

碩士學位論文

형광 공초점 현미경에서의
side-lobe 감소 방안에 대한 연구



濟州大學校 大學院

物 理 學 科

趙 亨 峻

2002 年 12 月

형광 공초점 현미경에서의
side-lobe 감소 방안에 대한 연구

指導教授 劉 榮 勳

趙 亨 峻

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2002 年 12 月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

趙亨峻의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2002 年 12 月

A Study on the Effect of the Side-lobe Axial Image of Fluorescence type Confocal Microscope

Hyoung-Jun Cho

(Supervised by Propessor Young-Hun Yu)



A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

2002. 12.

This thesis has been examined and approved.

2002.

Department of Physics
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

SUMMARY

I. 서 론	1
II. 이 론	3
1. 공초점 현미경의 원리	3
2. 공초점 광학 현미경과 형광 공초점 현미경	3
3. 수차와 side-lobe	8
4. Airy 원판과 Rayleigh 기준	8
5. 초점심도	10
6. Sine 조건과 Herschel 조건	12
7. 렌즈 왜곡에 의한 경로차	12
8. Fresnel 방정식	16
III. 실험 방법	24
1. 실험 장치	24
2. 실험 방법	28
IV. 결과 및 논의	29
1. 실험 결과	29
V. 결 론	41
VI. 참 고 문 헌	42

SUMMARY

The effects of side-lobe on the axial response in fluorescence type confocal microscope have been investigated by computer simulation and experiment. The axial response becomes broad and asymmetric with side-lobes, and the peak intensity of the image was greatly reduced because the Herschel condition was violated. We found the condition for the minimized of side-lobe with the Herschel condition according to change of optical path altering the distance from sample to objective lens and from objective lens to image. From the results of computer simulation and experiment, we found that the distribution of intensity was shifted, the peak of intensity being increased and the axial response was symmetric after compensating a phase error according to thickness was increased. From analysis of this results, an optimized axial response can be achieved by minimizing side-lobe and side-lobe can be minimized by compensating phase error

I. 서론

현재 물리학, 생물학, 유전공학, 전자공학 등의 발전으로 미시세계의 구조 및 물질 특성에 대한 관측요구가 높아지고 있다. 또한 물리학 및 정밀기계산업 등 응용과학이 발전됨에 따라 단순한 형태의 관측이 아닌 그 목적에 따라 시료의 물리적, 화학적 특성을 정량적으로 측정 할 수도 있으며, 2차원적인 구조에서 벗어나 3차원의 입체적인 상을 관찰 할 수 있는 현미경이 개발되고 있다. 현재 주로 사용되고 있는 현미경으로는 광학 현미경, 형광 현미경(fluorescent microscope), 주사 전자 현미경(Scanning electron microscope : SEM), 투과 전자 현미경(transmission electron microscope : TEM), 주사 탐침 현미경(Scanning probe microscope : SPM), 원자 간력 현미경(atomic force microscope : AFM), 공초점 현미경(confocal microscope) 등이 있다. 3차원의 상을 구성하는 현미경에는 대표적으로 SEM, AFM, 공초점 현미경 등이 있다. 그러나 SEM, AFM의 경우 세포 또는 조직 처리 시 고정 및 관측 등의 과정에서 높은 에너지 및 물리적인 접촉 등으로 시료에 직접적인 손상을 줄 뿐 아니라, 시료 주사 속도가 매우 느려 살아 있는 시료의 빠른 움직임을 관찰할 수 없다. 이러한 단점을 보완하여 개발된 것이 바로 공초점 현미경이다(Fukadno 등(2000), Fujita 등(2000), Ilev 등(2000), Ishihara 등(1999), Nutter 등(1998), Schrader 등(1998), Yang 등(2000)).

공초점 현미경은 광원에서 나온 빛이 렌즈에 의해 시료 표면에 조사되고, 렌즈의 공초점 위치에 바늘 구멍을 설치하여, 시료 표면에서 반사되어 나오는 빛의 초점 외상을 제거함으로써 고해상도의 상을 얻을 수 있게 한 것이다(Minsky 등(1961), Shotton 등(1989)). 공초점 현미경은 형광 염색 유·무에 따라 공초점 광학 현미경과 형광 공초점 현미경으로 구분된다. 시료 표면에서 반사되어 나오는 빛을 검출하는 방식을 공초점 광학 현미경이라 한다. 이는 전체 상을 얻는데는 많은 시간이 소요되며, 시료의 부분적인 반사율 차이에 따라 시료의 상이 변형 될 우려가 있으며, 시료의 특정한 조직을 선별적으로 관측 할 수도 없다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 개발된 것이 형광 공초점 현미경이다. 이는 시료를 형광 염색함으로써, 짧은 시간 내에 상을

구현 할 수 있고, 특정조직을 선별적으로 관찰 할 수 있으며, 시료의 부분적인 굴절률 차이에 따라 상이 변형될 우려가 거의 없다. 그러나 광학계가 갖는 근본적인 문제인 잡음, 구조적인 문제에 의한 위상 오차, 간섭, 회절 등의 문제를 해결한다면, 보다 나은 상을 얻을 수 있을 것이다(Boone 등(1998), Christian 등(1995), Cogswell 등(1991), Sheppard 등(1992), Sheppard 등(1988), Sheppard 등(1981), Steffen 등(1996)). 또한 해상도의 문제는 광축 방향의 해상도를 결정짓는 초점심도(depth of focus : DOF)의 크기가 평면방향의 해상도를 결정짓는 Airy원판의 크기 보다 현격히 크므로, 광축 방향에 대한 해상도가 평면 방향의 해상도 보다 현저하다. 이는 시료를 관측하여 3차원의 상을 구성할 때, 광축과 평면방향에 따른 해상도의 차이를 현격히 나타내므로 해상도 향상에 있어서 광축 방향의 해상도 향상은 시급한 과제라 할 수 있다. 또한 시료의 굴절률은 세포의 염색과정 및 측정과정에서 물, 식염수, 덮개유리 등의 사용으로 불규칙적으로 바뀌게 되며, 이러한 시료의 굴절률의 차이는 완벽한 형광 공초점 현미경을 제작하더라도 광축 방향에 경로 차를 발생시키게 되고, 이는 광축 방향에 side-lobe를 발생시키므로 광축 방향의 해상도 저해요인으로 작용한다.

본 연구에서는 형광 공초점 현미경의 자체의 문제가 아닌 시료의 굴절률 차이에 따라 조사된 빛의 경로가 바뀌게 되고, 그에 따른 위상 오차의 문제를 해결하여 줌으로써 광축 방향에 대한 해상도를 보다 높이고자 함이다. 따라서 근본적인 위상경로 차를 감소시키기 위하여, Herschel 조건을 도입하여 전산시능을 통한 side-lobe의 최소화 조건을 찾아내고, 이를 실제 형광 공초점 현미경에 적용하여 광축 방향에 대한 side-lobe를 최소화하였다.

II. 이론

1. 공초점 현미경의 원리

공초점 현미경의 원리는 점 광원이 렌즈에 의해 초점이 형성되고 시료의 초점에서 반사된 빛은 다시 점 광원과 같은 위치에 초점을 형성하게 되는데 이를 공초점이라 한다(Minsky 등(1961), Shotton (1989)). Fig 1은 이러한 공초점을 검출하기 위해 반투과 거울을 사용하여 측정의 위치만을 바꾼 것이다. 또한 공초점 현미경의 가장 큰 장점은 Fig. 1에서 처럼 공초점 부분에 바늘 구멍을 사용하여 비 초점면을 제거하도록 한 것이다. 반면 기존의 광학 현미경은 초점과 초점 외의 정보를 모두 받아들임으로서 수차 등의 왜곡에 의한 영향으로 전체적인 분해능이 크게 감소한다.

그러므로 공초점 현미경은 일반 광학 현미경에 비하여 높은 해상도를 가질 수 있는 것이다. 또한 초점면의 정보만을 받아들임으로써 시료에 손상을 주지 않고 3차원의 상을 얻을 수 있다(Corle 등(1996)). 그러나 공초점 현미경은 공초점 된 위치에서의 점 광원만을 받아들이므로 그것으로 상을 구성 할 수는 없다. 이러한 이유로 공초점 현미경은 주사 방식을 통하여서 상을 구성한다. 현재 전산기를 사용한 상 구성 기술 (Video image processing technique)의 발전으로 주사방식을 통한 상의 구성은 3차원으로 측정된 시료를 원하는 위치에서 원하는 부분을 관찰 할 수 있도록 할 뿐 아니라, 상 구성 소요시간 역시 매우 짧아 일반 광학 현미경과 같이 살아 움직이는 시료의 관찰이 가능해졌다. 또한 제어공학의 발전으로 주사 시 시료를 움직일 수 있는 한계가 수십 nm영역까지 좁혀짐으로서 보다 정밀한 공초점 현미경을 구성 할 수 있다.

2. 공초점 광학 현미경과 형광 공초점 현미경

공초점 광학 현미경과, 형광 공초점 현미경의 차이점은 시료의 형광 염색 여부이다. 그러나 이는 단순한 시료의 형광 염색 유·무에 그치지 않고 공초점 현미경의구조 및

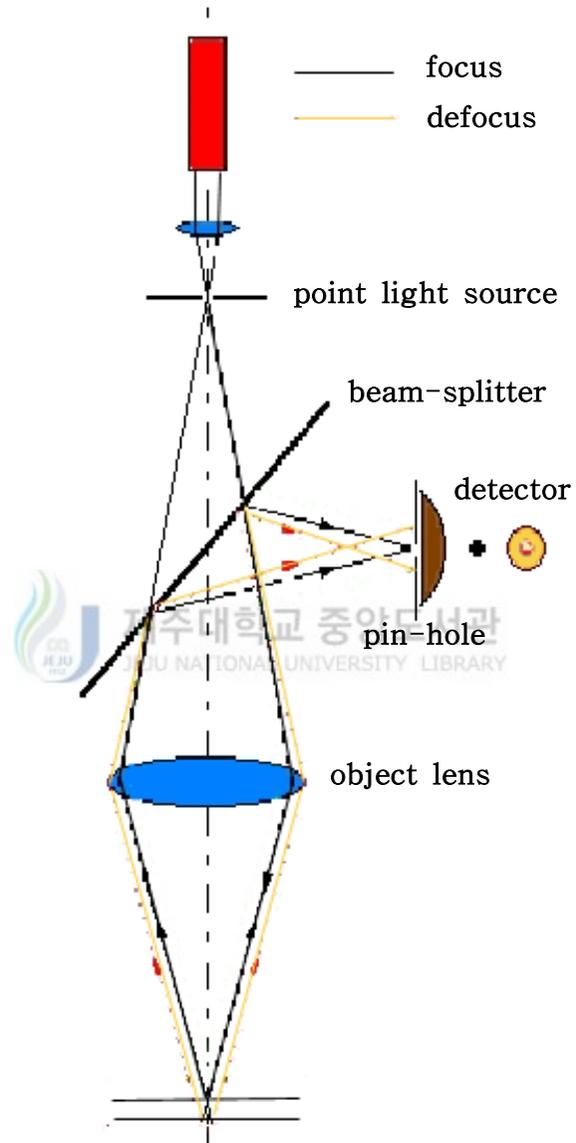


Fig 1. The principle of confocal microscope

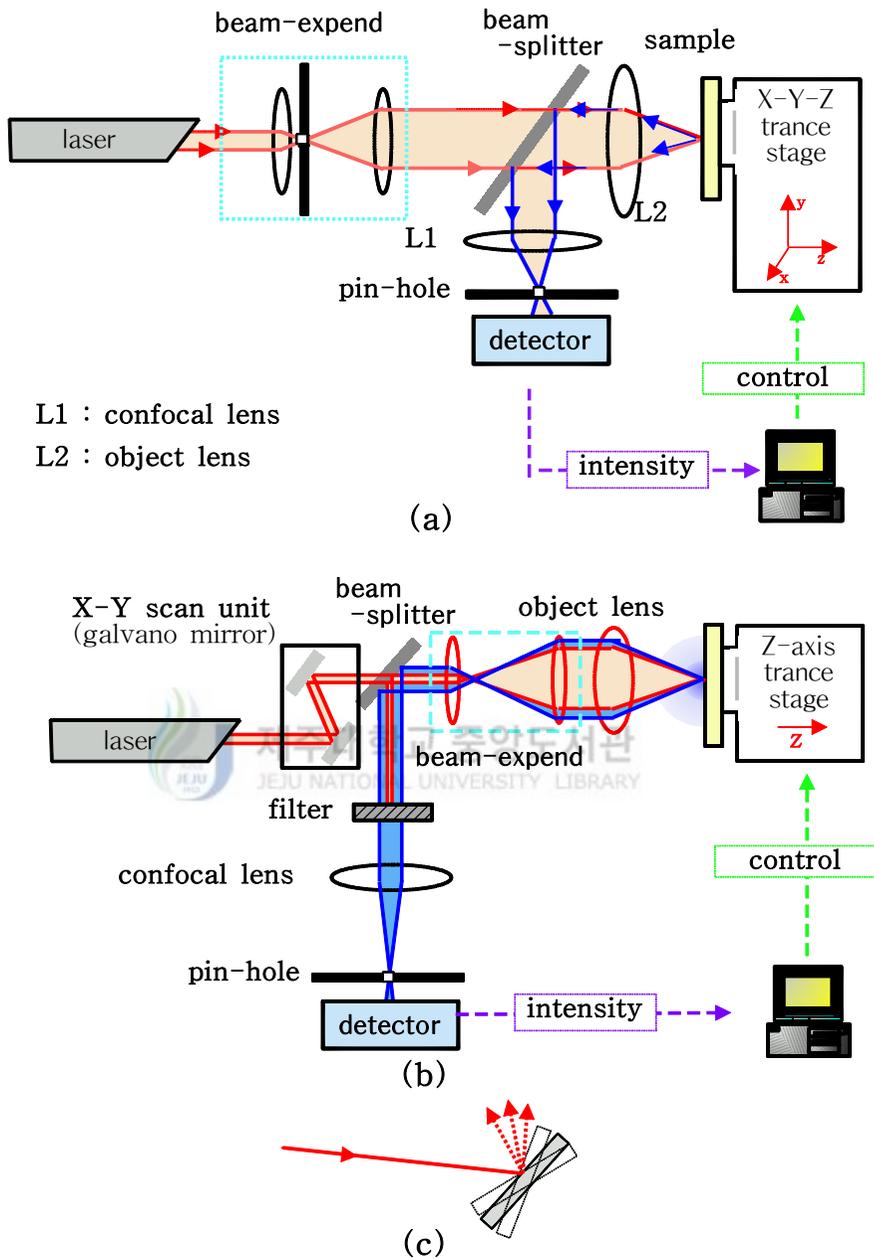
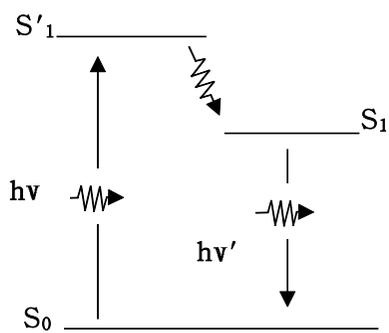


Fig. 2 Schematic diagram of confocal microscope (a) Reflective type confocal microscope (b) Fluorescence type confocal microscope (c) Schematic diagram of Galvano-mirror scanning system

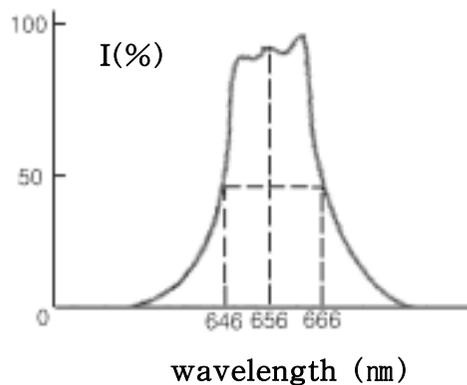
그 특성을 결정짓는 결정적인 요인이 된다. 우선 공초점 광학 현미경의 경우 시료에 형광 염색 등의 불필요한 전처리 과정 없이 시료를 관찰 할 수 있다. 공초점 광학 현미경의 구조는 Fig. 2(a)에서 보는 바와 같다. Fig. 2(a)에서 주목 할 만한 부분은 X-Y-Z 이동장치이다. 공초점 현미경의 상 구성 방법은 주사 방법이며, 공초점 광학 현미경의 경우 시료 표면에 초점이 맺힌 부분의 반사에 의한 검출을 위해서는 시료를 직접 움직여야 한다. 즉 주사 속도가 매우 느리며, 시료의 부분적인 반사율의 차이에 따라 검출 결과가 왜곡 될 수 있으며, 시료의 표면이 아닌 내부에서는 반사가 거의 일어나지 않으므로, 시료가 세포와 같이 반투명한 물질이라 할지라도 반사가 매우 미약하여, 3차원 상의 구성 시 시료 내부의 구조를 확인하기 어렵다. 또한 시료의 특정한 부분을 관찰하고자 할 때 그 부분에 대한 확실한 차이가 없으므로 판별이 힘들다. 공초점 광학 현미경은 반도체의 3차원 상 구성 및 고체의 표면을 관찰하고자 할 때 사용되고 있으나, AFM 및 SEM 등의 고해상도 현미경의 등장으로 그 수요가 줄고 있다.

현재 대부분의 공초점 현미경은 이러한 단점을 보완한 형광 공초점 현미경이다. 우선 형광이란 형광 색소의 분자들이 빛을 흡수하면 그 분자들이 낮은 에너지 준위에서 높은 에너지 준위로, 즉 안정화 상태 S_0 에서 S'_1 로 변하게 된다. 또한 여기 된 전자들은 다시 안정된 상태로 복귀한다(Fig. 3(a)). v 가 v' 으로, 즉 λ 가 장파장인 λ' 으로 방출된다(Fig. 3(a)). 다시 말하면 에너지의 차이 $\Delta E = (h\nu - h\nu')$ 가 발생하는 데 이러한 현상을 스토크스 이동(Stokes shift)라 한다. 이때 방출이 msec~sec 사이에서 일어나는 느린 반응의 경우를 인광이라 하고, 방출이 nsec~msec의 비교적 빠른 경우를 형광이라 한다. Fig. 3(c)는 형광 색소 분자가 흡수하는 빛의 파장대를 나타낸 것이고, Fig. 3(d)는 형광 물질에서 여기 된 파장대를 나타낸 것이다. Fig. 3(c), Fig. 3(d)에서 보여지는 형광 물질의 경우는 He-Ne 레이저의 633 nm 파장을 조사하였을 경우, 형광 물질에서 여기 된 파장은 약 660 nm에서 최고 값이 검출된다. 즉 이와 같은 경우 Fig. 3(b)에서와 같은 약 646 nm ~ 666 nm 파장대 만을 통과시키는 Bandpass-Filter를 사용한다면, 형광 된 파장만을 선택적으로 통과시킬 수 있게 된다.

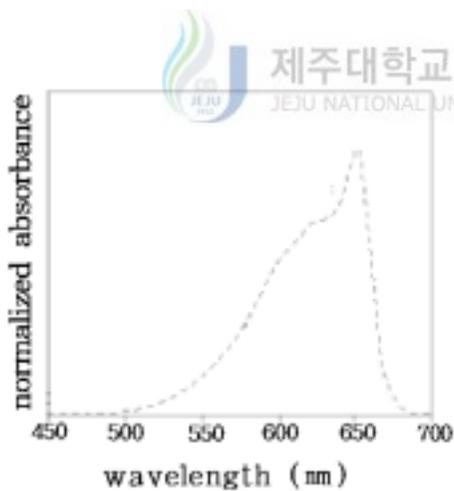
이러한 형광현상을 이용한, 형광 공초점 현미경의 경우 시료에 형광 염색을 함으로써, Fig. 2(b)에서 보는 바와 같이 평면 방향의 조사는 Galvano-mirror를 사용하여, 조사선의 경로만을 바꾸어 줌으로써(Fig. 2(c)), 빠른 주사 속도를 가지며, 시료의 굴



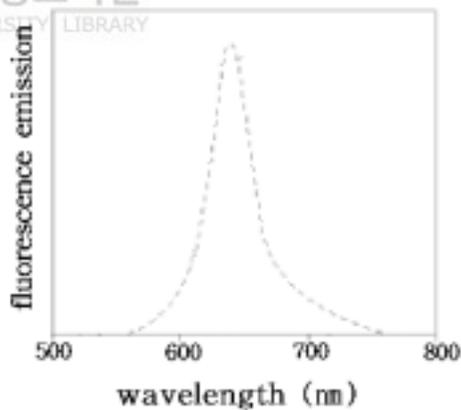
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 3 Fluorescence and Bandpass-Filter (a) Energy level of fluorescence (b) Bandpass wave length range of Bandpass-Filter (c) Absorption wave length (d) Fluorescence Emission wave length

절을 차에 무관하다. 세포 시료의 경우 항원 항체 반응을 이용한 형광 염색 기법으로 특정 부분의 염색이 가능하며, 조직내의 특정 부분을 선별적으로 관찰 할 수 있다. 또한 조사된 빛은 새로운 점 광원을 형성함으로써 세포 내부의 구조를 확실히 검출할 수 있게 된다. Bandpass-Filter를 사용하여, 시료 표면 등에서 반사되는 빛과 외부에서 유입되는 빛을 제거하고, 형광 물질에서 여기되는 파장대의 빛 만을 검출하므로써, 주변잡음을 최소화하여 보다 좋은 상을 구성할 수 있다.

3. 수차와 side-lobe

일반적으로 구면렌즈를 통과한 빛들이 한 초점에 모이지 않고, 초점주변에서 상이 변형되거나 뿌옇게 보이고, 선명도가 떨어지며, 색이 번지는 현상을 수차라 한다. 이러한 수차는 두 개 이상의 파장을 포함한 빛에서 발생하는 색 수차(chromatic aberration), 한 개의 파장에서 발생하는 단색 수차(monochromatic aberration) 두 가지로 구분된다. 색 수차는 빛의 파장에 따라 굴절 정도가 바뀌어 초점이 각기 다른 위치에 맺히는 현상이며, 단색 수차에는 구면수차, 코마수차, 비점수차, 상면수차, 만곡수차, 왜곡수차가 있는 데 이들 중 구면수차를 제외한 나머지 수차는 빛이 광축에서 벗어났을 때 발생한다. 이러한 수차는 공초점 현미경에서 단 파장의 레이저를 사용하고, 광축 방향과 일치하게 구성한다면 대부분의 수차에 의한 영향을 제거 할 수 있다. 그러나 구면수차는 렌즈 자체가 갖는 문제로 앞서 제시한 방법으로는 해결할 수 없다 (Hecht (1998)).

side-lobe란 검출 시 수차를 포함한 외적인 요인에 의하여 실제의 정보가 변형되는 현상을 말한다. side-lobe는 빛이 렌즈를 통과한 후 빛의 세기 분포에 잡음으로 작용하며, 전체적인 상에 변형을 가져온다(김억봉 (2001)).

4. Airy 원판과 Rayleigh 기준

평면파가 작은 원형 구멍을 통과하였을 때는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 막(Screen)

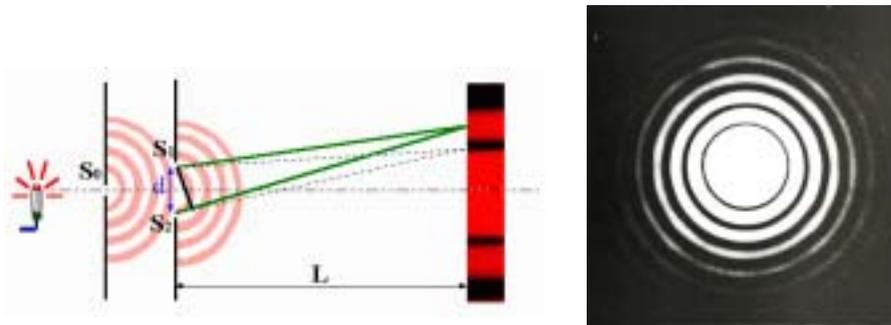


Fig. 4 diffraction profile

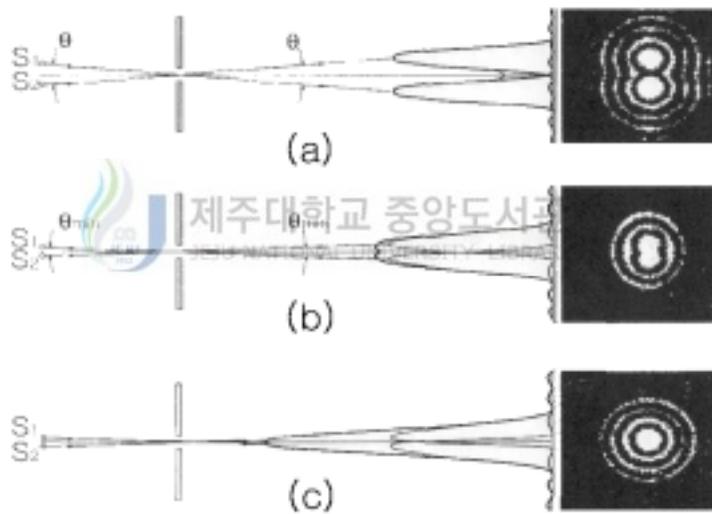


Fig. 5 Rayleigh Criterion for resolvability

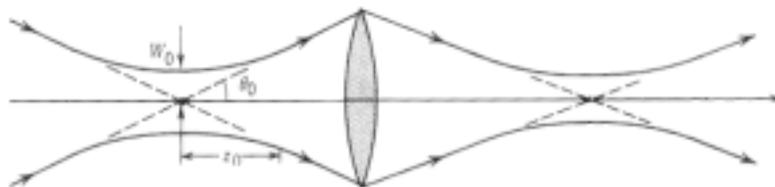


Fig. 6 Transmission of a Gaussian beam through a thin lens

상에 원형반점과 그를 둘러싸는 원형고리의 회절무늬가 나타난다. 이때 중심에 위치한 원형 반점을 Airy 원판이라고 하며, Airy 원판의 크기 w_0 는

$$w_0 = 1.22 \frac{f\lambda}{D} \quad (1)$$

이다. 여기서 D 는 구멍의 직경이며, f 는 초점거리, λ 는 빛의 파장이다. 이러한 에어원 판은 현미경 혹은 망원경 등의 광학 측정 기구의 평면 방향의 분해능을 결정짓는 중요한 요소이다. 이러한 회절 무늬의 식별 한계를 Rayleigh 기준이라고 하며, 간신히 분해되어 보이는 두 물체에 대한 점 사이의 한계 분리 각 θ_{\min} 은

$$\theta_{\min} = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (2)$$

로 정의된다. 여기서 D 는 렌즈의 직경이고, λ 는 빛의 파장이다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 두 점이 S_1, S_2 를 관찰한다고 하면, (a)의 경우는 $\theta > \theta_{\min}$ 으로 두 점이 완전히 분리 되어 관찰되며, (b)의 경우는 $\theta = \theta_{\min}$ 으로 두 점을 간신히 식별 할 수 있는 정도이며, (c)의 경우는 $\theta < \theta_{\min}$ 으로 두 점이 서로 겹쳐지기 때문에 식별이 불가능하다(Beiser (1991)).

5. 초점심도(DOF)

평행광선이 렌즈로 들어갔을 때 그 경로는 Fig. 6과 같게 된다. 여기서 초점심도는 Airy 원반의 $\sqrt{2}$ 배가되는 거리를 말한다. 초점심도 z_0 는

$$2z_0 = \frac{2\pi w_0}{\lambda} \quad (3)$$

로 정의된다. 여기서 w_0 는 식(1)에 나타난 Airy 원반의 크기이다. 이러한 초점심도는 대물렌즈의 광축 방향의 해상도를 결정하게 된다(Bahaa E. 등(1991)).

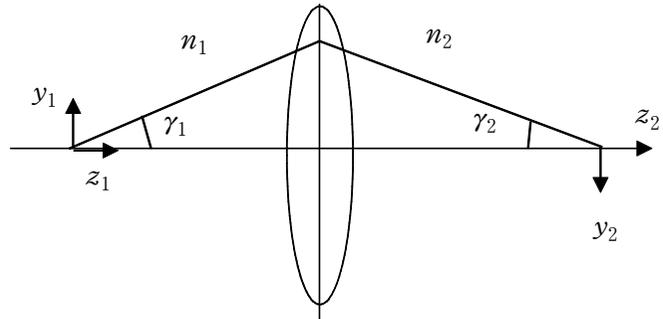


Fig. 7 Illustrating the sine condition and the Herschel condition

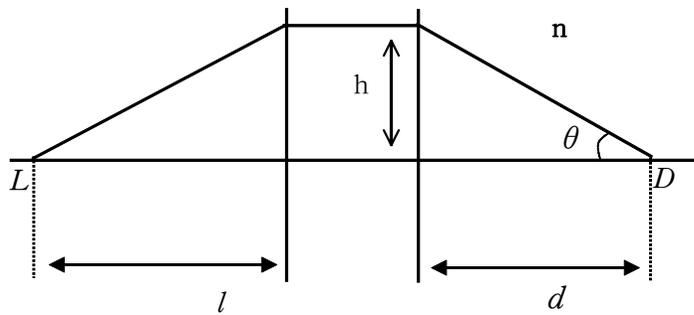


Fig. 8 Geometry of focusing by a lens

6. sine과 Herschel 조건

실제 광학계에서는 렌즈를 통과한 빛은 렌즈의 왜곡 때문에 한 초점에 맺히지 않는다. 렌즈의 왜곡이 없다면 Fig. 7과 같이 sine 조건을 만족해야한다. Sine 조건은

$$n_1 y_1 \sin \gamma_1 = n_2 y_2 \sin \gamma_2 \quad (4)$$

로 표현된다. 그러나 sine 조건을 만족시키지 못하면 렌즈를 통과한 빛이 한 초점에 형성되지 못하고 퍼지게 된다. 또한 완전한 영상을 형성하기 위해서는 Herschel 조건을 만족해야한다. Herschel 조건은

$$n_1 z_1 \sin^2\left(\frac{\gamma_1}{2}\right) = n_2 z_2 \sin^2\left(\frac{\gamma_2}{2}\right) \quad (5)$$

로 주어진다(Born 등(1991)). 식(5)을 이용하여 sine 조건을 다시 쓰면

$$n_1 z_1 \sin^2 \gamma_1 = n_2 z_2 \sin^2 \gamma_2 \quad (6)$$

가 된다. 일반적인 경우 식(4)와 식(5)를 동시에 만족시킬 수 없기 때문에 광학 현미경에서는 두 값의 차가 최소가 되도록 광학계를 설계한다. 일반적인 광학 현미경에서는 먼저 sine 조건을 만족하도록 계를 설계하고, 제작 후 영상이 공액면들 사이에 들어오게 함으로써 식(4)와 식(5)의 차이가 최소가 되게 한다(김억봉 (2001)). 이러한 이유로 최적의 영상을 얻기 위하여 광학계의 광 경로를 조절하는 것이다. 그러나 공 초점 광학 현미경에서는 바늘 구멍을 사용하여 초점 외의 상은 모두 제거되기 때문에 sine 조건을 고려할 필요가 없고, Herschel 조건 만을 만족하면 된다. 즉 대물렌즈에서 시료까지의 거리와 대물렌즈에서 검출기까지의 거리를 적절히 조절해 주면 Herschel 조건을 만족시킬 수 있다.

7. 렌즈 왜곡에 의한 경로차

Fig. 8과 같이 광축의 L점이 두꺼운 렌즈를 통과하여 광축의 D점에 초점이 형성된다고 하자. 이때 Herschel 조건을 만족시키지 못할 경우 위상 오차는

$$\phi = k(l - \sqrt{l^2 + h^2} + nd - n\sqrt{d^2 + h^2}) \quad (7)$$

로 주어진다(Sheppard 등(1991)). 여기서 광축으로부터 렌즈의 높이가 h , L점에서 렌즈까지의 거리 l , 렌즈에서 D점까지의 거리 d , 렌즈와 시료 사이의 굴절률 n , k ($k = \frac{2\pi}{\lambda}$)는 파수이다. 만약 $\frac{1}{l}$ 과 d 의 값의 변화에 따라서 경로차가 발생한다면 식(7)은

$$\nabla\phi = -k[l^2\nabla(\frac{1}{l}) - \frac{l^3}{\sqrt{h^2 + l^2}}\nabla(\frac{1}{l}) - n\nabla d + \frac{nd\nabla d}{\sqrt{d^2 + h^2}}] \quad (8)$$

이 된다. 식(8)에서 $h = d \tan \theta$, 그리고 배율은 $M = \frac{l}{d}$ 이므로 식(8)은

$$\nabla\phi = -k[(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}})\nabla(\frac{1}{l}) - n\nabla d(1 - \cos \theta)] \quad (9)$$

이 된다(김억봉 (2001)). 식(9)에서 M 값이 매우 크다면 이항정리(Binomial theorem)를 이용하여 다시 정리하면

$$\phi = -\frac{1}{2}kd^2\nabla(\frac{1}{l})\tan^2\theta + kn\nabla d(1 - \cos \theta) \quad (10)$$

이 되고, 식(9)의 마지막 부분은 θ 가 매우 작을 때 $\cos \theta \approx 1$ 로 전체 값이 영이 되어 무시할 수 있다. 따라서

$$\phi \approx -\frac{1}{2}kd^2\nabla(\frac{1}{l})\tan^2\theta = B \tan^2\theta \quad (11)$$

이다(Sheppaed 등(1991)). 여기서 $B = -\frac{1}{2}kd^2\nabla(\frac{1}{l})$ 이다. 위상 오차 ϕ 는 B 값

이 최소가 되고, $\tan^2\theta$ 가 최소가 될 때 최소가 된다. 그러나 θ 는 렌즈 제작 시 결정되는 고유한 값이므로, B 값이 최소가 될 때 위상 오차 ϕ 는 최소가 된다. 즉 $B = 0$ 일 때 위상 오차가 없는 상을 얻을 수 있다.

공초점 현미경에서 시료에서 검출기에 도달하는 빛의 세기는

$$I(z) = \left| \int_0^\alpha R(\theta_1) P^2(\theta_1) \exp[2ikzn_1 \cos \theta_1] \sin \theta_1 \cos \theta_1 d\theta_1 \right|^2 \quad (12)$$

로 주어진다(Sheppard 등(1981)). 여기서 , z 는 시료가 광축 방향으로 이동한 거리, α 는 광축과 렌즈를 통해 들어오는 빛 사이의 각, $P(\theta_1)$ 는 Pupil 함수이고, $R(\theta_1)$ 은 반사 계수이다. 이때 $P(\theta_1)$ 는 구면수차 효과에 의해 $P(\theta_1) = \exp(i\phi)$ 로 표현할 수 있으며, $R(\theta_1)$ 은 반사 계수를 나타내지만, 레이저에서 렌즈를 통해 시료에 조사된 빛의 초점 부분에서는 형광 물질에 의하여 새로운 점 광원이 발생된다. 또한 새로운 점 광원은 레이저 빛의 강도에 따라 그 정도가 선형적으로 비례하므로 $R(\theta_1) \approx 1$ 로 둘 수 있다(김억봉 (2001)). 공초점 현미경에서 위상 오차를 고려한 빛의 세기를 알아보기 위하여 식(11)을 이용하여 식(12)를 정리하여 보면,

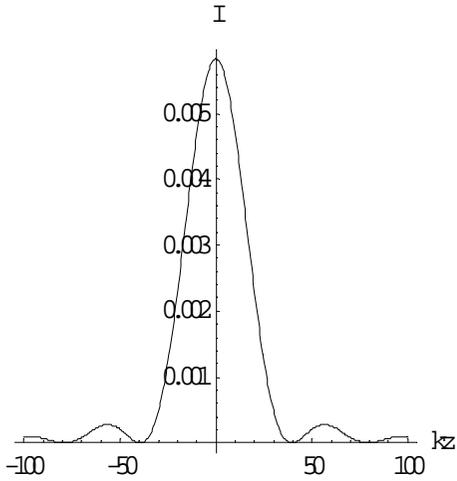
$$I(z) = \left| \int_0^\alpha \exp[2i(\phi + kz \cos \theta)] \sin \theta \cos \theta d\theta \right|^2 \quad (13)$$

이 된다. 식(13)을 다시 정리하면,

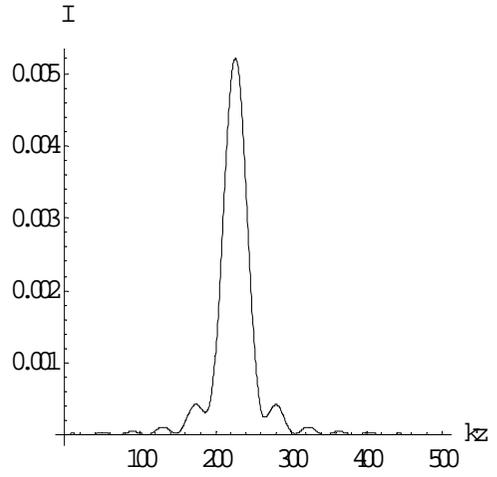
$$I(z) = \left| \int_{\cos \alpha}^1 \exp[2iB (\frac{1}{c^2} - 1) + 2ikz] c dc \right|^2 \quad (14)$$

이다(김억봉 (2001)). 여기서 $c = \cos \theta$ 이다.

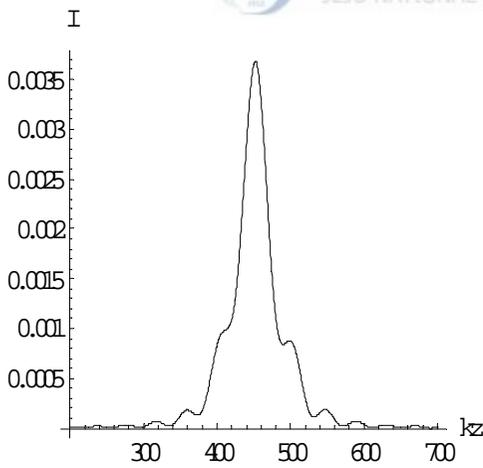
식(14)는 일반적인 공초점 현미경에서 주어지는 빛의 세기 방정식에 Herschel조건을 만족시키지 못할 경우의 위상 오차 항을 고려한 식이며, 위상 오차가 최소가 되는 조건은 $B = 0$ 이다. 전산 시뮬을 통하여 식(14)를 그래프로 표현하여 보면 그 결과는 Fig. 9와 같다. Fig. 9에서 (a)는 $B = 0$ 인 경우로 위상 오차가 없는 경우로, 그 빛의 세기도 매우 크고, side-lobe가 발견되지 않는다. (b)는 $B = 100$ 인 경우로 위상 오차가 나타나, side-lobe가 발생하였으며, 빛의 세기가 감소하였고, 위상 오차가 없는 경우 반치폭이 10인데 반해, 20인 경우는 반치폭이 15로 증가하였다. (c)는 $B = 200$ 인 경우로, (b)의 경우에 비하여 side-lobe가 증가하였고, 빛의 세기가 더욱 감소하였으며, 반치폭도 증가하였다. (d)는 $B = 300$ 인 경우로, side-lobe가 더욱 증가하였고, 빛의 세기는 매우 낮으며, 반치폭도 매우 증가하였다. 다시 정리하여 보면, 위상 오차 ϕ 는 B 에 의하여 결정되며, B 값이 증가하면, side-lobe와 반치폭은 증가하며, 빛의 세기는 낮아진다. 즉 공초점 현미경에서 Herschel조건을 만족시키지 못하는 위상 오차는 side-lobe를 증가시키며, 빛의 세기를 감소시키고, 반치폭이 넓어짐으



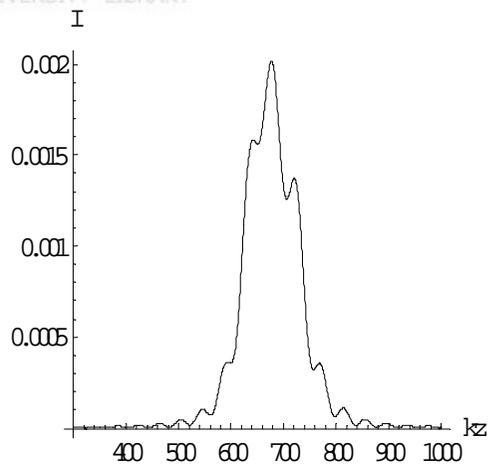
(a) $B = 0$



(b) $B = 100$



(c) $B = 200$



(d) $B = 300$

Fig. 9 Axial responses with 10X lens when $B = 0, 100, 200, 300$

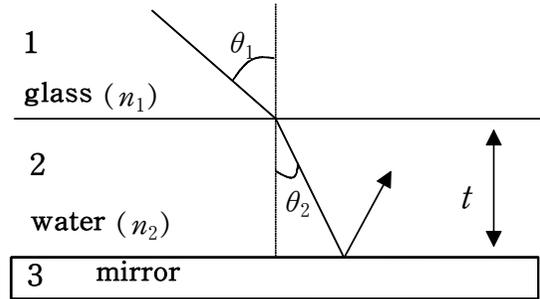


Fig. 10 Light reflection from a perfect reflector with a water layer

로서 상에 잡음이 발생하며, 해상도를 저하시키게 된다.

8. Fresnel 방정식



Fresnel 방정식은 파동이 경계면을 입사할 때, 그 경로를 해석하기 위하여 사용된다. 본 연구에서는 공초점 현미경에서 조사된 빛이 시료에 입사될 때, 시료의 굴절률 및 두께 등의 특성에 따른 경로를 알아보기 위하여 도입하였다.

Fresnel 방정식에서 전기장 \vec{E} 가 입사면에 수직인 경우의 반사계수 (r_{\perp})는

$$r_{\perp} = \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (15)$$

이고, 전기장 E 가 입사면에 평행한 경우의 반사계수 (r_{\parallel})는

$$r_{\parallel} = \frac{n_t \cos \theta_i - n_i \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_t + n_t \cos \theta_t} \quad (16)$$

이 된다(Hecht (1998)).

Fig. 10과 같이 거울위에 물이 있고, 그 위에 덮게 유리(Cover-glass)가 놓여있는 3중층 구조에 빛이 입사하였을 경우 전체 반사계수 r 은

$$r = \frac{r_{12} - r_{23}\exp(2i\beta)}{1 + r_{12}r_{23}\exp(2i\beta)} \quad (17)$$

로 주어진다(Born 등 (1999)). 여기서 $\beta = kn_2t\cos\theta_2$, r_{12} 는 덮개 유리와 물 사이의 반사계수이고, r_{23} 는 물과 거울사이의 반사계수 이다. 3번째 층이 거울인 경우에는 $r_{23} \approx 1$ 이다. 그리고 $n = \frac{n_1}{n_2}$, $c = \cos\theta_1$ 라 하면, 식 (15)를 적용한 입사 빛의 전기장 성분이 입사 면에 수직인 전자기파의 전체 반사계수는

$$r_{\perp} = \exp(2i\phi_{\perp}) \quad (18)$$

가 된다. 그리고 식(16)을 적용하여 입사 빛의 전기장 성분이 입사면에 평행한 전자기파의 전체 반사계수는

$$r_{\parallel} = \exp(2i\phi_{\parallel}) \quad (19)$$

이다.

이때, $\phi_{\perp} = \tan^{-1}\left(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \tan\beta\right)$, $\phi_{\parallel} = \tan^{-1}\left(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}} \tan\beta\right)$ 이다.

식(17)과 식(18)은 위상 오차 함수에 의한 전체 반사계수를 보여주고 있으며, 위상 오차가 시료의 두께와 굴절률에 비례하고 있음을 알 수 있다.

렌즈에 의해 빛이 한 초점에 형성된다고 할 때, 반사되는 빛의 평균 반사계수 (averaged reflection coefficient) $R(\theta)$ 는

$$\vec{R}(\theta) = \frac{r_{\parallel} + r_{\perp}}{2} \quad (20)$$

로 표현된다(Sheppard 등(1992)). 렌즈의 왜곡이 없을 때 Pupil 함수 $P(\theta_1) = 1$ 과 식(20)을 식(12)에 대입하여 다시 정리하면

$$\begin{aligned} I(z) = & \frac{1}{4} \left| \int_{\cos\alpha}^1 \left[\exp(2i) \left(\tan^{-1} \left(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}} \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)}) \right) \right) \right. \right. \\ & + kzn_1c) + \exp \left(2i \left(\tan^{-1} \left(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \right. \right. \right. \\ & \left. \left. \left. \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)}) + kzn_1c) \right) \right] c \, dc \right|^2 \end{aligned} \quad (21)$$

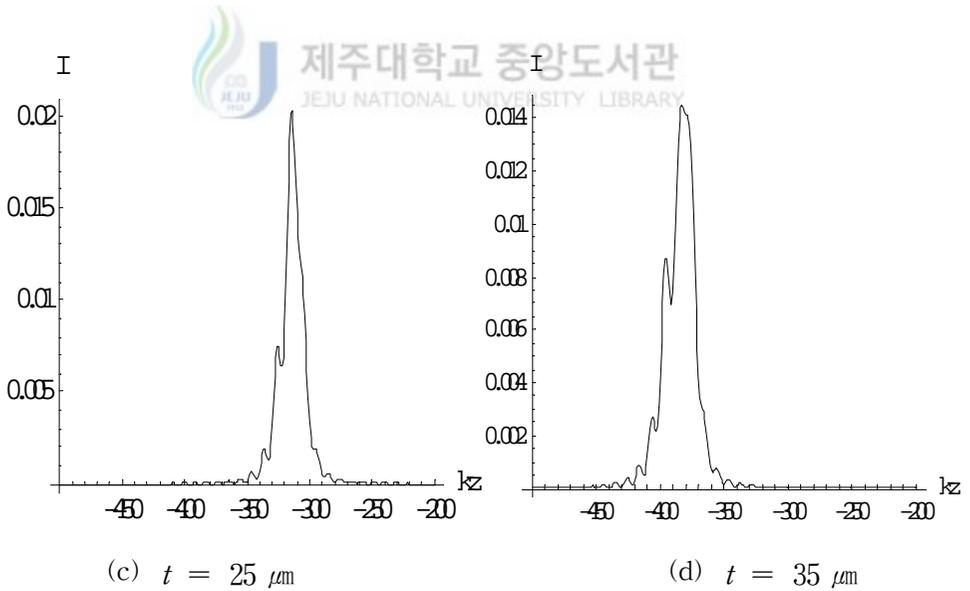
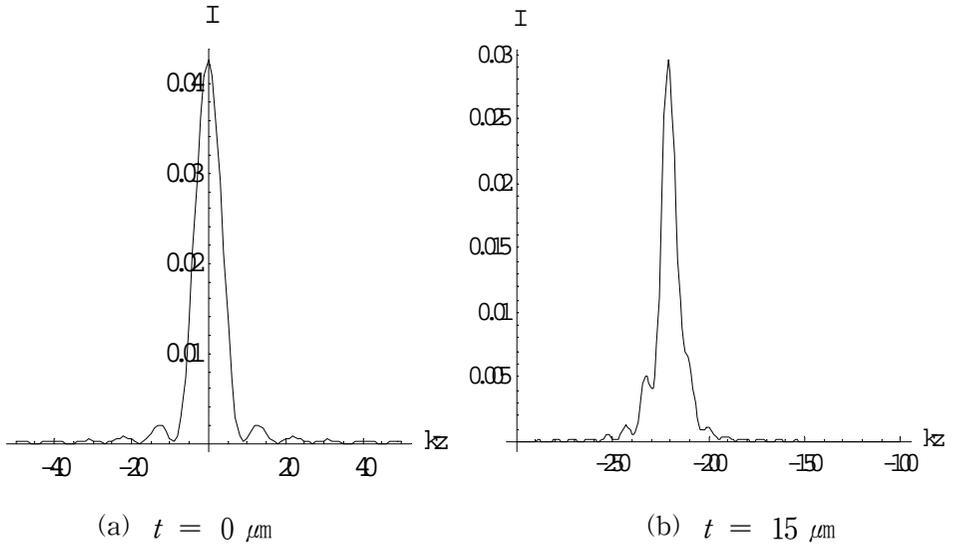


Fig. 11 Effect of side-lobe with thickness (t : thickness, $B = 0$)

로 표현되며, 여기서 $c = \cos \theta_1$, $n = \frac{n_1}{n_2}$, $g = kn_2t$ 이고, t 는 시료의 두께이다(김억봉 (2001)).

시료의 두께 및 굴절률이 고려된 경우인 식(21)을 전산 시뮬한 결과는 Fig. 11과 같다. Fig. 11에서 (a)는 시료의 두께 $t = 0$ 인 경우로, 그 빛의 세기도 매우 크고, side-lobe가 발견되지 않는다. (b)는 $t = 15$ 인 경우로 side-lobe가 발생하였으며, 빛의 세기가 감소하였다. (c)는 $t = 25$ 인 경우로, (b)의 경우에 비하여 side-lobe가 증가하였고, 빛의 세기가 더욱 감소하였다. (d)는 $t = 35$ 인 경우로, side-lobe가 더욱 증가하였고, 빛의 세기는 매우 감소하였다. 정리하여 보면, 시료의 두께가 증가함에 따라, side-lobe는 증가하고, 빛의 세기는 매우 감소한다. 즉 시료의 두께에 따라 위상 오차가 발생하고, 발생된 위상 오차는 side-lobe를 증가시켜, 상에 잡음으로 작용하며, 빛의 세기를 감소시켜, 두꺼운 시료의 경우 상을 구성할 수 없게 된다. 즉 식(21)은 렌즈의 왜곡이 없을 경우에도 시료의 두께와 굴절률에 의해서 위상 오차가 발생한다는 것을 보여 주고 있으며, 이로 인한 위상 오차가 광축 방향의 빛의 세기 변화에 많은 영향을 미치고 있음을 확인 할 수 있다.

이러한 위상 오차의 발생은 Herschel조건을 만족시키지 못한 경우 발생하므로, 앞에서 제시하였던, 위상 오차에 관한 식(11)을 적용하여야 한다. 식(21)에 식(11)을 적용한 빛의 세기는

$$\begin{aligned}
 I(z) = & \frac{1}{4} \left| \int_{\cos \alpha}^1 \exp(2i (\tan^{-1}(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}) \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) \right. \\
 & + B(\frac{1}{c} - 1) + kzn_1c) + \exp(2i (\tan^{-1}(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \\
 & \times \tan(h\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + B(\frac{1}{c} - 1) + kzn_1c)] c \, dc \, |^2
 \end{aligned} \tag{22}$$

으로 표현할 수 있다(Sheppard 등(1992)).

식(22)는 위상 오차를 보정 할 수 있는 B 가 포함되어 있다. 즉 대물렌즈에서 시료까지의 거리 d , 대물렌즈에서 상까지의 거리 l 을 조정함으로써, B 를 조절 할 수 있고, B 를 조정함으로써 광경로차를 조절하여, Herschel조건을 만족시켜 위상 오차를 최소화 할 수 있다.

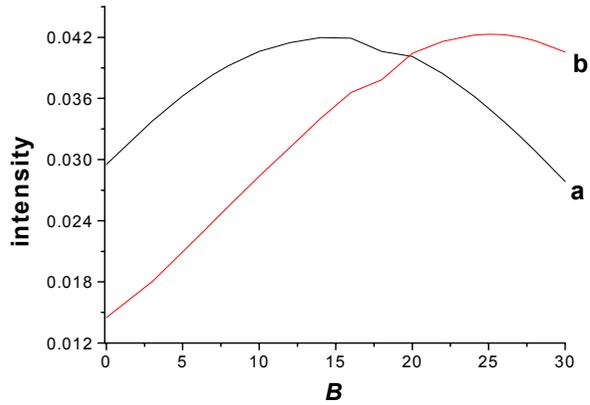


Fig. 12 Intensity for various values of coefficient B with sample thickness $a=15 \mu\text{m}$, $b=33 \mu\text{m}$.

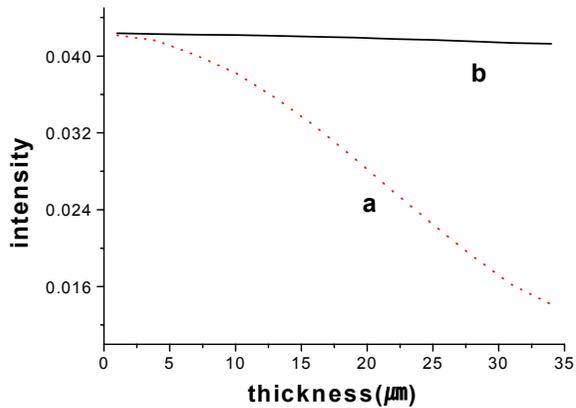


Fig. 13 The variations of intensity by not phase compensation(a) and phase compensation(b)

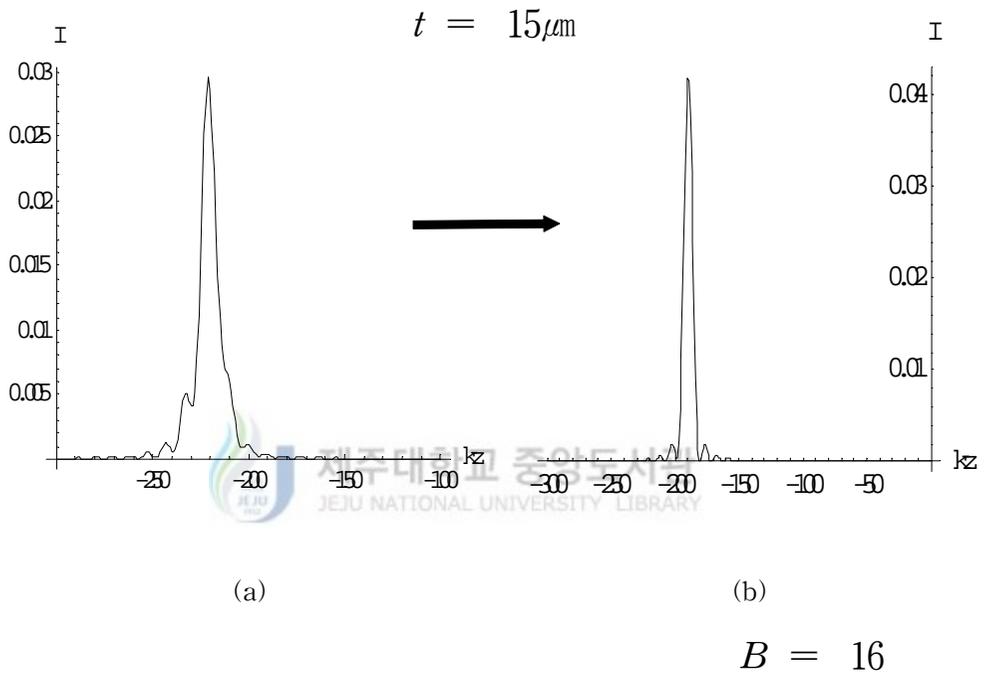
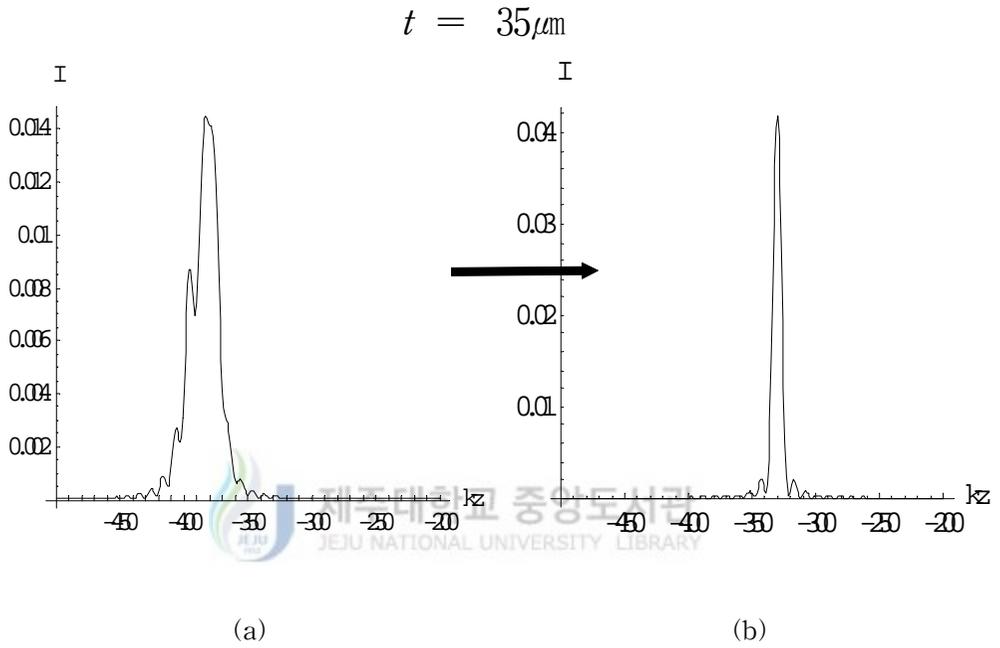


Fig. 14 Axial response intensity for various values of coefficient B .

(t : sample thickness, $B = -\frac{1}{2}kd^2\nabla\left(\frac{1}{l}\right)$, d : distance from objective to sample, l : distance from objective to image, a : before phase compensation, b : after phase compensation)



$$B = 28$$

Fig. 15 Axial response intensity for various values of coefficient B .

(t : sample thickness, $B = -\frac{1}{2}kd^2\nabla\left(\frac{1}{l}\right)$, d : distance from objective to sample, l : distance from objective to image, a : before phase compensation, b : after phase compensation)

광경로차 조절이 되지 않은 식(21)의 전산 시뮬인 Fig. 11은 광경로차 조절이 가능한 식(22)를 이용하여 그 광경로차 조절을 통한 위상 오차의 최소화가 가능해지며, Fig. 12는 $t = 15 \mu\text{m}$ (Fig. 11(b)),와 $t = 35 \mu\text{m}$ 인 경우(Fig. 11(d))의 광경로차 조절을 위한 B 값에 따른 빛의 세기이다. $t = 15 \mu\text{m}$ 의 경우 $B = 16$ 에서 빛의 세기가 최대가 되며, $t = 35 \mu\text{m}$ 의 경우 $B = 28$ 에서 빛의 세기가 최대가 된다. 즉 대물렌즈에서 시료까지의 거리 d 와, 대물렌즈에서 상까지의 거리 l 의 광경로차를 조절하여 줌으로써 위상 오차를 최소화하여, side-lobe를 최소화하고, 빛의 세기를 증가시킬 수 있다. 또한 Fig. 13은 시료의 두께의 변화에 따른 위상 오차를 광경로 변화값 B 에 의해 위상 보정을 해주지 않았을 때(a)와 보정을 해주었을 때(b)의 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. 위상 보정을 해주지 않았을 때는 시료의 두께가 증가함에 따라 그 빛의 세기가 급격히 감소하고, 이는 두꺼운 시료에서의 관측을 불가능하게 한다.

Fig. 14와 Fig. 15는 시료의 두께가 $15 \mu\text{m}$, $35 \mu\text{m}$ 일 때에 위상 보정 전·후의 광축 방향에 대한 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. Fig. 14에서 (a)는 위상 보정전의 상태이며, (b)는 위상 보정 후의 상태이다. Fig. 12의 전산 시뮬 결과에서 시료의 두께가 $15 \mu\text{m}$ 일 때 빛의 세기가 가장 크게 나타난 $B = 16$ 을 도입하면 side-lobe의 영향이 최소화된다. 즉 위상 보정치 $B = 16$ 을 적용하면, 빛의 세기는 증가하였고, side-lobe는 감소한다. Fig. 15는 시료의 두께가 $35 \mu\text{m}$ 인 경우 $B = 28$ 의 값을 적용하여 side-lobe 영향을 최소화한 것이다. 즉 시료의 두께에 따른 위상 오차를 보정하여 광축 방향의 side-lobe의 영향을 최소화 할 수 있다. 즉 시료의 3차원 상을 형성할 때 중요한 요소로 작용하는 광축 방향의 분해능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

III. 실험 방법

1. 실험 장치

식(22)에서 B 값을 조정하여 줌으로써, 위상 오차를 최소화 할 수 있음을 확인하였다. 또한 B 값은 대물렌즈에서 시료까지의 거리 d , 대물렌즈에서 상까지의 거리 l 을 변화시킴으로서 조절할 수 있다. 즉 본 연구에서는 d 와 l 값을 조절 할 수 있도록 Fig. 16과 같은 실험장치를 구성하였다.

본 연구에서의 실험장치 Fig. 16은 광원으로는 He-Ne 레이저(Melles Griot)를 사용하였고, 10배 대물렌즈를 사용하였으며, 바늘 구멍은 $10\ \mu\text{m}$ 를 사용하였다. 또한 Rayleigh 기준을 결정하는 식(2)를 고려하여, 입사 광선의 크기 D 를 넓히기 위해 초점거리가 12mm와 24mm인 렌즈를 사용하여 빛 넓히개(Beam expander)를 구성하였다. 시료 제작시 형광 물질은 Cyanine Dyes - Cy5(주성분 : Indodicarbocyanine)로, 최고 흡광 파장은 650nm, 형광 최고 방출 파장은 670nm이다(Fig. 17). 흡광 최고 파장이 650nm라 하더라도, He-Ne 레이저의 633nm에서 약 63%정도의 흡광률이 나올 수 있으므로 충분한 형광 방출 빛을 낼 수 있다. 또한 최고 방출 파장이 670nm이므로 형광으로 여기 되어 방출된 파장만을 받기 위해서 통과 파장 대역이 $671\pm 10\text{nm}$ 인 Bandpass Filter를 사용하여, 시료표면에서 반사되는 레이저 파장이나 기타 외부에서 유입되어 검출되는 빛을 차단하였다. 광축 방향을 조사하기 위하여 시료 거치대에 스텝모터를 사용하였으며, 최소 이동거리는 $2.5\ \mu\text{m}$ 이다.

Fig. 16에서의 전체적인 진행은 He-Ne 레이저에서 약 633nm의 파장을 갖은 광선은 빛 넓히개를 거쳐 약 10배 정도의 단면 크기를 갖게 되며, 이는 반투과 거울에서 반사되어 대물렌즈로 입사하게 되고, 대물렌즈에 의해 초점을 맺게 된다. 초점이 형성된 부분에 형광 물질이 위치해 있다면, 형광 물질에 의하여 여기된 약 671nm의 파장을 갖은 빛은 대물렌즈를 거쳐 반투과 거울을 통과하여 공초점 위치에 초점을 맺게 된다. 공초점 위치에 놓여 있는 바늘 구멍은 초점 외의 상을 제거하게 되고, 검출기에 의하여 초점의 빛의 세기가 검출된다.

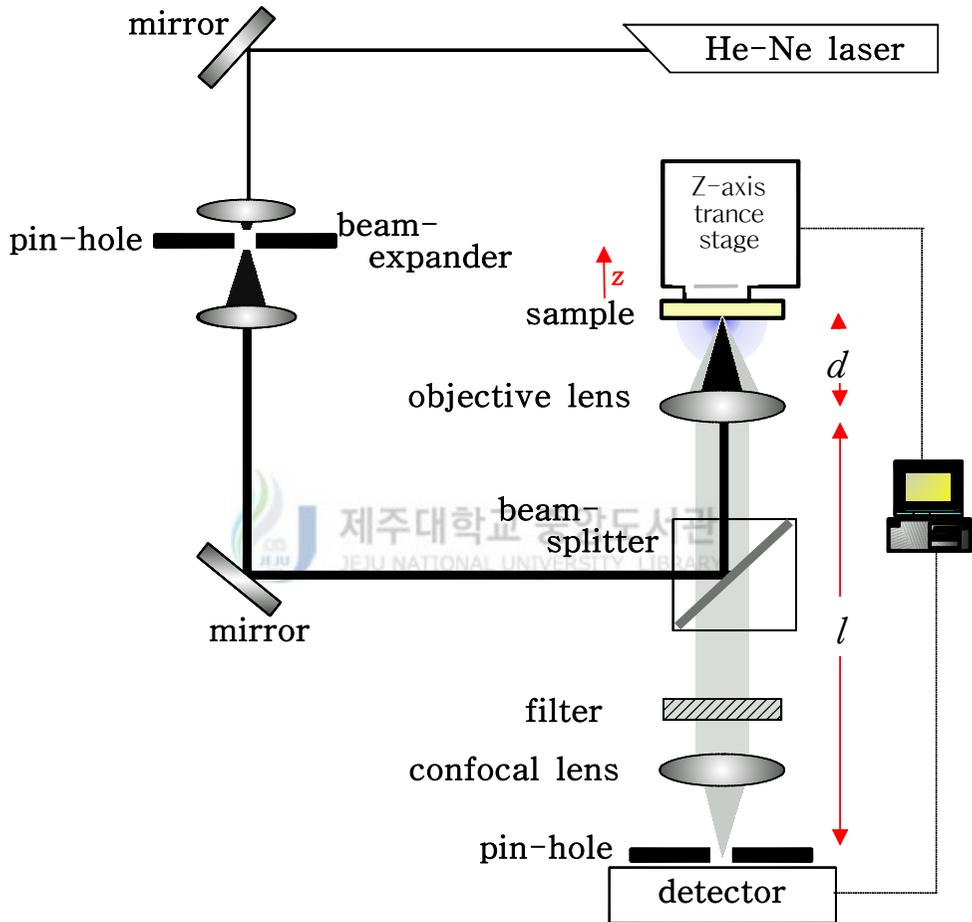
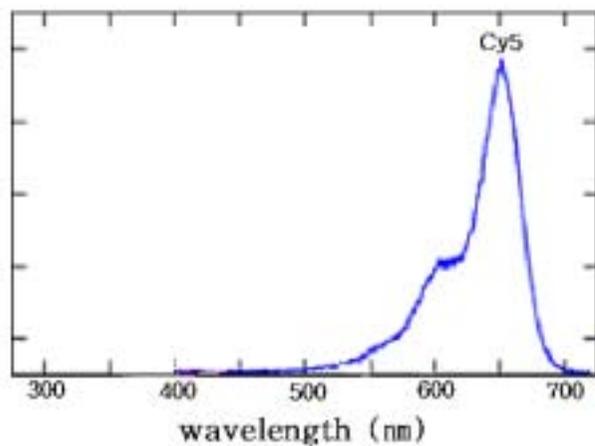
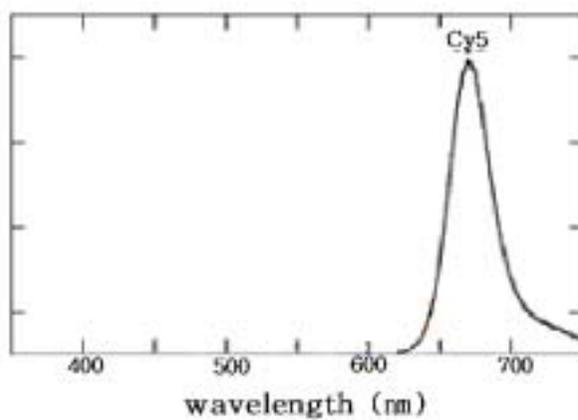


Fig. 16 Schematic diagram of confocal microscope



(a) Absorption spectra



(b) Fluorescence emission spectra

Fig. 17 Absorption and emission spectra of cy-5

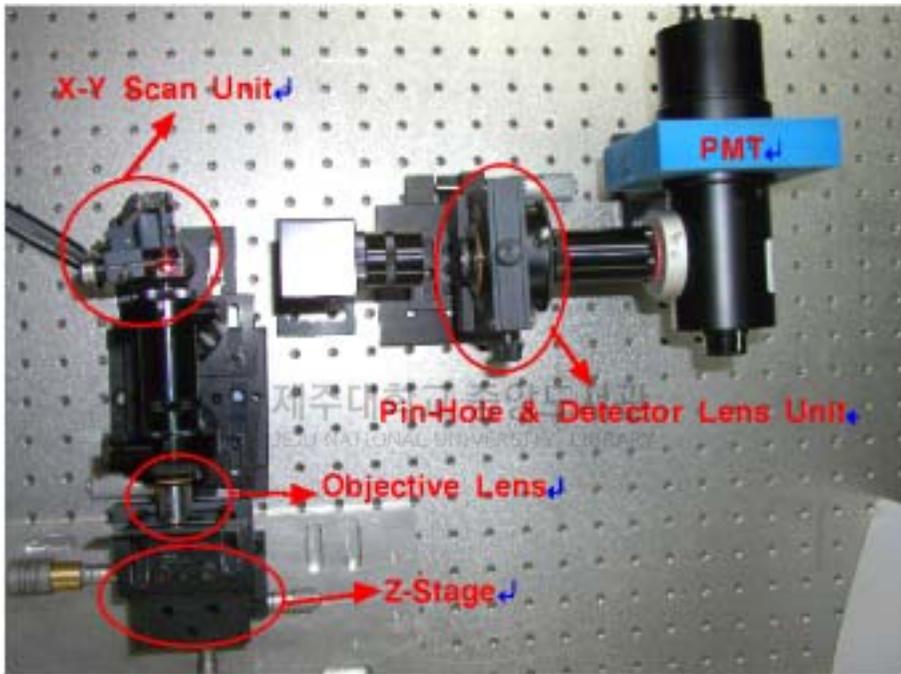


Fig. 18 Which is possible phase compensation fluorescence-type confocal microscope

2. 실험 방법

본 연구에서는 시료의 굴절률과 두께에 따른 위상 오차의 발생을 최소화하기 위하여, 시료에서 대물렌즈까지의 거리 d 와, 대물렌즈에서 상까지의 거리 l 을 보정하는데 있다. 이를 실험으로 하기 위하여 Fig. 16과 같은 실험장치를 구성하였다. 본 연구에서는 10배의 대물렌즈를 사용하였으며, 본 연구에서 사용한 10배의 대물렌즈의 경우 d 값은 $4300\ \mu\text{m}$ 이다.

본 연구에서는 우선 시료의 두께에 따른 위상 오차를 고려하기 위하여, 시료의 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 와 $35\ \mu\text{m}$ 를 광축 방향에 대하여 측정 비교하였으며, 시료의 굴절률 차이에 따른 위상 오차를 고려하기 위하여, 형광 염색과정에서 증류수와 생체 식염수를 사용한 2가지의 경우를 고려하였다. 이러한 결과를 토대로 실제 세포인 쥐의 뇌세포를 형광 염색하여, 위상 오차를 보정할 수 있는 실제 공초점 현미경을 제작 후(Fig. 18) 위상 오차를 보정하여, 위상 오차가 보정되지 않은 경우와 위상 오차가 보정된 경우를 비교해 보았다.

실험의 진행은 우선 d 값을 $4300\ \mu\text{m}$ 로 고정하여, d 값에 의한 공초점 위치까지의 거리 l 값을 결정 후 공초점 위치에 바늘 구멍을 설치하고, 광축 방향으로 스텝모터를 움직이며, 빛의 세기를 측정한다. d 값이 $4300\ \mu\text{m}$ 인 경우는 시료의 특성이 고려되지 않은 일반적인 형광 공초점 현미경이다. 다음에는 d 값을 $5\ \mu\text{m}$ 움직이고, 이에 따른 l 값을 결정하여 바늘 구멍 위치를 재설치하고, 같은 방법으로 진행한다. 이와 같은 방법으로 $5\ \mu\text{m}$ 씩 위상 보정을 하여 가며 실험하였다.

쥐의 뇌세포의 경우는 Fig. 18과 같은 형광 공초점 현미경을 구성하여 위상 오차를 보정하였으며, 쥐 뇌세포 시료의 두께는 약 $15\ \mu\text{m}$ 이며, 형광 염색과정에서 생체 식염수를 사용하였다. 위상 보정은 $15\ \mu\text{m}$ 로 제작한 시료에서 생체 식염수를 사용하여 형광 염색을 한 경우의 결과를 토대로, 빛의 세기가 최대가 되며, side-lobe가 최소가 되는 d 값과 l 값을 적용하여 위상 보정하였다.

IV. 결과 및 논의

1. 실험 결과

Fig. 19는 형광 물질을 증류수를 통하여 희석시킨 시료이다. 또한 그 두께를 매우 얇게 하게 하여, 시료의 굴절률 및 두께에 따른 영향력을 최소화하였다. 이는 본 연구에서 사용한 10배 대물렌즈의 d 값인 $4300 \mu\text{m}$ 에서의 광축 방향에 대한 빛 세기 분포를 확인하고, 식(14)의 전산 시뮬 결과인 Fig. 9를 확인해 보기 위함이다. Fig. 20이 바로 그 결과이다. Fig. 20에서 d 가 $4300 \mu\text{m}$ 인 경우 빛의 세기가 최고이며, side-lobe에 의한 영향력이 거의 없다. 그러나, d 가 $4305 \mu\text{m}$ 인 경우 빛의 세기가 감소하였고, side-lobe는 증가하였으며, 초점심도(DOF)가 증가하고, d 가 $4310 \mu\text{m}$ 인 경우 빛의 세기가 매우 감소하여 관측 자체가 거의 불가능한 상태이다. 즉 Fig. 9에서의 전산 시뮬 결과를 토대로 생각해보면, d 값이 $4300 \mu\text{m}$ 인 경우 $B = 0$ 에 해당된다고 볼 수 있다. 이는 시료의 굴절률 및 두께를 고려하지 않은 경우 Herschel 조건을 만족시키는 경우에 해당된다.

Fig. 21은 Fig. 19와 같이 형광 물질을 증류수를 통하여 희석시킨 시료이다. 그러나 시료의 두께를 $15 \mu\text{m}$ 로 두께를 갖는 시료이다. 이는 시료의 굴절률 및 두께에 따른 위상 오차를 확인하고, d 와 l 값을 조정하여 위상 보정이 가능함을 알아보기 위한 시료이다. Fig. 22는 d 가 $4300 \mu\text{m}$ 인 경우, 즉 Fig. 21에서 확인한 시료의 굴절률 및 두께가 고려되지 않은 경우의 광축 방향에서의 빛의 세기 분포이다. Fig. 22에서 알 수 있듯이 side-lobe가 발생하였고, 시료의 두께가 $15 \mu\text{m}$ 임에 반해 측정된 결과는 약 $25 \mu\text{m}$ 로 실제의 시료보다 더욱 두껍게 나타났다. 그러나 Fig. 23(a)는 d 값이 $4305 \mu\text{m}$ 인 경우로 $5 \mu\text{m}$ 보정을 해준 경우이다. 이러한 경우 side-lobe가 발생하지 않았으며, 시료의 두께가 약 $15 \mu\text{m}$ 로 실제의 시료와 거의 동일한 값을 갖으며, Fig. 22의 결과와 비교해 볼 때 빛의 세기 역시 증가하였다. 또한 Fig. 23(b)는 d 값이 $4310 \mu\text{m}$ 인 경우로 $10 \mu\text{m}$ 보정을 해준 경우이다. 이러한 경우 side-lobe가 매우 심하며, 관측된 시료의 두께는 약 $20 \mu\text{m}$ 로 실제의 경우보다 두껍게 나타났으며, 빛의 세기가 매우 감소하였다.

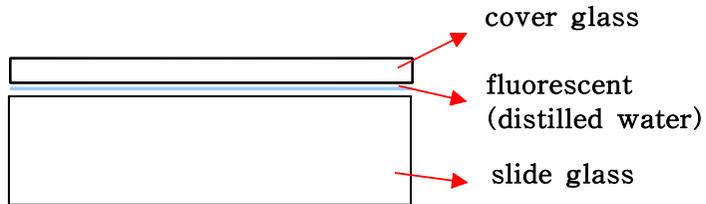


Fig. 19 The sample with a thin thickness

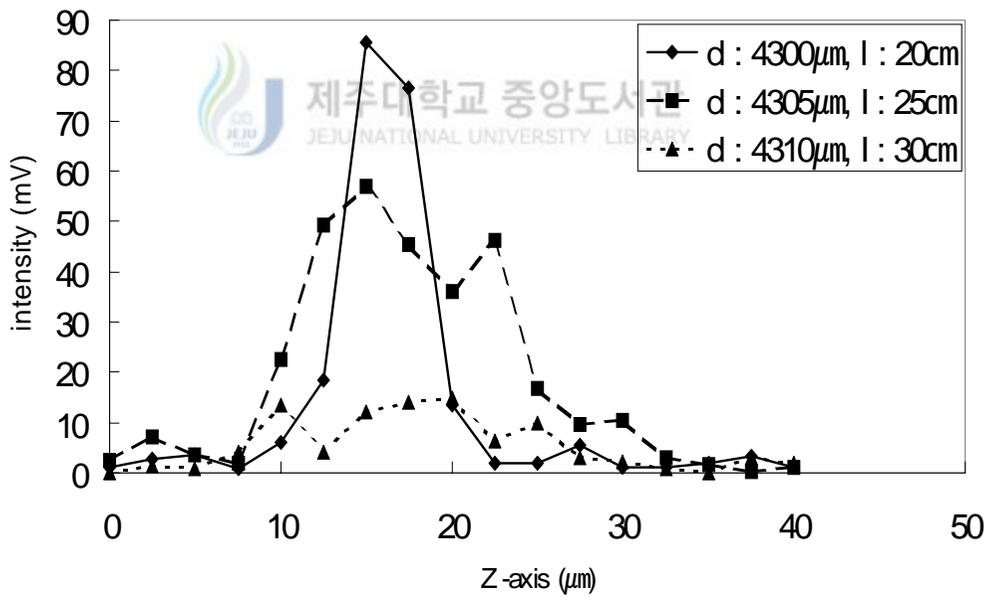


Fig. 20 Intensity of optical axis of sample with a thin thickness

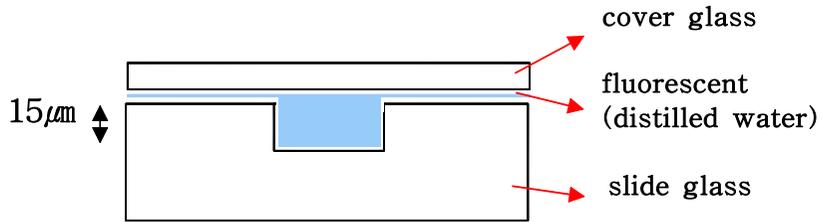


Fig. 21 Fluorescent dyed sample with distilled water a thickness $15\mu\text{m}$

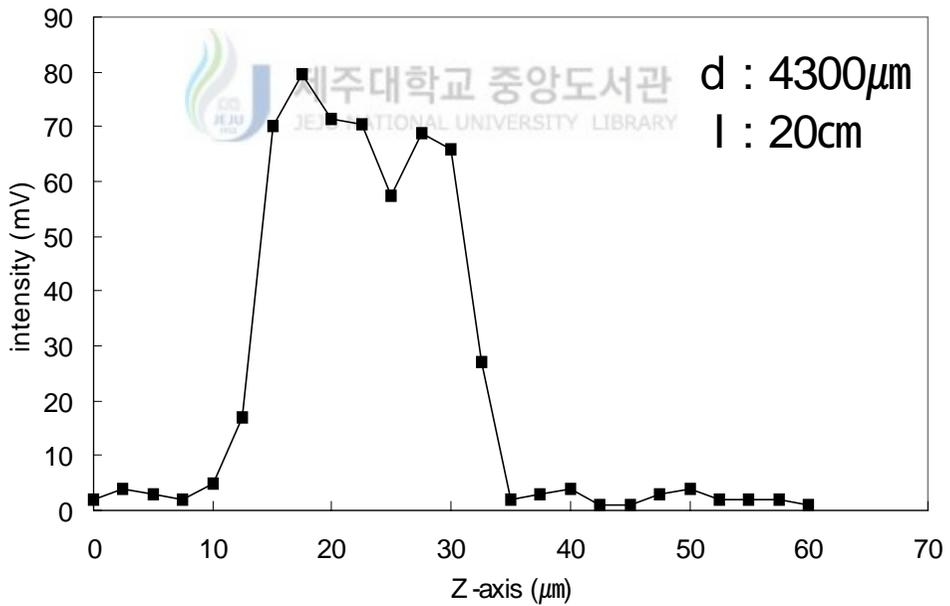
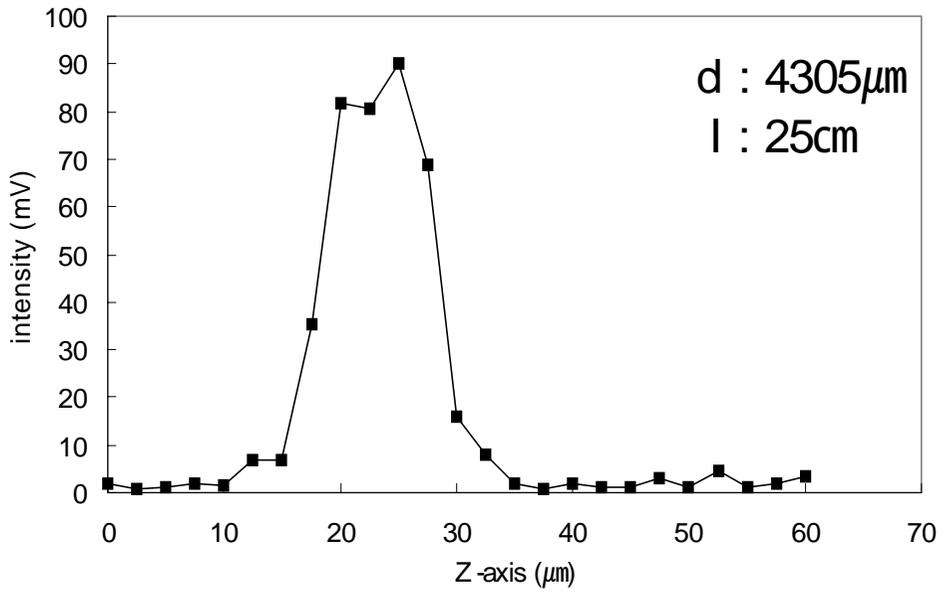
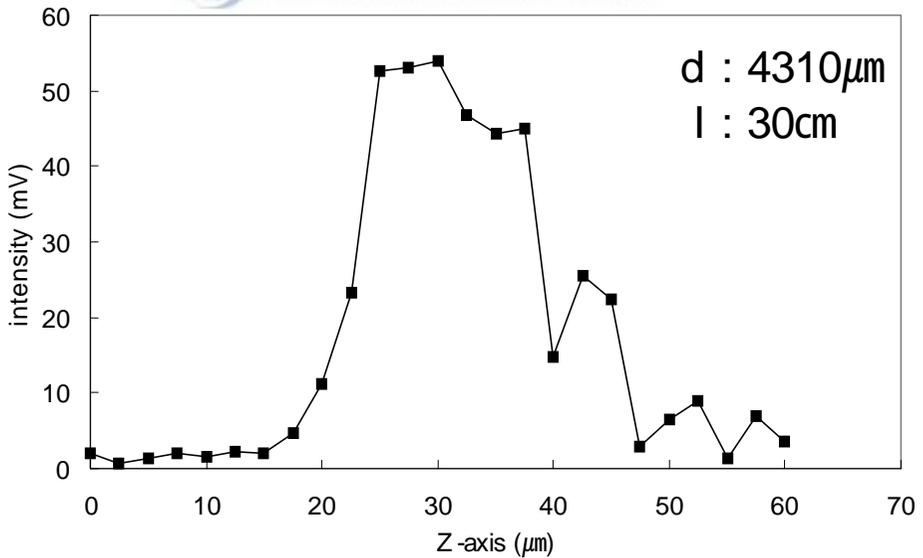


Fig. 22 Intensity distribution of light with a decompensated phase



(a)

 제주대학교 중앙도서관
 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



(b)

Fig. 23 Intensity distribution of light with a compensated phase

즉, Fig. 21과 같이 그 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 이며, 증류수를 사용한 형광 물질의 경우이다. d 값이 $4305\ \mu\text{m}$ 인 $5\ \mu\text{m}$ 가 보정 되었을 때, 위상 오차를 최소화 할 수 있었다. 또한 이 결과는 식(21)을 전산 시뮬한 결과인 Fig. 11(b)에서 확인한 바와 같이 시료의 굴절률 및 두께에 따라 위상 오차가 발생하고, 이는 식(22)의 전산 시뮬 결과인 Fig. 14에서 처럼 d 와 l 값을 조정함으로써 위상 오차를 감소시킬 수 있었다.

Fig. 24 역시 형광 물질을 증류수를 통하여 희석시킨 시료이다. 그러나 Fig. 21의 시료보다 더욱 두꺼운 $35\ \mu\text{m}$ 로 두께를 갖는 시료이다. 이는 더욱 두꺼워진 시료를 사용함으로써, 같은 굴절률에서도 시료의 두께가 달라짐에 따라 발생하는 위상 오차의 정도와 이에 따른 보정 정도의 차이를 알아보기 위함이다. Fig. 25는 보정되지 않았을 때($d = 4300\ \mu\text{m}$)의 광축 방향의 빛의 세기 분포이다. 보정되지 않은 경우 side-lobe가 발생하였으며, 실제의 시료의 두께가 $35\ \mu\text{m}$ 임에 반해 약 $45\ \mu\text{m}$ 로 측정되었다. Fig. 26(a)는 $5\ \mu\text{m}$ 보정한 d 값이 $4305\ \mu\text{m}$ 인 경우로, Fig. 25에 비해 side-lobe가 감소하였으며, 빛의 세기가 증가하였고, 측정된 두께가 약 $40\ \mu\text{m}$ 로 실제 시료의 두께에 가까워졌다. Fig. 26(b)는 $10\ \mu\text{m}$ 보정한 d 값이 $4310\ \mu\text{m}$ 인 경우로, 빛의 세기가 증가하였으며, side-lobe는 거의 발생하지 않았으며, 측정된 두께는 약 $35\ \mu\text{m}$ 로 실제의 시료 두께와 일치하였다. 즉 시료가 증류수이며, 그 두께가 약 $35\ \mu\text{m}$ 인 경우 d 값을 $10\ \mu\text{m}$ 보정한 $4310\ \mu\text{m}$ 인 경우 위상 오차를 최소화 할 수 있다. 이 결과는 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 인 경우와 비교해 볼 때, 두께에 따라 그 보정의 정도가 달리 적용됨을 확일 할 수 있었고, 그 결과는 식(22) 전산 시뮬 결과인 Fig. 12와 일치하는 결과이며, d 값과 l 값을 조정하여 위상 오차를 최소화 할 수 있는 전산 시뮬결과인 Fig. 14와 일치함을 알 수 있다. 즉 두께가 두꺼워 질수록 그 d 의 보정 값은 증가한다.

다음은 시료가 Fig. 27과 같은 경우로 시료의 두께는 $15\ \mu\text{m}$ 로 Fig. 21과 같고, 형광 물질을 식염수를 사용하여 희석시킴으로서 그 굴절률이 다른 경우이다. 이는 굴절률의 차이가 있는 시료를 사용함으로써, 같은 두께에서도 시료의 굴절률이 달라짐에 따라 발생하는 위상 오차의 정도와 이에 따른 보정 정도의 차이를 알아보기 위함이다. Fig. 28은 보정되지 않았을 때($d = 4300\ \mu\text{m}$)의 광축 방향의 빛의 세기 분포이다. 보정되지 않은 경우 side-lobe가 발생하였으며, 실제의 시료의 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 임에 반해 약 $25\ \mu\text{m}$ 로 측정되었다. Fig. 29(a)는 $10\ \mu\text{m}$ 보정한 d 값이 $4310\ \mu\text{m}$ 인 경우로, 빛의 세

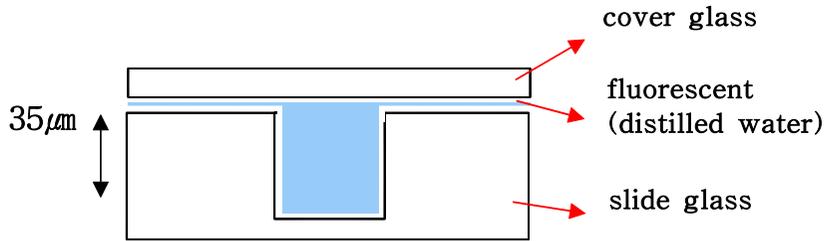


Fig. 24 Fluorescent dyed sample with distilled water a thickness $35 \mu\text{m}$

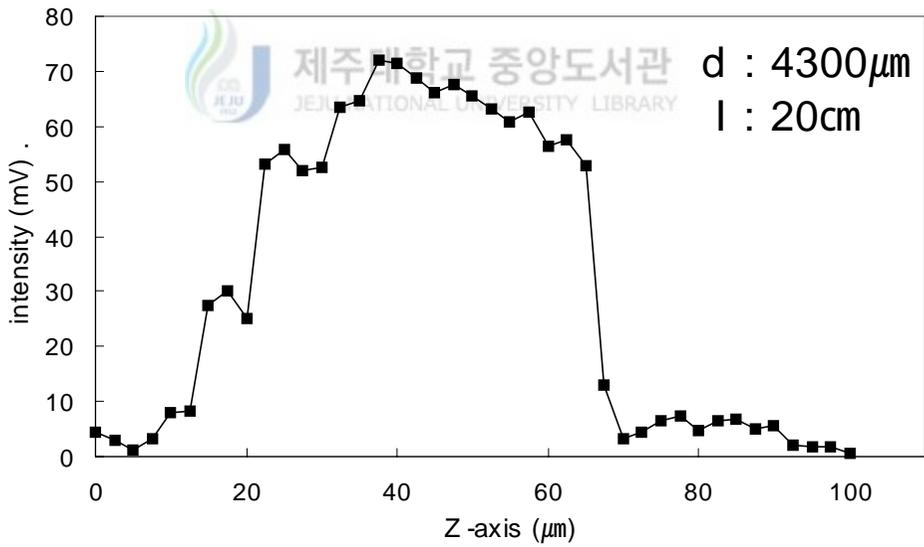
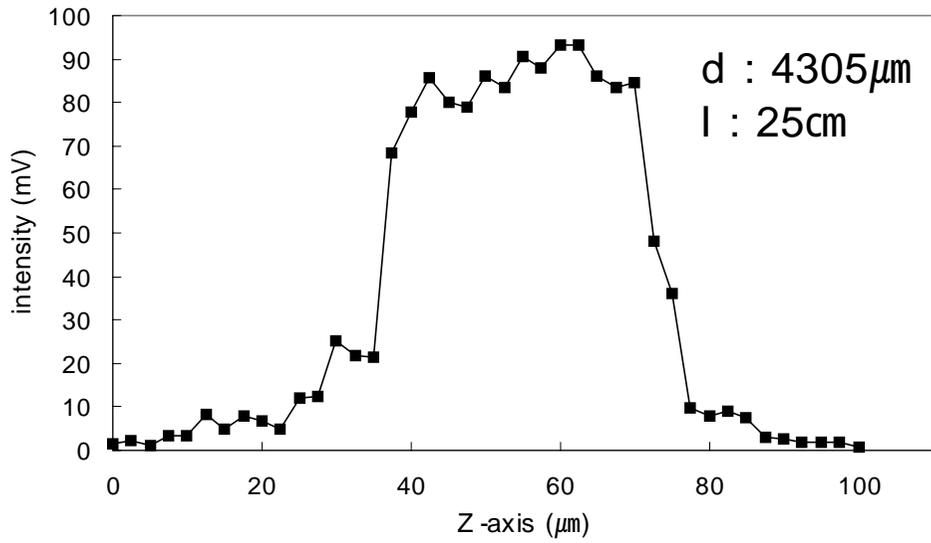
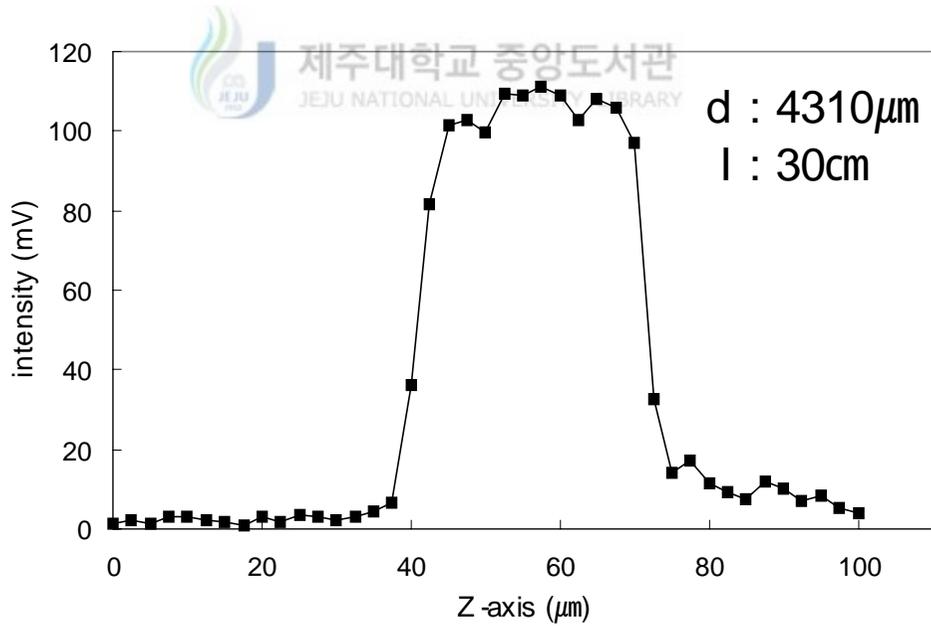


Fig. 25 Intensity distribution of light with a decompensated phase



(a)



(b)

Fig. 26 Intensity distribution of light with a compensated phase

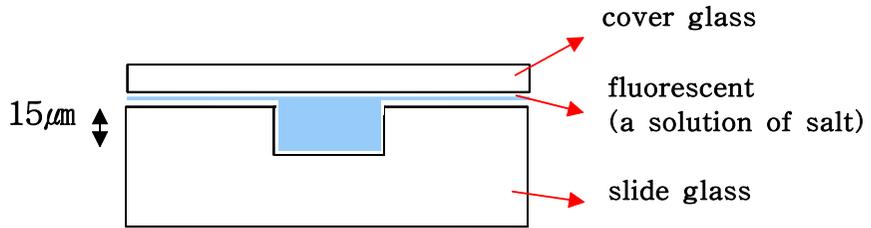


Fig. 27 Fluorescent dyed sample with a solution of salt thickness $15 \mu\text{m}$

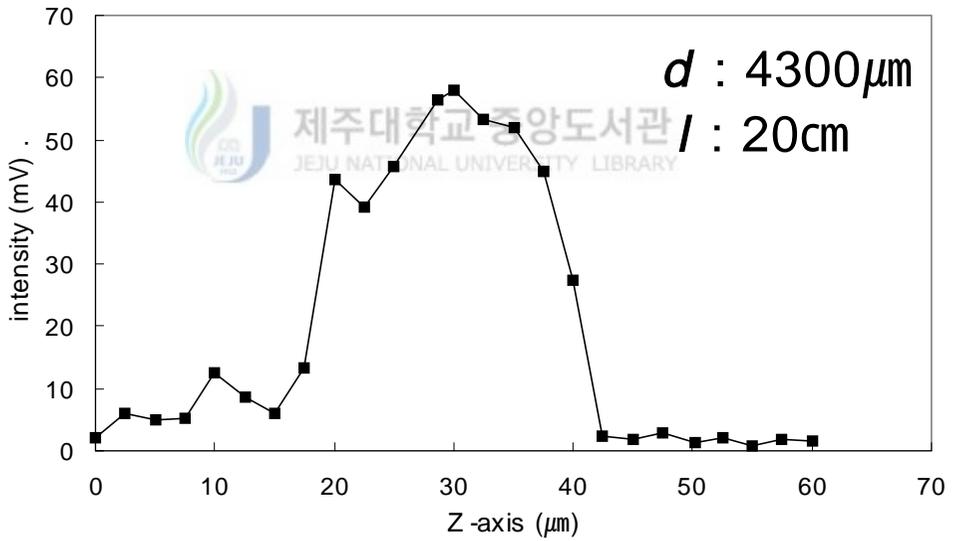
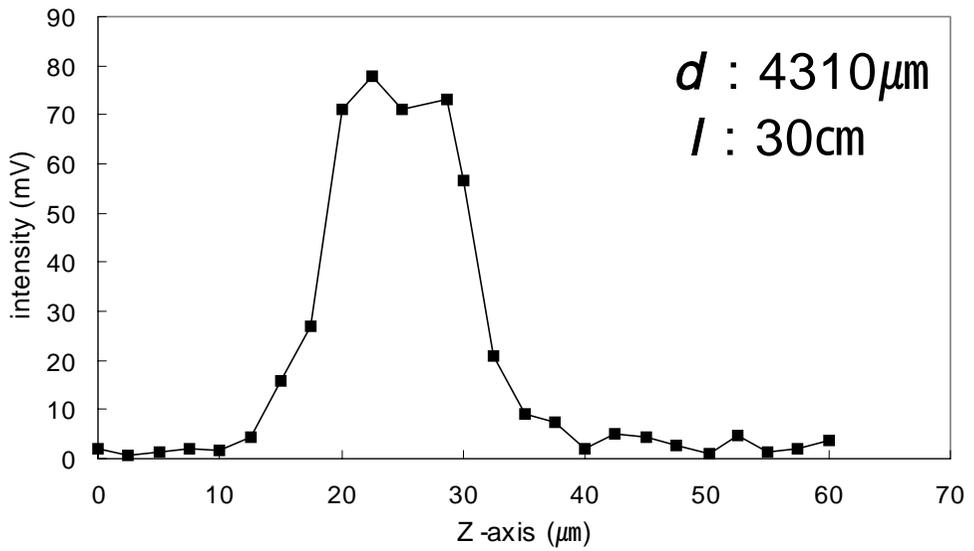
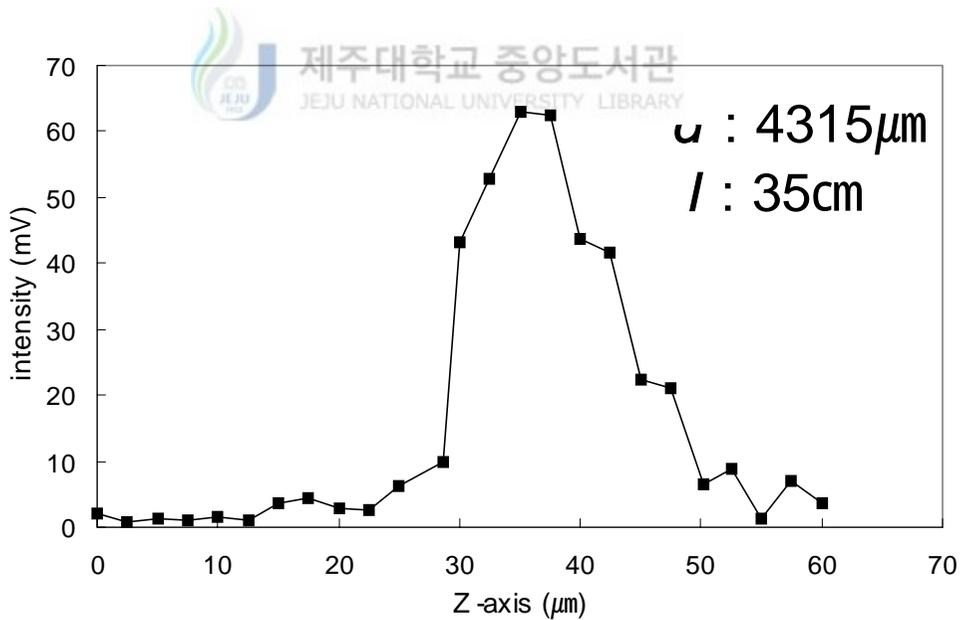


Fig. 28 Intensity distribution of light with a decompensated phase

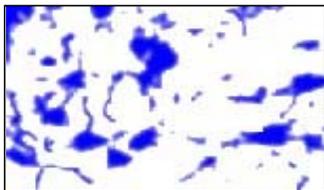


(a)



(b)

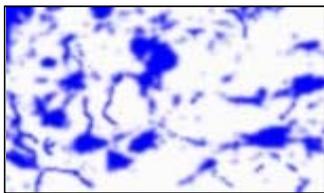
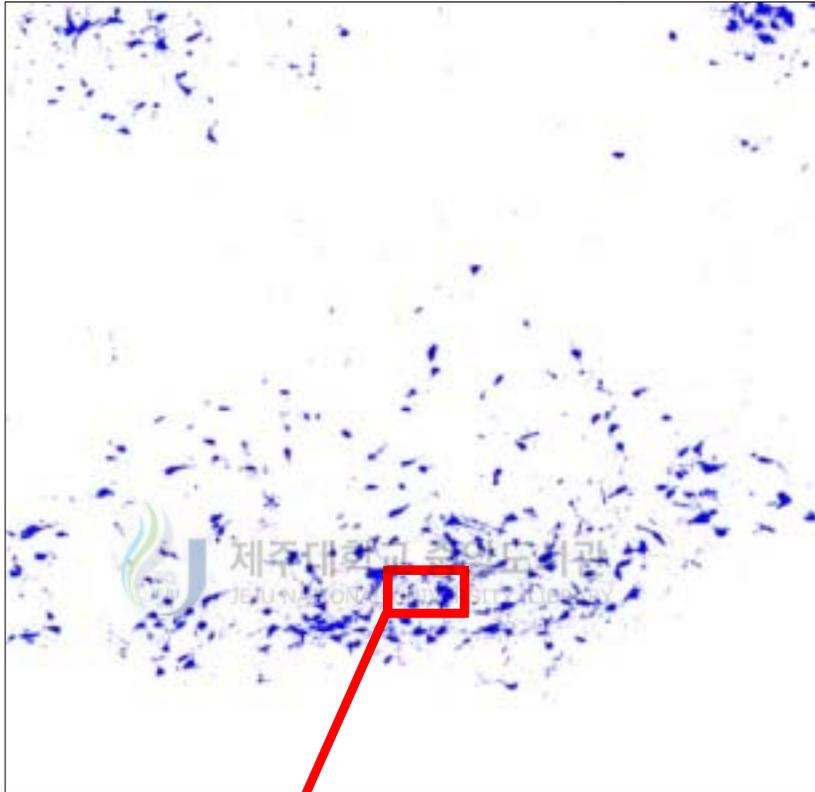
Fig. 29 Intensity distribution of light with a compensated phase



$d : 4300\mu\text{m}$

$l : 20\text{cm}$

Fig. 30 Image of decompensated phase



$d: 4310 \mu\text{m}$

$l: 30\text{cm}$

Fig. 31 Image of decompensated phase

기가 증가하였으며, side-lobe는 발생하지 않았으며, 측정된 두께는 약 15 μm 로 실제의 시료 두께와 일치하였다. Fig. 29(b)는 15 μm 보정한 d 값이 4315 μm 인 경우로, side-lobe가 심하며, 빛의 세기가 매우 낮아 졌다. 즉 Fig. 27과 같이 시료가 식염수이며, 그 두께가 15 μm 인 경우 d 값이 4310 μm 인 10 μm 보정한 경우 위상 오차를 최소화할 수 있다. 이 결과는 같은 두께의 시료라 할지라도 시료의 굴절률의 차이에 따라 위상 오차의 정도가 다르며, 그 보정의 정도 또한 다르며, 굴절률이 클 경우 두께가 두꺼운 경우와 마찬가지로 위상 오차가 심해지며, 보정값 또한 커진다.

이러한 위상 보정의 결과를 토대로 실제 형광 공초점 현미경에서의 side-lobe 감소를 알아보기 위하여 시료를 제작하였다. 시료는 두께 약 15 μm 의 쥐의 뇌 세포 조직을 식염수를 사용하여 형광 염색하였다. 또한 이제까지의 결과를 얻었던 Fig. 16의 실험장치와 달리 평면방향의 주사를 위하여 Fig. 18과 같이 X-Y Scan Unit을 사용하였고, d 와 l 값을 조절할 수 있도록 제작하였다. 쥐의 뇌 세포 시료의 경우 그 두께가 약 15 μm 이고, 식염수를 사용하여 형광 염색을 한 경우로 Fig. 24의 시료와 일치한다. 즉 위상 보정을 10 μm 한 d 값이 4310 μm 인 경우에 위상 오차를 최소화할 수 있다. Fig. 30은 d 값이 4300 μm 인 경우로 위상 보정을 하지 않은 경우이고, Fig. 31은 d 값이 4310 μm 인 경우로 10 μm 위상 보정을 한 경우이다. 위상 보정을 하지 않은 경우는 side-lobe의 영향으로 실제 세포 외 영역에 잡음이 발생하여 전체적으로 어둡게 보이고, 뇌 세포의 신경 가지가 확인되지 않는다. 그러나 위상 보정을 한 경우는 세포와 세포 외의 영역이 확실히 구분되어, 전체적으로 밝고 뚜렷하게 구분되며, 2 μm 이하의 뇌 세포의 신경 가지까지 확인할 수 있었다. 즉 위상 보정을 통하여 side-lobe를 최소화함으로써 상 형성 시 잡음을 최소화할 수 있을 뿐 아니라, 해상도의 향상으로 측정되지 않았던 부분을 측정할 수 있었다.

V. 결론

형광 공초점 현미경은 수차를 최소화함으로써 고해상도의 상을 얻을 수 있다. 그러나 시료의 특성에 따른 side-lobe의 발생으로 해상도에 악 영향을 미치고 있다. 본 연구에서는 side-lobe가 최소화되는 조건을 찾기 위하여 대물렌즈와 상까지의 거리 그리고 시료와 대물렌즈까지의 거리를 조절하여 광경로 차에 의한 위상오차를 보정하였다.

전산기 시뮬을 통해 시료의 특성에 따른 side-lobe 발생은, 시료의 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 인 경우 $B = 16$ 을 적용하여 위상 오차를 보정 하였고, 시료의 두께가 $35\ \mu\text{m}$ 일 때는 $B = 28$ 을 적용하여 side-lobe의 영향이 최소화됨을 확인할 수 있었다. 이를 실험에 적용하여 시료 두께와 굴절률의 변화에 따른 side-lobe 변화를 측정하였다. 시료의 두께가 없는 경우에는 위상 보정을 하지 않은 $d = 4300\ \mu\text{m}$ 에서 side-lobe가 최소가 되었고, 두께가 $15\ \mu\text{m}$ 인 경우 $5\ \mu\text{m}$ 의 위상 보정을 한 $d = 4305\ \mu\text{m}$ 에서 side-lobe가 최소가 되었고, 시료의 두께가 $35\ \mu\text{m}$ 인 경우 $10\ \mu\text{m}$ 의 위상 보정을 한 $d = 4310\ \mu\text{m}$ 에서 side-lobe가 최소가 되었다. 또한 식염수를 사용하여 형광 염색을 한 경우 $10\ \mu\text{m}$ 의 위상 보정을 한 $d = 4310\ \mu\text{m}$ 에서 side-lobe가 최소가 되었다. 실험 결과를 비교해 볼 때 시료의 두께가 두꺼워질수록 side-lobe의 발생이 증가하고, 빛의 세기는 감소하였고, 굴절률이 높을수록 side-lobe의 발생이 증가하고, 빛의 세기는 감소하였다. 또한 위상 보정이 가능한 형광 공초점 현미경을 구성하여 쥐의 뇌 세포를 관찰한 결과 보정을 하지 않은 경우에 비하여 side-lobe가 적은 상을 얻을 수 있었고, 광축 방향의 해상도 향상으로 $2\ \mu\text{m}$ 이하의 신경 가지 부분을 확인 할 수 있었다.

이와 같이 본 연구에서 얻어진 시료의 불규칙적인 특성(굴절률 및 두께)에 따른 side-lobe의 최소화 방안을 고려한다면, 형광 공초점 현미경을 통해 고해상도의 상을 얻을 수 있을 것이다.

VI. 참고문헌

- Bahaa E. A. Saleh, Malvin Carl Teich, 1991, *Fundamentals of photonics*, John Wiley & Sons, New York, chapter 2, 3.
- Beiser, 1991, *Physics*, Addison wesley, Chapter 24.
- Boone G., 1998, *Signal processing using Optics*, Oxford press, New York, pp.106-111.
- Born M. and Wolf E., 1999, *Principles of Optics*, Cambridge, Chapter 1, 4.
- Cheng P. C., T. H. Lin., W. L. Wu., J. L. Wu., 1994, Multidimensional microscopy, Springer-Verlag New York Inc, pp.1-31.
- Christian K. Sieracko, Christopher G. Levey, Eric W. hansen, 1995, Simplen binary optical elements for aberration correction in confocal microscope, Opt. Lett, 20(10), 1213.
- Cogswell C. J., Sheppard C. J. R., 1991, Effect of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties, Optic, 87(1), 34-38.
- Corle T. R., Kino G. S., 1994, *Confocal scanning optical microscope and related imaging system*, Academic predd, New York, Chapter 3.
- Dinsmore AD., Weeks E. R., Prasad V., Levitt A. C., Weitz DA., 2001, Three-dimensional confocal microscope of colloids, Appl. Opt, V.40, N.24
- Fujita K., Nakamura O., Kaneko T., Oyamada M., Takanatsu T., Kawata S., 2000, Confocal multipoint multiphoton excitation microscope with mocrolens and pinhole arrays, Opt. Comm., 174(1-4), 7-12.
- Fukano T., Yamagychi I., 2000, Geimetrical cross-sectional imaging by a heterodyne wavelength-scanning interference confocal microscope, Opt. Lett., 25(8), 548-550.
- Hecht, 1998, *Optics*, Addison Wesley, chapter 4, 5, 6.
- Ilev I. K., Waynant R. W., 2000, A simple submicron confcal microscope with a

- fiber optic output, *Review of Scientific Instruments*, 71(11), 4161-4164.
- Ishihara M., Sasaki H., 1999, High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope, *Opt. Eng.*, 38(6), 1035-1040.
- Jurgen R., Meyer-Arendt, 1995, *Introduction to classical and modern optics*, New jersey, Chapter 5, 6.
- 김억봉, 2001, 공초점 광학 현미경에서 Side-lobe 감소 방안에 대한 연구.
- Minsky M., 1991, *Microscopy apparatus.*, U.S. Patent.
- Nutter P. W., Wright C. D., 1998, Resolution issues in confocal magneto-optic scanning laser microscopy, *J. Appl. Phys.*, 37(4B), 2245-2254.
- Scharader M., Hell S. W., Vandernoort H.T.M., 1998, Three-dimensional super-resolution with a 4pi-confocal microscope using image restoration, *J. Appl. Phys.*, 84(8), 4033-4042.
- Sharma M. D., Sheppard C. J. R., 1999, Effects of system geometry on the axial response of the fiber optical confocal microscope, *J. Mod. Opt.*, 46(4), 60-62.
- Shotton D. M., 1989, Confocal scanning optical microscopy and its application for biological specimens, *J. Cell Sci.*, 94, 175-206.
- Sheppard C. J. R. and Min Gu., 1992, Axial imaging through an aberrating layer of water in confocal microscopy, *Opt. Comm.*, 88(2), 180-190.
- Sheppard C. J. R., Min Gu., 1991, Aberration compensation in confocal microscopy, *Appl. Opt.*, 30(25), 3563-3568.
- Sheppard C. J. R. 1988, Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging system, *Appl. Opt.*, 27(22), 4782-4786.
- Sheppard C. J. R., T. Wilson., 1981, Effect of high angles of convergence in $V(Z)$ in the scanning acoustic microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 38(11), 858-859.
- Sheppard C. J. R., Min Gu., Keith Brain, Hao Zhou, 1994, Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy, *Appl. Opt.*, 33(4), 616-624.

- Steffen Lindek, Christoph Cremer, Ernst H. K. Stelzer, 1996, Confocal theta fluorescence microscopy with annular apertures, Appl. Opt., 35(1), 126-130.
- Yang L. S., Wang G. Y., Wanf J. G., 2000, Surface profilometry with a fiber optical confocal scanning microscope. Measurement Science & Technology, 11(12), 1786-1791.



감사의 글

본 논문이 이루어지기까지 끊임없는 지도와 격려를 아끼지 않으신 유영훈 교수님께 깊은 감사를 드리며, 본 논문을 심사하는 과정에서 지도와 조언을 아끼지 않으신 최치규, 현남규 교수님께도 감사드립니다. 아울러 여러 가지로 부족한 제게 많은 질책과 격려를 해주신 홍성락, 김두철, 고정대, 김용주 교수님께도 감사 드립니다. 또한 언제나 학생들의 장래를 걱정해주시던 고 류재연 교수님의 명복을 빕니다.

사적인 일이든 공적인 일이든 부탁할 때마다 도움을 주었던 두성이 형과, 멀리서도 밤을 세워가며 도움을 준 역봉이 형 정말 고맙습니다. 실험실의 뒷일을 조용히 처리해 준 순호, 아름, 선규, 그리고 멀리에서 응원을 해준 영미까지 모두 모두 고맙다. 또한 동생을 자처했던 선에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

큰 병환 중에서도 저를 있게 해주신 부모님께 깊이 고개 숙여 감사드립니다. 또한 이렇다할 신혼 생활 없이도 나를 더 걱정해주고, 내게 소중한 아들을 선사해준 경희에게 깊은 감사드립니다.

