

## 연 X-선 현미경을 이용한 금 나노입자 세포영상

권영만, 김한경, 김경우, 김선희, 윤홍화, 천권수,  
강성훈, 박성훈, 정선관, 윤권하\*

원광대학교 의과대학 영상의학과 및 익산방사선영상과학연구소

### Cellular Imaging of Gold Nanoparticles Using a Compact Soft X-Ray Microscope

Young-Man Kwon, Han Kyong Kim, Kyong Woo Kim, Sun Hee Kim,  
Hong-Hua Yin, Kwon Su Chon, Sung Hoon Kang, Seong Hoon Park,  
Seon Kwan Juhng and Kwon-Ha Yoon\*

Department of Radiology and Institute for Radiological Imaging Science,  
Wonkwang University, School of Medicine, Iksan, Jeonbuk 570-711, Korea

(Received August 22, 2008; Accepted September 22, 2008)

#### ABSTRACT

A compact soft x-ray microscope operated in the 'water window' wavelength region (2.3~4.4 nm) was used for observing cells with nano-scale spatial resolution. To obtain cellular imaging captured with colloidal gold nanoparticles using a compact soft x-ray microscope. The colloidal gold nanoparticles showed higher contrast and lower transmission more than 7 times than that of cellular protein on the soft x-ray wavelength region. The structure and thickness of the cell membrane of the *Coscinodiscus oculoides* (diatome) and red blood cells were seen clearly. The gold nanoparticles within the HT1080 and MDA-MB 231 cells were seen clearly on the soft x-ray microscopy. The gold nanoparticles were aggregated within vesicles by endocytosis.

**Keywords :** Cellular imaging, Gold nanoparticles, Soft x-ray, X-ray microscopy

#### 서 론

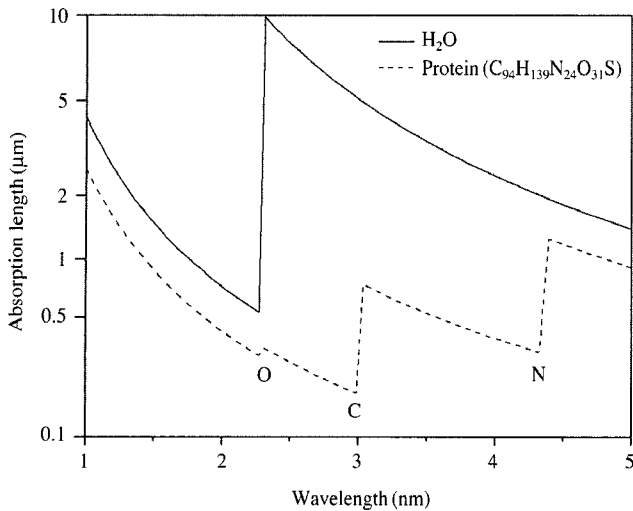
X-선은 1895년에, Röntgen에 의해 발견된, 가시광선보다 짧은 파장을 갖고 있는 전자기파이다. 일반적으로 x-선 영역에서의 전자기 스펙트럼은 파장에 따라 크게 3부분으로 나누어진다. 극 자외선 영역은 5 nm에서 40 nm (250 eV~30 eV)까지, 연 x-선은 0.3 nm에서 5 nm (4 keV~250 eV) 사이, 그리고 경 x-선은 0.3 nm (< 4 keV) 이하를 말한다(Attwood, 1999). x-선은 대부분의 물질을 투과하므로 그 대상의 내부

구조를 볼 수 있으며, x-선 영상에 대조도가 생기는 것은 각 원소에 대하여 x-선의 투과율과 굴절률에 차이가 있기 때문이다.

연 x-선 영역 중에서 '물의 창' 영역은 탄소(284 eV, 4.37 nm) K 흡수단에서 산소(543 eV, 2.28 nm)의 K 흡수단 사이의 파장을 갖는 x-선이다. 이 파장 영역에서는 세포의 주요 구성물질인 질소, 산소, 그리고 수소에 대한 x-선 흡수율이 물에 비하여 약 10배 정도로 매우 높기 때문에 '물의 창'이라 불린다. 또한 이 영역에서는 x-선의 높은 투과율에 의하여 약 10 μm의 두께의 단백질 시료도 관찰할 수 있다(Fig.

본 연구는 교육과학기술부 지원 한국과학재단 원자력연구개발과제 (NO. M2-0415-01-0001)에 의해 이루어졌음.

\* Correspondence should be addressed to Kwon-Ha Yoon, Department of Radiology and Institute for Radiological Imaging Science, Wonkwang University, School of Medicine, Iksan, Jeonbuk 570-711, Korea. Ph.: (063) 850-6800, Fax: (063) 850-6799, E-mail: khy1646@wonkwang.ac.kr



**Fig. 1.** The absorption length for soft x-rays in water and a typical protein ( $C_{94}H_{139}N_{24}O_{31}S$ ) as a function of wavelength. The spectral range between carbon (C) and oxygen (O) absorption edges is named the 'water-window'.

1). 따라서 '물의 창' 영역의 파장을 사용하는 연 x-선 현미경은 가시광선현미경과 같이 세포를 살아있는 상태에서 관찰할 수 있으며, 또한 파장이 매우 짧기 때문에 수십 nm의 분해능으로 관찰할 수 있다.

이는 가시광현미경의 낮은 분해능(~150 nm 이하)과 전자현미경의 낮은 투과율(수 백 nm 이하), 전자처리 과정에서의 시료의 손상 등의 문제점을 보완해 주는 장점을 가지고 있다(Abraham-Peskir et al., 1998; Scherfeld et al., 1998; Meyer-Ilse et al., 2001).

1952년 Wolter는 물의 창 영역의 x-선을 광원으로 하는 현미경을 제안하였다. 그러나 그 시절에는 기술적 한계에 의하여 실현되지 못하였으며, 1970년대에 들어 초정밀, 초미세 가공기술이 진보하여 연 x-선용 광학소자의 제작이 가능하게 되었고 방사광 시설도 대형화, 고휘도화 되었다. 이에, 고분해능의 연 x-선 현미경이 현실화 되었으며, 현재 가장 일반적인 연 x-선 현미경은 광원으로 방사광을 사용하고 집광·결상소자로서 존 플레이트 회절 광학소자를 이용한 방식으로, 몇 개의 연구 그룹이 수십 nm의 고분해능을 달성하였고 수분을 함유한 생체시료의 관찰도 이루어졌다(Abraham-Peskir et al., 1998; Scherfeld et al., 1998; Meyer-Ilse et al., 2001). 특히 근래에는 Chao et al. (2005)은 15 nm 이하의 공간분해능을 얻었고, Larabell et al. (2004)은 이스트를 극저온으로 냉각하여 내부의 미세기관을 60 nm 이하의 분해능으로 3차원 토모그래피 영상을 획득하였다. 그러나 이런 높은 유용성에도 불구하고, 건설과 유지 비용이 상당히 높아 시설의 이용기회가 매우 한정되어 있어 다양하게 응용되지 못하고 있는 실정이다. 이에 쉽게 사용할 수 있는 소형의 연 x-선 현미경의 필요성이 대두되었다.

소형 연 x-선 현미경에 대한 연구는 존 플레이트 회절 광학소자와 레이저 플라즈마를 이용한 연구가 대부분이다(Nakayama et al., 1994; Berglund et al., 2000). Hoshino et al. (2006)은 넓은 영역의 파장을 발생하는 고체 탄탈을 타겟으로 하는 레이저 플라즈마 광원으로 Wolter형 사입사 거울을 조명과 결상 광학계로 하여 100 nm의 분해능을 갖는 영상을 획득하였다. Kim et al. (2006)은 쌍 타원 거울을 조명 광학계로 대물광학계는 존 플레이트를 이용하여, 2.88 nm의 파장을 이용하는 액체 질소 타겟 레이저 플라즈마 광원으로 약 50 nm의 분해능을 갖는 시스템을 개발하였다. 최근에는 Takman et al. (2007)은 레이저 플라즈마 액체 제트 타겟과 조명과 대물광학계로 존 플레이트를 이용하여 수분을 포함한 세포시료에서 약 60 nm 이하의 분해능 갖는 영상을 획득하였다.

현재 세포 생물학 연구는 기능성 단백질의 관찰이 주요한 연구 분야로서, 기능성 단백질은 수 nm~수 십 nm의 크기로서 산성도, Ca 농도, 이온 농도 등의 미세한 변화에 의해 기능이 발현되거나 정지되기도 하여 그 기능과 단백질형상과의 상호관계에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한 유전자 연구에 있어서도 DNA에서 수 nm~수 십 nm의 형상적인 변화가 중요한 의미를 가지고 있다. 이에 대한 연구는 기존 형광현미경 및 전자현미경을 이용하여 주로 이루어져 왔다. 가시광선현미경은 형광단백질 표지물을 이용하여 단백질의 위치 및 기능을 분석하였다. 전자현미경은 1971년 Faulk & Taylor(1971)가 소개한 콜로이드 금 표지 방법을 주로 이용하여 이중 표지 기법을 통해 동시에 여러 종류의 단백질을 표지하거나 단백질의 크기를 선택적으로 표지하여 검출할 수 있는 기술을 이용하고 있다. 가시광선현미경을 이용할 경우 분해능의 한계에 의하여 정확한 단백질의 위치를 확인할 수 없으며 전자현미경은 약 100 nm 정도의 초미세 박편상태에서 관찰할 수밖에 없다. 최근 엑스선현미경은 가시광선현미경과 전자현미경의 단점을 보완하여 살아있는 세포의 내부구조를 나노급의 고해상도로 관찰할 수 있는 새로운 바이오현미경으로서 연구개발이 이루어지고 있는 중이다.

본 연구에서는 소형 연 x-선 현미경을 이용하여 연 x-선의 세포 구성물질에 대한 높은 투과율과 고분해능을 갖는 광학적 특성, 그리고 금 나노입자의 연 x-선과의 특성을 이용하여 금 나노입자의 세포영상을 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 소형 연 X-선 현미경

실험에 사용한 소형 연 x-선 현미경은 연구소에서 자체

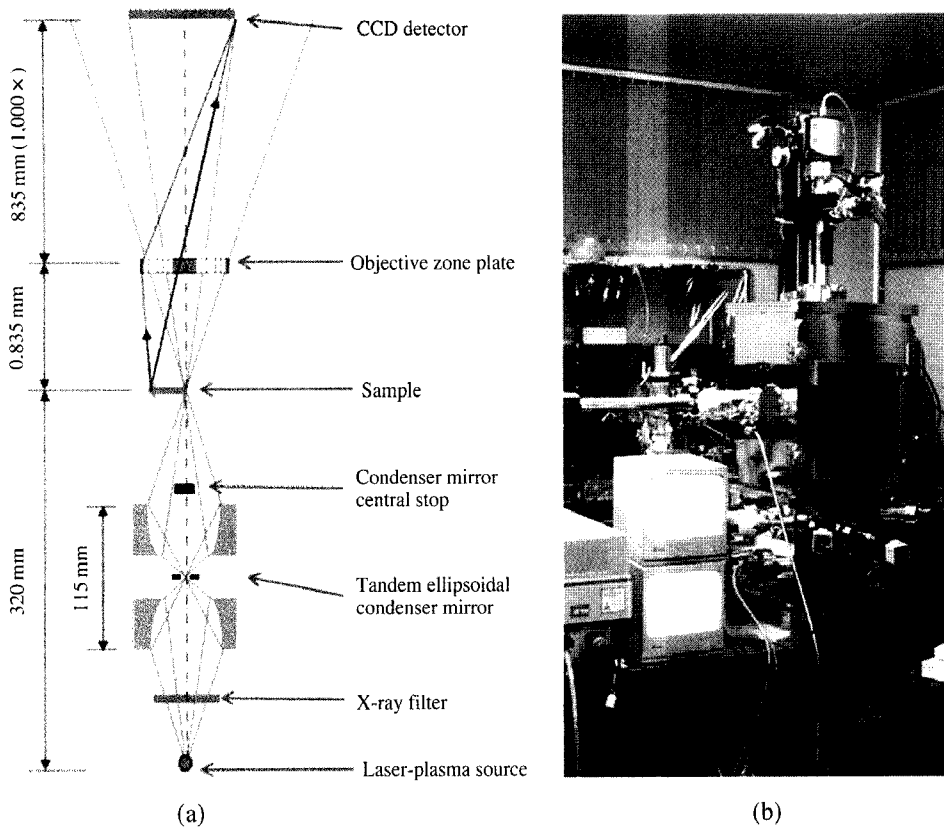


Fig. 2. Optical layout (a) and photograph (b) of the compact soft x-ray microscope.

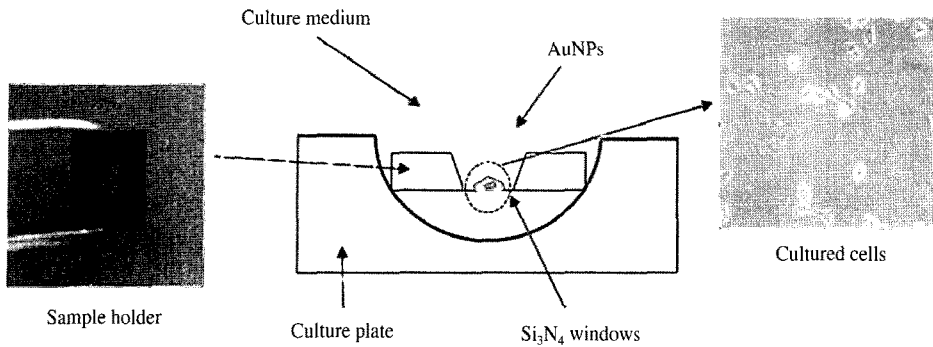
개발한 시스템으로서 액체 질소 제트 타깃 레이저 플라즈마 광원, 쌍 타원 조명거울, 시료홀더, 고 분해능 대물광학계인 마이크로 존 플레이트, 그리고 후면 조사방식의 연 x-선 검출기로 구성되어 있다.

Fig. 2는 소형 연 x-선 현미경의 광학계 구성과 배치를 나타낸 것이다. 연 x-선 광원은 액체질소 제트 타깃 레이저 플라즈마에 의해 생성된 연 x-선을 티타늄(Ti, thickness: 500 nm)을 필터로 사용하여 2.88 nm 준단색성을 갖는 광원을 이용하였다. 레이저는 파장 532 nm, 펄스폭 100 ps, 펄스당 에너지 125 mJ, 반복율 10 Hz인 Nd: YAG 레이저(Continuum, CA, USA)를 사용하였다. 예비펄스 8 mJ, 메인펄스 120 mJ, 지연시간 4 ns를 갖는 다중펄스 광학계를 구성하여 레이저 집속렌즈에 입사하였으며(Son et al., 2007), 레이저 집속렌즈는 초점거리가 85 mm이며, 집속된 레이저 직경은 약 12  $\mu\text{m}$  (full width half maximum: FWHM)이다. 이때 발생하는 2.88 nm 파장에서의 광원세기는 약  $1.4 \times 10^{12}$  photons/pulse  $\cdot$  sr  $\cdot$  line이었으며, 이때 광원직경은 약 45  $\mu\text{m}$  (FWHM)이었다. 쌍 타원 조명거울의 배율은 1배이며, 초점거리는 320 mm, 광원에서 쌍 타원 조명거울까지의 거리는 102.5 mm이다. 반사면의 길이는 29 mm, 반사율은 약 15%, 개구수는 약 0.05이다. 시료면에 조명 되는 x-선의 세기는  $1.29 \times 10^5$  photons/pulse  $\cdot$   $\mu\text{m}^2$ 이었다. 시료 홀더는 진공챔버 내부에 위치하며, 시료 홀더는 교체의 편리성과 수  $\mu\text{m}$  이하의 위치 재현성을 갖는 magnetic kinematic coupling 구조이다. 고분

해능의 확대영상을 얻기 위한 대물광학소자로는 마이크로 존 플레이트(Xradia, CA, USA)를 사용하였다. 마이크로 존 플레이트는 중심부에 40  $\mu\text{m}$  직경의 빔 차단 판이 있는 형태로 존의 개수는 667개, 최외각 존 폭은 30 nm이고, 직경 80  $\mu\text{m}$ 이다. 개구수는 0.48 ( $\lambda=2.88$  nm)이며, 초점거리는 835  $\mu\text{m}$  ( $\lambda=2.88$  nm)이다. 연 x-선 검출기는 후면조사방식의 전 하결합소자 방식의 카메라(Princeton Instruments, USA)를 사용하였으며, 결합소자의 크기는  $13 \times 13 \mu\text{m}^2$ 이고, 결합소자의 배열은  $1,024 \times 1,024$ 이다. 2.88 nm (430 eV)의 파장영역에서 변환효율은 약 60%이다. 소형 연 x-선 현미경의 배율은 연 x-선 검출기와 마이크로 존 플레이트와의 거리의 변화에 의하여 변경되며, 1,000배의 배율에서 마이크로 존 플레이트와 연 x-선 검출기 간의 거리는 835 mm이다.

## 2. 금 나노입자 합성

금 나노입자의 합성과정은  $\text{NaBH}_4$ 를 환원제를 사용하여  $\text{Au}^{3+}$  이온을  $\text{Au}^0$ 로 환원시켜 금 나노입자 콜로이드( $\phi$  5 nm)를 제조하였다. 금 나노입자의 세포에 대한 독성을 방지하기 위하여, 황(S) 원자가 금(Au) 원자와 잘 결합하는 성질을 이용하여 -SH (Sulfhydryl) 작용기를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol: PEG)을 캡핑제(capping agent)로 사용하였으며, PEG와 금 나노입자 콜로이드와 반응시켜 직경 9 nm의 PEG가 캡핑된 금 나노입자를 Cai et al. (2007)



**Fig. 3.** Schematic diagram for a sample holder and cultured cells treated gold nanoparticles on  $\text{Si}_3\text{N}_4$  membrane.

이 개발한 방법을 이용하여 제조하였다.

### 3. 금 나노입자의 x-선 특성검사

합성한 금 나노입자가 연 x-선 영역에서 나타낼 수 있는 영상의 대조도를 확인하기 위하여, x-선에 의한 투과율과 흡수길이를 평가하고자 하였다. 공개된 시뮬레이션 프로그램 (<http://www-cxro.lbl.gov>)을 이용하여 금 나노입자와 단백질의 '물의 창' 영역의 x-선에 대한 투과율을 알아보았다. 단백질 모델은  $\text{C}_{94}\text{H}_{139}\text{N}_{24}\text{O}_{31}\text{S}$ 의 화학식을 갖는 것으로 하였다. 2.88 nm 파장에서 단백질과 금 나노입자의 x-선 흡수길이를 평가하였고, 또한 금 나노입자의 군집의 크기에 따른 2.88 nm 파장에 대한 투과율을 평가하였다.

### 4. 세포시료 제작

세포시료는 *Coscinodiscus oculoides* (diatome)와 적혈구를 이용하였으며, 다이아몬드를  $10^4/\text{mL}$ 의 농도로  $\text{Si}_3\text{N}_4$  박막 ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )에 100  $\mu\text{L}$  떨어뜨린 후 공기 중에서 건조하였다. 적혈구 시료는 생쥐의 눈으로부터 채혈한 적혈구를 생리식염수로 3회 세척한 후 젤라틴으로 코팅된  $\text{Si}_3\text{N}_4$  박막 ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ )에  $10^4$  RBC/mL의 농도로 100  $\mu\text{L}$ 로 올린 후, 100%, 4°C의 메탄올로 5분간 고정 후 증류수로 세척한 다음 공기 중에서 건조하였다.

### 5. 금 나노입자 포획 세포시료 제작

세포를 배양하기 위한 시료 플레이트는  $5 \times 5 \text{mm}^2$  크기의 실리콘 플레이트의 중심부에  $1 \times 1 \text{mm}^2$  크기의  $\text{Si}_3\text{N}_4$  박막으로 이루어져 있다 (Fig. 3). 세포는 증식속도 및 소형 연 x-선 현미경의 가시영역의 크기를 고려하여 HT1080과 MDA-MB 231을 선정하였다. HT1080 세포는 American Type Culture Collection (ATCC) 타입으로서 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 4 mM L-글루타민(1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucoso, 10% fetal bovine serum)를 사용하였고, MDA-MB 231 세포는 American Type Culture Collection (ATCC) 타입이며, 배양액은 RPMI Medium 1640에 4 mM

L-글루타민(1.5 g/L sodium bicarbonate, 25 mM HEPES buffer, 10% fetal bovine serum)를 이용하였으며, 시료 플레이트는 70% 에탄올로 멸균 처리하였고, 세포가 잘 부착될 수 있도록  $\text{Si}_3\text{N}_4$  박막 표면을 1 mg/mL 젤라틴으로 처리한 다음 12-well culture plate에 넣고 세포시료를 약  $1 \times 10^4$  개씩 넣어 0.5% 이산화탄소를 공급하였고, 습도 20%, 온도 37°C의 배양기에서 3일간 배양하였다. 이후 각각의 배양액에 PEG가 캡핑된 금 나노입자 (Core  $\phi$  5 nm,  $\phi$  9 nm)를 0.1 mol/L씩 첨가한 후, 15시간 배양하여 세포의 내포작용이 충분히 발생되도록 하였다 (Fig. 3). 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 세척하고 4°C의 메탄올 용액을 3분간 처리하여 세포를 고정한 후, 공기 중에서 건조하였다.

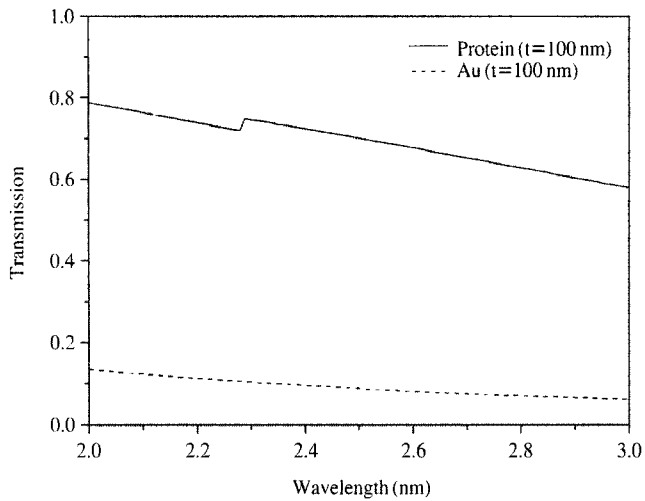
### 6. 광학현미경 및 투과전자현미경 관찰

세포시료를 연 x-선 현미경으로 관찰하기 전에 광학현미경 (CAMSCOPE, Seoul, Korea)으로 세포의 위치와 구조를 관찰하였다. 연 x-선 현미경으로 영상획득 후 금 나노입자의 세포 내 위치를 확인하고자 투과전자현미경 영상을 획득하였다. 이를 위해 금 나노입자가 포획된 MDA-MB 231 세포를 2.5% glutaraldehyde로 1시간 동안 1차 고정된 후 1%  $\text{OSO}_4$ 로 2시간 동안 2차 고정하여, 에탄올과 아세톤으로 세포를 건조한 후 Resin을 이용하여 4일 동안 embedding하여 블록을 완성하였다. Ultra microtome을 이용하여 약 200 nm의 두께로 절편화 하였으며 100 mesh 구리 grid에 절편을 올린 후 3시간 동안 건조하여 수분을 제거하고, Uranyl acetate와 lead citrate로 전자 염색한 후 건조하였다. 투과전자현미경은 H-7600 (HITACH, Japan)을 이용하였다.

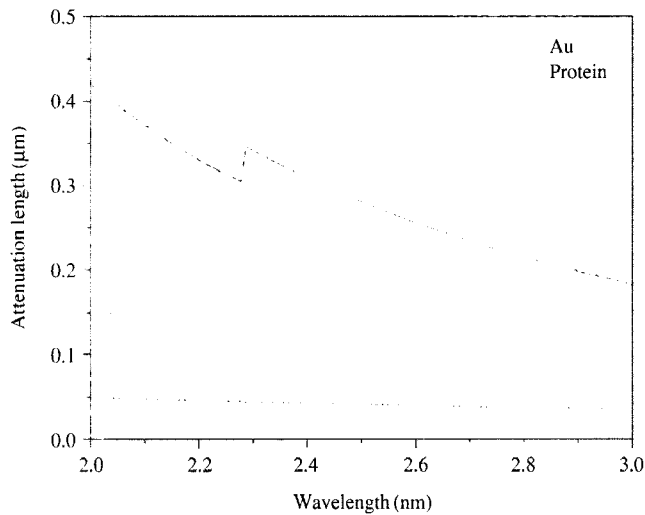
## 결 과

### 1. 금 나노입자의 연 x-선 특성

금 나노입자가 연 x-선 영역에서 나타낼 수 있는 영상의 대조도를 확인하기 위하여 '물의 창' 영역에서의 100 nm 두께의 금 나노입자와 단백질과의 x-선 투과율을 시뮬레이션

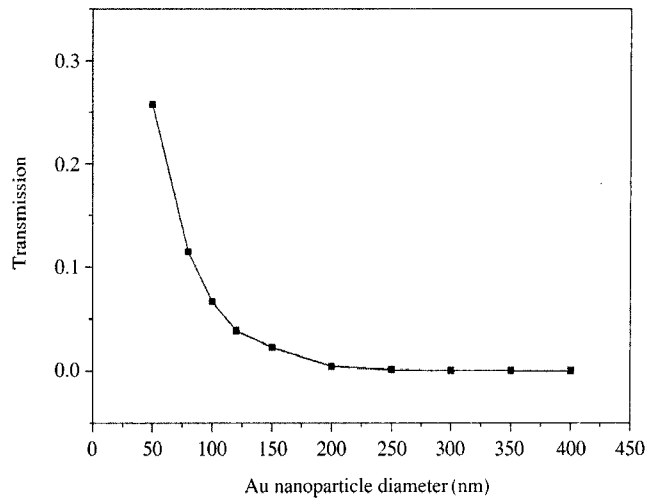


**Fig. 4.** Transmission of soft x-ray for gold nanoparticles and protein with 100 nm thickness, respectively.



**Fig. 5.** Attenuation length of soft x-ray for gold nanoparticle and protein.

한 결과, 2.88 nm 파장에서 100 nm 두께의 금 나노입자의 투과율이 같은 두께의 단백질에 비하여 약 7배 이상 투과율이 적어 영상에 대조도를 크게 나타낼 수 있음을 확인하였다(Fig. 4). 단백질과 금 나노입자의 x-선 흡수길이에 관한 시뮬레이션 결과, 2.88 nm 파장에서 금 나노입자의 흡수길이는 약 37 nm, 단백질의 흡수길이는 약 0.2 μm였다(Fig. 5). 흡수길이가 짧을수록 연 x-선이 쉽게 흡수되어 영상에서 대조도가 크게 나타나게 됨을 알 수 있다. 즉, 직경 37 nm의 크기에서도 세포 구성 물질과 투과되는 x-선의 차이가 커서 충분한 대조도를 갖는 것으로 평가되었으며, 또한 크기가 수십 nm 이하의 금 나노입자라도 연 x-선 영상에서는 세포의 주요 구성 물질인 단백질에 비하여 큰 대조도를 갖는 것으로 평가되었다.



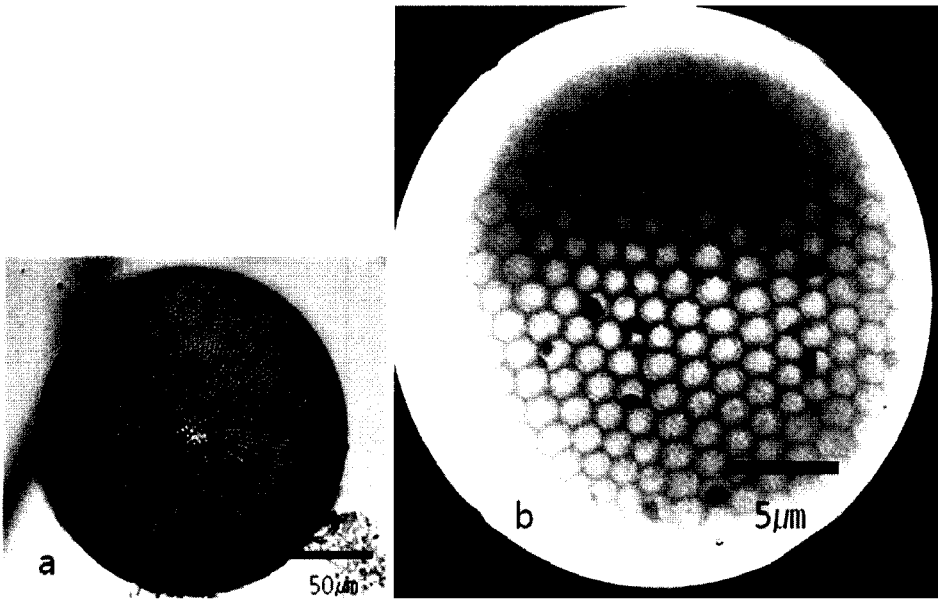
**Fig. 6.** Transmission of 2.88 nm x-ray wavelength according to the size distribution of aggregated gold nanoparticles.

금 나노입자의 균집직경에 따른 2.88 nm 파장에서의 x-선 투과율을 평가한 결과 약 60 nm 직경 이상의 금 나노입자 균집은 x-선의 투과율이 매우 낮아 영상에서 대조도를 충분히 나타낼 수 있었다. 또한, 금 나노입자의 균집의 크기가 200 nm 이상 증가됨에 따라 금 나노입자의 x-선 투과율은 급격히 감소하였으며, 그 이상의 크기에서는 투과율의 변화가 거의 없음을 확인하였다. 그러나 금 나노입자 균집의 크기가 50 nm 이하로 작아지는 경우에는 투과율이 급격히 증가되어 대조도가 감소하게 될 것으로 평가되었다(Fig. 6).

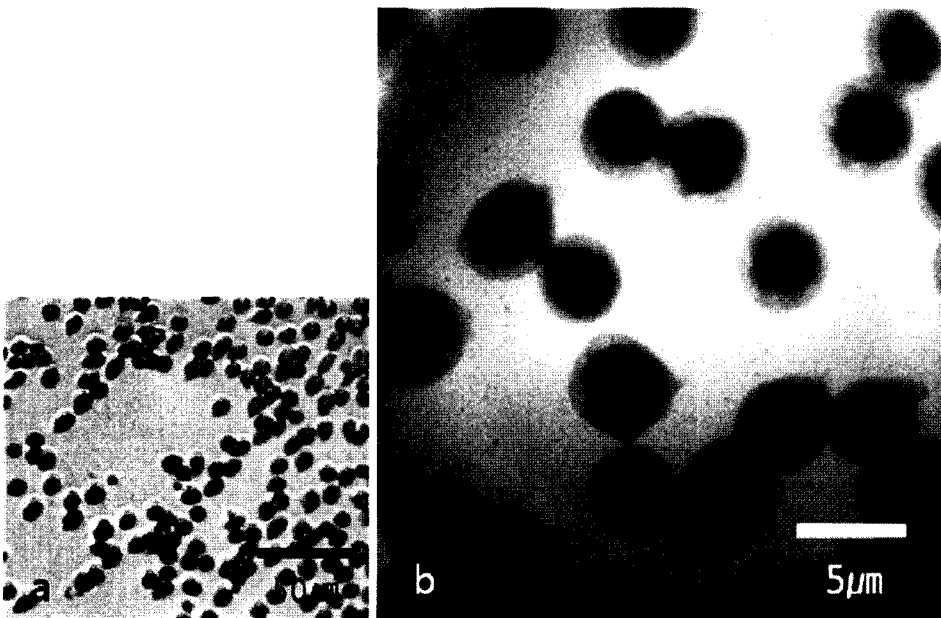
## 2. 세포 영상

다이하툼은 세포막이 규산질로 이루어져 있어 연 x-선의 흡수율이 높고 세포막이 특정한 형태를 가지고 있어 연 x-선 현미경의 의해 관찰이 용이한 세포시료이다. 이에 연 x-선 현미경으로 다이하툼을 520배의 배율로 5분간 노출하여 영상을 획득하였을 때 광학현미경에서 구별할 수 없었던 세포벽의 구조와 세포벽의 두께를 명확하게 확인할 수 있으며, 세포벽의 결합구조도 확인할 수 있는 영상을 획득하였다(Fig. 7). 다이하툼 세포막의 두께가 약 200 nm 정도로 측정되었고, 육각모양의 내부구조의 직경은 약 1~2 μm 정도로 다양하게 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 다이하툼을 파괴하지 않고 완전한 상태의 투과영상을 얻음으로써 육각구조 내부의 형태도 확인할 수 있었다. 이는 전자현미경을 이용하여 영상을 획득할 시에는 다이하툼을 100 nm 이하의 두께로 절편화하는 과정에서 세포벽을 제외한 부분이 파괴되어 얻을 수 없는 영상으로서 다이하툼을 파괴하지 않은 상태에서 얻을 수 있는 영상이다.

생쥐의 적혈구 영상은 460배의 배율과 10분의 노출시간



**Fig. 7.** Images of a diatom (*Coscinodiscus oculooides*) using a visible light microscope (a,  $\times 600$  magnification) and a compact soft x-ray microscope (b,  $\times 520$  magnification).



**Fig. 8.** Images of mouse red blood cells using a visible light microscope (a,  $\times 600$  magnification) and a compact soft x-ray microscope (b,  $\times 460$  magnification).

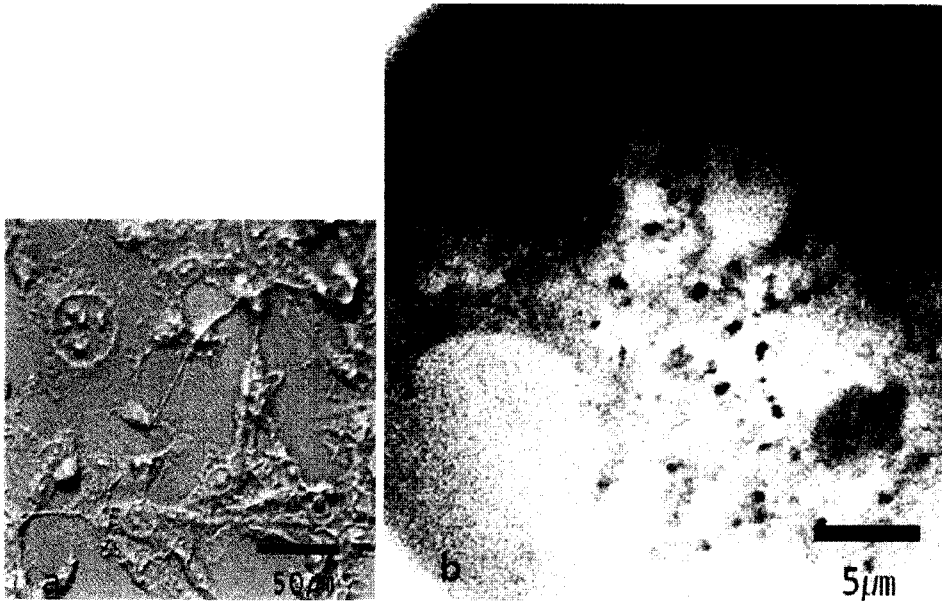
으로 획득하였다(Fig. 8). 적혈구영상은 적혈구의 중심보다 바깥쪽의 구성 물질의 연 x-선에 대한 흡수율이 작아, 충분한 대조도를 갖는 영상을 획득하기 위하여 노출시간을 증가하였다. 적혈구는 핵이 없는 세포로서 적혈구 중심부에는 철이 많이 포함되어 있으므로 적혈구 중심은 연 x-선의 투과율이 낮아 내부구조가 명확히 구분되지 않는 것으로 보였다. 그러나 적혈구 바깥쪽의 부분은 명확하게 형태를 관찰할 수 있었다.

### 3. 금 나노입자 포획 세포 영상

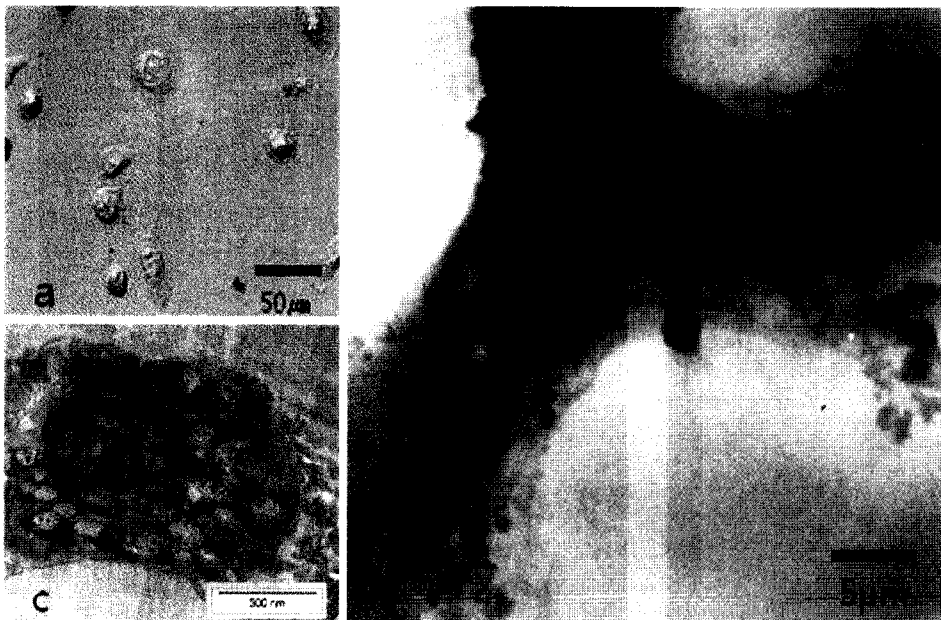
금 나노입자가 포획된 HT1080 세포의 영상을 획득하기

위하여 520배의 배율로 10분간 노출하였다(Fig. 9). 가시영역은  $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ 이고, 세포내의 약 200 nm 이하 크기의 금 나노입자는 가시광 현미경의 회절한계 때문에 관찰이 어렵지만 연 x-선 현미경 영상에서는 연 x-선 현미경의 고분해능(60 nm)과 금 나노입자의 연 x-선 대한 높은 대조도에 의하여 금 나노입자 군집의 크기 및 위치를 확인 할 수 있었다.

Fig. 10의 (b)는 금 나노입자를 포획한 MDA-MB 231 세포영상으로 노출시간은 10분, 배율 460배, 가시영역은  $35 \times 35 \mu\text{m}^2$ 이다. Fig. 9의 (b)에 비하여 레이저 플라즈마에 의해 단위 펄스당 발생된 광량이 증가하여 영상의 대조도가 높아져 명확하게 세포형태 및 금 나노입자의 군집들을 관찰



**Fig. 9.** Images of HT1080 cells engulfed gold nanoparticles using a visible light microscope (a,  $\times 600$  magnification) and a compact soft x-ray microscope (b,  $\times 520$  magnification).



**Fig. 10.** Images of MDA-MB 231 cells engulfed gold nanoparticles using a visible light microscope (a,  $\times 40$  magnification), a compact soft x-ray microscope (b,  $\times 460$  magnification). A transmission electron microscope image shows gold nanoparticles in the vesicles of the same cell (c,  $\times 10,000$  magnification).

할 수 있었다. 이는 시료에 조명되는 광량이 증가됨에 따라 영상의 분해능 및 대조도가 증가하기 때문이다. 획득된 영상에서 금 나노입자 군집의 크기는 약 직경 60 nm까지 구별이 가능하였고 이는 연 x-선 현미경의 분해능이 460배에서 최대 60 nm까지의 분해능을 갖기 때문이다. 세포내의 포획된 금 나노입자의 군집은 다양한 형태와 크기로 형성됨을 연 x-선 현미경 영상을 통하여 확인할 수 있었다. Fig. 10의 (c)는 세포내부의 액포에 금 나노입자가 포획된 상태를 확인하기 위하여 MDA-MB 231 세포를 200 nm 두께로 절편화하여 투과전자현미경(배율: 10,000배, 가시영역:  $1.5 \times 1.0 \mu\text{m}^2$ )을 이용하여 획득한 영상으로서 세포내부의 액포에 금 나노입자가 포획되어 있음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

본 논문에서는 2.88 nm 파장을 광원으로 사용하는 소형 연 x-선 현미경을 이용하여 금 나노입자가 포획된 세포의 영상을 약 60 nm의 분해능으로 획득하였다. 가시광선현미경은 세포를 파괴하지 않은 상태에서 관찰이 가능하나, 가시광의 회절한계와 세포내부를 관찰할 수 없기 때문에 세포내에 포획된 금 약 200 nm 이하의 나노입자는 확인할 수 없으며, 또한 전자현미경의 경우에는 수 백 nm 이하로 세포를 절편화해야만 영상을 얻을 수 있었다. 그러나 연 x-선 현미경은 세포를 파괴하지 않은 상태에서 영상을 획득할 수

있었으며, 이는 금 나노입자의 연 x-선의 대한 높은 흡수율에 의한 조영효과와 연 x-선의 세포에 대한 높은 투과율과 짧은 파장에 의하여 두꺼운 시료에서도 수 십 nm의 분해능으로 내부구조를 확인할 수 있기 때문이다. Fig. 9와 10에서 명확하게 관찰할 수 있는 금 나노입자 군집의 크기는 약 60 nm 이상이었다. 이는 현재 460배의 배율에서의 소형 연 x-선 현미경의 분해능이 약 60 nm 정도이기 때문에 그 이하의 금 나노입자의 군집의 크기는 관찰이 어려운 것으로 판단된다. 금 나노입자를 캡핑한 PEG는 2.88 nm의 파장에서 흡수길이가 650 nm로 금 나노입자의 흡수길이 37 nm에 비하여 매우 길어 세포 영상에서는 대조도가 거의 나타나지 않는다. 따라서 연 x-선에 조영효과 일으키는 것은 금 나노입자 크리스탈( $\phi$  5 nm)이며 가장 작은 군집의 경우 약 6 nm의 크기로 보이는 것으로 보아 금 나노입자가 10개 이상 모여 있는 것으로 판단되었다. 본 연구에서 포획된 금 나노입자의 수가 많을수록 금 나노입자의 두께에 따른 시물레이션 결과와 동일하게 획득된 세포영상에서도 대조도가 증가됨을 확인할 수 있었다.

MDA-MB 231 세포의 투과전자현미경 영상에서 액포 및 액포내의 금 나노입자는 소형 연 x-선 현미경에 비하여 고분해능으로 매우 명확하게 구별할 수 있으나 미세기관은 명확하게 구별되지는 않았다. 이는 세포를 약 200 nm 정도의 두께로 절편화하였기 때문에 전자현미경의 단점인 전자선의 낮은 투과율로 인하여 시료의 두께가 200 nm 이상이 되면 세포내부를 명확하게 관찰할 수 없음을 의미한다. 이에 비하여 연 x-선 현미경은 투과전자현미경에 비해 분해능은 낮으나 x-선의 높은 투과율에 의해 세포전체를 투과하여 관찰이 가능함을 확인할 수 있었다.

현재 소형 연 x-선 현미경으로 획득된 영상은 세포를 고정 후 수분을 제거한 상태이다. 이는 살아있는 상태의 세포와 형태 및 구조가 완벽하게 일치하지는 않으므로 살아있는 상태에서의 영상을 획득해야만 정확한 세포의 구조를 관찰할 수 있을 것으로 판단된다. 이를 위해서는 수분이 포함되어 있는 세포를 진공상태에서 건조되지 않도록 수분을 유지할 수 있는 시료홀더가 필요하다. 그러나 시료홀더는  $\text{Si}_3\text{N}_4$  박막이 추가되므로 광량의 증가가 필요하고, 이는 세포시료가 노출된 x-선에 의한 손상을 가져올 수 있으므로 이를 방지하기 위하여 적은 광량으로도 영상에 대조도를 증가시킬 수 있는 위상차에 의한 영상획득이 가능한 대물광학소자인 마이크로 존 플레이트가 필요하다. 근래에 들어 위상증폭과 결상을 하나의 광학소자에서 구현하여 위상차 영상획득이 가능함을 보여주는 연구가 방사광 가속기의 경 x-선 현미경(Wilhein et al., 2001; Fabrizio et al., 2003) 및 소형 연 x-선 현미경에서 이루어지고 있다(Vogt et al., 2005). 따라서 적은 광량으로도 대조도가 향상되어 방사선에 의한 시료의 손상을 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

방사광을 광원으로 하는 연 x-선 현미경에서는 금 나노입자를 먼역표지방법으로 세포핵 표면의 핵공을 형성하는 단백질에 표지하여 세포시료를 손상시키지 않고 수십 nm의 분해능으로 영상화 하였고 x-선에 낮은 대조도를 나타내는 세포내의 미세소관의 영상을 획득하였다(Meyer-Ilse et al., 2001). 따라서 소형 연 x-선 현미경을 이용하여 세포내 특정 단백질에 금 나노입자를 표지하거나 세포의 기능을 이용하여 세포내의 미세기관에 금 나노입자를 전달하면, 금 나노입자가 x-선 영상에서 큰 대조도를 나타내어 세포내 특정 미세기관 및 단백질의 위치, 형태, 기능 등을 세포를 파괴하지 않은 상태로 관찰할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 연 x-선 현미경이 투과형 영상을 얻기 때문에 투과 방향에 따른 표적자인 금 나노입자의 위치를 정확하게 파악할 수 없는 단점이 있다. 이의 해결하기 위해서는 획득된 투과영상에서 투과길이에 따른 금 나노입자의 대조도를 분석할 수 있어야 한다. 이는 획득 영상의 대조도 분석 알고리즘으로 해결이 가능할 것으로 판단되며, 이를 위한 분석 알고리즘에 대한 연구가 진행되었다(Stollberg et al., 2007). 이와 함께 3차원 토모그래피(Weiß et al., 2001; Larabell et al., 2004)를 이용하게 되면 세포내부의 미세기관 및 특정 단백질의 위치를 3차원으로 정확히 확인할 수 있어 세포의 기능 및 세포 내 각각의 미세기관의 구조와 기능 연구에 많은 활용이 가능할 것으로 보인다.

결론적으로 본 논문에서는 2.88 nm 파장의 연 x-선을 광원으로 하는 소형 연 x-선 현미경으로 직경 9 nm의 금 나노입자를 배양액에 처리하여 세포의 세포작용에 의해 금 나노입자를 포획한 HT1080 세포와 MDA-MB 231 세포를 절편화 하지 않고 약 60 nm의 분해능을 갖는 세포영상을 획득하였다. 세포에 대한 독성을 제거하기 위하여 PEG를 캡핑한 금 나노입자는 세포내에서 2.88 nm 파장의 연 x-선에 대하여 충분한 조영효과를 나타내어 세포영상에서 명확한 대조도를 나타내었다. 또한 액포에 포함 되어 있는 다양한 크기의 금 나노입자 군집을 확인하였으며, 세포 내부의 액포의 분포상태도 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 금 나노입자를 적용한 소형 연 x-선 현미경은 살아있는 세포에서 나노해상도의 공간분해능을 갖는 세포영상의 획득이 가능함을 보여주는 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

- Abraham-Peskir J, Chantler E, McCann C, Medenwaldt R, Ernst E: Ultrastructure of human sperm using x-ray microscopy. *Med Sci Res* 26 : 663-667, 1998.
- Attwood DT: Soft x-rays and extreme ultraviolet radiation. Cambridge University Press, Cambridge, p. 2, 1999.
- Berglund M, Rymell L, Peuker M, Wilhein T, Hertz HM: Compact



- water-window transmission x-ray microscopy. *J Microsc* 197 : 268-273, 2000.
- Cai QY, Kim SH, Choi KS, Kim SY, Byun SJ, Kim KW, Park SH, Juhng SK, Yoon KH: Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice. *Invest Radiol* 42 : 797-806, 2007.
- Chao W, Harteneck BD, Liddle JA, Anderson EH, Attwood DT: Soft x-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. *Nature* 435 : 1210-1213, 2005.
- Fabrizio ED, Cojoc D, Cabrini S, Kaulich B, Susini J, Facci P, Wilhein T: Diffractive optical elements for differential interference contrast x-ray microscopy. *Opt Exp* 11 : 2278-2288, 2003.
- Faulk WP, Taylor GM: An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochem* 8 : 1081-1083, 1971.
- Hoshino M, Aoki S: Laser plasma soft x-ray microscope with Wolter mirrors for observation of biological specimens in air. *Jpn J Appl Phys* 45 : 989-994, 2006.  
<http://www-cxro.lbl.gov>.
- Kim KW, Kwon YM, Nam KY, Lim JH, Kim KG, Chon KS, Kim BH, Kim DE, Kim JG, Ahn BN, Shin HJ, Seungyu Rah SY, Kim KH, Chae JS, Gweon DG, Kang DW, Kang SH, Min JY, Choi KS, Yoon SE, Kim EA, Namba Y, Yoon KH: Compact soft x-ray transmission microscopy with sub-50 nm spatial resolution. *Phys Med Biol* 51 : 99-107, 2006.
- Larabell CA, Le Gros MA: X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution. *Mol Biol Cell* 15 : 957-962, 2004.
- Meyer-Ilse W, Hamamoto D, Nair A, Lelievre SA, Denbeaux G, Johnson L, Pearson AL, Yager D, Legros MA, Larabell CA: High resolution protein localization using soft x-ray microscopy. *J Microsc* 1201 : 395-403, 2001.
- Nakayama S, Haramura K, Zeng GM, Daido H, Nakatsuka M, Nakai S, Katakura N, Nagata H, Aritome H: Zone plate x-ray microscope using a laser plasma source. *Jpn J Appl Phys.* 33 : 1280-1282, 1994.
- Scherfeld D, Schneider G, Guttman P, Osborn M: Visualization of cytoskeletal elements in the transmission x-ray microscope. *J Stru Biol* 123 : 72-82, 1998.
- Son JS, Cho M, Kim DH: Prepulse effect on laser-induced water-window radiation from a liquid nitrogen jet. *Appl Phys Lett* 90 : 261520, 2007.
- Stollberg H, Guttman P, Takman PAC, Hertz HM: Size-selective colloidal-gold localization in transmission x-ray microscopy. *J Microscopy* 225 : 80-87, 2007.
- Takman PAC, Stollberg H, Johansson GA, Holmberg A, Lindblom M, Hertz HM: High-resolution compact x-ray microscopy. *J Microsc* 223 : 175-181, 2007.
- Vogt U, Lindblom M, Jansson PAC, Tuohimaa TT, Holmberg A, Hertz HM: Single-optical-element soft-x-ray interferometry with a laser-plasma x-ray source. *Opt Lett* 30 : 2167-2169, 2005.
- Weiß D, Schneider G, Vogt S, Guttman P, Niemann B, Rudolph D, Schmahl G: Tomographic imaging of biological specimens with the cryo transmission x-ray microscope. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A* 467-468 : 1301-1311, 2001.
- Wilhein T, Burkhard K, Fabrizio ED, Romanato F: Differential interference contrast x-ray microscopy with submicron resolution. *Appl Phys Lett* 78 : 2082-2084, 2001.

#### < 국문초록 >

연 x-선 현미경은 '물의 창' 영역(2.3~4.4 nm)의 파장을 이용하여, 수십 nm의 분해능으로 세포를 파괴하지 않고 살아있는 상태에서 세포의 내부구조를 관찰할 수 있어 가시광선현미경과 전자현미경을 단점을 보완하는 특징을 갖는 세포 생물학 연구에 적합한 현미경이다. 그러나 기존 연 x-선 현미경은 광원으로 방사선 가속기를 이용하기 때문에 사용이 제한적이었다. 이에, 본 연구에서는 2.88 nm의 연 x-선을 광원으로 사용하는 소형 연 x-선 현미경을 이용하여, 내포작용에 의해 금 나노입자를 포획한 HT1080과 MDA-MB 231 세포의 영상을 약 60 nm 분해능으로 획득하였다. 금 나노입자의 세포에 대한 독성을 제거하기 위하여 폴리에틸렌 글리콜을 캡핑하였고, 2.88 nm 파장의 연 x-선에 대하여 충분한 조영효과로 인하여 세포영상에서 뚜렷한 대조도를 나타내었다. 내포작용에 의해 액포에 포함되어 있는 다양한 크기의 금 나노입자 군집을 확인하였으며, 세포내부의 액포의 분포상태도 관찰할 수 있었다. 따라서 고분해능을 가진 소형 연 x-선 현미경을 이용하여 금 나노입자를 세포내의 미세기관이나 특정 단백질에 표지하면 연 x-선에 대한 조영효과의 증가에 의하여 더욱 유용한 정보를 획득할 수 있을 것으로 생각한다.