

건조된 몇가지 생물시료의 현미경적시료전처리방법과 고진공주사전자현미경관찰방법에 대한 연구

김은철, 박규희

우리는 고진공주사전자현미경(《JSM-6610A》)을 리용하여 건조된 생물시료의 여러가지 특성들을 밝히기 위한 현미경적시료전처리방법 및 관찰방법을 확립하였으며 몇가지 대상시료에 적용하였다.

1. 꽃가루의 겉모양관찰을 위한 현미경적시료전처리방법과 관찰

일반적으로 생물시료(세포, 장기, 조직 등)들은 많은 물을 포함하고있으므로 연하고 파괴되기 쉬우며 건조, 온도변화, 당침, 구부림과 같은 외적요인에 의해 쉽게 변형되기때문에 시료전처리공정이 복잡하고 관찰조건에 대한 요구도 높다.[1] 최근에 생물시료를 기본대상으로 하는 전용주사전자현미경들이 출현하여 많이 리용되고있는데 이러한 현미경들에서는 대체로 저진공상태에서 시료를 관찰할수 있게 설계되어있다. 고진공주사전자현미경인 경우 진공도가 높으므로 그것에 따르는 시료전처리방법과 관찰방법을 확립하는것이 중요하다.

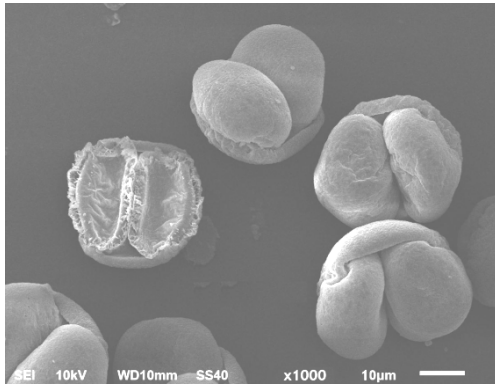
꽃가루의 겉면에는 지방질과 같은 물질이 부착되어있으므로 본래의 구조가 숨겨져있는 경우가 많기때문에 특수한 처리를 진행하여 썩어진 물질을 완전히 제거한 다음 관찰을 진행해야 자기의 본래모습을 관찰할수 있다.[3]

우리는 꽃가루시료로서 소나무꽃가루를 채취하고 다음과 같은 방법으로 시료전처리를 진행하였다.

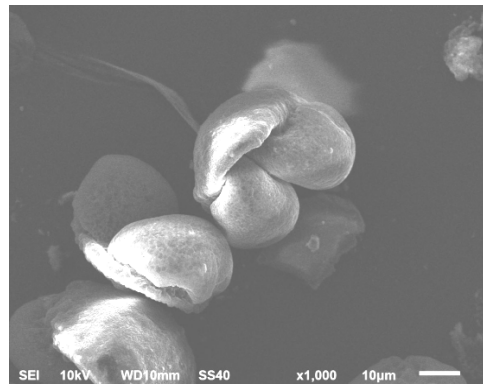
10% KOH를 넣은 시험관을 80~90℃로 가열하고 소나무꽃가루를 넣은 다음 다시 5min동안 가열한 후 1 200~1 300r/min의 속도로 10min동안 원심분리하여 꽃가루를 포집한다. 이것을 증류수로 3번 세척한 다음 초산을 넣고 원심분리하여 위에 뜬 초산을 버리고 초산 : 류산(9 : 1)의 용액을 넣어 80~90℃에서 5min동안 가열한다. 다시 원심분리하여 위에 뜬것을 버리고 증류수로 3~5번 세척한 다음 항온건조기(60℃)에서 1h동안 건조시킨다. 주사전자현미경시료대에 전도성탄소량면접착테프를 붙인 다음 그위에 건조시킨 꽃가루를 뿌리는 방법으로 붙이고 전도처리를 진행한다. 전도처리조건은 다음과 같다.

탄소증착은 증착함진공도 1.5Pa, 전압 1.0V에서 10s씩 3회, 금증착은 증착함진공도 2.0Pa, 전압 1.0V, 전류 4.0mA에서 60s동안 1회 진행한다.

이와 같은 방법으로 시료전처리를 진행한 소나무꽃가루의 주사전자현미경사진을 시료전처리를 진행하지 않은 시료와 대비하여 관찰하였다.(그림 1) 실험에 리용한 주사전자현미경(《JSM-6610A》)의 가속전압은 10kV, 작용거리는 10mm이다.



ㄱ)



ㄴ)

그림 1. 소나무꽃가루의 SEM사진

ㄱ) 시료전처리를 진행한 경우, ㄴ) 시료전처리를 진행하지 않은 경우, 확대배율 1 000배

그림 1의 ㄴ)에서 보는바와 같이 시료전처리를 진행하지 않은 경우에 대전현상이 명백하게 관찰되었으며 화상질도 떨어졌다는것을 알수 있다.

소나무꽃가루의 확대된 SEM사진은 그림 2와 같다.

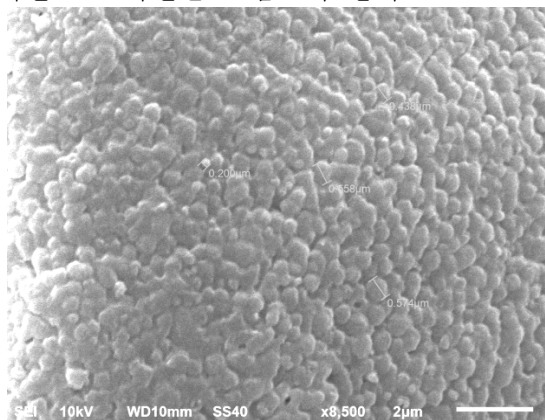


그림 2. 소나무꽃가루의 확대된 SEM 사진

확대배율 8 500 배

그림 2에서 보는바와 같이 시료의 결면구조가 명백하게 관찰되었으며 결면은 450~600nm정도 크기를 가진 작은 립자들로 덮여있다는것을 알수 있다.

2. 낱알시료의 자름면만들기와 조직관찰

건조된 낱알시료들은 생물시료중에서 그중 굳은 대상이지만 자름면을 만들 때 늘리우거나 칼자리가 생길 가능성이 높으므로 적합한 자르기방법을 적용하여야 한다.[1, 2]

우리는 낱알시료를 에폭시수지로 싸서 자름면을 만드는 방법을 대상시료에 적용하였다. 그 과정을 보면 다음과 같다.

금속판위에 낱알시료를 1~3알 놓고 그위에 에폭시수지를 떨어준다. 에폭시수지가 경화된 다음 금속판에서 떼어낸 덩어리를 러지에 싸서 금속판위에 올려놓고 도전칼 또는 조각칼을 시료의 중간위치에 대고 망치로 내리쳐서 자름면을 만들었다.

이와 같은 방법으로 흰쌀시료와 팽화흰쌀시료의 자름면을 만들고 그것에 대한 SEM 관찰을 진행하였다.(그림 3)

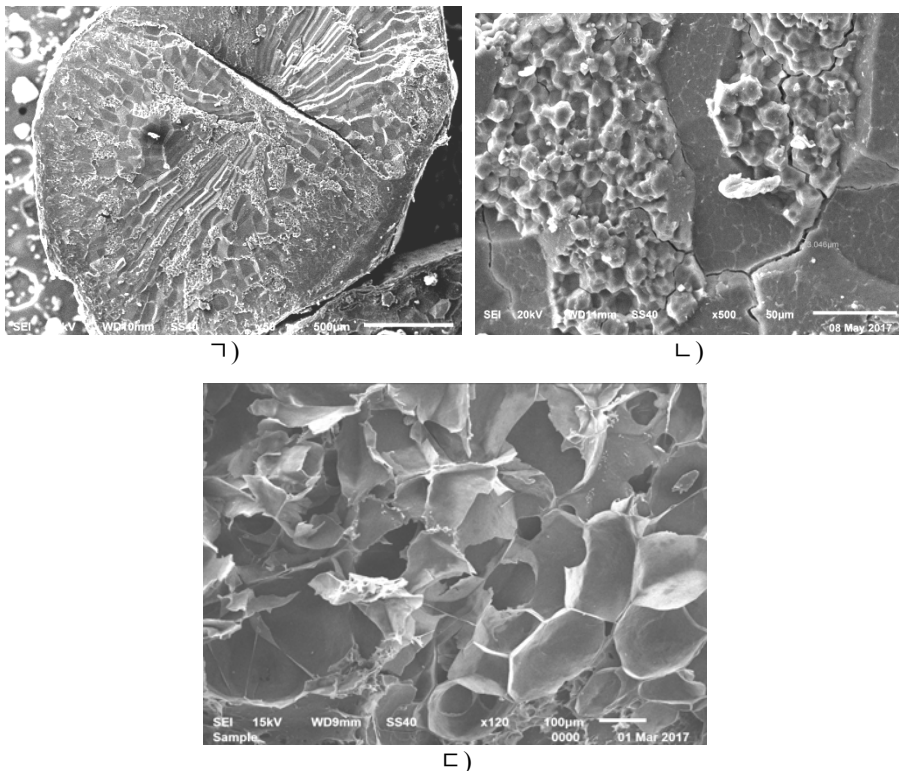


그림 3. 흰쌀시료(㉠, ㉡)와 팽화흰쌀시료(㉢)의 자름면에 대한 SEM사진
㉠) 50배, ㉡) 500배, ㉢) 120배

그림 3의 ㉠)로부터 흰쌀시료의 자름면이 비교적 평탄하게 얻어졌다는것을 알수 있으며 ㉡)로부터 흰쌀시료의 균열이 간 홈과 내부구조를 명백히 관찰할수 있다는것을 알수 있다. 또한 ㉢)로부터 팽화과정에 전반적으로 100~200 μ m크기의 닫긴 공극이 골고루 형성되고 공극벽은 1~3 μ m정도의 두께를 가지고 밀집되어있다는것을 알수 있다.

3. ㅅ지구 구조토의 립자모양 및 조성관찰

분말상태의 ㅅ지구 구조토시료는 작은 구조류화석의 모양이 보존되도록 전도성탄소량면접착테프우에 바르는 방식으로가 아니라 솜봉에 분말을 묻혀 뿌리는 방법을 적용하고 압축공기를 불어 잘 부착되지 않은 알갱이들을 제거하였다. 다음 금증착을 진행하고 가속전압 20kV, 작용거리 10mm, 확대배율 5 000에서 SEM관찰을 진행하였다.

ㅅ지구 구조토시료에 있는 여러가지 모양의 구조류화석의 SEM사진은 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 ㅅ지구 구조토에 원반형, 원기둥형, 깃형의 각이한 모양을 가진 구조류화석립자들이 들어있다. 또한 화석립자속에 있는 많은 기공들을 관찰하였는데 그것들의 크기는 150~250nm정도이다.

매개 모양의 알갱이들에 대한 구체적인 크기는 주사전자현미경 조종프로그램의 측정 도구를 리용하여 측정하였다.

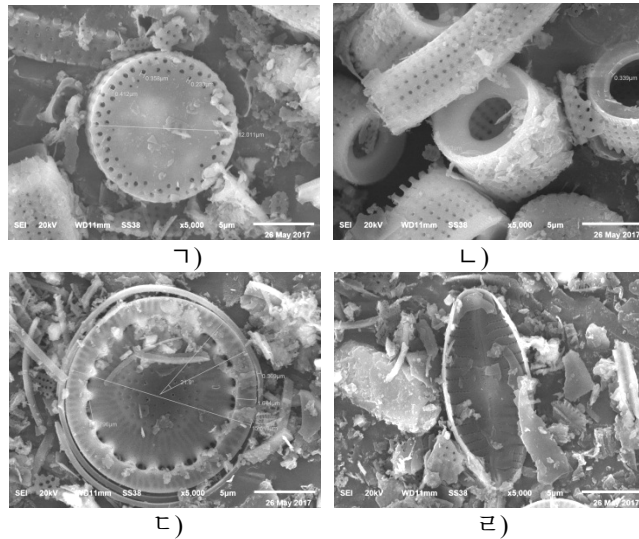


그림 4. 여러가지 모양의 구조류화석의 SEM사진
 ㉠, ㉡) 원반형, ㉢) 원기둥형, ㉣) 깃형

다음으로 주사전자현미경과 결합된 에네르기분산형X선분광기(EDX)를 리용하여 ㉠구 구조토에 대한 원소조성분석을 진행하여 구조류화석의 세포조직과 그 주위물질에 대하여 해명하였다. ㉠구 구조토시료의 EDX측정결과는 표와 같다.

표. ㉠구 구조토시료의 EDX측정결과

원소	에너지/keV	함량		k결수
		질량%	원자%	
O	0.525	51.54	67.43	57.494 3
Mg	1.253	0.86	0.74	0.541 0
Al	1.486	6.64	5.15	5.083 5
Si	1.739	29.61	22.07	25.177 9
P	2.013	0.54	0.37	0.456 3
Ca	3.690	0.94	0.49	1.113 3
Ti	4.508	0.81	0.35	0.816 3
Fe	6.398	9.06	3.40	9.317 4
합		100.00	100.00	100.000 0

표에서 보는바와 같이 세포조직기질은 기본성분이 Si, O로서 규산질이며 이 원소외에도 Al과 Fe 등이 검출되었다. 이것은 구조류화석에 토양성분이 서서히 침투하였다는것을 말해준다.

맺 는 말

우리는 고진공주사전자현미경(《JSM-6610A》)을 리용하여 꽃가루나 낱알, 화석과 같은 여러가지 생물건조시료들의 특성을 밝힐수 있는 새로운 주사전자현미경적시료전처리방법과 관찰방법을 확립하였다.

참 고 문 헌

- [1] 박규희 등; 주사전자현미경분석기술, 김일성종합대학출판사, 229~241, 주체105(2016).
- [2] Stephen Murray et al.; Methods in Cell Biology, 88, 320, 2008.
- [3] 山田满彦; 走査電子顕微鏡, 本電子顕微学会開東支部共立出版社, 310~330, 2010.

주체107(2018)년 1월 5일 원고접수

On the Methods of the Microscopic Sample-Pretreatment and the Observation of High-Vacuum SEM for Several Dried Biological Samples

Kim Un Chol, Pak Kyu Hoe

We established the methods of the microscopic sample-pretreatment and the observation for verifying the characteristics of the several dried biological samples such as pollens, grains and fossils using the high-vacuum scanning electron microscope(“JSM-6610A”) and energy dispersive X-ray spectrometer(EDX).

Key words: SEM, EDX, dried biological sample