

# 3 파장 광원을 이용한 생물 시편의 동특성 분석에 관한 기초 연구

## Fundamental research for dynamics of biological samples using three wavelength of light

\*이 협, 류성윤, 이광천, #김수현

\*H. Lee, S. Y. Ryu, Ch. K. Lee, # S. H. Kim(soohyun@kaist.ac.kr)  
한국과학기술원 기계공학과

Key words : phase object, osmotic phenomenon, refractive index, dynamics, biological sample

### 1. 서론

광학적으로는 투명하나 굴절률이 일정하지 않은 대표적인 측정 대상은 살아있는 생물의 세포였다. 살아있는 세포는 투명하여 일반적인 광학 현미경으로는 측정이 어려웠다. Zernike는 phase contrast microscopy를 고안하여 이러한 샘플의 측정을 가능하게 한 공로로 1953년에 노벨 물리학상을 수상하였다. 이후 많은 연구가 이루어져 phase contrast microscopy는 생물학 분야에서 표준적인 측정 방법으로 자리매김 하게 된다. phase object(위상물체)란 amplitude object에 대응되는 개념으로, 빛의 amplitude에는 거의 영향을 주지 않고 phase만을 변화시키는 물체를 말한다. 대부분 투명하여 빛을 투과 시키는 성질을 가진다. 생물체를 구성하는 세포, 광학 장비에 들어가는 렌즈, 광섬유 등을 그 예로 들 수 있다. phase object는 광학적으로 투명하지만, 굴절률은 일정하지 않다.[1] phase contrast 현미경은 이러한 phase object의 굴절률 분포를 2차원에서 뚜렷하게 관찰할 수 있는 유용한 방법이다.

정량적(quantitative) phase 측정 방법은 phase shifting interferometry의 원리를 이용하는 것으로 phase contrast 이미지만을 얻고 정량적인 phase 값을 알지 못하는 phase contrast microscopy와 달리 정량적인 phase 값을 얻을 수 있다.

일반적으로 시편의 phase 분포는 완전히 균일(homogeneous)하다고 할 수 없다. 대부분의 시편에서 Phase는 굴절률, 복굴절, 밀도 등의 물성치와 직접적으로 연관되어 있기 때문에 적혈구나 뉴런(neuron)의 형상(morphology), 운동성(dynamics), 상호작용(interaction)등의 연구에 필수적이다.[2,3]

본 연구는 광학적으로 투명한 위상 물체(phase object)의 한 종류인 생물 시편에 대해 변수 분리 알고리즘을 이용하여 위상맵으로부터 굴절률과 두께에 대한 정보를 2차원적으로 측정하는 실험에 대한 것이다. 3 파장 광원을 이용하여 위상 물체의 굴절률과 두께를 동시에 분리하여 양과 세포의 삼투압 현상에 대해서 실시간으로 volume의 변화를 측정하고자 한다.

### 2. 삼투압 현상

삼투(osmosis)는 반투과성 막을 통해서 용매분자들이 이동하는 것을 포함하는 특별한 확산현상이다. 물 분자는 막을 자유로이 투과할 수 있으나 용질은 자유로이 투과하지 못하므로 순수한 물 분자의 이동은 용질의 농도가 낮은 쪽에서 높은 쪽으로 일어난다. 생물체에서 용매는 물이다. 따라서 삼투란 높은 농도에서 낮은 농도로 반투과성막을 통한 물의 확산이라고 할 수 있다. 여기서의 농도란 용매에 용해되어 있는 이온이나 분자의 농도가 아니고 용매 그 자체를 의미한다. 살아있는 세포에는 삼투압을 일으킬 수 있는 많은 용질이 용해되어 있으므로 세포를 같은 삼투압을 가진 용액에 넣으면 수축도 팽창도 하지 않는다. 이러한 용액을 세포내 용액 혹은 등장액(isotonic solution)이라 한다. 어떤 용액이 세포내 용액보다 높은 농도의 용질이 용액을 포함하고 있다면 이 용액은 세포보다 삼투압이 높

으며 고장액(hypertonic solution)이다. 식물의 경우, 고장액에 세포를 넣으면 용매를 잃기 때문에 원형질이 수축되어 세포벽으로부터 떨어진다. 이러한 현상을 원형질 분리(plasmolysis)라고 한다. 원형질 분리가 일어난 세포를 다시 농도가 낮은 세포에 넣으면 원형질이 원상으로 복귀되는데, 이를 원형질 복귀(deplasmolysis)라고 한다. 또한 어떤 용액이 세포내 용액보다 낮은 농도를 포함하고 있다면, 그 용액은 세포보다 삼투압이 낮으며 저장액(hypotonic solution)이라고 한다. 그림 1은 양과 표피세포의 삼투에 의해 나타나는 현상을 저장액, 등장액, 고장액에서 관찰한 결과이다.

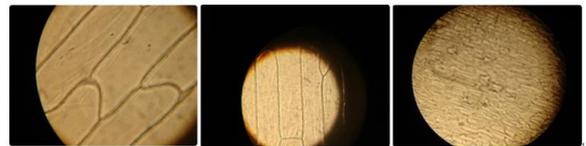


Fig. 1 Osmotic phenomenon of onion cell

### 3. 실험 구성

본 연구에서는 바이오 샘플에 적용하기 위해서 그림 1과 같이 4 배율 objective lens를 추가하여 Mach-Zehnder interferometer을 구성하였다. 3 파장 광원을 이용하여 먼저 각 파장에 대한 위상 지연을 주어 4 frame을 얻고, 4-bucket algorithm을 이용하여 위상맵을 구성하였다. 구성된 위상맵으로부터 굴절률 분포 맵과 두께 분포 맵을 구한다.

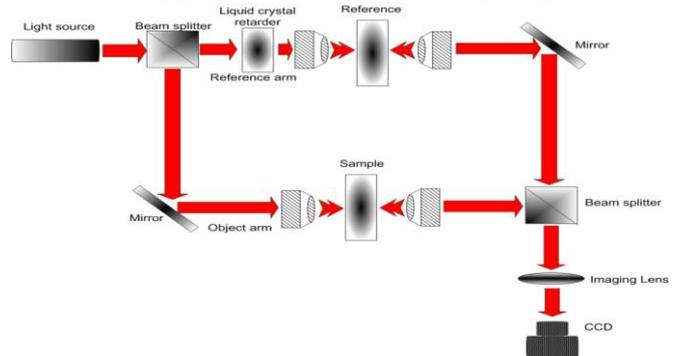


Fig. 2 Configuration of Mach-Zehnder interferometer

실험을 위하여 먼저 양과의 표피를 벗겨내고, 벗겨진 표피 세포를 slide glass 위에 부착시킨다. 이는 양과의 표피 세포와 slide glass의 표면 장력에 의해서 부착이 된다. 양과의 표피 세포가 부착된 slide glass를 증류수가 담겨 있는 chamber 안에 위치 시키고 일정 시간 간격으로 3 파장 광원을 이용하여 phase map를 구성한다. 구성된 phase map로부터 두께와 굴절률 분포에 대한 2차원 맵을 구성한다.

### 4. 실험 결과

그림 3은 그림 2의 시스템을 이용하여 기준 신호를 차단하고 샘플 신호를 CCD 상에서 추출한 것이다.

본 연구에서는 CCD의 전 면적이 아니라 일정한 영역에서의 굴절률과 두께 분포에 대한 정보를 얻고자 한다. 그림 3의 일정 영역에 대해서 본 연구에서 제안한 알고리

증을 일정한 시간 간격 (0 분, 5 분, 10 분)에 대해서 측정하고 삼투압 결과에 대해서 분석 하였다.

그림 5 는 측정된 위상 맵으로부터 두께정보와 굴절률 정보를 분리하여 측정한 결과이다. 실험은 저장액인 증류수에 양파의 표피세포를 시간이 지남에 따라 두께와 굴절률 분포가 어떻게 달라지는지 측정하였으며, 시간에 대한 측정결과는 그림을 통해 확인할 수 있다. 그리고 굴절률은 대략 1.332 에서 1.3340 사이에 분포하고 있으며, 두께 정보에서 세포벽이 다른 부분에 비해서 크다는 것을 확인하였다.

그리고 측정된 삼투압 실험에 대해서 어느 정도의 변화가 생기는지 확인하기 위해서 AA section 에 대해서 시간의 변화에 따라 비교를 하면 그림 4 와 같다. 다른 부분보다 높은 부분은 세포벽을 나타낸다. 식물세포이기 때문에 세포벽의 lateral 방향에 대한 변화는 거의 없고, 높이 방향에 대한 변화가 존재한다. 또한 세포막 내의 경우에 저장액속에 잠겨 있으며, 저장액인 증류수로부터 고장액인 세포막으로 삼투현상이 발생한다. 시간에 대한 변화를 보면, 삼투현상에 의해서 현미경 이미지로는 어느 정도 발생하는지 확인할 수 없지만, 변수 분리 알고리즘을 이용할 경우에 세포막의 높이 변화가 발생함을 알 수 있다. 본 연구에서는 삼투현상에 대한 실험을 수행하였지만, 다른 생체 시편의 동특성 역시 3 파장 광원을 이용하여 위상 물체의 굴절률과 두께를 동시 분리하는 방법을 사용하면 측정 가능할 것이라 예상한다.

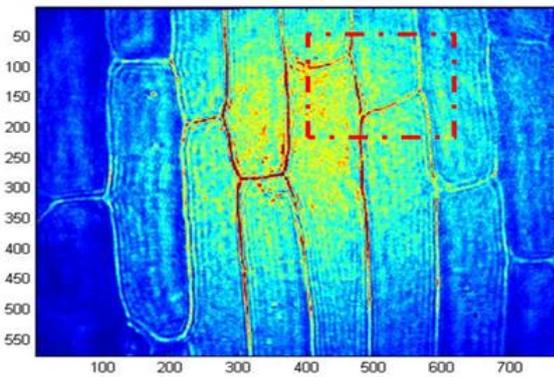


Fig. 3 Image of onion cell

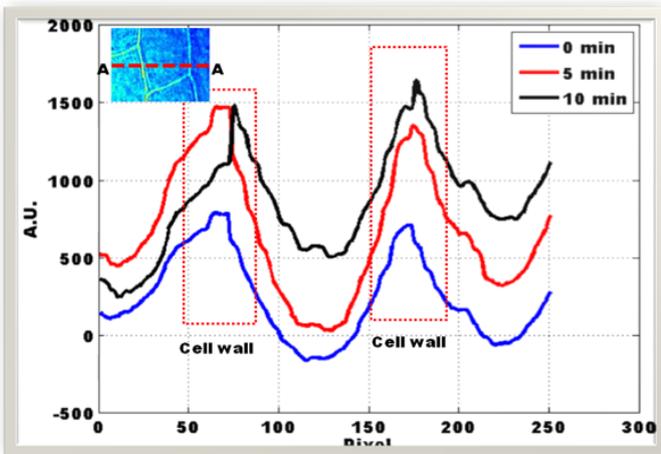


Fig. 4 Thickness change of onion cell

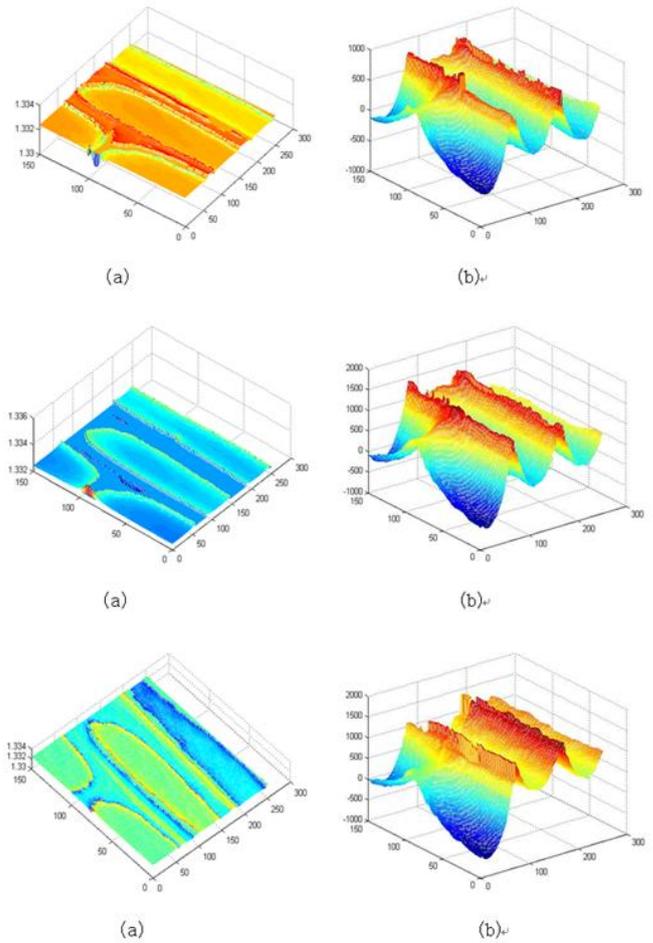


Fig. 5 (a) Refractive index distribution (b) Thickness distribution (0, 5, 10 min from up to down)

### 참고문헌

1. Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung, F.Zernike, Z. Tech. Phys., 16, pp. 454-457, 1935
2. Gabriel Popescu, et. al., "Optical Measurement of Cell Membrane Tension," PRL 97, 218101, Physical Review Letters, 2006
3. H. N. Ritland, "Relation between refractive index and density of a glass at constant temperature," Vol. 38, No.2, Journal of the American Ceramic Society, 1954