

방사광을 이용한 X-선 현미경 (X-ray Microscopy)

생물체의 기본 단위인 '세포'의 발견은 현미경의 발명 때문에 가능했다. 이후 광학현미경이 생물학의 발달에 끼친 영향은 지대했다. 물론 다른 분야의 자연과학과 공학에도 널리 활용되어온 광학현미경의 분해능은 대충 가시광선의 파장, 0.5 μm , 정도이다. 다시 말하면 파장보다 작은 개체의 관찰이 불가능하다는 것이다. 이후 나타난 전자현미경은 분해능 면에서 뛰어나 0.1 nm 수준에 이르렀으나, 관찰 대상의 표면(주사 전자현미경, SEM)이나 아주 얇은 박막(투과 전자현미경, TEM)을 볼 수 있는데 그것도 진공에서만 가능하다. 이러한 제한에도 불구하고 전자현미경은 현대 과학/기술에서 없어서는 안될 중요한 도구가 되었다.

이들 두 가지 현미경의 공통된 단점은 불투명한 물체의 내부를 볼 수 없다는 것이다. 개체를 파괴하지 않고 내부를 보는 것은 생명과학자들의 꿈이었으며 반도체 소자의

분해능이 약 10 nm에 접근하고 있다. 아래에서 방사광, X-선 현미경의 원리, 응용, 그리고 미래를 이야기 하려고 한다.

방사광¹⁾

1895년에 Roentgen에 의해 X-선이 발견된 이래 광원에 혁명을 가져온 것이 방사광(synchrotron radiation)이다. 방사광은 거대한 가속기에서 전자나 양전자의 에너지가 수 GeV에 이르도록 가속을 한 후 이 가속된 전자가 저장링(storage ring)에서 원형 궤도를 돌 때 나오게 된다. 전자나 양전자와 같은 하전 입자가 빛의 속도에 가까운 속도를 가지고 이극 자석을 만날 때 속도와 자장이 만드는 평면에 수직으로 힘(Lorentz 힘)을 받게 되어 궤도가 휘게

특집 | X-ray 광학

방사광을 이용한 X-선 현미경 (X-ray Microscopy)

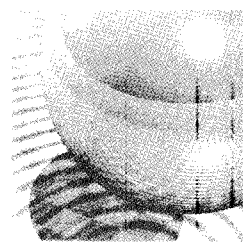
윤화식*

내부를 비파괴적으로 관찰하여 결함을 찾아낸다는 것은 대단한 매력이다.

X-선의 중요한 성질 중의 하나가 그 투과성이며, 이 성질은 지난 100여 년 동안 다양한 분야에서 활용되어왔다. 그 대표적인 예가 우리가 평생 적어도 한번은 찍는 가슴 X-선 사진일 것이다. 이 radiograph의 분해능은 잘해야 0.5 mm 정도에 지나지 않는다. 그런데 위에서 말한 바와 같이 X-선을 사용하면 가시광선의 파장보다 작은 것을 관찰하는 것이 가능해야 한다. 그것은 최근까지 적합한 광학계의 부재에 기인하는데, 근래 방사광 가속기들을 중심으로 X-선 광학의 눈부신 발달로 인해 X-선 현미경의 공간

되는데 이때 접선 방향으로 전자파 즉 '빛'이 나오게 되며 이것이 바로 방사광이다.(참고로 전자의 에너지가 2.5 GeV에 이르면 전자의 속력은 광속의 99.999998%가 된다.) 방사광은 전자가 가속을 받는 순간 원뿔모양으로 퍼져 나오는데 이 원뿔의 모선각이 $1/\gamma$ (전자의 에너지가 2.5 GeV 인 경우 $\gamma = 5,000$ 이므로 0.2 mrad, 즉 0.01°) 밖에 되지 않는 잘 collimated된 빛으로 광학부품을 사용하기에 편리하다. 가속기물리의 발달과 함께 방사광원의 크기가 작아져 왔는데, 대략 1990년 대 이후 건설된 소위 제 3세대 방사광 가속기들의 이극 자석에서 나오는 방사광원의 크기는 약 0.1 mm 정도이다. 광원의 크기가 작아지면

* 포항가속기연구소



여러 가지 유리한 점이 있는데 그 중요한 것이 결맞는 (coherent) 빛의 강도이다. 가로 세로의 크기가 σ_x, σ_y 인 광원에서 R 만큼 떨어진 곳에서 횡 방향의 coherent length L_x, L_y 는 다음의 식으로 주어진다.

$$L_x = \frac{R}{\sigma_x} \lambda, L_y = \frac{R}{\sigma_y} \lambda \quad (1)$$

여기서 λ 는 빛의 파장으로 $L_x L_y$ 보다 작은 바늘구멍을 통과한 결맞는 X-선을 사용하면 이미 가시광선 영역에서 레이저를 활용해서 이루어진 흥미로운 실험들이 짧은 파장에서 가능해지는 것이다.

그러면 방사광의 성질을 간단히 살펴보기로 하자. 아래 그림 1은 포항방사광가속기(Pohang Light Source)의 이극 자석에서 나오는 방사광 스펙트럼을 보여준다.

1. 위의 스펙트럼은 기존의 X-선 관보다 밝기가 적어도 만 배 이상 세다.(undulator라고 불리는 삼입장치에서 나오는 방사광은 이극 자석보다도 밝기가 약 만 배 더 세다.) 이렇게 밝은 '빛'은 sample을 관찰할 때 나오는 시그널의 개선된 감도로 나타난다. 특히, 단백질 결정을 포함한 유기시료는 구성원소의 X-선 산란단면적이 작아 기존의 X-선관 보다 방사광이 절대적으로 유리하다.
2. 그림에서 볼 수 있듯이 방사광은 넓은 에너지 스펙트럼을 가지고 나온다. 따라서 분광기를 사용하면 적외선, 자외선, X-선 중 원하는 에너지(파장)을 선택할 수 있다. 비결정 sample의 구조를 분석하는 X-선 흡수 분광학(XAFS)의 획기적인 발전을 가져온 것이 바로 방사광이다.

3. 전자 궤도면으로 나오는 방사광은 선편광(linearly polarized) 빛이며 궤도면에서 벗어나면 타원편광(elliptically polarized) 빛이 나온다. 이는 방사광을 이용하며 물질의 자성연구를 할 수 있다는 말이 된다.
4. 마지막으로 원형궤도를 도는 전자 뭉치들 사이의 짧은 시간 간격을 이용하여 time resolved 실험을 할 수가 있다.

X-선 광학

가시광선 영역에서의 유리의 굴절률은 약 1.5나 되어 꽤 큰 편이나 X-선 영역으로 가면 물질의 굴절률이 1에 매우 가까우며 1보다 작다. 이 차이로 인해 X-선 현미경의 구현이 가시광선을 이용한 광학현미경과 달라지는 것이다. X-선을 집속하거나 X-선 상을 확대하는 데는 FZP(Fresnel Zone Plate)와 집속 실관(Focusing Capillary)가 활용된다. 사실 최근의 X-선 현미경의 발달은 이들 렌즈의 성공적인 개발에 힘입은 바 크다. 따라서 아래에서 이들 X-선 렌즈들의 원리를 살펴보기로 하자.

FZP(Fresnel zone plate, 회절 광학 소자)^[2]

그림 2-1는 FZP가 어떻게 빛을 모으는 지를 보여주고 있다. FZP는 원형 회절격자인데 흰색과 검은색의 고리(ring)들이 zone들로 그들의 면적이 같다. 따라서 지름이 커질수록 zone의 폭이 좁아지며 맨 가장자리 zone의 폭이 대충 이 zone plate의 공간 분해능이 된다. 이웃하는 흰색

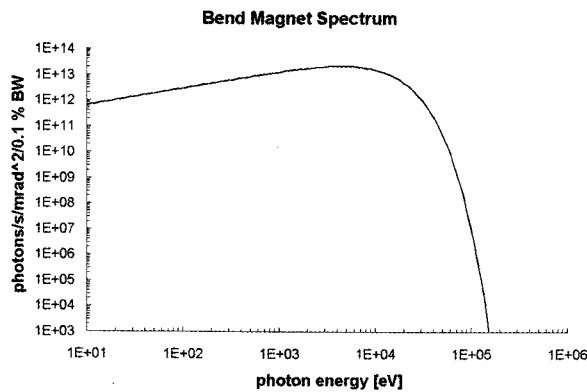


그림 1. PLS 이극 자석의 에너지 스펙트럼

방사광을 이용한 X-선 현미경 (X-ray Microscopy)

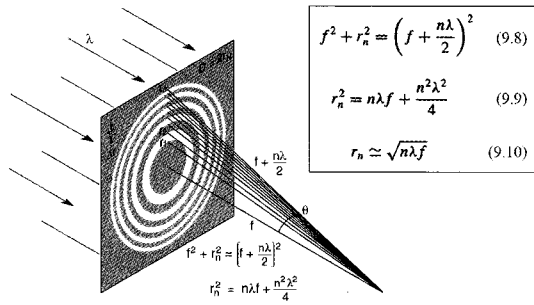


그림 2-1. FZP가 빛을 집속하는 것을 보여준다.

zone에서 초점까지의 경로 차가 파장의 정수 배가 되기 때문에 소위 보강간섭을 통하여 초점에 빛이 집속되게 된다.

$$f = \frac{4N(\delta r)^2}{\lambda} = \frac{D\delta r}{\lambda} \quad (2)$$

여기서 f , N , D , δr , λ 는 각각 zone plate의 초점거리, 총 zone의 개수, 지름, 최외각 zone의 폭, 들어오는 빛의 파장을 나타낸다. Zone plate에서 중요한 변수 중의 하나가 효율이다. 여기서 효율이란 광학소자(zone plate)에 들어온 빛 가운데 얼마나 초점으로 집속이 되는 가를 나타내는 숫자로 zone plate의 효율은 20%를 넘기가 쉽지 않다.

집속 실관(Focusing Capillary, 반사 광학 소자)^[3]

굴절률이 큰 매질에서 작은 매질로 입사된 빛이 입사각이 임계각보다 작으면 굴절이 되지 않고 전부 반사된다. 앞에서 우리는 X-선 영역에서 물질의 굴절률이 1보다 작다고 했다. 따라서 대기 중에서 물질에 입사하는 X-선이 임계각보다 작은 각도로 입사하면 마찬가지로 전반사

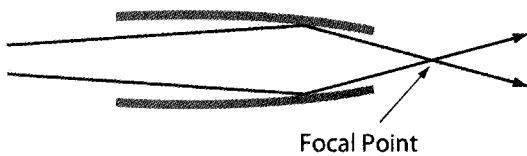


그림 3-1. 실관 렌즈의 단면 구조

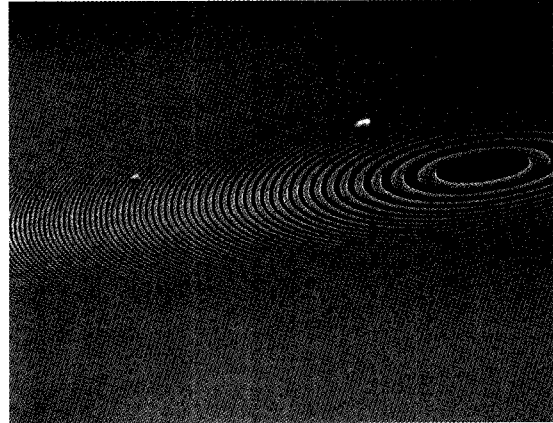


그림 2-2. FZP의 SEM 사진

(total external reflection)가 일어나는데 이 성질을 이용한 것이 X-선 거울이다. 물론 굴절률이 1에 매우 가까워 임계각이 0.1° 정도에 지나지 않는다. 속이 비고 가는 유리관에 열을 주면서 컴퓨터를 이용해서 단면이 타원(광원과 상이 타원의 두 초점이 되는 타원이다.)이 되게 잡아당기면 그림 3과 같은 실관 렌즈가 된다. X-선의 전반사를 이용하기 때문에 반사율이 90%가 넘는 것을 생각하면 위의 zone plate보다도 훨씬 효율이 높아 집광 렌즈로 잘 활용될 수 있을 것이다. 최근 Cornell 대학에 있는 그룹에서 실관 렌즈의 길이가 초점 거리의 2배가 되면 최적의 집속이 된다는 게 밝혀져 실용화를 앞당기게 되었다. 그들에 의해 최근 제작된 실관 렌즈는 이득(gain)이 450이 넘는다고 한다.

현미경의 구조

그러면 이들 렌즈들을 이용하여 어떻게 X-선 현미경을 구성할 수 있는 지를 알아보기로 하자. X-선을 이용한 현

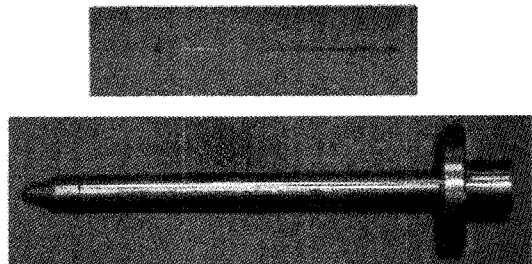
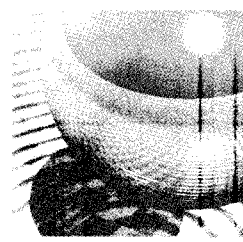


그림 3-2. 실관 렌즈 (위)와 조립된 모습 (아래)



미경에는 Scanning Microscope와 Full Field Microscope 두 가지가 있다. 전자는 미세한 크기로 X-선을 집속한 후 시료를 주사하여 성분 원소의 분포나 각 원소의 화학적 상태를 알아보는 방법이고 후자는 시료를 직접 확대하여 보는 방법이다. 여기서는 공간의 제한 때문에 후자에 국한하여 이야기 하고자 한다.

그림 4는 우리에게 익숙한 광학현미경을 보여주고 있다. 여기서 주요 부품을 보면 광원, 집광(Condenser)과 대물(Objective)렌즈, 그리고 대안 렌즈나 CCD 카메라로 되어 있는 것을 알 수 있다. 그러면 각각의 광학 부품에 대하여 생각해보기로 하자.

광원 : 위에서 본 두 가지 X-선 렌즈들은 모두 잘 collimated 된 빛, 매우 작은 입체각을 통하여 나오는 강도가 센 빛, 에 효율적으로 사용할 수 있는데 그런 빛을 내는 광원이 방사광원(synchrotron radiation source)이다.

렌즈 : 광학현미경에서 시료를 확대하는 대물렌즈 뿐만 아니라 시료에 빛을 모아주는 집광렌즈도 필요하다. 어두운 곳에서 물체를 볼 수 없기 때문인데, 집광기(Condenser)로 집속된 빛의 크기가 시야가 된다. 최근까지 zone plate가 쓰였으나 최근 성능이 좋은 집속 실관이 개발이 되어 경 X-선(Hard X-ray) 현미경에 사용되기 시작했다. X-

선 집광 렌즈가 가능한 한 많은 빛을 모으기 위해서는 aperture가 큰 것이 바람직하다. 미국의 LBL(Lawrence Berkeley Laboratory)에 설치된 연 X-선(soft X-ray) 현미경은 지름이 9 mm나 되는 zone plate를 쓰고 있다. 대물렌즈(Objective)는 주로 zone plate가 사용되고 있는데 최 외각 zone의 폭이 대충 분해능으로 연 X-선 영역에서는 최근 15 nm를 넘어섰다.⁽⁴⁾

대안 렌즈/CCD 카메라 : Video-Microscope처럼 X-선 현미경은 CCD 카메라로 디지털 상을 잡는다. 연 X-선 영역에서는 빛을 바로 보는 CCD 카메라를 사용하고, 경 X-선에서는 phosphor screen을 이용하여 가시광선 상으로 바꾼 후 가시광선 렌즈로 한 차례 더 확대한다.

그러면 실제로 X-선 현미경에 대하여 생각해보도록 하자. 포항공속기연구소의 X-선 현미경은 위에서 말한 LBL의 것과 달리 경 X-선 현미경이다. 연 X선은 에너지가 약 1.2 keV 이하의 영역($\lambda > 10 \text{ \AA}$)을 나타내는 반면에, 에너지가 약 4 keV보다 큰 빛을 경 X선($\lambda < 3 \text{ \AA}$)이라고 하는데 연 X-선 보다 투과력이 강하다. 연 X-선과 경 X-선에 동일한 광학적인 원리를 적용할 수 있음에도 그들의 구현에는 파장이 다른 데서 오는 차이들이 있다. X-선 렌즈로 가장 많이 쓰이고 있는 zone plate의 두께를 보자. 니켈을 85 nm 두께로 도금하여 만든 연 X-선용 zone plate는 500 eV에서 약 8%의 효율이 나온다. 하지만 7 keV에서 같은 효율을 얻기 위해서는 두께가 440 nm나 되도록 금으로 도금 해야 한다. 바꾸어 말하면 경 X-선 zone plate는 밀도가 갑절 큰 물질로 만들어야 할 뿐만 아니라 두께도 5배가 넘어야 한다. zone plate의 최 외각 zone의 폭이 수십 nm인 것을 감안하면 경 X-선 zone plate는 그만큼 만들기가 까다롭다는 것을 의미하며, 이는 왜 연 X-선 현미경의 개발이 경 X-선 현미경을 앞섰는지 설명할 수 있는 이유중의 하나가 된다.

연 X-선은 대기 중의 기체분자들에 의해 잘 흡수된다. 예컨대 500 eV의 빛이 공기 1 mm를 지나는 투과율이 20%도 되지 않을 정도이다. 따라서 연 X-선 현미경에서는 시료를 제외한 모든 광학 부품들이 진공에 놓이게 된다. 더욱이 연 X-선에서는 zone plate의 DOF(depth of focus)가 기껏해야 10 μm 정도에 지나지 않는데 반해 경 X-선으

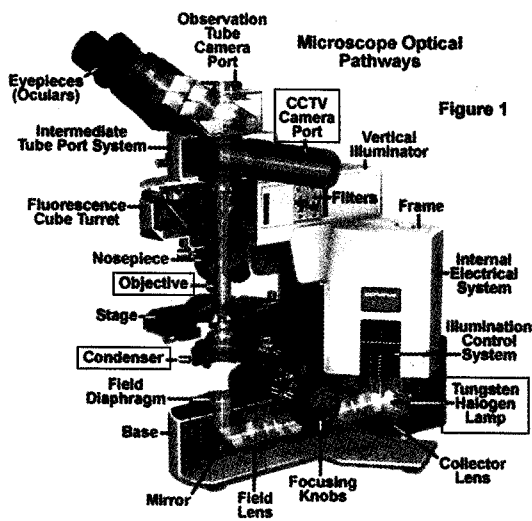


그림 4. 광학현미경의 내부 구조

방사광을 이용한 X-선 현미경 (X-ray Microscopy)

로 가면(7 keV에서) DOF가 수 십 μm 수준으로 두꺼운 시료를 볼 수 있다.

생체는 대부분 물로 구성되어 있다. 그런데 소위 Water-Window라고 하는 연 X-선 에너지 영역 (탄소와 산소의 흡수단 사이로 284 ~ 543 eV)에서는 단백질이 물보다 흡수 길이(absorption length)가 훨씬 짧아 자연스럽게 대비가 생긴다. 그러나 빛이 흡수단에 가까우면 산란 단면적이 크기 때문에 흡수가 잘된다. 따라서 sample이 탈 수 있으며 이를 피하기 위해 시료를 얼린 채 찍어야 한다. 반면에 생체는 경 X-선에는 투명하여 내부를 보기가 어렵다. 그래서 가시광선 현미경에서 사용되는 Zernike 위상차의 analog를 쓰게 된다.

그림 5는 포항가속기연구소에 설치된 경 X-선 현미경의 구성을 보여준다.⁽⁵⁾ zone plate 렌즈는 위의 식 (2)에서 볼 수 있는 것처럼 파장에 따라 초점거리가 달라지는 소위 'chromatic' 렌즈이다. 따라서 최초의 광학부품으로 분광기가 놓이게 된다. 집광 렌즈는 두께가 1.6 μm 인 금 zone plate인데, 4 mm 외경과 1.5 mm 내경 사이에만 zone들이 있다. 이 렌즈와 대물 렌즈(objective zone plate) 모두 최 외각 zone의 폭이 100 nm이다. 따라서 두 zone plate들의 최 외각 zone의 폭과 두께의 비인 종횡비(aspect ratio)가 16배이며 7 keV에서의 효율이 적어도 20%는 된다. 지름이 160 μm 인 텅스텐 바늘구멍(pinhole)은 OSA(Order Sorting Aperture)라고도 불리는데 고리모양의 구멍(annular aperture)과 함께 1st order를 제외한 0th order와 higher order로 회절된 빔을 막는다. 대물 zone plate의 지름이 160 μm 이며, 이 zone plate 렌즈에 우리

에게 익숙한 광학렌즈 공식, $1/a + 1/b = 1/f$, 을 적용할 수 있다. 시료에서 대물 zone plate사이의 거리와 대물 zone plate에서 상까지의 거리 비로 X-선 상이 확대된다. 여기서 b 가 약 2.5 m인데 그 거리를 지나면서 X-선이 대기에 의해 흡수되기 때문에 양쪽 끝에 Be 창이 있는 스테인리스 진공 파이프를 놓는다. 그림에서 보이는 고리모양의 구멍과 위상판(phase plate)은 Zernike 위상차를 위한 부품이다. 고리모양의 구멍은 Be foil에 두께가 약 2 mm인 스테인리스 원판을 붙여 외경이 3.2 mm이고 내경이 2.4 mm인 고리(ring) 모양의 빛을 투과시키고, 위상판은 고리모양의 구멍에 켈레(conjugate) 형태의 금 고리를 Si_3N_4 membrane에 도금한 것이다. 참고로 두께가 0.1 mm 정도의 Be foil이나 0.01 mm의 Si_3N_4 membrane은 경 X선에 투명하다. 음 위상차(negative phase contrast)를 주기 위해서 금 고리의 두께는 7 keV에서 $(3/4)\lambda$ 만큼 위상차를 주게 되어있다.

그림 6은 음 위상차를 이용하여 공간 분해능 80 nm로 찍은 사람 흰 머리카락의 사진이다.⁽⁶⁾ 가로와 세로가 각각 30과 20 μm 인 사진 4장을 이어 붙였다. 맨 왼쪽 부분에 밝게 보이는 것은 광학현미경에도 있는 소위 halo 효과이다. 급격하게 밀도 차가 나면 빛의 강도 변화가 실제보다 부풀려 보이는 것이다. 사람 머리카락의 지름은 서양사람의 경우는 50 ~ 60 μm 이며 동양인은 약 100 μm 정도라고 한다. 맨 바깥부분은 3에서 10 층에 이르는 투명한 비늘로 되어있어 그 내부를 보호하고 있다. 비늘의 안 쪽에는 머리카락의 대부분을 차지하고 있는 cortex가 있다. Cortex에는 cortical cell들이 마치 다발 형태로 차있으며

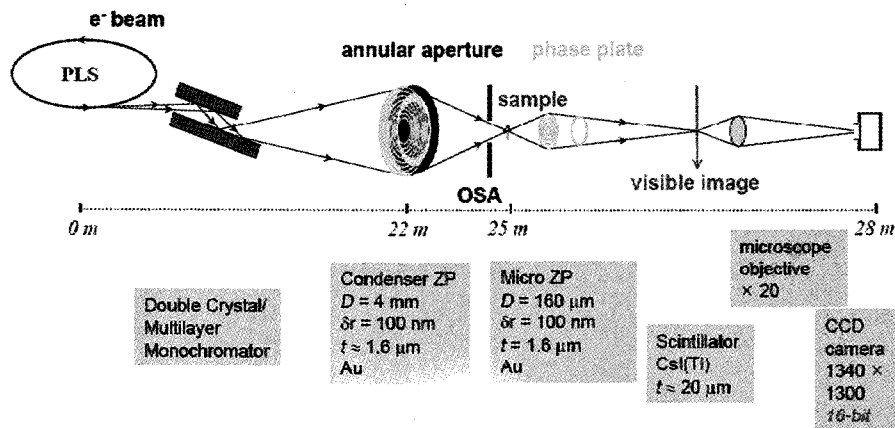


그림 5. 포항가속기연구소에 설치된 X-선 현미경의 구성

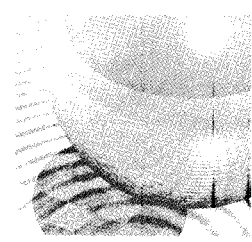


그림 6. 머리카락을 길이 방향으로 20 μm 만큼 보여주는 X-선 사진

각각의 cortical cell은 다시 macro-fibrils 다발로 되어 있다. 흰색 화살들이 가리키는 것들은 macro-fibrils이다. Cortex 중심의 기포가 있는 빈 공간이 바로 medulla 이다.

X-선 현미경은 분해능 면에서 광학현미경보다 우수하며 SEM의 수준에 이르렀다. 따라서 X선 현미경으로 시료를 보기 전에 저 배율 SEM으로 이미 관찰이 된 상을 참고하여야 한다. 그렇지 않으면 광학현미경 그림에 비해 너무 세밀하게 보여 무엇이 보이는지 알 수가 없게 된다.

X-선 CT(Computed Tomography)는 개체 내부의 3차원 구조를 보여준다. CT는 대상을 회전하든지 아니면 검출기를 대상 주위로 회전하여 얻은 그림들을 재구(reconstruct)해서 3차원 영상을 만드는 기술이다. 요즘에는 수 μm 분해능으로 X-선 CT를 하는 상용장비들도 있다. 그런데 위의 X-선 현미경에서 시료를 회전하여 얻은 그림들을 재구(reconstruct)하면 소위 나노 CT가 되는 것이다. 최근 LBL에서 분해능 60 nm 연 X-선 나노 CT로 효모를 찍었다.⁶⁾

이론적으로는 X-선 현미경의 분해능이 10 nm 수준까지 가능하다고 한다. 10 nm 공간 분해능으로 나노 CT를 찍을 수 있는 날이 불원간 도래할 것이며 이는 전자현미경이 아직 가보지 못한 미지의 나노 세계로 우리를 안내할 것이다.

참고문헌

- (1) Jens Als-Nielsen and Des McMorrow, *Elements of Modern X-ray Physics*, (John Wiley & Sons, 2001).
- (2) D. Attwood, *Soft X-rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications* (Cambridge University Press, 1999).
- (3) R. Huang and D. H. Bilderback, "Single-bounce monochapillaries for focusing synchrotron radiation: modeling, measurements and theoretical limits", *J. Synchrotron Rad.* 13, 74 (2006).
- (4) W. Chao *et al.*, "Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15nm", *Nature* 435, 1210 (2005).
- (5) Hwa Shik Youn and Tae Joo Shin, "A study of the human hair structure with a Zemike phase contrast X-ray microscope", *J. Microsc.* 228, 107 (2007).
- (6) C. A. Larabell and M. A. Le Gros, "X-ray Tomography Generates 3-D Reconstructions of the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm Resolution", *Mol. Biol. Cell* 15, 957(2004).

약 력



윤화식

• 학력 :

1990년 1월 University of Virginia, 미국, 이학박사
(응집물리실험 전공),
1980년 2월 서울대학교, 이학사
1973년 3월 서울대 문리대 물리학과 입학

• 경력 :

2003년 3월 포항공속기연구소, 수석연구원
2002년 6월 ~ 2003년 5월 미국 California주
Berkeley소재 Lawrence Berkeley
Laboratory 방문연구원
2000년 10월 - 2002년 3월 포항공속기연구소
팀리인부장
1991년 6월 포항공속기연구소, 책임연구원,
1990년 11월 일본 과기청 신기술사업단, 객원연구원
1989년 12월 University of Virginia, 미국,
postdoctor