

전자토모그래피의 정량적 분석에서 대물렌즈 조리개의 영향

김진규, 이상희, 권희석, 정종만, 정원구, 이수정¹, 주형태^{2,*}, 김윤중
한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부, ¹한국지질자원연구원 자원활용소재연구부,
²한국해양연구원 해양위성·관측기술연구부

Objective Aperture Effects for the Quantitative Analysis in Electron Tomography

Jin-Gyu Kim, Sang-Hee Lee, Hee-Seok Kweon, Jong-Man Jeong,
Won-Gu Jeong, Sujeong Lee¹, Hyeong-Tae Jou^{2,*} and Youn-Joong Kim

Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 350-333, Korea
¹Minerals and Materials Processing Division, Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources,
Daejeon 305-350, Korea

²Ocean Satellite Remote Sensing & Observation Technology Research Department,
Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan 426-744, Korea

(Received October 8, 2008; Accepted December 17, 2008)

ABSTRACT

We have evaluated the effects of experimental factors on transmitted electron beam intensities for quantitative analysis in electron tomography. For the correct application of Beer's law in electron tomography, the transmitted beam intensity should reflect the net effect of mass properties on beam path. So, the any other effects of the objective aperture and the specimen holder on beam path should be removed. The cut-off effects of objective aperture were examined using Quantifoil holey carbon film and a transmission electron microscope operated at 120 kV. The transmitted beam intensities with 30 μm objective aperture dropped about 16.7% compared to electron beam intensities without the objective aperture. Also, the additional losses of about 14.2% at high tilt angles were occurred by cut-off effects of the objective apertures. For the precise quantitative analysis in electron tomography, the effect of the objective aperture on transmitted electron beam intensities should be considered. It is desirable that 2-D tilt series images are obtained without the objective aperture for correct application of Bee's law.

Keywords : Beer's law, Cut-off effect, Electron tomography, Objective aperture

서 론

Transmission electron microscope (TEM)를 이용하여 획득한 일련의 2차원적 영상들로부터 3차원적 정보를 추출해 내

는 electron tomography는 의·생물, 재료과학, 지질학 등 다양한 분야에서 시료의 구조적인 문제점을 해결하기 위해 널리 사용되어지고 있다. Electron tomography의 이론적인 접근은 처음으로 1917년에 정립되었으나(Radon, 1917), 실제로 TEM을 이용한 연구는 1968년도에 의·생물 분야에서

본 연구는 기초기술연구회 협동과제 “나노·바이오 융합소재의 EM분석법 개발”의 지원을 받아 수행되었습니다.

* Correspondence should be addressed to Dr. Hyeong-Tae Jou, Ocean Satellite Remote Sensing & Observation Technology Research Department, Korea Ocean R & D Institute, Ansan 426-744, Korea. Ph.: (031) 400-6278, Fax: (031) 408-5822, E-mail: htjou@kordi.re.kr

시작이 되었으며 (Hart, 1968; DeRosier & Klug, 1968), 최근에 TEM 장비의 급속한 발전과 더불어 재료·화학분야 (Midgley & Weyland, 2002; Friedrich et al., 2005)에도 많은 시도가 이루어지고 있다.

Electron tomography를 이용한 시료의 3차원적 영상의 구현은 상용화된 분석프로그램을 사용하여 쉽고 빠르게 결과를 도출하여 낼 수 있지만, 실제로 복원된 영상의 신뢰도의 향상을 위해서는 아직도 많은 연구가 시도되고 있다. 그 이유는 2차원 영상을 획득할 때 발생하는 입사빔의 강도와 CCD 성능 (Jou et al., 2008), 고니오미터 및 시료홀더의 성능 (Kim et al., 2006)에 관계되는 문제로 인해 3차원적 복원 과정에서 영상의 잡음이 존재하기 때문이다.

특히, cryo-TEM을 이용하는 의·생물 시료, 유기구조체, Z-contrast tomography에서의 경원소 구조체와 같이 명암대비가 극도로 낮은 시료의 연구에 있어서는 3차원 영상의 구현이 쉽지 않기 때문에 2차원 영상으로부터 보다 정량적인 강도의 변화를 추출해야 하는 필요성이 제기되고 있다. 이를 위해서는 각각의 연속 기울기 이미지에서 초기 입사된 전자빔의 강도와 시료를 통과한 전자빔의 강도를 측정하여 그 상대적인 변화를 정확히 추출하는 것이 필요하다. 일반적으로 X-ray tomography에서는 이러한 강도의 변화와 시료의 성질 사이의 관계에 Beer' law를 적용하고 있으며, 이 법칙은 전자빔에 대해서도 선택적으로 적용이 가능하다고 보고되었다 (Pozsgai, 1997; Jou et al., 2008).

본 연구에서는 electron tomography를 이용한 시료의 3차원적 복원에 있어서 보다 정량적인 결과를 도출하기 위해 가장 중요한 요소인 시료의 영상강도에 영향을 미칠 수 있는 빔 경로상의 실험적 요인에 대한 영향을 조사하고자 하며 특히, 시료를 통과한 투과빔의 강도에 직접적으로 영향을 주는 대물렌즈 조리개의 효과를 집중적으로 다루고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 시료는 QUANTIFOIL R 2/2 (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany)이며, Cu 그리드의 각 mesh내에 2 μ m 간격으로 2 μ m 크기의 구멍이 일정하게 존재하기 때문에 시료를 통과하지 않은 전자빔과 시료를 통과한 전자빔의 강도를 측정하는 데 적당하다. 이 시료의 분석을 위해 전자현미경은 120 kV에서 작동하는 EM912 Ω (Carl Zeiss, Germany)를 사용하였다. Carl Zeiss TEM은 다른 장비와 달리 Köhler illumination system을 갖추고 있어서 형광관 또는 CCD 카메라에 도달하는 전자빔은 균일한 강도분포를 나타내기 때문에 본 연구의 목적에 적합한 장비라 할 수 있다. 이 장비는 열전자 방출방식의 전자총(LaB₆)을 사용하

며, 이 경우 필라멘트 표면의 열전자를 방출시키기 위해 주입된 전류, 가열 온도의 안정화 속도, 필라멘트 표면의 형상 및 면적에 따라 초기 방출되는 열전자에 의해 전류밀도가 급상승 하며, 일정 시간이 경과한 후에 안정되는 특성이 있다. 따라서 전류밀도의 불안정도에 의한 영향을 최소화하기 위해 약 1시간 동안 안정화시켰다.

필라멘트로부터 방출된 전자는 집속렌즈에 의해 첫 번째 교차점을 형성하게 되며, 집속렌즈 조리개에 의해 일정한 각도 범위 밖의 산란된 전자빔은 차단되어 시료에 도달하게 된다. 실질적으로 electron tomography에서는 전자빔을 기울이는 것이 아니고 분석하고자 하는 시료의 기울기를 통하여 3차원 정보를 획득하기 때문에 집속렌즈 조리개를 통과하여 시료에 도달하는 전자빔은 항상 일정하다고 간주할 수 있다. 따라서 시료를 기울이는 동안 시료를 통과한 전자빔이 대물렌즈 조리개를 통과하여 최종적으로 형광스크린 또는 CCD 카메라에 도달할 때까지 일정하게 유지되는 지 점검할 필요가 있다. 이를 위해 첫 번째로 시료와 holder가 삽입되지 않고 순수하게 대물렌즈 조리개의 크기 (30 μ m, 60 μ m 90 μ m)만을 변화시키며 전자빔이 검출기에 도달하는 강도를 측정하였다. 두 번째로, 시료가 장착되지 않은 홀더를 삽입하여 대물렌즈 조리개의 크기에 따라 통과한 전자빔이 검출기에 도달하는 경우를 측정하였고 마지막으로 준비된 시료가 장착된 홀더를 삽입 후, 대물렌즈 조리개의 크기에 따라 통과한 전자빔이 검출기에 도달하는 경우를 측정하였다. 각각의 경우에 대해서 연속 기울기에 따른 영상은 0° ~ 60° 범위 내에서 5° 간격으로 측정을 하였다. 자동으로 2차원적 연속 기울기 이미지를 획득하는 장비 및 프로그램의 경우에 장비의 정렬상태가 나쁘거나 고니오미터의 불안정도를 보정하지 않는 상태로 실험을 수행하게 되면, 연속 기울기에 따른 시료의 이동과 초점의 조정량이 과대하게 되어 오히려 이미지의 콘트라스트 및 영상강도에 나쁜 영향을 주게 된다. 본 연구에서는 이러한 문제를 피하기 위해 수동으로 고니오미터를 미세하게 조정하여 연속기울기를 수행하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1에 시료를 삽입하지 않은 상태에서의 대물렌즈 조리개와 시료홀더의 영향을 고려하기 위해 기록한 전자빔의 강도 분포에 대한 이미지를 나타내었다. 시료를 통과한 전자빔이 시료 위치 하단에 위치한 각각의 렌즈와 조리개의 영향을 받는 것을 배제하는 것이 중요하기 때문에 먼저 각 렌즈의 전류값은 중간값으로 지정하였고, 시료의 높이 또한 표준시료를 이용하여 유센트릭 높이를 조정하였다.

Fig. 2에는 quantifoil 시료를 장착한 홀더를 삽입한 후, 대

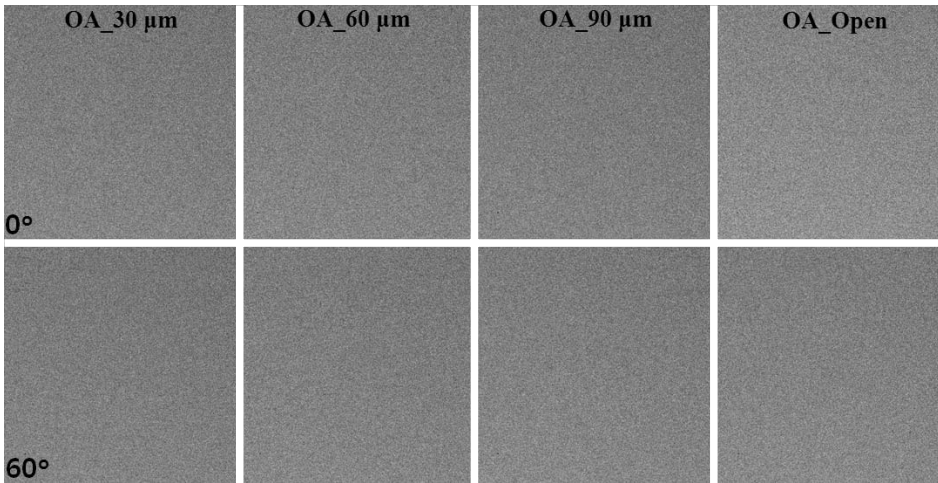


Fig. 1. Tilt series images acquired using various size objective apertures without specimen.

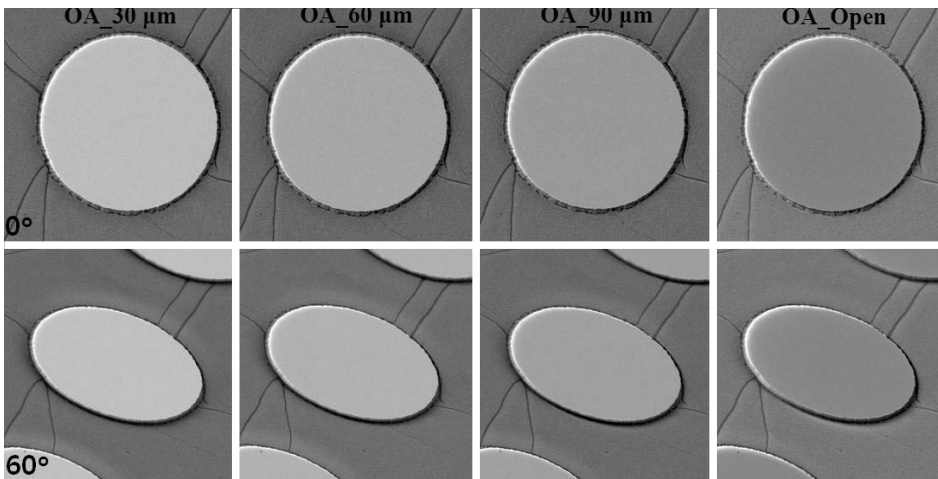


Fig. 2. Tilt series images of quantifoil carbon film acquired using various size objective apertures.

물렌즈 조리개의 크기에 따른 연속 기울기 이미지를 나타내었다. 배율은 앞서서 측정한 경우와 동일한 조건을 맞추기 위해, 전자빔이 시료를 통과하는 부분과 통과하지 않는 부분이 적절히 나타나도록 5,000배로 고정하였다. 또한 에너지 여과장치의 슬릿 조리개를 제거하여 슬릿 조리개의 유동에 의한 전자빔의 불안정성을 억제하여 대물렌즈 조리개에 의한 효과를 정밀히 측정하고자 하였다. 14-bit CCD 카메라에 기록된 영상은 16 bit gray scales의 형식으로 저장되었다. 기록매체인 CCD의 성능과 영상 방식에 대한 평가는 Jou et al. (2008)에 상세히 논의하였으므로 본 연구에서는 언급하지 않았다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 작은 크기의 대물렌즈 조리개를 넣을 수록 콘트라스트의 향상을 기대할 수 있어 대부분의 연구자가 electron tomography를 수행할 때 대물렌즈 조리개를 사용하게 된다. 하지만 다음에서 논의하겠지만, 실제 CCD에 노출된 강도를 픽셀 단위로 측정해보면 대물렌즈 조리개를 넣지 않은 영상의 강도가 가장 크며 히스토그

램의 영역 또한 넓게 분포하고 있는 것을 알 수 있다.

1. 시료와 홀더를 제거한 대물렌즈 조리개의 크기에 의한 전자빔의 강도 변화

Fig. 1에 나타난 영상에 대한 전자빔의 강도 변화의 추이를 Fig. 3에 나타내었다. 집속렌즈를 통과한 후 시료 위치에 평행하게 입사된 전자빔은 시료와 상호 작용이 없기 때문에, 단지 대물렌즈에 의한 로렌츠 힘의 영향으로 대물렌즈 조리개에 도달하게 된다.

대물렌즈 조리개에 도달한 모든 전자빔은 단지 대물렌즈 조리개의 크기에 의존하여 전자빔의 통과량이 결정되며, Fig. 3과 같이 검출기에 도달한 강도는 고니오미터의 기울기에는 의존하지 않고 거의 일정하게 유지되는 것을 알 수 있다. 또한 검출기를 이용하여 전자빔의 강도를 측정한 결과로부터 불특정 다수의 기울기 각도에서 전자빔의 강도가 불규칙하게 측정되고 있는 것을 알 수 있었다. 각각의 경우

에 대해 평균 전자빔의 강도 대비 표준편차 값을 구해 보면 약 2%의 불규칙한 튜밍 현상을 보여주고 있으며, 이것은 열 전자 방출 방식의 LaB₆ gun의 특성으로 여겨지며 일반적인 field emission gun (FEG)의 전류밀도의 안정도가 약 5%인 점을 감안할 때, LaB₆의 불안정도는 피할 수는 없으나, 무시할 수 있을 것으로 판단된다(Williams & Carter, 1995).

2. 빈 홀더를 장착한 대물렌즈 조리개의 크기에 의한 전자빔의 강도 변화

두 번째로는 시료를 장착하지 않은 채, 고니오미터의 기울기에 따라 홀더에 의한 전자빔의 산란의 영향을 고려해 보았다. Fig. 4는 첫번째 실험과 동일한 조건하에서 시료 홀더를 삽입한 후, 가장 큰 것과 가장 작은 크기의 대물렌즈 조리개에 의한 전자빔의 강도 측정 결과를 보여주고 있다. 이 경우에도 첫 번째의 경우와 마찬가지로 대물렌즈 조리

개의 크기에 의한 전자빔 강도의 일률적인 감소만 있을 뿐, 고니오미터의 기울기에 의한 영향은 나타나지 않았다. 다만, 60° 이상의 고경사각 기울기에서는 시료 홀더의 가장자리가 전자빔의 경로를 차단하기 때문에 측정하는데 어려움이 있었다. 최근에 개발된 electron tomography용의 특수 홀더는 시료가 장착되는 부분이 일반 홀더보다 상대적으로 얇고 좁기 때문에 70° 이상까지도 시료 홀더의 영향은 없을 것으로 사료된다.

3. 시료를 통과한 전자빔의 대물렌즈 조리개의 크기에 따른 강도 변화

마지막으로 표준시료를 장착한 시료 홀더를 삽입하여 시료의 기울기에 따른 전자빔의 강도 변화를 관찰하였다. 대물렌즈 조리개는 앞선 경우와 마찬가지로 open, 30 μm, 60 μm, 90 μm의 크기를 적용하였으며, 시료의 영향을 고려하

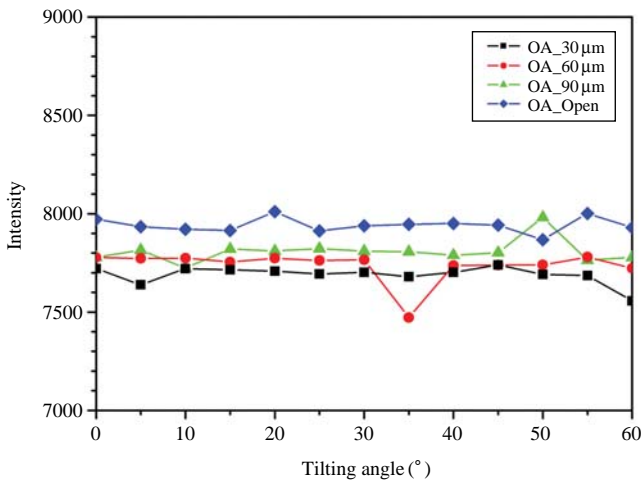


Fig. 3. Intensity distribution of tilt series image for various size objective apertures.

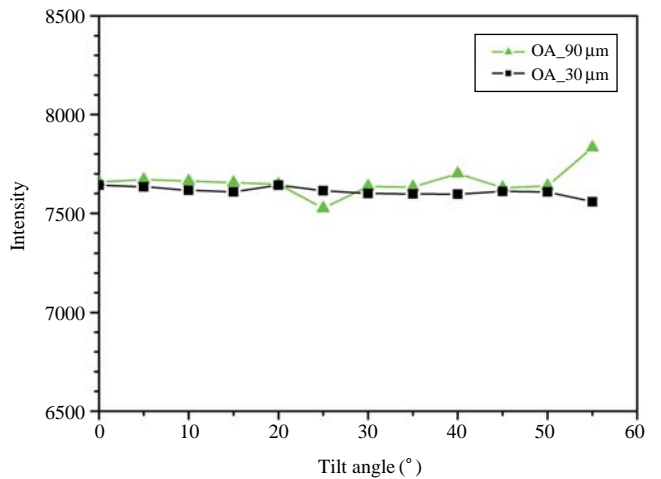


Fig. 4. Intensity distribution of tilt series image with the specimen holder for various size objective apertures.

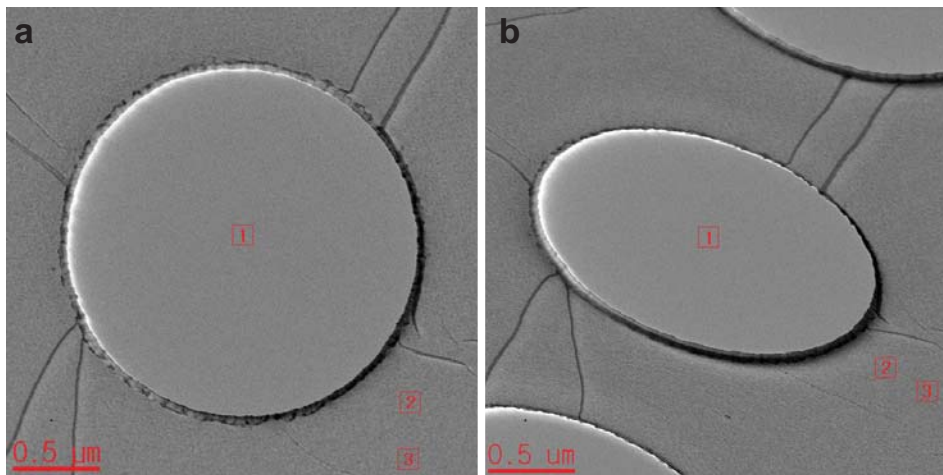


Fig. 5. Quantifoil carbon film images obtained at 0° and 55° tilt angle. Three small regions (marked as 1, 2, and 3) were selected for the evaluation of intensity variation of electron beam. The first one is for hole area (1), the second and third ones are for thin film area (2, 3) in the specimen.

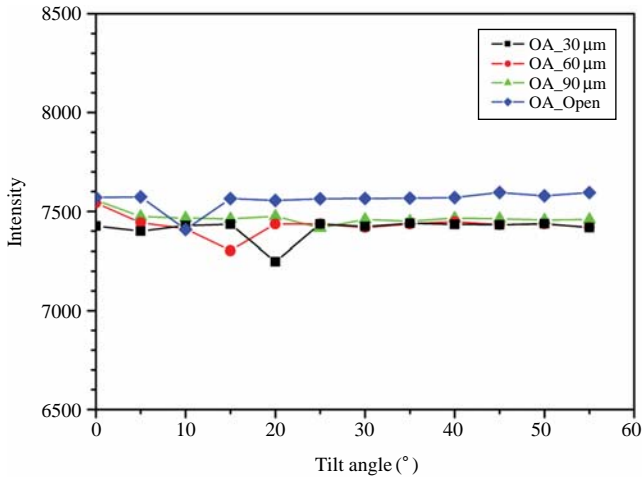


Fig. 6. Intensity distribution of the transmitted beam in hole area of quantifoil carbon film (1 in Fig. 5) in tilt series for various size objective apertures.

기 위해 시료가 없는 부분(시료내의 구멍)과 시료가 있는 부분(C-thin film)을 나누어서 측정하였다. Fig. 5는 5,000배에서 측정된 quantifoil의 이미지이며, 고니오미터의 기울기 축과 근접한 영역에 대해 시료가 없는 1곳과 시료가 존재하는 2곳을 선택하였다. 전자빔의 강도를 측정하기 위한 선택된 영역이 너무 넓으면 quantifoil의 표면의 불균일한 정도에 의한 영향이 있을 수 있기 때문에 최대한 균일한 곳을 선택하여 90×90 픽셀 영역을 기준으로 삼았다.

Fig. 6에는 시료내의 빈 공간 즉, 시료의 구멍 중심부에 대한 전자빔의 강도의 변화를 나타내었다. 시편 중앙의 구멍을 지나는 전자빔은 시편을 통과하지 않고 직접적으로 검출기에 도달하기 때문에 Fig. 3 또는 Fig. 4와 같이 전자빔의 강도는 시료의 기울기에 의존하지 않으며, 단지 대물렌즈 조리개의 크기에 따른 전자빔의 cut-off 효과만이 존재할 뿐이다. 이로부터, electron tomography를 수행하고자 하는 시료가 미세한 hole을 포함하고 있다면, 실험을 수행할 때 빈 공간내의 전자빔의 강도를 측정하여 시편에 입사된 전자빔의 강도의 예측이 가능하며, 실험 전, 후의 전자빔이 강도를 비교 및 선형적 fitting을 한다면 실험 도중의 전자빔 강도의 자연적 감쇠의 영향을 판단하여 보다 정밀히 시료의 기울기에 따른 입사빔의 강도를 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

마지막으로 Fig. 7에는 시료가 존재하는 영역에 대한 결과를 나타내었다. 시료의 영역에 따른 결과가 상이할 경우에 대비하여 2곳에 대한 전자빔의 강도를 분석한 결과, 거의 동일한 결과를 나타내었으며 편의상 영역 2의 경우만을 나타내었다.

Fig. 7의 결과로부터 앞서서 논의한 경우와 달리, 시료가 있는 경우에는 전자빔의 강도의 변화는 시료의 기울기에

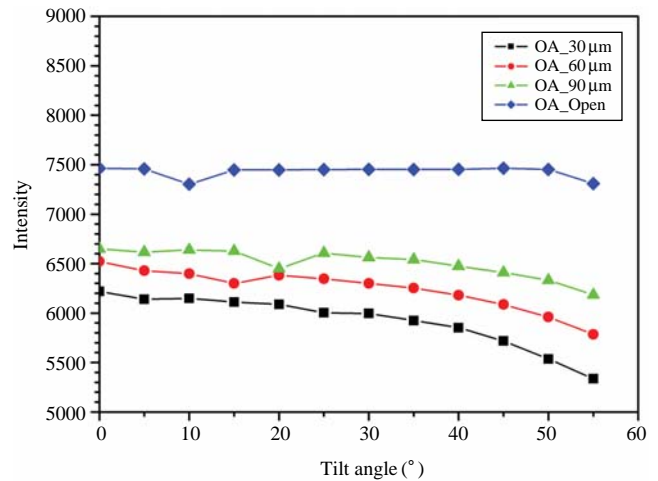


Fig. 7. Intensity distribution of the transmitted beam through carbon film (2 in Fig. 5) in tilt series for various size objective apertures.

민감하게 영향을 받고 있음을 알 수 있다. 대물렌즈 조리개를 삽입한 상태에서는 시료의 기울기에 따라 시료를 통과한 전자빔의 강도가 고경사각일수록 감소하는 것을 알 수 있다. 특히, 작은 크기의 대물렌즈 조리개를 사용하였을 경우에는 저경사각($\sim 20^\circ$)의 기울기에서도 전자빔 강도의 감소가 일어나며, 55° 의 기울기에서 측정된 전자빔의 강도는 0° 기울기에서 측정된 전자빔의 강도에 비해 약 14.2%의 감소가 일어남을 알 수 있다. 이러한 현상은 시편의 두께에도 의존할 수 있기 때문에 시료의 두께를 측정해 보았다. 시료의 두께는 제조사(Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany)의 사양에 의하면 약 20 nm 정도이며, low-loss 영역의 electron energy loss spectrum (EELS) 측정과 log-ratio 방법을 이용하여 계산한 결과 약 18.8~20.6 nm이었다. 일반적으로 저전압 TEM (80~120 kV)에서 electron tomography를 수행하는 경우, 의·생물 시료는 효율적인 3차원적 정보를 확보하기 위해 최대 200 nm~250 nm의 두께를 사용하고 있기 때문에 대물렌즈 조리개의 영향은 보다 심각하게 작용할 수 있다.

한편으로, 시료의 기울기에 따른 전자빔의 강도 변화는 서론에서 언급한 Beer's law에 의한 결과로 오인할 수 있으나 대물렌즈 조리개를 적용하지 않은 경우를 보면 명백히 구분을 할 수 있다. 만약 시료를 통과한 전자빔의 강도가 Beer's law에 의해 감소가 되었다면, 대물렌즈 조리개를 사용하지 않은 경우에도 시료의 기울기에 따라 전자빔의 강도가 감소하는 현상을 보여야 하나, 고경사각 기울기에서도 거의 일정하게 유지되고 있기 때문이다.

역으로 추론하면 본 실험에 사용된 약 20 nm의 C-film의 경우에는 Beer's law가 성립되지 않는다고 반론을 제기할 수 있다. 하지만 Beer's law의 성립여부에 대해서는 다음과 같

은 사항을 고려해야 할 필요가 있다. 첫째로, Pozsgai (1997)의 결과와 비교해 볼 때, 실험에서 사용된 시료인 Ti, Ge, Ag, Au의 금속박막에 비해 quantifoil의 mass thickness가 상대적으로 매우 작기 때문에 대부분의 전자빔은 시료와의 약한 상호작용 또는 투과된다. 두 번째로는 사용된 시료의 두께 범위 또한 금속박막을 약 10 nm~200 nm까지 폭넓게 변화시키면서 측정 및 분석을 시도한 반면에 electron tomography에서는 60°의 고경사각 기울기에서도 약 2배 정도의 두께 변화만이 발생하기 때문에 약 20 nm~40 nm 사이의 좁은 범위 내에서의 측정 및 분석이 가능하다는 것이다. 이와 같이 시료의 두께가 매우 얇고 탄소막으로 구성된 저밀도 시료에 대해서 Beer's law의 성립 여부에 대해서는 새로운 고려가 필요하며, 또한 실제 시료에 대한 electron tomography 방법에서 측정된 자료를 이용한 정량적 회귀분석을 통해 시료의 기울기에 따른 영상 강도 변화의 평가가 수행되어야 할 것이다.

본 연구에서의 가장 중요한 것은 Beer's law를 적용하기 위해서는 순수하게 시료의 기울기에 의한 전자빔의 강도의 변화만을 고려해야 하지만, 대다수의 연구자들은 시료의 콘트라스트를 증대시키기 위해 작은 사이즈의 대물렌즈 조리개를 사용한다는 것이다. 상기에서 언급했듯이, 대물렌즈 조리개를 사용할 경우에 고경사각에서 최대 14.2%의 오차를 발생할 수 있으며 또한 대물렌즈 조리개의 크기에 의한 전자빔 차단으로 인해 측정된 전자빔의 강도는 최대 16.7%까지 감소되어 총 28.5%의 오차를 불러올 수 있다는 것이다.

재료분야에서 일반적인 bright field transmission electron microscopy (BF TEM)를 이용한 electron tomography를 수행할 경우에 회절 콘트라스트의 발생으로 tomogram의 생성에 영향을 주기 때문에 이를 최소화하기 위해서는 대물렌즈 조리개를 제거하여 특정 방향으로의 강한 회절 콘트라스트를 억제하거나, BF-TEM의 경우보다 회절 콘트라스트의 영향을 덜 받는 annular dark field (ADF), high angle annular dark field (HAADF) scanning transmission electron microscopy (STEM)를 이용한 tomography (Friedrich et al., 2005) 또는 energy filtered transmission electron microscopy (EF TEM)를 이용한 tomography를 수행하는 것도 방법이 될 수 있다.

의·생물분야의 electron tomography에서는 cryo-TEM과 같이 극도로 낮은 콘트라스트를 가지는 시료를 연구하는 경우에 보다 나은 콘트라스트를 구현하기 위해 대물렌즈 조리개를 사용해야 한다면 반드시 electron tomography를 수행하기 전에 특정 TEM내의 장착된 대물렌즈 조리개의 영향을 평가하여 적용해야 한다. 하지만 낮은 콘트라스트는 히스토그램 분석을 통한 2차원적 영상 처리(이미지 필터링 등)를 통하여 tomogram을 생성함으로써 극복할 수 있기 때문에 원칙적으로 대물렌즈 조리개를 사용하지 않는 방법이

권장된다.

이외에도 high voltage electron microscope (HVEM)을 사용할 경우에는 대물렌즈 조리개의 영향력을 최소화할 수 있다. HVEM의 경우, 투과력이 강하기 때문에 상대적으로 콘트라스트는 저하되지만, 저전압 TEM과 동일한 크기인 30 μm의 대물렌즈 조리개를 이용하여 C-supporting film에 대한 투과전자빔의 강도를 측정된 결과, 약 4%의 전자빔 강도의 감소밖에 일어나지 않기 때문에 대물렌즈 조리개에 의한 오차를 줄일 수 있다(Unpublished data). 또 다른 대안은 단백질 구조체 또는 박테리아 같이 single particle analysis를 수행할 경우에는 phase plate와 같은 위상차 콘트라스트(Danev & Nagayama, 2008)를 이용하면 대물렌즈 조리개를 사용하지 않아도 시료의 콘트라스트를 극대화 할 수 있을 것으로 판단된다.

결 론

Electron tomography의 정량적 분석을 위해 도입되는 Beer's law의 올바른 적용을 위해 시료의 기울기에 따라 시료를 통과한 전자빔에 대한 대물렌즈 조리개의 영향을 평가하였다. 시료에 입사하는 전자빔의 유동성을 최소화하기 위해 전자빔의 전류밀도의 안정화를 수행하고, 집속렌즈, 집속렌즈 조리개, 대물렌즈, 중간렌즈, 확대렌즈 등 기타 변수를 고정하여 대물렌즈 조리개 이외에 시료를 통과한 전자빔의 강도에 영향을 주는 변수들의 영향을 배제하였다. Electron tomography를 이용한 3차원적 구조 복원을 위해서는 순수하게 시료의 기울기에 따른 투과전자빔의 강도만을 고려하여 Beer's law를 적용해야 한다. 하지만 콘트라스트 증대를 위해 사용되는 대물렌즈 조리개의 크기에 따라 전자빔 강도의 왜곡이 발생함을 알 수 있었으며, 이에 대한 정량적인 평가를 수행하였다. 대물렌즈 조리개를 사용하지 않은 경우와 비교해 볼 때, 대물렌즈 조리개에 의한 cut-off 효과는 최대 16.7% 정도가 발생하며 추가적으로 시료의 기울기에 따른 cut-off 효과는 최대 14.2% 정도가 발생하였다. 이러한 오차를 줄이기 위해서는 분석하고자 하는 시료의 두께를 최적화하여 적정 콘트라스트를 유지하고, 가능하면 대물렌즈 조리개를 사용하지 않고 2차원적 영상 강도를 획득하여야 하며, 부득이 대물렌즈 조리개를 사용할 경우에는 그 영향을 고려하여야 한다.

참 고 문 헌

- Danev R, Nagayama K: Single particle analysis based on zernike phase contrast microscopy. *J Struct Biol* 161 : 211-218, 2008.
DeRosier DJ, Klug A: Reconstruction of three dimensional struc-

- tures from electron micrographs. *Nature* 217 : 130-134, 1968.
- Friedricha H, McCartneyb MR, Busecka PR: Comparison of intensity distributions in tomograms from BFTEM, ADFSTEM, HAADFSTEM, and calculated tilt series. *Ultramicroscopy* 106 : 18-27, 2005.
- Hart RG: Electron microscopy of unstained biological material: the polytropic montage. *Science* 159 : 1464-1467, 1968.
- Jou HT, Lee S, Kim YJ, Suk BC: Model simulation for assessment of image acquisition errors affecting electron tomography. *Korean J Microscopy* 38(1) : 51-61, 2008. (Korean)
- Kim JG, Jeong JM, Kim YM, Kim YJ: Reliability test of the TEM rotation holder for 3-D structure analysis. *Korean J Microscopy* 36(3) : 209-216, 2006. (Korean)
- Midgley PA, Weyland M: 3D electron microscopy in the physical sciences: the development of Z-contrast and EFTEM tomography. *Ultramicroscopy* 96 : 413-431, 2003.
- Pozsgai I: Thickness determination by measuring electron transmission in the TEM at 200 kV. *Ultramicroscopy* 68 : 69-75, 1997.
- Radon J: *Ber. Verh. K. Sachs. Ges. Wiss. Leipzig, Math. Phys. Kl.* 69 : 262, 1917.
- Williams DB, Carter CB: *Transmission Electron Microscopy-A Textbook for Materials Science*. Plenum Press, New York and London, pp. 69-83, 1995.

< 국문 초록 >

Electron tomography의 정량적 분석을 위해서 대물렌즈 조리개가 투과빔의 강도에 미치는 영향을 평가하였다. Electron tomography에 도입되는 Beer's law의 올바른 적용을 위해서는 투과빔은 시료의 기울기에 따른 mass thickness의 변화에 의한 효과를 반영해야 한다. 그러므로 빔 경로상의 대물렌즈 조리개, 홀더 등에 의한 다른 효과는 제거되어야 한다.

본 연구에서는 대물렌즈 조리개의 cut-off 효과를 120 kV TEM과 Quantifoil holey 카본 시료를 이용하여 상세히 평가하였다. 대물렌즈 조리개를 사용하지 않은 경우와 비교할 때, 30 μm 크기의 대물렌즈 조리개를 통과한 투과전자빔의 강도는 약 16.7%의 감소가 일어난다. 또한 55° 이상의 고정사각 기울기에서는 대물렌즈 조리개의 cut-off 효과에 의해 14.2%의 강도 감소가 추가적으로 발생함을 알 수 있었다.

Electron tomography에서 정량적 분석을 위해서는 이러한 대물렌즈 조리개의 영향을 고려해야만 한다. 또한 Beer's law의 올바른 적용을 위해서는 일련의 기울기에 따른 2차원적 영상은 가능하면 대물렌즈 조리개를 사용하지 않은 상태에서 획득하는 것이 바람직하다.