



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0002742
(43) 공개일자 2010년01월07일

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01) G01N 21/25 (2006.01)

G01N 21/47 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0062756

(22) 출원일자 2008년06월30일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

정현식

서울특별시 강남구 압구정2동 489번지 한양아파트
35동 1005호

윤두희

대구광역시 달서구 월성1동 태왕아너스 105동
1902호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

현중철

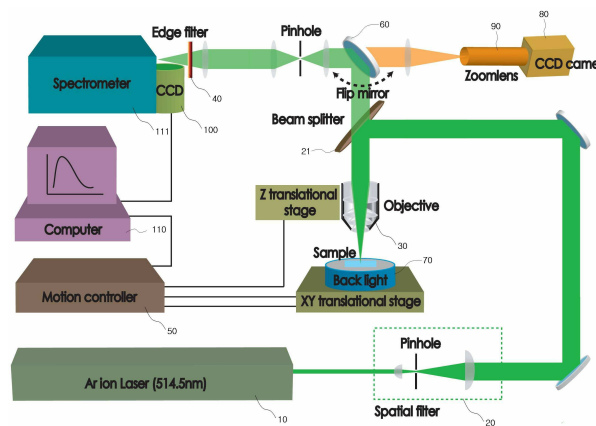
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법 및 장치

(57) 요약

세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법과 라만 신호 이미지와 광학 이미지를 함께 얻기 위한 장치를 제공한다. 본 발명은 (a) 제 1광원에 의해 가시광선 영역 파장의 빛을 발생시켜 제공하는 단계; (b) 상기 빛을 세포 또는 생체 조직 샘플의 한 개의 포인트에 입사시키는 단계; (c) 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 단계; (d) 상기 필터링된 빛을 분광기로 보내고 상기 분광기를 통과한 빛을 제 1 전하결합소자(charge-coupled device:CCD)로 보내 라만 신호를 검출하는 단계; (e) 포인트를 변환시켜 라만 신호를 검출하는 단계; 및 (f) 각 포인트에서 얻어진 라만 신호를 집합하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키는 단계를 포함하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정광환

경기도 성남시 분당구 이매동 101(25/5) 이매촌
1025-503

김정호

인천광역시 서구 불노동 328(73/4) 퀸스타운동성아
파트 203-204

박도영

서울특별시 관악구 신림11동 1573-19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10816

부처명 서울특별시

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(2006년 기술기반구축사업)

연구과제명 나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신 클러스터

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2006년 08월 01일 ~ 2008년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 제 1 광원에 의해 가시광선 영역 파장의 빛을 발생시켜 제공하는 단계;
- (b) 상기 빛을 세포 또는 생체 조직 샘플의 한 개의 포인트에 입사시키는 단계;
- (c) 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 단계;
- (d) 상기 필터링된 빛을 분광기로 보내고 상기 분광기를 통과한 빛을 제 1 전하결합소자(charge-coupled device:CCD)로 보내 라만 신호를 검출하는 단계;
- (e) 포인트의 위치를 변환시켜 라만 신호를 검출하는 단계; 및
- (f) 각 포인트에서 얻어진 라만 신호를 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키는 단계를 포함하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세포는 단세포 생물의 세포인 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 가시광선은 400 내지 700nm 의 파장을 가지는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 가시광선은 514.5nm 의 파장을 가지는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 포인트 위치의 변환이 모션 콘트롤러(Motion controller)에 의하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법.

청구항 6

레이저를 발생하는 제 1 광원(10);

상기 레이저의 빔 직경을 증가시키는 스페이셜 필터(spatial filter)(20);

상기 스페이셜 필터와 광학적으로 연결되는 광선 분리기 (beam splitter)(21);

상기 샘플의 위치변화를 제어하는 모션 콘트롤러(motion controller)(50);

상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40);

상기 필터(40)를 통과한 빛의 스펙트럼을 분리시키는 분광기(111);

상기 분광기의 라만 신호를 받는 제 1 CCD (100); 및

상기 모션 콘트롤러에 의해 위치한 포인트에서 얻어진 라만 신호를 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 CCD 이미지를 표시하는 장치(110)를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 라만 신호 영상화 장치는,

광학 이미지를 얻기 위한 제 2 광원(70);

상기 세포 및 생체 조직의 샘플에 제 2 광원의 빛을 입사시켜 상기 샘플을 투과시킨 빛을 검출하는 제

2 CCD 카메라(80); 및

상기 제 1 광원의 빛을 상기 샘플에 입사하여 산란된 빛은 상기 제 1 CCD 로(100) 보내고, 상기 제 2 광원(70)의 빛을 샘플에 투과시켜 얻어진 빛은 상기 제 2 CCD 카메라(80)로 보내는 플립 미러(60)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 라만 신호 영상화 장치는 제 2 광원(70)과 제 2 CCD 카메라(80) 사이에 대물렌즈(30)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 제 1광원(10)은 아르곤(Ar) 이온 레이저인 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40)는 에지 필터(Edge filter)인 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

청구항 11

제 6항에 있어서, 상기 제 2 CCD 카메라(80) 앞에 줌(zoom)렌즈(90)가 설치된 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법 및 장치에 관한 것으로, 라만 신호를 이미지화 하여 관찰할 수 있게 함으로써 바이오 물질들의 변형으로 발생하는 현상 또는 정상, 비 정상조직 및 세포 정확한 생화학적 정보를 알 수 있게 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 지난 수십 년에 걸쳐 분광학 기술의 발달은 바이오 분야에 상당한 영향을 미쳐왔다. 공초점 형광현미경, FT-IR 및 라만과 같은 분광학 기술들은 바이오 물질들의 변형으로 발생하는 현상의 근원 및 진전을 밝히기 위해 사용되어 왔다. 이들 기술은 바이오 물질 변형에 따른 세포 및 조직의 생화학적 변화의 진단에 사용되어 왔다. 이들 분광학 기술들 중에서 라만 분광법은 샘플을 준비하는 것이 비교적 간단하고 비 파괴적이며 정상 조직과 비 정상조직의 생화학적 구조에 대한 상세한 정보를 제공하기 때문에 바이오 영역 특히, 의학 분야에서 비정상 조직에 의한 질병 진단을 위해 상당한 관심을 끌어들였다. 그 결과, 조직손상이 적으면서 고화질의 라만 스펙트럼을 얻을 수 있는 광원의 개발과 양질의 라만 스펙트럼을 수집, 분석하고 영상화하는 기술, 스펙트럼 분석을 위한 컴퓨터 등으로 임상에서 연구도 활발히 진행되고 있다.

<3> 라만 분광학은 바이오 물질의 생화학적 구조에 대한 상세한 정보를 제공한다. 단색광의 빛을 샘플에 입사시켰을 때 이 빛에 의해서 산란된 빛이 발생한다. 이 빛을 검출했을 때, 입사 빛과 산란 빛 사이의 주파수 변동을 라만 변동으로 알려져 있는데, 이러한 변동은 특정한 분자의 회전에너지 혹은 진동 에너지 상태를 나타낸다. 이는 이 물질의 구성한 분자들만의 고유한 값으로 바이오 물질의 생화학적 정보를 알아낼 수 있다. 즉, 외부의 영향이나 내부의 변형을 고유한 값의 변화에 따라서 알아낼 수 있다. 이 점을 이용해 물질의 변형의 원인을 밝힐 수도 있고 변형에 따른 질병, 특히 암의 진단을 할 수 있다.

<4> 또한 라만을 이용한 다양한 질병의 진단에 대해 많은 연구가 되고 있다. 특히 암의 진단은 많은 발전을 이루어왔는데, 공진 라만을 이용해서 피부암의 진단의 가능성을 제시한 바 있고, 가시광선 광원을 사용하면서 자기 형광신호 감소법을 개발하여 피부암 진단에 적용한 적이 있다. 그러나 이 기술들은 샘플의 국소적인 부분만을 다루고 있다.

<5> 바이오 분야에서 이미징 기술은 주로 공초점 형광 현미경을 이용하는 방법이 주도되어 왔다. 그러나 형광 현미경의 경우 여러 분자의 다른 많은 분자들이 넓은 주파수 대역에서 형광을 발하기 때문에 특정 물질의 존재 여부를 확인하는 데 어려움이 있다. 라만 분광학을 이용한 이미징 기술의 경우, 광원의 파장의 네제곱에 반비례하게 신호 세기가 감소함에도 자기 형광신호로 인해 라만 신호 검출의 어려움 때문에 근적외선을 이용한 이미징 기술이 주로 발전 되어 왔다. 다만 최근에 공초점 마이크로 라만으로 자기 형광신호 감소법이 제시된 적은 있으나 이 역시 형광신호 감소를 시켜 라만 분광신호를 얻는 것에 그치고 라만 신호를 이미지화하는 것에는 이르지 못하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 바이오 물질의 변형을 진단하기 위해 공초점 마이크로 라만을 이용하여 생체 세포나 조직을 이미지화하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 이미지를 위한 장치를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

<7> 본 발명의 첫 번째 과제를 해결하기 위해 본 발명은 (a) 제 1 광원에 의해 가시광선 영역 파장의 빛을 발생시켜 제공하는 단계; (b) 상기 빛을 세포 또는 생체 조직 샘플의 한 개의 포인트에 입사시키는 단계; (c) 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 단계; (d) 상기 필터링된 빛을 분광기로 보내고 상기 분광기를 통과한 빛을 제 1 전하결합소자(charge-coupled device:CCD)로 보내 라만 신호를 검출하는 단계; (e) 포인트를 변환시켜 라만 신호를 검출하는 단계; 및 (f) 각 포인트에서 얻어진 라만 신호를 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키는 단계를 포함하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법을 제공한다.

<8> 상기 세포는 단세포 생물의 세포일 수 있다.

<9> 상기 가시광선은 400 내지 700nm의 파장인 것일 수 있다.

<10> 본 발명의 일 실시예로 상기 가시광선은 514.5nm의 파장인 것일 수 있다.

<11> 상기 포인트 위치의 변환이 모션 콘트롤러(Motion controller)에 의하여 이루어지는 것일 수 있다.

<12> 본 발명의 두 번째 과제를 해결하기 위해서, 레이저를 발생하는 제 1 광원(10); 상기 레이저의 빔 직경을 증가시키는 스페이셜 필터(spatial filter)(20); 상기 스페이셜 필터와 광학적으로 연결되는 광선 분리기 (beam splitter)(21); 상기 샘플의 위치변화를 제어하는 모션 콘트롤러(motion controller)(50); 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40); 상기 필터(40)를 통과한 빛의 스펙트럼을 분리시키는 분광기(111); 상기 분광기의 라만 신호를 받는 제 1 CCD (100); 및 상기 모션 콘트롤러(50)에 의해 위치한 포인트에서 얻어진 라만 신호들을 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 CCD 이미지를 표시하는 장치(110)를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치를 제공한다.

<13> 상기 라만 신호 영상화 장치는, 광학 이미지를 얻기 위한 제 2 광원(70); 상기 세포 및 생체 조직의 샘플에 제 2 광원의 빛을 입사시켜 상기 샘플을 투과시킨 빛을 검출하는 제 2 CCD 카메라(80); 및 상기 제 1 광원의 빛을 상기 샘플에 입사하여 산란된 빛은 상기 제 1 CCD로(100) 보내고, 상기 제 2 광원(70)의 빛을 샘플에 투과시켜 얻어진 빛은 상기 제 2 CCD 카메라(80)로 보내는 플립 미러(60)를 더 포함할 수 있고 이때 제 2 광원 (70)과 제 2 CCD 카메라(80) 사이에 대물렌즈(30)를 더 포함할 수 있다.

<14> 상기 제 1광원(10)은 아르곤(Ar) 이온 레이저일 수 있다.

<15> 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40)는 에지 필터 (Edge filer)일 수 있다.

<16> 상기 제 2 CCD 카메라(80) 앞에 줌(zoom)렌즈(90)를 설치하여 배율의 조절을 할 수 있다.

효 과

<17> 본 발명에 의해 생체 정상, 비 정상조직 및 세포 정확한 생화학적 정보를 제공할 수 있기 때문에 생체물질의 변

형의 근원을 규명하거나 변형을 진단할 수 있으며 나아가 질병의 상태나 원인 등을 진단하거나 규명할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 암 유발 세포 및 조직에서의 암 및 생화학적 변화의 조기 진단에 사용될 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <18> 본 발명은 가시광선 광원을 사용하는 공초점 마이크로 라만 이미징 분광법을 생체 조직과 단세포 생물에 적용하여 라만 이미지를 측정하는 것이다. 신호의 세기를 증가하도록 공초점 기술을 이용하여 자기 형광신호를 감소시켰고, 특히 기존의 공초점 마이크로 라만 시스템과 다르게 플립 미러(flip mirror)를 이용하여 라만 시스템과 광학 현미경 시스템을 구별해서 라만 신호의 감소를 막을 수 있다. 또한 광학 현미경의 배율 향상을 위해서 광학 현미경 CCD 카메라 앞에 줌렌즈가 설치된다.
- <19> 이하 도면 및 실시예 등을 이용하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 하지만, 하기의 도면 및 실시예 등은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 이에 본 발명이 제한되거나 한정되지 않는다.
- <20> 본 발명은 (a) 제 1 광원에 의해 가시광선 영역 파장의 빛을 발생시켜 제공하는 단계; (b) 상기 빛을 세포 또는 생체 조직 샘플의 한 개의 포인트에 입사시키는 단계; (c) 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 단계; (d) 상기 필터링된 빛을 분광기로 보내고 상기 분광기를 통과한 빛을 제 1 전하결합 소자(charge-coupled device:CCD)로 보내 라만 신호를 검출하는 단계; (e) 포인트의 위치를 변환시켜 라만 신호를 검출하는 단계; 및 (f) 각 포인트에서 얻어진 라만 신호를 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키는 단계를 포함하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 방법을 제공한다. 상기의 방법에 대하여는 하기의 장치를 통하여 상세하게 설명하기로 한다.
- <21> 상기 세포의 일 실시예로 세포는 단세포 생물의 세포일 수 있다. 정상 조직과 비 정상 조직간의 변이 차이점을 발견하기 수단으로 라만 신호 이미지화 기술은 유용하며, 단세포 생물의 세포를 관찰하는데에도 좋은 수단이 된다.
- <22> 상기 가시 광선은 400 내지 700 nm의 파장을 가지는 것일 수 있는데 일 실시예로 상기 가시광선은 514.5nm의 파장인 것일 수 있다. 바이오 분야에서 가시광선의 광원을 사용한 경우 자기 형광(auto-fluorescence)이 발생하고, 자기 형광은 라만 신호의 감소를 가져오기 때문에 주로 근적외선 광원을 사용한 라만 이미지 실험이 이루어져 왔다. 그런데 라만 신호는 광원의 파장의 사승에 반비례하므로 가시광선의 광원을 이용할 경우에 라만 신호의 세기를 증가시킬 수 있다. 그래서 자기형광을 감소시킬 수만 있다면 근적외선보다 가시광선의 경우에 광학장치들이 더 발달 되어 있기 가시광선의 광원을 사용하는 경우가 광학계를 최적화하는데 유리하다. 따라서 본 발명은 자기 형광을 감소시킬 수 있는 방법을 적용하여 라만 신호의 세기를 증가시킬 수 있는 가시광선 영역의 파장의 광원을 사용한다.
- <23> 상기 포인트 위치의 변환이 모션 콘트롤러(Motion controller)에 의하여 이루어지는 것일 수 있다. 샘플의 한 포인트에서 라만 신호가 얻어지면 모션 콘트롤러의 제어를 통하여 샘플의 다른 포인트를 이동하여 이 포인트의 라만 신호를 측정하며, 이러한 방식으로 수집된 라만 신호는 샘플 전체의 이미지화를 위하여 사용된다.
- <24> 본 발명은, 레이저를 발생하는 제 1 광원(10); 상기 레이저의 빔 직경을 증가시키는 스페이셜 필터(spatial filter)(20); 상기 스페이셜 필터와 광학적으로 연결되는 광선 분리기 (beam splitter)(21); 상기 샘플의 위치변화를 제어하는 모션 콘트롤러(motion controller)(50); 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40); 상기 필터(40)를 통과한 빛의 스펙트럼을 분리시키는 분광기(111); 상기 분광기의 라만 신호를 받는 제 1 CCD(100); 및 상기 모션 콘트롤러(50)에 의해 위치한 포인트에서 얻어진 라만 신호들을 수집하여 상기 세포 또는 생체 조직의 영상으로 변환시키고 변환된 CCD 이미지를 표시하는 장치(110)를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 또는 생체 조직의 라만 신호 영상화 장치를 제공한다.
- <25> 상기 라만 신호 영상화 장치는, 광학 이미지를 얻기 위한 제 2 광원(70); 상기 세포 및 생체 조직의 샘플에 제 2 광원의 빛을 입사시켜 상기 샘플을 투과시킨 빛을 검출하는 제 2 CCD 카메라(80); 및 상기 제 1 광원의 빛을 상기 샘플에 입사하여 산란된 빛은 상기 제 1 CCD로(100) 보내고, 상기 제 2 광원(70)의 빛을 샘플에 투과시켜 얻어진 빛은 상기 제 2 CCD 카메라(80)로 보내는 플립 미러(60)를 더 포함할 수 있고 이때 제 2 광원(70)과 제 2 CCD 카메라(80) 사이에 대물렌즈(30)를 더 포함할 수 있다.
- <26> 도 1은 가시광선 영역의 제 1 광원과, 스페이셜 필터(spatial filter), 줌렌즈(Zoom lens)를 사용한

공초점 마이크로 라만 스캐닝 시스템 도식도이다. 도 1을 참조하면, 제 1 광원(10)으로부터 발생한 빛이 스페이셜 필터(20)를 통과하여 빔직경(beam diameter)가 증가하고 클린업(clean up)된 514.5 nm의 파장을 가진 광원이 대물렌즈(30)를 통과하여 약 1 μ m의 크기로 샘플에 초점을 형성하게 된다. XY transition stage 시스템을 이용하여 샘플의 위치를 변화시키고 각 위치에서 여기 된 빛을 에지필터(40)와 제 1 CCD(100)를 이용하여 라만 신호로 검출한다. 광학 이미지를 얻기 위해서 추가적으로 제 2 CCD 카메라(80)를 장착되고 광학현미경의 배율 향상을 위해서 제 2 CCD 카메라(80) 앞에 줌렌즈(90)가 설치된다. 제 1 CCD 카메라(100)를 통과한 라만 신호를 변환시키고 변환된 CCD 이미지를 표시하기 위한장치(110)로 보내진다. 상기 변환 및 표시 장치의 일 실시예로는 모니터를 포함하는 개인용 컴퓨터가 될 수 있다.

<27> 공초점 라만 시스템과 광학 현미경을 구별해 줌으로써 라만 신호의 감소를 막기 위해 플립 미러(60)가 설치된다. 통상의 라만 시스템에서는 라만 신호를 검출하는 CCD와 광학 이미지를 측정하는 CCD 카메라를 광선 분리기(Beam splitter)(21) 통해서 나누어 진다. 이 경우 광선 분리기의 특성상 라만 신호와 광학이미지 신호가 분리되기 때문에 라만 및 광학 신호가 감소할 수밖에 없는데 본 발명과 같이 플립 미러(60)를 사용하면 라만 시스템과 광학 현미경 시스템을 선택하여 사용할 수 있기 때문에 라만 신호나 광학이미지 신호가 감소하지 않는다.

<28> 상기 제 1광원(10)은 아르곤(Ar) 이온 레이저일 수 있다. 아르곤 레이저는 514.5nm의 파장을 가지는 광원을 발생하기 때문이다.

<29> 상기 샘플로부터 산란된 빛에서 광원 파장의 빛을 필터링하는 필터(40)는 에지 필터 (Edge filter)일 수 있다. 본 발명의 라만 신호를 측정할 때, 샘플에서 산란된 빛은 여기광(514.5nm)과 라만 정보를 가지고 있는 빛으로 이루어져 있고, 여기광을 제거해주는 역할을 하는 것이 에지 필터이다. 에지 필터는 기준 진동수(frequency) 보다 작은 진동수는 통과시키고 큰 진동수는 통과시키지 않는데, 즉 기준 파장보다 큰 파장은 통과시키고 작은 파장은 통과시키지 않는다. 따라서 기준 파장이 514.5nm 이라면 514.5nm 파장은 제거되고 그보다 큰 파장, 즉 라만 정보를 갖는 빛은 통과시켜서 CCD로 라만 신호를 검출할 수 있다.

<30> 상기 제 2 CCD 카메라(80) 앞에 줌렌즈(90)를 설치하여 배율의 조절을 할 수 있다. 이는 광학 이미지를 구현하는 광학 현미경의 기능을 강화하여 광학 이미지를 더욱 자세하게 관찰할 수 있게 한다.

<31>

<32> 실시예 1 : 샘플제작

<33> 클라미도모나스(Chlamydomonas reinhardtii CC124) 균들을 엠펜실린(ampicillin, 50 μ g/ml)의 존재하에서 TAP (Tris-Acetate-Phosphate) 배지에서 온도 30 $^{\circ}$ C로 유지하여 배양하였다. (미국, Chlamy Core Collection Center에서 제공)를 중간 상태(mid-log phase)까지 배양한 후 TAP 배지로 희석한 다음 슬라이드 글라스에 한 방울 (10 μ L) 떨어뜨리고 진공상태로 말려 측정에 사용하였다.

<34> 실시예 2 : 라만 신호 및 광학 이미지 측정

<35> 공초점 마이크로 라만 분광은 공초점 라만 스캐닝 시스템을 사용하여 수행하였다. 514.5 nm의 파장을 가진 아르곤 이온 레이저 (Coherent 307C)를 여기광으로 이용하였으며, 대물렌즈를 통과한 레이저 빛은 약 1 μ m의 크기로 초점을 형성시켰다. 에지 필터와 전하 결합소자(CCD)를 이용하여 라만 신호를 검출하였다. 샘플의 광학 이미지를 얻기 위해서 추가적으로 CCD 카메라를 장착하였고 광학현미경의 배율 향상을 위해서 CCD 카메라 앞에 줌렌즈를 사용하였다.

<36> 실험예 1 : 단세포 생물 (클라미도모나스)의 라만 신호 및 이미징

<37> 도 2는 단세포 생물인 클라미도모나스의 주요 라만 스펙트럼이다. 도 2를 참조하면, 공초점 마이크로 라만 분광법을 이용하여 단세포 생물, 클라미도모나스의 카로테노이드와 관련한 진동모드는 각각 1015 cm^{-1} , 1159 cm^{-1} , 1524 cm^{-1} 이다. 도 3은 단세포 생물인 클라미도모나스의 광학 현미경 이미지이다. 도 4는 단세포 생물인 1524 cm^{-1} 를 기준으로 측정한 클라미도모나스의 공초점 라만 이미지이다. 도 3과 도4를 비교하면 광학 현미경 이미지와 라만 이미지의 차이점을 발견할 수 있다. 즉 라만 이미지로부터는 광학 현미경으로 확인할 수 없는 세포의 구성요소인 핵, 엽록체를 파악할 수 있다. 이 기술을 바탕으로 세포나 조직의 생화학적 변화를 2D 이미지화 시키면 바이오 물질의 변형을 진단할 수 있을 것이다.

<38> 실험예 2 : 쥐의 폐 생체 정상조직 라만 신호 및 이미징

<39> 도 5는 쥐의 폐 정상조직의 주요라만 스펙트럼이다. 도 5를 참조하면, 공초점 마이크로 라만 분광법을 이용하여 생체조직의 리피드와 단백질 (lipid and protein), Amide I, C-H bonding의 진동 모드를 각각 $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 에서 관찰할 수 있다. 도 6은 쥐의 폐 정상조직의 광학 현미경 이미지이다. 도 7은 $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ (C-H bonding 모드)를 기준으로 얻은 쥐의 폐 정상조직 라만 이미지이다. 도 6과 도 7을 비교하면 라만 이미지가 광학현미경 이미지와 정확하게 일치하는 것을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<40> 도 1은 가시광선 영역의 제 1 광원과, 스페이셜 필터(spatial filter), 줌렌즈(Zoom lens)를 사용한 공초점 마이크로 라만 스캐닝 시스템 도식도이다.

<41> 도 2는 단세포 생물인 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)의 주요라만 스펙트럼이다. 도 3은 단세포 생물인 클라미도모나스의 광학 현미경 이미지이다.

<42> 도 4는 단세포 생물인 클라미도모나스의 공초점 라만 이미지이다.

<43> 도 5는 쥐의 폐 정상조직의 주요라만 스펙트럼이다.

<44> 도 6은 쥐의 폐 정상조직의 광학 현미경 이미지이다.

<45> 도 7은 쥐의 폐 정상조직의 공초점 라만 이미지이다.

<46> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

<47> 10 : 제 1 광원 20 : 스페이셜 필터

<48> 21 : 광선 분리기 30 : 대물렌즈

<49> 40 : 에지 필터 50 : 모션 컨트롤러

<50> 60 : 플립 미러 70 : 제 2 광원

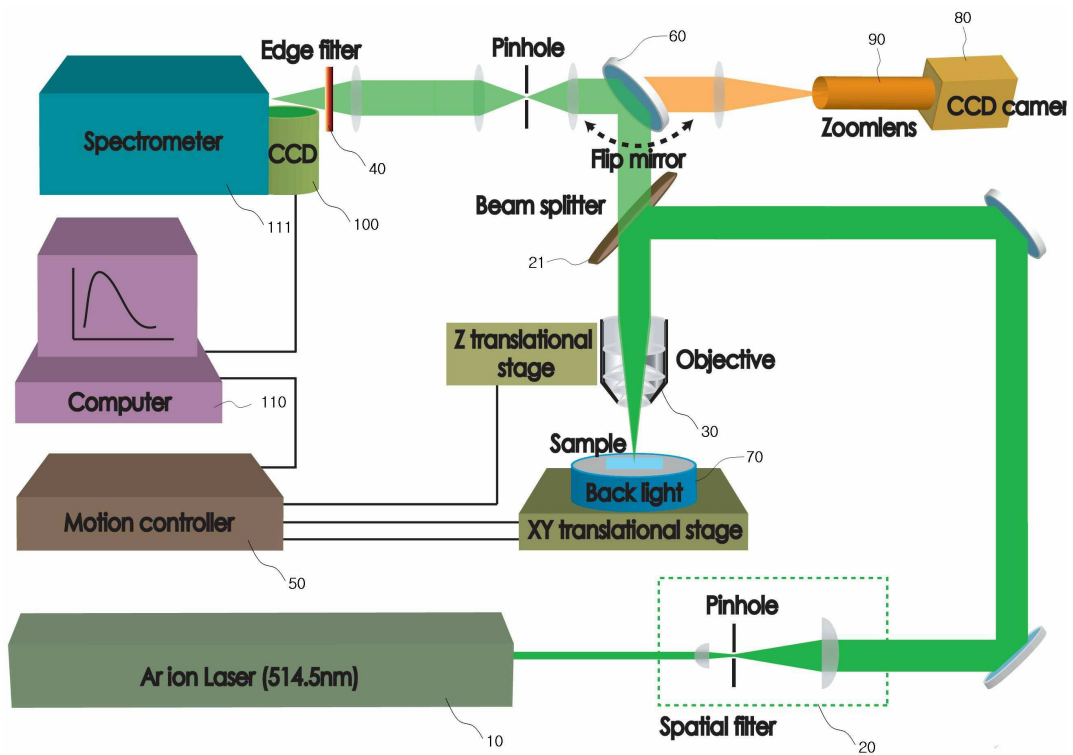
<51> 80 : 제 2 CCD 카메라 90 : 줌렌즈

<52> 100 : 제 1 CCD 110 : CCD 이미지 표시 장치

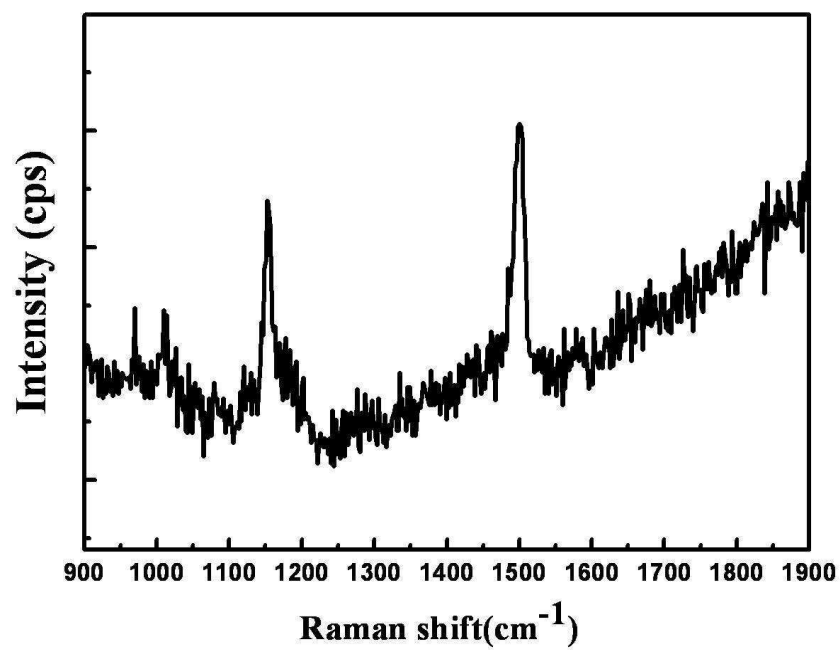
<53> 111 : 분광기

도면

도면1



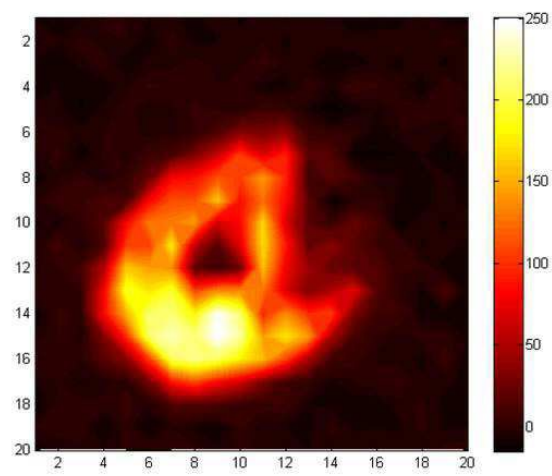
도면2



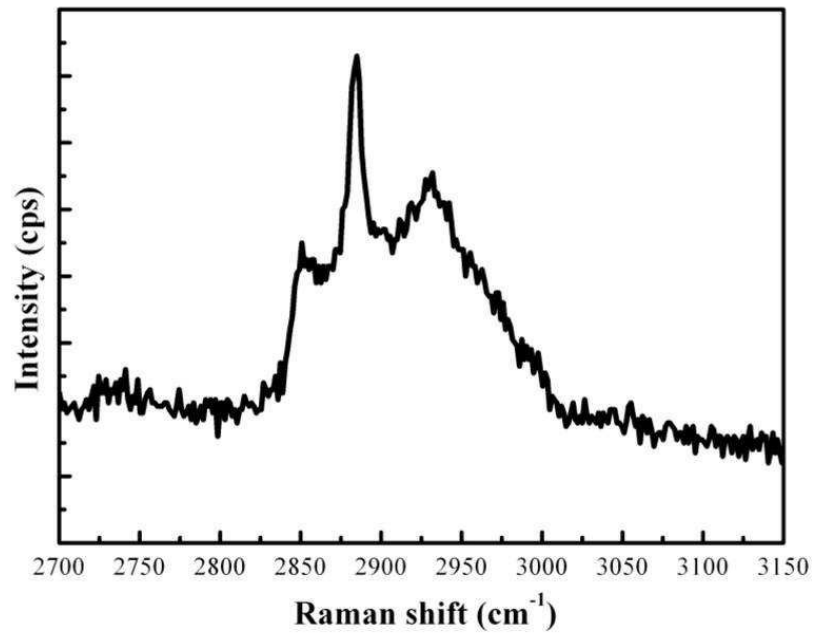
도면3



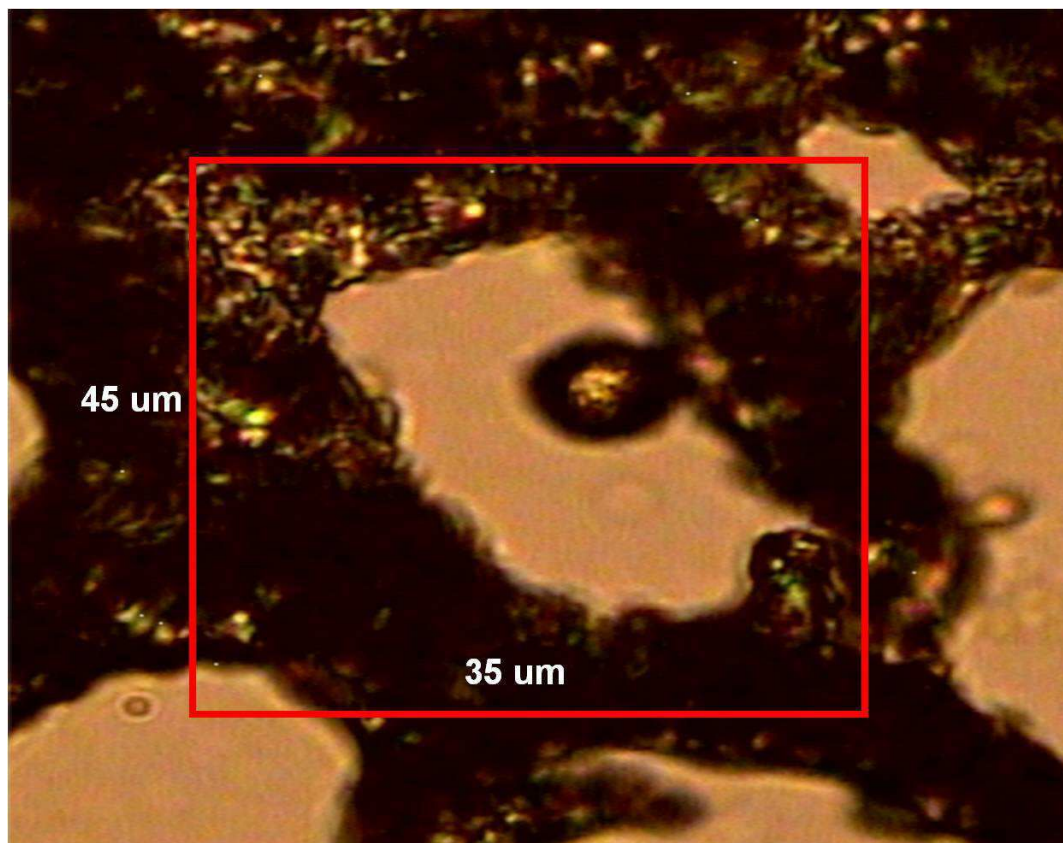
도면4



도면5



도면6



도면7

