



CHROMA TECHNOLOGY CORP

10 Imtec Lane
Bellow Falls, VT 05101-3119 USA
800 824 7662(800-8CHROMA) 수신자 부담
+1 802 428 2500 전화
+1 802 428 2525 팩스
sales@chroma.com
www.chroma.com

CHROMA TECHNOLOGY GMBH

+49 8141 527712 전화
+49 8141 527714 팩스
europe@chroma.com

CHROMA TECHNOLOGY CHINA

+86-0592-5062089 전화
china@chroma.com

아이콘 옵틱스

경기도 군포시 고산로 148번길 17 (당정동)
군포IT밸리 B동 1108호
031-459-5760 전화
0303-0640-5760 팩스
onetree@icon-optics.com
www.icon-optics.com

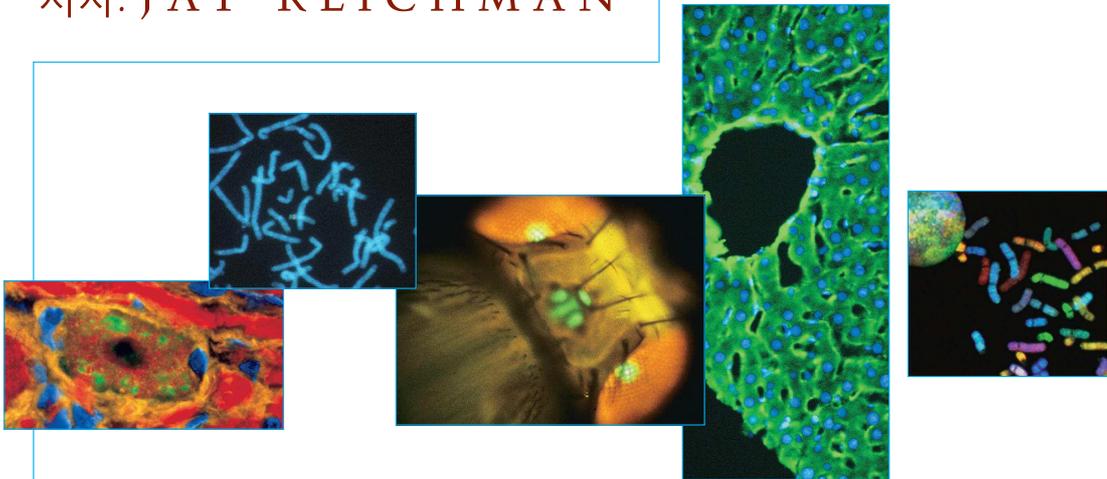
10%의 재생 섬유질이 함유된 종이에 식물성 잉크를
사용하여 인쇄

CHROMA TECHNOLOGY CORP 및 CHROMA 로고는 CHROMA TECHNOLOGY CORP의 등록 상표입니다.

C H R O M A T E C H N O L O G Y C O R P

형광 현미경용
광학 필터 핸드북

저자: JAY REICHMAN



HB2.0/2012년 5월

C H R O M A T E C H N O L O G Y C O R P

형광 현미경용
광학 필터 핸드북

저자: JAY REICHMAN

형광 현미경법 서론	2
여기 및 발광 스펙트럼	
형광 신호의 밝기	
형광 현미경	
형광 현미경에 사용하는 필터의 종류	
형광 현미경의 발전	
광학 필터에 관한 일반적인 설명	8
용어	
사용 가능한 제품	
색 유리 필터	
박막 코팅	
음향 광학 필터	
액정 가변 필터	
형광 현미경용 필터 설계	14
이미지 대조도	
형광 스펙트럼	
광원	
검출기	
빔 스플리터	
광학 품질	
광학 품질 매개 변수	
광역 현미경 검사법을 위한 광학 품질 요건	
서브픽셀 정합을 위한 필터 세트	24
공초점 현미경용 필터	25
광학 품질 요건	
Nipkow 디스크 스캔	
레이저 스캔	
스펙트럼 요건	
Nipkow 디스크 스캔	
레이저 스캔	
다중 탐침 사용을 위한 필터	29
참고문헌	30
용어 해설	31

형광 현미경에는 스펙트럼 및 물리적 특성 요건이 까다로운 광학 필터가 필요하다. 필터에 요구되는 특성은 현미경과 응용 분야에 따라 크게 다르다. 필터는 현미경 전체 시스템에서는 비교적 작은 부분이지만 최적화된 필터는 아주 큰 효과를 낼 수 있다. 따라서 광학 현미경에 사용하는 필터에 대한 원리를 알면 매우 유용하다.

본 가이드는 Chroma Technology Corp의 엔지니어들이 광역 현미경(wide-field microscopes), 공초점 현미경(confocal microscopes), 다중 형광 탐침(multiple fluorescent probes)의 동시 탐지와 관련된 응용 방법을 포함하여 다양한 형광 현미경 및 응용 방법을 위한 필터를 설계할 때 사용하는 원리와 노하우를 모은 것이다. 광학 필터에 관한 전문 용어 그리고 필터가 현미경의 광학 배열(optical alignment)에 미치는 영향에 대해서도 설명하고 있다.

마지막으로, 본 핸드북 끝에는 본문에 기울임꼴 또는 굵은 글씨로 표시되어 있는 용어에 대한 해설이 수록되어 있다.

형광에 관한 물리학 및 화학적 지식, 특정 형광 탐침의 사용, 샘플 준비 기법 및 현미경 광학 장치에 대한 더욱 심층적인 정보는 해당 주제만을 다룬 자료를 참조한다. 현미경 제조사에서 발행한 형광 현미경과 부품의 배열에 관한 자료도 유용한 참고 자료이다.

CHROMA TECHNOLOGY CORP 정보

Chroma Technology Corp은 종업원 소유의 회사로서 극도의 정밀도를 요하는 광학 필터와 코팅을 설계, 제조하고 있다.

- 저광도 형광 현미경 검사 및 세포 측정(cytometry)
- 광학 천문학 분야의 분광 영상 촬영
- 레이저 기반 계측
- 라만 분광법

Chroma Technology Corp의 각 코팅 및 광학 생산부서는 코팅 설계와 광학 제품 제작에 모두 수십 년의 경험을 쌓은 전문가가 운영하는 단일 시설에 통합되어 있다. 당사는 고객이 필요로 하는 필터에 맞도록 최적의 비용 효율적인 솔루션을 제공하는 데 전념하고 있다. 대부분의 경우, 본사는 추가 비용 없이 고객의 광학 시스템 설계와 적합한 필터 부품을 선택하는 데 있어 기술 지원을 제공한다.

© 2000-2010 Chroma Technology Corp 종업원 소유 회사
10 Imtec Lane, Bellows Falls, Vermont 05101-3119 USA
전화: 800-8-CHROMA 또는 802-428-2500 팩스: 802-428-2525 이메일: sales@chroma.com
웹 사이트: www.chroma.com

형광은 어떤 물질이 어떤 색을 띤 빛을 흡수하고 거의 즉각적으로¹ 에너지가 더 낮아 파장이 더 긴 다른 색의 빛을 방출하는 분자 현상이다. 이 과정은 **여기(excitation)** 및 **방출(emission)**이라고 한다. 수많은 유기 및 무기 물질이 형광 특성을 보인다. (세기의 전환기였던) 형광 현미경법 기술의 초기에는 현미경 사용자가 이런 **1차 형광(primary fluorescence)** 또는 **자가 형광(auto-fluorescence)**을 관찰했으나, 현재는 매우 밝은 형광성을 가지며 시료의 일부를 선택적으로 착색하는 데 사용되는 다양한 염료가 개발되었다. 이 방법을 **2차** 또는 **간접 형광**이라고 한다. 이런 염료를 **형광 색소(fluorochrome)**라고 하며, 항체 및 핵산과 같은 다른 유기 활성 물질과 공액 결합될 때는 **형광 탐침(fluorescent probe)** 또는 **형광단(fluorophore)**이라고 한다. 이제는 스펙트럼의 파란색, 녹색, 주황색 및 빨간색뿐 아니라 근적외선에서 특성 피크 방출이 일어나는 형광 색소들도 있다. 형광 색소를 통한 간접 형광 사용 시, 샘플의 자가 형광은 일반적으로 바람직하지 않다. 이는 현미경 이미지에서 불필요한 빛의 주요 광원이 될 때가 종종 있기 때문이다.

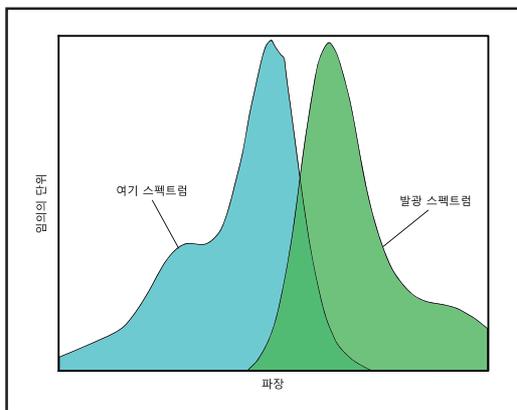


그림 1
형광 염료에 대한 일반적인 여기 및 방광 스펙트럼.

여기(EXCITATION) 및 방광(EMISSION) 스펙트럼

그림 1은 형광 색소의 전형적인 여기 및 방광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 이 스펙트럼은 조명 분광계와 분석 분광계의 두 분광계로 구성되는 분광 형광계(spectrofluorimeter)를 이용하여 얻는다. 우선, 형광을 일으키는 빛을 염료 샘플에 강하게 비춘다. 조도 색상이 고정된 상태에서 분석 분광계로 형광에 의한 방광 스펙트럼을 측정한다. 다음으로 가장 밝은 방광 색상에 분석 분광계를 고정하고, 조사하는 빛의 파장에 따른 방광 스펙트럼을 얻고, 이 고정된 파장에서 방출 강도의 변화를 측정한다. 필터 설계의 목적상, 이 스펙트럼은 신호의 상대 밝기에 따라 정규화된다.

이런 색 스펙트럼은 빛의 파장에 따라 정량적으로 기술한다. 형광 스펙트럼을 기술하기 위한 가장 일반적인 파장 단위는 **나노미터(nm)**이다. 가시광선에서의 색은 대략 다음과 같은 파장에 해당한다(그림 2).

보라색 및 남색	400 - 450nm
파란색 및 연한 녹색	450 - 500nm
녹색	500 - 570nm
노란색 및 주황색	570 - 610nm
빨간색	610 - 약 750nm

¹ 분자가 형광을 발하는 데 걸리는 시간은 나노 초(10^{-9} 초) 정도이다. 인광(phosphorescence)은 또 다른 광발광 현상으로, 존속 시간은 밀리 초에서 분 단위의 수준이다.

가시 스펙트럼의 단파장 쪽 끝은 320nm에서 400nm의 근자외선(near-UV) 대역이고, 장파장 쪽 끝은 750nm에서 약 2500nm의 근적외선(near-IR) 대역이다. 320nm ~ 2500nm의 빛의 넓은 대역은 크라운 유리와 창 유리가 투명한 대역으로, 이는 형광 현미경 검사에서 가장 자주 사용되는 대역이다. 유기화학 분야와 같은 특정 분야에서는 여기광으로 중간 자외선 대역(190~320nm)을 사용하는데 이 경우에는 특수한 UV 투명 광학부품을 사용해야 한다.

형광 현미경 검사와 필터 설계에 관련된 형광 스펙트럼에는 여러 가지 일반적인 특성이 있다. 첫째, 어떤 물질은 매우 넓은 여기 및 발광 스펙트럼을 가지고 있더라도 대부분의 형광 색소는 여기 및 발광 대역이 명확히 정해져 있다. 그림 1의 스펙트럼이 전형적인 예이다. 이들 대역의 피크 간 파장의 차이를 스토크스 이동(*Stokes shift*)이라고 한다. 둘째, 전체 발광 강도는 여기 파장과 함께 변하지만 방출되는 빛의 스펙트럼 분포는 대부분 여기 파장과는 무관하다.² 셋째, 형광 색소의 여기 및 발광은 pH 수준, 염료 농도, 다른 물질에 대한 공액 결합과 같은 세포 환경에 따라 변할 수 있다. 몇몇 염료(예: FURA-2 및 Indo-1)는 H⁺(pH 수준), Ca²⁺ 및 Na⁺와 같은 이온의 농도 변화에 따라 여기 또는 발광 스펙트럼이 크게 변하기 때문에 특히 유용하다. 마지막으로, 시간의 경과에 따라 염료의 형광 효율을 떨어뜨리는 광화학적 반응이 있는데, 이를 광표백(*photobleaching*) 또는 퇴색(*fading*) 효과라고 한다.

형광 신호의 밝기

여기광의 세기가 고정되어 있을 때, 착색된 시료의 형광 신호의 크기에 영향을 미치는 여러 요인이 있다. 이 요인으로는 1) 시료의 착색 부분 내 염료 농도와 시료의 두께, 2) 염료의 흡광 계수(*extinction coefficient*), 3) 염료의 양자 효율(*quantum efficiency*), 4) 현미경의 화각 내에 실제로 존재하는 착색 물질의 양 등이 있다. 흡광 계수는 주어진 염료 농도와 시료 두께에서 입사광이 얼마나 흡수될지 나타내고, 형광 색소의 파장에 따른 흡수 특성을 반영한다(형광 색소의 여기 스펙트럼). 다수의 형광 색소가 피크 여기 파장에서 높은 흡광 계수를 갖지만, 실제 샘플 준비 기법상 샘플에 허용되는 최대 농도가 제한될 때가 많으므로 착색 시료가 실제로 흡수하는 전체 광량은 감소한다.

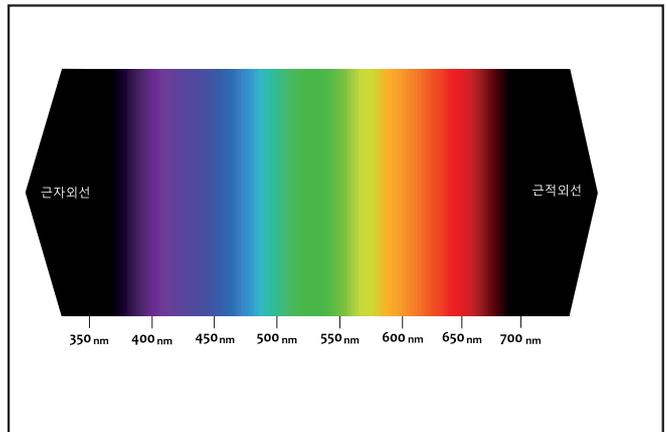


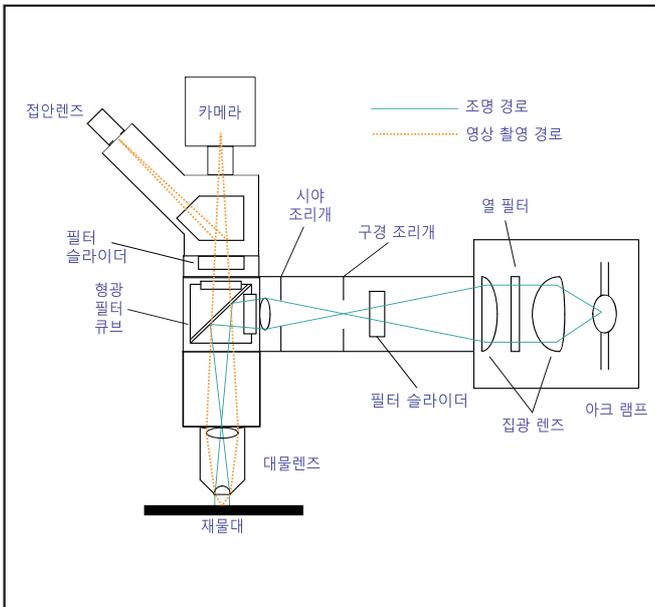
그림 2 스펙트럼의 색상 영역.

² 발광 스펙트럼의 모양이 어느 정도 달라질 수 있지만 대부분의 경우 그 효과는 미미하다. 형광 메커니즘에 대한 심층적 설명은 Lakowicz(1983)를 참조한다.

양자 효율에 따라 이렇게 흡수되는 빛 에너지 중에서 얼마나 많은 에너지가 형광으로 전환될지 결정된다. 가장 효율적인 일반 형광 색소의 양자 효율은 약 0.3 정도이지만, 실제 값은 광표백의 하나인 소광(queenching)에 의해 감소될 수 있다.

착색된 물질이 관찰 시야 내에 매우 적고, 소광(queenching) 등의 이유로 여기광과 형광의 비율은 대부분 10^4 (형광도가 매우 높은 샘플)~ 10^6 이다. 극소량의 형광 재료를 사용하는 형광핵산혼성화(fluorescence in situ hybridization)와 같은 기법에서는 여기광과 형광의 비율이 10^9 또는 10^{10} 으로 낮을 수 있다.

따라서 적절한 대조도로 형광 이미지를 보기 위해서는 형광 현미경이 형광 신호를 줄이지 않고 여기광을 10^{11} 만큼(매우 약한 형광의 경우) 감쇠할 수 있어야 한다. 형광 현미경은 어떻게 이런 불균형을 보정할까? 광학 필터가 필수적인 구성 요소이기는 하지만, 형광 현미경의 고유한 구성 역시 필터링 과정에 크게 영향을 미친다.



형광 현미경

그림 3은 입사광(즉, 반사) 조명을 사용하는 전형적인 반사 형광 현미경(epifluorescence microscope)의 구성도이다. 반사 형광 현미경은 가장 일반적인 유형의 형광 현미경이다. 이 현미경의 가장 중요한 특징은 입사광으로 조명하므로 시료에서 산란되어 나오거나 유리 표면에서 반사되는 여기광만 걸러내면 된다는 점이다. 고품질의 유침(oil-immersion) 대물렌즈(자가 형광이 최소인 재료로 제작되고 저형광 오일을 사용함)를 사용하면 표면 반사를 제거함으로써, 후방 산란광 수준을 입사광의 1/100로 줄일 수 있다. 뿐만 아니라, 이색성 빔 스플리터(dichroic beamsplitter)를 사용하면 후방으로 산란되는 여기광을 1/10~1/500으로 줄일 수 있다. (이런 빔 스플리터의 설계는 다음에 설명한다.)

이색성 빔 스플리터만을 사용하는 유침 반사 현미경은 여기광을 1(매우 밝은 형광)에서 10^5 또는 10^6 (매우 약한 형광)까지 줄일 수 있다. 배경광을 형광 신호의 1/10까지 낮추기 원하는 경우, 형광 신호는 대부분 통과시키면서 여기광을 10^6 또는 10^7 (약한 형광 시료의 경우)까지 낮출 수 있는 필터가 추가로 필요하다. 다행히도, 이런 엄격한 요건을 충족시킬 수 있는 필터 기술이 개발되어 있다(10페이지 시작 부분의 단원에 설명되어 있음).

그림 3
시료에 빛을 비추고 시료 영상 촬영을 하는 별개의 광학 경로를 보여주는 광역 형광 현미경의 구성도:
조명 경로 —————
영상 촬영 경로 ······

형광 현미경에 사용하는 필터의 종류

반사 형광 현미경에서 필터링을 위한 주요 구성요소는 여기 필터(excitation filter), 방출 필터(emission filter), 이색성 빔 스플리터(dichroic beamsplitter)로 구성된 필터 큐브(filter cube) (또는 필터 블록(filter block))이다. 그림 4는 전형적인 필터 큐브이다.

1) 여기 필터(excitation filter, exciter)는 특정 염료를 효율적으로 여기시키는 조명광의 파장만 투과시킨다. 공통 필터 블록은 여기 필터의 유형에 따라 명명한다.

UV 또는 U	DAPI 및 Hoechst 33342와 같은 염료의 자외선 여기
B	FITC 및 관련 염료에 대한 청색광 여기
G	TRITC, Texas Red® 등에 대한 녹색광 여기

과거에는 단파장 투과 필터(shortpass filter)를 사용했지만, 지금은 거의 대부분 대역 통과 필터(bandpass filter)를 사용한다.

2) 방출 필터(emission filter, barrier filter, emitter)는 여기 필터에서 투과되는 모든 빛을 차단하고 시료에서 방출되는 모든 형광을 매우 효율적으로 투과시킨다. 이 빛은 항상 여기광의 색보다 파장이 길다. 대역 통과 필터(bandpass filter)나 장파장 투과 필터(longpass filter)를 방출 필터로 사용할 수 있다. 일반적인 방출 필터 색은 U 블록에서는 파란색이나 옅은 노란색, B 블록에서는 녹색이나 짙은 노란색, G 블록에서는 주황색이나 빨간색이다.

3) 이색성 빔 스플리터(dichroic beamsplitter)(이색성 거울(dichroic mirror) 또는 2색성 빔 스플리터(dichromatic beamsplitter)³라고도 함)는 현미경의 광학 경로에 대해 45도 각도로 설치된 얇은 코팅 유리 조각이다. 이 코팅은 한 파장의 색(여기광, excitation light)은 반사하지만 다른 색(방출된 형광, emitted fluorescence)은 투과시키는 독특한 특성을 갖고 있다. 현재의 이색성 빔 스플리터는 뛰어난 효율로 이런 목적을 달성한다. 즉, 여기광을 95% 이상 반사하는 동시에 방출 형광의 약 95%를 투과시킬 수 있다. 이는 반사율과 투과율이 각각 50%밖에 되지 않아 효율이 약 25%에 불과한 기존의 회색 반도금 거울(half-silvered mirror)보다 크게 개선된 것이다. 유리(기판(substrate)이라고 함)에는 보통 자외선급 융합 실리카(fused silica)와 같이 낮은 자가 형광성 소재를 사용한다.

대부분의 현미경에는 2-4개의 개별 필터 큐브를 장착할 수 있는 슬라이더(slides) 또는 터릿(turret)이 있다. 각 큐브의 필터는 정합 세트(matched set)이므로 각 필터 구성 요소의 스펙트럼 특성을 완전히 파악하고 있지 않다면 필터와 빔 스플리터가 섞이지 않도록 주의해야 한다.

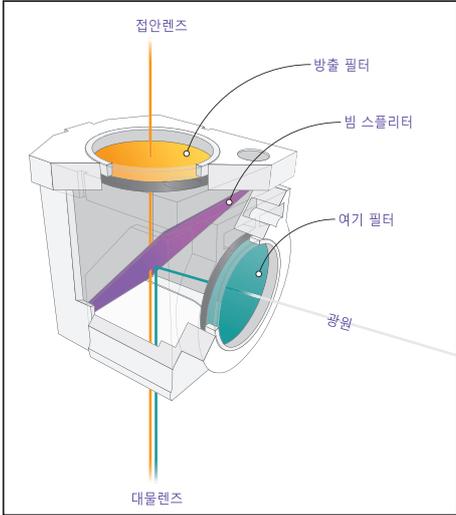


그림 4
형광 필터 큐브의 구성도

³ 빛의 편광 상태에 따라 빛을 선택적으로 흡수하는 결정 또는 기타 소재를 설명하기 위해 "이색성(dichroic)"이라는 용어 또한 사용한다. (폴라로이드® 플라스틱 필름 편광판이 가장 일반적인 예이다.) 혼동을 피하기 위해, "2색성(dichromatic)"이란 용어를 사용하기도 한다.

형광 현미경에는 아래에 나열한 다른 광학 필터를 사용하기도 한다.

1) 열 필터(heat filter)(핫 미러(hot mirror)라고도 함). 전부는 아니지만 대부분의 현미경에서 조명쪽 집광 장치에 사용한다. 이 필터는 적외선(보통 800nm보다 긴 파장의 빛)은 감소하지만 가시광선은 대부분 투과시킨다.

2) ND(Neutral-density) 필터. 보통 집광기와 구경 조리개 사이의 필터 휠 또는 필터 슬라이드에 위치하고 조명의 강도 조절에 사용한다.

3) 형광 분야 이외에도 투과광 현미경에는 색 필터(color filter)를, 편광 현미경에는 선형 편광 필터를 사용하기도 한다.

형광 현미경의 발전⁴

위에서 설명한 첨단 형광 현미경의 기본 구성은 거의 100년에 이르는 발전과 혁신의 결과이다. 그 오랜 세월에 걸쳐 이루어진 발전사를 살펴보면 이렇듯 다양한 구성 요소의 기능을 더 잘 이해할 수 있다.

최초의 형광 현미경은 비가시(invisible) 자외선으로 검체를 여기하여 여기 스펙트럼과 발광 스펙트럼을 적절히 분리하는 데 성공했다. 이에 따라 여과 필터(barrier filter)에 대한 필요성이 최소화되었다.⁵ 세기의 전환기를 장식한 이런 현미경 중 하나는 크고 위험한 2000W 철 아크 램프를 광원으로 사용했고, 젤라틴 형태의 Wood 용액(니트로소디메틸아닐린 염료(nitrosodimethylaniline dye)), 황산구리(copper sulfate) 용액, 파랑-보라색 계열의 유리를 조합하여 필터로 사용했다. 이 최초의 여기 필터(excitation filter)는 가시광선은 비교적 적게 투과시키고 넓은 근자외선(near UV) 영역을 투과시켜서 검체의 1차 형광(primary fluorescence)을 관찰할 수 있게 했다. 현미경 사용자는 대부분의 물질이 자외선으로 여기될 때 바로 형광을 발한다는 사실에 의지했다. 1914년에는

세포의 다양한 부분을 선택적으로 착색하기 위해 이 유형의 현미경과 함께 형광 색소가 처음으로 사용되었으며, 이는 2차 형광을 최초로 활용한 사례이다.⁶

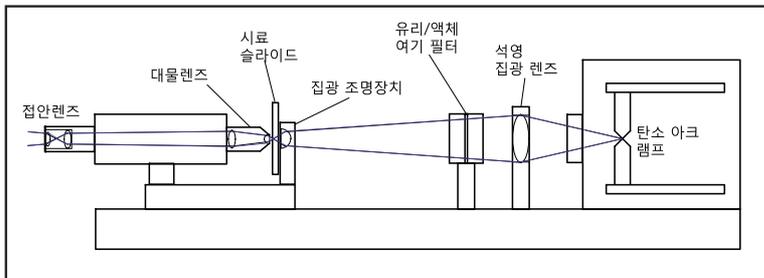


그림 5
초창기 투과광 형광 현미경의 구성도.
(Kasten, 1989년에 따름.)

그림 5에 투과 조명을 사용하는 형광 현미경이 나와 있다. 명시야(brightfield) 및 암시야(darkfield) 유침(oil-immersion) 집광렌즈(condenser)가 모두 사용되었지만, 각 집광렌즈마다 중요한 단점이 있었다.

명시야 집광 조명의 경우 당시 사용 가능했던 광학 필터의 기능적 한계로 인해 최대 조도가 크게 제한되었다. 여기광을 사각(oblique angle)의 광원별로 비추는

⁴ 이 정보의 대부분은 훌륭한 참고문헌인 Kasten(1989년)에서 발췌한 것이다.

⁵ 최초로 사용된 여과 필터는 연노란색 덮개 유리였는데, 유해광(hazardous radiation)으로부터 눈을 보호하는 역할을 했지만 초창기 형광 현미경 중 일부는 이런 보호 장치조차 없었다.

⁶ 18세기에는 기생 유기체를 착색하여 유해 광선에 민감하게 반응하도록 한 화학요법 약제로 사용한 것을 비롯하여, 다른 목적으로 여러 가지 형광 염료가 합성되었다.

암시야 집광 조명의 경우 대부분의 여기광이 대물렌즈로 들어오지 않으므로, 광학 필터를 사용할 필요성을 줄여주었다. 하지만 조명의 효율이 크게 떨어졌고, 대물렌즈에 필요한 개구수(*aperture*)가 작아져 밝기가 더욱 감소할 뿐 아니라 해상도도 낮아지는 결과를 낳았다.⁷

형광 현미경 검사에서 가장 중요한 발전은 1929년의 형광 현미경용 반사 조명 개발이었다. 반사 조명은 크고 불투명한 검체의 형광을 관찰하기 위해 최초로 사용되었다. 이렇듯 반사 조명을 사용한 최초의 형광 현미경에는 아마 전체 효율이 최대 25%인 빔 스플리터용 반도금 거울(*half-silvered mirror*)을 사용했겠지만, 1) 높은 개구수의 대물렌즈를 집광렌즈로 사용할 수 있다는 점, 2) 앞서 설명한 것처럼 유침 대물렌즈로 반사되어 오는 여기광의 조도가 입사광의 약 1%라는 사실,⁸ 3) 쉽게 정렬할 수 있다는 점이 중요한 장점이었다. 1948년에 E. M. Brumberg가 자외선 여기를 위해 도입하고 1960년대에 J. S. Ploem이 가시광선으로 여기하기 위해 독자적으로 개발한 이색성 거울이 등장하면서 빔 스플리터의 효율이 거의 100%로 증가하고 현미경의 필터링 능력이 더욱 향상되었다. Ploem이 반사 조명기 광학 기술에서 발전을 이룬 부분으로는 파란색 및 녹색 여기광을 위한 협대역 간섭 필터(*narrow-band interference filter*) 도입과 여러 가지 형광 색소를 위해 필터와 빔 스플리터를 손쉽게 교환할 수 있는 필터 큐브의 개발이 있다.⁹ 이런 발전은 형광 현미경의 상업화로 이어졌다.

이 역사적 기간 중에 이루어진 다른 중요한 기술적 진보는 1) 소형 수은 증기 및 크세논 아크 램프 개발(1935년), 2) 가시광선에 의해 효율적으로 여기되는 형광 색소를 사용할 수 있게 해준 색 필터 유리 생산 기술의 발전(이에 따라 간단한 텅스텐 필라멘트 광원을 사용할 수 있었음), 3) 현미경 대물렌즈 설계의 발전, 4) 현미경 광학계에 반사 방지 코팅(*anti-reflection coating*) 적용(1940년경)이 있다.

더 최근에 이루어진 기술적 발전으로 말미암아형광현미경은 다년간에 걸친 생물학 및 의생명과학분야의 괄목할 만한 발전과 보조를 맞춰 발전할 수 있었다. 초고감도 카메라¹⁰, 레이저 조명, 공초점(*confocal*) 및 다광자(*multi-hoton*) 현미경, 디지털 이미지 처리, 새로운 형광 색소 및 형광 탐침(*fluorescent probe*), 그리고 당연히 광학 필터와 빔 스플리터의 획기적 개선이 이런 발전상으로 꼽힌다.

⁷ Abramowitz(1993년).

⁸ 비금속 시료로 가정함.

⁹ Bas Ploem 박사와의 의견 교환을 통해 확인된 이벤트의 정보와 순서, 2006년.

¹⁰ Inoué(1986년)는 일반적인 비디오 영상 촬영과 현미경의 사용을 상세히 설명한 훌륭한 자료이다.

광학 필터에 관한 일반적인 설명

형광 현미경용 광학 필터의 설계에 대한 상세 설명에 앞서, 필터 성능을 지정하고 사용가능한 제품의 특성을 설명할 때 사용되는 용어를 몇가지 소개한다

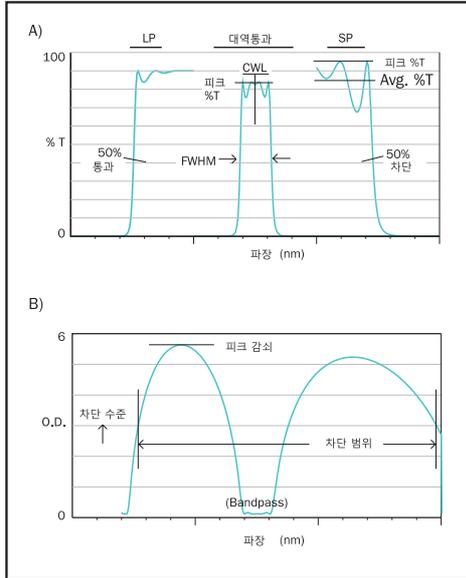


그림 6
A) 통과 특성에 대한 명명법
B) 차단에 대한 명명법

용어

U, B, G 등의 색명칭이 기본 필터세트를 설명하기에 적합한 때도 많지만, 필터를 더 정확하게 설명하기 위해 사용되는 용어를 익히는 것이 도움이 되며, 특히 보기 드문 염료와 탐침을 위한 특수한 세트를 다룰 때 더욱 그렇다. 앞서 설명한 형광 색소 스펙트럼과 마찬가지로 필터 성능을 설명하기 위한 가장 일반적인 단위는 빛의 파장(단위: nm)이다. 필터의 색은 특정 파장뿐 아니라 대역폭(bandwidth, 아래에서 설명)에 따라 다르다. 이는 특히 550-590nm 범위의 필터를 통해서 볼 때 두드러진다. 대역이 좁은 필터는 옅은 녹색으로 보이는 반면, 대역이 넓은 필터(특히 장파장 투과 필터)는 노란색을 띠거나 심지어 밝은 주황색으로 보이기도 한다.

광학 필터의 스펙트럼 성능을 설명하는 데 사용되는 몇 가지 중요한 용어를 아래에 설명한다. 그림 6~ 9의 예시를 참조한다.

1) **대역 통과 필터(bandpass filter)**는 필터의 중심 파장(CWL, center wavelength)과 대역폭(FWHM, bandwidth)으로 표시한다.¹¹ 중심 파장은 최대 투과의 50%에서 측정된 파장의 산술 평균이다. FWHM은 최대 투과의 50%에서의 대역폭이다.

2) **장파장 투과 및 단파장 투과 통과 필터(longpassfilter; LP 및 shortpassfilter; SP)**는 최대 투과의 50%에서 통과 또는 차단 파장으로 표시된다. 기울기가

매우 가파른 LP 또는 SP 필터(다음 페이지 참조)를 종종 **에지 필터(edge filter)**라고 한다. 평균 투과율은 전체 스펙트럼이 아니라 필터의 유용한 통과 영역을 대상으로 계산된다. ("고역" 및 "저역"이라는 용어는 파장이 아닌 주파수를 더 정확히 설명하는 용어이므로, 이런 용어는 사용하지 않는 것이 좋다.)

3) **감쇠 수준(attenuation level)**(차단 수준(blocking level)이라고도 함)과 **감쇠 범위**(차단 범위라고도 함)는 보통 다음과 같이 **광학 밀도(optical density, OD)**의 단위로 정의한다.

$$OD = -\log(T) \text{ 또는 } OD = -\log(\%T / 100)$$

$$\text{예: } OD 4.5 = 3 \times 10^{-5} T (0.003 \%T)$$

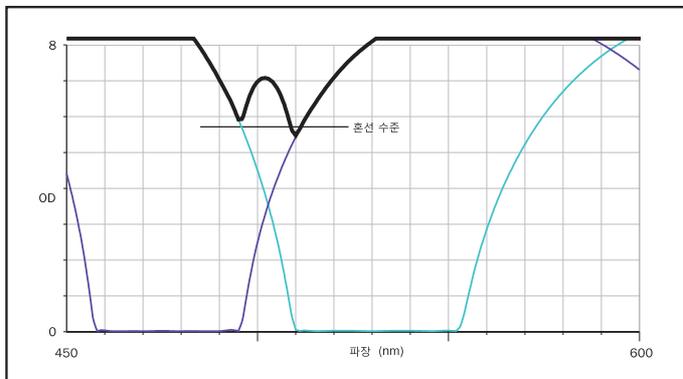


그림 7
직렬로 배치된 두 필터의 혼선 수준.

광학 밀도는 흡수량의 척도인 흡광도 양과 동일한 로그 단위를 사용하지만, 필터는 흡수 이외의 다양한 방식으로 빛을 감쇠할 수 있다. 예를 들어 박막 간섭

¹¹ 최대 투과의 절반에서의 전체 폭

필터는 주로 반사로 빛을 차단하고, 음향 광학 필터는 회절로 차단한다. 따라서 "광학 밀도" 라는 용어가 더 정확하다. (이 두 가지 필터는 모두 10페이지에서 시작되는 단원에서 자세히 설명한다.)

감쇠 수준과 관련하여 **혼선(cross-talk)**(그림 7)이라는 용어가 있는데, 이는 직렬로 함께 배치된 두 필터의 (특정 범위에 대한) 최소 감쇠 수준을 설명하는 용어이다. 이 값은 형광 필터 세트를 위해 여기 필터를 방출 필터와 매치할 때 중요하다.

4) **기울기(slope)**라는 용어는 투과에서 차단으로의 전환이 얼마나 급격하게 이루어지는지 설명하는 용어이다. **그림 8**은 대역폭 또는 통과(cut-on) 지점이 같지만 기울기는 다른 필터 세트 2개를 나타낸 것이다. 이 그림에서는 대역 통과 필터가 100% 투과 눈금에서는 매우 비슷해 보이지만, 광학 밀도 눈금에 표시되는 기울기는 상당한 차이가 난다는 것을 알 수 있다. 특정 파장에서 필터의 차단 수준을 규정하는 것으로 기울기를 지정할 수도 있다.

5) **입사각(AOI, angle of incidence)**은 **그림 9**에 표시된 것처럼 입사광의 광학축과 필터의 표면에 수직인 축 사이의 각도이다. 대부분의 필터는 수직 입사라고 하는 0도의 입사각에서 사용하도록 설계하지만, 빔 스플리터 코팅의 경우 보통 그 각도는 45도이다. 박막 간섭 코팅 및 음향 광학 결정체 소자(acousto-optical crystal device)와 같은 필터의 대부분은 "각도에 민감한"데, 이는 곧 특징적 성능이 각도와 함께 변한다는 의미이다. (이런 제품에 대해서는 다음 단원에서 더 자세히 설명한다.) 필터 또는 빔 스플리터를 통상적인 0도나 45도가 아닌 각도에서 사용해야 할 경우 그 점을 명시적으로 지정해야만 한다.

각도에 민감한 특성으로 인한 한 가지 결과는 수렴하거나 발산하는 빔에 필터를 사용할 경우 입사광의 **반원추각(half-cone angle)**을 지정해야 할 수도 있다(**그림 10**). 반원추각의 사인 값과 같은 f 수 또는 광선의 **개구수(numerical aperture, NA)**라는 용어로 반원추각을 설명할 수도 있다.

6) 이색성 빔 스플리터(그리고 사실상 수직이 아닌 입사각에서 사용되는 모든 박막 간섭 코팅)는 파장 및 특정 코팅 설계와 함께 크게 변하는 정밀한 효과인 **편광(용어 해설 참조)**을 일정량 일으키는 원인이 된다. **그림 9**에 몇몇 관련 용어가 그림으로 설명되어 있다. P 평면(TM(transverse magnetic) 모드라고도 함)은 빔 스플리터의 입사면에 평행한 전기장 진동의 성분이고, S 평면(TE(transverse electric) 모드라고도 함)은 빔 스플리터의 입사면에 수직인 전기장 진동의 성분이다. 일반적인 이색성 빔 스플리터의 편광 효과는 **그림 11**에 설명되어 있다.

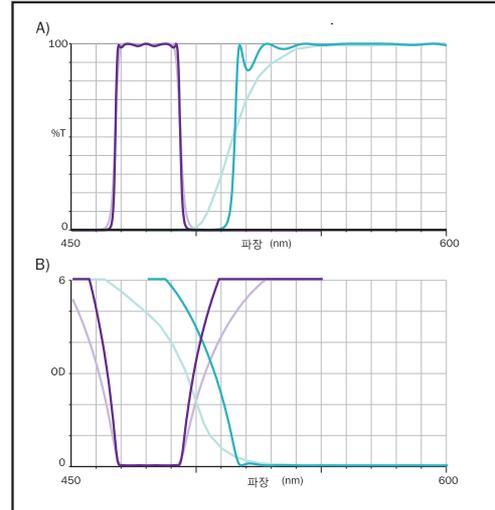


그림 8
A) 투과율 및 B) 광학 밀도로 표시되는 다양한 기울기의 필터 세트.

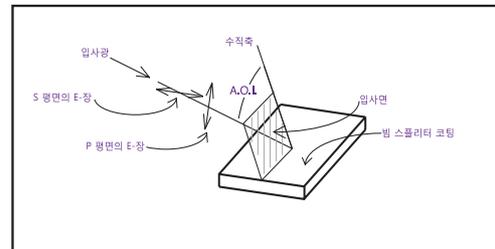


그림 9
편광을 설명하기 위해 사용되는 용어의 도식. 수직축은 코팅 표면에 직각인 축이며, 입사면은 수직축과 입사광선의 방향 벡터에 의해 정의된다.

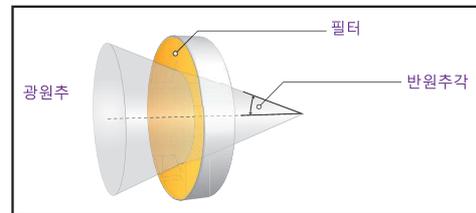


그림 10
발산 또는 수렴하는 입사광의 반원추각을 나타내는 그림.

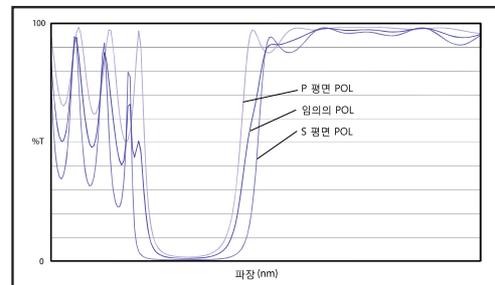


그림 11
일반적인 이색성(dichroic) 거울의 편광 효과. 이 특수 코팅은 S 평면에서 488nm의 선형 편광 아르곤 이온 레이저 광선을 반사하도록 설계되어 있다.

사용 가능한 제품

형광 분석에 사용되는 필터 기술의 두 가지 주요 유형은 색 필터 유리와 박막 코팅이다. 그 밖에도, 음향 광학 가변 필터도 특수한 응용 사례에 점점 많이 사용되고 있다. 이런 제품에 대해서는 아래에서 설명한다. 홀로그래픽 필터 및 액정 가변 필터와 같은 기타 제품도 사용할 수 있지만, 형광 현미경법에는 거의 사용되지 않는다.

색 유리 필터(Color Filter Glass)

흡수 유리(absorption glass)라고도 하는 색 유리 필터는 형광 분석에서 가장 널리 사용되는 유형의 필터로서, 특히 자외선은 투과시키고 가시광선은 흡수하는 노란색 및 주황색 샤프 컷(sharpcut) 유리와 "검은색" 유리가 많이 사용된다. 유리 필터는 흡수만으로 빛을 감쇠시키므로, 스펙트럼 성능은 유리의 물리적 두께에 따라 결정된다. 두께를 늘리면 차단 수준이 증가하지만 최대 대역내 투과율이 감소하기도 하므로(그림 12), 최적의 두께 값을 결정해야 한다. 유리 제조업체에서 상품으로 판매하는 색 유리 필터의 두께와는 다른 두께의 재료가 특정 응용에서는 더 나올 수 있다.

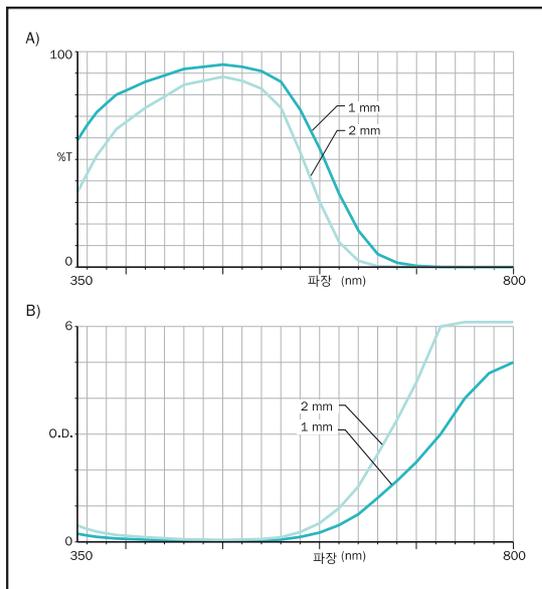


그림 12
근적외선 차단 유리의 스펙트럼(Schott® BG-39),
1mm 및 2mm 두께에서 A) 내부 투과율 및
B) 광학 밀도로 표시됨.
(출처: Schott Glaswerke 카탈로그.)

다음은 유리 필터 유리의 몇 가지 장점을 정리한 것이다.

- 1) 비교적 저렴하다.
- 2) 정상적인 사용 조건에서 안정적이고 수명이 길다.¹²
- 3) 유리 필터의 스펙트럼 특성은 유효 두께의 증가로 인한 약간의 변화를 제외하면 입사각에 무관하다.

유리 필터의 단점은 다음과 같다.

- 1) 유리를 선택할 수 있는 폭이 제한적이다.
- 2) 대역 통과(bandpass) 유형은 기울기가 작고 최대 투과율이 낮다.
- 3) 두께에 대한 스펙트럼 성능의 종속성 때문에 필터 두께를 지정할 때 용통성이 떨어진다.
- 4) 대부분의 장파장 투과 필터 유리는 자가 형광(auto-fluorescence)이 높다.
- 5) 입사된 대부분의 에너지가 흡수되어 열로 전환되므로 비강화 유리 필터는 강한 조명을 받으면 균열이 생길 수도 있다.

유리 필터 범주에는 폴리머 기반의 필터(동등한 유리 필터에 비해 자가 형광 수준이 낮아 때때로 장파장 여과 필터로 사용된다)와 유리 ND(neutral-density) 필터(아래에서 설명하는 박막 ND 코팅과 혼동하지 말 것)가 포함된다.

¹² 일부 사소한 예외 사항: 1) 샤프 컷 장파장 투과 필터 유리는 약 0.1-0.15nm/°C의 온도 변화율로 통과 대역에 변화가 생긴다. 2) 일부 유형의 필터 유리는 강렬한 자외선("솔라리제이션") 또는 높은 습도와 같은 특별한 환경의 영향을 받을 수 있다. (Schott Glaswerke 카탈로그.)

박막 코팅(thin film coating)

널리 사용되는 박막코팅은 다음과 같은 두가지이다. 1) 완전 반사 거울과 ND 필터를 만들기 위한 금속 코팅, 2) 간섭 필터의 주요 구성 요소인 **박막 간섭 코팅(thin film interference coating)**이다. 박막 간섭 코팅의 주요 장점은 작동 방식의 특성상 유연성이 매우 뛰어나다는 점이다. **그림 13**에 나온 것처럼, 간섭 코팅은 미시적으로 얇은 소재를 적층하여 만드는데, 각 층의 두께는 빛의 파장과 비슷하다(보통 빛 파장의 약 1/4로서, 이는 두께가 약 1/10,000mm임). 각 소재는 본질적으로 무색이지만, 소재의 층 사이에 있는 각 경계면에서 반사되는 빛이 파동 간섭 현상을 통해 결합되어 빛의 파장 중 일부를 선택적으로 반사하고 나머지는 투과시킨다. 흔히 자연스럽게 볼 수 있는 박막 간섭의 예로는 비누 거품에 알록달록한 색이 소용돌이처럼 형성되는 현상을 들 수 있다. 거품의 내부 표면과 외부 표면에서 반사되는 빛 사이에 간섭이 발생하며, 단일 비누 거품 층 내에서 일정한 두께의 유막을 따라 색이 발현된다.¹³

간섭 코팅을 사용하면 대역 통과, 단파장 투과, 장파장 투과 필터 및 이색성 빔 스플리터를 포함하여, 거의 모든 유형의 필터를 설계할 수 있다. 적층되는 층의 개수와 각 층의 두께를 조절하면 공칭 파장, 대역폭 및 차단 수준을 매우 정밀하게 제어할 수 있다. 또한, 표준 대역 통과, 장파장 또는 단파장 투과 유형보다 복잡한 필터를 만들 수도 있다. 예를 들어 **그림 14**에 나와 있듯이, 수정된 마그네트론 스퍼터 증착(magnetron sputter deposition) 공정으로 제작한 필터는 높은 투과율을 갖는 투과 대역이 여러 개 있으며 이는 형광 현미경 검사에서 매우 중요한 도구이다.

박막 간섭 코팅에는 다음을 포함한 여러 가지 제한이 있다.

1) 기존의 간섭 필터 설계에서는 일부 파장 범위 내에서만 차단율이 유지되었다. 이 코팅 기술은 수십 년 동안 산업 표준이었는데, 유전체(dielectric material)를 밀폐하고 적층하여 사용한다. 간섭 코팅과 흡수 유리를 둘 다 추가하면 차단 범위를 늘릴 수 있지만, 투과율이 감소하고 물리적 두께가 증가한다. 차단 영역이 추가되지 않은 필터("비차단" 필터라고 함) 그리고 구성 요소를 추가하여 새로운 차단 영역을 갖는 필터의 예가 **그림 15**에 나와 있다. 고정 세포 착색, 자가 형광을 이용한 식물 영상 촬영, 유동 세포 측정, 플레이트 리더와 같이 신호의 크기가 충분한 응용에서는 이 유형의 필터가 우수한 성능을 보인다.

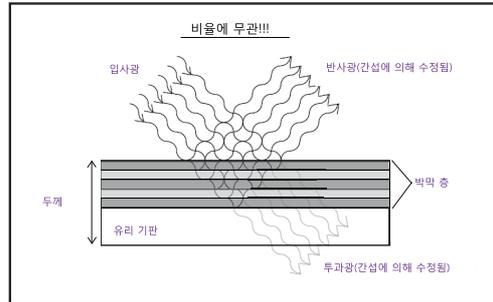


그림 13 박막 간섭 코팅의 구성도

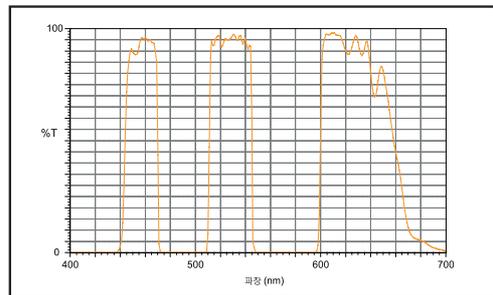


그림 14 DAPI, FITC 및 Texas Red® 방출용으로 설계된 삼중 대역 필터의 스펙트럼. (Chroma Technology Corp P/N 69002 방출 필터)

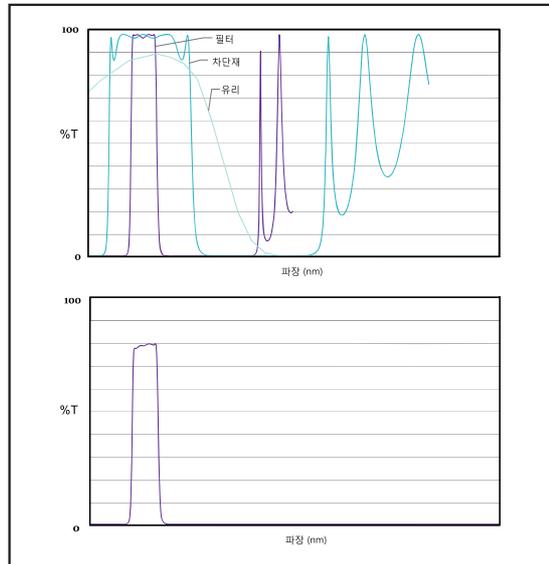


그림 15 차단된 필터의 예: A) 광대역 "차단기" 및 적외선을 차단하는 파란색 필터 유리를 포함하여, 차단되지 않은 필터와 차단 구성 요소의 스펙트럼, B) 차단된 필터의 스펙트럼. 적외선의 차단 범위(표시 안 됨)는 파란색 유리의 범위에 따라 결정되는데, 약 1.2미크론이다.

¹³ 하지만 비누 거품과는 달리, 광학 박막은 고체 소재(다결정질 또는 비결정질)로서 코팅 층의 두께가 극히 균일 하다.

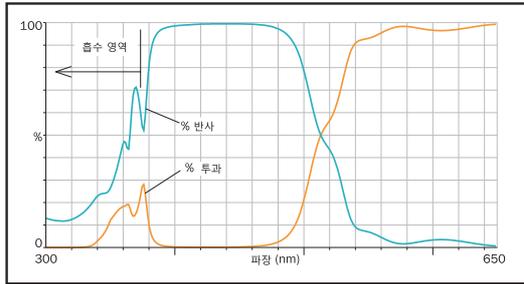


그림 16
반사율과 흡수율. 이 이색성(dichroic) 빔 스플리터 샘플은 UV에서 흡수율이 높다.

코팅 기술의 발전 덕분에, 이런 제한 사항 중 몇 가지는 크게 해소되었다. 금속 코팅이나 흡수 유리와는 달리, 모든 간섭 코팅은 차단 범위가 유한하지만 고에너지 코팅 기술로 투과율을 유지하는 동시에 차단 영역을 확장한다. 예를 들어 수정된 마그네트론 스퍼터(modified magnetron sputter) 기술로 생산되는 필터는 코팅 설계에 통합된 정교한 차단 기술을 사용하여 흡광 범위가 더욱 넓어졌다. 이 코팅 공정을 적용하여 얻은 필터는 차단 영역의 성능이 개선되면서도 투과 영역에서의 투과율에는 거의 영향을 미치지 않는다. 광자(photon) 하나 하나가 중요한 분야에서 이 유형의 필터를 사용하여 양질의 데이터를 얻을 수 있다.

2) 기존의 필터 기술에서는 코팅 소재의 투명도 범위가 제한적이었다. 그래서 이 범위를 벗어나면 코팅이 뛰어난 투과 또는 반사 능력을 발휘하는 것이 아니라, 오히려 많은 빛을 흡수한다. 가시광선 필터에 이상적인 일부 코팅 소재는 자외선 영역에서는 지나치게 흡수율이 높으므로, UV 필터에는 덜 이상적이더라도 다른 특성을 지닌 소재를 사용해야 한다. 결과적으로, UV 필터는 성능이 더 제한적이고 설계 유연성도 떨어지는 경향이 있다. 이 외에도, 스펙트럼에 표시한 파장 범위에서 흡수율을 0이라고 가정하고 투과 스펙트럼으로부터 반사율을 항상 계산할 수 있는 것은 아니라는 점이다. 그림 16은 가시광선에서만 높은 반사율을 갖도록 설계된 이색성 빔 스플리터의 예이다. UV 대역에서는 반사가 아니라 흡수 때문에 투과율이 떨어진다. 일반적으로, 가시광선을 반사하도록 설계된 빔 스플리터가 자외선도 반사할 것으로 가정하면 안 된다. 최신 고에너지 코팅 기술로 생산하는 필터에는 보라색 및 근자외선 스펙트럼에서 투명도가 더 높은 소재를 사용한다.

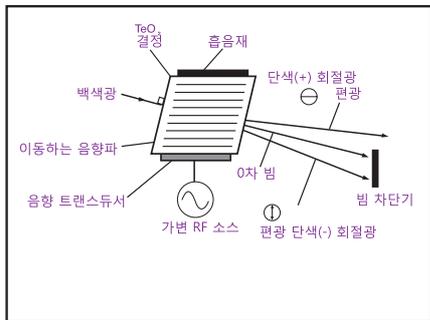


그림 17
음향 광학 가변 필터의 구성도.
(출처: Brimrose Corp.)

3) 9페이지에서 언급한 바와 같이, 간섭 코팅은 입사각에 민감하다. 입사각이 증가함에 따라 코팅의 스펙트럼 특성이 더 짧은 파장 쪽으로 이동한다(즉, 스펙트럼이 "청색 이동"됨).¹⁴ 뿐만 아니라, 비스듬한 입사각에서 코팅의 편광 효과는 대부분의 경우 바람직하지 않다. 코팅 설계자가 편광을 최소화할 수는 있겠지만 완전히 제거할 수는 없다. 하지만 몇몇 특수한 응용 분야에서는 이 효과를 유리한 방향으로 활용하기도 한다.

음향 광학 필터(Acousto-Optical Filter)

그림 17에 도식적으로 표시한 음향 광학 가변 필터(AOTF, acousto-optical tunable filter)는 여기광, 특히 레이저 여기광을 필터링하는 데 가장 자주 사용된다. 이 필터는 적당한 결정체(crystal)에 라디오 주파수를 걸어주면 벌크 투과 회절 격자(bulk transmission diffraction grating)가 생기는 방식으로 작동한다. 필터에 걸어주는 라디오 주파수를 변화시켜서 어떤 파장의 빛이든지 빠르고 정밀하게 분리할 수 있다. 일반적인 AOTF는 최대 반원추각(half-cone angle)이 약 5도인 입사광을 받아들인다. AOTF는 외부 전자 장치로 제어해야 하는 소자이다.

¹⁴ 박막 코팅의 물리적 유효 두께는 입사각이 증가함에 따라 증가하지만, 반사되어 간섭을 일으키는 광선 경로 길이의 차이는 감소한다.

³¹ 페이지의 참고문헌 참조

AOTF에는 다음과 같은 장점이 있다.

- 1) 수마이크로 초 이내에 어떤 파장으로든지 설정을 바꿀 수 있고, 파장 스캐닝을 수행하고, 여러 라디오 주파수를 혼합하여 다중 대역 필터링을 할 수 있다.
- 2) 음향 진동의 진폭을 바꾸어 강도를 빠르게 변화시킬 수 있다.

다음과 같은 몇 가지 단점도 있다.

- 1) FWHM(가시광선에서 약 2nm)이 작아서 AOTF를 여기 필터로 사용할 때 백색 광원에서 사용 가능한 광 출력이 제한된다.
- 2) 구경(약 10mm 이하)이 작고 전체 두께가 약 25mm로 두껍다.
- 3) 출력이 선형 편광되므로, 편광되지 않은 입사광을 사용하면 최대 투과율이 50% 밖에 안 된다.

액정 가변 필터(liquid crystal tunable filter)*

액정 가변 필터(LCTF)는 큰 유효 구경과 직렬식 광학 경로로 뛰어난 화질의 필터링을 가능하게 해주는 원리를 바탕으로 작동하기 때문에 방출 필터로서 점점 더 많이 사용되고 있는 또 다른 전자 제어 소자이다. LCTF의 핵심은 일련의 파장판(waveplate)으로서, 각 파장판은 액정 층과 페어링되고 선형 편광판 사이에 긴 복굴절 소재의 층으로 구성된다. 액정 층 근처의 투명 전도성 코팅에 걸여주는 전압을 미세조정하여 액정층에서 편광되는 정도를 조절한다.

간략히 말해, 복굴절을 유도하는 파장판을 편광된 빛이 통과하면서 파장에 종속적인 원편광으로 바뀐다. 두번째 편광판이 선형 및 원편광된 빛을 서로 다른 정도로 감쇠한다. 결과적으로 원편광을 파장에 종속적인 진폭 변화로 전환한다. LCTF 설계자는 직렬로 배치된 파장판의 수 및 각 파장판의 복굴절 특성과 같은 구조적 측면을 변화시켜 필터링 매개 변수를 제어할 수 있다.

LCTF의 특성은 다음과 같다.

- 1) 밀리초 단위의 짧은 시간 내에 파장 선택
- 2) 파장에 종속적인 이미지 이동 없음
- 3) 감쇠 정도 조절 가능
- 4) 대역폭(FWHM), 조정 가능한 스펙트럼 범위, 차단 수준과 같은 매개 변수는 다소 상호 종속적이긴 하지만 이런 매개 변수를 선택할 수 있음

LCTF는 편광 광학 구성 요소이므로, 편광되지 않은 빛에 대한 투과율은 최대 50%이다. 실제 소자는 파장과 차단 수준에 따라 50%에 크게 못 미칠 수 있다. 하지만 형광 현미경에 특수 편광 빔 스플리터를 사용함으로써 이런 전체적인 손실을 완화할 수 있다. 시중 제품으로 구현할 수 있는 최대 차단 수준은 약 10^{-5} 이다.

형광 현미경용 필터 설계

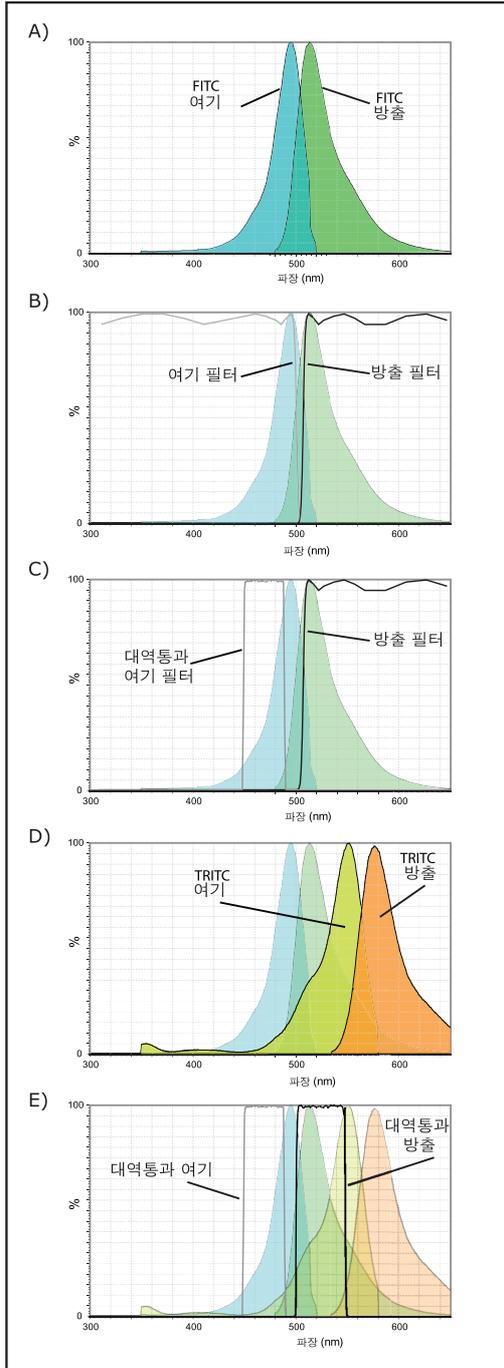


그림 18

- A) FITC 여기 및 발광 스펙트럼
- B) 여기 및 발광 스펙트럼 상에 겹쳐지는 FITC를 위한 완벽한 필터 쌍
- C) 특정 FITC에 맞추어 대역 여기 필터를 사용한 필터 쌍
- D) FITC 스펙트럼 상에 겹쳐지는 TRITC 여기 및 발광 스펙트럼
- E) FITC 및 TRITC에 대한 여기/발광 스펙트럼과 함께 겹쳐지는 FITC를 위한 대역 통과 필터 쌍(Chroma Technology Corp P/N 49002)

형광 현미경용 필터 설계의 기본 목표는 이미지 대조도(image contrast)를 극대화하고 화질을 유지하는 필터 세트(일반적으로 여기 필터, 방출 필터 및 이색성 빔 스플리터)를 만드는 것이다.

이미지 대조도는 다음과 같은 여러 요소들이 결합된 것이다. 1) 이미지의 절대 밝기, 2) 배경에 대한 형광 물질의 밝기(신호 대 잡음(S/N)으로 알려져 있음), 3) 시각 또는 사진 관찰의 경우 중요도는 좀 떨어지지만 눈으로 인지되는 색 밸런스. 필터는 투과율이 높으면서 대역폭이 넓어야 하고 혼선이 적어야 한다. S/N을 아무리 개선해도 이미지의 밝기가 적절히 검출하기에 충분히 밝지 않으면 이미지 대조도는 전혀 개선되지 않기 때문이다. 그 밖에도, 특정 응용 방법이나 기법에 따라 최대의 대조조를 얻는 방법이 달라질 수 있으므로, 필터 설계자는 이런 다양한 응용 분야를 이해하고 있어야 한다. 특정 응용 분야에 맞춰 정보를 취합하는 방법은 아래에 설명한다.

화질을 유지하기 위해서는 광학적 품질 요건을 충족하는 필터를 사용해야 한다. 이런 요건을 확정하기 위해서는 현미경 광학계의 기초를 잘 이해해야 하고 응용 분야와 기법의 요구 사항을 알아야 한다. 특히 조명 및 샘플 조작에 모두 레이저를 사용하고 디지털 이미지 처리, 컴퓨터를 이용한 위치 및 제어, 극히 민감한 검출 장치를 사용하는 오늘날에는 이런 최신기술을 이용하는 응용 분야가 늘어나고 있어 더욱 이런 점이 중요하다.

뿐만 아니라, 필터 설계자는 다양한 현미경 브랜드와 모델에서 요구되는 모든 물리적 치수를 알고 있어야 한다.

이미지 대조도

특정 형광 색소에 대해 필터 세트가 최적화되는 일반적인 과정은 FITC 염료로 시료를 예로들어, 이 염료에 맞춰 필터를 어떻게 설계하는지 설명함으로써 명확히 보여줄 수 있다.

형광 스펙트럼

필터세트를 설계하기 위해 가장 중요한 매개변수는 그림 18A에 나와 있는 여기 및 발광스펙트럼과 같은 염료의 스펙트럼 특성이다. 이것이 고려해야 할 유일한 매개변수라면, 모든 여기 스펙트럼을 통과시키는 단파장

투과(shortpass) 여기 필터를 사용하여 시료를 비추고, 전체 발광스펙트럼을 투과시키는 장파장투과(longpass) 방출 필터를 사용하여 형광을 관찰할 것이다. 이런 특성을 가진 FITC용 필터 쌍이 **그림 18B**에 나와 있다. 이들은 "이상적인" 단파장 투과 및 장파장 투과 필터이다. 실제 필터는 필터의 기울기에 한계 때문에 통과 대역과 차단 대역 사이가 더 넓게 분리될 필요가 있고 단파장 투과 필터의 차단 지점은 자외선 영역의 어딘가에 있을 것이다.

하지만 실제 시료에서는 다른 고려 사항이 있다. 단파장 투과 여기 필터, 특히 자외선을 투과시키는 필터를 사용할 경우에는 시료 내 많은 물질이 자가 형광을 발할 가능성이 있다. 특히 병리학용 조직 시료가 자가 형광을 발하는 경향이 있다. 또한, 고에너지(즉, 양자) 에너지가 높은 자외선이 있으면 형광 색소의 광표백 속도가 증가하거나 시료에 광손상을 일으키거나 두 가지 모두가 발생할 수 있다. 따라서 **그림 18C**에 표시된 것처럼, 대역 통과 여기 필터(bandpass excitation filter)를 사용하여 FITC 여기가 최대가 되는 영역으로 대역을 제한하되 여전히 적절한 강도는 허용할 만큼의 대역폭이 되도록 해야 한다.

시료에 두 번째 형광 색소가 포함되는 경우(예: **그림 18D**에 표시된 것처럼 여기 및 발광 스펙트럼을 가진 TRITC), 이 염료에 대해 파란색 영역의 여기 효율은 비록 낮기는 하지만 의미 있는 수준이다. FITC에 대해 장파장 투과방출필터(longpass emission filter)를 사용하는 경우, TRITC에서 작지만 뚜렷한 주황색 발광이 보일 수도 있다. 이는 보통 바람직하지 않으며, 특히 색을 구분하지 않는 흑백 카메라로 영상 촬영 시 더욱 그렇다. 이 경우에는 FITC의 최대 방출 대역에 맞추어 방출 필터의 투과 대역을 줄여야 한다 (**그림 18E**). **그림 18E**의 필터는 Chroma 49-시리즈 ET 필터의 예이다.

이미지 밝기가 그다지 중요하지 않은 세포측정의 경우, 형광 색소 사이의 감도를 최대화하기 위해 훨씬 더 좁은 대역의 필터를 사용하기도 한다.

광원

지금까지는 모든 색의 출력이 똑같은 가상의 광원(순수 백색광)을 가정하여 설명했다. 그러나 실제 광원은 스펙트럼 출력이 다양할 수 있고, 많은 경우에 있어 광원의 유형을 염두에 두고 필터를 설계하는 것이 중요하다. 다음은 형광 현미경 검사에 종종 사용되는 광원을 정리한 목록이다.

1) **수은 아크 램프(mercury arc lamp)**는 형광 현미경법에 가장 흔히 사용하는 광원으로, 자외선 및 가시광선 영역에서 아주 밝다(기술적 용어로는 휘도(luminance) 또는 방사 휘도(radiance)). 이 광원의 스펙트럼(**그림 19**)은 연속성이 아니다. 대부분의 광 출력이 선이라고 부르는 몇몇 좁은 대역에 집중되어 있고, 각 선의 폭은 약 10nm이다. 대부분의 다목적 필터 세트에는 이런 선을 하나 이상 투과시키는 여기

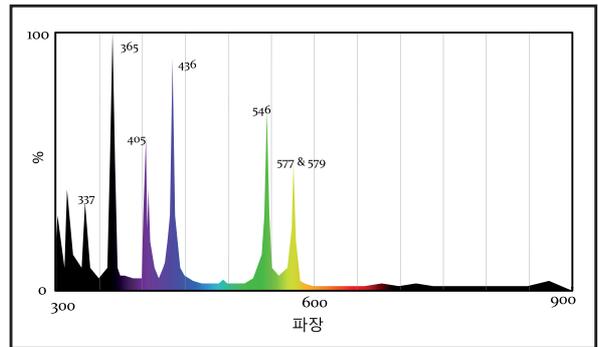


그림 19
수은 아크 램프의 스펙트럼. (300nm 미만의 중간 UV 출력은 표시되지 않음.)

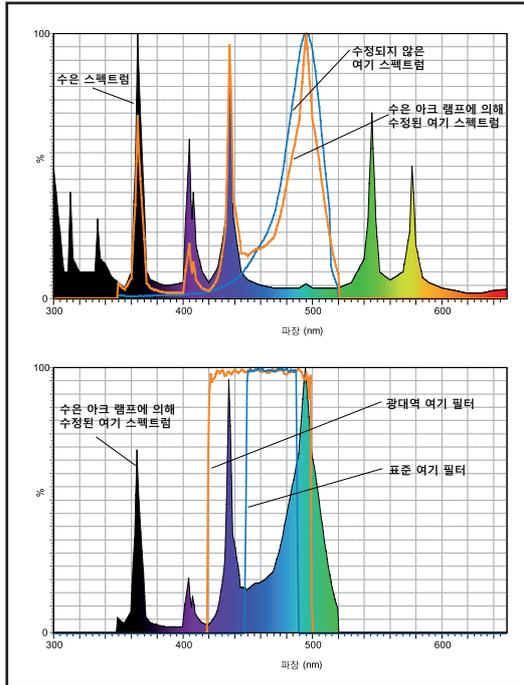


그림 20
 A) 수정되지 않은 FITC 여기 스펙트럼과 수은 아크 램프 스펙트럼에 의해 수정된 FITC 여기 스펙트럼(100% 상대 피크 T에 대해 정규화됨).
 B) 표준 및 광대역 여기 필터와 함께 겹쳐져 수정된 FITC 여기 스펙트럼.

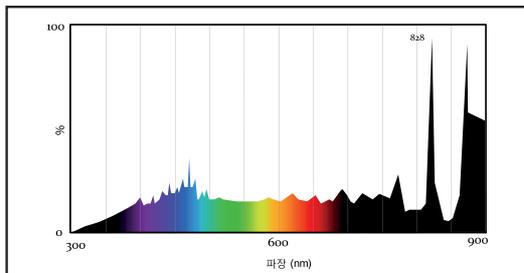


그림 21
 제논 아크 램프의 스펙트럼.

필터가 있어야 하지만, 두드러진 예외가 있을 수 있으며 다음 예에서 그 중 한 가지를 설명한다. 그림 20은 수은 아크 조명기의 선형적이지 않은 출력 때문에 FITC의 여기 스펙트럼이 달라진 효과를 나타낸 것이다. 436nm를 포함한 광대역 여기 필터는 이 파장을 포함하지 않는 필터를 사용할 때보다 훨씬 밝은 방출 신호를 제공할 것이다. 그러나 대부분의 시료에서는 형광신호의 증가보다 자가 형광에 의한 노이즈가 더 커질 것이므로 전체 S/N은 감소할 것으로 예상된다. 하지만 절대적인 형광 수준이 극히 낮은 분야에 사용하거나 FITC 스펙트럼이 청색 이동된 시료의 경우¹⁵에는 436nm 선을 포함하는 광대역 여기 필터를 사용하여 검출 능력이 향상될 수 있다. 발광 스펙트럼이 크게 변경되지는 않을 것이므로, 여기 대역과는 무관하게 같은 방출필터를 사용할 수도 있다.

2) 제논 아크 램프(xenon arc lamp)(그림 21)는 가시광선에서 상대적으로 연속적인 스펙트럼을 가진다. 염료 및/또는 시료의 스펙트럼 특성을 정량적으로 분석하는 시스템에서는 제논 아크 램프를 사용하는 것이 좋지만, 같은 와트수의 수은 아크 램프만큼 밝지는 않다. 수은 램프가 상대적으로 약한 FITC 여기 영역(450nm ~ 500nm)에서도 제논 아크는 조금 더 밝을 뿐이다. 이에 대해서는 두 가지 주요 이유가 있다. 첫째, 제논 램프의 발광 아크가 동등한 수은 램프의 아크보다 커서 일반적인 현미경 구성을 사용하여 시료에 초점을 맞추기 위해 사용 가능한 빛의 양이 감소한다. 표 1에 수은 및 제논 아크 램프에 관한 몇가지 관련 데이터가 나와 있다. 두 램프 간의 아크 크기 차이에 유의한다. 둘째, 제논 아크 램프는 적외선뿐 아니라, 그림 21에서 보는 바와 같이 근적외선에서 출력이 비례적으로 훨씬 더 크다.

이처럼 높은 적외선 출력으로 인해 제논 아크 램프에는 또 다른 단점이 있다. 여기 필터는 근적외선(>800nm)에서 우수한 차단 능력을 갖도록 설계해야 하고, 필터의 위치에 따라 더 높은 열 부하에 견디도록 설계해야 한다.

3) 메탈 할라이드 숏 아크 램프(metal-halide short-arc lamp)가 형광 현미경 검사에 점점 더 많이 사용되고 있다. 스펙트럼 관점에서 볼 때, 모델 간에 출력에 상당한 차이가 있다. 일반적으로, 이 램프는 수은 아크 램프와 비슷하지만 주요 방출선 사이의 상대 강도가 더 크다. 이 점에 있어서는 표준 제논 아크 램프와 비슷하다. 메탈 할라이드 광원은 기존의 수은 및 제논 아크 램프에 비해 상당한 이점이 있다. a) 유효 수명이 최대 2000시간으로, 일반적인 수은 조명기의 200시간이나 제논

¹⁵ 예를 들어 pH 값이 낮은 조건에서는(6 미만의 pH) 이런 변화가 발생할 수 있다(Haugland, 1992년).

램프 유형	정격 출력 (W)	광속 (lm)	평균 밝기 (cd/mm ²)	아크 크기 w x h(mm)	정격 수명 (시간)
수은					
HBO 50W/3	50	1300	900	0.20 x 0.35	200
HBO 100W/2	100	2200	1700	0.35 x 0.25	200
HBO 200W/2	200	10000	400	0.60 x 2.20	400
제논					
XBO 75W/2	75	1000	400	0.25 x 0.50	400
XBO 150W/1	150	3000	150	0.50 x 2.20	1200

표 1
제논 및 수은 아크 램프에 대한 데이터 굵게 표시한 항목은 형광 현미경에 대해 가장 일반적인 크기를 나타낸다. (출처: Abramowitz, 1993년)

램프의 400시간과 비교하면 훨씬 길다. b) 보통 정밀 가공된 하우징에 일체형으로 통합된 타원형 반사경이 함께 들어 있는 구조로 되어 있어, 쉽고 안정적으로 정렬할 수 있다.

주요 단점은 아크가 크고(가장 작은 크기가 약 1.2mm) 타원형 반사경의 광학적 특성 제한 때문에 평균 밝기가 제논 아크 램프와 비슷한 수준이라는 점이다. 제논 아크 램프와 마찬가지로, 일반적으로 수은 아크 램프보다 적외선에서 출력이 더 높다.

4) 발광 다이오드(LED) 광원 역시 인기를 끌고 있는데, 특히 학교에서 사용되는 저가형 현미경에 많이 사용된다. LED는 약 10 - 40nm 범위의 FWHM으로 상대적으로 좁은 스펙트럼 대역폭 내에서 빛을 방출한다는 점에서 아크 램프와는 다른 고유의 특징이 있다. 그림 22는 몇 가지 전형적인 LED 광원의 스펙트럼을 나타낸 것이다. 여기 필터의 차단 범위를 확장할 필요성이 사라지므로, 이는 형광 현미경 검사를 위해 매력적인 특징이다. 스토크스 이동(Stokes shift)이 큰 형광 색소를 사용하는 일부 응용 사례에서는 여기 필터가 아예 필요하지 않을 수도 있다. 하지만 대부분의 응용 사례에서는 스토크스 이동 폭이 좁은 형광 색소를 사용하므로 여기/방출 필터 쌍도 필요하다.

LED는 a) 일반적으로 정격 수명이 10,000시간 이상이고 50,000시간 이상 사용하는 경우도 많고, b) 전체 정격 수명에 걸쳐 출력 강도가 비교적 일정하게 유지되며, c) 반도체 소자이기 때문에 출력(ON/OFF 및 강도)을 밀리초 단위로 매우 빠르게 제어할 수 있는 등의 다른 중요한 장점도 있다.

형광 현미경 검사에 LED의 사용이 제한되었던 LED 광원의 주요 단점은 밝기였다. 하지만 최근의 LED 기술 발전으로 LED에서 방출되는 좁은 스펙트럼 대역 내에서는 밝기가 대략 아크 램프와 같은 수준의 LED가 개발되었다.

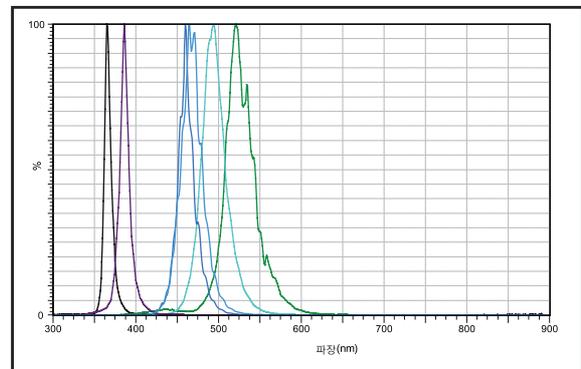


그림 22
일반적인 LED 광원의 스펙트럼. 공칭 파장: 365nm, 390nm, 455nm, 470nm, 505nm, 535nm. (Nichia Corp.에서 제공한 390nm LED 데이터)

역설적이게도, 이제는 좁은 스펙트럼 방출 대역이 주요 단점으로 꼽히고 있다. 이는 a) 다중 채널을 사용할 경우 LED의 여러 가지 다른 색의 LED를 조합해야 하므로 광학적 구성이 복잡해질 수밖에 없어 전체 밝기가 제한될 수 있다는 점, b) 제한적인 수의 스펙트럼 대역만 사용할 수 있고, 특히 매우 유용한 546nm 수는 선과 일치시킬 수 있는 녹색 스펙트럼 영역에 있는 대역이 제한적이라는 두 가지 이유 때문이다.¹⁶ 또한, 어떤 단일 LED 색에 대해서도 LED에 전력을 공급하는 데 사용되는 구동 전류의 온도와 크기에 대한 파장 증속성(최대 5nm까지)뿐 아니라, 생산 공정에 따라서 최대출력 파장(최대 20nm)의 가변성이 상당히 클 수 있다는 점도 인식해야 한다.

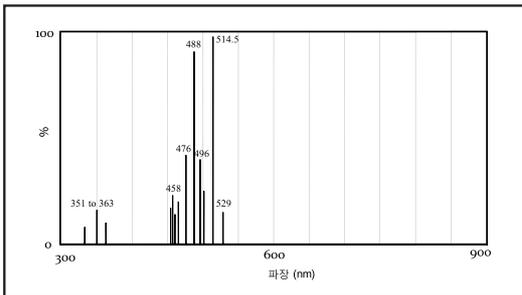


그림 23 아르곤 이온 레이저의 전형적인 스펙트럼. (Spectra-physics Lasers, Inc.에서 제공한 데이터)

5) 레이저(laser)는 공초점(confocal) 형광 현미경법에서는 거의 빠지지 않는 존재가 되었는데, 이는 (보통은 단색광의) 좁은 스펙트럼 대역에서 극히 밝기 때문이다. 하지만 레이저광의 간섭성으로 인해 샘플 조사 영역에 균일한 조도로 비추기 어렵기 때문에 광학 형광 현미경 검사에는 레이저가 거의 사용되지 않는다. 레이저 조명용 필터 설계에 대한 자세한 설명은 25페이지에서 확인할 수 있다.

검출기(detector)

여기 필터는 검출기가 검출할 수 있는 파장 범위에 대하여 관심 투과 대역 이외의 모든 파장의 빛을 차단하도록 설계되어야 한다. 아크 램프와 필라멘트 램프는 근자외선, 가시광선 및 적외선 전체에 걸쳐 출력이 존재하므로, 필터는 검출기 감도의 전체 범위에 걸쳐 필터에 적절한 감쇠 능력이 있어야 한다. 그러나 레이저 조명의 경우, 여기 필터의 차단 범위는 레이저의 출력 범위만 포함하면 된다. 예를 들어 아르곤 이온 레이저에 대해서는 적외선 차단이 필요하지 않다(그림 23).

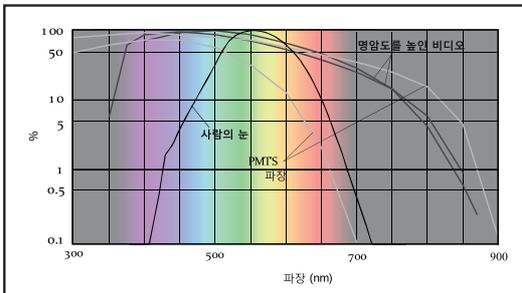


그림 24 다양한 검출기의 감도. 각 스펙트럼은 피크 감도에 대해 정규화된 것이다. (Hamamatsu Corp.에서 제공한 비디오 및 PMT 데이터)

그림 24는 중요한 검출기의 감도 스펙트럼(sensitivity spectrum)을 나타낸 것이다. 강화되지 않은 실리콘 포토다이오드(unintensified silicon photodiode) 또는 CCD의 감도는 표시되어 있지 않은데, 1100nm까지는 감지하지만 1200nm가 되면 감도가 0으로 떨어진다. 예를 들어 마이크로 채널플레이트(microchannel plate)로 강화된 실리콘검출기(intensified silicon detector)의 감도 범위는 그림 23에 나와 있는 강화된 비디오 스펙트럼과 비슷하다.

다음의 세가지 이유로 방출 필터 대신에 여기 필터로 대역 외 광을 차단하는 것이 좋다. 1) 시료가 더 적은 방사선에 노출되고, 2) 방출 필터의 구성 요소 수가 적어져서 대체로 광학 영상화질이 향상되고, 3) 수많은 현미경에는 방출 필터를 고정하기 위한 공간이 좁아서 최종 두께가 늘어나지 않도록 추가되는 부품 수를 줄이는 것이 좋다. 예를 들어 자외선 여기의 경우, 여기 필터의 차단 범위를 확장하는 과정에서 필터의 최대 투과율이 감소하는 경우가 있다. 이런 경우에는 여기 필터 대신에 방출 필터가 적외선을 차단하도록 하는 것이 좋다.

¹⁶ 최근에는 변환 형광체 사용으로 이러한 제한점이 극복되었다. 변환 형광체는 LED 시스템에 추가되는 코팅으로서, LED 광을 흡수하여 더 긴 파장의 빛을 방출한다. 여기 스펙트럼 형광 색소와 더욱 정확히 일치하는 출력 스펙트럼을 가진 형광체를 선택할 수 있다.

가시광선 사진 촬영을 할 때는 일부 내장형 노출계의 적외선 감도가 노출 시간에 영향을 줄 수 있는 수준이기 때문에 적외선 차단 기능이 있는 것이 중요하다.

빔 스플리터(Beamsplitter)

필터 세트 설계의 최종 단계는 여기 및 방출 필터의 스펙트럼과 일치하는 이색성 빔 스플리터(dichroic beamsplitter)를 선택하는 것이다. 여기 대역의 반사율과 방출 대역의 투과율이 모두 높은 빔 스플리터는 신호를 최대화할 뿐 아니라, 배경 잡음을 더욱 줄여 대조도를 향상시키는 역할도 한다. 이제는 수정된 마그네트론 스퍼터(modified magnetron sputter)와 같은 첨단 코팅 기술로 여기 대역에서 95%보다 높은 반사율과 방출 대역에서 95%보다 높은 평균 투과율을 달성할 수 있다.

45도의 비교적 큰 입사각에서는 코팅이 고도의 편광성을 띌 수 있으므로, 설계자는 이런 효과를 최소화하도록 설계해야 한다. 현미경과 같은 이미지 영상 시스템용 빔 스플리터는 보통 유리 기판의 한 면이나 양면에 직접 코팅을 하여 만들므로, 취급시 각별히 주의해야 한다. 광원과 표본 쪽을 향하도록 설계되는 표면을 빔 스플리터의 전면(front surface)이라고 한다. 어떤 표면이 전면인지 결정하기 어려울 수 있으므로, 제조업체에서는 보통 올바른 방향을 표시하기 위해 일종의 표시를 해 둔다.

그림 25는 여기 필터, 방출 필터, 그리고 이런 필터에 부합하는 이색성 빔 스플리터를 포함한 FITC용 필터 세트의 완성된 설계를 보여준다.

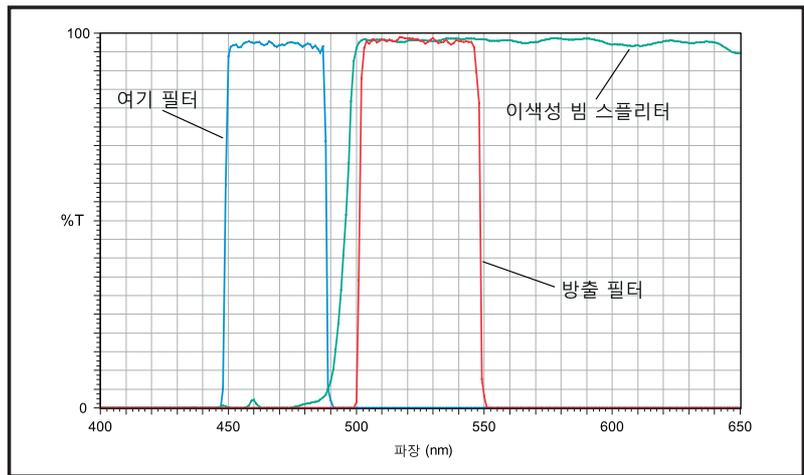


그림 25
FITC용으로 완성된 필터 세트 설계(Chroma Technology Corp P/N 49002)

광학 품질(OPTICAL QUALITY)

광학 필터에 대한 광학 품질 요구 사항은 필터 유형(특히 필터가 조명 광학 장치 또는 영상 촬영/검출 광학 장치의 구성 요소인지 여부), 현미경 유형 및 본래 용도와 같은 요인에 매우 크게 좌우된다. 예를 들어 정량적 이미지 분석에 사용하는 레이저 공초점 현미경용 방출 필터에 요구되는 품질과 정량적인 시각적 관찰에 이용하는 일반 광각 현미경용의 방출 필터에 요구되는 광학적 품질은 크게 다르다. 모든 유형의 필터와 모든 응용 방법에 대한 특정 요구 사항을 여기서 설명할 수는 없지만, 주요 광학 품질 매개 변수를 도입하고 몇 가지 기본적인 현미경 구성을 분석함으로써 대부분의 상황에 적용할 수 있는 일련의 일반적 지침을 마련할 수 있다.

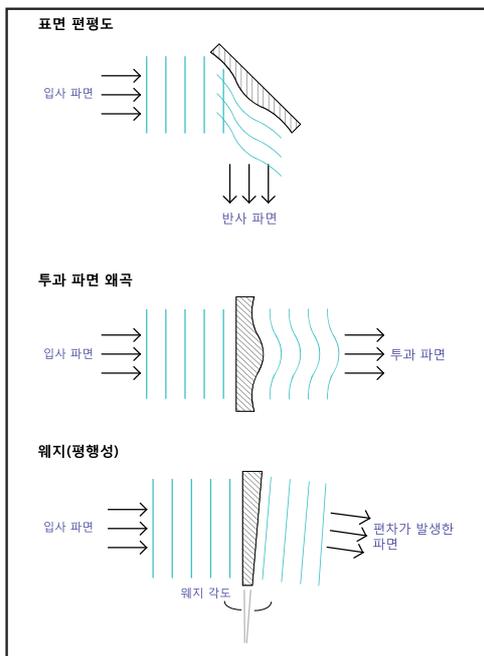


그림 26
표면 편평도, 투과 파면 왜곡 및 웨지의 효과를 나타내는 그림.

광학 품질 매개 변수(Optical quality parameters)

다음은 필터 또는 빔 스플리터의 전체적 화질을 정의하는 데 사용되는 중요한 매개 변수의 목록이다. 처음의 세 매개 변수는 그림 26에 설명되어 있다.

1) **표면 편평도(surface flatness)**는 완벽한 평면에서 광학 소자의 표면 편차를 측정하는 것으로, 보통은 가시광선 파장(보통 550nm 또는 630nm이지만, 때로는 대역 통과 필터에 대한 CWL 사용)의 분수 또는 배수로 측정된다. 표면에서 반사될 때 빛의 평면파가 받는 실제 반사 파면왜곡(RWD, reflected wavefront distortion)은 표면 편평도값의 2배이다.¹⁷ 하지만 "RWD" 라는 용어로 표현하는 사양은 보통 수직 입사 시 기관의 표면 편평도인데, 이것은 상용 간섭계로 측정할 때의 일반적인 구성이기 때문이다. 사양이 실제로 편평도가 아니라 RWD에 대한 것이라면, 이점을 분명히 명시해야 한다.

빔 스플리터나 거울에서 반사되는 빛의 RWD는 오로지 반사면(보통은 전면만 해당)의 표면 편평도에 따라 결정된다.

2) **투과 파면 왜곡(TWD, transmitted wavefront distortion)**은 광학 소자를 통해 투과될 때 빛의 평면파가 받는 왜곡의 척도로서, 앞서 설명한 표면 편평도와 똑같이 빛 파장의 분수 또는 배수로도 측정된다. 소자 외부 표면의 표면 편평도와 정도는 덜하지만 굴절률의 불균등성을 일으키는 내부 구조가 결합하여 광학 소자의 전체 TWD가 된다.

3) **웨이(wedge), 평행성(parallelism)**이라고도 함)는 광학 소자의 외부 표면이 얼마나 평행한지를 나타내는 척도이다. 웨지는 보통 각도의 분각 또는 초각 단위로 측정된다. 웨지가 있으면 빛의 진행 방향을 휘게 하여(angular deviation)

¹⁷ 이는 엄밀히 말하자면 수직 입사 시 반사되는 빛에만 해당되는 내용이다. 수직 입사가 아닌 입사 시의 반사 광에 대한 값은 코사인 인수에 의해 수정된다. 예를 들어 45도의 입사각에서 반사되는 파면 왜곡은 표면 편평도의 약 1.4배이다.

영상이 이동한다(image shift). 편향(angular deviation)된 각도는 일반적인 필터에 대한 웨지 각도의 약 절반 정도이다.¹⁸ 빔 편향에 크게 영향을 주지는 않지만, 코팅된 기판의 웨지는 축을 벗어나는 내부 반사의 결과로 눈에 띄는고스트 이미지의 원인이 될 수 있다.

4) 광학 필터의 유효 구경(clear aperture)이 현미경의 전체 구경을 제한하면 안 된다. 유효 구경의 가장자리 주위에 필터링되지 않은 빛이 새지 않도록 하는 것 역시 매우 중요하다. 필터 제조업체에서는 보통 빛이 새지 않도록 하기 위해 필터를 링에 끼워 판매한다. 링이 없는 필터를 구매한 경우 누출이 생기지 않도록 필터를 설치하는 것은 보통 고객의 책임이다.

5) 표면 결함(긁힘 및 패임, scratch-dig)은 군사 규격 표준(mil-spec standard)에 따라 측정된다(예: "80/50 scratch/dig"). 패임(digs)이라는 용어에는 필터 내에 포함된 입자 및 작은 기포와 노출된 코팅면에 혼입되어 육안으로 식별되는 이물질과 같은 것이 포함된다.

6) 핀홀(pinhole)은 간섭 필터의 코팅에 생기는 작은 손상 부위로, 보통 코팅 중에 기판에 먼지 입자가 있어 발생하게 된다. 핀홀의 크기는 높은 조도의 조명기를 사용하여 특정 조건에서 허용 가능한 표준 최대 핀홀에 대한 크기로 측정해야 한다.

Köhler 조명을 사용하는 광학 현미경에 대한 광학 품질 요건

대부분의 형광 현미경은 Köhler 조명을 사용하는 광역(wide-field) 형광 시스템이다 (4페이지의 그림 3 참조). 다음과 같이 간략하게 설명할 수 있다.

Köhler 조명에는 광량을 조절하기 위해 조절 가능한 조리개가 2개 있는데, 구경 조리개(aperture diaphragm)는 대물렌즈의 뒤쪽 구경 위로 이미지가 형성되고(즉, 뒤쪽 구경에 공액 결합) 시야 조리개(field diaphragm)는 초점을 맞춘 표본 평면 위로 이미지가 형성된다. 시야 조리개는 대물렌즈 뒤쪽 구경 위로 구경 조리개를 이미지화하는 렌즈 근처에 배치되어 있다. 집광 렌즈(collector lens) 어셈블리는 구경 조리개 위로 아크 램프의 조명을 집중시키고, 따라서 대물렌즈 뒤쪽 구경 위로 초점이 모이게 된다. 이 구성으로 세 가지 필수 효과를 얻을 수 있다. 1) 아크 램프의 이미지가 시료 평면에서 완전히 초점을 벗어나 시야 전체에서 균일한 조명 형성, 2) 시료 위에 시야 조리개의 이미지가 뚜렷하게 보이므로, 이를 조절하여 보는 영역을 정밀하게 제어함, 3)조명을 비추는 영역의 크기에 영향을 미치지 않으면서, 구경 조리개를 조절하여 조명의 밝기를 조절할 수 있음.¹⁹

이 점을 염두에 두고서, 이 유형의 현미경에 대한 광학 품질 요건에 관해 몇 가지 관찰을 할 수 있다.

¹⁸ 입사각이 작을 경우 각도 편차 = $(N - 1) \alpha$ 이며, 여기서 N은 필터에 있는 유리의 굴절률이고 α 는 웨지각이다. 대부분의 필터에는 굴절률이 약 1.5인 광학 유리가 사용된다.

¹⁹ Köhler 조명 광학에 대한 자세한 설명은 Inoué(1986년) 또는 현미경 제조업체의 설명서를 참조한다.

1) 현미경의 조명 광학 장치는 광원이나 구경을 꼭 충실하게 이미지화할 필요 없이 최소한의 불빛으로 시료를 균일하게 조명하도록 설계된다. 따라서 여기 필터의 투과 파면 왜곡은 영상 화질용일 필요는 없고,²⁰ 대체로 광학 품질에 관한 산업 표준에 맞으면 된다. 마찬가지로, 이색성 거울의 표면 편평도에도 영상 화질용이 필요하지 않다.

2) 필터 큐브를 바꿀 때 필터 큐브 어셈블리 내에 있는 빔 스플리터 정렬에 변화가 생기면 조명을 비추는 영역(즉, 시료 평면 상의 시야 조리개 이미지)이 눈에 띄게 이동하게 된다. 일반적인 응용 사례의 경우, 45도±3분각 정도의 정렬이면 적당하다. (반사광의 각도는 항상 입사광의 각도와 같기 때문에, 이 정렬 허용 오차로 인해 발생하는 전체 각도 편차는 ±6분각으로 2배가 된다.) 필터 큐브에 빔 스플리터가 미리 장착된 상태로 제공될 경우, 빔 스플리터를 올바르게 정렬하는 것은 공급업체의 책임이다. 또한, 필터 큐브를 현미경에 설치할 때 올바르게 정렬되도록 주의를 기울여야 한다.

반대로, 정렬의 변화는 시야에 들어오는 이미지의 실제 위치에는 거의 영향을 주지 않는다(정합 이동(*registration shift*)).

3) 마찬가지로, 여기 필터의 웨지 때문에 빛이 편향되어 조명을 비추는 영역이 이동하겠지만, 이미지 자체의 이동은 없을 것이다. 웨지는 필터 블록 어셈블리에 장착된 이색성 거울의 정렬 허용 오차 범위 내에서만 조절해야 한다.

4) 이색성 빔 스플리터뿐 아니라 방출 필터를 포함하여, 이미지 경로에 있는 필터는 일반적으로 영상 화질(image quality)용의 투과 파면 왜곡이 필요하다.

5) 방출 필터와 빔 스플리터에 웨지가 있으면 필터나 필터 큐브를 바꾸었을 때 이미지가 이동이 생긴다. 이런 부품의 웨지는 제어해야 한다.

그 밖에도, 빔 스플리터의 두께 변화로 인해 이미지 이동이 발생할 수 있다. 이런 두께 관련 이동의 범위는 현미경마다 다르다. 표준 튜브 길이의 광학계를 갖는 형광 현미경은 광 경로 내에 서로 평행하지 않은(not collimated) 빛이 있다.²¹ 따라서 이런 현미경은 광 경로 내에서 빛이 서로 평행한(collimated) 무한초점광학계(*infinite-corrected optics*)가 사용된 현미경보다 더 민감하다.

²⁰ "영상 품질"이라는 용어는 특정 광학 시스템의 전체 성능을 저하시키지 않을 광학적 품질의 수준을 나타낸다. 일반적인 현미경의 경우, 대체로 인치당 1개 파동의 TWD가 광학 필터 및 빔 스플리터에 적합한 것으로 간주된다.

²¹ 이 유형의 최신 현미경에는 대부분 필터 블록 하우징에 큐브 내부의 조준 성능을 향상시키는 릴레이 렌즈가 있다. 감도는 감소되지만 완전히 제거되지는 않는다.

서브픽셀 정합(SPR, sub-pixel registration)이 필요한 필터 세트의 경우 이색성 빔 스플리터 및 방출 필터의 위치와 정도는 달라지만 그 두께를 엄격히 조절해야 한다. SPR 필터 세트에 대한 광학 품질 요건은 24페이지에서 더 자세히 설명한다.

6) 여기 필터는 보통 시야 조리개(field diaphragm) 근처(Köhler조명에서 이미지 평면과 짝을 이루는 지점)에 배치되므로, 여기 필터의 핀홀은 매우 눈에 잘 띄며 이를 제거해야 한다.

7) 이색성 빔 스플리터는 여기광뿐만 아니라 이미지 광에도 노출되는 소자이기 때문에, 이색성 빔 스플리터의 자가 형광을 최소화해야 한다.

빔 스플리터는 표면 편평도와 투과 파면 왜곡을 위해 별개의 독자적 사양이 필요하다는 점에 유의해야 한다.

위의 관찰 결과를 바탕으로, 광역 형광 현미경에 사용되는 필터에 대한 일반적인 광학 품질 사양이 표 2에 나와 있다.

광학 품질 매개 변수	필터 유형		
	여기	방출	빔 스플리터
표면 편평도	기준 없음	기준 없음	인치당 10개 미만의 파동
투과 파면	기준 없음	인치당 1개 파동	인치당 1개 파동
웨이	<6분각	1분각	1분각
표면 결함(Scratch/dig)	80/50	60/40	40/40
핀홀	없음	최소	사양 없음*
자가 형광	사양 없음	보통 제어	최소

표 2
광역 형광 현미경의 필터에 대한 일반적인 광학 품질 사양.

*표면 결함(scratch/dig) 사양을 사용할 때 패인 곳으로 측정됨.

서브픽셀 정합을 위한 필터 세트

여러 가지 형광 색소를 이용한 한 가지 일반적인 시료 영상 촬영 방법은 고해상도 흑백 CCD 카메라를 사용하여 각 형광 색소의 이미지를 따로 촬영하는 것이다. 그 다음, 각각의 이미지에색을 입히고(pseudo-color), 단일 이미지로 오버레이(overlay)한다. 각 형광 색소에 맞는 필터 "큐브"를 사용하여 이미지를 얻는다. 서로 일치하는 필터 큐브 세트를 다중 위치 슬라이더 또는 터릿에 설치한다.

일부 응용 방법, 특히 공동국 소화분석(co-localization analysis)에서는 각각의 이미지를 한 픽셀(one pixel) 정밀도로 정합시켜야 한다. 이 정도 수준의 이미지 정합성을 갖도록 생산되는 필터 세트를 **서브픽셀 정합(SPR, sub-pixel registration) 필터 세트**라고 한다.

위에서 설명한 것처럼, 이미지 정합 이동(shift in image registration)의 첫 번째 원인은 이색성 빔 스플리터 및 방출 필터의 웨지이다. SPR을 달성하기 위한 구체적인 요건은 현미경의 광학적 레이아웃과 CCD검출기의 종류에 따라 다르겠지만, 웨지의 일반적인 사양은 빔 스플리터에 대해 2초각(arc second), 방출 필터에 대해 10초각(arc second)이다. 빔 스플리터에 대한 웨지 사양은 일반적으로 다음 두 가지 이유 때문에 더 낮다.

1) 45도의 AOI에서 기판에 의해 유도되는 각도 편차가 수직 입사보다 큼

2) 빔 스플리터는 항상 웨지에 대해 바로 조절할 수 있는 단일 기판으로 구성됨

이미지 이동의 두 번째 원인은 방출 필터와 이색성 빔 스플리터의 두께 때문일 수 있다. 위에서 설명한 것처럼, 이런 두께 차이에 따른 이미지 이동의 범위는 현미경마다 다르다. 표준 튜브 길이의 광학계를 사용하는 형광 현미경은 이미지 광 경로 내에 평행하지 않은 빛이 있다. 따라서 이들 현미경은 필터 큐브 내에서 평행광에 가까운 무한 초점 광학계를 사용하는 현미경보다 두께 차이에 더 민감하다. 필터 세트에서 방출 필터 간의 두께 차이가 0.2mm 이하, 빔 스플리터 간의 두께 차이를 0.2mm 이하로 하면 이 영향을 없앨 수 있다.²²

이미지 이동의 또 다른 원인은 이색성 빔 스플리터의 편평도(flatness) 때문일 수 있다. 박막 간섭 코팅은 기판이 휘게 만드는 고유의 기계적 응력(mechanical stress)을 지니고 있다. 응력의 크기는 주로 코팅 공정에 따라 결정된다. 마그네트론 및 이온 빔 스퍼터 증착과 같은 일부 공정에서는 얇은 기판을 눈에 띌 정도로 휘게 할 수 있는 매우 높은 응력을 가진 코팅을 만든다. 이미지 광 경로 내의 빛이 서로 평행하지 않을 경우 이런 휨 변형으로 인해 상당한 이미지 이동이 발생할 수 있다. 다중 위치 슬라이더 또는 터릿에 설치되는 세트에 있는 모든 이색성 빔 스플리터를 동일한 증착 공정에 따라 만들지 않을 경우 이 효과가 두드러질 수 있다.

²² 필터에 사용되는 유리 기판의 굴절률은 비슷한 것으로 가정할 경우이다.

공초점 현미경용 필터

공초점 형광 현미경(CFM)에 사용할 필터를 설계할 때는 주로 현미경의 광학적 구성을 고려해야 한다. 거의 모든 CFM 제품과 모델은 독자적인 구성과 광학 규격을 갖고 있지만, 대부분의 시스템은 다음의 두 가지 범주로 나눌 수 있다: 시료를 검사하기 위해 Nipkow 디스크 메커니즘을 활용하는 CFM과 레이저 빔으로 스캔하는 CFM. 이런 각각의 스캔 방법에 사용되는 광학 장치에 대해서는 표준 광학 현미경의 광학 장치와의 비교를 통해 아래에서 간략히 설명한다. 피사계 심도, 해상도 및 이미지 생성 기법과 같은 CFM 광학 기술에 대한 상세한 분석은 CFM 제조업체에서 제공하는 설명서와 더불어 생물학 및 유전학을 위한 현미경 검사 또는 실험실 기법과 관련된 과학 저널에 수록되어 있는 다양한 기사를 참조한다.

공초점 형광 현미경에 대한 광학 품질 요건

Nipkow 디스크 스캔 CFM

그림 27은 광대역 아크 램프 조명, Nipkow 디스크 스캔 메커니즘 및 이미지 검출기(카메라 또는 직접 육안 관찰)가 있는 CFM의 구성도이다.

이 현미경의 광학 경로는 표준 광역 현미경(그림 3에 설명되어 있음)과 원리가 비슷하다. 디스크는 시료 평면과 쌍으로 대응하는 위치에 설치되는데, 보통은 Köhler 조명으로 균일하게 조명을 받아야 한다. 따라서 여기 필터에 대한 투과 파면 요건과 이색성 빔 스플리터에 대한 표면 편평도 요건은 광학 현미경에 대한 요건과 동일하다. 마찬가지로, 방출 필터 및 빔 스플리터에 대한 투과 파면 요건도 광역 현미경에 대한 요건과 동일하다. 특정 CFM 설계의 초점 길이가 변하면 반드시 이런 사양을 수정해야 할 수도 있겠지만, 일반적으로 다양한 필터에 대한 웨지 요건 역시 바뀌지 않는다.

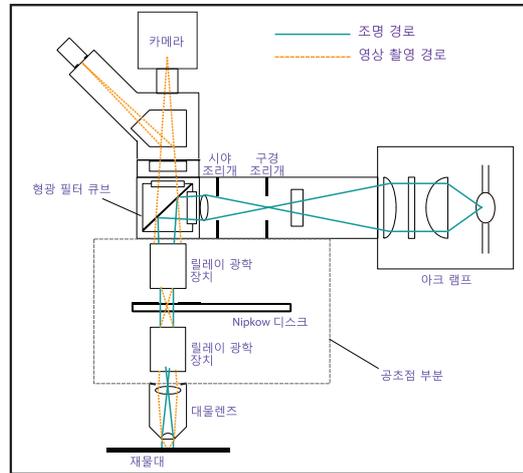


그림 27
Nipkow 디스크 스캔 기능이 있는 공초점 형광 현미경의 구성도.

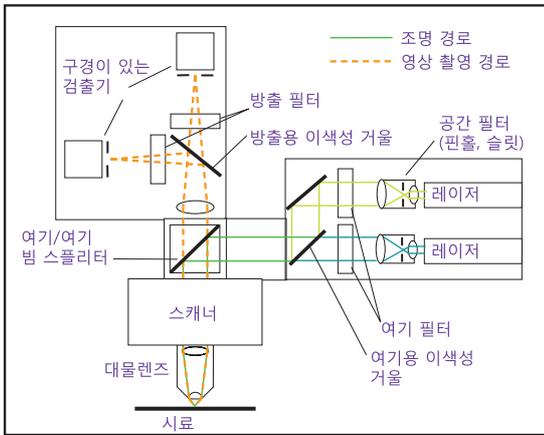


그림 28 레이저 스캔 공초점 형광 현미경의 구성도.

레이저 스캔 CFM(laser scanning CFM)

그림 28은 레이저 조명, 이동 거울 스캔(moving-mirror scanning) 메커니즘, 그리고 PMT(photomultiplier tube)와 같은 광검출 장치가 있는 CFM의 구성도이다. 이 현미경 설계의 광학 경로는 광각 현미경의 광학 경로와는 상당히 다르다. 다음 두 가지 주요 차이점이 있다.

- 1) 레이저 스폿(laser spot)의 초점이 샘플 위에 직접 맞춰질 때 조명기의 핀홀(또는슬릿) 이미지가 시료 평면 위에 나타난다(임계 조명, *critical illumination*).
- 2) 텔레비전의 결상 메커니즘과 유사하게, 검출기에서 생성되는 일련의 전기 신호를 시료상의 레이저 빔 위치에 동기식으로 일치시켜 이미지를 형성한다. 검출기에서 생성되는 전기 신호는 대응하는 핀홀(또는 슬릿) 구경을 통과하는 형광 신호의 강도에 따라 변한다.

이 구성에서는 시료 평면에서 최상의 초점이 형성되도록 하기 위해 레이저빔이 왜곡되지 않아야 하며, 실제 광학 경로에서 각도 편향(angular deviation)이 최소화야 한다. 또한, 이 유형에 속하는 대부분의CFM의 광 경로 길이는 필터에 의해 발생하는 어떤 각도 편향이든 확대시킬수 있을 정도로 비교적 길다. 따라서 여기 필터 및 빔 스플리터의 광학 품질은 방출 필터 및 빔 스플리터의 광학 품질보다 비슷하거나 더 좋아야 한다. 대부분의 시스템에서는 투과 파면 왜곡 및 표면 편평도 사양이 여기필터 및 빔 스플리터에 대해 인치당 1파장 수준이다. 웨지사양도 마찬가지로 더 엄격한데, 필터 교환시 정렬을 최소화하기 위해 일반적으로 1분각 이하이다.

방출 광학계에서 대물렌즈와 검출기 사이에 위치한 구성 요소는 영상 화질용을 충족해야 한다. 그림의 예에서는 표시된 모든 방출 필터 및 빔 스플리터가 포함된다. 일부 시스템에서는 주 여기/방출 빔 스플리터 및 검출 장치 사이에 위치하게 되는 단일 구경을 사용할 수도 있다. 이 경우에는 검출 장치 내부의 필터에 대한 광학적 요구 사항이 덜 중요할 수도 있다.

공초점 형광 현미경에 대한 스펙트럼 요건

현미경의 조명 및 검출기에 따라서 고유의 스펙트럼이 요구된다. Nipkow 디스크 스캔 CFM의 조명 및 검출 시스템은 레이저 스캔 CFM의 조명 및 검출 시스템과 다르므로, 대부분이 이런 두 가지 범주 중 하나로 다시 분류될 수 있다.

Nipkow 디스크 스캔 CFM

(위에서 설명하고 그림 26에 나와 있는) 이 구성의 광원과 검출 시스템은 표준 광역 EFM의 경우와 동일하므로, 한 가지를 제외하면 스펙트럼 요건이

기본적으로 동일하다. 신호 강도가 감소되고 다른 광학 소자가 추가되기 때문에, 각각 바람직하지 않은 반사와 산란을 일으키는 여기 및 방출 필터 쌍의 혼선 수준이 매우 낮아야 한다.²³ 뿐만 아니라, 필터의 핀홀에 대한 품질 관리에 있어 더욱 각별한 주의가 필요하다.

레이저 스캔 CFM

(위에서 설명하고 **그림 27**에 나와 있는) 이 구성을 위한 필터와 빔 스플리터는 사용 중인 특정한 레이저에 대해 최적의 상태로 작동하도록 설계된다. 현재 가장 일반적인 레이저는 레이저 다이오드(LD)와 다이오드 펌프 고체(DPSS, diode-pumped solid state) 레이저를 포함한 고체 레이저이다. 현재 가시광선 스펙트럼 전체에 걸쳐 사용할 수 있는 레이저가 있으므로 선택의 폭이 넓다. 아르곤-이온 (**그림 22** 참조), 헬륨-네온, 아르곤-크립톤과 같은 종래의 레이저도 사용된다. 레이저와 함께 사용할 필터를 설계할 때는 다음 사항을 고려해야 한다.

1) 여기 필터의 차단 범위에 레이저의 전체 출력 스펙트럼이 포함되어야 한다. 기존의 레이저 광원은 800nm까지 차단하는 필터가 적합하지만, DPSS 레이저는 검출기의 감지할 수 있는 범위 내에 속할 수 있는 NIR 파장, 특히 1064nm에 잔류 출력이 있는 경우가 종종 발생한다. 레이저 여기 필터 설계에서 특별한 고려해야 할 사항은 필터에 작용하는 열 부하를 줄이기 위해 레이저용 여기 필터가 반사를 통해 최대한 많이 감쇠해야 한다는 점이다. 예를 들어 아르곤-이온 레이저용 UV 여기 필터는 대부분의 레이저 출력이 집중되는 가시광선 스펙트럼의 파란색~녹색 영역에서 반사율이 높아야 한다.

2) 대부분의 CFM에 사용되는 레이저는 편광되므로, 최적의 성능을 고려하여 빔 스플리터를 설계할 때 편광 조건에 대한 지식이 매우 유용하다. 예를 들어 **그림 9**의 이색성 빔 스플리터는 488nm 아르곤-이온 레이저 광선으로 S 평면 방향에서 사용하도록 최적화되어, 이를테면 500nm에서 통과시키는 형광 방출 대역의 처리량을 더욱 늘렸다. 여기광이 편광될 때도 형광 방출은 대부분 편광되지 않으므로, 빔 스플리터는 두 편광의 형광을 효율적으로 투과시켜야 한다. 편광 조건에 대한 지식은 방출 신호의 전달을 최대화하기 위해 반사 대역이 매우 좁은 다중 대역 다색성 빔 스플리터(multiple-band polychroicbeamsplitter)를 설계할 때 특히 유용하다.

3) 방출 필터는, 특정 필터와 함께 사용할 수도 있는, 모든 레이저 파장을 포함하여 단파장 쪽을 차단해야 한다. 탐침 신호 간의 선택성을 개선하기 위해 여러 탐침을 사용하는 응용 방법에서는 장파장 쪽을 차단하는 것이 좋다. 이때 차단범위는 검출기의 검출범위까지만 포함하면 된다. 어떤 PMT는 검출 범위가 700nm밖에 안 된다. (**그림 23**).

²³ 일부 시스템에서는 이 반사 효과를 줄이기 위해 편광 광학 장치를 활용한다.

표 3
여러 탐침을 사용하는 응용 사례를 위한 방법.

방법	구성 요소	장점	단점
1. 별개의 단일 대역 필터 세트.	표준 현미경.	추가 장비가 필요하지 않다. 가장 밝은 이미지.	동시에 영상을 촬영할 수 없다. 결합된 이미지의 영상이 부정확하다.
2. 다중 대역 필터 세트.	표준 현미경.	정합 오류 없이 동시에 시각적으로 관찰. (특수 필터 세트 외에는) 추가 장비가 필요하지 않다.	밝기가 줄어든다. 제논 아크 조명 사용 시에는 권장되지 않는다. 색 밸런스가 고정되어 있다.
3. 다중 대역 빔 스플리터 및 방출기(emitter), 단일 대역 여자기(exciter).	조명 경로에 필터 휠 또는 슬라이더가 있는 현미경. 사진 촬영 카메라 또는 이미지 처리 기능이 있는 전자식 카메라.	정합 오류 없이 순서에 따라 시각적으로 관찰. 결합된 이미지의 정확한 정합, 색 밸런스 조정 가능. 최적화된 여기 필터가 방법 2보다 더 밝은 이미지를 제공한다.	추가 장비(필터 휠 또는 슬라이더)가 필요하다.
4. 다중 대역 빔 스플리터, 단일 대역 방출 필터 및 여기 필터 단일 카메라.	조명 경로와 영상 촬영 경로에 모두 필터 휠 또는 슬라이더가 있는 현미경. 사진 촬영 카메라 또는 이미지 처리 기능이 있는 전자식 카메라.	여기 필터와 방출 필터의 밝기가 방법 1과 비슷하도록 설계할 수 있다. 정합 오류 감소 (빔 스플리터의 움직임을 제거하여 감소).	추가 장비(2개의 필터 휠 또는 슬라이더)가 필요함. 방출 필터 간의 정합 오류가 계속 존재할 수 있다.
5. 다중 대역 빔 스플리터, 단일 대역 방출 필터 및 여기 필터 다중 카메라.	조명 경로에 필터 휠 또는 슬라이더가 있는 현미경. 각 채널마다 별개의 방출 필터가 있는 여러 채널을 분리하기 위한 빔 스플리터 어셈블리.	방법 4의 이점 외에도 다음과 같은 이점이 있다. 방출 필터로 인한 정합 오류를 제거할 수 있다. 추가 응용 방법이 지원된다(예: 비율 이미지 생성).	빔 스플리터와 카메라가 추가로 필요하므로 장치가 더 복잡해진다.
6. 방법 4 및 5에서 다중 대역 빔 스플리터를 대체하는 중성 빔 스플리터.		여기 필터와 방출 필터의 유효한 조합은 어떤 것이든 사용할 수 있다.	밝기가 80% 감소할 수 있으므로, 특수 광원(예: 레이저 조명)을 사용하는 것이 권장됨.

다중 탐침 사용을 위한 필터

표준 현미경에서 별개의 필터 큐브를 사용하여 여러 가지 형광 색소로 착색된 표본의 다중 노출 사진을 촬영하거나 여러 가지 전자 이미지를 만들 때, 노출 간에 불가피한 정합 이동이 발생한다. 방출 필터 및 빔 스플리터에서 변화하는 웨지의 양, 빔 스플리터 두께 및 정렬의 변화, 큐브를 전환할 때 발생하는 기계적 진동이 모두 이런 정합 이동에 기여하는 요소이다. 어떤 응용 사례에서는 이런 효과를 허용 가능한 수준으로 줄일 수 있지만, 다른 많은 경우에는 더욱 정교한 필터 설계와 광학 기구가 필요하다.

표 3에 여러 가지 탐침을 사용하는 경우에 사용 가능한 방법이 몇 가지 나와 있다. 여기에는 그림 29에 나와 있듯이 앞서 소개한 다중 대역 필터 세트와 다중 대역 및 단일 대역 필터 구성 요소를 모두 활용하는 다양한 구성이 포함된다. 이 모든 방법은 앞에서 언급한 정합 오류를 제거하기 위해 고안된 것이다. 방법 2를 사용하면 최대 세 가지 색을 동시에 시각적으로 관찰할 수 있다. (필터 세트에 다중 대역 필터가 추가되어 있는 경우 방법 3~6을 통해서도 관찰할 수 있다.) 이 목록은 하나의 지침일 뿐, 가능한 모든 방법과 구성을 빠짐없이 수록한 것으로 간주해서는 안 된다.

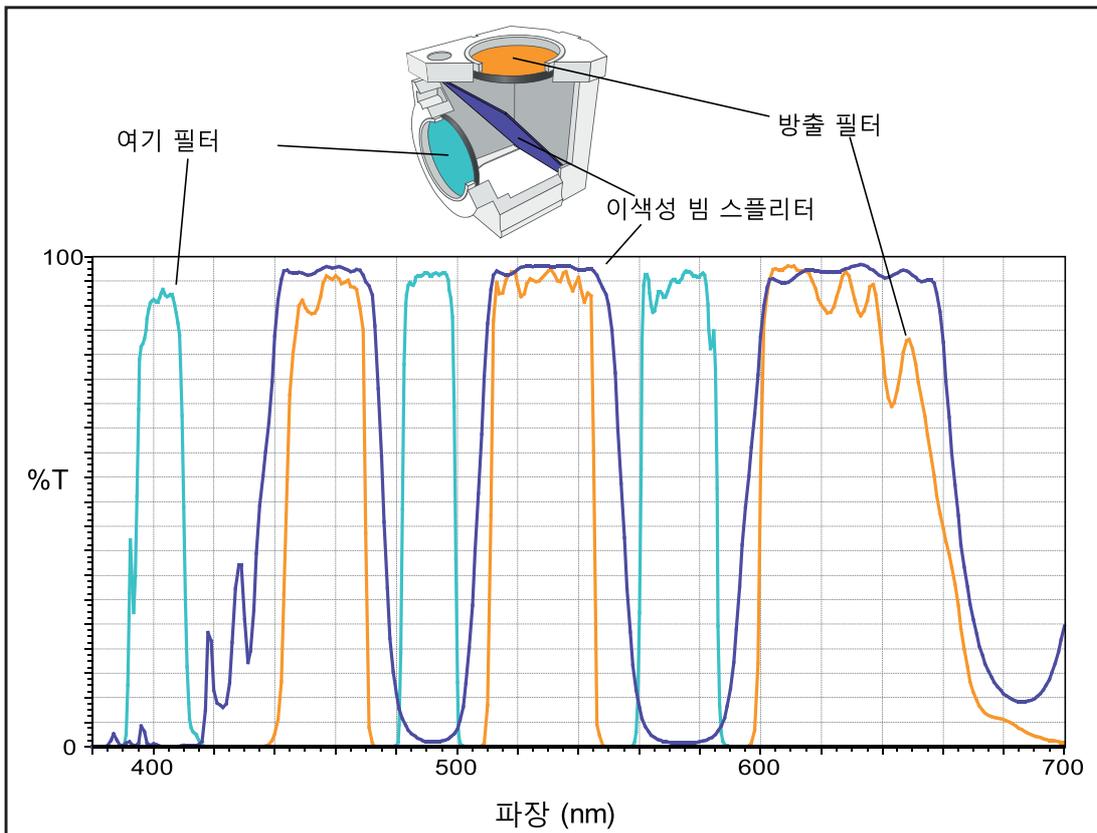


그림 29
DAPI, FITC 및 Texas Red® 염료용으로 설계된 삼중 대역 필터 세트의 스펙트럼.
(Chroma Technology Corp P/N 69002)

참고문헌

Abramowitz, M.(1993년) *Fluorescence Microscopy: The Essentials*. Olympus America, Inc.

Brimrose Corp., Baltimore, MD. *AOTF Spectroscopy*(1993년 3월 카탈로그).

Ealing Electro-optics(1992년) Product Guide, Holliston, MA.

Haugland, R.P.(1992년) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 5th ed. Molecular Probes, Eugene, OR.

Inoué, S.(1986년) *Video Microscopy*. Plenum Press, New York.

Kasten, F. H.(1989년) The origins of modern fluorescence microscopy and fluorescent probes. *Cell Structure and Function by Microspectrophotometry*(E. Kohen, J. G. Hirschberg(편)). Academic Press, San Diego, CA.

Lakowicz, J.(1983년) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York.

Schott Glasswerke. Mainz, Germany. *Optical Glass Filters*(카탈로그).

액정 가변 필터에 대한 참고문헌(p.13)

Cambridge Research and Instrumentation, Inc., Cambridge, MA. *Varispec Tunable Imaging Filter*(카탈로그).

Morris, Hannah R., Clifford C. Hoyt, Peter Miller, Patrik J. Treado(1996) Liquid crystal tunable filter Raman chemical imaging. *Applied Spectroscopy* **50**:806-808.

Hoyt, Clifford(1996년) Liquid crystal tunable filters clear the way for imaging multiprobe fluorescence. *Biophotonics International* **7 /8** .

용어 해설

참조 페이지 포함

음향 광학 가변 필터(Acousto-optical tunable filter, AOTF) (p. 12)

결정체에 라디오 주파수의 음향 진동을 설정하면, 그 결과 벌크 투과 회절 격자(bulk transmission diffraction grating)를 만드는 능동 결정 소자(active crystal device)이다. 주파수를 변화시킴으로써 빛의 파장 중 원하는 파장을 회절시켜 소자 밖으로 투과하도록 필터를 빠르게 조정할 수 있다.

입사각(Angle of incidence, AOI) (p. 9, 그림 9)

필터의 표면에 대한 입사광의 광학축과 이 표면에 수직인 축 사이의 각도이다.

각도 편차(Angular deviation) (p. 21)

시스템의 실제 광학축으로부터 벗어나는 광선의 방향 이동으로, 분각(1/60도) 또는 초각(1/60분각)과 같은 각도 단위로 측정한다.

구경 조리개(Aperture diaphragm) (p. 21)

조명 광학 장치에 위치하여 조명광의 개구수(numerical aperture)를 제어하고 조명광 밝기를 조절하는 조절 가능한 조리개이다.

감쇠 수준(Attenuation level) (p. 8, 그림 6)

차단 수준(blocking level이라고도 한다. 스펙트럼의 확장된 범위에 걸쳐 발생하는 광학 필터의 대역 외 감쇠의 척도이다. 감쇠 수준은 종종 광학 밀도(optical density) 단위로 정의된다 (광학 밀도 참조).

자가 형광(Autofluorescence) (p. 2)

형광 현미경 검사에서 검체로부터의 1차 형광, 유침 오일 및 기타 매질로부터의 형광, 현미경 내부 유리 광학 구성 요소로부터의 형광을 포함하여, 형광 색소 이외의 물질에서 발현되는 형광이다.

평균 투과율(Average transmission) (p. 8, 그림 6A)

전체 스펙트럼이 아니라 필터의 유용한 투과 영역을 대상으로 계산되는 투과율의 평균값이다. 대역 통과 필터의 경우 이 영역은 투과 대역의 FWHM에 걸쳐 있다.

배경(Background) (p. 4)

원하는 1차 또는 간접 형광 방출이 아니지만 검출 가능한 빛이다. 배경 광원으로는 자가 형광은 물론이고, 여기 및 방출 필터 사이의 혼선, 필터의 편광을 통해 누출되는 빛, 카메라의 전자 잡음이 포함된다.

대역 통과(Bandpass) (p. 8, 그림 6)

단파장 통과 및 장파장 차단이 명확히 정의된 광학 필터이다. 대역 통과 필터는 중심 파장과 대역폭으로 나타낸다.

대역폭(Bandwidth) (p. 8, 그림 6A)

FWHM(최대 투과의 절반에서의 전체 폭)이라고도 한다. 광학 대역 통과 필터의 경우, 일반적으로 피크 투과율의 50%에서 통과 파장과 차단 파장이 구분된다. 때로는 피크 투과율의 10%에서 대역폭이 지정된다.

여과 필터(Barrier filter)

방출 필터를 참조한다.

차단 수준(Blocking level)

감쇠 수준을 참조한다.

차단 범위(Blocking range) (p. 8, 그림 6B)

광학 필터가 지정된 감쇠 수준을 유지하는 파장의 범위이다.

차단재(Blocker) (p. 11, 그림 15)

필터에서 1차 코팅의 차단 범위를 확장하기 위해 대역 통과 간섭 필터에 포함되는 박막 간섭 코팅이다. 차단재는 보통 1차 필터의 대역에서 투과율이 높은 매우 넓은 대역의 대역 통과 필터이다.

명시야(Brightfield) (p. 6)

시야에 직접 조명이 되는 일종의 압시 조명(diascopic illumination)이다. 또한, 이런 종류의 조명에 사용되는 집광 조명 장치의 유형이기도 하다.

중심 파장(Center wavelength, CWL) (p. 8, 그림 6A)

광학 대역 통과 필터의 경우, 피크 투과율의 50%에서 통과 파장과 차단 파장의 산술 평균이다.

유효 구경(Clear aperture) (p. 21)

광학 필터에서 어떤 결함도 없고 가려지지 않은 표면 영역이다. 간섭 필터에서는 유효 구경의 경계가 종종 고리 형태의 금속 또는 불투명 소재에 의해 정해진다.

임계 조명(Critical illumination) (p. 26)

Köhler 조명 광학 장치와는 대조적으로, 광원의 상(image)이 시료 평면 위에 형성되는 조명 광학 장치의 일종이다. Köhler 조명도 참조한다.

혼선(Cross-talk) (p. 9, 그림 7)

직렬로 함께 배치되는 두 필터의 최소 감쇠 수준(지정된 파장 범위에 걸쳐)이다. 혼선 평가에 때때로 빔 스플리터의 투과 스펙트럼이 포함된다.

암시야(Darkfield) (p. 6)

대물렌즈로 직접 반사되어 들어가지 않을 각도로 시료를 비스듬히 비추는 일종의 암시 조명(diascopic illumination)이다. 또한, 이런 종류의 조명에 사용되는 집광 조명 장치의 유형이기도 하다.

암시 조명(Diascopic illumination) (p. 6)

빛의 초점을 맞추기 위해 집광 렌즈를 사용하여 시료를 통해 투과되는 빛을 이용한 조명이다.

이색성 빔 스플리터(Dichroic beamsplitter) (p. 5, 7 각주, 그림 4)

이색성 거울(dichroic mirror), 2색성 빔 스플리터(dichromatic beamsplitter)라고도 한다. 필터 큐브 안에 들어 있는 특수 거울로서, 선택적으로 여기 필터에 의해 필터링된 여기광을 반사하고 방출되는 형광을 투과시킨다. 파장을 기준으로 빛을 분할하거나 결합할 필요가 있는 현미경 시스템의 다른 부분에서도 이색성 빔 스플리터를 찾아볼 수 있다.

에지 필터(Edge filter) (p 8)

단파장(shortpass) 투과 또는 장파장(longpass) 투과 광학 필터를 지칭하는 또 다른 용어이다. 이 용어는 보통 매우 급격한 통과 또는 차단 특성을 지닌 필터를 나타낸다.

방출 필터(Emission filter) (p. 5, 그림 4)

여과 필터(barrier filter) 또는 이미터(emitter)라고도 한다. 여기 필터에서 투과되는 모든 빛을 감쇠하고 시료에서 방출되는 모든 형광을 매우 효율적으로 투과시키는 색 필터이다.

이미터(Emitter)

방출 필터를 참조한다.

형광 현미경(Epifluorescence microscope) (p. 4)

검체로 반사되는 빛을 이용하여 검체를 조명하는 형광 현미경이다.

반사 조명(Episcopic illumination) (p. 7)

입사광 조명(incident-light illumination)이라고도 한다. 검체를 통해 투과되는 것이 아니라 검체로 반사되는 빛을 이용한 조명이다. 조명 불빛이 부분적인 반사성 또는 이색성을 가진 빔 스플리터에 의해 대물렌즈를 통해 반사된다.

여기 및 발광(Excitation, emission) (p. 2)

형광을 참조한다.

여기 필터(Excitation filter) (p. 5, 그림 4)

여자기(Exciter)라고도 한다. 특정 염료를 효율적으로 여기시키는 조명광의 파장만 투과시키는 색 필터이다. 방출 필터를 참조한다.

여자기(Exciter)

여기 필터를 참조한다.

흡광 계수(Extinction coefficient) (p. 3)

형광 색소의 흡수 특성을 나타내는 척도이다.

퇴색(Fading)

광표백을 참조한다.

시야 조리개(Field diaphragm) (p. 21)

조명 광학 장치에 있는 조절 가능한 조리개로서, 검체에 비치는 조명 영역을 조절한다.

필터 블록(Filter block)

필터 큐브를 참조한다.

필터 큐브(Filter cube) (p. 5, 그림 4)

정합되는 형광 필터 세트를 고정하는 큐브 형태의 탈착식 장치이다. 이 세트에는 보통 여기 필터와 방출 필터가 포함되며, 이색성 빔 스플리터가 반드시 포함된다.

유리 필터(Filter glass) (p. 10)

흡수 유리(Absorption glass)라고도 한다. 기술 및 과학용으로 생산되는 색유리이다. 형광 현미경 검사에서 가장 흔히 사용되는 종류의 필터 유리는 자외선 투과 "검은색 유리" 필터, 적외선 흡수 열 필터, 그리고 노란색, 주황색, 빨간색의 샤프 컷 장파장 투과 필터이다. 유리 필터는 흡수를 통해 빛을 선택적으로 감쇠시키므로, 스펙트럼 성능은 유리의 두께에 따라 결정된다.

형광(Fluorescence) (p. 2)

어떤 물질이 빛을 흡수한 다음, 흡수한 에너지 중 일부를 에너지가 더 낮아 파장이 더 긴 다른 색의 빛으로 방출하는 분자 현상이다. 이 과정은 여기 및 방출로 알려져 있다. 형광은 여기 및 방출 과정이 거의 즉각적으로(즉, 나노초 단위의 짧은 시간 내에) 발생한다는 점에서 다른 유형의 발광 현상과 구별할 수 있다.

형광 탐침(Fluorescent probe) (p. 2)

형광단(Fluorophore)이라고도 한다. 시료 내 표적 물질을 선택적으로 착색하기 위해 단백질, 항체 또는 핵산과 같은 활성 물질에 공액 결합된 형광 색소이다.

형광 색소(Fluorochrome) (p. 2)

시료 착색제로 직접 사용되거나 활성 물질에 공액 결합되어 형광 탐침을 만드는 형광 염료이다.

형광단(Fluorophore)

형광 탐침을 참조한다.

전면(Front surface) (p. 19)

빔 스플리터의 면 중에서 입사광 쪽을 향하도록 설계된 면이다. 필터 큐브에서는 광원과 시료 쪽을 모두 향하는 면이 전면이다. 일반적으로 빔 스플리터는 올바른 방향으로 설치되어 있을 때 더 나은 성능을 발휘한다.

FWHM

대역폭(Bandwidth)을 참조한다.

반원추각(Half-cone angle) (p. 9)

수렴 또는 발산 광선의 가장 비스듬한 사광선(oblique ray)과 광선의 광축 사이의 각도이다. 또한 개구수(Numerical aperture)를 참조한다.

열 필터(Heat filter) (p. 6)

적외선은 감쇠시키지만 가시광선은 투과시키는 광학 필터이다. 감쇠는 흡수(유리 필터 사용), 반사(흔히 핫 미러hot mirror)라고 하는 박막 간섭 코팅 사용) 또는 이들의 조합에 의해 이루어진다.

핫 미러(Hot mirror)

열 필터를 참조한다.

간접 형광(Indirect fluorescence) (p. 2)

2차 형광이라고도 한다. 형광 현미경법에서, 시료에 착색제 또는 탐침으로 사용되는 형광 색소에 의해 방출되는 형광이다. 1D

형광(Primary fluorescence)을 참조한다.

무한 초점 광학계(Infinity-corrected optics) (p. 22)

대물렌즈가 무한대에서 이미지를 형성하고 2차 튜브 렌즈가 중간 이미지 평면에서 이미지를 형성하는 일부 현미경에서 채택되는 광학적 구성이다. (이 중간 이미지는 다시 접안렌즈에 의해 초점이 잡힌다.) 이 구성은 현미경의 결상 특성에 영향을 미치지 않고 대물렌즈와 튜브 렌즈 사이의 거리를 바꿀 수 있기 때문에 대물렌즈와 접안렌즈 사이의 거리를 유연하게 조정할 수 있도록 하기 위한 것이다. 무한 초점 광학계용으로 설계된 대물렌즈를 표준 튜브 길이 광학 장치용으로 설계된 대물렌즈로 교환하여 사용할 수는 없다.

간섭 필터(Interference filter)

박막 간섭 코팅을 참조한다.

Köhler 조명(Köhler illumination) (pp. 21)

보통 광역 형광 현미경에 사용되는 유형의 조명 광학 장치로서, 광원의 이미지가 시료 평면에서 완전히 초점을 잃는다.

장파장 투과(Longpass, LP) (p. 8)

스펙트럼의 활성 범위에 걸쳐 짧은 파장은 감소시키고 긴 파장은 투과시키는 광학 필터이다(특정 용도에 따라 다름). LP 필터는 피크 투과율의 50%에서의 통과 파장으로 나타낸다.

휘도(Luminance)

복사 조도(Radiance)를 참조한다.

나노미터(Nanometer, nm) (p. 2)

빛의 파장을 측정하는 데 흔히 사용되는 길이 단위로서, $1\text{nm} = 10\text{angstroms}(\text{Å}) = 10^{-9}\text{m}$, $1,000\text{nm} = 1\text{micron}(\mu) = 10^{-6}\text{m}$ 이다.

근적외선(Near-infrared, NIR) (p. 3)

약 750 - 2,500nm 파장 범위의 전자기 스펙트럼 영역이다.

ND(Neutral-density) 필터(p. 6)

필터의 유효 측정 범위 내에서 파장과는 무관한 양만큼 빛을 감소시키는 광학 필터이다. 금속 코팅 필터는 일반적으로 유리 필터(filter glass)보다 중립 범위가 더 넓고 열에 더 강하다.

수직 입사(Normal incidence) (p. 9)

0도의 입사각이다.

개구수(Numerical aperture, NA) (p. 7, 19)

현미경에서 시료 위에 초점이 형성되는 빛(집광 렌즈의 NA) 또는 대물렌즈에 의해 포착되는 빛(대물렌즈의 NA)의 유효 원추각을 나타내는 척도이다. NA 값이 높으면 이미지의 밝기와 해상도가 모두 향상된다. ($NA = N \sin(\theta)$, 여기서 N은 시료 주위 매질의 굴절률이고 θ 는 빛의 반원추각임)

광학 밀도(Optical density, OD) (p. 8)

투과율의 대수 단위로서 $OD = -\log_{10}(T)$ 이며, 여기서 T는 투과율이다($0 \leq T \leq 1$).

평행성(Parallelism)

웨지를 참조한다.

광표백(Photobleaching) (p. 3)

퇴색(Fading)이라고도 한다. 시간이 흐르면서 형광 강도가 감소하는 원인이 되는 광화학적 반응이다.

핀홀(Pinhole) (p. 21)

간섭 필터의 코팅에 생기는 작은 손상 부위로, 보통 코팅 중에 기판에 먼지 입자가 있어 발생하게 된다.

편광(Polarization) (p. 9)

진행하는 빛에 의해 발생하는 전자기장 진동의 방향과 위상 제한. 이런 진동은 빛의 진행 방향에 대해 수직인 방향이고, 진행축을 따라 어떤 각도를 이루어 방향을 가질 수 있다. 진동의 방향과 위상이 임의의 주기로 빠르게 변할 때는 빛이 편광되지 않은 상태라고 한다. 진동이 오랜 시간 동안 한 가지 특정한 방향으로 제한될 때는 빛이 *평면 편광(plane polarization)*된 상태라고 한다. 빛은 전부 평면 편광될 뿐만 아니라 부분적으로 평면 편광될 수도 있다. 진동의 상대 위상이 오랜 시간에 걸쳐 일정한 주기로 각도가 변할 때는 빛이 *타원 편광(elliptically polarized)*된 상태라고 한다. *원형 편광(Circular polarization)*은 진동의 진폭이 모든 각도에 대해 똑같은 특별한 경우이다. 빛이 타원 편광되면 진동의 방향이 빛의 진동수에서 진행축 주위로 회전한다.

빛이 수직 입사가 아닌 입사각으로 반사면에 부딪히면 표면의 입사면(P 평면)에 평행한 전기장 진동의 성분이 입사면(S 평면)에 수직인 성분과 다른 거동을 보인다. 이로 인해 표면 방향에 직각으로 정렬되는 편광 효과가 발생한다.

다색성(Polychroic) (p. 27)

여러 개의 반사 대역과 투과 영역을 가진 이색성 빔 스플리터의 명칭이다.

P 평면(P-plane)

편광을 참조한다.

1차 형광(Primary fluorescence) (p. 2)

형광 현미경 검사에서, 시료에 있는 임의의 형광 색소에서 방출되는 것이 아니라 시료 자체의 형광 방출을 의미한다. 자가 형광을 참조한다.

양자 효율(Quantum efficiency) (p. 3)

형광 색소가 흡수된 방사선을 얼마나 효율적으로 방출 형광으로 전환하는지를 나타내는 척도이다.

소광(Quenching) (p. 4)

실시간으로 형광 색소의 양자 효율을 줄이는 화학 처리 과정이다.

복사 조도(Radiance) (p. 15)

광원의 발광에 대한 밝기의 척도이다. 기술적으로, 복사 조도는 광원의 단위 면적에서 단위 입체각당 방출되는 복사속(radiant flux)이다. 공통 단위는 W/sr.cm²이다. 휘도(Luminance)는 사람의 눈으로 인지되는 광원의 밝기를 나타내는 척도로(즉, 광도 측정의 척도), 일반적으로 cd/cm²의 단위로 측정한다.

정합 이동(Registration shift) (p. 22)

광학 소자를 삽입 또는 제거하거나, 조정하거나, 다른 소자와 교환할 때 발생하는 시료 겹보기 위치의 이동이다.

긁힘/패임(Scratch/dig) (p. 21)

광학 표면에서 긁힘 및 패임 자국의 허용 가능한 최대 크기와 개수를 정의하기 위한 일련의 사양이다. 긁힘/패임(scratch/dig) 값(예: 80/50)은 각각 긁힘 자국의 폭(단위: micron)과 패임 자국의 직경(단위: 10micron)을 의미한다. 엄격한 기준을 유지해야 할 경우 광범위한 평가 절차가 존재하지만(예: 군사 규격 MIL-F-48616), 보통은 긁힘 및 패임 결함을 정량적인 시각적 평가로 확인하는 것으로 충분하다.

2차 형광(Secondary fluorescence) (p. 6)

간접 형광을 참조한다.

단파장 투과(Shortpass, SP) (p. 8)

스펙트럼의 활성 범위에 걸쳐 긴 파장은 감쇠시키고 짧은 파장은 투과시키는 광학 필터이다(특정 용도에 따라 다름). SP 필터는 피크 투과율의 50%에서의 차단 파장으로 나타낸다.

신호 대 잡음(Signal-to-noise, S/N) (p. 14)

배경의 밝기(잡음)에 대해 원하는 형광의 밝기(신호) 비율을 나타내는 척도이다.

기울기(Slope) (p. 9)

투과 영역에서 색 필터의 차단 영역으로 전이하는 선예도의 척도이다.

분광 형광계(Spectrofluorimeter) (p. 2)

형광 물질의 여기 및 발광 스펙트럼을 측정하는 데 사용되는 기기이다.

S 평면(S-plane)

편광을 참조한다.

표준 튜브 길이 광학계(Standard tube-length optics) (p. 22)

대물렌즈가 중간 이미지 평면에서 이미지를 형성하는 대부분의 현미경에서 채택되는 광학적 구성이다. (이 중간 이미지는 다시 접안렌즈에 의해 초점이 잡힌다.) 대물렌즈를 고정하는 대물렌즈대와 접안렌즈를 고정하는 경동 사이의 거리가 160mm의 표준 길이로 고정되므로, 현미경 간에 대물렌즈를 교환해서 사용할 수 있다. 무한 초점 광학계를 참조한다.

스토크스 이동(Stokes shift) (p. 3)

형광 색소의 피크 여기 강도와 피크 방출 강도 사이의 파장 이동을 의미한다.

서브픽셀 정합(Sub-Pixel Registration, SPR) (p. 24)

필터 또는 필터 큐브를 교체할 때 이미지 정합의 변화를 없애주는 수준의 정밀도로 생산되는 필터 세트를 설명하는 데 사용되는 용어이다.

기판(Substrate) (p. 5)

빔 스플리터 코팅의 기초로 사용되는 연마된 유리 조각이다.

표면 편평도(Surface flatness) (p. 20)

완벽한 평면에서 광학 소자의 표면 편차를 측정된 것으로, 가시광선 파장(보통 550nm 또는 630nm)의 분수 또는 배수로 측정된다.

TE 모드(TE-mode)

S 평면 편광에 대한 또 다른 용어이다. (“Transverse-electric” 모드를 축약한 것임) 편광을 참조한다.

박막 간섭 코팅(Thin-film interference coating) (p. 11)

미시적 수준으로 얇은 소재 층을 쌓은 적층으로 구성되는 광학 코팅의 한 종류이다. 각 소재는 본질적으로 무색이지만, 소재의 층 사이에 있는 각 경계면에서 반사되는 빛이 파동 간섭 현상을 통해 결합되어 빛의 파장 중 일부를 선택적으로 반사하고 나머지는 투과시킨다. 박막 간섭 코팅은 간섭 필터의 주요 구성 요소로서 하나 이상의 코팅된 유리판과 유리 필터(filter glass)로 구성된다.

TM 모드(TM-mode)

P 평면 편광에 대한 또 다른 용어이다. (“transverse-magnetic”) 모드를 축약한 것임) 편광을 참조한다.

투과 파면 왜곡(Transmitted wavefront distortion, TWD) (p. 20)

광학 소자를 통해 투과될 때 빛의 평면파가 겪는 왜곡의 척도로, 가시광선 파장(보통 550nm 또는 630nm)의 분수 또는 배수로 측정한다.

자외선(Ultraviolet, UV) (p. 3, 그림 2)

약 100 - 400nm 파장 범위의 전자기 스펙트럼 영역이다. 1) 근자외선(320 - 400nm), 2) 중간 자외선(190 - 320nm), 3) 진공 자외선(VUV, 190nm 미만)의 세 대역으로 분명히 구분된다. UV-A 및 UV-B라는 용어는 구분되는 생리적 효과를 가진 대역, 즉 각각 320 - 380nm와 280 - 320nm의 대역을 나타낸다.

웨지(Wedge) (p. 20)

평행성(Parallelism)이라고도 한다. 광학 소자의 외부 표면 간에 완벽한 평행성에서 벗어난 정도의 척도로서, 보통 분각 또는 분초의 각도로 측정된다.

광역(Wide-field) (p. 21)

공초점 형광 현미경과는 대조적으로, 전체 시야가 조명되는 형광 현미경이다. 명시야(*brightfield*)라는 용어도 사용되지만, 이는 기존의 압시 명시야 조명(*diascopic brightfield illumination*)과 혼동을 일으킬 수 있다.