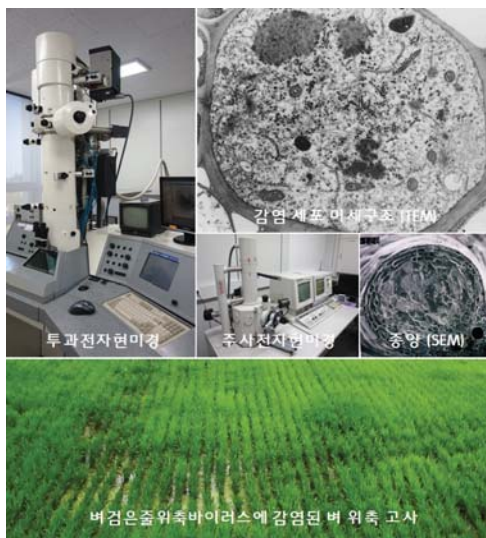


표지사진



우리나라 벼에 심한 위축 증상을 일으키는 벼검은 줄위축바이러스(RBSDV) 감염 벼 포장, RBSDV 감염 세포 내부 미세구조의 투과전자현미경(TEM) 사진, RBSDV에 의하여 형성된 종양 절단면 표면을 세포 구조의 주사전자현미경(SEM) 초저온 검경 사진.

식물 바이러스 감염 세포 검경을 위한 전자현미경 이해

인 쇄 2015년 10월 30일

발 행 2015년 11월 05일

지은이 김정수(국립안동대학교)
최홍수(국립농업과학원)

기획처 안동대학교 농업과학기술연구소
경북 안동시 경동로 1375(송천동)
054-820-7469

발행인 김준

발행처 도서출판 성심

인쇄처 성심인쇄소
등록 1995년 11월 5일 제5호
경북 안동시 옥동2길 31
054-857-8051

ISBN

값은 뒤표지에 있습니다.

잘못된 책은 바꾸어 드립니다.

Copyright© 2015 SUNGSIM. All rights reserved

머리말

필자가 투과전자현미경을 처음 마주한 것은 1979년 6월 국립농업과학원(농업기술연구소) 병리과 바이러스연구실에 연구직 공무원으로 발령을 받은 때이다. 그 당시 투과전자현미경은 진공관식 전자현미경으로 히타치회사의 제품이었다. 광학현미경만 보았던 나로서 당시에 투과전자현미경을 보니 엄청난 크기에 놀랐으며, 수많은 진공관에 발각게 불이 들어와 있는 것을 보니 매우 신기하였다. 전자현미경의 앞면에 표시된 글귀인 ‘이 전자현미경은 대일 청구권 자금인 우리 조상의 피의 대가로 구입한 연구 기자재이므로 잘 활용하라’고 하는 내용이 지금도 생생하게 기억이 난다.

당시의 전자현미경은 기계적으로 안정적이 못하여 자주 고장이 났으며 그 때마다 히다치회사의 기술자이신 윤평노 선생님께서 오셔서 늘 수리를 해 주셨다. 윤 선생님은 오래전에 전자현미경 기술회사인 주원테크를 창립하셔서 사장님으로 현직에서 활동하고 계시는데, 나의 스승이신 당시 실장님이셨고 충북대 교수이셨던 이순형 박사님께서 윤 사장님이 오시면 늘 같이 옆에 있으면서 전자현미경에 대하여 배우라고 하셔서 전자현미경에 대한 기초 원리와 이용 방법에 대하여 윤 사장님으로부터 자연스럽게 많은 것을 배우게 되었다. 윤사장님께서 수리를 하러 오시면 신문용지 2배 크기의 전자현미경 회로도를 현미경실 바닥에 펼쳐놓고 보시던 모습이 지금도 생생하게 기억이 난다.

1980년대 후반에 농업과학원에 신형 투과전자현미경을 설치하였고, 1994년에 원예특작과학원에 바이러스연구실의 전자현미경실을 처음

신설하면서 전자현미경의 기계적인 부분에 대하여 많은 공부를 하게 되었다. 전자현미경을 구입할 때에는 생물 시료 검경에 가장 좋은 기종선택을 위하여 전 세계에서 생산하는 전자현미경의 종류와 특성에 대하여 공부를 하여야 했었다. 원예특작과학원의 투과전자현미경을 구입할 때에 히디치회사 제품을 구입하지 않고 자이스회사의 투과전자현미경을 구입하였는데 이때에도 전문가이신 윤 사장님의 의견을 참고하여 최종 선택하였다. 또한, 독일 자이스회사와 하노버대학에서 생물시료의 원소분석기술, EM-TECH의 윤석천 이사님 등 여러분들에게서 많은 가르침을 받았다.

식물 바이러스연구는 바이러스 입자 형태를 알아야 하기 때문에 투과전자현미경 검경이 필수적인데 이는 마치 곰팡이 연구학자들이 광학현미경을 이용하여 기본적인 형태와 구조 연구를 하는 것과 동일하다. 식물 바이러스 학자가 투과전자현미경 검경을 하지 않고 연구를 한다는 것은 눈을 감고 길을 걸어가는 것과 마찬가지일 것이다.

우리나라 식물 바이러스 감염 세포와 조직학 연구는 공동 필자인 국립농업과학원 최홍수 박사의 1992년 벼검은줄위축바이러스RBSDV의 벼 세포내 증식기작과 종양의 내·외부 초저온 검경에 대한 석사학위 논문과 1995년 원예특작과학원에 전자현미경을 새로 설치하면서 함께 연구한 조점덕 박사의 1998년~2013년 석·박사학위 논문인 수박모자이크바이러스WMV와 오이녹반모자이크바이러스CGMMV의 복합감염에 의한 병증 상승기작의 세포 조직학적 해석이 가장 모범적인 연구이다. 이와 같은 세포 미세구조 연구는 세계적인 전자현미경 세포병리연구의 석학이시며 농촌진흥청 해외명예연구관으로 10여년 필자와 함께 연구

하신 미국 아칸사대학교의 김경수 교수님께서도 세계 최고의 연구라고
경하하셨습니다.

전자현미경학은 최근에는 식물 바이러스 학자들뿐만 아니라 세포와
조직을 연구하는 모든 학자들은 투과전자현미경의 검경을 통해 눈으로
직접 세포에 나타난 최종적인 미세구조 현상을 해석하여 생명현상을
밝히고, 전자현미경을 이용하여 세포와 조직의 약물 치료효과를 원소
분석을 통하여 직접 확인할 수 있기 때문에 의학을 중심으로 모든 생
물을 대상으로 하는 연구의 기본이 되는 학문이다.

필자가 농업과학원과 원예특작과학원에서 전자현미경실을 운영하면
서 많은 실험을 같이 직접 해주신 나의 동료이자 친구이며, 우리나라
식물 분야의 전자현미경학 발전에 큰 공헌을 한 식물바이러스연구실의
이준성 선생님과 조점덕 박사에게 무한한 감사를 보낸다. 전자현미경
급속 시료처리, 초박절편, 현상과 인화, 초저온 검경 등 다양한 전자현
미경 검경기술을 개발하기 위하여 많은 시간을 함께 하였다.

전자현미경학은 전자현미경, 초박절편기 등 다양한 기자재를 효과
적으로 운영하여야 하는 기계적 분야의 하드웨어와 시료제작, 사진촬
영, 현상과 인화, 그리고 세포와 조직의 미세구조에 대한 사진 해석
등의 소프트웨어를 모두 이해하여야 하는 폭넓은 종합학문이므로 많은
시간과 경험이 필요한 분야이다. 그럼에도 불구하고 꾸준한 실험과 검
경, 많은 영상 사진 해석을 하면 누구나 전문가가 될 수 있을 것이다.

이 책은 전자현미경을 이용하는 연구자들을 위하여 그동안 필자가
식물 바이러스연구를 하면서 직접 실험하고 그동안 여러 대학에서 강
의를 하면서 학생들이 궁금해 하는 것들을 알기 쉽게 기술하였다. 전

자현미경에 관한 책자는 '식물 바이러스 감염 세포 검경을 위한 전자현미경 이해'와 '식물 바이러스 감염 세포 미세구조의 전자현미경 사진 해설' 두 편으로 출간하고자 한다.

식물병리학을 비롯하여 농작물 연구 등의 생물연구를 하면서 기본적으로 중요한 초미세 병원체의 형태와 구조, 병원체 감염세포의 미세구조 연구에 필수적인 전자현미경 검경에 대한 국문도서를 출간하게 되어 그동안 도움 주신 모든 분들께 이 책을 헌정하며, 또한 무한한 기쁨으로 생각한다. 이 책에서 미진한 부분들은 후학들이 수정 증보하여 보다 충실한 책자가 될 수 있도록 부탁드립니다, 많은 독자 여러분의 관심과 조언을 적극 환영하는 바이다.

주요 차례

1. 전자현미경과 광학현미경 || 1
2. 전자의 특성 || 7
3. 전자자기렌즈 || 31
4. 영상에 관여하는 요인 || 42
5. 영상 맺힘 과정 || 53
6. 전자현미경의 고진공과 냉각 || 60
7. 전자현미경 검경 재료 준비 || 69
8. 시료제작 || 82
9. 투과전자현미경 검경과 사진촬영 || 132
10. 주사전자현미경 검경과 사진촬영 || 138
11. 암실작업과 명실작업 || 143

차례

1. 전자현미경과 광학현미경	1
2. 전자의 특성	7
2.1 전자의 종류	8
2.1.1 전자의 산란과정	8
2.1.2 시료에서 반사한 전자	9
(1) 반사산란전자	9
(2) 이차전자	10
(3) 오제전자	10
(4) 엑스레이	11
2.1.3 시료를 투과한 전자	12
(1) 탄성산란전자	13
(2) 비탄성산란전자	15
(3) 복산란전자	16
(4) 에너지 손실 전자의 투과전자현미경 이용	17
2.2 전자의 발산	19
2.2.1 가속전압과 전자의 파장	19
2.2.2 해상력	21
2.2.3 전자총 구조와 재질	22
2.2.4 전자발산 원리	23
2.2.5 필라멘트 종류와 해상력	26
2.2.6 최고 밝기의 전류 조정	29

3. 전자자기렌즈	31
3.1 일반적 구조	31
3.2 전자자기렌즈의 수차	33
3.2.1 구면수차	33
3.2.2 색수차	34
3.2.3 난시	36
3.3 렌즈의 수차 교정	37
3.3.1 구면수차의 교정과 최소화	37
3.3.2 색수차의 교정과 최소화	38
3.3.3 난시의 교정과 최소화	40
4. 영상에 관여하는 요인	42
4.1 배율	42
4.1.1 광학현미경	42
4.1.2 투과전자현미경	44
4.2 명암과 초점심도	47
4.3 해상력에 관여하는 요인	50
5. 영상 맺힘 과정	53
5.1 투과전자현미경	53
5.2 주사전자현미경	56
5.3 전자빔의 정렬	58

6. 전자현미경의 고진공과 냉각 || 60

6.1 고진공 || 60

6.2 진공펌프의 종류와 특성 || 62

6.2.1 회전오일펌프 || 62

6.2.2 오일확산펌프 || 63

6.2.3 이온게터펌프 || 65

6.2.4 터보분자펌프 || 66

6.3 냉각 || 67

7. 전자현미경 검경 재료 준비 || 69

7.1 실험실 안전수칙 || 69

7.1.1 산 || 69

7.1.2 유기용매 || 69

7.1.3 전기적 충격 방지 || 70

7.1.4 포매 용액 || 70

7.1.5 오스뮴 || 70

7.1.6 기타 || 71

7.2 그리드 || 71

7.2.1 그리드 종류와 선택 || 71

(1) 슬롯 및 홀그리드 || 73

(2) 사각형 메쉬그리드 || 73

(3) 육각형 메쉬그리드 || 73

7.2.2 그리드 지지막 준비 || 74

7.2.3 지지막의 안정화 || 78

7.2.4	그리드 세척	79
7.3	주사전자현미경 검경 준비	80
7.3.1	시료대	80
7.3.2	접착제	80
7.3.3	피막 입히기	80
	(1) 진공증착법	81
	(2) 이온발산법	81
8.	시료제작	82
8.1	시료의 구분	82
8.1.1	비생체 시료	83
	(1) 비전도성 시료	83
	(2) 전도성 시료	83
8.1.2	생물체 시료	84
8.2	시료의 채취	84
8.3	고정	85
8.3.1	영향 요인과 목적	85
8.3.2	세포구성 물질과 고정	86
8.3.3	고정액 제조방법	88
8.3.4	시료 고정과 완충액	89
8.4	탈수 및 포매 전처리	91
8.4.1	탈수	91
8.4.2	포매 전처리	91
8.5	시료 라벨 제작	92

8.6 포매 || 92

8.6.1 포매 프라스틱의 종류와 특성 || 92

8.6.2 포매 과정 || 93

8.6.3 포매 수지 조성 || 94

(1) 이폰 || 94

(2) 스퍼 || 95

(3) 아랄다이트 || 95

(4) 글리콜 메타크릴 || 96

(5) 이폰-아랄다이크 || 96

8.7 초박절편 제작 || 96

8.7.1 시료 블록 다듬기 || 97

8.7.2 초박절편 제작 || 99

(1) 유리칼 제작 || 99

(2) 칼각도 || 103

(3) 다이아몬드칼의 종류와 특성 || 105

(4) 초박절편의 두께와 색 || 106

(5) 초박절편기 사용 || 107

(6) 그리드에 절편 올려놓기 || 109

(7) 초박절편 불량률의 원인과 대책 || 109

8.8 염색 || 112

8.8.1 생물시료의 염색 || 113

8.8.2 염색과정과 염색약 종류 || 115

8.8.3 음염색 || 118

8.8.4 두꺼운 시료의 염색 || 121

8.8.5 초박절편 시료의 염색	125
8.9 주사전자현미경 시료의 건조	126
8.9.1 임계점 건조	127
8.9.2 물과 액화 이산화탄소의 임계점	128
8.10 시료제작표	129
9. 투과전자현미경 검경과 사진촬영	132
9.1 검경 준비 조정	132
9.2 검경 순서	134
9.3 사진촬영	136
10. 주사전자현미경 검경과 사진촬영	138
10.1 일반 검경	138
10.2 천연 시료 검경	139
10.2.1 시료실의 진공도 최소화	139
10.2.2 전자빔량의 최소화	140
10.3 극저온 검경	141
11. 암실작업과 명실작업	143
11.1 필름 현상	143
11.2 인화	144
11.3 암실작업 주의점	145
11.4 명실작업	146

1. 전자현미경과 광학현미경

투과전자현미경transmission electron microscope, TEM은 1931년 크놀Knoll과 러스카Ruska에 의해서 처음 만들어진 후 1939년에 독일의 Siemens 회사에 의해서 상업적인 전자현미경이 만들어졌다. 1943년에 오브리언OBrien은 면도날을 이용한 고속 시료 절편기를 개발하여 투과전자현미경 검경의 많은 발전을 가져왔으며 1950년에 라타Lattat와 하트만Hartmann은 유리칼을 이용하여 시료 절편 쉽게 만들 수 있도록 포매embedding 기술을 개발하였다. 1952~1953년에 시료의 초박절편 기술ultrathin sectioning이 개발되어 현대의 투과전자현미경 검경과 활용에 획기적인 발전이 이루어졌다.

주사전자현미경scanning electron microscope, SEM은 크놀Knoll이 1935년에 발명하였으며, 1938년 알덴네Manfred Von Ardenne에 의하여 기초적인 주사전자현미경이 개발 되었으며, 주사전자현미경은 투과전자현미경에 비하여 매우 늦은 1964년 캠브리지 회사에서 상업적으로 이용할 수 있는 현미경을 제작하였다.

광학현미경은 입체광학현미경stereoscopic light microscope과 투과광학현미경transmission light microscope으로 구분하는데, 입체(실체)현미경은 시료의 표면을 관찰할 수 있으며, 투과 광학현미경은 시료의 내부를 볼 수 있는 현미경이다. 전자현미경의 경우에도 시료의 내부를 관찰하는 현미경은 투과전자현미경(TEM)이라고 하며(그림 1.1, 좌), 표면을 관찰하는 현미경은 주사전자현미경(SEM)이라고 한다(그림 1.1, 우). 최근에는 투과전자현미경과 주사전자현미경의 원리

를 결합하여 STEM(scanning transmission electron microscopy)을 개발하여 실용화하고 있으며 STEM은 투과전자현미경에서 이용하지 못하는 전자들을 이용할 수 있는 장점이 있는 반면에 주사전자현미경의 장점인 크고 두꺼운 시료에 대한 검경이 불가능한 단점도 있다.



그림 1.1. 투과전자현미경(좌)과 주사전자현미경(우).

전자현미경은 최근에 사용법의 자동화에서부터 분석기능 위주로 발달하여왔는데, 투과전자현미경은 모든 초미세 생물과 무생물 모든 것을 관찰할 수 있으며 무생물의 경우에는 구조에 대한 기계, 전자 등 거의 모든 물질 연구에 활용되고 있다. 생물시료의 경우 생물의 기본 구성단위는 세포이며 세포의 내부 미세구조를 전자현미경으로 직접 눈으로 확인하면서 연구할 수 있는 유일한

연구 수단이다.

현대 생물학의 획기적 발전은 1953년 왓슨Watson과 크릭Crick이 발견한 DNA 이중 나선구조에 기초를 두고 있으며, 이는 최근 유전공학 등 분자생물학의 획기적 발전이 가능하도록 한 세기적 연구이다. DNA 이중 나선구조의 발견은 1952년 영국의 프랭크린 Rosalind Franklin이 투과전자현미경을 이용하여 DNA의 X선 전자회절 영상을 눈으로 확인한 것에 단초가 되었으며, 결국 현대의 생물과학의 획기적 발전은 투과전자현미경의 검경에서 비롯된 것을 알 수 있다. 최근의 전자현미경의 생물 연구 분야는 초미세구조를 밝히고 세포와 기관의 상호작용 연구, 특정 화학물질의 투여에 대한 세포와 조직의 원소 분포 연구 등 다양하게 발전하고 있다.

주사전자현미경은 외부표면과 내부표면 관찰에 의한 종합정보를 얻을 수 있으며 이 정보를 통해 정확히 현상을 분석하고 아울러 투과전자현미경 영상과 종합적으로 분석할 때 과학적인 연구가 가능하다. 또한 과거의 일반 광학현미경으로부터 제한적인 정보를 얻었으나 최근의 발달된 광학현미경상의 영상분석과 투과 및 주사전자현미경을 이용한 영상분석의 종합화 연구는 앞으로 생물과학의 유용한 분야임에 틀림없다. 주사전자현미경은 기본적으로 낮은 배율에서 고배율까지 폭넓은 배율을 활용할 수 있고, 투과전자현미경에 비하여 시료 크기의 제한이 적고 시료의 검경 이동 방향성이 넓어 매우 유용하다. 또한 광학현미경보다 300배 이상의 시료의 굴곡면 깊이까지 미세한 검경을 할 수 있는 장점

이 있으며 해상력도 높아 매우 유용한 연구 분야이다.

전자현미경은 광원light source으로 전자electron를 이용하는데 공기가 조금이라도 있으며 급속히 산란되어 없어지기 때문에 전자현미경의 전자이동 통로는 10^{-4} 토르Torr(1 토르=대기압의 10^{-7}) 이하의 진공상태이어야 하며, 이 상태에서만 전자영상을 얻을 수 있다. 전자현미경의 기본적 구성은 시료specimen, 전자원electron source, 전자자기렌즈electromagnetic lens, 형광판fluorescent screen, 각 필름 사진 촬영기sheet film camera 등으로 되어 있으며, 이것들은 모두 진공상태의 경통에 장착되어 있다. 최근에는 필름을 대신하여 디지털 영상 촬영장치가 설치되어 암실작업을 하지 않아도 되어 전자현미경 사용이 편리하게 되었다.

투과전자현미경의 생물 시료는 80 나노미터nm 정도의 얇은 절편으로 만들어야 하며 투과전자현미경에서 영상 명암은 일반적으로 무거운 전자밀도 원소를 갖는 원자량이 큰 염색약으로 염색을 함으로서 얻어질 수 있으며 이 처리는 고정과 염색과정에서 수행한다. 전자현미경의 전자렌즈는 일반 광학현미경과 같이 기본적으로 전자빔 축 상에 정렬되어야 하며, 이것은 직접적으로 전류를 만드는 코일을 철로 둘러 싸여져 있는 모양이다.

전자현미경과 광학현미경의 차이는 사용하는 광원이 다르기 때문인데, 광학현미경은 전구의 빛light을 광원으로 이용하지만 전자현미경은 전자electron를 이용한다. 또한 광학현미경은 유리렌즈glass lens를 이용하지만 전자현미경은 전류가 통하는 코일이 감겨 있는 전자자기렌즈electromagnetic lens를 이용하는데, 유리렌즈나

전자자기렌즈 모두 광을 투과시키고 집광하는 공통적인 기능을 한다(표 1-1).

광학현미경에서 이용하는 빛의 파장은 보통 400~700nm의 가시광선을 이용하고 전자현미경에서 이용하는 전자의 파장wave length은 보통 0.001~0.01nm로 시료의 정보를 전달하는 파장의 특성에서 전자현미경이 파장의 차이만큼 더욱 미세하게 관찰할 수 있다. 그러나 전자현미경은 전자를 이용하므로 전자의 손실을 방지하기 위하여 고진공의 특수한 장치에서만 이용할 수 있다.

표 1-1. 전자현미경과 광학현미경의 특성 비교

특성	광학현미경	전자현미경
광원 (light source)	빛 (light)	전자 (electron)
파장 (wave length)	400~700nm	0.001~0.01nm
렌즈 (lens)	유리 (glass)	전자자기렌즈 (electromagnetic lens)
진공 (vacuum)	필요 없음	고 진공 필요 (10^{-4} Torr)

투과전자현미경과 광학현미경의 렌즈체계는 거의 동일하다(그림 1.2). 투과전자현미경의 광원인 전자는 음극cathode에서 발산되어 집광렌즈condenser lens를 통과하면서 전자를 모으는데 이것은 광학현미경의 집광렌즈를 통한 광을 모으는 기능과 동일하다. 시료를 통과한 전자와 광은 모두 대물렌즈objective lens를 통과하면서 시료의 정보를 갖게 된다. 대물렌즈를 통과한 시료 영상은

바로 중간영상intermediate image이 맺히게 되며 이 영상은 투사렌즈projector lens를 통과하면서 확대된다. 광학현미경에서 투사렌즈는 대안렌즈eye piece라고 한다. 최종적으로 확대된 영상은 투과전자현미경은 형광판fluorescent screen에서 볼 수 있으며 보통 10배의 확대 렌즈로 본다. 광학현미경의 경우에는 대안렌즈 바로 앞에 맺히는 최소착란원Ramsden disc의 영상이 눈의 망막에 맺히게 되어 영상을 볼 수 있다. 따라서 망막에 맺힌 영상은 최종적으로 확대된 동일한 크기의 영상이다.

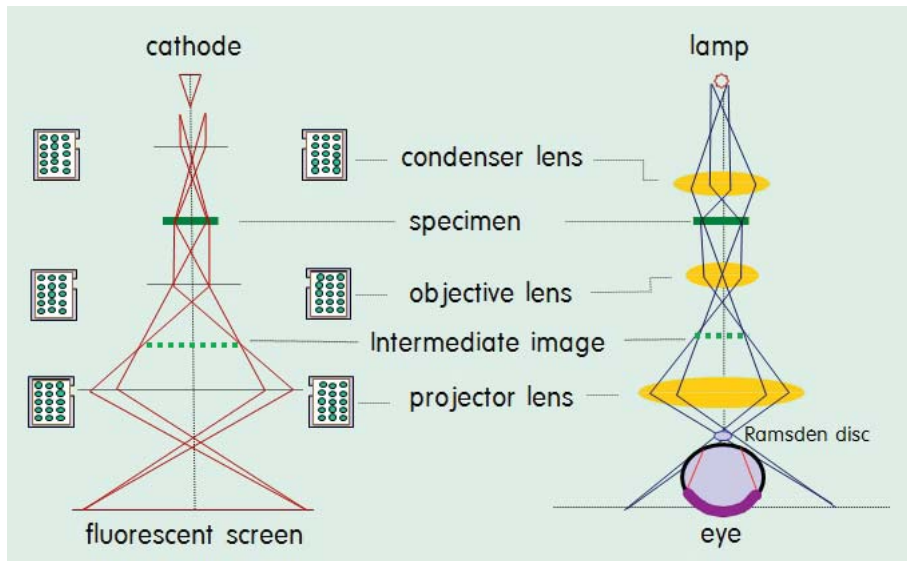


그림 1.2. 전자현미경의 렌즈체계(좌)와 광학현미경의 렌즈체계(우).

2. 전자의 특성

전자는 음전하를 띠고 있으며 양전하를 띠고 있는 핵을 둘러싸고 있다. 전자는 핵을 둘러싼 전자각(electron shell)에 존재하는데 전자각은 핵으로부터 K각, L각, N각, O각, P각, Q각 등으로 불리며, 각각의 각에 존재하는 전자의 수는 $2n^2$ 으로 K각은 2개, L각은 8개, N각은 32개의 전자를 갖고 있다. 전자는 입자이며 무게는 9.108×10^{-28} g이다.

전자현미경에서 전자는 보통은 텅그스텐으로 만들어진 음극의 전자총(electron gun) 필라멘트에서 발산되며 음극에서 접지의 양극 방향으로 가속(accelerating)되고 전장(electric field) 하에서 또 다시 가속된다. 전자와 시료 사이에서 일어나는 반응은 시료에서 반사되는 전자들과 투과하는 전자들로 구분하는데 반사하는 전자들은 오제전자(auger electron), 반사산란전자(back scattered electron), 이차전자(secondary electron)로 구분되고, 이 전자들은 주사전자현미경에서 영상을 얻는 전자들이다.

시료를 투과한 전자들은 비산란전자(unscattered electron), 산란전자(scattered electron)는 탄성산란전자(elastically scattered electron)와 비탄성산란전자(inelastically scattered electron)로 구분하며, 이 전자들은 투과전자현미경에서 영상을 얻는데 이용한다(그림 2.1).

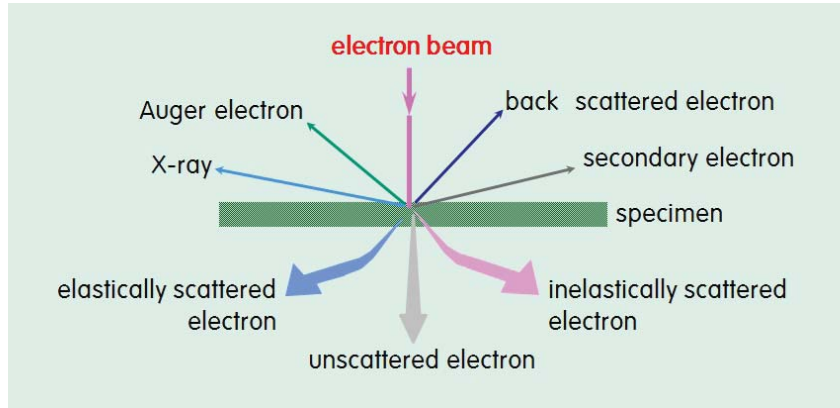


그림 2.1. 전자현미경의 전자빔과 시료와 상호작용하여 반사하는 전자들과 투과하는 전자들의 종류.

2.1 전자의 종류

2.1.1 전자의 산란과정

전자는 질량을 갖고 있는 전하를 띤 입자(e^-)와 파장(λ)을 갖는 파장효과로 크게 구분한다. 전자현미경은 방출전자에 에너지를 추가하기 위해서 전압을 올려주는데 이것을 가속전압 $accelerating\ voltage$ 이라 한다. 보통 생물시료의 경우는 50kV~120kV 사이에서 시료를 관찰하며, 광물시료의 경우는 120kV~4,000kV 까지 가속한다.

전자현미경에서 가속된 전자가 시료를 통과할 때에 시료의 원자 및 전자들과 상호작용이 일어나는데, 이 상호작용을 전자산란

electron scattering이라고 하며, 이 산란전자들에 의하여 전자현미경에서 시료의 영상을 볼 수 있으며 시료를 구성하는 원소의 분석도 가능하게 된다.

2.1.2 시료에서 반사한 전자

시료를 구성하고 있는 전자와 반응하여 반사하는 전자는 반사산란전자back scattered electron, 이차전자secondary electron 그리고 오제전자auger electron로 구분되며, 전자와 반응하여 발산하는 엑스레이X-ray는 시료 고유 특성인 원소의 분석에 이용된다.

(1) 반사산란전자

반사산란전자back scattered electron는 시료의 원자핵, 즉 양전하를 띠고 있는 원자핵에 의하여 전자현미경의 전자총에서 발산된 전자와 반응하여 전자의 진행 방향이 바뀌어 반사되는 전자를 말한다(그림 2.2).

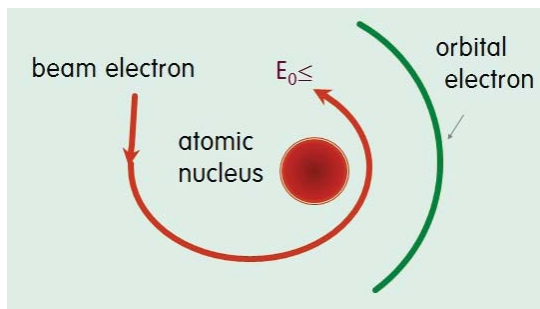


그림 2.2. 시료의 원자핵 영향으로 진행방향이
변화한 반사산란전자(적색).

따라서 후산란전자의 에너지는 시료의 원자핵과 반응하여 전자총에서 발산된 당시의 에너지와 같거나 적어지게 된다($E_0 \leq$).

(2) 이차전자

전자현미경의 전자총에서 발산된 전자는 시료의 궤도전자 orbital electron에 영향을 받아서 진행 방향이 원자각 방향으로 치우쳐서 진행하게 되는데 이 전자들을 이차전자secondary electron라고 한다(그림 2.3). 이차전자들은 전자총에 발산된 당시의 에너지 손실이 없이 동일한 에너지를 갖고 있으며 그 에너지는 보통 20~50eV 정도이다.

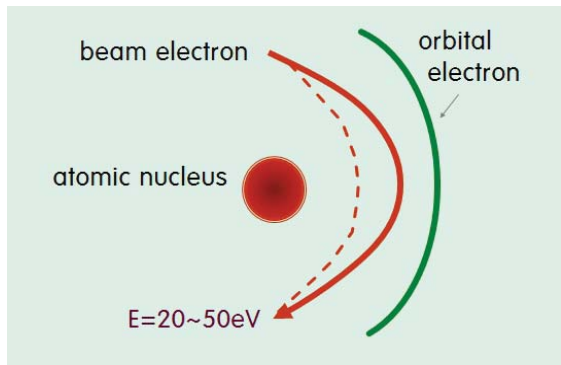


그림 2.3. 시료의 궤도전자 영향으로
진행방향이 변화한 이차전자(적색).

(3) 오제전자

전자현미경의 전자총에서 발산된 전자는 시료의 전자각의 궤

도전자와 반응을 하는데 이때 K각의 전자를 때리면 에너지를 흡수하여 전자운동이 활발해지는 여기exciting가 되며 K각에 있던 자리가 비워지게 되면 L각 전자가 K각으로 이동한다. 이때 X레이가 발산되어 탈여기de-excitation가 일어나며, 이때 L각의 전자는 오제전자 *auger electron*를 발산하게 된다(그림 2.4).

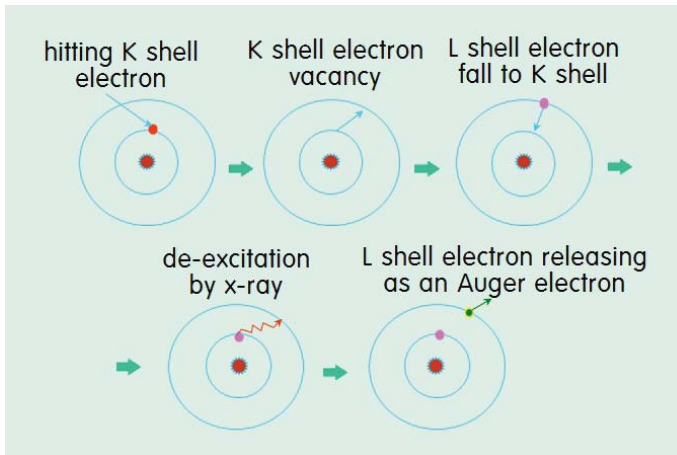


그림 2.4. 오제전자의 생성과 엑스레이 발생.

(4) 엑스레이

엑스레이X-ray는 주사전자현미경에서 영상을 얻는데 사용하는 빛은 아니지만 시료가 갖고 있는 고유한 원소의 특성을 갖기 때문에 주사전자현미경과 투과전자현미경 모두에서 활용한다. 전자현미경의 전자총에서 발산된 일차전자*primary electron*가 시료의 핵을 지나쳐서 진행wide miss 하면 이때 시료의 핵에서 낮은 에너지의 엑스레이가 방출되고, 직접 시료의 핵을 때리면direct hit 높은 에너

지의 엑스레이가 방출되는데 이를 연속 엑스레이(continuum X-ray) 라고 한다(그림 2.5).

엑스레이는 연속 엑스레이와 그림 5에서 오제전자를 방출하도록 에너지를 갖고 있는 전자가 L각에서 K각의 빈 전자각으로 이동할 때 발산하는 엑스레이, 즉 원소 고유의 특성 파장을 갖는 특성엑스레이(characteristic X-ray)로 구분된다. 시료와 반응하여 방출되는 엑스레이는 시료 고유의 특성을 나타내므로 시료의 정성분석에 이용된다.

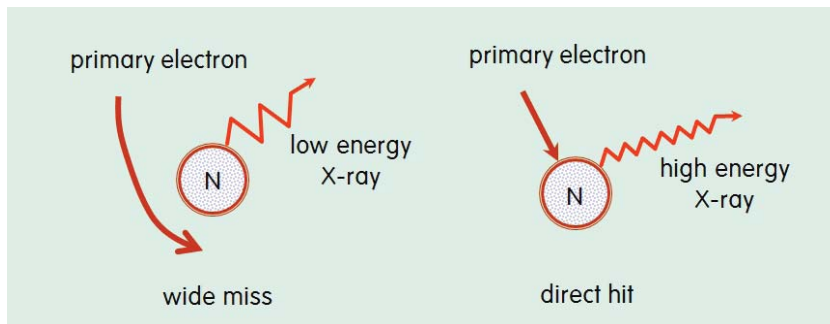


그림 2.5. 전자총에서 발산된 일차전자와 시료의 핵과 반응하여 발생하는 엑스선의 에너지.

2.1.3 시료를 투과한 전자

시료를 투과한 전자는 에너지 손실이 없는 비산란전자(unscattered electron, E_0), 탄성산란전자(elastically scattered electron, E_0)와 에너지가 손실된 전자인 비탄성산란전자(inelastically scattered electron, $E_0 - \Delta E$)로 구분할 수 있다. 비산란전자는 시료의 밝기에 관련되며 탄성산란전

자와 비탄성산란전자는 모두 시료의 정보를 갖고 있으며 영상을 만든다(그림 2.6).

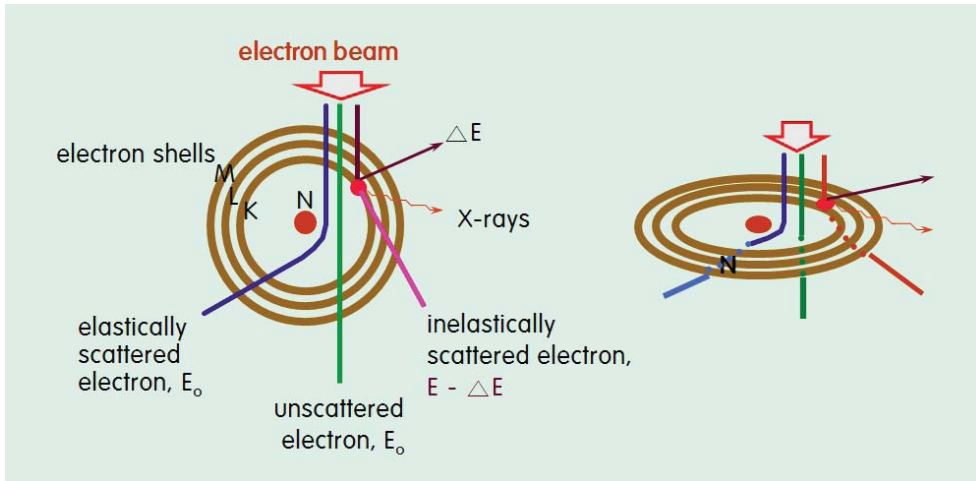


그림 2.6. 시료를 투과한 전자들의 종류와 이 전자들의 이동방향과 에너지. 수평방향(좌)과 수직방향(우)의 전자 이동 모식도.

(1) 탄성산란전자

하나의 광전자beam electron가 시료의 핵을 둘러싸고 있는 원자 각의 외각전자shell electron와 충돌하지 않고 시료 원자의 전자각 사이를 그대로 통과 한다면 그 전자는 양전하를 띤 원자핵에 의해서 끌어당겨져 운동방향이 기울어지게 된다. 원자핵의 질량은 $\geq 1.7 \times 10^{-24} \text{g}$ 이고 전자는 $9 \times 10^{-28} \text{g}$ 으로 원자핵과 전자의 질량 차이가 크기 때문에 전자는 탄성적으로 산란하는데 전하를 띠고 있으면서도 에너지는 갖고 있지 않다. 따라서 일차 광전자와 탄성

산란전자들의 에너지는 동일하다(그림 2.7).

탄성산란전자의 산란각은 0~100 미라드mrad, 1 라드rad는 조직 1kg 당 흡착되는 선량이며, 미라드는 1/1,000라드, 수준으로 산란각이 큰 전자들은 영상과정에서 대물렌즈 삽입판의 구멍 외부로 이 전자들이 제거된다. 삽입판의 구멍의 구경 크기에 따라서 약 6~18 미라드의 산란각을 갖는 전자들만 통과하도록 되어 있으며 이를 각선택angle selection이라고 한다.

영상명암은 큰 각도로 산란하는 전자들을 제거하여 얻어지는데 시료를 구성하는 원자수가 증가함으로서 탄성산란의 빈도도 같이 증가한다. 따라서 전자현미경 시료 영상의 명암 증대 목적으로 우라늄, 납, 오스뮴, 텅스텐과 같은 중금속들이 염색시약으로 사용된다.

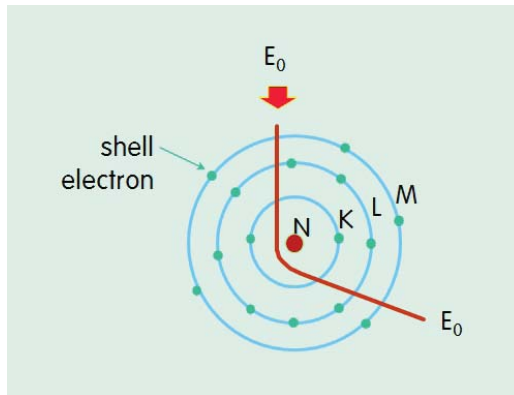


그림 2.7. 시료의 핵과 반응하는 탄성산란전자.

(2) 비탄성산란전자

광전자가 시료의 원자를 통과하여 투과하거나 원자각 전자와 충돌하면 서로 다른 상호작용이 일어나는데, 비탄성 산란과정에서 시료의 전자와 광전자가 충돌하여 수정된 각도를 갖는 광전자는 시료의 전자에게 에너지를 전달한다. 이때 에너지가 방출되며 이것은 에너지 손실 ΔE 로 측정할 수 있다. 시료의 K각 전자와 충돌하면 ΔE_k 만큼의 에너지 손실이 일어나고 전자의 에너지는 $E = E_0 - \Delta E_k$ 이다. 전자각 L각과 M각의 전자와 충돌할 경우의 에너지 손실도 동일하게 측정될 수 있다. 대부분의 전자각의 전자와 충돌하여 손실된 에너지는 10~100eV 정도이다(그림 2.8).

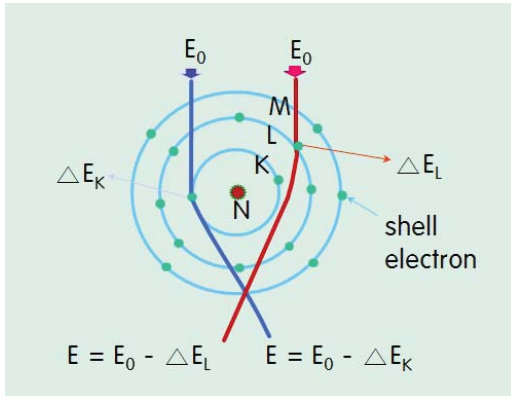


그림 2.8. 시료의 외각전자와
반응하는 비탄성산란전자.

비탄성산란전자들은 복합에너지를 갖거나 파장이론에 따라 복합 색채를 갖고 있다. 비탄성 충돌은 에너지손실 ΔE 이외에 전자

운동방향에 있어서도 약간의 변화가 일어나는데 기본적으로 0~1 mrad 사이이다. 이와 같이 약간의 운동방향 변화가 일어나므로 거의 모든 비탄성산란 전자들은 대물렌즈 삽입판의 구멍을 통과하여 영상을 만드는 중요한 전자들이다.

복합에너지 전자들은 산란 흡수 명암과 위상차 명암 상태를 방해하지만 만약 하나의 광전자가 많은 에너지를 갖고 있다면 각 전자가 보다 높은 에너지 수준으로 여기exciting 되거나 원자각으로 부터 완전히 방출되는 이온화ionization 현상이 비탄성산란전자에서 발생할 수 있다. 따라서 원자의 여기나 이온화에 필요한 에너지는 각각의 원자와 이에 상응하는 시료가 갖고 있는 고유의 특성과 일치하는 것이다. 원자핵의 외각들은 여러 가지의 에너지 수준을 갖고 있으며, 외각의 여기와 이온화에 의하여 생성된 에너지 손실 결과로 시료가 갖고 있는 고유의 원자를 알 수 있다. 결국 시료의 원자와 충돌하여 나타나는 에너지 손실 전자들은 시료의 모든 정보를 완벽하게 갖고 있으며, 이것을 이용하면 시료를 구성하고 있는 원소의 분석이 가능하다.

(3) 복산란전자

하나의 전자가 시료를 통과할 때에 두 번 또는 그 이상의 산란을 할 경우가 있는데 이를 복(multiple)산란이라고 한다. 복산란 가능성은 시료의 두께와 원자수의 증가에 따라서 증가한다. 복산란전자multiply scattered electron는 탄성산란전자+탄성산란전자, 비탄성산란전자+탄성산란전자 그리고 비탄성산란전자+비탄성산란

전자들로 구분할 수 있다.

복산란전자들의 에너지는 감소하게 되며, 시료의 두께가 증가하면 에너지 분포 폭과 대물렌즈의 색수차 효과도 증가한다. 따라서 복산란전자들은 시료를 통과한 후 현저하게 방향이 변화하며 대물렌즈 삽입판의 구멍을 통과하는 전자들의 비율을 감소시켜서 영상의 강도를 감소시켜 좋은 영상을 얻을 수 없다.

따라서 복산란전자들은 시료의 적절한 정보를 갖고 있지 못하고 왜곡된 정보를 갖고 있으며 시료의 배경background 강도를 증가시켜서 신호와 잡음 비율을 높여서 시료 정보 검출 효율을 떨어뜨리게 되므로 좋은 영상을 얻을 수 없다. 복산란전자들의 감소를 위해서는 적절한 시료 두께가 필수적이며, 너무 얇으면 밝기가 증대되어 명암이 감소한다. 경우에 따라 매우 두꺼운 시료를 관찰하여 3차원 영상 구성을 하기 위해서 사용하기도 하는데 이는 영상분석의 특별한 장치를 이용한다.

(4) 에너지 손실 전자의 투과전자현미경 영상 이용

투과전자현미경에서 시료의 정보를 갖고 있는 전자의 이용은 탄성산란전자elastically scattered electron와 비탄성산란전자inelastically scattered electron이며, 비산란전자unscattered electron와 복산란전자multiply scattered electron는 정보를 정확히 갖고 있지 못한다.

시료의 정보를 갖고 있는 전자들을 효과적으로 이용하는 것은 좋은 영상을 얻기 위한 필수적인 과정인데, 일반적인 투과전자현미경은 시료를 통과한 전자들을 전자렌즈 바로 아래에 위치하고

있는 삽입판aperture의 구멍 크기를 작게 하여 명암을 높인다. 그러나 시료의 명암을 이용한 영상의 해상력은 한계가 있기 때문에 시료의 정보를 갖고 있지 않은 전자들을 제거하면 좋은 영상을 얻을 수 있다.

시료의 정보를 갖고 있지 않은 전자의 제거는 전자의 파장을 고려하여 프리즘을 통하여 제거할 수 있는데 이 방법을 영상 전자 에너지 손실 분광검경imaging electron energy loss spectrometer electron microscopy이라고 한다.

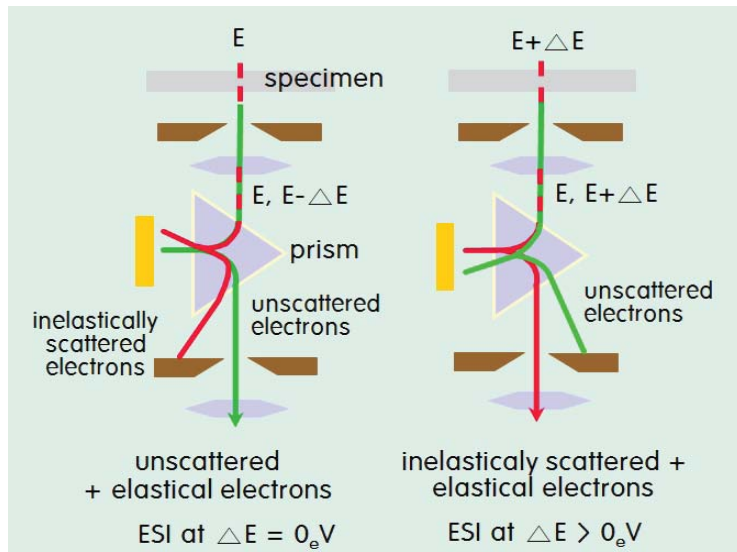


그림 2.9. 프리즘을 이용한 영상 전자 에너지 손실 분광검경 원리.

시료의 정보를 갖고 있는 전자들을 잘 이용하면 매우 좋은 영

상을 얻을 수 있는데, 전자총에서 발산된 일차전자(primary electron)는 영상에 이용할 경우 비산란전자와 탄성산란전자의 정보의 영상을 볼 수 있는 방법이 있다(그림 2.9, 좌). 일반적인 투과전자현미경은 시료를 통과한 비산란전자와 산란전자 모두 형광판에 도달하므로 시료 정보를 정확히 검경할 수 없다. 그러나 인위적으로 전자총에서 발산하는 전자들에 에너지를 가하면 삽입판에 의하여 비산란전자들을 제거하고 시료의 정보를 갖고 있는 비탄성산란전자와 탄성산란전자 모두를 영상에 이용할 수 있기 때문에 시료의 정보를 더욱 많이 갖고 있어 좋은 영상을 얻을 수 있다(그림 2.9, 우).

전자총에서 발산하는 일차전자에 인위적으로 에너지를 가해주면 시료와 반응하여 생성된 전자들을 활용하여 시료가 갖고 있는 고유의 원소 분석도 가능하다. 시료의 정성분석은 이와 같은 방법 이외에도 엑스레이 분석법 등 다양한 방법이 개발되어 전자현미경은 영상을 얻는 기본적 기능 이외에 분석 기능도 갖추고 있어 의학 분야를 포함하여 활용 분야가 넓다.

2.2 전자의 발산

2.2.1 가속전압과 전자의 파장

전자현미경은 전자의 가속을 높이면 시료를 투과하는 전자의 투과력을 높일 수 있는데, 전자의 가속을 높이는 방법은 전압을

증가시켜 전자의 파장을 짧게 하면 가능하다. 전자는 9.108×10^{-28} g의 무게를 갖는 입자이므로 가속전압이 높아지면 파장이 짧아지는데, 80kV이면 파장은 0.0041nm, 100kV에서 0.0037nm, 500kV에서 0.0014nm의 파장을 갖는다(표 2.1).

표 2.1. 전자현미경의 가속전압에 따른
전자의 파장

전압 (kV)	파장 (nm)	전압 (kV)	파장 (nm)
10	0.0122	80	0.0041
20	0.0086	100	0.0037
40	0.0060	200	0.0025
50	0.0053	500	0.0014

투과전자현미경 검경을 위한 보통 생물 시료의 두께는 약 80nm 정도이므로 전자현미경 검경을 할 때에 가속전압은 보통 80~100kV에서 검경 한다. 가속전압이 그 이하이면 전자의 투과력이 낮아서 배경이 전체적으로 어둡고, 그 이상이면 배경이 밝아져서 검경하기 어렵다. 또한 가속전압이 너무 높으면 시료 절편이 다량의 전자와 세기로 인하여 파괴되기 쉬워 검경 자체가 어렵다. 따라서 생물시료는 높은 가속전압에서 높은 해상력의 영상을 얻기가 쉽지 않다. 매우 높은 가속전압을 필요로 하는 시료는 생물시료가 아닌 광물시료의 검경에 사용한다.

2.2.2 해상력

해상력resolution은 두 점 또는 두 선 사이를 구분할 수 있는 능력을 말하는데, 사람 눈은 2.0이면 0.1mm의 차이를 구분할 수 있는 해상력을 갖고 있다. 광학현미경은 0.2 μ m의 해상력이 있으므로 사람의 눈에 비교하면 약 2,000배 미세한 것을 볼 수 있다.

표 2.2. 해상력 비교

관찰 종류	해상력
사람의 눈(2.0)	0.1 mm
광학현미경(light microscope)	0.2 μ m (0.2×10^{-3} mm)
자외선현미경(ultraviolet)	0.1 μ m
주사전자현미경(SEM, 50kV)	5.0 nm (5.0×10^{-6} mm)
투과전자현미경(TEM, 500kV)	0.14 nm

광원을 가시광선visible light ray이 아닌 자외선ultraviolet ray을 이용하는 형광현미경은 해상력이 0.1 μ m이므로 광학현미경보다 두 배 이상 더 미세한 것을 구분할 수 있다.

광원으로 전자를 이용하는 주사전자현미경의 해상력은 보통 5.0nm 이며, 투과전자현미경은 0.1nm 정도이므로 투과전자현미경이 약 50배 이상 해상력이 좋다. 이와 같이 현미경의 해상력 차이는 근본적으로 시료의 정보를 갖고 있는 광원의 종류와 파장에 따라서 차이에 의하여 나타나는 것이다(표 2.2).

2.2.3 전자총 구조와 재질

전자총electron gun은 전자를 발산하는 음극인 전극cathode과 이를 둘러싸고 있는 워넬트전극wehnelt cylinder, 접지 양극으로 구성되어 있다(그림 2.10). 음극 필라멘트는 텅그스텐 헤어핀tungsten hair pin, 란타넘극lanthanum hexa-bromide, LaB_6 , 전계극field emission, FE 등이 개발되어 있다.



그림 2.10. 전자총의 구성.

헤어핀은 일반전구의 필라멘트와 같이 V자 형이며, 전계극은 원통의 끝이 뾰족한 모양으로 형태가 다르다. 필라멘트의 재질과 형상은 전자의 양과 질을 결정하므로 전자현미경의 성능과 직접적인 관련이 있다(표 2.3).

일반적으로 가장 많이 사용하는 헤어핀 필라멘트는 광원 직경이 $15,000\mu\text{m}$ 이지만 란타넘극 LaB_6 은 $5\mu\text{m}$ 로 매우 작으며, 전계방출극FE은 $2.5\mu\text{m}$ 로 더욱 작다. 이와 같이 광원의 직경이 적으면 그 만큼 밝기가 높아지는데 텅그스텐 필라멘트에 비하면 란타넘극은 10배,

란타넘극에 비하여 냉전계방출극cold FE은 200배 이상 된다.

전자가 방출되는 작동온도는 헤어핀은 2,800K(1,000K=727°C)인데 비하여 LaB₆는 1,900K로 낮으며, cold FE는 300K로 매우 낮은 반면에 냉전계방출극은 요구 진공도가 헤어핀의 10^{-5} 보다 10^{-10} 으로 두 배 이상 높다.

표 2.3. 전자총의 전극 종류별 특성

특성	Hair pin	LaB ₆	cold FE
음극 재질	텅스텐	LaB ₆	텅스텐
작온도(K)	2,800K	1,900K	300K
전자빔 반경(radius)	15,000	5	2.5
밝기(brightness)	1×10^{-4}	1×10^{-5}	2×10^{-7}
요구 진공도(hPa)	10^{-5}	10^{-6}	10^{-10}
음극 수명(H)	200	1,000	2,000
민감성(sensitivity)	Low	Low	High

전자현미경에서 음극의 성능이 좋아지면 그에 따라서 좋은 영상을 얻을 수 있으며 오랜 기간 사용할 수 있어 유리한 반면에 상대적으로 더욱 높은 고진공이 필요하고 진동 등 환경에 민감도가 높아 관리에 어려움이 있고, 가격이 높아서 전자현미경 운영을 고려하여야 한다.

2.2.4 전자발산 원리

전자현미경 전자총의 필라멘트에서 고전압 상태에서 발산된

전자들은 음극인 와넬트캐브 구멍을 통하여 이동하는데 전압이 필라멘트 음극보다 약간 낮아 구멍으로 이동되며, 구멍 외부로 나온 전자들은 접지(anode at ground potential)와 사이에 전자기장(electrostatic force)이 만들어진 곳으로 이동한다.

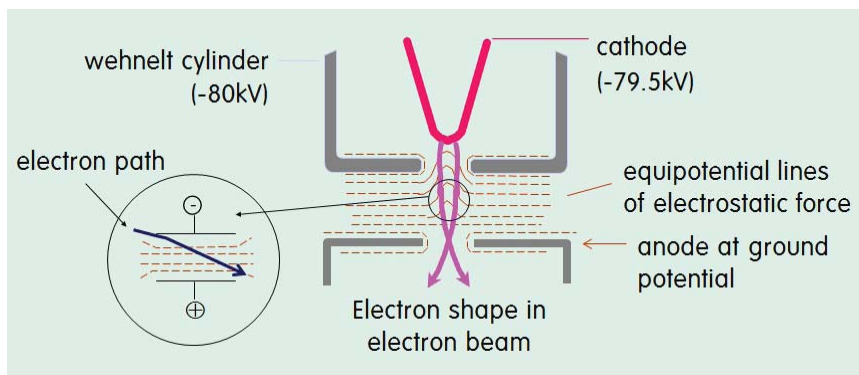


그림 2.11. 전자총에서 전자의 발산과 이동.

등전위선(equipotential line)이 형성된 자기장에서 전자는 나선형의 회오리 모양으로 음극에서 양극으로 이동(electron path)하는데, 이때의 모양은 마치 광선이 볼록렌즈를 통과할 때의 모양과 동일한 볼록한 현상이다(그림 2.11, 동그라미). 따라서 필라멘트에서 발산된 전자들은 유리 볼록렌즈를 통과한 빛과 같이 전자의 집중에 일어나게 되는데 이것은 전자현미경에 장착된 모든 전자렌즈를 통과할 때 똑같이 일어난다(그림 2.11).

필라멘트에서 전자가 방출되기 위해서는 표면에 어느 이상의 에너지가 없으면 전자가 방출되지 않는데 이것을 페르미준위(fermi

level라고 한다. 텅그스텐 필라멘트 표면에서 열전자 방출thermionic emission은 전기적으로 가온이 필요하며, 실온에서 5.8eV 이상이 되어야 전자 방출이 일어나며 그 이상이 되었을 때를 일함수work function라고 한다(그림 2.12).

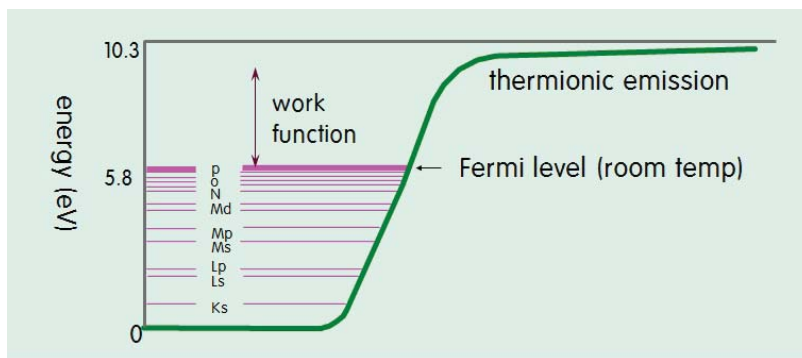


그림 2.12. 텅스텐 음극의 표면에서 탈출하기 위한 전자의 열 방출 곡선.

필라멘트의 재질인 텅그스텐과 란타넘 La_{60} 을 비교하면 음극의 전자각인 P각과 O각의 맨 위에 분포하는 전자가 주요 열전자인데, 텅그스텐의 전자방출을 위해서는 높은 온도가 필요하다는 것을 알 수 있다. 이와 같은 단점을 개선하기 위해서 냉전계방출 cold FE을 이용하는데 이는 필라멘트에 강한 전기장을 가하여 전자가 방출되도록 하는 것이다. 따라서 강한 전기장이 가해지면 일함수가 감소하고 전자가 음극 텅그스텐 필라멘트 표면 바로 아래에서 터널field emission tunnel을 만들어 이를 통하여 전자가 방출된다(그림 2.13).

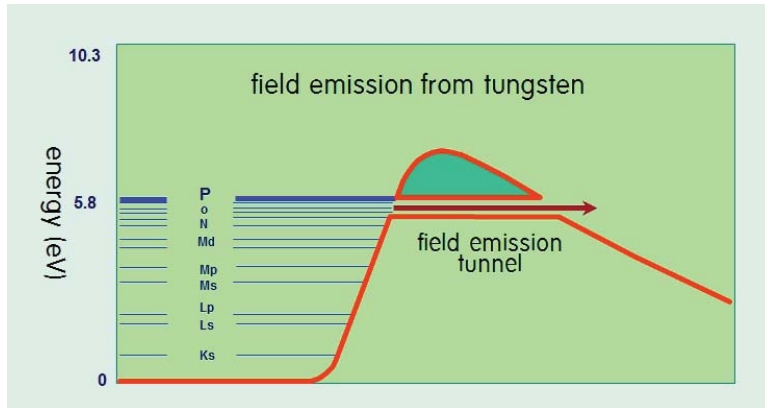


그림 2.13. 고진공 상태에서 냉 고체 표면이 강한 가속 전기장($10^8\text{V}/\text{cm}^2$) 하에 놓일 때 전자 방출 (R.W. Wood, 1897).

전자현미경의 진공상태에서 필라멘트가 $10^8\text{V}/\text{cm}^2$ 의 강한 전자기장에 노출되면 전자가 방출하는데, 냉전계방출cold FE은 전자의 방출을 위하여 음극에서 상대적으로 고에너지가 주어지지 않아도 동시에 많은 수의 전자들이 방출된다. 또한 전자들의 에너지와 민감도sensitivity가 비슷하여 양질의 전자를 이용할 수 있고 에너지의 확산이 적다. 이와 같이 전자의 질의 좋아지면 전자현미경 영상의 높은 해상력을 얻을 수 있다.

2.2.5 필라멘트 종류와 해상력

전자현미경의 전자총에서 발산되는 전자는 가속전압accelerating voltage이 높아질수록 전자의 파장이 짧아지므로 그만큼 해상력이 높아진다. 반대로 가속전압이 낮아지면 해상력 또한 낮아지므로

좋은 영상을 얻기가 어렵다. 따라서 양질의 전자를 얻기 위하여 여러 종류의 전자총 필라멘트가 개발되어 있으며, 낮은 가속전압에서도 높은 해상력을 얻을 수 있는데, 주사전자현미경의 경우 일반 전자총 필라멘트인 헤어핀tungsten hair pin, 란타넘LaB₆, 전계극FE, 스코치전계극scotch FE과 비교하면 성능의 차이를 알 수 있다(그림 2.14).

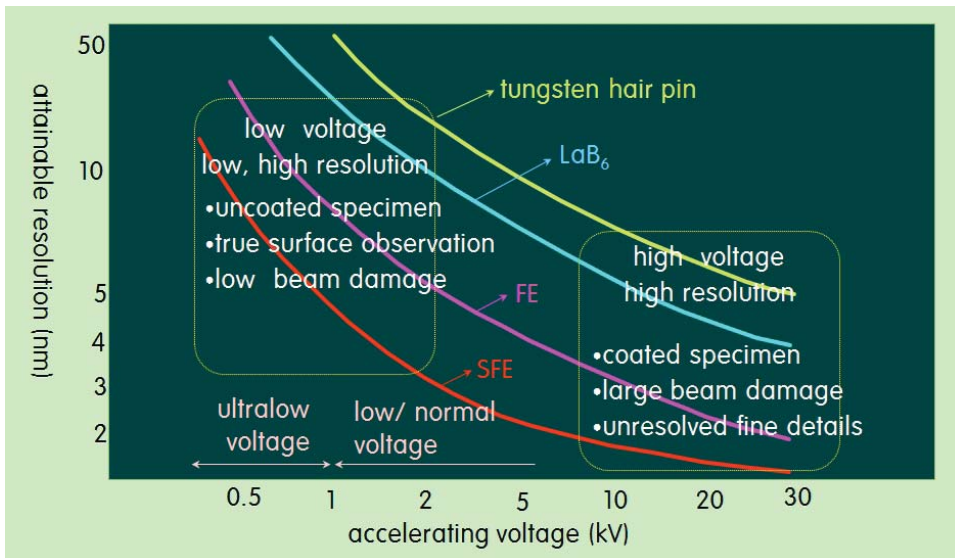


그림 2.14. 주사전자현미경의 가속전압과 해상도의 관계.

높은 가속전압 상태에서 주사전자현미경을 관찰할 경우에는 시료 표면에서 반사된 전자를 이용하여 영상을 얻는데 이를 위해서 시료 표면을 금속으로 코팅하여야 한다. 높은 가속전압에서는 전자빔에 의하여 시료 표면의 손상이 일어나기 쉬우며, 진정한

표면의 미세구조 영상을 얻기가 어렵다(그림 2.14, 우측 사각형). 그러나 낮은 가속전압을 이용할 경우에는 시료의 표면을 코팅하지 않아도 되므로 진정한 표면 관찰이 용이하고 전자빔으로 인하여 표면의 손상을 방지할 수 있는 장점이 있다(그림 2.14, 좌측 사각형).

주사전자현미경의 가속전압 $accelerating\ voltage$ 은 0.3~30kV 범위이며 1.0kV 이하는 초저압 $ultralow\ voltage$, 1.0~5.0kV 사이를 저압 $low\ voltage$ 이라 하며, 그 이상을 고압 $high\ voltage$ 이라고 한다.

가속전압이 높아지면 해상력도 같이 증가하며 반대로 가속전압이 낮아지면 해상력이 감소한다. 이와 같은 현상은 전자총의 캐소드 $cathode$ 종류에 관계없이 동일한 경향이다. 그림 2.14에서 보면 텅스텐(황색), LaB_6 (하늘색), 전계극(보라색), 스코치전계극(빨간색)은 순서대로 낮은 전압에서 높은 해상력을 얻을 수 있다.

가속전압이 높아지면 이에 따른 전자빔에 의한 시료의 손상이 많아지고 전자의 전도도가 방해를 받아서 좋은 영상을 얻을 수 없다. 따라서 높은 가속전압에서 관찰할 때에는 시료 표면에 전자의 전도도를 좋게 하기 위해서 금, 백금 등으로 피막을 입혀서 관찰한다. 반면에 낮은 가속전압에서 관찰할 때는 그림 2.14에서 보면 전자총의 캐소드 $cathode$ 가 텅스텐(황색)이나 LaB_6 (하늘색)는 CFE(보라색)나 SFE(적색) 보다는 불리하다. 기본적으로 텅스텐 캐소드를 장착한 현미경은 피막을 입히지 않은 시료를 관찰하기 어려운 단점이 있으므로 최적의 영상을 얻기 위해서는 고도의 기술적 지식을 갖고 있어야 하며 최근에는 영상분석기능을 갖추고

있는 현미경은 관찰이 보다 쉽다.

냉전계극CFE과 스코치전계극SFE을 장착한 현미경은 매우 낮은 가속전압에서 시료에 피막을 입히지 않은 시료의 관찰이 비교적 쉬우며 전자빔에 의한 시료 손상도 적고 더욱 중요한 것은 시료에 금속 피막을 입히지 않아서 실제표면 관찰이 가능하다는 것이다. 그러나 낮은 가속전압에서 자연 상태의 시료로 관찰할 때는 냉전계극CFE과 스코치전계극SFE을 사용하여도 란타넘LaB₆이나 텅스텐 필라멘트 보다는 좋으나 고배율이나 고해상도를 얻기가 일반적으로 어려우므로 시료에 금속 피막을 입히고 가속전압을 높여 검경할 수밖에 없다.

2.2.6 최고 밝기의 전류 조정

전자현미경의 전자총 필라멘트에 열전류heating current를 증가시키면 전자의 방출이 증가하게 되는데, 일정한 전류 이상으로 증가시켜도 더 이상 밝아지지 않는데 이때를 포화점saturation point이라고 한다.

전자현미경을 검경할 때에는 포화점의 전류 한계를 설정하는 것이 양질의 전자를 얻을 수 있고 전류를 필요 이상으로 높이지 않아서 필라멘트의 수명 또한 길게 할 수 있다. 전류를 증가시키면 투과전자현미경의 형광판 또는 주사전자현미경의 모니터에 전자빔의 모양이 나타나는데 이 모양을 보면서 포화점을 맞춘다(그림 2.15).

주사전자현미경을 예로 들면 30kV 가속전압에서 필라멘트에

-29.99kV의 전압에서는 어두운 밝기의 동그란 모양의 전자빔 형태를 볼 수 있으며, 이때 전자빔의 동그랗게 모아지는 끝부분은 애노드(anode)의 내부에 존재한다. 전압이 -29.95kV가 되면 고양이 눈 모양(catch eye)의 전자빔 형태를 볼 수 있고 이때의 전자빔의 둥근모양의 끝은 애노드의 구멍과 일치하고 있다. 그러나 -29.90kV의 전압이 되면 완전한 밝기의 동그란 모양의 전자빔 형태가 되며 이때 전자빔의 가장 볼록한 둥근 부분의 중간이 애노드 구멍 중간에 위치하고 있다(그림 2.15).

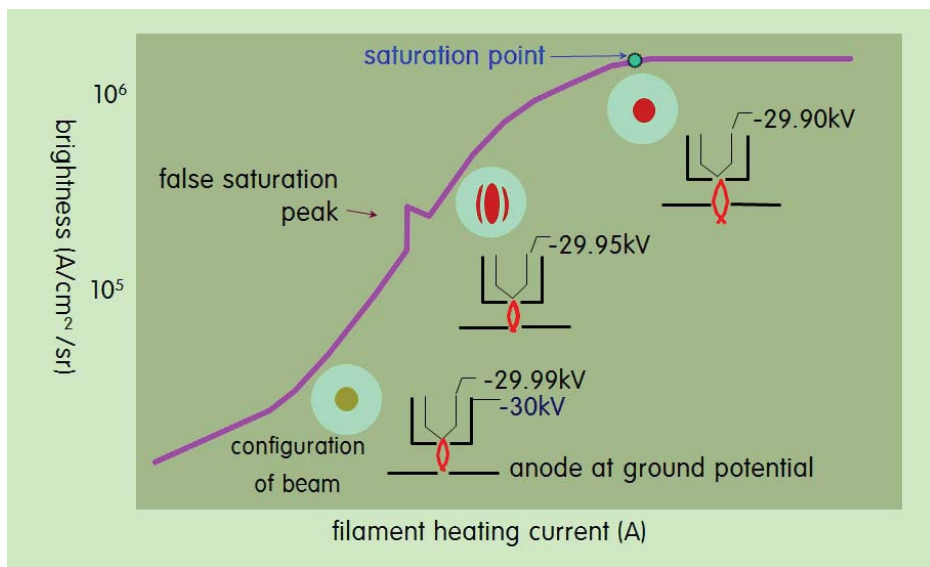


그림 2.15. 텅스텐 필라멘트의 전자빔의 밝기와 가열 전류(SEM).

3. 전자자기렌즈

3.1 일반적 구조

전자자기렌즈electromagnetic lens는 원통형 구조로 전류가 흐르는 코일wire coil이 감겨져 있으며 가장자리는 철soft iron로 둘러싸여 있다. 전자자기렌즈의 단면을 보면 구멍이 있는 원통형에 구리선copper wire coil이 감겨져 있다(그림 3.1).

전자자기렌즈의 코일에 전류가 흐르면 플레밍의 왼손법칙에 따라서 수직 방향으로 자기장magnetic field이 발생하며, 이때 전자렌즈 구멍 안으로 전자가 통과하면 속도가 빨라지게 되는 전자의 가속이 일어난다. 전자렌즈의 코일이 많이 감길수록 전류가 높아지면 코일 주변에 자기장의 강도가 높아지며, 이에 따라서 전자의 가속도도 더 증가하고 아울러 투과력도 증가한다.

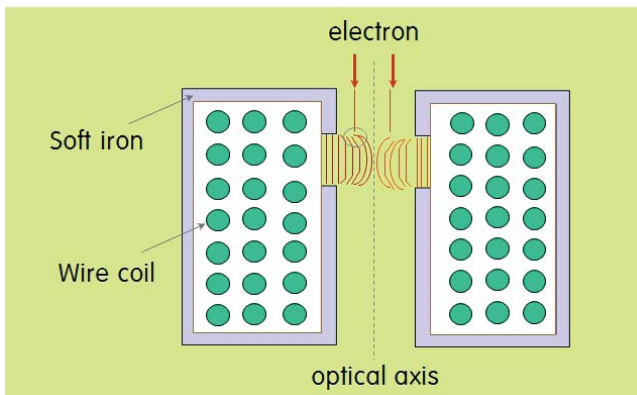


그림 3.1. 전자자기렌즈의 절단 모양과
자기장에서 전자 이동.

전자자기렌즈를 통과할 때에 일정한 가속을 갖는 전자들을 한 점으로 모으기 위하여 자계 분포를 고르게 할 필요가 있다. 전자의 집중은 전자자기렌즈의 가운데 구멍에 전류가 잘 통하는 구리로 된 자극편pole piece을 삽입 한다(그림 3.2, 좌).

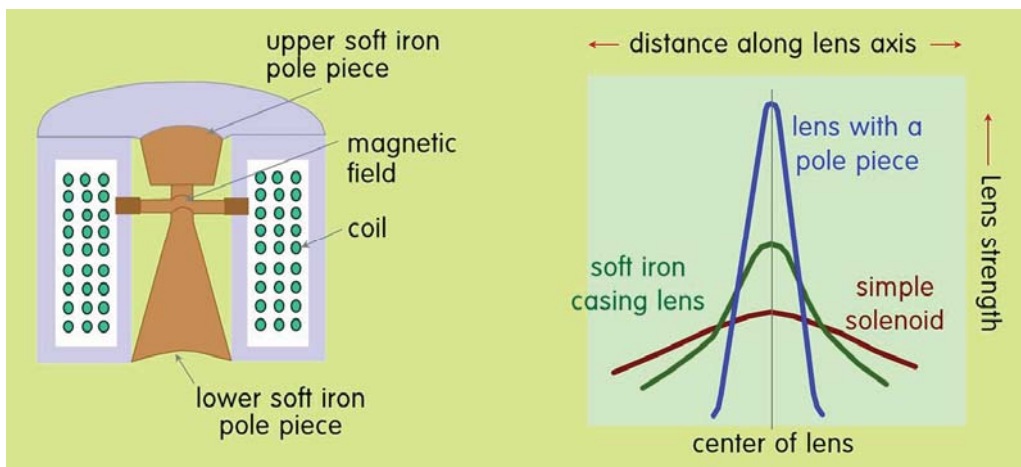


그림 3.2. 전자자기렌즈의 자극편 삽입(좌)과 전자빔의 강도(우).

자극편이 없는 전자렌즈의 전자 강도와 비교하여 보면 단순히 코일이 감겨있는 전자자기렌즈 단독simple solenoid일 때에 가장 낮고, 전자자기렌즈 가장자리를 무른 철로 감싸면soft iron casing lens 더 강해지며, 전자자기렌즈 구멍에 자극편이 있는 경우lens with a pole piece에 강도가 가장 크며 전자빔의 직경도 가장 작아서 양질의 전자를 집중 시킬 수 있다(그림 3.2, 우).

3.2 전자자기렌즈의 수차

모든 광학렌즈는 구면수차spherical aberration, 색수차chromatic aberration 그리고 난시astigmatism의 결점을 갖고 있으며 전자자기렌즈도 광학 유리렌즈와 동일한 3가지 수차를 갖고 있기 때문에 이 수차를 교정하여야 시료의 정보를 갖고 있는 양질의 전자로 좋은 영상을 촬영할 수 있다.

3.2.1 구면수차

광학렌즈는 유리로 만들어져 있고 렌즈의 가장자리와 가운데의 곡면이 다르기 때문에 가장자리와 가운데를 통과한 빛은 서로 다른 거리로 인하여 한 점에 모아지지 않는다. 전자자기렌즈의 경우에도 전자자기렌즈의 가운데와 가장자리는 전장이 동일하지 않기 때문에 전자자기렌즈의 가운데와 가장자리를 통과한 전자들은 전자의 속도가 다르므로 광학렌즈의 구면수차와 동일한 현상이 발생한다.

유리 볼록렌즈의 가장자리를 통과한 빛은 렌즈 앞쪽에 가장자리초점marginal focus이 맞추어지고 가운데를 통과한 빛은 굴절이 덜 일어나므로 더 먼 곳에 축초점axial focus이 맺히기 때문에 실제 영상은 최소착란원disc of least confusion이 존재하는 가장자리초점과 축초점 사이에 존재한다(그림 3.3, 좌).

전자자기렌즈의 경우에도 전자자기렌즈의 구멍의 가장자리를 통과하는 전자는 더 강한 전장의 영향을 받아서 방향이 더 심하

게 경로가 바뀌어서 렌즈 앞쪽에 초점이 맞아지고, 가운데를 통과한 전자는 더 먼 곳에 초점이 맞으며 실제로 영상은 가장자리 초점과 축초점 사이에 맺힌다(그림 3.3, 우).

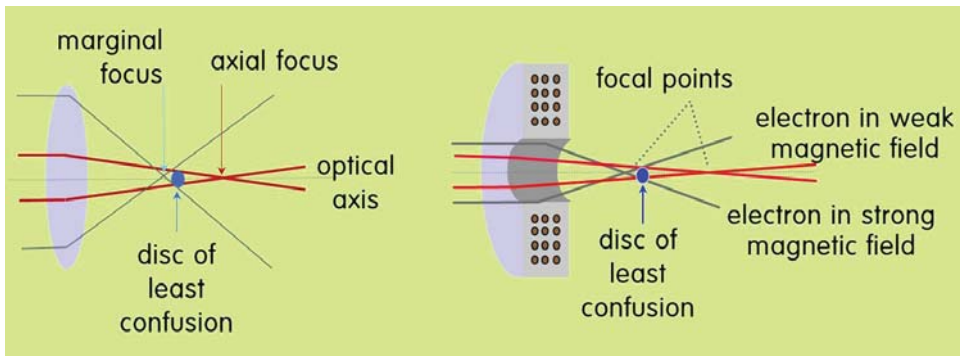


그림 3.3. 유리렌즈(좌)와 전자자기렌즈(우)의 구면수차 발생.

3.2.2 색수차

광학렌즈에서 광원으로 이용하는 가시광선 visible light은 파장이 서로 다른 400~700nm의 복합광선으로 구성되어 있으며, 가시광선 중에서 빨간색의 광선은 파장이 700nm로 가장 길고 오렌지색의 광선은 600nm, 녹색광은 500nm, 보라색 광선은 400nm로 가장 짧다(그림 3.4).

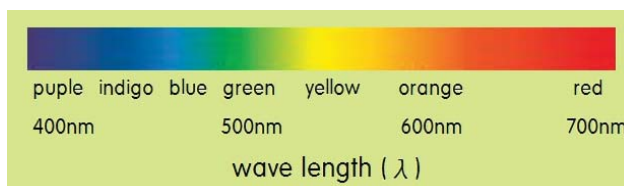


그림 3.4. 가시광선의 파장.

유리 볼록렌즈의 가시광선에 의한 색수차는 동일한 지점을 통과한 빛은 파장이 짧은 보라색 광선의 초점은 렌즈 앞쪽에 맺히며 blue focus point, 파장이 긴 적색 광선의 초점은 뒤쪽에 맺히며 red focus point, 실제로 영상이 잘 보이는 초점은 그 중간에 맺히는데 이를 색수차 chromatic aberration라고 한다(그림 3.5, 좌).

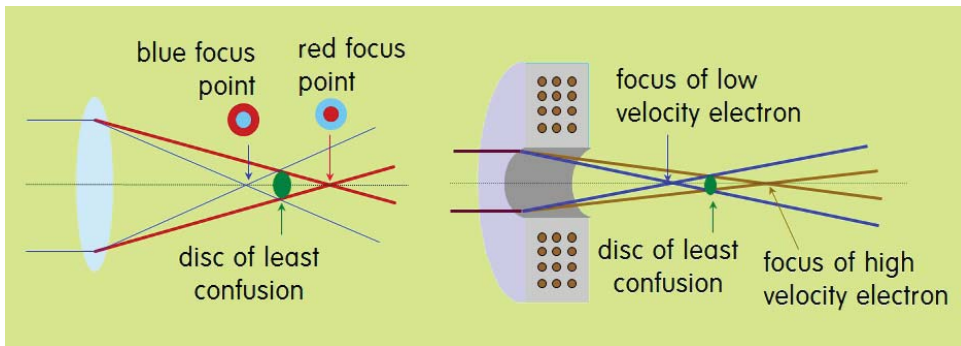


그림 3.5. 유리렌즈(좌)와 전자자기렌즈(우)의 색수차 발생.

전자자기렌즈의 경우에도 전자자기렌즈의 가운데를 통과하는 전자는 동일한 지점을 통과한 전자들 각각의 속도가 달라져서 가시광선의 파장과 동일한 서로다른 지점에 영상이 맺히는 현상이 일어난다. 전자현미경의 전자에 의한 색수차는 전자총의 전자 방출속도 emission velocity, 가속전압 accelerating voltage과 전자자기렌즈의 전류 세기 lens current에 따라서 다르기 때문에 복합적인 원인으로 발생한다.

전자자기렌즈의 전자에 의한 초점은 렌즈의 전장에 의하여 속도가 늦은 전자는 렌즈 앞쪽에 초점이 맺히며 focus of low velocity

electron, 속도가 빠른 전자는 그 뒤에 초점이 맺히게 되고 focus of high velocity electron, 가장 영상이 잘 보이는 초점은 그 사이에 맺힌다(그림 3.5, 우).

3.2.3 난시

유리렌즈를 만들기 위해서는 표면을 매끄럽게 하여야 투과하는 광질이 좋아지는데 표면이 매우 미세한 높낮이도 없는 유리렌즈를 만들기는 매우 어렵다. 최근에는 컴퓨터를 이용한 정밀작업이 가능하여 유리렌즈의 난시 astigmatism를 거의 없게 하고 있다. 전자자기렌즈의 경우에도 전장을 완전히 동일하게 만들어야 하지만 현실적으로 코일의 직경이나 매우 균일하게 감는 것에서 완벽을 기하기 어렵기 때문에 전자기렌즈의 난시 발생은 필연적이다.

유리렌즈의 표면이 매끄럽지 않은 부분을 통과한 광선은 렌즈를 통과할 때에 서로 다른 방향으로 진행을 하여 결국 서로 다른 지점에 초점이 맺히며(그림 22, 초록색), 사선의 수평 초점선 horizontal local line은 렌즈 앞에 초점에 맺히고 난시가 발생하지 않은 부분을 통과한 광선의 수직 초점선 vertical local line은 그 뒤에 맺히며 가장 선명한 영상은 그 사이의 점 disc of least confusion에 맺히게 되므로 난시가 있으면 거의 초점이 맺히지 않는 영상을 볼 수밖에 없다(그림 3.6, 좌).

전자자기렌즈의 경우에도 유리렌즈와 마찬가지로 완벽하고 균일한 전장이 형성되지 않기 때문에(그림 3.6, 우, 타원형), 전자의

진행방향이 다르게 되어 초점이 서로 다른 지점에 맺히게 되므로 난시가 발생한다(그림 3.6, 우). 전자현미경의 난시는 전자가 통과하는 경통body tube, 삽입판aperture, 전자렌즈 등의 오염으로 인하여 발생하기 때문에 전자현미경의 청결한 관리는 좋은 영상을 얻기 위한 필수적인 조치이다.

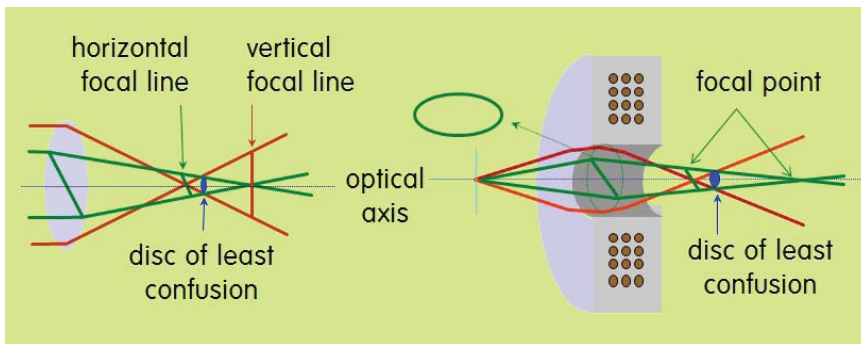


그림 3.6. 유리렌즈(좌)와 전자자기렌즈(우)의 난시 발생.

전자현미경의 난시는 특히 대물렌즈를 포함한 광학계에서 영상의 해상력을 결정하는 가장 중요한 요인이므로 난시가 발생하지 않도록 최적의 전기적 조정을 통하여 해결한 다음 전자현미경을 검경하여야 좋은 영상을 얻을 수 있다.

3.3 렌즈 수차의 조정

3.3.1 구면수차의 교정과 최소화

유리렌즈는 광선을 수렴하는 볼록렌즈convex lens와 광선을 발

산하는 오목렌즈concave lens를 결합하여 서로 다른 굴절률refractive index을 갖도록 서로 붙여서 제작하면 구면의 상이함으로 발생하는 파장이 다른 적색광과 청색광의 다른 수렴 장소를 한곳에 수렴하게 하여 구면수차를 최소화할 수 있다(그림 3.7, 좌). 그러나 최근에는 정밀한 컴퓨터 작업을 통한 비구면 렌즈aspherical-curved lens를 만들어 최소화하고 있다.

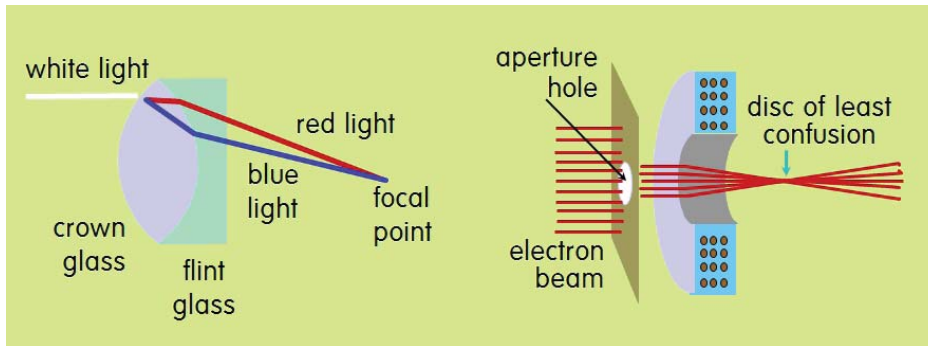


그림 3.7. 유리렌즈(좌)와 전자자기렌즈(우)의 구면수차 조정.

전자자기렌즈는 렌즈 코일에 전류를 증가시켜서 초점거리focal length를 짧게 하여 구면수차를 최소화할 수 있으며, 직경이 보다 작은 삽입판의 구멍을 이용하면 그만큼 더 작은 최소화된 구면수차를 교정한 영상을 얻을 수 있다(그림 3.7, 우).

3.3.2 색수차의 교정과 최소화

유리렌즈는 색수차가 발생하지 않도록 광원 앞에 단일 파장의

빛만 통과하도록 하면 쉽게 극복할 수 있으며, 또한 볼록렌즈와 오목렌즈를 접합하여 사용하면 색수차를 최소화할 수 있다. 색수차가 교정된 렌즈는 적색 광선에서 보라색 광선의 파장과 상관없이 초점이 한 지점에서 맺히게 되어 정확한 영상을 얻을 수 있다.



그림 3.8. 광학현미경의 대물렌즈와 특성 표시.

광선의 파장을 극복하도록 색수차를 교정하여 만든 렌즈를 비색수차렌즈achromatic lens라고 하며, 색수차와 구면수차를 교정하여 만든 렌즈는 아포크로마틱 렌즈apochromatic lens라고 한다. 광학현미경을 이용할 때 대물렌즈에 기록된 렌즈 특성을 확인하고 이용하면 좋은 영상을 얻을 수 있다(그림 3.8).

광학현미경의 대물렌즈에 표시된 수차 교정 정보 이외에 배율magnification, 집광력light gathering power 즉 개구수numerical aperture, NA, 대물렌즈의 경통 길이tube length, 적정 슬라이드그라스의 시료를 덮는 커버슬립cover slip 두께의 정보를 표시하고 있으므로 각 렌즈의 특성

을 알고 검경하여야 한다.

전자현미경의 전자자기렌즈는 렌즈의 구조상 기술적으로 색수차가 교정된 렌즈를 만들 수 없기 때문에 전자현미경의 전압과 전류에 관여되는 기계적 안정성을 증대시켜야 한다.

3.3.3 난시의 교정과 최소화

유리렌즈는 비색수차 렌즈를 사용하면 난시를 교정할 수 있다. 그러나 전자자기렌즈는 완전히 균일한 전장의 강도를 만들 수 없기 때문에 강한 전장을 받은 부위strong magnetic field와 약한 전장을 받은 부위weak magnetic field로 인하여 타원형의 전자빔 형태 astigmatic electron beam가 되어 난시가 발생한다. 전자자기렌즈는 정전식 교정장치cylindrical rod of electrostatic stigmator를 사용하여 전자빔을 동그랗게 만들어 난시를 교정한다(그림 3.9).

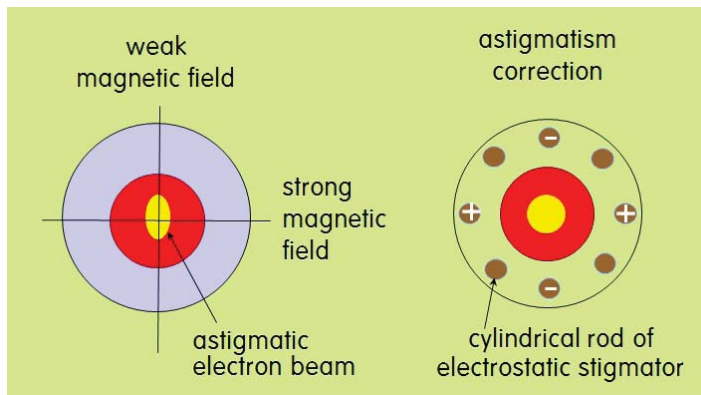


그림 3.9. 전자렌즈의 자기장 비대칭에 의한 타원형의 전자빔 모양(좌)과 교정(우).

타원형의 전자빔(electron beam)이 생기면 자기렌즈 가장자리에 설치된 교정막대에 인위적으로 타원형의 긴 쪽에 음전하를 주고 짧은 쪽에 양전하를 가해 주면서 원형이 되도록 교정하면 난시 발생을 최소화할 수 있다(그림 3.9, 우). 난시의 교정은 전자현미경 검경 전에 필수적으로 조정하여야 하는 중요한 기본 작업이며, 난시교정이 되지 않으면 좋은 영상을 얻을 수 없다.

4. 영상에 관여하는 요인

모든 현미경은 배율magnification, 명암contrast, 초점focus 등이 최고로 잘 맞아야 좋은 영상을 얻을 수 있으며, 이는 현미경을 검경하는데 있어서 기본적으로 중요한 요소이다.

광학현미경은 광선에 의하여 시료의 형상을 있는 그대로 보여주는 진실 영상true image이며, 투과전자현미경의 영상도 전자가 시료를 투과하여 명암에 의하여 만들어진 영상이므로 또한 진실 영상이다. 그러나 주사전자현미경은 음극선 경통 안에서 점point과 점, 또는 픽셀pixel과 픽셀의 시료 영상 점들을 조합scanning하여 만들어지므로 우리가 모니터로 보는 영상은 진실 영상이 아니라고 볼 수 있다.

4.1 배율

4.1.1 광학현미경

광학현미경의 배율magnification, M 은 단 렌즈의 경우 초점길이 focal length, f 와 영상이 맺히는 지점의 길이length, L 의 두 요소가 관여하며, 배율의 측정은 $M=L/f$ 로 표시한다(그림 4.1, 좌). 대물렌즈objective lens와 투사렌즈projection lens가 장착된 복렌즈 현미경의 경우에는 $M=L1/f1 \times L2/f2$ 로 배율을 측정한다(그림 4.1, 우).

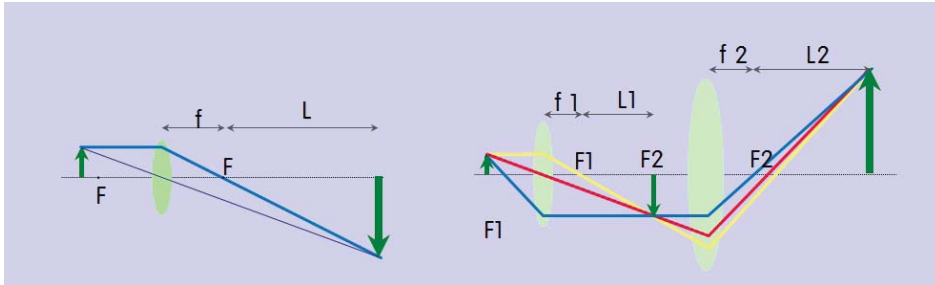


그림 4.1. 광학현미경의 단 렌즈(좌)와 복 렌즈의 영상 확대.

현대의 광학현미경은 기본적으로 켈러Kohler의 고안에 의하여 제작되는데, 광원light source으로부터 눈의 망막retina에 영상이 맺히기까지의 광학체계illumination system는 광원에서 발산된 빛을 모아주는 수광렌즈collector lens, 삽입판aperture, 광의 량과 질을 높여주는 집광렌즈condenser lens, 시료specimen, 시료의 정보를 갖고 있는 광선을 잘 전달하고 영상을 볼 수 있도록 하는 가장 중요한 대물렌즈objective lens, 대물렌즈 후 초점면back focal plane, 그리고 일차영상primary image을 최종적으로 확대하는 대안렌즈eye piece의 체계이며, 대안렌즈를 통과한 빛의 영상이 대물렌즈 바로 앞에 맺히는 영상Ramsden disc이 망막에 맺혀 눈으로 볼 수 있다(그림 4.2). 대안렌즈는 보통 10배 정도로 영상을 단순히 확대하는 기능만 하며 시료의 정보는 대물렌즈의 해상력, 배율과 밝기에 의존한다.

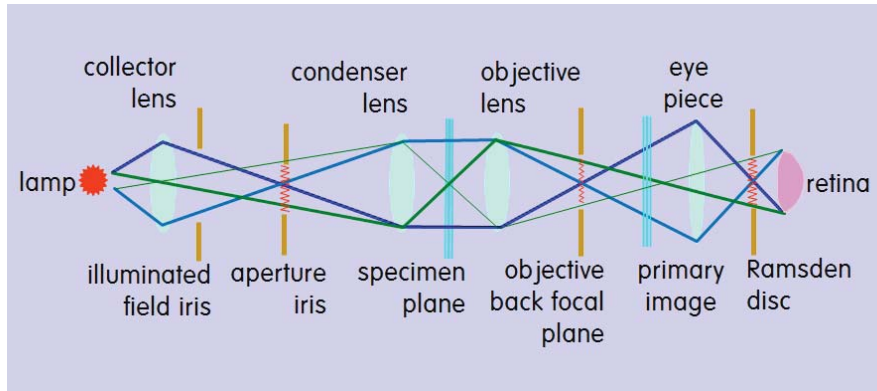


그림 4.2. 현대 광학현미경의 기본 광학체계.

4.1.2 투과전자현미경

투과전자현미경의 광학체계는 위에서 설명한 광학현미경과 기본적으로 동일하다. 전자현미경 경통의 맨 위에 장착된 전자를 발산하는 전자총electron gun에서부터 맨 아래 영상이 맺히는 형광판 fluorescent screen까지의 체계를 보면 집광렌즈condenser lens, 시료 specimen, 대물렌즈objective lens, 투사렌즈projector lens로 구성되어 있다. 집광렌즈는 보통 2개가 설치되어 있고 투사렌즈는 보통 3개가 설치되어 있다. 집광렌즈와 대물렌즈 아래에는 삽입판aperture이 설치되어 있는데 집광렌즈 아래에는 집광삽입판condenser aperture, 대물렌즈 아래에는 명암삽입판contrast aperture과 선택삽입판selector aperture이 장착되어 있다.

광학현미경의 배율은 대물렌즈와 대안렌즈의 고정된 배율에 따라서 결정되지만, 투과전자현미경에서는 전자자기렌즈의 활성화에 따라서 배율이 결정된다. 투과전자현미경에서 저배율인 150배~

1,100배의 경우에는 집광렌즈 하나는 최고로 활성화excitation되며 집광 삽입판은 큰 구멍을 사용한다. 대물렌즈는 가장 낮은 수준의 활성화가 되며 대물렌즈 아래의 명암 삽입판은 빼내어 사용하지 않는다. 낮은 배율에서는 선택 삽입판이 대조(명암)삽입판의 기능을 대체하며, 일차 투사렌즈가 활성화되어 최종 영상이 형광판에 맺힌다(그림 4.3, 좌).

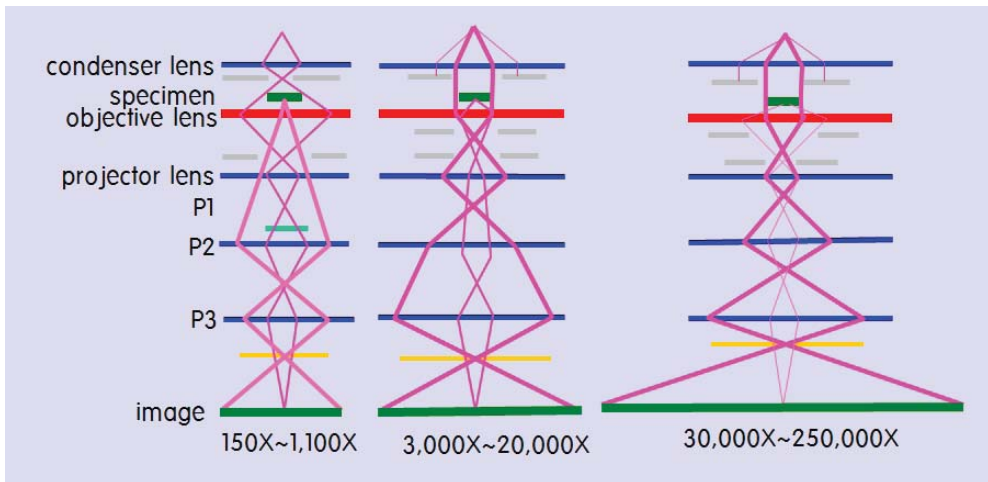


그림 4.3. 투과전자현미경의 배율에 따른 전자자기렌즈의 활성화와 전자빔의 이동 모양.

투과전자현미경의 중간 배율인 3,000배~20,000배에서 검경을 할 때에는 일차 집광렌즈는 항상 활성화되어 있으며 배율이 증가할 경우 2차 집광렌즈도 활성화된다. 집광 삽입판은 밝기와 영상의 대조에 따라서 100 μ m, 200 μ m, 400 μ m의 구멍을 선택하는데, 구

명이 작을수록 전자량이 감소하고 모아주어 밝기가 어두워지지만 명암은 증가하므로 적절한 선택을 하여 검경한다. 그러나 선택삽입판은 사용하지 않는다. 대물렌즈는 매우 높게 활성화되어 있으며 높은 해상력의 영상을 얻을 수 있다. 중간 배율에서는 일차 투사렌즈가 활성화되어 최종 영상이 형광판에 맺힌다(그림 4.3, 중)

생물시료는 보통 배율이 3만 배 정도에서 검경하는데, 그 이상 25만 배까지 매우 높은 배율로 검경을 할 때에는 두 개의 집광렌즈 모두 활성화되며 집광 삽입판의 구멍은 $400\mu\text{m}$ 정도를 사용한다. 대물렌즈는 최고로 활성화되어 최고 해상력의 영상을 얻을 수 있다. 명암 삽입판이 영상의 명암을 기본적으로 결정하며 선별 삽입판은 사용하지 않는다. 투사렌즈는 모두 활성화되어 1차, 2차, 3차 투사렌즈의 확대 영상이 형광판에 맺힌다(그림 4.3, 우).

투과전자현미경과 광학현미경에서 영상이 맺히는 체계는 기본적으로 동일하지만 투과전자현미경은 배율에 따라서 전자렌즈의 활성화가 다르고 중간에 삽입판의 사용이 배율에 따라서 다르기 때문에 전자 투사 체계를 잘 이해하고 이를 적절히 이용하면 최고의 영상을 얻을 수 있다. 투과전자현미경의 배율 측정은 검경시료에 길이 측정 표준 시료를 동시에 검경하여 비교 측정을 하여야 정확하다. 또한 배율별로 미리 측정치를 컴퓨터에 입력하여 길이를 측정할 수도 있다.

4.2 명암과 초점심도

영상의 명암contrast은 시료 표면의 높낮이 차이에 따라서 나타나는 지형명암topographic contrast과 시료를 구성하는 부분의 원자수atomic number의 차이에 따라서 나타나는 구성명암compositional contrast으로 구분된다.

시료의 명암 정도는 시료의 명암강도specimen contrast intensity, SCI와 배경의 명암강도back ground contrast index, BCI의 상관이며, $(BCI-SCI)/BCI$ 로 정의한다.

생물 시료를 투과전자현미경으로 검경할 때에는 시료의 두께가 보통 80~100nm의 매우 얇기 때문에 표면의 높낮이가 없어 지형 명암을 이용할 수 없다. 또한 생물 시료는 보통 투명하여 시료의 내용물과 배경이 거의 동일한 명암이기 때문에, 광학현미경 검경을 할 때에도 염색을 하거나 파장을 선택적으로 활용할 수 있는 필터를 사용하며, 위상차phase contrast 현미경, 또는 차등간섭 대비differential interference contrast 현미경을 이용한다.

투과전자현미경으로 생물 시료를 검경할 경우에도 시료가 갖고 있는 단백질 등에 염색이 되는 피티에이phosphor tungstic acid, PTA와 같은 중금속heavy metal을 염색 시약으로 이용하여 전자의 산란을 많게 하여 영상을 얻는다. 또한 시료를 구성하고 있는 원자의 서로 다른 특성을 이용하여 특수하게 고안된 영상 전자 에너지 손실 분광검경으로 검경할 수 있다.

주사전자현미경의 경우는 시료의 표면을 관찰하므로 지형명암

을 이용할 수 있기 때문에 투과전자현미경과 달리 입체적인 영상을 얻을 수 있다. 주사전자현미경의 명암은 지형명암뿐만 아니라 초점심도(focus depth)를 조절하여 보다 좋은 명암의 영상을 얻을 수 있다.

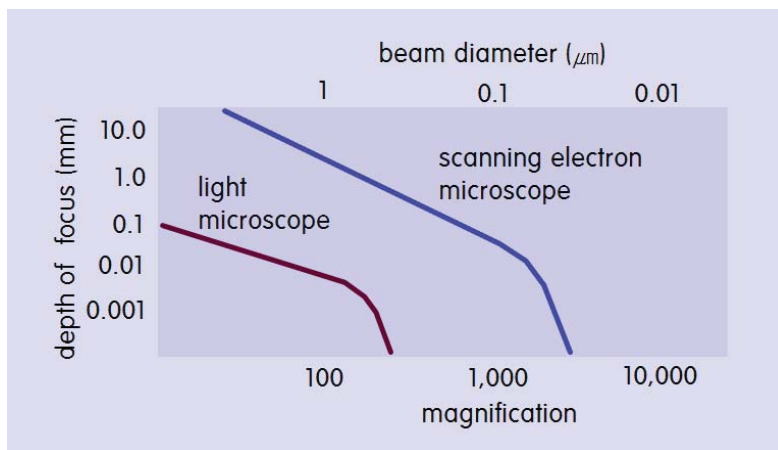


그림 4.4. 광학현미경과 주사전자현미경의 초점심도.

광학현미경이나 주사전자현미경 모두 배율이 증가하면 초점심도가 낮아지며 주사전자현미경은 약 50배의 배율에서 광학현미경에 비하여 매우 높은 10mm의 심도로 검경할 수 있다(그림 4.4). 또한 주사전자현미경의 배율이 1,000배 이상이면 심도가 0.1mm로 낮아지며 전자빔의 직경도 100배 배율의 1μm에서 0.1μm로 현저히 작아지므로 고 배율에서는 전자빔의 강도도 높아진다.

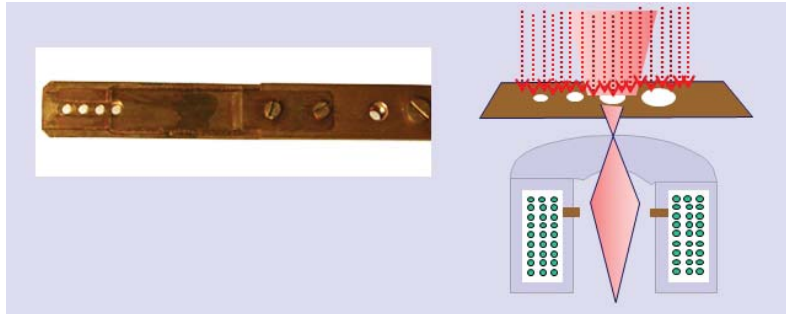


그림 4.5. 전자현미경의 열러개의 구멍이 있는 대물렌즈
삽입판(좌)과 삽입판 구멍을 통과한 전자빔의
집광(우).

전자현미경의 대물렌즈 삽입판(objective aperture)은 전자가 삽입판의 구멍(hole)을 통과할 때에 필요한 전자를 통과시키는 기능을 한다. 대물렌즈 삽입판에는 여러 개의 구멍이 있는 삽입판 multi-hole stripe aperture을 주로 사용하는데(그림 4.5, 좌), 각 직경 크기에 따라서 통과한 전자의 집광상태가 다르다(그림 4.5, 우).

대물렌즈 삽입판의 구멍크기의 배열은 전자현미경 제조회사와 모델에 따라서 다르지만 일반적인 구멍 크기에 따른 검경 특성은 다르다(표 4.1). 삽입판 구멍의 직경이 가장 큰 $1,000\mu\text{m}$ 는 전자현미경 검경 전에 전자현미경의 전자빔의 축을 정렬할 때에 사용한다. 삽입판 구멍직경이 작아질수록 명암이 높아지고 초점심도도 높아지며, 고해상도의 검경이 가능하다. 일반적인 생물시료의 투과전자현미경 검경에는 $50\mu\text{m}$ 의 삽입판 구멍을 사용하며, 고해상도 검경과 높은 명암을 얻기 위해서는 $30\mu\text{m}$ 의 삽입판 구멍의 직경을 사용한다.

표 4.1. 삽입판 구멍 크기와 검경 특성

구분	직경 (μm)	검경 특성
0	1,000	전자빔 축 정렬
1	110	매우 낮은 명암
2	70	고해상도 검경, 낮은 명암
3	50	일반 검경, 보통 명암
4	30	초고해상도 검경, 높은 명암

4.3 해상력에 관여하는 요인

사람 눈은 2.0일 경우 0.1mm ~ 0.2mm의 사이를 구분할 수 있는 해상력resolution을 갖고 있으며, 광학현미경의 해상력은 기본적으로 대물렌즈objective lens의 종류에 따라서 다르다. 광학현미경의 대물렌즈에는 그 렌즈의 특성이 렌즈 표면에 표시되어 있으며 사용한 렌즈를 알고 있기 때문에 해상력과 배율을 알기 쉽다. 광학현미경의 해상력은 $0.61 \times \text{파장} / \text{개구수NA}$ 로 구한다. 빛의 파장은 붉은색 광의 경우 700nm, 녹색광의 경우 500nm, 청색광의 경우 400nm이며, 개구수는 일반 건식대물렌즈dry objective lens는 0.95, 유침대물렌즈oil immersion objective lens는 1.4이다. 광학현미경에서 대물렌즈와 집광렌즈를 사용할 경우에는 해상력= $0.61 \times \text{파장} \times (\text{대물렌즈 개구수} + \text{집광렌즈 개구수}) / 2$ 로 구한다.

투과전자현미경의 해상력은 기본적으로 전자의 파장인 1.4nm의 해상력을 구현할 수 있다. 그러나 전자현미경은 기계적 요인과 시료를 만드는 기술적 요인으로 인하여 최고의 해상력을 구현하기는 실제로 어렵다. 기계적 요인으로는 우선 전자빔의 안정성이 좋아야 한다. 전자현미경의 설치 장소의 안정성과 전기적 안정성이 관여된다. 전자현미경은 전자총으로부터 영상이 맺히는 형광판에 이르기까지 전자의 경로 정렬을 일직선으로 잘 하여야 한다.

전자현미경은 광원으로 전자를 사용하기 때문에 전자현미경의 전자가 이동하는 곳은 모두 진공 상태로 되어 있어야 한다. 따라서 진공 상태의 좋고 나쁨이 해상력을 결정하는 중요 요인이 된다. 진공 상태를 최고로 유지하기 위해서는 진공 계통의 기계적 성능을 최고로 유지할 수 있도록 관리를 철저히 하여야 한다.

전자현미경을 사용하면 전자총을 중심으로 전자가 지나가는 길이 전자에 의하여 오염이 되거나 시료를 넣고 뺄 때에도 오염이 되기 쉬우므로 주의가 필요하며 항상 청결한 상태가 유지되어야 한다. 전자현미경은 양질의 전자를 이용하기 위하여 여러 종류의 삽입판을 사용하는데 전자가 통과하는 삽입판 구멍의 청결도 역시 해상력에 영향을 미친다.

해상력에 영향을 주는 기술적 요인으로는 최고의 영상을 얻기 위해서는 우선 검경하고자 하는 시료가 최상의 조건으로 제작되어야 한다. 또한 시료가 잘 만들어져 있을지라도 검경할 때에 초점을 잘 맞추어 촬영을 하여야 하고, 사진을 촬영할 때에도 노출 시간 등 촬영 조건을 잘 이행하여야 한다. 촬영된 필름을 암실작

업을 할 때에는 현상development과 인화printing의 조건이 서로 잘 맞아야 최종적으로 최고 영상물을 얻을 수 있다.

최근에는 암실작업을 할 필요 없이 디지털 영상을 컴퓨터에서 직접 얻을 수 있는데, 필름에서 얻은 영상과 비교하면 질이 매우 낮다. 앞으로 디지털 영상 기술이 많이 개발되고 이를 활용하여야 좋은 영상을 얻을 수 있겠으나 디지털 영상 촬영장치가 매우 고가이어서 이용하기가 쉽지 않다.

5. 영상 맺힘 과정

투과전자현미경TEM과 주사전자현미경SEM은 전자를 발산하는 전자총electron gun, 전자자기렌즈electromagnetic lens, 시료실specimen chamber, 삽입판aperture, 진공펌프vacuum pump 등이 공통적으로 구성되어 있다. 투과전자현미경은 영상을 보는 형광판fluorescent screen과 영상 촬영 카메라가 모두 진공상태의 전자현미경 내부에 설치되어 있는 반면에 주사전자현미경은 영상을 볼 수 있는 모니터가 별도로 설치되어서 모니터의 영상을 보면서 촬영하므로 투과전자현미경과 구조상 다르다.

5.1 투과전자현미경

투과전자현미경의 영상 맺힘 과정은 전자총electron gun에서 전자가 방출되면 두 개의 집광렌즈condenser lens를 거치면서 전자들이 집광된다. 집광된 전자빔electron beam은 집광 삽입판condenser aperture을 통과하게 되는데 이 삽입판의 구멍 크기에 따라서 전자빔의 직경을 결정한다. 이어서 전자빔은 시료를 통과하게 되는데 이때에 시료의 정보를 얻은 전자들이 만들어 진다(그림 5.1).

시료를 통과한 전자들은 대물렌즈 삽입판objective lens aperture을 통과하며 이때에는 삽입판 구멍의 크기에 따라서 저배율에서는 구경이 큰 구멍을 이용하고 고배율에서는 구경이 작은 구멍을 이용한다. 이 삽입판의 구멍이 작을수록 영상의 명암이 증가하는

반면에 밝기는 어두워진다. 시료 정보를 갖고 있는 전자들은 대물렌즈를 통과하는데 이때에 영상의 질적인 우량도가 결정되므로 대물렌즈의 성능이 가장 중요하다.

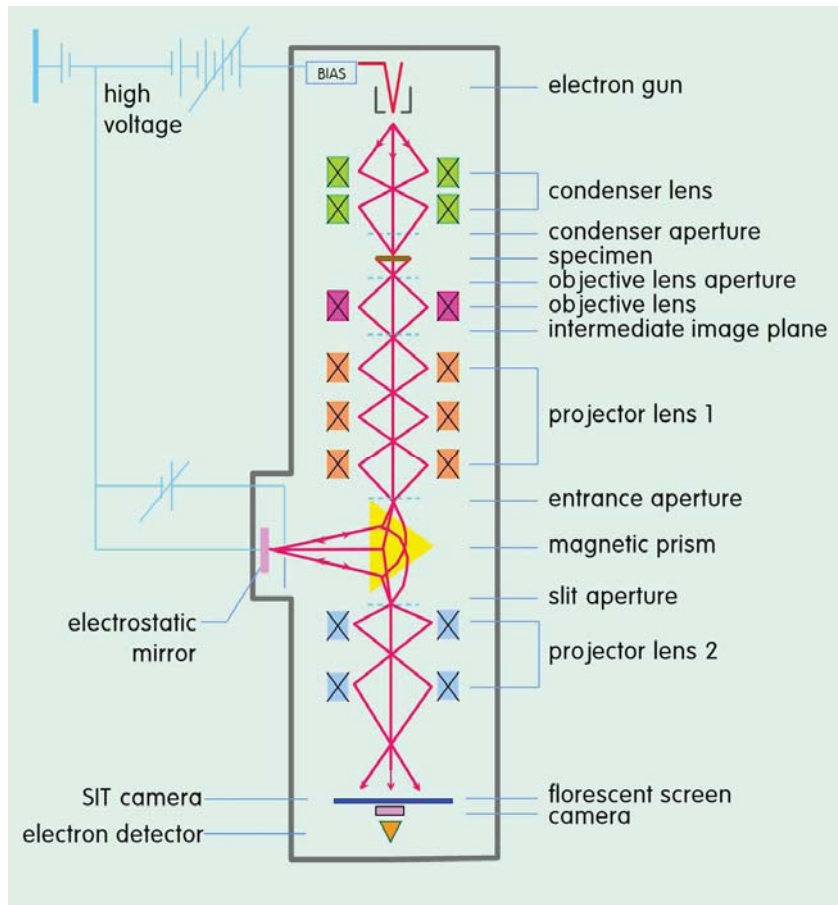


그림 5.1. 투과전자현미경의 전자광학 체계 (Zeiss EM902A).

영상 정보를 갖는 전자들은 일차 투사렌즈projector lens 3개를 통과하면서 배율에 따라서 가속이 일어나며 배율을 결정한다. 자이스 투과전자현미경EM902A은 일차 투사렌즈 바로 아래에 자기프리즘magnetic prism이 설치되어 있으며 이 자기프리즘으로 들어오는 전자들의 양과 질을 결정하는 인입 삽입판entrance aperture이 있다. 산란전자scattered electron, SE들은 에너지 정도에 따라서 비산란전자unscattered electron, 탄성산란전자elastically SE와 비탄성산란전자inelastically SE들이 복합적으로 존재하며 이들은 자기 프리즘을 통과하면서 구별이 가능해 진다.

시료의 정보를 갖고 있는 전자들이 자기프리즘을 통과하여 분리되면 바로 아래에 설치되어 있는 평행삽입판slit aperture을 이용하여 선택할 수 있다. 이 삽입판은 구멍으로 되어 있지 않고 자기프리즘magnetic prism을 통과한 전자빔의 넓이를 조절하는 기능으로 전자들의 양과 질을 결정하여 영상이 멧히도록 한다.

자기프리즘을 통과한 전자들은 이어서 2차 투사렌즈projector lens 2를 통과한 후 영상의 최종 배율, 명암, 해상력 등의 질을 결정하면서 형광판fluorescent screen에 영상이 멧히고 이 영상을 10배로 확대하여 볼 수 있는 대안렌즈eye piece가 설치된 현미경으로 검경하게 된다. 영상의 촬영은 형광판 아래에 설치된 각필름카메라sheet film camera로 하며, 촬영된 필름은 암실에서 현상development과 인화print 작업을 거쳐 영상 사진이 완성된다. 최근에는 투과전자현미경의 영상을 형광판 위SIT camera나 아래에 설치된 검출기에서 모니터로 신호를 보내어 디지털 영상을 촬영한

다, 디지털 영상의 질적 수준은 필름 영상과 비교하면 매우 낮지만 암실작업을 하지 않는 편리성 때문에 선호한다. 한편, 시료의 원소분석은 형광판 아래에 설치된 전자 검출기^{electron detector}를 이용한다.

5.2 주사전자현미경

주사전자현미경의 영상 맺힘 과정은 투과전자현미경과는 다르다. 시료의 표면에서 반사한 전자는 2차전자^{secondary electron} 검출기^{detector}에서 증폭기를 거쳐서 영상 신호가 음극선관^{cathode ray tube, CRT}의 모니터에 영상이 맺힌다.

검출기는 시료실의 시료 상측 면에 있는 측면검출기^{lateral detector}와 집광렌즈^{condenser lens}와 대물렌즈^{objective lens} 사이에서 2차전자를 검출하는 고리모양 검출기^{annular detector}가 있다. 시료표면에 전자빔이 충돌 후 그 지점으로부터 발생하는 2차 전자는 에너지가 낮으며 시료표면에 존재하는 약한 전장에 의해서 방해를 받는다. 따라서 전자렌즈에 의해서 높은 에너지를 갖도록 하여 대물렌즈 위 전자빔 증폭부 내부에 장착된 고리모양 검출기에서 검출된다.

반사전자^{back scattered electron}들은 기본적으로 전자총에서 발사된 일차 전자빔의 전자들과 동일한 에너지를 갖고 있으며 이들은 고리모양 검출기로 쉽게 검출할 수 있다. 검출기 신호는 시료의 높은 해상력을 제공하며 이와 함께 2차 검출기는 적정 형태 정보를 제공하므로 이 두 신호를 이용하여 양질의 영상을 만든다. 영상은 검출된 영상신호^{image signal}를 확대하여 증폭기를 거

쳐서 모니터CRT에서 볼 수 있으며, 이 영상을 카메라로 촬영한다 (그림 5.2).

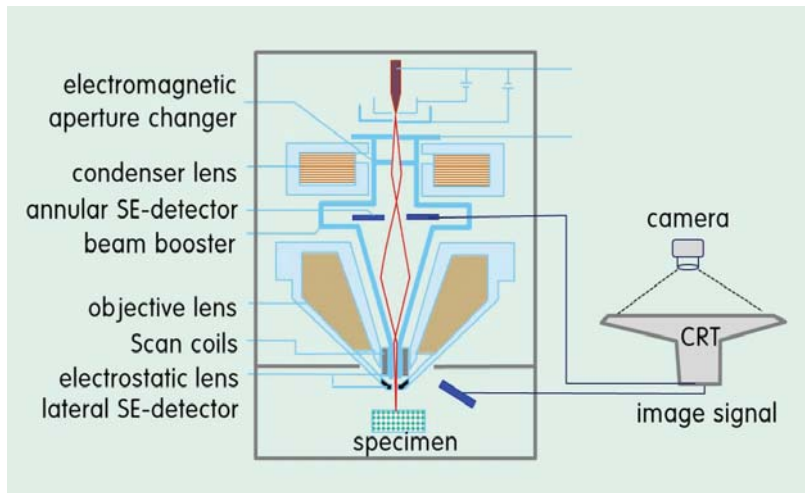


그림 5.2. 주사전자현미경의 광학체계 (Zeiss DSM982).

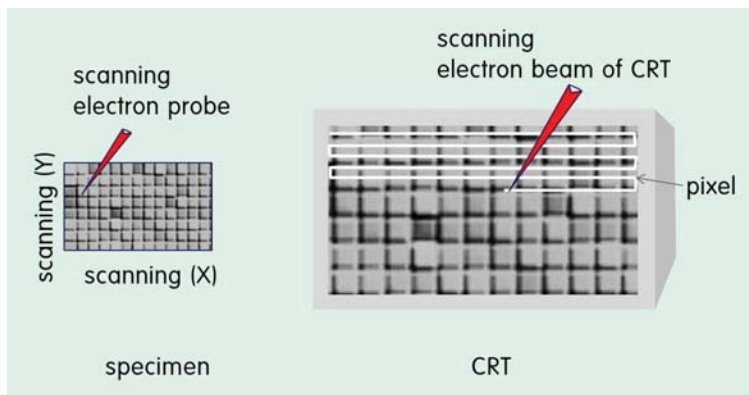


그림 5.3. 주사전자현미경에 있어서 전자탐침의 시료 표면 주사(좌)와 모니터의 주사영상(우).

주사전자현미경의 영상은 주사 전자탐침(scanning electron probe)에 의하여 시료의 X축과 Y축을 차례로 이동하면서 영상신호 image signal를 증폭하여 모니터로 보내면 영상을 볼 수 있다. 주사전자현미경의 시료 배율은 시료의 크기와 모니터에 보이는 영상의 차이를 비교하여 측정한다(그림 5.3).

5.3 전자빔의 정렬

전자빔이 전자총으로부터 발산되어 최종 영상이 맺히려면 형광판까지 전자빔의 축이 정렬되어야 한다. 집광렌즈, 대물렌즈, 투사렌즈 등의 기계적 정렬은 투과전자현미경을 처음 조립할 때에 공장에서 맞추어져 생산되며, 전자현미경을 설치할 때에 재정렬을 하여 설치한다. 경우에 따라 조정해야 할 필요성이 있으면 사용자는 할 수 없으며 전문기술자가 하여야 한다. 전자현미경 사용자들은 각 전자렌즈의 전기적 정렬과 시료 사이에 들어가는 삽입판의 구멍 정렬 방법을 필수적으로 숙지하고 있어야 한다. 투과전자현미경이나 주사전자현미경 모두 기본적인 것은 거의 모두 동일하다.

투과전자현미경의 영상이 맺히기까지 전자빔이 매우 복잡한 길을 통과하므로 기본적인 구조를 이해하는 것은 중요하다(그림 29). 전자총에서 발산된 전자빔은 집광렌즈를 통과한 후 전자빔의 집중이 일어나며 집광렌즈 삽입판 구멍의 중심에 맞도록 전자빔의 축을 조정하고 필요한 부분 이외의 전자들은 걸러낸다. 다

음으로 시료를 통과한 전자빔은 대물렌즈 샵입판을 통과하게 되는데 이때에 샵입판의 구멍 크기에 따라서 영상의 명암이 달라지므로 이를 명암 샵입판 **contrast aperture**이라고 한다. 투사렌즈를 통과하는 전자빔도 역시 전자적으로 길을 정렬시켜주어야 한다. 이와 같이 통과한 전자빔은 마지막으로 형광판에 영상을 맺히게 된다.

한편 일부 투과전자현미경 모델 EM902, EM912의 경우는 투사렌즈 1과 2사이에 두 개의 샵입판이 더 있으며, 이 샵입판은 보다 더 질 좋은 영상 명암을 얻을 수 있게 하며, 또한 산란하여 영상 해상도에 나쁜 영향을 주는 빔의 영역을 선택하여 제거할 수 있어 염색을 하지 않은 시료나 두꺼운 시료 및 시료의 원소분석을 가능하게 한다.

투과전자현미경의 경우 전자빔의 기본 정렬 순서는 다음과 같다. 집광렌즈 샵입판 정렬, 집광렌즈의 난시 교정, 대물렌즈 전자빔 정렬, 전자총의 전자빔 정렬, 대물렌즈의 전자빔 흔들림 조정, 대물렌즈 샵입판의 구멍 정렬, 대물렌즈의 난시 교정, 기타 샵입판의 정렬 등이다.

6. 전자현미경의 고진공과 냉각

전자현미경은 광원으로 전자를 이용하므로 전자현미경의 전자가 이동하는 모든 통로는 고진공 상태이어야 한다. 따라서 전자현미경의 성능을 결정하는데 진공 상태의 좋고 나쁨 또한 중요한 요인이 된다. 진공 상태가 낮으면 가스 분자에 의하여 전자가 산란되어 흩어져 없어져 버린다. 또한 고진공 상태가 되지 않으면 전자총의 필라멘트가 열이 가해질 때에 산소가 생성되고 음극을 산화시켜 쉽게 끊어져 못쓰게 되며, 전계방출field emission 전자총의 경우에도 음극cathode의 표면을 코팅하여 전자 발산을 방해한다.

전자현미경의 고진공을 위한 기본적 구조와 여러 진공펌프의 종류 및 특성을 이해하는 것은 최고 상태의 전자현미경 성능을 유지하는 데 중요하다. 또한 냉각 계통은 전자빔으로 인한 고열과 진공 기능을 하는 펌프에 냉각이 잘 되도록 하는 것이다.

6.1 고진공

진공 계통은 진공펌프vacuum pump, 전자총, 시료실, 카메라 부분의 진공을 넣고 뺄 수 있는 밸브valve, 진공이 유지되도록 하는 동그란 모양의 밀봉 고무O-ring rubber 그리고 진공 측정기vacuum gauge로 구성되어 있다.

전자현미경은 검경하기 위해서 시료를 넣고 빼야 하므로 시료

실의 진공을 제어하는 밸브가 있으며specimen valve, 사진 촬영 후 필름을 넣고 빼야하는 카메라실의 진공을 제어하거나 전자총의 필라멘트를 교환하기 위한 카메라실과 분리되는 밸브separating valve가 기본적으로 전자현미경 검경에 중요한 기능을 한다(그림 6.1).

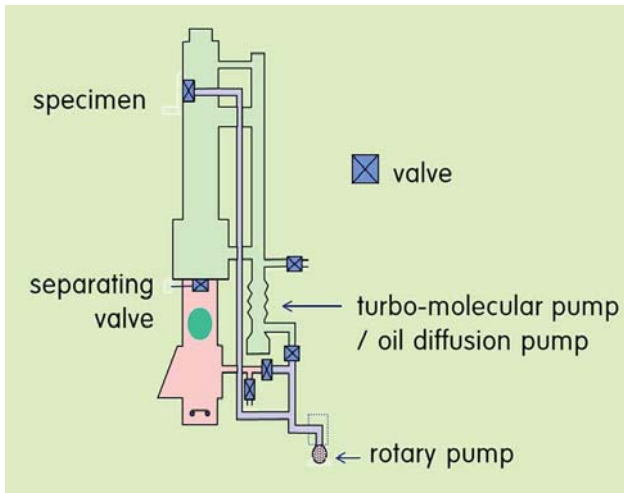


그림 6.1. 투과전자현미경의 진공 제어 밸브.

일차펌프인 회전펌프rotary pump와 이차펌프인 터보분자펌프 turbo-molecular pump와 오일확산펌프oil diffusion pump의 진공 제어는 시료 교환 등의 경우 일차펌프가 먼저 작동을 하고 일정한 진공상태에 도달한 후 이차펌프가 작동을 하도록 밸브가 제어를 한다.

전자현미경을 검경할 때에 시료실과 필름실의 진공 제어 밸브

사용을 적절히 하지 않으면 진공이 급속히 나빠지므로 주의를 하여야 하며, 특히 오일을 사용하는 펌프의 경우 밸브의 여닫이를 잘 확인하지 않고 인위적으로 잘못 사용하면 오일 입자가 경통 내부로 흡입되어 전자현미경 전체가 오염되어 못쓰게 되는 경우도 있으므로 각별한 주의가 필요하다.

6.2 진공펌프의 종류와 특성

진공펌프는 크게 두 종류로 구분할 수 있는데, 기름을 사용하는 유체 진공펌프인 회전 오일펌프(rotary oil pump)와 오일 확산펌프(oil diffusion pump)가 있으며, 기름을 사용하지 않는 건식 펌프에는 이온 게터펌프(ion getter pump)와 터보분자펌프(turbo-molecular pump)가 있다. 전자현미경의 진공 펌프는 일차 진공 펌프로 회전 진공펌프를 사용하며 고 진공을 위하여 오일 확산 펌프 또는 터보 분자 펌프를 이용한다.

6.2.1 회전오일펌프

회전오일펌프(rotary oil pump)는 고진공 이전에 작동하는 펌프로 일차펌프(rough pump, fore pump)라고 하며, 기본구조는 회전하는 축의 양쪽을 불균형하게 만들어서 고속으로 회전하면서 전자현미경 내부의 기체를 빨아들이며(intake) 빨아들인 기체는 외부로 유출(exhaust) 되도록 고안된 펌프이다(그림 6.2). 회전펌프의 진공 능력은 10^{-2} mbar(1Pa) 정도이며, 기체가 펌프내로 유입되므로 오일의

산화, 수분 함유가 일어나므로 정기적으로 규격 진공 펌프 오일로 교체해 주어야 한다.

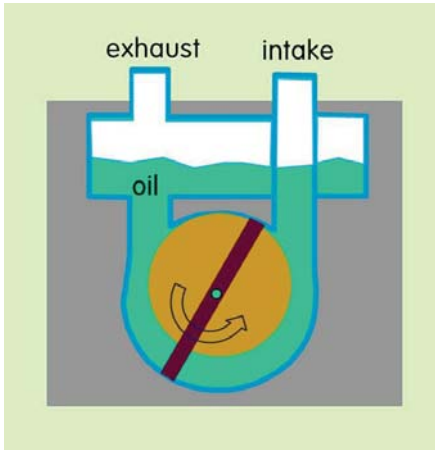


그림 6.2. 회전오일펌프 구조.

6.2.2 오일확산펌프

전자현미경의 고 진공을 얻기 위한 2차 펌프로 사용하는 오일 확산펌프(oil diffusion pump)는 전자현미경의 경통 바로 뒤에 위치하고 있으며, 일차 회전펌프와 연결되어 있어 일차 진공이 도달하면 이차 고 진공이 될 수 있도록 밸브가 작동한다. 오일확산펌프는 오일을 고온으로 끓이면 기체가 되고 기체가 상승하면 즉시 냉각수에 의하여 유체로 바뀌면서 전자현미경 내부의 가스를 붙잡아서 아래로 내려와 고 진공이 가능하도록 되어 있다. 따라서 오일확산펌프 내부에는 깔때기를 거꾸로 놓은 모양의 갓이 여러 개 설치되어 있다(그림 6.3).

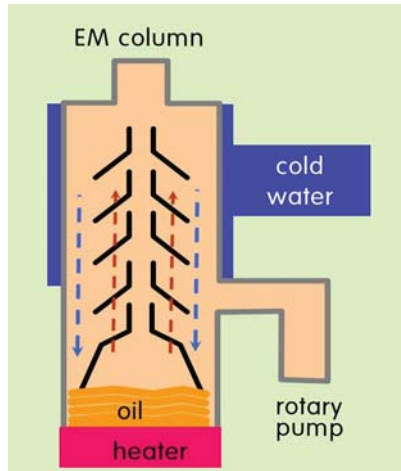


그림 6.3. 오일확산펌프
구조와 냉각수.

오일확산펌프에 사용하는 기름은 탄화수소오일, 실리콘오일 등 여러 종류가 있으며, 사용 오일의 종류에 따라서 특성이 다르므로 반드시 각각의 전자현미경에 사용하는 것을 이용한다. 끓는점 boiling point은 탄화수소계인 아피존오일apiezon oil은 220°C, 실리콘계통인 다우코닝dow corning 704은 223°C이며, 최고 진공 성능은 각각 5×10^{-8} mbar와 5×10^{-10} mbar이다. 오일확산펌프의 운영은 진공펌프의 규격에 맞는 적절한 종류를 사용하는가, 히터의 온도 유지는 적정한가, 냉각수(15°C)의 온도는 적정하며 잘 순환하는가, 일차펌프인 회전펌프가 잘 작동하고 있는지 등의 유지관리에 유의하여야 한다.

6.2.3 이온게터펌프

이차 고진공펌프로 이용하는 이온게터펌프ion getter pump는 전자현미경 경통 내의 잔류 기체를 자석으로 된 박스 내부에 티타늄 음극cathode과 스테인리스 양극anode을 설치하고 양극에 5kV의 직류전원을 가하여 가스 분자를 수착sorption시켜 제거하는 원리이다. 이온게터펌프의 진공 능력은 초당 100 리터이며, $10^{-3} \sim 10^{-8}$ mbar이다. 가스의 수착 제거 원리는 고체에 가스 입자를 표면에 흡착adsorption하는 것과 흡착한 가스 분자를 다른 유체나 고체로 침투penetration시켜 빼내는 흡수absorption의 기작에 의하여 고진공이 되도록 한다(그림 6.4).

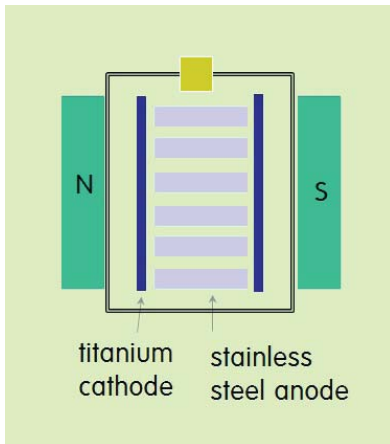


그림 6.4. 이온게터펌프 구조.

6.2.4 터보분자펌프

고 진공을 얻기 위한 펌프는 오일 확산펌프(oil diffusion pump)가 가장 보편적으로 사용되는데 터보분자펌프(turbo-molecular pump) 보다 가격이 저렴하기 때문이다. 오일확산펌프와 이온게터펌프는 전자현미경을 작동할 수 있는 고 진공상태까지 도달하는 시간이 매우 긴 반면에 터보분자펌프는 시간당 펌프용량이 크기 때문에 그 시간이 상대적으로 매우 짧아 편리하며 고 진공유지에 매우 좋은 펌프이다.

터보분자펌프는 분당 5만 번의 회전으로 초당 240리터의 가스를 제거할 수 있는데 10^{-8} mbar(10^{-6} Pa)의 진공 능력을 갖는다. 터보 분자펌프의 기본원리는 회전하는 날(rotator)과 고정된 날(stator)이 교대로 설치되어 있어 회전 날이 매우 빠른 속도로 회전하면서 가스를 제거(exhaust)하여 고 진공을 얻는다. 회전 날과 고정 날에는 서로 가스가 제거될 수 있도록 날의 모양이 대칭으로 되어 있다(그림 6.5).

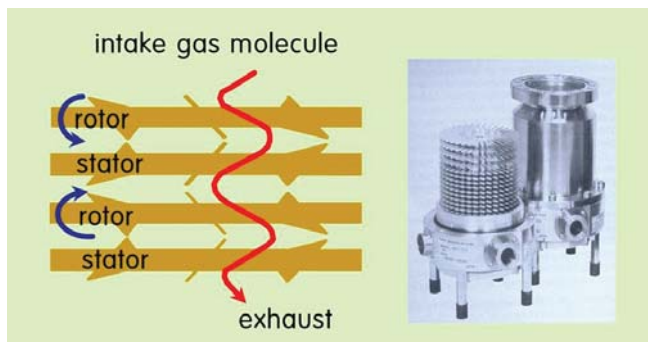


그림 6.5. 터보분자펌프의 기본 구조.

터보분자펌프의 장점은 자기부상magnetic levitation 원리로 회전하기 때문에 초고속 회전이 가능하며, 따라서 진동vibration과 소음noise이 거의 없어 검경을 할 때에 정신적 피로감이 거의 없다. 또한 윤활유가 사용되지 않으므로 기름의 산화로 인한 탄화수소hydrocarbon가 발생하지 않기 때문에 전자현미경과 전자현미경실 내부의 공기오염 가능성도 없으며 냉각이 거의 필요하지 않는 장점이 있다.

6.3 냉각

전자현미경이 커져 있는 상태에서는 열이 발생하는 부위가 많은데 이곳들은 15°C 정도의 냉각수cooling water로 열을 식혀 주어야 한다. 열이 발생하는 주요 부위는 전자현미경 경통EM column 내의 전자총 부위와 모든 렌즈의 코일이며 터보분자펌프turbo-molecular pump나 오일확산펌프oil diffusion pump, 렌즈 전류 공급 장치lens filter supply, 제어장치panel, 전자총에 고전압을 공급하는 전원 공급 장치power supply system 등이 있다(그림 6.6). 대부분의 일차 진공펌프인 회전펌프는 공기순환으로 열을 식혀준다.

냉각수는 상수도를 사용할 수 있으나 폐쇄형 냉각수 순환장치를 사용하면 증류수를 이용할 수 있어 지하수로 인한 물때scale가 끼는 것을 방지할 수 있다. 냉각수 순환장치는 소음이 많이 발생하여 오랜 시간 전자현미경 검경을 하기 어렵다.

냉각수로 지하수를 사용할 경우가 있는데, 이때에는 몇 겹의 필터를 사용하여야 한다. 그러나 필터를 사용할 경우에도 각종

냉각수관에 물때가 끼어 막힐 염려가 있으므로 전자현미경 초기 장착 때부터 증류수를 사용하고 증류수도 가능한 년 2~3회 정도 교체하여 주는 것이 바람직하다.

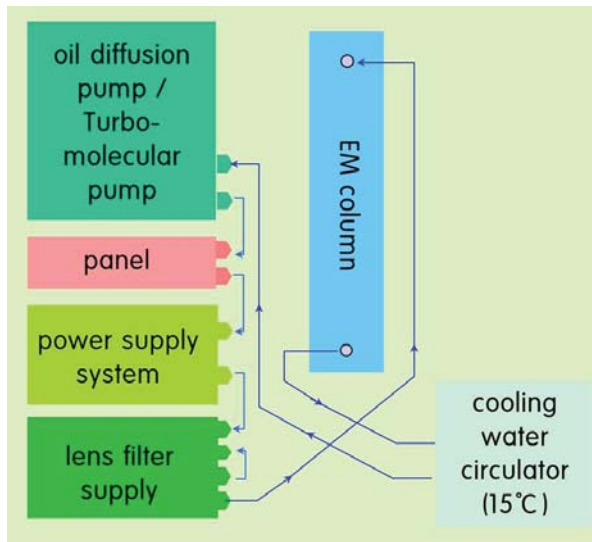


그림 6.6. 전자현미경의 냉각수 순환 시스템.

7. 전자현미경 검경 재료 준비

7.1 실험실 안전규칙

전자현미경 관찰을 위한 재료 준비 및 시료 준비 과정에 사용하는 모든 시약들은 대부분 해롭고 매우 위험한 것들이므로 각별한 주의를 하여야 한다.

7.1.1 산(acid)

모든 산 혹은 알칼리 계통의 시약을 사용할 때에는 일회용 비닐장갑을 이용한다. 시약병을 단단히 잠그고 마개외부는 파라필름으로 감아서 새지 않도록 한다. 산을 희석할 때에는 물에다 산을 조금씩 서서히 섞는다. 희석 시 열이 발생할 경우는 충분히 식히면서 섞는다. 산이 직접 피부에 묻지 않게 하고 만약 묻었다면 흐르는 찬물로 즉시 충분히 세척한다. 어떠한 시약이든 결코 냄새를 맡지 않도록 하여 흡 후드fume hood를 이용한다.

7.1.2 유기용매

전자현미경 시료 제작에 흔히 사용하는 유기용매acetone, amyl acetate, ethylene dichloride, propylene oxide를 취급할 때에는 흡 후드에서 한다. 병마개는 꼭 닫도록 하며 열을 가하지 않는다. 냄새를 맡지 않아야 한다. 작업 시 항상 충분히 통풍되도록 한다. 유기용매는 싱크대에 부주의하게 버리지 않는다. 폭발할 염려가 있으므로 불

꽃이나 열이 나는 곳 근처에서 작업하지 않는다.

7.1.3 전기적 충격방지

모든 기기는 접지가 되어 있는 상태에서 사용한다. 수도가나 습기가 많은 곳에서 사용하지 않는다. 플러그, 콘센트, 전선 상태를 늘 잘 관리한다.

7.1.4 포매 용액

시료를 플라스틱 내부에 고정시키는 포매embedding는 반드시 흡 후드에서 작업한다. 대부분의 포매 용액은 끈끈하고 냄새가 매우 나쁘며 피부에 묻으면 알레르기 반응을 일으키거나 피부염을 유발하기도하며 발암성이므로 주의한다. 플라스틱 장갑을 사용한다. 피부에 묻으면 비누로 여러 번 깨끗이 씻는다. 실험대나 문고리, 서랍 등에 묻어 타인에게 피해가 없도록 하며 시약이 묻으면 알코올, 아세톤 등으로 깨끗이 닦아낸다. 포매용액이 묻은 용기는 한꺼번에 밀폐용기에 모아 두었다가 폐기한다.

7.1.5 오스뮴

오스뮴osmium tetroxide, OsO_4 시약을 사용할 경우에는 반드시 흡 후드에서 작업한다. 가장 위험한 시약으로 피부에 묻었을 때 뿐만 아니라 냄새로도 코나 눈에 심각한 피해가 발생하므로 매우 특별한 주의가 필요하다. 일회용 비닐장갑을 반드시 사용한다. 눈을 보호하는 보호안경을 착용한다. 폐 용기는 큰 갈색 병에 모아

두었다가 폐기한다. 시료 조제 시 사용한 것은 식용유등 식물성 기름에 1:1 비율로 섞어 밀폐하여서 독성을 중화하고 갈색 병에 모아두었다가 시약 폐기 전문업소를 통하여 폐기하거나, 5% 수산화나트륨NaOH과 섞으면 4산화물tetroxide이 이산화물dioxide로 변하여 독성이 현저히 감소된다.

7.1.6 기타

유리 용기는 열처리된 파이렉스pyrex 기구를 사용하여야 하며, 깨지기 쉬우므로 다치지 않도록 주의한다. 항상 고압 멸균된 깨끗한 용기를 사용한다. 시약이 묻은 비닐장갑을 낀 채로 시약병, 문고리, 서랍 등 다른 곳에 묻히지 않도록 한다.

7.2 그립드

7.2.1 그립드 종류와 선택

생물시료는 수지에 포매하고 보통 70~100nm의 초박절편으로 만들어 투과전자현미경 검경을 하는데 이때에 초박절편 시료를 안정적으로 검경할 수 있도록 올려놓을 수 있는 것을 그립드grid라고 하며, 그립드는 메쉬mesh의 수, 모양 등에 따라 여러 가지가 있다. 투과전자현미경에 사용하는 그립드의 직경은 3.0~3.5mm이며, 전자현미경 기종에 따라서 사용할 수 있는 직경의 그립드를 선택하여야 하며, 연구자가 검경하고자 하는 목적에 따라서 적절한 그립드 종류를 선택하여 사용하면 효과적이다(그림 7.1).

그리드 메쉬의 수가 많으면 그만큼 절편 시료가 안정적이거나 메쉬 수가 적은 것은 그만큼 시료가 안정적이지 못하다. 또한 그리드는 동과 니켈, 스테인리스 스틸, 금, 백금, 몰리브덴 재질로 되어 있으므로 용도에 맞게 선택하여 사용한다. 일반적으로 동 그리드는 가격이 저렴하여 많이 사용하는데 시료 작업을 할 때에 찌그러지기 쉽다. 그러나 니켈 그리드는 잘 찌그러지지 않지만 가격이 비싸다.

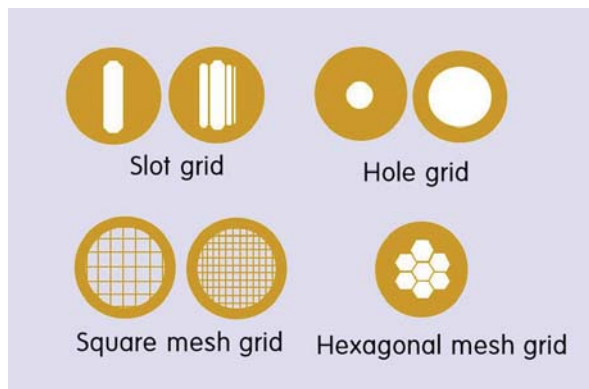


그림 7.1. 그리드 메쉬의 종류.

그리드를 선택할 때에는 동일한 모양일 경우에도 구멍직경hole width과 메쉬의 구역을 정하는 살폭bar width이 정해져 있다. 그리드 살폭이 큰 것은 절편의 안정성은 좋으나 살의 폭이 넓으면 전자현미경 검경을 할 때에 시료를 가리는 부분이 많기 때문에 검경 하다가 꼭 필요한 시료의 부분을 검경하지 못하는 경우가 있어서 가능하면 살폭이 작은 것이 좋다.

(1) 슬롯 및 홀 그리드

슬롯그리드slot grid와 홀그리드hole grid는 메쉬를 이루는 그물이 없어 절편 시료의 어느 부분도 검경할 수 있는 장점이 있다. 따라서 연속적인 시료 절편을 계속하여 만들어서 동일 부위를 관찰하고자 할 때 유용하게 사용된다. 그러나 슬롯이나 홀 부위를 지지하고 있는 지지막이 전자빔이나 물리적 충격에 의하여 파손되면 전체 시료를 모두 검경할 수 없는 단점이 있다.

(2) 사각형 메쉬 그리드

투과전자현미경 검경을 할 때 가장 일반적으로 사용하는 그리드는 사각형 메쉬그리드square mesh grid 이다. 보통 침지방법dip으로 사용할 경우에는 200~300메쉬 정도의 그리드가 좋으나 절편용 시료의 경우는 400~500 메쉬 그리드가 더욱 안정적이어서 좋다. 그러나 메쉬가 높으면 절편시료의 검경부위를 더욱 많이 가리게 되므로 적절히 선택하여 사용하도록 한다.

(3) 육각형 메쉬 그리드

육각형 메쉬그리드hexagonal mesh grid, honeycomb mesh grid는 동일한 메쉬의 경우 사각형 메쉬 그리드보다 시료의 안정성이 높다. 따라서 전자현미경 시료 분석용에 주로 사용되며 200메쉬 이하 그리드는 지지막을 입혀 사용하고 300메쉬 이상 그리드는 지지막 없이 절편시료를 올려놓고 검경하면 지지막으로 인한 전자빔의 영향이 없어 효과적으로 검경할 수 있다.

7.2.2 그리드 지지막 준비

포매 시료의 절편을 만들어 검경할 경우에는 지지막이 필요하지 않으나, 액체 시료에 있는 바이러스 입자, 세균 등을 검경할 때에는 그리드 메쉬를 막아주는 투명한 얇은 막을 먼저 만들어주어야 한다. 지지막을 만드는 데는 여러 종류의 시약이 사용되며 여러 방법이 있다.

지지막은 시료를 올려놓는 그리드 표면을 균일하게 하며 그리드 메쉬 구멍을 막아서 구멍 아래로 시료가 빠져나가는 것을 방지한다. 한편 검경 시 시료가 안정적으로 있을 수 있도록 물리적으로 안정성이 있어야 한다. 따라서 지지막 준비는 투과전자현미경 검경에 기본적으로 매우 중요한 작업이며, 고도의 숙련을 요구하는 기술이다.

대부분의 전자현미경실은 온도는 20~25°C 정도로 일정하고 상대습도도 50~70% 정도로 유지시켜야 하는데 이 전자현미경 준비실 조건이 연중 유지될 때에 지지막이 잘 만들어진다. 그러므로 온도 및 습도가 불균일하고 먼지가 많은 조건하에서는 좋은 지지막을 만들기 어렵다. 따라서 전자현미경실과 준비실은 온습도 및 청결상태가 항상 좋은 조건에서 유지 관리되어야 한다.

지지막 준비에 필요한 기구, 시약 등은 매우 깨끗한 것을 사용해야 하며, 이는 지지막 자체의 청결도가 낮아 검경과 사진촬영에 나쁜 영향을 주기도 하지만 먼지 등으로 오염되면 전자현미경 내부까지 오염시키므로 매우 주의를 요한다.

그리드는 사용하지 전에 세척하고 막을 입힌 후 사용한다. 세

척은 초음파세척기sonicator에서 살균 증류수에 넣고 충분히 세척한 다음 순수아세톤pure acetone이나 0.1N HCl에 세척한다. 그리드 막으로 이용하는 물질은 팔로디온palodion, 폼바formvar와 이 두 물질을 섞어서 사용하기도 한다. 팔로디온은 아밀아세테이트amyl acetate에 니트로셀룰로오스nitrocellulose을 녹인 것이며, 폼바는 클로로폼chloroform 또는 염화에틸렌ethylene dichloride에 폴리비닐포르몰플라스틱polyvinyl formol plastic을 녹인 것이다. 그리드 막으로 사용하는 시약들은 시중에서 구입하여 사용한다. 그리드에 막을 입히는 과정은 다음과 같다.

(1) 방법 1

재료 준비는 아밀아세트amyl acetate 용액에 팔로디온palodion 0.25~1%을 녹인다. 플라스틱 농도가 낮으면 필름두께가 얇아진다. 깨끗한 1000ml 비커에 증류수를 가득 채운다. 광학현미경용 유리 슬라이드를 깨끗하게 닦아 준비한다. 전자현미경 그리드를 준비한다. 한번 작업을 할 때에 100개 정도만 한다. 깨끗한 피펫과 핀셋을 준비한다.

지지막을 만드는 순서는 비커의 물 표면에 플라스틱 용액 2~3 방울을 조심스럽게 떨어뜨린다. 이때에 방울은 비커 가운데에 떨어뜨리며 떨어뜨릴 때 튀지 않게 한다. 물표면 위에 있는 플라스틱 용액이 마를 때 까지 기다린다. 용액이 휘발될 때에는 무지개색이 있게 되는데 이것을 간섭색이라 한다.

플라스틱 용액 마르면 무지개 색이 없어지고 은빛의 필름이

형성되는데 금빛이면 두꺼운 것이므로 농도를 더 낮춘다. 끝이 매우 뾰족한 생물용 핀셋으로 그리드를 하나씩 잡고 물위의 필름 위에 조심스럽게 놓는다. 그리드의 거친 부분이 필름에 닿도록 하여 놓는다. 슬라이드 그라스나 표면이 매끈한 두꺼운 종이를 물 표면과 수직으로 조심스럽게 밀어 넣고 다시 표면으로 올린다. 이때 그리드가 있는 필름이 슬라이드 그라스나 종이에 붙게 되고 이것을 수직으로 놓고 깨끗한 비커 안에서 말린다. 광학현미경하에서 필름이 그리드에 잘 붙어 있는지 확인하고 전자현미경을 보면서 필름의 균일도, 두께, 기포 형성 등을 보아 깨끗하면 사용한다.

(2) 방법 2

재료 준비는 0.25%~0.5% 포르마formvar를 염화에틸렌ethylen dichloride 또는 클로로포름chloroform에 녹인다. 지지막을 만드는 순서는 기본적인 방법은 방법 1과 같다. 플라스틱과 용매를 처리한 것을 각각 비교 검토하여 사용한다.

(3) 방법 3

재료 준비는 슬라이드 그라스, 면도날, 0.25% 포르마formvar를 염화에틸렌ethylen dichloride 또는 클로로포름chloroform에 녹인다. 1000mℓ 비커에 증류수를 가득 담는다. 지지막을 만드는 순서는 슬라이드 그라스를 비눗물로 깨끗이 닦고 증류수로 세척하여 오염된 것을 모두 제거한다. 포르마 용액에 슬라이드 그라스가 반

정도 잠기게 한후 꺼내어 슬라이드 그라스 밑면에 남아 있는 용액방울을 필터페이퍼로 없앤 후 수직으로 놓고 말린다. 얇은 막이 떨어질 수 있도록 면도날로 슬라이드 그라스 가장자리를 살살 긁어내린다. 이때 유리가루가 떨어지지 않게 매우 약하게 긁어야하며 잘린 미세한 막이 날리므로 호흡 시 흡입하지 않도록 주의한다.

슬라이드 그라스를 끓는 물위 증기에 약간 처리한 다음 비커 물에 아주 천천히 담근다. 이때 포름바 막이 물위에 뜬다. 만약 포름바 막이 떨어지지 않으면 증기를 더 처리한 후 막을 벗겨 낸다. 슬라이드 그라스가 깨끗하면 비교적 막이 잘 벗겨진다. 그리드의 무딘 부분이 막에 접착되도록 그리드를 막 위에 올려놓는다. 슬라이드 그라스로 막 위의 그리드를 건져내고, 건조시켜 사용한다.

(4) 주의사항

보통 막을 씌운 그리드는 1주일 이상 보관하면서 사용하는 것이 일반적인 경우이나 너무 오랜 기간 동안 보관하여 사용하면 그리드가 오염이 되고 막이 갈라지는 경우가 있으므로 가능하면 1주일 정도 간격으로 만들어 사용하면 좋다. 그리드에 막이 붙어 있는 부분은 항상 무딘 부분으로 함으로서 검경 시에 어느 부분이 시료가 있는 쪽인지 쉽게 알 수 있다. 이와 같이 일정하게 사용치 않아 그리드마다 다를 경우 검경 시에 초점 거리가 달라지므로 불편하다.

그리드막이 두꺼우면 전자빔 투과율이 낮아 전체적으로 어두워 검경이 곤란하고 너무 얇으면 전자빔에 의해 쉽게 찢어지며 또한 기포가 많은 것은 영상을 혼동 시키므로 적당한 두께의 기포가 없는 막을 만드는 것이 중요하다.

7.2.3 지지막의 안정화

모든 시료는 전자현미경의 전자빔에 안정성이 있어야 하며 특히 그리드 지지막은 보호막을 입힘으로서 전자빔에 안정하게 된다. 이때 사용하는 것이 탄소carbon로 된 얇은 증착막이며 고진공 하에서 탄소 입자를 입히는 기계를 진공증착기vacuum evaporator라고 한다(그림 7.2).



그림 7.2. 탄소 진공 증착기(좌)와 탄소 진공 증착된 그리드(우).

재료 준비는 매우 가는 입자로 된 시료, 슬라이드 글라스, 막을 입힌 그리드, 탄소 막대(carbon rod) 이다. 막을 입힌 그리드를 입체광학현미경(stereomicroscope)으로 검경하여 그리드에 막이 잘 붙어 있는지 막은 찢어지지 않았는지 확인한다. 진공 증착기에 장착하고 약 10cm 정도 떨어진 위치에 탄소 막대를 설치한다. 진공증착기가 진공상태가 적절히 되고 준비가 되면 증착을 한다. 증착시간은 전자현미경을 보면서 그리드 막의 안정성을 설정하고, 증착시간이 짧으면 막의 안정성이 떨어지고 증착시간이 길면 너무 두껍게 증착되어 전자빔 투과가 저하되어 어둡기 때문에 검경이 곤란하다.

7.2.4 그리드 세척

사용한 그리드를 재활용할 때에는 그리드 100개를 500mL 크기의 비커에 넣고 그리드 막에 사용하는 용매(acetone, ethylene dichloride, amyl acetate)를 선택하여 100mL 정도를 붙는다. 그리드를 담근 비커를 초음파세척기에 넣고 1~2분 정도 약간씩 흔들어 준다. 용액을 버리고 그리드를 남긴 다음 증류수를 넣고 1~2분정도 흔들어 준다. 입체광학현미경(stereomicroscope)으로 보아서 그리드에 씌웠던 막이 모두 없어져 깨끗해 질 때까지 반복한다(2~3회). 충분히 세척 후에도 붙어있는 것들은 전자현미경 검경 시 방해를 주지만 지장은 없다. 그러나 그리드를 세척하는 시약과 노력을 생각하면 재생하는 것보다 새것을 사용하는 것을 권장한다.

7.3 주사전자현미경 검경 준비

7.3.1 시료대

전자현미경 시료를 올려놓기 위하여 사용하는 것으로 알루미늄, 동, 카본 등으로 만들어져 있으며 현미경 구입 시 충분히 구입하거나 별도로 구입하여 사용할 수 있다. 시료대는 크기나 모양이 다양하므로 각 연구실에 설치한 주사전자현미경의 기종에 맞는 시료대를 구입한다.

7.3.2 접착제

시료를 시료대에 올려 놓을 때에 접착제(silver paste, carbon paste)를 사용한다. 그러나 본드나 다른 접착제를 사용하기도 하진만 권장하지 않는다. 주사전자현미경 검경은 시료관찰을 할 때에 좌, 우, 상, 하 뿐만 아니라 기울여 관찰하므로 반드시 접착제를 사용하여야 한다. 접착제를 사용하면 여기서 발생하는 가스가 충분히 휘발될 때까지 기다린다.

시료가 분말일 경우는 접착제를 시료대 위에 바르고 여기에 분말을 흩뿌려 놓고 관찰할 수도 있지만 일반적으로는 양면테이프를 사용하며 분말시료를 충분히 붙이고 붙지 않은 분말은 소형 진공기로 제거한다.

7.3.3 피막 입히기

비 전도성 시료의 경우에는 전자들이 시료 표면에 부딪히면

전자들 간의 간섭이 커져서 영상 맺힘에 장애가 발생하므로 시료 표면에 전도성의 얇은 5~20nm의 피막을 형성시켜 검경을 용이하게 한다. 고배율 및 고해상도를 요구하는 경우에는 반드시 피막을 입혀야 하는데 피막이 두껍게 되면 미세구조가 피막 아래에 묻혀서 불리한 경우가 있으므로 주의한다. 시료를 고정, 탈수하였어도 시료자체가 전자빔에 의하여 손상받기 쉬운 경우는 피막을 입히거나 최대한 낮은 가속전압에서 낮은 전류로 관찰하여야 한다. 시료에 피막을 입히는 방법은 다음과 같다.

(1) 진공증착법

용기 내부의 진공도를 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ Torr 이하로 낮춘 상태에서 코팅하고자 하는 금속선과 그 아래에 시료를 놓고 가열 증발시켜 시료표면에 금속 피막을 입힌다. 진공증착법 vacuum evaporation은 금속선이 있는 부위 아래로 집중적으로 피막이 형성되므로 시료를 여러 각도로 회전시키면서 피막을 입히면 골고루 피막을 입힐 수 있다.

(2) 이온발산법

이온발산법 ion sputtering의 기본원리는 진공증착법과 동일하나 장치구조가 간단하고 조작도 쉬우며 장점은 발산한 입자들이 시료 미세구조에 깊이 들어가 막을 형성하기 때문에 고른 영상관찰이 용이하다. 0.05~0.1 Torr 정도의 진공도가 필요하다.

8. 시료 제작

전자현미경 검경을 위한 생물시료의 제작은 시료 채취 sampling, 고정 fixation, 세척 washing, 탈수 dehydration 과정을 거친다. 이어서 투과전자현미경 검경을 위해서는 포매 embedding, 경화 hardening, 불럭다듬기 block trimming, 초박절편 ultramicrosectioning 그리고 염색 staining 과정을 거친다. 주사전자현미경 검경을 위해서는 탈수된 시료를 건조 drying 시키며 금입자 피막 입히기 coating을 한 다음 시료 고정판에 고정 mounting을 한 후 검경한다.

8.1 시료의 구분

전자현미경 검경 시료는 모든 무생물과 생물 시료가 가능하다. 시료의 구분은 금속 물질인 도체 conductor, 실리콘과 같은 전도성이 10^{-10} ohms 이하인 반도체 semi-conductor, 부도체 또는 절연체 non-conductor, 그리고 이들이 복합적으로 이루어진 복합체 mixed material가 있다. 부도체는 비 변성물질 non-denatured material과 변성물질 denatured material로 구분되고 비 변성물질에는 알루미늄, 변성물질은 뼈, 나무, 토양 등과 같이 딱딱한 특성이 있는 물질 hard material과 대부분의 생물시료인 연한 물질 soft material로 구분한다.

8.1.1 비생체 시료

(1) 비전도성 시료

비전도성 시료는 원칙적으로 금과 같은 전도성 금속으로 시료를 피막한 후 관찰하는 것이 기본적 시료 검경 방법이다. 그러나 시료에 피막을 입히지 않고 원래 상태 그대로 관찰하는 것이 더욱 유익할 때도 많다. 이러한 경우에는 가속전압은 가능한 한 낮게 하고 전류도 최소화하여 영상을 관찰하여야 한다.

분말시료는 분말의 크기에 따라서 가장 적절한 방법을 선택하여 사용하여야 하는데 비교적 큰 분말은 양면 접착테이프를 이용하여 시료를 붙이고 피막을 입혀서 관찰하면 된다. 그러나 매우 미세한 입자의 경우는 양면 접착테이프를 이용하여도 무방하겠지만 투과전자현미경용 그리드를 이용하여 여기에 침지dip 방법처럼 올려놓고 피막을 입히거나 혹은 그대로 관찰할 수도 있다. 형태가 큰 시료인 섬유, 목재, 반도체 등을 관찰할 때는 시료대에 맞도록 적절한 크기로 잘라 시료를 정확히 시료대에 붙인 후 금속 피막을 입혀 관찰한다.

(2) 전도성 시료

금속과 같은 전도성 시료는 원칙적으로 시료에서 전자방해가 일어나지 않기 때문에 금속 피막을 입히지 않고 그대로 관찰할 수 있다. 금속조각의 경우 일반적인 표면 관찰 시에는 표면이 오염되지 않도록 하며 오염되었을 경우 깨끗이 제거한 후 관찰하면

된다. 금속의 내부 표면일 경우는 관찰 직전 금속을 깨서 즉시 관찰하여야 한다. 전도성 시료의 경우도 시료상태, 관찰목적에 따라서 피막을 입힌 후 관찰할 수 있다.

8.1.2 생물체 시료

곤충의 날개 등과 같이 표피가 딱딱하여 변형이 거의 없는 경우는 고정 등의 과정 없이 관찰할 수 있다. 따라서 피막을 입히지 않고 바로 검경할 수 있다.

일반적으로 생물체는 쉽게 변형이 일어나므로 변형되지 않은 시료를 관찰하여야만 좋은 영상을 얻을 수 있다. 변형이 일어나는 시료의 조제 과정은 변형이 일어나지 않도록 고정과 탈수 과정에 주의하며 시료조제실의 온도와 습도의 적절한 환경에서 수행하여야 한다.

8.2 시료의 채취

전자현미경 시료의 채취는 검경하는 시료의 크기가 일반적으로 작으며, 특히 투과전자현미경의 경우에는 더욱 작으며 세포와 조직 수준에서 검경하기 때문에 채취하는 시료를 선정하는 것이 매우 중요하다.

투과전자현미경의 생물 시료는 크기가 보통 1x3mm 정도로 작아야 고정, 탈수, 포매 등 다음의 시료 제작 과정이 용이하다.

시료 채취는 반드시 3반복 이상, 보통 10반복 정도로 한다. 또한 채취하는 시료가 연구 시험에 적절한 대표성을 나타내어야 하며, 동시에 건전한 시료도 함께 채취하여야 한다.

8.3 고정

8.3.1 영향 요인과 목적

시료 고정fixation에 영향을 미치는 요인은 우선 고정액의 농도tonicity로서 저장액hypotonic이나 등장액isotonic에서는 세포가 부풀어 커지며swelling, 고장액hypertonic에서는 세포가 쭈그러지는wrinkling 현상이 일어난다. 따라서 등장액보다 아주 약간 높은 고장액이 유리하다.

고정액의 산도pH 역시 시료에 영향하는데 생리적 산도인 7.0~7.4가 좋다. 고정 시의 처리온도는 시료 채취 시 온도의 고정액에서 시작한 후 3분 정도 지나면 4°C로 낮추어 준다. 이렇게 온도 처리를 하여야 세포가 생명을 다할 때의 자가분해autolytic change의 변화를 감소시킬 수 있으며 고정액의 침투를 초당 1~2 μm 정도 천천히 하도록 할 수 있다.

시료의 세포와 조직은 고정액이 침투할 때까지 계속 호흡을 하므로 고정액에 시료를 넣으면 즉시 심하게 흔들어 고정액 속에 기포가 많이 발생하여 시료의 세포에 산소가 계속 공급될 수 있도록 하면 세포의 물리화학적 변형을 최소화할 수 있다.

고정은 생물체의 시료 제작에 가장 먼저 하는 과정인데 고정

목적은 다음과 같다. 첫째 살아있는 상태에서 가능한 한 변함없이 미세구조를 보존하기 위한 것이며, 둘째 포매, 절편 등 시료 제작 과정에서 시료가 파괴되는 것을 방지하고, 셋째 염색과 전자현미경 검경 시 전자 광선에 대한 보호 등 일련의 시료 처리과정을 위하여 준비하는 초기 과정이다.

시료의 고정 방법은 화학적 고정chemical fixation과 물리적 고정physical fixation 즉 냉동고정으로 구분할 수 있으며, 생물시료의 화학적 고정은 세포에 함유되어 있는 단백질protein, 다당류polysaccharide, 지질lipid, 핵산nucleic acid 등의 고분자macro molecule 물질들이 서로 교차결합cross-link하여 단단한 그물구조reticulate network가 만들어지도록 하는 것을 말한다.

화학적 고정은 비 응집 고정시약non-coagulant fixative으로 먼저 처리하는데 고분자 물질의 안정화를 위하여 알데히드aldehyde를 사용하며 이어서 응집 고정시약coagulant fixative인 에틸알코올ethanol로 교차 침전을 하도록 한다.

고정 방법은 작은 시료의 경우에는 시료가 고정액에 잠기immersion도록 하며, 비교적 큰 시료로서 동물인 경우에는 고정액을 혈관에 직접 주사venal injection하여 전체적으로 고정되게 하는 방법이 있다.

8.3.2 세포구성 물질과 고정

투과전자현미경 시료용 염색약은 다음의 조건을 만족시키는 것이 좋다. 염색약이 시료와 반응하지 말아야 하며, 높은 밀도와

높은 용해성을 갖고 있어야 하고, 염색약의 원자나 이온들이 적을수록 좋으며, 높은 용해점을 갖고 있는 것이 좋다.

투과전자현미경의 고정과 염색은 일차고정은 알데히드aldehyde로 하며 이차고정(후 고정)은 오스뮴osmium tetroxide로 하는 것이 일반적이다. 생물시료의 세포 구성성분과 고정액과의 특성을 보면 단백질은 거의 모든 고정액에 잘 처리가 되지만 지질은 오스뮴에서 잘 염색되고, 핵산은 우라닐에서 잘 되는 특성이 있다. 그러나 탄수화물과 같은 다당류polysaccharide는 우라닐uranyl과 과망간산염permanganate에서 약한 반응이 일어난다. 따라서 시료의 특성을 파악하여 염색 시약을 1~2종 선택하여 사용하면 좋은 영상을 얻을 수 있다(표 8.1).

표 8.1. 고정 시약 종류별 세포 내용물의 고정 반응 정도

고정 시약	다당류	핵산	단백질	인지질	지질
오스뮴 (osmium tetroxide)	-	△	△	○	○
알데하이드 (aldehyde)	-	△	○	-	-
우라닐 (uranyl)	△	○	○	-	-
과망간산염 (permanganate)	△	-	○	○	△
텅스텐인산 (PTA)	-	-	○	-	-

- : 무반응, △ : 중간반응, ○ : 강한반응

식물 바이러스를 침지dip 방법으로 세포 즙액에서 직접 검경할 경우에는 보통 피티에이phosphor tungstic acid, PTA로 3~5초 정도

염색하고 건조시킨 후 검경하는데 바이러스는 핵산을 단백질이 둘러싸고 있는 구조이므로 바이러스 입자 표면의 단백질을 염색하여 검경하는 것이다.

8.3.3 고정액 제조 방법

고정액은 여러 종류가 개발되어 있으며 종류별 제조방법은 다음과 같다.

(1) 오스뮴

오스뮴osmium tetroxide, OsO_4 1g/1이 들어 있는 병을 이중 마개 갈색 병에 증류수 50ml 을 넣고 병 속에서 조심해서 깬다. 반드시 흡 후드에서 일회용 비닐장갑을 착용하고 한다. 병뚜껑을 즉시 잘 닫고 오스뮴이 다 녹을 때까지 매우 조심하면서 가만히 흔들어 준다. 증류수 49ml을 넣는다. 최종 농도는 1% 고정액으로 만든 다음 사용한다.

(2) 그루탈알데히드

그루탈알데히드glutaraldehyde 10% 또는 25% 원액을 완충액에 희석하여 사용하고자 하는 농도로 맞춘다.

(3) 오스뮴-그루탈알데히드

그루탈알데히드glutaraldehyde 50% 1 ml, 4% 오스뮴 OsO_4 2 ml, 완충액 5 ml에 녹인다. 이 고정액은 1% 오스뮴과 6.25% 그

루탈알데히드 용액이다. 삼투압은 900mOsM이다(Trump and Bulger, 1966).

(4) 그루탈알데히드-파라포름알데히드

파라포름알데히드paraformaldehyde 8% 25ml과 그루탈알데히드 glutaraldehyde 50% 5ml을 0.2M 인산완충액phosphate buffer 또는 카코딜완충액cacodylate 50ml에 희석한다. 카코딜완충액을 사용할 경우는 염화칼슘CaCl₂ 25mg을 넣는다. 고정액의 삼투압은 2,010mOsM 정도이다(Karnovsky, 1965).

(5) 오스뮴-설탕

오스뮴OsO₄ 2% 8ml과 베로날 완충액veronal acetate, pH 7.2 2ml, 증류수 4ml, 설탕sucrose 0.72g, 0.1N 염화수소HCl 2ml, 고정액 삼투압은 270mOsM 정도이다(Caulifield, 1957).

8.3.4 시료 고정과 완충액

적절한 크기 1×3mm의 시료를 고정액에 2시간 동안 고정시킨다. 이때 시료에 따라 시료 내부까지 고정액 침투가 용이하도록 약한 진공상태를 유지시킨다. 완충액으로 2~3회 각 20분씩 세척한다. 1~2%의 오스뮴으로 2시간 동안 후 고정시킨다. 증류수로 2회 각 1~2분 동안 간단히 세척한다. 세척 후 0.5% 우라닐uranyl acetate로 하룻밤 냉장고에서 염색시킨다. 시료 고정과 세척에 사용하는 완충액의 제조는 다음과 같다.

그 이외에 흔히 사용하는 완충액의 종류는 Millonig's phosphate 완충액으로 A액 2.26% Sodium phosphate monobasic, B액 2.52% NaOH, C액 5.40% glucose을 제조하고, D액은 A+B = 41.5mL + 8.5mL = 50mL로 만들고 산도 7.3인 완충액은 C+D = 5mL + 45mL로 만들어 사용한다.

① 소렌슨인산(0.1M)

② 인산완충액(0.2M)

산도(pH)	A 액	B 액	산도(pH)	A 액	B 액
6.0	12.1	87.9	6.4	73.5	26.5
7.0	61.2	38.2	6.8	51.0	49.0
7.2	72.6	27.4	7.0	39.0	61.0
7.4	81.8	18.2	7.2	28.0	72.0
7.6	88.5	11.5	7.4	19.0	81.0
7.8	93.6	6.4	7.6	13.0	87.0

A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.9g/ 1000mL 증류수,
B: KH_2PO_4 9.1g /1000mL 증류수

A: NaH_2PO_4 27.8g/1000mL 증류수,
B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65g /1000mL 증류수

③ 카코딜-황산(0.2M)

④ 구연산-인산

산도(pH)	A 액	B 액	증류수	산도(pH)	A 액	B 액
6.4	50	18.3	31.7	6.0	30.75	69.25
6.6	50	13.3	36.7	6.8	22.75	77.25
6.8	50	9.3	40.7	7.0	18.15	81.85
7.0	50	6.3	45.8	7.2	13.05	86.95
7.2	50	4.2	45.8	7.4	9.15	90.85
7.4	50	2.7	47.3	7.6	6.35	93.65

A: $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$ 2.8g/1000mL 증류수,
B: 0.2M HCl 6.7mL /1000mL 증류수

A: sodium citrate 2.1g/100mL 증류수,
B: Na_2HPO_4 1.19g /100mL 증류수

8.4 탈수 및 포매 전처리

8.4.1 탈수

탈수dehydration는 시료 내부에 포함되어 있는 물 또는 습기를 포매 물질이 시료 내부로 잘 침투하고 혼합되게 하는 것이며, 주사전자현미경 시료의 탈수는 임계점 건조장치critical point dryer에서 사용하는 유체와 잘 교체 될 수 있도록transitional fluid 하는 것이다.

탈수에 사용하는 시약은 고급 에틸알코올ethyl alcohol 또는 아세톤acetone이며, 이 시약은 흡습작용hygroscopic property을 한다. 희석 농도 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100% 또는 30%, 50%, 75%, 90%, 95%, 100%, 100% 또는 25%, 60%, 95%, 100%, 100%로 한다. 농도별 희석은 살균 증류수로 한다.

탈수처리는 각 농도별로 급속 탈수 방법의 경우에는 각 단계 별 5~10분씩 처리하며 일반적인 방법은 30~40분씩 처리한다. 탈수과정이 100%까지 끝나면 프로필렌옥시드propylene oxide로 2회 처리한다. 프로필렌옥시드는 탈수과정에서 처리한 에틸알코올과 아세톤을 조직 내부에서 치환하여 다음의 시료 제작 과정인 포매 과정을 용이하게 하기 위해서 처리한다. 탈수 과정은 흡 후드에서 한다.

8.4.2 포매 전처리

프로필렌옥시드propylene oxide와 포매 액인 이폰epon의 비율을 1:1로 섞는다. 급속 포매 방법에서는 30분 처리하며 일반포매방

법은 2~3시간 처리한다. 다음 단계는 프로필렌옥시드와 이폰의 용액을 1:2로 섞은 다음 30분 또는 2~3 시간 처리한다.

8.5 시료 라벨 준비

포매블록embedding block 별로 라벨을 브릭 안에 넣어야 하며 라벨은 연구실에서 시료를 구분하고 정리할 수 있도록 편리한 방법으로 하는 것이 좋다. 일반적인 라벨 표시 방법은 연구실 포매 일련번호-시료번호-반복번호를 부여하는 것이 시료 브릭을 찾기가 용이하다. 또한 라벨은 반드시 연필을 사용하여야 처리과정 중에서 번지지 않는다.

8.6 포매

8.6.1 포매 플라스틱의 종류와 특성

시료의 포매 플라스틱은 투과전자현미경 검경이 용이하도록 여러 조건을 만족시켜야 한다. 우선 탈수에 사용되는 시약dehydrant인 알코올 또는 아세톤과 잘 섞여야 한다. 그리고 시료에 잘 침투되어야 하며, 점도viscosity가 높지 않아 탈수와 포매 작업을 할 때에 쉽게 할 수 있어야 한다. 또한 블록을 경화hardening 시킬 때 중합polymerization 과정 중에 시료의 손상이 없어야 한다. 블록이 만들어 진 후 초박절편이 잘 되어야 하고, 전자현미경 검경을 할 때에 초박절편 시료가 전자빔의 열에 안정적thermostable 이어야

하고, 블록 내에 포매 된 시료가 영구적으로 보관될 수 있도록 보관성(preservation)이 좋아야 한다.

포매 플라스틱은 소수성(hydrophobic) 재질과 친수성(hydrophilic)으로 구분할 수 있다. 소수성 재질은 아랄다이트(araldite), 이폰(epon), 스퍼(spurr)가 있으며, 친수성 재질은 LR white, lowicryl, vestopa, glycol methacrylate, 아랄다이트 유사물질인 durcupan 등이 사용된다. 또한 포매 수지(resin)는 화학성분에 따라서 아크릴 수지(acrylic resin)에는 methacrylate와 LR white가 속하며, 폴리에스터 수지(polyester resin)에는 vestopal과 rigolac 등이 있고, 에폭시 수지(epoxy resin)에는 araldite, epon, spurr 등이 있다. 포매 수지는 각각의 특성이 모두 다르므로 사용설명서를 반드시 숙지하고 포매를 하여야 한다.

수지의 선택은 투과전자현미경의 검경 목적에 따라서 선택을 할 수 있는데 일반적으로 사용하는 것은 이폰 수지이며 경도가 좋고 초박절편에 유리하고 스퍼 수지의 경우에는 딱딱하지 않아서 초박절편이 쉽지만 이폰 수지만큼 안정적이지 않다. 반면에 면역전자현미경 검경(immuno-electron microscopy)을 위해서는 친수성 수지인 LR white를 사용하여야 처리와 경화 과정에서 단백질의 변성이 일어나지 않으므로 항혈청을 이용하여 세포 내에서 상호 반응을 검정을 할 수 있다.

8.6.2 포매과정

포매판(embedding mold)의 각 블록 안에 1/2정도의 포매 용액을

넣는다. 포매판은 수평인 곳에 놓고 작업한다. 시료의 정보를 적은 라벨(label)을 뽕족하지 않은 넓은 쪽의 가운데에 병렬로 놓는다. 끝이 뽕족한 가는 대나무 막대로 시료를 순서대로 포매판 블록의 좁은 쪽에 놓는다. 포매용액을 블록에 넘치지 않을 정도로 가운데가 볼록하게 채운다. 시료를 블록의 뽕족한 쪽의 가운데에 가지런히 놓는다. 포매용액의 경화에 맞는 온도와 시간에 맞는 열처리를 한다.

8.6.3 포매 수지 조성

투과전자현미경 시료 포매에 가장 일반적으로 사용하는 수지의 조성은 다음과 같으며, 각각의 수지는 키트로 되어 판매되므로 사용설명서를 숙지하도록 한다.

(I) 이폰

이폰epon은 전자빔에 안정적이어서 가장 보편적으로 사용한다. 조성은 A액 이폰epon812 62mℓ과 DDSA 100mℓ을 혼합하고, B액은 이폰 100mℓ과 MNA89를 혼합 한다. 최종 혼합액은 A액 10mℓ, B액 10mℓ, DMP 30 0.3mℓ으로 만든다. 혼합액을 만들 때에는 수지가 점도가 높아 기포가 발생하기 쉬우므로 기포가 생기지 않도록 매우 천천히 조심스럽게 잘 혼합하여야 한다. 만약 공기방울이 생겼으면 데시케이터 안에 넣고 진공펌프로 기체를 뽑아낸다. A 용액과 B 용액은 냉장고에 보관하고 사용 전에는 실온과 같아진 후 혼합하여 사용하여야 한다. 수지의 경화를 위한 열처리는 4

0°C에서 24 시간, 60°C에서 48 시간 처리하는 것이 좋으며, 경화 상태에 따라서 온도와 처리시간의 가감이 필요하다.

(2) 스퍼

스퍼spurr 수지의 포매 혼합액은 ERL-4207 등 4종류의 시약이 사용되며, 브력의 경화 정도에 따른 혼합액의 조성은 표 8.2와 같다. S-1(DMAE)는 혼합이 다 된 후에 첨가하며 약 10분 동안 자동 분주기(피펫)로 잘 섞는다. 입으로 하는 수동 분주기는 사용하지 않는다. 혼합액은 완전히 혼합되도록 하여야 한다. 경화 열처리 70°C에서 8 시간 하며, 급속처리는 3시간 처리하면 충분하다.

표 8.2. 시료 블록의 강도별 스퍼액 조제

시약종류	표준	딱딱함	무름	급속처리
ERL-4207	10.0g	10.0	10.0	10.0
DER736	6.0g	4.0	8.0	6.0
NSA	26.0g	26.0	26.0	26.0
S-1(DMAE)	0.4g	0.4	0.4	1.0

(3) 아랄다이트

조성은 아랄다이트araldite 502 68ml, DDSA 19ml, TAC 10ml, DMP30 3ml이다. TAC양이 감소하면 브력이 보다 단단하게 되며, DDSA 양이 감소하면 무른 브력이 된다.

(4) 글리콜 메타크릴

조성은 A액 글리콜 메타크릴 glycol methacrylate 97mℓ과 증류수 3mℓ, B액 글리콜 메타크릴 98mℓ과 루펠코 luperco 2mℓ을 섞어서 만들고, 혼합액은 A액과 B액의 비율을 7대 3으로 한다. 혼합액은 사용 전에 미리 중합 pre-polymerize 시켜야 하며 중합방법은 혼합액을 천천히 흔들어주면서 끓기 시작할 때까지 하면 된다. 혼합액은 흔들어주면서 찬 얼음물에 담겨서 2°C까지 식힌다. 처리가 끝난 혼합액은 냉동고에 보관하면서 사용한다.

(5) 이폰-아랄다이트

조성은 A액은 이폰 epon812 31mℓ, 아랄다이트 araldite 25mℓ, 디부틸프탈레이트 dibutyl phthalate 4mℓ로 만든 다음에 혼합액은 A액 8ml과 DDSA 20mℓ, DMP30 2mℓ을 섞어서 사용한다. 아랄다이트나 DDSA의 양을 증가시키면 보다 단단한 블록이 된다.

8.7 초박절편 제작

투과전자현미경 검경에 좋은 초박절편을 만들기 위해서는 무엇보다도 시료 블록이 잘 만들어져야 하며, 매우 예리한 초박절편용 칼을 사용하여야 얻을 수 있다. 다시 말하면 나쁜 시료 브릭과 나쁜 칼로는 절대 좋은 초박절편 시료를 얻을 수 없다. 매우 잘 된 초박절편을 검경하여야 좋은 시료의 정보와 영상을 얻을 수 있다.

8.7.1 시료 브릭 다듬기

초박절편기ultramicrotome에서 블록을 자르기 전에 다듬기 trimming를 하는데 이 다듬기는 입체 광학현미경을 보면서 한다. 시료 블록을 바이스vise에 움직이지 않게 고정하고 일차적으로 시료가 있는 부분이 블록 표면에 나올 때까지 다듬는다. 입체 광학현미경에서 다듬기 하기 전에 간이 다듬기는 면도칼보다 줄file을 사용하면 더욱 빨리 다듬을 수 있다.

간이하게 다듬은 블록은 계속하여 면도칼로 다듬고 초박절편기로도 다듬을 수 있다. 다듬을 때에 많은 시료 부스러기가 나오므로 초박절편기에서 다듬는 것은 가급적 피하는 것이 좋고 손으로 정교하게 다듬을 수 있을 때까지 연습하는 것이 좋다.

시료 블록은 그림 8.1에서 보는바와 같이 순서대로 정교하게 다듬고 마지막에는 사다리꼴이 되도록 하여야 초박절편기ultramicrotome에서 절편을 만들 때 용이하다. 면도날은 사용한 부위는 다시 사용하지 않도록 한쪽 끝부터 차례로 사용하며 다듬을 때에 시료 블록 표면의 상태를 보아서 미세한 줄이 생기면 새것으로 교체하여 자른 표면이 매끄럽게 되어야 한다.

블록의 다듬기는 먼저 블록의 맨 위를 다듬어서 시료가 나오도록 한 다음에 직각과 사선으로 4번 연속하여 다듬기를 한다(그림 8.1, 좌). 다듬기가 끝나면 블록 맨 끝의 표면이 1~2mm 정도의 사각형으로 보인다(그림 8.1, 우).

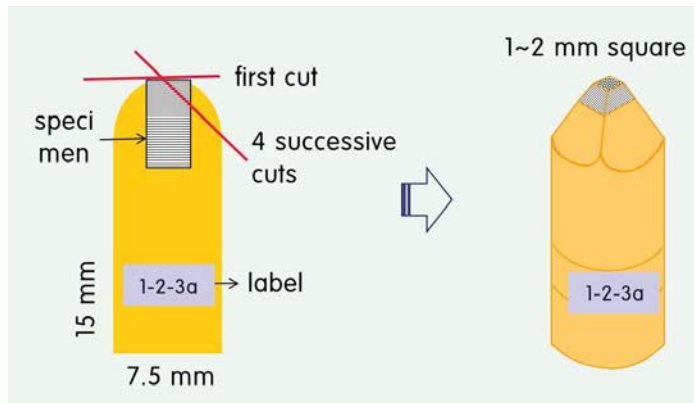


그림 8.1. 시료블록의 일차다듬기 과정.

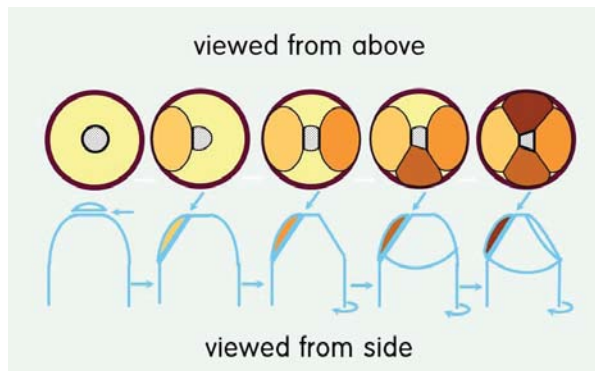


그림 8.2. 시료 블록의 이차다듬기 과정.

일차 다듬기를 한 4각형 모양의 포매 시료 표면을 이차 다듬기를 하여 사다리꼴 모양으로 다듬기를 한다(그림 8.2). 이차 다듬기의 순서는 일차 다듬기와 동일하다. 그림 8.2의 위쪽은 다듬기 하는 과정을 위에서 내려다 본 모양이며 아래쪽은 시료 블록

을 옆에서 본 모양이다.

8.7.2 초박절편 제작

초박절편을 만들기 위해서는 일차적으로 시료 블록을 잘 만들어야 하며, 또한, 시료 블록의 초박절편 제작을 하려면 칼을 사용해야 한다.

초박절편은 초박절편기ultramicrotome를 사용하여야 하며, 여기에 장착하여 사용하는 칼은 유리칼glass knife과 다이아몬드칼diamond knife이 있다. 다이아몬드칼은 개당 500만 원 정도로 매우 비싸고 약간의 부주의한 취급에는 손상이 일어나 못쓰게 되므로 초보자들은 가급적 사용하지 말아야 한다. 유리칼은 초보자나 두꺼운 시료를 만들 때 또는 블록 다듬기 등에 사용하며 초보자들이 매우 능숙하게 유리칼을 사용할 수 있을 때에 비로소 다이아몬드 나이프를 사용하여야 한다.

(1) 유리칼 제작

전자현미경 실험실에는 유리칼 제조기glass knife maker가 갖추어져 있으며(그림 8.3), 사용방법은 기종에 따라 약간씩 다르지만 기본적인 원리, 주의점만 설명하면 다음과 같다.

손을 깨끗이 씻는다. 또는 일회용 비닐장갑을 끼고 한다. 손에 있는 기름이 유리칼을 오염시킬 수 있으므로 깨끗이 하도록 한다. 유리칼용 유리는 세척제로 깨끗이 닦고 증류수로 2~3회 청결히 닦은 후 세워서 먼지가 묻지 않도록 잘 말린다. 유리칼용 유

리는 먼지가 발생하지 않는 종이 타월에 올려놓는다. 유리칼 제조기에서 사용법대로 유리칼을 만든다. 유리칼 만들 때에 조그만 유리파편이 생기므로 입으로 불지 말고 반드시 소형 진공소제기로 청소한다. 만들어진 유리칼은 95% 에틸알콜로 흔들어 씻어 준다.

칼 면은 만지거나 휴지 등으로 닦지 말아야 한다. 깨끗이 만들어진 유리칼은 유리칼 보관함에 넣는다. 유리칼 면에 물을 담을 수 있도록 보트boat를 만든다. 완성된 유리칼은 유리칼 보관함에 습기가 차지 않도록 깨끗이 보관하여 충격이 가해져서 유리칼끼리 서로 부딪히지 않도록 한다.

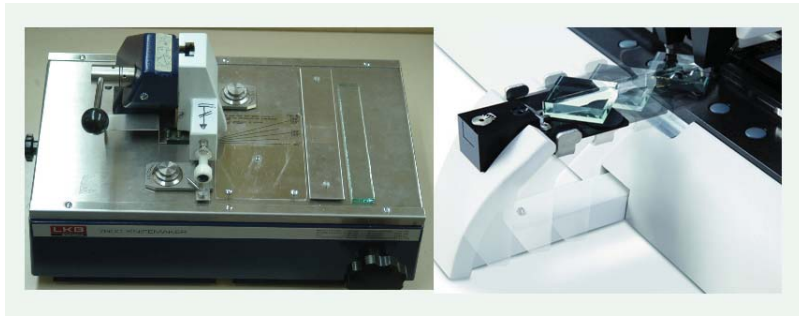


그림 8.3. 유리칼 제조기. LKB7800(좌), EM KMR3(우).

유리칼은 칼 면의 예리한 정도의 질이 우수하여야 하는데 이것은 두께 5mm의 유리를 자를 때 유리칼 제조기에서 가장 빠른 속도로 깎fastest break 때에 가장 예리한 면sharpest crack이 넓은 유리칼이 만들어 진다. 유리칼 각은 초박절편의 질을 결정하는

중요한 요소이다(그림 8.4).

유리칼 제조기에 유리칼용 유리 막대는 전자현미경 재료를 취급하는 회사의 것을 시중에서 구입하여 사용하면 된다. 유리막대를 장착하고 다이아몬드칼로 자를 때 남는 면의 폭이 0.5~2.0mm 정도가 되게 하도록 정한 후에 다이아몬드 나이프로 선을 그은 후 가장 빠른 속도로 유리를 자른다.

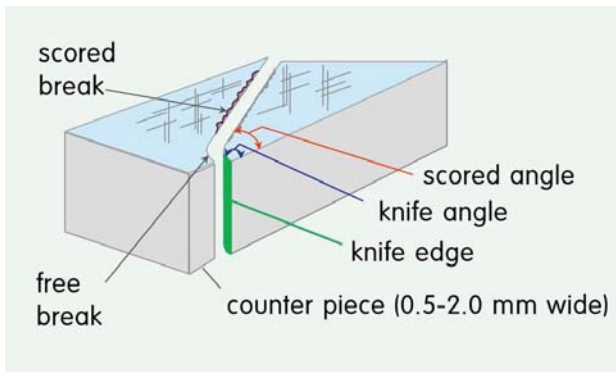


그림 8.4. 유리칼 면과 여러 유리칼 각도의 종류.

유리칼 제조에서는 칼각도knife angle가 상처난면의 각도scored angle 보다 커야 칼날이 예리해지는 칼로 사용하지 않을 반대쪽의 유리면counter piece이 0.5~2mm 정도 되도록 유리칼 제조기에 유리막대를 정확히 장착하도록 한다. 이렇게 유리막대를 자르면 매끄럽게 잘린 면free break과 거친 면scored break이 생긴다. 유리칼로 만들어진 부분은 칼날knife edge이 생기고 칼날의 아랫부분의 삼각형 부분을 칼각knife angle이라고 하며, 거친면이 생기는 부분의

각을 거친면 각scored angle이라고 한다.

유리칼이 일차적으로 만들어지면 초박절편기ultramicrotome에 장착하여 사용할 수 있도록 물을 담을 수 있는 보트boat를 만들어야 한다. 보트는 시중에서 만들어진 것을 이용할 수 있지만 유리칼을 수시로 교체하여야 하므로 바람직하지 않다. 따라서 일회용 보트를 만들어 사용하는 것이 좋다. 전선용 접착성이 좋은 테이프를 사용하며 테이프를 그대로 감아서 보트를 만드는 방법(그림 8.5, 좌)과 보트를 약간 작게 만들지만 누수가 잘 되지 않도록 유리칼 사면을 잘라서 만드는 방법(그림 8.5, 우)이 있다. 두 방법 모두 사면에 접착된 테이프와 유리 사이는 양초wax를 녹여서 붙이면 물이 새지 않는다.

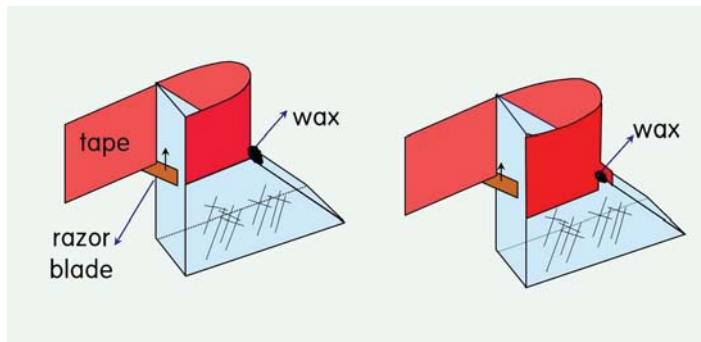


그림 8.5. 유리칼의 보트를 만드는 두 가지 방법.

(2) 칼각도

유리칼이 제작되면 초박절편기에 장착하여야 시료를 적절한 두께로 얇게 자를 수 있다. 유리칼 장착을 위해서는 초박절편기와 의 장착 시 나타나는 관계를 알 필요가 있다. 시료 블록이 초박절편기에 장착되면 블록이 장착된 시료 장착봉specimen arm이 상하 방향으로 진행을 하면서 절편이 만들어 지는데 아래로 내려 오면서specimen arm movement 절편이 만들어지고cut direction, 위로 올라가면서 블록 장착봉이 앞으로 진행arm advance을 하면서 절편을 만든다(그림 8.6, 청색 화살표).

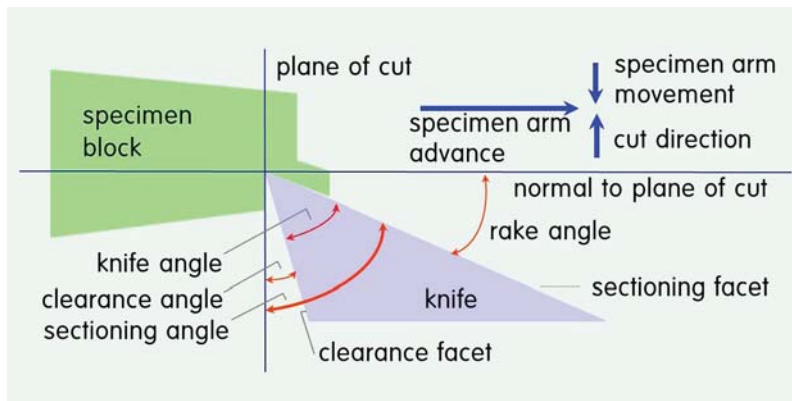


그림 8.6. 초박절편기에 장착된 유리칼 각도와 종류.

유리칼 면이 시료 블록을 자를 때 관여되는 것은 시료 장착봉의 왕복 운동 시간이 중요하며 이것은 절편이 만들어지는 것을 살펴보면서 결정한다. 또한 유리칼을 장착할 때 각도가 중요한데,

유리칼의 칼각knife angle과 유리칼 앞면 여유각 또는 틈새각 clearance angle으로 산출되는 유리칼의 자름각sectioning angle이 작아지면 절편이 예리하게 만들어지나 너무 작으면 블록에 절편이 붙게 되므로 유리칼을 제작할 때 유리칼 제조기에서 최초로 만들 때의 각도를 알고 있어야 한다(그림 8.6).

유리칼을 제작할 때 유리가 처음에 쪼개지는 부분부터 칼날이 매끄러운 면smooth이 먼저 생기고 이어서 거친면whisker이 생기는데(그림 8.7, 좌), 초박절편을 할 때에 유리칼의 거친면을 사용하면 시료 절편에 칼자국이 생겨서 검경과 영상 사진에 그대로 나타나므로 이 부분은 사용하지 않도록 한다(그림 8.7, 중). 초박절편이 만들어지기 시작하면 유리칼 보트의 물 위에 잘려 나오며 다듬기를 할 때에 사다리 모양으로 하였기 때문에 절편이 긴 사다리 모양으로 연결되어 초박절편 띠ribbons를 얻을 수 있다(그림 8.7, 우).

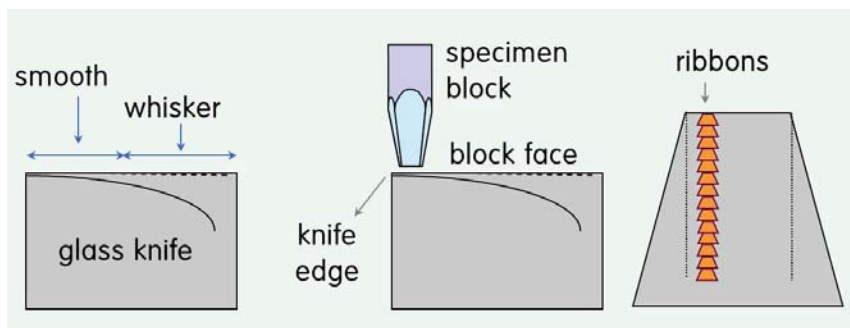


그림 8.7. 유리칼의 예리한 부분(좌)의 사용(중)과 초박절편 모습(우).

(3) 다이아몬드칼의 종류와 특성

최근에는 다이아몬드칼(diamond knife) 가격이 많이 저렴해져서 시중에서 구매하여 사용하기가 용이해졌으나, 다이아몬드칼의 특성을 이해하고 사용하면 정교한 절편시료를 만들 수 있고 오랜 기간 사용할 수 있다.

다이아몬드칼은 보통 칼 각도가 35도, 45도, 55도의 3종류가 시판된다. 35도의 다이아몬드칼은 초박절편의 두께가 30~150nm에 사용하는데 적당하며 생물시료(biological specimen), 중합체 polymer 또는 무른 시료(soft material)를 자를 때 사용한다.

45도의 다이아몬드칼은 30~150nm의 두께로 자르는 용도로 사용하며 특히 10~30nm의 두께로 시료를 잘라 원소분석(ESI)을 할 때 이용한다. 55도의 칼각이 비교적 무딘 다이아몬드 나이프는 딱딱한 시료(hard specimen), 유리(glass), 세라믹(ceramic) 등을 자를 때 이용한다(표 8.3, 그림 8.8).

표 8.3. 다이아몬드칼의 각도와 용도

각도	시료 두께(nm)	용도
35도	30~150	생물시료, 무른 시료
45도	30~150	일반적인 초박절편용
	10~30	원소분석 (ESI)
55도	50~150	딱딱한 시료, 유리, 세라믹



그림 8.8. 초박절편기에 다이아몬드칼의 장착(좌)과 종류(우).

(4) 초박절편의 두께와 색

투과전자현미경 검경에 적당한 생물 시료의 두께는 80~100nm 정도이다. 이보다 두꺼우면 전자빔 투과율이 낮아 어둡고 영상 촬영에도 좋지 않은 반면에 40~50nm 정도로 너무 얇으면 전자빔에 의하여 시료막이 파열되어 관찰하기 어렵다. 경우에 따라서 1000nm 이상의 두꺼운 시료를 광학현미경이나 전자현미경으로 특수한 목적으로 사용하는 경우에는 초박절편기 사용할 때 특별한 주의가 필요하며 또한 시료 원소분석을 목적으로 30nm 정도로 얇은 시료를 필요로 할 경우는 초박절편기 사용법도 더욱 잘 익혀야 하고 그리드의 메쉬가 많고 안정적인 것을 선택하여야 한다.

유리칼이나 다이아몬드칼로 자른 절편이 보트의 물표면 위에서 형광등 불빛에 산란하는 색깔에 따라서 절편의 두께를 알 수

있다(그림 8.9). 투과전자현미경 검경을 위한 적절한 초박절편 시료의 두께는 절편의 색이 은색silver으로 80~90nm 정도인데 약간의 금색gold이 나는 90~100nm의 두께도 검경에 좋다. 절편의 색이 보라색purple이나 청색blue은 너무 두꺼워 검경을 할 때에 시야가 어둡고 시료의 정보를 갖고 있는 전자의 간섭이 많이 일어나 좋은 영상을 얻을 수 없다.

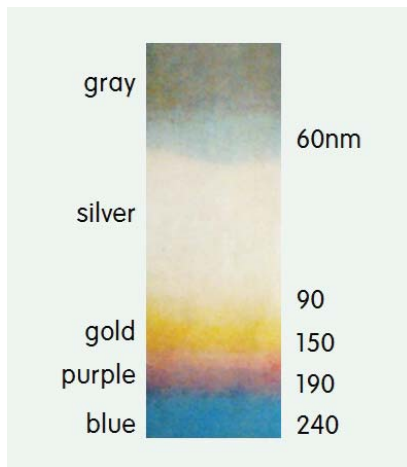


그림 8.9. 초박절편의 두께와 색.
(유리굴절률 1.5)

(5) 초박절편기 사용

초박절편기ultramicrotome는 구조적으로 매우 정교한 톱니바퀴 gear로 구성된 기자재이므로 조심스럽게 다루어야 한다(그림 8.8, 좌). 또한 기계가 동작하고 있을 때에는 숨도 크게 쉬지 않을 정도로 조심해야 하며, 약간의 충격이 가해지면 시료절편을 자르는

데에도 좋지 않지만 기계 내부의 미세한 구동기아에도 영향을 주기 때문에 주의하도록 한다. 초박절편기에 익숙하지 않은 초보자는 익숙한 사람한테서 충분히 주의사항을 숙지한 후 한 단계씩 사용법을 정확히 배우고 익숙해지고 난후 독자적으로 기계적 사용하도록 한다. 초박절편기는 여러 회사에서 생산되는데 미세한 진동을 흡수할 수 있는 책상 위에 설치를 하며, 기본적인 사용법은 각 기종의 운영 지침서를 숙지하도록 한다.

초박절편기의 일반적 사용방법과 주의사항은 다음과 같다. 시료블록을 초박절편기에 지침서대로 정확히 장착한다. 유리칼을 장착한다. 유리칼의 칼 면에 현미경의 초점을 맞추고 유리칼면의 예리한 부분에 시료를 맞춘다. 유리칼 보트에 증류수를 채우고 현미경으로 보아 물 표면이 수평이 되게 한다. 유리칼 각도를 2~5°사이에 맞춘다. 현미경을 보면서 유리칼과 시료 블록 면 사이가 1mm 정도 되도록 밀착시키며 이때 유리칼 면과 시료 면이 수평이 되도록 한다. 기계작동을 시작한다. 절편 면을 보면서 금색리본으로 잘려지는지 확인한다. 이때 금색리본이 나오지 않으면 두께 조절을 한다. 절편이 충분히 잘라졌으면 시료 블록을 뒤로 밀고(기계작동) 절편을 머리카락의 단모 브러시로 모은 다음 핀셋으로 그리드를 잡고 절편을 뜬다. 필터페이퍼 상에서 절편의 물기를 없앤다. 작업이 종료되면 기계의 초기 동작 상태로 복귀시킨 후 전원을 끄고 유리칼을 빼고 기타 오염된 것을 정리한다.

(6) 그리드에 절편 올려놓기

절편시료는 그리드위에 올려놓고 투과전자현미경 검경을 검경 하여야 하는데 그리드에 지지막을 씌운 것은 그리드 처리를 할 필요가 없으나 그리드 막을 씌우지 않은 것에 절편시료를 올려놓을 때 그리드 처리를 하면 절편시료를 보트에서 뜰 때 절편들이 많이 겹치는 것을 막을 수 있으며, 그리드 표면에 용이하게 접착시킬 수 있다. 이것을 그리드에칭grid etching이라고 하는데 방법은 다음과 같다. 0.1N 염산HCl에 그리드를 담근다. 증류수에 담근다. 95% 에틸알콜에 담근다. 필터페이퍼(고급) 위에 올려놓는다. 이 과정은 짧은 시간에 처리하면 되고 사용하기 직전에 하는 것이 좋다.

(7) 초박절편 불량률의 원인과 대책

① 절편의 불균일한 두께

유리칼이나 다이아몬드칼의 상태를 확인하고 새것으로 교체한다. 다이아몬드칼은 수선하도록 한다. 칼의 각도가 적절하지 않으면 두께가 일정하게 잘리지 않으므로 각도를 조절하면서 절편이 잘 잘리는지 확인한다. 실험실 온도와 초박절편기와의 온도가 차이가 나면 두께가 불량하므로 전자현미경 실험실의 온도를 늘 일정하게 유지하도록 한다.

초박절편기에 미세한 진동이 있으면 자를 때 두께 차이가 나므로 숨을 쉴 때에도 조심한다. 자르는 속도가 너무 빠르면 절편 두께의 차이가 나기 때문에 절편의 색깔을 보면서 시료 장착봉의

상하운동 속도를 조절한다. 일정한 절편이 나온 후에는 시료 블록의 자르는 면이 너무 커져서 두께 차이가 나므로 다시 다듬기를 한다. 시료 블록이 너무 무르면 일정한 두께로 잘리지 않으므로 다시 블록을 경화 시킨다.

② 절편 찌그러짐

칼이 오염되어 있거나 무디면 절편이 찌그러지므로 유리칼은 새것으로 교체하고 다이아몬드칼은 세척하거나 여러 면을 사용하고 보고 동일한 증상이 나타나면 수선을 의뢰한다. 시료 블록이 무르면 다시 경화 시킨다. 틸새각clearance angle이 크면 찌그러지므로 각 설정을 줄인다. 보트의 물 표면이 낮을 경우에도 찌그러지므로 보트에 물을 보충한다. 또한 칼각도, 속도, 블록 다듬기가 정상인지 확인한다.

③ 달그락 소리 발생

초박절편기의 진동이 있으면 소음이 발생하므로 기계 받침대의 수평 등의 이상이 있는지 확인한다. 칼각도knife angle와 틸새각clearance angle 등 칼의 장착 상태를 확인하고 각도가 넓으면 소리가 나므로 줄인다. 칼과 블록의 높이가 잘 맞는지 확인한다. 시료 블록상태 점검은 자르는 면이 너무 넓은지, 다듬은 부분이 너무 많이 나와 있게 장착 되어 있는지, 블록이 너무 딱딱하거나 무른지를 확인한다. 또한 실험실, 기계, 블록 등의 온도 차이가 있으면 달그락 소리가 나므로 실험실 환경을 정비한다.

④ 절편이 블록 자른 면에 붙음

칼이 무디거나 오염되어 있거나, 브럭의 다듬은 면이 오염되어 있으면 절편이 잘 나오지 않고 블록에 붙는다. 시료 블록은 정전기가 발생하지 않는 렌즈 티슈로 닦는다. 칼 각도가 너무 좁으면 발생하므로 각도를 조절한다. 시료 블록의 처음 잘리는 부위와 칼날이 너무 붙어 있으면 블록에 절편이 붙으므로 조절한다.

⑤ 절편이 줄이 보임

칼날에 흠이 있거나 시료 절편 부스러기가 붙어 오염되어 있으면 절편에 줄이 보이므로 교체한다. 시료에 잡물이 있을 경우에는 다듬기를 다시 하여 잡물이 있는 부위를 제거하여야 하며 다른 블록으로 교체한다.

⑥ 절편에 구멍이 보임

시료 블록에 공기방울이 있거나 시료에 딱딱한 이물질이 있거나 포매 액이 잘 침투가 되지 않았을 경우에 절편에 구멍이 나므로 새로운 블록으로 교체한다.

⑦ 절편이 리본으로 나오지 않음

시료 블록의 다듬기를 할 때 사다리 모양이 매우 정교하여야 리본이 일렬로 잘 나온다. 사다리 모양이 찌그러지면 리본 모양으로 일렬로 잘리지 않고 사다리꼴의 좁은 방향으로 휘면서 절편이 나온다. 자르는 속도가 너무 느릴 경우에도 리본 형성이 되지

않으므로 리본이 나오는 것을 보면서 속도를 조절한다. 또한 블록의 다듬은 면에 정전기가 발생할 경우에도 리본이 잘 안 나오므로 증류수에 젖은 렌즈 티슈로 습기가 있도록 한다.

⑧ 기타

절편이 잘리자마자 흩어질 경우에는 블록이 단단하지 않기 때문이며 경화를 다시 한다. 절편이 잘 보이지 않는 경우는 보트에 물 표면이 맞지 않으므로 물 높이를 조절한다. 리본이 일렬로 나오지 않고 구부러지면 사다리 모양이 수평이 아니므로 다듬기를 다시하며 블록에 이물질이 있을 경우에도 발생하므로 다듬기를 다시 하거나 다른 블록으로 교체한다. 절편이 칼 뒤로 넘어가면 보트의 물 높이가 너무 높아서 발생하므로 물 높이를 맞추어준다.

8.8 염색

생물시료의 투과전자현미경 검경은 시료 자체가 전자산란 능력electron scattering power이 근본적으로 매우 낮은 결점을 갖고 있다. 또한 생물시료의 플라스틱 포매 물질은 전자산란을 불규칙random 하게 하여 시료 정보를 제대로 갖고 있지 않은 전자량이 많고, 초박절편이 매우 잘 되었다고 하여도 두께가 완벽하게 일정하지 않아 전자산란이 발생하므로 명암이 좋지 않은 단점이 있다.

초박절편 시료를 염색할 때 고려하여야 할 중요한 점은 염색이 균일(uniformity)하게 되어야 하며, 선택적 반응(selective reaction)이 정확하여야 하고, 너무 진하거나 흐리거나 하지 않고 적절한 명암(adequate contrast)을 나타내어야 한다. 또한 염색으로 인하여 인공적인 변형(artifact)이 없어야 하고, 고정액과 세포 내용물과 반응이 일어나 형태적이나 화학적으로 변성이 되지 말아야 한다. 모든 염색약은 전자현미경을 검경할 때 일반적 환경에서 안정적이어야 하고 사용이 쉽고 제조하기가 간단한 것이 좋다.

염색을 할 때 영향하는 요인은 염색약의 산도(acidity)와 농도(concentration)에 따라서 염색 반응이 매우 다르므로 주의가 필요하며, 염색약이 세균 또는 다음 물질들과 오염되지 않도록 하여야 한다. 또한 염색을 할 때 온도와 염색 시간 또한 염색의 질을 결정하는 중요한 요인이 된다.

8.8.1 생물시료의 염색

생물시료의 투과전자현미경 검경은 위와 같은 단점을 보완하고 검경을 용이하게 하기 위하여 염색(staining)을 한다. 염색은 일반적으로 중금속(heavy metal)으로 하는데 단백질(protein)과 핵산(nucleic acid)을 대상으로 할 때에는 우라늄(uranyl acetate, UA)를 사용하며 지질은 납(lead citrate)으로 한다. 유기염색약(organic dye)은 비선택(non-selective) 반응을 방지하고, 중금속 원자가 선택적으로 잘 염색이 되도록 한다.

투과전자현미경 시료 제작을 할 때 고정액인 오스뮴과 알데히

드와 염색약인 납과 PTA의 조합에 따른 식물 세포 기관의 염색 정도는 표 8.4에서 보는 바와 같다. 생물시료의 경우에는 오스뮴으로 고정하고 납으로 염색하면 모든 세포기관과 내용물을 검경하기 쉽다. 오스뮴과 PTA 조합에서는 원형질막과 단백질의 검경에는 매우 좋으나 핵산 등 기타 세포 기관과 내용물은 중간 정도의 염색이다. 알데히드와 납, PTA 조합은 원형질막이 잘 염색이 되지 않아 검경에 불리하다.

표 8.4. 생물시료의 고정액과 염색약의 조합별 특성

세포 기관과 물질	오스뮴		알데히드	
	Lead	PTA	Lead	PTA
핵산	○	△	○	○
리보솜	○	△	◎	○
골지체	○	△	-	-
원형질막	○	○	△	○
미토콘드리아	○	△	○	○
인지질	○	△	△	△
지질	◎	△	△	△
다당류	○	△	○	○
단백질	○	◎	○	◎

PTA: pH 6.8, 0.25~2.0%; UA: pH 4.2, 1%

-: 무반응, △: 약, ○: 중, ◎: 강.

또한 바이러스 입자와 같이 특정 단백질에 선택적으로 반응하는 바이러스 항체antibody와 면역 금입자를 반응시켜 검경할 수 있는 면역 금입자 전자현미경 검경immuno-gold electron microscopy 방법이 있으며, 이 방법은 세포와 조직 내에서 바이러스 단백질의 분포와 이동, 단백질의 변성 정도 등을 금입자와 부착량에 따라서 측정과 해석이 가능하므로 병리해부학에서 가장 많이 사용하는 방법이다.

8.8.2 염색과정과 염색약 종류

일반적으로 생물 시료의 염색은 3단계로 하는데 첫째 시료를 채취할 때 사산화오스뮴osmium tetroxide, OsO_4 또는 초산 우라늄uranyl acetate으로 고정 과정을 수행하며 탈수 과정에서 초산 우라늄으로 염색을 한다. 둘째 그리드 표면을 세척하는 과정wetting, 셋째 초박절편 시료의 염색으로 오스뮴과 구연산납lead citrate으로 이중염색double staining을 하여 염색시약의 세포 기관과 내용물의 염색 특이성으로 인한 검경의 불리한 점을 극복할 수 있다.

(1) 몰리브덴암모늄

몰리브덴암모늄ammonium molybdate, AM 염색시약은 원형질막과 이에 부수하는 물질의 염색에 유용하게 사용되는데 음염색negative staining에 사용되는 대부분의 농도에서 고른 삼투압을 갖고 있기 때문이다. 농도는 보통 1~3%(w/v)를 사용되며 산도는

pH6.0~10.0 사이에서 사용할 수 있으나 보통 pH7.0~7.4가 세포와 조직의 염색에 좋다. 대부분의 바이러스 염색에 사용하며 중간 정도의 명암을 얻을 수 있다.

(2) 포스포텡그스넨산

포스포텡그스넨산phosphotungstic acid, PTA 염색시약은 용해되면 다량의 음전하를 형성하므로 침투성이 상대적으로 낮다. 사용 농도는 보통 0.25~2.0%(w/v)이고, 1M의 KOH와 NaOH로 산도를 pH6.0~pH8.0 사이에서 사용하는데 보통 pH7.0이다. 염색 시약 종류는 potassium phosphor tungstate, sodium phosphor tungstate, sodium silico tungstate이며, 모두 사용하기 편리하고 오염이 되지 않은 상태라면 비교적 오랜 기간 사용해도 무방하다. 바이러스를 염색할 경우에는 산도가 낮으면 입자의 와해가 일어날 수 있다.

(3) 초산우라닐

초산우라닐uranyl acetate, UA 염색시약은 침투성이 좋고 우라닐의 입자가 작기 때문에 시료를 검경하기 좋아서 가장 많이 사용하는 시약이다. 일반적으로 PTA보다는 우수하나 수산화납lead hydroxide 보다는 염색 정도가 낮다. 사용농도는 0.5~4.0%(w/v)이다. 염색용액은 산도가 pH4.2 정도이며 pH5.0 이상이 되면 염침전이 일어나는 단점이 있으며 산도가 낮아서 세포의 변형이 있음을 알고 검경하여야 한다. 제조된 UA 염색용액은 갈색 시약병

에 담아 보관하면 오랜 기간 사용할 수 있다. 그러나 실험실에서 흔히 사용하는 알루미늄 호일을 뚜껑으로 사용하면 기체에 의하여 알루미늄과 화학반응에 의해 오염되므로 사용하지 않는다.

UA 염색 시약은 매우 높은 명암의 염색이 가능하나 바이러스 입자의 염색에는 입자가 약간 와해되므로 초박절편 시료를 염색할 때 사용한다. UA 염색 시약은 킬레이트 화합물을 형성하는 EDTAethylene diamine tetra acetic acid를 사용하여 복합체로 만든 염색약은 산도를 중성까지 맞추어 사용할 수 있는 장점이 있으나, 안정성이 상대적으로 낮고 염색약 입자도 커져서 불리한 점도 있다. UA-EDTA 염색약은 1% 초산우라닐uranyl acetate과 0.5% disodium EDTA, 0.1% 아세트산암모늄ammonium acetate를 섞어 만들며 산도는 암모니아수로 중성으로 맞춘다.

(4) 옥살산우라닐

옥살산우라닐uranyl oxalate, UO 염색시약은 입자가 매우 작아 유용하게 쓰인다. 12 mM 초산우라닐uranyl acetate와 12 mM 옥살산oxalic acid과 동량을 섞어서 만들고 산도는 암모니아수로 PH6.5~6.8로 맞추어 사용한다. 빛에 매우 민감하므로 아주 적은 양으로 분주하여 놓고 1ml 씩 냉동시켜 놓은 후 1개씩 한 번만 사용한다.

(5) 포름산우라닐 Uranyl formate (UF)

포름산우라닐(uranyl formate, UF) 염색시약은 매우 높은 명암의 염색 효과를 얻을 수 있는 장점이 있으며, 주로 1%(w/v) 용액을 사용하며 암모니아수로 산도 pH4.5~5.2 사이에 맞추어서 사용한다. 바이러스 입자의 염색에는 입자가 약간 부서지기도 하므로 전자현미경 검경 시에 이 특성을 참고하도록 한다.

8.8.3 음염색

바이러스, 핵산, 박테리오파지, 세포소기관 등 액체내의 생체 고분자 물체를 관찰할 경우에 주로 음염색(negative staining)을 이용한다. 음염색은 매질염색이라고도 한다. 시료의 굴곡부위, 틈, 구멍 등에 중금속 염색약을 채우면 시료의 명암이 생겨서 검경이 가능하며 실제 고분자 물체는 염색이 되지 않아 음영상(negative image)으로 검경이 된다. 따라서 음염색은 시료와 염색약 사이에 직접반응(direct reaction)이 일어나는 것은 아니다. 그러나 염색약의 산도, 농도에 의하여 바이러스 입자와 같은 고분자 물질은 변형이 일어나므로 검경할 때 고려하여야 한다.

음염색은 보통 침지(dip) 방법이라고도 하는데 염색약은 음염색 용과 초박절편 시료의 염색에 사용하는 직접 반응 염색약을 사용하여 비교 검경하면 좋다.

(1) 염색약

시료 염색시약의 농도와 산도는 시료종류에 따라 다르므로 여러 번 반복하여 가장 적합한 것을 선택한다. 염색시약의 종류는 다음과 같다. 1~5% 포스포텡그스텐산phosphor tungstic acid, PTA, pH 6.8~7.4, 2% 초산우라닐uranyl acetate pH4.8, 1% 포름산우라닐uranyl formate, pH4.0~5.2, 1~3% 멀리브덴산암모늄ammonium molybdate, pH6.0~8.0, 2% 텡그스텐산리튬lithium tungstate, pH6.0~7.5 등이 있다.

(2) 바이러스 염색

순화 액 속의 바이러스 입자는 농도가 1mℓ 당 $10^6 \sim 10^9$ 의 농도가 되게 적절히 희석한다. 농도가 높으면 바이러스 입자들이 서로 엉겨서 검경하기 어려우며, 너무 낮으면 바이러스 입자를 찾기가 어려워 검경하는데 시간이 많이 걸린다.

식물 바이러스에 감염된 잎 조각 내용물을 염색할 경우에 다음의 순서로 한다. 잎의 크기를 1×3~5mm 정도로 예리한 면도칼로 자른다. 슬라이드 글라스에 스카치테이프를 붙이고 테이프 가장자리에 그리드를 살짝 붙인다. 막이 입혀진 그리드에 순화한 시료를 한 방울(0.02mℓ) 올려놓는다. 여과지로 시료를 그리드 가장자리에 가만히 대고 수분을 빨아낸다. 염색시약을 그리드에 한 방울 떨어뜨리고 5~10초 정도 후에 여과지로 빨아낸다. 잎 조각 내용물 염색의 경우는 이때에 잎 조각을 2~3초 동안 담근 후 여과지로 빨아낸다. 염색이 끝난 것은 백열전구 밑에서 충분히 건조시키거나 실험실에서 충분히 건조시키고 전자현미경 검경을 한다.

(3) 세균 염색

세균은 여러 가지 모양이 있으며 특히 편모flagellum가 달려있는 세균들은 염색을 할 때에 처리를 잘하여야 편모가 잘리지 않은 상태로 검경할 수 있다. 세균은 세포 주변의 섬모가 달린 모양에 따라서 주생모peritrichous flagellum, 단극모monotrichous flagellum, 속생모lophotrichous flagellum 등이 있으며 이것은 세균의 핵심 분류체계이므로 전자현미경 검경에 중요하다.

세균 염색을 위해서는 먼저 신선하게 키운 세균을 사용하는 것이 좋으므로 약 8~10시간 전에 신선한 배양기에 옮겨 놓아 신선한 배양을 하는 것이 중요하다. 다음으로는 약간 자란 세균 균총colony 위에 산도와 삼투압이 배양기와 같은 액을 4~5방울 가만히 떨어뜨린 후 잠시 기다리면 세균이 확산되는 것을 볼 수 있다. 확산초기, 중기에 각각 시료를 채취하여 염색하면 목적하는 검경이 가능하다. 이하 염색방법은 바이러스와 동일하다.

(4) 세포미세기관 염색

세포 내용물을 1~2% 암모늄아세트산ammonium acetate 용액이나 0.32M 설탕sucrose 용액에 농도별로 희석한다. 희석한 용액과 같은 부피의 2% PTA로 염색한다. 염색액은 얼음에 차게 하여ice cold 사용한다. 막이 입혀진 그리드에 염색된 세포용액을 올려놓은 다음 여과지로 조심스럽게 빨아낸 후 실온에서 건조시켜서 전자현미경 검경을 한다.

8.8.4 두꺼운 시료의 염색

전자현미경 검경은 세포 수준에서 관찰할 수 있으나 조직 수준에서의 관찰은 곤란하다. 따라서 전자현미경 검경 전에 시료의 조직 수준의 해부학적 비교 관찰을 위해서 시료를 두껍게 절편을 만들어 검경할 필요가 있으며, 광학현미경 검경을 통한 일차정보를 알고 나서 전자현미경 검경을 하면 보다 좋은 결과와 해석을 할 수 있다. 따라서 초박절편과 함께 광학현미경 검경을 위해서 1~2 μ m로 두껍게 잘라서 검경한다.

블록을 두껍게 자르면 대부분 절편이 말리는 경우가 발생하는데, 슬라이드그라스 위에 증류수distilled water, 에탄올ethanol 또는 크실렌xylene 액체를 떨어트리고 여기에 절편이 잠기게immerse 한 다음 알코올램프 불꽃 위에서 매우 약한 열로 처리하면 말린 절편이 퍼진다.

광학현미경용 염색약은 toluidine blue, azure B, methylene blue-Azure B, basic fuchsin, crystal violet, polychrome, coomasie brilliant blue 등을 사용하며, 염색약의 반응 색과 사용법은 각각의 설명서를 숙지한다.

두꺼운 시료를 광학현미경으로 검경하기 위해서는 먼저 슬라이드그라스를 세척하여야 한다. 사용하지 않았던 슬라이드글라스라도 세척하여 사용한다. 세척액 조제는 증류수 1,000ml에 중크롬산칼륨potassium dichromate 60g을 먼저 녹인 다음 황산sulfuric acid 6ml을 천천히 저어가면서 조금씩 녹인다. 슬라이드 그라스를 이 용액에 10분 동안 담그고 꺼내어 증류수로 깨끗이 세척한 후

옆으로 세워 말려서 사용한다.

슬라이드그라스와 시료 절편과의 접착력 증대를 위하여 처리 용액 조제는 증류수 500ml에 젤라틴gelatin 2.5g, 0.25g 황산크롬 암모늄chrome alum, $\text{Crk}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 을 녹여 만든다. 한 시간 동안 잘 혼합하고 여과지whatman#1로 걸러낸 후 필요하면 매우 소량의 계면활성제tween 20를 넣는다. 슬라이드그라스 1개에 1방울을 떨어뜨리고 종이 타월로 닦아낸다. 깨끗한 지퍼 백에 넣은 후 냉장고에 보관하면 접착력이 오래 지속된다. 염색약 조제 및 처리 방법은 다음과 같다

(1) 아주르 B

조제는 0.6% 아주르azure B와 탄산수소나트륨sodium bicarbonate 3g을 증류수 100ml에 녹인다. 처리방법은 다음과 같다. 블록 시료의 절편은 1.0~2.0 μm 정도로 두껍게 자른다. 슬라이드그라스에 10% 아세톤 한 방울을 떨어뜨리고 절편을 올려놓은 후 60°C에서 약 1~2분 동안 절편을 처리한다. 충분한 양의 염색약을 절편위에 놓은 후 50°C에서 2~5분 동안 처리한다. 증류수로 깨끗이 씻는다. 건조시킨 후 광학현미경 검경을 한다.

(2) 아주르 B-메틸렌블루

조제방법은 A액은 증류수 100ml에 붕산염sodium borate 1g과 메틸렌블루methylene blue 1g을 녹여 만들고, B액은 증류수 100ml에 Azure B 1g을 녹인다. A와 B용액을 1:1 비율로 사용 직전

에 섞어 사용한다. 처리방법은 슬라이드 그라스에 증류수 한 방울을 떨어뜨리고 그 위에 절편을 올려놓고 70°C에서 약 1~2분 동안 건조시켜 슬라이드그라스에 절편을 접착시킨다. 염색약에 1~2분 동안 처리하며 건조되지 않도록 하고, 충분히 세척한 후 건조시킨다. 슬라이드 커버그라스를 덮고 밀봉 처리 후 검경한다.

(3) 베이직혹신-메틸렌블루

조제방법은 A액은 증류수 50ml에 베이직혹신basic fuchsin 2g, B액은 증류수 50ml에 메틸렌블루methylene blue 1g을 녹인다. 처리방법은 다음과 같다. 슬라이드그라스에 아주르azure B 처리와 같이 절편을 붙인다. 신선한 염색약에 70°C에서 A액에 1분 동안 처리한다. 증류수로 깨끗이 세척한다. 실온에서 건조시킨 후 0.1N 수산화나트륨NaOH 2방울과 1방울의 B액과 15초 동안 섞고 이용액으로 실온에서 2분 동안 염색한다. 증류수로 깨끗이 세척한 후 건조시켜 검경한다.

(4) 헤마톡실린-플록신 B

조제방법은 A액은 과망간산칼륨KMnO₄ 0.5g을 증류수 500ml에 녹인다. B액은 옥살산oxalic acid 1g을 증류수 100ml에 녹인다. C액은 헤마톡실린hematoxylin B 2.5g과 암모늄명반ammonium alum 50g을 에틸알코올ethyl alcohol 25ml에 녹인 다음 증류수를 넣으면서 천천히 녹이면서 총 500ml이 되게 한다. 2~3분 동안 A+B+C 용액을 섞어 끓인 후 실온에서 식히고 1~2g 산화수은mercuric oxide,

HgO와 20mℓ 아세트산acetic acid를 섞는다. D액은 증류수 200ml에 플록신phloxine B 1g을 녹인다.

시료 처리 방법은 슬라이드그라스에 절편을 붙인다. 시료절편을 크실렌xylene에 1시간 동안 담근다. 크실렌과 에틸알콜(1:1) 혼합액에 2분 처리하고, 에틸알콜에 2분씩 2회 처리한 후 95% 에틸알콜에 2분 처리 후 증류수로 10분씩 3회 처리한다.

오스뮴을 처리한 시료이면 A용액에 2분간 처리하고 B용액으로 처리한다. 증류수로 7분 동안 3회 세척한 후 60°C에서 C용액에 하룻밤 처리한다. 증류수로 6회 3분씩 세척한 후 D용액에 10분간 처리한다. 에틸알콜로 2회 3분씩 세척한다. 크실렌과 에틸알콜(1:1) 혼합액에 2분간 처리한 후 크실렌으로 1분씩 3회 처리한다.

(5) 톨루이덴블루

조제방법은 1% 톨루이덴블루toluidine blue 0.5mℓ, 2.5% 탄산나트륨sodium carbonate, Na_2CO_3 20mℓ에 섞은 다음 여과지로 여과한다. 시료 처리방법은 슬라이드 그라스에 절편을 붙인다. 2~3방울의 염색액에 10~20분 동안 처리한다. 처리 시 염색정도를 관찰하여 적절한 시간에 증류수로 세척한다. 과도하게 염색되었으면 70% 에틸알콜로 탈색시킨다.

(6) 베이직혹신

조제방법은 50% 에틸알코올ethyl alcohol 100mℓ에 베이직혹신basic fuchsin 1g을 녹인다. 시료 처리방법은 슬라이드 그라스에

절편을 붙인 다음 5~15분 동안 염색한다. 40~60°C에서 건조시킨다.

(7) 쿠마시브릴리언트블루

조제방법은 7% 아세트산acetic acid 100ml에 브릴리언트블루 brilliant blue 0.25g을 녹인다. 시료 처리방법은 슬라이드 글라스에 절편을 붙인다. 염색약을 3시간 동안 55~60°C에서 처리한다. 증류수로 세척한다. 염색이 과도하게 되었으면 7% 아세트산acetic acid으로 5~10분 동안 처리하여 탈색시키고 증류수로 세척한다. 50°C에서 5~10분 동안 건조시킨 후 크실렌xylene에 담그고 슬라이드 커버글라스를 덮는다. 이 염색약은 세포기관은 진한 청색, 원형질은 옅은 청색, 염색체는 검은색으로 염색된다. 또한 0.3μm 정도까지 잘 염색이 되어 자주 사용하는 염색약이다.

8.8.5 초박절편 시료 염색

생물시료의 초박절편 시료를 위한 염색약 조제는 A액은 시트르산납lead citrate-초산우라닐uranyl acetate의 경우, 질산염납lead nitrate 1.33g와 구연산나트륨sodium citrate 1.76g을 순서대로 증류수 30ml에 녹인 후 30분 동안 둔다. 1N 수산화나트륨NaOH 8ml을 첨가하고 증류수로 최종 50ml로 만든다. B액은 초산우라닐 uranyl acetate 1g을 증류수 50ml에 녹인다.

시료 염색방법은 초박절편 시료가 올려 있는 그리드를 증류수로 적신다(말리지 않는다). B액에 5~10분 동안 처리한 다음 증

류수로 세척한다(말리지 않는다). A용액에 2~10분 동안 처리한다. 증류수로 세척한 후 필터페이퍼로 빨아내고 건조시킨다. 전자현미경 검을 하면서 시료의 종류와 염색의 정도에 따라서 염색 처리 시간을 결정하도록 한다.

아세트산납lead acetate의 경우에는 암모늄아세트ammonium acetate 1.85g를 포화용액의 아세트산납 100ml에 녹인다. 염색방법은 시료가 올려있는 그리드를 증류수로 세척한다. 염색약에 20~45분 동안 처리한다. 증류수로 세척한다. 시료 종류와 염색의 정도에 따라서 염색 처리시간을 결정한다. 염색이 만족하지 않을 경우에는 2% 초산우라닐uranyl acetate로 다시 염색한다.

8.9 주사전자현미경 시료의 건조

주사전자현미경 시료는 탈수 후 건조 과정을 거쳐야 하는데, 건조의 문제점은 식물 세포의 경우 액포vacuole가 많은 부분을 차지하므로 세포의 용적volume에 변화가 생긴다. 또한 표면 잠재에너지surface potential energy로 인한 표면장력surface tension이 생겨서 시료의 원래 상태로 건조되기 어렵다. 물의 경우 표면장력은 20°C에서 73dyn/cm^2 ($1\text{mbar}=1000\text{dyn/cm}^2$)로 높은 반면에 대부분의 다른 액체는 $20\sim40\text{dyn/cm}^2$ 로 현저히 낮다. 따라서 표면장력이 낮은 액체상에서 건조 시키는 방법을 임계점 건조critical pont drying라고 한다.

8.9.1 임계점 건조

임계점이란 기체와 액체가 어느 일정온도 이상이 되면 어떠한 압력을 가하여도 액화하지 않는 점을 일컬으며, 그 방법은 시료를 액체에 넣은 후 가열하여 임계점 온도 이상으로 높여 시료의 내외부가 완전히 기화한 상태로 온도를 유지한 후 대기압까지 압력을 떨어뜨리고 서서히 기체를 제거하여 건조시키는 방법이다.



그림 8.9. 임계점 건조장치.

시료의 표면장력은 수분이 없는 곳에서는 존재하지 않으므로 변형이 거의 되지 않은 상태로 건조가 가능하다. 임계점 건조를 위해서는 탈수를 아세톤이나 알코올로 하였을 경우에는 각각 프레온13이나 프레온23 액체를 임계점 건조의 이행 중간액체transitional fluid로 사용한다. 일반적으로 알코올이나 아세톤으로 탈수한 후 아세트산아밀amyl acetate로 치환시키는 것은 임계점 건조 장치의 이행 중간 액체로 액화 이산화탄소carbon dioxide를 사용하기 위한 것이다. 이산화탄소를 사용하는 임계점 건조 장치의 사용법은 기계의

사용설명서를 숙지한 후 사용하며, 2~3회 반복하여 건조시키면 표면이 원래상태와 거의 유사한 좋은 시료를 얻을 수 있다(그림 8.9).

8.9.2 물과 액화 이산화탄소의 임계점

물의 승화곡선sublimation curve은 고체solid에서 증기vapor로 변화하는 A~B, 용해곡선melting point line은 고체에서 액체liquid로 변화하는 B~C, 증발곡선evaporation curve은 액체에서 증기로 변화하는 B~D이다(그림 8.10).

물의 고상solid phase, 액상liquid phase, 증기vapor phase의 3중점triple point은 B점이며 이때의 온도는 0.01°C 이며 압력은 0.0088psi ($1\text{psi}=0.068$ 기압)이다. 또한 액상과 증기 그리고 가스의 3중점은 D점으로 이점을 임계점critical point이라고 한다. 물의 임계점 온도는 374°C 이고 이때의 압력은 $3,266\text{psi}$ 이다.

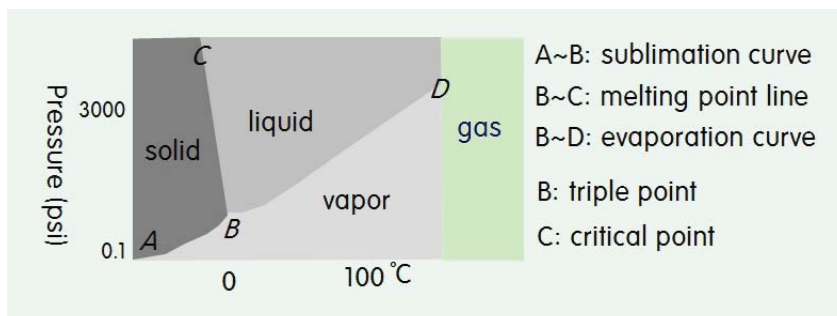


그림 8.10. 물의 3상곡선, 3중점과 임계점.

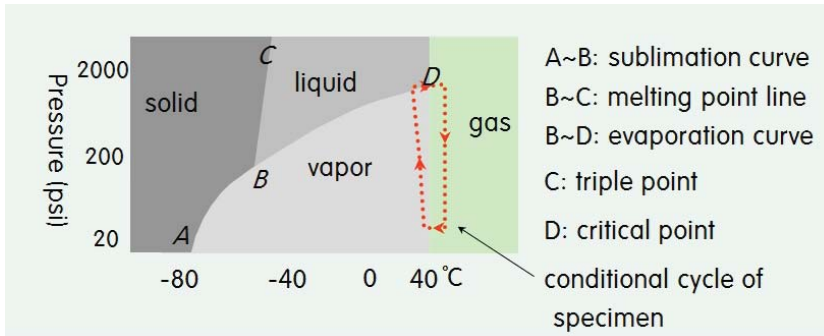


그림 8.11. 이산화탄소의 3상곡선, 3중점과 임계점.

이와 같이 이산화탄소는 물에 비하여 압력과 임계점 온도가 매우 낮기 때문에 효과적이며 안정적으로 시료를 건조를 시킬 수 있다(그림 8.11). 이산화탄소를 이용한 임계점 건조 장치에서의 시료 건조 과정은 시료가 액체 이산화탄소에 잠긴 상태에서 압력의 상하를 조절하면서 가스 상태와 증기상태의 경계면을 이동하면서 conditional cycle 건조가 된다(그림 8.11, 적색).

8.10 시료제작표

지금까지 설명한 전자현미경 시료제작 과정을 표로 만들어 사용하면 제작과정이 능률적이다. 시료제작표에 처리내용과 시간 등 시료 제작자가 선택한 기본적인 시간을 기입해 놓으면 시료제작 후에 시료상태를 점검할 수 있는 기회로 활용할 수 있기 때문이다. 표 9는 시료제작표로 실제적으로 사용하였던 예를 들어놓았으니 보다 발전적으로 사용하길 바란다.

생물시료의 시료 조제 및 블록 제작표(예시)

실험자 :		일자 :	
시료 (식물명, 채집지역):			
증상 : (설명과 함께 그림, 사진 추가)		시료블록 :	
과정	농도(%)	실험 시간	온도 (°C)
GA %			
세척(완충액 종류)			
OsO ₄ %			
세척(완충액 종류)			
UA %			
Ethanol %			
%			
%			
%			
%			
순수 PO			
PO + Epon (1:1)			
PO + Epon (1:2)			
순수 Epon			
Epon + DMP30(1.5%)			
경화 °C			
경화 °C			
경화 °C			

GA: glutaraldehyde, UA: uranyl acetate, PO: propylen oxide

시료제작표 맨 위에는 시료제작자와 시료 제작일자를 적는다.
다음에는 시료에 대한 정보로 식물 종류, 채집날짜, 채집지역, 제

작 이유 등에 대하여 기록한다. 시료의 증상은 처리별 식물체의 상태, 증상 등에 대한 상세한 사항을 기록하며 그림으로 스케치를 하여 놓으면 좋다. 처리별 채집한 시료와 반복에 대한 블록 라벨과 동일한 숫자를 기록한다. 시료제작 과정은 표에 모두 기록하여 놓았는데 다른 처리를 한다면 이 표에 추가로 기입하면 된다. 각 단계별 처리 시 각 처리별 시약별 농도와 실제 실험한 시간working time을 적어 놓으면 시료제작 과정에서 잘못되는 경우가 거의 없으며, 추후 시료제작 과정을 재검토할 경우에도 유용하게 활용할 수 있다.

9. 투과전자현미경 검경과 사진촬영

9.1 검경 준비 조정

전자현미경의 가속전압 기능은 가속전압이 높을수록 전자빔의 투과율이 높아지는 것을 의미하므로 높은 가속전압 검경은 두꺼운 시료의 검경이 가능하다고 말할 수 있다. 그러나 보통 80~100nm 두께의 생물시료는 가속전압이 120kV 이상 너무 높으면 투과율이 너무 높아 배경이 밝아지고 명암이 낮아지며 시료 막이 손상을 입어서 검경하기가 어렵다. 따라서 생물시료의 경우는 투과전자현미경은 70~100kV사이에서 검경하는 것이 가장 효과적이다. 자이스회사의 투과전자현미경EM902A의 경우에는 염색하지 않은 시료 또는 1,000nm 이상 두꺼운 시료를 검경할 수 있도록 전자자기필터렌즈를 장착하고 있다. 여기서는 전자현미경 검경에 기본적으로 조작하여야 하는 내용을 설명하고 그 중요성을 인식하여 각 기종의 전자현미경을 적절히 활용하도록 함에 있다.

전자현미경의 주전원main power을 켜다. 전자현미경은 가능하면 매일 켜져 있어야 하는데, 그 이유는 전자빔은 고 진공상태에서 전자의 휘손이 없으며, 진공상태가 좋으면 좋을수록 전자현미경 상태가 양호한 것이다. 또한 오래 사용하지 않고 꺼진 상태로 있으면 각종 밸브의 밀봉이 불량해지므로 진공 상태가 나빠진다. 따라서 아침 일찍 출근하자마자 바로 켜야 하고 퇴근할 때에 가장 늦게 끄는 것이 바람직하다.

진공상태가 적정 이상으로 좋아지면 각종 스위치를 켜고 고압 high voltage 스위치를 켜다. 고압 스위치는 원하는 시료 검경 시 적합한 가속전압에 맞춘다. 다음으로 필라멘트 filament 스위치를 켜다. 필라멘트 스위치를 켜면 전자발산으로 인하여 잠시 진공상태가 약간 낮아지지만 진공상태가 정상으로 될 때까지 몇 초 동안 기다린다. 필라멘트 스위치를 켜면 전자현미경을 이전에 보았던 상태이면 전자빔이 바로 나오며 그렇지 않을 경우에는 전자빔의 축 조절을 한다. 필라멘트 스위치를 켜면 바로 전자빔에 이전에 맞추어져 있는 밝기의 상태로 되는 현미경과 스위치를 서서히 올리면서 전자빔이 나타나는 형태가 있다.

전자현미경의 경통에 있는 각종 삽입판 aperture과 시료대를 전자빔의 축 경로에서 모두 뺀다. 전자빔의 적정 밝기를 조정한다. 배율을 3000~7000배 사이에 놓는다. 콘덴서삽입판 condenser aperture을 넣는다. 콘덴서의 전자빔 밝기 조절기로 전자빔을 역삼각형이 되게 한다. 전자빔의 중앙을 형광판 fluorescent screen 가운데의 십자 표시 중앙으로 이동시킨다. 전자빔이 균일하도록 밝기 조절기 brightness control로 맞춘다. 필라멘트로 밝기를 전자빔의 X와 Y축 조절기를 이용하여 이중 타원형이 정확히 되도록 맞추면서 필라멘트 밝기를 올려 하나의 원이 되도록 한다. 너무 밝게 하면 필라멘트의 수명이 단축되며, 많이 전류를 올려도 밝기가 더 밝아지는 것은 아니다.

콘덴서삽입판의 구멍 정렬이 되고 나면 전자빔의 명암삽입판 구멍을 정렬한다. 이것은 대물렌즈삽입판 objective lens aperture 또는

명암삽입판contrast aperture이라고도 한다. 다음으로 투사렌즈삽입판 projection lens aperture을 넣어 형광판 중앙으로 전자빔이 오도록 조정한다. 시료를 넣고, 회절diffraction 스위치를 켜고 명암 삽입판을 넣는다. 회절점이 전자빔의 중앙에 오도록 맞춘다. 회절 스위치를 끄고 투사렌즈삽입판을 뺀다. 저배율에서 검경을 하려면 투사렌즈의 전자빔 축 정렬을 하는데, 형광판에 전자빔이 고루 퍼지게 한 다음 시료를 넣고 초점을 맞춘다. 삽입판 구멍의 가장자리가 명확히 보이도록 초점이 잘 맞도록 한다.

다음으로는 각종 전자자기렌즈의 수차astigmatism 교정을 한다. 집광렌즈condenser lens의 수차 교정은 전자빔의 축 정렬이 맞추어진 상태에서 시료를 넣은 후 전자빔의 구형모양이 찌그러지지 않고 완전히 동그란 모양이 되도록 맞춘다. 이때 초점을 맞추면서 조정한다. 대물렌즈objective lens의 수차 교정은 먼저 시료를 넣은 후 배율을 140,000배 이상으로 확대한다. 확대하였을 경우 시료의 동그라미 부분의 가장자리가 모두 형광판 가장자리에 정확히 맞도록 하고 형광판 안에 위치하고 있어야 한다. 대물렌즈 비점수차 조정레버로 원이 일정하도록 한다. 투사렌즈projector lens의 수차 교정은 시료를 넣고 배율을 1,000배에 맞춘다. 비점수차 조정레버로 시료의 동그란 원 부위와 동일하게 맞춘다.

9.2 검경 순서

관찰자의 눈의 밝기는 대부분 다르고 왼쪽과 오른쪽 눈도 서

로 다르므로 대안렌즈eye piece의 초점을 반드시 맞추어야 한다. 어떤 기종의 전자현미경도 관찰자가 자기 눈에 맞는 현미경 초점을 맞출 수 있도록 되어 있다. 대안현미경의 초점은 형광판을 올리고 형광판 중앙에 그어져 있는 십자의 선이 가장 선명하게 잘 보이도록 왼쪽과 오른쪽 눈의 대안렌즈 조절레버로 맞춘다. 대안현미경의 초점은 전자현미경 검경을 할 때 틀려지므로 중간 중간 항상 정확히 맞추는 습관을 갖도록 한다.

전자현미경에 시료를 넣는 방법은 전자현미경 시료의 삽입 방법에 따라서 그리드를 장착한 시료 홀더가 전자빔과 같은 방향으로 삽입하는 형태는 평행 삽입구조top entry system라고 하며, 시료 홀더가 전자빔과 수직방향으로 삽입하는 형태는 수직 삽입구조side entry system라고 한다.

평행 삽입구조는 시료가 안정적으로 전자현미경 경통에 장착하여 수직 삽입구조 보다 안정적으로 시료가 삽입되어 검경에 좋다. 그러나 수평 삽입구조는 그리드 운반대에 그리드를 넣고 빼기와 전자현미경에 장착하기가 편리한 장점이 있다. 전자현미경에 시료를 넣는 방법은 각 현미경의 지침에 따라 정확히 하여야 하며 그렇지 못하면 그리드가 전자현미경 경통 내부로 떨어져서 전자현미경을 분해하여야하는 큰 고장을 일으킬 수 있다. 또한 시료를 넣을 때나 빼 때에 급작스럽게 조작하면 진공상태가 깨지게 되고 다시 진공을 시작하여야 하므로 시간적으로 손실이 많으며 또한 갑자기 공기가 들어가게 되므로 전자현미경 경통 내부가 오염이 많이 되므로 주의를 하여야 한다.

배울의 설정은 저배율부터 고배율로 검경한다. 시료를 검경할 때에는 검경하는 곳이 시료의 어느 부분인지 먼저 파악하여야 할 필요성이 있고 파악 후 확대하여 그 부분의 미세부분을 관찰하는 것이 중요하다. 검경이 끝나면 다음 검경을 위하여 배율을 저배율 상태로 하고 시료를 빼는 것이 전자현미경 내부의 오염을 방지하고 다음 검경을 할 때에 용이한 경제적인 검경이 된다.

9.3 사진촬영

전자현미경 시료를 검경할 때 특이한 구조나 특징이 관찰되면 이것이 무처리 시료와 어떻게 같은지 다른지를 먼저 생각하여야 한다. 그와 같은 특징이 처리별 차이가 있는 것인지도 검경하면서 전자현미경 검경 야장에 간단한 그림을 그리면서 정확히 기록한다. 이와 같이 시료에 대하여 전체적인 정보를 얻고 난 후 어떤 세포구조의 영상과 세포의 어느 부분을 어떻게 사진 찍을 것인가를 결정한다.

좋은 사진을 촬영하기 위해서는 우선적으로 시료를 잘 만들어야 하며 가속전압, 삽입판들의 사용법, 렌즈정렬, 전자빔 제어, 초점, 영상의 구도, 배율, 명암상태 등 매우 여러 요인들이 복합적으로 작용하므로 가장 최적조건에 맞았을 때 최고의 영상을 얻을 수 있다. 따라서 초보자들은 사진촬영을 전문가한테 의뢰하는 것이 좋으며 사진촬영 방법에 대해 숙련될 때까지 배워야 할 것이다. 모든 학문분야와 마찬가지로 사진촬영은 아무리 배워도 끝

이 없으므로 신중하게 하도록 한다.

사진촬영이 끝나면 사진번호, 배율, 날짜, 시료, 촬영자 등의 정보를 전자현미경 검경 야장에 정확히 기록하는 것이 중요하며, 그렇지 않으면 나중에 어느 시료의 어느 사진인지 알 수 없는 경우가 많다. 따라서 각 전자현미경실에서는 필름번호별 촬영일지를 기록하는 것이 중요하다.

필름은 모두 찍고 나면 새로운 필름으로 교체하여야 하는데 이때 주의할 점은 먼저 필름은 투과전자현미경에 넣기 전에 진공 상태에서 하룻밤 두어 필름에서 나오는 화학약품 가스를 제거한 후 사용하여야 하며 이렇게 하지 않으면 전자현미경 내부에서 가스가 제거될 때까지 투과전자현미경의 진공상태가 불안정하여 작동되지 않으므로 진공시간이 매우 길어지고 기계 상태에 도움이 되지 못한다. 필름교환을 할 때에 전자현미경의 각종 스위치와 현미경실내의 모든 불을 꺼서 감광되지 않도록 하고 난 후 필름을 교환한다.

10. 주사전자현미경 검경과 사진촬영

10.1 일반 검경

주사전자현미경SEM의 진공도가 충분하고 기계작동 준비상태가 완료되면 기본적인 전자빔 축 조정, 비점수차 조정, 시료대의 중앙정렬 등을 조정한다. 이와 같은 준비조정이 완료되면 시료를 현미경내에 장착한다. 검경을 하려면 준비한 시료상태에 따라서 어느 정도의 가속전압에서, 그 가속전압에서 어느 정도의 전류로 검경할 것인지를 미리 알고 있어야 하며 가능하면 사전에 전문가와 협의를 한 후 검경을 시작한다.

가장 좋은 영상을 얻기 위한 조건들은 서로 다른데, 저배율의 검경만으로도 충분할 경우, 가능한 최고의 고배율이 필요한 경우, 배율과는 큰 상관없이 일정한 시료 부분의 원소분석이 필요한 경우 등 다르므로 각 연구자의 필요성에 따라서 시료가 조제되고 이에 맞추어서 검경하여야 한다.

주사전자현미경 검경에서 저배율로 검경을 할 경우는 금속피막을 입힐 필요 없이 시료 자체를 직접 검경할 수 있도록 가능한 한 가속전압과 전류상태를 조절하여 검경하는 것이 좋으며 금속피막을 입힐 경우에도 고해상도 영상을 얻기 위하여 고 전류로 인한 시료 손실이 일어나지 않는 상태의 피막을 입힌다.

최고 배율이 필요한 경우는 금속피막을 입히는 과정에 매우 조심스럽게 하여야 하며 전류장해가 발생한다고 너무 두꺼운 피

막을 입히면 표면의 미세구조를 관찰할 수 없으므로 이 두 조건에 맞는 최적 조건에서 검경하도록 한다. 고배율은 가속전압도 최대한으로 하고 이 전압에서 적절한 전류를 선택하는 것이 고해상도의 영상을 얻는데 매우 중요하다. 시료의 원소분석이 필요한 경우는 가능한 한 자연 상태의 시료를 사용하는 것이 좋으며 피막도 금속이 아닌 탄소 코팅이 유리한 경우도 있다.

10.2 천연 시료검경

생물 시료의 검경은 일반적으로 금속 피막을 입히고 검경하여야 한다. 그러나 최근에는 시료에 어떠한 처리도 하지 않으며 피막도 입히지 않고 검경할 수 있기 때문에 보다 원래 상태의 시료 정보를 얻기에 유리하다. 피막을 입히지 않은 시료 검경의 기본 원리는 가장 낮은 가속전압에서 가장 낮은 전자빔 양으로 가장 좋은 영상을 얻을 수 있으므로 고도의 숙련된 기술이 필요하다. 시료에 손상을 주는 원인은 고진공과 전자빔으로 크게 구분할 수 있다.

10.2.1 시료실의 진공도 최소화

시료의 표면에 금 등의 금속 막을 입히지 않고 검경하는 무 피막 시료를 검경할 수 있는 주사전자현미경은 제조회사에 따라서 자연 주사전자현미경 natural SEM, N-SEM 혹은 저진공 주사전자현미경 low vacuum SEM, LV-SEM이라고 한다. 고 진공은 천연 시료의 수

분을 증발시켜 시료의 표면 상태를 급속히 악화시킬 수 있으므로 시료실의 일부분을 고진공으로 하지 않고 자연 상태의 시료를 검경하는 원리이다. 이 방법에서는 진공도가 낮으므로 자연히 전자빔의 전자양이 많아져야 영상을 관찰할 수 있다. 효과적인 검경을 위해서는 아무리 저 진공 상태라고 하여도 진공에 따른 수분 손실 등에 의한 시료의 손상을 무시할 수 없으므로 가능한 시료의 손상을 적게 하기 위하여 최단 시간에 검경하는 것이 좋다.

10.2.2 전자빔 양의 최소화

시료실의 진공도를 낮추면 전자빔이 전자총에서 방출되면서 전자들의 손실이 많아지기 때문에 자연히 전자량을 높여야 검경이 가능하다. 그러나 고진공 상태를 유지하면서 최소한의 전자량을 사용하여 검경할 경우 역시 시료의 손상을 적게 할 수 있다. 이와 같이 고진공 상태에서 검경할 때 저 진공 상태에서 보다는 시료 표면의 수분 손실량이 크므로 시료의 손상이 커지게 된다. 따라서 시료 손상을 최소화하기 위하여 전자빔의 양을 최소화하여 검경하는데, 이 경우 고진공에 의한 전자빔의 안정성은 좋으나 수분 손실이 많아 시료 손상이 되는 단점도 있다.

고진공 상태에서 천연 시료를 검경할 때는 저 진공 상태에서 검경할 때 보다 검경시간을 더욱 짧게 하는 것이 필요하며, 경험에 의하면 약 30분 정도 지나면 시료의 표면 상태가 변화하는 것으로 보아 시료의 종류에 따라 다르겠으나 약 20분 안에 검경을 완료하는 것이 좋은 것으로 판단된다.

10.3 극저온 검경

전자현미경 검경 방법에는 복잡한 시료 처리를 거쳐서 검경하는 일반적인 방법이 있으나 시료 처리과정에서 변형 등의 단점을 극복하기 위하여 시료와 전자현미경 시료실을 극저온 상태로 하여서 검경하는 방법이 있는데 이를 극저온관찰법(cryogenic observation)이라고 한다. 여기서는 주사전자현미경의 극저온 관찰법에 대하여 방법을 설명하도록 한다(그림 10.1).

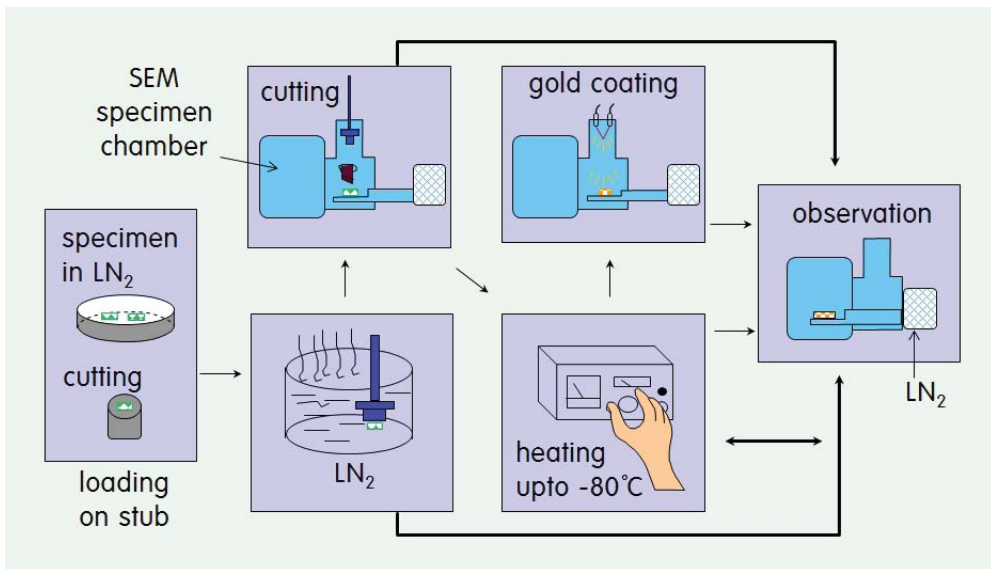


그림 10.1. 극저온 주사전자현미경 검경 과정.

전자현미경의 시료실 뒤에 붙어 있는 액체질소 통에 충분히 충전하며 검경하는 동안 액체질소가 다 없어지지 않도록 보충한

다. 시료를 액체질소(liquid nitrogen, LN₂)에 용기에 충분히 담가서 영하 120°C 이하가 되도록 한다. 시료를 올려놓는 지지대(stub)도 액체질소에 담근 후 시료를 접착제로 지지대에 붙인다. 시료 지지대를 전자현미경 내에 장착하기 전에 다시 한 번 액체질소에 담가서 온도가 조금이라도 상승한 것을 낮추어야 한다. 전자현미경 시료실에 시료대를 장착한다. 시료 표면에 어떠한 처리를 하지 않고 바로 보려면 낮은 가속전압에서 검경한다.

시료의 내부 표면을 관찰하려면 시료실 내부에서 장착된 칼로 시료의 일부를 자른다. 자른 표면을 직접 검경하는 방법이 있으며, 시료 표면에 흰 얼음과 같은 성애가 형성되므로 승화열을 이용하여 제거한 다음 검경하는 방법이 있다. 승화열을 이용한 성애 제거방법은 전자현미경 내부에 장착된 온도계를 보면서 -120°C에서 -80°C 정도 되도록 가열하면 없어진다. 승화열을 처리한 시료는 직접 낮은 가속전압에서 검경할 수 있다.

또한 주사전자현미경 시료실 내부에서 직접 시료에 금입자를 코팅한 후 높은 가속전압에서 검경할 수 있다. 높은 가속전압에서 검경하면 높은 해상도의 검경이 가능하지만, 극저온 상태에서 시료의 어떠한 변형 없이 검경하는 극저온 관찰법의 목적으로 볼 때에 추천하는 방법은 아니다. 주사전자현미경의 극저온 검경은 시료 처리 과정 중의 변형을 방지할 수 있으므로 일반 시료제작 방법으로 처리한 시료의 영상과 비교하면 세포와 조직의 좋은 변화양상을 비교 해석할 수 있다.

11. 암실작업과 명실작업

투과전자현미경 필름을 현상development하거나 필름을 인화print 할 때 암실dark room에서 작업을 하는데, 하루에 많게는 100여장 이상의 사진을 촬영하고 이를 인화하여야 영상을 해석할 수 있기 때문에 표준 작업조건을 확립하는 것이 능률상 매우 필요하다.

현상과 인화의 표준작업 조건설정을 위해서는 전자현미경에서 사진을 촬영할 때부터 전자빔의 밝기를 정하고, 이렇게 촬영한 필름은 어떤 현상액에서 몇 도의 온도, 몇 분간 현상을 하여야 하는지를 정한다. 작업 순서에 따라 촬영된 필름현상은 사진 확대기enlarger에서 노출시간과 현상액에서 처리 시간을 정하며, 사진인화의 경우에도 현상액에서 최적 시간을 결정한다. 이와 같이 확립된 조건하에서 일관작업을 하면 매우 많은 필름도 처리가 가능하며, 좋은 사진을 얻을 수 있는 암실 작업시간을 효과적으로 절약할 수 있다. 한편 특별한 경우 여러 장의 사진이 필요하거나 확대할 필요가 있을 때는 각 조건에 따라 여러 번 시행착오를 거쳐야 좋은 사진을 얻을 수 있다.

11.1 필름현상

코닥필름SO1643.3 $\frac{1}{4}$ × 4" 의 경우에는 명시야 또는 극저온 검경을 할 때에 이용한다. 현상액developer은 Kodak O19를 사용하며 보통 20°C에서 4분 동안 현상한다. 일반적으로 투과전자현미경

사진촬영을 할 때 동일한 밝기에서 촬영하므로 현상 시간은 일정하다 그러나 현상 정도에 따라서 현상 시간을 가감할 수 있다. 코닥필름4489은 명시야 고배율 촬영에 이용한다. 현상은 코닥 현상액 D19를 사용하고 보통 20°C에서 4분 동안 현상한다. 현상 후 정착액fixer에서 3~5분 처리한 후 흐르는 수돗물에서 10분 이상 필름의 약품을 완전히 제거한다.

11.2 인화

현상된 필름은 사진과 반대의 명암영상이면 음영상필름negative film 이라고 하며, 피사체와 동일한 영상은 슬라이드필름은 포지티브필름positive film이라고 한다. 따라서 인화지에 영상을 노출시키면 투과전자현미경의 형광판에서 검경한 영상과 동일한 명암의 영상을 얻는데 이것을 인화print라고 한다.

인화작업은 확대기에서 적정크기의 배율을 정확히 하고 초점을 미리 맞추어 놓은 후 확대기enlarger의 일정 시간 노출을 한다. 노출된 인화지는 현상액에서 영상이 나타날 때까지 기다린다. 영상 명암의 정도는 확대기에서 노출시간과 현상액에서 영상발현 시간과 상관관계가 있다. 인화지용 현상액은 필름현상액을 증류수로 2배 희석하여 사용한다. 너무 오랜 시간 현상을 하면 영상이 모두 검게 된다. 따라서 목적하는 영상이 충분히 현상되면 바로 증류수에 세척하고 정착액으로 옮긴다. 정착액으로 옮기는 과정에서도 현상이 지속적으로 일어나므로 이를 감안해야 한다. 정착액에 3~5분 정도

영상이 더 이상 발현되지 않도록 정지시킨다. 흐르는 수돗물에 10분 이상 가능한 충분히 세척하여 현상액의 화학약품을 모두 세척해야 한다. 건조대에서 말린다.

11.3 암실작업 주의점

암실에서 사용하는 현상액과 정착액들은 냄새도 매우 나쁘고 발암성 물질이므로 취급할 때에 주의하여야 한다. 또한 의복에 묻으면 부식되어 구멍이 나므로 가운을 입거나 앞치마를 사용한다. 사용한 그릇은 중성세제로 깨끗이 닦아 말려 둔다.

실험대에 흘린 액들도 5% 차아염소산나트륨sodium hypochlorite를 섞은 세제로 깨끗이 닦고 중성세제로 닦아서 암실의 청경을 유지해야 한다. 현상액과 정착액을 담은 갈색 병들은 뚜껑을 꼭 닫고 파라필름parafilm으로 감아서 냄새가 새어 나오지 않도록 한다. 무엇보다도 암실 환경은 청결해야 하므로 고성능 흡 후드 장치를 반드시 설치해야 하며 암실을 사용하지 않더라도 각종 시약 병에서 냄새가 새어 나오므로 항상 냄새가 나지 않도록 아침저녁으로 흡 후드 장치를 가동시켜야 한다.

암실은 전자현미경실 옆에 있으므로 암실에서 현상액 등의 기체가 전자현미경실로 유입이 되면 현미경 내부를 부식시켜 내구성을 크게 저하시키고 또한 늘 전자현미경실에서 생활하는 사람에게도 누적된 피해가 발생할 염려가 있으므로 암실은 문틀이 밀봉이 되도록 잘 설치하고 청결을 유지하는 것이 전자현미경과 검경자의 건강을 해치지 않도록 하는 것이 중요하다.

11.4 명실작업

최근에는 전자현미경 사진촬영을 필름을 이용하지 않고 직접 디지털 영상으로 저장하여 컴퓨터에서 직접 이용할 수 있어 편리하다. 디지털 영상은 필름 영상에 비하여 그 질이 매우 낮은 단점이 있으나, 암실작업을 하지 않는 편리함 때문에 현미경 사진촬영에 활용하고 있다. 디지털 영상을 촬영할 경우에도 필름 촬영과 마찬가지로 구도, 명암, 밝기 등의 사진촬영의 기본적인 것은 동일하다.

좋은 영상을 얻기 위하여 최종 인화까지 암실에서 작업하는 명암조절, 초점조절 등을 하는데 이와 마찬가지로 디지털 영상의 경우에도 좋은 영상을 얻기 위하여 컴퓨터에서 영상의 초점과 명암 등을 조절하는데 이것을 명실light room 작업이라고 한다. 명실작업은 최근 디지털 카메라의 사진작업을 위하여 매우 많은 프로그램이 개발되어 있어 어느 것을 이용하여도 편리하게 작업을 할 수 있다. 전문가들은 보통 어도비 포토샵 프로그램, 코렐 페인트샵 프로그램 등을 보통 사용하며, 어도비 포토샵 라이트룸 등 간단히 사용할 수 있는 프로그램들이 많이 있다. 또한 간단한 영상 처리는 윈도우 프로그램이나 각종 디지털기기의 회사에서 제공하는 프로그램 등에서도 활용이 가능하다.

명실작업에서 주의할 점은 예술적 측면의 영상작업은 어떠한 작업을 하여도 예술성이 높아진다면 상관없지만, 과학적 측면에서의 영상작업은 처리와 무처리의 시료 비교가 정확하게 표현되는 범위 내에서 하는 것이 학술논문에 사용할 때 논지를 정확하게 할 수 있다.

참고문헌

- Cho, J.D., J.S. Kim, H.S. Choi, Y.J. La and K.S. Kim. 2000. Ultrastructural aspects of the mixed infections of *Watermelon mosaic potyvirus* isolated from pumpkin and *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus* from watermelon. Plant Pathol. J. 16(4): 216-221.
- Choi, H.S., J.S. Kim and J. S. Lee. 1992. Ultrastructure and virus replication in cells of rice plant infected with *Rice black-streaked dwarf virus*. RDA, J. Agr. Sci. 35(1): 344-353.
- Choi, H.S., J.S. Kim, K.H. Lee and J.S. Shim. 1993. Formation of tumor galls on rice plant infected with *Rice black-streaked dwarf virus*. RDA, J. Agr. Sci. 35(1): 354-359.
- Dawes, C. J. 1984. Biological techniques for transmission and scanning electron microscopy. P303. LADD.
- Haggis, G.H. 1966. The electron microscope in modern biology. P84. Longmans
- Hayat, M.A. 1972. Principles and techniques of electron microscopy. P460. CRC Press.
- Kim, J. S., J. D. Cho, H. S. Choi and K. S. Kim. 2000. Ultrastructural aspects of the mixed infection of *Watermelon mosaic potyvirus* and *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus*. Korean J. Pl. Path.16(4): 211-215.
- Kuo, J. 2007. Electron microscopy, Methods and protocols. Humana Press. P608.
- Norma Reid. 1975. Ultramicrotomy. P353. North-Holland Publishing Company.
- Sommerville, J. and U. Scheer. 1987. Electron microscopy in molecular biology. P247, IRL Press.
- Wattm I.A. 1997. The principles and practice of electron microscopy. P489. Cambridge University Press.