멀티스케일 이미징을 위한 광전자융합현미경의 개발

DOI: 10.3938/PhiT.27.019

조복래·박인용

Development of a Correlative Light and Electron Microscope for Multi-scale Nano-bioimaging

Boklae CHO and In-Yong PARK

An electron microscope (EM) can easily provide images of structures with nanometer or sub-nanometer scale resolution; furthermore, the properties of materials can be obtained by using an energy dispersive spectrometer. On the other hand, a light microscope (LM) gives both images and color information on species, but the resolution is generally limited to a few hundred nanometers. Recently, a correlative light and electron microscope (CLEM) was introduced to combine the advantages of EM and LM.^[1-3] In this article, we introduce a fluorescence-based CLEM, that allows the user to observe the sample in real-time by using electron and light beams; some experimental results are also given.

들어가는 말

현미경은 크게 광자빔을 사용하는 광학현미경과 전자 빔을 사용하는 전자현미경으로 구분된다. 광학현미경은 컬러 이미지 및 3차원 정보를 볼 수 있지만 일반적으로 수백나노미터 정도의 해상도 한계를 갖는다. 또한 전자현미경은 나노미터(nm)급의 고해상도 정보를 통해 원소단위의 정보를 알 수 있지만, 이미지가 흑백이라는 단점이 있다.

현재 현미경 각각의 기술발전과 함께 각 현미경의 장점과

Fig. 1. A comparison of the concept in Google earth and CLEM.^[5,6]

기능을 다른 기술의 현미경과 융합하여 더 다양한 기능을 동시에 구현하는 융복합 현미경의 기술개발이 대세를 이루고 있다.^[1-4] 전자현미경과 이온현미경을 융합한 집속이온빔은 현재 산업과 과학에서는 없어서는 안 될 필수장비로 자리매김하였고, 레이저와 하전입자 현미경이 융합된 장비도 많이 개발이 되고 있다. 본 개발에는 전자현미경과 광학현미경을 융합하여 관찰영역의 이미지 분해능을 약 700 nm에서 수 nm까지 넓히며, 광학현미경의 색상정보를 이용할 수 있도록 하는 데에 목적이 있다. 이의 특성을 잘 보여주는 것이 그림 1의 Google earth와 비교이다. 광학현미경으로 전체적인 시료의 칼라 영상을 얻어 상태를 확인하고, 관찰자가 더 정확하고 세밀하게 분석하고자 하는 곳을 전자현미경을 확대하여 보는 것이다. 이

저자약력

조복래 박사는 포항공대에서 물리학 박사를 취득하였으며, 졸업 후 일본 와세다 대학 박사후 연구원, 히타치하이테크놀로지를 거쳐 2012년부터 한국표준과학 연구원에서 재직 중이며 2017년 (주)모돌싸이를 창업하였다. (blcho@kriss.re.kr)

박인용 박사는 한국과학기술원에서 기계공학 박사를 취득하였으며, 2012년부터 한국표준과학연구원에 입사 후 현재는 광전자융합장비팀장을 맡고 있다. (inyoung.park@kriss.re.kr)

REFERENCES

- [1] A. C. Zonneville, *et al.*, *J. Microscopy* **252**, 58 (2013).
- [2] C. J. Peddie, *et al.*, *Ultramicroscopy* **143**, 3 (2014).
- [3] P. Boer *et al.*, *Nature Methods* **12**, 503 (2015).
- [4] T. Kanamaru, *et al.*, *Ultramicroscopy* **109**, 344 (2009).
- [5] <https://www.google.com/earth>.
- [6] W. Kukulski *et al.*, *J. Cell Biol.* **192**, 111 (2011).

Fig. 2. Structures of conventional CLEM.^[3]

융복합 현미경은 전자현미경과 광학현미경의 두 가지 기능을 동시에 구현하게 되므로 관찰자는 더 쉽고 빠르게 원하는 시료로부터 다양한 정보를 얻을 수 있게 된다.

그림 2는 기존에 개발된 융복합 현미경의 구조를 보여주고 있다. 융복합 현미경의 제작에 있어 가장 중요한 것이 어떻게 하면 전자현미경의 대물렌즈와 광학현미경의 대물렌즈의 기능을 동시에 구현할 수 있도록 구조를 설계할 수 있는냐이다. 전자현미경과 대물렌즈의 초점거리, 좀 더 정확히 말하면 각 대물렌즈의 working distance를 고려해야 하는데, 고배율의 특성상 둘 다 working distance가 짧다. 이 때문에 그림 2에서 보이고 있는 모든 구조의 공통점이 광학현미경의 대물렌즈 working distance의 기준에 맞춰서 설계되어 있다. 시료를 회전하거나, 전자현미경의 반대쪽에서 시료를 관찰하고 그리고 시료가 직접 좌우로 움직이는 구조를 갖게 된다. 따라서 엄밀히 말하면 전자현미경과 광학현미경이 동시에 보지 않거나 같은 면을 관찰하고 있다고 할 수 없는 문제가 생긴다.

핵심 개발 아이템

1. 광전자융합 대물렌즈의 개발

기존 융복합 현미경의 단점을 해결하고자 본 개발에서는 그림 3과 같은 기본구조를 가정하고 융복합 현미경을 설계하였다. 이와 같은 구조의 개념설계가 가능한 이유는 전자현미경과 대물렌즈의 기능 및 이를 위한 구조에 대한 충분한 이해가 있기 때문이다. 위 그림과 같은 구조가 되기 위해서 여러 가지 조건이 검토되고 만족되어야 하는데 아래와 같은 조건을 고려하여 대물렌즈를 선정하였다.

- 광학현미경에서 분해능 700 nm.
- 전자빔과 광학빔이 동시에 시편에 조사되어야 함.
- 시편은 진공 중에 있으므로 광학대물렌즈가 진공에 있거나 view port를 통해서 관찰해야 함.
- View port 사용 시 색수차의 영향.

Fig. 3. Conceptual diagram of developed CLEM having a hole mirror for electron beam passing and light beam reflecting.

- 전자빔과 광학빔의 정렬을 위해서 대물렌즈가 움직여야 함.
- 형광현미경의 특징
- 진공 중에서 사용할 수 있는가?

본 개발에서 목표로 하는 광학 현미경의 분해능은 700 nm 인데, 광학현미경 대물렌즈의 분해능은 개구수(numerical aperture)에 의해서 결정이 된다. 개구수는 수식 (1)로 표현이 되는데, n 은 물질의 굴절률, θ 은 대물렌즈 통과 후의 빛의 각도의 절반이다.

$$n(\sin(\theta)) \quad (1)$$

$$\text{Resolution} = \lambda / 2n(\sin(\theta)) \quad (2)$$

분해능은 수식 (2)와 같이 개구수가 클수록, 그리고 파장이 짧아질수록 좋아진다. 따라서 광학대물렌즈의 분해능은 개구수와 파장에 의해서 결정된다고 할 수 있다. 표 1은 주로 많이 사용되는 대물렌즈의 종류와 개구수에 따른 일반적인 분해능을 정리해 놓은 것이다. Plan Achromat 대물렌즈를 기준으로 하면 개구수가 0.4는 되어야 분해능이 690 nm 정도 된다. 즉, 본 개발의 목표분해능 700 nm를 위해서는 개구수가 0.4 이상은 되어야 한다는 의미이다. 하지만 개구수는 빛의 각도와 연관이 있는데, 이는 곧 대물렌즈의 직경과 working distance가 연관이 있다. 즉, 개구수가 커지면 빛의 각도 때문에 대물렌즈가 작아지면 working distance가 짧아지고, 반대로 work-

Table 1. Resolution and numerical aperture by general objective lens.^[7]

Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	0.08	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.40
63x	0.75	0.85	0.95
63x (oil)	n/a	1.30	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40

Magnification	20 X
Numerical Aperture NA	0.42
Working Distance (mm)	20
Wavelength range(nm)	435 ~ 655
Resolving Power (μm)	0.7

Fig. 4. Specifications of 20X Mitutoyo Plan Apo Infinity Corrected Long WD Objective.

ing distance가 길어지면 대물렌즈의 직경이 커지는 관계를 갖는다. 이 문제 때문에 한정된 공간 내에서 전자현미경과 광학현미경 모두 높은 분해능을 구현하는 구조 설계가 어려운 것이다. 이 부분에 대해서는 뒤에서 도면에 대한 설명에서 부가하도록 하겠다.

그림 4는 융복합 현미경의 여러 가지 사항을 고려하여 결정한 Mitutoyo 대물렌즈의 실제 치수로 샘플스테이지와 같이 설계하여 실제로 적용이 가능한지 확인한 것이다. Working distance가 20 mm이므로 대물렌즈에서 반사거울까지가 15 mm 그리고 반사거울에서 시료까지가 5 mm 하면 현재 융합하려고 하는 전자현미경의 구동에 영향이 없다.

대물렌즈 선정 후에 가장 중요한 것이 전자빔과 광학빔이 공통 광경로를 갖도록 하는 전자빔 통과를 위한 구멍이 있는

광 전자 융합 주사 전자 현미경

Fig. 5. 3-dimensional assembling drawing of CLEM.

거울 제작이다. 전자빔이 거울을 구멍을 통과하게 되면, 이 말은 구멍의 크기가 곧 전자현미경의 field of view를 결정하게 된다. 전자현미경은 고분해능 이미지 획득이 목적이므로 넓은 영역을 모두 관찰할 필요는 없다. 따라서 전자현미경은 약 200 μm 정도의 field of view를 갖도록 구멍크기를 결정하였다.

그림 5는 전자현미경과 광학현미경을 융합한 모습을 3차원으로 설계한 설계도이다. 본 개발에서는 개발된 융복합 현미경이 최상의 성능을 발휘할 수 있도록 설계단계부터 철저하게 검토하고 있으며, 3차원 조립프로그램으로 조립과정 중의 문제를 사전에 예측하여 설계단계에서 보완 및 수정하고, 최종 조립 모습 역시 검토하여 수정 및 보완하고 있다.

광학현미경과 전자현미경을 융합하기 위해서는 소프트웨어적으로 통합되어 관리되어야 한다. 그러기 위해서 각 현미경의 제어부가 통합이 되어야 하므로 전자현미경의 제어회로를 직접 제작하고 광학현미경 역시 직접 제작하여 하드웨어뿐만 아니라 소프트웨어적으로도 통합할 수 있도록 하였다. 두 가지 현미경의 이미지가 동시에 보이도록 그림과 같이 user interface를 C++ 기반으로 프로그램하였다. 이 프로그램은 일반적인 전자현미경의 user interface에서 구현되는 기능이 거의 모두 포함되어 있으며, 광학현미경과 통합되어 있다. 사용자는 한 개의 프로그램에서 두 가지 모드의 전자현미경과 광학현미경을 이미지를 모두 볼 수 있으므로 매우 편리하게 융복합 현미경을 사

REFERENCES

- [7] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html>.

Fig. 6. Observation of metal grid in real-time with electron and light beam and self-developed user-interface.

Fig. 7. Observation of μm scale line patterning with developed CLEM.

용할 수 있다. 이 개발은 상용화와 사업화를 목표에 두고 있으므로 장비의 하드웨어적인 성능의 향상과 안정화뿐만 아니라 사용자가 직접 장비를 조작하는 소프트웨어 개발에도 많은 정성을 들이고 있다. 그림 6은 자체 제작한 소프트웨어로 전자현미경과 광학현미경 이미지를 동시에 PC상의 윈도우에 띄워 보여주는 실제 GUI 영상이다.

실제 개발에서는 목표로 하는 700 nm 분해능을 확인해야 한다. 그림 7은 융복합현미경의 광학현미경 분해능 확인을 위하여 1 μm 의 선폭과 약 3 μm 간격으로 실리콘 웨이퍼에 줄모양을 가공한 시편을 관찰한 것이다. 광학대물렌즈의 개구수를 계산하면 분해능이 700 nm인데, 그림 7과 같이 광학현미경으로 1 μm 의 패턴도 잘 보이는 것을 확인할 수 있다. 이때 중요한 것이 전자현미경과 광학현미경이 시료의 같은 면을 실시간으로 동시에 보고 있다는 것이다. 이는 기존의 다른 융복합 현미경에서는 불가능하였던 것으로 시료가 투명하지 않아도 실시간 동시 관찰이 가능한 특징이 있다.

그림 8에서 볼 수 있듯이 전자현미경과 형광현미경의 이미지를 동시에 얻을 수도 있다. 광축정렬이 정확하게 되어 전자현미경과 광학현미경이 같은 시료를 관찰하고 있다. 이것이 융복합 현미경에 있어 가장 중요한 것으로 향후에는 소프트웨어

Fig. 8. CLEM image of quantum dot coated metal grid, (a) electron beam image, (b) fluorescence image.

Fig. 9. Inside view of developed CLEM.

적으로도 계속 개발하여 두 이미지를 동기화하고, 부분확대 기능을 완성할 것이다.

2. CeB6 전자총 탑재 SEM

광전자 융합현미경의 전자현미경 분해능을 높이기 위해 CeB6 전자총을 개발하였다. 테스트 결과 CeB6 전자총의 압력은 10^{-8} Torr 영역에 도달하였으며, 현재 field emission 전자총에서 확립한 double O-ring 구조를 채택함으로써 10^{-9} Torr 영역 이하에서 작동시켜 100만 원 이상의 고가인 CeB6 전자총의 수명 연장 및 전자총의 안정성 향상을 도모할 예정이다. 좀 더 고분해능의 이미지를 얻거나, energy-dispersive X-ray spectroscopy 실험 등을 수행할 경우 광학현미경은 실험에 방해가 될 우려가 있어 필요시 광학현미경 블록을 전자현미경 근처에서 10 cm 이상 이동시킬 수 있는 이동형으로 재설계하였다.

시료 스테이지는 진공 모터를 사용함으로써 시료 스테이지의 정밀도를 향상시켜, 향후 3D 측정 등의 정밀도를 높일 수 있게 설계되었다. 그림 9는 스테이지 및 광학현미경 모듈의 3D 설계도를 보여준다. 아래 그림 및 사진은 시스템의 전체 배기

Fig. 10. The image of nano gold particle on carbon substrate, (a) acceleration voltage: 20 kV, (b) acceleration voltage: 30 kV.

❖ 적용분야

Fig. 11. CLEM images of semiconductor and SiO_2 samples.

시스템의 부품 및 조립 과정을 보여준다. 시료실 및 전체 초기 배기는 터보분자 펌프를 사용하여, CeB6 전자총은 이온펌프 1대, FE 전자총에는 이온펌프 2대가 추가된다.

3. 광전자융합현미경 시료 관찰

CeB6 전자총 탑재와 전자현미경 대물렌즈 설계 최적화를 통해 15만 배 이상의 선명한 이미지를 얻을 수 있었으며, 분해능은 2 nm급으로 추정된다. 그림 10은 금 입자의 고분해능 SEM 이미지를 보여준다.

Fig. 12. HeLa cell image. (a) Bright field optical microscope mode. (b) Electron microscope magnification: 2500. (c) Electron microscope magnification: 5000. (d) Electron microscope magnification: 10,000.

Fig. 13. Comparison HeLa cell image. (a) Bright field image. (b) Fluorescence image.

각종 반도체 시료 및 바이오 시료를 광전자융합 모드에서 관찰하였다. 그림 11은 RF 반도체의 솔더링 부분 등을 보여준다. 광학적으로 관심있는 부분을 전자현미경으로 실시간으로 확대하는 형태의 관찰 방법이 유효함을 알 수 있다. 그림 11은 바이오 시료를 고정-탈수건조시켜 금속 코팅한 후 얻은 이미지이다. 금속 코팅이 형광을 탈색시키는 경향이 있어 추후 대책이 필요하다.

그림 12는 아산병원에서 제공받은 HeLa cell을 본 개발에서 제작한 CLEM으로 찍은 이미지이다. 세포는 일반적인 전자현미경 시료 전처리를 하였으며, 나노입자 안에 형광물질이 (TRITC, Ex/Em=558/581) 포집되어 있어서 형광이미지 가능하도록 하였다. 하지만 전자현미경 관찰을 위해서 시료를 Pt 코팅을 5 nm 하였는데, 이 때문인지 형광이미지 관찰은 되지 않았다. 그림 13, 14는 한국생명공학연구원에서 제공받은 HeLa cell을 CLEM으로 찍은 것이다. 이때는 금속코팅의 영향을 정확히 분석하고자 코팅을 하지 않고 먼저 형광이미지와

Fig. 14. HeLa cell image after metal layer coating for electron microscope imaging. (a) Electron microscope magnification: 1,000. (b) Electron microscope magnification: 5,000. (c) Faint fluorescence image.

bright field 이미지를 얻었다. 그림 13과 같이 형광신호가 잘 검출이 되는 것을 알 수 있다. 하지만 그림 14와 같이 금을 약 5 nm 증착하니 전자현미경 이미지는 잘 관찰이 되었지만, 형광신호가 매우 약해지는 것을 알 수 있었다. 따라서 바이오 시료 관찰을 위해서는 금속코팅의 유무에 따른 이미지 영향을 고려해야 할 것 같다.

결론과 전망

이 글에서는 전자현미경과 광학현미경을 융합하여 mm에서 부터 nm까지의 분해능 구현이 가능하고 시료의 형광정보를 실시간으로 얻을 수 있는 융복합현미경 개발 과정 및 실험 예에 대해서 기술하였다. 기존의 상용 융복합현미경은 구조적으로 시료를 전자현미경과 광학현미경으로 동시에 관찰이 불가능하여 하드웨어 또는 소프트웨어로 전자현미경 이미지와 광학현미경 이미지를 합성해야 하는 단점이 있었는데, 이를 극복할

수 있는 장비를 자체 개발한 것이다. 이를 통해서 사용자는 시료의 이동이나, 장비 간의 이동없이 시료의 기능과 구조를 고분해능으로 얻을 수 있어서 시료의 분석에 한층 강력한 기능을 제공할 수 있다. 현재 전자현미경의 분해능을 sub-nm급까지 향상시키고 공초점 이미지와 분광이미지까지 제공할 수 있도록 광학현미경의 기능도 추가하는 연구가 진행되고 있다.

요즘 현미경 개발 동향은 두 가지 이상의 빔을 하나의 장비에 융합하여 다양한 정보를 시료로부터 사용자가 고분해능으로 동시에 얻을 수 있도록 하는 것이다. 이는 각각의 현미경 장비의 기술이 성숙되고, 또한 자연스럽게 융합의 요구에 부응할 수 있는 장비 간 융합기술이 발전하면서 가능하게 되었다. 이를 통해서 사용자는 여러 대의 장비에서 측정 및 관찰이 가능했던 연구를 하나의 장비에서 가능하게 되므로 시간적, 공간적 나아가서는 연구비 측면에서도 많은 이점이 생기게 되었다. 앞으로 본 연구원 및 모듈사이에서도 이런 동향에 맞춰 지속적으로 융복합장비 개발에 매진할 계획이다.