

전계방사형 주사전자현미경에 의한 연속블록면 이미징

김 기 우*

경북대학교 생태환경시스템학부

Serial Block-Face Imaging by Field Emission Scanning Electron Microscopy

Ki Woo Kim*

School of Ecology and Environmental System, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

(Received August 25, 2011; Revised September 21, 2011; Accepted September 22, 2011)

ABSTRACT

Backscattered electrons (BSE) are generated at the impact of the primary electron beam on the specimen. BSE imaging provides the compositional contrast to resolve chemical features of sectioned block-face. A focused ion beam (FIB) column can be combined with a field emission scanning electron microscope (FESEM) to ensure a dual (or cross)-beam system (FIB-FESEM). Due to the milling of the specimen material by 10 to 100 nm with the gallium ion beam, FIB-FESEM allows the serial block-face (SBF) imaging of plastic-embedded specimens with high z-axis resolution. After contrast inversion, BSE images are similar to transmitted electron images by transmission electron microscopy. As another means of SBF imaging, a specialized ultramicrotome has been incorporated into the specimen chamber of FESEM (3View®). Internal structures of plastic-embedded specimens can be serially revealed and analyzed by 3View® with a large field of view to facilitate three-dimensional reconstruction. These two SBF approaches by FESEM can be employed to unravel spatial association of (sub)cellular entities for a comprehensive understanding of complex biological systems.

Keywords : 3View, Focused ion beam, Serial block-face, Tomography

서 론

전자현미경에서는 전자빔 (electron beam)이 시료와 충돌하여 상호작용을 하면서 다양한 신호가 발생한다. 이 중에서 전자신호로는 주로 이차전자 (secondary electron, SE), 오제이전자 (Auger electron), 후방산란전자 (backscattered electron, BSE)가 해당한다. 특히 BSE는 시료와의 탄성산란에 의하여 발생하고 입사전자와 거의 동일한 수준의 에너지를 갖는다. 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)에서 SE는

주로 시료의 표면 형태 관찰에 활용되고, BSE는 시료의 조성 정보를 획득하는 데 활용된다. BSE는 SE에 비하여 시료의 대전 현상 (charging phenomenon)에 크게 영향을 받지 않으므로 수분을 함유하고 대전 현상이 심한 시료의 관찰에도 유용하게 활용된다 (Kim et al., 2008). 또한 BSE가 형성하는 조성 대비 (compositional contrast)는 금 또는 백금과 같은 전도성 물질로 코팅하지 않은 시료의 관찰 및 조성 분석에 활용된다 (Kim & Jaksch, 2009). 특히 BSE 이미지의 대비 (contrast)를 반전 (inversion)시키면 투과전자현미경 (transmission electron microscope, TEM)의 이미지의 대비와 유사하다 (Fig.

* Correspondence should be addressed to Prof. Ki Woo Kim, School of Ecology and Environmental System, Kyungpook National University, 2559 Gyeongsang-daero, Sangju 742-711, Korea. Ph.: (054) 530-1246, Fax: (054) 530-1248, E-mail: kiwoo@knu.ac.kr

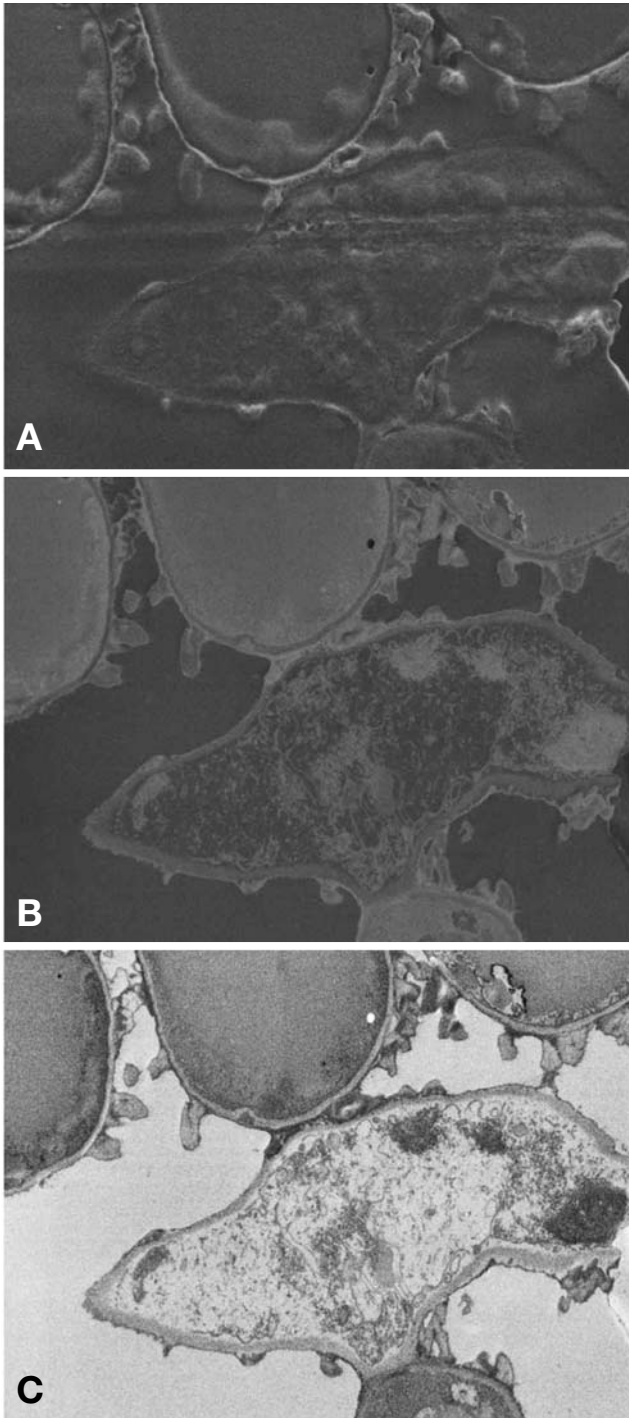


Fig. 1. Comparison of electron images of fungal spores and hyphae. (A) Secondary electron image. (B) Backscattered electron image. (C) Contrast-inverted image of (B). After contrast inversion, the contrast of backscattered electron images is similar to that of transmitted electron images by transmission electron microscopy (Reproduced from Kim & Jaksch, 2009 with permission from the publisher).

1). 이와 같이 BSE를 경우에 따라 적절히 활용하면 시료의 형태 관찰 및 조성 구분이 가능하여 기존의 SE 검출에 주로

국한되었던 SEM의 활용을 더욱 다양하게 극대화할 수 있다.

SEM 제작 기술도 비약적으로 발전하여 전계방사형 주사 전자현미경 (field emission scanning electron microscope, FESEM)이 오래 전부터 분석현장에서 활발히 활용되고 있다. 전자방출 방식과 진공도를 크게 개선시키므로 FESEM에서는 기존의 SEM에 비하여 우수한 해상도가 확보되어 고배율 작업이 원활하게 수행된다. 또한 다양한 전자신호를 검출하도록 장비가 구성되므로 분석 능력이 향상되었다.

시료의 내부 구조를 관찰하기 위하여 TEM을 이용할 경우, 일반적으로 블록(block)을 제작한다. 에пон(Epon)이나 스퍼(Spurr's medium)가 대표적인 에폭시(epoxy) 계열이나 LR White와 같은 아크릴(acrylic) 계열의 수지(resin)를 중합 반응시켜 고형화하므로 블록을 제작한다. 이후 유리칼 또는 다이아몬드칼을 이용하여 절편(section)을 제작한 후 중금속으로 염색하여 TEM으로 관찰한다. 이와 같이 블록으로부터 절편을 제작하여 블록 속에 포매된 시료의 구조를 관찰하는 일반적인 방법 이외에도 SEM을 이용하여 블록을 활용하는 방법이 보고되어 여러 목적으로 활용되고 있다(Denk & Horstmann, 2004; Knott et al., 2008). 본 논문에서는 블록의 다양한 활용과 부가적인 정보의 획득을 위하여 연속블록면(serial block-face)을 이미징(imaging)하는 기법에 대하여 소개하고자 한다.

연속블록면 이미징

전자현미경을 이용하여 시료의 3차원 구조를 관찰하기 위하여 대략 3가지 방법이 활용된다(Fig. 2) (Arenkiel & Ehlers, 2009). (i) 연속절편 투과전자현미경기법(serial-section TEM, SS-TEM): 블록에서 연속적으로 절편을 제작하여 개별 절편을 모두 관찰하는 방법으로서 다수의 절편에서 연속적으로 이미지를 획득해야 하는 실험적인 어려움이 있다. (ii) 연속블록면 주사전자현미경기법(serial block-face SEM, SBF-SEM): 절편을 관찰하는 것이 아니고 연속적으로 블록면을 절삭하고 SEM으로 이미징을 하므로 신속하게 다수의 이미지를 특별한 이미지 배열 과정(alignment)이 없이 획득할 수 있다. (iii) 연속절편 전자단층촬영기법(serial-section electron tomography): SS-TEM 방식보다 두꺼운 절편($0.5 \sim 3 \mu\text{m}$)을 주로 고전압 TEM 등을 이용하여 경사각을 주면서 이미징을 하므로 SS-TEM보다 시간적인 단축을 도모할 수 있다.

보다 구체적으로 SBF-SEM이란, TEM용으로 제작한 블록의 상단면 자체를 연속적으로 z축 방향으로 노출시키며 관찰하는 것을 의미한다. 즉 블록을 주로 FESEM 내부에 고정시킨 후 마치 대패질을 하듯이 계속 블록면을 깎아내면서 블록 표면 자체를 금 또는 백금 등으로 코팅하지 않고 FESEM으로 블록면을 이미징하는 것을 뜻한다. 비교적 넓은 면적

의 부위를 나노 수준에 근접하는 해상도로 자동화하여 이미징할 수 있는 특징을 가지고 있다. 또한 블록과 이미징하는 광학계가 동일 광축상에 배열하므로 개별 이미지의 정렬 작업이 거의 필요 없이 획득 이후 바로 구획화(segmentation) 등 모델링 단계를 수행할 수 있다.

이 방법으로 실험할 경우, 일반적으로 형태를 관찰할 때 사용하는 SE가 아니고 BSE를 검출하여 이미징한다. SE를 검출할 경우, 블록면 자체는 균일하게 평탄면이 되므로 요철에 의한 대비 효과가 매우 적고, 블록 내부에 포매된 시료의 단면 정보 자체를 획득하기에는 적합하지 않다. 또한 전도성 물질로 코팅하지 않으므로 대전 현상이 발생하여 고품질의 이미징에 어려움이 있다. 그러나 BSE를 활용하면 노출된 시료 단면의 조성 정보를 이용하여 대비를 구성할 수 있고, 대전 현상의 영향을 최소화하며 이미징할 수 있다.

실제적으로 삭정(trimming) 과정을 통하여 실험자가 원하는 시료 부위에 근접하거나 노출시킨 후 블록을 FESEM 내부에 장착한다. 이러한 SBF 이미징은 블록면의 절삭 방식에 따라서 현재까지 크게 두 가지 방법으로 수행되고 있다. 즉 (i) 집속이온빔장치(focused ion beam, FIB)를 이용하여 블록면을 절삭하는 방법과, (ii) FESEM 내부에 다이아몬드칼을 장착한 특수한 초박절편기(ultramicrotome)가 구동하며 블

록면을 절삭하는 방식이 활용되고 있다. 후자의 경우, 3View[®]라는 기종명으로 Gatan사에 의하여 상용화되어 있다.

FIB 기반 SBF-SEM

FIB의 기본 기능인 밀링(milling)은 고에너지의 이온빔(ion beam)이 시료 원자의 이탈을 유발하므로 구현된다(Kim et al., 2010). 이로써 블록 표면 이하의 시료가 노출되고 형성된 단면을 FESEM으로 관찰할 수 있다(Fig. 3). 이 방식은 흔히 갈륨(gallium, Ga) 이온빔을 장착한 FIB와 BSE 검출기가 장착된 FESEM을 결합한 이중빔(two-beam) 장치인 FIB-FESEM을 구성하여 운영된다.

이 방식을 이용하면 SBF 이미징의 z축 해상도를 향상시킬 수 있다. 즉 FIB로 블록면을 10 nm 수준까지 절삭할 수 있으므로 일반적으로 다이아몬드칼로 절삭할 수 있는 40~60 nm 수준을 능가할 수 있다. 따라서 블록면과 수직인 z축으로 10 nm 수준으로 절삭 가능하므로 동일한 시료일지라도 다이아몬드 칼로 절삭할 때보다 다수의 블록면을 획득할 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 2006년부터 본격적으로 활용이 시작된 것으로 추정되며(Heymann et al., 2006), 이온연마주사전자현미경기법(ion-abrasion SEM)이라고도 칭한다(Heymann et al., 2009). 실험 비용적인 측면에서 고려할 때, FIB로 절삭한다면 비교적 장시간이 소요되고 Ga 이온 소스가 고가이므로 고비용이 수반된다. 따라서 비교적 좁은 면적의 블록면을 보다 얇은 두께로 절삭하며 이미징

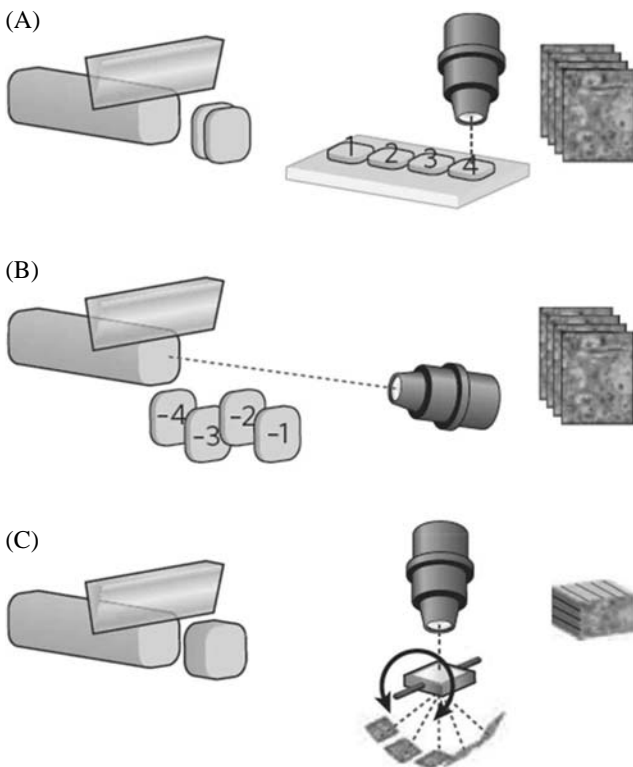


Fig. 2. Schematic diagram of electron tomography. (A) Serial-section TEM. (B) Serial block-face SEM. (C) Serial-section electron tomography (Reproduced from Arenkiel & Ehlers, 2009 with permission from the publisher).

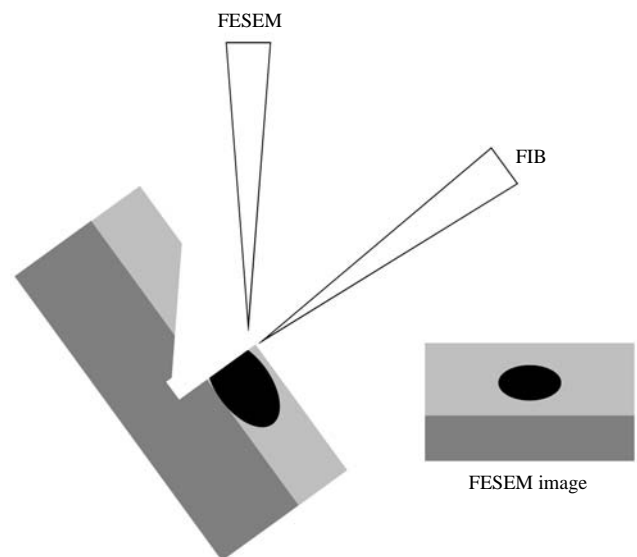


Fig. 3. Schematic diagram of SBF imaging by FIB-FESEM. Specimens are tilted and milled by FIB. The newly exposed block surface is observed by FESEM.

할 때 효과적인 방법이라고 알려져 있다.

3View[®] 기반 SBF-SEM

이 방법은 블록면을 다이아몬드칼로 절삭하는 것으로써 FESEM 내부에 특수한 초박절편기가 장착되어 있는 형태를 갖는다(Fig. 4). 1981년 Leighton의 보고를 시작으로 하여 독일 막스플랑크연구소의 Winfried Denk와 Heinz Horstmann이 구체화하여 2004년에 보고하였다(Leighton, 1981; Denk & Horstmann, 2004). 이후 FESEM에 장착되는 특수 초박절편기 시스템 일체를 3View[®]라는 기종명으로 Gatan사가 상용화하여 보급하고 있다.

TEM용으로 사용하는 초박절편기에서는 절편이 보통 물에 젖게 되지만 이 경우에는 물이 없는 상태에서 블록을 절삭하고 절편은 활용하지 않는다. 블록면 절삭에 수반되는 진공 부하의 증가 문제로 개발 초기부터 주로 저진공(환경형 또는 가변압력형) FESEM에 3View[®]가 장착이 되었지만 현재는 고진공 FESEM에도 장착되어 활용되고 있다.

이 방법은 이전에 소개한 FIB를 이용하는 SBF 이미징에 비하여 보다 넓은 면적을 신속하게 처리할 수 있다는 장점

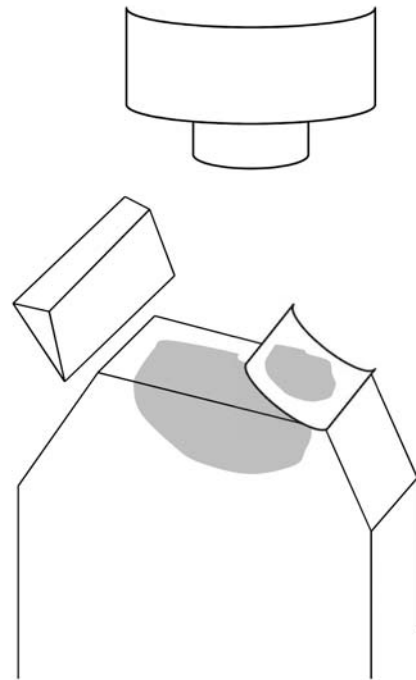


Fig. 4. Schematic diagram of SBF imaging by 3View[®]. Blocks are cut using a specialized ultramicrotome with a diamond knife within FESEM. The newly exposed block surface is observed by FESEM.

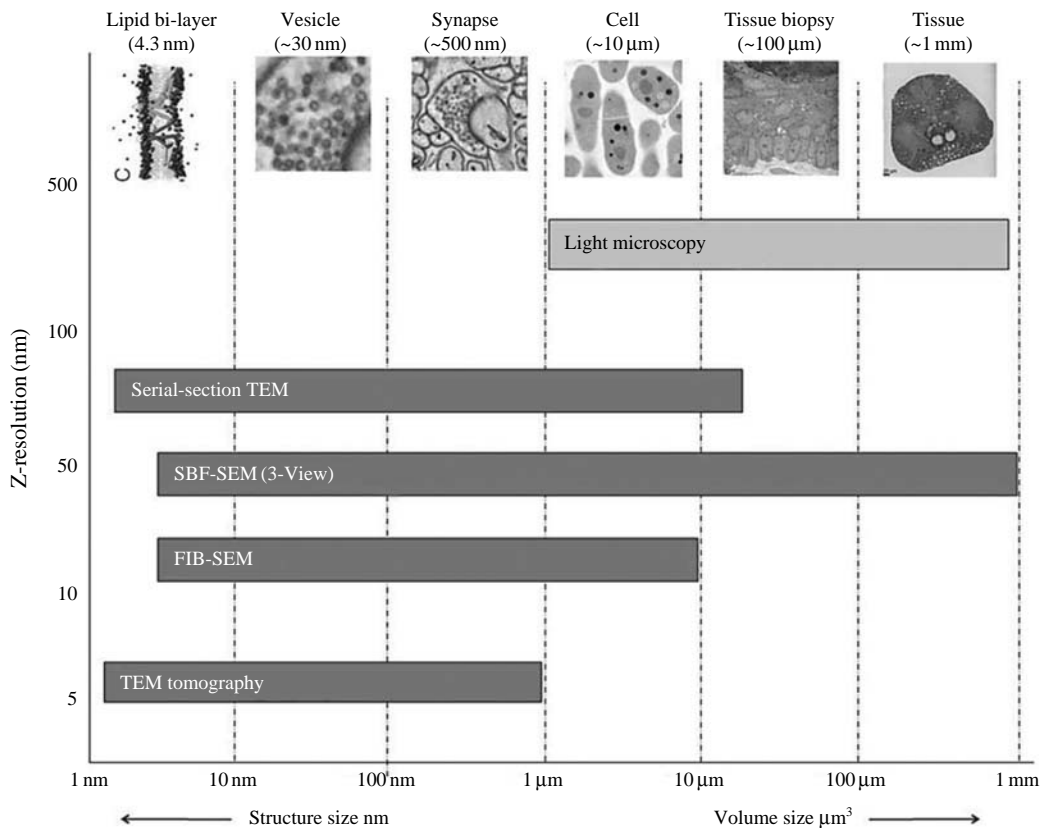


Fig. 5. Comparison of z-resolution of a variety of microscopy. The maximum volume size of 3View[®] is greater than that of FIB-SEM (Reproduced from Müller-Reichert et al., 2010 with permission from the publisher).

을 가지고 있다. 전체 시료에서 대략 $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ 수준의 영역 ($15,625\ \mu\text{m}^3$)을 관찰할 수 있다. 이미징 속도는 경우에 따라서 차이는 있지만 일례로서 400장의 이미지를 6시간 내에 획득한다면 대략 1분 이내에 절삭-이미징 작업이 완료되는 것으로 생각할 수 있다 (Müller-Reichert et al., 2010). 또한 Ga 이온 소스 교체 비용이 다이아몬드칼 교체 비용보다 고가이므로 비교적 저렴한 비용으로 처리할 수 있는 장점도 있다. 하지만 다이아몬드칼로는 FIB만큼 얇게 블록면을 절삭할 수 없는 단점이 있으나 전반적으로 해상도 측면에서 FIB-FESEM 기법과 거의 유사한 것으로도 보고되었

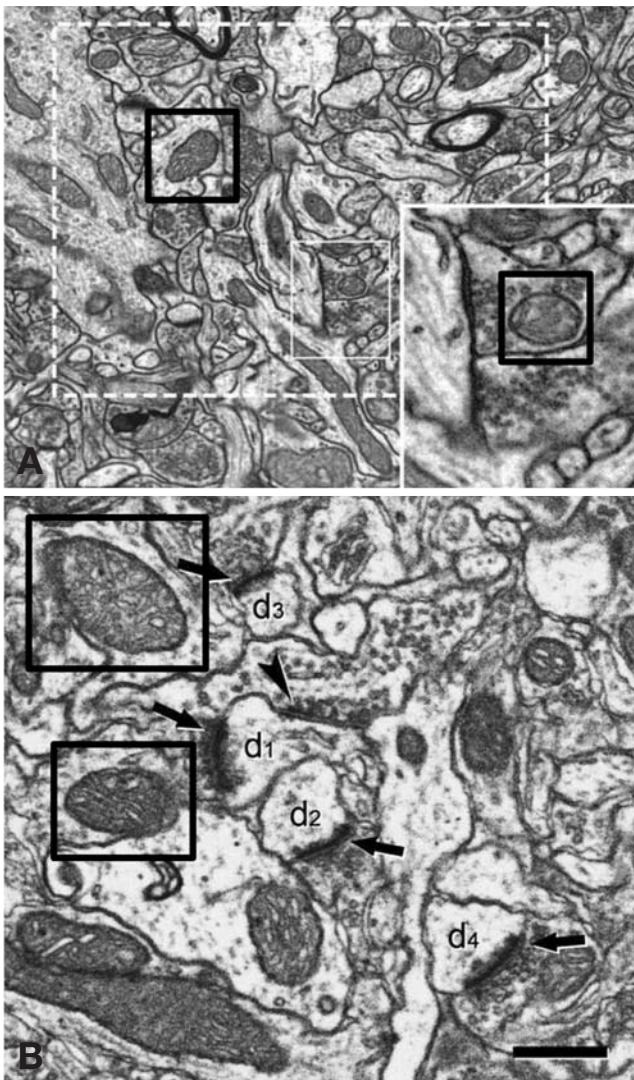


Fig. 6. Comparison of x- and y-resolution of SBF images. (A) BSE image by 3View[®] (Reproduced from Knott et al., 2008 with permission from the publisher). (B) BSE image by FIB-FESEM (Reproduced from Merchán-Pérez et al., 2009 with permission from the publisher). Bar=500 nm. Inlets with thick black lines show that the resolution of both images is sufficient to resolve inner membrane systems of mitochondria.

다 (Fig. 5). 두 기법 모두 세포내 미토콘드리아의 내막 구조를 확인할 수 있을 정도의 해상도를 제공할 수 있다 (Fig. 6).

연속블록면 이미징을 위한 고려 사항

실제로 SBF 이미징 실험을 수행할 때 다음과 같은 몇 가지 사항을 유념할 필요가 있다.

1. 대비 (contrast) 증진

고정을 진행할 때 1~2% osmium tetroxide는 물론이고 이후에 0.1~0.5% uranyl acetate를 추가로 처리하는 ‘en bloc’ 염색과정을 수행한다. 이외에도 ferrocyanide로 환원된 osmium tetroxide 또는 thiocarbohydrazide-osmium tetroxide 등의 방법도 사용한다 (Deerinck et al., 2010). 이로써 세포막, 핵산, 지질 등에 부착되는 오스미움 또는 우라늄과 같은 중금속량의 증가로 BSE의 생성량이 증가하고 이에 따라 대비가 향상된다.

2. 수지 선정 및 고형화

Epon 등 일반적으로 TEM용으로 많이 사용하는 수지도 SBF 이미징에 활용된다. 그러나 Durcupan이라는 수용성 에폭시 수지의 장점이 보고되었다 (Bushby et al., 2011). Durcupan은 전자빔의 대비가 우수하고 FIB에 의한 절삭에 적합한 것으로 알려져 있다 (Bushby et al., 2011). 일반적인 초박절편 작업에서도 블록의 경도가 중요하듯이 SBF 이미징에서도 중요한 요소로 작용한다. 특히 블록의 경도가 낮을 경우에는 다이아몬드칼에 의한 블록면 절삭 작업이 원활하지 않으므로 블록을 오븐에 넣어 두는 등 중합반응을 추가

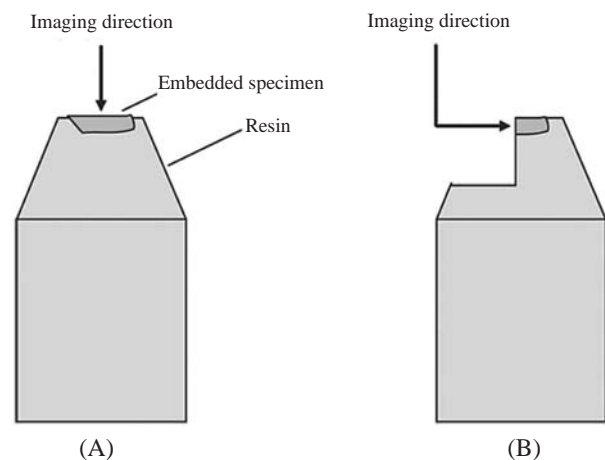


Fig. 7. Schematic diagram of specimen orientation for serial block-face imaging. (A) 3View[®]. (B) FIB-FESEM. The imaging direction of each method is perpendicular with each other (Reproduced from Müller-Reichert et al., 2010 with permission from the publisher).

로 하여 경도를 향상시켜야 한다.

3. 시료 장착 및 삭정

3View[®]로 실험할 경우, 블록에 포매된 시료에서 관심 부

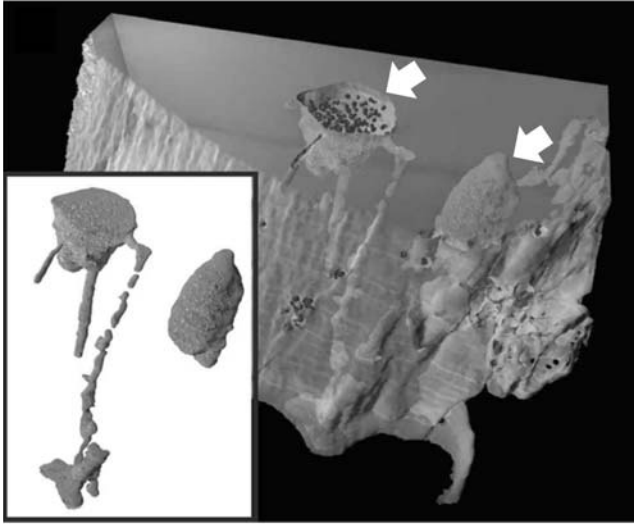


Fig. 8. Three-dimensional reconstruction of an HIV-1 infected macrophage. Virions are found in two internal compartments (arrows) shown in an inlet (Reproduced from Bennett et al., 2009 with permission from the publisher).

위가 충분히 포함되도록 삭정한다. SBF 이미징 실험자체가 z축 방향으로 블록을 절삭하는 것이므로 표면 이하에 존재하는 구조도 z축 방향으로 절삭을 하여도 시야에서 제외되지 않고 포함되도록 완충 구역을 충분히 설정한다. 하지만 FIB로 실험할 경우, 시료와 이온빔과의 배열 구도를 이해하여 블록을 장착하고 관심 부위가 표면 바로 아래에 존재하도록 주변의 블록을 제거한다(Fig. 7).

4. 해상도 설정

일상적으로 세포 소기관의 3차원 구조를 관찰한다면 x-y 픽셀(pixel) 크기는 3 nm이고 10 nm 두께로 블록을 절삭한다. 이 경우에 z축 방향이 고려되었으므로 복셀(voxel)의 개념이 적용되고 그 크기는 $3 \times 3 \times 10$ nm로 규정할 수 있다. 이외에도 시료 특성 및 실험의 목적에 부합하도록 해상도를 설정할 수 있다.

연속블록면 이미징의 활용 사례

현재까지 SBF 이미징을 가장 활발히 활용하는 분야는 신경과학이다. 특히 최근 뇌 연구에서는 개개의 절편을 제작하여 관찰하는 방식에서 벗어나 보다 넓고 큰 부피를 갖는 시료를 고해상도로 신속하게 이미징하여 3차원으로 구현하

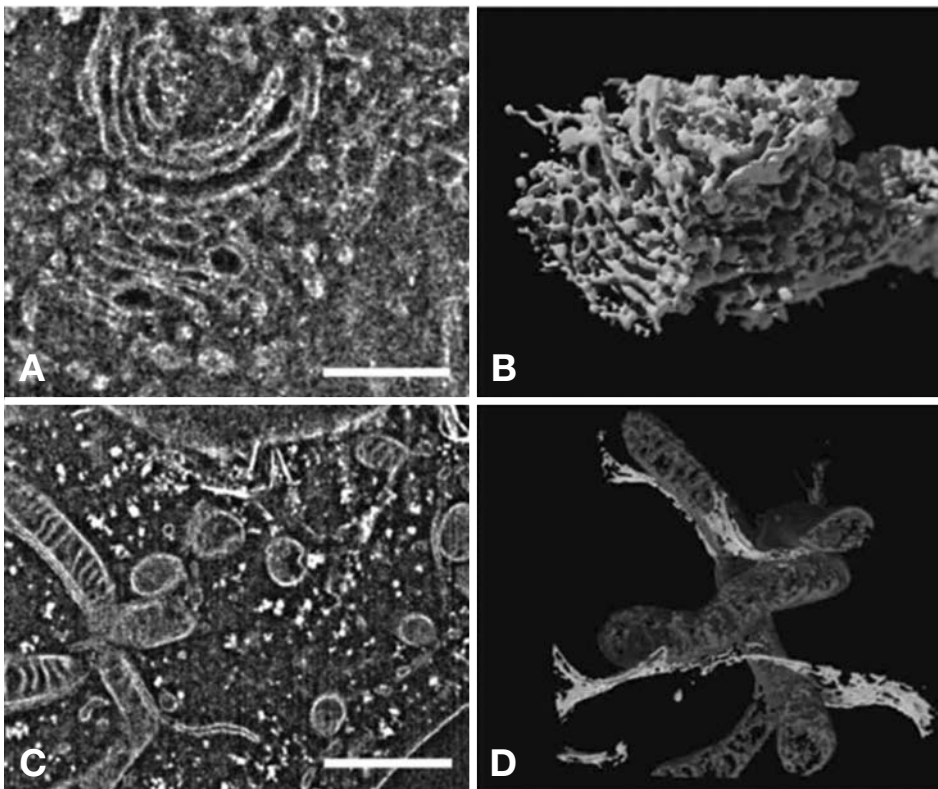


Fig. 9. Mammalian cells. (A and C) Block-face images of MNT-1 melanoma cells. Golgi and mitochondria/endoplasmic reticula are observed in A and C, respectively. (B and D) Three-dimensional reconstruction of Golgi (B) and mitochondria/endoplasmic reticula (D) (Reproduced from Heymann et al., 2009 with permission from the publisher).

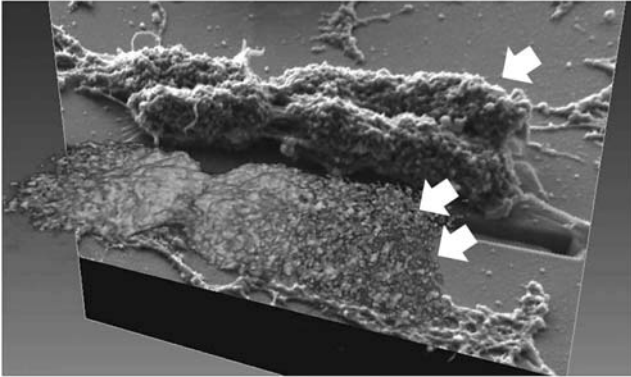


Fig. 10. Barley chromosome. Note an SE image (an arrow) and a three-dimensional reconstructed image (double arrows) of a barely metaphase chromosome (Reproduced from Schroeder-Reiter et al., 2009 with permission from the publisher).

는 것이 핵심이다(Knott et al., 2008). 이 과정에서 수집된 방대한 자료를 처리하고 분석하여 일종의 지도를 작성하는 것 또한 중요한 단계이다(Eisenstein, 2009).

의과학분야에서도 FIB-FESEM을 활용한 시료의 3차원적인 구조를 통하여 병원체와 기주의 상호작용을 규명한다. HIV-1에 의하여 감염된 대식세포 내에 바이러스 입자가 군집을 형성하는 구획이 대식세포 표면까지 연결되는 것이 보고되었다(Fig. 8) (Bennett et al., 2009). 포유류의 세포내 소기관을 FIB-FESEM으로 관찰하여 주변 세포내 소기관과의 공간적인 분포 관계를 연구한 사례도 있다(Fig. 9) (Heymann et al., 2009).

동물 시료 이외에도 식물학 연구에 있어서도 SBF 이미징이 활용되고 있다. 그 중에서 보리의 염색체를 분리하여 3차원 재구성을 한 사례가 보고되었다(Fig. 10) (Schroeder-Reiter et al., 2009). FIB-FESEM으로 획득한 198개의 BSE 이미지를 기초로 염색체 내부에서의 인산화된 히스톤 3 (phosphorylated histone 3)의 위치를 결정하는 데 활용하였다.

현재까지 국내에서는 SBF 이미징이 활발한 상태는 아니고 초기 단계에 있는 것으로 판단된다. 최근에는 이미 국내에 보급되어 활용되고 있는 FIB-FESEM을 의생물 연구에 활용하려는 시도가 본격화되고 있다. 이외에도 3View[®]를 활용한 국내 연구자의 연구 성과도 가시화되고 있다(Mun et al., 2011). 따라서 과거보다 두께 또는 심도 있는 부피(volume)의 정보를 제공하는 부피전자현미경기법(volume electron microscopy)이 향후 보편화될 때 SBF 이미징이 큰 기여를 할 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

Arenkiel BR, Ehlers MD: Molecular genetics and imaging technolo-

- gies for circuit-based neuroanatomy. *Nature* 461 : 900-907, 2009.
- Bennett AE, Narayan K, Shi D, Hartnell LM, Gousset K, He H, Lowekamp BC, Yoo TS, Bliss D, Freed EO, Subramaniam S: Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages. *PLoS Pathog* 5 : e1000591, 2009.
- Bushby AJ, P'ng KMY, Young RD, Pinali C, Knupp C, Quantock AJ: Imaging three-dimensional tissue architecture by focused ion beam scanning electron microscopy. *Nat Protoc* 6 : 845-858, 2011.
- Deerinck TJ, Bushong EA, Lev-Ram V, Shu X, Tsien RY, Ellisman MH: Enhancing serial block-face scanning electron microscopy to enable high resolution 3-D nanohistology of cells and tissues. *Microsc Microanal* 16(Suppl 2) : 1138-1139, 2010.
- Denk W, Horstmann H: Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* 2(11) : e329, 2004.
- Eisenstein M: Putting neurons on the map. *Nature* 461 : 1149-1152, 2009.
- Heymann JAW, Hayles M, Gestmann I, Giannuzzi LA, Lich B, Subramaniam S: Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope. *J Struct Biol* 155 : 63-73, 2006.
- Heymann JAW, Shi D, Kim S, Bliss D, Milne JLS, Subramaniam S: 3D imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy. *J Struct Biol* 166 : 1-7, 2009.
- Kim KW, Baek SG, Park BJ, Kim HW, Rhyu IJ: Applications of focused ion beam for biomedical resarch. *Korean J Microsc* 40 : 177-183, 2010.
- Kim KW, Choi SJ, Moon TW: Backscattered electron imaging for reduced charging of moisturized corn starch granules: Implications for imagery of hygroscopic powder specimens. *Micron* 39 : 1160-1165, 2008.
- Kim KW, Jaksch H: Compositional contrast of uncoated fungal spores and stained section-face by low-loss backscattered electron imaging. *Micron* 40 : 724-729, 2009
- Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B: Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci* 28 : 2959-2964, 2008.
- Leighton SB: SEM images of block face, cut by a miniature microtome within the SEM-a technical note. *Scan Electron Microsc* 2 : 73-76, 1981.
- Merchán-Pérez A, Rodriguez J-R, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J: Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3(Article 18) : 1-14, 2009.
- Mun JY, Jeong SY, Kim JH, Han SS, Kim IH: A low fluence Q-switched Nd:YAG laser modifies the 3D structure of melanocyte and ultrastructure of melanosome by subcellular-selective photothermolysis. *J Elect Microsc* 60 : 11-18, 2011.
- Müller-Reichert T, Mancuso J, Lich B, McDonald K: Three-dimensional reconstruction methods for *Caenorhabditis elegans* ultrastructure. *Meth Cell Biol* 96 : 331-361, 2010.
- Schroeder-Reiter E, Pérez-Willard F, Zeile U, Wanner G: Focused

ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: A promising tool for 3D analysis of chromosome architecture. J Struct Biol 165 : 97-106, 2009.

< 국문초록 >

후방산란전자(BSE)는 입사전자빔이 시료와 충돌하면서 발생한다. BSE 이미징은 시료의 화학적 특성을 구분할 수 있는 조성 대비를 제공한다. 집속이온빔장치(FIB)는 전계방사형 주사전자현미경(FESEM)과 결합할 수 있으므로 이중빔 체계(FIB-FESEM)

가 구현된다. 갈륨(Ga) 이온빔으로 10~100nm 두께로 시료를 절삭할 수 있으므로 FIB-FESEM은 플라스틱으로 포매된 블록의 면을 z축 고해상도를 유지하며 연속적으로 이미징할 수 있다. BSE 이미지의 대비를 반전시키면 투과전자현미경의 이미지와 유사하다. 연속블록면 이미징의 또 다른 방안으로써 특수한 초박절편기가 FESEM 내부에 장착된 것이 3View[®]로 상용화되어 있다. 이로써 플라스틱으로 포매된 시료의 내부 구조를 넓은 면적을 연속적으로 이미징할 수 있으므로 3차원 재구성도 용이하게 된다. 이러한 FESEM에 기반한 두 가지 방식은 복잡한 생물계의 총체적인 이해를 위하여 세포 및 세포 수준 이하의 구조물 간의 공간적 연관성을 규명하는 데 활용될 수 있다.