

急速凍結과凍結置換에 의한組織細胞觀察法

韓 盛 植 · 朴 奎 澤

Improved Method of Rapid Freezing and Freeze-Substitution for Tissue Cells

Han, Sung Sik and Kyu Tek Park
(Received July 4, 1990)

Abstract

The ultrastructure of freeze-substituted Malpighian tubule cells of German cockroach after rapid freezing was compared to that fixed with conventional chemical fixation. As results, freeze-substitution proved to be the superior technique revealing much more structural details of the tissue cells.

Especially, all kinds of membrane structures including infoldings, microfilament, microtubules and ribosomes were best preserved in this material.

緒 論

電子顯微鏡을 利用하는 學者들의 一次的 目標은 固定으로 시작되는 試料制作過程 中에서 생겨나는 人工的 構造(artefact)를 最小化 시키면서 가능한한 細胞構造를 自然 그대로 保存시키는데 있다.

실제 構造保存에 영향을 미칠 수 있는 過程은 固定, 脫水, 그리고 包埋등으로 생각할 수 있으며, 특히 固定過程이 중요한 것으로 널리 알려져 있다.

현재까지는 주로 化學物質에 依存하여 細

胞를 固定하여 왔다. 이들은 glutaraldehyde 를 포함하는 aldehyde계, osmium tetroxide, potassium permanganate, phosphotungstic acid, potassium dichromate, uranium, picric acid 등이다(Gray, 1973). 그러나 놀랍게도 이러한 化學物質에 의존하는 固定法은 30여년 이상을 별다른 進展없이 使用되어 왔다. 그런중 일각에서는 化學物質에 의한 人工構造 즉, 變形된 細胞構造를 觀察하여 왔다는 憂慮가 높아 졌으며, 이러한 우려는 Howard와 Aist(1979)의 報告에 의하여 現實化 되었다. 그것은 急速凍結(rapid or

江原大學校 農生物學科

Dept. of Agricultural Biology, Kangweon National University.

本 研究는 1989年度 文教部 學術研究 助成費에 의하여 研究되었음.

quick freezing)에 이은凍結置換(freeze-substitution)法の開發에 힘입어 증명된 것이다. 즉, 化學物質에 의한固定이 아닌急速凍結에 의한固定法の 이용과 이어冷凍 상태에서脫水 할 수 있는方法의 개발이 이루어졌기 때문에 이原理는 이미 Simpson(1941)과 Feder와 Sidman(1958)에 의하여報告된 바 있으나 실제 완전한固定法으로定着이 된것은 1980년대 이후로 볼 수 있다. 현재에는 이러한凍結方法에 의한固定效果는 化學物質과 비교하여 볼때 탁월한 것으로評價되고 있다.

그러나急速凍結에 의한固定法은 처음에는凍結割斷(freeze-fracture)法을 위한固定法으로서開發되었었으며, 또한凍結乾燥法(freeze-drying)과凍結切斷(cryosectioning)에도應用되고 있기 때문에初心者들은急速凍結에 이은凍結置換法과上記方法을混同하기 쉽다.

따라서 본報告는急速凍結固定法중 slam-freezing法, 그리고凍結置換法의方法과 그過程상의 문제점들을 바퀴의 Malpighian tubule을材料로 하여紹介하고자 하였다.

材料 및 方法

共試材料는 27°C 暗處에서 人共飼料로 사육한 바퀴(*Blattella germanica*)를 사용하였다.

1) 本實驗에서는 EIKO RF-2 Quick Specimen Freezer를 사용하였다. 우선液體窒素를 freezer의 coolant chamber에 넣은 후 gold plated pure copper disc를冷却시켜 약 -190°C 정도가 되도록 하였다.

이때溫度測定은超低溫溫度計(-200°C)를 사용하였다.

2) 이와는 별도로 병마개가 있는 10 ml 硝子瓶에 4% osmium tetroxide (in absolute acetone)를 만들어 -80°C에 보관하였다.

Deep freezer가 없는 경우는 잘 알려진대로 dry ice를 잘게 부수어 acetone에 녹지않는 plastic ice box나 적당한 容器에 넣은 후 acetone을 넣는다. 이렇게 하면 약 -80°C가 된다. 이때의 acetone은 사실상工業用을 사용하여도 무방하나, 상기 4% osmium tetroxide 溶液을製造할 때에는 극히 유의를 하여야 한다. Acetone의 강력한吸水作用으로 일단 마개를 열어 사용된 적이 있는 acetone은 사용하지 않는 것이 좋다. 만약 사용된 적이 있는 acetone을 이용할 경우 상기 초자병에 반정도를 Molecular Sieve로 채우고서 osmium tetroxide용 용기로 사용하면 된다. Molecular Sieve가 강력한吸水作用을 하기 때문에 이 경우 매우有用하다.

3) 急速凍結: 바퀴를解剖하여 Malpighian tubule을 재빨리適出하여 urethane sheet와 teflon dish가 붙어있는 specimen press-fit rod 위에 올려놓았다. 이때는 물론 어떠한 용액이나 buffer도 사용하지 않는다. 다만過多한血液이나液體成分이 관찰하고자 하는組織을 덮고있는 경우 filter paper로 재빨리 제거시키도록 한다. Rod위에 재료를 올려놓은 후 신속하게 freezer의 insertion port를 열고 최대한 빨리 위에서 내려찍듯이 copper disc의表面에接觸시켜冷凍시켰다. 이急速凍結의全過程은 되도록 빠른 시간안에 이루어져야 한다. 즉 10초 이내에凍結이 이루어져야만 미세구조의變形을 막을 수 있다. 따라서初心者들은凍結시키기 전에 예비연습이 필요하다.

4) 凍結置換: Copper disc 위에接觸시킨狀態에서 2-3분정도放置하여 둔 후 -80°C에 보관되어 있는硝子瓶(4% osmium tetroxide in absolute acetone)의 마개를 조심스럽게 열어두고迅速하게凍結狀態의材料를 집어넣었다. 이때순간적이나마凍結된材料가室溫에露出되기 때문에 녹기 쉽

다. 만약 녹았다면 그 實驗은 완벽하게 실패된 것이므로 다시 試圖하여야 한다. 일단 硝子瓶에 성공적으로 옮겨 놓았으면 12시간에서 2-3일정도 -80°C 상태에서 방치시킨다. 時間은 材料의 두께에 基準하여 決定하면 된다.

-80°C 에 이어 -20°C (冷藏庫의 冷凍室이면 무난하다), 0°C , 4°C , 그리고 室溫 등의 順序로 溫度를 올린 후, 순수 acetone 溶液으로 3회 交換하여 주었다. 室溫에서 초자병의 마개를 열면 爆發하듯이 4% osmium teroxide가 사방으로 튀기 때문에 후드내에 고무장갑을 낀 손만을 넣은 후 비닐로 손과 초자병을 덮은 상태에서 병마개를 열어야 한다.

5) 包埋 : Acetone으로 3회 交換한 후 일반적으로 사용되는 embedding medium들

중에서 Spurr액을 사용하였다.

6) 染色 : 銀色切片을 製作한 후 二重染色을 실시하여 Zeiss 109 투과전자현미경으로 관찰하였다.

結果

本 研究에서 사용된 方法은 plunge-freezing法과 slam-freezing法이나 plunge-freezing法은 失敗率이 너무 높은 것이 확인되었다. 즉 組織細胞를 관찰하기에는 부적합하다. 반면 slam-freezing에서는 組織細胞 保存에 높은 成功率를 보여주었다. Plunge-freezing법에서의 실패, 그리고 slam-freezing에서 re-freezing에 의한 細胞 損傷은 mitochondria만이 형태를 확인할 수 있었을 뿐 세포운곽조차도 보존되지 않았다(Fig. 1).

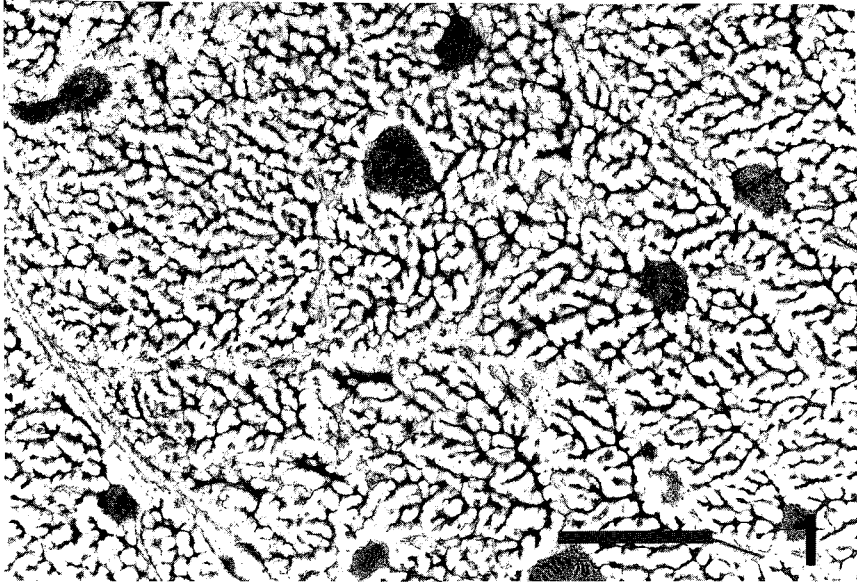


Fig. 1. Injured cells by numerous ice crystals. Bar means $1\ \mu\text{m}$.

化學物質에 의한 固定法(Fig. 2)과 slam-freezing法(Fig. 3, 4, 5)에서 微細構造의 保存에서 큰 差異를 확인할 수 있었다. 우선 細胞質 전체를 볼때, Fig. 2에서는 細胞質의 많은 部分이 비어 있어 흡사 아무런 物質이

나 構造가 없는 것처럼 觀察되고 있으나, slam-freezing法에 의한 切片에서 보면 비어 있는 곳이 없다(Fig. 3, 4, 5).

이들을 자세히 觀察하면 우선 ribosome들이 잘 保存되어 있으며 그 이외의 micro-

molecule들이 細胞質 전체에서 잘 觀察되었다.

Basal layer에서, 化學物質 固定法에서는 관찰되지 않는 filamentous structure가 확실한 構造로 관찰되었다(Fig. 3). 또한 basal layer에 인접한 細胞質에서 microfilament들 또한 잘 保存되어 있었다. 그 이외의 microtubule들 역시 完璧하게 保存되어 있었다(Fig. 3).

Infolding 역시 化學的 固定(Fig. 2)에 비하여 slam-freezing에서 內腔의 폭이 均一하였으며, 斷面으로 보아 緩慢한 曲線으로서 細胞質 內部로 뻗어져 있었다(Fig. 3, 4). 또한 gap-, septate-junction 등 細胞膜 連接 모습 또한 일반적으로 알려진 것과는 뚜렷한 차이를 보여주었다(Fig. 3, 4, 5).

Mitochondria 역시 다른 膜系와 마찬가지로 cristae막의 脂質層 構造가 化學物質 固定法에 비하여 明確하게 保存되었다(Fig. 5). 그 이외의 核膜 역시 保存에서 차이를 보여주었으며 핵물질 또한 보존에 있어서 큰 차이를 보여주었다(Fig. 4, 5).

考 察

세포를 구성하고 있는 小器官, ion, 특히 활발하게 작용하고 있는 動的인 分子와 溶液에 suspension 되어 있는 分子들, 그리고 膜系에 연결되어 있는 작은 分子들은 순간적으로 固定되어야 保存이 된다. 또한 固定시 야기되는 分子들 사이의 集합이나 結合 등 分子의 移動과 相互作用도 막아주어야 한다.

이러한 目的을 達成하기 위하여 대부분은 化學的 固定液이 사용되지만, 이는 의심할 바 없이 화학작용의 지연성으로 말미암아 上記의 條項들을 만족시킬 수 없으며, 오직 物理的 方法 즉 凍結固定만이 이러한 要求들을 充足시켜 줄 수 있다(Plattner and Bachmann, 1982).

현재까지 소개되어 있는 急速凍結 方法은 5가지 정도이다. 그것은 1) spray-, plunge-, jet-freezing, 2) popsicle-freezing, 3) punch-freezing, 4) slam-freezing, 그리고 5) high pressure-freezing 등이다.

이들중 本 研究에서 시도된 凍結方法은 plunge-freezing과 slam-freezing이다. Plunge-freezing은 실제로 試料의 폭이 좁은, 즉 單細胞 정도에서 有用하였다. 그 연구 예를 보면 flagella (Marchese-Regona, 1984), fungi (Lancelle *et al.*, 1985), pollen, stamen hair, microsporocytes (Lancelle *et al.*, 1986), aleurone layer (Fernandez and Staehelin, 1985), blood platelet (Morgenstern *et al.*, 1985), insect sensory sensilla (Haug and Altner, 1984; Lee *et al.*, 1985; Steinbrecht, 1980, 1982, 1984; Steinbrecht and Gnatzy, 1984; Toh, 1985; Volker *et al.*, 1984) 등이 plunge-freezing과 이를 變形시킨 sandwich-freezing 方法으로 凍結固定시켜 構造들을 관찰하였다.

Plunge-freezing 方法에서 cryogen으로 사용되는 것은 liquid propane 혹은 liquid freon이다. 이 實驗의 가장 중요한 要素는 凍結速度인데, liquid propane의 경우 $-10,000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ($1-5\ \mu\text{m}$) 정도이며 liquid freon은 $-2,000^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ($1\ \mu\text{m}$)로서 liquid propane이 凍結速度가 빠르다(Reichert Scientific Instrument 主催 Quick freezing and freeze-substitution workshop의 講議중에서, New York, 1986).

상기 liquid propane의 경우, ice crystal-free의 상태에서 觀察이 가능한 시료의 폭은 $1-5\ \mu\text{m}$ 정도여서 사실상 관찰에는 커다란 制限을 받게 된다.

凍結速度가 늦어지면 단번에 ice crystal이 形成되며, 따라서 ice crystal들이 細胞內容物들을 破壞시키면서 細胞내에 充滿하게 된다.

Plunge-freezing에서凍結速度를遲延시키게 만드는 요인은, 試料를 液化시킨 cryogen에 집어넣을때 試料表面의 溫度가 cryogen(liquid propane의 경우는 보통 -160°C 에서 -180°C 사이에서 사용됨)보다 엄청나게 높기 때문에 試料가 cryogen에 닿는 순간 cryogen이 氣化되어 試料와 cryogen과의 사이에 gas層이 形成되며, 이 層이 試料를 둘러싸면서 一種의 保溫作用을 해주기 때문이다. 따라서 組織細胞 내지 組織内の 特定 細胞를 觀察하고자 할 때에는 plunge-freezing은 그리 좋은 方法이 되지 못한다.

이에 1980년대에 들어와서 組織細胞用으로 脚光을 받기 시작한 凍結固定 方法이 slam-freezing이다. 이 方法은 초저온으로 냉각된 copper나 silver, 혹은 gold block 위에 試料를 내려치듯이 接觸시켜(slamming) 超高速, 超低溫으로 冷凍시키는 方法이다.

이때 block는 熱傳導를 極大化 시키기 위하여 oxygen-free이어야 한다. 또한 block의 表面은 유리면처럼 매끈하여야 한다. Block 表面이 매끈하지 않으면 表面에 凍結된 試料가 떨어지지 않는다. Block을 초저온으로 冷却시킬 때는 주로 liquid nitrogen 혹은 helium을 사용한다. Slam-freezing의 特徵은 試料를 直接 melting cryogen에 넣어 凍結시키지 않고 초저온으로 冷却된 block에 接觸시키는, 이른바 間接的인 冷凍方法을 使用하기 때문에 plunge-freezing의 경우처럼 gas層이 形成되지 않는다. 따라서 초고속으로 冷凍이 이루어진다. Slam-freezing법은 Van Harreveld와 Crowell(1964)에 의하여 처음 사용되었으나 1980년대에 와서야 適用되기 시작하였다. 그 예는 acinar cells (Ichikawa *et al.*, 1980), type II pneumocytes(Ikeda *et al.*, 1984), fibroblasts(Hatae *et al.*, 1984), acinar cell(Ichikawa and Ichikawa, 1987), mucus-secreting cells (Ichikawa *et al.*, 1987), leyding cells(Na-

gano and Kamimura, 1987) 등 動物에서의 組織細胞의 微細構造가 觀察되었다.

凍結置換(freeze-substitution)의 置換溶媒는 acetone을 사용한다. Acetone은 融점(melting point)이 -94°C 로서 일반적인 凍結置換 溫度인 -80°C 에서는 液體狀態를 유지하며, -80°C 에서도 강력한 脫水作用을 하는 크나큰 長點을 지니고 있다. 이때 -80°C 의 設定은 細胞내에서 存在하는 많은 液狀物質들의 移動이나 소실을 막기 위해서는 가능한 한 낮은 온도에서 脫水가 이루어져야 하며, acetone의 融점이 -94°C 정도이며 흔히 사용되는 deep freezer의 最低溫度등을 고려하여 이루어진 것이다.

凍結置換에서의 주의점은 re-freezing을 막아야 한다. 즉, 急速凍結에서 凍結置換으로 넘어갈때 당연히 室溫을 거치게 되는데, 이때 時間이 遲滯되면 凍結된 試料가 녹게 된다. 일단 試料가 녹은 상태에서 凍結置換의 過程으로 넘어가면 試料는 re-freezing된다. 이때에는 凍結速度가 너무 늦기 때문에 生物試料는 ice crystal 형성에 의하여 극심한 損傷을 입게 된다(Fig. 1).

本 論文에 引用된 文獻들의 結果들을 檢討하여 보면, 그들의 結果가 化學固定에 의한 構造와는 엄청난 差異를 보여주고 있었다. 이들의 差異의 정도는 본 실험의 結果를 통하여 보아도 쉽게 짐작 할 수 있다.

바퀴의 Malpighian tubule의 細胞에서, 우선 全體의으로 볼때 化學的 固定에서는 核質이나 細胞質이 대부분 혹은 부분적으로 비어 있었다. 그러나 急速凍結에 의한 固定에서는 어떠한 部位에서도 빈곳을 發見할 수 없었다. 이 빈곳의 意味는 化學物質에 의한 固定에서, 固定液의 固定作用의 限界와 固定作用의 遲延性 때문에 細胞內容物이 細胞밖으로 빠져 消失된 것으로 생각된다.

Basal layer 部位에서 보면, 化學的 固定에서는 amorphous substance로서 이루어

진 듯이 觀察되었지만, 急速凍結에 의한 結果에서는 明確한 filamentous structure를 確認할 수 있었다. 그리고 그 외부에는 또 다른 얇은 膜狀의 構造物이 둘러싸고 있음도 確認할 수 있었다. Basal layer에 隣接된 細胞의 內部에는 microfilament들이 잘 保存되어 관찰되었으며, 그들 사이에서 microtubule들 역시 잘 保存되어 있었다. 細胞內部에서 electron density가 강한 particle들은 ribosome들로서, 화학적 固定에서도 물론 ribosome을 保存시킬 수는 있으나 이들의 保存率에 있어서는 急速凍結에 의한 固定과는 比較할 수 없을 정도로 化學的 固定方法이 微弱하였다.

또한 infolding에서, 化學적 固定에서는 그 폭이 不規則적이었으나 急速凍結과 凍結置換에서는 一定하였다. 細胞膜의 보존에서도 뚜렷한 差異를 보여주었다. Fig. 4에서 보면, 核膜의 外膜과 內膜의 폭 역시 일정하였으며 그들 사이의 space에서는 電子密度가 약하지만 어떠한 物質의 存在가 確認되었다. Mitochondria에서 cristae 역시 이중막이 잘 관찰되며, 이 膜사이의 폭 역시 一定하였다. 細胞膜사이의 space의 폭 역시 매우 一定하며, 그들 사이의 gap junction, 그리고 septate junction 역시 잘 보존되었다.

이와 같이 急速凍結 固定과 凍結置換은 細胞내의 모든 膜系의 保存, 그리고 膜이외 蛋白質을 포함한 모든 物質分子들의 保存에 있어서 어떠한 電子顯微鏡의 方法보다 우수한 方法이라는 것이 다시 確認되었다. 또한 急速凍結에 이은 凍結置換方法은 光學, 透過電子顯微鏡, 그리고 走査電子顯微鏡등에 適用시킬 수 있다. 특히 analytical electron microscopy, autoradiography (Harvey, 1982), freeze fracture and etching과 immunocytochemistry (Menco, 1986), 그리고 ion localization (Harvey *et al.*, 1976)등 투과

전자현미경에 폭넓게 應用되고 있으며, 또한 주사전자현미경에도 적용되어 최근에는 투과전자현미경으로나 觀察이 可能하였던 微細構造를 三次元的 立體構造로 觀察할 수 있게 되었다(Osatake *et al.*, 1985; Arima *et al.*, 1985).

따라서 本 研究者들은 既存 研究된 結果들이라 하더라도 다시 急速凍結, 凍結置換方法으로 確認되어야 할 것으로 생각되며, 이후 其 電子顯微鏡室에는 필수적으로 上記 方法을 定着시켜 항상 微細構造等 電子顯微鏡을 利用하는 研究들에 活用하여야 할 것으로 생각한다. 그 이유는 現在까지의 微細構造에 關한 研究結果들은 거의 대부분이 化學固定에 의한 人爲的 構造를 觀察한 것으로서 때로는 부분적인, 때로는 엄청난 誤謬를 범하였을 可能性이 있기 때문이다. 또한 細胞를 보다 完璧하게 保存시킬 수 있는 方法 改善에 항상 關心을 기울여야 할 것으로 생각된다.

結 論

液體窒素에 의하여 冷却된 銅版을 이용한 急速凍結에 이어 凍結置換시킨 組織細胞로서 바퀴의 Malpighian tubule 細胞를 通常의 化學固定에 의한 것과 比較하여 本 結果 急速凍結, 凍結置換法이 組織細胞의 微細構造 保存을 위하여는 훨씬 優秀한 方法이라는 것이 확인되었다. 특히 바퀴의 Malpighian tubules의 경우, infolding을 포함한 모든 膜構造, 微細纖維, 微細小官, ribosomes의 保存에서 卓越하였다.

References

- Arima, T., Y. Shibata and T. Yamamoto. 1985. Three-dimensional visualization of basal body structures and some cytoskeletal components in the apical zone of tracheal ciliated cells. *J. Ultrastruct.*

- Res. 93, 61-70.
- Fernandez, D. E. and L. A. Staehelin. 1985. Structural organization of ultra-rapidly frozen barley aleurone cells activity involved in protein secretion. *Planta*. 165, 455-468.
- Feder, N. and R. L. Sidman. 1958. Methods and principles of fixation by freeze-substitution. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 593-600.
- Gray, P. 1973. *Encyclopedia of microscopy and microtechnique*. Van Nostrand Reinhold Co. pp.153-165.
- Hatae, T., K. Okuyama and M. Fugita. 1984. Visualization of the cytoskeletal elements in tissue culture cells by bloc-staining with hafnium chloride after freezing and freeze-substitution fixation. *J. Electron Microsc.* 33(2), 186-190.
- Haug, T. and H. Altner. 1984. A cryofixation study of presumptive hygroreceptor on the antennule of a terrestrial isopod. *Tissue Cell*. 16, 377-391.
- Harvey, D. M. R. 1982. Freeze-substitution. *J. Microsc.* 127, 209-221.
- Harvey, D. M. R., J. L. Hall and T. J. Flowers. 1976. The use of freeze-substitution in the preparation of plant tissue for ion localization studies. *J. Microsc.* 107, 189-198.
- Howard, R. J. and J. R. Aist. 1979. Hyphal tip cell ultrastructure of the fungus *Fusarium*: Improved preservation by freeze-substitution. *J. Ultrastruc. Res.* 66, 224-234.
- Ichikawa, A., M. Ichikawa and N. Hirokawa. 1980. The ultrastructure of rapid-frozen, substitution fixed parotid gland acinar cells of the *Mongolian gerbil* (*Meriones meridianus*). *Amer. J. Anat.* 157, 107-110.
- Ichikawa, M. and A. Ichikawa. 1987. The fine structure of sublingual gland acinar cells of the *Mongolian gerbil*, *Meriones unguiculatus*, processed by rapid freezing followed by freeze-substitution fixation. *Cell Tissue Res.* 250, 305-314.
- Ichikawa, M., A. Ichikawa and S. Kidokoro. 1987. Secretory process of mucus-secreting cells in mouse colonic mucosa studied by rapid freezing and freeze-substitution. *J. Electron Microsc.* 36(3), 117-127.
- Ikeda, H., A. Ichikawa and M. Ichikawa. 1984. The effects of freeze-substitution media on the ultrastructure of inclusion bodies in type II pneumocytes of mouse lung processed by the cryofixation method. *J. Electron Microsc.* 33(3), 242-247.
- Lancelle, S. A., D. A. Callahan and P. K. Hepler. 1986. A method for rapid freeze fixation of plant cells. *Protoplasma* 131, 153-165.
- Lancelle, S. A., J. G. Torrey, P. K. Hepler and D. A. Callahan. 1985. Ultrastructure of freeze-substituted *Frankia* strain HFPCc13, the actinomycete isolated from root nodules of *Casuarina cunningghamiana*. *Protoplasma* 127, 64-72.
- Lee, J. K., R. Selzer and H. Altner. 1985. Lamellated outer dendritic segments of a chemoreceptor within wall-pore sensilla in the labial palp-pit organ of the butterfly, *Pieris rapae* L. (Insecta, Lepidoptera). *Cell Tissue Res.* 240, 333-342.
- Marchese-Ragona, S. P. 1984. Ethanol, an efficient coolant for rapid freezing of biological material. *J. Microsc.* 134, 169-171.
- Menco, B. P. M. 1986. A survey of ultra-

- rapid cryofixation methods with particular emphasis on applications to freeze-fracturing, freeze-etching, and freeze substitution-fixation. *J. Electron Microsc. Techn.* 4, 177-240.
- Morgenstern, E., L. Edelmann, H. J. Reimers, C. Miyashita and M. Haurand. 1985. Fibrinogen distribution on surfaces and in organelles of ADP stimulated human blood platelets. *Eur. J. Cell Biol.* 38, 292-300.
- Nagano, T. and K. Kamimura. 1987. Mouse Leydig cells processed by freeze-substitution, with particular reference to the lamellar arrangement of the smooth endoplasmic reticulum. *J. Electron Microsc. 36* (3), 128-132.
- Osatake, H., K. Tanaka and T. Inoue. 1985. An application of rapid freezing, freeze substitution-fixation for scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc. Techn.* 2, 201-208.
- Plattner, H. and L. Bachmann. 1982. Cryofixation: A tool in biological ultrastructural research. *Intern. 1 Review of Cytol.* 79, 237-304.
- Simpson, W. L. 1941. An experimental analysis of the Altmann technique of Freezing drying. *Anat. Rec.* 80, 173-189.
- Steinbrecht, T. A. 1980. Cryofixation without cryoprotectants, freeze substitution and freeze etching of an insect olfactory receptor. *Tissue Cell* 12, 73-100.
- Steinbrecht, R. A. 1982. Experiments on freezing damage with freeze substitution using moth antennae as tests objects. *J. Microsc.* 125, 187-192.
- Steinbrecht, R. A. 1984. Cryofixation and follow-up techniques in biological electron microscopy-outline and demonstration. *Zeiss MEM.* 3, 9-17.
- Steinbrecht, R. A. and W. Gnatzy. 1984. Pheromone receptors in *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*. 1. Reconstruction of the cellular organization of the sensilla trichodea. *Cell Tissue Res.* 235, 25-34.
- Toh, Y. 1985. Structure of companiform sensillar on the haltere of *Drosophila* prepared by cryofixation. *J. Ultrastruct. Res.* 93, 92-100.
- Van Harreveld, A. and J. Crowell. 1964. Electron microscopy after rapid freezing on a metal surface and substitution fixation. *Anat. Rec.* 149, 381-385.
- Volker, W., H. Meschede, J. Weil and U. Thurm. 1984. Immersion-freezing and freeze-substitution or irregularly shaped specimens with the aid of a cryoinjector. *Mikroskopie(Wien).* 41, 351-359.

Figure Legends

Fig. 2. Distal portions of Malpighian tubule cells fixed with conventional chemicals. Note the irregular infoldings(IF), basal layer(BL) and mitochondria(M). Bar means 1 μm .

Fig. 3. Distal portions of a rapid freezing and freeze-substituted Malpighian tubule cell. Various organelles such as infoldings(IF), basal layer(BL), ribosomes(white arrow), microtubule(white arrow-ahead), outer membrane(black arrow-ahead), microfilaments(double arrow-ahead), and septate junction(black arrow) are particularly very well preserved. Bar means 1 μm .

- Fig. 4.** Portions of a rapid freezing and freeze-substituted Malpighian tubule cells. Nucleus (N) and nuclear envelope, infolding(IF), gap junctions(white arrows), septate junction(SJ), mitochondria(M), and ribosomes are well preserved. Bar means 0.5 μm .
- Fig. 5.** Portions of rapid freezing and freeze-substituted Malpighian tubule cells showing well preserved organelles such as nucleus(N) and its envelope, mitochondria(M), and septate junction(SJ). Bar means 0.3 μm .

