

# SEM 시료제작

박창현 (고려대학교 의과대학)

## I. 조직채취(Sampling)

- 1) SEM 조직에서도 TEM 에서와 마찬가지로 가능하면 적게 채취한다. 그러나 관찰하고자 하는 표면적은 넓고, 두께는 얇게 채취하는 것이 좋다. (소장, 어떤조직의 surface 를 볼 경우)
- 2) Fracture(할단)를 할 경우는 조직을 할단할때 용이하게 하기 위하여 한쪽을 약간 길게 즉 1x1x4mm 정도로 채취한다.
- 3) Fracture를 할 조직을 제외하고는 pH7.2 - 7.4 정도의 buffer 나 saline을 이용하여 고정전에 surface 에 부착된 이물질을 반드시 제거하여야 한다(소장, 위장 등).
- 4) 실험동물을 사용시에는 마취후 살아있는 상태하에서 필요 부분을 잘라낸 후 신속히 고정액에 담그어야 하며, 해부시 시간이 오래걸리거나 조직이 손상되기 쉬운 조직은 관류고정을 실시한 후 조직을 분리한다(뇌조직).

## II. 고정(Fixation)

### 1) 고정의 목적

1. 고정이란 세포의 autolysis를 방지하고 세포성분의 응고 및 경화 시키는 것이다.
2. 세포의 구조가 살아있는 상태에서의 변화를 최소화시켜서 잘 보존시킨다.
3. 탈수 과정및 후에 전자 beam 에 노출 되었을때 조직을 보존하기 위함이다.

### 2) 고정액 (fixative)의 선택

1. 이상적인 고정액은 조직의 수축 또는 팽창등의 변화를 최소화하며 빨리조직 내에 침투하는 고정액이다.
2. 전고정에는 aldehyde 계통은 2%정도의 glutaraldehyde fixative나 2% 정도의 paraformaldehyde fixative나 많이 사용된다.
- 3.. TEM 조직 고정에는 glutar. fixative 단독으로 사용하거나 paraform.과 glutar. 혼합 fixative를 많이 사용한다.

4. SEM 조직 고정시 특히 할단용 시료는 glutar. fixative 만을 사용하는 것이 좋다.
5. 후고정에는 중금속인 1 - 2% OsO<sub>4</sub>를 사용하여 조직을 더욱 안정시키고 전기전도성을 증가 시킨다.

### 3) 완충액(buffer)의 사용

1. 고정액의 pH와 삼투압을 조절하기 위하여 완충액을 사용함(동물시료; pH 7.2 - 7.4, 식물시료; pH 6.6 - 6.8, 물을 많이 함유하고있는 시료 즉 원생동물, 태아기 조직 등; pH8.0 - 8.5).
2. 전고정과 후고정 사이에서 이들 고정액들간의 화학적 반응을 방지하기 위하여 고정액에 사용된 같은 buffer 로 세척을 한다.
3. 후고정후에도 과도한 fixative 의 제거 및 고정액과 탈수제 사이의 반응을 방지하기 위하여 세척을 한다.
4. Buffer 에는 phosphate, cacodylate, ueronal acetate buffer의 많은 종류가 사용되나 통상 phosphate 나 cacodylate buffer가 많이 사용됨.

### 4) 고정액의 온도 및 시간

1. Autolysis또는 extraction 을 최소화 하기 위해서 0 - 4°C 의 저온에서 실시하는 것이 좋다(특히 소화효소를 다량 함유한 췌장).
2. 전고정액에는 2 - 4시간 고정한다.(경우에 따라서 over night 시킨다.)
3. 후고정액 (OsO<sub>4</sub>)에는 1 - 2시간 정도 고정한다. OsO<sub>4</sub>를 이용하여 화학적 etching을 할 경우에는 2 -3일 정도 시행한다.
4. RBC 또는 단세포 시료는 시료가 매우 작으므로 전고정을 1시간, 후고정을 30분 정도로 줄여도 무방하다.

### 5) 고정액 사용시 주의 사항

1. OsO<sub>4</sub>는 1gm 으로 시판되는데 용해가 잘 안되므로 최소한 사용하기 1일전 증류수에 2% 용액으로 만들어 갈색병에 담아서 냉장고에 보관한다.
2. 고정액은 눈, 코의 점막, 기도 등에 손상을 주므로 작업시에는 반드시 hood에서 다룬다.

## III. 탈수(Dehydration)

### 1) 목적

1. 시료중 수분이 남아 있으면 건조할 때 물의 표면 장력에 의해 조직에 변형을 초래한다.
2. 인계점 건조시 사용되는 액체 CO<sub>2</sub> 나 freon등과 물은 완전히 혼합되지 않으므로 제거하여야 한다.
3. 탈수시는 물보다 표면 장력이 낮은 유기 용매로 서서히 대체시킨다. 즉 50%부터 100% 까지 점차로 대체시킨다.

### 2) 탈수방법 및 시간

1. 조직의 성질과 크기등에 따라서 탈수 시간이 달라지나 가능한한 짧은 시간내에 실시한다.
2. 탈수시간이 너무 길면 조직으로 부터 물질의 유출 (extration)의 우려와 조직의 수축등이 일어 날 수 있다.
3. 탈수의 실제방법

50%	Ethanol	10 - 20 min	1회
60%	”	”	“
70%	”	“	”
90%	“	”	“
95%	”	“	”
100%	“	”	3회

### 4. Isoanyl acetate 에 치환

Iso : Ethanol	- 1:3	10 - 15 min	1회
	1:1	“	”
	3:1	“	”
Ab. Iso	-	10 - 20 min	2회

## IV. 건조(Dry)

### 1) 목적

탈수후 시료에 포함되어 있는 탈수용액을 제거하기 위하여 실시하며 건조가 완전하지않을 경우에는진공에 방해가 되고 진공 중에서 시료가 수축되며 coating이 원활히 실시될 수 없으며

로 시료의 보존과 좋은 coating을 얻기 위하여 완전히 건조되어야 한다.

## 2) 방법

Air dry(단단한 유각류), Freeze dry, C P D 이용 등이 있으며 통상 일반적인 조직은 C P D를 많이 사용하나, 배양시료 같이 plastic dish 채로 건조를 하는 경우에는 HMDS(hexamethyl-disilazane) 또는 TMS(tetramethyl-silane) 등의 시약을 이용하기도 한다.

## V. 시료의 부착

건조가 완료된 시료를 silver paste, 양면 tape, 목공용 본드등을 이용하여 시료대(stub)에 부착한다. 관찰시 charge-up 현상을 고려하여 윗부분이 아래부분 보다 넓게 시료를 트리밍하여 부착시키는 것이 좋다.

## VI. 증착(Coating)

### 1) 목적

1. 비전도성 시료의 도체화 (charge-up 현상의 방지): 비전도성 시료 (생물체)의 경우 조사된 전자선의 일부가 시료내에 charge-up 되어 상에 이상 contrast 또는 상의 distortion 등이 생기게 되므로 이것을 방지하고자 실시한다.
2. 전자선 손상의 경감: 시료중에는 조사된 전자에 의해 시료가 분해되기도 하고 화학 반응을 일으키기도 하므로 (특히 고분자, 생물시료)이것을 방지 하고자 coating 을 하면 coating 막이 시료에 전자선의 직접 접촉을 방지하여 열에 대하여 보호해주고 시료의 수축 및 팽창도 방지 할 수 있다.
3. 2차 전자 방출증가: SEM을 시료로 부터 2차 전자상을 관찰하기 위해서는 2차 전자 발생이 많을수록 좋으므로 coating을 한다.
4. 표면만의 정보로 한정: SEM은 시료 표면으로 부터의 2차 전자만으로 상의 형성이되는 것이 아니라 내부의 정보를 가진 전자도 반사되어 나오므로 여러가지 정보가 혼입되어 있다. 따라서 coating을 하여 내부 정보를 차단하여 표면의 정보만을 관찰할 수 있게 한다.

### 2) 방법

1. 일반적으로 ion coater를 사용하여 진공상태가 비교적 낮은 0.05 torr정도로 배기된 cha

mber 안에서 coating을 한다.

2. Pt, Au, Au-Pd, Pt-Pd등의 금속을 이용하여 100 - 200 Å 정도의 두께로 coating을 실시한다.

3. F.E.SEM의 경우는 매우 낮은 가속 전압 (2kv 이하)에서도 좋은 상을 관찰할 수 있으므로는 매우 얇게 coating하여야 좋은 관찰상을 얻을 수 있다.

4. Natural SEM(Low Vacuum SEM)으로 시료를 관찰할 경우에는 coating하지 않아도 관찰이 가능하며 나무잎 또는 섬유등의 관찰에 적합하지만 수분을 함유한 시료는 관찰시간이 경과함에따라서 시료에 변형이 발생한다.