

미국08536뉴저지주플레인스보로폭스런드라이브22-06

닉클라우스, 닐, 에이.

미국08520뉴저지주이스트윈저원저페리네빌로드865

(74) 대리인 장수길
 위혜숙

심사관 : 정진수

(54) 공초점 마이크로스코피 영상 시스템

요약

가늘고 긴 빔을 이용하는 공초점 영상 시스템. 특정 실시예는 전하 결합 소자(CCD)를 갖는 장치에 관한 것이며, 상기 장치는 형광 물체 관측에 사용된다.

대표도

도 6

색인어

공초점 영상 시스템, 생물학적 분석, 형광 물체 관측, 라인 스캔, 마이크로스코피

명세서

기술분야

본 발명은 조직, 세포, 또는 세포 추출물에 대해 다양한 분석을 실행함으로써 병의 진단 및 치료에 유용한 약리 약물을 식별하기 위한 방법 및 장치에 관한 것인데, 여기서 생물학적 활동도(biological activity)의 측정은 라인 스캔 공초점(line-scan confocal) 영상 시스템 및 그와 관계된 데이터 처리 루틴에 대한 다양한 실시예들을 사용하는 것과 관련된다.

배경기술

약제 발견과 개발 분야에서 일반적으로는 생물학적 연구 분야에서 세포 기반 분석(cell-based assay)을 정확히 실행하기 위한 방법 및 장치에 관한 필요성이 존재한다. 화합물의 생물학적 활동도 및 새로운 생물학적 타겟의 작용 메카니즘을 평가하는 데에 세포 기반 분석이 유익하게 사용된다. 세포 기반 분석에서, 관심있는 재료의 활동도는 경쟁 및 상보적인 프로세스 모두에서 측정된다. 화합물 스크리닝에 관하여, 화합물의 특정한 활동도에 관한 정보가 이용 가능하다. 예를 들면, 화합물이 분석의 타겟을 결합시키는 지의 여부뿐만 아니라, 타겟의 정상적 활동도의 작용물질인지 길항제인지의 여부를 평가하는 것도 가능하다. 종종, 상기 타겟은 세포-표면 수용체(cell-surface receptor)이다. 몇몇 신호 경로에서, 잠재적으로 가장 큰 치료 요법적 가치를 갖는 경로의 요소는 상기 수용체가 아니라 상기 수용체에 관련된 세포내 신호 단백질(intracellular signaling protein)이다. 따라서, 바람직하게는 세포 환경에서 상기 경로를 통해 활동도를 평가하기 위한 방법을 개발하는 것이 타당하다.

또한, 많은 수의 화합물을 빠르고 저렴하게 스크리닝(screening)할 필요성이 있다. 일반적으로, 다양한 생화학적 타겟, 예를 들면, 수용체, 효소, 및 핵산에 대한 활동도에 관하여 화합물을 테스트하는 제약 산업분야에서 이러한 필요성이 발생한다. 이러한 화합물은, 때때로, 백만개 이상의 별개의 화합물로 된 큰 라이브러리에 집합된다. 화합물이라는 용어는 단순한 유기 및 무기 분자, 단백질, 펩타이드(peptides), 핵산 및 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides), 탄수화물(carbohydrates), 리피드(lipid) 또는 생물학 분야의 임의의 화학적 구조를 포함하지만 이것에만 제한되지는 않고 넓게 해석되는 의도로 사용된다.

화합물 스크리닝 분야에서, 세포 기반 분석은 세포군에 대해서 실행된다. 상기 측정된 반응은 일반적으로 세포 집단에 대한 평균값이다. 예를 들면, 이온 채널 분석에 자주 사용되는 기구는 U.S. 특허 No.5,355,215에 개시되어 있다. 일반적인 분석은 이온 민감성 염료의 형광-상기 형광은 화합물의 첨가의 결과로 변화하는 관심있는 이온의 세포내 농도의 척도임의 시간 의존도를 측정하는 것으로 구성된다. 상기 염료는, 측정 전에 다중 웰 플레이트(multit-well plate)의 웰의 저부에 위치한 세포 집단으로 로드된다. 일반적으로, 세포의 반응은 크기 및 시간 모두에 대해 이질적이다. 이러한 가변성은 화합물 스크리닝에 중요한 생물학적 활동도의 관측을 방해하거나 불명료하게 할 수 있다. 상기 이질성은 실험적인 원인으로부터 발생할 수 있으나, 좀 더 중요하게는, 이질성은 임의의 세포 집단에 대해 근본적인 것이다. 특히, 가변성의 근원은 상기 집단에서의 라이프-사이클 다이버전스(divergence)의 결과이거나, 액티브 타겟 분자 수의 진화적인 다이버전스의 결과일 수 있다. 상기 가변성을 완화, 보충 또는 심지어 이용하는 방법은 화합물의 약학적 활동도의 특성 분석에서 세포 기반 분석의 가치를 향상시킬 것이다.

개별 세포의 반응의 정량화는 세포 집단의 반응의 비균일성에 의해 야기된 문제점을 회피하게 한다. 상기 집단의 일부분이 상기 자극에 반응하는 경우를 생각해 보자. 평균 반응을 측정하는 장치는 개별적인 세포 반응을 판정하는 것보다 덜 민감할 것이다. 후자의 방법은 액티브 세포의 부분 집합을 선택하도록 하여 주는 반응 프로파일의 통계적인 특성을 발생시킨다. 집단의 추가 특성 분석은 상기 반응 프로파일의 해석을 향상시킬 것이다.

종래 기술에서는 이러한 필요성을 충족하기 위하여 다양한 측정 장치가 사용되었다. 플로우-시토미터-기초 분석(Flow-cytometer-based assay)은 널리 사용되며 세포를 집속된 레이저 빔을 통과하게 함으로써 한번에 하나의 세포 특성을 측정한다. 이 방법에는 몇가지 단점이 있다. 제약 산업에서 가장 중요한 것은, 분석이 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)에 위치한 화합물에 대해서는 쉽게 실행될 수 없다는 것이다. 또한, 처리량도, 일반적으로, 시료당 10-100초, 각 세포의 관찰 시간은 1ms 보다 작아서 빈약하다. 따라서 동적 분석은 되지 않고 최종적으로, 단지 세포-평균 신호만이 판정될 수 있다.

추가로, 많은 분석은 형광 신호의 상대적 위치의 판정을 필요로 한다. 단일 세포의 스캐닝을 위하여, U.S 특허 No.5,107,422 및 U.S 특허 No.5,547,849에 개시된 것과 같이, 스캐닝 시토미터(scanning cytometer)로 불리우는 장치가 널리 사용된다. 만족할 만한 속도를 얻기 위하여, 이러한 장치는 낮은(~ 5 내지 10um) 분해능에서 동작한다. 따라서, 이러한 장치는 형광신호의 분포에서 공간적 정보를 요구하는 분석용 플로우 시토미터와 비교할 때 별다른 이점이 없다.

또다른 대체 기술은 고속 카메라, 전역 마이크로스코프(full-field microscope)이다. 이들 장치는 어떤 시료들에 대해서는 본 발명에 필적하는 분해능 및 속도로 이미지를 얻을 수 있는 능력이 있다. 그러나, 이것들은 공초점이 아니며, 따라서 형광 배경에 민감하여 시료를 광학적으로 구분하는 데 사용될 수 없다. 게다가, 동시의 다중 파라미터 데이터가 용이하게 획득될 수 없다.

종래 기술과 대조적으로, 본 발명은 합성 스크리닝에 사용하는 데에 충분히 빠르고 다용도의 방식으로, 단일 세포 및 세포 집단에 대하여 다중 파라미터 형광 이미지를 획득하는 데에 사용될 수 있다. 개개의 세포의 주 반응 및 시료 집단의 이질성의 추가적인 측정 모두를 획득하고 분석하기 위한 방법 및 장치가 제공된다. 게다가, 이들 다수의 형광 물질의 위치는 세포 크기 이하의 분해능으로 결정될 수 있다. 마지막으로, 본 발명은 신속하게 변화하는 사건들을 비디오 속도로 영상화하는 데 사용될 수 있다. 이들 능력이 결합하여 약물 후보의 활동 메커니즘에 대한 새로운 연구 영역을 가능케 한다.

본 발명은, 또한 화합물들을 스크리닝하기 위한 보다 널리 이용되는 방법 중 하나인 표면 섬광 분석("SSA")(surface scintillation assay)과 다소 유사한, 독창적인 형광을 이용한 생화학 분석에 이용될 수 있다.

도 1a 내지 1f는 수용체 결합 SSA의 단계들을 도시한다. 도 1a에서, 선택된 수용체들(12)을 갖는 용해 가능한 멤브레인들(10)이 액체(30)를 함유하는 웰(20)에 부가된다. 이들 멤브레인은 수용체를 표시하는 세포들과 격리된다. 도 1b에서, 방사성 동위원소로 표식된(radio-labeled) 리간드들(14)이 웰에 부가된다. 이 리간드는 막 수용체에 대해 높은 결합 친화력을 갖는 것으로 알려져 있다. 가장 일반적인 방사성 동위 원소들은 ³H, ³⁵S, ¹²⁵I, ³³P 및 ³²P이다. 도 1c에서, 비드들(16) (beads)이 웰에 부가된다. 비드들은 맥아 아글루티닌(wheat germ agglutinin)와 같은 재료로 코팅되고, 거기에 막들이 강력히 부착된다. 비드들은 3-8μm의 직경을 갖고 섬광 재료로 도핑된 플라스틱으로 이루어진다. 대안으로, 도 1b 및 1c에 도시된 동작들의 순서가 교환될 수도 있다.

방사성 동위 원소들은, 방사성 동위 원소(radio-isotope)에 따라서, 약 1-100μm의 거리를 이동한 후 멈추는, 높은 에너지의 전자, 또는 베타 입자를 방출함으로써 자연 붕괴한다. 만일 방사성 동위 원소들이 비드들에 부착된 막들에 결합되면, 베타 입자들은 비드로 진행하고, 발광을 야기시킨다. 만약 방사성 동위원소들이 액체 전체에 퍼졌다면, 방사된 베타 입자들

은 일반적으로 비드들에서 발광을 여기시키지 않을 것이다. 도 1d에서, 방사성 동위 원소들의 붕괴에 의해 야기된 비드들의 발광이 검출된다. 도 1e에서, 시험 화합물(18)이 웰에 추가된다. 분석의 목적은 이 화합물이 방사성 동위원소로 표식된 리간드들을 치환시키는 정도를 결정하기 위한 것이다. 만일 방사성 동위원소로 표식된 리간드들이 치환되어 액체로 확산되면, 비드들의 발광이 감소될 것이다. 도 1f에서, 비드들의 발광이 다시 검출된다. 발광의 감소를 측정함으로써, 시험 화합물의 활동도가 결정될 수 있다.

도 2a 내지 2f는 수용체 결합 SSA의 대체 실시예를 도시한다. 이 실시예는, 비드들을 사용하는 대신에, 섬광 재료로 도핑된 플라스틱으로 이루어지고 거기에 막들이 부착되는 재료로 코팅된 웰 저부(22)(well bottom)를 사용한다는 것을 제외하면, 본질적으로 도 1a 내지 1f에 도시된 것과 동일하다. 따라서, 비드들의 발광을 검출하는 대신에, 도 2a 내지 2f에 도시된 실시예는 웰 저부의 발광을 검출한다.

도 3a 내지 3d는 효소 SSA의 실시예의 단계들을 도시한다. 도 3a에서, 방사성 동위원소 표식된 펩티드들(42)이 부착된 섬광재료로 도핑된 비드들(40)이 액체(60)를 함유하는 웰(50)에 추가된다. 도 3b에서, 시험 화합물(44)이 웰에 추가된다. 도 3c에서, 효소들(46)이 웰에 추가된다. 만일 제지되지 않는다면, 효소들(46)은 비드들(40)로부터 방사성 동위원소 표식된 펩티드들(42)을 분리시킬 것이다. 그 결과, 방사성 동위 원소가 용액으로 확산되고, 방사성 동위 원소 붕괴는 비드들(40)에서 발광을 생성하지 않을 것이다. 한편, 시험 화합물(44)이, 전형적으로 효소 활성 위치를 차단함으로써 효소들(46)을 제지하면, 효소들(46)은 방사성 동위 원소를 분리시키지 못할 것이고, 방사성 동위 원소의 붕괴는 비드들에서 발광을 생성할 것이다. 도 3d에서, 비드들의 발광이 측정되고 시험 화합물의 활동도가 결정될 수 있다.

도 4a 내지 4d는 효소 SSA의 대체 실시예를 도시한다. 도 4a에서, 방사성 동위원소로 표식된 펩티드들(42)이 섬광 도핑된 웰 저부(52)에 부착된다. 도 4b에서, 시험 화합물(44)이 웰에 추가된다. 도 4c에서, 효소들(46)이 웰에 추가된다. 도 4d에서, 웰 저부의 발광이 측정되어 시험 화합물의 활동도가 결정된다.

상기 실시예는 SSA의 일반적 원리, 즉 관심 대상인 활동도가 섬광 재료(scintillant)의 방사 붕괴 길이 내에서의 방사성 동위원소의 개수의 변화에 의해 분석된다는 점을 예시하였다. SSA들의 유리한 점 중의 하나는 섬광 재료에 부착되지 않은 방사성 동위원소들은 세척 단계에서 웰로부터 제거될 필요가 없다는 것이다. 즉, SSA들은 균일한 분석 방법이라는 것이다.

방사 면역 분석법(RIA)은, 수용체가 항체이며 리간드가 대부분의 경우 천연 또는 합성 펩타이드, 단백질, 카르보이드레이트(carbohydrate) 또는 작은 유기 분자인, 수용체 결합 분석 방법 중의 한 특정 방법이다. RIA들은 임의의 준비된 시료에서 리간드의 농도를 측정하는 간접 방법이며, 여기서 시료들은 대부분의 생물학적 시료들, 즉, 혈장, 중추 신경계의 유동체, 소변(urine), 또는 세포질 추출물과 같은 것이다. 표준 RIA에서는 항체는 리간드에 대해 특정 친화력을 가지며, 분석물은 항체, 방사성 동위원소 표식된 리간드의 고정 농도 및 비 표식 리간드의 알려지지 않은 농도를 포함한다. 비 표식 리간드의 농도는 그것이 항체에 결합하여 이에 의해 표식된 리간드의 결합을 막는 정도에 의해 결정된다. RIA들은 대부분 세척 단계로 속박되지 않은 리간드로부터 속박된 리간드의 분리를 요하는 이종(heterogenous) 분석법으로서 실행된다. RIA들은 항체 수용체가 섬광 재료로 채워진 비드(bead)에 부착되고 세척 단계가 제거된 SSA 구성을 사용하며 발전되어 왔다.

그러나, SSA 및 RIA 들은 다수의 결점을 갖고 있다. 첫째, 이러한 분석법은 고비용 및 시간 소모를 요하는 방사능 물질의 취급을 요한다. 둘째, 이러한 분석법은 큰 거대 웰들에서만 효과적이다. 비드들 또는 웰 저면으로부터의 발광 방사율은 베타 입자 방사율에 비례한다. 전형적인 ^3H 분석법은 ^3H 붕괴마다 하나의 광자 검출율 이하의 검출율을 보인다. 분석법의 속도를 증가시키기 위해서는, 방사성 동위원소 표식된 리간드의 양이 증가되어야 하며, 따라서, 막(membrane), 비드 및 테스트 화합물의 양도 증가한다. 10 내지 60 초 내에 삼중수소 SSA를 실행하기 위해서는, 10^7 개의 비드들이 사용되어야 한다. 이러한 비드들의 양은 약 150 μL 의 웰을 요구한다. SSA는 다수의 화합물들을 스크리닝하는데 바람직한 μL 크기의 체적을 갖는 웰 내에서 효과적이지 않다.

하기와 같이, 본 발명에서, 특히 SSA 및 RIA에서 쓰이는 방사성 동위원소 표식된 리간드를 형광 표식된 리간드로 교체한다. 이렇게 하여, RIA에 대한 동형 포맷을 도입하고 SSA의 동형 포맷을 유리하게 유지시킨다. 표면 장력이 세척을 불가능하게 만들기 때문에, 이런 점은 μL 크기 체적을 갖는 웰에서 특히 중요하다. 그러나, 동형 포맷에서는, 형광이 수용체-결합 분석법으로 예시될 수 있는 바와 같이 문제점이 될 수 있다. 테스트 화합물이 추가되면, 다른 것들은 막에 붙어있는데 반해, 몇몇 형광 표식 리간드들은 치환되고 웰의 체적 전체를 통해 자유롭게 확산한다. 테스트 화합물의 활동도를 판정하는데 이용되는 것은 막에 부착된 형광 표식 리간드에 의한 형광이다. 그러나, 전체 웰로부터 형광이 검출되면, 웰의 체적 내에 있는 형광 표식 리간드로부터의 방사는 막에 부착된 형광 표식 리간드들로부터의 방사를 불분명하게 할 것이다.

이러한 문제를 다루는 한가지 방법이 쉬퍼더등에게 허여된 미국 특허 제5,355,215호 에 기술되어 있고, 도 5a 및 5b 에 도시되어 있다. 쉬퍼더등의 방법에 의하면, 시료들은 도 5의 A로 도시된 바와 같이 비스듬한 각도로 웰 저면으로 지향되는 광의 빔(134)에 의해 조명(illumination)되며, 따라서 이는 전체 웰을 조명하지 않는다. 게다가, 빔이 영역(114')을 조명하는 동안, 최소한의 조명량을 받는 웰 체적 아래에 소재한 영역(114a)으로부터만 형광이 검출된다.

그러나 쉬퍼더등의 방법은 다수의 결점을 갖는다. 첫째, 그것은 웰 저면의 적은 부분만을 검출하기 때문에, 쉬퍼더 등의 방법은 상당히 큰 웰에 대해서는 충분한 정도의 정확성을 가져야만 실행될 수 있다. 1536-웰 플레이트의 약 1 mm 직경의 웰 내에 배치된 시료들을 영상화하는 것은 적절한 것이 아니다. 둘째, 경사진 조명이라는 기하학적 속박은, 웰 저면에서 개개의 셀들과 같은 마이크로론(micron) 크기의 물체들을 영상화하는데에 충분한 정도의 감도 및 분해능을 얻는데 필요한 높은 개구수의 집광 광학계를 사용하는 것을 배제시켜 버린다.

이러한 문제에 대한 다른 접근법에서는 점 스캔(point-scan) 마이크로스코프를 사용한다. 예컨데, 베어등에게 허여된 미국 특허 제5,547,849호 에서는 점 스캔 공초점 시스템의 사용이 개시되어 있다. 베어등은 공간 분해능을 희생함으로써 점 스캔 공초점 기법에 내재된 이미지 획득의 저속성을 극복하는 방법을 보여주고 있다. 예컨데, 만약 차수 10 정도로 시료 위의 조명 빔의 직경을 확장시킨다면, 조명 영역은 어떤 조건 하에서, 100배(fold)로 증가하여 100 배 빠른 스캔을 허용해 준다. 그러나, 분해능을 희생한 결과로 속도 증가가 달성된다. 게다가, '849 특허에 개시된 바와 같이, 상기 스캐닝 방법에 적절한 검출 장치는, 주로 감도의 측면에서, 본 발명에서 유리하게 사용되는 것들보다 열등하다. 마지막으로, 배경차단(background rejection)의 정도는 분해능과 함께 감소된다. 따라서, '849 특허에 개시된 장치는 본 발명보다 작은 감도, 높은 배경 및 낮은 분해능을 가지며, 그러한 모든 것들은 본 응용 분야에서 중요한 것들이다.

본 발명은 라인 스캔 공초점 마이크로스코프의 새로운 실시예를 포함한다. 라인 스캔 공초점 마이크로스코프는 본 기술분야에 알려져 있다. 두개의 대표적인 실시예는 도 7에 도시되고, Brakenhoff and Visscher in J.Microscopy 171 17-26 (1993)에 의해 출판되었고, 화이트등에게 허여된 미국 특허 제 5,452,125에 개시된 시스템이다. 그 두 실시예들은 시료를 가로지르며 조명을 획 비추어주는 스캐닝 미러(mirror)를 사용한다. 동일 미러는 형광 방출을 디스캐닝(de-scan)한다. 슬릿으로 공간 필터링을 한 후에, 형광은 시각으로 관찰할 수 있도록 재스캔된다. 오실레이팅(oscillating) 미러의 사용은 이러한 마이크로스코프들이 신속하게 시계(field of view)를 스캔할 수 있도록 한다. 라인 조명은 신속한 영상화를 요하는 응용에 유익하다. 그러나, 포인트 조명과 비교하여 라인 조명의 병렬 조명 방식에 내재한 잠재적 속도 증가는 영상 시스템이 조명선을 따라 시료의 각 지점으로부터 방출된 광을 동시에 검출하는 것이 가능한 경우에만 실현된다. 개시된 장치의 핵심 특징은 대상체면(object plane)에 공액인 평면 내에 다수의 독립된 검출 소자를 구비하는 검출 장치의 사용에 있다.

본 발명에 따르면, 시료는 반드시 "평면" 내에 존재해야 하는데, 여기에서 영상 시스템의 필드 깊이가 "평면성(planarity)"의 정밀도를 결정한다. 양호한 실시예에서, 영상화된 면적은 1mm^2 이고, 필드 깊이는 $10\mu\text{m}$ 이다. 그러므로, 전체 필드가 동시에 포커싱되어야 하는 경우에, 시료는 100 분의 1(1 part in 100) 내외로 편평해야 한다. 이것은 (웰 저면부의 중앙 영역과 같은) 로컬 영역 상의 많은 시료 기관(예를 들면 마이크로타이터(micrititer) 플레이트)에 적용된다. 그러나, 시료 기관이 그 전체 표면에 걸쳐 편평해야 된다고 요구하는 것은 실용적이지 못하다. 100mm 정도의 마이크로타이터 플레이트에 대해서, 10,000 분의 1 정도이 평면성이 필요할 것이다.

본 발명은 영상화되는 시료 기관 부분을 "포커싱"한 상태로 유지하는 광학적 자동 포커스 시스템을 제공한다. 광학적 자동 포커스 메카니즘은 빠르고, 플라스틱 마이크로타이터 플레이트 및 마이크로스코프 슬라이드와 같은 비도전 기관과 함께 동작될 수 있다고 하는 장점을 가지고 있다. 유익하게는 이 포커스 메카니즘은 무시할만한 지연을 갖고 동작한다. 즉, 포커싱 메카니즘의 응답 시간이 이미지 획득 시간보다 짧은데, 양호하게는 수분의 1초가 된다. 본 어플리케이션에 적합한 광학 기반 자동 포커스 메카니즘은 알려져 있다. 예를 들면, 서보 제어에 적합한 위치 에러 신호를 생성하기 위한 비접수차 렌즈 기반 시스템은 Applied Optics 23 565-570(1984)에 개시되어 있고, "스큐 빔(skew beam)"을 이용하는 포커스 에러 검출 시스템은 SPIE 200 73-78(1979)에 개시되어 있다. 본 발명의 양호한 실시예에서, 시료 기관은 마이크로타이터 플레이트이다. 이 경우에, 포커싱을 달성하는 양호한 수단은 플레이트의 특성에 따라 추가로 좌우된다. 플레이트 저면부의 두께가 포커스 깊이의 부분 값 내외로 균일하다면, 플레이트 저면부를 물체 평면으로부터 일정 오프셋으로 유지했던 포커싱 메카니즘은 적절할 것이다. 그러나, 통상 이용되는 마이크로타이터 플레이트은 충분히 균일하지 않다. 그러므로, 포커싱 메카니즘은 시료가 소재하는 표면 상을 추적해야만 하는데, 이는 통상 마이크로타이터 플레이트 웰의 내부가 된다. 본 발명의 하나의 양상은 마이크로타이터 플레이트의 웰 저면부와 같은 불연속면에 대한 쾌속 포커싱을 이루기 위한 새로운 자동 포커스 시스템이다.

그러므로, 다수의 화학적 화합물들을 정확하고, 빠르며, 저렴하게 그리고 동일한 포맷으로 스크리닝하기 위한 방법 및 장치가 필요하다. 또한, 다중 파라미터 형광 영상화를 충분한 분해능으로 수행하여 개개의 세포 및 세포 하위 이벤트를 영상화할 수 있는 방법 및 장치가 필요하다. 또한 통계적으로 의미 있는 세포 집단을 비디오 레이트로 추가적으로 모니터링할 수 있는 영상 시스템이 필요하다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 생물학적 활동을 분석하기 위한 라인 스캔 공초점 마이크로스코프 및 라인 스캔 공초점 영상(LCI) 시스템의 이용에 관한 것이다.

양호한 실시예에서, 라인 스캔 공초점 영상 시스템은 다수 파장 대역을 갖는 레이저 광원을 이용하고, 이들 광원을 시료에 조명하여 형광단(fluorophore)을 여기함으로써 전자기 에너지를 방출하도록 한다. 이들 파장 대역은 가시 광선 뿐만 아니라 자외선 대역까지를 포함한다.

본 발명은, 얇은 광학 섹션을 해상할 수 있는 공초점 마이크로스코프의 고유 장점을 잃지 않고서, LCI 시스템이 하나의 웰로부터 다른 웰로 신속하게 이동하는 것을 가능하게 하는 자동 초점 기능을 이용함으로써, 마이크로 웰 플레이트에 대한 일련의 쾌속 분석을 수행할 수 있다.

본 발명의 다양한 실시예에서, 시료가 이동되어 시료에 대한 조명 라인의 스캔이 이뤄지도록 되어 있다. 다른 실시예에서는, 진동 미러가 이용되어, 조명 라인이 신속하게 이동하게 함으로써 고정된 채로 있는 시료의 스캔을 가능하게 한다. 예를 통해서, 이미지들은 초당 50 프레임의 레이트까지로 얻어질 수 있다.

양호하게는, 본 발명은 성분의 부가가 신경 또는 근육 세포 내의 액션 포텐셜의 전파와 같은 급변 생물학적 이벤트를 개시하는 것을 가능하게 하는 통합 디스펜싱(integrated dispensing)을 제공한다.

양호하게는, 본 발명은 전하 결합 소자(CCD; Charged Coupled Device)와 같은 다중-소자 고체 상태 검출 장치를 이용한다. 이 장치는 연속적으로 판독하는 것이 바람직하다. 양호한 실시예에서, 본 발명은 완전한 2차원 검출기를 필요로 하지 않고 고속 판독 속도가 가능한 장방형 CCD를 이용한다. 또한, 스테이지-스캐닝 실시예에서 더 넓은 유효 시계를 얻을 수 있다.

본 발명은 또한 양호한 실시예에서, 데이터 획득과 동시에 전담 데이터 분석을 수행함으로써, 높은 처리 능력의 스크리닝 모드로 동작하도록 하는 능력을 제공한다.

본 발명은 형광을 이용하는 다양한 생물학적 분석을 수행하는 방법을 제공한다. 하나의 실시예에서, 관심 대상인 타겟은 고정된 또는 활동하는 세포 내 또는 세포 하위 기관 내 또는 세포막 상에 존재할 수 있다. 이들 분석은 일반적으로 입사광의 서로 다른 파장들에 민감한 하나 이상의 형광 표식의 여기를 필요로 하는 하나 이상의 파라미터를 판정하는 것을 포함한다. 또한, 이들 분석은 그로부터 2차원 또는 3차원 위치 및 형광 표식된 종의 강도 및 이들 상관 관계가 판정되는, 하나 이상의 파장에서의 방출된 광의 동시 및 정확한 영상화를 필요로 한다.

또한, 본 발명은 형광 방출 수단에 의한 응답의 단일 영상화, 또는 동일 영역 또는 세포의 신속 반복 영상화를 필요로 하는 분석을 수행하는 방법을 제공한다. 다양한 실시예에서, 영상화는 초당 50 프레임 정도의 속도로 수행된다. 다수의 파장에서 높은 공간 분해능으로 신속하게 영상화할 수 있는 능력으로 인해, 본 발명은 이전에는 수행할 수 없었던 분석을 수행할 수 있고, 또한 우수한 방식으로 수행할 수 있다.

본 발명은 화학적 화합물을 스크리닝하고, 형광 물질 또는 형광 프로브의 이용과 관계된 다수 형태의 분석을 수행하기 위한 수개의 방법에 관련된다. 일반적으로, 이들 분석 및 스크리닝 절차는, 그 중 전부 또는 일부가 형광 표식으로 태그되거나 형광 제품으로 변형된, 본질적으로 형광성인 테스트 혼합물 및 시약의 사용과 관련된다. 테스트 화합물 및 시약은 다양한 방식으로 결합될 수 있다.

하나의 실시예에서, 시약들은 액체를 포함하는 웰에 부가된다. 이것은 다중 웰 플레이트 상의 단일 웰 또는 다수 웰 중의 하나일 수도 있다. 라인 스캔 공초점 마이크로스코프로 측정할 때, 웰의 저면부 상 또는 웰의 저면부 상에 배치된 비드의 표면 상에 배치된 형광단의 존재 또는 부재에 의해 관심의 대상인 생물학적 활동도가 결정된다. 본 실시예는 SSA 포맷과

공통적으로, 검출된 종의 국부화로부터 활동도를 결정한다. SSA의 경우에, 국부화는 섬광 재료에 가깝다. 본 방법에서는, 국소하는 웰의 영역, 양호하게는 저면부이다. SSA의 경우에, 근접 종의 민감도는 베타 분자의 붕괴 길이에 의해 결정된다. 본 방법에서, 국부화된 형광관에 대한 민감도는 공초점 마이크로스코프의 광학-절단 깊이에 의해 결정된다.

또한, 본 발명은 다수 시료를 고속 및 자동 방식으로 스캔하는 것을 요구하는 고성능 분석을 수행할 수 있다. 이들 시료들은 개개의 마이크로 웰일 수 있고, 액체 상태 및 움직이거나 고정된 세포 또는 세포의 성분들을 포함하는 웰이 관련될 수 있다. 본 발명은 또한 분석 동안 액체 상태 시료를 유지하거나 움직이는 세포를 유지하는데 요구되는 환경 제어를 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1a 내지 1f는 제1 수용체-결합 SSA를 도시한다.

도 2a 내지 2f는 제2 수용체-결합 SSA를 도시한다.

도 3a 내지 3d는 제1 효소 SSA를 도시한다.

도 4a 내지 4d는 제2 효소 SSA를 도시한다.

도 5a 내지 5d는 웰(well)의 저부에 배치된 샘플들을 영상화(imaging)하기 위한 종래 장치의 개략도이다.

도 6은 본 발명에 따라 샘플들을 영상화하는 데 사용되는 라인스캔 공초점 마이크로스코프의 제1 실시예의 개략도이다.

도 7은 종래의 마이크로스코프의 개략도이다.

도 8a 내지 8b는, 각각, 스캐닝 미러가 없는 본 발명의 다색 실시예의 광선 경로의 평면도 및 측면도이다. 도 8c는 단일 빔 자동초점의 광선 경로의 평면도이다.

도 9a 내지 9b는, 각각, 스캐닝 미러를 구비한 본 발명의 다색 실시예의 광선 경로의 평면도 및 측면도이다. 도 9c는 단일 빔 자동초점의 광선 경로의 평면도이다.

도 10은 두개의 빔 자동초점 시스템의 측면도이다.

도 11a 내지 11c는 장방형 CCD 카메라 및 관독 레지스터를 도시한다.

도 12a 및 12b는 종래의 암시계 영상화(dark-field imaging)를 채용한 본 발명에서의 라인스캔 공초점 마이크로스코프에 의해 형성된 광선 경로들의 단면도이다.

도 13a 및 13b는 역(reverse) 암시계 영상화를 이용한 본 발명에서의 라인스캔 공초점 마이크로스코프에 의해 형성된 광선 경로들의 단면도이다.

도 14는 샘플 평면의 회절제한 면적보다 큰 면적이 조명되는 경우, 역 암시계 영상화를 이용한 본 발명에서의 라인스캔 공초점 마이크로스코프에 의해 형성된 광선 경로들의 단면도이다.

도 15a 내지 15f는 본 발명에 따른 수용체-결합 분석의 제1 실시예를 도시한다.

도 16a 내지 16f는 본 발명에 따른 수용체-결합 분석의 제2 실시예를 도시한다.

도 17a 내지 17d는 본 발명에 따른 효소 분석의 제1 실시예를 도시한다.

도 18a 내지 18d는 본 발명에 따른 효소 분석의 제2 실시예를 도시한다.

도 19a 내지 19d는 전사 인자 전위 분석(transcription factor translation assay)을 도시한다.

도 20a 내지 20d는 전위 분석 데이터 분석을 도시한다.

도 21a 내지 21e는 다른 데이터 분석을 도시한다.

도 22는 카르바콜(Carbachol)에 대한 신경원 세포 칼슘 응답을 도시한다.

도 23a 내지 23h는 50 mM KCL에 대한 신경원 세포 칼슘 응답을 도시한다.

도 24a 내지 24c는 균질 생 세포 수용체 결합 분석을 도시한다.

도 25a 내지 25c는 균질 생 세포 수용체 결합 분석을 도시한다.

도 26a 내지 26d는 Cy3 표식 리간드를 갖는 균질 생 세포 수용체 결합 분석을 도시한다.

도 27a 내지 27d는 가변 수의 Cy5 표식들을 갖는 4 μ m 직경의 실리카 비드(silica bead)들을 도시한다.

도 28a 내지 28d는 전위 분석, 이온 채널 분석 및 세포 표면 수용체 결합에서의 데이터를 그래프로 도시한다.

실시예

본 발명의 이들 및 다른 목적, 특징, 및 이점들은, 첨부 도면을 참조한 이하의 상세한 설명으로부터 보다 명확하고 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

본 명세서에 열거된 모든 특허 출원, 간행물, 및 다른 참조들은 그 전체 내용 그대로 여기에 포함된다.

본 발명은 질병의 치료를 위한 약제들을 식별하는 데 유용하다. 본 발명은 생물학적 반응을 측정하기 위해 하나 이상의 형광성 시약들이 채용되는 경우 광범위한 각종 생물학적 분석들을 수행하기 위한 고효율 방법을 제공한다. 그러한 분석들은 조합 가능 라이브러리에서 발견되는 것들과 같은 약품 후보에 포함되지만 그것에만 제한되지는 않는 화학적 화합물 또는 생물학적 관심이 있는 임의의 분자에 대해 수행될 수 있다. 게다가, 본 발명은 세포 및 조직 샘플로부터 병리학적 상태를 진단하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 형광성 시약들을 이용하여 전체 세포에 대한 약품 후보들의 다양한 생물학적 반응을 프로파일링하기 위한 방법을 제공한다.

삭제

본 발명의 기술은, 개개의 세포들에 대해, 세포 레벨로 또는 세포 하위 레벨로 충분히 신속하게 데이터를 획득하여, 충분한 수의 세포들에 대해 이런 데이터를 얻을 수 있도록 함으로써, 세포 집단에 대해 통계학적으로 의미 있는 샘플을 구성할 수 있도록 하는 분석에서 사용될 수 있다. 본 발명은 다수의 파라미터에 대해 동시 측정을 할 수 있으며, 또한 개개의 세포들로부터의 다수의 신호들을 상관시킬 수 있다. 그러므로, 본 발명은 이질적인 세포 반응들을 분석하고 작은 부분 집합의 세포들에 한정된 반응들을 분석하기 위해 채택될 수 있다.

게다가, 본 발명은 다수의 신호 경로의 동시 활성화를 영상화할 수 있고 다수의 신호들을 동시에 및 시간 경과에 따라서 상관시킬 수 있다. 이 능력은 특정 분석에서 개개의 세포들의 시간 반응 또는 개개의 세포들의 시간 반응의 비교가 요구될 때 핵심적인 사안이 된다.

게다가, 본 발명은 잠재적인 약품 후보를 포함하여, 원래적으로 형광성의 화학적 화합물이 존재하거나 또는 구속되지 않은 형광단이 존재하는 경우에 세포들의 공초점 평면으로부터 형광성 신호들을 영상화할 수 있다.

이들 분석은 임의의 공지된 형광단 또는 형광성 표식을 이용할 수 있으며, 이들은 플루오레세인(fluorescein), 로다민(rhodamine), 텍사스 레드, 애머샴(Amersham) 사 염료 Cy3, Cy5, Cy5.5, 및 Cy7, 헤흐스트(Hoechst)의 핵염료 및 Coumarin 염료를 포함하지만 이것들에 제한되지는 않는다. (오리건주 유진, Molecular Probes 사의 Fluorescent Probes and Research Chemicals 제6판, Haugland R.P. 핸드북을 참조할 것).

이들 분석은, 수용체 결합 분석, 세포내 전기 전위 또는 pH의 분석, 이온 농도의 분석, 효소 활동 분석, 트래피킹 분석 (trafficking assays), 운동 영상화 분석 및 희귀 세포 사건의 분석을 포함하지만 그것들에 제한되지는 않는다.

수용체 결합 및 효소 활동 분석은 비드 기반이거나(bead-based) 또는 세포 기반(cell-based) 분석일 수 있다. 비드를 이용한 분석의 일부 예들이 WO 98/55866에 기술되어 있다. 그러나, 상기 명세서에 기술된 방법은 점 스캔 공초점 기술을 이용할 뿐이고, 본 발명의 라인 스캔 공초점 영상 시스템은 데이터 획득 속도면에서 상당히 유리하다.

광학 구성

도 6은 본 발명의 제1 실시예를 도시한다. 마이크로스코프는, 예를 들어 350-750nm의 광학 범위의 전자기 방사의 소스(400 또는 410), 실린더형 렌즈(420), 제1 슬릿 마스크(430), 제1 릴레이 렌즈(440), 다이크로익 미러(450), 대물 렌즈(470), 샘플 웰(482)들의 2차원 어레이를 포함하는 마이크로타이터 플레이트(480), 튜브 렌즈(490), 필터(500), 제2 슬릿 마스크(510), 및 검출기(520)를 포함한다. 이들 소자는 광학축 OA를 따라서 배열되고, 마스크들(430, 510) 내의 슬릿 개구들(432, 512)은 도 6의 평면에 대해 수직으로 연장한다. 렌즈들(440, 470, 490)의 초점 길이 및 이들 렌즈 사이의 간격 뿐만 아니라 마스크(430)와 렌즈(440) 사이의 간격, 대물 렌즈(470)와 마이크로타이터 플레이트(480) 사이의 간격 및 렌즈(490)와 마스크(510) 사이의 간격은 공초점 마이크로스코프를 제공하기에 적절한 것이다. 이 실시예에서, 램프(400) 또는 레이저(410)로부터의 전자기 방사는 실린더형 렌즈(420)를 이용하여 라인으로 포커싱된다. 라인의 형상은 제1 슬릿 마스크(430)에 의해 최적화된다. 이 슬릿 마스크(430)는 광학 시스템의 이미지 평면, 즉 대상체 평면과 공액(conjugate)인 평면에 도시되어 있다. 마스크(430) 내의 개구(432)에 의해 형성된 조명 스트라이프는 렌즈(440), 다이크로익 미러(450) 및 대물 렌즈(470)를 거쳐서 샘플 웰(482)들의 2차원 어레이를 포함하는 마이크로타이터 플레이트(480) 상으로 중계된다. 설명의 편의를 위하여, 도 6의 광학 시스템은 단면으로 도시되고 웰 플레이트는 사시도로 도시되어 있다. 조명 라인의 웰 플레이트 상으로의 투사는 라인(484)에 의해 도시되고 또한 도 6의 평면에 대해 수직인 것으로 이해된다. 화살표 A 및 B에 의해 지시된 바와 같이, 웰 플레이트(480)는 도시되지 않은 수단에 의해 어레이의 차원과 평행한 2차원(X, Y) 상에서 이동될 수 있다.

대체 실시예에서, 슬릿 마스크(430)는 광학 시스템의 푸리에 평면, 즉 대상체 후방 초점 평면(BFP)(460)과 공액인 평면에 소재한다. 이 경우, 개구(432)는 도면의 평면에 위치하고, 렌즈(440)는 개구(432)에 의해 형성된 조명 스트라이프를 대물 렌즈(470)의 후방 초점 평면(460) 상으로 중계하고, 대물 렌즈(470)는 이것을 도 6의 평면에 대해 수직인 대상체 평면 내의 라인(484)으로 변환한다.

또 다른 대체 실시예에서, 슬릿 마스크(430)는 완전히 제거된다. 이 실시예에 따르면, 조명 소스는 레이저(410)이고, 그것으로부터의 광은 대물 렌즈(470)의 후방 초점 평면(460) 내에 포커싱된다. 이것은 도 6에 도시된 바와 같이 실린더형 렌즈(420) 및 구형 렌즈(440)의 조합에 의해 달성되거나, 또는 조명은 실린더형 렌즈(420)에 의해 평면(460) 내로 직접 포커싱될 수 있다.

샘플 영역, 예를 들어 샘플 웰(482) 내의 샘플의 이미지는 조명 라인을 샘플 내의 평면 상으로 투사하고, 그로부터의 형광 방사를 검출기(520) 상에 영상화하고 검출기(520)의 관독과 동기하여 플레이트(480)를 조명 라인에 대해 수직인 방향으로 이동시킴으로써 획득된다. 도 6에 도시된 실시예에서, 형광 방사는 대물 렌즈(470)에 의해 집광되고, 다이크로익 빔 스플리터(450)를 통하여 투사되고, 렌즈(490)에 의해 필터들(500) 및 제2 슬릿 마스크(510)를 통하여 검출기(520) 상에 영상화되며, 그러한 것은 무한대 보정 대물 렌즈(470)를 갖는 공초점 영상 시스템에 적합하게 이뤄진다. 다이크로익 빔 스플리터(450) 및 필터(500)는 조명 파장의 광을 선택적으로 차광한다. 검출기(520)는 예시적으로 카메라이며 1차원 또는 2차원 중 어느 하나의 유형일 수 있다. 만일 1차원 검출기가 사용되면, 슬릿 마스크(510)가 필요하지 않다. 조명, 검출 및 변환 과정은 소정 영역이 영상화 완료될 때까지 계속된다. 만일 샘플이 연속적인 비율로 변환되면 기계적인 운동은 단순화된 다. 연속적인 운동은 카메라 관독 시간이 노출 시간에 비하여 작은 경우에는 매우 유용하다. 바람직한 실시예에서, 카메라는 연속적으로 관독된다. 결합된 노출 시간 및 관독 시간 동안의 샘플의 변위 d 는 조명 라인 W 의 폭보다 크거나 또는 작을 수 있다. 예를 들면, $0.5W \leq d \leq 5W$ 가 된다. 멀티 웰 플레이트의 모든 웰들은 유사한 방식으로 영상화될 수 있다.

대안적으로, 마이크로스코프는 주로 광학 시스템의 시계에 의해 제한을 받으면서 조명 라인을 다수의 인접 웰들에 걸쳐서 포커스하도록 구성될 수 있다. 마지막으로, 하나 이상의 마이크로스코프가 동시에 사용될 수 있다.

조명 스트라이프(484)의 크기와 형태는 대물 렌즈 후방 초점 평면(460)에서 푸리에 변환 스트라이프의 폭과 길이에 의해 결정된다. 예를 들면, 라인(484)의 길이는 (460)에서의 라인의 폭에 의해 결정되고 역으로 (484) 내의 폭은 (460)에서의 길이에 의해서 결정된다. 회절 한계 성능에 대하여, (460)에서의 조명 스트라이프의 길이는 대물 렌즈 후방 구경을 완전

히 채울 수 있도록 선택된다. 조명스트라이프(484)의 크기와 형태는, 실린더형 렌즈(420)의 초점 길이와 (420)에서의 빔 사이즈의 조합, 즉 대물 렌즈 내의 수차에 의해 부과되는 제약 하에서의 유효 개구수와 대물 렌즈의 시계 범위에 의해 제어된다는 것이 본 기술 분야의 통상을 지식을 가진 자들에게는 명백하다.

조명(484) 라인의 치수는 신호 대 잡음비를 최적화하도록 선택된다. 따라서, 이들은 샘플에 의존한다. 분석에 따르면, 분해능은 회절 한계, 즉 $0.5\mu\text{m}$ 이하, 및 약 $5\mu\text{m}$ 사이에서 변화할 수 있다. 빔 길이는 대물 렌즈의 시계, 예를 들면 0.5 와 1.5mm 사이에서 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들면, Nikon ELWD, 0.6 NA , 40X 대물 렌즈는 약 0.75 mm 의 시계를 갖는다. 이 대물 렌즈에 의한 633nm 방사에 대한 회절 한계 분해능은 약 $0.6\mu\text{m}$ 또는 약 1100 분해능 엘리먼트가 된다.

유효 깊이 분해능은 주로 슬릿 마스크(510) 내의 구경(512) 폭 또는 일차원 검출기의 폭 및 대물 렌즈(470)와 렌즈(490)의 결합에 의해 생성된 상의 배율에 의해 결정된다. 공초점 마이크로스코프의 최상의 깊이 분해능은 $1\mu\text{m}$ 에 근접한다. 본 응용에서, $5\text{-}10\mu\text{m}$ 의 깊이 분해능이면 충분하고 또한 유리하게는 장점까지 제공한다.

예를 들어, 라이브 세포와 같은 관심 대상 샘플은, 충분히 짧은 획득시간 내에 적합한 신호 대 잡음비를 갖는 이미지를 허용하기에는 회절-제한 체적 내에서 불충분한 형광단을 포함할 때, 회절 한계 체적보다 더 큰 체적에 대해 조명하고 및 발광을 집광하는 것이 바람직하다. 이온-채널 개방과 같은 순간적 사건에 대한 비디오-레이트의 동역학적 연구의 경우에 있어서 유사한 상황이 나타난다. 실제적으로, 이는 조명 구경의 직경을 증가시키는 것과 마찬가지로, 대물 렌즈들의 후방 구경을 미흡하게 채우는 것에 의해 이루어진다. 조명의 유효 개구수("NA")는 대물 렌즈의 NA보다 작다. 그러나, 형광 발광은 충분한 NA를 갖는 대물 렌즈로 집광된다. 구경(512)의 폭은 보다 큰 조명 체적으로부터의 발광을 검출할 수 있도록 증가되어야만 한다. 기하 광학은 회절 한계보다 수배 큰 구경 폭으로 검출 체적 성분의 크기에 대한 적절한 근사화를 제공한다.

측면 폭 : $a_d = d_d/M$,

축의 폭 : $z_d = \sqrt{2a_d/tan\alpha}$

M은 배율, d_d 는 구경(512)의 폭 및 α 는 대물 렌즈(470)에 대응하는 반각(half-angle)이다. 본 발명의 중요한 부분은 어떠한 개구도 갖지 않은 실시예에서의 조명 구경(432)이나 그 등가물 및 검출 구경(512)이 독립적으로 제어가능하다는 것이다.

다파장 구성

임의의 형태의 분석에서는 다파장 형광 이미지 형성을 가능하게 하는 실시예가 바람직하다. 생물학적 반응에서 하나의 중요한 파라미터는 시간이므로 둘 이상의 측정을 동시에 행하는 것이 통상 유리하며 종종 필수적이다.

독립적인 파장들 또는 컬러의 수는 수행되는 특정 시험에 의존하게 될 것이다. 일 실시예에서, 세개의 조명 파장들이 사용된다. 도 8(a) 및 8(b)는 각각 상부 및 측면에서 본 3 컬러 라인 스캔 공초점 영상 시스템에서의 광선 경로들을 도시한 것이다. 일반적으로, 이 시스템은, 실린더형 라인 CL에 의해 초점이 조정되는 시준 빔을 제1 공간 필터 SF₁에서의 엘롱게이트된(elongated) 빔으로 생성하기 위한 수개의 전자기 방사 소스 S_n, 시준 렌즈 L_n 및 미러 M_n, 제1 공간 필터 SF₁ 및 제2 공간 필터 SF₂와 영상화 렌즈 IL 간의 공초점 마이크로스코프, 및 샘플로부터 서로 다른 파장의 형광 발광 성분을 분리 및 검출하기 위한 빔 스플리터 DM₁ 및 DM₂ 및 검출기 D_n을 포함한다. 공간 필터 SF, SF₁, 및 SF₂는 양호하게는 슬릿 마스크이다.

특히, 도 8a 는 컬러 λ_1 , λ_2 , 및 λ_3 용 소스 S₁, S₂, 및 S₃ 및 각 소스로부터의 광을 시준하는 렌즈들 L₁, L₂, 및 L₃을 도시한다. 바람직하게는, 렌즈들 L₁, L₂, 및 L₃ 은 시스템 내의 다른 렌즈들의 임의의 색 분리를 보상하도록 조정된다. 미러들 M₁, 및 M₂ 은 부분적으로는 투과시키고, 부분적으로는 반사하는 이색성(dichroic)을 갖는 것이 바람직하다. 예를 들면, M₂는 λ_3 을 투과시키며, λ_2 를 반사시킨다. 따라서, λ_3 가 λ_2 보다 크다.

공초점 모드에서 마이크로스코프의 동작은, 소스 S_n로부터 여기되고 결합된 빔들이 대상체 평면 OP에서, "라인" 또는 고편심 타원에 초점이 맞추어지도록 요구한다. 상기 도 6에 관련하여 설명한 바와 같이, 이를 수행하기 위해서 다양한 구성

이 활용될 수 있다. 도 8에 도시된 실시예에서, 결합된 조명 빔들은 실린더형 렌즈 CL에 의해, 공간 필터 SF₁ 내의 슬릿에 일치하는 엘롱게이트된 타원으로 초점이 조정된다. 도 8a 및 도 8b에 도시된 바와 같이, 슬릿 마스크 SF₁는 시스템의 이미지 평면 내에 소재하고, 그 장축이 도 8a의 지면의 평면에 있고 조명 광의 전파 방향에 수직으로 정렬된다. 렌즈 TL 및 OL는 SF₁을 포함하는 평면으로부터 대상체 평면 OP으로 조명 라인을 중계한다. 편의상 터닝 미러 TM(turning mirror)이 사용된다. 다른 실시예에서, DM₃는 TL과 OL 사이에 있으며, CL은 조명 광의 초점을 직접 BFP 내에 맞춘다. 다른 실시예는 본 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자에게 명백할 것이다.

도 8b를 참조하면, 샘플에 의해 발광되어 대물 렌즈 OL에 의해 집광되는 광은 튜브 렌즈 TL에 의해 공간 필터 SF₂ 상에 이미지를 만든다. SF₂는 바람직하게는, 지면의 평면에 수직으로 연장하도록 정렬된 슬릿이다. 따라서, 필터 SF₂를 통과한 광은 사실상 조명 라인이 된다. SF₂는 주요 이미지 평면 또는 이와 공액인 임의의 평면에 배치될 수 있다. DM₃는 부분적으로는 반사하고 부분적으로는 투과하며 "다색성"을 갖는 것이 바람직하다. 임의의 파장 대역을 반사시키고 다른 파장들은 투과시키는 다파장 "이색성" 미러들 또는 "다색성" 미러들이 획득될 수 있다.

$\delta\lambda_1$ 은 λ_1 에 의해 여기된 형광 발광으로 규정된다. 이는 통상 λ_1 보다 다소 긴 파장의 분포를 갖는다. $\delta\lambda_2$ 와 $\delta\lambda_3$ 도 유사하게 규정된다. DM₃는 λ_n 을 반사하고 $\delta\lambda_n$ 을 투과하는 것이다 ($n=1, 2, 3$). SF₂에 의해 투과된 광은, 첫 번째 이미지 평면에 공액인 평면에 존재하는, 검출 디바이스 상에 이미지를 형성한다. 도 8a에서, 공간 필터 SF₂의 이미지는 모두 3개의 검출기 D_n 상의 렌즈 IL에 의해서 생성된다. 본 실시예는 각각의 검출기에 의해 발생된 이미지들 사이의 거의 완벽한 레지스트리를 요구하는 응용에 바람직하다. 다른 실시예에 있어서, 개개의 렌즈들 IL_n은 검출 디바이스와 관련되며, 렌즈쌍 IL 및 IL_n은 공간 필터 SF₂의 이미지를 개개의 검출기 D_n 쪽 상에 중계하는 작용을 한다. 광은 미러들 DM₁ 및 DM₂에 의해 검출기들 간에서 분리된다. 이 미러들은 부분적으로는 투과하며 부분적으로는 반사하여 이색성을 갖는 것이 바람직하다. DM1은 $\delta\lambda_1$ 을 반사하고 $\delta\lambda_2$ 및 $\delta\lambda_3$ 을 투과한다. 차단 필터 BF1는 $\delta\lambda_1$ 을 투과하고 제공된 다른 모든 파장들은 효과적으로 차단한다. DM₂는 $\delta\lambda_2$ 을 반사하고 $\delta\lambda_3$ 을 투과한다. 차단필터 BF₂ 및 BF₃는 부분적으로는 각각 $\delta\lambda_2$ 및 $\delta\lambda_3$ 를 투과하고 제공된 다른 모든 파장들은 효과적으로 차단한다.

스캐닝 미러의 구성

본 발명의 몇몇 실시예에서, 고속으로 데이터 획득하려면 비디오 레이트로 이미지를 구성하는 것이 요구된다. 비디오 레이트 영상화는 일반적으로 초당 30 또는 60 프레임을 말한다. 본 발명의 용도로는 30Hz 크기 정도의 프레임 레이트를 의미하는 것으로 의도하였다. 바람직한 실시예에서 비디오 레이트 영상화는 샘플 명면의 일차원을 따라 조명하는 것과 이에 수직인 방향으로 조명 빔을 스캐닝함으로써 조명과 샘플의 상대적 변이가 나타나도록 하여 획득된다. 스캐닝 스테이지는 일반적으로 대규모이다, 따라서 이를 충분히 고속으로 이동시킬 수가 없다.

도 9는 스캐닝 미러 SM를 이용하는 본 발명의 실시예를 도시한다. 바람직하게는 이 미러는 후방 초점 평면(BFP)에 공액인 평면 내에 배치되고, BFP (또는 이에 공액인 평면)에서의 회전은 대상체 평면(OP) 및 그 공액 평면 내에서 변이를 이루어 낸다. SM의 풀 스캔 범위로 렌즈들 RL₁ 및 RL₂의 초점 길이들의 전형적인 값들에 대하여 몇 도 정도만이 필요하다. 도 9에 도시된 바와 같이, 이들 렌즈쌍들은 1의 배율로 BFP 이미지를 형성하지만, 다양한 배율을 이용하는 것도 바람직하다. 이미지 획득율을 제한하는 요인은 카메라 판독 속도 및 신호 세기이다. 상술한 영상화 모드에서는, 카메라 판독 속도, 예시적으로는 1MHz로 지속적으로 데이터를 얻을 수 있다. 스캐닝 미러에 대해서는, 단일 방향으로 데이터를 획득되는 것이 바람직하다. 데이터를 연속적으로 획득하도록 하여주는 이상적인 스캐닝 동작은 톱니형 동작이다. 실제로, 턴 어라운드 및 복귀 스캔 시간들의 결합 시간은 스캔 주기의 1/3 내지 2/3을 차지한다. 50%의 데드 타임, 50Hz의 미러 진동 주파수 및 1MHz의 픽셀 획득율을 가정했을 때, 초당 50 프레임의 속도로 프레임 당에서 약 10,000 개 내외의 픽셀들이 획득될 것이며, 이는 프레임마다 세포와 같은 개개의 대상물을 규정하고 추적하는데 충분하다. 그러나, 이미지 당 10⁴의 픽셀들은 상기 일반적으로 생각했던 것보다는 100 분의 1 정도 작은 것이다. 이 응용에 따르면, 높은 분해능, 예를 들면 0.5 μ m × 0.5 μ m 픽셀 레이션을 갖는 50 μ m × 50 μ m에서, 비교적 작은 이미지를 획득하거나, 낮은 분해능, 예를 들면 2 μ m 픽셀 레이션을 갖는 200 μ m × 200 μ m에서, 비교적 큰 이미지를 획득하는 것이 바람직하다.

자동 초점 조정

본 발명에 따르면 샘플은 영상 시스템의 대상체 평면 내에 놓여 있어야만 한다. 따라서, 본 발명은 영상 시스템의 시계 내의 샘플의 일부분을 이 시스템의 대상체 평면 내에 유지시키는 자동 초점 조정 메카니즘을 제공한다. 정확한 평면성은 시스템의 필드 깊이에 의해 결정된다. 바람직한 실시예에서, 필드 깊이는 대략 10 μm 이며 시계는 약 1 mm이다.

설명된 자동 초점 조정 시스템에는 무시할 수 있을 정도의 지연으로 작동하는데, 즉 응답 시간이 이미지 획득 시간에 비해 짧는데, 예시적으로 0.01~0.1s가 된다. 또한, 자동 초점 조정 광 소스는 조명 광 소스와 샘플 특성과는 독립적이다. 여러 장점들 중에서, 이러한 구성은 영상 시스템의 광축을 따른 샘플 캐리어의 위치가 대상체 평면의 위치와 독립적으로 결정될 수 있도록 한다는 장점이 있다.

단일-빔 자동 초점 조정의 일 실시예가 파장 λ_4 의 별개 광 소스 S_4 및 검출기 D_4 를 도시한 도 8 및 도 9에서 제공된다. 파장 λ_4 가 샘플 형광으로부터 구별될 필요가 있으며, 샘플 내에서 상당한 정도의 형광을 여기할 수 없는 파장이다. 그리하여, λ_4 는 바람직하게는 근적외선 영역, 예를 들면, 800 내지 1000 nm이다. 일부는 투과시키고, 일부는 반사하는 미러인 DM_4 는 바람직하게는 λ_4 를 반사하고, λ_n 과 $\delta\lambda_n$ (여기서, $n=1,2,3$)을 투과시키는 이색 미러이다. 본 출원에 적합한 광학계 자동 초점 메카니즘이 공지되어 있다. 예를 들면, 서보 제어에 적합한 위치 에러 신호를 발생하기 위한 비점수차 렌즈계 시스템(astigmatic-lens-based system)이 Applied Optics 23 566-570(1984)에 개시되어 있다. "스큐 빔"을 사용하는 초점 에러 검출 시스템이 SPIE 200 73-78(1979)에 개시되어 있다. 후자의 연구는 도 8 및 9에 따라 용이하게 구현된다(여기서, D_4 는 스플릿 검출기이다).

삭제

웰 저면에 소재하는 샘플을 갖는 마이크로타이터 플레이트로 사용되기 위해, 서보 루프는 웰 사이에서 움직이도록 깨뜨려져야 한다. 이는 조명이 다른 웰로 이동할 때마다 재초점 조정할 필요가 있기 때문에 실질적인 시간 지연을 낳게 된다.

샘플 면과 대상체 평면의 상대 위치에 대한 연속적인 페루프 제어 가 도 10에 도시된 본 발명의 바람직한 실시예에 개시되어 있다. 이 시스템은 두개의 독립적인 전자기 방사 빔을 사용한다. 하나의 빔은 S_5 로부터 발생하고, 연속면, 예를 들면 마이크로타이터 플레이트의 저면에 포커싱된다. 나머지 빔은 S_4 로부터 발생하고 비연속면, 예를 들면 마이크로타이터 플레이트의 웰 저면에 포커싱된다. 일 실시예에서, S_4 및 S_5 로부터 발생하는 빔은 각각 파장 λ_4 및 λ_5 를 갖는다. λ_4 는 L_4 에 의해 시준되고, 조리개 I_4 에 의해 개구되며, 대물 렌즈 OL에 의해 비연속면 상으로 포커싱된다. λ_5 는 L_5 에 의해 시준되고, 조리개 I_5 에 의해 개구되며, 대물 렌즈 OL과 연관된 렌즈 CFL에 의해 연속면 상으로 포커싱된다. 반사광은 렌즈 IL_4 및 IL_5 에 의해 각각 검출기 D_4 및 D_5 에 포커싱된다. 일부는 투과하고 일부는 반사하는 미러 DM_4 는 바람직하게는 λ_4 와 λ_5 를 반사하고, λ_n 및 $\delta\lambda_n$ (여기서, $n=1,2,3$)을 투과시키는 이색 미러이다. 미러 M_4 , M_5 및 M_6 는 일부는 투과시키고 일부는 반사한다. λ_4 와 λ_5 가 별개인 경우, M_6 는 바람직하게는 이색성이다.

샘플이 마이크로타이터 플레이트에 소재한 실시예에 따르면, λ_4 가 웰 저면에 포커싱된다. 대상체 평면은 가변되는 거리만큼 웰 저면으로부터 오프셋될 수 있다. 이것은 L_4 를 조정함으로써 또는 대안적으로 서보 제어 루프에서의 오프셋 조정에 의해 달성될 수 있다. 설명의 편의상, λ_4 가 대상체 평면에 포커싱되는 것으로 가정한다.

자동 초점 시스템의 동작은 다음과 같다. 샘플 웰 저면이 대물 렌즈 OL의 초점면에 있지 않다면, 검출기 D_4 는 스위치 SW로부터 Z 제어까지 제공되는 에러 신호를 발생한다. Z 제어는 대물 렌즈쪽으로 또는 대물 렌즈로부터 마이크로타이터 플레이트를 이동시키기 위해 모터(도시안됨)를 제어한다.

대안적으로는, Z 제어는 대물 렌즈를 움직일 수 있다. 마이크로타이터 플레이트의 저면 PB가 렌즈 CFL과 대물 렌즈 OL의 결합된 것의 초점 면에 있지 않다면, 검출기 D_5 는 스위치 SW를 통해 Z 제어까지 제공되는 에러 신호를 발생한다. XY 제어는 렌즈 OL의 대상체 평면 OP 내에 마이크로타이터 플레이트를 이동시키기 위한 모터(도시안됨)를 제어한다.

설명한 바와 같이, 전체 스캐닝은 컴퓨터 제어하에 있다. 예시적 스캐닝은 다음과 같다. 특정 웰에서의 이미지의 완료 시에, 컴퓨터는 SW를 동작시켜 D_4 에 의해 발생된 예러 신호로부터 D_5 에 의해 발생된 예러 신호로 서보 메카니즘의 제어를 스위칭한다. 컴퓨터는 이후 서보가 D_4 로 스위칭백 된 다음, 플레이트를 다음 웰로 이동시키기 위해 XY 제어를 지시한다.

플레이트의 저면으로부터의 신호를 활용하는 '성긴(coarse)' 포커싱 메카니즘이 샘플 면의 위치를 플레이트 저면의 두께의 웰마다의 변동 범위 내로 유지하기 위해 사용되어, 검색에 요구되는 '정밀(fine)' 메카니즘이 적용되는 범위가 최소화되도록 한다. 만약 예를 들어, 조리개 I_5 의 직경이 2 mm이고 IL_5 가 100 mm이면, 검출기 상의 이미지 크기는 100 μm 내외가 될 것이다. 유사하게, 조리개 I_4 의 직경이 0.5 mm이고 IL_4 가 100 mm이면, 검출기 상의 이미지 크기는 400 μm 내외가 될 것이다. 후자는 '성긴' 포커싱으로서 동작하기 위해 덜 민감하도록 선택된 것이다.

상술한 실시예의 단일 빔에서와 같이, 파장 λ_4 및 λ_5 는 샘플 형광과는 구별될 필요가 있는데, 바람직하게는 샘플에서 상당한 형광을 여기시킬 수 없는 파장이다. 그리하여, λ_4 및 λ_5 는 근적외선 영역, 예를 들면, 800 내지 1000 nm이다. 또한, 두 파장은 바람직하게는 예를 들면, $\lambda_4 = 830 \text{ nm}$ 이고, $\lambda_5 = 980 \text{ nm}$ 로 별개이다.

2-빔 자동초점의 다른 실시예에서, $\lambda_4 = \lambda_5$ 이고, 두 빔은 동일한 소스로부터 발생된다. 바람직하게는, 두개의 빔은 상호 직교하여 편광되고 M_6 는 편광 빔 스플리터이다.

다음과 같이 동작하는 단일 빔 자동초점의 바람직한 실시예에서 의사-폐루프 제어가 제공된다. 스캔의 종료시에 컴퓨터는 샘플-앤드-홀드 장치에 대한 제어를 스위칭하도록 SW를 동작시키는데, 샘플-앤드-홀드 장치는 SW가 D_4 로 스위칭백된 후에 플레이트가 다음 웰로 이동하는 동안 Z-제어 출력을 일정한 레벨로 유지한다.

검출 장치

개시된 장치의 본질적인 특성은 대상체 평면과 공액인 면에서 매니폴드(manifold)이며 독립적인 검출 소자를 갖는 검출 장치를 사용한다는 것이다. 상술한 바와 같이, 라인 조명은 빠른 영상화를 요하는 응용에서 주로 유리하다. 점 조명과 비교하였을 때 라인 조명의 병렬성에 근거하는 잠재적 속도 증가는, 영상 시스템이 조명 라인을 따라 샘플의 각 지점으로부터 방출된 광을 동시에 검출할 수 있을 때에만 실현된다.

상술한 종래의 영상 시스템의 출력에 전하 결합 소자(CCD) 또는 다른 카메라를 배치할 수 있다(White 등에 의한 미국특허 5,452,125 및 Brakenhoff 및 Visscher에 의한 J. Microscopy 171 17-26). 귀결 장치는 본 발명에 비해 세가지의 상당한 단점을 갖는다. 하나는 2차원 검출기 상에 이미지를 재스캐닝해야 한다는 것인데, 이는 장치를 불필요하게 복잡하게 한다. 다른 하나는 통상 카메라를 구성하는 1000 픽셀 \times 1000 픽셀 어레이를 넘는 충분한 품질을 갖는 완전한 2차원 검출기가 필요하다는 것이다. 세번째 단점은 2차원 장치로부터 완전한 이미지를 판독하는 데 부가의 시간이 필요하다는 것이다.

본 발명은 이러한 세가지 단점을 피하여 설계된 것으로 고감도 및 저잡음 검출의 부여 조건 내에서 영상화 속도 뿐만 아니라 처리량까지 최적화시킨다. 일 실시예는 연속 판독 라인 카메라를 사용하고, 바람직한 실시예에서는 장방형 CCD가 라인 카메라로서 사용된다. 두 실시예는 이미지 내에서 또는 이미지들 간에 데드 타임이 없다. 본 발명의 추가적인 장점은 이하에서 설명되는 대로, 스테이지 스캐닝(stage-scanning) 실시예에서 유효 시계가 더 넓어진다는 데 있다.

검출 장치에서 요구되는 특성은 다음의 바람직한 실시예를 고려함으로써 좀 더 명백해진다. 대물 렌즈의 분해능 한계는 1 μm 보다 적고 통상은 0.5 μm 정도고, 검출기는 1000개 정도의 독립적인 소자로 구성된 어레이를 포함한다. 분해능, 시계 및 이미지 획득율은 독립적 변수들이 아니고, 이들 성능 파라미터들 간의 절충안을 필요로 한다. 일반적으로, 광학 시스템의 배율은 분해능을 희생하지 않고서 가능한 한 큰 시계를 영상화하도록 설정된다. 예를 들어, 1 mm 정도의 시계는 1 μm 픽셀 레이션을 갖는 1000-소자 어레이 상으로 영상화될 수 있다. 검출 소자가 20 μm 평방이면, 시스템 배율은 20 배로 설정될 것이다. 이것이 1 μm 분해능로 귀결되지 않음을 주의하기 바란다. 픽셀레이션은 분해능과 동등하지 않다. 만약, 예를 들어, 대물 렌즈의 원래 분해능 한계가 0.5 μm 이고, 대상체 평면의 각각의 0.5 $\mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ 영역이 픽셀 상으로 맵핑된다면, 귀결 디지털 이미지의 실제 분해능은 0.5 μm 가 아니다. 실제 분해능 0.5 μm 를 얻으려면, 픽셀레이션은 대상체 평면에서 0.2 $\mu\text{m} \times 0.2 \mu\text{m}$ 정도의 영역에 대응할 필요가 있다. 바람직한 일 실시예에서, 광학계의 실제 분해능을 달성하기 위해서 영상 시스템의 배율이 설정된다.

현재의 어플리케이션에 대한 충분한 판독 속도를 갖고 있고, 가장 높은 판독 효율과 가장 낮은 노이즈를 나타내는 검출 디바이스는 CCD 카메라이다. 도 11에는, 검출소자로 된 $m \times n$ 어레이(m 은 실질적으로 n 보다 작음)를 갖는 장방형 CCD 카메라가 도시되어 있다. 형광 방출 이미지는, 판독 레지스터에 가까운 것이 바람직한 하나의 가로열(row)을 커버한다. 이는, 과도 시간을 최소화하고, 조명된 가로열과 판독-레지스터 사이의 가로열로부터의 신호로 의사 카운트를 축적시키는 것을 피하게 한다.

원리적으로, 도 11에 도시한 바와 같이, 사용자는 CCD 카메라 상에서 슬릿 SF₂의 이미지 높이가 하나의 픽셀이 되도록 광학계의 배율을 설정할 수 있다. 실제로, 조명 라인과 카메라 가로열 축 사이의 완전한 정렬을 유지하는 것은 어려우며, 도 8 및 9에 예시된 바와 같은 세 개의 카메라와 다과장 실시예의 조명 사이의 정렬을 유지하는 것은 더욱 어렵다. 카메라의 각각의 세로열 내의 몇 개의 검출 소자(예를 들면, 2개 내지 5개)를 묶어줌으로써(binining), 판독 노이즈 또는 판독 시간에 대한 최소의 희생만 치루면서 정렬 조건이 완화될 수 있다.

도 8 및 도 9의 가변가능한 폭 검출 공간 필터 SF₂와 도 6의 참조부호 510(이들은 각각 대상체 평면에 대한 공액 평면에 배치됨)과 연결된 검출 장치로서 하나 이상의 장방형 CCD 카메라를 갖는 바람직한 실시예의 추가적인 이점은 이하로부터 명백하게 된다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 일실시예에서, 검출 공간 필터를 생략하며 라인 카메라를 결합된 검출 공간 필터 및 검출 디바이스로서 사용한다. 그러나, 전술한 바와 같이 가변가능한 폭 검출 공간 필터는 검출 체적을 최적화할 수 있도록 하여서 샘플에 따른 신호 대 잡음 비를 최적화한다. 이하의 바람직한 실시예는 라인 카메라의 이점, 즉, 속도 및 가변 가능 검출 체적의 유연성의 이점을 갖는다. 높이 h 의 회절 제한된 라인을 카메라의 하나의 가로열 상으로 영상화하도록 배율이 설정된다. 검출 공간 필터 d 의 폭은 가변가능하여 $h \leq d \leq 10h$ 인 것이 바람직하다. 카메라의 조명된 세로열 내의 검출기는 판독하기 전에 묶여지는데(binining) 이는 노출 및 판독 시간에 비해 무시할 수 있는 시간을 요구하는 동작이다.

하나의 바람직한 실시예에서, 카메라는 프린스턴 인스트루먼트(Princeton Instruments) NTE/CCD-1340/100-EMD이다. 바람직한 실시예에서 판독율은 판독 노이즈인 몇 개의 전자에 대해 1MHz이다. 픽셀 포맷은 1340×100이며, 카메라는 관심 영역으로부터 떨어져서 가로열의 대부분(80%)을 시프트하도록 와이어링될 수 있어서, 카메라를 실효 1340×20으로 만든다.

연속 판독 카메라의 전술한 이점, 즉 연속적인 획득 영상화 사이의 데드타임(dead-time)을 없애는 것에 추가하여, 샘플의 크기에 의해서만 그 길이가 제한되는 장방형 이미지를 획득할 수 있는 이점을 갖는다. 이 길이는 카메라 폭 중 작은 것과 라인 조명의 크기에 의해 결정된다. 바람직한 실시예에서, 샘플은 (지름은 7mm인) 96-웰 마이크로타이터 플레이트 내의 한 웰의 저면에 배치된다. 1 μ m×1mm 인 스트립이 조명되며, 조명된 영역으로부터 방출된 방사는 검출 디바이스 상에 영상화된다. 시계가 1mm² 이하로 되도록 광 트레인이 설계된다. 본 발명에 따르면, 웰 저면의 이미지는 1×7mm 필드에 걸쳐 1 μ m 픽셀레이션으로 생성될 수 있다.

환경 제어

본 발명의 일실시예에서, 라이브 세포에 대해 분석이 수행된다. 라이브 세포 분석에는 종종 적절히 가동시키기 위해 생리적인 상태에 대한 적당한 근사를 필요로 한다. 중요한 파라미터 중 하나는 온도이다. 온도를 올리고 내리는 수단을 포함하는 것이 바람직한데, 특히, 샘플의 온도를 37℃로 유지하는 것이 중요하다. 다른 실시예에서, 라이브 세포의 활력을 유지하기 위해, 상대 습도, 및/또는 CO₂ 및/또는 O₂에 대한 제어가 필요하다. 또한, 증발을 최소화하기 위한 습도 제어가 작은 샘플 체적에 대해 중요하다.

LCI 시스템과 호환하며 상승된 온도(바람직하게는, 37℃)에서 마이크로타이터 플레이트를 제공하는 세 개의 실시예에 대해 이하에 기술한다.

영상 시스템은 빛이 안통하는 밀폐부 내에 있는 것이 바람직하다. 제1 실시예에서, 샘플 플레이트는 전체 밀폐부 내부를 바람직한 온도로 유지함으로써 그 온도에 유지된다. 그러나, 37℃에서, 상승된 습도가 의도적으로 유지되지 않을 경우, 증발 냉각은 샘플 볼륨을 감소시켜 분석 지속기간을 제한하게 된다.

제2 실시예에서는, 플레이트가 정지한 커버 아래로 이동할 수 있게 해주는 마이크로웰 플레이트 용의 가열된 커버를 제공한다. 이 커버는 마이크로스코프의 광축에 정렬되는 웰 위의 단일 개구를 갖는다. 이 개구로 인해, 플레이트의 나머지로의 가열 및 제한된 순환을 유지하면서 활성 웰로 분배(dispense)하는 것이 가능하게 된다. 가열된 커버 플레이트와 마이크로

웰 플레이트 사이의 약 0.5mm의 공간으로 인해 마이크로웰 플레이트의 자유로운 이동이 가능해지며 증발을 최소화하게 된다. 조사되는 웰의 내용물이 기껏해야 몇초 동안 디스펜서 개구를 통해 주위환경에 노출되기 때문에, 상기 내용물은 측정동안 어떤 의미 있는 변화도 겪지 않는다.

제3 실시예에서, 얇고 가열된 사파이어 윈도우가 플레이트 저면 밀폐부로서 사용된다. 웰 분리기를 따른 저항성 히터의 패턴은 바람직한 레벨로 윈도우 온도를 유지시킨다.

다른 실시예에서, 세 가지 개시된 방법이 다양하게 결합될 수 있다.

합체된 디스펜서

영상 시스템의 비디오-레이트 구성의 일실시예는 타이밍된 시약 디스펜스로 동력학적(kinetic) 분석, 특히 이온-채널 분석을 개시하도록 추가로 구성되어 있다. 채널 개설의 개시는 마이크로웰로 용액을 분배함으로써 달성된다. 예를 들면, 전압 게이트된 채널은 플라즈마 막을 감극하기 위해 KCl의 용액을 첨가함으로써 개설될 수 있다. 채널 개설과 후속하는 폐쇄 및 세포내 농도에서의 상응 변화의 시간 의존성은 종종 충분히 빨라서 비디오-레이트 영상화를 요구한다. 그러나, 영상 시스템의 고유 속도는, 채널 응답이 빠르게 개시될 수 없는 경우 무관계하다.

본 발명의 일실시예에서는 통합된 디스펜서를 제공한다. 96 또는 384 웰 플레이트에서의 분석 가동을 위해, 이 범위 20-100 μ L의 부가적인 체적이 바람직하다. 예를 들어, 이온 채널 활동도의 작용 물질의 첨가에 적절한 단일 헤드 디스펜서는 IVEK Dispense 2000이다. 유사한 유닛은 CAVRO로부터 이용가능하다. 보다 일반적으로는, 고유한 화합물을 각 웰 내로 디스펜스할 수 있는 것이 바람직하다. 일실시예에서는, 분석 스테이션과, 고유한 화합물 및 팁 클린싱 스테이션을 포함하는 소스 플레이트 사이에서 디스펜스 헤드를 셔틀링하는 로봇식 모션 디바이스에 대해 단일 헤드 디스펜서를 제공한다. 팁 클린싱 스테이션은 고정된 팁 디스펜서를 위한 세척 스테이션과, 일회용 팁 디스펜서를 위한 팁 변환 스테이션이다. 이 시스템은 비교적 염가로 요구되는 기능을 제공하지만 처리량이 낮아서, 화합물 흡출-디스펜스-클렌즈(cleanse) 사이클당 거의 30초가 요구된다. 다른 실시예는 Hamilton Microlab MPH-96과 같은 멀티 헤드 디스펜서를 개시된 LCI 시스템에 합체시킴으로써 행해진다. MPH-96은 전술한 흡출-디스펜스-세척 사이클을 실행할 수 있는 로봇식 모션 디바이스에 탑재되는 96개의 독립적으로 고정된 팁 디스펜서로 구성된다.

자동화된 스크리닝 분석 평가에서 사용되는 본 발명의 다른 바람직한 실시예에서, 영상 시스템은 Zymark Twister와 같은 플레이트 핸들링 로봇과 통합된다.

다크 필드 공초점 구성

요구되는 측면 분해능이 회절 한계 미만인 경우, 상청액(supernatant liquid)으로 인한 배경 형광성은 다크 필드 영상화 기법의 신규한 응용에 의해 감소될 수 있다. 도 12(a) 및 12(b)는 종래의 다크 필드의 광선 경로를 도시한다. 도 12(a)에서, 샘플(600)은 대물 렌즈(620)로부터의 광(610)의 공동 콘(hollow cone)에 의해 조명된다. 이 광의 콘은, 예를 들면 도 10a의 렌즈(440)에 불투명한 바(630)를 배치함으로써 생성된다. 도 12(b)에서, 샘플(600)로부터의 형광 방출은 그 후 대물 렌즈(620)의 중심부를 통해 집광된다. 조명 및 수집이 상이한 각도로 인해, 조명되고 검출된 평면만이 샘플(600)을 포함하는 평면으로 된다.

도 13a 및 13b는 반전된 다크-필드의 광선 경로를 도시한다. 도 13(a)에서, 샘플(700)은 대물 렌즈(720)의 중심부를 통해 통과하는 광빔(710)으로 조명된다. 도 13(b)에서, 형광 방출은 그 후 대물 렌즈(720)의 외부 주위로부터만 수집된다. 대물 렌즈의 외부 주위로부터의 수집은 예를 들어 도 10(a)의 렌즈(490)에 불투명 바(730)를 배치함으로써 달성될 수 있다. 종래의 다크 필드와 같이, 반전된 다크 필드는 하나의 각도에서의 조명과 다른 각도에서의 수집과 관계되어서 샘플 평면만이 조명되고 검출되도록 한다.

도 14는 전술한 경우의 초점 영역을 도시하는 도면으로서, 샘플 평면의 회절 제한된 영역보다 더 큰 영역을 조명하는 것이 바람직하다. 조명 및 수집 광선은 도 13의 반전된 다크 필드 기하의 것과 동일하다. 조명 빔과 매칭되는 폭을 갖는 대상체 후방의 초점 평면과 공액인 평면에 스탑(stop)이 배치되었다면, 다크 필드 구성이 달성된다. 이 구성이 검출기에 충돌하는 평면 외부 형광을 감소시키는 것을 도 14로부터 알 수 있을 것이다. 위의 빗금친 영역과 아래의 대상체 평면으로부터의 형광은 스탑에 의해 통과되지 않는다. 점 스캔 공초점에서, 이들 평면 외부 영역으로부터의 형광은 검출 개구에 의해 효율적으로 거부된다. 라인 스캔 공초점에서, 라인에 따른 하나의 측면 위치로부터의 평면 외부 형광은 라인을 따른 다른 포인트

에서의 배경 신호에 기여하며, 이는 점 스캔 공초점에 비해 라인 스캔에서의 신호 대 배경의 저하의 발생원인이다. 라인 스캔 공초점의 역 다크 필드 구성은, 라인 스캔 구성의 속도 장점을 가지면서도 점 스캔 공초점의 배경 거부 속성의 중요한 부분을 복구한다.

실시간 데이터 분석

본 발명에 따르면 초당 메가바이트의 데이터를 연속적으로 생성할 수 있다. 일실시예에서, 이 시스템은 고속, 고밀도, 큰 체적의 저장 디바이스와 통합되는데, 이 저장 장치로 데이터가 후속 분석을 위해 실시간으로 스폴링(pool)될 수 있다. 바람직한 실시예에서, 데이터 분석은 데이터 획득과 동시에 핵심적으로 수행된다. 따라서, 이 데이터는 저장 전에 처리된다. 일반적으로, 분석의 결과만이 보관되지만, 선택된 원 데이터도 또한 보관하는 것이 바람직하다.

실시간 분석 루틴들의 예들이 각 분석 그룹과 함께 아래에 제공된다. 모든 경우에서, 프로시저들은, 관심 대상인 하드웨어 플랫폼 상에서의 동작을 위한 소프트웨어 코드를 최적화하는 데 사용된다. 본 바람직한 실시예에서, 컴퓨터는 펜티엄 II 과 같은 32 비트 프로세서이다. 이 경우에, 모든 데이터는 32 비트 단위로 액세스된다.

일반적으로 데이터의 획득 및 분석은 수많은 이산 단계를 필요로 한다. 첫째로, 형광은 하나 또는 그 이상의 디지털 이미지로 변환되며, 여기서 디지털 값들은 검출 장치의 각 픽셀에 입사하는 형광 방사의 강도에 비례한다. 시계를 가로지르는 영상 시스템의 불균일한 응답에 대한 보정이 행해지는데, 여기서 배경 감산된 데이터가 소위 플랫-필드(flat-field) 파일에 의해 분할된다. 둘째로, 어떤 기준을 충족하는 모든 값들이 1로 대체되고 이 기준을 충족하지 않는 모든 값들이 0으로 대체되는 디지털 이미지 중 하나로부터 이진 비트맵이 생성된다. 일 실시예에서, 이 기준은 이미지 자체로부터 결정되는 임계 값을 포함한다. 셋째로, 연속적인 값 1의 픽셀들의 그룹에 대해 비트맵이 탐색된다. 일 실시예에서 이 그룹들은 최소 및/또는 최대 크기 기준에 대해서 추가로 테스트된다. 넷째로, 분석된 그룹에 대해 동일한 이미지 또는 또다른 이미지 내의 대응하는 픽셀 값들이 총합되고 기록되며, 총합의 평균 또는 다른 통계적인 값이 결정되고 기록된다. 다양한 분석들에 적합한 이러한 기본 프로시저에 대한 추가 및 변형이 아래에 설명된다.

분석

아래에 설명된 분석법의 수많은 변형들이 본 발명에 따라 수행될 수 있다. 일반적으로, 하나 이상의 형광 표식된 종의 특징적인 공간 및/또는 시간 분포가 분석을 정량화하기 위해 사용된다. 바람직하게도, 형광은 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용해서 평면으로부터 관찰될 수 있다. 이 부분은 연관된 데이터 분석 루틴에서의 증가하는 복잡도에 따른 분석형에 의해 구성된다. 이러한 구성은 엄격하지 않지만, 분석 알고리즘이 하나 이상의 분석형에 적용될 수 있다.

결합 분석

본 발명의 방법에 따라 바람직하게 실시될 수 있는 첫번째 분석형은 결합 분석이다. 일반적으로, 관심 타겟에 대한 형광 표식된 리간드(ligand)의 결합도는, 적어도 타겟과 표식된 리간드를 포함하고 개시된 라인 스캔 공초점 영상 시스템으로 획득된 샘플의 하나 이상의 형광 이미지에 대한 분석으로부터 정량화된다. 이용된 리간드는, 형광단 콘주게이트된(conjugated) 천연 및 합성 펩티드 및 단백질, 당, 지질, 핵산 열, 비랄(viral), 박테리오파지 입자, 천연 및 합성 독신, 공지된 약품, 작은 유기 분자 또는 신경 전달 물질의 합성 대응물 또는 원래적 발광 소형 분자, 펩티드 또는 단백질, 조합 라이브러리로부터의 합성 화합물, 랜덤 펩티드, cDNA 익스프레스션 라이브러리로부터의 단백질, 및 펩티도미메틱스(peptidomimetics)(Haugland R.P.의 "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" 6판 제18장)를 포함하되 이들에 한정되지 않는다. 타겟은, 수용체의 셀 추출물 또는 정제, 리간드 게이티된 및 이온 게이티된 채널 단백질, 효소, 전사 팩터, 시토스켈레탈(cytoskeletal) 단백질, 및 항체들을 포함하되 이에 한정되지 않으며, 바이러스, 박테리아, 박테리오파지 무척추 또는 척추(vertebrate) 셀로부터 유도될 수 있다. 예시적인 수용체들은 아세틸콜린, 어드레너지(adrenergic)(α 및 β), 무스카리닉(muscarinic), 도파민, 글리신, 글루타민, 세로토닌, 아스파테이트(aspartate), 감마 아미노 부티릭 산(GABA), 퓨리너지(purinergic), 히스타민, 노레피네프린(norepinephrine), 성분 P, 뉴로펩티드 Y, 엔케팔린(enkephaline), 뉴로텐신(neurotensin), 콜레시스토키닌(CCK), 엔돌핀(오피오이드(opioid)), 멜라노크로틴(melanocrotin)/ACTH, 소마토스타틴(somatostatin), 파라티로이드(parathyroid) 호르몬, 성장 호르몬, 티로트로핀(thyrotropin), 티록신(thyroxine), 시토킨(cytokine), 케모킨(chemokine), 인슐린, 인슐린형 성장 인자(IGF), 스템 셀 인자, 루테이나이징(luteinizing) 호르몬-릴리징 호르몬, 고나도트로핀(gonadotropin), 안지오텐신(angiotensin), 엔도텔린(endothelin), 뉴로텐신, 인테페론, 브래디키닌(bradykinin), 바소프레신, 옥시토신, 바소액티브 인테스티날 폴리펩티드(VIP), 코르티코트로핀 릴리징-호르몬, 뉴로트로핀, 에리트로포에틴(erythropoetin), 프로스타글란딘(prostaglandin), 류코트리엔(leukotriene), 트롬복산(thromboxane) A2, 칼시토닌(calcitonin), T 셀, LDL/HDL, 상피 성장 인자(EGF), 에스트로젠, 및 갈라이난(Galainan)을 포함하되 이들에 한정되지 않는다.

비드 기초 결합

도 15(a)~15(f)는 본 발명에 따라 수행될 수 있는 수용체-결합 분석의 실시예의 단계들을 도시한다. 도 15(a)에서, 세포 또는 조직으로부터 마련되고 수용체 타겟(212)을 포함하는 멤브레인(210)이 액체(230)를 포함하는 웰(220)에 추가된다. 도 15b에서 형광 표식된 리간드(214)는 웰(220)에 추가된다. 이런 리간드들은 멤브레인 수용체(212)에 결합된다. 도 15c에서 비드(224)들은 웰(220)에 추가된다. 대안으로, 15(b)와 15(c)의 순서는 바뀔 수 있고, 바람직한 실시예에서, 멤브레인 코팅된 비드가 웰에의 추가 이전에 별도로 마련된다. 비드(224)는 대략 1-20 μm 의 범위의 지름을 갖고, 멤브레인(210)이 부착되는 맥아 아글루티닌 등의 물질로 코팅되거나 또는 멤브레인들의 직접 공유 결합 또는 비공유 결합을 허용하는 표면을 갖는다.

이전 단계들은, 표식들이 방사성이 아니라 형광성이라는 점을 제외하고는 도 1(a) 내지 도 1(f)에 도시된 종래의 SSA의 대응하는 단계들과 동일하다. 그러나, 본 발명에서, 비드(224)는 발광하지 않고 웰 저면에 가라앉을 정도로 또는 스핀 다운할 정도로 밀도를 갖거나 또는 자기성을 띠어 외부 자석을 사용하여 웰 저면으로 이동될 수 있다. 도 15(d)에서, 형광 표식은, 가령 소자 (240)으로 도시된 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용해서 영상화된다. 도 15(e)에서, 테스트 성분(218)이 웰에 추가된다. 종래 기술 분석과 같이, 본 분석의 목적은 테스트 화합물(218)이 멤브레인 수용체(212)로부터 형광 표식된 리간드(214)들을 어느 정도까지 치환하는 지를 결정하는 것이다. 도 15(f)에서, 멤브레인(210)에 여전히 고착된 형광 표식은 영상화된다. 두 형광 이미지를 비교함으로써, 테스트 화합물의 활동도가 결정될 수 있다.

도 15(a) 내지 도 15(f)에 도시된 분석의 대안 실시예에서, 도 15(d)의 이미징 단계는 생략될 수 있고, 테스트 화합물의 활동도가 도 15(f)에서 얻은 이미지와, 제어 웰의 이미지 또는 웰에 추가된 형광 표식된 리간드들의 공지량과 수용체와의 알려진 친화도(affinity)로부터 예상된 이미지를 비교함으로써 결정된다.

도 15(a) 내지 도 15(f)에 도시된 분석들의 특정 실시예에서, 수용체는 리간드를 인식하는 항체이고, 형광 표식된 리간드는 표식되지 않은 리간드의 알려지지 않은 양을 포함하는 샘플과 함께 반응에 추가된다. 종래의 방사 면역 분석법에서와 같이, 본 발명의 분석의 목적은 항체 수용체로부터 형광 표식된 리간드(214)들을 치환하는 정도를 측정함으로써 샘플 내의 표식 안된 리간드의 농도를 결정하는 것이다.

표면 결합

도 16(a) 내지 도 16(f)은 본 발명에 따른 수용체 결합 분석의 제2 실시예의 단계들을 도시한다. 도 16(a)에서, 셀 또는 조직으로부터 마련되고 수용체 타겟(252)을 포함하는 멤브레인(250)이 액체(260)를 포함하는 웰(260)에 추가된다. 웰 저면(262)은 멤브레인이 그 쪽에 부착되는 맥아 아글루티닌과 같은 물질로 코팅된다. 도 16(b)에서, 멤브레인(250)은 이 물질에 고정된 것으로 도시되었다. 도 16(c)에서, 형광 표식된 리간드(254)가 웰(260)에 추가되고 멤브레인 수용체(252)에 결합된다. 대안으로, 도 16(b) 및 도 16(c)의 순서는 바뀔 수 있다.

도 16(d)에서, 형광 표식의 형광은, 가령, 성분(280)으로 표시된 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용하여 영상화될 수 있다. 도 16(e)에서, 테스트 화합물(258)이 웰에 추가된다. 도 16f에서, 멤브레인(250)에 여전히 부착된 형광 표식은 영상화되고 제1 이미지와 비교되어 테스트 화합물(258)의 활동도를 결정한다.

도 16a~16f에 도시된 분석법의 또다른 실시예에서, 도 16d에서 영상화는 생략될 수 있으며, 테스트 화합물의 활동도는 도 16f에서 얻어진 이미지를, 제어 웰의 이미지 또는 웰에 추가된 형광 표식된 리간드의 공지량 및 수용체에 대한 알려진 친화도로부터 기대되는 이미지와 비교함으로써 결정될 수 있다.

셀에 기초를 둔 결합

다른 실시예에서, 리간드-타겟 결합은 그 타겟을 표현하는 세포 집합 상에서 유리하게는 분석 평가된다. 일반적으로, 화학적 화합물을 차폐하기 위한 세포 기반 분석에는 많은 장점이 있다. 특히 관심의 대상인 활동도는 화합물의 생물학적 활동도에 영향을 미치는 경쟁적 및 보완성 있는 세포 대사 모두의 경우에 측정된다. 세포 분석에서, 세포 계통 또는 조직으로부터 준비된 세포는 조직 배양 웰 또는 마이크로스코프의 슬라이드 상에 놓여진다. 세포는 살아있고 손상되지 않은 것이거나, 다이곡시제닌(digoxigenin)과 같은 시약에 삼투처리(permeabilize) 되거나, 또는 대안으로 포르알데히드(formaldehyde)와 같은 시약으로 고정될 수 있다. 하나 또는 그 이상의 형광 표식된 리간드가 분석에 필요한 임의의 비형광 시약들과 함께 세포에 첨가되고 형광 표식된 리간드는 하나 또는 그 이상의 세포 성분에 결합된다. 그 후 테스트 화합물이 세포에 가해된다. 대안으로, 형광 리간드와 화학적 화합물의 순서는 바뀔 수 있다. 형광 표식은, 예를 들어, 기호 (240)

으로 개략적으로 도시된 라인 스캔 공초점의 마이크로스코프를 사용하여 영상화된다. 본 분석의 목적은 테스트 화합물이 수용체로부터 형광 표식된 리간드를 치환하는 정도를 결정하는 것이다. 여전히 세포에 결합된 형광 표식은 테스트 화합물의 존재시와 부재시에 영상화된다. 두개의 형광 이미지를 비교함으로써, 테스트 화합물의 활동도는 결정될 수 있다.

세포에 기초를 둔 수용체 결합 분석의 다른 실시예에서, 화합물이 없을 때의 영상화 단계는 제거될 수 있으며, 테스트 화합물의 활동도는 화합물이 있을 때 획득된 이미지를, 제어 웰의 이미지 또는 웰에 첨가된 형광 표식된 리간드의 기지량 및 수용체에 대한 알려진 친화도로부터 기대되는 이미지와 비교함으로써 결정된다.

바인딩 분석에서 라인 스캔 공초점의 영상화의 이점

제1 실시예에서, 리간드-타겟 결합은 하나의 여기 파장과 하나의 방사 파장으로 수행된다. 도 27에 본 발명의 속도와 민감도를 예시하는 데이터가 제공된다. 리간드가 방사성 동위원소에 의해 표시되어 이들의 검출이 가능해지는 종래의 발명에 대한 분석은 뒤에 나온다. 수용체-리간드 분석에 대한 종래의 기술은 고착(binding)된 및 비고착된 리간드가 물리적으로 분리되어 있는 포맷 뿐만 아니라 SSA 포맷도 포함하며, 수용체에 결합된 리간드의 양은 섬광 용액 첨가물에 의해 측정된다.

첫째로, 본 발명은 작은 부피, 예를 들어 1 μ L의 웰에 사용될 수 있다. 방사성 동위원소에 의해 표시되는 리간드를 이용하는 수용체-리간드 결합 분석에서, 각각의 방사 표식, 예를 들어 ^3H 는 오직 한번만 붕괴할 수 있으며, 초당 10^{-8} 이하의 붕괴 비율에서 붕괴 당 거의 90개의 포톤(photon)을 생성한다. 단일 형광 분자는 총 $10^4 \sim 10^7$ 개의 포톤을 생성할 것이며, 그 분자는 초당 10^3 과 10^6 개 사이의 포톤을 방사할 것이다. 따라서, 형광 표식의 카운트 속도는 ^3H 방사성원소와 비교할 때 대략 10^{11} 배가 된다. 그러므로, 본 발명은 웰 당 매우 적은 표식, 막 및 비드를 필요로 한다. 예를 들어, 삼중수소 SSA는 웰 당 10^7 개의 비드를 필요로 하는데 반해, 본 발명은 웰당 10^3 이하의 비드를 필요로 한다. 결과적으로, 본 발명은 μL 규모의 웰에서 훨씬 짧은 시간에 수행될 수 있다. 또한, SSA에서는 방사 표식이 고정 비율로 붕괴하기 때문에, 영상화 시간을 바꾸는 것이 어렵다. 대조적으로, 형광 표식의 여기 비율은 증가될 수 있어서 포톤의 방사율을 증가시킴으로써, 필요한 영상화 시간을 감소시킬 수 있다. 그러나, 여기 비율은 제한 없이 증가될 수는 없다. 실제로, 본 발명에서 라인 스캔 공초점이 점 스캔 공초점에 대해 실질적인 이점을 갖는 것의 기초가 되는 것은 형광 방사율의 소위, 포화 한계의 존재이다. 둘째로, 본 발명은 방사능을 처리하는데 드는 시간과 비용을 필요로 하지 않는다. 셋째로, 본 발명은 작은 부피의 웰에서도 수행될 수 있기 때문에, 화합물과 시약의 소비가 SSA에 비해 훨씬 작아서 더욱 더 비용을 감축시킨다. 마지막으로, 본 발명은 섬광-도핑된 비드나 웰 저면을 필요로 하지 않아서 훨씬 더 비용을 줄인다.

본 발명은 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용하여 웰에 있는 시료의 형광을 영상화한다. 마이크로스코프의 공초점화는 광학적 구역화, 즉, 용액의 대부분으로부터의 형광의 검출을 최소화하면서 시료가 놓인 평면으로부터 형광을 검출하는 것을 이루어 준다. 이것은 비결합된 형광 표식된 리간드를 제거하기 위한 세척 단계의 필요성을 제거하는데, 이 단계는 SSA에서는 요구되지 않는 반면에 비드를 포함하는 섬광제가 사용되지 않는 RIA를 포함하는, 임의의 수용체-리간드 결합 분석에서는 여전히 요구된다. 마이크로스코프의 공초점 측면은 고유한 형광 테스트 화합물에서 생길 수 있는 임의의 간섭 또한 제거한다. 라인 스캔 성질은 샘플이 전형적인 점 스캐닝보다 충분한 배경 복사 배제를 상실하지 않고서도 더욱 빠르게 영상화되도록 한다. 속도의 증가는 형광단의 밀도, 측면 분해능, 시계, 및 대물 렌즈의 NA, 검출 민감도 및 카메라 관독율을 포함하는 하드웨어의 매개변수들에 의해 좌우된다. 이론적으로, 속도의 증가는 라인 당 픽셀수에 가까워지며, 픽셀수는 본 발명의 바람직한 실시예에서 1000이다. 실제적으로, 증가는 대략 100 배이다.

이러한 장점을 명시하기 위하여, 예시적 샘플이 설명된다. 분석은 세포에 기초를 두며, 여기서 형광의 위치는 1 μm 의 정확도로 분석된다. 따라서 1-mm 직경의 시료 영역의 이미지는 약 10^3 픽셀의 약 10^3 라인으로 구성될 것이다. 관심의 대상인 형광 신호는 세포 표면 상의 리간드 또는 핵세포의 수용체와 같은 세포 내의 국부적인 근원지에서 비롯되었을 것이다. 어느 경우든, 형광단의 국부적 농도는 중요한 매개변수이다. 세포 당 약 10^5 개의 수용체를 표현하는 처리된 세포 라인에서, 세포 평균 농도는 약 1 μM 이다. 핵에 국소적으로 존재하는 수천개의 수용체들은 비슷한 국부적 농도로 귀결된다. 소정의 약 1 μM 의 측면 분해능과 일치하여, 픽셀당 약 2×10^3 정도의 형광단이 있다. 고유 세포의 배경 형광은 표식 형광보다는 작으나 그 차수는 비슷하고, 소망 신호 대 잡음비는 최소한 10으로 가정된다. 그러면, 신호와 배경의 샷(shot) 잡음과 고품질의 고체 상태의 검출기의 관독 잡음을 고려할 때, 검출되는 포톤의 수는 거의 10^3 일 필요가 있다. 본 장치의 수집 및 검출 효율은 0.7 NA의 대물렌즈, 차단 필터, 및 고체 카메라를 사용하여 거의 ~1%이며, 픽셀 당 약 10^5 개의 포톤이 또는 분자당 약 10^2 개의 포톤이 방사되는 것을 필요로 한다. 이미지가 1초보다 작은 시간에, 되도록이면 몇분의 1초에 얻어지는 것이 바람

직하다. 픽셀이 직렬 방법으로 얻어진다면, 픽셀의 머뭇 시간은 $1\mu\text{s}$ 보다 작아야만 하며, 이는 분자당 초당 10^8 이상의 포톤 방사율을 요구한다. 이것은 전형적으로 10^6 정도의 방사율을 갖는 대부분의 형광단의 포화값을 넘는 값이다. 중요하게는, 포화 상태를 성취하기 위하여 필요한 플럭스(flux) $10^5 \sim 10^6\text{W}/\text{cm}^2$ 는 비선형의 광자 유도 표백화를 이뤄내는 데에 충분하다. 최고 효율의 검출 장치는 직렬 스캐닝에서 요구되는 데이터 비율에서는 사용될 수 없다. 대조적으로, 10^3 개의 픽셀이 동시에 조명되면, 형광단 당 방사율은 겨우 10^5 정도면 된다. 점 스캔 공초점의 배경 형광 차단 증가는 급격히 감소된 스캔 속도의 불리한 점을 정당화해주지는 못한다.

도 27의 예시적 데이터는 개시된 시스템이 비드 당 수십개의 형광단을 정량화하면서도, 수백개의 각각의 비드를 1초 미만 에 명확하게 해상할 수 있는 충분한 민감도를 갖는다는 것을 제시한다. 필적할만한 데이터는, 아래에 예시되는 바와 같이, 세포 기반 결합 실험에서 얻어질 수 있다.

데이터 분석

데이터 분석 루틴들은 결합이 세포 기반인지 비드 기반인지와 밀접하게 관련되며 아래에 함께 설명된다. 데이터는 아래의 루틴들에 의해 분석될 수 있는데, 이들 루틴 중 가장 간단한 것은 임계 이미지 분석 알고리즘이다. 이 루틴의 목적은 최소 형광 강도를 초과하도록 그리고 선택적으로는 광학적으로 최대 형광 강도를 초과하지 않도록, 연속 또는 락스(Lock) 방식으로 국부화된 형광 표식된 종의 양을 결정하는 것이다. 일 실시예에서, 이러한 분석은 화합물의 활동도를 분석하는 데 사용된다.

이 알고리즘의 단계들은 다음과 같다:

1. 표식된 종의 디지털 이미지를 획득한다.
2. 행 단위로 파일을 열고,
 - i. 이미지로부터 카메라 오프셋 값을 빼고,
 - ii. 이미지의 각 행에 플랫폼 필드 이미지 파일의 대응하는 행의 역을 곱한다.
3. 선택적인 것으로, 배경 레벨을 결정하기 위하여 이미지를 히스토그램화한다.
4. 최소값 및 선택적인 최대값을 포함하는 선택 기준을 설정한다. 이 값들은 예컨대 배경 히스토그램 피크 폭에 대한 통계적인 분석에 의해, 또는 소정 값을 사용하여, 평균 배경 레벨의 일정 배수로서, 평균 배경 레벨을 넘는 일정 카운트 수로 결정된다.
5. 이미지의 각 픽셀을 선택 기준과 비교한다. 기준을 만족시키는 이미지의 각 픽셀에 대해 그 값을 러닝 합계에 더한다. 적격 픽셀의 총 수 및 평균 강도가 보고된다.

이 루틴은 도 27의 것과 유사한 데이터를 처리하는 데 이롭게 사용되는데, 여기서 개별 비드들은 배경으로부터 뚜렷이 구별되고, 응집된 비드 또는 세포들로 인한 산물은 작다. 이런 루틴은 또한 웹 저면에 고착된 막을 구비한 분석형에 적합하다.

바인딩 데이터를 분석하는 데 이용할 수 있는 제2 루틴은 추가적인 형태 분석 프로토콜을 수반하는 국부화 분석 알고리즘이다. 임계 루틴과 같이, 이 루틴의 목적도 연속 또는 락스(Lock) 방식으로 국부화된 형광 표식된 종의 양을 결정하는 것이다. 일 실시예에서, 이러한 분석은 화합물의 활동도를 분석하는 데 사용된다.

이 알고리즘의 단계들은 다음과 같다:

1. 표식된 종의 이미지를 획득한다.
2. 행 단위로 파일을 열고,

- i. 이미지로부터 카메라 오프셋 값을 빼고,
 - ii. 이미지의 각 행에 플랫 필드 이미지 파일의 대응하는 행의 역을 곱한다.
3. 선택적인 것으로, 이미지의 픽셀 값을 히스토그램화하고 합산한다.
4. 최소값 및 선택적인 최대값을 포함하는 선택 기준을 설정한다. 이 값들은 예컨대 배경 히스토그램 피크 폭에 대한 통계적인 분석에 의해, 또는 소정을 값을 사용하여, 평균 배경 레벨의 일정 배수로서, 평균 배경 레벨 위의 일정 카운트 수로서 결정된다.
5. 이미지의 각 픽셀을 선택 기준과 비교한다. 모든 적격 픽셀에 1의 값을 할당하고 다른 모든 픽셀에 0의 값을 할당하여 16:1 비트 압축을 실시한다.
6. 에지 터칭(edge-touching) 멤버를 구비한 2진 마스크에서 1의 값을 가진 모든 연속 픽셀을 0으로 설정함으로써 이미지의 에지를 클리닝한다.
7. i. 라인 단위 패턴으로 이미지를 검색하여 1의 값을 가진 픽셀을 찾는 단계,
- ii. i)에서 식별된 픽셀에 연속하는 1의 값을 가진 모든 픽셀을 결정하는 단계,
- iii. 선택적인 것으로서, 선정된 최소 및 최대 크기 필터를 대상체에 적용하는 단계,
- iv. 대상체가 적격인 경우, 단계 8로 진행하고, 그렇지 않은 경우에는 대상체 내의 1의 값을 가진 모든 픽셀을 0으로 변경하고 다음 대상체의 검색을 계속하는 단계, 및
- v. 비트맵의 끝에 도달한 경우 단계 9를 진행하는 단계
- 에 의해 1의 값을 가진 연속 픽셀의 그룹으로 정의된 대상체에 대한 비트맵을 검색한다.
8. 필터 기준치를 통과한 각 대상체에 대해:
- i. 선택적인 것으로서, 대상체의 에지로부터 각 방향으로 대상체 더하기 n개의 여분의 0 값 픽셀을 포함하는 확장 경계를 가진 새로운 장방형 비트맵을 생성한다. n은 아래에서 수행될 팽창(dilation) 단계의 수이며, 미리 결정된다.
 - ii. 단계 8.i.이 실시된 경우, 1의 값을 가진 픽셀을 터치하는 0의 값을 가진 픽셀들이 1의 값으로 설정되는 팽창 단계를 n번 적용하여 대상체를 팽창시킨다.
 - iii. 단계 8.i.이 실시되지 않은 경우, 팽창된 비트맵 또는 원시 비트맵 내의 1의 값을 가진 픽셀들의 각 집합에 대해 이미지로부터 대응하는 픽셀 값들을 합산하고 평균하여 마스크 하에서의 평균 픽셀 강도를 계산한다.
 - iv. 원시 비트맵 이미지에서 대상체의 모든 픽셀을 0으로 변경하고 단계 7로 복귀하여 더 많은 대상체를 검색한다.
9. 모든 대상체가 카운트된 후, 대상체 당 형광 표식된 종의 평균 강도 및 선택적인 것으로서 국부화된 종의 총 강도의 일부가 이미지 내의 모든 대상체에 대해 계산되어 표준 편차와 같은 통계 정보와 함께 보고된다.

아래의 모든 알고리즘에 의해 공유되는 상기 루틴의 특징적 동작은 단계 4-6에서의 2진 마스크의 생성이다. 마스크 생성은 도 20에 도시되어 있다. 마스크에 대한 대상체의 선택 기준은 선택적으로 최소값 및 최대값, 크기 및 형상을 포함할 수 있다. 예컨대, 일 실시예에서, 비드 기반 분석의 분석 루틴은 단계 7.iii.에서의 라운드니스 필터(roundness filter)를 포함한다.

제2 실시예에서, 2개 이상의 형광 표식된 종의 방출이 동시에 검출되는데, 이는 하나 이상의 조명 파장에 의해 여기된다. 결합 분석에 이용되는 바와 같이, 제1 형광 표식된 종은 제2 형광 표식된 종이 고착되는 대상체를 식별하는 데 사용된다. 2색 셀 기반 결합 분석의 두가지 예가 도 24 및 도 26에 제공되어 있다. 이런 이미지를 분석하는 데 사용될 수 있는 예시적인

절차는 제2 형광 표식된 종에 대해 국부화된 제1 형광 표식된 종의 양을 결정할 수 있도록 설계된 공동 국부화 분석 루틴이다. 일 실시예에서, 이러한 분석은 예컨대 그 활성이 관심 대상인 세포 하위 국부화에 의존하는 화합물의 활동도를 분석하는 데 사용된다.

이 알고리즘의 단계들은 다음과 같다:

1. 제1 및 제2 형광 표식된 종의 디지털 이미지를 각각 획득한다.
2. 행 단위로 파일을 열고,
 - i. 각 이미지로부터 각 카메라 오프셋 값을 빼고,
 - ii. 각 이미지의 각 행에 그 각각의 플랫폼 필드 이미지 파일의 대응하는 행의 역을 곱한다.
3. 선택적인 것으로, 배경 레벨을 결정하기 위하여 제1 종의 이미지를 히스토그램화하고 제2 종의 이미지의 강도를 합산한다.
4. 최소값 및 선택적인 최대값을 포함하는 선택 기준을 설정한다. 이 값들은 예컨대 배경 히스토그램 피크 쪽에 대한 통계적인 분석에 의해 또는 소정 값을 사용하여, 평균 배경 레벨의 일정 배수로서, 평균 배경 레벨을 넘는 일정 카운트 수로서 결정된다.
5. 제1 종의 이미지의 각 픽셀을 선택 기준과 비교한다. 모든 적격 픽셀에 1의 값을 할당하고 다른 모든 픽셀에 0의 값을 할당하여 16:1 비트 압축을 실시한다.
6. 에지 터칭 멤버를 구비한 2진 마스크에서 1의 값을 가진 모든 연속 픽셀을 0으로 설정함으로써 이미지의 에지를 클리닝한다.
7. i. 라인 단위로 이미지를 검색하여 1의 값을 가진 픽셀을 찾는 단계,
 ii. i)에서 식별된 픽셀에 연속하는 1의 값을 가진 모든 픽셀을 결정하는 단계,
 iii. 선택적인 것으로서, 선정된 최소 및 최대 크기 필터를 대상체에 적용하는 단계,
 iv. 대상체가 적격인 경우, 단계 8로 진행하고, 그렇지 않은 경우에는 대상체 내의 1의 값을 가진 모든 픽셀을 0으로 변경하고 다음 대상체의 검색을 계속하는 단계, 및
 v. 비트맵의 끝에 도달한 경우 단계 9를 진행하는 단계
- 에 의해 1의 값을 가진 연속 픽셀의 그룹으로 정의된 대상체에 대한 비트맵을 검색한다.
8. 필터 기준치를 통과한 각 대상체에 대해:
 - i. 선택적인 것으로서, 대상체의 에지로부터 각 방향으로 대상체 플러스 n개의 여분의 0 값 픽셀을 포함하는 확장 경계를 가진 새로운 장방형 비트맵을 생성한다. n은 아래에서 수행될 팽창 단계의 수이며, 미리 결정된다.
 - ii. 단계 8.i.이 실시된 경우, 1의 값을 가진 픽셀을 터치하는 0의 값을 가진 픽셀들이 1의 값으로 설정되는 팽창 단계를 n번 적용하여 대상체를 팽창시킨다.
 - iii. 단계 8.i.이 실시되지 않은 경우, 팽창된 비트맵 또는 원시 비트맵 내의 1의 값을 가진 픽셀들의 각 집합에 대해 이미지로부터 대응하는 픽셀 값들을 합산하고 평균하여 마스크 하에서의 평균 픽셀 강도를 계산한다.
 - iv. 원시 비트맵 이미지에서 대상체의 모든 픽셀을 0으로 변경하고 단계 7로 복귀하여 더 많은 대상체를 검색한다.

9. 모든 대상체가 카운트된 후, 대상체 당 형광 표식된 종의 평균 강도 및 선택적인 것으로서 제1 종과 함께 공동 국부화된 제2 종의 총 강도의 일부가 이미지 내의 모든 대상체에 대해 계산되어 표준 편차와 같은 통계 정보와 함께 보고된다.

이렇게 더 복잡한 루틴의 이점은 대상체가 세포이던지 비드이던지 간에 독립적으로 식별될 수 있다는 것이다. 도 24에 예시된 바와 같이, 모든 세포가 응답하는 것이 아니다. 세포의 개별적인 식별은 예컨대 응답 대 무응답 세포의 비율이 응답 세포들의 응답 정도와 함께 도표화될 수 있게 한다. 이러한 알고리즘은 부가적인 복잡성에도 불구하고 펜티엄 II 플랫폼 상에서 1초 이내에 1 메가픽셀 이미지를 분석하도록 구현될 수 있다.

전위 분석(TRANSLOCATION ASSAYS)

제2 실시예에 따라서 유리하게 수행될 수 있는 부가적인 분석형(assay-type)은 - 즉 둘 이상의 형광 표식된 종의 방사가 동시에 검출되고, 하나 이상의 조명 파장에 대해 여기됨 - 전위 분석이다. 이들 분석에서, 관심 대상인 전위는 하나의 세포의 잘 정의된 영역으로부터 다른 곳으로 하나 이상의 종 - 단백질, 지방질 또는 기타 분자 합성물 또는 소기포(vesicles)와 같은 세포 하위 구조일 수 있음 - 의 전위이다. 이들은 시냅틴(synaptin; 소기포 막 단백질), 전사 인자들(transcription factors; NF-kB, NFAT, AP-1), 호르몬 수용체들, LDL/HDL 수용체들, T-세포 수용체들, 및 PTH 수용체들 등을 포함하지만 이들에 제한되는 것은 아니다.

원형 전위 분석(prototypical translocation assay)은 공동-국부화(co-localization) 측정의 특별한 경우이다. 예시적으로, 제1 종 및 제2 종의 공동-국부화는 공동-국부화된 제2 종의 제1 종에 대한 나뉠셈값, 또는 공동 국부화된 제2 종의 제1 종 및 세포 내에서 그외의 곳에 남겨진 것들과의 비율에 의해 정량화된다. 전위 이미지 데이터를 처리하기 위해 바람직하게 사용되는 확장된 분석 루틴이 이하에 제공된다.

예시적인 전위 이미지들 및 분석 프로시저가 도 19 내지 21에 제공된다. 표식 -이 표식은 핵스트(Hoechst) 33342와 같이 DNA에 특정적인 형광단임 - 된 위치는 세포핵들이다. 기타 핵산 중 염료들은 공지되어 있다(Hauhland, R.P.의 "Handbook of Fluoresceng Probes and Research Chemicals" 제6판 제8장 참조). 제2 종은 세포질로부터 핵으로의 이주가 분석의 과제인 전사 인자이다. 이 단백질은 GFP와의 융합으로서의 표현을 포함하여, 다양한 방법에 의해서 표식될 수 있는데, 전사 인자 단백질에 특유한 형광 표식된 항체로서 샘플을 접촉시킨다.

이하의 전위 데이터 분석 루틴은, 제2 형광 표식된 종들에 대해서 상관 방식(correlated manner) 또는 비상관 방식(anti-correlated manner)으로 분포된 제1 형광 표식된 종들의 양을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 일 실시예에서, 이 분석은 화학적 화합물의 활성을 분석하기 위해서 사용된다.

알고리즘의 단계들은 아래와 같다:

1. 제1 및 제2 표식된 종들 각각의 이미지를 취득.
2. 열 단위로 파일을 열고,
 - i. 각 이미지로부터 각각의 카메라 오프셋값을 감산
 - ii. 각 이미지 내의 각 열을 그 각각의 플랫 필드 이미지 파일 내의 대응 열의 역수로 승산.
3. 선택적으로, 배경 레벨을 결정하기 위해 제1 종들의 이미지를 히스토그램하고, 제2 종들의 이미지 강도를 합산.
4. 최소값 및 선택적으로 최대값을 포함하는 선택 기준 수립. 이들 값들은, 예를 들어, 배경 히스토그램 피크 상의 통계 분석에 의해 또는 미리 결정된 값들에 의해서, 평균 배경 레벨의 고정 배수, 평균 배경 레벨 이상의 카운트의 고정 수로서 결정됨.
5. 제1 종들의 이미지 내의 각 픽셀을 선택 기준과 비교. 자격이 있는 모든 픽셀들은 1의 값이 할당되고, 그 나머지 모두는 0의 값이 할당되어, 16 대 1 비트 압축이 실행됨.
6. 에지 터칭 멤버를 구비하는 이진 마스크에서 그 값이 1인 연속 픽셀 모두를 0으로 설정함으로써 이미지의 에지를 "클리닝" 함.

삭제

7. i. 그 값이 1인 픽셀을 찾기 위해 라인 단위 패턴으로 이미지 검색.

삭제

ii. 단계 i)에서 식별된 픽셀들에 연속하고 그 값이 1인 픽셀 모두를 결정.

iii. 선택적으로, 대상체에 최소 및 최대 사이즈 -이 사이즈는 사전에 결정됨- 필터를 적용.

iv. 대상체가 자격이 있으면 단계 8로 진행, 그렇지 않으면 대상체 내의 그 값이 1인 모든 픽셀들을 0으로 변경하고 다음 대상체에 대해 계속 검색.

v. 비트맵의 끝에 도달하면 단계 9로 진행하는 단계에 의해 그 값이 1인 연속 픽셀들의 그룹으로서 규정되는 대상체에 대한 비트맵 검색

8. 필터 기준치를 통과한 각 대상체에 대해,

i. 대상체의 에지로부터 각 방향으로, 대상체 더하기 n 개의 여분 0 값 픽셀을 포함하는 확장된 경계로 새로운 장방형의 비트맵 생성.

ii. 그 값이 1인 픽셀들을 터치하는 값이 0 인 픽셀들의 값이 1로 설정되는 팽창 단계를 n 회 적용함으로써 대상체를 팽창.

iii. 팽창된 비트맵을 본래 풀 사이즈 비트맵과 비교. 본래 비트맵의 대응 영역에서 그 값이 1인 팽창된 비트맵 내의 모든 픽셀들을 0으로 설정. 이와 같이 하면 환형 마스크(annular mask)가 생성되고, 비트맵 경계가 팽창동안 증가되었을 때 오로지 하나의 대상체만이 캡처됨.

iv. 본래 대상체로부터 또 하나의 비트맵 생성, 그 값이 0인 픽셀들을 터치하는 그 값이 0 인 1 픽셀들을 0에 설정함으로써 이것을 m 회- m은 통상 n과 같거나 사전에 미리 결정됨 - 침식시킴.

v. 환형이고 침식된 비트맵들 내의 값이 1인 픽셀들의 각 집합에 대하여, 침식되고 환형인 마스크 하에서 평균 픽셀 강도를 계산하기 위해서, 제2 종들의 이미지로부터 대응 픽셀 값들을 평균함.

vi. 각 대상체에 대한 환형 강도에 대해 침식률 계산 및 테이블에 저장.

vii. 본래 비트맵 이미지 내의 대상체의 모든 픽셀들을 0으로 변경하고, 단계 7로 복귀하여 그 외의 대상체에 대해 검색함.

9. 모든 대상체가 카운트된 후, 이미지 내의 모든 대상체의 평균 강도 비율이 표준 편차와 같은 통계적 정보와 함께 계산됨.

위에 개시된 것들에 대하여 본 루틴의 새로운 특징은 단계 8에서 2개의 도터 마스크(daughter mask), 주 마스크의 1회 환형 확장, 주 마스크의 1회 침식을 생성하는 것이다. 후자는 본 실시예에서 1-종에 대한 2-종의 공동-국부화, 전사 인자 및 세포 핵들(실제로는, DNA)을 정량화하기 위해 사용된다. 전자의 마스크는 공동-국부화되지 않은 2-종을 정량화하기 위해 사용된다. 본 실시예에서, 이들 두가지 양의 비율은 세포 단위 기준으로 형성되고 그 결과가 표로 만들어진다.

본 발명의 방법에 따르면, 데이터 취득 및 분석이 대략 1초 내에 수행될 수 있다. 비교를 위해, 두가지 종래 기술의 실시예들이 참조된다. Ding 등(J. Biol. Chem, 273, 28897-28905(1998))에서, 비교할만한 2-컬러 전위 분석이 수행되었다. 본 발명의 장점은 : 1) 데이터 채널당 대략 50배 이상 빠른 이미지 취득, 2) 동시적인 2-컬러 획득, 3) 보다 낮은 염색 레벨들을 허용하는 대략 10배 이상의 감도 우수성, 4) 세척 단계의 제거를 허용하는 공초점 검출, 5) 대략 30초인 것에 비하여 대략 0.1초의 초점 시간, 6) 대략 프레임 당 3 내지 6초인 것에 비하여 대략 프레임 당 0.2초의 데이터 분석 시간, 및 7) 연속적인 이미지 획득 등을 포함한다. 본 발명은 1) 보다 높은 공간 분해능, 대략 4배 이상, 2) 보다 높은 픽셀 획득률, 대략 16 배 이상, 3) 보다 빠른 데이터 분석, 4) 마이크로타이타 플레이트에서 자동 초점 조작 가능성, 및 5) 프레임 당 3 내지 6초인 것에 비하여 프레임 당 대략 0.2 초의 데이터 분석 시간 등을 제공한다.

세포 이물 흡수, 토세포 현상 및 수용체 부결현상(ENDOCYTOSIS, EXOCYTOSIS AND RECEPTOR SEQUESTRATION)

일반적으로는 세포 이물 흡수 및 토세포 현상 그리고 구체적으로는 수용체 부결현상 및 재생 이용은 제1 혹은 제2 실시예 및 상술된 관련 이미지 분석 프로토콜에 따라 분석될 수 있는 추가적인 과정이다.

형광 표식은 다양한 공지된 방법에 따라 실행될 수 있다. 예를 들어, 수용체 및 리간드 모두의 식별을 포함하는 우수한 실험이 Tarasova 등에 의해 개시된다.(J. Biol. Chem., 272, 14817-14824(1997)). 본 발명의 영상 시스템은 데이터 채널 당 대략 50배 더 빠르고 두 개의 이미지를 동시에 포착한다. 추가적으로, 본 발명의 분석 프로토콜, 예컨대 공통 국부화 알고리즘은 실시간으로 부결현상 이미지 데이터를 처리하기 위해 사용될 수 있다. 이런 예들은 종래 기술에 전혀 없다.

유사한 영상 및 분석 능력을 필요로 하는 많은 다른 시도가 기술적으로 공지되었다. 예를 들어, 식균 작용(phagocytosis) 및 관련 세포적 이벤트와 관련된 분석(예컨대, J. Immunology, (1983) 130, 1910; J. Leukocyte Biol. (1988) 43, 304); 저밀도 리포단백질(lipoprotein) 복합체의 수용체 중개된 세포 이물 흡수(J. Cell Biol. 121, 1257(1993) 참조) 및 척추동물 세포로의 트랜스페린(Transferrin)의 전달(Cell 49, 423(1994) 참조)을 포함하는, 수용체 중개된 세포 이물 흡수와 비-수용체 중개된 세포 이물 흡수 모두 및 토세포 현상과 관련된 분석(예컨대, Neuron 14, 983(1995); J. Physiol. 460, 287 (1993) 및 Science 255, 200(1992)); 세포 이물 흡수 및 형광 표식된 상피 성장 인자의 측면 이동성을 영상화(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2135(1975); J. Cell Biol. 109, 2105(1989)); 형광 덱스트란(dextran)의 세포 이물 흡수에 의한 재흡수 및 외인성 물질의 내부 처리(J. Biol. Chem. 269, 12918(1994)); 및 친수성 염료를 사용함으로써 활동적으로 발화하는 뉴런에서 시냅스 소포의 세포 이물 흡수-중개된 재생 이용의 영상 모니터링(Nature 314, 357(1985))이 있다. 추가적으로, 토세포 현상 및 분비 소포(크로모그레닌 B, 분비 미립 단백질(J. Cell Sci. 110, 1453(1997) 혹은 분화된 신경단위 세포에서 성장 콘에 위치한 tPA(Mol. Biol. Cell 9: 2463(1998))와 같은 것에 편재 위치한 단백질에 융합된(fuse) 녹색 형광 단백질(GFP; green fluorescent protein)을 표현하는 세포 라인의 유전공학 처리는 토세포 현상의 감시를 허용한다. 형광 표식의 폭넓은 다양성은 그러한 분석들에 이용할 수 있다(Hangland R. Handbook of Fluorescent Probes and Research chemicals, 6th Ed. Chap. 17).

이온 채널(ION CHANNELS)

삭제

도 9에 도시된 하나의 버전으로서, 본 발명의 제3 실시예는 대략 1초당 30프레임의 비율로 하나 이상의 형광 표식 중의 시간 의존 반응을 영상화하는데 사용될 수 있다. 이러한 것은 이온 채널의 개방 및 폐쇄와 같은, 과도 현상의 포착을 허가한다. 예시적 이온 채널은 K^+ -게이트된 전압, Na^+ -게이트된 전압, Ca^{++} -게이트된 전압, Cl^- , Na^+/K^+ ATP아제, 및 P-당단백질을 포함하지만 이것에만 제한된 것은 아니다.

다음 동역학적 영상 데이터 분석 알고리즘은 통계적으로 의미있는 데이터를 얻기 위해 충분한 수의 세포에 대해 동시 동역학적 분석을 가능하게 하도록, 프레임마다 개개의 세포를 규정하고 탐지한다. 상기 알고리즘의 단계는 다음과 같다:

1. 시간 함수로써 하나(인디케이터만), 둘(마커 및 인디케이터 혹은 두개의 인디케이터) 혹은 그 이상의 디지털화된 이미지를 포착.
2. 행 단위로 파일을 개방한다
 - i. 각 이미지로부터 각각의 카메라 오프셋 값을 뺀다,
 - ii. 각 이미지의 각 행에 각각의 플랫폼-필드 이미지 파일에서 대응하는 행의 역을 곱한다. 각 이미지로부터 각각의 카메라 오프셋 값을 뺀다.
3. 선택적으로, 배경 레벨을 결정하기 위해 제1 종의 이미지를 히스토그램화 한다.
4. 최소값 그리고 선택적으로는 최대값을 포함하는 선택 기준을 설정한다. 상기 값들은 예를 들어, 배경 히스토그램 피크 폭 상의 통계적인 분석에 의해 혹은 미리 결정된 값을 사용하여, 평균 배경 레벨의 고정된 배수로서, 평균 배경 레벨 이상의 수로서 결정된다.

5. 선택 기준에 따라 제1 종의 이미지에서 각 픽셀을 비교한다. 모든 검증된 픽셀에 1의 값이 할당되고 모든 다른 것들에는 0의 값이 할당되므로, 16 대 1 비트 압축을 실현한다.

6. 에지 터칭 맴버를 갖는 이진 마스크에서 1로 값이 정해진 연속하는 픽셀 모두를 0으로 설정함으로써 이미지의 에지를 "클리닝"한다.

7. 값이 1인 연속하는 픽셀의 그룹으로부터 정의된, 대상체에 대한 비트맵을 다음과 같이 탐색한다:

- i. 값이 1인 픽셀을 찾기 위해 라인 단위 패턴으로 이미지를 탐색한다.
- ii. i에서 식별된 픽셀에 연속하는 값이 1인 모든 픽셀을 결정한다.
- iii. 선택적으로, 대상체에 최소 및 최대 크기의 필터를 제공하는데, 상기 크기는 미리 결정된 것이다.
- iv. 대상체가 검증되면 단계 8이 실행되고, 그렇지 않으면 대상체에서 1의 값을 갖는 모든 픽셀이 0으로 바뀌며 다음 대상체에 대한 탐색을 계속한다.
- v. 비트맵의 끝에 도달되면, 단계 9로 진행한다.

8. 필터 기준치를 통과하는 각 대상체에 대해, 시간계열로 이미지 각각으로부터의 대응하는 픽셀을 평균한다. 단일 인디케이터가 사용되면, 강도를 기록한다. 비율미터법(ratiometric) 인디케이터가 사용되면, 시간 계열에서의 각 이미지에 대해 하나의 이미지 값을 다른 것으로 나누고 그 결과를 기록한다.

9. 모든 대상체가 분석된 후에, 단계 8의 분석 결과는 각 대상체에 대해 기록된다. 상승시간, 하강 시간 및 진폭을 포함하는 동역학적 파라미터는 동역학적 분석의 집합 및 고정된 시간에서 모든 대상체의 집합으로부터 도출된 통계적 정보로서 각 대상체에 대해 보고된다.

이온 채널과 연관된 과도 이벤트를 영상화하고 분석하기 위한 본 발명의 두 가지 사용예가 도 22 및 23에 제시되어 있다. 이들 분석은 세포내 Ca^{++} 농도의 변화를 가리키기 위해 Ca^{++} -민감성 염료, 플루오-3(Fluo-3)을 사용했다. 첫 실험에서, 아세틸콜린 수용체의 활성화에 의해 개시된 Ca^{++} 제2 신호에 의해 변화가 유발되고, 제2 실험에서 변화는 전압-게이트된 Ca^{++} 채널의 활성화에 기인한다.

이온 채널은 최근 왕성한 연구 활동의 영역이 되어 왔다. 종래 기술에 비해 본 발명의 장점은 다음에 의해 더욱 명확하게 될 것이다.

화합물 스크리닝 응용에 있어서, 배경 기술에서 인용된 종래 기술 표준은 미국 특허 번호 제5,355,215호에 개시되어 있다. 세포내 Ca^{2+} 에서의 유도 변화를 검출하기 위해 주로 사용된 이러한 장치는 과도 이벤트를 개시하기 위해 디스펜서를 포함한다. 종래 기술에 비해 본 발명의 주요한 장점은 다음과 같다. 1) 웰 상에서 평균화된 응답과 비교된 개별 세포 응답의 결정을 허용하는 영상화 및 분석, 2) 보다 낮은 시약 부하 및 보다 낮은 조명 세기를 필요로 하고, 보다 작은 샘플 양을 가능하게 하는 증가된 감도, 및 3) 초당 1 포인트의 최대 비율에 비교되는 비디오 레이트에서의 이미지 획득이다.

연구 응용에 있어서, 'Handbook of Biological Confocal Microscopy, J.B. Pawley, ed., Plenum Press, New York, 1995, pp.459-478'에 개시된 Tsien 및 협력자들에 의해 만들어진 시스템은 표준으로서의 역할을 한다. 여기서, 본 발명을 넘는 레이트로 영상화하는 성능을 보여준다. 그러나, 이 성능은 현재 관심 대상인 샘플에 대해서는 달성될 수 없다. 종래 기술은, 필적할만한 신호 대 잡음비로 본 발명에 필적할만한 레이트를 달성하기 위해서는 픽셀 당 $10^2 \sim 10^3$ 만큼 큰 횡관단을 필요로 한다. 게다가, 본 발명은 12 또는 16 비트 분해능으로 이미지를 얻을 수 있는데, 이는 4 내지 16배의 보다 큰 동적 범위를 제공한다.

연구 응용의 제2 예는 'Sun et al., J. Physiology, 509, 67-80, 1998'에 개시되어 있다. Sun에 따르면, 데이터는 종래의 스폿 스캐닝 공초점 마이크로스코프를 사용하여, 픽셀 집적(integration) 시간 당 5 마이크로초로 600 픽셀 라인 당 650 Hz

까지의 레이트로 발생된다. 단지 일차원의 "영상화"가 수행된다. 과도 현상은 스캔 라인을 따라 놓인 대상체에 대해 모니터 될 수 있다. 게다가, 이러한 레이트는 1 마이크로초 픽셀 집적 시간으로만 달성될 수 있어서, 본 발명에 필적할만한 이미지 품질을 달성하기 위해서는 10^2 내지 10^3 만큼의 형광단 농도를 필요로 한다.

외부 자극에 응답하여 세포내 이온 농도의 변화를 영상화하고 분석하기 위한 본 발명의 성능은 화합물 스크리닝 및 일반 생물학 연구 응용에서의 다수의 응용을 가진다(예를 들어 'J.Cell Biol.137(3), 633-648(1997); J.Biol. Chem. 271(9), 4999-5006(1996); Science 280, 69-76(1998); Biochem. J.,324, 645-651(1997)'을 참조하라). 형광 인디케이터의 광범위한 다양성은 특정 이온에 유용하게 민감하다('Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Ed. Chaps 18, 22 및 24'를 참조). 이들 인디케이터는 Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Ga^{2+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} , 및 Dy^{3+} 의 농도를 측정할 수 있다. 게다가, Na^+ 및 K^+ 의 분석은 혈액, 두뇌 및 근육 세포와 같은 다양한 세포에서의 Na^+ 레벨 또는 Na^+ 유출의 분석('J, biol, Chem. 268, 18640 (1993); J, Neurosci. 14, 2464(1994); Am J. Physiol. 267, H568(1994)')을 포함하여, 다른 1가 카티온(cation)의 생리적 농도('J. Biol. Chem. 264, 19449 (1989)')의 존재, 및 스웸 세포에서의 K^+ 변화, 신경 터미널 시냅소스 및 림프 사이트의 경우에도 수행될 수 있다. 게다가, 본 발명은 소포(vesicles), 리포좀 및 라이브 세포에서의 Cl^- 농도를 분석하는데 사용될 수 있다.

게다가, 본 발명은 세포 및 하위 세포적 세포 기관에서의 멤브레인 포텐셜의 변화를 분석하는데 사용될 수 있다. 멤브레인 포텐셜에서의 변화를 빨리 영상화하는 능력은 세포 및 세포 기관 생존력, 신경 임펄스 발생, 근육 수축, 세포 신호 및 이온 채널 게이팅('Biophys J. 67, 208(1994); Neuron 13, 1187(1994); J. Membrane Biol. 130, 1(1992)' 참조)에 대한 분석에 중요하다. 형광 인디케이터는 뉴런, 심장 세포 및 건전한 두뇌 세포와 같은 흥분성 세포의 급속한(밀리초) 포텐셜 변화에 응답하는 데에 쓸 수 있다. ('Haugland R.P. Handbook of Fluorescent probes and Research Chemicals, 6th Ed. Chap.25' 참조). 급속한 트랜스멤브레인 포텐셜 변화에 반응하는 형광 프로브는 100mV 당 단지 2-10%의 형광 변화를 보여준다. 세포의 플라즈마 멤브레인은 대략 -70mV의 트랜스멤브레인 포텐셜을 가지며, 미토콘드리아와 같은 일부 세포 기관은 150mV의 트랜스멤브레인 포텐셜을 유지한다. 따라서, 이러한 급속한 변화를 포함하는 분석은 본 발명의 다양한 실시예에 공통적인 고 민감성, 급속 데이터 획득 능력을 필요로 한다.

침식 기반 측정(Fret-Based Measurements)

본 발명은 형광 공진 에너지 전달(FRET)과 관계된 분석을 수행하는데 유익하게 사용될 수 있다. FRET는 도너(donor)인 하나의 형광단이 포톤을 흡수하고, 비방사적으로 흡수된 에너지를 억셉터인 다른 형광단에 전달한다. 도너 및 억셉터 분자는 효과적인 에너지 전달이 일어나도록 하기 위해 대략 10 nm 미만으로 근접하여야 한다('Method Enzymol. 211, 353-388(1992); Methods Enzymol. 246, 300-334(1995)'를 참조). 근접 요건은 도너-억셉터 쌍 간의 작은 분리에 민감한 분석을 구성하는데 사용될 수 있다. FRET는 전형적으로는 단일 여기 파장 및 두개의 방출 파장, 및 도너 및 억셉터 방출 세기의 비를 구성하는 분석을 필요로 한다. FRET 도너 억셉터 쌍은 비드에 기초한 분석 및 셀에 기초한 분석 모두에 대해 구성될 수 있다. 증가된 형광 및 변경된 방출 파장을 디스플레이하는 몇몇 녹색 형광 단백질(GFP) 변종은 GFP FRET 도너를 하나의 단백질에 융합시키고 GFP FRET 억셉터를 동일 단백질 또는 동일 세포 내에 표현된 또 다른 단백질에 융합시킴으로써 FRET에 기초한 분석에 대해 쌍이 될 수 있다. 이러한 FRET 쌍은 Ca^{2+} 의 Ca^{2+} -단백질(calmodulin) 고착과 같은 분자내 변화 또는 수용체 이수화(receptor dimerization)과 같은 분자내 상호 반응을 측정하는데 이용될 수 있다. 상술된 동역학적 영상화 알고리즘이 보다 바람직하게 사용될 수 있다.

과도기적 트랜스펙션(TRANSIENT TRANSFECTION)

이미지에 기초한 측정의 중요한 장점 중에서 평균값 내에서는 손실된 희귀 이벤트를 측정하는 것과 제2 응답에 대해 대상체별로 주 응답을 정규화하는 것이 있다. 두 특징은 과도적으로 트랜스펙트된 타겟을 갖는 세포 라인을 이용하는 분석에서 중요할 수 있다. 트랜스펙션에 이어지는 유전자 표현 및 차순의 단백질 생성은 종종 비효율적이고 과도적이다. 본 발명에서 유리하게 이용될 수 있는, 트랜스펙션 효율성을 감시하기 위한 방법이 종래 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 관심 대상인 유전자는 녹색 형광 단백질(GFP)에 대한 유전자와 함께 트랜스펙트될 수 있어서, 두 단백질이 융합 또는 별도 엔티티로서 표현될 것이다. 본 발명은 하나의 파장에서 존재하는 인디케이터의 양 및 또 다른 파장에서의 타겟과 관련된 응답을 측정하는데 사용될 수 있다. 전자의 신호는 존재하는 타겟의 양에 대해 후자의 응답을 정규화하는데 사용될 수 있다. 이는 너무 불안정해서 지금까지 이용가능한 스크리닝 방법에서는 사용될 수 없고 단지 몇 퍼센트의 트랜스펙션 효율성도 감시할 수 없는 타겟에 대한 분석을 본 발명이 실행할 수 있도록 한다. 상술된 동역학적 영상화 알고리즘은 이러한 데이터를 분석하는데 사용될 수 있으며, 여기서 단지 하나의 이미지 프레임만이 요구된다. 단지 몇 퍼센트의 세포가 감염되더라도, 비

랄(viral) 단백질의 표현을 통해 직접적으로 또는 새로운 페노타입(phenotype)의 획득에 의해 간접적으로 세포의 바이러스 감염이 감시될 수 있다. 최종적으로, 본 발명은 다양한 cDNA의 라이브러리로서 전체 셀 집단의 트랜스펙션의 결과로서 특정 cDNA의 트랜스펙션에 기인하여 개별 세포 또는 세포 그룹에 의한 신규 페노타입의 획득과 같은, 희귀 이벤트를 검출하기 위한 방법을 제공한다.

효소 분석(ENZYME ASSAYS)

본 발명은 또한 효소 활동의 일반적 분석을 수행하는데 사용될 수 있다. 전형적인 세포내 효소는 탄소 무수물(carbolic anhydrase), 구아닌 뉴클레오티드-고착 단백질(G 단백질), 아데닐 시클라제, 단백질(calmodulin), PI, PIP 및 PIP2 키나제(kinases), cAMP 키나제 및 cAMP 하이드롤라제(hydrolase), 시토크롬(cytochrome) P-450, 세린/트레오닌(serine/threonine) 단백질 키나제, 타이로신(tyrosine) 단백질 키나제, 단백질 포스파타제(phosphatases), β-락타마제(lactamase), β-갈락토시다제(galactosidase), 디하이드로폴레이트 리덕타제(dihydrofolate reductase), 포스포디에스테라제(phosphodiesterases), 카스파제(caspases), 프로테오좀 프로테아제(proteasome proteases), 니트릭 옥사이드 신타제(nitric oxide synthase), 티미딘 키나제, 뉴클레오사이드 데아미나제(nucleoside deaminase), 글루타티온-S-트랜스페라제, 리폭시제나제(lipoxygenases) 및 포스포리파제(phospholipases)를 포함하지만 이것에만 제한되지 않는다.

도 17(a) - 도 17(d)는 본 발명에 따른 효소 분석의 제1 실시예 단계를 도시한다. 도 17(a)에서, 부착된 형광 표식 펩타이드(312)의 공지된 양을 갖는 비드(310)가 액체(330)를 함유하는 웰(320)에 첨가된다. 비드(310)는 그것이 웰 저면에 가라앉게 되는 밀도를 갖는다. 도 17(b)에서, 테스트 화합물(314)이 웰에 첨가된다. 도 17(c)에서, 효소(316)가 웰에 첨가된다. 도 17(a), 17(b) 및 17(c)에 도시된 단계의 순서는 웰이 테스트 화합물이 없는 펩타이드 및 효소를 어떠한 때에라도 함유하지 말아야 한다는 것을 제외하고 상호교환 가능하다. 만약 방해되지 않는다면, 효소(316)는 펩타이드를 쪼갤 것이며, 형광 표식은 액체 내로 확산할 것이다. 반면에, 만약 테스트 화합물(314)이 전형적으로 효소 활동 사이트를 차단함으로써 효소(316)를 억제한다면, 효소(316)는 형광 표식을 쪼개지 않을 것이다. 도 17(d)에서, 여전히 비드에 부착된 형광 표식은, 예를 들어 구성 요소 (340)으로 개략 도시된 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용하여 영상화된다. 이러한 이미지로부터, 테스트 화합물(314)의 활동도가 결정될 수 있다.

도 17(a) - 도 17(d)에 도시된 분석의 대안적인 실시예에서, 테스트 화합물의 활동도는 도 17(d)에 얻어진 이미지를, 도 17(a) 또는 17(b)에서의 형광 표식의 형광을 영상화함으로써 얻어진 이미지 또는 제어 웰의 이미지와 비교함으로써 결정될 수 있다.

도 18(a)-도 18(d)는 본 발명에 따른 효소 분석의 제2 실시예의 단계를 도시한다. 도 18(a)에서, 형광 표식 펩타이드(352)의 공지된 양은 웰(360)의 저면에 부착된다. 도 18(b)에서, 테스트 화합물(354)이 웰에 첨가된다. 도 18(c)에서, 효소(356)가 웰에 첨가된다. 도 18(d)에서, 여전히 웰 저면에 부착된 형광 표식은 예를 들어 테스트 화합물(354)의 활동도를 결정하기 위해 구성 요소 (380)으로 개략 도시된 라인 스캔 공초점 마이크로스코프를 사용하여 영상화된다.

도 18(a) - 도 18(d)에 도시된 분석의 대안적인 실시예에서, 테스트 화합물의 활동도는 도 18(d)에서 얻어진 이미지를, 도 18(a) 또는 18(b)에서의 형광 표식의 형광을 영상화함으로써 얻어진 이미지 또는 제어 웰의 이미지와 비교함으로써 결정될 수 있다.

본 발명에 따라 수행될 수 있는 분석의 다른 예는 티로신 키나제 분석(tyrosine kinase assay)이다. 티로신 키나제는 기질 펩타이드의 티로신 잔여물을 포스포릴레이트화(phosphorylate)한다. 기질 펩타이드는 티로신 잔여물 및 형광 태그 모두를 갖는다. 이러한 분석에서, 하나의 단부에서 포스포릴레이트화된 티로신에 대해 선택적인 항체는 다른 단부에서 비드와 같은 표면 또는 웰 저면에 바운딩된다. 티로신 잔여물을 갖는 티로신 키나제 및 형광 태그된 펩타이드가 웰에 첨가된다. 만약 티로신 키나제가 펩타이드를 포스포릴레이트화한다면, 포스포릴레이트화된 티로신은 항체에 결합하여, 항체가 부착되는 표면 상의 형광 태그를 국부화할 것이다. 만약 티로신 키나제가 펩타이드를 포스포릴레이트화하지 않는다면, 펩타이드 상의 형광 태그는 웰 전체에 분산될 것이다. 펩타이드의 포스포릴레이션 정도는 표면에 인접한 형광을 측정함으로써 결정될 수 있다. 형광 기질 상의 효소 활동에 의해 생성되는 형광 산물에 특정화된 이러한 분석은 또한 항체가 사용되는 경우에 행해질 수 있다.

또한, 라이브 세포 효소 분석이 본 발명에 따라 수행될 수 있다. 라이브 세포에서의 효소 활동을 분석하기 위한 다수의 기술은 효소에 의해 반응될 때 형광 산물을 생산하는 기질에서와 같이 ('Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probe and Research Chemical 6th Ed. Chap. 10') 종래 기술('Biochem. Histochem 70,243(1995), J.Fluorescence 3, 119 (1993)')에 공지되어 있다. 일반적으로, 이들 분석은 세포에 수동적으로 진입하고 이어서 세포내 효소에 의해 처리되어 세포 내에 보유된 산물을 생성시키는 프로브를 사용한다. 다른 기질은 효소 활동의 사이트에서 침전하는 불용해성 형광 산물

을 생성한다. 본 발명은 이러한 프로브를 이용하여 효소 활동의 정도를 분석하고 효소 활동의 정확한 공간 편재를 결정할 수 있다. 포스파타시스(phosphatases), ATPases, 5'-뉴클레오티다제(nucleotidase), DNA 및 RNA 폴리머라제(polymerases), 펩타이다제(peptidases), 프로테아제(proteases), 에스트라제(estrases) 및 페록시다제(oxidase)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 프로브가 본 발명을 이용하여 광범위한 범위의 효소를 분석하는데 유용하다.

효소 활동 분석은 제1 또는 제2 실험 실시예 및 상술된 관련 이미지 프로토콜에 따라 수행될 수 있다.

형태(MORPHOLOGY)

본 발명의 방법은 액손(axons) 및 세포 기관(organelles)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포 또는 세포 하위 형태의 관정을 요구하는 분석을 실행하는데 사용될 수 있다. 이러한 분석을 수행하기 위해서, 형광 프로브가, 직접 마이크로 주입에 의해 또는 신진대사화되거나 다른 식으로 변경되어 관심 대상인 구조에 보유되는 세포 삼투 시약과 세포를 접촉시킴으로써, 세포 또는 세포 조직과 같은 관심 대상 구조에 도입된다. 만약 그것이 라이브 세포에 대해 사용된다면, 형광 표식은 비독성 및 생물학적으로 불활성이 되어야 한다. 많은 적절한 염료가, 예를 들어 모세혈관에서의 흐름, 뉴런 세포 결합, 갭 접합을 통한 염료의 전위, 세포 분할 및 세포 용해 및 리포솜 융합과 관련된 분석시 상업적으로 사용하기에 유용하다 ('Haugland R.P. Handbook of Fluorescent Probe and Research Chemical 6th Ed. Chap. 15' 참조). 또한, 이들 추적자(tracer)는 배양체, 조직 또는 온전한 유기체에서의 표식된 세포의 움직임을 추적하는데 사용될 수 있다. 세포 또는 세포 하위 형태 또는 움직임을 분석하기 위해 형광 추적자를 이용하는 많은 기술들이 관련 기술분야에서 공지되어 있으며, 멤브레인 추적자, 바이오티닐레이티드 텍스트란 콘주게이터(biotinylated dextran conjugators), 형광 마이크로스피어(microspheres) 또는 단백질 및 단백질 콘주게이트의 사용과 관련된다(Meth. Cell Biol.29, 153(1989);Cytometry 21.230(1995);Cell 84,381(1996);Biochem Biophys.Acta 988,319(1989);Cytometry 14, 747(1993)). 본 발명의 다양한 실시예는 이들 분석 유형에 사용될 때 많은 이점을 가진다. 본 발명은 매우 세밀한 공간 분해능을 갖는 다수 파라미터의 급속 영상화를 이루어 낸다.

삭제

핵산

본 발명은 또한 핵산의 분석을 행하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 공간 분해능 및 다중 파장 영상화 능력으로부터 혜택을 입는 특정 DNA 분석은 형광-인-시투-교배(fluorescence-in-situ hybridization,FISH)이다. FISH는 세포, 조직, 간기 핵(interphase nuclei) 및 중기 염색체의 상대적인 양을 로컬라이즈하고 결정하기 위한 중요한 기술이며, 임상 진단 및 유전자 매핑에 사용된다(Histo-chem J.27,4(1995); Science 247,64(1990);Trends Genet.9,71(1993) and Science 250,559(1990)). 다양한 형광 교배 프로브는 다중 컬러 형광 DNA 및 RNA 교배 기술에 이용가능하다(Haugland R.P.Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals,6th Ed.Chap.8.4). 부가적인 기술은 핵산 카운터 착색제를 갖는 AT 또는 GC 선택적 DNA 염료의 사용에 의해 염색체 밴딩(banding)을 결정한다. 이런 기술은 카로타입(karyotype) 분석 및 염색체 구조 연구에 폭넓게 사용된다.

활성 산소종

본 발명은 싱글렛(singlet) 산소, 슈퍼산화물 및 질소 산화물과 같은 다양한 활성 산소종의 레벨을 분석하는데 사용될 수 있다. 이들 활성 산소종의 중요성은 최근에서야 깨닫게 되었다(Biochem Pharmacol 47,373(1994), J.Biol.126, 901(1994)). 싱글렛 산소가 활성 산소종에 의해 야기된 생리적인 손상의 상당 부분을 떠맡는다는 것이 알려졌다(J.Photochem.Photobiol.11,241(1991)). 특히, 질소 산화물(NO)은 신경 전달과 혈압 조절을 포함하는 다양한 생리적인 프로세스에서 분자적 매개자로서 중요한 구실을 하는 것으로 알려졌다(Current Biology 2,437(1995), J.Med.Chem.38,4343(1995), Cell 78,919(1994)). NO 를 간접적으로 측정하기 위하여 분석을 수행하는 기술이 종래에 알려졌다. 예컨대, 생리적인 조건하에서 NO는 아질산염으로 산화되고, 이는 548nm에서 흡수도를 모니터링하거나 또는 아질산염과 반응하는 식별가능한 형광 산물을 형성하는 프로브의 사용에 의해 검출될 수 있다(Haugland R.P.,Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6th Ed.Chap.21).

pH

본 발명은 세포 내 또는 세포 프리(cell free) 매개체 내의 pH 변화의 측정과 연관된 분석을 수행하는데 사용될 수 있다. 세포 내 pH 역할의 중요성은 세포 증식, 어포토시스(apoptosis), 수정, 악성 종양, 약물 남용 내성(multi-drug resistance), 이온 전송, 리소소말(lysosomal) 저장 무질서 및 알츠하이머 질병을 포함하는 많은 여러가지의 많은 생리 및 병리 현상에

서 인식된다(Cell Physiol.Biochem.2,159(1992);J.BIOL.Chem.270,6235(1995);Biophys.J.68,739(1995);J.Biol.Chem.270,19599(1992);Cancer Res.54,5670(1994)). 생리 분야에서 pH의 분석에 유용한 형광 프로브는 구득가능하다(Haugland R.P.,Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6th Ed.Chap.23).

예

여기서 설명되고 청구된 본 발명은 후술하는 예를 참고로 본 기술 분야의 숙련자들에게 충분히 이해될 것이다. 이들 예는 본 발명의 여러가지 예를 예시하는데만 제공되며 어떤 식으로든 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

전사 인자 전위

세포는 96-웰 플레이트에서 성장되고, 고착되고, 전사 인자 단백질에 대한 Texas-Red-labeled 항체로 인큐베이트되고, 세척되고, 그후 버퍼에서 5 μ M 핵스트 33342로 염색된다.

도 19에서의 이미지는 1.08 \times 1.08 μ m² 픽셀레이션을 갖는 0.5 \times 0.5mm²의 크기를 갖는다. Texas Red 방출은 568nm에서 여기되며 600nm 길이의 통과 필터로 검출된다. 핵스트 방출은 364nm에서 여기되며 420 내지 480 nm의 대역 통과 필터로 검출된다. 이미지 획득 시간은 0.9초이다. 이미지당 150 개 정도의 세포가 있다.

도 19a는 이미지 고정 전에 활성화되지 않은 세포 필드의 이미지이다. 핵에서의 Texas Red 강도는 세포질과 비교할 때 낮다. 도 19b는 도 19a의 이미지와 핵스트 33342 방사에 기인한 이미지의 합성물이다.

도 19c는 고정 전에 활성화되는 세포 필드의 이미지이다. 컬러 스케일링에 기인하여 세포질은 핵을 포화시키지 않고 관찰하는 것이 어렵다. 도 19d는 도 19c에서의 이미지와 동일 시료로부터 핵스트 33342 방사에 기인한 이미지의 합성물이다.

데이터 분석은 다음 방법에 따라 수행된다. 도 19b에서 하이라이트된 영역은 마스크 발생 단계를 묘사한 도 20에서 재생된다. 핵스트 이미지의 이진 표현은 적당한 임계값을 적용함에 의해 발생되며, 이 임계값보다 큰 것은 1로 설정되며 이 임계값보다 작은 것은 0으로 설정된다. 이는 주 마스크로서 기능한다. 두개의 딸 마스크는 그후 발생되며, 그 하나는 주 마스크를 침식함에 의해 발생되고 다른 하나는 마스크를 팽창시키고 환형 마스크를 형성하기 위해 원 마스크로부터 차감함에 의해 발생된다. Texas-Red-방사 이미지는 도 21에 도시된 바와 같이 침식된 이진 마스크에 의해 증배되고, 픽셀은 핵에서의 표식된 전사 인자의 양의 척도로서 합산된다. 유사하게, Texas-Red-방사 이미지는 도 21에 도시된 바와 같이 환형 이진 마스크에 의해 증배되고 픽셀은 세포질에서의 표식된 전사 인자의 양의 척도로서 합산된다. 활성화의 정도는 핵과 세포질 강도 간의 비를 사용하여 평가된다.

이들 비는 활성화된 또는 활성화되지 않은 세포에 대해 도 28a에 도시된 바와 같이 막대 그래프로 표현된다.

무스카리닉 수용체의 과도 Ca 영상화 및 전압 게이트된 채널 자극

도 22 및 23의 세포는 신경모세포종 계통에서 나온 것이다. 이들은 표준 매개체에서 성장되고 영상화된다. 이들 세포는 제 2 신호로서 큰 세포내 Ca 릴리스를 발생시키는 카르바콜(carbachol)로 자극될 수 있는 무스카리닉 아세틸콜린(muscarinic acetylcholine) 수용체를 나타낸다. 또한, 세포는 외부 K⁺ 농도에서 큰 변동을 갖는 세포 멤브레인을 비분극화함에 의해 자극될 수 있으며 베라파밀(Verapamil)로 억제될 수 있는 전압-게이트된 "L" Ca 채널을 표현한다.

일반적으로, 이미지 열은 96 웰 플레이트에서의 100 μ L의 성장 매개체에 있는 세포에 성장 매개체에 있는 1000 μ L의 시약을 빠르게 부가함에 의해 개시된다. 부가된 체적에 의한 난류는 세포 형상에서의 작은 왜곡을 발생시킨다. 이런 왜곡은 부가 후 제1 이미지 프레임에서 각각의 세포에 할당된 Ca 형광도의 과도 변경으로서 관측가능하다.

도 22a에서 프레임들 간에 1.2초 간격을 갖는 동영상은 디스플레이된다. 이미지 열은 100 μ M 카르바콜의 빠른 부가에 의해 개시된다. 최종 이미지는 주입전 프레임으로부터 발생된, 이미지에서의 형광 대상을 식별하며 계수하는데 사용되는 이진 마스크이다. 주입전 이미지가 희미한 것처럼 보이지만 이는 실상은 굉장히 밝다. 마스크는 직렬로 각각의 이미지에 인가되며, 각 대상물에 대해 주입전 이미지로 정규화된 집적 강도는 도 28b에 도시된 바와 같이 시간에 대해 도시된다. 마스크는 중첩 세포에 대해서도 처리되지 않는다. 예컨대, 대상 1은 하나의 세포 이상인 것 같으나 응답하지 않는 것으로 도시된다. 대상 7은 그 하나가 지연된 응답을 보여주는 두개의 세포가 될 수 있다.

도 23a-도23h는 전압 게이트된 "L" 채널을 개방하는 50mM KCl의 부가에 의해 개시되는 비분극화 이벤트에 대한 뉴로블라스토마(neuroblastoma) 세포의 응답을 도시하는 동영상의 선택된 프레임이다. 분석 절차는 도 28b를 참고로 상술되었다. 결과는 도 28c에 디스플레이된다. "이미지 평균"이 아니라 "세포 평균"을 이용하여 얻어진 증가된 민감도를 유의해야 한다.

라이브 세포 G-단백질 결합된 수용체 고착

도 24a-24c 내지 도 25a-25c에 디스플레이된 이미지는 96 웰 플레이트에서의 라이브 세포 상에서 얻어진다. 세포는 그 자연 펩타이드 리간드가 공지된 G-단백질 결합된 수용체로 트랜스펙트되었다. 영상화 전에, 세포는 37°C에서 20분 동안 10% 세럼(serum)을 함유한 보통의 성장 매개체에서 자연 비표식된 리간드로 인큐베이션되고, 뒤이어 37°C에서 20nM 형광 표식된 리간드 및 100nM LDS 751에 의해 20분 동안 처리된다. 시료는 세척되지 않는다.

도 24a는 표식된 리간드를 갖는 인큐베이션 후의 세포의 이미지이다. 영상화 전에 어떤 세척도 수행되지 않는다. 수용체 활성화에서의 실질적인 변동은 명백하다. 몇몇 세포는 너무나 적은 리간드 만을 고착시켜서 이들은 배경에서 디프레션으로서 나타날 뿐이다. 고착 활성화의 세포별 분석은 도 25b에 도시된, LDS 751 방사, 비특정 핵산 염료로부터 마스크를 제조합에 의해 용이하게 된다. 염색은 전체가 균일하지 않으나 세포 체적의 대다수는 나타내어진다. 수용체 고착 이미지로 도 25b에서의 데이터를 임계화하여 발생된 이진 마스크의 도 25c에서의 오버레이는 수용체 활동도의 의사-컬러 맵을 낳는다. 높은 활동도는 노란색으로서 표현되며 낮은 활동도는 오렌지-적색으로서 표시된다.

도 25에서, 세가지 이미지가 표식되지 않은 리간드를 갖는 20nM 표식된 리간드의 적정 곡선 상의 포인트에 대응하여 디스플레이된다. 이 곡선은 도 28d에 도시된다. 표식되지 않은 리간드용 $A K_1=3\pm 1\times 10^{10}M$ 이 계산된다.

다른 포유류 세포 계통 상의 수용체 바인딩을 예시하는 이미지는 도 26a-26d에 도시된다. 도 26a는 256nM Cy3 표식된 리간드로 인큐베이션된 세포의 이미지이다. 바인딩 활동의 범위는 가시적이다. 도 26b는 Cy3 데이터와 1 μ M 핵스트 33342 염색 핵의 동시에 획득된 이미지와의 중첩을 도시한다. 후자는 개별 세포에 대한 신뢰성 있는 식별자로서 작용한다. 도 26c에서, 이미지는 10 μ M의 표식되지 않은 리간드의 존재시 256nM Cy3 표식된 리간드로 인큐베이션된 세포의 이미지이며, 도 26d에서 데이터는 1 μ M 핵스트 33342 염색 핵의 이미지가 오버레이되어 디스플레이된다. 표식되지 않은 세포에 의해 치환된 유체의 효과는 도 26c에서 명백하다. 도 26c와 도 26d 사이의 높은 상관 관계에서는 이들 배제된 체적에 의해 세포를 식별하는 것의 효율성을 예시한다.

시플레이트된 비드 기반 수용체 바인딩

도 27a-27d에서, Cy5 표식된 실리카 비드의 이미지가 표시된다. 실험은 형광 표식된 리간드가 마이크로스피어 상에 지지된 멤브레인 고착된 수용체에 바인딩되는 수용체 바인딩 분석의 시플레이션이다.

직경 4 μ m인 실리카 마이크로스피어는 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)으로 코팅되며 바이오틴 NHS 에스테르(biotin NHS-ester)로 바이오틴화된다. 비드의 활동도는 공지의 비트량으로 흡수됨에 의해 용액으로부터 제거되는 Cy5 표식된 스트렙타비딘(streptavidin)의 양을 정량화함에 의해 플루오리메타(fluorimeter)로 분석된다. 각각의 비드는 1.3×10^6 스트렙타비딘 분자를 보유하는 것으로 발견된다. 비드는 Cy5 표식되고 비표식된 스트렙타비딘의 적절한 비를 미리 혼합하고 비드로 인큐베이션함에 의해 Cy5 분자의 공지량으로 로드된다. 로딩은 폴리스티렌 비드의 0.16, 1.6 및 16 fmole/200 μ g과 동등하다. 각각의 비드는 각각 17, 170 또는 1700 표식의 평균을 갖는다. 시료는 영상화용 Costar 96웰에 배치된다. Cy5는 647nm 레이저 광으로 여기되며, 방출된 형광은 690nm를 중심으로 하는 40nm 대역 통과 필터를 통해 검출된다. 스캐닝된 이미지는 약 0.7초로 1 μ m 픽셀레이션에서 획득된다.

170 및 1700 분자로 로딩된 비드는 용이하게 검출될 수 있으며, 17 플루오르 비드는 도 27을 구성하는 이미지에서 판별 가능하다. 비표식된 스트렙타비딘으로만 로딩되는 비드는 충분한 강도를 생성하지 못한다.

산업상 이용 가능성

가늘고 긴 빔을 이용하는 공초점 영상 시스템이 개시되었다. 특정 실시예는 전하 결합 소자(CCD)를 갖는 장치에 관한 것이며, 상기 장치는 형광 물체 관측에 사용된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

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

청구항 45.
삭제

청구항 46.
삭제

청구항 47.
삭제

청구항 48.
삭제

청구항 49.
삭제

청구항 50.
삭제

청구항 51.
삭제

청구항 52.
삭제

청구항 53.
삭제

청구항 54.
삭제

청구항 55.
삭제

청구항 56.
삭제

청구항 57.
삭제

청구항 58.
삭제

청구항 59.
삭제

청구항 60.
삭제

청구항 61.
삭제

청구항 62.
삭제

청구항 63.
삭제

청구항 64.
삭제

청구항 65.
삭제

청구항 66.
삭제

청구항 67.

- a) 전자기 방사가 전파되는 광축에 대해 횡방향으로 뻗어 있는 가늘고 긴(elongated) 전자기 방사 빔을 형성하는 수단과;
- b) 상기 가늘고 긴 빔을 물체가 위치하는 제1 평면내의 제1의 가늘고 긴 영역으로 향하게 하여 집속시키고, 상기 물체로부터 방출된 전자기 방사를 제2의 가늘고 긴 하나 또는 복수의 영역으로 향하게 하는 수단-상기 제2의 가늘고 긴 영역 각각은 상기 제1 평면에 대해 공액(conjugate)인 또 다른 제2 평면상에 있음-과;
- c) 상기 제2 공액면들 중 적어도 하나 또는 상기 제2 공액면들 중 적어도 하나에 공액인 제3 평면내에, 상기 물체로부터 방출된 상기 전자기 방사가 동시 도달하는(coincident) 장방형의 검출 소자 어레이를 포함하는 검출 장치; 및
- d) 상기 방출된 전자기 방사가 상기 장방형의 검출 소자 어레이에 전달되어 상기 검출 장치에 의해 스캔과 동기하여 상기 방출된 전자기 방사를 나타내는 복수의 전기 신호로 변환되도록, 상기 가늘고 긴 빔을 상기 물체에 대해 이동시키거나 상기 물체를 상기 가늘고 긴 빔에 대해 이동시킴으로써 상기 물체를 스캔하는 수단

을 포함하는 공초점 영상 시스템(confocal imaging system).

청구항 68.

제67항에 있어서,

- a) 상기 제2의 가늘고 긴 영역과 일직선으로 정렬된 장축을 갖는 가늘고 긴 공간 필터 - 상기 공간 필터의 폭(width)은 고정되거나 가변임 - ; 및
- b) 상기 검출 장치 상에 상기 제2 공액면의 영상을 형성하는 수단

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 69.

제67항에 있어서, 상기 물체로 향하는 상기 가늘고 긴 전자기 방사 빔은 2개 이상의 파장을 포함하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 70.

제67항에 있어서, 상기 물체는 불연속면과 동일 방향으로 뻗어 있는 연속면을 갖는 기관의 상기 불연속면 상에 위치해 있고, 상기 시스템은 집속 시스템을 더 포함하되, 상기 집속 시스템은,

- a) 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하고 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 제1 파장을 갖는 제1의 전자기 방사 집속 빔과;
- b) 대물 렌즈를 통해 상기 연속면으로 향하고 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 제2 파장을 갖는 제2의 전자기 방사 집속 빔과;
- c) 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 상기 제2 파장의 방사로부터 상기 제1 파장의 방사를 분리하는 수단과;
- d) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 상기 제1 집속 빔을 검출하는 제1 검출기와;
- e) 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 상기 제2 집속 빔을 검출하는 제2 검출기와;
- f) 상기 기관에 대해 상기 대물 렌즈를 이동시키거나 상기 대물 렌즈에 대해 상기 기관을 이동시키는 이동 수단; 및

g) 상기 제1 및 제2 검출기와 상기 이동 수단에 접속된 제어기

를 포함하되, 상기 제어기는 상기 기관에서의 상기 제1 집속 빔 또는 상기 제2 집속 빔의 위치에 따라 상기 제1 검출기 또는 상기 제2 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 이동 수단을 조작하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 71.

제67항에 있어서, 상기 스캔 수단은 상기 가늘고 긴 빔을 물체를 가로질러 이동시키거나 또는 상기 물체가 배치되어 있는 가동 스테이지(movable stage)를 가로질러 이동시키기 위한 회전 광학 소자를 포함하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 72.

제67항에 있어서, 상기 물체로 향하는 전자기 방사의 가늘고 긴 빔은 하나 이상의 파장을 포함하고 상기 제2 평면은 단일 면인(singular) 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 73.

제67항에 있어서,

상기 전자기 방사의 2개 이상의 파장은 제1 평면내의 제1의 가늘고 긴 영역 의 물체로부터 방출되고, 상기 시스템은 하나 이상의 검출 장치에 의해 상기 분리된 파장 중 적어도 하나를 검출하기 위해 상기 방출된 파장을 분리하는 수단을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 74.

제67항에 있어서,

상기 물체는 불연속면과 동일한 방향으로 뻗어 있는 연속면을 포함하는 기관의 상기 불연속면 상에 위치해 있고, 상기 시스템은 집속 시스템을 더 포함하되,

상기 집속 시스템은,

(a) 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하고 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 전자기 방사 집속 빔과;

(b) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 상기 집속 빔을 검출하는 초점 검출기와;

(c) 상기 기관에 대해 대물 렌즈를 이동시키거나 상기 대물 렌즈에 대해 상기 기관을 이동시키는 이동 수단; 및

(d) 상기 초점 검출기와 상기 이동 수단에 접속된 제어기를 포함하고,

상기 제어기는 상기 기관에서의 상기 집속 빔의 위치에 따라 상기 초점 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 이동 수단을 조정하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 75.

제70항에 있어서, 상기 제1 및 제2 파장은 동일한 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 76.

제70항 또는 제74항에 있어서,

상기 기관은 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)이고, 상기 불연속면은 상기 마이크로타이터 플레이트에서 웰 저면(a bottom of a well)인 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 77.

제73항에 있어서,

상기 물체는 불연속면과 동일 방향으로 뻗어 있는 연속면을 포함하는 기관의 상기 불연속면 상에 위치하고, 전자기 방사의 2개 이상의 파장이 상기 물체로부터 방출되며, 상기 시스템은 집속 시스템을 더 포함하되,

상기 집속 시스템은,

- a) 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하고 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 제1 파장을 갖는 제1의 전자기 방사 집속 빔과;
- b) 대물 렌즈를 통해 상기 연속면으로 향하고 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 제2 파장을 갖는 제2의 전자기 방사 집속 빔과;
- c) 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 상기 제2 파장의 방사로부터 상기 제1 파장의 방사를 분리하는 수단과;
- d) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 상기 제1 집속 빔을 검출하는 제1 검출기와;
- e) 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 상기 제2 집속 빔을 검출하는 제2 검출기와;
- f) 상기 기관에 대해 상기 대물 렌즈를 이동시키거나 상기 대물 렌즈에 대해 상기 기관을 이동시키는 이동 수단; 및
- g) 상기 제1 및 제2 검출기와 상기 이동 수단에 접속된 제어기

를 포함하되, 상기 제어기는 상기 기관에서의 상기 제1 집속 빔 또는 상기 제2 집속 빔의 위치에 따라 상기 제1 검출기 또는 상기 제2 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 이동 수단을 조작하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 78.

제73항에 있어서,

상기 물체는 상기 불연속면과 동일 방향으로 뻗어 있는 연속면을 포함하는 기관의 상기 불연속면 상에 위치해 있고, 전자기 방사의 두개 이상의 파장이 상기 물체로부터 방출되며, 상기 시스템은 집속 시스템을 포함하되,

상기 집속 시스템은,

- (a) 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하고 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아 오는 전자기 방사 집속 빔과;

- (b) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 되돌아오는 상기 집속 빔을 검출하는 초점 검출기와;
- (c) 상기 기관에 대해 대물 렌즈를 이동시키거나 상기 대물 렌즈에 대해 상기 기관을 이동시키는 이동 수단; 및
- (d) 상기 초점 검출기와 상기 이동 수단에 접속된 제어기를 포함하고,

상기 제어기는 상기 기관에서의 상기 집속 빔의 위치에 따라 상기 초점 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 이동 수단을 조정하는 것을 특징으로 하는 공초점 영상 시스템.

청구항 79.

삭제

청구항 80.

삭제

청구항 81.

삭제

청구항 82.

물체를 검사하는 방법에 있어서,

- a) 제1항에 따른 공초점 영상 시스템을 사용하여 상기 물체로부터 방출되는 전자기 방사를 측정하는 단계; 및
- b) 검출 장치에 의해 생성된 복수의 전기 신호를 그룹화하는 단계를 포함하되,

상기 그룹화 단계는,

상기 복수의 신호를 수신하는 단계와;

상기 복수의 신호를 어떤 임계값과 비교하는 단계와;

상기 복수의 신호를 상기 임계값과 비교한 것에 근거하여 상기 복수의 신호에 대응하는 축소된 데이터 값의 집합을 생성하는 단계; 및

상기 축소된 데이터 값의 집합에 대응하는 상기 물체의 복수의 영역중 일부의 공간적 관계에 근거하여 상기 축소된 데이터 값의 집합을 적어도 2개의 그룹으로 그룹화하는 단계

를 포함하는 프로세스를 사용하는 것을 특징으로 하는 물체 검사 방법.

청구항 83.

삭제

청구항 84.

물체를 검사하는 방법에 있어서,

- a) 전자기 방사가 전파되는 광축에 횡방향으로 뻗어 있는 가늘고 긴 전자기 방사 빔을 형성하는 단계와;

b) 상기 가늘고 긴 빔을 상기 물체가 위치하는 제1 평면내의 제1의 가늘고 긴 영역으로 향하게 하여 집속시키고 상기 물체로부터 방출된 전자기 방사를 하나 이상의 제2의 가늘고 긴 영역으로 향하게 하는 단계-상기 제2의 가늘고 긴 영역 각각은 상기 제1 평면에 대해 공액(conjugate)인 다른 제2 평면상에 있음-와;

c) 상기 제2 공액면들 중 적어도 하나 또는 상기 제2 공액면들 중 적어도 하나에 공액인 제3 평면내에, 상기 물체로부터 방출된 상기 전자기 방사가 동시에 도달하는(coincident) 장방향의 검출 소자 어레이를 포함하는 검출 장치를 배치하는 단계; 및

d) 상기 방출된 전자기 방사가 상기 장방향의 검출 소자 어레이에 전달되어 상기 검출 장치에 의해 스캔과 동기하여 상기 방출된 전자기 방사를 나타내는 복수의 전기 신호로 변환되도록, 상기 가늘고 긴 빔을 상기 물체에 대해 이동시키거나 상기 물체를 상기 가늘고 긴 빔에 대해 이동시킴으로써 상기 물체를 스캔하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 물체 검사 방법.

청구항 85.

제84항에 있어서, 상기 물체는 불연속면과 동일 방향으로 뻗어 있는 연속면을 갖는 기관의 상기 불연속면 상에 위치하고, 상기 방법은 집속 방법을 더 포함하되,

상기 집속 방법은,

a) 제1 전자기 방사 집속 빔이 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오도록 제1 과장을 갖는 상기 제1 전자기 방사 집속 빔을 상기 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하게 하는 단계와;

b) 제2 전자기 방사 집속 빔이 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오도록 제2 과장 -제2과장은 상기 제1 과장과 같거나 다를 수 있음- 을 갖는 상기 제2 전자기 방사 집속 빔을 상기 대물 렌즈를 통해 상기 연속면으로 향하게 하는 단계와;

c) 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오는 상기 제2 과장의 방사로부터 상기 제1 과장의 방사를 분리시키는 단계와;

d) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오는 상기 제1 집속 빔을 제1 검출기로 검출하는 단계와;

e) 상기 연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오는 상기 제2 집속 빔을 제2 검출기로 검출하는 단계; 및

f) 상기 제1 집속 빔 또는 상기 제2 집속 빔의 상기 기관에서의 위치에 따라 상기 제1 또는 제2 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 대물 렌즈를 상기 기관에 대해 이동시키거나 상기 기관을 상기 대물 렌즈에 대해 이동시키는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 물체 검사 방법.

청구항 86.

제84항에 있어서, 상기 물체는 불연속면과 동일 방향으로 뻗어 있는 연속면을 포함하는 기관의 상기 불연속면 상에 위치하고, 상기 방법은 집속 방법을 더 포함하되,

상기 집속 방법은,

a) 전자기 방사 집속 빔이 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오도록 상기 전자기 방사 집속 빔을 상기 대물 렌즈를 통해 상기 불연속면으로 향하게 하는 단계;

b) 상기 불연속면에 의해 반사되어 상기 대물 렌즈로 돌아오는 상기 집속 빔을 초점 검출기로 검출하는 단계; 및

c) 상기 기관에서의 상기 집속 빔의 위치에 따라 상기 초점 검출기로부터의 신호에 응답하여 상기 대물 렌즈를 상기 기관에 대해 이동시키거나 상기 기관을 상기 대물 렌즈에 대해 이동시키는 단계

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 물체 검사 방법.

청구항 87.

삭제

청구항 88.

삭제

청구항 89.

제84항에 있어서, 상기 방법은 상기 검출 장치에 의해 생성된 복수의 전기 신호를 그룹화하는 단계를 더 포함하되, 상기 그룹화 단계는,

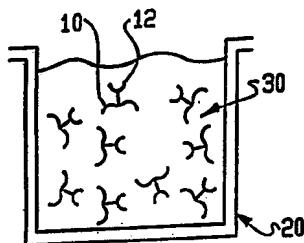
- a) 복수의 신호를 수신하는 단계와;
- b) 상기 복수의 신호를 임계값과 비교하는 단계와;
- c) 상기 복수의 신호와 상기 임계값을 비교한 것에 기초하여 상기 복수의 신호에 대응하는 축소된 데이터 값의 집합을 생성하는 단계; 및
- d) 상기 축소된 데이터 값의 집합에 대응하는 상기 물체의 복수의 영역 중 일부분의 공간적 관계에 기초하여, 상기 축소된 데이터 값의 집합을 적어도 2개의 그룹으로 그룹화하는 단계

를 포함하는 프로세스를 사용하는 것을 특징으로 하는 물체 검사 방법.

도면

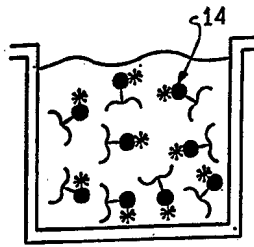
도면1a

(종래 기술)



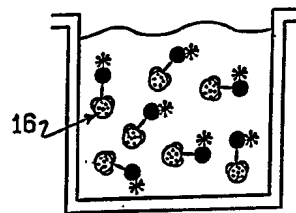
도면1b

(종래 기술)



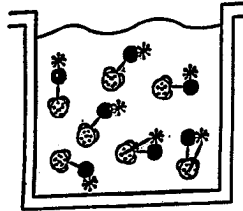
도면1c

(종래 기술)



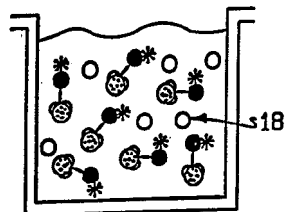
도면1d

(종래 기술)



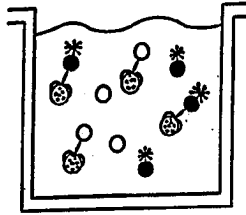
도면1e

(종래 기술)



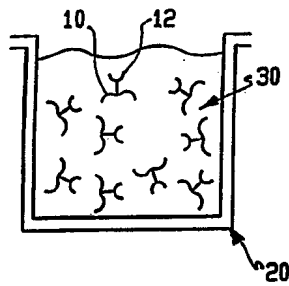
도면1f

(종래 기술)



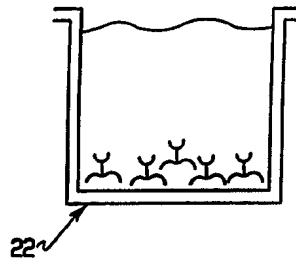
도면2a

(종래 기술)



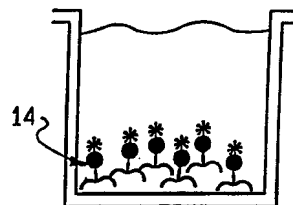
도면2b

(종래 기술)



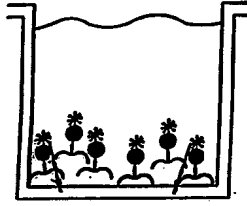
도면2c

(종래 기술)



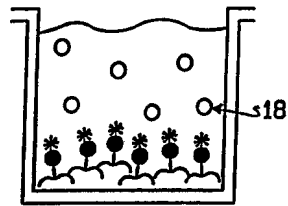
도면2d

(종래 기술)



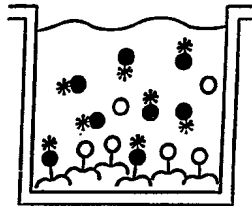
도면2e

(종래 기술)



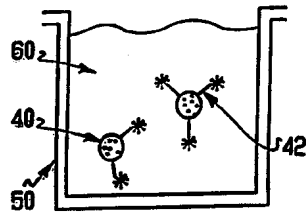
도면2f

(종래 기술)



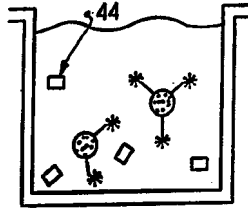
도면3a

(종래 기술)



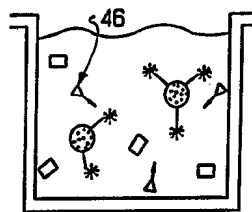
도면3b

(종래 기술)



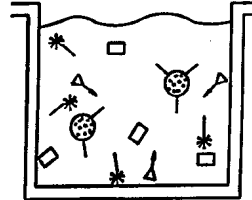
도면3c

(종래 기술)



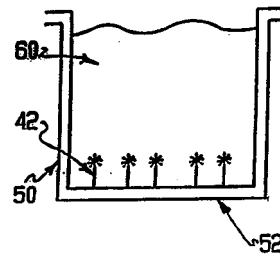
도면3d

(종래 기술)



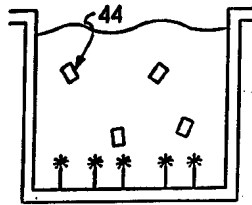
도면4a

(종래 기술)



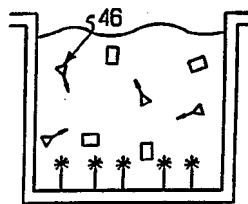
도면4b

(종래 기술)



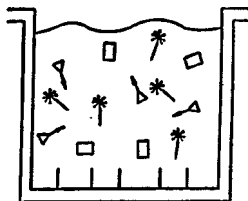
도면4c

(종래 기술)



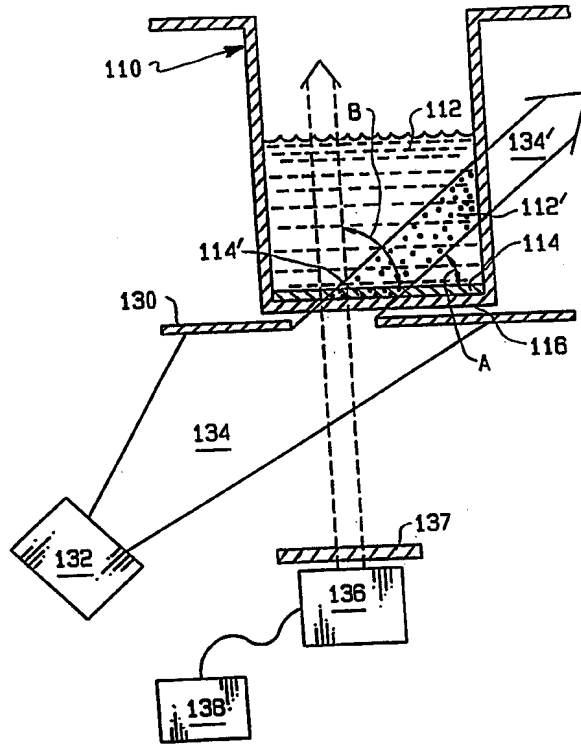
도면4d

(종래 기술)



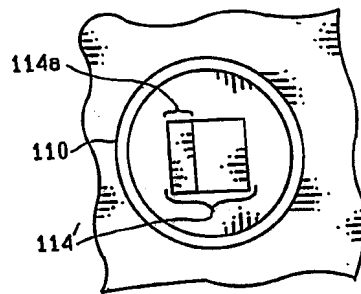
도면5a

(종래 기술)

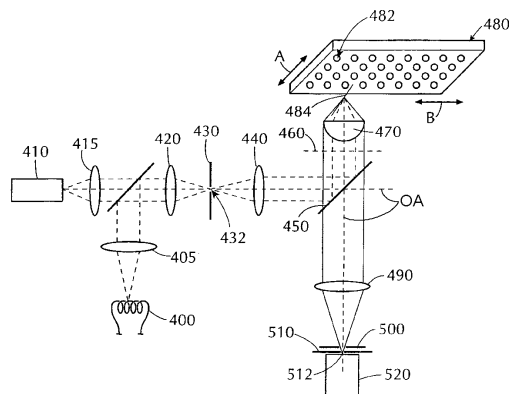


도면5b

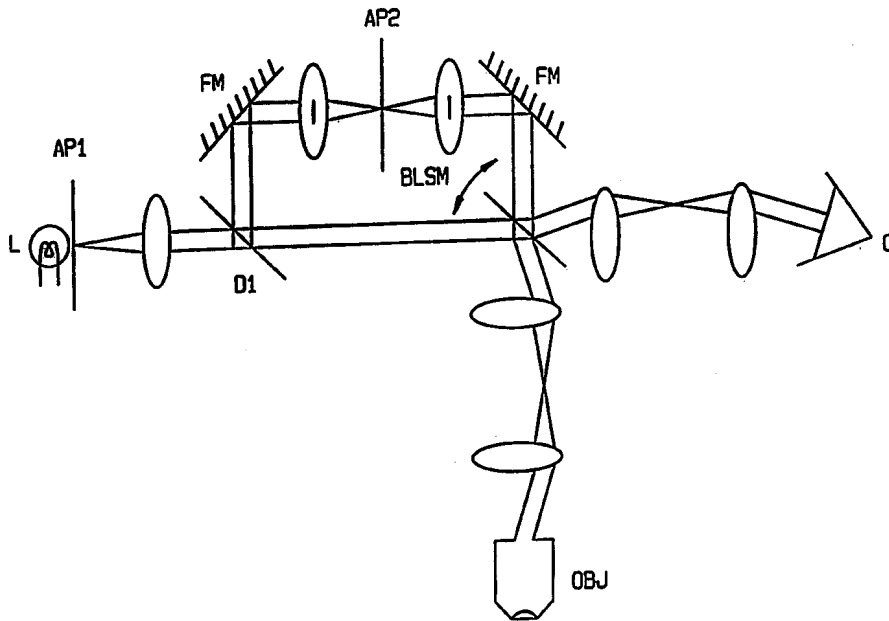
(종래 기술)



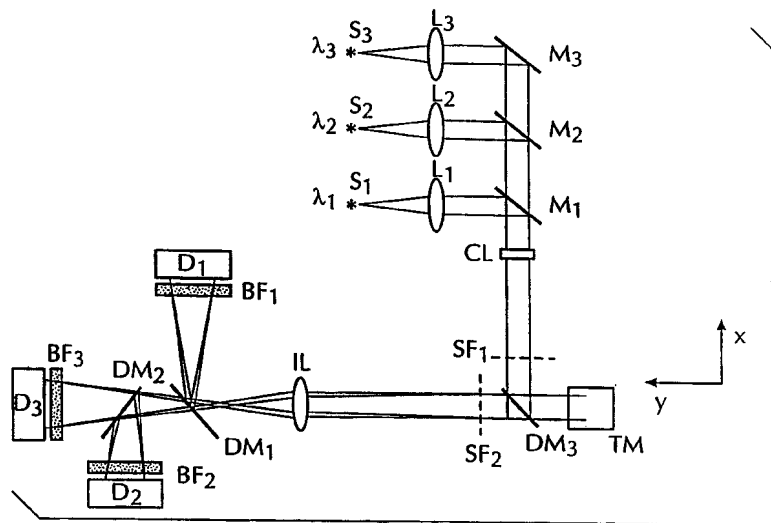
도면6



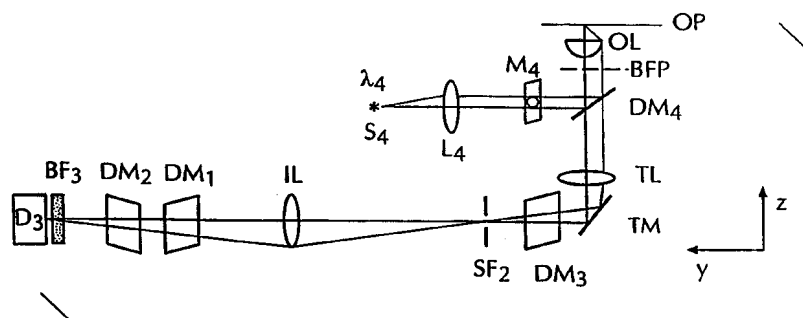
도면7



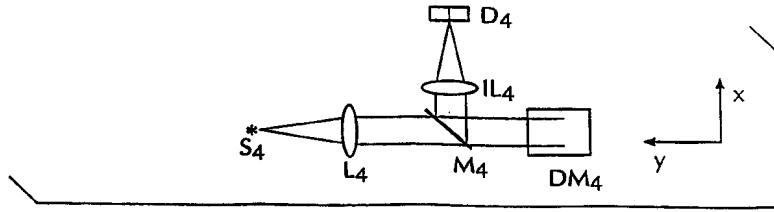
도면8a



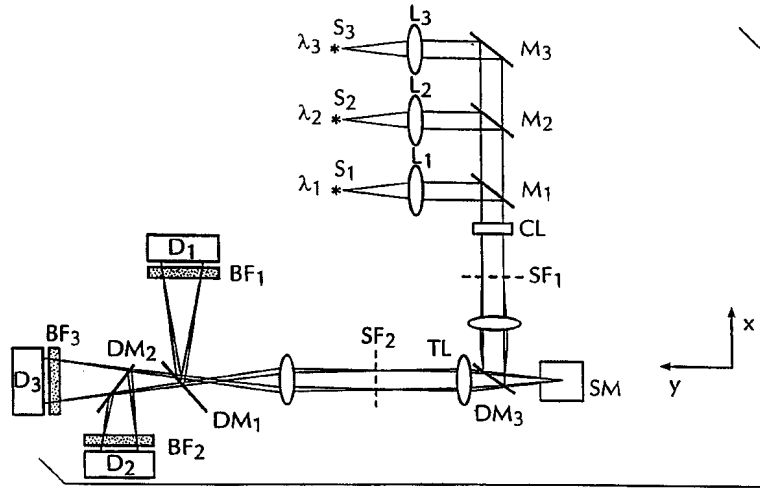
도면8b



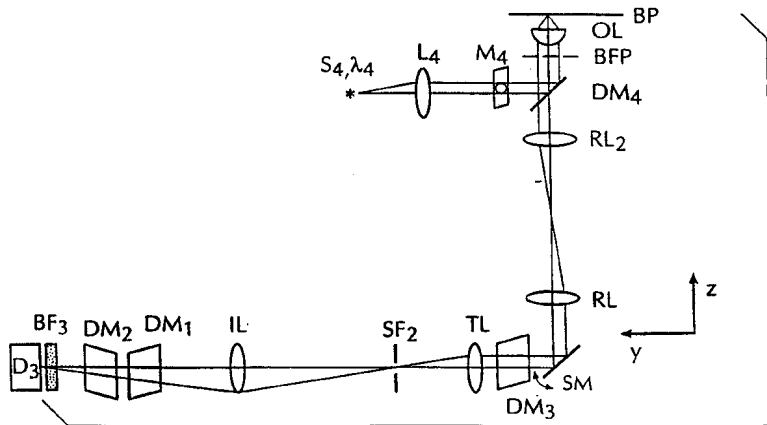
도면8c



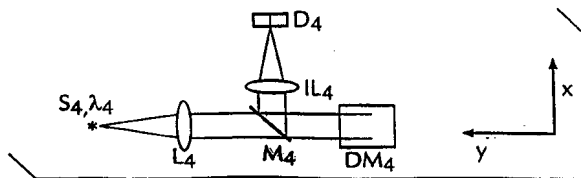
도면9a



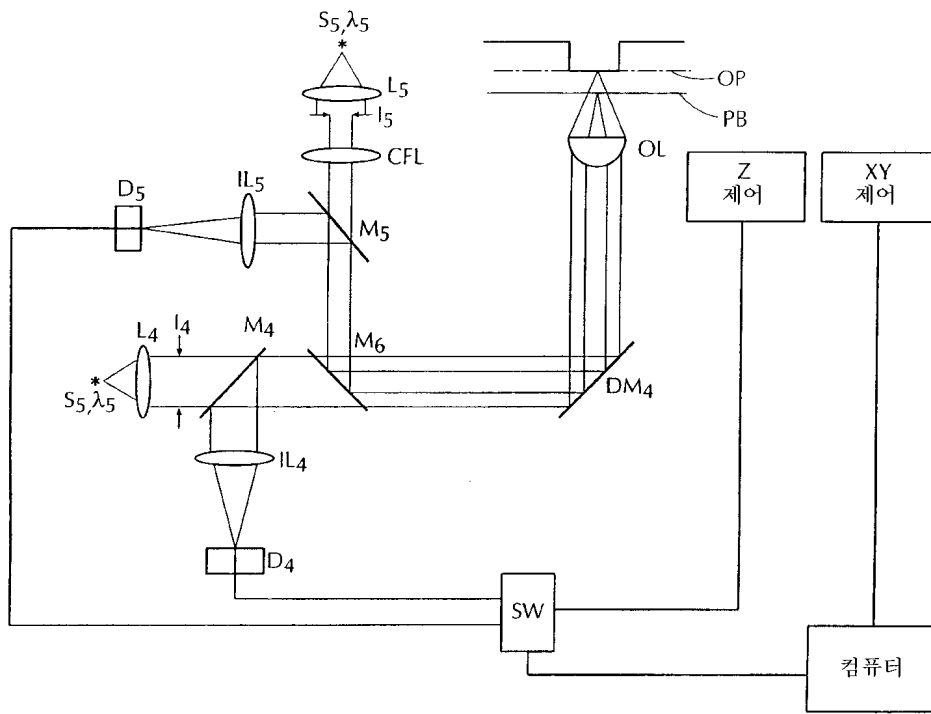
도면9b



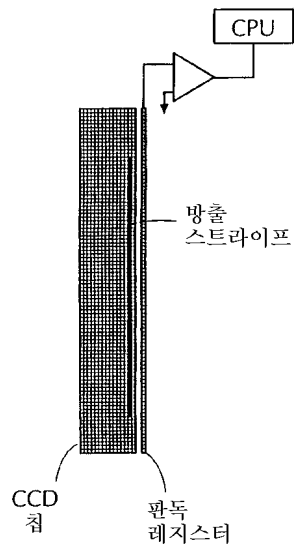
도면9c



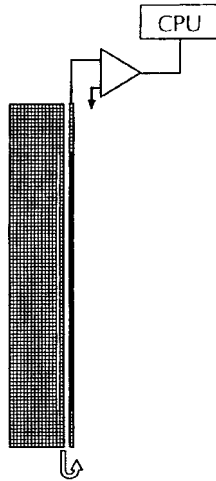
도면10



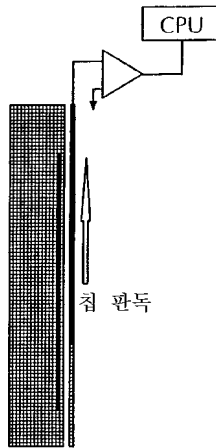
도면11a



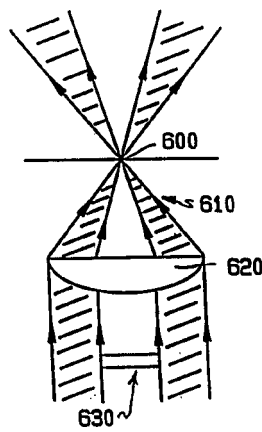
도면11b



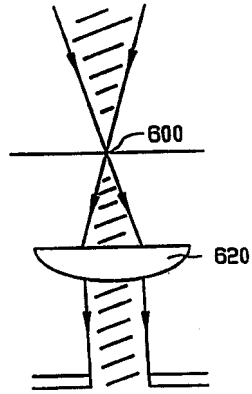
도면11c



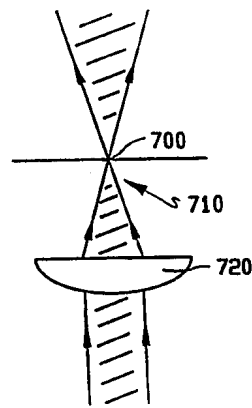
도면12a



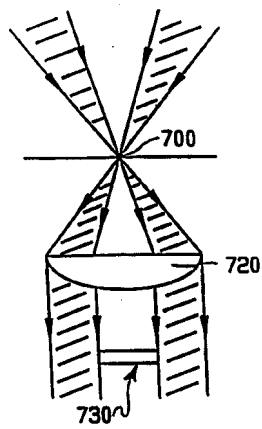
도면12b



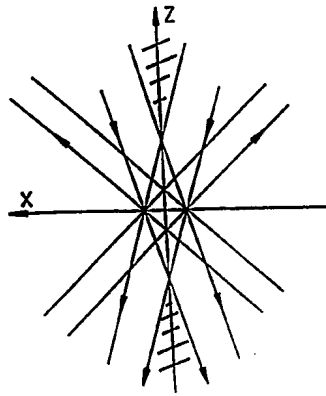
도면13a



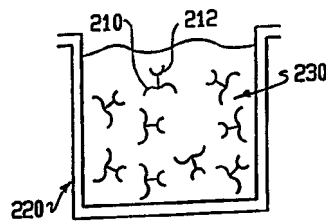
도면13b



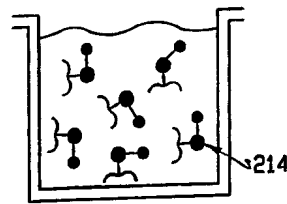
도면14



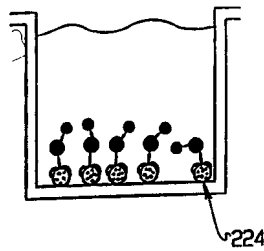
도면15a



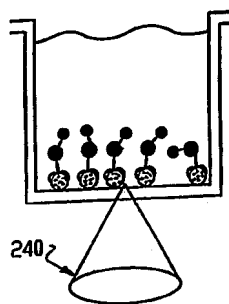
도면15b



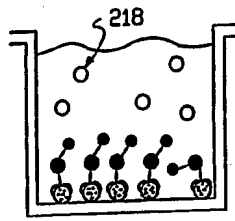
도면15c



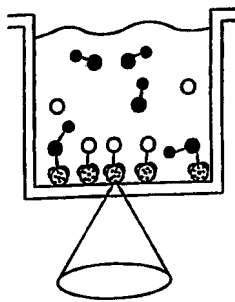
도면15d



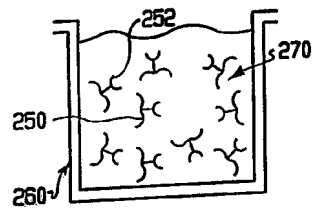
도면15e



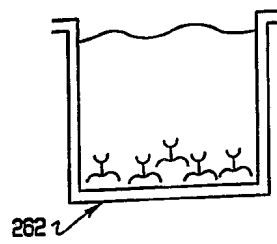
도면15f



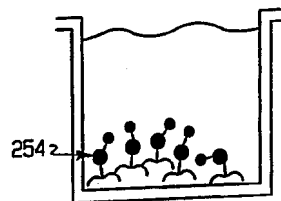
도면16a



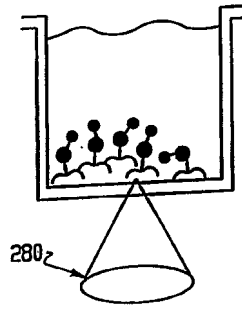
도면16b



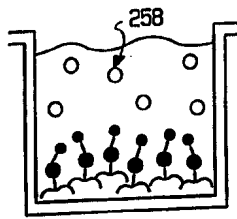
도면16c



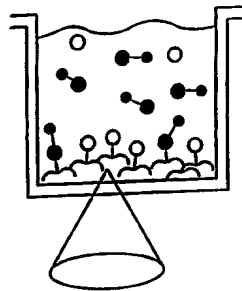
도면16d



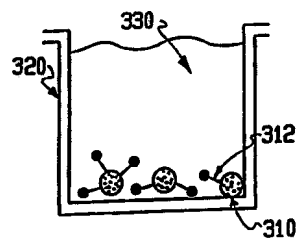
도면16e



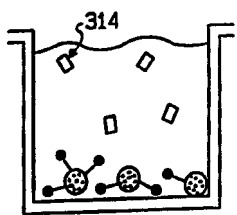
도면16f



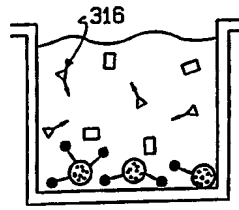
도면17a



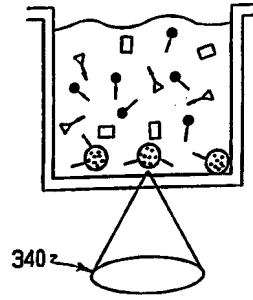
도면17b



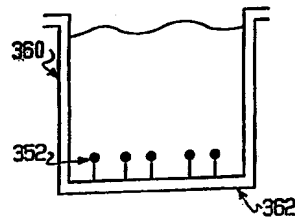
도면17c



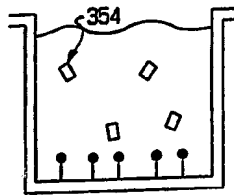
도면17d



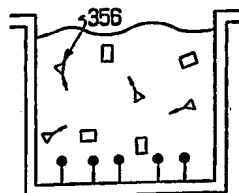
도면18a



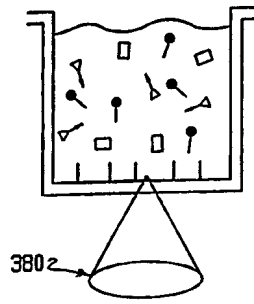
도면18b



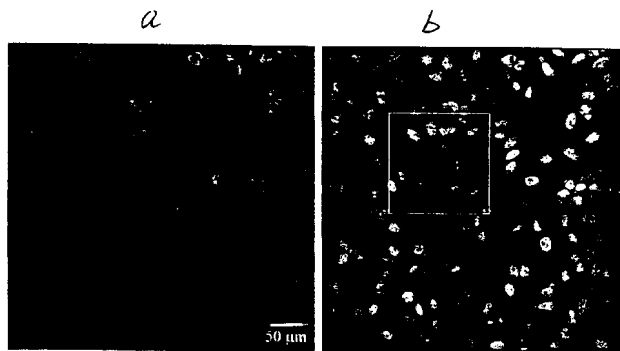
도면18c



도면18d

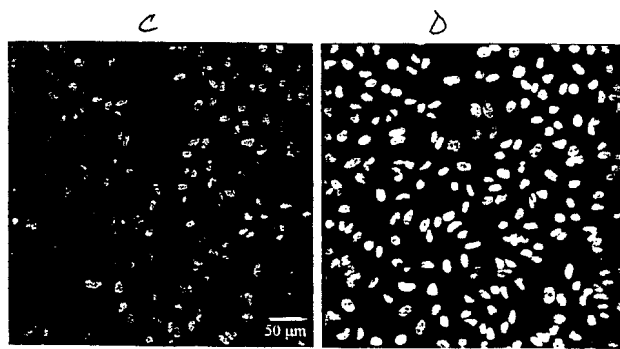


도면19



텍사스 레드 표식된 항체
(활성 없음)

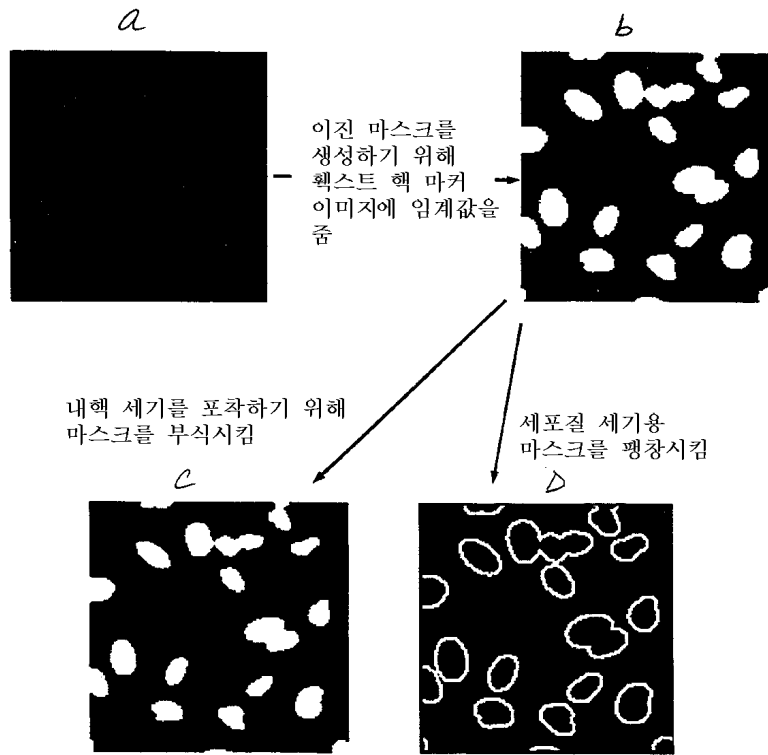
렉스트 오버레이



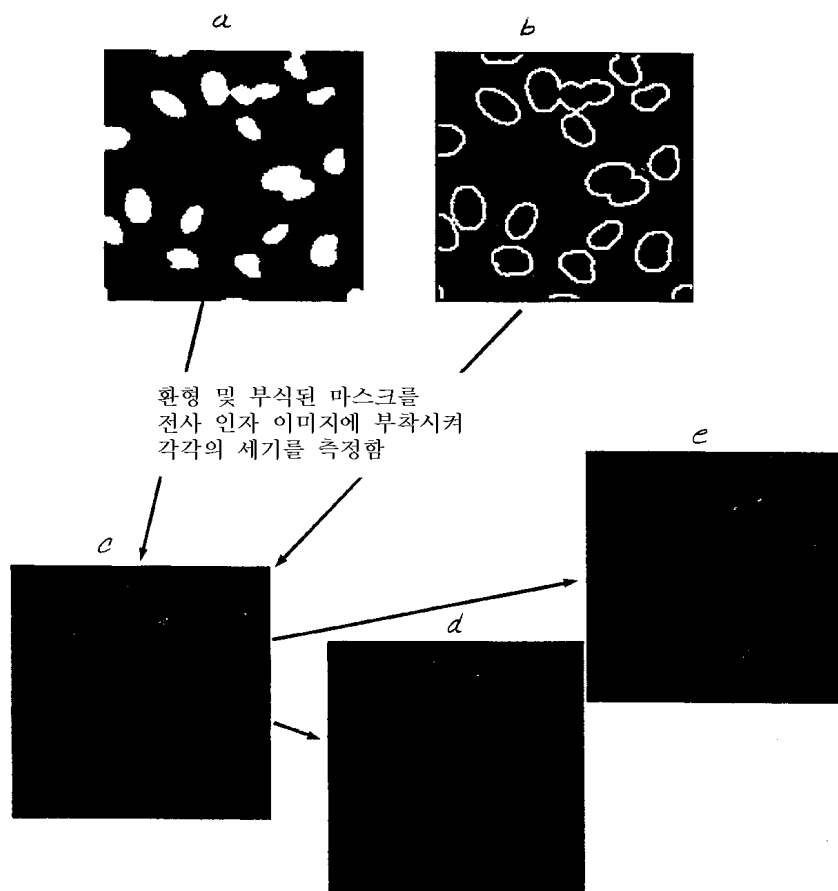
텍사스 레드 표식된 항체
(활성 있음)

렉스트 오버레이

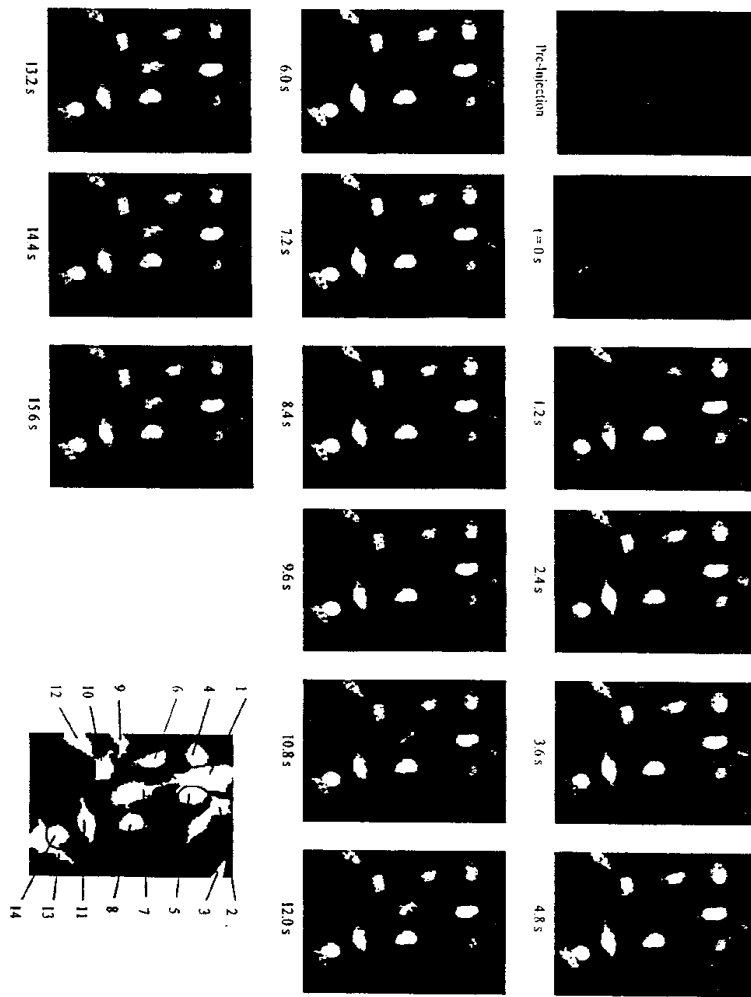
도면20



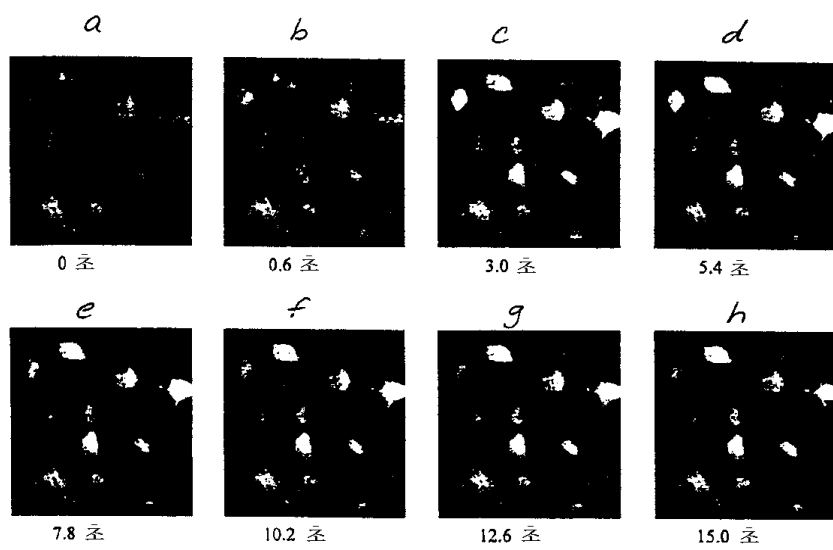
도면21



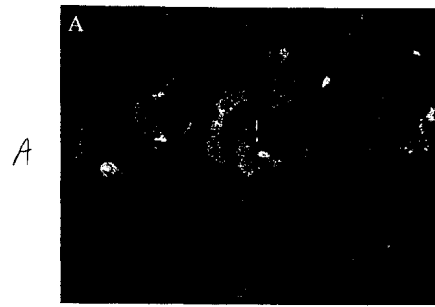
도면22



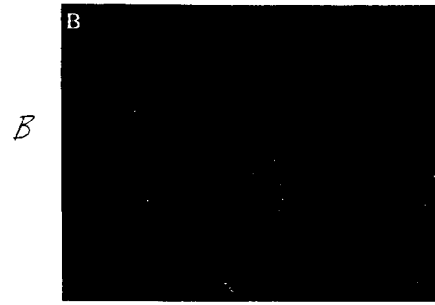
도면23



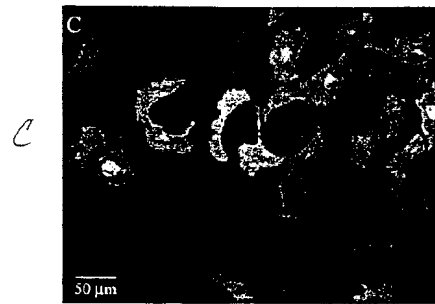
도면24



형광 표식된 펩티드 리간드 20nM

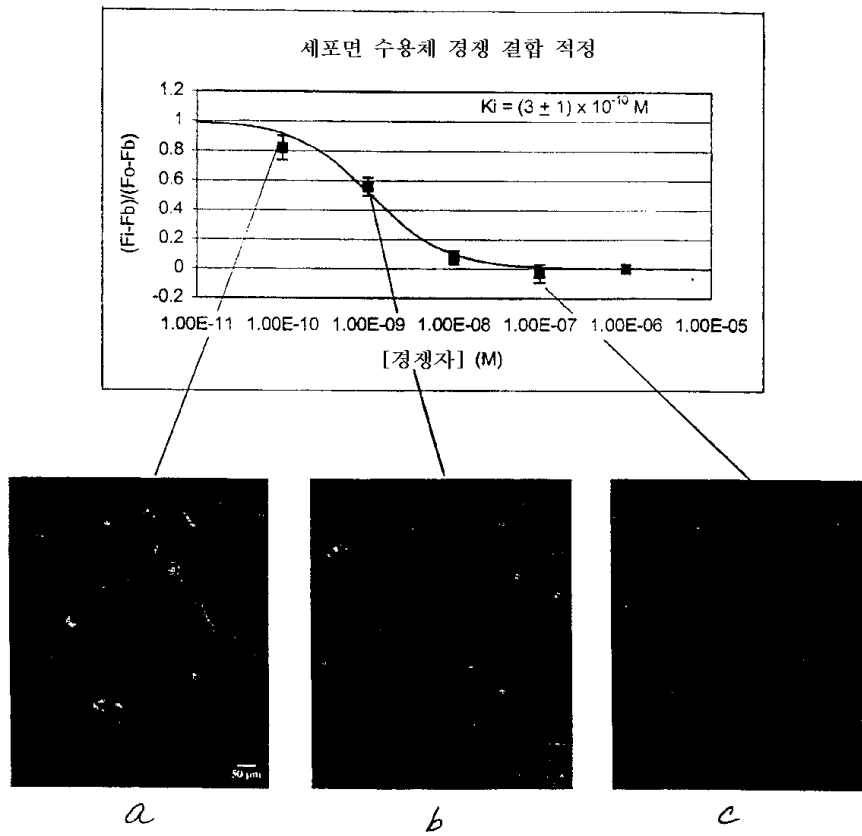


LDS 751 세포질 염색액 발생 마스크

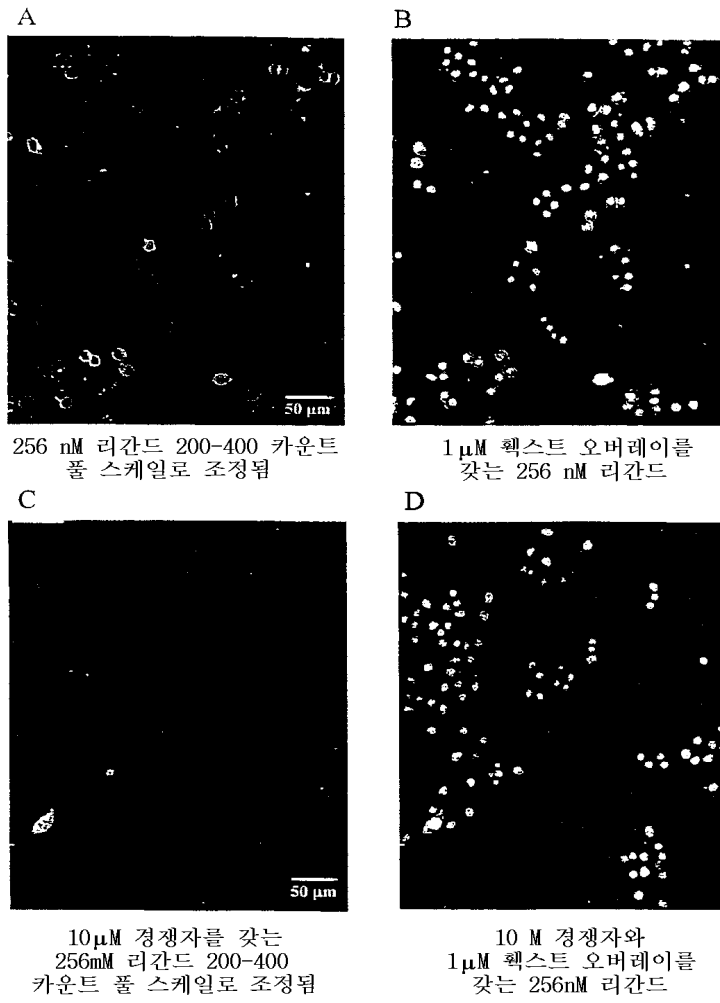


가변적인 수용체 활동을 보여주는 A와 B의 오버레이

도면25



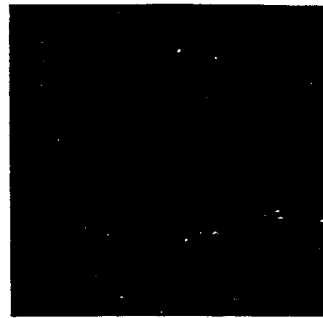
도면26



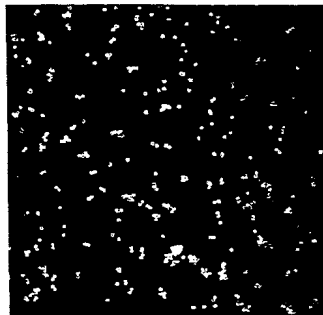
도면27



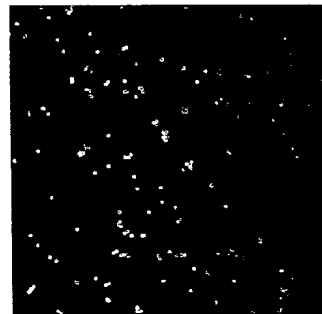
A) 미표식 비드



B) 17 플루오르/비드

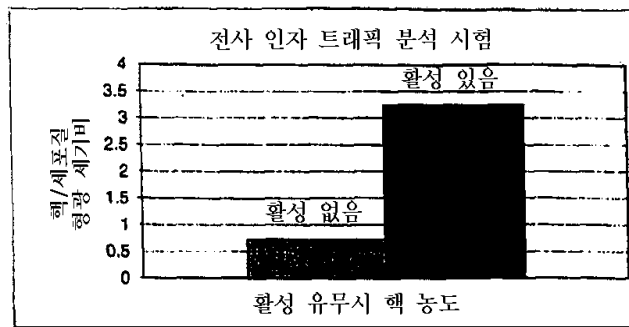


C) 170 플루오르/비드

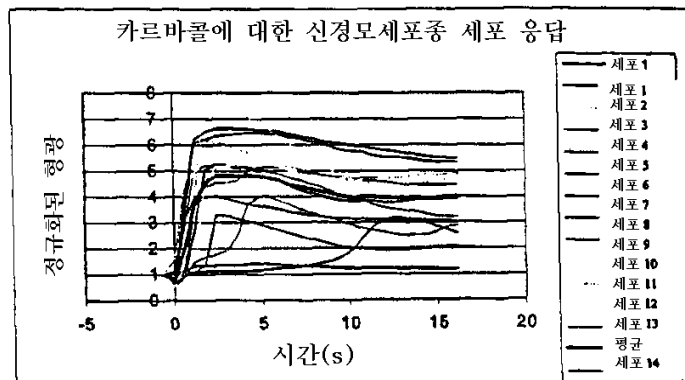


D) 1700 플루오르/비드
(10배 축소)

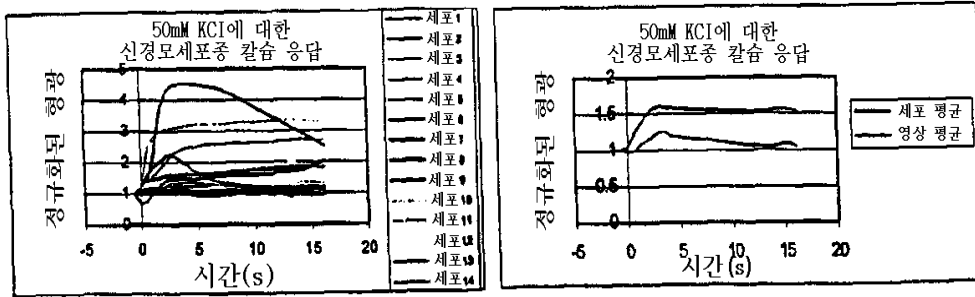
도면28a



도면28b



도면28c



도면28d

