

생물시료의 전자현미경 시료 제작 및 관찰 과정에서 발생하는 인공물

박창현*, 조강용², 엄창섭¹
고려대학교 의과대학 전자현미경실, ¹해부학교실,
¹동결폐조직은행, ²고려대학교 의료원 안암병원 병리과

Artifacts Frequently Encountered in Electron Micrographs

Chang-Hyun Park*, Kang-Yong Cho² and Chang-Sub Uhm¹
Electron Microscope Facility, ¹Department of Anatomy, Korea Lung Tissue Bank,
Korea University College of Medicine, ²Department of Pathology, Anam Hospital,
Korea University Medical Center, Korea University, Seoul 136-705 Korea.
(Received August 30, 2004; Accepted January 17, 2005)

ABSTRACT

Fine photographs are essential in the electron microscopy. Artifacts can be introduced during all steps of electron microscopy; specimen processing, observation and printing. Every caution is necessary to avoid the artifact formation. In this review, the authors discussed the causes of various artifacts and suggested the solution to help the correct tissue handling and electron microscopic observations.

Key words : Artifact, Development, Electron micrograph, Observation, Printing, Tissue processing

서 론

인간은 항상 새로운 세계에 대한 동경을 가져 왔다. 그러한 노력의 하나는 맨눈으로는 보이지 않는 미세 세계나 가보지 못한 우주에 대한 동경으로 나타나왔으며, 전자현미경과 천체망원경 등의 개발은 새로운 세계에 대한 노력의 결과로 볼 수 있다. 전자현미경을 사용함으로써 맨눈이나 광학현미경으로 관찰되는 것보다 미세한 구조들에 대하여 보다 쉽게 접근할 수

있게 되었으며, 세포나 조직 속에서 일어나는 여러 생명현상들을 이해하는 데 도움을 받게 되었다.

기본적으로 전자현미경으로 관찰된 결과들은 현미경사진(micrograph)의 형태로 만들어지며 현미경사진의 정확한 해석은 미세구조와 기능을 이해하는 기본이 되어 전자현미경 연구에 있어서 술기와 함께 중요한 부분이다. 이를 위하여는 현재까지 규명된 세포 및 조직의 미세구조적 특징과 연관된 기능에 관한 지식을 숙지하고 있어야 할 뿐만 아니라 얻어진 현미경사진의 체계적 분석 방법도 가지고 있어야 한다. 예를

본 논문의 일부는 1997년 제28차 한국전자현미경학회 춘계학술대회에서 발표되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Chang-Hyun Park, Electron Microscope Facility, Korea University College of Medicine, Korea University, 126-1 Anam-Dong 5-Ga, Seongbuk-Ku, Seoul 136-705 Korea. Ph.: (02) 920-6297, FAX: (02) 926-9165, E-mail: kseam01@empal.com

들면, 촬영된 현미경 사진의 배율, 관찰 대상인 세포나 조직의 일반적 특징, 세포의 일반적 구조, 현미경사진 촬영시까지 적용된 연구기법 등을 고려한 상태에서 현미경사진을 해석할 때에 비로소 적절한 해석이 가능하게 된다(Bozzola & Russell, 1992).

이와 더불어 관찰되는 구조들 중 어느 것이 실제 의미를 부여할 수 있는 '실체구조(real structure)'이고, 어느 것이 표본의 처리과정 중 발생된 '인공물(artifact)'인지를 구분하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 혹자는 전자현미경으로 관찰되는 구조 자체가 인공산물의 덩어리라고 주장한다. 그 이유는 조직의 채취로부터 사진의 인화에 이르기까지의 많은 조직처리 단계를 거치는 동안 각 단계마다 조직의 형태나 조성의 변화가 일어나서 실제 살아있는 세포나 조직과 다르다는 것이고, 또한, 전자현미경은 실제 조직 자체를 관찰하는 것이 아니고 염색제 혹은 코팅 재료로 사용한 중금속의 그림자나 반사된 전자를 관찰하는 것이라는 것이다(Bozzola & Russell, 1992). 이러한 관점은 어느 정도는 수긍이 되는 주장이다. 그러나, 이러한 제한점에도 불구하고 오랜 기간의 관찰과 연구를 통하여 전자현미경학자들은 실체구조라고 인정될 수 있는 미세구조적 지식을 축적하여 왔고, 이를 바탕으로 큰 오류없이 전자현미경사진 해석이 가능한 상태에 이르렀다. 동결치환법(freeze substitution)이나 동결전자현미경법(cryoelectron microscopy) 등 새로운 기법은 과거에 비하여 표본의 처리 과정에 발생하는 변형이나 인공산물의 생성을 줄이는 역할을 하지만 아직 고식적인 방법이 많이 사용되고 있는 한 전자현미경사진에 나타나는 구조물이 해석에서 제외하여야 할 인공산물 인지를 확인하는 것은 매우 중요한 의미를 가진다.

본 고에서는 조직 표본의 처리과정에서 출현하는 여러 가지의 인공산물과 그 발생원인을 검토함으로써 궁극적으로는 미세구조의 적절한 해석에 도움을 주고자 한다.

1. 분석 대상 및 방법

본 고의 작성을 위하여 분석 대상으로 삼은 재료는 고려대학교 의과대학 전자현미경실에서 그동안 관찰 촬영된 사진들이다. 사진들 중 명확히 인공산물을 가

지고 있는 사진을 선별 분류하였다. 시료 제작 과정과 문제점, 그 결과로 발생될 수 있는 다양한 인공물에 관한 원인과 대안의 검토에는 이미 발간된 문헌들(Hayat, 1970, 1981, 1986; Johannessen, 1978; Gabriel, 1982; Bozzola & Russell, 1992)과 연구자들의 경험을 바탕으로 하였다.

2. 인공물(Artifact)의 정의와 한계

'인공물(artifact)'이란 절편표본에 나타나는 변화된 구조를 통틀어 말하는 것으로 표본제작과정에서 사용한 시약이나 조직의 취급과정(Table 1)에서 발생하는 것을 말한다(Chung, 2001). 본 고에서는 정상적인 조직의 구성 성분이 아닌 것으로 관심있는 관찰대상의 정확한 관찰을 방해하거나 구조 식별을 어렵게 하는 것을 인공물로 취급하였다. 즉, 전통적인 인공물에 포함되는 사후변화(postmortem degeneration), 수축(shrinkage), 절편의 주름(folding, wrinkling), 칼자국 등 외에 배양 과정에 오염된 박테리아, 미코플라즈마(mycoplasma) 등은 표본 제작과정 중 발생한 것은 아니지만, 관찰하고자 하는 대상 조직의 성분이 아니고 세포의 상태에도 영향을 미칠 수 있어 원래 의도했던 정확한 미세구조의 관찰과 해석에 영향을 미치게 되므로 인공물로 취급될 수 있을 것이다. 또한, 다른 인공물이 없는 시료의 사진일지라도 초점이 맞지 않은 사진은 정확한 미세구조의 식별이 어려우므로 빛나간 초점상태 역시 인공물로 간주해야 할 것이다.

Table 1. Steps of electron microscopy during which artifacts may form

	TEM	SEM
Tissue preparation	Sampling	Sampling
	Fixation	Fixation
	Dehydration & Embedding	Dehydration
	Sectioning	Drying & Attachment
	Staining	Coating
Observation	Observation	Observation
	Photographing	Photographing
Photography	Development	Development
	Printing	Printing

3. 시료 제작 시 발생하는 인공물

1) 투과전자현미경 시료 제작

(1) 시료채취 (sampling)

시료의 채취는 조직을 관찰하기 위한 최초의 단계이다. 관류고정 (perfusion fixation)을 시행하거나 생체 내에 고정액을 미리 주입하지 않는 한 대부분의 시료 채취는 살아있는 조직에서 이루어진다. 따라서, 약간의 부주의로도 쉽게 손상이 가해질 수 있으므로 주의를 요한다.

실험동물로부터 장기를 제거할 때 핀셋으로 잡은 부위의 조직은 많은 손상을 받게 되며, 내부 구조도

압력에 의한 손상을 받게 된다. 또한, 장기를 쉽게 제거하기 위하여 잡아당기는 경우 조직이 파손될 수 있다. 상피조직의 미세융모 (microvilli)나 섬모 (cilia) 등 세포의 표면구조물 (surface specialization)은 끊어지는 등 훼손될 우려가 있고 (Fig. 1B) 가해진 압력에 의하여 분비세포의 분비과립이 세포 밖으로 밀려 나오는 경우도 있다 (Fig. 2). 특히 말초신경의 경우, 과도한 인장력이 가해지거나 혹은 외부의 충격에 의해 흔히 수초

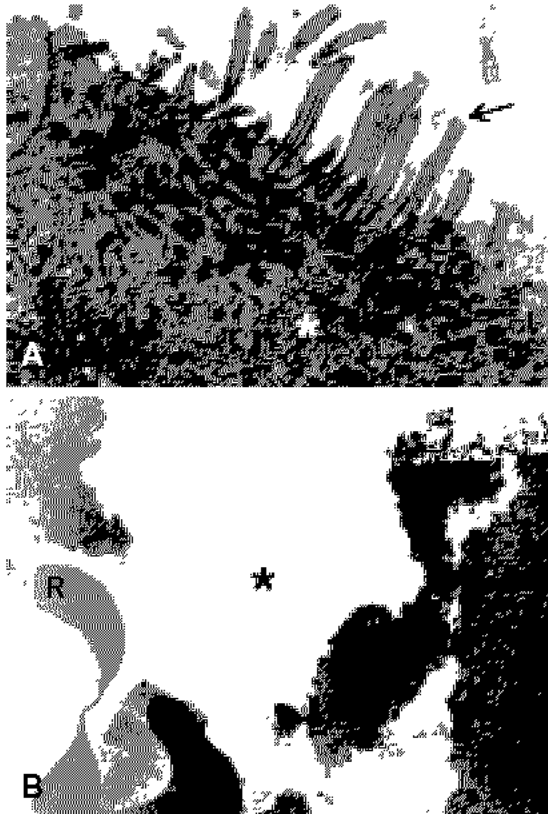


Fig. 1. Artifacts caused by an improper handling of the sample. In A, cilia are broken (arrow) and tissue fragments are present. Also incomplete washing after staining left dusts on the section (Area near white *). The section through the area near surface (B) often have an area lacking tissue (*) and RBC (R) contaminated from the bleeding.

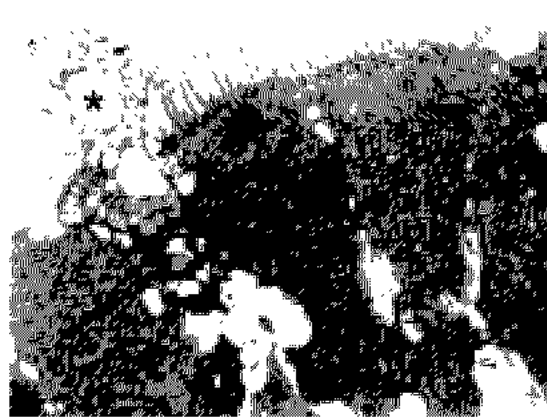


Fig. 2. Artifacts caused by an improper handling of the sample. If pressure is applied during tissue sampling, some parts of tissue protrude from the surface (*).



Fig. 3. Artifact caused by improper handling of the specimen and poor fixation. Layers of myelin sheath is often separated and axonal axoplasm often shows the disorganization. Discontinuous plasma membrane is also noted (arrow).

의 각 층이 분리되는 인공물이 생성될 수 있다(Fig. 3). 따라서 시료 채취 시 관찰 부위를 직접 잡거나 과도하게 당겨지지 않도록 주의하여야 하며, 세절 시에도 가능한 압력을 가하지 않도록 주의하여야 한다. 불가피하게 손상이 가해진 경우에는 단시간 고정 후 손상되었을 가능성이 있는 부위를 제거하고 시료를 제작하는 것이 바람직하다.

채취된 조직은 완충액 속에서 세척한 후 고정하게 되는 데, 이 때 세척이 불완전하면 조직 채취 시 발생한 출혈로 인해 조직 표면에 적혈구 등 혈구 세포가 관찰되는 경우가 있다(Fig. 1A).

(2) 고정 (fixation)

고정은 살아있는 상태로 세포나 조직을 보존하기 위한 과정이나 아직까지 어떠한 고정방법도 변형없이 살아있는 상태를 완전히 보존할 수는 없다. 흔히 사용되는 침지고정법 (immersion fixation)은 혈관을 통해 고정액을 관류하는 관류고정법에 비해 살아있을 때보다 더 많은 변형을 일으킬 수 있다.

불완전한 고정으로 인해 발생하는 인공물 중 가장 대표적인 것은 채취한 조직을 신속하게 고정액에 담그지 못하여 발생하는 세포 자가용해 (autolysis) 현상을 들 수 있다(Fig. 4). 이러한 경우 실험의 결과 혹은 병리적 손상의 결과인 세포괴사 (necrosis)와 부적절한 고정의 결과로 생긴 세포의 손상을 식별하기는 매우 어려우므로 주의를 요한다. 특히, 고정을 위하여 채취

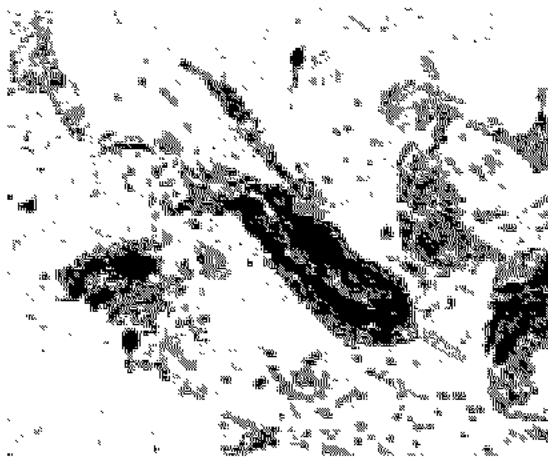


Fig. 4. Artifact caused by improper fixation. Delays in fixation often cause tissue damage similar to necrosis.

한 조직편이 너무 큰 경우나 고정 시간이 부적절한 경우 미세조직의 관찰을 위해 적절히 고정이 된 (optimally fixed) 부분을 일단 포매된 bloc에서 찾아내는 것은 매우 어려우므로, overfixation 혹은 underfixation

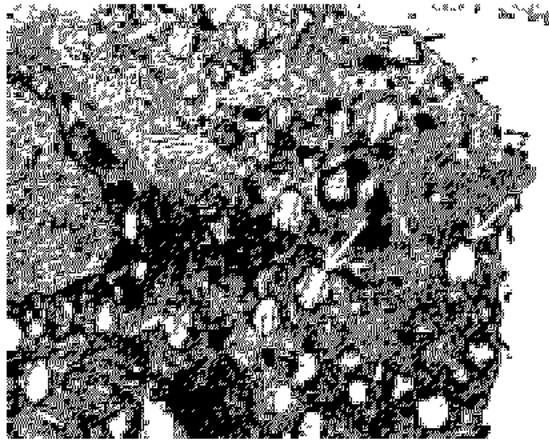


Fig. 5. Artifact caused by improper fixation. Mitochondria is often the first organelle damaged by ischemic injury and by delayed fixation after sampling (arrow).

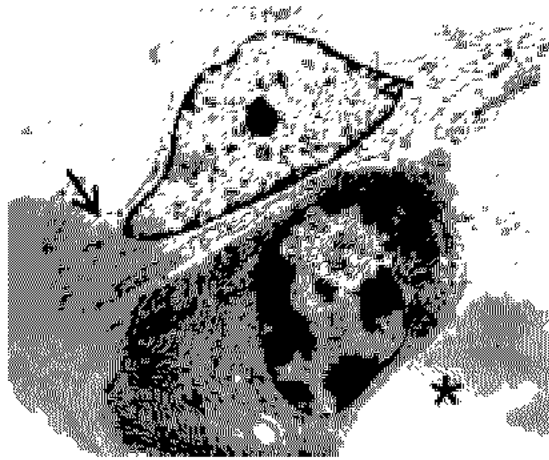


Fig. 6. Artifact caused by poor initial fixation and incomplete fixation during photographic processing. Due to improper fixation, plasma membrane of the upper cell shows a local discontinuity (arrow). Endoplasmic reticulum are dilated. Cytoplasm and nucleoplasm became electron lucent due to the loss of soluble components. Electron dense stains (*) are caused by improper washing of the developer.

이 일어나지 않도록 세심한 주의를 요한다.

초기 고정이 잘못되었을 때 가장 흔히 나타나는 인공물은 세포소기관 중 미토콘드리아(mitochondria)의 cristae와 matrix의 변성이다. 미토콘드리아의 일부분의 전자밀도가 낮아지고 팽창(partial swelling)되는 현상이 일어나고 더 심하면 matrix의 전자 밀도가 낮아지고 cristae가 조각나거나 주변부로 모여면서 구형화(rounding)되는 현상 등을 볼 수 있다(Fig. 5).

세포막(plasma membrane) 등 막성 구조물은 인지질로 이루어져 있어 보통 osmium으로 이차고정을 필요로 한다. 이 과정이 불완전하면 세포막이나 세포소기관의 막구조가 아예 관찰되지 않거나 막이 비연속적으로 끊어져 보이는 현상(membrane discontinuity)이 나타난다(Fig. 6).

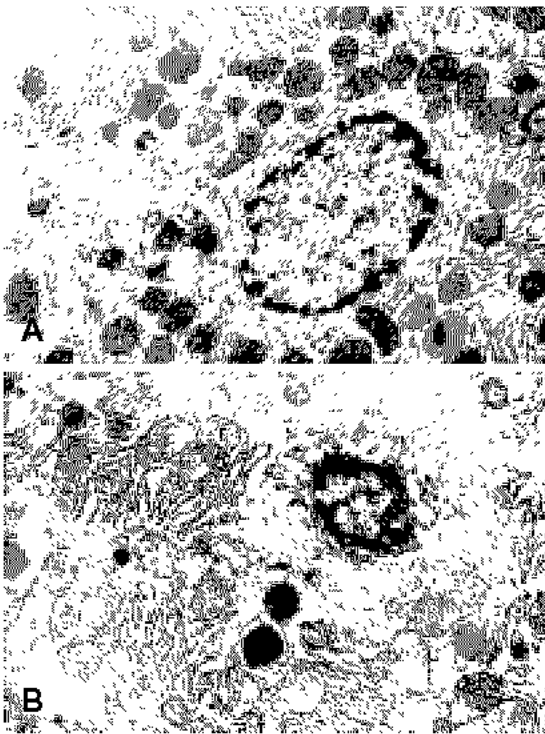


Fig. 7. Artifacts caused by inadequate buffer. Inadequate buffer or pH often produce artifacts caused by insufficient buffering capacity. A is fixed with a glutaraldehyde fixative with a buffer of pH 4.0 and B is fixed with a paraformaldehyde fixative with a buffer of pH 4.0. In both conditions, cellular structures are not properly preserved.

잘못된 완충액의 선택 혹은 적절치 못한 고정액의 pH 등으로 완충력(osmotic strength)이 부적절한 경우 세포질의 유출 및 세포 내로의 수분의 침투 등으로 인하여 세포질의 전자밀도가 비정상적으로 변할 수 있고, 세포나 세포소기관의 팽창, 세포간극의 팽창 등의 인공물이 나타날 수 있다. 이러한 경우, 무과립내형 질세망(smooth endoplasmic reticulum)이 조각나 작은 소포(vesicle)의 형태로 관찰되거나 핵주위수조(perinuclear cisternae)가 비정상적으로 팽창(enlarged perinuclear cisternae)되기도 하며, 미토콘드리아의 cristae가 뚜렷하지 않게 변화되는 인공물이 나타난다(Fig. 7). 따라서, 고정시에는 조직에 따라 고정액의 조성, 사용하고자 하는 완충액의 종류와 osmotic strength, 첨가제 등을 조절함으로써 가장 적절한 고정 상태를 찾아내야 한다.

(3) 탈수 및 포매 (dehydration & embedding)

탈수와 침투 과정을 통하여 조직 속으로 포매제를 침투시키게 된다. 이 과정이 부적절하게 진행되면 조직 속에 수분이나 치환제로 사용된 액체가 남고, 이 부분에 포매제의 침투가 불충분하여 절편에서 크고 작은 구멍들이 관찰되게 된다(Fig. 8). 이러한 구멍은 현미경 관찰 중 전자빔에 의해 커지는 경우가 있어 그 결과 주변 구조물의 변화를 야기하고, 사진 촬영을 어렵게 하므로 구멍이 많이 발생할 경우 탈수 및 포매 기법을 전반적으로 재검토하여야 한다.

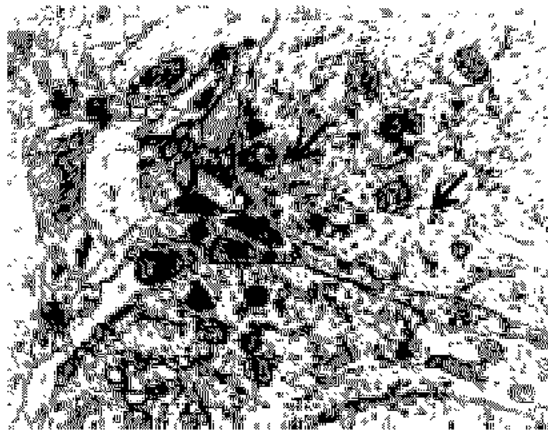


Fig. 8. Artifact caused by inadequate infiltration of resin. Small holes (arrows) are present.

(4) 절편제작 (sectioning)

절편제작 시 미세절편기 (ultramicrotome)의 기계적 진동, 불안정한 시료 및 knife의 고정에 의하여 chatter가 발생된다. chatter는 절편방향과 수직, 즉, 칼날과 평행하게 절편의 두께가 두껍고 얇은 부위가 반복적으로 출현하는 것을 말하며 심한 경우 저배율관찰이 곤란해진다(Fig. 9A). 칼의 각도를 조절하거나 절단속도를 조절함으로써 chatter의 발생을 줄일 수 있다.

칼날이 손상되거나 조직편이 붙어 제거되지 않은 경우, 절편방향, 즉 칼날과 수직으로 다양한 굵기의 선(홈)이 만들어지는 데 이를 knife mark라 한다(Fig. 9B). 심한 경우 관찰시 전자선에 의해 knife mark의 선을 따라서 구멍이 생기고 결국에는 절편이 찢어져 관찰이 불가능한 경우도 있다. 일단 knife mark가 관찰되면 칼

날을 청소하거나 새로운 칼로 교환하여야 한다.

절편의 두께는 반사색을 기준으로 판단하므로 조절이 가능하므로 엄밀한 의미에서 인공물로 간주할 수는 없으나 간혹 무던 knife를 사용하는 경우 절편이 두꺼워져 특히 고배율 관찰시 초점을 맞추기 어려운 경우도 있다(Fig. 10).



Fig. 9. Artifacts made during the sectioning. Chatter can be identified by parallel lines with different section thickness at right angle to the section direction (A, Provided by Mr. Je-Yong In, Kyunghee University Medical Center). Knife mark is made by the faulty knife edge, which runs to the direction of the sectioning.

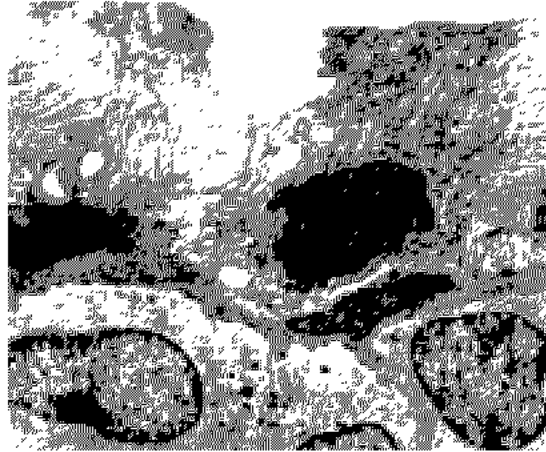


Fig. 10. Artifact made during section. Thick sections often prevent from observing the ultrastructural details.

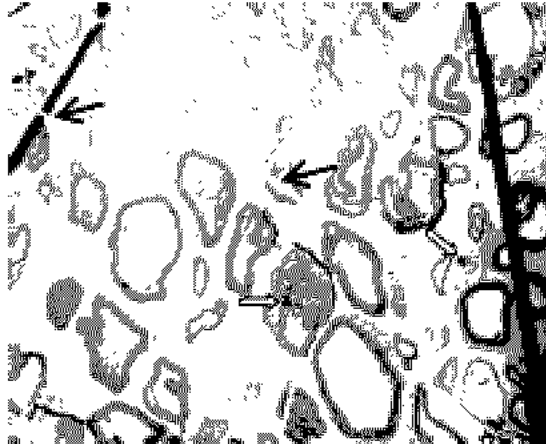


Fig. 11. Artifacts caused during collecting sections, staining, and observation. Folds are often made by the improper procedure to pick up sections. During observation, sections are often torn by the electron beam (Arrow). Uranyl acetate stain artifact appear as irregular electron dense precipitates (White arrow).

블록의 경도가 심하게 차이가 나거나 블록이 너무 무른 경우, 절편제작 중 혹은 절편을 grid에 떠올리는 과정에서 절편에 주름(folding)이 생기는 경우가 있다 (Fig. 11). 조직의 주름은 관찰 도중 상의 흐름을 일으켜 정확한 관찰 뿐만 아니라 사진 촬영을 어렵게 하는 경우가 많다. 주름 뿐만 아니라 절편을 grid에 떠올리는 과정에서 몇 장의 절편이 겹쳐져서 떠지는 경우도 있는데, 이러한 경우에는 각 절편의 미세구조를 모두 관찰할 수 없다.

절편과는 직접 관련이 없는 인공물로, 절편 제작 시 boat를 제대로 청소하지 않거나 많은 양의 절편을 제작하는 경우 boat의 표면에 부스럭진 epoxy resin이 있을 수 있다. 간혹, 오랫동안 병이나 주사기에 담겨져 있던 물로 boat를 채우는 경우 절편에서 오염된 박테리아가 관찰되는 수도 있고, 또, 불완전하게 처리된 grid를 사용하여 절편을 떠올리는 경우 기름때가 수면에 퍼져 절편을 오염시키는 경우가 있다. 이러한 것은 절편 제작 시 약간만 주의를 기울여도 해결할 수 있다.

(5) 염색과정 (staining)

전자현미경 사진 촬영 시 조직의 보존이나 절편도 우수하고 관심을 끄는 부위에 아쉽게도 염색으로 인한 인공물이 있는 경우가 종종 있다. 통상적인 전자현미경 염색으로 사용되는 대표적인 염색제인 uranyl acetate는 염색액 제조 후 사용 전에 용기의 흔들림에 의하여 많은 침전입자가 부유되어 시료에 부착함으로써 인공물이 발생되고 불충분한 세척에 의하여 침전물의 불완전한 제거로 발생된다. uranyl acetate에 의한 인공물은 모양과 크기가 불규칙한 형태로 나타난다 (Fig. 11).

Lead citrate에 의한 인공물의 경우 염색약 자체에 존재하는 입자인 경우도 있고, 염색과정 중 작업자의 호흡에 포함된 CO₂ 또는 대기 중의 CO₂와 lead citrate가 반응하여 형성된 침전물(PbCO₃)인 경우도 흔하다. 따라서, 염색 시에는 물이나 공기 중의 이산화탄소를 가능한 제거하도록 주의하여야 하며 염색 용액을 제작할 때 알칼리 용액으로 제작하여 밀봉 보관하는 것이 바람직하며 염색 중에도 NaOH pellet으로 채운 petri dish 속에서 염색하는 것이 바람직하다(Sevéus & Johannessen, 1978). 납에 의한 인공물의 형태는 미세한 가시모양 또는 비교적 큰 형태의 둥글거나 반달모

양으로 나타나기도 하며, 아주 작은 둥근 입자 형태로 보이기도 한다(Fig. 12). 이 경우에 있어서 특정 소기관을 따라서 마치 먼역 반응에 이용된 gold particle 같

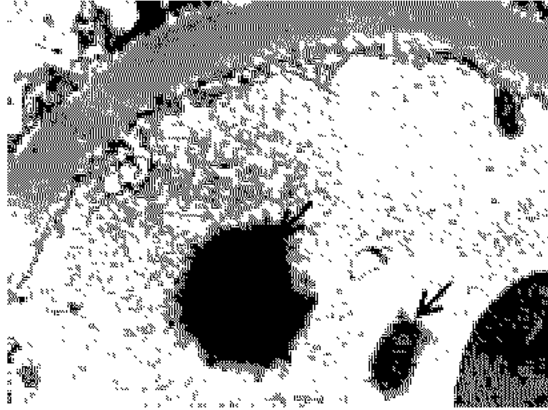


Fig. 12. Artifact during staining. Lead stains appear as fine dots of irregular size (Arrow).

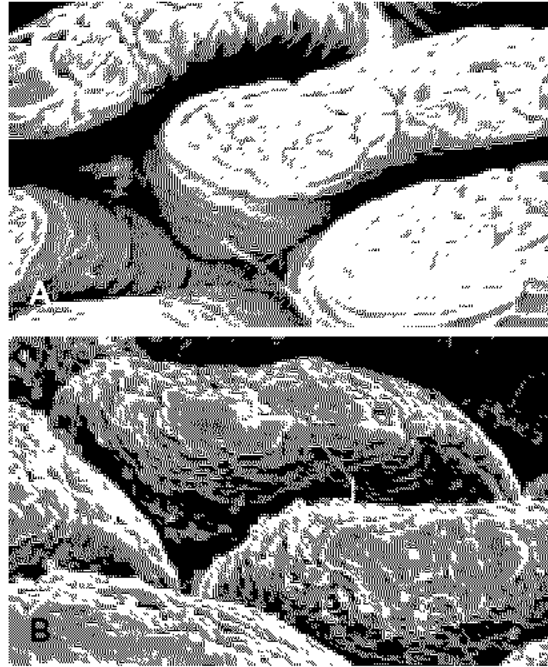


Fig. 13. Artifact caused by incomplete washing before fixation. Incomplete washing leave tissue fragments and other elements on the tissue surface (B) obscuring structural details. A, well-washed sample.

은 모양으로 나타나는 경우도 있으므로 gold를 이용한 면역 염색을 시행한 경우 해석에 주의를 요한다. negative 염색의 경우에서도 uranyl acetate의 경우와 유사하게 인공물이 발생된다. 그 외 염색 후 불완전한 세척으로 다양한 형태의 염색 찌꺼기가 형성될 수 있다.

2) 주사전자현미경 시료 제작

(1) 시료채취 (sampling)

시료채취 시 TEM에서는 문제시 되지 않으나 SEM에서 특별히 주의할 점은 일반적으로 표면구조를 관찰할 목적으로 시료를 만들기 때문에 고정 전에 완충액이나 식염수를 사용하여 조직을 깨끗이 씻어서 표면에 부착되어 있는 이물질들을 잘 제거하여야 한다는 것이다. 만일 불충분한 세척으로 조직표면에 이물질이

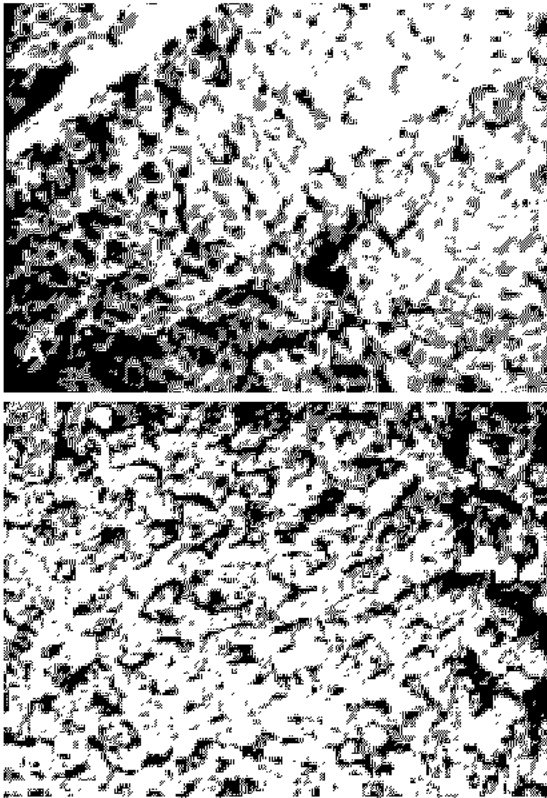


Fig. 14. Artifact caused by improper fixation. When the tissue is fixed with glutaraldehyde (A), tissues are well preserved even in the center of the specimen. When fixed with paraformaldehyde (B), the center of the specimen may crumble.

남아있다면 시료를 관찰함에 있어서 커다란 장애요소가 된다(Fig. 13).

(2) 고정과정 (fixation)

SEM의 경우 paraformaldehyde를 사용하여 고정하는 방법을 사용하는 경우 시료 표면 관찰에는 큰 어려움이 없으나 시료의 내부를 할단하여 관찰하는 경우에는 고정이 불완전하여 부서지기 때문에 정확한 구조 관찰이 어려운 경우가 발생할 수 있다(Fig. 14).

(3) 탈수과정 (dehydration)

부적절한 탈수제의 농도 또는 탈수시간으로 인하여 조직의 수축 또는 팽창 등 부피의 변형이 초래될 수 있다. 만일 불완전하게 탈수된 상태에서 건조시키게 되면 표본 제작 후에 형태의 변형이 생기는 경우가 있는데 (Fig. 15), 습기가 많은 날씨에 건조된 표본을 코팅하지 않고 실온에 오래 방치하는 경우에도 공기 중의 습기에 의해 나중에 표본이 변형되는 경우가 생길 수 있다.

(4) 건조 및 시료부착 (drying & attachment)

건조 시 발생하는 가장 큰 문제점은 조직의 수축에 의한 미세구조의 변형이다. 탈수 후 즉시 시행하는 대기 건조가 수축률이 가장 높고 (Park et al., 1995), HMDS 또는 TMS를 이용한 대기건조가 두 번째, 임계 점건조기(CPD)를 이용한 건조방법이 세 번째, 동결건조기(freezing dryer)를 사용한 건조법이 변형률이 가장 낮다 (Gabriel, 1982). 따라서, 표본에 따라 적절한 건조방법을 선택하여야 한다. 적절하지 않은 건조법을 사용한 경우 세포나 조직이 틀어지거나 끊어지는 현

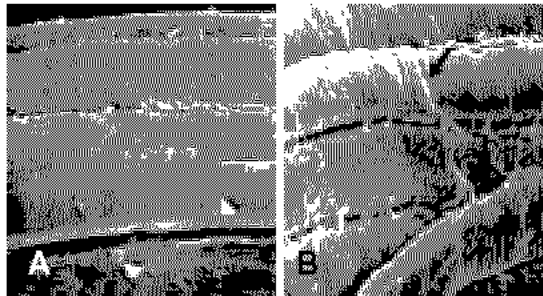


Fig. 15. Artifact during the dehydration. Air dry of the dehydrated tissue causes the shrinkage of the tissue components resulting in the space (B, arrow) and wrinkling of the surface. Proper dehydrated and dried specimen keeps the structure well (A).

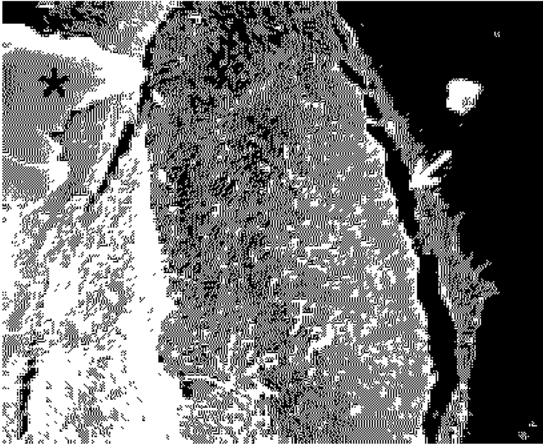


Fig. 16. Artifact caused during the drying process. Tearing of a thin part of the cultured cell is evident (arrow). Also note the contaminant in the drying agent (*).

상 등 변형이 나타난다(Fig. 16).

건조 후 시료를 시료대(specimen stub)에 부착시킬 때에도 시료를 핀셋으로 잡을 때 발생하는 압력으로 시료가 변형될 수 있다. 또한, 전도성 접착제인 silver paste를 사용하는 경우 시료의 바닥 면에만 조금 사용하지 않고 너무 많은 양 또는 너무 농도가 낮은 용액을 사용할 경우에는 시료내의 혈관 또는 내장 등의 빈 공간을 따라서 관찰하고자 하는 시료의 표면까지 은접착제가 올라와서 시료표면을 덮어버림으로써 관찰을 방해할 수 있다.

(5) 코팅 (coating)

과거에 분해능 3~6 nm 정도의 일반적인 주사전자 현미경이 주로 보급되어 있었던 시절에는 SEM의 실제 관찰배율이 1만배 내지 2만배 이하의 낮은 배율이어서 코팅의 재료에 따른 인공산물은 문제되지 않았다. 그러나 오늘날 같이 고분해능 FE-SEM이 많이 보급되어 10만배 이상의 고배율을 관찰이 가능하게 됨에 따라 백금 또는 금으로 코팅을 하는 경우에는 그 코팅재료의 입자에 의하여 실제 시료의 모습의 관찰 함에 있어 방해가 받게 되었다(Fig. 17). 따라서 고배율 관찰 시에는 무경형이며, 코팅두께가 매우 얇게(2 nm 정도) 제작이 가능한 OsO₄를 사용하는 osmium plasma coater를 사용하여 시료표면에 형성되는 입자의 형성도 억제함과 동시에 가능한 한 얇게 코팅을

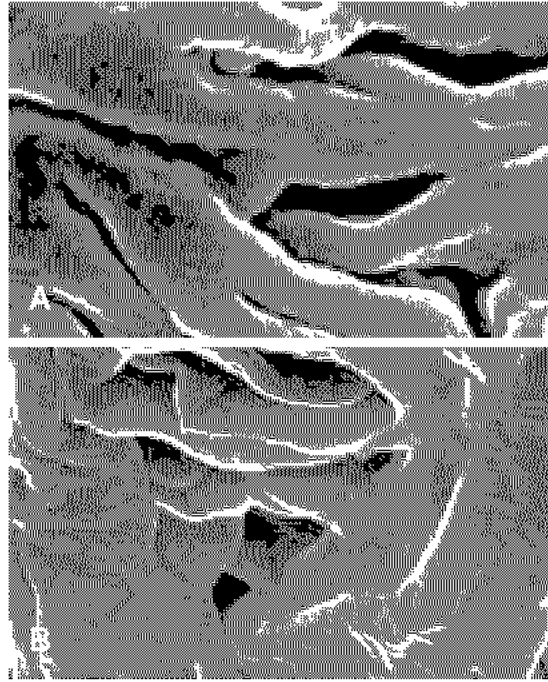


Fig. 17. Artifact caused by coating material. The surface of the sample looks granular due to the deposition of gold particles (A). The granular deposition is not present when coated with osmium tetroxide (B).

하는 것이 바람직하다 하겠다.

Ion coater를 사용할 경우 진공상태가 적절하지 않거나 과도 전류가 흐르는 경우 스파크가 발생하여 코팅재료가 균일하지 않게 표면에 튀는 경우도 있으며 장시간 코팅으로 열이 발생되어 시료를 손상시키기도 한다.

4. 기계작동 시 발생하는 인공물

1) 관찰 (observation)

전자현미경 관찰에서 가장 흔히 발생하는 인공물은 전자빔에 의한 손상(beam damage)이다. 이는 작은 부위에 전자선이 집중적으로 조사될 때 시료가 마치 불에 그을린 것 같이 검게 변화되는 현상을 말한다(Fig. 18). 이 현상은 특히 고배율 관찰에서 심하게 나타나므로 중요한 부위를 관찰하고 촬영할 때에는 저배율로부터 고배율로 바꾸어가면서 관찰하는 것이 바람직하다.

또한, TEM 관찰 중 절편에 주름이 있거나 일부에 구멍이 있는 경우 과도한 전자빔은 절편을 팽창시키거나 형태를 찌그러트리는 경우가 있고, 이 과정에서 상이 흐르는 현상이 발생하여 관찰 및 사진 촬영을 방해할 수 있다(Fig. 11). SEM의 경우 전도성 처리가 부족한 시편에 순간적으로 강한 전자빔이 가해지거나 장시간 관찰시 조직의 약한 부위가 갈라지는 현상이 나타나기도 한다(Fig. 18).

TEM에서와는 달리 SEM에서는 전자가 시료에 모여서 시료의 일부분에 과도한 contrast가 형성되어 하얗게 되거나 촬영 도중 횡선이 발생하는 현상이 있는데 이를 charge-up이라고 한다(Fig. 19). 이러한

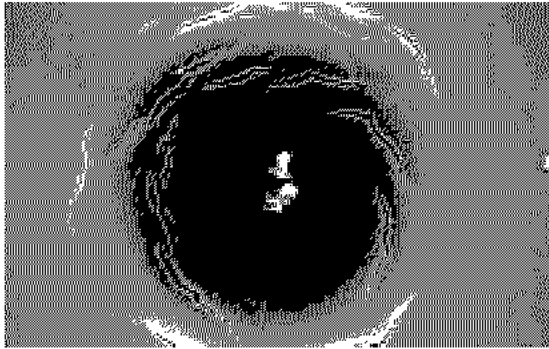


Fig. 18. Artifact due to a beam. Prolonged exposure to a small area (center) tends to burn the tissue. Strong beam often cause tearing or distortion of samples (note cracks).

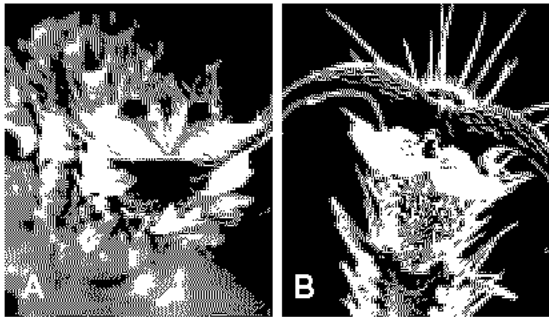


Fig. 19. Artifact due to insufficient conduction coating. Insufficient coating often results in the glaring of the specimen, which is called 'charge-up' (A, central area), which is not present when the coating is sufficient (B).

charge-up 현상은 시료의 전도성 처리가 부족하거나 코팅의 두께가 얇은 경우에 발생된다.

현미경의 축조정이 잘못된 경우에는 전자빔이 한 쪽으로 치우쳐져 한쪽은 밝고 다른 쪽은 어두운 경우가 있다. 현미경의 경체 내가 오염되거나 잔류개스로 인하여 비점수차(astigmatism)가 발생하여 상이 한 쪽으로 찌그러져 보이고 정확한 초점을 맞출 수 없는 경우가 있다(Fig. 20). 이러한 현상들은 특히 고배율 관찰에서 심하게 나타난다. 적절한 관찰을 위한 현미경의 정비는 항상 중요하다 할 것이다.

2) 촬영 (photographing)

사진을 촬영할 때에도 기계적 오류 또는 사용자의 실수로 이중 촬영이 되거나, 진동, 자장, 소음 등 실험실의 조건을 고려하지 않은 채 촬영할 경우에 필름 상에 고스란히 옮겨진다(Fig. 21). 노출시간과 광량(전

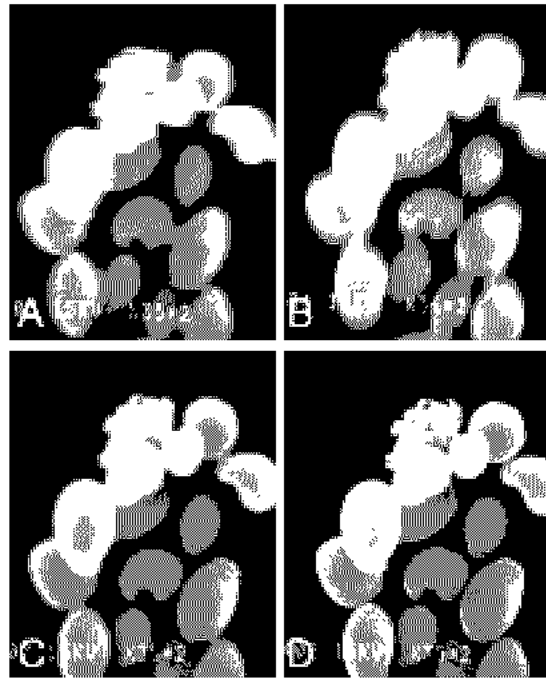


Fig. 20. Artifacts due to the astigmatism. Astigmatism along the X axis (A), Y axis (B) causes the distortion of the image. Even with the astigmatism corrected, when the focus is not correct (C), defocused image is produced. Clear image is obtained when astigmatism is corrected and properly focused (D).

자신의 밝기)이 적절하지 않을 경우에도 과대조(over contrast) 또는 반대로 노출부족으로 인하여 중간색조의 사진을 얻는데 실패하며 결과적으로 검거나 너무 옅은 사진이 되므로 이것 역시 인공산물의 범주에 포함된다(Fig. 22). 촬영 시 초점을 잘못 맞추거나 비점을 보정하지 못하여 상이 흐르는 현상도 정상적인 구조의 식별을 방해하므로 촬영에서 발생하는 일종의 인공산물이다.

5. 사진제작 시 발생하는 인공물

1) 필름현상(developing)

필름 현상 과정에서 만들어지는 인공물로 대표적인

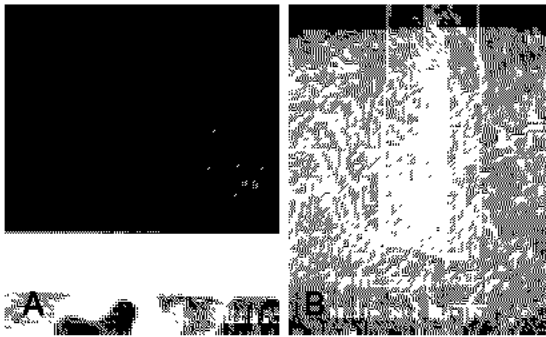


Fig. 21. Artifact caused by double exposure. Error in loading films or personal mistake can expose 2 images on the same film.

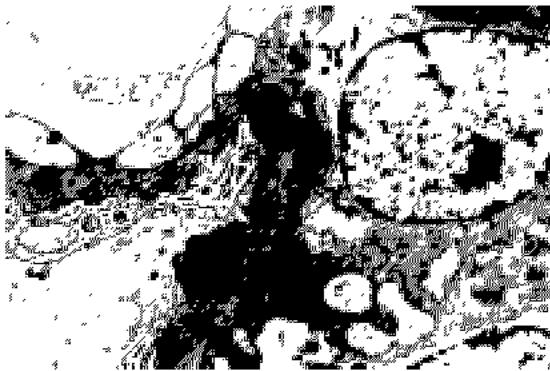


Fig. 22. Artifact caused by faulty exposure. Failure to get optimal exposure condition during photographing (too long exposure with a low brightness) causes a picture with a high contrast.

것은 필름을 잘못 다루어서 생기는 흠집과 필름 막면에 손이 직접 닿았을 때 발생하는 지문 등을 들 수 있는데, 사진 인화 시 인화지에 흔적을 남기므로 필름 취급시에는 항상 주의를 해야 한다(Fig. 23).

필름과 맞지 않은 현상액을 사용하거나, 현상액의 strength, 온도, 현상시간 등을 적절하게 조절하지 못한 경우 촬영 때와 마찬가지로 필름이 너무 검게 되거나 과도한 콘트라스트를 생성하는 경우도 있고, 반대로 너무 연한 색조 또는 부족한 콘트라스트의 필름이 될 수도 있다.

2) 사진인화(printing)

사진제작 과정 중 만들어지는 인공물은 실제 필름에 있는 것보다는 주의 부족으로 발생하는 경우가 많다. 예를 들면, 인화액이 부족하거나 또는 전체 노출면이 신속하게 인화액에 담기지 못하는 경우 사진의 일

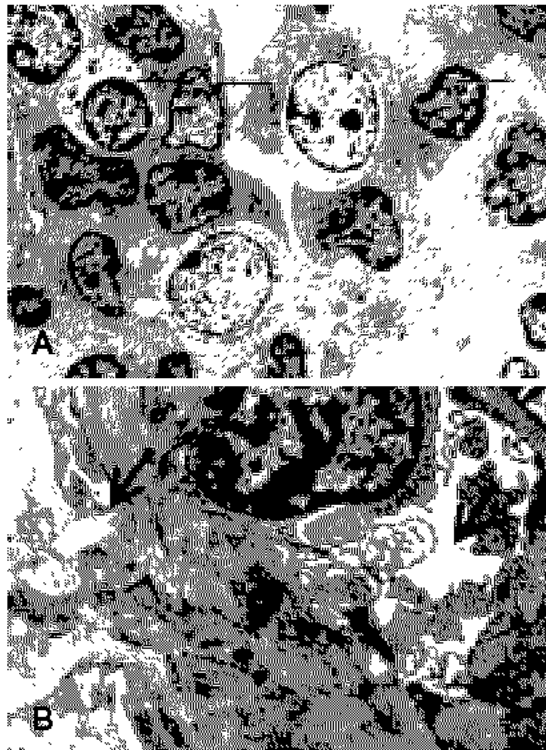


Fig. 23. Artifact due to careless handling of the film. Scratches (A) and fingerprints (B, arrow) are among the most common artifacts produced due to careless handling of the film.

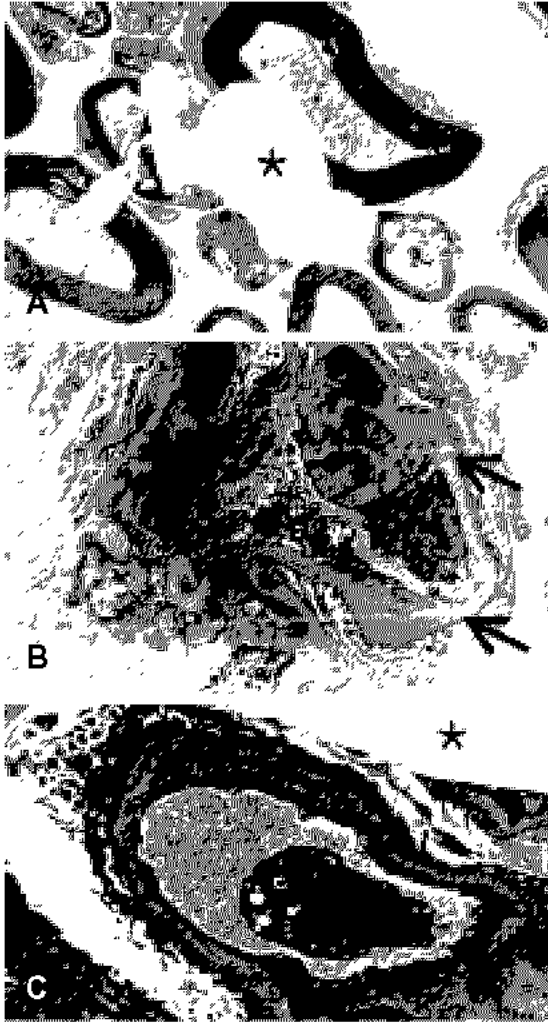


Fig. 24. Artifacts during the processing of the prints. Partial failure to contact the developer leave a white area (A, *) on prints. When leaving the paper in the developer tray without stirring, parallel white lines are formed (B, arrow). Failure to wash the fixer leaves an area without an image (C, *).

부에 상이 형성되지 않고 하얗게 되거나 흐리게 인화되는 경우가 생긴다(Fig. 24A). 또 현상 용기의 바닥에 인화지가 밀착되어 있는 채로 인화액 속에서 인화지를 흔들어 주지 않는 경우 역시 부분적 현상 부족으로 띠가 형성된다(Fig. 24B). 사진인화 시 인화지나 필름을 맨손으로 만져 지문이 발생되지 않게 주의할 요

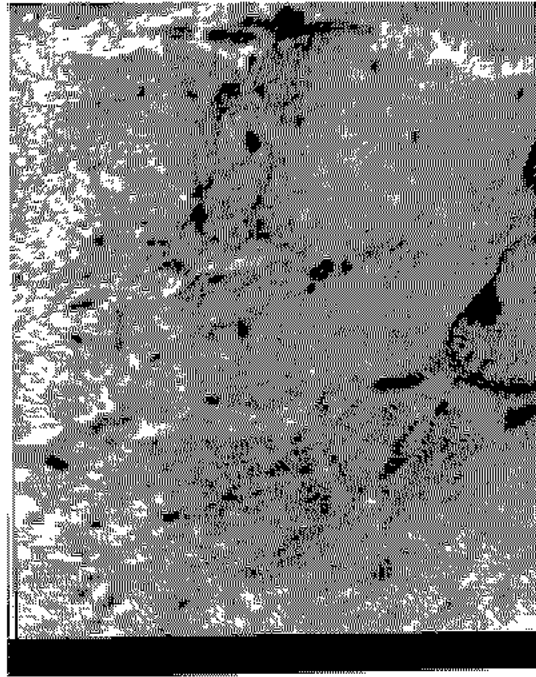


Fig. 25. Artifact made during the exposure. Touching the enlarger may shift the location of printing paper results in the double exposure.

한다(Fig. 23B). 수세 및 정착 시간이 부족하거나 수명이 다한 정착액을 사용할 경우 사진에 붉거나 노란, 경우에 따라서는 푸른 얼룩을 만든다(Fig. 6). 이외에도 필름현상에서와 같이 현상시간과 현상액의 온도 등은 사진의 질에 지대한 영향을 미친다.

인화 중에 확대기를 건드리거나 인화지를 건드리는 경우 사진의 필름 혹은 이중 노출 현상이 생길 수도 있고(Fig. 25), 확대기 빗가리개의 부정확한 사용으로 인한 검은 띠가 만들어질 수도 있다. 이외에 극히 드물지만 정착 후 수세과정에서 인화지가 물위에 노출되어 수세가 안되고 결국에 물이 닿지 않은 부분은 상이 사라져서 하얗게 되는 경우도 있다(Fig. 24C).

결 론

본 고에서는 통상적인 전자현미경 관찰을 위한 시료의 채취로부터 사진의 현상, 인화에 이르는 여러 단

계에서 발생될 수 있는 인공물들과 그 원인을 살펴보았다.

시료의 미세구조를 잘 보존하고 해석하기 위하여는 시료제작, 관찰, 사진 촬영의 모든 단계에서 발생하는 인공물들을 잘 이해할 필요가 있다.

참 고 문 헌

- Bozzola JJ, Russell LD: Electron Microscopy. Jones And Bartlett Publishers, Boston, USA, pp. 377-404, 1992.
- Chung JW: Human Tissue Biology. 2nd Ed., SooMoonSa Publishing, Seoul, Korea, pp. 82-83, 2001. (Korean)
- Gabriel BL: Biological Scanning Electron Microscopy. Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp. 108-115, 1982.
- Hayat MA: Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy. Academic Press, Orlando, 1986.
- Hayat MA: Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New York, 1981.
- Hayat MA: Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Vol. 1, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1970.
- Johannessen JV (Ed.): Electron Microscopy in Human Medicine. Vol. 1, Instrumentation and Techniques.

- McGraw Hill International Book Co., New York, 1978.
- Park CH, Jang BJ, Cho KY: Comparison of Scanning Electron Microscopic Specimens Dried with Different Methods. Korean J Electron Microscopy 25(3): 33-39, 1995. (Korean)
- Sevéus L, Johannessen JV: Chapter 6 Embedding, Sectioning, and Staining. In: Electron Microscopy in Human Medicine. Vol. 1, Instrumentation and Techniques. (Ed.: Johannessen JV). McGraw Hill International Book Co., New York, pp. 116-186, 1978.

<국문초록>

전자현미경 관찰에 있어서 최종적인 목표는 정확한 정보를 포함하는 좋은 사진을 얻는 것이라 할 수 있다. 이를 위하여는 사진에 인공물이 포함되지 않도록 표본의 채취, 처리, 관찰 및 사진 작업 등 모든 단계에서 주의를 기울여야 한다. 본 고에서는 통상적인 전자현미경 관찰을 위한 시료의 채취로부터 사진의 현상, 인화에 이르는 여러 단계에서 발생될 수 있는 인공물들과 그 원인을 살펴보고 해결책을 제시함으로써 전자현미경 관찰을 위한 표본의 올바른 제작과 미세구조의 해석에 도움을 주고자 하였다.