(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월06일
(11) 등록번호 10-1655020
(24) 등록일자 2016년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/552 (2014.01) *G01N 21/55* (2014.01)
G02B 21/10 (2006.01) *G02B 21/36* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/554 (2013.01)
G02B 21/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0036751
(22) 출원일자 2015년03월17일
심사청구일자 2015년03월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140127463 A*
US20120307247 A1*
JP2014164004 A
KR1020120114933 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강성호
경기도 수원시 영통구 매영로 366 현대아파트 725동 1901호 (영통동, 현대아파트)
장평
경기도 용인시 기흥구 서그내로 16번길 17, 4동 208호
이승아
경기도 화성시 영통로61번길 10 111동 1301호 (반월동, 신영통현대1차아파트)
(74) 대리인
손민

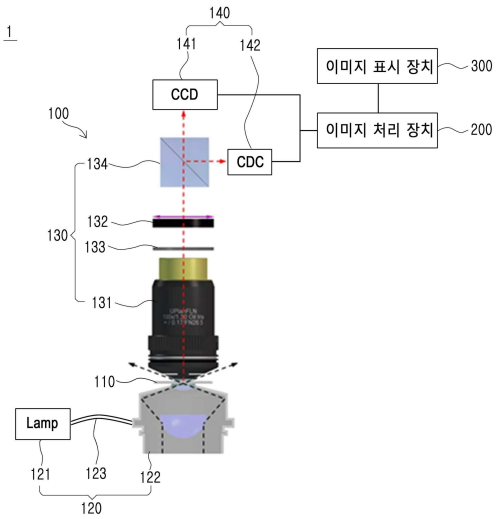
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 박준영

(54) 발명의 명칭 **플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템 및 방법**

(57) 요 약

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템 및 방법이 개시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 초고분해능 이미지 획득 시스템은, 한 종류 이상의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료의 이미지를 검출하며, 상기 플라즈몬 나노 물질의 공명 산란 광의 검출을 위해 증강된 암시야(enhanced dark-field) 조명을 사용하는 이미지 검출 장치; 상기 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를 측정하고, 상기 이미지 검출 장치에 의해 검출된 이미지를 상기 국산화적인 정밀도에 기초하여 재구성하는 이미지 처리 장치; 및 상기 이미지 처리 장치에 의해 재구성된 이미지를 표시하는 이미지 표시 장치;를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G02B 21/361 (2013.01)
G01N 2021/556 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

한 종류 이상의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료의 이미지를 검출하며, 상기 플라즈몬 나노 물질의 공명 산란 광의 검출을 위해 증강된 암시야(enhanced dark-field) 조명을 사용하는 이미지 검출 장치;

상기 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를 측정하고, 상기 이미지 검출 장치에 의해 검출된 이미지를 상기 국산화적인 정밀도에 기초하여 재구성하는 이미지 처리 장치; 및

상기 이미지 처리 장치에 의해 재구성된 이미지를 표시하는 이미지 표시 장치;를 포함하며,

상기 이미지 처리 장치는 상기 검출된 이미지를 재구성하는 과정에서 상기 플라즈몬 나노 물질의 중심 좌표에서 일정 거리 이상 떨어진 상기 플라즈몬 나노 물질의 이미지 영역을 제거하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이미지 처리 장치는 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘을 사용하여 상기 국산화적인 정밀도를 측정하는,

초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 적어도 한 종류의 플라즈몬 나노 물질은 금나노입자(Gold Nano-Particle: GNP), 금나노막대(Gold Nano-Rode: GNR), 및 은나노입자(Silver Nano-Particle: SNP) 중에서 한 종류 이상을 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 관찰 대상 시료는 상기 플라즈몬 나노 물질을 자연적으로 지니고 있거나 상기 플라즈몬 나노 물질이 전처리 과정을 통해 인공 부착된 생체 분자를 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이미지 검출 장치는,

상기 관찰 대상 시료가 탑재되는 재물대;

상기 재물대에 안착된 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하는 조명 유닛;

상기 관찰 대상 시료로부터 나오는 광을 안내하는 광 가이드 유닛; 및

상기 광 가이드 유닛에 의해 안내된 광을 검출하는 광 검출 유닛;을 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조명 유닛은,

상기 암시야 조명을 생성하는 광원; 및

광섬유를 통해 상기 광원에 연결되며 상기 암시야 조명을 증강시켜 상기 관찰 대상 시료에 제공하는 광콘덴서;를 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 광 가이드 유닛은,

상기 재물대 위에 배치되는 대물렌즈; 및

상기 대물렌즈를 통과한 시료의 광을 집광하는 프리즘;을 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 광 가이드 유닛은,

특정 대역의 파장을 선택적으로 통과시키는 하나 이상의 광학 필터를 더 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 광학 필터는 상기 대물렌즈와 상기 프리즘 사이에 배치되는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 광 검출 유닛은,

광다이오드 어레이(photodiode array: PDA), 전하 주입 장치(charge injection device: CID), 전하-쌍 장치(charge-couple device, CCD), 및 디지털 일안 반사식 카메라(digital single lens reflex camera) 중 하나 이상을 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 12

제6항에 있어서,

상기 재물대는 상기 플라즈몬 나노 물질의 방향각 측정을 위해 360° 회전 분석기로 구비되는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 13

제6항에 있어서,

상기 관찰 대상 시료의 3차원 영상 획득을 위해 상기 재물대를 상하로 승강시키는 승강 모터를 더 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템.

청구항 14

(a) 한 종류 이상의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료를 준비하고 상기 관찰 대상 시료를 재물대 상에 배치시키는 단계;

(b) 조명 유닛을 통해 상기 관찰 대상 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하면서 광 가이드 유닛을 통과한 상기 관찰 대상 시료의 이미지를 광 검출 유닛을 통해 검출하는 단계;

(c) 상기 광 검출 유닛에 의해 검출된 상기 관찰 대상 시료의 이미지를 이미지 처리 장치를 통해 재구성하는 단계; 및

(d) 상기 이미지 처리 장치에 의해 재구성된 이미지를 이미지 표시 장치를 통해 표시하는 단계;를 포함하며,

상기 (c) 단계는,

(c1) 상기 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를 측정하는 단계; 및

(c2) 상기 플라즈몬 나노 물질의 중심 좌표로부터 일정 거리 이상 떨어진 상기 플라즈몬 나노 물질의 이미지 영역을 제거하는 단계를 포함하는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 (c1) 단계는 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘을 사용하여 수행되는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 광 가이드 유닛에 구비된 광학 필터를 통해 상기 광학 필터에 상응하는 대역의 파장만을 선택적으로 통과시키면서 수행되는,

플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초고분해능 이미지 획득 시스템 및 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 플라즈몬 나노 입자의 공명 산란 광을 이용한 초고분해능 이미지 획득 시스템 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 잘 알려져 있는 바와 같이 광학 현미경은 대물렌즈와 접안렌즈를 이용하여 시료(specimen)의 확대 이미지를 관찰하는 장치이다.

[0003] 통상적인 광학 현미경은 빛의 회절 한계(diffraction limit)로 인해 200 나노미터(nm) 이하의 분해능을 제공할 수 없다. 즉 통상적인 광학 현미경을 사용하여 200 nm 이하로 근접한 두 물질을 구별할 수 없다.

[0004] 빛의 회절 한계를 극복한 기술로서 초고해상도 형광 현미경(super resolution fluorescence microscopy : SRFM)이 개발되었다. 이러한 초고해상도 형광 현미경에서는 빛의 회절 한계를 극복하기 위해 형광 염료(형광 탐침)를 결합시킨 시료가 이용되며, 그 결과 200nm 이하의 분해능을 제공할 수 있다.

[0005] 이러한 초고해상도 형광 현미경은 형광 염료가 결합된 시료의 검출만 가능한 것으로서 형광 염료의 의존도가 절대적이다.

[0006] 그런데, 이처럼 형광 염료를 이용하는 현미경 기술은 광표백(photobleaching)에 의해 시간 경과에 따라 형광의 세기가 약화되는 문제점, 조건에 따라 형광 신호의 변동(fluctuation)이 발생되는 문제점, 및 상당 수의 형광 염료들이 독성을 지니는 문제점이 있고, 또한 시료 전처리(sample pre-treatment)에 따른 시간 소모, 표적 시료의 오염과 같은 부수적인 단점들을 피하기 어렵다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0052995호 (2013.05.23 공개)

(특허문헌 0002) 일본공개특허 제2010-197208호 (2010.09.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 초고해상도 형광 현미경 기술의 상술한 문제점들 및 단점들을 해결하기 위한 것으로서, 형광 표지(fluorescent labeling) 없이도 빛의 회절 한계를 극복할 수 있는 이미지 획득 기술을 제공하는 것에 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은, 한 종류 이상의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료의 이미지를 검출하며, 상기 플라즈몬 나노 물질의 공명 산란 광의 검출을 위해 증강된 암시야(enhanced dark-field) 조명을 사용하는 이미지 검출 장치; 상기 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를

측정하고, 상기 이미지 검출 장치에 의해 검출된 이미지를 상기 국산화적인 정밀도에 기초하여 재구성하는 이미지 처리 장치; 및 상기 이미지 처리 장치에 의해 재구성된 이미지를 표시하는 이미지 표시 장치;를 포함하는 초고분해능 이미지 획득 시스템을 제공한다.

[0010] 상기 이미지 처리 장치는 상기 검출된 이미지를 재구성하는 과정에서 상기 플라즈몬 나노 물질의 중심 좌표에서 일정 거리 이상 떨어진 상기 플라즈몬 나노 물질의 이미지 영역을 제거할 수 있다.

[0011] 상기 이미지 처리 장치는 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘을 사용하여 상기 국산화적인 정밀도를 측정할 수 있다.

[0012] 상기 적어도 한 종류의 플라즈몬 나노 물질은 금나노입자(Gold Nano-Particle: GNP), 금나노막대(Gold Nano-Rode: GNR), 및 은나노입자(Silver Nano-Particle: SNP) 중에서 한 종류 이상을 포함할 수 있다.

[0013] 상기 관찰 대상 시료는 상기 플라즈몬 나노 물질을 자연적으로 지니고 있거나 상기 플라즈몬 나노 물질이 전처리 과정을 통해 인공 부착된 생체 분자를 포함할 수 있다.

[0014] 상기 이미지 검출 장치는, 상기 관찰 대상 시료가 탑재되는 재물대; 상기 재물대에 안착된 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하는 조명 유닛; 상기 관찰 대상 시료로부터 나오는 광을 안내하는 광 가이드 유닛; 및 상기 광 가이드 유닛에 의해 안내된 광을 검출하는 광 검출 유닛;을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 조명 유닛은, 상기 암시야 조명을 생성하는 광원; 및 광섬유를 통해 상기 광원에 연결되며 상기 암시야 조명을 증강시켜 상기 관찰 대상 시료에 제공하는 광콘덴서;를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 광 가이드 유닛은, 상기 재물대 위에 배치되는 대물렌즈; 및 상기 대물렌즈를 통과한 시료의 광을 집광하는 프리즘;을 포함할 수 있다.

[0017] 상기 광 가이드 유닛은, 특정 대역의 파장을 선택적으로 통과시키는 하나 이상의 광학 필터를 더 포함할 수 있다.,

[0018] 상기 광학 필터는 상기 대물렌즈와 상기 프리즘 사이에 배치될 수 있다.

[0019] 상기 광 검출 유닛은, 광다이오드 어레이(photodiode array: PDA), 전하 주입 장치(charge injection device: CID), 전하-쌍 장치(charge-couple device, CCD), 및 디지털 일안 반사식 카메라(digital single lens reflex camera) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 상기 재물대는 상기 플라즈몬 나노 물질의 방향각 측정을 위해 360° 회전 분석기로 구비될 수 있다.

[0021] 상기 관찰 대상 시료의 3차원 영상 획득을 위해 상기 재물대를 상하로 승강시키는 승강 모터를 더 포함할 수 있다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 또한, (a) 한 종류 이상의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료를 준비하고 상기 관찰 대상 시료를 재물대 상에 배치시키는 단계; (b) 조명 유닛을 통해 상기 관찰 대상 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하면서 광 가이드 유닛을 통과한 상기 관찰 대상 시료의 광을 광 검출 유닛을 통해 검출하는 단계; (c) 상기 광 검출 유닛에 의해 검출된 상기 관찰 대상 시료의 이미지를 이미지 처리 장치를 통해 재구성하는 단계; 및 (d) 상기 이미지 처리 장치에 의해 재구성된 이미지를 이미지 표시 장치를 통해 표시하는 단계;를 포함하는 초고분해능 이미지 획득 방법을 제공한다.

[0023] 상기 (c) 단계는, c1) 상기 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를 측정하는 단계; 및 c2) 상기 플라즈몬 나노 물질의 중심 좌표로부터 일정 거리 이상 떨어진 상기 플라즈몬 나노 물질의 이미지 영역을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 (c1) 단계는 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다.

[0025] 상기 (b) 단계는 상기 광 가이드 유닛에 구비된 광학 필터를 통해 상기 광학 필터에 상응하는 대역의 파장만을 선택적으로 통과시키면서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 검출 시스템 및 방법에 의하면, 플라즈몬 나노 물질의 공명 산란 광을 검출하고 이를 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도에 기초하여 재구성함으로써 관찰 대상 시료에 대한 200 nm 이하의 초고분해능 이미지를 획득할 수 있다.

[0027] 그리고, 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 검출 시스템 및 방법에 의하면, 종래의 초고해상도 형광 현미경(SRFM)에서 채택된 형광 표지법을 사용하는 대신 플라즈몬 나노 물질을 이용하므로, 형광 염료의 사용으로 인해 발생되는 문제점들(광표백, 형광 신호의 변동, 독성) 및 부수적인 단점들(시료 전처리에 따른 시간 소모, 표적 시료의 오염)을 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 획득 시스템의 일 실시예를 나타낸 개략도이다.

도 2는 도 1의 실시예를 적용하여 구현된 초고분해능 이미지 획득 시스템의 실제 적용 예를 보이는 사진이다.

도 3은 금나노막대(GNR)의 방향각에 따른 광학적 성질을 설명하기 위한 도면이다.

도 4는 금나노입자(GNP), 금나노막대(GNR), 및 은나노입자(SNP) 각각에 대한 공명 산란 광의 파장 분포를 보이는 도면이다.

도 5는 초고분해능 이미지 획득 시스템에 의해 수행되는 파장 선택기(wavelength selector)를 이용한 파장 변조(wavelength modulation)를 설명하기 위한 도면이다.

도 6은 플라즈몬 나노 물질의 가우시안 분포(Gaussian distribution)를 보이는 도면이다.

도 7은 금나노입자(GNP), 금나노막대(GNR), 및 은나노입자(SNP) 각각에 대해 측정된 중심 좌표 및 표준 편차를 보이는 도면이다.

도 8은 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 획득 방법의 일 실시예를 보이는 흐름도이다.

도 9는 도 8의 초고분해능 이미지 검출 방법을 실제 적용하여 얻어낸 이미지들의 예를 보이는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 기존의 초고해상도 형광 현미경에서 사용되는 형광 염료 대신 플라즈몬 나노 물질을 이용한다.

[0030] 이러한 플라즈몬 나노 물질에 빛이 입사되면 플라즈몬 나노 물질의 자유 전자들이 입사광의 특정 전자기장과 공명하면서 플라즈몬 나노 물질로부터 강한 산란 광이 방출되는 이른바 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)이 일어나게 되는데, 본 발명에서는 플라즈몬 나노 물질에 표면 플라즈몬 공명을 발생시키고 이때 방출되는 산란 광을 검출하는 방법을 사용한다.

[0031] 관찰 대상 시료로는 세포, 단백질, 유전자, 효소 등 생체 내의 모든 분자를 가리키는 생체 분자(bio-molecule)가 적합하게 적용될 수 있다.

[0032] 플라즈몬 나노 물질을 자연적으로 지니고 있는 관찰 대상 시료의 경우에는 플라즈몬 나노 물질의 부착을 위한 전처리 과정이 필요하지 않지만, 그렇지 않은 관찰 대상 시료의 경우에는 플라즈몬 나노 물질의 인공 부착을 위한 전처리 과정이 요구된다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 플라즈몬 나노 물질의 예로는, 금나노입자(Gold Nano-Particle: GNP), 금나노막대(Gold Nano-Rode: GNR), 및 은나노입자(Silver Nano-Particle: SNP)를 들 수 있다. 하지만, 이에 제한될 필요 없이, 표면 플라즈마 공명이 일으키는 다른 플라즈몬 나노 물질들이 마찬가지로 적용될 수 있다.

[0034] 이하에서는 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예들에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

[0035] 도 1은 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 획득 시스템의 일 실시예를 나타낸 개략도이고, 도 2는 도 1의 실시

예를 적용하여 구현된 초고분해능 이미지 획득 시스템의 실제 적용 예를 보이는 사진이다.

[0036] 도 1 및 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 초고분해능 이미지 획득 시스템(1)은, 이미지 검출 장치(100), 이미지 처리 장치(200), 및 이미지 표시 장치(300)를 포함한다.

[0037] 이미지 검출 장치(100)는 관찰 대상 시료의 이미지를 확대 검출한다. 여기서, 관찰 대상 시료로는 단백질, 유전자, 효소 등 생체 내의 모든 분자를 가리키는 생체 분자가 적합하게 적용될 수 있으며, 적어도 한 종류의 플라즈몬 나노 물질을 포함한다. 그리고, 시료 내의 플라즈몬 나노 물질의 산란 광을 검출하기 위해 이미지 검출 장치(100)는 시료에 증강된 암시야(enhanced dark-field) 방식으로 조명광을 제공한다.

[0038] 일 실시예에 따라, 이미지 검출 장치(100)는, 시료가 탑재되는 재물대(110), 재물대(110)에 안착된 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하는 조명 유닛(120), 암시야 조명에 의해 시료로부터 나오는 광을 안내하는 광 가이드 유닛(130), 및 광 가이드 유닛(130)에 의해 안내된 광을 검출하는 광 검출 유닛(140)을 포함할 수 있다.

[0039] 재물대(110)는 조명 유닛(120)과 광 가이드 유닛(130) 사이에 배치되며, 관찰 대상 시료가 그 위에 안착된다. 이러한 재물대(110)는 플라즈몬 나노 물질의 방향각 측정을 위해 360° 회전하는 회전 분석기(rotation analyzer)로 구비될 수 있다.

[0040] 금나노막대(GNR)와 같은 이방성 물질은 용액 내에서 자유회전 상태를 보이며 그 회전 상태는 광학적 성질에 큰 영향을 미친다. 이에 대해 금나노막대(GNR)의 회전에 따른 검출 이미지를 보이는 도 3을 참조하면, 2차원 표면에서 금나노막대의 편각(Θ)은 90° 의 상수로 추정되지만 금나노막대의 회전에 따른 방향각(ϕ)의 변화로 인해 금나노막대의 산란 광은 편광을 보이게 되며, 이에 따라 도 3(c)에 도시된 바와 같이 금나노막대의 검출 이미지는 그 방향각(ϕ)의 변화에 따라 상이하게 나타난다.

[0041] 이처럼 금나노막대와 같은 이방성 물질의 광학적 성질은 방향각(ϕ)에 달라지는 특성을 나타내게 되며, 그러한 방향각(ϕ)은 360° 회전 분석기로 구비된 재물대(110)를 통해 측정될 수 있다.

[0042] 조명 유닛(120)은 암시야 조명을 생성하는 광원(121), 및 암시야 조명을 증강시켜 시료에 제공하는 광콘덴서(122)를 포함할 수 있다. 이때 광원(121)과 광콘덴서(122)는 광섬유(123)에 의해 연결될 수 있다. 이처럼 광콘덴서(122)와 광섬유(123)를 구비함으로써, 조명 유닛(120)은 시료에 증강된 암시야 조명을 제공할 수 있다.

[0043] 광 가이드 유닛(130)은 전술한 암시야 조명에 의해 시료로부터 나오는 광을 집광 및 확대하는 대물 렌즈(131), 및 대물 렌즈(131)를 통과한 시료의 광을 집광하는 프리즘(132)을 포함할 수 있다. 여기서, 대물 렌즈(131)로는 오일 타입의 대물 렌즈가 적용될 수 있다. 한편, 프리즘(132)은 대물 렌즈(131)를 통과한 시료의 광을 모음으로써 그 광의 세기(intensity)를 증대시키는 역할을 한다. 이러한 프리즘(132)은 전술한 광콘덴서(122)와 더불어 플라즈몬 나노 물질의 산란 광을 검출을 가능하도록 하기 위해 필수적인 구성이다.

[0044] 이러한 광 가이드 유닛(130)은 시료의 광에 대해 특정 대역의 파장을 선택적으로 통과시키는 하나 이상의 파장 선택기인 광학 필터(133)를 더 포함할 수 있다. 본 실시예에서 광학 필터(133)는 대물 렌즈(131)와 프리즘(132) 사이에 배치된다. 도 2에 도시된 바와 같이, 광 가이드 유닛(130)의 여러 장의 광학 필터(133)를 구비하는 경우 광학 필터(133)는 박스 형태의 외부 케이싱 내에 구비될 수 있다.

[0045] 전술한 바와 같이, 플라즈몬 나노 물질로는 금나노입자(GNP), 금나노막대(GNR), 또는 은나노입자(SNP)가 사용될 수 있다. 도 4에는 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자에 대해 공명 산란 광의 파장 분포가 나타나 있다. 도 4에 도시된 바와 같이, 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자의 산란 광들은 다른 파장에서 피크값을 갖는다.

[0046] 따라서, 관찰 대상 시료에 플라즈몬 나노 입자로서 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자가 포함된 경우 광 가이드 유닛(130)은 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자에 각각 대응하는 3장의 광학 필터(133)를 포함할 수 있다.

[0047] 도 5는 이러한 3장의 광학 필터(133)를 이용하는 파장 변조(wavelength modulation)를 통해 얻을 수 있는 이미지에 대해 설명하기 위한 것이다.

[0048] 도 5(A)는 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자가 200 nm 이하의 근접 거리에 있는 영역을 원거리장(far-field) 광학 현미경으로 검출한 이미지를 보이는 것인데, 빛 회절로 인해 입자의 크기나 모양과 같은 고유 특성이 상실됨을 볼 수 있다. 한편, 도 5(B)는 동일 영역에 대해 도 2의 이미지 검출 시스템으로 검출한 이미지를

보이는 것인데, 각 나노 입자들이 공명 산란에 따른 특이적 색을 나타내지만 상호 간의 혼선 산란(cross-talk scattering)에 의해 입자들의 여러 색이 섞여진 이미지가 얻어지게 된다.

[0049] 도 5(C), 도 5(D), 및 도 5(E)는 상기 동일 영역에 대해 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자 각각에 상응하는 광학 필터들(133)을 사용하여 얻어지는 이미지들을 보인다. 즉, 도 5(C), 도 5(D), 및 도 5(E)는 광학 필터(133)를 통해 파장 변조된 각 나노 입자의 이미지라 할 수 있는데, 이러한 파장 변조에 의하면, 다른 종류의 나노 물질들이 인접 배치된 이미지 영역에 발생되는 전술한 혼선 산란(cross-talk scattering)을 회피할 수 있다. 또한, 이러한 파장 변조는 검출하고자 하는 특정 종류의 나노 물질에 대한 이미지만을 선별적으로 검출하고자 할 때 유용하게 적용될 수 있다.

[0050] 광 검출 유닛(140)은 광다이오드 어레이(photodiode array: PDA), 전하 주입 장치(charge injection device: CID), 전하-쌍 장치(charge-couple device, CCD), 및 디지털 일안 반사식 카메라(digital single lens reflex camera) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0051] 본 실시예의 경우, 광 검출 유닛(140)은 시료 이미지를 고감도 흑백 이미지로 검출하는 CCD(charge-couple device: 141), 및 시료 이미지를 칼라 이미지로 검출하는 CDC(칼라 디지털 카메라: 142)로 구성된다. 시료의 광이 CCD(141)와 CDC(142)에 안내될 수 있도록, 전술한 광 가이드 유닛(130)은 빔 스플리트(beam split: 134)를 더 포함할 수 있다.

[0052] 도 2에 도시된 바와 같이, 이미지 검출 장치(100)는 재물대(110)를 상하로 승강시키는 승강 모터(150)를 더 포함할 수 있다. 승강 모터(150)를 통해 재물대(110)에 안착된 관찰 대상 시료를 상하 방향(Z축 방향)으로 이동시킬 수 있으며, 이러한 상하 시료의 상하 이동을 통해 시료에 대한 3차원 영상을 얻을 수 있다.

[0053] 이미지 처리 장치(200)는 관찰 대상 시료에 포함된 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)를 측정하고 그 측정된 국산화적인 정밀도에 기초하여 검출된 이미지를 재구성한다.

[0054] 여기서, 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도를 측정하는 것은 플라즈몬 나노 물질의 검출 이미지의 국소 분포(localization distribution)를 측정하여 그 분포의 중심 좌표 및 표준편차를 연산하는 것을 말한다.

[0055] 도 6에 도시된 바와 같이, 플라즈몬 나노 물질의 검출 이미지의 국소 분포는 가우시안 분포(Gaussian distribution)로 나타나게 된다. 도 7은 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자에 대해 측정된 국소 분포로부터 연산되는 중심 좌표 및 표준 편차를 보이는 예이다. 도 7의 예에서, 금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자에 대해 연산된 표준 편차는 각각 2.5nm, 5.0nm, 2.9nm로 표시되어 있다.

[0056] 이미지 처리 장치(200)에 의한 이미지의 재구성은 플라즈몬 나노 물질의 이미지에서 중심 좌표로부터 표준 편차 이내의 영역은 남기되 중심 좌표로부터 표준 편차 이상 떨어진 영역을 제거하는 방식으로 수행될 수 있다. 전술한 도 6을 예로 들면, 플라즈몬 나노 물질(금나노입자, 금나노막대, 및 은나노입자)의 이미지에서 표준 편차의 값에 대응하는 거리를 표시하는 점원(dotted circle) 밖에 있는 영역을 제거하는 방식으로, 이미지의 재구성 과정이 진행될 수 있다.

[0057] 이미지 처리 장치(200)는 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘과 같은 공지의 알고리즘을 적용하여 상술한 국산화적인 정밀도(localization precision)의 측정을 수행할 수 있다. 또한, 이미지 처리 장치(200)는 이러한 이미지 처리 알고리즘이 컴퓨터 프로그램으로 탑재된 마이크로프로세서 또는 그러한 마이크로프로세서를 구비한 각종 컴퓨팅 장치로 구현될 수 있다.

[0058] 이미지 표시 장치(300)는 이미지 처리 장치(200)에 의해 재구성된, 관찰 대상 시료의 이미지를 표시한다. 이미지 표시 장치(300)에 의해 표시되는 이미지는 스틸 영상일 수도 있고 동영상일 수도 있다.

[0059] 이미지 표시 장치(300)로는 이미지 처리 장치(200)에 연결되어 이미지 처리 장치(200)가 제공하는 이미지를 표시할 수 있는 것이라면 어떤 것이라도 적용될 수 있다. 예로써, 이미지 표시 장치(300)는 이미지 표시 장치(300)에 통합된 디스플레이로 구현되거나 별도의 모니터 형태로 구현될 수도 있다.

[0060] 도 8은 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 획득 방법의 일 실시예를 보이는 흐름도이다. 이를 참조하여 전술한 초고분해능 이미지 획득 시스템(1)을 적용한 초고분해능 이미지 획득 방법의 일 실시예에 대해 설명한다.

[0061] 먼저, 적어도 한 종류의 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 관찰 대상 시료를 준비하여 재물대(110) 상에 배치시킨다(S10).

[0062] 이때 플라즈몬 나노 물질로는 예로써 금나노입자(GNP), 금나노막대(GNR), 및 은나노입자(SNP) 중 한 종류 이상이 사용될 수 있다. 그리고 관찰 대상 시료는 이러한 플라즈몬 나노 물질을 포함하는 생체 분자가 사용될 수 있으며, 앞서 언급한 바와 같이 여기서 생체 분자는 세포, 단백질, 유전자, 효소 등 생체 내의 모든 분자를 의미한다.

[0063] 다음으로, 조명 유닛(120)을 통해 재물대(110) 상의 관찰 대상 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하면서 광 가이드 유닛(130)을 통과한 시료의 광을 광 검출 유닛(140)을 통해 검출한다(S20).

[0064] 앞서 설명한 바와 같이, 광 가이드 유닛(130)은 대물 렌즈(131) 및 프리즘(132)을 포함할 수 있으며, 대물 렌즈(131)와 프리즘(132) 사이에는 하나 이상의 광학 필터(133)가 배치될 수 있다. 그리하여, S20 단계는 광학 필터(133)를 통해 광학 필터(133)에 상응하는 대역의 파장만을 선택적으로 통과시키면서 수행될 수 있다.

[0065] 조명 유닛(120)을 통해 관찰 대상 시료에 증강된 암시야 조명을 제공하고 광가이드 유닛(130)에 프리즘(132)을 구비함으로써, 관찰 대상 시료에 포함된 플라즈몬 나노 물질의 산란 광의 검출이 가능하게 된다.

[0066] 다음으로, 광 검출 유닛(140)에 의해 검출된 관찰 대상 시료의 이미지를 이미지 처리 장치(200)를 통해 재구성한다.

[0067] 앞서 설명한 바와 같이, 이미지의 재구성은 시료에 포함된 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도(localization precision)에 기초하여 수행될 수 있으며 그러한 국산화적인 정밀도의 측정은 가우시안 맞춤(Gaussian fitting) 알고리즘 또는 점상강도분포함수(point spread function) 중심국 알고리즘과 같은 공지의 알고리즘을 적용하여 수행될 수 있다.

[0068] 또한 앞서 설명한 바와 같이, 상기 이미지의 재구성 과정에서 이미지 처리 장치(200)에 의한 이미지의 재구성은 플라즈몬 나노 물질의 이미지에서 중심 좌표로부터 표준 편차 이내의 영역은 남기되 중심 좌표로부터 표준 편차 이상 떨어진 영역을 제거하는 방식으로 수행될 수 있다(도 7 참조).

[0069] 마지막으로, 이미지 처리 장치(200)에 의해 재구성된 관찰 대상 시료의 이미지를 이미지 표시 장치(300)를 통해 표시한다(S40).

[0070] 도 9는 전술한 초고분해능 이미지 검출 방법의 실시예를 실제 적용하여 얻어낸 이미지들의 예를 보이는 도면이다.

[0071] 도 9의 이미지들은 얻는 과정에서, 헬라(HeLa) 세포의 4시간 배양을 통해 103-nm 금나노입자(GNP), 80-nm 은나노입자(SNP), 40-nm 금나노막대(GNR)을 흡수시킨 것을 관찰 대상 시료로 사용하였다.

[0072] 도 9의 (A),(B),(C)는 이미지 처리 장치(200)에 의한 이미지 재구성이 수행되기 전의 것들을 나타내는데, 플라즈몬 나노 물질들(GNP,SNP,GNR)이 200 nm 이하의 근접 거리에 배치된 곳에서는 그 물질들이 식별되지 않는다.

[0073] 하지만, 이미지 처리 장치(200)에 의한 이미지 재구성이 수행된 도 9의 (D)를 살펴보면, 200 nm 이하의 근접 거리에 배치된 플라즈몬 나노 물질들(GNP,SNP,GNR)이 식별될 수 있음을 볼 수 있다. 그리고 도 9의 (D)에서 그 우측 상단에 삽입된 방향각 표시는 금나노막대(GNR)의 방향각이 124° 로 해결되었음을 보이고 있다.

[0074] 이상 설명한 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 검출 시스템 및 방법에 의하면, 플라즈몬 나노 물질의 공명 산란 광을 검출하고 이를 플라즈몬 나노 물질의 국산화적인 정밀도에 기초하여 재구성함으로써 관찰 대상 시료에 대한 200 nm 이하의 초고분해능 이미지를 획득할 수 있다.

[0075] 그리고, 본 발명에 따른 초고분해능 이미지 검출 시스템 및 방법에서는 기존의 초고해상도 형광 현미경(SRFM)에서 채택된 형광 표지법을 사용하는 대신 플라즈몬 나노 물질을 이용하므로, 형광 염료의 사용으로 인해 발생되는 문제점들(광표백, 형광 신호의 변동, 독성) 및 부수적인 단점들(시료 전처리에 따른 시간 소모, 표적 시료의

오염)을 극복할 수 있다.

[0076] 이상 본 발명의 바람직한 실시 예를 참조하여 설명하였지만, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자라면 이하의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

부호의 설명

[0077] 1 : 초고분해능 이미지 획득 시스템

100 : 이미지 검출 장치

110 : 재물대

120 : 조명 유닛

121 : 광원

122 : 광콘덴서

123 : 광섬유

130 : 광 가이드 유닛

131 : 대물 렌즈

132 : 프리즘

133 : 광학 필터

134 : 빔 스플리트

140 : 광 검출 유닛

141 : CCD

142 : CDC

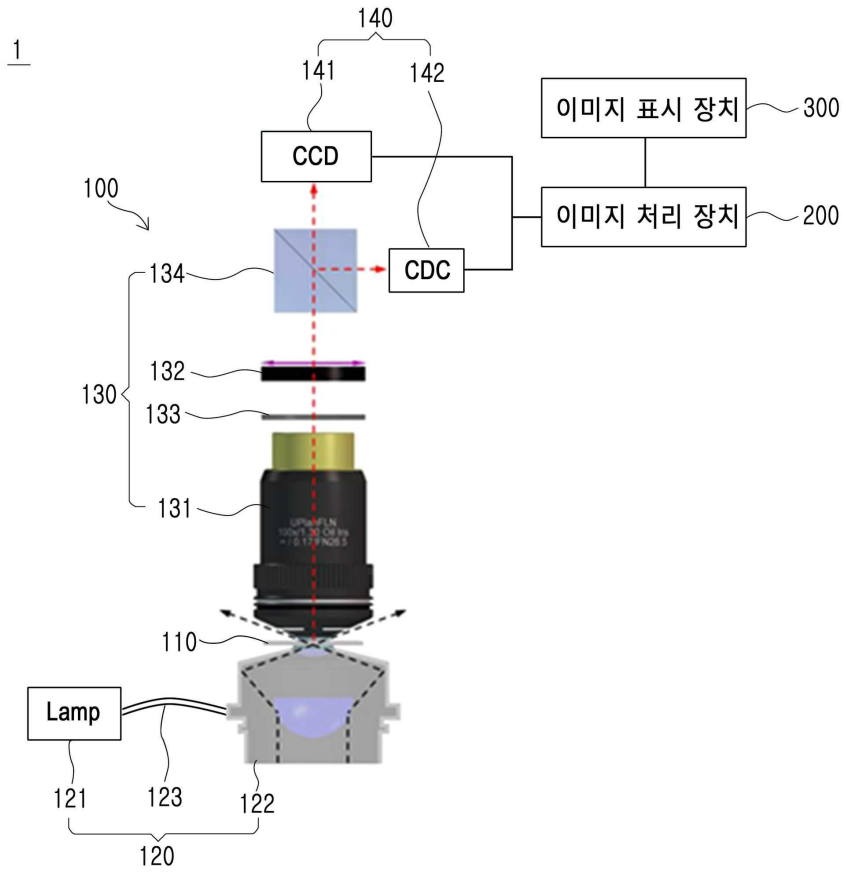
150 : 승강 모터

200 : 이미지 처리 장치

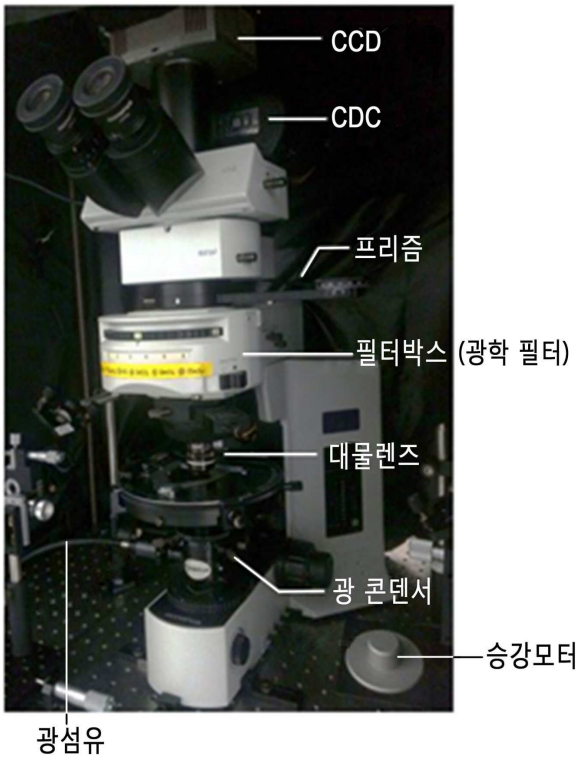
300 : 이미지 표시 장치

도면

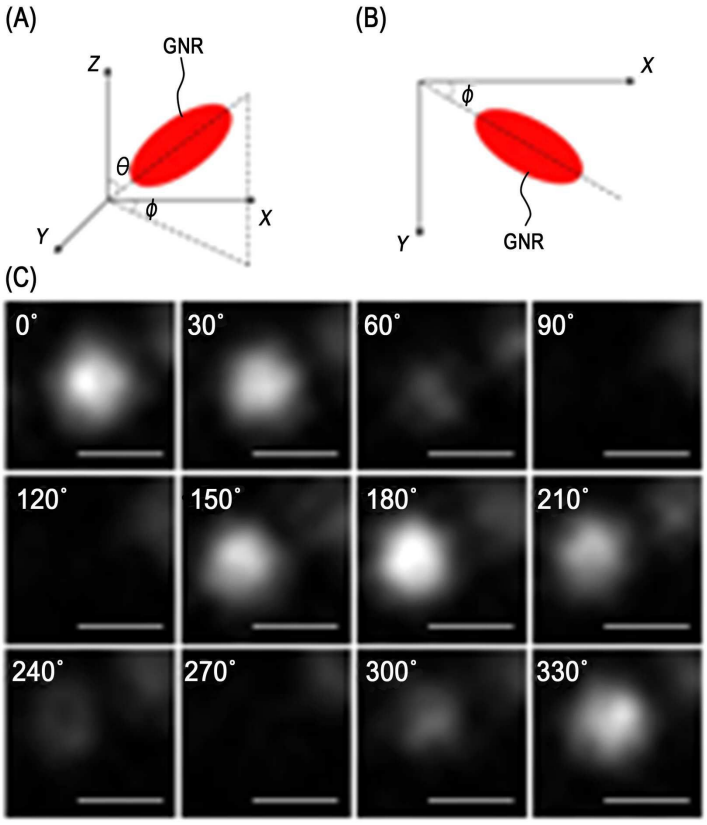
도면1


1
140
141
142
이미지 표시 장치
300
CCD
100
이미지 처리 장치
200
CDC
134
132
130
133
131
110
Lamp
121
123
122
120

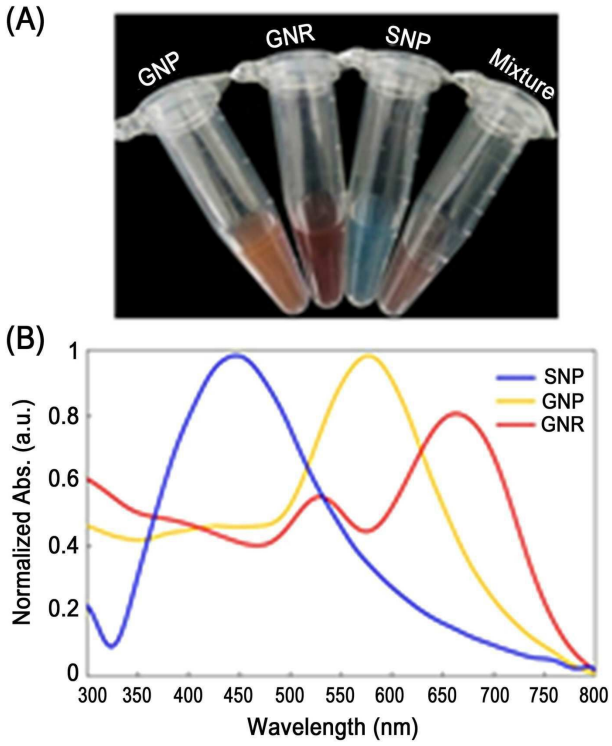
도면2


CCD
CDC
프리즘
필터박스 (광학 필터)
대물렌즈
광 콘덴서
승강모터
광섬유

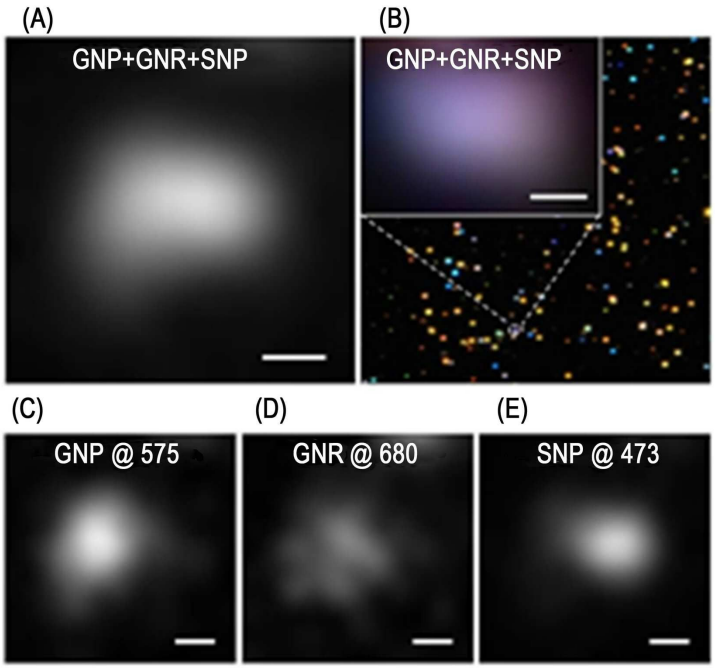
도면3


(A)
GNR
Z
θ
ϕ
Y
X
(B)
X
ϕ
Y
GNR
(C)
0°
30°
60°
90°
120°
150°
180°
210°
240°
270°
300°
330°

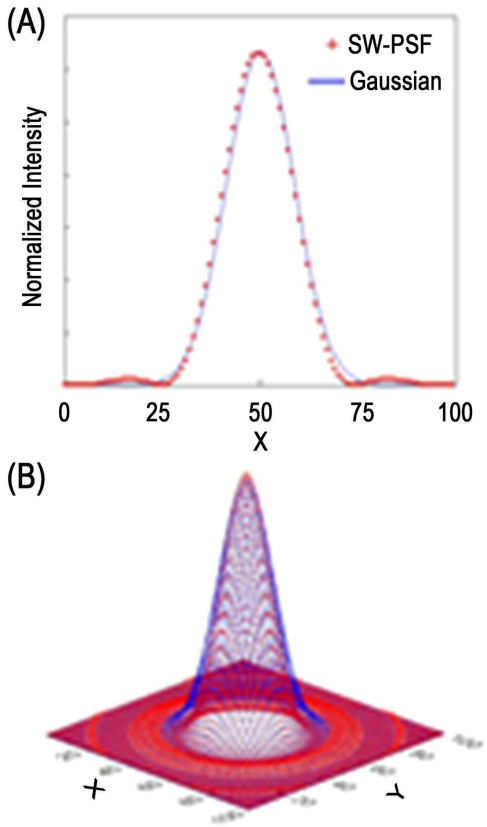
도면4


(A)
GNP
GNR
SNP
Mixture
(B)
Normalized Abs. (a.u.)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
300 350 400 450 500 550 600 650 700 750 800
Wavelength (nm)
SNP
GNP
GNR

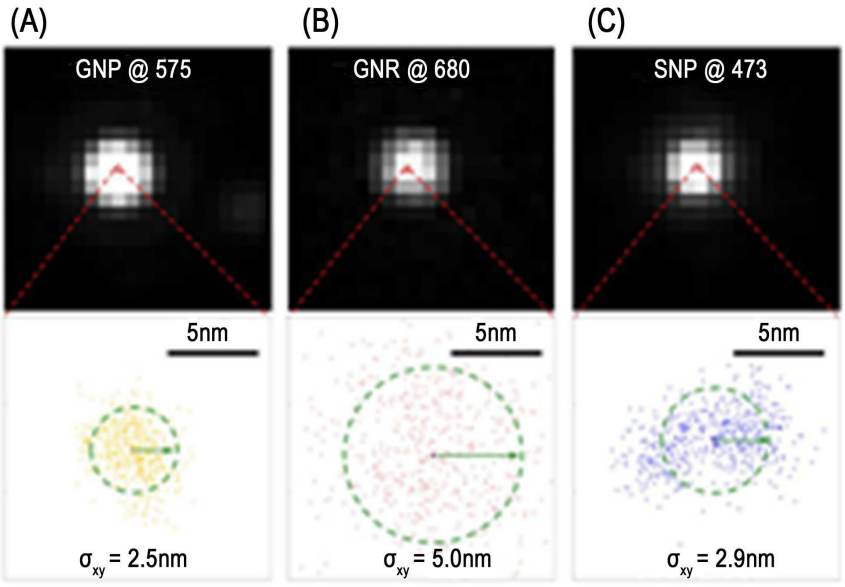
도면5


(A)
GNP+GNR+SNP
(B)
GNP+GNR+SNP
(C)
GNP @ 575
(D)
GNR @ 680
(E)
SNP @ 473

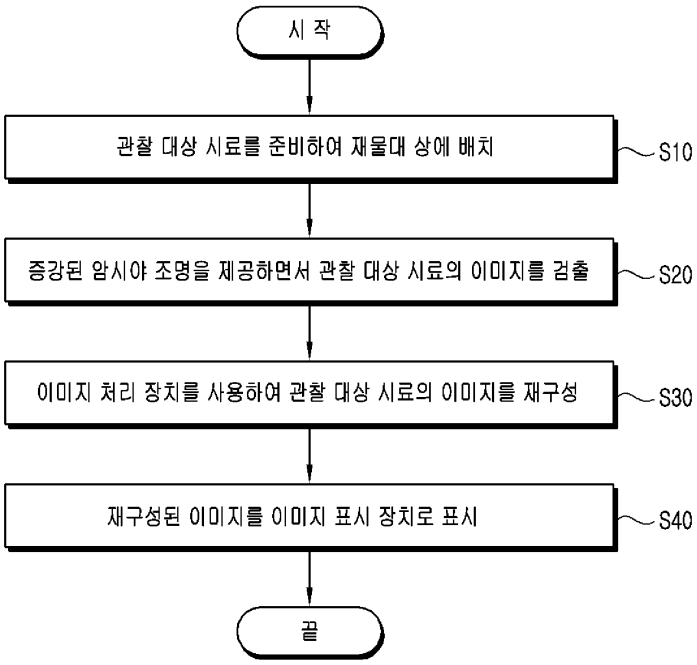
도면6


(A)
SW-PSF
Gaussian
Normalized Intensity
0
25
50
75
100
X
(B)
Y
X

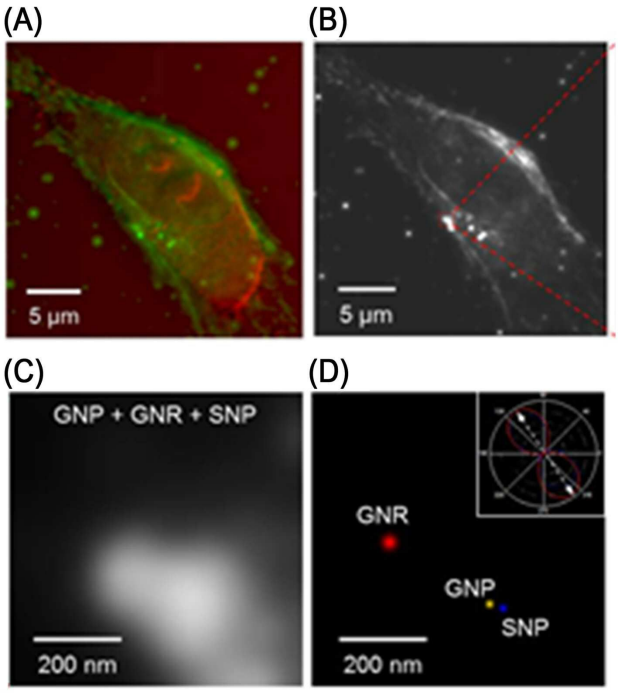
도면7


(A)
GNP @ 575
5nm
σxy = 2.5nm
(B)
GNR @ 680
5nm
σxy = 5.0nm
(C)
SNP @ 473
5nm
σxy = 2.9nm

도면8


시 작
관찰 대상 시료를 준비하여 재물대 상에 배치
S10
증강된 암시야 조명을 제공하면서 관찰 대상 시료의 이미지를 검출
S20
이미지 처리 장치를 사용하여 관찰 대상 시료의 이미지를 재구성
S30
재구성된 이미지를 이미지 표시 장치로 표시
S40
끝

도면9


(A)
(B)
5 μm
5 μm
(C)
(D)
GNP + GNR + SNP
200 nm
GNR
GNP
SNP
200 nm