에서의 동력학적 현상을 실시간 추적 분석할 수 있다.
- [0117] **[실시예 1] 6차원 통합된 다기능 빔시트 나노경 시스템(6D iMLSN)**
- [0118] 본 발명의 실시예에 따른 새로운 이미징 접근 방식은 편광 기반 초고국부화, DIC 현미경에 의한 세포 이미징, 이중-파장 검출 및 난시 이미징과 같은 원래의 장점을 유지한다. 아울러, 크기가 작은 AuNR(5 nm × 15 nm)을 살아있는 단일 세포 내부의 이동을 실시간으로 모니터링하기 위한 검출 표지물질로 사용한다.
- [0119] 도 1과 같이 원기둥 렌즈(초점 거리 1000 mm)를 이미징 경로에 삽입하여 난시 이미징 방법을 사용하여 점상강도 분포함수(point spread function, PSF)를 피팅하여 순수 AuNR 또는 Fu-AuNR의 x, y 및 z 좌표를 해결한다. PSF 함수로 2D 타원 가우시안 함수를 사용하며 PSF의 너비 w_x 및 w_y 를 검정곡선과 비교한다.
- [0120] AuNR의 평면 내 및 평면 외 회전 역학을 추적하기 위해 AuNR의 가로 및 세로 축 방향과 해당 여기 레이저의 편광 방향 사이의 편광 특성을 이용한다.
- [0121] 도 1에 도시된 빔시트 나노 현미경 시스템(6D iMLSN)은 이방성 플라즈몬 집합체의 3D 배향을 분석한 프리즘 기반 3D 통합 빔시트 초고해상도 현미경을 기반으로 개발되었다. 올림푸스 BX53 정립형 현미경은 다차원 SPT 실험을 위한 이미징 시스템을 구축하는 데 사용되었다. 그리고 조정 가능한 532 nm 연속파 레이저(L1)와 698 nm 연속파 레이저(L2)가 여기 소스로 사용되었다. 레이저의 편광 방향을 변환하기 위해 532 nm 레이저용 수평 편광 편광판(HP)과 698 nm 레이저용 수직 편광 편광판(VP)을 레이저 앞에 배치한다. 광 경로에서 빔 확장기(BE) 및 제1 원기둥 렌즈(CL1)(초점 거리 = 500 mm)를 사용하여 얇은 빔시트로 10× 대물렌즈(개구수 NA = 0.3, Olympus)에 의해 샘플 챔버에 초점이 맞춰진다.
- [0122] 모든 이미지 신호는 100× 대물렌즈(UPLANFLN, NA 1.4, Olympus)로 수집되었고 전자증폭 전하쌍 장치(EMCCD, iXon Ultra, Andor, Belfast, UK)로 감지된다. 검출용 대물렌즈(OL2)와 EMCCD 카메라 사이에는 듀얼뷰 장치(DV)와 원기둥 렌즈(CL2)(cylindrical lens; 초점거리 = 1000 mm)를 장착하였다. 듀얼 뷰 장치에는 2개의 대역 통과 필터가 삽입되었으며, 단파장 슬롯에는 520/15 nm 필터와 680/13 nm 필터는 장파장 슬롯에 삽입되었다. 샘플은 z-모터(LEP MAC 5000, LUDL Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA)에 의해 제어되었다. 살아있는 세포의 DIC 이미지를 촬영하기 위해 건식 콘덴서와 한 쌍의 Nomarski 프리즘을 사용하였다. 모든 이미징 데이터는 MetaMorph(Universal Imaging, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 10 ms 간격 노출시간에서 수집한다.
- [0123]
- [0124] **[실시예 2] 시료 준비**
- [0125] 다양한 표면 리간드와 전하는 나노프로브(나노탐침)와 세포 사이의 상호작용에 영향을 끼친다. 나노프로브로 선택된 순수 AuNR, CTAB-AuNR 및 Fu-AuNR의 형태, 크기, 광학 및 표면 특성은 TEM, UV-vis 흡광도 스펙트럼, FT-IR 스펙트럼 및 제타 전위에 의해 확인하였다.
- [0126] 도 5는 순수 AuNR, CTAB-AuNR 및 Fu-AuNR의 TEM 이미지, UV-vis 흡수스펙트럼, FT-IR 스펙트럼 및 제타 전위를 보여주는 도면이다.
- [0127] 세 종류의 AuNR은 모두 5 × 15 nm(직경 × 길이) 크기의 막대 모양의 형태를 유지했다. 또한, 도 5의 a에 도시된 Fu-AuNR의 TEM 이미지를 보면, AuNR 표면에 회색 코팅이 보이며 이는 AuNR 표면에서 후코이단의 접합을 나타낸다.
- [0128] 도 5의 b에 도시된 UV-vis 흡광 스펙트럼의 경우, 순수 AuNR이 513 nm에서 TSPR 흡수피크와 726 nm에서 LSPR 흡수 피크를 가지며, 이는 적절한 강한 산란 신호에 해당한다. 후코이단을 사용한 표면 변형으로 인해 TSPR 및 LSPR에서 Fu-AuNR의 흡수 피크는 모두 CTAB-AuNR에 비해 약간 빨간색으로 이동하였다.
- [0129] AuNR에서 후코이단의 접합을 확인하기 위해 순수 AuNR, CTAB-AuNR 및 Fu-AuNR에 대해 FT-IR 스펙트럼을 확인하였다. 도 5의 c와 같이, CTAB-AuNRs 및 Fu-AuNRs의 두 스펙트럼 모두 $\sim 1465\text{ cm}^{-1}$ 에서 특징적인 피크를 보였으며, 이는 CTAB의 $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 그룹에 기인한다. ~ 1220 및 $\sim 840\text{ cm}^{-1}$ 에서 특징적인 피크는 Fu-AuNRs 스펙트럼에서 관찰되었으며 각각 황산염 그룹의 S = O 비대칭 스트레칭 및 C-O-S 스트레칭에 할당되었다. 이는 후코이단이

CTAB-AuNR의 표면에 접합되었음을 나타낸다. 다른 표면 개질로 인해 도 5의 d와 같이 순수 AuNR의 제타 전위는 CTAB-AuNR의 경우 음전하(-12.5 mV)에서 양전하(+37.5 mV)로, Fu-AuNR의 경우 더 많은 음전하(-24.7 mV)로 바뀌었다.

[실시예 3] 데이터 처리

1. 6D 통합된 다기능 빔시트 나노경 시스템(6D *i*MLSN)을 이용한 글리세롤 내 금나노로드(AuNR)의 모션 해독

이방성 플라즈몬 나노입자로서 금나노로드(AuNR)은 단일 입자 이동(공간이동) 추적뿐만 아니라 회전 추적에서도 널리 이용되고 있다. 개발된 6D 통합된 다기능 빔시트 나노스코피를 이용하여 100% 글리세롤 안에 존재하는 순수한 금나노로드(native-AuNR) 및 후코이단이 결합된 금나노로드(Fu-AuNR)의 실시간 이동을 추적한 결과는 도 6 및 도 7과 같다.

여기서 AuNR(직경 5 nm × 길이 15 nm) 및 Fu-AuNR을 글리세롤과 함께 떨어뜨려 시료를 준비하였다. 글리세롤의 점성으로 인해 AuNR 및 Fu-AuNR의 움직임은 모두 마이크로미터 범위 내에 제한된다.

도 6은 100% 글리세롤에서 Fu-AuNR(직경 5 nm × 길이 15 nm)의 추적 정보를 보여주는 도면이고, 도 7은 100% 글리세롤에서 순수 AuNR(직경 5 nm × 길이 15 nm)의 추적 정보를 보여주는 도면이다. 각 도면의 a 내지 f는 2D 추적 궤적, 3D 추적 궤적, 변위, 순간 속도, 정규화된 강도, 그리고 회전 각도를 보여준다.

단일 입자 추적의 3D 재구성 궤적은 Fu-AuNR이 글리세롤에서 이동하는 동안 명백한 변위 변동 없이 확산을 제한하는 경향이 있는 반면(도 6b), AuNR은 더 큰 공간에서 더 자유롭게 움직이는 것처럼 보였다(도 7b). Fu-AuNR의 변위와 비교하여 AuNR의 변위는 특히 *z* 방향에서 급격한 변동을 나타내었다. 더욱이 100% 글리세롤에서 Fu-AuNR의 평균 순간 속도는 $2.8 \pm 1.7 \mu\text{m/s}$ 로, AuNR의 평균 순간 속도 $16.9 \pm 15.4 \mu\text{m/s}$ 보다 훨씬 작았으며, 이는 3D 궤적 및 변위의 결과와 일치한다. 병진 운동뿐만 아니라 Fu-AuNR의 회전 동작도 100% 글리세롤에 의해 제한되었다.

도 6e의 경우 글리세롤에서 Fu-AuNR의 정규화된 TSPR 및 LSPR 산란 강도 추적을 보여준다. 글리세롤에서 Fu-AuNR 및 AuNR의 무작위 평면 내/외 회전은 유사한 패턴을 보이나 산란 강도와 감박임 주파수는 다를 것을 보여준다. AuNR은 최대 및 최소 사이에서 빠른 TSPR 및 LSPR 강도 변동을 보였으며, Fu-AuNR의 산란 신호는 강도가 낮을수록 더 느리게 변동한다. 해당 방위각(ϕ)과 고도각(θ)은 TSPR에 대해 $\cos^2\phi$ 를, LSPR에 대해 $\sin^2\theta$ 를 피팅하여 계산되었다. 도 6f 및 도 7f에서 확인할 수 있듯이 Fu-AuNR의 계산된 각도는 기본 AuNR의 고속 및 광각 회전에 비해 글리세롤의 더 작은 각도 범위 내에서 더 느린 회전 운동을 보여준다.

Fu-AuNR과 AuNR 각각의 움직임 및 회전의 차이는 AuNR 표면과 주변 용액 사이의 마찰력의 영향으로 추정되며, AuNR 표면의 후코이단 분자는 글리세롤 분자 간의 상호작용을 크게 증가시켜 Fu-AuNR의 움직임을 감소시켰다. 이상과 같은 결과로부터 6D *i*LSRM은 자유용액에서 표면 변형된 이방성 나노입자의 움직임과 회전 거동을 연구하는 데 사용 가능성을 보였다.

2. 빛의 한계 해상도 이하에서 세포 소기관, 단일생체분자의 초정밀 검출 및 추적

도 8 및 도 9는 각각 살아있는 단일 A549 암세포에서 이동하는 Fu-AuNR 및 AuNR 각각에 대한 미분간섭대비(DIC) 이미지, 3D 추적 궤적, 속도 변화, 회전각도 변화, 초고분해능 3차원 영상을 보여주는 도면이다. 각 도면의 a 내지 g는 DIC 이미지, 3D 추적 궤적, 추적 속도 변화, 회전 각도 변화, 원본 산란 영상(좌)과 비교한 초고분해능 3차원 영상(우)을 나타낸다.

각각의 DIC 이미지에서 빨간색 프레임(점선 박스) 영역은 나노로드의 세포 내 이입 과정을 나타내고, 녹색 점선은 세포 윤곽을 나타낸다. 회전 각도 변화의 경우 방위각과 고도각 정보를 함께 도시하였다.

도 8은 Fu-AuNRs가 세포막에 부착되어 A549 세포에 의해 세포 내 세포가 되는 완전한 과정의 대표적인 예를 보여준다. Fu-AuNR의 높은 음의 표면 전하로 인해 Fu-AuNR은 세포막에 도달하기 어려운데, Fu-AuNR이 세포막에 부착되기 전에 반발력을 극복하기 위해 무작위로 움직이고 회전하는 모습을 확인할 수 있다(도 8d). 또한 그 과정에서 높은 이동 속도($\sim 1.2 \mu\text{m/s}$, 도 8c의 R1)를 유지했다.

나노로드가 처음 세포막에 착륙했을 때는 도 8의 R2 영역과 같이 활동적인 측면 확산과 규칙적인 회전뿐만 아니라 느린 이동 속도를 보여주었다. 이 과정에서 Fu-AuNR 표면의 후코이단은 세포막의 수용체와 상호 작용하여, Fu-AuNR의 움직임은 세포막의 상대적으로 좁은 영역에서 활성 측면 확산을 보였다. 상호 작용이 증가함에 따라 Fu-AuNR은 결합 부위에서 정지적으로 회전하여(도 8e) 이동 속도가 훨씬 느렸다. Fu-AuNR과 비교할 때 순수

AuNR(native-AuNR)은 유사한 동작 패턴을 보였다(도 9). 그러나 표면이 노출되어 있기 때문에 AuNR과 세포막의 수용체 간의 상호작용이 약하여 활성 측면 확산은 세포막에서 비교적 넓은 영역에서 나타났다.

[0146] 세포 내 이입 후, 세포 내 소포는 미세소관의 운동 단백질에 의해 세포 내로 운반될 수 있다. 금 나노로드는 막 수용체에 결합되고 소포 막에 의해 싸여있는 형태이다. 이러한 나노로드는 일반적으로 소포에 대해 독립적인 회전 자유를 잃는다. 따라서 그들은 운동 단백질에 의해 운반되는 초기 엔도솜의 병진 및 회전 운동에 대한 정보를 제공할 수 있다.

[0147] 도 10은 A549 암세포에서 이동하는 Fu-AuNR의 6차원 특징을 실시간 획득한 결과를 보여주는 도면이다. 이러한 도 10은 Fu-AuNR의 x, y 및 z 변위, 속도 변화 및 평면 내/외 회전 역학을 포함한 6차원 세포 내 수송 정보를 획득한 결과이다. 도 10으로부터 금나노로드(직경 5 nm × 길이 15 nm)는 x, y 및 z 변위에서 약간의 변동과 함께 미세소관을 따라 거의 직선으로 이동하며 트랙을 따라 앞뒤로 움직일 수 있음을 알 수 있다. 나노로드의 회전 거동의 경우, 나노로드의 장력이 약해져 모터(motor)의 재배열로 인해 일부는 평면 내/외 회전을 유지했다. 이러한 관찰을 결합하여 살아있는 세포 내부의 입자/분자 운송 과정을 추적, 방향 운송, 트랙 전환 및 일시 중지 및 같은 세부 정보로 렌더링할 수 있음을 증명할 수 있었다.

[0148] 도 11은 도 8의 추적레적 R1 내지 R3 에서의 Fu-AuNR의 각도 변화 및 해당하는 산란 이미지를 보여주는 도면이다. 이러한 도 11은 살아있는 A549 세포에서 Fu-AuNR 추적의 산란감도 변화를 확인할 수 있다.

[0149] 오른쪽 그림에서 가로 방향은 시간 축이며, CH1과 CH2는 듀얼 뷰 장치(DV)의 두 채널에 해당한다. 이를 통해 각 채널에서 시간에 따라 검출된 이미지를 확인할 수 있으며, 이러한 두 채널의 결과 이미지로부터 세포 내 이동하는 금나노로드의 고도각(θ)과 방위각(ϕ)을 동시 획득할 수 있다.

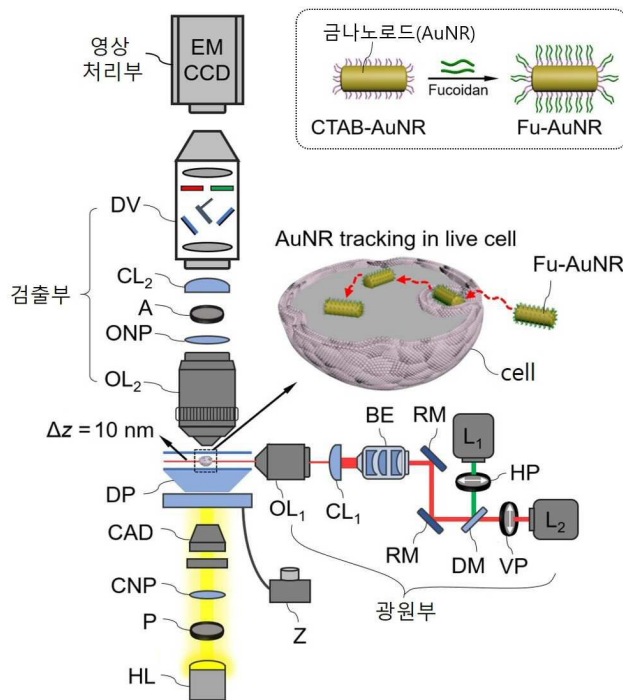
[0150] 본 발명은 도면에 도시된 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

부호의 설명

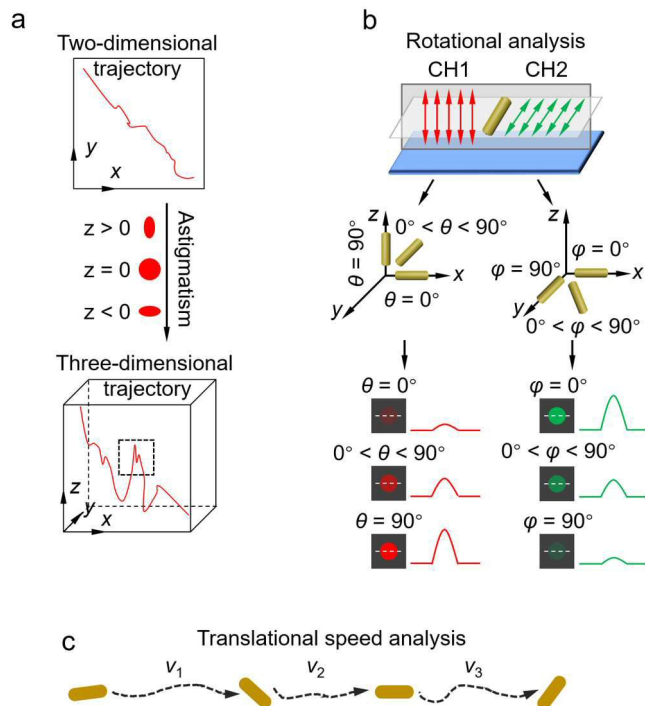
[0151] L1: 제1 광원	L2: 제2 광원
HP: 수평 편광판	VP: 수직 편광판
DM: 이색성 거울	RM: 반사 거울
BE: 빔 확장기	CL1: 제1 원기둥 렌즈
OL1: 조사용 대물 렌즈	HL: 할로겐 램프
P: 편광판	CNP: 콘덴서 노마스키 프리즘
CAD: 콘덴서 조리개 다이어그램	DP: 도브 프리즘
Z: z-스테이지 조절기	OL2: 검출용 대물 렌즈
ONP: 대물렌즈 노마스키 프리즘	A: 분석기
CL2: 제2 원기둥 렌즈	DV: 듀얼 뷰 장치
EMCCD: 영상 처리기	

도면

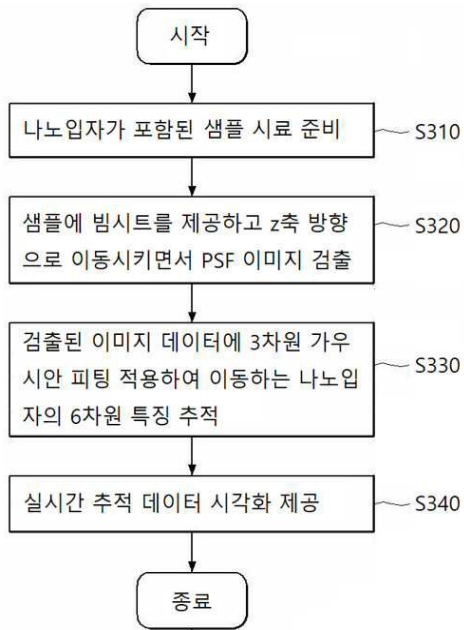
도면1



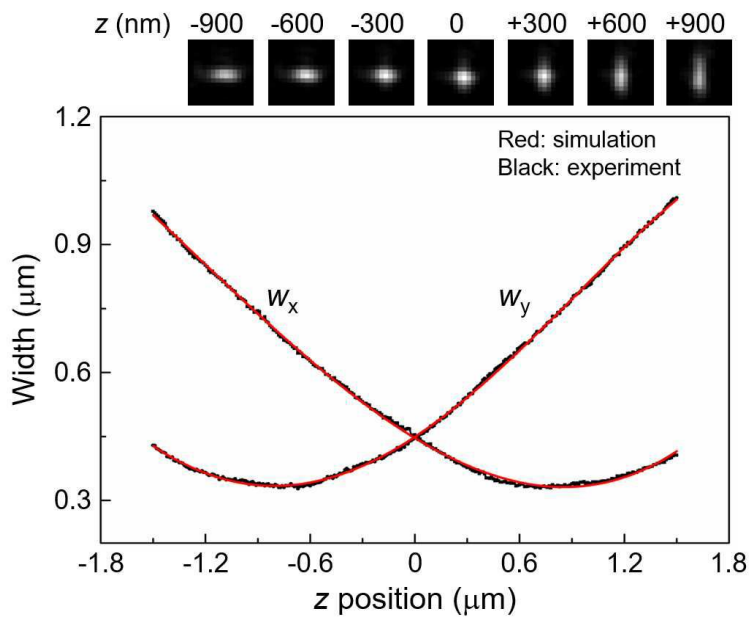
도면2



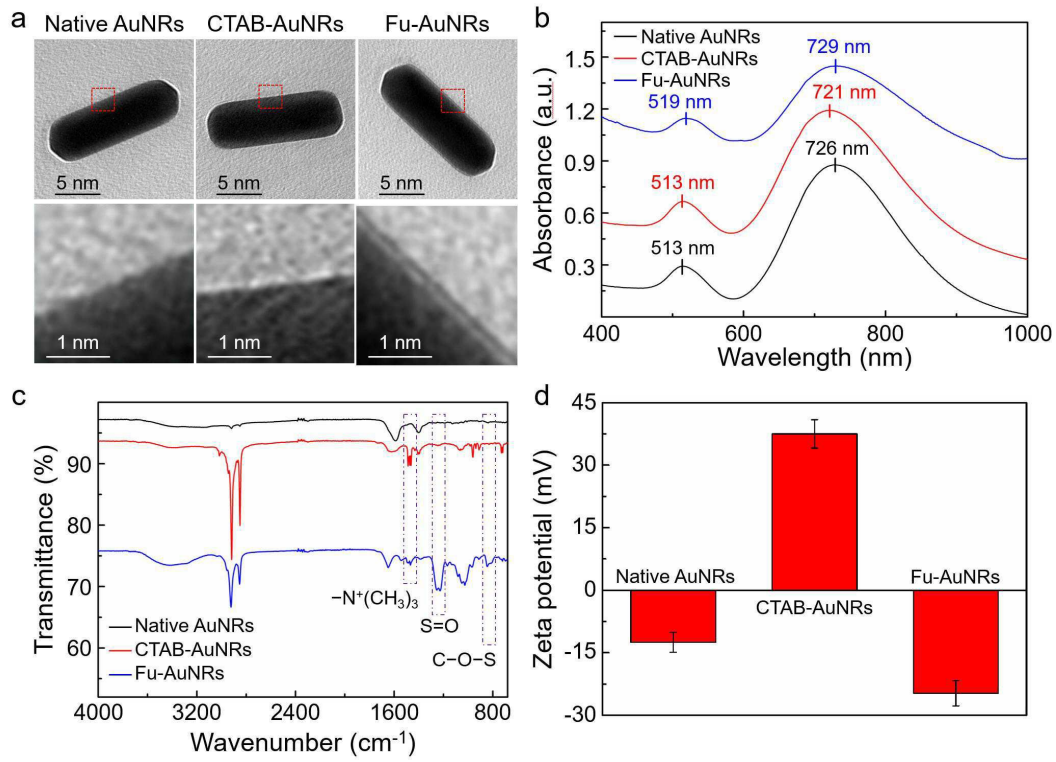
도면3



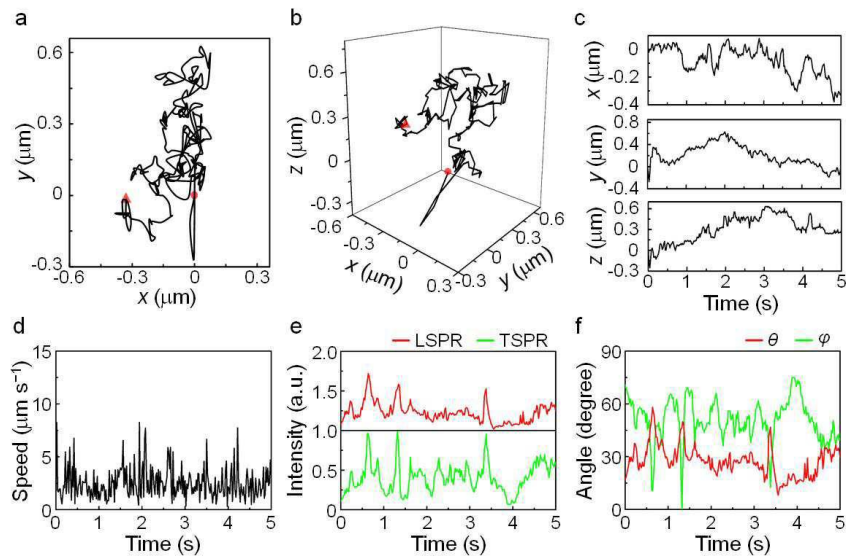
도면4



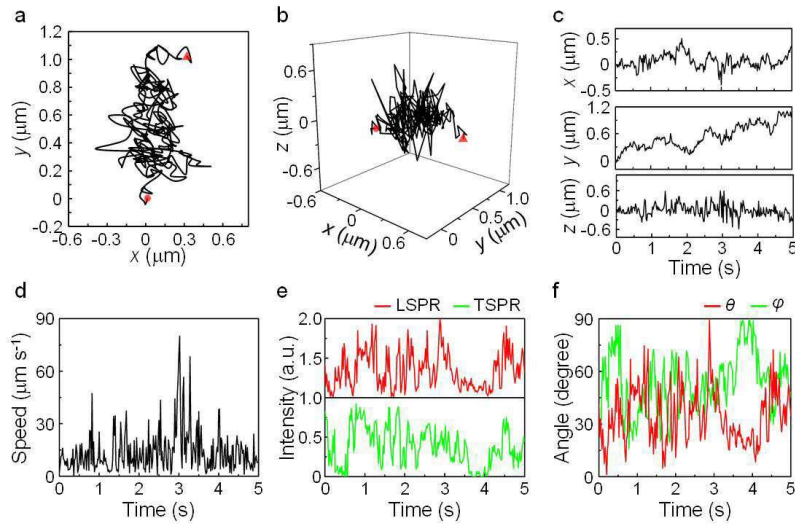
도면5



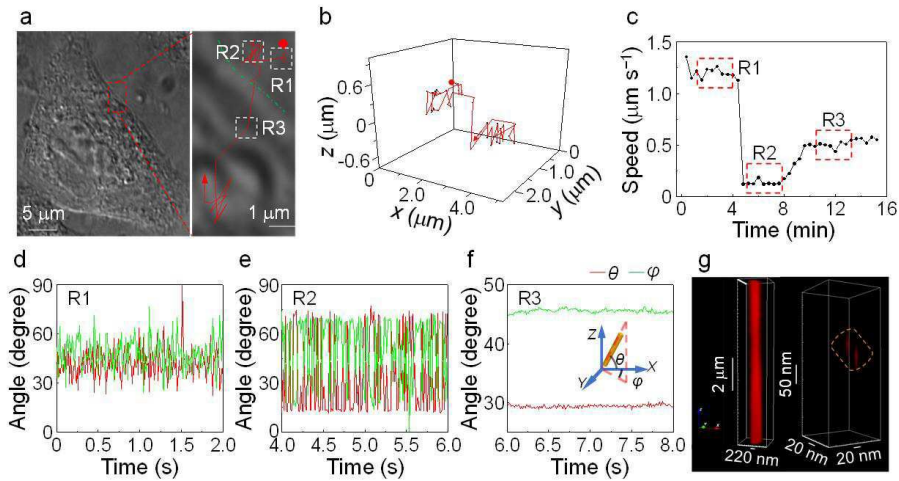
도면6



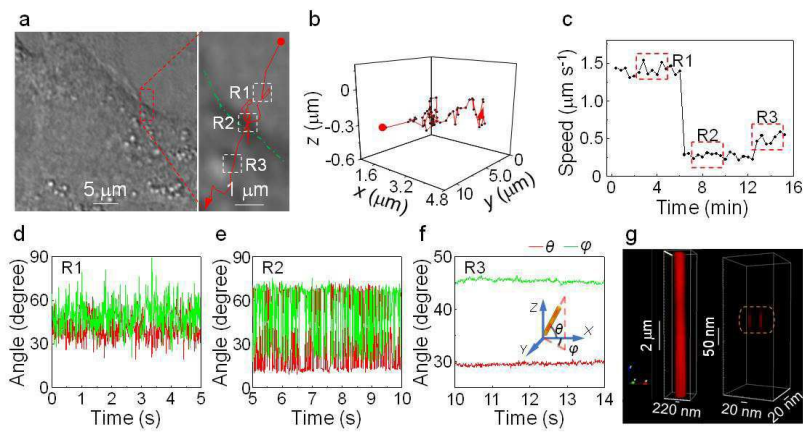
도면7



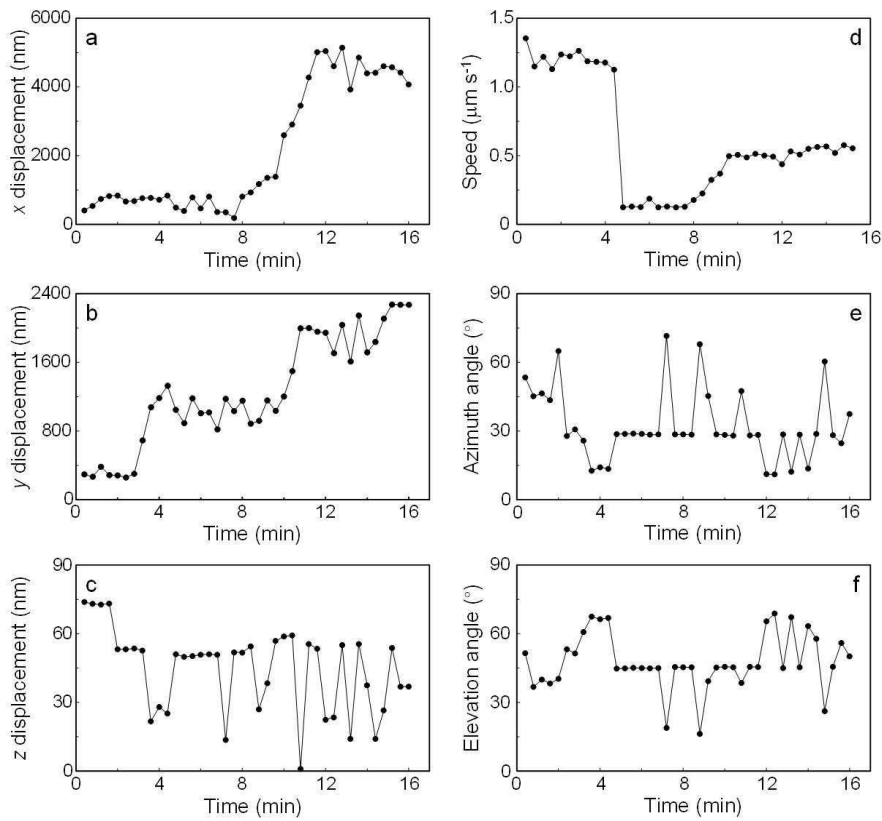
도면8



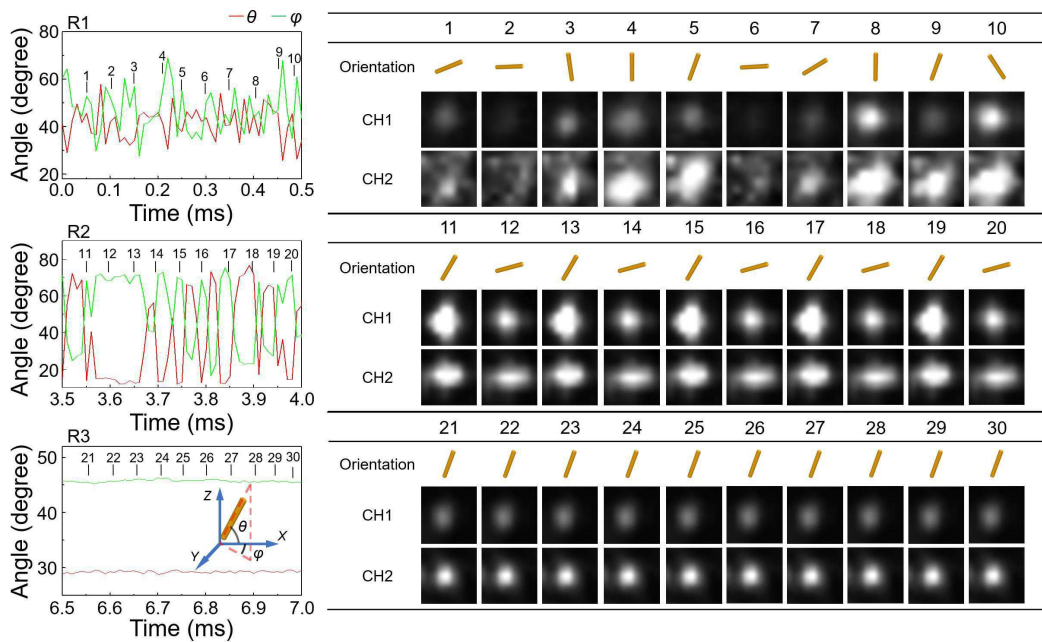
도면9



도면10



도면11



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

청구항 1에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

t 번째와 t+1 번째 프레임에서 각각 관측된 3차원 좌표인 (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 간의 유클리디안 거리(d_t) 및 프레임 간 시간 간격(Δt)을 다음의 수학식에 적용하여 상기 나노입자의 이동 속도(v_t)를 획득하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 획득 방법.

$$v_t = \frac{d_t}{\Delta t}$$

【변경후】

청구항 1에 있어서,

상기 6차원 특징을 실시간 추적하는 단계는,

t 번째와 t+1 번째 프레임에서 각각 관측된 3차원 좌표인 (x_t, y_t, z_t) 와 $(x_{t+1}, y_{t+1}, z_{t+1})$ 간의 유클리디안 거리(d_t) 및 프레임 간 시간 간격(Δt)을 다음의 수학식에 적용하여 상기 나노입자의 이동 속도(v_t)를 획득하는 비형광 비등방성 나노입자의 6차원 정보 추적 방법.

$$v_t = \frac{d_t}{\Delta t}$$