

공진 스캔 미러를 이용한 공초점 광학 현미경 구현

Construction of Confocal Optical Microscope based on Resonant Scanning Mirror

김동욱, 송호성, 송우섭, 김덕영
광주과학기술원 정보통신공학과
E-mail: dykim@gist.ac.kr

광 검출기 앞에 미세한 구멍을 대물렌즈의 켈레 초점면에 놓음으로써 초점에 정확하게 일치하는 빛만 검출하는 공초점 광학 현미경은 마이크로미터 이하의 불투명한 샘플 표면, 구조뿐만 아니라 투명한 샘플인 경우 절단 없이 선택적으로 단면을 관찰하는데 사용된다. 이런 장점 때문에 특정 원자나 분자에 인위적으로 염색 시킬 수 있는 형광물질을 사용하여 세포의 기관 구조나 세포 기관간의 활동을 3차원적으로 관찰하는 생물학연구에서도 공초점 광학 현미경이 사용된다.⁽¹⁻²⁾

본 논문에서는 공진 스캔 미러를 이용하여 공초점 광학 현미경을 구현 하고자 한다.

바이오 샘플 관찰 시 광원에 의한 손상을 줄이기 위해 고속 스캔이 가능한 공초점 광학 현미경을 그림 1과 같이 구현 하였다. 기존 광학 현미경 (BX51; Olympus)을 기반으로 광원으로는 532 nm와 635 nm 레이저, 광원을 쉽게 현미경에 연결할 수 있는 광섬유 커플러를 사용하여 공초점을 구성하였다. x축은 4 kHz (250 μ s/line) 공진 스캔 미러 (Counter Rotating Scanner; CRS, GSI Lumonics)와 y축은 가변 스캔 미러 (M3H, GSI Lumonics)를 사용하였고 서로 다른 미러 회전축 때문에 생기는 문제를 해결하기 위해 중간에 4f 렌즈 시스템을 놓아 2D 고속 스캐너를 제작하였다.⁽¹⁻²⁾ 반사광 또는 형광을 검출하기 위해 photomultiplier tube (PMT; R3896, Hamamatsu)를 사용하였고 고속 이미지를 획득을 위해 frame grabber (PCI-1409; National Instruments)를 사용하였다. 그림 2는 2D 이미지 획득을 위한 스캔 제어 유닛, 픽셀 클럭, 수평과 수직 동기 신호 발생과 흐름을 보여준다. 스캔 제어 유닛은 10bit 카운터를 사용하여 프레임의 시작을 알리는 H Sync 신호를 입력 받아 프레임의 끝을 알리는 V Sync 신호를 출력한다. 카운터의 출력을 DA 컨버터와 Op-Amp로 적분기에 입력하여 y축 미러 구동을 위한 톱니파형의 제어 신호를 발생시킨다. 보통 100 μ m \times 100 μ m인 스캔 영역(x, y)은 스캔 미러에 가해지는 전압으로 조절되며 최대 440 μ m \times 440 μ m까지 확대된다. 이미지 크기는 1024 \times 512 픽셀이며 초당 8 프레임의 속도로 이미지를 얻는다. 이미지 크기를 반으로 줄이거나 양방향 스캔을 하면 프레임 속도는 최대 4배 빨라진다.

그림 3의 (a)는 분해능 테스트 패턴 (USAF 1951 Target; Edmund Optics)에 대한 반사 이미지로서 635 nm 레이저와 40 \times , N.A. 0.65 대물렌즈를 사용하여 Group 9 Element 1의 512nm 격자 패턴까지 분해하며 그림 3의 (b)에서 보듯이 knife-edge 방법으로 Group 6 Element 3 (80.64 line pair/mm)의 한 격자쌍 (1 line pair = 12.4 μ m)을 스캔할 때 가장자리의 반사광의 변화를 미분하여 563nm 분해능을 실험적으로 측정하였다.⁽³⁾ 그림 4는 532 nm 레이저와 40 \times , N.A. 0.65 대물렌즈를 사용하여 얻은 다중 염색된 *Convallaria*의 형광 이미지이다. 그림 4의 (a)는 노이즈가 있지만 노이즈가 랜덤하기 때문에 초당 얻을 수 있는 8개의 이미지를 모두 중첩시켜 평균화하여 다시 이미지를 생성하는 방법으로 그림 4의 (b)를 얻었다.

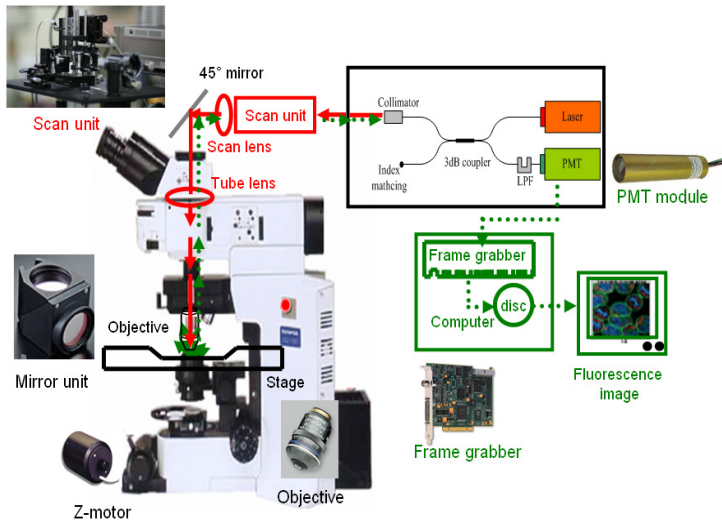


그림 1. 공초점 광학 현미경 구성도

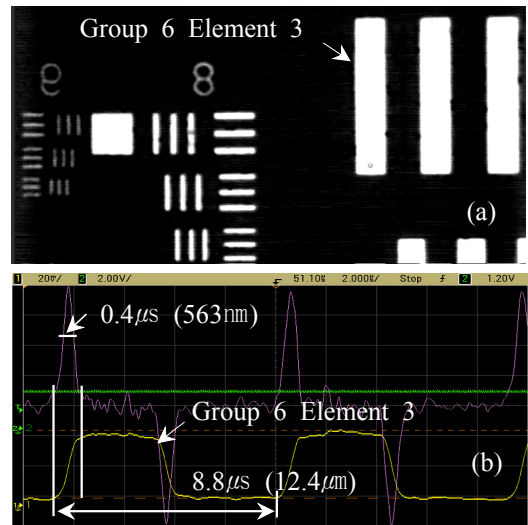


그림 3. 분해능 테스트 패턴의 반사 이미지

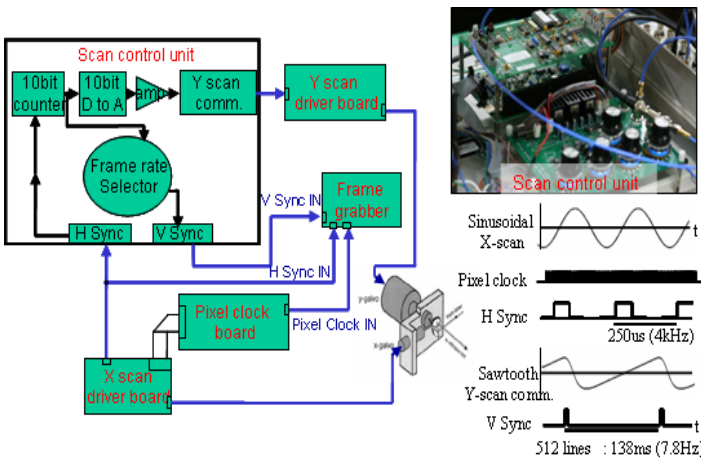


그림 2. 2D 이미지를 위한 스캔 제어 유닛과 신호 흐름도

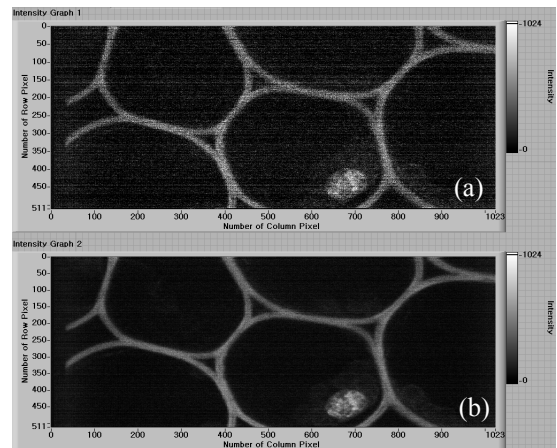


그림 4. convallaria sample의 형광 이미지

공진 스캔 미러를 사용하여 고속 2D 스캐너 및 이미지 획득을 위한 제어신호를 생성하는 스캔 제어 유닛 제작, 제어하여 고속 스캔이 가능한 공초점 광학 현미경을 구현 하였으며 반사광 또는 형광 이미지를 얻어 현미경의 성능을 시험하였다.

Acknowledgment

This work was supported by Creative Research Initiatives (3D Nano Optical Imaging Systems Research Group) of MOST/KOSEF

참고문헌

1. Pawley JB (editor), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd ed., Berlin: Springer. (2006)
2. Fellers TJ, Davidson MW, Introduction to Confocal Microscopy. Olympus Fluoview Resource Center, National High Magnetic Field Laboratory, (2007)
3. A. H. Firester. et all, "Knife-edge scanning measurements of subwavelength focused light beams", Applied Optics, Vol. 16, No. 7, (1997).