

의생물 연구 분야에서 집속이온빔장치의 응용

김기우*, 백생글, 박병준¹, 김현욱², 류임주^{2,*}

서울대학교 농생명과학공동기기원, ¹칼자이스 NTS사업부

²고려대학교 의과대학 해부학교실

Applications of Focused Ion Beam for Biomedical Research

Ki Woo Kim*, Saeng Geul Baek, Byung Joon Park¹,
Hyun-Wook Kim², Im Joo Rhyu^{2,*}

National Instrumentation Center for Environmental Management, Seoul National University,
Seoul 151-921, Korea

¹NTS Division, Carl Zeiss Co. Ltd., Seoul 121-828, Korea

³Department of Anatomy, College of Medicine Korea University, Seoul 136-705, Korea

(Received December 1, 2010; Revised December 14, 2010; Accepted December 15, 2010)

ABSTRACT

A focused ion beam (FIB) system produces a beam of positive ions (usually gallium) which are heavier than electrons and can be focused by electrostatic lenses into a spot on the specimen. With its ability milling of the specimen material by 10 to 100 nm with each pass of the beam, FIB is widely adopted in materials science, semiconductor industry, and ceramics research. Recently, FIB has been increasingly employed in the field of biomedical sciences. Here we provide a brief introduction to FIB and its applications for a wide variety of biomedical research.

The surface of specimen can be *in situ* processed and quasi-real time visualized by two beam combination of FIB and field emission scanning electron microscope (FESEM). Due to its milling process, internal structures can be exposed and analyzed: yeast cells, fungus-inoculated wheat leaf, mannitol particles in inhalation aerosols, and oyster shell. Serial block-face tomography with the system kindles 3-dimensional reconstruction researches in the realm of nervous system and life sciences.

Two-beam system of FIB/FESEM is a versatile tool to be utilized in the biomedical sciences, especially in 3-dimensional reconstruction studies.

Keywords : Focused ion beam, Milling, Serial block-face, Tomography

서 론

생물 시료의 미세구조를 연구하기 위하여 다양한 현미경

이 이용되고 있다. 주사전자현미경 (SEM)을 이용하여 시료 표면을 관찰할 수 있으나, 시료 내부에 대한 정보는 획득할 수 없다. 반면에 투과전자현미경 (TEM)으로 시료의 절편을 관찰하므로 내부에 대한 정보를 획득할 수 있으나, 포매와

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 지원으로 서울대학교 농생명과학공동기기원이 보유한 집속이온빔장치 등의 장비를 활용하여 수행된 연구임.

* Correspondence should be addressed to Dr. Ki Woo Kim, National Instrumentation Center for Environmental Management, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-921, Korea. Ph.: (02) 880-4957, Fax: (02) 888-4847, E-mail: kiwoo@snu.ac.kr or Im Joo Rhyu M.D., Ph.D., Department of Anatomy, College of Medicine, Korea University, 126-1 Anam dong 5 ga Seongbuk gu, Seoul 136-705, Korea. Ph.: (02) 920-6149, Fax: (02) 929-5696, E-mail: irhyu@korea.ac.kr

초박절편 등의 전처리 과정이 필요하다. 특히 TEM 시료 준비의 경우, 수지(resin) 침투와 중합의 불균일성, 유리 또는 다이아몬드칼의 절단면 손상으로 인한 흠집 발생, 절편의 파괴와 변형 등이 발생할 수 있다. 조직과 세포의 3차원 구조 정보를 위하여 다량의 연속 절편을 손실 없이 얻기 위해서는 실험자의 고속연도가 요구된다. 집속이온빔장치(focused ion beam, FIB)는 이러한 문제를 일부 대체하는 방안으로서 최근 의생명 연구에 활발히 이용되고 있다(Hou & Yao, 2007; Eisenstein, 2009; Marko, 2010).

현재까지 대부분의 FIB는 재료, 반도체, 세라믹 시료의 정밀 미세가공 장비로서 연구 및 산업 현장에서 폭넓게 활용되고 있다(Kim et al., 2009). FIB는 고에너지의 이온빔을 시료 표면에 집속 조사하는 기능을 수행한다(Yao, 2007). 최근에 활용되는 FIB의 이온 소스로서 갈륨(Ga)이 주로 이용된다. Ga 이온(Ga^+)은 질량이 $1.2 \times 10^{-25} \text{ kg}$ 으로서 전자의 질량인 $9.1 \times 10^{-31} \text{ kg}$ 에 비하여 약 13만배 무겁다. Ga^+ 입자 크기가 0.2 nm이고, 전자는 0.00001 nm로서 전자에 비하여 2만배 크다. 또한 Ga^+ 은 1가의 양전하, 전자는 1가의 음전하를 각각 나타낸다. 이러한 특성을 가지는 Ga^+ 빔을 집속하여 시료에 조사하면 표면의 원자와 충돌하므로 국소 부위의 온도 증가, 표면 전하의 균형 상실 등으로 인하여 밀링(milling), 이온의 집적(deposition)과 같은 다양한 일련의 현상이 발생한다. 본 논문에서는 최근 의생명 연구에서 주로 활용되는 FIB의 개략적인 구조와 기능을 중심으로 다양한 응용 분야에서의 사례를 소개하고자 한다.

FIB의 구조

FIB 개발 초기에는 이온빔 단독으로 구성되는 형태(single-beam)로 활용되었다. 고에너지 이온빔으로 시료 표면을 가공할 수 있으나, 이온빔으로 시료 표면을 관찰할 경우에 이온빔의 특성으로 인하여 시료가 손상되므로 장시간 관찰이 제한된다. 또한 이온빔의 공간분해능은 전자빔의 공간분해능에 비하여 낮으므로 고품질의 표면 이미징이 불가능한 단점이 있다.

최근에 상용화되는 FIB는 SEM과 결합하여 2개의 빔(two-beam) 형태를 취하므로 FIB 작업 후 결과물인 시료 표면을 전자빔으로 관찰한다. 따라서 이온빔과 전자빔을 모두 활용한다는 의미에서 기종명으로서 DualBeam 또는 CrossBeam으로 칭하기도 한다. 특히 FIB 분석 결과의 고해상도 이미징을 위하여 저가속전압에서 고해상도 성능을 보유하는 전계방사형 주사전자현미경(FESEM)과 결합하는 경우가 최근에는 주종을 이루고 있다(Fig. 1).

FESEM의 전자빔 경통이 중심에 위치하고, 중심 광축의 측면에 기종에 따라서 48~54도의 경사각을 형성하며 FIB



Fig. 1. Modern FIB-FESEM. An FESEM column is located in the middle, and an FIB column is installed in the left side of the system.

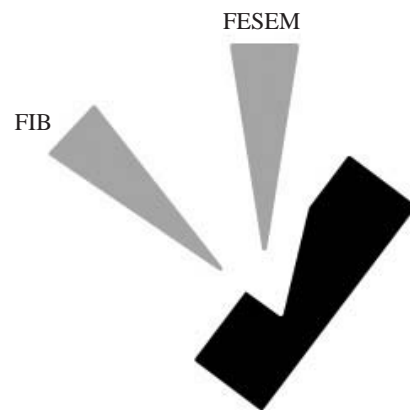


Fig. 2. Schematic diagram of FIB-FESEM. Specimens are tilted, processed by FIB, and observed by FESEM.

의 이온빔 경통이 설치된다. 따라서 이온빔으로 가공할 시료를 먼저 48~54도 기울여 위치시키고 가공한 후, 전자빔으로 해당 경사각을 보정한 후 이미징을 하는 것이 일반적이다(Fig. 2). 이 때 발생하는 시료의 잔재는 진공펌프에 의하여 외부로 배출되므로 이온빔과 전자빔이 원활히 구동되는 진공 환경을 유지한다.

이온빔과 시료가 상호작용한 결과로 발생하는 이차이온(secondary ion, SI)을 이용하여 표면 이미징을 할 수 있으나 시료의 손상을 유발한다. 이러한 특성을 역이용하여 시료 표면의 물질을 제거하는 목적으로 SI를 활용하기도 한다

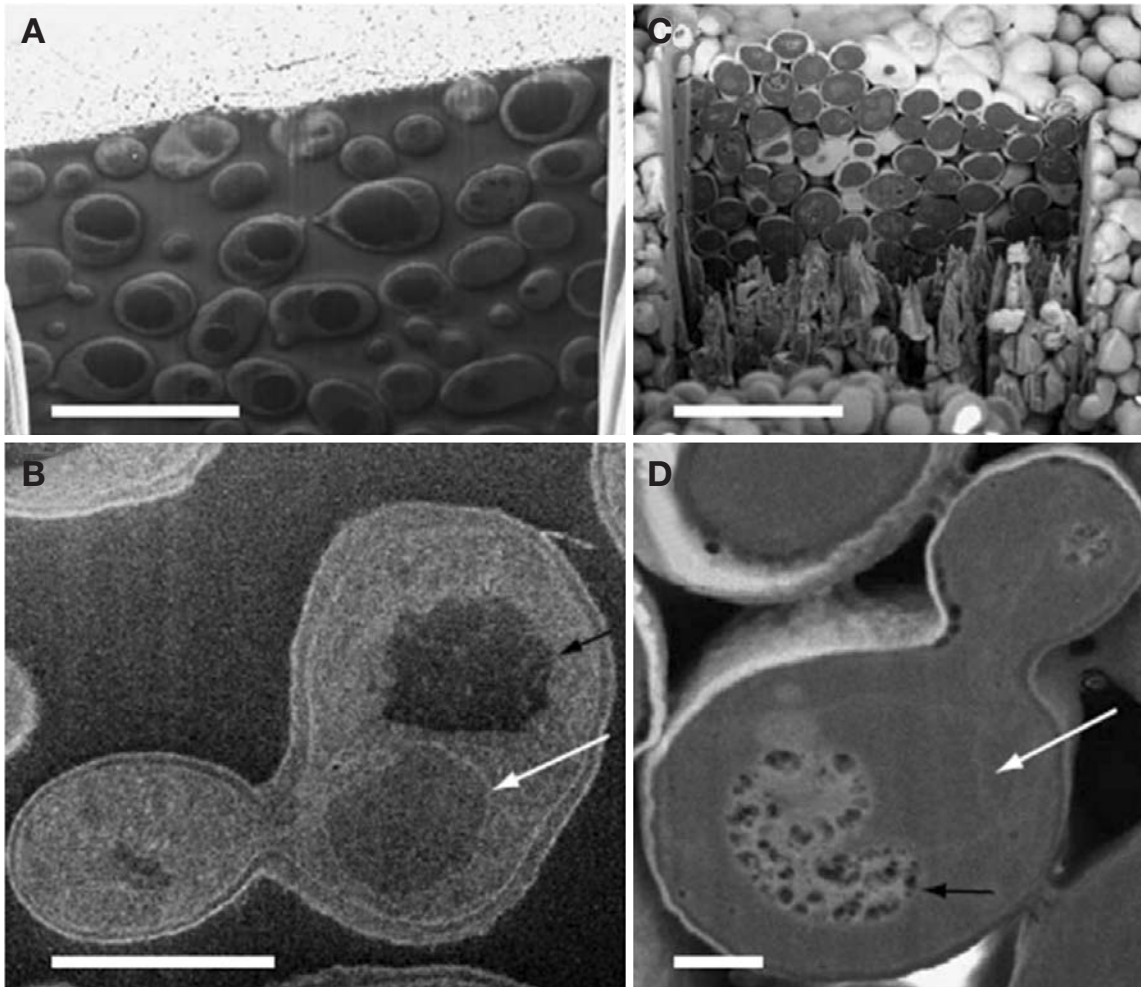


Fig. 3. Exposing of the specimen interior by FIB. (A) Plastic embedded yeast cells. Bar=10 μm . (B) Backscattered electron image of the milled surface of A. A white and a black arrow indicate a nucleus and a vacuole, respectively. Bar=2 μm . (C) Critical point-dried yeast cells. Bar=10 μm . (D) Secondary electron image of the milled surface of C. A white and a black arrow indicate a nucleus and a vacuole, respectively. Bar=0.5 μm . (Reprinted from *J. Struc. Biol.*, 115, Heymann et al., Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope, 63-73, 2006, with permission from Elsevier.)

(Drobne et al., 2005). 그러나 대부분의 경우 전자빔을 시료에 조사하여 발생하는 이차전자(secondary electron, SE)와 후방산란전자(backscattered electron, BSE)를 이용하여 이미징을 한다. 또한 함께 발생하는 X-선을 분석하므로 시료 표면의 원소 조성을 규명할 수 있다.

밀 링

FIB의 기본 기능인 밀링은 고에너지의 이온빔이 시료 원자의 이탈을 유발하므로 발생한다. 이로써 시료 표면 이하의 내부 구조가 노출되고 형성된 단면을 SEM으로 관찰할 수 있다. 이로써 조직이나 세포를 포매한 상태는 물론이고 포매를 하지 않은 상태에서 시료의 단면을 노출시켜 이미

징할 수 있다. 포매하는 경우에는 시료를 TEM 관찰을 목적으로 전처리하고 플라스틱 블록을 제작한다. 일반적으로 TEM 관찰에 활용하는 Epon, Spurr 등과 같은 에폭시(epoxy) 수지는 FIB 밀링에 적합하다. 포매하지 않는 경우에는 시료를 SEM 관찰을 목적으로 전처리하고 스티브에 치상하고 금이나 백금으로 코팅한다. Heymann et al. (2006)은 효모를 포매한 경우와 임계점 건조하여 밀링한 경우를 구분하여 제시하였다(Fig. 3). 이 때 SE와 BSE에 의한 이미징 결과의 상이성과 핵과 액포의 위치를 구분할 수 있는 가능성을 보여주었다. BSE는 SE에 비하여 전자의 대전현상(charging)에 크게 영향을 받지 않으므로, 전도성 코팅을 하지 않은 밀링 표면의 이미징에 활용할 수 있고, 시료의 조성 정보를 제공한다(Kim et al., 2008, 2009).

식물과 병원균의 상호작용을 연구하기 위하여 FIB가 활용

되기도 한다. Kaminskyj & Dahms (2008)는 밀 흰가루병균인 *Blumeria graminis tritici*의 포자를 밀 잎 표면에 접촉하고 기주-기생체 반응 부위를 FIB로 분리하는 데 성공하였다. 이후 X-선 미세분석을 이용하여 망간(Mn)이 특이적으로 국소 영역에 축적됨을 보고하였다.

조직과 세포 이외에도 단백질이나 유기물의 입자를 밀링하여 단면을 획득할 수 있다. Heng et al. (2007)은 수화 수준을 일정하게 처리한 후 직경이 약 1 μm 인 만니톨(mannitol) 입자의 단면을 보여 주었다. 이로써 약학 분야에서 흡입용 입자의 다공성을 측정할 수 있는 분석 기반을 제공하였다.

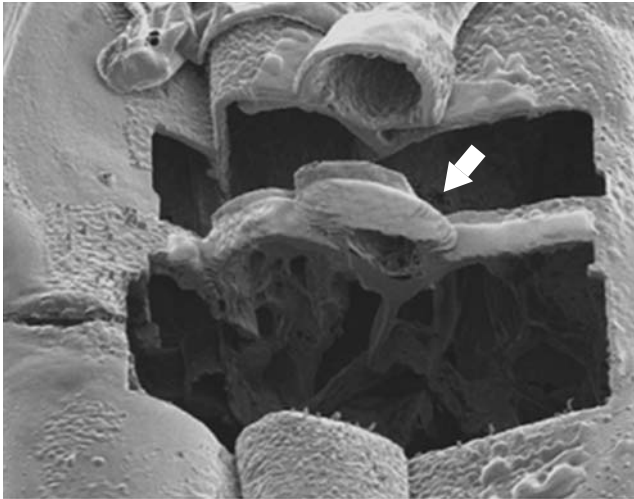


Fig. 4. Isolation of a thin leaf section for X-ray microanalysis. An arrow indicates a spore of *Blumeria graminis tritici* on the wheat leaf surface. Mn was found to be localized in the leaf cell wall. (Reprinted from Micron, 39, Kaminskyj and Dahms, High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM, 349-361, 2008, with permission from Elsevier.)

FIB는 기본적으로 재료 및 세라믹과 같이 고강도 시료의 가공에 이용되고 있어 감각류나 어패류의 껍질은 일반적인 TEM 시료 전처리로 단면을 얻기가 어려우므로 FIB를 이용하여 절편을 제작할 수 있다(Kudo et al., 2010). 최근 탈회 처리하지 않은 상아(ivory) 조직의 박편을 제작하여 투과전자현미경으로 관찰이 가능하여 치과영역에서도 활용 될 수 있음을 보여 주었다(Jantou et al., 2009).

연속 블록면 이미징 및 3차원 모델링

최근 의생물분야에서 3차원 구조에 대한 관심은 급속도로

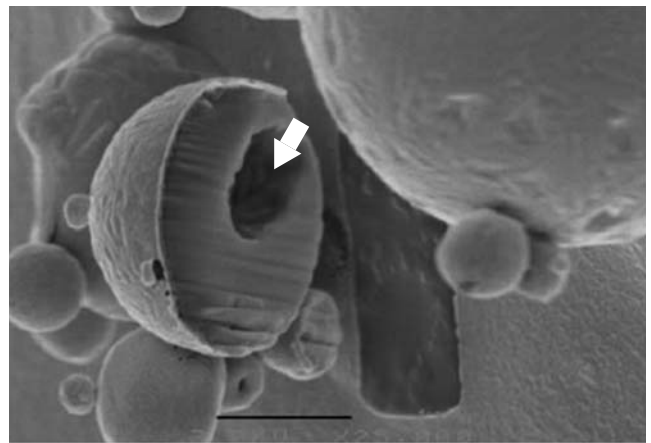


Fig. 5. Cross-section of a mannitol particle by FIB. The particle was found to be porous (an arrow) under a certain hydration condition. Bar=1 μm . (Reprinted from Pharm Res., 24, Heng et al., Focused-ion-beam milling: a novel approach to probing the interior of particles used for inhalation aerosols, 1608-1617, 2007 with permission from Springer.)

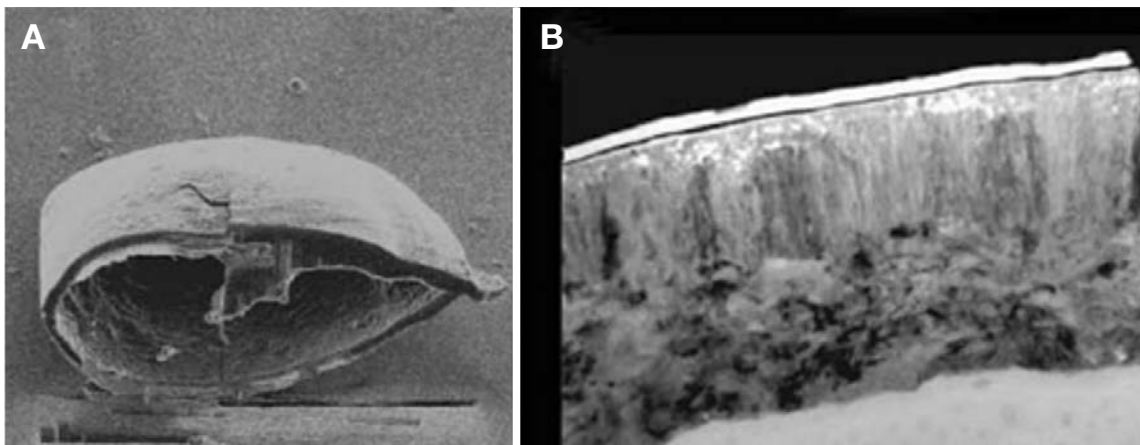


Fig. 6. Cross-section of an oyster shell by FIB. (A) Secondary ion imaging of an oyster shell. (B) Thin film of the shell by FIB. (Reprinted from J. Struc. Biol., 169, Kudo et al., Microtexture of larval shell of oyster, *Crassostrea nippona*: A FIB-TEM study, 2010, with permission from Elsevier.)

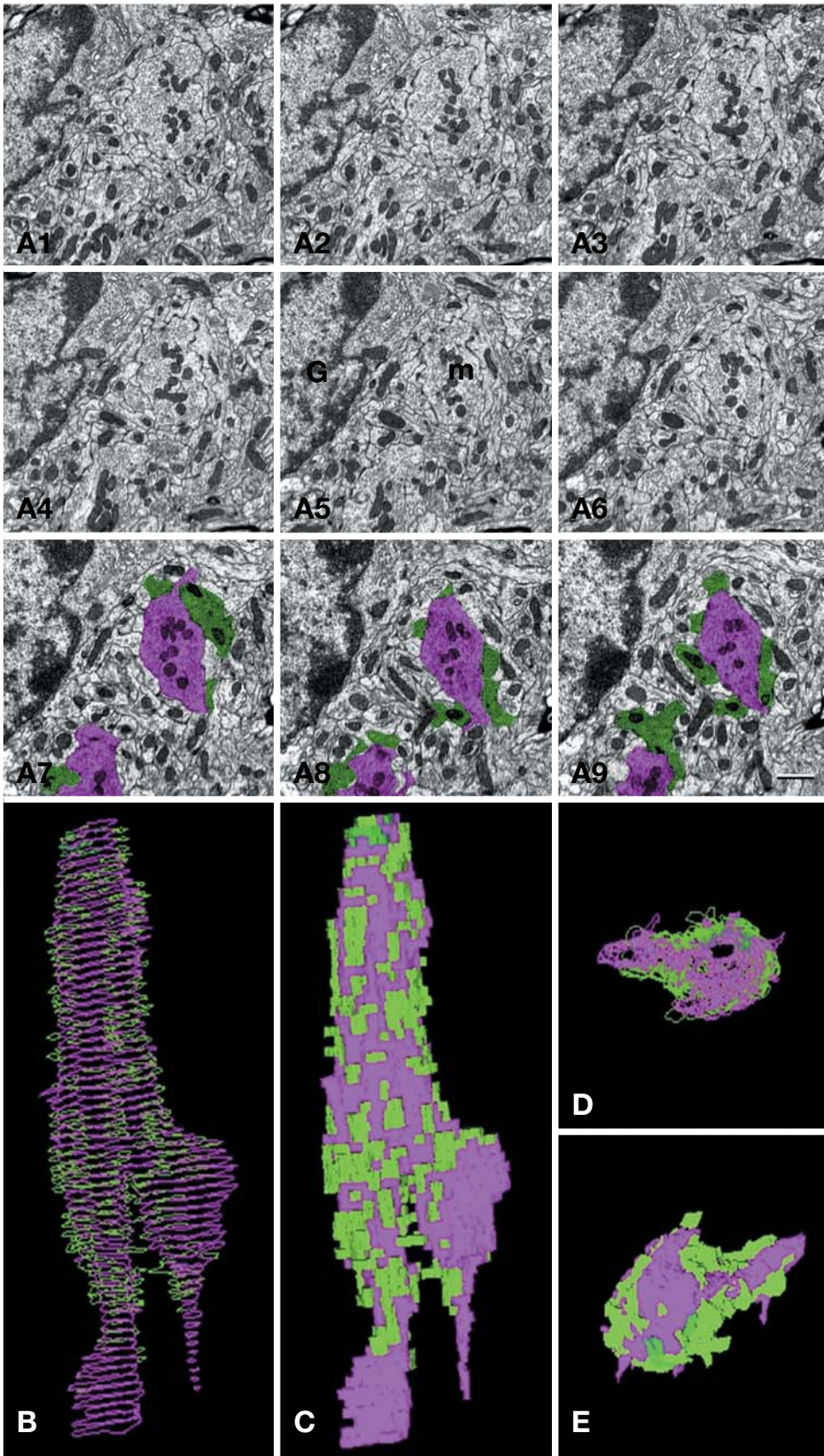


Fig. 7. Serial milled surface of granule cell layer of the mouse cerebellum (A1-9). The mossy fiber (m) is localized in the central field of the images and the nucleus of a granule is observed in the left side (G). The mossy fiber was marked by purple color and its synaptic structures were marked by green color (as seen at A7-9). The marked sections were filed (B, D) and surface rendered (C, E). The 3 D model of the mossy fiber can be observed through different angles (side view: B, C; top view: D, E). (unpublished preliminary data of I.J.R.)

증가되었다. 3차원 정보를 획득하기 위한 방법으로 광학현미경 연속절편, 공초점현미경, 투과전자현미경 연속절편, 초고압전자현미경 및 전자단층촬영 등의 기법이 활용되어 왔으며, 최근 연속 블록면 이미징(serial block-face imaging) 기법은 시료 제작이 용이하고 상대적으로 쉽게 3차원 모델을 구성할 수 있기에 많은 연구자들의 관심이 되고 있다.

밀링된 의생물 시료의 표면을 연속적으로 촬영하는 방법은 밀링하는 방법에 따라 다이아몬드 칼을 사용하는 방법(Denk & Hortsman, 2004)과 집속이온빔을 이용한 방법(Knott et al., 2008; Merchan-Perez et al., 2009)이 있다. 이러한 실험기법은 특히 신경과학 분야에서 신경망의 연결관계를 연구하는 분야를 활성화 시키는데 기여하였다. 기존의 연구는 관심 있는 작은 부분의 뇌조직에서의 시냅스의 연결관계를 연구하였으나, 이 연구기법의 출현으로 genomics, proteomics, physiomics 등의 시스템생물학의 하나로 connectomics라는 분야가 등장하였다(Eisenstein, 2009). 위에서 인용한 Denk (2004), Knott (2008) 및 Merchan-Perez (2009)의 실험 재료가 모두 신경조직이라는 것을 보면 시사하는 바가 크다. 최근 본 실험실에서 분석한 예비 실험결과를 살펴보면, 생쥐뇌에서 얻은 300여 장의 연속 촬영면 중(Fig. 7A1-9) 소뇌 이끼섬유(mossy fiber) 종말부가 포함된 63장의 영상을 이용하여 시냅스의 형태를 3차원적으로 모델링하고 분석할 수 있었다(Fig. 7B-E). Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 밀링된 단면을 촬영한 영상에서 조직의 자세한 구조와 연결관계를 확인할 수 있었고, 짧은 시간 내에 효과적으로 3차원 모델을 구축할 수 있음을 알 수 있다.

신경세포뿐 아니라, 흑색종 배양세포의 연속면을 3차원적으로 촬영하여 골지체, 내형질세망 및 미토콘드리아 등의 3차원 구조를 제시하기도 하였으며(Heymann et al., 2009), 염색체를 연속적으로 밀링하여 구조를 3차원적으로 해석한 연구도 보고되었다(Schroeder-Reiter et al., 2009). 최근 국내 연구진에 의해서 피부표피층의 멜라닌세포 구조를 3차원 모델로 작성하여 보고한 바 있어(Mun et al., 2009) 신경조직 외에 다양한 적용가능성을 보여주고 있다.

참 고 문 헌

- Drobne D, Milani M, Zrimec A, Lešer V, Zrimec MB: Electron and ion imaging of gland cells using the FIB/SEM system. *J Microsc* 219 : 29-35, 2005.
- 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.
- Heng D, Tang P, Cairney JM, Chan H-K, Cutler DJ, Salama R, Yun J: Focused-ion-beam milling: a novel approach to probing the interior of particles used for inhalation aerosols. *Pharm Res* 24 : 1608-1617, 2007.
- 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.
- Hou K, Yao N: Applications for biological materials. In: Yao N, ed, *Focused Ion Beam Systems. Basics and Applications*, pp. 337-354, Cambridge, University Press, Cambridge, 2007.
- Jantou V, Turmaine M, West GD, Horton MA, McComb DW: Focused ion beam milling and ultramicrotomy of mineralised ivory dentine for analytical transmission electron microscopy. *Micron* 40 : 495-501, 2009.
- Kaminskyj SGW, Dahms TES: High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron* 39 : 349-361, 2008.
- 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.
- Kim J-S, Lee S-R, Lee L-S, Kim J-Y: Three dimensional reconstruction of structural defect of thin film transistor device by using dual-beam focused ion beam and scanning electron microscopy. *Korean J Microsc* 39 : 349-354, 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.
- Kudo M, Kameda J, Saruwatari K, Ozaki N, Okano K, Nagasawa H, Kogure T: Microtexture of larval shell of oyster, *Crassostrea nippona*: A FIB-TEM study. *J Struct Biol* 169 : 1-5, 2010.
- Marko M: Focused ion beam applications in biology. *Microsc. Microanal.* 16(Suppl 2) : 1944-1945, 2010.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez 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 J-Y, Jung M-K, Kim J-H, Han S-S: New plasma treatment by Collimated Low Fluence Q-switched Nd: YAC laser modify the 3D structure of melanocyte by subcellular selective photothermolysis. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, p. 26, Kobe, 2009. (Abstract)
- 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.
- Yao N: Introduction to the focused ion beam system. In: Yao N, ed,

Focused Ion Beam Systems. Basics and Applications, pp. 1-30, Cambridge, University Press, Cambridge, 2007.

< 국문 초록 >

집속이온빔장치(focused ion beam, FIB)는 전자보다 무거운 양이온빔을 이용하여 시료를 10~100 nm 정도로 깎아 낼 수 있는 장비로 주로 재료분야에서 활용되어 왔다. 최근 세계적으로 의생물 분야에서의 활용이 점차 늘어나고 있는 추세에 있어 국내 연구자들의 이해를 돕기 위해 간단히 기기의 메커니즘과 그 활용 예를 기술하고자 한다.

FIB에 주로 사용되는 갈륨(Ga)빔의 특성 때문에 시료의 표면을

효과적으로 쳐 낼 수 있고, 전계 방사형 주사전자현미경(FESEM)을 이용하면 그 표면의 영상을 얻을 수 있다. 이 두 가지 시스템을 하나의 시스템으로 묶어낸 것을 dual beam system이라고 한다. 최근 이러한 시스템을 이용하여 효모, 병원균에 감염된 식물 등이 소개되었으며, 통상적으로 경도가 높아 처리하기 힘든 상아나 어패류의 껍질 등의 시료를 효과적으로 분석한 연구도 있다. 또한 FIB를 이용한 밀링과 FESEM을 이용한 절단면 촬영을 반복하여 얻는 영상을 이용하여 신경계의 연결망을 재구성하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

FIB/FESEM dual beam은 의생물학 분야의 다양한 연구에 활용될 수 있는 유용한 도구며, 의생물 시료의 3차원 연구에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.