

Chapter 8. 현미경의 종류, 구조와 사용법

식물체의 형태를 확인하는데 있어서 육안이나 확대경으로만 관찰하는 것은 한계가 있어 보다 자세한 구조를 파악하기 위해 사용된 것이 현미경이다.

현미경은 1665년 Robert Hook가 처음 사용한 이래 성능이 계속 발전하여 현재에는 고성능 광학현미경은 물론 고전압 투과전자현미경(High Voltage TEM), 세포의 미세구조를 관찰 할 수 있는 주사전자현미경(High Resolution SEM), 분자구조를 확인 할 수 있는 원자현미경(Atomic Microscope), 크기가 큰 생물체를 관찰 할 수 있는 동초점현미경(Confocal Microscope)에 이른다.

이러한 현미경의 구조 이해와 사용법을 익히는 것은 식물의 형태를 연구하는데 있어서 가장 기본이 되는 일이다.

1. 현미경의 종류

1) 광학현미경(Light Microscope)

a. 입체 해부 현미경(Stereoscopic dissecting microscope) : 광원은 반사광, 투과광 등 두가지가 있으며 생물을 해부할 때, 저배율로 볼 때 사용함.

b. 연구용 복합 현미경(Research compound microscope) : 쌍안현미경으로서 대부분 카메라가 붙어 있어서 관찰한 결과를 사진으로 찍을 수 있고 위상차현미경장치, 편광렌즈, 형광장치 등이 내장되어 있어 단추만 누르면 쉽게 다른 기능을 할 수 있음.

c. 위상차 현미경(Phase contrast microscope) : 생물 시료를 염색하지 않고 관찰할 수 있는 현미경 시료를 통과한 광선의 위상변화를 감지할 수 있는 장치가 있어 생체의 관찰이 가능함.

d. 간섭 현미경(Interference microscope) : 물체를 통과한 광선의 속도가 늦어진다는 점을 이용한 것으로 위상차 현미경과 같은 원리이나 정량적인 분석이 가능하며 두께, 건량의 농도, 수분함량을 알 수 있음.

e. 암시야 현미경(Darkfield microscope) : 대물렌즈에 직접 광이 들어오지 않게 하고 산란된 광에 의하여 관찰하므로 물체가 밝게 보이고 주변은 어둡게 관찰됨.

f. 편광 현미경(Polarized microscope) : 편광기(polarizer)와 분석기(analyser)의 두 가지 장치를 사용하며 이 장치를 통과한 광선을 이용하여 관찰함. 어떤 각도에서 한 가지 물체만 관찰하든가 혹은 어떤 물체가 혼합되어 있는가를 관찰하는데 사용함.

g. 도립 현미경(Inverted microscope) : 광이 위에서 내려와서 렌즈를 투과하는 것으로 대물렌즈가 거꾸로 달려 있다. 재물대 아래에 대물렌즈가 있으므로 큰 물체도 관찰이 가능함.

h. 형광 현미경(Fluorescence microscope) : 조직을 형광색소로 전처리한 후 여기에서 발하는 형광을 감지하므로써 관찰하는 현미경임.

I. 동초점 현미경(Laser confocal microscope) : 가시광선 대신에 레이저 광원을 사용하며 레이저 광선은 관찰하고자 하는 시편 내부의 일정한 지점을 점진적으로 통과하면서 초점면을 이동시키며 반사되거나 발산되는 빛을 모아서 화면으로 보내게 되고 일반적인 영상기술을 사용하여 관찰 자료를 얻게 되는 현미경임.

2) 전자 현미경(Electron microscope)

a. 주사형 현미경(SEM : Scanning Electron Microscope) ; 전자총에서 주사하는 전자가 조직의 표면에서 반사하는 원리를 이용한 현미경이다. 전자를 반사시키기 위해서는 조직의 표면을 도금(coating)해야 하며 반사된 전자를 monitor에 모아서 관찰한다.

b. 고분해능 주사전자현미경(High Resolution Scanning Electron Microscope) ; 주사전자현미경의 성능을 극대화시킨 것으로서 투과전자현미경과 거의 같은 정도의 해상력을 갖는다.

c. 투과형 전자현미경(TEM : Transmission Electron Microscope);

전자빔이 조직을 투과한 후 형광판에 나타난 그림자를 관찰하는 것으로 조직의 두께는 약 60-90 nm정도이어야 하며 전자빔이 투과하지 못하는 중금속으로 염색되어야 한다.

그렇다면, 여기서 TEM을 사용한 세포의 내부구조 관찰을 위한 과정을 살펴보자.

과정은 10단계로 구분 할 수 있다.

1단계, Prefixion : 조직의 크기는 1×1×1로 시행한다.

2단계, Washing

3단계, Post fixation : 1% OsO₄으로 4℃에서 2시간동안 한다. 식물조직의 경우, 2℃의 OsO₄를 많이 사용한다. 이 시약은 독성이 강해서 막구조를 고정하는 역할을 한다.

4단계, Washing

5단계, Dehydration : 조직에 따라 Embedding 하는 것에 따라 달라진다. Aceton, Alcohol 을 많이 사용한다.

6단계, Epon infiltration : LRwhite와 Spurr를 사용하면 더욱 좋다.

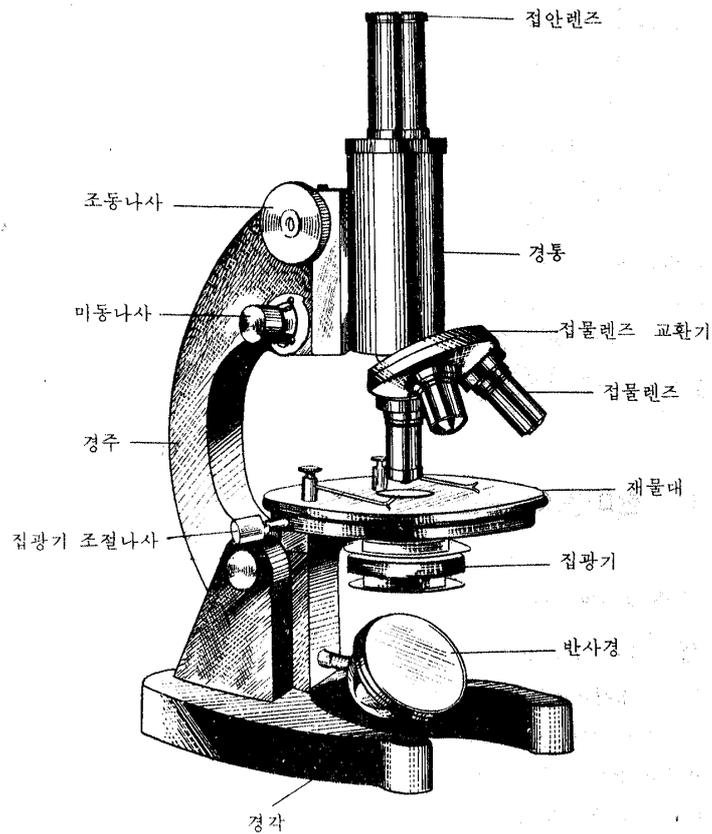
7단계, Embedding

8단계, Sectioning : 제일 어려운 단계이다. Microtome을 이용하며 유리나 다이아몬드 칼을 써야 한다.

9단계, Staining : Slide대신 니켈이나 구리, 금으로 된 grid에 section 한 것을 올려 놓고 고정시킨 후 금속이온을 세포막 부분에 붙이는 단계이다.

10단계, Observation

2. 광학현미경의 구조



<현미경의 구조>

- 1) 대안 렌즈(또는 접안렌즈, ocular lens)--2개의 렌즈로 구성되어 있음
- 2) 경통(body tube)--대안렌즈를 끼우는 통
- 3) 대물렌즈(또는접물렌즈, objective lens)-보통 3개의 렌즈가 복합적으로 조합되어 구성됨
- 4) 대물렌즈 교환기(revolving nosepiece, objective revolver)--접물렌즈를 다른 배율로 교환 할 때 사용하는 곳으로 여러개의 렌즈가 끼워져 있다.
- 5) 조동나사(macroscrew, coarse adjustment)와 미동나사(macroscrew, fine adjustment) - 초점을 맞추는데 쓰임

- 6) 경기(stand)--구형 현미경에서 경주와 연결된 지지부를 말함
- 7) 재물대(stage)--slide glass를 올려 놓는 곳
- 8) 반사경(광원)--빛을 반사시켜 사용하는 거울과 전구를 사용하는 조명기 등 두 가지 종류가 있다.
- 9) 클립(clip)--slide holder라고도 하며 재물대 위에 부착되어 있어서 slide glass를 고정시키는 것
- 10) 집광기(condenser)--광원에서 들어온 광의 성질을 바꾸어 대물렌즈로 보내는 장치
- 11) 경각(base)--현미경을 지지하는 바닥 부위
- 12) 경주(arm)--경각과 연결되어 있으며 여러 부분을 지탱
- 13) 조리개(diaphragm, iris)--광원으로부터 나오는 광선의 세기를 조절하는 것
- 14) 필터(filter)--광선의 조성을 변경시킬 때 쓰는 것

3. 현미경 사용법

- 1) 현미경을 운반할 때는 현미경에 있는 부품이나 렌즈가 떨어지거나 빠질 염려가 있으므로 반드시 두 손을 사용해야 한다. 한 손은 경주(arm)를 잡고, 다른 한 손은 경각(base)을 받친다.
- 2) 현미경은 창문 쪽 또는 광원쪽을 향해 실험대 위에 놓고 진동이나 충격을 주지 않도록 조심스럽게 놓는다.
- 3) 실험대 위에 현미경을 놓을 때 편안한 자세가 되도록 현미경을 놓는다.
- 4) 실험대 위가 편평하지 않으면 현미경 밑에 종이를 끼운다. 현미경 관찰

이 끝날 때까지 현미경을 움직여서는 안된다.

5) 대물렌즈 교환기를 돌리면 각 배율에 해당되는 렌즈에서 찰칵 소리가 난다. 처음 현미경 관찰을 시작할 때는 저배율의 렌즈를 사용한다.

6) 조리개를 최대한 열어서 광선이 많이 들어 오도록 한다.

7) 대안렌즈를 보면서 두 손으로 반사경을 광원이 있는 방향으로 움직여서 대안렌즈의 시야가 밝도록 조정한다.

8) 이 상태에서 프레파라트를 재물대위에 놓고 조동나사로 경통을 서서히 내리거나 또는 서서히 올리면서 관찰하고, 미동나사를 사용하여 초점을 맞춘다.

9) 쌍안 현미경인 경우 자신의 두 동공 사이의 거리에 맞게 대안렌즈 사이의 거리를 조절하여 시야의 원이 하나로 일치하도록 한다. 왼쪽 눈을 감고 오른쪽 눈으로만 관찰하면서 미동나사로 정확히 초점을 맞추고 난 다음 오른쪽 눈을 감고 왼쪽 눈으로 관찰하면서 대물렌즈에 달려있는 나사를 돌려서 초점을 맞춘다.

10) 광선의 양을 조리개로 조절하며 집광기 나사를 움직여서 선명한 상이 맺히도록 조절한다.

11) 대물렌즈 교환기를 돌려서 원하는 배율로 관찰한다. 배율이 바뀌면 조리개, 집광기 등을 조절해야만 선명한 상을 관찰할 수 있다.

12) 검경이 끝나면 조동나사를 돌려서 재물대와 경통사이의 간격이 1-2 cm 떨어지도록 하여 슬라이드를 빼고 재물대에 묻은 먼지나 물기 등을 닦아낸다.

13) 대물렌즈 교환기를 돌려서 가장 저배율 렌즈가 경통과 일치하도록 맞춘다.