

Plunge freezing with cryoprotectant after chemical fixation and freeze-substitution method for retinal and pigment cell preservation.

Ji Young MUN, Daniel Studer**, and Sung Sik HAN**

**School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea*

***Institute of Anatomy, University of Bern, Bhlstrasse 26, 3000 Bern, Switzerland*

초파리 망막세포 (retinal cell)의 미세구조에 관한 연구는 이미 Waddington과 Perry [1,2]에 의해 종합 되어 있으나. 이들은 모두 aldehyde 종류에 의한 전고정과 osmium tetroxide에 의한 후고정, 그리고 알코올, 혹은 아세톤에 의한 탈수과정을 거친 화학고정 (Chemical Fixation-Dehydration, CF-D)을 이용한 결과였다. 한편, 1980년 경에 개발된 급속동결법 (Rapid freezing method)은 화학고정법에 비하여 고정 속도가 빨라 세포 구조의 보전에 우수한 효과를 나타내었다. 본 연구에서는 초파리 망막세포의 구조를 변형 없이 관찰하기 위하여 초고압동결법-동결치환 (High Pressure Freezer-Freeze Substitution, HPF-FS), 화학고정 후 급속동결-동결치환 (Chemical fixation and rapid freezing with cryo-protectant-Freeze Substitution, CF-FS), 그리고 화학고정 (CF-D) 방법을 이용하였다.

그 결과, CF-D에 비하여 HPF-FS와 CF-FS의 두 방법에서 향상된 고정효과를 관찰할 수 있었다. HPF-FS를 이용하여 고정한 시료에서는 다른 고정방법에 의한 시료보다 세포사이의 공간이 작고, 세포막의 고정이 완전한 것이 특징적으로 관찰되었다. 또한 미토콘드리아 크리스테의 폭이 매우 좁고 일정하였는데, 이는 CF-FS의 미토콘드리아에서도 유사한 결과를 보였다. CF-D를 이용한 미토콘드리아는 HPF-FS과 CF-FS를 사용한 경우에 비하여 미토콘드리아 당 크리스테의 표면적은 크고 세포질 당 미토콘드리아의 표면적은 작아진 결과를 보여, 탈수과정 중 세포구조의 격심한 변형이 초래된다는 사실을 확인할 수 있었다. 이외에 조면소포체나 기타의 세포소기관들 역시 CF-D 방법이 다른 두 방법에 비하여 보존력이 좋지 않았다. 그러나 망막세포(retinal cell)나 색소세포(pigment cell)내의 색소체 (pigment granule)의 보존력에 있어서는 반대의 특성이 관찰되었다. 즉, CF-D 가 색소체 보존에 유용하였고, 다른 두 방법은 그렇지 못했다. 색소체의 미세구조는 1.25 megavolt 초고압 전자현미경 (KBSI)을 활용하여 더욱 자세히 관찰할 수 있었다.

참고문헌

- [1] C. H. Waddington et al., Proc. Roy. Soc. London Ser B. 153 (1960) 155.
- [2] M. Perry, J. Morph. 124 (1968) 227.
- [3] D. Studer et al., Scann. Microsc. Suppl. 3 (1989) 253.
- [4] K. Nitta et al., J Electron Microsc. 53(6) (2004) 677.

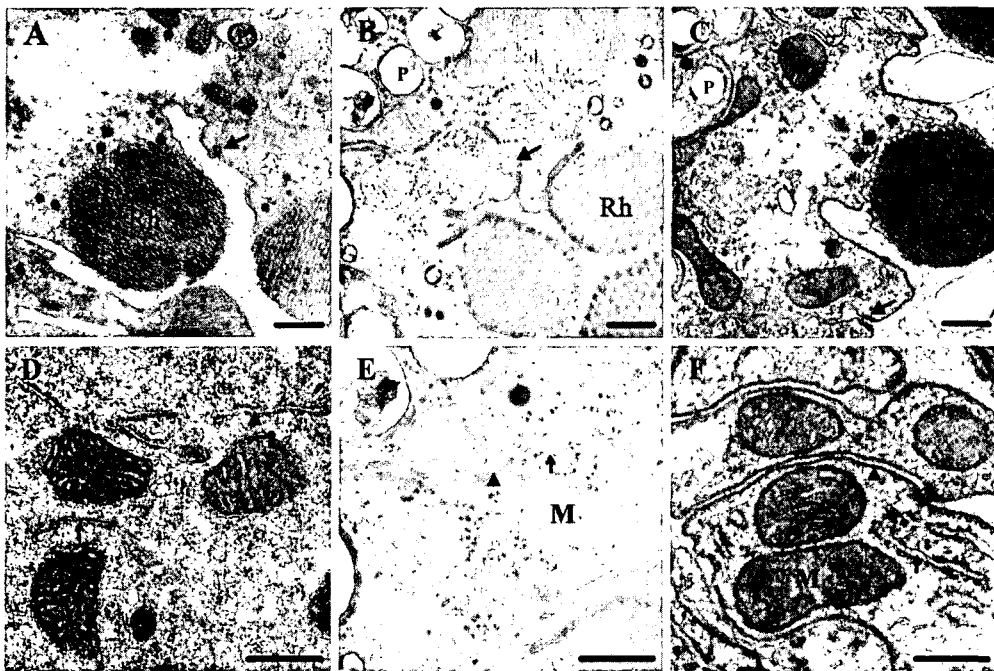


Fig. 1. Images of retinal cells in *drosophila melanogaster* processed by conventional fixation (A, D), High Pressure Freezer (B, E), and Modified Plunge Freezing method (C, F). M-mitochondria, Rh-rhabdomere, arrow (A, B, C) - ZA (zonula adherens junction), arrow head (D, E, F) - membrane, arrow (D, E, F) ER. Size Bar = 500 nm