

형광 공초점 주사 현미경의 측정 강도 향상을 위한 반사 광학계의 제안 및 설계

강동균*(한국과학기술원 기계공학과), 서정우 (한국과학기술원 기계공학과), 권대갑 (한국과학기술원 기계공학과)

Proposal and design of reflecting optical system to improve detection intensity in fluorescence confocal scanning microscopy

D. K. Kang* (Mechanical Eng. Dept. KAIST), J. W. Seo (Mechanical Eng. Dept. KAIST), D. G. Gweon (Mechanical Eng. Dept. KAIST)

ABSTRACT

Confocal microscopy is very popular technology in bio-medical inspection due to its ability to reject background signals and to measure very thin slide of thick specimens, which is called optical sectioning. But intensity of detected signal in fluorescence type confocal microscopy is so small that only 0.2% of emitted fluorescence light can be detected in the best case. In this paper, we proposed the reflecting optical system to improve the detection intensity and designed the optical system by optimal design method. At the end of the paper, we analyzed the characteristics of the proposed reflecting optical system.

Key Words : Confocal scanning microscopy (공초점 주사 현미경), Detection intensity (측정 강도), Reflecting optical system (반사 광학계), Optimal design (최적 설계), Point spread function (점 확산 함수)

1. 서론

공초점 주사 현미경은 1980 년대에 이르러 상업 용으로 개발되면서 생의학 분야에 많이 응용되기 시작했다. 세포의 관찰, 생리학, 세포 유전학, 병리학 등의 분야에 응용되어 왔으며 최근에 와서는 염색체의 관찰에도 사용되고 있다.¹ 또한, 생의학 분야 뿐만이 아니라 기계 가공품의 표면 검사나 반도체의 선폭 검사등에도 이용되고 있어 그 응용분야를 지속적으로 넓혀가고 있다. 공초점 주사 현미경을 이용하는 경우 광검출기 전면에 위치한 편홀이 초점 평면이 아닌 곳에서 나오는 신호를 제거하여 두꺼운 시편 내에서 아주 얇은 조각만을 관찰할 수 있다. 이 얇은 조각에서 나온 신호, 즉 2 차원 평면의 모양을 광축 방향으로 초점 평면의 위치를 바꾸면서 얻으면 측정하고자 하는 시편의 3 차원 형상을 얻는 것이 가능해진다.² 이렇게 아주 얇은 조각만을 관찰하는 것을 광학적 절편(Optical sectioning)

이라고 부르며, 이러한 특성 때문에 생의학 분야에 많이 응용되고 있다.

형광 현미경을 제작하는 경우 가장 문제가 되는 것은 염료가 가지는 광화학적 특성이다. 이 광화학적 특성에는 염료가 날아가 버리는 포토블리칭(Photo bleaching)과 여기하는 입사광의 광량이 증가하는 경우에도 방출되는 형광이 포화되어 제한되는 현상이 있다. 이런 문제들은 일반적인 광학 현미경도 가지는 문제이며, 공초점 주사 현미경의 경우에는 부가의 광학계에 의한 광량 감소 효과 때문에 측정되는 광량이 많이 줄어들게 된다. 일반 광학 현미경의 가장 좋은 경우라고 하더라도 방출되는 광량의 5%미만만을 측정할 수 있으며 공초점 주사 현미경의 경우에는 이 비가 0.2%미만으로 쉽게 떨어질 수 있다.³

포토블리칭 효과를 줄이기 위해서 여러 가지 방법이 시도되었는데, 레이저가 주사를 끝낸 다음 처음의 위치로 돌아가는 동안 레이저의 입사를 차단

하여 시편이 입사광에 노출되는 시간을 줄이는 방법, 레이저의 출력을 감소시키는 방법, 주사 속도를 빨리 하여 레이저가 시편 상에 머무르는 시간을 줄이는 방법이 있다. 이 외의 방법으로는 Anti-fading agent 를 사용하는 방법이 있다.⁴ 이들 방법은 시스템 자체의 구조를 바꾸어 향상을 꾀하기 보다는 시편 상에 입사광이 머무르는 시간을 짧게 하는 방향이므로 근본적인 해결책이 되지는 못한다.

다른 방법으로 관찰하고자 하는 점에서 광검출기까지 들어오는 광량이 작다고 할 때 검출기의 민감도를 높여 보다 나은 영상을 얻는 방법이 실현되었다. PMT 전반부에 프리즘을 설치하여 전반사를 이용하여 광자를 프리즘과 PMT 의 음극에 잡아둠으로써 광자 효율(Quantum efficiency)을 2 배에서 4 배까지 향상시킨 Bio-rad 사의 방법이 그것이다.

본 논문에서는 광 검출기에 들어가는 광량 자체를 증가시켜 측정되는 강도를 향상시키는 반사 광학계를 제안한다. 그리고 제안된 반사 광학계를 유한 광선 추적법을 이용하여 최적 설계하고 광 전이 함수의 개념을 이용하여 제안되는 광학계의 성능을 평가해 보고자 한다.

2. 반사 광학계의 제안

제안되는 반사 광학계는 Fig. 1 과 같은 모양을 가진다.

제안되는 광학계는 기존의 공초점 주사 현미경의 대물렌즈와 시편 후방에 위치하게 된다. 대물렌즈에 의해 시편 상에 초점이 맺히면 이 점에서부터 형광이 나오는데 이 형광은 모든 방향으로 나가게 된다. 대물렌즈는 NA(Numerical Aperture) 의 한계를 가지기 때문에 모든 방향으로 나가는 빛 중 일부분을 받아들이게 된다. 제안되는 반사 광학계는 시편 후방으로 진행하는 형광을 반사 광학계를 이용하여 원래 형광이 나왔던 점으로 돌아가게 만들고, 이 돌아온 빛이 시편 전방의 대물렌즈, 즉 영상을 만들기 위해 사용되는 대물렌즈에 입사하게 하여, 전체적으로 대물렌즈에 입사하는 광량을 증대시키게 된다.

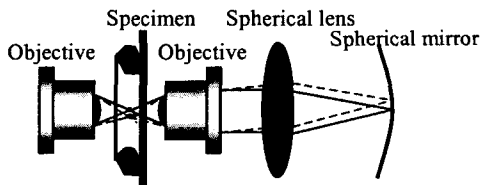


Fig. 1 Proposed reflecting optical system

시편의 보다 빠른 검사를 위해서는 빔 편향 방식을 이용하여 시편 상에서 초점이 맺히는 점을 바

꾸게 되는데 이런 경우, 형광이 나오는 점이 달라지게 된다. 제안되는 반사 광학계의 경우 형광이 나오는 점의 위치에 관계없이 시편 후방으로 진행하는 형광을 돌릴 수 있기 때문에 빔 편향 방식을 이용하는 공초점 주사 현미경에서도 사용이 가능하

3. 제안된 광학계의 설계

2 장에서 제안된 광학계의 설계를 위해 유한 광선 추적법을 이용한다. 유한 광선 추적법이란 하나의 광선이 광학계를 거치고 난 후 최종면에서 어떤 위치에 어떤 각도로 입사하는 가를 계산하는 방법이다.⁵ 제안된 광학계에서는 구면 렌즈와 구면 거울을 사용하게 되므로 굴절 광학계와 반사 광학계에서 광선의 경로에 관한 다음과 같은 관계식을 이용하게 된다.

$$n' \begin{pmatrix} L' \\ M' \\ N' \end{pmatrix} = n \begin{pmatrix} L \\ M \\ N \end{pmatrix} - k_f \begin{pmatrix} x \\ y \\ z-r \end{pmatrix} \quad (1)$$

$$\begin{pmatrix} L' \\ M' \\ N' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} L \\ M \\ N \end{pmatrix} - k_f \begin{pmatrix} x \\ y \\ z+r \end{pmatrix} \quad (2)$$

최적 설계를 위해서는 목적 함수를 선정하는 것이 필요한데, 본 논문에서는 중심광선이 반사 광학계를 거친 다음 시편 후방의 대물 렌즈에 입사할 때, 원래의 위치에서 벗어나는 정도와, 가장 자리 광선들이 반사 광학계를 거친 후 시편 후방의 대물 렌즈에 입사할 때 두 가장 자리 광선 사이의 수렴 각을 포함하는 목적 함수를 선정하였다. 그리고 이 목적 함수를 최소화 하기 위하여 구면 렌즈의 곡률 반경(r), 구면 렌즈와 대물 렌즈 사이의 거리(a), 구면 거울의 곡률 반경(sr)을 설계 변수로 하여 최적 설계를 수행하였다. 이 때 목적 함수는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

$$I(r, a, sr) = W_1 \times factor_1 \times (\text{central ray deviation from 0}) + W_2 \times factor_2 \times (\text{converging angle of marginal rays}) \quad (3)$$

Fig. 2 (a), (b)는 각각의 목적함수의 값이 어떤 경향을 보이는지를 보여준다. 이를 이용하여 목적 함수가 최소가 되는 설계 변수의 값을 구하면 최종 설계 값을 구할 수 있다.⁶

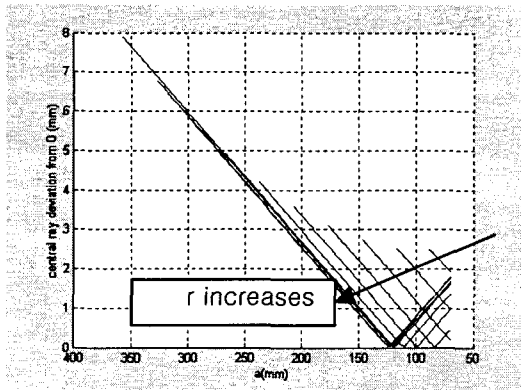


Fig. 2(a) Central ray deviation from 0 ($sr=500mm$)

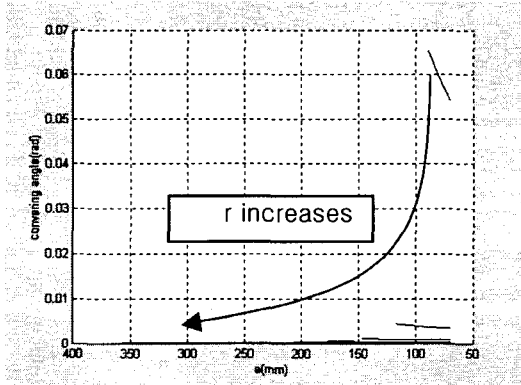


Fig. 2(b) Converging angle of marginal rays ($sr=500mm$)

이렇게 하여 설계한 결과는 다음과 같다.

Spherical lens	KBX079 ($f=250mm$)
Spherical mirror	10DC500 ($f=250mm$)
OL -Spherical lens	125mm

Table 1 Result of optimal design of reflecting optical system

4. 반사 광학계의 성능 분석

반사 광학계는 측정되는 강도를 향상 시켜줄 것으로 기대된다. 그러나 분해능에는 어떤 영향을 줄지에 대해서는 파동 광학을 이용한 보다 엄밀한 접근이 필요하다. 본 논문에서는 시편 후방에 있는 반사 광학계 내의 대물렌즈의 NA가 변함에 따라 측정 강도와 분해능에 어떤 영향을 알아보려고 한다.

4.1 점 확산 함수와 광 전이 함수

점으로 되어 있는 시편을 측정할 때 어떤 영상을 얻을 수 있는지를 알 수 있다면 전체 시편에 대해 어떤 영상을 얻을 수 있는 지 이론적으로 알

수 있다. 점이 어떤 영상으로 맺히는가를 점 확산 함수라고 하며 이는 다음과 같은 관계식을 통해 조명부의 점 확산 함수와 측정부의 점 확산 함수로 나타낼 수 있다.⁷

$$h_a(\beta) = |h_{illu}(\beta)|^2 |h_{de}(\beta)|^2 \quad (4)$$

이 때 측정부의 점 확산 함수는 시편 전방의 대물렌즈를 통해서 전파되는 점 확산 함수와, 시편 후방의 반사 광학계를 거친 다음 대물 렌즈에 입사하는 경로의 점 확산 함수의 합으로 나타난다. 시편 전방의 대물 렌즈가 가지는 NA와 시편 후방의 대물 렌즈가 가지는 NA 사이의 비를 m 이라고 하면 각각의 검출 경로에 따른 점 확산 함수 사이의 관계는 다음과 같은 관계를 가진다.

$$h_2(x, y, z) = m^2 h_1(mx, my, -m^2 z) \quad (5)$$

이러한 관계를 이용하면 반사 광학계의 대물렌즈가 NA를 바꿈에 따라 전체 광학계에 성능에 어떤 영향을 주는지 알 수 있다.

광 전이 함수는 점 확산 함수를 Fourier 변환한 것으로 광학계의 성능을 나타내어 주는 지표중의 하나이다. 광 전이 함수가 가지는 밴드가 넓다는 것은 보다 자세한 정보를 영상화 할 수 있다는 것으로 광학계의 성능이 낫다는 것을 의미한다.

4.2 반사 광학계의 성능

앞의 4.1 절에서 언급된 점 확산 함수를 이용하여 광축 방향의 응답 특성과 광 전이 함수를 통해 광학계의 성능을 분석한다.

광축 방향의 응답 특성이란 점으로 된 물체를 광축 방향으로 이동시키면서 측정기에서 검출되는 광량을 본 것이다. Fig. 3(a), (b)는 m 값을 변화시키면서 광축 방향 응답 특성의 변화를 본 것이다.

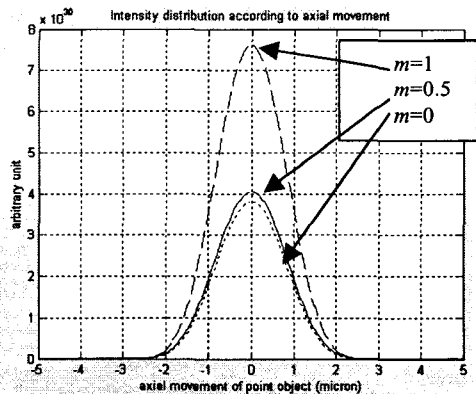


Fig. 3(a) Axial response varying m

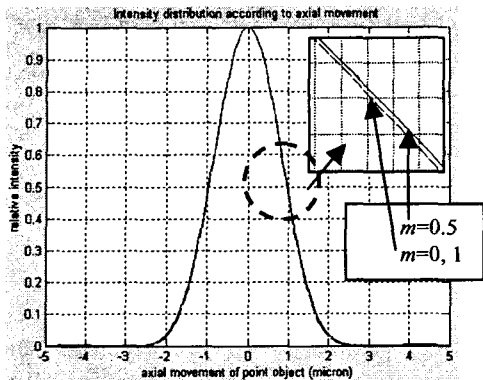


Fig. 3(b) Normalized axial response object varying m

Fig. 3(a)에서 알 수 있듯이 m 이 증가할수록, 즉 반사 광학계의 NA 가 커질수록 측정되는 강도가 커지는 것을 알 수 있다. 이 때 강도의 증가량은 m' 에 비례하는 것을 알 수 있다. Fig. 3(b)는 m 의 변화가 분해능에 미치는 영향을 보기 위한 것으로 m 이 0.5 인 경우 FWHM 이 m 이 0 인 경우나 m 이 1 인 경우에 비해서 더 커져 성능이 나빠진다는 것을 알 수 있다. 그러나 그 증가량이 크지 않으므로 분해능에는 큰 영향을 주지 않는다. 이러한 경향은 Fig. 4 에서 잘 알 수 있다.

광 전이 함수의 경우 반사 광학계를 사용하는 경우 광 전이 함수 전체의 크기는 증가하지만 그 모양 자체에는 큰 변화가 없음을 알 수 있다. m 값 이 달라짐에 따라 광 전이 함수의 크기 증가량이 m' 에 비례하여 달라지며, m 값에 따라 밴드의 폭이 좁아지기도 한다. 반사 광학계를 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 광 전이 함수를 비교한 결과는 Fig. 5 에 잘 나타나 있다. 반사 광학계를 사용한 경우 광 전이 함수의 크기가 전체적으로 더 커졌다는 것을 알 수 있다.

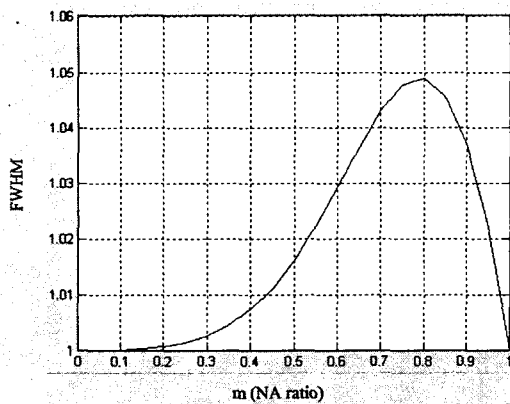


Fig. 4 FWHM varying m

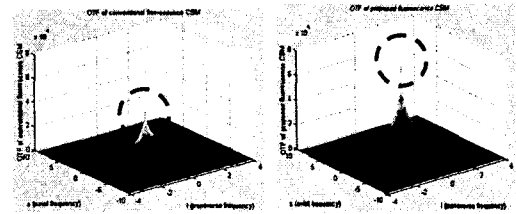


Fig. 5 Comparison of OTF between without and with reflecting optical system

4. 결론

본 논문에서는 형광 공초점 주사 현미경에서 측정 강도 향상을 위한 반사 광학계를 제안했다. 제안한 광학계를 설계하기 위하여 유한 광선 추적법을 이용하였으며, 목적 함수를 최소화하는 설계 변수를 설정하였다. 반사 광학계의 성능 분석을 위해 점 확산 함수, 광축 방향 응답 특성, 광 전이 함수의 개념을 도입하였으며, 반사 광학계를 사용하는 경우 시편 전방의 대물 렌즈와 반사 광학계의 대물 렌즈가 가지는 NA 비의 4 제곱에 비례하여 측정 강도가 증가한다는 것을 알 수 있다. 반사 광학계를 사용하는 경우 분해능에 약간의 저하가 있으며, 최대 5% 의 저하가 있을 수 있다.

참고문헌

1. C.J.R.Sheppard, "Confocal Laser Scanning Microscopy", Bios Scientific publishers, pp.xi-xii, 1997
2. James B. Pawley, "Handbook of Biological Confocal Microscopy", Plenum Press, pp. 1-14, 1990
3. David R. Sandison, "Handbook of Biological Confocal Microscopy", Plenum Press, pp. 39-53, 1995
4. P. Michael Conn, "Methods in Enzymology Vol.307 Confocal Microscopy", Academic press, pp. 55-78, 1999
5. 이상수, "기하광학", 교학연구사, pp. 57-59, 1993
6. D.K. Kang, J.W. Seo, Dae-gab Gweon, "Signal increasing method in confocal scanning microscopy in fluorescent mode using curved mirror", International conference on control, Automation and Systems 2001, pp. 1572-1575, 2001
7. Min Gu, "Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes", World scientific, pp. 123-149, 1996