(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 4 월 25 일 (25.04.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/078578 A1

(51) 국제특허분류:
G02B 21/08 (2006.01) *G02B 21/36* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012170

(22) 국제출원일: 2018 년 10 월 16 일 (16.10.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0135008 2017 년 10 월 18 일 (18.10.2017) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 기초과학연구원 (**INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE**) [KR/KR]; 34126 대전시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **심상희 (SHIM, Sang Hee)**; 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 202동 701호., Seoul (KR). **권지웅 (KWON, Ji Woong)**; 06139 서울시 강남구 테헤란로39길 37-4, 201호., Seoul (KR).

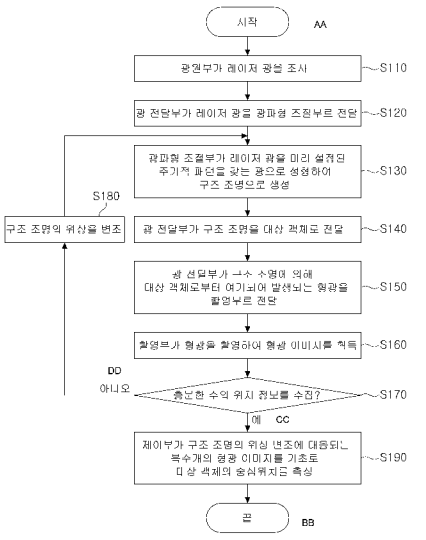
(74) 대리인: **김순웅 (KIM, Soon Woong)**; 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호., Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR MEASURING CENTRAL LOCATION OF SINGLE MOLECULE USING STRUCTURED ILLUMINATION AND PHASE DETECTION

(54) 발명의 명칭: 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법



S110 ... Light source unit emits laser light
S120 ... Light transmission unit transmits laser light to light waveform control unit
S130 ... Light waveform control unit forms laser light into light having predetermined periodic pattern and generates same into structured illumination
S140 ... Light transmission unit transmits structured illumination to target object
S150 ... Light transmission unit transmits, to capturing unit, fluorescence generated by excitation from target object by structured illumination
S160 ... Capturing unit captures fluorescence so as to acquire fluorescence image
S170 ... Have sufficient amount of location information been collected?
S180 ... Modulate phase of structured illumination
S190 ... Control unit measures central location of target object on basis of plurality of fluorescence images corresponding to modulation of phase of structured illumination
AA ... Start
BB ... End
CC ... Yes
DD ... No

(57) Abstract: The present invention enables the central location of a single molecule to be measured by changing a phase of a structured illumination, the phase having a periodic pattern, and receiving an optical signal released from the single molecule, and thus the central location of the single molecule may be measured by displacing the periodic pattern by a predetermined interval and measuring the phase of the pattern of which the fluorescence intensity periodically changes according to the distance between the pattern and the single molecule, and the accuracy of the central location of the single molecule may be increased by means of low photons, and as a result, the resolution of an image may be enhanced.

(57) 요약서: 본 발명은, 주기적 패턴을 갖는 구조 조명의 위상을 변화시키면서 단분자에서 방출된 광 신호를 수신하여 단분자의 중심 위치를 측정함으로써, 주기적인 패턴을 특정 간격으로 이동시키면서 패턴과 단분자 간 거리에 따라 형광 세기가 주기적으로 변하는 패턴의 위상을 측정하여 해당 단분자의 중심위치를 측정할 수 있고, 낮은 광자로 단분자의 중심 위치의 정확도를 향상시킬 수 있으며, 이로 인해 이미지의 해상도를 향상시킬 수 있다.

WO 2019/078578 A1

[다음 쪽 계속]

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법

기술분야

[1] 본 발명은 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 레이저 광을 주기적 패턴을 갖는 구조 조명으로 성형하고, 구조 조명의 위상을 변화시키면서 단분자에서 방출된 광 신호를 수신하여 단분자의 중심 위치를 측정하는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 단분자의 중심위치를 획득하기 위해 다양한 방법이 현재 이용되고 있다. 그 중 가장 널리 사용되는 방법은 단일 분자의 픽셀화된 2차원 이미지를 2차원의 함수(예컨대, 가우시안이나 에어리 함수)로 근사하여 해당 단일 분자의 중심위치를 측정하는 것이다. 이 방법은 이미지와 함수의 차이를 최소화시키는 함수의 중심위치 값을 비선형 회귀분석 또는 최대가능도추정량을 통하여 계산하며, 일반 형광분자에 대해 수십 나노미터의 정확도를 가지고 있다. 그러나, 이 방법은 한정된 광자수를 여러 픽셀로 나누어 측정하기 때문에 측정 가능한 광자수에 한계가 있다. 또한, 각 픽셀 간의 감도 및 노이즈의 차이에 의하여 위치 측정의 정확도가 떨어지는 문제가 있다.

[3] 최근(2017년) 발표된 다른 방법은 중심 세기가 0인 도넛형으로 성형한 빛을 이용하여 형광분자를 여기시킬 때, 빛의 중심과 분자 간 거리에 따라 형광세기가 달라지는 것을 이용하여 단일 분자의 중심위치를 측정하는 것이다. 이 방법은 위에서 설명한 방법에 비해 낮은 광자수를 가지고도 수 나노미터의 정확도를 얻을 수 있다. 그러나, 이 방법은 수백 나노미터의 면적에 집중된 도넛형 빛을 사용하여 좁은 면적에 국한된 분자들의 위치 측정만이 가능한 단점이 있다.

[4] 이에 따라, 임의의 분포와 구조를 가지는 분자들을 대상으로 분자의 중심위치를 보다 높은 정확도로 측정할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 낮은 광자로 단분자의 중심 위치의 정확도를 향상시키고 대면적에서 임의의 위치와 구조로 분포된 다수의 광자들의 위치를 편리하게 측정할 수 있는 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[6] 상기의 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치는, 레이저 광을 조사하는 광원부; 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는

광으로 성형하여 구조 조명을 생성하는 광파형 조절부; 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득하는 촬영부; 및 상기 광파형 조절부를 통해 생성되는 상기 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명에 대응되는 형광 이미지를 상기 촬영부를 통해 획득하고, 획득된 복수개의 형광 이미지를 기초로 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 제어부를 포함한다.

[7] 상기 제어부는 상기 복수개의 형광 이미지로부터 상기 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 상기 대상 객체의 중심위치를 측정할 수 있다.

[8] 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광파형 조절부로 전달하고, 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 대상 객체로 전달하며, 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 촬영부로 전달하는 광 전달부를 더 포함할 수 있다.

[9] 상기 광 전달부는 광섬유; 제1 편광 조절판; 거울; 편광 빛 분리기; 제2 편광 조절판; 제1 렌즈; 제3 편광 조절판; 마스크; 파장 선택 거울; 제2 렌즈; 제3 렌즈; 및 파장 선택 필터를 포함하며, 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광섬유, 상기 제1 편광 조절판, 상기 거울, 상기 편광 빛 분리기, 및 상기 제2 편광 조절판을 거쳐 상기 광파형 조절부로 전달하고, 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 제2 편광 조절판, 상기 편광 빛 분리기, 상기 제1 렌즈, 상기 제3 편광 조절판, 상기 마스크, 상기 파장 선택 거울, 및 상기 제2 렌즈를 거쳐 상기 대상 객체로 전달하며, 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 제2 렌즈, 상기 파장 선택 거울, 상기 제3 렌즈, 및 상기 파장 선택 필터를 거쳐 상기 촬영부로 전달할 수 있다.

[10] 상기 광 전달부는 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 현미경을 통해 상기 대상 객체로 전달하고, 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 현미경을 통해 전달받을 수 있다.

[11] 상기 구조 조명은 줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광일 수 있다.

[12] 상기의 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법은, 광원부, 광파형 조절부, 촬영부 및 제어부를 포함하는 단분자 중심위치 측정 장치의 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법으로서, 상기 광원부가 레이저 광을 조사하는 단계; 상기 광파형 조절부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명을 생성하는 단계; 상기 촬영부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득하는 단계; 및 상기 제어부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성되는 상기 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명에 대응되는 형광 이미지를 상기 촬영부를

통해 획득하고, 획득된 복수개의 형광 이미지를 기초로 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 단계를 포함한다.

[13] 상기 중심위치 측정 단계는 상기 제어부가 상기 복수개의 형광 이미지로부터 상기 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 것으로 이루어질 수 있다.

[14] 상기 단분자 중심위치 측정 장치는 광 전달부를 더 포함하며, 상기 광 전달부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광파형 조절부로 전달하는 단계; 상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 대상 객체로 전달하는 단계; 및 상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 촬영부로 전달하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[15] 상기 광 전달부는 광섬유; 제1 편광 조절판; 거울; 편광 빛 분리기; 제2 편광 조절판; 제1 렌즈; 제3 편광 조절판; 마스크; 파장 선택 거울; 제2 렌즈; 제3 렌즈; 및 파장 선택 필터를 포함하며, 상기 레이저 광 전달 단계는 상기 광 전달부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광섬유, 상기 제1 편광 조절판, 상기 거울, 상기 편광 빛 분리기, 및 상기 제2 편광 조절판을 거쳐 상기 광파형 조절부로 전달하는 것으로 이루어지고, 상기 구조 조명 전달 단계는 상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 제2 편광 조절판, 상기 편광 빛 분리기, 상기 제1 렌즈, 상기 제3 편광 조절판, 상기 마스크, 상기 파장 선택 거울, 및 상기 제2 렌즈를 거쳐 상기 대상 객체로 전달하는 것으로 이루어지며, 상기 형광 전달 단계는 상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 제2 렌즈, 상기 파장 선택 거울, 상기 제3 렌즈, 및 상기 파장 선택 필터를 거쳐 상기 촬영부로 전달하는 것으로 이루어질 수 있다.

[16] 상기 구조 조명 전달 단계는 상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 현미경을 통해 상기 대상 객체로 전달하는 것으로 이루어지고, 상기 형광 전달 단계는 상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 현미경을 통해 전달받는 것으로 이루어질 수 있다.

[17] 상기 구조 조명은 줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광일 수 있다.

[18] 상기의 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명에 따른 컴퓨터 프로그램은 컴퓨터로 읽을 수 있는 기록 매체에 저장되어 상기한 방법 중 어느 하나를 컴퓨터에서 실행시킨다.

발명의 효과

[19] 본 발명에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법에 의하면, 주기적인 패턴을 특정 간격으로 이동시키면서 패턴과 단분자 간 거리에 따라 형광 세기가 주기적으로 변하는 패턴의 위상을 측정하여 해당

단분자의 중심위치를 측정할 수 있다.

[20] 또한, 한 단분자에서 발광된 모든 광자를 하나로 모아 그 세기를 이용하여 낮은 광자로 단분자의 중심 위치의 정확도를 향상시킬 수 있고, 이로 인해 이미지의 해상도를 향상시킬 수 있다.

[21] 아울러, 본 발명은 집중된 빛 대신 2차원의 넓은 영역에 반복되는 패턴의 여기빛을 이용하므로 대면적에서 임의의 위치와 구조로 분포된 다수의 광자들의 위치도 편리하게 측정할 수 있다. 즉, 주기적인 패턴을 사용하고 패턴의 위치를 주기만큼 스캔하는 과정을 통해 특정 영역에 국한되지 않고 임의의 대면적에 적용할 수 있다. 그리고, 임의의 크기와 모양의 구조체를 수 나노미터의 해상도로 초고분해능 광학 이미징을 수행할 수 있어, 기존의 초고분해능 광학 현미경보다 해상도를 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치를 설명하기 위한 블록도이다.

[23] 도 2는 도 1에 도시한 단분자 중심위치 측정 장치의 구성을 설명하기 위한 블록도이다.

[24] 도 3은 도 1에 도시한 단분자 중심위치 측정 장치의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[25] 도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명의 위상 변조의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[26] 도 5는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 편광 조절의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[27] 도 6은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 단분자 중심위치 측정의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[28] 도 7은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정의 성능을 설명하기 위한 도면이다.

[29] 도 8은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[30] 이하에서 첨부한 도면을 참조하여 본 발명에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치 및 방법의 바람직한 실시예에 대해 상세하게 설명한다.

[31] 먼저, 도 1을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치에 대하여 설명한다.

[32] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치를 설명하기 위한 블록도이다.

[33] 도 1을 참조하면, 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을

이용한 단분자 중심위치 측정 장치(이하 '측정 장치'라 한다)(100)는 레이저 광을 주기적 패턴을 갖는 구조 조명으로 성형한다. 그리고, 측정 장치(100)는 구조 조명을 현미경(200)에 전달한다. 그러면, 현미경(200)은 구조 조명을 대상 객체(예컨대, 단분자 등)에 조사하고, 대상 객체에서 방출되는 형광을 수신하여 측정 장치(100)로 전달한다.

[34] 또한, 측정 장치(100)는 구조 조명의 위상을 변화시키면서 대상 객체(예컨대, 단분자)에서 방출된 형광을 현미경(200)을 통해 수신하여 단분자의 중심 위치를 측정한다.

[35] 즉, 측정 장치(100)는 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴으로 성형된 구조 조명으로 대상 객체를 여기시키고, 구조 조명의 위치를 변조시키면서 측정한 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출함으로써 해당 대상 객체의 중심 위치를 보다 정확하게 측정할 수 있다.

[36]

[37] 한편, 측정 장치(100)와 현미경(200)이 서로 독립적인 장치인 것으로 도 1에 도시하였으나, 이에 한정되지 않고 실시예에 따라 측정 장치(100)와 현미경(200)은 하나의 장치로 구현될 수 있다. 예컨대, 현미경(200)이 측정 장치(100)의 내부의 한 모듈로 구현되고, 측정 장치(100)가 구조 조명을 대상 객체에 직접 조사하고, 대상 객체로부터 방출된 형광을 직접 수신할 수 있다.

[38]

[39]

[40] 그러면, 도 2 및 도 3을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치에 대하여 보다 자세하게 설명한다.

[41] 도 2는 도 1에 도시한 단분자 중심위치 측정 장치의 구성을 설명하기 위한 블록도이고, 도 3은 도 1에 도시한 단분자 중심위치 측정 장치의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[42] 도 2 및 도 3을 참조하면, 측정 장치(100)는 광원부(110), 광파형 조절부(130), 촬영부(150), 광 전달부(170) 및 제어부(190)를 포함할 수 있다.

[43] 광원부(110)는 레이저 광을 조사한다. 즉, 광원부(110)는 광원으로 레이저 광원을 이용한다. 레이저 광원은 간섭광(coherent light)의 특징으로 인해 본 발명에 따른 구조 조명의 패턴을 만들기에 용이하다. 또한, 레이저 광원은 많은 광량으로 인해 광학 기기 및 부품에서 발생할 수 있는 광량 손실을 대비할 수 있고, 대면적 측정을 위한 충분한 여기 광량을 확보할 수 있다 예컨대, 광원부(110)는 연속 발진형 레이저 광원, 펄스형 레이저 광원 등을 광원으로 이용할 수 있다.

[44]

[45]

[46] *광파형 조절부(130)는 광원부(110)를 통해 조사되는 레이저 광을 미리 설정된

주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명을 생성한다. 여기서, 구조 조명은 줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광을 말한다

[47] 즉, 광파형 조절부(130)는 입사된 빛의 위상을 변화시켜 레이저 광으로부터 구조 조명을 생성할 수 있다. 예컨대, 광파형 조절부(130)는 픽셀들로 이루어진 액정 패널을 구비하고, 액정패널을 제어하여 입사된 빛의 위상을 변화시켜 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광인 구조 조명을 생성할 수 있다.

[48] 예컨대, 광파형 조절부(130)는 레이정 광으로부터 사인 함수의 모양을 갖는 줄무늬 패턴으로 이루어진 구조 조명을 생성할 수 있다. 물론, 광파형 조절부(130)는 줄무늬 패턴 이외에도 격자무늬, 물결무늬 등과 같이 패턴이 주기성을 갖는 광을 구조 조명으로 생성할 수 있다. 이하, 구조 조명은 줄무늬 패턴을 갖는 것으로 가정하고 이하 설명한다.

[49] 줄무늬 패턴을 갖는 구조 조명을 생성하기 위해, 광파형 조절부(130)는 회절 격자의 역할을 수행하며, 거시적 관점에서 입사된 빛을 두 경로로 나누어 반사할 수 있다. 이는 차후 불필요한 빛을 제거하는 과정을 거쳐 현미경(200)의 대물 렌즈의 뒷면에 초점을 형성하게 되고, 결과적으로 대물 렌즈의 초점에서 상쇄/보강 간섭을 통해 줄무늬 구조를 형성하게 된다.

[50] 그리고, 광파형 조절부(130)는 제어부(190)의 위상제어 신호에 따라 구조 조명의 위상을 변조시킨다.

[51] 즉, 광파형 조절부(130)는 전압을 통해 액정 패널의 배열 구조를 변경함으로써 입사된 빛에 위상 차이를 가하여 구조 조명의 위상을 변조시킬 수 있다. 예컨대, 광파형 조절부(130)는 회절 격자로 작용하기 위해 위상 차이를 0 또는 파이만큼 줄 수 있는 액정 배열을 특정 주기로 구성할 수 있다. 이때, 주기를 유지하면서 배열 순서를 바꾸어주면 반사되어 나가는 빛의 경로가 변화하게 되고, 이는 현미경(200)의 대물 렌즈의 초점에 형성된 구조 조명의 위상 차이를 야기할 수 있다. 광파형 조절부(130)에 설정된 액정 주기에 따라 구조 조명에 가해지는 위상차가 결정되게 된다.

[52] 또한, 광파형 조절부(130)는 촬영부(150)와 동기화되어 동작된다. 즉, 촬영부(150)에서 한 장의 형광 이미지를 획득할 때 광파형 조절부(130)는 단일 위상을 갖는 구조 조명을 생성하게 되고, 촬영부(150)가 다음 형광 이미지를 획득할 때에는 위상차를 발생시킬 수 있도록 광파형 조절부(130)가 액정 배열을 조정하게 된다. 예컨대, 광파형 조절부(130)는 촬영부(150)로 동기화 신호를 전달하여 촬영부(150)가 광파형 조절부(130)의 구조 조명 위상 변조에 동기화 되어 형광 이미지를 획득할 수 있도록 제어할 수 있다. 물론, 촬영부(150)가 광파형 조절부(130)로 동기화 신호를 전달하여 광파형 조절부(130)와 촬영부(150)의 동기화가 이루어질 수도 있다.

[53] 한편, 광파형 조절부(130)가 액정 패널을 구비하고, 전압을 통해 액정 패널의 배열 구조를 변경하는 것으로 설명하였으나, 이에 한정되지 않고 실시예에 따라

특정 구조 조명에 최적화된 위상판 또는 회절 격자를 사용하고 전동 장치를 통해 이를 움직이거나 거울 스캔을 통해 빛을 움직여 위상을 조절하는 방식을 이용할 수도 있다.

[54]

[55] 촬영부(150)는 광파형 조절부(130)를 통해 생성된 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득한다.

[56]

[57] 광 전달부(170)는 레이저 광, 구조 조명, 형광 등을 광파형 조절부(130), 촬영부(150), 현미경(200) 등에 전달한다. 이를 위해, 광 전달부(170)는 광섬유(171), 제1 편광 조절판(172a), 거울(173), 편광 빛 분리기(174), 제2 편광 조절판(172b), 제1 렌즈(175a), 제3 편광 조절판(172c), 마스크(176), 파장 선택 거울(177), 제2 렌즈(175b), 제3 렌즈(175c) 및 파장 선택 필터(178)를 포함할 수 있다.

[58] 즉, 광 전달부(170)는 광원부(110)를 통해 조사되는 레이저 광을 광파형 조절부(130)로 전달한다. 광 전달부(170)는 광원부(110)를 통해 조사되는 레이저 광을 광섬유(171), 제1 편광 조절판(172a), 거울(173), 편광 빛 분리기(174) 및 제2 편광 조절판(172b)을 거쳐 광파형 조절부(130)로 전달할 수 있다.

[59] 그리고, 광 전달부(170)는 광파형 조절부(130)를 통해 생성된 구조 조명을 현미경(200)을 통해 대상 객체로 전달한다. 광 전달부(170)는 광파형 조절부(130)를 통해 생성된 구조 조명을 제2 편광 조절판(172b), 편광 빛 분리기(174), 제1 렌즈(175a), 제3 편광 조절판(172c), 마스크(176), 파장 선택 거울(177) 및 제2 렌즈(175b)를 거쳐 현미경(200)을 통해 대상 객체로 전달할 수 있다.

[60] 또한, 광 전달부(170)는 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 현미경(200)을 통해 전달받고, 형광을 촬영부(150)로 전달한다. 광 전달부(170)는 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 현미경(200)을 통해 전달받고, 형광을 제2 렌즈(175b), 파장 선택 거울(177), 제3 렌즈(175c) 및 파장 선택 필터(178)를 거쳐 촬영부(150)로 전달할 수 있다.

[61] 여기서, 광섬유(171)는 레이저 광의 공간적 패턴을 가우시안 형태로 만들어 줄 수 있는 단일모드 광섬유일 수 있다. 또한, 광섬유(171)로 편광 유지 광섬유를 사용하면, 광량 손실을 최소화하면서 구조 조명에 필요한 편광 조절을 할 수 있다. 편광 유지 광섬유를 사용하지 않을 경우, 광섬유 이후 선편광을 만들기 위해 편광판을 도입해야 하며, 이 과정에서 많은 수준의 광량 손실이 발생될 수 있다. 광섬유(171)는 수 마이크로미터 수준의 지름을 갖는 핀홀로 대체될 수 있다. 한편, 일반적인 레이저 광원을 가정하고 광원의 공간적 패턴을 가우시안 형태로 만들기 위해 광섬유(171)나 핀홀을 사용하였으나, 광섬유 레이저와 같이 발진 형태가 가우시안 형태인 광원을 사용할 경우, 광섬유(171)는 사용하지 않을 수 있다.

[62] 그리고, 이상적인 구조 조명을 만들기 위해서는 진행하는 빛의 편광을 적절히 조절해야 한다. 이 과정은 편광 조절판(172a, 172b, 172c)과 편광 빛 분리기(174)를 이용해 이루어질 수 있다. 제1 편광 조절판(172a)은 λ/2 종류를 사용하며, 선편광의 방향을 조절할 수 있다. 제2 편광 조절판(172b)은 λ/4 종류를 사용하며, 선편광과 원편광을 서로 변환시킬 수 있다. 제3 편광 조절판(172c)은 vortex retarder 종류를 사용하며, 방위편광을 만들 수 있다.

[63] 또한, 회절 격자를 이용해 빛을 나누는 과정은 원하는 일차 회절에 의한 빛 외에도 다양한 다차 회절에 의한 광 경로를 포함한다. 이들을 제거하지 않을 경우 대물 렌즈의 초점에서 간섭 과정에 참여하기 때문에 구조 조명의 패턴을 일그러뜨리게 된다. 이를 효과적으로 제거하기 위해 광학계의 푸리에 평면에 마스크(176)를 도입하여 일차 회절에 의한 경로를 제외한 나머지 빛들을 물리적으로 차단할 수 있다.

[64] 그리고, 파장 선택 거울(177)은 일반적인 형광 현미경에서 보편적으로 사용하는 광학 부품으로, 특정 파장의 빛을 반사하고 그 외의 빛은 통과시키는 특성을 가지고 있다. 도 3에 도시된 파장 선택 거울(177)은 레이저 광을 통과시키고 형광에 해당하는 파장을 반사하는 것이나, 반대의 특성을 갖는 파장 선택 거울을 이용하여 광 전달부(170)를 구성할 수 있다.

[65] 또한, 파장 선택 필터(178)는 일반적인 형광 현미경에서 범용적으로 사용하는 광학 부품으로서, 형광 외의 파장에 해당하는 빛을 높은 효율로 제거한다. 파장 선택 필터(178)는 촬영부(150)의 앞에 두어 원하는 신호만을 측정하는데 사용되며, 관측하고자 하는 신호가 형광이 아닐 경우 적합한 필터로 교체할 수 있다.

[66] 아울러, 마스크(176)가 원형 마스크인 것으로 도 3에 도시하였으나, 이에 한정되지 않고 실시예에 따라 구조 조명의 패턴에 따라 마스크(176)의 모양이 변경될 수 있고, 핀홀 배열 등과 같은 다양한 형태의 마스크를 이용할 수 있다.

[67]

[68] 제어부(190)는 광파형 조절부(130)를 통해 생성되는 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명에 대응되는 형광 이미지를 촬영부(150)를 통해 획득한다.

[69] 그리고, 제어부(190)는 획득된 복수개의 형광 이미지를 기초로 대상 객체의 중심위치를 측정한다.

[70] 이때, 제어부(190)는 복수개의 형광 이미지로부터 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 대상 객체의 중심위치를 측정할 수 있다.

[71] 이와 같이, 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명을 대상 객체에 조사하고, 위상이 변조되는 구조 조명에 따라 대상 객체에서 방출되는 신호를 모아서 대상 객체의 중심 위치를 측정함으로써, 픽셀화된 촬영부(150)의 노이즈 영향을 최소화해 낮은 광자수에서도 위치 추적의 정확도를 향상시킬 수

있다. 또한, 집중된 빛 대신 2차원의 넓은 영역에 반복되는 패턴을 갖는 구조 조명을 이용함으로써, 임의의 위치와 구조로 다수의 광자들이 대면적에 분포되어 있는 대면적 시료에서 다수의 광자들의 위치를 편리하게 측정할 수 있다.

[72]

[73]

[74] 그러면, 도 4 내지 도 6을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치에 대하여 보다 자세히 설명한다.

[75] 도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명의 위상 변조의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[76] 도 4를 참조하면, 광파형 조절부(130)의 액정 배열이 여섯 개의 픽셀 단위로 주기를 띄고 있다. 이 경우, 최대 3개의 위상 차이(각 위상차는 120도)를 만들 수 있다. 광파형 조절부(130)는 도 4의 왼쪽 그림과 같이 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명을 생성하고, 도 4의 오른쪽 그림과 같이 제어부(190)의 위상제어 신호에 따라 구조 조명의 위상을 변조시킬 수 있다.

[77]

[78] 도 5는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 편광 조절의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[79] 도 5를 참조하면, 광원부(110)에서 나오는 빛은 일반적으로 선편광을 가지고 있으며, 그 방향은 광원을 장착한 방향에 따라 달라질 수 있다. 광섬유(171)를 이용해 선편광을 유지하고, 이후 제1 편광 조절판(172a)을 이용해 선편광의 방향을 실험에 맞게 조절한다. 편광 빛 분리기(174)는 수평방향 편광은 통과시키고 수직방향 편광은 반사시킨다. 레이저 광을 광파형 조절부(130)에 전달하기 위해, 제1 편광 조절판(172a)을 이용해 수평방향 편광을 만들어 주며, 이는 편광 빛 분리기(174)를 통과한 후 제2 편광 조절판(172b)을 통해 원편광으로 변하게 된다.

[80] 광파형 조절부(130)에서 반사된 빛은 다시 제2 편광 조절판(172b)을 통과하면서 선편광으로 변하게 되고, 작동 원리로 인해 수직방향 편광을 갖기 때문에 편광 빛 분리기(174)에서 반사되 현미경(200) 방향으로 진행하게 된다. 이후 제3 편광 조절판(172c)을 통해 방위편광으로 만들어 주면 중심을 기준으로 반대 방향의 빛은 같은 방향의 선편광을 갖게 된다. 이에 따라, 현미경(200)의 대물 렌즈의 초점에서 간섭 현상이 일어날 때 최고의 효율로 간섭 현상을 일으킬 수 있어, 이상적인 형태의 구조 조명을 만들 수 있다.

[81]

[82] 도 6은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 단분자 중심위치 측정의 일례를 설명하기 위한 도면이다.

[83] 도 6의 왼쪽 그림은 총 4개의 위상에 따라 특정 위치에 존재하는 단일 분자의 신호가 변화하는 모습을 나타내고 있다. 단일 분자의 위치에 구조 조명의 광량이 가장 큰 부분이 위치할 경우, 단일 분자의 신호가 가장 강하게 검출된다. 구조 조명의 위상을 변화시켜 광량이 점차 줄어들 경우, 단일 분자의 신호 또한 광량에 따라 감소하는 형태를 띄게 된다.

[84] 이와 같은 신호의 증감은 구조 조명의 주기에 맞추어 변화하고, 신호의 강도를 주어진 위상차와 구조 조명의 주기 함수에 대해 근사함으로써, 단일 분자의 정확한 위치를 추정할 수 있다. 가장 강한 신호를 얻을 수 있는 위치가 단일 분자의 위치로, 방출 신호의 변조 패턴 위상을 얻어 가장 높은 위치를 추정함으로써. 해당 단일 분자의 위치를 획득할 수 있다. 이때, 방출 신호를 읽는 과정에서 다수의 픽셀에서 나온 정보를 종합적으로 처리하기 때문에 픽셀간의 다양한 신호 오차를 상쇄할 수 있고, 이는 기존의 접근 방식(예컨대, 가우시안 근사를 통해 단일 분자의 위치를 추적하는 방식)보다 더 높은 정확도로 단일 분자의 위치를 추적할 수 있다.

[85]

[86] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 1차원 위치 추적을 기준으로 본 발명을 설명하였지만, 실제 대상 객체의 이미지를 획득하기 위해서는 2차원으로 위치 추적을 할 필요가 있다. 광파형 조절부(130)의 회절 격자를 1차원 분석에 사용했던 패턴과 수직하게 구성하고, 구조 조명의 위상 역시 패턴의 변화에 맞추어 수직하게 조절함으로써, 2차원 분석을 수행할 수 있다.

[87]

[88]

[89] 그러면, 도 7을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정의 성능에 대하여 설명한다.

[90] 도 7은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정의 성능을 설명하기 위한 도면이다.

[91] 도 7의 (a)는 종래기술 1에 의해 획득한 이미지이고, 도 7의 (b)는 종래기술 2에 의해 획득한 이미지이며, 도 7의 (c)는 본 발명에 의해 획득한 이미지이고, 도 7의 (d)는 종래기술 2와 본 발명의 정확도를 비교하는 그래프이다.

[92] 종래기술

[93] 종래기술 1은 어떤 위치 추적 메커니즘도 적용하지 않은(공간 분해능이 회절 한계에 의해 제한되어 있는) 일반적인 광학 현미경을 통해 이미지리를 획득하는 방법을 말한다.

[94] 종래기술 2는 단일분자의 픽셀화된 2차원 이미지를 2차원 함수로 근사하여 해당 단일분자의 중심위치를 측정하는 방법으로서, 종래기술 1에 해당하는 이미지를 복수개 획득하고, 각 이미지마다 2차원 함수 근사 방법을 이용해 중심점을 추적한 후 얻어진 중심점 위치를 이미지로 재구성하는 방식이다.

[95] 실험과정

[96] 광학 현미경 상에 샘플(금 나노 입자)을 올려 놓고 주기적 구조 조명(줄무늬 패턴을 갖는 구조 조명을 이용)을 샘플에 조사하였다. 2차원으로 위치 추적을 하기 위해 수직한 방향의 2가지 줄무늬 패턴을 이용하였으며, 각각 4번의 위상 변화에 따른 이미지를 획득하여 단일 입자에서 나오는 신호(산란된 광신호)를 총합해 위치 추적을 진행하였다(총 8번의 위상 변화). 각 위상마다 단일 입자가 방출하는 광신호를 합해 처리함으로써 카메라 잡음을 최소화했고, 위상에 따른 광신호 변화를 구조 조명 함수로 근사해 위치 추적을 진행하였다. 이렇게 얻어진 위치 정보를 이미지로 재구성하였다.

[97] 실험결과

[98] 본 발명에 따른 이미지(도 7의 (c) 참조)와 종래기술 1 및 종래기술 2에 따른 이미지(도 7의 (a) 및 (b) 참조)를 비교하면, 본 발명이 종래기술보다 더 좋은 공간 분해능을 제공함을 확인할 수 있다.

[99] 또한, 도 7의 (d)를 참조하면, 본 발명이 종래기술 2에 비해 약 2.9배 정도 공간 분해능이 향상됨을 확인할 수 있다. 도 7의 (d)는 이미지 상에 확대되어 표시된 입자(도 7의 (b) 및 (c) 참조)의 위치 정보를 1차원으로 투시해 얻은 위치 분포 그래프이다.

[100] 정리하면, 본 발명은 종래기술 2보다 1차원상으로는 약 2.9배 향상되고, 2차원상으로는 약 8.3배 향상됨을 확인할 수 있다.

[101]

[102]

[103] 그러면, 도 8을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법에 대하여 설명한다.

[104] 도 8은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.

[105] 도 8을 참조하면, 광원부(110)가 레이저 광을 조사한다(S110).

[106] 이후, 광 전달부(170)가 레이저 광을 광파형 조절부(130)로 전달한다(S120). 즉, 광 전달부(170)는 광원부(110)를 통해 조사되는 레이저 광을 광섬유(171), 제1 편광 조절판(172a), 거울(173), 편광 빛 분리기(174) 및 제2 편광 조절판(172b)을 거쳐 광파형 조절부(130)로 전달할 수 있다.

[107] 그러면, 광파형 조절부(130)가 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명으로 생성한다(S130). 여기서, 구조 조명은 줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광을 말한다. 즉, 광파형 조절부(130)는 입사된 빛의 위상을 변화시켜 레이저 광으로부터 구조 조명을 생성할 수 있다.

[108] 이후, 광 전달부(170)가 구조 조명을 대상 객체로 전달한다(S140). 즉, 광 전달부(170)는 광파형 조절부(130)를 통해 생성된 구조 조명을 제2 편광 조절판(172b), 편광 빛 분리기(174), 제1 렌즈(175a), 제3 편광 조절판(172c), 마스크(176), 파장 선택 거울(177) 및 제2 렌즈(175b)를 거쳐 현미경(200)을 통해

대상 객체로 전달할 수 있다.

[109] 그런 다음, 광 전달부(170)가 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영부(150)로 전달한다(S150). 즉, 광 전달부(170)는 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 현미경(200)을 통해 전달받고, 형광을 제2 렌즈(175b), 파장 선택 거울(177), 제3 렌즈(175c) 및 파장 선택 필터(178)를 거쳐 촬영부(150)로 전달할 수 있다.

[110] 그러면, 촬영부(150)가 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득한다(S160).

[111]

[112] *충분한 수의 위치 정보가 수집되지 않은 경우(S170-N), 제어부(190)는 광파형 조절부(130)를 제어하여 구조 조명의 위상을 변조한다(S180). 즉, 광파형 조절부(130)는 제어부(190)의 위상제어 신호에 따라 구조 조명의 위상을 변조시킨다. 예컨대, 광파형 조절부(130)는 전압을 통해 액정 패널의 배열 구조를 변경함으로써 입사된 빛에 위상 차이를 가하여 구조 조명의 위상을 변조시킬 수 있다. 이후, 단계 S130, S140, S150, S160을 수행한다.

[113] 이에 반면, 충분한 수의 위치 정보가 수집된 경우(S170-Y), 제어부(190)가 구조 조명의 위상 변조에 대응되는 복수개의 형광 이미지를 기초로 대상 객체의 중심위치를 측정한다(S190). 즉, 제어부(190)는 복수개의 형광 이미지로부터 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 대상 객체의 중심위치를 측정할 수 있다.

[114]

[115]

[116] 본 발명은 또한 컴퓨터로 읽을 수 있는 기록 매체에 컴퓨터가 읽을 수 있는 코드로서 구현하는 것이 가능하다. 컴퓨터로 읽을 수 있는 기록 매체는 컴퓨터에 의하여 읽혀질 수 있는 데이터가 저장되는 모든 종류의 기록 장치를 포함한다. 컴퓨터가 읽을 수 있는 기록 매체의 예로는 롬(ROM), 램(RAM), 씨디-롬(CD-ROM), 자기 테이프, 플로피 디스크, 광 데이터 저장장치 등이 있다.

[117] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명은 상술한 특정의 바람직한 실시예에 한정되지 아니하며, 다음의 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변형 실시가 가능한 것은 물론이고, 그와 같은 변경은 청구범위 기재의 범위 내에 있게 된다.

[118] < 부호의 설명 >

[119] 100 : 단분자 중심위치 측정 장치, 110 : 광원부,

[120] 130 : 광파형 조절부, 150 : 촬영부,

[121] 170 : 광 전달부, 190 : 제어부,

[122] 200 : 현미경

청구범위

[청구항 1] 레이저 광을 조사하는 광원부;
상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명을 생성하는 광파형 조절부;
상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득하는 촬영부; 및
상기 광파형 조절부를 통해 생성되는 상기 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명에 대응되는 형광 이미지를 상기 촬영부를 통해 획득하고, 획득된 복수개의 형광 이미지를 기초로 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 제어부;
를 포함하는 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 2] 제1항에서,
상기 제어부는,
상기 복수개의 형광 이미지로부터 상기 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 3] 제1항에서,
상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광파형 조절부로 전달하고, 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 대상 객체로 전달하며, 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 촬영부로 전달하는 광 전달부;
를 더 포함하는 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 4] 제3항에서,
상기 광 전달부는,
광섬유; 제1 편광 조절판; 거울; 편광 빛 분리기; 제2 편광 조절판; 제1 렌즈; 제3 편광 조절판; 마스크; 파장 선택 거울; 제2 렌즈; 제3 렌즈; 및 파장 선택 필터;를 포함하며,
상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광섬유, 상기 제1 편광 조절판, 상기 거울, 상기 편광 빛 분리기, 및 상기 제2 편광 조절판을 거쳐 상기 광파형 조절부로 전달하고,
상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 제2 편광 조절판, 상기 편광 빛 분리기, 상기 제1 렌즈, 상기 제3 편광 조절판, 상기 마스크, 상기 파장 선택 거울, 및 상기 제2 렌즈를 거쳐 상기 대상 객체로 전달하며,

상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 제2 렌즈, 상기 파장 선택 거울, 상기 제3 렌즈, 및 상기 파장 선택 필터를 거쳐 상기 촬영부로 전달하는,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 5] 제3항에서,
상기 광 전달부는,
상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 현미경을 통해 상기 대상 객체로 전달하고, 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 현미경을 통해 전달받는,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 6] 제1항에서,
상기 구조 조명은,
줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광인,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 장치.

[청구항 7] 광원부, 광파형 조절부, 촬영부 및 제어부를 포함하는 단분자 중심위치 측정 장치의 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법으로서,
상기 광원부가 레이저 광을 조사하는 단계;
상기 광파형 조절부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명을 생성하는 단계;
상기 촬영부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득하는 단계; 및
상기 제어부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성되는 상기 구조 조명의 위상을 변조시키면서 위상 변조된 구조 조명에 대응되는 형광 이미지를 상기 촬영부를 통해 획득하고, 획득된 복수개의 형광 이미지를 기초로 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 단계;
를 포함하는 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

[청구항 8] 제7항에서,
상기 중심위치 측정 단계는,
상기 제어부가 상기 복수개의 형광 이미지로부터 상기 대상 객체에서 방출되는 형광 방출 세기의 변조 패턴의 위상을 검출하여 상기 대상 객체의 중심위치를 측정하는 것으로 이루어진,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

[청구항 9] 제7항에서,
상기 단분자 중심위치 측정 장치는, 광 전달부를 더 포함하며,

상기 광 전달부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광파형 조절부로 전달하는 단계;
상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 대상 객체로 전달하는 단계; 및
상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 촬영부로 전달하는 단계;
를 더 포함하는 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

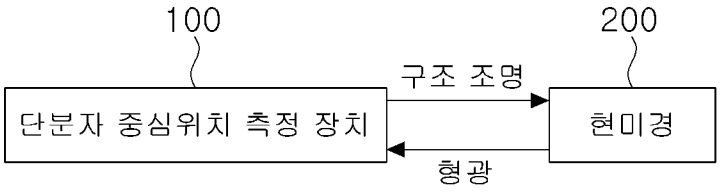
[청구항 10] 제9항에서,
상기 광 전달부는,
광섬유; 제1 편광 조절판; 거울; 편광 빛 분리기; 제2 편광 조절판; 제1 렌즈; 제3 편광 조절판; 마스크; 파장 선택 거울; 제2 렌즈; 제3 렌즈; 및 파장 선택 필터;를 포함하며,
상기 레이저 광 전달 단계는, 상기 광 전달부가 상기 광원부를 통해 조사되는 상기 레이저 광을 상기 광섬유, 상기 제1 편광 조절판, 상기 거울, 상기 편광 빛 분리기, 및 상기 제2 편광 조절판을 거쳐 상기 광파형 조절부로 전달하는 것으로 이루어지고,
상기 구조 조명 전달 단계는, 상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 상기 제2 편광 조절판, 상기 편광 빛 분리기, 상기 제1 렌즈, 상기 제3 편광 조절판, 상기 마스크, 상기 파장 선택 거울, 및 상기 제2 렌즈를 거쳐 상기 대상 객체로 전달하는 것으로 이루어지며,
상기 형광 전달 단계는, 상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 제2 렌즈, 상기 파장 선택 거울, 상기 제3 렌즈, 및 상기 파장 선택 필터를 거쳐 상기 촬영부로 전달하는 것으로 이루어진,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

[청구항 11] 제9항에서,
상기 구조 조명 전달 단계는, 상기 광 전달부가 상기 광파형 조절부를 통해 생성된 상기 구조 조명을 현미경을 통해 상기 대상 객체로 전달하는 것으로 이루어지고,
상기 형광 전달 단계는, 상기 광 전달부가 상기 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 상기 현미경을 통해 전달받는 것으로 이루어진,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

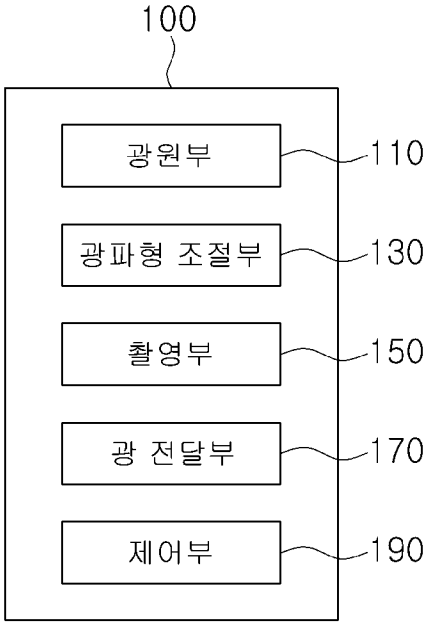
[청구항 12] 제7항에서,
상기 구조 조명은,
줄무늬, 격자무늬, 물결무늬와 같이 빛의 세기가 균일하지 않은 패턴이 주기적으로 반복되도록 성형된 광인,
구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법.

[청구항 13] 제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 구조 조명과 위상 검출을 이용한 단분자 중심위치 측정 방법을 컴퓨터에서 실행시키기 위하여 컴퓨터로 읽을 수 있는 기록 매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

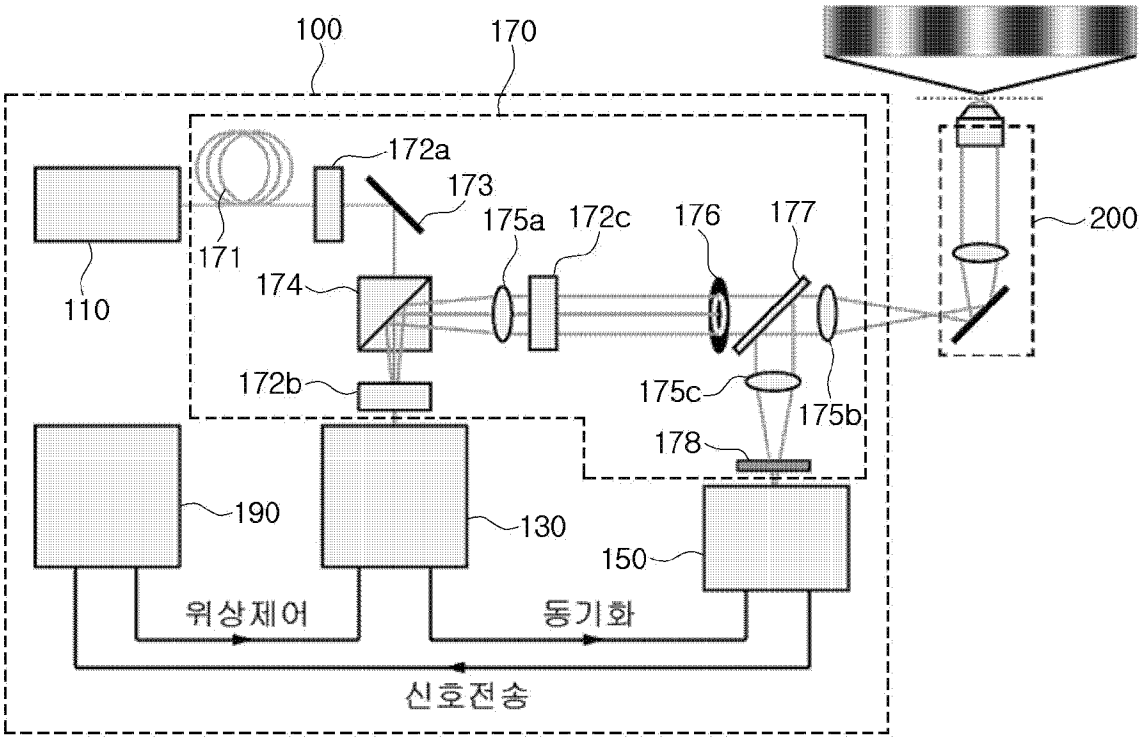
[도1]


100
200
구조 조명
단분자 중심위치 측정 장치
현미경
형광

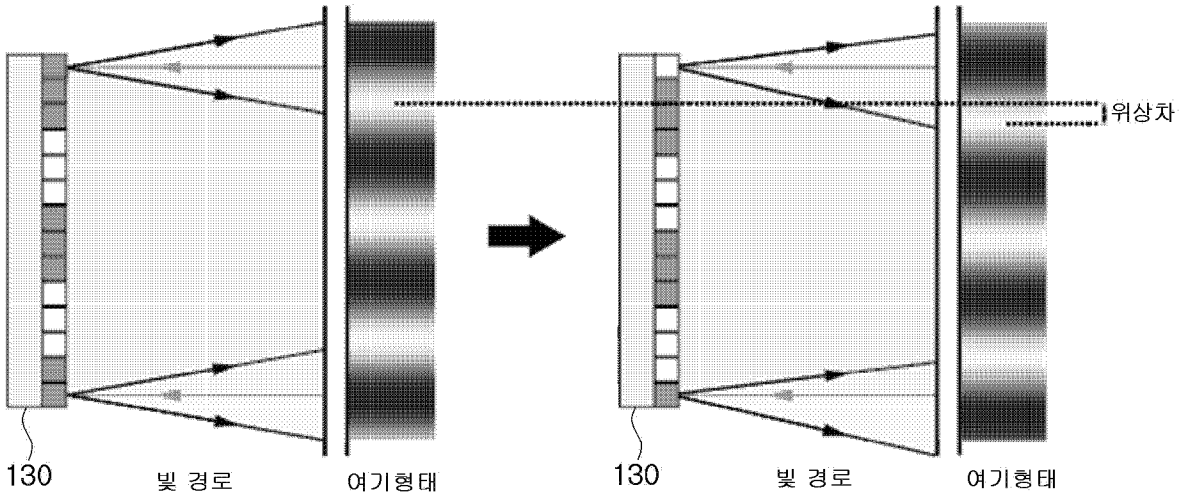
[도2]


100
광원부
110
광파형 조절부
130
촬영부
150
광 전달부
170
제어부
190

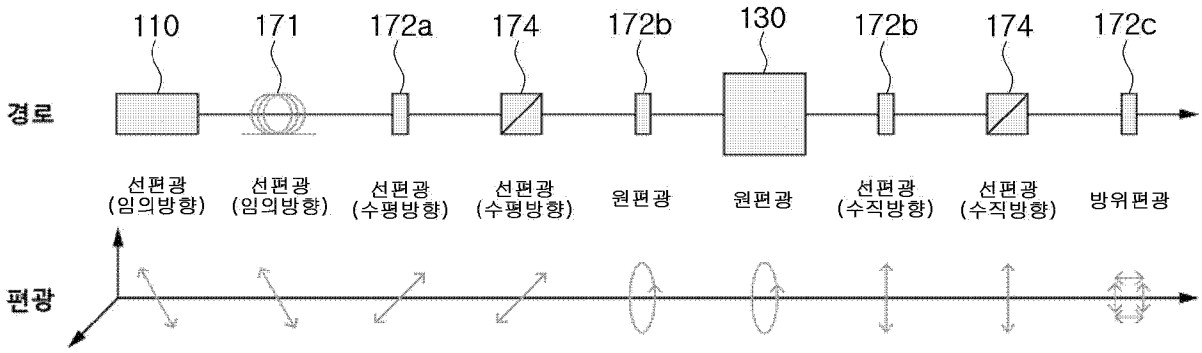
[도3]


100
170
172a
173
171
175a
172c
176
177
200
110
174
172b
175c
175b
178
190
130
150
위상제어
동기화
신호전송

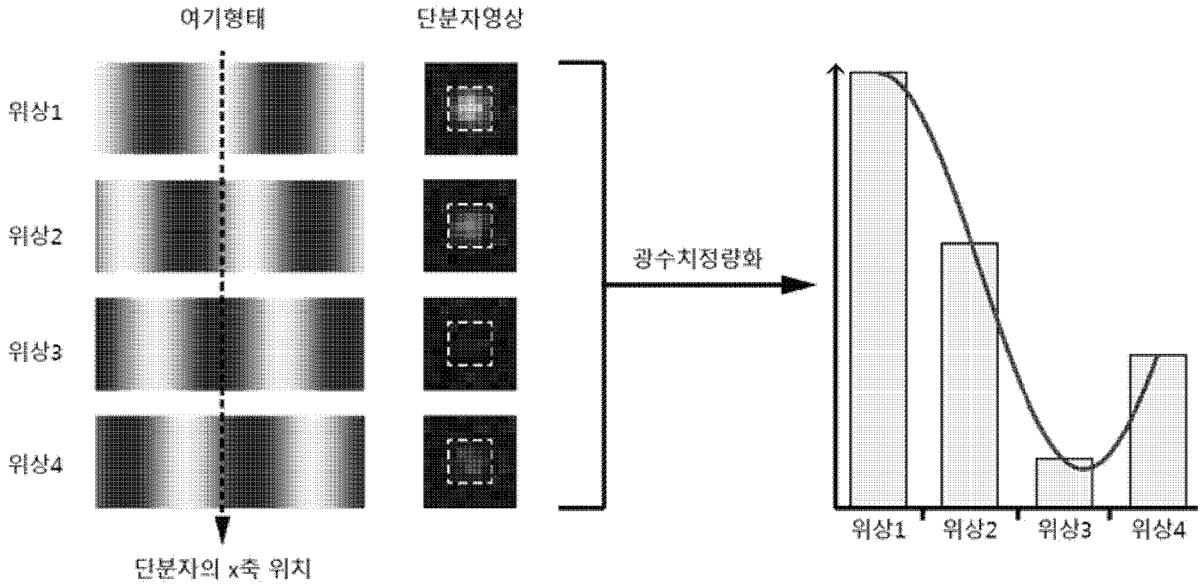
[도4]


위상차
130
빛 경로
여기형태
130
빛 경로
여기형태

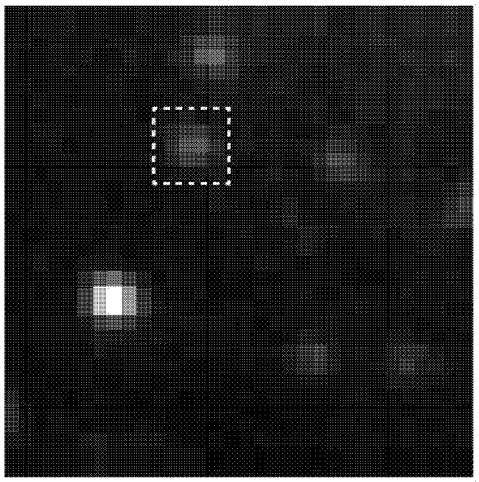
[도5]


110
171
172a
174
172b
130
172b
174
172c
경로
선편광 (임의방향)
선편광 (임의방향)
선편광 (수평방향)
선편광 (수평방향)
원편광
원편광
선편광 (수직방향)
선편광 (수직방향)
방위편광
편광

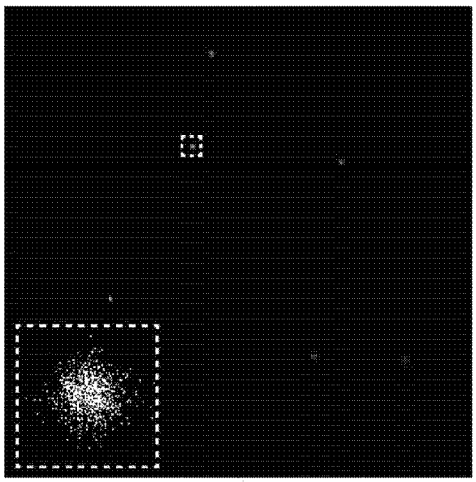
[도6]


여기형태
단분자영상
위상1
위상2
위상3
위상4
단분자의 x축 위치
광수치정량화
위상1
위상2
위상3
위상4

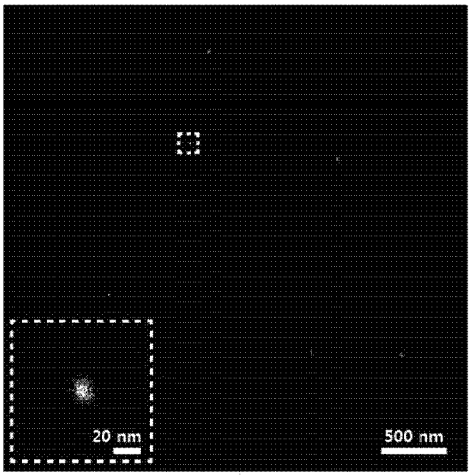
[도7]



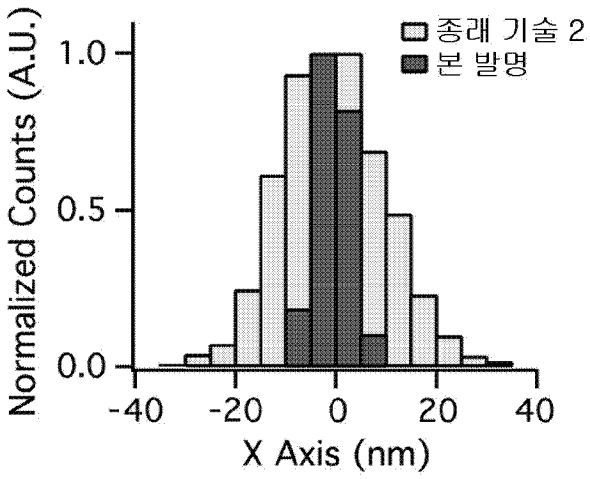
(a)



(b)

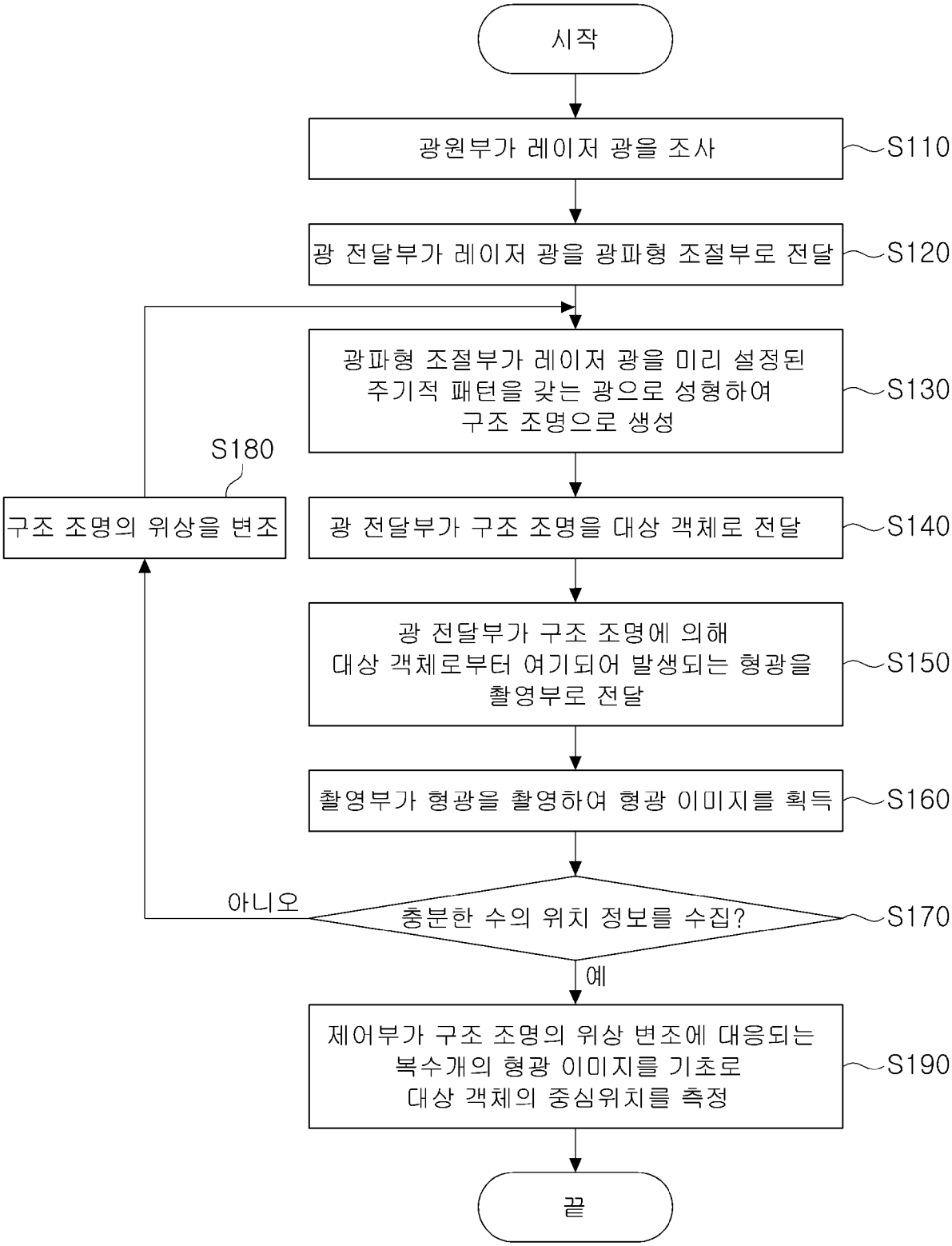

20 nm
500 nm

(c)


종래 기술 2
본 발명
Normalized Counts (A.U.)
1.0
0.5
0.0
-40
-20
0
20
40
X Axis (nm)

(d)

[도8]


시작
광원부가 레이저 광을 조사
S110
광 전달부가 레이저 광을 광파형 조절부로 전달
S120
광파형 조절부가 레이저 광을 미리 설정된 주기적 패턴을 갖는 광으로 성형하여 구조 조명으로 생성
S130
광 전달부가 구조 조명을 대상 객체로 전달
S140
광 전달부가 구조 조명에 의해 대상 객체로부터 여기되어 발생되는 형광을 촬영부로 전달
S150
촬영부가 형광을 촬영하여 형광 이미지를 획득
S160
충분한 수의 위치 정보를 수집?
S170
아니오
예
S180
구조 조명의 위상을 변조
제어부가 구조 조명의 위상 변조에 대응되는 복수개의 형광 이미지를 기초로 대상 객체의 중심위치를 측정
S190
끝

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/012170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G02B 21/08(2006.01)i, G02B 21/36(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G02B 21/08; G01B 11/25; G01B 9/02; G01B 9/04; G02B 21/00; G02B 21/06; G02B 21/36; G02B 26/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: monomolecule, structure lighting, phase detection, laser light source, optical waveform control part

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0092429 A (HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) 20 August 2013 See paragraphs [0015]-[0045]; claim 1; and figures 1-5.	1-2,6-8,12-13
A		3-5,9-11
A	KR 10-2015-0066736 A (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 17 June 2015 See paragraphs [0021]-[0054]; and figures 1-6.	1-13
A	KR 10-2013-0115891 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 22 October 2013 See paragraphs [0019]-[0030]; and figures 1-4.	1-13
A	KR 10-1479249 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 05 January 2015 See paragraphs [0024]-[0176]; and figures 1-11.	1-13
A	KR 10-2016-0091380 A (SUZHOU UNIVERSITY et al.) 02 August 2016 See paragraphs [0044]-[0086]; and figures 1-10.	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 JANUARY 2019 (18.01.2019)	**18 JANUARY 2019 (18.01.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/012170

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0092429 A	20/08/2013	CN 102947741 A	27/02/2013
		EP 2587298 A1	01/05/2013
		EP 2587298 A4	05/03/2014
		JP 2012-008261 A	12/01/2012
		TW 201213849 A	01/04/2012
		US 2013-0120563 A1	16/05/2013
		WO 2011-162187 A1	29/12/2011
KR 10-2015-0066736 A	17/06/2015	KR 10-1541610 B1	03/08/2015
KR 10-2013-0115891 A	22/10/2013	KR 10-1356706 B1	05/02/2014
KR 10-1479249 B1	05/01/2015	NONE	
KR 10-2016-0091380 A	02/08/2016	CN 105814402 A	27/07/2016
		CN 105814402 B	06/11/2018
		WO 2015-077926 A1	04/06/2015

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/012170

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G02B 21/08(2006.01)i, G02B 21/36(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G02B 21/08; G01B 11/25; G01B 9/02; G01B 9/04; G02B 21/00; G02B 21/06; G02B 21/36; G02B 26/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 단분자, 구조 조명, 위상 검출, 레이저 광원, 광파형 조절부

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0092429 A (하마마츠 포토닉스 가부시키가이샤) 2013.08.20 단락 [0015]-[0045]; 청구항 1; 및 도면 1-5 참조.	1-2,6-8,12-13
A		3-5,9-11
A	KR 10-2015-0066736 A (한양대학교 산학협력단) 2015.06.17 단락 [0021]-[0054]; 및 도면 1-6 참조.	1-13
A	KR 10-2013-0115891 A (한국과학기술원 등) 2013.10.22 단락 [0019]-[0030]; 및 도면 1-4 참조.	1-13
A	KR 10-1479249 B1 (한국표준과학연구원) 2015.01.05 단락 [0024]-[0176]; 및 도면 1-11 참조.	1-13
A	KR 10-2016-0091380 A (쑤저우 유니버시티 등) 2016.08.02 단락 [0044]-[0086]; 및 도면 1-10 참조.	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 01월 18일 (18.01.2019)	2019년 01월 18일 (18.01.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이창호
전화번호 +82-42-481-8288

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/012170

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0092429 A	2013/08/20	CN 102947741 A	2013/02/27
		EP 2587298 A1	2013/05/01
		EP 2587298 A4	2014/03/05
		JP 2012-008261 A	2012/01/12
		TW 201213849 A	2012/04/01
		US 2013-0120563 A1	2013/05/16
		WO 2011-162187 A1	2011/12/29
KR 10-2015-0066736 A	2015/06/17	KR 10-1541610 B1	2015/08/03
KR 10-2013-0115891 A	2013/10/22	KR 10-1356706 B1	2014/02/05
KR 10-1479249 B1	2015/01/05	없음	
KR 10-2016-0091380 A	2016/08/02	CN 105814402 A	2016/07/27
		CN 105814402 B	2018/11/06
		WO 2015-077926 A1	2015/06/04