

## 형광 공초점 현미경의 side-lobe 감소에 대한 연구

조형준, 최치규, 김두철, 유영훈

제주대학교 물리학과, 기초과학연구소

### 요 약

구면렌즈를 사용한 광학 관측계의 경우 관측계 자체의 문제뿐만 아니라 시료의 두께 및 굴절률에 따라 위상오차에 의한 side-lobe가 발생한다. 특히 형광 공초점 현미경의 경우 시료 제작 시 사용되는 형광물질, 증류수, 식염수 등의 불규칙적인 사용으로 위상오차에 의한 side-lobe의 발생이 매우 심각하다. 본 연구에서는 시료의 특성에 따른 side-lobe를 최소화하기 위하여 Herschel 조건을 도입하였다. 또한 형광 공초점 현미경을 구성하여 Herschel 조건에 의한 위상보정을 함으로써 side-lobe가 최소화됨을 확인하였다.

### I. 서 론

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 공초점 현미경이 개발되었다.[1-7]

공초점 현미경은 광원에서 나온 빛이 렌즈에 의해 시료 표면에 조사되고, 렌즈의 공초점 위치에 바늘 구멍을 설치하여, 시료 표면에서 반사되어 나오는 빛의 초점 외 상을 제거함으로써 고해상도의 상을 얻을 수 있게 한 것이다.[8-9] 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 시료 자체를 움직여서 주사하는 방식을 택하므로 상을 얻는데 많은 시간이 소요되며, 시료의 부분적인 반사율 차이에 따라 시료의 상이 변형될 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.[10-17] 또한 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 현저히 나쁘다. 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 현미경에서 시료의 굴절률 차이에 따라 조사된 빛의 경로가 바뀌게 되고, 그에 따른 위상 오차의 문제를 해결하여 줌으로써 광축 방향에 대한 해상도

를 향상시키는 방법에 대하여 연구하였다.

## II. 이 론

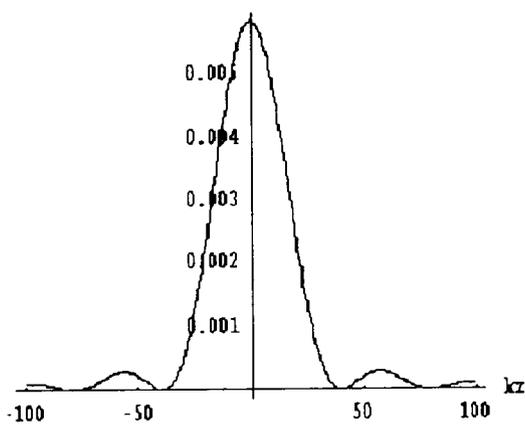
공초점 현미경에서 시료에서 검출기에 도달하는 빛의 세기는 식(1)로 주어진다[15].

$$I(z) = \left| \int_0^{\alpha} R(\theta_1) P^2(\theta_1) \exp[2ikzn_1 \cos \theta_1] \sin \theta_1 \cos \theta_1 d\theta_1 \right|^2 \quad (1)$$

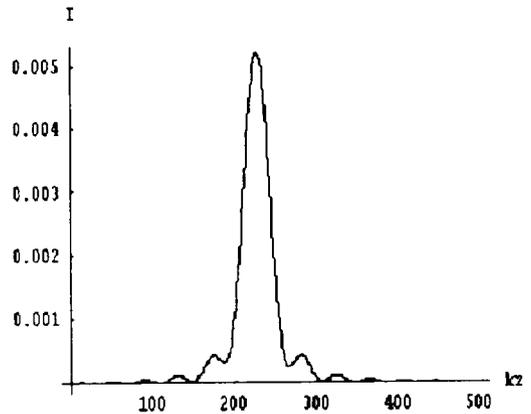
여기서  $z$ 는 시료가 광축 방향으로 이동한 거리,  $\alpha$ 는 광축과 렌즈를 통해 들어오는 빛 사이의 각,  $P(\theta_1)$ 는 Pupil 함수이고,  $R(\theta_1)$ 은 반사 계수이다. 이때  $P(\theta_1)$ 는 구면수차 효과에 의해  $P(\theta_1) = \exp(i\phi)$ 로 표현할 수 있으며,  $R(\theta_1)$ 은 반사 계수를 나타내지만, 레이저에서 렌즈를 통해 시료에 조사된 빛의 초점 부분에서는 형광 물질에 의하여 새로운 점 광원이 발생된다. 또한 새로운 점 광원은 레이저 빛의 강도에 따라 그 정도가 선형적으로 비례하므로  $R(\theta_1) \approx 1$ 로 둘 수 있다. (1)식은 평면 방향의 위상오차를 고려하지 않은 식으로, Hershel 조건을 고려하면 (2)식과 같이 쓸 수 있다

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

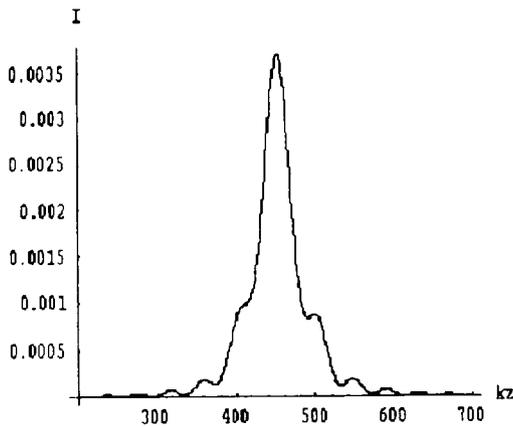
여기서  $c = \cos \theta$ ,  $B = -1/2kd^2 \nabla(1/l)$ 이다.  $k$ 는 파수,  $l$ 은 렌즈에서 상까지의 거리,  $d$ 는 시료에서 렌즈까지의 거리이다. 위상 오차가 최소가 되는 조건은  $B = 0$ 이다. 전산 시뮬을 통하여 식(2)를 그래프로 표현하여 보면 그 결과는 Fig. 1과 같다.



(a)  $B = 0$



(b)  $B = 100$



(c)  $B = 200$

Fig. 1 Axial responses with 10X lens when  $B = 0, 100, 200$

Fig. 1에서 (a)는  $B = 0$ 인 경우로 위상 오차가 없는 경우로, 그 빛의 세기도 매우 크고, side-lobe가 발생하지 않는다.

(b)는  $B = 100$ 인 경우로 위상 오차가 나타나, side-lobe가 발생하였으며, 빛의 세기가 감소하였고, 위상 오차가 없는 경우 반치폭이 10인데 반해,  $B=100$ 인 경우는 반치폭이 15로 증가하였다. (c)는  $B = 200$ 인 경우로, (b)의 경우에 비하여 side-lobe가 증가하였고, 빛의 세기가 더욱 감소하였으며, 반치폭도 증가하였다. 즉, 위상 오차  $\phi$ 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 넓어짐으로서 상에 잡음이 발생하며, 해상도를 저하시키게 된다.

$$\begin{aligned}
 I(z) = & \frac{1}{4} \left| \int_{\cos \alpha}^1 \left[ \exp\left(2i \left( \tan^{-1} \left( \frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}} \right) \times \tan \left( h\sqrt{1-n^2(1-c^2)} \right) \right) \right) \right. \right. \\
 & + B\left(\frac{1}{c} - 1\right) + kzn_1c \left. \right) + \exp\left(2i \left( \tan^{-1} \left( \frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \right) \right. \right. \\
 & \left. \left. \times \tan \left( h\sqrt{1-n^2(1-c^2)} \right) \right) + B\left(\frac{1}{c} - 1\right) + kzn_1c \right] c \, dc \right|^2
 \end{aligned} \quad (3)$$

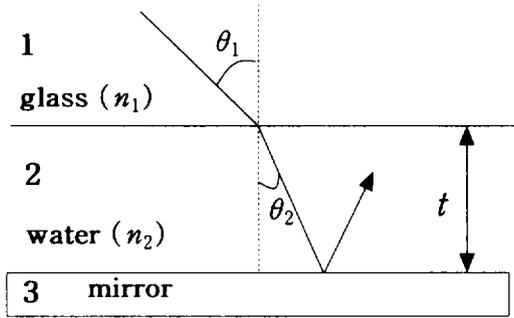


Fig.2 Light reflection from a perfect reflector with a water layer

Fig.2와 같이 시료가 두께를 가지는 3층구조에서 위상오차를 고려한 빛세기는 (3)식과 같이 주어진다.

(3)식은 위상오차를 보정할 수 있는 B가 포함되어 있다. 즉 대물렌즈와 시료까지의 거리 ( $d$ ), 대물렌즈와 상까지의 거리 ( $l$ )을 조정함으로써 B값을 조정하고, 이로부터 위상오차가 최소가 되는 조건을 조정할 수 있다.

### III. 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 위하여 Fig.3과 같은 실험장치를 구성하였다.

본 연구에서는 10배의 대물렌즈를 사용하였

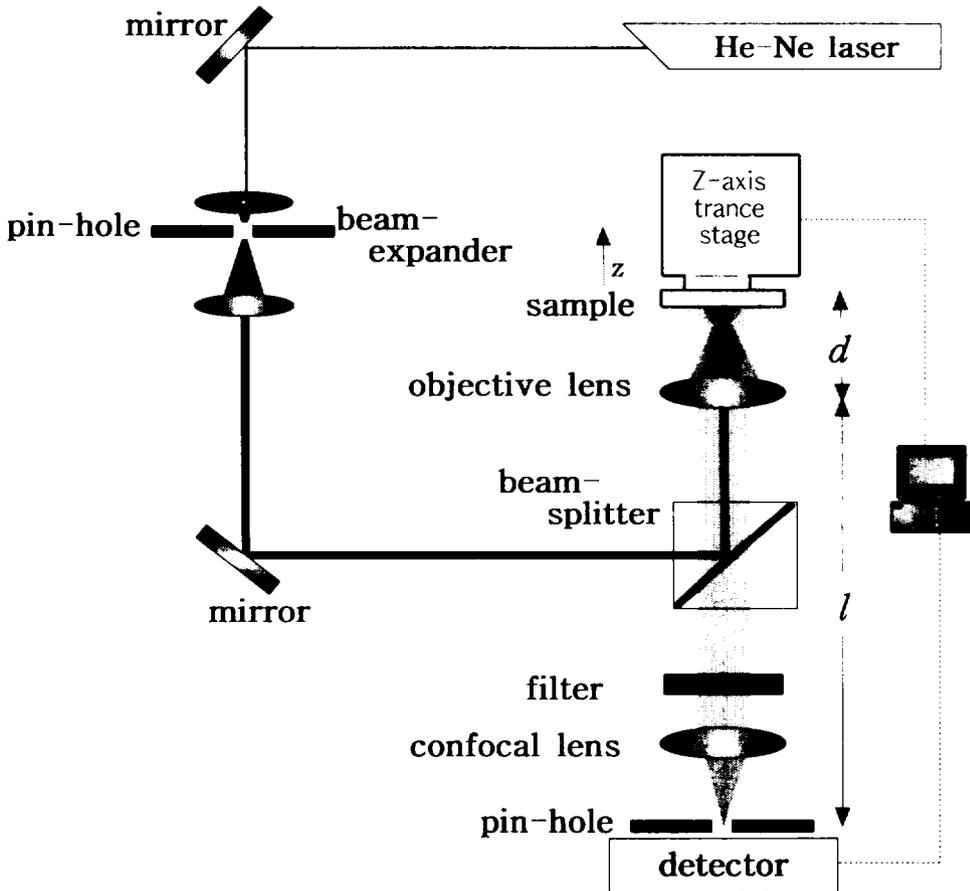


Fig. 3. Schematic diagram of experimental set-up

으며, 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  $15 \mu\text{m}$ 를 광축 방향에 대하여 측정 비교하였으며, 형광 염색과정에서 증류수를 사용하였다.

#### IV. 실험결과 및 논의

Fig.4는 형광 물질을 증류수를 통하여 회색 시킨 시료이다. 또한 그 두께를 매우 얇게 하게 하여, 시료의 굴절률 및 두께에 따른 영향력을 최소화하였다. Fig.5는 광축 방향에 따라 측정한 광세기 변화이다. Fig. 5에서  $d$ 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. 1에서의 전산 시뮬 결과와 비교하면,  $d$ 값이  $4300 \mu\text{m}$ 인 경우  $B = 0$ 에 해당된다. 이는 시료의 굴절률 및 두께를 고려하지 않은 경우 Herschel 조건을 만족시키는 경우에 해당된다.

Fig. 6은 형광 물질을 증류수를 통하여 회색 시킨 시료이다. 그러나 시료의 두께를  $15 \mu\text{m}$ 로

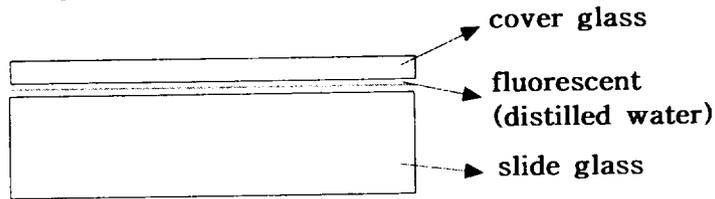


Fig. 4 The sample with a thin thickness

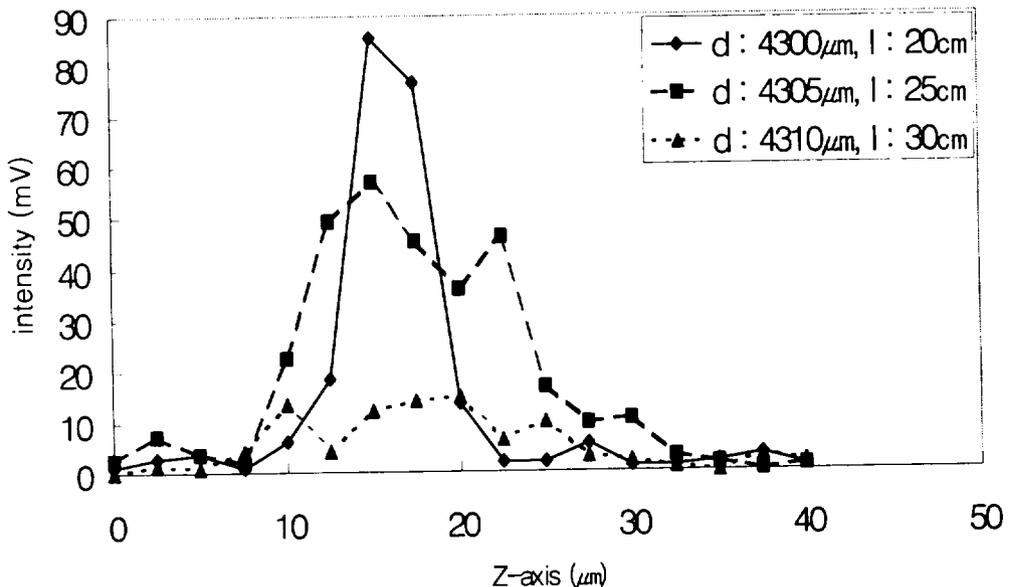


Fig. 5 Intensity of optical axis of sample with a thin thickness

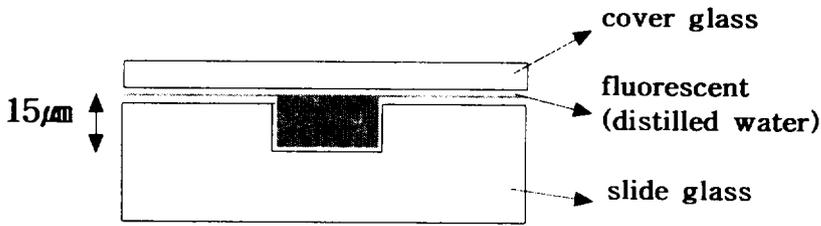
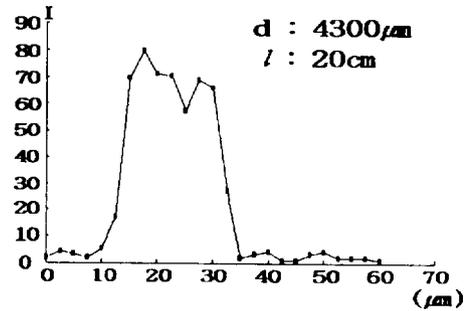


Fig. 6 Fluorescent dyed sample with distilled water a thickness 15  $\mu\text{m}$

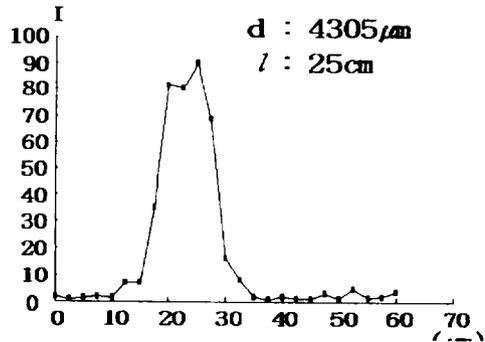
두께를 갖는 시료이다. 이는 시료의 굴절률 및 두께에 따른 위상 오차를 확인하고,  $d$ 와  $l$ 값을 조정하여 위상 보정이 가능함을 알아보기 위한 시료이다.

Fig. 7은 렌즈와 시료의 거리를 변화시킨 상태에서 광축방향에 따른 광세기 분포를 측정 한 것이다.

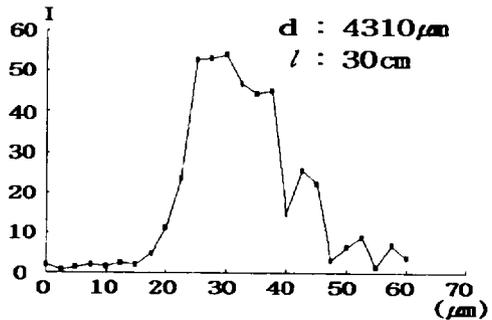
Fig. 7(a)는  $d$ 가 4300  $\mu\text{m}$ 인 경우 광축 방향에서의 빛의 세기 분포이다. Fig. 7(a)에서 알 수 있듯이 side-lobe가 발생하였고, 시료의 두께가 15  $\mu\text{m}$ 임에 반해 측정된 결과는 약 25  $\mu\text{m}$ 로 실제의 시료보다 더욱 두껍게 나타났다. 그러나 Fig. 7(b)는  $d$ 값이 4305  $\mu\text{m}$ 인 경우로 5  $\mu\text{m}$  보정을 해준 경우이다. 이러한 경우 side-lobe가 발생하지 않았으며, 시료의 두께가 약 15  $\mu\text{m}$ 로 실제의 시료와 거의 동일한 값을 갖으며, Fig. 7(a)의 결과와 비교해 볼 때 빛의 세기 역시 증가하였다. 또한 Fig. 7(c)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.  $d$ 값이 4305  $\mu\text{m}$ 인 5  $\mu\text{m}$ 가 보정 되었을 때, 위상 오차를 최소화 할 수 있었다. 또한 이 결과는 식(3)에서 확인 한 것과 같이 시료의 두께 및 두께에 따라 광축방향의 위상 오차가 발생하므로,  $d$ 와  $l$  값을 조정함으로써 위상 오차를 감소시킬 수 있었다.



(a)



(b)



(c)

Fig. 7 Axial responses with 10X lens

## V. 결 론

형광 공초점 현미경은 수차를 최소화함으로써 고해상도의 상을 얻을 수 있다. 그러나 시료의 특성에 따른 side-lobe의 발생으로 해상도를 낮춘다. 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, 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 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.

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

- [1] Fujita K., Nakamura O., Kaneko T., Oyamada M., Takanatsu T and Kawata S., *Opt. Comm.*, **174**(1-4), 7, 2000
- [2] Fukano T., Yamaguchi I., *Opt. Lett.*, **25**(8), 548, 2000
- [3] Hecht, *Optics*, Addison Wesley, chapter 4-6, 1998
- [4] Ilev I. K. and Waynant R. W., *Review of Scientific Instruments*, **71**(11), 4161, 2000
- [5] Ishihara M., Sasaki H., *Opt. Eng.*, **38**(6), 1035, 1999
- [6] Nutter P. W. and Wright C. D., *J. Appl. Phys.*, **37**(4B), 2245, 1998
- [7] Scharader M., Hell S. W. and Vander-noort H.T.M., *J. Appl. Phys.*, **84**(8), 4033, 1998,
- [8] Yang L. S., Wang G. Y. and Wanf J. G., *Measurement Science & Technology*, **11**(12), 1786, 2000
- [9] Minsky M., *Microscopy apparatus.*, U.S. Patent, 1991
- [10] Shotton D. M., *J. Cell Sci.*, **94**, 175, 1989,
- [11] Beiser, *Physics*, Addison wesley, Chapter 24, 1991
- [12] Christian K. Sieracko, Christopher G. Levey and Eric W. Hansen, *Simplen, Opt. Lett.*, **20**(10), 1213, 1995
- [13] Cogswell C. J. and Sheppard C. J. R., *Optic*, **87**(1), 34, 1991
- [14] Sheppard C. J. R. and Min Gu., *Opt. Comm.*, **88**(2), 180, 1992
- [15] Sheppard C. J. R., *Appl. Opt.*, **27**(22), 4782, 1988
- [16] Sheppard C. J. R. and T. Wilson., *Appl. Phys. Lett.*, **38**(11), 858, 1981,
- [17] Sheppard C. J. R., Min Gu., K. Brain and H. Zhou, *Appl. Opt.*, **33**(4), 616, 1994
- [18] Steffen L., C. Cremer and Ernst H. K. Stelzer, *Appl. Opt.*, **35**(1), 126, 1996

# A Study on the method for Decreasing Side lobe of Fluorescence Confocal Microscope

HyungJoon Cho, ChiKyu Choi, DooCheol Kim and YoungHun Yu

*Department of Physics, Cheju National University, Jeju, Korea, 690-756*

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.