

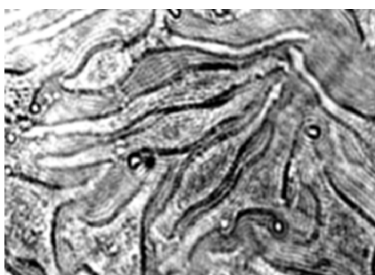
디지털 홀로그래픽 현미경을 이용한 생체세포 이미징 시스템 구현

Biological Cell Imaging system by Using Digital Holographic Microscope

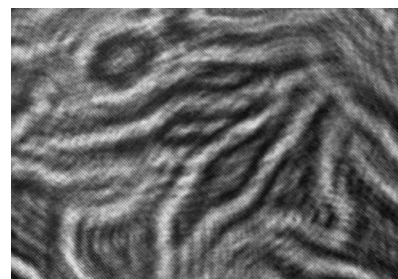
배윤성, W.Z. Yang, 김덕영
광주과학기술원, 정보기전공학부
bys@gist.ac.kr

디지털 홀로그래픽 현미경(Digital Holographic Microscope)은 대물렌즈를 통해 확대된 샘플의 홀로그램을 CCD로 획득하여, 컴퓨터 연산을 거쳐 필요한 영상을 재생해 낸다⁽¹⁾. 홀로그래피는 빛의 진폭(amplitude)과 함께 위상(phase) 정보도 획득이 가능하다. 일반적으로 생체 세포는 내부기관들의 낮은 굴절율 차이로 인해 고전적인 광학현미경으로는 관찰이 쉽지 않지만, 디지털 홀로그래픽 현미경을 이용하면 세포에 의해 발생하는 빛의 위상변화를 얻어냄으로써 높은 명암대비를 가지는 이미지로 영상화시킬 수 있다. 컴퓨터 연산을 거쳐 샘플의 위상을 추출하기 때문에 세포 두께 및 굴절율에 대한 측정이 가능하며, 단 한 장의 홀로그램만으로 세포관찰에 필요한 다양한 형태의 정량적인 이미지를 만들어 낼 수 있다. 또한 수차 보정 알고리즘을 통해 광학 시스템에서 발생할 수 있는 수차를 보정해 줄 수도 있다.⁽²⁾

본 논문은 투과형 off-axis 디지털 홀로그래픽 현미경을 이용하여, 생체 세포의 위상영상을 추출해 RBL-2H3(Rat Basophilic Leukemia) 세포를 관찰하였다. 본 실험에서는 셋업은 마하젠더형 간섭계를 기본으로 하여 632.8nm의 He-Ne 레이저가 광원으로 사용되었으며, 기준광(reference light)과 시료광(sample light)의 간섭으로 만들어진 홀로그램은 640×480 pixel의 CCD를 이용하여 획득하였다. 획득된 홀로그램에서 위상정보를 추출하기 위한 알고리즘으로는 콘볼루션 방식을 사용하였으며, 이것은 높은 정확도를 가지며, 복원 거리에 따라 재생된 이미지의 해상도가 변하지 않는 장점이 있다⁽³⁾.



(a)



(b)

그림 3.(a) RBL-2H3 세포의 명시야 현미경(Bright field microscope) 이미지
(b) RBL-2H3 세포의 홀로그램

그림 1.(a)는 40× 배율의 대물렌즈를 사용하여 얻어진 RBL 세포의 명시야(Bright Field) 이미지로써 세포의 형태만 보일 뿐이다. 그림 1.(b)는 RBL-2H3 세포의 홀로그램으로 초점면(focal plane)을 벗어난 곳에서 얻어진 세포의 이미지와 간섭무늬가 중첩되어진 형태이다. 그림 2.(a)는 홀로그램영상을 이용하여 얻은 RBL-2H3 세포의 음위상차(negative phase-contrast) 이미지이며, 세포핵 부분이 높은 위상을 가지며 밝게 나타난다. 음위상차영상으로부터 세포주위용액과 세포핵과의 위상차이는 4.5rad으로 측정되었다. RBL-2H3 세포는 평균 굴절율이 1.4, 세포주위 용액은 굴절율이 1.33으로 계산된 RBL-2H3 세포의 두께는 6.5 μ m이다. 그림 2.(b)는 양위상차(positive phase-contrast) 이미지이며, 세포 굴절율이 외부 용액의 굴절율보다 높을 때 세포가 어둡게 나타나게 된다. 그림 2.(c)는 간단한 알고리즘을 통하여 홀로그램에서 얻어진 위상정보를 DIC(differential interference contrast)형태의 이미지로 변환시킨 RBL-2H3의 영상이다.

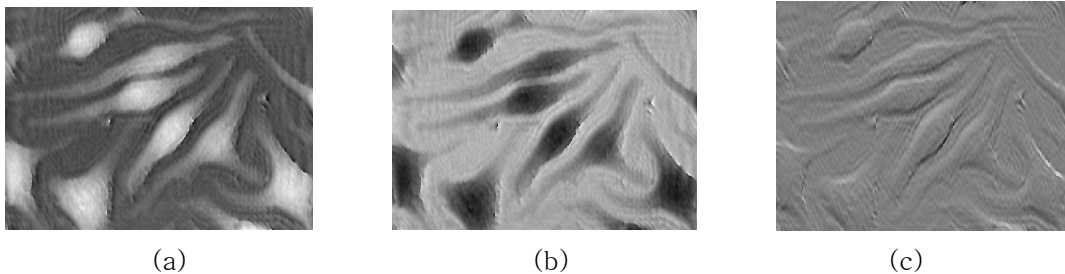


그림 2.(a) negative phase-contrast image, (b) positive phase contrast image
(c) DIC(difference interference contrast) image

본 논문에서는 투과형 off-axis 홀로그래픽 현미경을 이용하여 RBL-2H3 세포의 다양한 영상을 얻었으며 이를 이용하여 세포의 두께를 측정하였다. 디지털 홀로그래픽 현미경은 샘플을 통과하는 빛의 위상 변화를 얻어낼 수 있어서, 낮은 굴절율의 샘플을 영상화하기에 적합하여 다양한 생체세포에 대한 응용을 기대할 수 있다.

Acknowledgment

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

참고문헌

1. Cuhe E, Marquet P and Depeursinge "Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms "Appl. Opt. 38, 6994-7001(1999)
2. Christopher J. Mann ,Lingfeng Yu, Chun-Min Lo, and Myung K. Kim "High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography", Opt. Express 13, 22(2005)
- 3.Ulf Schnars and Werner P O Jüptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms",Meas. Sci. Technol. 13 (2002) R85--R101