

Microscopy Training & Overview

제품 마케팅
2011년 10월

Stephan Briggs - PLE



Edmund
optics | worldwide

개요 및 목차

- 핵심 용어 정리
- 소개
 - 현미경 기술의 발전사
 - 혁신과 진보
 - 현미경의 주요 부품
- Edmund Optics의 현미경 제품군
- 조명 시스템
- 현미경 기술
 - 명시야(brightfield)
 - 암시야(darkfield)
 - 위상차(phase contrast)
- 현미경 대물렌즈
 - Finite Conjugate
 - Infinity Corrected

핵심 용어

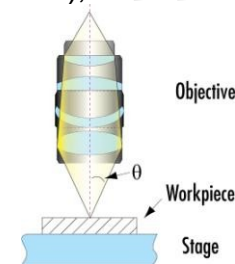
- Numerical Aperture (NA) - 개구수

초점거리(focal length)와 입사동 지름(entrance pupil diameter)의 상관관계에 의해 정의되며, 분해능(resolving power), 심도(depth of field), 대비(contrast)를 결정하는 요소이다. 높은 NA 값은 우수한 분해능, 낮은 심도를 나타내며, 아래 공식1과 같이 계산할 수 있다.

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

공식1

'n'은 작동 중인 렌즈 주위에 있는 매질의 굴절률이며 (공기의 굴절률, $n=1.0$), ' θ '는 렌즈를 입사 또는 사출하는 최대 원뿔형 광원 각도의 반각(half angle)을 의미한다.



- Resolving Power (R) - 분해능

구분 가능한 두 개의 점이나 선 사이의 최소 거리를 의미하며, 아래 공식2와 같이 NA와 광원의 파장(λ)으로 계산할 수 있다.

$$R = 0.61 \cdot \lambda / NA$$

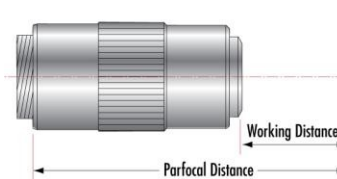
공식2

- Working Distance (WD) – 작동 거리

초점이 잡힌 피검체의 표면에서부터 대물렌즈 앞단까지의 거리를 의미한다.

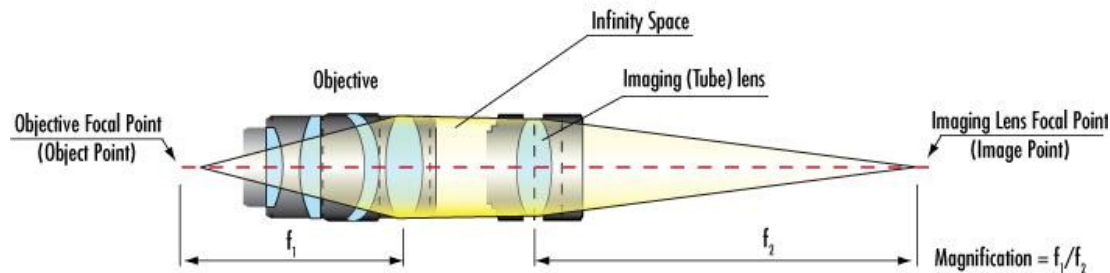
- Parfocal Length – 동초점 거리

초점이 잡힌 시료의 표면에서 대물렌즈의 체결부(mounting position)까지의 거리.



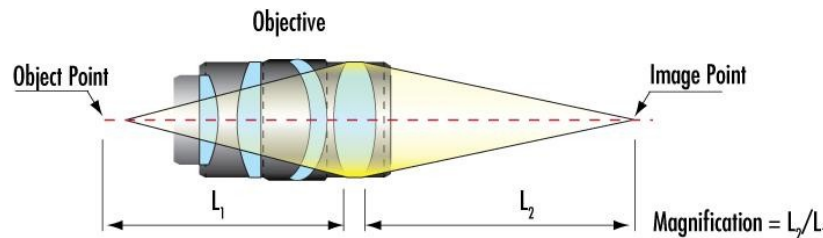
- Infinity Corrected Optical System

대물렌즈와 튜브렌즈(tube lens)에 의해 이미지를 형성하며, 중간에 다양한 광학 부품을 추가할 수 있는 무한한 길이의 공간이 생기는 이점을 가진다.



- Finite Conjugate Optical System

튜브렌즈를 사용하는 Infinity corrected optical system과 달리, 대물렌즈만으로 이미지를 형성한다.



핵심 용어

- Focal length (F) – 초점 거리

주점(principal point)에서 초점(focal point)까지의 거리로, F1은 대물렌즈의 초점거리이며, F2는 튜브렌즈의 초점거리이다. Infinity-corrected systems에서 배율은 튜브렌즈의 초점거리와 대물렌즈의 초점거리의 비율에 의해 정의된다.

$$\text{Magnification of Objective} = \text{Focal length of tube lens} / \text{Focal length of objective}$$

- Field Number & Field of View (FOV) – 시야수 및 시야

접안렌즈(eyepiece)의 시야수(field number)는 접안렌즈의 시야조리개 구경(field stop diameter)에 의해 정의된다. 시야는 FOV로 표현하며, 관찰이 가능한 시료의 면적을 의미한다. 아래 공식과 같이 접안렌즈의 시야수와 대물렌즈의 배율에 의해 정의된다.

$$\text{FOV} = \text{Field number of eyepiece} / \text{magnification of objective}$$

- Depth of Field (DOF) - 심도

피검체의 위아래로 초점이 맞는 공간이 형성될 때, 그 사이의 수직 거리를 의미한다. NA가 높을수록 낮은 심도를 가진다.

$$\pm \text{DOF} = \lambda / (2 \cdot (\text{NA})^2) \quad - \quad \text{standard wavelength of 550nm}$$

- Aperture Diaphragm - 구경비

투과되는 광량을 조절하고, 광학 시스템의 분해능과 밝기에 영향을 준다. 특히 명암이 생기는 원통형 물체의 너비를 측정할 때 유용하며, 조리개가 최적일 때 회절을 억제하면 최상의 측정과 관찰이 가능하다.

핵심 용어

- **Field Stop – 시야 조리개**

이미지를 저하시키는 불필요한 광원을 제한하는 역할을 한다.

- **Vignetting - 비네팅**

이미지의 중심부에 비해 외각이나 모서리가 어둡고 선명하지 않은 현상을 의미한다. 렌즈 후드(lens hood)와 같은 외부적 특성 또는 다양한 대물렌즈 치수와 같은 내부적 특성에 의해 발생된다.

- **Double Image - 이중상**

하나의 이미지가 2개로 분리되어 보이는 이미지 저하 현상으로, 광량이 지나치거나 광학시스템 상의 간섭 현상에 의해 발생된다.

- **Flare - 플레어**

렌즈의 플레어 이미지나 시야 전반에 걸쳐 별 모양, 링 또는 원형의 광채가 잇달아 나타나는 현상이며, 내부 반사 및 난반사가 주된 원인이다.

현미경 기술의 혁신과 진보

- **1590** - 네덜란드에서 lens grinder에 의해 현미경과 비슷한 개념이 최초로 도입
- **1625** - Galileo의 디자인에서 “microscope”라는 용어를 최초로 사용
- **1644** - 최초로 살아있는 조직(insect eyes)을 관찰
- **1660** - 이탈리아, 네덜란드, 영국 등지에서 광범위한 연구 시작
- **1667** - Robert Hooke/ 현미경에 대한 최초의 저서<Micrographia> 발간
- **1676** - Antoni van Leeuwenhoek / 미생물을 발견하고 적혈구와 박테리아를 분석
- **1830** - Joseph Jackson Lister / 구면 수차를 줄이기 위해 여러 개의 단순 렌즈를 겹친 doublets와 triplets를 디자인
- **1878** - Ernst Abbe / 파장과 분해능 간의 관계를 공식화
- **1893** - August Kohler/ 현대 광학 현미경의 중심이 되는 혁신적인 조명기술을 개발
- **1953 – 1955** - Fritz Zernike & George Nomarski / 위상차 및 차등 간섭 대비 (DIC)를 이용하는 앞선 광 기술을 도입

현미경의 주요 부품

- Eyepiece(s)
- Camera Port
- Objective
 - Lenses
 - Turret
- Condenser
 - Diaphragm
- Light source
- Stage
 - Focus
 - XY Adjustment



EDMUND OPTICS의 현미경 부품

- Infinity Corrected Objectives
- Finite Conjugate Objectives
- Reflective Objectives
- Stereo Microscopes
- Miscellaneous
 - Accessories, eyepieces, relay lenses, couplers, reticles, micro meters, pocket and direct microscopes, simple magnifiers



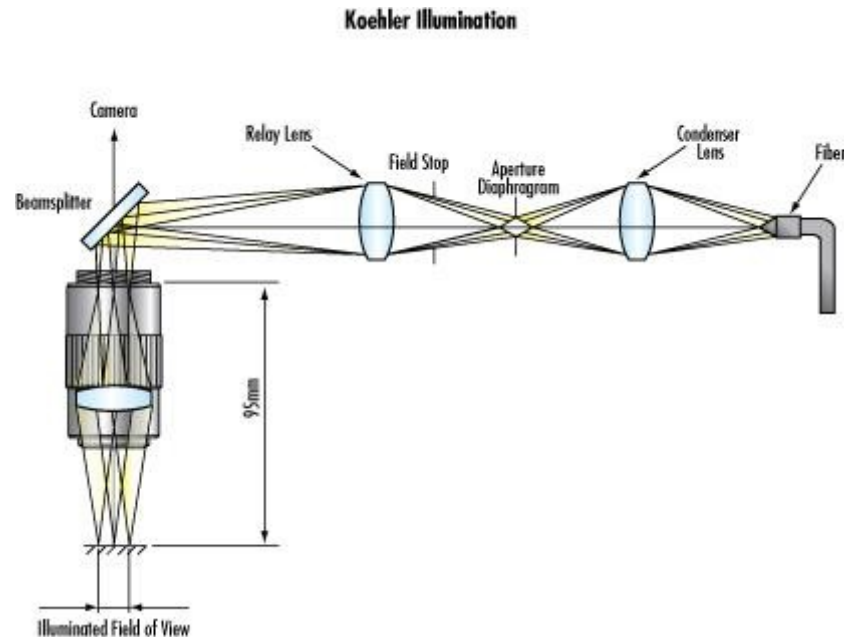
현미경 조명 시스템

- Afocal/Nonfocused Illumination
 - 광 경로 상의 특정한 지점에서 광원으로부터 이미지를 형성하지 않는 시스템. 초기 현미경은 빛의 확산을 위해 자연광인 햇빛과 구름을 활용하였다.
- Critical/Nelsonian Illumination
 - 균질화된 조명으로부터 포커스 된 이미지를 형성하기 위해 substage condenser를 사용하여 FOV 전반에 걸쳐 균일한 조명을 조사한다.
- 최신 조명 기술
 - Incandescent Lamp (백열등)
 - Arc Lamp
 - LED
 - Laser



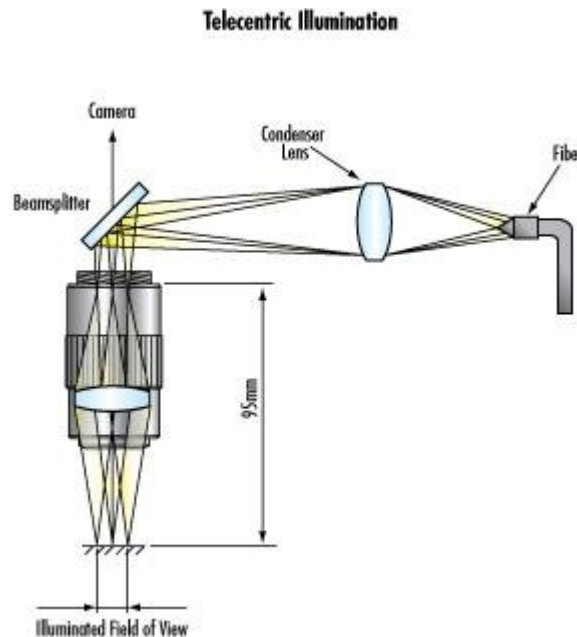
KOEHLER ILLUMINATION

Koehler illumination은 광원이 시료에 빛을 비출 때 초점이 맺치지 않는 평행 광선이 되기 때문에 일반적인 illumination system이 갖는 단점을 보완하며, 시료의 이미지에는 광원의 이미지가 포함되지 않는다.



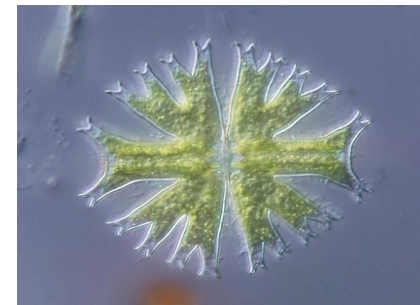
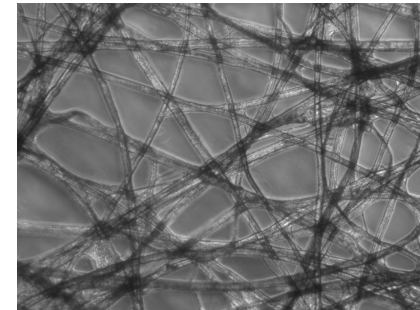
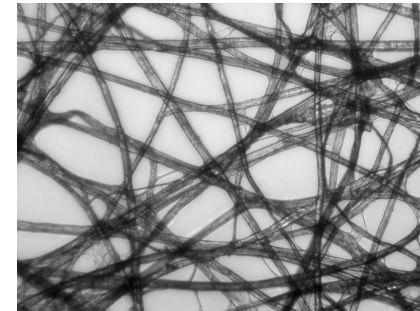
TELECENTRIC ILLUMINATION

Telecentric illumination은 광원이 초점을 지나도록 설계되어, 이미지 둘레의 초점이 흐려지거나 포커스가 되지 않은 상태에서도 이미지 중심부의 사이즈를 유지하는 장점이 있다. Telecentric illumination 시스템은 전체 시야 범위에 걸쳐 빛의 고른 강도를 유지하며, 주로 2x-5x 정도의 낮은 배율에서 사용된다.



현미경 기술

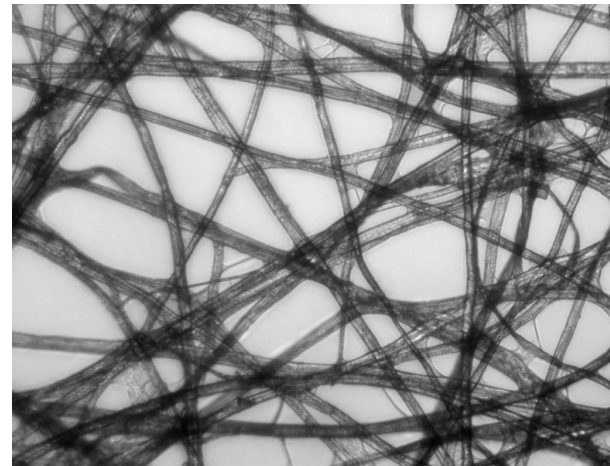
- 명시야 현미경 (brightfield)
- 암시야 현미경 (darkfield)
- 위상차 현미경 (Phase Contrast)
- 편광 현미경 (Polarization Contrast)
- 미분 간섭 현미경 (Differential Interference Contrast, DIC)
- 형광 현미경 (Fluorescence)
- 전반사 형광 현미경 (Interference Reflection, TIRF)



명시야 현미경 **vs.** 암시야 현미경

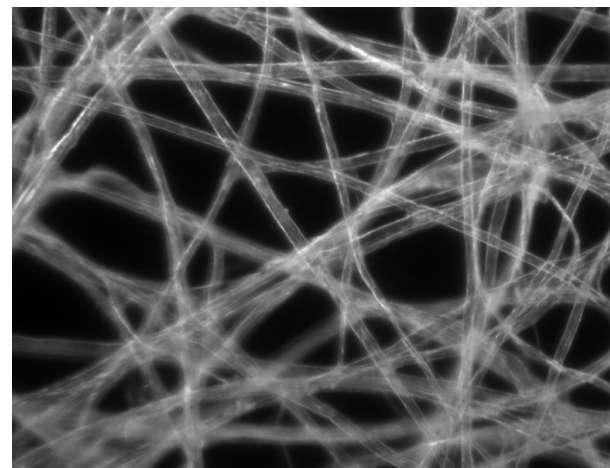
- Brightfield Illumination

- 샘플의 흡광도에 따라 명암 결정
- 가장 간단하고 널리 이용되는 현미경 조명 시스템
- 주로 밝은 배경에 어두운 샘플로 관찰

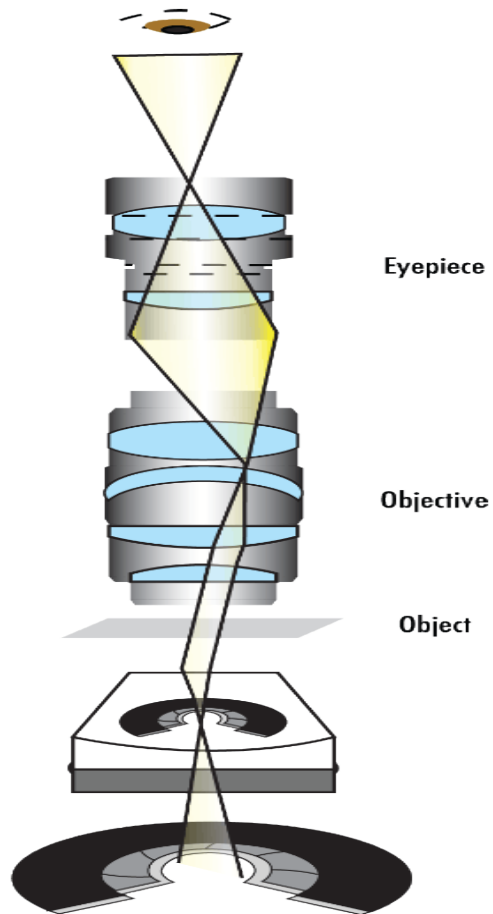


- Darkfield Illumination

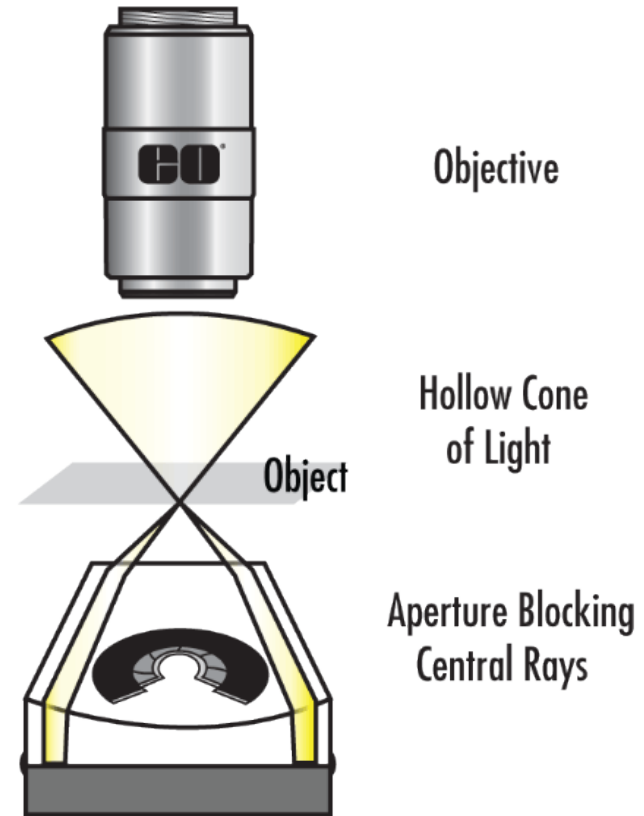
- 샘플의 산란에 의해 명암 결정
- 염색하지 않은 샘플의 명암을 높이는 유용한 기술
- 주로 어둡거나 검은 배경에 밝은 샘플로 관찰



명시야 및 암시야 현미경 구조



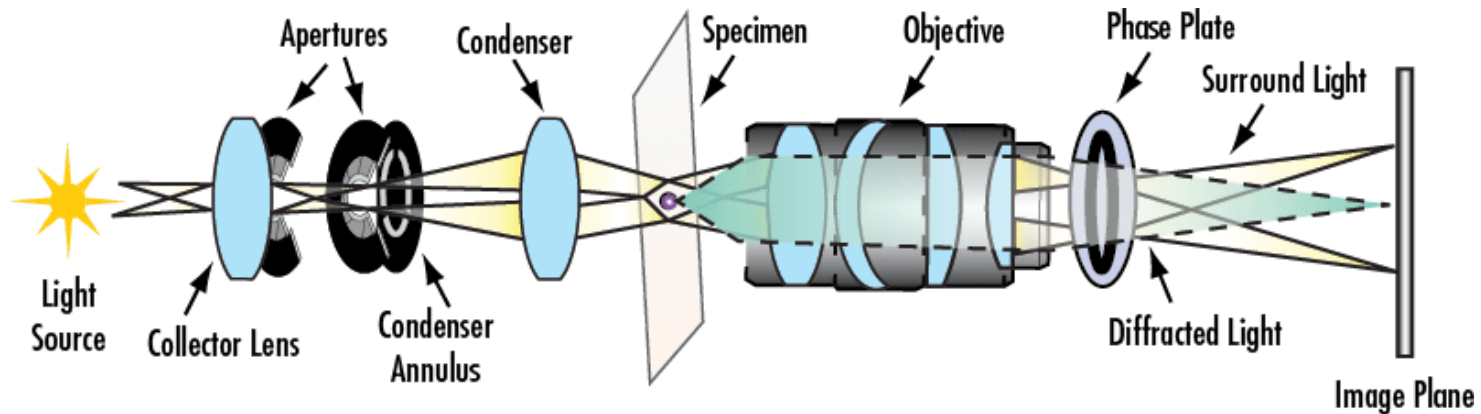
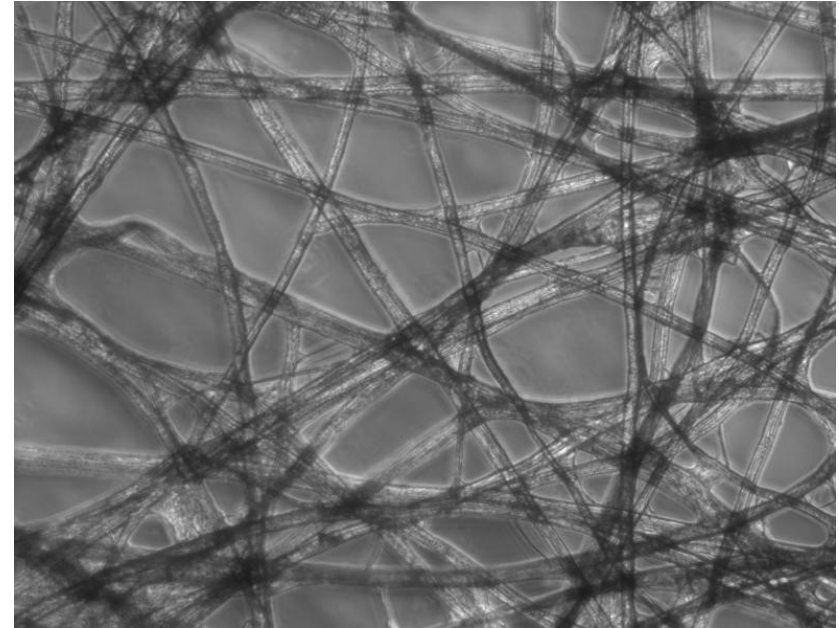
Brightfield



Darkfield

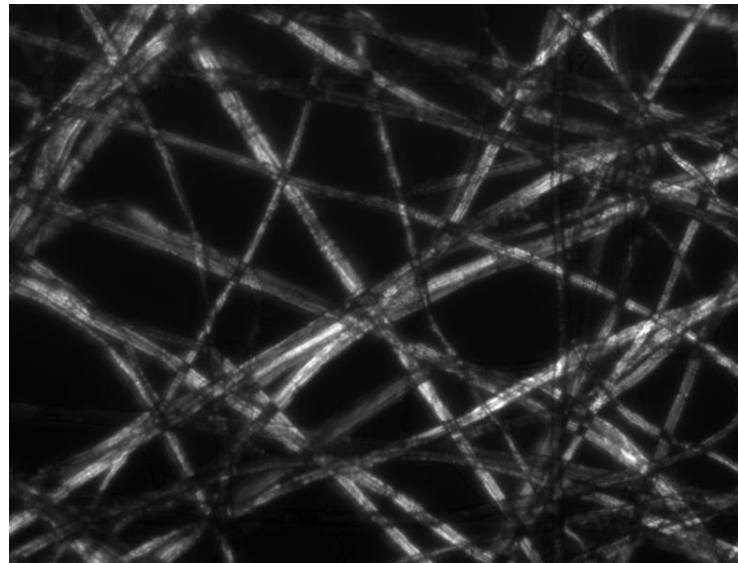
위상차 현미경

- OD(optical density)에 비례한 차이를 보임
- 명암 차이로 굴절률의 차이를 관찰
 - 세포핵이 주변의 세포외기질(ECM) 보다 더 어둡게 보임
- 명암(light & dark)의 특성을 갖는 주로 회색조의 배경에 어두운 샘플로 관찰 – OD의 변화를 나타냄



편광 현미경

- 편광된 광원을 사용하는 모든 현미경을 의미
- DIC과 TIRF를 보완한 현미경
- 명시아 수준으로 굴절률을 구분
- 등방성(isotropic) 또는 이방성(an isotropic) 물질을 구분
- 광 경로에는 polarizer를 이미지 경로에는 analyzer를 반드시 장착해야 함
- 복굴절 소재의 샘플과 상호 작용하여 이미지의 명암 향상



미분 간섭 현미경 (DIC)

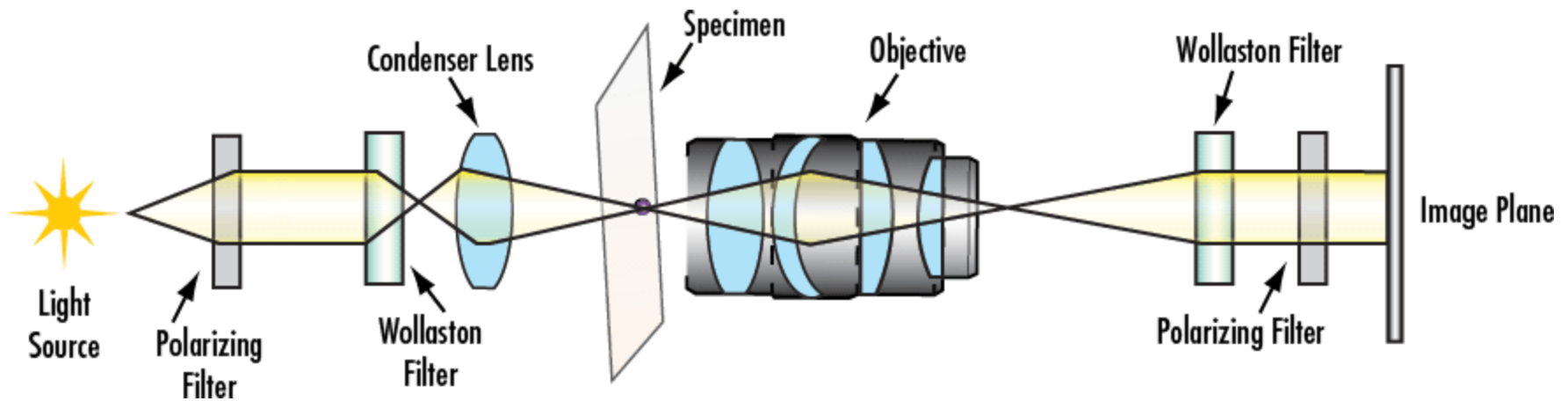
DIC 현미경은 투명하거나, 염색하지 않은 샘플의 명암을 향상시킨다. 광 경로에서의 간섭원리를 이용하여 눈에 보이지 않는 샘플의 특성들을 관찰할 수 있다. 회절현상에 의한 halo(후광)를 제외하면 위상차 현미경과 유사하다.

- 시스템의 NA 값을 활용
- 위상(phase) 이미지에서 halo가 발생하지 않음
- 광학적 염색에 의해 더욱 선명한 이미지 관찰
 - 3D 이미지와 같은 명암 관찰
- 저비용의 Plan achromats 또는 achromants 활용 가능
- 높은 해상도
- 두꺼운 샘플의 얇은 부분에서도 초점을 맞출 수 있으며, 이미지 주변의 noise 감소



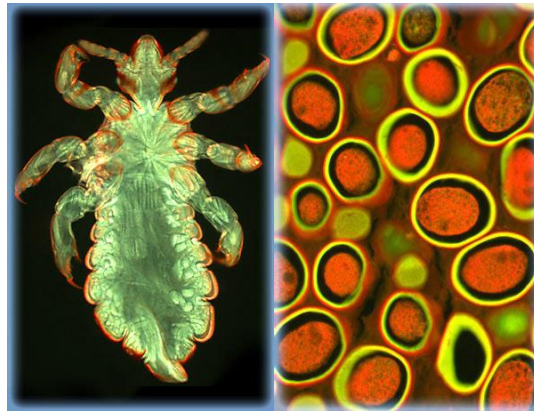
Micrasterias furcata - Transmitted DIC Microscopy

DIC 현미경의 광경로



형광 현미경

- **Photoluminescence** (발광) – 물질이 빛을 흡수하여 다시 그 빛을 방출하는 현상
- **Phosphorescence** (인광) – 빛을 제거한 후에도 수초 동안 빛의 발광이 유지되는 현상
- **Fluorescence** (형광) – 방출한 빛을 흡수하는 동안에만 빛의 발광이 지속되는 현상



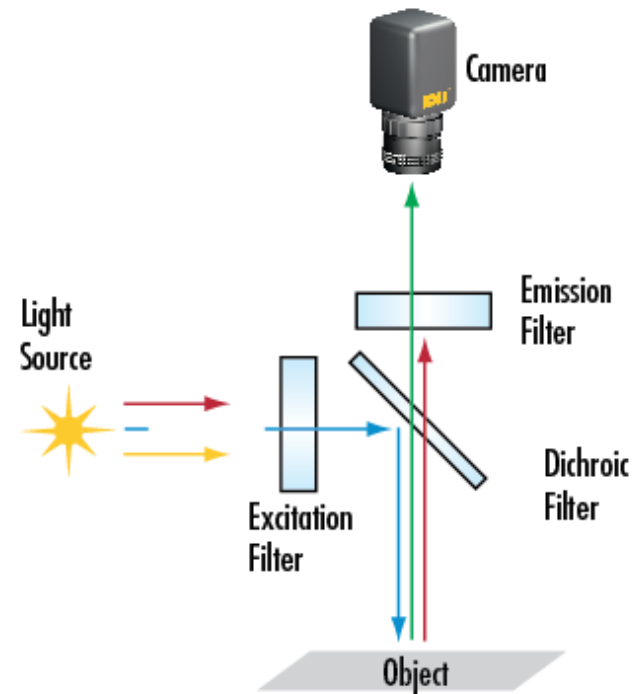
Head lice

Round Worm

샘플은 형광에 사용되는 빛보다 더 긴 파장을 방출

최상의 이미지 구현을 위해 3가지 필터를 사용:

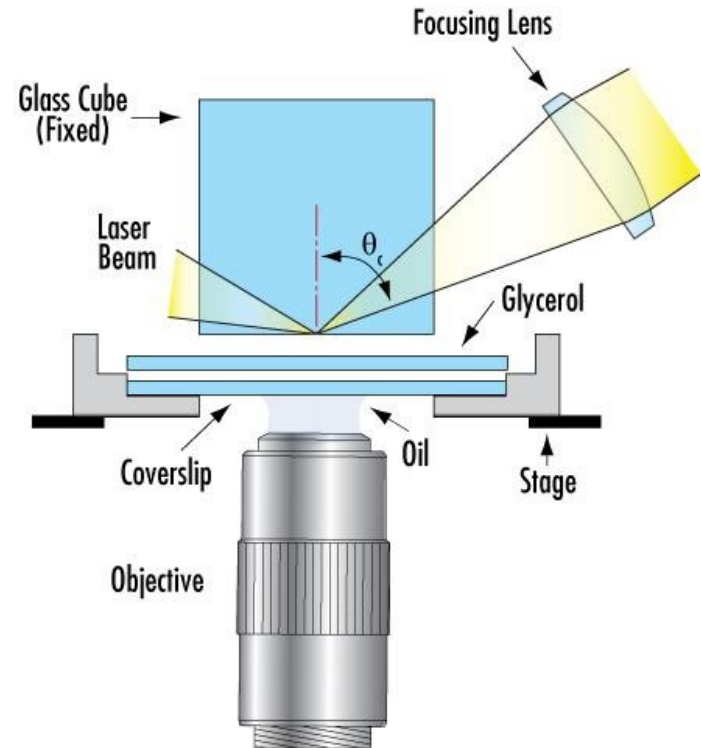
1. Excitation
2. Emission
3. Dichroic



전반사 형광 현미경 (TIRF)

TIRF는 표면 위의 접착력이 있는 지점에서 주로 형광 단일 분자를 관찰하는 데 매우 훌륭한 광학 현미경이다. 분자와 표면 간의 상호작용은 세포분자생물학을 비롯한 다양한 학문 분야에 매우 중요한 역할을 한다.

- 형광단을 밝게 하거나 여기 상태로 만들어 주는 **evanescent wave**(소멸파)의 속성을 유도하고 이를 적용
 - 대부분의 경우 분자나 형광단은 **glass-water**의 경계면과 인접한 곳에 위치
- 큰 입사각으로 **excitation light**를 샘플에 조사하는 간단한 컨셉
- **Glass**와 **water**의 굴절률 차이로 빛의 굴절/반사를 조절
- **Evanescent wave**와 **field intensity**는 표면에서부터의 거리가 멀어질수록 기하급수적으로 감소



TIRF 현미경의 광경로

