

연 X-선 현미경을 위한 생체시료 고정장치 설계

권영만*(원광대 X-선현미경연구센터), 김경우(원광대 X-선현미경연구센터),
윤권하(원광대 의과대학 방사선과, X-선현미경연구센터)

Design of a specimen holder for living cell in the soft X-ray microscopy

Y. M. Kwon(X-ray microscopy research center, WKU), K. Y. Kim(X-ray microscopy research center, WKU)
K. H. Yoon(X-ray microscopy research center, Medical School, WKU)

ABSTRACT

To observe a hydrated biological specimen, an environmental chamber was necessary to keep the specimen in a wet state under vacuum surroundings. The specimen holder is as follows designed consequently. The specimen holder consisted of two Si wafers, the centers of which were Si₃N₄ (100nm thickness) windows of a 0.3mm square. The windows were made by a photo-lithographic method. The transmission of a window at 400eV is about 70%. A hydrated biological specimen was put between the two windows. When the chamber was closed, two wafers were contact at the metal mesh by the pressure of O-rings, and the specimen holder moved by the three micrometers.

Key Words : Soft X-ray microscopy(연 X-선 현미경), Specimen Holder(시료고정장치), Living Cell(생체세포), Si₃N₄(질화규소)

1. 서론

파장 2.3~4.4nm 영역은 물과 생체를 구성하는 단백질과의 흡수계수의 차가 크므로 수분층을 통해서도 단백질을 관찰할 수 있기 때문에 물의 창(water window)영역이라고 부른다. X-선 결상광학은 크게 물의 창 영역을 이용한 연 X-선 현미경과 단파장 즉 0.2nm 이하의 경 X-선 현미경을 이용한 분야로 나눌수 있다^[1,2].

물의 창 영역의 연 X-선을 이용하면 가시광선보다도 파장이 짧기 때문에 원리적으로 광학 현미경보다도 높은 분해능을 얻을 수 있으며, 또 수 μm 의 두께의 수분층을 통해서도 시료의 관찰이 가능하기 때문에 생체시료를 염색, 탈수 등의 전처리과정없이 관찰할 수 있다. 또한 전처리과정에 의하여 생체시료가 죽지 않으므로 살아있는 상태에서 수십 나노미터의 분해능으로 생체시료를 관찰할 수 있어 기존 현미경으로는 얻을 수 없는 영상 및 세포내의 기능성 단백질의 관찰도 가능하다.^[1,2,3]

연 X-선 현미경을 위한 생체시료 고정장치(이하 Specimen holder)는 생체시료를 대기압 상태로 유지하며 생체시료에 수분공급이 가능하여 생체시료를 살아 있는 상태로 유지시켜야 한다^[4,5].

Specimen Holder 의 외부는 고진공 상태이므로 충분한 밀봉이 필요하며, 동시에 연 X-선은 물질에

쉽게 흡수가 되므로 Specimen holder 시료창은 연 X-선의 투과율이 우수한 재질을 사용하여야 한다.

2. Specimen holder 의 구조

2.1 진공 챔버부

연 X-선 광학계는 공기에 의한 연 X-선의 흡수를 줄이기 위해 광학계를 진공중에 설치하게 된다. 생체시료는 진공중에서 수분이 증발하여 건조되므로 생체시료는 죽고 조직은 파괴되어 버린다. 따라서 생체시료의 보존을 위하여 대기압 상태로 수용액의 공급이 가능한 형태의 Specimen holder 가 필요하다(Fig. 1). 본 연구에서 설계한 진공 챔버부는 크게 두 부분으로 나누어져 있으며 첫번째 부품은 시료실을 고정시키기 위한 부분이며, 두번째 부품은 시료실의 진공을 유지하기 위한 외부하우징 역할을 하는 부분이다. 진공은 O-ring 에 의하여 유지가 된다. 외부하우징에는 시료실에 수용액을 공급하기 위한관이 연결되어있으며 이 관의 외경은 1/8"이며 재질은 스테인레스 스틸이다. 수용액은 양쪽 끝단에 연결된 주사기를 이용하여 공급한다.

Fig. 2 는 생체시료를 설치하는 시료실 고정장치로서 내부의 정사각형 홀에 시료실을 설치하게 된

다.

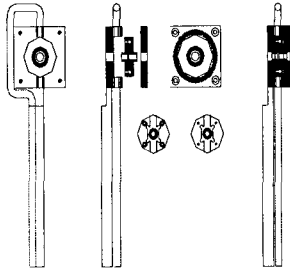


Fig. 1 Drawing of specimen holder for living cell

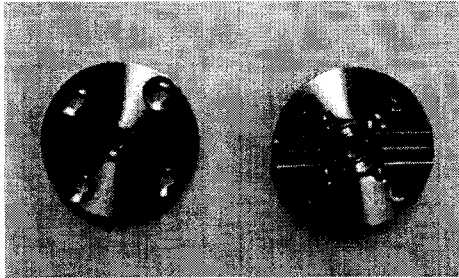


Fig. 2 Photograph of fixture for sample wafers

2.2 Specimen holder 이송부

Specimen holder 이송부는 관찰하고자 하는 생체시료를 연 X-선 광원의 초점 위치로 이동시키기 위한 장치로서 광축을 포함한 3 축으로 이동이 가능한 구조이다. 3 개의 마이크로미터를 이용하여 Specimen holder 를 정밀이송하며, 3 축 스테이지는 진공을 유지한 상태에서 정밀조정이 가능하도록 아래 그림과 같이 벨로우즈관을 이용하여 연결하였다(Fig. 3).

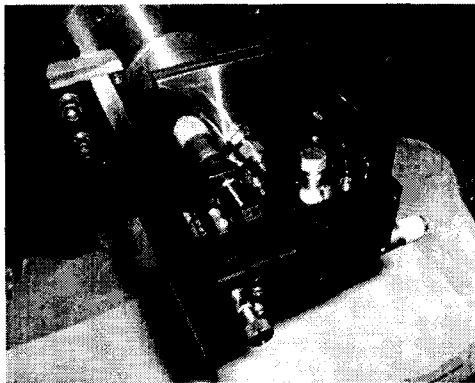


Fig. 3 Photograph of transport device for specimen holder

2.3 시료실(Wafer)

생체시료를 고정하기 위한 시료실 기판은 실리콘(Si) 웨이퍼를 이용하였으며, 형태는 가로, 세로가 10mm 인 정사각형이고 두께는 0.5mm 이며 중심부에는 한변의 길이가 0.3mm 인 정사각형 홀을 포토리소그래피법으로 가공하였고, 이 홀은 연 X-선 투과를 위한 창 역할을 하며 생체시료가 위치한다 (Fig. 4).

시료실 기판의 한 쪽 면은 Si_3N_4 를 100nm 두께로 코팅하였다. Si_3N_4 를 이용하여 창을 제작한 이유는 연 X-선의 투과율이 약 70%정도로 우수하고, 연 X-선을 이용하여 생체시료를 관찰하기 전에 광학 현미경을 이용하여 생체시료의 놓인 위치와 부착상태를 확인해야 하므로 가시광 파장에서 투명하며, 또한 진공을 유지할 수 있는 강도를 가지고 있기 때문이다. Si_3N_4 창 코팅은 LPCVD 방법으로 제작하였으며, 약 800℃, 290mTorr 조건하에서 증착하였다.

생체시료의 설치시 시료실 기판 2 장을 겹쳐 Si_3N_4 코팅면 사이 중심부의 창 역할을 하는 홀에 금속메쉬를 이용하여 고정하게 된다. 생체시료는 광학 현미경을 사용하여 시료실 홀에 금속메쉬를 부착한 후, 금속메쉬에 생체시료를 고정한다.

연 X-선 현미경은 X-선이 생체시료를 투과하여 영상을 얻게되므로 X-선의 강도와 노출시간에 따라 생체시료는 Radiation damage 를 입게 된다. 생체시료가 Radiation damage 를 입게 되면 생체시료에 손상을 입혀 세포구조가 파괴되거나 죽게된다. 그러므로 오랜 노출시간이 필요한 경우에는 생체시료의 보호를 위하여 생체시료를 냉동할 수 있는 specimen holder 의 개발이 필요하다.

Fig. 5 는 Si_3N_4 창을 투과하는 연 X-선의 투과율을 나타낸 그래프이다. 본 연구에서 사용하게 되는 약 410eV 부근의 에너지 영역에서 연 X-선의 투과율은 코팅막의 두께에 따라 각각 약 50%와 70%의 투과율을 보이고 있다^[6]. 투과율 면을 고려하면 Si_3N_4 창 두께를 가능하면 얇게 제작하는 것이 유리하지만, 생체 시료가 놓이는 시료실은 대기압 상태를 유지하게 되고 시료실 바깥쪽은 진공을 유지하게 되어 압력차가 발생하므로 시료실의 파괴가 문제가 된다. 그러므로, 시뮬레이션과 실험을 통하여 적용 가능한 시료실 Si_3N_4 창 두께를 설계 변수로 정한다.

Fig. 6 은 물을 함유하고 있는 생체시료의 두께 변화와 연 X-선 파장에 따른 연 X-선의 투과율을 나타낸 그래프이다. 파장 3.4nm 부근에서 생체시료

두께 3micron 일 때 약 50%의 투과율을 나타내고 있으며, 두께 10micron 일 때 약 7% 정도의 투과율을 보이고 있다.

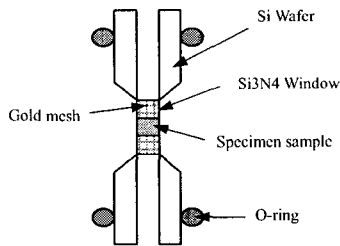


Fig. 4 Drawing of the specimen holding plate (wafer)

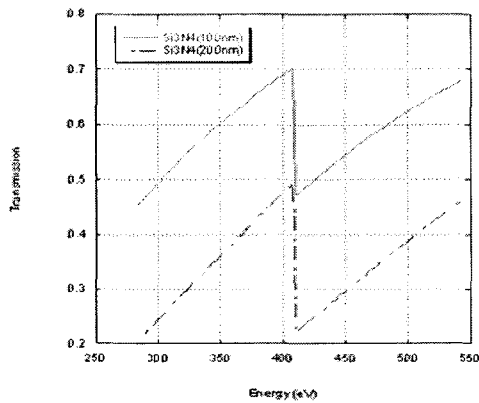


Fig. 5 Transmission of soft X-ray through according to Si_3N_4 thickness

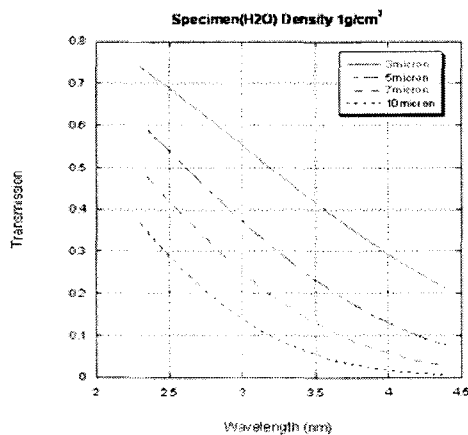


Fig. 6 Transmission of soft X-ray through according to specimen (H_2O) thickness

2.4 Si_3N_4 의 두께에 따른 변형량

연 X-선은 그 특성상 흡수가 쉽게 되기 때문에 시료실 창은 연 X-선의 투과율이 우수한 Si_3N_4 를 연 X-선이 투과하는 창 부분의 재료로 선정하여 사용하였다. Specimen holder 외부는 연 X-선 광원이 공기중의 입자에 의해 흡수가 일어나므로 약 1×10^{-5} Torr 이상의 진공 상태를 유지하도록 하여야 하며, 또한 연 X-선의 투과율을 높이기 위해서는 창(Si_3N_4)의 두께가 가능한 얇아야 하지만 시료실 내부는 대기압을 외부는 진공상태를 유지해야 하므로 압력 차이에 의하여 창의 변형과 파괴가 일어날 수 있다. 따라서 Si_3N_4 막이 파괴되지 않는 최소두께를 목적함수로 선정하여 최적설계하여야 한다. 이에 상용프로그램인 ProEngineer/Mechanica 를 이용하여 제작된 시료실 Si_3N_4 창의 두께에 따른 최대 변형량을 해석한 결과 창 두께가 100nm 인 경우 약 50micron, 200nm 는 100micron 정도의 변형량을 보였다.

4. 결론

본 연구에서는 연 X-선 현미경시스템을 위한 생체시료용 Specimen holder 를 설계하였다. 진공 중에서의 생체시료의 보존 및 연 X-선의 투과율을 고려하여 설계하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Specimen holder 는 생체시료의 보존을 위하여 수용액 공급이 가능하며 대기압상태를 유지할 수 있는 구조로 설계하였다.
2. 시료실은 연 X-선의 투과율을 높이기 위하여 Si_3N_4 재질로 창의 두께를 최적화하여 설계 제작하였다.
3. Specimen holder 의 이송장치는 정렬을 위하여 3 축으로 이송할 수 있도록 제작하였으며 마이크로미터를 사용하여 구동하였다.

후 기

본 연구는 산업자원부에서 주관하는 중기거점기술개발사업 “나노계측 X-선 결상현미경 시스템 기술개발사업”에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Jacobsen, C., “Soft x-ray microscopy,” Trends in Cell Biology, Vol. 9, pp. 44-47, 1999.
2. Attwood, D., “Soft X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation,” Cambridge University Press, 1999.

3. 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.
4. Johansson, G. A., Holmberg, A., Hertz, H. M., and Berglund, M., "Design and performance of a laser-plasma-based compact soft X-ray microscope," Review of scientific instrument, Vol. 73, No. 3, pp. 119-1197, 2002.
5. Medenwaldt, R., Uggerhoj, E., "Description of an x-ray microscope with 30nm resolution," Review of scientific instrument, Vol. 69, No. 8, pp. 2974-2980, 1998.
6. Ogata, T., Aoki, S., and Yoshidomi, Y., "Development of a Grazing Incidence Soft x-ray microscope with a Laser-produced plasma source," Journal of electron spectroscopy and related phenomena80, pp. 357-360, 1996.