

극저온 전자현미경을 이용한 연성 나노소재의 분석

Cryogenic Transmission Electron Microscopy :A Powerful Tool for Structure Analysis of Soft Materials

김호준 | Hojun Kim

Center for Biomaterials, Biomedical Research Institute, KIST,
5, Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 02792, Korea
E-mail: 90hojun@gmail.com

1. 서론

연성 소재(soft materials) 혹은 복잡 유체(complex fluid)는 큰 반응 함수를 지녀, 작은 외부 영향에도 시스템의 구조와 동역학이 크게 변화하는 시스템을 일컫는다. 우리 몸을 구성하는 생체 분자에서부터 플라스틱, 그리고 liquid crystal display(LCD)에 이르기까지 연성 소재는 우리 삶에 거의 모든 면에서 밀접하게 연관되어 있다. 이처럼 다양한 분야에 쓰이는 연성 소재는 그 구조가 기능을 결정짓기 때문에, 연성 소재의 구조를 제어하려는 노력이 계속되어오고 있다.

하지만 연성 소재는 일반적인 분석 기술로 그 구조를 분석하기가 어렵다. 대표적인 구조 분석 장비인 전자현미경은 샘플의 실제 모습을 원자수준까지 직접적으로 보여주기 때문에 굉장히 강력한 분석 기술이다. 하지만 전자현미경은 강한 전자 빔을 샘플에 일정하게 조사하기 위해 고진공을 필요로 하는데, 강성 소재(금속, 세라믹 등)와 달리 연성 소재는 고진공과 전자빔에 취약하기 때문에 일반적인 전자현미경을 사용하기 어렵다.^{1,2} 이를 해결하기 위해 전자 밀도가 큰 우라늄 기반의 염색법이나 무기물 나노입자를 결합시키는 등의 간접적인 해결책이 고안되어 사용되어왔으나,³ 샘플의 변형과 낮은 해상도로 인해 이미지에서 많은 인위적인 요소(artifact)가 생기기 때문에 연성 소재의 구조를 분석하는 것은 굉장히 제한적이었다.^{1,2}

2017년 노벨 화학상이 세명의 과학자(Jacques Dubochet, Joachim Frank, 그리고 Richard Henderson)에게 ‘for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution’의 공로로 수여되었다. 즉, 연성 소재의 변형 없이 원자 수준의 해상도(~1.5 Å)로 이미지를 얻을 수 있게 된 것이다.⁴ 이를 위해서는 샘플을 용액 혹은 벌크 상태에서 급냉하여 500 nm 이하 두께의 비정질 상태로 얼리는 것이 필요하다.⁵ 액상 샘플의 경우, 과량의 용액을 전자현미경 grid에 도포한 후, blotting 및 급냉하는 과정을 거치게 되는데, 이 때 용매의 증기압, blotting 조건(시간, 힘, force) 등 다양한 중요한 변수들을 최적화해야만 원하는 두께의 균일한 샘플을 준비할 수 있다. 극저온 전자현미경의 가장 힘든 점은 샘플을 보기 전까지 어디서 잘못되었는지 확인할 수 없다는 점이다. 짧은 시간이라도 극저온 상태(물 기준 -165 °C 이하)를

Author



김호준

2012
2017
2018-2020
2020-현재

KAIST 신소재공학과 (학사)
University of Illinois at Urbana-Champaign Materials Science and Engineering (박사)
KIST 의공학연구소 위촉연구원 (전문연구요원)
KIST 바이오·메디컬융합연구본부 선임연구원

유지하지 못한다면 얼음 결정 등 많은 불순물에 의해 제대로 된 이미지 분석이 힘들어진다. FEI사의 극저온 전자 현미경 전문가는 ‘샘플 준비 과정 전체가 아주 부드럽게 이루어졌을 때’라는 모호한 표현으로 성공적인 샘플 준비 비법을 말하곤 했다. 이처럼 TEM grid 위에 샘플을 성공적으로 준비하는 것이 가장 어려운 부분이지만, 지금은 Vitrobot과 cryo-tomming 기계의 발달로 간단한 트레이닝만 거치면 수개월 이내에 누구든지 사용할 수 있는 기술이 되고 있다. 본고에서는 극저온 전자현미경의 원리와 사용 방법을 실질적인 측면에서 다루고자 한다. 특히 용액 상태 샘플에서 가장 많이 사용하는 Vitrobot을 이용하는 방법에 대해 자세히 다룰 것이다. 그리고 연성 소재의 나노구조 분석에 대한 실질적인 예시로 인지질기반의 나노구조체를 소개하며 본고를 마무리 하고자 한다.

2. 본론

2.1 극저온 전자현미경의 원리

기존의 전자현미경은 고진공과 높은 에너지의 전자를 사용하기 때문에 연성 소재의 변형 없이 관찰하는 것이 불가능했다.^{1,2} 즉, 고진공 자체에 의해 용매가 고체 결정으로 상변이 하면서 연성 소재의 구조가 변이 되거나, 전자빔에 의해 재료 자체가 비가역적으로 변성되는 등의 문제로 연성 소재 분석에 명확한 한계점을 지니고 있었다. 이를 획기적으로 해결한 방식이 바로 극저온 전자현미경(cryo-transmission electron microscopy, cryo-TEM)이다.⁶ 극저온 전자현미경은 샘플을 극저온으로 급냉(quenching)시켜 연성 나노 소재의 구조를 용액상에서와 동일한 형태(morphology)로 freeze 시킨 후 극저온을 유지하면서 샘플을 관찰하는 현미경이다.⁷ 용매의 경우 이론적으로는 어는점과 재결정 온도만 너무 낮지 않으면 어떠한 용매라도 사용이 가능하나, 주된 사용처가 생체소재적인 것을 감안하면 물이 용매인 경우가 압도적으로 많다. 실제로 Vitrobot이라 불리는 FEI사의 샘플 준비용 장비에서도 ‘humidity’만 조절할 수 있도록 기본 설정이 되어 있다. 샘플을 극저온으로 급냉시키는 cryogen 또한 굉장히 중요한데, 용매를 비정질상으로 급냉하기 위해서는 1) 열전도도가 높고 2) 어는점이 용매의 재결정화온도보다 낮으며, 3) 상대적으로 높은 열 용량을 지녀야 하므로 에탄이나 프로판 등이 흔히 사용되고 있다.⁷ 성공적으로 샘플을 급냉시킨 후에는, 전자현미경으로 온도 상승 없이 샘플을 ‘transfer’ 해야 한다. 전자현미경 관측을 위한 모든 준비가 끝나면, 연성 소재의 낮은 전자밀도 때문에 샘플에 따라 수 마이크로미터정도 underfocusing한 조건에서 샘플을 관측한다. 실질적인 샘플 준비 측면에서 보면, 새로운 샘플의 경우 단 한번에 원하는 이미지를 얻는 경우는 드물다. 이 모

든 과정을 적어도 수 차례 반복해야 비로소 원하는 이미지를 얻을 수 있다.

극저온 전자현미경은 일반적인 이차원 이미지를 얻는 경우가 대부분이다. 예를 들어 단백질이나 바이러스처럼 그 구조가 균일한 샘플은 많은 이미지를 얻으면 삼차원 구조를 얻을 수 있다. 그러나 불균질한 연성 나노입자의 삼차원 구조를 얻을 수 있는 cryo-TEM tomography의 경우에는, 얼음 두께와 전자 빔 밀도 등을 정밀하게 제어해야 하기 때문에 굉장히 여러 면에서 어려운 기술에 속한다. 최근에는 ‘Serial EM’ 등 자동화된 프로그램을 설치하고 셋업해주는 서비스도 있으며, 이를 통해 일반 유저들도 이러한 삼차원 이미지를 얻을 수 있게 되었다.

2.2 샘플 준비

2.2.1 샘플 종류 및 조건

극저온 전자현미경으로 분석 가능한 용액 샘플은 이론적으로는 aggregate이 일어나지 않는 한 모든 연성 나노 입자 용액 샘플이 가능하나, 현실적인 면에서는 1) 물을 용매로 하고 2) aggregate이 일어나지 않는 한 높은 농도(~mg/ml)를 가지며, 3) 나노입자 크기가 500 nm를 넘지 않는 샘플이 극저온 전자현미경 분석이 가능하다. 비정질 얼음 두께가 500 nm를 넘으면 통상적으로 사용하는 전자현미경의 전자(200-300 keV)가 투과하기 힘들어지기 때문에 통상적으로는 500 nm입자 크기가 상한선으로 여겨진다.⁵

2.2.2 급속 동결(Vitrification)

본 고에서는 용액에 분산된 연성 나노 입자 분석을 초점에 두고 있기 때문에, plunge freezing, spray freezing, cold metal block freezing, jet freezing, cryomicrotome 등의 기술 중 plunge freezing 기술에 대해서 자세하게 다루고자 한다.

TEM grid 위에 균일한 비정질 샘플을 준비하기 위해서는 나노미터 두께의 용액 샘플을 grid 위에 준비하고, 물이 증발하기 전에 샘플을 급속 동결시켜 비정질 상태로 만드는 것이 필요하다. 샘플을 500 nm 이하 두께로 비정질화하기 위해서는 온도와 증기압이 잘 제어된 환경이 필요하다. 비정질화는 물을 결정화 없이 비정질 상태로 액상에서 고체상으로 변이시키는 것으로 정의할 수 있는데, 이를 위해서는 결정의 nucleation이 생기기 전에 빠른 속도로 충분히 온도를 낮추고, 극저온을 유지하여 고체상에서 얼음 결정성을 나타내지 않도록 하는 것이 중요하다. 그림 1에 나와있듯이, 얼음 결정의 nucleation은 냉각 속도(시간), 온도, 그리고 압력에 의존하는 것이기 때문에 이를 종합적으로 조절하는 것이 필수적이다. 실험적 측면에서 보면, 냉각 속도는 용매(물)의 열 특성, 샘플 두께, 표면에서의 열의 이동 등에 의존하므로 이러한 특성을 제어하는 것이 성공적인 비정질화에

매우 중요하다.

극저온 전자현미경의 샘플 준비는 초창기에는 직접 제작한 챔버로 샘플을 제작하였으나, 샘플 제작의 어려움(재현성 및 신뢰성) 때문에 최근에는 거의 대부분 FEI사의 Vitrobot 이라 불리는 자동화 로봇을 활용하여 샘플 제작이 이루어진다.

전자현미경으로 샘플을 관찰하기 위해서는 샘플을 grid 위에 준비하게 되는데, grid는 3.05 mm의 직경을 갖는 얇은 원판으로, 구리, 금과 같은 금속(서포트) 부분과 그 위에도 포된 얇은 탄소막으로 이루어져 있다. 보통 lacey carbon grid를 쓰거나, 특별한 용도(이미지 획득 자동화 프로그램/tomography)의 경우 holey carbon grid를 쓰기도 한다.

균일한 샘플 준비를 위해 먼저 grid를 plasma cleaning하여 친수성으로 표면 특성을 변화시킨다. 이후 물의 상대습도가 100%로 맞춰진 챔버 안에서 용액 샘플을 도포한 후, 미리 준비한 cryogen(액체 상태의 ethane)에 빠르게 담귀(quenching) 비정질화시킨 후, cryo-box에 옮겨서 TEM 홀더로 트랜스퍼 하기 위해 다음 단계로 넘어가게 된다.

간단해 보일 수 있는 과정이지만, 실제로 가장 많은 시간과 노력이 필요한 단계인 만큼, 단 한 번의 실수 없이 매끄러운 과정이 되도록 많은 연습이 필요한 단계이기도 하다. 마지막으로 나노스케일에서 물의 증발 현상에 대해 언급하고 다음 단계로 넘어가고자 한다. 벌크 상태의 물과는 달리, 얇은 필름의 물은 높은 비부피(표면적/부피)를 가지기 때문에 증발 과정이 주변 환경에 의해 굉장히 민감하게 영향을 받는다. 그림 2를 보면, 상대습도에 따라 특히 증발 속도는 100 nm/sec에 이를 수 있는데, 500 nm보다 얇은 두께를 만들어야 하는 입장에서는 상대습도를 포화시키는 것이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 두 번째로, 증발과정에서 열의 손실 또한 발생하는데, 이에 의해 용액 필름의 온도 또한 급격히 떨어지게 된다. 1초 이내에 무려 12 °C나 떨어질 수 있다. 따라서 상대습도가 포화된 상태에서 샘플을 준비해야 한다. 하지만 습도 조절기능이 탑재된 Vitrobot을 사용한다

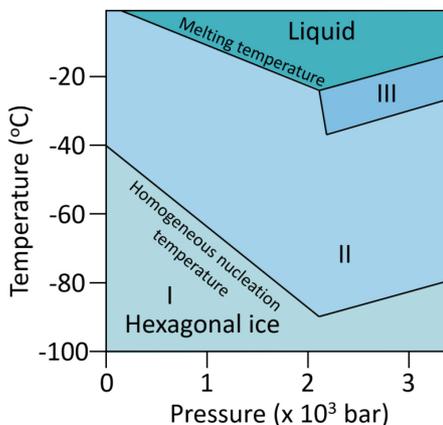


그림 1. 온도와 압력에 따른 물의 결정화에 관한 상태도.⁸

하더라도 그날의 날씨, 외부 습도에 챔버 내부의 습도가 영향을 받는 것이 현실이다.

2.2.3 샘플 트랜스퍼

극저온 전자현미경의 원리는 극저온에서 샘플을 관찰하는 것임을 감안할 때, 관찰 중에 샘플의 온도가 올라가지 않도록 유지하는 것이 중요하다. 이를 위해서는 1) 지속적으로 냉각시켜 주고 2) 고진공을 유지하여 열 손실을 줄여야 한다. 따라서 cryo 홀더는 진공 챔버로 구성되어 있고, grid를 얹는 tip 부분이 액체질소 보관통과 연결되어 있다. 그리고 cryo 홀더에는 zeolite가 있는데, 이는 ‘thermal storage’ 특성이 극저온을 오랜 시간 유지하기에 알맞기 때문이다. 매 cryo 세션이 끝나면, 60 °C에서 100 °C 정도에서 수시간 또는 overnight baking을 해서 zeolite를 회복시킨 후, 극저온 전자현미경을 다시 사용할 수 있다.

샘플 트랜스퍼는 간단히 말해 준비한 grid 샘플을 미리 액체질소로 냉각해 둔 홀더에 옮기는 과정이다. 하지만 좁은 트랜스퍼 공간과 액체질소에서 나오는 증기, 그리고 극저온이라는 요소 때문에 얇고 휘기 쉬운 grid를 홀더의 팁에 정확하게 옮기는 것이 쉬운 일은 아니다. 이 과정에서 중요한 점은, grid가 액체질소 밖으로 나오는 시간을 최소화하는 것인데 일반적으로 샘플 트랜스퍼 챔버 안에서라면 수 초 정도는 샘플에 큰 영향을 주지 않는다. 이 단계에서는 종종 빠르게 급냉하면서 생긴 cryogen(보통 ethane(l))이 고체

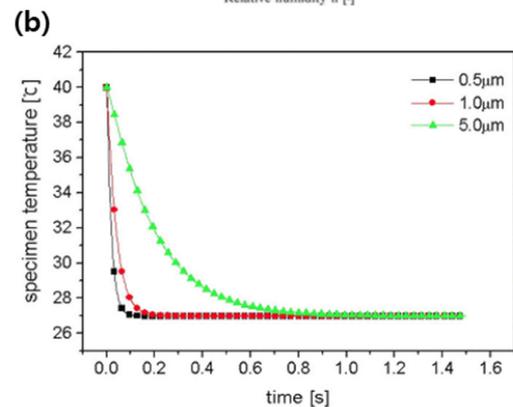
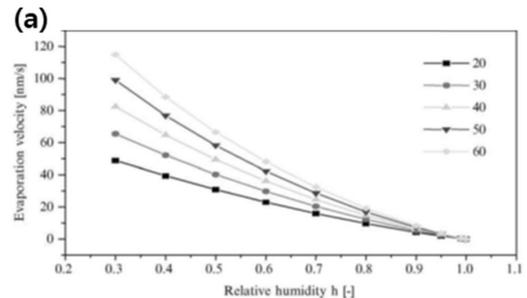


그림 2. 외부환경에 따른 물 필름의 특성 변화: (a) 상대습도에 따른 물 필름의 증발 속도, (b) 증발에 의한 물 필름의 온도 변화.⁹

화되어 grid에 붙어있는데, 샘플 온도가 충분히 저온으로 유지되고 있다는 신호로 해석해도 된다. 하지만 전자현미경에 그대로 집어넣을 시에 cryogen이 지속적으로 승화되어 진공이 잡히는데 시간이 오래 걸리게 된다. 따라서 고체화된 cryogen이 너무 많다면 털어준 후 샘플을 홀더로 옮기는 것이 좋다. 성공적으로 샘플을 트랜스퍼 했다면, 전자현미경으로 집어 넣어 적절한 고진공이 될 때까지 기다린 후 이미지 관측을 비로소 시작한다.

2.3 이미지 관찰

극저온 전자현미경의 이미지 관측은 일반적인 전자현미경과 그 방법이 동일하나, 몇 가지 중요한 차이점이 있다. 첫째로, 연성 소재와 비정질 얼음은 전자빔에 민감하기 때문에 이미지를 빠르게 획득해야 한다. 가능하다면 low-dose 모드를 활용하는 것이 좋다. 둘째로, 연성소재(탄소, 산소, 질소, 인, 수소 등으로 구성)와 물은 전자 밀도 차이가 미미하여 낮은 contrast를 가지기 때문에 최대 수 마이크로미터 정도 ‘under focus’하여 이미지를 관측한다. 셋째로, 앞선 샘플 준비 및 트랜스퍼 과정 중 생기는 artifact들을 샘플의 이미지와 구분하는 것이 필수적이다. 즉, 모든 artifact와 낮은 contrast 이미지에 대해 완벽하게 이해하고 구분할 수 있어야 제대로 된 이미지 관찰과 분석을 할 수 있다. 특별한 주기적인 구조가 없는 연성 소재의 경우, 실제로 artifact와 샘플을 구분하기가 불가능한 경우도 있다. 이런 경우 단범위 규칙성(SRO)이 있다면 회절 패턴을 참고해 보는 것도 좋은 방법이다.

이미지 관찰의 가장 어려운 점은 artifact를 구분하는 것이다. 냉각 속도가 느리거나, 샘플을 전자현미경에 넣을 때까지 온도가 잠깐이라도 -165 °C 이상 올라간 경우에는 다양한 형태의 얼음 결정이 생길 수 있다. 이러한 결정은 특이한 모양과 패턴을 지녀 손쉽게 알아볼 수 있는데, 결정이 나타난 hole부분은 샘플이 영향을 받았을 수 있기 때문에 이미지 관측에서 배제해야 한다. 또 한가지 흔한 artifact로는 ‘Ethane 오염’이라고 불리는 작은 구름같은 것이 있다. 엄밀히 말하면 고체화된 ethane은 고진공 하에서 빠르게 승화하기 때문에 Ethane 오염은 존재하지 않는다. 관측되는 이러한 오염은 사실상 ethane 통 자체가 기름 등에 의해 오염된 것이 옮겨진 것이다. 그림 3에 대표적인 artifact 몇 가지가 소개되어 있다.

Artifact가 생기는 중요한 원인 중 하나는 cryo-shielding이 제대로 이루어지지 않았을 때 이다. Grid가 장착되는 홀더의 팁 부분은 보통 shielding을 할 수 있게 되어있는데, shielding이 제대로 되어있지 않을 경우 특히 ice 오염이 심각하게 발생할 수 있다. Cryo-shielding이 제대로 이루어진다면 grid 주위 진공의 상태도 10배 이상 좋아지기 때문에

국소적인 열적 평형 상태를 개선해주며, 따라서 이미지 관측 시 drift를 줄여 줄 수 있다.

2.4 극저온 전자현미경을 이용한 연성소재 분석의 예시

2.4.1 용액상 인지질 큐보솜 구조 분석

인지질은 thermotropic과 lyotropic 특성을 갖는 다양한 구조로 자기조립이 가능한 연성 소재이다. 인지질이 갖는 다양한 자기조립 구조 중 bicontinuous cubic 구조는 세포막인 인지질 이중층과 융합하는 과정이 자유에너지를 낮추는 자발적인 과정이기 때문에,¹¹ 입자 형태(큐보솜)로 제작할 경우 기존 소포체 형태의 리포솜 대비 두배 가량 뛰어난 유전체 전달 효율을 보인다.¹² 그러나 균일한 크기와 구조의 큐보솜을 합성하는 것은 어려운 과제이다. 이는 그 합성법 자체에 대한 한계점도 있지만, 만들어진 큐보솜의 균질성과 자세한 구조를 일반적인 장비로 분석하기 어렵기 때문이다. 균질성과 크기 조절 문제를 해결하기 위한 방안으로 2018년 미세유체소자를 활용한 합성법이 개발되었고,¹³ 극저온 전자현미경을 통해 전구물부터 큐보솜이 합성되는 메커니즘이 밝혀졌다. 그리고 이를 통해 균일하고 작은 (<100 nm) 크기의 큐보솜이 합성되었다(그림 4).

2.4.2 벌크 인지질 Bicontinuous Cubic 구조 분석

액상 결정(liquid crystal)을 띄는 인지질 자기조립 결정은, 벌크 형태도 극저온 전자 현미경으로 분석이 가능하다. 인지질 bicontinuous cubic 구조는 약물 전달, 방향성 자기조

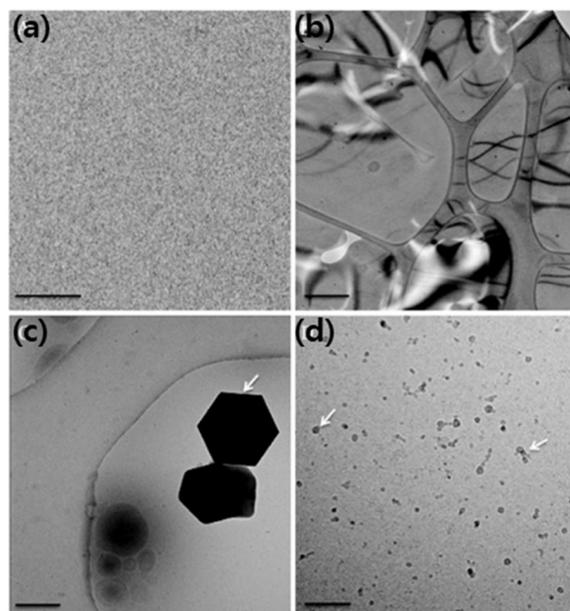


그림 3. 대표적인 극저온 전자현미경 artifact 예시: (a) 비정질 얼음 (scale bar 50 nm), (b) 육각형 얼음 크리스탈(scale bar 400 nm), (c) 큰 얼음 결정(scale bar 400 nm), (d) 기타 불순물(scale bar 200 nm).¹⁰

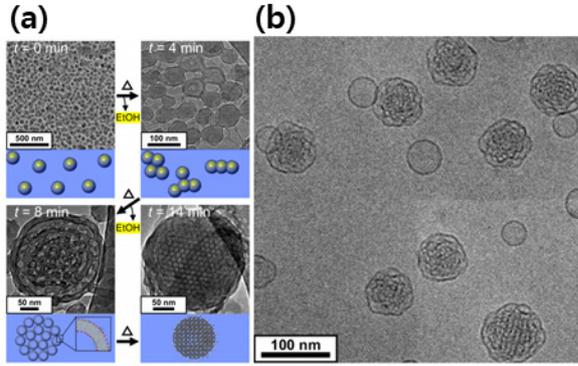


그림 4. 인지질 bicontinuous cubic 구조 분석: (a) 큐보솜 형성 메커니즘, (b) 큐보솜 이미지.¹³

립, 막 단백질 결정구조 분석 등의 응용 분야에 유용하게 쓰일 수 있으나, 고분자에 비해 작은 단위 격자 크기와 그에 수반되는 좁은 water channel($d \sim 5$ nm)에 의해 그 활용도가 제한되고 있다. 2017년에 특정한 자기조립 조건에서 water channel 크기를 최대 38.1 nm까지 키운 새로운 자기조립 방법이 발견되었다(그림 5).¹⁴ 소각 엑스선 산란 장비를 활용하여 거대해진 단위 격자 크기가 밝혀졌고, 극저온 전자현미경을 통해 거대해진 water channel의 실제 이미지가 얻어졌다. 일반적인 연성 소재도 전자빔에 민감하여 그 구조가 쉽게 변성이 되지만, 이 새로운 자기조립구조는 특히 더 전자빔에 민감한 것으로 발견되었다. 이는 grid 위 필름의 상당 부분이 연성 소재로 이루어져 있기 때문으로 생각된다(그림 5).

3. 결론

본고에서 액상 형태의 연성 소재 분석을 위한 극저온 전자현미경에 대한 원리와 구체적인 실험 방법에 대해 설명하였고, 그 예시로 인지질 나노구조 분석에 대해 소개하였다. 극저온 전자현미경은 액상 연성 소재를 artifact 없이 용액에 분산된 그대로 관찰 가능하게 함으로써 새로운 연구의 장을 열었다. 2017년 노벨 화학상이 수여되었을 만큼, 그 파급력은 이미 널리 인정받았으며 특히 다양한 단백질의 삼차원 구조를 밝히는데 핵심적인 역할을 수행하고 있다. 결정성을 나타내는 연성 소재가 드물기 때문에, 극저온 전자현미경에만 의존한 분석보다는, 평균적인 구조와 분포를 알려주는 소각 X선 산란법을 포함해 NMR, Raman 분광법 등을 같이 활용한다면 연성 소재의 정확한 거동을 파악할 수 있

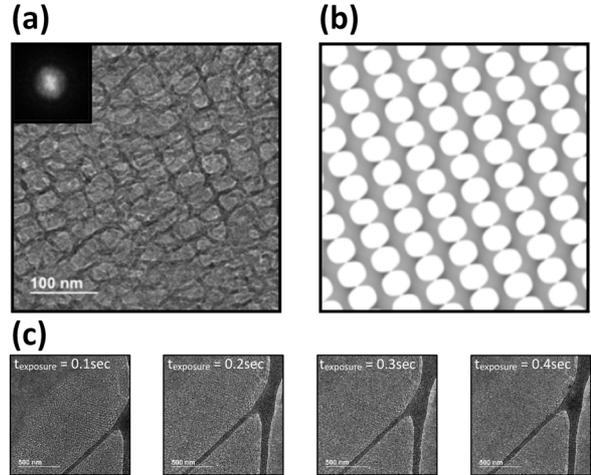


그림 5. 극저온 전자현미경을 통해 얻어진 super-swelled lyotropic single crystal 이미지와 simulation: (a) 단결정 이미지, (b) 단결정 simulation, (c) 전자빔에 의한 데이지.¹⁴

어 연성 소재를 목적에 맞게 디자인하는데 극저온 전자현미경이 많은 산업 분야, 그 중에서도 특히 바이오 관련 분야에서 굉장히 핵심적인 역할을 수행할 것이다.

참고문헌

1. R. F. Egerton, *Ultramicroscopy*, **127**, 100 (2013).
2. R. F. Egerton, P. Li, and M. Malac, *Micron*, **35**, 399 (2004).
3. H. T. Jung, *Polym Sci Technol*, **13**, 503 (2002).
4. R. Danev, H. Yanagisawa, and M. M. Kikkawa, *Trends Biochem Sci*, **44**, 837 (2019).
5. K. Murata, and M. Wolf, *BBA-Gen. Subjects.*, **1862**, 324 (2018).
6. R. Henderson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 10804 (2018).
7. J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, and P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.*, **21**, 129 (1988).
8. H. Kanno, R. J. Speedy, and C. A. Angell, *Science*, **189**, 880 (1975).
9. P. M. Frederik and D. H. W. Hubert, *Methods Enzymol.*, **391**, 431 (2005).
10. R. F. Thompson, M. Walker, C. A. Siebert, S. P. Muench, and N. A. Ranson, *Methods*, **100**, 3 (2016).
11. W. Helfrich, *Z. Naturforsch. C.*, **28**, 693 (1973).
12. H. Kim and C. Leal, *ACS Nano*, **9**, 10214 (2015).
13. H. Kim, J. Sung, Y. Chang, A. Alfeche, and C. Leal, *ACS Nano*, **12**, 9196 (2018).
14. H. Kim, Z. Song, and C. Leal, *PNAS*, **114**, 10834 (2017).