

레이저 플라즈마 기반의 생물의료용 연 X-선 현미경 설계

김경우*(원광대 X-선 현미경 연구센터), 윤권하(원광대 의과대학, X-선 현미경 연구센터)

Conceptual Design of Laser Plasma-based Soft X-ray Microscope system for Biomedical Application

K. W. Kim(X-ray Microscopy Research Center, WKU), K. H. Yoon(XMRC, Medical School, WKU)

ABSTRACT

Soft x-ray microscopy provides a unique set of capabilities in-between those of visible light and electron microscopy. It has long been recognized that nature provides a 'water window' spectral region between the K shell x-ray absorption edges of carbon (~290eV) and oxygen (~540eV), where organic materials show strong absorption and phase contrast, while water is relatively non-absorbing. This enables imaging of hydrated biological specimens that are several microns thick with high intrinsic contrast using x-rays with a wavelength of 2.3~4.4nm. Soft X-ray microscopy is therefore well suited to the study of specimens like single biological cells. The most direct advantage of X-ray microscope is their high spatial resolution when compared with visible light microscopes, combined with an ability to image hydrated specimens that are several microns with a minimum of preparation. Our study describes the conceptual design of soft x-ray microscope system based on a laser-based source for biomedical application with high resolution ($\leq 50\text{nm}$) and short exposure time ($\leq 30\text{sec}$).

Key Words : Laser Plasma (레이저 플라즈마), Soft X-ray (연 X-선), X-ray Optics (X-선 광학), Ultra Precision Positioning (초정밀 위치제어), Back illuminated type CCD (후면조사방식 CCD)

1. 서론

웬트겐에 의해 1895 년 최초로 X-선이 발견된 이후 X-선은 의료용 방사선 진단 및 치료, 신약제조, 물질 연구를 포함한 신소재 제조 및 비파괴 검사 등 산업체의 응용 등 매우 다양하고 중요한 역할을 해오고 있다. 1952 년 Wolter^[1]는 2.3~4.4nm 의 영역에서 물과 단백질간의 흡수계수 차이가 매우 크다는 사실을 밝히고 이를 이용하면 살아있는 생물체의 영상을 높은 대비로 얻을 수 있음을 제안하였다. 그러나 당시에는 X-선 광학기술이 발전되지 못했고 충분한 세기의 연 X-선 광원이 없었을 뿐만 아니라 원하는 분해능을 뒷받침할 만한 검출기가 없었기 때문에 관심의 대상에서 벗어나 있었다. 그러나 최근 방사광 시설에 의한 연 X-선원의 등장과 나노 기술의 괄목할만한 발전에 의하여 X-선 광학기술이 진보와 나노 제어가 가능하게 되어 X-선 현미경은 실현 가능한 기술로 주목 받게 되었다.

현재까지 일반적인 연 X-선 현미경은 광원으로

써 방사광을 사용하고 집광, 결상소자로써 회절을 이용하는 존플레이트를 이용한 유형으로 선진 연구 그룹이 30~50nm 의 분해능을 달성하고 있으나 광원으로써 대형 방사광 시설을 사용하므로 건설과 시설의 유지비용이 상당히 높고 시설의 이용 기회가 한정되어 생물연구로의 응용에 장애가 되고 있다. 이에 반해 레이저 플라즈마를 이용하여 X-선을 발생하게 되면 단위 실험실용 X-선 현미경의 실현이 가능하게 된다^[2,3,4,5].

광학 현미경의 경우 광원이 가시광선이므로 회절효과 때문에 파장 정도($\sim 0.5 \mu\text{m}$) 이하의 분해능을 얻을 수 없다. 고분해능 현미경으로는 전자 현미경이 있지만 생체시료를 관찰하기에는 적절하지 못하다. 왜냐하면 전자는 원자에 대해 대비가 작고 흡수가 잘 되기 때문에 생체시료의 영상을 얻을 때에는 생물시료를 말리거나 착색하거나 $1 \mu\text{m}$ 이상의 두꺼운 시료는 단면을 잘라서 그 영상을 본다. 이러한 전처리 과정을 거치게 되면 생체시료의 원래 살아있는 모양을 그대로 볼 수 없게 된다. 또한 전

자를 직접 생물체 표면에 주사하므로 방사선 (radiation)에 의한 피해도 배제할 수 없다. 분해능은 전자현미경보다 낮지만 광학현미경보다 높은 분해능으로 위에서 나열한 단점을 보완하고 물과 단백질의 뚜렷한 흡수차를 이용하여 물속에 살아있는 생체시료의 영상을 얻고자 하는 것이 연 X-선 현미경이다.

X-선 현미경은 크게 세 가지로 나눌 수 있는데 초정밀 나노가공기술을 이용한 반사광학계 등과 같은 X-선 광학계를 이용하여 X-선을 집속시켜 시료의 상을 확대하여 얻는 방법 (imaging microscopy), 시료의 국부위치에 X-선을 조사하여 그 투과도를 검출하면서 시료를 스캐닝하고 전자장치를 이용하여 시료의 상을 실시간으로 얻을 수 있는 방법 (scanning microscopy), 시료를 레지스트 위에 밀착시켜 시료의 2 차원 영상을 1:1 배율로 얻는 방법 (contact microscopy) 등이 있다^{16,17}.

본 논문에서는 레이저 플라즈마 연 X-선 광원과 X-선의 전반사 조건을 이용한 경사입사 X-선 광학계 등을 적용하는 영상 현미경 기술을 이용하여 생체시료의 관찰에 응용할 수 있는 시스템의 개념 설계와 그 특성에 대하여 연구하였다.

2. 연 X-선 현미경의 시스템의 개념설계

2.1 개요

본 연구에서는 생체 시료를 관찰하기 위한 고분해능의 X-선 현미경을 구현하기 위하여 경사 입사형 X-선 광학계를 이용하여 Fig. 1 과 같이 연 X-선 현미경시스템의 광학계를 구성하였다. Nd-YAG 레이저에 의해 생성된 펄스 레이저는 집광렌즈에 의하여 고체타겟상에 집광 조사된다. 고체타겟은 높은 에너지의 레이저에 의하여 고온 고밀도의 플라즈마 상태가 되게 되며 플라즈마 내의 전자에 의해서 연 X-선이 생성되어 방사되게 된다.

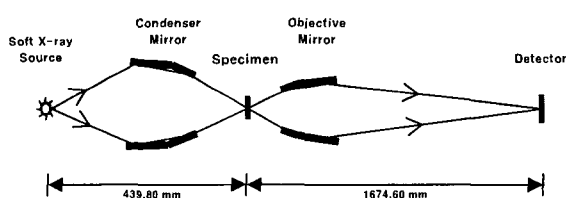


Fig. 1 Schematic diagram of laser plasma soft X-ray microscope system for biological application

레이저 기반의 생물의료용 연 X-선 현미경 시스템은 연 X-선 광원, X-선 광학계, 시료실, 검출기 등 크게 네 가지 요소로 구성된다. 레이저 플라즈

마에 의하여 방사된 연 X-선원은 조명광학계에 의하여 시료를 조명하게 된다. 시료를 투과한 연 X-선원은 대물광학계에 의하여 영상 검출기 센서에 결상시켜 영상을 얻게 된다. 본 연구에서 사용하는 연 X-선원은 그 특성상 공기에 의하여 흡수가 일어나기 때문에 광원이 생성되는 타겟에서 검출기까지의 모든 경로는 생체시료의 관찰을 위한 시료실을 제외하고는 모두 10^{-4} Torr 이하의 진공상태를 유지하도록 설계하였다. Fig. 2 는 연 X-선 현미경 시스템의 전체 조립도를 나타낸 것이다.

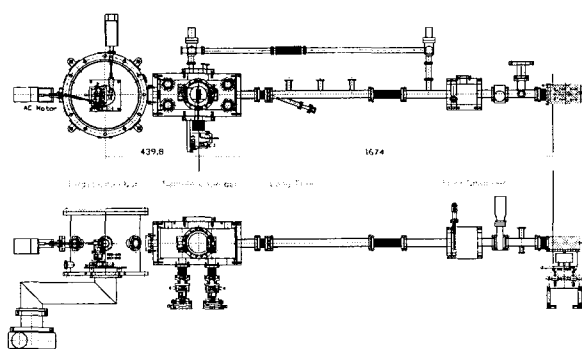


Fig. 2 The assemble drawing of soft X-ray microscope system

2.2 레이저 플라즈마 연 X-선 광원

고출력 레이저를 금속 타겟에 집속시키면 짧은 시간 동안 좁은 공간에서 고온 고밀도의 플라즈마가 발생한다. 본 연구에서의 Nd-YAG 레이저의 출력 에너지가 1.2J, 펄스 폭이 8ns, 반복 주파수 20Hz 이므로 레이저 집속 렌즈로 레이저 빔을 집속시키는 경우 집속 직경을 약 50 μ m 로 생각하면 집속된 레이저의 세기는 $E = 7.5 \times 10^{12} W/cm^2$ 에 이른다. 레이저 플라즈마는 레이저 강도 $10^8 W/cm^2$ 이상일 때 생성되며 $10^8 \sim 10^{12} W/cm^2$ 까지는 photon 이 이온과 충돌하여 자유전자를 방출하는 역제동 복사 과정을 통해 레이저 빔이 플라즈마 상태에 있는 자유 전자들에 의해 흡수된다. 레이저 강도가 $10^{13} W/cm^2$ 이상이 되면 레이저가 많은 양의 플라즈마 입자들과 공명흡수와 같은 집단적인 상호작용으로 흡수한다. 이 때 플라즈마 내부에는 전자파와 이온파가 생기고 다른 전자기 모드가 생기게 되어 넓은 스펙트럼을 갖는 전자기파가 방출된다. 본 연구에서 사용한 금속 타겟은 Ta 이다. Ta 를 선택한 이유는 스펙트럼의 분포가 파장 5nm 부근에 한정되고 장파장의 연 X-선을 포함하지 않기 때문이다.

2.3 필터

레이저 플라즈마 연 X-선원을 발생하기 위한 금속 타겟에서는 고에너지의 레이저에 의해 고온인 타겟 원자가 분출된다. 이와 같은 타겟원자에 의해 정밀가공된 조명거울 등의 광학소자 표면에 흡착되게 되어 광학계의 반사특성 등 광학특성을 악화시키게 된다. 또한 레이저의 레이저의 산란광이 광학계에 들어오게 되고 Nd-YAG 레이저의 적외광선이 광학계에 들어오게 되어 시료에 손상을 줄 수 있다.

그리고, 레이저 플라즈마에 의해 발생된 X-선원은 가시광선과 자외선을 포함하게 되기 때문에 고분해능을 얻기 위한 시스템에 나쁜 영향을 미쳐 영상의 질을 떨어뜨린다. 이를 극복하기 위하여 광원 발생부와 조명광학계 사이에 필터를 설치하였다. 필터는 사용하고자 하는 파장영역을 선별하여 투과하도록 Ti를 사용하였다. Fig. 3은 두께변화에 따른 Ti 필터의 투과율을 나타낸 그림이다. 그림에서 보는 바와 같이 관심영역인 3nm에서 두께 100nm인 경우 약 82%로 가장 높은 투과율을 보이므로 광량의 손실을 줄이기 위하여 선택하였다.

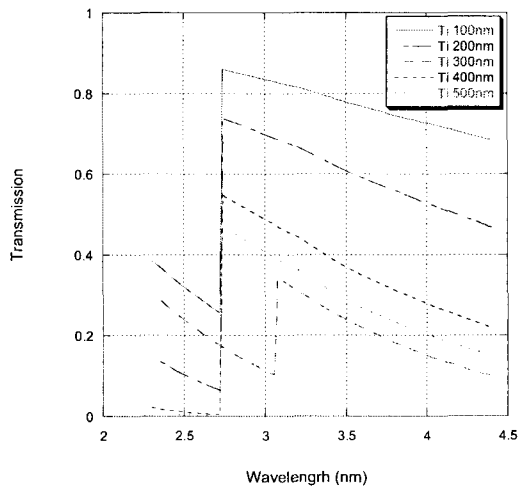


Fig. 3 Transmission of Titanium filters with variation thickness.

2.4 X-선 광학계

2.4.1 조명 광학계

연 X-선은 수직으로 입사하게 되면 그 특성상 굴절도 반사도 일으키지 않고 직진하게 된다. 따라서 X-선에 적용하기 위한 광학계는 전반사 조건을 이용한 광학계를 사용하게 된다. 본 연구에서는 시료를 조명하기 위한 광학계로써 전반사 조건을 이

용한 경사입사 광학계인 Wolter 형 광학계를 적용하여 설계하였다. Fig. 4는 레이저 플라즈마 연 X-선원으로부터 방사된 연 X-선을 시료 위에 조명하기 위해 사용되는 조명 광학계의 설계 변수를 나타낸 것이다. 조명 광학계는 1/4 배의 축소 광학계를 사용하였으며 입사각은 42.6mrad이다.

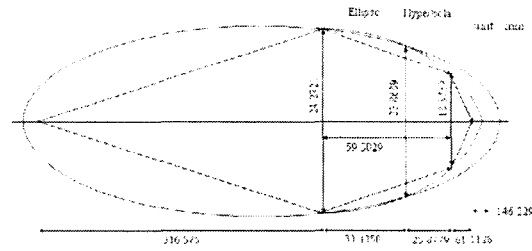


Fig. 4 The Condenser Wolter mirror for soft X-ray Microscopy.

2.4.2 대물 광학계

대물 광학계로는 반사 광학계인 Wolter 반사경을 이용하였다. 대물 광학계의 설계 변수를 Fig. 5에 나타내었다. 배율 32 배, 초점거리 mm, 회전 쌍곡면부의 길이 17.10mm, 회전 타원면부의 길이 25.55mm, 입사각 35.15mrad이다. 샘플과 대물 반사경의 거리는 33.34mm로 샘플이 놓이는 공간적 자유도는 적절하다고 판단된다. Fig. 6은 표면 거칠기가 RMS 1nm, X-선의 에너지가 410eV인 경우에 재료에 따른 광학계의 반사율을 계산하여 나타낸 것이다. 그림에서와 같이 파장 3nm일 때 Ni의 반사율이 약 78% 정도로 가장 높게 나타났다. X-선이 시료를 지난 후 대물 반사경의 쌍곡면부와 타원면부를 2번 반사하게 되므로 대물 광학계에서의 반사율은 61%가 된다.

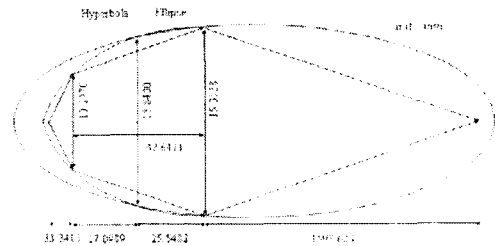


Fig. 5 The Objective Wolter mirror for soft X-ray Microscopy.

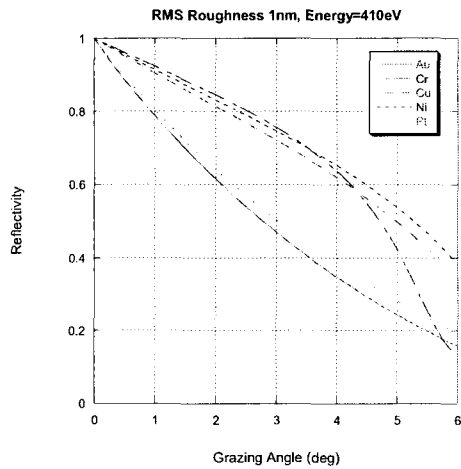


Fig. 6 Reflectivities for selected materials and wavelengths plotted versus the grazing angle of incidence.

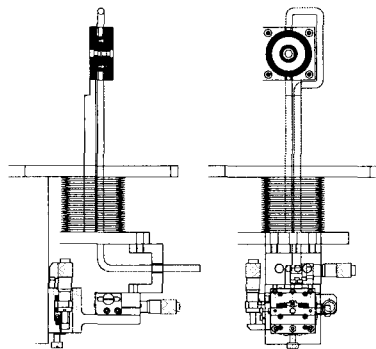


Fig. 7 Wet specimen holder maintained in an atmospheric environment

2.5 시료실

연 X-선 현미경 시스템은 공기에 의한 연 X-선의 흡수를 막기 위하여 진공시스템으로 구성되어 있다. 생체시료의 경우에는 진공 중에 놓게 되면 수분이 급속하게 증발, 건조하거나 동결하게 되고, 이 결과 생체시료는 죽게 되거나 파괴되어버린다. 이를 피하기 위해서 생체시료의 관찰을 위한 대기압 유지를 위한 시료실을 설계하여 살아있는 샘플을 관찰할 수 있도록 하였다. Fig. 7에 수용액 공급이 가능한 생체시료용 시료실의 개략도를 나타내었다. 시료실은 시료실 주위를 대기압으로 유지하고 동시에 시료실에 의한 연 X-선의 흡수를 억제하기 위하여 연 X-선이 투과되는 광원의 경로는 X-선원

의 투과율이 높게 유지하도록 100nm 두께의 Si_3N_4 윈도우를 적용하였다.

3. 결론

본 연구에서는 수용액 상태의 살아있는 세포의 관찰이 가능한 레이저 플라즈마 기반의 연 X-선 현미경의 개념과 중요요소의 설계 변수에 관하여 고찰하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고해상도를 갖는 레이저 플라즈마 기반의 생물의료용 연 X-선 현미경 시스템을 단위 실험실에서 사용 가능하도록 고안하여 사용 편의성과 기계적 안정성을 갖도록 설계 하였다.

2. 연 X-선 현미경 시스템은 연 X-선 광원부, 반사 광학계를 기반으로 하는 Wolter 형 X-선 광학계, 수용액 상태의 살아있는 세포의 고해상도 관찰이 가능한 시료실, 연 X-선을 직접 검출하는 방식의 CCD 카메라로 구성된다.

3. 향후 연 X-선 현미경 시스템의 제작과 생물학적 적용 실험을 통하여 성능을 개선함으로써 단백질의 기능 해석 등 생명공학 연구에 적용할 수 있다.

후 기

산업자원부 중기저점기술개발사업 “나노계측 X-선 결상 현미경시스템 개발사업”에 의하여 지원되었음.

참고문헌

1. Wolter, V. H., “Spiegelsysteme streifenden Einfalls als abbildende Optiken für Röntgenstrahlen,” *Annalen der Physik*, Vol. 10, pp. 94 - 114, 1952.
2. Jacobsen, C., “Soft x-ray microscopy,” *Trends in Cell Biology*, Vol. 9, pp. 44-47, 1999.
3. Attwood, D., “Soft X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation,” Cambridge University Press, 1999.
4. http://www.esrf.fr/exp_facilities/ID21/xrmlinks.html
5. <http://www.cxro.lbl.gov>.
6. 최병일, 김동환, 공홍진, 이상수, “육소레이저 플라즈마에서 발생된 연 X-선을 이용한 밀착현미경기술”, *한국광학회지*, 제 1 권, 제 1 호, pp. 46-51, 1990.
7. Yoon, K. H., Kim, K. W., Shin, Y. D., “Design of Laser Plasma-based X-ray Microscope System Using Grazing Incidence Mirror for Biology Application,” *VII International Conference on X-ray Microscopy*, pp.79, 2002.